

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6276591号  
(P6276591)

(45) 発行日 平成30年2月7日(2018.2.7)

(24) 登録日 平成30年1月19日(2018.1.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
A 01 K 67/027	(2006.01)	A 01 K	67/027	
C 07 K 14/405	(2006.01)	C 07 K	14/405	
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K	19/00	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N	5/10	

請求項の数 24 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-537851 (P2013-537851)
(86) (22) 出願日	平成23年11月4日 (2011.11.4)
(65) 公表番号	特表2014-500716 (P2014-500716A)
(43) 公表日	平成26年1月16日 (2014.1.16)
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/059276
(87) 國際公開番号	W02012/061679
(87) 國際公開日	平成24年5月10日 (2012.5.10)
審査請求日	平成26年10月31日 (2014.10.31)
審判番号	不服2016-18182 (P2016-18182/J1)
審判請求日	平成28年12月5日 (2016.12.5)
(31) 優先権主張番号	61/410,736
(32) 優先日	平成22年11月5日 (2010.11.5)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	61/511,912
(32) 優先日	平成23年7月26日 (2011.7.26)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	503115205 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニ ア エニバーシティー アメリカ合衆国 94305-2038 カリフォルニア州 スタンフォード メイ ン クワッド ビルディング 170 サ ード フロア ピー. オー. ボックス 2 0386 オフィス オブ ザ ジェネラ ル カウンセル
(74) 代理人	100149294 弁理士 内田 直人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】光活性化キメラオプシンおよびその使用方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1、3、5、または 7 に記載のアミノ酸配列を含む光応答性キメラポリペプチド。

## 【請求項 2】

C 末端輸送シグナルをさらに含む、請求項 1 に記載のキメラポリペプチド。

## 【請求項 3】

輸送シグナルがアミノ酸配列 K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N V (配列番号 1 5 ) を含む、請求項 2 に記載のキメラポリペプチド。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするスクレオチド配列を含む単離ポリスクレオチド。

## 【請求項 5】

スクレオチド配列が C a M K I I プロモータに作動可能に連結されている、請求項 4 記載の単離ポリスクレオチド。

## 【請求項 6】

発現ベクターである、請求項 4 記載のポリスクレオチド。

## 【請求項 7】

発現ベクターがウイルスベクターである、請求項 6 に記載のポリスクレオチド。

## 【請求項 8】

10

20

ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項7に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項4～8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞培養培地中に単離された動物細胞であって、光応答性キメラポリペプチドが細胞膜に存在する、動物細胞。

【請求項 10】

細胞膜に存在する第2の光活性化ポリペプチドをさらに含む、請求項9記載の動物細胞。

【請求項 11】

請求項4～8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む非ヒト動物。

10

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチドが非ヒト動物の前頭前皮質の興奮性ニューロンに発現される、請求項11に記載の非ヒト動物。

【請求項 13】

請求項11又は12に記載の非ヒト動物の脳組織切片。

【請求項 14】

光活性化タンパク質を光で活性化することを含む、請求項9又は10に記載の細胞を使用する方法。

【請求項 15】

第1の光活性化タンパク質を含む興奮性ニューロンを選択的に脱分極化することであって、前記第1の光活性化タンパク質が第1の波長を有する光に暴露されたときに脱分極化される脱分極化、または

20

第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを選択的に脱分極化することであって、前記第2の光活性化タンパク質が第2の波長を有する光に暴露されたときに脱分極化される脱分極化、  
を含む、同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを選択的に脱分極化する方法において、

前記第1または前記第2の光活性化タンパク質として使用される請求項1～3のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 16】

30

興奮性ニューロンに第1の光活性化タンパク質を発現することと、抑制性ニューロンに第2の光活性化タンパク質を発現することと、を含み、

前記第1の光活性化タンパク質は、独立して、第1の波長を有する光に暴露されたときに脱分極化され、前記第2の光活性化タンパク質は、独立して、第2の波長を有する光に暴露されたときに脱分極化される、

同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを選択的に脱分極化する方法において、

前記第1または前記第2の光活性化タンパク質として使用される請求項1～3のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 17】

40

(a) 第1の波長を有する光で第1の光活性化タンパク質を含む興奮性ニューロンを選択的に脱分極化するか、または第2の波長を有する光で第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを選択的に脱分極化することと、

(b) 第1の光活性化タンパク質を含む前記興奮性ニューロンを選択的に脱分極化することに応答して、興奮性シナプス後電位 (E P S P) を測定するか、または第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを選択的に脱分極化することに応答して、抑制性シナプス後電流 (I P S C) を測定することと、

(c) 前記興奮性ニューロンまたは前記抑制性ニューロンを化合物と接触させることと、

(d) 前記興奮性ニューロンまたは前記抑制性ニューロンのいずれかを前記化合物と接触させることが、いずれかのニューロンの前記脱分極化を選択的に阻害するかどうかを判定

50

するために、前記興奮性シナプス後電位（E P S P）を測定するか、または前記抑制性シナプス後電流（I P S C）を測定することと、を含む、

同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンの脱分極化を選択的に阻害する化合物を識別するための方法において、

前記第1または前記第2の光活性化タンパク質として使用される請求項1～3のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項18】

前記方法が、前記化合物が心臓活動電位に悪影響を及ぼすかどうかを判定するために、心臓組織で前記化合物をアッセイすることをさらに含む、請求項17に記載のキメラポリペプチド。

10

【請求項19】

前記第2の光活性化タンパク質は、配列番号11、12、13、または14で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項15～18のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項20】

前記抑制性および興奮性ニューロンが、生きている非ヒト動物中、又は、非ヒト動物からの生体脳切片中に存在する、請求項15～18のいずれか一項に記載のキメラポリペプチド。

【請求項21】

ニューロンを脱分極化する方法に使用するための、請求項1～3のいずれか一項に記載の光応答性キメラポリペプチド。

20

【請求項22】

ニューロンが海馬ニューロンである、請求項21記載の光応答性キメラポリペプチド。

【請求項23】

ニューロンを脱分極化する方法に使用するための、請求項4～8のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項24】

ニューロンが海馬ニューロンである、請求項23記載の単離ポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2010年11月5日に出願された米国特許仮出願第61/410,736号、2010年11月5日に出願された同第61/410,744号、および2011年7月26日に出願された同第61/511,912号の優先権を主張し、これらのそれぞれの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

技術分野

本出願は、光活性化キメラタンパク質をその原形質膜上に発現する動物細胞を含む組成物と、前頭前皮質で同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを選択的に分極化するために、それを使用する方法に関する。

40

【背景技術】

【0003】

ほとんどの精神障害の精神生理学的基質は、自閉症および統合失調症に観察されるもののような、複雑な行動表現型に関連する遺伝的要因について、急速に明らかになっている情報にもかかわらず、不明なところが多い（Cichon et al., The American Journal of Psychiatry 166(5):540(2009)、O'Donovan et al., Human Genetics 126(1):3(2009)）。1つの目立って明らかになっている原理は、非常に広範囲の一見無関係な遺伝的異常が、同じクラスの精神医学的表現型を引き起こし得ることである

50

(社会的行動障害等、Folstein & Rosen-Sheidley, *Nature Reviews* 2(12):943(2001))。この驚くべきパターンは、一般的な病態生理学的原理のもとに、多様な遺伝的要因を統合し得る、回路レベルの知見を単純化することを識別する必要性を指摘した。

#### 【0004】

1つのこのような回路レベルの仮説は、皮質細胞の興奮および抑制の比率（細胞のE/Iバランス）の上昇が、自閉症の社会的および認知的障害を引き起こし得るということである（Rubenstein, *Current Opinion in Neurology* 23(2):118、Rubenstein & Merzenich, *Genes, Brain, and Behavior* 2(5):255(2003))。この仮説は、多くの自閉症関連遺伝子が、イオンチャネルおよびシナプスタンパク質内で機能獲得表現型に結合される（Bourgeron, *Current Opinion in Neurobiology* 19(2), 231(2009)）、および自閉症患者の約30%が、臨床的に明らかな発作もまた示す（Gillberg & Billstedt, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 102(5):321(2000)）という観察を含む、病態生理学的根拠の多様な動向を、統合し得る可能性がある。しかしながら、このような不均衡（疾患の症状に関連する）が、長期的（例えば、進行中）または短期的な時間尺度で作用するかどうかについては、明らかになっていない。さらに、この仮説は、1つには依然として直接的な試験を受けるに至らないという理由で、決して普遍的に受け入れられるものではない。薬理学的および電気的な介入は、臨床設定にあるか、または自由に行動しているかに関わらず、社会的および認知的活動中の実験哺乳動物において、新皮質の興奮性細胞の活性を、抑制性細胞よりも選択的に支持する（受容体調節とは根本的に異なる方法で）ために必要な特異性を欠いている。自閉症および統合失調症の社会的および認知的障害が、大部分が診療における従来の精神薬理学的治療に対して応答しないことが証明されたことは、おそらく、このような問題に関連する。

#### 【0005】

光遺伝学は、機能しているインタクトの生体系とペースを保つために必要とされる時間精度（ミリ秒の時間尺度）で、自由に行動している哺乳動物および他の動物の体内でさえも、生体組織の標的細胞内の特定のイベントを制御するために使用される、遺伝的および光学的方法の組み合わせである。光遺伝学の特徴は、特定の標的機構の使用を通して細胞型分解能を維持しながら、ニューロン膜電位の時間的に正確な操作を可能にする、標的神経細胞の原形質膜への高速光応答性チャネルタンパク質の導入である。神経系の機能を調べるために使用することができる微生物オプシンの中には、光に応答して脱分極化を推進するために使用される、チャネルロドプシン（ChR2、ChR1、VChR1、およびSFO）がある。わずか2～3年の間に、光遺伝学の分野は、特定の細胞型が、インビボ神経回路等の生物組織の機能にどのように貢献するかという基本的な科学的理をさらに深めてきた。また、臨床側では、光遺伝学によって動かされた研究が、パーキンソン病ならびに他の神経学的および精神医学的障害への洞察につながってきた。

#### 【0006】

しかしながら、皮質のE/Iバランスの比率の上昇が、自閉症の社会的および認知的障害ならびに統合失調症等の他の障害と関連し得るという仮説を調査するために、既存の光遺伝学的手段には制限がある。従来のチャネルロドプシンの光電流は、E/Iバランスに段階様の変化をもたらすことを排除する（替わりに、細胞のE/Iバランスにおける安定した変化の調査に好適でないであろう傾斜または変調を要する）著しい脱感作を示し、さらに、SFOおよび従来のChRのいずれも、青色光によって駆動され、それが、異なる回路要素集団（興奮性および抑制性ニューロン等）を駆動する効果の調製物内比較を排除する。したがって、皮質のE/Iバランスの操作および皮質切片中の振動の監視を可能にし、これらの操作が、どのように前頭前皮質内の同じ微小回路内に存在する下流ニューロンに影響を与えるかの調査を可能にするであろう手段が必要とされる。

#### 【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【0007】

細胞が光で照射されたときに細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である、キメラ光活性化タンパク質カチオンチャネルを含む組成物を、本明細書に提供する。

## 【0008】

細胞膜で発現される光活性化タンパク質を含む動物細胞であって、タンパク質は、(a)ボルボックス・カルテリからのVChR1およびコナミドリムシからのChR1に由来するキメラタンパク質であり、タンパク質は、ChR1の第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、少なくとも第1および第2の膜貫通ヘリックスを有する、VChR1のアミノ酸配列を含み、(b)光応答性であり、(c)細胞が光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である、動物細胞を、本明細書に提供する。いくつかの実施形態では、細胞は、単離されているか、または細胞培養培地中にある。10

## 【0009】

細胞膜上に本明細書に記載のキメラタンパク質を発現する細胞を含む細胞集団もまた、本明細書に提供される。細胞膜上に本明細書に記載のキメラタンパク質を発現する細胞を含む、非ヒト動物および脳組織もまた、本明細書に提供される。

## 【0010】

細胞膜上に発現される光活性化タンパク質を符号化するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、タンパク質は、ボルボックス・カルテリからのVChR1およびコナミドリムシからのChR1に由来するキメラタンパク質であり、タンパク質は、ChR1の第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、少なくとも第1および第2の膜貫通ヘリックスを有するVChR1のアミノ酸配列を含み、光応答性であり、細胞が光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である、ポリヌクレオチドを、本明細書に提供する。ポリヌクレオチドを含むベクター(発現ベクター等)もまた、提供される。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクター(例えば、AAVベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、HSVベクター、またはレンチウイルスベクター)である。20

## 【0011】

さらに、細胞膜上に本明細書に記載のキメラタンパク質を発現する動物細胞を使用する方法もまた、本明細書に提供され、本方法は、キメラタンパク質を光で活性化することを含む。30

## 【0012】

さらに、同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを、選択的に脱分極化する方法であって、第1の光活性化タンパク質を含む興奮性ニューロンを選択的に脱分極化することであって、第1の光活性化タンパク質は、第1の波長を有する光に暴露されたときに脱分極化される、脱分極化と、または第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを選択的に脱分極化することであって、第2の光活性化タンパク質は、第2の波長を有する光に暴露されたときに脱分極化される、脱分極化と、を含む、方法を本明細書に提供する。いくつかの実施形態では、第1または第2の光活性化タンパク質は、ボルボックス・カルテリからのVChR1およびコナミドリムシからのChR1に由来するキメラタンパク質であり、タンパク質は、ChR1の第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、少なくとも第1および第2の膜貫通ヘリックスを有するVChR1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号1、3、5、または7で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、第2の光活性化タンパク質は、配列番号11、12、13、または14で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。40

## 【0013】

同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを選択的に脱分極化する方法であって、興奮性ニューロンで第1の光活性化タンパク質を発現することと、抑制性ニューロンで第2の光活性化タンパク質を発現することと、を含み、第1の光活性化タンパク質は、独立して、第1の波長を有する光に暴露されたときに脱分極化し、第2の光活性化

1020304050

タンパク質は、独立して、第2の波長を有する光に暴露されたときに脱分極化する、方法。いくつかの実施形態では、第1または第2の光活性化タンパク質は、ボルボックス・カルテリからのV C h R 1 およびコナミドリムシからのC h R 1 に由来するキメラタンパク質であり、タンパク質は、C h R 1 の第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、少なくとも第1および第2の膜貫通ヘリックスを有するV C h R 1 のアミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号1、3、5、または7で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、第2の光活性化タンパク質は、配列番号11、12、13、または14で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

## 【0014】

10

同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンの脱分極化を選択的に阻害する化合物を識別するための方法であって、(a) 第1の光活性化タンパク質を含む興奮性ニューロンを、第1の波長を有する光で選択的に脱分極化するか、または第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを、第2の波長を有する光で選択的に脱分極化すること、(b) 第1の光活性化タンパク質を含む興奮性ニューロンを選択的に脱分極化することに応答して、興奮性シナプス後電位(E P S P)を測定するか、または第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを選択的に脱分極化することに応答して、抑制性シナプス後電流(I P S C)を測定すること、(c) 興奮性ニューロンまたは抑制性ニューロンを化合物と接触させること、(d) 興奮性ニューロンまたは抑制性ニューロンのいずれかを化合物と接触させることが、いずれかのニューロンの脱分極化を選択的に阻害するかどうかを判定するために、興奮性シナプス後電位(E P S P)を測定するか、または抑制性シナプス後電流(I P S C)を測定すること、を含む、方法もまた、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、第1または第2の光活性化タンパク質は、ボルボックス・カルテリからのV C h R 1 およびコナミドリムシからのC h R 1 に由来するキメラタンパク質であり、タンパク質は、C h R 1 の第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、少なくとも第1および第2の膜貫通ヘリックスを有するV C h R 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号1、3、5、または7で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、第2の光活性化タンパク質は、配列番号11、12、13、または14で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

20

## 【0015】

30

本明細書に記載の種々の実施形態の特性の1つ、いくつか、または全てを組み合わせて、本発明の他の実施形態を形成してもよいことを理解されたい。本発明のこれらまたは他の態様は、当業者には明白となるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0016】

【図1】コンビナトリアル光遺伝学のための、改善された赤方偏移チャネルロードプシンの構造を描写する。(a) C a M K I I a プロモータの制御下でV C h R 1 - e Y F P またはC 1 V 1 - e Y F P をトランスフェクトした、培養海馬ニューロンの共焦点画像。四角は、最後のパネルに拡大された領域を示し、C 1 V 1 - t s Y F P の樹状膜の局所化を示す。スケールバー：20 μm(左)、4 μm(右)。(b) 示されるオプシンを発現する、培養中の海馬ニューロンにおける全細胞パッチクランプ記録からのピーク光電流。(c) C h R 1、C h R 2、およびV C h R 1 の配列比較。2つのC 1 V 1 変異形に対するスライス部位を示す。推定の膜貫通ヘリックス1～7を、棒で示し(T M 1～7)、突然変異したアミノ酸を灰色で示す。(d) C 1 V 1 スライス変異形1および2を発現する、H E K 細胞において記録された光電流振幅。(e) 示されるオプシンをトランスフェクトし、E Y F P に融合した培養海馬ニューロンの単一の共焦点平面画像。D N A 濃度は、構築物全体で一致していた。(f) C h R 2、V C h R 1、C 1 V 1 野生型、C 1 V (E 1 2 2 T)、C 1 V 1 (E 1 6 2 T)、およびC 1 V 1 (E 1 2 2 T / E 1 6 2 T)の作用スペクトル。光電流は、H E K 2 9 3 細胞において2ミリ秒の光パルスで収集した。(

40

50

g ) カチオン単離外部溶液を使用して、全細胞パッチクランプによって、H E K 細胞において - 4 0 m V の光電流量により測定された、C 1 V 1 スプライス変異形 1 のイオン透過度。データは、最大ピーク N a 電流に対して正規化した。( h ) 白色で示される点突然変異位置を有する C 1 V 1 キメラの概略図。C h R 1 配列を黒色で示し、V C h R 1 配列を灰色で示す。

【図 2】コンビナトリアル光遺伝学のための、改善された赤方偏移チャネルロードプシンの試験を描写する。( a ) 示されるオプシンを発現する培養ニューロン内のチャネル閉鎖の時定数 (  $t_{0_{ff}}$  ) の代表的トレースおよび要約プロットであり、トレースは、ピーク電流に対して正規化される。( b ) C h R 2 の非活性化と比較した、C 1 V 1 - E 1 2 2 T の不活性化である。( c ) 他の C 1 V 1 変異形と対比した、C 1 V 1 二重変異 E 1 2 2 T / E 1 6 2 T における電流の不活性化。( d ) 2 ミリ秒の 5 4 2 n m の光パルスに応答して、示されるオプシンを発現する、培養ニューロンで記録された平均ピーク光電流。

【図 3】前頭前部の錐体ニューロンにおける急性切片記録からの光電流を描写する。( a ) ピーク光電流は、統合された蛍光強度との一貫した相関を示す。( b ) C h R 2 ( H 1 3 4 R ) および C 1 V 1 ( E 1 2 2 T / E 1 6 2 T ) における蛍光 - 光電流の関係。黒色の線は、データを線形に当てはめたものである。( c ) 5 6 0 n m の光パルス列または示される周波数での電流注入で刺激した、前頭前部の錐体ニューロンにおける急性切片の記録。要約グラフは、集団データを示す (  $n = 6$  )。( d ) 電流注入 ( 2 0 0 p A, 1 0 ミリ秒のパルス、左上) または示される波長および光パワー密度で 2 ミリ秒の光パルスに対する、成功したスパイクの割合。2 0 × 2 ミリ秒のパルスから構成される全パルス列は、S u t t e r D G - 4 光源を使用して顕微鏡対物レンズを通じて送達され、2 0 n m のバンドパスフィルタおよび追加の減光フィルタを使用してフィルタ処理して、光パワーを減衰させた ( 2 個の切片において  $n = 6$  個の細胞 )。( e ) C 1 V 1 - E 1 2 2 T または C 1 V 1 - E 1 2 2 T / E 1 6 2 T を発現する細胞における、5 4 2 n m および 6 3 0 n m の光パルスに対する電圧クランプ反応 ( 上 )。C 1 V 1 - E 1 2 2 T を発現する細胞における電流クランプの記録は、3 . 2 m W mm<sup>-2</sup> で、5 H z 列の 5 0 ミリ秒の 6 3 0 n m の光に応答してスパイクを示す ( 下 )。( f ) C 1 V 1 ( E 1 2 2 T ) における赤色光応答動態。5 4 0 n m および 6 3 0 n m で C 1 V 1 ( E 1 2 2 T ) を発現する、培養ニューロンから記録された光電流の活性化時定数 (  $\tau_n$  )。光パワーは、6 3 0 n m で 3 . 2 m W mm<sup>-2</sup> 、5 4 0 n m で 7 . 7 m W mm<sup>-2</sup> (  $n = 5$  個の細胞、 $p = 0 . 0 0 6$  対応  $t$  検定 ) であったことに留意されたい。( g ) 電圧クランプのトレースは、C 1 V 1 ( E 1 2 2 T ) を発現するニューロンにおける、6 3 0 n m の光パルスに対する応答を示す。パルス長は、トレースの上に示される。1 5 0 ミリ秒のトレースから計算される  $\tau_n$  は、6 7 ミリ秒である。( h ) 6 3 0 n m で 5 0 ミリ秒のパルス ( パワー密度 3 . 2 m W mm<sup>-2</sup> ) によって誘発されるスパイクを示す、C 1 V 1 ( E 1 2 2 T ) を発現するニューロンからの電流クランプの記録。

【図 4】興奮性錐体ニューロンおよび抑制性パルプアルブミン発現細胞の独立した活性化を描写する。( a ) 5 6 0 n m または 4 0 5 n m で 2 ミリ秒の光パルス ( 5 H z 、両方の波長において 7 . 6 m W / mm<sup>2</sup> ) に応答して、C 1 V 1 ( E 1 2 2 T / E 1 6 2 T ) または C h R 2 ( H 1 3 4 R ) を発現する培養海馬ニューロンからの電流クランプの記録。( b ) 皮質錐体ニューロンに C 1 V 1 、および抑制性パルプアルブミン陽性介在ニューロンに C h R 2 ( H 1 3 4 R ) を発現する、二重注入した動物における記録の構造。オプシンを独立して発現させるために、P V : : C r e マウスに、L e n t i - C a M K I I - C 1 V 1 ( E 1 2 2 T / E 1 6 2 T ) および A A V 5 - E F 1 a - D I O - C h R 2 ( H 1 3 4 R ) を含有する 2 つのウイルスの混合物を注入した。( c ) C 1 V 1 発現 P Y R 細胞および C h R 2 発現 P V 細胞からシナップス入力を受容する、非発現 P Y R ニューロンからの電圧クランプの記録。0 m V でクランプすると、4 0 5 n m の光パルスは短潜 I P S C を引き起こし、一方で 5 6 0 n m のパルスは、小さな長潜の抑制性シナップス応答を誘起するのみである。( d ) c に示したものと同じ細胞からの電圧クランプの記録。- 6 5 m V でクランプすると、5 6 0 n m の光パルスは、E P S C を引き起こすが、4 0 5 n m

10

20

30

40

50

のパルスは、検出可能なシナプス電流を誘起しない。灰色の線は、個別のイベントを示し、黒色の線は、光パルスに引き起こされたものの平均を示す。(e) CaMKIIa: : C1V1 (E162T) - ts - eYFP および Ef1a - DIO: : ChR2 - eYFP を注入した麻酔 PV: : Cre マウスにおける mPFC オプトロード記録(図は、実験ステップを示す)。紫色(405nm)の光パルスは、緑色の光パルスに対する可変遅延(At)を示す(例示トレース)。(f)要約グラフは、紫色のパルスが、示される遅延時間で緑色光パルスに先行する状態で、緑色光に誘起されるスパイクの確率を示す。個々の点は、単一の記録からのものである。黒色の線は、全ての記録の平均を示す(ビンあたり > 3 記録部位)。(g)それぞれ、561nm の刺激(右、上の波形)および 405nm の刺激(右、下の波形)に応答して発火する、1 つの推定錐体ユニットおよび 1 つの推定 PV ユニットを示す、ウイルスを注入したマウスからのオプトロード記録。

【図 5】異なるインタクト系調製物におけるコンビナトリアル光遺伝的励起を描写する。(a)インビトロにおける C1V1 - E122T / E162T および ChR2 - H134R でのコンビナトリアル投射制御。実験的パラダイムは、それぞれ、皮質 - 視床(CT)および底腹側(VB)視床 - 皮質細胞(TC)における C1V1 および ChR2 の発現を示す。(b) CT および TC 両方の細胞から投射を受容する、nRT 細胞からの電圧クランプ記録。同時刺激(At = 0 ミリ秒)は、両方の投射から誘起された EPSC の線形和をもたらす。(c) TC および CT 線維からの個々の閾値入力は、入力が正確に一致する場合にのみ、nRT ニューロンにスパイクをもたらす。(d) CT 入力と TC 入力との間の遅延時間を左側に示す。水平方向の点線は、切断されたスパイクを示す。可変の待機時間(At)で活性化される CT および TC 線維によって誘起された、正規化した活動電位の数(6 個の nRT 細胞から)は、CT および TC の入力が、5 ミリ秒以内で同時に起こる場合にのみ効果的な統合をもたらすことを示す。要約データは、平均 ± 標準誤差を表す。

【図 6】時間スペクトル分離およびコンビナトリアル制御、すなわち進行中のシナプス活性下での改変された E / I 状態における回路の調節および発生パターンを描写する。(a) PV ニューロンの SSFO 活性化および錐体ニューロンにおける C1V1 活性化の実験的パラダイム。(b) CaMKIIa: : C1V1 (E162T) および DIO - SSFO を発現する、PV: : Cre マウスからの急性切片調製物における、錐体ニューロンからの 0mV での電圧クランプ記録。SSFO および C1V1 は、青色の光パルスにより活性化され(2)、IPSC 周波数は、持続的な SSFO 活性によって増加される(3、活性化前および後の IPSC 活性に対する差込図において上と下のトレースを比較)。持続的な黄色の光パルスは、SSFO を非活性化し、C1V1 を活性化し、一過的に IPSC 周波数を増加させる(4)。集団パワースペクトル(右)は、興奮性および PV ニューロン(470nm のパルス)の同時活性化の際に増加される、光学的な興奮性ニューロン活性化(590nm のパルス)の際の周波数活性を示す。トレースの下の図は、実験中の C1V1 および SSFO の予測活性を示す。(c)観察された周波数ピークは、事前の SSFO を介した PV ニューロンの刺激に依存するものではなかった。(d)ベースラインおよび初期の青色または橙色パルス後の、(b) および (c) からの要約 IPSC 周波数。トレースの下の図は、実験中の C1V1 および SSFO の予測活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

詳細な説明

本発明は、とりわけ、光活性化キメラタンパク質をその原形質膜上に発現する動物細胞を含む組成物と、前頭前皮質内で同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを選択的に分極化するためにそれを使用する方法を提供する。発明者らは、初めて、皮質の E / I 上昇および皮膚切片の振動を監視する能力の実験的操作を可能にする、固有の生理学的特性を有するキメラタンパク質を開発した。これらの固有の光感受性キメラタンパク質は、非ヒト動物の前頭前皮質の興奮性神経回路または抑制性神経回路のいずれかで発現され、次いで、特定の波長を有する光に応答して、脱分極化することができる。さ

10

20

30

40

50

らに、本明細書に開示されるキメラ光感受性タンパク質を発現する、皮質興奮性または抑制性ニューロンを含む非ヒト動物からの脳切片は、同じ神経回路内に存在する興奮性ニューロンまたは抑制性ニューロンのいずれかの脱分極化を選択的に阻害することができる、化合物を探索するために使用することができる。

#### 【0018】

##### 一般的技法

本発明の実践は、特に指示されない限り、当業者に周知である、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、および免疫学の従来の技法を採用する。このような技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) および 10 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001) (本明細書では併せて「Sambrook」と称される)、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, 2001までの付録を含む)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)、Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York、Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (本明細書では併せて「Harlow and Lane」と称される)、Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000)、Handbook of Experimental Immunology, 4th edition (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987)、ならびにGene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987) 等の文献に十分に記載されている。 30

#### 【0019】

##### 定義

本明細書で使用されるように、「a (1つの)」、「an (1つの)」、および「the (その)」という単数形は、特に指示されない限り、複数の参照を含む。

#### 【0020】

「動物」とは、任意の一般的な研究室モデルの生物、または哺乳動物等の脊椎動物であり得る。哺乳動物は、ヒト、家畜、スポーツ用動物、ペット、靈長類、マウス、ラット、および他のげっ歯類を含むが、それらに限定されない。

#### 【0021】

本明細書に使用される際の「アミノ酸置換」または「突然変異」は、定義されたアミノ酸配列のうち少なくとも1つのアミノ酸構成要素が別のアミノ酸で改変または置換され、細胞内に改変された活性または発現レベルを有する、そのアミノ酸配列によって符号化されたタンパク質をもたらすことを意味する。 40

#### 【0022】

「キメラタンパク質」は、1つ以上の異なるタンパク質に由来する1つ以上の部分を含む、タンパク質である。キメラタンパク質は、キメラタンパク質を符号化する核酸をトランسفェクトした組み換え細胞を培養することによって、生成することができる。

#### 【0023】

本明細書の全体を通して挙げられる全ての最大数値制限は、全てのより低い数値制限が本明細書で明示的に書かれたかのように、そのようなより低い数値制限を含むことが意図 50

される。本明細書の全体を通して挙げられる全ての最小数値制限は、全てのより高い数値制限が本明細書で明示的に書かれたかのように、そのようなより高い数値制限を含む。本明細書の全体を通して挙げられる全ての数値範囲は、そのようなより広い数値範囲内に入る全てのより狭い数値範囲が、本明細書で明示的に書かれたかのように、そのようなより狭い数値範囲を含む。

#### 【0024】

##### V1C1キメラタンパク質およびそれを発現する細胞

いくつかの態様では、本明細書に開示される動物細胞は、ボルボックス・カルテリからのVChR1カチオンチャネルおよびコナミドリムシからのChR1カチオンチャネルに由来する、「C1V1」として既知の、キメラ光感受性タンパク質を含む。本タンパク質は、VChR1のアミノ酸配列から構成され得る、さらに、ChR1の対応する第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、VChR1ポリペプチドの少なくとも第1および第2の膜貫通ヘリックスを、有してもよい。C1V1キメラオプシンタンパク質は、単独では十分にニューロンで発現しない、他のオプシンタンパク質の小片から構築され、強力で、赤方偏移した、安定なチャネルロドプシンである。いくつかの実施形態では、動物細胞は、細胞の原形質膜上に第2の光活性化タンパク質を発現し得る。第2の光活性化タンパク質は、光による活性化に応答して、細胞の原形質膜の過分極化を仲介することが可能であり得る。細胞の原形質膜の過分極化を仲介することが可能である光活性化タンパク質の例は、例えば、国際特許出願第PCT/US2011/028893号に見出すことができ、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

#### 【0025】

本開示の実施形態はまた、C1V1の修飾形または突然変異形を対象とし得る。これらのタンパク質は、ニューロンに対して光学的制御を行使するために、単独でか、または種々の他のオプシンと組み合わせて、使用することができる。具体的には、他のオプシンと関連した、修飾されたC1V1の使用が、神経系障害に対する光学的制御に有用であると見られている。C1V1の特定の使用は、神経回路に対する時間的、空間的、および/または細胞型特異的な制御を、測定可能な尺度と相關させる、光遺伝学系または方法に関する。

#### 【0026】

##### V1C1キメラタンパク質

30

動物細胞の原形質膜上に発現される、光活性化キメラタンパク質を、本明細書に提供する。いくつかの態様では、本光活性化タンパク質は、ボルボックス・カルテリからのVChR1およびコナミドリムシからのChR1に由来するキメラタンパク質である。いくつかの実施形態では、本キメラタンパク質は、ChR1の対応する第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、少なくとも第1および第2の膜貫通ヘリックスを有する、VChR1のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、キメラタンパク質は、ChR1の対応する第1および第2の膜貫通ヘリックスによって置換される、第1および第2の膜貫通ヘリックスを有する、VChR1のアミノ酸配列を含み、ChR1からの対応する部分によって置換される、第2および第3の膜貫通ヘリックスの間に位置する、細胞内ループドメインの少なくとも一部分をさらに含む。いくつかの実施形態では、光活性化タンパク質の第2および第3の膜貫通ヘリックスの間の細胞内ループドメイン全体が、ChR1からの対応する細胞内ループドメインで置換され得る。他の実施形態では、ChR1の対応する部分で置換される、第2および第3の膜貫通ヘリックスの間に位置する細胞間ループドメインの一部分は、配列番号1のA145にまで及び得る。他の実施形態では、キメラタンパク質は、ChR1の対応する第1および第2の膜貫通ヘリックスならびに細胞内ループドメインによって置換される、第1および第2の膜貫通ヘリックスならびに細胞内ループドメインを有するVChR1のアミノ酸配列を含み、さらに、ChR1の対応する部分によって置換される、少なくとも一部分の第3の膜貫通ヘリックスを含む。別の実施形態では、ChR1から対応する部分によって置換される、第3の膜貫通ヘリックスの一部分は、配列番号1のW163にまで及び得る。いくつかの実施形態では、光活性化キメ

40

50

ラタンパク質は、C h R 1 のアミノ酸 1 - 1 4 5 および V C h R 1 のアミノ酸 1 0 2 - 3 1 6 を含む。いくつかの実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、C h R 1 のアミノ酸 1 - 1 6 2 および V C h R 1 のアミノ酸 1 1 9 - 3 1 6 を含む。いくつかの実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、シグナルペプチド配列を有さない、配列番号 1 で示される配列と、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一である、アミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、配列番号 1 で示される配列と、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一である、アミノ酸配列を含むことができる。

## 【0027】

10

他の実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、細胞が光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。いくつかの実施形態では、光は、緑色光であり得る。他の実施形態では、光は、約 5 4 0 n m ~ 約 5 6 0 n m の波長を有し得る。いくつかの実施形態では、光は、約 5 4 2 n m の波長を有し得る。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が紫色光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない場合がある。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が 4 0 5 n m の波長を有する光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない場合がある。

## 【0028】

20

いくつかの実施形態では、タンパク質は、C 末端蛍光タンパク質をさらに含んでもよい。いくつかの具体的な実施形態では、C 末端蛍光タンパク質は、強化された黄色蛍光タンパク質 ( E Y F P ) 、緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) 、シアン蛍光タンパク質 ( C F P ) 、または赤色蛍光タンパク質 ( R F P ) であり得る。いくつかの実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、細胞の原形質膜へのタンパク質の輸送を強化する、輸送シグナル ( t s ) の付加によって修飾される。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネル K i r 2 . 1 のアミノ酸配列から導出される。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列 K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N V を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質内のシグナルペプチド配列は、異なるシグナルペプチド配列で置換することができる。

## 【0029】

30

いくつかの実施形態では、動物細胞は、神経細胞、筋細胞、または幹細胞であり得る。一実施形態では、動物細胞は、神経細胞である。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する興奮性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。さらに他の実施形態では、抑制性ニューロンは、パルプアルブミンニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する抑制性ニューロンであり得る。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する抑制性ニューロンであり得る。

## 【0030】

40

いくつかの実施形態では、動物細胞は、細胞の原形質膜上に発現される第 2 の光活性化タンパク質をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、第 2 の光活性化タンパク質は、細胞が光で照射されたときに、細胞内の過分極電流を仲介することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、第 2 の光活性化タンパク質は、N p H r 、e N p H r 2 . 0 、e N p H r 3 . 0 、e N p H r 3 . 1 、または G t R 3 であってもよい。他の光活性化カチオンチャネル、アニオンポンプ、およびプロトンポンプに関するさらなる情報は、米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 9 3 4 0 3 号、および国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 1 / 0 2 8 8 9 3 号に見出すことができ、それらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、他の光活性化カチオンチャネルタンパク質を発現する細胞と比べて、光に暴露された神経細胞において、強化された光電流を有する。いくつかの実施形態では、光活性化キメラタンパ

50

ク質によってもたらされる光電流の強化は、他の光活性化カチオンチャネルタンパク質を発現する細胞よりも、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、または15倍のいずれか以上であり得る。

#### 【0031】

動物細胞の原形質膜上に発現される1つ以上の光活性化タンパク質であって、前記1つ以上の光活性化タンパク質は、配列番号1、3、5、7、9、11、12、13、または14で示される配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列を含み、輸送シグナル（例えば、原形質膜への輸送を強化するもの）をさらに含む、光活性化タンパク質もまた、本明細書に提供する。輸送シグナルは、コアアミノ酸配列のC末端に融合させることができ、またはコアアミノ酸配列のN末端に融合させることができる。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、リンカーによってコアアミノ酸配列に結合され得る。リンカーは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含んでもよい。リンカーはさらに、例えば、強化された黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネルKir2.1のアミノ酸配列から導出され得る。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N Vを含み得る。

10

20

#### 【0032】

##### V1C1キメラ突然変異体

いくつかの態様では、本発明は、置換または変異アミノ酸配列を含む、ポリペプチドを含み、変異ポリペプチドは、前駆体C1V1キメラポリペプチドの特徴的な光活性化可能な性質を保持するが、また、いくつかの特定の態様では、改変した性質を保有してもよい。例えば、本明細書で説明される変異光活性化キメラタンパク質は、動物細胞内または動物細胞原形質膜上の両方での増加したレベルの発現、光の異なる波長、具体的には赤色光に暴露されたときの改変した応答性、および/または特質の組み合わせを示すことができ、それにより、キメラC1V1ポリペプチドは、低い脱感作、高速非活性化、他の光活性化カチオンチャネルを用いた最低限の相互活性化のための低い紫色光活性化、および/または動物細胞での強力な発現という性質を保有する。

30

#### 【0033】

アミノ酸置換または突然変異を含む光活性化キメラタンパク質には、光に応答する能力および原形質膜の分極状態を制御する能力を保持しながらも、1つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸置換を有するものが含まれる。例えば、アミノ酸置換または突然変異を含む光活性化タンパク質は、1つ以上のアミノ酸を、配列番号1に対応するアミノ酸配列に置換することによって、作製することができる。いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列と比較して、改変されたアミノ酸配列を含む、タンパク質を含み、改変された光活性化キメラタンパク質は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する、タンパク質の原形質膜にわたって、特徴的な光活性化性質、および/またはイオン流動を調節する能力を保持するが、いくつかの具体的な態様では、改変した性質を有してもよい。

40

#### 【0034】

天然タンパク質配列中のアミノ酸置換は、保存または非保存であり得、このような置換アミノ酸残基は、遺伝暗号によって符号化されたものであってもよく、またはそうでなくともよい。標準的な20種類のアミノ酸の「アルファベット」を、それらの側鎖の化学的性質に基づいて、化学的なファミリーに分類した。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するもの（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するもの（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するもの（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン

50

、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、-分枝側鎖を有するもの(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族を有する側鎖を有するもの(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、化学的に類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである(すなわち、塩基性側鎖を有するアミノ酸を、塩基性側鎖を有する別のアミノ酸で置換する)。「非保存アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、化学的に異なる側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである(すなわち、塩基性側鎖を有するアミノ酸を、芳香族側鎖を有するアミノ酸で置換する)。アミノ酸置換は、保存または非保存であり得る。さらに、アミノ酸置換は、C1V1レチナール結合ポケット、C1V1細胞内ループドメインの1つ以上、および/またはレチナール結合ポケットもしくは細胞内ループドメインの両方に、位置することができる。 10

#### 【0035】

したがって、本明細書では、キメラポリペプチドのVC<sub>h</sub>R1部分のレチナール結合ポケットの全体を通した主要位置に特定のアミノ酸置換を有することができる、C1V1キメラ光活性化タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、C1V1タンパク質は、配列番号1のアミノ酸残基E122に突然変異を有することができる。いくつかの実施形態では、C1V1タンパク質は、配列番号1のアミノ酸残基E162に突然変異を有することができる。他の実施形態では、C1V1タンパク質は、配列番号1のアミノ酸残基E162およびE122の両方に突然変異を有することができる。いくつかの実施形態では、開示された変異C1V1キメラタンパク質のそれぞれは、光に応答して動物細胞の膜を脱分極化することに使用するための特定の性質および特性を有することができる。 20

#### 【0036】

##### C1V1-E122変異ポリペプチド

本明細書では、動物細胞の原形質膜上に発現される、本明細書に開示される光活性化C1V1キメラタンパク質であって、1つ以上のアミノ酸残基が、C1V1活性(すなわち、光の活性化に応答して、動物細胞の脱分極化を触媒する能力)を保持しながらも、アミノ酸置換を受けており、突然変異が、配列番号1のE122に対応するグルタミン酸残基に存在し得る(C1V1-E122)、光活性化C1V1キメラタンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、C1V1-E122変異キメラ光活性化タンパク質は、E122に突然変異を有さないC1V1キメラ光活性化タンパク質と比べて、増加した光に対する感受性、増加した光の特定の波長に対する感受性、および/または増加した細胞の原形質膜の極性状態を調節する能力を有するキメラタンパク質をもたらすことができる、配列番号1で示されるアミノ酸配列のアミノ酸E122に導入される置換を含む。いくつかの実施形態では、突然変異は、保存アミノ酸置換であり得る。いくつかの実施形態では、突然変異は、非保存アミノ酸置換であり得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基E122における突然変異は、スレオニンであってもよい(C1V1-E122T)。他の実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、シグナルペプチド配列を有さない、配列番号3で示される配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。他の実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、配列番号3で示される配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。他の実施形態では、C1V1-E122変異キメラ光活性化タンパク質は、C末端輸送シグナルに融合させることができる。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、リンカーによって、C1V1-E122変異キメラ光活性化タンパク質に結合され得る。リンカーは、長さで5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーはさらに、例えば、強化された黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、輸送シグ 30 40 50

ナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネルK<sub>i</sub>r2.1のアミノ酸配列から導出され得る。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N Vを含み得る。

【0037】

他の実施形態では、C1V1-E122キメラタンパク質は、細胞が光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。いくつかの実施形態では、光は、緑色光であり得る。他の実施形態では、光は、約540nm～約560nmの波長を有することができる。いくつかの実施形態では、光は、約546nmの波長を有することができる。他の実施形態では、C1V1-E122キメラタンパク質は、細胞が赤色光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することができる。いくつかの実施形態では、赤色光は、約630nmの波長を有することができる。いくつかの実施形態では、C1V1-E122キメラタンパク質は、細胞が紫色光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない場合がある。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が405nmの波長を有する光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない場合がある。いくつかの実施形態では、動物細胞は、神経細胞、筋細胞、または幹細胞であり得る。一実施形態では、動物細胞は、神経細胞であり得る。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する興奮性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する抑制性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。さらに他の実施形態では、抑制性ニューロンは、パルプアルブミンニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、動物細胞は、細胞の原形質膜上に発現される第2の光活性化タンパク質をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、細胞が光で照射されたときに、細胞内の過分極電流を仲介することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、N<sub>p</sub>H<sub>r</sub>、eN<sub>p</sub>H<sub>r</sub>2.0、eN<sub>p</sub>H<sub>r</sub>3.0、eN<sub>p</sub>H<sub>r</sub>3.1、またはG<sub>t</sub>R<sub>3</sub>であってもよい。

【0038】

C1V1-E162変異ポリペプチド

本明細書では、動物細胞の原形質膜上に発現される、本明細書に開示される光活性化C1V1キメラタンパク質であって、1つ以上のアミノ酸残基が、C1V1活性（すなわち、光の活性化に応答して、動物細胞の脱分極化を触媒する能力）を保持しながらも、アミノ酸置換を受けており、突然変異が、配列番号1のE162に対応するグルタミン酸残基に存在し得る（C1V1-E162）、光活性化C1V1キメラタンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、C1V1-E162変異キメラ光活性化タンパク質は、E162に突然変異を有さないC1V1キメラ光活性化タンパク質と比べて、増加した光に対する感受性、増加した光の特定の波長に対する感受性、および/または増加した細胞の原形質膜の極性状態を調節する能力を有するキメラタンパク質をもたらすことができる、配列番号1で示されるアミノ酸配列のアミノ酸E162に導入される置換を含む。いくつかの実施形態では、突然変異は、保存アミノ酸置換であり得る。いくつかの実施形態では、突然変異は、非保存アミノ酸置換であり得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基E162における突然変異は、スレオニンであってもよい（C1V1-E162T）。他の実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、シグナルペプチド配列を有さない、配列番号5で示される配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。他の実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、配列番号5で示される配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。他の実施形態では、C1V1-E162変異キメラ光活性化タンパク質は、C末端輸送シグナルに融合させることができる。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、リンカーによって

10

20

30

40

50

、 C 1 V 1 - E 1 6 2 変異キメラ光活性化タンパク質に結合され得る。リンカーは、長さで 5、 10、 20、 30、 40、 50、 75、 100、 125、 150、 175、 200、 225、 250、 275、 300、 400、 または 500 個のうちいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーはさらに、例えば、強化された黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネル K i r 2 . 1 のアミノ酸配列から導出され得る。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列 K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N V を含み得る。

## 【 0 0 3 9 】

10

他の実施形態では、 C 1 V 1 - E 1 6 2 キメラタンパク質は、細胞が光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。いくつかの実施形態では、光は、緑色光であり得る。他の実施形態では、光は、約 540 nm ~ 約 535 nm の波長を有し得る。いくつかの実施形態では、光は、約 542 nm の波長を有し得る。他の実施形態では、光は、約 530 nm の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、 C 1 V 1 - E 1 6 2 キメラタンパク質は、細胞が紫色光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない場合がある。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が 405 nm の波長を有する光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない場合がある。いくつかの実施形態では、 C 1 V 1 - E 1 6 2 キメラタンパク質は、 C 末端蛍光タンパク質をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、動物細胞は、神経細胞、筋細胞、または幹細胞であり得る。一実施形態では、動物細胞は、神経細胞であり得る。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する興奮性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する抑制性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。さらに他の実施形態では、抑制性ニューロンは、パルプアルブミンニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、動物細胞は、細胞の原形質膜上に発現される第 2 の光活性化タンパク質をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、第 2 の光活性化タンパク質は、細胞が光で照射されたときに、細胞内の過分極電流を仲介することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、第 2 の光活性化タンパク質は、 N p H r 、 e N p H r 2 . 0 、 e N p H r 3 . 0 、 e N p H r 3 . 1 、または G t R 3 であってもよい。いくつかの実施形態では、 C 1 V 1 - E 1 6 2 光活性化キメラタンパク質は、 E 1 6 2 において突然変異が欠けている C 1 V 1 タンパク質、または他の光活性化カチオンチャネルタンパク質と比べて、加速した光周期を有することができる。いくつかの実施形態では、 C 1 V 1 - E 1 6 2 光活性化キメラタンパク質は、 E 1 6 2 において突然変異が欠けている C 1 V 1 タンパク質よりも、または他の光活性化カチオンチャネルタンパク質と比べて、1倍、1 . 5倍、2倍、2 . 5倍、3倍、3 . 5倍、4倍、4 . 5倍、または5倍以上速い光周期を有することができる。

## 【 0 0 4 0 】

30

## C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 二重変異ポリペプチド

40

本明細書では、動物細胞の原形質膜上に発現される、本明細書に開示される光活性化 C 1 V 1 キメラタンパク質であって、1つ以上のアミノ酸残基が、 C 1 V 1 活性（すなわち、光の活性化に応答して、動物細胞の脱分極化を触媒する能力）を保持しながらも、アミノ酸置換を受けており、突然変異が、配列番号 1 の E 1 2 2 および E 1 6 2 に対応するグルタミン酸残基に存在し得る（ C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 ）、光活性化 C 1 V 1 キメラタンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、 C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 変異キメラ光活性化タンパク質は、 E 1 2 2 および E 1 6 2 に突然変異を有さない C 1 V 1 キメラ光活性化タンパク質と比べて、増加した光に対する感受性、増加した光の特定の波長に対する感受性、および / または増加した細胞の原形質膜の極性状態を調節する能力を有するキメラタンパク質をもたらすことができる、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の

50

アミノ酸 E 1 2 2 および E 1 6 2 に導入される置換を含むことができる。いくつかの実施形態では、突然変異は、保存アミノ酸置換であり得る。いくつかの実施形態では、突然変異は、非保存アミノ酸置換であり得る。いくつかの実施形態では、突然変異は、保存および非保存の両方のアミノ酸置換であってもよい。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基 E 1 2 2 および E 1 6 2 における突然変異は、スレオニンであってもよい ( C 1 V 1 - E 1 2 2 T / E 1 6 2 T )。他の実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、シグナルペプチド配列を有さない、配列番号 7 で示される配列と、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一である、アミノ酸配列を含むことができる。他の実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、配列番号 7 で示される配列と、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一である、アミノ酸配列を含むことができる。他の実施形態では、C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 変異キメラ光活性化タンパク質は、C 末端輸送シグナルに融合させることができる。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、リンカーによって、C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 変異キメラ光活性化タンパク質に結合され得る。リンカーは、長さで 5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または 500 個のうちいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーはさらに、例えば、強化された黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネル K i r 2 . 1 のアミノ酸配列から導出され得る。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列 K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N V を含み得る。

#### 【 0 0 4 1 】

他の実施形態では、C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 キメラタンパク質は、細胞が光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。いくつかの実施形態では、光は、緑色光であり得る。他の実施形態では、光は、約 5 4 0 n m ~ 約 5 6 0 n m の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、光は、約 5 4 6 n m の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 キメラタンパク質は、細胞が紫色光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない場合がある。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が 4 0 5 n m の波長を有する光で照射されたときに、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない場合がある。いくつかの実施形態では、C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 キメラタンパク質は、E 1 2 2 / E 1 6 2 において突然変異が欠けている C 1 V 1 タンパク質と比べて、または他の光活性化カチオンチャネルタンパク質と比べて、紫色光に暴露されたときに少ない活性化を示すことができる。いくつかの実施形態では、動物細胞は、神経細胞、筋細胞、または幹細胞であり得る。一実施形態では、動物細胞は、神経細胞であり得る。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する興奮性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する抑制性ニューロンであり得る。さらに他の実施形態では、抑制性ニューロンは、パルプアルブミンニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、動物細胞は、細胞の原形質膜上に発現される第 2 の光活性化タンパク質をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、第 2 の光活性化タンパク質は、細胞が光で照射されたときに、細胞内の過分極電流を仲介することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、第 2 の光活性化タンパク質は、N p H r 、e N p H r 2 . 0 、e N p H r 3 . 0 、e N p H r 3 . 1 、または G t R 3 であってもよい。いくつかの実施形態では、C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 光活性化キメラタンパク質は、E 1 2 2 / E 1 6 2 において突然変異が欠けている C 1 V 1 タンパク質、または他の光活性化カチオンチャネルタンパク質と比べて、減少した不活性化を有することができる。いくつかの実施形態では、C 1 V 1 - E 1 2 2 / E 1 6 2 変異光活性化キメラタンパク質は、E 1 2 2 / E 1 6 2 において突然変異が欠けている C 1 V 1 タンパク質と

比較して、または他の光活性化カチオンチャネルタンパク質と比べて、約 15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、または30%のいずれかを含めた、不活性化を行うことができる。いくつかの実施形態では、C1V1-E122/E162光活性化キメラタンパク質は、E122/E162において突然変異が欠けているC1V1タンパク質よりも、または他の光活性化カチオンチャネルタンパク質と比べて、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、または10倍以上速い光周期を有することができる。

## 【0042】

10

アミノ酸モチーフの細胞内輸送の強化

本開示は、哺乳類細胞の原形質膜への輸送を強化する1つ以上のアミノ酸配列モチーフの付加による、細胞内で発現される光活性化キメラタンパク質の修飾を提供する。進化的により単純な生物に由来する構成要素を有する光活性化キメラタンパク質は、哺乳類細胞によって発現されないかもしくは耐容性を示されない可能性があるか、または哺乳類細胞において高レベルで発現された場合に細胞内局在化障害を示す可能性がある。結果として、いくつかの実施形態では、細胞内で発現されるキメラ光活性化タンパク質は、シグナルペプチド、小胞体（ER）輸送シグナル、膜輸送シグナル、およびN末端ゴルジ体輸送シグナルから成る群から選択される、1つ以上のアミノ酸配列モチーフに融合される。哺乳類細胞の原形質膜への光活性化キメラタンパク質の輸送を強化する1つ以上のアミノ酸配列モチーフは、光活性化タンパク質のN末端、C末端、またはN末端およびC末端の両方に融合されてもよい。任意選択的に、光活性化タンパク質および1つ以上のアミノ酸配列モチーフは、リンカーによって分離されてもよい。いくつかの実施形態では、光活性化キメラタンパク質は、細胞の原形質膜へのタンパク質の輸送を強化する、輸送シグナル（ts）の付加によって修飾される。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネルKir2.1のアミノ酸配列から導出される。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列KSRITSEGELYIPLDQIDINVを含む。細胞の原形質膜への光活性化タンパク質の輸送を強化することができるさらなるタンパク質モチーフは、米国特許出願第12/041,628号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質中のシグナルペプチド配列は、欠失しているか、または異なるタンパク質由来のシグナルペプチド配列で置換されている。

20

## 【0043】

30

動物細胞、非ヒト動物、および脳切片

本明細書に開示される光活性化キメラタンパク質を含む細胞を、本明細書に提供する。いくつかの実施形態では、細胞は、動物細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞は、配列番号1に対応するC1V1タンパク質を含む。他の実施形態では、動物細胞は、配列番号3に対応する変異C1V1-E122Tタンパク質を含む。他の実施形態では、動物細胞は、配列番号5に対応する変異C1V1-E162Tタンパク質を含む。他の実施形態では、動物細胞は、配列番号7に対応する変異C1V1-E122T/E162Tタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、動物細胞は、神経細胞、筋細胞、または幹細胞であり得る。一実施形態では、動物細胞は、神経細胞であり得る。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する興奮性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する抑制性ニューロンであり得る。さらに他の実施形態では、抑制性ニューロンは、パルプアルブミンニューロンであつてもよい。

40

## 【0044】

動物における細胞の細胞膜上に発現される、本明細書に開示される光活性化キメラタンパク質を含む、非ヒト動物もまた、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、動

50

物細胞は、配列番号1に対応するC1V1タンパク質を含む。他の実施形態では、動物細胞は、配列番号3に対応する変異C1V1-E122Tタンパク質を含む。他の実施形態では、動物細胞は、配列番号5に対応する変異C1V1-E162Tタンパク質を含む。他の実施形態では、動物細胞は、配列番号7に対応する変異C1V1-E122T/E162Tタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、動物は、本明細書に記載の光活性化キメラタンパク質を含む動物は、前記光活性化キメラタンパク質を遺伝子導入により発現している。他の実施形態では、本明細書に記載の光活性化キメラタンパク質を含む動物は、アデノウイルスベクター等であるが、これに限定されない、光活性化タンパク質を持つベクターをウイルストラ NSフェクトされている。

## 【0045】

10

切片中の細胞の細胞膜上に発現される、本明細書に開示される光活性化キメラタンパク質を含む、非ヒト動物に由来する生体脳切片を、本明細書に提供する。いくつかの実施形態では、脳切片は、本明細書に記載の光活性化キメラタンパク質を遺伝子導入で発現する非ヒト動物に由来する。他の実施形態では、脳切片は、アデノウイルスベクター等であるが、これに限定されない、前記光活性化タンパク質を持つベクターをウイルストラ NSフェクトされている、非ヒト動物に由来する。いくつかの実施形態では、脳切片は、冠状脳切片である。いくつかの実施形態では、脳切片は、約100μm、約150μm、約200μm、約250μm、約300μm、約350μm、約400μm、約450μm、または約500μmを含め、これらの値の間の任意の厚さを含む、いずれかの厚さである。

## 【0046】

20

単離ポリヌクレオチド

例えば、少なくとも1つのC1V1ポリペプチド活性を有する、本明細書に記載の任意のキメラポリペプチドを符号化する単離C1V1ポリヌクレオチドを、本明細書に提供する。本開示は、配列番号2、4、6、または8の核酸と、少なくとも約10、例えば、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000個のヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも約70%、例えば、少なくとも約71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%、または完全な(100%)配列同一性を有する核酸配列を含む、単離、合成、または組み換えのポリヌクレオチドを提供する。

## 【0047】

30

本開示は、特に、C1V1および/またはその突然変異体を符号化する核酸を提供する。例えば、本開示は、単離核酸分子であって、核酸分子が、(1)配列番号1のアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含むポリペプチド、(2)配列番号3のアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含むポリペプチド、(3)配列番号5のアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含むポリペプチド、または(4)配列番号7によって表されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含むポリペプチドを符号化する、単離核酸分子を提供する。

## 【0048】

40

プロモータおよびベクター

本開示はまた、上述の核酸を含む、発現力セットおよび/またはベクターを提供する。

50

好適には、本開示のキメラタンパク質を符号化する核酸は、プロモータに動作可能に結合される。プロモータは当該技術分野において周知である。宿主細胞で機能する任意のプロモータを、本開示の C 1 V 1 および / またはその任意の変異形の発現に使用することができる。特定の動物細胞において C 1 V 1 キメラタンパク質またはその変異形の発現を駆動するために有用である開始制御領域またはプロモータは非常に多く、当業者によく知られている。これらの核酸を駆動することが可能である実質的にあらゆるプロモータを使用することができる。

【 0 0 4 9 】

具体的には、興奮性神経細胞での C 1 V 1 キメラタンパク質の組み換え発現が所望される場合には、ヒトカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ I I ( C a M K I I ) プロモータを使用してもよい。他の実施形態では、伸長因子 1 a ( E F - 1 a ) プロモータを、 C r e 誘発性組み換え A A V ベクターと併せて、パルブアルブミン - C r e トランスジェニックマウスに使用して、発現 C 1 V 1 キメラタンパク質を抑制性ニューロンに標的化してもよい。

【 0 0 5 0 】

C 1 V 1 キメラポリペプチドまたはその変異形を符号化する、本明細書に開示されるポリヌクレオチドを含むベクターもまた、本明細書に提供される。本発明に従って投与することができるベクターはまた、ベクターのポリヌクレオチドから転写されたときに、標的動物細胞の原形質膜上に光活性化キメラタンパク質の蓄積をもたらすであろう R N A ( 例えれば、 R N A i 、リボザイム、 m i R N A 、 s i R N A ) を符号化するポリヌクレオチドを含む、ベクターも含む。使用することができるベクターは、制限なく、レンチウイルス、 H S V 、およびアデノウイルスベクターを含む。レンチウイルスは、 H I V - 1 、 H I V - 2 、 S I V 、 F I V 、および E I A V を含むが、これらに限定されない。レンチウイルスは、 V S V 、狂犬病、 M o - M L V 、バキュロウイルス、およびエボラを含むがこれらに限定されない、他のウイルスのエンベロープタンパク質を有する偽型であってもよい。このようなベクターは、当該技術分野における標準的な方法を使用して調製することができる。

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態において、ベクターは、組み換え A A V ベクターである。 A A V ベクターは、それらが感染する細胞のゲノム内に安定した部位特異的な様式で組み込むことができる、比較的小さい寸法の D N A ウイルスである。これらは、細胞の成長、形態、または分化に対するいずれの影響も誘発することなく幅広い細胞に感染することができ、またこれらはヒトの病理には関与していないと考えられる。 A A V ゲノムは、クローニングされ、シーケンシングされ、特徴付けられてきた。該ゲノムは、約 4 7 0 0 塩基を包含し、ウイルスの複製開始点としての役割を果たす約 1 4 5 塩基の末端逆位配列 ( I T R ) 領域を各末端に含む。ゲノムの残りの部分は、キャプシド形成の機能を担う 2 つの必須領域に分割される：ウイルスの複製およびウイルス遺伝子の発現に関与する r e p 遺伝子を含む、ゲノムの左側部分、ならびにウイルスのキャプシドタンパク質をコードする c a p 遺伝子を含む、ゲノムの右側部分。

【 0 0 5 2 】

遺伝子療法用のベクターとしての A A V の用途は、近年、急速に発達してきた。野生型 A A V は、比較的高い力値で、ヒトを含む哺乳動物の分裂もしくは非分裂細胞または組織に感染し得、さらに、特定の部位で ( 染色体 19 の長腕上 ) ヒト細胞内へ統合され得る ( K o t i n , R . M . , e t a l , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 7 : 2 2 1 1 - 2 2 1 5 , 1 9 9 0 ) ( S a m u l s k i , R . J , e t a l , E M B O J . 1 0 : 3 9 4 1 - 3 9 5 0 , 1 9 9 1 、これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる ) 。 r e p および c a p 遺伝子を有さない A A V ベクターは、部位特異的統合の特異性を欠くが、依然として外因性遺伝子の長期の安定した発現を仲介することができる。 A A V ベクターは、 2 つの形態で細胞内に存在し、 1 つは、染色体のエピソーム側であり、もう 1 つは、染色体内に統合されるが、前者が主要な形態である。

10

20

30

40

50

さらに、AAVは、これまで、いずれのヒト疾患との関連も見出されておらず、その統合から生じる生物学的特性の変化も全く観察されていなかった。16種類のAAVの血清型が、文献に報告されており、それぞれ、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、およびAAV16と称され、AAV5は、もともと、ヒトから単離されたものである(Bantel-Schaal, and H.zur Hausen. 1984. *Virology* 134: 52-63)が、AAV1~4およびAAV6は、全てアデノウイルスの研究中に発見された(Ursula Bantel-Schaal, Hajo Delius and Harald zur Hausen. *J. Virol.* 1999, 73: 939-947)。

10

### 【0053】

AAVベクターは、当該技術分野における標準的な方法を使用して調製されてもよい。いずれの血清型のアデノ隨伴ウイルスも好適である(例えば、Blacklow, "Parvoviruses and Human Disease" J. R. Patterson, ed. (1988) pp. 165-174、Rose, *Comprehensive Virology* 3:1, 1974、P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" In *Parvoviruses* (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p5-14, Huddersfield Arnold, London, UK (2006)、およびDE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "The Genus Dependovirus" (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p15-23, Huddersfield Arnold, London, UK (2006)を参照されたく、それらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。ベクターを精製するための方法は、例えば、米国特許第6566118号、第6989264号、および第6995006号、ならびにWO/1999/011764号(標題「Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors」)に見出すことができ、それらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ハイブリッドベクターの調製は、例えば、PCT出願第PCT/US2005/027091号に記載されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。インビトロおよびインビボで遺伝子を移動させるためのAAVに由来するベクターの使用が記載されている(例えば、国際特許出願公開第91/18088号およびWO93/09239号、米国特許第4,797,368号、同第6,596,535号、および同第5,139,941号、ならびに欧州特許第0488528号を参照されたく、これらの全ては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。これらの刊行物は、repおよび/cap遺伝子が欠失し、対象となる遺伝子によって置換された種々のAAV由来構築物、ならびにインビトロ(培養細胞内)またはインビボで(生物内で直接的に)対象となる遺伝子を移動させるためのこれらの構築物の使用について記載している。本発明による複製欠損組み換えAAVは、2つのAAV末端逆位配列(ITS)領域によって隣接された対象となる核酸配列を含むプラスミドと、AAVキャプシド形成遺伝子(repおよびcap遺伝子)を持つプラスミドを、ヒトヘルパーウイルス(例えばアデノウイルス)に感染させた細胞株内にコトランスフェクトすることによって調製することができる。生成されたAAV組み換え体は、次いで、標準的な技術によって精製される。

20

### 【0054】

いくつかの実施形態では、本発明の方法に使用するためのベクター(複数を含む)は、ウイルス粒子(例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、およびAAV16を含むがこれらに限定されないAAVウイル

30

40

50

ス粒子)中にキャプシド形成される。したがって、本発明は、本明細書に記載のベクターのいずれかを含む組み換えウイルス粒子(組み換えポリヌクレオチドを含むため、組み換え体である)を含む。このような粒子を生成する方法は、当該技術分野で既知であり、米国特許第6,596,535号に記載されている。

【0055】

本明細書に記載の動物細胞について、1つ以上のベクターを、神経細胞、心臓細胞、または幹細胞に投与することができることを理解されたい。1つ以上のベクターが使用される場合、それらは、同時または異なる時点で、動物細胞に投与することができることを理解されたい。

【0056】

本発明の方法

同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを、そのようなニューロンで本明細書に記載の光活性化キメラタンパク質を発現させることによって、選択的に脱分極化する方法を、本明細書に提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるもの等の第1の光活性化タンパク質は、興奮性ニューロンで発現し得、一方で、第2の光活性化タンパク質は、抑制性ニューロンで発現し得る。いくつかの実施形態では、興奮性ニューロンで発現される第1の光活性化タンパク質は、抑制性ニューロンで発現される第2の光活性化タンパク質とは異なる波長の光によって、活性化することができる。いくつかの実施形態では、第1および第2の光活性化タンパク質は、生きている非ヒト動物中、または非ヒト動物からの生体脳切片中に発現され得る。

【0057】

他の実施形態では、同じ神経回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンの脱分極化を、そのようなニューロンで本明細書に記載の光活性化キメラタンパク質を発現させることによって、選択的に阻害する化合物を識別するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、興奮性ニューロンで発現し、一方で第2の光活性化タンパク質は、抑制性ニューロンで発現する。いくつかの実施形態では、興奮性ニューロンで発現される第1の光活性化タンパク質は、抑制性ニューロンで発現される第2の光活性化タンパク質とは異なる波長の光によって、活性化することができる。いくつかの実施形態では、第1および第2の光活性化タンパク質は、生きている非ヒト動物、または非ヒト動物の生体脳切片に発現され得る。

【0058】

同じ微小回路内に存在するニューロンでE/Iバランスを選択的に改変するための方法

いくつかの態様では、同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを選択的に脱分極化するための方法であって、第1の光活性化タンパク質を含む興奮性ニューロンを選択的に脱分極化することであって、第1の光活性化タンパク質は、第1の波長を有する光に暴露されたときに、脱分極化される、脱分極化と、または、第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを選択的に脱分極化することであって、第2の光活性化タンパク質は、第2の波長を有する光に暴露されたときに、脱分極化される、脱分極化と、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号1で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。他の実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号3で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号5で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号11で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号12で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号13で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号14で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。他の光活性化カチオンチャネルの開示に関するさらなる情報は、米国特許出願公開第2007/0054319号、米国特許出願第61/410,704号、および国際特許出願公開第WO2010/056970号に見出すことができ、それらのそれぞれの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0059】

他の態様では、同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンを選択的に脱分極化するための方法であって、興奮性ニューロンで第1の光活性化タンパク質を発現することと、抑制性ニューロンで第2の光活性化タンパク質を発現することと、を含み、第1の光活性化タンパク質は、独立して、第1の波長を有する光に暴露されたときに、脱分極化し、第2の光活性化タンパク質は、独立して、第2の波長を有する光に暴露されたときに、脱分極化する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号1で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。他の実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号3で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号5で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号11で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号12で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号13で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号14で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。

#### 【0060】

いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、緑色光によって活性化することができる。一実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、約560nmの波長を有する光によって、活性化することができる。一実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、赤色光によって活性化することができる。別の実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、約630nmの波長を有する光によって、活性化することができる。他の実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、紫色光によって活性化することができる。一実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、約405nmの波長を有する光によって、活性化することができる。他の実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、緑色光によって活性化することができる。いくつかの実施形態では、光活性化タンパク質は、約1ミリ秒(

10

20

30

40

50

ms)、約2ms、約3ms、約4ms、約5ms、約6ms、約7ms、約8ms、約9ms、約10ms、約15ms、約20ms、約25ms、約30ms、約35ms、約40ms、約45ms、約50ms、約60ms、約70ms、約80ms、約90ms、約100ms、約200ms、約300ms、約400ms、約500ms、約600ms、約700ms、約800ms、約900ms、約1秒、約1.25秒、約1.5秒、または約2秒を含めた、これらの値の間の任意の時間を含む、いずれかの期間を有し得る、光パルスによって活性化される。いくつかの実施形態では、光活性化タンパク質は、約0.05mW mm<sup>-2</sup>、約0.1mW mm<sup>-2</sup>、約0.25mW mm<sup>-2</sup>、約0.5mW mm<sup>-2</sup>、約0.75mW mm<sup>-2</sup>、約1mW mm<sup>-2</sup>、約2mW mm<sup>-2</sup>、約3mW mm<sup>-2</sup>、約4mW mm<sup>-2</sup>、約5mW mm<sup>-2</sup>、約6mW mm<sup>-2</sup>、約7mW mm<sup>-2</sup>、約8mW mm<sup>-2</sup>、約9mW mm<sup>-2</sup>、約10mW mm<sup>-2</sup>、約11mW mm<sup>-2</sup>、約12mW mm<sup>-2</sup>、約13mW mm<sup>-2</sup>、約14mW mm<sup>-2</sup>、約mW mm<sup>-2</sup>、約16mW mm<sup>-2</sup>、約17mW mm<sup>-2</sup>、約18mW mm<sup>-2</sup>、約19mW mm<sup>-2</sup>、約20mW mm<sup>-2</sup>、約21mW mm<sup>-2</sup>、約22mW mm<sup>-2</sup>、約23mW mm<sup>-2</sup>、約24mW mm<sup>-2</sup>、または約25mW mm<sup>-2</sup>を含めた、これらの数の間の任意の値を含む、いずれかの光パワー密度を有し得る光パルスによって、活性化される。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する興奮性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する抑制性ニューロンであり得る。さらに他の実施形態では、抑制性ニューロンは、パルプアルブミンニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、抑制性および興奮性ニューロンは、生きている非ヒト動物中に存在し得る。他の実施形態では、抑制性および興奮性ニューロンは、非ヒト動物からの脳切片中に存在し得る。  
10  
20

## 【0061】

同じ微小回路内に存在するニューロンでE/Iバランスを選択的に変更する化合物を識別するための方法

いくつかの態様では、同じ微小回路内に存在する興奮性または抑制性ニューロンの脱分極化を選択的に阻害する化合物を識別するための方法であって、(a)第1の光活性化タンパク質を含む興奮性ニューロンを、第1の波長を有する光で選択的に脱分極化するか、または第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを、第2の波長を有する光で選択的に脱分極化することと、(b)第1の光活性化タンパク質を含む興奮性ニューロンを選択的に脱分極化することに応答して、興奮性シナプス後電位(EPSp)を測定するか、または第2の光活性化タンパク質を含む抑制性ニューロンを選択的に脱分極化することに応答して、抑制性シナプス後電流(IPSC)を測定することと、(c)興奮性ニューロンまたは抑制性ニューロンを化合物と接触させることと、(d)興奮性ニューロンまたは抑制性ニューロンのいずれかを、化合物と接触させることが、いずれかのニューロンの脱分極化を選択的に阻害するかどうかを判定するために、興奮性シナプス後電位(EPSp)を測定するか、または抑制性シナプス後電流(IPSC)を測定することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号1で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。他の実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号3で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、配列番号5で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの態様では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号11で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%  
30  
40  
50

%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号12で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号13で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、配列番号14で示されるアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるタンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、化合物は、コンビナトリアル化学ライブラリーのメンバーであり得る。他の実施形態では、本方法は、哺乳動物において、心臓組織の機能または心臓活動電位に悪影響を及ぼすかどうかを判定するために、化合物をアッセイすることをさらに含む。

#### 【0062】

いくつかの実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、緑色光によって活性化することができる。一実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、約560nmの波長を有する光によって、活性化することができる。一実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、赤色光によって活性化することができる。別の実施形態では、第1の光活性化タンパク質は、約630nmの波長を有する光によって、活性化することができる。他の実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、紫色光によって活性化することができる。一実施形態では、第2の光活性化タンパク質は、約405nmの波長を有する光によって、活性化することができる。いくつかの実施形態では、光活性化タンパク質は、約1ミリ秒(ms)、約2ms、約3ms、約4ms、約5ms、約6ms、約7ms、約8ms、約9ms、約10ms、約15ms、約20ms、約25ms、約30ms、約35ms、約40ms、約45ms、約50ms、約60ms、約70ms、約80ms、約90ms、約100ms、約200ms、約300ms、約400ms、約500ms、約600ms、約700ms、約800ms、約900ms、約1秒、約1.25秒、約1.5秒、または約2秒を含めた、これらの値の間の任意の時間を含む、いずれかの期間を有し得る、光パルスによって活性化することができる。いくつかの実施形態では、光活性化タンパク質は、約0.05mW mm<sup>-2</sup>、約0.1mW mm<sup>-2</sup>、約0.25mW mm<sup>-2</sup>、約0.5mW mm<sup>-2</sup>、約0.75mW mm<sup>-2</sup>、約1mW mm<sup>-2</sup>、約2mW mm<sup>-2</sup>、約3mW mm<sup>-2</sup>、約4mW mm<sup>-2</sup>、約5mW mm<sup>-2</sup>、約6mW mm<sup>-2</sup>、約7mW mm<sup>-2</sup>、約8mW mm<sup>-2</sup>、約9mW mm<sup>-2</sup>、約10mW mm<sup>-2</sup>、約11mW mm<sup>-2</sup>、約12mW mm<sup>-2</sup>、約13mW mm<sup>-2</sup>、約14mW mm<sup>-2</sup>、約mW mm<sup>-2</sup>、約16mW mm<sup>-2</sup>、約17mW mm<sup>-2</sup>、約18mW mm<sup>-2</sup>、約19mW mm<sup>-2</sup>、約20mW mm<sup>-2</sup>、約21mW mm<sup>-2</sup>、約22mW mm<sup>-2</sup>、約23mW mm<sup>-2</sup>、約24mW mm<sup>-2</sup>、または約25mW mm<sup>-2</sup>を含めた、これらの数の間の任意の値を含む、いずれかの光パワー密度を有し得る光パルスによって、活性化することができる。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する興奮性ニューロンであり得る。他の実施形態では、興奮性ニューロンは、錐体ニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、神経細胞は、非ヒト動物の前頭前皮質に位置する抑制性ニューロンであり得る。さらに他の実施形態では、抑制性ニューロンは、パルプアルブミンニューロンであってもよい。いくつかの実施形態では、抑制性および興奮性ニューロンは、生きている非ヒト動物中に存在し得る。他の実施形態では、抑制性および興奮性ニューロンは、非ヒト動物からの脳切片中に存在し得る。

#### 【0063】

##### 例示的実施形態

本開示は、中で発現されたときに、膜電圧を修飾する光活性化キメラオプシンに関する。本開示は、必ずしもこれらの文脈に限定されるわけではなく、本開示の種々の態様は、

10

20

30

40

50

これらおよび他の文脈を使用した実施例の説明を通じて、理解することができる。

【0064】

本開示の種々の実施形態は、哺乳動物細胞を含む、細胞膜での発現のために修飾された光活性化オプシンに関する。オプシンは、2つの異なるオプシンである、ポルボックスチャネルロドプシン（VChR1）およびコナミドリムシチャネルロドプシン（ChR1）の組み合わせに由来する。オプシンは、個々のオプシンが由来するいずれかのものよりも、高いレートのレベルにおける発現に有用である。

【0065】

ある特定のより具体的な実施形態では、ChR1 / VChR1キメラ（C1V1）の遺伝子配列は、主としてVChR1である。輸送に関連するVChR1配列の部分は、ChR1の相同配列で置換される。

10

【0066】

種々の実施形態は、哺乳動物細胞での発現を改善するための、輸送シグナルの付加を対象とした修飾に関する。

【0067】

本開示のある特定の態様は、C1V1のさらなる修飾形を対象とする。例えば、ある特定の実施形態は、E162TからC1V1への突然変異を含み、実験では、加速した光周期（例えば、ほぼ3倍）をもたらすことが示唆されている。

20

【0068】

種々の本開示の実施形態は、神経回路に対する時間的、空間的、および／または細胞型特異的な制御を、測定可能な尺度と相關させる、光遺伝学系または方法に関する。光遺伝学系は、C1V1および／またはC1V1変異形を含む、種々のオプシンを使用して、神経回路の部分に対する制御を確立する。例えば、種々の評価基準または症状は、神経障害と関連する可能性がある。光遺伝学系は、患者内の神経回路を、その選択的な制御の標的とする。光遺伝学系は、神経障害と関連する評価基準または症状について、患者を監視することを伴う。このようにして、光遺伝学系は、神経回路、その機能、および／または神経障害についての詳細な情報を提供することができる。

【0069】

本明細書に説明される実施形態と一致して、具体的な実施形態は、種々のオプシンを使用して、障害を研究および調査することに関する。他の実施形態は、表現型およびエンドフェノタイプの識別および／または研究に関する。さらに他の実施形態は、治療標的の識別に関する。

30

【0070】

本開示の態様は、速い時間尺度における、障害／疾患状態の人工的な誘発を対象とする。C1V1等のオプシンの使用が、加速した光周期に関する特性に基づいて、特に有用である。さらに、ある特定の実施形態は、可逆的な疾患状態を可能にし、それは、疾患状態を呈する場合および疾患状態を呈さない場合の、試験のための基準／対照点を確立するため、および／または同じ動物に対する治療効果を試験するために、特に有用であり得る。C1V1等のオプシンの使用は、光源を使用した細胞の制御を可能にする。C1V1は、光に反応して、細胞の膜電位に変化をもたらす。光の除去およびそれに続くC1V1活性化の休止は、細胞が、そのベースライン状態に戻ることを可能にする。種々の他の可能性が存在し、そのいくつかは、本明細書にさらに詳細に説明される。

40

【0071】

本開示の種々の態様は、C1V1オプシンのE122T突然変異を対象とする。本開示のある特定の実施形態では、E122T突然変異は、C1V1またはその変異形の最大吸収を、未変異オプシンに対して赤色光スペクトルに偏移させる。

【0072】

種々の本開示の実施形態は、哺乳動物細胞での発現のために修飾され、緑色光スペクトルでの最大吸収のためにChR2に対して偏移された、オプシンに関する。C1V1オプシンは、オプシンの組み合わせに由来し、それが由来するオプシンのいずれかよりも高い

50

レートで発現する。オプシン C 1 V 1 は、ボルボックスチャネルロドプシン ( V C h R 1 ) およびコナミドリムシチャネルロドプシン ( C h R 1 ) に由来する。結果として得られるオプシンである C 1 V 1 およびその変異形は、530 nm ~ 546 nm の波長で、最大吸収を有する。

【 0 0 7 3 】

本開示のある特定の態様は、C 1 V 1 のさらなる修飾形を対象とする。例えば、ある特定の実施形態は、赤色光スペクトルに向かって C 1 V 1 の最大吸収を偏移させる、突然変異 E 1 2 2 T を含む。他の修飾は、さらなる突然変異 E 1 6 2 T を含み得、実験は、E 1 2 2 T 突然変異によって提供される赤方偏移に加えて、加速した光周期を提供することを示唆する。

10

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、V C h R 1 に由来し、C h R 1 の相同配列で置換される輸送配列を有する、膜貫通分子を提供する。いくつかの実施形態では、分子は、突然変異 E 1 2 2 T をさらに含む。他の実施形態では、分子は、E 1 6 2 T および E 1 2 2 T に突然変異をさらに含む。ある特定の実施形態では、分子は、緑色光に応答して、イオンチャネルを活性化する。一実施形態では、分子は、およそ 546 nm の最大光吸収を有する。別の実施形態では、分子は、およそ 535 nm の最大光吸収を有する。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、動物細胞であって、赤色光に応答性であるイオンチャネルを発現する、一体化した外因性分子を含み、外因性分子は、V C h R 1 に由来し、C h R 1 からの相同配列によって置換される、その膜輸送配列を含む、動物細胞を提供する。いくつかの実施形態では、外因性分子は、E 1 2 2 T をさらに含む。他の実施形態では、細胞は、それぞれ、405 nm および 560 nm の波長を有する光に応答して、約 14 % ~ 94 % の神経発火率を有する。他の実施形態では、細胞は、それぞれ、405 nm および 560 nm の波長を有する光に応答して、約 11 % ~ 72 % の神経発火率を有する。

20

【 0 0 7 6 】

本開示のさらなる例示的実施形態は、C h R 2 配列を全く含まず、個別では十分に発現しない 2 つのオプシン遺伝子に由来し、本明細書に C 1 V 1 と称される、ハイブリッド C h R 1 / V C h R 1 キメラの使用に関する。本開示の実施形態はまた、K i r 2 . 1 チャネルから導出される膜輸送シグナルの付加を通じた、V C h R 1 の膜標的化の改善に関する。V C h R 1 - E Y F P を発現する培養ニューロンからの共焦点画像は、C h R 2 と比較して、細胞内タンパク質の大部分を明らかにしたため、K i r 2 . 1 チャネルから導出される膜輸送シグナル ( t s ) を、V C h R 1 の膜標的化を改善するために使用した。この V C h R 1 - t s - E Y F P の膜標的化は、V C h R 1 - E Y F P と比較してわずかに強化されたが、V C h R 1 - t s - E Y F P を発現する培養海馬ニューロンから記録された平均光電流は、V C h R 1 - E Y F P のものよりもわずかに大きかっただけである。したがって、本開示の実施形態は、ヘリックスを、他の C h R からの対応するヘリックスと交換することによって修飾されている V C h R 1 に関する。例えば、ヘリックス 1 および 2 が C h R 1 からの相同セグメントで置換された 2 つのキメラに、堅調な改善が発見された。スライス部位が、ヘリックス 2 と 3 の間 ( C h R 1 の残基 A 1 a 1 4 5 ) の細胞内ループにあるか、またはヘリックス 3 ( C h R 1 残基 T r p 1 6 3 ) 内にあるかに関わらず、結果として得られるキメラは、いずれも、堅調に発現され、同様に強化された光電流およびスペクトル特性を示した。この結果は、C h R 1 が、ほとんどの哺乳動物宿主細胞の膜での発現が弱く、そこへの統合が不十分であるため、予想外であった。

30

【 0 0 7 7 】

本開示の特定の態様は、神経科学に適した微生物オプシン遺伝子に関し、インタクトの哺乳動物の脳内の特定の細胞型において、光パルス列が、ミリ秒の時間尺度の膜電位変化へと変換することを可能にするものである ( 例えば、チャネルロドプシン ( C h R 2 ) 、ボルボックスチャネルロドプシン ( V C h R 1 ) 、およびハロロドプシン ( N p H R ) ) 。C h R 2 は、単細胞の緑藻類コナミドリムシに由来するロドプシンである。本明細書に

40

50

使用される際の用語「ロドプシン」は、少なくとも 2 つの構成要素、すなわち、オプシンタンパク質、および通常はレチナール（レチナルアルデヒド）である共有結合される補因子を含む、タンパク質である。ロドプシン Ch R 2 は、もともとはコナミドリムシゲノム中のクラミオプシン（Chlamyopsin）-4（Cop4）と称された、チャネルオプシン-2（Chop2）というオプシンに由来する。1 つの脱分極化チャネルロドプシンである Ch R 2 の時間的な特性は、時間が正確な活動電位列の生成をもたらす、速い活性化および非活性化動態が挙げられる。長い時間尺度の活性化を要する用途については、通常は速いチャネルロドプシンのオフ動態を、遅延させることができることが発見された。例えば、チャネルロドプシンのある特定の実装では、事実上、脱分極化が所望される全時間に、1 mW / mm<sup>2</sup> の光を適用し、これは、望ましいものに満たなくてもよい。

10

#### 【0078】

本明細書における考察の多くは、Ch R 2 を対象とする。別段に示されない限り、本開示には、多数の類似した変異形が含まれる。例には、Chop2、Ch R 2 - 310、Chop2 - 310、およびボルボックスチャネルロドプシン（VCh R 1）が挙げられるが、これらに限定されない。VCh R 1 のさらなる詳細については、"Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from Volvox carteri," Nat Neurosci. June 2008, 11(6):631-3. Epub 2008 Apr 23 を参照することができ、その開示は、参照によりその全体が完全に本明細書に組み込まれる。他の実装では、類似の修飾を、他のオプシン分子に行ってもよい。例えば、修飾 / 突然変異を、Ch R 2 または VCh R 1 変異形に対して行ってもよい。さらに、修飾した変異形を、光活性化イオンポンプと組み合わせて使用することができる。

20

#### 【0079】

本開示の実施形態には、天然に存在する配列の、比較的軽微なアミノ酸の変異形が含まれる。1 つの例では、変異形は、天然に存在する配列のタンパク質配列と、約 75 % を上回って相同である。他の変異形では、相同性は、約 80 % を上回る。さらに他の変異形は、約 85 % を上回る、90 % を上回る、またはさらに約 93 % ~ 約 95 % 程度に高い、または約 98 % の相同性を有する。この文脈における相同性とは、配列の類似性または同一性を意味するが、同一性がほしい。この相同性は、配列分析において既知の標準的な技術を使用して、判定することができる。本開示の実施形態の組成物には、本明細書に提供されるタンパク質および核酸配列が含まれ、提供される配列と約 50 % を上回って相同である、提供される配列と約 55 % を上回って相同である、提供される配列と約 60 % を上回って相同である、提供される配列と約 65 % を上回って相同である、提供される配列と約 70 % を上回って相同である、提供される配列と約 75 % を上回って相同である、提供される配列と約 80 % を上回って相同である、提供される配列と約 85 % を上回って相同である、提供される配列と約 90 % を上回って相同である、または提供される配列と約 95 % を上回って相同である、変異形が含まれる。

30

#### 【0080】

本明細書に使用される場合、「標的細胞の刺激」は、概して、細胞の特性の修飾を説明するために使用される。例えば、標的細胞の刺激は、標的細胞の脱分極化または分極化につながり得る細胞膜の特性の変化をもたらし得る。具体的な例では、標的細胞は、ニューロンであり、刺激は、ニューロンによるインパルス（活動電位）の生成を促進または阻害することによって、インパルスの伝達に影響を及ぼす。

40

#### 【0081】

光活性化オプシンに関するさらなる詳細については、「Optically-Base d Stimulation of Target Cells and Modifications Thereto」と題される、Deisserothらへの国際公開第 WO 2010 / 056970 号を参照することができ、これは、参照によりその全体が本明細書に完全に組み込まれる。

50

## 【実施例】

## 【0082】

実施例1：キメラチャネルロドプシン変異形C1V1の開発

この実施例では、皮質のE/I上昇の駆動および皮質切片での振動の監視、ならびに生きた動物でのインピボ実験を可能にするであろう手段を、1) 用量反応の調査を可能にする、さらにより高い力価、2) E/Iバランスの段階様の変化を可能にする低い脱感作、および3) 同じ調製物内での異なる集団の相対的な駆動を可能にする、赤方偏移した励起、の3つの主要な特性とともに、模索した。

## 【0083】

これらの実験を、まず、赤方偏移および低下した脱感作の両方を示す<sup>1-4</sup>、VChR1に試みたが、以前の調査は、VChR1を発現する細胞における光電流が小さい(-100~150 pA<sup>1-4</sup>)ことを示唆し、下流細胞(示されない)では強いシナプス活性を誘発しなかった。実際に、細胞にVChR1を発現することを初めて試みたとき、以前の発見と一致する、小さな光電流のみが観察された(図1A)。VChR1-iS-EYFPを生成するために、Kir2.1チャネルから導出される膜輸送シグナルを付加することは、VChR1-EYFPと比較して、ごく限られた光電流の強化傾向をもたらした(図1B)。しかしながら、ChR2において、膜貫通セグメントをChR1からの相同領域で置換することは、膜の標的化を増加させ、光電流を強化したことに留意し、VChR1のヘリックスと、他のChRからの対応するヘリックスとの間の類似の系統的交換が、同様に、HEK細胞において強化された膜発現をもたらすという仮説を立てた。

## 【0084】

## 材料および方法

キメラチャネルロドプシン変異形C1V1を、重複伸長PCRにより、野生型またはヒトコドン最適化のいずれかのチャネルロドプシン-1を、ヒトコドン適応VChR1(GenBankTM受託番号ACD70142.1)と融合させることによって生成した。C1V1スプライス変異形を、重複PCRによって生成した。変異形1は、ChR1の最初の145のアミノ酸およびVChR1のアミノ酸102~316を含有していた。変異形2は、ChR1の最初の162のアミノ酸およびVChR1のアミノ酸119~316を含有していた。結果として得られたキメラPCRフラグメントを、CaMKIIプロモータ下で、pECPF-N1(Clone tech, Mountain View, CA)およびレンチウイルス発現ベクターにクローニングした。膜輸送シグナルは、Kir2.1チャネル1から導出した。突然変異は、コード配列およびスプライス部位のシークエンシングによって確認した。AAV仲介の遺伝子送達については、CaMKIIプロモータとともに、オプシン-EYFP融合体を、pAAV2-MCSベクターの修飾形にサブクローニングした。Cre依存性オプシンの発現は、オプシン-EYFPカセットを、伸長因子1a(EEF-1)プロモータの制御下で、互換性のないlox部位(loxPおよびlox2722)の対の間に逆向きにクローニングして、二重floxの逆位オープンリーディングフレーム(D10)を生成することによって、達成した。全ての構築物は、Deisseroth Lab([www.optogenetics.org](http://www.optogenetics.org))から入手可能である。

## 【0085】

HEK293細胞を、10%ウシ胎仔血清、2 mMグルタミン(Biochrome, Berlin, Germany)、および1%(w/w)ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したダルベッコ基礎培地で培養した。細胞を、0.175×10<sup>6</sup>細胞/m<sup>2</sup>の濃度でカバースリップに播種し、1 μMのオールトランスレチナールを補充した。一過的なトランスフェクションを、Fugene 6(Roche, Mannheim, Germany)を用いて行い、20~28時間後に記録を行った。一過的にトランスフェクトしたHEK293細胞内の光電流を、従来の全細胞パッチクランプにより記録した。外部溶液は、140 NaCl、2 CaCl<sub>2</sub>、2 MgCl<sub>2</sub>、2 KCl、10 HEPES(pH 7.2)を含有した[mM]。内部溶液は、110 NaCl、10 EG

10

20

30

40

50

TA、2 MgCl<sub>2</sub>、1 CaCl<sub>2</sub>、5 KCl、10 HEPES (pHは、CsOHまたはHClのいずれかを使用して、7.2に調節した)を含有した[mM]。パッчピペットを、微小ピペット引具モデルP-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA)を使用して、1.5~2Mの抵抗でマイクロヘマトクリット管(Hecht-Assistant, Sondheim, Germany)から引き出した。HEK細胞の全細胞パッチクランプを、EPC 7 (HEKA, Elektronik GmbH, Lambrecht, Germany)增幅器を用いて行った。アナログデータを、20 kHzでサンプリングし、Digidata 1440 (Molecular Devices, Foster City, CA)を用いてデジタル化し、pClamp 10.1ソフトウェア (Molecular Devices, Foster City, CA)を使用して、表示した。波長依存性を記録するために、Polychromome Vユニット (TILL Photonics, Planegg, Germany)からの光導体を、Olympus IX70顕微鏡の落射蛍光ポートに載置した。対物レンズに光を反射するためにビーム分割器 (70%R/30%T)を使用し、カバースリップ上において、470 nmで約  $1 \times 10^{22}$  光子  $m^{-2} s^{-1}$  の最終光子密度をもたらした。作用スペクトルの記録には、50%の強度の光のみを使用した。polychromome Vユニットを、pClampソフトウェアと同期させたTillvisionソフトウェア (TILL Photonics, Planegg, Germany)で制御した。

## 【0086】

20

## 結果

興味深いことに、キメラにおける最も強い改善は、ヘリックス1および2が、ChR1からの相同体で置換された場合に見られた(図1C~D)。膜標的化および光電流の大きさについて、2つのキメラChR1-VChR1チャネルを、培養HEK293細胞において試験した。第1のものを、ChR1のA1a145後の第2の細胞内ループに結合させ、第2のものを、ChR1のTrp163後のヘリックス3内に結合させた(図1C)。いずれの変異形も、HEK293細胞で同程度に十分に発現したが(図1D)、培養ニューロンにおいては、第2の変異形がより強く発現し(図1E)、VChR1-EYFPと比較して、非常に強化されたピーク光電流( $888 \pm 128$  pA, n=11個の細胞,  $p < 0.0005$ )を示した(図1B)。作用スペクトルピークは、ChR2に対して強く赤方偏移したままであり(表1、図1F)、キメラのイオン選択性は、ChR2およびVChR1について以前に報告されたものと類似していた(図1G)。Kir2.1輸送配列を、このハイブリッドに付加することは、さらに増加した光電流をもたらす傾向を見せた( $1104 \pm 123$  pA, n=12個の細胞, VChR1-EYFPと比較して  $p < 0.0005$ 、C1V1-EYFPと比較して  $p = 0.23$ 、図1B、表1~2)。結果として得られるハイブリッドChR1/VChR1キメラは、ChR2配列を全く含まず、単独では十分に発現しない2つのオプシン遺伝子から顕著に誘導され、本明細書にC1V1と称される(図1A、H)。

## 【0087】

30

## 実施例2: C1V1の光電流動態の最適化

40

この赤方偏移したオプシンの速い非活性化特性<sup>2~8</sup>は、可視スペクトルの青色末端の方向に位置する波長によって活性化される、他のオプシンからの最大限の時間的ならびにスペクトル的な分離に必要となるであろう。しかしながら、C1V1-ts-EYFPによって提示される光電流は、ChR2よりも10倍を上回って遅い減衰、およびもともとのVChR1よりもさらに遅い減衰を示し(図2A、To<sub>off</sub>が、それぞれ、C1V1-ts-EYFP (n=4) およびVChR1-EYFP (n=5)に対して、 $156 \pm 12$  ms および $132 \pm 12$  ms、表1)、速い発火レートを要する用途へのC1V1の使用を排除する可能性があることが見出された。C1V1の光電流動態を補正するために、発色団領域に、既知の構造モデル<sup>2~2</sup>、<sup>2~8</sup>を使用して、より速い光周期動態、減少した不活性化、および減少した青色吸収を有する突然変異を探した(図1H)。次に、この突然

50

変異が不活性化を減少させることを示す、ヘリックス2におけるグルタミン酸塩が豊富なモチーフの研究に基づいて<sup>3</sup>、グルタミン酸塩-122をスレオニンに突然変異させた。

### 【0088】

#### 材料および方法

C1V1ベクターでの全ての点突然変異は、部位特異的な突然変異生成 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) によってプラスミドにおいて生成した。膜輸送シグナルは、Kir2.1チャネルから導出した。突然変異は、コード配列およびスプライス部位のシークエンシングによって確認した。

### 【0089】

#### 結果

ChETA - 相同突然変異E162T<sup>2,8</sup>は、光周期を、ほぼ3倍、著しく加速させた (Toff 58 ± 4.7ミリ秒、n = 7個の細胞、図2A、表1)。驚くべきことに、ChR2または他の微生物オプシンにおける類似の突然変異は、赤方偏移をもたらし<sup>2,8</sup>、<sup>2,9</sup>、C1V1においては、この突然変異は、望ましくない方向にある作用スペクトルを、浅色から530nmに偏移させた (図1F、表1)。C1V1-E122Tは、ChR2の46%の非活性化と比較して、26%不活性化しただけであり (図2B、表1)、加えて、スペクトルは、さらに546nmまで赤方偏移され (図1F、表1)、C1V1作用スペクトルの厄介な青色ショルダーの顕著な損失を示した。最終的に、二重変異E122T/E162Tにおいては、作用スペクトルの赤方偏移および青色ショルダーの非存在を保持しながらも、電流の不活性化は、E122T変異のものよりもさらに低くさえあり、光周期は、E162Tと比較してもさらに速かった (Toff 34 ± 4.9ミリ秒、n = 7個の細胞、図2A、図2C、表1)。さらに、E122変異が、光電流の振幅を大幅に減少させる一方で (図2D)、二重変異は、本来のC1V1-tsの非常に高い電流特性を再現した。したがって、個々の突然変異の複数の驚くべきかつ有用な特性は、二重変異の輸送強化されたC1V1キメラにおいて保存された。

### 【0090】

#### 表1: ChR2、VChR1、およびC1V1変異形のスペクトル/動態特性

2ミリ秒の光パルスをピーク活性化波長に使用して、HEK細胞におけるピーク活性化波長を記録した。2ミリ秒の光パルスを最大活性化波長に使用して、非活性化動態 (Toff) およびピーク光電流を培養海馬ニューロンにおいて記録した。ChR2とのコンビナトリアル活性化に最適な変異形を識別するために、405nmおよび560nmでの反応率をHEK細胞において記録した。光電流の脱感作を、300ミリ秒の光パルスを使用して記録し、ピーク光電流 (Imax) の減衰を定常状態に対して定量化した。

10

20

30

【表1】

	最大吸収 (nm)	Toff 動態 pH7.2(ミリ秒)	-60 Mv*でのピーク 電流 (pA)	比率 405/560	脱感作 %	
ChR2	460±6 (N=5)	10 ±1 (N=5)	816±181 (N=5)	60% : 8%	65±8 (N=5)	
					(N=7)	
VChR1	543±7 (N=7)	85 ±11 (N=6)	284±54 (N=5)	9% : 82%	53±10 (N=18)	
					(N=7)	
C1V1	539 ±4 (N=10)	60 ±6 (N=6)	1035±158 (N=6)	28% : 86%	46±12 (N=14)	10
					(N=10)	
C1V1(E162T)	530 ±4 (N=6)	23 ±5 (N=4)	1183±53 (N=6)	20% : 71%	41±12 (N=7)	
					(N=6)	
C1V1(E122T)	546 ±5 (N=4)	55 ±8 (N=5)	572±21 (N=5)	14% : 94%	26±6 (N=4)	
					(N=4)	
C1V1(E122T, E162T)	535 ±5 (N=7)	12 ±1 (N=5)	1072±89 (N=9)	11% : 72%	11±9 (N=9)	
					(N=7)	

表2：表1に示される全オプシンにわたるピーク光電流の振幅に対する、対応のないt検定からのP値比較の概要。光電流は、540 nm (VChR1およびC1V1変異形)または470 nm (ChR2(H134R))で2ミリ秒の光パルスを使用して、培養ニューロンにおいて記録した。

【表2】

VChR1-YFP	VChR1-ts-YFP	C1V1-YFP	C1V1-ts-YFP	C1V1(E162T)-ts-Y	C1V1(E162T/E122T)-ts-YFP	ChR2(H134R)-YFP	VChR1-YFP
1.0000	0.5770	0.0188	0.0029	6.5E-06	1.1E-05	0.0448	VChR1-YFP
	1.0000	0.266	0.0039	1.1E-06	0.0015	0.0579	VChR1-ts-YFP
		1.0000	0.3372	0.0399	0.0788	0.8175	C1V1-YFP
			1.0000	0.4099	0.8442	0.4222	C1V1-ts-YFP
				1.0000	0.3254	0.1490	C1V1(E162T)-ts-Y
					1.0000	0.3001	C1V1(E162T/E122T)-ts-YFP
						1.0000	ChR2(H134R)-YFP

【0091】

このように、個々の突然変異の複数の有用な特性は、二重変異体において、ともに保存された。

【0092】

### 実施例3：前頭前皮質ニューロンにおける新規なC1V1キメラの使用

これらの新規なC1V1オプシン遺伝子をニューロンにおいて試験するために、C1V1-ts-EYFPを符号化するレンチウイルスベクターおよび点突然変異の組み合わせを生成した。これらのオプシンを、次いで、培養海馬ニューロンに発現させ、同一な刺激条件下(2ミリ秒のパルス、542 nmの光、5.5 mW mm<sup>-2</sup>)で全細胞光電流を記録して、光電流振幅における改善が、VChR1と比較して、増加したC1V1の発現から直接的にもたらされたかどうかを判定した。

20

30

40

50

## 【0093】

## 材料および方法

動物

野生型またはトランスジェニックのパルプアルブミン : : C r e C 5 7 / B L 6 J 雄性マウスを、3 ~ 5 匹の群でケージに収容し、餌および水を自由に摂取させて 12 時間の逆明 / 暗周期で保管した。実験プロトコルは、Stanford University I A C U C に認可されており、National Institutes of Health 基準の Care and Use of Laboratory Animals についての指針を満たす。

## 【0094】

10

## 海馬および皮質ニューロンにおける全細胞パッチクランプ電気生理学

初代海馬培養物を、P O S プラーグドーリーラットから単離し、Matrigel ( I n v i t r o g e n ) コーティングしたガラスのカバースリップに蒔き、F U D R で処理して、神経膠の過剰成長を阻害した。内毒素不含プラスミド D N A を、H E P E S 緩衝化した生理食塩水 / C a P O 4 混合物を使用して、培養ニューロンにトランスフェクトした。蛍光タンパク質発現によって識別される個々のニューロンからの電気生理学的記録を、3 ~ 5 M のガラスピペット中の標準的な内部溶液 ( [ m M ] 1 3 0 K グルコン酸塩、1 0 K C l 、1 0 H E P E S 、1 0 E G T A 、2 M g C 1 2 、K O H で p H 7 . 3 ) を使用して、タイロード培地 ( [ m M ] 1 5 0 N a C l 、4 K C l 、2 M g C 1 2 、2 M g C 1 2 、1 0 D - グルコース、1 0 H E P E S 、N a O H で p H 7 . 3 5 ) において取得した。皮質切片の生理学については、8 ~ 9 週齢の野生型 C 5 7 B L / 6 J または事前にウイルスを注入した P V : : C r e マウスからの 3 0 0 g m の急性冠状切片を、ビプラトーム ( L e i c a ) を使用して、氷冷スクロース切断溶液 ( [ m M ] 1 1 D - グルコース、2 3 4 スクロース、2 . 5 K C l 、1 . 2 5 N a H 2 P O 4 、1 0 M g S O 4 、0 . 5 C a C 1 2 、2 6 N a H C O 3 ) に得た。切片を、3 2 で 1 時間、酸素化した人工脳脊髄液 ( A C S F ; [ m M ] 1 2 4 N a C l 、3 K C l 、1 . 3 M g C 1 2 、2 . 4 C a C 1 2 、1 . 2 5 N a H 2 P O 4 、2 6 N a H C O 3 、1 0 D - グルコース ) 中で回復させた。蛍光タンパク質の発現を識別した後、一定な A C S F 灌流下で、示される前頭前皮質層から個々のニューロンパッチを取得した。広い波長のキセノンランプ源 ( S u t t e r I n s t r u m e n t s D G - 4 ) からフィルタ処理した光を、顕微鏡 ( L e i c a D M - L F S A ) の蛍光ポートに結合させた。バンドパスフィルタ ( S e m r o c k ) は、2 0 n m のバンド幅を有し、追加の減光フィルタ ( T h o r L a b s ) で調節して、スペクトル全体にわたって光パワーの出力を均一化した。

20

## 【0095】

30

培養細胞の画像を、露出 1 0 0 ミリ秒、感度 3 0 で R e t i g a E x i C C D カメラ ( Q i m a g i n g , I n c . ) を使用して、同じ顕微鏡において取得した。照射パワー密度は、標準的な E Y F P フィルタセットで、5 0 0 n m において 1 2 m W m m - 2 であった。蛍光の定量化は、I m a g e J ソフトウェアを用いて、体細胞および近位神経突起を含む領域を標識化し、光電流は面積あたりの平均チャネル発現ではなく膜結合チャネルの総数と関連する傾向にあるため、平均蛍光ではなく、その領域の全統合ピクセル強度を各細胞に対して計算することによって、行った。

40

## 【0096】

ウイルスの調製および注入

レンチウイルス仲介および A A V 仲介の両方の遺伝子送達を、マウスにおけるオプシンの異種発現に使用した。示されるオプシンを、皮質の興奮性ニューロンを標的とするヒトカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ I I ( C a M K I I ) プロモータ、または C r e 誘発性カセットおよび続くウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素 ( W P R E ) と併用した伸長因子 1 a ( E F - 1 a ) のいずれかによって、駆動した。C r e 誘発性組み換え A A V ベクターは、University of North Carolina

50

a Vector Core (Chapel Hill, NC, USA) によって生成し、パルプアルブミン : : Cre トランスジェニックマウスと併せて使用して、パルプアルブミン陽性の介在ニューロンを標的化した。簡単にいうと、University of North Carolinaにおいて、AAV構築物を pAAV2-MCS の修飾形にサブクローニングし、AAV5 コーティングしたタンパク質で血清型にして、ウイルスベクターコアによってパッケージ化した。AAVベクターの最終的なウイルス濃度は、 $1 \times 10^{12}$  ゲノム複製 (gc) / mL であった。レンチウイルス構成物を、報告した通りに生成した。全ての構築物は、Deisseroth Lab (www.optogenetics.org) から入手可能である。定位ウイルス注入を、Stanford University に認可されたプロトコルのもとに実行した。イソフルラン麻酔下に保った若齢 (4 ~ 6 週齢) のマウスを、定位フレーム (Kopf Instruments) に配置し、ブレグマおよびラムダ頭蓋計測点を使用して高さを合わせた。皮質組織への損傷が最小となるように、開頭術を実行した。10 μL のシリジおよび 35 g の勾配付きの針 (Word Precision Instruments) を使用して、辺縁系前頭前皮質 (Infralimbic prefrontal cortex) (IL、ブレグマから前方 1.8 mm、側方 0.35 mm、腹側 -2.85 mm) を標的とした。ウイルスを 0.1 μL / 分の速度で注入した。挙動研究のため、ウイルスを注入した対象に、さらに、局所送達用に付属の貫通性脳線維ありまたはなしのいずれかで、光の送達を促進するための慢性光ファイバー結合装置を埋め込み、記載のように皮質領域を標的化した (Doric Lenses, Canada)。貫通性線維を、同じ前方および側方の座標から -2.5 mm の深さに定位挿入し、頭皮の接着閉鎖 (Vetbond, 3M) の前に接着性合着用セメント (C&B Metabond) を使用して付着させた。手術からの回復後、動物に鎮痛剤を投与した。

#### 【0097】

##### 結果

個々の構築物を発現する培養海馬ニューロンからの記録および統合された蛍光読み出しが、それぞれの個々の細胞から得た。個々の細胞において、蛍光レベルは、構築物全体で、測定された光電流振幅と緊密に相關していた (図 3 A)。したがって、強く増加した C1V1 の光電流は、主として、ニューロンにおける改善された発現からもたらされたと結論付けた。二重変異 C1V1 - E122T / E162T は、試験した全ての範囲 (光電流の大きさ、不活性化動態、および作用スペクトル) にわたって優れた能力を示したため、ChR2 (H134R) に対する能力もまた、統合された体細胞 YFP 蛍光およびピーク光電流を測定することによって直接比較した。驚くべきことに、C1V1 - E122T / E162T 細胞は、同等の蛍光レベルで、ChR2 - H134R 細胞よりも強い光電流を示し (図 3 B)、単位コンダクタンスが増加した可能性を示唆した。

#### 【0098】

C1V1 - E122T / E162T が、錐体ニューロン内でスパイクを光学的に駆動するためには適であるかどうかを調べるために、CaMKIIa プロモータ下で、C1V1 - E122T / E162T - ts - EYFP 遺伝子を含むアデノ随伴ウイルスベクター (AAV5 - CaMKIIa - C1V1 - E122T / E162T - ts - EYFP) を生成し、そのウイルスをマウスの前頭前皮質に注入した。2 ミリ秒の光パルス列で、急性切片内の発現ニューロンからの反応を記録し、同じ周波数で一連の電流注入 (10 ミリ秒、200 pA) に対する反応と比較した。560 nm のパルス列に対するニューロンの周波数反応は、同じ周波数での電流注入に対する反応と区別がつかないことが見出され (図 3 C、2 つの切片において n = 6 個の細胞)、C1V1 動態ではなく、細胞の固有特性が、高レートでスパイク性能を制限することを示唆する。類似の性能特性が、緑色、黄色、および琥珀色の照射範囲にわたって見られ、中程度の光強度 (< 10 mW / mm<sup>2</sup>) で、哺乳動物におけるインビオ用途に好適な強い能力を有した (図 3 D)。実際に、540 nm および 590 nm での反応は、予想通り、低い光パワーで低い忠実度を有し、時間が正確な活動電位を誘起するという点で、同様に効果的であった (図 3 D)。

## 【0099】

著しく赤方偏移した作用スペクトルにより、C1V1が、これまでいずれのオプションにも報告されておらず、改善されたスペクトル分離ならびにより深い組織でのニューロンの制御を可能にするために重要な可能性のある、赤色光でのスパイクを駆動するためすら使用できる可能性を、考慮した。したがって、あらゆるC1V1変異形が、遠赤色光を使用してスパイクを駆動するために使用可能であるかどうかを試験した。C1V1-E122Tの動態は、C1V1-E122T/E162Tのものよりも遅かったが、その作用スペクトルは、全ての変異形の中で最も赤方偏移し(図1F)、実際に、C1V1-E122Tを発現する細胞は、二重変異体を発現する細胞よりも強く赤色光(630nm)に反応した(図3E、上)。動態上の630nmでのE122T変異は、545nmでのものよりも遅かったが(図3F)、光電流は、定義されたスパイク列を誘発するには十分な(図3H、図3E下)、より長いパルスの630nmの光を中程度の強度で使用して動員した(図3G)。

## 【0100】

実施例4：マウスの前頭前皮質ニューロンからの生体脳切片における新規なC1V1キメラの使用

本研究により、同じ微小回路内に存在する抑制性および興奮性ニューロンを、C1V1変異形を導入することにより標的化できるかどうかを判定することにした。生体脳切片内の2つのニューロン集団の独立した活性化を調査し、この場合、CaMKII-C1V1-E122T/E162Tts eYFPおよびEF1a-DIO-ChR2-H134R-EYFPを、PV::CreマウスのmPFCに発現させた。

## 材料および方法

## 【0101】

8~9週齢の野生型C57BL/6Jまたはウイルスを事前に注入したPV::Creマウスから単離した300μmの急性冠状切片を、ビブラトーム(Leica)を使用して、氷冷スクロース切断溶液([mM]11D-グルコース、234スクロース、2.5KCl、1.25NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10MgSO<sub>4</sub>、0.5CaCl<sub>2</sub>、26NaHCO<sub>3</sub>)に得た。切片を、32で1時間、酸素化した人工脳脊髄液(ACSF、[mM]124NaCl、3KCl、1.3MgCl<sub>2</sub>、2.4CaCl<sub>2</sub>、1.25NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、26NaHCO<sub>3</sub>、10D-グルコース)中で回復させた。蛍光タンパク質の発現を識別した後、一定なACSF灌流下で、示される前頭前皮質層から個々のニューロンパッチを取得した。広い波長のキセノンランプ源(Sutter Instruments DG-4)からフィルタ処理した光を、顕微鏡(Leica DM-LFS A)の蛍光ポートに結合させた。切片の生理学データを、Matlabからインポートし、特注のソフトウェアを使用して分析した。Sohalら<sup>55</sup>によって記載のように、ウェーブレット法を使用してパワースペクトルを計算した。簡単にいうと、各周波数fに対して、記録されたトレースを、まずf±5Hzの間のバンドパスフィルタでフィルタ処理したトレースを、次に、ウェーブレット関数で畳み込みを行い、

## 【数1】

$$W(f, t) = s(t) * g(f, t)$$

$$G(f, t) = e^{(-t^2)(2\sigma^2 s^{-10f} t^{-1})}$$

式中、\*は、畳み込みを意味する、=5/(6f)。次に、500ミリ秒枠にわたるW(f, t)の振幅の二乗を、種々の周波数でのパワーを測定するために使用した。切片記録からの全てのパワースペクトルを、1/fに対して正規化した。

## 【0102】

10

20

30

40

50

培養細胞画像を、露出100ミリ秒、感度30でRetiga Exi CCDカメラ(Qimaging inc.)を使用して取得した。照射パワー密度は、標準的なEYFPフィルタセットで、500nmにおいて12mW mm<sup>-2</sup>であった。蛍光の定量化は、ImageJソフトウェアを用いて、体細胞および近位神経炎を含む領域を標識化し、光電流は面積あたりの平均チャネル発現ではなく膜結合チャネルの総数と関連する傾向にあるため、平均蛍光発光ではなく、その領域の全統合ピクセル強度を各細胞に対して計算することによって、行った。

#### 【0103】

電流クランプを使用して、単一の錐体細胞を一連のシミュレーションEPSC波形で刺激した。個々のsEPSCイベントは、200pAのピーク電流量を有し、2ミリ秒の時定数で減衰した。各実験は、ランダウ恩を最小化するために、それぞれ長さ10秒で、5秒間隔の10個の掃引に分割した。各掃引を、500ミリ秒のセグメントに分割した。各500ミリ秒のセグメント中のsEPSCの総数は、0～250の間で均一な分布から無作為に選択した。次に、500ミリ秒のセグメント内のsEPSCの時間を、全セグメントに及ぶ均一な分布から無作為に選択し、非同期ニューロンの集団からの興奮性入力をシミュレートした。実験的に、これらの刺激パラメータは、0～30Hzの発火レートで、錐体ニューロンを確実に駆動した。ベースラインとして示される条件において、590nmの光の10秒のパルスを、sEPSCプロトコルを実行する前に、オプシンを完全に不活性化するために送達した。オプシンが活性化された条件では、470nmの光の1秒のパルスを、sEPSCプロトコルより先に行う。

#### 【0104】

改変されたE/Iバランスが情報処理に与える正味の影響を理解するために、I-O曲線の形状および反応の変動性における関連変化を捉える、各ニューロンの入力sEPSCレートと出力スパイクレートとの間の相互情報量をコンピュータで算出した。まず、時間ビンで区切ることによりsEPSCレートおよびスパイクレートの結合分布、sEPSCレート、およびスパイクレートを推定し、結合ヒストグラムを構築した。時間ビンは、125ミリ秒幅であり、sEPSCレートを、等間隔の10個の0～500Hzのビンに分割したが、相互情報量の結果は、広範なビンパラメータにわたり一貫していた。スパイクレートを、時間ビン幅が得られる最小の有意なビン幅を使用して、ビンに区切った（例えば、125ミリ秒の時間ビンに対して8Hzのビン幅）。この結合ヒストグラムから、前述のように、コンピュータ相互情報量を、コンピュータ計算し、反応エントロピーとノイズエントロピーとの間の差異を等しくした。

#### 【0105】

反応エントロピーにより、ニューロンの出力スパイクレートにおける不確実性の合計量を定量化する。ノイズエントロピーにより、入力レートが得られる出力スパイクレートに残る不確実性を定量化する。神経反応が伝達する入力刺激についての最大情報は、刺激セットのエントロピーであることに留意されたい。等間隔の10個の入力sEPSCレートビンおよびこれらのビンにわたる均一な入力レートの分布に対して、入力レートのエントロピーは、 $\log_2(10) = 3.322$ ビットである。

#### 【0106】

不十分なサンプリングの確率分布から計算した相互情報量は、上方にバイアスされ得る。結果として、相互情報量、反応エントロピー、およびノイズエントロピーの全ての報告値は、不十分なサンプリングのため、バイアスを補正した。この補正は、全データのより小さい分数（2分の1から8分の1）から値をコンピュータ計算し、無限データの限界を外挿することによって行う。125ミリ秒の時間枠を使用して、補正係数は、常に0.07ビット未満であった。

#### 【0107】

ベクターを上述のように作製し、注入を行った。

#### 【0108】

結果

10

20

30

40

50

この一連の多重改変オプシン遺伝子を使用して、細胞のコンビナトリアル制御の可能性およびインタクトな哺乳動物類系における投射を調査した。まず、同じ微小回路内に存在する興奮性および抑制性ニューロンが、C1V1変異形および従来のChRをこれらの2つの細胞集団内へ個別に導入することによって別々に標的化することができるかどうかを調べた。C1V1-E122T/E162Tを発現する培養海馬ニューロンは、2ミリ秒の緑色光パルス(560nm)に反応してスパイクするが、紫色光パルスではスパイクしないことが見出された。対照的に、ChR2-H134Rを発現する細胞は、2ミリ秒の405nmの光パルスに反応してスパイクするが、2ミリ秒の561nmの光パルスには反応しなかった(図4A)。したがって、この原理を生体脳切片内で試験し、この場合、AAV5-EF1a-DIO:ChR2-H134R-EYFPとともに、AAV5-CaMKIIa:C1V1-E122T/E162T-ts-mCherryを、PV:CreマウスのmPFCに発現させた(図4B)。いずれのオプシンをも発現しない錐体ニューロンにおいて、405nmの光パルスは、PV細胞の直接的な活性化のため、強く早い抑制性シナプス後電流を引き起こした(図4C)が、一方で、561nmの光パルスは、短潜EPSC(図4D)、および局所的な抑制性ニューロンを駆動するC1V1発現錐体細胞から生じることが予測される長潜の多シナプスIPSC(図4C)の両方を引き起こした。

#### 【0109】

オプトロード記録を用いて、インビオでのこれらの独立した細胞要素の励起を調査した(図4E、左)。錐体ニューロンのスパイクに対するPV細胞活性の抑制性効果を試験するために、種々のパルス間隔で、5Hzの紫色光パルス(PV細胞内でChR2を活性化するため)を、5Hzの緑色光パルス(興奮性錐体ニューロンでC1V1を活性化するため)より先に行う実験プロトコルを設計した。紫色光および緑色光のパルスが、100ミリ秒離れていた場合(図4E、上トレース)、緑色光パルスに対する反応は、紫色パルスによって影響されなかった。しかしながら、紫色パルスと緑色パルスとの間の遅延が減少するにつれて、緑色光に誘発されるイベントは、より容易に阻害されるようになり、光パルスが十分な同期性を示したときに完全に無効となった(図4E、下のトレース、要約データは図4F)。これらのデータは、インタクトな哺乳動物内でのコンビナトリアル光遺伝的活性化(1つの集団を単独で、または別のものとの正確な時間の組み合わせで駆動する)を示し、オプシンの速度および送達される光パルスの特性を利用する。

#### 【0110】

実施例5:視床網様核のニューロンに影響を及ぼす皮質視床(CT)および視床皮質(TC)のグルタミン酸軸索の独立した活性化の効果

直接的な細胞の体細胞刺激の代わりに、軸索投射に対するコンビナトリアル制御特性を検証するために、視床網様核のニューロン(nRT)に影響を及ぼす皮質視床(CT)および視床皮質(TC)のグルタミン酸軸索の独立した活性化の効果(図5A)を、視床切片において試験した。

#### 【0111】

##### 材料および方法

C57BL/6Jの野生型(出生後90~120日)を、ペントバルビタール(100mg/kg、腹腔内)で麻酔し、頭部を切除した。視床切片の調製および全細胞パッチクランプ記録を行った。記録は、Zeiss(Oberkochen, Germany)、Axioskop顕微鏡、および赤外線カメラを有する微分コントラスト光学を使用して視覚的に識別した、nRT(視床網様)およびTC(中継視床皮質)ニューロンから取得した。EPSCおよび電流クランプ記録については、内部溶液は、(mM単位で)120K-グルコン酸塩、11KC1、1MgCl<sub>2</sub>、1CaCl<sub>2</sub>、10Hepes、1EGTAを含有した。pHは、KOH(290mOsm)で7.4に調節した。E<sub>Cl</sub><sup>-</sup>は、ネルンストの式に基づいて約-60mVと推定した。電位は、-15mVの液体注入電位に補正した。電圧クランプ実験については、ニューロンを、-80mVでクランプし、EPSCを、GABA A受容体アンタゴニストピクロトキシン(50μM,

10

20

30

40

50

Tocris) の浴適用 (bath application) によって薬理学的に単離した。全ての記録条件において、アクセス抵抗を監視し、細胞は、実験過程にわたってアクセス抵抗が < 18 M であり、抵抗の変化が < 25 % であった場合にのみ分析に含めた。

#### 【0112】

600nL の rAAV5 / CamKII - hChr2 (H134R) - EYFP または 900nL の rAAV5 - CaMKII C1V1 (E122T / E162T) - TS - mCherry ウィルスを、それぞれ、出生 30 ~ 35 日後に、インピボで C57BL / 6J 野生型マウスの底腹側視床 (VB) またはパレル皮質に定位注入した。皮質内および視床内 (VB) 注入を、同じマウスを行った (n = 6)。(ブレグマから) 皮質表面の後方 1.3 mm、側方 3 mm、下方 1.15 mm に、皮質内注入を行った。視床内注入は、皮質表面の後方 1.7 mm、側方 1.5 mm、下方 3.5 mm であった。注入後約 2 ~ 3 ヶ月でマウスを屠殺し、水平方向の脳視床切片を、上述のように、光学刺激およびインピトロ記録のために作製した。CT - TC - nRT 経路を介した nRT ニューロンの 2 シナプス性活性化を避けるために、VB 視床を除去した。VB 視床を切片から切断することで、全ての光感受性細胞体を除去し、CTnRT および TC - nRT 投射の直接的な試験を可能にし、nRT ニューロンの電気的な膜特性に影響を及ぼすことがなかった (示されない)。Chr2 発現 TC および C1V1 発現 CT の軸索の光学的活性化を、それぞれ、光ファイバー (BFL37-300, ThorLabs) で nRT に突出する CT および TC 経路に沿って上流に送達される、40 nm および 560 nm のレーザー刺激 (5 ミリ秒期間の光パルス、2 ~ 3 mW) (OEM Laser Systems, MI) で行った。50 ~ 70 % の失敗 (30 ~ 50 % の成功)、固定された反応動態、および低い反応振幅変動性をもたらす光パワーとして定義される、最小の刺激強度を使用した。結果として生じる最小の誘起 EPSC は、おそらく、記録した細胞に対するシナプス前の単一の CT 軸索または TC 軸索の選択的な光学的活性化からもたらされたものである。刺激光パワーは、失敗の数が 0 になるまで、わずかに増加した (最小刺激より約 5 % 上回る)。CT および TC 入力を (同時に) 刺激し、最小の誘起 EPSC および EPSP (それぞれ独立して活動電位発火の閾値下) を、nRT 細胞において記録した。

#### 【0113】

統計的有意性を、適宜、対応 t 検定または対応のない両側 t 検定を使用して計算した。データを、Matlab Statistics ツールボックスまたは Microsoft Excel を使用して分析した。

#### 【0114】

##### 結果

TC 軸索の最小刺激は、nRT ニューロンに大きく速い興奮性シナプス後電流 (EPSC) を誘起し、一方で、CT 軸索の最小刺激は、nRT ニューロンに小さく遅い EPSC を誘起し (図 5B)、いずれもこれらの経路に典型的であった。

#### 【0115】

次に、CT および TC 入力のシナプス統合を、これらの 2 つの入力の間で可変の遅延条件下において調査した。各経路からの閾値下の EPSP は、5 ミリ秒以内で同時に起こる場合にのみ、活動電位発火が閾値上になった (図 5C ~ D)。C1V1 および Chr2 活性化の時間の正確性は、TC および CT 入力間の遅延の確実な制御を可能にし、したがって、皮質および視床の相互結合性、ならびに CT および TC の軸索の近似性のため、これまで、既存の電気的、薬理学的、または光遺伝的技術では観察不可能であった、nRT 細胞における効果的なシナプス統合の狭い枠 (- 5 ミリ秒) の決定を可能にした。これらの結果は、同じインタクトな調製物での異なる軸索投射の独立した活性化を初めて実証し、同じ標的細胞に対するそれらのコンビナトリアル効果を調べる。

#### 【0116】

実施例 6：同じ回路内で神経活性化の時間スペクトル分離を達成するための C1V1 および S5FO の使用

10

20

30

40

50

上の 2 つの調製物の両方において、可視スペクトルの紫色 (405 nm) および緑色 (560 nm) レーザーを使用して、2 つのオプシンの分離可能な活性化を達成した。405 nm のレーザーは、安全な非紫外光を送達するが、470 nm の光は、より深く組織を貫通し、散乱が少なく、より容易かつ経済的に一般的な青色光源から送達されるため、多くの用途については、青色応答性オプシンに 470 nm のレーザー光を使用することが好ましい場合がある。これは、470 nm の光が、C1V1 (図 1G)、ならびに C h R 2 を部分的に活性化させることになるため、不可能に思われる場合があるが、コンビナトリアル制御は、470 nm の光でさえも達成可能であり、SSFO の時間特性および C1V1 の赤方偏移性質の両方を利用して、インタクトな哺乳動物組織内での「時間スペクトル分離」を達成することができる。この可能性を検証するために、同じ調製物内で、安定して増強する興奮性または抑制性いずれかの細胞の律動的活性への影響を直接比較することが決定された (図 6A)。 10

#### 【0117】

##### 材料および方法

C h R 2 - D 1 5 6 A および S S F O を、部位特異的な突然変異生成 (Quikchange II XL、Stratagene) を使用して p L e n t i - C a M K I I - C h R 2 - E Y F P - W P R E ベクターに点突然変異を挿入することによって、生成した。ウイルス遺伝子送達、冠状脳の区分化、およびパッチクランプの記録を、上述のように行なった。C a M K I I a : : C 1 V 1 および D I O - S S F O を P V : : C r e マウスの m P F C に発現させるため、二重ウイルス注入を行なった。 20

#### 【0118】

S S F O を発現する細胞または組織を扱う際、周辺光による活性化を阻止するために、露光を最小化するように注意を払った。各実験の前に、S S F O チャネルの全てを暗状態に変換し、光電流の減少を阻止するために、20 秒のパルスの 590 nm の光を適用した。S S F O の活性化および非活性化スペクトルを取得するために、培養ニューロンからの記録は、電圧クランプモードで行なった。活性化スペクトルの記録のために、1 秒のパルスの種々の波長を適用し、続いて 10 秒の 590 nm パルスを適用した。非活性化スペクトルは、まず、1 秒の 470 nm パルスを適用して S S F O を活性化し、続いて 10 秒のパルスの種々の波長を適用することによって取得した。正味の活性化または非活性化は、それぞれ、第 1 または第 2 のパルスの後の光電流を、その細胞に対するピーク波長によって誘発された最大限の光電流変化で除することによる計算した。非活性化スペクトルの負の値は、例えば、10 秒の 470 nm パルスが、チャネルを非活性化するのではなく光電流にわずかな増加をもたらした、トレースからもたらされた。これは、S u t t e r D G - 4 でのこれらの記録に使用した、比較的広い (20 nm) バンドパスフィルタ幅の結果であり得る。中間波長 (470 nm ~ 520 nm) は、同じ理由から、チャネル集団に対して入り混じった効果を有することが予想される。 30

#### 【0119】

S S F O の統合特性についての光束計算は、各光パワーにおいて顕微鏡対物レンズを通る光束を計算し、続いて、記録された細胞の直径に基づいて細胞表面全体に光束に到達させるように分割し、細胞の形状を球状に近づけることによって、行なった。 40

#### 【0120】

##### 結果

S S F O は、C 1 V 1 を活性化させるものと同じ波長で効果的に非活性化することができ、強化された光感受性を有し、数分間わたるニューロンの双安定興奮を可能にする、29 分の減衰定数を有する新規な多重変換チャネルロードプシンである。S S F O に関する情報は、国際特許出願公開第 WO 2010 / 056970 号、ならびに米国特許出願第 61 / 410,704 号、同第 61 / 410,711 号に見出すことができ、これらの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。C a M K I I a : : C 1 V 1 および D I O : : S S F O を、P V : : C r e マウスの m P F C からの急性切片に発現させるために、二重ウイルス注入を行なった。これらの条件下では、興奮性錐体細胞は赤方偏移した光 50

に、抑制性 P V 細胞は青色光に応答するはずである。実際に、P V 細胞において S S F O を活性化させるための 1 秒の 4 7 0 nm の光パルスに応答して、進行中の I P S C レートは、ベースラインでの  $8.5 \pm 1.2 \text{ Hz}$  (期間 3、図 6 B) から青色光パルスの後の  $16.8 \pm 2.1 \text{ Hz}$  (期間 2、n = 4 回の記録、 $p < 0.005$ 、対応 t 検定、図 6 C) に安定して増加し、S S F O 発現抑制性細胞の持続的な活性化を示した。4 7 0 nm の光もまた一過的に C 1 V 1 を活性化するとはいえ、この活性化は、点火後の非常に速い C 1 V 1 の非活性化のため、光パルス自体の間にのみに生じ得、点火後の持続期間は、S S F O 活性のみによって特徴付けられ (図 6 B)、光遺伝学的制御モードの時間的分離を示す。興味深いことに、この長期間の P V ニューロン活性の増加中に、I P S C パワースペクトルに著しい上昇ピークの誘発はなく、この減少した調製物における P V ニューロン単独の直接的な活性化が、ネットワークにおける同期性の誘発には不十分であることを示唆する。しかしながら、非常に対照的に、4 7 0 nm の光パルス自体の間に、同じレベルの P V ニューロン活性化だけでなく、C 1 V 1 発現錐体細胞の部分的な活性化もまた予測される場合、顕著な ピークが一貫して観察され (ピーク周波数  $39.2 \pm 3.5 \text{ Hz}$ 、n = 4 回の記録)、高 範囲 ( $> 60 \text{ Hz}$ ) に及んだ。

## 【0121】

さらに、同じ実験において (実際は、同じ記録された掃引の後半)、この C 1 V 1 錐体細胞単独の場合の 5 9 0 nm の光 (P Y 細胞内の C 1 V 1 の活性化および P V 細胞内の S S F O の非活性化を同時に行う) での直接的活性化は、より低い周波数ピーク ( $26.6 \pm 1 \text{ Hz}$ 、n = 6 回の記録) で、堅調な 同調性をもたらした。P V 細胞での前の S S F O 活性化歴に関連するあらゆる残留 P V ニューロン活性は、この作用には必要ではないことを示し、錐体細胞での C 1 V 1 活性化の履歴のみを用いた、他の点では同一であり、I P S C レートが上昇した前歴のない掃引は、同じ結果を誘発した)。これらの結果は、時間スペクトルのコンビナトリアル制御の総合的な原理を示し、さらに、錐体ニューロンにおける活性の上昇が、ネットワーク特性から 振動を通じて生じ得ることを示唆する<sup>31</sup>。興味深いことに、4 7 0 nm の光パルスの最中に、P V および錐体細胞の両方の活性化が予測され、 同期性が、興奮性ニューロンのみが活性化された場合よりも高い周波数で一貫して観察され、 振動の誘発における P V および錐体細胞の両方の協調的な重要性についての情報を支持および拡大する<sup>31 - 33</sup>。

## 【0122】

## 結論

本研究の過程において、C 1 V 1 変異形と称される、新しい手段の系統がもたらされた。C 1 V 1 は、注目すべきことに、単独ではニューロンに十分に発現しないが、初期のゲノム研究で特定されていた他のオプシン遺伝子 (V C h R 1 および C h R 1) が結集された、赤方偏移されたオプシン遺伝子である。C 1 V 1 は、C h R 2 配列を全く有さないが、それにもかかわらず、ここで本明細書に報告されたその多重改変された変異形は、最も強力で、最も赤方偏移した、最も安定した既知のチャネルロドプシンを代表する。レチナール結合ポケット全体で重要なアミノ酸位置における突然変異生成は、(1) C h E T A 突然変異の高速相同体として生成される、高発現の赤方偏移したオプシン遺伝子である C 1 V 1 (E 1 6 2 T)、(2) 最も赤い作用スペクトルショルダーを示し、赤色光で活動電位を発火させるために使用可能である C 1 V 1 (E 1 2 2 T)、(3) 最も低い脱感作、最も速い非活性化、C h R 2 との最小限の交差活性化のための最も少ない紫色活性化、および強い発現を有する組み合わせの変異体である C 1 V 1 (E 1 2 2 T / E 1 6 2 T) の生成をもたらした。実際に、C 1 V 1 変異形は、電流の大きさ、非活性化動態、および作用スペクトルの検討 (表 1) に基づいて、異なる用途に選択することができ、例えば、二光子作業では、C h R 2 の 2 P 活性化が、電流の大きさおよび速いチャネル閉鎖動態のために困難であるため、C 1 V 1 (E 1 6 2 T) が目的のものである可能性が高い。C 1 V 1 変異形は、細胞の E / I バランスの上昇のレベルを増加させることができ、以前は統合失調症および自閉症の両方に関連していた現象である、 周期性の強度を増加させることにつながるという仮説の直接的な検証を可能にした。当然ながら、異なる手段もまた相

10

20

30

40

50

乗効果があり、C 1 V 1 変異形を C h R 2 と一緒に使用することにより、この研究で取り組む 2 つの異なるニューロン集団である、興奮性錐体ニューロン、および高速スパイクのパルプアルブミン発現抑制性介在ニューロンにおいてスパイクの確実で別々な駆動を可能にし、安定して上昇した細胞の E / I バランスが、バンド回路活性の生成に効果的であり、光遺伝学的手段における動態およびスペクトルの両方の差異を十分に利用していることを確認する。この種類のコンビナトリアル活性化は、複数の細胞型を越えて複数の神経経路型にまで及び得、例えば、システム神経科学の念願の目標である、単一の脳領域内で、異なる位置から生じる 2 つの軸索求心性集中経路における分離可能なスパイクの活性化にまで及び得る。

## 【 0 1 2 3 】

10

本発明を純粹に例示することを目的とし、したがって、決して本発明を限定すると見なされるべきではない実施例はまた、上記で論議される本発明の態様および実施形態を説明および詳述する。先述の実施例および詳細な説明は、限定ではなく例証として提供される。本明細書で引用される出版物、特許出願、および特許は、各個別出版物、特許出願、または特許が、参照することにより組み込まれると特異的および個別に示されたかのように、参照することにより本明細書に組み込まれる。上に記載された、および添付の付属書類に説明される種々の実施形態は、一緒におよび / または他の様式で実施されてもよい。本開示および付属文書における態様の 1 つ以上はまた、明らかなはずであり、有用である、特定の目的の用途にしたがって、さらに分離または統合された様式で実装されてもよい。具体的には、本明細書で引用される全ての出版物および付属文書は、本発明と関連して使用され得る組成物および方法を説明および開示する目的で、参照することにより本明細書に明示的に組み込まれる。先述の発明は、理解を明確にする目的で、例証および一例として、いくらか詳細に説明されているが、本発明の教示に照らして、添付の請求項の精神または範囲から逸脱することなく、ある変更および修正が行われてもよいことが、当業者に容易に明白となるであろう。

20

## 【 0 1 2 4 】

## 参考文献

- Deisseroth, K. Optogenetics. *Nat Methods* 8, 26-29 (2011).
- 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).
- Nagel, G. et al. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* 15, 2279-2284 (2005).
- Li, X. et al. Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 17816-17821 (2005).
- Bi, A. et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50, 23-33 (2006).
- Schroll, C. et al. Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Curr Biol* 16, 1741-1747 (2006).
- Zhang, F. et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633-639 (2007).
- Douglass, A.D., Kraves, S., Deisseroth, K., Schier, A.F. & Engert, F. Escape behavior elicited by single, channelrhodopsin-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons. *Curr Biol* 18, 1133-1137 (2008).
- Hagglund, M., Borgius, L., Dougherty, K.J. & Kiehn, O. Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nature neuroscience* 13, 246-252, doi:10.1038/nn.2482 (2010).

30

40

50

- Huber, D. et al. Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 451, 61-64 (2008).
- Hira, R. et al. Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. *J Neurosci Methods* 179, 258-263 (2009).
- Higley, M.J. & Sabatini, B.L. Competitive regulation of synaptic Ca<sup>2+</sup> influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nature neuroscience* 13, 958-966, doi:10.1038/nn.2592 (2010).
- Petreanu, L., Huber, D., Sobczyk, A. & Svoboda, K. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci* 10, 663-668 (2007). 10
- Ishizuka, T., Kakuda, M., Araki, R. & Yawo, H. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci Res* 54, 85-94 (2006).
- Nagel, G. et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13940-13945 (2003).
- Rickgauer, J.P. & Tank, D.W. Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15025-15030 (2009).
- Yonehara, K. et al. Spatially asymmetric reorganization of inhibition establishes a motion-sensitive circuit. *Nature* 469, 407-410, doi:10.1038/nature09711 (2011). 20
- Yaroslavsky, A.N. et al. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues *in vitro* in the visible and near infrared spectral range. *Phys Med Biol* 47, 2059-2073 (2002).
- Wang, H. et al. Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from chlamydomonas. *J Biol Chem* 284, 5685-5596 (2009)
- Wen, L. et al. Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin. *PLoS One* 5, e12893 (2010).
- Zhang, F. et al. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat Neurosci* 11, 631-633 (2008). 30
- Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L.A., Hegemann, P. & Deisseroth, K. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* 12, 229-234 (2009).
- Barnann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. & Bamberg, E. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* 49, 267-278 (2010).
- Schoenenberger, P., Gerosa, D. & Oertner, T.G. Temporal control of immediate early gene induction by light. *PLoS One* 4, e8185 (2009).
- Stehfest, K., Ritter, E., Berndt, A., Bartl, F. & Hegemann, P. The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T. *J Mol Biol* 398, 690-702 (2010). 40
- Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O. & Deisseroth, K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698-702 (2009).
- Lin, J.Y., Lin, M.Z., Steinbach, P. & Tsien, R.Y. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J* 96, 1803-1814 (2009).
- Gunaydin, L.A. et al. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci* 13, 387-392 (2010).
- Tittor, J., Schweiger, U., Oesterhelt, D. & Bamberg, E. Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N. *Biophys J* 67, 1682-1690 (1994). 50

Sugiyama, Y. et al. Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2. *Photochem Photobiol Sci* 8, 328-336 (2009).

Adesnik, H. & Scanziani, M. Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. *Nature* 464, 1155-1160 (2010).

Colgin, L.L. et al. Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* 462, 353-357 (2009).

Cardin, J.A. et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663-667 (2009).

Bamann, C., Kirsch, T., Nagel, G. & Bamberg, E. Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol* 375, 686-694 (2008).

【 0 1 2 5 】

## 配列

## 配列番号 1 (ヒト化 C1V1 アミノ酸配列)

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLENNGSVICIPNNGQCFCLAWLK  
SNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWEIYVATIEMIKFIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTWVLRY  
AEWLLTCPVLLIHLNLNTGLKDYSKRTMGLLSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYTYPHAAKVYIEAFH  
TVPKGICRELVRVMAWTFFVAWMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSLDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDI  
RKKQKITIAGQEMEVETLVAEEED

10

20

配列番号 2 (ヒト化 C 1 V 1 ヌクレオチド配列)

atgtcgacgccccgtggcccttgcgtctcgatggcggtggcgcttgcagcggatcggcaggagctcaaccggaa  
cgatgcgaccgtccccgtggctacgcaagacggaccagattacgtttccacagagccacgagcggatgttgttccaga  
catcatacacacttggaaacaatggtagcgtattgcattccctaacaatggcagtttttgcctggctggttgaaa  
tcgaacggtacgaacgcccagaagctggcgcaacatttcgcagttggatcacatttcgcacttcggcgcttcgccttat  
gttctatggctaccagacttggaaatccacgtgtggatggaaagagatctacgttagcaaccattgaaatgtcaagttt  
tcatttgtatccatgagtttgcgaaccggccgtaatctactcatcgaatggaaataagacagttgttgaggat  
gcggagttggctccctcacctgcccgtcccttgcgtccatctgagcaaccacacaggcctgaaggacgattatagcaaaaag  
gactatgggcctgttggttctgtatgtggatgcattgtgtggcgcaaccacgcgcattgttacgggtggacgaaga  
tcctgttccatctcatgttgcgtatggatgtataccattttcatgtctaaagtttatatcgaagcatccac  
acagttccaaaaggattgtcgagaactggccgagttgtgcgtatggccatctttgtggatggaaatgttccagt  
cccttctgtggcacggaggattcggtcatatcagccattatggatctgcattggcactccatccgcacccatgt  
ttgcggaaacatgtgggtgtgtgtggaaattacctgcgcgtcaaaaatccacgagcacatccgttgtatggcagacatc  
aquaqaqaqcqaaaattacqatcgcggccaaqqaqatqqaqgttqagacactqgtqgctqaaqaqqqaqactaa

30

配列番号 3 ( ヒト化 C 1 V 1 E 1 2 2 T アミノ酸配列 )

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLENNNSVICIPNNQCFCLAWLK  
SNGTNAEKLAAI LQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIYVATIEMIKFIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTWLRY  
AEWLLTCPVLLIHLNSLTGLKDYSKRTMGLLVDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYTFFHAAKVYIEAFH  
TVPKGICRELVRVMAWTFFVAWMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSLDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDI  
RKKQKITIAGQFMEVFTIVAFFED

10

配列番号 4 (ヒト化 C 1 V 1 E 1 2 2 T ヌクレオチド配列)

atgtcgcgacgcccgtggctcctgctctcgatggcggtggcgcttgcagcgggatcggcaggagcgtcaaccggaa  
cgatgcgaccgtccccgtggctacgcaagacggaccagattacgtgttccacagagccacagagcggatgttgtt  
caga  
catcatacacacttggaaaacaatggtagcgtattgcattccctaacaatggcagtgttttgcctggctggttgaaa  
tcgaacggtacgaacgcccagaagctggcgcaacattctgcagtggtcacattcgcactctcgccgtctgccttat  
gttctatggctaccagacttggaaatccacgtgtggttggaaaccatctacgttagcaaccattgaaatgatcaagttt  
tcattgagtatttccatgagtttgcacgaaaccggccgttaatctactcaicgaatggaaataagacagttgtgggtat  
qcqqqatqqctccacctqcccqgtcccttctqatccatctqagcaaccctcacqqccctqaqqqacqattataqcaaaaq

50

gactatggccgttggttctgatgtggatgcacgtgtgggcgaaccagcgccatgttacgggtggacgaaga  
tcctgtctccatctcattgagctatggatgtataacctatttcatgtctgtaaagtttatatcgaagcattccac  
acagttccaaaaggatttgcgagaactggccgagtgatggccctggacattttgtggcttgggaatgttccagt  
cctgtttctgctggcacggacaggattcggatcatatcagccctatggatctgcattggcactccatcctcgaccatga  
ttgcaaagaacatgtgggtgtgctgggaattacctgcccgtcaaaatccacgagcacatcctgttgtatggcgcacatc  
agaaagaagcagaaaattacgatcgcggccaagagatggaggttggacactggggctgaagaggaggactaa

## 配列番号5(ヒト化C1V1 E162Tアミノ酸配列)

MSRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATPVATQDGPDYVFRAHERMLFQTSYTLENNGSVICIPNNQCFCLAWLK  
SNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWEEIVYATIEMIKFIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTWLRY 10  
ATWLLTCPVLLIHSNLTKDDYSKRTMGLLSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYTYFHAAKVYIEAFH  
TVPKGICRELVVRVMAWTFVAWMFPVLFLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDI  
RKKQKITIAGQEMEVETLVAEEED

## 配列番号6(ヒト化C1V1 E162Tヌクレオチド配列)

atgtcgacgccccgtggctccttgctctgcattggccgtggcgcttcgcggatcgccaggagcgtaaccggaaag  
cgatgcgaccgtccccgtggctacgcaagacggaccagattacgtttccacagagccacgagcgatgttgttccaga  
catcatacacacttggaaacaatggtagcgtcatggatccataacaatggcagtgtttgcctggctgggttggaaa  
tcgaacggtaacgaacgcccggaaagctggccgcaacattctgcagtggatcacattcgactctggcgttcgccttat  
gttctatggctaccagacttggaaatccacgtgtggatggaaagagatctacgttagcaaccattggaaatgtcaagttt 20  
tcattgagtatccatgagtttgcgaaccggccgtaatctactcatcgaatggaaataagacagtctgggttggat  
gcgacgtggccctcacctggccgttcgcattctgcacatctggcaacccatcggcgttggacatgttgcctgggttggaaa  
gactatggccgttggttctgatgtggatgcacgtgtggcccaaccagcgccatgttacgggtggacgaaga  
tcctgttctccatctcattgagctatggatgtataacctatttcatgtctgtaaagtttatatcgaagcattccac  
acagttccaaaaggatttgcgagaactggccgagtgatggccctggacattttgtggcttgggaatgttccagt  
cctgtttctgctggcacggacaggattcggatcatatcagccctatggatctgcattggcactccatcctcgaccatga  
ttgcaaagaacatgtgggtgtgctgggaattacctgcccgtcaaaatccacgagcacatcctgttgtatggcgcacatc  
agaaagaagcagaaaattacgatcgcggccaagagatggaggttggacactggggctgaagaggaggactaa

## 配列番号7(ヒト化C1V1 E122T/E162Tアミノ酸配列)

MSRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATPVATQDGPDYVFRAHERMLFQTSYTLENNGSVICIPNNQCFCLAWLK  
SNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIVYATIEMIKFIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTWLRY  
ATWLLTCPVLLIHSNLTKDDYSKRTMGLLSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYTYFHAAKVYIEAFH 30  
TVPKGICRELVVRVMAWTFVAWMFPVLFLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDI  
RKKQKITIAGQEMEVETLVAEEED

## 配列番号8(ヒト化C1V1 E122T/E162Tヌクレオチド配列)

atgtcgacgccccgtggctccttgctctgcattggccgtggcgcttcgcggatcgccaggagcgtaaccggaaag  
cgatgcgaccgtccccgtggctacgcaagacggaccagattacgtttccacagagccacgagcgatgttgttccaga  
catcatacacacttggaaacaatggtagcgtcatggatccataacaatggcagtgtttgcctggctgggttggaaa  
tcgaacggtaacgaacgcccggaaagctggccgcaacattctgcagtggatcacattcgactctggcgttcgccttat  
gttctatggctaccagacttggaaatccacgtgtggatggaaaccatctacgttagcaaccattggaaatgtcaagttt 40  
tcattgagtatccatgagtttgcgaaccggccgtaatctactcatcgaatggaaataagacagtctgggttggat  
gcgacgtggccctcacctggccgttcgcattctgcacatctggcaacccatcggcgttggacatgttgcctgggttggaaa  
gactatggccgttggttctgatgtggatgcacgtgtggcccaaccagcgccatgttacgggtggacgaaga  
tcctgttctccatctcattgagctatggatgtataacctatttcatgtctgtaaagtttatatcgaagcattccac  
acagttccaaaaggatttgcgagaactggccgagtgatggccctggacattttgtggcttgggaatgttccagt  
cctgtttctgctggcacggacaggattcggatcatatcagccctatggatctgcattggcactccatcctcgaccatga  
ttgcaaagaacatgtgggtgtgctgggaattacctgcccgtcaaaatccacgagcacatcctgttgtatggcgcacatc  
agaaagaagcagaaaattacgatcgcggccaagagatggaggttggacactggggctgaagaggaggactaa 50

## 配列番号 9 (オルターナティブヒト化 C 1 V 1 アミノ酸配列 ( C 1 V 1 \_ 2 5 ) )

MSRRPWLLALALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNQCFCLAWLK  
 SNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKSTCGWEIYVATIEMIKFIEYFHEFDEPATLWLSSGNGVVMRY  
 GEWLLTCPVLLIHLNLNTGLKDDYSKRTMGLLSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYTYPAAKVIIEAFH  
 TVPKGICRELVRVMAWTFVAWGMFPVLFLGTEGFGHISPYGSAIGHSLIDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGD  
 RKKQKITIAGQEMEVETLVAEEED

## 配列番号 10 (オルターナティブヒト化 C 1 V 1 ヌクレオチド配列 ( C 1 V 1 \_ 2 5 ) )

Atgagcagacggccctggctgctggccctggcttcgcgtgtggccctggccggcagcgccggagccaggccggcag  
 cgacgccaccgtgcccgttgccacacaggacggcccccgactacgtgtccaccggccacgagcggatgtgtccaga  
 ccagctacacccttgaaaaacaacggcagcgtgatctgcatccccaaacaacggccagtgttctgcctggccctggctgaag  
 tccaaacggcaccacgcccagaagctggccccaacatcctgcagtggatcaccttcgcctgtgtgcctgtgcctgt  
 gtctacggcaccagacacttggaaagtccacactggccgtgggaggaaatctacgtggccaccatcggatgtcaagttca  
 tcatcgagttacttccacgagttcgacgagcccccacccctgtggctgtccagcggaaacggcgtgggtggatgagatac  
 ggcgagtggtgctgctgaccctgcctgtgctgatccacacttgcacccatcggactgaaggatgactacagcaagag  
 aaccatgggactgtgggtccgatgtgggatgtccatcgatgtggggagccacccatccgcctgtgcacccatggaccaaga  
 tccctgttccctgtatcagcctgagctacggaaatgtacacacttccacgcgcacccatgtggatgttccctgt  
 accgtgcctaaggaaatctgcagagaactggcagatgtggccgtggacccatccatcggacttgcacccatgtggatgt  
 gctgttccctgtgggaaaccggaggatccggacacatcggccatcggacacacgcacccatgtggatgt  
 tcgccaagaacatgtgggagtgctggaaacttacctgagatgtggacccatccatcggacttgcacccatgtggatgt  
 agaaaagaagcagaagatcaccatcggccacaggaaatggaaatgtggacccatccatcggacttgcacccatgtgg  
 40 agggat

## 配列番号 11 C h R 2 アミノ酸配列

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNQATASNVLQWLAA  
 GFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEIYVCAIEMVKVLEFFFKNPSMLYLATGHRVQWLR  
 YAELLLTCPVILIHLNLNTGLSNDYSRRTMGLLSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCL  
 GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGCRQVVTGMAWLFFVSGMFPILFILGPEGFGVL  
 SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV  
 EDEAEAGAVP

10

20

30

## 配列番号 12 C h R 2 ( H 1 3 4 R )

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNQATASNVLQWLAA  
 GFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEIYVCAIEMVKVLEFFFKNPSMLYLATGHRVQWLR  
 YAELLLTCPVILIRLSNLNTGLSNDYSRRTMGLLSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCL  
 GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGCRQVVTGMAWLFFVSGMFPILFILGPEGFGVL  
 SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV  
 EDEAEAGAVP

40

## 配列番号 13 S F O

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNQATASNVLQWLAA  
 GFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEIYVCAIEMVKVLEFFFKNPSMLYLATGHRVQWLR  
 YAELLLTCPVILIRLSNLNTGLSNDYSRRTMGLLSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCL  
 GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGCRQVVTGMAWLFFVSGMFPILFILGPEGFGVL  
 SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV  
 EDEAEAGAVP

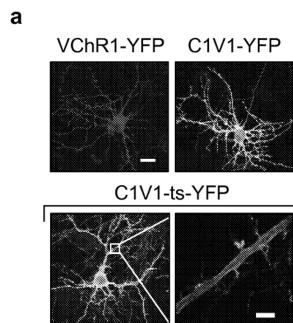
40

## 配列番号 14 ( S S F O )

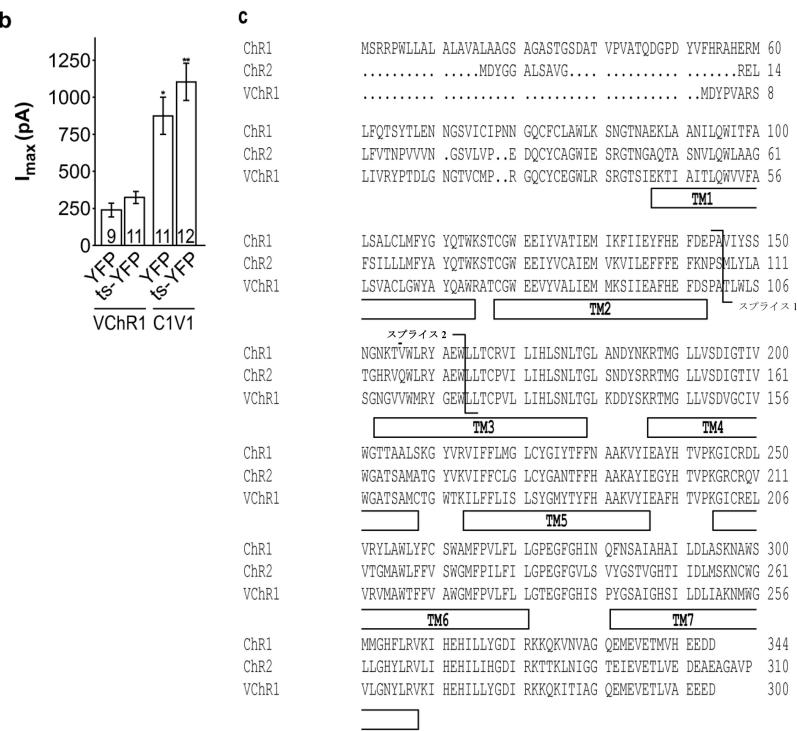
MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNQATASNVLQWLAA  
 GFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEIYVCAIEMVKVLEFFFKNPSMLYLATGHRVQWLR  
 YAELLLTCPVILIRLSNLNTGLSNDYSRRTMGLLSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCL  
 GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGCRQVVTGMAWLFFVSGMFPILFILGPEGFGVL  
 SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV  
 EDEAEAGAVP

50

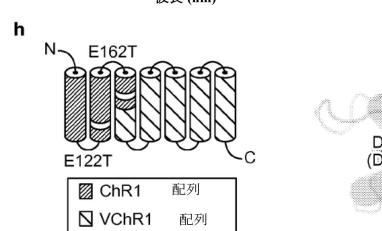
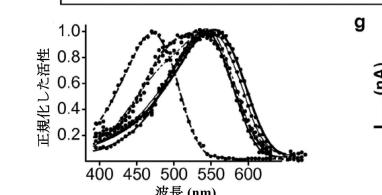
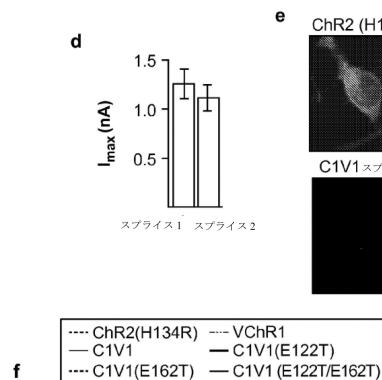
【図1 a - b】



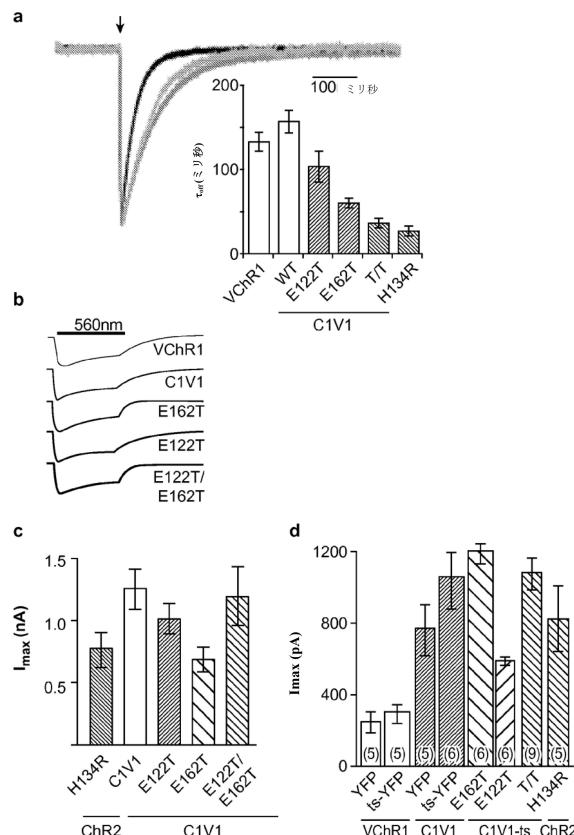
【図1 c】



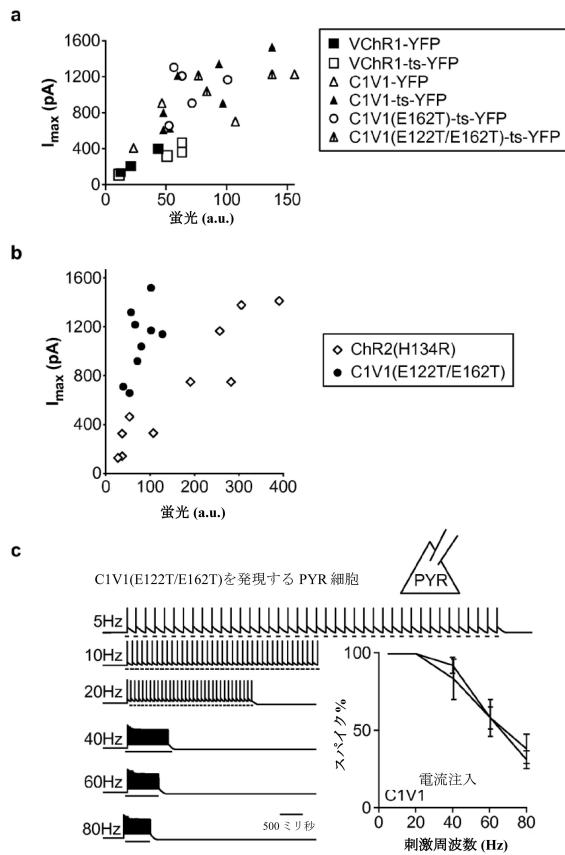
【図1 d - h】



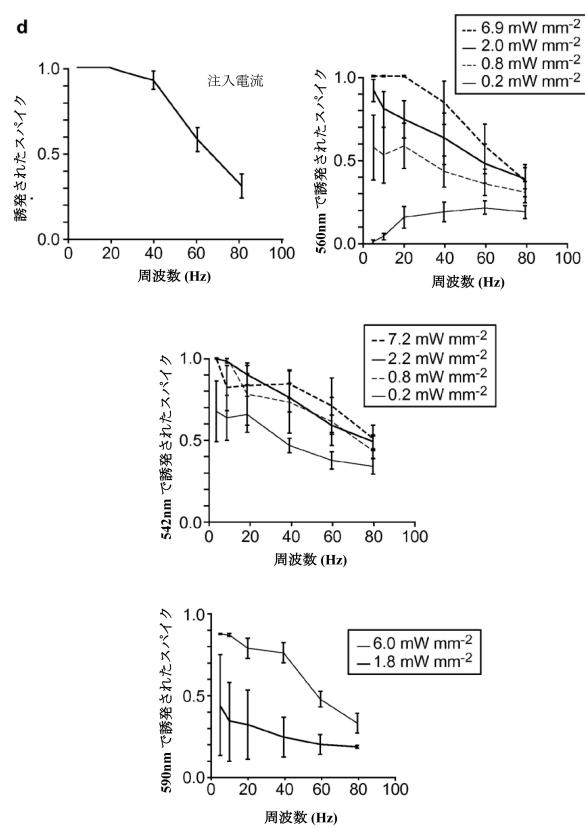
【図2】



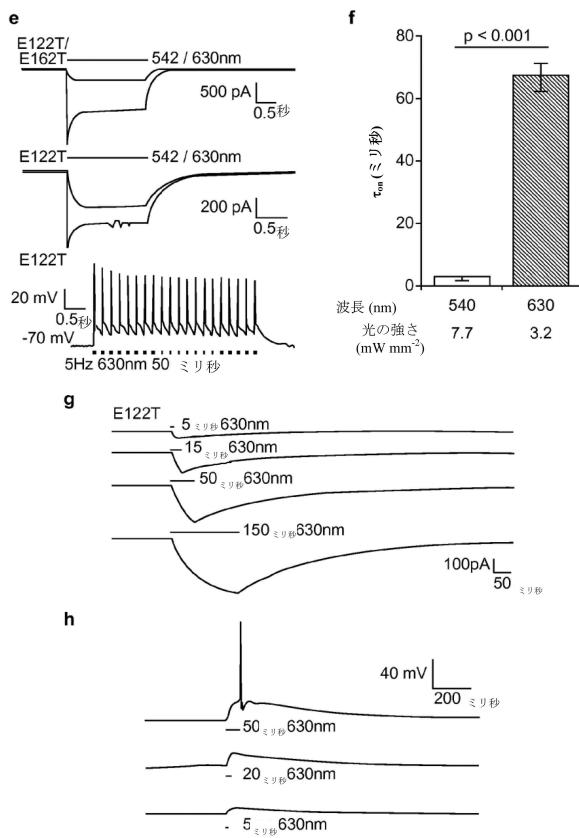
【図3 a - c】



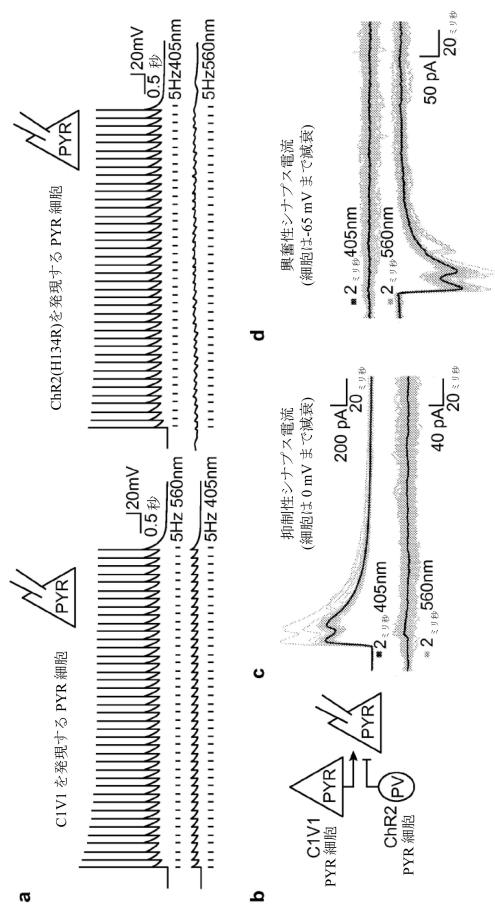
【図3 d】



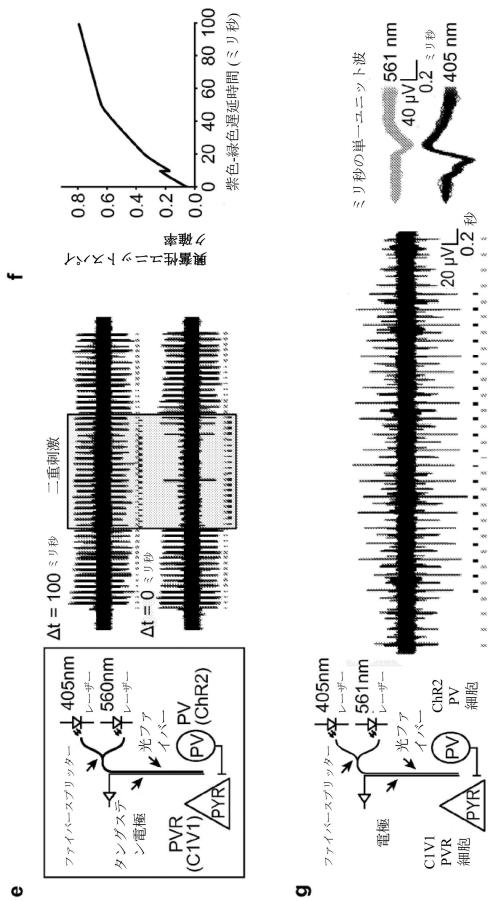
【図3 e - h】



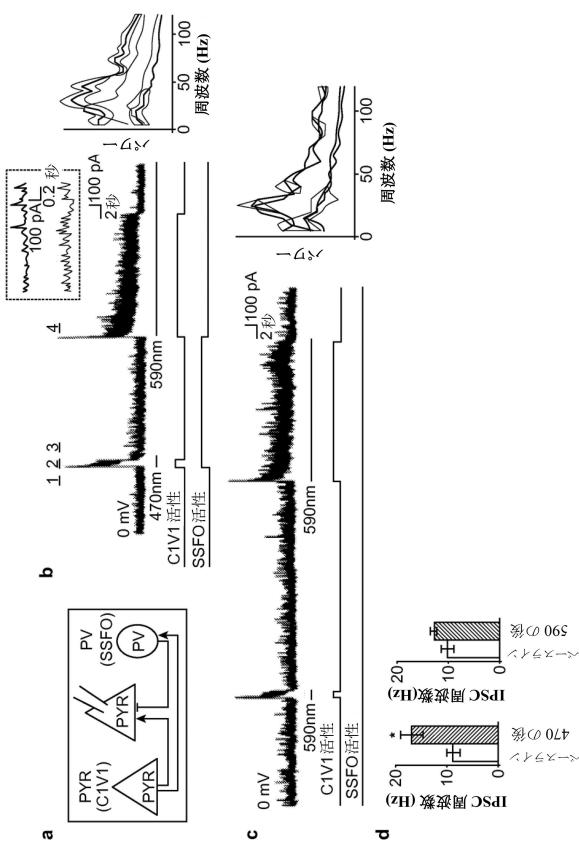
【図4 a - d】



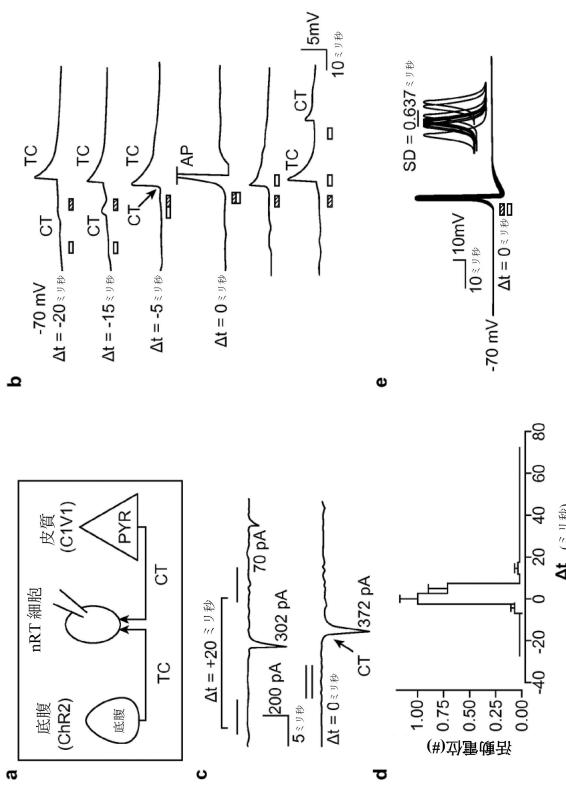
【図4 e - ga】



【図6】



【図5】



【配列表】

0006276591000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/58	(2006.01)	G 0 1 N	33/58	Z

(31)優先権主張番号 61/410,744

(32)優先日 平成22年11月5日(2010.11.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ダイスロス, カール

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 5, パロ アルト, ピーター カツツ サークル  
7 0

(72)発明者 イザハール, オフェル

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 4, パロ アルト, クラーク ウェイ 7 3 5

(72)発明者 フエノ, リーフ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, フォース ストリート 5  
5 5, アパートメント 9 3 0

(72)発明者 ヘーゲマン, ピーター

ドイツ連邦共和国, 1 4 6 1 2 ファルケンゼー, コッホシュトラーセ 5 6

(72)発明者 ブリギ, マシアス

ドイツ連邦共和国, 1 0 9 9 7 クロイツベルク, ベルリン, オッペルナーシュトラーセ 1 9

## 合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 長井 啓子

審判官 山本 匠子

(56)参考文献 国際公開第2009/131837 (WO, A1)

国際公開第2009/119782 (WO, A1)

Exp / Physiol., vol. 98, pp. 19 - 25 (Publ. 2010 Jul  
. 9)J. Biol. Chem., vol. 284, pp. 5695 - 5696 (2009.2.2  
7)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 -15/90

C07K 1/00 - 19/00

UniProt / GeneSeq

CAPplus / BIOSIS / MEDLINE / EMBASE / WPIDS (STN)

JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed