

博士論文

$\mu W$  オーダーの光に対する感度を持つ  
チャンネルロッドプシン遺伝子の開発

岩手大学 工学研究科

フロンティア物質機能工学専攻

渡邊 義人

1 概要	-----3
2 背景、目的	-----5
2.1 背景	-----5
2.2 目的	-----7
3 実験方法、実験装置	
3.1 変異体の設計とプラスミドの調製	----- 8
3.2 細胞の準備	----- 8
3.3 HEK293 細胞への遺伝子導入(リン酸カルシウム法)	----- 9
3.4 細胞内液の作製	----- 10
3.5 細胞外液の作製	----- 11
3.6 バッチ電極の作製	-----11
3.7 ホールセル記録	----- 12
3.8 実験動物	----- 13
3.9 アデノ随伴ウイルス(AAV, adeno-associated virus) ベクターの調製	-----13
3.10 アデノ随伴ウイルス(AAV)の投与	----- 14
3.11 網膜切片とホールマウント網膜	-----14
3.12 免疫組織染色	----- 15
3.13 分子動力学シミュレーション	----- 15
3.14 行動解析	----- 16
4 実験結果	----- 18
4.1 変異体の光応答	----- 18
4.2 ex3mV1Co 発現細胞の光電流	-----18
4.3 AAV を用いた ex3mV1Co 遺伝子のラットへの遺伝子導入	----- 20
4.4 視覚誘発電位(VEP)の記録	-----20
4.5 行動解析	----- 20
5 考察	----- 21
6 結論	----- 25
7 参考文献	----- 26
8 付録、図	-----34
9 謝辞	-----54

## 1. 概要

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。光感受性を向上させるために、バイオインフォマティクス的手法を用いてイオン透過経路をシミュレーションし、mVChR1 のアミノ酸配列のうち 2 つの部位を ChR2 の相同アミノ酸配列に置換した。さらに、TM6 と TM7 の細胞外ドメインと TM6、c 末端領域を置換した ex3mV1Co の 405-617nm における光感受性は、mVChR1 よりも有意に高くなり、Human embryonic kidney (HEK) 293 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 で 40nW/mm<sup>2</sup> の光に応答した。また、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) ベクターを用いて ex3mV1Co を導入したところ、視力が回復し、 $\mu$ W オーダー

の光への応答を確認した。以上のように、ex3mV1Co を利用することにより、より高度な視覚機能を提供できると考えられた。

## 2. 背景、目的

### 2.1 背景

近年、イオンポンプ型やイオンチャネル型のロドプシンを神経細胞に発現させて光により神経の興奮、抑制を制御することで脳や神経などの機能を研究する光遺伝学 (Optogenetics、オプトジェネティクス) という分野が注目されている。オプトジェネティクスで利用されているロドプシンは、オプシンと呼ばれるタンパク質とビタミン A 誘導体のレチナールで構成されており、オプシンの中央に位置するシッフ塩基を介してレチナールが結合した 7 回膜貫通型のタンパク質である。ロドプシンが光を感受すると、レチナールの光異性化に伴うロドプシン自体の構造変化が引き起こることで、チャネルが開口し、ナトリウムイオンの細胞内への流入が生じる。この機能を応用して、神経細胞にロドプシンを発現させることで、光刺激により細胞膜の脱分極を介して活動電位を生じさせることができる。特に、光駆動型カチオンチャネルである channelrhodopsin-2 (ChR2) [1, 2] は、オプトジェネティクス技術の中心的な役割を果たしており、オプトジェネティクス技術は様々な分野の研究で利用されるに至っている。神経科学の研究では、チャネルロドプシン-2 (ChR2) 遺伝子を神経細胞に導入し、神経活動[3, 4]や行動の光制御[5]、脳機能の研究[6]、神経疾患のメカニズムの研究[7, 8]などが行われている。視覚研究の分野では、オプトジェネティクス技術が失明者の視覚再建をする治療の研究に利用されており[9]、これまでに失明したマウスやラットの網膜神経節細胞に ChR2

を導入することで、光に対する応答が回復することが報告されている[10,11,12,13]。また、ラット[14]やマーマウス[15]を用いた安全性試験も行われており、ChR2 遺伝子の持続的な発現によっても免疫反応は惹起されず、安全性は比較的高いと考えられている。すでに、米国では視力回復のための ChR2 遺伝子を用いた遺伝子治療臨床試験が進行中である。しかし、ChR2 は青色光に対する応答は優れているものの、それ以外の可視光に対する応答は小さく、特に赤色光などの長波長光には応答がない。そこで、我々は、ChR2 よりも広い波長感受性を持つ改変型 Volvox channelrhodopsin-1 (mVChR1) を開発し [16]、mVChR1 遺伝子の導入により、遺伝的に視細胞が変性する RCS ラットの視機能の回復を実証している。また、回復した視覚応答は 1 年以上経過しても減衰せずに副作用がないことを報告している[17]。しかし、チャンネルロドプシン遺伝子治療により回復した視覚機能は、本来の視覚に比べて光感受性が劣ることが明らかになっている。また、網膜への 2 つのチャンネルロドプシン遺伝子の共発現は、波長感受性は拡大するが、光感受性は増大しないことも報告している[18]。そのため、単一の遺伝子で mVChR1 よりも光感受性の高いチャンネルロドプシンを開発する必要がある。

これまでに、ChR2 (E123T/T159C) [19,20]、ChIEF (キメラ) [21] など、様々なタイプのチャンネルロドプシンが開発されているが、これらの多くは、光刺激には mW オーダーの光強度が用いられた実験で光感受性が評価されている。私たちが日常的に受けている光による視覚は、一般的に  $\mu\text{W}$  オーダーの光であり、失明者に対する治療技術とし

ての利用を考慮すると、少なくとも  $\mu\text{W}$  オーダーの光に対してより高い光感受性を持つチャンネルロドプシンが視力回復に有用であると考えられる。

### 2.2 目的

本研究では、mVChR1 のイオン透過経路に関連するアミノ酸を光感受性の高い ChR2 のアミノ酸に置換することで、 $\mu\text{W}$  オーダーの光に対してより高い光感受性を持つチャンネルロドプシンを創出することを目的とした。また、光感受性が増大した要因をチャンネルロドプシンの分子サイクルとイオン透過経路に基づいて考察を行った。

### 3. 材料と方法

#### 3.1. 変異体の設計とプラスミドの調製

イオン透過性を向上させるために、mVChR1 の膜貫通領域(TM3)と細胞外ループに近い3つの部位(ex1,ex2,ex3)をそれぞれChR1とChR2のものに置き換えた。ChR1のTM3(図1)はコンダクタンスの増加[22]に関連するアミノ酸配列であると報告されている。そこで、以前に報告されたC1C2の結晶構造からCAVER3.0でmVChR1のex1,ex2,ex3のアミノ酸配列をChR2の対応する配列に置換し、それぞれex1mV1, ex2mV1, ex3mV1, ex13mV1とした(図2)。さらに、ex3mV1のTM6およびc末端領域をChloromonas Oogama derived-channelrhodopsin (CoChR)[23]の対応するアミノ酸に置換し、ex3mV1Coとした。上記でアミノ酸の置換をした各遺伝子を含むプラスミドベクターを設計した[17]。すべてのプラスミドベクターは、各遺伝子のC末端にVenus蛍光タンパク質をコードする遺伝子を融合させた。これらのVenus融合cDNAを6P1-CAGプラスミドにサブクローニングした[11]。これらのプラスミドベクターを用いて、各遺伝子をHuman embryonic kidney (HEK)293細胞に導入し、AAVベクターを調製した。

#### 3.2 細胞の準備

HEK 293 細胞は、37°Cの5%CO<sub>2</sub>の条件で下記の組成で調製した Minimum Essential



Medium (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)で培養した。培地は3日ごとに新たな培地に交換し、0.02%エチレンジアミン四酢酸/DPBS溶液を用いて細胞を継代した。

MEM (Minimum Essential Medium, Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)

10% FBS (Fetal Bovine Serum, ThermoFisher, Massachusetts)

1 × Ab (Antibiotic-Antimycotic, ThermoFisher, Massachusetts)

1 × GM (GlutaMAX<sup>TM</sup> Supplement, ThermoFisher, Massachusetts)

1 × MEM NEAA (MEM Non-Essential Amino Acids Solution, ThermoFisher, Massachusetts)

### 3.3. HEK293 細胞への遺伝子導入(リン酸カルシウム法)

各 pAAV ベクターの HEK293 細胞へのトランスフェクションは、リン酸カルシウム法により行った。トランスフェクションの前に培地を新たな培地に交換し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>の条件下で5-10分間インキュベートすることで培地を温めた。600 μLの0.3M CaCl<sub>2</sub>溶液と6 μgのプラスミド溶液を混合し、この混合液をHBS溶液(HEPES-buffered Saline, pH 7.10)に滴下して、リン酸カルシウム-DNA粒子を準備した。事前にインキュベートしたdishにリン酸カルシウム-DNA粒子を添加し、37°Cで6時間培養した後、培地を新しい培地に交換した。細胞は24~30時間培養し、パッチクランプ法による測定の前日にスライドガラスに播種した。

280 mmol/L NaCl  
1.5 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
50 mmol/L HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid, 同仁科学研究所, Japan)

#### 3.4 細胞内液の作製

下記の組成で、pH7.2 に調製した細胞内液を作製し[24]、1.5mL tube に分注後、-20°C で保存した。使用時に、室温で融解して0.2 μm のフィルターにより滅菌した。

130mmol/L CsCl  
1.1mmol/L EGTA (ETHYLENE GLYCOL-bis(β -AMINOETHYL ETHER)-N, N, N', N'-TETRAACETICACID, Sigma, Missouri)  
2mmol/L MgCl<sub>2</sub>  
0.1mmol/L CaCl<sub>2</sub>  
10mmol/L NaCl  
10mmol/L HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid, 同仁科学研究所, Japan)  
2mmol/L Na<sub>2</sub>ATP

### 3.5 細胞外液の作製

下記の組成で、pH7.4 に調製した細胞外液を作製し [24]、使用時まで 4°C で保存した。

実験で使用する際は、95%O<sub>2</sub> と 5%CO<sub>2</sub> の混合ガスを通気させて使用した。

138mmol/L NaCl

3mmol/L KCl

10mmol/L HEPES

4mmol/L NaOH

1mmol/L CaCl<sub>2</sub>

2mmol/L MgCl<sub>2</sub>

### 3.6 パッチ電極の作製

ガラス管キャピラリー (BOROSILICATE GLASS, Sutter Instrument, California) をブ

ラー (PC-10, NARISHIGE, Japan) を用いて引き伸ばし、先端が直径 1-5 μm のガラス

電極を作製した。続いて、ホールセル状態を長時間持続させるために MICRO FORGE

(NARISHIGE, Japan) を用いてガラス電極先端のヒートポリッシュ(熱研磨)を行った。

その後、ガラス電極内に細胞内液を充填し、パッチ電極を作製した。実験には、実験当

日に作製したパッチ電極を使用した。

### 3.7 ホールセル記録

測定前日に細胞を直径 12mm の円形ガラスプレート入りの 35mmdish に播種して、  
37°C・5%CO<sub>2</sub> でインキュベートした。測定時、ガラスプレートを顕微鏡(Eclipse, Nikon,  
Japan)下のチャンバーに移し、細胞外液を灌流させた。顕微鏡下でガラスプレート上に  
単一の細胞であることを確認し、460nm-500nm の励起光を照射して蛍光を発している  
ことを確認した。マニピレーター (EMM-3NV, NARISHIGE, Japan) を用いて、細胞  
にパッチ電極を密着させ、パッチ電極内に陰圧をかけてシール状態 (パッチ電極と細胞  
膜の間が高抵抗の状態) にした後、さらに陰圧をかけてパッチ電極下の細胞膜を破壊し  
た (ホールセル状態)。ホールセル状態形成後、発光ダイオード (Mightex Systems,  
Pleasanton, CA) により光刺激を与え、EPC-10 アンプ (HEKA, Electronic, Germany)  
によりイオン電流を測定した。光刺激には、405, 455, 505, 560, 617, 656 nm の波長光  
を用いて、光強度は  $1\mu\text{W}/\text{mm}^2$  に統一した。測定データは、10 kHz でフィルタリ  
ングし、5 kHz でサンプリングした。また、測定は、膜電位を -60mV に固定下で行っ  
た。なお、測定は暗室内で行われた。記録されたデータを CSV 形式で出力し、エクセ  
ルを用いて、ピーク電流、定常電流、脱感作、 $t_{\text{er n i n g - O N}} (\tau_{\text{O N}})$  および  $t_{\text{e r n i n g - O F F}} (\tau_{\text{O F F}})$  の解析を行った[25]。  $\tau_{\text{O N}}$  は、光刺激中の最大光電  
流の振幅の  $1-e^{-1}$  (63%) に達するまでの時間として算出した。  $\tau_{\text{O F F}}$  は、光刺激の終  
了時の定常状態の光電流の振幅の  $e^{-1}$  (37%) に到達する時間として算出した。脱感作

は、最大光電流の振幅と定常状態の光電流の振幅の差をピーク振幅で割ったものとして算出した。

#### 3.8 実験動物

すべての動物実験は、岩手大学動物管理・使用委員会のガイドラインに準拠して実施した。実験は、CLEA Japan (東京) から入手した 7-10 ヶ月齢の Royal College of Surgeons (RCS; rdy/rdy) [26] ラットを用いて行った。ラットは、水を自由に飲めるようにして、周期的な明暗サイクル (8 時点灯、20 時消灯) で、室温を  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  に維持して飼育した。

#### 3.9 アデノ随伴ウイルス(AAV, adeno-associated virus) ベクターの調製

AAV ベクターの作製には、ex3mV1Co を含むプラスミドベクターを使用した。AAV Helper-Free System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用して、マニュアルに従ってシングルステップカラム精製法で感染性 AAV ウイルスを作製した [27]。精製された AAV ベクターの濃度は、ELISA (PROGEN、ハイデルベルグ、ドイツ) を用いて AAV キャプシドタンパク質レベルを測定して算出した。

### 3.10 アデノ随伴ウイルス(AAV)の投与

ラットに  $34.6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ケタミンと  $3.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  キシラジンを筋肉内注射して麻酔をした。手術顕微鏡を用いて、 $1\sim 10\times 10^{12}$ 個 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ を含む懸濁液  $5\mu\text{L}$ を、32ゲージの針 (Hamilton Company, Reno, NV) の自動注射器 (Neurosyringe AC, ACruX inc., Morioka) を用いて、鋸状縁に静脈内注射した。

### 3.11 網膜切片とホールマウント網膜

ラットの眼球を 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, phosphate-buffered saline ; pH7.4) を用いて  $4^{\circ}\text{C}$ で一晩固定した。眼球を PBS で洗浄し、角膜、虹彩、水晶体などの前眼部を除去した。アイカップから網膜を剥離し、網膜伸展標本を作成し、NeuN 抗体で網膜神経節細胞を染色した。蛍光顕微鏡 (Axiovert2, Zeiss) 下で撮影を行い、撮影終了後に、網膜伸展標本をスライドガラスから剥離し、網膜切片を作製するために、網膜組織を 10%、20%、30%ショ糖/PBS に浸漬し、Histotech Pino<sup>®</sup> (Sakura, Tokyo, Japan) を用いて、optimal cutting temperature(OCT) compound (Sakura, Tokyo, Japan) に包埋した。クライオスタット (CM1950, Leica) を用いて、凍結切片 ( $12\mu\text{m}$ ) を作製した。

### 3.12 免疫組織染色

網膜を hyaluronidase (300 units/mL, Cat No. H3884, Merk, Tokyo) で室温で 2 時間処理した。0.5% Triton X-100/ PBS (0.5% Tx-PBS) で洗浄した後、網膜を 2% normal goat serum と 2% Triton X-100 を含む PBS で希釈した ALEXA FLUOR® 594 anti-NeuN ポリクローナル抗体 (5  $\mu$ g/mL) で室温に置き一晩インキュベートした。0.5% Tx-PBS で洗浄した後、網膜をスライド上にフラットマウントし、fluoromount-G® (Cosmo-Bio, Tokyo) で封入した。切片とフラットマウントした網膜を蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Tokyo) で観察した。

### 3.13 分子動力学シミュレーション

ex3mV1 および ex3mV1Co タンパク質の初期構造座標は、相同性モデリングサーバー SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) を用いて、チャンネルロドプシン (PDB: 4yzi) の基底状態結晶構造に基づいて決定した。モデル構造は、タンパク質の二量体、共有結合したレチナール分子、5 つのオレイン酸、タンパク質モノマーあたり 19 個の水分子を含んでいる。ポテンシャルエネルギー関数は、タンパク質とオレイン酸には CVFF 力場を、ポリエーテル鎖 (レチナール分子) には ESFF 力場を用いた。MD シミュレーションには以下のプロトコルを採用した。構造最適化の際には、タンパク質の重原子やオレイン酸、結晶構造中の分解された水分子を固定した。平衡計算として、200ps の

MD シミュレーションにおいて力定数を  $25 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}$ 、 $10 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}$  および  $1 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}$  と減少させることにより、初期構造への位置制限を徐々に緩和させながら分子動力学シミュレーションを行った。次に、National Variety Trial (NVT)アンサンブルにおいて、位置制限を行わずに、298K の一定温度で 1ns のシミュレーションを行った。分子動力学シミュレーションは、Discover/Insight II ソフトウェアパッケージ (BIOVIA, Inc.)で行った。1fs で積分し、短距離相互作用のカットオフは  $9.5 \text{\AA}$  とした。Discovery Studio 4.5 ソフトウェアパッケージ (Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release, 2017, San Diego. Dassault Systemes, 2016) を用いて分子グラフィックスを操作し、シミュレーション解析を行った。

#### 3.13 行動解析

ex3mV1Co を遺伝子導入したラットの視運動反応を測定した。黒い背景上に縞模様の刺激を伴う可変周波数の正弦波関数に従って生成された仮想視運動システムを使用した[16]。ex3mV1Co は mVChR1 より感度が高いため、プロジェクターの代わりに液晶ディスプレイを使用した。最大光強度は白色光で 103 ルクスだった。色を青、緑、赤に設定し、プラットフォームの中央の輝度値はそれぞれ 30、40、36 ルクスだった。画面に表示される各波長は、照明メーター (LX-1128SD;マザーツール、長野、日本) を使用して測定した。測定では、ラットが動きを停止するまで待機し、その後、各縞模様の



刺激前に、均一な灰色の画面を 5 秒間表示した。縞模様の移動方向は 5 秒ごとに左右方向が切り替わり、全体で 60 秒間縞模様を表示した。

## 4. 結果

### 4.1 変異体の光応答

各遺伝子導入 HEK293 細胞の光電流をパッチクランプ法により測定した。ex3mV1-HEK293 細胞の光電流は、mVChR1-HEK293 細胞の光電流よりも有意に大きかった (図 3)。一方、ex1mV1-HEK293 細胞では応答が得られず、ex13mV1-HEK293 細胞では応答が低下していた。ex3mV1 および ex13mV1-HEK293 細胞の  $\tau_{ON}$  と  $\tau_{OFF}$  は、HEK-mVChR1 細胞の  $\tau_{ON}$ 、 $\tau_{OFF}$  よりも有意に長かった (図 4、5)。光刺激時間依存性の解析では、ex3mV1-HEK293 細胞の光電流は、いずれの刺激時間(10ms, 100ms, 1000ms)においても mVChR1-HEK293 細胞の光電流よりも大きかった (図 6)。また、ex2mV1 の光電流は、TM3 と遠い位置にある ex2 領域に近いアミノ酸を ChR2 に対応するアミノ酸に置換したものであり、mVChR1-HEK293 細胞の光電流と有意な差はなかった (補足図 1)。各遺伝子発現の局在は特に変化しなかった (図 7)。

### 4.2 ex3mV1Co 発現細胞の光電流

ex3mV1 の C 末端を改変した ex3mV1Co の光電流を測定した結果、ex3mV1Co の光電流は mVChR1 よりも有意に大きく (図 9 A)、 $\tau_{ON}$  は mVChR1 と有意な差は見られなかった (図 9 B)。一方、 $\tau_{OFF}$  は ex3mV1 より短縮したものの、mVChR1 よりも長かった (図 9 C)。ex3mV1 と ex3mV1Co の比較から、TM6 と c 末端領域の置換が  $\tau_{ON}$

に影響を与えていることが示唆された。mVChR1 と ex3mV1Co の I-V 曲線にわずかな差がみられ (図 10)、ex3mV1Co の反転電位は mVChR1 と比較して 0mV 側にシフトしていた。また、ex3mV1Co の波長感受性は、mVChR1 と同様に、光電流のピークは 505nm で最大を示した。HEK-ex3mVChR1 のピーク光電流 (図 11 A) と定常光電流 (図 11 B) は 405-617nm で HEK-mVChR1 よりも有意に大きく、また、ex3mV1Co-HEK293 細胞の 405-656nm における脱感作率は、mVChR1-HEK293 細胞の脱感作率よりも有意に小さかった (図 12)。mVChR1-HEK293 細胞の脱感作率は、505nm で最大であり、この傾向は、ex3mV1Co-HEK293 細胞の脱感作率と同様であった。光強度に対する光応答 (図 13 A) および光刺激時間依存性 (図 13 B) を測定した。0.04  $\mu\text{W}/\text{mm}^2$  の弱い光刺激においても、ex3mV1Co-HEK293 細胞では光電流が測定され、さらに、0.2  $\mu\text{W}/\text{mm}^2$  の光強度で 10ms, 100ms の短時間光刺激を与えた場合の ex3mV1Co の光電流は、mVChR1 の 1.00  $\mu\text{W}/\text{mm}^2$  の光刺激を 1000ms 与えた場合とほぼ同じ値であった (図 13 A)。図 13 に示すように、ex3mV1Co は光強度・刺激時間に依存して光電流が増大し、mVChR1 と比較して傾きが急であり、光強度・刺激時間依存性が高かった。mVChR1 と ex3mV1Co の間では、いずれのデータも  $p < 0.01$  以上の有意な差があった。

### 4.3 AAV を用いた ex3mV1Co 遺伝子のラットへの遺伝子導入

Venus の蛍光は網膜全体で観察され (図 14 A)、Venus 蛍光の大部分は、NeuN の免疫反応を示すローダミンの染色と重なっていた (図 14 B)。3 次元写真では、共標識領域が網膜表面に局在していることが確認できた (図 14 C)。縦断面の観察では、ex3mV1Co は主に網膜神経節細胞と内網状層で発現していることが示された (図 14 D)。

### 4.4 視覚誘発電位(VEP)の記録

7-10 ヶ月齢の RCS ラット (遺伝的に盲目) では VEP の反応は認められなかった (データは示していない)。ex3mV1Co 遺伝子を導入してから 2 ヶ月後、465nm、525nm、650nm の光刺激では、 $3.3 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  の弱い光強度でも VEP が記録された (図 15)。また、周波数応答についても測定したところ (図 16)、応答の低下は見られなかった。

### 4.4 行動解析

ex3mV1Co を遺伝子導入したすべてのラットは、青黒の縞模様で 0.09 から 0.42 までの空間周波数の範囲で視運動反応が見られた (図 17)。ただし、5 匹中 1 匹のラットにおいては、空間周波数 0.36 の白黒、緑黒の縞模様に対する視運動反応が見られなかった。さらに、5 匹中 1 匹のラットにおいては、空間周波数 0.18 の赤黒の縞模様に対する視運動反応がみられなかった。

## 5. 考察

膜貫通領域(TM)1,2,3,7によって、ChR2のイオン透過経路が形成されることが報告されている[20]。このChR2の結晶構造をもとにmVChR1のイオン透過経路をシミュレーションしたところ、TM1,2,3,7に沿ったいくつかのトンネル構造が検出された。先行研究[25]から、ChR1のTM3が光電流の増加に重要な役割を果たしていると考えられており、mVChR1のイオン透過経路もまた、TM3に存在するため(図1)、ChR1のTM3を置換することでイオン電流を増加させると考えられた。また、VChR1由来のmVChR1の光感受性はChR2のそれよりも低いため[9,28]、mVChR1のイオン透過経路に沿ったアミノ酸をChR2に置換することで、反応性を高められる可能性がある。mVChR1とChR2の一次構造を比較したところ、ex1(TM2とTM3の間の細胞外ループ)とex3(TM6とTM7の間の細胞外ループ)のアミノ酸配列の相同性が低いことが判明した。このex1とex3は、イオン透過経路の入り口に存在し、これらのアミノ酸配列がイオン電流に影響を与えている可能性が考えられた。これらのアミノ酸配列を置換した結果、ex1mV1では光誘起イオンチャネルの活性がみられず、一方ex3mV1では光誘起イオンチャネルの活性が有意に上昇した。これらの結果から、ex1とex3がイオンチャネルの活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、ex3mV1はmVChR1よりも広いスペクトル範囲で大きな光電流を誘起したが、 $\tau_{ON}$ や $\tau_{OFF}$ などのイオンチャネルの開閉速度は遅くなった(図4、5)。 $\tau_{ON}$ や $\tau_{OFF}$ が遅延した

点は、視覚再建への応用においては不利である。生来のヒトの視覚では、1秒間に30枚の画像を動画として認識していると言われおり、光への反応速度が遅い( $\tau_{ON}$ ,  $\tau_{OFF}$ が遅延している)と認識できる画像の枚数減り、滑らかな動画として認識できないと考えられる。そのため、ex3mV1の大きな光電流を持つ利点を維持した上で、 $\tau_{ON}$ や $\tau_{OFF}$ を短縮する必要があると考えられる。そこで、 $\tau_{ON}$ と $\tau_{OFF}$ を速くするために、チャンネル開閉速度ならびに膜発現性に優れるCoChR[29, 30]のアミノ酸配列を組み込み、ex3mV1をさらに改良した。その結果、ex3mV1Coの $\tau_{ON}$ と $\tau_{OFF}$ はex3mV1よりも速くなった(図4、5、図9A、B)。

チャンネルロドプシンにおける光電流の分子的原理は、多重光サイクルモデルに基づいており[31, 32]、イオンチャンネルの開閉は、基底状態と開口状態で説明される[33, 34]。ex3mV1Coの開口速度はmVChR1と変わらないが、ex3mV1Coの閉口速度はmVChR1に比べて遅くなっている。従って、開口状態を維持する時間が長くなっていることから、開口状態を維持することで光電流や脱感作が改善されていると考えられる。また、分子動力学シミュレーションの結果より、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)とイオントンネルを形成している(補足図2)。ex3mV1Coの246番目のアミノ酸とイソロイシン309の平均距離は $8.3\text{\AA}$ であり、ex3mV1の $6.9\text{\AA}$ よりイオン透過経路が拡大しており(補足図3)、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とな

ったと考えられる。

ex3mV1Co の反転電位は mVChR1 に比べて 0mV 側にシフトしていた(図 10)。ナトリウムイオンの平衡電位は+60mV 付近であり、ナトリウムイオン選択性の高いチャンネルでは、反転電位は+60mV に近くなる[35]。一方、プロトンやカリウムイオンなどの他の陽イオンも透過するチャンネルでは、反転電位が負方向にシフトする[36, 37]。ex3mV1Co の反転電位が負方向にシフトしているため、ex3mV1Co のナトリウムイオン選択性は mVChR1 よりも低くなっていると考えられる。アニオンチャンネルロドプシンでは、細胞外ループのアミノ酸残基がアニオンのイオン透過性に関与しており[38, 39]、細胞外側に位置する R84 の正電荷が陰イオン輸送活性に阻害的な役割を果たしていることが報告されている。また、ex3 のアミノ酸は TM6 と TM7 の細胞外側のループであり、アニオンチャンネルロドプシンの報告と同様に、ex3 上のアミノ酸がナトリウムイオン選択性に関与しているのかもしれない。

残存する神経節細胞(RGC)や双極細胞を標的としたチャンネルロドプシンを用いた遺伝子治療は、失明者の視力回復のための有望な治療法として期待されている。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結果、ex3mV1Co が生体内でも安定的に発現し視機能を再生できることが確認された。ex3mV1Co は、青、緑、赤の光に対しての広い波長感受性を有し、感受波長ピークは、in vitro と同じ緑色光であった(図 11)。最も重要な点として、ex3mV1Co 遺伝子を導

入したラットが $\mu\text{W}$  オーダーの光強度に対しても光応答が十分に測定できたことである。遺伝子治療によって回復した視機能は、網膜へ導入した遺伝子の機能に大きく依存していると考えられ [40]、ex3mV1Co を用いることにより高度な視機能を創出できると考えられる。



## 6. 結論

$\mu\text{W}$  オーダーの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。本研究では、光感受性を高めるための分子基盤と、イオン透過経路に基づくチャネルロドプシン遺伝子のチャネル動態を明らかにした。その結果、3番目の細胞外ループ(TM6とTM7の間の細胞外ループ)がナトリウムイオンの選択性に関与していること、TM6とc末端領域がチャネル動態に関与していることを明らかにした。また、日常生活で受ける光の強度は非常に低いため、光感受性が高く、広帯域の波長に感受性を持つチャネルロドプシン遺伝子は、特に視覚再建の遺伝子治療に有用であると考えられる。今回の発見は、より感度の高い遺伝子や異なるチャネル特性を持つ遺伝子など、新たな遺伝子の開発に貢献できると考えられる。

## 7.参考文献

- [1] G. Nagel, T. Szellas, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Hegemann, E. Bamberg, Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels, *Biochem. Soc. Trans.* 33 , 863–866, 2005
- [2] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 13940–13945, 2003
- [3] Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263–1268, 2005
- [4]Komatsu M, Sugano E, Tomita H, Fujii N, A Chronically Implantable Bidirectional Neural Interface for Non-Human Primates, *Front Neurosci*, 11, Article514, 2017
- [5] Georg Nagel, Martin Brauner, Jana F Liewald, Nona Adeishvili, Ernst Bamberg, Alexander Gottschalk, Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* 15, 2279–2284, 2005
- [6] Xue Han, Xiaofeng Qian, Jacob G. Bernstein, Hui-hui Zhou, Giovanni Talei Franzesi, Patrick Stern, Roderick T. Bronson, Ann M. Graybiel, Robert Desimone, and

- Edward S. Boyden, Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. *Neuron* 62, 191–198, doi:10.1016/j.neuron.2009.03.011, 2009
- [7] Shin-ichiro Osawa, Masaki Iwasaki, Ryosuke Hosaka, Yoshiya Matsuzaka, Hiroshi Tomita, Toru Ishizuka, Eriko Sugano, Eiichi Okumura, Hiromu Yawo, Nobukazu Nakasato, Teiji Tominaga, Hajime Mushiake, Optogenetically induced seizure and the longitudinal hippocampal network dynamics. *PLoS One* 8, e60928, doi:10.1371/journal.pone.0060928, 2013
- [8] D.S. Roy, A. Arons, T.I. Mitchell, M. Pignatelli, T.J. Ryan, S. Tonegawa, Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer’s disease, *Nature* 531, 508–512, 2016
- [9] Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M, Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. *J Genet*, 88(4), 409-15, 2009
- [10] A. Bi, J. Cui, Y.P. Ma, E. Olshevskaya, M. Pu, A.M. Dizhoor, Z.H. Pan, Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration, *Neuron*, 50, 23–33, 2006
- [11] H. Tomita, E. Sugano, H. Yawo, T. Ishizuka, H. Isago, S. Narikawa, S. Kugler, M. Tamai, Restoration of visual response in aged dystrophic RCS rats using AAV-

- mediated channelrhodopsin-2 gene transfer, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3821–3826, 2007
- [12] Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, Isago H, Sugiyama Y, Hiroi T, Ishizuka T, Mushiake H, Kato M, Hirabayashi M, Shigemoto R, Yawo H, Tamai M, Visual properties of transgenic rats harboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the thy-1.2 promoter, *PLoS One*, 4(11), e7679, 2009
- [13] Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Ohta E, Tamai M, Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats, *Exp Eye Res*, 90(3), 429-36, 2010
- [14] E Sugano, H Isago, Z Wang, N Murayama, M Tamai, H Tomita, Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. *Gene Ther* 18, 266–274, doi: 10.1038/gt.2010.140, 2010
- [15] Ivanova, E. & Pan, Z. H. Evaluation of the adeno-associated virus mediated long-term expression of channelrhodopsin-2 in the mouse retina. *Mol Vis* 15, 1680–1689, 2009
- [16] H. Tomita, E. Sugano, N. Murayama, T. Ozaki, F. Nishiyama, K. Tabata, M. Takahashi, T. Saito, M. Tamai, Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox channelrhodopsin-1, *Mol. Ther*, 22, 1434–1440, 2014

- [17] Sugano E, Tabata K, Takahashi M, Nishiyama F, Shimizu H, Sato M, Tamai M, Tomita H, Local and systemic responses following intravitreal injection of AAV2-encoded modified Volvox channelrhodopsin-1 in a genetically blind rat model, *Gene Ther*, 23(2), 158-66, 2016
- [18] Sato M, Sugano E, Tabata K, Sannohe K, Watanabe Y, Ozaki T, Tamai M, Tomita H\*, Visual Responses of Photoreceptor-Degenerated Rats Expressing Two Different Types of Channelrhodopsin Genes, *Sci Rep*, 7, 41210, 2017
- [19] Hideaki E. Kato, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, Tomohiro Nishizawa, Kunio Hirata, Jumpei Ito, Yusuke Aita, Tomoya Tsukazaki, Shigehiko Hayashi, Peter Hegemann, Andrés D. Maturana, Ryuichiro Ishitani, Karl Deisseroth, Osamu Nureki, Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel, *Nature*. 482, 369–374, 2012
- [20] Monika R. VanGordon, Gaurav Gyawali, Steven W. Rick, and Susan B. Rempe, Atomistic Study of Intramolecular Interactions in the Closed-State Channelrhodopsin Chimera, C1C2, *Biophysical Journal*. 112, 943-952, 2017
- [21] John Y. Lin, Michael Z. Lin, Paul Steinbach, and Roger Y. Tsien, Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics, *Biophysical Journal*. 96, 1803–1814, 2019

- [22] Brezovský J., Kozlíková B., Damborský J.: Computational Analysis of Protein Tunnels and Channels, *Protein Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Uwe T. Bornscheuer and Matthias Hohne (eds.), vol. 1685, pp 25-42, doi: 978-1-4939-7364-4, 2018
- [23] Nathan C Klapoetke, Yasunobu Murata, Sung Soo Kim, Stefan R Pulver, Amanda Birdsey-Benson, Yong Ku Cho, Tania K Morimoto, Amy S Chuong, Eric J Carpenter, Zhijian Tian, Jun Wang, Yinlong Xie, Zhixiang Yan, Yong Zhang, Brian Y Chow, Barbara Surek, Michael Melkonian, Vivek Jayaraman, Martha Constantine-Paton, Kane Ka-Shu Wong, Edward S Boyden, Independent Optical Excitation of Distinct Neural Populations, *Nat Methods*, Mar; 11(3): 338–346, 2014
- [24] 岡田泰伸 編、新パッチクランプ実験技術法、吉岡書店、2001
- [25] H. Wang, Y. Sugiyama, T. Hikima, E. Sugano, H. Tomita, T. Takahashi, T. Ishizuka, H. Yawo, Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*, *J. Biol. Chem.* 284, 5685–5696, 2009
- [26] LaVail, MM and Battelle, BA, Influence of eye pigmentation and light deprivation on inherited retinal dystrophy in the rat. *Exp Eye Res* 21: 167–192, 1975
- [27] Sugano, E., Tomita, H., Ishiguro, S., Abe, T. & Tamai, M. Establishment of effective methods for transducing genes into iris pigment epithelial cells by using adeno-

- associated virus type 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3341–3348, 2005
- [28] John Y. Lin, A User's Guide to Channelrhodopsin Variants: Features, Limitations and Future Developments, *Exp Physiol*, 96(1): 19–25, 2011
- [29] Lisa C. Schild, Dominique A. Glauser, Dual Color Neural Activation and Behavior Control with Chrimson and CoChR in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, Aug; 200(4): 1029–1034, 2015
- [30] Or A. Shemesh, Dimitrii Tanese, Valeria Zampini, Changyang Linghu, Kiryl Piatkevich, Emiliano Ronzitti, Eirini Papagiakoumou, Edward S. Boyden, Valentina Emiliani, Temporally precise single-cell resolution optogenetics, *Nat Neurosci*. Dec; 20(12): 1796–1806, 2017
- [31] O.P. Ernst, P.A. Sanchez Murcia, P. Daldrop, S.P. Tsunoda, S. Kateriya, P. Hegemann, Photoactivation of channelrhodopsin, *J. Biol. Chem.* 283, 1637–1643, 2008
- [32] P. Hegemann, S. Ehlenbeck, D. Gradmann, Multiple photocycles of channelrhodopsin, *Biophys. J.* 89, 3911–3918, 2005
- [33] K. Stehfest, E. Ritter, A. Berndt, F. Bartl, P. Hegemann, The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T, *J. Mol. Biol.* 398, 690–702, 2010

- [34] O.P. Ernst, D.T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L.S. Brown, H. Kandori, Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms, *Chem. Rev.* 114, 126–163, 2016
- [35] Elena G. Govorunova, Oleg A. Sineshchekov, and John L. Spudich, Structurally Distinct Cation Channelrhodopsins from Cryptophyte Algae, *Biophysical Journal*, 110, 2302–2304, 2016
- [36] Bao-Ming Wu, Tian-Dong Leng, Koichi Inoue, Jun Li, Zhi-Gang Xiong, Effect of Redox-Modifying Agents on the Activity of Channelrhodopsin-2, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23, 216–221, 2017
- [37] Shunta Shigemura, Shoko Hososhima, Hideki Kandori, Satoshi P. Tsunoda, Ion Channel Properties of a Cation Channelrhodopsin, Gt\_CCR4, *Appl. Sci.*, 9, 3440; doi:10.3390/app9173440, 2019
- [38] Satoko Doi, Takashi Tsukamoto, Susumu Yoshizawa, Yuki Sudo, An inhibitory role of Arg-84 in anion channelrhodopsin-2 expressed in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 7, 41879, 2017
- [39] Keiichi Kojima, Hiroshi C. Watanabe, Satoko Doi, Natsuki Miyoshi, Misaki Kato, Hiroshi Ishikita, Yuki Sudo, Mutational analysis of the conserved carboxylates of anion channelrhodopsin-2 (ACR2) expressed in *Escherichia coli* and their roles in



anion transport, *Biophysics and Physicobiology*. 15, 179–188, 2018

- [40] Yoshito Watanabe, Eriko Sugano, Kitako Tabata, Taku Ozaki, Takehiko Saito, Makoto Tamai, Hiroshi Tomita, Kinetic profiles of photocurrents in cells expressing two types of channelrhodopsin genes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496, 814-819, 2018

## 8.付録、図

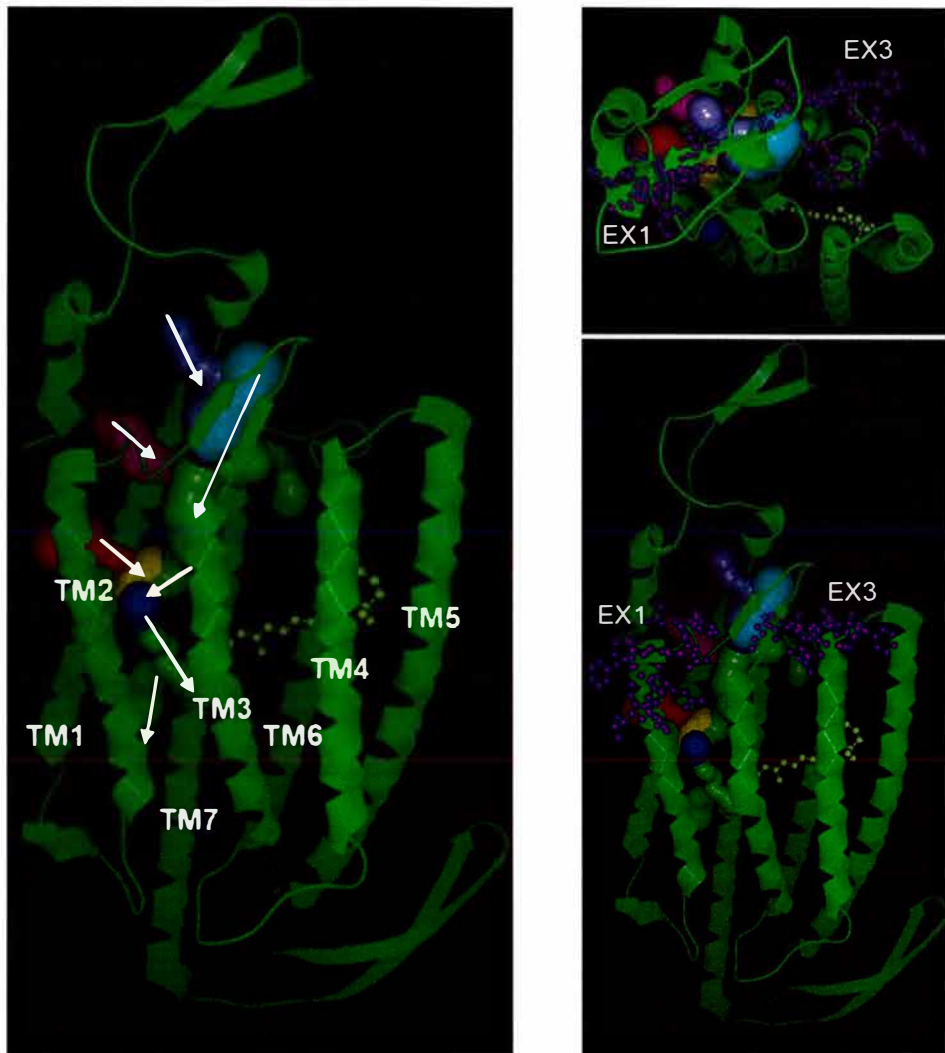


図 1 *Chlamydomonas* 由来 ChR に置換した mVChR1 イオン伝導経路近傍の細胞外領域の位置 TM2 と TM3(EX1)、TM6 と TM7(EX3)の細胞外ループ周辺のアミノ酸配列を示す。イオン透過経路は、CAVER3.0 を用いてシミュレーションした。シミュレーションしたイオン透過経路を白矢印で示した。また、置換されたアミノ酸を紫色の点で示した。

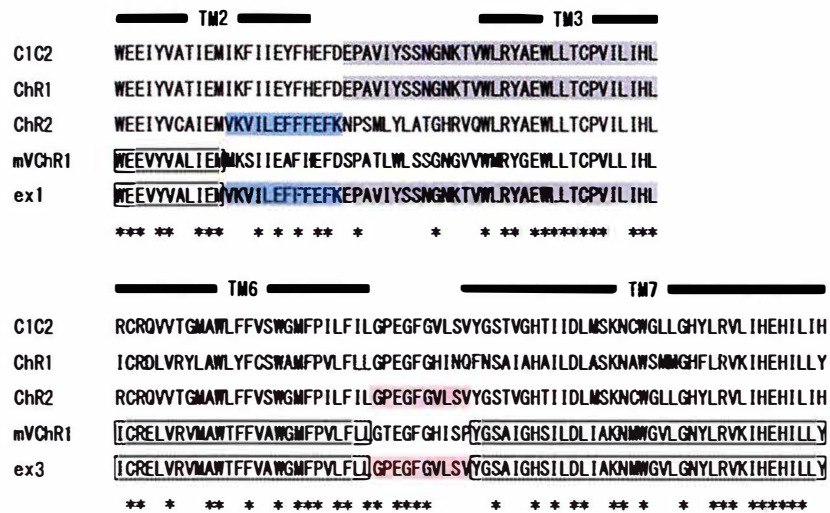


図 2 TM2 と TM3、TM6 と TM7 の細胞外ループ周辺のアミノ酸配列を示す  
 チャンネルロドプシン-1 またはチャンネルロドプシン-2 の置換したアミノ酸は、それぞれ  
 灰色または青色、赤色で示した。

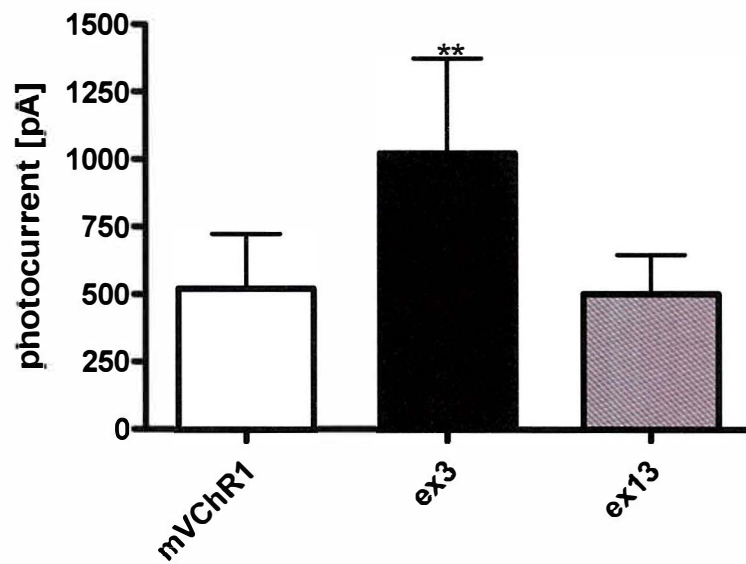


図 3 mVChR1、ex3mVChR1、および ex13mVChR1 遺伝子発現細胞の光電流  
光刺激波長は 505nm で 10 秒間刺激したピーク光電流を比較した(mVChR1: n=11、  
ex3mVChR1: 8、ex13mVChR1: n=6)。光強度は  $1\mu\text{W}/\text{mm}^2$  で統一して、データは Mean  $\pm$   
SEM でしめた(\*, \*\*p < 0.05, 0.01, Dunnett's Multiple Comparison Test)。

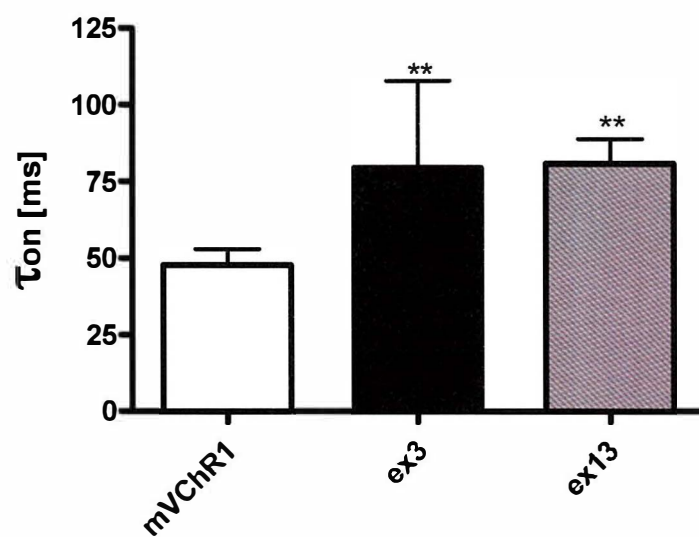


図 4 mVChR1、ex3mVChR1、および ex13mVChR1 遺伝子発現細胞の turning-ON ( $\tau_{ON}$ ) 505nm で 10s の光刺激を与えた場合の各遺伝子発現細胞の  $\tau_{ON}$  を比較した(mVChR1: n=11、ex3mVChR1: 8、ex13mVChR1: n=6)。光強度は  $1\mu\text{W}/\text{mm}^2$  で統一して、データは Mean  $\pm$  SEM で示した(\*, \*\*p < 0.05, 0.01, Dunnett's Multiple Comparison Test)。

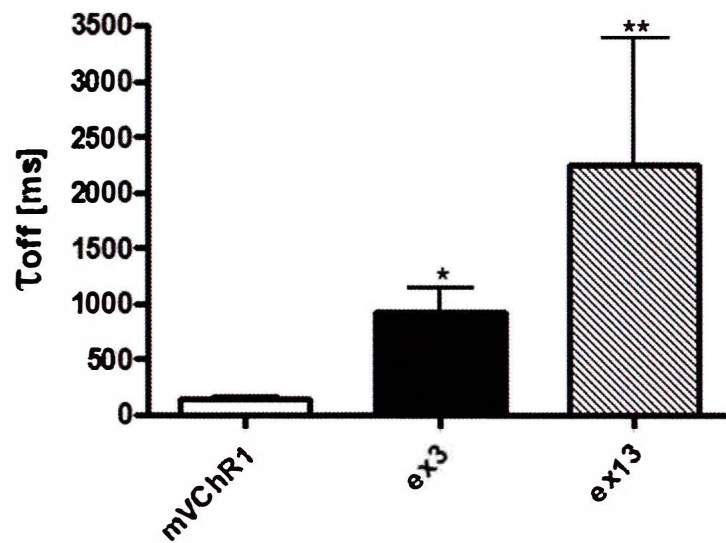


図 5 mVChR1、ex3mVChR1、および ex13mVChR1 遺伝子発現細胞の turning-OFF ( $\tau$  OFF) 505nm で 10s の光刺激を与えた場合の各遺伝子発現細胞の  $\tau$  OFF を比較した(mVChR1: n=11、ex3mVChR1: 8、ex13mVChR1: n=6)。光強度は  $1 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  で統一して、データは Mean  $\pm$  SEM で示した(\*, \*\*p < 0.05, 0.01, Dunnett's Multiple Comparison Test)。

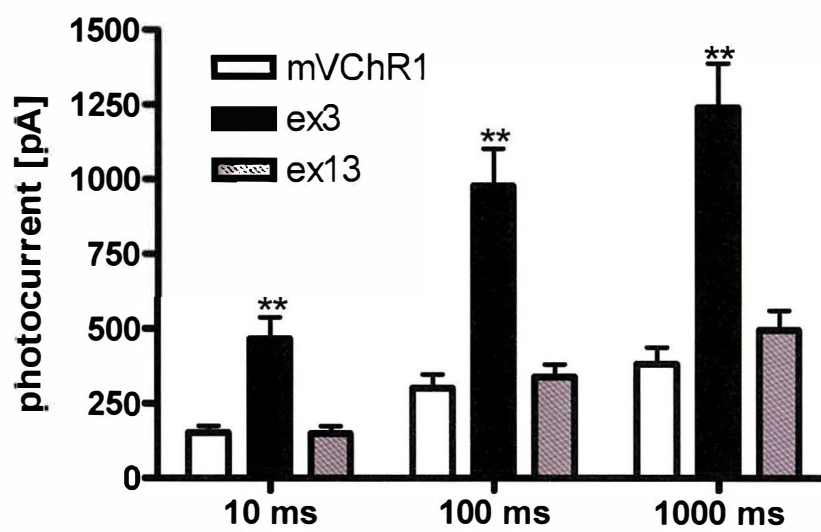


図 6 様々な光刺激時間で誘発された光電流

光刺激時間を 10, 100, 1000ms の 3 条件で、505nm の波長光で刺激した時の光電流を比較した。光強度は  $1 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  で統一して、データは Mean  $\pm$  SEM で示した(\*, \*\* $p < 0.05, 0.01$ , Dunnett's Multiple Comparison Test)。

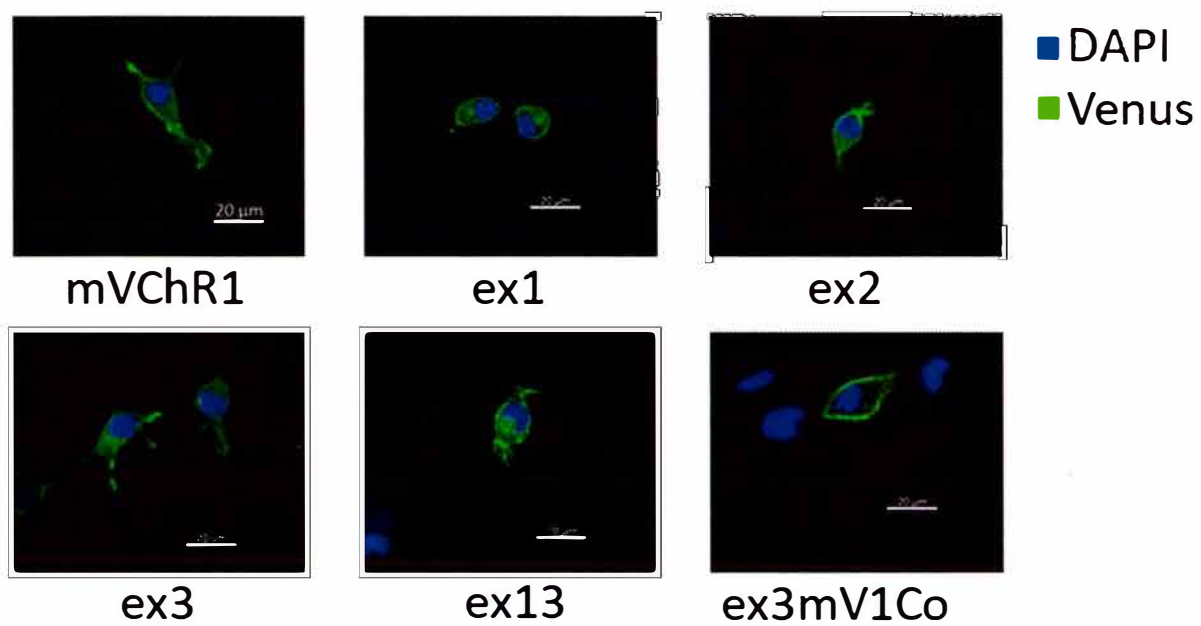


図 7 mVChR1、ex3mV1、および ex13mV1 遺伝子発現の局在  
各遺伝子の発現の局在に差は見られなかった。



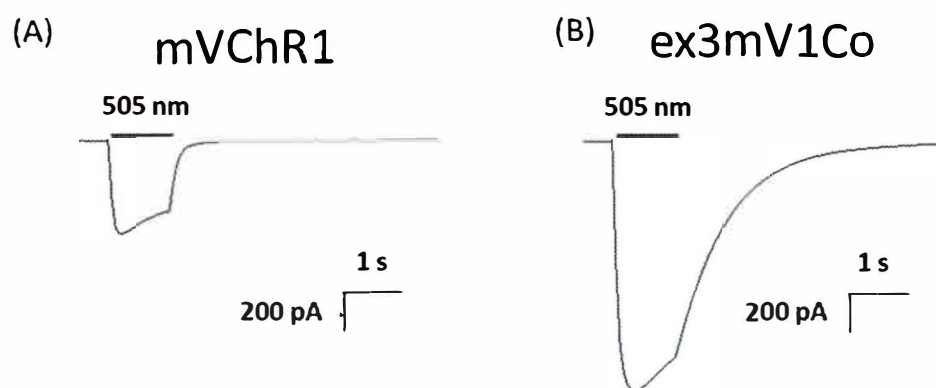


図 8 mVChR1、ex3mV1Co 発現細胞における光電流の波形

505 nm、1s で光刺激した mVChR1、ex3mV1Co 発現細胞の典型的な波形を示した(A, B)。光強度は  $1 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  とした。

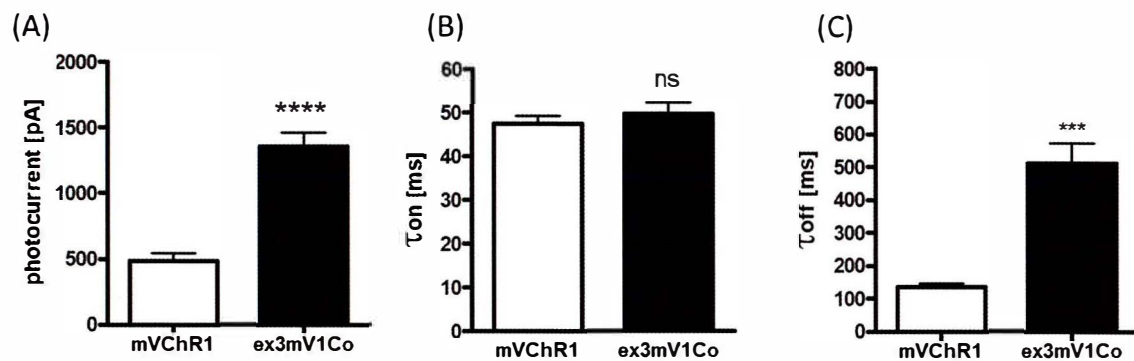


図 9 mVChR1、ex3mV1Co 発現細胞における光電流の比較

505 nm、1s で光刺激した mVChR1 または ex3mV1Co-発現細胞の光電流と  $\tau_{ON}$ 、 $\tau_{OFF}$  を比較した (mVChR1 : n=8、ex3mV1Co : n=11)。光強度は  $1 \mu W/mm^2$  で統一して、データは Mean  $\pm$  SEM で示した (\*\*\*, \*\*\*\*:  $p < 0.001, 0.0001$ , Unpaired t test)。

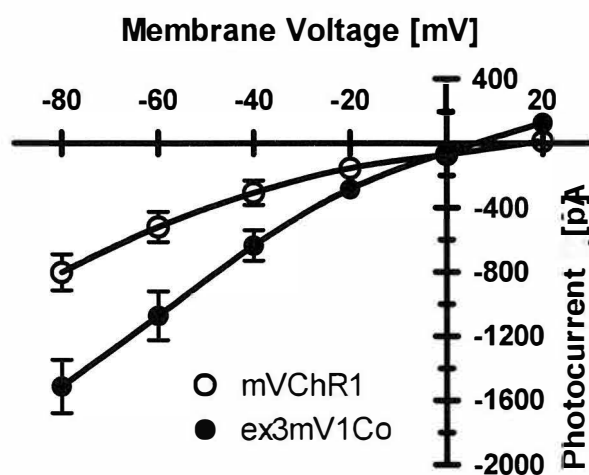


図 10 mVChR1、ex3mV1Co 発現細胞の I-V 曲線

mVChR1 と ex3mV1Co の I-V 曲線を比較した (mVChR1: n=6、ex3mV1Co: n=5)。光強度は  $1 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  で統一して、データは Mean  $\pm$  SEM で示した。

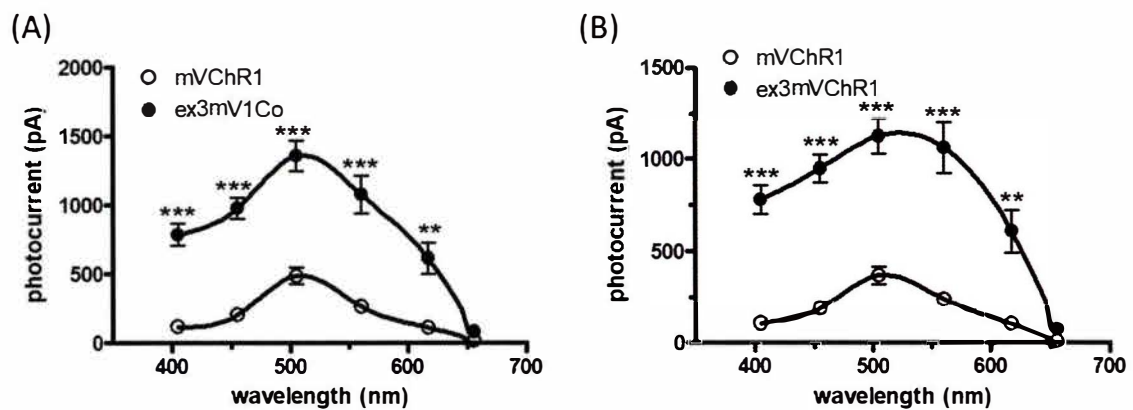


図 11 mVChR1、ex3mV1Co 発現細胞における波長感受性

各ピーク電流 (A) および定常光電流 (B) は、波長光 (405、455、505、560、617、656 nm) を 1 秒間照射した条件下で測定した (mVChR1: n=8、ex3mV1Co: n=11; \*, \*\*, \*\*p < 0.05、0.01、0.001、Tukey's Multiple Comparison test)。光強度は  $1 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  で統一して、データは Mean  $\pm$  SEM で示した。

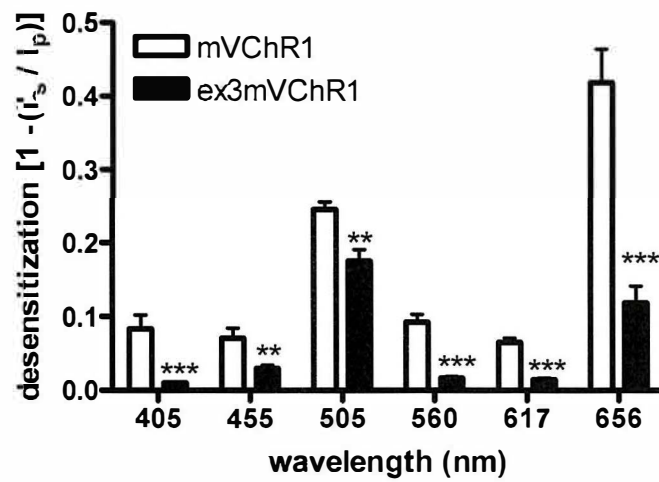


図 12 mVChR1、ex3mV1Co 発現細胞における脱感作

ピーク光電流と定常光電流のデータから脱感作を算出した。データは Mean  $\pm$  SEM で示した (\*\*、\*\*\* $p < 0.01, 0.001$ , unpaired t-test)。

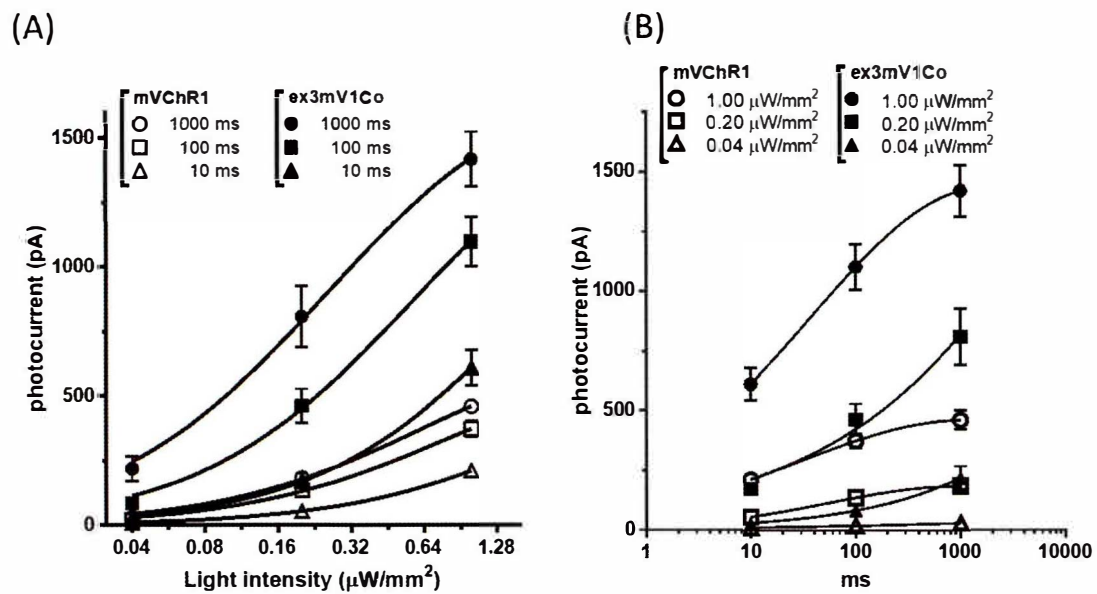


図 13 mVChR1、ex3mV1Co 発現細胞における光強度および刺激時間依存性  
 様々な刺激強度(0.04, 0.20, 1.00  $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ )と刺激時間(10 ms, 100 ms, 1000 ms)で測定した(n=8-9)。データは Mean  $\pm$  SEM で示した。

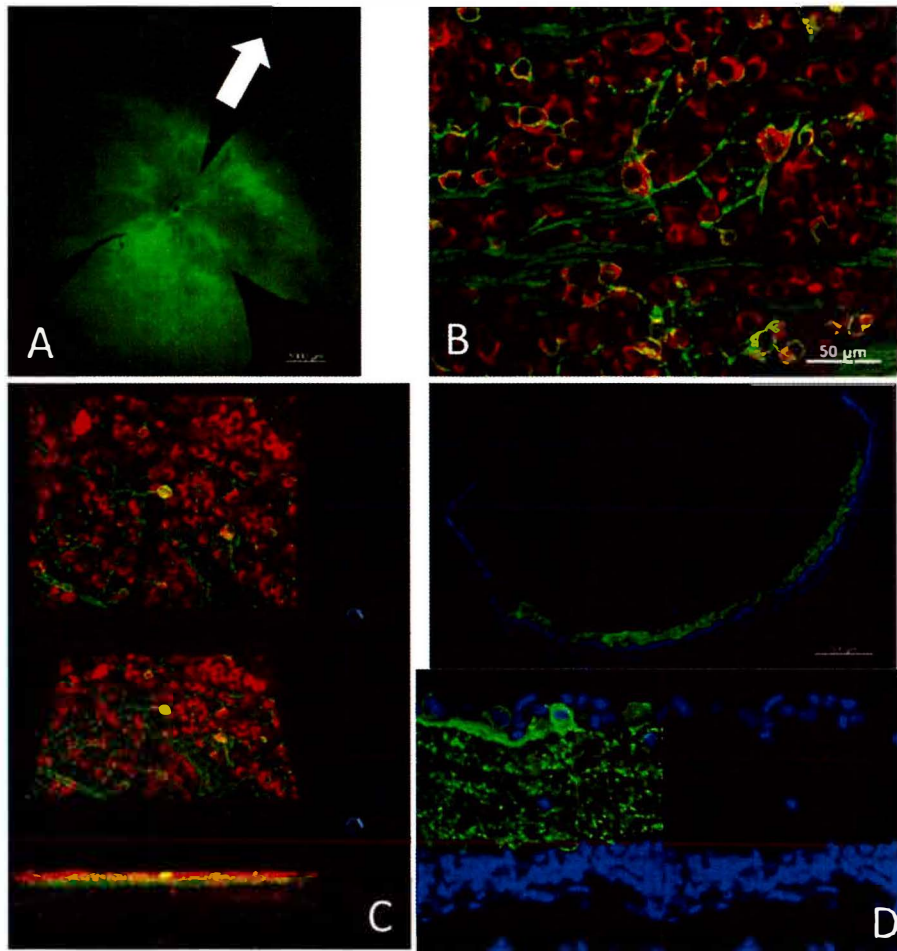


図 14 AAV2による遺伝的な盲目ラット網膜への ex3mV1Co 遺伝子導入

(A) ホールマウント網膜の Venus 蛍光 (緑色) を示した。矢印は 12 時方向を示す。(B) NeuN 抗体の免疫染色により、ホールマウント網膜の網膜神経節細胞を同定した。(C) 免疫染色した網膜の三次元図を示した。(D) 凍結網膜切片の蛍光画像を示した。核染色は DAPI を含む封入剤を用いて行った。

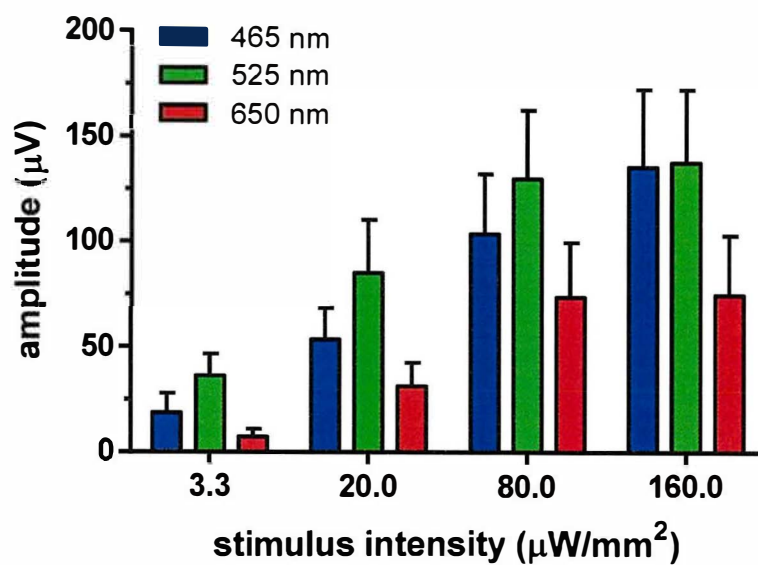


図 15 ex3mV1Co 導入ラットにおける青、緑、赤色光による VEP  
様々な光強度に反応した誘発電位を示した (n=8)。データは Mean  $\pm$  SEM で示した。



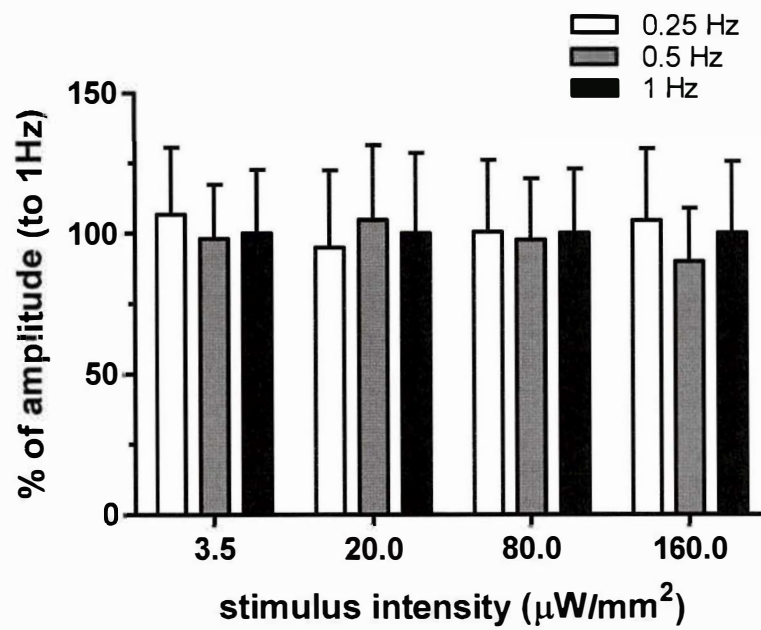


図 16 ex3mV1Co 導入ラットにおける青、緑、赤色光による周波数応答  
光刺激による誘発電位の周波数応答を示した (n=7)。データは Mean  $\pm$  SEM で示した。

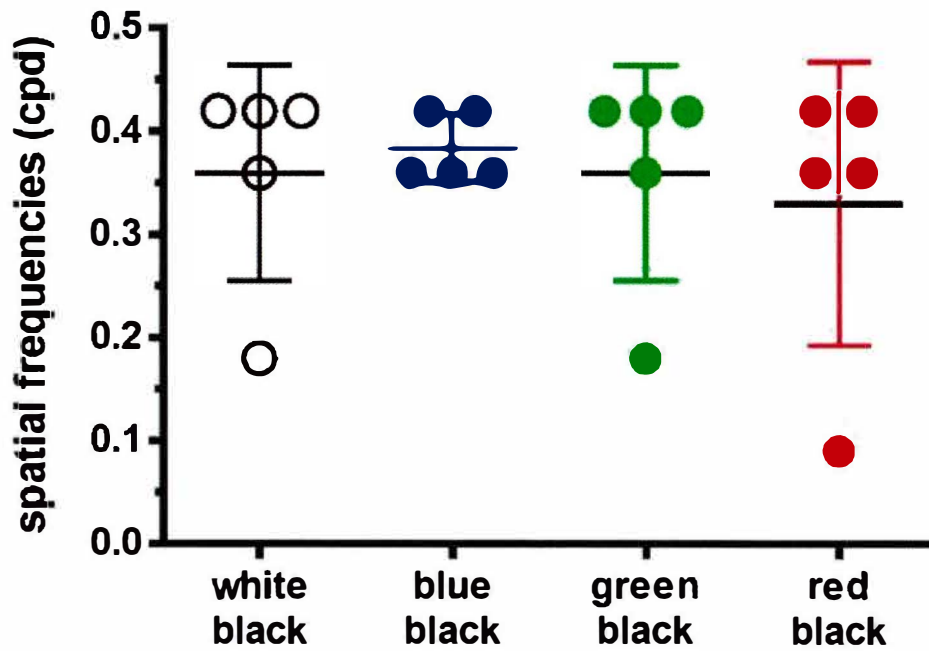
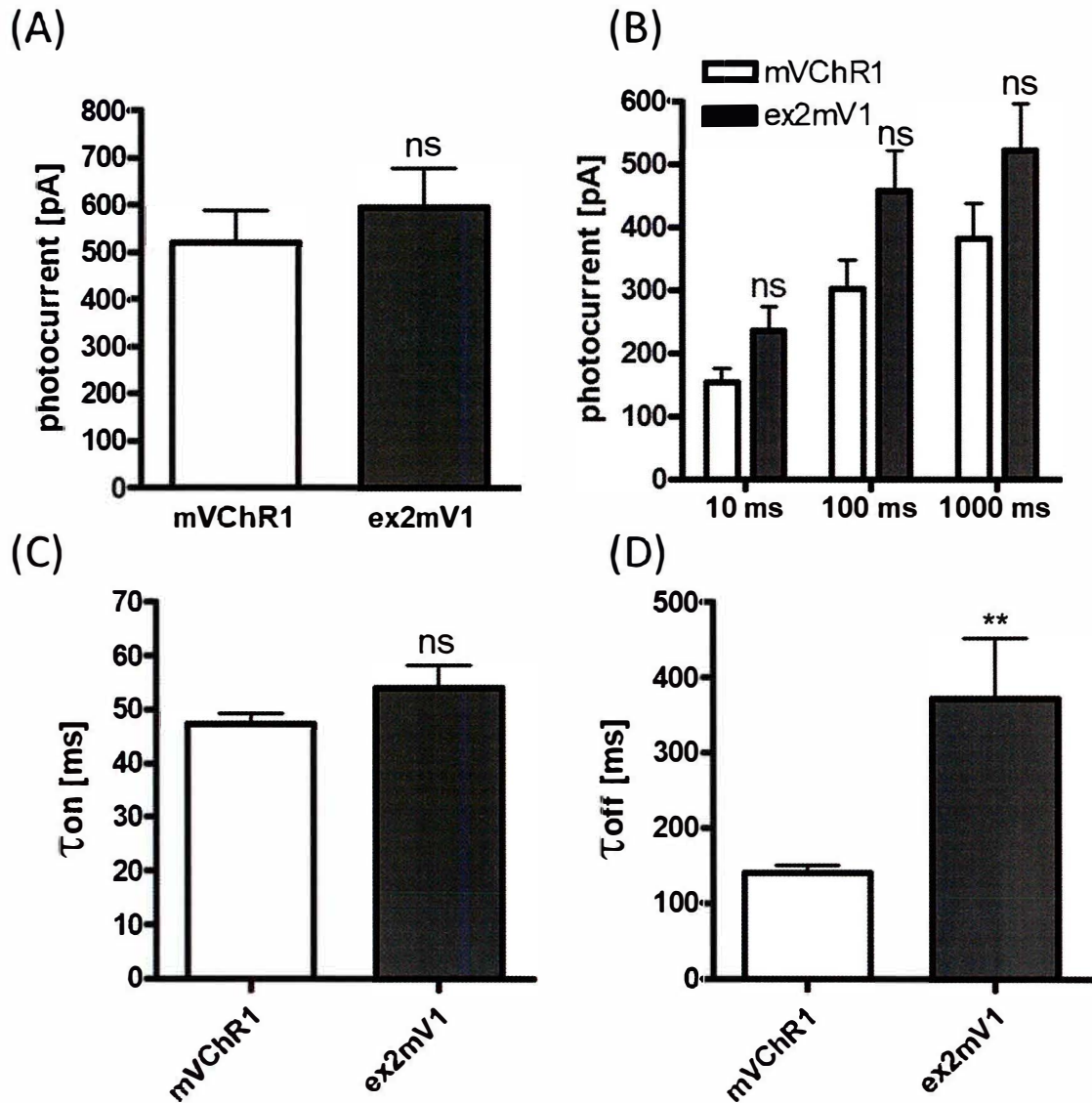


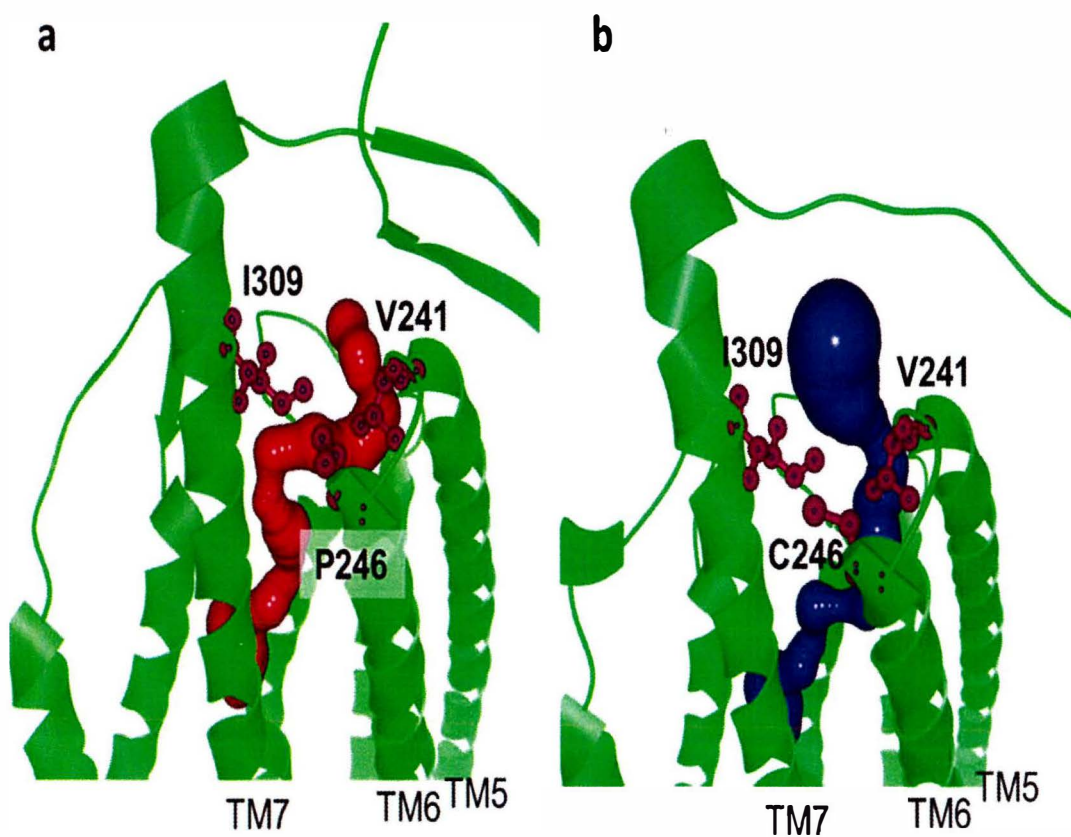
図 17 盲目ラットへの ex3mV1Co 遺伝子導入後の行動解析

画面に表示される周波数の白黒、青黒、緑黒、赤黒の縞模様に対する視運動反応を示した (n = 5)。データは平均±SD として示した。



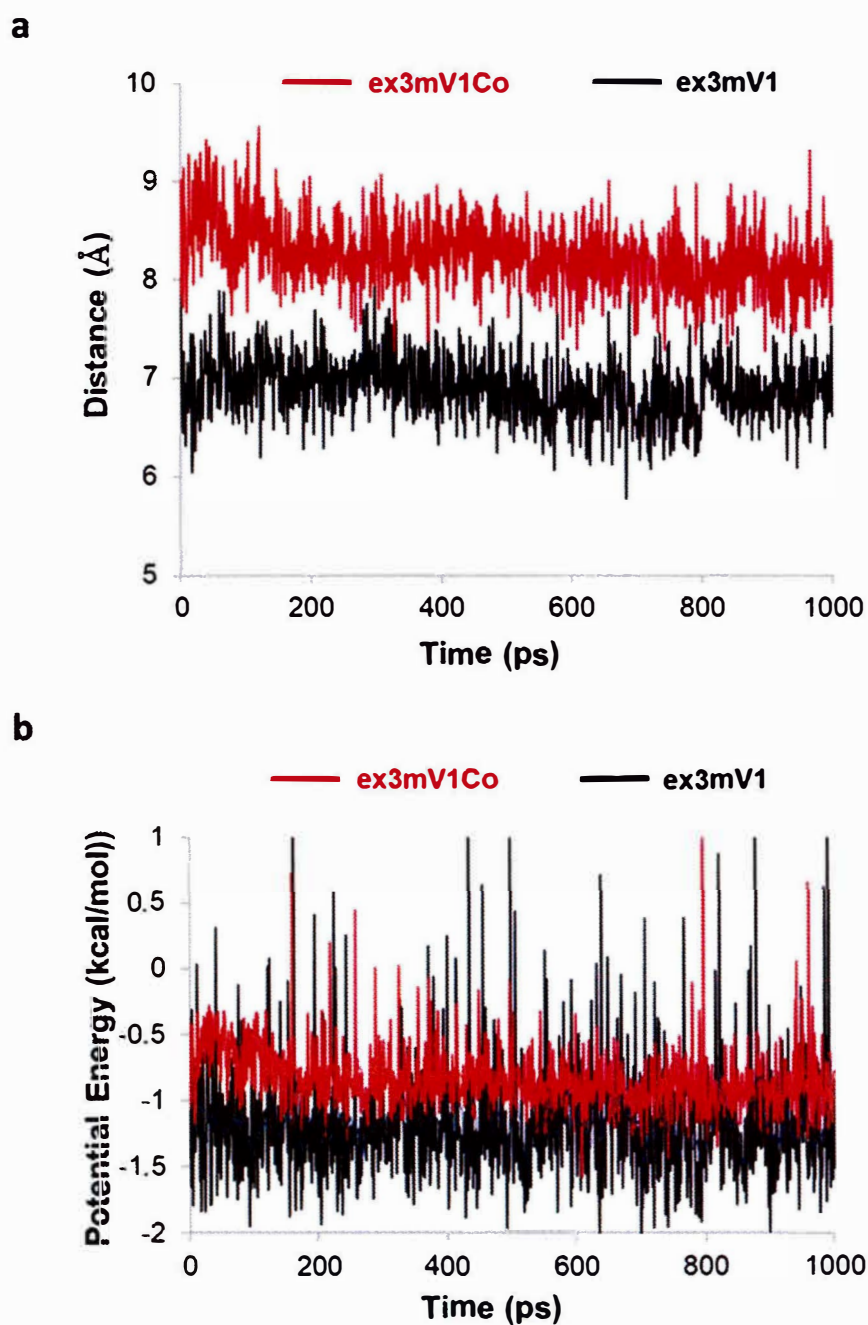
補足図1 mVChR1 と ex2mV1 発現細胞における光電流

(A)mVChR1 と ex2mVChR1 発現細胞における 505nm 光刺激に対するピーク光電流を比較した。(B)1  $\mu$ W/mm<sup>2</sup> の光強度での光刺激時間依存性を示した (C、D) 1  $\mu$ W/mm<sup>2</sup> の光強度で 505nm の光刺激を 10 秒間与えた場合の各細胞の  $\tau_{ON}$ 、 $\tau_{OFF}$  を示した。データは Mean  $\pm$  SEM で示した(\*\*p < 0.001, Unpaired t test, mVChR1: n=9, ex2mVChR1: n=4)。



補足図 2 ex3mV1 と ex3mV1Co の 246 番目のアミノ酸におけるイオン透過経路シミュレーション

Pro246(ex3mV1Co; a)/Cys246(ex3mV1; b)は、TM5 のバリン 241(V241)、TM7 のイソロイシン 309(I309)とイオントンネルを形成している。



### 補足図 3 ex3mV1 と ex3mV1Co の分子動力学シミュレーション

(a) ex3mV1Co 及び ex3mV1 の 246 番目のアミノ酸と I309 の平均距離はそれぞれ 8.3Å 及び 6.9Å であった。分子動力学シミュレーションは 298K で行った。(b) ex3mV1Co 及び ex3mV1 の 246 番目のアミノ酸と I309 の間のポテンシャルエネルギーは、それぞれ -0.84kcal/mol 及び -1.18kcal/mol であった。

## 9.謝辞

本研究に際して、ご指導を頂いた岩手大学工学部視覚神経科学研究室、富田浩史教授、菅野江里子准教授、田端希多子特任准教授に感謝申し上げます。また、分子動力学シミュレーションに関する研究を行ってくださった九州栄養福祉大学食物栄養学部食物栄養学科の坂尻徹也准教授に感謝申し上げます。また、研究の指導や日常生活でもお世話になった視覚神経科学研究室内の皆様にも感謝申し上げます。