

doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2019.02.090

藻类光遗传学的研究进展

任庆敏, 王寅初

(中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003)

摘要 光遗传学作为一种新型技术有助于在神经科学等方面的深入研究, 该技术源自对藻类光受体的研究, 且至今仍然不断地从藻类中得到新的光遗传学工具。因此, 藻类的光遗传学的深入研究具有重要价值。藻类中发现的光敏感通道蛋白等是对光高度敏感的光受体, 能在不到一秒的时间内对不同的光做出响应从而改变其构象, 进而诱导生理和行为反应。介绍了藻类的感光系统和光敏感蛋白等的分类和功能, 综述了藻类光受体在体内的功能以及其在光遗传方面的应用和相关研究进展, 以便为以后藻类光遗传的进一步研究提供参考。

关键词 藻类光生物; 光遗传学; 光受体; 光敏感通道蛋白

中图分类号 Q178.53

文献标识码 A

文章编号 2095-1736(2019)02-0090-04

Research advances in algal optogenetics

REN Qing-min, WANG Yin-chu

(Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract Studying of algal optogenetics makes a difference for that optogenetics, as a original technology, can help in the research of neuroscience and so on. The optogenetics is derived from the study of algal photoreceptors and continues to obtain new optogenetic tools from algae. Highly sensitive photoreceptors include channelrhodopsin in algae can change their conformation in response to different light qualities on a subsecond time scale and induce physiological and behavioral responses. This paper reviewed the research progress of classification and functions of algal photoreceptor proteins, as well as *in vivo* functions of algal photoreceptors and the applications, it is expected to give some references for who will devote to the further study.

Keywords algal photobiology; optogenetics; photoreceptors; channel rhodopsin

藻类是光合自养的低等生物, 能感知自然界中光质、光强和光照方向的变化。藻类通过复杂的光感知系统感知环境中光的变化, 从而适应性地改变其生理和发育过程。藻类具有多种类型的光受体, 使得它们能够调节各种光依赖性的细胞和生理过程从而改变它们的行为。此外, 波长或光谱组成的变化也能够调节其发育和生理过程, 例如昼夜节律。因此, 对潜在的趋光和避光反应的机制以及其他光依赖性的过程的深入探索有助于藻类光生物学的发展。

经过一个多世纪的研究, 已经基本了解藻类在生理、生物物理和形态学方面对光的响应过程。然而, 直到 21 世纪初, 随着基因组和转录组测序技术的迅速发

展, 才发现光介导的行为反应中的关键蛋白。光敏感通道蛋白-1 (Channelrhodopsin-1, ChR1) 和光敏感通道蛋白-2 (Channelrhodopsin-2, ChR2), 这两种从莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 中发现的视紫红质光受体, 参与了单细胞绿藻的光感知和光诱导运动^[1-4]。经蓝光照射后的光门控离子通道能够使细胞去极化^[1-2]。之后, 新的光敏感通道蛋白的发现和新的修饰变体的设计促使该领域迅速扩大, 为在时间和空间上精确地控制细胞信号传导提供了一个良好的基础。

光遗传学领域的快速发展使光敏感结构域的需求日益增加, 比如开发具有其他吸收光谱和新的光电性质的结构域, 以应用于光遗传学和合成生物学。目前

收稿日期: 2018-04-19; 修回日期: 2018-08-20

基金项目: 国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作”重点专项(2016YFE0106700); 中国科学院与俄乌白等国科技合作专项(1753); 中国科学院国际人才计划(2017VBB0017)

作者简介: 任庆敏, 硕士, 主要从事微藻研究, E-mail: hitqmren@163.com

通信作者: 王寅初, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为海岸带生物进化和生物资源多样性利用, E-mail: ycwang@yic.ac.cn

这一领域最热门的是光控酶,例如光激活的鸟苷酸或腺苷酸环化酶。这些酶可以以光依赖性方式改变信号分子 cGMP 或 cAMP 的水平。另一类有前景的具有酶活性的光感受器来源于组氨酸激酶视紫红质的家族,其发现于团藻和衣藻。紫外/蓝光敏感光感受器使光遗传学不仅应用于神经科学,还能通过解锁许多其他细胞过程和参数进行光遗传学干预,包括基因表达、DNA 重组、亚细胞定位、细胞骨架动力学、细胞内蛋白质稳定性、信号转导级联、细胞凋亡和酶活性^[5]。新的光敏感工具的发现有力促进了光遗传技术的发展,而藻类无疑是光敏感蛋白的一个重要来源。

1 光敏感蛋白

光敏感蛋白是一类发现于单细胞微生物的视蛋白,可以感知不同波长的光的刺激,并对该光学刺激产生一系列反应。光敏感蛋白是膜整合蛋白(如光敏感通道蛋白)或细胞质的可溶性蛋白质(如光敏色素),通常由蛋白质部分和非蛋白质光传感器组成,其吸收光子并直接或间接产生生物效应。

光敏感蛋白可以分为3类:红/远红光吸收的光敏感蛋白(例如光色素),UV-A/蓝光吸收的光敏感蛋白(如向光素和隐花色素)和UV-B-sensing(如UVR8)光敏感蛋白。这些光感受器已经被证实调控植物光形态发生期间的大量基因表达^[5]。光受体介导多种方式的基因表达调控,包括转录、分化、翻译和翻译后,最终诱导适应性或发育性光形态反应。此外,最近的报告表明,组织或发育调节的光感受器或相关信号成分的表达以组织特异性方式触发不同靶基因的转录水平的变化^[6]。

自1971年细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin, BR)首次被报道后,各种特性不同、激活波长不同的光敏感蛋白也陆续被发现,如盐视紫红质(Halorhodopsin, HR)、通道视紫红质(Channelrhodopsin, ChR)等,但在2005年Lopez-juez等^[7]证明了绿藻来源的视蛋白可以使神经元对光产生应答后,光遗传学才首次引起人们的普遍重视。

用于激活神经元的光敏感通道蛋白ChR2,最早从莱茵衣藻中发现,后经人为突变、修饰,改造成适用于哺乳动物细胞、表达稳定对细胞无毒的工具。该蛋白在蓝光的激发下通道会快速打开,渗透吸收一价和二价阳离子,但是其对不同阳离子的通透性并不相同,ChR2对Ca²⁺的通透性最大,形成光电流的主要离子为Ca²⁺^[2]。

光遗传学中也使用了其他一些来自于藻类的光敏感蛋白,包含CyChR1、CraChR2、MChR1、DChR以及VChR1等。Banghart等人在隐芽藻类中发现了天然存在的阴离子转运通道:阴离子通道视紫红质(Anion

Channel Rhodopsins, ACRs)^[8],ACRs能够严格地传导阴离子,完全阻止质子及更大的阳离子通过,所以能实现快速超极化,因此它拥有前所未有的光敏感度和时间精度。第一种定位于真核细胞的质膜的藻类离子泵视紫红质发现于南极藻*Coccomyxa subellipsoidea*中,其仅通过光照可以复原(沉默)神经元活动^[9]。

光敏感蛋白不仅能兴奋靶细胞,另外还有对其具有抑制作用的光敏感通道蛋白,常用的抑制性光敏感蛋白有盐视紫红质(HaloR、NpHR)和古紫红质(Archaeorhodopsin-1, ArchT)^[9]。如NpHR,为氯离子转运视紫红质蛋白,来源于嗜盐碱单孢菌,可被黄光激活,泵入氯离子使细胞膜超极化从而抑制其兴奋性^[10]。

2 藻类光受体在体内的功能

藻类具有高度复杂和多样化的隐花色素光受体,藻类光受体包括最初在高等植物中发现的经典光感受器(即向光素、细胞色素、光敏色素和UV-B光受体),用作光门控离子通道的视紫质样光受体,以及其他光受体家族。

藻类必须根据光来优化它们的光合活性以实现光合作用高效化,许多细胞生理过程包括性发育、昼夜节律、氮和脂质代谢、细胞周期和细胞分化都由光调节^[11-12]。

向光素的光感受器是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,由蓝光激活,蓝光可以诱导蓝藻细胞分裂的延迟^[13],并参与控制衣藻的性发育和细胞大小过程。由于衣藻中的向光素的非光化学淬灭(NPQ)过程,光感受器、光合作用和光保护作用之间存在分子联系,而且除了光,下游代谢也会影响这种适应过程^[14]。向光素的感光细胞也参与蓝光介导的转录物的积累变化,这是负责叶绿素和类胡萝卜素生物合成的酶产生的^[15]。在多细胞藻类中,向光素的转录在小的深绿色的生殖细胞中比在大的中更易表达。

藻类隐花色素家族一般是蓝光受体,它们参与昼夜节律的调节以及DNA修复。在衣藻中,隐花色素参与调节各种途径的基因的转录水平,这些基因以各种方式响应蓝光和红光^[16]。植物隐花色素和CPF1是UVA/蓝光受体,而动物样隐花色素几乎可以响应整个可见光谱,包括红光。因此,根据植物隐花色素、动物样隐花色素和CPF1的可见光和红外光谱特征能够揭示对光的结构响应^[17]。

在团藻中,这种感光器在生殖细胞中高度表达,并表现出较高的光合活性。光敏感通道蛋白,属于I型视紫红质,参与衣藻的趋光性或避光反应^[3,18]。VChR1被假定为营养条件下趋光性的主要光受体^[19]。另外4种视紫红质样光受体,被称为组氨酸激酶视紫红质,已在团藻和衣藻基因组中被鉴定。这些光受体

响应光刺激或其他环境刺激(如温度)可以改变 cAMP 或 cGMP 的浓度。cAMP 被假定为团藻细胞内的第二信使,能针对诱导物的存在而触发信号级联反应,导致性发育。但 cAMP 在团藻中是否参与性分化是有争议的。cAMP(或 cGMP)不仅激活交配反应也能激活所有必要的反应。cAMP 介导的蛋白激酶级联反应和 cAMP 控制的离子通道都与衣藻的 cAMP 信号转导相关^[20]。在团藻中,丁酰 cAMP 增加之后雄配子体就解体了^[21]。因此,对组氨酸激酶视紫红质的有关性分化功能的研究具有一定的意义。

团藻生活的自然环境中夏季温度的升高会作为一种环境刺激使其从无性到有性发展。保守视紫红质域的组氨酸激酶视紫质可以检测某些波长之间光属性的变化,导致那些进行无性生殖的单倍体物种中二倍体受精卵的基因重组。这可能是由于反应调节器可激活响应域的鸟苷酸和腺苷酸环化酶然后产生 cGMP/cAMP。在团藻中,性发育不仅发生在温度增加时,还发生在抗氧化反应中。cAMP/cGMP 触发的转录因子可能参与生长过程中细胞特异性基因表达的调控^[23]。此外,在衣藻中 cAMP 依赖的蛋白激酶级联反应被认为参与 cAMP 信号转导,Nedelcu 等人发现 cAMP 水平增加可能是由于视紫红质的激活引起的^[24]。

3 藻类光遗传学的应用

光敏感通道蛋白的细胞类型特异性启动子可以激活空间和时间分辨率极高的特定类型的神经元。大多数实验室目前使用的是来自衣藻的野生型光敏感通道蛋白-2,其吸收的蓝色光峰值约为 470 nm,但越来越多的证据表明来自其他藻类的光敏感通道蛋白(如来自团藻的光敏感通道蛋白)也在神经生物学中有巨大的应用潜力。如团藻光敏感通道蛋白-1 在大约 520 nm 的峰处红移,因为红光比蓝光危害小,因此,它似乎更适宜应用于动物和人类模型。在过去几年中,根据团藻和衣藻中已公开的光敏感通道蛋白序列的相似性,在各种藻类物种中鉴定出了几种其他的光敏感通道蛋白。在鞭毛藻 *Mesostigma viride* 中发现了一种红移的光敏感通道蛋白, MChR1, 其在 520 nm(在中性 pH 值下)有峰值^[25]。在海藻 *Platymonas subcordiformis* 中,鉴别出一种峰值在 437 nm(在中性 pH 值)的高效蓝移光敏感通道蛋白^[26]。它们在光遗传学中都有很大发展潜力。

此外,衣藻光敏感通道蛋白-1 和团藻光敏感通道蛋白-1 的嵌合体被用于生成新的高效色彩调节光敏感通道蛋白。这些嵌合的光敏感通道蛋白具有较大的光电流,最大吸收波长范围为 526 nm 到 545 nm^[27]。

另一种类型的藻类视紫红质样感光器——组氨酸激酶的视紫红质家族,可用于控制光遗传学应用中的

细胞过程。这些光控酶可以根据光来改变信号分子的水平,例如 cAMP。因此,它们也适合作为利用外部光刺激来操纵动物行为的光遗传学工具。但是由于这些光感受器中的大的蛋白质由 4 个亚基组成,使其在宿主细胞中表达及纯化复杂。此外,组氨酸激酶视紫红质的功能还包括吸收光谱、光电流性质、酶活性和生物功能。

一些最近的研究表明,光敏感蛋白也可以用来控制蛋白质之间的相互作用,例如植物光敏色素,已成功用于控制红色和远红光下的基因表达^[28]。利用蓝光诱导系统,实现了莱茵衣藻中靶基因表达的光遗传学调控从而可以诱导产氢^[29]。

隐花色素和与之相互作用的 CIB1 也是用蓝光控制基因表达的蓝光受体,它们被用于开发了具有光诱导转录效应子(LITE)的光遗传学双杂交系统。这种 LITE 系统可用于基因转录的可逆激活^[29]。

4 展望

以基因工程的方法将光敏感通道蛋白转入神经细胞,使神经细胞经蓝光照射而兴奋,经黄光照射则抑制,此光感基因调控技术利用不同波长的光可实现活体水平神经细胞精确调控^[30]。

随着多种特性不同、被激活波长不同的光敏感蛋白的陆续发现与丰富,采用光照以精准控制并调控细胞的光遗传学技术也得到了迅速发展。光遗传学最初被用作神经元的前体,现在该技术可用于操纵多种系统,例如心房心肌细胞、胰岛细胞和肿瘤细胞,在多种细胞和多种疾病的研究与治疗中表现出极大的潜力^[31]。

在未来,重点可以放在新的光受体的深入研究上,包括它们的精确的(酶)活性、吸收性能、光电性能和蛋白质结构分析。如果能够在藻类中发现新的光受体,那将对之后的深入研究带来巨大的影响。这对于揭示某些分子作用机制十分有益,甚至可以用作光敏感蛋白基于结构的工程基础。我们还需要鉴定光受体中的相互作用对,这不仅有利于进一步了解光受体信号网而且对合成生物学和光遗传学的进展是非常重要的。

参考文献

- [1] NAGEL G, OLLIG D, FUHRMANN M, et al. Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae [J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2395-2398.
- [2] NAGEL G, SZELLAS T, HUHN W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel [J]. *PNAS*, 2003, 100(24): 13940-13945.
- [3] SINESHCHIKOV O A, JUNG K H, SPUDICH J L. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas*

- reinhardtii* [J]. PNAS, 2002, 99(13): 8689–8694.
- [4] SUZUKI T, YAMASAKI K, FUJITA S, et al. Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 301(3): 711–717.
- [5] LOSI A, GARDNER K H, MÖGLICH A. Blue-light receptors for optogenetics [J]. Chemical Reviews, 2018, 118(21): 10659–10709.
- [6] KAMI C, LORRAIN S, HORNITSCHKE P, et al. Light-regulated plant growth and development [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2010, 91: 29–66.
- [7] LOPEZ-JUEZ E, DILLON E, MAGYAR Z, et al. Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2008, 20(4): 947–968.
- [8] BANGHART M, BORGES K, ISACOFF E, et al. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing [J]. Nature Neuroscience, 2004, 7(12): 1381–1386.
- [9] GOVORUNOVA E G, SINESHCHEKOV O A, JANZ R, et al. Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics [J]. Science, 2015, 349(6248): 647–650.
- [10] RANJAN P, KATERIYA S. Localization and dimer stability of a newly identified microbial rhodopsin from a polar, non-motile green alga [J]. BMC Research Notes, 2018, 11(1): 65.
- [11] GRADINARU V, THOMPSON K R, DEISSEROTH K. eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications [J]. Brain Cell Biology, 2008, 36(1–4): 129–139.
- [12] CHOW B Y, HAN X, DOBRY A S, et al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps [J]. Nature, 2010, 463(7277): 98–102.
- [13] HUANG K Y, BECK C F. Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. PNAS, 2003, 100(10): 6269–6274.
- [14] GROSSMAN A R, LOHR M, IM C S. *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments [J]. Annual Review of Genetics, 2004, 38: 119–173.
- [15] MUNZNER P, VOIGT J. Blue-light regulation of cell-division in *Chlamydomonas-Reinhardtii* [J]. Plant Physiology, 1992, 99(4): 1370–1375.
- [16] FLORI S. Light utilization in microalgae: the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [D]. Plymouth: Marine Biological Association of the UK, 2016.
- [17] IM C S, EBERHARD S, HUANG K Y, et al. Phototropin involvement in the expression of genes encoding chlorophyll and carotenoid biosynthesis enzymes and LHC apoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. The Plant Journal, 2006, 48(1): 1–16.
- [18] BEEL B, PRAGER K, SPEXARD M, et al. A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Cell, 2012, 24(7): 2992–3008.
- [19] KOTTKE T, OLDEMEYER S, WENZEL S, et al. Cryptochrome photoreceptors in green algae: unexpected versatility of mechanisms and functions [J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 217: 4.
- [20] BERTHOLD P, TSUNODA S P, ERNST O P, et al. Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization [J]. Plant Cell, 2008, 20(6): 1665–1677.
- [21] KIANIANMOMENI A, STEHFEST K, NEMATOLLAHI G, et al. Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer [J]. Plant Physiology, 2009, 151(1): 347–366.
- [22] QUARMBY L M, HARTZELL H C. Dissection of eukaryotic transmembrane signaling using *Chlamydomonas* [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 1994, 15(9): 343–349.
- [23] WAFFENSCHMIDT S, KNITTLER M, JAENICKE L. Characterization of a sperm lysin of *Volvox-carteri* [J]. Sex Plant Reprod, 1990, 3(1): 1–6.
- [24] NEDELUCU A M, MICHOD R E. Sex as a response to oxidative stress: the effect of antioxidants on sexual induction in a facultatively sexual lineage [J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Science, 2003, 270: S136–S139.
- [25] SHAULSKY G H E. Components of the *Dictyostelium* gene expression regulatory machinery [J]. Horizon Bioscience, 2005, 58: 1–22.
- [26] BOONYARETH M, SARANAK J, PINTHONG D, et al. Roles of cyclic AMP in regulation of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biologia, 2009, 64(6): 1058–1065.
- [27] GOVORUNOVA E G, SPUDICH E N, LANE C E, et al. New *Channelrhodopsin* with a red-shifted spectrum and rapid kinetics from *Mesostigma viride* [J]. Mbio, 2011, 2(3): 00115–00111.
- [28] GOVORUNOVA E G, SINESHCHEKOV O A, LI H, et al. Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis* [J]. J Biol Chem, 2013, 288(41): 29911–29922.
- [29] PRIGGE M, SCHNEIDER F, TSUNODA S P, et al. Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(38): 31804–31812.
- [30] SHIMIZU-SATO S, HUQ E, TEPPERMAN J M, et al. A light-switchable gene promoter system [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(10): 1041–1044.
- [31] WANG Y, JIANG X, HU C, et al. Optogenetic regulation of artificial microRNA improves H₂ production in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 257.
- [32] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states [J]. Nature, 2013, 500(7463): 472–477.
- [33] 张志成, 孙天胜, 李放等. 光感基因调控技术——研究和治疗神经系统疾病的新方法 [J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2013, 18(6): 280–282.
- [34] KIM H K, ALEXANDER A L, SOLTESZ I. Optogenetics: lighting a path from the laboratory to the clinic [M]. Optogenetics: A Roadmap. Humana Press, New York, NY, 2018: 277–300.