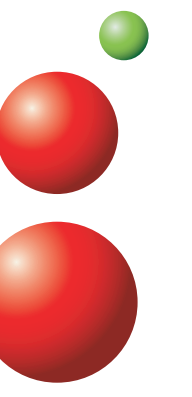


再構成型無細胞タンパク質合成系(PUREfrex)を用いたプロリン残基を含むタンパク質の合成効率の改善

Improvement of the translation efficiency of proline residue-containing proteins 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) GeneFrontier

○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1mg/mL程度まで増大しており、抗体(IgG)などの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になっている。しかしながら、合成するタンパク質の配列によっては合成量が低い場合もある。塩基配列が原因の場合は、同義コドンへの置換により合成量を改善させることも可能である。一方、アミノ酸配列が原因の場合は配列を変えることができないため、反応液の調整が必要になる。本発表では、プロリン残基が原因で合成量が低い場合に、特定の因子を添加した反応液を使用することにより合成量が増加した例を報告する。

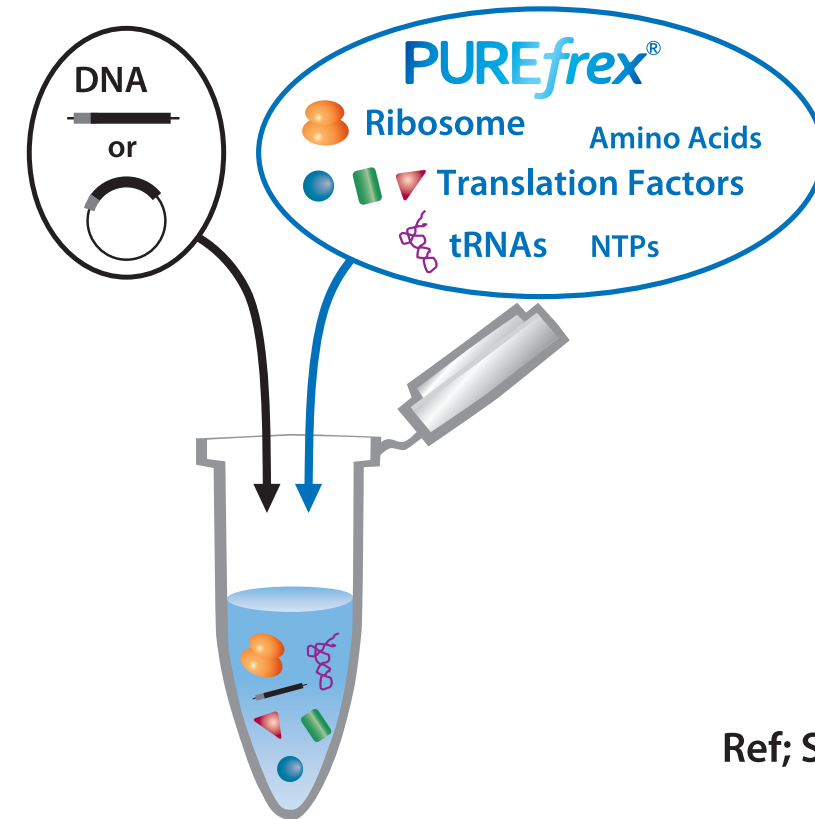
連続したプロリン残基(Pro-Pro-Proなど)を含むタンパク質の合成において、大腸菌ではEF-Pと呼ばれる翻訳因子の関与が知られているが、現行のPUREfrexにはEF-Pは含まれていない。そこで、連続したプロリン残基を含むタンパク質を、PUREfrexで合成する場合のEF-Pの添加効果を検証した。その結果、PUREfrexでは、EF-Pを添加しなくても合成できるが、EF-Pを添加することで合成量が2倍程度増加することを確認した。また、N末端に近い部位にプロリンが存在するIL6成熟体をEF-Pを添加せずに合成した場合、目的産物よりも低分子量の副産物も確認されたが、EF-Pを添加して合成すると、この副産物はほぼ消失して目的産物の合成量も増加した。一方、C末端がプロリン残基のタンパク質を現行のPUREfrexで合成した場合、終止コドンがUGAでは翻訳効率が低かったが、比活性の高い終結因子(RF2)を使用することで合成量が増加した。

以上の結果は、EF-Pや比活性の高い翻訳因子を添加したPUREfrexを用いることで、プロリン残基を含むタンパク質の翻訳効率を改善できることを示している。

1. 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.
- contains RF2 (246T/-methylation).

2. Method

PUREfrex^{2.0}

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

PUREfrex^{2.0} (- RF2)

- ↓ + RF2 (246T/-methylation or 246A/-methylation)
- ↓ + each DNA (DHFR-Ala or DHFR-Pro)
- ↓ incubation at 37°C for 4 h
- ↓ SDS-PAGE and quantification

3. 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).

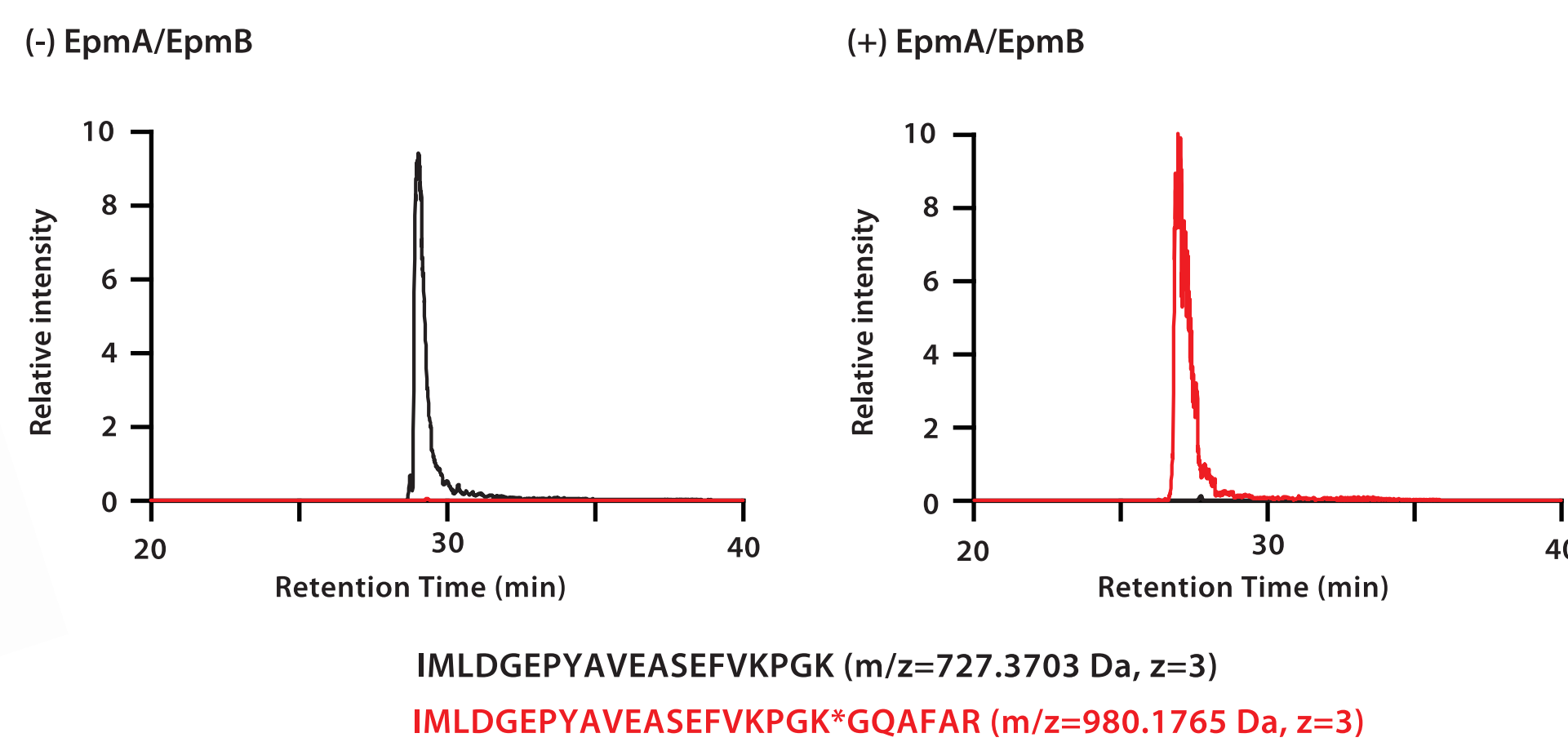
Lysine at 34th is post-translationally modified to β -lysyllysine by EpmA (YjeA/GenX) and EpmB (YjeK) and the modification is important for its activity.

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



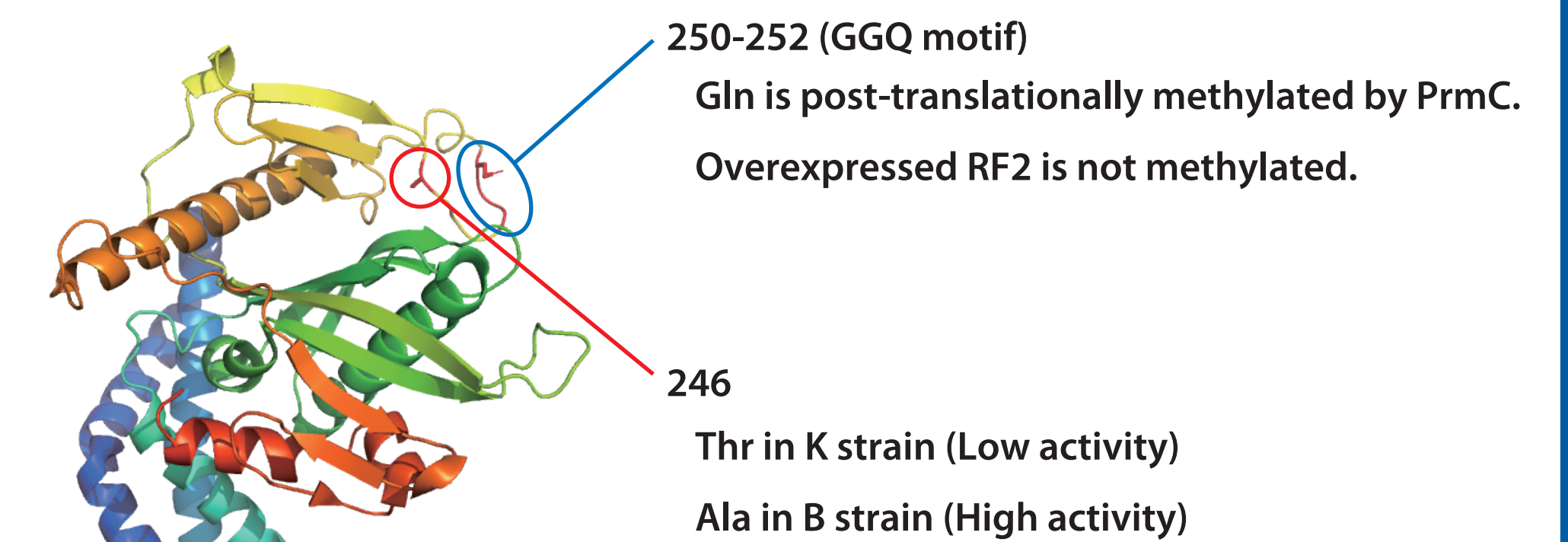
(PDB ID: 3A5Z)

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



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

6. Release Factor 2 (RF2)

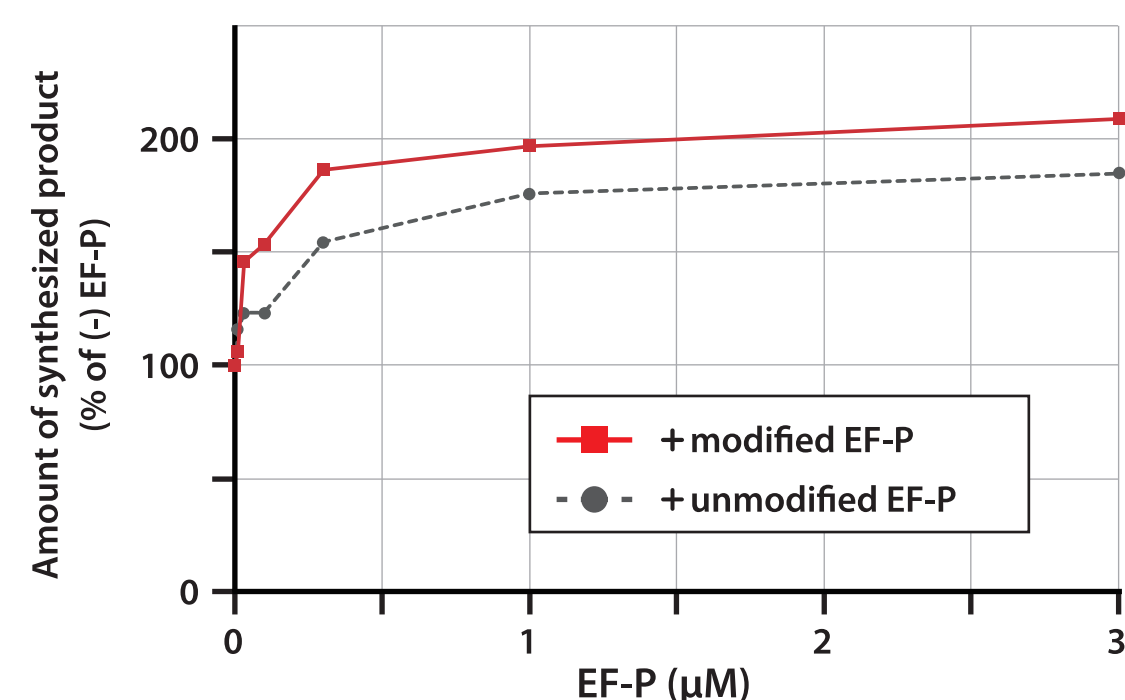
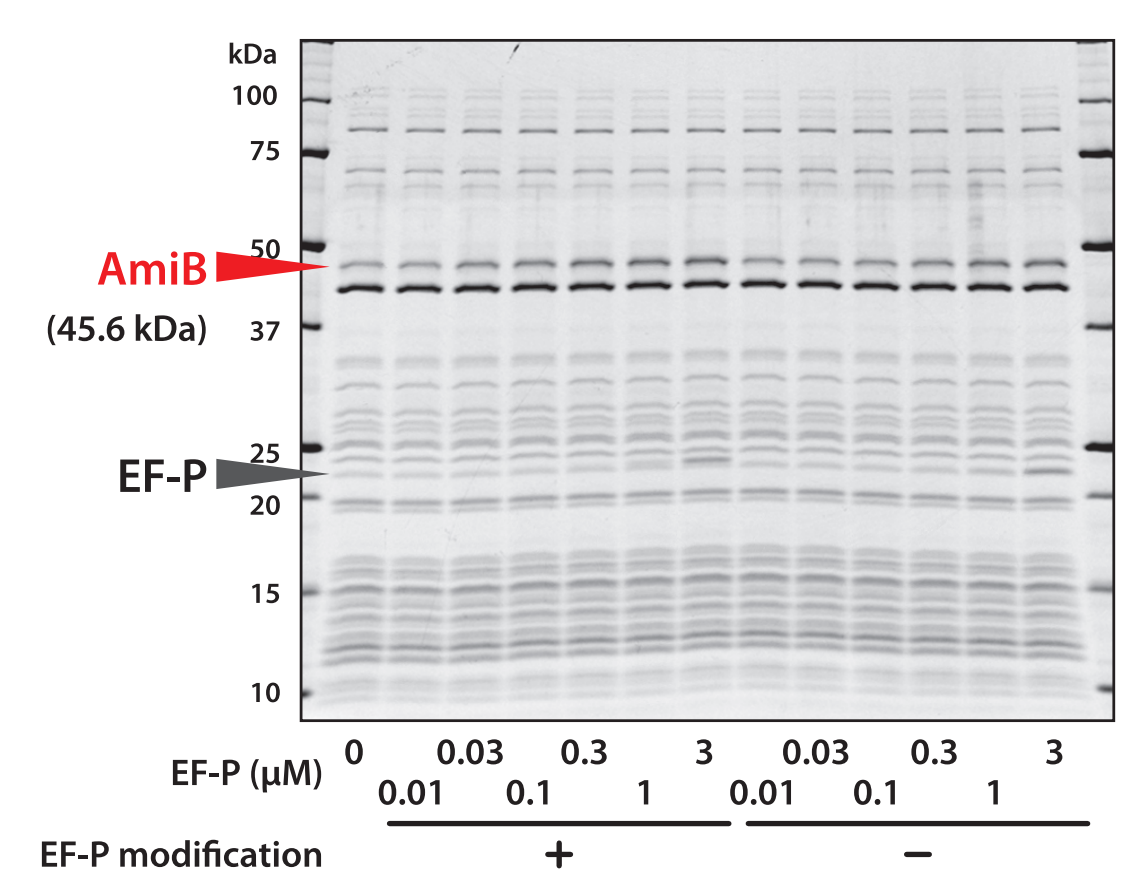


Ref; Mora L. et al. (2007) *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p. 36538
Pierson W.E. et al. (2016) *Cell Rep.*, vol. 17, p. 11

4. Synthesis of proteins containing Pro-stretch

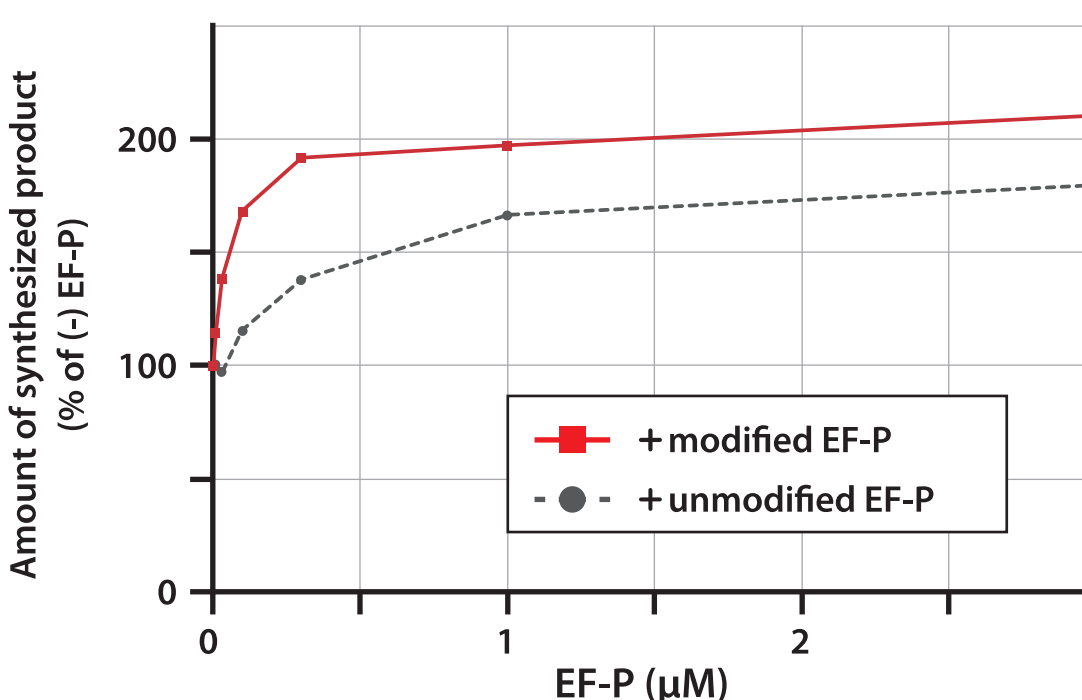
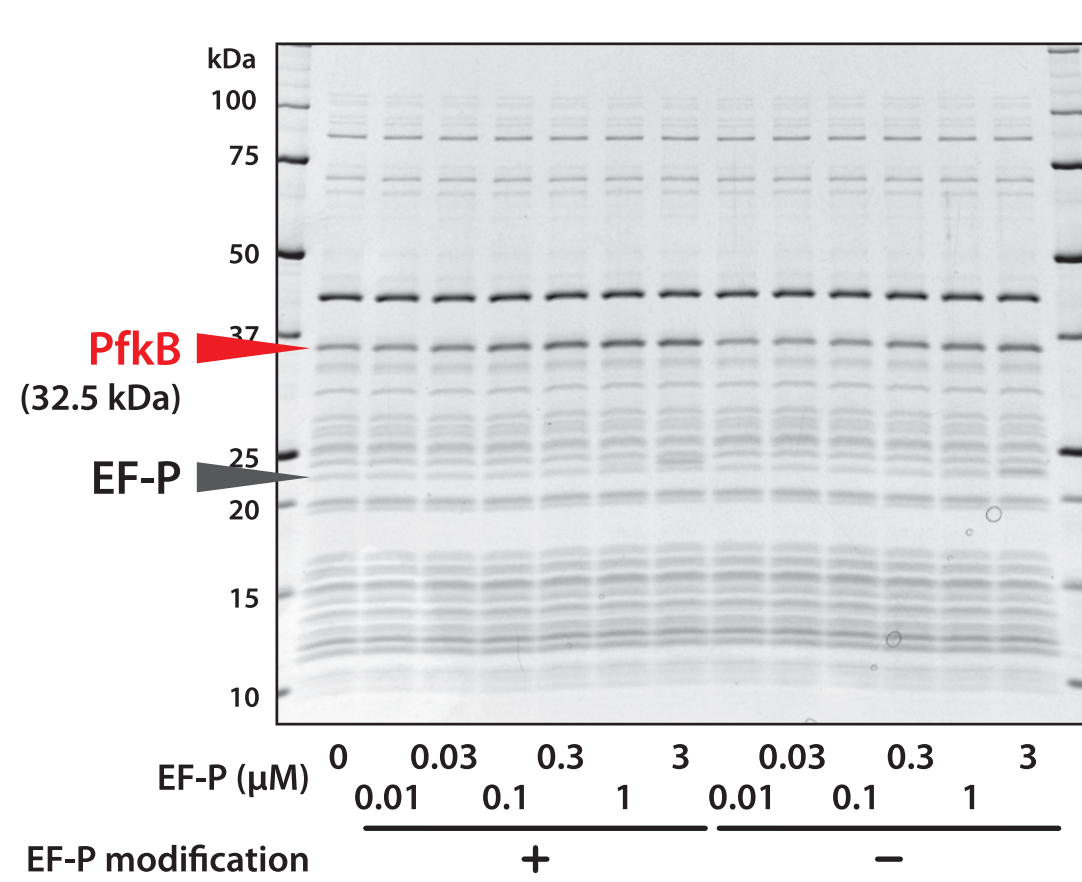
AmiB (*E. coli*)

GTGCGCCACCGCCTCTCCGCCGCCGTG
129 V P P P P P P P P V 138



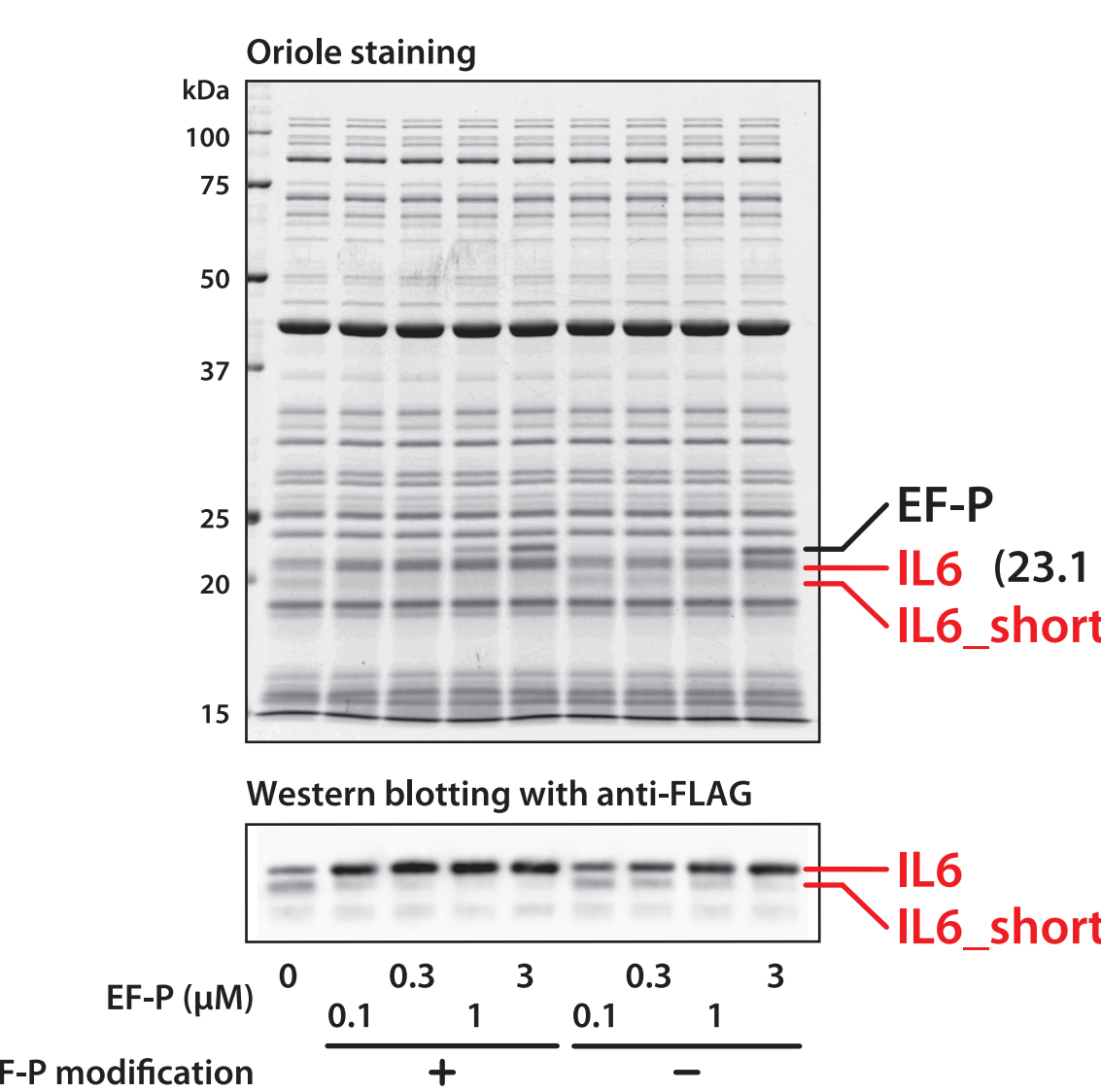
PfkB (*E. coli*)

GTGCCACACCGGTG
242 V P P P V 246



IL6 (*H. sapiens*)

Met IL6 (mature region) FLAG 6xHis
ATGGTTCACCTGGAGAA
1 M V P P G E 6



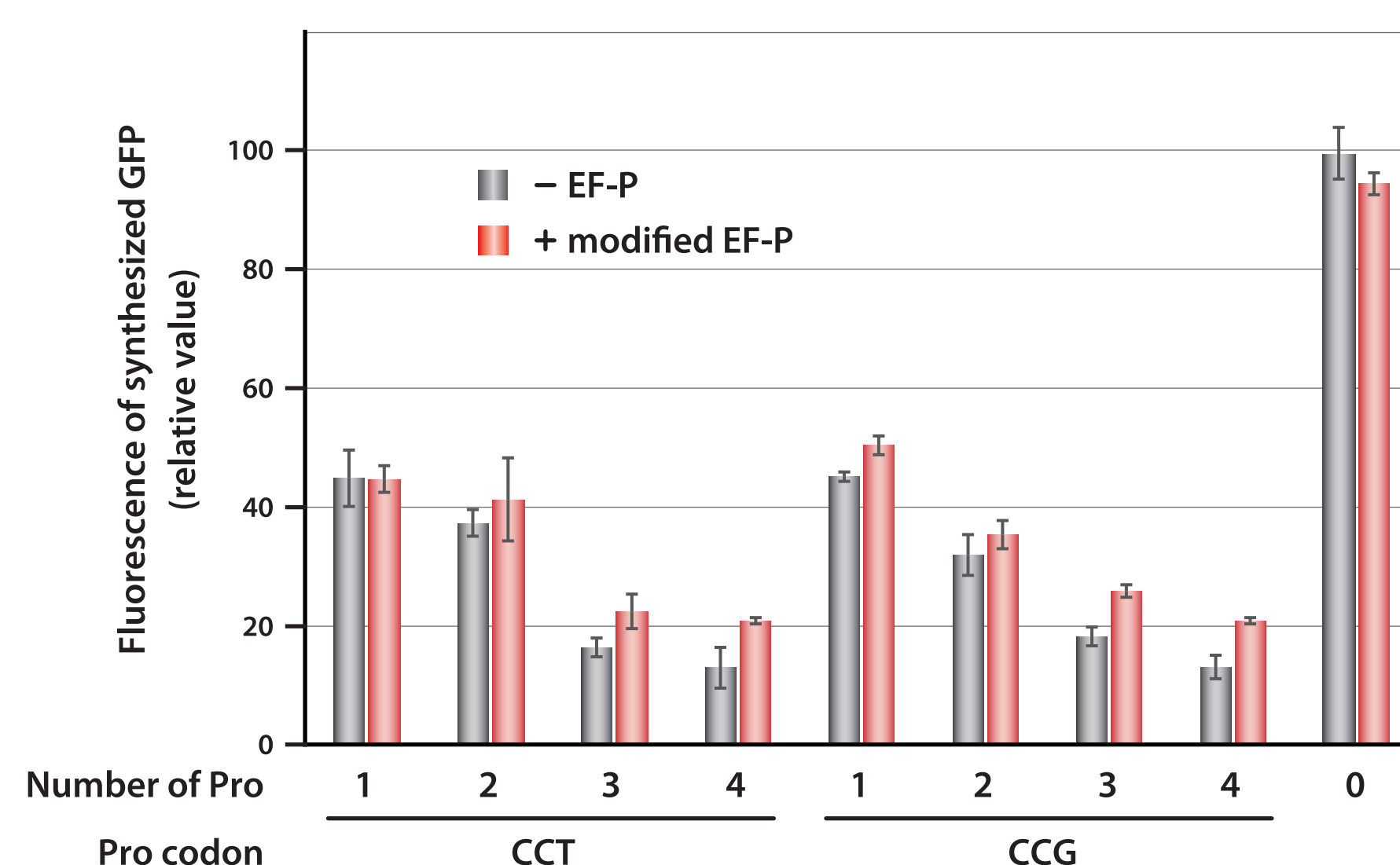
Proteins containing proline stretch could be synthesized even without EF-P. Addition of EF-P increased the amount of the products. Modified EF-P was more effective than unmodified EF-P.

5. Synthesis of Pro-GFP

Pro-GFP

Met Proline (CCT)_n or (CCG)_n n=1-4

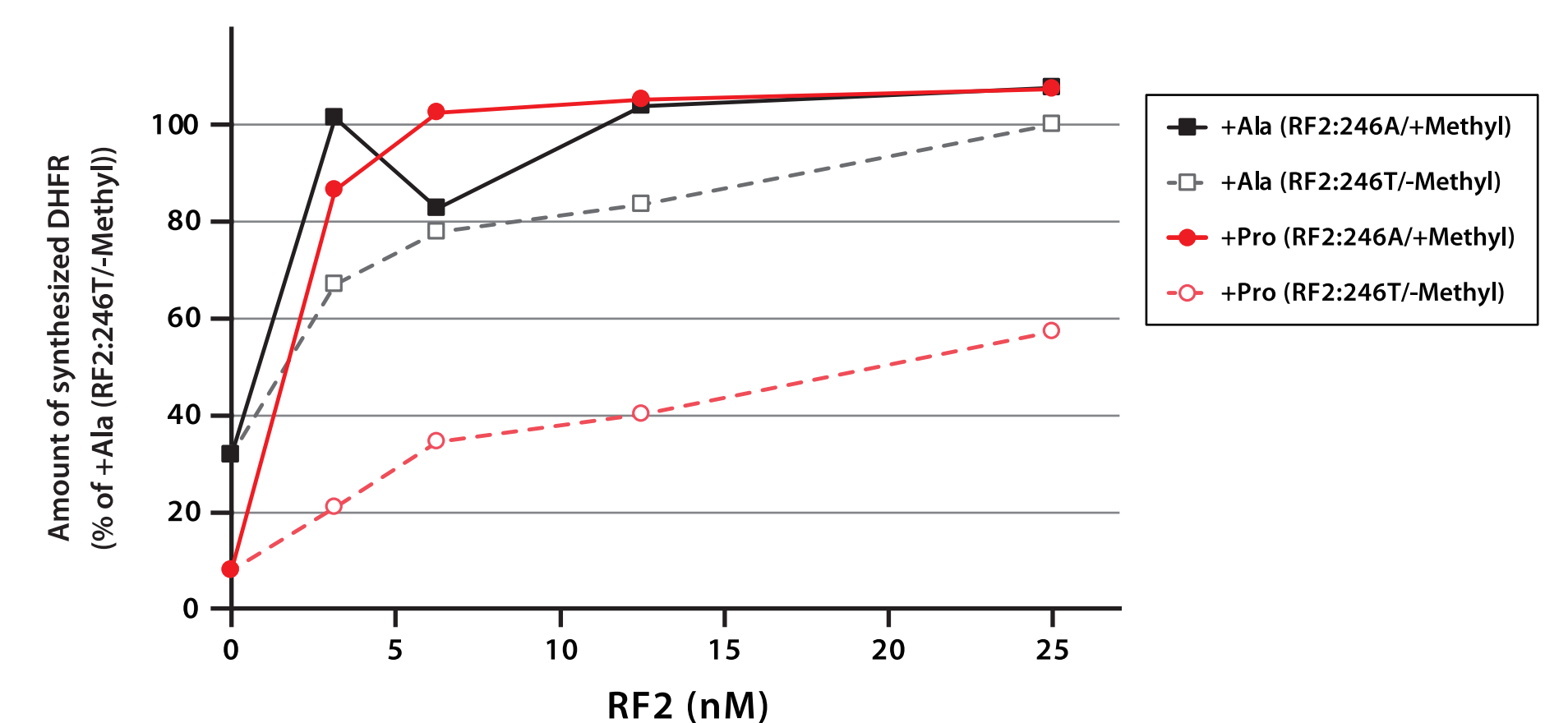
The amount of the synthesized products were reduced by insertion of a proline residue immediately after the first methionine. In case of 3 and 4 prolines, addition of EF-P increased the yield.



7. Synthesis of DHFR-Pro

DHFR-Pro (or Ala)

DHFR Pro/Ala-(UGA)



Proline residue just before the stop codon (UGA codon) reduced the translation efficiency. RF2 with higher activity improved the translation efficiency regardless of the kind of amino acids before the stop codon.

Summary

プロリン残基を含むタンパク質のPUREfrexでの合成

- プロリンが連続しているタンパク質
 - ・ EF-Pの添加により合成量が1.5–2倍増加する。
 - 添加効果は、合成するタンパク質によって異なり、プロリン残基の数だけに依存しない。
- N末端側にプロリン残基を含むタンパク質
 - ・ 合成量を低下させる。
 - ・ EF-Pの添加により改善できる。
- C末端にプロリン残基を含むタンパク質
 - ・ 活性の高い終結因子の添加により合成量が増加する。