

再構成型無細胞タンパク質合成系 (PURE^{frex}®) を用いた 標的タンパク質の様々な脂質修飾と膜局在化

Various lipid modifications and membrane localization of target proteins using a reconstituted cell-free protein synthesis system



○松本 令奈¹, 嶋根 康弘², 久野 香², 丹羽 達也³, 田口 英樹³, 車 兪澈², 金森 崇¹
(¹ジーンフロンティア株式会社, ²海洋研究開発機構・超先鋭研究開発プログラム, ³東京科学大・総合研究院・細胞制御工学研究センター)
○Rena Matsumoto¹, Yasuhiro Shimane², Kaori Kuno², Tatsuya Niwa³, Hideki Taguchi³, Yutetsu Kuruma² and Takashi Kanamori¹
(¹GeneFrontier Corp., ²X-star, JAMSTEC, ³Cell Biology Center, IIR, Science Tokyo)

<Abstract>

PURE^{frex}は、PURE systemを基にした、大腸菌でのタンパク質合成に関与する因子のみから再構成した無細胞タンパク質合成系であるが、翻訳後修飾に関与する酵素や基質の添加で翻訳後修飾も可能である。我々はPURE^{frex}による脂質修飾タンパク質の合成を検討し、これまでにN末端にミリスチル基を付加したタンパク質を合成できることを示している(1)。さらにTEVプロテアーゼによる切断を利用した翻訳後ミリスチル化反応およびGUV内でのミリスチル化タンパク質の膜局在化の効率向上にも成功している。

本研究では、脂質修飾タンパク質をリボソームの表面に提示することを目指した。リボソームの外側にミリスチル化タンパク質を合成したが、リボソーム上にはほとんど局在しなかった。そこで、膜との相互作用を強めるため、アルギニン残基を導入した標的タンパク質を用い、パルミトイル基で修飾したところ、脂質修飾されたタンパク質のリボソーム上への局在を確認した。さらに、脂質修飾したVHH抗体を局在させたリボソームが、標的抗原を表面に発現している培養細胞へ特異的に結合することを確認した。本システムは、脂質膜上にタンパク質を簡便に提示することが可能であり、標的化リボソームの開発に応用できる可能性を有している(2)。

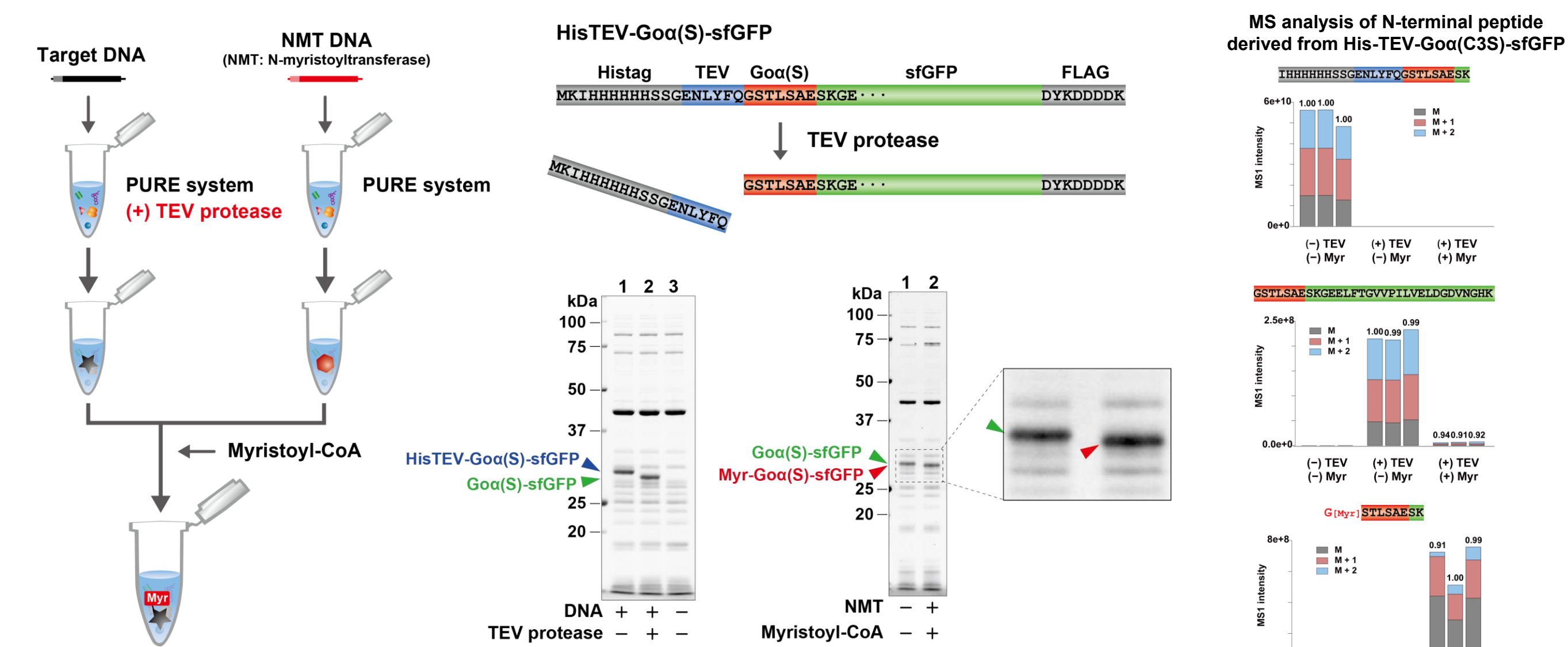
現在はN末端ミリスチル化とは異なる脂質修飾も試みている。

(1) Matsumoto et al. (2023) ACS Synth. Biol. Vol.12, 1935–1942

(2) Matsumoto et al. (2025) ACS Synth. Biol. (accepted)

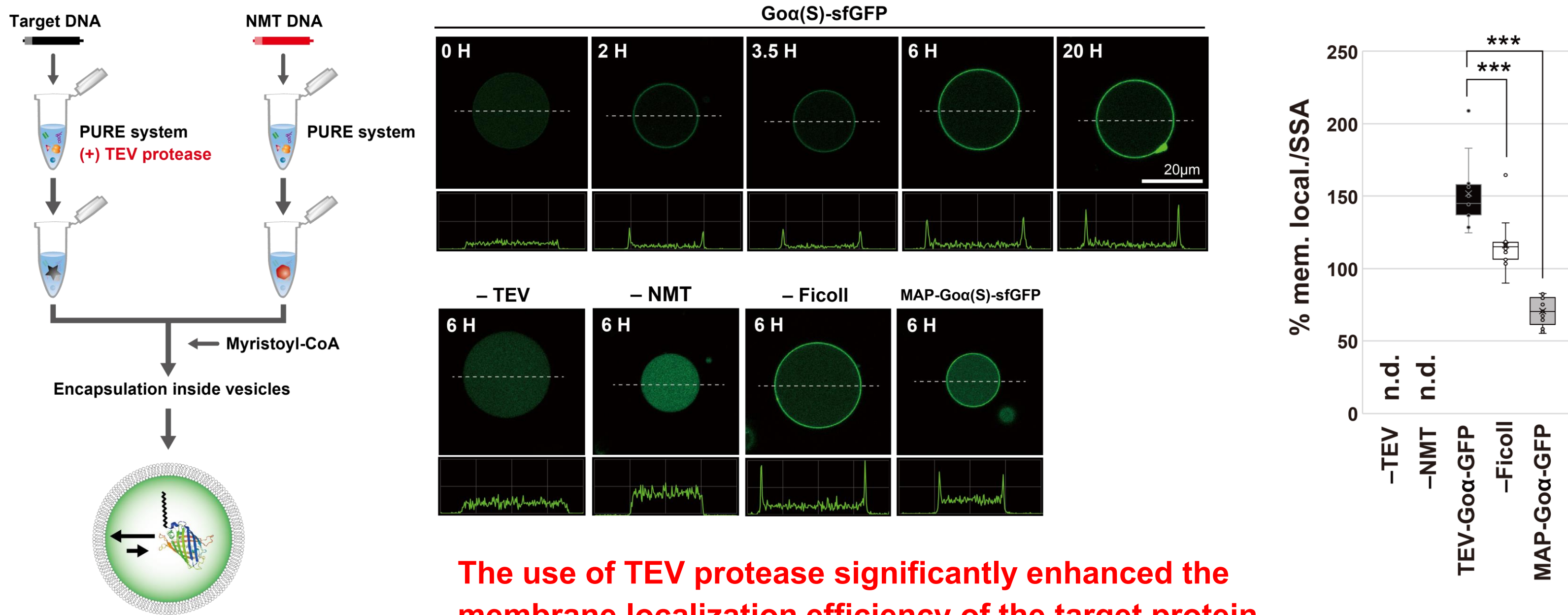
1. N-myristoylation of the target protein cleaved by TEV protease

1-1. N-myristoylation of the target proteins cleaved by TEV protease



Target proteins cleaved by TEV protease were efficiently N-myristoylated.

1-2. Membrane localization of N-myristoylated proteins after cleavage by TEV protease



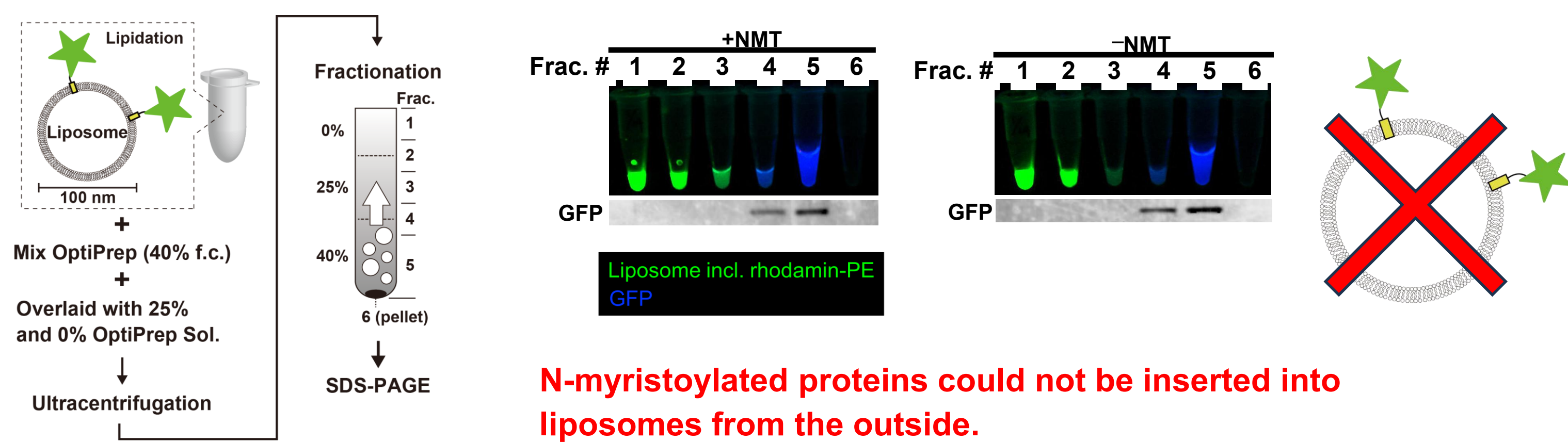
The use of TEV protease significantly enhanced the membrane localization efficiency of the target protein.

2. Displaying N-acylated proteins on the surface of liposomes

<Next challenge>

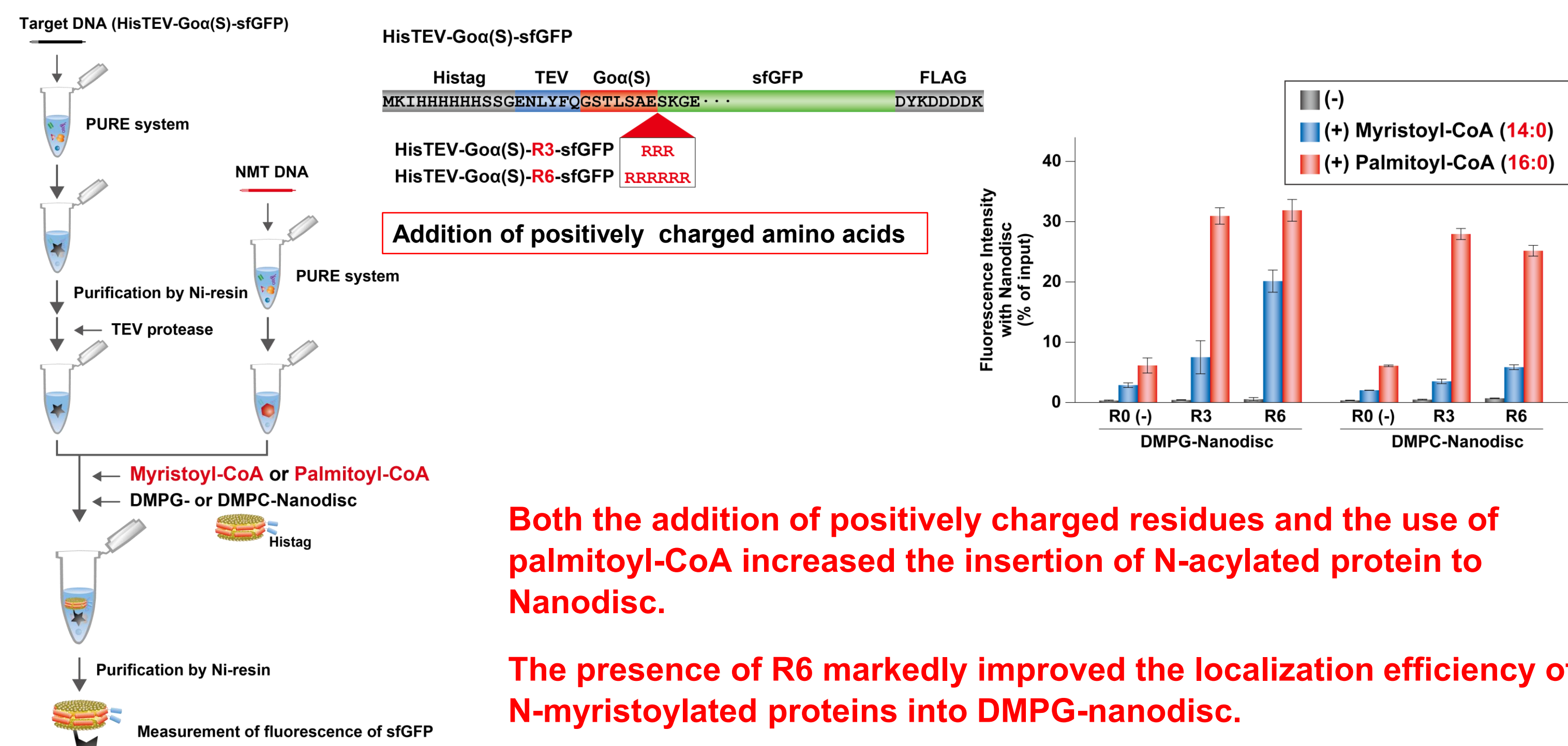
N-acylated proteins synthesized using PURE^{frex} were successfully inserted into the liposomal membrane **from the inner side**.

To broaden the applicability of N-acylated proteins in fields such as therapeutics, their insertion into liposomes **from the outer side** is considered advantageous.



N-myristoylated proteins could not be inserted into liposomes from the outside.

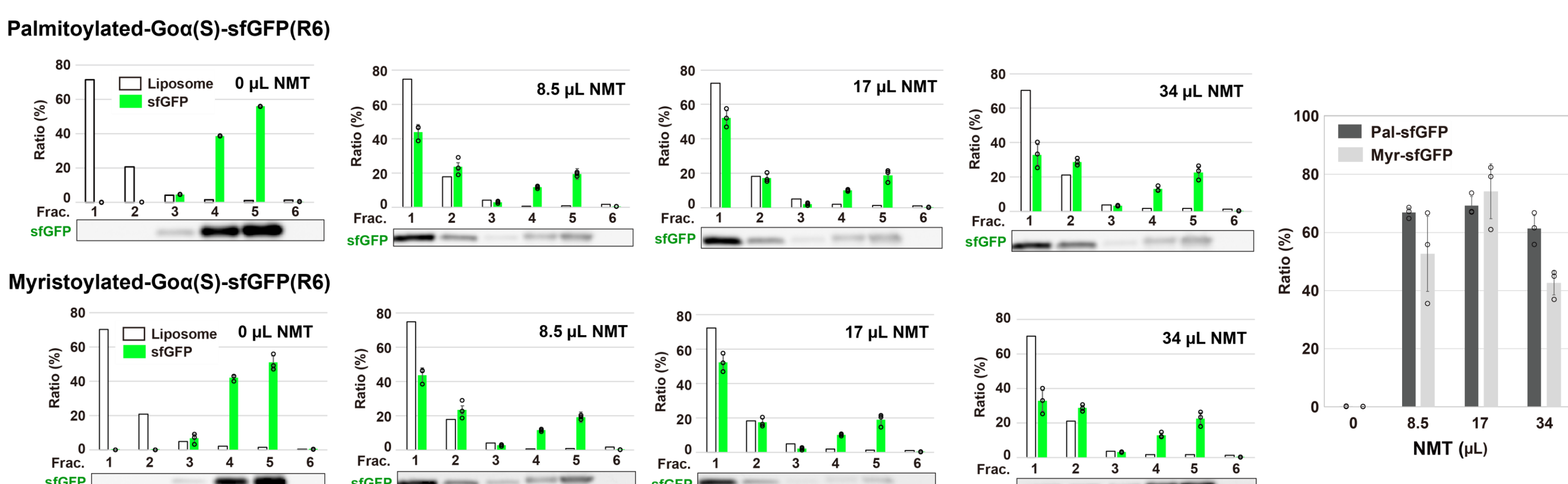
2-1. Improvement of the membrane localization efficiency of N-acylated protein



Both the addition of positively charged residues and the use of palmitoyl-CoA increased the insertion of N-acylated protein to Nanodisc.

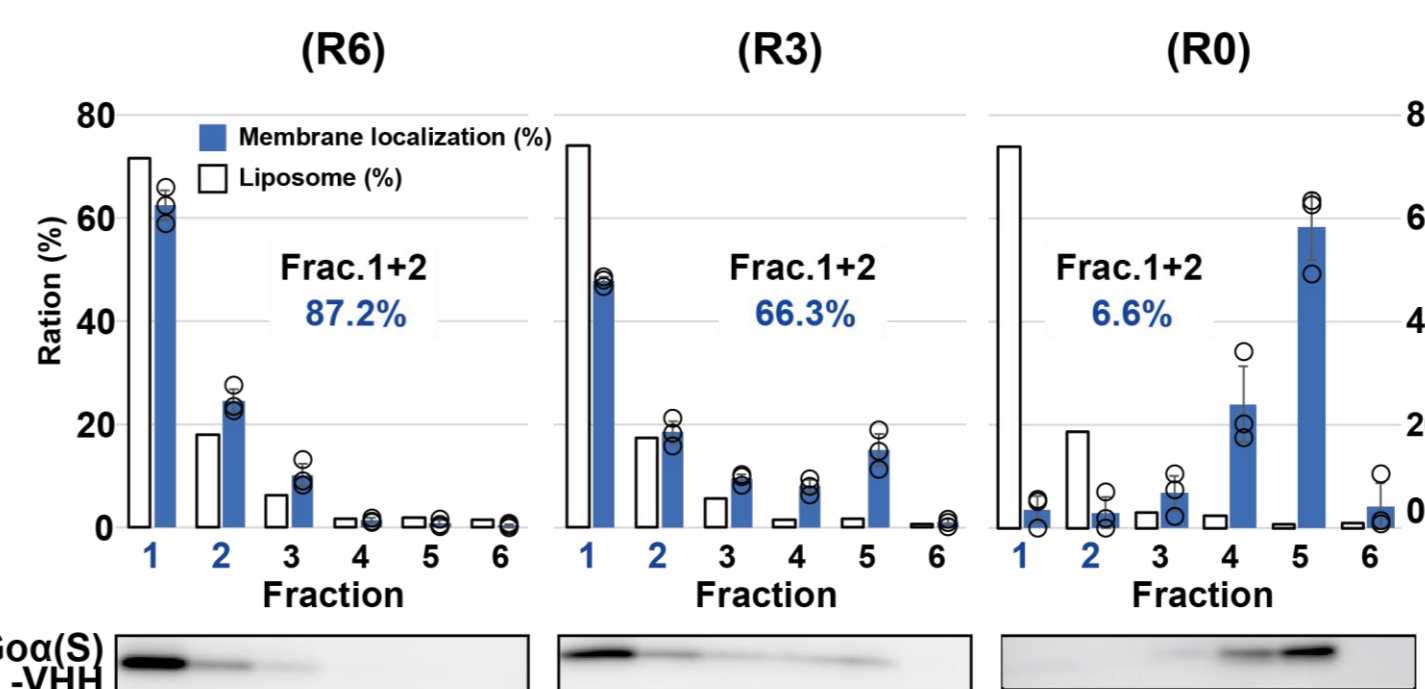
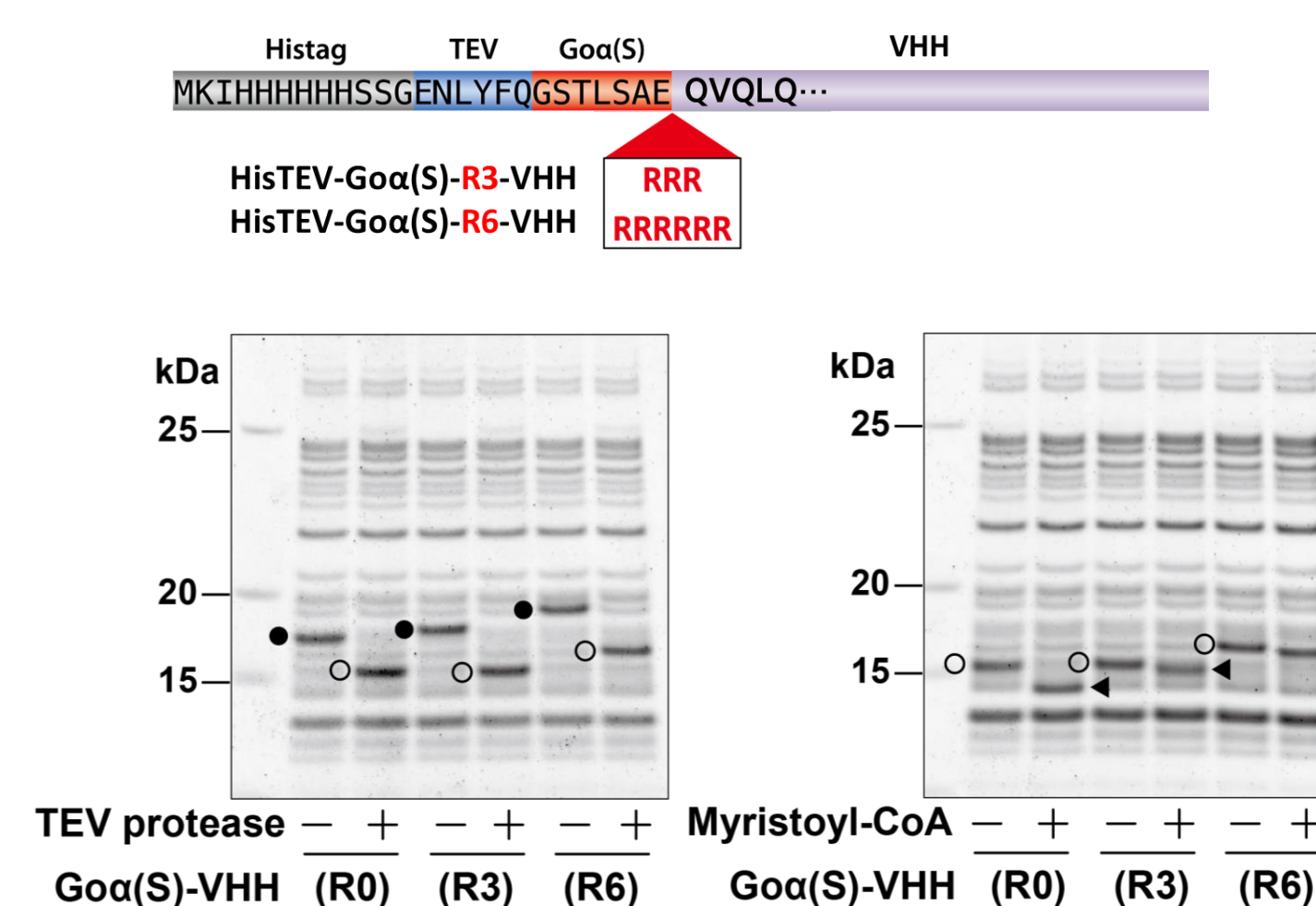
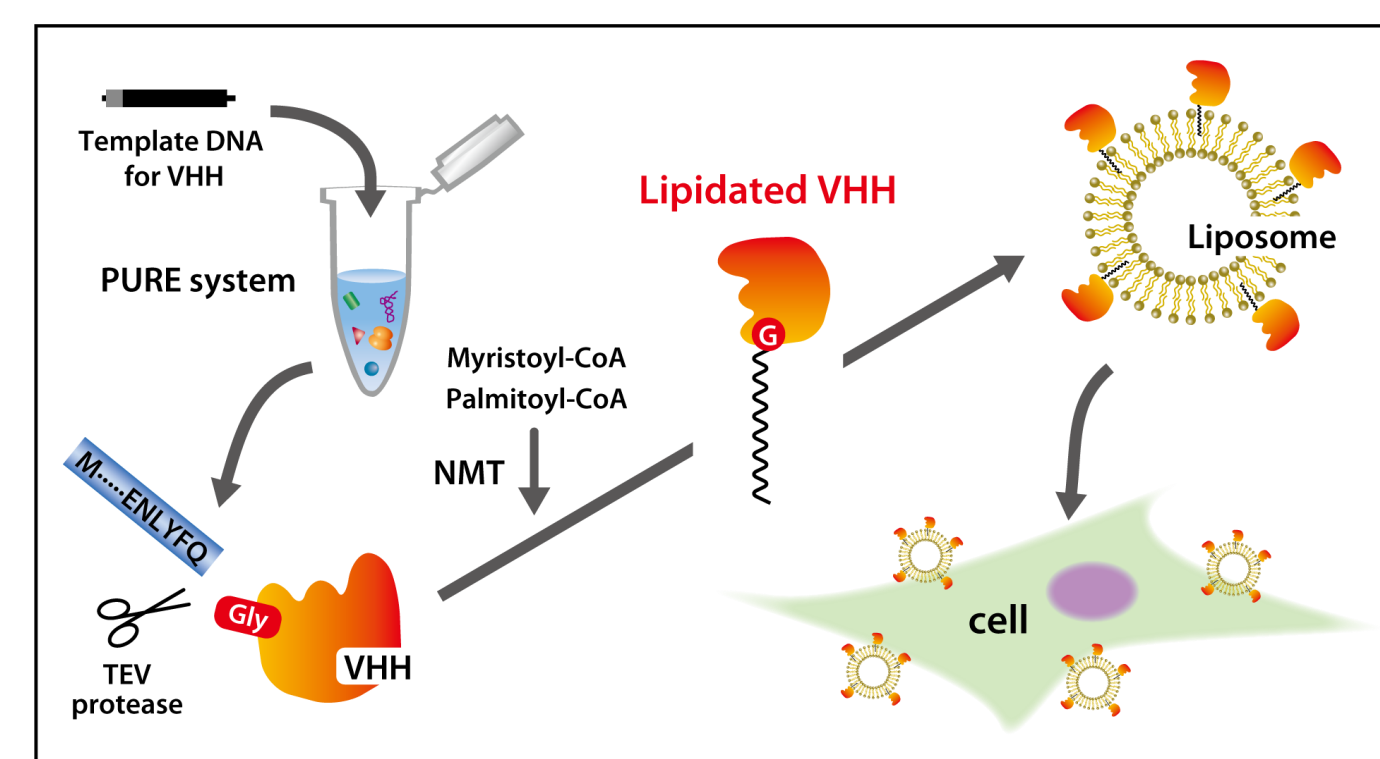
The presence of R6 markedly improved the localization efficiency of N-myristoylated proteins into DMPG-nanodisc.

2-2. Displaying N-acylated proteins on the surface of liposomes



The introduction of R6 sequence significantly enhanced the membrane localization efficiency of N-acylated proteins onto liposome.

3. Targeting of liposomes displaying membrane-anchored VHH antibodies to cell surface antigens



Liposomes displaying N-acylated VHH antibodies exhibited specific binding to cell surface antigens.

<Conclusion>

- The use of TEV protease significantly enhanced the membrane localization efficiency of the target protein.
- Both the addition of positively charged residues and the use of palmitoyl-CoA increased the insertion of N-acylated protein to lipid membrane.
- Liposomes displaying N-acylated VHH antibodies exhibited specific binding to cell surface antigens.

<Summary and Future project>

