

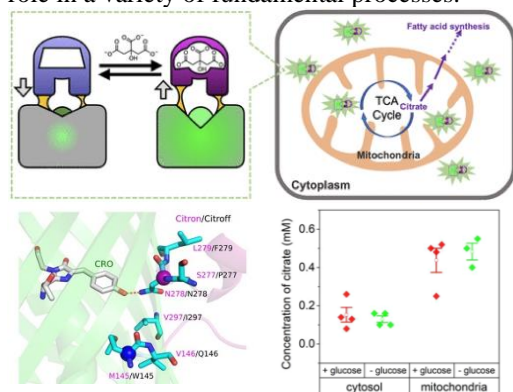
# BIOMOLECULAR CHEMISTRY

## Annual Research Highlights

### (1) “High performance citrate indicators”

Motivated by the growing recognition of citrate as a central metabolite in a variety of biological processes associated with healthy and diseased cellular states, we have developed a series of high-performance genetically encoded citrate biosensors suitable for imaging of citrate concentrations in mammalian cells. The design of these biosensors was guided by structural studies of the citrate-responsive sensor histidine kinase and took advantage of the same conformational changes proposed to propagate from the binding domain to the catalytic domain. Following extensive engineering based on a combination of structure guided mutagenesis and directed evolution, we produced an inverse-response biosensor ( $\Delta F/F_{\min} \approx 18$ ) designated Citroff1 and a direct-response biosensor ( $\Delta F/F_{\min} \approx 9$ ) designated Citron1. We report the X-ray crystal structure of Citron1 and demonstrate the utility of both biosensors for qualitative and quantitative imaging of steady-state and pharmacologically perturbed citrate concentrations in live cells.

In summary, we expect these high-performance citrate biosensors will see widespread adoption for use in tracking the metabolism of various types of cells for biochemical and pharmacological studies conducted either *in vitro* and *in vivo*. Both abnormally low and abnormally high concentrations of citrate have been reported to be key characteristics of diseased cell types and to play a role in a variety of fundamental processes.



**Fig. 1** High performance citrate indicators.

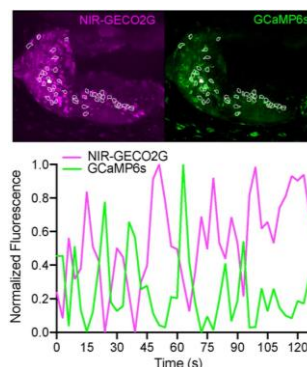
(Upper) Schematic representation of Citron and its use in mitochondria. (Bottom left) X-ray structure of the chromophore environment. (Bottom right) Measurement of intracellular citrate concentration.

(1)-2) *ACS Cent. Sci.*, **6**, 1441 (2020)

### (2) “Improved genetically encoded near-infrared calcium ion indicators”

Near-infrared (NIR) genetically encoded calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) indicators (GECIs) can provide advantages over visible wavelength fluorescent GECIs in terms of reduced phototoxicity, minimal spectral cross talk with visible light excitable optogenetic tools and fluorescent probes, and decreased scattering and absorption in mammalian tissues. Our previously reported NIR GECI, NIR-GECO1, has these advantages but also has several disadvantages including lower brightness and limited fluorescence response compared to state-of-the-art visible wavelength GECIs, when used for imaging of neuronal activity. Here, we report 2 improved NIR GECI variants, designated NIR-GECO2 and NIR-GECO2G, derived from NIR-GECO1. We characterized the performance of the new NIR GECIs in cultured cells, acute mouse brain slices, and *Caenorhabditis elegans* and *Xenopus laevis* *in vivo*. Our results demonstrate that NIR-GECO2 and NIR-GECO2G provide substantial improvements over NIR-GECO1 for imaging of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics.

Even with the improvements described in this work, NIR GECIs still face challenges including lower brightness, slower kinetics, and faster photobleaching compared to the state-of-art green and red fluorescent GECIs. For these reasons, it remains challenging to use NIR-GECO2 and NIR-GECO2G to image  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics with single-cell resolution in rodents where neuronal BV concentrations are low.



**Fig. 2** Imaging of NIR-GECO2G in the olfactory bulb of *Xenopus laevis*.

(Upper) Images of the olfactory bulb expressing both NIR-GECO2G and GCaMP6S. (Bottom) Spontaneous activity from one cell in the olfactory bulb.

(1)-1) *PLoS Biol* **18**, e3000965 (2020)

# 生体分子化学研究室

## 研究ハイライト

### (1) 高性能クエン酸センサーの開発

近年、クエン酸が細胞の健康状態に関連する様々な生物学的プロセスの中心的な代謝物であるという認識が高まっている。こうした背景を受け、我々は、哺乳類細胞内のクエン酸濃度のイメージングに適した、高性能な遺伝子コード型クエン酸バイオセンサーを開発した。これらのバイオセンサーは、クエン酸応答性センサーであるヒスチジンキナーゼの構造研究に基づいて設計されており、同酵素の結合ドメインと触媒ドメインとの間で起こると提案されている立体構造変化を利用して、立体構造に基づく変異導入と指向性進化を組み合わせた大規模なタンパク質工学により開発した逆反応型バイオセンサー ( $\Delta F/F_{\min} \approx 18$ ) を Citroff1、順反応型バイオセンサー ( $\Delta F/F_{\min} \approx 9$ ) を Citron1 と名付けた。また citron1 の X 線結晶構造を報告するとともに、生細胞中の定常状態および薬理的に変化させたクエン酸濃度の定性的・定量的な蛍光イメージングを通じて両バイオセンサーの有用性を示した。

これらの高性能クエン酸バイオセンサーは、*in vitro* および *in vivo* で行われる生化学および薬理学研究のために、さまざまな種類の細胞の代謝を追跡する目的で広く採用されることが期待される。

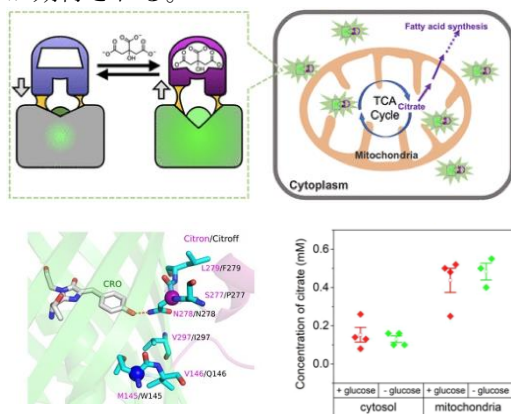


図 1. 高性能クエン酸センサー

(上) Citron の模式図およびミトコンドリアでの利用。(左下) 発色団近傍の X 線構造。(右下) 細胞内クエン酸濃度の測定。

(1)-2) *ACS Cent. Sci.*, **6**, 1441 (2020)

### (2) 遺伝子コード型近赤外カルシウム指示薬の改良

近赤外光 (NIR) を用いた遺伝子コード型カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 蛍光指示薬 (GECI) は、可視光を用いた GECI と比較して、光毒性の低減、可視光で励起可能な光遺伝学ツールや蛍光プローブとの干渉の最小化、哺乳類組織での散乱・吸収の低減などの利点がある。我々が以前に報告した NIR GECI である NIR-GECO1 はこれらの利点を持つ一方で、神経活動のイメージングに使用する場合、最先端の可視光 GECI に比べて輝度が低く、蛍光応答が小さいという欠点があった。そこで本研究では、NIR-GECO1 から派生した 2 つの改良型 NIR GECI (NIR-GECO2 および NIR-GECO2G と命名) を報告した。我々は、培養細胞、マウスの急性脳切片、さらに線虫とアフリカツメガエルの生体内でこれらの性能を評価した。その結果、NIR-GECO2 と NIR-GECO2G は、神経細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにおいて NIR-GECO1 よりも大幅に優れた結果を与えた。

ただし、今回の研究での改善を考慮しても、NIR GECI は最先端の緑や赤の蛍光 GECI に比べて輝度が低い、反応速度が遅い、光退色が速いなどの課題を抱えている。これらの理由から、神経細胞のビリベルジン濃度が低いげっ歯類では、NIR-GECO2 や NIR-GECO2G を用いて単一細胞の解像度で  $\text{Ca}^{2+}$  動態を可視化することは未だ困難である。

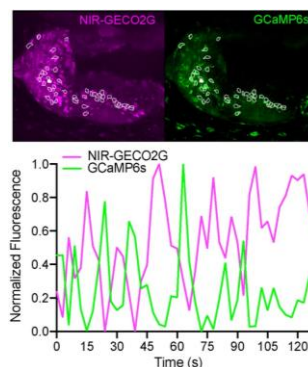


図 2. NIR-GECO2G によるアフリカツメガエル嗅球のイメージング

(上) NIR-GECO2G および GCaMP6S を共発現させた嗅球の画像。(下) 単一嗅球細胞の自発的活性化

(1)-1) *PLoS Biol* **18**, e3000965 (2020)

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) Y. Qian, D.M.O. Cosio, K.D. Piatkevich, S. Aufmkolk, W.-C. Su, O.T. Celiker, A. Schohl, M.H. Murdock, A. Aggarwal, Y.-F. Chang, P.W. Wiseman, E.S. Ruthazer, E.S. Boyden, and R.E. Campbell\*, “Improved genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicators for in vivo imaging”, *PLoS Biol.*, **18**, e3000965 (2020).
- 2) Y. Zhao, Y. Wen\*, Y. Shen, and R.E. Campbell\*, “High performance intensimetric direct- and inverse-response genetically encoded biosensors for citrate”, *ACS Cent. Sci.*, **6**, 1441–1450 (2020).
- 3) L. Zarowny (equal contribution), A. Aggarwal (equal contribution), V. Rutten, I. Kolb, The GENIE Project, R. Patel, H.-Y. Huang, Y.-F. Chang, T. Phan, R. Kanyo, M. Ahrens, W. T. Allison, K. Podgorski, and R.E. Campbell\*, “A bright and high-performance genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicator based on mNeonGreen fluorescent protein”, *ACS Sensors*, **5**, 1959–1968 (2020).

### (2) その他

- 1) X. Lu, Y. Wen, S. Zhang, W. Zhang, Y. Chen, Y. Shen, M.J. Lemieux, and R.E. Campbell\*, “Improved Photocleavable Proteins with Faster and More Efficient Dissociation”. *bioRxiv* 2020.12.10.419556; DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.12.10.419556>.
- 2) R. Dalangin, M. Drobizhev, R.S. Molina, A. Aggarwal, R. Patel, A.S. Abdelfattah, Y. Zhao, J. Wu, K. Podgorski, E.R. Schreiter, T.E. Hughes, R.E. Campbell\*, and Y. Shen\*, “Far-red fluorescent genetically encoded calcium ion indicators”. *bioRxiv* 2020.11.12.380089; DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.11.12.380089>.
- 3) V. Gielen, V. Mönkemöller, Y. Shen, J. Hofkens, P. Vanden Berghe, R.E. Campbell, B. Moeyaert, and P. Dedecker\*, “Absolute measurement of cellular activities using photochromic single-fluorophore biosensors”. *bioRxiv* 2020.10.29.360214; DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.10.29.360214>.

## 2. 総説・解説

- 1) X. Lu, Y. Shen, and R.E. Campbell\*, “Engineering photosensory modules of non-opsin-based optogenetic actuators”, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6522 (2020).
- 2) R. Dalangin, A. Kim, and R.E. Campbell\*, “The role of amino acids in neurotransmission and fluorescent tools for their detection”, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6197 (2020).
- 3) Y. Shen, R.E. Campbell, D. Côté and M.-E. Paquet\*, “Challenges for therapeutic applications of opsin-based optogenetic tools in humans”, *Front. Neural Circuits*, **14**, 41 (2020).

## 3. 著書

## 4. その他