

再構成型無細胞タンパク質合成系 (PUREflex®) における翻訳開始過程に関する因子の必要性

Requirement of factors involved in the initiation process in the reconstituted cell-free protein synthesis system (PUREflex®)

○金森崇、布施(村上)朋重(ジーンフロンティア(株))

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

Abstract

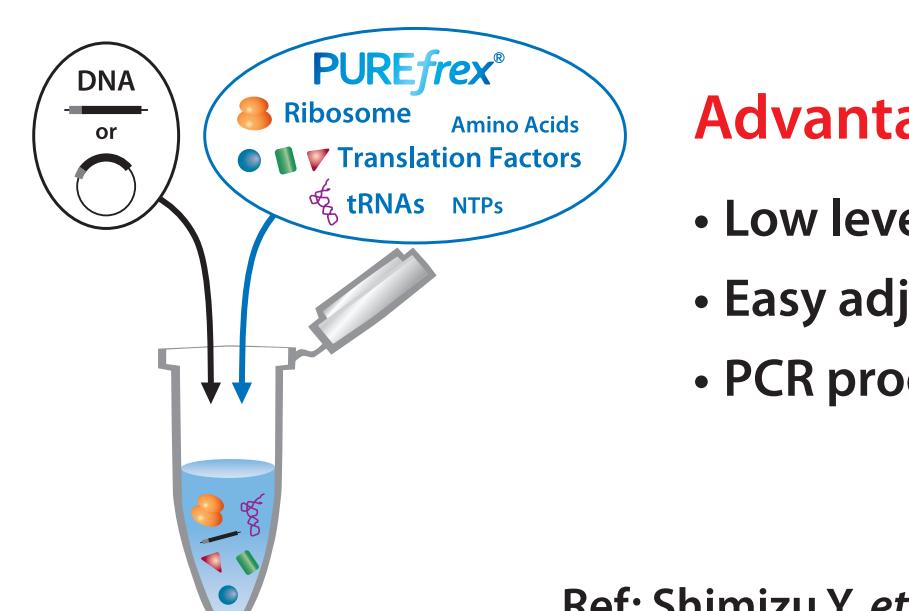
PUREflex®は、大腸菌の翻訳系を精製因子から再構成した無細胞タンパク質合成系(PURE system)を基にした反応系である。我々は、PUREflexの合成量を向上させるため、反応液の改良を継続している。一方で、大腸菌の翻訳反応では翻訳開始反応が律速であり、翻訳開始因子(IF1、IF2、IF3)は、大腸菌の生存に必須の遺伝子であることが報告されている。そこで、PUREflexの翻訳開始反応について、開始反応に関与する種々の因子の必要性や最適添加濃度などの検討を行っている。本発表では、主に翻訳開始因子の必要性について検討した結果を報告する。

初めに、T7ファージのgene10の5'UTRを持つsfGFP遺伝子からの37°Cでの合成反応で、翻訳開始に必要とされる因子の必要性を検証した。IF1、IF2、IF3をそれぞれ除去した反応液では、全ての因子を添加した反応液に対して、それ程程度、50%程度、20%程度のsfGFPの蛍光を確認した。また、大腸菌において開始メチオニンに附加されるフォルミル基のドナー(10-CHO-THF)を除いた反応液で合成した場合、90%程度の蛍光量が確認された。以上の結果は、PUREflexにおいては、IF1、IF2、IF3および10-CHO-THFは、反応効率を高めるためには必要であるが、反応に必須ではないことを示す。

次に、開始コドンをATGから、大腸菌で使用されているGTG、TTG、ATTに置換したsfGFP遺伝子を用い、蛍光量を比較した。いずれのコドンに置換したsfGFPでも20%以上の蛍光量を確認した。また、置換したコドンによって、開始因子を除去した反応液での蛍光量の低下の割合が異なっていた。例えば、IF3を除去した反応液では、GTGに置換した場合ほとんど合成されなかったが、その他のコドンでは、IF3を添加した反応液に対して20%程度合成された。同様の実験をmCherryやDHFRの合成でも行ったが、sfGFPの場合とは異なり、ORFの配列により開始コドンや開始因子の依存性が異なることが示唆された。

2. PUREflex®

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.

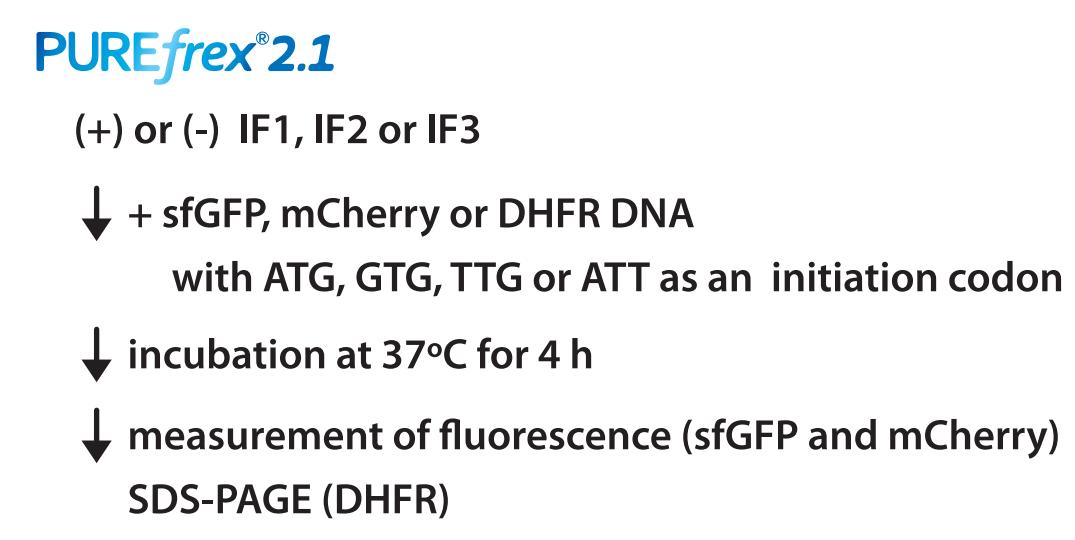


Ref: Shimizu Y. et al. (2001) Nat. Biotechnol., vol. 19, p. 751.

<Construct of the template DNA>

T7 promoter AT-rich SD ORF
5'-GAATACTACGACTCACTAGGGGACACAAAGGTTCCCTAGAAAATTTGTTAACCTTAAAGGAGGATATCCAATGNNNNNNNNN...NNNTAANNNNNNNNNNNNN-3'

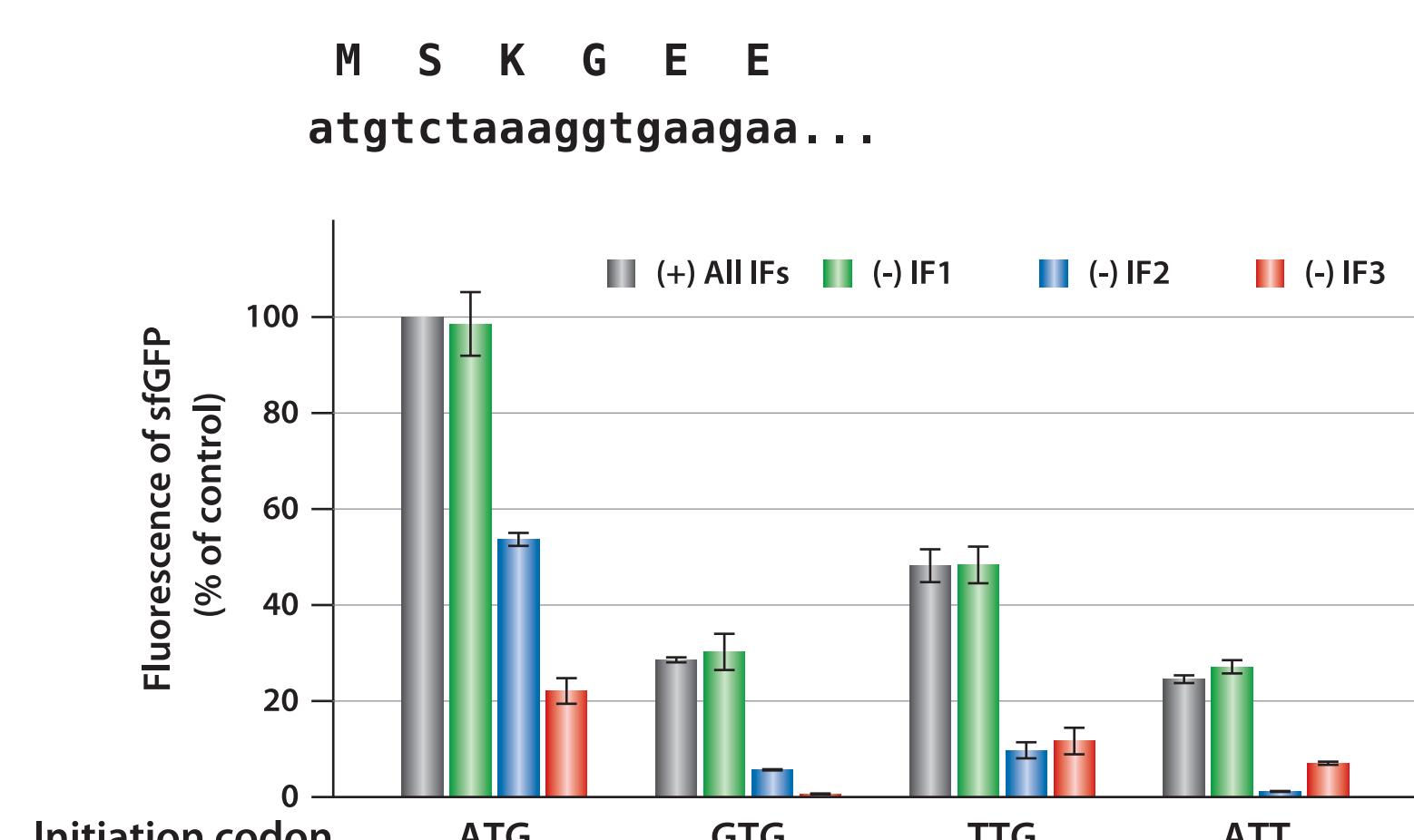
4. Initiation codon and IFs



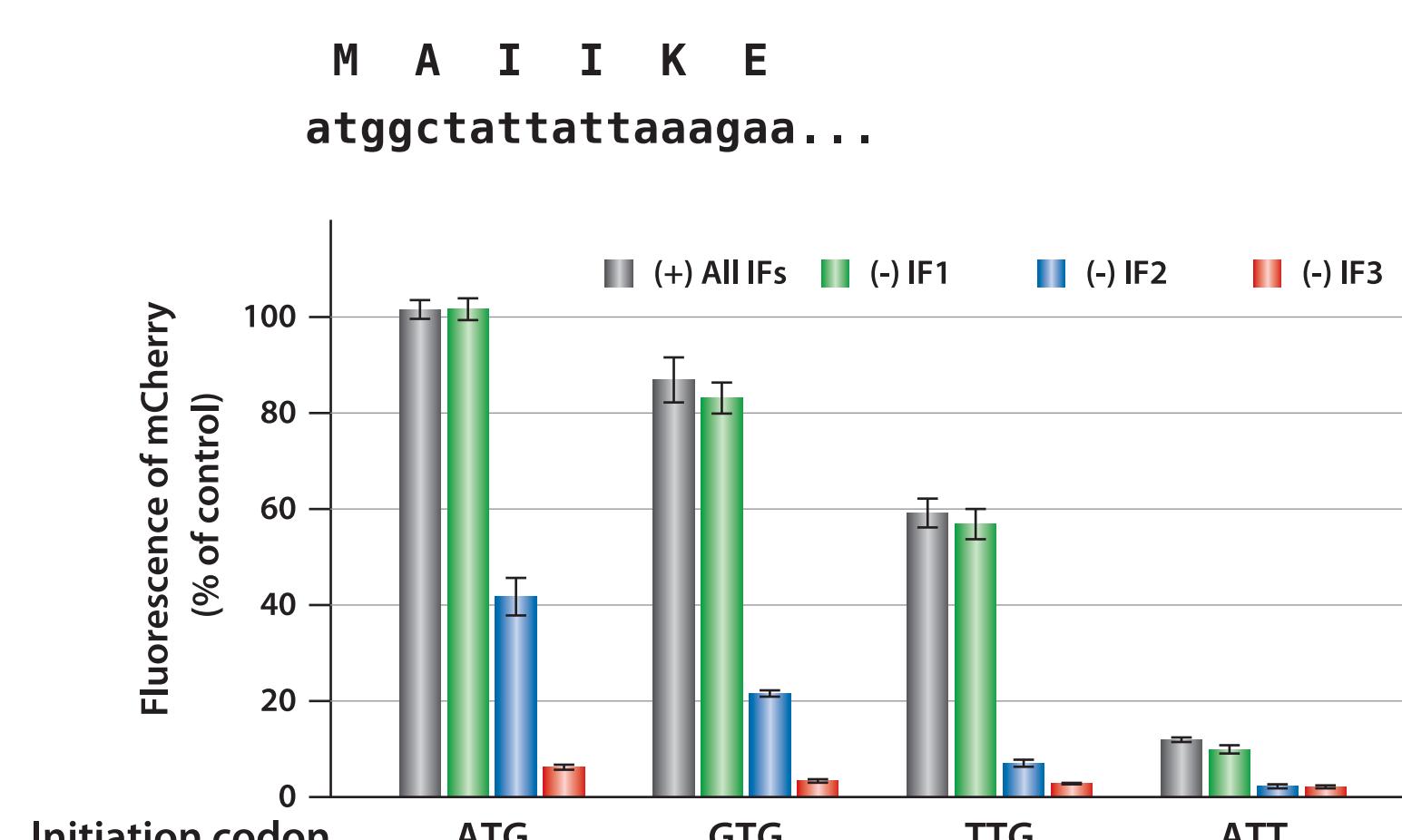
Initiation codons in *E. coli*

ATG: 83%
GTG: 14% (e.g. EF-Tu, ArgRS, HisRS, RRF)
TTG: 3%
ATT: 2 genes (*infC* (initiation factor 3), *pCNB* (poly(A) polymerase I))
Ref: Blattner F.R. et al. (1997) Science, vol. 277, p. 1453.

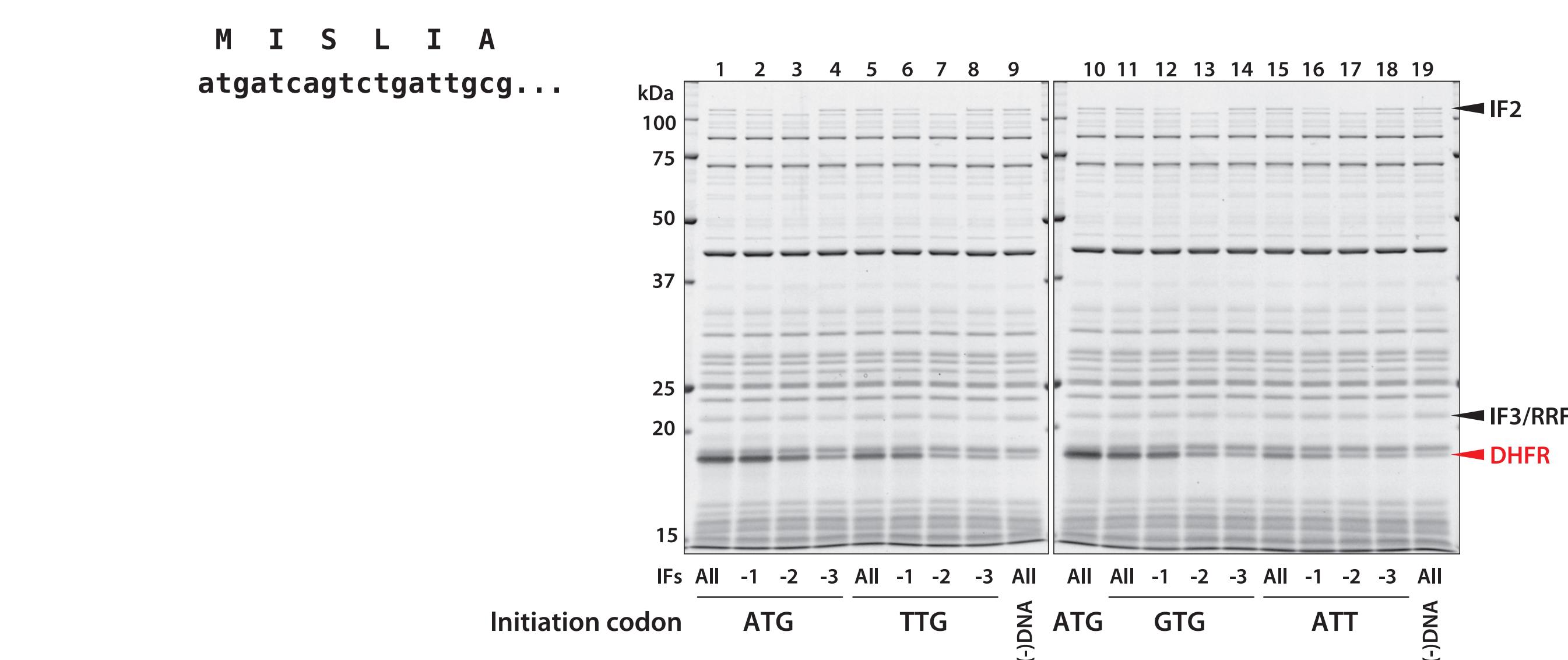
4-1. Synthesis of sfGFP



4-2. Synthesis of mCherry

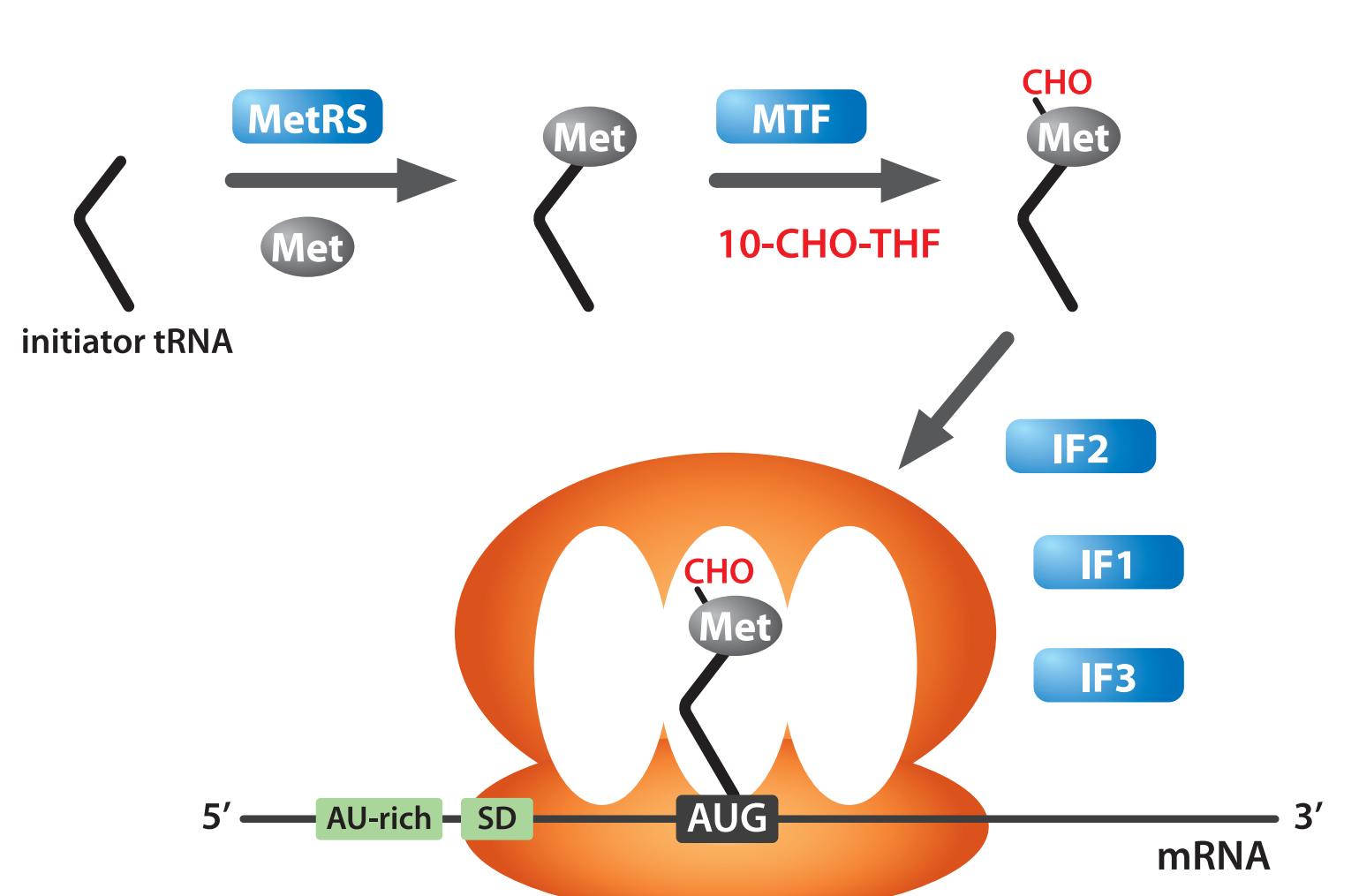


4-3. Synthesis of DHFR



- GTG, TTG and ATT functioned as an initiation codon, albeit with lower synthetic efficiency than ATG.
- Synthesis efficiency in the case of non-ATG differed depending on the target protein.
- IFs were not necessarily required for the protein synthesis even in the case of non-ATG, except that sfGFP was not synthesized in the case of GTG in the absence of IF3 and ATT in the absence of IF2.

1. Formation of 70S initiation complex in *E. coli*



Methionyl-tRNA transformylase (MTF)

- transfers formyl residue from 10-formyl-tetrahydrofolic acid (10-CHO-THF) to amino residue of methionine bound to initiator tRNA.

Initiation Factor 1 (IF1)

- binds the A-site in the 30S subunit and prevents binding of aminoacyl-tRNA.
- modulates and stabilizes binding of IF2 and IF3 to the 30S subunit.

Initiation Factor 2 (IF2)

- is a GTPase and hydrolyzes GTP during formation of the 70S initiation complex.
- binds formylmethionyl-initiator tRNA and promotes its entry to the P-site in the ribosome.
- is expressed as 3 isoforms (α, β, β') from in-frame initiation codons of *infB* gene.

Initiation Factor 3 (IF3)

- binds to the 30S subunit and prevents association of the premature 50S subunit.
- enhances the accommodation of formylmethionyl-initiator tRNA to the P-site.

All four proteins are essential for growth.

Are three IFs and formylation of the first methionine essential for translation in PUREflex?

2. PUREflex®

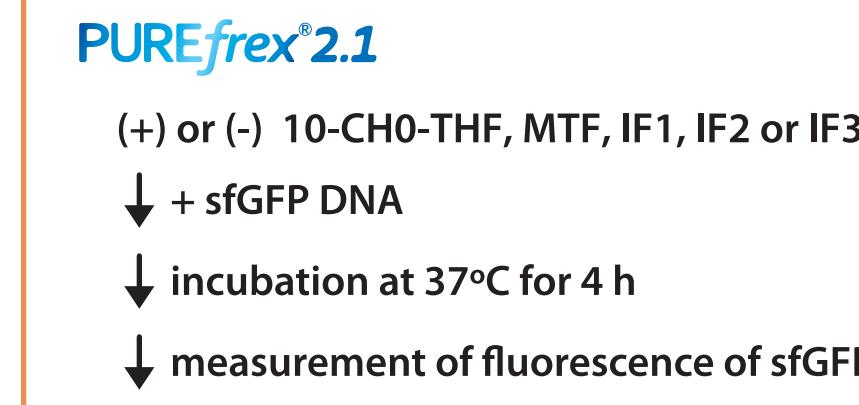
The PURE system is a reconstituted cell-free protein synthesis system, which consists of only purified factors necessary for transcription, translation and energy regeneration.

Advantage

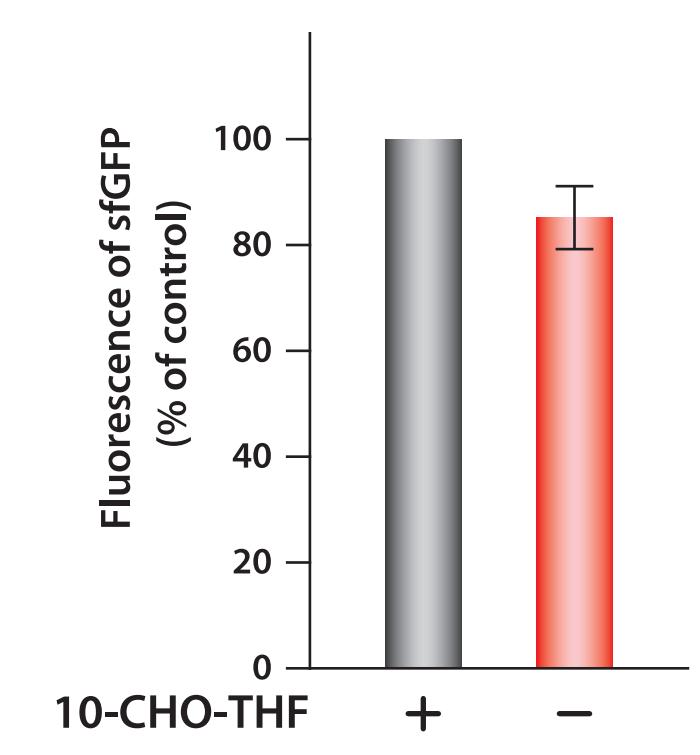
- Low level of contamination
- Easy adjustment of the reagent composition
- PCR product usable as a template DNA

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

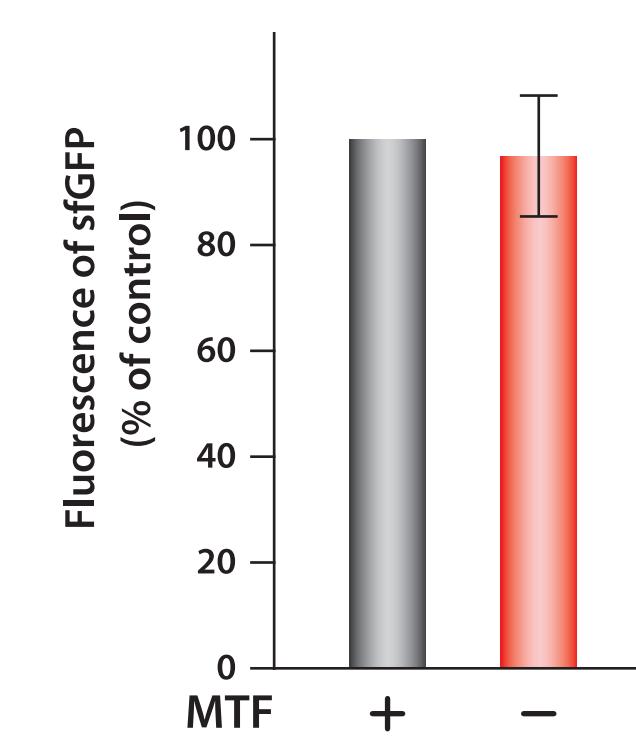
3. 10-CHO-THF, MTF and IFs



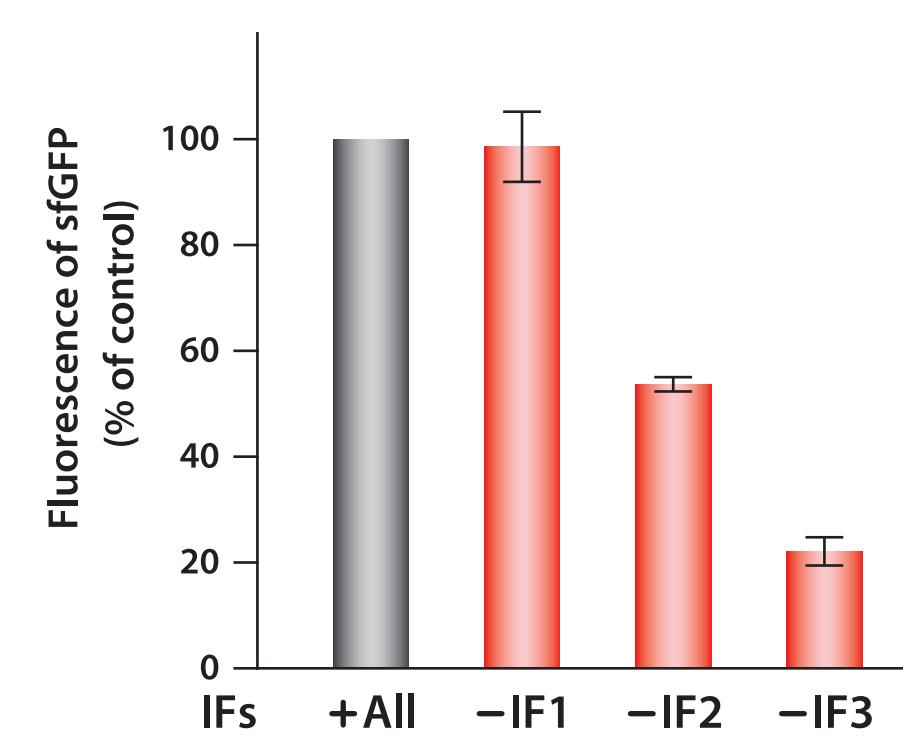
3-1. (+)/(-) 10-CHO-THF



3-2. (+)/(-) MTF

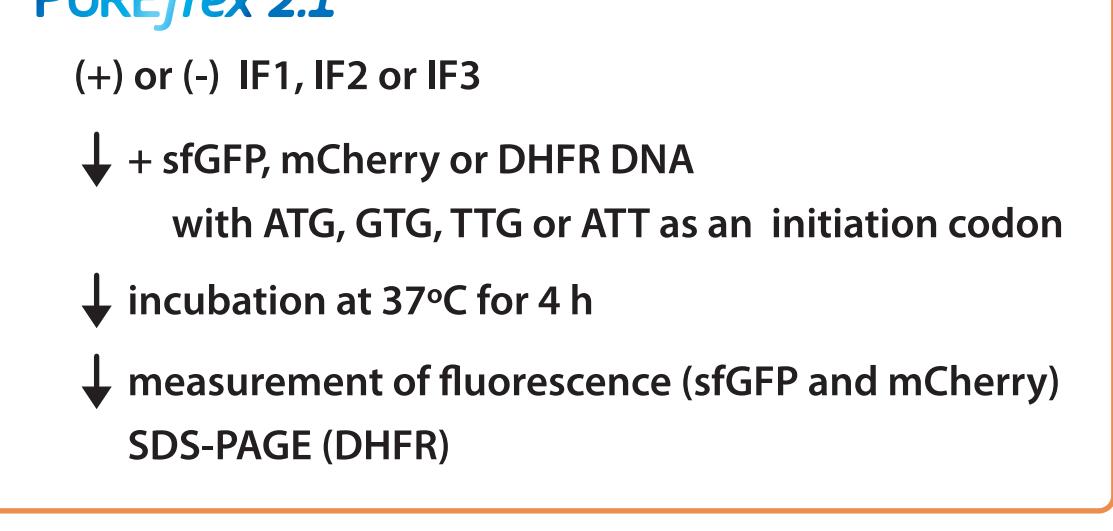


3-3. (+)/(-) IF1, IF2 or IF3



- Formylation of the first methionine was not necessary for translation.
- All of IF1, IF2 and IF3 were not essential for translation.
- IF3 was the most important factor for efficient translation.

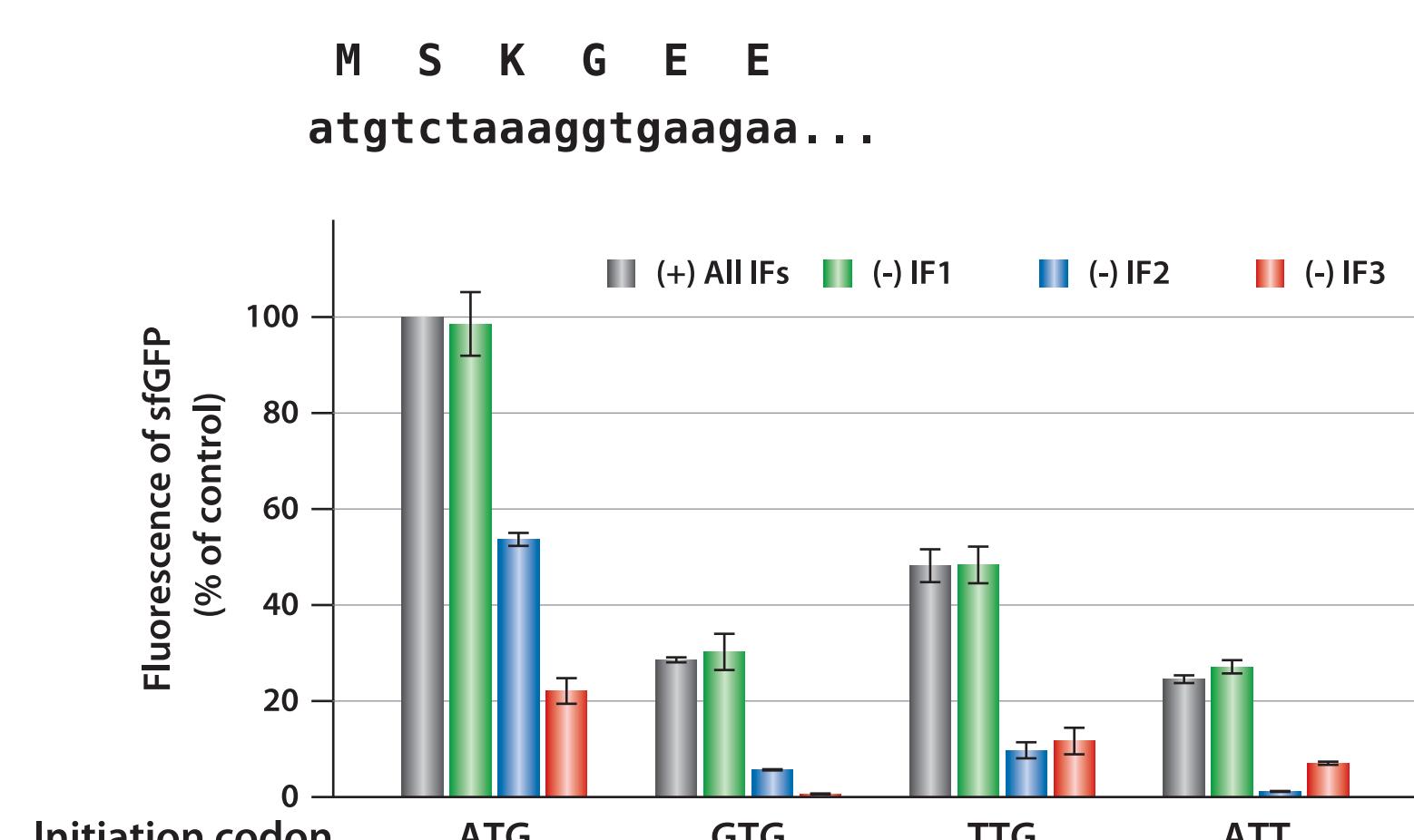
4. Initiation codon and IFs



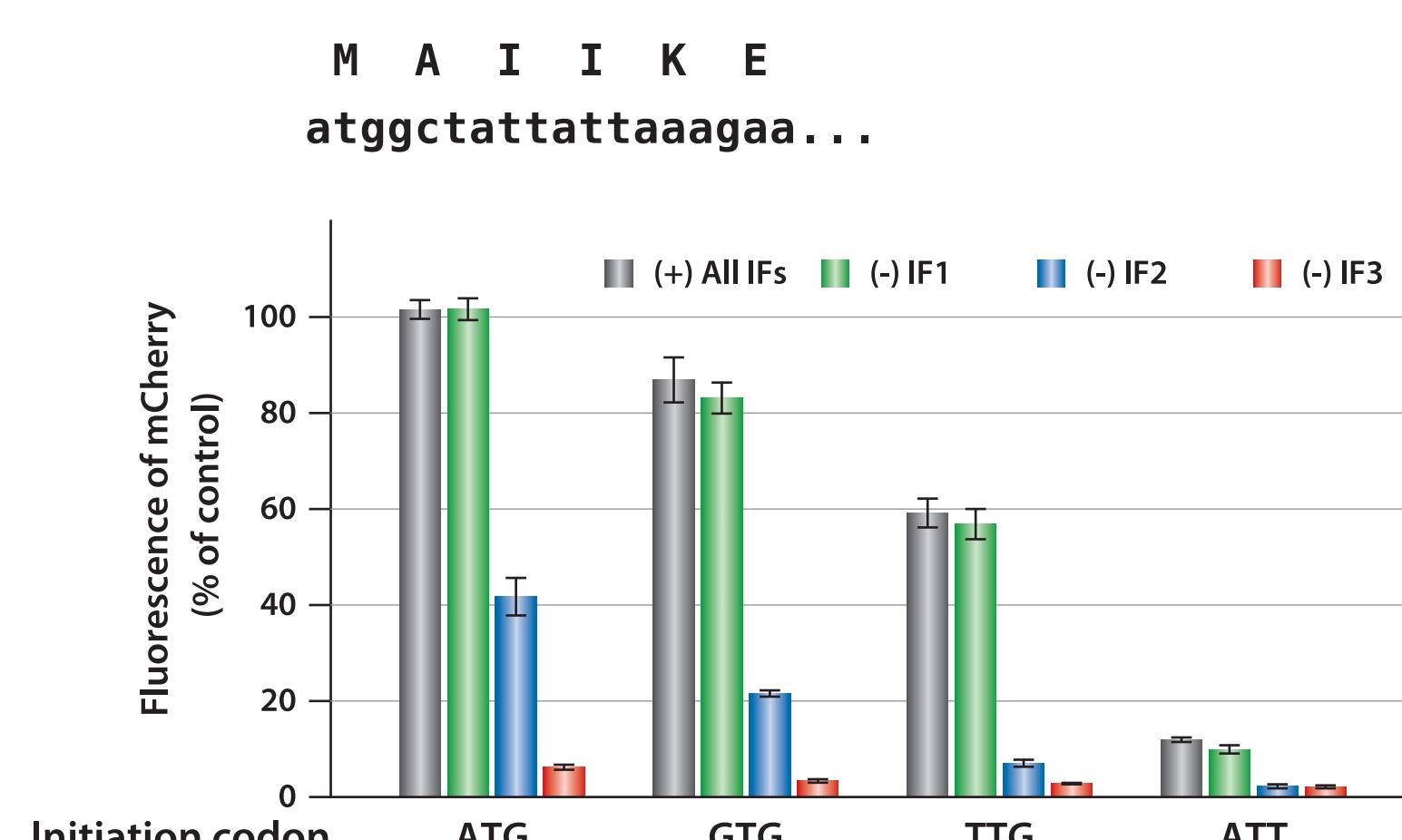
Initiation codons in *E. coli*

ATG: 83%
GTG: 14% (e.g. EF-Tu, ArgRS, HisRS, RRF)
TTG: 3%
ATT: 2 genes (*infC* (initiation factor 3), *pCNB* (poly(A) polymerase I))
Ref: Blattner F.R. et al. (1997) Science, vol. 277, p. 1453.

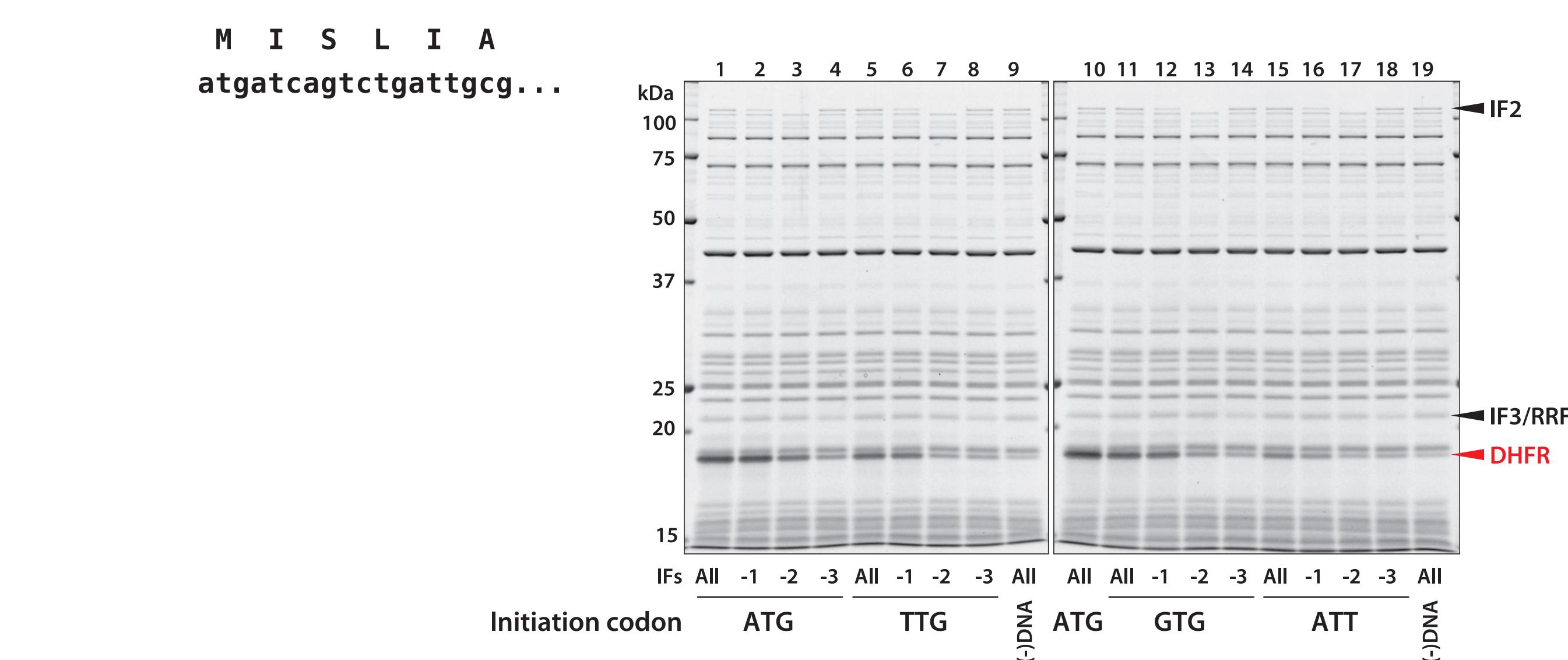
4-1. Synthesis of sfGFP



4-2. Synthesis of mCherry

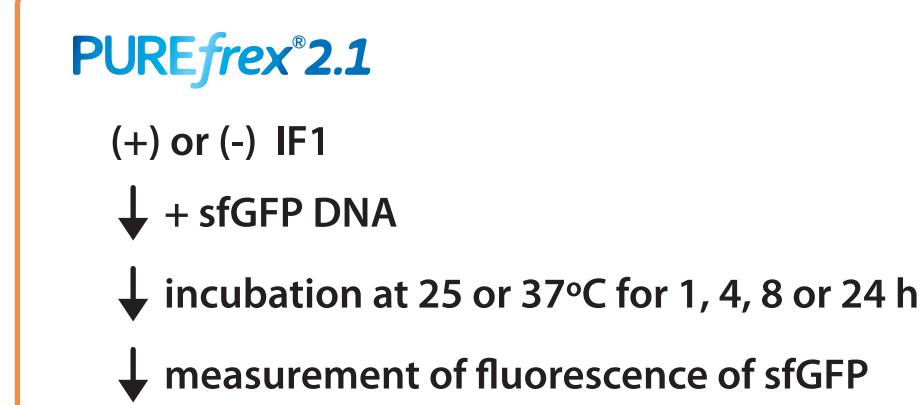


4-3. Synthesis of DHFR

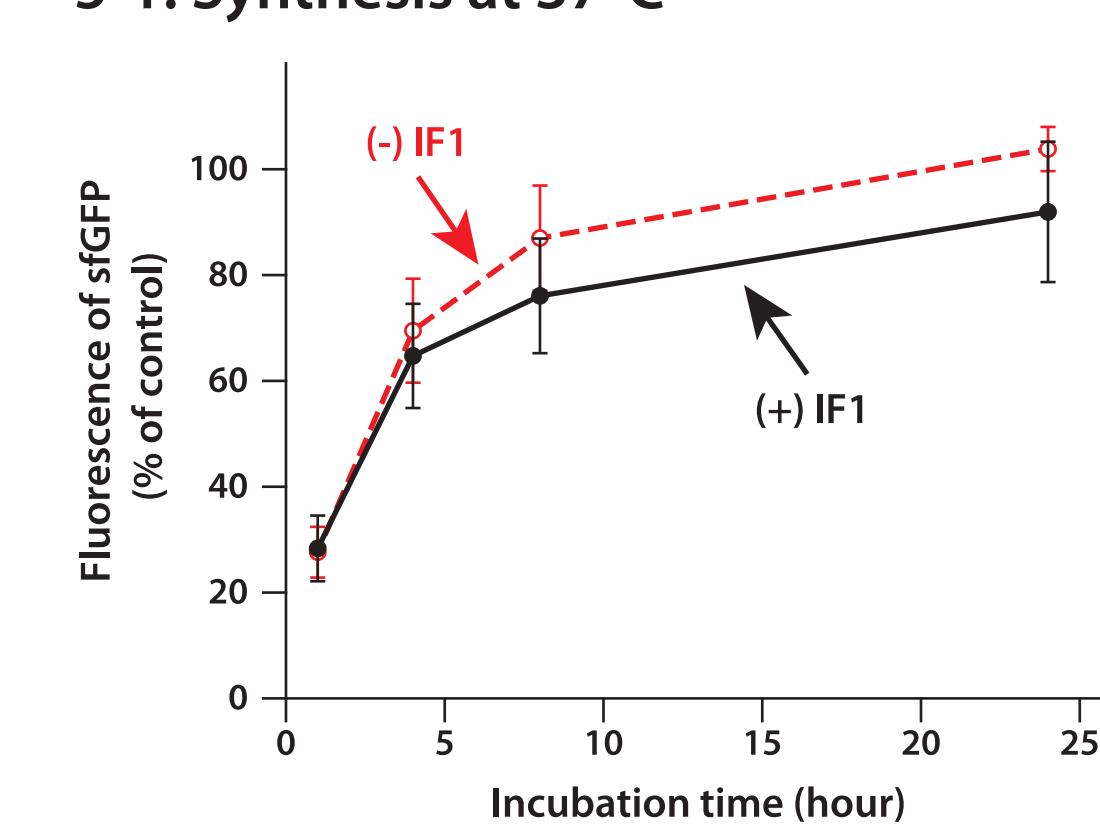


- GTG, TTG and ATT functioned as an initiation codon, albeit with lower synthetic efficiency than ATG.
- Synthesis efficiency in the case of non-ATG differed depending on the target protein.
- IFs were not necessarily required for the protein synthesis even in the case of non-ATG, except that sfGFP was not synthesized in the case of GTG in the absence of IF3 and ATT in the absence of IF2.

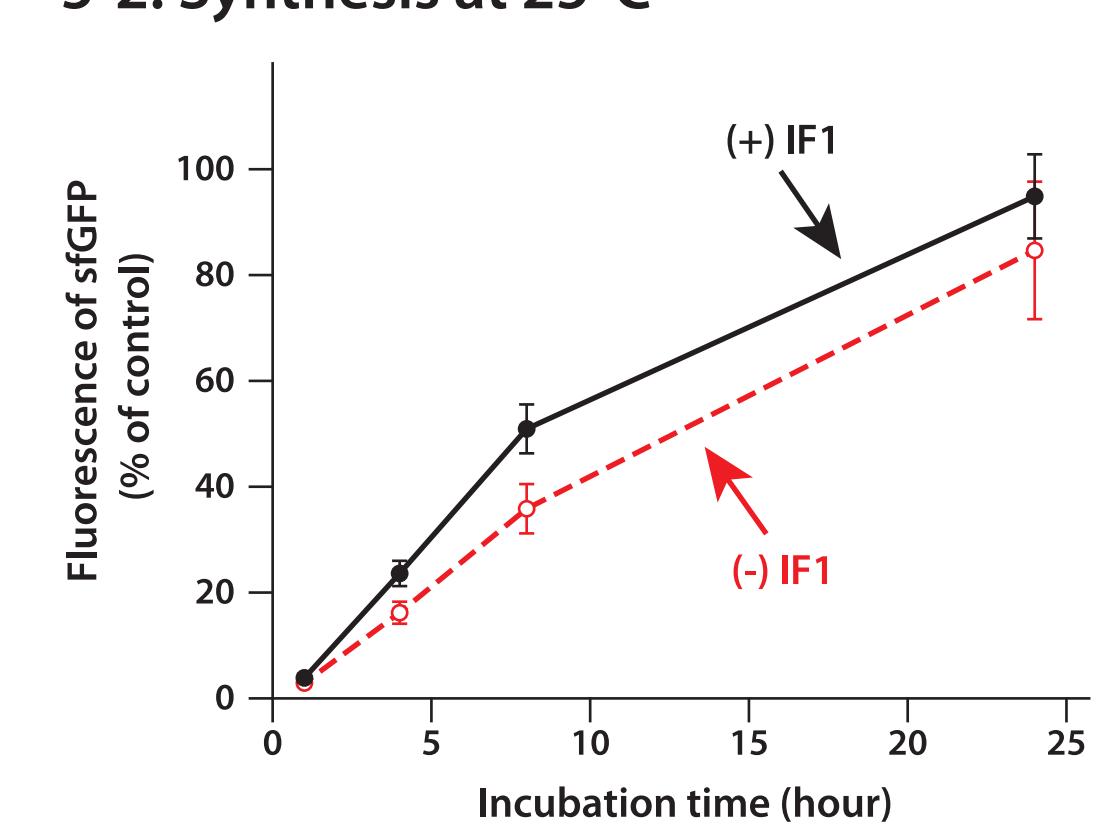
5. IF1 at lower temperature



5-1. Synthesis at 37°C



5-2. Synthesis at 25°C



The synthesis efficiency of sfGFP was decreased without IF1 at 25°C.

6. Truncated IF2