

植物Kunitz型蛋白酶抑制剂的结构与功能

张娴, 廖东颖, 缙绪卓, 周嘉裕*, 廖海*

西南交通大学生命科学与工程学院, 成都610031

摘要: Kunitz型蛋白酶抑制剂(KPI)是植物在长期进化过程中所形成的一类抗性多肽, 参与调控胞外及胞内靶蛋白酶的活性, 调控植物细胞生长、细胞周期、细胞凋亡、蛋白质的降解与运输、胁迫应答与生长发育等生理过程。KPI家族成员中常含有1、2个Kunitz结构域, 具有典型的 β -三叶草型结构。KPI能够抑制丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶与天冬氨酸蛋白酶, 其对靶蛋白酶的抑制特异性与强弱主要依赖其抑制中心的若干氨基酸残基。目前, 已从绝大多数被子植物中发现并筛选出KPI, 它受到很多胁迫的诱导。本文结合我们实验室开展的植物KPI的结构与抗虫分子机制的研究, 对有关植物KPI的结构和功能研究进展进行综述。

关键词: Kunitz型蛋白酶抑制剂; 分子结构; 生理功能

Kunitz型蛋白酶抑制剂(Kunitz-type protease inhibitor, KPI)是植物在长期进化过程中所形成的一类抗性多肽, 通常呈现 β -三叶草形状, 其抑制中心突出于三维结构的表面, 能够深入到靶酶的底物口袋, 与其靶蛋白酶形成稳定的靶蛋白酶-抑制剂复合物, 封闭靶蛋白酶的活性中心, 从而抑制丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶及天门冬氨酸蛋白酶的活性。由于KPI对靶酶具有较强的特异性, 也已成为研究蛋白质与蛋白质相互作用的模型分子(Majumder等2015; 罗玉娇等2012)。根据Rawlings等(2004)的分类, KPI属于I3抑制剂家族, 其主要功能是调控胞外及胞内靶蛋白酶的活性, 参与植物细胞生长、细胞周期、细胞凋亡、蛋白质的降解与运输、胁迫应答与生长发育等生理过程(罗玉娇等2012; 王荣春等2013; Islam等2015, 2017)。结合我们实验室开展的植物KPI分子作用机制和抗逆基因工程的研究, 本文概述了有关植物KPI结构和功能的研究进展。

1 KPI的分布与种类

参考Santamaría等(2014)的方法, 我们首先利用植物基因组数据库Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)在线查询, 再利用Pfam网站(<http://pfam.xfam.org/>)验证KPI结构域。统计结果显示绝大多数被子植物中均含有KPI成员, 单子叶与双子叶植物的KPI成员数量有明显区别, 其中单子叶植物KPI成员的数量普遍较少, 仅有1~3个, 而双子叶植物KPI成员较多, 比如苜蓿KPI成员的数量最多, 达到51个, 其次为大豆(50

个), 最少如玉吊钟、野生猴面花等植物, 仅1个(表1), 推测KPI在双子叶植物生长发育与抗逆响应过程中发挥了更重要的作用。此外, 采用蛋白质分离技术与基因克隆技术也从一些无基因组信息的植物中发现了KPI成员, 其中尤以豆科植物最多(表2)。

2 KPI的结构特征

植物KPI家族成员中常含有1、2个Kunitz结构域, 有一段由F**GGC*****F*****C组成的特征序列(Ranasinghe和McManus 2013)。植物KPI大多含有4个半胱氨酸残基, 能够形成2个二硫键(Cys63-Cys110和Cys160-Cys169), 这对于维持KPI的三维结构与功能稳定性非常重要(张亚光等2011); 动物KPI往往有6个半胱氨酸残基, 形成3个二硫键, 这也是植物与动物来源KPI的第一个区别。Hansen等(2007)还推测氢键在维系 β -三叶草结构中也发挥了重要作用, 比如来源于*Bauhinia bauhinioides*的BbCI不含有半胱氨酸, 却能够形成植物KPI家族共有的 β -三叶草三维结构。此外, 植物KPI的三维结构中不含有 α -螺旋, 这也与动物不同。

植物KPI的抑制中心位置在一级结构中较为

收稿 2018-05-31 修定 2018-06-29

资助 国家自然科学基金(31500276)、四川省科技计划(2017-JY0222和2018SZ0061)、成都市科学技术研发项目(2015-HM01-00051-SF和2016-HM01-00260-SF)、国家级大学生创新创业训练计划(201810613080)和个性化实验(GX-201812088)。

* 共同通讯作者: 廖海(ddliaohai@home.swjtu.edu.cn)、周嘉裕(spinezhou@home.swjtu.edu.cn)。

表1 KPI的分布

Table 1 Distribution of KPI

纲名	科名	植物名称	KPI成员数量		
双子叶植物纲	杨柳科	红皮柳(<i>Salix purpurea</i>)	30		
		毛果杨(<i>Populus trichocarpa</i>)	32		
	苋科	千穗谷(<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	17		
	毛茛科	洛矶山楼斗菜(<i>Aquilegia coerulea</i>)	4		
	十字花科	十字花科	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	7	
			异叶拟南芥(<i>Arabidopsis halleri</i>)	8	
			芹叶拟南芥(<i>Arabidopsis lyrata</i>)	9	
			<i>Boechea stricta</i>	10	
			卷心菜(<i>Brassica oleracea capitata</i>)	27	
			芜菁(<i>Brassica rapa</i>)	32	
			大花芥菜(<i>Capsella grandiflora</i>)	5	
			芥菜(<i>Capsella rubella</i>)	8	
			<i>Eutrema salsugineum</i>	8	
			景天科	景天科	玉吊钟(<i>Kalanchoe fedtschenkoi</i>)
	卵形落地生根(<i>Kalanchoe laxiflora</i>)	2			
	蔷薇科	蔷薇科	野草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	5	
			苹果(<i>Malus domestica</i>)	4	
			碧桃(<i>Prunus persica</i>)	3	
	豆科	豆科	大豆(<i>Glycine max</i>)	50	
			蒺藜苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)	51	
			菜豆(<i>Phaseolus vulgaris</i>)	24	
			红车轴草(<i>Trifolium pratense</i>)	29	
			亚麻科	亚麻(<i>Linum usitatissimum</i>)	21
	大戟科	大戟科	蓖麻(<i>Ricinus communis</i>)	3	
			木薯(<i>Manihot esculenta</i>)	5	
	芸香科	芸香科	克莱门柚(<i>Citrus clementina</i>)	33	
			甜橙(<i>Citrus sinensis</i>)	17	
	葡萄科	葡萄科	葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	5	
	锦葵科	锦葵科	雷蒙德氏棉(<i>Gossypium raimondii</i>)	8	
	梧桐科	梧桐科	可可(<i>Theobroma cacao</i>)	10	
	番木瓜科	番木瓜科	番木瓜(<i>Carica papaya</i>)	7	
	葫芦科	葫芦科	黄瓜(<i>Cucumis sativus</i>)	5	
	桃金娘科	桃金娘科	大桉(<i>Eucalyptus grandis</i>)	4	
	伞形科	伞形科	胡萝卜(<i>Daucus carota</i>)	15	
	茄科	茄科	马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i>)	36	
	玄参科	玄参科	野生猴面花(<i>Mimulus guttatus</i>)	1	
	单子叶植物纲	禾本科	凤梨(<i>Ananas comosus</i>)	1	
			二穗短柄草(<i>Brachypodium distachyon</i>)	2	
			复原草(<i>Oropetium thomaeum</i>)	1	
			水稻(<i>Oryza sativa</i>)	1	
			<i>Panicum hallii</i>	2	
			柳枝稷(<i>Panicum virgatum</i>)	3	
			小米(<i>Setaria italica</i>)	2	
狗尾草(<i>Setaria viridis</i>)			1		
高粱(<i>Sorghum bicolor</i>)			2		
<i>Brachypodium stacei</i>			3		
玉米(<i>Zea mays</i>)			1		
芭蕉科			芭蕉科	小果野蕉(<i>Musa acuminata</i>)	2

表2 近年来鉴定的胰蛋白酶抑制剂

Table 2 Trypsin inhibitors identified in recent years

名称	来源物种科名	参考文献
菠菜胰蛋白酶抑制剂(<i>Spinacia oleracea</i> trypsin inhibitor, SoTI)	藜科	Kang等2009
凤凰木胰蛋白酶抑制剂(<i>Delonix regia</i> trypsin inhibitor, DrTI)	豆科	Krauchenco等2003
小决明胰蛋白酶抑制剂(<i>Cassia tora</i> trypsin inhibitor, CtTI)	豆科	Tripathi等2011
银合欢胰蛋白酶抑制剂(<i>Leucaena leucocephala</i> trypsin inhibitor, LTI)	豆科	Sattar等2004
决明胰蛋白酶抑制剂(<i>Cassia obtusifolia</i> trypsin inhibitor, CoTI)	豆科	Liao等2007
褐毛羊蹄甲胰蛋白酶抑制剂(<i>Bauhinia rufa</i> trypsin inhibitor, BrTI)	豆科	Nakahata等2006
月桂印加豆胰蛋白酶抑制剂(<i>Inga laurina</i> trypsin inhibitor, IITI)	豆科	Macedo等2011
酸角Kunitz型抑制剂(tamarind Kunitz-type inhibitor, TKI)	豆科	Patil等2012
<i>Pithecellobium dumosum</i> Kunitz型胰蛋白酶抑制剂(<i>Pithecellobium dumosum</i> Kunitz-type trypsin inhibitor, PdKI)	豆科	Oliveira等2007
鹰嘴豆Kunitz蛋白酶抑制剂(<i>Cicer arietinum</i> Kunitz proteinase inhibitor, CaKPI)	豆科	Srinivasan等2005
阿拉伯胶树蛋白酶抑制剂(<i>Acacia senegal</i> proteinase inhibitor, AsPI)	豆科	Babu和Subrahmanyam 2010
<i>Pithecellobium dumosum</i> Kunitz型胰蛋白酶抑制剂4 (<i>Pithecellobium dumosum</i> Kunitz trypsin inhibitor-4, PdKI-4)	豆科	Rufino等2013
山合欢胰蛋白酶抑制剂(<i>Albizia kalkora</i> trypsin inhibitor, AkTI)	豆科	Zhou等2008
<i>Bauhinia bauhinioides</i> Cruzipain型抑制剂(<i>Bauhinia bauhinioides</i> Cruzipain inhibitor, BbCI)	豆科	Hansen等2007
鸡蛋果胰蛋白酶抑制剂(<i>Passiflora edulis</i> trypsin inhibitor, PeTI)	西番莲科	Pereira等2011
马铃薯丝氨酸蛋白酶抑制剂(potato serine protease inhibitor, PSPI)	茄科	Meulenbroek等2012

保守, 通常位于Kunitz结构域中。植物KPI发挥抑制作用的抑制中心包括6个氨基酸残基(P3'-P3'-P2'-P1-P2-P3), 位于Loop的顶部, 突出于三维结构的表面, 并能插入到靶蛋白酶的底物口袋。P1位氨基酸残基的侧链可以深入到底物口袋的底部, 与靶蛋白酶的催化残基形成氢键、离子键等非共价键, 在抑制过程中发挥最关键的作用。不同的P1残基往往具有不同的抑制特异性, 比如来源于大豆、决明与合欢等植物的P1位残基是Arg或Lys, 这两种氨基酸残基的碱性侧链能够与胰蛋白酶底物口袋中的Asp189形成离子键, 因此它们对胰蛋白酶的抑制特异性最强。然而, 鹰嘴豆与凤凰木KPI也能够特异性地抑制胰蛋白酶的活性, 但它们P1位的Arg/Lys残基被Gly/Glu-Ile-Ser取代, 可能是由于抑制剂中Glu与Ser残基能够形成一个口袋并与胰蛋白酶的Arg和(或) Lys结合, 从而起到抑制胰蛋白酶活性的作用(Pando等2001; Srinivasan等2005)。四棱豆、豌豆等植物的KPI能够特异性地抑制胰凝乳蛋白酶的活性, 它们P1位点的氨基酸残基通常为非极性的异亮氨酸或亮氨酸(如四棱豆KPI的P1位点为Leu89)。而弹性蛋白酶抑制剂P1位点多为丙氨酸(Bode和Huber 2000)。

抑制中心中其他位置的氨基酸残基通过疏水作用与氢键等次级键与靶蛋白酶底物口袋顶部及中部区域的侧面残基相互作用, 稳定靶蛋白酶-抑制剂复合物。比如, 决明胰蛋白酶抑制剂CoTI的P1位点残基(Arg86)进行定点突变后, 突变体的活性只有野生型的17%; 对P3'及P3位点残基(Leu84与Thr88)进行定点突变后, 突变体分别失去了59%与64%的抑制活性, 表明P3'及P3位点残基对于增强CoTI与靶蛋白酶的结合也起到了重要作用。Araújo等(2005)发现N-末端的Asn13是高度保守的, 三维结构分析认为Asn13能够稳定活性Loop。Majumder等(2015)也发现了高度保守的Trp91, Trp91位于 β -三叶草结构的顶盖区域并与 β -三叶草结构底部的氨基酸残基侧链发生相互作用, 参与 β -三叶草结构疏水核心的程序化堆积。大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, STI)的Trp91突变后, 突变体的三维结构虽未发生明显变化, 然而热稳定性却迅速下降。

某些植物KPI还具有一些新的结构特征。比如, 来源于褐毛羊蹄甲的BrTI分子中含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartate, RGD)序列, 该三肽序列与抑制活性无关, 在三级结构上

与抑制中心处于不同的区域。RGD序列存在于多种细胞外基质中,可与位于细胞表面的整合素特异性结合,介导整合素相关信号通路,在转录水平上诱导酶基因的表达,从而引起细胞生理生化变化,但具体机制仍不清楚(Gamble等2010)。Sumikawa等(2010)认为该三肽序列是在进化过程中突变产生,其赋予了BrTI更强的抗虫活性。本实验室克隆了决明胰蛋白酶抑制剂CoTI基因,序列分析发现CoTI也含有RGD序列。我们利用同源建模的方法,虚拟出CoTI的三维结构,发现CoTI的抑制中心位于S4-S5折叠间的Loop5中;而RGD序列(Arg159-Gly160-Asp161)位于S8-S9折叠间的Loop9中,突出于CoTI三级结构的表面,Cys156与Cys164之间的二硫键能够为Loop9提供稳定性,推测其能够有效结合鳞翅目昆虫中肠细胞表面的整合素(图1)(Liu等2015)。

3 植物KPI的功能

3.1 参与植物生长发育

已有研究发现,丝氨酸蛋白酶在植物胁迫应激、衰老、细胞程序性死亡和有性繁殖过程中都

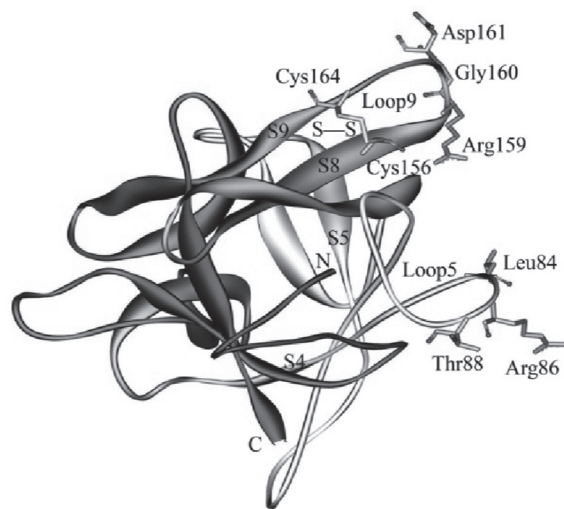


图1 CoTI的三维模拟结构

Fig.1 Three dimensional simulation structure of CoTI

根据Liu等(2015)文献修改。C: 羧基端; N: 氨基端; S—S: 二硫键; Cys156和Cys164: 第156和第164位的半胱氨酸残基; Asp161: 第161位的天冬氨酸残基; Gly160: 第160位的甘氨酸残基; Arg159和Arg86: 第159和第86位的精氨酸残基; Leu84: 第84位的亮氨酸残基; Thr88: 第88位的苏氨酸残基; loop5和loop9: 第5和第9个环; S4、S5、S8和S9: 第4、第5、第8和第9个 β 折叠。

担任重要角色(Lucinski等2011)。比如,菜豆类枯草杆菌蛋白酶2 (*Phaseolus vulgaris* subtilisin-like protease 2, PvSLP2)在衰老叶片中的活性远超过成熟与幼嫩叶片,推测其活性高低与叶片的衰老程度相关(Budic等2013)。降低丝氨酸蛋白酶活性能够延长在胁迫环境下的生存时间(Joshi等2014);相反,提高丝氨酸蛋白酶活性,则会加速衰老过程(吴蔚2014)。

由于植物KPI能够调控丝氨酸蛋白酶的活性,避免蛋白质过度降解,促进细胞内稳态平衡,近年来受到越来越多的关注,多篇报道指出其与植物的生长发育密切相关。Rech等(2013)发现苜蓿Kunitz蛋白酶抑制剂106 (Kunitz protease inhibitor 106, KPI106)作为丝氨酸羧肽酶的负调控因子,其抑制中心的Lys171残基与丝氨酸羧肽酶1 (serine carboxypeptidase 1, SCP1)发生特异性的相互作用,从而抑制SCP1的酶活性;且进一步的实验发现,过表达KPI106基因或SCP1基因表达下调的苜蓿表现出一致的表型,从而从分子水平上揭示了KPI106与SCP1相互作用,其参与苜蓿根皮中丛枝菌根的发育过程。Islam等(2015)发现白车轴草Kunitz蛋白酶抑制剂2 (*Trifolium repens* Kunitz proteinase inhibitor 2, Tr-KPI2)基因的表达降低影响了包括茎长度、分枝数量与叶柄长度等的一系列发育性状,增加了形态的多样性,降低了发育的稳定性,表明植物KPI对遗传变异及发育的稳定性具有重要作用。Boex-Fontvieille等(2015)发现植物KPI家族成员水溶性叶绿素结合蛋白(water-soluble chlorophyll-binding protein, WSCP)能够抑制颗粒体结构域蛋白酶(granulin domain-containing protease)的活性,激活细胞凋亡信号途径,参与拟南芥发育过程的调控。随后他们还发现乙烯与机械损伤能够激活拟南芥bHLH转录因子家族成员HECATE 1 (HEC1)的转录活性,促进拟南芥Kunitz蛋白酶抑制剂1 (Kunitz-protease inhibitor 1, Kunitz-PI;1)在顶端弯勾与子叶顶端的积累(Boex-Fontvieille等2016)。García-Valencia等(2017)发现植物自交不亲和性也与植物KPI相关,烟草KPI可以与线粒体磷酸转运蛋白相互作用,导致花粉管的生长受到抑制。

3.2 参与生物与环境胁迫

植物KPI是植物抵抗鳞翅目害虫的一类重要

防御物质, 主要通过抑制与诱导两种机制发挥抗虫功效: (1)植物KPI能够抑制鳞翅目幼虫肠道内类胰蛋白酶与类胰凝乳蛋白酶对食物蛋白质的水解, 使鳞翅目幼虫不能获取生长发育所需的必需氨基酸(De Oliveira等2014); (2)当KPI被鳞翅目幼虫摄食并在体内积累时, 它将刺激消化酶的合成紊乱, 破坏鳞翅目幼虫肠道内消化酶的协调性, 同时造成大量营养物的消耗, 扰乱幼虫正常代谢, 产生毒害, 致使幼虫出现畸形甚至死亡(Babu和Subrahmanyam 2010; Machado等2013)。如大豆STI能够抑制棉铃虫与甜菜夜蛾等幼虫肠道的绝大部分类胰蛋白酶活性, 并且诱导不同类型消化酶的过量表达, 导致幼虫的取食量明显下降, 营养不良, 虫体重变轻, 延缓幼虫的生长发育(Chougule等2005, 2008)。鹰角豆、酸角和牛蹄豆胰蛋白酶抑制剂也具有相似的抗虫活性, 能够破坏棉铃虫幼虫正常的代谢(Pandey和Jamal 2014; Pandey等2015)。本实验室研究发现, 决明CoTI重组蛋白不仅能够有效抑制棉铃虫、斜纹夜蛾与菜青虫等鳞翅目害虫中肠碱性类胰蛋白酶的活性, 还能够抑制菜青虫的生长(Liu等2015); 随后分析菜青虫肠的转录组数据发现, 实验组菜青虫肠中丝氨酸蛋白酶、细胞色素P450、糖苷转移酶与丝氨酸蛋白酶抑制蛋白(serpin)等基因的表达发生了变化, 推测CoTI的摄入影响菜青虫中肠基因的正常表达, 出现代谢紊乱(Xiang等2018)。

Sumikawa等(2010)发现褐毛羊蹄甲BrTI的RGD序列与其抗代谢能力存在紧密联系。将该三肽序列引入到*B. bauhinoides*胰蛋白酶抑制剂(不含有RGD序列), 发现突变体能够导致试虫的蛹化率下降到30%, 为对照的14倍, 抗虫能力明显提高, 因此推测BrTI含有两个相对独立的位点(抑制作用位点与诱导作用位点), 该三肽序列可能是BrTI发挥诱导作用的关键位置。大豆STI与苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)等其他类型抗虫性物质的协同作用比它们的单独作用更能发挥抗虫作用, 进一步阐明了KPI与一些抗虫物质之间存在着增效作用(吴国昭等2013)。将植物KPI基因导入烟草、芥菜等植物, 获得了对鳞翅目害虫有较高抗性的转基因植株, 表明通过转基因技术将植物KPI转入到异源植物中, 培育抗虫植物新品种是一条

比较可行和快速的途径(Khalf等2010; Srinivasan等2009; 牛蓓等2016)。

与此同时, 植物KPI还能够提高植物对干旱、盐、低温等逆境的耐受能力(Islam等2015; Srinivasan等2009)。比如, 高温、水分胁迫、茉莉酸甲酯会明显提高卷心菜、大豆、土豆及百香果等植物中KPI的mRNA及蛋白的含量(Botelho-Junior等2014; Islam等2017; Kang等2002; Komatsu等2009; Sheshukova等2017), 表明其在响应非生物胁迫过程中会发挥重要作用。我们分析决明CoTI在不同胁迫条件下的表达情况, 发现其表达受到盐胁迫、干旱和脱落酸(abscisic acid, ABA)的影响显著。Islam等(2015)利用RNA干扰技术降低了三叶草KPI基因的mRNA含量, 结果导致细胞内稳态的破坏及细胞内应急分子(H_2O_2)的大量释放, 并激活了黄酮类代谢途径。Shan等(2008)从抗盐能力较高的小麦品种中克隆到WRSI5基因, 转入拟南芥之后提高了其抗盐性, 推测该基因在盐胁迫条件下, 在调节植物生长速率中发挥重要的作用。Srinivasan等(2009)发现转烟草蛋白酶抑制剂(*Nicotiana tabacum* protease inhibitor, NtPI)烟草植株对盐、酸碱和干旱胁迫表现出更高的抗性。Huang等(2007)的研究表明, 超表达水稻胰凝乳蛋白酶抑制剂1 (*Oryza sativa* chymotrypsin inhibitor-like 1, OCPI1)的转基因水稻在干旱胁迫条件下, 产量及结实率均显著高于对照组, 且总蛋白量的降低情况要明显少于对照组; 此外转水稻胰凝乳蛋白酶抑制剂2 (*Oryza sativa* chymotrypsin inhibitor-like 2, OCPI2)基因的拟南芥也获得了对盐及渗透胁迫的抗性(Tiwari等2015)。Rustgi等(2017)进一步发现, 拟南芥Serp1与WSCP能够与响应脱水的半胱氨酸蛋白酶21 (responsive to desiccation-21, RD21)分别形成共价与非共价复合物, 调控RD21的活动, 参与拟南芥对干旱的响应。

有一类植物KPI兼备 α -淀粉酶抑制剂的功能, 这种抑制剂称为双功能抑制剂。本实验室从川产道地中药川芎(*Ligusticum chuanxiong*)中分离出一个具有Kunitz结构域的 α -淀粉酶/枯草杆菌蛋白酶抑制剂基因, 该基因的重组蛋白对棉铃虫、斜纹夜蛾等鳞翅目害虫的 α -淀粉酶及枯草杆菌蛋白酶均具有抑制作用(Yu等2017)。植物KPI和淀粉酶抑

制剂很可能起源于同一祖先,在抗逆与生长发育中行使相似的功能。在抗逆方面, α -淀粉酶抑制剂能够抑制摄食害虫肠道内淀粉酶的活性,行使蛋白酶抑制剂功能时可以抵抗病原菌的危害;在生长发育中,它们可以起到调节内源 α -淀粉酶活性的作用,当行使蛋白酶抑制剂功能时防止不必要的蛋白质降解。

3.3 药用价值

大豆KTI能抑制人卵巢癌细胞系HRA细胞中尿激酶纤维蛋白溶酶原激活因子的上调(Kobayashi等2004),在转移初期或内渗阶段具有抑制作用。甘薯Sporamin蛋白不仅能够消除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基和羟基自由基的活性,还对人体结肠癌细胞系SW480细胞具有增殖抑制效果,这为Sporamin蛋白的开发和利用提供了依据(邓乐2009)。

此外,从牛胰腺中提取的抑胰肽酶,药用名称为Aprotinin,是一种多功能抑制剂,能够抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、溶血纤维蛋白酶及各种组织或血浆激肽释放酶。Aprotinin已广泛用于急性胰腺炎、纤维蛋白溶解引起的出血及弥漫性血管内凝血,还可用于抗休克治疗,具有独特的疗效。

张晓琦等(2007)发现 α -淀粉酶/枯草杆菌蛋白酶抑制剂能够抑制肠道内 α -淀粉酶的活性,阻碍人体对食物中淀粉及其他糖类化合物的消化吸收,降低血糖含量及糖向脂肪转化,从而起到糖尿病、高血糖、高血脂患者的饮食治疗作用。

4 展望

目前,大量文献报道过多种植物KPI的性质、结构及功能,但是要全面了解植物KPI,特别是结构与功能之间的关系,尚需进一步的研究。KPI对不同靶蛋白酶的特异性抑制及抑制强度是其发挥生物学功能的重要因素。在不同植物来源的KPI研究中发现,尽管它们具有相似的三维结构,但是组成其抑制中心的氨基酸序列同源性有很大差别,这些差别极有可能与其特异性抑制及抑制强度有紧密联系。因此,能否确定这些关键位点及作用机制是阐释KPI抑制作用的关键问题,这些问题的解决需要通过结构生物学、生物信息学与分子生物学等技术的相互融合,这对于发挥KPI在农业、

林业及生态学领域的应用具有重要的指导意义,值得深入研究。

此外,虽然多篇文献报道植物KPI参与植物的生长发育、环境胁迫及生物胁迫,具有很高的药用价值,但其作用机理还知之甚少。

在植物生长发育与环境胁迫方面,KPI在植物体内作为一种维持细胞稳态物质,通过与不同靶蛋白酶作用来调控细胞生长、环境胁迫的耐受能力,但具体的分子机制并不清楚。首先,KPI特异性作用的靶蛋白酶迄今发现较少,目前仅有丝氨酸羧肽酶、RD21与颗粒体结构域蛋白酶等靶蛋白酶被报道。由于不同KPI有不同的靶蛋白酶,某一种KPI只能与一种或几种丝氨酸蛋白酶形成复合体,发挥特定的功能。因此,在未来的研究中,筛选与KPI相互作用的靶蛋白酶是认识其参与植物生长发育与逆境响应的一个核心问题。其次,KPI能够稳定细胞内环境,参与植物生长发育与胁迫应答过程。此外,KPI极有可能影响到一系列基因的表达,找到这些受KPI调控的下游基因也将是未来的重点。

在生物胁迫方面,植物KPI是植物抵抗鳞翅目害虫的一类重要防御物质,主要通过抑制消化酶活性与扰乱昆虫消化系统两种机制发挥抗虫功效,但是昆虫在与植物的长期协同进化过程中,产生出适应性进化,对来自寄主植物的蛋白酶抑制剂不敏感。比如菜青虫的生长并不受白菜等十字花科寄主植物蛋白酶抑制剂的影响(Broadway 1995)。棉铃虫的生长也不受烟草等寄主植物KPI的影响(Chougule等2005),而受来自花生、土豆等非寄主植物的KPI的抑制(Harsulkar等1999)。分析基因组中丝氨酸蛋白酶基因的数量,发现其远远超过植物KPI基因的数量,这其中就包括了一些对KPI不敏感的丝氨酸蛋白酶。摄食害虫在适应KPI的过程中,通过改变基因的表达模式,产生了一些新蛋白酶代替原有的蛋白酶,失去对KPI的敏感性。我们推测新产生的蛋白酶底物口袋中的部分氨基酸残基(非催化残基)发生了突变,导致蛋白酶与KPI的结合能力下降,从而失去对KPI的敏感性。此外,摄食害虫还能够诱导表达一些非丝氨酸蛋白酶,这些蛋白酶能够降解KPI,减弱KPI的抗虫活性。因此,在KPI抗虫基因工程应用中,将重点选择来

源于非寄主植物的KPI。与此同时,对摄食害虫的适应机制开展相关研究,能够帮助研究人员设计更长效与更特异性的抑制剂。

在KPI基因药物资源的进一步挖掘方面,多篇文献报道过植物KPI具有抗炎、抗病毒、抗癌等作用,有些动物来源的KPI已经在临床试验阶段。鉴于植物KPI来源广泛且种类多样,在未来的研究中,植物KPI将为我们提供更丰富的药物筛选资源。

参考文献(References)

- Araújo AP, Hansen D, Vieira DF, et al (2005). Kunitz-type *Bauhinia bauhinioides* inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of the cDNAs, heterologous expression and structural studies. *Biol Chem*, 386 (6): 561–568
- Babu SR, Subrahmanyam B (2010). Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pestic Biochem Physiol*, 98 (3): 349–358
- Bode W, Huber R (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta*, 1477 (1–2): 241–252
- Boex-Fontvieille E, Rustgi S, Reinbothe S, et al (2015). A Kunitz-type protease inhibitor regulates programmed cell death during flower development in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 66 (20): 6119–6135
- Boex-Fontvieille E, Rustgi S, von Wettstein D, et al (2016). An ethylene-protected achilles' heel of etiolated seedlings for arthropod deterrence. *Front Plant Sci*, 7: 1246
- Botelho-Junior S, Machado OL, Fernandes KV, et al (2014). Defense response in non-genomic model species: methyl jasmonate exposure reveals the passion fruit leaves' ability to assemble a cocktail of functionally diversified Kunitz-type trypsin inhibitors and recruit two of them against papain. *Planta*, 240 (2): 345–356
- Broadway RM (1995). Are insect resistant to plant proteinase inhibitors? *J Insect Physiol*, 41 (2): 107–116
- Budic M, Sabotic J, Meglic V, et al (2013). Characterization of two novel subtilases from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their responses to drought. *Plant Physiol Biochem*, 62: 79–87
- Chougule NP, Doyle E, Fitches E, et al (2008). Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *J Insect Physiol*, 54 (3): 563–572
- Chougule NP, Giri AP, Sainani MN, et al (2005). Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochem Mol Biol*, 35 (4): 355–367
- De Oliveira CF, Marangoni S, Macedo ML (2014). The trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* seeds affects negatively the development of Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella*. *Pestic Biochem Physiol*, 108: 74–79
- Deng L (2009). The study of anticancer effect of Sporamin (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese with English abstract) [邓乐(2009).甘薯蛋白Sporamin抗肿瘤效果研究(学位论文).北京:中国农业科学院]
- Gamble LJ, Borovjagin AV, Matthews QL (2010). Role of RGD-containing ligands in targeting cellular integrins: applications for ovarian cancer virotherapy (review). *Exp Ther Med*, 1 (2): 233–240
- Garcia-Valencia LE, Bravo-Alberto CE, Wu HM, et al (2017). SIPP, a novel mitochondrial phosphate carrier, mediates in self-incompatibility. *Plant Physiol*, 175 (3): 1105–1120
- Hansen D, Macedo-Ribeiro S, Verissimo P, et al (2007). Crystal structure of a novel cysteinless plant Kunitz-type protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 360 (4): 735–740
- Harsulkar AM, Giri AP, Patankar AG, et al (1999). Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. *Plant Physiol*, 121 (2): 497–506
- Huang Y, Xiao B, Xiong L (2007). Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta*, 226 (1): 73–85
- Islam A, Leung S, Burgess EP, et al (2015). Knock-down of transcript abundance of a family of Kunitz proteinase inhibitor genes in white clover (*Trifolium repens*) reveals a redundancy and diversity of gene function. *New Phytol*, 208 (4): 1188–1201
- Islam A, Leung S, Nikmatullah A, et al (2017). Kunitz proteinase inhibitors limit water stress responses in white clover (*Trifolium repens* L.) plants. *Front Plant Sci*, 8: 1683
- Joshi RS, Tanpure RS, Singh RK, et al (2014). Resistance through inhibition: ectopic expression of serine protease inhibitor offers stress tolerance via delayed senescence in yeast cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 452 (3): 361–368
- Kang SG, Choi JH, Suh SG (2002). A leaf-specific 27 kDa protein of potato Kunitz-type proteinase inhibitor is induced in response to abscisic acid, ethylene, methyl jasmonate, and water deficit. *Mol Cells*, 13 (1): 144–147
- Kang Z, Jiang JH, Wang D, et al (2009). Kunitz-type trypsin inhibitor with high stability from *Spinacia oleracea* L. seeds. *Biochemistry (Mosc)*, 74 (1): 102–109
- Khalf M, Goulet C, Vorster J, et al (2010). Tubers from potato lines expressing a tomato Kunitz protease inhibitor are substantially equivalent to parental and transgenic controls. *Plant Biotechnol J*, 8 (2): 155–169

- Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, et al (2004). A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clin Exp Metastasis*, 21 (2): 159–166
- Komatsu S, Yamamoto R, Nanjo Y, et al (2009). A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. *J Proteome Res*, 8 (10): 4766–4778
- Krauchenco S, Pando SC, Marangoni S, et al (2003). Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. *Biochem Biophys Res Commun*, 312 (4): 1303–1308
- Liao H, Ren W, Kang Z, et al (2007). A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. *Biotechnol Lett*, 29 (4): 653–658
- Liu Z, Zhu Q, Li J, et al (2015). Isolation, structure modeling and function characterization of a trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia*. *Biotechnol Lett*, 37 (4): 863–869
- Lucinski R, Misztal L, Samardakiewicz S, et al (2011). Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. *Plant Physiol Biochem*, 49 (3): 311–320
- Luo YJ, Li B, Shu HP, et al (2012). Research advances in Kunitz trypsin inhibitor. *Chin J Biochem Pharm*, 33 (3): 316–319 (in Chinese) [罗玉娇, 李滨, 舒衡平等(2012). Kunitz型胰蛋白酶抑制剂的研究进展. *中国生化药物杂志*, 33 (3): 316–319]
- Macedo ML, Freire M, Franco OL, et al (2011). Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 158 (2): 164–172
- Machado SW, De Oliveira CF, Bezerra Cda S, et al (2013). Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J Agric Food Chem*, 61 (10): 2469–2478
- Majumder S, Khamrui S, Banerjee R, et al (2015). A conserved tryptophan (W91) at the barrel-lid junction modulates the packing and stability of Kunitz (STI) family of inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 1854 (1): 55–64
- Meulenbroek EM, Thomassen EA, Pouvreau L, et al (2012). Structure of a post-translationally processed heterodimeric double-headed Kunitz-type serine protease inhibitor from potato. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68 (Pt 7): 794–799
- Nakahata AM, Bueno NR, Rocha HA, et al (2006). Structural and inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif. *Int J Biol Macromol*, 40 (1): 22–29
- Niu B, Li R, Yang L, et al (2016). Cloning and characterization of a Kunitz type protease inhibitor gene *JcKTI* from *Jatropha curcas*. *J Sichuan Univ (Nat Sci Ed)*, 53 (5): 1169–1176 (in Chinese with English abstract) [牛蓓, 李锐, 杨林等(2016). 一个麻风树Kunitz型蛋白酶抑制剂基因的克隆和鉴定. *四川大学学报(自然科学版)*, 53 (5): 1169–1176]
- Oliveira AS, Migliolo L, Aquino RO, et al (2007). Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. *J Agric Food Chem*, 55 (18): 7342–7349
- Pandey PK, Jamal F (2014). Bio-potency of a 21 kDa Kunitz-type trypsin inhibitor from *Tamarindus indica* seeds on the developmental physiology of *H. armigera*. *Pestic Biochem Physiol*, 116: 94–102
- Pandey PK, Singh D, Jamal F (2015). The influence of a 11 kDa Kunitz-type trypsin inhibitor from nonhost madras thorn, *Pithecellobium dulce*, seeds on *H. armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol*, 89 (1): 18–34
- Pando SC, Oliva MLV, Sampaio CAM, et al (2001). Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*, 57 (5): 625–631
- Patil DN, Chaudhary A, Sharma AK, et al (2012). Structural basis for dual inhibitory role of tamarind Kunitz inhibitor (TKI) against factor Xa and trypsin. *FEBS J*, 279 (24): 4547–4564
- Pereira KR, Botelho-Junior S, Domingues DP, et al (2011). Passion fruit flowers: Kunitz trypsin inhibitors and cystatin differentially accumulate in developing buds and floral tissues. *Phytochemistry*, 72 (16): 1955–1961
- Ranasinghe S, McManus DP (2013). Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Dev Comp Immunol*, 39 (3): 219–227
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J*, 378: 705–716
- Rech SS, Heidt S, Requena N (2013). A tandem Kunitz protease inhibitor (KPI106)-serine carboxypeptidase (SCP1) controls mycorrhiza establishment and arbuscule development in *Medicago truncatula*. *Plant J*, 75 (5): 711–725
- Rufino FP, Pedroso VM, Araujo JN, et al (2013). Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests' digestive proteinases. *Plant Physiol Biochem*, 63: 70–76
- Rustgi S, Boex-Fontvieille E, Reinbothe C, et al (2017). Serpin1 and WSCP differentially regulate the activity of the cysteine protease RD21 during plant development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114 (9): 2212–2217
- Santamaría ME, Diaz-Mendoza M, Diaz I, et al (2014). Plant protein peptidase inhibitors: an evolutionary overview based on comparative genomics. *BMC Genomics*, 15: 812

- Sattar R, Ali SA, Kamal M, et al (2004). Molecular mechanism of enzyme inhibition: prediction of the three-dimensional structure of the dimeric trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* by homology modelling. *Biochem Biophys Res Commun*, 314 (3): 755–765
- Shan L, Li C, Chen F, et al (2008). A Bowman-Birk type protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat. *Plant Cell Environ*, 31 (8): 1128–1137
- Sheshukova EV, Komarova TV, Ershova NM, et al (2017). An alternative nested reading frame may participate in the stress-dependent expression of a plant gene. *Front Plant Sci*, 8: 2137
- Srinivasan A, Giri AP, Harsulkar AM, et al (2005). A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. *Plant Mol Biol*, 57 (3): 359–374
- Srinivasan T, Kumar KR, Kirti PB (2009). Constitutive expression of a trypsin protease inhibitor confers multiple stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol*, 50 (3): 541–553
- Sumikawa JT, Brito MV, Macedo ML, et al (2010). The defensive functions of plant inhibitors are not restricted to insect enzyme inhibition. *Phytochemistry*, 71 (2–3): 214–220
- Tiwari LD, Mittal D, Chandra Mishra R, et al (2015). Constitutive over-expression of rice chymotrypsin protease inhibitor gene *OCPI2* results in enhanced growth, salinity and osmotic stress tolerance of the transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol Biochem*, 92: 48–55
- Tripathi VR, Kumar S, Garg SK (2011). A study on trypsin, *Aspergillus flavus* and *Bacillus* sp. protease inhibitory activity in *Cassia tora* (L.) syn *Senna tora* (L.) Roxb. seed extract. *BMC Complement Altern Med*, 11: 56
- Wang RC, Sun JH, He SD, et al (2013). Recent advance in research on the structure and function of trypsin Inhibitor. *Food Sci*, 34 (9): 364–368 (in Chinese with English abstract) [王荣春, 孙建华, 何述栋等(2013). 胰蛋白酶抑制剂的结构与功能研究进展. *食品科学*, 34 (9): 364–368]
- Wu GZ, Hu L, Ye M, et al (2013). Effects of soybean trypsinase inhibitor and defense signaling compounds on detoxification enzymes in *Spodoptera litura* (F.) larvae. *Chin J Appl Ecol*, 23 (7): 1952–1958 (in Chinese with English abstract) [吴国昭, 胡林, 叶茂等(2013). 大豆胰蛋白酶抑制剂和防御信号物质对斜纹夜蛾解毒酶的影响. *应用生态学报*, 23 (7): 1952–1958]
- Wu W (2014). Purification and characterization of two serine protease correlated leaf senescence in wheat leaves (dissertation). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [吴蔚(2014). 两种小麦叶片衰老相关丝氨酸蛋白酶的纯化与其生化特性鉴定(学位论文). 南京: 南京农业大学]
- Xiang M, Zhang X, Deng Y, et al (2018). Comparative transcriptome analysis provides insights of anti-insect molecular mechanism of *Cassia obtusifolia* trypsin inhibitor against *Pieris rapae*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 97 (1): e21427
- Yu JH, Li YY, Xiang M, et al (2017). Molecular cloning and characterization of alpha-amylase/subtilisin inhibitor from rhizome of *Ligusticum chuanxiong*. *Biotechnol Lett*, 39 (1): 141–148
- Zhang XQ, Yang MY, Ma Y, et al (2007). Study on extraction and purification of an α -amylase inhibitor from white kidney beans and its hypoglycemic activity. *Pharm Biotechnol*, 14 (6): 406–410 (in Chinese with English abstract) [张晓琦, 杨明琰, 马瑜等(2007). 白豆 α -淀粉酶抑制剂糖蛋白的提取纯化及降血糖活性研究. *药物生物技术*, 14 (6): 406–410]
- Zhang YG, Huang Y, Song YJ, et al (2011). Bioinformatics analysis of Kunitz protease inhibitors in plants. *Biotechnol Bull*, (12): 102–107 (in Chinese with English abstract) [张亚光, 黄勇, 宋玉娇等(2011). 植物Kunitz蛋白酶抑制剂的生物信息学分析. *生物技术通报*, (12): 102–107]
- Zhou JY, Liao H, Zhang NH, et al (2008). Identification of a Kunitz inhibitor from *Albizia kalkora* and its inhibitory effect against pest midgut proteases. *Biotechnol Lett*, 30 (8): 1495–1499

Structure and function of plant Kunitz-type protease inhibitors

ZHANG Xian, LIAO Dong-Ying, GOU Xu-Zhuo, ZHOU Jia-Yu*, LIAO Hai*

School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: Kunitz-type protease inhibitors (KPIs) in plants are a class of resistant peptides formed during long-term evolution. They mainly regulate the activities of extracellular and intracellular target proteases which are involved in plant cell growth, cell cycle, cell apoptosis, protein degradation and transport, stress response, and growth and development. The members of this family usually contain 1–2 Kunitz domains and formed typical β -trefoil fold structure. KPIs are able to inhibit different enzymes, such as serine proteases, cysteine proteases and aspartic proteases, and those inhibitory specificity and strength mainly depend on the residues in the inhibitory center. To date, KPIs have been found in most angiosperm plants, and the expression level of KPI is induced by various stresses. In this paper, the research progresses in the structure and function of plant KPIs are reviewed, and the researches accomplished in our laboratory are also introduced.

Key words: Kunitz-type protease inhibitor; molecular structure; physiological function

Received 2018-05-31 Accepted 2018-06-29

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31500276), Sichuan Science and Technology Program (2017JY0222 and 2018SZ0061), Chengdu Science and Technology Research and Development Project (2015-HM01-00051-SF and 2016-HM01-00260-SF), National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (201810613080), and Individualized Experiment (GX201812088).

*Co-corresponding authors: Liao H (ddliaohai@home.swjtu.edu.cn), Zhou JY (spinezhou@home.swjtu.edu.cn).