

京都大学	博士 ( 工学 )	氏名	Vikram Thimaradka
論文題目	Development of chemical tools for covalent protein modification using metal-chelation assisted short peptide tag		
<p>This thesis describes the development of new chemical covalent protein modification methods by harnessing the interaction between six consecutive Histidine tag (H6 tag) and binuclear Ni(II) complex (<math>2\text{Ni}^{2+}</math>-NTA). The thesis consists of three chapters and key findings on each of them are described below.</p>			
<p><b>Chapter 1</b></p> <p>This chapter describes the design and development of new lysine based reactive short peptide tag (H6K or KH6)/<math>2\text{Ni}^{2+}</math>-NTA-NASA (<i>N</i>-acyl <i>N</i>-alkyl sulfonamide) probe pair for <i>in vitro</i> covalent protein modification. The method utilizes the proximity effect induced by the interaction of the <math>2\text{Ni}^{2+}</math>-NTA motif with the H6 tag on the peptide/protein to enable a rapid chemical reaction between <math>\epsilon</math>-amine of reactive Lys residue on the tag and electrophilic NASA reaction center. Initially, the optimal tag sequence suitable for the <math>2\text{Ni}^{2+}</math>-NTA-NASA probe was determined and the reaction time profile was characterized. Further, the method was used to covalently modify KH6 tag-fused enhanced green fluorescent protein (EGFP), and tag site specificity of the new labeling method was demonstrated. To demonstrate the general usefulness of this method to install variety of functional probes on protein of interest (POI), the reactive tag strategy was coupled with strain promoted copper-free click chemistry, which successfully installed a fluorescent dye on the POI. Finally, the method was applied to prepare a functional anti-delta-type glutamate receptor 2 (GluD2) nanobody-biotin conjugate for immunostaining of GluD2. This nanobody probe could be used to visualize GluD2 expressed on the surface of living cell membranes, demonstrating the applicability of this labeling method for protein engineering and functionalization.</p>			
<p><b>Chapter 2</b></p> <p>This chapter expands the new reactive tag method to label proteins in live cells and cultured neurons. To demonstrate the general applicability and tag site flexibility of this method, three membrane-bound proteins (KH6-epidermal growth factor receptor, internal-H6K tagged Neurexin-1<math>\beta</math> and H6K-Neurologin-1) were specifically labeled on live HEK293T cell surface by treatment with sub-<math>\mu\text{M}</math> <math>2\text{Ni}^{2+}</math>-NTA-NASA reagent. Further, specific labeling and imaging of GFP tagged H6K-Neurologin-1 on rat hippocampal neurons were revealed by CLSM protein imaging analysis. Finally, the applicant generated a H6K-Neurologin-1 knock-in mouse using clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 genome editing technology and demonstrated the labeling of endogenously expressed Neurologin-1 in knock-in mouse primary cultured neurons.</p>			

### **Chapter 3**

By harnessing the interaction of His tag with  $2\text{Ni}^{2+}$ -NTA, the applicant succeeded in the development of a new endogenous covalent protein modification strategy called metal-chelation assisted affinity guided oxime chemistry (AGOX). By introducing His tag recognition motif on the anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) single chain Fv (scFv) tethered pyridinium oxime catalyst, the applicant showed the efficient recruitment of NTA tethered acyl donor towards the ligand bound catalyst on membrane surface of live N87 cells. Compared to previously developed AGOX chemistry, the new approach indicated more than 20-fold efficient labeling of HER2 receptor and allowed the minimization of amount of acyl donor to as low as 30 nM. Finally, this new method was applied to specifically label endogenous HER2 receptor on live N87 cells cocultured with HEK293T cells, which demonstrated the efficient and selective labeling of endogenous receptor in live cells by chelation-mediated AGOX chemistry.

氏名	Vikram Thimaradka
----	-------------------

本論文は、オリゴヒスチジン配列(His-tag)とニッケル二核錯体(2Ni-NTA)プローブの特異的な相互作用を利用したタンパク質化学修飾法の開発と、それらに応用したタンパク質のイメージング解析を行った成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. リジン残基を含む短い His-tag (KH6 または H6K 配列) と *N-acyl-N-alkyl sulfonamide*(NASA)反応基を有する 2Ni-NTA 化合物を利用した新しいペプチドタグ-プローブペアを開発した。申請者は本反応系のアミノ酸選択性や速度論を明らかにするとともに、デルタ型グルタミン酸受容体 (GluD2) に対する低分子抗体を試験管内にて蛍光標識し、培養細胞系における GluD2 の可視化に成功した。
2. 上述の修飾反応を生細胞系へと展開し、膜タンパク質のイメージング解析を行った。KH6/H6K 配列を融合した膜タンパク質(Nlgn1, EGFR など)を HEK293T 細胞に一過的に発現させ、2NiNTA プローブによる標識を行ったところ、タグ融合タンパク質を特異的に蛍光イメージングできることがわかった。さらに、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて H6K-Nlgn1 ノックインマウスを作出し、内在的に発現している Nlgn1 のラベル化を実施した。その結果、初代培養神経細胞において Nlgn1 選択的な可視化に成功した。
3. 細胞表層に内在的に発現している膜受容体を特異的に標識する手法として、新たに「Metal chelation-assisted pyridinium oxime catalyst」を開発した。この手法では、His-tag とオキシム触媒を連結した低分子抗体 scFv と、2Ni-NTA にアシルイミダゾール反応基を導入したアシルドナーを使用する。His-tag と 2Ni-NTA 間の相互作用によって、アシルドナーが効率的に触媒と反応し、標的受容体への修飾反応が進行する。実際に本手法によって、ヒト胃癌由来 N87 細胞に内在的に発現する HER2 受容体や HEK293T 細胞に一過的に発現させた GluD2 の選択的ラベリングに成功した。

本論文は上記の通り、化学生物学研究における新規タンパク質修飾技術の開発に取り組んだものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和5年4月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。