

<b>氏名</b>	わたなべ よしと 渡邊 義人
本籍（国籍）	宮城県
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	工博 第336号
学位授与年月日	令和4年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当 課程博士
研究科及び専攻	工学研究科フロンティア物質機能工学専攻
<b>学位論文 題目</b>	<b><math>\mu</math>Wオーダーの光に対する感度を持つチャンネルロドプシン遺伝子の開発</b>
学位審査委員	主査 教授 富田 浩史 副査 准教授 菅野 江里子 副査 准教授 尾崎 拓

## 論文内容の要旨

### 学位論文要旨

#### 背景

光駆動型カチオンチャンネルであるチャンネルロドプシン-2（ChR2）は、神経科学研究において、神経ネットワークの仕組みを調べるためのツールとして広く用いられるようになってきている。一方、視覚分野では、ツールとしての利用だけでなく、失明者の視覚を再建する治療技術として、開発が進められている。我々は、失明したラットの網膜細胞に ChR2 を導入することで、視機能を回復できることを報告し、さらに、ChR2 よりも広い波長感受性を持つ改変型 Volvox チャンネルロドプシン-1（mVChR1）の開発に成功し、mVChR1 は、現在、製薬企業において遺伝子治療薬として開発が進められている。しかし、この遺伝子治療で回復される視機能は、導入する遺伝子の機能に依存するため、本研究では、mVChR1 よりもさらに高機能な遺伝子を人工的に創出することを目的とした。

mVChR1 は、青色から赤色まで幅広い波長光に応答するという特徴的な機能

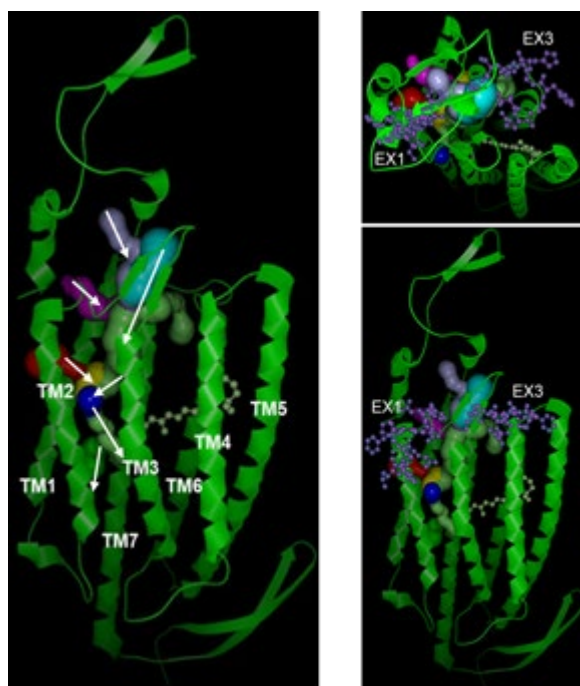


図 1 mVChR1 イオン伝導経路

を有する反面、光感受性に関しては、青色のみに波長感受性を持つ ChR2 に及ばない。mVChR1 の波長感受性をそのままに、光感受性を増大させるために、ChR2 のアミノ酸配列を組み入れた新規遺伝子を創出した。チャンネルロドプシンは 7 回膜貫通型のタンパク質で、7 個の膜貫通領域(TM)のうち、TM1, TM2, TM3, TM7 によって、イオン伝導経路が形成されることが報告されている。そこで、ChR2 の結晶構造をもとにして mVChR1 のイオン伝導経路をシミュレーションした (図 1)。このイオン伝導経路のシミュレーションから、イオン伝導経路に関わるアミノ酸配列を置換することで光によって誘発されるイオン透過量を調節できる可能性がある。

## 方法

シミュレーションしたイオン伝導経路に近接する mVChR1 のアミノ酸配列のうち 2 つの部位を光感受性の高い ChR2 の相同アミノ酸配列に置換した。また、イオン伝導経路近傍のアミノ酸置換により、光電流特性が変化していることを確認するために、イオン伝導経路から遠い位置にある細胞外ループも ChR2 の相同アミノ酸配列に置換した変異体を作製した。光電流特性が優れていた変異体を、さらにチャンネルの開閉速度を速くするために、開閉速度とイオン透過性に優れていると報告されている CoChR のアミノ酸配列を導入した ex3mV1Co を作製した。作製したチャンネルロドプシン遺伝子のプラスミドには目的タンパク質の下流に緑色蛍光タンパク質 Venus を付加している。培養細胞に遺伝子導入後、蛍光画像を取得して膜局在を確認した。また、パッチクランプ法による光電流測定の際にも Venus の蛍光を有している細胞であることを確認して測定を行った。光電流測定にはパッチクランプ法を用いた。パッチクランプ法は、細胞に微小なガラス電極を  $G\Omega$  以上で高密着させて細胞膜に発現するイオンチャンネルを解析する電気生理学の手法である。今回、ホールセル記録を行い光電流を記録をした。ホールセル記録では、細胞に微小なガラス電極を  $G\Omega$  以上で高密着させたのち、細胞膜に穴を開けて細胞内とガラス電極内を一体化させる。その後、刺激によりイオンチャンネルが開閉した際のイオンの出入りを電位変化として測定する手法である。光電流特性が優れていた変異体 ex3mV1Co を、遺伝的に視細胞が変性する Royal College of Surgeons (RCS) ラットに遺伝子導入し、生体内でも機能して光応答が回復するかを確認するために、視覚誘発電位 (VEP) を測定した。その後、網膜を摘出し NeuN で免疫染色をして、チャンネルロドプシンタンパク質発現の局在を確認した。

## 結果

ex1(TM2 と TM3 の間の細胞外ループ) を置換した ex1mV1 では光電流が低下していたが、ex3 (TM6 と TM7 の間の細胞外ループ) を置

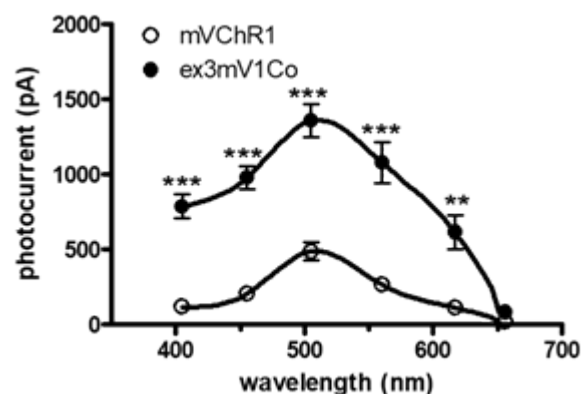


図 2 ex3mV1Co のピーク光電流の比較

換した ex3mV1 では光電流が有意に上昇した。また、ex2 (TM4 と TM5 の間の細胞外ループ) を置換した ex2mV1 では有意な変化はなかった。そこで、ex3 と TM7、c 末端領域を置換した ex3mV1Co を作製した。405-617nm における光感受性は、mVChR1 よりも高かった (図 2)。さらに、ex3mV1Co は培養細胞を用いたパッチクランプ法によるホールセル記録では 505nm において 40nW/mm<sup>2</sup> の弱い光にも高い応答を示した。最後に、ラットの網膜変性モデルにおいて、ex3mV1Co が生体内で機能するかどうかを検討した。遺伝的に視細胞が変性する Royal College of Surgeons (RCS) ラットにアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを介して ex3mV1Co を導入したところ、視力が回復し、 $\mu$ W オーダーの弱い光への応答を確認した (図 3)。また、青、緑、赤の光に対しての広い波長感受性を有していた。さらに、行動解析実験により ex3mV1Co 導入ラットにおいて視運動反応が確認された。このことから、ex3mV1Co は生体内でも機能していることを示した。

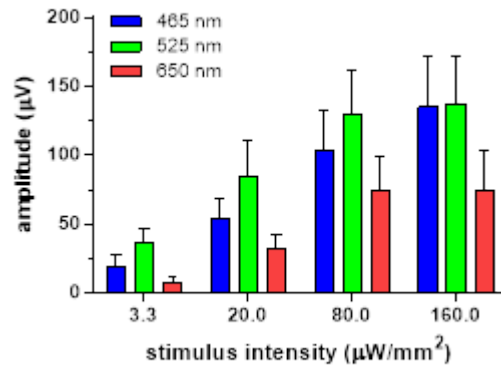


図 3 ex3mV1Co 導入ラットの VEP 応答

## 結論

$\mu$ W オーダーの弱い光強度や広帯域の光に感度を持つ遺伝子の開発に成功した。日常生活で受ける光の強度は非常に低いため、 $\mu$ W オーダーの弱い光強度や広帯域の光に感度を持つチャンネルロドプシンは、特に視力回復のための遺伝子治療に有用であると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

近年、光で神経細胞を制御する光遺伝学 (Optogenetics) という分野が注目されている。光による神経細胞の制御には、チャンネルロドプシンと呼ばれるタンパク質がツールとして用いられている。チャンネルロドプシンは、光受容によりレチナールの光異性化に伴いチャンネルロドプシン自体の構造変化が生じて、光応答するタンパク質として知られている。特に視覚分野では、チャンネルロドプシンを用いて失明者の視覚を再建する治療技術として開発が進められている。この治療技術で回復される視機能は、導入する遺伝子の機能に依存する。そこで、先行研究において、失明したラットの網膜細胞にチャンネルロドプシン-2 (ChR2) を導入することで視機能を回復できることを報告し、さらに ChR2 よりも広い波長感受性を持つ改変型 Volvox チャンネルロドプシン-1 (mVChR1) の開発に成功している。本論文は、より高度な視機能の回復を目的とした、mVChR1 よりもさらに高機能な遺伝子

の人工的な創出に関するものである。

チャンネルロドプシンは7個の膜貫通領域(TM)を有しており、そのうちのTM1, TM2, TM3, TM7によってイオン透過経路が形成されることが知られている。そこで、タンパク質内部のイオン透過経路探索ソフトウェアであるCAVER3.0を用いて、以前に報告されたC1C2の結晶構造をもとにしてmVChR1のイオン透過経路をシミュレーションした。このシミュレーションから、mVChR1のイオン透過経路に近接する細胞外ループ(ex1, ex3)と遠い位置にある細胞外ループ(ex2)を光感受性の高いChR2の相同アミノ酸配列に置換した変異体を作製した(ex1mV1, ex2mV1, ex3mV1)。mVChR1のイオン透過経路に近接する細胞外ループを置換したex1mV1では光電流が低下し、一方ex3mV1では光電流が上昇した。また、mVChR1のイオン透過経路と遠い位置にある細胞外ループを置換したex2mV1では光応答には変化が見られなかった。この結果により、イオン透過経路に近接する細胞外ループが光電流の増減に関与することを明らかにした。

次に、光電流特性が優れていた変異体ex3mV1のチャンネル開閉速度を速くすることを目的として、チャンネル開閉速度とイオン透過性が優れていると報告されているChloromonas Oogama derived-channelrhodopsin (CoChR)のTM6のアミノ酸配列を導入したex3mV1Coを作製した。作製した変異体ex3mV1Coのチャンネル開口速度( $\tau_{ON}$ )とチャンネル閉口速度( $\tau_{OFF}$ )はともに、ex3mV1よりも速くなった。チャンネル開閉速度は視覚再生の治療への応用をする上では光への反応速度と関係があり、チャンネル開閉速度の向上はより生来に近い視覚の再生へと繋がる可能性がある。

続いて、ex3mV1Coの機能向上を分子動力学シミュレーションにより解析を行った。解析結果より、プロリン246(ex3mV1Co;)/システイン246(ex3mV1)は、TM5のバリリン241(V241)、TM7のイソロイシン309(I309)とイオン透過経路を形成していることを明らかにした。また、ex3mV1Coの246番目のアミノ酸とイソロイシン309の平均距離は8.3Åであり、ex3mV1の6.9Åよりイオン透過経路が拡大しており、このイオン透過経路の拡大がex3mV1Coにおける光電流の増大の要因であることを示した。

最後に、ラットの網膜変性モデル(Royal College of Surgeons, RCS)において、ex3mV1Coが生体内で機能するかどうかを検討した。ex3mV1Coを導入してから2ヶ月後の視覚誘発電位(VEP)の測定では、 $3.3 \mu\text{W}/\text{mm}^2$ の弱い光強度でもVEPが記録された。また、行動解析実験(視運動反応)においても、黒白、黒青、黒緑、黒赤の縞模様に対する視運動反応が確認された。この際の光刺激の照度はそれぞれ103、30、40、36ルクスと低い照度で視運動反応が観察されることを示した。ラットの網膜変性モデルにおける実験結果より、開発したex3mV1Coが生体内でも弱い光強度でも機能することを明らかにした。

以上のように、本論文ではmVChR1よりも弱い光強度に感度を持つ高機能な遺伝子の開発に成功した。日常生活で受ける光の強度は非常に低いため、 $\mu\text{W}$ オーダー

の弱い光強度に感度を持つチャンネルロドプシンは、特に視力回復のための遺伝子治療に貢献するものと期待される。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。

#### 原著論文（1編）

Development of an optogenetic gene sensitive to daylight and its implications in vision restoration, Yoshito Watanabe, Eriko Sugano, Kitako Tabata, Akito Hatakeyama, Tetsuya Sakajiri, Tomokazu Fukuda, Taku Ozaki, Tomoya Suzuki, Tatsuki Sayama, Hiroshi Tomita, NPJ Regenerative Medicine, Volume 6, Article number:64,  
DOI:<https://doi.org/10.1038/s41536-021-00177-5>, 2021年10月