

Orai1 钙通道的可逆光控改造及其在果蝇疾病模型中的应用*

王刘清¹⁾ 何 涟²⁾ 孙 林¹⁾ 王友军^{1)†}

(1) 北京师范大学生命科学院遗传与发育所, 抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 100875, 北京;

2) Center for Translational Cancer Research, Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University, Houston, TX, USA)

中图分类号 Q71

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2021039

钙释放激活的钙(Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} , CRAC)通道是一种介导细胞器互作的动态组装型通道. 质膜上的 Orai 六聚体构成其通道部分, 而内质网膜上的基质相互作用分子(stromal interaction molecule, STIM)钙感受器则是通道的开关元件. CRAC 通道介导的钙内流是细胞内重要的钙信号产生机制, 参与调节多种关键的生理过程, 如基因表达, 细胞因子分泌, 细胞迁移、增殖, 器官发育以及免疫反应等. CRAC 信号功能异常与免疫缺陷、管状聚集性肌病(tubular aggregate myopathy, TAM)以及神经退行性疾病等多种疾病的产生密切相关^[1]. 因此, 以 CRAC 信号通路为靶点, 开发其调控工具是治疗相关疾病的重要方向.

近年来, 研究者们将时空特异性高、可逆性强、毒副作用小的光化学及光遗传学手段引入 CRAC 领域, 实现了对 CRAC 信号的光学开关及 CRAC 相关疾病的干预. 针对 CRAC 通路异常激活所引发的血小板减少、Stormorken 综合征等疾病, 本实验室通过合作开发了光化学开关分子 piCRAC^[2]. 该工具在紫外光照射后可变构并抑制 CRAC 信号, 进而有效缓解了斑马鱼 Stormorken 综合征模型的相关表型. 针对与 CRAC 功能受损密切相关的免疫缺陷、肿瘤及神经退行性疾病等, 何涟等设计出基于 STIM 蛋白的光激活元件 Opto-CRAC 等工具^[3-4]. Opto-CRAC 可在 470 nm 蓝光激活下产生构象上的改变, 激活质膜上的 Orai 蛋白产生钙信号, 并在小鼠模型中显示了抑制肿瘤发展的潜力. 但这类工具的不足之处在于: 它们起作用需要细胞表达有足量的 Orai 蛋白;

Orai 蛋白并不是 STIM 蛋白的唯一靶蛋白, 因而, 当光控 STIM 工具被激活时, 同时也能够作用于瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)、电压门控的钙通道等, 产生非特异性的副反应. 这些缺点使其在应用上具有一定的局限性.

基于以上问题, 亟待开发出一种靶向性强、特异性高的光激活 CRAC 工具. 2020 年 1 月 12 日, 本实验室与国外课题组合作在《Nature Communications》杂志上发表题为《Engineering of a bona fide light-operated calcium channel》的文章^[5]. 通过对 Orai 进行改造, 得到了一种蓝光激活的、具有高度钙离子选择性的钙通道(light operated calcium, LOCa).

首先, 我们进行了光激活 CRAC 通道(LOCa)的设计、优化及鉴定. 4 次跨膜的 Orai 是 CRAC 通道的通道亚基, 它的激活需要内质网膜上的 STIM 蛋白的结合及门控作用, 因而将 Orai 蛋白从 STIM 门控改为光激活具有一定的难度. 特别是光敏蛋白构象改变提供的自由能较小, 难以提供使 Orai 蛋白从“关闭”构象变为“开放”状态所需的能量. 于是我们通过 Orai 持续激活突变体(Orai-P245T)的跨膜(transmembrane, TM)区域 TM2 与 TM3 之间的 loop 区域插入光敏蛋白光-氧-电压(light-oxygen-voltage, LOV)结构域 2(LOV2), 制备出了最初版本的 LOCa. 光敏蛋白在黑暗下使 LOCa 处于关闭状态, 受到 470 nm 蓝光激活后, LOV2 产生构象改变, 使 LOCa 变为开放状态, 产生钙内流. 但该版本的 LOCa 介导的钙内流较小. 因此, 我们通过优化 LOV2 的插入位置(S1631 和 P164 位点之间), 以及结合随机突变和高

* 国家自然科学基金重大研究计划资助项目(91954205)

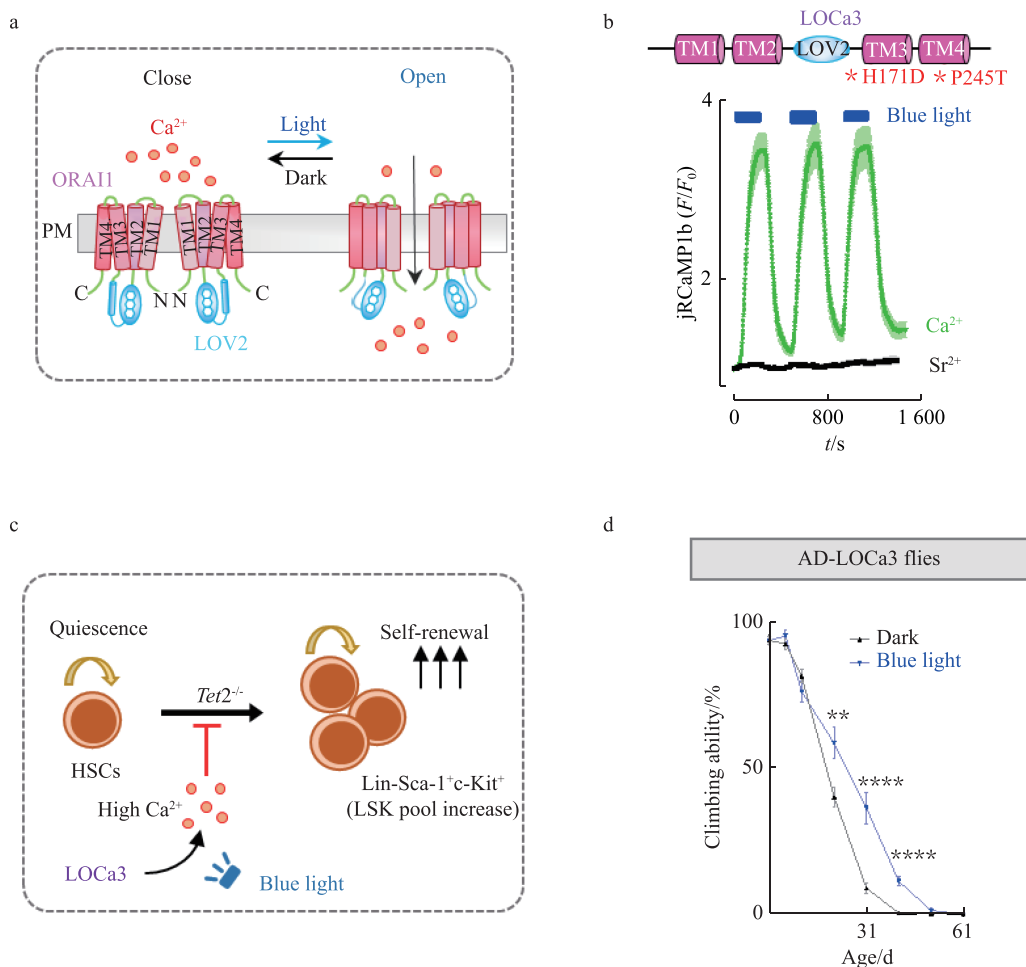
† 通信作者: 王友军(1975—), 男, 教授, 博士生导师. 研究方向: 钙信号机制. E-mail: wyoujun@bnu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-26

通量筛选的定向进化方法引入新的突变(H171D和P245T),最终得到了具有暗激活更小、光反应更大,及可逆性更高的 LOCa3(图 1-a). 首先, LOCa3 的反应幅度受激发光强的调制. 在 $1\sim 40\ \mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$ 的光密度范围内,随着给光的增强, LOCa3 介导的钙信号也随之增大. 其次,进一步的测试结果表明, LOCa3 保留了其母本 Orai 蛋白对钙离子的高度选择性. Orai 蛋白对 Ca^{2+} 的选择性是 Na^{+} 的 1000 倍以上,对二价阳离子 Sr^{2+} 的选择性也在 10 倍以上 ($P(\text{Ca})/P(\text{Na}) > 1000$, $P(\text{Ca})/P(\text{Sr}) > 10$)^[6-7],其他钙通道如 L 型钙通道则对 Ca^{2+} 和 Sr^{2+} 的选择性较差 ($P(\text{Ca})/P(\text{Sr}) \approx 0.75$)^[8]. 而我们的钙成像结果表明, LOCa3 对 Ca^{2+} 的选择性也远大于 Sr^{2+} (图 1-b). 此外, LOCa3 还摆脱了实际使用

时对外源 Orai 蛋白或 STIM 蛋白的依赖,成为首个真正的单元件光激活钙通道.

随后,我们将 LOCa3 应用在细胞及个体水平,检测了其 CRAC 相关疾病表型的作用. 研究表明,肿瘤抑制基因 *Tet2* (Ten-eleven Translocation 2) 缺陷型小鼠造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)具有过度的自我更新能力,药物抑制钙内流可增强 HSCs 的稳定性^[9]. 我们在 *Tet2* 敲除型小鼠的造血干/祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)中表达 LOCa3,发现蓝光作用下,能显著抑制 *Tet2*^{-/-} 型 HSPCs 的自我更新能力(图 1-c). 研究发现,阿尔兹海默症病人神经元的 STIM 蛋白表达量下调,CRAC 信号降低^[10]. 我们制备了表达 LOCa3 的阿尔兹海默症模型



a. LOCa3 设计示意: 光-氧-电压结构域 2 (LOV2) 插入在持续性激活的 Orai1 蛋白第二跨膜区 (TM2) 与第三跨膜区 (TM3) 之间的 loop 环上. LOCa3 在黑暗下保持关闭状态, 而 470 nm 光的照射会使得 LOCa3 中的 LOV2 产生构象改变, 进而经协同变构效应打开 LOCa3, 引发胞外钙离子内流. b. LOCa3 介导的可逆光控钙信号. 在 Orai 敲除的细胞中共表达 jRCaMP1b 钙指示剂与 LOCa3 后, 将细胞置于含 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Sr}^{2+}$ 或 Ca^{2+} 成像溶液中, 反复进行“蓝光照射-黑暗”的刺激. 结果表明, LOCa3 细胞会产生可逆的 Ca^{2+} 内流 (绿色), 但几乎没有 Sr^{2+} 内流. c. LOCa3 在抑制 *Tet2*^{-/-} 型造血干/祖细胞 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs) 的自我更新上的应用: *Tet2*^{-/-} 型 HSPCs 自我更新能力异常增强, 钙内流增加后可抑制这一现象. 通过 LOCa3 激活的钙内流可抑制 *Tet2*^{-/-} 型 HSPCs 的自我更新. d. 蓝光照射缓解 AD-LOCa3 果蝇的攀爬能力. AD 果蝇的攀爬能力随时间下降, 在出生 40 d 后, 几乎丧失攀爬能力 (黑色折线), 蓝光照射后, 这种攀爬能力的衰退有了明显的改善 (蓝色). (改编自 [5])

图 1 LOCa3 的光开关反应及在体应用

果蝇, 培养过程中以每小时照射 10 min 的频率间断性进行蓝光照射, 使阿尔兹海默症模型果蝇爬行能力随年龄增长而衰退的现象有了明显的减缓(图 1-d). 这表明 LOCa3 能在个体水平上对阿尔兹海默症相关表型具有一定的缓解作用.

虽然目前 LOCa3 在缓解上述疾病表型中的具体作用机制还有待进一步的阐释, 其光反应大小也有进一步优化的空间, 但仍然可以看到 LOCa3 的应用前景及价值. LOCa3 作为一种光开关的钙通道, 能为研究钙信号机制提供新的思路和方法, 也有望成为治疗 CRAC 相关疾病的新工具.

参考文献

- [1] FESKE S. CRAC channels and disease-From human CRAC channelopathies and animal models to novel drugs[J]. *Cell Calcium*, 2019, 80: 112
- [2] YANG X Y, MA G L, ZHENG S S, et al. Optical control of CRAC channels using photoswitchable azopyrazoles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(20): 9460
- [3] HE L, ZHANG Y W, MA G L, et al. Near-infrared photo-activatable control of Ca^{2+} signaling and optogenetic immunomodulation[J]. *Elife*, 2015, 4: e10024
- [4] MA G L, WEN S F, HE L, et al. Optogenetic toolkit for precise control of calcium signaling[J]. *Cell Calcium*, 2017, 64: 36
- [5] HE L, WANG L Q, ZENG H X, et al. Engineering of a bona fide light-operated calcium channel[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 164
- [6] VIG M, BECK A, BILLINGSLEY J M, et al. CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel[J]. *Current Biology*, 2006, 16(20): 2073
- [7] HOTH M. Calcium and barium permeation through calcium release-activated calcium (CRAC) channels[J]. *Pflügers Archiv*, 1995, 430(3): 315
- [8] JEZIORSKI M C, GREENBERG R M, CLARK K S, et al. Cloning and functional expression of a voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunit from jellyfish[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(35): 22792
- [9] UMEMOTO T, HASHIMOTO M, MATSUMURA T, et al. Ca^{2+} -mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2018, 215(8): 2097
- [10] WEGIERSKI T, KUZNICKI J. Neuronal calcium signaling via store-operated channels in health and disease[J]. *Cell Calcium*, 2018, 74: 102

【责任编辑: 武 佳】