



海葵多肽神经毒素结构与功能 研究新进展*

张均顺 张培军

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 海葵神经毒素是一类能与可激动细胞电压门控钠通道发生亲和作用的海洋多肽毒素。根据80—90年代中期国际上对海葵神经毒素的研究成果,重点对其结构特征、结构与功能的关系进行综合评述。已有的结果表明,所有已发现的海葵神经毒素其同源性较高,拥有相似的二级结构和三维结构;不规则环状结构的正确构象对毒素的心肌刺激活性是至关重要的。通过比较研究方法,作者认为: type I 毒素的残基18和 type II 毒素的残基17侧链具有强疏水性,对毒素的活性起关键作用;而 type I 毒素残基43和 type II 毒素残基40的疏水烷基侧链,可能对海葵毒素的形成起决定作用。

关键词 海葵多肽毒素 结构 功能

学科分类号 Q176

目前,众多的研究表明多种多肽毒素能与可激动细胞的电压门控离子通道发生相互作用,其中 α -蝎毒素、 μ -芋螺毒素和海葵毒素能与钠通道发生相互作用。海葵毒素与神经、肌肉的电压门控钠通道3位点发生作用,并改变通道的功能。因此,毒素作为分子探针可用于钠通道的生物学的研究(Catterall, 1992);另一方面,海葵毒素表现出多种药物活性,其中最为重要的是海葵毒素对心肌组织显示出非常强的生理活性,即对心肌产生正收缩功能。更令人兴奋的是,海葵毒素对心肌产生生理活性的过程中,对实验哺乳动物的心率和血压都没有不利的影响(Blair *et al*, 1978; Shibata *et al*, 1976; Gross *et al*, 1985),因此,海葵毒素是一类良好的强心剂的药物模型。探讨海葵毒素的结构与功能,特别是确定多肽的药物活性团(pharmacophore),是未来设计强心药物的基础。

1 海葵神经毒素的结构特征

1.1 海葵神经毒素的氨基酸序列

从所有已经纯化的海葵神经毒素一级结构来看,大部分为46—49个氨基酸,称为长链神经毒素,分子量在5KDa左右;另一些分子量小于3KDa的多肽,称为短链多肽毒素。所有已知的长链海葵毒素序列见表1。从氨基酸序列的比较可以看到,海葵毒素的共性

* “九五”国家科技攻关项目,96C010504号。张均顺,男,出生于1963年4月,博士,助理研究员, E-mail: lyjing li

是,这种毒素皆由 46—49 个氨基酸残基组成;存在 6 个 Cys 残基;所有毒素存在 12 个相同的氨基酸残基(包括 6 个 Cys);所有的毒素 C 末端都是亲水性氨基酸残基;至今发现的所有海葵神经毒素都存在三对二硫键。众所周知,相同的蛋白活性应该具有相似的结构特征。由此可知,以上 5 个特性构成了海葵神经毒素的共性,这是表现生理活性的基本要素。

通过双扩散实验发现(Schweitz *et al*,1985),毒素 As II 和 As V 的抗体能与毒素 As II,AsV, Ap-A 和 Ap-B 发生免疫沉淀反应;毒素 Rp I,Rp II,Rp III,Rp IV 都能识别 Rp III 的抗体,但不能被 AsII,AsV 的抗体沉淀;RpIII 的抗体不能与毒素 AsII,As V,Ap-A 和 Ap-B 发生免疫沉淀反应。此外,用双扩散检测实验发现浮标海葵(Bolocera)毒素的抗血清能沉淀 sII,并且 AsII 的抗血清能沉淀浮标海葵毒素,浮标海葵毒素的氨基酸序列与 AsII 十分相似(Kem *et al*, 1989)。由以上结果可以明显看出,海葵毒素分成两大类。

表1 海葵神经毒素的氨基酸序列

Tab.1 Amino acid sequences of sea anemone neurotoxins

Ap-A	G V S	C L C	D S D	G P S	V R G	N T L S	G T L	W L Y P S G	C P S	G W H N C	K A H G P T I G W	C C K Q
Ap-B	G V P	C L C	D S D	G P R	R P R	G N T L S	G I L	W F Y P S G	C P S	G W H N C	K A H G P N I G W	C C K K
As I	G A	C L C	K S D	G P N	T R G	N S M S	G T I	W V - - F G	C P S	G W N N C	E G R A - I I G T	C C K Q
As II	G P	C L C	D S D	G P S	V R G	N T L S	G I I	W L - - A G	C P S	G W H N C	K K H G P T I G W	C C K Q
As V	G V P	C L C	D S D	G P S	V R G	N T L S	G I L	W L - - A G	C P S	G W H N C	K K H K P T I G W	C C K
Af I	G V A	C L C	D S D	G P N	V R G	N T L S	G T I	W L A - - G	C P S	G W H N C	K A H G P T I G W	C C K Q
Af II	G G V P	C L C	D S D	G P S	V R G	N T L S	G I I	W L A - - G	C P S	G W H N C	K A H G P T I G W	C C K Q
Bc III	G V A	C R C	D S D	G P T	S R G	M T L T	G T L	W L T - G G	C P S	G W H N C	C R G S G P F I G Y	C C K K
Sh I	A A	C K C	D D E	G P D	I R T	A P L T	G T V	D L - - G S	C N A	G W E K C	C A S Y Y T I I A D	C C R K K K
Rp II	A S	C K C	D D D	G P D	V R S	A T F T	G T V	D F - - W N	C N E	G W E K C	C T A V Y T P V A S	C C R K K K
Rp III	G N	C K C	D D E	G P N	V R T	A P L T	G Y V	D L - - G Y	C N E	G W E K C	C A S Y Y S P I A E	C C R K K K
Hm III	G N	C K C	D D E	G P Y	V R T	A P L T	G Y V	D L - - G Y	C N E	G W E K C	C A S Y Y S T I A E	C C R K K K

1) Ap-A 见 Tanaka 等(1977); Ap-B 见 Reimer 等(1985); As I 见 Wunderer 等(1978); As II 见 Wunderer 等(1976); As V 见 Scheffler 等(1982); Af I, AfII 见 Sunahara 等(1987); Bc III 见 Malpezzi 等(1993); Sh I 见 Kem 等(1989); Rp II 见 Wemmer 等(1986); Rp III 见 Metrone 等(1987); Hm III 见 Zykova 等(1985)

另外,从氨基酸序列比较容易将海葵神经毒素分成两种类型,Ap-A,Ap-B, Af I, AfII,AsI,AsII,AsV 属一类,这类多肽中有 24 个氨基酸残基相同,其他 12—15 个氨基酸残基不同;Sh I, Rp II, RpIII, HmIII 属另一类,这类多肽有 28 个氨基酸残基相同,其他 10 个不同。Kem 等(1989)根据毒素氨基酸残基差异和免疫学交叉反应实验,将已知的海葵毒素分成两类:Ap-A 所在的组为第一类(type I)毒素,也称海葵肽类(Actiniid)毒素,因为它们皆来源于海葵科(Actiniidae)。Sh I 所在的组为第二类(type II)毒素,也称刺海葵肽类(Stichodactylid)毒素,因为它们皆来源刺海葵科(Stichodactylidae)(Kem *et al*,1989)。进一步比较后看到,type I 和 type II 之间的细节性差异:刺海葵肽类毒素中存在三个连续的羧基氨基酸残基 Asp-6—Asp-7—Glu-8(或 Asp-8),而在海葵类毒素中存在间断的两个羧基氨基酸残基,即 Asp-7 和 Asp-9;海葵肽类毒素中存在 2—3 个 trp 残基,而在刺海葵肽类毒素中只存在 1 个 trp 残基;海葵肽类毒素 C-末端中存在 1—2 强碱性残基,而在刺海葵肽类毒素 C-末端存在 4 个强碱性残基,即 Arg-Lys-Lys-Lys。Type I 和 Type II 结构差

别是决定以上两种毒素活性差异的重要因素。

1.2 海葵神经毒素的二级结构及其特征

二维核磁共振技术引入到海葵神经毒素结构的研究中,使若干海葵神经毒素的二级结构获得确定(Norton,1991)。它们的共同特征为:在整个多肽二级结构中不存在 α 螺旋结构。四链反向平行的 β 折叠(four stranded antiparallel β -sheets)结构组成多肽二级结构的核心, β 折叠链则由三个大小不同的环状结构连接,其中连接第一链和第二链 β 折叠的是不规则环状结构。

1.3 海葵神经毒素的三维结构及其特征

随着多维高分辨率核磁共振(NMR)技术的出现和不断完善,多肽三维结构分析得到迅速发展,特别是长距几何学和限制性分子动力学(restrained molecular dynamics)计算方法引入到NMR数据分析,使许多溶液状态下的多肽三维结构获得确定。已经确定三维结构的海葵毒素有:AsIa,ShI和Ap-A。虽然AsIa和Ap-A为type I,ShI为type I,但三个毒素有十分相似的三维总体折叠结构,只是在分子的二级结构上,如分子内的氢键、分子的 β 凸起结构和 β -转角结构等存在局部结构差异。从Ap-A的立体结构来看,从Ap-A四链反向平行 β -折叠结构中延伸出的侧链,对整个分子的疏水核心的形成有决定性作用;另外,分子中的三个芳香族残基Trp的吲哚环也参与疏水核心的形成,其中Trp23的吲哚环在疏水核的中心,而Trp33和Trp45的芳香环在疏水区表面(Pallaghy *et al.*,1995; Norton *et al.*,1986)。因此,可以得出以下的结论:海葵神经毒素的三维总体折叠结构是决定海葵毒素生物活性的基础,而不同毒素一级结构的差异是导致所有毒素空间构象不同,最终使不同毒素的生物活性表现异性的决定因素,因此全面认识不同残基突变,特别是对空间构象影响很大的疏水性残基,将有助于确定海葵毒素的药物活性团。

2 海葵神经毒素的结构与功能的关系

化学修饰是研究蛋白质一级结构中残基变化对蛋白质功能影响的重要手段,但化学修饰的反应条件比较难以控制,使这种方法又存在致命的弱点,不同的化学修饰有可能使蛋白质结构产生差别,使修饰衍生物的活性不同,可能导致自相矛盾的结论。例如:Ap-A中Arg-14残基用苯甲酰甲醛衍生对毒素的生物活性没有影响(Newcomb *et al.*,1980);而AsII中Arg-14残基用1,2-环己二酮修饰之后,则完全不能与培养细胞中钠通道结合(Barhanin *et al.*,1981);另外,RTX III的Arg-13用苯甲酰甲醛或1,2-环己二酮修饰,只导致毒素的活性降低5倍(Makhnyr *et al.*,1989)。因此,寻找其他手段研究结构与功能显得十分必要。由于克隆化DNA的点突变技术的出现和成熟,使其成为研究蛋白质结构与功能的理想手段。

在所有已发现的海葵毒素中,Ap-B表现出最强的心肌收缩活性(Norton,1991),所以大部分有关海葵毒素结构与功能的研究都是以Ap-B为材料获得的。1992年,Ap-B表达质粒(PMG2)的构建(Gallagher *et al.*,1992),使用点突变技术研究海葵毒素的结构与功能成为现实。

Blumenthal研究组(Khera *et al.*,1995)基于ShI的三级结构建立了Ap-B的三维结构模型。结果显示,Arg-12,Arg-14,lys-48和lys-49形成正离子簇,它们参与和受体发生相互作用。用点突变技术对Ap-B中Arg-12,Arg-14,lys-48和lys-49进行了单点和两点突变

(Khera *et al*, 1994; Gallagher *et al*, 1994; Khera *et al*, 1995), 通过 Ap-A, Ap-B 和 Ap-B 的双突变体 R12s-K49Q 的电生理性质比较研究表明, Ap-B 中 Arg-12 和 lys-49 对 Ap-B 的高亲和性及分辨钠通道异构体有决定性作用; Arg-14 所带的正电荷对生物活性来说不是必不可少的, 因为 Arg-14 突变体电荷的失去可能可以从 Arg-12 或两个 C 末端残基的电荷中获得部分补偿。曾用胰蛋白酶将 Ap-A 的 Arg-14—Gla-15 之间肽链切断, 结果使 Ap-A 完全失去了心肌刺激活性, 但与钠通道的结合亲和力没有显著的下降 (Gould *et al*, 1990; Norton, 1991), 因此认为: 由残基 8—18 组成的不规则的环状结构的正确构象, 对海葵神经毒素的心肌刺激活性起关键作用; 而 lys-48 所带正电荷对 Ap-B 生物活性影响很小。

现有的文献通常认为: 在两大类海葵神经毒素中处于无规则状态结构中的 Asp-7, Asp-9 (Type I) 及 Asp-6—Asp-7—Glu-8 (type II) 残基结构, 对毒素的活性十分重要 (Newcomb *et al*, 1980; Barhanin *et al*, 1981; Fogh *et al*, 1990), 但没有确切的结论。1996 年, Blumenthal 研究组 (Khera *et al*, 1996) 用点突变技术探讨了 Ap-B 中除 Arg-12, Arg, lys-48 和 lys-49 之外的其它带电荷残基对毒素生物活性所起的作用。Asp-7 的突变将使 Ap-B 的突变体不能折叠成有活性的产物, 突变体 H39A 和 H34A 的生物活性与 Ap-B 的天然产物相似或基本一致。相比之下, D9N 和 K37A 突变体和活性则比 Ap-B 本身要降低 7—12 倍。因此 Khera 等 (1996) 认为: Asp-7 是一个重要的结构残基, 它的存在对二硫键的形成, 乃至高级结构的确定有关键的作用。而 Asp-9 的负电荷并不是必不可少的, 但能形成氢键的侧链对多肽的正常折叠及作用于钠离子通道都起关键作用, 另外, lys-37 可能与钠通道作用中发挥作用。

Dias-kadambi 等 (1996) 还是用点突变技术研究了疏水性残基 Leu-18 和 Ile-43 对 Ap-B 生物活性的贡献。他发现, Ile-43 进行保守性突变, 如 I43L 和 I43V 对生物活性影响不大, 而 I43A 和 I43G 突变体则不能正常折叠形成三对二硫键。对于疏水残基 Leu-18 进行 L18V 和 L18A 突变, 通过离子流动 (in flux) 检测, 可以发现, L18V 和 L18A 突变体的生物活性分别下降 231 倍和 672 倍, 是至今发现对 Ap-B 生物活性影响最大的残基。对表 1 中 Type I 型和 Type II 型毒素的氨基酸序列进行分析, 可以清楚看到: 与 Ap-B 的 leu-18 残基对应的所有已知海葵多肽毒素的氨基酸残基, 都有强疏水性的侧链, 如 Met, Leu, Phe。因此, 认为, 这个位置的残基的强疏水性侧链对海葵毒素的活性起关键性作用。另外, 在 Ap-B 的二级结构里, Ile-43 处于连接第三和第四链 b 折叠的环状结构上; 同时在三级结构上, 它与 Phe-24 和 Tyr-25 形成疏水区是 Ap-B 折叠成有活性构象的重要条件。在 ShI 连接第三和第四链 b 折叠环状结构中, 存在一个紧密的转角为强疏水性, 由残基 38—41 组成, 残基 Ile-39 和 Ile-40 的疏水侧链与空间相通的 Tyr-36 和 Leu-24 的侧链相互作用形成分子的疏水区。纵观 Type I 和 Type II 毒素的一级结构, 在 Ap-A 和 ShI 对应的残基位置上, 所有的已知海葵毒素都是由疏水性较强的 Leu 和 Ile 的残基构成。虽然 Ile-43 的突变对于钠通道作用影响不大, 但 Ile-43 可能是一个重要的结构决定子。

3 结语

海葵神经毒素存在 12 个完全相同的基本氨基酸残基, 它们是决定海葵神经毒素二级结构的基本要素。

海葵神经毒素的二级结构为: 四链反向平行的 β 折叠和三个连接 β 折叠链的环状结构;

其中不规则环状结构的正确空间构象对心肌刺激活性有决定性作用。

从已确定的海葵神经毒素的二级和三维结构来看,毒素有十分相似的二级结构和几乎相同的三维整体结构,但每种毒素的生理活性相差很大,从而表明毒素的活性不仅取决于二级和三维结构,而且与毒素一级结构中残基侧链的空间构象密切相关。

总结近年来海葵毒素结构与功能的研究成果,作者认为: Type I 毒素的 Ile-43 残基和 Type II 毒素的 Ile-40 可能是一个重要的结构决定因素,而 Typr I 毒素的第 18 位残基和 Type II 毒素的第 17 位残基侧链的疏水性对海葵毒素的活性起关键性作用。

参 考 文 献

- Barhanin J, Hugues M, Schweitz H *et al*, 1981. Structure-function relationship of sea anemone toxin II from *Anemonia sulcata*. *J Biol Chem*, 256: 5764—5769
- Blair R W, Peterson D F, Bishop V S, 1978. The effects of anthopleurin-A on cardiac dynamics in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 207:271—276
- Catterall W A, 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Reviews*, 72: S15—S48
- Dias-Kadambi B L, Drum C L, Hanck D A *et al*, 1996. Leucine 18, a hydrophobic residue essential for high affinity binding of anthopleurin B to the voltage-sensitive sodium channel. *J Biol Chem*, 271: 9422—9428
- Fogh R H, Kem W R, Norton R S, 1990. Solution structure of neurotoxin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, a nuclear magnetic resonance, distaste geometry, and restrained molecular dynamics study. *J Biol Chem*, 265: 13016—13028
- Gallagher M J, Blumenthal K M, 1992. Cloning and expression of wild-type and mutant forms of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B *J Biol Chem*, 267: 13958—13963
- Gallagher M J, Blumenthal K M, 1994. Importance of the unique cationic residues arginine 12 and lysine 49 in the activity of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J Biol Chem*, 269:254—259
- Gould A R, Mabbutt B C, Norton R S, 1990. Structure-function relationships in the polypeptide cardiac stimulant, Anthopleurin-A, effects of limited proteolysis by trypsin. *Eur J Biochem*, 189: 145—153
- Gross G J, Warltier D C, Hardman H F *et al*, 1985. Cardiotoxic effects of anthopleurin-A (Ap-A), a polypeptide from a sea anemone, in dogs with a coronary artery stenosis. *Eur J Pharmacol*, 110:271—276
- Kem W R, Parten B, Pennington M W *et al*, 1989. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry*, 28: 3483—3489
- Khera P K, Blumenthal K M, 1994. Role of the cationic residues arginine 14 and lysine 48 in the function of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J Biol Chem*, 269:921—925
- Khera P K, Benzinger G R, Lipkind G *et al*, 1995. Multiple cationic residues of anthopleurin B that determine high affinity and channel isoform discrimination. *Biochemistry*, 34: 8533—8541
- Khera P K, Blumenthal K M, 1996. Importance of highly conserved anionic residues and electrostatic interactions in the activity and structure of cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *Biochemistry*, 35: 3501—3507
- Makhnyr V M, Kozlovskaya E P, 1989. Modification of neurotoxin RTX-III from the sea anemone *Rodianthus macrodactylus* with acetic anhydride. *Toxicon*, 27: 1075—1084
- Malpezzi E L A, Carlos de Freitas J, Muramoto K *et al*, 1993. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*, 31:853—864
- Metrione R M, Schweitz H, Walsh K A, 1987. The amino acid sequence of toxin R_pIII from the sea anemone, *Rodianthus paumotensis*. *FEBS Lett*, 218:59—62
- Newcomb R, 1980. *Frontiers in Protein Chemistry*. New York: Elsevier-North Holland. 539—550
- Norton R S, 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone protein that interact with

the sodium channel. *Toxicon*, 29:1 051—1 084

Norton R S, Beress L, Stob S *et al*, 1986. Photochemically induced dynamic nuclear polarization NMR study of the aromatic residues of sea anemone polypeptide cardiac stimulants. *Eur J Biochem*, 157: 343—346

Pallaghy P K, Scanlon M T, Monks S A, 1995. Three-dimensional structure in solution of the polypeptide cardiac stimulant anthopleurin-A. *Biochemistry*, 34:3 782—3 794

Reimer N S, Yasunobu C L, Yasunobu K T, 1985. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, Anthopleurin-B. *J Biol Chem*, 260: 8 690—8 693

Scheffler J J, Tsugita A, Linden G *et al*, 1982. The amino acid sequence of toxin V from *Anemonia sulcata*. *Biochem Biophys Res Commun*, 107:272—278

Schweitz H, Birdard J N, Frelin C, 1985. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel. *Biochemistry*, 24: 3 554—3 561

Shibata S, Norton T R, Izami T, 1976. A polypeptide (AP-A) from sea anemone with potent positive inotropic action. *J Pharmacol Exp Ther*, 199:298—309

Sunahara S, Muramoto K, Tenma K *et al*, 1987. Amino acid sequence of two sea anemone toxins from *Anthopleura fuscoviridis*. *Toxicon*, 25:211—219

Tanaka M, Hanu M, Yasunobu K T, 1977. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, Anthopleurin A. *Biochemistry*, 16:204—208

Wemmer D E, Kumar N V, Metrione R M *et al*, 1986. NMR analysis and sequence of toxin II from the sea anemone *Rodianthus paumotensis*. *Biochemistry*, 25:6 842—6 849

Wunderer G, Machleidt W, Wachter E, 1976. Toxin II from *Anemonia sulcata*—the first sequence of a coelenterate toxin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 357:239—240

Wunderer G, Fritz H, Wachter E *et al*, 1976. Amino-acid sequence of a coelenterate toxin: Toxin II from *Anemonia sulcata*. *Eur J Biochem*, 87:193—198

Wunderer G, Eulitz M, 1978. Amino acid sequence of toxin I from *Anemonia sulcata*. *Eur J Biochem*, 89: 11—17

Zykova T A, Vinokurov L M, Kozlovskaya E P *et al*, 1985. Amino acid sequence of neurotoxin III from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg Khim*, 11:302—310



Review

RECENT ADVANCES IN STRUCTURE AND FUNCTION OF SEA ANEMONE POLYPEPTIDE NEUROTOXINS

ZHANG Jun-shun, ZHANG Pei-jun

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Sea anemone neurotoxins are a series of marine polypeptide toxins which possess binding affinity for voltage-gated sodium channels of excitable cells. In accordance studies in the 1980's and 1990's on the structure and function of anemone neurotoxins, the first, secondary and tertiary structure of anemone neurotoxins, and the relationship between structure and function are summarized. It is concluded that the anemone polypeptides so far identified are homologous and the main secondary and tertiary structure features of theirs are very similar; correct conformation of the irregular loop of anemone neurotoxins is critical for cardiostimulant activity. The result of a comparative study demonstrates that the strongly hydrophobic residues at position 18 and 17 in Types I and II neurotoxins, respectively, play a critical role in high affinity channel binding, while hydrophobic residues Ile-43 and Ile-40 in both Types I and II neurotoxins are probably an important structural determinant. the Ap-A and Ap-B residues at positions 12 and 49 are essential for both high affinity and isoform discrimination. Consequently, these characteristics are essential for the application of the anemone toxin to the design of new cardiotoxic drugs.

Key words Anemone polypeptides Structure Function

Subject classification number Q176