

## [ 研究成果報導 ]

## 細胞內中心粒遠端附屬物的超高解析度結構

中央研究院原子與分子科學研究所 廖仲麒

國立台灣大學電機工程學系 楊東霖

## 介紹

脊椎動物的主纖毛(primary cilia)是由中心粒(centrioles)遠端長出的重要胞器，其中，中心粒的遠端附屬物(distal appendages)的功能為啟動主纖毛生長，負責募集膜囊泡(vesicles)並調節軸絲(axoneme)成長。遠端附屬物先前被定義為從脊椎動物中心粒的遠端周邊突出的九個風車扇葉狀結構，位於高度複雜的多功能交接位置，處於中心粒和軸絲（或過渡區）之間的邊界，也處於質膜和纖毛膜連接的地方。位處獨特的遠端附屬物極可能透過其相關蛋白質形成控制纖毛結構屏障的一部分。然而，很難想像電子顯微鏡顯示風車狀的遠端附屬物如何作為屏障，因為每個風車葉片之間的大空間將允許許多物質通過而幾乎沒有阻力。因此，由於電子顯微鏡的限制，風車形狀可能在形態上不能完全反映遠端附屬物的複雜性。

在此一研究中，我們使用 dSTORM (direct stochastic optical reconstruction microscopy) 超高解析度顯微技術(superresolution microscopy)分辨 12 種遠端附屬物蛋白質和 4 種圍繞遠端附屬物的其他蛋白質，定出 3D 20 納米解析度的完整複雜結構，觀察到過去其他研究從未了解的細節，包含該體系結構內以前未被識別的結構。總之，我們的研究結果找出了脊椎動物主纖毛基底前所未有結構和功能的框架。

## 結果

## dSTORM 定位遠端附屬物蛋白質不同的徑向位置

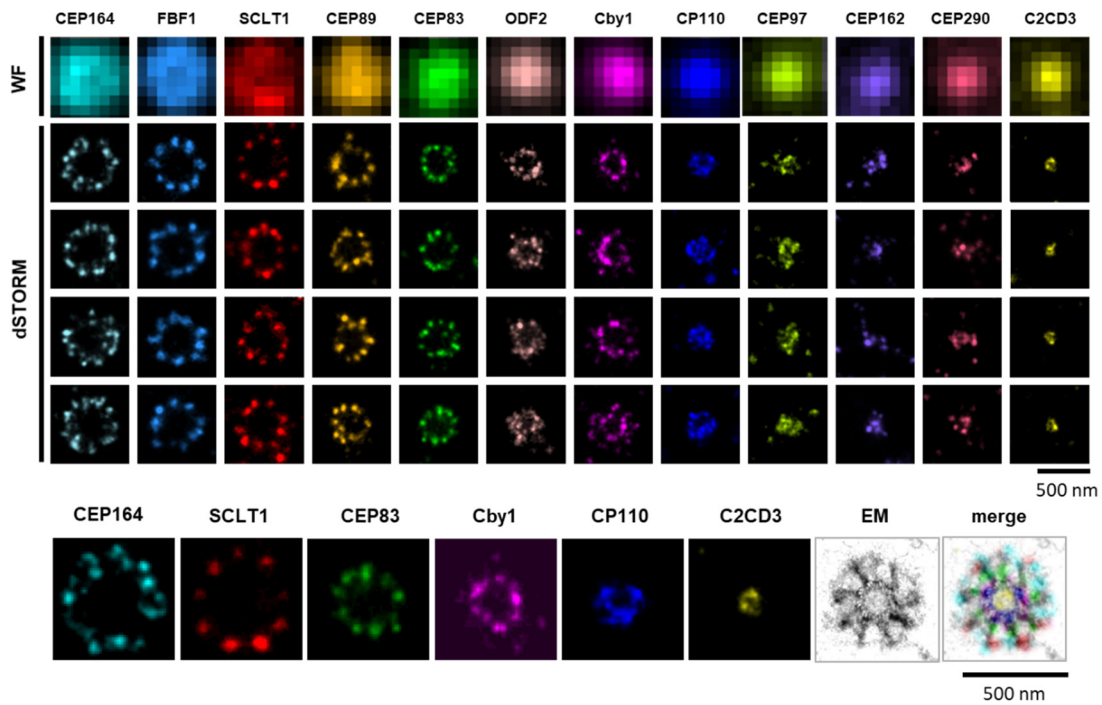
為了有系統地了解遠端附屬物的結構，我們使用 dSTORM 成像分析，定位人類視網膜色素上

皮(RPE-1)細胞中核心遠端附屬物組成 (CEP83, CEP89, SCLT1, CEP164 和 FBF1)，遠端附屬物相關蛋白質 (Cby1, TTBK2 和 IFT88)，其他中心粒遠端蛋白質 (C2CD3, CP110, CEP97, CEP162 和 CEP290)，纖毛膜蛋白質 (ARL13B 和 EHD1) 和次遠端附屬物 ODF2。先前已經有其他研究使用超解析度顯微術來定位中心粒蛋白質，但是從未有中心粒遠端蛋白質的系統定位。

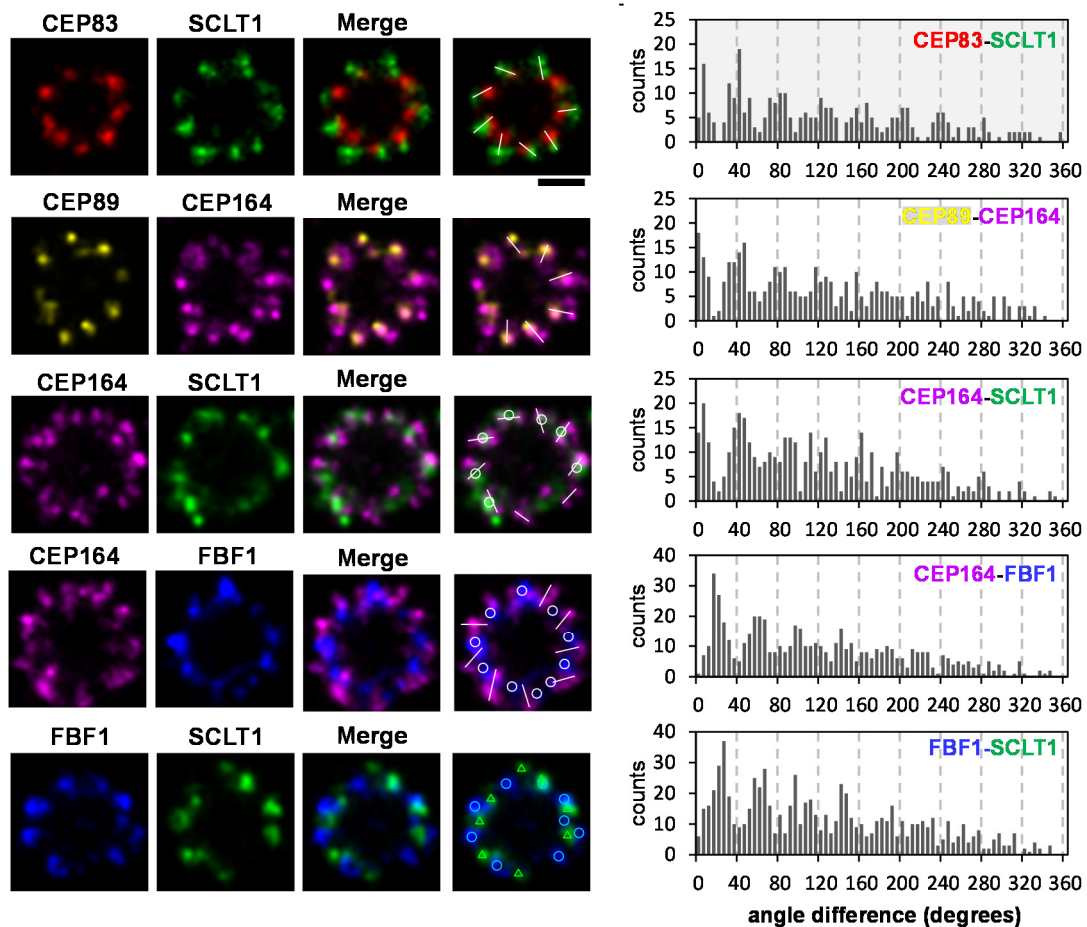
軸向取向的中心粒分析揭示了核心遠端附屬物組成的徑向定位，其呈現出尺寸/直徑不同的九重對稱環狀圖案，其中 CEP164 和 FBF1 形成最大環，其次是 SCLT1, CEP89 和 CEP83 (圖一)。CEP164 顯示更寬的徑向分佈，具有明顯的外部 and 內部強度峰值，類似於電子顯微鏡定義的遠端附屬物的風車狀特徵 (圖一)。相比之下，C2CD3，一種遠端附屬物組裝必需的蛋白質，其位於中心腔內部，且分佈出乎意料的小，比 CP110, CEP97, CEP290 和 CEP162 (圖一) 這些形成環狀分佈直徑約 170-200 nm 的還要小。這表示 C2CD3 不是電子顯微鏡定義的遠端附屬物傾斜結構的一部分，而是一種腔內蛋白質，可能決定遠端附屬物形成所需的中心粒環境。

徑向分佈的雙色 dSTORM 成像進一步揭示了核心遠端附屬物蛋白質之間的不同角度位置 (圖二)。成對的 CEP83-SCLT1, CEP89-CEP164 和 CEP164-SCLT1 的影像顯示它們都可以分配到如電子顯微鏡中觀察到的遠端附屬物葉片，類似九個電子密集排列的傾斜線上相比之下，FBF1 則與其他遠端附屬物蛋白質的角度位置不同。

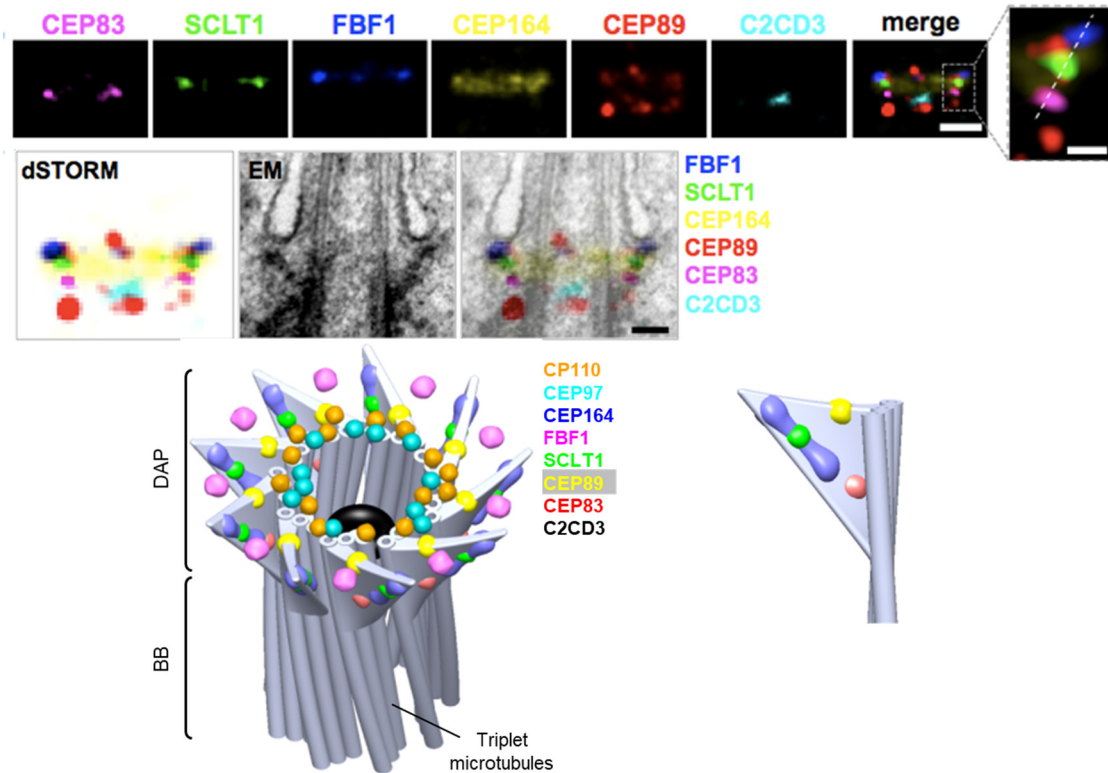
軸向和側向影像顯示遠端附屬物的 3D 分子定位  
透過一系列雙色 dSTORM 側視分析顯示，



圖一 超高解析度顯微技術顯示核心遠端附屬物組成的徑向定位。



圖二 雙色超高解析度顯微技術顯示核心遠端附屬物蛋白質之間的不同角度位置。

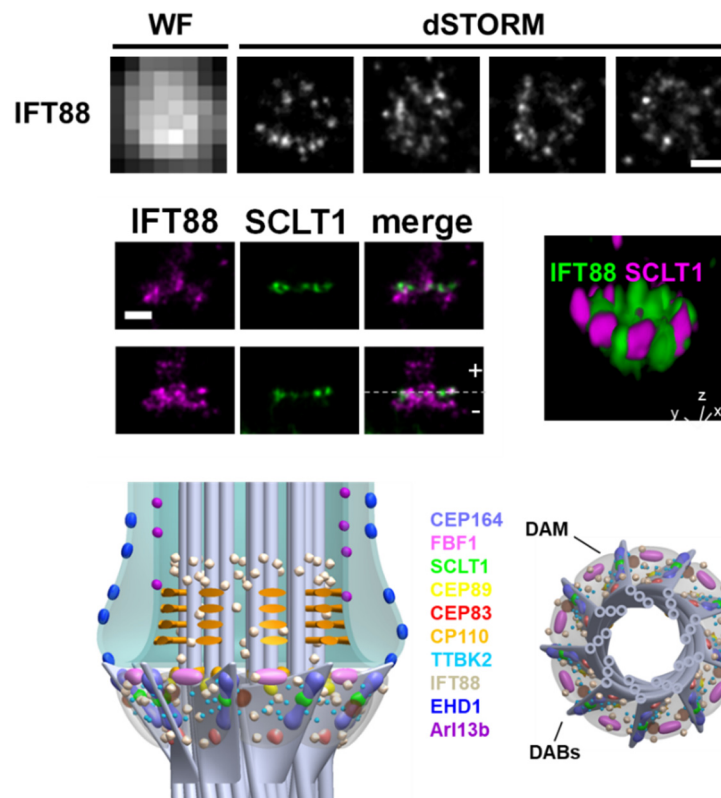


圖三 軸向和縱向影像分析顯示遠端附屬物的 3D 分子架構。

CEP83, SCLT1 和 FBF1 分別沿著中心粒的近端到遠端形成不同的薄層 (圖三)。與其寬徑向分佈一致, CEP164 也具有寬的縱向定位, 形成具有兩個錐形側面的梯形形狀, 類似於電子顯微鏡觀察到的遠端附屬物傾斜結構 (圖三), 表示 CEP164 是遠端附屬物的主要骨幹。同時, CEP89 在中心粒遠端佔據兩層, 兩者俱有相似的寬度, 但縱向分開~130 nm。CEP89 的遠端層接近與 FBF1 相同的縱向位置, 而近端層位於次遠端附屬物中縱向靠近 ODF2, 表示 CEP89 可能具備遠端附屬物和次遠端附屬物的雙重角色。透過在纖毛中心粒的電子顯微鏡影像上疊加 dSTORM 資訊, 我們發現 CEP164, CEP83, SCLT1 和 FBF1 與遠端附屬物對齊, 其中以 FBF1 定位最接近纖毛膜。總體而言, 遠端附屬物蛋白質在側視影像中的相對位置反映了遠端附屬物葉片的輪廓, 其中不同蛋白質之間的不同定位變化表示它們在空間中的分佈範圍大不相同。結合來自所有相對軸向和縱向位置的資訊, 我們構建了一個 3D 計算模型, 以顯示蛋白質在遠端附屬物區域的定位 (圖三)。

### IFT88 和 FBF1 分佈於遠端附屬物基質

接下來我們觀察 IFT88, 一種與遠端附屬物相關的核心 IFT (intraflagellar transport) 蛋白質複合體的成分。我們發現 IFT88 佔據了大範圍的角度分佈, 在軸向影像中沒有透露明顯可區分的九重訊號 (圖四)。側向分析顯示, 除了沿整個纖毛軸上分佈外, IFT88 亦大量集中在纖毛基部, 位於跨越和接近 SCLT1 分子的縱向位置 (圖四)。為了進一步了解 IFT88 接近遠端附屬物的確切定位, 我們對 IFT88 和 SCLT1 進行了 3D 雙色 dSTORM 成像。我們發現 IFT88 佔據了錐形分佈 (圖四), 類似於遠端附屬物的錐形構造。引人注目的是, IFT88 和 SCLT1 的相對分佈揭示了大量的 IFT88 充斥於相鄰 SCLT1 分子之間間隙, 證明了分子可以佔據或停留在遠端附屬物葉片之間的這個過去研究中尚未定義的區域。因此, 我們將九個遠端附屬物葉片之間的區域定義為遠端容納物基質 (distal appendage matrix, DAM), 其中可以容納諸如 IFT88 的蛋白質。因此, 完整的遠端附屬物結構應該包含了遠端附屬物葉片 (distal appendage blades, DAB) 和基質 (DAM) 兩種



圖四 運用超高解析度顯微技術發現新的結構：遠端附屬物基質(distal appendage matrix, DAM)。

不同的部分。我們進一步建構了一個更詳細的3D計算模型，包括所有已觀察的纖毛結構，如細胞膜，纖毛袋(ciliary pocket)，軸絲，DAB和DAM(圖四)。

#### FBF1 對於纖毛生長不是必需的

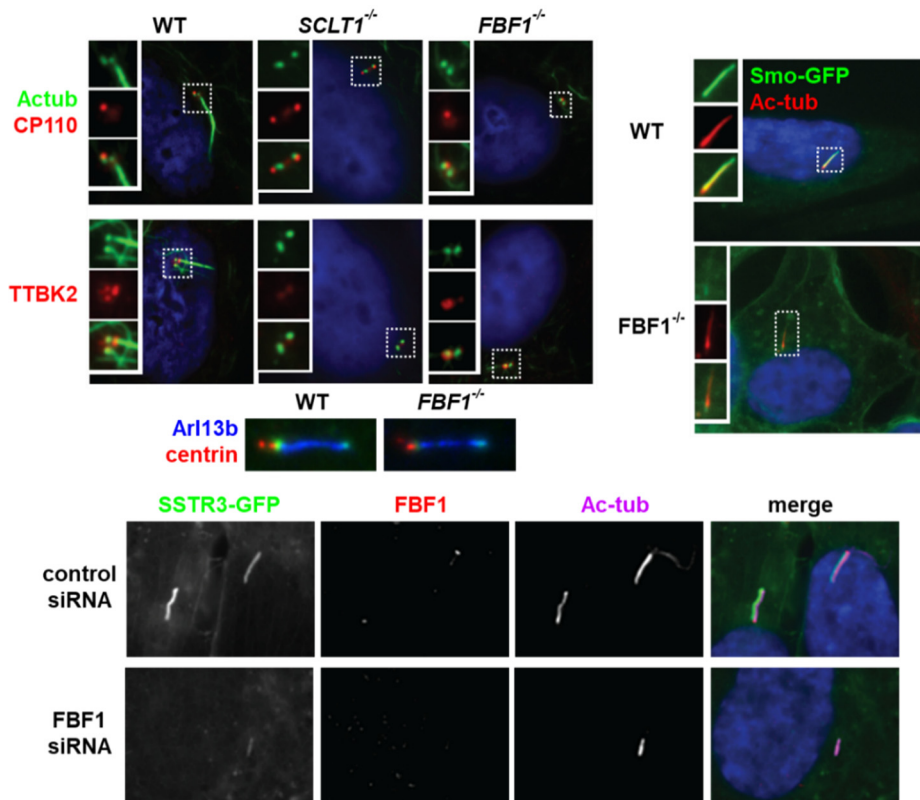
建立了分子架構之後，我們更進一步了解不同遠端附屬物蛋白質在纖毛生長中是否具有不同的功能。我們發現去除SCLT1(使用CRISPR knockout)以消除DAB和纖毛生長(圖五)，則導致纖毛生長的啟動缺陷，因為細胞在沒有SCLT1時，其母中心粒遠端的CP110沒辦法順利移除而長出纖毛，並且TTBK2沒辦法募集。然而，有趣的是，去除FBF1(CRISPR knockout)並不會對纖毛生長的相同起始步驟產生影響。與正常細胞(~80%)相比，CP110去除和TTBK2募集能正常地在沒有FBF1的細胞中發生(~70%)，但僅在約通常14%的細胞中觀察到纖毛(圖五)。這些結果表示，FBF1與CEP164或SCLT1不同，其作用於SCLT1的下游並參與纖毛的維持。

#### FBF1 與 Smoothened 和 SSTR3 的纖毛進出控制相關

為了探究FBF1如何維持纖毛功能，我們檢查了它是否與纖毛進出控制相關。在正常細胞和FBF1移除細胞中，我們並未觀察到ARL13B在纖毛中的顯著差異(圖五)。雖然過量表現的Smoothened能大量集中在正常細胞的纖毛中，然而，於缺乏FBF1的細胞纖毛中，則無法觀察到Smoothened(圖五)。相同地，SSTR3，另一種已知位於纖毛的跨膜蛋白質，也沒辦法在FBF1缺乏(siRNA knockdown)的細胞中正常地進入纖毛(圖五)。這些結果顯示，跨膜蛋白質(Smoothened或SSTR3)進出纖毛或停留於纖毛的機制，在FBF1缺乏的細胞中是有缺陷的。

#### 結 論

總之，運用超解析度顯微技術，我們確定了中心粒遠端附屬物的詳細分子結構和纖毛基底周圍的結構，以拉近了結構生物學和細胞生物學之間的差距，這對於精確的功能研究是不可缺少的。我們的工作提供了前所未有的3D圖譜以利



圖五 遠端附屬物蛋白質 FBF1 與跨膜蛋白質的纖毛進出控制相關。

功能方面的研究，該功能研究基於中心粒和纖毛 12 種以上的分子。最重要的是，我們的研究結果表示，遠端附屬物為一個受遠端附屬基質所包埋的九重 DAB 組成的圓錐形結構，而不是基於先前電子顯微鏡研究僅僅顯現出風車葉片狀輪廓，我們稱之為 DAM。DAB 和 DAM 都具有不同的分子元件，具有不同的功能。其中 DAM 充滿了 IFT 分子。由於已知 FBF1 與形成上皮屏障的頂端連接複合物相關，它也可能在纖毛體和纖毛腔底部的質膜之間的連接處有類似的作用以管控纖毛腔的跨膜蛋白質。

### 參考文獻

- [1] Yang, T.T., Tran T.M.N., Chong, W.M., Huang, C.-E. and Liao, J.-C. (2019) Single particle tracking localization microscopy reveals nonaxonemal dynamics of intraflagellar transport proteins at the base of mammalian primary cilia. *Molecular Biology of the Cell*, 30, 828-837.
- [2] Chu, S.-H., Lo, L.-L., Lai, R.L., Yang, T.T., Liao, J.-C. and Huang, N.-T. (2019) A microfluidic device for in situ fixation and super-resolved mechanosensation studies of primary cilia. *Biomicrofluidics*, 13, 014105.
- [3] Weng, R.R., Yang, T.T., Huang, C.-E., Chang, C.-W., Wang, W.-J. and Liao, J.-C. (2018) Super-resolution imaging reveals TCTN2 depletion-induced IFT88 lumen leakage and ciliary weakening. *Biophysical Journal*, 115, 263-275.
- [4] Yang, T.T., Chong, W.M., Wang, W.-J., Mazo G., Tanos, B., Chen, Z., Tran T.M.N., Chen, Y.-D., Weng, R.R., Huang, C.-E., Jane, W.-N., Tsou, M.-F.B. and Liao, J.-C. (2018) Super-resolution architecture of mammalian centriole distal appendages reveals distinct blade and matrix functional components. *Nature Communications*, 9, 2023.
- [5] Yang, T.T., Su, J., Wang, W.-J., Craige, B., Witman, G.B., Tsou, M.-F.B. and Liao, J.-C. (2015) Superresolution pattern recognition reveals architectural map of the ciliary transition zone, *Scientific Reports*, 5, 14096.