

## Protein synthesis from low concentration DNA using a reconstituted cell-free protein synthesis system (PURE<sup>flex</sup>®)

○ 金森 崇、布施 (村上) 朋重 (ジーンフロンティア (株))      ○ Takashi Kanamori, Tomoe Fuse-Murakami (GeneFrontier Corp.)

### Abstract

PURE<sup>flex</sup> 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。反応液には T7 RNA polymerase (T7RNAP) が含まれていて、DNA から転写・翻訳反応によりタンパク質が合成される。現在の反応液は、2 nM DNA から合成した時に合成量が最大になるように最適化されていて、合成量は最大で 1 mg/mL 以上に達している。最近では、PURE<sup>flex</sup> は酵素や抗体などタンパク質の高性能化のスクリーニングにも使用されてきているが、このようなスクリーニングでは少量の DNA が含まれる微小空間で転写・翻訳反応を行い、合成されたタンパク質の機能評価を行うこともある。この場合、DNA 濃度は 2 nM よりもかなり低くなっている。そこで、このような低濃度の DNA から転写・翻訳反応を行う場合に適した反応液組成を検討した。

実験では、モデルタンパク質として sfGFP(G4Y) を使い、PCR 産物から合成された sfGFP の蛍光量を比較した。はじめに、市販の反応液を使用して異なる濃度の DNA からタンパク質を合成したところ、2 pM DNA から合成した場合、2 nM DNA からの合成に比べて 100 分の 1 以下の合成量だった。T7RNAP の添加量を増やして合成すると、低濃度 DNA でも合成量が増加し、2 pM DNA から合成した場合は合成量が約 10 倍増加した。マグネシウムや翻訳因子などの T7RNAP 以外の構成因子の組成も検討した結果、さらに 3 倍程度合成量が増加し、2 nM DNA からの合成量の 15% 程度まで合成量が増加した。以上の結果から、低濃度 DNA からの合成でも、PURE<sup>flex</sup> の組成を調整することで、目的タンパク質の機能評価に必要な合成量が得られることが分かった。

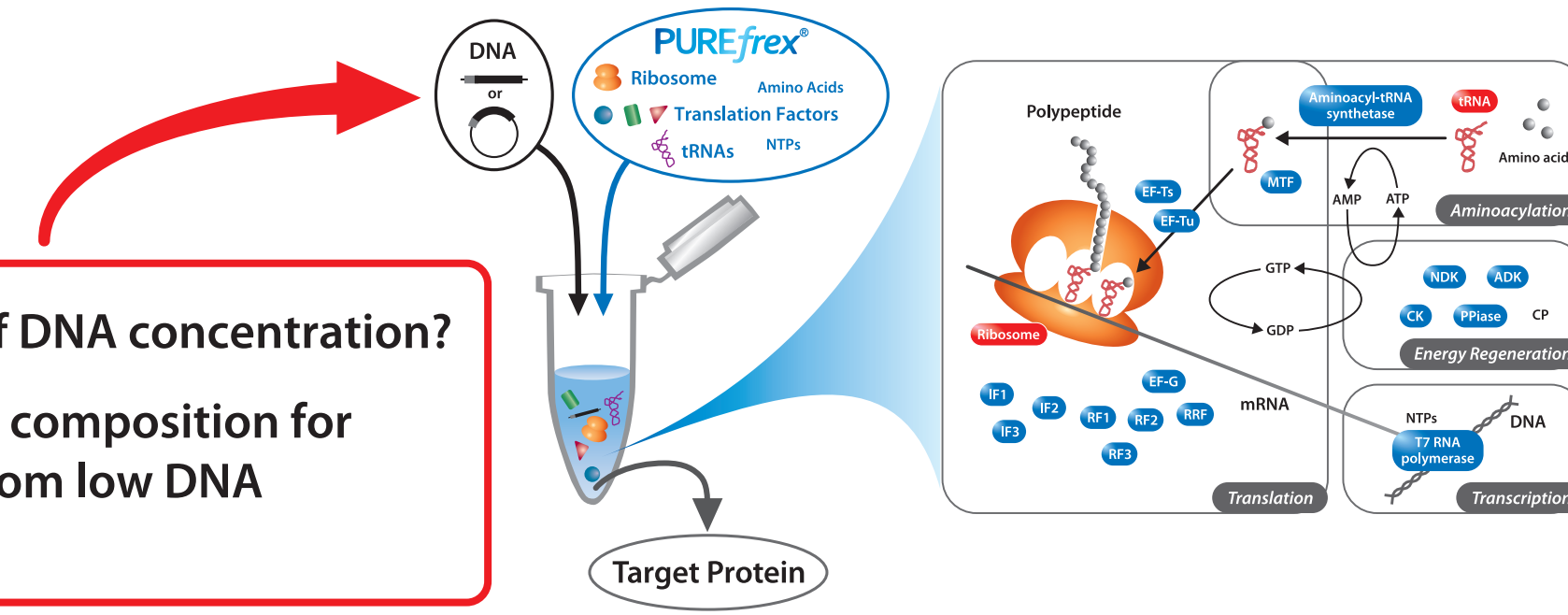
### 1. Introduction

PURE<sup>flex</sup>® 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. 1; Shimizu, Y. et al. (2001) *Nat. Biotechnol.*, 19, 751

- What is the effect of DNA concentration?
- What is the optimal composition for protein synthesis from low DNA concentration?



### 2. Method

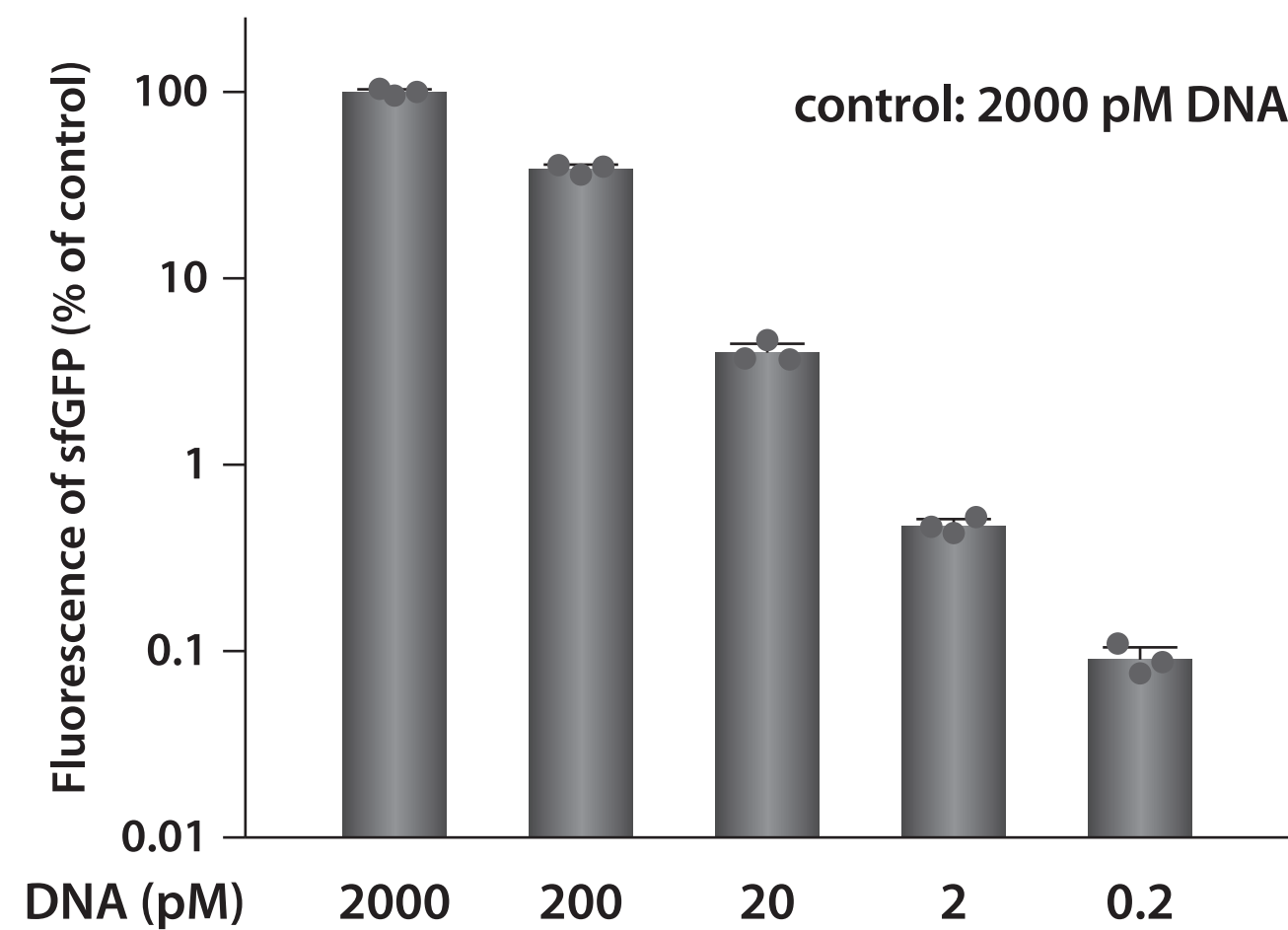
#### PURE<sup>flex</sup> 2.1

with modification (e.g. T7 RNA polymerase)

- ↓ + sfGFP(G4Y) DNA (Ref. 2) (PCR product)
- ↓ Incubation at 37 °C for 6 h
- ↓ Measurement of fluorescence control: 2000 pM DNA v.2 + x1 T7 RNAP

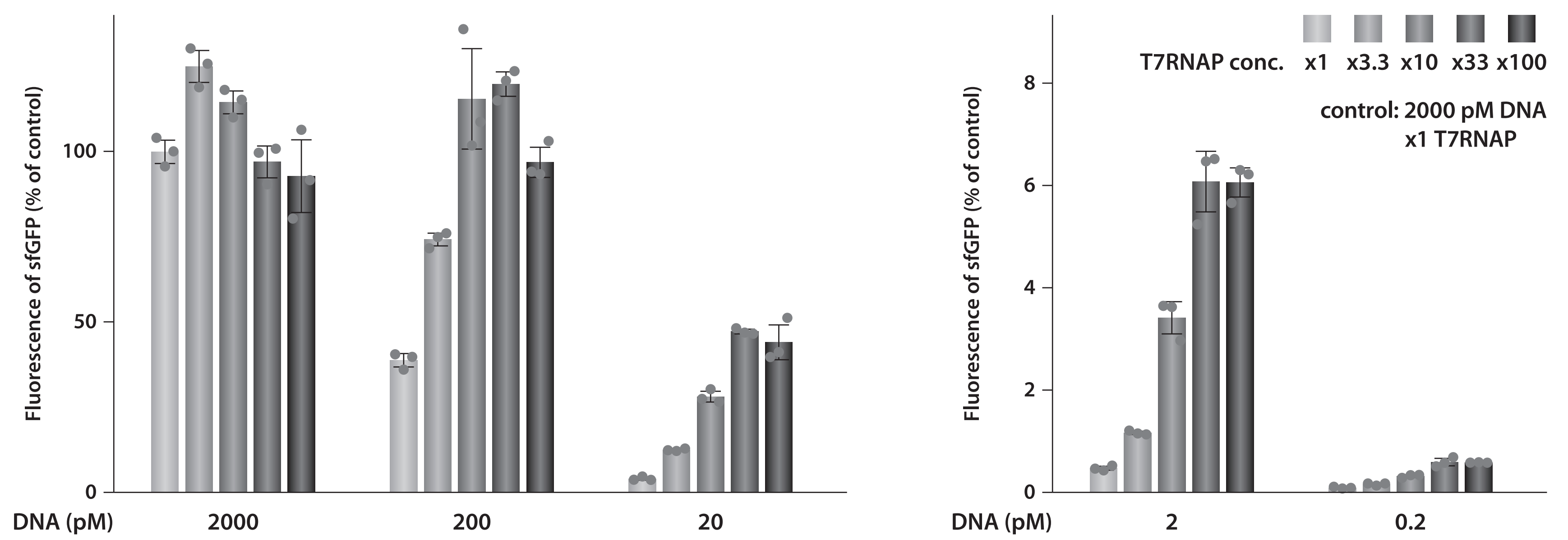
Ref. 2; Fuse-Murakami, T. et al. (2024) *Int. J. Mol. Sci.*, 25, 5264

### 3. Protein synthesis from low concentration DNA



- Protein synthesis decreased with decreasing DNA concentration.
- The synthesis from 2 pM decreased to less than 1% of that from 2 nM DNA.

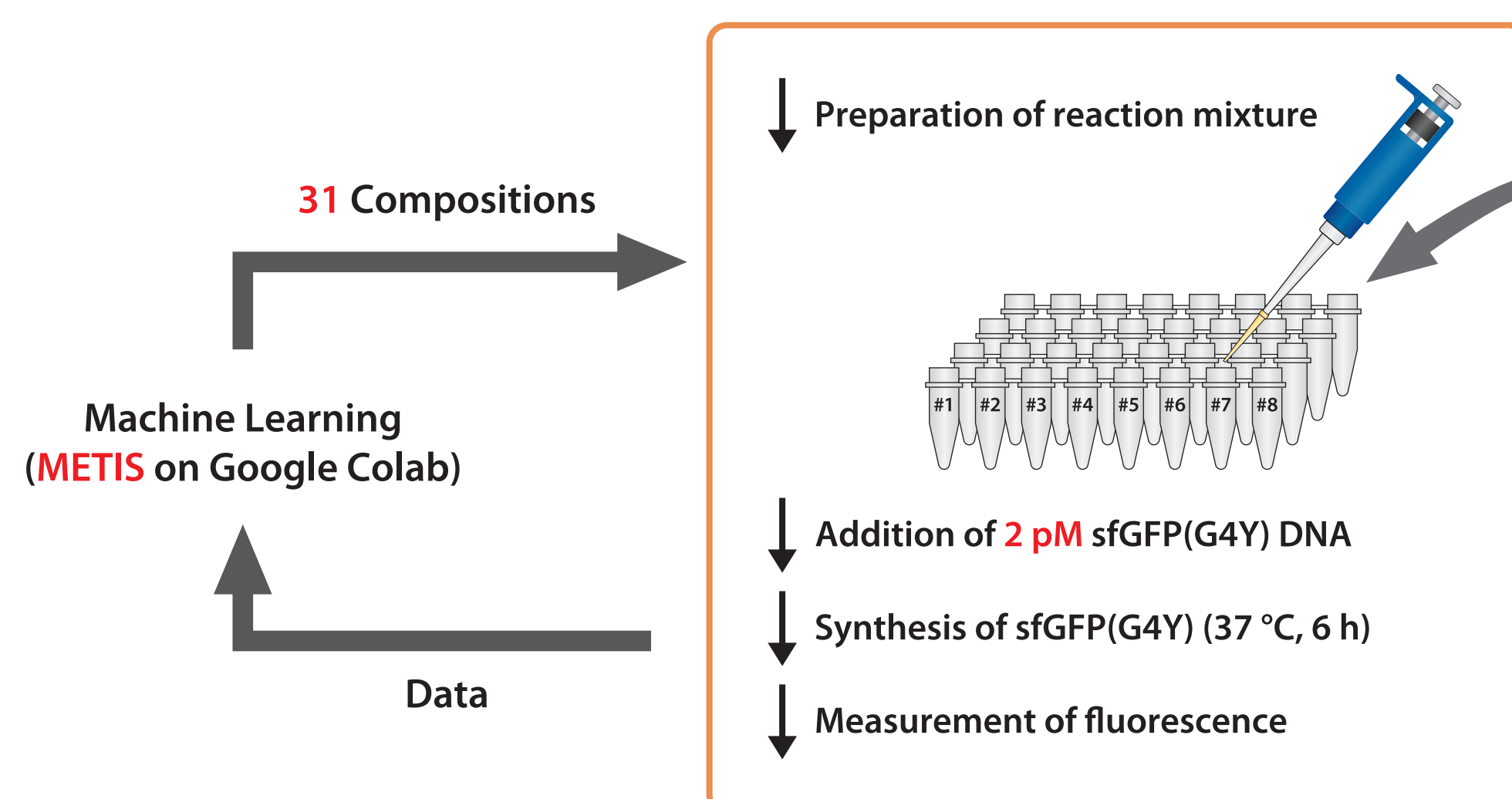
### 4. Protein synthesis with increasing concentration of T7RNAP



- Protein synthesis from low-concentration DNA increased by the addition of T7RNAP.
- The addition of 33-fold T7RNAP increased protein synthesis from 2 pM DNA to over 5% of that from 2 nM DNA.

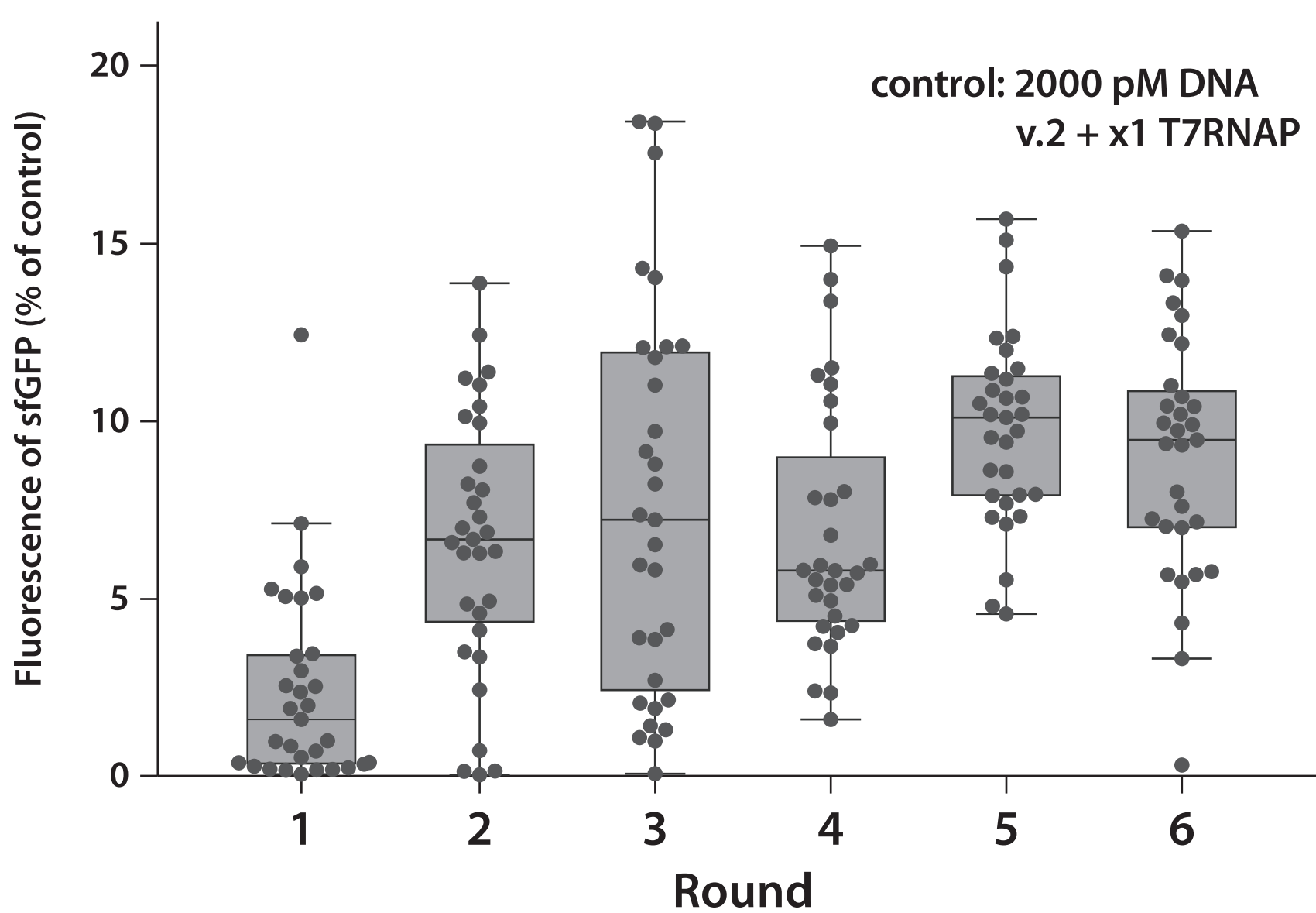
### 5. Exploration of the optimal composition for protein synthesis from low concentration DNA

#### 5-1. Overview of optimization of composition

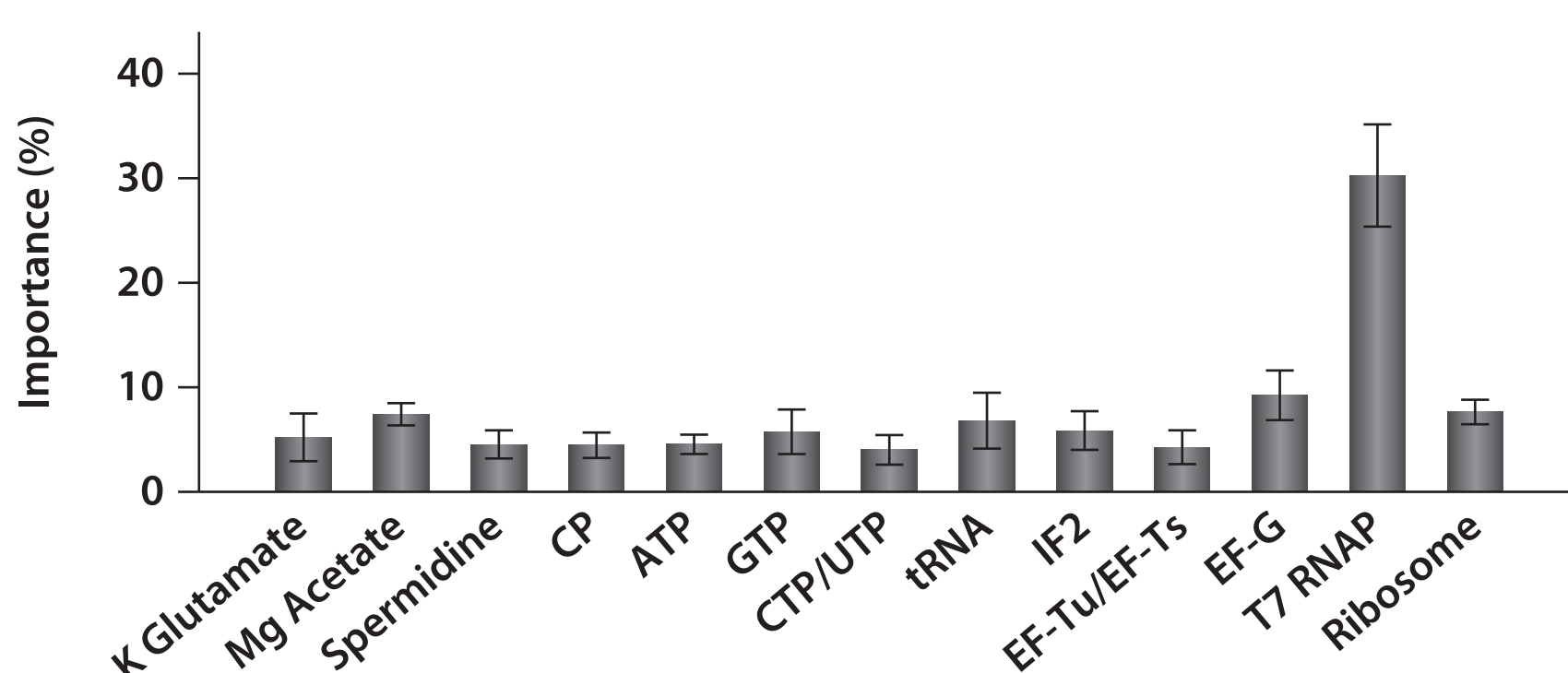


METIS (Machine-learning guided Experimental Trials for Improvement of Systems)  
Ref. 3; Pandi, A. et al. (2022). A versatile active learning workflow for optimization of genetic and metabolic networks. *Nat. Commun.* 13, 3876.

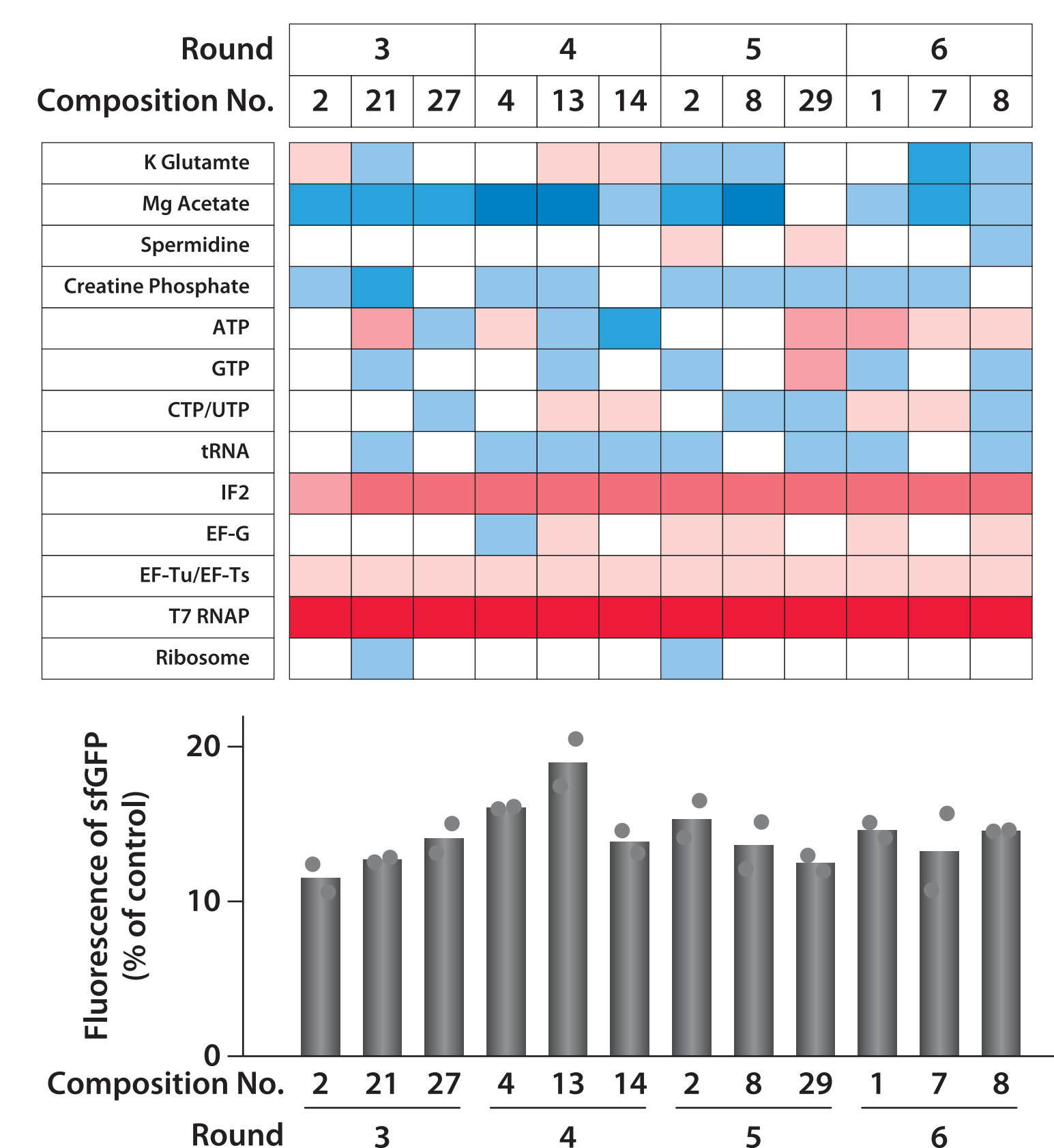
#### 5-2. Plot of yield in 6 rounds



#### 5-3. Effect of each factor on the model's decision

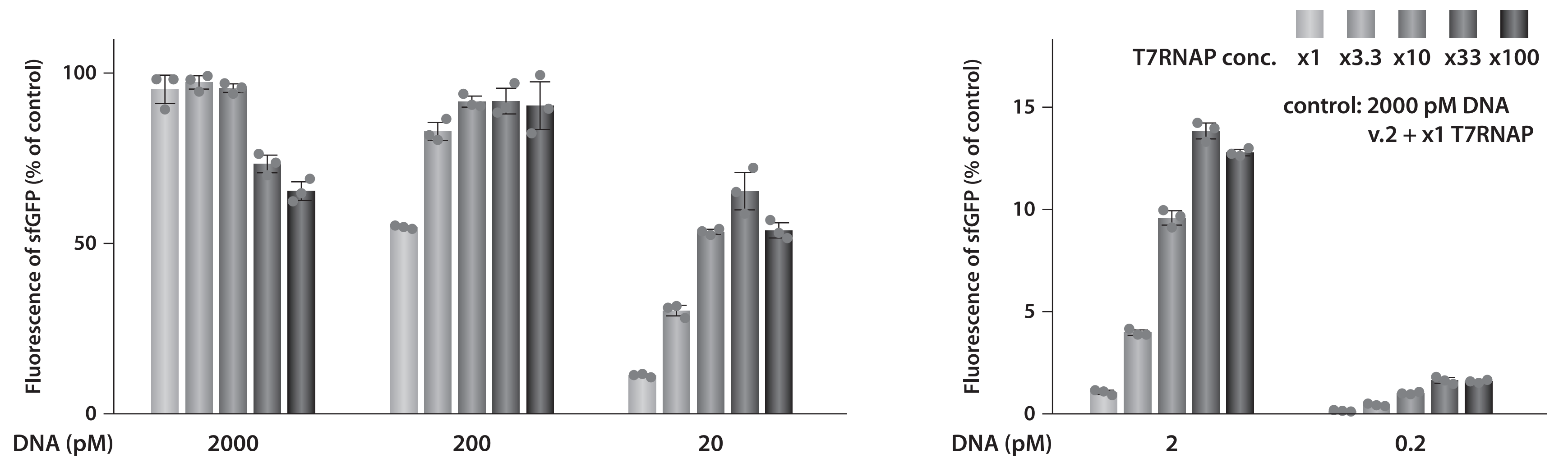


#### 5-4. Comparison of compositions showing high synthesis activity



- Using METIS, we identified compositions that increased the synthesis from 2 pM DNA to more than 10% of that from 2 nM DNA.
- T7RNAP was identified as the key factor contributing for the high synthesis efficiency from 2 pM DNA.

### 6. Protein synthesis using new composition (R4\_#13)



- The composition identified by METIS was optimal for protein synthesis from low concentrations of DNA.

### Conclusion

- Protein synthesis decreased as the concentration of DNA decreased.
- The addition of T7RNAP significantly increased protein synthesis from low-concentration DNA.
- Optimizing the composition of the reaction mixture led to a more than 30-fold increase in the synthesis from 2 pM DNA.



- Detailed analysis of the compositions found in this study
- Search for new compositions with higher synthesis efficiency under different search conditions