

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6395611号
(P6395611)

(45) 発行日 平成30年9月26日(2018.9.26)

(24) 登録日 平成30年9月7日(2018.9.7)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/02

A 6 1 K 38/17 (2006.01)

A 6 1 K 38/17

請求項の数 21 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-561051 (P2014-561051)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月5日(2013.3.5)
 (65) 公表番号 特表2015-510759 (P2015-510759A)
 (43) 公表日 平成27年4月13日(2015.4.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/029171
 (87) 国際公開番号 W02013/134295
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日(2013.9.12)
 審査請求日 平成28年3月4日(2016.3.4)
 (31) 優先権主張番号 61/606,663
 (32) 優先日 平成24年3月5日(2012.3.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 504338070
 ウェイン・ステート・ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 ミシガン 48202,
 デトロイト, ウェスト カービー 6
 56
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74) 代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チャネルロドプシン-2 (Chop2) の変異の同定および使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号26において、

(a) 132位のアミノ酸がシステイン(C)であり、かつ、159位のアミノ酸がシステイン(C)であるか、または

(b) 132位のアミノ酸がシステイン(C)であり、かつ、159位のアミノ酸がセリン(S)である

配列を含む、単離されたポリペプチド分子であって、ここで

網膜細胞において、(a)または(b)の該ポリペプチドが、配列番号26の132位において単一の変異を有するポリペプチドと比較して、5Hz~15Hzの間の光明滅頻度でより高い光感受性を、そして、配列番号26を含む野生型(WT)ポリペプチドと比較した場合、より遅いチャネルoff速度を、与える、単離されたポリペプチド分子。

【請求項2】

請求項1の(a)に記載の単離されたポリペプチド分子をコードする、単離された核酸分子。

【請求項3】

配列番号15を含む、請求項2に記載の核酸分子。

【請求項4】

請求項1の(b)に記載の単離されたポリペプチド分子をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 18 を含む、請求項 4 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物。

【請求項 7】

単一変異体 L132C または野生型 (WT) が、200 Hz ～ 20 kHz の間の明滅頻度での光感受性を与える、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子を含む組成物。

10

【請求項 9】

前記ポリペプチド分子が、野生型 ChR2 タンパク質の光強度閾値よりも低い光強度閾値に応答して電流を誘発する変異体 ChR2 タンパク質をコードする、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド分子。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド分子を含む細胞。

【請求項 11】

請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子を含む細胞。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド分子または請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子を含む細胞を提供する方法であって、細胞を、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド分子または請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子とインビトロ、またはエキソビボで接触させるステップを含む、方法。

20

【請求項 13】

前記細胞が、光受容体細胞、双極細胞、桿体双極細胞、ON 型錐体双極細胞、網膜神経節細胞、光感受性網膜神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞、または AII アマクリン細胞である、請求項 11 に記載の細胞。

【請求項 14】

前記細胞が、網膜神経節細胞または光感受性網膜神経節細胞である、請求項 13 に記載の細胞。

30

【請求項 15】

被験体において視覚を改善または回復するための、請求項 1 に記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸分子を含む薬学的組成物。

【請求項 16】

前記被験体が、正常な視覚を有する、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

前記被験体が、視覚障害を有する、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 18】

前記被験体が、眼科疾患に罹患している、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

前記眼科疾患が、黄斑変性または網膜色素変性である、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 20】

前記薬学的組成物が、硝子体内注射または網膜下注射による前記被験体への投与に適していることを特徴とする、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

前記視覚を改善または回復することが、以下：光感受性を増大させること；光電流を誘発するのに必要とされる光強度閾値を低下させること；および視覚皮質において視覚誘発電位を増大させること、のうちのいずれか 1 つ以上を含む、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2012年3月5日に出願された米国仮出願第61/606,663号に対する優先権およびその利益を主張する。この仮出願の内容は、その全体が参考として本明細書に援用される。

【0002】

政府の支援

本発明は、National Institutes of Health / National Eye Instituteの助成金NIH EY 17130の下、米国の政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

本発明は一般的に、分子生物学の分野に関連する。チャネルオプシン(channelopsin)-2(Chop2)遺伝子の変異を同定する。変異体Chop2遺伝子を含む組成物を、視力喪失を改善および回復するための治療方法において使用する。

【背景技術】

【0004】

網膜は、光受容体(または光受容細胞、桿体および錐体)から成る。光受容体は、光伝達、または視覚系において一連の事象を伝播し、最終的に我々の世界の表示を生成する(電磁放射の形態での)光の電気的および化学的シグナルへの変換を担う、高度に特殊化されたニューロンである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

光受容体の喪失または変性は、網膜内の視覚情報の光伝達を、完全に阻害はしないにしても、ひどく損なう。光受容細胞の喪失および/または光受容細胞機能の喪失は、視力の低下、光感受性の低下、および失明の主な原因である。当該分野において、視力喪失を経験している被験体の網膜の羞明を回復する組成物および方法に対する、長年のニーズが存在する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、チャネルオプシン-2(Chop2)遺伝子の有利な変異、および/またはその組み合わせの発現による、光受容細胞の光感受性を回復および/または増大させる方法に対する、長年のニーズに関する解決策を提供し、そして続いてチャネルオプシン-2(Chop2)に基づく遺伝子治療のための方法を提供する。

【0007】

チャネルオプシン-2(Chop2)に基づく遺伝子治療は、光受容体の変性後に、網膜の光感受性を回復するためのすぐれた戦略を提供する。Chop2遺伝子のタンパク質産物は、光異性化可能な発色団、オールトランスレチナールに結合した場合、チャネルロドプシン-2(ChR2)と呼ばれる、機能的な光ゲートチャネルを形成する。天然のChR2は、低い光感受性を示す。最近、2つの変異体ChR2、L132CおよびT159Cが、その光感受性を著しく増大させることが報告された(Kleinlogelら(2011)Nat Neurosci.14:513-8; Berndtら(2011)Proc Natl Acad Sci USA.108:7595-600; Priggeら(2012)J Biol Chem.287(38)3104:12; そのそれぞれの内容は、それらの全体が本明細書に援用される)。これらの2つのChR2変異体(すなわち、L132CおよびT159C)の特性を調査し、そしてこれらの2つの部位における多くの二重変異体と比較して、治療方法のために適当な候補を同定した。これらの変異のうち1つまたはそれより多くを含む組成物が、視覚を回復する目的のために、そ

の必要のある被験体に提供される。具体的には、C h o p 2 遺伝子の望ましい変異を、細胞に導入する、および/または細胞のゲノムDNAに組み込んで、視覚を改善または回復する。視覚を改善または回復するために細胞に導入されるC h o p 2 遺伝子の望ましい変異はまた、ゲノムDNAに組み込まれずに、エピソーム性のままであり得る。

【0008】

C h o p 2 (および従って、できたC h R 2) のL 1 3 2またはT 1 5 9アミノ酸位置の変異は、C h R 2 媒介性の光電流を誘発するために必要な光強度閾値を、著しく低下させる。アミノ酸位置L 1 3 2およびT 1 5 9における二重変異体はさらに、低い光強度における光電流を増大させ、対応する単一の変異のいずれのものも超える。L 1 3 2およびT 1 5 9位置における二重変異体を発現する網膜神経節細胞は、通常の屋外の照明条件の範囲内に入る光強度に応答し得るが、依然として、有用な視覚を回復するために適当な、十分かつ高い時間分解能を維持しなければならない。従って、視覚を回復または改善するために、改善された光感受性を有する変異体C h R 2を形成する、本発明の変異体C h o p 2タンパク質を、単独で、または組み合わせて使用する。

10

【0009】

具体的には、本発明は、配列番号26を含む、またはそれから成る、単離されたポリペプチド分子を提供し、ここで配列番号26の位置132のアミノ酸はロイシン(L)ではない。単離されたポリペプチド分子のある実施態様において、位置132のアミノ酸はシステイン(C)またはアラニン(A)である。位置132のアミノ酸がシステイン(C)である場合、そのポリペプチド分子は、配列番号13を含み得る、またはそれから成り得る。位置132のアミノ酸がアラニン(A)である場合、そのポリペプチド分子は、配列番号20を含み得る、またはそれから成り得る。

20

【0010】

本発明は、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子を提供し、ここで配列番号26の位置159のアミノ酸は、トレオニン(T)ではない。単離されたポリペプチド分子のある実施態様において、位置159のアミノ酸は、システイン(C)、セリン(S)、またはアラニン(A)である。位置159のアミノ酸がシステイン(C)である場合、そのポリペプチド分子は、配列番号14を含み得る、またはそれから成り得る。位置159のアミノ酸がセリン(S)である場合、そのポリペプチド分子は、配列番号17を含み得る、またはそれから成り得る。位置159のアミノ酸がアラニン(A)である場合、そのポリペプチド分子は、配列番号23を含み得る、またはそれから成り得る。

30

【0011】

本発明は、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子を提供し、ここで配列番号26の位置132のアミノ酸はロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸は、トレオニン(T)ではない。配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子のある実施態様において、位置132のアミノ酸はシステイン(C)であり、そして位置159のアミノ酸はシステイン(C)である。この単離されたポリペプチド分子の好ましい実施態様において、そのポリペプチド分子は、配列番号16を含む、またはそれから成る。本発明は、配列番号16を含む、またはそれから成る、単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を提供する。好ましくは、配列番号16を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子は、配列番号15を含む、またはそれから成る核酸分子である。

40

【0012】

配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子のある実施態様において、位置132のアミノ酸はシステイン(C)であり、そして位置159のアミノ酸はセリン(S)である。配列番号26の位置13

50

2のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子は、配列番号19を含み得る、またはそれから成り得る。あるいは、またはそれに加えて、配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子は、配列番号19を含み得る、またはそれから成り得、ここで位置132のアミノ酸はシステインであり、そしてここで位置159のアミノ酸はセリンである。本発明は、配列番号19を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を提供する。好ましくは、その核酸分子は、配列番号18を含む、またはそれから成る。

10

【0013】

配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子のある実施態様において、位置132のアミノ酸はアラニン(A)であり、そして位置159のアミノ酸はシステイン(C)である。配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子は、配列番号22を含み得る、またはそれから成り得る。あるいは、またはそれに加えて、配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子は、配列番号22を含み得る、またはそれから成り得、ここで位置132のアミノ酸はアラニン(A)であり、そしてここで位置159のアミノ酸はシステイン(C)である。本発明は、配列番号22を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を提供する。好ましくは、その核酸分子は、配列番号21を含む、またはそれから成る。

20

【0014】

配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子のある実施態様において、位置132のアミノ酸はシステイン(C)であり、そして位置159のアミノ酸はアラニン(A)である。配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子は、配列番号25を含み得る、またはそれから成り得る。あるいは、またはそれに加えて、配列番号26の位置132のアミノ酸がロイシン(L)ではなく、そして位置159のアミノ酸がトレオニン(T)ではない、配列番号26を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチド分子は、配列番号25を含み得る、またはそれから成り得、ここで位置132のアミノ酸はシステイン(C)であり、そしてここで位置159のアミノ酸はアラニン(A)である。本発明は、配列番号25を含む、またはそれから成る単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を提供する。好ましくは、その核酸分子は、配列番号24を含む、またはそれから成る。

30

40

【0015】

本発明は、本明細書中で記載された、単離されたポリペプチド分子のいずれか1つを提供し、ここでそのポリペプチド分子は、変異体ChR2を形成する変異体Chop2タンパク質をコードし、それは野生型ChR2タンパク質の閾値よりも低い光強度閾値にตอบสนองして電流を誘発する。さらに、その電流は陽イオンを伝導する。代表的な陽イオンは、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、および Ca^{2+} イオンを含むがこれに限らない。ChR2野生型および本明細書中で記載された変異体タンパク質は、非特異的に陽イオンを伝導する。従って、その電流は以下のものの1つまたはそれより多くを伝導する： H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、および Ca^{2+} イオン。

【0016】

50

本発明は、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、本明細書中で記載された、単離されたポリペプチド分子のいずれか1つを提供する。本発明はまた、少なくとも1つの、本明細書中で記載された、単離されたポリヌクレオチド分子を含む組成物を提供する。その組成物はさらに、薬学的に受容可能なキャリアを含み得る。

【0017】

本発明は、本明細書中で記載された、単離されたポリペプチドのいずれかをコードする、単離された核酸分子を提供する。さらに、その単離された核酸分子はさらに、薬学的に受容可能なキャリアを含み得る。本発明はまた、少なくとも1つの、本明細書中で記載された、単離された核酸分子を含む組成物を提供する。その組成物はさらに、薬学的に受容可能なキャリアを含み得る。

10

【0018】

本発明は細胞を提供し、ここでその細胞は、本発明の単離されたポリペプチド分子と接触した、またはそれを含む。さらに、本発明は細胞を提供し、ここでその細胞は、本発明の単離されたポリペプチド分子をコードする、単離された核酸分子と接触した、またはそれを含む。本発明は、本発明の単離されたポリペプチド分子、または本発明の単離されたポリペプチド分子をコードする核酸分子を含む細胞を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る組成物を提供する。本発明の細胞を、単離されたポリペプチドまたはそのポリペプチドをコードする単離された核酸分子と、インビトロ、エキソビボ、インビボ、またはインサイチュで接触させ得る。本発明のある実施態様において、その細胞は、光受容体；水平細胞；双極細胞；アマクリン細胞、および特に、AIIアマクリン細胞；または光感受性網膜神経節細胞を含む網膜神経節細胞である。好ましくは、その細胞は、網膜神経節細胞、光感受性網膜神経節細胞、双極細胞、ON型双極細胞、桿体双極細胞、またはAIIアマクリン細胞である。本発明のある局面において、その細胞は、光受容体、双極細胞、桿体双極細胞、ON型錐体双極細胞、網膜神経節細胞、光感受性網膜神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞、またはAIIアマクリン細胞である。

20

【0019】

本発明は、被験体に、本明細書中で記載された組成物のいずれか1つを投与する事を含む、視覚を改善または回復する方法を提供する。本発明はさらに、被験体に、本明細書中で記載された組成物のいずれか1つを投与する事を含む、視覚を維持する予防的な方法を提供する。

30

【0020】

本明細書中で記載される方法は、健康な、盲目の（部分的なまたは完全な）被験体、および/または網膜の変性（桿体および/または錐体光受容細胞の喪失によって特徴付けられる）を有する被験体にも適用され得るが、周囲の光レベルの決定に関して光感受性網膜神経節細胞の活性に依存し得る。例えば、本明細書中で記載される方法を、24時間の明/暗サイクルに概日リズムを同調するための光情報の伝達、瞳孔の調節および反射、およびメラトニン放出の光による制御を媒介する、光感受性網膜神経節細胞の活性を維持、改善、または回復するために使用し得る。

【0021】

本発明の方法のある実施態様において、その被験体は、正常な視覚または視覚障害を有し得る。あるいは、またはそれに加えて、その被験体は、視覚の障害を引き起こす眼科疾患を発症するリスクを有し得る。例えば、その被験体は、黄斑変性および網膜色素変性を含む、眼科疾患の家族歴を有し得る。その被験体は、網膜の光感受性細胞に損傷を引き起こす眼の損傷を負うリスクを有し得る。その被験体は、視覚障害、低視力、法的盲、部分的な盲目、または完全な盲目をもたらす、遺伝マーカーまたは遺伝性/先天性状態を有し得る。被験体は、近視（myopia）（近視（near-sightedness））または遠視（hyperopia）（遠視（far-sightedness））を引き起こす屈折の欠陥を有し得る。

40

【0022】

本発明の方法の組成物を、全身的または局所的のいずれかで被験体に投与し得る。局所

50

投与の好ましい経路は、硝子体内注射である。

【 0 0 2 3 】

本発明の他の特徴および利点が、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになり、そしてそれに含まれる。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

配列番号 2 6 を含む、単離されたポリペプチド分子であって、ここで配列番号 2 6 の 1 3 2 位のアミノ酸はロイシン (L) ではない、単離されたポリペプチド分子。

(項目 2)

1 3 2 位のアミノ酸がシステイン (C) またはアラニン (A) である、項目 1 に記載のポリペプチド分子。

10

(項目 3)

1 3 2 位のアミノ酸がシステイン (C) であり、かつ前記ポリペプチド分子が配列番号 1 3 を含む、項目 2 に記載のポリペプチド分子。

(項目 4)

1 3 2 位のアミノ酸がアラニン (A) であり、かつ前記ポリペプチド分子が配列番号 2 0 を含む、項目 2 に記載のポリペプチド分子。

(項目 5)

配列番号 2 6 を含む、単離されたポリペプチド分子であって、ここで配列番号 2 6 の 1 5 9 位のアミノ酸はトレオニン (T) ではない、単離されたポリペプチド分子。

20

(項目 6)

1 5 9 位のアミノ酸がシステイン (C)、セリン (S) またはアラニン (A) である、項目 5 に記載のポリペプチド分子。

(項目 7)

1 5 9 位のアミノ酸がシステイン (C) であり、かつ前記ポリペプチド分子が配列番号 1 4 を含む、項目 6 に記載のポリペプチド分子。

(項目 8)

1 5 9 位のアミノ酸がセリン (S) であり、かつ前記ポリペプチド分子が配列番号 1 7 を含む、項目 6 に記載のポリペプチド分子。

(項目 9)

1 5 9 位のアミノ酸がアラニン (A) であり、かつ前記ポリペプチド分子が配列番号 2 3 を含む、項目 6 に記載のポリペプチド分子。

30

(項目 1 0)

配列番号 2 6 を含む、単離されたポリペプチド分子であって、ここで配列番号 2 6 の 1 3 2 位のアミノ酸はロイシン (L) ではなく、かつ 1 5 9 位のアミノ酸はトレオニン (T) ではない、単離されたポリペプチド分子。

(項目 1 1)

1 3 2 位のアミノ酸がシステイン (C) であり、1 5 9 位のアミノ酸がシステイン (C) である、項目 1 0 に記載のポリペプチド分子。

(項目 1 2)

配列番号 1 6 を含む、項目 1 0 または 1 1 に記載のポリペプチド分子。

40

(項目 1 3)

項目 1 2 に記載の単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

(項目 1 4)

配列番号 1 5 を含む、項目 1 3 に記載の核酸分子。

(項目 1 5)

1 3 2 位のアミノ酸がシステイン (C) であり、1 5 9 位のアミノ酸がセリン (S) である、項目 1 0 に記載のポリペプチド分子。

(項目 1 6)

配列番号 1 9 を含む、項目 1 0 または 1 5 に記載のポリペプチド分子。

50

(項目 17)

項目 16 に記載の単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

(項目 18)

配列番号 18 を含む、項目 17 に記載の核酸分子。

(項目 19)

132 位のアミノ酸がアラニン (A) であり、159 位のアミノ酸がシステイン (C) である、項目 10 に記載のポリペプチド分子。

(項目 20)

配列番号 22 を含む、項目 10 または 19 に記載のポリペプチド分子。

(項目 21)

項目 22 に記載の単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

(項目 22)

配列番号 21 を含む、項目 21 に記載の核酸分子。

(項目 23)

132 位のアミノ酸がシステイン (C) であり、159 位のアミノ酸がアラニン (A) である、項目 10 に記載のポリペプチド分子。

(項目 24)

配列番号 25 を含む、項目 10 または 23 に記載のポリペプチド分子。

(項目 25)

項目 24 に記載の単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

(項目 26)

配列番号 24 を含む、項目 25 に記載の核酸分子。

(項目 27)

項目 1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、15、16、19、20、23 および 24 のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

(項目 28)

前記単離されたポリペプチドが、約 315 アミノ酸長、約 310 アミノ酸長、約 300 アミノ酸長、約 275 アミノ酸長、約 250 アミノ酸長、約 225 アミノ酸長、約 200 アミノ酸長、約 175 アミノ酸長または約 160 アミノ酸長である、項目 27 に記載の単離された核酸分子。

(項目 29)

薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、項目 27 または 28 に記載の単離された核酸分子。

(項目 30)

前記ポリペプチド分子が、野生型 ChR2 タンパク質の光強度閾値よりも低い光強度閾値に応答して電流を誘発する変異体 ChR2 タンパク質をコードする、項目 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、19、20、23 および 24 のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド分子。

(項目 31)

前記ポリペプチド分子が、約 315 アミノ酸長、約 310 アミノ酸長、約 300 アミノ酸長、約 275 アミノ酸長、約 250 アミノ酸長、約 225 アミノ酸長、約 200 アミノ酸長、約 175 アミノ酸長または約 160 アミノ酸長である、項目 30 に記載の単離されたポリペプチド分子。

(項目 32)

薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、項目 30 または 31 に記載の単離されたポリペプチド分子。

(項目 33)

項目 27、28 および 29 のいずれか一項に記載の単離された核酸分子を含む組成物。

(項目 34)

10

20

30

40

50

項目 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、19、20、23、24、29、30 および 31 のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド分子を含む組成物。

(項目 35)

項目 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、19、20、23、24、29、30 および 31 のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド分子を含む細胞。

(項目 36)

項目 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、19、20、23、24、29、30 および 31 のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド分子をコードする単離された核酸分子を含む細胞。

10

(項目 37)

項目 27 または 28 に記載の単離された核酸分子を含む細胞。

(項目 38)

項目 35、36 および 37 のいずれか一項に記載の細胞を含む組成物。

(項目 39)

前記細胞が、前記単離されたポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする単離された核酸分子とインビトロ、エキソビボ、インビボ、またはインサイチュで接触せられる、項目 35、36 および 37 に記載の細胞。

20

(項目 40)

前記細胞が、光受容体、双極細胞、桿体双極細胞、ON型錐体双極細胞、網膜神経節細胞、光感受性網膜神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞、またはAIIアマクリン細胞である、項目 35、36 および 37 に記載の細胞。

(項目 41)

前記細胞が、網膜神経節細胞または光感受性網膜神経節細胞である、項目 40 に記載の細胞。

(項目 42)

被験体に項目 33 に記載の組成物を投与するステップを含む、視覚を改善または回復する方法。

(項目 43)

被験体に項目 34 に記載の組成物を投与するステップを含む、視覚を改善または回復する方法。

30

(項目 44)

被験体に項目 38 に記載の組成物を投与するステップを含む、視覚を改善または回復する方法。

(項目 45)

前記被験体が、正常な視覚を有する、項目 42、43 および 44 に記載の方法。

(項目 46)

前記被験体が、視覚障害を有する、項目 42、43 および 44 に記載の方法。

(項目 47)

前記被験体が、眼科疾患に罹患している、項目 42、43 および 44 に記載の方法。

40

(項目 48)

前記眼科疾患が、黄斑変性または網膜色素変性である、項目 47 に記載の方法。

(項目 49)

前記組成物が、硝子体内注射または網膜下注射によって投与される、項目 42、43 および 44 に記載の方法。

(項目 50)

前記視覚を改善または回復することが、以下：光感受性を増大させること；光電流を誘発するのに必要とされる光強度閾値を低下させること；および視覚皮質において視覚誘発電位を増大させること、のうちのいずれかを含む、項目 42、43 および 44 に記載の方

50

法。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、その光感受性の比較のための、HEK細胞における、野生型(WT)ChR2、L132C、L132C/T159C、およびL132C/159S変異体からの、光誘発電流の代表的な記録を示す(A)。光刺激(460nmにおける光子/cm²・s)を、キセノンアークランプによって産生し、そして濃度フィルターによって減弱した：ND4.0(2.8×10¹⁴)、ND3.0(1.4×10¹⁵)、ND2.5(4.8×10¹⁵)；ND2.0(1.6×10¹⁶)、ND1.0(1.3×10¹⁷)、ND0(1.2×10¹⁸)。(B)同じ電流トレースを、異なる電流スケールで示す。矢印によって示されるトレースは、同じ光強度(ND2.5)によって誘発される。

10

【図2】図2は、その非活性化時間の過程(消灯後の減衰時間の過程)の比較のための、HEK細胞における、10msの光パルス(460nmにおける1.2×10¹⁸光子/cm²/s)に対する、野生型(WT)ChR2、T159C、L132C、L132C/T159C、およびL132C/T159S変異体からの、光誘発電流の代表的な記録を示す。

【図3】図3は、その光感受性の比較のための、網膜全組織標本における、網膜神経節細胞からの、WT ChR2、L132C、L132C/T159C、およびL132C/T159Sに媒介されるスパイク活性の代表的な多チャンネルアレイの記録を示す。光刺激(光子/cm²/s)を、473nmの青色レーザーによって産生し、そして濃度フィルターによって減弱した：ND0(6.3×10¹⁶)、ND1.0(7.4×10¹⁵)、ND1.5(2.7×10¹⁵)、ND2.0(7.3×10¹⁴)、ND2.5(3.2×10¹⁴)、ND3.0(8.5×10¹³)、ND3.5(3.8×10¹³)、およびND4.0(9.5×10¹²)。

20

【図4A】図4は、その時間的動態の比較のための、網膜全組織標本における、網膜神経節細胞からの、WT ChR2、L132C、L132C/T159C、およびL132C/T159Sに媒介されるスパイク活性の代表的な多チャンネルアレイの記録を示す。各パネルにおいて、単一のニューロンから由来する10個の連続する光誘発スパイクのラスタプロット(上)および平均スパイク率のヒストグラム(下)を示す。異なる頻度の光パルスを、各変異体の閾値強度よりも約1 log単位高い強度で、473nmの青色レーザーによって産生した。WT ChR2およびL132Cの記録を(A)に示し、そしてL132C/T159CおよびL132C/T159Sの記録を(B)に示す。

30

【図4B】図4は、その時間的動態の比較のための、網膜全組織標本における、網膜神経節細胞からの、WT ChR2、L132C、L132C/T159C、およびL132C/T159Sに媒介されるスパイク活性の代表的な多チャンネルアレイの記録を示す。各パネルにおいて、単一のニューロンから由来する10個の連続する光誘発スパイクのラスタプロット(上)および平均スパイク率のヒストグラム(下)を示す。異なる頻度の光パルスを、各変異体の閾値強度よりも約1 log単位高い強度で、473nmの青色レーザーによって産生した。WT ChR2およびL132Cの記録を(A)に示し、そしてL132C/T159CおよびL132C/T159Sの記録を(B)に示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0025】

視覚系

中枢神経系は、視覚系に存在する特殊化した細胞および独特のシグナル伝達方法によって、視覚(本明細書中で視力(sight)とも呼ばれる)を媒介する。視覚系の主な責務は、電磁放射の形態である光を、周囲の世界の表示または画像に変換することである。この系の「視覚」機能に加えて、視覚系はまた、瞳孔対光反射(PLR)、周期的な明/暗サイクルに対する概日性光同調、およびホルモンであるメラトニンの放出を制御する。

【0026】

網膜の細胞は、光(様々な波長および強度の電磁放射)に遭遇する視覚または神経系の

50

最初の細胞である。光子は、角膜、瞳孔、および水晶体を通り、その後網膜に達する。直接光子を吸収する光受容細胞が、網膜の外側層に位置するので、網膜は、独特の構造を有する。水晶体を横切った光子は、まず網膜神経節細胞の内側層（そのうちの少数がオプシン、メラノプシンの発現によって光感受性である）および双極細胞の中間層に遭遇し、その後、光受容細胞（桿体および錐体としても公知である）の外側層に達する。桿体光受容体は、薄暗い照明条件で作用し（暗所視）、一方錐体光受容体は、色覚を担い、明るい照明条件で作用する（明所視）。錐体光受容体は、ONおよびOFF型錐体双極細胞に直接シナプス伝達（synapse）し、それは次にONおよびOFF型網膜神経節細胞にシナプス伝達する。桿体光受容体は、桿体双極細胞（独特の型の双極細胞、ON型）にシナプス伝達し、それはAIIアマクリン細胞にシナプス伝達する。AIIアマクリン細胞は次いで、視覚シグナルを、ギャップ結合によってON型の錐体双極細胞に、および抑制性グリシン作動性シナプスによってOFF型錐体双極細胞およびOFF神経節細胞に伝える。網膜神経節細胞は、視覚情報を脳のニューロンに関係付けることを担う。

【0027】

光伝達

網膜内で、光受容細胞は光子粒子を吸収し、そして光の周波数および波長の生データを、化学的、および続いて電気シグナルに変換し、それがこの最初の情報を視覚および神経系を通して伝える。具体的には、光受容体（桿体、錐体、および/または光感受性網膜神経節細胞）の表面に位置するオプシントタンパク質が光子を吸収し、そして細胞内シグナル伝達カスケードが開始し、それが光受容体の過分極をもたらす。暗所において、そのオプシントタンパク質は光子を吸収せず、光受容体は脱分極する。光受容体の視覚シグナルは次いで、双極細胞、アマクリン細胞、および神経節細胞によって、脳の高次視覚中枢へ伝わる。具体的には、桿体および錐体光受容体が脱分極した場合（暗所において）、それらは桿体双極細胞およびON型錐体双極細胞の脱分極を引き起こすが、OFF型錐体双極細胞の過分極を引き起こし、それは次にAIIアマクリン細胞の脱分極、およびON型網膜神経節細胞のスパイクの増大、およびOFF型網膜神経節細胞のスパイクの減少を引き起こす。桿体および錐体光受容体が過分極した場合（光にตอบสนองして）、反対のことが起こる（桿体、ONおよびOFF型双極細胞、AIIアマクリンおよびONおよびOFF型神経節細胞に対して）。

【0028】

光情報は、光受容体、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、および網膜神経節細胞の作用によって、処理および有意に精密化される。この系の複雑性に加えるために、光受容体は、桿体、錐体（そのうち3つの型が、区別できる波長の光に最も強く応答する）、および光感受性網膜神経節細胞を含む、3つの主な種類で見出される。従って、情報処理の最初の層は、光の特定の波長および強度に異なって応答する、光受容体のレベルで起こる。網膜の双極細胞は、光受容細胞および水平細胞の両方から情報を受け取る。網膜の水平細胞は、複数の光受容細胞から情報を受け取り、そして従って、細胞型間および網膜内の距離をわたり情報を統合する。双極細胞はさらに、網膜神経節細胞に主に段階電位（graded potential）を産生することによって、光受容細胞および水平細胞からの情報を直接統合するが、いくつかの最近の研究は、いくつかの双極細胞は活動電位を産生し得ることを示す。錐体双極細胞は、網膜神経節細胞およびアマクリン細胞にシナプス伝達し、一方桿体双極細胞は、AIIアマクリン細胞のみにシナプス伝達する。水平細胞と同様、ほとんどのアマクリン細胞は、網膜内で情報を側方に統合する。水平細胞と異なり、ほとんどのアマクリン細胞は、抑制性（GABA作動性）介在ニューロンである。それぞれのアマクリン細胞は、特定の型の双極細胞（10種類の双極細胞のうち1つ）に特異的にシナプス伝達するので、アマクリン細胞はまた、水平細胞より特殊化されている。特に、AIIアマクリン細胞は、桿体経路において重要な中継ニューロンである（錐体光受容体が応答しない暗所視において）。AIIアマクリン細胞は、桿体双極細胞からシナプスの入力を受け、そして次いでONおよびOFF型錐体双極細胞を介して、上記で記載したようなONおよびOFF型神経節細胞へ、シグナルを錐体経路へ伝達する（pig

g y - b a c k)。従って、桿体双極細胞またはA I I アマクリン細胞における、C h o p 2 の発現、およびその結果としてのC h R 2 の形成は、網膜神経節細胞においてO N およびO F F の応答の両方を生じ得る。さらに、網膜神経節細胞は、双極細胞由来の情報およびアマクリン細胞由来の情報を統合する。網膜神経節細胞は、サイズ、接続性、および視覚刺激（例えば視野）に対する応答に関して有意に異なるが、全ての網膜神経節細胞は、長い軸索を脳に伸ばす。瞳孔対光反射および概日同調に関する非視覚情報を伝達する網膜神経節細胞のわずかな部分を除いて、網膜神経節細胞から伸びる軸索の全体は、視神経、視神経交差、および中枢神経系の視索を形成する。結果として、かなりの量の情報処理が、網膜自体で起こる。

【0029】

10

光受容細胞は、ロドプシンのような内因性オプシントタンパク質を発現する。本発明の変異体C h o p 2 タンパク質は、あらゆる細胞型で発現され得、そして機能的なC h R 2 チャネルを形成し得る。好ましくは、その細胞は網膜の細胞である。代表的な細胞は、光受容細胞（例えば桿体、錐体、および光感受性網膜神経節細胞）、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、および網膜神経節細胞を含むがこれに限らない。

【0030】

チャンネルオプシン - 2 (C h o p 2)

チャンネルオプシン - 2 (C h o p 2) は、緑藻類、C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d t i i から最初に単離された。チャンネルオプシン - 2 は、7 回膜貫通型ドメインタンパク質であり、発色団オールトランスレチナールと結合した場合、光スイッチ可能（光感受性）になる。C h o p 2 は、シッフ塩基結合によってレチナール分子と結合した場合、チャンネルロドプシン - 2 (C h o p 2 レチニリデン (r e t i n a l i d e n e)、C h R 2 と省略される) と呼ばれる、光ゲート、非特異的、内向き整流性、陽イオンチャンネルを形成する。

20

【0031】

本明細書中で言及する場合、「チャンネルオプシン - 2」または「C h o p 2」は、チャンネルオプシン - 2 をコードする遺伝子を指し、それは次いで一旦レチナールに結合すればチャンネルロドプシン - 2 (C h R 2) を形成する。本発明の遺伝子構築物は、主にチャンネルオプシン - 2 (すなわちレチナールを含まない) を指し、そして本明細書中で開示される全てのC h o p 2 変異体は、機能的なチャンネルロドプシン - 2 改変体を形成する。本明細書中で開示される方法は、外来性のレチナール無しに、C h o p 2 を細胞へ送達することを含み得る。細胞（すなわち網膜ニューロン）においてC h o p 2 が発現した時に、内因性の利用可能なレチナールが、野生型C h o p 2 または本発明のC h o p 2 変異体に結合して、機能的な光ゲートチャンネル、W T C h R 2 または変異体C h R 2 を形成することが理解される。従って、本明細書中で言及されるC h o p 2 タンパク質はまた、C h R 2 と同義であり得る。

30

【0032】

本明細書中で使用される場合、「チャンネルロドプシン - 2」または「C h R 2」は、レチナールに結合した機能的な光感受性チャンネルを指す。1 つの実施態様において、その結合したレチナールは、外来性に提供され得る。好ましい実施態様において、その結合したレチナールは、細胞において利用可能な内因性レベルから提供される。本発明はまた、本明細書中で記載されたC h o p 2 変異体をコードするポリペプチドおよびポリヌクレオチドによって形成された、機能的なチャンネルロドプシン - 2 チャネルを含む。

40

【0033】

好ましい線量の光放射によって照射された場合に、C h R 2 はチャンネルの孔を開き、それを通して細胞外スペースから細胞内に H^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、および/または Ca^{2+} イオンが流入する。C h R 2 チャネルの活性化は、典型的にはそのチャンネルを発現する細胞の脱分極を引き起こす。脱分極した細胞は、段階電位および/または活動電位を生じ、C h o p 2 / C h R 2 発現細胞から、網膜または脳の他の細胞へ情報を運ぶ。

【0034】

50

C h R 2 の野生型形態または高い時間分解能を有する変異体 C h R 2 が、神経科学研究の中心的な焦点となった。哺乳動物ニューロンにおいて発現された場合、C h R 2 は、インビトロまたはエキソビボの培養の、光で制御された脱分極を媒介する。野生型 C h R 2 または高い時間分解能を有する変異体 C h R 2 (後者は通常低い光感受性を示す) は、視覚回復の目的のためにそれらを使用することを可能にするために取り組まなければならない、いくつかの困難を提示した。視覚回復の目的のためには、高い時間分解能よりも高い光感受性を有する C h R 2 が望ましい。

【 0 0 3 5 】

野生型 C h R 2 タンパク質は、完全な活性化のために、強い青色光強度の照明を必要とする (すなわち、 480 nm の波長で、 $10^{18} \sim 10^{19}$ 光子 $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) 。この型の連続的な照明は、細胞を損傷し得る。

10

【 0 0 3 6 】

野生型 C h R 2 タンパク質の動態は、チャンネル有効性を最大化するために最適ではない。野生型 C h R 2 タンパク質の 1 つまたはそれより多くのアミノ酸を修飾することによって、有効性を上昇させ得、チャンネルの開口状態を延長し得る、またはチャンネルの単位コンダクタンスを増大させ得る、またはその両方である。野生型 C h R 2 の単一チャンネルのコンダクタンスは小さい。従って、インビボにおけるニューロンの活性化は、野生型チャンネルの高い発現か、または好ましい波長の青色光による非常に強力な活性化のいずれかを必要とする。チャンネルコンダクタンスを変化させること、またはチャンネル開口時間を延長することによって、より単純な解決策を見出し得る。これらのメカニズムのいずれか 1 つ、および特にこれらのメカニズムの組み合わせが、より低い、およびより安全な光強度を使用して、同じレベルの細胞脱分極を達成することを可能にする。

20

【 0 0 3 7 】

例えば、本発明の変異体 C h R 2 タンパク質は、チャンネル開口状態の延長によって、より高い光感受性を達成する。結果として、各変異体 C h R 2 チャンネルは、同じ光強度によって活性化された場合、野生型 C h R 2 チャンネルよりも大きい光電流を伝導する。従って、その変異体チャンネルは、野生型 C h R 2 チャンネルの活性化に必要なものよりも低い光強度によって活性化される。定量的に、変異体 C h R 2 タンパク質を発現する網膜神経節細胞の検出可能なスパイク活性を、野生型 C h R 2 を発現する網膜神経節細胞からスパイク活性を誘発するために必要な光強度より、 $1.5 \sim 2$ log 単位低い光強度によって誘発し得る。従って、変異体 C h R 2 タンパク質を活性化するために必要な光強度は、通常の屋外照明条件に近いが、またはその範囲内に入る。

30

【 0 0 3 8 】

以下の配列は、野生型および変異体 C h o p 2 タンパク質、および本発明の当該 W T および変異体 C h o p 2 タンパク質をコードし、そして本発明の W T および変異体 C h R 2 を形成するポリヌクレオチドの制限しない例を提供する。

【 0 0 3 9 】

本発明の野生型 (W T) C h o p 2 は、以下の *C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d t i i* クラミオプシン (*c h l a m y o p s i n*) 4 光ゲートイオンチャンネル (C O P 4) m R N A 配列によってコードされ得る (G e n B a n k アクセッション番号 X M _ 0 0 1 7 0 1 6 7 3 、および配列番号 1) :

40

【 0 0 4 0 】

【化 1】

```

1 gcagcaccat acttgacatc tgtcgccaag caagcattaa acatggatta tggaggcgcc
61 ctgagtgccg ttggggcgga gctgctattt gtaacgaacc cagtagtcgt caatggctct
121 gtaacttgctg ctgaggacca gtgttactgc gggggctgga ttgagtcggg tggcacaaac
181 ggtgccccaa cggcgctgaa cgtgctgcaa tggcttgctg ctggcttctc catcctactg
241 cttatgtttt acgctacca aacatggaag tcaacctgcg gctgggagga gatctatgtg
301 tgcgctatcg agatgggcaa ggtgattctc gagttcttct tcgagtttaa gaaccgctcc
361 atgctgtatc tagccacagg ccaccgctgc cagtgggtgc gttacgccga gtggcttctc
421 acctgccccg tcattctcat tcacctgtca aacctgacgg gcttgtccaa cgactacagc
481 agggcgacca tgggtctgct tgtgtctgat attggacaaa ttgtgtgggg cgccacttcc
541 gccatggcca ccggatacgt caaggtcato ttcttctgco tgggtctgtg ttatgggtct
601 aacacgttct ttacgctgct caagcctac atcgagggtt accacacggt gccgaagggc
661 cgggtgtcgcc aggtgggtgac tggcatggct tggctcttct tcgtatcatg gggatgttcc
721 cccatcctgt tcctcctcgg ccccgagggc ttccgctgco tgagcgtgta cggctccacc
781 gtcggccaca ccacattga cctgatgtcg aagaactgct ggggtctgct cgccactac
841 ctgcgctgct tgatccacga gcatatcctc atccacggcg acattcgcaa gaccacaaa
901 ttgaacattg gtggcactga gattgaggtc gagacgctgg tggaggacga gcccgaggct
961 ggcgctgtca acaaggcgac cggcaagtac gctcccgcg agtccctcct ggtcatgccc
1021 gacaagatga aggagaaggc cattgacgtg cgcgcctctc tggacaacag caaggagggt
1081 gagcaggagc aggcgcgacg ggctgcccag atgatgatga acggcaatgg catgggtatg
1141 ggaatgggaa tgaacggcat gaacggaatg ggcggtatga acgggatggc tggcgccgcc
1201 aagcccgccc tggagctcac tcccgagcta cagcccgccc gcgtcatcct ggcggtgccc
1261 gacatcagca tgggtgactt ctcccgcgag cagtttgctc agctatcggg gacgtacgag
1321 ctgggtgccc ccttgggcgc tgacaacaca ctggcgctgg ttacgcaggc gcagaacctg
1381 ctgcgctgct actttgtgtt gattcacccc gagttctctg gcgaccgctc tagcaccaga
1441 atcctgagcc gctcgcgcg cgcgggcccag cgtgtggctg cgttcggctg ggcgcagctg
1501 gggcccatgc gtgaacctgat cagtcocgca aacctggacg gctggctgga gggccctctg
1561 ttccggacagg gcatcctgcc ggccacatc gttgcccctg tggccaagat gcagcagatg
1621 gcgaagatgc agcagatgca gcagattggc atgatgaccg gcggcatgaa cggcatgggc
1681 ggcggtatgg agcgcgccat gaacggcatg ggcggcgcca acggcatgaa caacatgggc
1741 aacggcatgg gcggcgccat gggcaacggc atggcgcgca atggcatgaa cggaatgggt
1801 ggcggcaacg gcatgaacaa catggcgccc aacggaatgg ccggcaacgg aatggcgccc
1861 ggcgtggggc gcaacgggat ggggtggctc atgaacggca tgagctccgg cgtgggtggc
1921 aacgtgacgc cctccgcccgc cgcggcgcatg ggcggcgatg tgaacggcgg catggctgcg
1981 cccagtgccg ccggcatgaa cggcgcgccc ctgggtacca acccgctctt caacgcggcg
2041 cctcaccgcc tcagctcgca gctcgggtgc gaggcaggca tgggcagcat gggaggcatg
2101 ggcggaatga gcggaatggg aggcattgggt ggaatggggg gcattggcgg ccgcggcgcc
2161 gccacgaacg aggtgcgggg cggcaacggc gaggcggaga tgctgcagaa tctcatgaac
2221 gactcaatc gctgaagcg cgagcttggc gagtaaaagg ctggaggccg gtactgcgat

```

10

20

【 0 0 4 1】

【化 2】

```

2281 acctgcgagc tgcgcgccct gactcgtcgt acacacggct caggagcacg cgcgcgtgga
2341 cttctcaacc tgtgtgcaac gtatctagag cggcctgtgc gcgaccgtcc gtgagcattc
2401 cgggtgcgatc ttcccgccct cgcacccgca gttcccttcc tggccctgct ggcctgacg
2461 catcgtccga acggaagggc ggcttgatca gtaaaagcatt gaagactgaa gtcgtgagc
2521 actagtctga tggctctgca cgtaaagtgg cgctgcccctg cttactacgc attgcccagg
2581 actgcttctt tttgggtggc gagggccctgg tcccacatca ttcatctgca taacgtactg
2641 tttagttaca tacgctttgc ttaacctoga caattgcaac atgggctgag agtccgtacg
2701 ggcgctatgg acgaagggtg tatcggtatg gattaggaat ctcggttgaa aggtctcgag
2761 aaagtgaagc tcactctgtg cttctgttgg ggtcatcaag aagaacgacg gtaaggcaaa
2821 cgaggtaaaa gtggcacgct tttgtgcaca acgggcccgt ggagagtggg ggagtgcattg
2881 tgtgcggtcc taacacgcga gtgcaaagcg ggcttttctg gagctgggtt acggtctggc
2941 tcggcaactg ctctgtgttt taaccacagc ttcggaagtc tgggtatgtt ttgttggcag
3001 aaacatttgg gtaacctgag ggtgattcgt ctggagtcgg acaacatggc tgccgtccgt
3061 gtgcagggag gtaaatcaat gagctggagc tgtgatgtct accacacggt gcataccctt
3121 gcttacaaaa acactttgat gtcgtggcca aactatgctg gagcaaaagag ttaaaggaggc
3181 atgagtgcac ggttgccgac gtgcgcaaca attgcatcaa gtatttgacg ccttcaagcc
3241 aacaagtggc cgcgcggcaa cttgattaac acgcgggacg cagtgggtgg ggcgtgtaca
3301 gtgtttatga gctgccatc tcgatccgt agtggttagt tgctgtgac gccgcggcg
3361 tgtgggccc taccatggaga gttgggtgct tcaccacagc gttggcgccg ctgaagggtg
3421 tgctatgttt tggtaagcc ggggcccgtg agacggcaac cgtagaacgg tactgaagg
3481 gtgtcagccc ggggtaactg gatgccttgg gacatagcta ttaatgttga agtgaagccg
3541 tcaagccgag tgcgctgccc cgtgtatca ccaaggcccg tcta

```

30

40

本発明の野生型 (WT) ChR2 は、以下の Chlamydomonas reinhardtii クラミオプシン 4 光ゲートイオンチャネル (COP4) アミノ酸配列によってコードされ得る (GenBank アクセッション番号 XP_001701725、および配列番号 2) :

【 0 0 4 2】

【化 3】

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnvlqwlai
61 gfsilllmfy aygtwkstcg weelyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltctpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgsatsamat gyvkviffcl
181 glcygantff haakayiegy htpvkgrcrq vvtgmawlfv vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklmig gteievetlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasi dnskeveqeq aaraammmnn
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakpgl eltpqlqpgv vilavpdism vdfreqfag
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tgaqnlggvd fvlhpeflr drsstsilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggg ilpahivalv akmqgmrmkq qmqgigmntg
541 gmngmgggmg gmngmggggn gmnngmgngmg gmgngmgngn gmngmgggng mnmngmgma
601 gngmgggmg ngmgggmgm ssgvvanvtp saagmgggmm nggmaapqsp gmgggrigt
661 plfnaapsp ssqgaeagm gsmggmggms gmgmgggmg mggagaattq aaggnaeem
721 lqnlmneinr lkrelge

```

10

本発明の野生型 (WT) Chop2 は、以下の Chlamydomonas reinhardtii レチナル結合タンパク質 (cop4) 遺伝子配列によってコードされる (GenBank アクセッション番号 AF461397、および配列番号 3) :

【0043】

【化 4】

```

1 gcattctgtcg ccaagcaagc attaaacatg gattatggag ggcgcctgag tgccgttggg
61 cgcgagctgc tatttgtaac gaacccagta gtcgtcaatg gctctgtact tgtgcctgag
121 gaccagtgtt actgcgcggg ctggattgag tgcgtggca caaacggtgc ccaaacggcg
181 tgaacagtgc tgaatggct tgcgtctggc ttctccatcc tactgtttat gttttacgcc
241 taacaaacat ggaagtcaac ctgcggcttg gaggagatct atgtgtgcgc tatcgagatg
301 gtcgaagtga cctacatcga ttctctcgag tttaagaacc cgtccatgct gtatctagcc
361 acaggccacc gcgtccagtg gttgcgttac gcgagtggtc ttctccatcc cccggtcatt
421 ctcatcacc tgcacaaact gacgggcttg tccaaacgact acagcaggcg caccatgggt
481 ctgcttctgt ctgatattgg cacaattgtg tggggcgcca ctcccgccat ggccaccgga
541 taogtcaagg tcatcttctt ctgcctgggt ctgtgttatg gtgctaaccac gttctttcac
601 gctgccaaag cctacatcga gggttaccac accgtgccga agggccggtg tgcgcaagtg
661 gtgactggca tggcttggtt ctctctcgta tcatggggtg tgttccccat cctgttcac
721 ctgcggcccg agggcttcgg cgtctcgagc gtgtacggct ccaccgtcg ccacaccatc
781 attgacctga tgcgaagaa ctgctgggtt ctgctcggtc actacctgag cgtgctgagc

```

20

【0044】

【化 5】

```

841 cagcagcata tctcatcca cggcgacatt cgcaagacca ccaaatgaa cattggtggc
901 actgagattg aggtcgagac gctgggtggag gacgagggcg aggtggggc ggtcaacaag
961 ggcacgggca agtacgcctc ccgagagctc ttcttggtca tgcgcgacaa gatgaaggag
1021 aagggcattg acgtgcgcgc ctctctggac aacagcaagg aggtggagca ggagcaggcc
1081 gccagggttg ccatgatgat gatgaacggc aatggcatgg gtatgggaat gggaatgaac
1141 ggcattgaac gaattggggg tatgaacggg atggctggcg gcgccaagcc cggcctggag
1201 ctcaactccg agctacagcc cggcgcgctc atcctggcg tgcggacat cagcatgggt
1261 gaattcttcc gcgagcagtt tgcctagcta tgggtgacgt acgagctggt gccggccctg
1321 ggcgctgaca acacactggc gctgggttac caggcgagca acctggggcg cgtggacttt
1381 gtgttgattc accccagatt cctgcgcgac cgtctagca ccagcatcct gagccgctg
1441 cgcggcgcg ggcagcgtgt ggctgggttc ggctggggcg agctggggcc catgctgac
1501 ctgatcgagt ccgcaaacct ggacggctgg ctggagggcc cctcgttcgg acagggcac
1561 ctgcgggccc acatcgttgc cctgggtggc aagatgcagc agatgcgaa gatgcagcag
1621 atgcagcaga ttggcatgat gaccggcggc atgaacggca tggcgcgcg tatggcgggc
1681 ggcattgaac gcattggggc cggcaacggc atgaacgaa tgggcaacg catggcgggc
1741 ggcattgggca accgcaatgg cggcaatggc atgaacggaa tgggtggcg caacggcatg
1801 aacaacatgg gcggcaacgg aatggcgggc aacgggaatg gcggcgcat gggcggaac
1861 ggtatgggtg gctccatgaa cggcatgagc tccggcggtg tggccaacgt gacgccctcc
1921 gccgcggcg gcatggggcg catgatgaac ggcgcgatg ctgcgcacca gtgcggcg
1981 atgaacggcg gccgctggg taccacccg ctcttcaac ccgcgcctc accgctcagc
2041 tgcgagctcg gtgcgagcg agcatggg agcatgggag gcatggggcg aatgagcgg
2101 atgggaggca tgggtggaat ggggggcatg ggcgcgcgcg gcgcggccac gacgcaggct
2161 gcggggcgca acggcgagc ggagatgct cagaatctca tgaacgagat caatcgctg
2221 aagcgcgagc ttggcgagta a

```

30

40

本発明の野生型 (WT) Chop2 は、以下の Chlamydomonas reinhardtii レチナル結合タンパク質 (cop4) アミノ酸配列によってコードされる (GenBank アクセッション番号 AAM15777、および配列番号 4) :

【0045】

【化 6】

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvvngsvlvp edqcyagwi esrgtnaqat asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewllltpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
181 glycgantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklnig gteievetlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskevedeq aaraammmmn
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakppl eltpqlqpgr vilavpdism vdffreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tgaqnlggvd fvlihpelr drsstsilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggg ilpahivalv akmqmrmkmq qmqqigmmtg
541 gmngmgggmg ggmngmgggn gmnmgngmg ggmngmgggn gmngmgggng mnnmgngma
601 gngmgggmg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggmm nggmaapqsp gmnggrlgt
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmgmgmgmg mggagaattq aaggnaeae
721 lqnlmneinr lkrelge

```

10

本発明の野生型 (WT) Chop2 は、以下の Chlamydomonas reinhardtii 感覚性オプシン B (CSOB) mRNA 配列によってコードされ得る (GenBank アクセッション番号 AF508966、および配列番号 5) :

【0046】

【化 7】

```

1 ttgacatctg tgcaccaagca agcattaaac atggattatg gaggcgcctt gagtgcctgt
61 gggcgcgagc tgctatttgt aacgaaccca gtagtcgtca atggctctgt acttgtgcct
121 gaggaccagt gttactgcgc gggctggatt gtagtcgtg gcacaaacgg tgcccaaacg
181 gcgtcgaaacg tgcctgcaatg gcttgctgct ggcttctcca tctactgct tatgttttac
241 gcctaccaaaa catggaagtc aacctgcggc tgggaggaga tctatgtgtg cgctatcgag
301 atggccaagg tgattctcga gttcttcttc gagtttaaga acccgccat gctgtatcta
361 gccacaggcc accgcgtcca gtggttgctg tacgccgagt ggcttctcac ctgcccggtc
421 attctcattc acctgtcaaa cctgacggc ttgtccaacg actacagcag gcgcaccatg
481 ggtctgcttg tgtctgatat tggcacaatt gtgtggggcg ccacttcgc catggccacc
541 ggatacgtca aggtcatctt cttctgcctg ggtctgtgtt atggtgctaa cacgttctt

```

20

【0047】

【化 8】

```

601 cacgtgcca aggcctacat cgagggttac cacaccgtgc cgaagggccg gtgtgcgcag
661 gtgtgactg gcatggcttg gctcttcttc gtatcatggg gtatgttccc catcctgttc
721 atcctcggcc ccgagggttt cggcgctcctg agcgtgtacg gctccaccgt cggccacacc
781 atcattgacc tgatgtcgaa gaactgtctg ggtctgtctg gccactacct gcgctgtctg
841 atccacgagc atatcctcat ccacggcgac attcgcaaga ccaccaaatt gaacattggt
901 ggcactgaga ttgaggtcga gacgtgggtg gaggacgagg ccgagggtgg cgggtcaac
961 aagggcaccg gcaagtacgc ctcccgcgag tccttctctg tcatgcgcga caagatgaag
1021 gagaagggca ttgacgtgcg cgcctctctg gacaacagca aggaggtgga gcaggagcag
1081 gccgccaggg ctgccatgat gatgatgaac ggcaatggca tgggtatggg aatgggaatg
1141 aacggcatga acggaatggg cggatgaac gggatggctg gcggcgccaa gcccggtg
1201 gagctcactc cgcagctaca gcccgccgcg gtcatccttg cggtgccgga catcagcatg
1261 gttgacttct tccgcgagca gtttgcctag ctatcgggtg cgtacgagct ggtgccggcc
1321 ctgggcgctg acaacacact ggcgctggtt acgcaggcgc agaacctggg cggcgtggac
1381 tttgtgttga ttcaccccga gttcctgcgc gaccgctcta gcaccagcat cctgagccgc
1441 ctgcgcggcg cgggccagcg tgtggtctgc ttcggtggg cgcagctggg gcccatgcgt
1501 gacctgatcg agtcgcgaaa cctggacggc tggctggagg gccctcgtt cggacagggc
1561 atcctgccgg cccacatcgt tgccctggtg gccaatgagc agcagatgcg caagatgcag
1621 catatgcagc agattggcat gatgaccggc ggcatgaacg gcatggcgcg cggatgggc
1681 gccggcatga acggcatggg cggcgcaac ggcatgaaca acatgggcaa cggcatgggc
1741 gccggcatgg gcaacggcat gggcggaat ggcatgaacg gaatgggtgg cggcaacggc
1801 atgaacaaca tggcgcgcaa cggaatggcc ggcaacggaa tggcgcgcg catggcgcg
1861 aacggtatgg gtggtctccat gaacggcatg agctccggcg tggtgccaa cgtgacgcc
1921 tccgcgcgcg gcggcatggg cggcatgatg aacggcgga tggtgcgcc ccagtgcgcc
1981 ggcatgaacg cggcgccgct gggtaccaac ccgctcttca acgcgcgcgc ctaccgctc
2041 agctcgagc tcggtgccg ggcaggcatg ggcatggg gaagcatggg cggatgagc
2101 ggaatgggag gcatgggtgg aatggggggc atggcgcgcg ccggcgccgc cagcagcag
2161 gctcgggcg gcaacgcgga ggcggagatg ctgcagaatc tcatgaacga gatcaatgc
2221 ctgaagcgcg agcttggcg gtaaaaggct ggaggccgt actgcgatac ctgcgagctc
2281 gcgcgcctga ctgctgtac acacggctca ggagcacgcg cgcgtggact tctcaacctg
2341 tgtgcaacgt atctagagcg gcctgtgcgc gaccgtccgt gacgattccg gtgcgactt
2401 cccgccttcg caccgcaagt tcccttctg gccctgctgc gcctgacgca tcgtccgaac
2461 ggaagggcgg cttgatcagt aaagcattga agactgaagt cgtgcgaccg tagtgctatg
2521 gctctgcacg taagtggcg ctgccctgct tactacgcat tgcccaagac tgcttcttt
2581 tgggtggcga ggcctggtc ccacatcatt catttgcata acgtactgtt tagttacata
2641 cgctttgctt aacctcgaca attgcaacat gggtgagag tccgtacggc ggctatggac
2701 gaaggtgtta tcggtgtga tttagaatct cggttgaaa gcttcgagaa agtgagcttc
2761 tctgtggct tctgttgggg tcatcaagaa gaacgacggt aaggcaaacg aggtaaaagt
2821 ggcacgtctt tgtgcacaac gggcccggtg agagtgggg agtgcatgtg tgcggtccta
2881 acacgcgagt gcaaagcggg cttttctgga gctgggttac ggtctggctc ggcaactgct
2941 ctgtgtttta accacagctt cggaaagtct ggtatgtttt gttggcagaa acatttggtt
3001 aacttgaggg tgattcgtct ggagtcggac aacatggctg ccgtccgtgt gcaggagcg
3061 taatcaatga agctgaagct gtgatgctca ccacacgttg cataccctg cttacaaaaa
3121 cactttgatg tcgtggccaa actatgcgtg agcaaagagt taaagaggca tgagtgcag
3181 gttgcggacg tgcgcaacaa ttgcatcaag tatttgacgc cttcaagcca acaagtgcg
3241 gcgcggcaac ttgattaaca cgcggacgc agtggtggg gcgtgtacag tgtttatgag
3301 ctgccattct gcgatccgta gtgttaggtt gcgtgtgacg ccgcgcggct gtgggcccct
3361 acatggagag ttgggtgctt caccacacgg ttggcgccgc tgaaggggtg gctatgtttt
3421 ggtaaagccg gggccctgaa gaccgcaacc gtagaacgt actgaaaggg tgcagcccg
3481 gggttaactg atgccctggg acatagctat taatgttgaa gtgaagccgt caagccgagt
3541 gccgtgcgcc gctgtatcac caaggccgct ccaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

10

20

30

本発明の野生型 (WT) *Chop2* は、以下の *Chlamydomonas reinhardtii* 感覚性オプシン B (CSOB) アミノ酸配列によってコードされ得る (GenBank アクセス番号 AAM44040、および配列番号 6) :

【0048】

40

【化 9】

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwatsamat gyvkviffcl
181 glcygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl

```

【0049】

【化 1 0】

```

241 svygstvght iidlmskncw glghylrvl ihehilihgd irkttklmig gteievetlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskevegeq aaraammmmn
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakpgl eltpqlqpgv vilavpdism vdffreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tgaqnlggvd fvlihpelr drsstsilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfqqg ilpahivalv akmqgmrmq qmqqigmmtg
541 gmgmgggmg gmgmggggn gmnmgngmg gmgmgmggn gmgmgggng mnnmgngnma
601 gngmgggmg ngmggsmngm ssgvvavntp saagmggmm nggmaapqsp gmgnggrlgt
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmgms gmgmgmgmg mggagaattq aaggnaeae
721 lqnlmneinr lkrelge

```

本発明の野生型 (WT) Chop2 は、以下の Chlamydomonas reinhardtii の、古細菌型 オプシン 2 核酸配列の acop2 mRNA によってコードされ得る (GenBank アクセッション番号 AB058891、および配列番号 7) :

【0050】

【化 1 1】

```

1 catctgtcgc caagcaagca ttaaaccatgg attatggagg cgccttgagt gccgttgggc
61 gcgagctgct atttgaacg aaccagtag tcgtcaatgg ctctgtactt gtgcctgagg
121 accagtgtta ctgcgcgggc tggattgagt cgcgtggcac aaacggtgcc caaacggcgt
181 cgaacgtgct gcaatggcct gctgctggct tctccatcct actgcttatg ttttacgcct
241 accaaacatg gaagtcaacc tgcggctggg aggagatcta tgtgtgcgct atcgagatgg
301 tcaaggtgat tctcgagttc ttcttcgagt ttaagaaccc gtccatgctg tatctagcca
361 caggccaccg cgtccagtggt ttgcgttacg ccgagtggtt tctcacctgc ccggtcattc
421 tcattcacct gtcaaacctg acgggcttgt ccaacgacta cagcaggcgc accatgggtc
481 tgcttgtgtc tgatattggc acaattgtgt ggggcgccac ttccgccatg gccaccggat
541 acgtcaaggt catcttcttc tgccctgggtc tgtgttatgg tgctaacacg ttctttcacg
601 ctgccaaggg ctacatcgag gggttacaca ccgtgccgaa gggccggtgt cgcacgggtg
661 tgactggcat ggcttggctc ttcttcgtat catggggtat gttcccatc ctgttcac
721 tcggccccga gggcttcggc gtccctgagcg tgtacggctc caccgtcggc cacaccatca
781 ttgacctgat gtcaagaac tgctggggtc tgcctcgcca ctacctgcgc gtgctgatcc
841 acgagcatat cctcatccac ggcgacattc gcaagaccac caaattgaac attggtggca
901 ctgagattga ggtcgagacg ctggtggagg acgagggcga ggctggcgcg gtcaacaagg
961 gcaccggcaa gtacgcctcc cgcgagtcct tectgtcat gcgcgacaag atgaaggaga
1021 agggcattga cgtgcgcgcc tctctggaca acagcaagga ggtggagcag gagcaggccg
1081 ccagggtgct catgatgatg atgaacggca atggcatggg tatgggaatg ggaatgaacg
1141 gcatgaacgg aatggcggtg atgaacggga tggctggcg cgccaagccc ggctggagc
1201 tcaactccga gctacagccc ggccgcgtca tectggcggt gccggacatc agcatggttg
1261 acttctccg cgagcagttt gctcagctat cgggtgacgt cgagctgggt ccggcccttg
1321 gcgctgacaa cacactggcg ctgggttacg aggcgcgaaa cctggcggcg gtggactttg
1381 tgttgattca ccccgagttc ctgcgcgacc gctctagcac cagcatcctg agccgcctgc
1441 gcggcgcggg ccagcgtgtg gctgcgttcg gctgggcgca gctggggccc atgcgtgacc
1501 tgatcgagtc cgcaaacctg gacggctggc tggaggggcc ctcgctcgga cagggcatcc
1561 tgccggccca catcggtgcc ctggtggcca agatgcagca gatgcgcaag atgcagcaga
1621 tgcagcagat tggcatgatg accggcgcca tgaacggcat gggcgcggtg atggcgcgcg
1681 gcatgaacgg catggcgcg gcgaacggca tgaacaacat gggcaacggc atggcgcgcg
1741 gcatgggcaa cggcatgggc ggcaatggca tgaacggaat ggggtggcggc aacggcatga
1801 acaacatggg cggcaacgga atggcggcga acggaatggg cggcgcatg ggcggcaacg
1861 gtatgggtgg ctccatgaac ggcatgagct ccggcggtgt ggccaacgtg acgccctccg
1921 ccgcccggcg catggcgggc atgatgaac gggcgatggc tgcgccccag tcgcccggca
1981 tgaacggcg cgccctgggt ccttcaacgc cgcgccctca ccgctcagct
2041 cgcagctcgg tgccgaggca ggcatgggca gcatgggagg catggcgga atgagcgga
2101 tgggaggcat ggggtggaatg gggggcatgg cggcgccgg cgccgccacg acgaggtg
2161 cggcggcaa cgcgaggcg gagatgctgc agaattctat gaacgagatc aatcgccatga
2221 agcgcgagct tggcgagtaa aaggetggag gccggtactg cgatacctgc gagctcgcg
2281 gectgactcg tcgtacacac ggctcaggag cagcgcgcg tggacttctc aacctgtgtg
2341 caacgtatct agagcgccct gtgcgcgacc gtcgctgagc attccggtgc gatcttcccg
2401 ccttcgcacc gcaagttccc ttcttgcccc tgcctgcgct gacgcate

```

本発明の野生型 (WT) Chop2 は、以下の Chlamydomonas reinhardtii の、古細菌型 オプシン 2 アミノ酸配列の acop2 mRNA によってコードされ得る (GenBank アクセッション番号 BAB68567、および配列番号 8) :

【0051】

【化 1 2】

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqycagwi esrgtngagt asnvlqwlaa
61 gfsillllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcbv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdgti vwgatsamat gyvkviffcl
181 glcygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklng gteievetlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmn
361 gngmgmgmgm ngmgmgggm gmaggakpgl eltpqlqpgv vilavpdism vdfreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlihpelr drsstsilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggq ilpahivalv akmgqmrkmq qmqqigmmgtg
541 gmngmgggmg ggmngmgggg gmnmngngmg gmgngmgggg mnmngmgngma
601 gngmgggmgg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggmm nggmaapqsp gmnnggrlgt
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmgmgmgmgg mggagaattq aaggnaeae
721 lqnlmneinr lkrelge

```

10

C h R 2 変異体

本発明は、1つまたはそれより多くのアミノ酸が変異したC h o p 2 変異体を提供する。いくつかの実施態様において、そのC h o p 2 は、少なくとも1つのアミノ酸変異を有する、配列番号2、4、6、および8のような、全長ポリペプチドである。いくつかの実施態様において、その変異はアミノ酸132および/またはアミノ酸159においてである。いくつかの好ましい実施態様において、位置132のアミノ酸は、ロイシンからシステインまたはアラニンに変異している。いくつかの好ましい実施態様において、位置159のアミノ酸は、トレオニンからアラニン、システイン、またはセリンに変異している。全ての実施態様において、そのC h o p 2 変異体は、機能的なC h R 2 チャンネルを形成する。

20

【0052】

本発明はまた、C h o p 2 タンパク質およびC h o p 2 の生物学的に活性な断片、または保存的アミノ酸置換または他の変異改変体をコードする核酸を含む。有用な断片の制限しない例は、野生型C h o p 2 のアミノ酸1-315をコードするポリペプチド、すなわち配列番号26を含み、ここで、例えばアミノ酸位置132および/または159において、少なくとも1つのアミノ酸が変異されているかまたは保存的に置換されている。野生型C h o p 2 のより小さい断片も、本発明において有用であり得、ここで少なくとも1つのアミノ酸が変異されているかまたは保存的に置換されている（すなわちアミノ酸位置132および/または159において）。よって、本発明のC h o p 2 ポリペプチドおよび核酸はさらに、野生型C h o p 2 のアミノ酸1-315、1-310、1-300、1-275、1-250、1-225、1-200、1-175、または1-160をコードする、生物学的に活性な断片を含むがこれに限らず、ここで例えばアミノ酸位置132および/または159において、少なくとも1つのアミノ酸が変異されているかまたは保存的に置換されている。他の実施態様において、本発明のC h o p 2 ポリペプチドおよび核酸は、315アミノ酸長、310アミノ酸長、300アミノ酸長、275アミノ酸長、250アミノ酸長、225アミノ酸長、200アミノ酸長、175アミノ酸長、または160アミノ酸長までであるか、または約315アミノ酸長、約310アミノ酸長、約300アミノ酸長、約275アミノ酸長、約250アミノ酸長、約225アミノ酸長、約200アミノ酸長、約175アミノ酸長、または約160アミノ酸長であり得る。

30

40

【0053】

本発明の単一変異体C h o p 2 は、以下の合成構築物h V C h R 1 - m K a t e - b e t a h C h R 2 (L 1 3 2 C) 遺伝子配列 (G e n B a n k アクセッション番号J N 8 3 6 7 4 6、および配列番号9) によってコードされ得、注釈は以下の通りである、G F P 配列は太字であり、L 1 3 2 C C h o p 2 配列には下線が引かれている：

【0054】

【化 1 3】

1 atggattacc ctgtggcccg gtccctgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgga
 61 accgtgtgca tgccagaggg acaatgctac tgcgaggggt ggctgaggag ccggggcact
 121 agtatcgaaa aaaccatcgc tatcaccctc cagtgggtag tgttcgctct gtccgtagcc
 181 tgtctcggtt ggtagcata ccaagcctgg agggctacct gtgggtggga ggaagtatac
 241 gtggccctga tcgagatgat gaagtccatc atcgaggctt tccatgagtt cgactcccca
 301 gccacactct ggctcagcag tgggaatggc gtagtgtgga tgagatatgg agagtggctg
 361 ctgacctgtc ccgtcctgct cattcatctg tccaatctga ccgggctgaa agatgactac
 421 tccaagagaa caatgggact gctgggtgag gacgtggggg gtattgtgtg gggagccacc
 481 tccgccaatg gcaactggatg gaccaagatc ctctttttcc tgattttccct ctccataggg
 541 atgtatacat acttccacgc cgctaagggtg tatattgagg ccttccacac tgtacctaaa
 601 ggcatctgta gggagctcgt gcggggtgat gcatggacct tctttgtggc ctgggggatg
 661 ttccccgtgc tgttctctct cggcactgag ggatttggcc acattagtcc ttacgggtcc
 721 gcaattggac actccatcct ggatctgatt gccaaagata tgtggggggg cctgggaaat
 781 tatctcgagg taaagatcca cgagcatatc ctgctgtatg gcgatatcag aaagaagcag
 841 aaaatcacca ttgctggaca ggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac
 901 gggaccgagg tcgccaccat ggtgtctaag ggcgaagagc **tgattaagga gaacatgcac**
 961 **atgaagctgt acatggaggg caccgtgaac aaccaccact tcaagtgcac atccgagggc**
 1021 **gaagcaagc cctacgaggg caccagacc atgagaatca aggtggctga gggcgggcct**
 1081 **ctccccctcg ccttcgacat cctggctacc agcttcatgt acggcagcaa aaccttcac**
 1141 **aaccacaccc agggcatccc cgacttcttt aagcagtcc tccctgaggg cttcacatgg**
 1201 **gagagagtca ccacatacga agacgggggc gtgctgaccg ctaccagga caccagcctc**
 1261 **caggacggct gcctcatcta caacgtcaag atcagagggg tgaacttccc atccaacggc**
 1321 **cctgtgatgc agaagaaaac actcggctgg gaggcctcca ccgagatgct gtaccccgct**
 1381 **gacgcgggc tggaggcag agccgacatg gccctgaagc tcgtgggcgg gggccacctg**
 1441 **atctgcaact tgaagaccac atacagatcc aagaaacccg ctaagaacct caagatgcc**
 1501 **ggcgtctact atgtggacag aagactggaa agaatcaagg aggccgacaa agagacctac**
 1561 **gtcagcagc acgaggtggc tgtggccaga tactgcgacc tcctagcaa actggggcac**
 1621 aaacttaatt gcctgcagga gaagaagtca tgcagccagc gcattggccga attccggcaa
 1681 tactgttgga acccgacac tgggcagatg ctgggcgcga cccagccccg gtgggtgtgg
 1741 atcagcctgt actatgcagc ttctacgtg gtcagtactg ggctctttgc cttgtgcatc
 1801 tatgtgctga tgcagacat tgatccctac accccgact accaggacca gttaaagtca
 1861 ccgggggtaa ccttgagacc ggatgtgtat ggggaaagag ggctgcagat ttctacaac
 1921 atctctgaaa acagctctag acaggcccag atcaccggac gtccggagac tgagacattg
 1981 ccaccggtgg actacggggg ggcctgagc gctgtgggca gagaactcct gtctgtgaca
 2041 aatccagtcg tggtagaacg ctccgtactc gtaccggagg atcagtgcta ttgcgcagga
 2101 tggatcgaga gcagagccac aaacggcgca cagactgcat ccaacgtgct ccagtggttg
 2161 gcgcaggct ttccattct cctgctcatg ttttacgct accagacttg gaagtccaca
 2221 tgtgctggg aggaatcta cgtgtgtgca atcgaaatgg tgaagggtgat cctggagttt
 2281 ttcttcgaat ttaaaaaccc aagcatgctg tacctggcta ctggccacag agtgacgtgg
 2341 ctgcggtatg ccgaatggct gctgacttgc ccagtgtatt gcattccact gtccaacctg
 2401 actgggctgt ctaacgatta cagtaggaga acaatgggac tgctcgtatc cgacatcggc
 2461 actatcgtat gggcgcaac tagtgccatg gccactggat acgtgaaagt gatcttcttc

10

20

30

【 0 0 5 5】

【化 1 4】

2521 tgctggggac tctgctacgg agcaaacaca ttttttcatg ccgcaaaagc atatatcgag
 2581 gggtatcata ccgtcccaaa gggccggtgt agacaagtgg tgactggcat ggcttggctg
 2641 ttcttcgtgt cctgggggat gtttccatc ctctttatcc tgggcccaga aggcttcggg
 2701 gtgctgagtg tgtatggcag taccgtagg cactatca ttgacctgat gagcaaaac
 2761 tgctgggggc tgctcgcca ctacctgaga gtactcatcc acgagcatat cctgattcat
 2821 ggcgatatcc ggaaaactac caagctcaat atcgggggca ccgagattga agtgagaca
 2881 ctcgtggagg acgaggcca ggcggagca gtgaacaaag gactggcaa gtatgcctcc
 2941 agagaatcct ttctggtgat gcgggacaaa atgaaggaga aaggcattga tgtacggtgc
 3001 agtaatgcca aagccgtcga gactgatgtg tag

本発明の単一変異体 ChR2 は、以下の合成構築物 hVChR1 - mKate - beta hChR2 (L132C) アミノ酸配列 (GenBank アクセス番号 AER29839、および配列番号 10) によってコードされ得、注釈は以下の通りである、GFP 配列は太字であり、L132C Chp2 配列には下線が引かれている：

【 0 0 5 6】

40

【化 1 5】

```

1 mdypvarsli vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrsgt siektiaitl qwvfvalsva
61 clgwyayqaw ratcgweevy valiemmxsi ieafhefdsp atlwlssng vvwrmrygewl
121 ltcvlllhl snltglkddy skrtmgllvs dvgcivwgt samctgwtki lffllislsyg
181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelvrvm awtffvawgm fpvllfillgte gfgghispygs
241 aighsildli aknmwgvlg ylrvihihi llygdirkkq kitiaggeme vetlvaeed
301 gtavatmvsk geelikenmh mklymegtnv nhhfktseg egkpyegtqt mrikvveggp
361 lpfafdilat sfmygsktft nhtqgipdff kqsfpegftw ervttyedgg vltatqdtst
421 qdgcliynvk irgvnfpsng pvmqkktlgw eastemlypa dgglegadm alklvggghl
481 icnlkttysr kkpaknlkmp gvyyvdrle rikeadkety veqhevavar ycdlpsklgh
541 klncqlqekks csqrmaefrq ycwnpdtgqm lgrtparvwv islyyaafyv vmtglfalci
601 yvlmqtidpy tpdydqqlks pgvtlrpdvy gerglqisyn isenssraq itgrpetetl
661 ppvdyggals avgrellfvt npvvngsvl vpedqcyag wiesrgtnga gtasnlqwl
721 aagfsilllm fyaygtwkst cgweeiyyca iemvkilef ffefknpsml ylatghrvqw
781 lryaewlltc pvicihlsnl tqlsndysrr tmglvdsdig tivwgatsam atgyvkviff
841 clglcygant ffhaakayie gyhtvpkgrc rgvvtgmawl ffvswgmfpf lfilgpegfg
901 vlsvygstvg htiiidmskn cwglghylr vlihehilih gdirkttkln iggteievst
961 lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv

```

10

本発明の単一変異体 C h o p 2 は、以下の合成構築物 h V C h R 1 - m K a t e - b e t a h C h R 2 (L 1 3 2 C) 遺伝子配列 (G e n B a n k アクセション番号 J N 8 3 6 7 4 5、および配列番号 1 1) によってコードされ得、注釈は以下の通りである、G F P 配列は太字であり、L 1 3 2 C C h o p 2 配列には下線が引かれている：

【 0 0 5 7】

【化 1 6】

20

```

1 atggattacc ctgtggcccg gtccctgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgga
61 accgtgtgca tgcccagagg acaatgctac tgcgaggggt ggctgaggag ccggggcact
121 agtatcgaaa aaaccatcgc tatcaccctc cagtgggtag tgttcgctct gtccgtagcc
181 tgtctcggtt ggtatgcata ccaagcctgg agggctacct gtgggtggga ggaagtatac
241 gtggccctga tcgagatgat gaagtccatc atcgaggctt tccatgagtt cgactcccca
301 gccacactct ggctcagcag tgggaatggc gtagtgtgga tgagatatgg agagtggctg
361 ctgacctgtc ccgtcctgct cattcatctg tccaatctga ccgggctgaa agatgactac
421 tccaagagaa caatgggact gctggtgagt gacgtggggt gtatttgtgtg gggagccacc
481 tccgccatgt gcaactggat gaccaagatc ctctttttcc tgatttcctt ctcctatggg
541 atgtatacat acttccacgc cgctaagggt tatattgagg ccttccacac tgtacctaaa
601 ggcatctgta gggagctcgt gcggtgatg gcatggacct tctttgtggc ctgggggatg
661 ttccccgtgc tgttctctct cggcactgag ggatttggcc acattagtcc ttacgggtcc
721 gcaattggac actccatcct ggatctgatt gccaaagaata tgtggggggg gctgggaaat
781 tatctgctgg taaagatcca cgagcatatc ctgctgtatg gcgatatac aaagaagcag
841 aaaatcacca ttgctggaca ggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac
901 gggaccgcgg tcgccaccat ggtgtctaag ggcgaagagc tgattaagga gaacatgcac

```

30

【 0 0 5 8】

【化 1 7】

961 atgaagctgt acatggaggg caccgtgaac aaccaccact tcaagtgcac atccgagggc
 1021 gaaggcaagc cctacgaggg caccagacc atgagaatca aggtggtcga gggcgccct
 1081 ctccccctcg ccttcgacat cctggctacc agcttcatgt acggcagcaa aaccttcac
 1141 aaccacaccc agggcatccc cgacttcttt aagcagtcct tccttgaggg cttcacatgg
 1201 gagagagtca ccacatacga agacgggggc gtgctgaccg ctaccagga caccagcctc
 1261 caggacggct gcctcatcta caacgtcaag atcagagggg tgaacttccc atccaacggc
 1321 cctgtgatgc agaagaaaac actcgctgg gaggcctcca ccgagatgct gtaccccgct
 1381 gacggcggcc tggaaggcag agccgacatg gccctgaagc tcgtggggcg ggggcacctg
 1441 atctgcaact tgaagaccac atacagatcc aagaaacccg ctaagaacct caagatgccc
 1501 ggcgtctact atgtggacag aagactggaa agaatcaagg aggccgacaa agagacctac
 1561 gtcagcagc acgaggtggc tgtggccaga tactgcgacc tccttagcaa actggggcac
 1621 aaacttaatt gcctgcagga gaagaagta tgacagccag gcattggcca attccggcaa
 1681 tactgtttga acccggacac tgggcagatg ctgggcgcga cccagccc gtgggtgtgg
 1741 atcagcctgt actatgcagc tttctacgtg gtcatgactg ggctctttgc cttgtgcac
 1801 tatgtgctga tgacagccat tgatccctac accccgact accaggacca gttaaagtca
 1861 ccgggggtaa ccttgagacc ggatgtgtat ggggaaagag ggctgcagat ttcctacaac
 1921 atctctgaaa acagctctag acaggcccag atcaccggac gtccggagac tgagacattg
 1981 ccaccggtgg actacggggg ggccctgagc gctgtgggca gagaactcct gttcgtgaca
 2041 aatccagtcg tggtgaacgg ctccgtactc gtacccgagg atcagtgcct ttgcgcagga
 2101 tggtatcgaga gcagagggcac aaacggcgca cagactgcac ccaacgtgct ccagtgggtg
 2161 gccgcaggct tttccattct cctgctcatg ttttacgcct accagacttg gaagtccaca
 2221 tgtggctggg aggaaatcta cgtgtgtgca atcgaaatgg tgaaggtgat cctggagttt
 2281 ttcttcgaat ttaaaaaccc aagcatgctg tacctggcta ctggccacag agtgcagtg
 2341 ctcggttatg ccgaatggct gctgacttgc ccagtgatcc tgatccacct gtccaacctg
 2401 actgggctgt ctaacgatta cagtaggaga acaatggggc tgctcgtatc cgacatcggc
 2461 actatcgtat ggggcgcaac tagtgccatg gccactggat acgtgaaagt gatcttcttc
 2521 tgctggggac tctgtacgg agcaaacaca tttttcatg ccgcaaaagc atatatcgag
 2581 gggtatcata ccgtcccaaa gggcccgtgt agacaagtgg tgactggcat ggcttggctg
 2641 ttcttcgtgt cctgggggat gtttcccatc ctctttatcc tgggcccaga aggttcggg
 2701 gtcgtgagtg tgtatggcag taccgtagga cacactatca ttgacctgat gagcaaaaac
 2761 tgctgggggc tgctcgcca ctacctgaga gtactcatcc acgagcatat cctgattcat
 2821 ggcgatatcc ggaaaactac caagctcaat atcgggggca ccgagattga agtggagaca
 2881 ctcgtggagg acgagggcca ggccggagca gtgaacaaag gcactggcaa gtatgcctcc
 2941 agagaatcct ttctggtgat gcgggacaaa atgaaggaga aaggcattga tgtagcgtgc
 3001 agtaatgcca aagccgtcga gactgatgtg tag

10

20

本発明の単一変異体 C h o p 2 は、以下の合成構築物 h V C h R 1 - m K a t e - b e
 t a h C h R 2 (L 1 3 2 C) アミノ酸配列 (G e n B a n k アクセション番号 A E R
 2 9 8 3 8、および配列番号 1 2) によってコードされ得、注釈は以下の通りである、G
 F P 配列は太字であり、L 1 3 2 C C h o p 2 配列には下線が引かれている：

30

【 0 0 5 9】

【化 1 8】

1 mdypvarsli vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrsgt siektiaitl qwvfvalsva
 61 clgwyaygaw ratcgweevy valiemnksi ieafhefdsp atlwlssng vwmrygewl
 121 ltcpvllihl snltgklddy skrtmglivs dvgcivwgt samctgwtki lfflislsyg
 181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelvrvm awtffvawgm fpvlflllgte gfghispygs
 241 aighsildli aknmwgvln ylrvihehi llygdirkkq kitiaggeme vetlvaeed
 301 gtavatmvsk **geelikenmh** **mklymegtnv** **nhhfktseg** **egkpyegtqt** **mrikvveggp**
 361 **lpfafdilal** **sfmygsktfi** **nhtqgipdff** **kqsfpegftw** **ervttyedgg** **vltatqdtst**
 421 **qdgcliynvk** **irgvnfpsng** **pvmqkktlgw** **eastemlypa** **dggleggradm** **alklvggghl**
 481 **icnlkttysr** **kkpaknlkmp** **gvyyvdrle** **rikeadkety** **veqhevavar** **ycdlpsklgh**
 541 klnclqekks csqrmaefrq ycnwvdtgqm lgrtparvwv islyyaafyv vmtglfalci
 601 yvlmqtidpy tpdyqdlks pgvtrlpdvy gerglqisyn isenssrqag itgrpetetl
 661 ppvdyggals avgrellfvt npvvnngsvl vpedgcycag wiesrgtnga qtasnvlqwl
 721 **aagfsilllm** **fyayqtwkst** **cgweeiycv** **iemkvilef** **ffefknpsml** **ylatghrvqw**
 781 **lryaewlltc** **pvlilhsl** **tglsndysrr** **tmglivsdiq** **tivwgatsam** **atgyvkviff**
 841 **clglcygant** **ffhaakayie** **gyhtvpkgrc** **rqvvtgmawl** **ffvswgmfp** **lflilgpegfg**
 901 **vlsvygstvg** **htiidlmskn** **cwglghylr** **vlihehilih** **gdirkttkln** **iggteievet**
 961 **lvedeaeaga** **vnkgtgkyas** **resflvmrdk** **mkekgidvrc** **snakavetdv**

40

本発明の L 1 3 2 C 単一変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ
 得る (位置 1 3 2 は下線および太字、配列番号 1 3) :

【 0 0 6 0】

【化 1 9】

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

本発明の T 1 5 9 C 単一変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る（位置 1 5 9 は下線および太字、配列番号 1 4）：

【0 0 6 1】

【化 2 0】

10

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

本発明の L 1 3 2 C / T 1 5 9 C 二重変異体 C h o p 2 は、以下のヌクレオチド配列によってコードされ得る（配列番号 1 5）：

【0 0 6 2】

【化 2 1】

20

```

1 atggactacg ggggggctct gtctgtctgc gggagggaac tgctgtttgt gactaacctt
61 gtcgtcgtga acgggagtggt gctgggccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc
121 gaatcacgcg gaaccaacgg gccccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct
181 ggggttagta tctctgtctg gatgttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcggc
241 tgggaggaaa tctacgtgtg cgtattgag atggtgaaag tgatcctgga gttctctctc
301 gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgcg gtggctgaga
361 tatgcagaat ggctgctgac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc
421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgctccgacat cggctgcatt
481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgcctg
541 gggctgtgct atggcgcaaa tacctttttc caccgagcca aggcctacat tgagggggtat
601 cataccgtgc caaaaggccg gtgccgacag gtggtcacag gaatggcttg gctgtttttc
661 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg
721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg
781 ggctgtctgg gacactatct gagagtgtg atccacgagc atatcctgat tcatggcgat
841 attcggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacactgggtg
901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

```

30

本発明の L 1 3 2 C / T 1 5 9 C 二重変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る（位置 1 3 2 および 1 5 9 は下線および太字、配列番号 1 6）：

【0 0 6 3】

【化 2 2】

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR

```

【0 0 6 4】

【化 2 3】

40

```

121 YAEWLLTCPV ICIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

本発明の T 1 5 9 S 単一変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る（位置 1 5 9 は下線および太字、配列番号 1 7）：

【0 0 6 5】

【化 2 4】

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFCFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

本発明の L 1 3 2 C / T 1 5 9 S 二重変異体 C h o p 2 は、以下のヌクレオチド配列によってコードされ得る（配列番号 1 8）：

【0 0 6 6】

【化 2 5】

```

1 atggactacg ggggggctct gtctgtctgc gggagggaac tgctgtttgt gactaaccct
61 gtcgtcgtga acgggagtggt gctggtccct gaggaccagt gctactgtgc cggtgggacg
121 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct
181 ggggttagta tcctgtctgt gatgtctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcccgc
241 tgggaggaaa tctacgtgtg cgtattgag atgggtgaaag tgatcctgga gttcttcttc
301 gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgcg gtggctgaga
361 tatgcagaat ggctgtctgc atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc
421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgtccgacat cggcagcatt
481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt ttctgtcctg
541 gggtgtgtct atggcgcaaa taccttttcc cagcagcca aggcctacat tgagggggat
601 cataccgtgc caaaaggccg gtgcccagag gtggtcacag gaatggcttg gctgttttcc
661 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg
721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg
781 ggcctgtctg gacactatct gagagtgtct atccacgagc atatcctgat tcatggcgat
841 attcggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacactggtg
901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaaa

```

本発明の L 1 3 2 C / T 1 5 9 S 二重変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る（位置 1 3 2 および 1 5 9 は下線および太字、配列番号 1 9）：

【0 0 6 7】

【化 2 6】

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFCFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

本発明の L 1 3 2 A 単一変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る（位置 1 3 2 は下線および太字、配列番号 2 0）：

【0 0 6 8】

【化 2 7】

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IAIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFCFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

本発明の L 1 3 2 A / T 1 5 9 C 二重変異体 C h o p 2 は、以下のヌクレオチド配列によってコードされ得る（配列番号 2 1）：

【0 0 6 9】

10

20

30

40

【化 2 8】

```

1 ATGGACTACG GGGGGGCTCT GTCTGCTGTC GGGAGGGAAC TGCTGTTTGT GACTAACCCCT
61 GTCGTCGTGA ACGGGAGTGT GCTGGTCCCT GAGGACCAGT GCTACTGTGC CGGCTGGATC
121 GAATCACGCG GAACCAACGG GGCCAGACA GCTAGCAATG TGCTGCAGTG GCTGGCCGCT
181 GGGTTTAGTA TCCTGCTGCT GATGTTCTAC GCCTATCAGA CTTGGAAGTC AACCTGCGGC
241 TGGGAGGAAA TCTACGTGTG CGCTATTGAG ATGGTGAAAG TGATCCTGGA GTTCTTCTTC
301 GAGTTCAAGA ACCCAAGCAT GCTGTACCTG GCTACTGGAC ACCGAGTGCA GTGGCTGAGA
361 TATGCAGAAT GGCTGCTGAC ATGCCCCGTC ATCGCCATTC ACCTGTCCAA CCTGACAGGC
421 CTGAGCAATG ACTACTCCAG GAGAACTATG GGACTGCTGG TGTCCGACAT CGGCTGCATT
481 GTCTGGGGAG CAACTTCTGC TATGGCAACC GGATACGTGA AGGTCATCTT TTTCTGCCTG
541 GGGCTGTGCT ATGGCGCAAA TACCTTTTC CACGCAGCCA AGGCCTACAT TGAGGGGTAT
601 CATACCGTGC CAAAAGGCCG GTGCCGACAG GTGGTCACAG GAATGGCTTG GCTGTTTTTC
661 GTCTCTTGGG GAATGTTTCC CATCTGTTC ATTCTGGGGC CTGAAGGGTT CGGCGTGCTG
721 TCTGTCTACG GAAGTACAGT GGGGCATACT ATCATTGACC TGATGTCCAA AAAGTGTGG
781 GGCCTGCTGG GACACTATCT GAGAGTGCTG ATCCACGAGC ATATCCTGAT TCATGGCGAT
841 ATTCGGAAGA CCACAAACT GAATATCGGC GGAACCGAGA TTGAAGTGGA AACACTGGTG
901 GAAGACGAGG CTGAGGCTGG GGCTGTGAAC AAGGGGACTG GCAAA

```

本発明の L 1 3 2 A / T 1 5 9 C 二重変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る（位置 1 3 2 および 1 5 9 は下線および太字、配列番号 2 2）：

【0 0 7 0】

【化 2 9】

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLMFY AYQTWKSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IAHLNLITG LSNDYSRRIM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANITF HAAYKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

本発明の T 1 5 9 A 単一変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る（位置 1 5 9 は下線および太字、配列番号 2 3）：

【0 0 7 1】

【化 3 0】

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLMFY AYQTWKSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLNLITG LSNDYSRRIM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANITF HAAYKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

本発明の L 1 3 2 C / T 1 5 9 A 二重変異体 C h o p 2 は、以下のヌクレオチド配列によってコードされ得る（配列番号 2 4）：

【0 0 7 2】

【化 3 1】

```

1 atggactacg ggggggctct gtctgctgtc gggaggggaac tgctgtttgt gactaacccct
61 gtcgtcgtga acgggagtgat gctggtccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc
121 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct
181 gggtttagta tctgctgctg gatgtttctac gctatcaga cttggaagtc aacctgcggc
241 tgggaggaaa tctacgtgtg cgctattgag atgggtgaaag tgatcctgga gttcttcttc
301 gaggttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgca gtggtgaga
361 tatgcagaat ggctgctgac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc
421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgctccgacat cggcgccatt
481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgctg
541 gggctgtgct atggcgcaaa taccttttcc cagcgagcca aggcctacat tgaggggtat
601 catacctgct caaaaaggcgg gtgcccagag gtggtcacag gaatggcttg gctgttttcc
661 gtctcttggg gaatgtttcc cactctgttc attctggggc ctgaaggggt cggcgctgtg
721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg
781 ggctgctggt gacactatct gagagtgtcg atccacgagc atatcctgat tcattggcgt
841 attcgggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacctgggtg
901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

```

本発明の L 1 3 2 C / T 1 5 9 A 二重変異体 C h o p 2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る（位置 1 3 2 および 1 5 9 は下線および太字、配列番号 2 5）：

【0 0 7 3】

10

20

30

40

50

【化 3 2】

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV ICIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFCCL
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

本発明の野生型 (WT) Chop2 は、以下のアミノ酸配列によってコードされ得る (配列番号 26) :

【0074】

【化 3 3】

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFSILLLMFY AYQTWKSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFCCL
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

本発明の変異体 ChR2 タンパク質はまた、より遅いチャネル動態を示す。より高い光感受性は、より遅いチャネル動態と関連することが見出され、光感受性とチャネル動態との間の二律背反を示した。本発明の ChR2 タンパク質を形成する Chop2 タンパク質はまた、ChR2 のチャネル動態を改善し得る、または非活性化速度を増大させ得る、さらなる変異または修飾を含み得る。特に好ましい ChR2 変異体は、光感受性の閾値とチャネル動態の釣り合いを保つ。

【0075】

組成物およびキット

本発明の組成物およびキットは、本発明の変異体 ChR2 タンパク質、および結果として生じる ChR2 をコードする、少なくとも 1 つの核酸分子またはポリペプチド分子を含む。本発明の変異体 ChR2 タンパク質をコードする、少なくとも 1 つの核酸分子またはポリペプチド分子はさらに、薬学的に受容可能なキャリアを含み得る。本発明のキットはさらに、本発明の組成物を被験体に投与するための説明書を含む。

【0076】

治療的使用

L132 (ロイシン 132) および T159 (トレオニン 159) 部位において単一および二重変異を生じるために、コドン最適化 Chop2 - GFP 融合タンパク質に変異を作製した。各変異体 ChR2、またはその組み合わせの機能的特性を、まず HEK 細胞において調査した。CAG プロモーターによって駆動される変異体 Chop2 - GFP 構築物を保持する AAV2 ウイルスベクターを作成し、そして成体マウスの眼に硝子体内注射した。変異体 Chop2 により媒介される光応答を、網膜全組織標本 (whole-mount retina) からの多電極アレイ記録を用いて調査した。

【0077】

単一変異体 ChR2、すなわち L132C および T159C は、ChR2 により媒介される光電流を誘発するために必要な光強度の閾値を、著しく下げる。さらに、L132C / T159C、L132A / T159C、および L132C / T159S を含む、いくつかの二重変異体 ChR2 改変体は、低い光強度で、どの単一変異体 ChR2 の結果よりも上回って、光電流をさらに増大させることが見出された。その二重変異体は、より遅い off 速度を示し、それはおそらく低い光強度における光電流の増大に寄与する。L132C / T159C 二重変異体によって媒介される網膜神経節細胞のスパイク活性が、 10^3 光子 / cm^2 / s の光強度および 473 nm の波長で観察された。この光レベルは、野生型 ChR2 でスパイク活性を誘発するために必要な光レベルより、約 1.5 から 2 log 単位低い。L132C / T159C を発現する網膜神経節細胞のスパイク発火は、15 Hz までの光明滅頻度に追従し得る。進行中の研究は、網膜ニューロンにおける、本発明の変異体 ChR2 の長期の発現および安全性を評価している。

【0078】

さらに、本発明の変異体Chop2タンパク質、および結果として生じるChR2タンパク質の発現は、マウスにおいてウイルス注射の2ヶ月後まで、神経毒性を引き起こさないことが見出され、治療的使用のための本発明の安全性を示した。

【0079】

本発明において使用するためのベクターは、プラスミドおよび組換えウイルス、すなわち組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)、組換えアデノウイルス、組換えレトロウイルス、組換えレンチウイルス、および当該分野で公知の他のウイルスのような、様々なウイルスベクターを含み得る。

【0080】

いくつかの実施態様において、本発明のChop2タンパク質の発現は、構成的プロモーター、すなわちCAGプロモーター、CMVプロモーター、LTRによって駆動される。他の実施態様において、そのプロモーターは、誘導性または細胞特異的プロモーターである。特定の細胞の亜集団、すなわち網膜ニューロン細胞、または変性細胞において、Chop2タンパク質の発現を可能にする、細胞型特異的プロモーターが好ましくあり得る。これらの細胞は、網膜神経節細胞、光受容細胞、双極細胞、桿体双極細胞、ON型錐体双極細胞、網膜神経節細胞、光感受性網膜神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞、またはAIIアマクリン細胞を含み得るがこれに限らない。細胞型特異的プロモーターは、当該分野で周知である。特に好ましい細胞型特異的プロモーターは、mGluR6、NK-3、およびPcp2(L7)を含むがこれに限らない。

【0081】

いくつかの実施態様において、本発明の変異体Chop2タンパク質および標的化遺伝子発現に加えて、異なるオプシン遺伝子の使用はさらに、光感受性を増大させ得る、または視覚を改善し得る。視覚情報は、2つの経路：光のONをシグナル伝達するON経路、および光のOFFをシグナル伝達するOFF経路によって、網膜を通して処理される。対比感度の増強のために、ONおよびOFF経路の存在が重要である。ON経路の視覚シグナルは、ON錐体双極細胞から、ON神経節細胞へ伝わる。ON錐体双極細胞およびON神経節細胞はどちらも、光に応答して脱分極する。他方、OFF経路の視覚シグナルは、OFF錐体双極細胞から、OFF神経節細胞へ伝わる。OFF錐体双極細胞およびOFF神経節細胞はどちらも、光に応答して過分極(hypopolarized)する。薄明かりで見る能力(暗所視)を担う桿体双極細胞は、ON双極細胞である(光に応答して脱分極する)。桿体双極細胞は、視覚シグナルを、AIIアマクリン細胞(ON型網膜細胞)を通して、ONおよびOFF錐体双極細胞に伝える。

【0082】

よって、視覚処理および視力に不可欠な、ONおよびOFF経路を再現するために、二重ロドプシンシステムを使用し得る。簡単には、本発明のChop2タンパク質を、ON型網膜ニューロン(すなわち、ON型神経節細胞および/またはON型双極細胞)に特異的に標的化し得、一方、過分極(hypopolarizing)する光センサー(すなわち、ハロロドプシンまたは当該分野で公知の他のクロライドポンプ)を、OFF型網膜ニューロン(すなわち、OFF型神経節細胞および/またはOFF型双極細胞)に標的化して、ONおよびOFF経路を生じ得る。好ましい細胞亜集団への特異的標的化を、異なる細胞型特異的プロモーターを用いることによって達成し得る。例えば、Chop2の発現を、ON型網膜ニューロン(すなわち、ON型神経節細胞および/またはON型双極細胞)における標的化発現のために、mGluR6プロモーターによって駆動し得、一方、ハロロドプシンのような過分極(hypopolarizing)するチャネルの発現を、OFF型網膜ニューロン(すなわち、OFF型神経節細胞および/またはOFF型双極細胞)における標的化発現のために、NK-3プロモーターによって駆動する。

【0083】

網膜においてONおよびOFF経路を回復するための代替のアプローチを、ChR2のような脱分極する光センサーを、桿体双極細胞またはAIIアマクリンに発現することに

10

20

30

40

50

よって達成する。このアプローチにおいて、桿体双極細胞またはA I I アマクリン細胞の脱分極は、錐体双極細胞および下流の網膜神経節細胞のレベルにおけるONおよびOFF応答を引き起こし得る。従って、網膜において固有のONおよびOFF経路が維持される。

【0084】

本発明を、被験体または患者に投与するために適当な、薬学的組成物または医薬に処方し得る。適当な投与経路は、例えば硝子体内注射、眼内注射、または網膜下注射を含む。

【0085】

そのような処方物は、生理学的pHを維持するための、緩衝化食塩水または他の緩衝液、例えばHEPESのような、薬学的および/または生理学的に受容可能なビヒクル、希釈剤、キャリア、または賦形剤を含む。そのような成分およびその処方物の議論のために、一般的に、Gennaro, A E., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2003または最新版を参照のこと。WO00/15822も参照のこと。もしその調製物を長期間保存するなら、例えばグリセロールの存在下で、それを凍結し得る。

【0086】

上記で記載した薬学的組成物を、標的化される網膜層に依存して、あらゆる適当な経路によって、好ましくは硝子体内注射または網膜下注射によって、視覚疾患または失明疾患 (blinding disease) を有する被験体に投与する。

【0087】

Bennettおよび同僚らの開示(本明細書中で引用される)は、網膜色素上皮-硝子体空間から最も遠位の層の標的化を懸念する。本発明によって、Chop2構築物またはポリペプチドを、網膜細胞、すなわち網膜神経節細胞または双極細胞に標的化する。そのような細胞は、本明細書中で開示されるような硝子体内注射に適度に良好に接近可能であることが公知である。硝子体内および/または網膜下注射は、特に変性のために光受容細胞層が存在しない状況においては、双極細胞に対して必要な接近を提供し得、それは本発明が克服することを意図するある形態の変性において当てはまる。

【0088】

AAV媒介性の送達によって、特に哺乳動物網膜ニューロンにおいて、本発明のChop2変異体を発現するベクターの能力を試験するために、SV40ポリA配列に結合した、LacZまたはGFPのようなリポーター遺伝子に結合した好ましいプロモーター配列の組み合わせを、プラスミドに挿入し、そしてrAAVウイルス粒子にパッケージングし、濃縮し、混入アデノウイルスに関して試験し、そして感染中心アッセイ(infectious center assay)を用いてrAAVに関して力価測定(titer)し得る。多くの試験被験体、好ましくは近交系マウスの右目に、約1 μ lのrAAV調製物(例えば約10¹⁰感染単位(infectious unit)mlより多い)を網膜下注射し得る。2週間後、半分の動物の右眼(試験)および左眼(コントロール)を除去し、固定し、そして適当な基質または抗体または他の物質で染色して、リポーター遺伝子の存在を明らかにし得る。注射した眼の試験網膜の大部分は、局在化した網膜の剥離を生じる、注射したウイルスの網膜下のプレブと一致して、限局性の染色領域、例えばLacZ/Xgalについては青、またはGFPについては緑を示す。全てのコントロール眼は、リポーター遺伝子産物に関して陰性であり得る。より後の時期に屠殺したマウスにおいて調査したリポーター遺伝子発現を、注射の少なくとも10週間後に検出し、それはリポーター導入遺伝子の持続する発現を示唆する。

【0089】

1つの実施態様において、導入遺伝子送達のために、Chop2構築物を、アデノウイルスベクターにパッケージングする。選択したプロモーター、好ましくは構成的CMVプロモーターまたはmGluR6のような細胞特異的プロモーターの制御下で、Chop2 DNAをコードする核酸配列を保持するrAAVビリオンの有効量は、注射あたり約15

10

20

30

40

50

0 および約 800 μ l の間の容積で、好ましくは約 10^{10} から約 10^{13} rAAV 感染単位の間である。rAAV 感染単位を、McLaughlin, SKら、1988、J Virol 62:1963 によって測定し得る。より好ましくは、その有効量は、約 10^{10} および約 10^{12} rAAV 感染単位の間であり、そして注射容積は、好ましくは約 250 および約 500 μ l の間である。好ましくはこれらの範囲内であるが、あるいはその外側である可能性もある、他の投与量および容積を、年齢、体重、一般的な健康、およびその特定の眼の障害の性質および重症度を含む、処置されている被験体（好ましくはヒト）の身体的状態を考慮して、処置する専門家が選択し得る。

【0090】

本核酸または rAAV 組成物のさらなる用量（「追加免疫（booster）」）を投与することも望ましくあり得る。例えば、眼の標的細胞内の導入遺伝子の発現期間に依存して、第2の処置を、6ヶ月後または毎年投与し得、そして同様に反復し得る。使用する経路および用量の観点から、AAV に対する中和抗体は産生されないことが予測され、従って反復回の処置を可能にする。

【0091】

そのようなさらなる用量の必要性を、例えば周知の電気生理学的および他の網膜および視覚機能試験および視覚行動試験を用いて、処置する専門家がモニターし得る。処置する専門家は、当該分野における日常的な技術を適用して、適切な試験を選択し得る。関連する結果パラメーターをさらに改善するために、単回用量または複数回用量のいずれかで、より多い量の組成物を注射することが望ましくあり得る。

【0092】

眼の障害

本Chop2タンパク質、および結果として生じるChR2タンパク質が意図され、そして視覚の1つまたはそれより多くのパラメーターを改善するために使用し得る眼の障害は、眼の前方および後方部分の両方に影響する発生異常を含むがこれに限らない。前方部分の障害は、緑内障、白内障、角膜ジストロフィー、円錐角膜を含む。後方部分の障害は、網膜ジストロフィーおよび変性によって引き起こされる、光受容体の機能不全および/または死によって引き起こされる、失明障害を含む。網膜の障害は、先天性停止性夜盲、加齢性黄斑変性、先天性錐体ジストロフィー、および網膜色素変性（RP）関連障害の大きなグループを含む。これらの障害は、様々な年齢で起こる、網膜の光受容細胞、桿体、および錐体の、遺伝的に素因のある死を含む。年齢とともに進行し、そして小児期および成人期初期に失明を引き起こす、RP自体のサブタイプのような重度の網膜症、およびしばしば0歳時のように早く、小児期の間に視覚の喪失をもたらす、LCAの遺伝的サブタイプのようなRP関連疾患が含まれる。後者の障害は一般的に、光受容細胞、桿体および錐体の、重度の減少、および多くの場合完全な喪失によって特徴付けられる（Trabulsi, EI編、Genetic Diseases of the Eye、Oxford University Press、NY、1998）。

【0093】

特に、本発明のChop2およびChR2タンパク質は、機能喪失にも関わらず眼の組織構造の長期保存によって、および機能喪失と被験体の眼の細胞における正常遺伝子の欠損または欠如との間の関連によって特徴付けられる、RPE関連網膜症のような、眼の障害に起因して視覚を失った被験体に対して処置および/または少なくとも部分的な視覚の回復に有用である。小児期に発症する失明疾患、網膜色素変性、黄斑変性、および糖尿病性網膜症、および当該分野で公知の眼の失明疾患のような、様々なそのような眼の障害が公知である。これらの他の障害、および現在原因が未知であり、後に上記と同じ説明によって特徴付けられる失明障害も、本発明のChop2およびChR2タンパク質によってうまく処置され得ることが予測される。従って、本発明によって処置される特定の眼の障害は、上記で述べた障害、およびまだ特徴付けられていない多くの疾患を含み得る。

【0094】

オプトジェネティクス（optogenetics）

10

20

30

40

50

出現しつつあるオプトジェネティクスの分野は、生きた組織の標的化細胞において、特定のイベントを制御する遺伝的および光学的方法の組み合わせを含む。オプトジェネティクスを、自由に動く哺乳動物および他の動物において使用し得る。さらに、オプトジェネティクス法の時間的精度（ミリ秒のタイムスケール）は、インタクトな生物学的システムにおいて機能するために十分である。

【0095】

本発明は、網膜細胞に、少なくとも1つのChop2の変異体形態をコードする核酸またはポリペプチドを導入することによって、眼の網膜組織に対してChop2遺伝子治療を提供する。本発明の変異体Chop2/ChR2タンパク質は、その野生型の対応物より低い光強度の閾値で光活性化されるように特異的に適合されている。よって、本発明の変異体Chop2/ChR2タンパク質を、より損傷の少ない照射源を用いて網膜および視覚系の細胞を活性化するために使用し得る。その変異体Chop2/ChR2タンパク質はまた、活性化時により大きい光電流を伝導し、変異体Chop2/ChR2発現細胞からより確固とした、または有効な応答をもたらす。

10

【0096】

例えば、本発明のChop2タンパク質を、変異体Chop2をコードする核酸分子、変異体Chop2ポリペプチド分子、または変異体Chop2/ChR2を発現する細胞の局所、硝子体内、または網膜下注射を介して、被験体に投与する。被験体の網膜細胞は、細胞膜内に変異体Chop2タンパク質を発現する。トランスフェクトした、または形質転換した網膜細胞が、光放射と遭遇した場合、そのトランスフェクトした、または形質転換した網膜細胞は、改善または回復したシグナルを伝達する。

20

【0097】

これらの方法を、正常な視覚および/または視覚障害を有する被験体において使用し得る。本発明のChop2/ChR2変異体は、視覚を維持、改善、または回復し得る。さらに、本発明のChop2/ChR2変異体を、光感受性網膜神経節細胞から脳への、非視覚情報の伝達を維持、改善、または回復するために使用する。

【0098】

本明細書中で使用される「視覚」という用語は、識別または行動のために刺激として光を有用に検出する生物の能力として定義される。視覚は、以下のものを含むことが意図される：

30

1. 光の検出または知覚 - 光が存在するかどうかを見分ける能力；
2. 光投影能 - 光刺激が来る方向を見分ける能力；
3. 分解能 - 格子または文字標的において、異なる明るさレベル（すなわちコントラスト）を検出する能力；
4. 認識 - 標的内の異なるコントラストレベルを参照することによって、視覚標的の形状を認識する能力。

【0099】

従って、「視覚」は、単に光の存在を検出する能力を含む。本発明の変異体Chop2をコードするポリペプチドおよびポリヌクレオチドを使用して、視覚を改善または回復し得、ここでその視覚の改善または回復は、例えば、光の検出または知覚の増大、光刺激に応答した光感受性または羞明の増大、光刺激が来る方向を見分ける能力の増大、異なる明るさレベルを検出する能力の増大、視覚的標的の形状を認識する能力の増大、および視覚誘発電位または網膜から皮質への伝達の増大を含む。従って、視覚の改善または回復は、視力の完全な回復、すなわち、本発明で処置された患者の視覚が、罹患していない個体の視覚の程度まで回復されることを含み得る、または含まないかもしれない。下記で記載する動物実験において記載される視覚の回復は、ヒトの関係において、完全な視力を回復することなく、視覚の1つの局面（すなわち、光感受性、または視覚誘発電位）を増大させることによって、そのヒトを視覚機能の下端に置き得る。それにも関わらず、そのようなレベルにすることは、有意に有益である。なぜなら、これらの個体は、運動性（mobility）において、および潜在的に低分解能のタスクにおいて訓練し得、それは完全な

40

50

盲目と比較して、非常に改善したレベルの視覚的な独立を彼らに提供するからである。基本的な光の知覚さえ、視覚に障害のある個体によって使用され得、その視覚は本組成物および方法を用いて改善されて、特定の毎日のタスクを達成し、そして一般的な運動性、能力、および生活の質を改善する。

【0100】

視覚の回復の程度を、例えばChop2をコードするDNAを含むベクターを投与する前、および好ましくはその後に視覚を測定することによって決定し得る。当該分野において周知の多くの方法、またはまだ確立されていない方法のいずれかを用いて、視覚を測定し得る。本発明によって改善または回復した視覚を、以下の視覚応答のいずれかによって測定し得る：

1．光刺激に曝露した後の被験体による光検出応答、ここで明かりを点灯した場合に、その対象の個体による、光のおおよその方向の指示または動作の信頼性の高い応答に関して証拠を探す；

2．光刺激への曝露後の被験体による光投影応答、ここで明かりを点灯した場合に、その個体による、光の特定の方向の指示または動作の信頼性の高い応答に関して証拠を探す；

3．光対暗パターン化視覚刺激の被験体による光分解能、それは以下のものによって証明される、光対暗パターン化視覚刺激を解像する被験体の能力を測定する：

a．明白な、信頼性の高い、視動性に生じた眼振様の眼の動き、および／もしくは標的（上記を参照のこと）の追跡を示す関連する頭部または体の運動の存在、ならびに／または

b．パターン化視覚刺激を識別する、およびそのような識別を、言語、もしくは例えば指差し、またはバーまたはボタンを押すことを含む非言語的手段によって示す、信頼性の高い能力の存在；あるいは

4．閃光刺激またはパターン視覚刺激に対する視覚皮質応答の電気的記録、それは回復した網膜から視覚皮質への電気的伝達のエンドポイントであり、視覚誘発電位（VEP）とも呼ばれる。測定は、皮質表面における、視覚皮質領域の頭皮表面における電気的記録、および／または視覚皮質の細胞内の記録により得る。

【0101】

従って、本発明による視覚の改善または回復は、網膜細胞の光刺激に応答した、光電流の振幅または動態、または電気的応答の増大、網膜細胞の光感受性の増大（すなわち、光刺激に応答した光電流または電気的応答の開始に必要な光強度閾値の低下、それによる光電流を誘発するために必要な光の減少または低下）、光誘発性スパイクまたはスパイク発火の数または振幅の増大、網膜または網膜細胞から、視覚皮質または脳に伝達される視覚誘発電位の増大を含む、視覚皮質に対する光応答の増大を含み得るがこれに限らない。

【0102】

本発明の様々なパラメーターを評価するために、ヒトの眼の失明障害の、認識された動物モデルを含む、インビトロおよびインビボ研究の両方を使用し得る。ヒト網膜症、例えば小児期の失明の大型動物モデルは有用である。本明細書中で提供される実施例は、当業者が、この方法を一連の網膜疾患を処置するために同様に使用し得ることを、容易に予測することを可能にする。

【0103】

他の人々による初期の研究は、網膜の変性を遺伝子治療技術によって遅らせ得ることを示したが、本発明は、機能の明確な生理学的回復を示し、それは行動パラメーターを含む、視覚の様々なパラメーターを産生または改善することが期待される。

【0104】

公知の動物モデルおよび試験、例えば、視覚が維持されている、または様々な程度に回復した被験体が、光に向かって泳ぐ水迷路における成績を用いて、行動の測定値を得ることができる（Hayes, J Mら、1993、Behav Genet 23:395~403）。

【0105】

成体の間に盲目が誘導されるか、または個体が視覚を失う前にその個体が視覚を経験するのに十分ゆっくりと先天性の盲目が進行するモデルにおいて、様々な試験でその被験体の訓練を行い得る。この方法において、その視覚回復効果に関して本組成物および方法の有効性を試験するために、これらの試験を視覚喪失後に再び施す場合、動物は盲目状態で新規にタスクを学習する必要がない。他の行動試験は、学習を必要とせず、そしてある行動の本能的であること (instinctiveness) に依存する。例は、視動性眼振試験である (Balkema GWら、1984、Invest Ophthalmol Vis Sci. 25:795-800; Mitchiner JCら、1976、Vision Res. 16:1169-71)。

【0106】

本発明をまた、視覚を改善または回復することが当該分野で公知である他の形態の視覚治療と組み合わせて使用し得る。例えば、網膜インプラント、角膜インプラント、外側膝状体核インプラント、または視神経インプラントを含む、視覚プロテーゼ (visual prostheses) の使用。従って、本方法を用いた生存網膜ニューロンの遺伝的修飾に加えて、処置されている被験体に、分子的方法を採用する前に、それと同時に、またはその後に視覚プロテーゼ (visual prosthesis) を提供し得る。視覚プロテーゼ (visual prosthetics) の有効性を、その個体の訓練によって改善し、従って本明細書中で企図される、患者細胞のChop2形質転換の潜在的な影響を増強し得る。(i) 様々なレベルの光および/またはパターン刺激、および/または(ii) 当業者によって理解されるような、一般的な光源または物体からの環境刺激を認識するように被験体を訓練することによって特徴付けられる習慣訓練; および局所的な物体を視覚的に検出し、そして訓練無しよりも効率的に当該物体の間を移動するように被験体を訓練することによって特徴付けられる、見当識および運動性訓練のような訓練法。実際、低視覚のリハビリテーションの分野で典型的に使用される、あらゆる視覚刺激技術を、ここに適用可能である。

【実施例】

【0107】

実施例1: 標識変異体Chop2構築物の生成

コドン最適化Chop2-GFP融合タンパク質に対して変異を作製し、L132 (ロイシン132) およびT159 (トレオニン159) 部位において単一および二重変異を産生した。いくつかの変異体、例えば、L132A、L132C、T159A、T159C、およびT159Sのような単一変異体、およびL132C/T159C、L132C/T159S、L132A/T159C、およびL132C/T159Aのような二重変異体を産生した。Chop2-GFP導入遺伝子を、当該分野で公知の方法を用いて、CAGプロモーターの制御下でrAAVベクターにクローニングした。

【0108】

実施例2: 変異体Chop2構築物のインビトロ分析

各変異体Chop2、またはその組み合わせの機能的特性を、最初にHEK細胞において調査した。Chop2構築物を、例えばアデノウイルスの感染によって、HEK細胞に送達した。WTまたは変異体Chop2の発現時に、機能的WTおよび変異体ChR2チャネルが形成された。ChR2チャネルの光感受性および他の特性の測定値を、本明細書中で記載したように評価した。光刺激 (460 nm において光子 $/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$) を、キセノンアークランプによって産生し、そして濃度フィルターによって減弱した: ND4.0 (2.8×10^{-14})、ND3.0 (1.4×10^{-15})、ND2.5 (4.8×10^{-15}); ND2.0 (1.6×10^{-16})、ND1.0 (1.3×10^{-17})、ND0 (1.2×10^{-18})。光誘発電流を、野生型ChR2、T159C、L132C、L132C/T159C、およびL132C/T159Sから測定した。当該分野で公知の方法を用いて、パッチクランプ記録を行った。

【0109】

Chop2構築物の間で光感受性を比較したこの実験からの代表的な記録は、L132

における変異は単独で、またはT159における変異と組み合わせて、WTと比較して光電流の増大を示すことを実証した(図1Aおよび1B)。図1Bは、WT ChR2およびChR2変異体の間の、光電流の振幅の差異をより明らかに示すために、同じ電流トレースを異なるスケールで示す。図1Bは、 4.8×10^{15} 光子/cm²/sと同等の、濃度フィルター(ND2.5)を用いた光刺激から生じる電流トレースを具体的に比較する；そのトレースを矢印によって示す。L132C変異体の光電流の振幅は、WTのものより大きい；二重変異体L132C/T159Cの光電流の振幅は、L132Cのものより大きい；およびL132C/T159S変異体の光電流の振幅は、L132C/T159Cのものより大きい。ChR2変異体、特に二重変異体L132C/T159CおよびL132C/T159Sの電流トレースはまた、WTおよびL132Cと比較した場合に、より遅い非活性化動態を示す。

10

【0110】

図2は、消灯後の非活性化時間の過程、または減衰時間の過程を比較するために、10msの光パルス(460nmの波長で 1.2×10^{18} 光子/cm²/s)による刺激後の、WT ChR2、L132C、L132C/T159C、およびL132C/T159Sからの光誘発電流の代表的な記録を示す。変異体ChR2は、より長い非活性化時間の過程を示し、二重変異体L132C/T159Sが最も長かった。L132C/T159CおよびL132C/T159Sによって示されるような、より高い光感受性は、より遅いチャネル動態と関連し得る。

【0111】

20

実施例3：変異体Chop2構築物のインビボにおける眼への投与および分析

CAGプロモーターによって駆動される変異体Chop2-GFP構築物を保持するAAV2ウイルスベクターを作製し、そしてC57BL/6J成体マウスの眼に硝子体内注射した。成体マウスを、ケタミン(100mg/kg)およびキシラジン(10mg/kg)のIP注射によって麻酔した。解剖顕微鏡下で、眼瞼をハサミで切開し、強膜を露出した。針で水晶体の後方の強膜領域に小さい穿孔をあけ、そして約 10^{11} ゲノム粒子/mlの濃度の0.8~1.5μlのウイルスベクター懸濁液を、32ゲージの平滑末端針を有するハミルトンシリンジで、その孔から硝子体内スペースに注射した。各動物に関して、通常一方の眼のみに、Chop2構築物を有するウイルスベクターを注射し、そして他方の眼には注射しないか、またはGFPのみを有するコントロールウイルスベクターを注射した。WTまたは本発明の変異体Chop2の発現時に、内因性レチナールを用いて機能的WTまたは変異体ChR2チャネルが形成され、そしてこれらのChR2タンパク質の特性を、本明細書中で記載したように評価した。

30

【0112】

ChR2に媒介される光応答を、全組織標本網膜由来の多電極アレイ記録によって調査した。光刺激(光子/cm²/s)を、473nmの青色レーザーで産生し、そして濃度フィルターによって減弱した：ND0(6.3×10^{16})、ND1.0(7.4×10^{15})、ND1.5(2.7×10^{15})、ND2.0(7.3×10^{14})、ND2.5(3.2×10^{14})、ND3.0(8.5×10^{13})、ND3.5(3.8×10^{13})、およびND4.0(9.5×10^{12})。

40

【0113】

多電極アレイ記録は、TianおよびCopenhagen(2003)によって報告された手順に基づいていた。簡単には、網膜を切開し、そして光受容体側を下にしてニトロセルローズフィルターペーパー片(Millipore Corp.、Bedford、MA)に置いた。標本にした(mounted)網膜を、神経節細胞層を記録電極に面して、200μm離しておいた直径30μmの電極の、MEA-60多電極アレイ記録チャンパーに置いた(Multi Channel System MCS GmbH、Reutlingen、Germany)。その網膜を、全ての実験の間、34の酸素添加細胞外溶液で持続的に灌流した。その細胞外溶液は、以下のものを含んでいた(mM)：NaCl、124；KCl、2.5；CaCl₂、2；MgCl₂、2；NaH₂PO

50

4、1.25; NaHCO_3 、26; およびグルコース、22 (pH 7.35、95% O_2 および5% CO_2)。通常、網膜を記録チャンバーに置いてから60分後に記録を開始した。各光刺激の開始の間の間隔は、10~15sであった。シグナルを、200Hz (低カットオフ) および20kHz (高カットオフ) の間でフィルタリングした。個々のニューロンからの応答を、Offline Sorterソフトウェア (Plexon, Inc., Dallas, TX) を用いて分析した。

【0114】

単一変異体 *Chop2/ChR2* 変異体、すなわち *L132* および *T159C* は、*ChR2* に媒介される光電流を誘発するために必要な光強度閾値を著しく低下させる。さらに、*L132C/T159C*、*L132A/T159C*、および *L132C/T159S* を含む、いくつかの二重変異体は、低い光強度で、光電流をさらに増大させることが見出された。異なる濃度フィルターを使用して、光刺激を減弱して、低い光における *Chop2* 構築物の光誘発応答を区別した。本発明の変異体によって媒介される、網膜神経節細胞のスパイク活性を、野生型 *ChR2* でスパイク活性を誘発するために必要な光レベルより、約1.5から2 log 単位低い光強度で観察した (図3)。具体的には、WT *ChR2* は、濃度フィルター2.5による光刺激 (3.2×10^{14} 光子/cm²/s) に応答していかなるスパイク活性も示さない一方、*ChR2* 変異体 (*L132C*、*L132C/T159C*、および *L132C/T159S*) は、スパイク活性を示した。実際、*ChR2* 変異体は、濃度フィルター3.0および3.5による光に応答して、依然としてスパイク活性を示した。従って、本発明の *ChR2* 変異体は、より高い光感受性を有し、そして従って、*ChR2* に媒介される光電流を誘発するために必要な光強度閾値が著しく低い。さらに、*ChR2* 二重変異体は、単一変異体、すなわち *L132C* よりも高い光感受性を有する。それに加えて、*L132C/T159C* および *L132/T159S* を発現する網膜神経節細胞のスパイク発火は、それぞれ15Hzおよび5Hzまでの光明滅頻度に追従し得る (図4)。

【0115】

L132C/T159A 変異体は、高い光感受性を示し、おそらくこれらの変異体のうちで最も高い光感受性を示すが、それはまた極めて遅いオフ速度を示す (チャンネルは、消灯後、長い秒数にわたって開口し続ける)。興味深いことに、黄色光のような長い波長の光を用いて、それをより迅速にオフにすることができる。*L132C/T159A* 変異体 (配列番号24および25番によってコードされる) は、有意な可能性を示す。

【0116】

光感受性およびチャンネル動態の間の二律背反を考慮して、*L132C/T159C* または *L132C/T159S* のような、光感受性およびチャンネル動態の間のバランスを示す *Chop2/ChR2* 変異体が、視覚回復の適用のために適当であり得る。

【0117】

実施例4：疾患のマウスモデルにおける、変異体 *Chop2* 構築物の分析

変性眼科疾患のマウスモデルが、当該分野で公知である。例えば、ホモ接合 *rd1* (*rd1/rd1*) マウスは、一般的に使用される光受容体変性モデルである。*Rd1* マウスは、サイクリックGMPホスホジエステラーゼ、PDE6にヌル変異を有し、ヒトにおける一部の形態の網膜色素変性に類似する。*ChR2* 変異体の安全性および有効性を示すために特に関心のあり得る、他のよく確立された眼科疾患のマウスモデルは、*rd5* (*Prph^{Rd2}* としても公知である)、*rd3*、*rd4*、*rd5*、*rd6*、*rd7*、*rd8*、*rd9*、*Pde6b^{rd10}*、または *cpl1* マウスを含む。

【0118】

本発明の *Chop2-GFP* 構築物を、新生仔 (P1) または2~12ヶ月齢の成体マウスの眼に硝子体内注射し得る。*GFP* シグナルを、*Chop2-GFP* を注射した網膜において観察し得、*ChR2* 発現のレベル、または網膜神経節細胞のような、特定の細胞集団における発現を決定し得る。変異体 *Chop2-GFP* の発現を、ウイルス注射後、所定の時間量、すなわち3~6ヶ月、または1年間、モニターし得る。当該分野で公知の

、および本明細書中で記載された方法を用いて、パッチクランプおよび多チャンネルアレイ記録を行って、インピボで変異体 C h o p 2 - G F P を発現する細胞の光誘発応答を測定し得る。

【 0 1 1 9 】

光感受性または視覚の回復に関して試験するために、さらなる技術および試験が、当該分野でよく確立されている。C h o p 2 - G F P 発現細胞または視覚皮質からの視覚誘発電位を、P C T 公開 W O 2 0 0 7 / 1 3 1 1 8 0 において記載されたように調査し得る。他の試験は、マウスにおける視力の行動評価、すなわち擬似視覚運動試験 (v e r t u a l o p t o m o t o r t e s t) および視覚水迷路を含む。

【 0 1 2 0 】

実施例 5 : 変異体 C h o p 2 構築物の網膜ニューロンへの投与の、長期発現および安全性の分析

本発明の C h o p 2 構築物を注射した C 5 7 B L / 6 J 成体マウスにおいて、神経毒性を評価した。網膜における C h o p 2 変異体発現の安全性を、強力な青色光に 2 週間曝露した後に、免疫染色および細胞計数によって評価した。どのマウスも、注射後 2 ヶ月までの間、神経毒性の症状を示さなかったことが見出された。

【 0 1 2 1 】

さらなる進行中の試験は、網膜ニューロンにおける、本発明の C h o p 2 / C h R 2 変異体の長期発現および安全性を評価している。

【 0 1 2 2 】

他の実施態様

本発明を、その詳細な説明とあわせて記載したが、前述の説明は、例証することを意図し、そして添付の特許請求の範囲によって規定される、本発明の範囲を制限しない。他の局面、利点、および修飾は、以下の特許請求の範囲内である。

【 0 1 2 3 】

本明細書中で参照される特許および科学論文は、当業者が入手可能な知識を確立する。本明細書中で引用される、全ての米国特許および公開または非公開米国特許出願は、参考文献に組み込まれる。本明細書中で引用される、全ての公開された外国特許および特許出願は、本明細書中で参考文献に組み込まれる。本明細書中で引用された、全ての他の出版された参考文献、文書、原稿、および科学論文は、本明細書中で参考文献に組み込まれる。

【 0 1 2 4 】

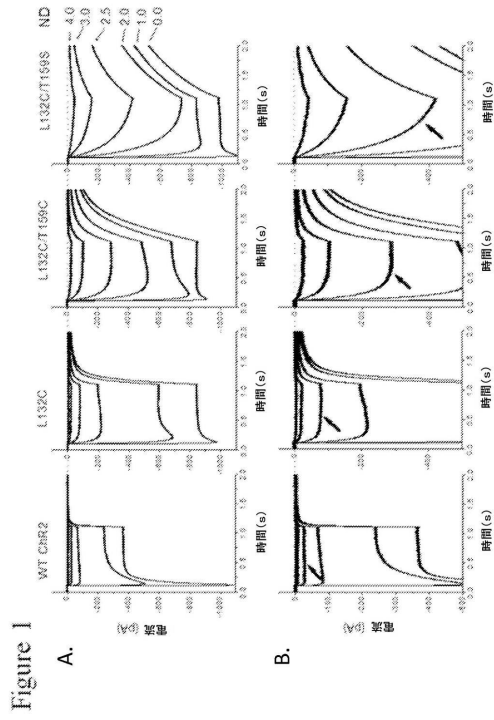
本発明を、具体的に示し、そしてその好ましい実施態様に関して記載したが、添付の請求によって含まれる本発明の範囲から離れることなく、そこで形態および詳細における様々な変更をし得ることが、当業者によって理解される。

10

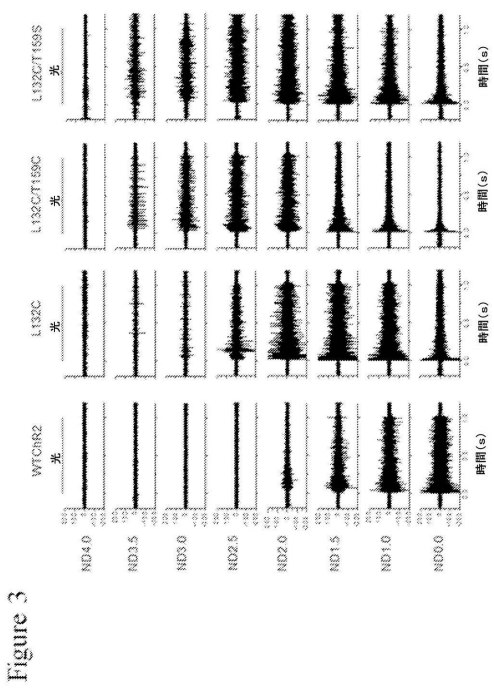
20

30

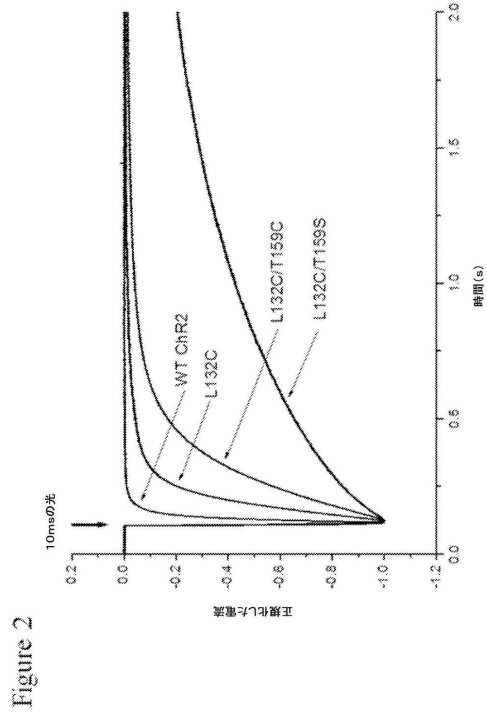
【図 1】



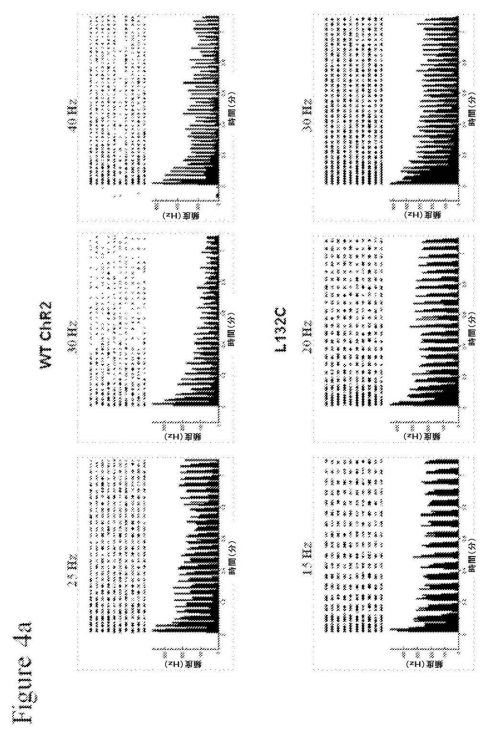
【図 3】



【図 2】

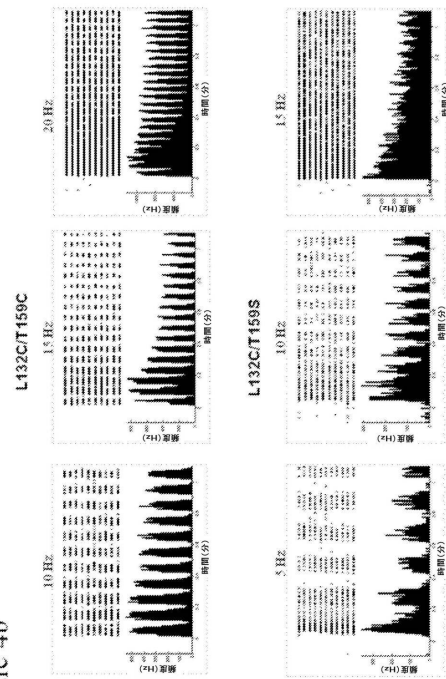


【図 4 A】



【図 4 B】

Figure 4b



【配列表】

0006395611000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 48/00 (2006.01) A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01) A 6 1 K 31/7088

(72)発明者 パン, ズオ - ファ
 アメリカ合衆国 ミシガン 48084, トロイ, ランサー ドライブ 2140

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 国際公開第2011/140279(WO, A1)
 Mol. Genet. Genomics, 2011年12月20日, Vol. 287, , pp.95-109
 Nature Methods, 2011年, Vol. 8, No. 12, pp.1083-1091

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00 - 15/90
 PubMed
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq