

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791833

研究課題名(和文)変異型チャンネルロドプシンの分子機能解析

研究課題名(英文)Molecular functional analysis of the modified volvox-derived channelrhodopsin-1

研究代表者

村山 奈美枝 (Murayama, Namie)

岩手大学・工学部・学術研究員

研究者番号：60597516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：クラミドモナス由来チャンネルロドプシン-2(ChR2)は、感受波長が青色に限定される。本研究は新たに変異型チャンネルロドプシンを作製し、光特性を明らかにすることを目的とし、ボルボックスより見出された赤方型チャンネルロドプシン(VChR1)を基本に変異型チャンネルロドプシン遺伝子を作製した(mVChR1)。

mVChR1遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立し(HEK-mVChR1)、光反応性を測定したところ、VChR1に比べ約30倍高い反応が記録された。また、波長感受性では、450nmから600nmの幅広い波長光に应答し、ヒトの可視光を考えた場合、mVChR1は視覚再生に有用な遺伝子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The sensitive wavelength of channelrhodopsin2 (ChR2) derived from chlamydomonas is limited under 540 nm corresponding to blue color. On the other hands, it has been reported that the volvox derived channelrhodopsin-1 (VChR1) had a red sifted sensitivities compared to ChR2. We developed a new type of channelrhodopsin which had a broad band wavelength sensitivities by modifying the VChR1 and investigated the ion channel properties.

After establishing the cell line which expressed mVChR1 gene (HEK-mVChR1), we measured the photo current caused by a light stimuli. The photo current in the modified VChR1-expressing cell induced by a stimuli of blue, green, yellow and red light, which showed approximately 30 times higher currents compared to that of the native VChR1. In consideration to human visual spectrum, mVChR1 was useful for the purpose of restoring vision.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼生理 パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は失明原因の上位に位置する疾患のひとつであるが、未だ有効な治療法が確立されていない。さらに重篤な網膜はく離や年々増加している加齢黄斑変性症などを含めると今後失明者が増加することは明らかである。これらの疾患のほとんど(緑内障をのぞく)は、視細胞の変性に原因があり、神経節細胞をはじめ多くのニューロンは残存し、視神経が十分機能することは最近の研究で明らかにされている。

失明に対する唯一の視機能再建として、光受容を工学的技術によって代用し、残存する網膜神経細胞を電気的に刺激する「人工網膜」が世界的に研究されている。この方法は映像情報を人工網膜チップで捉え、電気的な信号に変換し、残存する網膜神経節細胞を刺激し、擬似的な光覚を得ようというものである。アメリカ、ドイツで臨床試験が始められているものの、様々な問題点が明らかになってきている。また、研究段階にある視覚再生法として、幹細胞移植が挙げられる。現状では、幹細胞から特定の神経細胞へ分化をコントロールすることが難しい点や、それが可能であったとしても、生来の神経ネットワークを再構成できるかなどの問題がある。我々は光受容を機械によって代用するのではなく、「残存する神経細胞に光受容能を賦与する」という全く新しい方法を用いての視覚再建をめざしている。この方法では残存する神経細胞に光受容能が賦与されるため、既存の神経ネットワークをそのまま利用することができる。われわれの研究室ではすでに、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、網膜神経節細胞にChR2遺伝子を導入することにより、遺伝盲ラットの視覚を取り戻すことに成功している(Tomita et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48(8):3821-6, 2007, 日経新聞 2007年4月16日)。また、ラットの首振り運動による行動解析で、行動学的にもし機能の回復を確認している(毎日新聞全国版 2008年3月8日、朝日新聞宮城版 2008年3月13日、NHK 宮城ニュース特集「視力が落ちる難病にひとすじの光」2008年3月28日、Tomita et al., 2009, revision)。このように、世界で初めて行動学的に視機能の回復を示し、この研究で世界をリードしている。

緑藻類クラミドモナス由来のチャンネルロドプシン-2 (ChR2) は、発色団としてレチナルを有し、530nm以下(青色)の光に応答し、細胞内に陽イオンを透過させる光受容陽イオン選択的チャンネルとして機能することが知られている。「光+陽イオンチャンネル」という特性から、神経細胞に発現させた場合、単一の分子の働きで光情報を電気信号に変換することが可能である。ChR2が反応する光波長は約400-520nmであり、これは正常な視覚の波長域(380-760nm)と比較して、極端に狭く、視機能が回復したとしても見える波長域が限定されてしまう。

2008年、同じ緑藻類ボルボックスから単離したチャンネルロドプシン(VChR1)が531-581nm(黄色)の光刺激に反応し、細胞内に陽イオンを透過させる陽イオン選択的チャンネルであることが報告されている。このことにより、VChR1とChR2を共に神経細胞に発現させることにより、より広い波長領域に光感受性を持たせることができると考え、我々はVChR1を哺乳類の細胞に発現させることを試みた。しかしながら、VChR1遺伝子導入細胞の発現効率は低く、光刺激での十分な反応が得られなかった。そこで、我々は視機能再建を考慮した時に、より機能的と思われるChRを創出するために、赤方方のチャンネルロドプシンをはじめ、様々な変異型を作製している。その一例として、光感受性および波長特性を改善する目的で、クラミドモナスチャンネルロドプシン変異型を作製している。これは、光刺激に対する反応スピードが速くなり、感度が高くなるといった反応性の向上を期待しているものである。これらの変異型の光特性を解析することで、さらにも有用なChR変異型が得られる可能性がある。本研究により、新たなChRが創出されれば、通常の視覚に近い視機能が得られる可能性があり、今後、ChRを利用した視覚再建研究に重要な知見となると考えられる。

2. 研究の目的

緑藻類クラミドモナス由来のチャンネルロドプシン-2 (ChR2) は、発色団としてレチナルを有し、530nm以下(青色)の光に応答し、細胞内に陽イオンを透過させる光受容陽イオン選択的チャンネルとして機能することが知られている。このような特性から、神経細胞に発現させた場合、単一の分子の働きで光情報を電気信号に変換することが可能である。光感受性遺伝子チャンネルロドプシンは近年、新たな視機能再建のツールとして研究されてきている。しかし、オリジナルのチャンネルロドプシンには、受容波長域が狭いといった問題点が多い。本研究はその短所の改善を目指し、新たに作製したChRの光特性等について電気生理学的に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞への遺伝子導入による変異型チャンネルロドプシン遺伝子発現株の樹立

遺伝子発現株のみを選択するために、ピューロマイシン耐性遺伝子が付加されたChRプラスミドベクターを作製した。また、各遺伝子に蛍光タンパク質を融合させたベクターを作製した。その場合は蛍光顕微鏡観察による導入遺伝子の発現確認が可能である。

これらのベクターを制限酵素を用いて1箇所切断し、直線状にしてからHEK293細胞、PC12細胞へエレクトロポレーション装置を

用いて遺伝子導入を行った。

抗生物質（ピューロマイシン）耐性遺伝子が含まれていることにより、遺伝子が発現した細胞へ抗生物質を添加することで、遺伝子導入細胞を選択的に培養した。

(2)パッチクランプ法を用いた光感受性・波長感受性の解析

それぞれの波長（400, 450, 500, 550, 600nm）で光刺激を1秒間与え、波長感受性を測定した。それぞれの遺伝子ごとのピーク波長や応答波長領域を確認した。

同一波長で、減光フィルタを用いて光刺激の強さを1/5, 1/10, 1/50, 1/100と変えたときに強度の差による応答の違いを確認した。

(3)モデル動物への遺伝子導入、及び導入後の光応答の解析

遺伝盲ラットの硝子体へ作製したアデノ随伴ウイルスを投与した。

発現を確認後、網膜スライス標本作製し、パッチクランプ法による光感受性・波長感受性の解析を行った。

4. 研究成果

クラミドモナス由来チャンネルロドプシン-2(ChR2)は、感受波長が青色に限定される。本研究は新たに変異型チャンネルロドプシンを作製し、光特性を明らかにすることを目的とした。

ボルボックスより見出された赤方型チャンネルロドプシン(VChR1)は、その波長特性から視覚再建に有用と考えられるが、ChR2に比べ光反応性が悪く実用的ではない。そこでVChR1を基本に変異型チャンネルロドプシン遺伝子を5種類作製した。

遺伝子発現細胞株のみを選択するために、ピューロマイシン耐性遺伝子が付加されたChRプラスミドベクターと改変型ChR-Puroベクターを作製した。これらをエレクトロポレーション法を用いて培養細胞（HEK293）に導入し、抗生物質ピューロマイシンを添加し選択的に培養を続け、mVChR1遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立した（HEK-mVChR1）。

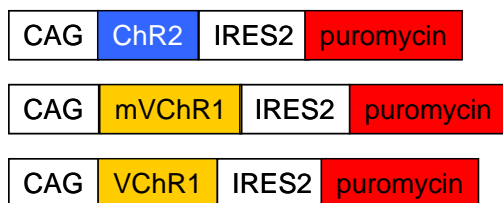


図1. 作製したプラスミドベクター

今回作製した変異型チャンネルロドプシンの光特性についてパッチクランプ法により電気生理学的に検討した。光反応性を測定した

ところ、VChR1は比べ約30倍高い反応が記録された。

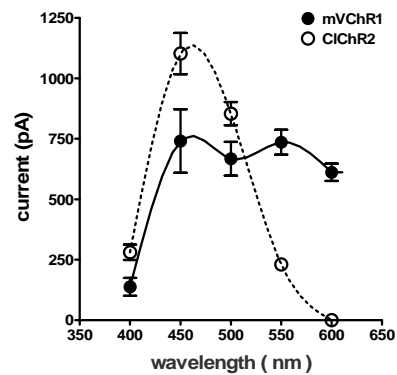


図2. 波長特性

また、波長感受性では、450nmから600nmの幅広い波長光に反応し、ヒトの可視光を考えた場合、mVChR1は視覚再生に有用な遺伝子であると考えられた。遺伝盲ラットを用いた電気生理学、行動学的評価でも、パッチクランプ法で得られた結果と同様の反応が観察された。さらに、網膜内での光受容機構を詳細に解析するために、遺伝子導入した網膜のスライス標本作製し、光刺激に伴う遺伝子導入細胞および非導入細胞の光刺激に伴う反応を記録することを試みた。しかしながら、ラット網膜スライス標本を維持することが困難で、現状では記録するに至っていない。引き続き、スライスパッチによる記録を試みるとともに、網膜伸展標本やラット以外の下等動物でのパッチクランプ法も検討し、失明網膜の光受容機構を調べる予定である。

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4件)

Tomita H, Sugano E, Murayama N, Ozaki T, Nishiyama F, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M. (2014) Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox

channelrhodopsin-1. Mol Ther. in press. Eriko Sugano, Namie Muayama, Maki Takahashi, Kitako Tabata, Makoto Tamai, Hiroshi Tomita, Essential Role of Thioredoxin 2 in Mitigating Oxidative Stress in Retinal Epithelial Cells, Journal of Ophthalmology, 査読有, 2013 巻, 2013, 185825, DOI: 10.1155/2013/185825.

Sugano, E. Isago, H. Murayama N, Tamai, M.

Tomita, H. Different anti-oxidant effects of thioredoxin 1 and thioredoxin 2 in retinal epithelial cells, Cell Struct Funct, 査読有, 38(1)巻, 2013, 81-88,

Isago H, Sugano E, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Establishment of monocular-limited photoreceptor degeneration models in rabbits. BMC Ophthalmol. 査読有、13 巻、2013、13-19、DOI: 10.1186/1471-2415-13-19.

〔学会発表〕(計 7 件)

富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、田端希多子、高橋麻紀、斎藤建彦、西山史朗、玉井信、網膜から脳へのシグナル：光による修飾、行動との相関、視覚の再建 「オプトジェネティクスの視覚への応用-失明者の視覚再建に向けて-」、第 91 回日本生理学会大会、2014/3/16、鹿児島大学 郡元キャンパス

富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、田端希多子、高橋麻紀、斎藤建彦、西山史朗、玉井信、光計測と操作による先端脳研究 「オプトジェネティクスの視覚への応用」、第 13 回生理学若手サマースクール、2013/8/4、順天堂大学センチュリータワー南 13 階

富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、田端希多子、高橋麻紀、斎藤建彦、西山史朗、玉井信、視機能再建のための遺伝子治療・現状と課題、日本網膜色素変性症協会 (JRPS) 長野県支部医療講演会、2013/6/23、長野県佐久平野沢会館

砂金ひとみ、菅野江里子、村山奈美枝、原富雄、萩森一郎、玉井信、富田浩史、カニクイザルの片眼視細胞変性モデルの確立、日本動物学会第 83 回大会、2012/9/13、大阪大学豊中キャンパス

村山奈美枝、菅野江里子、砂金ひとみ、斎藤建彦、玉井信、富田浩史、変異型チャネルロドプシンのパッチクランプ法による評価、日本動物学会第 83 回大会、2012/9/13、大阪大学豊中キャンパス

Hiroshi Tomita, Hitomi Isago, Eiji Iwata, Namie Murayama, Yuri Shinomoto, Masami Watanabe, Makoto Tamai, Eriko Sugano、Establishment of a method for the visual acuity test on cynomolgus monkey、The Association for Research in Vision and Ophthalmology、2012/5/9、Fortlauderdale, FL

Eriko Sugano, Hitomi Isago, Namie Murayama, Takehiko Saito, Yuri Shinomoto, Makoto Tamai and Hiroshi Tomita、Restore vision covering visible light by using single gene, modified volvox channelrhodopsin-1、The Association for Research in Vision and Ophthalmology、2012/5/7、Fortlauderdale, FL

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

村山 奈美枝 (MURAYAMA NAMIE)

岩手大学・工学部・学術研究員

研究者番号：60597516