

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5933556号
(P5933556)

(45) 発行日 平成28年6月15日(2016.6.15)

(24) 登録日 平成28年5月13日(2016.5.13)

(51) Int.Cl.	F 1
C 07 K 14/47	(2006.01)
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
C 12 N 1/19	(2006.01)
C 12 Q 1/02	(2006.01)
C 07 K	14/47
C 12 N	15/00
C 12 N	5/10
C 12 N	1/19
C 12 Q	1/02

請求項の数 24 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-527595 (P2013-527595)
(86) (22) 出願日	平成23年9月8日(2011.9.8)
(65) 公表番号	特表2013-544494 (P2013-544494A)
(43) 公表日	平成25年12月19日(2013.12.19)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2011/065510
(87) 國際公開番号	W02012/032103
(87) 國際公開日	平成24年3月15日(2012.3.15)
審査請求日	平成26年8月13日(2014.8.13)
(31) 優先権主張番号	61/380,793
(32) 優先日	平成22年9月8日(2010.9.8)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	10175832.4
(32) 優先日	平成22年9月8日(2010.9.8)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁(EP)

(73) 特許権者	390040420 マックス-プランク-ゲゼルシャフト・ツ ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ ヤフテン・エー・ファオ Max-Planck-Gesellsc haft zur Foerderung der Wissenschaften e. V. ドイツ80539ミュンヘン、ホーフガル テンシュトラーゼ8番
(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】変異チャネルロードプシン2

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1(C H O P - 2)の1-309位置に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1においてL132に相当する位置での置換を含む光誘起イオンチャネルであって、該置換がチャネルの極性を増加するものであり、HEK293細胞でのFura-2-イメージングによって測定される、カルシウム伝導度が、WT C H O P - 2と比較して少なくとも2倍増加される、光誘起イオンチャネル。

【請求項 2】

L132の置換を除いて、配列番号1(C H O P - 2)の1-309位置に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1に記載の光誘起イオンチャネルであって、該置換がチャネルの極性を増加するものである、光誘起イオンチャネル。

【請求項 3】

L132の置換を除いて、配列番号1(C H O P - 2)の1-309位置に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1に記載の光誘起イオンチャネルであって、該置換がチャネルの極性を増加するものである、光誘起イオンチャネル。

【請求項 4】

置換が、L132C、L132S、L132E、L132DおよびL132Tから選択される、請求項 1～3のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネル。

【請求項 5】

10

20

置換が、L 1 3 2 Cである、請求項4に記載の光誘起イオンチャネル。

【請求項6】

- a) 光感受性が、海馬ニューロンにおいてWT CHOP-2と比較して5倍より多く増加する；かつ／または
- b) HEK293細胞でのFura-2-イメージングによって測定される、カルシウム伝導度が、WT CHOP-2と比較して少なくとも3倍増加される；かつ／または
- c) 海馬ニューロンにおいて全細胞電気生理学的記録により測定した刺激頻度が、WT CHOP-2と比較して、少なくとも1.5倍の増加を示す、
請求項1～5のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネル。

【請求項7】

10

さらに、少なくとも1個の以下のアミノ酸残基：配列番号1の位置253に対応する位置のアスパラギン酸；配列番号1の位置257に対応する位置のリジン；配列番号1の位置260に対応する位置のトリプトファン；配列番号1の位置123に対応する位置のグルタミン酸；配列番号1の位置134に対応する位置のヒスチジンまたはアルギニン；配列番号1の位置128に対応する位置のトレオニン、セリン、またはアラニン；および／または配列番号1の位置156に対応する位置のアラニン、を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネル。

【請求項8】

共通モチーフ、L(I)D×××K××W(F,Y)を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネル。

20

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネル、およびレチナールまたはレチナール誘導体を含む、チャネルロドプシン。

【請求項10】

30

レチナール誘導体が3,4-デヒドロレチナール、13-エチルレチナール、9-dm-レチナール、3-ヒドロキシレチナール、4-ヒドロキシレチナール、ナフチルレチナール；3,7,11-トリメチル-ドデカ-2,4,6,8,10ペンタエナール；3,7ジメチル-デカ-2,4,6,8-テトラエナール；3,7-ジメチル-オクタ-2,4,6-トリエナール；および6-7回転阻止レチナール、8-9回転阻止レチナール、および10-11回転阻止レチナールからなる群から選択される、請求項9に記載のチャネルロドプシン。

【請求項11】

請求項1～8のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネルをコードする核酸配列を含む、核酸構成体。

【請求項12】

請求項1～8のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネルをコードする核酸配列または請求項11に記載の核酸構成体を含む発現ベクター。

【請求項13】

遺伝子治療に好適である、請求項12に記載の発現ベクター。

【請求項14】

40

ウイルス媒介性の遺伝子導入に好適である、請求項13に記載の発現ベクター。

【請求項15】

請求項9に記載のチャネルロドプシン、請求項11に記載の核酸構成体または請求項12に記載の発現ベクターを含む、細胞。

【請求項16】

哺乳動物細胞または昆虫細胞、または酵母細胞である、請求項15に記載の細胞。

【請求項17】

サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ポンベまたはピチア・パストリスからの酵母細胞である、請求項16に記載の細胞。

【請求項18】

50

哺乳動物細胞が、

(a) 光受容細胞、網膜桿状体細胞、網膜錐体細胞、網膜神経節細胞、双極ニューロン、神経節細胞、偽単極ニューロン、多極ニューロン、ピラミッド状ニューロン、プルキンエ細胞、または、顆粒細胞；または

(b) メラノーマ細胞、COS細胞；BHK細胞；HEK293細胞；CHO細胞；骨髄腫細胞；またはMDCK細胞、

である、請求項1_6に記載の細胞。

【請求項19】

薬剤としての使用のための、請求項1～8のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネル、または請求項9に記載のチャネルロドプシン、または請求項1_1に記載の核酸構成体、または請求項1_2に記載の発現ベクター、または請求項1_8に記載の細胞。

10

【請求項20】

遺伝子治療における使用のための、請求項1_2に記載の発現ベクター。

【請求項21】

失明または視力減少の治療における使用のための、請求項1～8のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネル、または請求項9に記載のチャネルロドプシン、または請求項1_1に記載の核酸構成体、または請求項1_2に記載の発現ベクター、または請求項1_8に記載の細胞。

【請求項22】

がん細胞の切除における使用のための、配列番号1の位置128に相当する位置にスレオニン、セリンまたはアラニンを有し、かつ/または配列番号1の位置156に相当する位置にアラニンを有する、請求項7に記載の光誘起イオンチャネル。

20

【請求項23】

がん細胞が黒色腫のがん細胞である、請求項2_2に記載の光誘起イオンチャネル。

【請求項24】

請求項1～8のいずれか1項に記載の光誘起イオンチャネル、または請求項9に記載のチャネルロドプシン、または請求項1_5に記載の細胞の、高スループットのスクリーニングにおける使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は改良された特性を有する変異チャネルロドプシン、それをコードする核酸構成体、核酸構成体を担持する発現ベクター、該核酸構成体または発現ベクターを含む細胞、およびそれらのそれぞれの利用に関する。

【背景技術】

【0002】

光駆動性の(light-gated)、内向き整流性の(inwardly rectifying)陽イオンチャネル、チャネルロドプシン-2(CHR2)は、in vitroおよびin vivoの両方で、ニューロンの、標的とされた光活性化のための好ましいツールとなっている^{1～4}。野生型(WT)CHR2は光誘起された脱分極(light-induced depolarization)のために用いられるが、潜在的な将来の臨床応用のための、増加した光感受性をもつCHR2変異体の検索が現在進行している(WO03/084994および^{5～7})。より高い効力は、低い光透過率、例えば脳組織、にも関わらず、適用された光源から離れた細胞層の脱分極を可能にするであろう。光感受性の増加もまた、完全なWT CHR2活性化(480nmでの、10¹⁸～10¹⁹ ph s⁻¹ cm⁻²)に必要である高い青色光強度に起因して、連続照射下での潜在的な細胞損傷の問題を解決するであろう。より高い光感受性がある変異体も、視力回復に關係する調査に重要である^{8～9}。タンパク質レベルでは、光感受性そのものがCHR2発色団レチナールの本質に起因してわずかに改善できるように、より高い光効力は、開口状態の存続期間を増加させること、および/またはチャネルの単位コンダクタンス

40

50

を上昇させることによってのみ達成できる。以前の研究は、ヘリックス3および4におけるそれぞれC128およびD156の位置での変異が、30分以上までの開口存続期間をもつ著しく遅いチャネル動態をもたらし、500倍またはさらに高い光感受性を得ることを示した⁵、⁶。これらのC128およびD156変異体は、赤色光により様々な開口時間でスイッチを切ることができる。優れた光感受性にもかかわらず、それらの遅い閉口動態は、それらの適用を阻害する要因として残っている。

【0003】

従って、より高い光感受性と、より速い応答動態を示す、光誘起(light-inducible)陽イオンチャネルの必要性がいまだある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

細胞内膜表面の電位はCa⁺⁺によって強く影響されることが知られているので、亜膜性の(submembraneous)細胞内Ca⁺⁺レベルの修飾は膜の脱分極およびニューロンにおける電位依存性Na⁺チャネルの活性化をもたらすであろう。したがって、発明者は、ニューロンの光感受性がCa⁺⁺流入で内膜表面の電位を上げることによって間接的に増加できると仮定した。驚くべきことに、発明者は強化されたCa⁺⁺透過性をもつ、以下でCatCh(すなわち、カルシウム転位チャネルロドプシン)として表される、ChR2変異体を見出した。CatChは、WT ChR2と比べて、海馬ニューロンにおいて発現するとき、4倍高いCa⁺⁺透過性、70倍高い光感受性、およびより速い応答動態を有する。強化された光感受性およびより早い動態は、内膜表面電位を上昇させ、Ca⁺⁺活性化大コンダクタンスカリウム(BK)チャネルを活性化させる、比較的高い光駆動性のCa⁺⁺流入に起因することが示される。[Ca⁺⁺]_iの増加は、内側面の電位を上げ、電位依存性Na⁺チャネルの活性化を容易にし、かつ間接的に光感受性を増加させる。光刺激に続く再分極はCa⁺⁺依存BK-チャネル活性化により著しく加速される。CatChはニューロンの刺激光感受性を増加させるように光駆動性チャネルを設計できる新しい原則を例示する。活性化のために低い光強度を必要とする一方で、正確で速い活動電位の引き金となることなどの特性は臨床応用における光駆動性チャネルの使用のための道を開く。

【課題を解決するための手段】

【0005】

従って、第一の態様において、本発明は配列番号1(CHOP-2)の1-309位置に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1においてL132に相当する位置での変異を含む、光誘起イオンチャネルに関する。

【0006】

類似の第二の態様において、本発明はまた、第一の態様による光誘起イオンチャネル、およびレチナールまたはレチナール誘導体を含む、チャネルロドプシンに関する。さらに、第三の態様において、本発明は第一の態様による光誘起イオンチャネルをコードする核酸配列を含む、核酸構成体を提供する。さらに他の態様において、本発明は第一の態様による光誘起イオンチャネルをコードする核酸または第三の態様による核酸構成体を含む、発現ベクターを提供する。

【0007】

さらに、第二の態様によるチャネルロドプシン、第三の態様による核酸構成体、または第四の態様による発現ベクターを含む細胞が提供される。

【0008】

また、本発明は、第一の態様による光誘起イオンチャネル、第二の態様によるチャネルロドプシン、本発明による核酸構成体または発現ベクター、本発明による細胞の、薬剤としての使用に関する。特に、遺伝子療法における本発明による発現ベクターの使用が熟慮される。

10

20

30

40

50

【0009】

より具体的に、失明または視力減少の治療における本発明による光誘起イオンチャネル、チャネルロドプシン、核酸構成体、発現ベクターまたは細胞の使用が考慮される。

【0010】

さらに他の態様において、本発明はさらに配列番号1の位置128に相当する位置にスレオニン、セリンまたはアラニンを有し、かつ/または配列番号1の位置156に相当する位置にアラニンを有する、第一の態様による光誘起イオンチャネルのがん細胞の切除における使用を提供する。

【0011】

最終的な態様において、本発明は第一の態様による光誘起イオンチャネル、または第二の態様によるチャネルロドプシンまたは本発明による細胞の、高スループットのスクリーニングにおける使用に関する。 10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】センサリーロドプシン2構造(PDBコード1H2S)に基づく、CHR2の相同性モデル。システインスキャニングのための目標領域(R115からT139)は膜貫通ヘリックス3(TM3)に位置し、赤で強調される。挿絵は、変異L132C、TM3およびTM4を結合する、水素結合したC128およびD156を点線で、および、陽子供与体(H134)および陽子受容体(E123)それぞれのためのホモログ残基の推定される位置を示す。発色団は、シップ塩基によって共有結合された全トランスのレチナール(ATR)およびK257により形成される。ロイシンのメチル基の除去で形成された空洞は球として表され、システイン残基の変異したスルフヒドリル基(黄色い球)に重ね合わされた。図は、VMD^{3.0}で作成された。 20

【0013】

【図2】HEK293細胞およびアフリカツメガエル卵母細胞におけるCatChの生物物理学的特徴。(a)左、平均±標準偏差(n=6)で示される、-60mVにて、CatCh(黒)およびWT-CHR2(赤)を発現するHEK293細胞において測定された、500ms青色光パルスに反応した定常電流振幅の概要。右、定常電流に正規化された光電流のオフ動態(off-kinetics)の比較。(b)左、1秒間の青色473nm光パルスに反応した実際の光電流。出力(trace)は、WT(赤)と比較して、CatCh(黒)の、定常電流-ピーク電流比における増加を説明するためにピーク光電流振幅に正規化される。右、ピーク電流に正規化された光電流のオン動態の比較。(c)80mM細胞外Ca⁺⁺(pH9)中で、-120mVにてアフリカツメガエル卵母細胞を発現するCatChおよびWT-CHR2の473nm光反応(連続した下側の出力)。残留チャネルロドプシンCa⁺⁺電流は残る一方で、内因性の(introinsic)Ca⁺⁺感受性塩素チャネルの重複電流を無効にする、1mMの最終的細胞質濃度へのCa⁺⁺キレート剤BAPTAの注射(破線の上側の出力)。電流は、WT-CHR2ピーク電流に正規化され、他の6つの実験の典型である。WT-CHR2と比較して増加したCa⁺⁺透過性を示す、CatChのBAPTA注射の前後のより大きい光電流振幅差がわかる。(d)-80mV(n=6、方法を参照)でのHEK293細胞中のCatChのイオン流出の特性。(e)140mM NaCl(- -)、WT-CHR2および重ねられたCatCh)と比較された90mM CaCl₂中のWT-CHR2(- -)およびCatCh(- -)の電流電圧曲線。電流は-100mVにてWT-CHR2電流に正規化された。CaCl₂中のCatChの逆転電位は陽電位に移行し、増加するCa⁺⁺透過性(平均±標準偏差、n=5)を示す。(f)CatCh中の細胞内Ca⁺⁺(対照非トランスフェクトHEK293細胞、)の4倍に増加した上昇を示す、90mM細胞外Ca⁺⁺(n=10)の存在中での10秒間の460nm光(青い棒)にWT-CHR2()およびCatCh()を発現するHEK293細胞中のCa⁺⁺流入のFura-2測定。 30

【0014】

50

【図3】海馬培養ニューロンにおけるCatCh発現。(a) CAGプロモーター下でChR2(L132C)-2A-EGFPを発現する培養された海馬ニューロンの共焦点画像。縮尺目盛り20μm。(b) 473nm青色光($J_{473\text{nm}} = 1 \times 10^{19}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)の600msパルスのによって誘起されたCatCh(黒)およびWT(赤)の典型的な光電流の比較。(c) 定常状態電流振幅(-60mV, n=6)の概要。

【0015】

【図4】高速および高感度の神経の光刺激。(a-d) 2秒間の光パルスに反応したCatCh発現海馬ニューロンからの、代表的な全細胞電流固定の記録。(a) WTに必要である473nmの光強度は、脱分極性遮断($J_{473\text{nm}} = 2.5 \times 10^{17}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)を引き起こす。(b) 光強度の減少は、発火を回復する($J_{473\text{nm}} = 2.5 \times 10^{16}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)。(c) スパイク発火のための代表的な光同調曲線(light-tuning curve)($J_{\text{max}} = 9.7 \times 10^{16}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$ 、平均±標準偏差、2回実行)。(d) 中程度の緑色の532nm照射もまた、活動電位のトレーン(train)を誘起する($J_{532\text{nm}} = 2.5 \times 10^{17}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)。(e) 2mM細胞外Ca++中の()、およびコントロールとしての、WT ChR2と類似の値まで待ち時間を増加させる3mM細胞外Mg++中の()、5Hzでの、1ms、473nmの25の光パルスからなる、光パルスのトレーンを通した、光パルスからスパイクまでのピーク待ち時間($J_{473\text{nm}} = 3 \times 10^{18}$ 個の光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$ 、平均±標準偏差[ジッター])。(f) 50Hzの率で、1ms、473nmのパルスに反応した($J_{473\text{nm}} = 2.8 \times 10^{19}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)および(g) 10ns、473nmの10Hzでの光パルスに反応した($J_{473\text{nm}} = 1.1 \times 10^{25}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)、スパイク発火。(h) 1mM TETによるBKチャネルの阻害に起因する、不完全な膜の再分極(両矢印)。パルストレーンの3番目のスパイク(黒)、TET適用後の最初のスパイク(赤)、および3番目のスパイク(青)の重ね合わせ($J_{473\text{nm}} = 1.8 \times 10^{18}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)。(i) 細胞外溶液中のCa++のMg++による置換は、スパイク再分極を遅らせ、持続性の脱分極(5Hz、左)および、高周波(20Hz、右)での複数のスパイクの形成を引き起こす($J_{473\text{nm}} = 8.3 \times 10^{18}$ 光子 $\text{s}^{-1}\text{cm}^{-2}$)。

【0016】

【図5】CatChの分光学的特性評価。光励起の後に、CatCh変異体(黒い出力波形)は、動態において、および光中間体(photointermediates)の存在において、WT(赤い出力波形)に匹敵する光サイクル(photoncycle)に入る。図は、脱プロトン化シップ塩基、P390(381nm、天板)、開口状態において優位なP520(541nm、2番目のパネル)のための、および基底状態(440nm、3番目のパネル)の固有波長での、450nmの励起後のスペクトル変化について表す。最初の赤に移行した中間体、おそらくP500は、解像されず、オフセットとしてのみ検出される。シップ塩基は、マイクロ秒単位の時間尺度($t = 50\mu\text{s}$)で、541nmでの上昇を伴う、381nmでの小さな振幅に起因してほとんど観察できない事象で、脱プロトン化する。P520中間体の上昇は、それが減衰し($t = 9\text{ms}$)、その結果2番目に持続する種(P480)が存在する(populating)前に、次の工程($t = 1.5\text{ms}$)で起こる。基底状態(D470)は次の工程($t = 10\text{秒間}$)で戻る。光サイクルの変遷はWTで観測されたものに類似する。電流測定における開口および閉口の動態に関して、変異は機能的な状態の肉眼的变化を全くもたらさない。開口状態は主にP520中間体により決定される。主な違いは、WTより低いP520と比べて、P390振幅の程度において見つけられる。したがって、L132C変異は、発色団部位での明反応に影響しない。光サイクルの分光動態データが50mM Ca++の存在で変更されなかったことに注意。

【0017】

【図6】CatChの動作スペクトルはアフリカツメガエル卵母細胞において2電極電圧固定法で決定された。電流振幅は、(実施例に示すように) Ca++の不存在下、異なる

波長()で測定され、陽子流で正規化された($n = 6$)。基底状態(-)と動作スペクトル()の比較。

【0018】

【図7】 Ca^{++} によって誘起された表面電位変化。膜を横断する電圧降下は、適用された電位差(')により、表面電位(ϕ)で変更されることが知られている。一般に ϕ は、対イオンでのスクリーニングで変更できる、陰性表面電荷密度に依存する。したがって、電位依存性ナトリウムチャネル(および他の電位感受性チャネル)の活性は、膜の外部または内部の側面のどちらかでの表面電荷の変化によって影響される¹⁻⁸。我々の場合、 CatCh を通して伝達された Ca^{++} はニューロンの内膜表面の陰性表面電荷を中和する。これにより、膜電位への脱分極作用が誘起され、より低い光強度での活動電位の誘起につながる。このメカニズムの概要図面はa - cに表される(Hille 2001 の後に)。 (a) 暗闇では、 CatCh チャネルは閉じられ、膜上の電位差、EM(適用された外部電位)は静止膜電位(ここに、-60mVに設定される)と同等である。簡単にするため、 ϕ は ϕ' に設定された。 b) CatCh の光活性化の際に、普通の膜の脱分極 Na^+ 流入が起こる。しかしながら、ニューロンに入る追加 Ca^{++} は内膜表面の表面電位(ϕ'')を増加させる。より高い Ca^{++} 流入は、より陽性の ϕ'' (両矢印で示される) およびより小さい膜を横断する電圧低下となる。これは電位依存性ナトリウムチャネルの活性化を容易にする。 (c) 細胞外 Ca^{++} を、 CatCh に浸透せず、サイトゾルに既に~4mMで存在する Mg^{++} に置換することによって、小さな脱分極効果だけが起こる。これは、 Ca^{++} と比較して、わずかに細胞外表面電位(ϕ')を下げる、より弱い Mg^{++} の細胞外膜側面への結合に起因する。表面電位の脱分極効果が、膜を横断する電圧降下による傾きの減少とともに増加することに注意。

【発明を実施するための形態】

【0019】

好ましい実施形態の詳細な説明

第一の態様において、本発明は配列番号1(CHOP-2)の1-309位置に示されるアミノ酸配列、より好ましくは配列番号1の1-315位置に示されるアミノ酸配列、さらには配列番号1の1-737位置に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1においてL132に相当する位置での変異を含む、光誘起イオンチャネルに関する。

【0020】

野生型CHOP2は以下のアミノ酸配列を有する：

M D Y G G A L S A V G R E L L F V T N P V V V N G S V L V P E D Q C Y C A
 G W I E S R G T N G A Q T A S N V L Q W L A A G F S I L L L M F Y A Y Q
 T W K S T C G W E E I Y V C A I E M V K V I L E F F F E F K N P S M L Y L
 A T G H R V Q W L R Y A E W L L T C P V I L I H L S N L T G L S N D Y S
 R R T M G L L V S D I G T I V W G A T S A M A T G Y V K V I F F C L G L
 C Y G A N T F F H A A K A Y I E G Y H T V P K G R C R Q V V T G M A W L F
 F V S W G M F P I L F I L G P E G F G V L S V Y G S T V G H T I I D L M
 S K N C W G L L G H Y L R V L I H E H I L I H G D I R K T T K L N I G G
 T E I E V E T L V E D E A E A G A V N K G T G K Y A S R E S F L V M R D K
 M K E K G I D V R A S L D N S K E V E Q E Q A A R A A M M M M N G N G M
 G M G M G M N G M N G M G G M N G M A G G A K P G L E L T P Q L Q P G R
 V I L A V P D I S M V D F F R E Q F A Q L S V T Y E L V P A L G A D N T L
 A L V T Q A Q N L G G V D F V L I H P E F L R D R S S T S I L S R L R G
 A G Q R V A A F G W A Q L G P M R D L I E S A N L D G W L E G P S F G Q G
 I L P A H I V A L V A K M Q Q M R K M Q Q M Q Q I G M M T G G M N G M G
 G G M G G G M N G M G G N G M N N M G N G M G G G M G N G M G G N G M
 N G M G G G N G M N N M G G N G M A G N G M G G G M G G N G M G G S M N G
 M S S G V V V A N V T P S A A G G M G G M M N G G M A A P Q S P G M N G G

10

20

30

40

50

R L G T N P L F N A A P S P L S S Q L G A E A G M G S M G G M G G M S G
M G G M G G M G G M G G A A T T Q A A G G N A E A E M L Q N L M N E I
N R L K R E L G E (配列番号: 1)

【0021】

本発明の光誘起イオンチャネルは少なくとも5個の膜貫通ヘリックスをもつ、光感受性ポリエンと結合できる膜タンパク質である。6または7個の膜貫通ヘリックスをもつ膜貫通タンパク質が好ましい。しかしながら、7個以上、例えば8、9または10のヘリックスをもつ膜貫通タンパク質もまた、本発明に含まれる。その上、本発明は膜貫通部分に加えて、C-末端配列が、膜に包まれた内腔の内側、例えば細胞の細胞質またはリポソームの内側、まで拡張でき、または膜外表面上にも配置できるところの、C-および/またはN-末端配列を含む膜貫通タンパク質も含む。同様のことが、任意に存在する、同様に内腔内部および膜の外表面上にも配置できるN-末端配列にも適用される。C-および/またはN-末端配列の長さは原則としてどんな制限も受けないが、しかしながら、膜に埋め込まれていない1から1000アミノ酸、好ましくは1から500、特に好ましくは5から50のアミノ酸をもつ、C-末端配列をもつ光誘起イオンチャネルが好ましい。C-末端配列の長さから独立して、膜に埋め込まれないN-端末に位置する配列は、好ましくは1から500のアミノ酸、特に好ましくは5から50のアミノ酸を含む。膜貫通ヘリックスの概念は当業者によく知られている。これらは一般にらせん状の、原則として20から25のアミノ酸を含む、立体構造である。しかしながら、天然の膜、例えば細胞または原形質膜、または合成膜の場合がある、膜の性質によって、膜貫通領域も、より短いか、または、より長い場合がある。例えば、人工膜の膜貫通領域は30アミノ酸まで含むことができるが、他方で数個のみのアミノ酸、例えば12から16個を含むこともできる。

【0022】

好ましい実施形態において、光誘起イオンチャネルは、配列番号1の1-309位置に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0023】

他の好ましい実施形態において、光誘起イオンチャネルは、配列番号1の1-315位置に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0024】

一般に、アミノ酸配列と、配置された配列との間の配列同一性が少なくともx%であれば、アミノ酸配列は上記の配列番号1または他のアミノ酸配列と「少なくともx%の同一性」を有する。そのような配置は、例えば公衆に利用可能な、N C B I ホームページ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi> で提供される「BLAST」プログラムのような、コンピュータ相同性プログラムを、ここで提供される初期の設定で用いることにより実施できる。一組の核酸配列の配列同一性割合を計算するさらなる方法は当業者に既知である。

【0025】

そのような、配列番号1の1-309または1-315位置に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含む光誘起イオンチャネルの例は、コナミドリムシ(C. reinhardtii)(gi:15811379)からのCHO P1、ボルボックス(Volvox carteri)からのCHOP2(gi:167650748)およびCHOP1(gi:167650744)、またはCHOP2またはCHOP1の他のいかなるオルソログまたは対立遺伝子多型である。

【0026】

10

20

20

30

40

50

さらにより好ましい実施形態において、光誘起イオンチャネルは、L 1 3 2 の変異を除いて、配列番号1 (C H O P - 2) の 1 - 3 0 9 位置に示されるアミノ酸配列を含む、好ましくはからなる。

【 0 0 2 7 】

他のさらにより好ましい実施形態において、光誘起イオンチャネルは、L 1 3 2 の変異を除いて、配列番号1 (C H O P - 2) の 1 - 3 1 5 位置に示されるアミノ酸配列を含む、好ましくはからなる。

【 0 0 2 8 】

配列番号1のL 1 3 2 位置、またはL 1 3 2 に対応する位置での変異は、置換、追加および/または欠失であり得る。しかしながら、好ましくは変異は置換、より好ましくはL 1 3 2 C、L 1 3 2 S、L 1 3 2 E、L 1 3 2 D およびL 1 3 2 T から選択され、最も好ましくは置換はL 1 3 2 C である。実験データがL 1 3 2 C に関するものしかないとしても、置換L 1 3 2 S、L 1 3 2 E、L 1 3 2 D およびL 1 3 2 T は、全ての置換がチャネルの極性を増加させるので、効用の特性を示すであろうことが予期される。

10

【 0 0 2 9 】

加えて、光誘起イオンチャネルはさらに(準)保存的置換を含む。保存的置換は、それらの側鎖および化学的性質で関連性のあるアミノ酸ファミリー内で起こるものである。そのようなファミリーの例は、塩基性側鎖、酸性側鎖、無極性脂肪族側鎖、無極性芳香族側鎖、非荷電極性側鎖、小さい側鎖、大きい側鎖、等である。典型的な準保存的および保存的置換は以下の通りである。

20

【 0 0 3 0 】

【表1】

アミノ酸	保存的置換	準保存的置換
A	G ; S ; T	N ; V ; C
C	A ; V ; L	M ; I ; F ; G
D	E ; N ; Q	A ; S ; T ; K ; R ; H
E	D ; Q ; N	A ; S ; T ; K ; R ; H
F	W ; Y ; L ; M ; H	I ; V ; A
G	A	S ; N ; T ; D ; E ; N ; Q
H	Y ; F ; K ; R	L ; M ; A
I	V ; L ; M ; A	F ; Y ; W ; G
K	R ; H	D ; E ; N ; Q ; S ; T ; A
L	M ; I ; V ; A	F ; Y ; W ; H ; C
M	L ; I ; V ; A	F ; Y ; W ; C ;
N	Q	D ; E ; S ; T ; A ; G ; K ; R
P	V ; I	L ; A ; M ; W ; Y ; S ; T ; C ; F
Q	N	D ; E ; A ; S ; T ; L ; M ; K ; R
R	K ; H	N ; Q ; S ; T ; D ; E ; A
S	A ; T ; G ; N	D ; E ; R ; K
T	A ; S ; G ; N ; V	D ; E ; R ; K ; I
V	A ; L ; I	M ; T ; C ; N
W	F ; Y ; H	L ; M ; I ; V ; C
Y	F ; W ; H	L ; M ; I ; V ; C

30

【 0 0 3 1 】

さらに、当業者は立体的に要求された位置のグリシンを置換すべきでないこと、およびアルファ-ヘリックスまたはベータ-シート構造を有するタンパク質の一部にプロリンを挿入すべきでないことを理解するであろう。

40

【 0 0 3 2 】

他の好ましい実施形態において、光誘起イオンチャネルは共通モチーフ (c o n s e n

50

sus motif)、L(I)D×××K××W(F, Y)を含む。この共通配列はレチナール結合アミノ酸リジンを囲むモチーフである。

【0033】

高い時間精度を維持する一方で、自然に起こる光強度でCatChを活性化させる可能性は、特に遺伝子治療での視力回復への努力のための、また他の生物医学的応用のための、優れた候補となる。その減少した光要求のために、CatChスパイクは474 nmのスペクトル最大から離れた、例えば、緑色光(532 nm、図4d参照)による励起によつても発生できる。作用スペクトル外側の隣接域での作業は、その減少した光要求のために可能となり、組織透過を容易にする。

【0034】

従つて、好ましい本発明の変異光誘起イオンチャネルの光感受性は、海馬ニューロンにおいてWT CHOP-2と比較して5倍より多く、好ましくは10倍より多く、より好ましくは20倍より多く、例えば30倍より多く、さらにより好ましくは40倍より多く、例えば50倍より多く、もっとも好ましくは60倍より多く、または70倍より多く増加する。さらに、本発明の変異光誘起イオンチャネルは、海馬ニューロンにおいて全細胞電気生理学的記録(whole-cell electrophysiological recording)により測定したWT CHOP-2と比較して、少なくとも1.5倍、より好ましくは2倍、またはさらにより好ましくは2.5倍増加した刺激頻度を示す。実施例に示されているように、WT-CHOP-2は、20 Hzでのシグナル伝達はすでに不正確であるところの、約10 Hzから約20 Hzまでの海馬ニューロンにおける刺激頻度を示す。さらに、当業者は、内因性のスパイク頻度もまた細胞の型に依存することを認めるであろう。例えば、聴細胞は、500 Hzまでの内因性スパイク頻度を有する。さらに、実験はin vitroで、すなわち周囲温度で行われた。しかしながら、当業者は、動態もまた温度依存であるため、刺激頻度が哺乳動物などの温血動物でさらに高くなると予想するであろう。したがつて、細胞型と温度に依存して、本発明の変異光誘起イオンチャネルが、全細胞電気生理学的記録により測定したWT CHOP-2と比較して、少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば少なくとも20倍、または少なくとも30倍、またはより好ましくは少なくとも40倍、少なくとも50倍、例えば少なくとも60倍、または少なくとも70倍、さらにより好ましくは少なくとも80倍、少なくとも90倍、または少なくとも100倍、最も好ましくは少なくとも125倍、例えば少なくとも150倍、または少なくとも175倍、およびさらに最も好ましくは少なくとも200倍増加した刺激頻度を示し得ることが予想される。海馬ニューロンからの海馬培養神経細胞および電気生理学的記録は以下の実施例に例示される。

【0035】

簡潔に、海馬は出生後P1 Sprague-Dawleyラット(Jackson Laboratory)から取り出され、パパイン(20 U/ml-1)で37にて20分間処理される。海馬は10%の牛胎児血清が補われたDMEM(Invitrogen/Gibco、高グルコース)で洗浄され、少量のこの溶液中で粉碎される。~7万5000個の細胞が、24ウェルプレート中のポリ-D-リジン/ラミニンでコートされたカバーガラス上に播種(plate)される。3時間後に、プレート培地(recording medium)は、培地(2% B-27補足剤、2 mM Glutamax-I、および100 U/mlペニシリンおよび100 µg/mlストレプトマイシンを含むNeurobasal A)に置き換えられた。変異体ChR2(L132C)-YFPおよびChR2(WT)-YFPは、播種の5~10日後にリポフェクタミン2000試薬(Invitrogen)を使用してトランスフェクトされる。あるいは、2~5×10⁹ G C/mlのウイルス(AAV2/7-CAG-ChR2(L132C)-2A-EGFP-WPRE-bGH)が播種の4~9日後に各々のウェルに加えられ得る。アデノ随伴ウイルスベクター構成体の代表的な構造は、以下の実施例で詳細に説明される。発現は、形質導入後5日間で目に見えるようになる。いかなる実験においても、全トランスレチナルは培地または記録培地(recording medium)に全く添加されない。

10

20

30

40

50

【0036】

海馬培養神経細胞の全細胞記録のために、5～10の抵抗をもつパッチャピペットが、129 mM グルコン酸カリウム、10 mM KCl、4 mM MgATP および 0.3 mM Na₃GTP で満たされ、pH 7.2 に滴定される。タイロード溶液は細胞外溶液として用いられる (125 mM NaCl、2 mM KCl、2 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、30 mM グルコース および 25 mM HEPES、pH 7.4 に滴定)。名目上は Ca⁺⁺ 無しの細胞外溶液は、0 mM Ca⁺⁺ および 3 mM Mg⁺⁺ を有することを除いて、この同じ溶液を含む。記録は、興奮性シナプス伝達遮断剤、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 6 - ニトロ - 2, 3 - ジオキソ - ベンゾ [f] キノキサリン - 7 - スルホニアミド (NBQX, 10 μM, Sigma) および D(-) - 2 - アミノ - 5 - ホスホノペンタン酸 (AP - 5, 50 μM, Sigma) の存在下で行われた。電圧固定記録のため、1 μM のテトロドトキシンが細胞外溶液に添加される。BK チャネル活性を阻害するため、1 mM TEA が加えられる。記録は、蛍光ランプを備える倒立 Zeiss Axiovert 25 顕微鏡上で行われる。成功したタンパク質の発現は EGFP または YFP によってもたらされる蛍光によって立証される。ニューロンのアクセス抵抗は、15～40 M であり、実験全体にわたって、安定性のために監視される。電気生理学的信号は、Axopatch 200A 増幅器 (Axon Instruments, Union City, CA) を使用することで増幅され、10 kHz でフィルターにかけられ、Axon Digidata 1600 (50 Hz) でデジタル化され、かつ pClamp 9 ソフトウェア (Axon Instruments) を用いて入手および分析される。光電流は、ダイオード励起固体レーザー (Pusch Opto Tech GmbH; 1 = 473 nm, P1 = 100 mW, 2 = 532 nm, P2 = 50 mW) からの様々な波長の光パルスまたはエキシマー励起色素レーザー (Coumarin 2, = 450 nm) からの 10 ns 閃光により誘起される。特定の光強度は、細胞から ~ 500 μm の距離にて、400 μm 直径の石英光ファイバー (STE-F100/400-Y-VIS/NIR; Laser 2000, Wessling, Germany) の末端での強度である。ChR2 (L132C) - YFP および ChR2 (L132C) - 2A - EGFP を発現するニューロンから測定された電流は同じである。

【0037】

加えて、他の好ましい実施形態において、本発明の変異光誘起イオンチャネルの、HEK293 細胞での Fura - 2 - イメージングによって測定される、カルシウム伝導度は、WT CHOP - 2 と比較して少なくとも 2 倍、好ましくは少なくとも 3 倍、より好ましくは少なくとも 4 倍増加される。カルシウム伝導度 Fura - 2 AM (5 mM, In vitro) 室温にて 30 分から 1 時間ロードされる。ローディングの後に、細胞は Ca⁺⁺ なしの 140 mM NaCl 溶液 (140 mM NaCl, 7 mM EGTA、2 mM MgCl₂、および 10 mM HEPES) 中で回収される。黄色蛍光タンパク質は、その YFP - 蛍光からの各々の細胞発現レベルを見積もるため、460 / 40 nm のフィルター (Visatron Systems, Puchheim, Germany) を使用する光に 500 ms 曝すことにより励起される。15 分間の暗闇の後、光駆動チャネルが青色光 (460 / 40 nm) で 10 秒間刺激される。Fura - 2 は、340 nm (340 / 20) および 380 nm (380 / 20)、および CCD カメラ (全てのフィルターは Visatron Systems, Puchheim, Germany) で検出される放射光 (540 / 80 nm) で励起される。

【0038】

上記に示すように、変異光誘起イオンチャネルは、追加でさらなる変異、好ましくは置換を含み得る。一の好ましい実施形態において、光誘起イオンチャネルはさらに、少なくとも 1 個の以下のアミノ酸残基：配列番号 1 の位置 253 に対応する位置のアスパラギン酸；配列番号 1 の位置 257 に対応する位置のリジン；配列番号 1 の位置 260 に対応する位置のトリプトファン；配列番号 1 の位置 123 に対応する位置のグルタミン酸；配列番号 1 の位置 134 に対応する位置のヒスチジンまたはアルギニン、好ましくはアルギニ

ン；配列番号1の位置128に対応する位置のトレオニン、セリン、またはアラニン；および/または配列番号の位置156に対応する位置のアラニン、を含み得る。従って、変異光誘起イオンチャネルは、配列番号1に対応する、示された位置におけるアミノ酸残基の以下の組み合わせの1個：

【0039】

Cys132+Asp253; Cys132+Lys257; Cys132+Trp260; Cys132+Glu123; Cys132+His134; Cys132+Arg134; Cys132+Thr128; Cys132+Ser128; Cys132+Ala128; Cys132+Ala156;

【0040】

Cys132+Asp253+Lys257; Cys132+Asp253+Trp260; Cys132+Asp253+Glu123; Cys132+Asp253+His134; Cys132+Asp253+Arg134; Cys132+Asp253+Thr128; Cys132+Asp253+Ser128; Cys132+Asp253+Ala128; Cys132+Asp253+Ala156;

10

【0041】

Cys132+Lys257+Trp260; Cys132+Lys257+Glu123; Cys132+Lys257+His134; Cys132+Lys257+Arg134; Cys132+Lys257+Thr128; Cys132+Lys257+Ser128; Cys132+Lys257+Ala128; Cys132+Lys257+Ala156;

20

【0042】

Cys132+Trp260+Glu123; Cys132+Trp260+His134; Cys132+Trp260+Arg134; Cys132+Trp260+Thr128; Cys132+Trp260+Ser128; Cys132+Trp260+Ala128; Cys132+Trp260+Ala156;

【0043】

Cys132+Glu123+His134; Cys132+Glu123+His134; Cys132+Glu123+Thr128; Cys132+Glu123+Ser128; Cys132+Glu123+Ala128; Cys132+Glu123+Ala156;

30

【0044】

Cys132+His134+Thr128; Cys132+His134+Ser128; Cys132+His134+Ala156;

【0045】

Cys132+Arg134+Thr128; Cys132+Arg134+Ser128; Cys132+Arg134+Ala156;

【0046】

Cys132+Thr128+Ala156; Cys132+Ser128+Ala156; Cys132+Ala128+Ala156;

40

【0047】

Cys132+Asp253+Lys257+Trp260; Cys132+Asp253+Lys257+Glu123; Cys132+Asp253+Lys257+Arg134; Cys132+Asp253+Lys257+Thr128; Cys132+Asp253+Lys257+Ser128; Cys132+Asp253+Lys257+Ala128; Cys132+Asp253+Lys257+Ala156;

【0048】

50

Cys132 + Lys157 + Trp260 + Glu123 ; Cys132 + Lys157 + Trp260 + Arg134 ; Cys132 + Lys157 + Trp260 + Thr128 ; Cys132 + Lys157 + Trp260 + Ser128 ; Cys132 + Lys157 + Trp260 + Ala128 ; Cys132 + Lys157 + Trp260 + Ala156 ;

【0049】

Cys132 + Trp260 + Glu123 + His134 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + Arg134 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + Thr128 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + Ser128 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + Ala128 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + Ala156 ;

10

【0050】

Cys132 + Glu123 + His134 + Thr128 ; Cys132 + Glu123 + His134 + Ala128 ; Cys132 + Glu123 + His134 + Ala156 ;

【0051】

Cys132 + Glu123 + Arg134 + Thr128 ; Cys132 + Glu123 + Arg134 + Ala128 ; Cys132 + Glu123 + Arg134 + Ala156 ;

【0052】

Cys132 + His134 + Thr128 + Ala156 ; Cys132 + His134 + Ala128 + Ala156 ;

20

【0053】

Cys132 + Arg134 + Thr128 + Ala156 ; Cys132 + Arg134 + Ala128 + Ala156 ;

【0054】

Cys132 + Asp253 + Lys257 + Trp260 + Glu123 ; Cys132 + Asp253 + Lys257 + Trp260 + His134 ; Cys132 + Asp253 + Lys257 + Trp260 + Arg134 ; Cys132 + Asp253 + Lys257 + Trp260 + Thr128 ; Cys132 + Asp253 + Lys257 + Trp260 + Ser128 ; Cys132 + Asp253 + Lys257 + Trp260 + Ala128 ; Cys132 + Asp253 + Lys257 + Trp260 + Ala156 ;

30

【0055】

Cys132 + Lys257 + Trp260 + Glu123 + His134 ; Cys132 + Lys257 + Trp260 + Glu123 + Arg134 ; Cys132 + Lys257 + Trp260 + Glu123 + Thr128 ; Cys132 + Lys257 + Trp260 + Glu123 + Ser128 ; Cys132 + Lys257 + Trp260 + Glu123 + Ala128 ; Cys132 + Lys257 + Trp260 + Glu123 + Ala156 ;

40

【0056】

Cys132 + Trp260 + Glu123 + His134 + Thr128 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + His134 + Ser128 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + His134 + Ala128 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + His134 + Ala156 ;

【0057】

Cys132 + Trp260 + Glu123 + Arg134 + Thr128 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + Arg134 + Ser128 ; Cys132 + Trp260 + Glu123 + Arg134 + Ala128 ;

50

2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + A l a 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + T r p 2 6 0 + G
1 u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + A l a 1 5 6 ;

【 0 0 5 8 】

C y s 1 3 2 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + T h r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3
2 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + S e r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + G l u
1 2 3 + A r g 1 3 4 + A l a 1 2 8 + A l a 1 5 6 ;

【 0 0 5 9 】

C y s 1 3 2 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + T h r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3
2 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + S e r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + G l u
1 2 3 + H i s 1 3 4 + A l a 1 2 8 + A l a 1 5 6 ;

10

【 0 0 6 0 】

C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3
4 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g
1 3 4 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + T
h r 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3
+ S e r 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1
2 3 + A l a 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l
u 1 2 3 + A l a 1 5 6 ;

【 0 0 6 1 】

C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + T h r 1 2
8 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + S e r
1 2 8 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + A
l a 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4
+ A l a 1 5 6 ;

20

【 0 0 6 2 】

C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + T h r 1 2
8 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + S e r
1 2 8 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + A
l a 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4
+ A l a 1 5 6 ;

30

【 0 0 6 3 】

C y s 1 3 2 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + T h r 1 2 8 + A l a 1 5
6 ; C y s 1 3 2 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + S e r 1 2 8 + A l a
1 5 6 ; C y s 1 3 2 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + A l a 1 2 8 + A
l a 1 5 6 ;

【 0 0 6 4 】

C y s 1 3 2 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + T h r 1 2 8 + A l a 1 5
6 ; C y s 1 3 2 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + S e r 1 2 8 + A l a
1 5 6 ; C y s 1 3 2 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + A l a 1 2 8 + A
l a 1 5 6 ;

40

【 0 0 6 5 】

C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3
4 + T h r 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u
1 2 3 + H i s 1 3 4 + S e r 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T
r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + A l a 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3
+ L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + A l a 1 5 6 ;

【 0 0 6 6 】

C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3
4 + T h r 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u
1 2 3 + A r g 1 3 4 + S e r 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T

50

r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + A l a 1 2 8 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3
+ L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + A l a 1 5 6 ;

【0067】

C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + T h r 1 2
8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s
1 3 4 + S e r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G
l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + A l a 1 2 8 + A l a 1 5 6 ;

【0068】

C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + T h r 1 2
8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g
1 3 4 + S e r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G
l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + A l a 1 2 8 + A l a 1 5 6 ;

10

【0069】

C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3
4 + T h r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p
2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + S e r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + A
s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + H i s 1 3 4 + A l a 1 2 8
+ A l a 1 5 6 ;

【0070】

C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3
4 + T h r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + A s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p
2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + S e r 1 2 8 + A l a 1 5 6 ; C y s 1 3 2 + A
s p 2 5 3 + L y s 2 5 7 + T r p 2 6 0 + G l u 1 2 3 + A r g 1 3 4 + A l a 1 2 8
+ A l a 1 5 6 、を含み得る。

20

【0071】

しかしながら、上記のリストにおいて C y s 1 3 2 はまた、 S e r 1 3 2 、 G l u 1 3
2 、 A s p 1 3 2 または T h r 1 3 2 のいずれかに置換され得る。

【0072】

一般に、光誘起イオンチャネルの機能に必要なレチナール、またはレチナール誘導体は
、細胞により生産され、該イオンチャネルでトランスフェクトされる。その配座によって
、レチナールは、全トランスレチナール、1 1 - シスレチナール、1 3 - シスレチナール
、または9 - シスレチナールであり得る。しかしながら、本発明の変異光誘起イオンチャ
ネルが小胞、リポソーム、または他の人工の細胞膜に組み込まれることもまた、予期さ
れる。従って、第二の態様において、本発明は第一の態様の光誘起イオンチャネル、およ
びレチナールまたはレチナール誘導体を含む、チャネルロドプシンを提供する。好ましく
は、レチナール誘導体は3 , 4 - デヒドロレチナール、1 3 - エチルレチナール、9 - d
m - レチナール、3 - ヒドロキシレチナール、4 - ヒドロキシレチナール、ナフチルレチ
ナール；3 , 7 , 1 1 - トリメチル - ドデカ - 2 , 4 , 6 , 8 , 1 0 ペンタエナール；3
, 7ジメチル - デカ - 2 , 4 , 6 , 8 - テトラエナール；3 , 7 - ジメチル - オクタ - 2
, 4 , 6 - トリエナール；および6 - 7回転阻止 (r o t a t i o n - b l o c k e d)
レチナール、8 - 9回転阻止レチナール、および1 0 - 1 1回転阻止レチナールからなる
群から選択される。加えて、第一の態様の好ましい実施形態は、第二の態様の好ましい実
施形態に対応する。

30

【0073】

第三の態様において、本発明はまた、第一の態様の光誘起イオンチャネルをコードする
核酸配列を含む、核酸構成体に関する。

【0074】

最適の発現を確実にするために、コーディング D N A もまた、例えば、適切な調節配列
および / または標的配列の付加、および / または、コーディング D N A 配列の、選択され
た宿主の好ましいコドン使用頻度との照合により、変更できる。標的配列は、シナプス、

40

50

ポストシナプス部位、軸索小丘、または小胞体などの、細胞内の特定の部位または区画 (compartiment) に光誘起イオンチャネルを標的化する、C-末端伸張をコードし得る。核酸は、本発明のタンパク質の配列の発現を提供するために更なる要素、例えば、プロモーター、転写開始および停止信号、翻訳開始および停止信号、およびポリアデニル化信号、に結合され得る。プロモーターは誘導型または構成的、一般的または細胞特異的プロモーターであり得る。細胞特異的プロモーターの例は両極細胞に特有の mGlu6 - プロモーターである。プロモーター、ベクター、および他の要素の選択当業者のレベルでの設計事項である。そのような多くの要素が、文献に記載され、商業的供給者を通して入手可能である。

【0075】

10

従って、第四の態様において、本発明は第一の態様の光誘起イオンチャネルをコードする核酸配列または第三の態様の核酸構成体を含む、発現ベクターを提供する。好ましい実施形態において、ベクターは遺伝子治療に好適であり、特に、ウイルス媒介性の遺伝子導入に好適である。「ウイルス媒介性の遺伝子導入に好適」なる用語は、本明細書では、該ベクターがウイルスにパックされ、その結果、対象の部位または細胞に送達できることを意味する。遺伝子治療に好適なウイルスの例は、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、狂犬病ウイルス、セムリキ森林熱ウイルスおよびヘルペスウイルスである。これらのウイルスは、それらが認識し、感染させることができる細胞に遺伝子をどれくらいよく転移させるか、そして、それらが細胞のDNAを永久にまたは一時的に変更するかどうかの点で異なる。しかしながら、遺伝子治療は裸のDNA、リポブレックスおよびポリブレックス、およびデンドリマーの適用などの非ウイルス性の方法もまた包含する。

【0076】

20

上記の通り、得られる核酸配列は細胞、例えば担体としてのウイルスの使用により、または例えば、(リポフェクタミン、フージーンなどの) 化学トランスフェクタント、電気穿孔法、リン酸カルシウム共沈殿およびDNAの直接拡散を含むトランスフェクションにより細胞に導入され得る。細胞をトランスフェクトする方法は実施例に詳述され、それぞれの受容細胞に適合され得る。DNAでのトランスフェクションは、染色体外の形態で存在する、トランスフェクトされたDNAがゲノム、または不安定な(一時的な)細胞または細胞株に組み込まれると、安定な細胞または細胞株をもたらす。その上、安定な細胞株は、エピソーム複製プラスミドを使用することにより、安定した細胞株を入手でき、それは、染色体外プラスミドの遺伝的形質が細胞ゲノムに組み込まれる制御要素により制御されることを意味する。一般に、適切なベクターまたはプラスミドの選択は、対象となる宿主細胞による。

【0077】

30

従って、第五の態様において、本発明は第二の態様のチャネルロドプシン、第三の態様の核酸構成体または第四の態様の発現ベクターを含む細胞に関する。

【0078】

40

以下で説明されるように、本発明の変異光誘起イオンチャネルの一つの適用は、人間または動物などの盲目的対象の治療である。生まれつきの視細胞がもはや機能しない、多くの疾患があるが、すべての神経接合部は、作動し続けることができる。今日、網膜上に人工セラミック光電セルの薄いフィルムを移植する試みが様々な研究センターで行われている。これらの光電セルは、二次的に網膜のいまだ無傷の細胞を脱分極し、その結果、神経インパルス(人工眼)の引き金となることを意図する。これらの神経節細胞、アマクリン細胞または両極細胞における本発明の光制御イオンチャネルの意図的な発現は、非常により的確な解決策であり、より大きい三次元的な視覚解像度を可能にするであろう。

【0079】

変異光誘起イオンチャネルの、天然において対応するチャネルが発現しない細胞の膜への組込みは単純に、例えば、組み換えDNA技術の既知の手順を用いて、このイオンチャネルをコードするDNAがまず適切な発現ベクター、例えばプラスミド、コスミドまたは

50

ウイルスに組み込まれ、標的細胞はその後これにより形質転換され、タンパク質がこの宿主で発現されるということを達成できる。次に、細胞は適当な方法、例えばレチナールで、タンパク質およびレチナール間のシップ塩基結合を可能にするために処理される。

【0080】

好ましい実施形態において、これはサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces Pombe*) またはピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの種々の酵母において、細菌ロドブシン、および / またはウシロドブシンなどのロドブシンで既に成功裏に実施されているように、起こる。

【0081】

また、発現は哺乳動物細胞系または昆虫細胞系でも生じ得る。それゆえ、好ましい実施形態において、細胞は哺乳動物細胞または昆虫細胞である。発現は、好ましくはメラノーマ細胞 (例えば、BLM細胞株)、COS細胞 (「アフリカミドリザル腎臓CV1」細胞感染により生成される) またはHEK細胞 (「ヒト胎児腎臓細胞」例えばHEK293細胞)、またはBHK細胞 (「ベビーハムスター腎細胞」) における一時的発現としてのエピソーマルベクターで、またはCHO細胞 (「チャイニーズハムスター卵巣細胞」)、骨髄腫細胞またはMDCK細胞 (「Madine-Darbyイヌ腎臓細胞」) またはバキュロウイルスに感染したSf9昆虫細胞における、(ゲノムへの組込による) 安定な発現形態においてのいずれかで生じる。従って、より好ましい実施形態において、哺乳動物細胞はCOS細胞；BHK細胞；HEK293細胞；CHO細胞；またはMDCK細胞である。

10

【0082】

視力回復の文脈における、最も好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は光受容細胞；網膜桿状体細胞；網膜錐体細胞；網膜神経節細胞；双極ニューロン；神経節細胞；偽単極ニューロン；多極ニューロン；ピラミッド状ニューロン；プルキンエ細胞；または、顆粒細胞である。

【0083】

ニューロンは、他の細胞との接続に特化された、電気的および、化学的シグナル伝達がシナプスを通して起こるところの、化学的シグナル伝達により情報を処理および伝達する電気的興奮細胞である。感覚器官の細胞に作用する、接触、音、光および多数の他の刺激に反応する感覚ニューロン、脳および脊椎から信号を受信し、筋収縮を引き起こし、腺に作用する運動ニューロン、脳または脊椎の同じ領域内の他のニューロンにニューロンを接続する介在ニューロンなどの、多数の特化された型のニューロンが存在する。一般に、ニューロンは体細胞、樹状突起、および軸索を有する。樹状突起は、細胞体から生じ、しばしば何百ミクロンも広がっていて、複数回分岐している、フィラメントである。軸索は、軸索小丘と呼ばれる部位の細胞体から生じる特別な細胞フィラメントである。ニューロンの細胞体は頻繁に複数の樹状突起をもたらすが、軸索がその終点までに数百回分岐し得るけれども、決して1つ以上の軸索をもたらさない。主要なシナプスにて、シグナルは1個のニューロンの軸索から他の樹状突起に送られる。しかしながら、これらの法則には多数の例外：樹状突起を欠くニューロン、軸索を全く有さないニューロン、軸索を別の軸索へ、または樹状突起を別の樹状突起に接続するシナプスなど、がある。さらにほとんどのニューロンは、解剖学的に単極または偽単極 (樹状突起および軸索は同じ過程から現れる)、双極 (体細胞の反対端の軸索および単独の樹状突起)、多極 (2個以上の樹状突起を有し、さらに (i) 錐体細胞、プルキンエ細胞および前角細胞などの、長突起の軸索突起 (long-projecting axonal process) をもつゴルジIニューロン、および (ii) 軸索突起が局所的に突出するゴルジIIニューロン、例えば顆粒細胞、としてさらに分類し得る) として特徴付けられる。

20

【0084】

光受容細胞は、光伝達能を有する網膜で見つけられた特化されたニューロンである。2種の古典的な光受容体は、それぞれが視覚系により使用される情報に寄与する、桿体視細

30

40

50

胞および錐体視細胞である。網膜神経節細胞は、目の網膜の内表面の近くに位置する一種のニューロンである。これらの細胞は、視蓋前域（中脳）、視床下部の視交差上核、および外側膝状体（視床）に突出させる、樹状突起および長い軸索を有する。わずかな比率は、視覚にほとんど貢献しないか全く貢献しないが、それ自体は感光性である。それらの軸索は、網膜視床下部路を形成し、日周期および瞳孔対光反射、瞳孔のリサイズに貢献する。それらは光受容体から、2個の介在ニューロン型：両極細胞およびアマクリン細胞、を経て視覚情報を受け取る。アマクリン細胞は網膜における介在ニューロンであり、網膜神経節細胞への入力の70%に関与する。網膜神経節への他の30%の入力に関与する両極細胞はアマクリン細胞によって調節される。網膜の一部として、両極細胞は光受容体（桿体細胞と錐体細胞）と神経節細胞の間に存在する。それらは、光受容体から神経節細胞まで信号を伝えるために直接または間接的に働く。

【0085】

細胞は単離され（および遺伝学的に改変され）、維持され、適切な温度およびガス混合（典型的には、37、5%CO₂）で、任意に、当業者に既知および実施例における特定の細胞株または細胞型のために例示された、細胞培養器内で、培養され得る。培養条件は各々の細胞型により変化し得、特定の細胞型のための条件の変化は異なった表現型をもたらすことができる。温度とガス混合は別として、細胞培養系における最も一般的な変化の要素は増殖培地である。増殖培地のためのレシピは、pH、グルコース濃度、増殖因子、および特に他の栄養成分の存在において変化できる。増殖培地は、商業的に利用可能であるか、またはアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC）から入手可能な組成に従って、調製できる。補足培地に使用される増殖因子はしばしば子牛血清などの動物血液由来である。追加で、抗生物質が増殖培地に加えられ得る。一般的な操作の中で、培養細胞上で実施されるものは、培地変更および細胞通過である。

【0086】

Ca⁺⁺適用のための追加の電位場がある。Ca⁺⁺は重要な細胞内調節因子であるため、Ca⁺⁺は、細胞の、状態と活動を調節する、微調整されたCa⁺⁺の恒常性への光の介入を可能にする。基礎研究では、Ca⁺⁺は、閉じ込められたCa⁺⁺²⁺に代わる手段としてCa⁺⁺依存開口分泌（例えば、シナプスの伝達物質放出）を光学的に制御する、カルシウム活性化キナーゼおよびホスファターゼを経て下流の細胞内プロセスを光学的に活性化する、またはゴルジ装置または小胞体などの細胞内区画にCa⁺⁺を標的とすることによってアポトーシスを引き起こすために使用され得る。

【0087】

したがって、本発明の更なる態様は、第一の態様の光誘起イオンチャネルまたは第二の態様のチャネルロドプシン、または第三の態様の核酸構成体または本発明の細胞の薬物としての使用である。特に、本発明の発現ベクターは遺伝子治療で使用され得る。より具体的には、第一の態様の光誘起イオンチャネル、第二の態様のチャネルロドプシン、第三の態様の核酸構成体、または本発明の細胞は、盲目または減少した視力の治療で使用され得る。しかしながら、300Hzまでのその早いスパイク開始の動作のため、聴力回復または難聴の治療における光誘起イオンチャネルの使用もまた熟慮される。

【0088】

さらに、第一の態様の変異光誘起イオンチャネルは、恒久的な光誘起カルシウム流入を引き起こし、順に細胞死を引き起こす、追加の置換（SFOの、または遅い変異体と呼ばれる、表1参照）を含み得る。従って、癌細胞の除去における、配列番号1の位置128に相当する位置にスレオニン、セリンまたはアラニンを、および/または配列番号1の位置156に相当する位置にアラニンを追加的に有する本発明の光誘起イオンチャネルの使用が熟慮される。例えば、本発明の発現ベクターは癌細胞への癌細胞表面マーカーを経てウイルス媒介性の遺伝子導入で標的化できるであろう。さらに、具体的にはレトロウイルスが好ましくは癌細胞などの急速に分裂する細胞に組み込まれることに注意すべきである。結果として、本発明の光誘起イオンチャネルは、支配的に発現され、癌細胞の細胞膜に組み込まれる。光による刺激の際に、これらのイオンチャネルは、結果として癌細胞の死

10

20

30

40

50

に通じる、恒久的なカルシウム流入を開いて、引き起こすであろう。そのような使用は、黒色腫の癌細胞のように光に自然に露出される癌細胞の除去に特に有利である。したがつて、好ましい実施形態において、癌は黒色腫の癌である。

【0089】

最終的な態様において、本発明は第一の態様の光誘起イオンチャネル、または第二の態様のチャネルロドプシン、または本発明の細胞の、高スループットのスクリーニングでの使用に関する。高スループットのスクリーニング (HTS) は、特に創薬に使用され、かつ生物学および化学の分野に関連している科学実験のための方法である。HTSは、研究者が、しばしば現代のロボット工学、データ処理、制御ソフトウェア、液体の処理方法装置、および高感度検出器の組み合わせを通して、何百万もの生化学、遺伝子、または、薬理学の試験を短時間に行うことを許容する。この工程により、特定の生体分子経路を調節する活性剤；特に本発明の光誘起イオンチャネル、Ca⁺⁺誘導カリウムチャネルまたはBKチャネルなどのイオンチャネルを改変する物質、を急速に同定し得る。例えば、宿主細胞の中でCa⁺⁺誘導カリウムチャネルおよび光誘起イオンチャネルを共発現し得る。光による刺激の際に、光誘起チャネルは開かれ、細胞内Ca⁺⁺濃度が増加し、その結果、カリウムチャンネルを活性化するであろう。それ故、RH421 (N(4-スルフォブチル)-4-(4(ジペンチルアミノ)フェニル)ブタジエニル) ピリジニウム、内塩)などの電位感受性色素によって監視され得る、膜電位における変化を受けるであろう。その結果、そのようなHTSは以下の段階を含み得る；(i) Ca⁺⁺誘導(カリウム)チャネルおよび本発明の光誘起イオンチャネルを発現する細胞に、Ca⁺⁺誘導チャネルに対する候補剤を接触させる、(ii) 光誘起チャンネルを誘起するために光刺激を適用する；(iii) 膜電位(混合シグナル)の変更の決定、および(iv) 段階(iii)で決定したシグナルと、段階(ii)に供された本発明の光誘起イオンチャネルのみを発現する細胞で決定されたシグナル(单一シグナル)の比較。膜電位の変化の減少は、Ca⁺⁺誘導(カリウム)チャネルの有望なモジュレータを暗示するであろう。そのようなアプローチが、Ca⁺⁺誘導チャネルのみを発現する細胞で実施された直接測定と比較して遙かに改良された、約5:1のシグナル・ノイズ比を得ることが示されるであろう。改良されたシグナル・ノイズ比のため、特に光誘起イオンチャネルを使用することによって、前述の方法は特にHTSに適当であり得る。

【0090】

本質において、HTSは、比較的短い時間で、特定の標的にに対する多数の物質の効果について多量の実験データを集めるためのアプローチを使用する。スクリーニングは、この文脈においては、ただ一つの目標(通常、科学的仮説を試験する)のために、すべてのデータが続いて適用され得る、より大きい実験である。HTSに関して、本発明の細胞は、マルチウェルプレート、例えば96ウェルプレートのような組織プレートに播種され得る。その後、プレート中の細胞は標的イオンチャネルと相互作用するために十分な時間、試験物質と接触される。試験物質は、プレートにわたって、ウェルからウェルで異なり得る。培養時間が過ぎた後に、測定は、プレートのすべてのウェルにわたって、手動または機械によって行われ、任意に試験物質で接触されていない細胞の測定値と比較される。研究者が、自動化されたルーチンでまだ実行されていなかった効果を探して、パッチ・クランプを使用するとき、手動測定が必要であり得る。そうでなければ、特化された自動分析装置はウェル上で多数の実験(特定の頻度または高スループットパッチ・クランプ測定の光の分析など)を実行できる。この場合、装置は単一のウェルから得られた値へ各数をマッピングして、各々の実験の結果を、例えば数値の格子として、出力する。この最初のアッセイの結果によって、研究者は、同じスクリーニングの中で新しいアッセイプレートへ活性(すなわち、細胞内環状ヌクレオチドレベルを変更する)として特定されたものと同様の物質を使用することによって、追跡アッセイを実行でき、次に詳しいデータを集めるために実験を再実行して、化学剤の構造を最適化して、細胞への剤の効果を改良できる。自動化はHTSの有用性において重要な要素である。特化されたロボットは、最終分析を経た創作から、しばしば単一のアッセイプレートの寿命を超える過程の多くの原因となる。

10

20

30

40

50

HTSロボットは通常、多くのプレートを同時に調製、分析でき、さらにデータ収集の過程を促進する。本発明のHTSに好適な装置の例は、Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPRTM; Molecular Devices)、FLEXstation (登録商標) (Molecular Devices)、Voltage Ion Probe Reader (VI-PR, Aurora Biosciences)、Attofluor (登録商標) Ratio Vision (登録商標) (ATTO) を含む。

【0091】

以下で、本発明は本発明の範囲を限定する意図でない図と実施例によって説明される。

【実施例】

10

【0092】

CatChの構築および生物物理学的特徴

以前のアプローチと対照的に、発明者の目的は、その変異が陽イオン透過性を改変するWT ChR2内の残基、を特定することであった。発明者は、3番目の膜貫通ドメインに、このドメイン内のいくつかの変異している残基が光サイクルを改変し、チャネルを駆動する(gating)ものとして、着目した(図1)^{5-7, 12}。Arg¹¹⁵からThr¹³⁹までの各々の残基は、個別にシステインに置き換えられ、アフリカツメガエル卵母細胞中で機能的な変化をスクリーニングされた。

【0093】

20

分光法

CatChは以前説明される^{5, 13}ように、ピチア・パストリス内で発現され、精製された。閃光光分解(Flash-photolysis)研究が実施され、吸収変化が、エキシマー励起染料レーザー(excimer pumped dye laser)(450nm、2-3mJ)¹³からの10nsのレーザー閃光の励起後に測定された。

【0094】

L132C (CatCh)変異は電流出力の振幅および波形に優位な改変を示す。

【0095】

HEK293細胞培養および分子生物学

C末端切断型のChR2 (L132C) - YFP (ベクター: pcDNA3(-) - chop2-309 (L132C) - EYFP) は、HEK293細胞にトランスフェクトされ、常にG418選択下(0.6mg/ml; PAA Germany, Colbe, Germany)で保持された。野生型WT ChR2のために、C末端切断型のChR2 - YFPベクター: pcDNA4TO - chop2-309 - EYFP)がHEK293 - Trex細胞(Invitrogen)に安定してトランスフェクトされ、以前に記載されたように¹³、培養され、誘導された。定常関係(stationary relation)のピークは、測定の24時間前にヒトコドン最適化pcDNA3.1(-) - ChR2 - YFP構成体(WT、H134RまたはL132C)で一時的にトランスフェクトされたHEK293細胞(Effectene, QIAGEN)から決定された。

30

【0096】

HEK293細胞における電気生理学的記録

40

2-4Mの抵抗をもつパッチャピペットは、水平なDMZユニバーサルプーラー(シリアルNo. 5318904120B, Zeitz - Instruments, Augsburg, Germany)上で薄肉のホウケイ酸ガラス(GB150-8P, Science Products, Hofheim, Germany)から作成された。光電流は全細胞パッチ・クランプ法で記録され、400μmの光ファイバーに焦点を合わせられたダイオード励起固体レーザー(Pusch Opto Tech GmbH, Baden Baden, Germany; = 473nm)からの光パルスで活性化された。光パルスは速いコンピュータ制御シャッター(Uniblitz LS6ZM2, Vincennt Associates)によって適用された。与えられたすべての光強度が、光導体の端で測定される。異なる陽イオンでの透過率の見積りを得るために、我々は、光電流

50

- 電圧関係を測定し、逆転電位を測定した。細胞内液は、140 mM NaCl、7 mM EGTA、2 mM MgCl₂ および 10 mM Tris (pH = 9) を含み、細胞外液は 140 mM NaCl、2 mM MgCl₂ および 10 mM Tris (pH = 9) を含んだ。陽イオン透過率のために、外部の 140 mM NaCl は、140 mM KCl、90 mM CaCl₂ または 90 mM MgCl₂ でそれぞれ交換された。プロトン透過性は、pH が 9 から 7.4 (または 6) に減少したときに、電流 - 電圧関係の逆転電位のシフトによって測定された。透過率比は、Na⁺、K⁺、H⁺ および Ca⁺⁺ のための条件を含む、ゴールドマン - ホジキン - カツツ (GHK) の式により計算された。

【0097】

HEK293 細胞において、トランスフェクションの 24 時間後に、CatCh の青色光励起定常電流は、WT ChR2 と比較して ~2.5 倍高い振幅を有した (CatCh : 25.0 ± 8.8 pA / pF ; WT : 10.1 ± 4.1 pA / pF ; 平均 ± 標準偏差、n = 6, -60 mV (図 2a))。また、定常状態 - ピーク電流比もまた、WT の 0.37 ± 0.18 から、CatCh の 0.71 ± 0.16 まで増加した (図 2b)。反復性の青色光刺激の間、CatCh ピーク電流は消失した。回復が黄色光で早期に誘導されなかったときに、それは暗闇の中で数分以内に回復した。対照的に、同じ条件下での WT ChR2 ピーク電流の完全な回復は 20 秒かかった¹³。CatCh の活性化および非活性化時定数 (τ_{on} = 590 ± 3 μs, τ_{off} = 15 ± 2 ms, n = 9, pH 7.4, -60 mV, 平均 ± 標準偏差) は、WT ChR2 と比べてわずかに長かった (τ_{on} = 214 ± 2 μs, τ_{off} = 10 ± 1 ms, n = 9, pH 7.4, -60 mV; 平均 ± 標準偏差; 図. 2a, b, 図. 5 下段, 表 1)。

【0098】

次に、発明者は、チャネル特性の記載された効果を光サイクルにおけるスペクトル変化と比較した。精製 CatCh の閃光光分解実験は、WT ChR2 スペクトル¹³ からのわずかな逸脱だけを明らかにした (図 5 を参照)。1. 脱プロトン化シップ塩基を示す、初期 P390 中間体はわずかに検出可能である。2. チャネルの開口状態を示す、P520 中間体は、電気生理学的に測定された τ_{off} 値に相当する 9 ms のわずかに延長された生存時間を示す。同様の開口生存期間値は、変化していない単位コンダクタンスにて倍増した活性を示す^{2, 14}、変異体 H134R で得られた。したがって、CatCh の場合でも、開口状態の減速された動態は、単位コンダクタンスが変化していないところの、HEK293 細胞で測定された 2.5 倍の増加する定常電流に関与できた。これは、以前に説明されるように¹⁴、定常雑音解析 (stationary noise analysis) を使用して、CatCh の単独チャネルコンダクタンスを測定することによって、確認された。

【0099】

雑音解析

実験が、以前に記載された¹⁴ とおりに HEK293 細胞上で実施され、室温 (23) で実施された。ピペット液は 1 mM ゲアニジン - HCl、199 mM NMG - Cl (N-メチルグルカミン)、10 mM EGTA、2 mM MgCl₂ および 20 mM Hepes (pH 7.4) を含み、浴溶液は 200 mM ゲアニジン - HCl、2 mM MgCl₂、2 mM CaCl₂、および 20 mM Hepes (pH 7.4) を含んだ。青色光刺激への電流応答は、飽和光条件 (saturating light condition) 下および再度の、-60 mV での電流応答が最大電流の半分であるところの光条件 (I_{0.5}; 2 kHz low-pass Bessel filter; サンプリングレート: 100 kHz; 細胞直径: 15 μm) 下での電圧ステッププロトコル (voltage step protocol) の適用下で記録された。-60 mV の保持電位での持続的な照射 (2 分) の間の定常 I_{0.5} の記録は、単独チャネルコンダクタンスを見積もるのに使用された (2 kHz low-pass Bessel filter; サンプリングレート 20 kHz)。照射無し (コントロール、3 個の記録) および有り (光刺激開始の 30 秒後、2 個の記録) の交互の記録は、集められ、フーリエ変換さ

10

20

30

40

50

れ、単独チャネルコンダクタンスがローレンツ関数での近似から見積もられた（詳細は¹ ⁴ 参照）。より低い光強度は、光駆動性チャネルの開口と閉鎖の最大限度の変動を得るために選ばれた。

【0100】

WT ChR2 および H134R 雜音解析実験に沿って、グアニジンは導電イオンとして使用された。チャネルの力学的特性は透過性陽イオンと独立であることに注意¹ ⁴。異なるパワースペクトルの評価は、150 fS と推定された室温での WT ChR2 単独チャネルコンダクタンス¹ ⁴ と同様の、室温(23)で 200 mM グアニジンのための 140 ± 5 fS ($n = 6$ 、-60 mV) の単独チャネルコンダクタンス をもたらした。雑音解析によって測定された CatCh の開口確率は、H134R ($p_o \sim 0.6$) との比較において変わりがなかった。それ故、増加した開口チャネルの存続期間は 2.5 の要素による光電流観測された増加を容易に占めることができるが、CatCh コピーのわずかに高められた発現は除くことができない。

【0101】

アフリカツメガエル卵母細胞調製および分子生物学

細胞外に露出したシステイン残基のない C 末端切断型の ChR2 変異体（残基 1 - 315）（C34A および C36A 変異を含む）は、ベクター-pTQN² ⁷ にサブクローニングされた。単一のシステイン変異は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) によって導入されて、配列決定により確認された。mRNA は、SP6 message machine キット (Ambion, Austin, TX) を使用して調製された。30 ng の WT ChR2 / CatCh mRNA を含む、50 nL cRNA が各々のアフリカツメガエル卵母細胞に注入された。部分的な卵巣摘出後のコラゲナーゼ処理で卵母細胞を得た。cRNA 注入後に、卵母細胞は、全トランスレチナル（1 μM、エタノール中の 1 mM ストックより）中で培養され、1 mg / mL ゲンタマイシンを含む ORI バッファー（90 mM NaCl、2 mM KCl、2 mM CaCl₂ および 5 mM Mops、pH 7.4）中で、18 にて 2 ~ 4 日間保持された。

【0102】

アフリカツメガエル卵母細胞上の 2 電極電圧固定法

光電流は、75-W キセノンアーク灯および 450 ± 25 nm の帯域フィルターで活性化され、その光は $\sim 10^{18}$ 光子 s⁻¹ cm⁻² の出力の 1 mm 光導体と結合された。作用スペクトルは、各波長あたり $\sim 1.4 \times 10^{17}$ 光子 s⁻¹ cm⁻² のファイバー出力を達成するために、中性密度フィルターと組み合わせて狭帯域幅フィルター（398 - 645 nm; ± 10 nm; K-series Balzer）を使用することで記録された。作用スペクトルの生成のため、CaCC 電流を抑制するために ORI 溶液中の Ca⁺⁺ を Ba⁺⁺ に置き換えた。各波長における電流振幅は、等しい光子露出を表すために正規化された。分光法で決定された規定スペクトル（ground spectrum）は、その後平均データポイントに合わせられた。カルシウム依存性塩素チャネル（CaCC）の活性化を抑制するために、速い Ca²⁺ キレート剤 1,2-ビス(2-アミノフェノキシ)エタン-N, N, N', N' - テトラ酢酸 (BAPTA) の 20 mM 溶液の 50 nL が、各卵母細胞に注入された（卵母細胞において、~1 mM の最終濃度）。

【0103】

アフリカツメガエル卵母細胞において波長が変化している CatCh の励起は、474 nm の最大の励起波長での WT ChR2 スペクトルとほとんど同じ、ほとんど同じ動作スペクトルであることが明らかになった（図 6）。細胞外 Ca⁺⁺ および負の保持電位の存在下で、CatCh 電流は、カルシウム依存性塩素チャネル（CaCC）のものと類似の重疊外向電流（superimposed outward current）¹ ⁵、¹ ⁶ に起因する照射の間、劇的な振幅の増加を示した（図 2c）。WT ChR2 を発現する卵母細胞においてもまた、CaCC 電流が観察されたが、それらは CatCh によって誘導されたものより著しく小さかった（図 2c）。WT ChR2、および CatCh

10

20

30

40

50

、の両方について、80 mMの細胞外 Ca^{++} にて、速い Ca^{++} キレート剤 BAPTA 、1,2-ビス(2-アミノフェノキシ)エタン- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -テトラ酢酸の細胞への注入は、残余の Ca^{++} 電流が残る一方¹で、 CaCC 電流をなくした(図2c)。CatChのためのBAPTA注射の前後での光電流のより大きい違いは、捕獲活性化(catch activation)に続く増加する Ca^{++} 流動の仮説をサポートする。

【0104】

増加した、CatChのカルシウム透過率

CatChイオン透過率の見積りを得るために、異なる陽イオンのための光電流電圧関係および逆転電位が、HEK293細胞において測定された。これらの実験は、ナトリウム、カリウム、およびマグネシウムのための透過率がWT ChR2¹に匹敵していることを明らかにした(図2d)。WT ChR2($\text{pH}/\text{pNa} = 2.5 * 10^6$)と比較して、CatCh($\text{pH}/\text{pNa} = 4 * 10^6$)のプロトン透過性はわずかに増加した。 Ca^{++} 透過率(pCa/pNa)は、細胞外液の140 mM Na^+ を90 mM Ca^{++} に置き換えたときの逆転電位シフトにより測定された。CatChの相対的な Ca^{++} 透過率が、-30.7 ± 2.7 mV(WT ChR2、平均 ± 標準偏差、n = 5)から-21.6 ± 3.8 mV(CatCh、平均 ± 標準偏差、n = 5; 図2e)への逆転電位(二イオン電位(bi-ionic potential))のシフトからもわかるように、WT ChR2における0.15から0.24まで増加した。CatChの増加する Ca^{++} 透過率をさらに定量化するために、我々は、CatChを発現しているHEK293細胞のFura-2カルシウムイメージングを実施し、340/380の測定比率をWT ChR2発現細胞で測定された比率と比較した。

【0105】

HEK293細胞でのFura2イメージング

Fura-2 AM(5 mM; *In vitro* oxygen)は室温で30分から1時間ロードされた。ローディングの後に、細胞は Ca^{++} なしの140 mM NaCl溶液(140 mM NaCl、7 mM EGTA、2 mM MgCl₂、および10 mM HEPES)で回収された。黄色蛍光タンパク質はそのYFP-蛍光から各細胞の発現レベルを見積るために、460/40 nmのフィルター(Visitron Systems、Puchheim, Germany)を用いる光に500 ms露出することにより励起された。溶液はその後、90 mM CaCl₂、7 mM EGTA、2 mM MgCl₂および10 mM HEPESから成る細胞外 Ca^{++} 溶液に置き換えられた。暗闇において15分後、光駆動性チャネルは10秒間、青色光(460/40 nm)で刺激された。Fura-2は、340 nm(340/20)および380 nm(380/20)、およびCCDカメラ(全てのフィルターはVisitron Systems、Puchheim, Germany)で検出された放射光(540/80 nm)で、励起された。

【0106】

カルシウム取込みの要素としての異なったタンパク質の発現レベルを除去するために、測定された340/380比が、各個別の細胞のYFP-蛍光値で正規化された。図2fは、飽和90 mM Ca^{++} 溶液における10秒間の青色光(470 nm)の光刺激の際に、CatCh発現細胞の Ca^{++} 増加が、WT発現細胞より約4倍大きいことを示す。

【0107】

海馬ニューロンへの適用

ニューロンへの適用のためのCatChの適合性を試験するため、構成体は培養された海馬錐体細胞の中で発現された。

【0108】

海馬ニューロン培養物

海馬は出生後P1 Sprague-Dawleyラット(Jackson Laboratory)から取り出され、パパイン(20 U ml⁻¹)で37にて20分間処理された。海馬は10%の牛胎児血清が補われたDMEM(*In vitro* / Gib

10

20

30

40

50

c o、高グルコース)で洗浄され、少量のこの溶液中で粉碎された。~7万5000個の細胞が、24ウェルプレート中のポリ-D-リジン/ラミニンでコートされたカバーガラス上に播種(plate)された。3時間後に、プレート培地(planting medium)は、培養培地(2% B-27補足剤、2mM Glutamax-I、および100U/mlベニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを含むNeurobasal A)に置き換えられた。ChR2(L132C)-YFPおよびChR2(WT)-YFPは、播種の5~10日後にリポフェクタミン2000試薬(Invitrogen)を使用してトランスフェクトされた。あるいは、2~5×10⁹GC/mlのウイルス(AAV2/7-CAG-ChR2(L132C)-2A-EGFP-WPRE-bGH)が播種の4~9日後に各々のウェルに加えられた。発現は、形質導入後5日間で目に見えるようになった。培養物の生存期間(~5週間)について、神経毒症状は全く見られなかった。ここで記載されるいかなる実験においても、全トランスレチナールは培地または記録培地(recording medium)に全く添加されなかった。

【0109】

アデノ随伴ウイルスベクター構成体

サイトメガロウイルス初期エンハンサー/ニワトリ アクチン(CAG)プロモーターは、PCR増幅され、pAAV2-CAG-EGFPを入手するために、pAAV2-Rho-EGFP(Alberto Auricchioからの親切な贈り物²⁸)に挿入された。pAAV2-CAG-EGFPウイルス発現プラスミドはさらに、ウッドチャック転写後調節要素(WPRE)および牛成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化配列を含んだ。ChR2(L132C)-2A-EGFP(Volker Busskampからの親切な贈り物-2A自己切断型ペプチド/CHYSSEL²⁹)はアダプターPCRによって構築され、Clontechのin fusion kitを使用して、EGFPの置換により、pAAV2-CAG-EGFPにサブクローニングされた。ウイルスベクター(pAAV2-CAG-ChR2(L132C)-2A-EGFP-WPRE-bGH)はパッケージ化され(血清型7)、親和性はペンシルバニア大学のGene Therapy Programで2.26×10¹¹ゲノムコピー/mlの最終的な感染性ウイルス測定濃度で精製した。

【0110】

海馬ニューロンからの電気生理学的記録

海馬培養神経細胞の全細胞記録のために、5~10の抵抗をもつパッチャピペットが、129mMグルコン酸カリウム、10mM KCl、4mM MgATPおよび0.3mM Na₃GTPで満たされ、pH 7.2に滴定された。タイロード溶液は細胞外溶液として用いられた(125mM NaCl、2mM KCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、30mMグルコースおよび25mM HEPES、pH 7.4に滴定)。名目上はCa⁺⁺無しの細胞外溶液は、0mM Ca⁺⁺および3mM Mg⁺⁺を有することを除いて、この同じ溶液を含んだ。記録は、興奮性シナプス伝達遮断剤、1,2,3,4-テトラヒドロ-6-ニトロ-2,3-ジオキソ-ベンゾ[f]キノキサリン-7-スルホンアミド(NBQX, 10μM, Sigma)およびD(-)-2-アミノ-5-ホスホノペンタノ酸(AP-5, 50μM, Sigma)の存在下で行われた。電圧固定記録のため、1μMのテトロドトキシンが細胞外溶液に添加された。BKチャネル活性を阻害するため、1mM TEAが加えられた。記録は、蛍光ランプを備える倒立Zeiss Axiovert 25顕微鏡上で行われた。成功したタンパク質の発現はEGFPまたはYFPによってもたらされる蛍光によって立証された。ニューロンのアクセス抵抗は、15~40Mであり、実験全体にわたって、安定性のために監視された。電気生理学的信号は、Axopatch 200A増幅器(Axon Instruments, Union City, CA)を使用することで増幅され、10kHzでフィルターにかけられ、Axon Digidata 1600(50Hz)でデジタル化され、かつpClamp 9ソフトウェア(Axon Instruments)を用いて入手および分析された。光電流は、ダイオード励起固体レーザー(Pusch Opto Tech

10

20

30

40

50

G m b H ; 1 = 4 7 3 n m , P 1 = 1 0 0 m W , 2 = 5 3 2 n m , P 2 = 5 0 m W) からの様々な波長の光パルスまたはエキシマー励起色素レーザー (C oumarin 2 , = 4 5 0 n m) からの 1 0 n s 閃光により誘起された。特定の光強度は、図の注釈および文書に示され、細胞から ~ 5 0 0 μ m の距離にて、4 0 0 μ m 直径の石英光ファイバー (S TE - F 1 0 0 / 4 0 0 - Y - V I S / N I R ; L a s e r 2 0 0 0 , W e s s l i n g , G e r m a n y) の末端での強度である。 C h R 2 (L 1 3 2 C) - Y F P および C h R 2 (L 1 3 2 C) - 2 A - E G F P を発現するニューロンから測定された電流は同じである。

【 0 1 1 1 】

共焦点イメージング

10

イメージングについて、海馬ニューロンがあるカバーガラスは、2 % スクロースを含む P B S バッファー中の4 % パラホルムアルデヒド中で10分間、4 °C にて固定された。細胞は続いて、ウサギ - G F P I g G (I nv i t r o g e n , A 1 1 1 2 2) 中で1.5時間培養され、その後 A l e x a F l o u r 4 8 8 口バ - - ウサギ I g G (I nv i t r o g e n , A 2 1 2 0 6) 中で45分間培養された。取り付けられたカバーガラスの免疫蛍光は Z e i s s L S M 5 1 0 共焦点顕微鏡 (Z e i s s , P l a n - N e o f l u a r 4 0 \times / 0 . 7 5) 上で撮影された。

【 0 1 1 2 】

C a t C h 変異体が数週間で、神経毒症状の兆候なしに海馬培養で確実に発現され (図 3 a) 、 H E K 2 9 3 細胞のように、全細胞の記録において高い定常状態 - ピーク比および 4 7 3 n m の青色光への反応において、 W T の $1 6 4 \pm 3 9$ p A (- 6 0 m V , n = 6 、 平均 \pm 標準偏差) と比較して、 $6 4 4 \pm 3 1$ p A (- 6 0 m V , n = 6 、 平均 \pm 標準偏差) の約4倍増加した電流振幅を示した (図 3 b) 。電流固定モードにおいて、典型的に W T を活性化するために用いられる人工的な高い光強度 ($1 0^{1 8} \sim 1 0^{1 9}$ 光子 s $^{-1}$ cm $^{-2}$) は、 C a t C h 発現錐体細胞を脱分極性遮断に追い込んだ (図 4 a) 。信頼できるスパイクトレーンを誘導するために、光強度は2ログ単位 ($5 * 1 0^{1 6} \sim 2 * 1 0^{1 7}$ 光子 s $^{-1}$ cm $^{-2}$) によって錐体光受容体駆動明所視の本来の範囲内の光強度に減少させた (図 4 b) $^{1 7}$ 。図 4 c は錐体細胞の光強度に依存する発火率のための代表的な同調曲線を示す。平均した最大発火率は、 $8 . 2 \times 1 0^{1 6} \pm 2 . 5 \times 1 0^{1 6}$ 光子 s $^{-1}$ cm $^{-2}$ (平均 \pm 標準偏差、 n = 5) の状態である。 C a t C h 発現ニューロンのより高い光効率は、図 4 d において緑色光 (5 3 2 n m) で例示されるように、最大感度から離れた波長での活性化を容易にする。これは、より深く貫通する緑色光での、より効果的な組織動員の点で利益を与え得る。我々は増加した C a $^{++}$ 透過率に、 C a t C h 発現ニューロンの劇的に高められた光感受性を割当て、その結果、細胞質膜表面上の表面電位を一時的に増加させる $^{1 0} 、 1 1 、 1 8 、 1 9$ (表面電位の C a $^{++}$ 効果の説明について、図 7 を参照) 。光励起の間、 C a t C h は局所的な細胞内表面 C a $^{++}$ 濃度を一時的に増やすことにより、膜結合した速い C a $^{++}$ 供給源として機能し、その結果、負の表面電荷を中和する (図 7) 。このことは、内側面電位のより正の値へのシフトを引き起こし、その結果膜を脱分極することが知られている (図 7) $^{1 1} 、 1 8$ 。その帰結は、電圧駆動性 N a $^{+}$ チャネルが、より負の膜電位で活性化することである $^{1 8}$ 。短い光パルスまたは定常光を消した後に、 C a $^{++}$ が細胞質内で急速 (マイクロ秒) に平衡化し、急速な回復および即座の活動電位の消失につながる。それ故、 C a t C h に関して、 W T C h R 2 と比べて、より少ない光電流およびそれに続くより少ない光がスパイク開始に必要である。

C a t C h における光パルスからスパイクまでの待ち時間は、同様の光強度 ($2 . 8 \times 1 0^{1 8}$ 光子 s $^{-1}$ cm $^{-2}$) 時に、 W T C h R 2 (~ 1 0 m s) の待ち時間 3 よりもより小さいジッターで、より速かった (~ 5 - 6 m s ; 図 4 e) 。発明者は C a t C h の、高頻度の光刺激で単一の活動電位を誘導するその性能についてさらに試験した。 1 m s 長の青色の 4 7 3 n m の光パルス ($2 . 8 \times 1 0^{1 9}$ 光子 s $^{-1}$ cm $^{-2}$) のトレーンは、 1 0 0 % 信頼できるスパイクトレーンを 5 0 H z の周波数まで動作させた (n = 8 ; 図 4 f - ほとんど) の錐体細胞は直流注入があっても 5 0 H z を超えたウェルに続かない) 。 W

20

30

40

50

Tは他方では、確実にスパイクを誘導するために少なくとも2 ms光パルスを必要とし、これは20 Hzの周波数までしか行われない^{1 2}。我々は、CatChの短い活性化時間をさらに推し進め、各々のCatChタンパク質で単一の反転だけを誘導するのに十分な短いパルス長である、10 Hzの周波数までの10 nsの青色光パルス(1.1×10^2
 5 光子 $s^{-1}cm^{-2}$)まで、単一の活動電位を誘起した(図4b)。しかしながら、速い刺激頻度もまた、各スパイクの後に細胞の速い再分極を必要とする。WTと比較して減速されたCatChの Ca^{++} にもかかわらず、各活動電位のミリセカンド後以内に元來の静止電位に細胞を強力に再分極するための十分な Ca^{++} 活性化大コンダクタンスカリウムチャネル(BKチャネル)^{2 0}を活性化させるために、CatCh活性化の間に~4倍増加した Ca^{++} 流入(Fura-2測定、図2fを参照)が現れる。速い再分極がBKチャネルを介してもたらされたことを立証するため、我々は $100\mu\text{M}$ のカリウムチャネル阻害薬テトラエチルアンモニウム(TEA)を細胞外液へ加え、不完全な膜の再分極およびWT ChR2のパルス刺激プロトコルで典型的に見られるプラトー電位の生成を観測した³(図4h)。

【0113】

まとめると、WT-発現細胞と比べて、CatCh発現ニューロンは、より速いスパイク開始、より速い再分極、および増加した光感受性を示す(比較について、表1参照)。外部の Ca^{++} が不在で、3 mM Mg^{++} が存在する、表面電位にそれほど著しくない効果を有し^{1 1}、^{1 8}(図7)、WT ChR2またはCatChを通して行われない対照実験は、上記の解釈を支持する: 1)光パルスからスパイクへの待ち時間はWT ChR2値で増加した(図4e)、2) Ca^{++} の存在下で観察される速いスパイク再分極の代わりに、WT ChR2実験で見られるようなものと同様の長引いている人為的な脱分極が観察された(図4i、左)、3) Ca^{++} 不在において、同等の光強度は、その他の点で等しい実験条件下で~10 mV減少した脱分極をもたらした、4)CatChの持続的な開口時間から期待される多重スパイクは、 Ca^{++} 不在において再発する(図4i、右)。

【0114】

したがって、発明者は、高い Ca^{++} 透過性をもつチャネルロドプシン、CatChは増加する光感受性および速い動態を組み合わせ、その結果、WT ChR2および発表された遅いおよび速い変異体より優れることを示した(異なるChR2変異体の特性の比較について、表1参照)。

【0115】

考察

一見したところでは、CatCh、WT ChR2のL132C変異体、WT ChR2と比較してむしろ平凡な結果を示している: 1)開口状態の存続期間の2倍の増加、2)光サイクル動態における、P520中間体の減速された減衰、3)変化しない単独のチャネルコンダクタンス、および4)わずかに赤にシフトした吸収極大(4 nm)。 2.5 倍に増加した光電流は、発現レベルの増加と全く関連のないパラメータで容易に説明できる。しかしながら、もう一度見てみると、アフリカツメガエル卵母細胞を発現するCatChから得られた電圧固定法データのさらなる精査は、逆転電位の測定およびHEK293細胞上のカルシウムイメージング実験でその後確認された、上昇した Ca^{++} 透過性を与えた。図1におけるモデルから判断すると、 Ca^{++} 透過性の増加は、光駆動プロトンポンプ細菌ロドプシンのL94A変異体について示されるように(図1と比較)^{2 1}、より柔軟な構造の構成およびその結果としての空洞の形成により容易にされ得る。この空洞は、C128から1らせん回転分だけ離れた、保存された膜貫通ヘリックス3(TM3)の一部として疎水性パッチ中に位置するであろう。C128(TM3)およびD156(TM4)の間の相互作用の操作は、ChR2の反応サイクルを劇的に減速し⁵、⁶、その効果は細菌ロドプシン変異体L93A^{2 2}、^{2 3}、すなわちL94の隣接残基でも観察された。ChR2では、TM3およびTM4の相互作用は、イオン孔への明反応のトランスデューサーとしての構造要素24を指す、開閉(gating)および選択性の両方に影

響するように見える。より小さい、より親水性のシステインの挿入は螺旋状のセグメントの柔軟性を高め、 Ca^{++} のアクセスを容易にし得る。

【 0 1 1 6 】

海馬錐体細胞に送達されたとき、CatChはWT ChR2と比較して、~70倍増加した光感受性を示した。通常、そのような増加した光効力は、強く持続された開口チャネル存続期間を伴う^{2, 6, 13}。CatChではそれが当てはまらない。観察された光感受性はこれまでの他のチャネルロドプシンから観察されたものと著しく異なる。以下で説明されるように、神経細胞の興奮性への副次的効果はCatChを通したCa⁺⁺流入によって誘導される。WTと比較してより遅い閉鎖動態を有するにもかかわらず、CatChは高頻度の光刺激の間、増加したスパイク信頼性および正確性を示し、追加のスパイクを抑えて、20Hzを超える刺激頻度にてWT発現細胞で典型的に観察される人為的なプラトー電位^{3, 7, 12}を排除する。室温で照射された1msの光パルスは、CatCh発現錐体細胞で最大50Hz(それらの自然なスパイクの自然の限界; 図4f)までの信頼できるスパイクトレーンを誘導した。皮質パルプアルブミン介在ニューロンなどの細胞をより速くスパイクする高頻度のCatCh介在スパイク誘導は、試験されるべきものとして残る¹²。チャネルロドプシン動態が~2.3のQ₁₀で温度依存である¹⁴ので、発明者は光感受性をゆるめることなしの37でのin vivo実験について、3.2倍加速したCatChを予想するであろう。これはCatCh介在スパイク刺激を少なくとも300Hzまで許容するであろう。より速い動態および高い時間精度と組み合わせられた増加した光感受性は、我々に各々のCatCh分子でシングルターンオーバーを活性化し、続いて単一のスパイクとなる。10nsのように短い光パルスでCatChを活性化することを許容した。興奮細胞における観察は、照射の間、増加したニューロンへのCa⁺⁺流入により最も良く説明される。透過性の増大による駆動力へのCa⁺⁺の寄与を無視できることに注意。しかしながら、我々は、CatChを、CatChチャネルが開いている限り、細胞膜の細胞質側表面にCa⁺⁺を一時的に送達する、光駆動性膜結合Ca⁺⁺源(「膜結合収容Ca⁺⁺(membrane bound caged Ca⁺⁺)」)であるとみなすことができる。これは内膜表面上で負の帯電を一時的に中和し、その結果、膜の脱分極と同等である¹¹、膜電位の増加が起こる(図7)。予想されるように、細胞外Ca⁺⁺を非透過性Mg⁺⁺に置き換えたとき、観察されたCa⁺⁺の活動電位への効果が消失され、WT ChR2の表現型が回復した。このことは、観察されたCa⁺⁺の効果が、細胞外Ca⁺⁺の流入によるものであり、小胞体のような細胞小器官における電位発現を通した[Ca⁺⁺]_iの上昇によって引き起こされるものではないことを証明する。表面電位を経る速い初期の脱分極は、光パルスからピークへの待ち時間を、WT ChR2発現細胞³の~10msから、CatCh発現細胞の~5msまで半減させる。WT ChR2と比較して、ピーク定常電流比はCatChで非常に低下する(表1参照)。したがって、CatChの持続している照射の間、細胞の脱分極レベルはほとんど静止したままで残る。持続的な照射の間の連続したCa⁺⁺流入は、カルシウム活性化非選択性陽イオンチャネルを活性化し得、それはさらに、定常的な脱分極レベルの維持を支持する。他方では、成功した高頻度のパルス刺激のための必須条件は、各々の活動電位に続く細胞の速い再分極である。WTと比較してわずかに増加したCatChの開口状態の存続期間は、その最大限度の刺激頻度を制限するはずである。しかしながら、増加したCa⁺⁺透過性は、カルシウム活性化大コンダクタンスカリウムチャネル(BKチャネル)の強力な活性化により、この制限を打ち消す。これは各々の活動電位の後、数ミリ秒以内でニューロンの静止膜電位を回復する。この理論は、パルス刺激プロトコルの長さの間、ニューロンの持続性の脱分極をもたらす、開口チャネル阻害薬TEAでのBKチャネルの阻害により確認された。

【 0 1 1 7 】

既に利用可能な光遺伝学的方法 (optogenetic tool)との比較において、CatChは遅い変異体^{1,3}またはSFO⁶と類似する、増加した光感受性を、しかしその増加したCa⁺⁺透過性による、より加速された応答動態および神経細胞の興奮性

の結果と共に有する。これは、高い光感受性は速い動態のコストで確定される必要があり、速いチャネルロードプシン⁷、¹ ²に関して逆もまた同様であるところの、利用可能なC h R 2 変異体より優れたC a t C h を作る（概観に関して、表1を参照）。

【0118】

光遺伝学的アプリケーションに関して、我々は、特異反応が究極的にはニューロンとC a t C h 発現レベルの本質的な生物物理的性質によって制御されるように、刺激の長さや強度などのそれぞれの実験的な準備における最適の光パルスパラメータを有効にするのが重要であることを注意する。

【0119】

【表2】

	τ_{on} [ms]	τ_{off} [ms]	γ [S]	$I_{(pA)stat}$	I_{stat}/I_{max}	λ_{max} (nm)	$J(\text{光子} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2})$ [EC50(mW/mm ²)]	最大スパイク	P_{ca}/P_{Na}	AD	参照
CaTCh	0.6±0.003	15±2ms	140±5	643.8±30.9	0.71±0.16	474	$10^{16} \text{--} 10^{17}$ [0.7]	70 × 45Hz WT [0.7]	≥50Hz	0.24	無
WT ChR2	0.2±0.002	10±1ms	~150 ^b	216.3±39.0	0.37±0.18	470	$5 \times 10^{17} \text{--} 10^{18}$ [0.7]	≤20Hz	0.15	有	[2,3,14]
ChR2 H134R	~0.6	19±2ms	~150 ^b	~1.5 × I_{WT}	0.53±0.09	450	$5 \times 10^{17} \text{--} 10^{18}$ [0.7]	~20Hz	—	有	[1,7,14]
SFOの、 遅い変異 (体)	C128T	9±1.6	2±0.5s	—	~0.73 × I_{WT}	~0.5	480	$5 \times 10^{17} \text{--} 10^{18}$ [0.03]	c	—	有
	C128A	5.7±1.0	52±2s	—	~0.30 × I_{WT}	~0.7	480	$5 \times 10^{17} \text{--} 10^{18}$ [0.01]	c	—	有
ChETA	C128S	30±7.5	106±9s	—	~0.25 × I_{WT}	~0.85	480	$5 \times 10^{17} \text{--} 10^{18}$ [0.01]	c	—	有
	D156A	3.3±0.1	>150s ^a	—	~ I_{WT}	~1	480	$5 \times 10^{17} \text{--} 10^{18}$ [0.01]	d	—	有
ChIEF	—	48±0.6ms	—	~0.9 × I_{WT}	0.6±0.04	500	$10^{16} \text{--} 10^{18}$ WTより低い感度	200Hz	—	無	[12]
ChIEF	—	9.8±0.7ms	—	~3 × I_{WT}	~0.8	450	$10^{16} \text{--} 10^{18}$ WTより低い感度 [0.992]	25Hz	0.12	有	[7]

τ_{on} : 単一の反転測定からの値、 τ : 200mMグアニン-HClにおける、RT、-60mV; I_{WT}: それぞれの実験条件下でのWT ChR2電流、 τ_{off} : 単一の反転測定からの値、 τ : 200mMグアニン-HClにおける、RT、-60mV; I_{WT}: それぞれの実験条件下でのWT ChR2電流

WO 03/084994

1. Nagel, G. et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13940-13945 (2003).
2. 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).
3. Boyden, E., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263-1268 (2005).
4. Zhang, F. et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633-639 (2007).
5. Bamann, 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).
6. Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L., Hegemann, P. & Deisseroth, K. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* 12, 229-234 (2009).
7. Lin, J., Lin, M., Steinbach, P. & Tsien, R. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J* 96, 1803-1814 (2009).
8. Lagali, P. et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* 11, 667-675 (2008).
9. Bi, A. et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50, 23-33 (2006).

10. Frankenhauser, B. & Hodgkin, A. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol (Lond)* 137, 218-244 (1957).
11. Hille, B. 649-662 (Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts USA, 2001).
12. Gunaydin, L. et al. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci* 13, 387-392 (2010). 10
13. 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).
14. Feldbauer, K. et al. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009). 20
15. Caldwell, J. et al. Increases in intracellular calcium triggered by channelrhodopsin-2 potentiate the response of metabotropic glutamate receptor mGluR7. *J Biol Chemistry* 283, 2430024307 (2008).
16. Weber, W.-M. Ion currents in *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421, 213-233 (1999). 30
17. Thyagarajan, S. et al. Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrhodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci* 30, 8745-8758 (2010).
18. Hille, B., Woodhull, B. & Shapiro, B. Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 270, 301-318 (1975). 40
19. Muller, R. & Finkelstein, A. The effect of surface charge on the voltage-dependent conductance induced in thin lipid membranes by monazomycin. *J General Physiol* 60, 285-306 (1972).

20. Faber, E. & Sah, P. Calcium-activated potassium-channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist* 9, 181-194 (2003).
21. Joh, N., Oberai, A., Yang, D., Whitelegge, J. & Bowie, J. Similar energetic contributions of packing in the core of membrane and water-soluble proteins. *J Am Chem Soc* 131, 10846-10847 (2009). 10
22. Subramaniam, S., Faruqi, A., Oesterhelt, D. & Henderson, R. Electron diffraction studies of light-induced conformational changes in the Leu-93 Ala bacteriorhodopsin mutant. *Proc Nat Acad Sci USA* 94 1767-1772 (1997).
23. Subramaniam, S., Greenhalgh, D., Rath, P., Rothschild, K. & Khorana, H. Replacement of leucine-93 by alanine or threonine slows down the decay of the N and O intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin: implications for proton uptake and 13-cis-retinal all-trans-retinal reisomerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6873-6877 (1991). 20
24. Nack, M. et al. The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9, 194-198 (2010). 30
25. Busskamp, V. et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 329, 413-417 (2010).
26. Ellis-Davies, G. C. R. *Neurobiology with caged calcium. Chem Rev* 108, 1603-1613 (2008). 40
27. Lorenz, C., Pusch, M. & Jentsch, T. Heteromultimeric ClC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 13362-13366 (1996).
28. Allocca, M. et al. Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transd 50

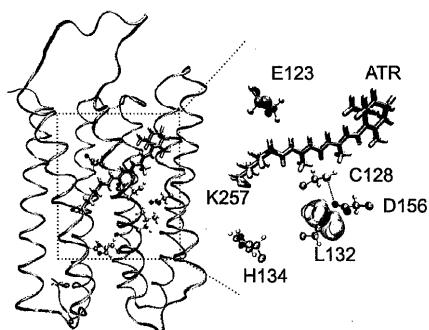
uce murine photoreceptors. *J Virology* 81, 11372-11380 (2007).

29. de Felipe, P. et al. E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol* 24, 68-75 (2006).

30. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics* 14, 33-38 (1996).

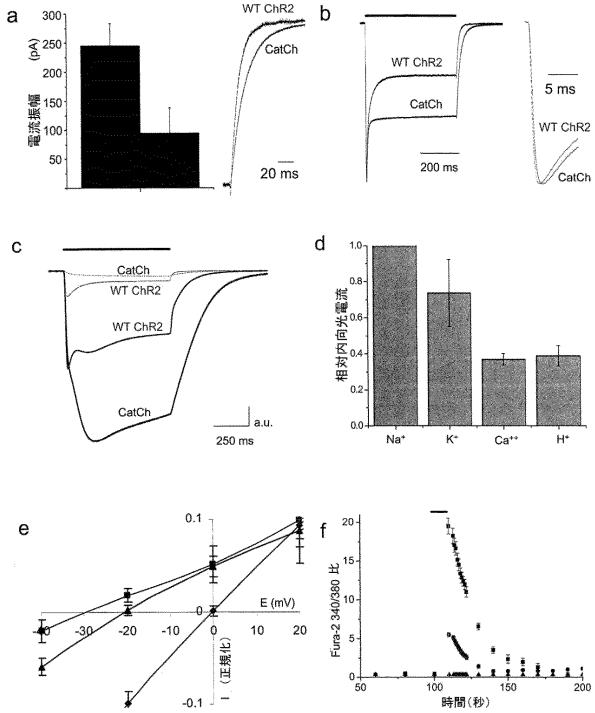
【図1】

Fig. 1



【図2】

Fig. 2



【図3】

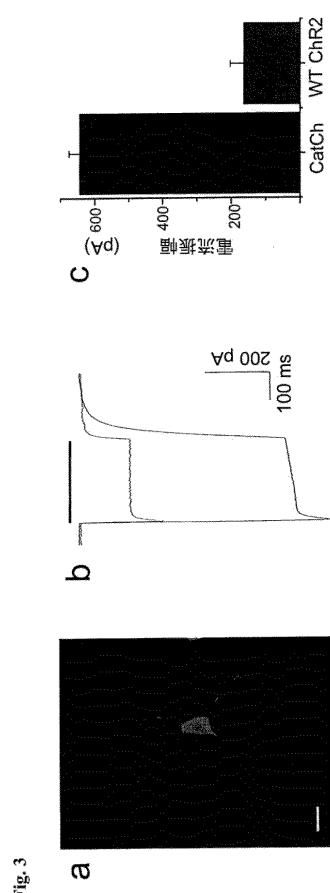
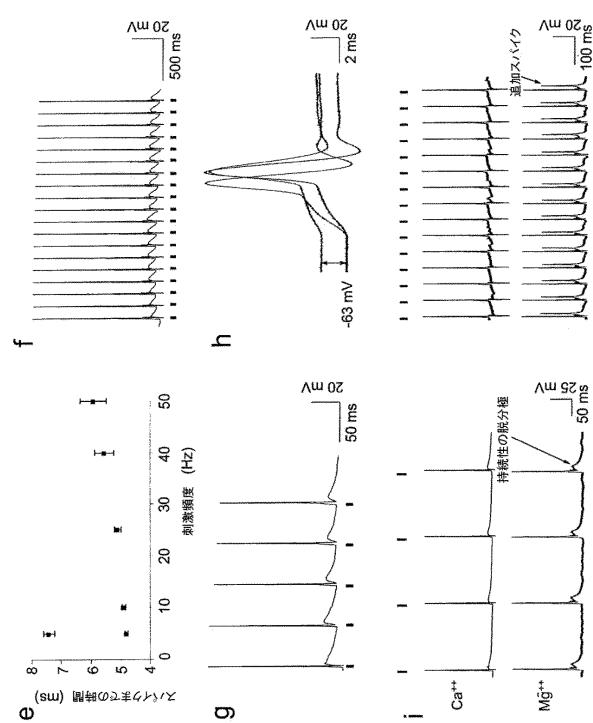


Fig.3

【図4-2】



【図4-1】

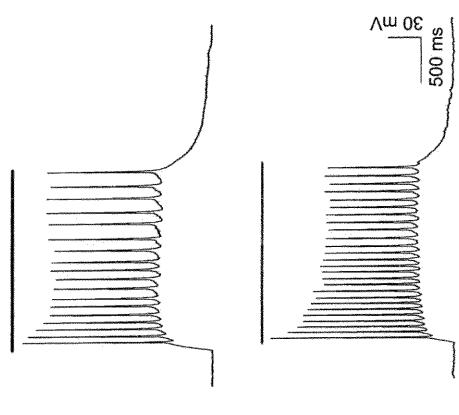


Fig.4

【図5】

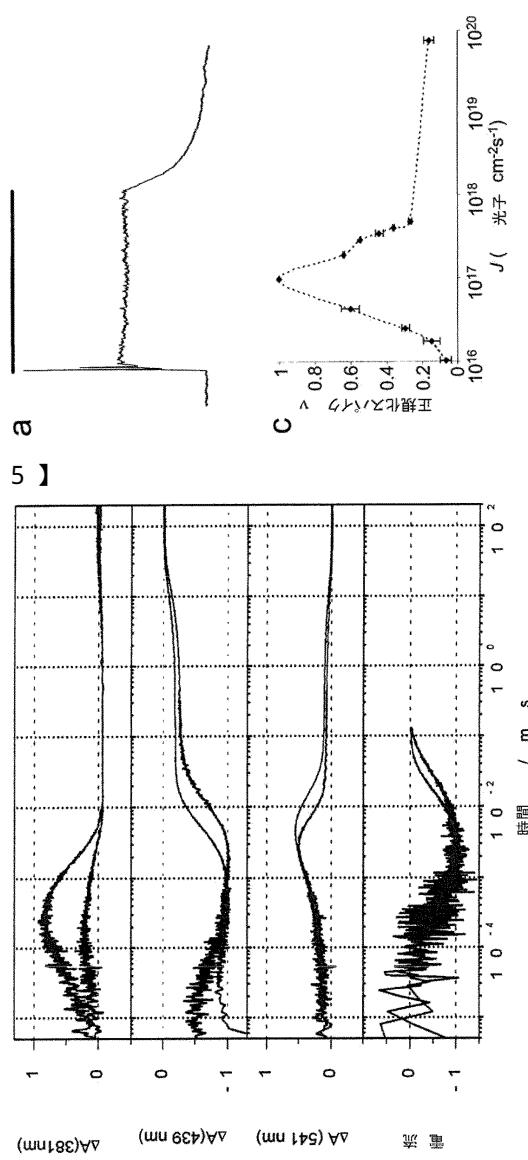
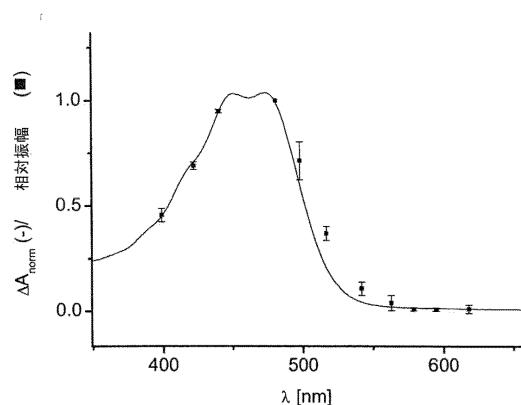


Fig.5

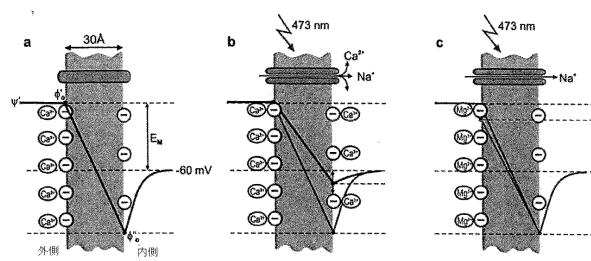
【図6】

Fig. 6



【図7】

Fig. 7



【配列表】

0005933556000001.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 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 K 35/44 (2015.01)	A 6 1 K 35/44
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 エルнст・バンベルク

ドイツ 6 5 7 7 9 ケルクハイム、グンデルハルトシュトラーセ 4 8 番

(72)発明者 クリストイアン・バーマン

ドイツ 6 0 5 9 4 フランクフルト、シュールシュトラーセ 5 4 番

(72)発明者 ソーニヤ・クラインロゲル

ドイツ 6 1 4 4 9 シュタインバッハ / タウヌス、クローンベルガー・シュトラーセ 8 アー番

(72)発明者 フィリップ・ウッド

ドイツ 6 6 8 3 9 シュメルツ、トリーアラーシュトラーセ 8 1 番

(72)発明者 ロバート・イー・デンプスキー

アメリカ合衆国 0 1 6 0 9 マサチューセッツ州ウースター、ハドソン・ストリート 3 7 番

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 0 / 0 5 6 9 7 0 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 0 2 3 9 8 (U S, A 1)

特表 2 0 0 9 - 5 3 6 2 1 9 (J P, A)

Biophys. J., 2 0 0 9 年, vol. 96, no. 3, p. 671a, 3465-Po

Exp. Physiol., 2 0 1 0 年 7 月 9 日, vol. 96, no. 1, p. 19-25