

原核生物类泛素蛋白 Pup-蛋白酶体系统的研究进展*

汪春军¹⁾ 林进²⁾ 张俊杰^{2)**}

(¹⁾ 北京林业大学理学院, 北京 100083; (²⁾ 北京师范大学生命科学学院, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875)

摘要 真核泛素-蛋白酶体系统是细胞内蛋白质降解的重要机制, 参与细胞生理功能调控, 因此泛素-蛋白酶体通路的机制和功能研究备受关注。20 世纪 80 年代, 人们就发现放线菌中存在原核蛋白酶体, 但是对于原核蛋白酶体的功能和作用机理长期以来了解甚少。2008 年, Pearce 等在结核分枝杆菌中发现了原核类泛素蛋白(prokaryotic ubiquitin-like protein, Pup)。在 Dop、PafA、Mpa 等辅助因子的作用下, Pup 可以共价标记多种功能蛋白, 并介导被标记蛋白质通过蛋白酶体降解, Pup-蛋白酶体系统的发现揭示了原核生物中一个崭新的蛋白质降解机制。Pup-蛋白酶体系统的靶蛋白涉及物质中间代谢、信号通路、毒性和抗毒性因子、细胞壁和细胞膜组分等多个方面, 并且与结核分枝杆菌的致病性相关, 被认为是新的结核病治疗药物靶点。本文就原核 Pup-蛋白酶体系统的作用机理及其功能的研究进展作一综述。

关键词 原核类泛素蛋白(Pup), 蛋白酶体, 蛋白质降解, 结核分枝杆菌

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00110

蛋白酶体(proteasome)在真核细胞中普遍存在, 被蛋白酶体降解的蛋白质绝大部分要经过泛素标记, 泛素-蛋白酶体通路是调控细胞内蛋白质水平和消除错误折叠蛋白的重要机制, 参与细胞多种生理功能调控, 因此真核泛素-蛋白酶体通路的机制和功能研究备受关注。20 世纪 80 年代, 人们就在放线菌属中发现原核生物中也存在蛋白酶体, 但是长期以来对于原核蛋白酶体的功能和作用机理了解甚少。2008 年, Pearce 等在结核分枝杆菌中发现了与泛素功能相似的蛋白质, 命名为原核类泛素蛋白(prokaryotic ubiquitin-like protein, Pup)。Pup 可以在辅助因子的作用下标记多种功能蛋白, 并介导被标记蛋白质通过蛋白酶体降解。Pup-蛋白酶体通路的发现揭示了原核生物中一个崭新的蛋白质降解机制, 对 Pup-蛋白酶体降解途径的作用机理和生理功能的研究已成为当前病原放线菌研究的热点之一。

1 原核蛋白酶体的研究

真核细胞中最普遍的是 26 S 蛋白酶体, 包含

一个 20 S 核心颗粒和两个 19 S 调节颗粒。目前已发现的原核生物蛋白酶体存在于放线菌中, 对原核蛋白酶体的研究主要是在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*)和耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, *Msm*)中进行的^[1]。

Mtb 是一种已知存在蛋白酶体的少数细菌之一, 对 *Mtb* 蛋白酶体的研究相对比较深入。*Mtb* 蛋白酶体的核心颗粒在结构上与真核生物的蛋白酶体“20 S”核心颗粒相似, 都是由 28 个亚基($\alpha_7\beta_7\beta'\alpha_7$)构成的桶状结构, 两个外部环状结构分别由 7 个 α 亚基构成, 两个内部环状结构分别由 7 个 β 亚基构成^[2-3]。真核蛋白酶体中有 7 种不同 α 亚基和 7 种不同 β 亚基, 但仅有 β_1 、 β_2 、 β_5 三种亚基发挥

* 国家自然科学基金资助项目(30770030, 31070714)和北京市科技新星计划资助项目(2005B47)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-58802137, E-mail: jjzhang@bnu.edu.cn

收稿日期: 2011-03-07, 接受日期: 2011-04-01

蛋白质降解作用, 这些亚基分别具有半胱天冬蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性. *Mtb* 蛋白酶体核心颗粒中只含有一种 α 亚基和一种 β 亚基, 它们分别由 *prcA*(Rv2109c)和 *prcB*(Rv2110c)基因编码(图 1). 原核蛋白酶体中外部两个环状结构分别由 7 个相同的 α 亚基构成, 这两个外环具有类似“门”的作用, α 亚基 N 端 8 个氨基酸的缺失可以削弱“门”的阻碍作用, 提高了降解底物的活性^[4]. 原核蛋白酶体内部两个环状结构分别由 7 个相同的 β 亚基构成, β 亚基的 N 端有胰凝乳蛋白酶活性, 其 N 端苏氨酸的—OH 为蛋白酶体的活性部位, 因此 β 亚基组成的两个内环具有蛋白质降解作用^[3-5]. Lin 等^[6]以合成的多肽为底物, 发现

Mtb 和真核生物蛋白酶体对底物的降解具有序列特异性上的差异.

1998 年, Wolf 等^[7]发现, 放线菌蛋白酶体基因的上游基因 *Rv2115c* 可编码具有 ATP 水解功能的蛋白质, Darwin 等^[8]正式将其命名为 Mpa (mycobacterial proteasome ATPase). Mpa 属于 AAA (ATPase associated with various activities)家族, 与真核生物蛋白酶体 19 S 调节颗粒中的 ATP 酶具有同源性, 而且两者具有相似的功能, 即参与调节蛋白酶体 α 亚基“门”的开关, 同时, Mpa 自身是原核蛋白酶体的底物^[9-12], 表明原核蛋白酶体可以通过对 Mpa 的降解进行自我功能的反馈调节.

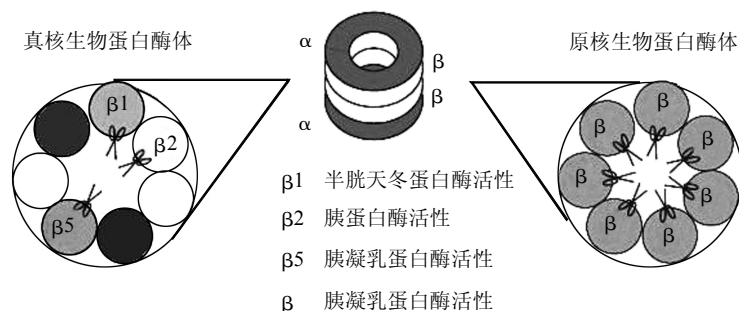


Fig. 1 Comparison of eukaryotic and prokaryotic proteasome β subunits^[6]

图 1 真核和原核生物蛋白酶体 β 亚基的比较^[6]

2 原核类泛素蛋白 Pup 的发现

泛素(ubiquitin)是真核细胞中一种 76 个氨基酸的小分子蛋白质. 真核细胞中被蛋白酶体降解的蛋白质绝大多数都要先被泛素共价标记, 即蛋白质上的一个赖氨酸 ϵ 氨基与泛素羧基之间形成共价连接, 进一步通过泛素间的共价连接将底物蛋白多泛素化, 泛素化的蛋白质可以被 19 S 调节颗粒识别, 将其导入蛋白酶体降解.

结核分枝杆菌中的 Mpa 与真核生物蛋白酶体 19 S 调节颗粒中的 ATP 酶具有同源性. 2008 年, Pearce 等^[13]利用细菌双杂交系统(bacterial two-hybrid, BTH)筛选 Mpa 结合蛋白时, 发现 *Rv2111c* 通过其 C 端的 26 个氨基酸与 Mpa 相互作用. *Rv2111c* 基

因位于蛋白酶体基因上游, 与编码蛋白酶体核心颗粒(α 、 β 亚基)的 *prcA* 和 *prcB* 基因共同组成一个操纵子^[13]. *Rv2111c* 基因编码一个 64 个氨基酸的蛋白质, 该蛋白质在放线菌中普遍存在. *Rv2111c* 同源蛋白与真核泛素进行蛋白质序列比较发现, 尽管它们与泛素同源性低, 但在其 C 端的保守序列 K/RGGQ 中含有泛素中保守的 Gly-Gly 序列(图 2). 泛素中的 Gly-Gly 有利于泛素 C 端与底物的 Lys 形成 Gly-Gly~Lys 异肽键^[14]. 进一步研究表明, 一些已知被蛋白酶体降解的蛋白质如 FabD(malonyl Co-A acyl carrier protein transacylase) 和 PanB(ketopantoate hydroxymethyl transferase) 等可以被 *Rv2111c* 在 Lys 位点共价标记, 因此将 *Rv2111c* 命名为原核类泛素蛋白(prokaryotic ubiquitin-like protein, Pup).

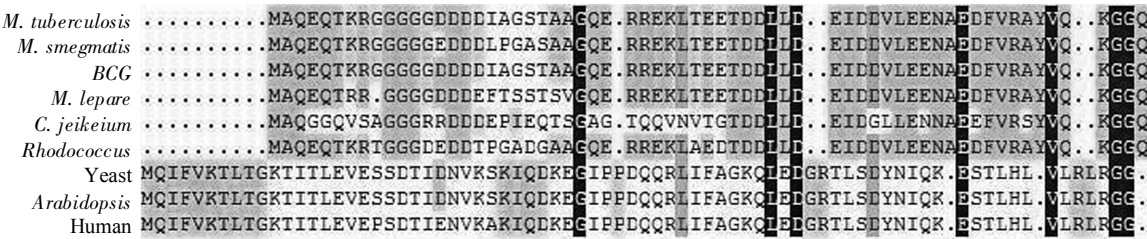


Fig. 2 Alignment of Pup or ubiquitin from some of actinomycetes and eukaryotes

图 2 已知的放线菌 Pup 和真核生物泛素的氨基酸序列对比

结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*) GI: 15609248, 耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*) GI: 259546730, 卡介苗菌(*BCG*) GI: 284022050, 麻风分枝杆菌(*M. leprae*) GI: 4200273, 棒状杆菌(*C. jeikeium*) GI: 123651079, 红球菌(*Rhodococcus*) GI: 123341023, 酵母菌(*Yeast*) GI: 48429170, 拟南芥(*Arabidopsis*) GI: 28202244, 人类(*Human*) GI: 51703339. 数据来自 NCBI.

Pup 蛋白 C 端为 Gly-Gly-Gln 序列, 通过串联亲和层析(tandem affinity purification, TAP)和质谱分析(mass spectrometry, MS), 人们发现, 在连接底物的过程中 Gln 变为 Glu, 然后与底物的 Lys 连接, 形成 Gly-Gly-Glu~Lys^[13]. 绝大多数靶蛋白中只有一个 Lys 与 Pup 共价连接, 与 Pup 连接的 Lys 位点附近在一级和二级结构上均没有同源性, 而且未发现多聚 Pup 化的现象. 对于 Pup 结构研究发现, Pup 是一种无序蛋白(intrinsically disordered protein, IDP), 有不稳定的二级结构^[15], Pup 标记蛋白质后其 N 端仍保持无序状态, C 端 S21-K61 形成螺旋结构, 能与 Mpa 的 N 端螺旋结构域非共价作用, 被 Mpa 传递入蛋白酶体进行降解^[16-17], 因此 Pup 可能具有两种功能, 它不仅是让底物成为蛋白酶体识别的标记物, 而且使靶蛋白带上无序标签, 有利于靶蛋白的降解^[18].

3 Pup-蛋白酶体系所需的辅助因子

在真核生物中, 泛素介导的蛋白质降解需要一系列辅助因子(如 E1、E2、E3, DUBs 等)来发挥作用, 这些辅助因子分别参与靶蛋白的泛素化和去泛素化过程, 来调控细胞内蛋白质的降解. 原核生物 Pup-蛋白酶体系途径介导的蛋白质降解也需要辅助因子, 目前已知的辅助因子除了上文提到的 Mpa, 还有 Dop (deamidase of Pup) 和 PafA (proteasome accessory factor A), Pup-蛋白酶体系的相关基因在 *Mtb* 基因组上的分布见图 3.

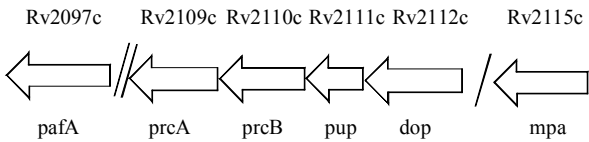


Fig. 3 Genomic context of the genes of Pup-proteasome system in *Mtb*^[19]

图 3 结核分枝杆菌基因组上的 Pup-蛋白酶体系相关基因^[19]

3.1 去酰胺酶 Dop

Dop 蛋白由 Rv2112c 基因编码, 该基因位于 pup 基因 Rv2111c 上游^[19]. Dop 的氨基酸序列与真核生物蛋白酶体系中的 E1、E2 和 E3 没有同源性, 但与羧氨连接酶具有一定同源性^[20]. 在真核泛素-蛋白酶体系中, E1 具有活化泛素的作用. Pup 蛋白 C 端序列为 Gly-Gly-Gln, Dop 的 N 端可以催化去酰胺化反应, 将 Pup C 端的 Gln 转变为 Glu^[13, 19]. Imkamp 等^[21]对 *Msm* 菌株 dop 基因进行了敲除, 结果发现 *Msm* 中蛋白质的 Pup 化不能发生, 造成底物蛋白的积累. 将 dop 基因回补入 dop 缺失突变株后, Pup 化得到了恢复, 这表明 Dop 催化的去酰胺化反应对 Pup 与靶蛋白的共价连接是必需的. 2010 年 Burns 和 Imkamp 等^[22-23]发现, Dop 还具有去 Pup 化功能, 在 Dop 的作用下被 Pup 标记的底物蛋白 FabD、Ino1 和 PanB 可以被去 Pup 化,

产生游离的 Pup, 这一去 Pup 过程依赖于 Mpa 的存在.

3.2 连接酶 PafA

由 *Mtb* Rv2097c 基因编码的 PafA 是一个依赖于 ATP 的羧氨连接酶^[24]. 真核泛素 - 蛋白酶体系统中, E3 起到识别特定底物并与泛素连接的作用. PafA 的氨基酸序列与真核生物蛋白酶体系统的 E1、E2 和 E3 没有同源性, 在糖多孢菌属中发现与 PafA 同族的蛋白质 GCS2 (γ -glutamyl-cysteine synthetase-2)、PafA 和 GCS2 同属于羧氨连接酶家族, 比较 PafA 和 GCS2 蛋白 N 端发现有明显的保守序列: GhExE (h 为疏水区, x 为任意区), 这些区域与 Mg^{2+} 、ATP 形成活性中心^[24]. 其催化 Pup 与底物的连接过程可分为两步: 首先 PafA 能够催化去酰胺化 Pup 的 C 端 Glu 发生磷酸化, 形成磷酸化 Pup-GGE 中间体, 然后由这种酶 - 中间体复合物促进 Pup 与底物的 Lys 相连^[25]. Cerda-Maira 和 Festa 等^[20, 26-27]发现, *Mtb* pafA 的突变可以造成底物

蛋白的积累, 同时检测不到 Pup 标记蛋白的存在, 说明 PafA 对于 Pup 与靶蛋白连接是必需的. 但是, 对于各种在结构上没有同源性的靶蛋白, PafA 如何催化其与 Pup 连接, 以及是否存在其他辅助因子, 有待于进一步探究.

4 Pup 介导的蛋白质降解过程

综合已有对原核生物蛋白酶体、Pup 及辅助因子的研究成果, 对 *Mtb* 中 Pup-蛋白酶体系统介导的蛋白质降解过程总结如下: Pup 的 C 端 Gln 在去酰胺酶 Dop 催化下形成 Glu; 在 PafA 连接酶的作用下, 通过水解 ATP, 使 Pup C 端 Glu 磷酸化, 并催化其以共价键的形式与底物蛋白上的 Lys 连接; Pup 标记的蛋白质通过 Pup C 端与 Mpa N 端相互作用, Mpa 水解 ATP 打开蛋白酶体核心区域的门 (α 亚基), 传递底物蛋白到蛋白酶体的核心区域 (β 亚基), 同时 Dop 促使去 Pup 化, 使 Pup 重复利用; 底物经由蛋白酶体被降解 (图 4).

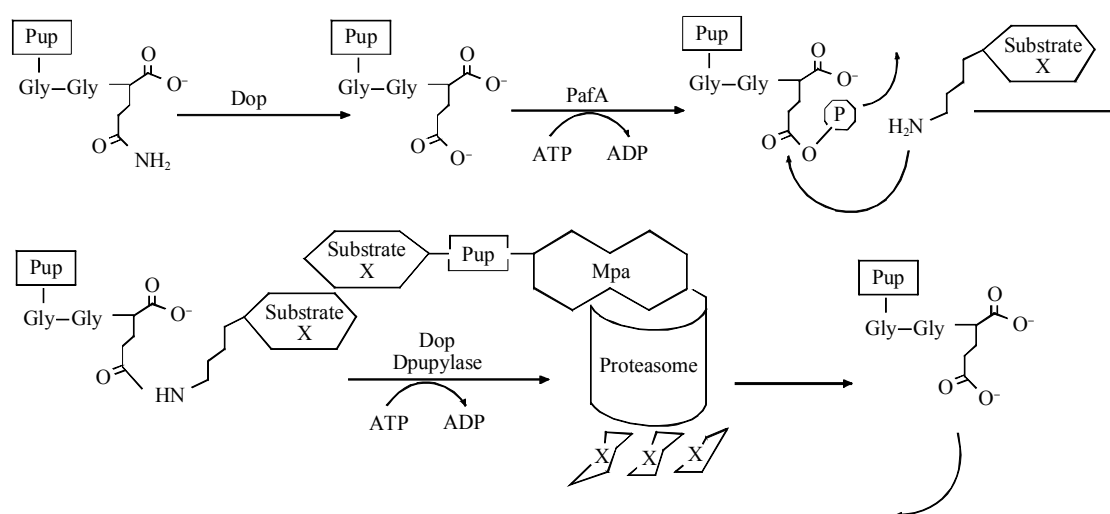


Fig. 4 The mechanism of *Mtb* Pup-proteasome system

图 4 结核分枝杆菌 Pup-蛋白酶体系统的作用机制

5 Pup-蛋白酶系统的靶蛋白及其功能

真核泛素 - 蛋白酶体系统是胞内蛋白质降解的重要途径, 并通过调控蛋白质降解参与细胞周期、凋亡和发育等生命活动. 因此, 人们在研究原核 Pup-蛋白酶体系统作用机理的同时, 对原核 Pup-蛋白酶体系统的靶蛋白及其生物学功能进行了深入

的探讨. 2009 年, Festa 等^[27]用串联亲和层析和质谱分析法对 *Mtb* 中的 Pup 标记蛋白进行了系统的分析, 根据是否存在 Pup 与靶蛋白形成的 Gly-Gly-Glu~Lys 连接结构来判定 *Mtb* 中被 Pup 标记的蛋白质, 共发现有 55 个符合此条件的靶蛋白, 并确定了这些蛋白质中与 Pup 共价连接的 Lys 位点. 这 55 种蛋白质的功能涉及物质中间代谢、信号通路、

毒性与抗毒性因子、细胞壁和细胞膜组分等多个方面(表 1)。Watrous 等^[28]用相同的方法在 *Msm* 中发

现 52 种被 Pup 标记的蛋白质, 其中大部分在 *Mtb* 中存在对应的同源蛋白。

Table 1 Functional classification of proteins identified in the *Mtb* pupylome^[27]
表 1 结核分枝杆菌 Pup 标记蛋白谱中蛋白质的功能分类统计^[27]

蛋白质功能分类	数目	占 Pup 标记蛋白比例 /%	占 <i>Mtb</i> 蛋白质组比例 /%
中间代谢	25	45	22
脂类代谢	8	15	6
毒性 / 抗毒性因子	6	11	3
信号通路蛋白	4	7	6
细胞壁、膜蛋白	4	7	18
调节蛋白	1	2	5
保守的假定蛋白	7	13	26

目前在 *Mtb* 中, 已经通过实验证实, 能被 Pup 标记且被蛋白酶体降解的底物蛋白有 FabD、PanB、Mpa、SodA、Ino1、Icl 和 MtrA 等, 这些被确定的 Pup- 蛋白酶体系底物蛋白各自具有重要的生物学功能, 并与 *Mtb* 的致病性相关。丙二酰乙酰辅酶 A 转酰酶 FabD(malonyl Co-A acyl carrier protein transacylase)是脂肪酸合酶 II 之一, 催化脂肪酸和分枝菌酸的合成, 而分枝菌酸与 *Mtb* 的病原性有关^[9, 29]。酮脂酰羟甲基转移酶 PanB(ketopantoate hydroxymethyl transferase)参与 *Mtb* 体内泛酸(V_{B5})的生物合成, 而泛酸与乙酰辅酶 A(Co-A)的形成有关, Co-A 参与了 TCA 循环和脂肪酸代谢, 泛酸缺陷型的 *Mtb* 不易在小鼠体内长期生存^[9, 30]。过氧化物歧化酶 SodA(superoxide dismutase)与 *Mtb* 的病原性有关, 参与抗宿主免疫作用, 和非病原菌 *Msm* SodA 蛋白的输出方式有区别^[31-32]。1- 磷酸肌醇合酶 Ino1(inositol-1-phosphate synthase)对 *Mtb* 的

硫醇和细胞壁脂多糖的形成很重要, *Mtb* 的 Ino1 突变体不易在巨噬细胞和小鼠体内长期生存^[26, 32-33]。异柠檬酸盐裂解酶 Icl(isocitrate lyase)是乙醛酸循环途径中重要的酶, 它的催化作用为在醋酸盐或含有某些脂肪酸的培养基上生长的 *Mtb* 提供了碳源^[27, 34]。*Mtb* 反应调节器 MtrA(*Mtb* response regulator A), *Mtb* 感染小鼠或巨噬细胞, 高表达 MtrA 蛋白可以加速 *Mtb* 的清除, 但在体外培养基中高表达 MtrA 的 *Mtb* 菌株可以正常生长^[27, 35]。鉴于这些 Pup- 蛋白酶体系底物蛋白的生理功能, Pup- 蛋白酶体系可以通过调控蛋白质降解在 *Mtb* 的生长调控和致病性中发挥重要作用。

6 总结与展望

我们将 Pup- 蛋白酶体系与真核泛素 -蛋白酶体系相比较, 可以发现两者在结构组成、调控方式和生物学功能等方面均存在一定的差异(表 2)。

Table 2 Comparison of eukaryotic and prokaryotic proteasome systems
表 2 真核生物和原核生物蛋白酶体系的比较

	原核生物(<i>Mtb</i> , <i>Msm</i>)	真核生物
蛋白酶体	2 外环(每环 7 个相同 α 亚基)	2 外环(每环 7 个不同 α 亚基)
核心结构	2 内环(每环 7 个相同 β 亚基)	2 内环(每环 7 个不同 β 亚基)
活性中心	所有 β 亚基的 N 端, 发挥胰凝乳蛋白酶活性作用	每环的 3 个 β 亚基 N 端, 分别具有半胱天冬蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 3 种活性作用
介导物质	Pup	泛素
辅助因子	Mpa、Dop、PafA	E1、E2、E3, DUBs, ATP 酶, 及许多调节亚基等
底物	FabD、PanB、Mpa、SodA、Ino1、Icl、MtrA 等 50 多种	超过 600 种, 大多数需要泛素的先前连接, 但有些也无需泛素, 如: 鸟氨酸脱羧酶 ^[36]
功能	蛋白质更新, 新陈代谢, 抗免疫等	蛋白质更新, 信号转导, 核内 κB 调控因子, 内吞作用, DNA 修复, 自噬作用, 细胞周期和转录等 ^[37]

Knipfer 等^[1]发现将 *Msm* 的蛋白酶体基因 *prcBA* 敲除对 *Msm* 的生长没有显著影响, 然而 Gandotra 等^[38]发现敲除 *Mtb* 蛋白酶体基因 *prcBA* 对 *Mtb* 在体外的正常生长有一定的影响. 当 *Mtb* 进入宿主肺泡细胞时, 巨噬细胞由可诱导 NO 合酶 (iNOS) 产生 NO 和其他活性氮中间体 (reactive nitrogen intermediates, RNI) 来破坏 *Mtb* 的核酸、蛋白质和脂质体等物质, 抑制病原菌 *Mtb* 的感染^[39-40]. Darwin 等^[8]发现, *Mtb* 的蛋白酶体具有抗 RNI 功能, 对 *Mtb* 在小鼠体内的存活至关重要. 其后的一系列实验结果表明, 无论是蛋白酶体亚基还是辅助因子 Mpa 和 PafA 编码基因的敲除或突变, 都可以导致 *Mtb* 抗 RNI 能力减弱^[20, 26, 41]. 其中的原因可能有两种: a. *Mtb* 被 RNI 破坏的蛋白质不能被降解, 这些缺陷蛋白质对细胞有毒性, 导致细胞死亡; b. 可能存在某些蛋白质在暴露于 RNI 后会变得有毒性, 不能被降解, 促进了细胞死亡.

目前全世界约 1/3 的人感染了 *Mtb*, 每年近 300 万人死于结核病, 结核病有继续蔓延且感染者死亡率增高的趋势. 在世界范围内已发现多药耐受性的 *Mtb*, HIV 病毒感染者体中, 结核分枝杆菌不被免疫, 出现了双重感染者, 这给结核病的防治带来很大困难^[42-43]. 近些年来, 高效的抗结核病新药研发进展缓慢. Pup- 蛋白酶体系统在 *Mtb* 致病性中的作用使该系统成为结核病治疗的潜在药物靶点. 但是, 从真核生物和 *Mtb* 蛋白酶体的结构来看, β 亚基都有胰凝乳蛋白酶活性中心, 在抑制 *Mtb* β 亚基的同时也会抑制人体细胞蛋白酶体 β 亚基的胰凝乳蛋白酶活性, 这是从 *Mtb* 蛋白酶体入手研发抗结核药物需要突破的主要障碍. 2009 年, Lin 等^[44]发现化合物 oxathiazol-2-one 可以改变 *Mtb* β 亚基的构象, 抑制 β 亚基的蛋白质降解活性, 同时这种化合物对真核蛋白酶体 β 亚基抑制较弱, 对真核细胞毒性较小. Lin 等^[45]又在 2010 年发现一种天然物质 Fellutamide B, 其对 *Mtb* 蛋白酶体 β 亚基的抑制能力显著超过对真核蛋白酶体 β 亚基的抑制能力, 可以作为以 *Mtb* 蛋白酶体为靶标的抗结核药物. 随着对 Pup- 蛋白酶体系统的作用机理和生物学功能的研究, 将丰富对包括蛋白酶体、辅助因子和底物蛋白质在内的整个系统的认识, 针对 Pup- 蛋白酶体系统的抗结核药物研发将得到进一步的发展.

参 考 文 献

- [1] Knipfer N, Shrader T E. Inactivation of the 20S proteasome in *Mycobacterium Smegmatis*. *Mol Microbio*, 1997, **25**(2): 375-383
- [2] Baumeister W, Walz J, Zu F, *et al*. The proteasome: Paradigm of a self-Compartmentalizing protease. *Cell*, 1998, **92**(3): 367-380
- [3] Hu G, Lin G, Wang M, *et al*. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome and mechanism of inhibition by a peptidyl boronate. *Mol Microbio*, 2006, **59**(5): 1417-1428
- [4] Lin G, Hu G, Tsu C, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* *prcBA* genes encode a gated proteasome. *Mol Microbio*, 2006, **59**(5): 1405-1416
- [5] Lowe J, Stock D, Jap B, *et al*. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 1995, **268**(5210): 533-539
- [6] Lin G, Tsu C, Dick L, *et al*. Distinct specificities of *Mycobacterium tuberculosis* and mammalian proteasomes for N-Acetyl tripeptide substrates. *J Biol Chem*, 2008, **283**(49): 34423-34431
- [7] Wolf S, Nagy I, Lupas A, *et al*. Characterization of ARC, a divergent member of the AAA ATPase family from *Rhodococcus erythropolis*. *J Biol Chem*, 1998, **277**(1): 13-25
- [8] Darwin K H, Ehrt S, Gutierrez-Ramos J C, *et al*. The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science*, 2003, **302**(12): 1963-1966
- [9] Pearce M J, Arora P, Festa R A, *et al*. Identification of substrates of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *EMBO J*, 2006, **25**(22): 5423-5432
- [10] Darwin K H, Lin G, Chen Z, *et al*. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue. *Mol Microbio*, 2005, **55**(2): 561-571
- [11] Wang T, Darwin K H, Tang C Y, *et al*. Structural insights on the *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase Mpa. *Structure*, 2009, **17**(10): 1279-1285
- [12] Li D, Li H L, Wang T, *et al*. Structural basis for the assembly and gate closure mechanisms of the *Mycobacterium tuberculosis* 20S proteasome. *EMBO J*, 2010, **29**(12): 2037-2047
- [13] Pearce M J, Mintseris J, Ferreyra J, *et al*. Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2008, **322**(5904): 1104-1107
- [14] Hershko, Ciechanover. The ubiquitin system. *Nature Medicine*, 2000, **6**(10): 1073-1081
- [15] Chen X, Solomon W C, Kang Y, *et al*. Prokaryotic ubiquitin-like protein Pup is intrinsically disordered. *J Mol Biol*, 2009, **392**(1): 208-217
- [16] Sutter M, Striebel F, Damberger F F, *et al*. A distinct structural region of the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is recognized by the N-terminal domain of the proteasomal ATPase Mpa. *FEBS Letters*, 2009, **583**(19): 3151-3157
- [17] Wang T, Darwin K H, Li H L, *et al*. Binding-induced folding of prokaryotic ubiquitin-like protein on the *Mycobacterium*

- proteasomal ATPase targets substrates for degradation. *Nat Stru Mol Biol*, 2010, **17**(11): 1352–1357
- [18] Burns K E, Pearce M J, Darwin K H, *et al.* Prokaryotic ubiquitin-like protein provides a two-part degron to *Mycobacterium* proteasome substrates. *J Bacteriol*, 2010, **192**(11): 2933–2935
- [19] Striebel F, Imkamp F, Sutter M, *et al.* Bacterial ubiquitin-like modifier Pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes. *Nat Stru Mol Biol*, 2009, **16**(6): 647–651
- [20] Cerda-Maira F A, Pearce M J, Fuortes M, *et al.* Molecular analysis of the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) conjugation pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbio*, 2010, **77**(5): 1123–1135
- [21] Imkamp F, Rosenberger T, Striebel F, *et al.* Deletion of dop in *Mycobacterium smegmatis* abolishes pupylation of protein substrates *in vivo*. *Mol Microbio*, 2010, **75**(3): 744–754
- [22] Burns A E, Cerda-Maira F A, Wang T, *et al.* "Depupylation" of prokaryotic ubiquitin-like protein from *Mycobacterial* proteasome substrates. *Mol Cell*, 2010, **39**(5): 821–827
- [23] Imkamp F, Striebel F, Sutter M, *et al.* Dop functions as a depupylase in the prokaryotic ubiquitin-like modification pathway. *EMBO Rep*, 2010, **11**(10): 791–797
- [24] Iyer L, Burroughs A M, Aravind L. Unraveling the biochemistry and provenance of pupylation: a prokaryotic analog of ubiquitination. *Biology Direct*, 2008, **3**(6150): 45–52
- [25] Guth E, Thommen M, Weber-Ban E. *Mycobacterial* ubiquitin-like protein ligase PafA follows a two-step reaction pathway with a phosphorylated Pup intermediate. *J Biol Chem*, 2011, **286**(6): 4212–4219
- [26] Festa R A, Pearce M J, Darwin K H. Characterization of the proteasome accessory factor (paf) operon in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 2007, **189**(8): 3044–3050
- [27] Festa R A, McAllister F, Pearce M J, *et al.* Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, 2010, **5**(1): e8589
- [28] Watrous J, Burns K E, Liu W T, *et al.* Expansion of the mycobacterial "PUPylome". *Molecular Bio Systems*, 2010, **6**(22): 376–385
- [29] Kremer L, Nampoothiri K M, Lesjean S, *et al.* Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonyl-CoA: AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *J Biol Chem*, 2001, **276**(30): 27967–27974
- [30] Sambandamurthy V K, Wang X, Chen B, *et al.* A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med*, 2002, **8**(10): 1171–1174
- [31] Harth G, Horwitz M A. Export of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. A model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria. *J Biol Chem*, 1999, **274**(7): 4281–4292
- [32] Burns K E, Liu W T, Boshoff H I M, *et al.* Proteasomal protein degradation in *Mycobacteria* is dependent upon a prokaryotic ubiquitin-like protein. *J Biol Chem*, 2008, **284**(5): 3069–3075
- [33] Movahedzadeh F, Smith D A, Norman R A, *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* *ino1* gene is essential for growth and virulence. *Mol Microbio*, 2004, **51**(4): 1003–1014
- [34] Honer Zu Bentrup K, Miczak A, Swenson D L, *et al.* Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 1999, **181**(23): 7661–7667
- [35] Fol M, Chauhan A, Niar N K, *et al.* Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator. *Mol Microbio*, 2006, **60**(3): 643–657
- [36] Deshaies R J, Joazeiro C A P. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Biochemistry*, 2009, **78**(1): 399–434
- [37] Wickliffe K, Williamson A, Jin L Y, *et al.* The multiple layers of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Chem Rev*, 2009, **109**(4): 1537–1548
- [38] Gandotra S, Lebron M B, Ehrt S. The *Mycobacterium tuberculosis* proteasome active site threonine is essential for persistence yet dispensable for replication and resistance to nitric oxide. *PLoS Pathogens*, 2010, **6**(8): e1001040
- [39] Nathan C, Shiloh M U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(16): 8841–8848
- [40] Gandotra S, Schnappinger D, Monteleone M, *et al.* *In vivo* gene silencing identifies the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome as essential for the bacteria to persist in mice. *Nat Med*, 2007, **13**(12): 1515–1520
- [41] Lamichhane G, Raghunand T R, Morroson N E, *et al.* Deletion of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue gene produces a slow-growing strain that persists in host tissues. *J Infect Dis*, 2006, **194**(9): 1233–1240
- [42] Mitchison D A. Tuberculosis hits back. *Nature*, 2004, **427**(22): 295
- [43] Ginsberg A M, Spigelman M. Challenges in tuberculosis drug research and development. *Nature Medicine*, 2007, **13**(3): 290–294
- [44] Lin G, Li D Y, Carvalho L P S, *et al.* Inhibitors selective for mycobacterial versus human proteasomes. *Nature*, 2009, **464**(1): 621–626
- [45] Lin G, Li D Y, Chidawanyika, *et al.* Fellutamide B is a potent inhibitor of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *Arch Biochem Biophys*, 2010, **501**: 214–220

Progress in The Study of Prokaryotic Ubiquitin-like Protein (Pup)-Proteasome System*

WANG Chun-Jun¹⁾, LIN Jin²⁾, ZHANG Jun-Jie^{2)**}

¹⁾ College of Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

²⁾ The Key Laboratory for Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education,
Institute of Cell Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Ubiquitin-proteasome system, the essential mechanism for eukaryotic cellular protein degradation, plays an important role in the regulation of cellular physiological functions. In 1980s, researchers found that proteasome also reside in actinomycetes, but the function and mechanism of the prokaryotic proteasome were unknown. In 2008, the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) was identified in *Mycobacterium tuberculosis*. With the help of accessory factors, Dop, PafA and Mpa, Pup covalently linked to the Lys ϵ -NH₂ in the target proteins and mediated the target protein degradation through the proteasome. The discovery of Pup-proteasome system revealed a novel mechanism of prokaryotic protein degradation, which is involved essential physiological function including the intermediary metabolism, information pathway, detoxification/virulence, cell wall and cell membrane formation and so on. Disruption of Pup-proteasome system can suppress the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore it is regarded as the new therapeutic target for tuberculosis. In the present paper, the progress in the study on mechanism and function of Pup-proteasome system is reviewed.

Key words prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), proteasome, protein degradation, *Mycobacterium tuberculosis*

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00110

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30770030, 31070714.) and The Beijing NOVA Program (2005B47).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-58802137, E-mail: jjzhang@bnu.edu.cn

Received: March 7, 2011 Accepted: April 1, 2011