

再構成型無細胞タンパク質合成系 (PURE_{frex}[®]) を用いた 標的タンパク質のN末端ミリスチル化の効率向上

Improving efficiency of N-Terminal myristoylation of target proteins using a reconstituted cell-free protein synthesis system

○松本 令奈¹, 丹羽 達也², 嶋根 康弘³, 久野 香³, 車 愈激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, Kaori Kuno³, Yutetsu Kuruma³, Hideki Taguchi² and Takashi Kanamori¹
(¹GeneFrontier Corp., ²Cell Biology Center, IIR, Tokyo Tech, ³X-star, JAMSTEC)

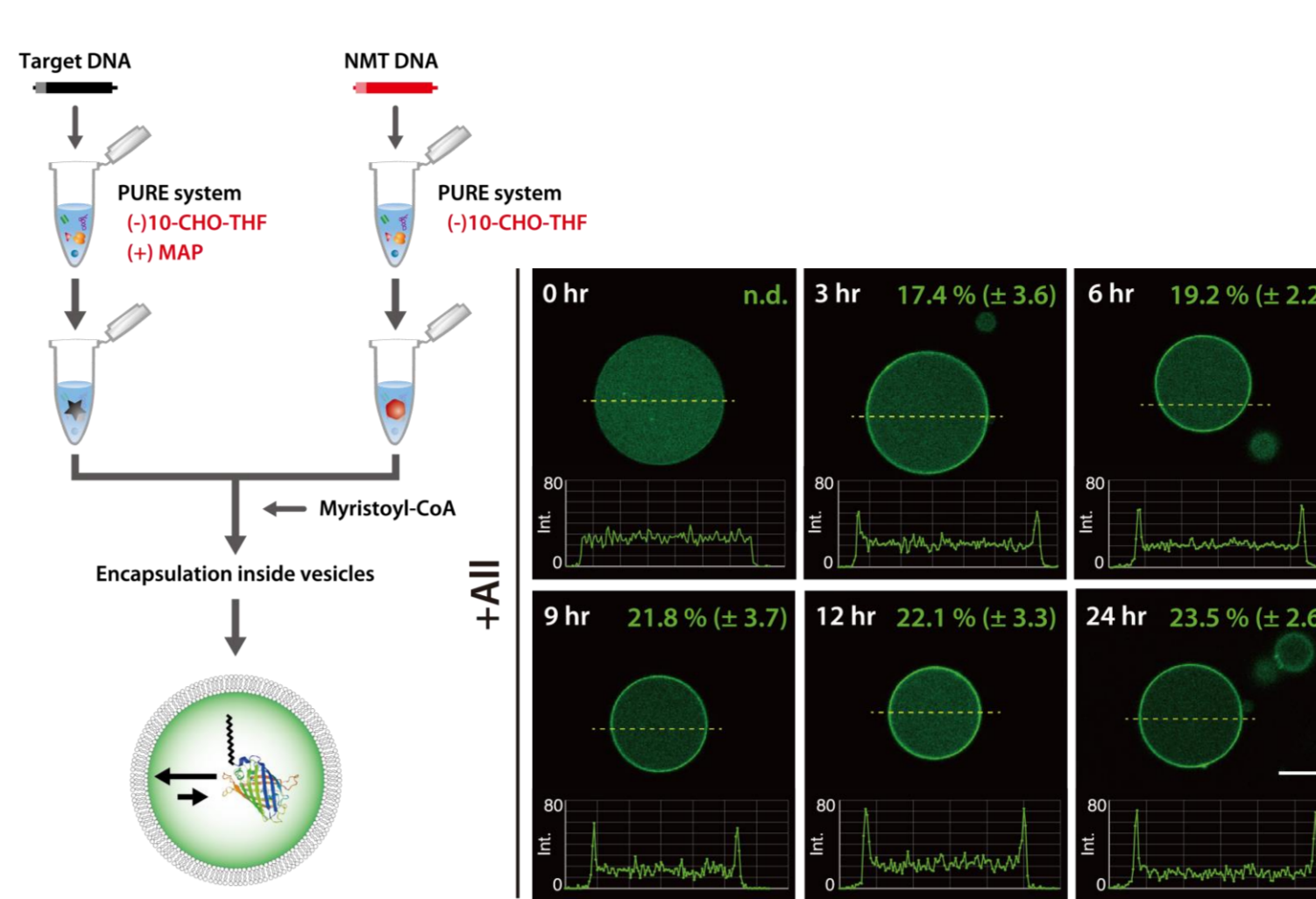
<Abstract>

PURE_{frex}は、PURE systemを基にした、大腸菌でのタンパク質合成に関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。昨年度は、翻訳後修飾されたタンパク質の合成例として、N末端にミリスチル基を付加したタンパク質の合成例を示した。N末端ミリスチル化は開始メチオニン切断によりN末端がグリシンとなることが必須であるが、メチオニンアミノペプチダーゼ (MAP)による開始メチオニン切断効率の低さなどから、合成されたタンパク質のリポソーム(GUV)膜への局在は、2割程度にとどまった。

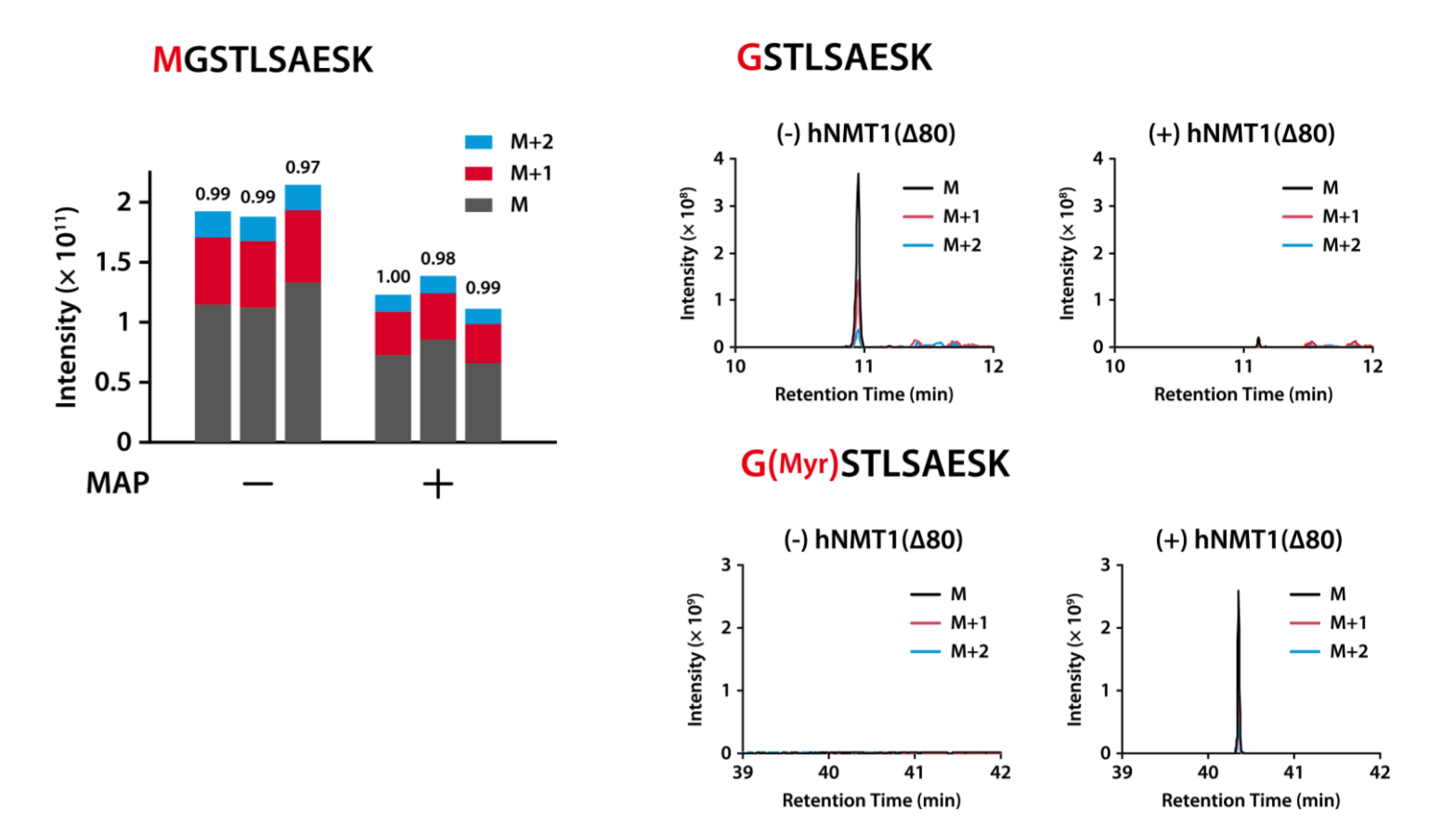
そこで本研究では、PURE_{frex}で合成された標的タンパク質のミリスチル化効率を向上させるため、TEVプロテアーゼを利用してN末端がグリシンとなる標的タンパク質を作製した。標的タンパク質のN末端側にTEVプロテアーゼ切断サイトを付加したコンストラクトを作製し、TEVプロテアーゼを添加した反応液による標的タンパク質の合成および翻訳後ミリスチル化反応を行った。この反応産物のN末端ペプチドについて質量分析を行ったところ、N末端へのミリスチル化修飾が確認された。また、GUV内で翻訳後ミリスチル化反応を行ったところ、GUV膜に局在する標的タンパク質の割合は6割程度にまで向上した。さらに膜局在を向上を図るため、ターゲットタンパク質にプラスチャージ配列を付加したコンストラクトの使用および修飾する脂質についても検討したので紹介する。この結果を基に、現在、PURE_{frex}で合成されたミリスチル化タンパク質をリポソームの外側から膜に局在化させる方法についても検討している。

<Introduction>

Previous Study



Membrane localization of the synthesized proteins was low (approximately 20%).



Why the membrane localization efficiency was low?

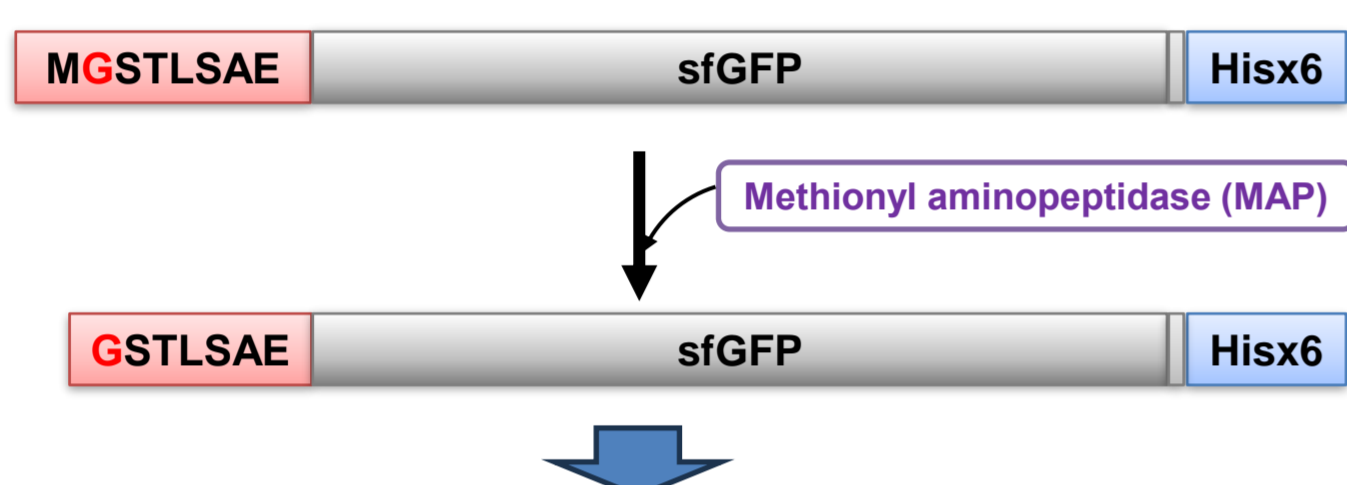
- Low efficiency of N-terminal methionine cleavage by methionine aminopeptidase (MAP).
- Low affinity of myristoyl groups to lipid bilayer.

Matsumoto et al., ACS Synth. Biol. (2023)
DOI: 10.1021/acssynbio.3c00191

1. N-myristoylation of the target protein cleaved by TEV protease

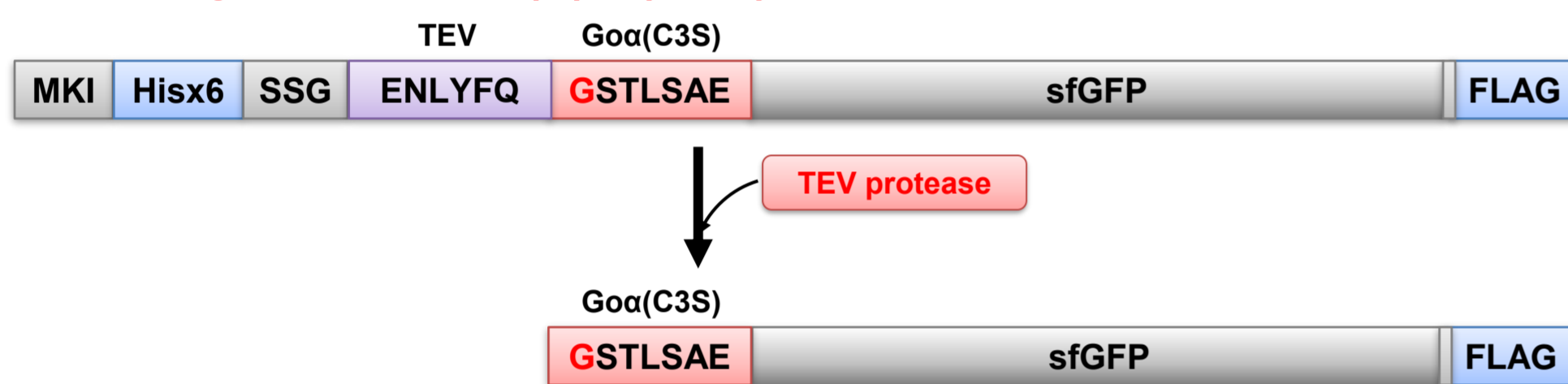
1-1. Cleavage of the synthesized protein using TEV protease

Previous study: G(o)α (C3S)-sfGFP-His

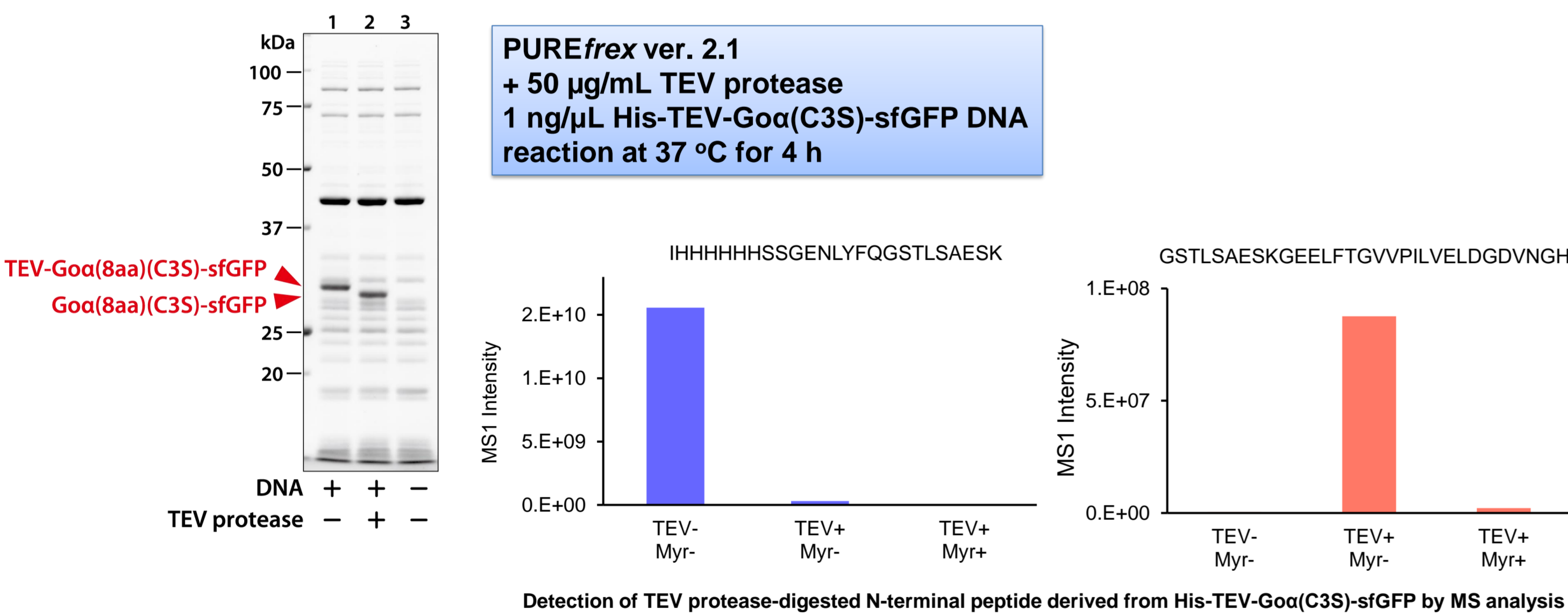


MAP can cleave non-formylated α-amino group of initiator methionine.
→ Protein synthesis reaction should be performed without 10-CHO-THF.

This study: His-TEV-G(o)α (C3S)-sfGFP-FLAG

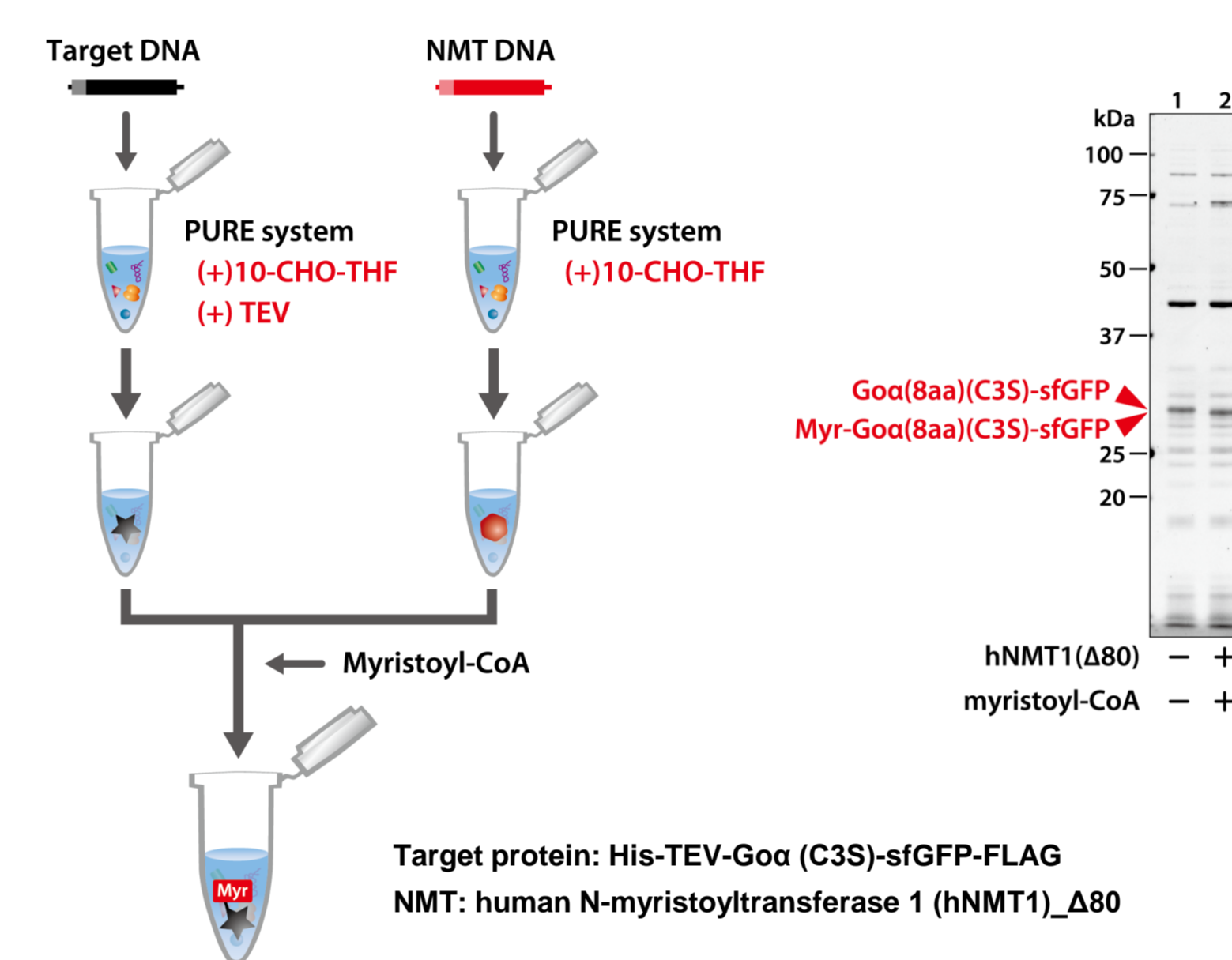


The conventional PURE_{frex} reagent with 10-CHO-THF can be used for synthesizing the target proteins with TEV protease cleavage site.



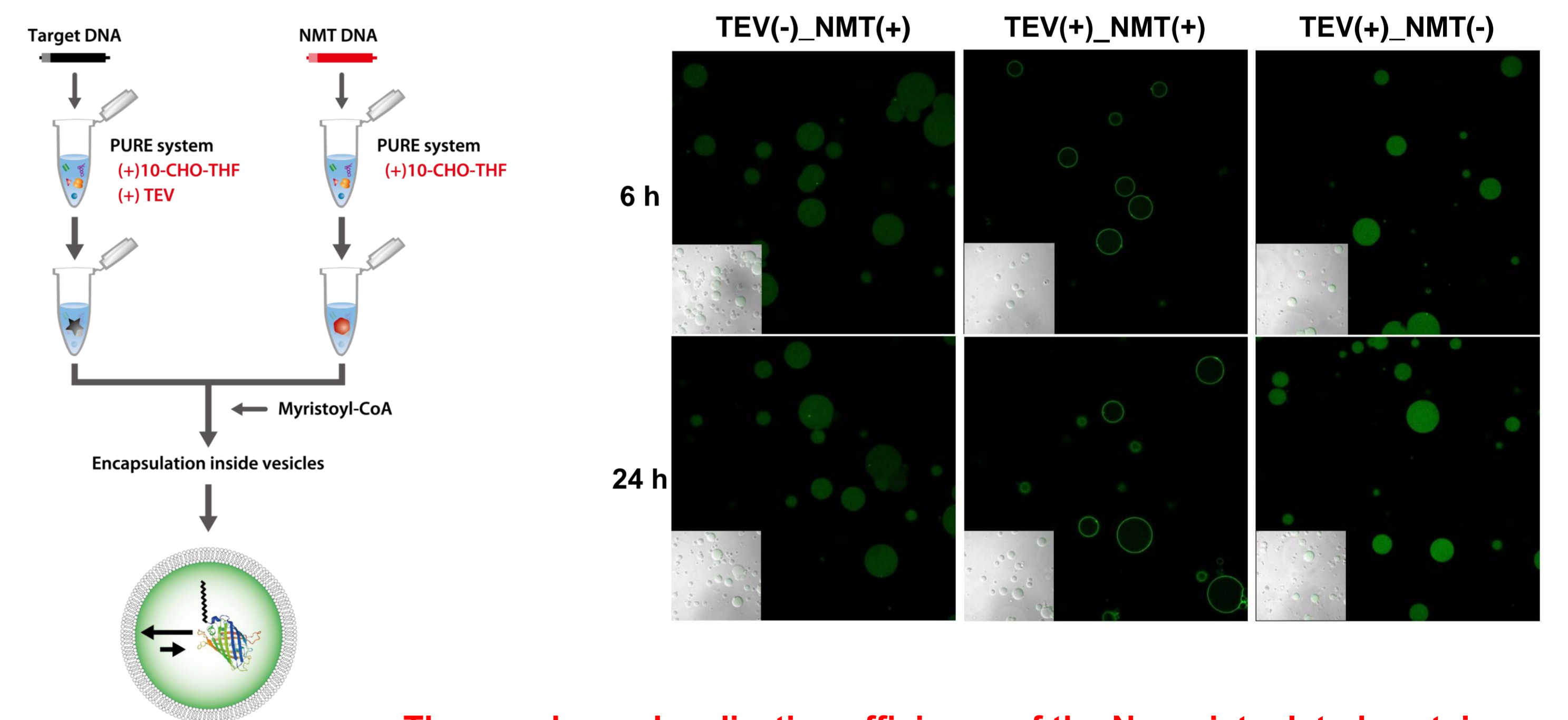
The synthesized protein was efficiently cleaved by TEV protease.

1-2. N-myristoylation of the target protein cleaved by TEV protease



The target protein cleaved by TEV protease was myristoylated.

1-3. Membrane localization of the myristoylated protein after cleavage by TEV protease



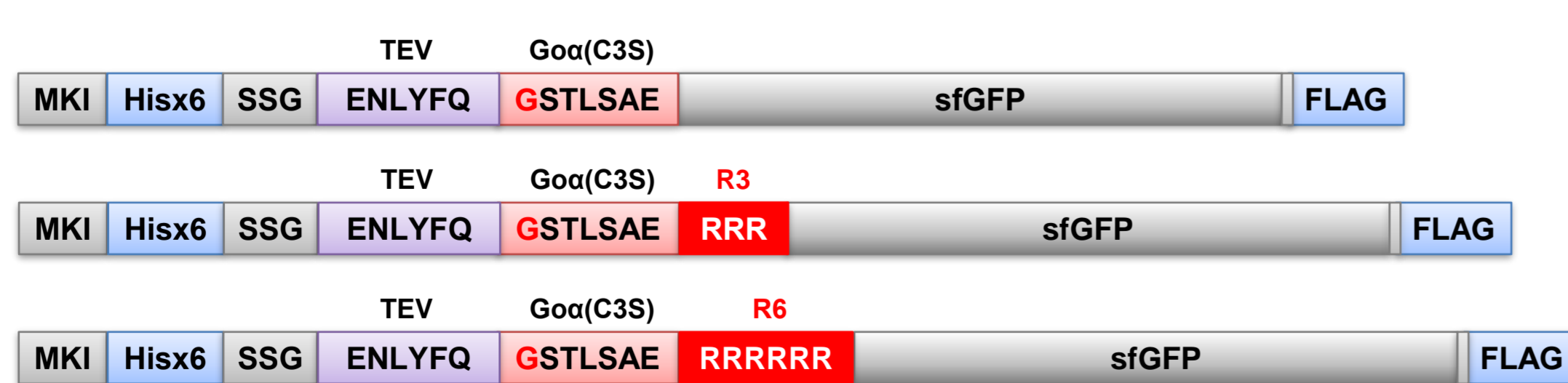
The membrane localization efficiency of the N-myristoylated protein was increased to 60% by using TEV protease.

2. Insertion of N-acylated protein to Nanodisc

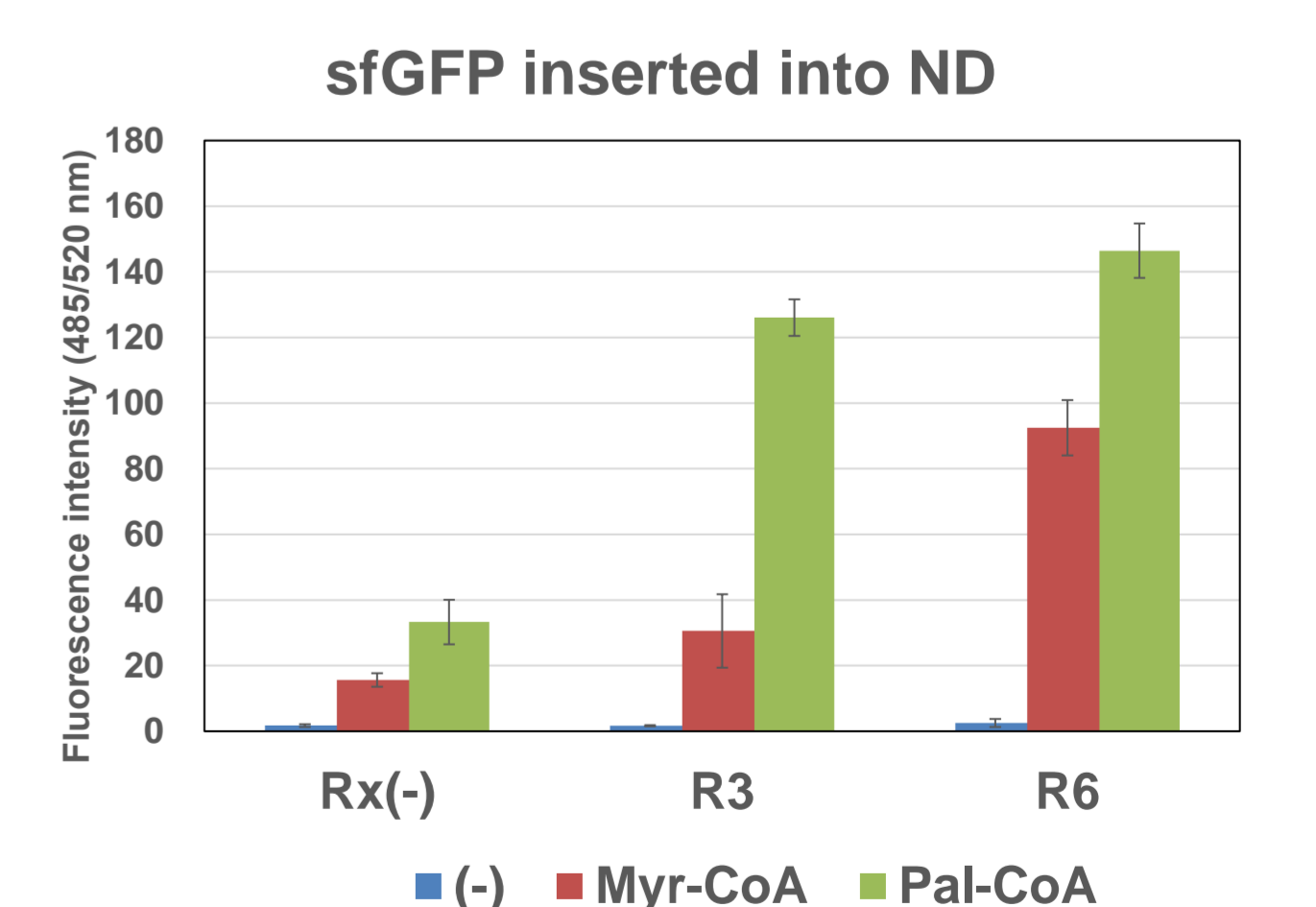
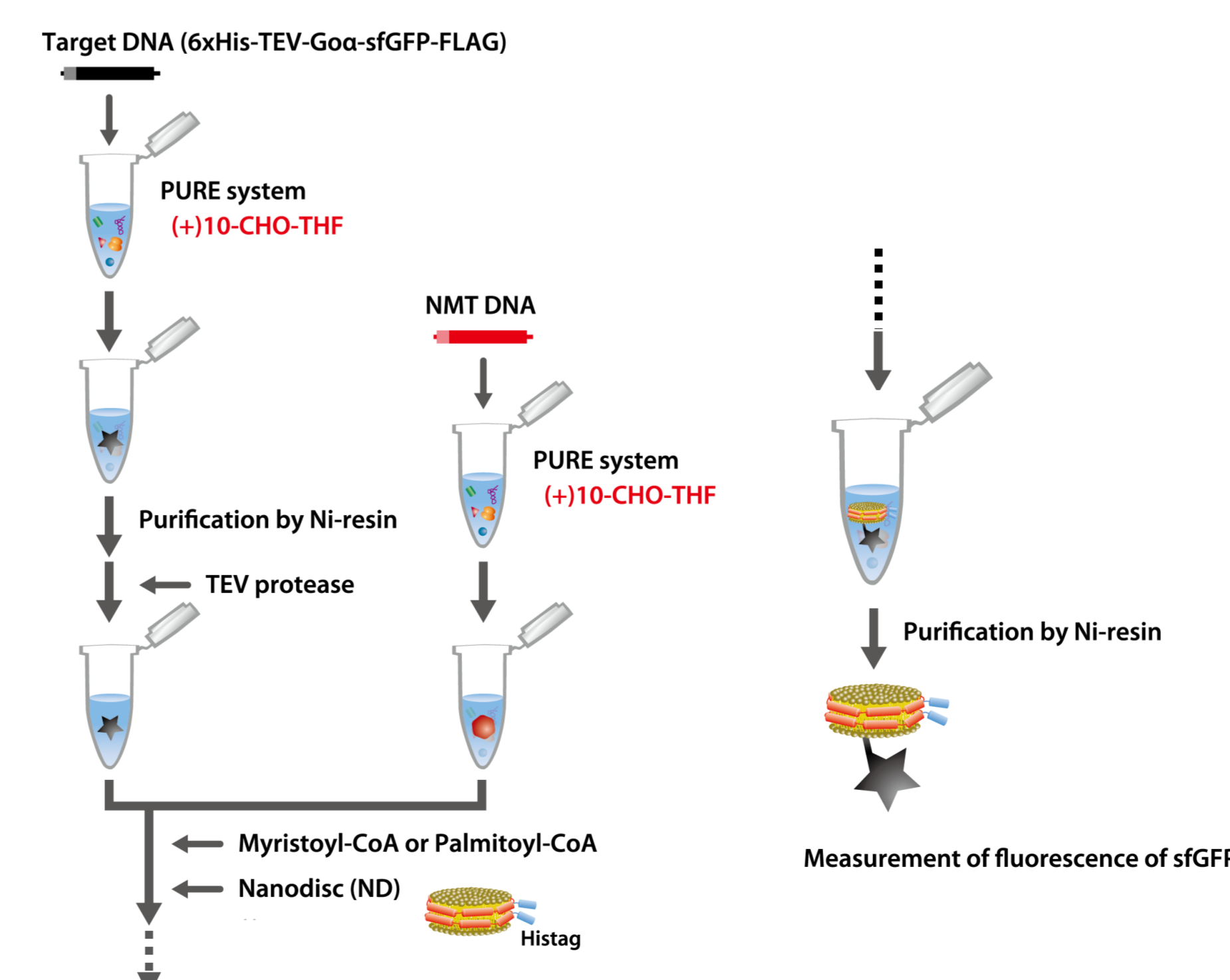
Only N-myristoylation is insufficient for the efficient localization to membrane, and other signal is usually required, such as S-palmitoylation and positive charged amino acids cluster. (Maurer-Stroh et al, Genome Biol. 2004, 5, R21)

- Addition of positive charged amino acids (RRR or RRRRRR) between myristoylation motif (Goα(C3S)) and sfGFP.
- Use of palmitoyl-CoA (16:0) instead of myristoyl-CoA (14:0) as a substrate for NMT

2-1. Construct with positive charged amino acids



2-2. Insertion of N-acylated target proteins to Nanodisc membrane



Both the addition of positive charged amino acids and the use of palmitoyl-CoA increased the insertion of N-acylated protein to ND.

<Conclusion>

- Cleavage by TEV protease instead of MAP increased N-myristoylation and following the membrane localization efficiency to 60%.
- Addition of positive charged amino acids improved the efficiency of insertion of the protein to ND.
- Use of palmitoyl-CoA as a substrate for NMT increased the efficiency of insertion to ND.

<On-going>

- Insertion of N-acylated proteins to the liposome from outside
- Engineering of NMT for palmitoyl-CoA