

アゾベンゼンに結合する人工抗体の細胞内結合能評価と光スイッチング

(名工大工¹・名工大院工²・名大院工³・名大未来ナノ⁴) ○宮崎 友輝¹・田原 海²・吉川 優²・深谷 菜摘²・吉井 達之²・舟根 守³・村田 直哉³・藤野 公茂³・林 剛介³・村上 裕^{3,4}・築地 真也²

Intracellular binding and photoswitching properties of anti-azobenzene artificial antibodies (¹*Faculty of Engineering*, ²*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*, ³*Graduate School of Engineering*, ⁴*Institute of Nano-Life-Systems, Institute of Innovation for Future Society, Nagoya University*) ○Tomoki Miyazaki¹, Kai Tahara², Masaru Yoshikawa², Natsumi Fukaya², Tatsuyuki Yoshii², Mamoru Funane³, Naoya Murata³, Tomoshige Fujino³, Gosuke Hayashi³, Hiroshi Murakami^{3,4}, Shinya Tsukiji²

The chemo-optogenetic control of tag-fused proteins in living cells using photoresponsive small molecules and light is a powerful approach for cell biological research. However, most of the systems reported so far are irreversible. In this work, we aimed to generate a novel chemo-optogenetic system that enables the on/off switching of protein activity reversibly using two different wavelengths of light. To this end, we generated anticalin-based artificial antibodies that bind to the cis-form of azobenzene by using the TRAP display. By evaluating each clone's binding and photoswitching properties using HeLa cells, we successfully identified artificial antibody clones that show selective binding to the cis-form of azobenzene but not to its trans-form in cells.

Keywords: Artificial antibody, Azobenzene, Photoisomerization, Chemo-optogenetics, Protein dimerization

細胞内の生体分子の活性を光で操作する技術は、時空間分解能の高い細胞機能制御を可能にする強力なアプローチである。そのような手法の一つとして、遺伝子工学(主にタンパク質の融合)と光機能性合成小分子を組み合わせた「光化学遺伝学」が注目を集めている。例えばこれまでに、ケージドダイメライザーを用いたタンパク質の光誘導二量化システム^{1,2)}や、ケージド局在性リガンドによるタンパク質の光局在制御ツール³⁾などが報告されている。しかし、これらの手法は、タンパク質の素早い光活性化には適している一方、その活性を元に戻すのが困難である(可逆性がない)。そこで本研究では、可逆的な光化学遺伝学ツールの構築を目指し、二つの異なる波長に応答して結合と解離を制御可能な新規タンパク質-小分子ペアの開発に着手した。

我々はまず、可逆的な trans-cis 光異性化を示すアゾベンゼンに着目し、TRAP 提示法⁴⁾を用いることで、cis 型アゾベンゼンに特異的に結合するアンティカリン型人工抗体群を取得した(藤野ら、本年会にて発表)。本研究では、それら人工抗体群の細胞内における結合能評価を行なった。具体的には、HaloTag を介してアゾベンゼンを細胞膜内膜上に固定化することで、細胞質に発現させた人工抗体を光依存的に(cis 型アゾベンゼンへの結合を介して)細胞膜へリクルートする系を構築した。本アッセイ系を用いることで、細胞内で trans 型アゾベンゼンには結合せず、cis 型アゾベンゼンに高効率に結合する人工抗体クローンを見出すことに成功した。

1) N. Umeda et al., *JACS*, **2011**, 133, 12. 2) E. R. Ballister et al., *Nat. Commun.* **2014**, 5, 5475. 3) T. Yoshii et al., *ACS. Chem. Biol.*, **2021**, 16, 1557. 4) T. Ishizawa et al., *JACS*, **2013**, 135, 5433