

学位論文題名

Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup)/proteasome-dependent proteolytic pathway in *Rhodococcus erythropolis*

(ロドコッカス・エリスロポリスにおけるユビキチン様分子

Pup-プロテアソーム依存的なタンパク質分解系)

学位論文内容の要旨

Regulation of the accumulation of specific proteins in the cells depends on the rate of both synthesis and degradation of the proteins. Bacterial intracellular proteases have a variety of functions, including processing of precursor forms (such as removal of signal peptides in exported proteins) degradation of aberrant or damaged proteins (resulting from mutations or environmental stress), and inactivation of proteins that play key roles in regulatory processes.

The proteolysis is an essential element of many regulatory processes. It must be subject to spatial and temporal control in order to prevent damage to the cell. If damaged proteins are accumulated in the cell, it may be resulting in death of the cell. Therefore, damaged proteins have to be degraded by proteases. The proteases can perform selective degradation of proteins with signaling functions in order to protect cellular proteins from unwanted degradation.

Intracellular proteins are initially degraded by ATP-dependent proteases followed by ATP-independent proteases (endopeptidases and/or exopeptidases). One of the ATP-dependent proteases, the 20S proteasome exists in eukaryote, archaea and bacteria. In bacteria, the proteasome has been found in some actinomycetes, and is known to interact with the proteasomal ATPase complex.

In mycobacterial proteasome system, the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) has been found in 2008. Pup is now known as a degradation signal, which is post-translationally modified to target proteins. Post-translationally modified pupylated-proteins are selectively degraded by a proteasome-dependent proteolytic system. Before the substrates are translocated into the proteasome chamber, Pup is removed from pupylated-proteins by Dop (depuplase of Pup), suggesting that de-pupylated Pup is recycled like ubiquitin.

However, in Pup-proteasome system of *Rhodococcus erythropolis*, we could confirm that Pup is removed from pupylated-proteins by Dop, and then it is further hydrolyzed by Dop. These results suggested that *Rhodococcus* Pup is not recycled after deconjugation. The depupylase function of Dop is still unclear whether Dop involves in the removal of Pup from substrates to facilitate delivery into the proteasome or to rescue substrates from degradation.

Here, we studied the Pup-dependent protein degradation system by proteasome in *Rhodococcus*

1. Pup is deconjugated from pupylated-protein, and then free Pup is further hydrolyzed by Dop

Pupylated proteins were isolated and analyzed by LC-MS/MS. More than 100 proteins were detected and the pupylation sites of 31 proteins were successfully identified. We selected 6 proteins as model substrates and prepared pupylated-substrates: inorganic pyrophosphatase (PPase), aldehyde dehydrogenase (Aldh), 2-isopropylmalate synthase (leuA), adenosylhomocystenase (ahcY), N⁵-dimethyl-4-nitrosoaniline-dependent alcohol oxidoreductase (Mno), and myco-inositol-1-phosphate synthase (ino1). Pups are deconjugated from all model substrates by Dop but free Pup is not accumulated. Dop functions removing Pup from pupylated substrates by cleaving the isopeptide bond between Pup and target proteins (isopeptidase activity). By LC-MS/MS analysis of degradation products of Pup, N- and C-terminal region of Pup were detected, indicated that Dop cleaved at multiple sites of de-conjugated Pup.

2. Dop has endopeptidase activity

To confirm the endopeptidase activity of Dop, fluorogenic (AMC) substrates were incubated with Dop, and the released AMC was measured. Dop alone did not release free AMC from amino acid and peptide substrates. However, the peptidase activity of Dop was detected in conjunction with F2 aminopeptidase. Analysis of H-AR-AMC revealed that Dop cleaved after an alanine residue, and the resultant H-R-AMC was further hydrolyzed by the F2 aminopeptidase. This reaction sequence was also observed when H-AAF-AMC was used as a substrate. These results suggested that Dop cleaves the isopeptide bond between Pup and substrate and subsequently degrades de-conjugated Pup.

3. Pup is not only function as a degradation signal, but also may regulate the function of target proteins

We identified several proteins which were degraded by a Pup-proteasome-dependent proteolytic system. In the *in vitro* reconstitution experiment, however, the half-lives of most pupylated proteins were much longer than the doubling time of the host cell. This finding suggests that, in addition to being a degradation signal, Pup may have other unknown functions. Pupylated PPase is a stable protein and is not degraded by proteasome-dependent proteolytic system. Interestingly, the enzymatic activity of pupylated-PPase ($407 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) was dramatically enhanced by Dop treatment ($715 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$); the accessibility of the substrate to the catalytic site may be increased by the removal of Pup. This suggests that Pup ligation to or removal from cellular proteins may regulate their functions. Further investigation is required to determine the roles of the pupylation and intracellular protein degradation systems in *Rhodococcus*.

学位論文審査の要旨

主 査	客員教授	田 村 具 博
副 査	教 授	横 田 篤
副 査	客員教授	鎌 形 洋 一
副 査	客員准教授	湯 本 勲

学 位 論 文 題 名

Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup)/proteasome-dependent proteolytic pathway in *Rhodococcus erythropolis*

(ロドコッカス・エリスロポリスにおけるユビキチン様分子

Pup-プロテアソーム依存的なタンパク質分解系)

本論文は英文 92 項、図 33、表 4、4 章からなり、参考論文(原著論文 2 編、日本語総説 1 編、学会要旨 4 編)が付されている。

微生物の細胞内タンパク質の安定性(半減期)は、タンパク質の構造安定性に依存する一方、細胞が置かれる環境や状況によって変化することが知られている。細胞内タンパク質は、その殆どが安定な高次構造をもつため、必ず ATP 依存性タンパク質分解系による分解を最初に受ける。この分解系に寄与するタンパク質分解酵素として、複数の ATP 依存性プロテアーゼが知られているが、標的蛋白質がどの様に選別・分解を受けるのかその機構には不明な点が多い。この細胞内タンパク質の分解系を理解し目的タンパク質の細胞内量を制御する技術が開発されれば、微生物を宿主とした高効率物質生産系の構築が容易になると考えられ、現在も精力的に研究が続けられている。

本研究では、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* の ATP 依存性プロテアーゼの一つであるプロテアソームに焦点を当て、同酵素依存的なタンパク質分解系において、分解シグナルとして機能する Pup 分子の翻訳後修飾系について解明を試み、結果をまとめたものである。

1) Pup 分子の翻訳後修飾と Dop による脱 Pup 化反応との関係

Mycobacterium 属放線菌の研究より、Pup 標識を受けたタンパク質は、プロテアソーム依存性分解システムによって分解を受けることが知られている。この時 Pup 分子は、分解シグナルとして認識され、標的タンパク質が分解を受ける際に Dop により切り離される。そして切り離されたフリーの Pup は、他のタンパク質の標識へと再利用されることが考えられている。そこで尹氏は、まず同様の現象を確認するため、解析ツールが発達している放線菌 *Rhodococcus erythropolis* を宿主として、Pup 化タンパク質を調整し Dop 処理を施すと、脱 Pup 化は確認できるが、切り離されたフリーの Pup が消失することを

見出した。そこで、*Rhodococcus*あるいは*Mycobacterium*由来Pupを標識したPup化タンパク質を調整し、両微生物由来のDopでそれぞれ反応させると、*Mycobacterium*由来Pupは両微生物由来DopともフリーのPup分子の蓄積を確認することができたが、*Rhodococcus*由来PupはDopの種類にかかわらずフリーのPup分子を検出することができなかった。このことより、*Rhodococcus*由来Pupは*Mycobacterium*由来のPupに比べて構造安定性が異なる可能性を見出した。次に、上記調整した*Rhodococcus*由来Pup化タンパク質をLC-MS/MSで解析し、100種以上のPup化されたタンパク質を同定すると共に、31種類のタンパク質についてPup化部位を同定することに成功した。そして、この31種のタンパク質から6種のタンパク質(inorganic pyrophosphatase (PPase), aldehyde dehydrogenase (Aldh), 2-isopropylmalate synthase (leuA), adenosylhomocystenase (ahcY), N'-dimethyl-4-nitrosoaniline-dependent alcohol oxidoreductase (Mno), and myco-inositol-1-phosphate synthase (inol))を選抜し、それぞれPup化タンパク質を調整しDopによる脱Pup反応を検討した。その結果、いずれのモデル基質においてもフリーのPupを確認することができなかった。これらのことより、*Rhodococcus*由来Pupは脱Pup反応とともに分解を受けている可能性を見出し、これまでの概念を変えるデータを取得した。

2) Dop分子はエンドペプチダーゼ活性をもつ

PupがDopにより分解を受けている可能性を見出した尹氏は、Pupの単独発現と精製を試みたが、Pup自身の細胞内不安定性のため成功しなかった。そこで、PupとECFPを連結した融合タンパク質を調整しDop処理による分子量の変化を見ると、Pupの内部が切断されたPup-ECFP断片が複数確認された。また、Pup化タンパク質のモデル基質として調整したPup-PPaseをDop処理し、分解産物を回収してLC-MS/MSで解析を行うと、Pupの分解物を多数確認することができた。更に、合成基質を用いてDopのペプチダーゼ活性を測定すると、*Rhodococcus*由来Dopのみならず*Mycobacterium*由来Dopにおいてもエンドペプチダーゼ活性を確認することができた。このことは、Dop分子には、Pupに対する脱アミド活性やイソペプチダーゼ活性に加え、エンドペプチダーゼ活性を持つことを初めて示した。本研究では、異なる基質を調整し多角的に解析して得られた成果であり高く評価される。

3) Pupには分解シグナル以外の機能がある

Pupは、分解シグナルとして機能すると考えられてきたが、プロテアソーム分解系によるPup化タンパク質の分解は、細胞の増殖速度以上に遅い場合があること、また全てのPup化タンパク質はプロテアソームによって分解を受けないことを見出した(モデル基質として使用したPup-PPaseも分解を受けない酵素である)。このことから、Pupには分解シグナル以外の機能があると考え、Pup-PPaseのDop処理の有無によるPPase活性を測定すると、脱PupによりPPaseの活性が著しく上昇することを見出した($407 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \rightarrow 715 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。このことは、Pup分子の翻訳後修飾が、タンパク質の機能に影響を及ぼしPPaseの酵素活性を制御する可能性を示した。この内容は同時に、なぜPup分子が真核生物のユビキチン修飾同様、標的タンパク質に複数のPup分子から成る鎖状の修飾をせず、Pup 1分子だけの修飾系として存在しているのかを説明出来るかもしれない。

上記研究により、Pup修飾系に必須なDop分子にエンドペプチダーゼ活性があることを初めて示すとともに、Pup分子自身においても、分解シグナルとして機能する以外に、タンパク質の機能を制御するといった新しい概念を提唱する成果が得られ非常に高く評価される。

よって、審査員一同は、Hea-Yeon Yun氏が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。