

Synthesis of functionally active proteins using the new PURE system (PUREflex®)

○ Takashi Kanamori^{1,2}, Tomoe Murakami², Yuki Hayami¹, Mikiko Nakamura¹, Takuya Ueda²
(¹GeneFrontier Corp., ²Grad. Sch. of Frontier Sci., Univ. of Tokyo)

PUREflex®を用いた活性型タンパク質の合成

○ 金森 崇^{1,2}、村上 朋重²、速水 友紀¹、中村 美紀子¹、上田 卓也² (¹ジーンフロンティア(株)、²東大院・新領域)

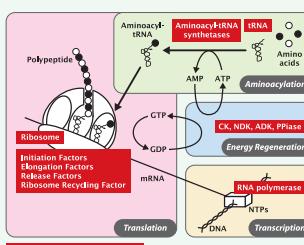
要旨

PURE systemは、翻訳反応に必要な因子を個別に精製し、再構成した無細胞タンパク質合成系である。PURE systemは、他の無細胞タンパク質合成系と異なり、合成効率を低下させるリボヌクレアーゼ(RNase)やプロテアーゼなどの混入が少ないので、使用目的に応じて反応液の因子組成を自由に設計できるなどの特長を有した系である。最近では、PURE systemの利用目的は、タンパク質の調製だけでなく、リボソームディスプレイ(RD)などのin vitro選択系への応用などにも拡大している。我々は、リボ多糖混入量を従来比1/1000に減少させることで、RDでの高い選択性や再現性を実現した新規PURE system(PUREflex®)を完成させている。その改良過程で、RNaseなどの夾雑物の混入量も従来の反応液から大幅に減少させることができ、タンパク質合成効率も向上できている。

しかしながら、従来のPURE system同様、PUREflex®も転写・翻訳に必要な因子のみから再構成されるため、活性型での合成が困難なタンパク質も少なくない。本研究では、PUREflex®と分子シャペロンの組合せによる活性型タンパク質の合成を目的に種々検討を行った。翻訳反応に必要な因子と同様に、リボ多糖やRNaseなどの夾雑物の混入が極めて少ない分子シャペロン(DnaK, Dnaj, GrpE, GroEL, GroES)の調製法を開発し、これら分子シャペロンを添加したPUREflex®を、活性型での合成が困難であった複数タンパク質の合成に適用した。その結果、分子シャペロンを適切な濃度で添加したPUREflex®を用いることにより、複数のタンパク質で可溶性及び活性を増大させることができた。これらの結果から、分子シャペロンなどの添加剤を使用することで、PUREflex®を用いて多くのタンパク質を活性型で合成できることが示された。

1. PURE system

転写・翻訳反応に必要なリボソームなどの構成因子を個別に精製した後、再構成した無細胞タンパク質合成系



特長

- ・タンパク質合成を阻害する因子の混入が少ない
- ・反応液の構成の調節が容易

利用

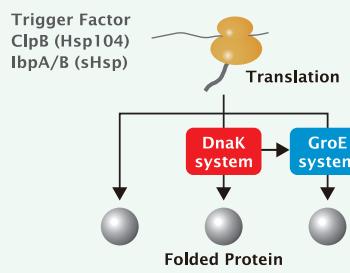
- ・タンパク質調製
SS結合含有タンパク質
膜タンパク質
非天然アミノ酸含有タンパク質
- ・タンパク質科学研究
翻訳・フォールディング
・in vitro ディスプレイ
リボソームディスプレイ
mRNA ディスプレイ

しかし、
まだ精製が不十分な構成因子由来の夾雑物 (LPS) などが含まれていた。

4. 大腸菌の分子シャペロン

DnaK system
DnaK (Hsp70)
Dnaj (Hsp40)
GrpE

GroE system
GroEL (Hsp60)
GroES



2. PURE systemの改良

純度を向上させた改良型 PURE system の開発

1. 構成因子の調製方法の改良

Improved Original

Proteins	None	His-tag
Tag	None	His-tag
Number of column	3	1
Wash with detergent	+	-
Ribosome		
Wash with detergent	+	-
tRNA		
Wash with detergent	+	-

(Original; Shimizu et al. (2005) Methods, vol.36, p.299)

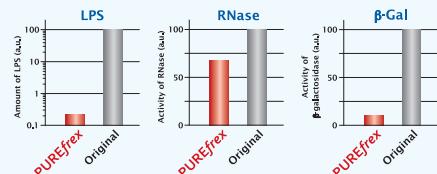
2. 構成因子の添加濃度の変更

改良型 PURE system → PUREflex®

3. PUREflexの特徴

3-1.

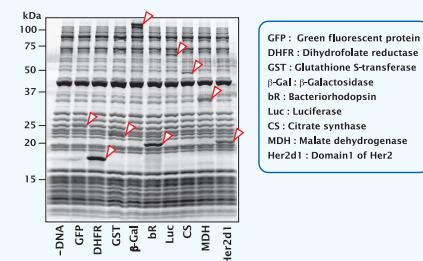
PUREflexに混入している夾雑物量は、従来の反応液よりさらに低減している



PURE systemに含まれている夾雑物のうち、代表的な3種類の夾雑物の混入量を、それぞれ常法により測定した。従来の反応液(Original)に混入している夾雑物量を100とした相対値で示す。

3-2.

PUREflexでは様々なタンパク質を合成できる

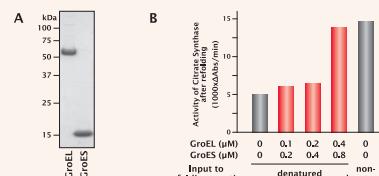


PUREflexに、様々なタンパク質をコードするDNAを添加して37°Cで4時間反応させた後、SDS-PAGEにかけ、Oriole (Bio-Rad)でゲルを染色した。

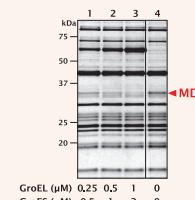
5. GroEを添加した反応液を用いた合成

5-1.

精製したGroEL/GroESは変性CSを巻き戻させることができる



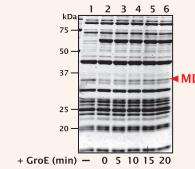
5-2.
GroEを添加したPUREflexではタンパク質合成量が低下する



GroEL/GroES を添加した PUREflex でリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) を合成し、合成反応液を SDS-PAGE にかけ、SyproOrange (Invitrogen) でゲルを染色した。

5-3.

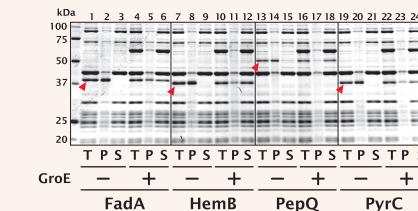
GroEの添加時期を遅らせるとタンパク質合成量は回復する



PUREflex に MDH DNA を添加して合成開始後、図に示した時間で GroEL/GroES を添加して合成を続けた。合成反応液を SDS-PAGE にかけ、SyproOrange でゲルを染色した。

5-4.

GroEを添加したPUREflexで可溶性が増大したタンパク質を合成できる

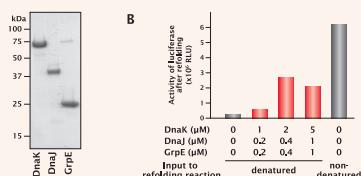


合成開始 15 分後に GroEL/GroES を添加した PUREflex を使用して、4 種類の大腸菌タンパク質 (FadA, HemB, PepQ, PyrC) を合成した。合成後、遠心により沈殿と上清を回収し、合成後(T)、沈殿画分(P)上清画分(S)を SDS-PAGE にかけ、SyproOrange でゲルを染色した。

6. DnaKを添加した反応液を用いた合成

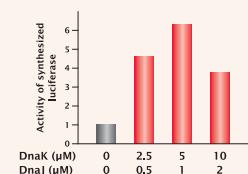
6-1.

精製したDnaK/Dnaj/GrpEは変性ルシフェラーゼを巻き戻させることができる



6-2.

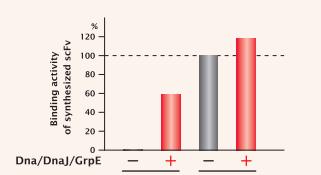
DnaKを添加したPUREflexで活性の高いルシフェラーゼを合成できる



図に示した濃度でDnaK/Dnaj/GrpEを添加したPUREflexでルシフェラーゼを合成後、酵素活性を測定した。DnaKを添加していない反応液の酵素活性を1とした相対値で示す。

6-3.

DnaKを添加したPUREflexで活性の高いscFvを合成できる



DnaK/Dnaj/GrpEを添加したPUREflex、またはPUREflex SSでscFvを合成後、ELISAで結合活性を測定した。DnaKを添加していないPUREflex SSの結合活性を100とした相対値で示す。

まとめ

- PUREflex®への添加に適した分子シャペロンを調製した。
- 調製した分子シャペロンを添加したPUREflex®を用いることにより、合成したタンパク質の可溶性および活性が上昇した。