

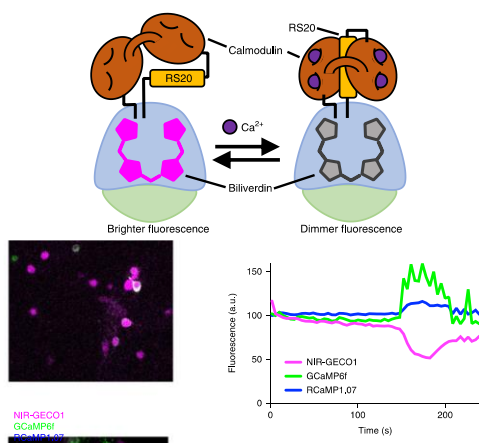
# BIOMOLECULAR CHEMISTRY

## Annual Research Highlights

### (1) “Near-infrared fluorescent calcium ion indicator”

In this work we reported an intensimetric, near-infrared (NIR) fluorescent, genetically encoded calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) indicator (GECI) with excitation and emission maxima at 678 and 704 nm, respectively. This GECI, designated NIR-GECO1, enabled imaging of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in cultured mammalian cells and brain tissue with sensitivity comparable to that of currently available visible-wavelength GECIs. We demonstrated that NIR-GECO1 opened up new vistas for multicolor  $\text{Ca}^{2+}$  imaging in combination with other optogenetic indicators and actuators.

We demonstrated that NIR-GECO1 was a useful new addition to the GECI palette. Specifically, NIR-GECO1 did provide a robust inverse response to  $\text{Ca}^{2+}$  concentration changes in cultured cells, primary neurons and acute slices roughly on par with GCaMP3. In addition, because of its highly red-shifted excitation maximum, it was the preferred  $\text{Ca}^{2+}$  indicator for pairing with blue-light-activated optogenetic actuators, to minimize actuator activation during imaging. Finally, it created a multitude of new opportunities for multiparameter imaging in conjunction with multiple fluorescent-protein-based intensimetric or ratiometric FRET-based indicators.



**Fig. 1** NIR fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, NIR-GECO1 (Upper) Schematic representation of the structure of NIR-GECO1.

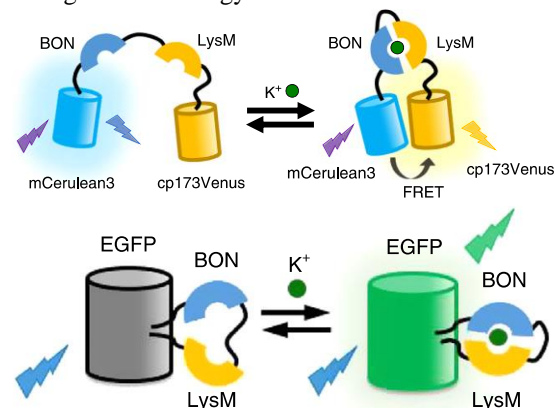
(Bottom left) Three color imaging of neurons with NIR-GECO1 and red and green indicators. (Bottom right) Detection of spontaneous activity from neurons in the image on the left.

1. (1)-6) *Nat. Methods*, **16**, 171 (2019)

### (2) “Genetically encoded potassium ion indicator”

Potassium ion ( $\text{K}^+$ ) homeostasis and dynamics play critical roles in biological activities. Here we described three genetically encoded  $\text{K}^+$  indicators. KIRIN1 (potassium (K) ion ratiometric indicator) and KIRIN1-GR are Förster resonance energy transfer (FRET)-based indicators with a bacterial  $\text{K}^+$  binding protein (Kbp) inserting between the fluorescent protein FRET pairs mCerulean3/cp173Venus and Clover/mRuby2, respectively. GINKO1 (green indicator of K<sup>+</sup> for optical imaging) was a single fluorescent protein-based  $\text{K}^+$  indicator constructed by insertion of Kbp into enhanced green fluorescent protein (EGFP). These indicators were suitable for detecting  $\text{K}^+$  at physiologically relevant concentrations in vitro and in cells. KIRIN1 enabled imaging of cytosolic  $\text{K}^+$  depletion in live cells and  $\text{K}^+$  efflux and reuptake in cultured neurons. GINKO1, in conjunction with red fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, enabled dual-color imaging of  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in neurons and glial cells. These results demonstrated that KIRIN1 and GINKO1 were useful tools for imaging intracellular  $\text{K}^+$  dynamics.

The advent of Kbp-based  $\text{K}^+$  biosensors opened new avenues for investigation of cellular signaling associated with normal or abnormal  $\text{K}^+$  dynamics at the single-cell level or across large cell populations. As they were genetically encoded, these indicators were compatible with *in vivo* expression in animal models, either with viral vectors or through transgenic technology.



**Fig. 2** Kbp-based  $\text{K}^+$  biosensors. (Upper) Schematic representation of KIRIN1. (Bottom) Schematic representation of GINKO1.

2. (1)-7) *Commun. Biol.*, **2**, 18 (2019)

# 生体分子化学研究室

## 研究ハイライト

### (1) 近赤外蛍光 $\text{Ca}^{2+}$ センサー

本研究では、近赤外 (NIR) 領域に蛍光を発する遺伝子コード型カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 指示薬 (GECI) について報告した。この GECI は励起極大波長が 678 nm, 発光極大波長が 704 nm である。この GECI は NIR-GECO1 と名付けられ、哺乳類の培養細胞や脳組織における  $\text{Ca}^{2+}$  の一過の上昇を、現在市販されている可視波長の GECI と同等の感度でイメージングすることができた。また NIR-GECO1 は、他の光遺伝学的インジケーターやアクチュエーターと組み合わせることで、多波長での  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングに新たな道を開くことができた。

具体的には、NIR-GECO1 は培養細胞、初代培養神経細胞、急性脳切片において、既存 GECI である GCaMP3 とほぼ同等の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化に対する反応を示した。さらに NIR-GECO1 は励起波長の極大値が赤色側にシフトしていることから、青色光で作動する光遺伝学的アクチュエーターと組み合わせるのに適した  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬であった (イメージング中のアクチュエーターの起動を最小限に抑えられるため)。また蛍光タンパク質を用いた複数の蛍光強度変化型または FRET レシオ測定型の指示薬と組み合わせることで、多パラメータイメージングに多くの新しい可能性をもたらした。

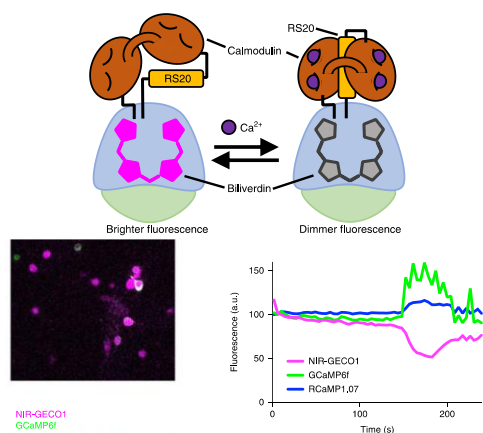


図 1 近赤外蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 NIR-GECO1。 (上) NIR-GECO-1 の構造模式図。 (左下) 赤および緑色の指示薬との同時イメージング。 (右下) 左図における神経細胞の自発発火の検出。

1. (1)-6) *Nat. Methods*, **16**, 171 (2019)

### (2) 遺伝子コード型カリウムイオン指示薬

カリウムイオン ( $\text{K}^{+}$ ) の恒常性と動的变化は、生命活動において重要な役割を果たしている。本研究で我々は、遺伝的にコードされた 3 つの  $\text{K}^{+}$  指示薬を開発した。KIRIN1 と KIRIN1-GR は、それぞれ mCerulean3/cp173Venus と Clover/mRuby2 の蛍光タンパク質 FRET ペアのために細菌の  $\text{K}^{+}$  結合タンパク質 (Kbp) を挿入した Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) 型の指示薬である。GINKO1 は、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) に Kbp を挿入して構築した単一蛍光タンパク質型の  $\text{K}^{+}$  指示薬である。これらのセンサーは *in vitro* および細胞内の生理的濃度の  $\text{K}^{+}$  を検出するのに適していた。KIRIN1 は、生細胞における細胞質  $\text{K}^{+}$  の枯渇、および培養神経細胞における  $\text{K}^{+}$  の流出と再取り込みのイメージングを可能にした。また GINKO1 は、赤色蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬と組み合わせることで、神経細胞やグリア細胞における  $\text{K}^{+}$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の動態を 2 色で可視化できた。これらの結果から、KIRIN1 および GINKO1 は、細胞内の  $\text{K}^{+}$  動態をイメージングする有用なツールであることが示された。

Kbp を基盤とする  $\text{K}^{+}$  バイオセンサーの登場は、正常または異常な  $\text{K}^{+}$  動態に関連した細胞シグナルを単一細胞レベル、あるいは大規模な細胞集団で調査するための新たな道を開いた。これらのバイオセンサーは、ウイルスベクターやトランスジェニック技術を用いて動物モデルで *in vivo* 発現させることもできる。

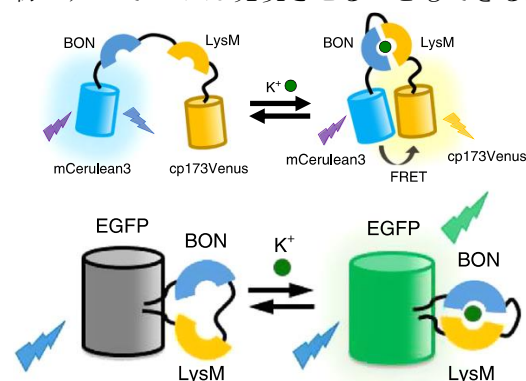


図 2. Kbp に基づく  $\text{K}^{+}$  バイオセンサー (上) KIRIN1 の模式図 (下) GINKO1 の模式図

2. (1)-7) *Commun. Biol.*, **2**, 18 (2019)

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) Y.(Yufeng) Zhao, W. Zhang, Y.(Yongxin) Zhao, R.E. Campbell, and D.J. Harrison\*, “Microfluidic cell sorter for multiparameter screening in directed evolution”, *Lab Chip*, **19**, 3880-3887 (2019).
- 2) C.J Robidillo, S. Wandelt, R. Dalangin, L. Zhang, H. Yu, A. Meldrum, R.E. Campbell, and J.G.C. Veinot\*, “Ratiometric Detection of Nerve Agents by Coupling Complementary Properties of Silicon-Based Quantum Dots and Green Fluorescent Protein”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11**, 33478-33488 (2019).
- 3) Y. Adam, J.J. Kim, S. Lou, Y. Zhao, M.E. Xie, D. Brinks, H. Wu, M.A. Mostajo-Radji, S. Kheifets, V. Parot, S. Chettih, K.J. Williams, B. Gmeiner, S.L. Farhi, L. Madisen, E.K. Buchanan, I. Kinsella, D. Zhou, L. Paninski, C.D. Harvey, H. Zeng, P. Arlotta, R.E. Campbell and A.E. Cohen\*, “Voltage imaging and optogenetics reveal behaviour-dependent changes in hippocampal dynamics”, *Nature*, **569**, 413–417 (2019).
- 4) R. Molina, Y. Qian, J. Wu, Y. Shen, R.E. Campbell, T. Hughes, and M. Drobizhev, “Understanding the Fluorescence Change in Red Genetically Encoded Calcium Ion Indicators”, *Biophys. J.*, **116**, 1873–1886 (2019).
- 5) S.L. Farhi, V. Parot, A. Grama, M. Yamagata, A.S. Abdelfattah, Y. Adam, S. Lou, J.J. Kim, R.E. Campbell, D.D. Cox, and A.E. Cohen\*, “Wide-area all-optical neurophysiology in acute brain slices”, *J. Neurosci.* **39**, 4889–4908 (2019).
- 6) Y. Qian (equal contribution), K.D. Piatkevich (equal contribution), B. McLarney (equal contribution), A.S. Abdelfattah, S. Mehta, M.H. Murdock, S. Gottschalk, R.S. Molina, W. Zhang, Y. Chen, J. Wu, M. Drobizhev, T.E. Hughes, J. Zhang, E.R. Schreiter, S. Shoham, D. Razansky, E.S. Boyden, and R.E. Campbell\*, “A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator”, *Nat. Methods*, **16**, 171–174 (2019).
- 7) Y. Shen, S-Y. Wu, V. Rancic, A. Aggarwal, Y. Qian, S.-I. Miyashita, K. Ballanyi, R.E. Campbell\*, and M. Dong\*, “Genetically encoded fluorescent indicators for imaging intracellular potassium ions”, *Commun. Biol.*, **2**, 18 (2019).
- 8) Y. Qian, V. Rancic, J. Wu, K. Ballanyi, and R.E. Campbell\*, “A bioluminescent Ca<sup>2+</sup> indicator based on a topological variant of GCaMP6s”, *ChemBioChem*, **20**, 516-520 (2019).

### (2) その他

## 2. 総説・解説

## 3. 著書

- 1) W. Zhang and R.E. Campbell\*, “Optogenetic Reporters for Cell Biology and Neuroscience” in “*Optogenetics: Light-driven Actuators and Light-emitting Sensors in Cell Biology*”, edited by S. Vriz and T. Ozawa (Royal Society of Chemistry, 2019), pp. 63 – 98.

## 4. その他