

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

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

松本令奈、村上智史、○金森崇 (ジーンフロンティア株式会社)

## <Abstract>

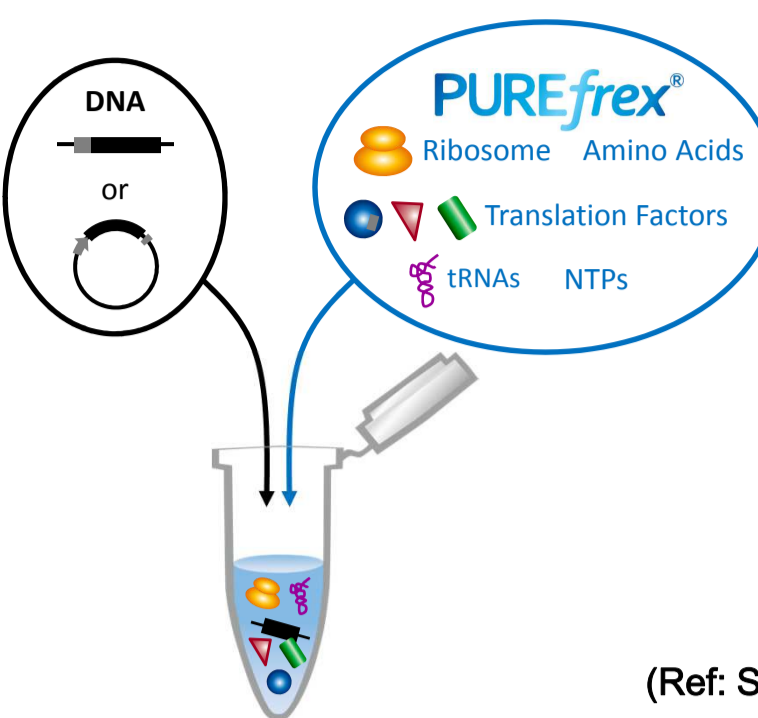
大腸菌で組換えタンパク質を発現させる際に使用するコドンは、同義コドンの中から高使用頻度のコドンを選択することが一般的である。一方、大腸菌ゲノム由来のタンパク質で発現量が多いものは、N末端領域(開始~数アミノ酸の範囲)にATリッチコドンが優先的に使用されているという複数の報告がある<sup>a-c</sup>。しかし、これらの報告は、in vivoのデータを基に行われたものが多く、分解、代謝などの翻訳反応以外の反応が最終的なタンパク質発現量に影響を与えている可能性がある。そこで、本研究では、翻訳以外の反応の影響を排除するため、大腸菌由来の再構成型無細胞タンパク質合成系(PURE system)を使用してN末端領域のコドンが翻訳効率に与える影響を検証した。

はじめに、抗体断片(Fab)の重鎖タンパク質について、開始メチオニンのすぐ下流の2~6アミノ酸のコドンを同義置換した56種の鋳型DNAを作製し、PURE system (PUREfrex 2.0)を用いてタンパク質合成を行った。合成量は、使用した鋳型DNAにより大きく異なり(最大と最小では2桁の差)、鋳型DNAのN末端領域のAT含量に非常に相関していた。また、最大の合成量が得られたATリッチコドンの鋳型DNAから合成した場合に比べて、高使用頻度コドンからなる鋳型DNAから合成した場合には、合成量が20%以下に減少した。さらに、合成量が低いヒトPD-L1などの他のタンパク質についても同様の実験を行った結果、いずれのタンパク質においても、ATリッチコドンを使用した鋳型DNAから合成した場合に、合成量が最大なることを確認した。

これらの結果は、N末端領域のATリッチコドンが翻訳反応自体の効率を増大させることを示唆している。すなわち、無細胞タンパク質合成系においても、大腸菌発現系と同様にN末端領域のコドンをATリッチコドンに置換した鋳型DNAの使用により、合成量が低いタンパク質の合成量の増大が期待できる。

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

## 1. PUREfrex<sup>®</sup>; based on the PURE system technology



### Advantage

- Low level of contamination of proteins (including Fab, scFv, protein toxin etc.)
- 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 etc.)

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

## PUREfrex<sup>®</sup> 1.0 PUREfrex<sup>®</sup> 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

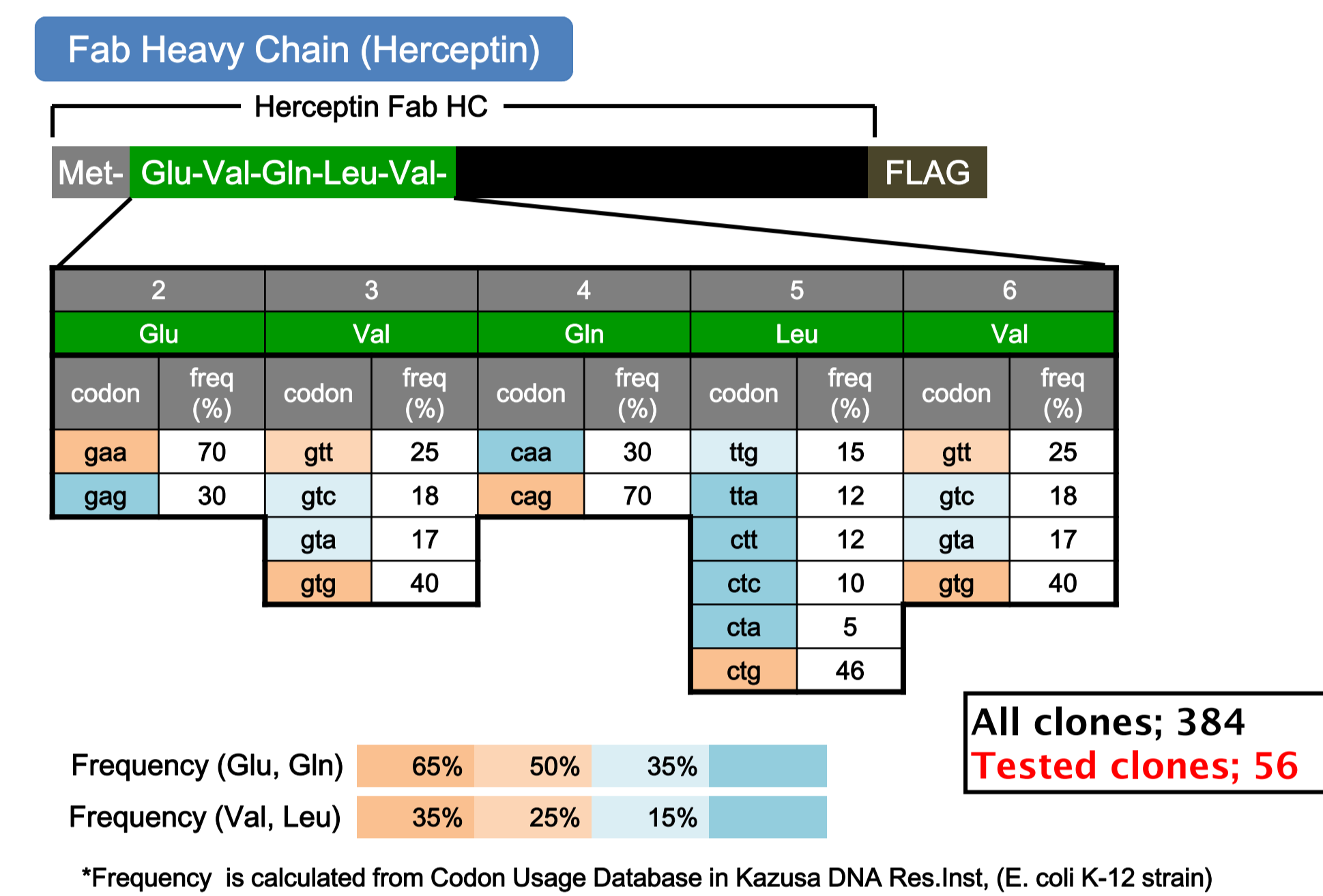
a supplement for the synthesis of aggregate-prone proteins

## 2. Experiments

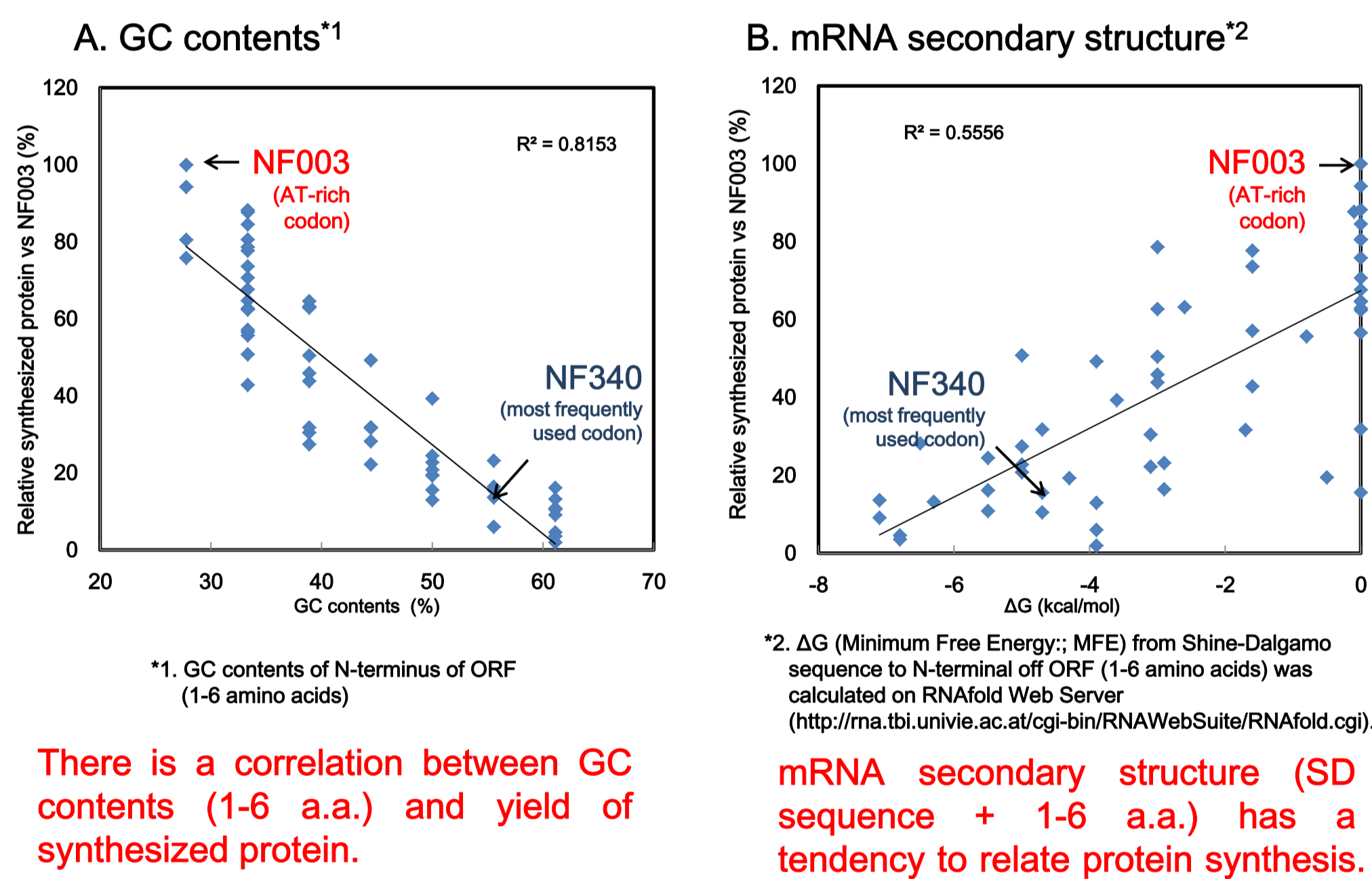
Protein	Reaction mix	Template DNA	Incubation
1. Fab Heavy chain (Herceptin)	PUREfrex <sup>®</sup> 2.0 +DS supplement +DnaK Mix	PCR product	30°C, 4 h
2. PD1 (Programmed Cell Death Protein 1)			
3. PDL1 (Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1)	PUREfrex <sup>®</sup> 2.0 +DS supplement	PCR product	37°C, 4 h
4. GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)			
5. Citrate Synthase (Yeast Cit1p)			
6. PTGDS (Prostaglandin-H2 D-isomerase)	PUREfrex <sup>®</sup> 2.0	PCR product	37°C, 4 h
7. His-tagged- $\alpha$ -Synuclein			

Protein Synthesis  
↓  
SDS-PAGE (0.5 – 1  $\mu$ L of reaction mixture/lane)  
↓  
Gel stain with Oriole (Bio-Rad) or CBB

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

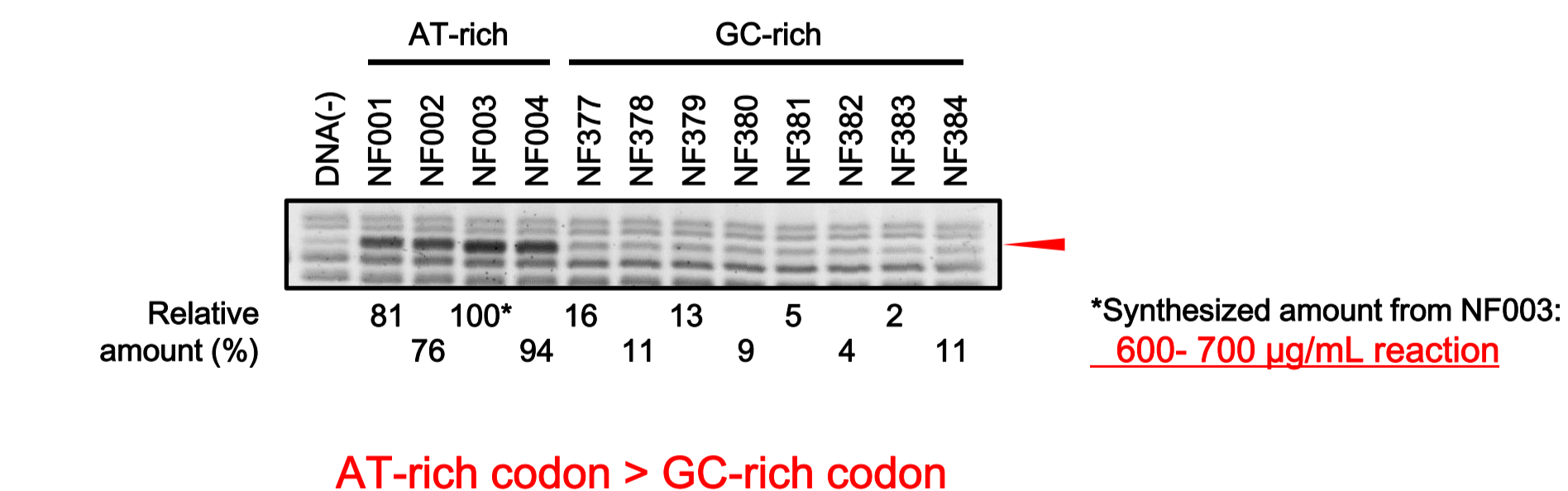


## Relationship between protein synthesis and N-terminal sequence

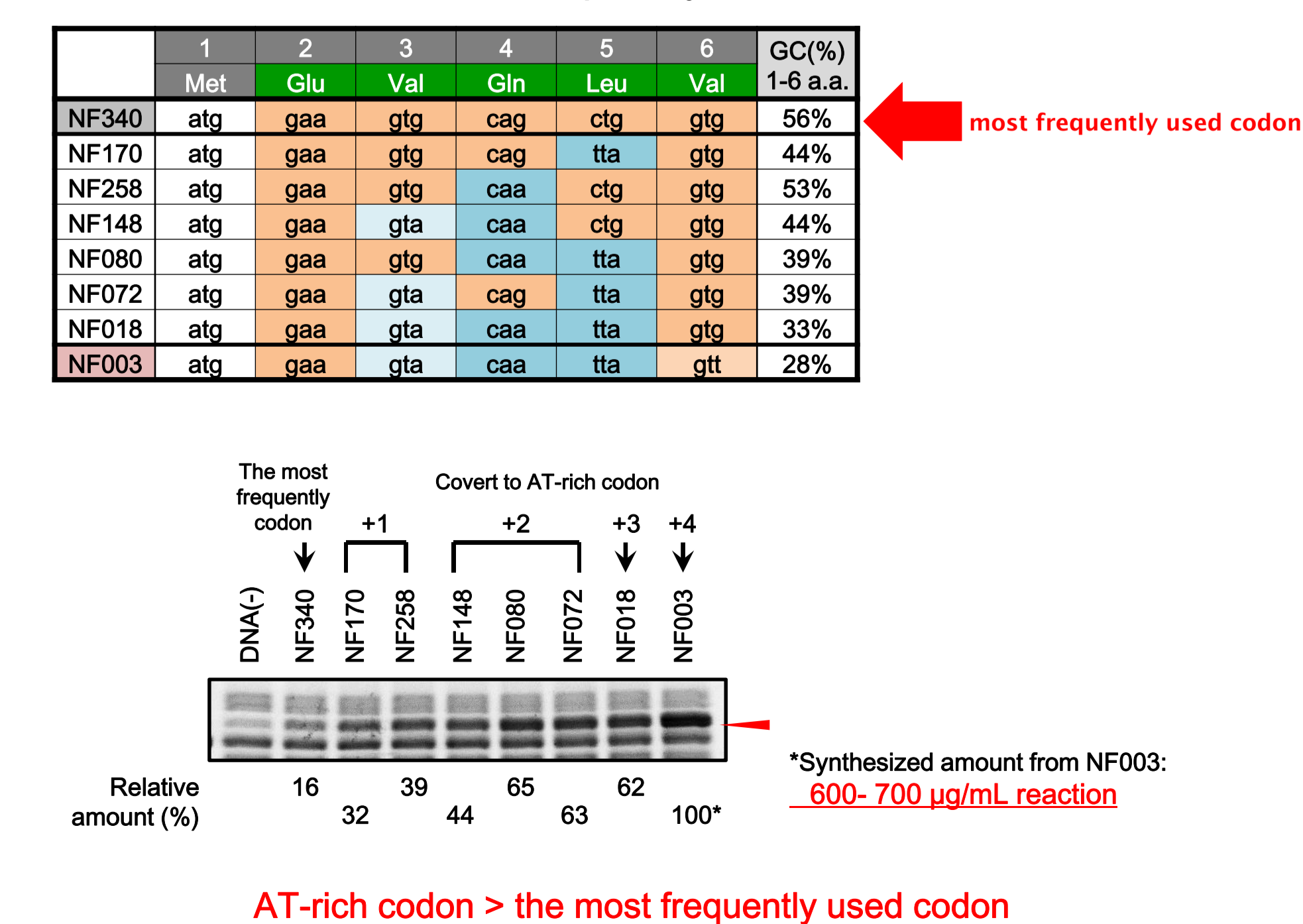


## AT-rich codon vs. GC-rich codon

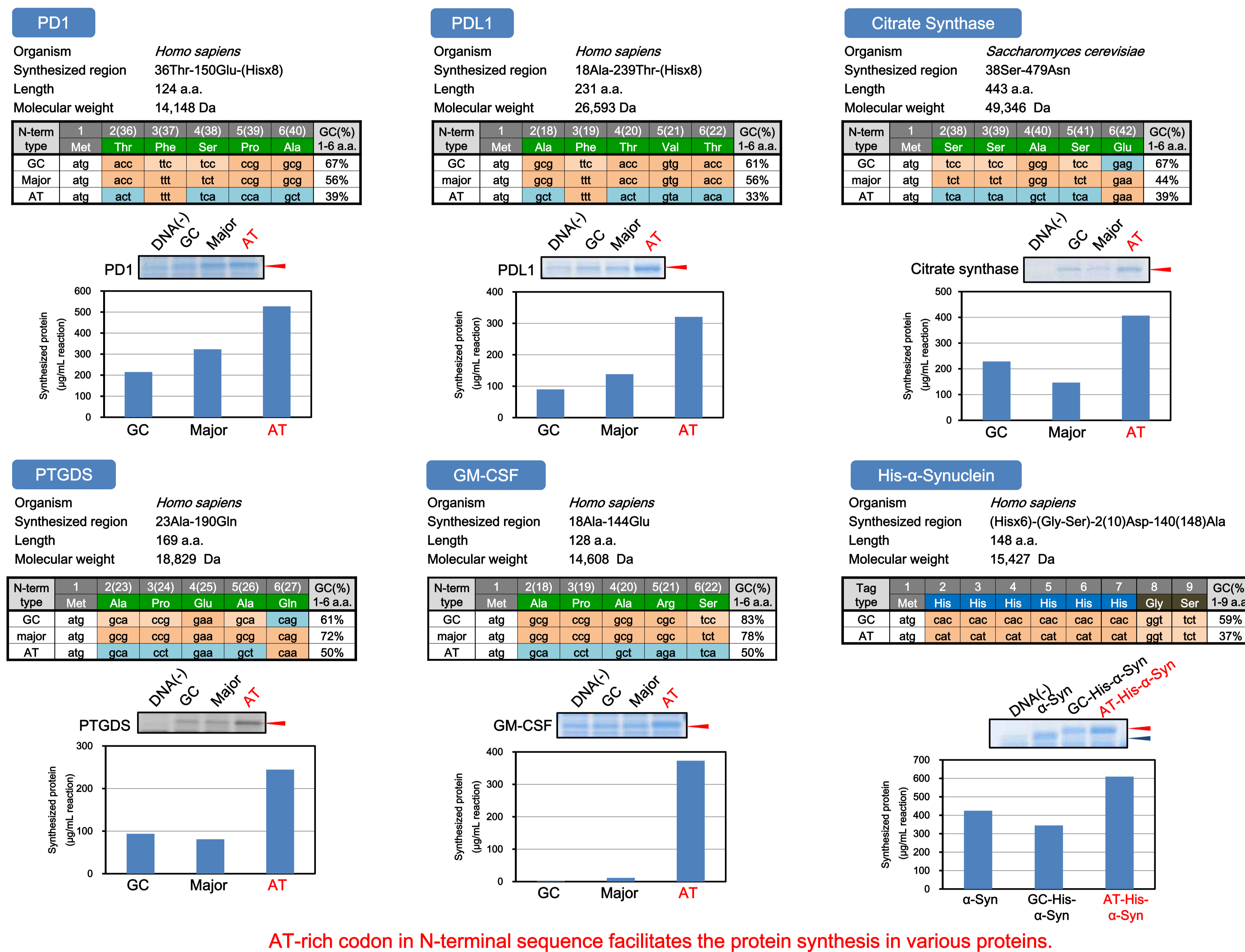
N-term type	1	2	3	4	5	6	GC(%) 1-6 a.a.
NF001	atg	gaa	ggt	caa	tta	ggt	28%
NF002	atg	gaa	ggt	caa	tta	gta	28%
NF003	atg	gaa	gta	caa	tta	ggt	28%
NF004	atg	gaa	gta	caa	tta	gta	28%
NF377	atg	gag	gtc	cag	ctc	gtc	61%
NF378	atg	gag	gtc	cag	ctc	gtg	61%
NF379	atg	gag	gtc	cag	ctg	gtc	61%
NF380	atg	gag	gtc	cag	ctg	gtg	61%
NF381	atg	gag	gtg	cag	ctc	gtc	61%
NF382	atg	gag	gtg	cag	ctc	gtg	61%
NF383	atg	gag	gtg	cag	ctg	gtc	61%
NF384	atg	gag	gtg	cag	ctg	gtg	61%



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

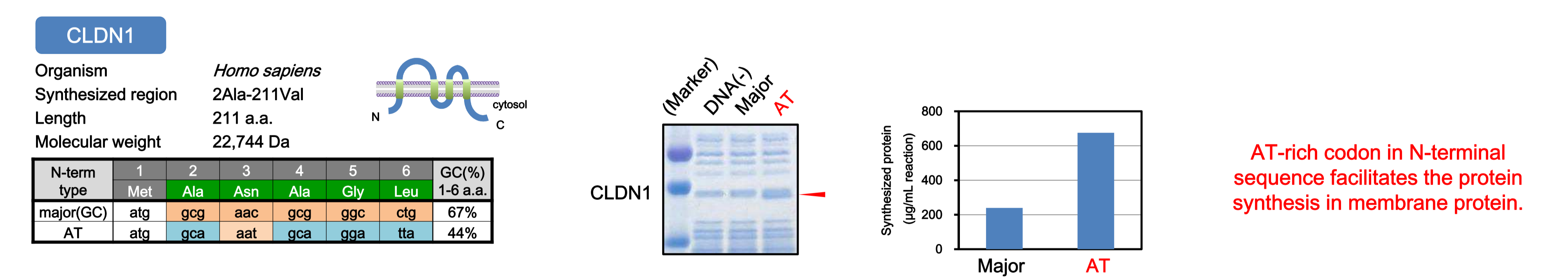


## 4. Result 2: N-terminal codon optimization of various proteins

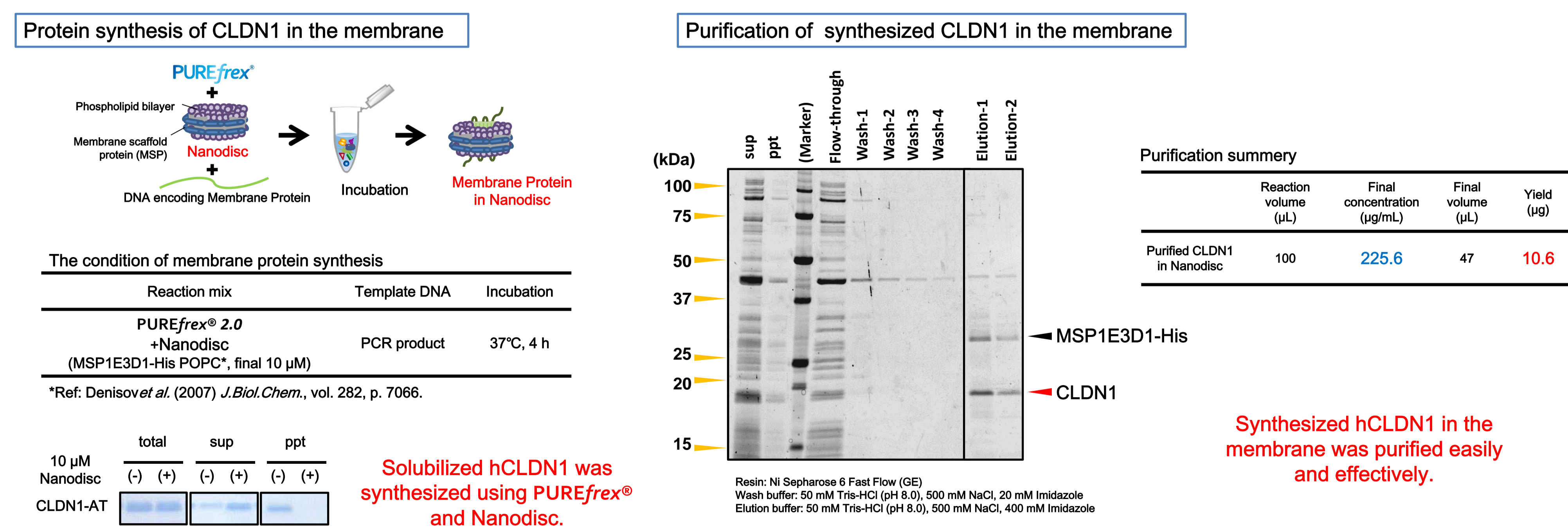


## 5. Result 3: Application to Membrane protein synthesis

### N-terminal codon optimization of membrane protein



### Membrane protein synthesis using PUREfrex<sup>®</sup> and Nanodisc



## 6. Conclusion

- N-terminal codon**
- No correlation between codon usage and protein synthesis efficiency.
  - AT-rich codon facilitated the protein synthesis in various proteins including membrane protein.

We recommend the AT-rich codons in N-terminal sequence for high protein expression level.

### On-going

- Investigation of the reason why AT-rich codon of N-terminus facilitates the protein synthesis.

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