

DOI:10.13350/j.cjpb.231125

• 综述 •

顶复门原虫类枯草杆菌蛋白酶 SUB1 的研究进展*

张欣,李瑾,谢金晶,孙慧**

(山东省寄生虫病防治研究所,山东第一医科大学(山东省医学科学院),山东济宁 272033)

【摘要】 类枯草杆菌蛋白酶-1(subtilisin-like protease, SUB1)是一种绝大多数顶复门原虫所必需的蛋白酶, SUB1广泛参与顶复门原虫的粘附、入侵、复制和逸出等多个生命活动。研究发现, SUB1属于丝氨酸蛋白酶家族,催化结构域保守,具有高度的专一性,并与虫体的运动和毒力相关。本文对已发现的顶复门原虫类枯草杆菌蛋白酶 SUB1的结构和功能做一综述。

【关键词】 顶复门原虫; SUB1; 蛋白酶功能; 蛋白酶结构; 综述

【中图分类号】 R382

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)11-1364-03

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Nov. ;18(11):1364, inside back cover, back cover.]

Research advance of subtilisin-like protease-1 in Apicomplexa

ZHANG Xin, LI Jin, XIE Jinjing, SUN Hui (*Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jining 272033, Shandong, China*)

【Abstract】 The subtilisin-like protease-1 is an essential protease for the majority of apicomplexa, and SUB1 is widely involved in multiple life activities, including adhesion, invasion, replication and egress. According to previous research, the SUB1 is a serine protease that has highly specific catalytic domain and associated with motility and virulence of the parasites. We summarize the structure and function of SUB1 in Apicomplexa.

【Key words】 Apicomplexa; SUB1; protease function; protease structure; review

***顶复门原虫是一类专性细胞内寄生原虫,包括疟原虫(*Plasmodium*)、弓形虫(*Toxoplasma*)、隐孢子虫(*Cryptosporidium*)、新孢子虫(*Neospora*)及艾美耳球虫(*Eimeria*)等^[1]。多数顶复门原虫能够引起人和动物严重疾病,给人和动物的健康造成危害,给养殖业造成经济损失^[2]。

顶复门原虫对宿主细胞的粘附、入侵是其致病的关键,虽然宿主类型不同,但其入侵机制非常相似,原虫入侵依赖于顶端细胞器蛋白的连续分泌^[3],包括微线体蛋白、棒状体蛋白和致密颗粒蛋白。多数蛋白需经蛋白酶修饰或加工使其功能域展现或活性位点形成,蛋白才能发挥功能^[4]。因此,蛋白酶在弓形虫入侵宿主细胞、逃避宿主免疫机制、参与细胞分化和调节致病机制中发挥重要作用^[5-6]。蛋白酶对蛋白水解过程是入侵宿主细胞、蛋白质组装、运输以及从宿主细胞排出所必需的^[7],这些蛋白质中有许多是由丝氨酸蛋白酶加工的,其特征是在活性位点上存在一个保守的丝氨酸残基,丝氨酸蛋白酶抑制剂已被证明可以阻断弓形虫^[8]和疟原虫^[9-10]以及隐孢子虫^[11]的入侵,细胞内发育或逸出,这表明了这些蛋白酶在介导感染中的重要性。

类枯草杆菌蛋白酶(subtilisin-like protease, SUB)是一种丝氨酸蛋白酶,最初是以无活性的前蛋白形式存在,一般由信号肽、前肽结构域(前结构域)和催化结构域组成。在信号肽裂解后,前结构域被自催化裂解,但仍保持非共价键结合,并作为正确折叠和成熟活性酶的分子内伴侣^[12],前结构域通常是它们同源酶的有效和选择抑制剂^[13]。虽然SUB在功能上具有多样性,但一般在分泌运输系统和细胞外分泌中发挥作用。SUB催化三联体残基以保守的 Asp-His-Ser 排列,并且这些残基周

围拥有易于识别的序列^[14]。在寄生虫中, SUB与毒力有关,在虫体入侵宿主细胞的过程中发挥了重要作用,主要参与膜表面糖蛋白、生长因子、血液凝集相关酶、补体酶类等多种蛋白的加工成熟,也可水解外源蛋白提供自身所需。

1 疟原虫 SUB1 的研究进展

疟原虫生活史包括人体内的无性繁殖和蚊体内的有性繁殖两个阶段。疟疾的所有临床表现都是由疟原虫在红细胞内的增殖引起的,其临床特征包括间歇性发热、呕吐、疲劳和因红细胞损伤引起的头痛。大力推行的预防措施和各种抗疟药物的广泛使用大大降低了疟疾的发病率和死亡率,但迄今为止,该疾病在世界范围内仍然每天造成 2 000 人死亡^[15]。

恶性疟原虫在红细胞内进行裂体增殖周期约 36-48 h,大量裂殖子从红细胞释放的过程称为逸出。逸出这一过程受到蛋白酶的调节,起到关键作用的是钙依赖性丝氨酸蛋白酶(Pf-SUB1),在所有已知的疟原虫属基因组中都发现了 PfSUB1 同源基因。

在恶性疟原虫中,已经发现了两种 SUB,分别是 PfSUB1 和 PfSUB2^[16-17]。PfSUB1 具有 SUB 序列保守残基^[18],包括

* **【基金项目】** 山东省自然科学基金(No. ZR2022MH271);山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 202101050153);山东省重点研发项目(No. 2019GSF107054);山东第一医科大学学术提升计划(No. 2019QL005)。

** **【通讯作者】** 孙慧, E-mail: sunhui123aq@126.com

【作者简介】 张欣(1991-),女,山东济宁人,硕士研究生,主要从事寄生虫病原生物学相关研究。

E-mail: xinz1991@163.com

Asp³⁷⁴, His⁴³⁰ 和 Ser⁶⁰⁸, 氧阴离子残基 Asn⁵²², 以及 Gly⁶⁰⁶, Thr⁶⁰⁷ 和 Pro⁶¹²。PfSUB1 在裂殖子发育的后期表达, 最初以酶原形式存在, 至少经历两次蛋白水解后发挥作用^[19]。首先, PfSUB1 自催化裂解形成 p54(54 ku), 然后在天冬氨酸蛋白酶 X 介导下形成成熟的 p47(47 ku), 并集中在致密颗粒中^[20]。利用敲除 PfSUB1 基因的疟原虫感染红细胞, 发现虫体不能逸出, 究其原因是敲除 PfSUB1 的疟原虫无法破坏 PV 和红细胞膜, 因此 PfSUB1 在虫体入侵细胞中发挥作用^[21]。

PfSUB1 具有高度有限的底物特异性, 包括裂殖子表面蛋白和可溶性 PV 蛋白(SERA)^[22]。更好地了解 PfSUB1 的功能、酶学和特异性, 以及筛选 PfSUB1 内源性抑制剂, 有助于开发基于 PfSUB1 特异性抑制剂的抗疟新疗法。

2 弓形虫 SUB1 的研究进展

弓形虫病是由刚地弓形虫引起的一种常见的寄生虫病, 大多数患者没有临床症状或症状轻微, 而免疫功能低下的人可能出现严重症状如危及生命的脑炎, 发育中的胎儿出现流产、死胎等症状^[23]。

Mille 等^[24]利用疟原虫 SUB 的催化区域序列对弓形虫 EST 文库进行同源性搜索, 得到弓形虫 SUB 的 DNA 片段, 设计引物, 利用弓形虫 RH 株 cDNA 文库进行基因扩增, 获得 TgSUB1 基因序列。通过对该基因序列进行蛋白结构分析可知, TgSUB1 含 795 个氨基酸残基, 分子量 8.491 6 ku, 等电点为 5.15, 是一种丝氨酸蛋白酶。利用能够有效识别 TgSUB1 的 PfSUB1 抗血清对 TgSUB1 进行免疫荧光定位, 结果显示荧光集中于虫体尖端, 通过 GPI 锚着与虫体胞膜连接; 免疫电镜分析 TgSUB1 定位于微线体, 以钙离子依赖的方式从虫体的微线体分泌。

Miller 等^[24]的研究发现 TgSUB1 能够连续被加工, TgSUB1 是一种 120 ku 的前蛋白, 在内质网中, TgSUB1 从 120 ku 的形式被快速裂解到 90 ku 形式, 进而被分泌至微线体, 在微线体内发生二次加工, 将 90 ku 的蛋白分解为 82 ku 和 70 ku, 最后分解为 47 ku 直至 44 ku。当使用丝氨酸蛋白酶抑制剂 brefeldin A 可抑制 TgSUB1 由 90 ku 到 82 ku 的转化, 提示 TgSUB1 可能具有自身修饰功能。

有研究认为 TgSUB1 有可能参与虫体逸出过程中蛋白的酶解加工^[25]。通过 TgSUB1 基因缺失虫株进行功能和毒力的研究发现, 缺失 TgSUB1 基因虫株粘附和入侵效率显著下降, 并且无法进行正常的滑移运动。静脉感染小鼠结果显示, TgSUB1 基因缺失组相对于对照组, 小鼠死亡时间推迟, 提示 TgSUB1 的表达对于弓形虫毒力是必须的^[26]。

3 隐孢子虫 CpSUB1 的研究进展

隐孢子虫是一种感染肠道上皮细胞的顶复门原虫^[27], 通过动物与人、人与人接触或者食用受污染的水或食物进行传播, 导致人类和动物腹泻^[28]。免疫力良好的个体通常是无症状或自限的^[29], 然而, 免疫功能低下的患者(如艾滋病患者)感染, 有可能是致命的。

生物信息学分析显示, CpSUB1 全长 3 975 bp, 编码 1 324 个氨基酸, 分子量约为 147 ku, 等电点为 5.829 6。对其蛋白结构预测, 包含一个信号肽, 信号肽位点在 Cys²³ 和 Asn²⁴ 之间, 一个 99-aa 前肽结构域(Pro¹³⁰ 到 Tyr²²⁸)和 291-aa 肽酶 S8 催

化结构域(Lys²⁸⁸ 到 Ile⁵⁷⁸), CpSUB1 的催化结构域包含保守的催化三联体残基 Asp³¹⁰, His³⁶⁶, Ser⁵²⁷ 和氧阴离子残基 Asn⁴⁵⁹^[10], 与其他顶复门原虫 SUB 的同源性为 38~45%^[30-31]。

Wanyiri 等^[32]的研究克隆了 CpSUB1 基因, 表达并纯化了重组前域蛋白并制备了抗血清, CpSUB1 前域的抗血清与隐孢子虫裂解物的 Western blot 结果显示蛋白条带包括 2 条主带(64 ku 和 48 ku)和 2 条次要条带(55 ku 和 30 ku), 其分子量低于预测的 147 ku, 提示 CpSUB1 是作为一种非活性的前蛋白合成, 然后经过翻译后加工成中间产物和成熟的酶。对隐孢子虫感染的 HCT-8 细胞提取 RNA 进行 RT-PCR 分析显示, CpSUB1 在 HCT-8 细胞感染过程中均有表达, 免疫荧光显示该蛋白定位于虫体顶端区域。由于前域蛋白通常是其同源酶的选择性抑制剂, 重组前域蛋白抑制 gp40 的蛋白酶活性和 gp40/15 蛋白加工, 提示 CpSUB1 可能是激活隐孢子虫蛋白酶活性和 gp40/15 加工的候选基因。与对照蛋白相比, 重组前域蛋白显著抑制了 HCT-8 细胞的感染, 这表明 CpSUB1 在隐孢子虫感染宿主细胞中发挥了重要作用, 并提示该酶可能作为干预感染的靶点。

虫体从宿主细胞的逸出以及再感染是完成顶复门原虫生命周期的关键过程, CpSUB1 是调控微小隐孢子虫从宿主细胞逸出的关键酶^[33]。Siezen 等^[18]的研究表明在体外感染 12-20 h 后, 在逸出前 CpSUB1 表达量增加。在 Nava 等^[33]的研究中, 首先确定了 CpSUB1 和 CDPK5 在整个无性感染阶段的表达模式, 然后通过改良的小干扰 RNA(siRNA)方法确定了 CpSUB1 和 CDPK5 的具体作用, 并评估了 CpSUB1 对寄生虫生存能力、宿主肠道感染和感染过程中裂殖子逸出的影响。通过使用 CpSUB1 单链反义 RNA 与 Argonaute 蛋白结合, 诱导了 CpSUB1 的沉默, CpSUB1 的沉默并不影响虫体的运动和靶细胞的入侵。然而, 通过定量 PCR 和流式细胞技术, 检测 CpSUB1 的沉默导致体外释放的裂殖子比例下降了 95%。相比之下, 钙依赖蛋白激酶 CDPK5 的沉默对逸出没有影响。CpSUB1 是隐孢子虫逸出的关键酶, 并提示 CpSUB1 可能是未来疫苗研发和药物开发的一个理想靶点。

4 结语

近年来的研究表明, SUB1 蛋白是顶复门原虫入侵宿主细胞的关键。SUB1 在虫体入侵和发育中发挥重要作用, 且可能成为一个潜在的抗感染药物靶点或者疫苗候选分子。随着顶复门原虫 SUB 的深入研究, 将揭开 SUB 家族蛋白酶在虫体入侵中更深层次的作用。因此, 进一步挖掘并探索 SUB 的结构与生物学功能, 将推动顶复门原虫致病机制研究和抗感染疫苗或潜在药物的研发。

【参考文献】

- [1] 张维, 刘群. 顶复门寄生虫顶质体的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2006(8): 674-678.
- [2] 鲁飞, 卓洵辉, 陆绍红. 顶复门原虫感染与宿主细胞自噬相互作用的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2021, 39(6): 826-831.
- [3] Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together; an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion[J]. Curr Opin Microbiol, 2007, 10(1): 83-89.
- [4] Labesse G, Gelin M, Bessin Y, et al. ROP2 from *Toxoplasma*

- gondii*; a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity[J]. *Structure*, 2009,17(1):139-146.
- [5] Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, et al. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion[J]. *EMBO J*, 2001,20(8):1910-1920.
- [6] Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, et al. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome[J]. *J Clin Invest*, 2000,106(9):1127-1137.
- [7] Shaw MK, Roos DS, Tilney LG. Cysteine and serine protease inhibitors block intracellular development and disrupt the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*[J]. *Microbes Infect*, 2002,4(2):119-132.
- [8] Blackman MJ. Malarial proteases and host cell egress; an emerging cascade[J]. *Cell Microbiol*, 2008,10(10):1925-1934.
- [9] Blackman MJ. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite[J]. *Cell Microbiol*, 2004,6(10):893-903.
- [10] Feng X, Akiyoshi DE, Widmer G, et al. Characterization of subtilase protease in *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis*[J]. *J Parasitol*, 2007,93(3):619-626.
- [11] Forney JR, Yang S, Du C, et al. Efficacy of serine protease inhibitors against *Cryptosporidium parvum* infection in a bovine fallopian tube epithelial cell culture system[J]. *J Parasitol*, 1996,82(4):638-640.
- [12] Shinde U, Inouye M. Propeptide-mediated folding in subtilisin; the intramolecular chaperone concept[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1996,379:147-154.
- [13] Li Y, Hu Z, Jordan F, Inouye M. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants[J]. *Biol Chem*, 1995,270(42):25127-25132.
- [14] Siezen RJ, Leunissen JA. Subtilases; the superfamily of subtilisin-like serine proteases[J]. *Protein Sci*, 1997,6(3):501-523.
- [15] White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, et al. Malaria[J]. *Lancet*. 2014,383(9918):723-735.
- [16] Blackman MJ, Fujioka H, Stafford WH, et al. A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites[J]. *J Biol Chem*, 1998,273(36):23398-23409.
- [17] Barale JC, Blisnick T, Fujioka H, et al. *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999,96(11):6445-6450.
- [18] Siezen RJ, de Vos W, Leunissen JA, et al. Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases[J]. *Protein Eng*, 1991,4(7):719-737.
- [19] Sajid M, Withers-Martinez C, Blackman MJ. Maturation and specificity of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease[J]. *J Biol Chem*, 2000,275(1):631-641.
- [20] Pino P, Caldelari R, Mukherjee B, et al. A multistage antimalarial targets the plasmepsins IX and X essential for invasion and egress[J]. *Science*, 2017,358(6362):522-528.
- [21] Lidumniece E, Withers-Martinez C, Hackett F, et al. Subtilisin-like serine protease 1 (SUB1) as an emerging antimalarial drug target; current achievements in inhibitor discovery[J]. *J Med Chem*, 2022,65(19):12535-12545.
- [22] Withers-Martinez C, Strath M, Hackett F, et al. The malaria parasite egress protease SUB1 is a calcium-dependent redox switch subtilisin[J]. *Nat Commun*, 2014,5:4031.
- [23] Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis[J]. *Lancet*, 2004,363(9425):1965-1976.
- [24] Miller SA, Binder EM, Blackman MJ, et al. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*[J]. *J Biol Chem*, 2001,276(48):45341-45348.
- [25] Lagal V, Binder EM, Huynh MH, et al. *Toxoplasma gondii* protease TgSUB1 is required for cell surface processing of micronemal adhesive complexes and efficient adhesion of tachyzoites[J]. *Cell Microbiol*, 2010,12(12):1792-1808.
- [26] Checkley W, White AC Jr, Jaganath D, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*[J]. *Lancet Infect Dis*, 2015,15(1):85-94.
- [27] Huang DB, White AC. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006,35(2):291-viii.
- [28] Cabada MM, White AC Jr. Treatment of *Cryptosporidiosis*: do we know what we think we know? [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2010,23(5):494-499.
- [29] Xiao L, Ryan UM. *Cryptosporidiosis*: an update in molecular epidemiology[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2004,17(5):483-490.
- [30] Wanyiri JW, O'Connor R, Allison G, et al. Proteolytic processing of the *Cryptosporidium* glycoprotein gp40/15 by human furin and by a parasite-derived furin-like protease activity[J]. *Infect Immun*, 2007,75(1):184-192.
- [31] Louie K, Nordhausen R, Robinson TW, et al. Characterization of *Neospora caninum* protease, NcSUB1 (NC-P65), with rabbit anti-N54[J]. *J Parasitol*, 2002,88(6):1113-1119.
- [32] Wanyiri JW, Techasintana P, O'Connor RM, et al. Role of CpSUB1, a subtilisin-like protease, in *Cryptosporidium parvum* infection in vitro[J]. *Eukaryot Cell*, 2009,8(4):470-477.
- [33] Nava S, White AC Jr, Castellanos-Gonzalez A. *Cryptosporidium parvum* subtilisin-like serine protease (sub1) is crucial for parasite egress from host cells[J]. *Infect Immun*, 2019,87(5):e00784-18.

【收稿日期】 2023-06-25 【修回日期】 2023-09-14