

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09433

研究課題名(和文) チャネルロドプシンの機能亢進とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) To elucidate an enhanced function of Channelrhodopsin and its mechanism

研究代表者

田端 希多子 (Tabata, Kitako)

岩手大学・理工学部・特任准教授

研究者番号：80714576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：緑藻類の一部は光合成を効率的に行うために光を求めて移動する。この光感受性物質がチャネルロドプシンであり、当研究室ではこれを基に遺伝的な操作を加え、より多くの色を感知できるmVChR1を開発した。失明に至った網膜の網膜神経節細胞にmVChR1を発現させ、視機能を回復できる可能性がある。チャネルロドプシンの光受容に重要な役割を担うレチナールは、ラット網膜において視細胞が変性消失すると低値となった。mVChR1投与網膜において、レチナール合成関連酵素遺伝子および輸送タンパク遺伝子の一部の増加が確認されていることから、ビタミンA供給量を増やすことでmVChR1機能向上に寄与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性症は4000～8000人に一人が罹患しており、重篤な場合は失明に至る。原因遺伝子は多数発見されており、未だ確立された治療法が無い。当研究室で開発したmVChR1は、視細胞変性により失明に至った網膜の神経節細胞へ発現させることにより、視力を回復させる可能性がある。mVChR1の光受容に重要な役割を担うのはレチナールであり、視細胞変性後の網膜にmVChR1を発現させると、レチナール合成関連酵素遺伝子および輸送タンパク遺伝子の一部の増加が確認されたが、レチナール量が生来のものより低いことがわかった。このことから遺伝子治療後のビタミンA投与により視機能向上できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Some of the green algae class family move forward to sunlight to perform photosynthesis efficiently and they use the photosensitive protein, Channelrhodopsin, to detect light. Our developed mVChR1 modified volvox-derived channelrhodopsin that has a broad range of wavelength sensitivity. The expression of mVChR1 in retinal ganglion cells may recover of blindness. Channelrhodopsin uses a vitamin A derivative, retinal, to receive light. However, there is no report how much content is in the degenerated retina. So, we compared the retinal concentration in normal retina with that in degenerated one. The retinal content in the photoreceptor degenerated retina was lower than normal one. We also investigated the synthesis pathways of retinal by using an RNA-seq analysis and revealed that up-regulations of retinal synthesis related enzyme genes were detected. These results indicated that the increase of Vitamin A possibly contributed on enhancing the mVChR1 function.

研究分野：眼生理学

キーワード：眼生理学 遺伝子治療 網膜色素変性症

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症患者は、人口4000～8000人に1人と推定されている。重篤な場合は失明に至り、中途失明原因の上位に位置する疾患である。近年の遺伝子解析技術の進歩により、網膜色素変性症(RP)に関する多くの原因遺伝子が明らかにされているが、その治療法は未だ開発されていない。近年、RPや加齢黄斑変性症による視細胞変性に対して、変性を保護する方法として遺伝子治療やiPS細胞を利用した臨床研究が進められている。しかし、視細胞が完全に消失し失明に至った場合の視覚再生法は未だ確立されていない。当研究室では、緑藻類由来の光活性化陽イオンチャネル遺伝子を視細胞の変性により失明に至った網膜の神経節細胞に導入することによって視機能を回復させることに成功している(Tomita H et al, IOVS, 2007; PLOS ONE, 2010; Exp Eye Res, 2011)。ただ、ChR2は応答できる波長が青色領域に限定されるため、視覚が回復したとしても青色以外の物体を見ることができない。この問題点の解決に取り組み、緑藻類ボルボックス由来のチャンネルロドプシン遺伝子を改変し、多波長に応答する遺伝子(mVChR1)の開発に成功している(Tomita H, et al, Molecular Therapy, 2014; 日米で登録済み, 2015 文部科学大臣表彰「研究部門」)。こちらは安全性試験を終え、アステラス製薬株式会社とライセンス契約を締結、実用化へと進んでいる。このようにチャンネルロドプシン類(ChR)を利用した視覚再生のための遺伝子治療は臨床応用に向け進んでいるものの、得られる解像度は遺伝子導入効率に依存する、生来の視機能に比べて光感受性が低い、といった問題点が残されている。前者の遺伝子導入効率については、合成ペプチドを添加することでAAVの感染効率を上昇させることに成功している(Tabata K, et al, BBRC, 2016)。後者について、ChRの機能発現にはレチナールが関与しているが、視細胞が変性し、消失している網膜において通常のレチナールサイクルは機能していない。従ってChRを導入した神経節細胞へのレチナール供給経路は不明であり、かつ充分量存在しているかも不明である。当研究室では、パッチクランプ法によりレチナール添加培地において、ChRの光反応性が高まることを見出している。このことからビタミンAのRP治療における役割とは全く異なり、ChRの機能を最大限に発揮させるためにレチナールは重要な役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

視細胞のレチノイドサイクルは広く研究されているものの、神経節細胞において、mVChR1の機能発現に重要な役割を担うレチナールの合成経路は明らかとなっていない。ChRの機能を最大限に発揮させるためにレチナールは重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、神経節細胞におけるレチナールの代謝経路を明らかにすること、並びにレチナールの投与により、mVChR1の光感受性を高めることができるかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mVChR1遺伝子をAAVウイルスに載せ、遺伝的盲ラットであるRCSrdy/rdyラットの硝子体内に投与し2ヶ月以上経過すると、網膜神経節細胞の細胞膜へmVChR1が発現する。この個体を用いて、高照度の光(500, 1000, 3000, 5000lx)を24時間、1週間照射し、視覚誘発電位測定(VEP)を行った。

(2) (1)と同様に、mVChR1遺伝子を投与し、発現しているラット網膜と未投与ラット網膜を用いて、RNA-seqにて網羅的に解析した。

(3) mVChR1を発現させたRCSrdy/rdyラット、基剤のみ投与したRCSrdy/rdyラット、クラミドモナス由来ChR2を神経節細胞に発現させたトランスジェニック(ChR2-TG)ラット、ChR2-TGラットに高照度光照射にて視細胞変性処置をしたラット、ChR2-TGラットの基となった品種のWistarラットについて網膜のレチナール濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) mVChR1を発現させたRCSrdy/rdyラットのVEPにおいて、どの強度の光照射後でも、光照射前と、その振幅には有意差が認められなかった(図1)。視細胞を変性させる強度の光においてもmVChR1を発現させた神経節細胞は光照射前の数・サイズにおいても有意差は認められなかった。高強度の光を照射することで、強制的にmVChR1を働かせたが、光応答に有意差が無く、レチナールの枯渇はしないことが示唆された。

(2) mVChR1発現ラット網膜と未投与ラット網

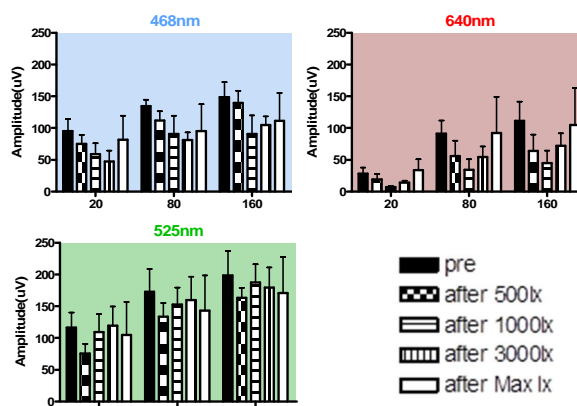


図1. mVChR1発現RCSrdy/rdyラットにおける各光強度照射前後のVEP

膜において遺伝子発現の違いを RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析を行い検討してみると、mVChR1 投与網膜ではビジュアルサイクルに關与する酵素遺伝子および輸送タンパク遺伝子の一部が、未投与網膜に比べ増加していた(図 2)。これらの比較には視細胞変性動物を使用しており視細胞は存在しないため、網膜への積極的なレチナール供給は必要がないと考えられる。しかしながら mVChR1 投与網膜においては、これら遺伝子群が増加しており、mVChR1 へのレチナール供給を意味していると示唆される。また視細胞が変性消失していることから、これら増加遺伝子群は主に網膜色素上皮細胞およびミュラー細胞が有しているものと推察できる。

(3) RCSrdy/rdy ラットに基剤のみを硝子体内投与したものと mVChR1 を含むウイルスを投与した網膜のレチナールの濃度は同程度で、有意な差は認められなかった。一方、視機能が正常の Wistar ラットおよび ChR2-TG ラットのレチナールの濃度はこれらより高い値を示した。また、高照度光照射による視細胞変性 Ch2-TG ラットの網膜中のレチナール濃度は、前述の RCSrdy/rdy ラットと同程度となった。このことから正常視機能を持つラット網膜においては視細胞内にロドプシンを有するため、高いレチナール量であったと考えられた。

視細胞変性網膜に mVChR1 を発現させることで、レチナールの合成が再活性化されていることが明らかとなったものの、本年度行ったレチナールの定量結果から、生来のレチナール量には及ばず、ビタミン A の投与により供給量を増やすことは mVChR1 機能向上に寄与する可能性があると考えられた。

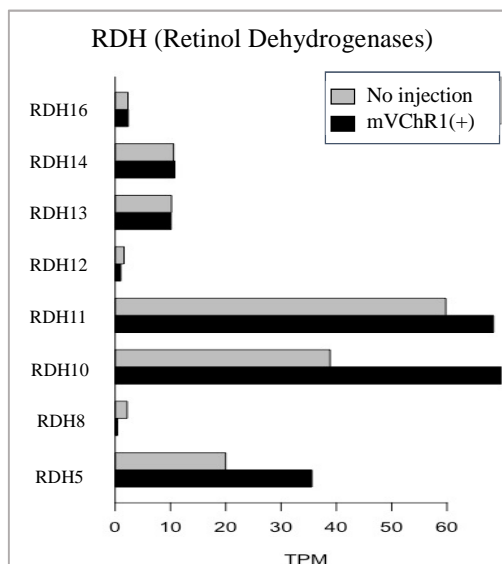


図 2 . mVChR1 発現 RCSrdy/rdy ラット網膜と未投与網膜におけるビジュアルサイクル関連遺伝子発現の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sugano Eriko, Endo Yuka, Sugai Akihisa, Kikuchi Yuki, Tabata Kitako, Ozaki Taku, Kurose Takahiro, Takai Yoshihiro, Mitsuguchi Yoko, Honma Yoichi, Tomita Hiroshi	4. 巻 883
2. 論文標題 Geranylgeranyl acetone prevents glutamate-induced cell death in HT-22?cells by increasing mitochondrial membrane potential	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173193 ~ 173193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugano Eriko, Tabata Kitako, Takezawa Tsubasa, Shiraiwa Raki, Muraoka Hiroki, Metoki Tomomi, Kudo Asaka, Iwama Yuki, Nakazawa Mitsuru, Tomita Hiroshi	4. 巻 2019
2. 論文標題 N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Photoreceptor Degeneration Is Inhibited by Nicotinamide via the Blockade of Upstream Events before the Phosphorylation of Signalling Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/3238719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kurose T, Sugano E, Sugai A, Shiraiwa R, Kato M, Mitsuguchi Y, Takai Y, Tabata K, Honma Y, Tomita H	4. 巻 12
2. 論文標題 Neuroprotective effect of a dietary supplement against glutamate-induced excitotoxicity in retina	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1231 ~ 1237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18240/ijo.2019.08.01	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakajiri Yuko, Sugano Eriko, Watanabe Yoshito, Sakajiri Tetsuya, Tabata Kitako, Kikuchi Takeshi, Tomita Hiroshi	4. 巻 503
2. 論文標題 Natronomonas pharaonis halorhodopsin Ser81 plays a role in maintaining chloride ions near the Schiff base	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2326 ~ 2332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.06.156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 熊谷俊哉 田端希多子 菅野江里子 富田浩史
2. 発表標題 認知症モデルラットに対する保護薬の効果検討
3. 学会等名 日本動物学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiya Kumagai, Kitako Tabata, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita
2. 発表標題 Understanding of cell-cell interactions in the retina after transduction of channelrhodopsin
3. 学会等名 細胞ダイバース 第3回若手ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野江里子, 田端希多子, 熊谷俊哉, 富田浩史
2. 発表標題 神経細胞の再活性化による RNA発現パターンの網羅的解析
3. 学会等名 細胞ダイバース 公開シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sugano E, Tabata K, Sakajiri Y, Watanabe Y, Tamai M, Tomita H
2. 発表標題 Protein structural prediction of modified Volvox channelrhodopsin-1 and the verification by amino acid sequence
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomita H, Sugano E, Tabata K, Yamane T, Nagasaka E, Kudo H, Yoshikawa D, Yoshikawa M, Nakazawa F, Kitaura N, Tamai M
2. 発表標題 Induction of local photoreceptor degeneration by a subretinal injection of N-Methyl-N-nitrosiourea in rats
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田端希多子、菅野江里子、富田浩史
2. 発表標題 光感受性遺伝子を導入した遺伝性網膜変性ラット網膜への光障害の影響
3. 学会等名 日本眼薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山根峻維、田端希多子、菅野江里子、富田浩史
2. 発表標題 網膜局所障害ラットの視機能評価
3. 学会等名 日本眼薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁谷 仁寿, 渡邊 京祐, 奈良 篤樹, 田端 希多子, 佐藤 美穂, 前野 哲輝, 菅野 江里子, 田村 勝, 富田 浩史, 城石 俊彦, 山本 博章
2. 発表標題 脈絡膜メラノサイト機能の遺伝学的解析
3. 学会等名 日本色素細胞学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁谷 仁寿、渡邊 京祐、奈良 篤樹、田端 希多子、佐藤 美穂、前野 哲輝、菅野 江里子、田村 勝、富田 浩史、城石 俊彦、山本 博 章
2. 発表標題 Mitf 変異体マウスを用いた眼球におけるメラノサイトの遺伝学的機能解析
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	富田 浩史 (Tomita Hiroshi) (40302088)	岩手大学・理工学部・教授 (11201)	
研究 分担者	菅野 江里子 (Sugano Eriko) (70375210)	岩手大学・理工学部・准教授 (11201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------