

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2020年3月26日(26.03.2020)



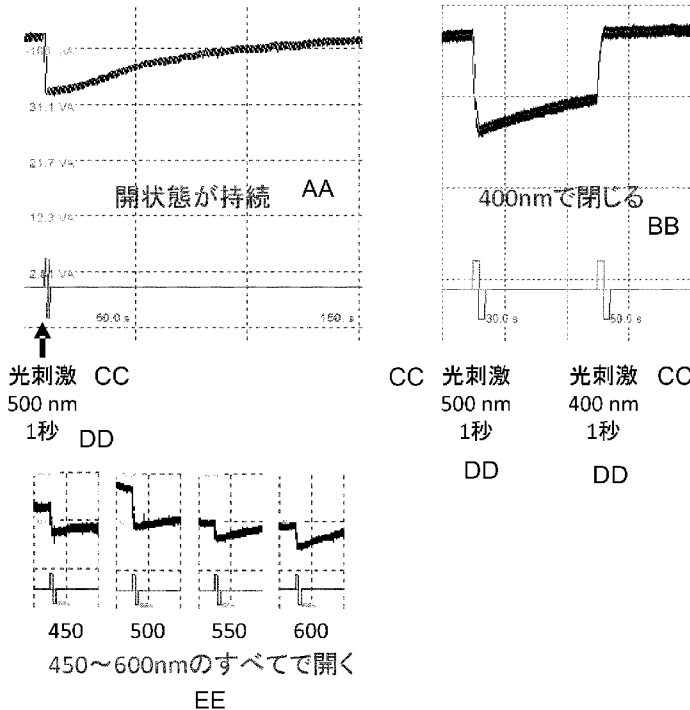
(10) 国際公開番号  
**WO 2020/059675 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 15/62* (2006.01)    *C07K 14/405* (2006.01)  
*A61K 35/76* (2015.01)    *C07K 19/00* (2006.01)  
*A61K 38/02* (2006.01)    *C12N 5/10* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)    *C12N 15/31* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)    *C12N 15/85* (2006.01)
- (21) 国際出願番号:                    PCT/JP2019/036252
- (22) 国際出願日:                    2019年9月15日(15.09.2019)
- (25) 国際出願の言語:                    日本語
- (26) 国際公開の言語:                    日本語
- (30) 優先権データ:  
 特願 2018-176671    2018年9月20日(20.09.2018)    JP

- (71) 出願人: 国立大学法人岩手大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION, IWATE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0208550 岩手県盛岡市上田三丁目1 8番8号 Iwate (JP).
- (72) 発明者: 富田 浩史(TOMITA Hiroshi); 〒0208550 岩手県盛岡市上田三丁目1 8番8号 国立大学法人岩手大学内 Iwate (JP). 菅野 江里子(SUGANO Eriko); 〒0208550 岩手県盛岡市上田三丁目1 8番8号 国立大学法人岩手大学内 Iwate (JP). 田端 希多子(TABATA Kitako); 〒0208550 岩手県盛岡市上田三丁目1 8番8号 国立大学法人岩手大学内 Iwate (JP). 渡邊 義人(WATANABE Yoshito); 〒0208550 岩手県盛岡市上田三丁目1 8番8号 国立大学法人岩手大学内 Iwate (JP).

(54) Title: MODIFIED CHANNEL RHODOPSIN

(54) 発明の名称: 改変チャンネルロドプシン



AA Open state is sustained  
 BB Close at 400 nm  
 CC Light stimulus  
 DD 1 second  
 EE Open at all of 450-600 nm

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a modified channel rhodopsin capable of opening and closing an ion channel when irradiated with light having different wavelengths, and/or having high ion permeability (optical reactivity). The solution is to substitute a C-terminal region of a channel rhodopsin obtained by substituting an N-terminal region of volvox-derived channel rhodopsin by an N-terminal region of *Chlamydomonas reinhardtii*-derived channel rhodopsin-1, by a C-terminal region of *Chlamydomonas reinhardtii*-derived channel rhodopsin-2 or a C-terminal



WO 2020/059675 A1

(74) 代理人: 辻田 幸史, 外(TSUJITA Takashi et al.);  
〒1710033 東京都豊島区高田 3 - 1 1 - 1  
2 K Tビル4階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

---

region of *Tetraselmis striata*-derived channel rhodopsin.

(57) 要約: 本発明の課題は、異なる波長の光照射によってイオンチャネルの開閉が可能な、及び/又は、イオン透過性(光反応性)が高い、改変チャネルロドプシンを提供することである。その解決手段は、ボルボックス由来のチャネルロドプシンのN末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャネルロドプシン-1のN末端領域に置換したチャネルロドプシンのC末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャネルロドプシン-2のC末端領域又はテトラセルミス・ストリアータ由来のチャネルロドプシンのC末端領域に置換する。

## 明 細 書

発明の名称： 改変チャネルロドプシン

### 技術分野

[0001] 本発明は、改変チャネルロドプシンに関する。より詳細には、異なる波長の光照射によってイオンチャネルの開閉が可能な、及び／又は、イオン透過性（光反応性）が高い、改変チャネルロドプシンに関する。

### 背景技術

[0002] 遺伝子導入によって光応答性タンパク（チャネルロドプシン）を発現させた神経細胞に、光を当てることで細胞応答を制御するオプトジェネティクス（Optogenetics：光遺伝学）により、視機能の再建を図る研究が世界的に行われていることは周知の通りであり、本発明者らも、ボルボックス（*Volvocax carterii*）由来のチャネルロドプシンのN末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ（*Chlamydomonas reinhardtii*）由来のチャネルロドプシン-1のN末端領域に置換することで、細胞膜上での発現効率が改善された改変チャネルロドプシンを特許文献1において報告している。この改変チャネルロドプシンは、光を当てることでイオンチャネルを開いて興奮を誘起することができるものであり、失明に至ったラットの網膜にその遺伝子を導入することによって視力を回復させることに本発明者らは成功している。

[0003] しかしながら、元来の網膜に存在する神経細胞は、イオンチャネルの開閉によって興奮とその抑制を行う機能を有することから、こうした生来の視覚システムにより近い改変チャネルロドプシンが求められている。また、これまでに報告されている改変チャネルロドプシンよりも、イオン透過性が高い改変チャネルロドプシンが求められている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献1：特許第5322067号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] そこで本発明は、異なる波長の光照射によってイオンチャネルの開閉が可能な、及び／又は、イオン透過性が高い、改変チャネルロドプシンを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記の点に鑑みて鋭意検討を行った結果、本発明者らが特許文献1において報告した改変チャネルロドプシンのC末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャネルロドプシン-2のC末端領域又はテトラセルミス・ストリアータ (*Tetraselmis striata*) 由来のチャネルロドプシンのC末端領域に置換することで、可視光の広い波長領域の光照射によってイオンチャネルを開き、イオンチャネルを開く波長よりも短い波長の光照射によってイオンチャネルを閉じるチャネルロドプシンが得られることを見出した。

[0007] また、本発明者らが特許文献1において報告した改変チャネルロドプシンが有する7つの膜貫通ドメインの3番目の膜貫通ドメインを、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャネルロドプシン-1が有する7つの膜貫通ドメインの3番目の膜貫通ドメインに置換することで、イオン透過性が高いチャネルロドプシンが得られることを見出した。

[0008] 上記の知見に基づいてなされた本発明の改変チャネルロドプシンは、請求項1記載の通り、ボルボックス由来のチャネルロドプシンのN末端領域をクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャネルロドプシン-1のN末端領域に置換したチャネルロドプシンのC末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャネルロドプシン-2のC末端領域に置換したポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含むポリペプチドのC末端に、配列番号2に示すアミノ酸配列の270～315番目のアミノ酸を少なくとも含むクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャネルロドプシン-2のC末端領域が付加されてなる。

また、本発明の改変チャンネルロドプシンは、請求項2記載の通り、ボルボックス由来のチャンネルロドプシンのN末端領域をクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のN末端領域に置換したチャンネルロドプシンのC末端領域を、テトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域に置換したポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含むポリペプチドのC末端に、配列番号3に示すアミノ酸配列の252～292番目のアミノ酸を少なくとも含むテトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域が付加されてなる。

また、請求項3記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項1又は2記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列の166番目のアミノ酸（システイン）がアラニンに置換されてなる。

また、請求項4記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項3記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、以下の（a）～（c）のいずれかである。

- （a）配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド
- （b）配列番号4に示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ（a）のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド
- （c）配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ（a）のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

また、請求項5記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項3記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、以下の（a）～（c）のいずれかである。

- （a）配列番号5に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド
- （b）配列番号5に示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ（a）のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド
- （c）配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有

するアミノ酸配列からなり、かつ（a）のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

また、請求項6記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項1又は2記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列の142～169番目のアミノ酸が、配列番号6に示すクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のアミノ酸配列の143～170番目のアミノ酸に置換されてなる。

また、請求項7記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項6記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、配列番号6に示すアミノ酸配列の167番目のアミノ酸（システイン）がアラニンに置換されてなる。

また、請求項8記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項6又は7記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、配列番号6に示すアミノ酸配列の162番目のアミノ酸（グルタミン酸）がトレオニンに置換されてなる。

また、請求項9記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項7記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、以下の（a）～（c）のいずれかである。

（a）配列番号7に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

（b）配列番号7に示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ（a）のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

（c）配列番号7に示すアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ（a）のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

また、請求項10記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項7記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、以下の（a）～（c）のいずれかである。

（a）配列番号8に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

（b）配列番号8に示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ（a）のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

また、請求項 11 記載の改変チャンネルロドプシンは、請求項 8 記載の改変チャンネルロドプシンにおいて、以下の (a) ~ (c) のいずれかである。

(a) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列において、1 個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

また、本発明の改変チャンネルロドプシンは、請求項 12 記載の通り、ボルボックス由来のチャンネルロドプシンの N 末端領域をクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1 の N 末端領域に置換したチャンネルロドプシンが有する 7 つの膜貫通ドメインの 3 番目の膜貫通ドメインを、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1 が有する 7 つの膜貫通ドメインの 3 番目の膜貫通ドメインに置換したポリペプチドであって、以下の (a) ~ (c) のいずれかである。

(a) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列において、1 個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

また、本発明のポリヌクレオチドは、請求項 13 記載の通り、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする。

また、本発明の発現ベクターは、請求項 1 4 記載の通り、プロモーターと機能的に連結された請求項 1 3 記載のポリヌクレオチドを含む。

また、本発明の細胞は、請求項 1 5 記載の通り、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のポリペプチドを発現する。

また、請求項 1 6 記載の細胞は、請求項 1 5 記載の細胞において、細胞が視細胞である。

また、本発明は、請求項 1 7 記載の通り、網膜外層の障害を患う被検体を治療するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のポリペプチド、請求項 1 3 記載のポリヌクレオチド、請求項 1 4 記載の発現ベクターのいずれかの使用である。

また、請求項 1 8 記載の使用は、請求項 1 7 記載の使用において、網膜外層の障害が、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症、網膜はく離のいずれかである。

また、本発明の網膜外層の障害を治療するための医薬組成物は、請求項 1 9 記載の通り、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のポリペプチド又は請求項 1 4 記載の発現ベクターのいずれかを有効成分として含む。

## 発明の効果

[0009] 本発明によれば、異なる波長の光照射によってイオンチャネルの開閉が可能な、及び／又は、イオン透過性が高い、改変チャネルロドプシンを提供することができる。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例 1 における、neomVChR1 発現アデノ随伴ウイルスベクター作製用プラスミドの構成である。

[図2]同、neomVChR1 を発現する細胞についてのパッチクランプ法による光誘発電流の測定結果である。

[図3]実施例 2 において、switCh が neomVChR1 よりもイオン透過性が高いことを示すグラフである。

[図4]実施例 3 における、mVChR1-C1ChR1-3TM 発現アデノ随

伴ウイルスベクター作製用プラスミドの構成である。

[図5]同、mVChR1-C1ChR1-3TMがmVChR1よりもイオン透過性が高いことを示すグラフである。

[図6]実施例4において、switCh2がswitChよりも細胞膜における局在性が高いことを示す蛍光顕微鏡写真である。

[図7]実施例5において、switCh2の161位のグルタミン酸をトレオニンに置換したswitCh2-mut1がswitChよりもイオン透過性が高いことを示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0011] 本発明の改変チャンネルロドプシンは、本発明者らが特許文献1において報告した改変チャンネルロドプシンを基礎とする。この改変チャンネルロドプシンは、ボルボックス由来のチャンネルロドプシンのN末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のN末端領域（細胞膜局在発現に関与する領域であって膜貫通ドメインを含まない）に置換することで、細胞膜上での発現効率が改善されたものであり、その具体例としては、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド（特許文献1において配列番号10に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド）が挙げられる。特許文献1に記載された事項は、本明細書に記載された事項として取り扱う。

[0012] 本発明の改変チャンネルロドプシンは、本発明者らが特許文献1において報告した改変チャンネルロドプシンのC末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域又はテトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域に置換したものである。

[0013] 本発明者らが特許文献1において報告した改変チャンネルロドプシンのC末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域に置換した本発明の改変チャンネルロドプシンは、具体的には、配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも

含むポリペプチドのC末端に、配列番号2に示すアミノ酸配列の270～315番目のアミノ酸を少なくとも含むクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域が付加されてなるものである。

[0014] 本発明者らが特許文献1において報告した改変チャンネルロドプシンのC末端領域を、テトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域に置換した本発明の改変チャンネルロドプシンは、具体的には、配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含むポリペプチドのC末端に、配列番号3に示すアミノ酸配列の252～292番目のアミノ酸を少なくとも含むテトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域が付加されてなるものである。

[0015] ここで、本発明の改変チャンネルロドプシンが、例えば、450～600nmといった可視光の広い波長領域の光照射によってイオンチャンネルを開き、400nmといったイオンチャンネルを開く波長よりも短い波長の光照射によってイオンチャンネルを閉じる特性を有するためには、配列番号1に示すアミノ酸配列の166番目のアミノ酸（システイン）がアラニンに置換されることが好ましい。また、配列番号1に示すアミノ酸配列の194番目のアミノ酸（アスパラギン酸）がシステインに置換されたり、229番目のアミノ酸（ヒスチジン）がアスパラギンに置換されたりしてもよい。さらに、その他の部位特異的な変異を有していてもよい。

[0016] 配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含み、かつ、166番目がアラニンに、194番目がシステインに、229番目がアスパラギンに置換されたポリペプチドのC末端に、配列番号2に示すアミノ酸配列の270～315番目のアミノ酸を少なくとも含むクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域が付加されてなる本発明の改変チャンネルロドプシンの具体例としては、配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

[0017] 配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含み、かつ、166番目がアラニンに、194番目がシステインに、229

番目がアスパラギンに置換されたポリペプチドのC末端に、配列番号3に示すアミノ酸配列の252～292番目のアミノ酸を少なくとも含むテトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域が付加されてなる本発明の改変チャンネルロドプシンの具体例としては、配列番号5に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

[0018] また、配列番号1に示すアミノ酸配列の142～169番目のアミノ酸が、配列番号6に示すクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のアミノ酸配列の143～170番目のアミノ酸に置換されてもよい。この置換は、本発明者らが特許文献1において報告した改変チャンネルロドプシンが有する7つの膜貫通ドメイン（即ちボルボックス由来のチャンネルロドプシンが有する7つの膜貫通ドメイン）の3番目の膜貫通ドメインを、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1が有する7つの膜貫通ドメインの3番目の膜貫通ドメインに置換することを意味し、この置換により、イオン透過性を高めることができる。

[0019] この場合においても、例えば、450～600nmといった可視光の広い波長領域の光照射によってイオンチャンネルを開き、400nmといったイオンチャンネルを開く波長よりも短い波長の光照射によってイオンチャンネルを閉じる特性を有するためには、配列番号6に示すアミノ酸配列の167番目（配列番号1に示すアミノ酸配列の142～169番目のアミノ酸と置換した後は166番目）のアミノ酸（システイン）がアラニンに置換されることが好ましい。また、配列番号1に示すアミノ酸配列の194番目のアミノ酸（アスパラギン酸）がシステインに置換されたり、229番目のアミノ酸（ヒスチジン）がアスパラギンに置換されたりしてもよい。さらに、その他の部位特異的な変異を有していてもよい。

[0020] また、配列番号6に示すアミノ酸配列の162番目（配列番号1に示すアミノ酸配列の142～169番目のアミノ酸と置換した後は161番目）のアミノ酸（グルタミン酸）をトレオニンに置換することで、イオン透過性を高めることができる。また、配列番号1に示すアミノ酸配列の170番目の

アミノ酸（ロイシン）をシステインに置換したり、197番目のアミノ酸（システイン）をセリンに置換したりしてもよい。

[0021] 配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含み、かつ、142～169番目のアミノ酸が、配列番号6に示すクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のアミノ酸配列の143～170番目のアミノ酸に置換され、さらに、166番目がアラニンに、194番目がシステインに、229番目がアスパラギンに置換されたポリペプチドのC末端に、配列番号2に示すアミノ酸配列の270～315番目のアミノ酸を少なくとも含むクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域が付加されてなる本発明の改変チャンネルロドプシンの具体例としては、配列番号7に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

[0022] 配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含み、かつ、142～169番目のアミノ酸が、配列番号6に示すクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のアミノ酸配列の143～170番目のアミノ酸に置換され、さらに、166番目がアラニンに、194番目がシステインに、229番目がアスパラギンに置換されたポリペプチドのC末端に、配列番号3に示すアミノ酸配列の252～292番目のアミノ酸を少なくとも含むテラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域が付加されてなる本発明の改変チャンネルロドプシンの具体例としては、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

[0023] 配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含み、かつ、142～169番目のアミノ酸が、配列番号6に示すクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のアミノ酸配列の143～170番目のアミノ酸に置換され、さらに、161番目がトレオニンに、166番目がアラニンに、194番目がシステインに、229番目がアスパラギンに置換されたポリペプチドのC末端に、配列番号2に示すアミ

ノ酸配列の270～315番目のアミノ酸を少なくとも含むクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域が付加されてなる本発明の改変チャンネルロドプシンの具体例としては、配列番号9に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

[0024] 本発明者らが特許文献1において報告した改変チャンネルロドプシンが有する7つの膜貫通ドメインの3番目の膜貫通ドメインが、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1が有する7つの膜貫通ドメインの3番目の膜貫通ドメインに置換されてなる本発明の改変チャンネルロドプシンの具体例としては、配列番号10に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

[0025] 本発明の改変チャンネルロドプシンは、配列番号4, 5, 7～10のそれぞれに示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を有し、かつ配列番号4, 5, 7～10のそれぞれに示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチドを含む。また、配列番号4, 5, 7～10のそれぞれに示すアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4, 5, 7～10のそれぞれに示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチドを含む。ここで、「複数個」とは、50個以下の整数、好ましくは30個以下の整数、より好ましくは10個以下の整数、例えば2～9個、2～7個、2～5個である。配列番号4, 5, 7～10のそれぞれに示すアミノ酸配列との配列同一性は、好ましくは少なくとも95%であり、より好ましくは少なくとも96%であり、さらに好ましくは少なくとも97%であり、さらにより好ましくは少なくとも98%であり、最も好ましくは少なくとも99%である。なお、同一性の%は、複数(2つ)のアミノ酸配列間の同一性を演算するソフトウェア(例えば、FASTA、DANASYIS、BLASTなど)をデフォルトの設定で使用して算出した値をいう。「同等の生物学的活性」とは、例えば光感受性、チャンネル機能といった生物学的な活性の強さが実質的に同一であることをい

う。また、この用語は、実質的に同質の生物学的活性を有する場合を含んでもよく、この場合の「同質」の生物学的活性とは、光感受波長やイオン透過性などの性質が同一であることをいう。

[0026] 本発明の改変チャンネルロドプシンは、遺伝子工学的手法により製造することができる。具体的には、まず、本発明の改変チャンネルロドプシンをコードするポリヌクレオチド（以下、「本発明の改変チャンネルロドプシン遺伝子」という）を調製する。本発明の改変チャンネルロドプシン遺伝子は、当業者に公知の手法によって調製することができる。具体的には、例えば、本発明者らが特許文献1において報告した改変チャンネルロドプシンをコードするポリヌクレオチド、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2をコードするポリヌクレオチド、テトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンをコードするポリヌクレオチド、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1をコードするポリヌクレオチドのそれぞれの配列情報に基づいて化学合成することで調製することができる。また、それぞれのポリヌクレオチドの配列情報に基づき、それぞれのポリヌクレオチドの所望領域を増幅するPCRプライマーを用いてそれぞれのポリヌクレオチドの所望領域を増幅し、連結することによって調製することもできる。次に、プロモーターと機能的に連結された本発明の改変チャンネルロドプシン遺伝子を、宿主菌体内で複製維持が可能であり、コードされるポリペプチドを安定に発現させることができ、この遺伝子を安定に保持できる発現ベクターに組み込み、得られた組換え発現ベクターを用いて宿主を形質転換し、宿主において本発明の改変チャンネルロドプシンを生産させることができる。組換え技術については、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1984 81:5662や、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pressなどを参照することができる。発現ベクターとしては、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド（例えば

pET28、pGEX4T、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、及び他のプラスミドDNA)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来のプラスミド (例えばpUB110、pTP5、及び他のプラスミドDNA)、酵母由来のプラスミド (例えばYEp13、YEp24、YCP50、及び他のプラスミドDNA)、λファージ (λgt11やλZAP)、哺乳動物用プラスミド (pCMVやpSV40)、ウイルスベクター (例えばアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターなどの動物ウイルスベクター、バキュロウイルスベクターなどの昆虫ウイルスベクター)、植物用ベクター (例えばバイナリベクターpBI系)、コスミドベクターなどを用いることができる。ここで、「機能的に連結された」とは、プロモーター配列が目的のポリヌクレオチド配列の転写を開始することができるような、プロモーター配列と目的のポリヌクレオチド配列との間の機能的な結合をいう。プロモーターは特に制限されず、宿主に応じて適するプロモーターを選択すればよく、公知の構成的プロモーターや誘導性プロモーターを用いることができるが、構成的プロモーターを用いることが好ましい。その具体例としては、CMVプロモーター、SV40プロモーター、CAGプロモーター、シナプシンプロモーター、ロドプシンプロモーター、CaMVプロモーター、解糖系酵素プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、GAPDHプロモーター、GAL1プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、thy1プロモーターなどが挙げられる。本発明の改変チャンネルロドプシン遺伝子の発現ベクターへの挿入は、例えば、本発明の改変チャンネルロドプシン遺伝子にフランキングする制限酵素部位を作製又は連結し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入することにより行う。発現ベクターは、プロモーター及び本発明の改変チャンネルロドプシン遺伝子の他、必要に応じてエンハンサー及び他のシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー (アンピシリン耐性マ-

カー、テトラサイクリン耐性マーカなどの薬剤耐性遺伝子マーカ、LEU1、TRP1、URA3などの栄養要求性相補遺伝子マーカ、APH、DHFR、TKなどの優性選択マーカなど)、リボソーム結合部位(RBS)などを含んでもよい。宿主の形質転換は、プロトプラスト法、スフェロプラスト法、コンピテントセル法、ウイルス法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、ジーンボンバートメント法、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーションなどを用いて行うことができる。こうして得られた形質転換体は、資化する炭素源、窒素源、金属塩、ビタミンなどを含む培地を用いて適当な条件で培養する。形質転換体の培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、25~37℃で3~6時間行う。培養期間中、pHは中性付近に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液などを用いて行う。培養中は、必要に応じて、組換え発現ベクターに挿入した選択マーカに応じて、アンピシリンやテトラサイクリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。また、形質転換に使用する宿主は、本発明の改変チャネルロドプシンを発現できるものであれば特に制限されるものではなく、細菌(大腸菌や枯草菌)、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*など)、動物細胞(COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293細胞など)、昆虫細胞などが挙げられる。本発明の改変チャネルロドプシンは、形質転換体の培養により得られた培養物(培養上清、培養細胞、培養菌体、細胞や菌体のホモジェネートなど)から一般的な方法によって分取や精製を行い、限外濾過濃縮、凍結乾燥、噴霧乾燥、結晶化などによって、その活性を保持する形態で得ることができる。或いは、本発明の改変チャネルロドプシンは、単離や精製を行うことなく、本発明の改変チャネルロドプシンを発現する細胞の形態で提供してもよい。この場合、形質転換に使用する宿主細胞は、その後の用途に適した宿主細胞、例えば視細胞、好ましくヒト視細胞である。また、本発明の改変チャネルロドプシンを医療用途に使用する場合には、本発明の改変チャネルロドプシンの発現ベクタ

一の形態で提供してもよい。この場合には、細胞への導入効率、細胞内での複製維持、安定性、発現効率などに優れた発現ベクターを用いることが好ましい。このようなベクターとしては、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクター、（自立複製可能な）プラスミド、トランスポゾンなどを挙げることができる。本発明の改変チャネルロドプシンの発現ベクター作製用プラスミドは、例えば Tomita H et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007 Aug; 48 (8) : 3821-6 や、 Sugano E et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005 Sep; 46 (9) : 3341-8 に記載される方法に従って調製することができる。

[0027] ここで、本発明の改変チャネルロドプシン遺伝子としては、例えば、配列番号 11 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド（配列番号 4 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコード）、配列番号 12 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド（配列番号 5 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコード）、配列番号 13 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド（配列番号 7 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコード）、配列番号 14 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド（配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコード）、配列番号 15 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド（配列番号 9 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコード）、配列番号 16 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド（配列番号 10 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドをコード）が挙げられる。しかしながら、本発明の改変チャネルロドプシン遺伝子は、これらのポリヌクレオチドに限定されず、これらのポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、配列番号 4, 5, 7~10 のそれぞれに示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。また、配列番号 11~16 のそれぞれに示す塩基配列と少なくとも

も90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは少なくとも97%、さらにより好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドであって、配列番号4, 5, 7~10のそれぞれに示すアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ここで、「ストリンジेंटな条件でのハイブリダイゼーション」とは、例えば、30~50℃、3~4×SSC(150 mM塩化ナトリウム、15 mMクエン酸ナトリウム、pH7.2)、0.1~0.5% SDS中で1~24時間のハイブリダイゼーション、好ましくは40~45℃、3.4×SSC、0.3% SDS中で1~24時間のハイブリダイゼーション、そしてその後の洗浄を含む。洗浄条件としては、例えば、2×SSCと0.1% SDSを含む溶液、及び1×SSC溶液、0.2×SSC溶液による室温での連続した洗浄などの条件が挙げられる。ただし、上記条件の組み合わせは例示であり、当業者であればハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記の要素や他の要素(例えば、ハイブリダイゼーションプローブの濃度、長さ及びGC含量、ハイブリダイゼーションの反応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0028] 本発明の改変チャネルロドプシンは、本発明者らが特許文献1において報告した改変チャネルロドプシンが有する細胞膜上での発現効率が高いという特性を保持し、さらに、可視光の広い波長領域の光照射によってイオンチャネルを開き、イオンチャネルを開く波長よりも短い波長の光照射によってイオンチャネルを閉じるという特性や、イオン透過性が高いという特性を有するものである。従って、本発明の改変チャネルロドプシンや、これをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、網膜外層の障害を患う被検体の治療に有用である。ここで、「網膜外層の障害」とは、網膜外層に存在する視細胞が変性、消失するなどして視機能不全や視機能障害を生じているが、視細胞以外の細胞は依然として正常なままであったり、機能の一部が保持

されていたりする任意の疾患をいう。このような疾患としては、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症、網膜はく離などを挙げることができる。「被検体」とは、網膜外層の障害に起因して、失明している被検体や、失明のリスクを有する被検体を意味する。被検体はヒトに限らず、その他の哺乳動物であってもよい。その他の哺乳動物としては、例えばマウス、ラット、サル、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマなどが挙げられる。「網膜外層の障害を患う被検体の治療」とは、網膜外層の障害に起因して失明していたり、失明のリスクを有したりする被検体において、本発明の医薬の投与前と比較して、視機能を回復することを意味する。

[0029] 本発明の医薬組成物は、本発明の改変チャンネルロドプシンや、これをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを有効成分とし、網膜外層の障害を患う被検体を治療するための医薬として製剤化される。その有効量は、所与の症状や用法について治療効果を与え得る量であり、動物を用いた試験、臨床試験の実施により当業者によって適宜決定されるが、投与対象とする被検体の年齢、体重、性別、疾患の状態や重篤度、投与方法などが考慮される。ウイルスの場合、ウイルス量は、例えば $10^{12} \sim 10^{13}$  capsids / ml (例えば、約 $10^{13}$  capsids / ml)である。医薬としての製剤化に際し、有効成分は1以上の薬学的に許容される担体と共に製剤化されてよい。薬学的に許容される担体としては、各種緩衝液、例えば生理食塩水、リン酸塩、酢酸塩などの緩衝液が挙げられる。医薬は、その他の治療成分を含んでよい。その他の治療成分としては、網膜色素変性症、加齢性黄斑変性症、網膜はく離などの治療剤として公知の薬剤が挙げられる。医薬は、例えば局所投与用の注射剤、点眼剤、洗眼剤などに製剤化することができる。注射用製剤は、保存剤を添加して、例えばアンプルや複数回投与容器中の単位投与剤形として提供することができる。また、医薬は、好適なビヒクル、例えば発熱物質不含の滅菌水などで使用前に再構成するための凍結乾燥剤としてもよい。医薬の投与は、被検体の患部、すなわち網膜への直接的な注射や、硝子体への直接的な接触によって行うことが好ましい。

## 実施例

[0030] 以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は以下の記載に限定して解釈されるものではない。

[0031] 実施例 1：配列番号 4 に示すアミノ酸配列からなる本発明の改変チャンネルロドプシン（略称：neomVChR1）

（neomVChR1 を発現する細胞の取得）

特許文献 1 に記載の方法に準じて次のようにして取得した。特許文献 1 に記載の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなる改変チャンネルロドプシンの 1～307 番目のアミノ酸（但し 166 番目をアラニンに、194 番目をシステインに、229 番目をアスパラギンに置換）をコードするポリヌクレオチドの領域と、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2 の配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 270～315 番目のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドの領域が連結され、その 5' 末端と 3' 末端に制限酵素配列を付加したポリヌクレオチドを化学合成し、アデノ随伴ウイルスベクター作製用プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入した。こうして調製した neomVChR1 発現アデノ随伴ウイルスベクター作製用プラスミドの構成を図 1 に示す。このプラスミドは、マルチクローニングサイトの 3' 領域に蛍光タンパク質遺伝子（venus）が配置されており、目的遺伝子は C 末領域に venus を付加した融合タンパク質として発現されるので、venus を指標にしてセルソータ（SH-800、Sony）を用いて neomVChR1 を発現する細胞を分取した。なお、細胞は、Human embryonic Kidney（HEK）293 細胞を用い、10% FBS を含む DMEM 培地で、5% CO<sub>2</sub>、37℃ で培養した。neomVChR1 発現アデノ随伴ウイルスベクター作製用プラスミドは、2 種類のプラスミド（pAAV-RC、pHelper）とともに、制限酵素で切断して直鎖状にした後、電圧ポレーション法（CUY21 Pro-vitro system、Nepa Gene）により細胞に導入した。

[0032] （パッチクランプ法による光誘発電流の測定）

neomVChR1を発現する細胞について、顕微鏡下でvenusの発現を確認した後、パッチクランプシステム（EPC-10、HEKA）を用いて測定した。細胞外液は、138mM NaCl、3mM KCl、10mM HEPES、4mM NaOH、1mM CaCl<sub>2</sub>、2mM MgCl<sub>2</sub>からなり、1N HClでpH7.4に調整したものをを用いた。電極内液は、130mM CsCl、1.1mM EGTA、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM CaCl<sub>2</sub>、10mM NaCl、10mM HEPES、2mM Na<sub>2</sub>ATPからなり、1N CsOHでpH7.2に調整したものをを用いた。光照射は1秒間で行い、強度は1μW/mm<sup>2</sup>に設定した。波長は400、450、500、550、600nmのそれぞれとした。結果を図2に示す。図2から明らかなように、neomVChR1は、450~600nmの可視光の広い波長領域の光照射によってイオンチャネルを開き、イオンチャネルを開く波長よりも短い400nmの光照射によってイオンチャネルを閉じる特性を有することがわかった。

[0033] 実施例2：配列番号8に示すアミノ酸配列からなる本発明の改変チャネルロドプシン（略称：switCh）

特許文献1に記載の配列番号1に示すアミノ酸配列からなる改変チャネルロドプシンの1~141番目のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドの領域と、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャネルロドプシン-1の配列番号6に示すアミノ酸配列の143~170番目のアミノ酸（但し167番目をアラニンに置換）をコードするポリヌクレオチドの領域と、配列番号1に示すアミノ酸配列の170~307番目のアミノ酸（但し194番目をシステインに、229番目をアスパラギンに置換）をコードするポリヌクレオチドの領域と、テトラセルミス・ストリアータ由来のチャネルロドプシンの配列番号3に示すアミノ酸配列の252~292番目のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドの領域が連結され、その5'末端と3'末端に制限酵素配列を付加したポリヌクレオチドを化学合成し、アデノ随伴ウイルスベクター作製用プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入すること以外は

実施例1と同様にして、switChを発現する細胞を分取した。こうして取得したswitChを発現する細胞について、パッチクランプ法による光誘発電流の測定を実施例1と同様にして行った。結果を図3に示す。図3から明らかのように、switChは、neomVChR1よりもイオン透過性が高いことがわかった。

[0034] 実施例3：配列番号10に示すアミノ酸配列からなる本発明の改変チャンネルロドプシン（略称：mVChR1-C1ChR1-3TM）

（mVChR1-C1ChR1-3TMを発現する細胞の取得）

特許文献1に記載の配列番号1に示すアミノ酸配列からなる改変チャンネルロドプシンの1～141番目のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドの領域と、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1の配列番号6に示すアミノ酸配列の143～170番目のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドの領域と、配列番号1に示すアミノ酸配列の170～307番目のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドの領域が連結され、その5'末端と3'末端に制限酵素配列を付加したポリヌクレオチドを化学合成し、アデノ随伴ウイルスベクター作製用プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入すること以外は実施例1と同様にして、mVChR1-C1ChR1-3TMを発現する細胞を分取した。mVChR1-C1ChR1-3TM発現アデノ随伴ウイルスベクター作製用プラスミドの構成を図4に示す。

[0035] （パッチクランプ法による光誘発電流の測定）

mVChR1-C1ChR1-3TMを発現する細胞について、パッチクランプ法による光誘発電流の測定を実施例1と同様にして行った。結果を図5に示す。図5には、mVChR1-C1ChR1-3TMを発現する細胞と同様にして取得した特許文献1に記載の配列番号1に示すアミノ酸配列からなる改変チャンネルロドプシン（略称：mVChR1）についての測定結果をあわせて示す。図5から明らかのように、mVChR1-C1ChR1-3TMは、mVChR1よりもイオン透過性が高いことから、mVChR1

が有する7つの膜貫通ドメイン（即ちボルボックス由来のチャンネルロドプシンが有する7つの膜貫通ドメイン）の3番目の膜貫通ドメインを、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1が有する7つの膜貫通ドメインの3番目の膜貫通ドメインに置換することで、イオン透過性を高めることができることがわかった。

[0036] 実施例4：配列番号7に示すアミノ酸配列からなる本発明の改変チャンネルロドプシン（略称：switCh2）

特許文献1に記載の配列番号1に示すアミノ酸配列からなる改変チャンネルロドプシンの1～141番目のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドの領域と、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1の配列番号6に示すアミノ酸配列の143～170番目のアミノ酸（但し167番目をアラニンに置換）をコードするポリヌクレオチドの領域と、配列番号1に示すアミノ酸配列の170～307番目のアミノ酸（但し194番目をシステインに、229番目をアスパラギンに置換）をコードするポリヌクレオチドの領域と、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2の配列番号2に示すアミノ酸配列の270～315番目のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドの領域が連結され、その5'末端と3'末端に制限酵素配列を付加したポリヌクレオチドを化学合成し、アデノ随伴ウイルスベクター作製用プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入すること以外は実施例1と同様にして、switCh2を発現する細胞を分取した。こうして取得したswitCh2を発現する細胞の蛍光顕微鏡写真を図6に示す。図6には、実施例2において取得したswitChを発現する細胞の蛍光顕微鏡写真をあわせて示す。図6から明らかなように、switCh2は、switChよりも細胞膜における局在性が高いことがわかった。この結果から、本発明の改変チャンネルロドプシンのC末端領域は、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域であることの方が、テトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域であることよりも、細胞膜における局在性が高い点で有利であると

考察された。

[0037] 実施例5：配列番号7に示すアミノ酸配列からなる本発明の改変チャンネルロドプシン（略称：switCh2）の変異体のイオン透過性の検討

（検討方法）

以下の7種類のswitCh2の変異体を発現する細胞を、実施例4におけるswitCh2を発現する細胞と同様にして取得し、パッチクランプ法による光誘発電流を実施例1と同様にして測定した。

・ switCh2-mut1：switCh2の161位のグルタミン酸をトレオニンに置換した変異体（E161T）

・ switCh2-mut2：switCh2の170位のロイシンをシステインに置換した変異体（L170C）

・ switCh2-mut3：switCh2の197位のシステインをセリンに置換した変異体（C197S）

・ switCh2-mut4：switCh2の161位のグルタミン酸をトレオニンに、170位のロイシンをシステインに置換した変異体（E161T+L170C）

・ switCh2-mut5：switCh2の161位のグルタミン酸をトレオニンに、197位のシステインをセリンに置換した変異体（E161T+C197S）

・ switCh2-mut6：switCh2の170位のロイシンをシステインに、197位のシステインをセリンに置換した変異体（L170C+C197S）

・ switCh2-mut7：switCh2の161位のグルタミン酸をトレオニンに、170位のロイシンをシステインに、197位のシステインをセリンに置換した変異体（E161T+L170C+C197S）

[0038] （検討結果）

switCh2の161位のグルタミン酸をトレオニンに置換することで、イオン透過性が向上することがわかった。switCh2とswitCh

2 - m u t 1 (配列番号 9 に示すアミノ酸配列からなる) の測定結果を図 7 に示す。

### 産業上の利用可能性

[0039] 本発明は、異なる波長の光照射によってイオンチャネルの開閉が可能な、及び／又は、イオン透過性（光反応性）が高い、改変チャネルロドプシンを提供することができる点において産業上の利用可能性を有する。

## 請求の範囲

- [請求項1] ボルボックス由来のチャンネルロドプシンのN末端領域をクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のN末端領域に置換したチャンネルロドプシンのC末端領域を、クラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域に置換したポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含むポリペプチドのC末端に、配列番号2に示すアミノ酸配列の270～315番目のアミノ酸を少なくとも含むクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-2のC末端領域が付加されてなる改変チャンネルロドプシン。
- [請求項2] ボルボックス由来のチャンネルロドプシンのN末端領域をクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のN末端領域に置換したチャンネルロドプシンのC末端領域を、テトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域に置換したポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列の1～307番目のアミノ酸を少なくとも含むポリペプチドのC末端に、配列番号3に示すアミノ酸配列の252～292番目のアミノ酸を少なくとも含むテトラセルミス・ストリアータ由来のチャンネルロドプシンのC末端領域が付加されてなる改変チャンネルロドプシン。
- [請求項3] 配列番号1に示すアミノ酸配列の166番目のアミノ酸（システイン）がアラニンに置換されてなる請求項1又は2記載の改変チャンネルロドプシン。
- [請求項4] 以下の（a）～（c）のいずれかである請求項3記載の改変チャンネルロドプシン。
- （a）配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド
  - （b）配列番号4に示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ（a）のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペ

チド

(c) 配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ(a)のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

[請求項5] 以下の(a)～(c)のいずれかである請求項3記載の改変チャンネルロドプシン。

(a) 配列番号5に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号5に示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ(a)のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号5に示すアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ(a)のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

[請求項6] 配列番号1に示すアミノ酸配列の142～169番目のアミノ酸が、配列番号6に示すクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1のアミノ酸配列の143～170番目のアミノ酸に置換されてなる請求項1又は2記載の改変チャンネルロドプシン。

[請求項7] 配列番号6に示すアミノ酸配列の167番目のアミノ酸(システイン)がアラニンに置換されてなる請求項6記載の改変チャンネルロドプシン。

[請求項8] 配列番号6に示すアミノ酸配列の162番目のアミノ酸(グルタミン酸)がトレオニンに置換されてなる請求項6又は7記載の改変チャンネルロドプシン。

[請求項9] 以下の(a)～(c)のいずれかである請求項7記載の改変チャンネルロドプシン。

(a) 配列番号7に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号7に示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個

のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

[請求項10]

以下の (a) ~ (c) のいずれかである請求項 7 記載の改変チャンネルロドプシン。

(a) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列において、1 個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

[請求項11]

以下の (a) ~ (c) のいずれかである請求項 8 記載の改変チャンネルロドプシン。

(a) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列において、1 個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ (a) のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

[請求項12]

ボルボックス由来のチャンネルロドプシンの N 末端領域をクラミドモナス・レインハルトチイ由来のチャンネルロドプシン-1 の N 末端領域

に置換したチャンネルロドプシンが有する7つの膜貫通ドメインの3番目の膜貫通ドメインを、クラミドモナス・レインハルトチ由来のチャンネルロドプシン-1が有する7つの膜貫通ドメインの3番目の膜貫通ドメインに置換したポリペプチドであって、以下の(a)~(c)のいずれかである改変チャンネルロドプシン。

(a) 配列番号10に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号10に示すアミノ酸配列において、1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含むアミノ酸配列からなり、かつ(a)のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ(a)のポリペプチドと同等の生物学的活性を有するポリペプチド

[請求項13] 請求項1~12のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[請求項14] プロモーターと機能的に連結された請求項13記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[請求項15] 請求項1~12のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞。

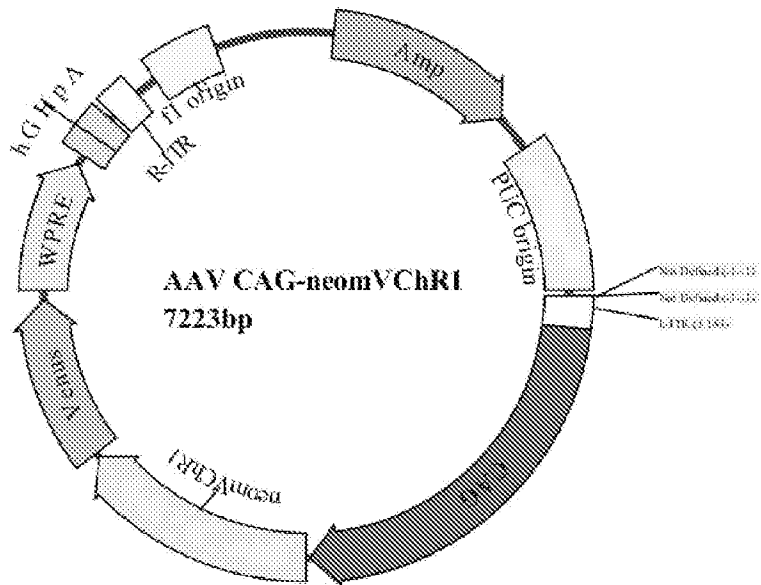
[請求項16] 細胞が視細胞である請求項15記載の細胞。

[請求項17] 網膜外層の障害を患う被検体を治療するための医薬の製造における、請求項1~12のいずれかに記載のポリペプチド、請求項13記載のポリヌクレオチド、請求項14記載の発現ベクターのいずれかの使用。

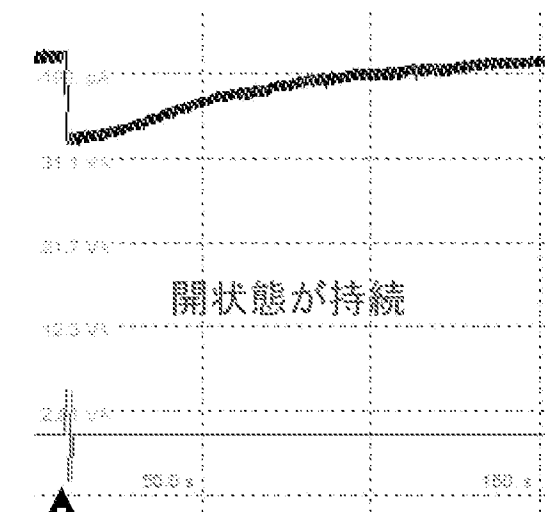
[請求項18] 網膜外層の障害が、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症、網膜はく離のいずれかである請求項17記載の使用。

[請求項19] 請求項1~12のいずれかに記載のポリペプチド又は請求項14記載の発現ベクターのいずれかを有効成分として含む網膜外層の障害を治療するための医薬組成物。

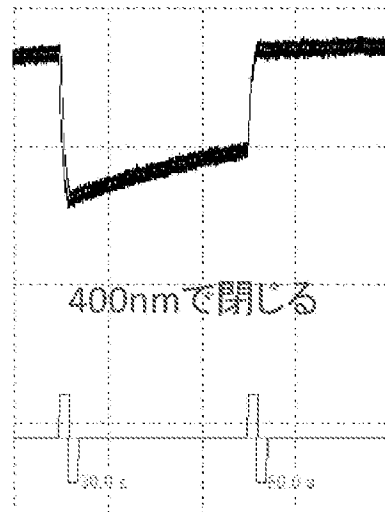
[図1]



[図2]

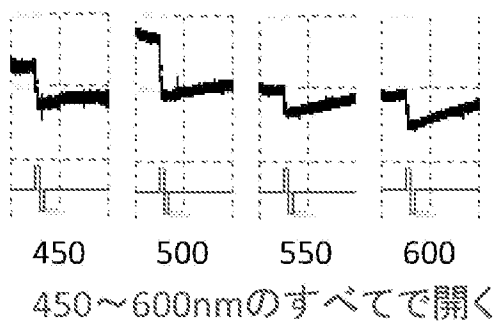


光刺激  
500 nm  
1秒

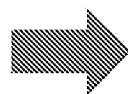
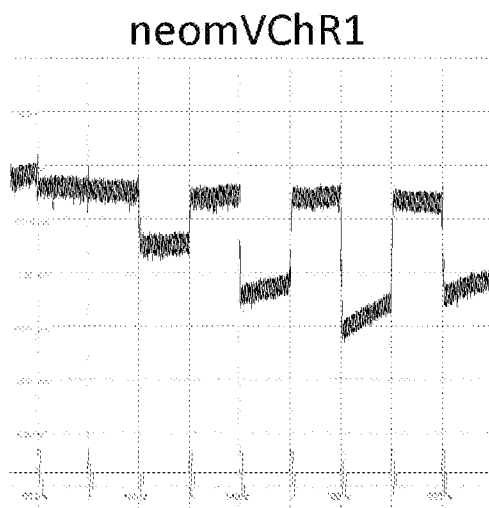


光刺激  
500 nm  
1秒

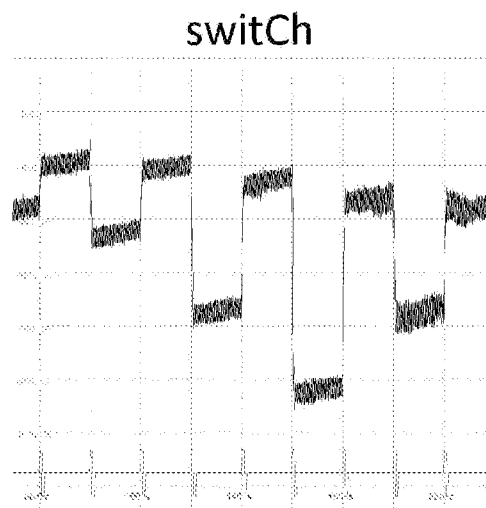
光刺激  
400 nm  
1秒



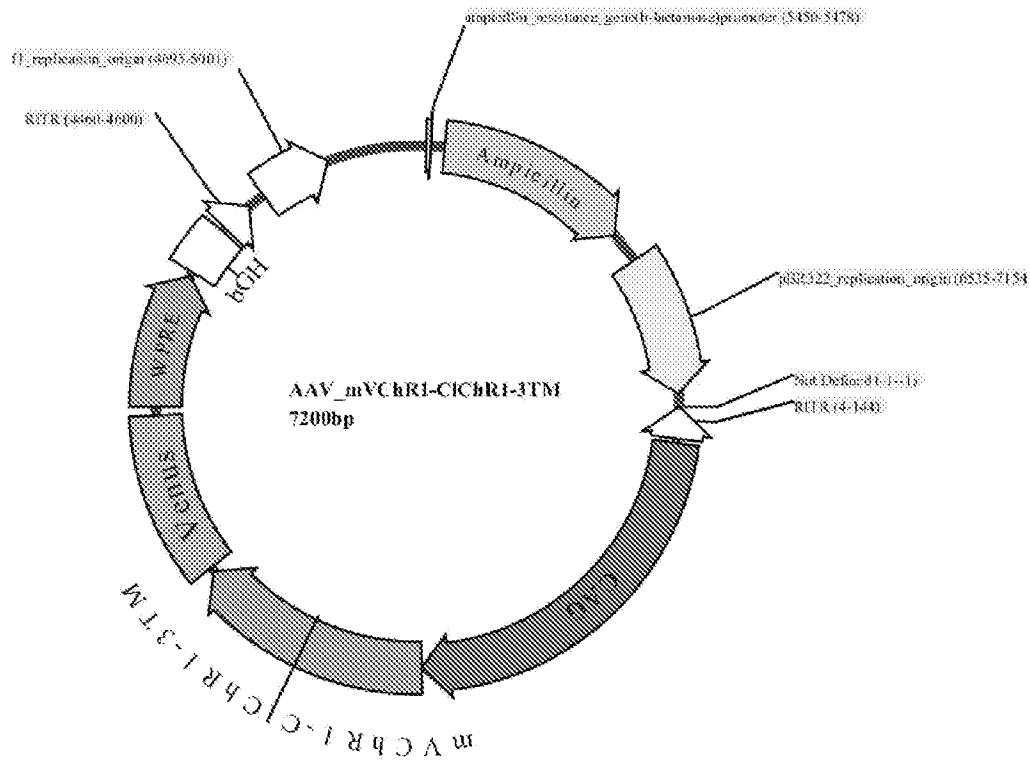
[図3]



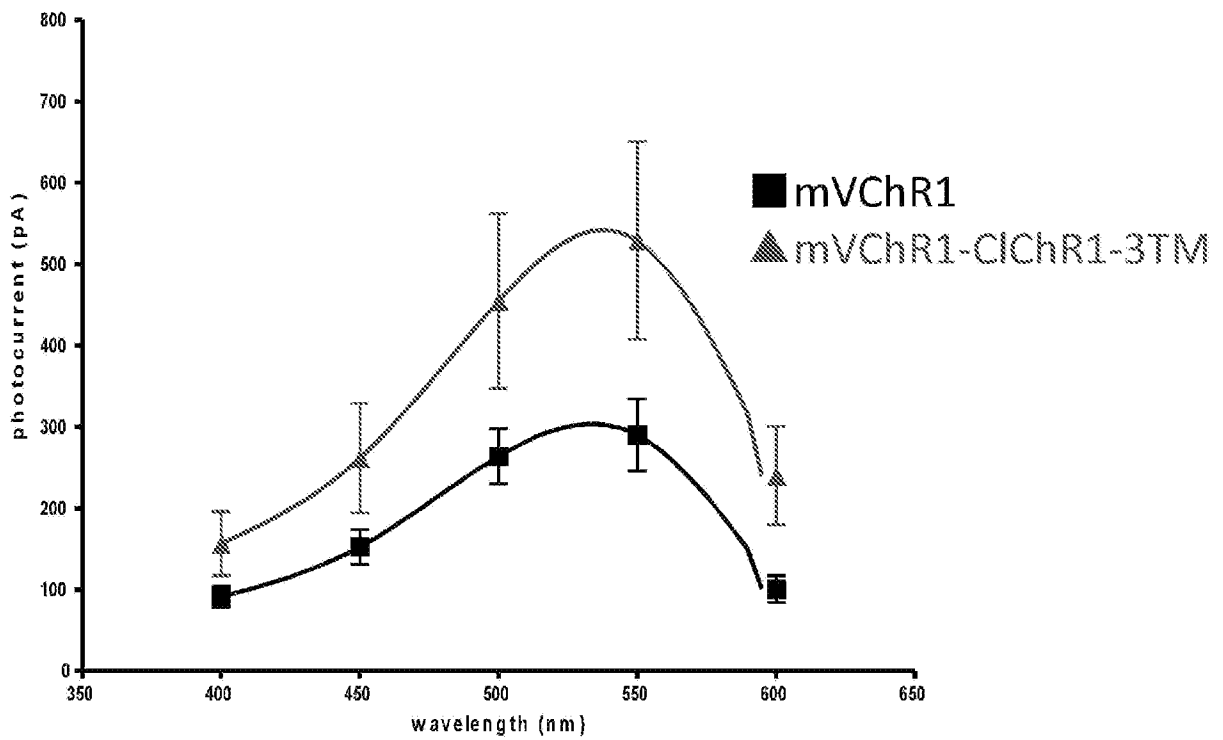
増強



[圖4]

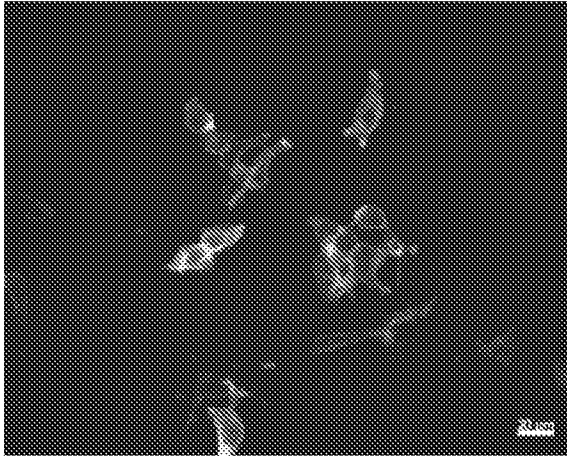


[圖5]

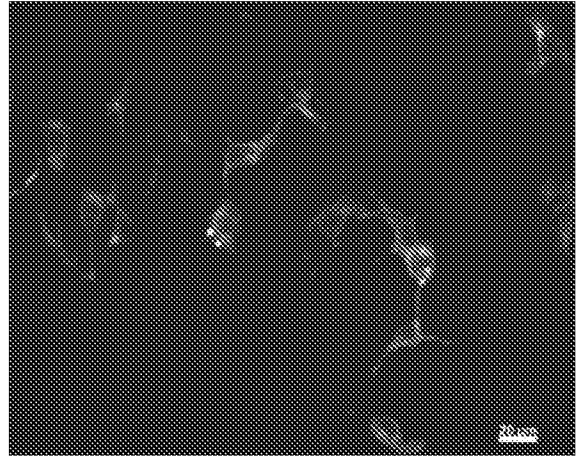


[圖6]

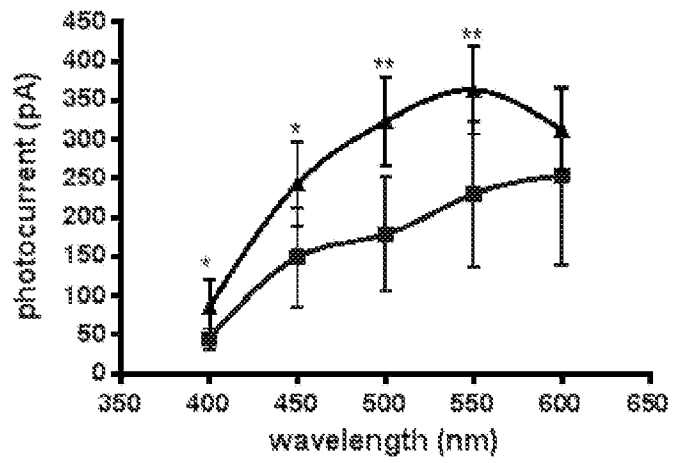
switCh2



switCh



[圖7]



- switCh2
- ▲ switCh2-mut1(E161T)

vs switCh2  
Tukey's Multiple Comparison Test  
p<0.01 \*  
p<0.001 \*\*

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/036252

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl. C12N15/62 (2006.01) i, A61K35/76 (2015.01) i, A61K38/02 (2006.01) i,  
 A61K48/00 (2006.01) i, A61P27/02 (2006.01) i, C07K14/405 (2006.01) i,  
 C07K19/00 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, C12N15/31 (2006.01) i,  
 C12N15/85 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C07K1/00-19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)  
 CAPLUS/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)  
 UniProt/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/019081 A1 (TOHOKU UNIVERSITY) 17 February 2011, page 10, lines 26-29, page 14, line 27 to page 15, line 5, page 17, lines 26-29, SEQ ID NO: 10 & US 2012/0190629 A1 paragraphs [0015], [0074], [0092], [0093], [0109], SEQ ID NO: 10 & EP 2465931 A1	4, 5, 9, 11-19
Y		12-19
A		1-3, 6-8, 10

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 21 November 2019 (21.11.2019)	Date of mailing of the international search report 10 December 2019 (10.12.2019)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/036252

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	PRIGGE, Matthias et al., "Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics", <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 14 September 2012, vol. 287, no. 38, pp. 31804-31812, fig. 1	12-19 1-11
A	HOSOSHIMA, Shoko et al., "Kinetic evaluation of photosensitivity in bi-stable variants of chimeric channelrhodopsins", <i>PLOS ONE</i> , 19 March 2015, journal.pone.0119558, pp. 1-14	1-19
A	WANG, Hongxia et al., "Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from <i>Chlamydomonas</i> ", <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 27 February 2009, vol. 284, no. 9, pp. 5685-5696	1-19
A	SINESHCHEKOV, Oleg A. et al., "Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins", <i>Biophysical Journal</i> , February 2013, vol. 104, pp. 807-817	1-19

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/62(2006.01)i, A61K35/76(2015.01)i, A61K38/02(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, C07K14/405(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/31(2006.01)i, C12N15/85(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K1/00-19/00</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2019年	日本国実用新案登録公報	1996-2019年	日本国登録実用新案公報	1994-2019年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2019年											
日本国実用新案登録公報	1996-2019年											
日本国登録実用新案公報	1994-2019年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) UniProt/GeneSeq</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="vertical-align: top;">X Y A</td> <td style="vertical-align: top;">WO 2011/019081 A1 (国立大学法人東北大学) 2011.02.17, 10頁26-29行目, 14頁27行目-15頁5行目, 17頁26-29行目, 配列番号10 &amp; US 2012/0190629 A1 段落0015, 0074, 0092, 0093, 0109、配列番号10、&amp; EP 2465931 A1</td> <td style="vertical-align: top;">4, 5, 9, 11-19 12-19 1-3, 6-8, 10</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X Y A	WO 2011/019081 A1 (国立大学法人東北大学) 2011.02.17, 10頁26-29行目, 14頁27行目-15頁5行目, 17頁26-29行目, 配列番号10 & US 2012/0190629 A1 段落0015, 0074, 0092, 0093, 0109、配列番号10、& EP 2465931 A1	4, 5, 9, 11-19 12-19 1-3, 6-8, 10			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X Y A	WO 2011/019081 A1 (国立大学法人東北大学) 2011.02.17, 10頁26-29行目, 14頁27行目-15頁5行目, 17頁26-29行目, 配列番号10 & US 2012/0190629 A1 段落0015, 0074, 0092, 0093, 0109、配列番号10、& EP 2465931 A1	4, 5, 9, 11-19 12-19 1-3, 6-8, 10										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">21.11.2019</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">10.12.2019</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:60%;">特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td style="width:10%;">4B</td> <td style="width:30%;">1194</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">鈴木 優志</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101 内線</td> <td></td> <td>3448</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	1194	鈴木 優志			電話番号 03-3581-1101 内線		3448
特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	1194										
鈴木 優志												
電話番号 03-3581-1101 内線		3448										

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	PRIGGE, Matthias et al., Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics, The Journal of Biological Chemistry, 2012.09.14, Vol.287, No.38, p.31804-31812 Figure 1	12-19 1-11
A	HOSOSHIMA, Shoko et al., Kinetic evaluation of photosensitivity in bi-stable variants of chimeric channelrhodopsins, PLOS ONE, 2015.03.19, journal.pone.0119558, p.1-14	1-19
A	WANG, Hongxia et al., Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from Chlamydomonas, The Journal of Biological Chemistry, 2009.02.27, Vol.284, No.9, p.5685-5696	1-19
A	SINESHCHEKOV, Oleg A. et al., Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins, Biophysical Journal, 2013.02, Vol.104, p.807-817	1-19