



УДК 577.152.34.042

НОВОЕ О ПРИРОДНЫХ ИНГИБИТОРАХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

© 1998 г. В. В. Мосолов*

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
117071, Москва, Ленинский просп., 33

Поступила в редакцию 25.08.97 г. Принята к печати 12.01.98 г.

Рассмотрены новые данные об ингибиторах протеолитических ферментов и механизме их взаимодействия с ферментами. В последние годы описан ряд новых ингибиторов, которые следует отнести к ранее неизвестным семействам белков. К их числу относятся белки из паразитической нематоды *Ascaris lumbricoides*, экотин из периплазмы *E. coli*, белки РМР-С и -D из саранчи *Locusta migratoria* и гирустазин из пиявки *Hirudo medicinalis*. В то же время установлено, что некоторые белки, которые по своей структуре должны быть отнесены к определенному семейству ингибиторов, могут выполнять иные (не ингибиторные) функции. Так, к семейству соевого ингибитора Кунитца относятся некоторые запасные белки растений, а также белки, образующиеся в ответ на стрессовые воздействия. Существенно расширилось число ингибиторов, взаимодействие которых с ферментами не следует субстратоподобному механизму. Таковыми являются некоторые новые ингибиторы протеиназ системы свертывания крови, такие, как орнитодорин и антикоагулянтный пептид из клеща *Ornithodoros moubata*, ингибитор из яда змеи *Bothrops jararaca*, а также экотин, ингибитор сериновых протеиназ с необычно широким спектром действия. Значительное внимание уделено рассмотрению ингибирования ферментов пропептидами и его механизму.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, ингибиторы протеолитических ферментов, цистатины, серпины, пропептиды, зимогены.

Ингибиторы протеолитических ферментов – большая группа белков, различающихся по физико-химическим свойствам, но объединяемых общей способностью образовывать с ферментами устойчивые комплексы, в составе которых фермент полностью или частично утрачивает активность.

Ингибиторам протеиназ посвящен ряд обзоров, опубликованных в разное время [1–6]. В представленной статье основное внимание будет уделено рассмотрению новых данных, появившихся в последние годы.

Согласно сложившимся представлениям, каждый ингибитор (или каждый реактивный центр

ингибитора) может избирательно действовать на протеолитические ферменты, принадлежащие к одному из четырех классов (сериновые, цистеиновые, аспартильные или металлопротеиназы) [3].

Наиболее многочисленную и наиболее изученную группу составляют ингибиторы сериновых протеиназ, большинство из которых взаимодействуют с ферментом по субстратоподобному механизму и поэтому называются “каноническими” ингибиторами. Молекулы ингибиторов этого типа имеют на поверхности специфическую структуру – “петлю связывания”, в которой располагается расщепляемая пептидная связь $P_1-P'_1$, образующая реактивный центр ингибитора [5].

Все канонические ингибиторы протеиназ внутри одного класса разделяются на семейства родственных белков. Основными критериями, позволяющими отнести ингибитор к тому или иному семейству, являются его аминокислотная последовательность, а также число и локализация дисульфидных связей [3]. До последнего времени насчитывалось 16 семейств канонических ингибиторов сериновых протеиназ [5]. Однако число известных ингибиторов этого типа быстро растет и появляются новые белки, которые по структуре не могут быть отнесены ни к одному из уже изве-

Сокращения: SBTI – соевый ингибитор Кунитца; РМР-С, РМР-D – ингибиторы химотрипсина и лейкоцитарной эластазы из саранчи *Locusta migratoria*; TIMP – тканевые ингибиторы металлопротеиназ; ОВ-белки – белки, связывающие олигосахариды и олигонуклеотиды; ТАР – антикоагулянтный пептид из клеща *Ornithodoros moubata*; IA-1, IA-2 – ингибиторы сериновых протеиназ микроорганизмов из гриба *Pleurotus ostreatus*; МТИ-2 – ингибитор трипсина и химотрипсина из семян горчицы *Sinapis alba*; RTI – ингибитор трипсина и химотрипсина из рапса *Brassica napus*; EPI-F – ингибитор субтилизина из гемолимфы шелковичного червя *Bombyx mor*.

* E-mail: inbio@glas.apc.org, факс: (7-095) 954-27-32.

Таблица 1. Канонические ингибиторы сериновых протеиназ, относящиеся к новым семействам белков

Ингибитор	Источник	Общее число остатков	Число S-S-связей	Ссылка
Ингибиторы трипсина и химотрипсина/калликреина	Корни стрелолиста <i>Sagittaria sagittifolia</i>	150	3	[7]
Ингибиторы трипсина и химотрипсина МТИ-2 и RTI	Семена горчицы (<i>Sinapis alba</i>) и рапса (<i>Brassica napus</i>)	63, 60	4	[8, 9]
Ингибиторы трипсина, химотрипсина и эластазы	Стенки тела паразитической нематоды <i>Ascaris suum</i>	62–65	5	[10]
Ингибиторы эндогенной сериновой протеиназы IA-1, IA-2	Плодовое тело гриба <i>Pleurotus ostreatus</i>	76	Нет	[11]
Экотин	Периплазма <i>E. coli</i>	142	Нет	[12]
Ингибиторы химотрипсина и лейкоцитарной эластазы PMP-C, PMP-D	Жировое тело саранчи <i>Locusta migratoria</i>	36	3	[13]
Ингибитор субтилизина EPI-F	Гемолимфа шелковичного червя <i>Bombyx mori</i>	55	4	[14]
Гирустазин	Пиявка <i>Hirudo medicinalis</i>	55	5	[15]

стных семейств. Некоторые из таких ингибиторов приведены в табл. 1. В нее включены только те белки, для которых полностью установлены аминокислотные последовательности, а также расположение дисульфидных связей. Для ингибитора химотрипсина и лейкоцитарной эластазы (PMP-C), выделенного из жирового тела саранчи *L. migratoria* [13]; ингибитора сериновых протеиназ из паразитической нематоды *A. suum* [10]; экотина (ингибитор сериновых протеиназ из периплазматического пространства *E. coli*) [12] и гирустазина (ингибитор тканевого калликреина из медицинской пиявки) [15] методами ЯМР и рентгеноструктурного анализа установлена также пространственная структура. Отличие пространственной структуры этих белков от всех описанных ранее структур столь велико, что не остается сомнений относительно их принадлежности к новым семействам белков. Таким образом, в настоящее время насчитывается не менее 20 семейств канонических ингибиторов сериновых протеиназ.

Что касается семейств ингибиторов, действующих на протеиназы других классов, то их число относительно невелико. В последние годы уделялось большое внимание изучению ингибиторов цистеиновых протеиназ. Однако подавляющее большинство из вновь выделенных ингибиторов принадлежит к хорошо изученному суперсемейству цистатинов, насчитывающему в своем составе четыре семейства – собственно цистатины, стефины, кининогены и фитоцистатины [16]. Наибольшее число новых ингибиторов цистеиновых протеиназ было выделено из растений и относится к фитоцистатинам. В дополнение к известным ранее фитоцистатинам из риса (оризацистатины I и II) и кукурузы [17, 18] были выделены ингибито-

ры цистеиновых протеиназ из семян глицинии (*Wisteria floribunda*) [19], пыльцы амброзии (*Ambrosia artemisiifolia*) [20], плодов авокадо (*Persea americana*) [21], семян сои [22–24], ячменя [25], подсолнечника [26], сорго [27], тыквы [28], цветочных почек китайской капусты (*Brassica campestris*) [29]. Из клубней картофеля были выделены относительно высокомолекулярные белки (M 80–90 кДа), обладающие активностью ингибиторов цистеиновых протеиназ [30, 31]. Исследования показали, что молекула 85-кДа белка содержит восемь центров связывания папаина с K_i 1×10^{-10} М [32]. С помощью ограниченного протеолиза молекула такого “мультицистатина” может быть расщеплена на несколько доменов. Хотя отдельные домены имели различающиеся N-концевые последовательности, отчетливо просматривается их родство с другими цистатинами [32].

Сведения об ингибиторах цистеиновых протеиназ, не относящихся к суперсемейству цистатинов, немногочисленны. Следует отметить ингибиторы цистеиновых протеиназ из клубней картофеля, которые по структуре могут быть отнесены к семейству соевого ингибитора трипсина Кунитца (SBTI) [33, 34], а также ингибиторы из сои, отличающиеся от цистатинов повышенной чувствительностью к действию восстанавливающих агентов [35].

Из ингибиторов металлсодержащих ферментов наибольшее внимание в последние годы было уделено белкам, относящимся к семейству TIMP из тканей млекопитающих. Этим белкам приписывается важная роль в регуляции активности Zn^{2+} -зависимых протеиназ матрикса – коллагеназы, желатиназы, стромелизина [36]. TIMP – сравнительно низкомолекулярные белки (M 25–30 кДа),

Таблица 2. Белки растений, относящиеся по структуре к семейству SBTI

Белок	Источник	Ссылка
ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ		
1. Бифункциональный ингибитор α -амилазы/субтилизина	Семена злаков	[42]
2. Ингибитор катепсина D	Клубни картофеля	[43]
3. Ингибиторы трипсина, химотрипсина, субтилизина	Клубни картофеля	[44]
	Семена горчицы	[8]
	Клубни таро	[45]
4. Ингибиторы цистеиновых протеиназ	Клубни картофеля	[33]
ЗАПАСНЫЕ БЕЛКИ		
5. Альбумин WBA-1	Семена крылатых бобов	[46]
6. Альбумин (M 21 кДа)	Семена какао	[47]
7. Спорамин	Клубни батата	[48]
СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ		
8. Белки раневого стресса	Листья тополя,	[49]
	ивы	[50]
9. Белок солевого стресса P22	Листья редиса	[51]
10. Белок водного стресса VnD22	Листья рапса	[52]
ДРУГИЕ БЕЛКИ		
11. Миракулин - белок, изменяющий вкус	Плоды тропического кустарника	[53]
12. Нодулин	Корневые клубеньки крылатых бобов	[54]
13. Дегидроаскорбатредуктаза	Хлоропласты шпината	[55]

шесть дисульфидных связей поддерживают структуру, состоящую из шести петель и двух доменов [37].

В 1983 г. японские исследователи Одани и соавт. [38] обратили внимание на сходство первичной структуры ингибитора трипсина из ячменя и запасного 2S-белка из семян клещевины. В свою очередь, белок клещевины, как позднее было установлено, относится к группе родственных запасных 2S-белков, широко распространенных у двудольных растений. Примерами могут служить напипы, запасные белки растений рода *Brassica* [39], конглютин δ 2 из семян люпина (*Lupinus augustifolius*) [40] и богатый серой запасной альбумин из бразильского ореха (*Bertholletia excelsa*) [41].

В табл. 2 представлены белки, которые по первичной структуре могут быть отнесены к семейству SBTI. В их число специально не включены многочисленные ингибиторы типа SBTI, выделенные из других, кроме сои, растений семейства бобовых. Прежде всего обращает на себя внимание то, что семейство белков SBTI объединяет не только ингибиторы сериновых протеиназ из широкого круга растений, но и некоторые ингибиторы, действующие на протеиназы других классов. Наряду с ингибиторами цистеиновых протеиназ, уже упоминавшимися выше, сюда относятся ингибиторы аспартильных протеиназ (катепсина D) из клубней картофеля [43]. Особые

группы составляют запасные белки семян, а также белки, синтез которых индуцируется в растениях в ответ на различные стрессовые воздействия. Некоторые из этих белков способны ингибировать протеиназы, тогда как другие лишены какой-либо выраженной активности. К первым относится белок, накапливающийся в листьях ивы в ответ на механическое повреждение листовой ткани и обладающий активностью ингибитора трипсина [50]. В то же время близкий белок из листьев тополя не обладает ингибиторной активностью [49]. Активность ингибитора трипсина недавно обнаружена у спорамина, главного запасного белка из клубней батата (*Ipomoea batatas*) [48].

Белки, родственные по структуре с ингибиторами протеиназ, но выполняющие другие функции, встречаются не только у растений. Так, к семейству серпинов (ингибиторы сериновых протеиназ из плазмы крови животных и человека) относятся белки – переносчики липофильных молекул, такие, как тироксин- и кортизонсвязывающие глобулины, предшественники пептидных гормонов (ангиотензиноген), а также некоторые белки с пока не выясненными функциями [56].

Подобное явление наблюдается не только для семейства ингибиторов сериновых протеиназ. Так, недавно было показано, что ингибиторы Zn^{2+} -содержащих металлопротеиназ из тканей животных (TIMP) по пространственной структу-

ре принадлежат к той же группе белков, что и нуклеаза стафилококков, энтеротоксин *E. coli* и некоторые другие белки, способные связывать олигосахариды и олигонуклеотиды (ОВ-белки) [37].

Подавляющее большинство протеиназных ингибиторов, как и канонические ингибиторы сериновых протеиназ, взаимодействуют с ферментами по субстратоподобному механизму, в связи с чем этот механизм часто называют стандартным [3, 5]. Однако исследования последних лет показали, что существуют и другие, отличные от стандартного механизмы взаимодействия ингибиторов с протеиназами. В 1990 г. были получены данные о структуре комплексов тромбина с гирудином [57] и одного из цистатинов (стефина В) с папаином [58], которые существенно отличались от структуры исследованных ранее комплексов ингибиторов с сериновыми протеиназами. Основное отличие состояло в том, что в образовании комплексов одновременно участвуют различные, достаточно удаленные области молекулы ингибитора, однако активные центры ферментов не принимают непосредственного участия во взаимодействии. Таким образом, в целом механизм принципиально отличается от стандартного механизма образования фермент-субстратного комплекса.

Дальнейшие исследования показали, что подобные механизмы фермент-ингибиторных взаимодействий достаточно широко распространены. Так, по такому же типу, как гирудин, реагирует с тромбином орнитодорин – белок, выделенный из кровососущего клеща *Ornithodoros moubata* и являющийся высокоспецифичным ингибитором фермента ($K_i 2 \times 10^{-12}$ М) [59]. Другой высокоспецифичный ингибитор тромбина – роднинин из насекомого *Rhodnius prolixus* – взаимодействует с ферментом по “смешанному” механизму. N-Концевой домен белка подобно субстрату образует комплекс с ферментом по его активному центру, тогда как его С-концевой домен связывается подобно С-концевому домену гирудина с центром “узнавания” фибриногена [60].

Еще один тип взаимодействия наблюдался в случае ингибитора тромбина из яда южноамериканской змеи *Bothrops jararaca*. Ингибитор подавляет комплексообразование тромбина с фибриногеном, но не влияет на способность фермента гидролизовать низкомолекулярные субстраты [61]. Позднее было установлено, что ингибитор реагирует с двумя центрами в молекуле тромбина – центром связывания фибриногена и центром связывания гепарина. Подобное взаимодействие, несмотря на полное неучастие активного центра фермента, обеспечивает образование стабильного комплекса ($K_d 0.6$ нМ) [62].

Существование “нестандартных” механизмов показано не только для ингибиторов тромбина. Так, высокоспецифичный ингибитор фактора Ха

ТАР – антикоагулянтный пептид клеща связывается с ферментом по механизму, аналогичному механизму взаимодействия тромбина с гирудином. Четыре аминокислоты N-концевого фрагмента ТАР образуют первичный центр связывания, однако при этом остаток Arg3 не входит в субстратсвязывающий карман S_1 фермента. В то же время С-концевая часть молекулы ингибитора, включающая остатки с 40-го по 54-й, образует вторичный центр связывания [63].

Рассмотренные выше случаи касались высокоспецифичных ингибиторов, действующих на ферменты системы свертывания крови. Однако “нестандартные” механизмы могут быть присущи и ингибиторам, действующим на другие протеиназы. Из этих ингибиторов наиболее изучен экотин. Экотин, белок из периплазматического пространства *E. coli*, находящийся обычно в форме димера, отличается необычно широким спектром действия на ферменты. Он с приблизительно равной эффективностью подавляет активность трипсина, химотрипсина, панкреатической и лейкоцитарной эластаз, калликреина плазмы, факторов Ха и XIIa [64, 65]. Молекула экотина содержит обычную, характерную для ингибиторов, действующих по стандартному механизму, петлю связывания с расщепляемой пептидной связью Met84 – Met85 [66]. Изучение структуры комплекса экотина с трипсином методом рентгеноструктурного анализа показало ее отличие от структуры всех других известных комплексов ферментов с ингибиторами [12, 67]. В процессе образования комплекса реактивный центр ингибитора взаимодействует с активным центром фермента по обычному субстратоподобному типу. Однако димерная структура экотина образует дополнительный центр связывания фермента, расположенный на расстоянии ≈ 45 Å от области реактивного центра. При этом наличие димерной структуры дает возможность каждой субъединице ингибитора связывать одну молекулу трипсина по активному центру, а вторую – используя вторичный центр связывания. Во взаимодействии с этим вторичным центром связывания участвуют остатки трипсина Tyr230...-Asn245 и His91...-Phe94 [12].

Строение комплекса, образованного димерной молекулой экотина с двумя молекулами трипсина, отображено схематически на рис. 1. Для сравнения здесь же представлено строение комплекса фермента с другим димерным ингибитором – ингибитором субтилизина из *Str. albobrigriseolus* (SSI). В отличие от комплекса с экотином каждая молекула SSI взаимодействует только с одной молекулой фермента [68].

Первичными продуктами трансляции для большинства протеиназ являются их неактивные формы или зимогены. Зимогены отличаются от зрелых протеиназ наличием дополнительных N-

Таблица 3. Ингибирование ферментов собственными пропептидами

Фермент	Пропептид (число остатков)	K_i , М	Ссылка
Пепсин куриный	42	1×10^{-8}	[70]
Катепсин D человека	46	3×10^{-8}	[70]
Папаин	107	1.9×10^{-9}	[71]
Глицилэндопептидаза	106	0.9×10^{-6}	[71]
Катепсин В крысы	62	0.4×10^{-9}	[72]
Катепсин L человека	87	0.088×10^{-9}	[73]
Субтилизин E	77	1.4×10^{-9}	[74]
α -Литическая протеиназа	166	0.1×10^{-9}	[75]
Карбоксипептидаза А	94	1.9×10^{-9}	[76]
Термолизин <i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	204	6×10^{-9}	[77]
Металлопротеиназы матрикса (коллагеназа, стромелизин)	81 (фрагменты)	1×10^{-6}	[78]

концевых последовательностей, пропептидов, которые отщепляются в результате процессинга [69]. При этом многие пропептиды способны действовать как эффективные и высокоспецифичные ингибиторы зрелых форм ферментов. Явление

ингибирования пропептидами характерно для протеиназ всех четырех классов. Значения K_i для большинства пропептидов лежат в тех же пределах, что и для других природных ингибиторов протеиназ (табл. 3).

Первые данные о механизме взаимодействия пропептида с ферментом были получены при изучении пространственной структуры пепсиногена. С помощью рентгеноструктурного анализа было показано, что в молекуле свиного пепсиногена часть пропептида, включающая остатки Ser11...-Leu44, занимает субстратсвязывающую полость активного центра, блокируя доступ к каталитически важным остаткам Asp32 и Asp215 [79]. Близкие результаты были получены при изучении пространственной структуры карбоксипептидазы В: глобулярная часть пропептида закрывает углубление, в котором расположен активный центр фермента [80].

Наиболее детально в последние годы были изучены свойства и механизм взаимодействия с ферментами пропептидов цистеиновых протеиназ. Было показано, что пропептид катепсина, и полученный синтетически, и освобождающийся в процессе активации, является эффективным обратимым ингибитором зрелого белка [72]. Интересно, что 87- и 81-членные фрагменты пропептида катепсина L человека с высокой эффективностью действуют на катепсин L (табл. 3), но значительно слабее – на катепсин S и вообще неактивны по отношению к катепсину В и папаину [73]. В отличие от этого пропептиды папаина и глицилэндопептидазы из папаи не обладают высокой избирательностью действия [71]. Пропептиды этих ферментов являются высокоэффективными ингибиторами также для других цистеиновых протеиназ папаи, а именно химопапаина и карикаина, со значениями K_i 10^{-8} – 10^{-9} М [71].

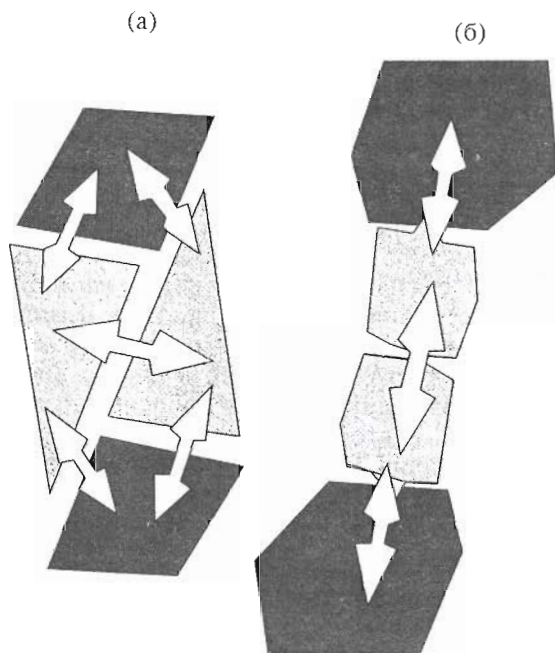


Рис. 1. Схема строения комплексов димеров ингибиторов протеиназ с ферментами: (а) – комплекс экотина с трипсином; (б) – комплекс ингибитора субтилизина из *Sir. albobrisciolus* (SSI) с ферментом. Области, соответствующие молекулам ферментов, более темные [12]. Димеризация молекул экотина происходит по типу “голова к хвосту”. Каждый мономер способен взаимодействовать одновременно с двумя молекулами фермента. Образующаяся при этом сложная сеть внутренних связей стабилизирует тетрамерный комплекс [12].

Ингибирующее действие пропептидов цистеиновых протеиназ сильно зависит от pH. Так, для пропептида катепсина В величина K_i составляет 0.4×10^{-9} М при pH 6.0, но возрастает более чем на порядок при pH 4.0 [72]. В связи с тем что активация катепсина В и других лизосомных ферментов может происходить не только в лизосомах, но и на более ранних этапах их биосинтеза, подобная зависимость от pH может играть важную роль в предотвращении повреждения клеточного содержимого, прежде чем активный фермент поступит в лизосому [81].

Из пространственной структуры прокатепсина L человека (рис. 2) видно, что N-концевая часть пропептида имеет глобулярный характер и содержит три α -спирали и гидрофобное ядро, образованное ароматическими боковыми цепями. С-Концевая часть пропептида имеет вытянутую конформацию и располагается вдоль субстрат-связывающей щели фермента [82]. В прокатепсине В пропептид располагается в молекуле зимогена точно таким же образом, однако более короткий, чем в прокатепсине L, и состоящий всего из 62 остатков пропептида не образует глобулярной структуры в N-концевой части [83]. У зимогена растительной цистеиновой протеиназы прокарикаина пропептид содержит 106 остатков и, так же как у пропептида прокатепсина L, образует глобулярный домен на N-конце [84]. Существенно, что во всех трех зимогенах цистеиновых протеиназ часть пропептида входит в субстрат-связывающую щель фермента подобно естественному субстрату, но в обратной ориентации [82 – 84].

К сожалению, практически отсутствуют данные о структуре комплексов пропептидов со зрелыми формами протеиназ. Единственное исследование было посвящено комплексу субтилизина с его синтетическим пропептидом [85]. Было показано, что в составе комплекса С-концевая часть пропептида связывается непосредственно в активном центре фермента подобно субстрату и остаток Туг77 занимает карман S_1 активного центра. На основании этих данных можно предположить, что механизмы взаимодействия пропептидов с различными ферментами существенно различаются. Специфический механизм, очевидно, имеет место в случае пропептидов металлопротеиназ матрикса. Пропептиды этих ферментов состоят из 80-84 а.о. и содержат консервативную последовательность из 12 а.о. [86]. Был синтезирован ряд пептидов, воссоздающих части этой последовательности, и изучено их действие на ферменты [86, 87]. Два остатка из этой последовательности оказались существенными – Cys75 и Val77 [86]. Можно предположить, что ингибирующее действие этих пептидов связано со способностью остатка Cys75 взаимодействовать с атомом цинка в активном центре фермента в соответствии с предложенным “cysteine-switch”-

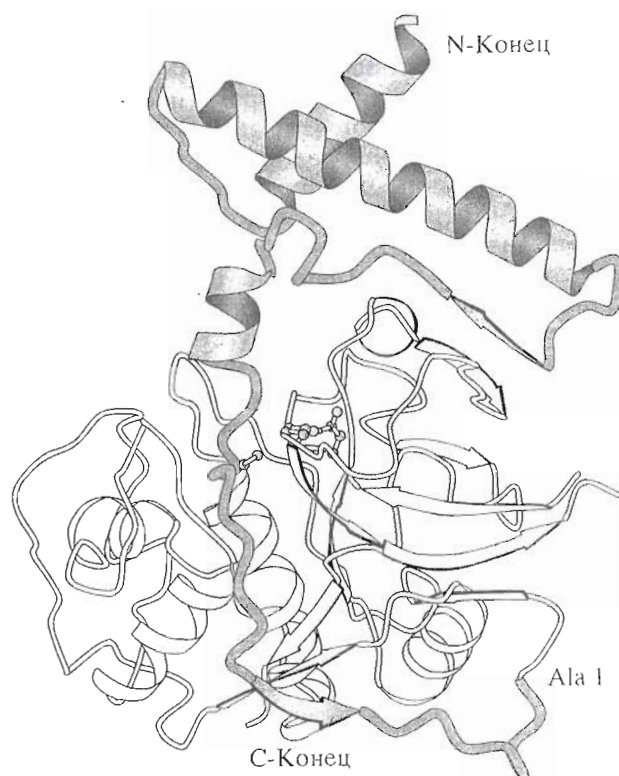


Рис. 2. Пространственная структура молекулы прокатепсина L по данным рентгеноструктурного анализа [82]. Область молекулы, соответствующая пропептиду, более темная. Ala1 – N-концевой остаток зрелого фермента. Кружками обозначены остатки, входящие в состав активного центра фермента.

механизмом активации зимогенов металлопротеиназ [88].

Как видно из приведенных выше данных, число семейств ингибиторов протеиназ достаточно велико и продолжает постоянно увеличиваться. На первый взгляд это положение противоречит общепринятым представлениям, согласно которым число истинно независимых семейств белков, возникших в процессе эволюции, ограничено [89]. Однако следует учитывать, что целый ряд семейств белков, первоначально описанных как семейства ингибиторов протеиназ, в действительности объединяет белки, выполняющие разные функции (см. табл. 2, а также [37, 56, 90]). Можно лишь высказывать предположения, какие из этих функций были присущи белкам-предшественникам. Считается, что у белков суперсемейства серпинов исходные формы обладали активностью ингибиторов протеолитических ферментов и лишь затем некоторые представители семейства приобрели другую специализацию [56]. Для ингибиторов из семян растений более правдоподобно выглядит версия, согласно которой белки-предшественники играли роль запасных белков, часть которых эволюционировала в защитные белки,

способные подавлять активность протеиназ и амилаз насекомых и микроорганизмов [40, 91]. Большой интерес представляет вопрос о взаимоотношениях между ингибиторами протеолитических ферментов и пропептидами. В последние годы появились данные, говорящие об их возможном эволюционном родстве. Так, было установлено структурное сходство между ингибиторами IA-1 и IA-2 из гриба *Pleurotis ostreatus*, действующими на сериновые протеиназы микробного происхождения, и пропептидами протеиназ, относящихся к семейству субтилизина [11]. Нельзя исключить и возможность происхождения пропептидов от собственного предшественника. Об этом говорят, в частности, данные, показывающие, что некоторые структурные особенности, свойственные пропептидам цистеиновых протеиназ семейства папаина, обнаруживаются у ряда других белков, например у белков Т-лимфоцитов, функции которых пока остаются неизвестными [92].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ryan C.A.// Ann. Rev. Plant Physiol. 1973. V. 24. P.173–196.
- Richardson M.// Phytochemistry. 1977. V. 16. P. 159–169.
- Laskowski M., Jr., Kato I.// Ann. Rev. Biochem. 1980. V. 49. P. 593–626.
- Garsia-Olmedo F., Salcedo G., Sanchez-Monge R., Gomez L., Royo J., Carbonero P.// Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol. 1987. V. 4. P. 275–334.
- Bode W., Huber R.// Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. P. 433–451.
- Мосолов В.В.// Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 153–160.
- Yang H.-L., Luo R.-S., Wang L.-X., Zhu D.-X., Chi C.-W.// J. Biochem. 1992. V. 111. P. 537–545.
- Menegatti E., Tedeschi G., Ronchi S., Bartolotti F., Ascenzi P., Thomas R. M., Bolognesi M., Palmieri S.// FEBS Lett. 1992. V. 301. P. 10–14.
- Ceceliani F., Bartolotti F., Menegatti E., Ronchi S., Ascenzi P., Palmieri S.// FEBS Lett. 1994. V.342. P. 221–224.
- Huang K., Strynadka N.C.J., Bernard V.D., Peanasky R.J., James M.N.G.//Structure. 1994. V. 2. P. 679–689.
- Dohmae N., Takio K., Tsumuraya Y., Hashimoto Y.// Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 316. P. 498–506.
- McGrath M.E., Gillmor S.A., Fletterick R.J.// Protein Sci. 1995. V. 4. P. 141–148.
- Mer G., Hietter H., Kellenberger C., Renatus M., Luu B., Lefevre J.-F.// J. Mol. Biol. 1996. V. 258. P. 158–171.
- Pham T.-N., Hayashi K., Takano R., Itoh M., Eguchi M., Shibata H., Tanaka T., Hara S.// J. Biochem. 1996. V. 119. P. 428–434.
- Mittl P. R., Marco S. D., Fendrich G., Pohlig G., Heim J., Sommerhoff C., Fritz H., Priestle J.P., Grutter M.G.// Structure. 1997. V. 5. P. 253–264.
- Turk V., Bode W.// FEBS Lett. 1991. V. 285. P. 213–219.
- Abe K., Emori Y., Kondo H., Suzuki K., Arai S.// J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 16793–16797.
- Abe M., Abe K., Kuroda M., Arai S.// Eur. J. Biochem. 1992. V. 209. P. 933–937.
- Hirashiki I., Ogata F., Yoshida N., Makisumi S., Ito A.// J. Biochem. 1990. V. 108. P. 604–608.
- Rogers B. L., Pollock J., Klapper D. G., Griffith I.J.// Gene. 1993. V. 133. P. 219–221.
- Kimura M., Ikeda T., Fukumoto D., Yamasaki N., Yonekura M.// Biosci. Biotech. Biochem. 1995. V. 59. P.2328–2329.
- Brzin J., Ritonja A., Popovic T., Turk V.// Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1990. V. 371. Suppl. P. 167–170.
- Hines M. E., Osuala C. I., Nielsen S. S.// J. Agric. Food Chem. 1991. V. 39. P. 1515–1520.
- Misaka T., Kuroda M., Iwabuchi K., Abe K., Arai S.// Eur. J. Biochem. 1996. V. 240. P. 609–614.
- Иевлева Е. В., Руденская Ю. А., Зимачева А. В., Мосолов В.В.// Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1618–1623.
- Kouzuma Y., Kawano K., Kimura M., Yamasaki N., Kadowaki T., Yamamoto K.// J. Biochem. 1996. V. 119. P. 1106–1113.
- Li Z., Sommer A., Dingermann T., Noe C. R.// Mol. Gen. Genet. 1996. V. 251. P.499–502.
- Иевлева Е.В., Руденская Ю.А., Дунаевский Я.Е., Мосолов В.В.// Биохимия. 1997. Т. 62. С. 644–650.
- Lim C. O., Lee S. I., Chung W. S., Park S. H., Hwang I., Cho M. J.// Plant Mol. Biol. 1996. V. 30. P. 373–379.
- Bolter C. J.// Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 1347–1353.
- Waldron C., Wegrich L. M., Owens-Merlo P. A., Walsh T. A.// Plant Mol. Biol. 1993. V. 23. P. 801–812.
- Walsh T. A., Strickland J. A.// Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 1227–1234.
- Krizaj I., Drobnic-Kosorok M., Brzin J., Jerala R., Turk V.// FEBS Lett. 1993. V. 333. P. 15–20.
- Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K.// Plant Cell Physiol. 1994. V. 35. P. 303–312.
- Зимачева А.В., Мосолов В.В.// Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1687–1696.
- Doherty A.J.P., O'Connell J., Crabbe T., Angal S., Murphy G. // Trends Biotechnol. 1992. V. 10. P. 200–207.
- Williamson R. A., Mortorell G., Carr M. D., Murphy G., Doherty A. J. P., Freedman R. B., Feeney J.// Biochemistry. 1994. V. 33. P. 11745–11759.
- Odani S., Koide T., Ono T., Ohnishi K.// Biochem. J. 1983. V. 213. P. 543–545.
- Svendsen I., Nicolova D., Goshev I., Genov N.// Carlsberg Res. Commun. 1989. V. 54. P. 231–239.
- Lilley G. G., Inglis A. S.// FEBS Lett. 1986. V. 195. P. 235–241.

41. *Ampe C., VanDamme J., DeCastro L. A. B., Sampio M. J. A. M., VanMontagu M., Vandekerckhove J.* // Eur. J. Biochem. 1986. V. 159. P. 597–604.
42. *Svendson I., Hejgaard J., Mundy J.* // Carlsberg Res. Commun. 1986. V. 51. P. 43–50.
43. *Mares M., Meloun B., Pavlik M., Kostka V., Baudys M.* // FEBS Lett. 1989. V. 251. P. 94–98.
44. *Walsh T. A., Twitchell W. P.* // Plant Physiol. 1991. V. 97. P. 15–18.
45. *Argall M. E., Bradbury J. H., Shaw D. C.* // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1204. P. 189–194.
46. *Kortt A. A., Strike P. M., DeJersey J.* // Eur. J. Biochem. 1989. V. 181. P. 403–408.
47. *Tai H., McHenry L., Fritz P. J., Furtek D. B.* // Plant Mol. Biol. 1991. V. 16. P. 913–915.
48. *Yeh K.-W., Chen J.-C., Lin M.-I., Chen Y.-N., Lin C.-Y.* // Plant Mol. Biol. 1997. V. 33. P. 565–570.
49. *Bradshaw H. D., Jr., Hollick J. B., Parsons T. J., Clarke H. R. G., Gordon M. P.* // Plant Mol. Biol. 1990. V. 14. P. 51–59.
50. *Saarikoski P., Clapham D., VonArnold S.* // Plant Mol. Biol. 1996. V. 31. P. 465–478.
51. *Lopez F., Vansuyt G., Derancourt J., Fourcroy P., Casse-Delbart F.* // Cell. Mol. Biol. 1994. V. 40. P. 85–90.
52. *Downing W. L., Mauxion F., Fauvargue M.-O., Reviron M. P., de Vienne D., Vartanian N., Giraudat J.* // Plant J. 1992. V. 2. P. 685–693.
53. *Theerasilp S., Hitotsuya H., Nakajo S., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y.* // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 6655–6659.
54. *Manen J. F., Simon P., Van Slooten J. C., Osteras M., Frutiger S., Hughes G. J.* // Plant Cell. 1991. V. 3. P. 259–270.
55. *Trumper S., Follmann H., Haberlein I.* // FEBS Lett. 1994. V. 352. P. 159–162.
56. *Huber R., Carrell R. W.* // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 8951–8966.
57. *Gruter M. G., Priestle J. P., Rahuel J., Grossenbacher H., Bode W., Hofsteenge J., Stone S. R.* // EMBO J. 1990. V. 9. P. 2361–2365.
58. *Stubbs M. T., Laber B., Bode W., Huber R., Jerala R., Lenarcic B., Turk V.* // EMBO J. 1990. V. 9. P. 1939–1947.
59. *Van de Locht A., Stubbs M. T., Bode W., Friedrich T., Bollschweiler C., Hoffken W., Huber R.* // EMBO J. 1996. V. 15. P. 6011–6017.
60. *Van de Locht A., Lamba D., Bauer M., Huber H., Friedrich T., Kroger B., Hoffken W., Bode W.* // EMBO J. 1995. V. 14. P. 5149–5157.
61. *Zingali R. B., Jandrot-Perrus M., Guillin M.-C., Bon C.* // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 10794–10802.
62. *Arocas V., Zingali R. B., Guillin M. C., Bon C., Jandrot-Perrus M.* // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 9083–9089.
63. *Dunwiddie C. T., Nepper M. P., Nutt E. M., Waxmann L., Smith D. E., Hofmann K. J., Lumma P. K., Garsky V. M., Vlasik G. P.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 12126–12131.
64. *Chung C. H., Ives H. E., Almeda S., Goldberg A. L.* // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 11032–11038.
65. *Seymour J. L., Lindquist R. N., Dennis M. S., Moffat B., Yansura D., Reilly D., Wessinger M. E., Lazarus R. A.* // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 3949–3958.
66. *McGrath M. E., Hines W. M., Sakanari J. A., Fletterick R. J., Craik C. S.* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 6620–6625.
67. *McGrath M. E., Erpel T., Bystroff C., Fletterick R. J.* // EMBO J. 1994. V. 13. P. 1502–1507.
68. *Takeuchi Y., Satow Y., Nakamura K.T., Mitsui Y.* // J. Mol. Biol. 1991. V. 221. P. 309–325.
69. *Neurath H.* // Science. 1984. V. 224. P. 350–357.
70. *Fusek M., Mares M., Vagner J., Voburka Z., Baudys M.* // FEBS Lett. 1991. V. 287. P. 160–162.
71. *Taylor M. A. J., Baker K. C., Briggs G. S., Connerton I. F., Cummings N.J., Pratt K. A., Revell D. F., Freedman R. B., Goodenough P. W.* // Protein Eng. 1995. V. 8. P. 59–62.
72. *Fox T., DeMiguel E., Mort J. S., Storer A. C.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 12571–12576.
73. *Carmona E., Dufuor E., Plouffe C., Takebe S., Mason P., Mort J. S., Menard R.* // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 8149–8157.
74. *Li Y., Hu Z., Jordan F., Inouye M.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 25127–25132.
75. *Baker D., Sohl J. L., Agard D. A.* // Nature. 1992. V. 356. P. 263–265.
76. *SanSegundo B., Martinez M. C., Vilanova M., Cuchillo C. M., Aviles F.X.* // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 707. P. 74–80.
77. *O'Donohue M.J., Beaumont A.* // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 26477–26481.
78. *Fotouhi N., Lugo A., Visnick M., Lusch L., Walsky R., Coffey J. W., Hanglow A.C.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 30227–30231.
79. *James M. N. G., Sielecki A. R.* // Nature. 1986. V. 319. P. 33–38.
80. *Coll M., Guash A., Aviles F. X., Huber R.* // EMBO J. 1991. V. 10. P. 1–9.
81. *Mach L., Mort J. S., Gloszl J.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 13030–13035.
82. *Coulombe R., Grochulski P., Sivaraman J., Menard R., Mort J. S., Cygler M.* // EMBO J. 1996. V. 15. P. 5492–5503.
83. *Cygler M., Sivaraman J., Grochulski P., Coulombe R., Storer A. C., Mort J. S.* // Structure. 1996. V. 4. P. 405–416.
84. *Groves M. R., Taylor M. A. J., Scott M., Cummings N. J., Pickersgill R. W., Jenkins J. A.* // Structure. 1996. V. 4. P. 1193–1203.

85. Bryan P., Wang L., Hoskins J., Ruvinov S., Strausberg S., Alexander P., Almog O., Gilliland G., Gallagher T. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 10310–10318.
86. Stetler-Stevenson W. G., Talano J.-A., Gallaher M. E., Krutzsch H. C., Liotta L. A. // *J. Am. Med. Sci.* 1991. V. 302. P. 163–170.
87. Melchiori A., Albini A., Ray J. M., Stetler-Stevenson W. G. // *Cancer Res.* 1992. V. 52. P. 2353–2356.
88. Springman E. B., Angleton E. L., Birkedal-Hansen H., Van Wart H. E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 364–368.
89. Rodakis G. C., Kafatos F. C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 3551–3555.
90. Strobl S., Muhlhahn P., Bernstein R., Wilschek R., Maskos K., Wunderlich M., Huber R., Glockshuber R., Holak T. A. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 8281–8293.
91. Barber D., Sanchez-Monge R., Mendez E., Lazaro A., Garsia-Olmedo F., Salcedo G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 869. P. 115–118.
92. Karrer K. M., Peiffer S. L., DiTomas M. E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 3063–3067.

Advances in Studies of Natural Inhibitors of Proteolytic Enzymes

V. V. Mosolov*

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia

New data on proteolytic enzyme inhibitors and mechanisms of their interaction with the enzymes are reviewed. In recent years, a number of new inhibitors comprising families earlier unknown have been described such as proteins from the parasitic nematode *Ascaris lumbricoides*, ecotin from the periplasm of *Escherichia coli*, proteins PMP-C and PMP-D from locust *Locusta migratoria*, and hirustasin from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. At the same time, some proteins that may be assigned to inhibitors on the basis of their structures were found to perform other (not inhibitory) functions. Thus, the family of the Kunitz soybean trypsin inhibitor includes plant storage proteins and proteins whose synthesis is induced by stress factors. Numerous inhibitors interacting with the enzymes by mechanisms other than the substrate-like ones were identified, such as ornithodorin and anticoagulant peptide from tick *Ornithodoros moubata* (inhibitors of the blood clotting system proteases), an inhibitor from snake (*Bothrops jararaca*) venom, and ecotin, an inhibitor of serine proteases with an unusually broad specificity range. Special emphasis is placed on enzyme inhibition with propeptides and the mechanism of this process.

Key words: proteolytic enzymes, proteolytic enzyme inhibitors, cystatins, propeptides, zymogens

* Fax: (+7-095) 954-2732; e-mail: inbio@glas.apc.org.