

再構成型無細胞タンパク質合成系 (PUREflex®) を用いたタンパク質合成における 錆型 DNA の 5' UTR の影響



布施(村上)朋重、松本令奈、金森崇 (ジーンフロンティア(株))

Effect of 5'UTR of template DNA on the protein synthesis using the reconstituted cell-free protein synthesis system (PUREflex®)

Tomoe Fuse-Murakami, Rena Matsumoto, Takashi Kanamori (GeneFrontier Corp.)

Abstract

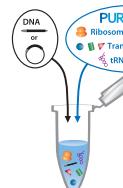
PUREflex®は、大腸菌でタンパク質合成に関与する因子を再構成した無細胞タンパク質合成系(PURE system)である。反応液の改良により、合成功能は最大で1 mg/mL以上に増大したが、合成功能が低いタンパク質の事例も多数報告されている。我々は、合成功能の差が生じる原因の一つに錆型DNAの塩基配列があると考え、PUREflex®でのタンパク質合成に適した塩基配列の検討を進めており。ORFのコンドンについては、大腸菌での使用頻度に応じて複数のコンドンを用いた場合に合成功能が高くなること、また、N末端領域のコンドンについては、使用頻度ではなくAT含量が高いコンドンを使用した場合に合成功能が高くなることを既に報告している。本発表では、開始コドン上流(5'UTR)の配列について検討した結果を報告する。

現在使用している5'UTRは、ステムループ領域、翻訳促進配列(イブシン配列)、リボソーム結合配列(SD配列)を含んでいる。各配列の有無や配列間のスペーサーの長さが異なる5'UTRをGFP遺伝子の上流に付加した錆型DNAを調製し、それら錆型DNAをPUREflex®に添加してGFPを合成功した。合成功能のGFPの蛍光量を比較することで、5'UTRのウイング配成に与える影響を評価した。その結果、ステムループ領域が付加された場合、下流側の配列に関係なく、付加されていない場合に比べてGFPの蛍光量が増大した。SD配列は、現在使用している5'UTRと比較して、長く(10塩基)しても短く(3塩基)しても20%程度蛍光量が減少し、完全に除去すると、蛍光量は10%以下まで顕著に減少した。翻訳促進配列が存在すると蛍光量が増大し、特にSD配列が短い場合や長い場合は増大効果が大きくなかった。以上の結果から、効率よくタンパク質合成を行うためには、5'UTRにステムループ領域、翻訳促進配列、および適切な長さのSD配列が必要であることが確認された。

1. PUREflex®; based on the PURE system technology

PUREflex® 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.

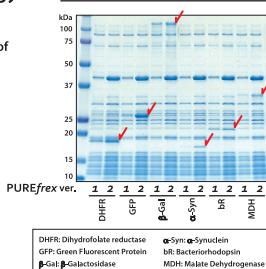


Advantage

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

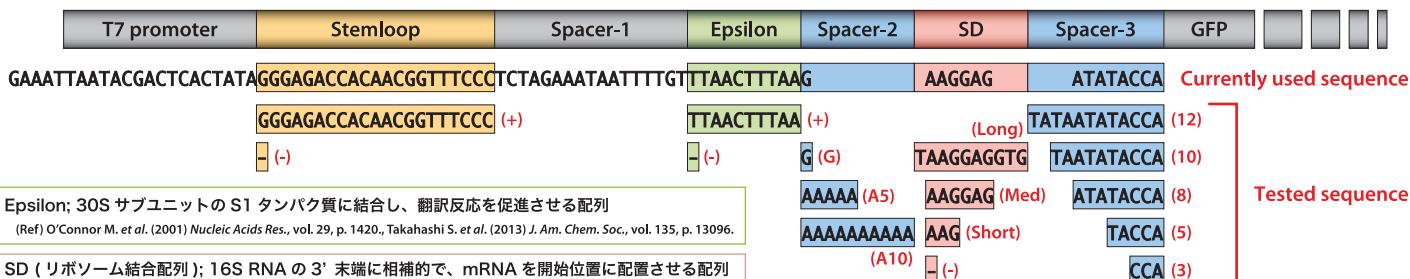
Ref: Shimizu Y. et al. (2001) *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, p. 751.

Example of Protein Synthesis

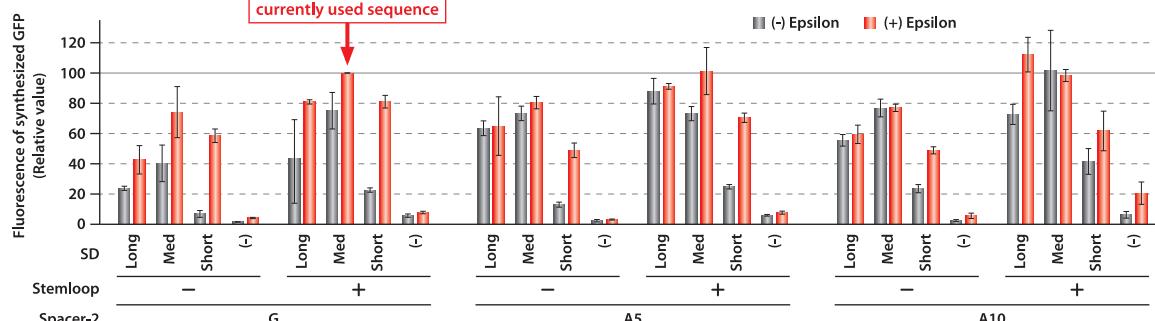


DHR: Dihydrofolate reductase
GFP: Green Fluorescent Protein
b-Gal: Bacteriorhodopsin
e-Syn: e-Synuclein
S5: S5 ribosomal RNA
MOH: Malate Dehydrogenase

2. Sequence of 5'-UTR of the template DNA

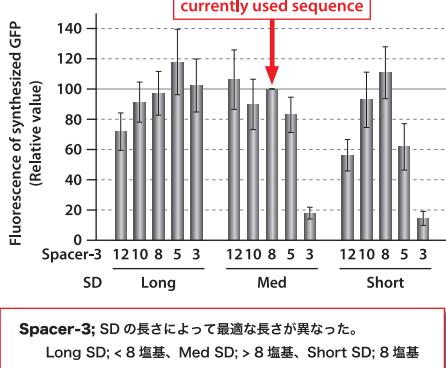


3. Effect of Stemloop, Epsilon, Spacer-2 and SD sequence

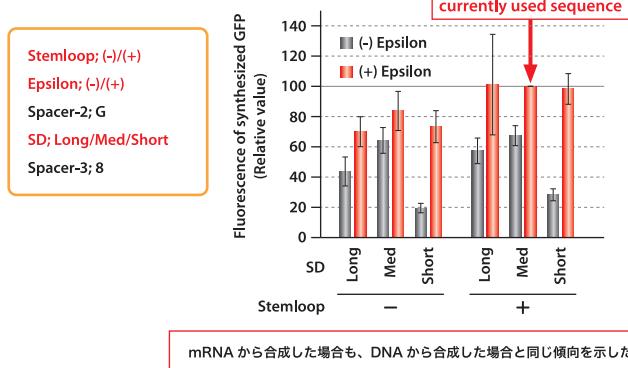


Stemloop; 全てのコンストラクトで、付加すると合成功能が増加した。(−) Stemloop では、合成功能が約 20% 減少した。
Epsilon; ほとんどのコンストラクトで、付加すると合成功能が増加した。特に、SD が長い場合や短い場合に増加量が大きかった。
Spacer-2; ほとんどのコンストラクトで、長くすると合成功能が増加した。
SD; ほとんどのコンストラクトで、現在使用している Med より長くしても短くしても合成功能が低下した。除去すると、ほとんど合成されなかった。

4. Effect of SD and Spacer-3 sequence



5. Protein synthesis from mRNA



Conclusion

- 最大効率で合成するためには、Stemloop、Epsilon、SD のいずれも必要。
- SD 配列の長さにより、Epsilon 配列の付加効果や、SD 配列と開始コドンとの最適距離が異なる。

Future Plan

- GFP以外のタンパク質での検証。
- Stemloop、Epsilon 配列を代替可能な配列の探索