

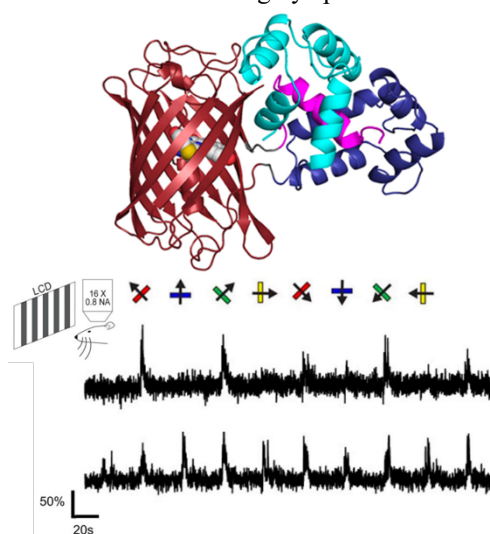
# BIOMOLECULAR CHEMISTRY

## Annual Research Highlights

(1) “Red fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator”  
(1)-7) Y. Shen, et al. *BMC Biol.*, **16**, 9 (2018))

Genetically encoded calcium ion (Ca<sup>2+</sup>) indicators (GECIs) are indispensable tools for measuring Ca<sup>2+</sup> dynamics and neuronal activities *in vitro* and *in vivo*. Red fluorescent protein (RFP)-based GECIs have inherent advantages relative to green fluorescent protein (GFP)-based GECIs due to the longer wavelength light used for excitation. Longer wavelength light is associated with decreased phototoxicity and deeper penetration through tissue. Red GECI can also enable multicolor visualization with blue- or cyan-excitable fluorophores. In this study, we reported the development, structure, and validation of a new RFP-based GECI, K-GECO1, based on a circularly permuted RFP derived from the sea anemone *Entacmaea quadricolor*. We have characterized the performance of K-GECO1 in cultured HeLa cells, dissociated neurons, stem-cell-derived cardiomyocytes, organotypic brain slices, zebrafish spinal cord *in vivo*, and mouse brain *in vivo*.

K-GECO1 is the archetype of a new lineage of GECIs based on the RFP eqFP578 scaffold. It offers high sensitivity and fast kinetics, similar or better than those of current state-of-the-art indicators, with diminished lysosomal accumulation and minimal blue-light photoactivation. Further refinements of the K-GECO1 lineage could lead to further improved variants with overall performance that exceeds that of the most highly optimized red GECIs.

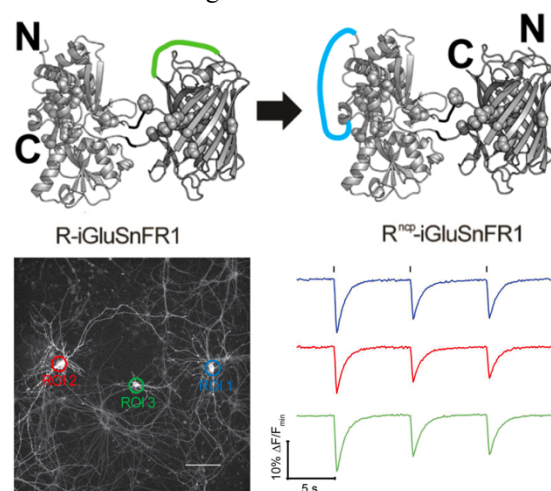


**Fig. 1** Red fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator, K-GECO1.  
(Upper) crystal structure of K-GECO1.  
(Bottom) *in vivo* imaging of living mouse neurons.

(2) “Red fluorescent glutamate indicator with altered topology”  
(1)-6) J. Wu, et al. *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1832 (2018))

Glutamate is one of the 20 common amino acids and of utmost importance for chemically mediated synaptic transmission in nervous systems. Red fluorescent protein (RFP)-based glutamate indicators have advantageous over green fluorescent protein (GFP)-based glutamate indicators due to the longer wavelength light used for excitation. To expand the color palette of genetically encoded indicators for glutamate, we used protein engineering to develop a red intensity-based glutamate-sensing fluorescent reporter (R-iGluSnFR1). Manipulating the topology of R-iGluSnFR1 led to the development of non-circularly permuted (ncp) variant, R<sup>ncp</sup>-iGluSnFR1. We demonstrate that these glutamate indicators are functional when targeted to the surface of HEK293 cells. Furthermore, we show that R-iGluSnFR can reliably resolve action potential-evoked glutamate transients by electrical field stimuli in cultures of dissociated hippocampal neurons.

In conclusion, we have engineered a single RFP-based glutamate indicator, R-iGluSnFR1, and a topological variant, R<sup>ncp</sup>-iGluSnFR1. These new red glutamate indicators will create new opportunities for multicolor and multianalyte imaging in combination with green fluorescent indicators.



**Fig. 2** Red fluorescent glutamate indicator, R<sup>ncp</sup>-iGluSnFR1.  
(Upper) Schematic figure of R- and R<sup>ncp</sup>-iGluSnFR1.  
(Bottom) Glutamate imaging in cultured rat hippocampal neurons using R<sup>ncp</sup>-iGluSnFR1.

# 生体分子化学研究室

## 研究ハイライト

### (1) 赤色蛍光 $\text{Ca}^{2+}$ センサー

((1)-7) Y. Shen, et al. *BMC Biol.*, **16**, 9 (2018))

遺伝コード型カルシウムイオン指示薬 (Genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, GECI) は  $\text{Ca}^{2+}$  の動態や神経活動を *in vitro* および *in vivo* で測定するためになくてはならないツールである。長波長の光は短波長の光に比べて光毒性や組織透過性の点で優れていることから、赤色蛍光タンパク質 (red fluorescent protein, RFP) を使った GECI は、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) を使った GECI と比べて励起光が長波長であることが強みである。赤色 GECI はまた、青色やシアン色の蛍光団と共に使うことでマルチカラーイメージングが可能である。本研究では、新規赤色 GECI である K-GECO1 の開発方法、構造情報及びその性能実証について報告した。

K-GECO1 は高い感度、速い反応速度を有し、これまでの赤色 GECI で報告されていたリソソーム中での蓄積や青色光による活性化という欠点を克服している。我々は、K-GECO1 が培養細胞、初代培養神経細胞、幹細胞由来心筋細胞、脳スライス、ゼブラフィッシュ脊髄及びマウス脳での性能を発揮することを確認した。

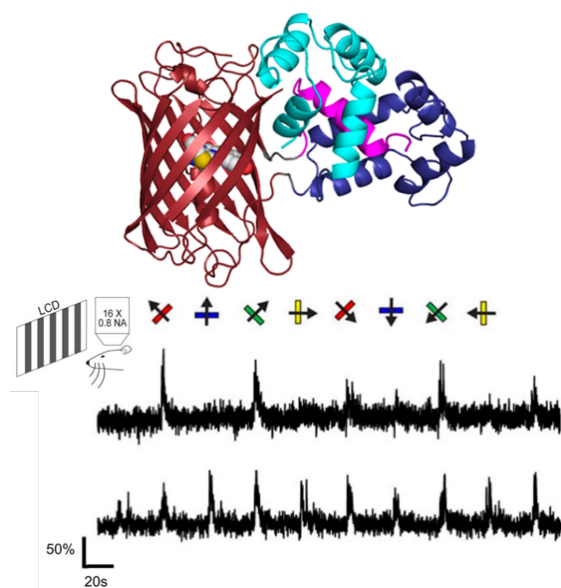


図 1. 赤色蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサー K-GECO1.

(上) K-GECO1 の結晶構造.

(下) マウス *in vivo* イメージング.

### (2) トポロジー改変型赤色蛍光グルタミン酸センサー

((1)-6) J. Wu, et al. *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1832 (2018))

グルタミン酸は 20 種類の天然アミノ酸の一種であり、シナプス伝達で働く重要な神経伝達物質である。より長波長の励起光を用いる点において、RFP を使ったグルタミン酸センサーは、GFP を使ったそれと比べて強みがある。これまでに GFP を用いた緑色グルタミン酸センサーが報告されていたが、本研究ではタンパク質工学技術により円順列変異体 (circularly permuted, cp) RFP を用いた赤色グルタミン酸センサー R-iGluSnFR1 を開発した。さらに、R-iGluSnFR1 のトポロジーを改変して、円順列ではない通常の RFP を用いた赤色グルタミン酸センサー  $\text{R}^{\text{ncp}}$ -iGluSnFR1 を開発することにも成功した。

我々は R-iGluSnFR1 が摘出したラット海馬神経中で活動電位依存的なグルタミン酸濃度変化を検出可能であることを示した。本研究で開発された赤色グルタミン酸センサーを用いることで、緑色センサー (例えば神経活動をモニターする緑色 GECI) との併用が可能になる。

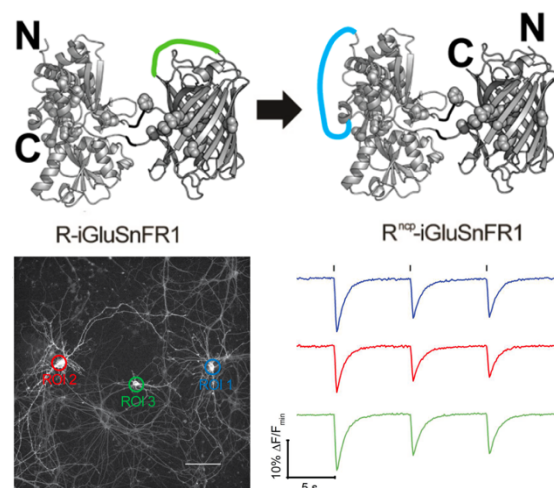


図 2. 赤色蛍光グルタミン酸センサー R-iGluSnFR1 及び  $\text{R}^{\text{ncp}}$ -iGluSnFR1.

(上) R- 及び  $\text{R}^{\text{ncp}}$ -iGluSnFR1 の模式図.

(下) ラット海馬神経におけるグルタミン酸イメージング.

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) R.K.W. Chee, Y. Li, W. Zhang, R.E. Campbell, and R.J. Zemp\*, “In vivo photoacoustic difference-spectra imaging of bacteria using photoswitchable chromoproteins”, *J. Biomed. Opt.*, **23**, 106006 (2018).
- 2) T.M. Wannier\*, S.K. Gillespie, N. Hutchins, R.S. McIsaac, S-Y. Wu, Y. Shen, R.E. Campbell, K.S. Brown, and S.L. Mayo\*, “Monomerization of far-red fluorescent proteins”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **115**, E11294–11301 (2018).
- 3) Y. (Yufeng) Zhao, D. Bushey, Y. (Yongxin) Zhao, E.R. Schreiter, D.J. Harrison, A.M. Wong\*, and R.E. Campbell\*, “Inverse-response Ca<sup>2+</sup> indicators for optogenetic visualization of inhibitory synapse activity”, *Sci. Rep.*, **8**, 11758 (2018).
- 4) M.D. Wiens, F. Hoffmann, Y. Chen, and R.E. Campbell\*, “Enhancing fluorescent protein photostability through robot assisted photobleaching”, *Integr. Biol.*, **10**, 419–428 (2018).
- 5) Aggarwal\*, L. Zarowny, and R.E. Campbell, “Auto Sequencer: A DNA Sequence Alignment and Assembly Tool”, *Spectrum*, **1**, 1–12 (2018).
- 6) J. Wu, A.S. Abdelfattah, H. Zhou, A. Ruangkittisakul, Y. Qian, K. Ballanyi and R.E. Campbell\*, “Genetically Encoded Glutamate Indicators with Altered Color and Topology”, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1832–1837 (2018).
- 7) Y. Shen, H. Dana, A.S. Abdelfattah, R. Patel, J. Shea, R.S. Molina, B. Rawal, V. Rancic, Y.-F. Chang, L. Wu, Y. Chen, Y. Qian, M.D. Wiens, N. Hambleton, K. Ballanyi, T.E. Hughes, M. Drobizhev, D.S. Kim, M. Koyama, E.R. Schreiter, and R.E. Campbell\*, “A genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicator based on circularly permuted sea anemone red fluorescent protein eqFP578”, *BMC Biol.*, **16**, 9 (2018). Preprint posted to bioRxiv doi.org/10.1101/213082.
- 8) M.D. Wiens and R.E. Campbell\*, “Surveying the landscape of optogenetic methods for detection of protein-protein interactions”, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **10**, e1415 (2018).

## 2. 総説・解説

- 1) Y. Nasu and R.E. Campbell\*, “Unnaturally aglow with a bright inner light”, *Science*, **359**, 868–869 (2018).