

# イオンチャネルとイオンポンプの本質的違いに迫る、ポンプ型ロドプシン様 チャネルロドプシン ChRmine の構造機能解析

## Structural and functional analysis of the pump-like cation-conducting channelrhodopsin ChRmine

(日本生物物理学会推薦)

代表研究者	東京大学	加藤 英明	The University of Tokyo	Hideaki KATO
協同研究者	Stanford 大学	Yoon Seok Kim	Stanford University	Yoon Seok KIM
協同研究者	金沢大学	柴田 幹大	Kanazawa University	Mikihiro SHIBATA

ChRmine, a recently discovered pump-like cation-conducting channelrhodopsin, exhibits puzzling properties (large photocurrents, red-shifted spectrum, and extreme light-sensitivity) that have created new opportunities in optogenetics. ChRmine and its homologs function as ion channels, but by primary sequence more closely resemble ion pump rhodopsins; mechanisms for passive channel conduction in this family have remained mysterious. Here we present the 2.0-Å resolution cryo-EM structure of ChRmine, revealing architectural features never seen before in channelrhodopsins: trimeric assembly, a short transmembrane-helix 3, a twisting extracellular-loop 1, large vestibules within the monomer, and an unprecedented opening at the trimer interface. We applied this structure to design three proteins (rsChRmine and hsChRmine, conferring further red-shifted and high-speed properties respectively; and frChRmine, combining faster and more red-shifted performance) suitable for fundamental neuroscience opportunities. These results illuminate conduction and gating of pump-like channelrhodopsins and point the way toward further structure-guided creation of novel channelrhodopsins for applications across biology.

### 研究目的

ヒトから微生物まで多くの生物は光からエネルギーや情報を受け取り、それに応じた行動を取る。この光受容に用いられる代表的タンパク質がロドプシンである。ロドプシンは微生物からヒトまで広く保存された光受容タンパク質ファミリーであり、微生物型（タイプ1）と動物型（タイプ2）の2つに大別することができる。いずれのタイプもオプシンと呼ばれる7回膜貫通型（7TM）タンパク質部分と、保存されたシッフ塩基を介してオプシンに共有結合したレチナール発色団から構成されている。ロドプシンが光を吸収すると、まず初めにレチナールの異性化が起こり、それをきっかけとして光反応サイクルと呼ばれる一連の立体構造変化が起こる。光反応サイクルの間、微生物型ロドプシンは分光学的に区別できる中間体状態（例えば、K、L、M、N、O）を経

由し、この光反応サイクルが一周する間にロドプシンはそれぞれの機能を発揮する。微生物型ロドプシンの分子機能はイオンチャネルやイオンポンプ、グアニル酸シクラーゼ、ホスフォジエステラーゼなど多岐に渡るが<sup>1</sup>、そのうちイオンポンプやイオンチャネルとして働くロドプシンはイオン輸送型ロドプシンとして総称される。このイオン輸送型ロドプシンは、光によって特に神経細胞の膜電位を操作することができる分子ツール（光遺伝学ツール）として近年注目を集めている。また、初のチャネル型ロドプシンである CrChR2 を用いて神経細胞の光操作が可能となった2005年以降<sup>2</sup>、様々なチャネル型ロドプシンが自然界より単離、あるいはヒトの手によって開発され、光遺伝学ツールの有用性を向上させていった。そうした研究の流れの一環として、我々は2019年に *Rhodomonas lens* と呼ばれる海洋微生物より新

規のチャンネル型ロドプシン ChRmine を発見することに成功した<sup>3</sup>。ChRmine はこれまで発見されてきたチャンネル型ロドプシンとはアミノ酸配列が大きく異なり、その配列は従来のチャンネル型ロドプシンよりも寧ろイオンポンプ型ロドプシンと類似していた。しかし、ChRmine は従来のチャンネル型ロドプシンと比較しても光電流が非常に大きく、高い光感度や長波長シフトした励起波長スペクトルを併せ持っていたことから、様々な新規の光遺伝学実験を可能にしてきた<sup>4,5</sup>。近年では網膜色素変性症の遺伝子治療にも利用可能ではないかと期待されており<sup>6</sup>、革新的光遺伝学ツールとしての地位を築きつつある。しかしながら、前述の通り ChRmine はそのアミノ酸配列が従来のイオンチャンネルよりもむしろイオンポンプと類似しており、なぜ ChRmine がこれだけ強力なイオンチャンネルとして機能することが可能なのか、その構造基盤は全くの謎であった。そこで、「ChRmine は（アミノ酸配列以上に）一体どこまでポンプ型ロドプシンと類似しているのか」、「ChRmine が単なるアミノ酸配列以上にポンプ型ロドプシンとの類似性を有しているのであれば、なぜ ChRmine はイオンチャンネルとして機能することができるのか」、「そもそもイオンポンプとイオンチャンネルの本質的違いは一体どこに存在しているのか」、そして「ChRmine が持つ高い光電流や長波長シフトした励起波長スペクトルといった特徴はどのような分子基盤によって支えられているのか」、それらの問いに対する答えを得るため、我々は本研究において ChRmine の構造機能解析を試みることにした。また、得られた構造情報を用いることで、ChRmine のツールとしての性質をさらに向上させた発展的光遺伝学ツールの開発を目指した。

## 研究経過

*Rhodomonas lens* 由来 ChRmine について、まず小スケールで条件検討を行い、Sf9 昆虫細胞を用いた発現精製系を確立することに成功した。次に、Sf9 細胞での発現スケールを 10ml から 6L へと上げ、得られた細胞ペレットから膜画分を素精製し、さらに Ni<sup>2+</sup> アフィニティーカラムクロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィー法を用いることで、最終的に 1L あたり 0.3-0.5mg の精製タンパク質標品を得ることに成功した。

さらに、得られたタンパク質を用いて、タンパク

質急速凍結装置 vitrobot により ChRmine の凍結 grid 調製を行い、東京大学の所有するハイエンドクライオ電子顕微鏡 Krios を用いて約 3000 枚の micrograph を撮影した。しかし、RELION3.1 を用いてデータ解析した結果、GDN の detergent micelle 中にタンパク質の大部分が埋もれてしまっており、このままでは高分解能の 3D map 再構成は困難であることがわかった。

そこで、京都大学岩田研究室との共同研究のもと、ChRmine に対して強固に結合する抗体の作成を試みた。Liposome に再構成した ChRmine 精製タンパク質をマウスに打ち込み、得られた抗体を ELISA, 蛍光クロマトグラフィー法によりスクリーニングすることで、最終的に ChRmine の立体構造を特異的に認識する抗体「Fab02」を得ることに成功した。

次に、得られた Fab02 を用いて ChRmine のクライオ電子顕微鏡構造解析を試みた。今回は Au grid より 3,528 枚の micrograph を撮影し、これを RELION3.1.1 でデータ処理することにより最終的に 2.02Å という高分解能の cryo-EM map を再構成することに成功した。これは、チャンネル型ロドプシンとしては初の高分解能 cryo-EM 構造であるとともに、結晶構造を含めても、これまででもっとも高分解能のチャンネルロドプシン構造の 1 つとなった。

得られた ChRmine の構造は二量体を形成する従来のチャンネルロドプシンとは異なり「3 量体構造」を形成していたため、この量体数が生理的なものであるかを検証するため、金沢大学柴田研究室との共同研究のもと、高速 AFM を用いて脂質中の ChRmine の量体数検証を行った。その結果、ChRmine は確かに脂質中でも 3 量体構造を形成していることが判明した。これは ChRmine が、アミノ酸配列のみならず、量体数までもが従来のチャンネル型ロドプシンよりも bacteriorhodopsin(BR)のようなポンプ型ロドプシンと類似していることを意味していた。

次に我々は、ChRmine がポンプ型ロドプシンとどこまで類似の構造的特徴を有しているかを検証するために、モノマー状態での構造比較を行った。その結果、ChRmine と C1C2(従来型チャンネルロドプシンの例)<sup>7</sup> の構造を重ね合わせた際、その r.m.s.d.は 2.14Å であったのに対し、ChRmine と BR 間での r.m.s.d.は 1.83Å であることが判明した。これは、ChRmine が量体数のみならず、モノマー単位での全体構造もまた BR と類似であることを示唆していた。

このように ChRmine は BR と多くの類似性を有していた一方で、数多くのユニークな構造的特徴も有していた。もっとも特筆すべき点は TM3 と細胞外ループ 1 番(ECL1)であり、ChRmine の TM3 は従来の微生物型ロドプシンと比較して顕著に短くなっており、その結果 ECL1 は非常に長く、また曲がりくねった構造をとっていた。BR において外向き H<sup>+</sup>ポンプ機能に重要な 3 アミノ酸残基、D85, T89, D96 はいずれも TM3 上に存在しており、これは DTD モチーフと呼ばれる。DTD モチーフは ChRmine にも保存されているが、そのうち D85 に相当する D115 は TM3 がほどけたことによりシッフ塩基と 6.9Å も離れた場所に位置していた。この位置の Asp 残基は微生物型ロドプシンにおいて高度に保存されているが、ここまで両者の距離が離れたロドプシンは ChRmine が初であった。また、プロトン化シッフ塩基の窒素原子と D115 の間には 3 個の結合水が観測された。

これらの結果を踏まえ、東京大学井上研究室との共同研究で野生型 ChRmine と D115N 変異体の過渡吸収分光解析を行ったところ、D115N 変異体では、野生型 ChRmine では観測されなかった K 様中間体の顕著な蓄積が観測された。D115 と同様にシッフ塩基の近傍に位置している D253 についてその D-to-N 変異体の過渡吸収を測定した際には、野生型と同様の光反応サイクルしか観測されなかったため、これらの観測結果より D115 が M 中間体においてシッフ塩基プロトンのアクセプターとして機能する可能性が強く示唆された。シッフ塩基と D115 までは 7Å 近い距離が離れているが、その間には複数の水分子が観測されたことから、現在我々は、M 中間体においてシッフ塩基から D115 まで複数の水分子を介してプロトンがリレー的に受け渡されるモデルを考えている。

次に我々は、ChRmine の TM2 の細胞内側、細胞外側が BR と比較してそれぞれ外向きに kink しているという構造的特徴に着目した。この TM2 の傾きと、前述した特徴的な ECL1 の構造により、ChRmine は BR と比較して単量体内部に大きな空隙を有していた。そのため、単量体内部の空隙のサイズで比較すると ChRmine は BR よりも明らかに C1C2 と類似していた。単量体内部の空隙は他のチャンネルロドプシンの持つイオン透過経路と類似の位置に存在しており、経路を形成するアミノ酸に変異を導入したところ、(発現量には影響がないが)チャンネル活性に顕著

な影響が現れたため、ChRmine においてもこの空隙がイオン透過経路の一部として働いていることが強く示唆された。ChRmine、C1C2 は共に BR と比較して単量体内部に大きな空隙を有していたため、この特徴がチャンネル型ロドプシン全般において保存されたものであるか検証するため、構造既知のチャンネルロドプシン全て(C1C2, CrChR2, C1Chrimson, GtACR1, iC<sup>++</sup>, ChRmine) について、空隙のサイズを計算しこれを BR と比較した。その結果、我々の仮説通りチャンネル型ロドプシンは例外なく BR よりも顕著に大きな空隙を単量体内部に有しており、これがチャンネルとポンプを切り分ける本質的な構造的特徴の一つであることが強く示唆された。

また、イオン輸送型ロドプシンにおいて高度に保存されている TM3 上の Arg 残基 (R82 in BR, R159 in C1C2, R112 in ChRmine) に着目したところ、BR を含むポンプ型ロドプシンと ChRmine を含むチャンネル型ロドプシンでは Arg 残基の配向が大きく異なっていることが判明した。具体的には、ポンプ型ロドプシンでは単量体内部の空隙を塞ぐように Arg 残基の側鎖が経路中心に向かって突き出していた一方、チャンネル型ロドプシンでは Arg 残基の側鎖が経路を塞がないよう細胞外側に向いていることが分かった。我々は、現在この Arg 残基の配向についてもチャンネルとポンプを切り分ける重要な一要因であると考えている。

さらに我々は、ChRmine が 3 量体を形成する生理的意義をより深く理解するため、ChRmine の単量体間で相互作用しているアミノ酸残基に変異を導入し、蛍光ゲル濾過クロマトグラフィー法により量体数を調べながら、パッチクランプ法によりチャンネル活性を測定した。その結果、ChRmine の量体数が 3 量体から単量体へとシフトする変異体については、そのチャンネル活性も顕著に減衰することが明らかとなった。我々が導入した変異はイオン透過経路やレチナールの結合部位からは大きく離れていることから、この結果は ChRmine の 3 量体形成自体がチャンネル活性の機能発現に重要であることを示していると考えられる。これはチャンネルロドプシンによる多量体形成がチャンネル活性に重要であることを実験的に示した初の例である。

次に、我々は今回得られた ChRmine の構造情報を用いて、ChRmine の持つパフォーマンスをより向上させた新規の光遺伝学ツールを開発できないか考え

た。ChRmine は既に高い光電流、高い光感度、長波長側にシフトした励起波長スペクトルという 3 つの長所を併せ持つ光遺伝学ツールだが、励起波長スペクトルやキネティクス面で改良の余地が大いに残されていた。そこで我々は、イオン透過経路内部の荷電アミノ酸残基とレチナール結合ポケット周辺のアミノ酸残基に着目し、複数の変異を導入することで、そのキネティクスや励起波長スペクトルの改良を目指した。イオン透過経路内部の荷電アミノ酸残基として 6 種のアミノ酸、レチナール結合ポケット周辺のアミノ酸残基として 2 種のアミノ酸に着目し、それぞれに変異を導入したところ、H33R 変異体、I146M/G174S 二重変異体において、それぞれオプキネティクス値の減少、励起スペクトルのさらなる長波長シフトが観測された。そこで、我々はこの H33R 変異体を high speed ChRmine (hsChRmine)、I146M/G174S 二重変異体を red-shifted ChRmine (rsChRmine) と名付け、両変異を掛け合わせた三重変異体を faster and further red-shifted ChRmine (frChRmine) と名付けた。

このうち、特に rsChRmine は 1 光子での全光光遺伝学実験(all-optical physiology 実験)に適していると考えられたため、米国 Stanford 大学 Karl Deisseroth 研究室の Yoon Seok Kim 研究員らとの共同研究のもと、緑色光によって励起される  $Ca^{2+}$  イメージングツール「GCaMP6」と rsChRmine を組み合わせ、培養細胞および脳スライスを用いた  $Ca^{2+}$  イメージング実験を行った。その結果、野生型 ChRmine と比較して rsChRmine は GCaMP6 と励起スペクトルの被りが顕著に小さく、GCaMP6 の励起光による ChRmine の活性化という”optical cross-talk”を最小限に抑えることが可能であることが分かった。そこで我々はさらに、この rsChRmine と GCaMP6 を、青色光によって励起される  $Ca^{2+}$  イメージングツール「XCaMP-B」と組み合わせることで、3 色の可視光を用いた *in vivo* 光遺伝学実験という世界初の試みを行った。具体的には、マウスの medial prefrontal cortex (mPFC) 内の pyramidal neuron (Pyr ニューロン) と paralbumin-expressing interneuron (PV ニューロン) にそれぞれ XCaMP-B と GCaMP6 を発現させ、さらにはいずれか一方の細胞に rsChRmine を発現させた状態で、光刺激により rsChRmine 発現細胞を活性化させるという 1 光子でのファイバーフォトリートメトリック実験を行った。その結果、Pyr ニューロンを光刺激した際には Pyr

ニューロンの活性化とともに Pyr ニューロンと接続している PV ニューロンの活性化を捉えることに、PV ニューロンを光刺激した際には PV ニューロンの活性化とともに PV ニューロンと接続している Pyr ニューロンの興奮抑制を捉えることに成功した。これは世界で初めての「3 色の可視光を組み合わせた *in vivo* 光遺伝学実験」であり、今後同技術を用いた all-optical physiology 実験により、神経科学研究が加速すると期待される。

また、我々は rsChRmine が 740 nm 超の近赤外光によって活性化可能な唯一のチャネルロドプシンであることを示しており、この点からも rsChRmine が今後神経科学をはじめとする幅広い生命科学分野において必須の光遺伝学ツールとして活躍する可能性は高いと考えている。

上記の結果は、代表研究者である加藤を最終著者及び責任著者の一人として学術誌 *Cell* に掲載された。

## 参考文献

1. Kato HE. Structure-Function Relationship of Channelrhodopsins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1293, 35-53 (2021)
2. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.*, 8, 1263-8 (2005)
3. Marshel JH, Kim YS, Machado TA, Quirin S, Benson B, Kadmon J, Raja C, Chibukhchyan A, Ramakrishnan C, Inoue M, Shane JC, McKnight DJ, Yoshizawa S, Kato HE, Ganguli S, Deisseroth K. Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception. *Science*, 365, eaaw5202 (2019)
4. Chen R, Gore F, Nguyen QA, Ramakrishnan C, Patel S, Kim SH, Raffiee M, Kim YS, Hsueh B, Krook-Magnusson E, Soltesz I, Deisseroth K. Deep brain optogenetics without intracranial surgery. *Nat. Biotechnol.*, 39, 161-164 (2021)
5. Matsubara T, Yanagida T, Kawaguchi N, Nakano T, Yoshimoto J, Sezaki M, Takizawa H, Tsunoda SP, Horigane SI, Ueda S, Takemoto-Kimura S, Kandori H, Yamanaka A, Yamashita T. Remote control of neural function by X-ray-induced scintillation. *Nat. Commun.*, 12, 4478 (2021)

6. Bansal H, Gupta N, Roy S. Theoretical analysis of optogenetic spiking with ChRmine, bReaChES and CsChrimson-expressing neurons for retinal prostheses. *J Neural Eng.*, 18 (2021)
7. Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana AD, Ishitani R, Deisseroth K, Nureki O. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*, 482, 369-74 (2012)
2. Hideaki Kato, "Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine" SFB 1078 Colloquium, Berlin, Germany (Zoom) (January 24, 2022)

誌上発表

1. Kishi KE, Kim YS, Fukuda M, Inoue M, Kusakizako T, Wang PY, Ramakrishnan C, Byrne EFX, Thadhani E, Paggi JM, Matsui TE, Yamashita K, Nagata T, Konno M, Quirin S, Lo M, Benster T, Uemura T, Liu K, Shibata M, Nomura N, Iwata S, Nureki O, Dror RO, Inoue K, Deisseroth K, **Kato HE**. Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine. *Cell*, in press (2022)

**研究の発表**

口頭発表

1. 加藤英明 : Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine, 第 44 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2021 年 12 月 2 日