

УДК 579.6

**МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ
БАКТЕРИЙ**

*А.Р. Сабирова, Н.Л. Рудакова, Е.И. Шагимарданова,
Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова*

Аннотация

В работе рассматривается группа малоизученных эндопептидаз клана ММ – мембраносвязанных протеиназ. Среди них S2P-подобные пептидазы формируют большое семейство мембраносвязанных металлопротеиназ, участвующих в клеточных сигнальных путях посредством протеолиза мембраносвязанных субстратов. Гомологи S2P-пептидаз обнаружены в геномах бактерий, архей и эукариот, включая прокариоты, растения, грибы и животные. Обсуждается также функциональная роль бактериальных S2P-подобных протеиназ – RseP-протеиназы *E. coli* и SpoIVFB-протеиназы *B. subtilis*.

Ключевые слова: мембранный протеолиз, мембраносвязанная металлопротеиназа, пептидаза S2P, фактор споруляции SpoIVFB, протеиназа YaeL/RseP.

Клан ММ протеиназ (классификация MEROPS, семейство M50) содержит мембраносвязанные эндопептидазы, среди которых охарактеризованы пептидаза S2P (M50.001) и фактор споруляции SpoIVFB (M50.002). Аминокислотные последовательности этих белков имеют низкую гомологию, и отнесены к разным подсемействам: M50A и M50B соответственно. К подсемейству M50A также относится пептидаза RseP *E. coli* (M50.004). Мотив активного центра ферментов клана ММ аналогичен термолизиноподобным ферментам семейства M4 клана MA – HE_{xx}H. По-видимому, два гистидина в структуре активного центра ферментов клана ММ представляют лиганды для единственного атома цинка, а глутамат, расположенный после первого гистидинового лиганда, ответственен за каталитическую активность. При замене в активном центре каталитического глутамата на аспартат в структуре протеиназы S2P и фактора споруляции SpoIVFB протеолитическая активность сохраняется [1]. Как показано в [2], эти белки содержат инвариантный мотив Asp-Gly, причем С-концевой остаток аспартата необходим для проявления каталитической активности, что предполагает существование третьего цинкового лиганда.

Мембраносвязанные металлопротеиназы M50 представляют собой белки, состоящие из трансмембранных сегментов, пронизывающих цитоплазматическую мембрану (рис. 1). При этом мотив активного центра (HE_{xx}H) располагается внутри одного из трансмембранных сегментов (рис. 2). Второй консервативный мотив (LDG или FDG) находится на С-конце молекулы белка. Несмотря на низкую гомологию аминокислотных последовательностей среди представителей

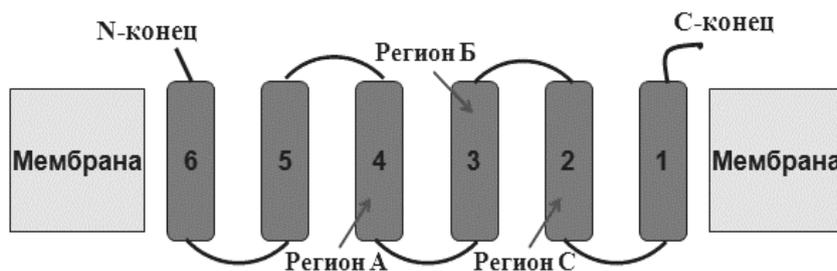


Рис. 1. Схема интрамембранной организации металлопротеиназ семейства M50. Регионы А, Б, С – консервативные домены [4]

	Регион А	Регион Б	Регион С
S2P HUMAN [166]	I S G V V H E I G H G I A A I R E Q V [34]	R I F C A G I W H N F V L A L L [215]	S L S G A L A I V N A V P C F A L D G Q W I L N [46]
027421.METTH [122]	T V I V V H E F A H G I L A R L E G V [34]	R I Z A A G S V A N L I L A G I [132]	F L N F A V G T V N L L P A K P L D G G L M F E [43]
033351.MYCTU [16]	I S V A L H E C G H M W V A R R T G M [63]	A V L F A G P G M N L A I C L V [209]	Q L N L I L A A I N L L P L L P F D G G H I A V [58]
P70995.BACSU [21]	V S F T M H E L A H A Y V A Y K F G D [51]	L V S I A G P V S N L I L A F I [31]	Q L N L V L F L F N L L P L P L D G Y R I I E [58]
Y611.METJA [44]	S G F I F H E L M H R T V A R K Y G A [44]	K I A L A G P L T N V A L A F V [22]	H I N L F L A G F N M L P I P P F D G E K V L K [23]
SP4G.BACSU [38]	L I V L I H E L G H A A L A V F F S W [28]	A V I I A G P L Q H I W L Q F A [19]	F Y N L S I L F V N L L P I W P L D G G K L L F [145]

Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей клана мембраносвязанных металлопептидаз семейства M50. Указаны представители 6 подсемейств, основанных на филогенетическом анализе [4]. Аббревиатуры организмов: METTH – *Methanobacterium thermoautotrophicum*, MYCTU – *Methanobacterium tuberculosis*, BACSU – *Bacillus subtilis*, METJA – *Metanococcus jannaschii*. Консервативные домены, присутствующие у всех представителей семейства M50, обозначены как регионы А, Б, С. Высококонсервативные аминокислоты доменов выделены жирным на светло-сером фоне, аминокислоты с высокой гомологией – серым. Аминокислотные последовательности выровнены относительно региона А, числами указаны расстояния от региона Б до региона С и до С-конца молекулы белка

семейства мембраносвязанных протеиназ, консервативные мотивы идентифицированы во всех последовательностях протеиназ клана ММ и используются как структурные маркеры для определения принадлежности белков к тому или иному семейству [3].

Третичная структура ферментов клана ММ не определена. Показано в работе [4], что полипептиды имеют высокую гидрофобность, но три региона в молекуле белка, образующие структурные домены мембраносвязанных протеиназ, обладают значительной гидрофильностью. Несмотря на то что консервативные аминокислоты активного центра ферментов семейства M50 аналогичны таковым для термолизина клана МА, фолдинг белков этого семейства отличается от фолдинга термолизиноподобных ферментов семейства М4 [4]. Это обстоятельство послужило основанием для выделения ферментов семейства M50 в отдельный клан ММ-протеиназ.

Первым изученным представителем семейства M50 клана ММ является протеиназа S2P *Homo sapiens*, поэтому протеиназы этого семейства также называют S2P-протеиназами. К ним относят мембраносвязанные протеазы, обеспечивающие механизм сигнальной трансдукции путем регулируемого интрамембранного протеолиза (РИП) [5, 6]. S2P-протеиназы представлены в секвенированных геномах

Табл. 1

Бактериальные протеиназы семейства M50

Организм	M50 протеаза	Субстрат	Функциональная роль	Источник
<i>Bacillus subtilis</i>	SpoIVFB	Про- σ^K	Споруляция	[8]
<i>Bacillus subtilis</i>	YluC	RsiW (анти- σ^W)	Щелочной и осмотический шок, синтез антибиотиков, нарушающих клеточную стенку	[9]
<i>Caulobacter crescentus</i>	MmpA	PodJ	Проростание проспоры	[10]
<i>Escherichia coli</i>	RseP (YaeL)	RseA (анти- σ^E)	Периплазматический стрессовый ответ	[11]
<i>Enterococcus faecalis</i>	Eep	cAD1-феромон	Конъюгация плазмид	[12]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rv2869c	Не известен	Вирулентность, функция липидов клеточной оболочки	[13]
<i>Vibrio cholerae</i>	YaeL	TcpP	Негативная регуляция экспрессии генов вирулентности	[14]

бактерий, однако детально изучены только два белка: человеческий S2P и бациллярный SpoIVFB [7]. Описаны единичные белки нового клана MM мембраносвязанных протеиназ [7], установлена их функциональная роль (см. табл. 1).

S2P-протеаза (металлозависимая, MEROPS, клан MM, семейство M50) выделена из клеток высших эукариот. S2P вместе с белком S1P отщепляет мембраносвязанный стерольный регуляторный элемент связывающих белков (SREBPs¹). Анализ последовательности белка S2P показал наличие консервативного мотива HExxH внутри гидрофобного сегмента молекулы, а также множественные трансмембранные домены и центральный гидрофильный PDZ-домен [15].

Протеиназа **YaeL/RseP** *E. coli* (прокариотический белок, представитель семейства S2P-белков) играет важную роль в процессинге регуляторного белка – σ^E -фактора транскрипции. В работе [16] установлено, что N-концевой домен белка RseA связывается с SigE. В клетках *E. coli* с делетированным геном *rseA* происходит конститутивная активация гена *sigE*. В связи с чем *rseA* рассматривают как негативный регулятор процессинга белка SigE. Белок RseA частично распадается под действием периплазматической протеазы DegS, а также расщепляется протеазой RseP. Этот процесс высвобождает SigE из комплекса SigE – RseA, после чего протеаза RseA окончательно расщепляется внутриклеточной протеазой ClpXP [17].

Фактор транскрипции **SpoIVFB** *B. subtilis* – гомолог семейства S2P-белков, участвующий в споруляции у бацилл. У грамположительных бактерий *B. subtilis* в процессе споруляции образуются два типа клеток: более крупная материнская клетка и меньшая клетка – проспора (см. рис. 3) [15, 18, 19]. В проспоре активируется регуляторный σ^G -фактор транскрипции, который запускает транскрипцию гена *spoIVB*. Продукт гена *spoIVB* индуцирует протеолитический процессинг предшественника σ^K -фактора транскрипции – регуляторного белка, активного

¹ SREBPs – sterol regulatory element binding proteins. SREBPs представляют собой мембраносвязанные факторы транскрипции, которые активируют гены биосинтеза стерола и жирных кислот.

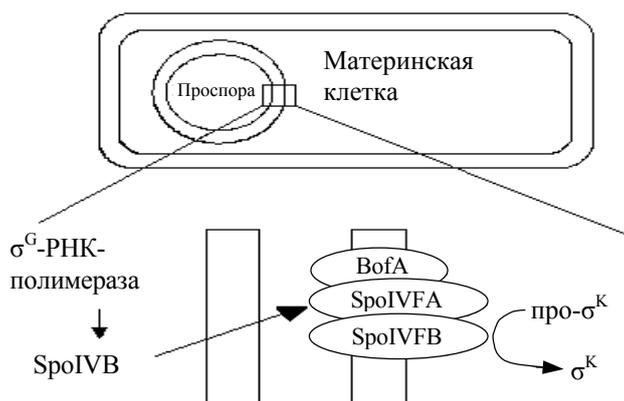


Рис. 3. Сигнальный путь SigK-распознавания. Проспора отделилась от материнской клетки. Комплекс белков BofA, SpoIVFA и SpoIVFB пронизывает мембрану проспоры [3, 24, 25]. σ^G -РНК-полимераза транскрибирует ген *spoIVB* проспоры и его продукт – белок SpoIVB – секретируется в межклеточное пространство между двумя мембранами, где активирует процессинг σ^K -фактора транскрипции в материнской клетке [20, 22]

в материнской клетке, обеспечивая строгую поочередность процессов дифференцировки [3, 20, 21]. Этот сигнальный путь назван σ^K -распознавание. Нарушение этого пути ведет к ингибированию регуляторного σ^K -фактора транскрипции и в конечном итоге к нарушению споруляции [3].

Сериновая пептидаза **SpoIVB** *B. subtilis* локализована в межклеточном пространстве между двумя мембранами, окружающими проспору. Фермент, катализирует собственный протеолиз, образуя белки с вариацией N-конца [22]. Один из этих белков запускает процессинг предшественника σ^K -фактора транскрипции, однако детали этого сигнального пути не выяснены. Установлено, что протеаза SpoIVB содержит консервативный PDZ-домен, необходимый для белок-белкового взаимодействия [17, 23] между белками, участвующими в регуляторных процессах. Кроме того, PDZ-домен играет важную роль в аутопротеолизе, который активирует сигнальную функцию белка SpoIVB [17]. Мишенью протеазы SpoIVB является комплекс белков BofA, SpoIVFA и SpoIVFB, пронизывающих внешнюю мембрану проспоры [3, 24, 25]. Эти белки синтезируются под контролем σ^E -фактора транскрипции [20, 22].

Белок SpoIVFB также относится к металлопротеазам семейства M50 мембраносвязанных протеиназ с консервативным мотивом HExxH внутри трансмембранного сегмента и аспартат-глициновым мотивом на С-конце. SpoIVFB необходим при споруляции, он обеспечивает протеолитический процессинг предшественника σ^K -фактора транскрипции [24]. SpoIVFB не имеет PDZ-домена [1, 26]. Установлено, что белок BofA вместе с белком SpoIVFA ингибирует активность фактора споруляции SpoIVFB [27], причем белок BofA стабилизирует SpoIVFA [28]. Таким образом, SpoIVFA является ингибитором протеазной активности SpoIVFB во время споруляции, а роль стабилизатора SpoIVFA играет белок BofA [28].

Широкое распространение протеолитических белков семейства M50 в бактериях, включая патогенные микроорганизмы, предполагает участие регуляторных мембраносвязанных протеаз в микробном патогенезе. Получены данные,

свидетельствующие о взаимосвязи этих ферментов у *V. cholerae* и *M. tuberculosis* с механизмом патогенеза этих бактерий. Установлено, что протеазы YaeL (*V. cholerae*) и Rv2869c (*M. tuberculosis*) контролируют экспрессию генов вирулентности [15, 29, 30], что представляет определенный практический интерес к этим белкам.

Таким образом, по результатам анализа протеиназы семейства S2P/M50, участвующие в регуляторном мембранном протеолизе (РИП-протеиназы), распространены в эукариотических и прокариотических организмах. Исследования, посвященные изучению их функций, механизма действия, третичной структуры соответствующих белков, являются приоритетными. Очевидно, что белки этого семейства участвуют в различных процессах, включая контроль фолдинга, споруляцию, патогенез, экспрессию генов вирулентности и построение клеточной оболочки. Несмотря на разнообразие физиологических процессов, в которых участвуют эти ферменты, они сохраняют общий механизм действия. Все известные представители семейства S2P/M50 проявляют активность в цитоплазматической мембране, способствуя прохождению сигнала, инициирующего экспрессию генов в ответ на физиологический стресс. Исследования, посвященные этим белкам, помогут подойти к выяснению молекулярных основ мембранной регуляции.

Работа поддержана грантами РФФИ (проект № 09-04-99044 р-офи) и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 гг. (ГК № П406 от 7.05.2010), Аналитической ведомственной целевой федеральной программы (РНП 2.11.1005).

Summary

A.R. Sabirova, N.L. Rudakova, E.I. Shagimardanova, N.P. Balaban, M.R. Sharipova.
Membrane-Bound Metalloproteinases of Bacteria.

This work deals with a group of insufficiently known endopeptidases of MM clan – membrane-bound metalloproteinases. Among them, S2P-like peptidases form a large family of membrane-bound metalloproteinases participating in cellular signal pathways through intramembrane proteolysis of membrane-bound substrates. Homologues of S2P peptidases were found in the genomes of bacteria, archaea and eukaryotes, including prokaryotes, plants, fungi, and animals. We also discuss the functional role of bacterial S2P-like proteinases – RseP proteinase of *E. coli* and SpoIVFB proteinase of *B. subtilis*.

Key words: intramembrane proteolysis, membrane-bound metalloproteinase, S2P peptidase, SpoIVFB sporulation factor, YaeL/RseP proteinase.

Литература

1. Yu Y.-T.N., Kroos L. Evidence that SpoIVFB is a novel type of membrane metalloprotease governing intercompartmental communication during *Bacillus subtilis* sporulation // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182, No 11. – P. 3305–3309.
2. Dong T.C., Cutting S.M. The PDZ domain of the SpoIVB transmembrane signaling protein enables cis-trans interactions involving multiple partners leading to the activation of the pro- σ^K processing complex in *Bacillus subtilis* // J Biol Chem. – 2004. – V. 279, No 42. – P. 43468–43478.

3. *Kinch L.N., Ginalski K., Grishin N.V.* Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: Sequence homologs suggest an ancient signaling cascade // *Protein Sci.* – 2006. – V. 15, No 1. – P. 84–93.
4. *Lewis A.P., Thomas P.J.* A novel clan of zinc metallopeptidases with possible intramembrane cleavage properties // *Protein Sci.* – 1999. – V. 8, No 2. – P. 439–442.
5. *Ehrmann M., Clausen T.* Proteolysis as a regulatory mechanism // *Annu. Rev. Genet.* – 2004. – V. 38. – P. 709–724.
6. *Weihofen A., Martoglio B.* Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides // *Trends Cell Biol.* – 2003. – V. 13, No 2. – P. 71–78.
7. *Makinoshima H., Glickman M.S.* Site-2 proteases in prokaryotes: regulated intramembrane proteolysis expands to microbial pathogenesis // *Microbes Infect.* – 2006. – V. 8, No 7. – P. 1822–1888.
8. *Rudner D.Z., Fawcett P., Losick R.* A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 96, No 26. – P. 14765–14770.
9. *Schöbel S., Zellmeier S., Schumann W., Wiegert T.* The *Bacillus subtilis* sigmaW anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 52, No 4. – P. 1091–1105.
10. *Chen J.C., Viollier P.H., Shapiro L.* A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter polarity* determinant // *Mol. Microbiol.* – 2005. – V. 55, No 4. – P. 1085–1103.
11. *Alba B.M., Gross C.A.* Regulation of the *Escherichia coli* σ^E -dependent envelope stress response // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 52, No 3. – P. 613–619.
12. *An F.Y., Sulavik M.C., Clewell D.B.* Identification and characterization of a determinant (*eep*) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1 // *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181, No 19. – P. 5915–5921.
13. *Makinoshima H., Glickman M.S.* Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis // *Nature* – 2005. – V. 436, No 7049. – P. 406–409.
14. *Matson J.S., DiRita V.J.* Degradation of the membrane-localized virulence activator TcpP by the YaeL protease in *Vibrio cholera* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102, No 45. – P. 16403–16408.
15. *Duncan E.A., Davé U.P., Sakai J., Goldstein J.L., Brown M.S.* Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273, No 28. – P. 17801–17809.
16. *Campbell E.A., Tupy J.L., Gruber T.M., Wang S., Sharp M.M., Gross C.A., Darst S.A.* Crystal structure of *Escherichia coli* σ^E with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA // *Mol. Cell.* – 2003. – V. 11, No 4. – P. 1067–1078.
17. *Flynn J.M., Levchenko I., Sauer R.T., Baker T.A.* Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation // *Genes Dev.* – 2004. – V. 18, No 18. – P. 2292–2301.
18. *Alba B.M., Leeds J.A., Onufryk C., Lu C.Z., Gross C.A.* DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the σ^E -dependent extracytoplasmic stress response // *Genes Dev.* – 2002. – V. 16, No 16. – P. 2156–2168.
19. *Songyang Z., Fanning A.S., Fu C., Xu J., Marfatia S.M., Chishti A.H., Crompton A., Chan A.C., Anderson J.M., Cantley L.C.* Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains // *Science.* – 1997. – V. 275, No 5296. – P. 73–77.
20. *Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J.* MEROPS: the peptidase database // *Nucleic Acid Res.* – 2006. – V. 34. – P. D270–D272.

21. Bohn C., Collier J., Bouloc P. Dispensable PDZ domain of *Escherichia coli* YaeL essential protease // Mol. Microbiol. – 2004. – V. 52, No 4. – P. 427–435.
22. Camacho L.R., Ensergueix D., Perez E., Gicquel B., Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis // Mol. Microbiol. – 1999. – V. 34, No 2. – P. 257–267.
23. Fraering P.C., Ye W., Strub J.M., Dolios G., LaVoie M.J., Ostaszewski B.L., van Dorsse-aer A., Wang R., Selkoe D.J., Wolfe M.S. Purification and characterization of the human gamma-secretase complex // Biochemistry. – 2004. – V. 43, No 30. – P. 9774–9789.
24. Rudner D.Z., Losick R. A sporulation membrane protein tethers the pro- σ^K processing enzyme to its inhibitor and dictates its subcellular localization // Genes Dev. – 2002. – V. 16, No 8. – P. 1007–1018.
25. Beck N.A., Krukonis E.S., DiRita V.J. TcpH influences virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by inhibiting degradation of the transcription activator TcpP // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186, No 24. – P. 8309–8316.
26. Zimmermann P., Meerschaert K., Reekmans G., Leenaerts I., Small J.V., Vandekerckhove J., David G., Gettemans J. PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane // Mol. Cell. – 2002. – V. 9, No 6. – P. 1215–1225.
27. Zhou R., Kroos L. BofA protein inhibits intramembrane proteolysis of pro- σ^K in an inter-compartmental signaling pathway during *Bacillus subtilis* sporulation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101, No 17. – P. 6385–6390.
28. Akiyama Y., Kanehara K., Ito K. RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences // EMBO J. – 2004. – V. 23, No 22. – P. 4434–4442.
29. Bhatt A., Kremer L., Dai A.Z., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. Jr. Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187, No 22. – P. 7596–7606.
30. Rachman H., Strong M., Ulrichs T., Grode L., Schuchhardt J., Mollenkopf H., Kosmiadi G.A., Eisenberg D., Kaufmann S.H. Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis // Infect. Immun. – 2006. – V. 74, No 2. – P. 1233–1242.

Поступила в редакцию
17.03.11

Сабирова Альбина Рушановна – кандидат биологических наук, инженер НИЛ ББФ кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: crazy-albina19@yandex.ru

Рудакова Наталья Леонидовна – кандидат биологических наук, инженер НИЛ ББФ кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: natalialrudakova@gmail.com

Шагимарданова Елена Ильясовна – кандидат биологических наук, инженер НИЛ ББФ кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: rjuka@mail.ru

Балабан Нэлли Павловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ ББФ Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: NellyBalaban@yandex.ru

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru