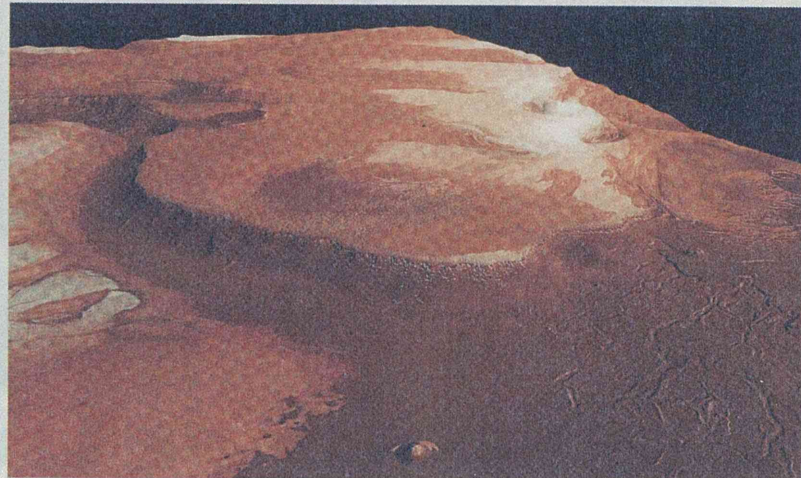


50 水と風が生んだ 火星の大地

マーズ・エクスプレスがとらえた3次元画像

協力 佐々木晶 画像 ESA

水と風、溶岩が作りだした火星の姿。
火星探査機マーズ・エクスプレスが撮影した
迫力ある3次元画像を紹介しよう。



94 深海の奇妙な生物

広く深い海に生きるさまざまな工夫

協力 藤倉克則 喜多村 俊

鉄の鎧をもつ貝、耳があるタコ。
深海生物の奇妙な姿をのぞきみる。

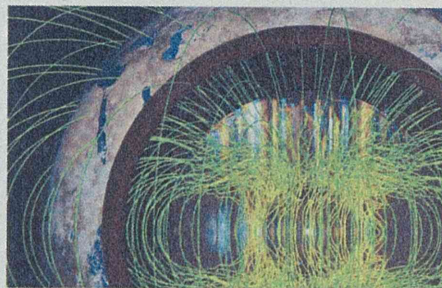


102 スーパーコンピューターとは何か?

なぜ「速さ」が重要なのか?
そのしくみと現状を紹介する

協力 松岡 聡 牧野淳一郎

1秒に1,000,000,000,000,000 (10の15乗) 回も
計算を行う、コンピューターの怪物を紹介しよう。



- 116 テクノロジー・イラストレイティッド
マイクロ波で食品を温める 電子レンジ
協力 初川 嘉一
- 118 パレオントグラフィ
爬虫類の台頭 中生代三畳紀
協力 小林快次/斎木健一
- 120 身近な"?"の科学
マスク
協力 藤田直哉
- 122 ライフサイエンス・ビュー
味わって食べると血糖値の上昇を抑制
協力 貫越靖彦
- 123 メディカル・トピックス
緑藻のタンパク質で視力回復
協力 富田浩史
- 124 プラネット・アース
北極海で進む「酸性化」と「淡水化」
協力 川合美千代/西野茂人
- 125 アーキオリポート
ナスカ地上絵はどのように
えがかれたのか?
協力 坂井正人
- 126 OUR FIELDWORK
廃坑からわき出す「赤い水」の浄化
にいどむ
協力 小田 裕
- 128 STAR-WATCHING
オリオン座
渡部潤一

学問の歩きオロジ

日本の気球事始め(4) 108

——日本の西と東で行われた気球競争

水谷仁

軍用、景気づけ、天覧公演など、さまざまな目的で気球があげられた
明治初期の東京・京都。気球飛揚にかけた人々の思いとは?

3月号予告 132

LETTERS 137

2010年7月号「編集特別モニター」募集 134

CONTRIBUTORS 143

NEWTON INFORMATION 135

編集長室から 144

2010年第1回「読者モニター」募集 136

失明したラットの視覚を再生させることに成功

網膜の「視細胞」がはたらかなくなったり消失したりすると、光を受け取ることができず、失明に至ることがある。視力をふたたび取りもどす有力な方法は今のところ存在しない。このたび、緑藻の一種がもつタンパク質を失明したラットの網膜に導入すると、視力が再生し、さらに通常より視力が上がる場合があることがわかった。緑藻のタンパク質を失明治療に使うという意外な発想が奏功したようだ。

私たちがものを見るとき、光はまず、網膜の「視細胞（杆体と錐体）」で受けとられる。視細胞では、あるタンパク質が光を受け取ったあと、また別のタンパク質が“信号”を発生して、網膜の「神経節細胞」に光の情報を伝える。さらにこの情報は神経節細胞から脳へと伝えられる。

視細胞になんらかの障害が生じると、光を感じるができなくなり、失明に至る場合がある。失明の代表的な原因である「加齢黄斑変性症」や「網膜色素変性症」は視細胞がはたらかなくなっておきる疾患だ。だが今のところ有効な治療方法はない。

“一人二役”のタンパク質

視覚再生の研究を進める富田浩史・東北大学国際高等融合領域研究所准教授は、2005年、「チャンネルロドプシン」に注目した。これは、「クラミドモナス」（クラミドは外套、モナスは単細胞の意味）、という緑藻の一種がもつタンパク質である。

チャンネルロドプシンは、クラミドモナスの細胞膜の一部（眼点）に存在する。チャンネルロドプシンは、光を感知すると同時に信号を発生することができる。いわば「一人二役」のタンパク質なのだ。こうしてクラミドモナスは光の来た方向を知ることができる。光合成を行う生物にとって、光の方向を知ることは重要だ。

富田准教授は、このチャンネルロドプシンが失明治療に使えらと考えた。用いた方法は、ウイルスを使った遺伝子導入である。クラミドモナスがもっている、チャンネルロドプシンをつくるための遺伝子をウイルスに組

みこみ、このウイルスを、視細胞が機能しないため失明したラットの神経節細胞に送りこんだ。神経節細胞に送りこんだのは、この細胞が脳に直結しているうえに、視細胞が消失しても正常に機能することがわかっていたためである。

遺伝子の導入後、ラットは視力が回復した。神経節細胞で合成されたチャンネルロドプシンが光を感知すると同時に信号を発生し、その刺激が脳に伝わったようだ。この手法では、神経節細胞の約30%に遺伝子が組みこまれるという。

次に富田准教授は、生まれつきすべての神経節細胞でチャンネルロドプシンを合成できるラットを作成し、視細胞がはたらかない状態にして、このラットの視力を調べた。すると、正常なラットと同等かそれ以上の視力をもつことが明らかとなった（アメリカのオンライン学術誌 PLoS ONE 2009年11月4日号で発表）。「ラットはもともと青い光に鈍感です。一方、緑藻は青い光だけを感知します。遺伝子導入によってラットの眼の感度が上がり、視力が向上したと考えています」（富田准教授）。

ヒトでの応用を目指す

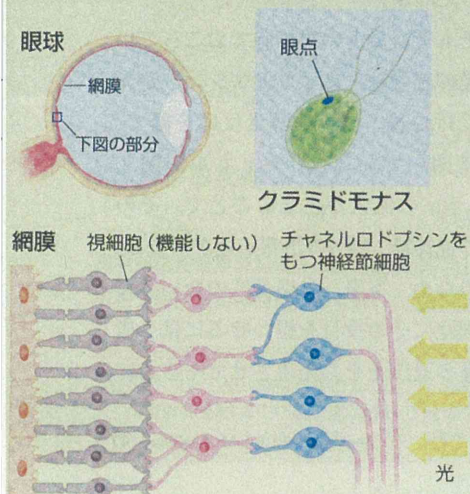
ヒトへの応用を目標として、現在はサルでの実験が進行中である。チャンネルロドプシンは本来ヒトのタンパク質ではないので、副作用が出る可能性があり、安全性の確認は必須だ。なお、ラットの実験では副作用は認められていないという。富田准教授は、少しでも早い臨床応用を目指したいと話している。

（担当：編集部 小野寺佑紀）

協力

富田浩史 東北大学国際高等融合領域研究所准教授

緑藻のタンパク質を網膜へ導入



左は、ヒトの網膜とクラミドモナスのイラスト。通常は視細胞で光を受け取るが、今回の手法では神経節細胞で受け取る。チャンネルロドプシンは、クラミドモナスの眼点に存在する。

***1 網膜色素変性症**

光受容に関係する遺伝子の変異が原因となって生じる網膜変性疾患の一つ。4000～8000人に1人の割合で発症するといわれている。

***2 加齢黄斑変性症**

網膜色素上皮細胞の加齢性変化のほか、遺伝子変異、環境要因も発症原因と考えられている網膜変性疾患。50歳以上の発症頻度は0.87%とされる。

***3 ロドプシン**

脊椎動物の光受容細胞に存在する色素タンパク質。哺乳類の場合、網膜の視細胞にあって、最初に光を受容する機能を担っている。

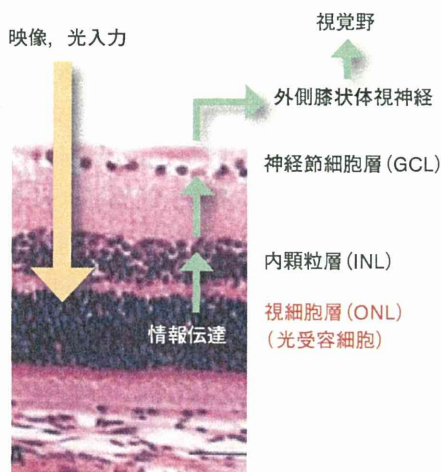
緑藻の光受容体遺伝子の導入による網膜色素変性ラットの視力回復

富田浩史 東北大学国際高等研究教育機構准教授

東北大学の富田浩史准教授らは、クラミドモナスの光受容体(チャンネルロドプシン-2)の遺伝子を、網膜色素変性モデルラットの神経節細胞に導入することで、失明ラットの視力を回復することに成功した。さらに、色覚再生を視野に入れた研究が進められている。

図1 網膜の構造

眼が受けた光を、網膜の下層にある視細胞が受容し、その情報は内顆粒層、神経節細胞層などの細胞、視神経を介して大脳の視覚野に伝えられる。網膜色素変性症、加齢黄斑変性症などで視細胞が障害をうけると、他の細胞が健全でも視覚は失われてしまう。



増加傾向にある網膜変性による中途失明

網膜色素変性症^{*1}や加齢黄斑変性症^{*2}などの網膜変性疾患は、遺伝子の異常や加齢が原因で網膜の視細胞が障害をうける疾患である。加齢黄斑変性症は、欧米において中途失明の最大の原因となっている。日本では、糖尿病網膜症、緑内障がその二大原因であるが、生活習慣の欧米化に伴い、増加傾向にあるという。

いまのところ、網膜変性疾患に対する根治療法はなく失明すると再び視力を取り戻すことは不可能だ。そのため国内外の研究機関において、網膜変性疾患の新たな治療法の研究開発が二つのアプローチで進められている。

まず、網膜や大脳の視覚野に電極を留置し、外部のカメラが捉えた映像を伝える“人工眼”の研究が進められている。臨床研究が実施されている。また、再生医療により視細胞を蘇らせる治療法も進められている。

これらにくわえ、東北大学国際高等研究機構准教授の富田浩

史らは、新たなアプローチによる治療法の開発に取り組んでいる。

「視細胞が受けた光刺激を脳に伝える内顆粒層や神経節細胞層の細胞が健全でも、網膜変性疾患で視細胞が障害をうけると、視覚は失われてしまう。ならば、光受容体の遺伝子を神経節細胞に導入し、神経節細胞が視細胞の代わりに光を受容できるようにすればよいと考えました(図1)」(富田)

なぜヒトではなく、緑藻の遺伝子なのか

富田が活用したのは、2002年にクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)という緑藻から発見されたチャンネルロドプシン-2(ChR2)の遺伝子。なぜ、ヒトの遺伝子ではなく、緑藻の遺伝子だったのか。

そもそもヒトの視細胞で起こっている光の感受は、まずロドプシン^{*3}が光を受けた後、種々の酵素反応を経て、通常開いているNa⁺チャンネルが閉じて、Na⁺の流入が止まることで、その後の視神経、脳への情報伝達が始まる。そのため、本来、光感受性のない神経節細胞にその役目を担わせるには、複数種の遺伝子を共発現させてやらなけ

ればならず、均質かつ高効率に発現させるのは決して簡単なことではない。実際、ロドプシンを導入した培養細胞を用いた *in vitro* 実験では光感受性が低く、患者を対象とした治療に利用するのは困難だという。

いっぽうクラミドモナスの ChR2 は、一分子で光受容から細胞内への Na⁺ 取込みまでの機能をもっている。視細胞では、Na⁺ の流入が止まることで視覚情報の伝達が始まるのに対して、神経節細胞では Na⁺ が流入すると神経細胞が発火する。つまり、ChR2 だけを導入すれば、神経節細胞に光受容の機能を付加できる可能性がある (図2)。

そこで富田は、先天的に視細胞に障害が生じる網膜色素変性症のモデルラット、RCS (Royal College of Surgeons) ラットを対象に、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて神経節細胞への ChR2 遺伝子の導入を試みた。CAG プロモーター^{*1} の下流に、ChR2 と蛍光タンパク質 Venus 遺伝子を組み込み、そのラットの目の硝子体内に投与した。すると、1回の投与で約30万個もの神経節細胞で発現が確認されたという。

「現在、臨床研究に用いられている人工眼の電極は16個。今後、研究が進んでも1000個が精一杯といわれています。これでは高精細な視覚を再生することはむずかしい。これに対して、ChR2 の遺伝子治療なら、1回の投与で30万個の神経節細胞に遺伝子導入できるのだから、解像度を飛躍的に向上させる可能性があります」(富田)

遺伝子導入をした RCS ラットでは、

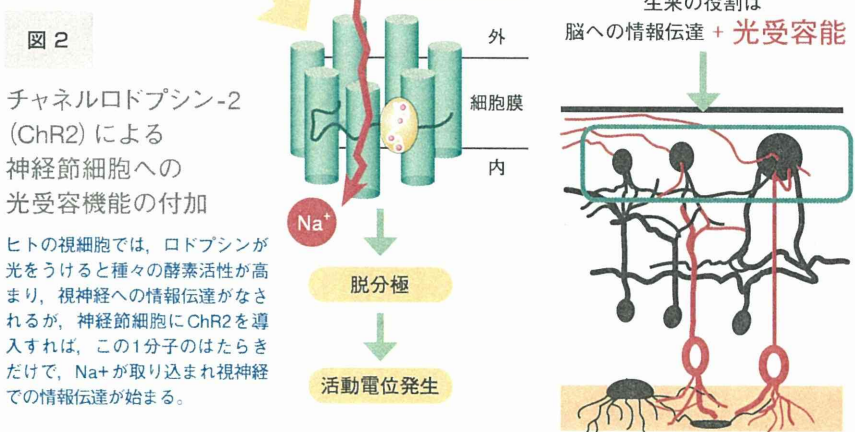


図2

チャンネルロドプシン-2 (ChR2) による神経節細胞への光受容機能の付加

ヒトの視細胞では、ロドプシンが光をうけると種々の酵素活性が高まり、視神経への情報伝達が行なわれるが、神経節細胞に ChR2 を導入すれば、この1分子のはたらきだけで、Na⁺ が取り込まれ視神経での情報伝達が始まる。

導入前には生じなかった視覚誘発電位が得られ、かつ、青色の縞模様が動く環境に置くと、その回転に合わせて首を振る動作が確認された (図3)。

コントラスト感度は正常視覚よりも鋭敏に

次に富田は、Thy-1 プロモーター^{*2} の下流に ChR2 と Venus^{*3} を組み込んだ遺伝子を、視覚が正常なラットの胚に導入し、トランスジェニックラットを作成。ChR2 導入による視覚への影響をたしかめた。なぜ、疾患モデル生物 (RCS ラット) への遺伝子導入による回復実験だけでは足りないのか。

「網膜変性疾患になったからといって、一気に全ての視細胞がつぶれてしまうわけではありません。正常な視細胞が残る可能性もある。将来、ChR2 遺伝子の導入によって視覚を再生させる治療法を患者に用いるためには、ChR2 遺伝子が導入された神経節細胞の光受容が、正常な細胞による視覚にどのような影響をおよぼすかを確認しなければなりません」(富田)

ラットの場合、3000lux の強い光を7日間、連続照射すれば視細胞に障害を与え失明させることができる。こうして作られたラットを、青黒の縞模様が動くディスプレイで囲まれた部屋に入れて、その視機能が調べられた (図4)。

主に評価したのはコントラスト感度と空間周波数の2項目。コントラスト感度は、青黒の縞模様の明暗の差で、コントラスト感度が強くなれば明暗の差は大きく視認しやすくなり、弱くなれば明暗の差は小さく視認しにくくなる。空間周波数は1度の感覚に示される縞模様の本数を示しており、本数が増えれば増えるほど視認しにくくなる。

こうした実験を行った結果、視細胞が障害されていない場合、ChR2 を導入した神経節細胞での光受容が加わっても、視覚が乱されないことが確認された。また、縞模様が少ないとき (低空間周波数) は、視覚が正常なラットよりも、視細胞が障害されたラットのコントラスト感度のほうが高かったという結果も得られた。

「コントラスト感度が高まった理由は

*4 CAGプロモーター
ウイルスベクターによる遺伝子導入で利用される遺伝子プロモーター。

*5 Thy-1プロモーター
神経細胞で特異的に発現するプロモーター。

*6 Venus
緑色蛍光タンパク質 (GFP) を改変して作られた蛍光発色タンパク質。非常に明るく発色することから、金星にちなんでVenusと名づけられた。

図3 ChR2遺伝子を導入して得られた視覚

先天的に視細胞が機能不全に陥るRCSラットの神経節細胞に、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてChR2遺伝子を導入すると、遺伝子導入前には生じなかった視覚誘発電位が確認された。また、青色の縞模様を描いた幕が回転する環境に置いて、その行動を観察したところ、幕の回転速度に合わせて首を振ることが確認された。回転方向とは逆に動かすときは、首の動かし方が回転速度と同期していなかった。

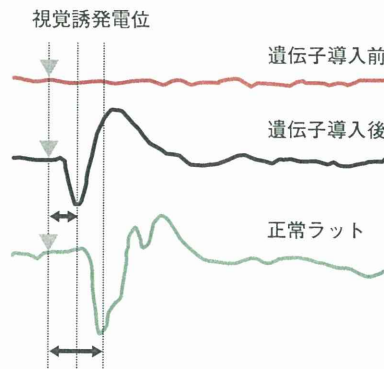
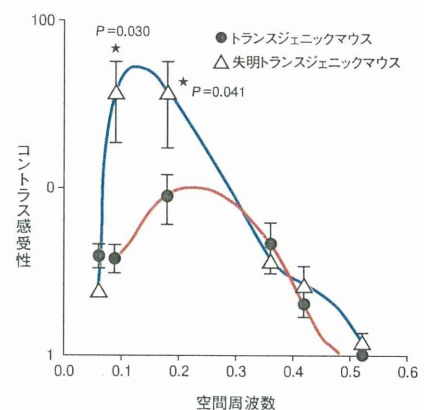
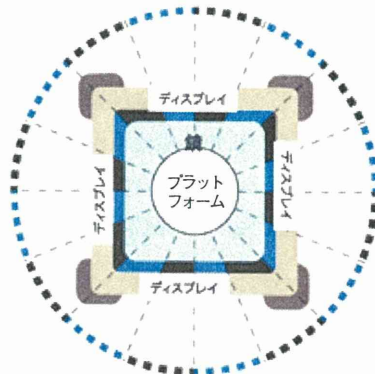


図4 ChR2の導入により回復した視機能

縞模様を表示するディスプレイで取り囲んだ環境に、ChR2とVenusを導入したマウスを入れて、その行動を観察した。ディスプレイに写される縞模様のコントラストと縞の数(空間周波数)は任意に変えられるようになっている。トランスジェニックラットの視覚能力を調べると、縞模様が少ない時(低空間周波数)、正常なラットよりも障害を受けたラットでコントラスト感度が高まること が たしかめられた。



まだ明らかになっていません。しかし、ChR2は神経節細胞にまんべんなく導入されたので、通常であれば色覚を担う視細胞(錐体)からの情報を伝達するはずの神経節細胞も光受容の役目をはたしたことで、コントラスト感度が高まったのかもしれない(富田)

ただし、ChR2遺伝子の導入だけでは、青い光の認識しか望めない。失明した患者にすれば、青い光を感じられるだけでもQOLの向上につながると思えるが、富田は色覚の再生も視野に入れて、研究を進めている。

「2009年に、クラミドモナスと同じ緑藻に分類されるボルボックス(*Volvox carteri*)にも、ChR2に類似した分子

(VChR1)があることが報告されています。しかも、ボルボックスの分子が受容する光の波長は、クラミドモナスとは、ずれていることも明らかになっている。受容できる光の波長が異なる複数種の光受容分子を利用すれば、色覚再生も可能になるのではないかと考えています(富田)

しかし、自然に存在する光受容分子だけで十分ではない可能性がある。クラミドモナスやボルボックスのChR2をもとに人為的な改変を加えるなどすることで、受容可能な波長の拡張が期待できるだろう。

今後、ヒトを対象とした臨床研究を実施するには、効果や安全性の検証を慎重

に進めていく必要があるが、人工眼や再生医療と比べ遺伝子治療は低侵襲であるといえる。今後の研究したいでは、失明者にとって光を取り戻す治療法の切り札になるかもしれない。(文中敬称略)

斉藤勝司(サイエンライター)

Profile

とみた・ひろし

1966年生まれ。1992年、京都府立大学大学院農学研究科修士課程修了。参天製薬研究員、東北大学大学院医学系研究科助手を経て、2002年～2004年、長寿科学振興財団海外派遣研究員として、オクラホマ大学眼科学講座にて網膜変性疾患の薬剤治療の研究に従事。2008年より現職。2010年より同大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター准教授を兼任。

参考文献

Tomita H et al : Plos One 4 (2009) e7379

脳を動かす 光のスイッチ

光を脳に照射して神経細胞を操作する研究が広がっている。光を当てるだけで、特定の神経細胞を興奮させたり、抑制させたりできる。神経の働きを精密に制御する道具となり、病気の治療法開発への応用も期待されている。

マウスの覚醒制御

マウスの脳を操作する研究が広がっている。光を当てるだけで、特定の神経細胞を興奮させたり、抑制させたりできる。神経の働きを精密に制御する道具となり、病気の治療法開発への応用も期待されている。

神経系の病気 治療法開発に期待

光で脳を操作する

特定の光に反応するたんばく質の存在
青い光に反応する、たんばく質「チャンネルロドプシン2」をもつ単細胞の深層(クワゾモナス)

黄色い光に反応する、たんばく質「ハロロドプシン」をもつ古細菌(高度好塩菌)

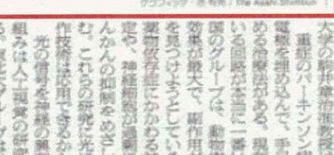
光を当てると、どうなるの? (一冊)

「チャンネルロドプシン2」を入れたマウス
青い光を照らすと、マウスが目を覚まし、動き始める。

「ハロロドプシン」を入れたマウス
黄色い光を照らすと、マウスが目を閉じ、寝るようになる。

将来は?

- ・光刺激による治療(てんかん、パーキンソン病など)
- ・人工視覚



特定の神経細胞に特定の波長の光を当てると、神経細胞が興奮して、特定の行動を引き起こす。

特定の神経細胞に特定の波長の光を当てると、神経細胞が抑制されて、特定の行動を止める。

この技術は、神経系の病気の治療法開発に期待されている。

この技術は、人工視覚の開発にも応用されている。

この技術は、動物実験の代替にも応用されている。

科学

(大・金掲載)

✉ kagaku@asahi.com

安全・効率的な iPS 使命

京都大 iPS 細胞研究所 山中伸弥所長



大阪府生まれ。神戸大医学部卒。米グラッドストーン研究所博士研究員、奈良先端科学技術大学院大学教授などを経て、04年から京都大教授。朝日賞、ガードナー国際賞、ラスカー賞など受賞多数。

「iPS細胞の再生医療への応用」... 多くの人も「iPS細胞を作るといっていい」を信じている。山中伸弥所長は、iPS細胞の再生医療への応用が、安全で効率的な治療法を開発する鍵になると信じている。山中伸弥所長は、iPS細胞の再生医療への応用が、安全で効率的な治療法を開発する鍵になると信じている。

「iPS細胞の再生医療への応用」... 多くの人も「iPS細胞を作るといっていい」を信じている。山中伸弥所長は、iPS細胞の再生医療への応用が、安全で効率的な治療法を開発する鍵になると信じている。

「iPS細胞の再生医療への応用」... 多くの人も「iPS細胞を作るといっていい」を信じている。山中伸弥所長は、iPS細胞の再生医療への応用が、安全で効率的な治療法を開発する鍵になると信じている。

「iPS細胞の再生医療への応用」... 多くの人も「iPS細胞を作るといっていい」を信じている。山中伸弥所長は、iPS細胞の再生医療への応用が、安全で効率的な治療法を開発する鍵になると信じている。

汚染物質 季節問わず日本襲来

日本に飛来する大気汚染物質が、黄砂の季節以外にも恒常的に飛来していることが、海洋研究開発機構の調査でわかった。中国などの大気汚染源や自動車などから排出された汚染物質とみられる。近くは大都市がなく、大気汚染が少ない長崎県佐賀県で観測した。直径2.5マイクロメートル以下の微粒子状物質(PM2.5)が日本の観測基準を超過していた日は1年のうち26日、うち黄砂の季節は4日だけ。汚染物質が季節を問わず飛んできていることが確認された。(東山正宣)

11月16日(土)から17日(日)まで、全国の主要な百貨店で、Doraemonのキャラクターグッズが販売されています。Doraemonのキャラクターグッズは、子供から大人まで人気があります。

光を当てるだけで、ミリスリで特定の細胞を制御できる。この「光スイッチ」は、神経の働きを精密に制御する道具となり、病気の治療法開発への応用も期待されている。



わかりやすい
臨床講座

チャンネルロドプシンを用いた視覚再生

富田 浩史・菅野江里子

「日本の眼科」82：12号（2011年）別刷

（2011. 12. 20 発行）

社団法人 日本眼科医会

第82巻 第12号 [通巻609号]

Vol. 82 No. 12 DECEMBER 2011 CONTENTS

お知らせ	会費引落とし銀行口座「変更・解約」の連絡のお願い……………1665
	「日本の眼科」カット募集のご案内……………1667
	薬価基準の追補収載について……………1669
	各都道府県眼科医会「医療機器・販売業等の管理者に対する継続的研修」 実施告知(状況)について……………1671
	白内障手術の術後眼内炎に対する前向き多施設共同研究 参加施設募集……………1677
綴 込	第63回生涯教育講座「白内障のすべて」のご案内・申込葉書……………
告知板	第35回日本眼科手術学会総会/平成23年度視覚障害者用補装具適合判定医師 研修会(第2回)/眼科診療アップデートセミナー2012(IN京都)/第116回 日本眼科学会総会/公益信託須田記念緑内障治療研究奨励基金平成22年度 (第24期)奨励金受給者のご報告……………1679
寄 稿	塩瀬芳彦先生とその業績を偲ぶ……………三宅謙作……………1695
新東西南北一都道府県眼科医会からのエッセイ	「うどん」だけじゃない……………河西葉子……………1697
眼科雑誌目次	臨床眼科(65-10)/眼科臨床紀要(4-11) あたらしい眼科(28-10)/眼科(53-10)……………1699
書 評	新ES NOW No.4 網膜剝離 こうすれば治る 復位率100%をめざして(担当編集委員:門之園一明)……………島田宏之……………1703
日本眼科医会行事・学会案内……………1688	研究会・集談会等案内……………1690
人事消息……………1705	「日本の眼科」投稿についてのご願い……………1716
会務日誌……………1709	投稿規定……………1717
編集室だより……………1713	生涯教育講座ビデオ案内・他……………1719
総目次……………1721	

表紙デザイン・福川 久之
カット・平野 潤三



チャネルロドプシンを用いた視覚再生

富田 浩史・菅野江里子

〔要 約〕

走光性を示す緑藻類“クラミドモナス”は「チャネルロドプシン-2 (ChR 2: channelrhodopsin-2)」と呼ばれる特徴的な機能を有する光感受性物質を持つ。この原始的な光感受性物質を利用することによって、従来光感受性を持たない神経細胞に光を受け取る能力を与えることができる。眼球と脳

を連絡する神経節細胞は、失明後も網膜に残存しており、ChR 2を用いてこれらの細胞に光を受け取る能力を与え、網膜神経節細胞を有効利用することによって、視覚機能を回復できる可能性がある。

はじめに

網膜色素変性症 (RP: Retinitis Pigmentosa) の原因は、光受容に關与する視細胞あるいは網膜色素上皮細胞に特異的に存在するタンパク質をコードする遺伝子の変異である。RPによる視細胞変性の機序は未だ不明な部分が多く、視細胞変性を阻止する治療法はない。RPの網膜組織像の特徴は、視細胞の消失であり、内顆粒層、神経節細胞層など他の細胞は、正常である (重症なRPでは神経節細胞数が減少する)。

近年、視覚再建法として、残存する網膜細胞を電氣的に刺激し、視機能を取り戻す人工網膜研究が盛んに行われている。アメリカ、ドイツ、日本で臨床試験が行われ、残存する網膜細胞を電氣的に刺激することによって視覚が得られることが明らかとなっている。人工網膜研究から、残存する網膜細胞に何らかの方法で光情報を伝えることができれば、視機能を再建することができると思われる。

緑藻類クラミドモナスより見出された、原始的な光感受性物質 ChR 2 タンパク質は、視細胞のロド

プシンと異なり、ChR 2 タンパク質のみで光応答を作り出すことができる。本稿では、ChR 2 と視細胞変性後も網膜に残存する神経節細胞を利用した視覚再生法の概略を述べる。

I. チャネルロドプシン-2 とロドプシン

池や田んぼ等に生息する緑藻類クラミドモナスは、2本の鞭毛を有し、光のある場所に移動し光合成によりエネルギーを作り出し生活している。クラミドモナスは眼点と呼ばれる器官を有し、その眼点で光受容に重要な役割を担っているタンパク質がチャネルロドプシン-2 (ChR 2) である。ChR 2 タンパク質は、古細菌型ロドプシンファミリー (微生物が持つ光受容タンパク質の総称) に属し、ヒトロドプシンと同様に7回膜貫通型の膜タンパク質である。発色団としてビタミンAアルデヒド「レチナール」分子を持つことから、古細菌型「ロドプシン」と呼ばれているが、両者のアミノ酸にホモロジー (アミノ酸配列の類似性) はない。また、光受容様式についても大きな違いが見られる。ロドプシンでは、ロドプシンによる光受容の後、複雑な細胞内の化学

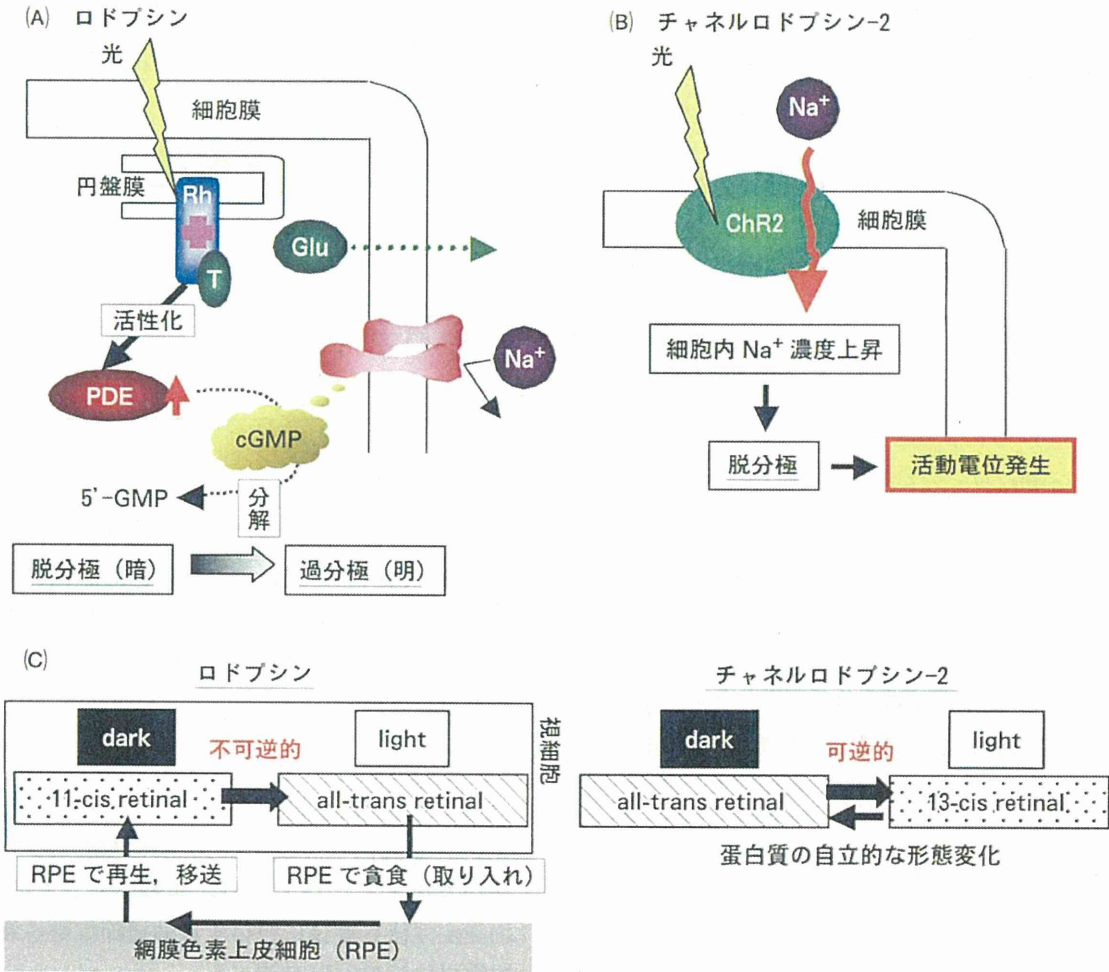


図1 ロドプシンとチャネルロドプシン-2 (ChR2) の比較

- (A) ロドプシンの光受容から過分極に至るまでの化学反応機構。レチナールの異性化によって活性化されたロドプシン (Rh) は、トランスデュシン (T) を活性化する。トランスデュシンはホスホジエステラーゼ (PDE) を活性化し cGMP を分解する。cGMP の分解に伴い、環状ヌクレオチド感受性陽イオンチャンネル* は閉じ、ナトリウムイオンの流入が途絶える。その結果、視細胞は過分極する。
- * 環状ヌクレオチド感受性陽イオンチャンネル (cyclic nucleotide-gated cation channel) : 環状ヌクレオチド (cAMP, cGMP) が結合しているときチャンネルを開き陽イオンを流入させる。
- (B) ChR2 の活動電位発生機構。光受容に伴い、ChR2 の構造が変化し、ナトリウムイオンの透過性が亢進する。ナトリウムイオンの上昇に伴い、神経細胞は脱分極し活動電位を発生する。
- (C) レチナールの異性化と再生。ロドプシンでは、一旦、異性化した安定な all-trans 型レチナールは、視細胞および網膜色素上皮細胞に存在する酵素により、11-cis 型レチナールへと変換され再利用される。一方、ChR2 では、光受容に all-trans 型レチナールを利用し、13-cis 型レチナールに異性化する。ロドプシンの 11-cis 型→all-trans 型が不可逆反応であるのに対し、ChR2 では、all-trans 型から不安定な 13-cis 型への異性化であるために、暗状態になると all-trans 型に戻る、可逆性反応である。

変化を経て光受容が進行するのに対し (図 1 A), ChR2 では、このような細胞内の連鎖反応を必要としない。視細胞のロドプシンの発色団 (ビタミン A アルデヒド) の再生は、視細胞および網膜色素上皮細胞を経て再利用されるのに対し (不可逆反応), ChR2 の発色団の再生は可逆反応である (図 1 B)。

このように、ChR2 は単一のタンパク質の機能で、光受容に伴い細胞の興奮を引き起こすことが可能で、ChR2 を導入することによって、どのような神経細胞にも光を受け取る能力を与えることができる¹⁾。

II. 遺伝子治療

1. チャネルロドプシン-2 遺伝子導入による 視覚再生法

視細胞の光受容は、ロドプシンだけでなく、種々の視細胞特異的なタンパク質の連鎖反応が必要で、視細胞以外の神経細胞にロドプシン遺伝子を導入したとしても光感受性を賦与することはできない。2002年 Zelman ら²⁾は、神経細胞にアレスチン、ロドプシン、G タンパク質 α サブユニットの3種の遺伝子を導入することによって光受容能を賦与できることを報告している。しかし、視覚再生のための治療法として考えた場合、3種の遺伝子を単一の細胞に導入することは難しく、また、この方法は光感受性が低く実用化に至っていない。

一方、ChR2は、光受容に伴い、細胞内に陽イオンを透過させる。すなわち、ChR2を網膜神経節細胞に発現させた場合、光によって神経節細胞を脱分極させることが可能となる。正常な網膜において、視細胞で捉えられた光情報は双極細胞を経て、最終的に神経節細胞に伝えられ、神経節細胞が活動電位を発生させる。活動電位は軸索を伝播し、光情報として脳に伝えられる。網膜神経節細胞の中で、脱分極によって活動電位を発生する神経細胞は、アマクリン細胞、神経節細胞があり、神経節細胞へのChR2の遺伝子導入によって、神経節細胞は、光照射によって脱分極し活動電位を発生するようになる。このように、1つのChR2遺伝子を神経節細胞に導入するのみで、神経節細胞自身が光にตอบสนองし、光情報を脳に伝えることが可能になる。また、Lagali ら³⁾は、神経節細胞ではなく、ON型双極細胞にChR2遺伝子を導入することによって、同様に視機能を回復させることに成功している。いずれにしても、ChR2を神経細胞に発現させることによって、光で神経細胞を脱分極させることが「鍵」となっている。

2. ウイルスベクターの利用

ChR2タンパク質を網膜で恒常的に発現させるためには、ChR2遺伝子を網膜細胞内に送り込む必要がある。遺伝子を対象とする細胞に送り込む方法として、ウイルスベクターを用いる方法がある。アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスなど様々なウイルスが遺伝子治療用のベクターとして開発されており、それぞれ

が特徴的な機能を持つ。なかでも、アデノ随伴ウイルスベクターは、神経細胞、筋細胞、肝細胞等の非分裂細胞に高効率で導入でき、しかも一度の投与で長期間(年単位)の遺伝子発現が可能である。レンチウイルスも同様の機能を有するが、アデノ随伴ウイルスが非病原性由来である点、そして、アデノ随伴ウイルスベクターで導入した遺伝子の多くがエピソード*として存在する点から安全性が高い。

アデノ随伴ウイルスには1~11型の血清型があるが、ChR2の神経節細胞への遺伝子導入には2型を用いている。2型は神経細胞に特異性が高く、網膜細胞では神経節細胞に高い親和性を持つためである。また、2型は広く遺伝子治療臨床研究(血友病やパーキンソン病など)に使用されているベクターであり、眼科分野においてもレーバー先天盲患者に対するRPE65遺伝子を利用した遺伝子治療⁴⁾が行われるなど、これまでにベクター自身の副作用は報告されておらず安全性の高い遺伝子治療ベクターと考えられている。

3. チャネルロドプシン-2によって得られる視覚

ChR2遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス2型ベクター溶液を遺伝盲ラットの硝子体内に投与すると、投与後1週間から視覚誘発電位の回復が見られ、視覚誘発電位の振幅は投与後8週間で最大となる⁵⁾。回復した視覚誘発電位の潜時は、正常な網膜の潜時より短くなる。これは、正常な網膜では、光情報は「視細胞→内顆粒層(双極細胞)→神経節細胞→脳」と伝えられるのに対し、ChR2を神経節細胞に導入した網膜では、「神経節細胞→脳」というように、「視細胞-内顆粒層」を経由しないためである(図2A, B)。光応答特性は、正常なラットと同等であることや、行動学的解析から、得られる視覚機能は低い空間周波数(視覚1度当たりの正弦波数)領域で高いコントラスト感度を持つことが示されている^{6,7)}(図2C)。しかしながら、ChR2タンパク質の特性として、感受波長ピークは460nm付近(青色)で、緑、赤色などには反応しないこと(図3A)、また、光感受性が正常な網膜と比べ極めて低いこと(図3B)などが問題点として挙げられている⁷⁾。

4. 遺伝子治療の安全性

ChR2は元来ヒトが持たないタンパク質であり、恒常的に網膜で発現させることによって免疫応答を惹起する可能性が考えられる。動物実験で使用され

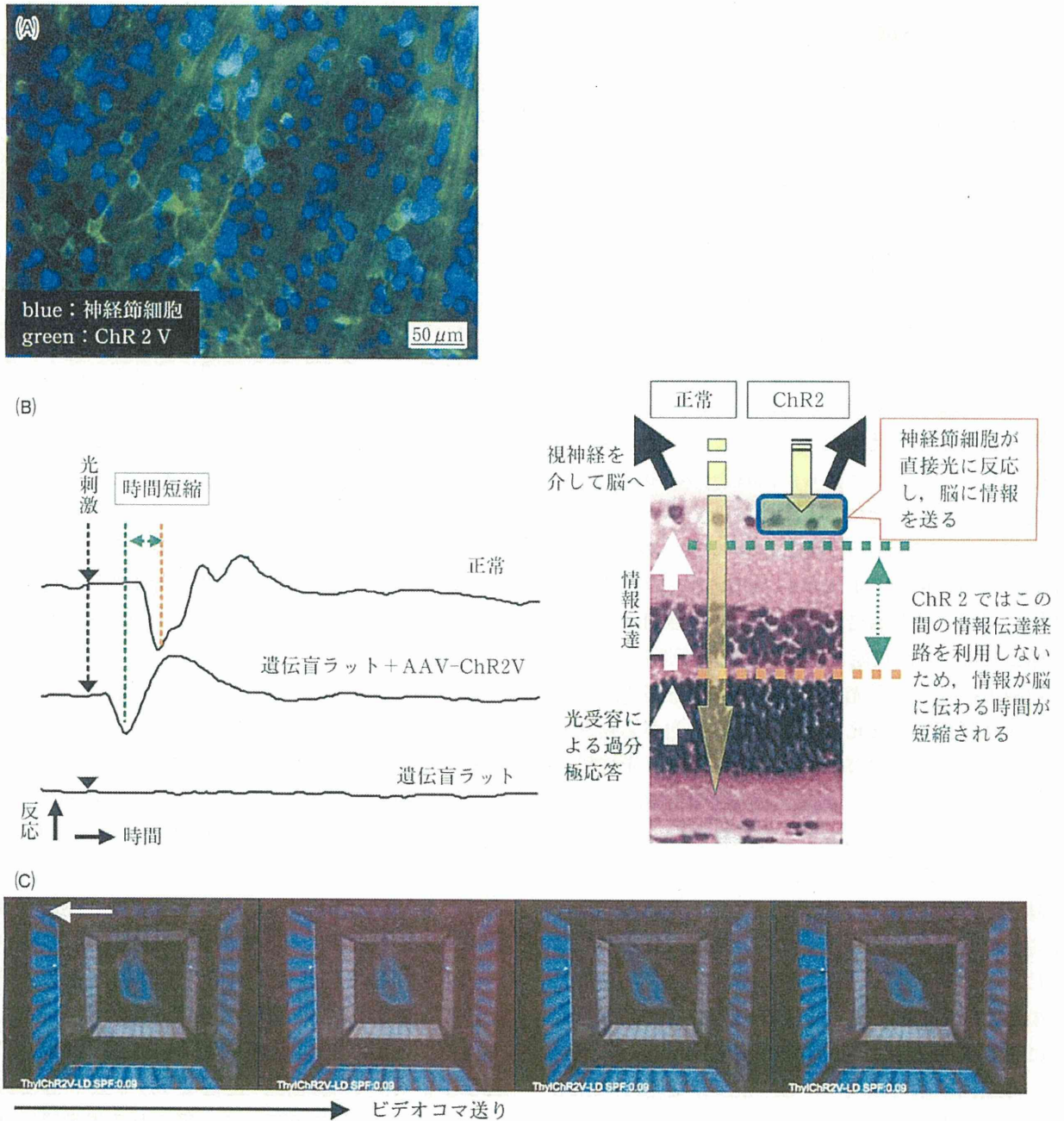


図2 ChR2 遺伝子導入ラット

- (A) 網膜伸展標本。上丘に蛍光色素（青色）を注入し、網膜神経節細胞を逆行性標識した。ChR2 遺伝子に蛍光タンパク質（Venus）を融合しているため、ChR2 の発現は緑色の蛍光タンパク質として可視化される。
- (B) 遺伝子導入後の視覚誘発電位波形。ChR2 を神経節細胞に発現するラットでは、潜時が短縮される（緑色矢印）。
- (C) 回転する縞模様を用いた行動学的評価。ChR2 を発現する遺伝子改変ラットは、視細胞が存在しないにも関わらず、縞模様の回転を追うことができる（写真はビデオのコマ送り画像。矢印は縞模様の回転方向）。

ているウイルスベクターは、強力に ChR2 の発現を誘導するように、転写活性の強力なプロモーター*が使用されている。また、このプロモーター*は細胞特異性を持たないために、万が一、標的細胞（神経節細胞）以外にウイルスが感染した場合、予期しない臓器で ChR2 が発現する可能性がある。

ラットを用いた安全性研究では、ウイルスベクターを硝子体内に投与後6ヶ月で、一部のラットで小腸、肺に ChR2 の発現が確認されている。これは眼内という閉鎖された空間であっても、また、自己複製能のないウイルスベクターであっても、全身への拡散の可能性がゼロではないことを示している。他臓

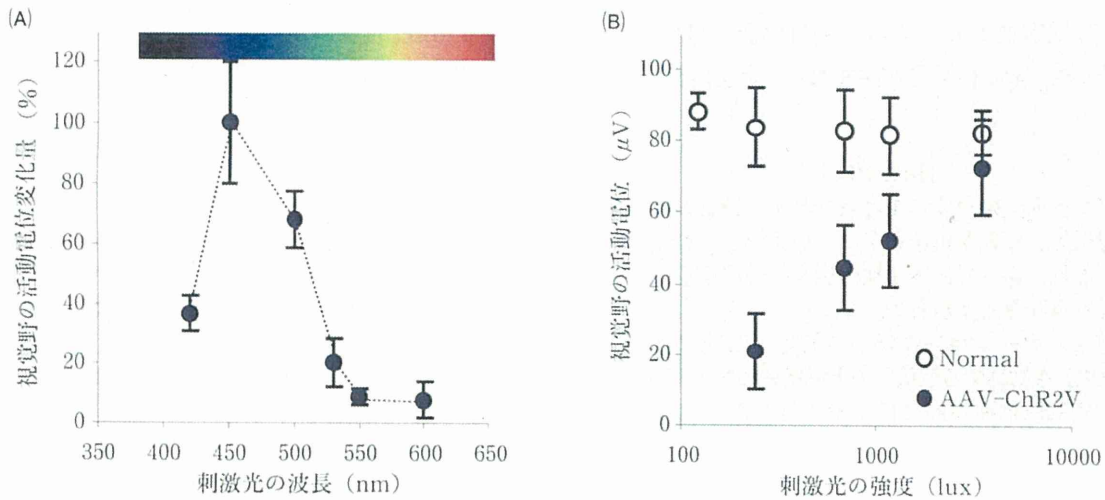


図3 ChR2の機能的な問題点

ChR2を発現する遺伝盲ラットの波長感受性(A)と光感受性(B)。青色波長域にのみ反応し、200 lux以下の刺激強度では視覚誘発電位は記録されない。

器への方が一の感染に備え、網膜細胞に特異的なプロモーター*によって遺伝子の発現を制御するなどの工夫が必要である。一方、異種タンパク質発現による免疫応答では、投与後2年間の観察期間を通して、炎症反応やChR2タンパク質に対する抗体価の上昇や発癌や大きな体調の変化は認められない。それを裏付けるように、一旦回復した視機能は減弱することなく生涯維持されており、ChR2タンパク質の恒常的発現によって重篤な副作用が引き起こされる可能性は低いと思われる⁸⁾。

III. 今後の課題と展望

ChR2の発見以来、同様の機能を持つ古細菌型ロドプシンが見出されている。緑藻類ボルボックスから見出されたチャンネルロドプシンは、青色ではなく緑色付近に感受性ピークを持つ光活性化陽イオンチャンネルタンパク質である。また、高度好塩菌(増殖に高い塩化ナトリウム濃度を要求する古細菌)から見出されたハロロドプシンは、光受容クロライドチャンネルとして機能する⁹⁾。また、自然界に存在するチャンネルロドプシンだけでなく、これらのチャンネルロドプシンのアミノ酸配列を人為的に変え、新しい機能あるいは機能強化されたチャンネルロドプシンを作るといった試みもなされている¹⁰⁾。このような波長感受性あるいはイオンチャンネル特性の異なるチャンネルロドプシンを同時に網膜細胞に導入することによって、より高度な視機能を作り出せる可能性があ

る。例えば、青色型ChR2と緑型ChR1を同時に導入し、感受できる波長幅を広げるというものや、青色型ChR2と黄色感受性クロライドチャンネルとして機能するハロロドプシンを同時に導入し、青色光で興奮を誘導し、黄色光で抑制するというものである。しかし、このような波長感受性の異なるChRが創出されたとしても、現時点では特定の神経節細胞だけに、青色型あるいは緑色型ChRなどを選択的に導入する技術は無く、色弁別は難しいと考えられる。また、緑内障のように、神経節細胞や視神経が障害される失明に対しては利用できない。

ChR2の特徴的な性質から、ChR2を導入するのみでどのような神経細胞にも光を受容する能力を与えることができる。このことから、網膜細胞への遺伝子導入にとどまらず、将来、視覚野に、これらの遺伝子を導入し、視覚野で直接、映像を見る、新しいタイプの人工視覚へと発展する可能性がある。

おわりに

本稿では、視細胞の消失後も網膜に残存する神経節細胞を、原始的な光感受性物質を用いて有効利用し視覚を再生できる可能性を示した。現在、チャンネルロドプシン-2を利用して光受容能を神経細胞に与えるという技術は、脳科学研究分野を中心に急速に発展し、光遺伝学(Optogenetics: オプトジェネティクス)という新しい分野として認知されるに至っている。治療目的だけでなく研究ツールとして、

革新的な技術であり、今後、眼科学研究分野でも広く利用され、新しい発見が生まれることを期待したい。

[用語解説]

- * **エピソーム**：染色体に組み込まれず、独立して存在する遺伝子。導入遺伝子がゲノムに組み込まれる場合、挿入部位によっては重要な機能を持つ遺伝子を不活化してしまう可能性がある。
- * **プロモーター**：目的遺伝子の転写（DNA から RNA の合成）を制御する遺伝子上流領域にある配列。例：Thy-1 抗原は網膜内では、網膜神経節細胞にのみ発現するタンパク質である。この Thy-1 抗原の転写を制御するプロモーター（Thy-1 プロモーター）の下流に ChR2 遺伝子を挿入すると、ウイルスベクターが神経節細胞以外の他の網膜細胞に感染したとしても、ChR2 タンパク質は神経節細胞のみで作られ、他の網膜細胞では作られない。

[文 献]

- 1) Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al: Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13940-13945, 2003.
- 2) Zemelman BV, Lee GA, Ng M, et al: Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* 33: 15-22, 2002.
- 3) Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, et al: Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* 11: 667-675, 2008.
- 4) Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al: Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2231-2239, 2008.
- 5) Tomita H, Sugano E, Yawo H, et al: Restoration of visual response in aged dystrophic RCS rats using AAV-mediated channelopsin-2 gene transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3821-3826, 2007.
- 6) Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, et al: Visual properties of transgenic rats harboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the thy-1.2 promoter. *PLoS One* 4: e7679, 2009.
- 7) Tomita H, Sugano E, Isago H, et al: Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Exp Eye Res* 90: 429-436, 2010.
- 8) Sugano E, Isago H, Wang Z, et al: Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. *Gene Ther* 18: 266-274, 2011.
- 9) Zhang F, Wang LP, Brauner M, et al: Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446: 633-639, 2007.
- 10) Wang H, Sugiyama Y, Hikima T, et al: Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from chlamydomonas. *J Biol Chem* 284: 5685-5696, 2009.

