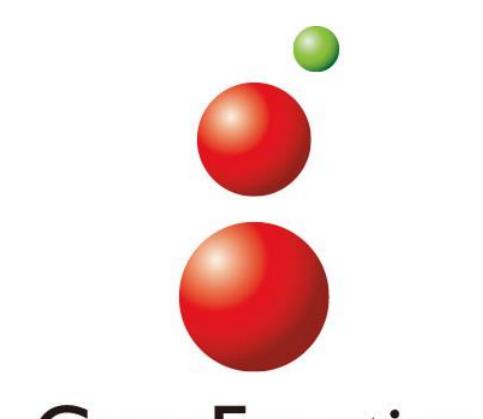


再構成型無細胞タンパク質合成系 (PUREflex®) によるN末端翻訳後修飾されたタンパク質の合成

Synthesis of N-terminal post-translationally modified proteins using PUREflex®



松本 令奈¹, 丹羽 達也², 田口 英樹², 金森 崇¹ (¹ジーンフロンティア株式会社、²東工大・研究院・細胞センター)

Rena Matsumoto, Tatsuya Niwa, Hideki Taguchi and Takashi Kanamori (¹GeneFrontier Corp., ²Cell Biology Center, IIR, Tokyo Tech)

<Abstract>

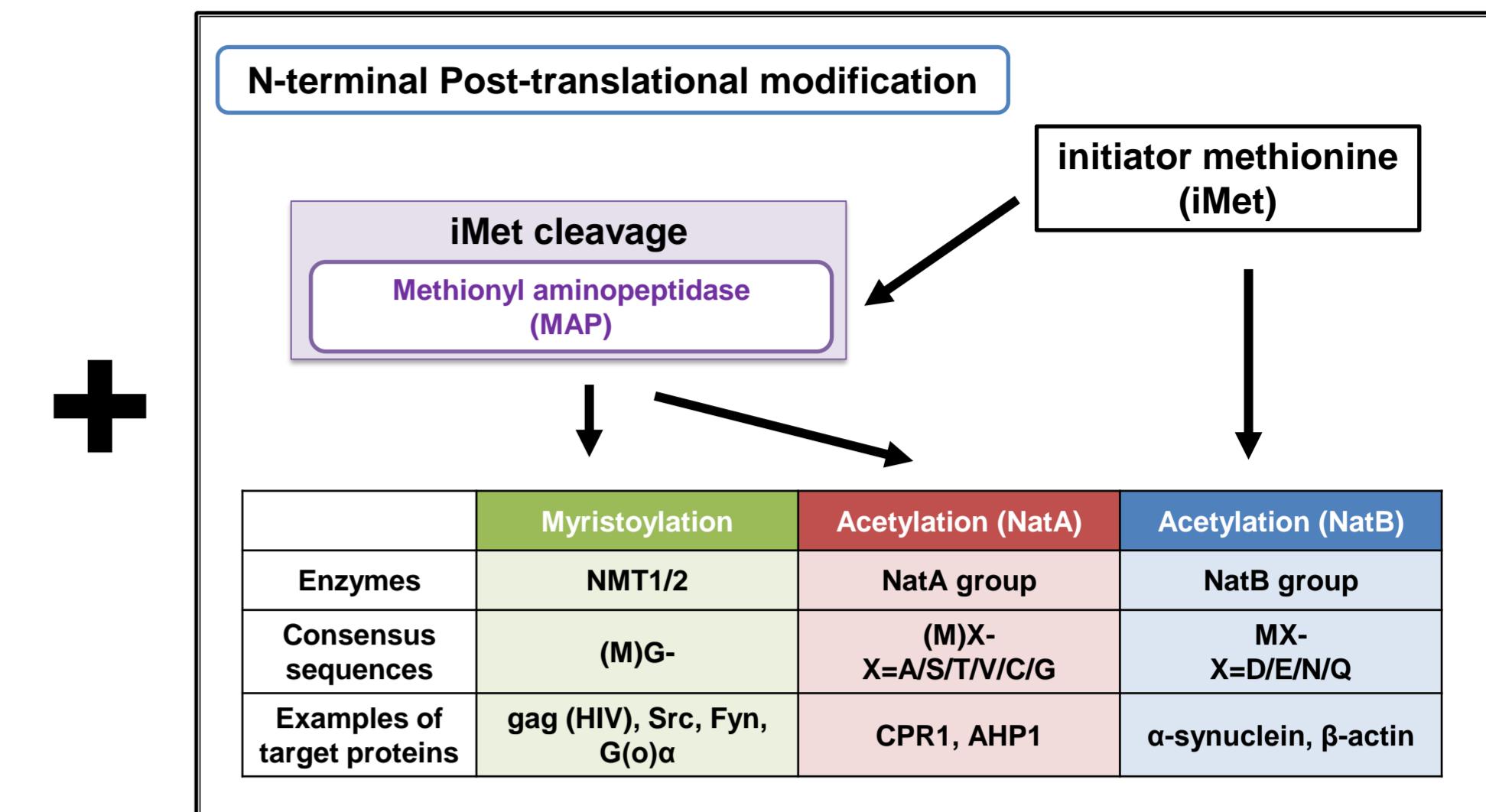
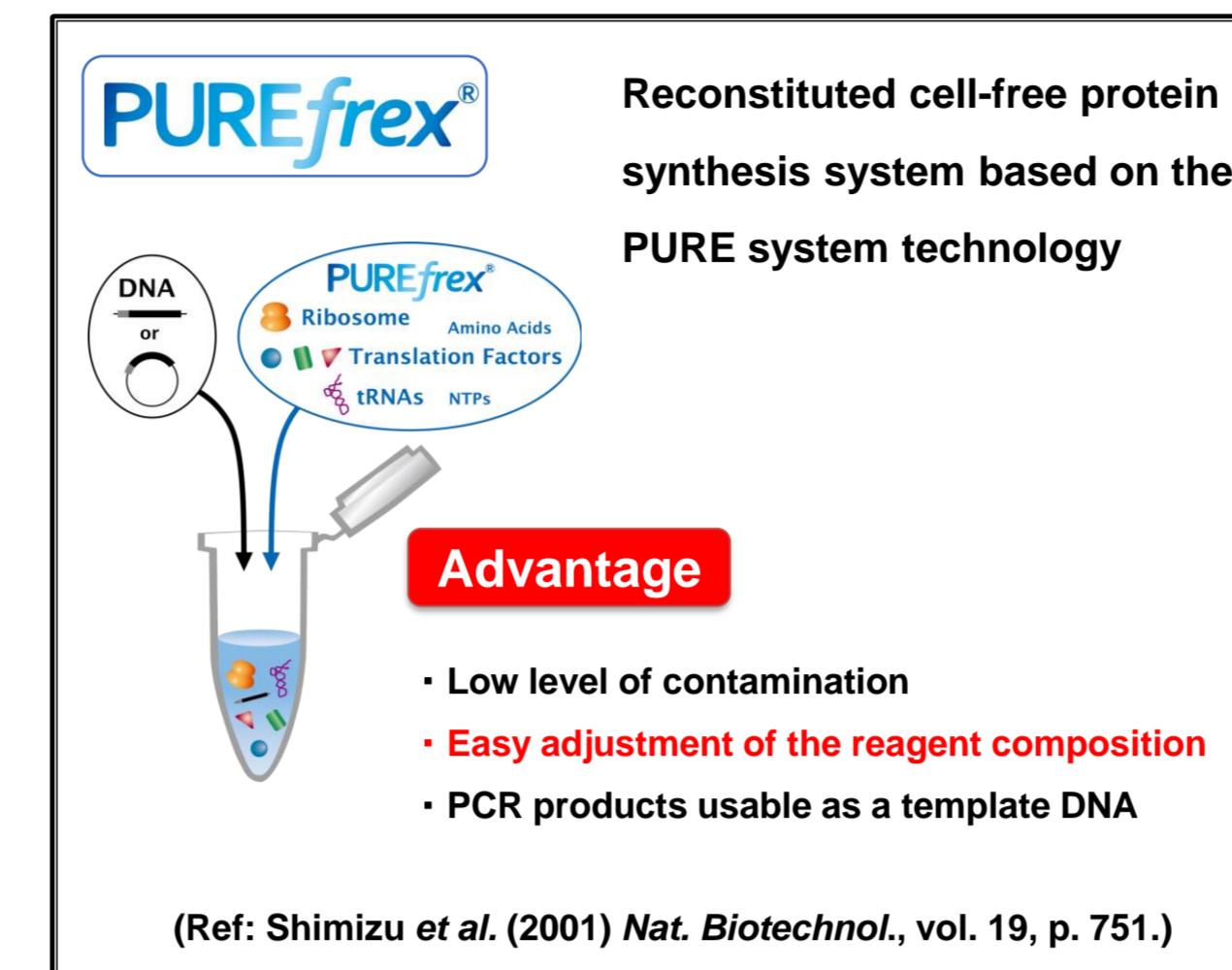
PUREflex®は、PURE systemを基にした大腸菌でのタンパク質合成に関与する因子のみから再構成した無細胞タンパク質合成系である。反応条件や追加因子の調節が容易なため、様々な翻訳後修飾の検討が可能である。PUREflex®を用いた翻訳後修飾の例として、これまでにジスルフィド結合含有タンパク質や糖鎖修飾タンパク質の合成などが可能であることを示してきた。本研究では、異なる翻訳後修飾タンパク質の合成例として、N末端にミリストイル基もしくはアセチル基を付加したタンパク質の合成について検討した。

N末端修飾タンパク質作製のためにはホルミル基のない開始メオニンから始まるポリペプチドを合成する必要があるため、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸(10-CHO-THF)を含まないPUREflex®の反応液(Δ10-CHO-THF)を用いた。また、ミリストイル化タンパク質の合成には、付加反応前に開始メオニンをメチオニルアミノペプチダーゼ (MAP)で切断してGly残基を露出させた。実際に、大腸菌由来のMAPを添加して開始メオニンが切断されたポリペプチドが合成できることを確認した上でのミリストイル化反応の条件検討を行った。

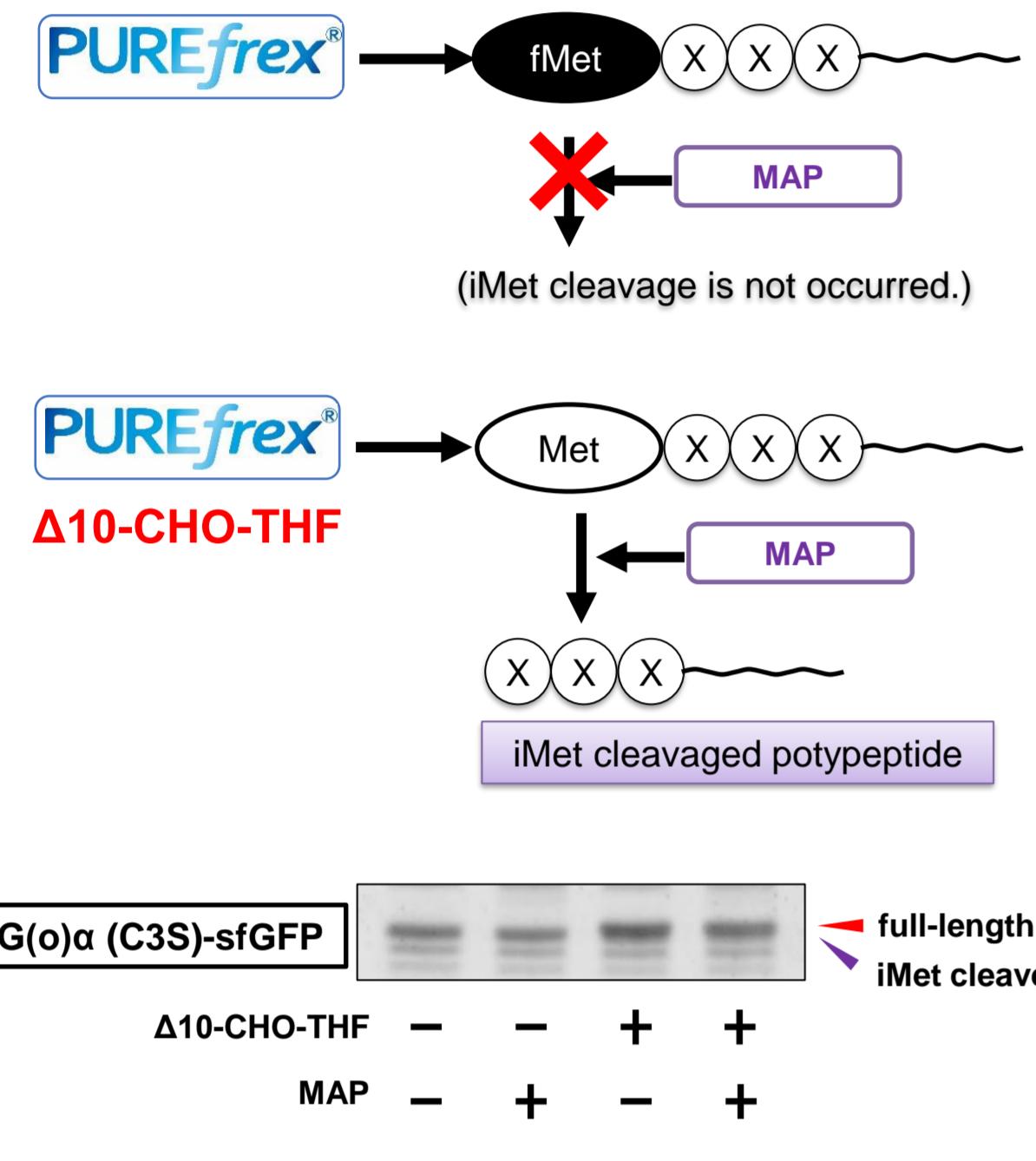
また、N末端アセチル化反応として、N末端アセチル化酵素NatAによるN末端アセチル化、およびNatBによるN末端アセチル化について検証した。NatAによるN末端アセチル化にはMAPによる開始メオニン切断が必要であるが、NatBによるN末端アセチル化は開始メオニンの切断を必要とせず、それぞれについてPUREflex®を用いたN末端アセチル化タンパク質の作製に向けて条件検討を行った。

これらについて、質量分析による修飾の有無を調べたところ、PUREflex®で合成したポリペプチドのN末端へのミリストイル化およびアセチル化が確認された。

Synthesis of N-terminal post-translationally modified proteins using PUREflex®

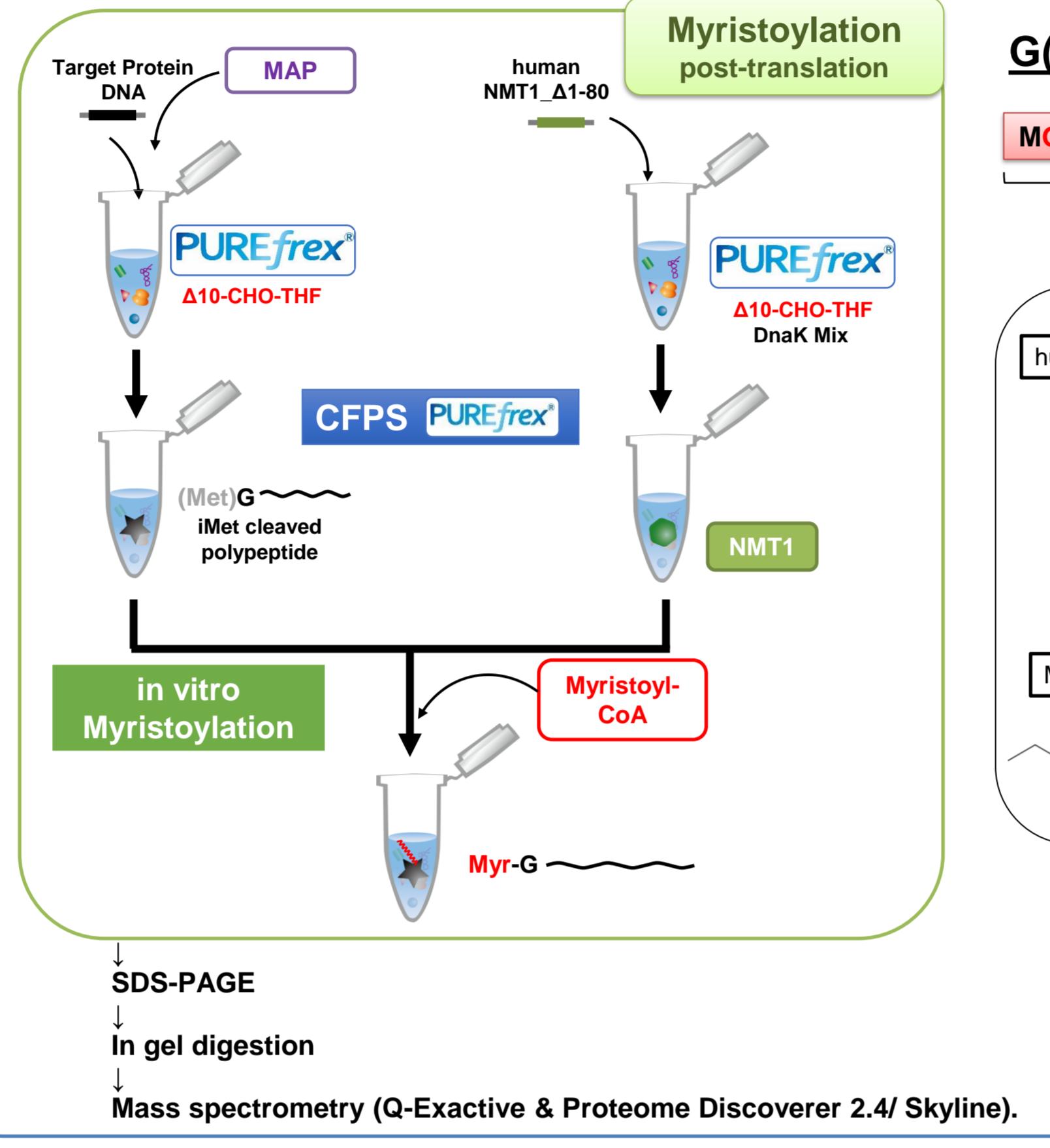


1. N-terminal modification requires the synthesis of polypeptides with unformylated methionine.

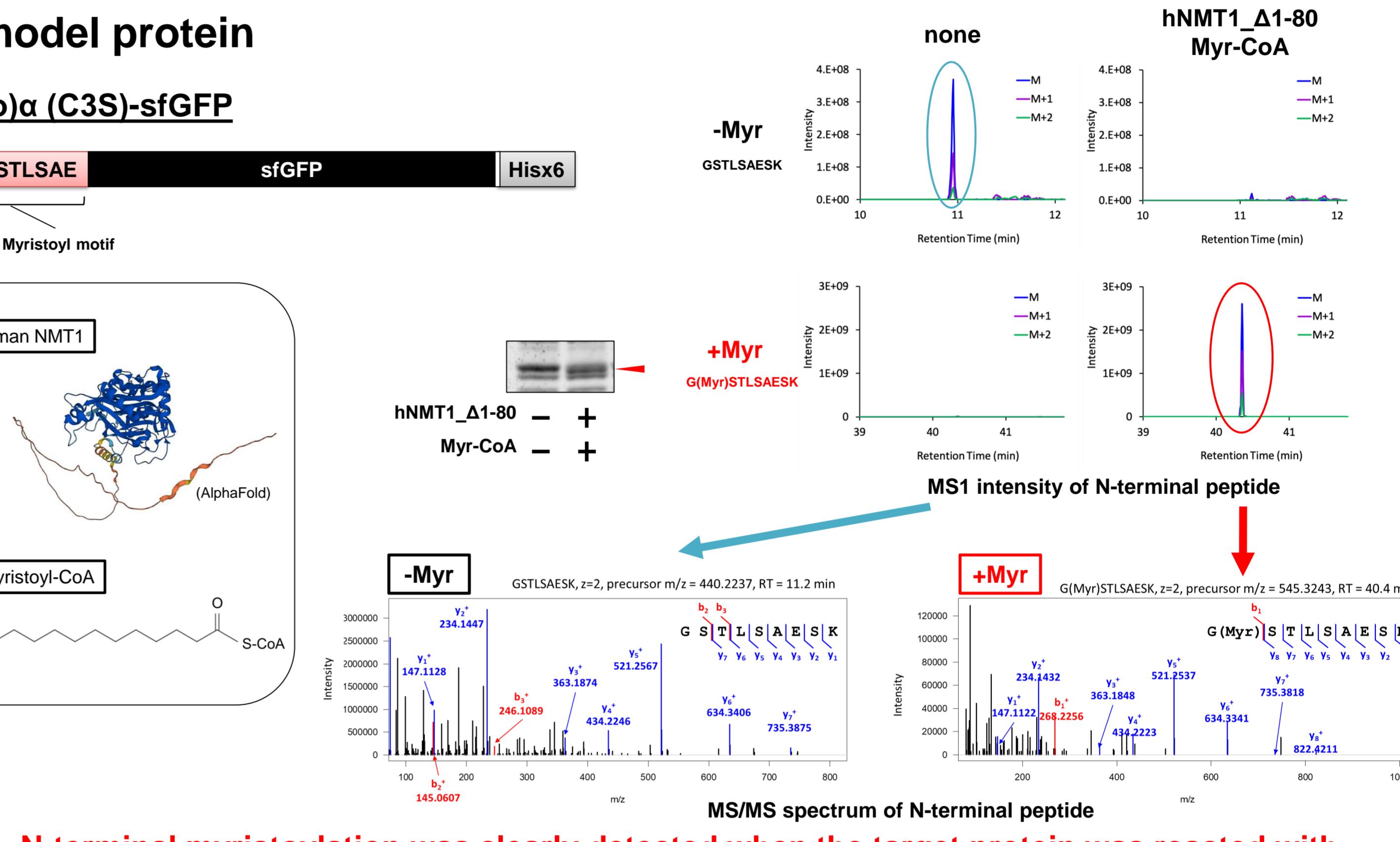


iMet was cleaved by MAP only when synthesized without 10-CHO-THF.

2. in vitro N-terminal myristylation of model protein

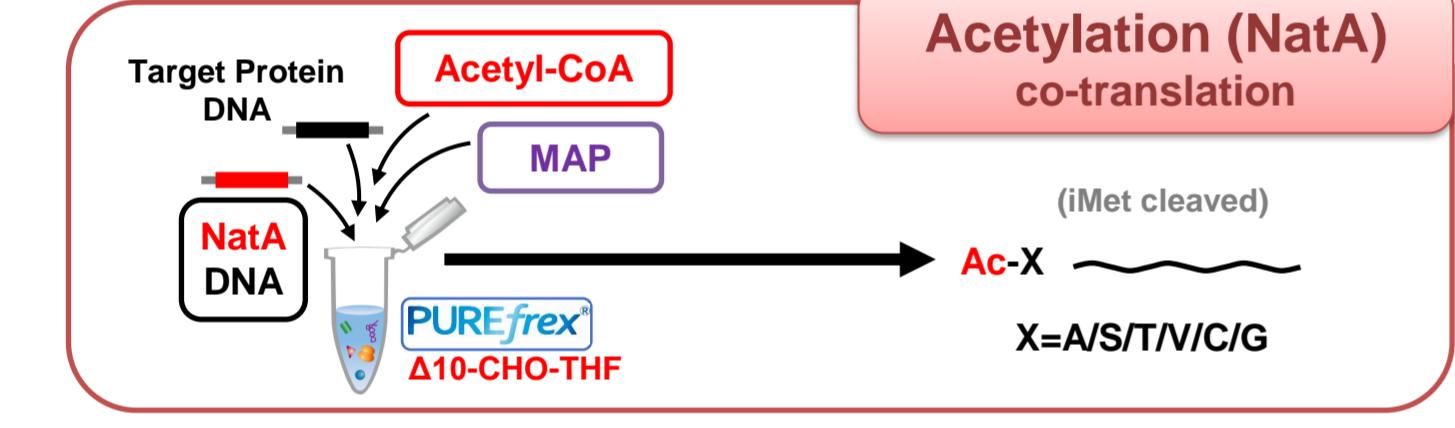


N-terminal myristylation was clearly detected when the target protein was reacted with hNMT1_Δ1-80 synthesized by PUREflex® and myristoyl-CoA.

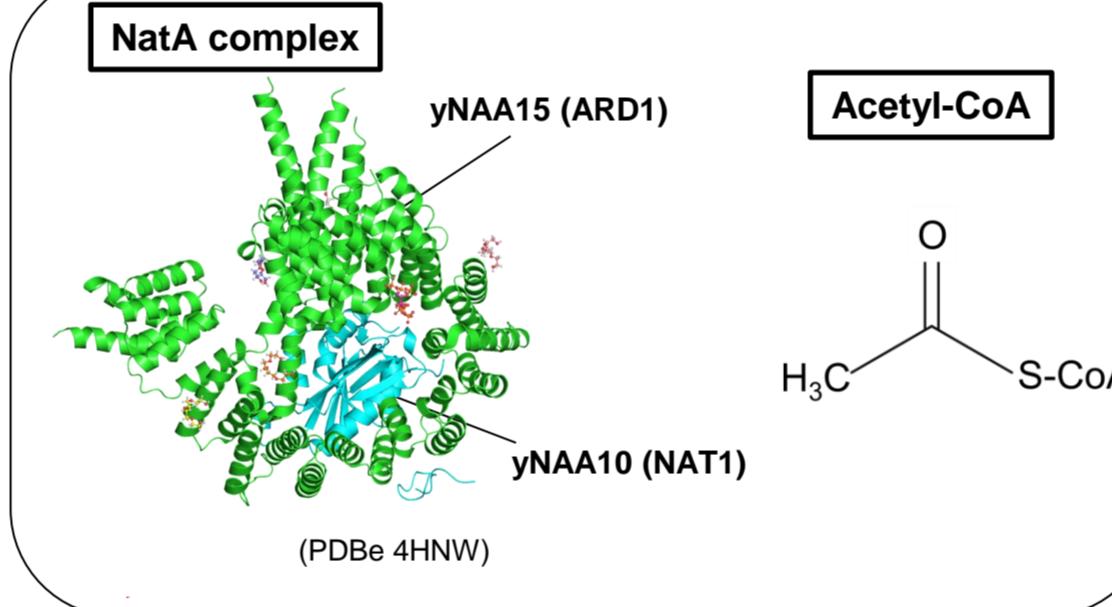


3. in vitro N-terminal acetylation of model protein by NatA

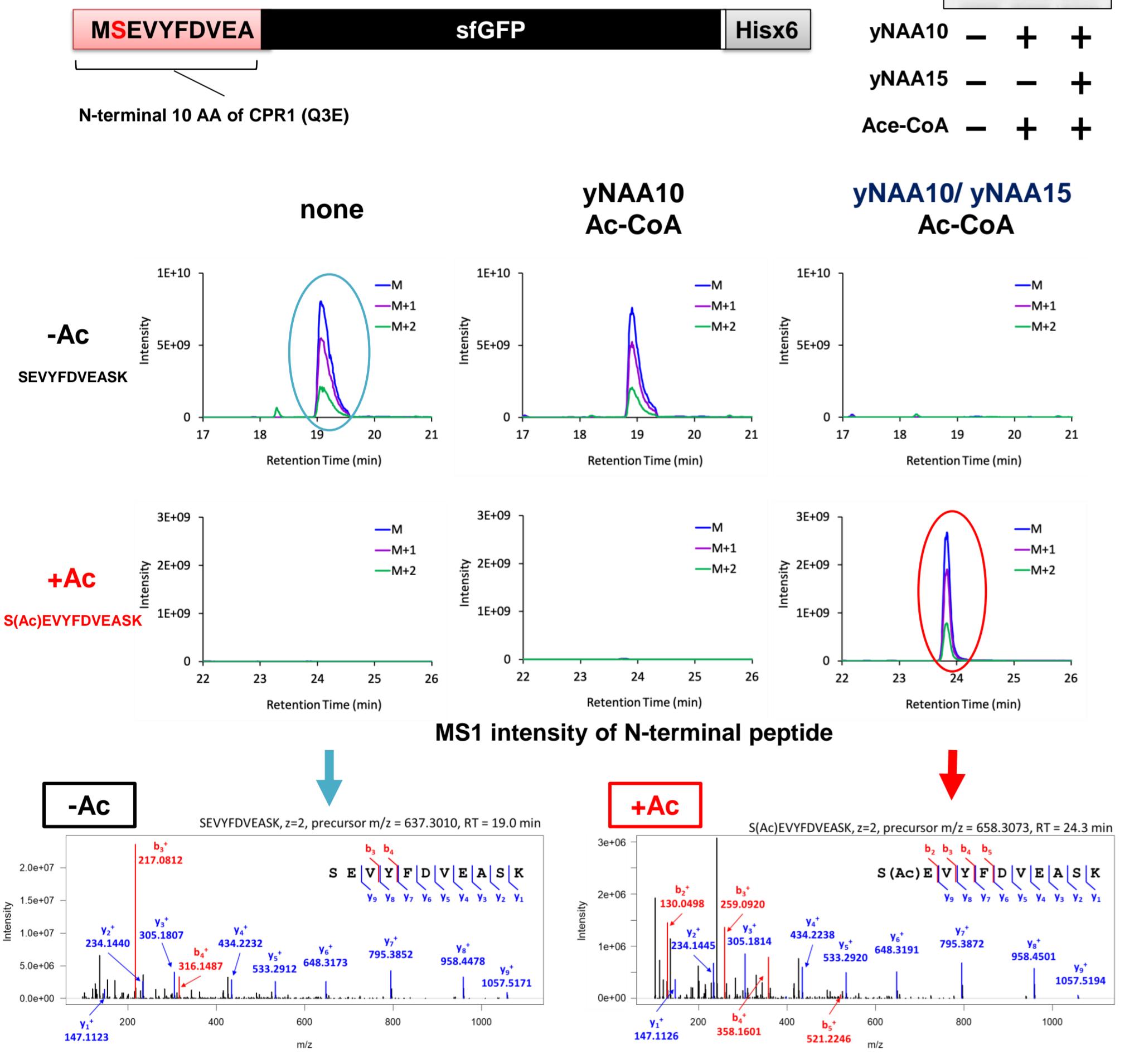
3-1. co-translational acetylation reaction



Co-translational acetylation condition		
Template DNA	Reaction mixture	Donor
target protein: 5 nM yNAA10 (ARD1): 0.2 nM yNAA15 (NAT1): 1 nM	PUREflex [®] 2.1 $\Delta 10\text{-CHO-THF}$ (4 mM GSH) + DnaK Mix + 1 μ M MAP	Acetyl-CoA: 1 mM

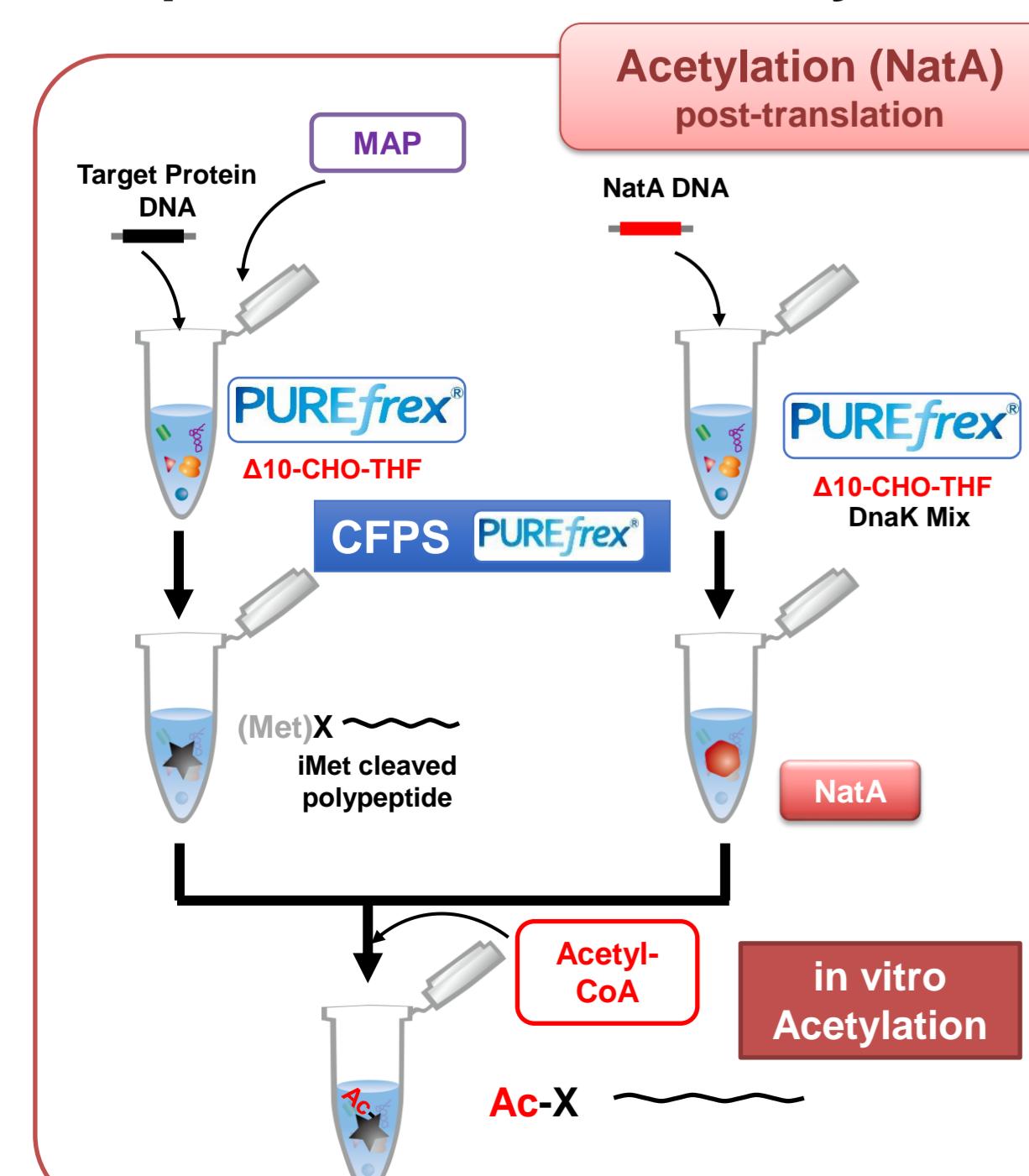


CPR1 (Q3E)-sfGFP

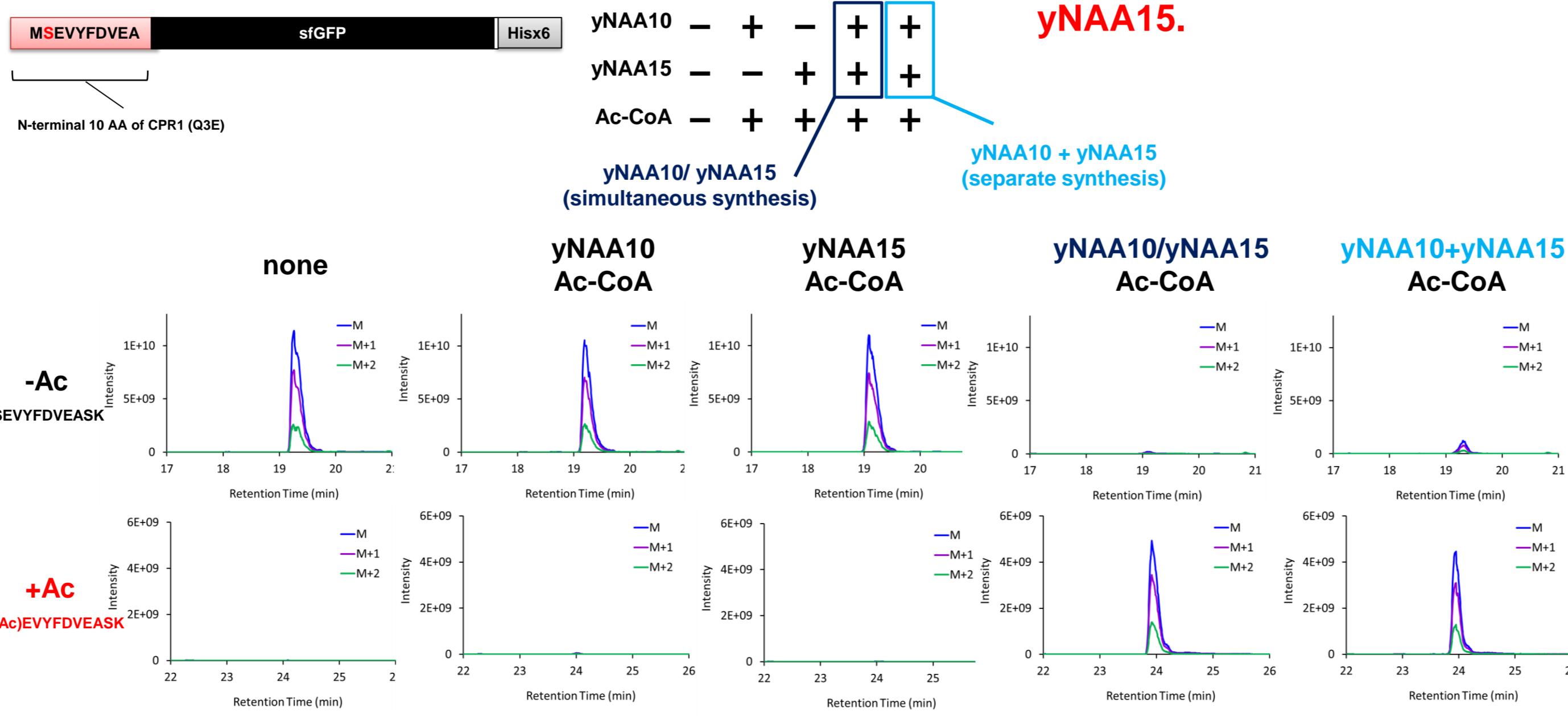


Co-translational acetylation of target proteins by NatA and acetyl-CoA using PUREflex® was successful only when yNAA10 and yNAA15 were present simultaneously.

3-2. post-translational acetylation reaction

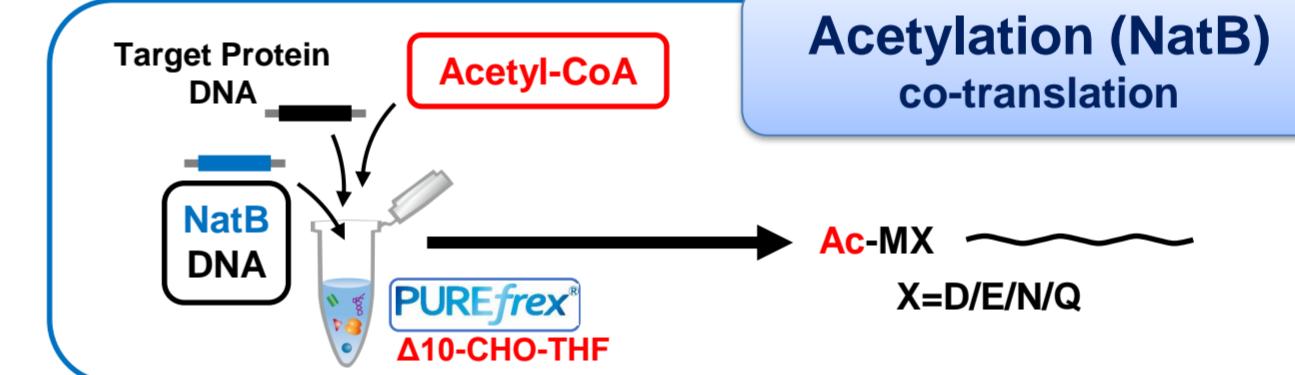


CPR1 (Q3E)-sfGFP



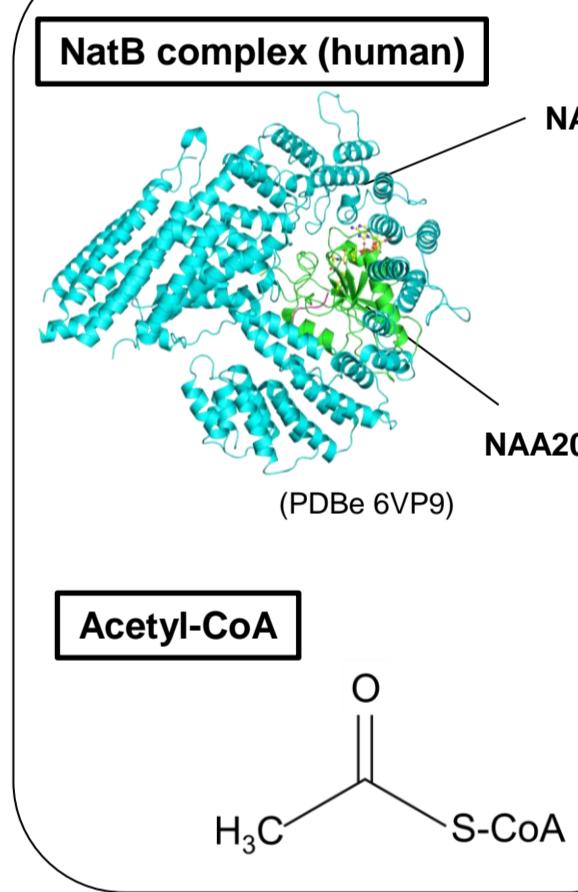
Acetylation of target proteins requires both yNAA10 and yNAA15.

4. in vitro N-terminal acetylation of model protein by NatB

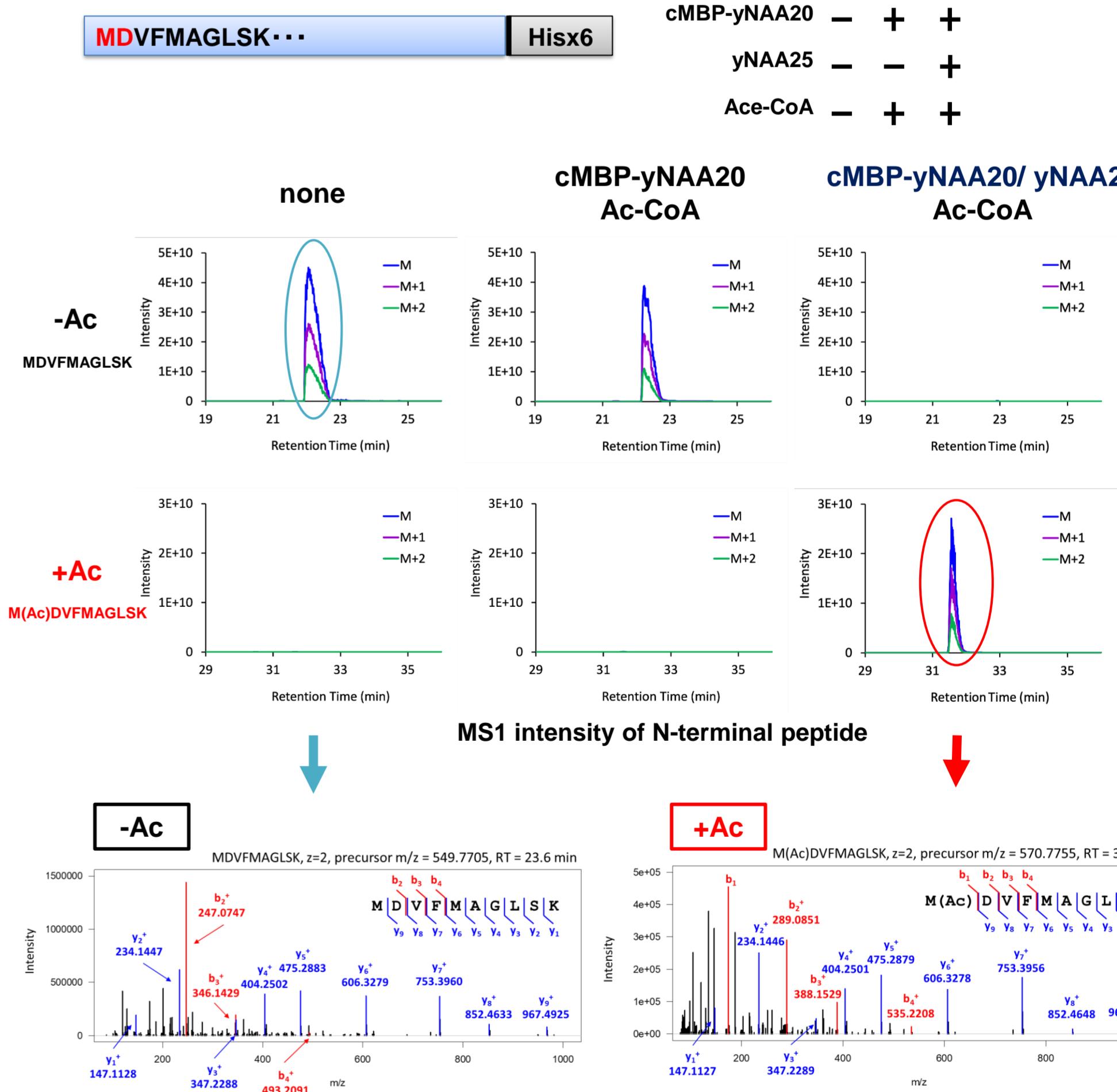


Co-translational acetylation condition

Template DNA	Reaction mixture	Donor
target protein: 3 nM cMBP-yNAA20 (NAT2): 1 nM yNAA25 (MDM20): 2 nM	PUREflex [®] 2.1 $\Delta 10\text{-CHO-THF}$ (4 mM GSH) + DnaK Mix	Acetyl-CoA (1 mM)



α-synuclein (K6A)



Co-translational acetylation of target proteins by NatB and acetyl-CoA using PUREflex® was successful only when yNAA20 and yNAA25 were present simultaneously.

<Conclusion>

N-terminal myristylation and acetylation of target proteins were succeeded using PUREflex®.

<In progress>

Membrane insertion experiments of myristoylated proteins using PUREflex®.

For more information, please contact us.

URL: www.genefrontier.com

E-mail: pureflex@genefrontier.com

