

プロリンが連続した配列を含むタンパク質の再構成型無細胞タンパク質合成系(PUREfrex)による合成

Synthesis of proteins containing consecutive proline residues using the reconstituted cell-free protein synthesis system (PUREfrex)

- 金森崇¹、松本令奈¹、丹羽達也²、田口英樹²、上田卓也³ (¹ジーンフロンティア(株)、²東工大・研究院、³東大院・新領域)
- Takashi Kanamori¹, Rena Matsumoto¹, Tatsuya Niwa², Hideki Taguchi², Takuya Ueda³
- (¹GeneFrontier Corp., ²IIR, Tokyo Tech., ³Grad. Sch. of Frontier Sci., Univ. of Tokyo)

Abstract

PUREfrexは、大腸菌でタンパク質合成に関与する因子を再構成した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1 mg/mL程度まで増大しており、反応液の酸化還元状態の調整やジスルフィドイソメラーゼの添加により、様々なジスルフィド結合含有タンパク質を、活性型で合成することも可能となっている。一方で、合成が難しいタンパク質も存在している。例えば、連続したプロリン残基(Pro-Pro-ProやPro-Pro-Glyなど)を含む一部のタンパク質である。このような配列を含むタンパク質の翻訳において、大腸菌ではEF-Pと呼ばれる翻訳因子の関与が知られているが、現行のPUREfrexにはEF-Pは含まれていない。そこで、PUREfrexにおけるEF-Pの添加効果を、連続したPro残基を含むタンパク質の合成で検証した。EF-Pは、34位のリジン側鎖にβリシル化という翻訳後修飾を受けるため、修飾の有無による翻訳促進効果への影響についても調べた。その結果、例えば、大腸菌のPfkBタンパク質の合成では、未修飾のEF-Pを添加した場合でも添加濃度依存的に合成量が増大し、1μMの添加で合成量が未添加の場合に対して約1.7倍になった。修飾EF-Pでは添加効果がさらに増大し、1μMの添加で約2.1倍の0.7mg/mLの合成量が得られた。一方、連続したPro配列を含まないDHFRの合成では、添加効果は見られなかった。このように、EF-Pの添加によりPUREfrexで合成できるタンパク質の対象がさらに広がることが期待される。

1. Preparation of EF-P

E. coli EF-P is one of translation factors.

EF-P has a promoting activity for the peptide bond formation between the first methionine and the second amino acid and the elongation of consecutive proline residues (3 or more prolines).

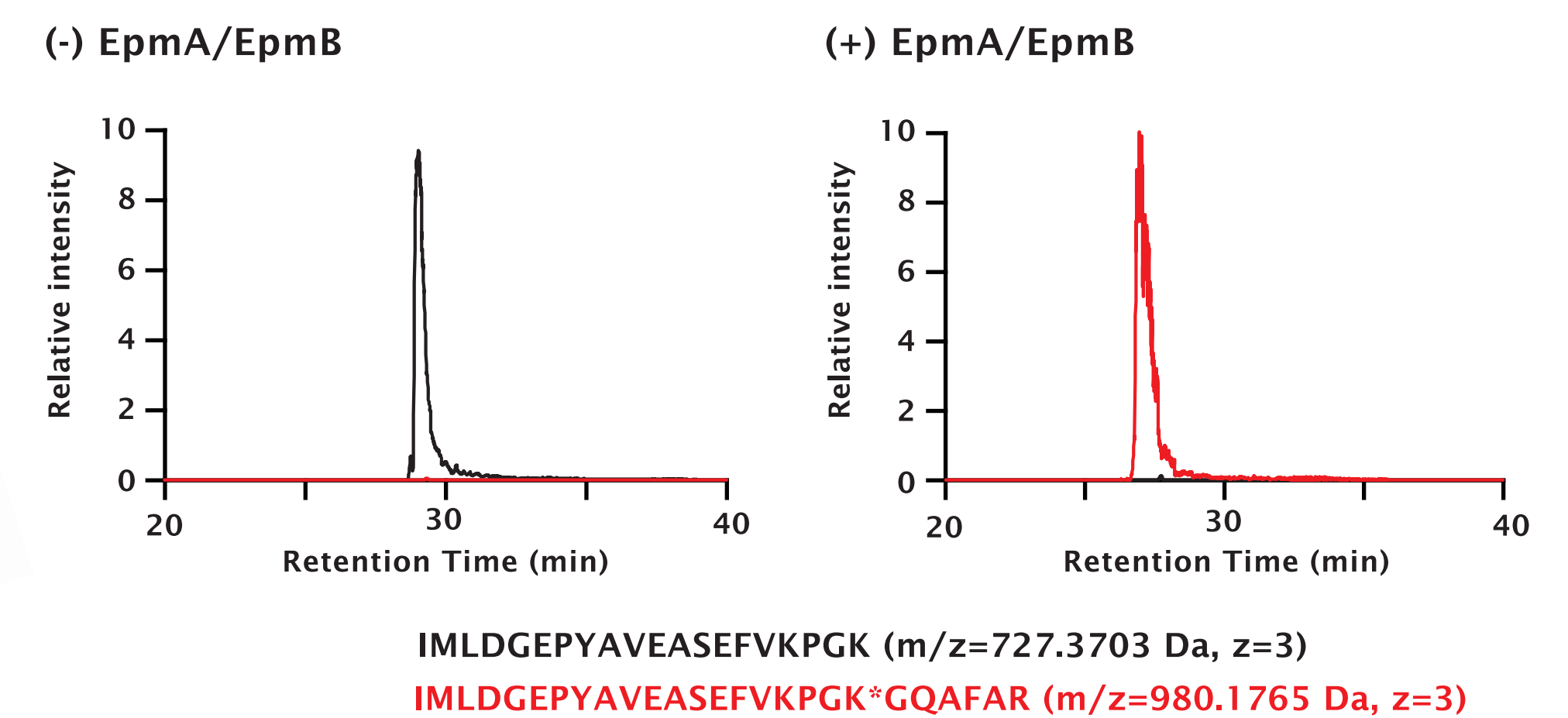
Lysine at 34th is post-translationally modified to β-lysllysine by EpmA (YjeA/GenX) and EpmB (YjeK) and the modification is important for its activity.

Eukaryote has a homolog (eIF5A) and specific lysine residue in eIF5A is post-translationally converted to hypusine.



(PDB ID: 3A5Z)

MS1 Extracted Ion Chromatogram of the isolated recombinant EF-P from *E. coli*

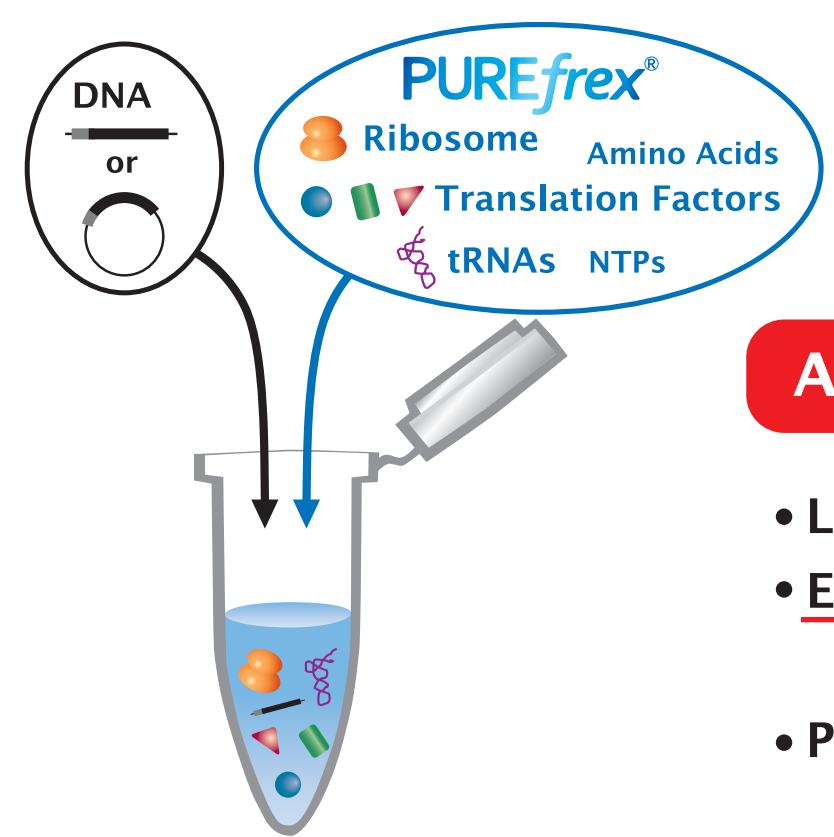


IMLDGEPYAVEASEFVKPGK (m/z=727.3703 Da, z=3)
IMLDGEPYAVEASEFVKPGK*GQAFAR (m/z=980.1765 Da, z=3)

Overexpressed EF-P was modified only when EpmA and EpmB were co-expressed.

2. PUREfrex®

PUREfrex® 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.



Advantage

- Low level of contamination
- Easy adjustment of the reagent composition
- PCR product usable as a template DNA

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

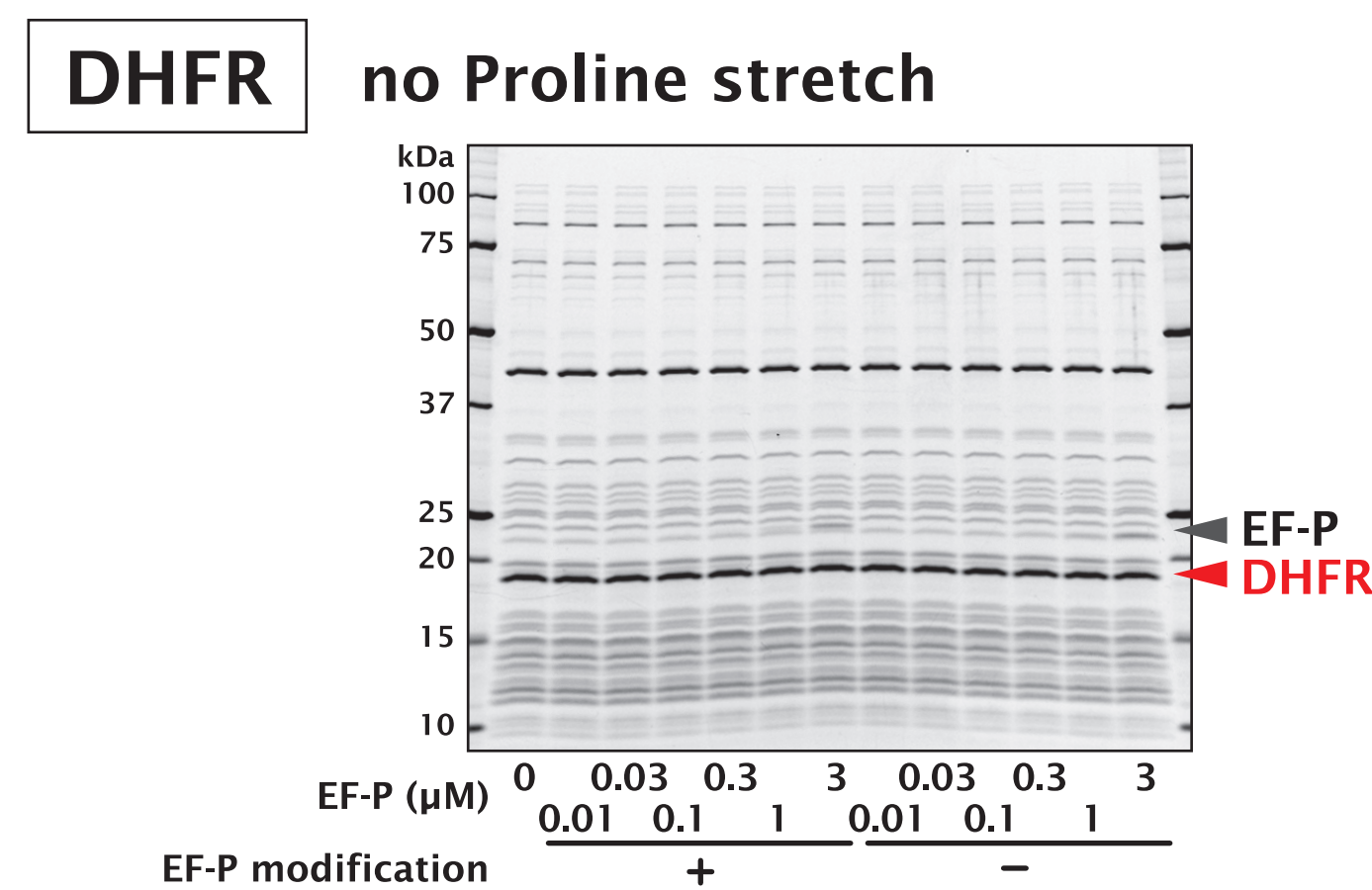
The current PUREfrex does not contain EF-P.

3. Method

PUREfrex^{2.0}

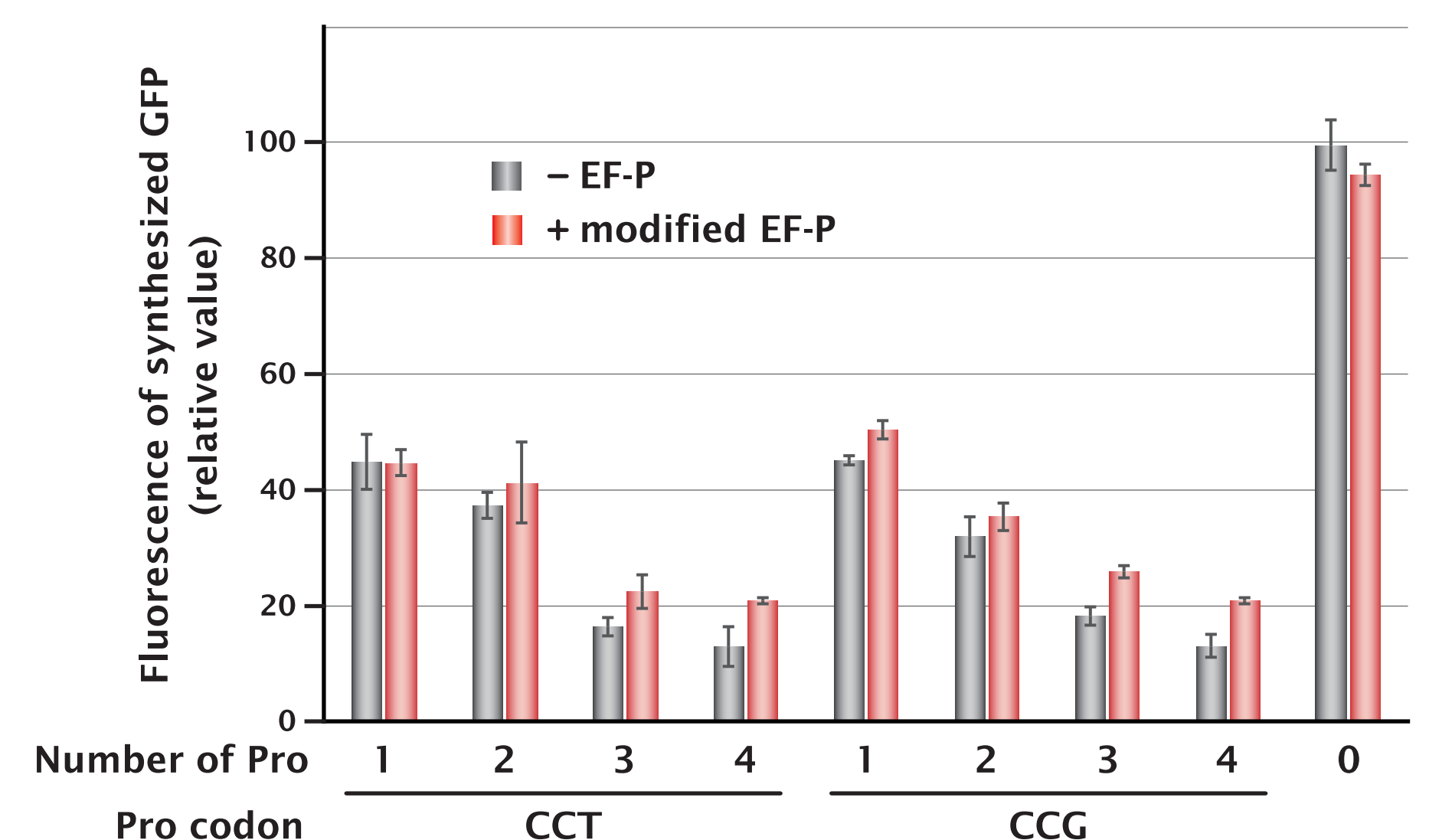
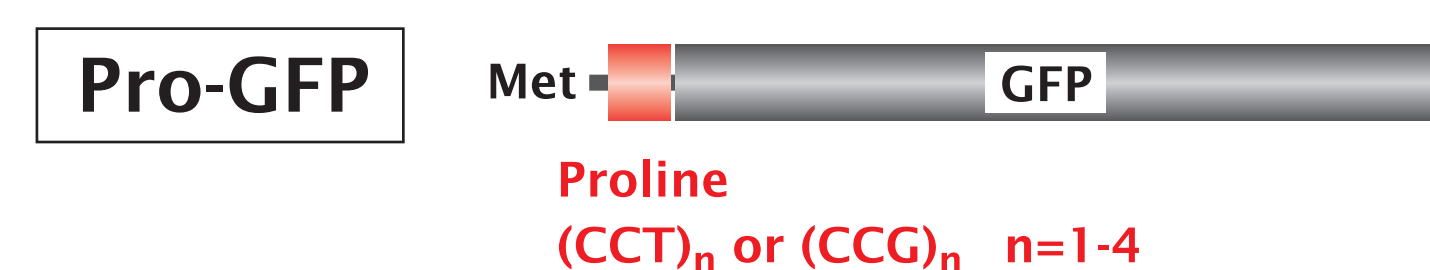
- ↓ + modified or unmodified EF-P
- ↓ + each DNA (DHFR, AmiB, PfkB, Ggt, IL6 or Pro-GFP)
- ↓ incubation at 37°C for 4 h
- ↓ SDS-PAGE or Fluorescence measurement

4. Synthesis of DHFR



Addition of EF-P did not affect at all on the synthesis of DHFR.

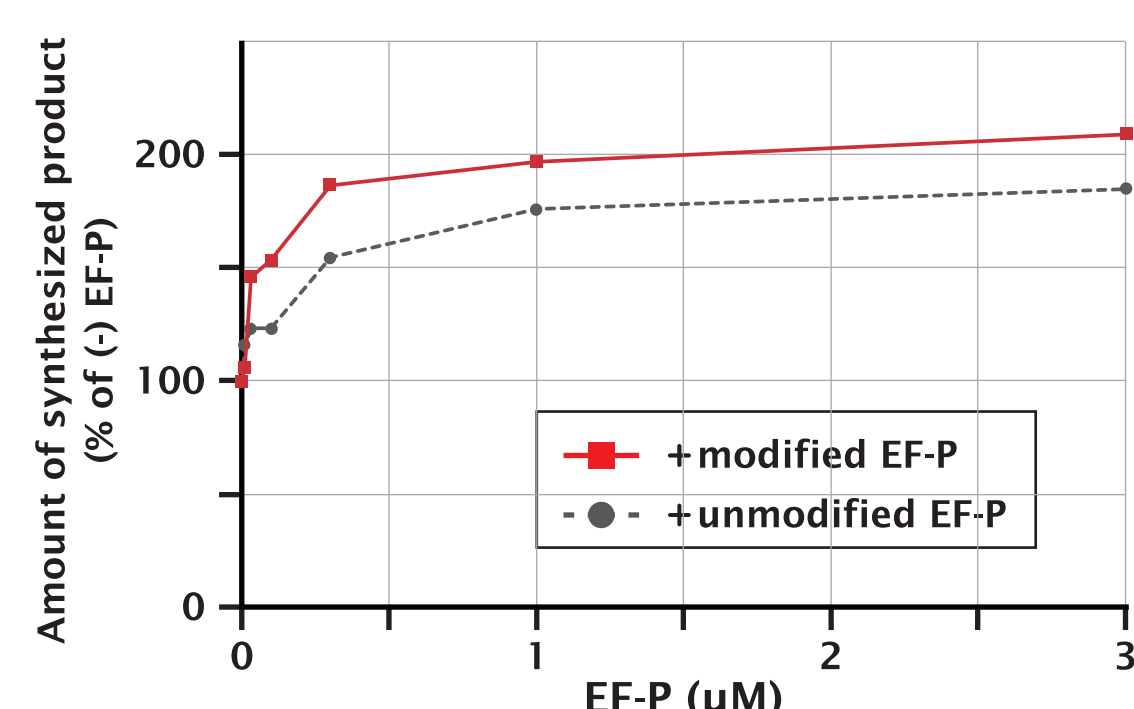
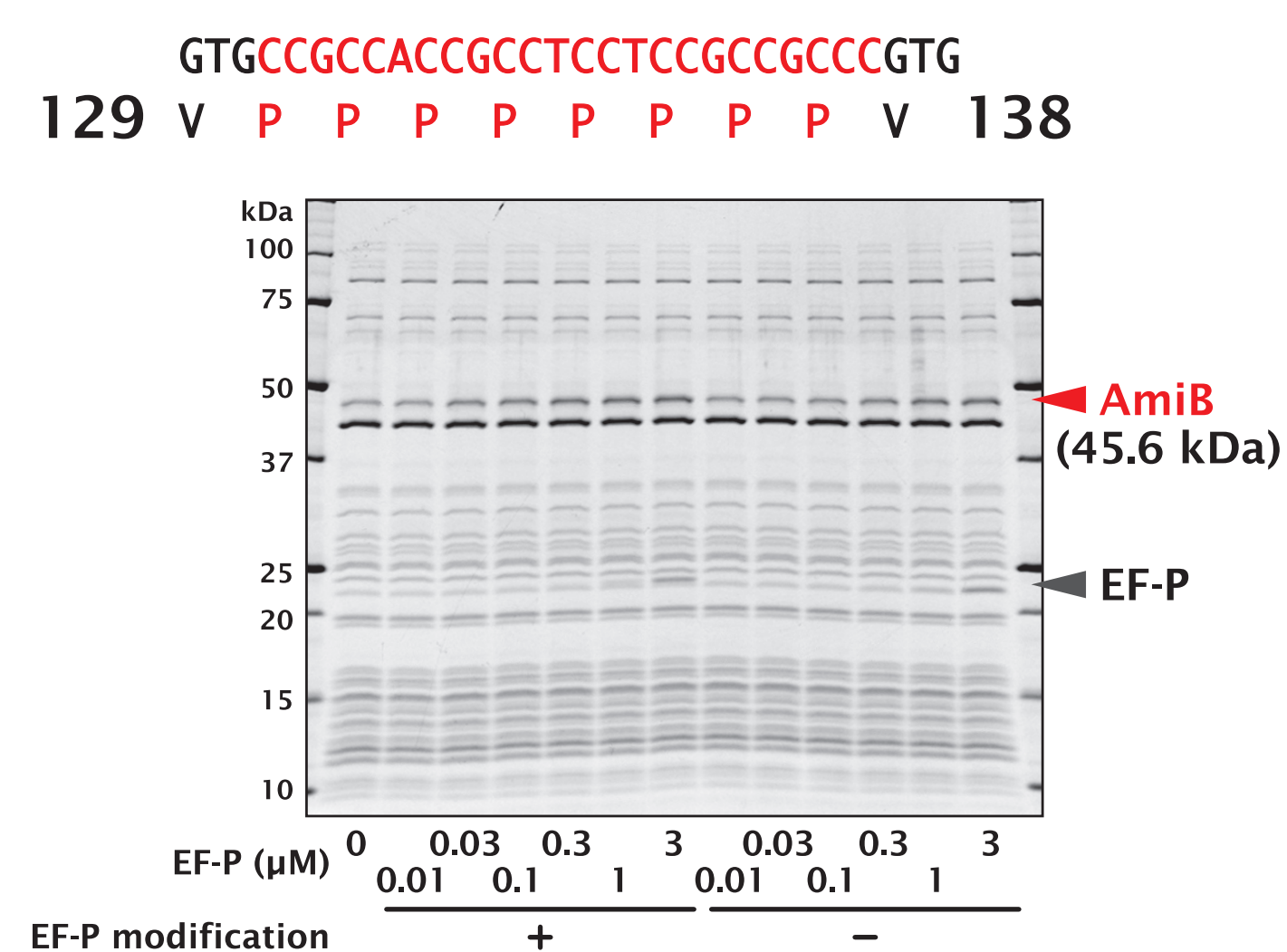
5. Synthesis of Pro-GFP



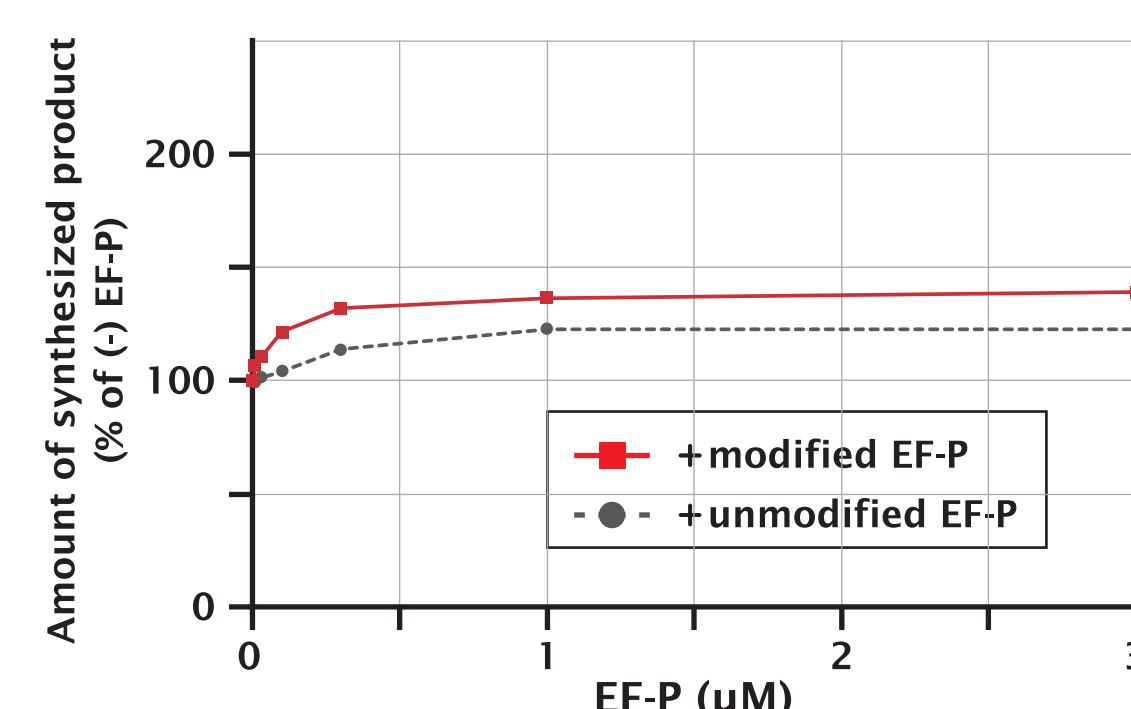
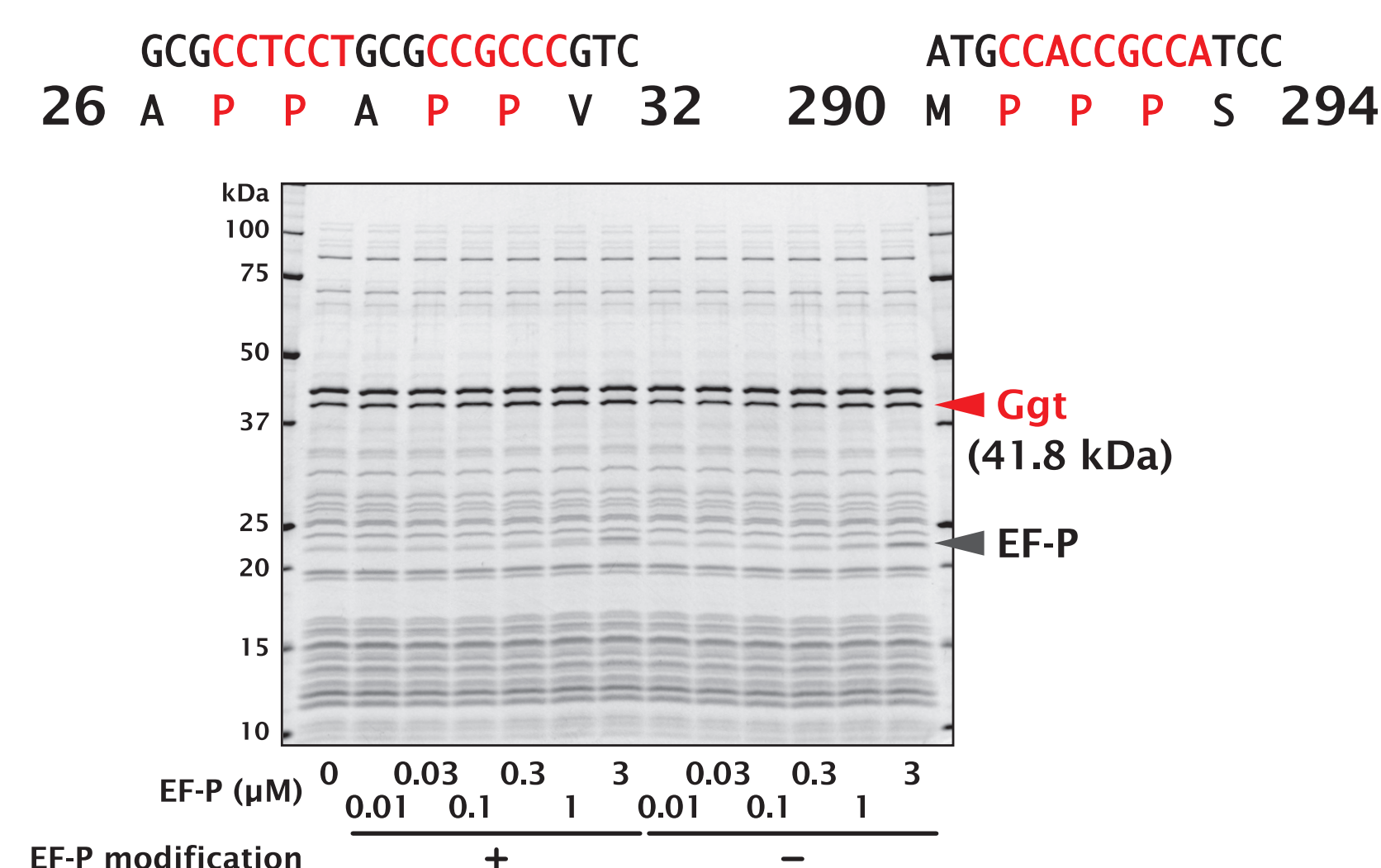
The amount of the synthesized products were reduced by insertion of a proline residue immediately after the first methionine. In case of 3 and 4 prolines, addition of EF-P increased the yield.

6. Synthesis of proteins containing Pro-stretch

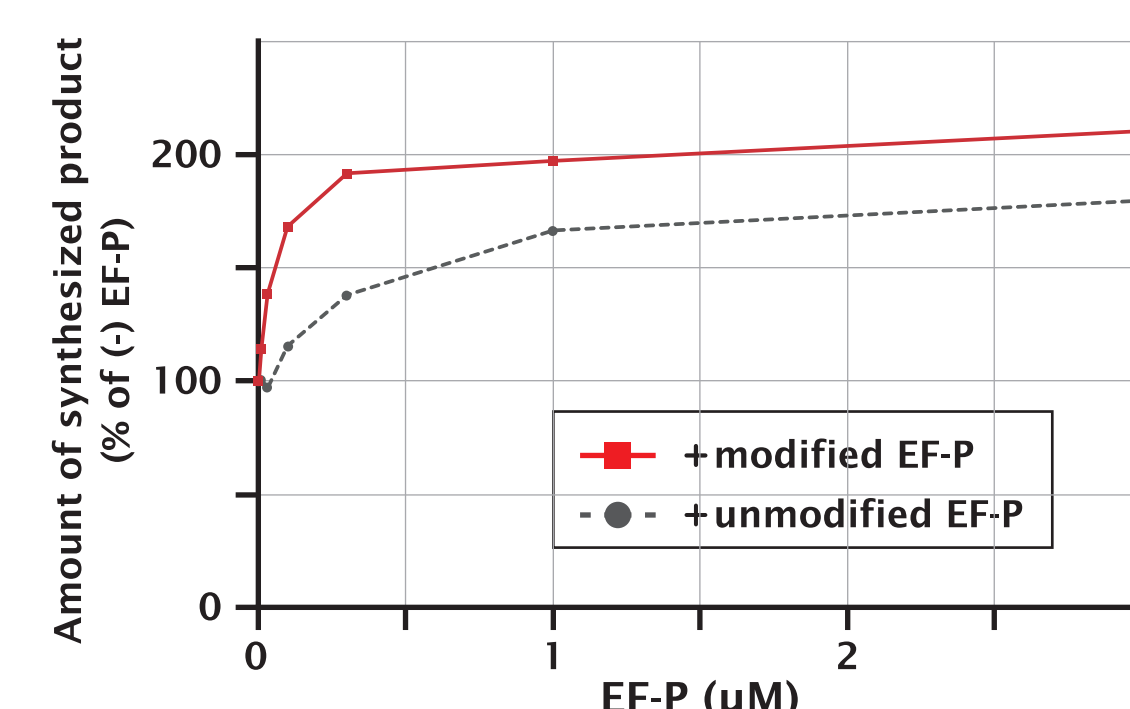
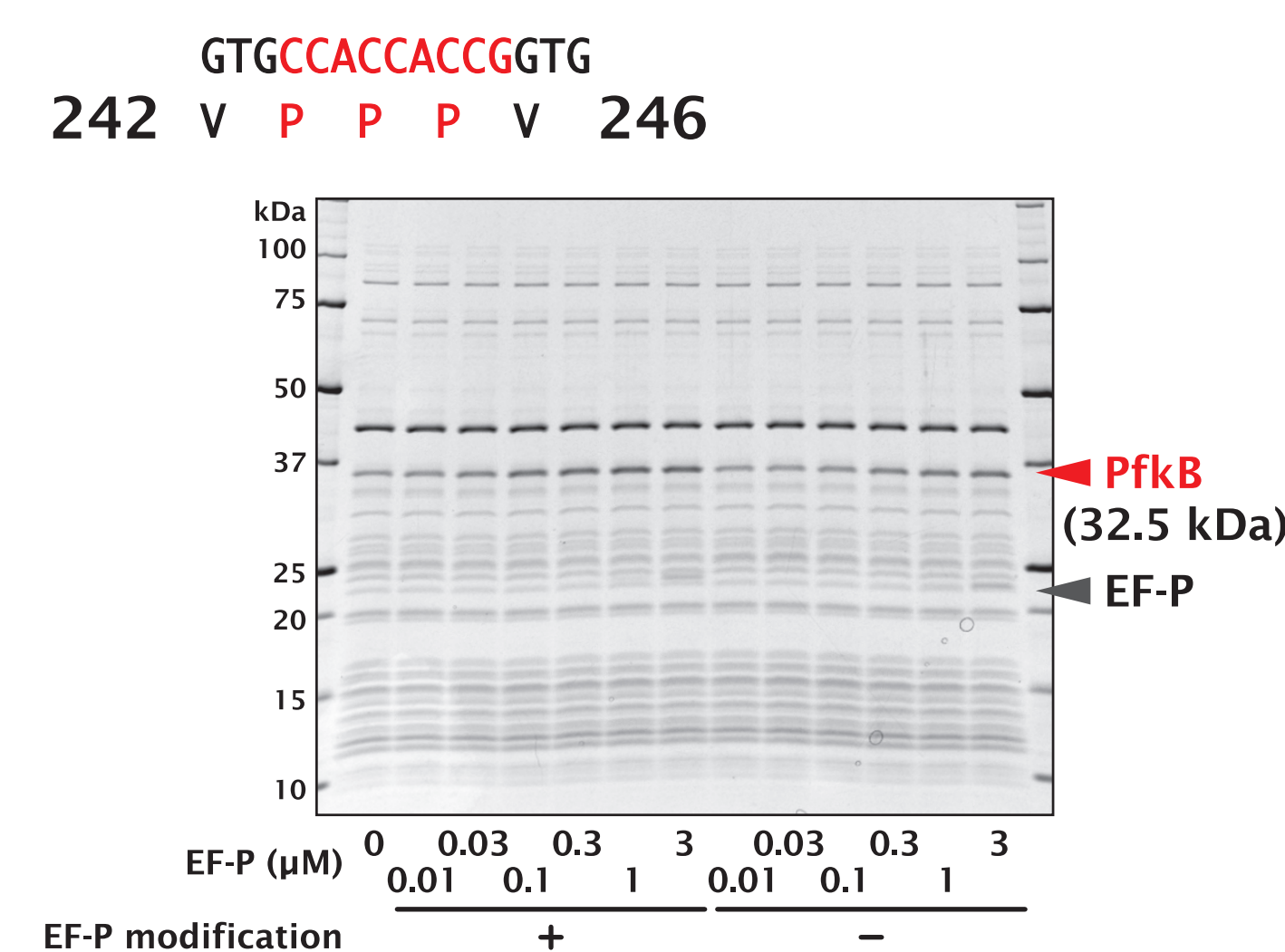
AmiB (*E. coli*)



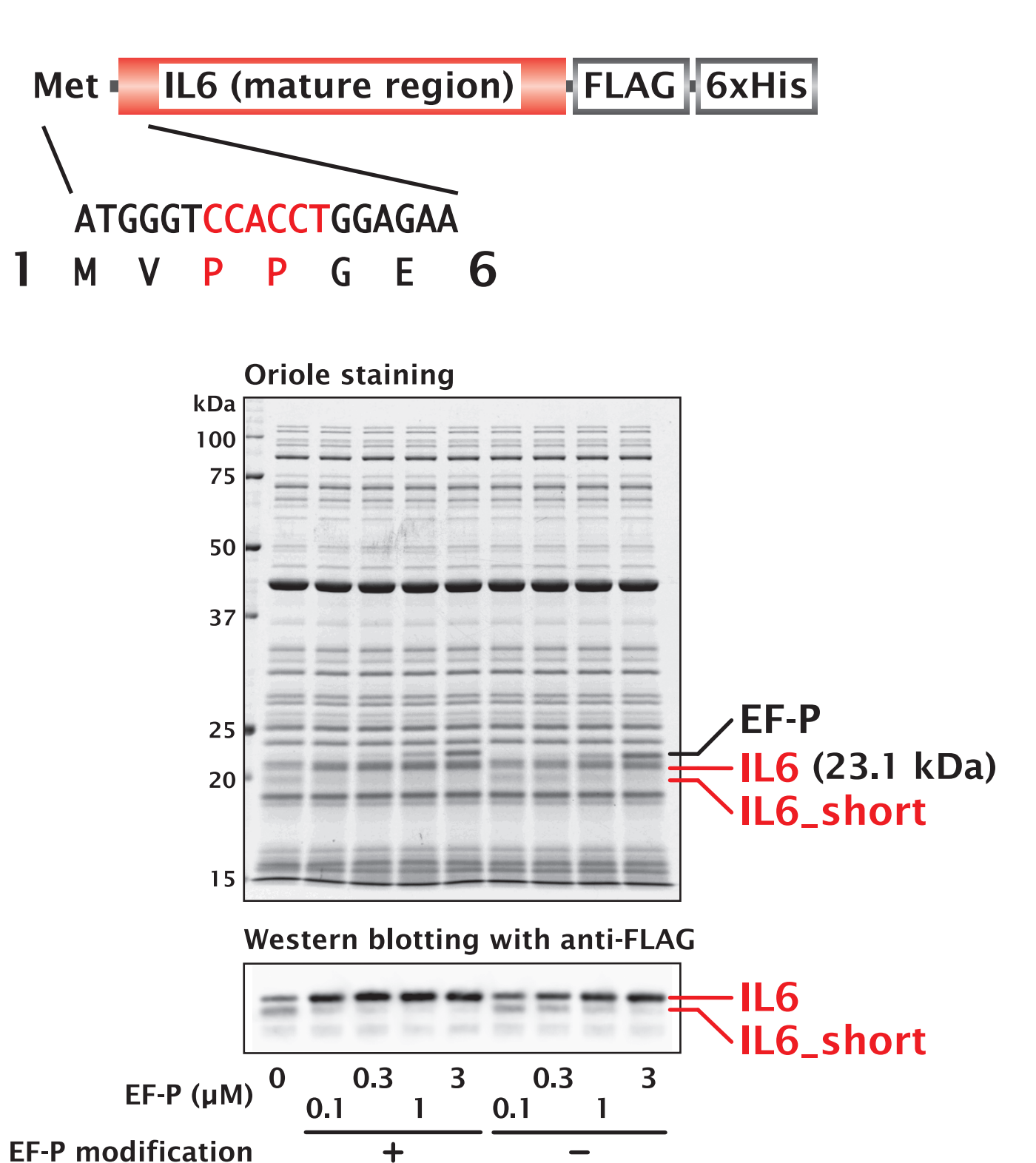
Ggt (*E. coli*)



PfkB (*E. coli*)

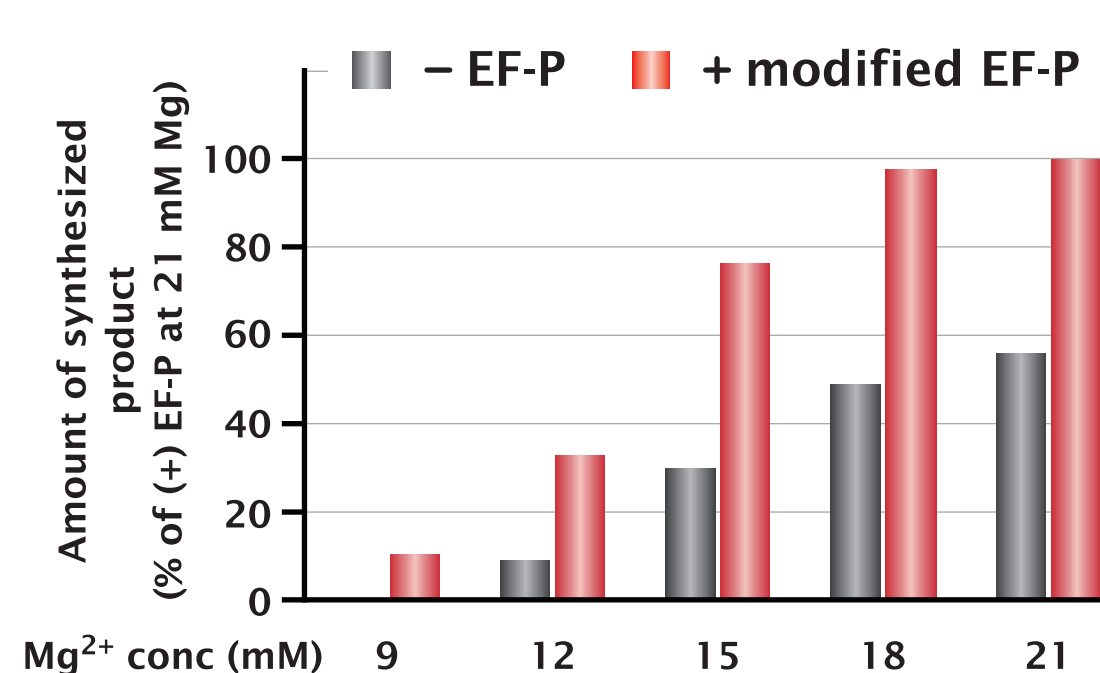
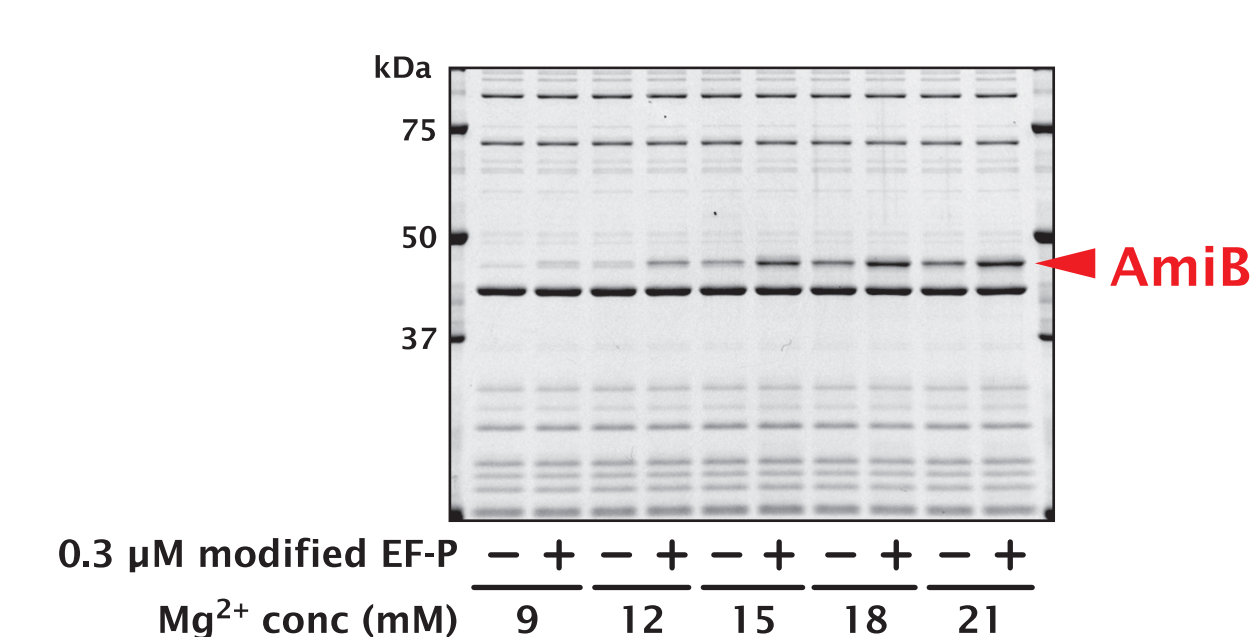


IL6 (*H. sapiens*)



Proteins containing proline stretch could be synthesized using PUREfrex even without EF-P. Addition of EF-P increased the amount of the products. Modified EF-P was more effective than unmodified EF-P.

7. Synthesis of AmiB at various Mg²⁺ concentration



Translation efficiency was affected by Mg²⁺ concentration. Effect of EF-P was larger at lower Mg²⁺.

Summary

PUREfrex でのプロリン残基が連続したタンパク質の合成

- EF-Pを添加すると、合成量が1.5–2倍程度に増加。
 - 添加効果は、合成するタンパク質によって異なる。
 - 添加効果は、プロリン残基の数だけに依存しない。
- EF-Pの翻訳後修飾は必須ではないが、翻訳後修飾により比活性が増加。
- N末端のプロリン残基は、合成に大きな影響を与える可能性がある。
- EF-Pを添加しなくても、高Mg²⁺濃度で合成可能。