

# BIOMOLECULAR CHEMISTRY LABORATORY

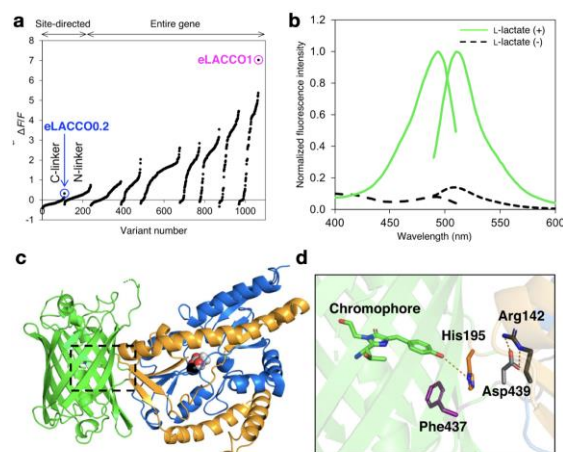
## Annual Research Highlights

### (1) “A genetically encoded fluorescent biosensor for extracellular L-lactate”

L-Lactate, traditionally considered a metabolic waste product, is increasingly recognized as an important intercellular energy currency in mammals. Investigations of intercellular L-lactate shuttles would be facilitated by a genetically encoded fluorescent biosensor that could enable high resolution spatially and temporally resolved imaging of the extracellular L-lactate concentration. Despite remarkable progress in biosensor technology, including the development of ones for intracellular L-lactate, no biosensors for extracellular L-lactate have previously been reported.

In this article we reported the development of the first genetically encoded fluorescent biosensor for extracellular L-lactate. This biosensor, designated eLACCO1.1, is the end-product of extensive directed evolution and structure-based mutagenesis followed by optimization of biosensor expression and localization on the cell surface.

Our results demonstrate that eLACCO1.1 enables cellular resolution imaging of extracellular L-lactate in cultured mammalian cells and brain tissue. We anticipate that eLACCO1.1, and its further improved variants, will be important tools for investigations of intercellular L-lactate shuttles.



**Fig. 1** A biosensor for extracellular L-lactate.

(a) The directed evolution process that led to eLACCO1.1. Additional optimization produced eLACCO1.1. (b) Fluorescence spectra of eLACCO1 +/- lactate. (c) X-ray crystal structure of eLACCO1 (PDB: 7E9Y). (d) A zoom-in view of the chromophore region, suggesting a critical role for His195 in the fluorescence response mechanism.

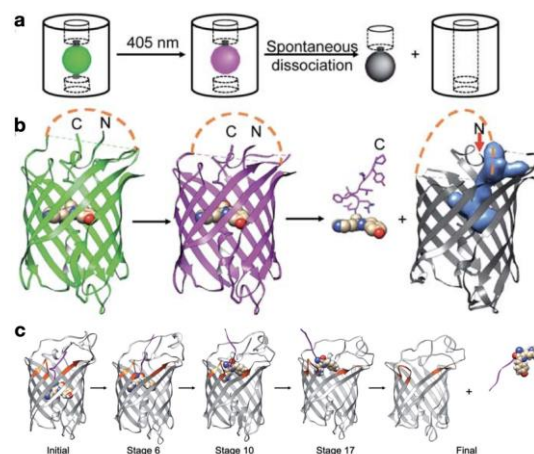
(1)-5) *Nat. Commun.* **12**, 7058 (2021)

### (2) “Photocleavable proteins that undergo fast and efficient dissociation”

Photocleavable molecules can enable the light-dependent modulation of biomolecular activities with high spatiotemporal precision. We previously reported a photocleavable protein (PhoCI1) that, uniquely, is a fully genetically encoded photocleavable molecule that can be introduced into cells in the form of its corresponding gene to enable optogenetic control of biomolecular activities. However, the first generation PhoCI1 exhibited a relatively slow rate of dissociation, potentially limiting its utility.

In this article we reported the X-ray crystal structures of the PhoCI1 green state, red state, and cleaved empty barrel. Molecular dynamics (MD) simulations were performed to provide insight into the precise dissociation mechanism. Using structure-guided engineering and directed evolution, we developed PhoCI2c with higher contrast ratio and PhoCI2f with faster dissociation. We characterized the performance of these new variants as purified proteins and in cultured cells.

Our results demonstrate that PhoCI2 variants exhibit faster and more efficient dissociation, which should enable improved optogenetic manipulations of protein localization and protein-protein interactions in living cells.



**Fig. 2** PhoCI2, an improved photocleavable protein.

(a) Schematic representation of photocleavage and dissociation. (b) X-ray crystal structures of the structures (except the small peptide) represent in (a). (c) Snapshots from a molecular dynamics simulation of the PhoCI2 dissociation process.

(1)-3) *Chem. Sci.* **12**, 9658 (2021)

# 生体分子化学研究室

## 研究ハイライト

### (1) 細胞外乳酸の蛍光バイオセンサー開発

乳酸 (L-lactate) は従来、単なる代謝廃棄物と考えられていたが、近年哺乳類における重要な細胞間エネルギー通貨として認識されつつある。遺伝子コード型の蛍光バイオセンサーによって、細胞外の乳酸濃度の時空間的な高解像度イメージングが可能になれば、乳酸の細胞間輸送の研究は大きく進展すると期待される。しかし、細胞内の乳酸に対するバイオセンサーは開発されている一方で、細胞外乳酸を検出するバイオセンサーはこれまで報告されていない。

本研究で、我々は世界で初めて細胞外乳酸に対する遺伝子コード型蛍光バイオセンサーを開発した。eLACCO1.1 と名付けられたこのバイオセンサーは、広範囲な指向性進化と立体構造に基づく変異導入、そしてバイオセンサータンパク質の発現および細胞表面への局在を最適化する事によって完成した。

我々はさらに、eLACCO1.1 が哺乳類培養細胞および脳組織における細胞外乳酸の 1 細胞レベルでのイメージングを可能にすることも実証した。eLACCO1.1 およびその改良型は、細胞間での乳酸輸送の研究において重要なツールとなることが期待される。

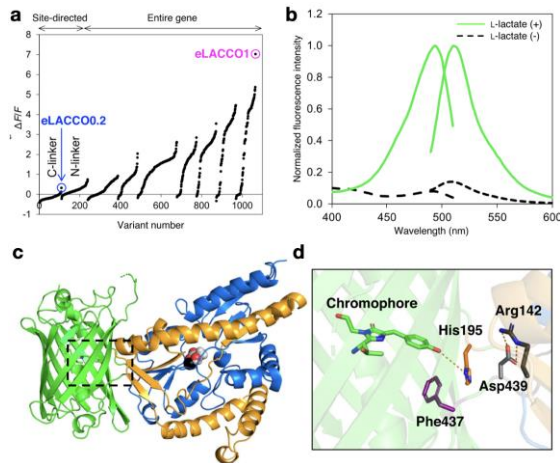


図 1. 細胞外乳酸バイオセンサー

(a) eLACCO1 に至る指向性進化。(b) eLACCO1 の励起・蛍光スペクトル。(c) eLACCO1 の X 線結晶構造 (PDB: 7E9Y)。(d) 発色団近傍の拡大図。

(1)-5) *Nat. Commun.* **12**, 7058 (2021)

### (2) 光開裂タンパク質の改良

光切断性分子は、光照射によって生体分子の活動を高い時空間精度で調節することを可能にする。我々は以前、光を当てると緑色から赤色を経てペプチド結合が切断する光開裂タンパク質 (PhoCl1) を報告した。このタンパク質は完全に遺伝的にコードされた独自の光切断性分子であり、対応する遺伝子の形で細胞に導入することにより、生体分子の活動を光遺伝的に制御することが可能であった。しかし第一世代の PhoCl1 は解離速度が比較的遅く、その有用性が不十分な場合もあった。

本論文では、PhoCl1 の緑色状態、赤色状態、および開裂後の空筒の X 線結晶構造を報告した。また、分子動力学 (MD) シミュレーションを行って正確な解離機構を明らかにした。さらに立体構造に基づくタンパク質工学と指向性進化を用いて、より解離効率の高い PhoCl2c と解離速度の速い PhoCl2f を開発した。またこれらの新しい変異体の精製タンパク質としての性能と培養細胞での性能を評価した。

その結果、PhoCl2 変異体がより速く、より効率的に解離することが明らかとなった。これらは生細胞でのタンパク質局在やタンパク質間相互作用の光遺伝学的操作性を向上させると期待される。

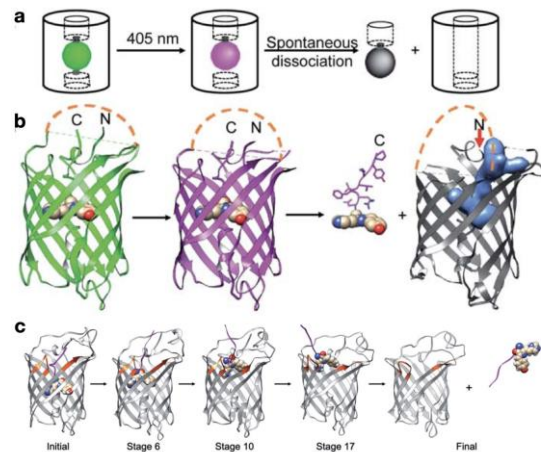


図 2. 改良型光開裂タンパク質 PhoCl2

(a) 光切断と解離の模式図。(b) (a)に対応する各 X 線結晶構造解析 (小ペプチドを除く)。(c) PhoCl2 の解離過程の動力学計算。

(1)-3) *Chem. Sci.* **12**, 9658 (2021)

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) L. Tang, S. Zhang, Y. Zhao, N. D. Rozanov, L. Zhu, J. Wu, R.E. Campbell, and C. Fang, “Switching between Ultrafast Pathways Enables a Green-Red Emission Ratiometric Fluorescent-Protein-Based Ca<sup>2+</sup> Biosensor”, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 445 (2021).
- 2) Y. Zhang, C. Fang, S. Zhang, R.E. Campbell and M. Serpe, “Controlled Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using Dexamethasone-Loaded Light-Responsive Microgels”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13**, 7051–7059 (2021).
- 3) X. Lu, Y. Wen, S. Zhang, W. Zhang, Y. Chen, Y. Shen, M.J. Lemieux, and R.E. Campbell, “Photocleavable proteins that undergo fast and efficient dissociation”. *Chem. Sci.*, **12**, 9658-9672 (2021).
- 4) S.S. Khan, Y. Shen, M.Q. Fatmi, R.E. Campbell, and H. Bokhari, “Design and prototyping of genetically encoded arsenic biosensors based on transcriptional regulator AfArsR”, *Biomolecules*, **11**, 1276 (2021).
- 5) Y. Nasu, C. Murphy-Royal, Y. Wen, J. Haidey, M.R.S. Molina, A. Aggarwal, S. Zhang, Y. Kamijo, M.-E. Paquet, K. Podgorski, M. Drobizhev, J.S. Bains, M.J. Lemieux, G.R. Gordon, R.E. Campbell, “A genetically encoded fluorescent biosensor for extracellular L-lactate”, *Nat. Commun.*, **12**, 7058 (2021).

### (2) その他

- 1) S-Y. Wu, Y. Wen, N.B.C. Serre, C.C.H. Laursen, A.G. Dietz, B.R. Taylor, A. Aggarwal, V. Rancic, M. Becker, K. Ballanyi, K. Podgorski, H. Hirase, M. Nedergaard, M. Fendrych, M.J. Lemieux, D.F. Eberl, A.R. Kay, R.E. Campbell\*, and Y. Shen, “A sensitive and specific genetically encodable biosensor for potassium ions”, *bioRxiv* 2021.10.07.463410.

## 2. 総説・解説

- 1) Y. Nasu, Y. Shen, L. Kramer, and R.E. Campbell\*, “Structure- and mechanism-guided design of single fluorescent protein-based biosensors”, *Nat. Chem. Biol.* **17**, 509–518 (2021).

## 3. 著書

## 4. その他