

· 特邀综述 ·

基于光控蛋白质相互作用的光遗传学技术及其应用

黄培元¹, 宋禹桐¹, 张宁¹, 赵志豪², 段丽婷^{1*}

¹香港中文大学生物医学工程系, 香港;

²四川大学华西基础医学与法医学院, 四川 成都 610041

摘要 光遗传学技术是一种新型的生物技术, 融合了光学及遗传学技术, 可以实现光对细胞活动的控制。在光遗传学应用当中, 靶向细胞可用基因来改造和表达光敏蛋白质, 并可被光所调控。光遗传学技术利用光敏离子通道蛋白对特定神经细胞进行精准、快速的光控, 已经掀起了神经科学研究领域的一场革命。除了光敏离子通道之外, 能产生蛋白质相互作用的光敏蛋白也已被广泛应用于光遗传学研究。本文讨论了常见的基于蛋白-蛋白相互作用的光敏蛋白, 然后介绍了基于光控蛋白-蛋白相互作用的光遗传学技术在光控基因表达、相分离、代谢工程和细胞器运输中的应用。

关键词 医用光学; 光遗传学; 蛋白相互作用; 基因表达; 细胞器运输; 相分离; 合成生物学

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207010

Optogenetics Based on Light-Gated Protein-Protein Interactions and Its Applications

Huang Peiyuan¹, Song Yutong¹, Zhang Ning¹, Zhao Zhihao², Duan Liting^{1*}

¹Department of Biomedical Engineering, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China;

²West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract Optogenetics is an emerging technique that exploits light to control cells by combining optics and genetics techniques. In optogenetic systems, cells are genetically modified to express photosensitive proteins and consequently become responsive to light pulses. Optogenetics has revolutionized neuroscience research by facilitating selective and rapid control of targeted neurons expressing light-gated ion channels. In addition to light-gated ion channels, photosensitive proteins based on light-gated protein-protein interactions are widely used in optogenetic research. In this review, we discuss these common photosensitive proteins and summarize optogenetic applications in optical control of gene expression, phase separation, biosynthesis, and organelle distribution based on light-gated protein-protein interactions.

Key words medical optics; optogenetics; protein-protein interaction; gene expression; organelle transport; phase separation; biosynthesis

OCIS codes 000.1430; 170.1420

1 引言

光遗传学技术是近年来在生命科学领域飞速发展的一种新型技术, 它是利用光来远程控制基因改造过的靶向细胞。光信号在时间和空间上能被精确地输送到目标细胞, 因此光遗传学技术可以对

细胞的活动进行精准的时空控制。光遗传学技术的时间准确程度可达到毫秒范围, 在空间上可实现对单一细胞甚至亚细胞范围的精确控制。经过基因改造的靶向细胞会对特定波长的光作出快速应答, 作用明确、副反应少。使用传统的化学小分子配体或拮抗剂往往无法实现对靶向细胞的精准定位, 在时

收稿日期: 2019-10-28; 修回日期: 2019-12-09; 录用日期: 2019-12-24

基金项目: 香港中文大学基金(4055095)、信兴高等工程研究所基金(4720247)、香港优配研究金/杰出青年学者计划(24201919)

* E-mail: ltduan@cuhk.edu.hk

间方面也缺乏精准的控制,因此利用光来控制细胞功能有着传统方法无法比拟的优势。

光遗传学的核心部件是可以响应光信号的光敏蛋白。早期的光遗传学技术,利用的是光敏蛋白离子通道,其已被广泛应用于神经科学领域的研究。在神经细胞上表达的光敏离子通道在接受光刺激后能选择性地让特定离子通过,致使细胞膜两侧的膜电位发生变化,故可以实现对于特定神经细胞的精准激活或者抑制。随着十几年来对光敏蛋白的进一步开发,光遗传学技术的运用更加多样化。其中,基于光响应蛋白-蛋白相互作用的光遗传学技术已经成为许多生命科学领域中重要的研究方法。本文将介绍能在光刺激下发生蛋白-蛋白相互作用的几类常用的光敏蛋白,并讨论基于光控蛋白-蛋白相互作用的光遗传学技术在光控基因表达、相分离、代谢工程和细胞器运输中的应用。

2 基于蛋白-蛋白相互作用的光遗传学工具

光敏蛋白是指接受特定波长的光刺激之后能够改变自身结构的一类蛋白质分子。光敏蛋白存在于自然界多种生物体中,使生物能够对环境光照变化做出反应。有些光敏蛋白接受特定波长的光刺激后,会与另一个蛋白发生异源二聚化(hetero-dimerization)[图 1(a)],而有些光敏蛋白会发生同源二聚化或多聚化(homo-dimerization or homo-oligomerization)[图 1(b)]。这两类光调节的蛋白-蛋白相互作用被广泛用于光遗传技术当中以实现光控各种细胞行为。本研究主要介绍三类广泛使用的光敏蛋白,分别是光敏色素(phytochrome)、隐花色素(cryptochrome)和光-氧-电感应结构域(light-oxygen-voltage-sensing domain)的性质、特点和功能。

2.1 光敏色素(Phytochrome)

光敏色素(Phytochrome, Phy)广泛存在于细菌、蓝藻细菌、真菌及植物中,参与调节对光敏感的生理机制^[1-3]。在光敏色素蛋白已经被鉴定出的 5 个成员(PhyA-E)中,PhyB 在光遗传学研究的应用中最为广泛^[4]。藻青素(phyocyanobilin, PCB)是能与 PhyB 结合的发色团,PhyB 在 PCB 的光异构化诱导下会产生可逆的构象改变。非激发态(Pr)的 PhyB 可以在 650 nm 波长的红光光照下发生构象变化并转换为激发态(Pfr)^[3,5],Pfr 会与其结合蛋白(PIF3 或 PIF6)发生异源二聚化[图 2(a)]。由于 PhyB 的构象变化稳定性较强,因此只需很短的脉

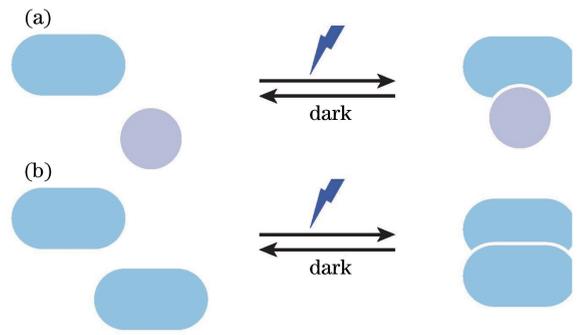


图 1 光遗传技术中常用的两类光信号激发的蛋白-蛋白相互作用。(a)异源二聚化; (b)同源二聚化
Fig. 1 Two types of light-gated protein-protein interaction widely used in optogenetics. (a) Hetero-dimerization; (b) homo-dimerization

冲红光即可使该系统保持长达数个小时的激活状态^[6]。当被远红外光(750 nm)照射时,激发态 Pfr 会吸收一个光子,解除二聚化后回到原始的非激发态 Pr,整个过程耗时只需几毫秒^[6-8]。

2.2 隐花色素(Cryptochrome)

隐花色素(Cryptochrome, CRY)参与植物的生长、发育和开花,以及植物和动物中的生物钟的调节^[9-10]。来源于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的二型隐花色素(Cryptochrome 2, CRY2)在蓝光照射下通过辅助因子黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)的作用,能与其结合蛋白 CIB1(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix)形成异源二聚体复合物[图 2(b)],在黑暗中则逐渐解离^[11-12]。蓝光照射也能同时引起 CRY2-CRY2 自身的多聚化作用[图 2(b)]^[13]。基于 CRY2 蛋白能够同时发生异源二聚和同源多聚的这一特性,研究者们对 CRY2 进行了工程化改造。例如,CRY2 的突变体(CRY2olig^[14], CRY2high^[15], CRY2clust^[15-16])能够显著增强 CRY2 的同源多聚效果,而另一种突变体 CRY2low 的同源多聚反应则被极大抑制^[15]。光诱导的 CRY2 异源二聚化和同源多聚化反应都是可逆的——无光刺激时会逐渐解离,这两个反应都已经被大量应用到对细胞生理过程的光控研究中。

2.3 光-氧-电感应结构域(Light-oxygen-voltage-sensing domain)

光-氧-电感应结构域(Light-oxygen-voltage-sensing domain, LOV)是在植物、藻类和真菌中均广泛存在的一个蛋白感受器。除了参与控制植物的向光性外,LOV 结构域在应激反应的调节中也起到重要作用^[17-18]。LOV 结构域带有 PAS(PER-

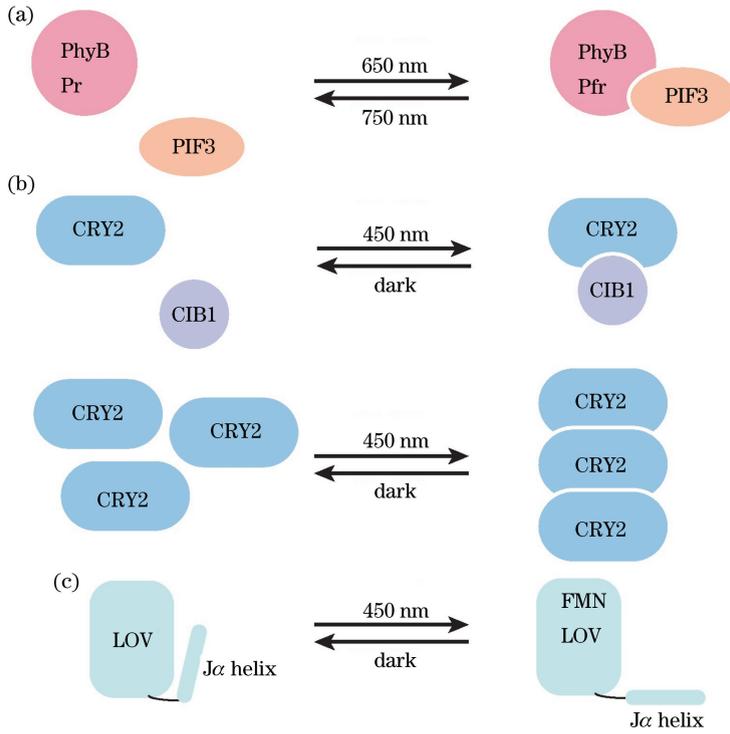


图 2 不同光敏蛋白的光诱导构象变化示意图

Fig. 2 Scheme of light-induced conformational change in various photoactivatable proteins

ARNT-SIM)核心结构域,能够与发色团黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)相结合。如图2(c)所示,在蓝光照射时,FMN与LOV结构域结合,导致LOV结构域C端的J α 螺旋(J α Helix)摆动离开LOV核心域。光照停止,FMN解离,LOV结构域回到基态^[19]。这种依赖于光的构象变化发生得非常快,最短只需几毫秒^[20]。通过对LOV结构域序列的工程改造,研究者们基于LOV结构域结合动力学设计了具有不同结合亲和力的光遗传学工具^[20-22]。这些能够发生自身同源二聚化^[23-24]或异源二聚化^[25-26]的LOV结构域已经在各种光遗传学技术的应用中广泛使用。

2.4 基于不同光敏蛋白优缺点的比较

光敏蛋白是光遗传学技术及其应用的核心。现有常见的几类光敏蛋白各有优缺点。PhyB的优势在于其激活光是红光,红光对细胞的毒性较小,可以更有效地穿透组织;但动物细胞缺少PhyB作用所需要的辅助因子PCB,因此在动物细胞内使用PhyB需添加外源性PCB或是额外地在动物细胞内合成^[27]。此外,PhyB蛋白分子(908个氨基酸)相对较大,可能会影响到融合蛋白的功能。相比之下,CRY2分子量稍小(498个氨基酸),所需的辅助因子FAD存在于大多数动物细胞中,不需要额外添加辅助因子。但CRY2激活所需要的蓝光对细胞

有一定的毒性,且组织穿透性较弱。此外,CRY2独特之处在于该光敏蛋白可以同时两种不同的蛋白-蛋白相互作用:同源多聚化和异源二聚化。因此,如果某些光遗传学应用需要同时使用这两类相互作用,那么CRY2是最佳的选择。从另外一方面来看,该独特之处又会变成劣势:如果某些光遗传学应用只需要异源二聚化反应,那么CRY2同时进行的同源多聚化反应可能会引入副作用,影响最后结果。同时,CRY2的同源多聚化产生的多聚体的分子量又难以保持一致,因此可能导致CRY2的使用变得复杂。LOV结构域由于其自身的光诱导构象变化较为独特,单个LOV结构域既可联合其他功能蛋白完成光制动(photocaging),也可以通过改造产生同源二聚化。每种光敏蛋白的性质和优缺点各不相同。不同的光遗传学应用需要不同的光响应行为,例如有些应用需要快速的启动和关闭以实现很高的时间精准度,有些应用需要在细胞局部实现很高的空间精准度,而有些应用则同时需要很强的同源和异源二聚化反应。我们将在下文讨论使用了不同光敏蛋白的光遗传学技术应用。

3 基于蛋白-蛋白相互作用的光遗传学应用

本章节主要介绍基于光控蛋白-蛋白相互作用

的光遗传学在光控基因表达、相分离、代谢工程和细胞器运输中的应用。光遗传学技术也被广泛应用于调控细胞内的各种信号通路^[28-32],但该领域的应用

已有其他综述详细描述,因此不在此综述中赘述。表 1 列出了现有的主要的光遗传学应用系统及其重要的光学参数。

表 1 光遗传学系统的主要光照参数

Table 1 Major parameters in optogenetics systems

Optogenetic system	Wavelength	Intensity	Light source	Illumination time	Reference
PhyB-PIF3	664 nm (ON), 748 nm (OFF)	N/A	LED array	5, 10, 30 min	Ref. [7]
CRY2	488 nm	25 μW 1 cm from object	AOTF laser	15, 1 h, >4 h	Ref. [12]
VVD (LOV)	460 nm	0.84 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$	LED lamp	Patterned illumination for 24 h	Ref. [33]
LOV-ePDZ	465 nm	0.005 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	Blue AlGaInP LEDs	1 s	Ref. [26]
IDR-CRY2	488 nm	0.02 μW , 0.06 μW , 1.5 μW	Nikon A1 laser	1 s	Ref. [34]
IDR-iLid-SspB	488 nm	84 $\mu\text{W}\cdot\mu\text{m}^{-2}$	Nikon A1 laser	2.2 s	Ref. [35]
iLid-SspB	488 nm	0.1 μW	Nikon A1 laser	1 s	Ref. [36]
LOV2-V19L	465 nm	53, 82 or 134 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	LED panel	8 h full light, or light pulses of 10 s on and 70 s off	Ref. [37]
CRY2	450nm	73 to 82 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	LED panel	5 min	Ref. [38]
CcaSR-pgi	520 nm (ON), 650 nm (OFF)	14.52 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ 15.21 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$	LED	Continuous up to 10 h	Ref. [39]
CRY2-CIB1	488 nm	9.7 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$	LED, Leica DMI6000B microscope	200 ms pulse duration per 10 s	Ref. [40]
LOV-ePDZ	488 nm	10 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$	Nikon Eclipse TE2000E	100-150 ms	Ref. [41]

3.1 基因表达

基因表达包括转录和翻译两个阶段。转录是指一段特定序列的 DNA 被 RNA 聚合酶复制为 mRNA (Messenger RNA, 信使 RNA) 的过程;翻译是指细胞内核糖体以 mRNA 为模板,根据遗传密码的中心法则,生成对应的氨基酸序列、合成多肽链的过程,多肽链最终被折叠为细胞内的功能蛋白质。转录因子是指能够结合在某一段基因上游特异核苷酸序列上的蛋白质,这些蛋白质能够通过调控 RNA 聚合酶与 DNA 模板的结合对基因表达进行调控。在转录因子

结构中,DNA 结合域(DNA-binding domain, DBD)负责识别并结合特定基因上游的 DNA 序列;激活域(activation domain, AD)负责与其他蛋白质作用,激活 RNA 聚合酶,启动转录。启动子(promoter)是由 RNA 聚合酶识别、结合的一段 DNA 序列。

长期以来,科研人员主要用一些化学分子对基因表达进行调控,但化学分子的毒性、非特异性、难以实现时空调控等特点限制了其应用。光具有毒性低、易操纵、高时空分辨率等特点,因此光遗传学工具被广泛用于精确调控基因表达^[42-43]。图 3 展示的

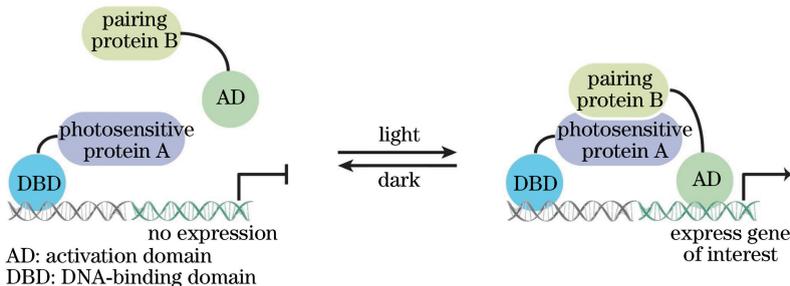


图 3 光控蛋白-蛋白相互作用激活基因表达

Fig. 3 Light-gated protein-protein interaction activates gene expression

是常用的光控基因表达方式,其中利用了光控异源二聚化反应。为了方便描述,将进行异源二聚化的光敏蛋白之一称作 A,光敏蛋白的结合蛋白称作 B。光控基因表达体系中,光敏蛋白 A 融合了 DBD,可以通过识别 DNA 上位于启动子附近的特定序列而与 DNA 分子结合;结合蛋白 B 则与 AD 融合。在特定波长的光照下,光敏蛋白 A 被激发从而改变形态,使其能够与蛋白 B 相结合,从而将 DNA 激活域招募到启动子附近,启动目的基因的转录和表达。A 与 B 的结合是可逆的,因此,无光照刺激时 A-B 复合物解离,基因表达即停止。

Quail 研究组首先在酵母中使用 PhyB-PIF3 这一对光敏蛋白进行光控基因表达的研究^[7]。他们设计了两个融合蛋白,分别把 PhyB 与酵母 Gal4 蛋白的 DNA 结合域相连(PhyB-Gal4DBD),PIF3 与 Gal4 蛋白的 DNA 激活域相连(PIF3-Gal4AD),LacZ 蛋白作为报告蛋白,其 DNA 序列置于启动子之后。在包含 PCB 的培养介质中,无光照条件下 LacZ 蛋白几乎没有表达,而红光光照后其表达量达到原来的 1000 倍。远红外光使这两个融合蛋白解离,停止基因表达。PhyB-PIF 系统随后被 Voigt 研究组应用在哺乳动物细胞内调控基因表达^[8]。Weber 实验室也用 PhyB-PIF6 光遗传系统控制哺乳动物细胞中的基因转录^[6],他们的研究表明,报告蛋白在光照组细胞内的表达量相对于未光照的细胞提高了 65 倍,且蛋白表达量与 PCB 的浓度或光照强度呈现相关性。CRY2-CIB1 这一对光敏蛋白也同样被用于光控基因表达。类似于 PhyB-PIF 系统,Kennedy 等^[12]通过将 CRY2-CIB1 分别与 Gal4 蛋白的 DNA 结合域和激活域融合,在蓝光照射 4 h 后得到了报告基因 Sn11 蛋白的强表达。Liu 等^[44]也使用 CRY2-CIB1 和 Gal4 构建的系统在斑马鱼胚胎中实现了光控基因表达。Wang 等^[33]利用 LOV domain 构建了名为 LightOn 的光控基因表达系统。受到蓝光刺激后,LightOn 触发的报告基因表达量增加了 200~300 倍。随后研究人员在小鼠体内验证了 LightOn 系统,将基因表达载体注射到小鼠肝脏中并观察到了光照激活的 mCherry 荧光蛋白表达,但由于蓝光的组织穿透能力有限,可观测的 mCherry 荧光仅限于距离表皮以下 1 mm 的范围内^[33]。Strickland 等^[26]基于光照下 LOV 结构域的异源二聚化创建了类似的策略并命名为 TULIP (tunable light-inducible dimerization tags,可调光控制的相互作用蛋白)。TULIP 系统在蓝光刺激下

发生异源二聚化,从而引发酵母中 β -半乳糖苷酶报告基因的表达增加 5 倍。

研究人员也通过设计光调控的 DNA 编辑和重组来调控基因表达水平。Polstein 和 Gersbach^[45]提出了一种基于 CRISPR-Cas9 的光控基因编辑系统(light-activated CRISPR-Cas9 effector)。该系统包含融合了 CRY2 的激活结构域与融合了 CIB1 的 dCas9 蛋白。蓝光光照后仅 2 h 内,mRNA 转录水平显著增加了 11 倍;在 30 h 光照内最大增加了约 400 倍。

3.2 细胞内相分离

光遗传学技术、用光控制细胞内相分离(phase separation)的方法在近几年被开发出来。活细胞可以将特定的生物分子划分到不同区室,使生化反应相对独立、高效、有序地进行。一部分区室被生物膜包被,另外还有大量的无膜区室,其中包括秀丽隐杆线虫(*caenorhabditis elegans*)生殖细胞的 P 颗粒、参与应激反应的应激颗粒、参与自噬活动的 p62 颗粒等,他们被称为“生物分子凝集体”。由于这些区室具有无膜的特性,他们可与外部进行快速的分子交换并在细胞内信号的传导中起重要作用。因此生物分子凝集体的形成过程、物理性质、化学性质及细胞功能已成为生物学及其交叉领域的研究热点。2009 年,普林斯顿大学的学者 Brangwynne 和 Hyman 发表了关于线虫中 P 颗粒的研究^[46],证明 P 颗粒实际上是由“液-液相分离”现象形成的蛋白质聚集体,也就是生物分子凝集体。随后科学家们逐渐发现大多生物分子凝集体,例如核仁、应激颗粒等,均由“液-液相分离”形成。这种相互作用通常由蛋白的固有无序区域(intrinsically disordered regions, IDR)的多聚化作用驱使。利用光遗传学工具对细胞内相分离过程进行精准操控,有助于研究人员加深对细胞内相分离具体机制和调控过程的理解。

2017 年,Shin 等通过 IDR-CRY2 融合蛋白在蓝光光照下引发 CRY2 多聚体的形成,构建了一套光控系统来控制细胞内的相分离过程^[34]。该方法可实现对细胞内相分离的可逆控制,并可以在细胞局部激活相分离过程。为优化光控相分离,该研究团队先后开发了 Corelets^[35]和 CasDrop^[36]两种光控系统,成功利用光遗传学工具精确探测到细胞内的相分离过程及其对染色体的影响。如图 4 所示,Corelets 系统由基于 AsLOV2 (*Avena sativa* LOV2)改进后的光诱导二聚体工程蛋白(improved light induced-dimer, iLID)及其同源结合蛋白 sspB

(stringent starvation protein B) 构建。Corelets 系统由两部分组成:iLID-GFP-FTH1 融合了 iLID、绿色荧光蛋白 GFP 和铁蛋白重链 (ferritin heavy chain, FTH1);IDR-mCherry-sspB 融合了 sspB、红色荧光蛋白 mCherry 和 IDR。首先,24 个 FTH1 自组装成直径为 12 nm 的球状颗粒铁蛋白核心;随后,通过 iLID 与 sspB 在蓝光光照下的结合作用,至多 24 个 IDR 可以被募集到铁蛋白核心。IDR 通过多聚化作用形成了细胞内的相分离。光照下快速响应、可量化的 Corelets 系统被用于研究细胞内相分离的起始

阈值蛋白浓度和转化机制。同样基于 iLID-sspB 结合的 CasDrop 系统则是将光遗传学工具和已经成熟的 CRISPR-Cas9 基因编辑技术的结合,使 IDR 在染色质局部特定的靶基因位点发生多聚,诱导局部相分离的形成。由于相分离过程通过机械力作用在局部拉扯并重塑了染色体结构,基于光遗传学工具的 CasDrop 系统为调控基因表达提供了新的思路。光遗传学技术以光为刺激媒介,可以实现对细胞活动精确的时空调控,具有控制灵敏、靶向明确等优势,在相分离研究领域表现出巨大的应用潜力。

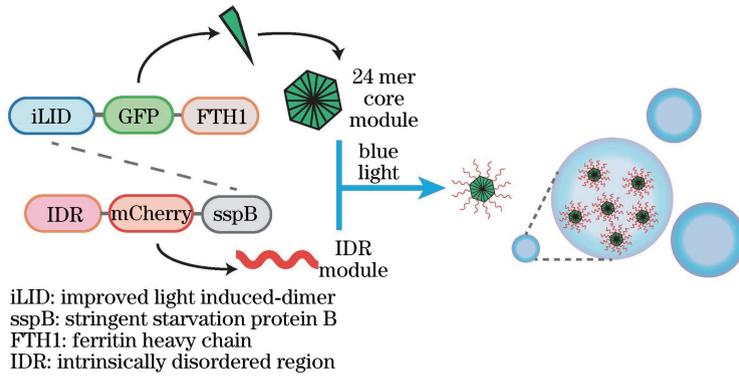


图 4 Corelets 系统示意图。Corelets 系统包括两个模块:第一个是 GFP 标记的 24 个可光激活的 iLID 连接组成的铁蛋白核心;第二个是带有 mCherry 的结合蛋白 SspB,并与固有无序蛋白区域 IDR 缀合。虚线表示光诱导异源二聚体单元
 Fig. 4 Schematic diagram of the Corelets system. Corelets system consists of two modules: a GFP-tagged ferritin core functionalized by 24 photoactivatable iLID domains and iLID's cognate partner, sspB, mCherry-tagged and conjugated to IDR. Dashed lines designate light-inducible hetero-dimerizing units

3.3 代谢工程

光遗传学最近也开始被应用于代谢工程领域。代谢工程 (metabolic engineering) 利用基因工程技术对微生物细胞内的生化代谢途径进行修饰、改造和调控,从而实现从廉价原料到目标化学品的生物合成。这种生物合成方法相对于化学合成而言是一种更加经济、环保和可靠的工业生产方法。目前已经有大量的产品可通过微生物工业发酵的方式获得,包括精细生化制品(氨基酸、维生素、抗生素等)、药物前体(青蒿素、鸦片类药物等)、生物燃料(乙醇、异丁醇等)和高分子聚合物(多聚乳酸、聚羟基脂肪酸酯等)。因此,代谢工程领域的进步极大地推动了工业经济的发展。从工业原料到目标产品的生物合成一般都经历数十步的酶促生化反应,因此研究人员往往通过引入、敲除或调控酶基因来实现对细胞内代谢网络的调控,这也构成了代谢工程研究领域的一个主要分支。现有的基因编辑策略大致可以分为以下几类:通过酶蛋白的优化和过表达来提高关键反应节点的酶活性;通过抑制基因表达或敲除特定基因来抑制生成副产物的代谢途径;通过提高转

运蛋白载体的运输效率来加快代谢反应过程等。

近几年来,光遗传学开始被应用于调控酶蛋白的基因表达并优化细胞内的代谢通路。相较于传统的小分子化学信号,光信号的引入和移除更为简单易行,不需要更换介质或反应条件。2018 年,来自普林斯顿大学的学者 Zhao 等^[37]设计了一个基于 LOV 结构域的光控“代谢阀”以调控酶蛋白的基因表达,其基本原理与 3.1 节中所介绍的相同:研究人员在波长为 450 nm 的蓝光光照条件下,激活酵母细胞中丙酮酸脱羧酶的表达,使酵母细胞在光照条件下快速生长并产生乙醇;而在黑暗条件下的发酵过程中,研究人员观察到酵母细胞停止生长,丙酮酸被转化为异丁醇等产物。这一基于光遗传学蛋白的“代谢阀”有效提高了目标产物的产量。作者的数据表明,光遗传学蛋白“代谢阀”调控的葡萄糖发酵可以产生 $8.49 \pm 0.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 异丁醇和 $2.38 \pm 0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2-甲基-1-丁醇,分别达到了现有文献报道最高产值的 5 倍和 20 倍。通过周期性的光信号调节,作者在发酵的不同阶段实现了对酶蛋白转录表达水平的精准控制,进一步提高了生物燃料产

品在发酵过程中的产量。

光遗传学还可以用于微生物代谢网络中创建一个可调控的通路导向系统。Zhao 等^[38]也报道了一套光遗传学工具用于精准控制酶的动态聚集和解散,用光诱导酶蛋白聚集从而提升目标产物的产量。作者选用脱氧紫色杆菌素(deoxyviolacein)的代谢途径作为生物合成模型,如图 5 所示,在 450 nm 波长的蓝光光照条件下,利用光遗传学蛋白的多聚化反应触发了活性酶蛋白簇的聚集。由于在酶蛋白聚集体内,酶蛋白的局部浓度大大提高,而中间代谢物浓度和其他竞争代谢通路的通量都较为下降,因此动态光调控的主要代谢通路不仅获得了 6 倍的目标产物产量,其特异选择性也得到了极大的提升。Tandar 等^[39]报道了在大肠杆菌中通过光遗传学工具实现 EMP 和 oxPP 两种糖酵解代谢通路的切换。作者构建了通过绿光或红光分别激活或抑制基因表达的 CcaSR-pgi 系统,在 520 nm 波长绿光光照下,两者糖酵解代谢通量的比例为 $\Phi(\text{EMP}) : \Phi(\text{oxPP}) = 50 : 49$,而在 650 nm 波长的红光照射下,这一比例切换为 $\Phi(\text{EMP}) : \Phi(\text{oxPP}) = 0.5 : 99$ 。这些研究结果表明,光遗传学工具的介入能够对微生物细胞内生物合成的代谢通路进行优化,在代谢工程领域具有潜在的应用价值。

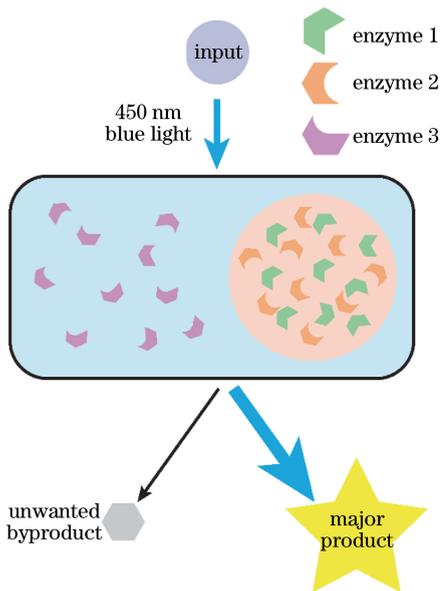


图 5 光触发活性酶蛋白簇聚集。代谢通路导向主要产物,副产物的生成被抑制

Fig. 5 Gather of light-induced active enzyme protein clusters, in which the input is shunted toward major product, and the production of unwanted byproduct is suppressed

3.4 细胞器运输与分子马达行为

在真核细胞中,细胞器作为细胞内重要的功能单位,其定位和分布对于细胞极化、信号传输、存活与凋亡等都有着重大的影响。例如在神经元细胞内,线粒体的定位可以影响突触功能和轴突的分支^[47],高尔基体的定位被认为可以控制树突的发育^[48-49],而胞内体的特定定位则被认为能够帮助神经元细胞的极化和局部生长^[48]。为了让细胞器能够在正确的时间到达正确的位置从而发挥其功能,细胞内部通过一套运输系统将细胞器移动至细胞的各个角落。该系统的基本机制是将细胞骨架作为“轨道”,将分子马达(molecular motor)作为连接细胞器与骨架的“牵引车”,从而达到控制细胞器的运输和定位之目的。细胞器可通过基于双向微管的交通系统主动运输到适当的位置。两个用于输送货物的主要分子马达分别为动力蛋白(dynein)和驱动蛋白(kinesin)。动力蛋白走向微管的负端,从而将货物运送到细胞核附近。与之相反,驱动蛋白走向微管的正端并将货物带到细胞边缘。虽然对于细胞器运输的工作原理以及对于细胞器定位与细胞活动的关联性已有广泛而深入的研究,然而了解特定细胞器时空上的分布的作用仍然具有挑战性。以往的研究使用药物干扰细胞骨架的元件和抑制分子马达来改变细胞器定位,但是这些方法通常缺乏受体的选择性以及空间特异性。而运用雷帕霉素(rapamycin)作为链接分子的 FKBP-FRB 二聚化系统,虽可以有选择性地活细胞中控制细胞器分布^[50],但对于化学辅助因子的依赖以及其不可逆性仍然会限制其运用。具有精确时空调控能力的光敏蛋白二聚化体系是用于精确控制细胞器运输的新工具。

通过光敏蛋白的异源二聚化,特定的分子马达蛋白可以被募集并连接到选定的细胞器上,从而实现对细胞器运输的控制。如图 6 所示,mCherry 荧光蛋白标记的光敏蛋白 A 融合了细胞器膜结合蛋白,与细胞器结合;GFP 标记的光敏蛋白 B 融合了分子马达,在细胞骨架上运动。当 A 与 B 的异源二聚化被特定波长的光信号激发时,细胞器与分子马达相连,在分子马达的牵引下沿细胞骨架向特定方向移动。光信号移除后,A 与 B 的异源二聚体分离,细胞器脱离分子马达。

大多数已有的光遗传工具都可被用于这个可逆的、作用于特定范围的控制体系的构建。Duan 等^[40]把 CRY2 连接在线粒体、过氧化物酶体或溶酶

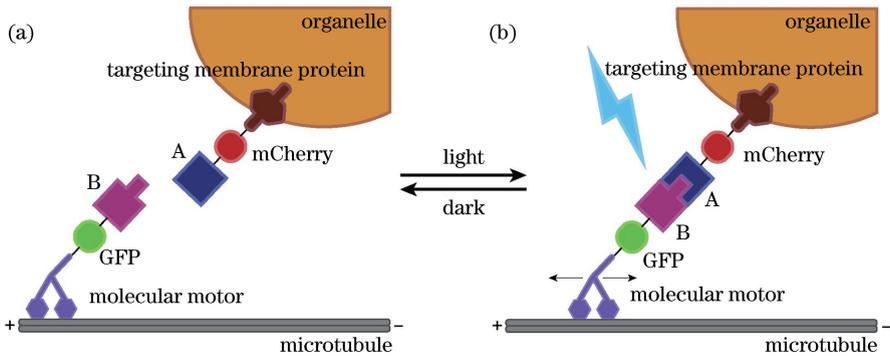


图 6 使用光遗传学工具控制细胞器运输与分子马达行为的基本机制

Fig. 6 Basic mechanism optogenetic control of organelle transport and molecular motors

体上；CIB1 则与 KIF5A (Kinesin heavy chain isoform 5A, 驱动蛋白重链 5A 亚型) 或与 BICDN (N terminus of Protein bicaudal D, 动力蛋白双锥蛋白 D 的 N 端) 相融合。在蓝光信号的刺激下, CRY2 与 CIB1 发生异源二聚化, 分子马达被召集至细胞器, 并开始引导细胞器向微管正端(细胞边缘方向)或负端(细胞核方向)运动。该方法可实现空间上的控制: 只有受到蓝光照射的范围内的细胞器发生了明显的分布变化。同时, 该方法是可逆的, 停止光照后, 线粒体在 3 h 内逐渐恢复了蓝光激发前的分布位置。van Bergeijk 等^[41]使用 LOV 结构域二聚体, 在不影响其他细胞器的分布的情况下控制了过氧化物酶体在细胞内的定向运输, 并展示了在海马体神经元细胞中光控 Rab-11 (Ras-related protein Rab-11A) 的运输和定位可以增强或抑制轴突生长锥生长这一现象。Harterink 等^[51]把这个系统应用在秀丽隐杆线虫(*caenorhabditis elegans*)中实现了各种细胞器的运输。这些研究证明了使用光遗传学工具在活体内控制细胞器运输的可行性。

4 结束语

基于蛋白-蛋白分子相互作用的光遗传学是一个正在快速兴起、蓬勃发展的领域。这类工具已经广泛应用于光调控细胞内信号通路和基因表达的研究当中。近几年来, 光控的方法已被应用到更多新的研究方向, 包括本文中讨论的相分离和代谢工程等。优化和改进现在已有的光敏蛋白的性能也是光遗传学领域的重要课题之一。我们相信, 新的光敏蛋白会被开发出来, 已有的光敏蛋白会被逐渐优化, 基于蛋白相互作用的光遗传学会被应用到越来越多的领域中。

光源波长、强度和照射时间等参数是在选择光遗传学系统作为研究工具时必须考虑的内容。目前

使用较多的光遗传学蛋白, 其激发光大多是蓝光(例如 CRY2 和 LOV 结构域), 而蓝光作为短波长光源面临着穿透能力受限的问题。为了突破此局限, Chen 等^[52]创新性地使用上转换纳米粒子(upconversion nanoparticle)将长波长的近红外光转化为短波长的蓝光, 把近红外光的深穿透力和蓝光光敏蛋白结合, 实现了深层组织的光学激活。因为长时间、大功率的光照可能会给细胞带来光毒性(phototoxicity), 研究人员一般通过调整光照时间、设置光照间隔等方法尽量消除光照对细胞的影响。光敏蛋白及其融合蛋白基本都是作为外源性蛋白引入细胞内, 但目前尚无报告明确指出外源性光敏蛋白对细胞活性有明显影响。此外, 表达了光敏蛋白的部分细胞在无光照条件下可能被背景激活, 这通常可以在对照组实验中得以验证。

近年来, 光遗传学工具已经被广泛用于以酵母细胞和哺乳动物细胞模型为主的生命科学研究中, 但仍有许多机制、功能各异的信号通路和细胞行为可成为光遗传学工具的调控对象。我们相信, 光敏蛋白将会被进一步用于动物、微生物甚至植物模型中, 通过与光学、生物物理和计算生物学的交叉, 将成为研究基本生命活动的有力工具。部分光敏蛋白在细胞外环境下仍保持着光敏特性, 能有效地进行蛋白间的相互作用。因此, 一方面, 光遗传技术有望促进体外蛋白质相互作用的研究, 另一方面, 光遗传学工具有很大潜力与材料工程结合, 将成为研发新型生物材料的重要组成部分。

引人注目的是, 光遗传学不仅被应用于基础领域研究, 亦正在成为潜在的生物医学新工具。例如, 人类临床试验已经开始运用光遗传疗法, 通过表达光控离子通道, 为非光感性的视网膜细胞赋予光感能力, 从而使失明的眼球恢复视力。再如, 全新的光辅助药物筛选平台利用光遗传学方法来筛选药物,

与传统的筛选方法相比,所需的操作步骤、原料成本和潜在错误更少,并有更高的通量。在医药行业中,拜耳公司已率先尝试此新型光遗传学辅助的药物筛选平台,启动了对其药物库中的数以百万计的化学成分筛选。我们相信,光遗传学除了会在各个基础研究领域当中大放异彩之外,还会应用到越来越多的临床和生物医药领域。

参 考 文 献

- [1] Davis S J, Vener A V, Vierstra R D. Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria [J]. *Science*, 1999, 286(5449): 2517-2520.
- [2] Auldrige M E, Forest K T. Bacterial phytochromes: more than meets the light[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 46(1): 67-88.
- [3] Rockwell N C, Su Y S, Lagarias J C. Phytochrome structure and signaling mechanisms [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 837-858.
- [4] Sharrock R A, Quail P H. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family [J]. *Genes & Development*, 1989, 3(11): 1745-1757.
- [5] Wagner J R, Brunzelle J S, Forest K T, et al. A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome [J]. *Nature*, 2005, 438(7066): 325-331.
- [6] Müller K, Engesser R, Metzger S, et al. A red/far-red light-responsive bi-stable toggle switch to control gene expression in mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): e77.
- [7] Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman J M, et al. A light-switchable gene promoter system [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(10): 1041-1044.
- [8] Levskaya A, Weiner O D, Lim W A, et al. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction[J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 997-1001.
- [9] Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors [J]. *Chemical Reviews*, 2003, 103(6): 2203-2238.
- [10] Lin C T, Todo T. The cryptochromes [J]. *Genome Biology*, 2005, 6(5): 220.
- [11] Liu H, Yu X, Li K, et al. Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2008, 322(5907): 1535-1539.
- [12] Kennedy M J, Hughes R M, Peteya L A, et al. Rapid blue-light: mediated induction of protein interactions in living cells [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(12): 973-975.
- [13] Che D L, Duan L, Zhang K, et al. The dual characteristics of light-induced cryptochrome 2, homo-oligomerization and heterodimerization, for optogenetic manipulation in mammalian cells [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(10): 1124-1135.
- [14] Taslimi A, Vrana J D, Chen D, et al. An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4925.
- [15] Duan L T, Hope J, Ong Q, et al. Understanding CRY2 interactions for optical control of intracellular signaling [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 547.
- [16] Park H, Kim N Y, Lee S, et al. Optogenetic protein clustering through fluorescent protein tagging and extension of CRY2 [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 30.
- [17] Liscum E, Briggs W R. Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis disrupt* the perception of phototropic stimuli [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(4): 473-485.
- [18] Christie J M, Swartz T E, Bogomolni R A, et al. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function [J]. *The Plant Journal: for Cell And Molecular Biology*, 2002, 32(2): 205-219.
- [19] Woolley G A. Designing chimeric LOV photoswitches [J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(4): 441-442.
- [20] Zoltowski B D, Vaccaro B, Crane B R. Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor [J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(11): 827-834.
- [21] Nash A I, Ko W H, Harper S M, et al. A conserved glutamine plays a central role in LOV domain signal transmission and its duration [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(52): 13842-13849.
- [22] Song S H, Freddolino P L, Nash A I, et al. Modulating LOV domain photodynamics with a residue alteration outside the chromophore binding site [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(13): 2411-2423.
- [23] Kawano F, Suzuki H, Furuya A, et al. Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6256.
- [24] Pudasaini A, El-Arab K K, Zoltowski B D. LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2015, 2:

- 18.
- [25] Guntas G, Hallett R A, Zimmerman S P, et al. Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(1): 112-117.
- [26] Strickland D, Lin Y, Wagner E, et al. TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology[J]. Nature Methods, 2012, 9(4): 379-384.
- [27] Uda Y, Goto Y, Oda S, et al. Efficient synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells for optogenetic control of cell signaling [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(45): 11962-11967.
- [28] Zhang K, Cui B X. Optogenetic control of intracellular signaling pathways [J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(2): 92-100.
- [29] Leopold A V, Chernov K G, Verkhusha V V. Optogenetically controlled protein kinases for regulation of cellular signaling[J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(7): 2454-2484.
- [30] Tischer D, Weiner O D. Illuminating cell signalling with optogenetic tools[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(8): 551-558.
- [31] Repina N A, Rosenbloom A, Mukherjee A, et al. At light speed: advances in optogenetic systems for regulating cell signaling and behavior [J]. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2017, 8(1): 13-39.
- [32] Nan D, Xu Y K. Studies of optogenetic control of intracellular signaling pathways[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2015, 37(11): 1560-1565.
南迪, 许迎科. 光遗传学技术用于调控细胞信号通路的研究 [J]. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(11): 1560-1565.
- [33] Wang X, Chen X J, Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system[J]. Nature Methods, 2012, 9(3): 266-269.
- [34] Shin Y, Berry J, Pannucci N, et al. Spatiotemporal control of intracellular phase transitions using light-activated optoDroplets [J]. Cell, 2017, 168(1/2): 159-171.
- [35] Bracha D, Walls M T, Wei M T, et al. Mapping local and global liquid phase behavior in living cells using photo-oligomerizable seeds[J]. Cell, 2019, 176(6): 407.
- [36] Shin Y, Chang Y C, Lee D S W, et al. Liquid nuclear condensates mechanically sense and restructure the genome [J]. Cell, 2019, 176(6): 1518.
- [37] Zhao E M, Zhang Y F, Mehl J, et al. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production[J]. Nature, 2018, 555(7698): 683-687.
- [38] Zhao E M, Suek N, Wilson M Z, et al. Light-based control of metabolic flux through assembly of synthetic organelles [J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(6): 589-597.
- [39] Tandar S T, Senoo S, Toya Y, et al. Optogenetic switch for controlling the central metabolic flux of *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2019, 55: 68-75.
- [40] Duan L T, Che D, Zhang K, et al. Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells [J]. Chemistry & Biology, 2015, 22(5): 671-682.
- [41] van Bergeijk P, Adrian M, Hoogenraad C C, et al. Optogenetic control of organelle transport and positioning[J]. Nature, 2015, 518(7537): 111-114.
- [42] Shao J W, Zhu S C, Yu Y H, et al. Synthetic optogenetic devices for biomedical applications [J]. Scientia Sinica(Vitae), 2017, 47(5): 531-543.
邵佳伟, 朱苏承, 于袁欢, 等. 光遗传学装置在生物医学领域中的应用研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(5): 531-543.
- [43] Chen X J, Zuo F T, Yang Y. Light-regulated gene expression systems [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2019, 31(4): 343-356.
陈显军, 左方婷, 杨弋. 光控基因表达系统 [J]. 生命科学, 2019, 31(4): 343-356.
- [44] Liu H T, Gomez G, Lin S, et al. Optogenetic control of transcription in zebrafish [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50738.
- [45] Polstein L R, Gersbach C A. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation[J]. Nature Chemical Biology, 2015, 11(3): 198-200.
- [46] Brangwynne C P, Eckmann C R, Courson D S, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation [J]. Science, 2009, 324(5935): 1729-1732.
- [47] Spillane M, Ketschek A, Merianda T T, et al. Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis [J]. Cell Reports, 2013, 5(6): 1564-1575.
- [48] Golachowska M R, Hoekstra D, van IJzendoorn S C D. Recycling endosomes in apical plasma membrane domain formation and epithelial cell polarity [J]. Trends in Cell Biology, 2010, 20(10): 618-626.
- [49] Ori-Mckenney K M, Jan L Y, Jan Y N. Golgi

- outposts shape dendrite morphology by functioning as sites of acentrosomal microtubule nucleation in neurons[J]. *Neuron*, 2012, 76(5): 921-930.
- [50] Kapitein L C, Schlager M A, van der Zwan W A, et al. Probing intracellular motor protein activity using an inducible cargo trafficking assay [J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99(7): 2143-2152.
- [51] Harterink M, van Bergeijk P, Allier C, et al. Light-controlled intracellular transport in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Current Biology*, 2016, 26(4): R153-R154.
- [52] Chen S, Weitemier A Z, Zeng X, et al. Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics [J]. *Science*, 2018, 359(6376): 679-684.