

# Improvement of translational efficiency by N-terminal codon optimization in the reconstituted cell-free protein synthesis system

再構成型無細胞タンパク質合成系(PUREflex®)におけるN末端コドン最適化による翻訳効率向上



○ Rena Matsumoto, Satoshi Murakami and Takashi Kanamori (GeneFrontier Corporation)

○ 松本 令奈、村上 智史、金森 崇(ジーンフロンティア株式会社)

for more infomation, please contact us.  
URL: [www.genefrontier.com](http://www.genefrontier.com)  
E-mail: [pureflex@genefrontier.com](mailto:pureflex@genefrontier.com)

## <Abstract>

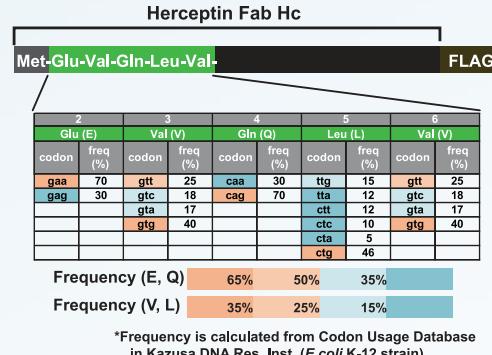
大腸菌で組換エンタープラック質を発現させる際、使用するコドンは同義コドンの中から高使用頻度のものを選択することが一般的である。一方、大腸菌エンタープラック質では、N末端部分(開始～数アミノ酸の範囲)にATリッチなコドンが多いものは発現レベルが高いといういくつかの報告がある<sup>a,b,c</sup>。しかし、これらの報告は、in vivoのデータを基に行われたものが多く、翻訳以外の反応(分解、代謝など)が最終的なタンパク質量に影響を与える可能性がある。本研究では、大腸菌由来の再構成型無細胞タンパク質合成系(PURE system)を用いることで翻訳以外の反応の影響を排除し、N末端のコドン選択がタンパク質合成量自体に与える影響、および低合成量タンパク質の合成功能向上に有効なコドン選択について検証した。

抗体断片(Fab)の重鎖などの元来合成量の低いタンパク質について、N末端部分のコドンを同義置換した種々の錆型DNAを作製し、PURE systemを改良したPUREflex®を用いてタンパク質合成を行った。その結果、高使用頻度のコドンよりATリッチなコドンを選択した方が、タンパク質合成量が数倍増加する傾向がみられた。この結果は、N末端のATリッチなコドン配列が翻訳反応自体を促進することを示唆するものである。従って、合成量の低いタンパク質を効率よく合成するためには、無細胞合成系、大腸菌発現系のいずれにおいてもN末端にはATリッチなコドンを使用することが推奨される。

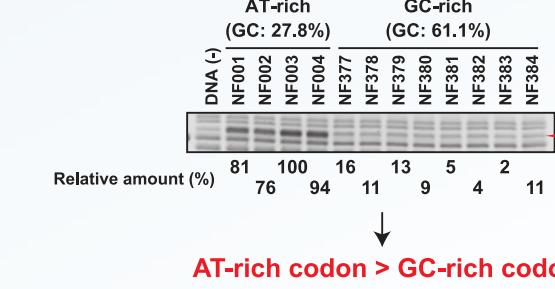
- a) Allert et al. (2010) J. Mol. Biol., vol.402, p. 905.
- b) Bentle et al. (2013) Mol. Sys. Biol., vol.9, p. 675.
- c) Boel et al. (2016) Nature, vol.529, p.358.

## 3. Results 1: N-terminal codon and protein synthesis

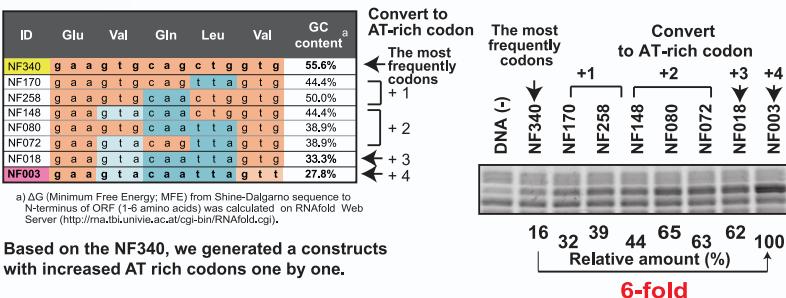
### 3-1. Fab Heavy chain (Herceptin)



### AT-rich codon vs GC-rich codon



### AT-rich codon vs the most frequently used codon



### Summary (Herceptin Hc)

AT-rich

GC-rich

9-fold

The most frequently codons

ID	Glu	Val	Gln	Leu	Val	GC content <sup>a</sup>	ΔG <sup>b</sup>	Product amount <sup>c</sup>
NF001	g a a g t t c a a t t t a g t t	27.8%	0.00	81%				
NF002	g a a g t t c a a a t t a g t t	27.8%	0.00	76%				
NF003	g a a g t t c a a a t t a g t t	27.8%	0.00	100%				
NF004	g a a g t t c a a a t t a g t t	27.8%	0.00	94%				
NF013	g a a g t t c a a t t c a g t t	33.3%	0.00	65%				
NF015	g a a g t t c a a a t t a g t t	33.3%	0.00	78%				
NF017	g a a g t t c a a a t t a g t t	33.3%	-1.00	74%				
NF019	g a a g t t c a a a t t a g t t	33.3%	0.00	65%				
NF021	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	-0.80	56%				
NF023	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	0.00	57%				
NF025	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	0.00	71%				
NF026	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	-0.10	68%				
NF027	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	0.00	85%				
NF028	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	0.00	89%				
NF029	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	-1.00	43%				
NF030	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	-1.60	57%				
NF031	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	-3.00	63%				
NF032	g a a g t t c a a a c t a g t t	33.3%	-3.00	79%				
NF065	g a a g t t c a a a c t c g t t	38.9%	-2.60	63%				
NF069	g a a g t t c a a a c t c g t t	38.9%	-3.10	30%				
NF072	g a a g t t c a a a c t a g t t	38.9%	0.00	63%				
NF080	g a a g t t c a a a c t a g t t	38.9%	0.00	65%				
NF088	g a a g t t c a a a c t a g t t	38.9%	-3.00	51%				
NF102	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	38.9%	-3.00	51%				
NF103	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	38.9%	-5.00	27%				
NF105	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	38.9%	-3.00	46%				
NF107	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	38.9%	-3.00	44%				
NF148	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	44.4%	-3.90	49%				
NF170	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	44.4%	0.00	32%				
NF209	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	44.4%	-6.50	28%				
NF213	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	44.4%	-3.00	22%				
NF250	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	44.4%	-4.00	36%				
NF254	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	50.0%	-5.00	23%				
NF258	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	50.0%	-3.60	36%				
NF262	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	50.0%	-5.00	24%				
NF266	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	50.0%	-0.50	19%				
NF267	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	50.0%	-3.90	13%				
NF268	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	50.0%	-5.00	21%				
NF269	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	50.0%	-7.10	14%				
NF270	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	50.0%	-2.80	6%				
NF328	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	55.6%	-2.80	23%				
NF339	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	55.6%	-3.90	6%				
NF340	g a a g t t c a a a c a c t a g t t	55.6%	-4.70	16%				
NF377	g a a g t t c a a a c a c t c g t t	61.1%	-5.50	16%				
NF378	g a a g t t c a a a c a c t c g t t	61.1%	-5.50	11%				
NF379	g a a g t t c a a a c a c t c g t t	61.1%	-6.30	13%				
NF380	g a a g t t c a a a c a c t c g t t	61.1%	-7.10	9%				
NF382	g a a g t t c a a a c a c t c g t t	61.1%	-8.80	4%				
NF383	g a a g t t c a a a c a c t c g t t	61.1%	-3.80	2%				
NF384	g a a g t t c a a a c a c t c g t t	61.1%	-4.70	11%				

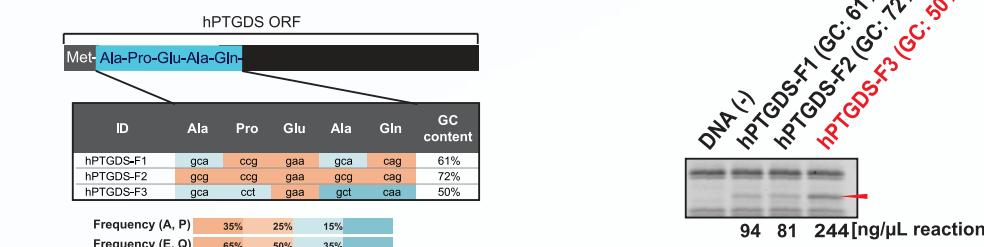
a) ΔG (Minimum Free Energy; MFE) from Shine-Dalgarno sequence to N-terminus of ORF (1-6 amino acids) was calculated on RNAlign Web Server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).

b) Based on the NF340, we generated a constructs with increased AT rich codons one by one.

c) NF003 was used as a positive control of each experiments to calculate relative synthesized protein.

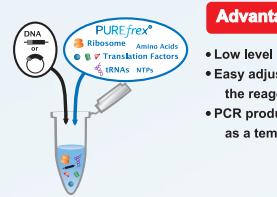
(Synthesized amount from NF003: 600-700 ng/μL reaction)

### 3-2. hPTGDS



### 1. PUREflex®; based on the PURE system technology

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



#### Advantage

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

#### Application

- High throughput preparation of proteins (including Fab, scFv, protein toxin etc.)
- Protein science research
- in vitro display
- Ribosome display
- mRNA display

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

### PUREflex®1.0 • PUREflex®2.0

a regular kit for the synthesis of proteins without disulfide bonds

#### DS supplement

a supplement for the synthesis of proteins containing disulfide bonds

#### DnaK Mix • GroE Mix

a supplement for the synthesis of aggregate-prone proteins

### 2. Experiments

Protein	Reaction Mixture	Template DNA	Incubation





</