

# 再構成型無細胞タンパク質合成系 (PUREflex®) を用いたタンパク質合成における N末端アミノ酸配列の影響



## Effect of N-terminal amino acid sequence on the protein synthesis using a reconstituted cell-free protein synthesis system (PUREflex®)

○ 金森 崇、布施(村上)朋重、松本 令奈 (ジーンフロンティア(株))

○ Takashi Kanamori, Tomoe Fuse-Murakami, Rena Matsumoto (GeneFrontier Corp.)

### Abstract

PUREflex®は、大腸菌でのタンパク質合成に必要な因子を精製し、混合した再構成型無細胞タンパク質合成系(PURE system)である。反応液の改良により、合成量は最大で1mg/mL以上に増大したが、合成するタンパク質によって大きく異なる。そこで、我々は目的タンパク質のアミノ酸配列や塩基配列が、タンパク質合成効率に与える影響についても検討を進めている。塩基配列については、N末端領域のコドンをATが多いコドンにすると合成量が増加することがわかっている。本発表では、目的タンパク質のN末端領域のアミノ酸配列が、タンパク質合成に与える影響について報告する。

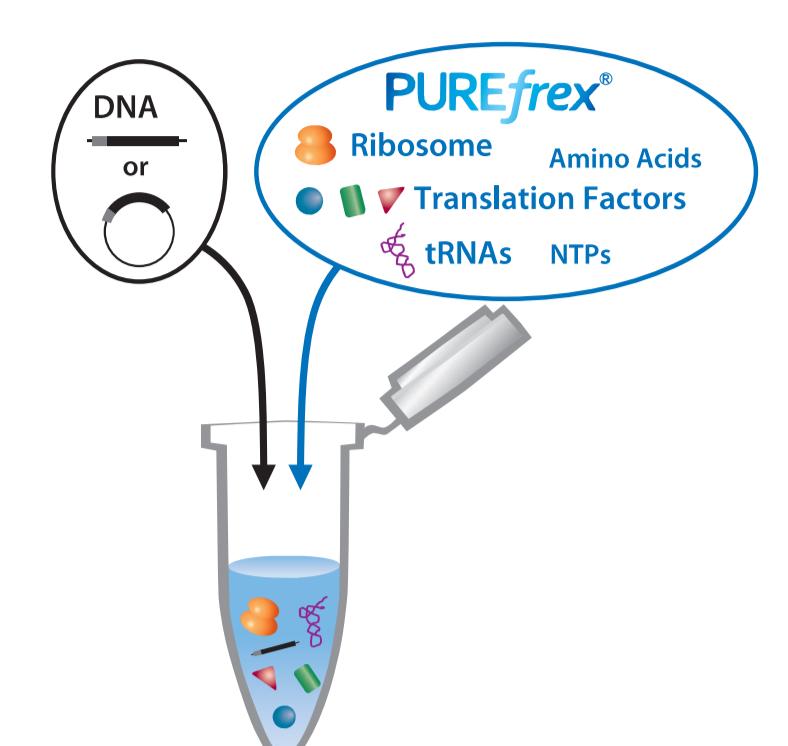
4種類のタンパク質を23, 30, 37°Cで合成したところ、37°Cでの合成量に対する23°Cでの合成量がタンパク質によって異なっていた。N末端領域では側鎖の大きなアミノ酸が翻訳に有利に働くことが報告されている。23°Cでの合成量が低かったsfGFPのN末端の配列はMSKGEであり、4番目にグリシンが存在する。そこで、このグリシンを他のアミノ酸に置換した変異体を23, 30, 37°Cで合成し、その蛍光量を比較した。その結果、側鎖の大きなアミノ酸(Y, H, N)に置換した変異体が、側鎖の小さいアミノ酸(G, V, A)の変異体よりも合成量が高くなった。チロシンに置換した変異体は野生型(グリシン)に対し、37°Cでは約30%高い合成量だったが、23°Cでは8倍以上の合成量が得られた。さらに、23°Cで合成量が低かったアルカリロイ fosfataーゼのN末端にsfGFPで合成量が高かったSKYを付加して合成すると合成量が増大した。一方、翻訳反応効率に影響を与えると報告されている2番目のアミノ酸についても同様の実験を行なったが、4番目のアミノ酸置換よりも、合成量に与える影響は小さかった。以上の結果から、PUREflex®を用いてタンパク質を合成する際は、タンパク質によってはN末端アミノ酸配列を変更することで合成量を増加できることが示唆された。

### 1. Introduction

PUREflex® is based on the PURE system.

The PURE system is a reconstituted cell-free protein synthesis system, which consists of only purified factors necessary for transcription, translation and energy regeneration.

Ref; Shimizu Y. et al. (2001) *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, p. 751



- One of the challenges;

Differences in the synthesis efficiency depending on the proteins

- Background;

- The 3rd to 5th amino acid residues in the N-terminal region are important for efficient translation.
- Large amino acids, which are encoded by AT-rich codon, facilitate early elongation reaction.

Ref; Verma M. et al. (2019) *Nat. Commun.*, Jia B. et al. (2021) *Sci. Rep.*

- Aim of this study;

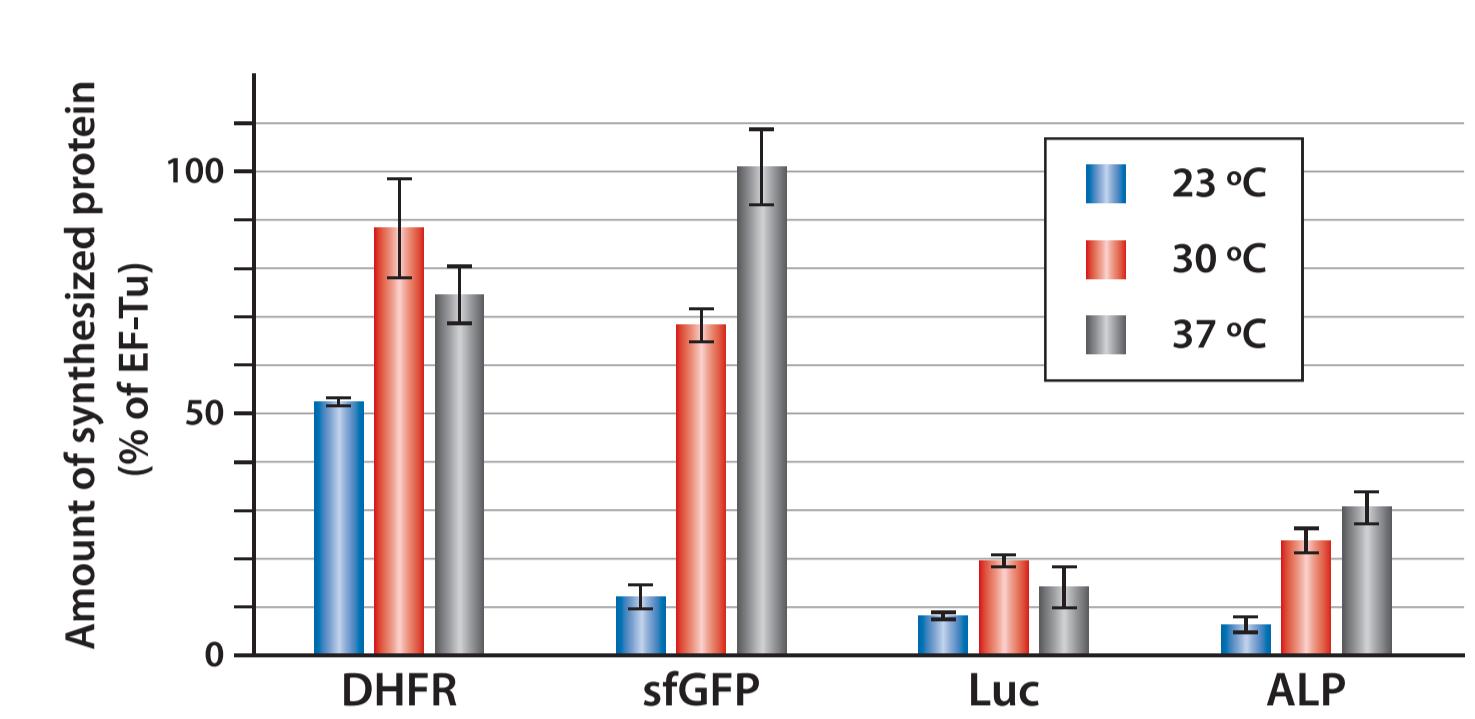
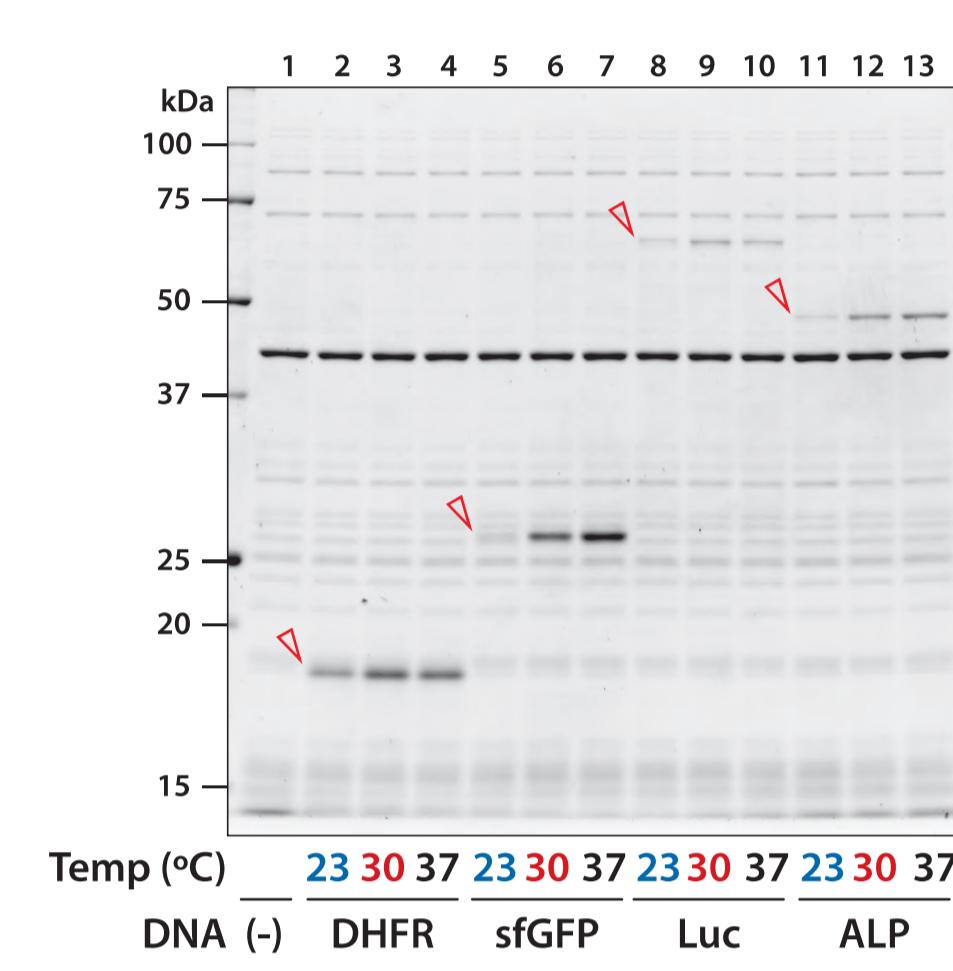
Evaluation of the effect of amino acids in the N-terminal region on the synthesis efficiency at 23, 30 and 37 °C.

### 2. Protein synthesis at 23, 30, or 37 °C

#### < Information of proteins used in this study >

Protein	M.W.	N-terminal AA Seq
DHFR <i>E. coli</i> dihydrofolate reductase	18.0 kDa	MISLIAALAV...
sfGFP Superfolder GFP	26.8 kDa	MSKGEEELFTG...
Luc Firefly luciferase	60.7 kDa	MEDAKNIKKG...
ALP <i>E. coli</i> alkaline phosphatase	47.3 kDa	MRTPEMPVLE...

PUREflex®2.1 (+ GSH)  
↓ + DNA  
↓ incubation at 23, 30 or 37 °C for 24 h  
↓ SDS-PAGE and quantification



The decrease in the amount of synthesized protein at 23 and 30 °C relative to 37 °C varied depending on the protein.

### 3. Influences of the second and fourth amino acid on sfGFP synthesis

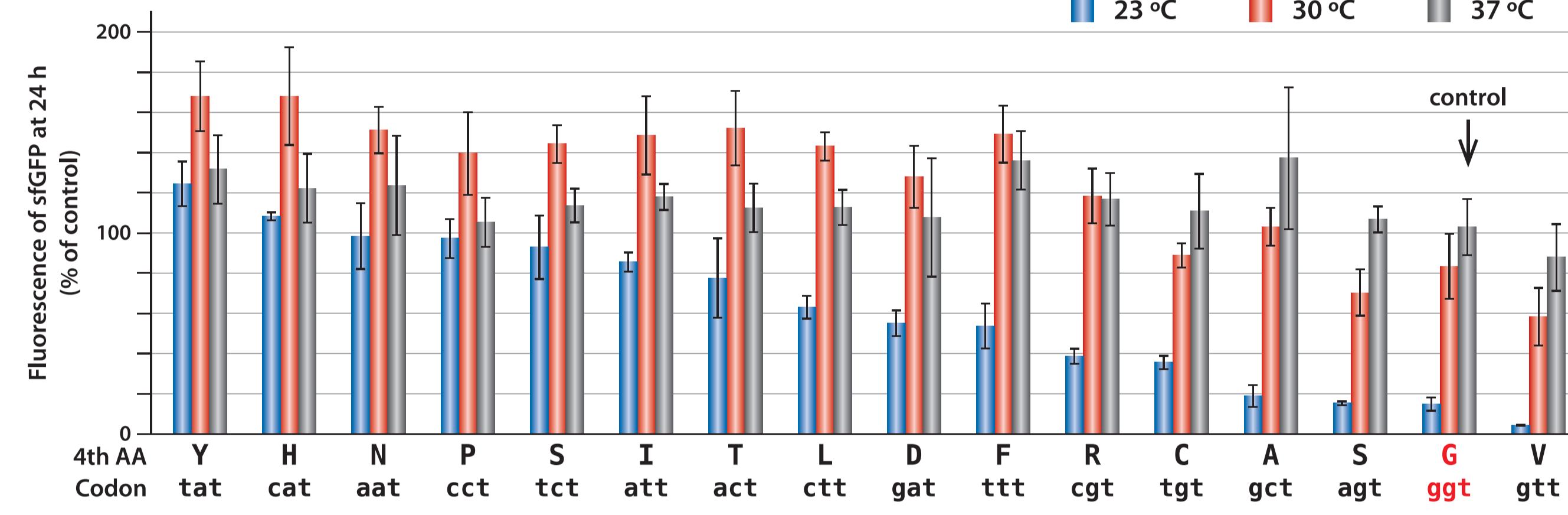
PUREflex®2.1 (+ GSH)  
↓ + sfGFP DNA  
↓ incubation at 23, 30 or 37 °C for 24 h  
↓ Measurement of fluorescence or SDS-PAGE

#### < N-terminal sequence of sfGFP >

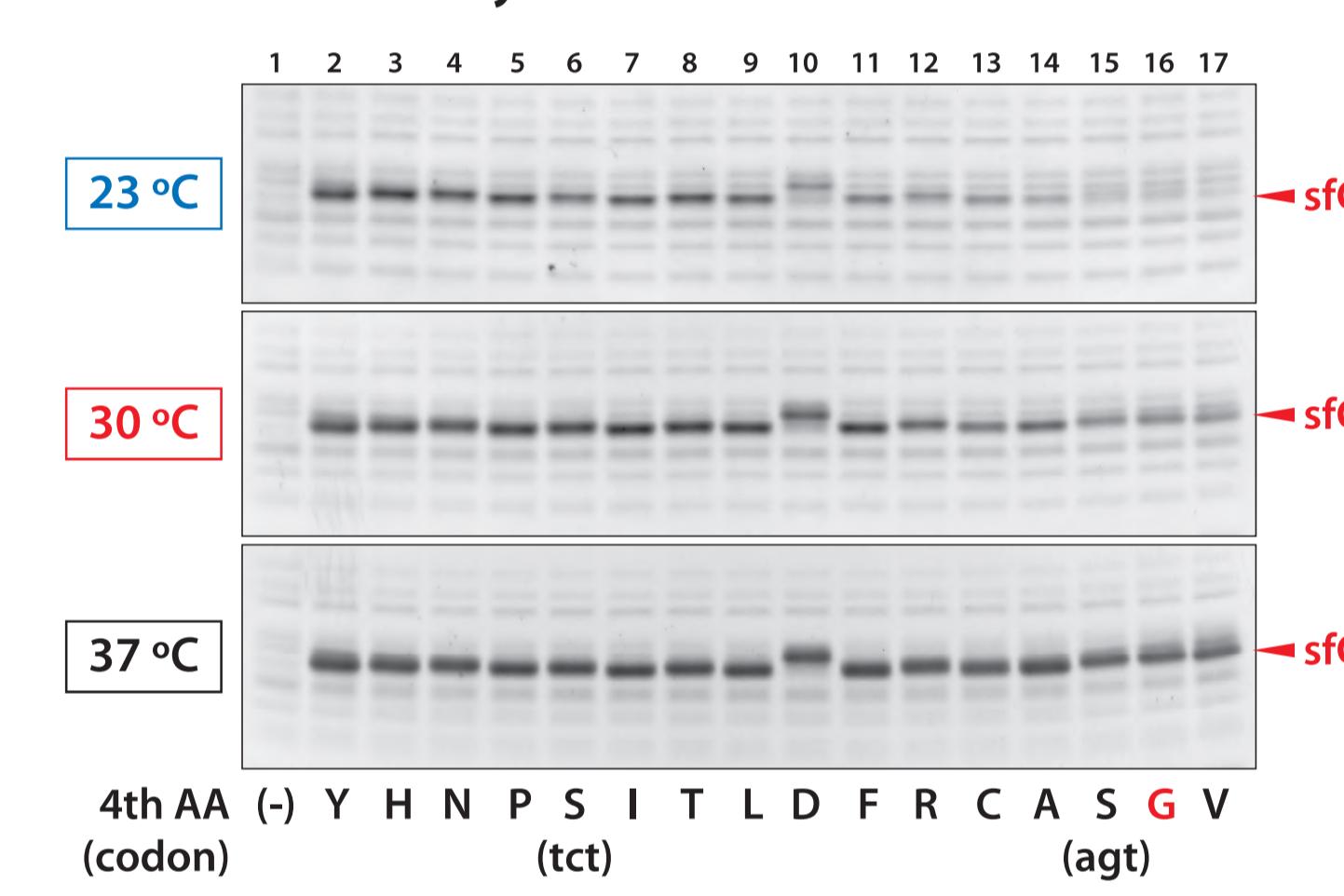
M S K G E E L F T G A A G A A . . . .  
atg tctaaggtaagaa....  
other amino acids

#### 3-1. Synthesis of sfGFP with a different amino acid at the fourth position

##### < Fluorescence of synthesized sfGFP with a different fourth amino acid >

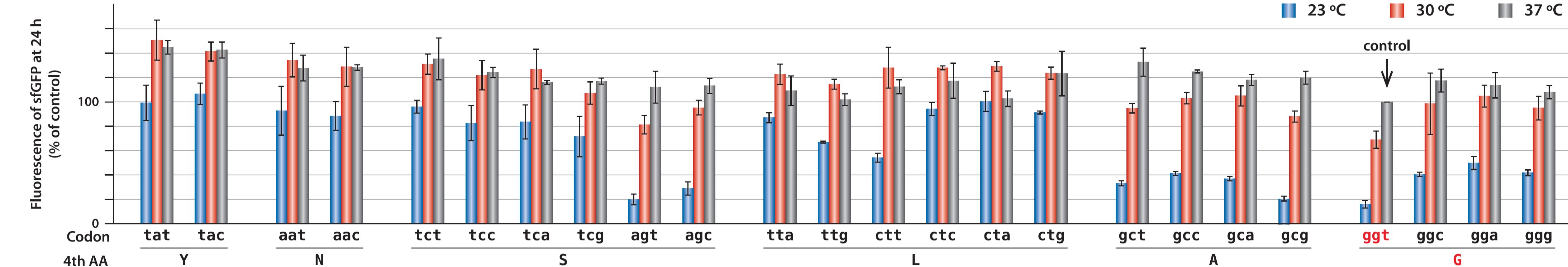


##### < SDS-PAGE of synthesized sfGFP >



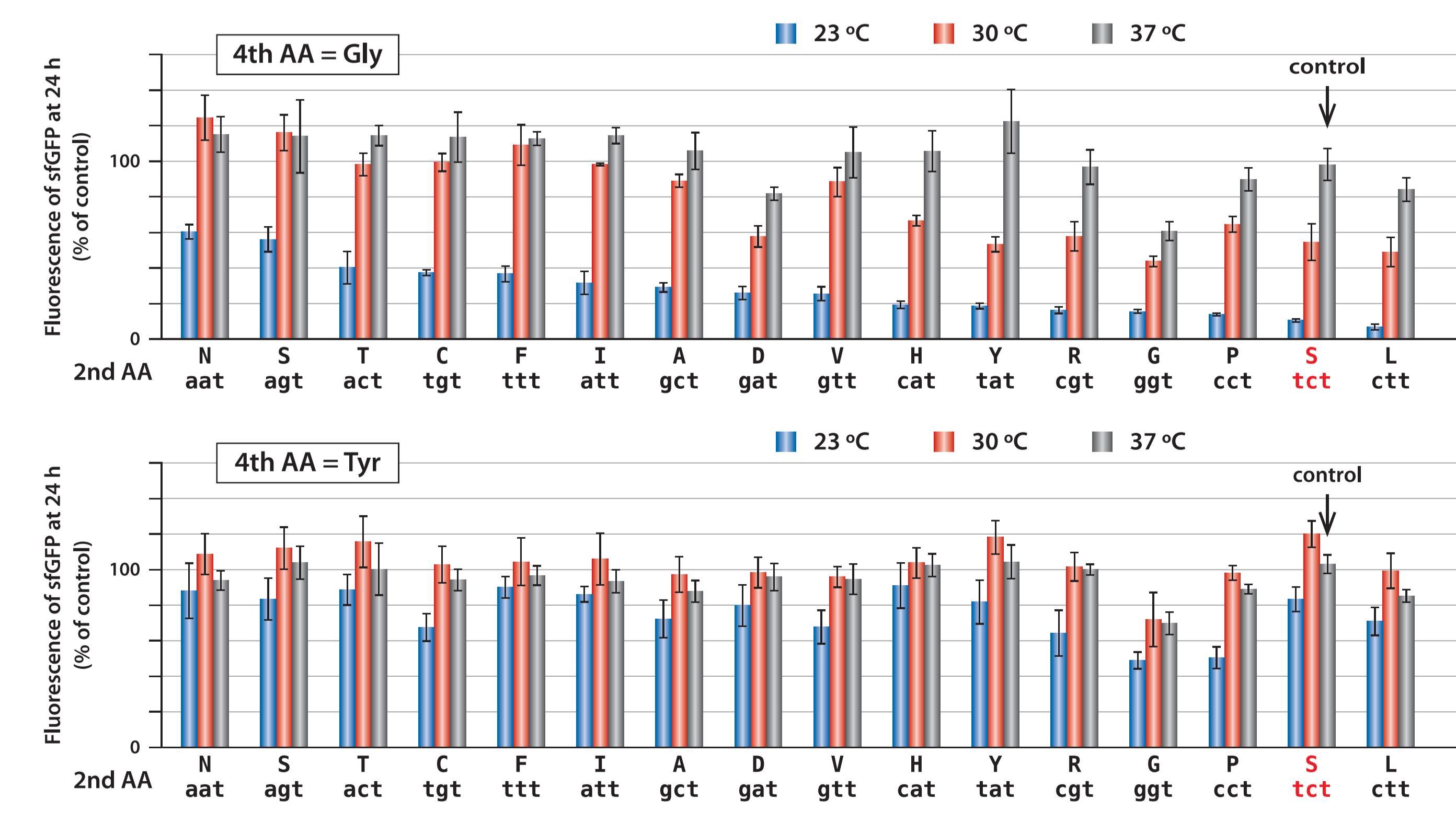
The amount of synthesized sfGFP, especially at 23 °C, differed depending on the fourth amino acid.  
When the fourth amino acid was a large amino acid such as Tyr or His, the amount of sfGFP was increased compared to Gly.

#### 3-2. Influences of synonymous codons at the fourth position



- The influence of amino acids on the translation efficiency at 23 °C was larger than that of synonymous codons.
- In the case of Ser, there was a difference in synthesis at 23 °C between TCN and AGN codons.

#### 3-3. Synthesis of sfGFP with a different amino acid at the second position



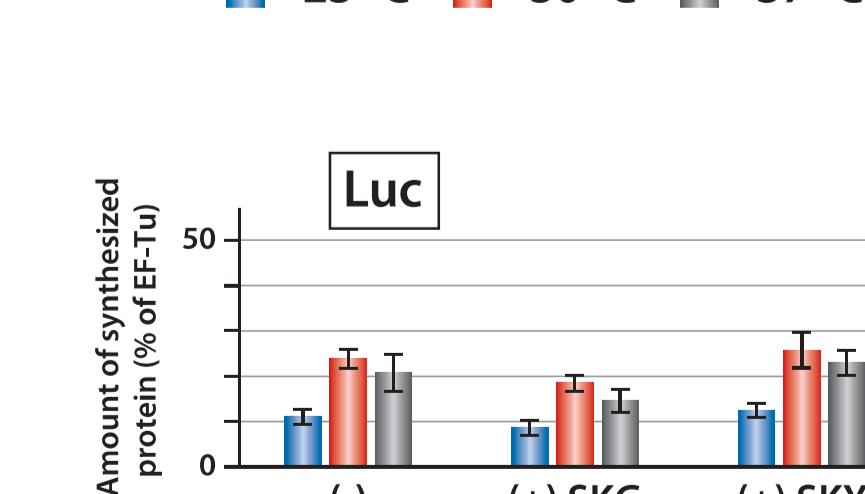
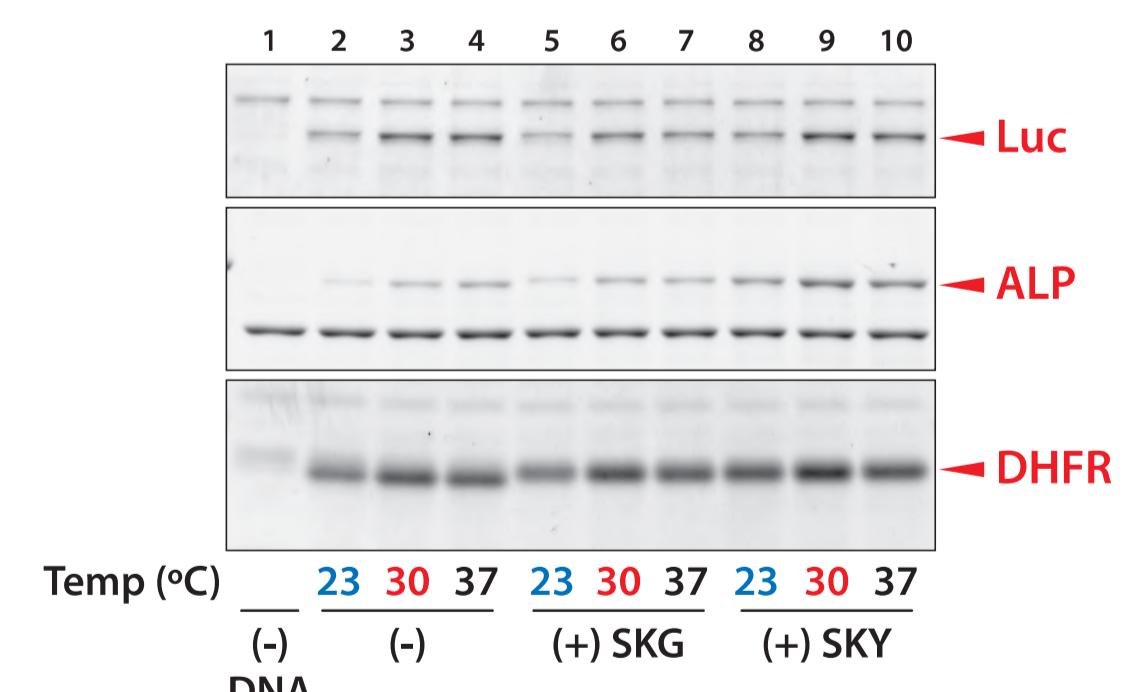
When the fourth amino acid was Gly, the amount of sfGFP synthesized at 23 °C differed depending on the second amino acid.

When the fourth amino acid was Tyr, there was little effect of the second amino acid except for Gly.

### 4. Effect of the N-terminal additional sequence

PUREflex®2.1 (+ GSH)  
↓ + DNA  
↓ incubation at 23, 30 or 37 °C for 24 h  
↓ SDS-PAGE and quantification

Luc MEDAKNIKKG...  
ALP MRTPEMPVLE...  
DHFR MISLIAALAV...  
SKG or SKY



Addition of Ser-Lys-Tyr at N-terminal region significantly increased the amount of synthesized ALP.

### Conclusion

- The efficiency of synthesis especially at low temperature varied from protein to protein.
- The fourth amino acid of sfGFP significantly affected the synthesis efficiency at 23 °C.
- Addition of Ser-Lys-Tyr to N-terminal region significantly increased the amount of synthesized ALP at low temperatures.



- Why does the fourth amino acid affect translation at low temperature?
- Would the same result be obtained when expressed in *E. coli*?