

## 研究简报

# Kinesin-1调控线虫温度感受神经元接受终端的结构

王康瑞<sup>1,2</sup> 吕筱惠<sup>1,3</sup> 欧光朔<sup>4</sup> 朱昊<sup>4\*</sup>

(<sup>1</sup>清华大学生命科学学院, 北京 100084; <sup>2</sup>北京师范大学附属实验中学, 北京 100084; <sup>3</sup>北京大学生命科学学院, 北京 100084; <sup>4</sup>清华大学生命科学学院, 清华-北大生命科学联合中心, 北京 100084)

**摘要** 对环境温度的感知和响应是生物个体的重要特征, 多细胞动物进化形成特异的温度感受神经元及树突接受终端。相较于光、气体、味觉神经元而言, 目前对温度感受神经元接受终端结构形成的分子调控机制知之甚少。AFD(amphid finger-like dendrite)神经元是秀丽隐杆线虫中重要的温度感受神经元。我们用聚焦离子束扫描电子显微镜成像技术观察比较AFD温度感受神经元树突接受终端在野生型和遗传突变体中的精细结构。结合对图像的三维重构, 我们发现, 相较于野生型或kinesin-3突变体而言, kinesin-1突变体线虫中的AFD树突接受终端基部显著膨大, 并且发现大量囊泡在基部异常堆积。这些结果表明, kinesin-1介导的囊泡运输调控温度感受神经元接受终端的结构。

**关键词** 秀丽隐杆线虫; 温度感受神经元; 驱动蛋白; 聚焦离子束扫描电子显微镜; 电镜三维重构

## Kinesin-1 Regulates Neuronal Receptive Ending Structure in *C. elegans* Thermosensory Neurons

Wang Kangrui<sup>1,2</sup>, Lü Xiaohui<sup>1,3</sup>, Ou Guangshuo<sup>4</sup>, Zhu Hao<sup>4\*</sup>

(<sup>1</sup>School of life science, Tsinghua University, Beijing 100084, China; <sup>2</sup>The Experimental High School Attached to Beijing Normal University, Beijing 100084, China; <sup>3</sup>School of life science, Peking University, Beijing 100084, China; <sup>4</sup>School of life science, Tsinghua University, Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, Beijing 100084, China)

**Abstract** To perceive and respond to temperature changes is an important feature for a living organism. Metazoans develop temperature sensory neurons, which form specialized neuronal receptive endings in their dendrites to sense temperature. However, the molecular mechanisms underlying the formation of dendritic endings in temperature sensory neurons remain elusive, in comparison to our understanding of light, odor and chemicals. AFD (amphid finger-like dendrite) neuron is an essential temperature sensory neuron in the nematode *C. elegans*. Here, we formed focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) analysis of neuronal receptive ending of AFD neuron in wild-type and mutant animals. Our three-dimensional reconstruction of FIB-SEM images revealed that that the base of AFD neuronal receptive endings in *unc-116(e2310)/kinesin-1* mutants was significantly expanded compared to these of WT or kinesin-3 mutant animals. Importantly, an abnormal amount of mem-

收稿日期: 2018-10-12 接受日期: 2018-11-27

国家自然科学基金青年基金项目(批准号: 31501131)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18310550775, E-mail: zhuh17@mails.tsinghua.edu.cn

Received: October 12, 2018 Accepted: November 27, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31501131)

\*Corresponding author. Tel: +86-18310550775, E-mail: zhuh17@mails.tsinghua.edu.cn

网络出版时间: 2019-05-08 14:05:32

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190508.1405.002.html>

brane vesicles ectopically accumulate at the base of AFD neuronal receptive endings. These results showed that kinesin-1-based vesicular transport is important to build the neuronal receptive ending of thermosensory neurons in *C. elegans*.

**Keywords** *Caenorhabditis elegans*; AFD neuron; kinesin; FIB-SEM; 3D reconstruction

温度感知和响应是生物体的重要机能。温度感知紊乱导致诸如巴德-毕德氏症(Bardet-Biedl syndrome)等人类遗传疾病。秀丽隐杆线虫由于其具有温度感知能力、简单的神经系统和便捷的遗传操作等优势,成为研究机体温度感知的重要动物模型。线虫中一个关键的温度感知神经元因其外形成指状故被称为指状神经元AFD(amphid finger-like dendrite)。AFD通过感知温度信号、分泌物质调控下游信号通路<sup>[1-5]</sup>。温度升高后,AFD中的CMK-1/CaMKI激酶激活CRH-1/CREB转录因子,分泌出酰胺神经肽FLP-6被AIY中间神经元接收,介入DAF-9固醇激素信号传导,而且FLP-6还可以下调数种胰岛素相关基因<sup>[6]</sup>。AFD的表面有许多微绒毛,神经胶质细胞中运输K/Cl离子的KCC-3通道通过调控离子浓度控制AFD微绒毛的形状和数量<sup>[7]</sup>。当失去KCC-3后,GCY-8的增加抑制了AFD神经元接收终端,减少了微绒毛的数量,影响AFD温度感知功能<sup>[7-14]</sup>。目前,我们对细胞骨架和分子马达调控温度感受神经元接受终端结构形成的机制并不十分清楚。

驱动蛋白(kinesin)是在真核细胞中一类基于微管细胞骨架的分子马达<sup>[15]</sup>。Kinesin由三磷酸腺苷水解提供动力,主要沿着微管的正端运动,支持着多种细胞内物质转运如囊泡运输<sup>[7]</sup>。Kinesin-1家族是一个由两条重链(KHC/KIF5)和两条轻链(KLC)组成的异四聚体。重链包含一个N端的马达域、一段由长卷曲螺旋域组成的杆状和一个C端的球状尾端<sup>[16]</sup>。线虫kinesin-1的重链由*unc-116*基因编码,*unc-116(e2310)*突变体通过Tc5转座子在*unc-116*的2 576和2 577对碱基中插入了一段3.2 Kb的含有终止密码子的序列<sup>[17]</sup>,而两条轻链则由*klc-1*和*klc-2*编码<sup>[18]</sup>。Kinesin-3家族驱动蛋白*unc-104*是人的轴突突触小泡运输马达蛋白的同源物,*unc-104*运输突触小泡在神经元中沿着微管正端运动<sup>[19]</sup>。UNC-104/KIF-1A或UNC-116/kinesin-1的功能缺失造成动物运动行为缺陷(uncoordinated)。

本文,我们使用聚焦离子束扫描电子显微镜成像技术,发现kinesin-1介导的囊泡运输调控温度感

受神经元AFD接受终端的结构建成。

本研究所用的多聚甲醛、戊二醛、醋酸双氧铀、钨酸、树脂、丙酮购自北京中镜科仪技术有限公司。聚焦离子束扫描电子显微镜(FEI Helios NanoLab G3 UC 9922567)、Amira软件购自FEI公司。镀金仪购自日本日立公司。高压冷冻仪(Leica HPM100)、冷冻替代仪(Leica EM ASF2)、超薄切片机(Leica UC7+FC7)购自徕卡显微系统(上海)贸易有限公司。

本实验对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)进行培养,*C. elegans*基因型分别是野生型N2、突变体*unc-116(e2310)/kinesin-1*、突变体*unc-104(e1265)/kinesin-3*。用NGM培养基以大肠杆菌OP50为食物在20 °C恒温培养箱中进行培养。

本研究采用高压冷冻对秀丽隐杆线虫进行固定及冷冻替代,压力2 100 Pa,冷冻速率15 000 K/s。冷冻替代为-90 °C 72 h, -60 °C 8 h, -30 °C 8 h。冷冻替代结束后丙酮清洗,树脂渗透包埋。

包埋好线虫样本的树脂块需用切片机修块处理,以方便在聚焦离子束扫描电子显微镜下找到样品。上电镜前需要将处理好的树脂包埋块用导电银胶粘在45°样品台上,进行喷金处理以增加样品导电性。

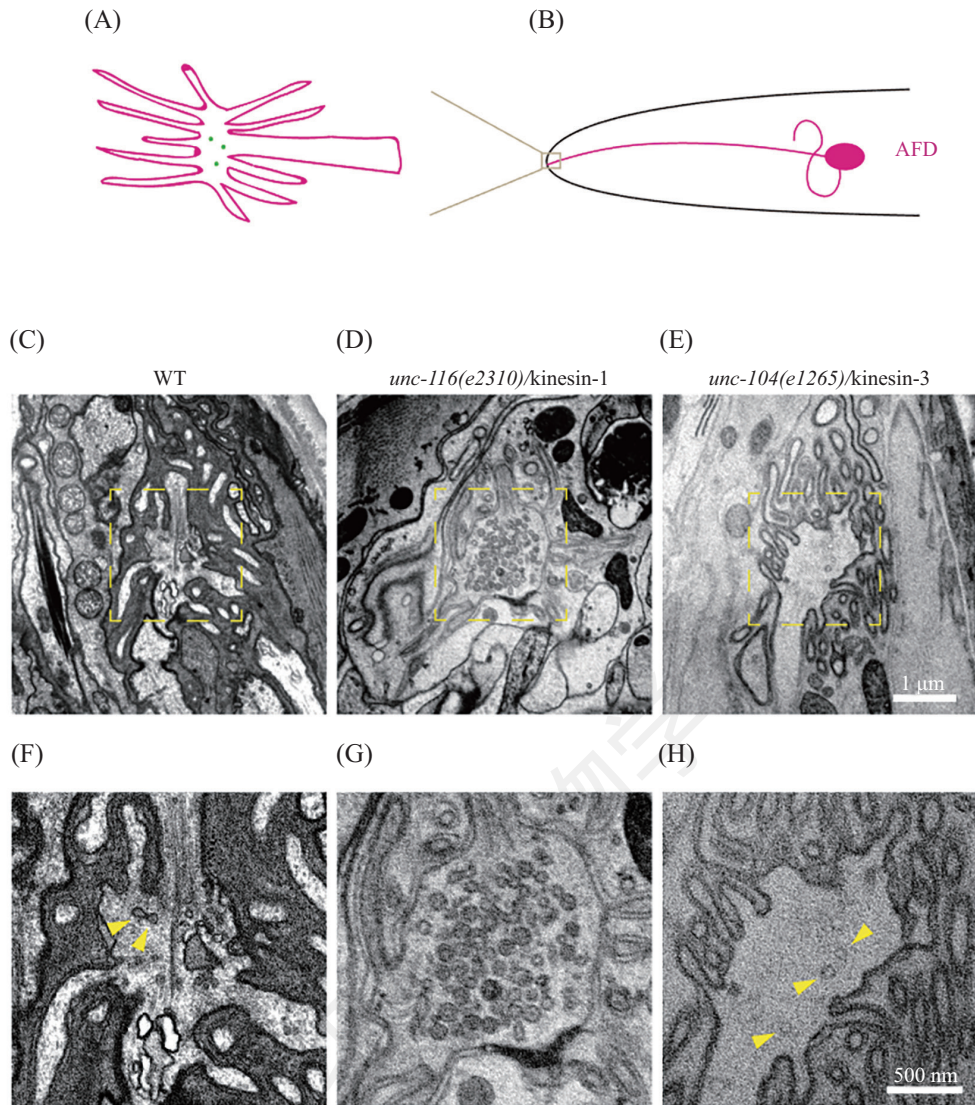
本研究应用AutoSlice and View软件进行样品的自动化切割与扫描成像。采集图像时电子束电压2 kV,束流0.4 nA,工作距离2 mm,扫描成像分辨率4 096×3 536,曝光时间8 μs。切割加工样品时离子束电压30 kV,束流2.5 nA,离子束成像分辨率1 536×1 024,曝光时间300 ns。切割样品每片厚度60 nm。

收集到的数据是4 096×3 536分辨率,需要先用Image J软件进行图像压缩成1 024×884分辨率,再导入Amira软件进行三维重构。

本研究用Image J软件进行囊泡大小的测量,用Excel进行统计,标准差计算,t检验。

## 突变体温度感受神经元膨大

经过对秀丽隐杆线虫高压冷冻固定,冷冻脱水替代,树脂包埋,上镜前预处理后,我们用聚焦离子束扫描电子显微镜对野生型和突变体的线虫头部



A: 秀丽隐杆线虫头部温度感受神经元(洋红), 神经元内运输的囊泡(绿色)。B: 秀丽隐杆线虫头部模式图, AFD温度感受神经元及胞体(洋红)。C~H: 聚焦离子束扫描电子显微镜(FIB-SEM)下的秀丽隐杆线虫头部AFD温度感受神经元; C: 野生型AFD温度感受神经元; F: 图C中黄色框内局部放大, 可见少量囊泡(黄色箭头所示); D: 突变体 $unc-116(e2310)/kinesin-1$  AFD温度感受神经元; G: 图D中黄色框内局部放大, 可见大量囊泡。E: 突变体 $unc-104(e1265)/kinesin-3$  AFD温度感受神经元; H: 图E中黄色框内局部放大, 可见少量囊泡(黄色箭头所示)。图C、D、E标尺为1  $\mu\text{m}$ , 图F、G、H标尺为500 nm。

A: the AFD neuron (magenta), vesicle (green). B: the amphid of *C. elegans*, AFD neuron and cell body (magenta). C-H: FIB-SEM images of the AFD neuron; C: the AFD neuron of the wild type (WT); F: partial enlarged drawing of Figure C, arrows indicate vesicles; D: the AFD neuron of the  $unc-116(e2310)/kinesin-1$  mutant; G: partial enlarged drawing of Figure D, lots of vesicles; E: the AFD neuron of the  $unc-104(e1265)/kinesin-3$  mutant; H: partial enlarged drawing of Figure E, arrows indicate vesicles. Scale bars are 1  $\mu\text{m}$  (uncropped) and 500 nm (cropped).

图1 秀丽隐杆线虫AFD温度感受神经元模式图及聚焦离子束扫描电镜图

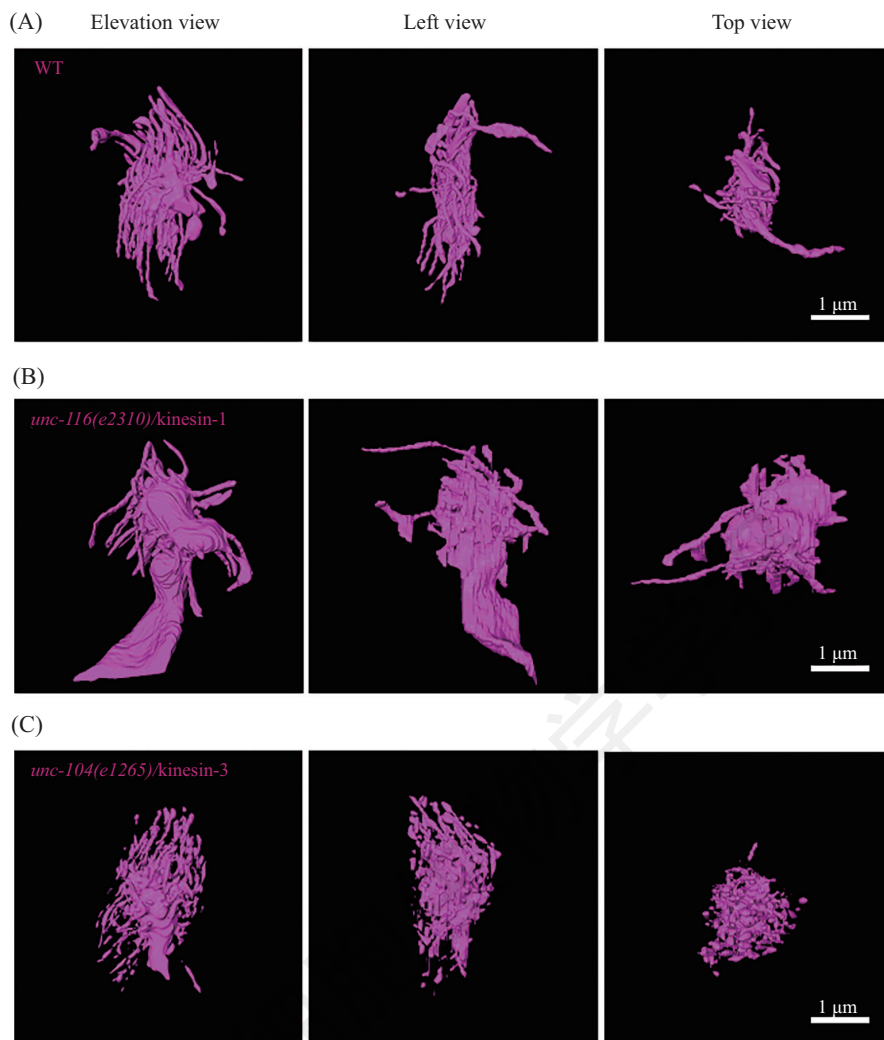
Fig.1 The AFD neuronal model and FIB-SEM images of *C. elegans*

进行逐层扫描。观察发现, 突变体 $unc-116(e2310)/kinesin-1$ 线虫的温度感受神经元基部相较于野生型而言异常膨大, 而且微绒毛数量显著减少。 $unc-116(e2310)$ 突变体通过Tc5转座子在 $unc-116$ 的2 576和2 577对碱基中插入了一段3.2 Kb的含有终止密码子的序列, 致使突变体缺失了重链的尾部但是多出了19个氨基酸<sup>[17]</sup>。而驱动蛋白家族kinesin-3突变体

$unc-104(e1265)$ 线虫的温度感受神经元基部相较于野生型无差异(图1)。

### 突变体温度感受神经元内囊泡数量显著增加

聚焦离子束扫描电子显微镜的单张图像所示, 突变体 $unc-116(e2310)/kinesin-1$ 线虫的温度感受神



A: 野生型AFD温度感受神经元。B: 突变体*unc-116(e2310)/kinesin-1* AFD温度感受神经元。C: 突变体*unc-104(e1265)/kinesin-3* AFD温度感受神经元。

A: the AFD neuron of the wild type. B: the AFD neuron of the *unc-116(e2310)/kinesin-1* mutant. C: the AFD neuron of the *unc-104(e1265)/kinesin-3* mutant.

图2 秀丽隐杆线虫AFD温度感受神经元三维结构重建图

Fig.2 3D reconstruction of AFD neurons in *C. elegans*

神经元内的囊泡数量相较于野生型显著增多, 而突变体*unc-104(e1265)/kinesin-3*线虫的温度感受神经元内的囊泡数量相较于野生型无差别(图1)。经过对双数扫描电子显微镜采集的数据三维重构后, 我们发现突变体*unc-116(e2310)/kinesin-1*线虫的温度感受神经元内的囊泡数量整体增多(图2和图3)。在对聚焦离子束扫描电子显微镜连续采集到的二维图像数据进行三维重构后, 我们可以得到温度感受神经元以及神经元内囊泡的三维结构(图1~图3)。

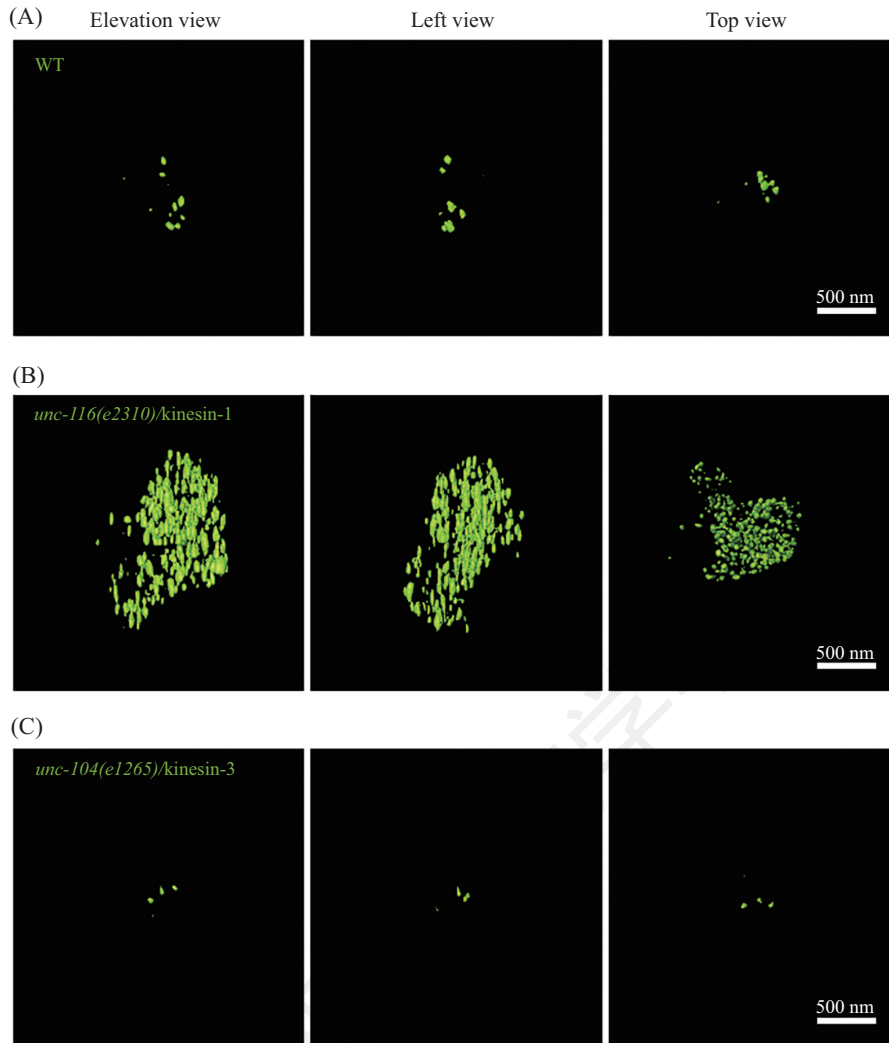
### 温度感受神经元内囊泡大小

在对野生型, 突变体*unc-116(e2310)/kinesin-1*,

突变体*unc-104(e1265)/kinesin-3*温度感受神经元内囊泡的大小进行测量统计后, 我们发现突变体和野生型动物体内的囊泡尺寸和形状没有显著性差异(图4)。

### 关于AFD温度感受神经元信号传导的讨论

秀丽隐杆线虫AFD温度感受神经元的功能主要是感受温度。我们借助聚焦离子束扫描电子显微镜来观察AFD温度感受神经元, 通过对二维电镜图像进行三维重构, 对其亚细胞结构进行全面系统的研究。在野生型线虫的AFD温度感受神经元中我们



A: 野生型AFD温度感受神经元内囊泡。B: 突变体*unc-116(e2310)/kinesin-1* AFD温度感受神经元内囊泡。C: 突变体*unc-104(e1265)/kinesin-3* AFD温度感受神经元内囊泡。

A: vesicles of the wild type in AFD neuron. B: vesicles of the *unc-116(e2310)/kinesin-1* mutant in AFD neuron. C: vesicles of the *unc-104(e1265)/kinesin-3* mutant in AFD neuron.

图3 秀丽隐杆线虫AFD温度感受神经元内囊泡三维结构重建图

Fig.3 3D reconstruction of vesicles in *C. elegans*

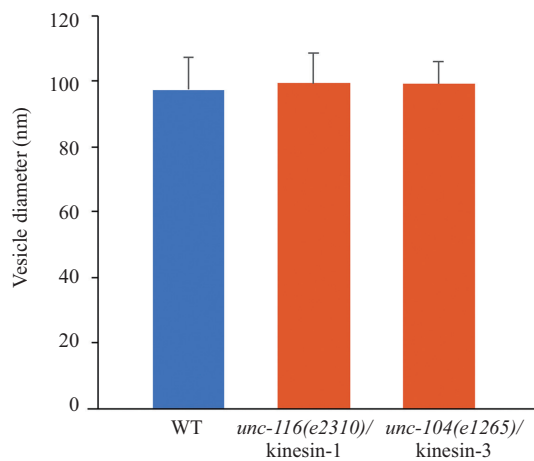


图4 秀丽隐杆线虫AFD温度感受神经元内囊泡大小统计图

Fig.4 Statistics of the vesicular size in *C. elegans*

发现了少量囊泡,推测这可能和神经元内的信号传递有关。在突变体*unc-116(e2310)/kinesin-1*的AFD温度感受神经元接收终端中我们发现了大量的囊泡,这暗示着这一系列囊泡运输依赖分子驱动蛋白kinesin-1。突变体中囊泡的大小相较于野生型并没有显著差异,暗示在野生型和驱动蛋白突变体中观察到的囊泡可能是同种类型。UNC-104驱动蛋白与UNC-116有着41%的氨基酸序列相似度<sup>[20]</sup>,但是在AFD接收终端囊泡运输过程中起关键功能的是kinesin-1,表明不同的分子马达转运不同的囊泡。分子马达和运输货物的选择性是一个重要的研究方向。Kinesin-1由UNC-116组成重链以及KLC-1和KLC-2组成轻链<sup>[21]</sup>,我们推测,KLC-1或KLC-2功能缺失可能也会造成AFD神经元接收终端囊泡运输的异常。在突变体*unc-116(e2310)*中,异常堆积囊泡所包含的递质没有相关研究,在后续研究中AFD下游的信号通路将是重要的关注点。

线虫是研究个体衰老的主要模型,神经元中的囊泡运输与衰老过程和神经退行性疾病密切相关。神经元中的囊泡运输一旦缺陷受损将会影响到胰岛素分泌、以及肌肉、器官能力丧失,并且神经元在衰老过程中也发生重要变化。例如,运动能力的退化,比起肌肉在中后期才出现的衰退,运动神经在很早的阶段就发生功能逐渐缺失。在这个过程起始就是突触囊泡融合的不足,紧接着是囊泡的对接(docking)和装填(priming)等异常<sup>[22]</sup>。类似地,在人体内衰老过程和退行性疾病如阿兹海默症中,囊泡的缺失也是重要的原因之一。许多囊泡相关基因的翻译都在这个过程中被下调,例如突触囊泡的运输和释放、神经递质受体的传递等<sup>[23]</sup>。深入探索神经元中囊泡的分布与调控机理<sup>[24]</sup>将是研究衰老及神经退行性疾病的重要方向。

### 参考文献 (References)

- 1 Wang D, O'Halloran D, Goodman MB. GCY-8, PDE-2, and NCS-1 are critical elements of the cGMP-dependent thermotransduction cascade in the AFD neurons responsible for *C. elegans* thermotaxis. *J Gen Physiol* 2013; 142(4): 437-49.
- 2 Samuel AD, Silva RA, Murthy VN. Synaptic activity of the AFD neuron in *Caenorhabditis elegans* correlates with thermotactic memory. *J Neurosci* 2003; 23(2): 373-6.
- 3 Nishida Y, Sugi T, Nonomura M, Mori I. Identification of the AFD neuron as the site of action of the CREB protein in *Caenorhabditis elegans* thermotaxis. *EMBO Rep* 2011; 12(8): 855-62.
- 4 Mori I. Genetics of chemotaxis and thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 399-422.
- 5 Luo L, Cook N, Venkatachalam V, Martinez-Velazquez LA, Zhang X, Calvo AC, et al. Bidirectional thermotaxis in *Caenorhabditis elegans* is mediated by distinct sensorimotor strategies driven by the AFD thermosensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(7): 2776-81.
- 6 Chen YC, Chen HJ, Tseng WC, Hsu JM, Huang TT, Chen CH, et al. A *C. elegans* thermosensory circuit regulates longevity through crh-1/CREB-dependent flp-6 neuropeptide signaling. *Dev Cell* 2016; 39(2): 209-223.
- 7 Singhvi A, Liu B, Friedman CJ, Fong J, Lu Y, Huang XY, et al. A Glial K/Cl transporter controls neuronal receptive ending shape by chloride inhibition of an rGC. *Cell* 2016; 165(4): 936-48.
- 8 Mori I, Ohshima Y. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1995; 376(6538): 344-8.
- 9 Tsukada Y, Yamao M, Naoki H, Shimowada T, Ohnishi N, Kuhara A, et al. Reconstruction of spatial thermal gradient encoded in thermosensory neuron AFD in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 2016; 36(9): 2571-81.
- 10 Kimura KD, Miyawaki A, Matsumoto K, Mori I. The *C. elegans* thermosensory neuron AFD responds to warming. *Curr Biol* 2004; 14(14): 1291-5.
- 11 Kato S, Xu Y, Cho CE, Abbott LF, Bargmann CI. Temporal responses of *C. elegans* chemosensory neurons are preserved in behavioral dynamics. *Neuron* 2014; 81(3): 616-28.
- 12 Goodman MB, Sengupta P. The extraordinary AFD thermosensor of *C. elegans*. *Pflugers Arch* 2018; 470(5): 839-49.
- 13 Clark DA, Biron D, Sengupta P, Samuel AD. The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 2006; 26(28): 7444-51.
- 14 Chung SH, Clark DA, Gabel CV, Mazur E, Samuel AD. The role of the AFD neuron in *C. elegans* thermotaxis analyzed using femtosecond laser ablation. *BMC Neurosci* 2006; 7: 30.
- 15 Oelz DB, Del Castillo U, Gelfand VI, Mogilner A. Microtubule dynamics, kinesin-1 sliding, and dynein action drive growth of cell processes. *Biophys J* 2018; 115(8): 1614-24.
- 16 Yang JT, Laymon RA, Goldstein LS. A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* 1989; 56(5): 879-89.
- 17 Yan J, Chao DL, Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, Hirotsune S, et al. Kinesin-1 regulates dendrite microtubule polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 2013; 2: e00133.
- 18 Sakamoto R, Byrd DT, Brown HM, Hisamoto N, Matsumoto K, Jin Y. The *Caenorhabditis elegans* UNC-14 RUN domain protein binds to the kinesin-1 and UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization. *Mol Biol Cell* 2005; 16(2): 483-96.
- 19 Wagner OI, Esposito A, Köhler B, Chen CW, Shen CP, Wu GH, et al. Synaptic scaffolding protein SYD-2 clusters and activates kinesin-3 UNC-104 in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(46): 19605-10.
- 20 Patel N, Thierry-Mieg D, Mancillas JR, Thierry-Mieg, and J.R. Mancillas, Cloning by insertional mutagenesis of a cDNA encoding *Caenorhabditis elegans* kinesin heavy chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(19): 9181-5.

- 21 Teuliere J, Gally C, Garriga G, Labouesse M, Georges-Labouesse E. MIG-15 and ERM-1 promote growth cone directional migration in parallel to UNC-116 and WVE-1. *Development* 2011; 138(20): 4475-85.
- 22 Liu J, Zhang B, Lei H, Feng Z, Liu J, Hsu AL, *et al.* Functional aging in the nervous system contributes to age-dependent motor activity decline in *C. elegans*. *Cell Metab* 2013; 18(3): 392-402.
- 23 Berchtold NC, Coleman PD, Cribbs DH, Rogers J, Gillen DL, Cotman CW. Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2013; 34(6): 1653-61.
- 24 Tan PL, Barr T, Inglis PN, Mitsuma N, Huang SM, Garcia-Gonzalez MA, *et al.* Loss of Bardet Biedl syndrome proteins causes defects in peripheral sensory innervation and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(44): 17524-9.

中国细胞生物学学报