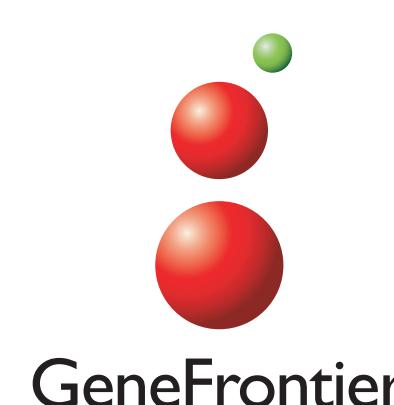


再構成型無細胞タンパク質合成系 (PUREflex®) を用いたタンパク質合成における N末端アミノ酸配列の影響



Effect of N-terminal amino acid sequence on the protein synthesis using a 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。反応液の改良により、合成量は最大で 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。そこで、我々は合成するタンパク質のアミノ酸配列や塩基配列が、PUREflex®での合成効率に与える影響についても検討を進める。塩基配列については、N末端領域のコドンをATが多いコドンにすると合成量が増加することがわかつている。本発表では、目的タンパク質のN末端領域のアミノ酸配列が、タンパク質合成に与える影響について報告する。

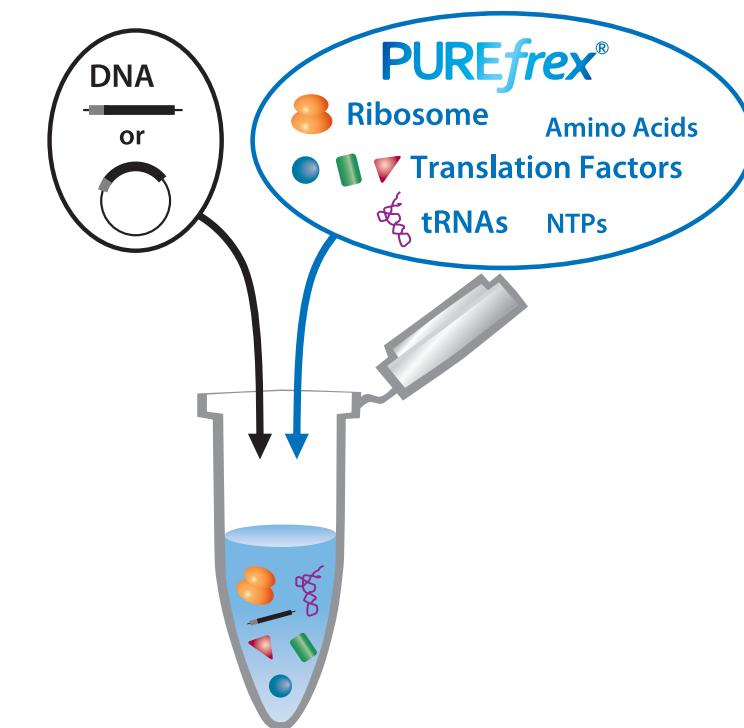
4種類のタンパク質を23, 30, 37°Cで合成したところ、23°Cでの合成量が大きく異なっていた。N末端領域では大きなアミノ酸が翻訳に有利に働くことが報告されている。そこで、23°Cでの合成量が低かったsfGFPの4番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異体を23, 30, 37°Cで合成し、その蛍光量を比較した。その結果、側鎖の大きなアミノ酸(Y, H, N)の方が小さいアミノ酸(G, V, A)より合成量が高くなった。チロシンに置換した変異体は野生型(グリシン)に対し、37°Cで合成した場合は約30%高い合成量だったが、23°Cでの合成では8倍以上の合成量が得られた。また、23°Cで合成量が低かったアルカリホスファターゼのN末端にSer-Lys-Tyrを付加して合成すると、特に低温での合成量が増大した。以上の結果から、PUREflex®を用いて低温でタンパク質を合成する際は、N末端のアミノ酸配列を改変することで合成量を増加させることができることが示唆された。

1. Introduction

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



- One of the challenges;

Variability in the synthesis efficiency among different proteins

- Background;

- The 3rd to 5th amino acid residues in the N-terminal region are important for efficient translation.
- Large amino acids, which are encoded by AT-rich codon, facilitate early elongation reaction.

Ref; Verma M. et al. (2019) *Nat. Commun.* & Jia B. et al. (2021) *Sci. Rep.*

- Aim of this study;

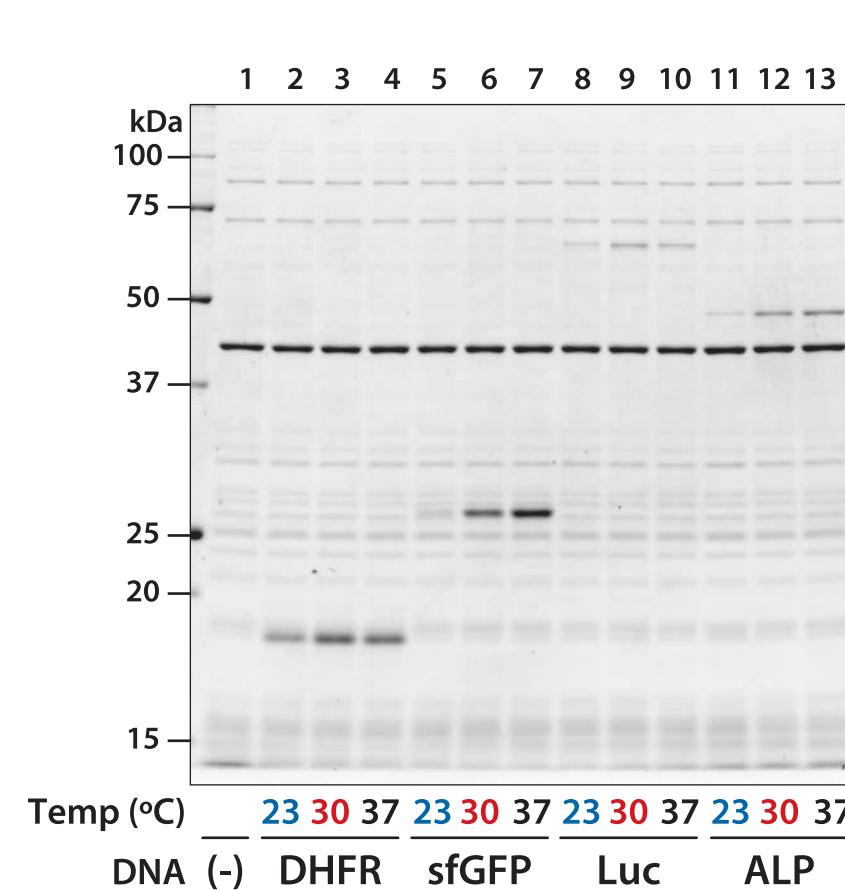
Evaluation of the effect of amino acids in the N-terminal region on the synthesis efficiency at different temperature

< Information of proteins used in this study >

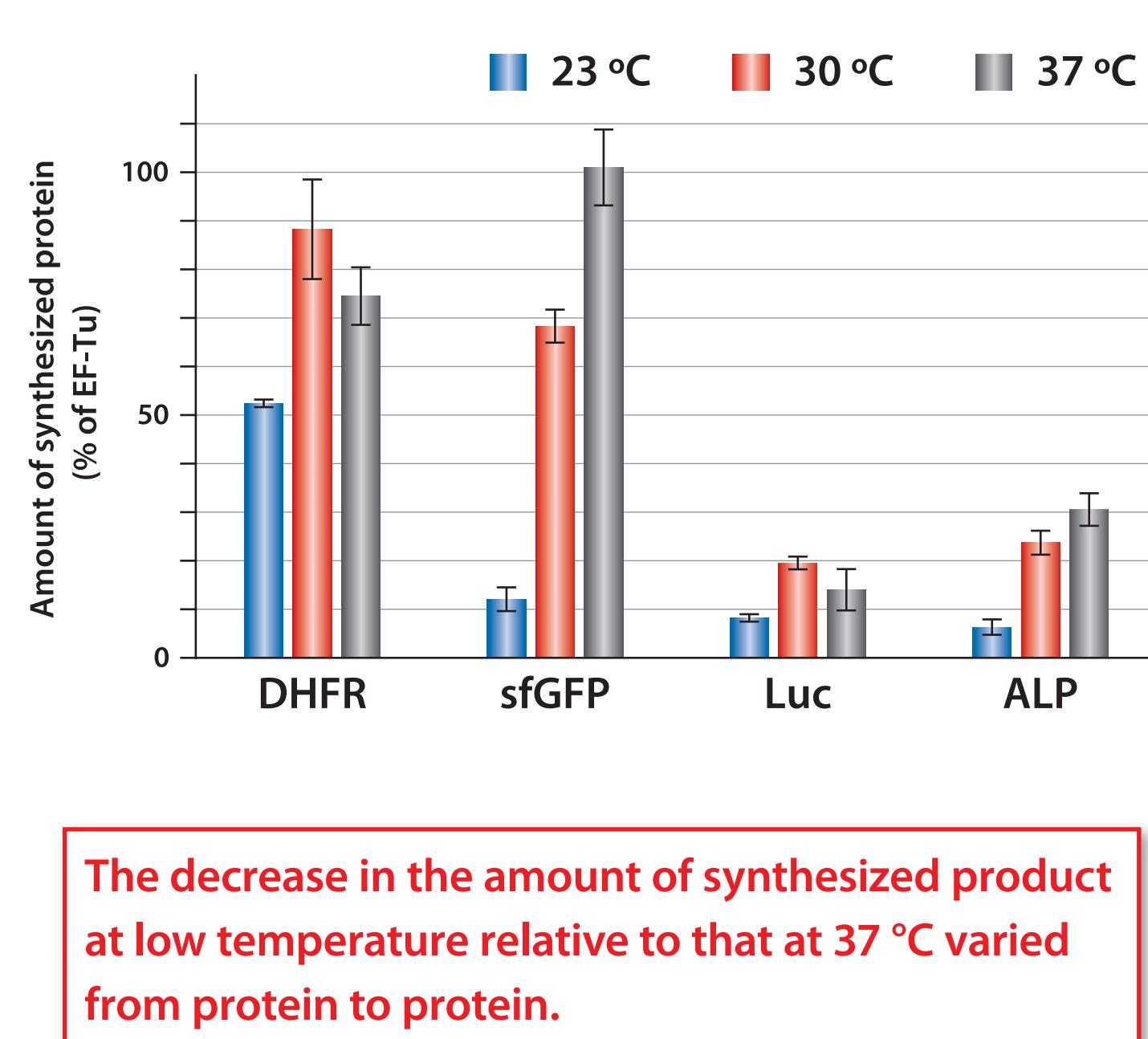
Protein	M.W.	N-terminal AA Seq
DHFR	<i>E. coli</i> dihydrofolate reductase	18.0 kDa MISLIAALAV...
sfGFP	Superfolder GFP	26.8 kDa MSKGEEELFTG...
Luc	Firefly luciferase	60.7 kDa MEDAKNIKKG...
ALP	<i>E. coli</i> alkaline phosphatase	47.3 kDa MRTPEMPVLE...

2. Protein synthesis at 23, 30, or 37 °C

PUREflex® 2.1 (+ GSH)
↓ + DNA
↓ incubation at 23, 30 or 37 °C for 24 h
↓ SDS-PAGE

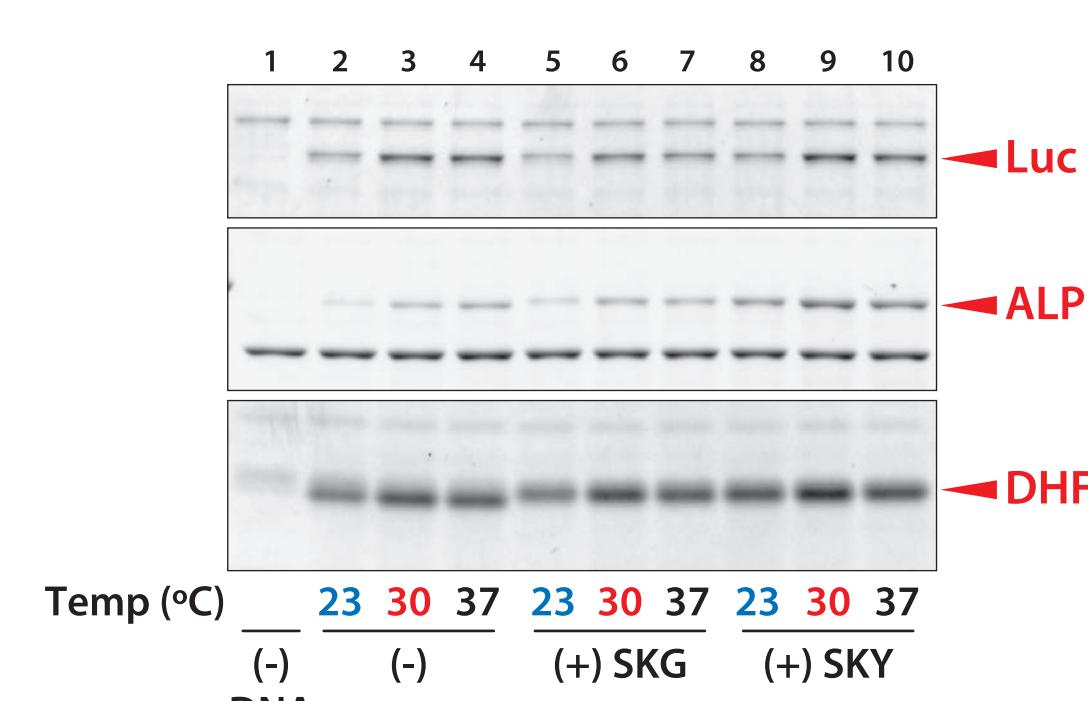


Temp (°C) 23 30 37 23 30 37 23 30 37 23 30 37
DNA (-) DHFR sfGFP Luc ALP



4. Effect of the N-terminal additional sequence

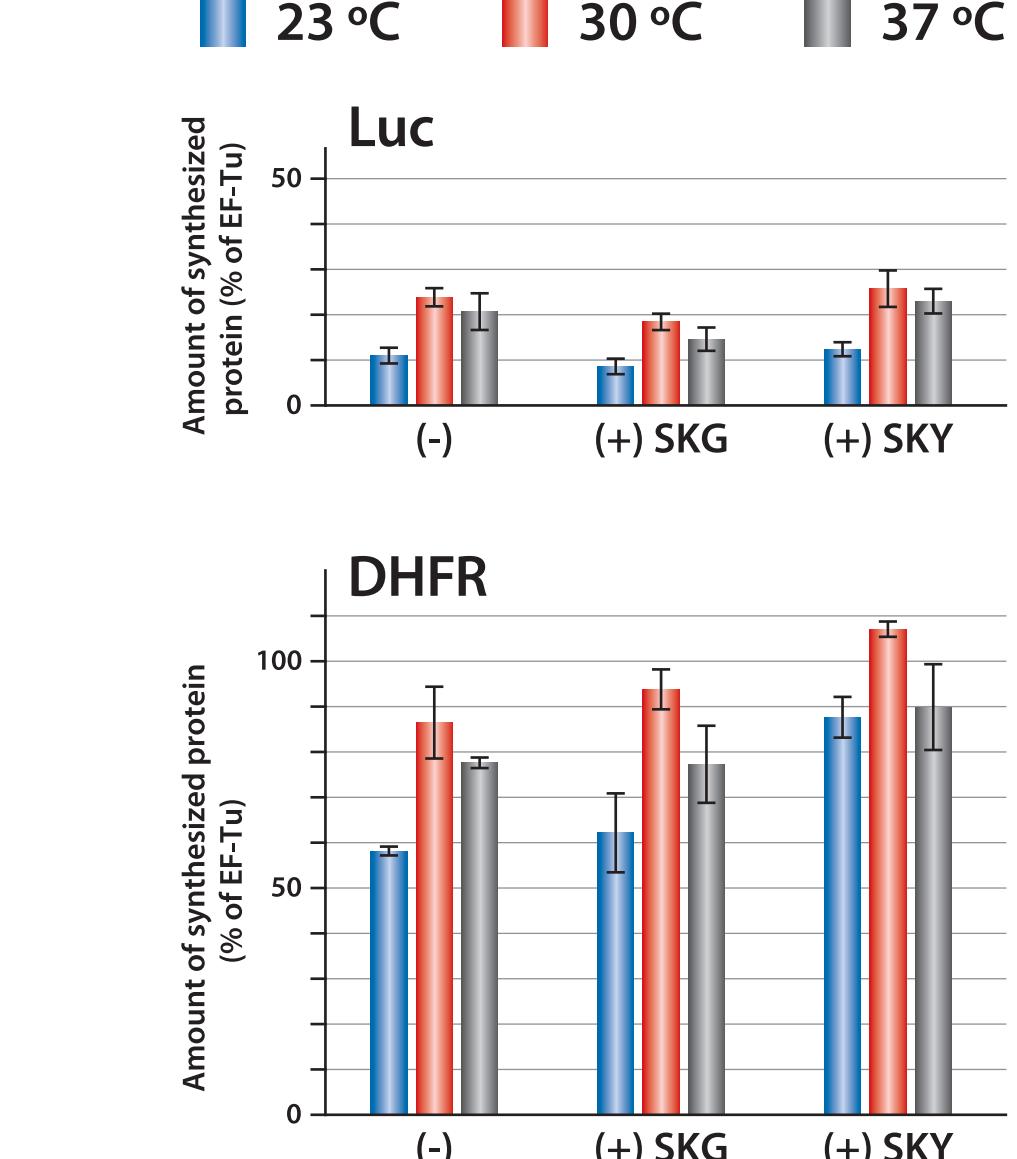
PUREflex® 2.1 (+ GSH)
↓ + DNA
↓ incubation at 23, 30 or 37 °C for 24 h
↓ SDS-PAGE



Addition of Ser-Lys-Tyr at N-terminal region significantly increased the amount of synthesized ALP.

Luc MEDAKNIKKG...
ALP MRTPEMPVLE...
DHFR MISLIAALAV...

SKG/SKY



3. Effects of the 4th amino acid on sfGFP synthesis

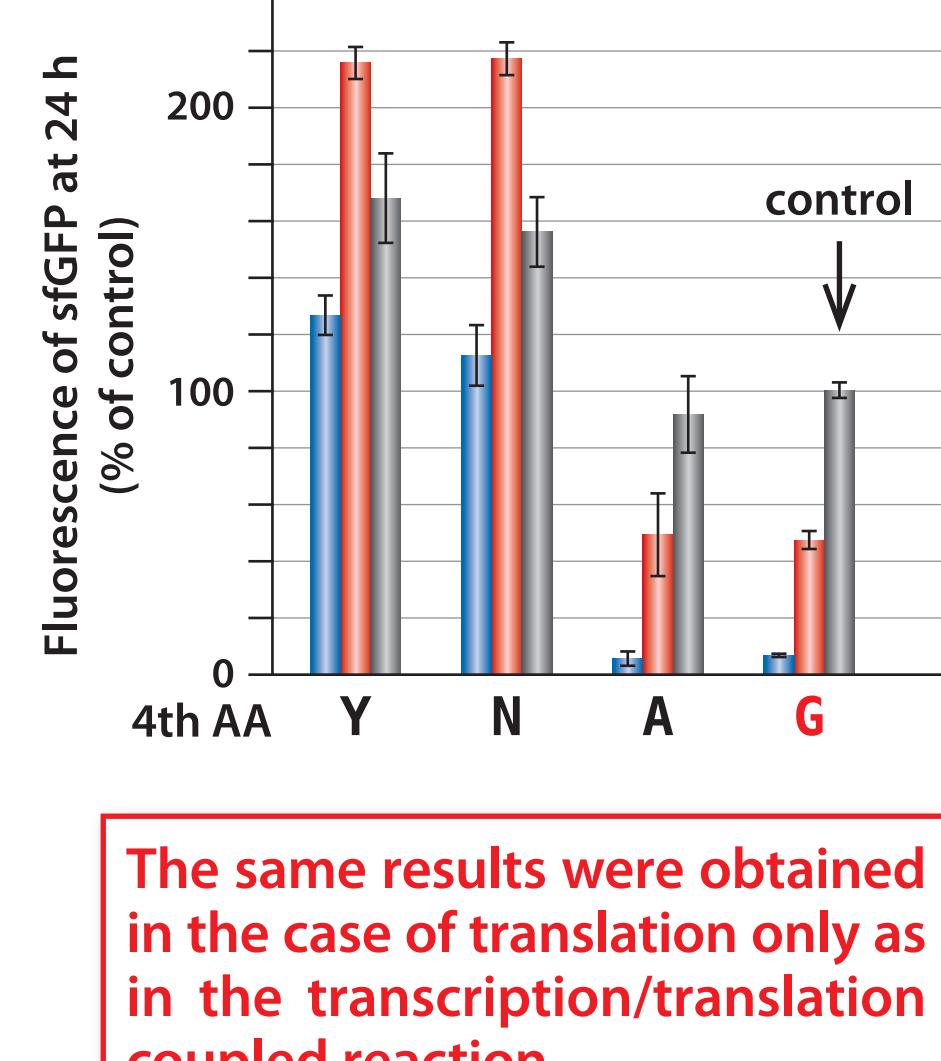
PUREflex® 2.1 (+ GSH)
↓ + sfGFP DNA or mRNA
↓ incubation at 23, 30 or 37 °C for 24 h
↓ Measurement of fluorescence or SDS-PAGE

< N-terminal sequence of sfGFP >

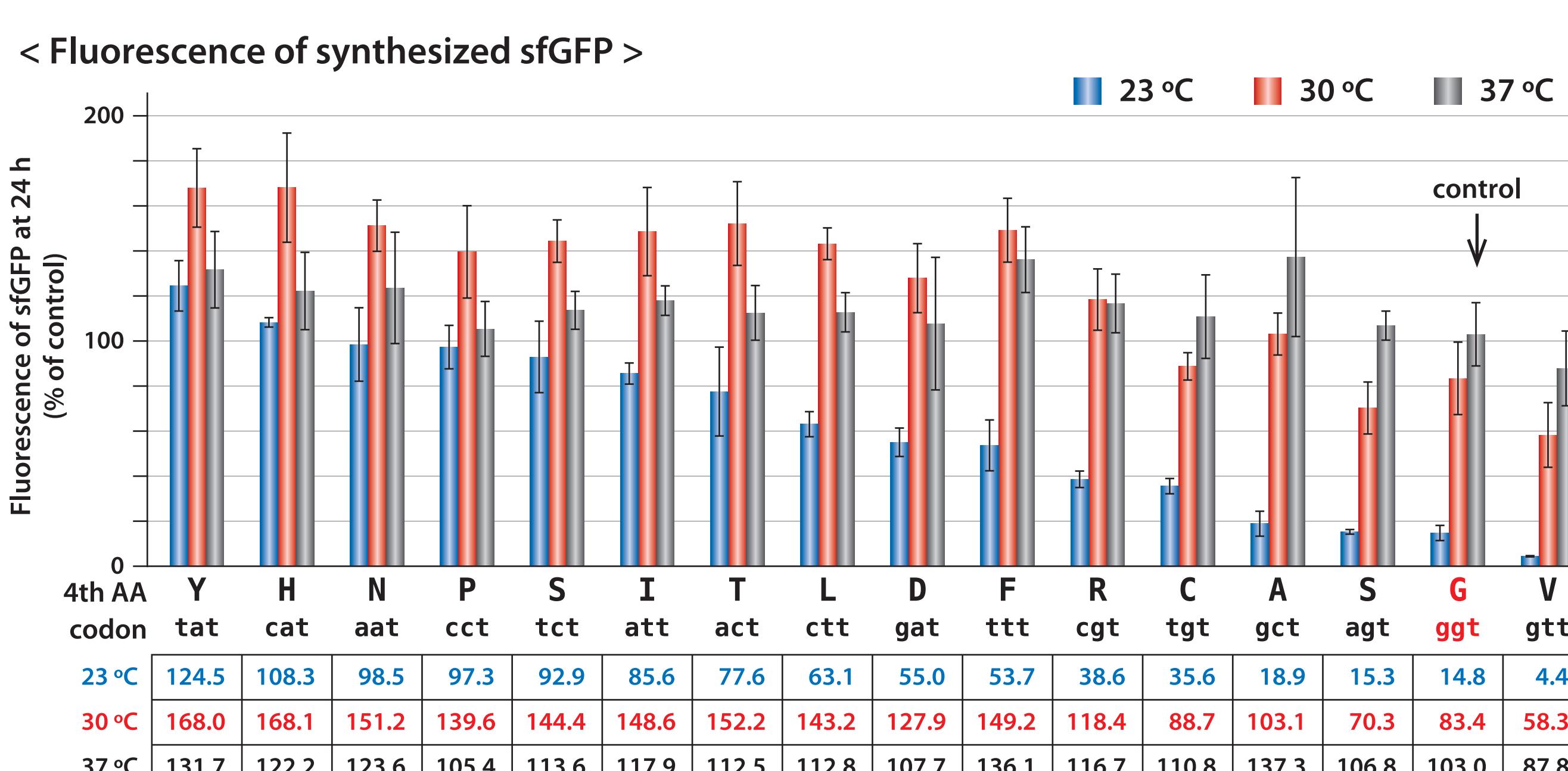
M S K G E E
atgtctaaaggtaaagaa
other amino acids (NNT codon)

3-B. Synthesis from mRNA

23 °C 30 °C 37 °C

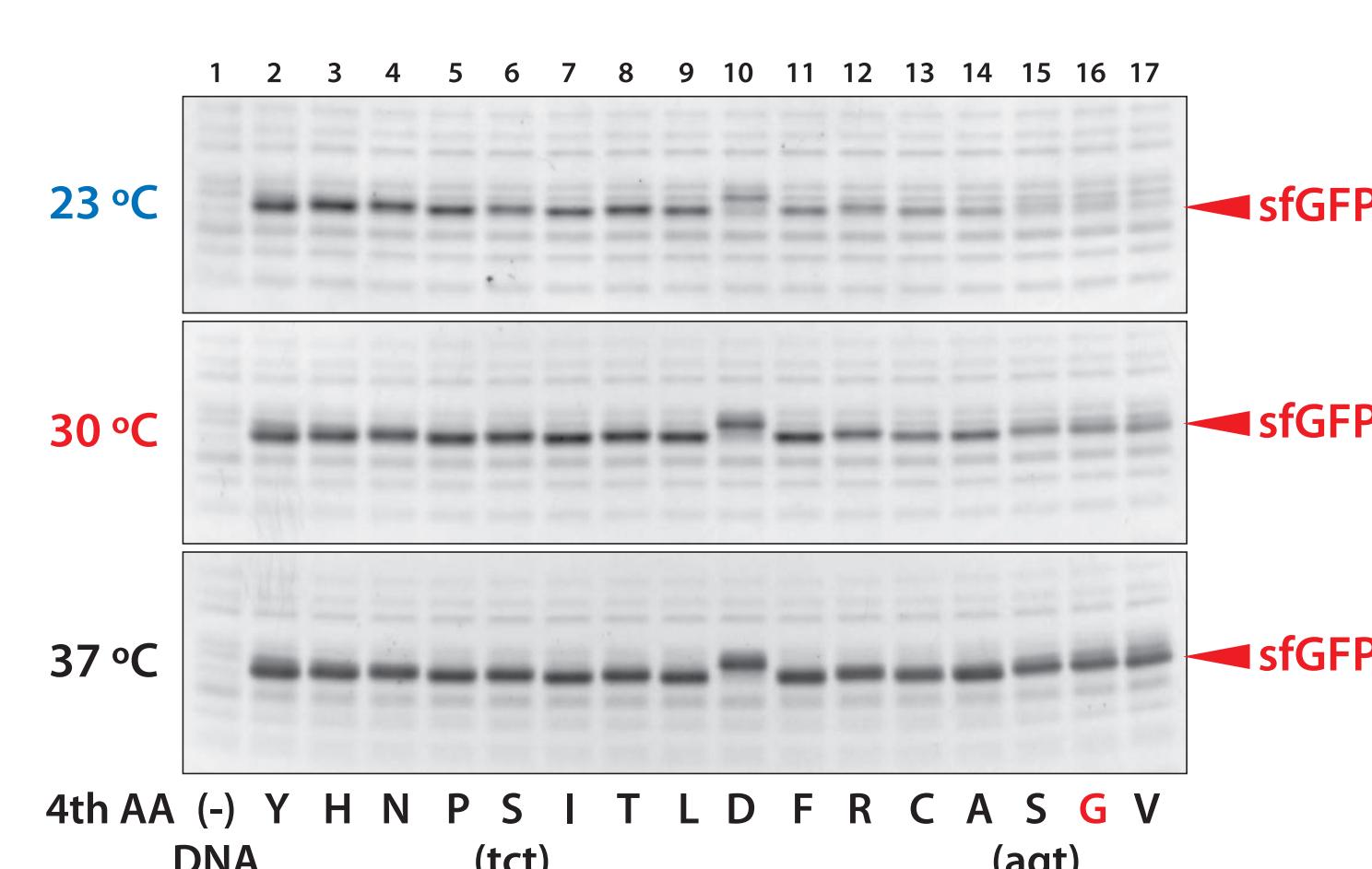


3-A. Synthesis from template DNA encoding sfGFP with different 4th amino acid

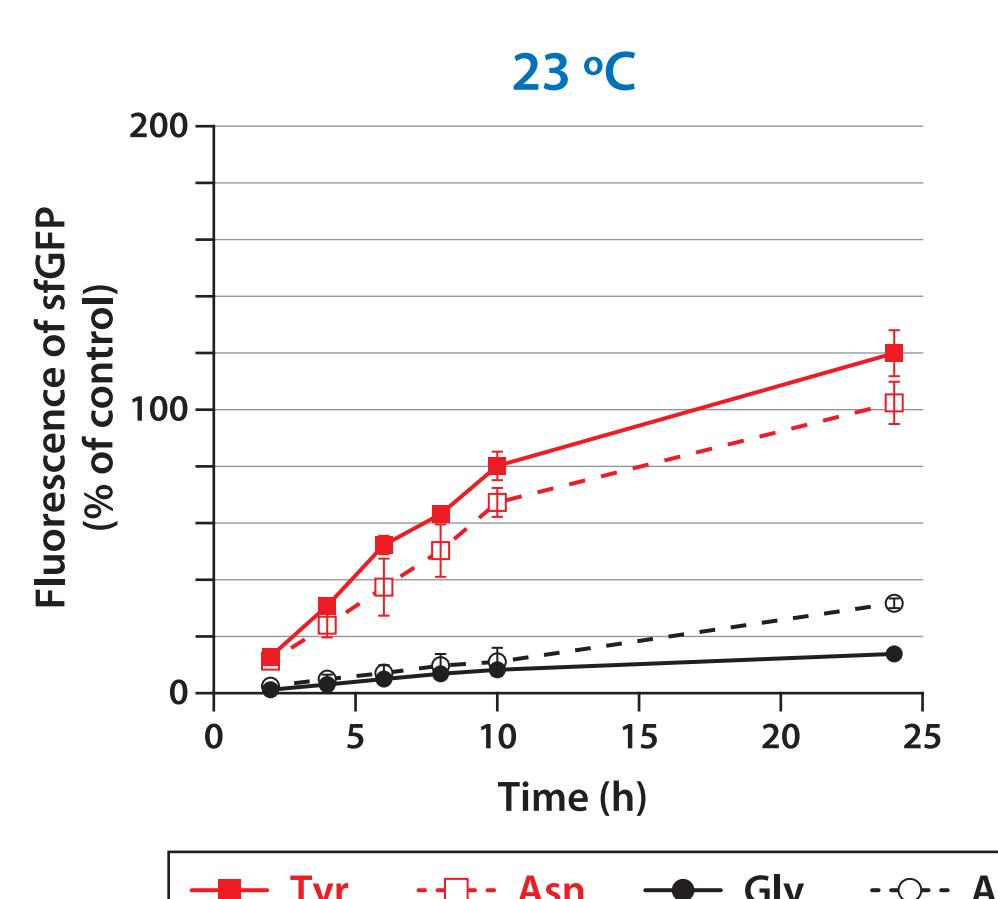


- The amount of synthesized sfGFP, especially at 23 °C, differed depending on the 4th amino acid.
- When the 4th amino acid was a large amino acid such as Tyr or His, the amount of sfGFP was increased compared to Gly.

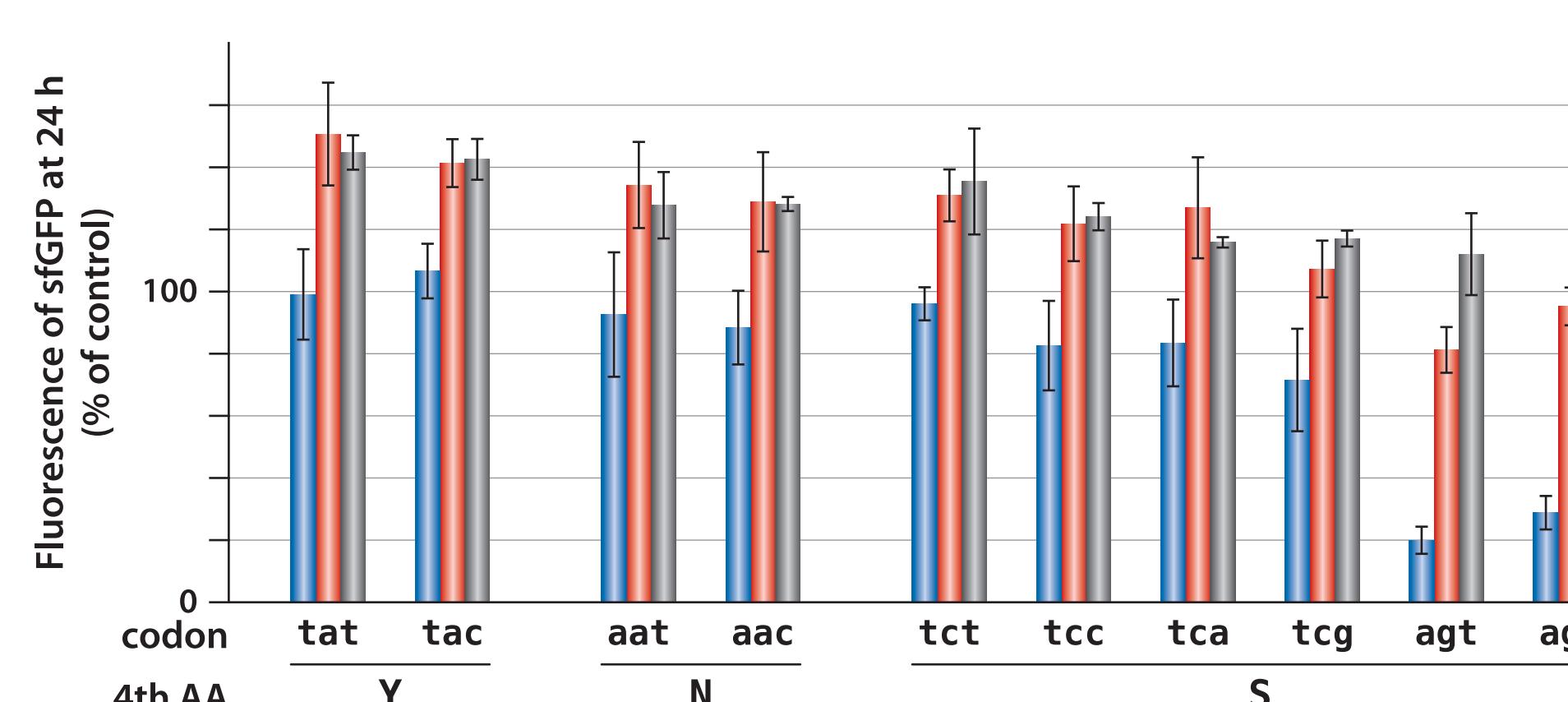
< SDS-PAGE of synthesized sfGFP >



3-D. Time course



3-C. Effects of synonymous codons at the 4th position



Conclusion

- The efficiency of synthesis especially at low temperature varied from protein to protein.
- The 4th amino acid affected the synthesis of sfGFP at low temperature.
- Addition of Ser-Lys-Tyr to N-terminal region significantly increased the amount of synthesized ALP at low temperatures.

- Why does the 4th amino acid affect synthesis at low temperature?
- Would the same result be obtained when expressed in *E. coli*?

In the case of Tyr and Asn, the synthesis rates at 23 and 30 °C were also high.