

再構成型無細胞タンパク質合成系 (PUREflex®) による標的タンパク質のN末端翻訳後修飾

N-terminal post-translational modification of target proteins using a reconstituted cell-free protein synthesis system (PUREflex®)



○松本 令奈¹, 丹羽 達也², 嶋根 康弘³, 車 愉澈³, 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、³海洋研究開発機構・超先鋭研究開発プログラム)

○Rena Matsumoto¹, Tatsuya Niwa², Yasuhiro Shimane³, Yutetsu Kuruma³, Hideki Taguchi² and Takashi Kanamori¹

(¹GeneFrontier Corp., ²Cell Biology Center, IIR, Tokyo Tech, ³X-star, JAMSTEC)

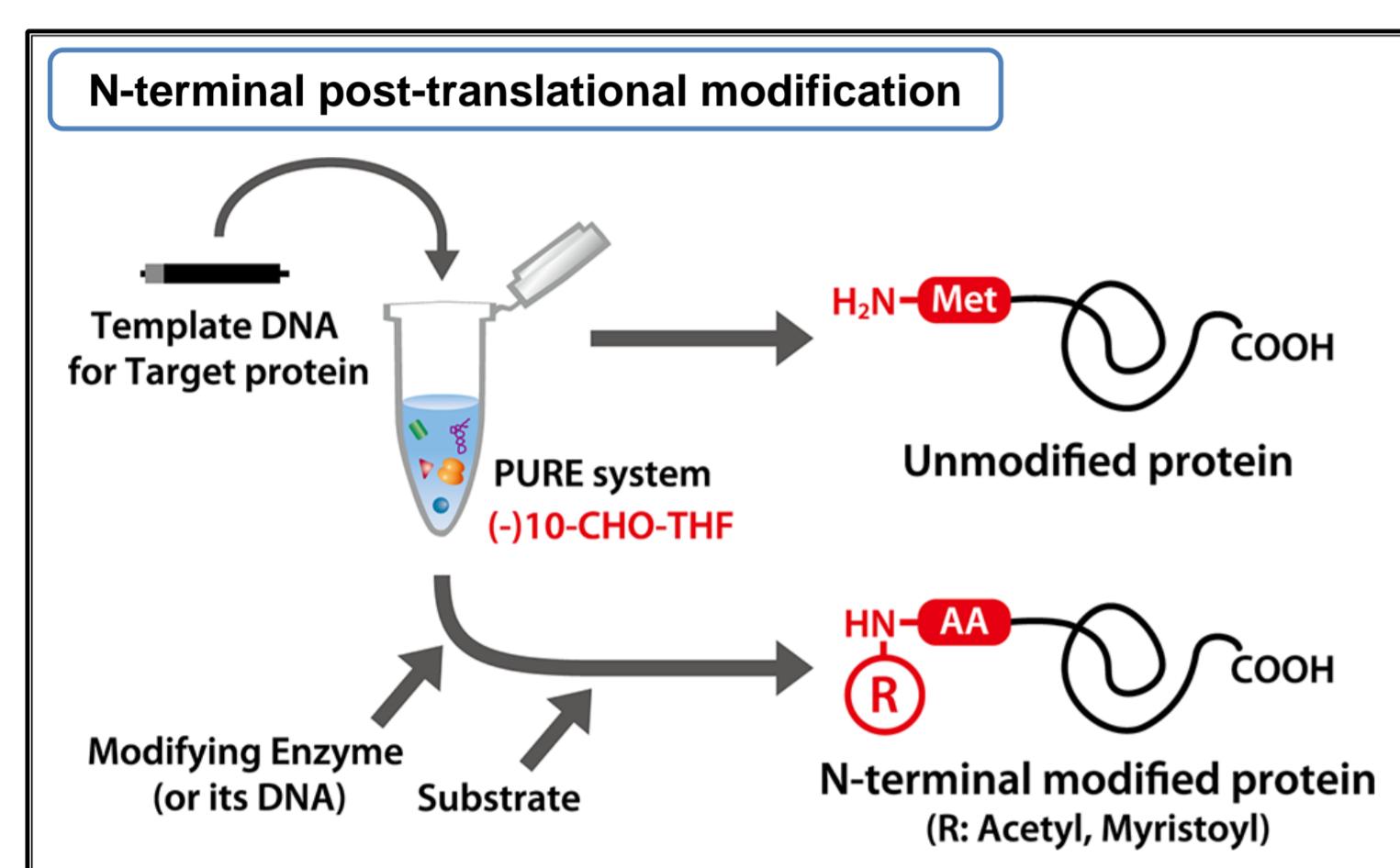
<Abstract>

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条件検討も容易である。本研究では、翻訳後修飾されたタンパク質の合成例として、N末端にミリストイル基を付加したタンパク質の合成を行った。

N末端翻訳後修飾タンパク質合成には非ホルミル化開始メチオニンから始まるポリペプチド合成が必要であるため、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸(10-CHO-THF)不含PUREflex®反応液を用いた。

本研究におけるN末端ミリストイル化タンパク質合成については、開始メチオニンをメチオニンアミノペプチダーゼ (MAP) で切断した標的タンパク質とN-ミリストイルトランスフェラーゼ (NMT) を個別に合成した後、これらとミリストイル-CoAを混合して翻訳後ミリストイル化反応を行った。この反応産物のN末端ペプチドについて質量分析を行ったところ、N末端へのミリストイル基修飾が確認された。また、リボソーム(GUV)内で翻訳後ミリストイル化反応を行ったところ、GUV膜に局在している標的タンパク質が観察され、PUREflex®により合成されたミリストイル化タンパク質が膜局在能を持つことが確認された。

PUREflex®を用いた翻訳後修飾タンパク質合成の他の成功例として、N末端アセチル化タンパク質の合成（翻訳共役型）についても紹介する。



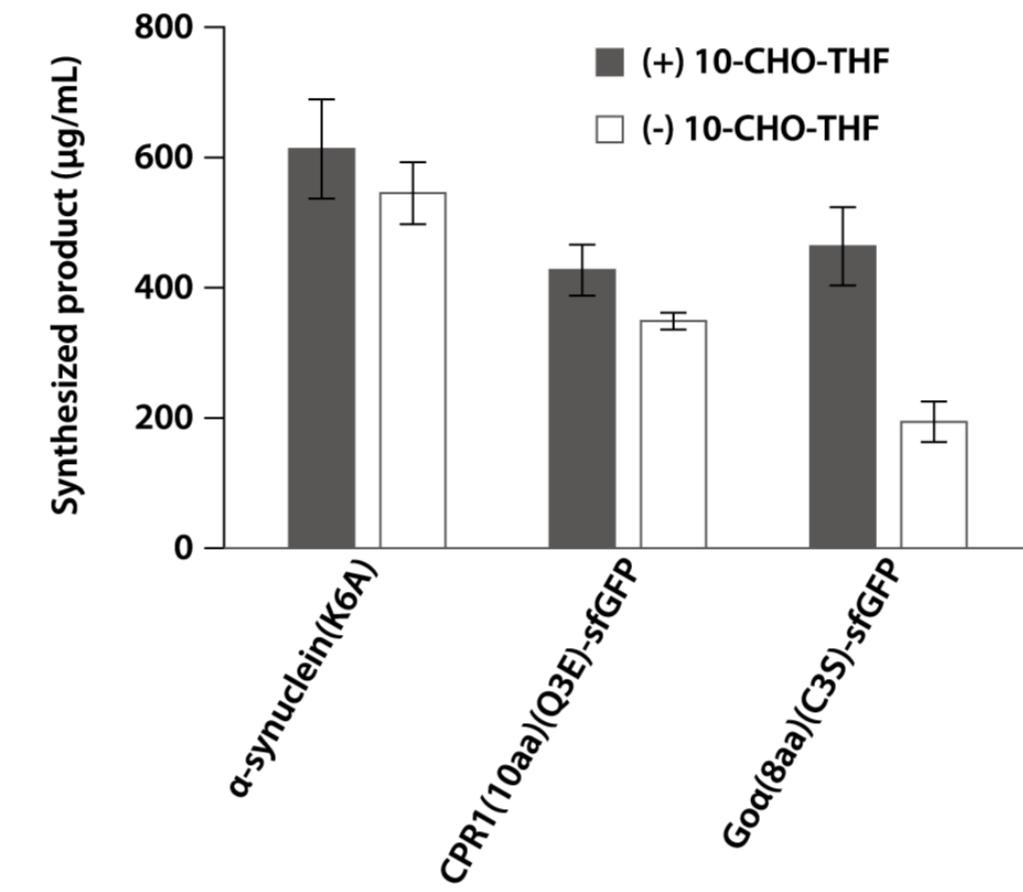
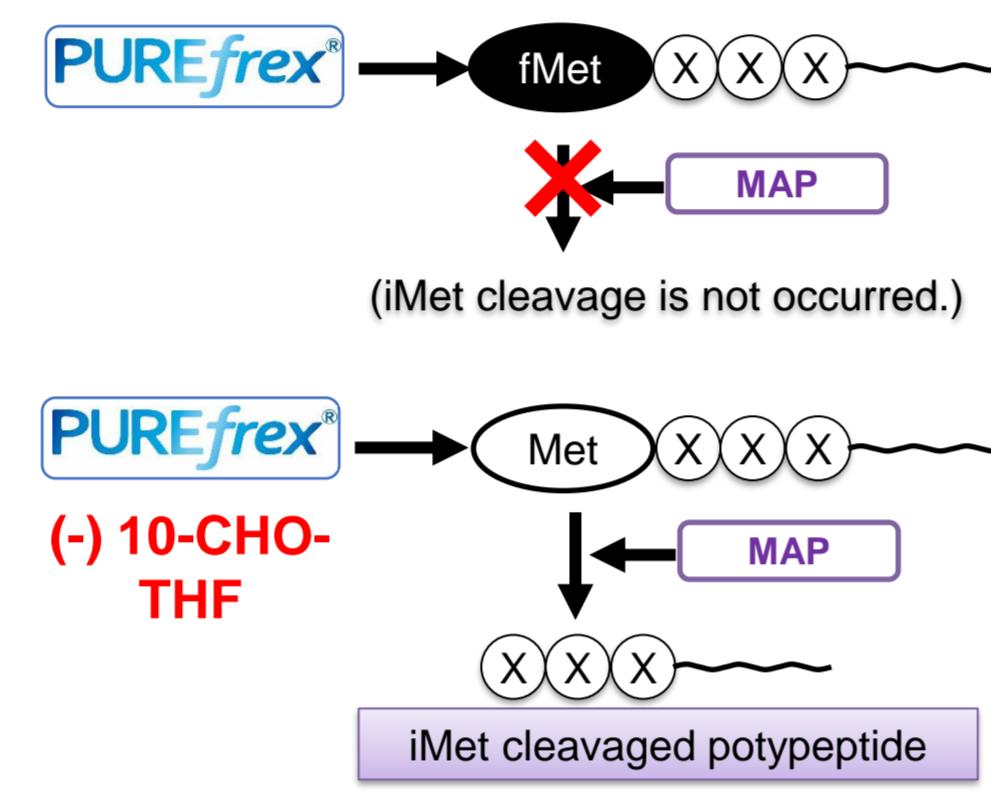
ACS Synth. Biol. (2023)
DOI: 10.1021/acssynbio.3c00191

Summary of the N-terminal modification in this study

PURE system	Acetylation (by NatB)	Acetylation (by NatA)	Myristylation
initial Met cleavage	unnecessary	necessary	necessary
Target protein	α -synuclein (K6A) 	CPR1(10aa)(Q3E)-sfGFP 	Goo(C3S)-sfGFP
Enzymes	yNAA20 (NAT3) yNAA25 (MDM20)	yNAA10 (ARD1) yNAA25 (NAT1)	hNMT1Δ80
Substrate	Acetyl-CoA	Acetyl-CoA	Myristoyl-CoA
Method	Co-translational reaction	Co-translational reaction	Post-translational reaction

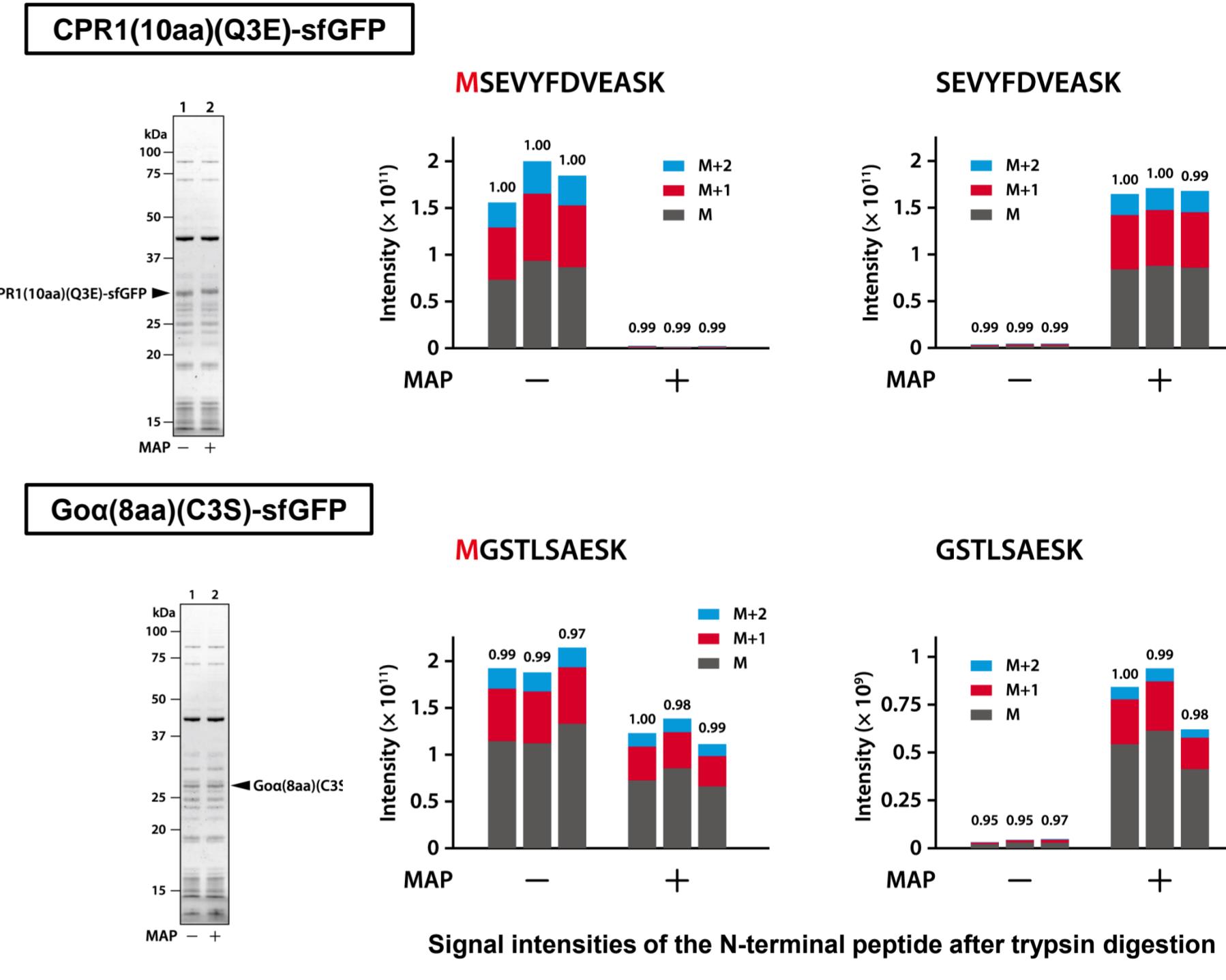
1. N-terminal modification requires the synthesis of polypeptides with unformylated methionine

1-1. Cell-free protein synthesis with or without 10-CHO-THF



10-CHO-THF is not essential for protein synthesis within the PURE system but affects the efficiency of protein synthesis, depending on the properties of each protein, especially its N-terminal sequence.

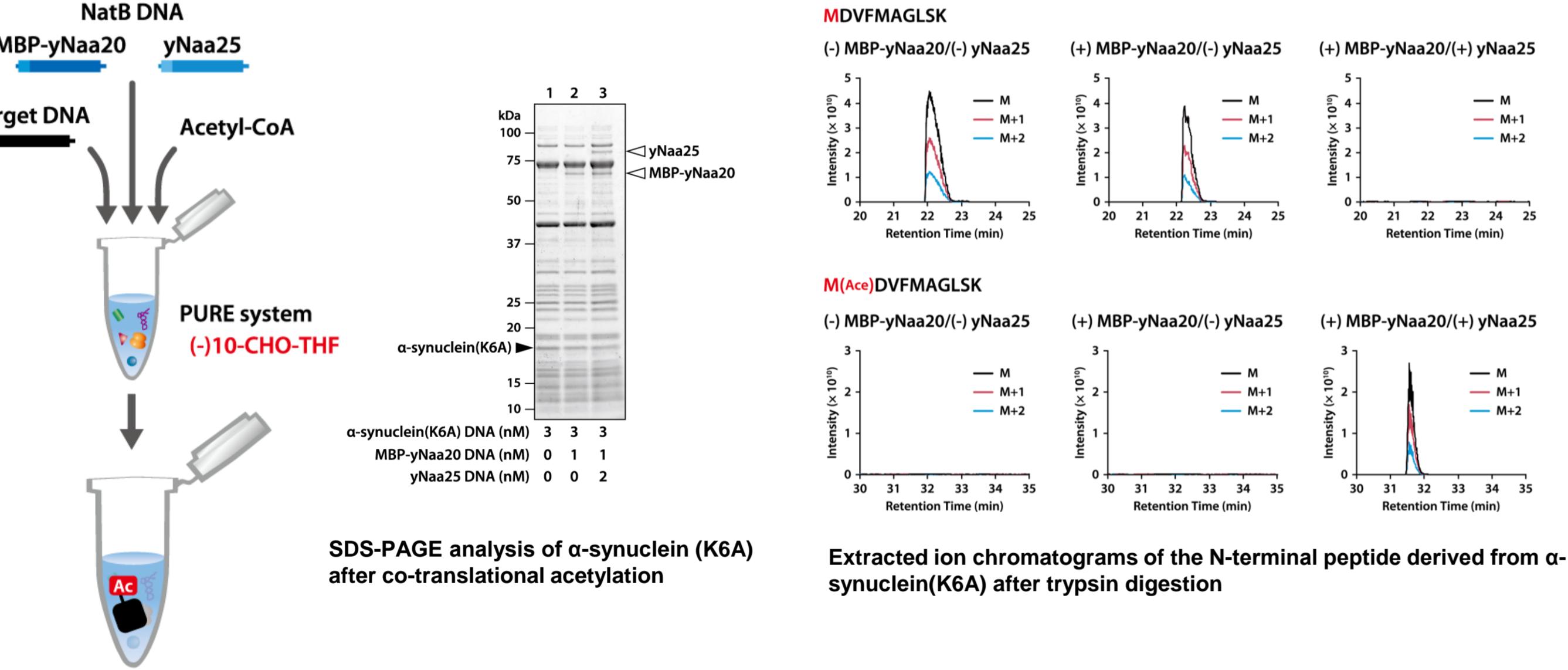
1-2. Cleavage of initial methionine (iMet) with methionine aminopeptidase (MAP)



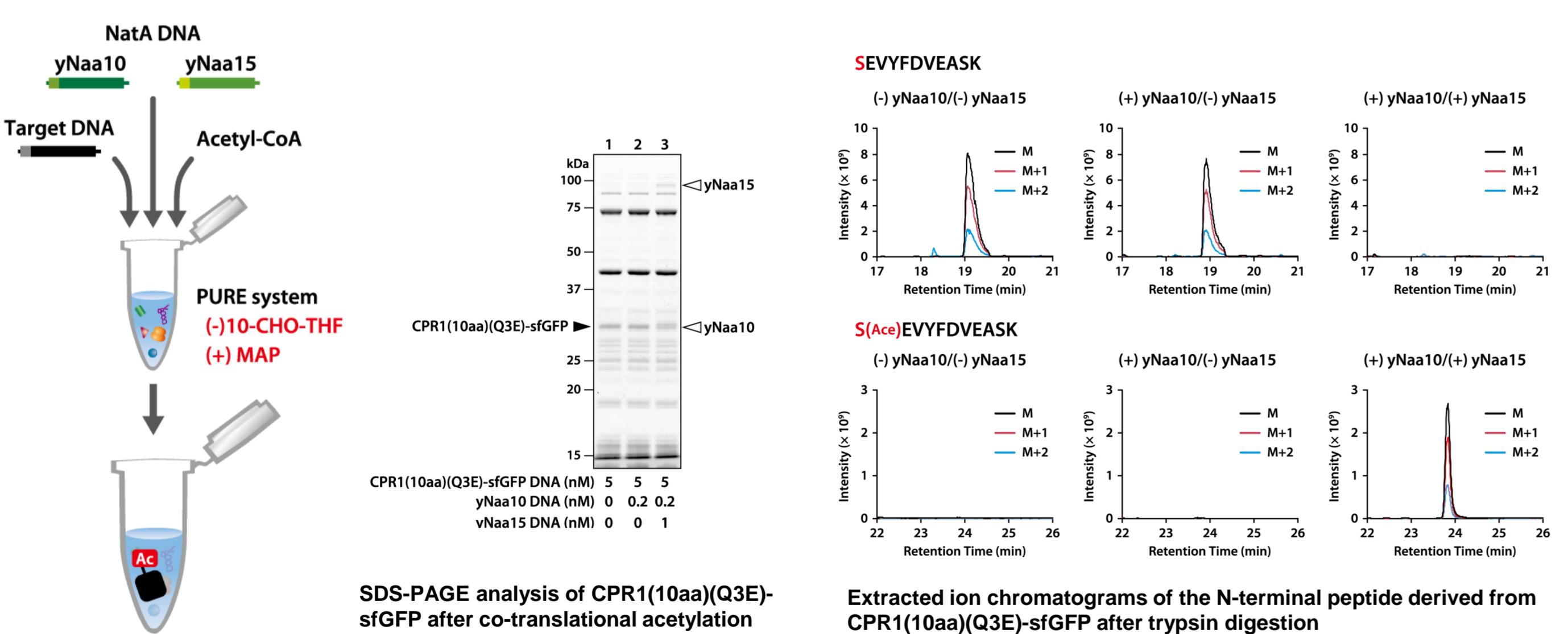
iMet was cleaved by MAP when synthesized without 10-CHO-THF.

2. in vitro N-terminal acetylation of model protein

2-1. N-terminal acetylation by NatB



2-2. N-terminal acetylation by NatA



N-terminal acetylation of target proteins using PUREflex was successful only when both transferase and auxiliary protein were present.

<Conclusion>

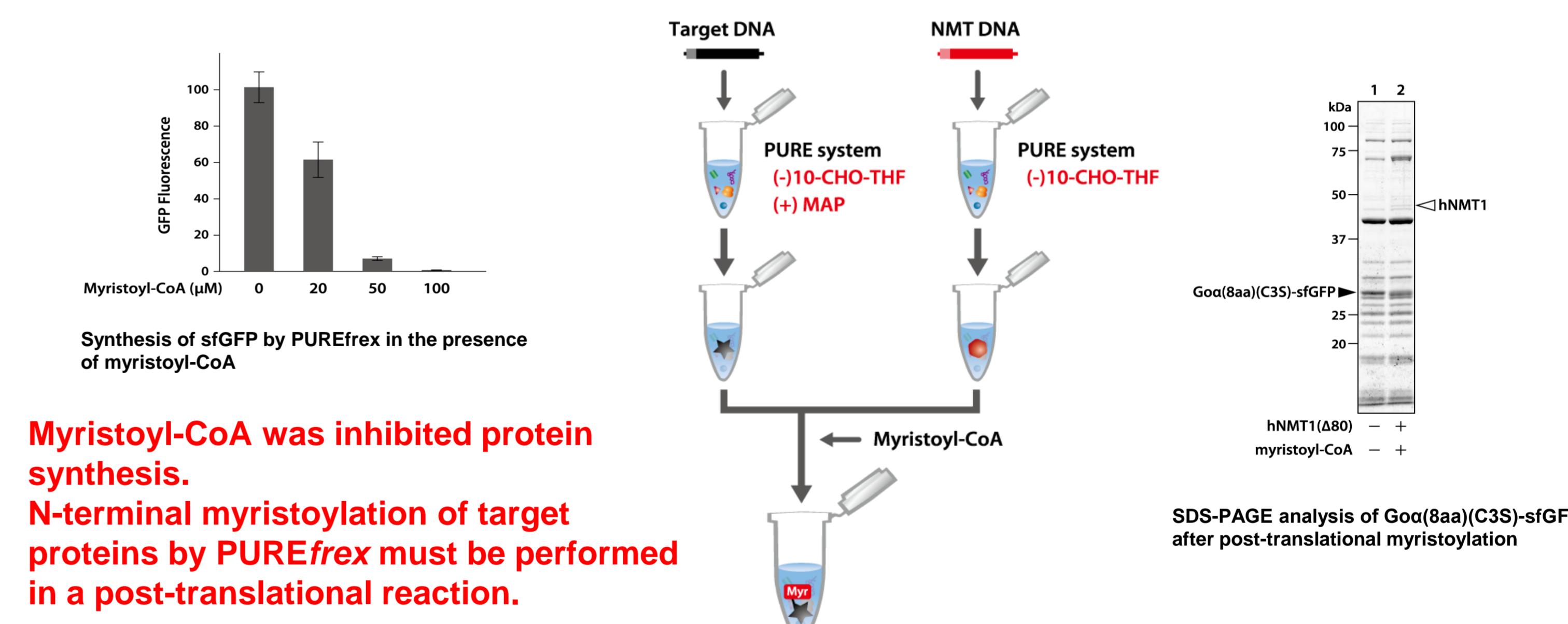
- In vitro acetylation or myristylation at the N-terminus of a protein was successfully accomplished using the PUREflex.
- N-terminal modified proteins can be prepared easily and simply, in a completely controlled manner.
- The modifying enzymes were also synthesized using the PUREflex and were used without purification. This may be useful for evaluating the activity of modifying enzymes without the use of live cells.

PUREflex is a useful tool for the preparation of N-terminal modified proteins.

For more information, please contact us.
URL: www.genefrontier.com
E-mail: pureflex@genefrontier.com

3. in vitro N-terminal myristylation of model protein

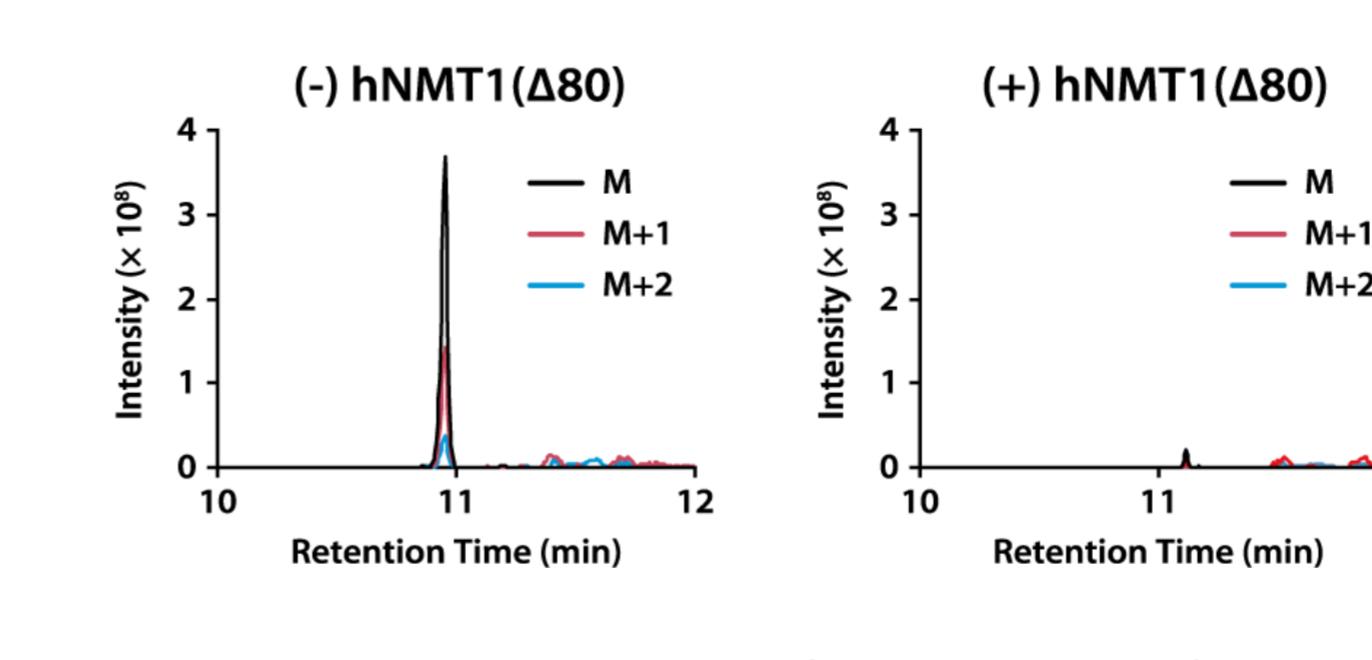
3-1. N-terminal myristylation



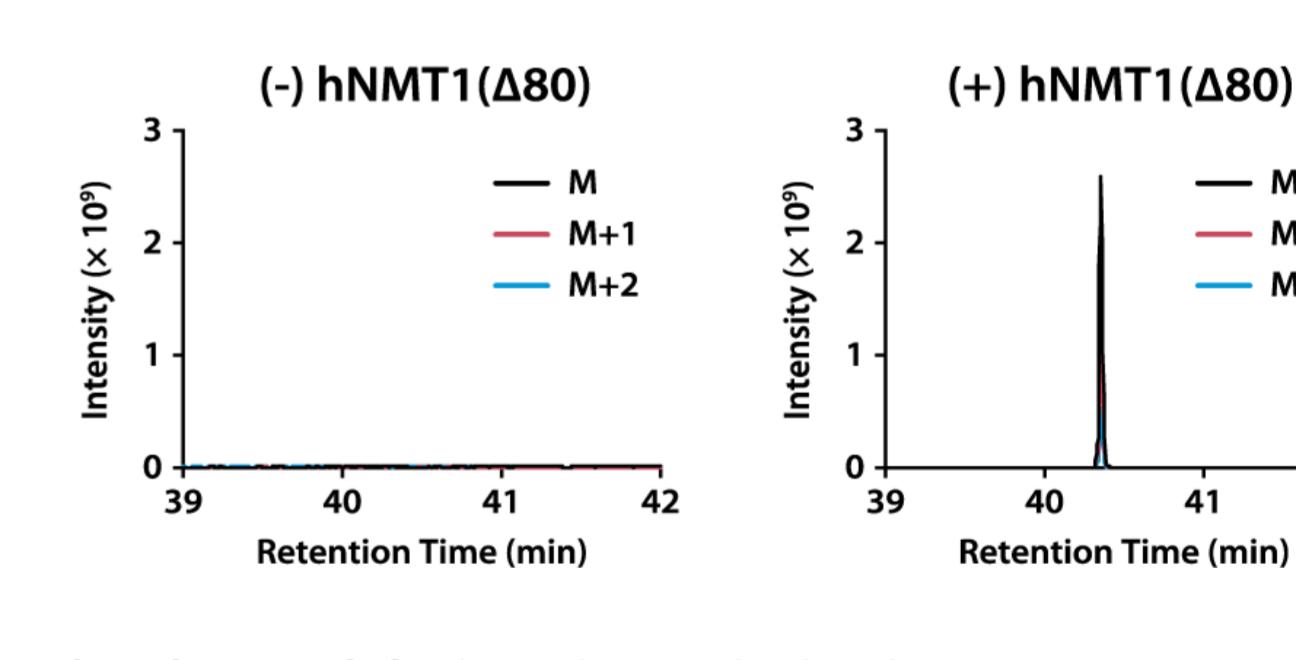
Myristoyl-CoA was inhibited protein synthesis.

N-terminal myristylation of target proteins by PUREflex must be performed in a post-translational reaction.

G(STLSEAESK)

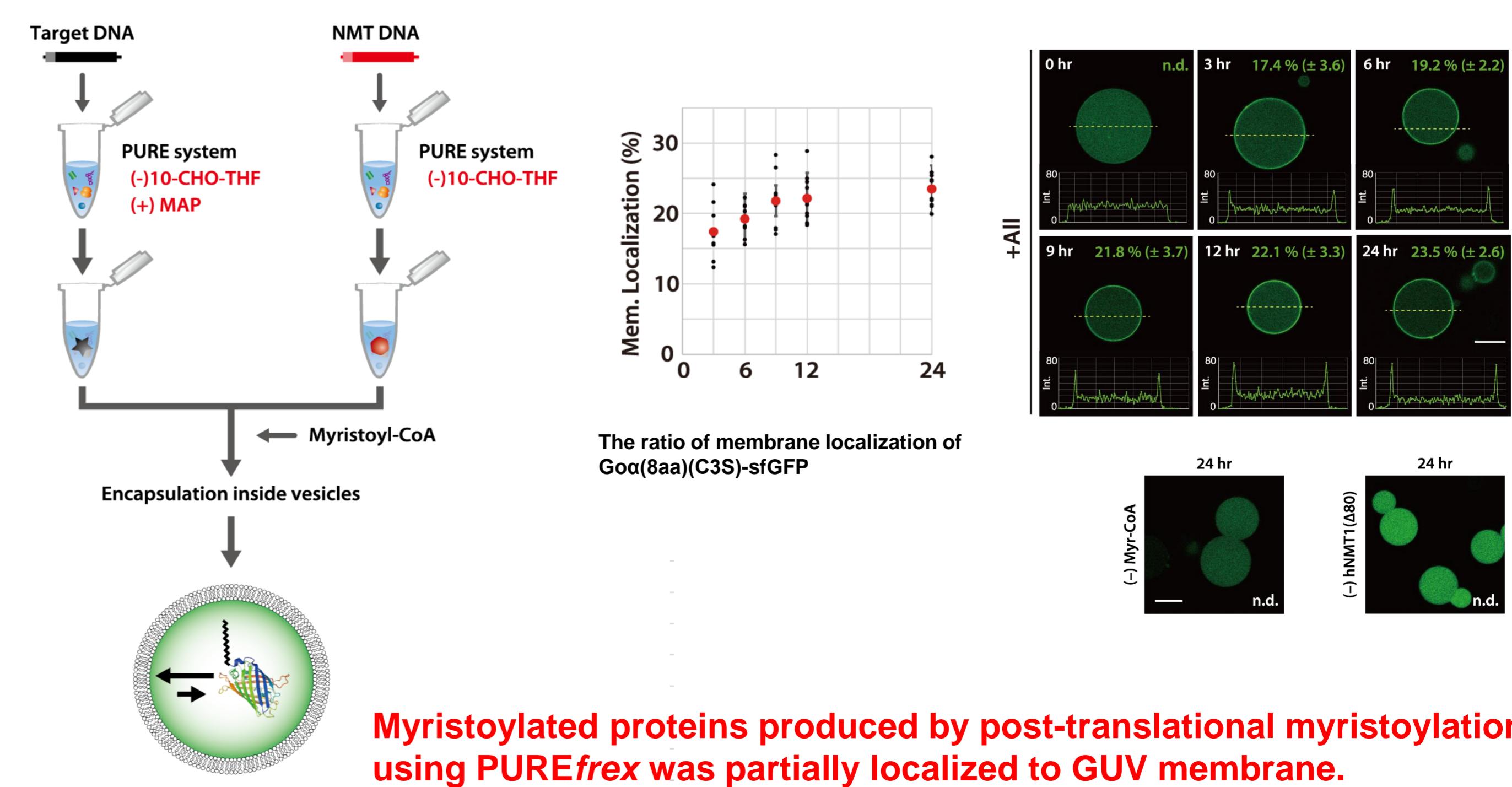


G(Myr)STLSEAESK



N-terminal myristylation was detected when the target protein was reacted with hNMT1Δ80 synthesized by PUREflex and myristoyl-CoA.

3-2. Membrane localization of N-terminal myristoylated protein



Myristoylated proteins produced by post-translational myristylation using PUREflex was partially localized to GUV membrane.