# ヒトプロテインジスルフィドイソメラーゼを添加した

# 再構成型無細胞タンパク質合成系(PUREfrex<sup>®</sup>)によるジスルフィド結合タンパク質合成

GeneFrontier

Synthesis of proteins containing disulfide bonds using PURE frex® with human protein disulfide isomerase

○松本 令奈、金森 崇 (ジーンフロンティア株式会社)

<sup>•</sup> Rena Matsumoto and Takashi Kanamori (GeneFrontier Corporation)

### <Abstract>

PURE systemは、大腸菌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。PURE systemにプロテインジスル フィドイソメラーゼ(PDI)として大腸菌DsbCを添加することで、活性を有 したジスルフィド結合タンパク質を合成できる。複雑な構造のタンパク質 や高等生物のジスルフィド結合タンパク質合成に広く対応するため、本発 表ではPUREfrex<sup>®</sup>(改良型PURE system)を用い、DsbCに替えてヒトPDI (hPDI) およびその関連タンパク質を利用できるか検討した。モデル系とし て、9つのジスルフィド結合を持つ組織プラスミノーゲン活性化因子 (tPA) の合成を行った。還元剤に還元型グルタチオン (GSH) を使用したPUREfrex をベースに、酸化型グルタチオン (GSSG) 存在下でhPDIを添加してtPAを合 成すると、合成されたtPAはhPDIの添加濃度依存的に活性が増加した。一方、 GSSG非存在下でも、hPDIおよびhEro1α (PDI酸化酵素)を添加しtPAを合成 した場合、合成されたtPAは同様に高い活性を示した。すなわち、hPDIを機 能させるためにはGSSGあるいはhEro1αの添加が必要であることが分かっ た。また、GSSG存在下でhPDIとDsbCの添加効果を比較したところ、hPDI はDsbCとほぼ同等の効果を示した。以上より、hPDI添加でも、酸化還元環 境の調節やhPDI酸化酵素の添加により効率よくジスルフィド結合タンパク 質の合成が可能であることが確認された。さらに他の基質タンパク質の合 成についても報告する。

## 4. Result 2: Disulfide bonded protein synthesis using hPDI and hEro1 $\alpha$ with PURE *frex*<sup>®</sup>

### truncated version of

### tissue plasminogen activator (tPA)

Homo sapiens Organism 36Ser-40lle/211Gly-562Pro (+FLAG) Synthesized region Length 368 a.a. 41,072 Da Molecular weight No. of disulfide bonds

#### Experimental conditions of protein synthesis

	No.	Factors	Basic condition	hPDI	GSSG	hEro1α	DsbC	Template DNA	Temp & Tim
	1	hPDI conc.		0-20 μM	2 mM	(-)	(-)		30°C 24 h
	2	hPDI + GSSG conc.	PURE <i>frex</i> ®2.1 + 0.5 mM Cvs	10 µM	0-8 mM	(-)	(-)		30°C 24 h
	3	hPDI + hEro1α conc.	+ 4 mM GSH + DnaK mix	10 µM	(-)	0-2 μM	(-)	PCR product	30°C 24 h
	А	Incubation time	5 μM DnaK 1 μM DnaJ,	10 uM	2 mM	(-)	(-)	(Tng/µ∟)	30°C
	-	incubation time	1 μM GrpE		(-)	0.125 μM	(-)		0-24
기	5	DsbC		(-)	0 mM/2 mM	(-)	20 µM		30°C 24 h



## 5. Result 3: Examples of other disulfide bonded protein synthesis

### Gaussia Luciferase (GLuc)

Organism	Gaussia princeps
Synthesized region	18Lys-185Asp (+FLAG-His6
Length	187 a.a.
Molecular weight	20,407 Da
No. of disulfide bonds	5

#### **Experimental condition of protein synthesis**

No.	Factors	Basic condition	hPDI	GSSG	hEro1α	DsbC	Template DNA	Temp. & Time
1	hPDI		10 µM	(-)	(-)	(-)		
2	hPDI + hEro1α	PURE <i>frex</i> ®2.1 + 0.5 mM Cvs	10 µM	(-)	0.125 μM	(-)	PCR product	37°C,
3	DsbC	+ 4 mM GSH	20 µM	(-)	(-)	20 µM	(1 ng/μL)	4 h
4	GSSG		(-)	1 mM	(-)	(-)		

 SDS-PAGE (0.25 – 0.5 µL of reaction mix/lane) → Western Blotting (anti-FLAG) or Gel staining (Oriole) · GLuc activity assay: BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (NEB#E3300S) (2 μL PURE reaction mix/50 μL assay soln.)





SDS-PAGE (0.25 – 0.5  $\mu$ L of reaction mix/lane)  $\rightarrow$  Western Blotting (anti-FLAG) or Gel staining (Oriole) tPA activity assay: Assay of chromogenic substrate cleavage activity (2.5 µL PURE reaction mix/ 200 µL assay soln.)



### 4-2. hPDI + GSSG concentration



4-3. hPDI + hEro1 $\alpha$  concentration





#### Acid phosphatase (AppA)

Organism	Escherichia coli
Synthesized region	23GIn-432Leu (+FLAG)
Length	421 a.a.
Molecular weight	45,959 Da
No. of disulfide bonds	4



#### **Experimental condition of protein synthesis**

No.	Factors	Basic condition	hPDI	GSSG	hEro1α	DsbC	Template DNA	Temp. & Time
1	hPDI		2 µM	2 mM	(-)	(-)		
2	hPDI + GSSG		2 µM	0 / 2 mM	(-)	(-)		
3	hPDI + hEro1α	PURE <i>frex</i> ®2.1 + 0.5 mM Cys + 4 mM GSH	2 µM	(-)	0.2 μM	(-)	PCR product	37°C, 4 h
4	DsbC + GSSG		(-)	0 / 2 mM	(-)	4 µM		
5	DnaK mix 5 μM DnaK 1 μM DnaJ 1 μM GrpE		0 / 2 µM	0 / 2 mM	0 / 0.2 μM	0 /4 µM	(1 ng/μL)	

• SDS-PAGE (0.5  $\mu$ L of reaction mix/lane)  $\rightarrow$  Western Blotting (anti-FLAG) • AppA activity assay: Assay of PNPP dephosphorylation activity (1 µL PURE reaction mix/100 µL assay soln.)



2-1. PDIs and related protein used in this study

hPDI (human protein disulfide isomerase) **UniProt ID** P07237 Homo sapiens Organism 492 a.a. Length 55,424 Da Molecular weight B ID: 4EKZ)

#### hEro1α (human endoplasmic oxidereductin)

UniProt ID	Q96HE7
Organism	Homo sapiens
Length	446 a.a.
Molecular weight	52,122 Da



**DsbC (thiol:disulfide interchange protein)** P0AEG6 UniProt ID Escherichia coli Organism Lenath 217 a.a. 23,591 Da Molecular weight

(PDB ID: 3AHQ)

3. Result 1: Selection of suitable reducing agent

### Alkaline phosphatase (AP)

Escherichia coli
22Arg-471Lys
451 a.a.
47,330 Da
2

 Necessary conditions for the synthesis of disulfide bonded proteins with activities are different for each proteins.

(PDB ID: 1AJA)

#### **Experimental conditions of protein synthesis**

No.	Factors	Basic condition	Reductant	hPDI	GSSG	hEro1α	Template DNA	Temp. & Time
1	hPDI		4 mM GSH	10 µM	(-)	(-)		
2	hPDI + hEro1α	PURE <i>frex</i> ®2.1 + 0.5 mM Cvs	or	10 µM	(-)	0.2 μM	plasmid (10 nɑ/uL)	37°C, 4 h
3	GSSG		2 mM DTT	(-)	2 mM	(-)	(	

SDS-PAGE (0.5  $\mu$ L of reaction mix/lane)  $\rightarrow$  Gel staining (Oriole) • AP activity assay: Assay of PNPP dephosphorylation activity (0.1 µL PURE reaction mix/100 µL assay soln.)

### **3-1.** Difference in synthesized AP activity by reducing agent





### 4-5. Comparison of hPDI with DsbC in tPA synthesis

Non-reduced

(\*polymerized and stacked)



Alkaline				
Aikainie		4 mM GSH		
Phosphatase	PURE <i>frex</i> ®2.1 (+ 0.5 mM Cys) 2 mM			2 mM GSSG
(AP)			10 µM hPDI	0.125 μM hEro1α
Trancated	DIIDE frox® 2 1		10 µM hPDI	2 mM GSSG
Tissure	(+ 0.5 mM Cys)	4 mM GSH	10 µM hPDI	0.125 μM hEro1α
Activator (tPA)	+ DnaK mix		20 µM DsbC	2 mM GSSG
Gaussia	PURE <i>frex</i> ®2.1	URE <i>frex</i> ®2.1 4 mM GSH ⊦ 0.5 mM Cys)		1 mM GSSG
(GLuc)	(+ 0.5 mM Cys)		10 µM hPDI	0.125 μM hEro1α
Acid			2 µM hPDI	2 mM GSSG
Phosphatase	PURE <i>frex</i> ®2.1 (+ 0.5 mM Cvs)	4 mM GSH	2 µM hPDI	0.2 μ <mark>M hEro1</mark> α
(АррА)	(* *** **** ****		4 µM DsbC	2 mM GSSG



For more information, please contact us. URL: www.genefrontier.com E-mail: purefrex@genefrontier.com