



(12) 发明专利

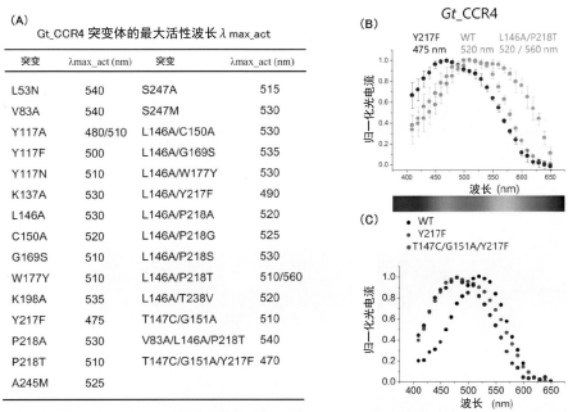
(10) 授权公告号 CN 115397991 B
(45) 授权公告日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202180028549.X
(22) 申请日 2021.03.15
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115397991 A
(43) 申请公布日 2022.11.25
(30) 优先权数据
2020-044713 2020.03.13 JP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.14
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/010440 2021.03.15
(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/182646 JA 2021.09.16
(73) 专利权人 国立大学法人名古屋工业大学
地址 日本国爱知县名古屋市昭和区御器所
町字木市29番
(72) 发明人 重村竣太 细岛颂子 角田聪
神取秀树
(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理
有限公司 11444
专利代理师 张黎 龚敏

(51) Int.Cl.
C12N 15/31 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
C07K 14/405 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
(56) 对比文件
US 2013281379 A1,2013.10.24
Yumeka等.Molecular properties of a
DTD channelrhodopsin from *Guillardia
theta*.Biophysics and Physicobiology.2017,
第14卷57-66.
Shoko等.Novel optogenetics tool: Gt_
CCR4, a light-gated cation channel with
high reactivity to weak light.Biophysical
Reviews.2020, (第12期) ,453-459.
审查员 王思佳
权利要求书1页 说明书31页
序列表3页 附图10页

(54) 发明名称
用于颜色识别的光响应性蛋白及其应用

(57) 摘要
为了改善颜色识别等,本发明提供一种蛋白,其在序列号1所示的第1氨基酸序列中在以下位置具备与所述第1氨基酸序列所具备的氨基酸残基不同的氨基酸残基并具有通道活性,所述位置为相当于选自自由第53位、第83位、第87位、第117位、第120位、第124位、第137位、第139位、第142位、第143位、第146位、第150位、第169位、第173位、第177位、第198位、第204位、第216位、第217位、第218位、第231位、第238位、第245位和第247位组成的组中的1个或2个以上的位置。



1. 一种蛋白, 其为由序列号1所示的第1氨基酸序列构成的蛋白的突变体, 所述突变体的突变为选自以下(1)~(3)的氨基酸替换中的仅1种:

(1) 选自L53N、V83A、Y117A、Y117F、Y117N、K137A、L146A、C150A、G169S、W177Y、K198A、Y217F、P218A、P218T、A245M、S247A和S247M之中的1种;

(2) 选自L146A/C150A、L146A/G169S、L146A/W177Y、L146A/Y217F、L146A/P218A、L146A/P218G、L146A/P218S、L146A/P218T、L146A/T238V、以及T147C/G151A中的1种;

(3) 选自V83A/L146A/P218T、以及T147C/G151A/Y217F中的1种,

所述蛋白具有通道活性。

2. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中, 所述氨基酸替换为选自Y217F、L146A/Y217F、以及T147C/G151A/Y217F中的1种。

3. 根据权利要求2所述的蛋白, 其中, 所述蛋白的最大活性波长小于520nm。

4. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中, 所述氨基酸替换为选自L146A、L146A/C150A、L146A/G169S、L146A/W177Y、L146A/P218S、L146A/P218T、以及V83A/L146A/P218T中的1种。

5. 根据权利要求4所述的蛋白, 其中, 所述蛋白的最大活性波长为530nm以上。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的蛋白, 其中, 所述蛋白在440nm处的通道活性等效值与在表现出最大通道活性的波长 $\lambda_{\max}$ 处的通道活性等效值的第一比为0.4以上。

7. 根据权利要求1、4或5所述的蛋白, 其中, 所述蛋白在600nm处的通道活性等效值与在表现出最大通道活性的波长 $\lambda_{\max}$ 处的通道活性等效值的第二比为0.4以上。

8. 权利要求1~7中任一项所述的蛋白、编码所述蛋白的多核苷酸、或含有所述多核苷酸的载体在制造视网膜的用于颜色识别的光响应性的改善剂或恢复剂中的用途。

9. 一种用于治疗或预防视网膜色素变性或色盲的药物组合物, 其包含权利要求1~7中任一项所述的蛋白、编码所述蛋白的多核苷酸、或含有所述多核苷酸的载体。

用于颜色识别的光响应性蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本说明书涉及用于颜色识别的光响应性蛋白或其突变体、以及其应用。

[0002] (相关申请的相互参照)

[0003] 本申请是2020年3月13日申请的日本专利申请特愿2020-44713的相关申请,主张基于该日本申请的优先权,并援引该日本申请中记载的全部内容。

背景技术

[0004] 作为导致失明的眼部疾病,例如包括视网膜色素变性、老年性黄斑变性等。在这些疾病中,视网膜中感光细胞即视杆细胞和视锥细胞发生变性或死亡,其结果最终导致失明。这些疾病中,视网膜色素变性为遗传性疾病,已报告100种以上的该致病基因。也就是说,这意味着导致视杆细胞、视锥细胞的变性/死亡的作用机制因患者而多种多样,难以在临床上建立明确的治疗方法,现状是尚未建立实际治疗方法。另外,认为老年性黄斑变性中也存在遗传因素,已报道多个关联基因。

[0005] 视网膜上的视杆细胞、视锥细胞接收来自外界的光信号并转变为电信号,进而,该信号到达视网膜神经细胞和视神经、大脑皮质的视皮质,作为图像被感知。

[0006] 在视杆细胞、视锥细胞中,负责将光信号转变为电信号的是视紫红质、视蛋白或色觉视质。目前,针对视网膜色素变性等,例如,正在为了实现以下治疗而进行研究:将编码源自趋光性藻类、即衣藻的通道视紫红质2(ChR2)的基因导入残存的视网膜神经节细胞,对该细胞赋予感光能力而使患者恢复视觉功能(专利文献1、专利文献2)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2007/131180号

[0010] 专利文献2:国际公开第2012/032103号

发明内容

[0011] 发明要解决的技术问题

[0012] ChR2是当感受到光时将 Na^+ 、 Ca^{2+} 从细胞外运送(输送)到细胞内或从细胞内运送(输送)到细胞外的感光阳离子通道(感光蛋白)。即,ChR2为蛋白分子单独感受光就能产生膜电位变化的蛋白。

[0013] 但是,即使是藻类来源的ChR2,也不足以恢复患者的视觉功能。例如,作为视觉功能的恢复,重要的是能够更适当地与关于颜色的信息一起识别本来是彩色的外界信息。

[0014] 本说明书提供了一种用于视觉上的颜色识别的光响应蛋白及其应用。

[0015] 用于解决技术问题的技术方案

[0016] 本发明人等发现,源自隐藻类、即Guillardia theta(G.Theta)的某种阳离子通道、即通道视紫红质的突变体在颜色识别方面具有有利的特性。本说明书基于上述发现而提供以下方案。

[0017] [1]一种蛋白,其在序列号1所示的第1氨基酸序列中在以下位置具备与所述第1氨基酸序列所具备的氨基酸残基不同的氨基酸残基并具有通道活性,所述位置相当于选自由第53位、第83位、第87位、第117位、第120位、第124位、第137位、第139位、第142位、第143位、第146位、第147位、第150位、第151位、第169位、第173位、第177位、第198位、第204位、第216位、第217位、第218位、第231位、第238位、第245位和第247位组成的组中的1个或2个以上的位置。

[0018] [2]根据[1]所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第87位、第117位、第120位、第124位、第139位、第142位、第143位、第146位、第150位、第169位、第173位、第177位、第217位、第218位、第238位、第245位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0019] [3]根据[1]所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第53位、第83位、第137位、第146位、第147位、第151位、第169位、第177位、第217位、第218位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0020] [4]根据[3]所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第169位、第177位、第217位、第218位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0021] [5]根据[4]所述的蛋白,其中,所述位置是第217位。

[0022] [6]根据[3]所述的蛋白,其中,所述位置是第147位和/或第151位。

[0023] [7]根据[6]所述的蛋白,其中,所述位置是第147位和第151位。

[0024] [8]根据[4]~[7]中任一项所述的蛋白,其中,最大活性波长小于520nm。

[0025] [9]根据[1]所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第53位、第83位、第137位、第146位和第218位组成的组中的1个或2个以上。

[0026] [10]根据[9]所述的蛋白,其中,所述位置是第146位。

[0027] [11]根据[10]所述的蛋白,其中,所述位置进一步是选自由第150位、第169位、第177位和第218位组成的组中的1个或2个以上。

[0028] [12]根据[9]~[11]中任一项所述的蛋白,其中,最大活性波长为530nm以上。

[0029] [13]根据[1]或[2]所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第137位、第146位、第150位、第177位、第198位、第238位、第245位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0030] [14]根据[13]所述的蛋白,其中,所述最大活性波长为520nm以上且小于530nm。

[0031] [15]根据[1]所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第150位、第169位、第177位、第218位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0032] [16]根据[1]所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第87位、第117位、第120位、第124位、第139位、第142位、第143位、第173位、第204位、第216位和第231位组成的组中的1个或2个以上。

[0033] [17]根据[1]~[16]中任一项所述的蛋白,其中,还具备一个或多个氨基酸残基的缺失、替换或插入。

[0034] [18]根据[1]~[17]中任一项所述的蛋白,其中,所述蛋白在所述第1氨基酸序列中的相当于以下位置的位置具有以下任一方式的氨基酸替换,

[0035] [表1]

[0036]

第 1 氨基酸序 列中的位置	氨基酸替换的方式			
53	L53N			
83	V83A			
137	K137A			
146	L146A			
150	C150A			
169	G169S			
177	W177Y			
198	K198A			
217	Y217F	Y217N		
218	P218A	P218S	P218G	P218T
238	T238V			
245	A245M			
247	S247A	S247M		
146/150	L146A/C150A			
146/169	L146A/G169S			
146/177	L146A/W177Y			
146/217	L146A/Y217F			
147/218	L146A/P218A	L146A/P218T	L146A/P218S	L146A/P218G
146/238	L146A/T238V			
83/146/218	V83A/L146A/P218A			
147	T147C			
147/151	T147C/G151A			
147/151/217	T147C/G151A/Y217F			

。

[0037] [19]根据[1]～[18]中任一项所述的蛋白,其中,所述蛋白在所述第1氨基酸序列中相当于以下位置的位置具有以下任一方式的氨基酸替换,

[0038] [表2]

[0039]

第 1 氨基酸序 列中的位置	氨基酸替换的方式			
53	L53A			
83	V83T			
87	A87S			

[0040]	117	Y117A	Y117D	Y117F	Y117N
	124	L124Q	L124C	L124T	L124A
	142	L142A			
	204	K204A			
	216	G216S			
	231	Q231L			
	137/204	K137A/K204A			
	146/218	L146A/P218C	L146A/P218H	L146A/P218N	L146A/P218V

[0041] [20]根据[1]～[19]中任一项所述的蛋白,其中,作为所述蛋白的440nm处的通道活性等效值与表现出最大通道活性的波长($\lambda_{\max}$)处的通道活性等效值的第一比为0.4以上。

[0042] [21]根据[1]～[20]中任一项所述的蛋白,其中作为所述蛋白的600nm处的通道活性等效值与表现出最大通道活性的波长($\lambda_{\max}$)处的通道活性等效值的第二比为0.4以上。

[0043] [22]根据[1]～[21]中任一项所述的蛋白,其中,所述蛋白的氨基酸序列与第1氨基酸序列具有90%以上的一致性。

[0044] [23]一种使用方法,其使用[1]～[22]中任一项所述的蛋白或编码所述蛋白的多核苷酸来改善或恢复视网膜的用于颜色识别的光响应性。

[0045] [24]一种用于治疗或预防视觉障碍的药物组合物,其包含[1]～[22]中任一项所述的蛋白或编码所述蛋白的多核苷酸。

[0046] [25]根据[24]所述的药物组合物,其中,所述视觉障碍选自由视网膜色素变性、老年性黄斑变性、糖尿病视网膜病变、视网膜脱落和色盲组成的组。

[0047] [26]一种突变体蛋白的筛选方法,其具备对被检测体蛋白评价照射光的波长与通道活性的关系的工序,所述被检测体蛋白在序列号1所示的第1氨基酸序列中的1个或2个以上的位置具备与第1氨基酸序列中的氨基酸残基不同的氨基酸残基。

[0048] [27]一种使用方法,其使用[1]～[22]中任一项所述的蛋白或编码所述蛋白的多核苷酸,通过光照射肌细胞、大脑上皮神经细胞或海马神经元细胞而引起放电(firing)。

附图说明

[0049] 图1是示出人的视杆细胞、视锥细胞中的视质的最大活性波长($\lambda_{\max \text{ act}}$)的图。示出视杆细胞中的视质(R)的最大活性波长(498nm)和视锥细胞中的3种视质(S,M,L)的最大活性波长(分别为420nm、534nm及564nm)。

[0050] 图2是组合了下述图而得到的图:示出实施例得到的突变体的最大活性波长($\lambda_{\max \text{ act}}$)的图(A)、示出Gt_CCR4野生型(WT)、Y217F突变体及Y146A/P218T突变体的活性光谱的图、以及(C)示出WT、Y217F突变体和T147C/G151A/Y217F突变体的活性光谱的图。

[0051] 图3是示出关于实施例得到的突变体的530nm的波长照射时的通道活性的比较结果的图。

[0052] 图4是合并示出关于实施例得到的突变体的530nm的波长照射时的通道活性的

比较结果、关于实施例得到的突变体的各突变体的 $\lambda_{\max}$ 处的通道活性与440nm处的通道活性的比、各突变体的 $\lambda_{\max}$ 处的通道活性与660nm处的通道活性的比的图。

[0053] 图5是示出表示光开闭型离子通道的示意图(A)、由光照射产生的通道电流的测定(B)、通道电流的成分(C)以及分别表达ChR2、GtCCR4的ND7/23细胞中的通道电流(D)和通道开放率(E)的图。

[0054] 图6是示出表达GtCCR4中具有单个突变的单突变体的ND7/23细胞的通道电流的测定结果的图。

[0055] 图7是：示出表达野生型ChR2的ND7/23细胞的通道活性测定结果的图(A)，示出表达野生型GtCCR4的ND7/23细胞的通道活性测定结果的图(B)，示出表达GtCCR4中具有V83A突变的单突变体的ND7/23细胞的通道活性测定结果的图(C)，示出表达GtCCR4中具有L146A突变的单突变体的ND7/23细胞的通道活性测定结果的图(D)，示出表达与野生型GtCCR4相比活性提高的具有单个突变的单突变体的ND7/23细胞的通道活性测定结果的图(E、F)。

[0056] 图8是示出表达GtCCR4中具有两个突变的双突变体的ND7/23细胞的通道电流(A)和通道开放率(B)的图。

[0057] 图9是示出表达GtCCR4中具有单个突变的另一单突变体的ND7/23细胞的通道电流测定结果的图。

[0058] 图10是示出大鼠大脑上皮原代培养细胞的神经活动的光刺激实验结果(A)和(B)、以及光强度依赖性的比较结果(C)的图。

具体实施方式

[0059] 本说明书的公开涉及用于颜色识别的具有光响应性的光响应性蛋白。基于以下发现：本发明人等发现的由序列号1所示的氨基酸序列构成的源自G.Theta的阳离子光响应性蛋白GtCCR4(以下，也称为第1蛋白。)与以往公知的来自衣藻的ChR2相比发挥优异的光响应性；以及，向第1蛋白中导入了突变的突变体与第1蛋白显示最大通道活性的最大活性波长、即约520nm相比在短波长侧及长波长侧具有最大活性波长以及具有与第1蛋白不同的活性光谱。

[0060] 例如，如图1的上部所示，人的视杆细胞及视锥细胞在细胞膜上分别具备最大活性波长为498nm的视杆视质及最大活性波长为420nm、534nm及564nm的视锥物质。通过这三种视锥视质，可实现外界信息的颜色识别。

[0061] 本说明书中公开的第1蛋白的突变体(以下，也称为本突变体。)根据其突变方式，可以在与第1蛋白不同的1种或2种以上的波长处具有最大的通道活性。换言之，本突变体通过突变可以具有与第1蛋白不同的最大活性波长或活性光谱。通过在神经节细胞或双极细胞等视网膜的细胞膜上表达本突变体，在该细胞中赋予与入射到细胞膜上的光的波长相应的本突变体固有的离子透过性(输送性)，发挥基于其的通道活性。

[0062] 例如，可以仅使用使1种或2种以上的本突变体分别在细胞膜中表达的细胞，也可以组合使用这样的本突变体表达细胞和使第1蛋白等具有与本突变体不同的最大活性波长或活性光谱的蛋白分别在细胞膜中表达的1种或2种以上的其他突变体表达细胞。作为表达本突变体或其他突变体的1种或2种以上的细胞，可以列举选自神经节细胞、双极细胞、无长突细胞和水平细胞等细胞中的细胞。在视网膜中具备这样的本突变体表达细胞或除了具备

本突变体表达细胞之外还具备其他突变体表达细胞时,这些细胞能够在视网膜中发挥与入射光对应的通道活性。由此,视网膜最终可以获得有助于脑中颜色识别的提供及其改善的光响应能力。

[0063] 作为本突变体的起点的本蛋白,在本蛋白于神经节细胞或双极细胞等视网膜的细胞膜上的表达量、由本蛋白构成的通道的离子透过性(输送性)和通道的开放率等方面优异。因此,本突变体也能够以高灵敏度发挥用于颜色识别的光响应能力。

[0064] 通过使用病毒载体等将编码本突变体的DNA等多核苷酸导入如神经节细胞或双极细胞等视网膜的细胞中,能够在神经节细胞或双极细胞等视网膜的细胞膜中表达本突变体,并且能够发挥用于颜色识别的高灵敏度的光响应能力。

[0065] 因此,本突变体或编码本突变体的核苷酸对于视网膜变性疾病或色盲等产生视杆细胞或视锥细胞变性的眼睛疾病的患者的视觉恢复是有用的。

[0066] 在本说明书中,“最大活性波长”是指具有光响应性的通道活性的光响应性蛋白显示最大的通道活性的照射光的波长($\lambda_{\max \text{ act}}$)。另外,在本说明书中,“活性光谱”是指具有光响应性的通道活性的光响应性蛋白在400nm~700nm左右的波长范围内显示的通道活性的光谱。

[0067] 以下,适宜参照附图详细说明本发明的代表性且非限定性的具体例。该详细说明旨在单纯向本领域技术人员示出用于实施本发明的优选例的详细方案,并非有意限定本发明的范围。另外,以下公开的附加特征以及发明是为了提供进一步改善的“用于颜色识别的光响应性蛋白及其应用”,可以与其它特征、公开发明分开使用或共同使用。

[0068] 另外,以下详细说明中公开的特征、工序的组合对最广义实施本发明而言并非必需,仅仅是用于特别说明本发明的代表性具体例而记载。此外,上述和下述代表性具体例的各个特征、以及独立权利要求和从属权利要求记载的各个特征,在提供本发明的追加的且有用的实施方式时,并非必须按照本申请记载的具体例那样、或者按照列举的顺序那样进行组合。

[0069] 本说明书和/或权利要求书记载的全部特征,旨在独立于实施例和/或权利要求记载的特征的构成,作为对原始申请公开以及请求保护的特定事项的限定,可个别且彼此独立地进行公开。此外,关于全部的数值范围以及组或集合的记载,旨在作为对原始申请公开以及请求保护的特定事项的限定,公开其中间的构成。

[0070] (第1蛋白的突变体)

[0071] (1) 第1蛋白

[0072] 第1蛋白具有序列号1所示的氨基酸序列,由该氨基酸序列表征。第1蛋白为包含367个氨基酸残基的蛋白,具有DTD(天冬氨酸-苏氨酸-天冬氨酸)基序,该DTD基序相当于源自嗜盐性古细菌的光驱动型质子泵即细菌视紫红质的DTD基序,已知与目前鉴定的源自G.Theta的阳离子通道视紫红质1~3的氨基酸序列的一致性低(分别为33%、34%和39%)(Biophysics and Physicobiology, Vol.14, pp.57-66(2017))。另外,如上述所示,第1蛋白为源自G.Theta的蛋白,本发明人等已鉴定其为光响应性阳离子通道蛋白(同上)。第1蛋白可输送 Na^+ 和 H^+ 这两者(同上)。

[0073] 第1蛋白中的DTD基序为D116位、T120位和D127位。需要说明的是,光驱动型质子泵即细菌视紫红质的DTD基序为其氨基酸序列的D85位、T89位和D96位。第1蛋白除该DTD基序

以外还具备K113位、D242位和K246位。细菌视紫红质中,这些氨基酸相当于R82位、D212位、K216位。

[0074] 另外,从其氨基酸序列等来看,认为第1蛋白为具有包含7个螺旋的7次跨膜结构的离子通道蛋白。第1蛋白可具备:位于从细胞膜向细胞外侧露出的位点或其附近,构成离子通道的细胞外侧区域的区域(细胞外侧区域);位于细胞膜的内部,构成离子通道的透过路径的区域(门区域);以及,存在于细胞膜的细胞质侧,构成离子通道细胞质侧区域的区域(细胞质侧区域)。

[0075] 本发明人等认为,第1蛋白中的这些区域例如可分配为以下氨基酸残基的位置或区域。第一蛋白具有DTD基序,因此认为氨基酸序列、分子结构与上述同样具有DTD基序的细菌视紫红质(源自嗜盐性古细菌的光驱动型质子泵)具有相关性。因此,基于公知的细菌视紫红质的分子结构推测第一蛋白内部的离子透过路径。需要说明的是,本说明书中,只要没有特别说明,则关于第1蛋白而示出的氨基酸残基的位置表示序列号1所示的氨基酸序列中的位置。

[0076] (细胞外侧区域)

[0077] 可认为:在第1蛋白中,细胞外侧区域为以下氨基酸序列区域:第1位~第41位、第92位~第115位、第147位~第165位和第222位~第237位。

[0078] (细胞质侧区域)

[0079] 另外,可预测:在第1蛋白中,细胞质侧区域为以下氨基酸序列区域:第51位~第82位、第125位~第138位、第174位~第213位和第250位~第367位。

[0080] (门区域)

[0081] 另外,可推测:在第1蛋白中,门区域为以下氨基酸序列区域:第42位~第50位、第83位~第91位、第116位~第124位、第139位~第146位、第166位~第173位、第214位~第221位和第238位~第249位。

[0082] (通道活性)

[0083] 第1蛋白是也为光驱动型质子泵的、具有光响应性阳离子通道活性的蛋白,在细胞膜上表达时,例如如果照射530nm的绿色光则质子(H^+)和阳离子(Na^+)透过细胞膜,从而产生通道电流。通过光照射而产生通道电流的活性通常被称为通道活性。

[0084] 第1蛋白的通道活性例如可按照以下方法测定:使合适的哺乳类细胞的细胞膜(优选不具备其它光响应性阳离子通道和光驱动型质子泵)表达第1蛋白,在此基础上,例如,在一定时间内照射极大吸收波长为530nm附近的一定强度的光时,通过基于全细胞记录的膜片钳法来测定。全细胞记录膜片钳法为对单个细胞以电荷移动(电流)形式计测透过其细胞膜的离子总量的方法。可将能够通过该方法测定的通道电流量作为通道活性。

[0085] 可具体例示以下方法。即,合成编码第1蛋白的氨基酸序列的DNA(根据需要使用哺乳类的密码子用法),以在第1蛋白的C末端侧标记eGFP且表达充分量的第1蛋白的方式整合到peGFP-N1等哺乳类细胞用载体质粒,将其作为导入用质粒,使用脂质体转染法将该质粒导入ND/723细胞等哺乳类细胞,从而进行转化。通过eGFP的荧光,可确认第1蛋白在导入细胞的细胞膜上的表达。

[0086] 对于如此在细胞膜上暂时表达第1蛋白的细胞,在导入后、例如在24~48小时以内,在稳定表达第1蛋白的状态下,进行基于全细胞记录的膜片钳法等电生理学测定。

[0087] 利用全细胞记录膜片钳法等的电生理学测定中的测定条件,没有特别限定,例如,可采用以下条件。

[0088] [表3]

[0089]	(1) 电流增幅器	Axopatch 200B 放大器 (Molecular Devices 公司制造)
	(2) 数字/模拟转换器	Digidata1550 或 Digidata1320 (Molecular devices 公司制)
	(3) 软件	控制软件; Clampex10.0, 分析软件; Clampfit10.7
	(4) 显微镜	IX-73 或 IX-70 (OLYMPUS 株式会社)
	(5) 移液器	用微电极拉制仪 P-97 (SUTTER 公司制) 制造, 用 MF-830 (NARISHIGE 公司制) 火融抛光得到的玻璃移液器, 移液器电阻; 1.5~2.5M Ω
	(6) 细胞外溶液	140mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , 2mM CaCl ₂ , 2mM KCl, 10mM Hepes-NaOH, pH7.2,
	(7) 细胞内溶液	110mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , 1mM CaCl ₂ , 5mM KCl, 10mM EGTA, 10mM Hepes-NaOH, pH 7.2。
[0090]	照射光: 530nm $\pm$ 40nm (优选 $\pm$ 30nm, 更优选 $\pm$ 20nm, 还更优选 $\pm$ 10nm, 特别更优选 $\pm$ 5nm), 光强 6.9mW/mm ² , 照射时间 100mS 至 600mS, 记录时间 300mS~1000mS, 室温	
	(8) 电流记录条件	对于活性光谱测定, 光强始终为 0.1 mW/mm ² 。首先, 照射波长为 410 nm 的光并进行电流测定。之后, 照射 420nm、430nm 和每次长 10nm 波长的光, 并测量对每次光照射的电流响应。其在高达 650nm 的波长范围内进行。根据通过各波长的光照射获得的电流值创建活性光谱。另外, 将获得最大电流值的光的波长定义为最大活性波长 ($\lambda_{\max \text{ act}}$)。

[0091] 在利用全细胞记录膜片钳法等的电生理学测定法中,例如,可将在上述条件下对细胞照射光时产生的峰状的最大电流值 (I_p) 以及在光照射中衰减到恒定水平的电流值 (I_s) 分别作为第1蛋白的通道电流值。例如,可使用 I_p 和 I_s 中的任一者或两者作为第1蛋白的通道活性。另外,可将 I_s 除以 I_p 而得到的值作为后述的通道开放率。

[0092] 本突变体在与第1蛋白的第1氨基酸序列中的1个或2个以上相当的位置,具备与第1蛋白中的氨基酸残基不同的氨基酸残基即可,可以是人为改变第1蛋白而得到的蛋白,也可以是天然来源的蛋白或其变体。本突变体也适用于例如具有与第1氨基酸序列具有一定以上一致性的氨基酸序列的蛋白。即,本突变体在与第1蛋白具有一定以上一致性的范围内,除了人造蛋白以外,还可以是源自除与第1蛋白相同来源的藻类以外的近缘的藻类、微

生物的阳离子离子通道等天然来源的蛋白或其变体。关于一致性将在后面进行说明。

[0093] 在此,与第1氨基酸序列中的1个或2个以上位置相当的位置是指:相对于第1氨基酸序列,进行本突变体的氨基酸序列的比对时,对应于第1氨基酸序列中的1个或2个以上的位置的、突变体中的1个或2个以上氨基酸残基的位置。在此,比对与后述的测定氨基酸序列和碱基序列的一致性中使用的比对含义相同。例如,与第1氨基酸序列中的位置相当的本突变体的位置可使用BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)等公知的氨基酸序列比对程序,例如以缺省参数的方式进行比对从而确定。

[0094] 本突变体可以具有与第1蛋白不同的最大活性波长或活性光谱。第1蛋白的最大活性波长约为520nm。另外,对于活性光谱,最大活性波长是在第1蛋白的通道活性的测定方法中将照射光的波长从短波长侧起例如以波长长10nm等一定波长的光而照射400~700nm的范围,例如410nm~650nm,测量对于各个光照射的电流响应,将得到最大电流值的光的波长作为最大活性波长。另外,根据使照射光的波长从低波长侧向长波长侧依次移动时的电流值来制作活性光谱。此外,活性光谱测量时的光强度例如可以为 $0.1\text{mW}/\text{mm}^2$,光照射时间可以为400msec,记录时间可以为1sec。

[0095] 以下,说明用于构成本突变体的第1氨基酸序列中的各种突变位点。

[0096] 对视网膜中的颜色识别有贡献的本突变体所具备的突变的位置,例如为第1氨基酸序列中与以下位点相当的位置:选自由第53位、第83位、第87位、第117位、第120位、第124位、第137位、第139位、第142位、第143位、第146位、第150位、第169位、第173位、第177位、第198位、第204位、第216位、第217位、第218位、第231位、第238位、第245位和第247位组成的组中的1个或2个以上。通过在这些位置具备氨基酸替换突变,可以使其最大活性波长向与第1蛋白具有的最大活性波长即约520nm相比短波长侧及长波长侧移动或赋予与第1蛋白不同的活性光谱。

[0097] 另外,还可列举第1氨基酸序列中的第147位及第151位。

[0098] 各突变位点的替换方式例如如下所述。

[0099] 第53位:L53A、L53Y、L53N、L53M、L53L、L53I、L53C

[0100] 第83位:V83A、V83L、V83I、V83N、V83T、V83D、V83K

[0101] 第87位:A87S、A787K、A87S

[0102] 第117位:Y117A、Y117D、Y117F、Y117N

[0103] 第120位:T120S

[0104] 第124位:L124Q、L124C、L124T、L124A

[0105] 第137位:K137A、K137E、K137R、K137H、K137D、K137C

[0106] 第139位:T139A、A139D

[0107] 第142位:L142A

[0108] 第143位:F143A

[0109] 第146位:L146A、L146M、L146I、L146V、L146Y、L146C

[0110] 第150位:C150A

[0111] 第169位:G169S

[0112] 第173位:F173Y、F173A

- [0113] 第177位:W177Y
- [0114] 第198位:K198A、K198R、K198H、K198D、K198C
- [0115] 第204位:K204A、K204E、K204R、K204H、K1204D、K204C
- [0116] 第216位:G216S、G216A、G216T、G216L、G216C、G216Y
- [0117] 第217位:Y217F、Y217N
- [0118] 第218位:P218A、P218T、P218S、P218G、P218C、P218H、P218N、P218V、P218D
- [0119] 第231位:Q231L、Q231A、Q231D、Q231E、Q231T
- [0120] 第238位:T238V
- [0121] 第245位:A245M
- [0122] 第247位:S247A、S247M
- [0123] 第147位:T147C
- [0124] 第151位:G151A
- [0125] (突变方式1)
- [0126] 这些突变位点中,例如选自由第53位、第83位、第137位、第146位、第169位、第177位、第217位、第218位及第247位组成的组的1个或2个以上具有波长容易移动的倾向和/或通道活性容易提高的倾向。例如,第169位、第177位、第217位、第218位及第247位例如对具有小于520nm、另外例如515nm以下的 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 的突变体有利,第53位、第83位、第137位、第146位及第218位对具有530nm以上的 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 的突变体有利。
- [0127] 例如,第53位的突变具有容易使最大活性波长向长波长侧移动的倾向。第53位的这样的替换方式除了L53N以外,还可列举L53A等。
- [0128] 例如,第83位的突变具有容易使最大活性波长向长波长侧移动的倾向。另外,该突变具有容易提高通道活性整体的倾向。第83位的这样的替换方式除了V83A ($\lambda_{\max \text{ act}}$: 540nm) 以外,还可列举V83T等。
- [0129] 例如,第137位的突变具有容易使最大活性波长向长波长侧移动的倾向。另外,该突变具有容易提高通道活性整体的倾向。第137位的替换方式可列举K137A ($\lambda_{\max \text{ act}}$: 530nm)。
- [0130] 例如,第146位的突变具有容易使最大活性波长向长波长侧移动的倾向。另外,该突变具有容易提高通道活性整体的倾向。第146位的替换方式可列举L146A ($\lambda_{\max \text{ act}}$: 530nm)。
- [0131] 例如,第169位的突变具有容易使最大活性波长向短波长侧移动的倾向。第169位的替换方式可列举G169S ($\lambda_{\max \text{ act}}$: 510nm)。
- [0132] 例如,第177位的突变具有容易使最大活性波长向短波长侧移动的倾向。第177位的替换方式可列举W177Y ($\lambda_{\max \text{ act}}$: 510nm)。
- [0133] 例如,第217位的突变具有容易使最大活性波长向短波长侧移动的倾向。第217位的替换方式除了Y217F ($\lambda_{\max \text{ act}}$: 475nm) 以外,还可列举Y217N。
- [0134] 例如,第218位的突变具有容易使最大活性波长向长波长侧和短波长侧移动的倾向。另外,该突变具有容易提高通道活性整体的倾向。第218位的替换方式除了P218T ($\lambda_{\max \text{ act}}$: 510nm) 和P218A ($\lambda_{\max \text{ act}}$: 530nm) 以外,还可列举P218S、P218G、P218等。
- [0135] 例如,第247位的突变具有容易使最大活性波长向短波长侧和长波长侧中的任一

侧移动的倾向。另外,该突变具有容易提高通道活性整体的倾向。第247位的替换方式可列举S247A($\lambda_{\max \text{ act}}$:510nm)和S247M($\lambda_{\max \text{ act}}$:530nm)。

[0136] (突变方式2)

[0137] 另外,上述突变位点中,例如选自由第137位、第146位、第150位、第177位、第198位、第245位及第247位组成的组中的1个或2个以上的突变的 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 为520nm以上且小于530nm左右,但在与通道活性高的其他突变制作相加突变体时在有助于提高通道活性等方面是有利的。

[0138] 作为第137位的突变,例如为K137A,作为第146位的突变,例如为L146A,作为第150位的突变,例如为C150A,作为第177位的突变,例如为W177Y,作为第198位的突变,例如为K198A,作为第245位的突变,例如为A245M,作为第247位的突变,例如为S247A、S247M。

[0139] (突变方式3)

[0140] 上述突变位点中,例如选自由第150位、第169位、第177位、第218位及第247位组成的组中的1个或2个以上是作为第1蛋白所具备的与视黄醛相互作用的氨基酸残基或位于其附近或影响与视黄醛相互作用的氨基酸残基的空间配置的氨基酸残基的位置而“初次”发现的,有利于获得与第1蛋白不同的最大活性波长或活性光谱。

[0141] 作为第150位的突变,例如为C150A,作为第169位的突变,例如为G169S,作为第177位的突变,例如为W177Y,作为第198位的突变,例如为K198A,作为第218位的突变,例如为P218A、P218S、P218G、P218T,作为第247位的突变,例如为S247A、S247M。

[0142] (突变方式4)

[0143] 上述突变位点中,例如选自由第87位、第117位、第120位、第124位、第139位、第142位、第143位、第173位、第204位、第216位及第231位组成的组中的1个或2个以上可以认为是第1蛋白所具备的与视黄醛相互作用的门区域的氨基酸残基或其附近的位置,有利于获得与第1蛋白不同的最大活性波长或活性光谱。

[0144] 作为第87位的突变,例如为A87S、A787K、A87S,作为第117位的突变,例如为Y117A、Y117D、Y117F、Y117N,作为第120位的突变,例如为T120S,作为第124位的突变,例如为L124C、L124T、L124A,作为第139位的突变,例如为T139A、T139D,作为第142位的突变,例如为L142A,作为第143位的突变,例如为F143A,作为第173位的突变,例如为F173Y、F173A,作为第204位的突变,例如为K204A、K204E,作为第216位的突变,例如为G216S,作为第231位的突变,例如为Q231L。

[0145] 例如,第117位的突变有时能够对 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 向小于520nm的短波长侧的移动作出贡献。作为该突变,例如可列举Y117A、Y117F、Y117N。

[0146] (突变方式5)

[0147] 上述突变中,第147位位于门区域附近的细胞外侧区域。该突变有时有助于小于520nm的 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 的移动。另外,有时能够增大通道活性本身。另外,与门区域中的与向小于520nm的 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 的波长移动有关的其他突变制成相加突变体时,可以有助于提高通道活性。第147位的替换方式例如可列举T147C。

[0148] 另外,第151位位于门区域附近的细胞外区域。该突变有时能够对小于520nm的 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 作出贡献。另外,有时能够增大通道活性本身。另外,与门区域中的与向小于520nm的 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 的波长移动有关的其他突变制成相加突变体时,可以有助于提高通道活性。第

151位的替换方式例如可列举G151A。

[0149] 例如,第147位和第151位的突变的组合有助于 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 向小于520nm的短波长侧移动,并且还有助于增加通道活性。

[0150] 另外,可以将作为门区域附近的细胞外侧区域的突变的第147位和/或第151位的突变以及作为门区域的突变且具有容易使 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 向短波长侧移动的倾向的第217位的突变组合。该相加突变体有时能够使第217位所具有的 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 进一步向短波长侧移动。例如,组合了T147C和G151A与Y217F的相加突变体能够使 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 比Y217F的最大活性波长475nm更进一步移动。

[0151] 如果考虑通道活性,则本突变体可以具备例如选自第83位、第87位、第146位和第216位等门区域中的突变。另外,也可以适当组合细胞质侧区域的例如第53位、第76位、第137位、第198位和/或第204位的突变。另外,还可以适当组合细胞外侧区域的第230位和/或第231位的突变。

[0152] 另外,本突变体的优选方式为突变位点的至少1个选自由第87位、第117位、第120位、第124位、第139位、第142位、第143位、第146位、第150位、第169位、第173位、第177位、第217位、第218位、第238位、第245位和第247位组成的组的方式。这些突变位点的氨基酸替换方式如前所述。

[0153] 从以上可知,本突变体例如在以下的突变位点具有氨基酸替换突变或者对该突变位点采取以下的突变方式有时是有利的。

[0154] [表4]

[0155]	第 1 氨基酸序列中的位置	氨基酸替换的方式			
	53	L53N			
	83	V83A			

[0156]

137	K137A			
146	L146A			
150	C150A			
169	G169S			
177	W177Y			
198	K198A			
217	Y217F	Y217N		
218	P218A	P218S	P218G	P218T
238	T238V			
245	A245M			
247	S247A	S247M		
146/150	L146A/C150A			
146/169	L146A/G169S			
146/177	L146A/W177Y			
146/217	L146A/Y217F			
147/218	L146A/P218A	L146A/P218T	L146A/P218S	L146A/P218G
146/238	L146A/T238V			
83/146/218	V83A/L146A/P218A			
147	T147C			
147/151	T147C/G151A			
147/151/217	T147C/G151A/Y217F			

[0157] [表5]

[0158]

第 1 氨基酸序 列中的位置	氨基酸替换的方式			
53	L53A			
83	V83T			
87	A87S			
117	Y117A	Y117D	Y117F	Y117N
124	L124Q	L124C	L124T	L124A
142	L142A			
204	K204A			
216	G216S			
231	Q231L			
137/204	K137A/K204A			
146/218	L146A/P218C	L146A/P218H	L146A/P218N	L146A/P218V

[0159] 本突变体有时优选至少1个突变选自表4所示的突变方式中的除L53N、V83A、K137A、K198A以外的突变方式。另外,本突变体有时优选至少1个突变选自表5所示的突变方式中的除L53A、K204A、G549S、Q231L以外的突变方式。

[0160] 此外,本突变体也可以具备以上记载的位置以外的1~30个以下,另外例如25个以

下,另外例如20个以下,另外例如15个以下,另外例如10个以下,另外例如数个以下的氨基酸残基的替换突变,和/或,进而1~30个以下,另外例如25个以下,另外例如20个以下,另外例如15个以下,另外例如10个以下,另外例如数个以下的氨基酸残基的替换突变、缺失突变和/或插入突变。

[0161] 此外,本突变体除了上述用于颜色识别的突变以外,还可以在细胞外侧区域、细胞质区域和门区域具备以下各种突变。这些突变位点和突变方式是基于通道活性和/或开放率的提高的观点,但有时也与用于颜色识别的突变位点和突变方式重复。

[0162] (细胞外侧区域中的突变)

[0163] 如上述所示,可认为细胞外侧区域为第1位~第41位、第92位~第115位、第147位~第165位和第222位~第237位,作为这些氨基酸区域中的突变位置,例如可列举第39位、第94位、第98位、第102位、第110位、第113位、第114位、第162位、第224位和第225位等。另外,例如可列举第230位、第231位、第235位。作为替换突变,例如可列举D39N、R94M、R94K、R94Q、H98A、D102N、N110L、K113A、K113N、Y114A、R162A、S230E,另外,例如可列举T224A、E225A、E225Q、Q231L、H235A、H235N、H235M。

[0164] (细胞质侧区域中的突变)

[0165] 如上述所示,推测细胞质侧区域为第51位~第82位、第125位~第138位、第174位~第213位和第250位~第367位,作为该氨基酸区域中的突变位置,例如可列举第53位、第61位、第68位、第74位、第76位、第80位、第130位、第137位、第194位、第195位和第198位等。另外,例如可列举第200位、第204位、第205位、第209位、第210位、第253位和第254位。作为替换突变,例如可列举K61A、R74A、E76Q、S80A、K137E、K137A、K198A、R200A、K204A、K204E,另外,例如可列举L53A、L53N、E68Q、W130A、E194Q、D195N、L205A、L209A、Y210F、L253N、L253S、L254N、L254S。

[0166] (门区域中的突变)

[0167] 如上所述、推测门区域为42位~50位、第83位~91位、第116位~124位、第139位~146位、第166位~173位、第214位~221位及238位~249位,作为该氨基酸区域中的突变位置,例如可列举46位、第83位、第84位、第87位、第90位、第91位、第116位、第117位、第120位、第124位、第139位、第142位、第143位、第146位、第173位。另外、例如可列举214位、第216位、第217位、第238位、第242位及245位。作为替换突变,例如可列举L46A、V83A、V83T、V83D、V83K、N84P、N84K、A87S、A87N、A87K、T90A、Y91A、D116A、D116T、Y117A、T120S、L124C、L124T和L124A。另外,例如可列举T139A、T139D、L142A、F143A、L146A、F173A、F173Y、W214A、W214Y、G216S、Y217A、Y217F、Y217W、T238A、T238K、T238D、D242A以及D242N、A245N和A245S。

[0168] 例如,作为这样的突变,可列举以下表6所示的替换突变。另外,还可列举表7所示的替换突变。

[0169] [表6]

[0170]

第1氨基酸序列中的位置	氨基酸替换的方式
39	D39N
46	L46A
53	L53A、L53N
61	K61A
68	E68Q
74	R74A
76	E76Q

第1氨基酸序列中的位置	氨基酸替换的方式
200	R200A
204	K204A、K204E
205	L205A
209	L209A
210	Y210F
214	W214A、W214Y
216	G216S

[0171]

80	S80A
83	V83T 、 V83A 、 V83D、 V83K
84	N84P、 N84K
87	A87S 、 A87N 、 A87K
90	T90A
91	Y91A
94	R94M 、 R94K 、 R94Q
98	H98A
102	D102N
110	N110L
113	K113A、 K113N
114	Y114A
116	D116A、 D116T
117	Y117A
120	T120S
124	L124C、 L124T、 L124A
130	W130A
137	K137A、 K137E
139	T139A、 T139D
142	L142A
143	F143A
146	L146A
162	R162A
173	F173Y、 F173A
194	E194Q
195	D195N
198	K198A

[0172] [表7]

217	Y217A、 Y217F、 Y217W
224	T224A
225	E225A、 E225Q
230	S230E
231	Q231L
235	H235N、 H235A、 H235M
238	T238A、 T238K、 T238D
242	D242A、 D242N
245	A245N、 A245S
253	L253N、 L253S
254	L254N、 L254S

[0173]

第 1 氨基酸序列 中的位置	氨基酸替换的方式
76	E76D、E76Q、E76N、E76A、E76T
83	V83A、V83L、V83I、V83T、V83N
137	K137A、K137R、K137H、K137D、K137C
146	L146A、L146M、L146I、L146V、L146Y、L146C
198	K198A、K198R、K198H、K198D、K198C
204	K204A、K204R、K204H、K204D、K204C
231	Q231L、Q231A、Q231D、Q231E、Q231T
230	S230E、S230T、S230Y、S230A

[0174]

第 1 氨基酸序列 中的位置	氨基酸替换的方式
53	L53A、L53Y、L53N、L53M、L53V、L53I、L53C
216	G216A、G216S、G216T、G216L、G216C、G216Y

[0175] 本突变体优选具备第1蛋白所具有的DTD基序。即,优选在与第1氨基酸序列中的D116位、T120位和D127位相当的位置具备氨基酸残基(分别为D、T和D)。此外,本突变体优选除该DTD基序以外还具备与选自第1氨基酸序列中的K113位、D242位和K246位中的1个或2个以上相当的氨基酸残基。

[0176] 本突变体具有的、与第1氨基酸序列的一致性没有特别限定,例如为75%以上,另外例如为80%以上,另外例如为85%以上,另外例如为90%以上,另外例如为95%以上,另外例如为97%以上,另外例如为98%以上,另外例如为99%以上,另外例如为99.5%以上。另外,类似性例如为80%以上,另外例如为85%以上,另外例如为90%以上,另外例如为95%以上,另外例如为97%以上,另外例如为98%以上,另外例如为99%以上,另外例如为99.5%以上。

[0177] 本说明书中,一致性或类似性是指:如本技术领域已知那样,通过对序列进行比较而确定的、2个以上的蛋白或2个以上的多核苷酸之间的关系。该技术中“一致性”是指:通过氨基酸序列或多核苷酸序列之间的比对或某些情况下通过一系列的这样的序列间的比对确定的、氨基酸序列或多核苷酸序列之间的序列不变性的程度。另外,类似性是指:通过氨基酸序列或多核苷酸序列之间的比对或某些情况下通过一系列的部分序列间的比对确定的、氨基酸序列或多核苷酸序列之间的相关性的程度。更具体而言,通过序列的一致性和保守性(序列中的特定氨基酸残基或维持序列中的物理化学特性的替换)来确定。需要说明的是,在后述的BLAST的序列同源性检索结果中,类似性被称为Similarity。确定一致性和类似性的方法优选为以在对对比的序列间进行最长的比对的方式设计的方法。以公众能够利

用的程序的形式提供用于确定一致性和类似性的方法。例如,可以利用Altschul等的BLAST (Basic Local Alignment Search Tool;局部序列排比搜索基本工具)软件(例如, Altschul SF,Gish W,Miller W,Myers EW,LipmanDJ.,J.Mol.Biol.,215:p403-410 (1990);Altschul SF,Madden TL,Schaffer AA,Zhang J,Miller W,Lipman DJ.,Nucleic Acids Res.25:p3389-3402(1997))、UniProtKB的比对功能来确定。在使用BLAST、UniProtKB之类的软件时,条件没有特别限定,优选使用缺省值。

[0178] 此外,氨基酸序列的校准使用BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)等中的氨基酸序列校准程序(blastp),例如可以通过用默认的参数进行校准来确定。

[0179] (本突变体的最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 等)

[0180] 例如,如图1所示,本突变体可以具有各种最大活性波长。根据本突变体的最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 等,可以用作在人的视锥细胞中表达的S视锥、M视锥及L视锥中的任一个。代替各视锥的最大活性波长可适当设定,例如,如果为400nm以上且515nm以下,则可用作例如对人的短波长具有灵敏度峰值的S视锥等。另外,例如,本突变体的最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 为515nm以上且545nm以下时,作为M视锥等利用。另外,例如最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 为540nm以上且600nm以下时,可以作为L视锥等利用。

[0181] 另外,本突变体与第1蛋白相比最大活性波长向短波长侧或长波长侧移动时,可以说具有与第1蛋白不同的活性光谱。另外,即使本突变体的最大活性波长与第1蛋白相等,例如在活性光谱的峰附近具有肩峰时,或第1蛋白的活性光谱的峰的锐度(峰宽度窄)高时等,也可以说具有与第1蛋白不同的活性光谱。

[0182] 例如,根据本突变体的440nm处的通道活性等效值与最大活性波长处的通道活性等效值之比即第一比以及600nm处的通道活性等效值与最大活性波长处的通道活性等效值之比即第二比,可以进行本突变体间的活性光谱的对比以及本突变体与第1蛋白的活性光谱的对比。

[0183] 第1蛋白的第一比为0.3,第二比为0.18左右,第一比/第二比为1.67,第二比/第一比为0.6,例如,如果第一比为第二比的2倍以上左右,则与第1蛋白相比,有最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 向短波长侧移动的倾向。当第一比比第二比大3倍以上、另外例如大4倍以上时,有进一步向短波长侧移动的倾向。另外,在第一比例如为0.4以上,另外例如为0.5以上,另外例如为0.6以上,另外例如为0.7以上,另外例如为0.8以上时等,在短波长侧具有最大活性波长的倾向变高,并且有时在最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 的短波长侧还具备肩峰等。

[0184] 另一方面,如果第二比为第一比的例如0.7倍以上,另外例如0.8倍以上,另外例如0.9倍以上,另外例如1.0倍以上,另外例如1.1倍以上,另外例如1.2倍以上,另外例如1.3倍以上,另外例如1.4倍以上,则最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 有向第1蛋白的长波长侧移动的倾向。进而,例如当第二比例如为0.3以上,另外例如为0.4以上,另外例如为0.5以上,另外例如为0.6以上,另外例如为0.7以上,另外例如为0.8以上,另外例如为0.9以上时等,在短波长侧具有最大活性波长的倾向变高,并且有时在最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 的长波长侧还具备肩峰等。

[0185] 本突变体可以通过规定最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 和活性光谱的第一比以及第二比,来表征其颜色响应性。

[0186] 本突变体具有通道活性。通道活性可以用与对第1蛋白说明的同样的方法确认。本突变体优选具有一定以上的通道活性。例如,优选地,在上述通道活性的评价方法和电生理学记录条件(照射时间400mS)下测定时的pA/pF为30以上,另外例如pA/pF为40以上。

[0187] 另外,本突变体具有通道活性,最大活性波长下的通道活性在按照上述测定方法时,例如为第1蛋白所具有的通道活性pA/pF的30%以上,另外例如为40%以上,另外例如为50%以上,另外例如为50%以上,另外例如为60%以上,另外例如为70%以上,另外例如为80%以上,另外例如为90%以上,另外例如为100%以上。

[0188] 另外,本突变体优选其通道开放率为一定以上。优选地,例如,在上述通道活性的评价方法和电生理学记录条件(照射时间400mS)下测定时的通道开放率(Is/Ip)例如0.7以上,另外例如0.8以上,另外例如0.85以上,另外例如0.9以上,另外例如0.95以上,另外例如0.97以上,另外例如0.98以上,另外例如0.99以上。

[0189] 另外,对于本突变体的通道开放率,也可以与第1蛋白同样地测定。将第1蛋白的开放率(Is/Ip)设为100%时的本突变体的通道开放率没有特别限定,例如为第1蛋白的30%,另外例如40%以上,另外例如50%以上,另外例如50%以上,另外例如60%以上,另外例如70%以上,另外例如80%以上,另外例如90%以上,另外例如100%以上。

[0190] 本领域技术人员基于本说明书中公开的本突变体的突变位置和优选的替换例,制作各种突变体和相加体,进行其评价,可以得到具有所希望的最大活性波长或活性光谱等的本突变体。

[0191] 本领域技术人员可以对第1蛋白和本突变体的N末端或C末端融合例如各种蛋白。

[0192] 本领域技术人员可通过以下方法获得本突变体,即,例如通过使用惯用的突变诱导法、位点特异性突变法、易错PCR的分子进化法等改变编码第1蛋白的氨基酸序列的DNA(序列号2)而获得改造DNA,基于该改造DNA等获得本突变体。作为获得改造DNA的方法,可列举Kunkel法或Gappedduplex法等公知方法或基于这些公知方法的方法,例如,使用可商业获得的利用各种位点特异性突变诱导法的突变导入用试剂盒来导入突变。

[0193] 例如,本突变体可通过以下方法得到,即,利用包含如此得到的改造DNA的DNA构建体转化毕赤酵母(*P.pastoris*)等宿主,按照本领域技术人员公知的常规方法培养该转化细胞,由该培养细胞或培养基回收本突变体,从而得到本突变体。例如,可以将惯用的纯化技术组合而分离本突变体。上述技术包括硫酸铵分级、有机溶剂处理、离心分离、超滤、各种色谱(例如,凝胶过滤色谱、离子交换色谱、亲和色谱、疏水性相互作用色谱等)、高效液体色谱(HPLC)、电泳等。

[0194] 此外,还可以将融合有编码GFP等信号蛋白的DNA的改造DNA导入至哺乳类神经细胞ND7/23细胞等并使其在细胞膜上表达,从而获得。

[0195] (多核苷酸)

[0196] 本说明书公开的多核苷酸(以下也简称为本多核苷酸)可编码本突变体的氨基酸序列。上述多核苷酸可采取各种形态,本氨基酸序列的编码区域为DNA或RNA,典型的为DNA。

[0197] 本多核苷酸除可采取DNA片段或RNA片段以外,还可采取适合于质粒、载体等转化等的公知的形态。

[0198] 本多核苷酸,作为用于得到本突变体的DNA,可通过人工合成而得到,除此以外,如前述所示,可基于前述的突变体获得方法以DNA形式获得。

[0199] (载体)

[0200] 本说明书公开的载体(以下也称为本载体)可具备本多核苷酸。本载体以在宿主细胞中表达本突变体为目标。表达载体可根据要转化的细胞的种类、目的等而采取各种形态。

[0201] 本多核苷酸例如可适当应用:适当的调节序列和/或靶序列,和/或,编码序列的选择的宿主的优选的密码子使用频率。例如,靶序列为在细胞膜、突触、突触后部位或轴索丘或内质网等细胞内特定部位或隔室(compartment)以光诱导离子通道为目标的、可编码N末端或C末端延伸部分的序列。本领域技术人员可基于本申请提出时的公知技术容易构建上述载体。

[0202] 关于用于表达本突变体的载体的获得方法、其构成要素,使使用GFP的领域、其他基因工程领域的本领域技术人员公知的。例如,本领域技术人员可通过适当参照T.Maniatis,J.Sambrook等的实验书(Molecular Cloning(分子克隆),A Laboratory Manual(实验室手册),冷泉港实验室,1982,1989,2001)等来实施。

[0203] 例如,在将本说明书公开的载体用于恢复视网膜神经细胞的用于颜色识别的光响应性,改善或再生视觉(色觉)等时,可以应用以下方式。

[0204] 本载体可优选用于眼部疾病的基因治疗。特别是可用于病毒介导的基因导入。“病毒介导的基因导入”是指:将本载体包装到病毒中,其结果,可送至目标部位或细胞。基因治疗优选的病毒示例可列举逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、慢病毒、痘病毒、阿尔法病毒、狂犬病病毒、塞姆利基森林病毒和疱疹病毒。需要说明的是,基因治疗还包括应用裸DNA、脂质复合体以及多聚体、以及树枝状聚合物等的非病毒性方法。

[0205] 作为以眼部疾病为目标的本载体,例如可使用已用于旨在通过导入编码这种治疗用的蛋白的基因而再生视觉功能的公知载体。例如,可使用AAV-2病毒载体等,作为启动子,例如可利用CAG启动子、人帽结合蛋白(Connexin-36)启动子(Greenberg KP等,2007,In vivo Transgene Expression in ON-Type Retinal Ganglion Cells:Applications to Retinal Disease(ON型视网膜神经节细胞的体内转基因表达:在视网膜疾病中的应用).ARVO摘要,2007)、mGluR6启动子。

[0206] 使用细胞特异性启动子,可靶向特定类型的视网膜神经细胞。可靶向视杆双极细胞的启动子为Pcp2(L7)启动子(Tomomura,M等、2001,Eur JNeurosci.14:57~63)。活性启动子的长度优选小于2.5Kb,因此,其可包装在AAV病毒盒中。

[0207] (靶细胞的转化和转化细胞)

[0208] 本说明书公开的转化细胞(以下也称为本转化细胞)以能够表达本突变体的方式保持本多核苷酸。本转化细胞能够通过将前述的本载体、裸DNA即本多核苷酸等导入靶细胞而得到。作为在靶细胞中的导入方法,可列举以往公知的各种方法,例如磷酸钙法、转化法、转染法、接合法、原生质体法、电穿孔法、脂质体转染法、醋酸锂法或其它方法。

[0209] 另外例如,如上述所示,使用病毒将本核苷酸导入至细胞,从而提供转化细胞。转化细胞根据其制作方法、用途的不同,可以是生物体外的细胞,也可以是生物体内的细胞,还可以是在生物体外制作并移植到生物体内的细胞。需要说明的是,作为转化细胞的靶细胞将在后文说明。

[0210] (本蛋白、本多核苷酸、本载体和本转化细胞在视觉再生等中的应用)

[0211] 本突变体、本多核苷酸、本载体和本转化细胞(以下也称为本蛋白等)可用于改善

包括色盲在内的视觉障碍或再生视觉功能等。即,均可在用于预防或治疗眼部疾病的研究和光遗传学用途中使用。虽然没有特别限定,但是,通过基因治疗,使本突变体在特定的视网膜细胞或视网膜附近的非视网膜细胞即神经细胞等中表达,从而可改善或恢复视网膜的光响应性。对该细胞赋予光响应性,由此可改善或再生视觉。

[0212] 本说明书中,作为视觉障碍或眼部疾病,例如可列举视网膜色素变性、老年性黄斑变性、视网膜脱落、糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、青光眼或色盲等,优选列举视网膜色素变性或老年性黄斑变性。本说明书中,治疗是指:针对细胞发生变性、死亡、脱落等而丧失视网膜功能的状态,通过改善或恢复神经细胞等的用于颜色识别的光响应性而实现色觉等视觉功能的改善、恢复或症状进展的抑制。本说明书中,预防是指:在发生细胞的变性、死亡或脱落的概率高、视觉障碍发病的风险高的状况下,改善或恢复神经细胞的光响应性,进而实现预防功能丧失或延迟视觉障碍的发病。本说明书中公开的“包含蛋白或编码上述蛋白的多核苷酸的用于治疗或预防视觉障碍的药物”包括用于上述基因治疗的物质。例如,该药物可以以靶组织中的该蛋白表达用载体的形态来提供。此时,优选使用在细胞中的导入效率、该细胞内的复制维持、稳定性、表达效率等优异的表达载体。作为上述载体,不限于此,例如可列举腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等病毒载体、(可自我复制的)质粒、转座子等。本发明的蛋白表达用载体,例如可按照Tomita H等人,Invest Ophthalmol Vis Sci.2007Aug;48(8):3821-6;及Sugano E等人,Invest Ophthalmol Vis Sci.2005Sep;46(9):3341-8记载的方法来制造,并对靶组织的细胞等进行基因导入。另外,本突变体还可用于实现上述视觉再生等或光遗传学的研究目的。

[0213] 旨在视觉的再生等、眼部疾病的治疗的该载体,例如可构成为:将全部类型的神经节细胞(ON和OFF这两种神经节细胞)或全部类型的双极细胞(视杆双极细胞、以及ON和OFF视锥双极细胞)作为对象。

[0214] 因此,根据本说明书,可提供包含本突变体的、用于治疗或预防视觉障碍的药物组合物。需要说明的是,没有特别限定,作为视觉障碍,例如可列举视网膜色素变性、老年性黄斑变性、视网膜脱落、糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、青光眼或色盲等。

[0215] 使用编码光响应性蛋白的DNA的基因治疗是公知的,对于本蛋白质等,也可用于相同的方法或基于该方法进行眼部疾病的基因治疗、研究用途。

[0216] (本突变体在光遗传学中的应用)

[0217] 另外,本突变体在使用光遗传学的各种神经通路的研究用途和神经疾病的治疗等用途中也是有用的。通常,神经细胞的细胞内外存在电位差(电压差)。常态时(抑制时)细胞内与细胞外相比为约-70mV~-80mV程度。将该状态称为过极化。当细胞膜内外的电位差上升至-40mV~-20mV时(称为脱极化),膜电位依赖性钠通道发生活化,从而引起神经细胞活化(或放电、兴奋)。第1蛋白为光响应性阳离子通道,因此,其在神经细胞膜上表达时,通过伴随光照射而使阳离子透过,从而产生通道电流。其结果,使细胞膜脱极化,结果能够使神经细胞活化(放电、兴奋)。

[0218] 因此,例如使用该载体或整合有该载体的病毒转化作为靶细胞的神经细胞,使靶细胞中表达本突变体。由此转化的神经细胞提供光照射会产生通道电流。通过在生物体外制备上述转化神经细胞并移植到生物体内或使该载体等转化生物体内的神经细胞,由此可在生物体内构建响应来自外部的光照射并活化的神经通路。特别是在长波长侧具有最大活

性波长 $\lambda_{\max}$ act的本突变体的组织渗透性高,因此适合光遗传学用途。

[0219] 因此,提出了一种使用方法,其使用本说明书中公开的蛋白或编码所述蛋白的多核苷酸,通过例如蓝色光(430~440nm)等光照射肌细胞、大脑上皮神经细胞或海马神经元细胞而引起放电。

[0220] (靶细胞)

[0221] 作为转化细胞的靶细胞,例如可列举酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces Pombe*)和毕赤酵母(*Pichiapastoris*)等。

[0222] 另外,作为其它靶细胞,可列举哺乳动物细胞和昆虫细胞。例如,作为哺乳类细胞,可列举黑色素瘤细胞(例如,BLM细胞株)、COS细胞(通过“非洲绿猴肾CV1”细胞感染产生)、HEK细胞(“人胎儿肾细胞”例如HEK293细胞)、BHK细胞(例如,“幼仓鼠肾细胞”)中的瞬时表达形式的附加型载体,或者CHO细胞(“中国仓鼠卵巢细胞”)、骨髓瘤细胞或MDCK细胞(“Madine-Darby犬肾细胞”),作为昆虫细胞,可列举感染了杆状病毒的Sf9昆虫细胞等。

[0223] 从为了得到光响应性而进行视觉再生等的观点出发,作为靶细胞,哺乳动物细胞可列举感光细胞;视网膜视杆细胞;视网膜视锥细胞;视网膜神经节细胞;双极神经元;神经节细胞;假单极神经元;多极神经元;视锥神经元;浦肯野细胞;或颗粒细胞等。

[0224] 从光遗传学等观点出发,作为靶细胞,例如可列举包括哺乳类细胞的动物细胞。哺乳类细胞例如可使用神经母细胞瘤细胞(例如,NG108-15细胞)、黑素瘤细胞(例如,BLM细胞株)、COS细胞(由“非洲绿猴肾CV1细胞”产生)、HEK细胞(“人胚肾细胞”,例如,HEK293细胞)或BHK细胞(“仓鼠肾细胞”),或者,可列举CHO细胞(“中华仓鼠卵巢细胞”)、骨髓瘤细胞或MDCK细胞(“Madine-Darby犬肾细胞”)。另外,还能够在感染有杆状病毒的Sf9昆虫细胞内。

[0225] 哺乳类细胞另外例如为电兴奋性的细胞。例如为海马细胞、双极神经细胞;神经节细胞;假单极性神经细胞;多极神经细胞;视锥神经细胞、浦肯野细胞;或粒细胞。电兴奋性的细胞另外还包括:响应接触、声、光以及影响感觉器官的细胞的其它多种刺激的感觉神经细胞、从脑和脊髓接受信号引起肌肉收缩或影响腺体的运动神经细胞、以及在脑或脊髓的相同区域内连接神经细胞彼此的中间神经细胞等多种神经细胞。此外,还可列举心肌、平滑肌和骨骼肌等。

[0226] 靶细胞另外例如为动物个体内的细胞、组织和器官,最终能够形成动物个体或其一部分的受精卵、ES细胞和iPS细胞等。作为动物个体,例如可列举蝇、线虫、小鼠、大鼠、猴子等。此外,作为由此获得的结果,可列举上述转化的动物或其一部分等。

[0227] 转化的靶细胞可进行分离(以及通过遗传学改造)、维持,在适当的温度和混合气体(典型的为37℃、5%CO₂)中,任意在本领域技术人员已知以及为实施例中的特定细胞株或细胞型而例示的细胞培养器内进行培养。培养条件可根据各细胞型而变化,用于特定细胞型的条件改变可带来不同的表型。除温度和混合气体以外,细胞培养体系中最常见的变化要素是增殖培养基。增殖培养基的组成中,可在pH、葡萄糖浓度、生长因子以及特别的其它营养成分的存在方面进行改变。增殖培养基可商业使用、或按照从美国模式菌种收集中心(ATCC)获得的组成来制备。补充培养基中使用的生长因子通常为胎牛血清等动物血液来源。另外,还可在增殖培养基中加入抗生素。在常规操作方面,对培养细胞实施的常规操作为培养基变更和细胞通过。

[0228] (对神经细胞赋予光响应性的方法)

[0229] 本突变体可对神经细胞赋予光响应性。因此,本方法除可实施改善视觉障碍或再生视觉功能的方法以外,还可用于光遗传学。例如,通过对认为与小鼠海马的攻击性、记忆形成有关的区域中存在的神经细胞导入赋予光响应性的蛋白或多核苷酸,可实际验证该区域与攻击性、记忆形成是否相关(Lin,D等人,2011,Nature.470(7333):221-6;及OKUYAMA等人,2016,Science(6307)1536-1541)。

[0230] 另外例如,对人或非人动物的、中枢或末梢的神经细胞赋予光响应性并照射规定波长和强度的光,从而可产生通道电流,由此活化神经细胞,从而能够验证该区域的神经细胞的活化、抑制与特定疾病是否相关。另外,通过活化上述神经细胞,有时能够恢复中枢或末梢的神经回路、治疗神经退行疾病等。

[0231] (光响应性细胞)

[0232] 根据本说明书,赋予了用于颜色识别的光响应性的上述靶细胞作为新的光响应性细胞(光响应性材料)被提供。该光响应性细胞例如可以用于在光遗传学的领域中与神经活动的活化等相关的研究。

[0233] (筛选方法)

[0234] 本说明书中公开的筛选方法可以具备:对被检体蛋白评价照射光的照射波长与通道活性的关系的工序,上述被检体蛋白在与序列号1所示的第1氨基酸序列的1个或2个以上的位置相当的位置具备与第1氨基酸序列不同的氨基酸残基。根据该筛选方法,能够以第1蛋白为起点,获得具有用于颜色识别的通道活性的突变体。此外,此处所说的通道活性例如可以通过上述的电生理学测定法来测定。另外,通道活性可以采用上述的Ip、Is及通道开放率中的任一个或2个以上的组合。

[0235] 在这些筛选方法中使用的被检测体即突变体可以基于上述的突变体的制作方法而得到。另外,对于通道活性的评价也可以适用已经说明的方式。

[0236] 实施例

[0237] 以下,为了更具体地说明本说明书的公开,记载了作为具体例的实施例。以下的实施例用于说明本说明书的公开,并不限定其范围。

[0238] 实施例1

[0239] (含有编码GtCCR4突变体的DNA的载体的制作及ND7/23的转化及转化细胞的电生理学测定之一)

[0240] 根据GtCCR4的氨基酸序列(序列号1),设计了赋予了各种单一突变和多突变的突变体。使用上述密码子用法确定编码这些的碱基序列,通过QuickChange法(QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit,Agilent Technologies株式会社)制作。此外,突变体的替换突变的内容如图2所示。

[0241] 对于该DNA片段,分别使用以下所示的引物进行扩增。另外,载体DNA(pEGFP-N1)也用反向PCR扩增。对于扩增的DNA片段和载体DNA片段,分别通过In-Fusion反应制作分别插入了各DNA片段的pEGFP-GtCCR4mutant。

[0242] 用于获得DNA片段(编码来自GtCCR4的突变体)的引物

[0243] 正向引物:

[0244] 5'CGAGCTCAAGCTTATGATGACAACAAGCGCCCCTAG 3'(序列号3)

[0245] 反向引物:

[0246] 5'GACCGGTGGATCCTGAACAGCCTCAGACTCTTGCA 3' (序列号4)

[0247] 用于获得vector pEGFP-N1的载体片段的引物

[0248] 正向引物:5'CATAAGCTTGAGCTCGAGATC3' (序列号5)

[0249] 反向引物:5'CAGGATCCACCGGTCGCCACC3' (序列号6)

[0250] 接着,使用DMEM (High glucose)+FBS5%培养基,在CO₂培养箱中于37℃培养源自小鼠神经/大鼠脊髓背根神经节且源自小鼠母细胞瘤×大鼠神经的ND7/23细胞。使用脂质转染法(Lipofectamine 2000 (Thermo Fischer公司))将所制作的载体导入该细胞,将质粒DNA导入ND7/23细胞中。ND7/23细胞中的GtCCR4 mutant的表达通过GFP荧光来确认。

[0251] 向细胞导入基因后,在24小时以后48小时以内,在以下条件下通过全细胞记录膜片钳法进行电生理学测定。

[0252] [表8]

(1) 电流增幅器	Axopatch 200B 放大器 (Molecular Devices 公司制造)
(2) 数字/模拟转换器	Digidata1550 或 Digidata1320 (Molecular devices 公司制)
(3) 软件	控制软件: Clampex10.0, 分析软件: Clampfit10.7
(4) 显微镜	IX-73 或 IX-70 (OLYMPUS 株式会社)
[0253]	用微电极拉制仪 P-97 (SUTTER 公司制) 制造, 用 MF-830
(5) 移液器	(NARISHIGE 株式会社) 火融抛光得到的玻璃移液器, 移液器电阻: 1.5~2.5MΩ
(6) 细胞外溶液	140mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , 2mM CaCl ₂ , 2mM KCl, 10mM Hepes-NaOH, pH7.2。
(7) 细胞内溶液	110mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , 1mM CaCl ₂ , 5mM KCl, 10mM EGTA, 10mM Hepes-NaOH, pH7.2。
[0254]	照射光: 410nm~650nm, 光强 0.1mW/mm ² , 照射时间
(8) 电流记录条件	400ms, 记录时间 1000mS, 室温
(9) 光源	OSG (Hamamatsu 株式会社)

[0255] 在电生理学测定中,对于各突变体,改变照射光的波长,并测量电流响应,测定波长依赖性(活性光谱)和最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 。

[0256] (活性光谱和最大活性波长的测定)

[0257] 波长依赖性(活性光谱)的测定是在照射光:光强度始终为0.1mW/mm²,首先照射410nm的波长的光,进行电流测定,然后利用波长每次长10nm的光进行光照射,测量对各个光照射的电流响应。在达到650nm的波长范围内进行。由通过各波长的光照射得到的稳定的电流值(Is)制作活性光谱。另外,将得到最大电流值的光的波长设为最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 。关于各突变体的最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 一并示于图2。另外,图2中还一并表示野生型

(WT)和突变体(Y117A、Y117F、Y117N、Y217F、L146A/P218T和T147C/G151A/Y217F)的各活性光谱。

[0258] (蓝色区域及红色区域的光响应性的评价)

[0259] 在上述实验得到的活性光谱的结果中,将440nm的光照射下的电流值与最大活性波长下的电流值的相对值(比)定义为蓝色区域的响应性,将600nm的光照射下的电流值与最大活性波长下的电流值的相对值(比)定义为红色区域的响应性。进行定义。这些结果示于图3和图4。

[0260] 如图2(A)所示,各突变体根据突变的方式表示各种最大活性波长 $\lambda_{\max \text{ act}}$ 。其中,Y117A、Y117F、Y117N、G169S、W177Y、Y217F、Y218T、S247A、L146A/Y217F的最大活性波长向短波长侧移动,确认了在蓝色区域的响应性的提高。另外,L53N、V83A、L146A/P218T、V83A/L146A/P218T的最大活性波长向长波长侧移动,确认了在红色区域的响应性的提高。L146A其自身的最大活性波长为530nm,但可知对与其他突变的组合有利。

[0261] 另外,如图2(B)和图2(C)所示,可知Y217F、L146A/P218T和T147C/G151A/Y217F都可以成为新的视质候选。另外,如图2(C)所示,T147C/G151A/Y217F在最短波长侧具有最大活性波长,并且在长波长侧响应性急剧减少,可知是在短波长侧能够以更高灵敏度响应的突变体。

[0262] 另外,如图3及图4所示,440nm的光照射时电流的相对值大的突变体为C150A、G169S、W177Y、Y217F、S247A、L146A/Y217F,这些的上述相对值其自身为0.4以上,并且比600nm的光照射时的相对值大2倍以上。另一方面,600nm的光照射时电流的相对值大的突变体为V83A、L146A、P218T、L146A/C150A、L146A/G169S、L146A/W177Y、L146A/P218A、L146A/P218G、L146A/P218T、V83A/L146A/P218T。这些的上述相对值均为0.3以上,另外,为440nm的光照射时的相对值的0.6倍以上。另外,L146A/P218T有两个 $\lambda_{\max \text{ act}}$,为510nm/560nm,但在短波长侧峰值获得440nm相对值,在长波长侧获得600nm相对值。

[0263] 另外,如图4所示,Y117A、Y117F、Y117N、T147C/G151A、T147C/G151A/Y217F也是440nm的光照射时电流的相对值大的突变体。Y117A、Y117F、T147C/G151A分别比600nm的光照射时的相对值大6倍以上、6倍以上、18倍以上。另外,在T147C/G151A/Y217F中,在600nm处几乎不显示电流值,因此可知与这些突变体相比,在短波长侧的响应特异性更优异。

[0264] 由以上可知,作为第1蛋白的GtCCR4的突变体可以提供对颜色识别有利的突变体。

[0265] 实施例2

[0266] (表达作为来自G.Theta的阳离子通道胰蛋白酶GtCCR4的ND7/23细胞的电生理学测定)

[0267] 对于实施例1中制备的表达GtCCR4的ND7/23细胞,将实施例1中制备的载体以与实施例1中相同的方式导入到ND7/23细胞中,并且在与实施例1中相同的条件下,在导入后24小时以后48小时内通过全细胞记录膜片钳法对已经确认GtCCR4表达的细胞进行电生理学测定。

[0268] 即,对细胞照射光,分别测定对细胞照射400ms时间的光时产生的峰状的最大电流值(I_p)和在光照射中衰减到一定水平的稳定的电流值(I_s)。进而,将 I_s 除以 I_p 所得的值作为通道开放率。测定原理等如图5的A~C所示,测定结果如图5的D、E所示。

[0269] 如图5的D、E所示,GtCCR4产生了大的通道电流。另外,GtCCR4均显示高的通道开放

率(0.81、0.85)。可以认为这些特性都有助于对神经节细胞赋予光响应性来进行视觉再生。通过相同的操作制备的ND7/23细胞的由来自衣藻的ChR2测定的通道电流值为GtCCR4的约一半,通道开放率为0.45。

[0270] 由以上可知,GtCCR4与ChR2相比,在通道活性和/或通道开放率方面均有利。

[0271] 实施例3

[0272] (含有编码GtCCR4突变体的DNA的载体的制作及ND7/23的转化及转化细胞的电生理学测定之一)

[0273] 根据GtCCR4的氨基酸序列(序列号1),设计了赋予了各种单一突变的突变体。使用上述密码子用法确定编码这些的碱基序列,通过QuickChange法(QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit,Agilent Technologies株式会社)制作。此外,单突变体的替换突变的内容如图6所示。

[0274] 对于该DNA片段,与实施例1同样地操作,通过In-Fusion反应,制作pEGFP载体,进而,与实施例1同样地操作,转化ND7/23细胞,获得表达各单突变体的转化细胞。进而,与实施例2同样地操作,对这些转化细胞进行电生理学测定。另外,作为对照,对于来自衣藻的ChR2及野生型GtCCR4的转化细胞也同样地进行测定。结果如图6所示。

[0275] 如图6所示,几个突变体关于通道电流值显示出优于野生型的结果。例如,E76Q、V83A、V83T、A87S、K137A、L146A、K198A、K204A、S230E和Q231L显示高的 I_p 和 I_s 。其中,E76Q、V83A、V83T、K137A、L146A、K198A、K204A和Q231L显示出相对于野生型优异的通道活性。另外,E76Q、V83A、V83T、K137A和L146A的通道开放率也约为1。

[0276] 由以上可知,上述的突变位置均为在GtCCR4中对控制通道活性有用的突变位置。上述突变位置和氨基酸替换残基是对通道活性和/或通道开放率有利的氨基酸替换突变。

[0277] 另外,即使是显示与野生型GtCCR4同等的通道活性的突变,也呈现比来自衣藻的ChR2充分高的通道活性和/或通道开放率,被认为是有用的突变位置和替换残基。

[0278] 实施例4

[0279] (含有编码GtCCR4突变体的DNA的载体的制作及ND7/23的转化及转化细胞的电生理学测定之二)

[0280] 对实施例3中制作的表达具有E76Q、V83A、K137A、L146A、K198A、K204A和Q231L的各单一突变的单突变体的转化细胞进行电生理学测定。另外,同时对来自衣藻的ChR2、野生型GtCCR4、实施例3中制作的V83A突变体的转化细胞也进行电生理学测定。另外,光照射条件如图7所示。结果示于图7。

[0281] 图7的A~D例示了来自衣藻的ChR2、野生型GtCCR4、V83A突变体和L146A突变体的结果,图7的E~F表示了各种突变体的结果。如图7中的A~F所示,可以确认与ChR2和野生型GtCCR4相比,各种突变体不仅具有高的通道电流值,而且具有高的通道开放率,并且抑制了通道的失活。抑制失活会增大流过的通道电流的总量,因此认为适合于光响应性的提高。

[0282] 由以上可知,这些突变体均为有用性高的突变体,认为这些突变位置及替换残基对通道活性或通道开放率作出贡献。

[0283] 实施例5

[0284] (含有编码GtCCR4的双突变体的DNA的载体的制作及ND7/23的转化及转化细胞的电生理学测定)

[0285] 对于实施例3和实施例4中确认的单一突变中的某种组合,按照实施例1和2制作载体,与实施例2同样地进行电生理学测定。另外,同时对来自衣藻的ChR2、野生型GtCCR4的转化细胞也进行电生理学测定。结果如图8所示。

[0286] 如图8A所示,双突变体显示约为野生型GtCCR4的两倍~四倍的通道活性。此外,如图8B所示,其通道开放率也超过野生型GtCCR4,大致为0.9~1.0。由以上可知,这些单一突变除了分别是有用的突变位置和替换残基以外,在双突变体中也是有用的突变位置和替换残基。因此可知,作为单一突变优异的突变位置和替换残基作为双突变体也是有用的。

[0287] 实施例6

[0288] (含有编码GtCCR4突变体的DNA的载体的制作及ND7/23的转化及转化细胞的电生理学测定之三)

[0289] 按照实施例3,根据GtCCR4的氨基酸序列(序列号1),设计了赋予了各种单一突变的单突变体,使用上述密码子用法确定编码这些的碱基序列,通过QuickChange法制作DNA片段。接着,按照实施例2,通过In-Fusion反应,制作pEGFP载体,转化ND7/23细胞,获得表达各单突变体的转化细胞,对这些转化细胞进行电生理学测定。另外,作为对照,对于野生型GtCCR4的转化细胞也同样地进行测定。单突变体的替换突变的内容和电生理学测定结果一并示于图9。

[0290] 如图9所示,几个突变体关于通道电流值显示出优于野生型的结果。例如,L53A、L53N、E76Q、V83T、G216S、Q231L等显示高的 I_p 和 I_s 。这些突变体的通道开放率都优异,特别是L53A、L53N、E76Q、V83T、Q231L的通道开放率也约为1。从活性的观点出发,L53A、V83T、Q231L优异。

[0291] 另外,L46A、E68Q、R94K、F173Y、T224A、H235A、H235N的活性与野生型大致相同,但被认为呈现出比来自衣藻的ChR2充分高的通道活性和/或通道开放率,因此被认为是有用的突变位置和替换残基。

[0292] 由以上可知,上述的突变位置均为在GtCCR4中对控制通道活性有用的突变位置。上述突变位置和氨基酸替换残基是对通道活性和/或通道开放率有利的氨基酸替换突变。

[0293] 实施例7

[0294] (神经细胞光刺激实验)

[0295] 在本实施例中,对使光响应性蛋白在细胞膜中表达的大鼠大脑上皮原代培养细胞照射光强度进行各种改变而引起响应的波长的光,测定其细胞膜电位,评价光刺激中的光强度依赖性。

[0296] 通过光照射使神经细胞活化(放电、兴奋)称为光刺激。在本实施例中,作为光刺激的评价方法,进行了基于以下的电生理学方法的实验。即,分离大鼠大脑上皮细胞,在培养皿上培养。将其称为原代培养细胞。按照实施例1、2等,使该原代培养细胞表达GtCCR4(WT)和Chr2(WT),然后分别以最大吸收波长530nm和488nm照射各种强度的光一定时间,此时,通过基于全细胞记录的膜片钳法的电流固定法,测量对单一神经细胞的兴奋(去极化)和过极化(抑制),测量细胞膜电位的时间变化。

[0297] 具体而言,合成编码GtCCR4和ChR2的各氨基酸序列的DNA(使用哺乳类的密码子用法),以使其标记在这些蛋白的C末端侧的方式将eYFP插入到具有CAMK2启动子的神经细胞用载体质粒中,作为导入用质粒,使用磷酸钙法将该质粒导入大鼠大脑上皮原代培养细胞

中进行转染。各蛋白的导入细胞在细胞膜上的表达可以通过eYFP的荧光来确认。

[0298] 对于这样在原代培养细胞膜上暂时表达各蛋白的细胞,导入后,在16天以内各蛋白稳定表达的状态下,进行全细胞记录的膜片钳法等电生理学测定。

[0299] 基于全细胞记录膜片钳法的电流固定法的测定条件采用以下的条件。

[0300] [表9]

(1) 带头载物台的电流 增幅器	膜片钳放大器 IPA (Sutter 社制造)
(2) 软件	控制软件: Igor8.0, 分析软件: Igor8.0
(3) 显微镜	IX-73 或 IX-70 (OLYMPUS 社)
(4) 移液器	通过使用微电极控制仪 P-97 (SUTTER 社制) 加工毛细管玻璃管来制造, 用 MF-830 (NARISHIGE 社制) 实施火融抛光。移液管电阻: 5~10M Ω
(5) 显微机械手	NMN-21 机械手 (NARISHIGE 社制造)
[0301] (6) 细胞外溶液	138 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM HEPES, 4 mM NaOH, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 11 mM glucose, 20 mM 二硝基喹酮 (DNQX), 25 mM D (-)-2-氨基-5-磷戊酸 (D-AP5) 以及 100 mM 印防己毒素, pH 7.4
(7) 细胞内溶液	125 mM 葡萄糖酸钾, 10 mM NaCl, 0.2 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl ₂ , 3 mM MgATP, 0.3 mM Na ₂ GTP, 10 mM 磷酸肌酸钠, 0.1 mM 亮抑蛋白酶肽, pH 7.4
(8) 电流记录条件	照射光: 530 nm (GtCCR4) 和 488 nm (ChR2), 光强 6.9mW/mm ² , 照射时间 100 mS~600 mS, 记录时间 300 mS~1000 mS, 室温

[0302] 测定顺序如下。将准备的细胞培养皿内的溶液更换为上述 (6) 的细胞外溶液。接着,在显微镜下观察细胞,选择强烈发出eYFP荧光的细胞。用上述 (6) 的细胞内溶液充满上述 (4) 中制造的玻璃移液管的管内,与 (1) 的电流放大器附属的头载物台连接。通过用上述 (5) 的显微机械手操作玻璃移液管的位置,使玻璃移液管前端移动到细胞上部约2-3微米。进而,通过显微机械手操作使玻璃移液管缓缓下降,移动到细胞与移液管前端接触的位置。然后通过对玻璃移液管内进行减压,使细胞膜完全紧贴在移液管前端。此时5~10M Ω 的吸液管电阻上升到1G Ω 左右。进而通过使移液管内减压而成为能够进行全细胞记录的完整细胞模式。

[0303] 达到上述状态后,通过膜片钳法电流固定法测定细胞膜电位。在抑制神经细胞时,膜电位显示-70~-80mV的值,但对表达了具有光响应活性的蛋白的细胞进行光照射时,细胞发生去极化,因此膜电位上升至-20~-40mV,然后观察到尖峰状的神经活化(兴奋、放

电)。通过测量在上述条件下测定时的去极化的程度,即尖峰状的神经兴奋的频度,验证了这些蛋白的光刺激的效果。结果如图10所示。

[0304] 如图10(A)~(C)所示,可知GtCCR4以比Chr2低的光强度激活。比较EC50,GtCCR4为 $0.02\text{mW}/\text{mm}^2$,Chr2为 $0.15\text{mW}/\text{mm}^2$,有7倍以上的差。这意味着GtCCR4具有Chr2的7倍以上的光灵敏度。由此可知,如果是确认了与GtCCR4同等以上的活性的GtCCR4的突变体,则是与GtCCR4同样的光强度依赖性,即,即使是低强度的光,也能够膜中表达该蛋白的细胞中充分地进行光刺激。

[0305] 此外,根据本说明书,包含以下所示的公开。

[0306] (1) 一种蛋白,其在序列号1所示的第1氨基酸序列中在以下位置具备与所述第1氨基酸序列所具备的氨基酸残基不同的氨基酸残基并具有通道活性,所述位置相当于选自由第53位、第83位、第87位、第117位、第120位、第124位、第137位、第139位、第142位、第143位、第146位、第150位、第169位、第173位、第177位、第198位、第204位、第216位、第217位、第218位、第231位、第238位、第245位和第247位组成的组中的1个或2个以上的位置。

[0307] (2) 根据(1)所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第87位、第117位、第120位、第124位、第139位、第142位、第143位、第146位、第150位、第169位、第173位、第177位、第217位、第218位、第238位、第245位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0308] (3) 根据(1)所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第53位、第83位、第137位、第146位、第169位、第177位、第217位、第218位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0309] (4) 根据(3)所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第169位、第177位、第217位、第218位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0310] (5) 根据(4)所述的蛋白,其中,最大活性波长小于520nm。

[0311] (6) 根据(3)所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第53位、第83位、第137位、第146位和第218位组成的组中的1个或2个以上。

[0312] (7) 根据(6)所述的蛋白,其中,最大活性波长为530nm以上。

[0313] (8) 根据(1)所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第137位、第146位、第150位、第177位、第198位、第238位、第245位和第247位组成的组中的1个或2个以上。

[0314] (9) 根据(8)所述的蛋白,其中,所述最大活性波长为520nm以上且小于530nm。

[0315] (10) 根据(1)或(2)所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第150位、第169位、第177位、第218位和第247位组成的组中选出的1个或2个以上。

[0316] (11) 根据(1)所述的蛋白,其中,所述位置是选自由第87位、第117位、第120位、第124位、第139位、第142位、第143位、第173位、第204位、第216位和第231位组成的组中的1个或2个以上。

[0317] (12) 根据(1)~(11)中任一项所述的蛋白,其中,还具备一个或多个氨基酸残基的缺失、替换或插入。

[0318] (13) 根据(1)~(12)中任一项所述的蛋白,其中,所述蛋白在所述第1氨基酸序列中的相当于以下位置的位置具有以下任一方式的氨基酸替换,

[0319] [表10]

[0320]

第 1 氨基酸序 列中的位置	氨基酸替换的方式			
53	L53N			
83	V83A			
137	K137A			
146	L146A			
150	C150A			
169	G169S			

[0321]

177	W177Y			
198	K198A			
217	Y217F	Y217N		
218	P218A	P218S	P218G	P218T
238	T238V			
245	A245M			
247	S247A	S247M		
146/150	L146A/C150A			
146/169	L146A/G169S			
146/177	L146A/W177Y			
146/217	L146A/Y217F			
147/218	L146A/P218A	L146A/P218T	L146A/P218S	L146A/P218G
146/238	L146A/T238V			
83/146/218	V83A/L146A/P218A			

[0322] (14) 根据 (1) ~ (12) 中任一项所述的蛋白, 其中, 所述蛋白在所述第 1 氨基酸序列中的相当于以下位置的位置具有以下任一方式的氨基酸替换,

[0323] [表 11]

[0324]

第 1 氨基酸序 列中的位置	氨基酸替换的方式			
53	L53A			
83	V83T			
87	A87S			
117	Y117A	Y117D	Y117F	Y117N
124	L124Q	L124C	L124T	L124A
142	L142A			
204	K204A			
216	G216S			
231	Q231L			
137/204	K137A/K204A			
146/218	L146A/P218C	L146A/P218H	L146A/P218N	L146A/P218V

[0325] (15) 根据 (1) ~ (14) 中任一项所述的蛋白, 其中, 作为所述蛋白的 440nm 处的通道活性等效值与表现出最大通道活性的波长 ($\lambda_{\max}$) 处的通道活性等效值的第一比为 0.4 以上。

[0326] (16) 根据 (1) ~ (15) 中任一项所述的蛋白, 其中, 作为所述蛋白的600nm处的通道活性等效值与表现出最大通道活性的波长 ($\lambda_{\max}$) 处的通道活性等效值的第二比为0.4以上。

[0327] (17) 根据 (1) ~ (16) 中任一项所述的蛋白, 其中, 所述蛋白的氨基酸序列与第1氨基酸序列具有90%以上的一致性。

[0328] (18) 一种使用方法, 其使用 (1) ~ (17) 中任一项所述的蛋白或编码所述蛋白的多核苷酸来改善或恢复视网膜的用于颜色识别的光响应性。

[0329] (19) 一种用于治疗或预防视觉障碍的药物组合物, 其包含 (1) ~ (17) 中任一项所述的蛋白或编码所述蛋白的多核苷酸。

[0330] (20) 根据 (19) 所述的药物组合物, 其中, 所述视觉障碍选自由视网膜色素变性、老年性黄斑变性、视网膜脱落、糖尿病视网膜病变和色盲组成的组。

[0331] (21) 一种突变体蛋白的筛选方法, 其具备对被检测体蛋白评价照射光的波长与通道活性的关系的工序, 所述被检测体蛋白在序列号1所示的第1氨基酸序列中的1个或2个以上的位置具备与第1氨基酸序列中的氨基酸残基不同的氨基酸残基。

[0332] 序列表自由文本

[0333] 序列号3~6: 引物

[0001] 序列表
 [0002] <110> 国立大学法人名古屋工业大学 (Nagoya Institute of Technology)
 [0003] <120> 用于颜色识别的光响应性蛋白及其应用
 [0004] <130> K191022PCT
 [0005] <160> 6
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 367
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> *Guillardia theta*S
 [0011] <400> 1
 [0012] Met Thr Thr Ser Ala Pro Ser Leu Ser Asp Pro Asn Trp Gln Tyr Gly
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Met Gly Gly Trp Asn Asn Pro Arg Leu Pro Asn Phe Asn Leu His Asp
 [0015] 20 25 30
 [0016] Pro Thr Val Ile Gly Val Asp Trp Leu Gly Phe Leu Cys Leu Leu Gly
 [0017] 35 40 45
 [0018] Ala Ser Leu Ala Leu Met Tyr Lys Leu Met Ser Phe Lys Gly Pro Asp
 [0019] 50 55 60
 [0020] Gly Asp Gln Glu Phe Phe Val Gly Tyr Arg Glu Glu Lys Cys Leu Ser
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Ile Tyr Val Asn Leu Ile Ala Ala Ile Thr Tyr Trp Gly Arg Ile Cys
 [0023] 85 90 95
 [0024] Ala His Phe Asn Asn Asp Met Gly Leu Ser Leu Ser Val Asn Tyr Phe
 [0025] 100 105 110
 [0026] Lys Tyr Leu Asp Tyr Ile Phe Thr Cys Pro Ile Leu Thr Leu Asp Leu
 [0027] 115 120 125
 [0028] Leu Trp Ser Leu Asn Leu Pro Tyr Lys Ile Thr Tyr Ser Leu Phe Val
 [0029] 130 135 140
 [0030] Gly Leu Thr Ile Ala Cys Gly Val Phe Cys Asn Ala Phe Glu Pro Pro
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Ala Arg Tyr Leu Trp Phe Met Phe Gly Cys Phe Ile Phe Ala Phe Thr
 [0033] 165 170 175
 [0034] Trp Ile Ser Ile Ile Arg Leu Val Tyr Ala Arg Phe Gln Gln Phe Leu
 [0035] 180 185 190
 [0036] Asn Glu Asp Ala Lys Lys Ile Arg Ala Pro Leu Lys Leu Ser Leu Thr
 [0037] 195 200 205
 [0038] Leu Tyr Phe Ser Ile Trp Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Trp Leu Leu Thr
 [0039] 210 215 220
 [0040] Glu Phe Gly Ala Ile Ser Gln Leu Ala Ala His Val Met Thr Val Ile
 [0041] 225 230 235 240

[0042]	Met Asp Val Ala Ala Lys Ser Val Tyr Gly Phe Ala Leu Leu Lys Phe	
[0043]	245	250 255
[0044]	Gln Leu Gly Val Asp Lys Arg Asp Val Trp Leu Asp Glu Leu Lys Ser	
[0045]	260	265 270
[0046]	Val Arg Tyr Arg Asp Val Val Pro Gln Ile Arg Pro Ser Lys Thr Arg	
[0047]	275	280 285
[0048]	Glu Ser Arg Met Glu Tyr Ser Glu Asp Gly Asp Phe Met Arg Pro Ser	
[0049]	290	295 300
[0050]	Lys Gly Lys Arg Ala Glu Gly Asp Tyr Met Asn Pro Arg Trp Asp His	
[0051]	305	310 315 320
[0052]	His Asp Asp Gly Arg Arg Leu Pro Asp Ser Arg Glu Met Asp Glu Gln	
[0053]	325	330 335
[0054]	Val His Glu Lys Asp Gln Glu Ile Ser Ser Thr Met Lys Gln Ile Ala	
[0055]	340	345 350
[0056]	Asp Leu Asn Lys Gln Leu Ser Ala Met Gln Glu Ser Glu Ala Val	
[0057]	355	360 365
[0058]	<210> 2	
[0059]	<211> 1101	
[0060]	<212> DNA	
[0061]	<213> <i>Guillardia theta</i>	
[0062]	<400> 2	
[0063]	atgacgacgt ctgcccccttc actctccgat cccaactggc aatatggcat gggaggatgg	60
[0064]	aacaatcctc gccttccaaa cttcaatctt caccgaccga ccgtgatcgg agttgattgg	120
[0065]	ctgggatttc tttgtcttct tgggtgcctct ctgcacctca tgtacaagct catgtcgttc	180
[0066]	aaggcccccg atggcgacca agagttcttc gtcggctacc gggaagagaa gtgcctctcc	240
[0067]	atctacgtca acctcatcgc tgccatcacc tactggggcc gtatctgcgc tcaattcaac	300
[0068]	aatgacatgg gcctttctct gtctgtcaac tacttcaagt acctggacta catcttcacc	360
[0069]	tgctctatcc tgacgtgga tctgtctgtg tcgtcacc tcccctacaa gatcacctac	420
[0070]	tctctcttcg tcggattgac catcgcatgc ggagtcttct gcaacgcgtt cgagcctccc	480
[0071]	gcgcggtacc tctggttcat gttcggctgc ttcattcttg ccttcacgtg gatcagcatc	540
[0072]	atccgcctcg tctacgcgcg gttccagcag tttctcaacg aggacgcgaa gaagatccga	600
[0073]	gcgcctctca agctctccct caccctctac ttcagcatct ggtgcggcta cccggccctc	660
[0074]	tggtctctca ccgagttcgg agccatctcc cagctggcag cccacgtgat gactgtcatc	720
[0075]	atggacgtcg ccgccaagtc tgtgtacggc ttgcacctgc tcaagttcca gctgggggtg	780
[0076]	gacaagcgag acgtctggct cgatgagctc aagagcgtca ggtatcgtga cgtcgtccct	840
[0077]	cagatccgac cgtcgaagac gcgagagagc cgcattggagt attcagagga cggagatttc	900
[0078]	atgcgtccga gcaaggggaa gagggcgaa ggagactaca tgaaccctcg ctgggaccac	960
[0079]	catgacgatg ggaggaggt gcccagacgc cgggagatgg acgagcaagt gcacgagaag	1020
[0080]	gaccaggaga tctcgtcgac gatgaagcag atcgccgacc tcaacaagca gctctctgcc	1080
[0081]	atgcaggagt ccgaggccgt t	1101
[0082]	<210> 3	
[0083]	<211> 36	

[0084]	<212> DNA
[0085]	<213> 人工序列
[0086]	<220>
[0087]	<223> 引物
[0088]	<400> 3
[0089]	cgagctcaag cttatgatga caacaagcgc ccctag 36
[0090]	<210> 4
[0091]	<211> 35
[0092]	<212> DNA
[0093]	<213> 人工序列
[0094]	<220>
[0095]	<223> 引物
[0096]	<400> 4
[0097]	gaccggtgga tcctgaacag cctcagactc ttgca 35
[0098]	<210> 5
[0099]	<211> 21
[0100]	<212> DNA
[0101]	<213> 人工序列
[0102]	<220>
[0103]	<223> 引物
[0104]	<400> 5
[0105]	cataagcttg agctcgagat c 21
[0106]	<210> 6
[0107]	<211> 21
[0108]	<212> DNA
[0109]	<213> 人工序列
[0110]	<220>
[0111]	<223> 引物
[0112]	<400> 6
[0113]	caggatccac cggtcgccac c 21

人的视杆细胞、视锥细胞中的视质的光谱

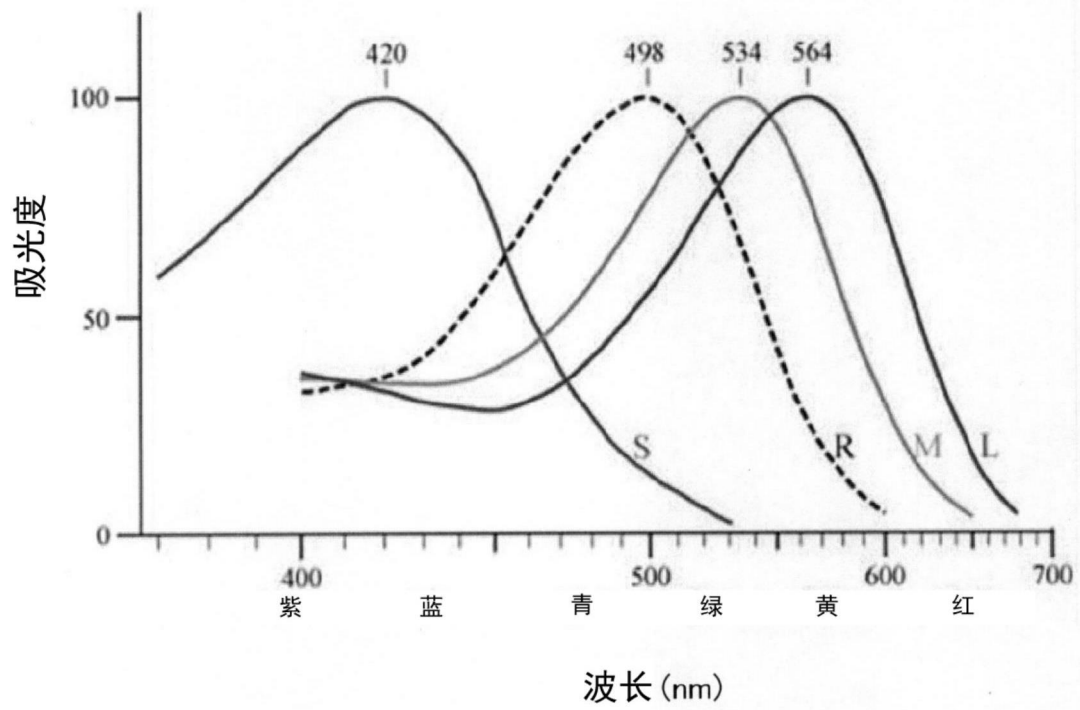


图1

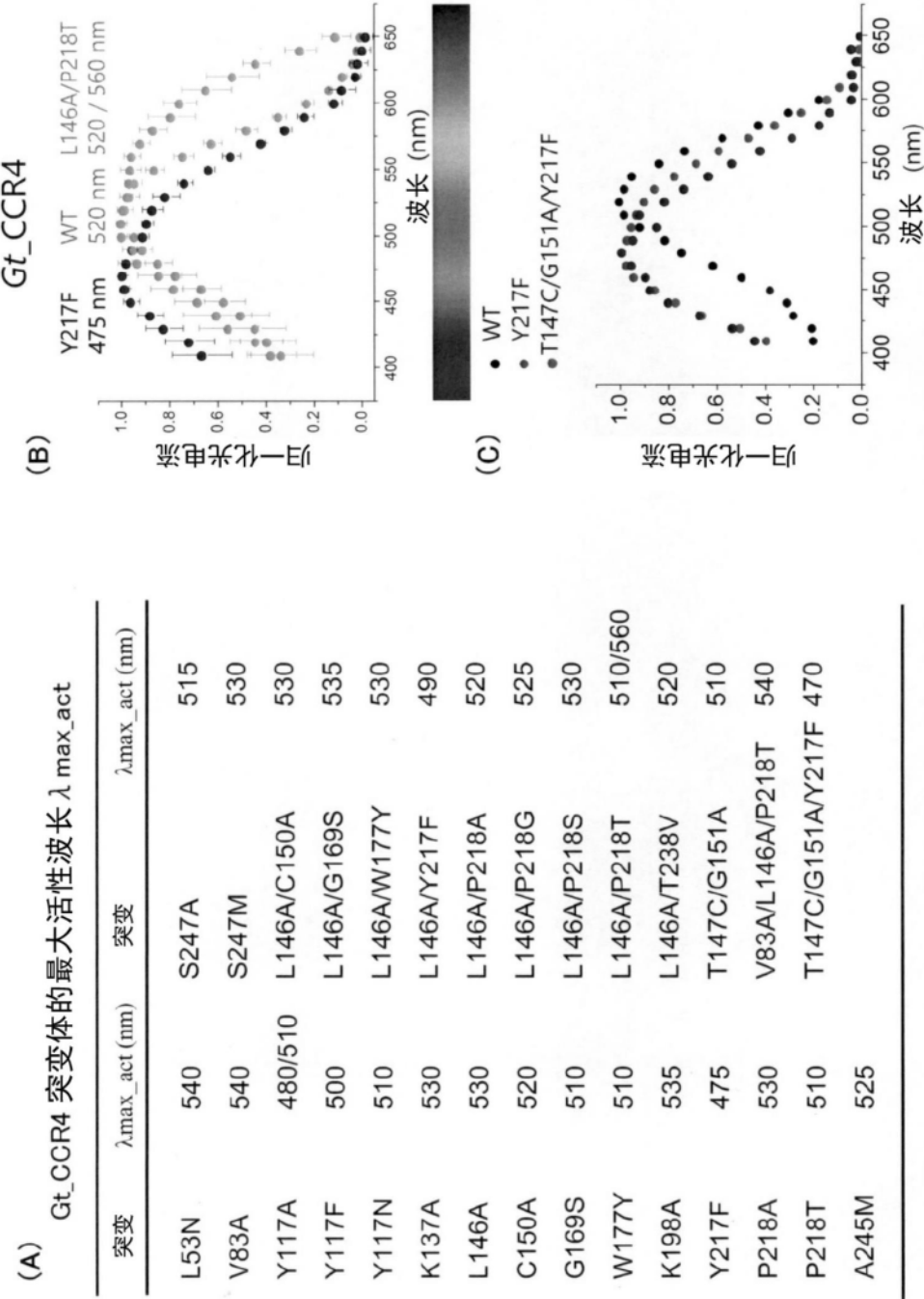


图2

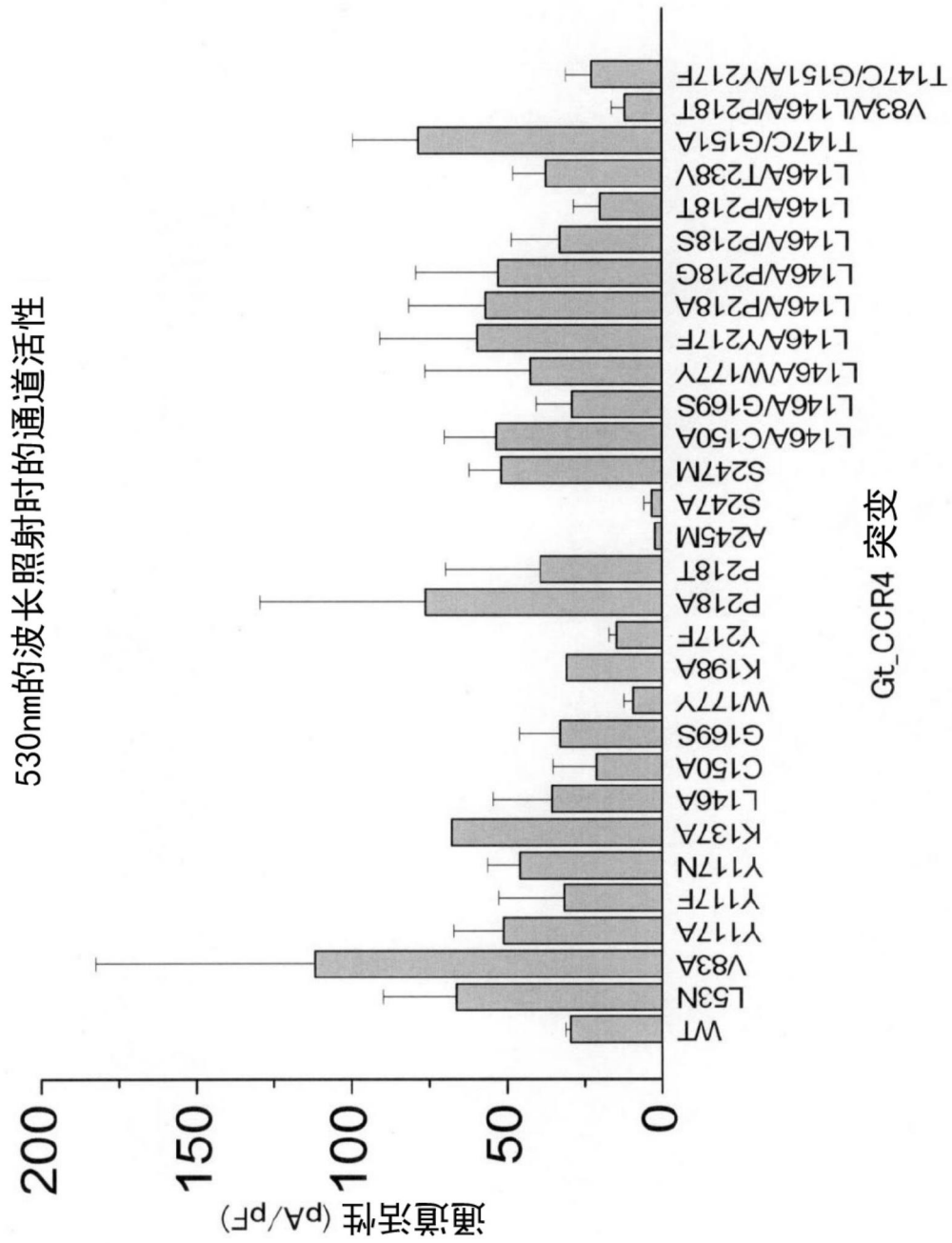


图3

通道活性的比

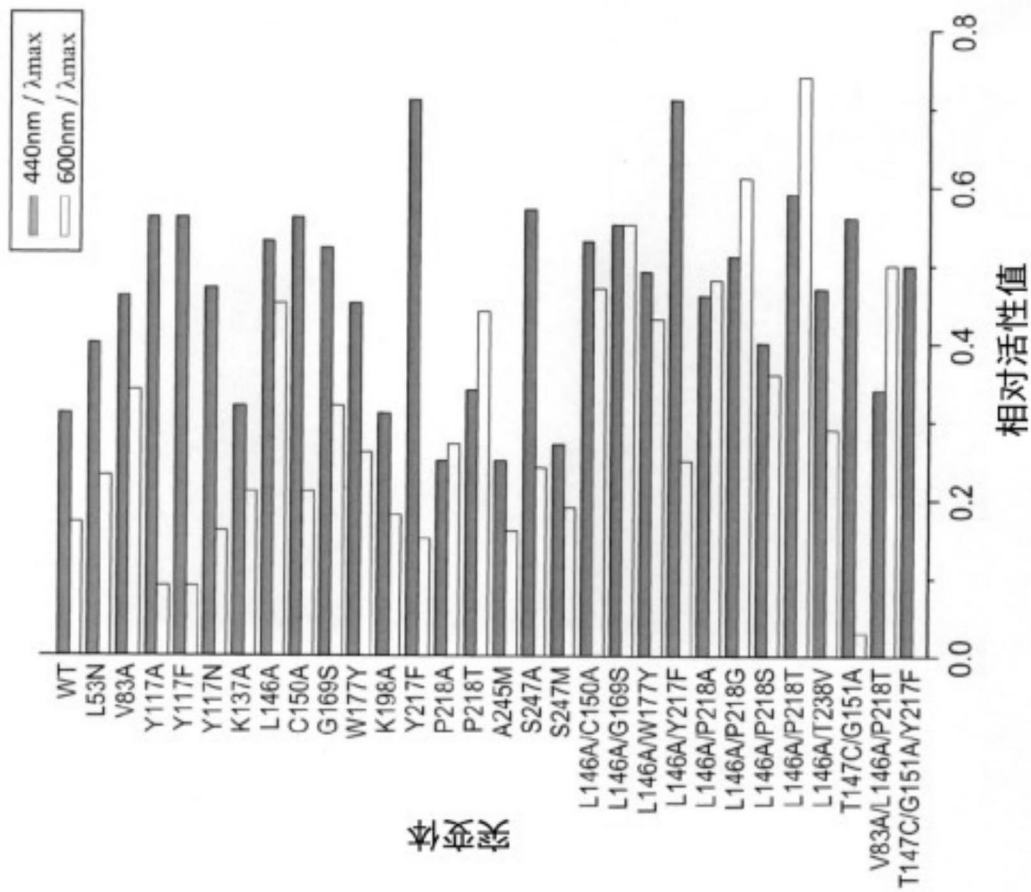
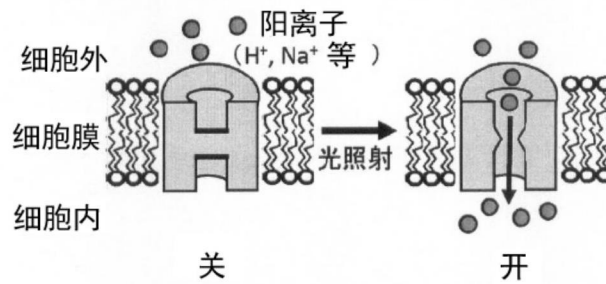


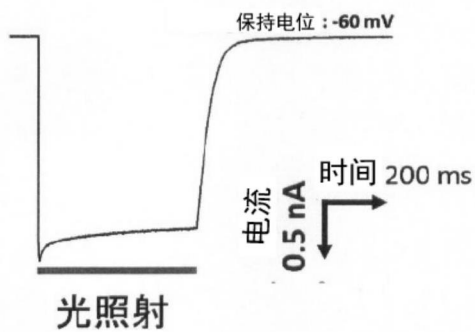
图4

离子通道活性

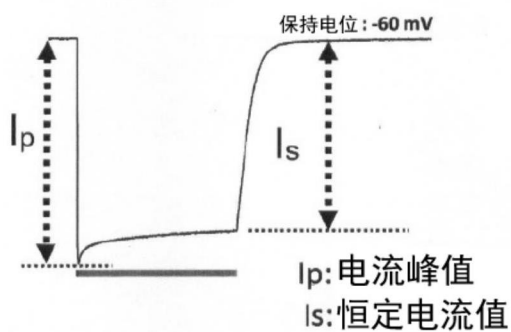
A, 光门控离子通道 (Gt_CCR4, Gt_CCR5)



B, 由光照射产生的通道电流的测定

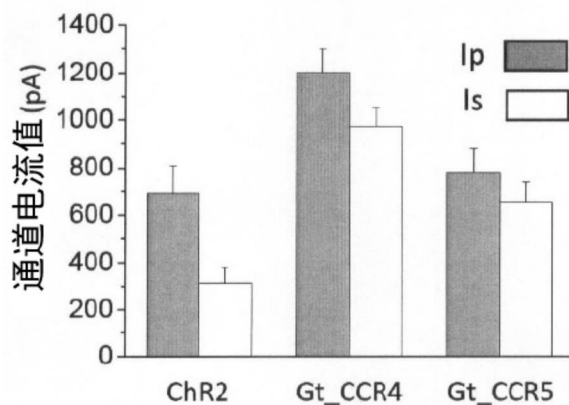


C, 通道电流的成分

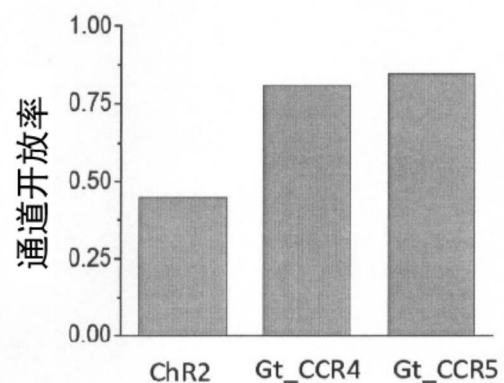


光照射: 波长530 nm (光强度6.88 mW/mm²)

D, 通道电流的各成分的电流值



E, 通道开放率



光照射: ChR2: 波长488 nm (光强度6.88 mW/mm²)

Gt_CCR4: 波长530 nm (光强度6.88 mW/mm²)

图5

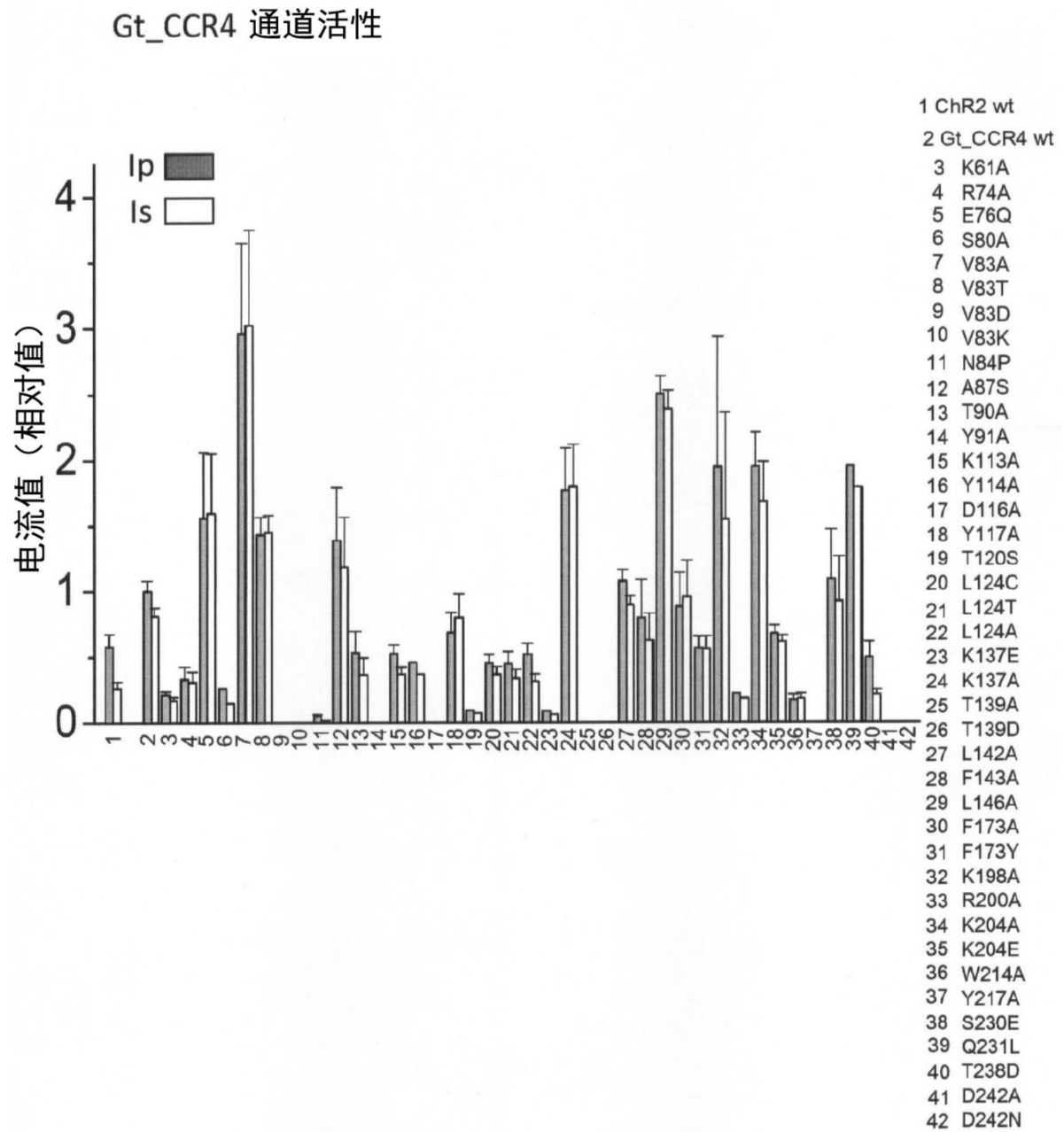


图6

Gt_CCR4 单突变体 通道活性

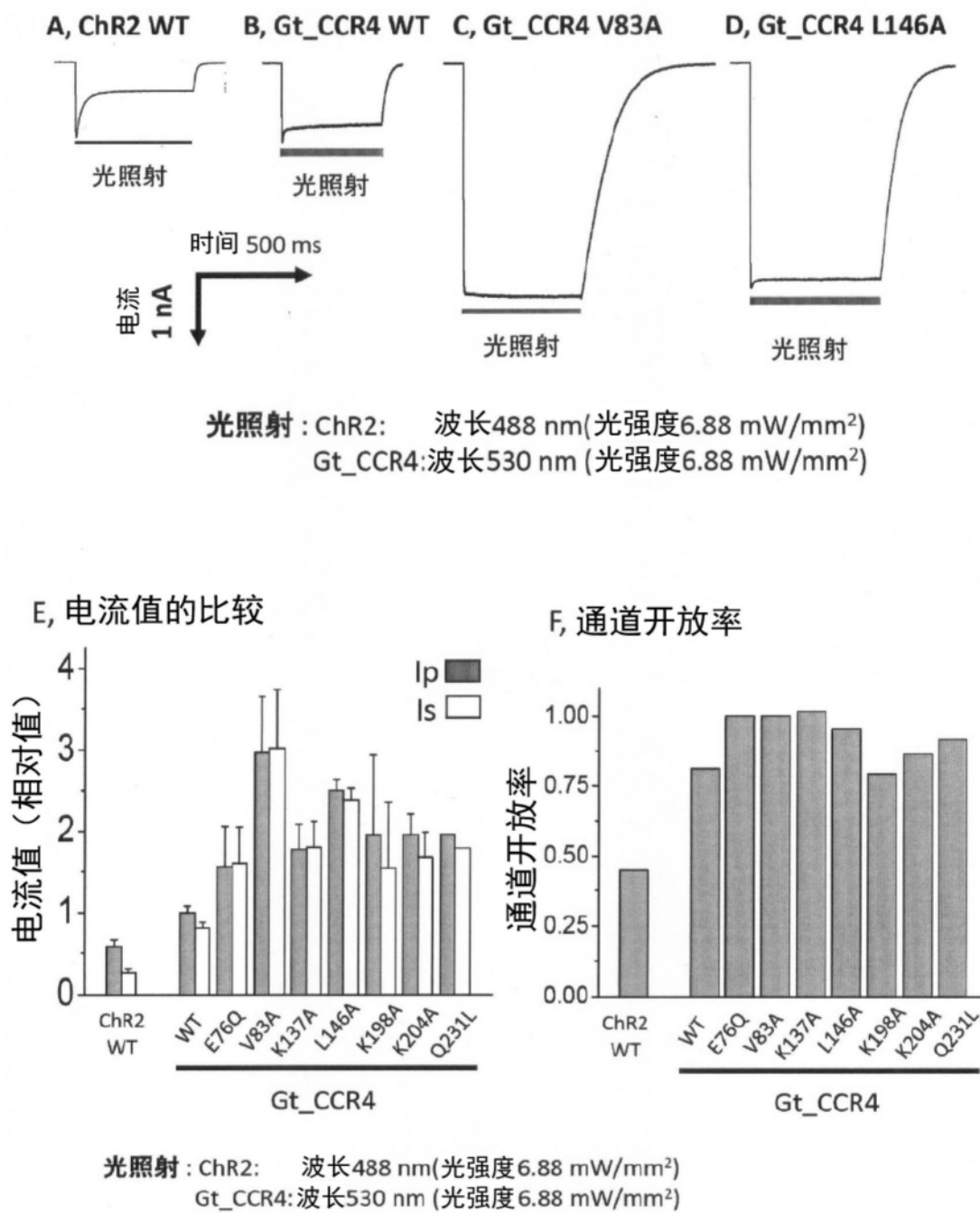
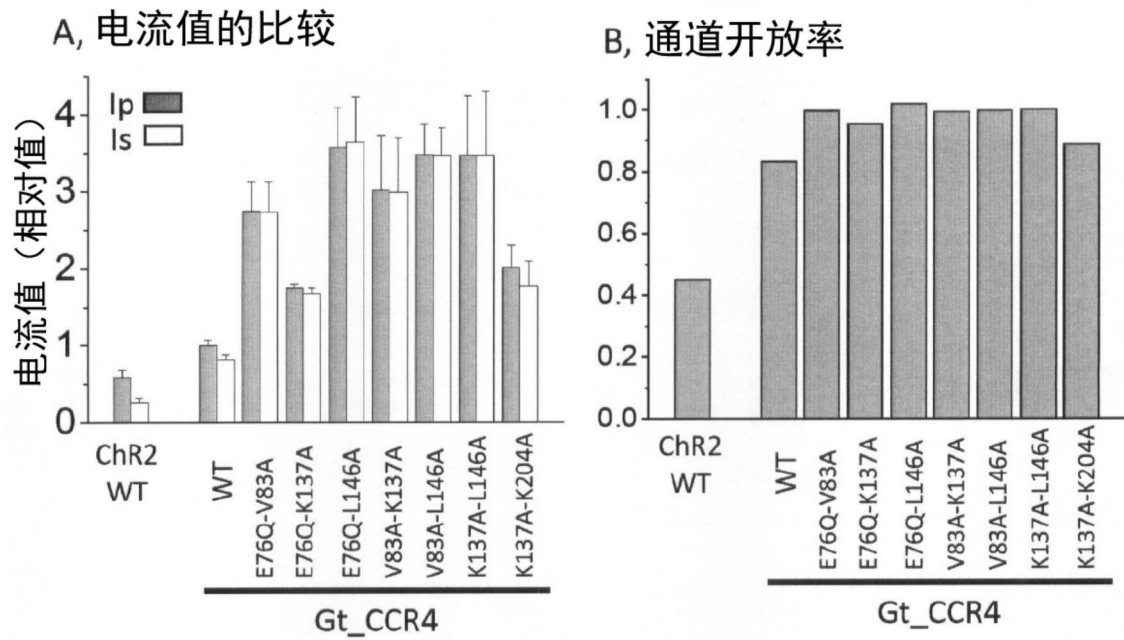


图7

Gt_CCR4 双突变体 通道活性



光照射: ChR2: 波长488 nm(光强度6.88 mW/mm²)
Gt_CCR4: 波长530 nm (光强度6.88 mW/mm²)

图8

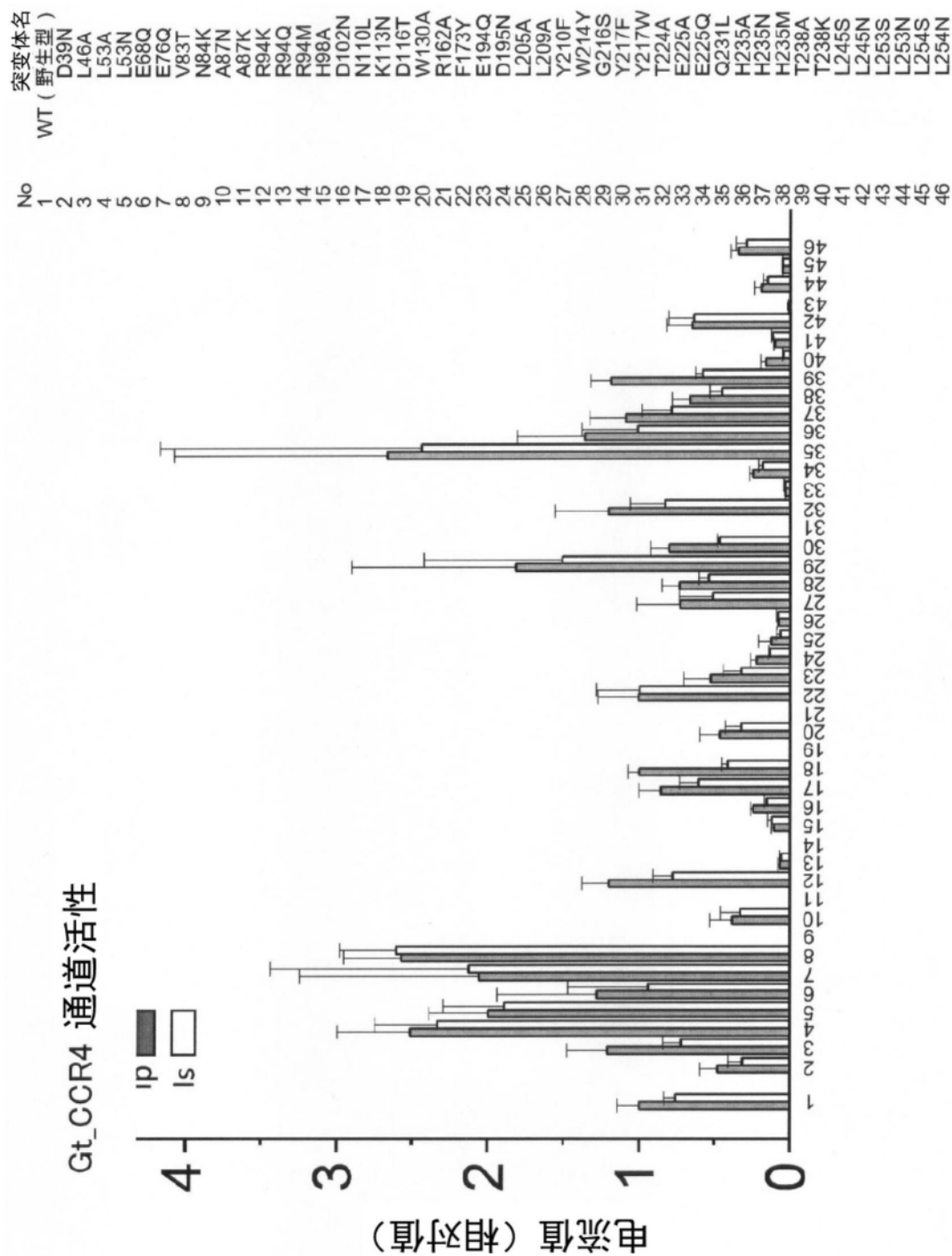


图9

大鼠大脑上皮原代培养细胞中的神经活动的光刺激 光强度依赖性

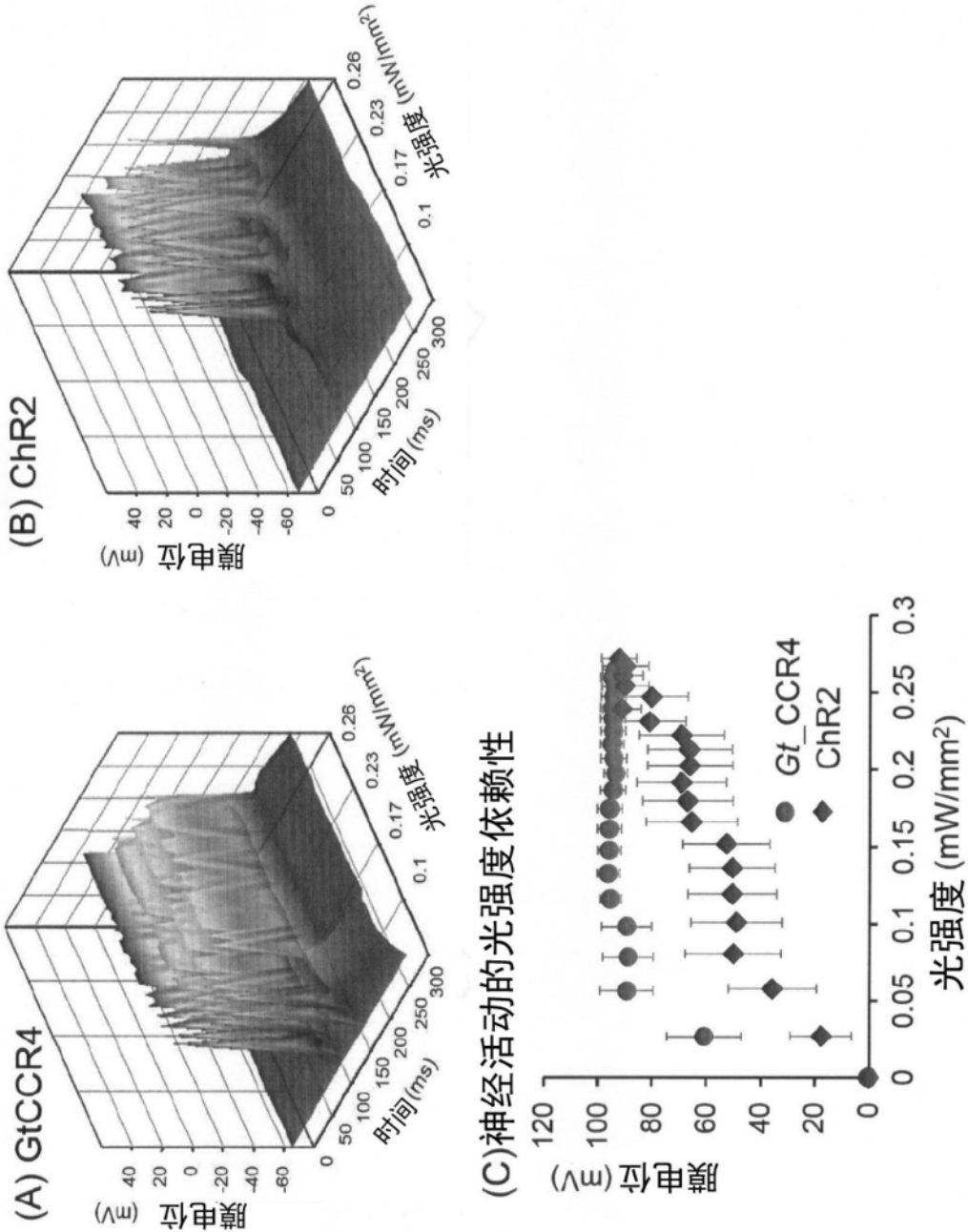


图10