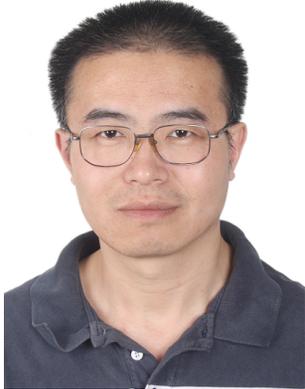


领域前沿 · 中国



王友军, 北京师范大学生命科学学院教授。1997年毕业于烟台大学生物系, 获学士学位; 2000年于北京大学生命科学学院获得神经生理学专业硕士学位; 2007年于美国马里兰大学帕克分校获得神经与认知专业博士学位, 2007–2010年在美国费城天普大学生物系Gill实验室做博士后, 之后三年继续在Gill处做副科学家(Associate Scientist)。2013年起, 在北京师范大学生命科学学院抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室工作, 并入选教育部2013年度“新世纪人才支持计划”及第五批“青年千人计划”。王教授多年来一直从事胞内钙信号转导的相关研究, 用荧光钙成像、FRET及膜片钳技术等手段研究STIM介导钙信号的分子机制及其生理意义。其主要工作揭示了STIM蛋白激活Orai通道的重要分子机制, 发现了STIM蛋白对Orai及L型钙离子通道的交互控制作用, 从而说明STIM是一个细胞内决定细胞反应类型的一个重要的选择开关。最近, 与周育斌教授合作鉴定了一个ER蛋白——STIMATE, 并初步阐明了其调控STIM1激活的分子机制。其中后两个发现均被同领域专家在同期杂志上加以评论。迄今为止, 王教授在Science、Nat Cell Biol、Proc Natl Acad Sci USA、Nat Commun等杂志上发表相关论文20余篇。

内质网–细胞质膜连接区蛋白质组鉴定及对 其中的STIMATE的功能研究

张舒策¹ 何 涟² 周育斌² 王友军^{1*}

¹北京师范大学生命科学学院抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875;

²Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University Health Science Center, Houston, Texas 77030, USA)

摘要 在细胞内存在着连接内质网和细胞膜的特殊连接部位, 称之为内质网–细胞质膜连接区(endoplasmic reticulum-plasma membrane junction, ER-PM J)。ER-PM J对脂类代谢及钙信号传导等有重要的作用, 主要由STIM1(stromal interaction molecule 1)和Orai1介导的钙库操纵的钙内流(store-operated calcium entry, SOCE)就发生在该部位。但由于技术手段的缺乏, 人们对ER-PM连接区中参与调控SOCE的特异的蛋白质组成了解得还不清楚, 因而相关研究一直进展缓慢。这里引入了抗坏血酸过氧化酶2(ascorbate peroxidase 2, APEX2)介导的活体生物素原位标记法, 标记STIM1附近的蛋白质组, 鉴定出了对钙内流起调节作用的STIM激活增强子STIMATE(STIM-activating enhancer), 并对其作用机制进行了初步的探究。

关键词 基质互作子1; 钙库操纵的钙离子内流; 基质互作激活增强子; 原位生物素标记; 抗坏血酸过氧化酶2; 皮层内质网; 内质网–细胞质膜连接区

*通讯作者。Tel: 010-58806258, E-mail: wyoujun@bnu.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-10-58806258, E-mail: wyoujun@bnu.edu.cn

网络出版时间: 2016-05-20 09:17:53

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160520.0917.004.html>

STIMATE, A Regulator of Ca²⁺ Influx, Identified by Proteomic Mapping of ER-PM J

Zhang Shuce¹, He Lian², Zhou Yubin², Wang Youjun^{1*}

(¹Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; ²Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University Health Science Center, Houston, Texas 77030, USA)

Abstract Endoplasmic reticulum (ER) and plasma membrane (PM) are connected at specialized junctional sites (endoplasmic reticulum-plasma membrane junction, ER-PM J). Crucial physiological processes, including lipid metabolism and many kinds of calcium signaling, especially store-operated calcium entry (SOCE), occur within these junctional sites. Due to the lack of appropriate methods and convenient tools, the proteomic composition of ER-PM J remains largely unknown. We thus tagged ascorbate peroxidase 2 (APEX2) to the ER-resident SOCE activator, STIM1, and applied APEX2-mediated *in situ* biotin labeling in living cell that efficiently labels proteins in close proximity to STIM1 (<20 nm). The resulting biotin-labeled proteome was then enriched by streptavidin beads and analyzed with mass spectrometry. Among those positive hits is an ER resident protein that we named as STIM1-activating enhancer (STIMATE). The molecular mechanism underlying this Ca²⁺ influx regulator was further examined.

Keywords STIM1; SOCE; STIMATE; *in situ* biotin labeling; APEX2; cortical ER; ER-PM J

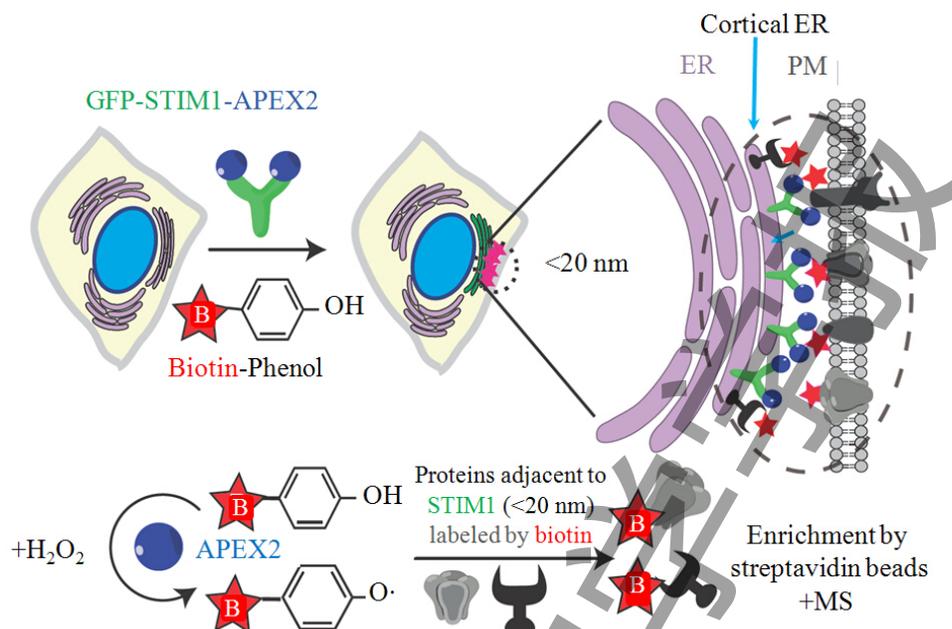
1 内质网-细胞质膜连接区背景介绍

真核细胞具有各种形状及功能各异的、膜包裹的细胞器, 这些细胞器膜之间的信息交流对于细胞维持正常的形态和执行功能非常重要^[1]。而其中对内质网与细胞质膜之间的交流的研究近来进展较快^[2]。在某些细胞的边缘, 管状或片状的内质网膜延伸至细胞膜附近, 与细胞质膜保持大约10~20 nm的距离, 两者之间没有直接的膜融合, 这些区域被称为内质网-细胞质膜连接区(endoplasmic reticulum-plasma membrane junction, ER-PM J或ER-PM连接区)。而其中位于ER-PM连接区的距离质膜较近的内质网被称为皮层内质网(cortical ER, cER)(如图1蓝色箭头所示)。在ER-PM连接区发生着许多重要的生理活动, 例如脂质代谢以及包括钙库操纵钙内流(store-operated calcium entry, SOCE)在内的钙离子稳态的维持等^[1]。由于缺少适当的方法和方便的工具对这个特化部位进行分子水平的解析一直非常困难。

钙池操纵钙内流(SOCE)是一种发生在ER-PM连接区的重要的生理过程^[3]。经典的SOCE由位

于内质网膜上的钙离子感受器蛋白STIM1(stromal interaction molecule 1)和质膜上Orai1钙离子通道共同介导。STIM1蛋白是内质网膜上的单次跨膜的一个钙结合蛋白, 其位于内质网腔内的N-端EF-hand结构域可以结合钙离子。当内质网钙库中钙离子浓度降低时, 钙离子从STIM1上解离下来, 引起STIM1发生构象变化^[4]并转位到ER-PM连接区的cER处, 并形成众多斑块状的结构“puncta”(如图2黄色箭头所示)。STIM1位于胞质一侧的C-末端, 与定位在细胞质膜上的Orai1通道相互作用, 并激活Orai1通道, 胞外的钙离子通过Orai1进入胞质, 这种钙内流即为SOCE^[5]。SOCE普遍存在于非兴奋性细胞和兴奋性细胞中, 在分泌、基因转录、酶活调节、细胞凋亡等过程中发挥重要的作用^[6-7]。SOCE重要的下游反应之一是导致活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)的激活和核转位, 并启动下游基因的转录^[8]。因而解析在ER-PM连接区参与调控SOCE的蛋白质组并了解其作用机理有着非常重要的意义。

尽管传统的基于免疫共沉淀的蛋白质组学的



在细胞内表达GFP-STIM1-APEX2后, 瞬时表达含APEX2的STIM1融合蛋白。利用外源的双氧水及生物素苯酚, 对STIM1蛋白周边20 nm之内的蛋白进行生物素标记。之后裂解细胞, 用亲和素磁珠从裂解液中富集生物素标记的蛋白。然后将这些富集后的具有生物素标记的蛋白洗脱下来, 用质谱进行鉴定。两个蓝色箭头所示处的ER为cER(cortical ER)。

With externally added H₂O₂, APEX2 fused to STIM1 enables biotin labelling on proteins located <20 nm from STIM1. Biotinylated proteins from cell lysate were further affinity-enriched with streptavidin beads. And the resulting eluted products were analyzed by mass spectrometry (MS). The position of cortical ER is indicated by blue arrows.

图1 基于APEX2原位活体蛋白标记法来鉴定ER-PM连接区内可能STIM1
互作蛋白质谱主要步骤的示意图(根据参考文献[12]修改)

Fig.1 Diagram of major procedures involved in proteomic mapping of potential STIM1
interactors at ER-PM J through APEX2-mediated *in situ* biotin labeling (modified from reference [12])

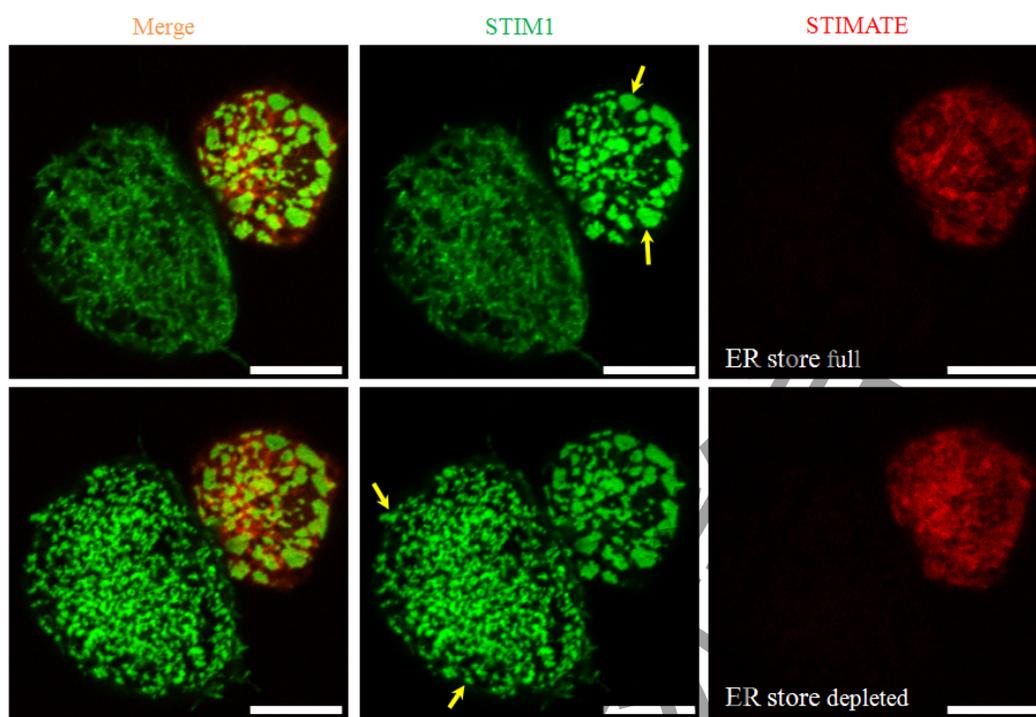
质谱鉴定方法可以同时检测数以千计的互作蛋白, 但是该方法的灵敏度和特异性均较低, 对互作蛋白的时空分辨率较低。比如在质谱检验之前的细胞裂解及免疫共沉淀过程中会损失掉很多蛋白, 特别是一些弱相互作用蛋白, 从而产生假阴性结果。另外, 细胞裂解后一些本来在细胞内不同部位、没有相互接触的蛋白也有可能发生相互作用而被鉴定为互作蛋白, 产生假阳性结果。

2 原位活体生物素蛋白标记技术

为了解决上述问题, Rhee等^[9]在2013年首次建立了基于抗坏血酸过氧化酶2(ascorbateperoxidase 2, APEX2)的原位活体蛋白标记技术。APEX2可以在H₂O₂存在的情况下催化生物素-苯酚转化为生物素酚氧自由基, 后者可以攻击附近蛋白的酪氨酸、色氨酸、组氨酸和半胱氨酸残基, 从而可以对临近的蛋白进行原位活体生物素标记。而且由于生物素-酚氧自由基存在的半衰期非常短(<1 ms), 因而该方

法仅能标记距APEX2小于20 nm的蛋白。生物素标记之后, 将细胞裂解, 用链霉亲和素磁珠富集这些被生物素标记的蛋白, 最后运用质谱技术对这些蛋白质组进行鉴定。通过这一方法, Rhee等^[9]在细胞内表达了特异性定位于线粒体基质的APEX2融合蛋白, 原位活体标记并鉴定了线粒体基质及线粒体内膜上面对基质的蛋白质组, 有效提高了实验结果的时空分辨率, 并显著降低了假阳性率。

由于STIM1可以在内质网钙库清空后转位到ER-PM连接区, 而且ER-PM连接区的空间大小正好与这种结合原位活体生物素标记法的蛋白质组鉴定技术的时空分辨率(<20 nm)一致。因而我们将该技术手段运用到对ER-PM连接区内的STIM1互作蛋白质组的鉴定上(图1)。我们首先构建了STIM1-APEX2融合蛋白, 并发现该融合蛋白的两个组分均能正常行使功能。全内反射荧光(total internal reflection fluorescence, TIRF)显微成像结果显示, 其STIM1部分作用跟野生型的STIM1一样, 都能在内



图片为激光共聚焦成像, 焦平面位于细胞底部。为方便显示, STIM1和STIMATE分别以绿色和红色的假色显示。黄色箭头所示为众多puncta中的几个。1 $\mu\text{mol/L}$ TG(thapsigargin)被用来清空钙库。标尺=10 μm 。

Confocal images showing the bottom of HEK STIM1-YFP stable cells transiently transfected with mCherry-STIMATE. To aid visualization, STIM1 and STIMATE are artificially colored in green and red respectively. The positions of several puncta are indicated by yellow arrows. Store depletion was triggered by 1 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin (TG). Scale bars=10 μm .

图2 在HEK STIM1-YFP稳定细胞中瞬时过表达的STIMATE会促进STIM1形成puncta
Fig.2 STIMATE facilitates the formation of STIM1 puncta in HEK STIM1-YFP cells

质网钙库清空后形成典型的激活后的斑块状结构“puncta”(图2)。而用亲和素进行免疫染色的结果显示, 该融合蛋白的APEX2部分跟野生型的APEX2一样, 都仅能在加入 H_2O_2 时才能对蛋白进行生物素标记。这表明, 我们构建的融合蛋白能有效地定位到ER-PM连接区并对其周围20 nm内的蛋白进行生物素标记。

3 运用原位活体生物素蛋白标记技术鉴定ER-PM连接区STIM1附近蛋白质组并发现STIMATE

借助我们构建的STIM1-APEX2融合蛋白, 在静息或内质网钙库清空时, 我们在HEK-293活细胞内原位标记了ER-PM连接区内距离STIM1蛋白20 nm之内的蛋白质组。然后, 用亲和素磁珠富集细胞裂解液中的生物素标记蛋白, 最后使用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)的方法对富集到的蛋白进

行分析鉴定。Orai1作为已知的STIM1结合蛋白仅在激活状态下被检测到, 这与STIM1和Orai1仅在STIM1激活时有相互作用的实验预期相符合。同时, 我们还检测到了其他已报导的STIM1结合蛋白, 如MAPRE1/EB1(microtubule associated protein RP/EB family member 1)、ATP2A2/SERCA2(ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} transporting 2)等。这些结果表明, 这一新的蛋白质组鉴定方法是有效的。包括上述蛋白在内, 我们一共找到了73个潜在的STIM1相互作用蛋白, 其中17个在HEK-293细胞中不论钙库充满还是清空的状态下都被检测到。它们中大部分都是内质网或细胞质膜的驻留蛋白、细胞骨架组分、参与胞内膜运输和翻译后修饰的蛋白。接下来, 我们选择了其中在钙库清空前后均能检测到的、具有钙信号功能注释的或具有预测的跨膜区的38个蛋白, 并进行了与STIM1的双分子荧光互补实验(bimolecular

fluorescence complementation, BiFc)。结果显示, TMEM110(RefSeq ID: NM_198563)在APEX和BiFc的实验中都是一个很好的潜在STIM1互作蛋白, 我们将它命名为STIMATE(STIM-activating enhancer)。

4 STIMATE功能初步探索

为了探究STIMATE对SOCE及其下游反应的影响, 我们使用siRNA在HEK-293细胞中对STIMATE进行沉默, 并分别使用钙成像技术和萤光素酶技术检测了沉默STIMATE对SOCE和NFAT活性的影响。与对照组相比, STIMATE沉默的细胞中SOCE和NFAT依赖的萤光素酶活性均受到了抑制。在干扰STIMATE的HEK-293细胞中回补STIMATE的表达可以恢复SOCE和萤光素酶的活性。我们又使用CRISPR/Cas9基因组编辑技术制作了两个稳定敲除STIMATE的HEK-293细胞系, 它们的第四个外显子被破坏, 具有提前的终止密码子。在这两个细胞系中, 离子霉素(ionomycin)引发的内质网钙库的钙释放没有明显的变化, 但SOCE显著地减小了。这些结果提示, STIMATE是一个之前未被发现的可上调SOCE的蛋白。

STIMATE在人和小鼠的组织中广泛表达, 在HEK-293、HeLa和COS-7等细胞系中单独过表达时定位于内质网上。在共表达STIMATE与STIM1的细胞中, 二者共定位; 在10 nm的尺度上, CFP标记的STIMATE与YFP标记的STIM1之间可以检测到荧光共振能量转移(försterresonance energy transfer, FRET)的信号; 在体外, STIM1和STIMATE可以免疫共沉淀。这些结果暗示, STIMATE是STIM1的互作蛋白。经过一些列的免疫共沉淀和FRET实验, STIMATE与STIM1相互作用的部分被定位在STIM1位于233~343位氨基酸的CC1(coiled-coil 1)区, 以及STIMATE的C-末端(STIMATE-CT、214-294位氨基酸)。应用表面等离子体共振(surface plasmonresonance, SPR)技术可以测定STIM1-CC1与STIMATE-CT之间的解离常数为 $8.9 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$ 。这些结果表明, STIMATE是通过其C-末端与STIM1-CC1的互作来实现其调控SOCE的作用的。

为进一步探究STIMATE是如何通过与STIM1互作来影响其介导SOCE的功能的, 我们首先进行了

TIRF成像实验。结果显示, 在部分共表达STIMATE和STIM1的细胞中, 即使在内质网钙库充满的静息状态下, STIM1也会移动到ER-PM连接区, 形成典型的激活时的puncta结构, 并与STIMATE共定位。钙库清空后, 过表达STIMATE的细胞中STIM1形成的斑块状结构面积更大, 而在STIMATE敲除的细胞中, TIRF成像所观察到的EGFP-STIM1的荧光减少了大约70%。基于这些结果, 我们认为, STIMATE可以调控STIM1 puncta的形成。进一步的钙及FRET成像结果表明, 由STIMATE共表达引起的puncta状分布的STIM1在静息时处于持续激活状态, 在钙库充满时即结合并激活Orai1, 引发自发的持续钙内流。并且该钙内流可以被高浓度的SOCE工具药2-氨基乙氧基二苯硼酸(2-aminoethoxydiphenyl borate, 2-APB)抑制。这些结果暗示, STIMATE可能通过与STIM1互作, 影响STIM1 puncta的形成, 进而调控由STIM1-Orai1介导的钙内流。

由于STIM1在激活时, 首先需要进入与质膜距离较近的层内质网(cortical ER, cER), 之后才能与Orai1结合并引发SOCE。所以另外一种可能是, STIMATE通过调节层内质网的形成, 从而间接地调节STIM1 puncta的产生。因而我们探究了STIMATE的敲除对cER形成的影响。但利用高分辨率透射电镜成像的结果表明, STIMATE的敲除没有显著影响cER的形成。为排除该阴性结果是由于所用技术手段分辨率不够造成的假象的可能, 我们进一步利用cER的选择性标记蛋白“膜系外周内质网(membrane-attached peripheral ER, MAPPER)”来标记cER, 或用我们构建的光遗传工具“光诱导膜系外周内质网(light-inducible membrane-tethered peripheral ER, LiMETER)”可逆性地标记cER, 然后进行高分辨率成像观察STIMATE的敲除对cER形成的影响。两种实验的结果均表明, STIMATE敲除仅减少了大约10%的cER。STIMATE敲除后对cER的微小抑制不能完全解释STIM1 puncta大量减少(约70%)的现象。因而STIMATE可能是更多的通过与STIM1直接的相互作用来影响后者的激活的。

我们之前的研究发现, 在静息时, STIM1激活Orai1的最小功能域SOAR(STIM-Orai-activating region)/CAD[CRAC(calcium release-activated

calcium channel) activation domain]^[10-11]被STIM1的CC1区锚定在内质网附近,阻止了其激活。在钙库清空后,STIM1的构象变化,使得CC1区释放SOAR/CAD,后者结合并激活质膜上Orai1钙离子通道,引发钙内流^[4]。因而我们猜想,STIMATE与CC1的相互作用可能破坏了CC1与SOAR/CAD相互作用,解除了静息时STIM1自抑制状态,促进了STIM1从静息到激活的构象变化,从而使得SOAR/CAD从STIM1上解离下来而激活Orai1。利用我们之前开发的可以检测STIM1构象变化的二元FRET体系STIM1₁₋₃₁₀-CFP和YFP-SOAR^[4],我们发现,共表达STIMATE和钙库清空一样,都使得二者之间的FRET信号变弱。这说明STIMATE的确通过与STIM1-CC1的相互作用,竞争性地减弱了STIM1的CC1区与SOAR区的相互作用,从而促进了STIM1由静息到激活的构象及定位变化。

5 总结

我们运用非破坏性的活体原位生物素蛋白标记的方法无损地鉴定了一个ER-PM连接内STIM1蛋白附近的蛋白质组。这一结果不仅提供了生理状态下ER-PM连接区蛋白质组成的第一个视角,也为未来研究它们在信号转导和疾病发生过程中的功能提供了一个框架。活体生物素标记技术有望揭示更多亚细胞结构中的分子信息。特别地,随着ER-PM连接区调控着STIM1依赖的钙信号过程的内质网驻留蛋白STIMATE的发现,我们不禁要问,STIMATE是怎样与ER-PM连接区的其他成分协同从而在钙信号转导和其他生理过程中发挥作用的?STIMATE本身对ER-PM连接区的cER形成与维持的作用又是如何实现的?ER-PM连接区隐藏着更多的疑惑需要

我们进一步探索和回答。

参考文献 (References)

- 1 Stefan CJ, Manford AG, Emr SD. ER-PM connections: Sites of information transfer and inter-organelle communication. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25(4): 434-42.
- 2 Henne WM, Liou J, Emr SD. Molecular mechanisms of inter-organelle ER-PM contact sites. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 35: 123-30.
- 3 Carrasco S, Meyer T. STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 973-1000.
- 4 Ma G, Wei M, He L, Liu C, Wu B, Zhang SL, *et al.* Inside-out Ca²⁺ signalling prompted by STIM1 conformational switch. *Nat Commun* 2015; 6: 7826.
- 5 Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: Dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(9): 549-65.
- 6 Hogan PG, Rao A. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 460(1): 40-9.
- 7 Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005; 85(2): 757-810.
- 8 Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS. Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* 2006; 174(6): 803-13.
- 9 Rhee HW, Zou P, Udeshi ND, Martell JD, Mootha VK, Carr SA, Ting AY. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* 2013; 339(6125): 1328-31.
- 10 Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, *et al.* STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 2009; 136(5): 876-90.
- 11 Yuan JP, Zeng W, Dorwart MR, Choi YJ, Worley PF, Muallem S. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* 2009; 11(3): 337-43.
- 12 Jing J, He L, Sun A, Quintana A, Ding Y, Ma G, *et al.* Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx. *Nat Cell Biol* 2015; 17(10): 1339-47.