

# 蛋白酶及其抑制剂关键活性位点研究进展

张杰<sup>1</sup>, 杨玺<sup>1</sup>, 李游山<sup>1,2</sup>

1 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001

2 陕西理工大学 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心, 陕西 汉中 723001

张杰, 杨玺, 李游山. 蛋白酶及其抑制剂关键活性位点研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(2): 561-579.

Zhang J, Yang X, Li YS. Key active sites of proteases and protease inhibitors: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 561-579.

**摘要:** 蛋白酶广泛存在于生物体中, 参与分解蛋白质, 维持生物体正常的生命活动。蛋白酶抑制剂通过与蛋白酶活性位点结合调控靶蛋白酶活性, 从而影响蛋白质代谢。蛋白酶及其抑制剂关键氨基酸的突变, 可以影响其生理功能、稳定性、催化活性、抑制特异性等。通过挖掘自然界蛋白酶及其抑制剂的各种突变体, 分析它们的关键活性位点, 并运用蛋白质工程手段改造和设计活性更强、稳定性更高、特异性更好、环境更友好、成本更低的蛋白酶及其抑制剂, 已成为当前的热点研究之一。文中对近年来蛋白酶及其抑制剂关键活性位点研究进行了简要综述, 以期深化人们对蛋白酶及其抑制剂活性作用机制的认识, 并为蛋白酶及其抑制剂的生物学活性改造研究提供理论参考。

**关键词:** 蛋白酶, 蛋白酶抑制剂, 生理功能, 关键活性位点, 活性改造

## Key active sites of proteases and protease inhibitors: a review

Jie Zhang<sup>1</sup>, Xi Yang<sup>1</sup>, and Youshan Li<sup>1,2</sup>

1 College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

2 Collaborative Innovation Center for Comprehensive Development of Qinba Biological Resources, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

**Abstract:** Proteases are widely found in organisms participating in the decomposition of proteins to maintain the organisms' normal life activities. Protease inhibitors regulate the activities of target proteases by binding to their active sites, thereby affecting protein metabolism. The key amino acid mutations in proteases and protease inhibitors can affect their physiological functions, stability, catalytic activity, and inhibition specificity. More active, stable, specific, environmentally friendly and cheap proteases and protease inhibitors might be obtained by excavating various natural mutants of proteases and protease

**Received:** September 9, 2020; **Accepted:** November 11, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31702187), Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province, China (No. 2018JQ3057), Special Scientific Research Project of Education Department of Shaanxi Province, China (No. 19JK0180), Key Research and Development Plan of Shaanxi Province, China (No. 2019FP-021), Open Project of the State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology (No. sklsgb-2019KF04), High-level Achievement Cultivation Project of Collaborative Innovation Center for Comprehensive Development of Qinba Biological Resources (No. QBXT-17-1).

**Corresponding author:** Youshan Li. Tel: +86-916-2641253; E-mail: li\_youshan@126.com

国家自然科学基金 (No. 31702187), 陕西省自然科学基金基础研究计划 (No. 2018JQ3057), 陕西省教育厅专项科研计划项目 (No. 19JK0180), 陕西省重点研发计划 (No. 2019FP-021), 家蚕基因组生物学国家重点实验室开放课题 (No. sklsgb-2019KF04), 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心高层次成果培育项目 (No. QBXT-17-1) 资助。

网络出版时间: 2020-11-26

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201125.1345.003.html>

inhibitors, analyzing their key active sites by using protein engineering methods. Here, we review the studies on proteases' key active sites and protease inhibitors to deepen the understanding of the active mechanism of proteases and their inhibitors.

**Keywords:** protease, protease inhibitor, physiological function, key active site, activity modification

蛋白酶和蛋白酶抑制剂被广泛应用于农业、工业以及医疗行业。蛋白酶在以水稻为原料生产燃料乙醇和微生物发酵降解豆粕抗营养因子过程中发挥重要作用。植物中蛋白酶抑制剂可以抑制昆虫肠道水解酶,从而保护植物不受农林害虫的侵害。植物源胰蛋白酶抑制剂的失活可提高动物对植物蛋白的利用率,过表达这些蛋白酶抑制剂则有助于培育转基因抗虫作物<sup>[1]</sup>。众所周知,蛋白酶和蛋白酶抑制剂活性异常与人类癌症、病毒感染、凝血等众多疾病有关,可作为研发特异性药物的重要靶点<sup>[2]</sup>。因此,有必要研究蛋白酶及蛋白酶抑制剂的活性作用机制,改善和调节蛋白酶及蛋白酶抑制剂的生物活性。通过对自然界蛋白酶和蛋白酶抑制剂的各种突变体进行挖掘,探究它们的关键活性位点,并运用蛋白质工程手段改造和设计活性更强、稳定性更高、特异性更好、环境更友好、成本更低的蛋白酶和蛋白酶抑制剂,已成为酶和抑制剂领域的研究热点之一。本文从关键活性位点突变对生物学效应的影响、关键活性位点分析、生物工程改造及其应用等方面,对蛋白酶及蛋白酶抑制剂关键活性位点研究进行综述,以期深化人们对蛋白酶及其抑制剂活性作用机制的认识,并为蛋白酶及蛋白酶抑制剂的生物学活性改造研究提供理论参考。

## 1 蛋白酶及蛋白酶抑制剂关键活性位点概述

蛋白酶广泛分布于动物、植物和微生物中,其主要作用是催化蛋白质和多肽水解。蛋白酶对生物体起着重要作用,其活性受到严格的调节和控制,蛋白酶过量表达也会损害机体健康。蛋白酶抑制剂是一类可以适时与靶蛋白酶活性部位或变构部位结合,使蛋白酶活力下降或消失的物质。

蛋白酶和蛋白酶抑制剂共同参与调节机体的许多生理反应。生物界中存在丰富的蛋白酶,同时也存在种类繁多的蛋白酶抑制剂。根据催化中心不同,可将蛋白酶分为丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。根据氨基酸序列的同源性和靶向蛋白酶的不同,蛋白酶抑制剂又可分为丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、天冬氨酸蛋白酶抑制剂以及金属蛋白酶抑制剂<sup>[3]</sup>。

蛋白酶属于大分子生物催化剂,催化反应具有高效性和专一性。它的活性中心包括催化部位和结合部位,催化部位决定酶的催化功能,结合部位负责结合底物,决定酶的特异性。因此,催化中心和底物结合位点的一些氨基酸残基影响着酶活性和底物特异性。蛋白酶使催化中心的蛋白底物肽键水解,生成短肽或游离氨基酸。蛋白酶与底物结合的氨基酸侧链基团的性质、大小和结构均能对蛋白酶底物特异性产生重要影响<sup>[4]</sup>。研究蛋白酶催化中心和底物结合部位的氨基酸有助于改善其催化效率和底物特异性。

蛋白酶抑制剂能够有效抑制靶蛋白酶,其主要原因是蛋白酶抑制剂暴露的反应中心与蛋白酶活性中心结合,形成“抑制剂-酶复合物”,并且蛋白酶抑制剂与靶酶的结合亲和力远远大于底物与酶的结合亲和力。因此,蛋白酶抑制剂优先与靶酶结合,导致靶酶活性中心肽链无法裂解,使得靶酶不能再与其他蛋白酶底物结合,从而失去酶活性。蛋白酶抑制剂通常含有一个或多个结构域,结构域中的一些氨基酸残基为蛋白酶提供接触位点,形成反应中心<sup>[5]</sup>。蛋白酶抑制剂反应中心的氨基酸通常决定了其抑制活性和抑制特异性。此外,很多蛋白酶抑制剂富含半胱氨酸(Cysteine, Cys)残基,形成多对分子内二硫键桥,这些二硫键维

持着蛋白刚性结构的稳定,对蛋白酶抑制剂的生物学活性至关重要。这些关键活性位点的改变皆可能影响蛋白酶抑制剂的活性或特异性。因此,合理设计、改变关键活性位点的氨基酸性质有利于改进蛋白酶抑制剂的抑制活性和抑制特异性。

## 2 蛋白酶的关键活性位点研究

### 2.1 关键活性位点突变对蛋白酶生物学效应的影响

#### 2.1.1 关键活性位点突变对丝氨酸蛋白酶生物学效应的影响

人胰凝乳蛋白酶 C 的氨基酸突变是慢性胰腺炎诱因之一。哺乳动物中慢性胰腺炎 (Chronic pancreatitis, CP) 是以胰腺破坏、消化不良和慢性疼痛为特征的一类疾病。人胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin C, CTRC) 是由胰腺分泌的一种消化性丝氨酸蛋白酶,其主要作用是调节胰蛋白酶激活和水解的平衡,保护胰腺组织结构免受胰蛋白酶过度活化的破坏<sup>[6-7]</sup>。热带钙化性胰腺炎中的 CTRC 基因分析表明,CTRC 基因在慢性胰腺炎发病过程中起重要作用,CTRC 基因突变会增加慢性胰腺炎的发生机率<sup>[8-10]</sup>。对 CTRC 的 8 个天然变异体的研究显示,其中 5 个具有正常酶活性, R29Q 失去催化活性, S239C 的催化活性降低;值得注意的是, G214R 对多肽显色底物的水解活性增强,但对牛酪蛋白或其他天然底物 (人胰蛋白酶原和羧肽酶 A1) 的水解活性显著降低<sup>[11]</sup>。上述研究表明,CTRC 氨基酸突变体 R29Q、S239C、G214R 引起的生理功能紊乱可能是慢性胰腺炎的重要危险因素之一。

#### 2.1.2 关键活性位点突变对天冬氨酸蛋白酶生物学效应的影响

组织蛋白酶 D 中的 D231 残基对其催化活性至关重要。组织蛋白酶 D (Cath-D) 是一种由乳腺癌细胞高度分泌的天冬氨酸蛋白酶,参与多种生理过程,在血管生成、肿瘤发生、转移、侵袭,以及细胞凋亡和增殖等方面都具有重要作用<sup>[12]</sup>。

Cath-D 的催化位点 D231N 突变可使其水解活性降低,但不影响其表达、加工和分泌。Cath-D 的 D231N 突变体转染到 3Y1-Ad12 大鼠肿瘤细胞后仍能促进细胞生长,提示 Cath-D 的有丝分裂活性与其催化活性无关<sup>[13]</sup>。

HIV-1 蛋白酶是一种天冬氨酸蛋白酶,在病毒复制中起重要作用。研究发现, HIV-1 蛋白酶突变与耐药性相关,对 HIV-1 蛋白酶突变相关的耐药性检测有助于改善艾滋病患者的病毒学结果<sup>[14]</sup>。成熟 HIV-1 蛋白酶的活性位点区的 Asp25 和 Asp29 突变会影响其与蛋白酶抑制剂的结合。大多数临床应用的 HIV-1 蛋白酶抑制剂对 D25N 和 D29N 的突变体蛋白具有高度敏感性,与 Asp25 突变相比, Asp29 突变对达鲁那韦 (Darunavir)、阿扎那韦 (Atazanavir)、沙奎那韦 (Saquinavir)、利托那韦 (Ritonavir)、安普那韦 (Amprenavir) 等 5 种临床抑制剂的结合影响较小<sup>[15]</sup>。另有研究显示, HIV-1 蛋白酶的 L76V 突变可能与罗匹那韦 (Lopinavir)、安普那韦和达鲁那韦的临床应用的带来的长期选择效应有关。L76V 突变虽然增加了 HIV 对上述药物的耐药性,但也同时赋予了其对阿扎那韦和沙奎那韦药物的敏感性,长期接受阿扎那韦或沙奎那韦和一种 L76V 选择药物联合用药的患者治愈率显著高于不使用 L76V 选择药物治疗的患者<sup>[16]</sup>。

#### 2.2.3 关键活性位点突变对金属蛋白酶生物学效应的影响

细胞外基质金属蛋白酶 MT1-MMP 突变影响骨组织发育。遗传性溶骨综合征是一种罕见的骨骼疾病,其特征是骨溶解和关节破坏。研究发现,缺失胶原酶会导致骨溶解和关节破坏,因此细胞外基质蛋白水解与骨骼生长发育密切相关<sup>[17]</sup>。MT1-MMP 是一种膜结合基质金属蛋白酶,能够介导细胞外基质成分细胞周蛋白水解。MT1-MMP 缺陷小鼠全身骨质减少,生存率严重下降,说明 MT1-MMP 对骨骼硬组织发育和维持十分重要。已有研究证实,氨基酸突变引起的基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 活性丧失与遗传性溶骨综合征有关,

R101H 和 Y244X 替换导致该酶的底物结合位点和催化位点缺失<sup>[18]</sup>。遗传性溶骨征患者的成纤维细胞中含有丰富的 MMP-2 酶原, MMP-2 活性很低<sup>[19]</sup>。MT1-MMP 是 MMP-2 上游重要的激活剂, 其需要定位到细胞膜上发挥功能。MT1-MMP 在信号肽疏水区的突变 (T17R) 降低了 MT1-MMP 的膜定位, 从而损害了 MMP2 酶原的活化<sup>[19]</sup>。另有研究显示, N-乙基-N-亚硝基脲 (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) 诱变后产生了一个表型不正常的系, 称为“卡通小鼠”, 它在生长和发育方面表现出严重的缺陷; “卡通小鼠”MT1-MMP 的血红素结构域中存在单位点突变 S466P, 该血红素结构域对 MT1-MMP 胶原溶解活性具有重要调节作用; S466P 替换不会导致 MT1-MMP 蛋白水解活性丧失, 但会赋予血红素结构域新的特性, 使其保留在内质网中, 不能运输到细胞表面, 从而导致功能表型丧失<sup>[20]</sup>。

除此之外, 芽孢蛋白 SpoIVFB 保守基序突变阻断转录因子  $\sigma$ K 活性。枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的产孢蛋白 SpoIVFB 是金属蛋白酶家族成员, 其催化中心邻近或在膜内。SpoIVFB 含有金属蛋白酶共有的保守序列“HEXXH”和该家族特有的第二个保守序列“NPDG”, 这两个序列是蛋白酶的催化中心<sup>[21]</sup>。SpoIVFB 可以将膜相关前体蛋白 pro- $\sigma$ K 氨基端的 20 个氨基酸残基切除, 使其转换为成熟的活性转录因子  $\sigma$ K<sup>[22-23]</sup>。在革兰氏阳性枯草芽孢杆菌芽孢形成过程中,  $\sigma$ K 在调控基因表达中起着核心作用。研究表明, HEXXH 基序和 NPDG 基序中的氨基酸替换皆会损害产孢过程中 pro- $\sigma$ K 的加工和  $\sigma$ K 相关基因的表达<sup>[21]</sup>。

## 2.2 蛋白酶关键活性位点分析

### 2.2.1 丝氨酸蛋白酶关键活性位点分析

研究发现, 家蚕丝氨酸蛋白酶 BmSP36、BmSP141 和 BmSP95 的关键活性位点影响底物特异性。家蚕 *Bombyx mori* 是一种重要的鳞翅目经济昆虫。笔者所在研究团队系统鉴定了家蚕基因组中

的丝氨酸蛋白酶基因, 共鉴定到 51 个丝氨酸蛋白酶 (SP) 基因和 92 个丝氨酸蛋白酶同系物 (SPH) 基因。活性位点分析表明, 51 个 SP 的活性部位具有一个典型的催化三联体结构 Ser-His-Asp, 其余 92 个 SPH 的活性部位不具有完整的催化三联体结构, 因此它们可能失去了催化功能<sup>[24]</sup>。笔者所在研究团队对家蚕丝氨酸蛋白酶 BmSP36、BmSP141、BmSP95 的功能和活性位点进行了深入研究。BmSP36 属于胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶, 该酶在中肠上皮中表达并能分泌到中肠腔, 在家蚕发育过程中参与蛋白质的消化。BmSP36 具有完整的催化三联体结构 His57-Asp102-Ser195 和保守的底物特异性结合位点 Gly189、His216 和 Gly226<sup>[25]</sup>。BmSP141 在中肠特异性表达, 参与食物消化过程。多序列比对显示, BmSP141 也具有完整的催化三联体结构 His57-Asp102-Ser195, 其底物特异性结合位点为 Gly189、Val216 和 Ser226, 其中 Gly189 较为保守, Val216 和 Ser226 发生突变可能会改变其底物特异性<sup>[26]</sup>。BmSP95 是一个典型的 Clip 结构域丝氨酸蛋白酶, 它由一个羧基端的胰蛋白酶样的 SP 结构域 (Tryp\_spc) 和一个氨基端 Clip 结构域组成<sup>[27]</sup>。Clip 结构域通常由 37-55 个残基组成, 该结构域中 6 个保守的半胱氨酸残基形成 3 个二硫键, 在昆虫发育和免疫反应中具有重要的作用<sup>[28]</sup>。丝氨酸蛋白酶 BmSP95 在蜕皮和变态过程中表达, 表皮细胞中合成的 BmSP95 蛋白以酶原的形式分泌, 并在蜕皮液中被激活, 参与蜕皮和变态过程中的表皮重塑<sup>[27,29]</sup>。BmSP95 不仅具有完整的催化三联体结构 His57-Asp102-Ser195, 还具有 3 个保守的底物结合位点 Asp189、Gly216 和 Gly226, 该底物结合位点可能决定了蛋白酶底物特异性<sup>[27,30-31]</sup>。

另有研究发现, 布鲁氏锥虫的寡肽酶 B (Oligopeptidase B, OPB) 关键活性位点突变会影响其与催化活性和热稳定性。寡肽酶 B 属于丝氨酸蛋白酶中脯氨酰寡肽酶 (Prolyl oligopeptidase,

POP) 家族成员, 在革兰氏阴性菌、植物及锥虫中皆有发现<sup>[32]</sup>。已有研究表明, OPB 蛋白是布鲁氏锥虫 *Trypanosoma brucei* 的重要毒力因子, 可作为非洲昏睡病的重要治疗靶点<sup>[32]</sup>, 该酶催化结构域中 Glu607、Glu609 和 Glu610 在 OPB 亚家族中高度保守, Glu607、Glu609 是与底物 P1 残基结合的关键残基<sup>[33]</sup>。采用定点诱变方法, 将 Glu607、Glu609 和 Glu610 分别替换为 Gln, 研究这 3 个位点 Glu 残基在 Tb OPB 中的作用<sup>[34]</sup>。结果显示, E607Q 会显著影响 Tb OPB 的  $K_{cat}/K_m$  值, 表明 Glu607 对 Tb OPB 的催化活性至关重要。相比之下, E610Q 对催化性能的影响明显小于 E607Q, 但其 E610Q 突变体在热处理后更容易失活, 提示 Glu610 在维持酶的热稳定中发挥关键作用。

此外, 沙门氏气单胞菌丝氨酸蛋白酶 ASP 的关键活性位点突变可影响其底物选择和蛋白酶水解活性。嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 是一种革兰氏阴性菌, 主要存在于水生环境中与人类疾病密切相关。嗜水气单胞菌的毒力菌株可产生多种细胞外毒素和蛋白酶, 这些蛋白酶的表达和分泌会增加菌株毒力<sup>[35]</sup>。沙门氏气单胞菌 *Aeromonas sobria* 可分泌一种丝氨酸蛋白酶 ASP, 该蛋白酶可以水解宿主细胞防御系统中的关键蛋白质, 参与肠道疾病的发生过程<sup>[36-37]</sup>。研究表明, ASP 的 Arg566 残基具有识别底物 P3 位点的能力, 是决定 ASP 底物选择的关键位点。将蛋白酶 ASP 中 Arg566 替换为 Ala (R566A), 可使 ASP 失去对底物识别的能力, 从而大大降低其对底物蛋白水解效率<sup>[38]</sup>。

### 2.2.2 半胱氨酸蛋白酶关键活性位点分析

基孔肯雅病毒半胱氨酸蛋白酶 NSP2pro、脊髓灰质炎病毒内肽酶 3C 和化脓性链球菌 SPE B 均在病原微生物感染过程中具有重要作用, 它们的活性位点影响蛋白酶水解效率和底物结合。基孔肯雅病毒 (Chikungunya virus, CHIKV) 是一种主要由蚊子传播的节肢动物传染性甲型病毒, 感染后引

起发热、黄斑皮疹、关节痛、头痛寒冷等症状<sup>[39]</sup>。该病毒编码的半胱氨酸蛋白酶 NSP2pro 是一种调节宿主细胞, 控制免疫反应的多功能蛋白, 可作为一种潜在的抗病毒药物靶点<sup>[40-41]</sup>。NSP2pro 晶体结构显示该蛋白由一个 N 端蛋白酶亚结构域和一个 C 端甲基转移酶亚结构域组成, 底物结合裂隙存在于两个亚结构域的界面<sup>[42-43]</sup>。NSP2pro 的两个亚结构域间的柔性环可阻断底物靠近其催化位点和底物结合位点, 该环包含催化位点 His548 和预测的底物结合位点 Trp549 和 Asn547。将 Asn547 替换为 Ala 后导致酶  $K_m$  增加 3 倍, 表明 Asn547 在底物结合和识别中发挥重要作用<sup>[44]</sup>。

脊髓灰质炎是一种人类病毒性疾病, 由脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus, PV) 引起。PV 基因组编码一个 247 kDa 的多蛋白 PV 3ABC, 该多蛋白能被内肽酶 3C 等病毒蛋白酶切割成几种单独或融合蛋白质。脊髓灰质炎病毒 3C 是具有胰凝乳蛋白酶样活性的半胱氨酸蛋白酶, 其分子量为 20 kDa, 由两个反平行的 6 链  $\beta$ -桶结构域组成。活性位点裂隙位于两个结构域交界处, 由催化三联体 His40-Glu71-Cys147 和亲电氧阴离子洞 (Gly145、Gln146、Cys147) 组成<sup>[45]</sup>。活性位点裂隙附近的其他残基可能与稳定活性位点结构以及底物相互作用有关。在大肠杆菌中表达 PV 3ABC 蛋白的过程中, 发现一个 3C 突变体 (L70P), 该突变体的蛋白酶活性丧失。结构分析表明, Leu70 靠近 3C 催化位点, L70P 突变导致 Leu62 和 Leu70 之间无法形成氢键, 引起构象变化, 从而影响催化位点上的底物结合<sup>[46]</sup>。

几乎所有对人类有致病性的化脓性链球菌都表达高度保守的胞外半胱氨酸蛋白酶, 称为链球菌发热性外毒素 B (Streptococcal pyrogenic exotoxin B, SPE B)。许多独立研究表明, 这种酶参与宿主-寄生虫相互作用的一个或多个阶段, 如炎症、软组织入侵以及抑制巨噬细胞清除凋亡细胞<sup>[47]</sup>。该蛋白酶以 40 kDa 的无活性酶原形式存在, 通过自催化作用断裂生成 28 kDa 的活性蛋白

酶<sup>[48-49]</sup>。研究发现, Cys192 参与活性位点形成和酶的催化。C192S 突变后, 突变体蛋白不能通过酶原自催化生成成熟体形式, 致使其对牛酪蛋白、人纤连蛋白和小分子合成底物的水解活性丧失<sup>[50]</sup>。

### 2.2.3 天冬氨酸蛋白酶关键活性位点分析

研究发现, 关键活性位点突变导致天冬氨酸蛋白酶 NapsinA 的活性丧失, 白色念珠菌毒力蛋白酶 Sap7 对天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Pepstatin A 的敏感性增强。与癌症有关的天冬氨酸蛋白酶 NapsinA 在肺 II 型细胞中表达, 参与表面活性蛋白 B (SP-B) 的加工<sup>[51]</sup>。NapsinA 催化中心 Asp 残基突变 (D283N) 可使酶失活, 但不影响其抑制肿瘤形成的能力, 也不影响 NapsinA 的加工、糖基化和细胞内定位<sup>[52]</sup>。此外, 白色念珠菌 *Candida albicans* 是常见的真菌病原体, 广泛存在于人类机体中, 可使宿主罹患念珠菌病。白色念珠菌产生的 3 种最重要的胞外水解酶分别是分泌型天冬氨酸蛋白酶、磷脂酶 B 酶和脂肪酶。SAP 基因家族编码的 10 个分泌型天冬氨酸蛋白酶 (Secreted aspartic proteases, Saps) Sap1-Sap10 都是重要的毒力因子, 其蛋白质大小在 35-50 kDa 之间<sup>[53-54]</sup>。从白色念珠菌 SC5314 中克隆出 SAP7 基因, 并在毕赤酵母中表达出 Sap7 蛋白。鉴于 Sap7 对天冬氨酸蛋白酶抑制剂 Pepstatin A 不敏感, 研究者在 Sap7 活性位点入口附近构建了 M242A、T467A 两个突变体。结果显示, M242A 和 T467A 突变体不仅具有正常的蛋白水解活性, 还获得了对 Pepstatin A 的敏感性, 该发现将有助于开发新型蛋白酶抑制剂<sup>[55]</sup>。

工业上, 天冬氨酸蛋白酶广泛应用于食品、动物饲料、发酵、制药和皮革等领域<sup>[56-57]</sup>。牛凝乳酶是一种天冬氨酸蛋白酶, 可以选择性地裂解牛奶中的  $\kappa$ -酪蛋白, 从而开始凝固以帮助消化。研究发现, 骆驼 *Camelus ferus* 凝乳酶是牛奶的有效凝结剂, 骆驼凝乳酶对牛奶的凝结活性比牛胰凝乳酶高 70%, 而非特异性蛋白酶水解活性仅为牛凝乳酶的 20%, 但牛凝乳酶不能使骆驼奶凝

固<sup>[58]</sup>, 因此, 有必要改进牛凝乳酶和骆驼凝乳酶的催化活性。已有研究证实, 牛凝乳酶表面水合位点有助于稳定凝乳酶- $\kappa$ -酪蛋白复合物, 可以使用分子积分方程理论精确计算牛凝乳酶- $\kappa$ -酪蛋白复合物中单点突变体的相对结合热力学<sup>[59]</sup>。在牛和骆驼凝乳酶结合位点处的 12 个单位点突变体中, D112E、K221V、Q242R、Q278K、E290D、H292N、Q294E 和 K295L 等 8 个突变体对理解结合热力学的差异极为重要。牛凝乳酶中的 Q242R 和 Q278K 突变体更有利于  $\kappa$ -酪蛋白结合, 而骆驼凝乳酶中 D112E、K221V 和 K295L 突变体更有利于  $\kappa$ -酪蛋白结合<sup>[60]</sup>。

### 2.2.4 金属蛋白酶关键活性位点分析

基质金属蛋白酶 MMPs 结构域 II/III 突变导致酶失活。基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMPs) 是结构中含  $Zn^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  的蛋白水解酶类, 主要参与细胞外基质的代谢, 在血管生成、胚胎发生、形态发生、伤口修复等多种生理过程, 以及心肌梗塞、纤维化疾病、骨关节炎、癌症、组织重塑等多种病理过程<sup>[61]</sup>。MMPs 在蛋白质中存在 3 个结构域: 结构域 I 包括信号序列和前肽<sup>[62]</sup>; 结构域 II 包含活性位点和催化锌结合区<sup>[63]</sup>; 结构域 III 具有与血红蛋白同源的羧基末端, 可能作为天然抑制剂 (如 TIMP) 结合位点的一部分发挥作用<sup>[63-64]</sup>。有研究指出, 结构域 III 使结构域 II 中的活性位点具有底物特异性<sup>[62]</sup>。在蛋白质浓度较高的情况下, 结构域 II/III 交界处的自水解效应会阻碍全长活性胶原酶 (即 II+III 结构域) 的结晶过程<sup>[65]</sup>。因此, 可通过改变该区域可能的靶肽键, 生成一种无活性的胶原酶。将 His149 替换为 Leu、Asp151 替换为 Asn, 获得胶原酶的双突变体 H149L/D151N, 进而耗尽非催化性锌原子, 无法裂解合成的底物。此外, 与野生型胶原酶相比, 单位点突变体 I251S 对蛋白水解的抗性增强<sup>[65]</sup>。

另有研究显示, 金属肽酶 (Metzincins) 中蛋白酶 C 的 Met 替换与蛋白水解活性相关。Metzincins 主要作用是参与非特异性蛋白质降解, 如摄取蛋

白质的消化和组织发育、维持和重塑等<sup>[66]</sup>。Metzincins 超家族包括基质金属蛋白酶 (MMP)、去整合素和金属蛋白酶 (ADAM) 以及具有血小板反应素基序 (ADAMTS) 的 ADAM<sup>[67]</sup>。Metzincins 是一类多结构域蛋白, 具有大约 130–260 个残基的球状催化结构域。该催化结构域存在共同的核心结构, 即一个长的锌结合共有基序 HEXXHXXGXX (H/D) 和一个含有甲硫氨酸的转角 (Met-turn), 其中 3 种 His 是锌配体, Glu 是催化位点。位于这个共有基序下游的 Met 是完全保守的, 该 Met 对蛋白酶水解活性或结构完整性很重要<sup>[66,68]</sup>。菊欧氏杆菌 *Erwinia chrysanthemi* 蛋白酶 C 是 Metzincins 家族中 Serralysin 亚家族的一员, 其共有基序下游保守的 Met226 被 Ile, Ala 和 His 所取代后, 蛋白酶的水解活性显著降低。此外, 将其催化位点 Glu189 替换为 Ala 后, 突变体蛋白 E189A 完全失活, 该突变体蛋白易于提纯和结晶<sup>[69]</sup>。晶体结构解析显示, Met 的替换可使锌结合基序的几何结构扭曲, 进而导致多肽链大片段的柔性增加, 蛋白水解活性丧失<sup>[69]</sup>。

金属酶都含有 1–2 锌离子。在许多单锌酶中, 皆有一个能形成  $\alpha$ -螺旋的 HExxH 基序, 该基序是与  $Zn^{2+}$  配位的活性位点。大鼠二肽基肽酶 (DPP III) 也是一种单锌酶, 该酶具有一个独特的锌结合基序“HELLGH... E” (残基 450–455, 508), 该基序为与  $Zn^{2+}$  配位的活性位点<sup>[70]</sup>。定点诱变实验表明, 锌结合基序对酶活性非常重要, His450、His455 和 Glu508 参与了锌配位, 并且 Glu451 也参与了催化活性<sup>[70]</sup>。删除 apo-DPP III 锌结合基序中的 Leu453 获得 apo-Leu453-del-DPP III, 该酶的活性丧失, 可见和电子顺磁共振谱显示,  $Cu^{2+}$  可与其基序部分“HELGH”结合<sup>[71]</sup>。

## 2.3 蛋白酶关键活性位点的生物工程改造及其应用

### 2.3.1 丝氨酸蛋白酶活性改造

纳豆激酶 (Nattokinase, NK) 最早从日本传

统食物“纳豆”中鉴定出来, 是枯草杆菌蛋白酶家族的丝氨酸蛋白酶。NK 是一种高效的纤溶酶, 不仅可以用于治疗血栓还可以预防疾病, 如抗高血压、抗动脉粥样硬化、降血脂和神经保护作用等<sup>[72–73]</sup>。NK 作为一种治疗心血管疾病的口服药物, 它必须克服胃肠道的酸性环境。因此, 为提高 NK 的耐酸性, Liu 等采用定点诱变技术构建了 11 个突变体, 从中筛选出 4 个具有独特的催化性能的单位点突变体<sup>[74]</sup>。结果表明, Q59E 增加了比活性, S78T 提高了酸稳定性, Y217K 增强了酸稳定性和热稳定性, N218D 改善了热稳定性<sup>[74]</sup>。继续构建多位点突变体, 得到了具有较好的酸稳定性、催化效率和热稳定性的突变体。突变体 SY (S78T/Y271K) 在低 pH 下具有最佳的耐酸性能和较高的活性, QN (Q59E/N218D) 和 QSN (Q59E/S78T/N218D) 具有最佳的热稳定性, 而 QYN (Q59E/Y271K/N218D) 具有较好的耐酸性、催化效率和热稳定性<sup>[74]</sup>。

### 2.3.2 半胱氨酸蛋白酶活性改造

半胱氨酸蛋白酶 Casp6 活性位点突变与阿尔茨海默病及年龄依赖性认知障碍相关, 该酶中的 3 个 Arg 突变会显著降低其底物亲和力。半胱氨酸蛋白酶 Caspase-6 (Casp6) 是参与调节细胞死亡、控制炎症反应和免疫反应的 Caspase 家族的成员, 对宿主防御起着重要作用<sup>[75–76]</sup>。Casp6 是阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 和年龄依赖性认知障碍的潜在治疗靶点<sup>[77–78]</sup>。对 Casp6 中两个罕见的氨基酸突变体 R65W 和 G66R 研究发现, Casp6-G66R 和 Casp6-R65W 会降低其与底物的结合能力, 从而使 Casp6 的催化活性大大降低。另外, 与野生型 Casp6 相比, 这两种 Casp6 突变体在转染的哺乳动物细胞中均不稳定且无活性<sup>[79]</sup>。除底物结合位点之外, Caspase 结构中还存在其他影响其底物特异性的位点。外结合位点是远离蛋白质底物结合沟, 且能影响蛋白质结构或功能的位点。外结合位点在 Caspase 招募、接合、定

向底物中发挥重要作用<sup>[80]</sup>。Casp6N 端结构域 NTD (残基 23–45) 内的三精氨酸基序 (42RRR44) 可作为外结合位点发挥作用, 参与 Casp6 对蛋白底物的招募过程。当 42RRR44 受损, 会大大减弱 Casp6 的底物亲和力。通过位点诱变技术, 取代 Casp6 中的 Arg42、Arg43、Arg44 均能显著改变蛋白质底物水解速率<sup>[81]</sup>。

研究表明, 破坏组织蛋白酶 B 中的闭塞环结构可提高其与胰抑素的亲和力。半胱氨酸蛋白酶中的组织蛋白酶 B (Cath-B) 是木瓜蛋白酶超家族成员之一, 既可作为内肽酶又可以作为肽基二肽酶。Cath-B 在癌症发生过程中有重要作用, 如控制肿瘤生长、迁移、侵袭, 血管生成和转移瘤发展等<sup>[82–83]</sup>。晶体结构解析发现, 与木瓜蛋白酶超家族其他成员相比, Cath-B 含有一种独特的“闭塞环”结构, 将位于界面区“顶部”的活性位点裂隙封闭在该环的后方, 阻碍了胰抑素与 Cath-B 活性位点的结合, 这似乎有利于具有两个羧基末端的肽底物结合到易裂解的肽键上。闭塞环中的 His110 和 His111 可以为多肽底物的羧基端羧基基团提供带正电荷的锚点。这些结构特征解释了组织蛋白酶 B 的二肽基羧肽酶活性<sup>[84]</sup>。将 His110 突变为 Ala (H110A) 破坏 His110 和 Asp22 之间的盐桥, 增加了“封闭环”的流动性, 有助于胰抑素进入酶的活性部位, 抑制 Cath-B 的活性<sup>[85]</sup>。删除 Cath-B 中的“闭塞环”片段 (Cys108–Cys119 残基), 并于毕赤酵母中表达得到二硫键缺失突变体 M1。与野生型组织蛋白酶 B 相比, 突变体 M1 仍具有内肽酶活性, 但无外肽酶活性, 且其对胰抑素的亲和力提高了 40 倍以上<sup>[86]</sup>。大多数组织蛋白酶 B 相关数据是通过研究动物获得的, 关于植物组织蛋白酶 B 的酶学研究较少。植物组织蛋白酶 B 样蛋白酶的“闭塞环”比动物短, 仅包含一个 His 残基<sup>[87]</sup>。从模式生物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中鉴定出 3 个组织蛋白酶 B: AtCathB1、AtCathB2 和 AtCathB3。AtCathB1 缺乏水解活性,

AtCathB2 和 AtCathB3 具有水解活性和底物特异性。通过定点诱变获得两个 AtCathB2 突变体 (G336E、H207A), 其中 G336E 改变了 S2 亚位点的底物结合特性, 该突变体对 Z-Arg-Arg-MCA 底物的催化效率显著高于野生型。H207A 能影响 AtCathB2 的内肽酶活性, 其切割 Z-Phe-Arg-MCA 和 Z-Arg-Arg-MCA 底物的  $K_{cat}/K_m$  值比野生型低 50 倍<sup>[88]</sup>。

除组织蛋白酶 B 之外, 肝片吸虫组织蛋白酶 L5 中的 L69Y 突变可显著提高底物水解能力。组织蛋白酶 L (Cath-L) 也属于类木瓜半胱氨酸蛋白酶超家族。成年肝片吸虫 *Fasciola hepatica* 分泌大量的组织蛋白酶 L 样蛋白酶, 与组织入侵、摄食、免疫逃避或卵壳形成等活动有关, 可作为合理设计疫苗的靶标<sup>[89–90]</sup>。肝片吸虫的组织蛋白酶 L5 (FhCatL5) 是理论分子量为 37.1 kDa 的蛋白质, 其对 P2 位置含有脯氨酸的底物没有显著的催化活性<sup>[91]</sup>。研究表明, 组织蛋白酶 L5 中的单个氨基酸取代可以影响肝片吸虫组织蛋白酶的底物特异性。通过点突变构建了 FhCatL5 (L69Y) 突变体, 该突变体与野生型组织蛋白酶 L5 相比, 裂解含 P2 脯氨酸的底物的能力显著提高<sup>[91]</sup>。

### 2.3.3 天冬氨酸蛋白酶活性改造

Guo 等从嗜酸真菌 *Bispora* sp. MEY-1 中克隆了一个天冬氨酸蛋白酶基因 *Bsapa*, 并使其在毕赤酵母中成功表达<sup>[92]</sup>。重组 BsAPA 在 pH 3.0 和 75 °C 时表现出最高的活性, 在 70 °C 及以下保持稳定, 表明 BsAPA 具有较高的热稳定性。然而, 热失活仍然限制了 BsAPA 的应用。为了进一步提高 BsAPA 的热稳定性, 研究者对该酶自催化位点 (Leu205–Phe206) 及其附近结构进行分析, 并构建 BsAPA 突变体。与野生型相比, BsAPA 的单位点突变体蛋白 F193W、K204P、A371V 在 75 °C 下的半衰期分别提高了 0.5 倍、0.2 倍和 0.3 倍, 三位点突变体蛋白 (F193W/K204P/A371V) 在 80 °C 时半衰期增加了 1.5 倍,  $T_m$  提高了 10.7 °C<sup>[92]</sup>。



该结果表明,天冬氨酸蛋白酶自催化降低了酶的热稳定性,对自催化位点附近定向诱变能够有效提高天冬氨酸蛋白酶热稳定性。

胶原蛋白是一种纤维蛋白,在生物结构中具有重要作用,明胶是暂时存在组织中的变性胶原蛋白,与组织重塑、组织损伤引起的炎症有关<sup>[93-94]</sup>。可以用温和的酸处理提取胶原蛋白,并且在酸提取过程中添加蛋白酶可提高胶原蛋白的产量。明胶广泛用于食品、制药、化妆品等行业。猪 *Sus scrofa* 胃蛋白酶和人组织蛋白酶 D 具有高度的序列一致性,因此,通过定点突变改变猪胃蛋白酶的底物特异性,选择少数几个位点切割牛皮胶原可得到高质量的明胶<sup>[95]</sup>。野生型胃蛋白酶可以切割牛 I 型胶原的多肽底物 (SGGYDLSFLPQQPQE),其切割位点主要位于 Asp-Leu、Leu-Ser 和 Phe-Leu 之间,但其切割 Ser-Phe 位点的速率明显较低。以 Val 和 Met 分别替代胃蛋白酶 S2 亚位点中的 T222 和 E287 获得双突变体蛋白 T222V/E287M,该双突变体的  $K_{cat}/K_m$  比野生型胃蛋白酶高 2-4 倍,其切割 Ser-Phe 的速率比野生型高 20 倍。双突变体蛋白 F111T/L112F 切割 Leu-Ser 位点的速率比野生型高 23 倍<sup>[96]</sup>。

### 3 蛋白酶抑制剂的关键活性位点研究

#### 3.1 关键活性位点突变对蛋白酶抑制剂生物学效应的影响

脑卒中的形成与蛋白质 C 抑制剂氨基酸突变有关。脑卒中是导致儿童病死率增高的主要原因之一。脑卒中的形成可能与蛋白 C 抑制剂 (Protein C inhibitor, PCI) 基因的改变有关。蛋白质 C 抑制剂是一种肝素依赖性丝氨酸蛋白酶抑制剂,存在于人血浆、尿液等体液中,除了能抑制蛋白 C 活性外,还可以抑制凝血酶、Xa 因子、XIa 因子、尿激酶等,在各物种的多个组织器官的血栓形成和止血中发挥着重要作用<sup>[97-98]</sup>。儿童卒中患者中蛋白质 C 抑制剂基因突变分析显示,第 2 外显子的核苷酸 6760 处存在 G 到 A 的错义突变,导

致 Ser 突变为 Asn (S188N),在该儿童父亲和其他骨髓移植后卒中儿童中也发现了同样的改变<sup>[99]</sup>。

#### 3.2 蛋白酶抑制剂关键活性位点分析

##### 3.2.1 丝氨酸蛋白酶抑制剂关键活性位点分析

鸡卵粘蛋白存在于鸟类的蛋清中,对多种丝氨酸蛋白酶有抑制作用。鸡卵粘蛋白 (Chicken ovomucoid, OMCHI) 由 3 个串联重复的 Kazal 同源结构域组成,分别是第一结构域 OMCHI1 (1-68)、第二结构域 OMCHI2 (65-130) 和第三结构域 OMCHI3 (131-186),每个结构域都有一个抑制丝氨酸蛋白酶的实际或假定反应位点<sup>[100]</sup>。目前以 OMCHI3 的研究最为广泛,将其 P1 位点残基 Ala16 替换为 Met 或 Lys 位点,突变体 A16M 和 A16K 分别获得了对胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶的抑制活性,提示 P1 位点是抑制特异性的主要决定因素<sup>[101]</sup>。

笔者所在研究团队从家蚕基因组序列鉴定出 80 个丝氨酸蛋白酶抑制剂 (SPI) 基因,分别命名为 BmSPI1-BmSPI80,从这些丝氨酸蛋白酶抑制剂中共鉴定到 10 种 SPI 结构域 (Serpine、Kunitz\_BPTI、Kazal、TIL、Amfpi、Bowman-Birk、Antistatin、WAP、Pacifast 和 Alpha-macroglobulin)<sup>[102]</sup>。进一步研究发现,家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 BmSPI38 和 BmSPI39 具有一个独特的 TIL (Trypsin inhibitor-like cysteine-rich domain) 结构域,它们能够抑制球孢白僵菌分泌的毒力蛋白酶 CDEP-1 的活性,抑制球孢白僵菌分生孢子的萌发,增强家蚕的抗真菌能力<sup>[103-104]</sup>。蚕丝中含有丰富的蛋白酶抑制剂,以 BmSPI39 为代表的 TIL 类蛋白酶抑制剂可以随泌丝过程进入茧层中,赋予蚕茧很强的抗微生物蛋白酶水解特性,为茧中蛹的发育提供长效保护<sup>[105-108]</sup>。多数 TIL 家族蛋白酶抑制剂的 TIL 结构域中含有 10 个保守的 Cys 残基,形成 5 对二硫键,抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶等哺乳动物源的蛋白酶<sup>[109-111]</sup>。而笔者研究发现,BmSPI37、BmSPI38 和 BmSPI39 的 TIL 结构域中缺少第 2 位和第 6 位 Cys 残基,它们皆可强

烈抑制微生物蛋白酶活性,但对胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶无抑制作用<sup>[112-113]</sup>。众所周知,丝氨酸蛋白酶抑制剂的抑制特异性通常由其反应中心的 P1 氨基酸残基决定,因此,通过替换 P1 残基来改变抑制特异性是蛋白酶抑制剂的共同特征。然而,日本学者将 BmFPI-F 的 P1 残基 Thr29 替换为不同理化性质的氨基酸 (Glu、Arg、Gly、Leu、Met 和 Phe) 没有改变其抑制特异性,该抑制剂也是带有一个含有 8 个保守的半胱氨酸残基的 TIL 结构域<sup>[114]</sup>。因此,笔者推测除 P1 残基以外其他氨基酸也可能决定 TIL 型蛋白酶抑制剂的特异性。生物信息学分析提示 BmSPI38 和 BmSPI39 中的 Cys<sup>2nd</sup> 和 Cys<sup>6th</sup> 缺失可能是它们获得对微生物蛋白酶抑制活性的重要原因。因此,笔者通过定点突变技术在 BmSPI38 和 BmSPI39 相应位点引入 Cys<sup>2nd</sup> 和 Cys<sup>6th</sup>,结果显示 Cys 的引入不仅会影响 BmSPI38 和 BmSPI39 的多聚化状态,还会显著降低它们对微生物蛋白酶的抑制活性<sup>[112]</sup>。突变前后的 BmSPI39 三维结构分析显示,两个二硫键桥 (D38C-L58C 和 C40-C54) 形成一个稳定的刚性区域,P1 残基 A56 位于中间,使 BmSPI39 (D38C/L58C) 反应中心的柔性降低,进而影响其抑制特异性和活性<sup>[112]</sup>。进一步对已报道的 TIL 类蛋白酶抑制剂序列特征和活性进行系统归纳,发现该类抑制剂的抑制特异性是有一定规律的,TIL 类蛋白酶抑制剂的抑制活性和特异性可能由这两个缺失的半胱氨酸 (Cys<sup>2nd</sup> 和 Cys<sup>6th</sup>) 和反应中心中 P1 和 P1'氨基酸残基的理化性质共同决定<sup>[112]</sup>。有鉴于此,笔者在引入或不引入 Cys<sup>2nd</sup> 和 Cys<sup>6th</sup> 的基础上对 BmSPI38 和 BmSPI39 中的 P1 和 P1'残基进行了饱和突变,现已取得一些可喜的研究进展,获得突变体蛋白 200 余个,有望实现 TIL 类蛋白酶抑制剂活性和特异性的定向改造 (数据尚未发表)。

### 3.2.2 半胱氨酸蛋白酶抑制剂关键活性位点分析

人胱抑素 C (Human cystatin C, HCC) 属于胱抑素超家族 II 亚家族,是分子量相对较小的碱

性单链淀粉样蛋白,能有效抑制半胱氨酸蛋白酶,参与免疫调节和细胞凋亡,与人类肿瘤恶性发展相关,可作为药物开发研究的生物标志物<sup>[115-117]</sup>。HCC 通过三维结构域 ( $\alpha$ -螺旋,两个  $\beta$  链和 L1 环) 交换机制形成二聚体而失去抑制活性,HCC 中 Val57 残基位于 L1 环顶部,可能是二聚体形成的关键<sup>[118-119]</sup>。用 Asn、Asp 和 Pro 替换 Val57 残基后发现,V57D 和 V57N 突变降低二聚体形成,而 V57P 突变可有效地形成二聚体。其中,V57D 突变增强了 L1 环的稳定性,使 HCC 分子保持单体形式,从而保持其对木瓜蛋白酶的抑制活性<sup>[120-121]</sup>。引入一个新的二硫键桥 (L47C-G69C) 可消除三维结构域交换,从而实现其单体状态的稳定性,该突变体显著降低了 HCC 二聚体化作用和蛋白酶原纤维形成,但不改变对木瓜蛋白酶的抑制作用<sup>[122]</sup>。

此外,家蚕中也有半胱氨酸蛋白酶抑制剂关键活性位点的研究报道。家蚕 Serpin18 实为一种独特的半胱氨酸蛋白酶抑制剂。典型的丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpins 构象包括 9 个  $\alpha$ -螺旋、3 个反平行  $\beta$ -折叠片和 1 个反应中心环 (Reactive center loop, RCL)。RCL 位于羧基末端附近,由约 20 个氨基酸组成,充当蛋白酶结合和切割的诱饵。笔者所在研究团队发现 Serpin18 的 RCL 只有 13 个氨基酸,比典型 Serpins 短约 7 个氨基酸,因此推测 Serpin18 具有独特的靶向特异性<sup>[123]</sup>。用胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、枯草杆菌素、蛋白酶 K 和木瓜蛋白酶与抑制剂一起孵育后发现,Serpin18 对丝氨酸蛋白酶几乎没有抑制活性,但对木瓜蛋白酶的水解活性达到 90%,表明 Serpin18 可能是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,而非丝氨酸蛋白酶抑制剂<sup>[124]</sup>。丝素酶是一种组织蛋白酶 L 样半胱氨酸蛋白酶,Serpin18 可以抑制丝素酶活性,提示其可能在家蚕发育过程中通过调节丝素酶活性来保护丝蛋白免受降解<sup>[124-125]</sup>。对反应中心的 3 个暴露残基 (Ser360、Val361 和 Val362) 进行定点突变,与野生型相比,S360A

和 V361G 突变体的抑制活性变化不大, 而 V362G 和 V362T 突变体的抑制活性显著降低<sup>[124]</sup>。

### 3.2.3 金属蛋白酶抑制剂关键活性位点分析

Sorsby 眼底营养不良 (Sorsby fundus dystrophy, SFD) 是一种中枢视网膜的常染色体显性遗传病, 由金属蛋白酶组织抑制剂 TIMP3 基因突变引起<sup>[126]</sup>。SFD 主要影响脉络膜, 可引发脉络膜新生血管萎缩, 形成严重的视力损害, 而脉络膜是一种基底膜与细胞外基质组成的多层结构<sup>[127-128]</sup>。TIMP 是基质金属蛋白酶 (MMPs) 的天然抑制剂, 调节 MMPs 和细胞外基质之间的平衡。小鼠 TIMP3 是由 211 个氨基酸组成的分泌蛋白, 具有 12 个进化上保守的 Cys 残基, 形成 6 个分子内二硫键桥<sup>[129]</sup>。TIMP3 在决定细胞形态的通路中发挥功能, TIMP3 中特定位点突变 (S156C、G166C、G167C、Y168C、S181C) 会导致该蛋白羧基端可能存在未配对的 Cys 残基, 从而使 TIMP3 丧失功能, 引发 SFD<sup>[130-131]</sup>。在一个 SFD 家族中发现了新的错义突变 (H158R), 并且该突变不会产生未配对的半胱氨酸残基<sup>[132]</sup>。已有研究证实, His158 是大多数脊椎动物 TIMP 同源物中进化保守的残基, H158R 突变会破坏 TIMP3 的功能<sup>[132]</sup>。总之, 对 TIMP3 关键位点异常突变的研究有助于进一步了解 SFD 的发病机制。

## 3.3 蛋白酶抑制剂关键活性位点的生物工程改造及其应用

### 3.3.1 丝氨酸蛋白酶抑制剂关键活性位点改造和应用

凝血是防止受伤过程中过度失血的重要生理过程, 凝血可分为 3 种途径: 内在途径、外在途径和共同途径。内源性凝血因子作为开发低出血风险抗凝药物的替代靶点, 已越来越受到研究人员的关注<sup>[133-134]</sup>。从金环蛇 *Bungarus fasciatus* 的毒液中分离鉴定的 Kunitz-type 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Fasxiator 能够选择性地抑制人凝血酶 FXIa 的活性<sup>[135]</sup>。通过选择性点突变设计了一系

列突变体以提高重组 Fasxiator 的抑制活性和特异性。与野生型相比, 突变体 N17R 和 L19E 抑制活性提高了约 1 000 倍, 突变体在人血浆中的抗凝活性比在小鼠血浆中的强 10 倍左右, 还可以延长 FeCl<sub>3</sub> 致血栓形成模型小鼠的颈动脉闭塞时间<sup>[135]</sup>。

### 3.3.2 天冬氨酸蛋白酶抑制剂关键活性位点改造和应用

猪蛔虫 *Ascaris suum* 主要感染猪, 但也会引起人类疾病。作为其在宿主肠道生存机制的一部分, 猪蛔虫会产生许多蛋白酶抑制剂, 包括分子量为 17 kDa 胃蛋白酶抑制剂-3 (Pepsin inhibitor-3, PI3)<sup>[136]</sup>。PI3 可竞争性的抑制胃蛋白酶、胃亚蛋白酶和组织蛋白酶等天冬氨酸蛋白酶活性。PI3-猪胃蛋白酶复合体三维结构显示, PI3 与酶有两个接触区域。PI-3 的氨基端前 3 个残基 (QFL) 可以与胃蛋白酶的活性位点裂隙一侧的氨基酸残基 70-82 配对, 并且 PI-3 羧基端多脯氨酸螺旋 (残基 138I-142I) 可以与胃蛋白酶的羧基端结构域中  $\beta$ -发夹环 (残基 289-294) 形成范德华接触<sup>[137]</sup>。对这两个区域进行突变分析以评估它们对 PI3 的结合亲和力的贡献, 结果表明, 总体上多脯氨酸突变 (P143A) 对所有测试的天冬氨酸蛋白酶的  $K_i$  值影响比较有限。相较于野生型, Q1L 突变体对恶性疟原虫的血浆蛋白酶 (PfPM2) 的  $K_i$  值降低了 200 倍<sup>[138]</sup>。

## 4 总结与展望

蛋白酶及其抑制剂与生物体生命活动密切相关, 广泛应用于农业、工业以及医疗行业。蛋白酶及其抑制剂的突变会影响其生物学效应, 对蛋白酶及其抑制剂的关键活性位点进行分析, 不仅有利于深化人们对其活性作用机制的认识, 还有助于其生物工程改造及应用。笔者对已报道的蛋白酶 (表 1) 和蛋白酶抑制剂 (表 2) 的关键活性位点研究进行了简要汇总, 发现氨基酸突变大多

发生在蛋白酶的催化位点和蛋白酶抑制剂的反应中心附近,随之引起生理功能失调或活性改变。目前,定点突变依然是进行蛋白酶及其抑制剂活性改造的有效手段之一。活性改造不仅可以提高蛋白酶的催化效率和稳定性,也可以改变蛋白酶抑制剂的抑制活性和特异性。大量的研究显示,

蛋白酶关键活性位点主要分布于催化位点和底物结合位点,蛋白酶抑制剂关键活性位点主要存在于反应中心内。除此之外,多聚体蛋白的相互作用界面、维持蛋白刚性结构的二硫键桥、游离的Cys 残基等都可能影响蛋白酶抑制剂的活性和抑制特异性,但相关研究报道较少,还需进一步探究。

表 1 蛋白酶的关键活性位点

Table 1 Key active sites of proteases

Proteases	Species	Functions	Key sites	Classifications	References
CTRC	<i>Homo sapiens</i>	Digestive serine protease	R29, G214, S239	Serine protease	[11]
Cath-D	<i>H. sapiens</i>	Endopeptidase of lysosome	D231	Aspartic protease	[13]
HIV-1 Protease	Human immunodeficiency virus	Protein precursors that lyse Virus particles	D25, D29, L76	Aspartic protease	[15–16]
MMPs	<i>H. sapiens</i>	Zinc dependent Endopeptidase	H149, D151, I251	Metalloproteinase	[65]
MT1-MMP	<i>H. sapiens</i>	Connective tissue metabolism	T17, S466	Metalloproteinase	[19–20]
SpoIVFB	<i>B. subtilis</i>	Pro- $\sigma$ K processing enzymes	E44, E44, D137	Metalloproteinase	[21]
BmSP36	<i>B. mori</i>	Digestive serine protease	H57, D102, S195, G189, H216, G226	Serine protease	[25]
BmSP141	<i>B. mori</i>	Digestive serine protease	H57, D102, S195, G189, V216, S226	Serine protease	[26]
BmSP95	<i>B. mori</i>	Be involved in molting and metamorphosis	H57, D102, S195, D189, G216, G226	Serine protease	[27]
OPB	<i>T. brucei</i>	A virulence factor and therapeutic target in African sleeping sickness	E607, E609, E610	Serine protease	[33–34]
ASP	<i>A. sobria</i>	Destroy host defense	R566	Serine protease	[38]
NSP2pro	Chikungunya virus	Protein processing	H548, W549, N547	Cysteine protease	[44]
PV 3C	<i>H. sapiens</i>	Cleavage polyproteins	L70	Cysteine protease	[46]
SPE B	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Substrate hydrolytic protease	C192	Cysteine protease	[50]
NapsinA	<i>H. sapiens</i>	Proteolytic enzymes of surfactant precursors	D283	Aspartic protease	[52]
Sap7	<i>C. albicans</i>	Extracellular hydrolase	M242, T467	Aspartic protease	[55]
Chymosin	<i>Bos taurus</i>	Hydrolyze $\kappa$ -casein	Q242, Q278	Aspartic protease	[60]
Chymosin	<i>C. ferus</i>	Hydrolyze $\kappa$ -casein	D112, K221, K295	Aspartic protease	[58, 60]
Protease C	<i>E. chrysanthemi</i>	Unspecific protein degradation	M226, E189	Metalloproteinase	[69]
DPP III	<i>Rattus norvegicus</i>	Zinc metallopeptidase	H450, E451, L453, H455, E508	Metalloproteinase	[71]
NK	<i>Bacillus natto</i>	Fibrinolytic enzyme	Q59, S78, Y217, N218	Serine protease	[74]
Caspase-6	<i>H. sapiens</i>	Regulatory protease	G66, R65, R42, R43, R44	Cysteine protease	[79,81]
Cath-B	<i>H. sapiens</i>	Endopeptidase and exopeptidase	H110, C108, C119	Cysteine protease	[85,86]
AtCathB2	<i>A. thaliana</i>	Endopeptidase and exopeptidase	G336, H207	Cysteine protease	[88]
FhCatL5	<i>F. hepatica</i>	Cleavage of proline substrate	L69	Cysteine protease	[91]
BsAPA	<i>B. sp. MEY-1</i>	Thermostable hydrolase	F193, K204, A371	Aspartic protease	[92]
Pepsin	<i>S. scrofa</i>	Digestive protease	T222, E287, F111, L112	Aspartic protease	[96]

表 2 蛋白酶抑制剂的关键活性位点

Table 2 Key active sites of protease inhibitors

Protease inhibitors	Species	Functions	Key sites	Classifications	References
PCI	<i>H. sapiens</i>	Heparin-dependent serine protease inhibitor	S188	Serine protease inhibitor	[99]
OMCHI3	<i>Gallus gallus</i>	Trypsin and chymotrypsin inhibitors	A16	Serine protease inhibitor	[101]
BmSPI37	<i>B. mori</i>	Microbial protease inhibitors	D38, F58, T56, A57	Serine protease inhibitor	[113]
BmSPI38	<i>B. mori</i>	Microbial protease inhibitors	D36, L56, G54, A55	Serine protease inhibitor	[112]
BmSPI39	<i>B. mori</i>	Microbial protease inhibitors	D38, L58, A56, A57	Serine protease inhibitor	[112]
Cystatin C	<i>H. sapiens</i>	Regulate cysteine protease activity	V57, C47, C69	Cysteine protease inhibitor	[118,120,122]
Serpin18	<i>B. mori</i>	Regulating fibroinase activity	V362	Cysteine protease inhibitor	[124]
TIMP3	<i>Mus musculus</i>	MMPs inhibitors	S156, H158, G166, G167, Y168, S181	Metalloproteinase inhibitor	[130-132]
Fasxiator	<i>B. fasciatus</i>	FXIa inhibitor	N17, L19	Serine protease inhibitor	[135]
PI-3	<i>A. suum</i>	Acid protease inhibitor	Q1	Aspartic protease inhibitor	[138]

蛋白酶活性失调与许多人类疾病有关,蛋白酶关键位点突变可作为干预疾病治疗的靶点,并且有利于开发新型蛋白酶抑制剂。关键活性位点分析不仅有助于了解发病机制,更有利于在医药领域上针对性地进行新药设计和研制。因此,与人类疾病预防和药物开发有关的蛋白酶关键活性位点研究始终是炙手可热的研究热点。此外,蛋白酶及其抑制剂在食品工业上的应用也非常重要,主要体现在调节蛋白酶的水解效率和稳定性上,有利于提高食品安全性和降低成本。因此,基于蛋白酶及其抑制剂的结构深入研究其关键活性位点,进而对蛋白酶和蛋白酶抑制剂进行生物工程改造,实现医药和食品上的生产应用是具有广阔发展潜力的研究方向。除此之外,蛋白酶及其抑制剂关键活性位点分析和改造在农林害虫防治等方面还有待进一步研究。迄今为止,有关蛋白酶关键活性位点的研究比蛋白酶抑制剂关键活性位点的研究更加丰富和深入,提示蛋白酶抑制剂关键活性位点研究还有着巨大的可挖掘空间。笔者对家蚕 TIL 类蛋白酶抑制剂关键活性位点的研究已经取得一些可喜的研究进展,有望实现 TIL 类蛋白酶抑制剂活性和特异性的定向改造。本文对近年来蛋白酶及其抑制剂关键活性位点研究进行了简要综述,可为蛋白酶和蛋白酶抑制剂的生物学活性改造和应用提供理论基础。

## REFERENCES

- [1] Senthilkumar R, Cheng CP, Yeh KW. Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotechnol J*, 2010, 8(1): 65-75.
- [2] Shamsi TN, Parveen R, Fatima S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: a review. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 1120-1133.
- [3] Niphakis MJ, Cravatt BF. Enzyme inhibitor discovery by activity-based protein profiling. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 341-377.
- [4] 熊科, 邓蕾, 柳佳芸, 等. 蛋白酶水解底物特异性机制研究进展. *食品与发酵工业*, 2019, 45(19): 292-298.  
Xiong K, Deng L, Liu JY, et al. Mechanisms of specific substrate hydrolysis of proteases: a review. *Food Fermentat Ind*, 2019, 45(19): 292-298 (in Chinese).
- [5] 张允萍, 吴子健, 李丹阳. 食源性蛋白酶抑制剂结构与功能. *食品研究与开发*, 2019, 40(10): 198-205.  
Zhang YP, Wu ZJ, Li DY. Structure and function of foodborne protease inhibitors. *Food Res Dev*, 2019, 40(10): 198-205 (in Chinese).
- [6] Iio-Akama K, Sasamoto H, Miyazawa K, et al. Active forms of chymotrypsin C isolated from autolyzed porcine pancreas glands. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 831(2): 249-256.

- [7] Mayerle J, Sendler M, Hegyi E, et al. Genetics, cell biology, and pathophysiology of pancreatitis. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 1951-1968.e1.
- [8] Paliwal S, Bhaskar S, Mani KR, et al. Comprehensive screening of chymotrypsin C (*CTRC*) gene in tropical calcific pancreatitis identifies novel variants. *Gut*, 2013, 62(11): 1602-1606.
- [9] Zhou J Y, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C mutations in chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(8): 1238-1246.
- [10] Geisz A, Jancsó Z, Németh BC, et al. Natural single-nucleotide deletion in chymotrypsinogen C gene increases severity of secretagogue-induced pancreatitis in C57BL/6 mice. *JCI Insight*, 2019, 4(14): e129717.
- [11] Szabó A, Ludwig M, Hegyi E, et al. Mesotrypsin signature mutation in a chymotrypsin C (*CTRC*) variant associated with chronic pancreatitis. *J Biol Chem*, 2015, 290(28): 17282-17292.
- [12] Dubey V, Luqman S. Cathepsin D as a promising target for the discovery of novel anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets*, 2017, 17(5): 404-422.
- [13] Glondu M, Coopman P, Laurent-Matha V, et al. A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene*, 2001, 20(47): 6920-6929.
- [14] Huang LQ, Li LF, Tien C, et al. Targeting HIV-1 protease autoprocessing for high-throughput drug discovery and drug resistance assessment. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 301.
- [15] Sayer JM, Louis JM. Interactions of different inhibitors with active-site aspartyl residues of HIV-1 protease and possible relevance to pepsin. *Proteins*, 2009, 75(3): 556-568.
- [16] Wiesmann F, Vachta J, Ehret R, et al. The L76V mutation in HIV-1 protease is potentially associated with hypersusceptibility to protease inhibitors Atazanavir and Saquinavir: is there a clinical advantage? *AIDS Res Ther*, 2011, 8: 7.
- [17] Vu TH. Don't mess with the matrix. *Nat Genet*, 2001, 28(3): 202-203.
- [18] Martignetti JA, Aqeel AA, Al Sewairi W, et al. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (*MMP2*) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet*, 2001, 28(3): 261-265.
- [19] Evans BR, Mosig RA, Lobl M, et al. Mutation of membrane type-1 metalloproteinase, *MT1-MMP*, causes the multicentric osteolysis and arthritis disease Winchester syndrome. *Am J Hum Genet*, 2012, 91(3): 572-576.
- [20] Sakr M, Li XY, Sabeih F, et al. Tracking the cartoon mouse phenotype: Hemopexin domain-dependent regulation of MT1-MMP pericellular collagenolytic activity. *J Biol Chem*, 2018, 293(21): 8113-8127.
- [21] Rudner DZ, Fawcett P, Losick R. A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 14765-14770.
- [22] Ramirez-Guadiana FH, Rodrigues CDA, Marquis KA, et al. Evidence that regulation of intramembrane proteolysis is mediated by substrate gating during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet*, 2018, 14(11): e1007753.
- [23] Halder S, Parrell D, Whitten D, et al. Interaction of intramembrane metalloprotease SpoIVFB with substrate Pro- $\sigma^K$ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(50): E10677-E10686.
- [24] Zhao P, Wang GH, Dong ZM, et al. Genome-wide identification and expression analysis of serine proteases and homologs in the silkworm *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 2010, 11: 405.
- [25] Liu HW, Li YS, Tang X, et al. A midgut-specific serine protease, BmSP36, is involved in dietary protein digestion in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Sci*, 2017, 24(5): 753-767.
- [26] 刘华伟, 李游山, 唐新, 等. 家蚕丝氨酸蛋白酶 BmSP141 的表达特征及对饥饿的响应. *中国农业科学*, 2016, 49(6): 1207-1218.
- Liu HW, Li YS, Tang X, et al. Characterization and expression analysis of serine protease BmSP141 from the silkworm (*Bombyx mori*) in response to starvation. *Sci Agric Sin*, 2016, 49(6): 1207-1218 (in Chinese).
- [27] Liu HW, Wang LL, Meng Z, et al. A clip domain serine protease involved in moulting in the silkworm, *Bombyx mori*: cloning, characterization, expression patterns and functional analysis. *Insect Mol Biol*, 2017, 26(5): 507-521.
- [28] Jiang H, Kanost MR. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 30(2): 95-105.
- [29] Liu HW, Heng JY, Wang LL, et al. Identification,

- characterization, and expression analysis of clip-domain serine protease genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol*, 2020, 105: 103584.
- [30] Czapinska H, Otlewski J. Structural and energetic determinants of the S<sub>1</sub>-site specificity in serine proteases. *Eur J Biochem*, 1999, 260(3): 571-595.
- [31] Greer J. Comparative modeling methods: application to the family of the mammalian serine proteases. *Proteins*, 1990, 7(4): 317-334.
- [32] Motta FN, Azevedo CDS, Neves BP, et al. Oligopeptidase B, a missing enzyme in mammals and a potential drug target for trypanosomatid diseases. *Biochimie*, 2019, 167: 207-216.
- [33] Morty RE, Shih AY, Fülöp V, et al. Identification of the reactive cysteine residues in oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett*, 2005, 579(10): 2191-2196.
- [34] Ismail NIM, Yuasa T, Yuasa K, et al. A critical role for highly conserved Glu<sup>610</sup> residue of oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei* in thermal stability. *J Biochem*, 2010, 147(2): 201-211.
- [35] Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, et al. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol*, 2006, 188(23): 8272-8282.
- [36] Nitta H, Imamura T, Wada Y, et al. Production of C5a by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. *J Immunol*, 2008, 181(5): 3602-3608.
- [37] Imamura T, Kobayashi H, Khan R, et al. Induction of vascular leakage and blood pressure lowering through kinin release by a serine proteinase from *Aeromonas sobria*. *J Immunol*, 2006, 177(12): 8723-8729.
- [38] Kobayashi H, Otsubo T, Teraoka F, et al. Involvement of the Arg566 residue of *Aeromonas sobria* serine protease in substrate specificity. *PLoS ONE*, 2017, 12(10): e0186392.
- [39] Pastorino BA, Peyrefitte CN, Almeras L, et al. Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus. *Virus Res*, 2008, 131(2): 293-298.
- [40] Saha A, Acharya BN, Priya R, et al. Development of nsP2 protease based cell free high throughput screening assay for evaluation of inhibitors against emerging *Chikungunya virus*. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10831.
- [41] Ramphan S, Khongwichit S, Saisawang C, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 is downregulated by the Chikungunya virus nsP2 protease. *Proteomics Clin Appl*, 2018, 12(4): 1700020.
- [42] Vasiljeva L, Valmu L, Kääriäinen L, et al. Site-specific protease activity of the carboxyl-terminal domain of *Semliki forest* virus replicase protein nsP2. *J Biol Chem*, 2001, 276(33): 30786-30793.
- [43] Vasiljeva L, Merits A, Auvinen P, et al. Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J Biol Chem*, 2000, 275(23): 17281-17287.
- [44] Narwal M, Singh H, Pratap S, et al. Crystal structure of chikungunya virus nsP2 cysteine protease reveals a putative flexible loop blocking its active site. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 451-462.
- [45] Mosimann SC, Cherney MM, Sia S, et al. Refined X-ray crystallographic structure of the poliovirus 3C gene product. *J Mol Biol*, 1997, 273(5): 1032-1047.
- [46] Uma M, Hegde SR, Rao PP, et al. A novel point mutation (L70P) inactivates poliovirus 3C protease. *Acta Virol*, 2018, 62(1): 68-77.
- [47] Chen CL, Wu YY, Lin CF, et al. Streptococcal pyrogenic exotoxin B inhibits apoptotic cell clearance by macrophages through protein S cleavage. *Sci Rep*, 2016, 6: 26026.
- [48] Elliott SD. The crystallization and serological differentiation of a streptococcal proteinase and its precursor. *J Exp Med*, 1950, 92(3): 201-218.
- [49] Elliott SD, Dole VP. An inactive precursor of *Streptococcal* proteinase. *J Exp Med*, 1947, 85(3): 305-320.
- [50] Musser JM, Stockbauer K, Kapur V, et al. Substitution of cysteine 192 in a highly conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease (interleukin 1 beta convertase) alters proteolytic activity and ablates zymogen processing. *Infect Immun*, 1996, 64(6): 1913-1917.
- [51] Chuman Y, Bergman AC, Ueno T, et al. Napsin A, a member of the aspartic protease family, is abundantly expressed in normal lung and kidney tissue and is expressed in lung adenocarcinomas. *FEBS Lett*, 1999, 462(1/2): 129-134.
- [52] Ueno T, Elmberger G, Weaver TE, et al. The aspartic protease napsin A suppresses tumor growth independent of its catalytic activity. *Lab Invest*,

- 2008, 88(3): 256-263.
- [53] Correia A, Lermann U, Teixeira L, et al. Limited role of secreted aspartyl proteinases Sap1 to Sap6 in *Candida albicans* virulence and host immune response in murine hematogenously disseminated candidiasis. *Infect Immun*, 2010, 78(11): 4839-4849.
- [54] Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(3): 400-428.
- [55] Aoki W, Kitahara N, Miura N, et al. *Candida albicans* possesses Sap7 as a pepstatin A-insensitive secreted aspartic protease. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32513.
- [56] Takenaka S, Umeda M, Senba H, et al. Heterologous expression and characterisation of the *Aspergillus aspartic* protease involved in the hydrolysis and decolorisation of red-pigmented proteins. *J Sci Food Agric*, 2017, 97(1): 95-101.
- [57] de Souza PM, Bittencourt MLDA, Caprara CC, et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz J Microbiol*, 2015, 46(2): 337-346.
- [58] Kappeler SR, Van Den Brink HJM, Rahbek-Nielsen H, et al. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(2): 647-654.
- [59] Palmer DS, Sørensen J, Schiøtt B, et al. Solvent binding analysis and computational alanine scanning of the bovine chymosin-bovine  $\kappa$ -casein complex using molecular integral equation theory. *J Chem Theory Comput*, 2013, 9(12): 5706-5717.
- [60] Ansari SM, Sørensen J, Schiøtt B, et al. On the effect of mutations in bovine or camel chymosin on the thermodynamics of binding  $\kappa$ -caseins. *Proteins*, 2018, 86(1): 75-87.
- [61] Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 1-73.
- [62] Windsor LJ, Birkedal-Hansen H, Birkedal-Hansen B, et al. An internal cysteine plays a role in the maintenance of the latency of human fibroblast collagenase. *Biochemistry*, 1991, 30(3): 641-647.
- [63] Clark IM, Cawston TE. Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J*, 1989, 263(1): 201-206.
- [64] Muller D, Quantin B, Gesnel MC, et al. The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem J*, 1988, 253(1): 187-192.
- [65] Williams DH, Murray EJ. Specific amino acid substitutions in human collagenase cause decreased autoproteolysis and reveal a requirement for a second zinc atom for catalytic activity. *FEBS Lett*, 1994, 354(3): 267-270.
- [66] Gomis-Rüth FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem*, 2009, 284(23): 15353-15357.
- [67] Rivera S, Garcia-González L, Khrestchatisky M, et al. Metalloproteinases and their tissue inhibitors in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(16): 3167-3191.
- [68] Bode W, Gomis-Ruth FX, Stöckler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett*, 1993, 331(1/2): 134-140.
- [69] Oberholzer AE, Bumann M, Hege T, et al. Metzincin's canonical methionine is responsible for the structural integrity of the zinc-binding site. *Biol Chem*, 2009, 390(9): 875-881.
- [70] Fukasawa K, Fukasawa KM, Iwamoto H, et al. The HELLGH motif of rat liver dipeptidyl peptidase III is involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme. *Biochemistry*, 1999, 38(26): 8299-8303.
- [71] Hirose J, Kamigakiuchi H, Iwamoto H, et al. The metal-binding motif of dipeptidyl peptidase III directly influences the enzyme activity in the copper derivative of dipeptidyl peptidase III. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 431(1): 1-8.
- [72] Guo HY, Ban YH, Cha Y, et al. Comparative anti-thrombotic activity and haemorrhagic adverse effect of nattokinase and tissue-type plasminogen activator. *Food Sci Biotechnol*, 2019, 28(5): 1535-1542.
- [73] Chen HJ, McGowan EM, Ren NN, et al. Nattokinase: a promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Biomark Insights*, 2018, 13: 1177271918785130.
- [74] Liu ZM, Zhao H, Han LC, et al. Improvement of the



- acid resistance, catalytic efficiency, and thermostability of nattokinase by multisite-directed mutagenesis. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(8): 1833-1843.
- [75] Galluzzi L, López-Soto A, Kumar S, et al. Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. *Immunity*, 2016, 44(2): 221-231.
- [76] Zheng M, Karki R, Vogel P, et al. Caspase-6 is a key regulator of innate immunity, inflammasome activation, and host defense. *Cell*, 2020, 181(3): 674-687.e13.
- [77] Albrecht S, Bogdanovic N, Ghetti B, et al. Caspase-6 activation in familial Alzheimer disease brains carrying amyloid precursor protein or presenilin 1 or presenilin 2 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(12): 1282-1293.
- [78] Guo HS, Albrecht S, Bourdeau M, et al. Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 2004, 165(2): 523-531.
- [79] Tubeleviciute-Aydin A, Zhou LB, Sharma G, et al. Rare human Caspase-6-R65W and Caspase-6-G66R variants identify a novel regulatory region of Caspase-6 activity. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4428.
- [80] Hill ME, MacPherson DJ, Wu P, et al. Reprogramming Caspase-7 specificity by regio-specific mutations and selection provides alternate solutions for substrate recognition. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(6): 1603-1612.
- [81] MacPherson DJ, Mills CL, Ondrechen MJ, et al. Tri-arginine exosite patch of caspase-6 recruits substrates for hydrolysis. *J Biol Chem*, 2019, 294(1): 71-88.
- [82] Mijanović O, Branković A, Panin AN, et al. Cathepsin B: a sellsword of cancer progression. *Cancer Lett*, 2019, 449: 207-214.
- [83] Li YY, Fang J, Ao GZ. Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010 - present). *Exp Opin Ther Pat*, 2017, 27(6): 643-656.
- [84] Musil D, Zucic D, Turk D, et al. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J*, 1991, 10(9): 2321-2330.
- [85] Pavlova A, Krupa JC, Mort JS, et al. Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration by release of loop anchoring through mutation of His110. *FEBS Lett*, 2000, 487(2): 156-160.
- [86] Illy C, Quraishi O, Wang J, et al. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 1197-1202.
- [87] Tsuji A, Kikuchi Y, Ogawa K, et al. Purification and characterization of cathepsin B-like cysteine protease from cotyledons of daikon radish, *Raphanus sativus*. *FEBS J*, 2008, 275(21): 5429-5443.
- [88] Porodko A, Cirnski A, Petrov D, et al. The two cathepsin B-like proteases of *Arabidopsis thaliana* are closely related enzymes with discrete endopeptidase and carboxydipeptidase activities. *Biol Chem*, 2018, 399(10): 1223-1235.
- [89] Tort J, Brindley PJ, Knox D, et al. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol*, 1999, 43: 161-266.
- [90] Norbury LJ, Basalaj K, Zawistowska-Deniziak A, et al. Intranasal delivery of a formulation containing stage-specific recombinant proteins of *Fasciola hepatica* cathepsin L5 and cathepsin B2 triggers an anti-fecundity effect and an adjuvant-mediated reduction in fluke burden in sheep. *Vet Parasitol*, 2018, 258: 14-23.
- [91] Smooker PM, Whisstock JC, Irving JA, et al. For the record: A single amino acid substitution affects substrate specificity in cysteine proteinases from *Fasciola hepatica*. *Protein Sci*, 2000, 9(12): 2567-2572.
- [92] Guo YJ, Tu T, Zheng J, et al. Improvement of *BsAPA Aspartic* protease thermostability via autocatalysis-resistant mutation. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(37): 10505-10512.
- [93] Zhang X, Chen YR, Zhao YL, et al. Type I collagen or gelatin stimulates mouse peritoneal macrophages to aggregate and produce pro-inflammatory molecules through upregulated ROS levels. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105845.
- [94] Rodriguez MIA, Barroso LGR, Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol*, 2018, 17(1): 20-26.
- [95] Fujinaga M, Chernaiia MM, Mosimann SC, et al. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein Sci*, 1995, 4(5): 960-972.
- [96] Galea CA, Dalrymple BP, Kuypers R, et al.

- Modification of the substrate specificity of porcine pepsin for the enzymatic production of bovine hide gelatin. *Protein Sci*, 2000, 9(10): 1947-1959.
- [97] Suzuki K. The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost*, 2008, 6(12): 2017-2026.
- [98] Stief TW, Radtke KP, Heimbürger N. Inhibition of urokinase by protein C-inhibitor (PCI). Evidence for identity of PCI and plasminogen activator inhibitor 3. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1987, 368(10): 1427-1433.
- [99] Torun D, Deda G, Ertem M, et al. A novel protein C inhibitor gene mutation in pediatric stroke patients after bone marrow transplantation. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(9): 5465-5468.
- [100] Kato I, Schrode J, Kohr WJ, et al. Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry*, 1987, 26(1): 193-201.
- [101] Kojima S, Fushimi N, Ikeda A, et al. Secretory production of chicken ovomucoid domain 3 by *Escherichia coli* and alteration of inhibitory specificity toward proteases by substitution of the P1 site residue. *Gene*, 1994, 143(2): 239-243.
- [102] Zhao P, Dong ZM, Duan J, et al. Genome-wide identification and immune response analysis of serine protease inhibitor genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e31168.
- [103] Li YS, Zhao P, Liu HW, et al. TIL-type protease inhibitors may be used as targeted resistance factors to enhance silkworm defenses against invasive fungi. *Insect Biochem Mol Biol*, 2015, 57: 11-19.
- [104] Li YS, Zhao P, Liu SP, et al. A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2012, 42(10): 766-775.
- [105] Dai ZJ, Sun W, Zhang Z. Comparative analysis of iTRAQ-based proteomes for cocoons between the domestic silkworm (*Bombyx mori*) and wild silkworm (*Bombyx mandarina*). *J Proteomics*, 2019, 192: 366-373.
- [106] Li YS, Liu HW, Zhu R, et al. Protease inhibitors in *Bombyx mori* silk might participate in protecting the pupating larva from microbial infection. *Insect Sci*, 2016, 23(6): 835-842.
- [107] Guo XM, Dong ZM, Zhang Y, et al. Proteins in the cocoon of silkworm inhibit the growth of *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE*, 2016, 11(3): e0151764.
- [108] Zhang Y, Zhao P, Dong ZM, et al. Comparative proteome analysis of multi-layer cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0123403.
- [109] Bania J, Stachowiak D, Polanowski A. Primary structure and properties of the cathepsin G/chymotrypsin inhibitor from the larval hemolymph of *Apis mellifera*. *Eur J Biochem*, 1999, 262(3): 680-687.
- [110] Mignogna G, Pascarella S, Amiconi G, et al. BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes. *Protein Sci*, 1996, 5(2): 357-362.
- [111] Babin DR, Peanasky RJ, Goos SM. The iso-inhibitors of chymotrypsin/elastase from *Ascaris lumbricoides*: the primary structure. *Arch Biochem Biophys*, 1984, 232(1): 143-161.
- [112] Li YS, Liu HW, Zhu R, et al. Loss of second and sixth conserved cysteine residues from trypsin inhibitor-like cysteine-rich domain-type protease inhibitors in *Bombyx mori* may induce activity against microbial proteases. *Peptides*, 2016, 86: 13-23.
- [113] 李游山, 赵萍, 董照明等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 BmSPI37 的克隆、表达及微生物诱导分析. *中国农业科学*, 2012, 45(23): 4898-4908.
- Li YS, Zhao P, Dong ZM, et al. Cloning, expression and microbial-induction analysis of *Bombyx mori* serine protease inhibitor BmSPI37. *Sci Agric Sin*, 2012, 45(23): 4898-4908 (in Chinese).
- [114] Taniguchi M, Atiwetin P, Hirai T, et al. Interaction of subtilisin BPN' and recombinant fungal protease inhibitor F from silkworm with substituted P<sub>1</sub> site residues. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(5): 1262-1264.
- [115] Zi MT, Xu YK. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis. *Immunol Lett*, 2018, 196: 80-90.
- [116] Leto G, Crescimanno M, Flandina C. On the role of cystatin C in cancer progression. *Life Sci*, 2018, 202: 152-160.
- [117] Kar S, Paglialunga S, Islam R. Cystatin C is a more reliable biomarker for determining eGFR to support drug development studies. *J Clin Pharmacol*, 2018, 58(10): 1239-1247.

- [118] Szymańska A, Radulska A, Czaplewska P, et al. Governing the monomer-dimer ratio of human cystatin c by single amino acid substitution in the hinge region. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(3): 455-463.
- [119] Staniforth RA, Giannini S, Higgins LD, et al. Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *EMBO J*, 2001, 20(17): 4774-4781.
- [120] Orlikowska M, Jankowska E, Borek D, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Val57 mutants of the amyloidogenic protein human cystatin C. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2011, 67(12): 1608-1611.
- [121] Rodziewicz-Motowidlo S, Iwaszkiewicz J, Sosnowska R, et al. The role of the Val57 amino-acid residue in the hinge loop of the human cystatin C. Conformational studies of the beta2-L1-beta3 segments of wild-type human cystatin C and its mutants. *Biopolymers*, 2009, 91(5): 373-383.
- [122] Kolodziejczyk R, Michalska K, Hernandez-Santoyo A, et al. Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J*, 2010, 277(7): 1726-1737.
- [123] Gettins PGW. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*, 2002, 102(12): 4751-4804.
- [124] Guo PC, Dong ZM, Zhao P, et al. Structural insights into the unique inhibitory mechanism of the silkworm protease inhibitor serpin18. *Sci Rep*, 2015, 5: 11863.
- [125] Guo PC, Wang Z, Wang Q, et al. Fibroinase and its physiological inhibitors involved in the regulation of silk gland development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2019, 106: 19-27.
- [126] Qi JH, Bell B, Singh R, et al. Sorsby fundus dystrophy mutation in tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3) promotes choroidal neovascularization via a fibroblast growth factor-dependent mechanism. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17429.
- [127] Sorsby A, Mason MEL, Gardener N. A fundus dystrophy with unusual features (Late onset and dominant inheritance of a central retinal lesion showing oedema, haemorrhage and exudates developing into generalised choroidal atrophy with massive pigment proliferation). *Br J Ophthalmol*, 1949, 33(2): 67-97.
- [128] Lin WL. Immunogold localization of extracellular matrix molecules in Bruch's membrane of the rat. *Curr Eye Res*, 1989, 8(11): 1171-1178.
- [129] Williamson RA, Marston FAO, Angal S, et al. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J*, 1990, 268(2): 267-274.
- [130] Soboleva G, Geis B, Schrewe H, et al. Sorsby fundus dystrophy mutation Timp3<sup>S156C</sup> affects the morphological and biochemical phenotype but not metalloproteinase homeostasis. *J Cell Physiol*, 2003, 197(1): 149-156.
- [131] Tabata Y, Isashiki Y, Kamimura K, et al. A novel splice site mutation in the tissue inhibitor of the metalloproteinases-3 gene in Sorsby's fundus dystrophy with unusual clinical features. *Hum Genet*, 1998, 103(2): 179-182.
- [132] Lin RJ, Blumenkranz MS, Binkley J, et al. A novel His158Arg mutation in TIMP3 causes a late-onset form of Sorsby fundus dystrophy. *Am J Ophthalmol*, 2006, 142(5): 839-848.e3.
- [133] van Montfoort ML, Meijers JCM. Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting the intrinsic pathway? *Thromb Haemost*, 2013, 110(2): 223-232.
- [134] Peter K, Lip GYH. Thrombosis and cardiovascular disease: exciting perspectives in cardiovascular prevention and therapy. *Thromb Haemost*, 2010, 103(5): 875-876.
- [135] Chen W, Carvalho LPD, Chan MY, et al. Fasxiator, a novel factor XIa inhibitor from snake venom, and its site-specific mutagenesis to improve potency and selectivity. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(2): 248-261.
- [136] Abu-Erreish GM, Peanasky RJ. Pepsin inhibitors from *Ascaris lumbricoides*. Isolation, purification, and some properties. *J Biol Chem*, 1974, 249(5): 1558-1565.
- [137] Ng KKS, Petersen JF, Cherney MM, et al. Structural basis for the inhibition of porcine pepsin by *Ascaris* pepsin inhibitor-3. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(8): 653-657.
- [138] Moose RE, Clemente JC, Jackson LR, et al. Analysis of binding interactions of pepsin inhibitor-3 to mammalian and malarial aspartic proteases. *Biochemistry*, 2007, 46(49): 14198-14205.

(本文责编 陈宏宇)