

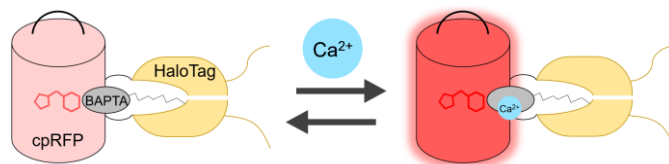
## 蛍光タンパク質と合成キレーターを組み合わせた赤色カルシウムセンサーの開発

(東大院理<sup>1</sup>・アルバータ大理<sup>2</sup>) ○今井 渉世<sup>1</sup>・朱 文超<sup>1</sup>・寺井 琢也<sup>1</sup>・Robert Earl Campbell<sup>1,2</sup>

A chemigenetic red fluorescent calcium ion indicator based on a fluorescent protein and a synthetic chelator (<sup>1</sup>*Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo*, <sup>2</sup>*Department of Chemistry, University of Alberta*) ○Shosei Imai,<sup>1</sup> Wenchao Zhu,<sup>1</sup> Takuya Terai,<sup>1</sup> Robert Earl Campbell,<sup>1,2</sup>

Fluorescent indicators, which detect ions or small molecules of interest, are generally categorized into small molecule-based indicators<sup>1)</sup> and genetically encoded indicators using fluorescent proteins (FPs)<sup>2)</sup>. Recently, we reported a chemigenetic calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sensor that combined a green FP, a HaloTag and a synthetic  $\text{Ca}^{2+}$  chelator<sup>3)</sup>. We expect that this design may overcome shortcomings of conventional sensors. In this study, a similar  $\text{Ca}^{2+}$  sensor based on a red FP (RFP) was developed to be used in conjunction with existing green sensors or optogenetic tools. In addition, its longer wavelength should have advantages for biological applications. We first screened the RFP-HaloTag structures and linker lengths of  $\text{Ca}^{2+}$  chelator to optimize the positional relation between the chromophore and the chelator. We then improved the sensor performance by introducing site-saturation and random mutations, and finally obtained a sensor which shows 3.5-fold fluorescence change upon  $\text{Ca}^{2+}$  binding *in vitro*.  
**Keywords :** *Fluorescent protein; Calcium ion; Chemigenetic indicator; HaloTag; Protein engineering*

生体内におけるイオンや分子を検出する蛍光センサーは、主に合成低分子を用いるもの<sup>1)</sup>と遺伝的にコードされた蛍光タンパク質を用いるもの<sup>2)</sup>の二つに分けられる。それらの利点を組み合わせてさらなるセンサー開発を推し進めるために、我々は緑色蛍光タンパク質と合成キレーター、タンパク質タグ(HaloTag)から構成される化学遺伝学  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを最近報告した<sup>3)</sup>。本研究では、長波長光を用いることでより生体応用に適したツールとし、また短波長光を使用する既存のセンサーや光遺伝学ツールとの併用も可能にするために、同様の設計で赤色蛍光タンパク質(RFP)に基づく化学遺伝学  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを開発した。複数の RFP に関して、発色団とキレーターの位置関係を最適化すべく、HaloTag の挿入箇所およびリガンドの長さに関するスクリーニングを行いセンサーの原型を作成した。その後、部位飽和変異とランダム変異の導入により性能の向上を試み、*in vitro* で 3.5 倍の蛍光変化を示すセンサーを開発した。



1) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, 59, 13734. 2) *Chem. Rev.* **2018**, 118, 11707. 3) *Nat. Chem. Biol.* **2023**, 19, 38.