

大腸菌由来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 配列の影響

Effect of the template DNA sequence on the protein synthesis using the *E. coli*-derived reconstituted cell-free protein synthesis system (PUREflex®)

○ 金森崇、布施(村上)朋重、松本令奈(ジーンフロンティア(株))

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

Abstract

PUREflex®は、大腸菌でのタンパク質合成に必要な因子を精製し、混合した再構成型無細胞タンパク質合成系(PURE system)である。合成量は、反応液の改良により最大で1mg/mL以上に増大したが、合成するタンパク質によって大きく異なる。我々は、反応液の改良だけでなく、目的タンパク質のアミノ酸配列や錆型DNAの塩基配列が合成量に与える影響についても検討を進めている。本発表では、錆型DNAの5'UTR、及びORFの塩基配列とアミノ酸配列がタンパク質合成に与える影響について、これまでに得られた知見を報告する。

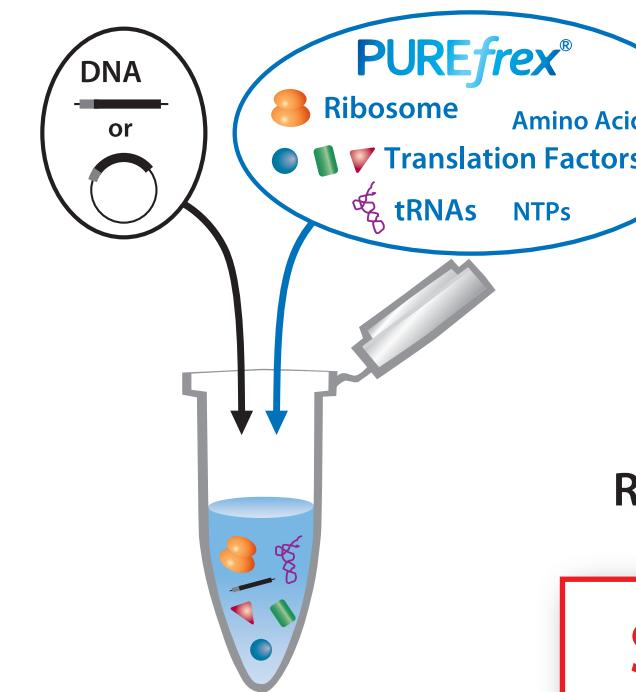
現在使用している5'UTRは、T7ファージのgene10由來の5'UTRで、T7プロモーターの下流にステムループ領域、AT-rich領域、リボソーム結合配列(SD配列)を含んでいる。それぞれの領域の必要性を確認するため、各領域の有無や長さが異なる5'UTRを付加したsfGFP遺伝子からsfGFPを合成し、蛍光量を比較した。その結果、ステムループ領域は5'側の6塩基がT7 RNA polymeraseによる転写の効率化に必要であること、SD配列を完全に除去すると合成量は10%以下に減少するが、3塩基以上あれば十分な合成量が得られることが確認した。また、AT-rich領域を削除すると合成量が1/10程度に減少し、本タンパク質合成系では、SD配列だけでなくAT-rich領域も高効率な翻訳に非常に重要であることが示された。

ORFで使用するコドンについては、大腸菌で使用頻度が最も高いコドンのみを使用した場合と、使用頻度に応じて数種類のコドンを使用した場合の合成量を比較した結果、数種類のコドンを用いた場合に合成量が高くなった。一方、開始コドン直下の約10アミノ酸のコドンは、大腸菌で使用頻度が高いコドンを使用するよりも、AT含量が高いコドンを使用すると合成量が高くなった。N末端領域のコドンは、数アミノ酸のコドンを変えるだけで合成量が10倍以上増大する場合があり、本合成系における合成効率に大きな影響を与えることが分かった。また、通常は37°Cで反応を行うが、30°C以下の低温で反応した場合、37°Cでの合成よりも、ORF(特にN末端領域)のアミノ酸配列の違いによる影響が大きいことも確認した。

1. PUREflex®; based on the PURE system technology

PUREflex® is based on the PURE system.

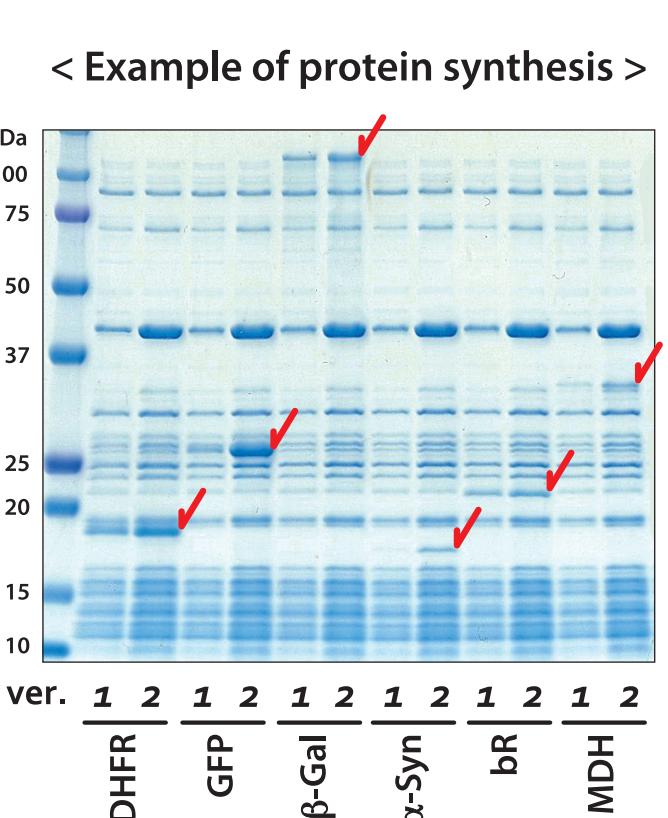
The PURE system is a reconstituted cell-free protein synthesis system, which consists of only purified factors necessary for transcription, translation and energy regeneration.



Advantage

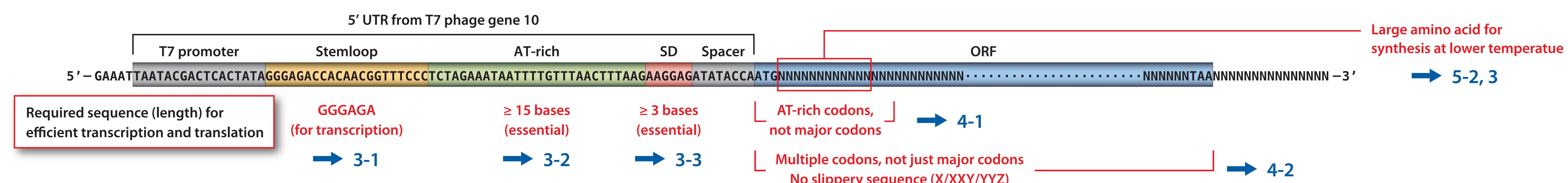
- Low level of contamination
- Easy adjustment of the reagent composition
- PCR product usable as a template DNA

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

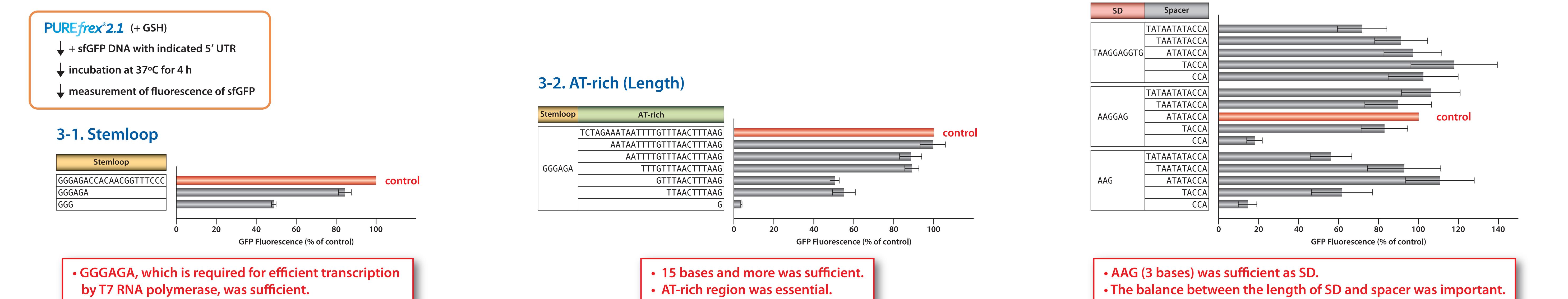


Synthesis efficiency is dependent on the protein to be synthesized.

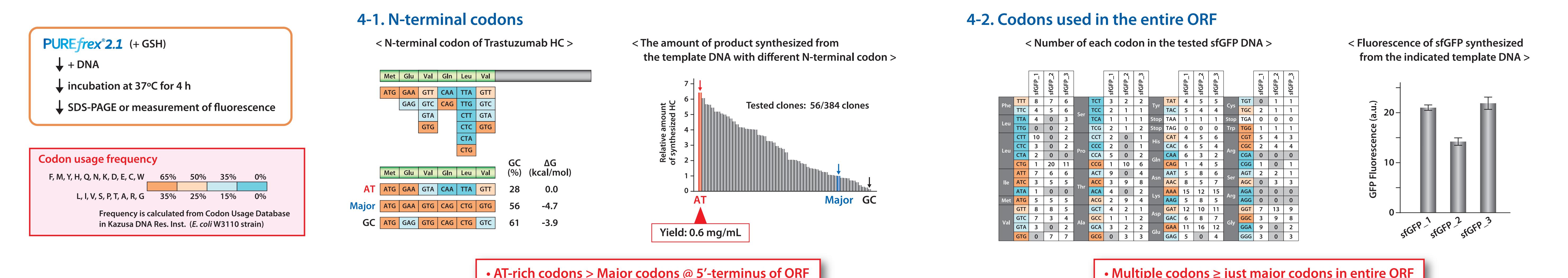
2. Construct of template DNA for PUREflex



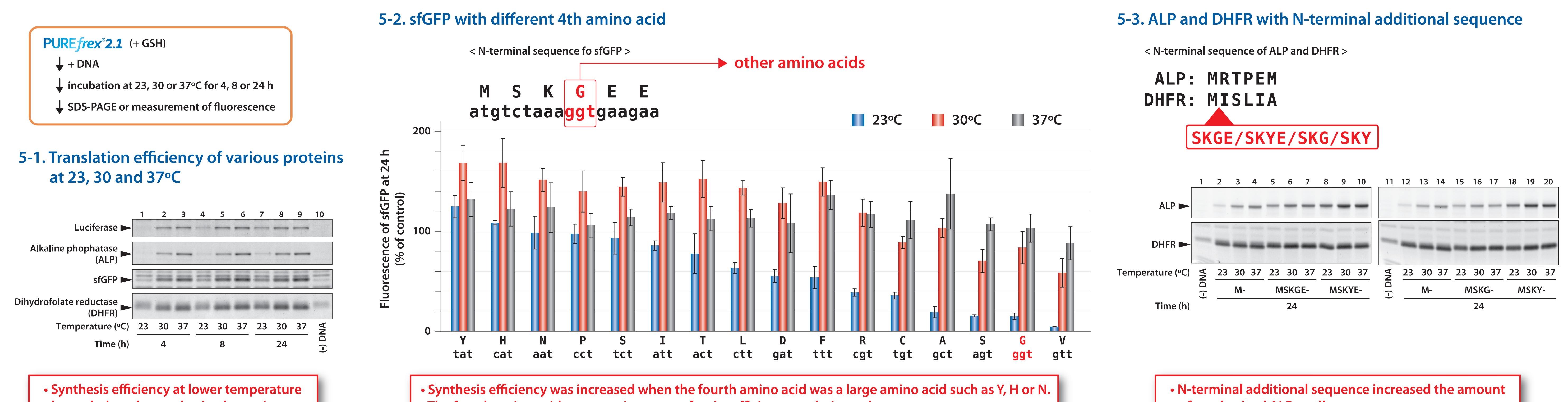
3. Effect of 5' UTR on the synthesis efficiency



4. Effect of ORF sequence on the synthesis efficiency



5. Effect of N-terminal amino acid sequence on the synthesis at lower temperature



Conclusion

5' UTR

- Not only SD sequence but also AT-rich region in 5' UTR is very important for the efficient translation reaction.

ORF

- AT-rich codons are preferable for the N-terminal codons.
- Multiple codons should be used for each amino acid in the entire ORF.
- N-terminal amino acids are very important for the efficient translation at lower temperature.