

光操作のための小分子光スイッチ結合性人工抗体の創製

(名工大院工¹・名大院工²・名大未来ナノ³・東大院工⁴) ○宮崎 友輝¹・藤野 公茂²・吉井 達之¹・舟根 守²・村田 直哉²・キムグエン チュン²・田原 海¹・吉川 優¹・深谷 菜摘¹・長門石 暁⁴・津本 浩平⁴・林 剛介²・村上 裕^{2,3}・築地 真也¹

Artificial antibodies against a photo-switchable small molecule for optical cell manipulation (¹Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, ²Graduate School of Engineering, ³Institute of Nano-Life-Systems, Institute of Innovation for Future Society, Nagoya University, ⁴Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) ○Tomoki Miyazaki¹, Tomoshige Fujino², Tatsuyuki Yoshii¹, Mamoru Funane², Naoya Murata², Chung Nguyen Kim², Kai Tahara¹, Masaru Yoshikawa¹, Natsumi Fukaya¹, Satoru Nagatoishi⁴, Kouhei Tsumoto⁴, Gosuke Hayashi², Hiroshi Murakami^{2,3}, Shinya Tsukiji¹

Optical manipulation of tag-fused proteins using photo-functional synthetic molecules is a powerful approach for controlling cell functions. In this study, we developed a novel chemoptogenetic tool for cell manipulation based on an artificial antibody–photo-switchable small molecule pair. First, we generated artificial antibodies that bind to the *cis*-form of azobenzene using the TRAP display. The clone #16 showed high affinity and specificity to *cis*-azobenzene *in vitro* and in cells. By fusing clone #16 to signaling proteins, we successfully demonstrated photo-reversible control of cell signaling, such as the Raf/ERK pathway, and cell migration.

Keywords: *In vitro* selection, Artificial antibody, Azobenzene, Tag protein, Intracellular signal transduction

細胞内のシグナル分子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。その一つに、HaloTag や SNAP-tag に代表される「タグタンパク質」を用いた手法がある。これらのタグタンパク質は特定の小分子と特異的に結合するため、それら小分子の光機能化（ケージド化やフォトクロミック化など）によって二種類のタグタンパク質間の相互作用を光制御する光化学遺伝学が報告されている^{1,2)}。一方、従来のツールは既存の「タグタンパク質–小分子ペア」に依存しているため、その種類は少ない。また、小分子の光機能化にも構造的な限界がある。そこで我々は、“任意の光機能性小分子に結合する人工抗体タグを進化分子工学により創製する”という新しい方法論に基づいた光操作ツールの開発を目指した。

本研究では、光で結合の可逆的な ON/OFF 制御が可能な人工抗体タグ–小分子ペアの確立を目指し、*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の *in vitro* セレクションを行なった。人工抗体ライブラリの作成後、TRAP 提示法³⁾によるセレクションを行なった結果、アゾベンゼンの *trans* 型には結合を示さず、*cis* 型に特異的に結合を示す人工抗体クローンの取得に成功した ($K_d \approx 14$ nM)。この人工抗体は、動物細胞内に安定に発現でき、細胞内での光可逆的な結合と解離が可能であった。さらに、人工抗体に種々のシグナル分子を融合することで、脂質・キナーゼのシグナル活性や細胞運動の光可逆的な操作に成功した。

1) E. R. Ballister et al., *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 5475. 2) T. Mashita et al., *ChemBioChem.*, **2019**, 5, 1382.

3) T. Ishizawa et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 14, 5433.