

## 领域前沿·中国



赵惠杰, 美国国立卫生研究院国家癌症研究所博士后。2007年毕业于南京大学生命科学院, 2014年在中科院上海生物化学与细胞生物学研究所获博士学位, 毕业后继续留所从事博士后研究, 2017年赴美国国立卫生研究院国家癌症研究所开展博士后研究。主要从事中心体及纤毛相关研究, 在多纤毛细胞中心粒扩增、运动性纤毛组装的分子机制以及运动纤毛与遗传性纤毛病等方面取得了重要进展。作为第一作者, 揭示了多纤毛细胞与增殖细胞中心粒复制的分子机理(ZHAO et al. *Nat Cell Biol*, 2013; ZHAO et al. *EMBO R*, 2019; ZHAO et al. *J Cell Sci*, 2020)及运动纤毛组装的调控机制(ZHAO et al. *Nat Commun*, 2021)。获得过2014年中国科学院院长特别奖和2015年赛诺菲-中国科学院上海生命科学研究优秀青年人才奖。

## 多纤毛细胞纤毛精确组装的调控机制

赵惠杰<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;

<sup>2</sup>美国国立卫生研究院国家癌症研究所, 马里兰州 21702)

**摘要** 高等动物体内气管、脑室管膜及输卵管等上皮组织具有一类富含运动纤毛的多纤毛细胞, 通过其细胞表面运动纤毛的周期性摆动可以清洁气管、驱动脑脊液流动和受精卵运动。运动纤毛发生或功能的异常则可导致气管炎、脑积水、不孕不育等多种遗传疾病。然而, 在多纤毛细胞分化过程中关于如何精确组装运动性纤毛复杂结构的分子机制仍不清楚。该研究运用蛋白组学、超高分辨率显微成像和电镜等多种技术, 发现多纤毛细胞特有的亚细胞结构—纤维状颗粒物是由中心体周围基质蛋白Pcm1相分离形成的具有液体特征的无膜细胞器, 不仅参与调控多纤毛细胞摇篮体的组装和空间分布, 而且在其多孔状结构中大量富集了特定的基体和纤毛的结构蛋白质, 并精确调控这些组分在运动纤毛发生的不同阶段定位到基体和纤毛中, 阐明了纤维状颗粒物作为组织者精确调控运动纤毛组装的分子机制。

**关键词** 运动性纤毛; 纤维状颗粒物; 摇篮体; 基体; 轴丝; 中心粒扩增

## The Regulatory Mechanism for Accurate Construction of Motile Cilia in Multiciliated Cells

ZHAO Huijie<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Excellence in Molecular Cell Science, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>2</sup>Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, MD 21702, USA)

\*通讯作者。Tel: 021-54921404, E-mail: zhaohuijie@sibcb.ac.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921404, E-mail: zhaohuijie@sibcb.ac.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5477>

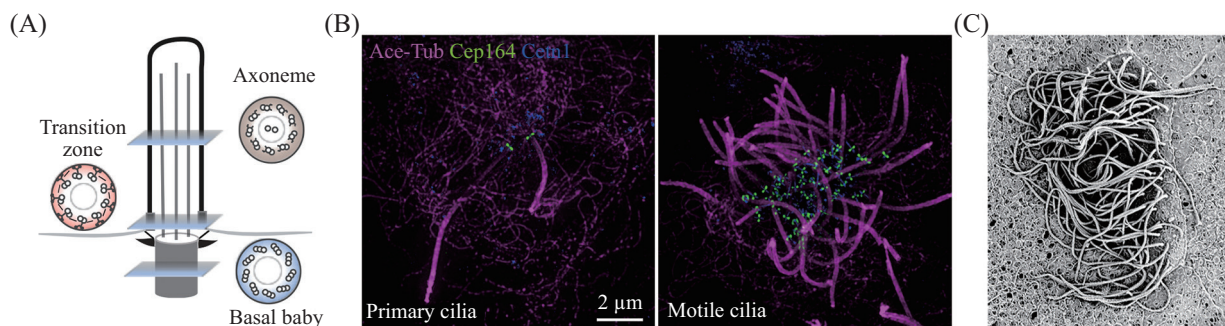
**Abstract** Motile cilia are present on the epithelial surface in large numbers to generate a directional fluid flow that is crucial for various biological processes, such as mucociliary clearance in airways, cerebrospinal fluid circulation in the brain, and fertility. Dysfunction of these cilia causes chronic tracheitis, hydrocephalus and infertility. In spite of the important role of motile cilia, little is known about the mechanism for accurate construction of intricate motile ciliary structures. Here, using a combination of proteomic analysis, super resolution microscopy, electron microscopy and live cell imaging, this article discovers that Pcm1 may undergo phase separation to form FGMs (fibrogranular materials), which regulate deuterosome size, number, and distribution, and selectively concentrate multiple important centriole-related proteins as clients. Disruption of FGMs markedly affects the ultrastructure of motile cilia. Together, these findings demonstrate that FGMs organize deuterosomes and centriole-related proteins to facilitate the faithful assembly of basal bodies and multiciliary axonemes.

**Keywords** motile cilia; fibrogranular material; deuterosome; basal body; axoneme; centriole amplification

纤毛(cilia)是一种突出于细胞表面的特化的毛状细胞器,其主要由微管构成,包括基体(basal body)、转接区(transition zone)、轴丝(axoneme)和纤毛膜等结构(图1)。基体在纤毛发生早期由中心粒在远端附属物(distal appendage)作用下特化而成,因此,基体的基本结构类似于中心粒,皆为由九组三联体微管组成的桶装结构。基体与细胞膜融合后在远端附属物顶部形成转接区,从而将纤毛膜与细胞膜分隔开,而轴丝则在基体微管的基础上向外延伸,形成纤毛的主体微管结构,与基体九组三联体微管不同,轴丝是由九组二联体微管构成的<sup>[1-2]</sup>。

纤毛的结构虽小,但是其在胚胎发育及多种生理功能中发挥着重要作用。根据纤毛的功能,可以划分为两大类(图1): (1) 初级纤毛(primary cilia),生物体内几乎所有的细胞在一定条件下都可以形成初

级纤毛,通常一个细胞只能组装一根初级纤毛,主要行使感知和传递细胞外信号刺激的功能<sup>[3-5]</sup>,比如在初级纤毛中特异性分布的Sonic Hedgehog(Shh)信号通路相关受体及下游蛋白在胚胎发育过程中参与调控多个器官及组织的生长发育,另外多个GPCR受体如生长抑素受体3(shekel somatostatin receptor type 3, SSTR3)、血清素受体6(serotonin receptor 6, HTR6)、视紫红质(Rhodopsin)以及GPCR信号通路下游腺苷酸环化酶3(adenylyl cyclase 3, AC3)也都特异性分布于初级纤毛中<sup>[6-7]</sup>; (2) 运动性纤毛(motile cilia),主要行使运动功能,通过运动性纤毛的摆动,可以在细胞表面形成液体流或为细胞运动提供动力。为了实现运动纤毛的运动功能,在运动性纤毛中存在多个协调控制纤毛运动性的特殊结构如内/外动力蛋白臂(inner/outer dynein arm, IDA/ODA)、辐射轴(ra-



A: 纤毛基体、转接区、轴丝超微结构示意图; B: 超高分辨率显微成像展示小鼠室管膜细胞表面的初级纤毛及运动纤毛; C: 扫描电镜展示非洲爪蟾胚胎多纤毛细胞表面运动性纤毛。

A: diagrams for the typical ciliary ultrastructures of the basal body, transition zone, or axoneme; B: representative 3D-SIM images of primary and motile cilia in mouse ependymal cells; C: scanning electron microscope image of motile cilia in multiciliated cells of *Xenopus* embryos.

图1 初生纤毛和运动纤毛超微结构及图像(根据参考文献[24]修改)

Fig.1 The typical ciliary ultrastructures and images of primary and motile cilia (modified from reference [24])

dial spoke)、连接蛋白-动力蛋白调节复合物(nexin-dynein regulatory complex)以及中央微管(central pair microtubule, CP)等<sup>[8-9]</sup>。运动性纤毛一般在细胞表面成束分布,即在一个细胞中可以组装数量众多的运动性纤毛(图1),但也存在一些特例,如单细胞生物衣藻(*Chlamydomonas*)仅有两根运动性纤毛/鞭毛,以及成熟的精子细胞只有一根运动纤毛/鞭毛。具有多根运动纤毛的细胞即多纤毛细胞(multiciliated cell, MCC),其分布于多种终末分化的上皮组织,例如气管上皮、室管膜上皮及输卵管上皮细胞等。MCC运动纤毛的持续摆动,可以带动上皮细胞表面的液体流动,从而行使湿润气管排除异物、营养脑细胞清除代谢废物以及协助受精卵运动等功能<sup>[10]</sup>。由于纤毛广泛分布于多种细胞类型并行使不同功能,纤毛功能异常可以导致多种遗传疾病,统称为纤毛病(ciliopathies),初级纤毛功能异常的病人通常具有多指/趾、内脏移位、肥胖以及视网膜病变等临床表征,而运动性纤毛功能缺失则通常导致慢性呼吸道炎症、脑积水和不孕不育等临床表征<sup>[2]</sup>。

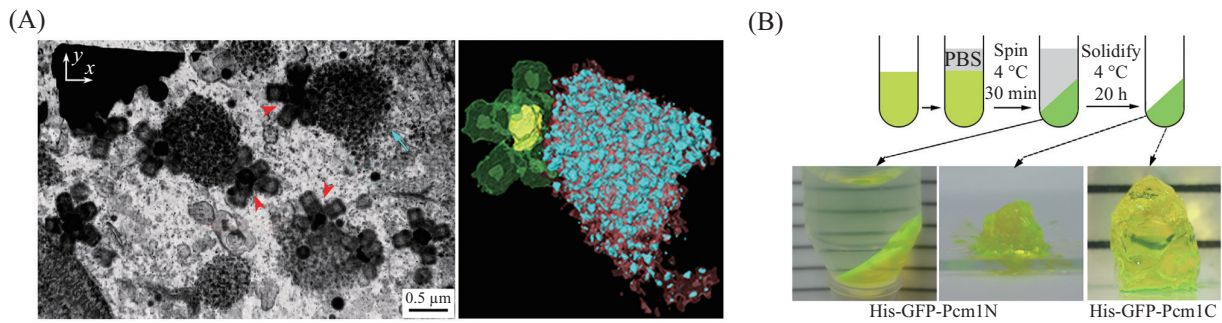
在增殖细胞中,中心粒的复制受到严格调控,从而保证亲本的遗传物质可以稳定地遗传到子代细胞中。与增殖细胞不同,MCC为了组装数以百计的动纤毛则需要形成相应数目的中心粒/基体,而且需要在极短的时间窗口内快速完成中心粒成熟(即获得远端附属物)、迁移并与细胞膜锚定、介导动纤毛组装等过程。因此,MCC的分化在生物体内受到一系列转录因子的精确调控。首先,MCC前体细胞在转录因子Gemc1、E2f5和Dp1等作用下激活下游多纤毛化因子Mcidas(multicilin)的转录;紧接着,在Mcidas与E2f4/E2f5-Dp1共同作用下激活转录一系列下游蛋白,其中包括:中心粒扩增相关蛋白如摇篮体蛋白Deup1,中心粒结构蛋白如Cep120、Ofd1等以及动纤毛轴丝组装相关转录因子Foxj1等;随后,Foxj1进一步转录一系列运动纤毛相关蛋白及下游转录因子<sup>[11-14]</sup>。由此可见,在MCC分化早期,参与MCC分化不同过程的不同蛋白几乎同时被大量地合成,这些蛋白是如何实现归类贮存和按需使用的,是一个重要且悬而未决的科学问题。

纤维状颗粒物(fibrogranular material, FGM)是一种存在于高等动物MCC的特殊的亚细胞结构。上个世纪六七十年代,研究人员通过电镜在MCC中观察到这一广泛分布的纤维状颗粒样片状结构,并

发现依附于这种结构的摇篮体(deuterosome)可以介导中心粒从头合成(*de novo amplification*)<sup>[15-17]</sup>。由于摇篮体与FGM这一空间分布关系以及电镜技术的局限性,FGM一直被推测为摇篮体的前体。目前除了已知其中含有中心体周围基质蛋白Pcm1外<sup>[18]</sup>,其分子组成与确切功能一直不为人所知。结合FGM的结构特性以及MCC归类存储的分化需求,MCC是否有可能通过FGM实现不同蛋白的归类存储和按需使用呢?

为了研究MCC运动纤毛的分化过程,在本研究中我们采用了小鼠气管上皮细胞(mouse tracheal epithelial cells, mTECs)和小鼠室管膜上皮细胞(mouse ependymal cells, mEPCs)体外分化系统。由于mTECs和mEPCs的体外分化过程可以重现MCC中心粒扩增至运动纤毛组装等分化的全部过程<sup>[19-20]</sup>,我们可以利用这两个系统开展运动纤毛的分子机制研究。我们以Pcm1为研究目标分析其与MCC分化的关系,发现Pcm1蛋白水平随着mTEC分化进程显著提高,提示Pcm1参与MCC分化过程。借助3D-SIM超高分辨率显微镜,我们发现Pcm1标记的亚细胞结构在MCC分化早期就开始在细胞质中大量形成,随着MCC分化细胞内该结构的数目逐渐减少但是其尺寸却显著变大。免疫电镜观察进一步证实,Pcm1标记的亚细胞结构确实为FGM。我们利用空间分辨率更高的聚焦离子束扫描电镜(focused ion beam scanning EM, FIB-SEM)进一步分析FGM的结构,结果显示,FGM是一种由高度聚集的FGM核心结构以及填充其中及周边松散的纤维状颗粒(fibrous granule, FG)构成的类似海绵的多孔状结构。这种片形多孔状结构具有极大的表面积,为大量吸附或存储蛋白提供可能。同时,我们也发现,MCC分化过程中摇篮体常依附于FGM介导中心粒扩增(图2),提示FGM可能与摇篮体存在某种生物学联系。

为了进一步研究FGM的功能,我们利用siRNA在mEPC中人为敲低Pcm1蛋白水平并通过连续切片电镜观察证实,敲低Pcm1后MCC细胞中FGM无法形成,因此,我们可以借助敲低Pcm1来研究FGM的功能。我们发现,在MCC分化过程中破坏FGM形成并不影响最终中心粒以及运动纤毛的数量,但是导致了摇篮体的数目、大小和分布的显著异常。与对照细胞相比,Pcm1敲低后MCC中摇篮体数目显著增多,但是其尺寸却明显变小,并且每个摇篮体介导组



A: 聚焦离子束扫描电镜(FIB-SEM)展示多纤毛细胞中纤维状颗粒与摇篮体的空间分布; B: Pcm1片段具有相分离的特性。红色和蓝色箭头分别标记多纤毛细胞摇篮体和纤维状颗粒。

A: focused ion beam scanning EM (FIB-SEM) revealed the spatial relationship between FGMs and deuterosomes in multiciliated cells; B: Pcm1 fragments phase-separated into hydrogels. The red arrowheads indicate deuterosome-procentriole complexes spatially adjacent to FGM cores, and the blue arrow indicates the FGM.

图2 Pcm1相分离形成多纤毛细胞纤维状颗粒亚细胞结构(根据参考文献[24]修改)

Fig.2 Pcm1 undergoes phase separation to form fibrogranular materials in multiciliated cells typical ciliary ultrastructures and images of primary and motile cilia (modified from reference [24])

装的中心粒数目也显著减少, 另外摇篮体也不再聚集在亲本中心粒附近而是广泛地分布于整个细胞基质。结合FGM和摇篮体的空间分布关系, 这一结果提示, FGM参与了调控MCC摇篮体的组装和空间分布。

虽然Pcm1敲低导致摇篮体的形态和分布异常, 但并不影响MCC运动纤毛的数量, 那么, 这些形成的运动纤毛是否能正常行使运动功能呢? 借助高速活体显微成像技术捕捉运动纤毛的运动轨迹, 我们发现在对照细胞中, 运动纤毛主要呈现规律性的麦浪式摆动, 而在Pcm1敲低的MCC中运动纤毛则是无规律的转动或彻底丧失运动能力。为了进一步了解Pcm1敲低如何影响运动纤毛的运动性, 我们利用电镜细致观察了纤毛的基体、转接区和纤毛轴丝的超微结构。结果显示, Pcm1敲低后纤毛基体的三联体微管结构、转接区和轴丝的二联体微管结构以及轴丝的中央微管结构等都不同程度的明显受损, 而纤毛超微结构损伤则极有可能最终影响了运动纤毛的规律性摆动。另外, 通过功能恢复实验, 我们证实了外源性表达的Pcm1蛋白可以恢复MCC中FGM的形成以及运动纤毛的正常摆动。因此, 这些结果表明, Pcm1介导组装的FGM对于MCC运动性纤毛的正确组装至关重要。

既然FGM对于运动纤毛超微结构的正确组装至关重要, 那么FGM又是如何参与调控这一过程呢? 为了回答这一问题, 我们首先需要更为细致地了解FGM的分子组成。利用抗坏血酸过氧化物酶

(ascorbate peroxidase, APEX)介导蛋白质邻近标记技术结合质谱分析, 我们发现很多中心粒相关蛋白如Cep135、Cep120、Ofd1、Pcnt和Cep215等都可以被特异性邻近标记。随后, 我们利用超高分辨率显微镜以及免疫电镜进一步证实这些中心粒相关蛋白定位于FGM。为了进一步了解Pcm1与这些新鉴定的FGM组分的关系, 我们在mEPC中敲低Pcm1, 然后通过免疫染色检测其在MCC分化过程中的空间分布。结果显示, Pcm1敲低后, 所有新鉴定蛋白的FGM定位消失, 并且各蛋白伴随中心粒扩进程的中心粒定位的时序调控被显著破坏。以Cep135蛋白为例, 在对照细胞中, Cep135在细胞质中定位于FGM, 并且在中心粒复制早期并不定位至中心粒, 而在复制晚期逐渐呈现显著的中心粒定位。但是在Pcm1敲低的细胞中, 细胞质中FGM样分布的Cep135完全消失, 同时在中心粒复制早期Cep135即定位至中心粒。因此, 与我们的假设一致, 这些结果证实, FGM的确可以存储MCC分化相关的多种蛋白并且调控各蛋白的有序释放和按需使用, 从而实现FGM对运动纤毛正确组装的精确调控。

另外, 我们还发现Pcm1敲低后, 中心粒远端蛋白Cetn1可以显著地穿过纤毛转接区伸入至纤毛轴丝内部, 从而呈现中心粒以及轴丝基部两种区域性定位。进一步研究发现, Pcm1的结合蛋白Cep131则仅与Cetn1共定位于纤毛轴丝基部这一区域。我们还发现, 运动纤毛的中央微管和辐射轴也是在Cep131-Cetn1标记的这一结构基础上组装的, 因此,

我们将这一个新的纤毛亚结构命名为中央微管座(CP-foot)。尽管在对照细胞中也存在相应结构,但Pcm1敲低后中央微管座显著增长并且影响了运动纤毛中央微管和辐射轴在轴丝中的空间分布,这一个改变也可能是影响运动纤毛运动性的重要原因。

最后,我们还对Pcm1如何介导FGM组装进行了初步研究。蛋白质相分离是最近几年新发现的一种蛋白质特性,即在某种条件下细胞内的特定分子(蛋白质或蛋白质-核酸等)通过某种特定方式聚集起来,从而在无序的细胞内部形成具有一定秩序的无膜结构<sup>[21]</sup>。蛋白质通过自身的结构特性发生蛋白分子间相互作用促使相分离的实现,其中一类以具备多个折叠的结构域为特征,而另一类则以内部无序区域(intrinsically disordered region, IDR)为特点<sup>[22-23]</sup>。我们首先通过活体成像观察在MCC分化过程中GFP-Pcm1是否具有相分离的特征,我们发现GFP-Pcm1形成的FGM可以发生融合现象(即两个FGM接触并融合成一个较大的FGM),而进一步的荧光漂白恢复实验(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)证明FGM可以与细胞质进行物质交换,这些结果表明,在MCC中GFP-Pcm1蛋白具备相分离的特征。通过预测Pcm1蛋白二级结构,我们发现Pcm1蛋白富含IDR。通过在*Escherichia coli*中表达纯化His-GFP标签的Pcm1的蛋白片段(N: 316~824 aa; M: 1 072~1 337 aa; C: 1 694~2 024 aa)并进行体外液滴(liquid droplet)形成实验,我们发现, Pcm1M可以相分离形成液滴,而且该液滴同样具备融合以及与环境进行快速物质交换等特性。尽管Pcm1N和Pcm1C不能相分离形成液滴,但是两者都可以形成透明的凝胶状物质(hydrogel)(图2)。综合上述结果,我们推测,FGM可能是由Pcm1相分离形成的具有液体特征的、大型(直径可达2  $\mu\text{m}$ )的、动态的无膜细胞器。

通过结合蛋白组学、超高分辨率显微成像、活细胞高速显微成像和多种电镜技术,我们的研究工作不仅成功解析了FGM的分子组成,而且明确了FGM在MCC分化过程中的重要功能<sup>[24]</sup>。我们发现,FGM在MCC分化过程中由Pcm1相分离形成的具有液体特征的无膜细胞器行使组织者的功能,它们不仅可以黏附摇篮体,参与调控MCC摇篮体的组装和空间分布,而且在其多孔状结构中大量富集了特定的基体和纤毛的结构蛋白质,通过某种未知的机制精确调控这些组分在纤毛发生的不同阶段定位到基

体和纤毛中,从而保证运动纤毛精细结构组装的有序性和正确性,有效地避免由于运动纤毛功能异常导致的疾病发生。

### 参考文献 (References)

- [1] KOBAYASHI T, DYNLACHT B D. Regulating the transition from centriole to basal body [J]. *J Cell Biol*, 2011, 193(3): 435-44.
- [2] NIGG E A, RAFF J W. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(4): 663-78.
- [3] PALA R, ALOMARI N, NAULI S M. Primary cilium-dependent signaling mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2272.
- [4] MALICKI J J, JOHNSON C A. The cilium: cellular antenna and central processing unit [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(2): 126-40.
- [5] ISHIKAWA H, MARSHALL W F. Ciliogenesis: building the cell's antenna [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(4): 222-34.
- [6] BARBEITO P, GARCIA-GONZALO F R. HTR6 and SSTR3 targeting to primary cilia [J]. *Biochem Soc Trans*, 2021, 49(1): 79-91.
- [7] SCHOU K B, PEDERSEN L B, CHRISTENSEN S T. Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(9): 1099-113.
- [8] REITER J F, LEROUX M R. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(9): 533-47.
- [9] SPASSKY N, MEUNIER A. The development and functions of multiciliated epithelia [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(7): 423-36.
- [10] BROOKS E R, WALLINGFORD J B. Multiciliated cells [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(19): R973-82.
- [11] MA L, QUIGLEY I, OMRAN H, et al. Multicilin drives centriole biogenesis via E2f proteins [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(13): 1461-71.
- [12] ARBI M, PEFANI D E, KYROUSI C, et al. GemC1 controls multiciliogenesis in the airway epithelium [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(3): 400-13.
- [13] KYROUSI C, ARBI M, PILZ G A, et al. Mcidas and GemC1 are key regulators for the generation of multiciliated ependymal cells in the adult neurogenic niche [J]. *Development*, 2015, 142(21): 3661-74.
- [14] WALLMEIER J, FRANK D, SHOEMARK A, et al. *De novo* mutations in FOXJ1 result in a motile ciliopathy with hydrocephalus and randomization of left/right body asymmetry [J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 105(5): 1030-9.
- [15] SOROKIN S P. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs [J]. *J Cell Sci*, 1968, 3(2): 207-30.
- [16] ANDERSON R G, BRENNER R M. The formation of basal bodies (centrioles) in the Rhesus monkey oviduct [J]. *J Cell Biol*, 1971, 50(1): 10-34.
- [17] DIRKSEN E R. Centriole morphogenesis in developing ciliated epithelium of the mouse oviduct [J]. *J Cell Biol*, 1971, 51(1): 286-302.
- [18] KUBO A, TSUKITA S. Non-membranous granular organelle consisting of PCM-1: subcellular distribution and cell-cycle-

- dependent assembly/disassembly [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 5): 919-28.
- [19] ZHAO H, ZHU L, ZHU Y, et al. The Cep63 paralogue Deup1 enables massive *de novo* centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(12): 1434-44.
- [20] ZHAO H, CHEN Q, FANG C, et al. Parental centrioles are dispensable for deuterosome formation and function during basal body amplification [J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(4): e46735.
- [21] MITREA D M, KRIWACKI R W. Phase separation in biology, functional organization of a higher order [J]. *Cell Commun Signal*, 2016, 14: 1.
- [22] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-98.
- [23] JIANG H, WANG S, HUANG Y, et al. Phase transition of spindle-associated protein regulate spindle apparatus assembly [J]. *Cell*, 2015, 163(1): 108-22.
- [24] ZHAO H J, CHEN Q C, LI F, et al. Fibrogranular materials function as organizers to ensure the fidelity of multiciliary assembly [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1273.