

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670750

研究課題名(和文)古細菌型ロドプシンを用いた網膜のON,OFF光受容システムの構築

研究課題名(英文)Development of the retinal ON-OFF responses using archeal rhodopsins

研究代表者

富田 浩史(TOMITA, Hiroshi)

岩手大学・工学部・教授

研究者番号：40302088

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、高度好塩菌より見出されたハロロドプシンを哺乳類に最適化し、網膜のOFF反応を誘発するために利用することを目的とした。AAV2型ベクターを用いることによって、改変型NpHRを網膜神経節細胞に導入することができた。しかし、光刺激によりOFF反応を誘発することができなかった。培養細胞を用いて、細胞内の発現部位を調べたところ、小胞体に多く蓄積し、改変型NpHRの細胞膜移行性が悪いことが原因であることが判明した。

研究成果の概要(英文):The aim of this study is to utilize the halorhodopsin (NpHR) gene derived from *Halobacterium salinarum* for producing OFF responses in the photoreceptor degenerated retina. We modified the amino acid sequence of NpHR (mNpHR) to express it into a mammalian cell. The mNpHR expression was clearly observed in the retina after the AAV2 mediated mNpHR gene transfer. However we could not get the expected responses such as the light induced OFF responses. We investigated the localization of mNpHR in the cell. The mNpHR expression was mainly observed in the endoplasmic reticulum but not in the cell membrane.

研究分野：眼科学

キーワード：生理学 脳・神経 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

生来の視覚システムでは、光に対する応答を作る ON 型、暗状態の応答を作る OFF 型が存在し(その他 ON-OFF 型などもある)、コントラスト強調などの機能的役割を担っている。当然のことながら、生来の視覚システムでは、視細胞からの出力(双極細胞経由)によって、神経節細胞の受容野が形成されている。しかし、視細胞が消失して失明に至った網膜にこの ON 型、OFF 型の受容野を創出するためには、直接、神経節細胞に ON あるいは OFF 反応を誘起するシステムを構築する必要がある。

我々はこれまでに、視神経を構成する神経節細胞に ChR2 を導入することによって遺伝盲ラットの視覚機能を回復できることを明らかにし(Tomita H et al, IOVS, 2007; PLOS ONE, 2010; Exp Eye Res, 2011)、人への応用に向け安全性研究を行っている(Sugano E et al, Gene Therapy, 2010; Isago H, J Mol Neurosci, 2012)。また、ChR2 の感受波長が青色に限定されることに対して、ボルボックス由来のチャンネルロドプシンを改変し、可視光全域に波長感受性を持つ改変型ボルボックス由来チャンネルロドプシン-1 (mVChR1) を開発している(日米欧登録済み)。しかしながら、生来の視覚システムを考えた場合、単に光感受性細胞を作り出すだけでなく、OFF 応答を示す網膜神経細胞も必要である(図 1)。

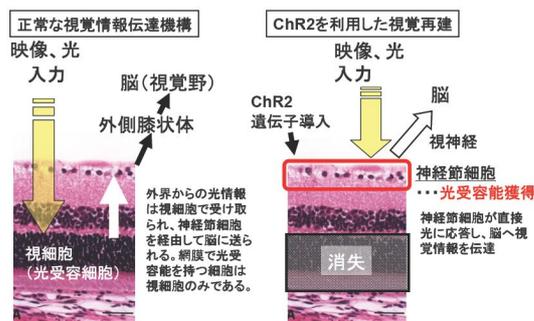


図 1 ChR2 によって作られる視覚システム

今回、ON 型反応を誘導するために、ChR2 遺伝子を用い、OFF 型の反応を誘導するために光活性化クロライドチャンネル(NpHR)を利用する。

## 2. 研究の目的

高度好塩菌より見出されたハロロドプシン(NpHR)は、光活性化クロライドチャンネルとして機能することが知られている。これを利用することによって特定の波長光で OFF 反応を模倣することができると考えられる。しかしながら、NpHR の哺乳類細胞での発現は細胞毒性を示し、実用化には細胞毒性を低減させる必要がある。我々は NpHR を改変し細胞毒性を示さない mNpHR を創出済みである。そこで、ChR2 と mNpHR を神経節細胞に導入し、照射光の波長を変えることによって、ON および OFF 反応を誘導することを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 血清型の異なる AAV ベクターの作製  
遺伝子導入に用いる AAV ベクターは、AAV ヘルパーフリーシステムによって産生した。AAV ヘルパーフリーシステムでは、目的遺伝子を搭載したプラスミドベクターと AAV の複製およびキャプシド遺伝子を持つ RC プラスミドとウイルス粒子産生に必要な遺伝子を持つヘルパープラスミドの 3 種を共感染させることによって、AAV を産生させた。

(2) 遺伝盲ラットへの遺伝子導入と導入効率評価

網膜変性症ラット(RCS ラット)の硝子体内に各血清型の AAV-mNpHR を投与し、2 ヶ月後に網膜伸展標本を作製した。眼球摘出の 1 週間前に上丘より蛍光色素 FluoroGold を注入し、網膜神経節細胞を逆行性標識し、神経節細胞への遺伝子導入効率を調べた。

(3) 視覚誘発電位測定

AAV2-mNpHR を RCS ラットの硝子体内に投与し、遺伝子導入を行った。硝子体内投与 2 カ月後に、視覚誘発電位を測定した。

(4) パッチクランプ法によるイオン電流の測定

HEK293 細胞に mNpHR 遺伝子を導入し、mNpHR を恒常的に発現する細胞株を作製した。パッチクランプ法により、光誘発イオン電流を測定した。

(5) NpHR の再改変

NpHR の細胞膜移行性を高めるために、NpHR の N 末領域に Neuromodulin タンパク質の N 末 20 アミノ酸を付加した(N20-NpHR)。

## 4. 研究成果

(1) 遺伝盲ラットへの mNpHR 遺伝子の導入および視覚誘発電位測定

AAV2 型、5 型、DJ 型のベクターを作製し、RCS ラットの網膜に遺伝子導入を行ったところ、AAV2 型で最も高い導入効率を得られた。このため、視覚誘発電位測定には AAV2 型で遺伝子導入を行った RCS ラットを用いた。網膜の神経節細胞に、mNpHR の発現が確認されたものの、NpHR によって誘発される OFF 反応は認められなかった。mNpHR の発現が網膜神経節細胞で確認されたものの、その発現は細胞膜および細胞質に顆粒状に観察され、細胞膜への移行効率が悪いために反応が誘起されない可能性が考えられた。そこで、培養細胞を用いて、発現部位を調べた。

(2) 培養細胞での発現部位同定とパッチクランプ法による光誘発電流の測定

HEK293 細胞にプラスミドベクター AAV-mVChR1-Venus をエレクトロポレーション法により導入した。導入細胞における

mNpHR の発現を確認した後、小胞体の特異的に染色する蛍光色素、Er-Tracker を培地中に添加し染色を行った。細胞を固定後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、mNpHR の細胞内の局在を調べた。その結果、改変体においても、依然として小胞体への蓄積が多く見られた。パッチクランプ法による膜電流測定においても、顕著な膜電流の増加は認められず、再度、ミスフォールディングの原因等、小胞体蓄積の要因を調べることにした。

### (3) NpHR の再改変

小胞体タンパク質は、小胞体への移行シグナルとして機能するシグナルペプチドが存在する。これらの配列を検索した結果、これらに完全に一致する配列は存在しないものの、類似した配列をもつことが明らかとなった。これらが、小胞体移行に関与するかについて、変異体を作製し、パッチクランプ法とともに検討する予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計3件)

1. Sugano E, Tabata K, Takahashi M, Nishiyama F, Shimizu H, Sato M, Tamai M, Tomita H, Local and systemic responses following intravitreal injection of AAV2-encoded modified Volvox channelrhodopsin-1 in a genetically blind rat model, *Gene Ther.* 23(2):158-66. 2016
2. Hososhima S, Yuasa H, Ishizuka T, Hoque MR, Yamashita T, Yamanaka A, Sugano E, Tomita H, Yawo H. Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics. *Scientific Reports* 5, Article number: 16533, 2015
3. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Ozaki T, Nishiyama F, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M. Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox channelrhodopsin-1, *Mol Ther.* 22(8):1434-40. 2014

#### [学会発表](計21件)

1. 細島頌子、湯浅英哉、菅野江里子、富田浩史、石塚徹、八尾寛、近赤外オプトジェネティクスを用いたニューロンの制御、2016.03.24、第93回日本生理学会大会(札幌)
2. 高橋麻紀、菅野江里子、田端希多子、富田浩史、酸化ストレス誘導性アポトーシスに対する酸性セラミダーゼの細胞保護効果、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会(仙台)
3. 佐藤雅俊、菅野江里子、田端希多子、高

橋麻紀、西山史朗、富田浩史、感受波長の異なる2つの光受容タンパク質が作り出す視覚機能、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会(仙台)

4. 三戸啓、菅野江里子、田端希多子、高橋麻紀、斎藤建彦、富田浩史、2つの光受容タンパク質を発現する細胞の光特性解析、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会(仙台)
5. 清水宏也、菅野江里子、田端希多子、高橋麻紀、富田浩史、亜硝酸ナトリウム誘導性の新規認知症様モデルの作製と脳機能評価、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会(仙台)
6. 野崎示穂、清水宏也、菅野江里子、高橋麻紀、富田浩史、マルチビタミンを用いた細胞死抑制効果の検討、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会(仙台)
7. 八尾 寛、細島頌子、阿部健太、湯浅英哉、菅野江里子、富田浩史、石塚 徹、ランタニドナノ粒子アップコンバージョン効果による近赤外オプトジェネティクス、2015.05.11、ナノ学会(仙台)
8. Tomita H, Use of optogenetic technologies to retinal gene therapy, 2015.03.03, International Symposium on Hybrid Organs of the future (Osaka)
9. Sugano E, Tabata K, Nishiyama F, Takahashi M, Shimizu H, Sato M, Tamai M, Tomita H, Systematic and local responses of modified volvox Channelrhodopsin-1 gene therapy. 2015.02.16, Asia-ARVO(Tokyo)
10. Tomita H, Sugano E, Tabata K, Sato M, Takahashi M, Sannohe K, Murayama N, Nishiyama F, Saito T, Tamai M. Visual properties of photoreceptor degenerated rat with dual channelrhodopsin genes, 2015.02.16, Asia-ARVO(Tokyo)
11. 富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、高橋麻紀、田端希多子、西山史朗、斎藤建彦、玉井信、オプトジェネティクスの視覚への応用、2014.11.30、第35回日本レーザー医学学会総会(東京)
12. KOMATSU M, SUGANO E, TOMITA H, FUJII N, Multi-focal photostimulations with light emitting diodes on a multi-channel electrocorticographic array in non-human primates, 2014.11.16, SFN2014(Washington, DC)
13. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, 光を用いた神経工学 2A2-5 Application of optogenetic technologies to restore vision in genetically blind rats, 2014.09.18, LE2014 ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2014(金沢)

14. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, 'Sensory-input dependent refinement of neural circuits' Gene therapy using channelrhodopsins for restoring vision, 2014.09.12, 第37回日本神経科学学会(横浜)
15. Iwasaki M, Osawa SI, Hosaka R, Matsuzaka Y, Tomita H, Ishizuka T, Sugano E, Okumura E, Yawo H, Nakasato N, Tominaga T, Mushiake H, Brain oscillations in its physiology and pathophysiology' Hippocampal network dynamics in optogenetically induced seizure model' 2014.09.11, 第37回日本神経科学学会(横浜)
16. Sugano E, Nishiyama F, Tabata K, Murayama N, Takahashi M, Saito T, Tamai M, Tomita H, VISUAL PROPERTIES OF RCS RATS TRANSDUCED WITH MODIFIED VOLVOX CHANNELRHODOPSIN-1, 2014.07.24, ISER2014(San Francisco)
17. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, RESTORATION OF THE MAJORITY OF THE VISUAL SPECTRUM IN RCS RATS USING AAV-MEDIATED MODIFIED VOLVOX CHANNELRHODOPSIN-1 GENE TRANSFER, 2014.07.24, ISER2014 招待講演 "RN10 - Road to Cure II: Gene Replacement, Optogenetics and Other Therapies for Retinal Diseases."(San Francisco)
18. 西山史朗、冨田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、尾崎拓、田端希多子、高橋麻紀、齋藤建彦、行動解析による視覚機能評価法の確立、2014.07.13、日本動物学会東北支部大会(仙台)
19. 苫米地一駿、菅野江里子、村山奈美枝、高橋麻紀、田端希多子、冨田浩史、アデノ随伴ウイルスの感染効率を左右する因子の検索、2014.07.12、日本動物学会東北支部大会(仙台)
20. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, Application of optogenetic technologies to vision -Restoring vision to patients with blindness-, 2014.4.5, WOC2014 JRPS (Tokyo)
21. 冨田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、田端希多子、高橋麻紀、齋藤健彦、西山史郎、玉井信、シンポジウム10 網膜の再生治療・人工視覚「チャンネルロドプシン遺伝子導入による視覚機能再生」、2014.4.4、第118回日本眼科学会(東京都)

〔図書〕(計6件)

1. 冨田浩史、菅野江里子、特集2 視覚を用いた脳科学研究 視覚再生、脳21 第17巻4号 通巻67号 Vol.17 No.4

2. 冨田浩史、失明ラットに、幅広い色を感じできる視覚を回復、螢雪時代8月号、p214
3. Sugano E, Tomita H, Chapter24; Establishment of gene therapy using channelrhodopsin-2 to treat blindness, Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications, Springer Tokyo, 341-352, 2015
4. 菅野江里子、冨田浩史、特集-未来を支えるライフサイエンス「視覚障害治療のための可視光に感受性を持つ光活性陽イオンチャンネルタンパク質」、月刊「化学工業」、66(11)、p.13-19, 2015
5. 冨田浩史、菅野江里子、網膜神経節細胞の光活性化を用いた視覚再建の取り組み、日本光学会「光学」、44、p.433-439, 2015
6. 冨田浩史、菅野江里子、オプトジェネティクスの視覚への応用-チャンネルロドプシン遺伝子の導入による失明者の視覚再建-、光アライアンス、27(1)、p.51-55, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 哺乳動物細胞に対する外来遺伝子の導入発現効率の向上剤

発明者: 冨田浩史、菅野江里子

権利者: 国立大学法人岩手大学

種類: PCT 出願

番号: 特願 2015-024849

出願年月日: 平成27年2月12日

国内外の別: 国外

取得状況(計1件)

名称: Light-receiving channel rhodopsin having improved expression efficiency

発明者: Hiroshi Tomita, Eriko Sugano

権利者: Tohoku University

種類: PCT

番号: US 8,754,048B2

取得年月日: Jun.17, 2014

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.cc.iwate-u.ac.jp/~htomita/vision-neurosci/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

冨田 浩史 (TOMITA Hiroshi)

岩手大学・工学部・教授

研究者番号: 40302088

(2)研究分担者

菅野 江里子 (SUGANO Eriko)

岩手大学・工学部・准教授  
研究者番号： 7 0 3 7 5 0 2 1

田端希多子 (TABATA Kitako)  
岩手大学・工学部・技術補佐員  
研究者番号： 8 0 7 1 4 5 7 6