



小分子蛋白酶抑制剂及多肽毒素的研究回顾

戚正武

中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所, 同济大学蛋白质研究所, 上海 200031

E-mail: zwqi@sibs.ac.cn

2009-07-16 收稿, 2009-08-28 接受

摘要 对以往小分子蛋白酶抑制剂及多肽毒素的研究成果作一历史性回顾, 重点介绍了 Bowman-Birk 家族的绿豆胰蛋白酶抑制剂, 对此抑制剂的 Lys 活性功能区作了解析. 它是双头抑制剂, 有两个功能区, 用蛋白与基因测序、基因表达、突变、肽段合成等手段证实, 其核心结构是一个由两个相连九元环组成的 16 肽, 与天然 14 环肽的向日葵抑制剂极类似. 另一深入研究的抑制剂是 27 肽的天花粉胰蛋白酶抑制剂, 属于南瓜族, 介绍了该家族的基因序列. 多肽毒素的研究包括蝎毒毒素及芋螺毒素. 本文介绍了多种东亚马氏钳蝎新的钾通道毒素, 有的是钙离子依赖的 BK 或 SK 钾通道毒素, 有的是电压门控毒素, 有的具有两个不同的功能区, 阐明了它们的构效关系. 表达的重组蝎氯毒素有望用于恶性胶质瘤的治疗. 芋螺毒素分子量小、序列多变、功能广泛, 有更好的应用前景. 从中国南海 16 种芋螺中纯化了 50 个结构新的芋螺毒素, 克隆了 134 个新基因; 确定了 3 个新超家族, 命名为 V, Y, K 超家族; 研究发现, 在某些芋螺毒素一级结构中有新的二硫键骨架和二硫键配对、独特的模板(motif)、氨基酸的 D 型化等; 分析了 A 超家族的基因组结构, 在内含子的 3' 端有一非常保守的序列, 可用作引物克隆更多新的芋螺毒素基因; 阐明了个别芋螺毒素的生理功能.

关键词

活性多肽
舒缓激肽增强肽
南瓜族蛋白酶抑制剂
Bowman-Birk 家族
蛋白酶抑制剂
大肠杆菌耐热肠毒素
东亚马氏钳蝎毒素
中国南海芋螺毒素

多肽与蛋白质的含义没有明确的界线, 通常以胰岛素(分子量约 6000, 由 51 个氨基酸残基所组成)作为界线, 分子量大于胰岛素的可视为蛋白质, 小于胰岛素的则为多肽. 天然活性多肽的特点是: 分子量小, 结构稳定, 含量低, 专一性强, 功能广泛, 在人的生理活动中起非常重要的作用, 如内分泌多肽激素、神经多肽、组织激肽、抗菌肽、细胞因子、免疫系统中的趋化因子、多肽毒素以及小分子酶抑制剂, 特别是蛋白酶抑制剂等, 目前也有不少重要的多肽药物. 本文主要介绍与我们过去工作相关的活性多肽, 即小分子蛋白酶抑制剂及多肽毒素.

1 小分子蛋白酶抑制剂

蛋白酶除了用于消化降解蛋白质外, 几乎参与

体内各种重要的生理功能, 如大分子的加工与组装, 酶原的激活, 激素与激肽的释放, 血液的凝固和纤溶, 补体反应, 细胞的发育、分化和凋亡, 炎症反应, 肿瘤的转移和浸润等. 上述每一种蛋白酶的功能都由其相应的抑制剂进行调控, 一旦平衡被破坏, 机体就会产生各种疾病. 自然界生物体内除大分子的蛋白酶抑制剂外, 还存在不少小分子抑制剂, 由于它们分子量小, 更有潜在的应用价值.

1.1 血管紧张素转换酶抑制剂

20 世纪 80 年代初, 我们从中国浙江蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 中分离纯化了舒缓激肽增强肽(bradykinin potentiating peptide, BPP), 它具有增强舒缓激肽(bradykinin, BK)的活性, 同时又是血管紧

引用格式: 戚正武. 小分子蛋白酶抑制剂及多肽毒素的研究回顾. 科学通报, 2009, 54: 2734~2745

Chi C W. Research retrospect on small molecule protease inhibitors and peptide toxins (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2009, 54: 2734-2745, doi: 10.1360/972009-1582

张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)的抑制剂. 鉴于 BK 能使血管舒张, 血压降低, 对 ACE 的抑制又使升血压的血管紧张素不能产生, 因而具有双重叠加降血压的作用. 最早的降血压药物卡博通(Captopril), 即是在研究蛇毒 BPP 结构基础上所衍生的三肽类似物(2-methyl-3-mercaptopropionylproline). 我们所研究的 BPP 由 11 个氨基酸残基所组成, N 端是焦谷氨酸, 结构很特殊, 有 3 对脯氨酸(PyroGlu-Gly-Arg-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ile-Pro-Pro); 用焦谷氨酸酶除去其 N 端焦谷氨酸后, 其活性非但不下降, 反而增加 1 倍左右. 若再用 Edman 方法逐步降解, 至最后 C 端三肽 Ile-Pro-Pro 仍具有 90% 的活性. 此外, 我们还合成了此三肽的不同类似物, 并分别测定对增强 BK 及抑制 ACE 酶的活性, 结果表明, 两者活性并不平行, 可能前者的活性是通过与 BK 的受体结合, 而后者则是直接作用于 ACE 酶. 上述工作 1981 年在德国慕尼黑国际激肽会议上获得优秀论文奖^[1,2].

1.2 南瓜族蛋白酶抑制剂

研究人员从天花粉根部及丝瓜种子中分离纯化到两种南瓜族小分子胰蛋白酶抑制剂, 分别含 27 及 29 个残基及 3 对二硫键, 阐明了它们的氨基酸及 cDNA 序列. 此 cDNA 序列是南瓜族抑制剂首先报道的基因序列, 我们根据此序列人工合成了天花粉抑制剂. 该抑制剂基因可分别在大肠杆菌和酵母中表达, 利用定点突变将第 3 位活性中心的 Arg 突变为 Phe 或 Leu 后, 能转变为胰凝乳蛋白酶抑制剂. 若同时将活性中心 P₁ 位的 Arg 及 P₁' 位的 Ile 分别突变为 Ala 及 Ser, 就成为很强的弹性蛋白酶抑制剂. 这也是在南瓜族蛋白酶抑制剂家族中最早利用蛋白质工程研究蛋白质结构与功能非常成功的报道^[3~6].

1.3 绿豆胰蛋白酶抑制剂活性碎片

属于 Bowman-Birk 家族的绿豆胰蛋白酶抑制剂(mung bean trypsin inhibitor, MBTI)含两个相似而又独立的结构域, 能同时抑制两分子胰蛋白酶, 是一双头小分子抑制剂. 这两个结构域可被胃蛋白酶限制性裂解, 拆分成两个分别以 Lys 及 Arg 为活性中心的碎片, 其中 Lys 活性碎片是由 26 肽长链及 9 肽短链通过两对二硫键连接而成, 如图 1(a)所示, Arg 活性碎片则是由 27 个残基组成的单链. Lys 活性碎片经还原移去短链后, 留下的长链经重氧化后仍具有抑制剂活性^[7]. 人工合成其 N 端及 C 端各缺失两个残基的

22 肽, 有两个主要异构体, 这是由于与短链连接的两个半胱氨酸会引起二硫键错配而造成的, 但两异构体都具有类似的活性. 此合成的 22 肽与胰蛋白酶所形成的复合物能获得结晶, 并测定了它们的晶体结构^[8]. 最近, 在完成 MBTI 基因克隆的基础上, 研究人员将 Lys 活性片段的长链中两个用于连接短链的半胱氨酸突变为丝氨酸, 避免了二硫键的错配(图 1(a)). 由此得到的表达产物只有两对二硫键, 此重组产物能以等克分子抑制胰蛋白酶. 若将活性中心残基 Lys 突变为 Phe, 则能以等摩尔抑制胰凝乳蛋白酶. 此外, 人工合成只含 2 个九元环的 16 肽, 移去 N 端与 C 端多余的氨基酸残基(图 1(b)), 也具有相同的抑制剂活性, 说明此双九元环是抑制剂活性的最基本

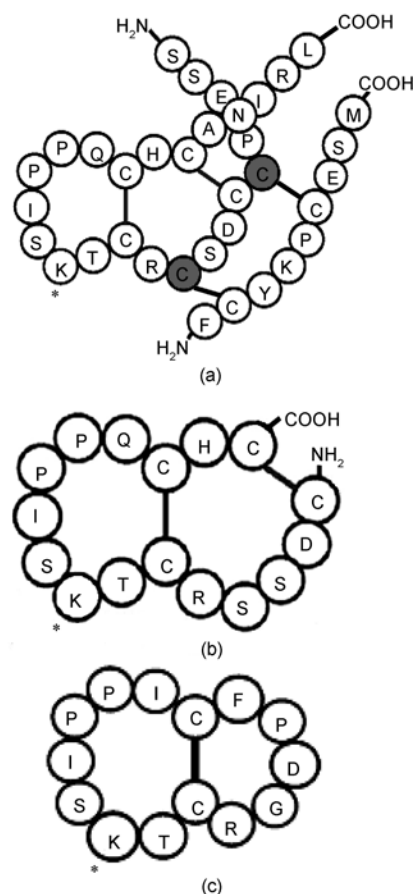


图 1 绿豆胰蛋白酶抑制剂 Lys 碎片与向日葵胰蛋白酶抑制剂的一级结构比较

(a) 由 26 肽长链与 9 肽短链组成的 Lys 活性碎片, 长链中用“*”所示的即为活性中心 Lys, 用阴影表示的两个 Cys 残基, 分别与短链形成两对二硫键; (b) 合成的 Lys 活性碎片中的双九元环, 右边九元环中一个 Cys 残基由 Ser 所取代; (c) 天然的向日葵胰蛋白酶抑制剂, 左边为九元环, 右边是由 N-端和 C-端残基缩合而成的环肽

结构^[9]. 值得指出的是, 最近从向日葵种子中发现一个由 14 个残基组成的环肽, 是很强的胰蛋白酶抑制剂, 这是自然界中发现的最小蛋白酶抑制剂, 它也是由基因转录、翻译, 最后由多肽环化酶加工而成^[10]. 其结构与我们合成的双九元环非常类似(图 1(c)). 该抑制剂以环肽的形式代替了双九元环中由 N-端和 C-端两半胱氨酸残基, 构成了二硫键. 向日葵抑制剂的另一对二硫键也形成一个九元环, 与 Lys 活性片段中的九元环仅有一个残基的差别, 即与半胱氨酸残基邻近的 Gln 被 Ile 所取代, 它们的活性中心也都是 Lys, 表明它们的基因可能来自同一祖先.

在此基础上, 我们对含双九元环的 16 肽进行改造, 将抑制剂活性中心附近的残基改变为前体蛋白转换酶(proprotein convertase, PC)所偏爱的识别位点, 即 P₁, P₂, P₄ 及 P₆ 位的残基都由碱性残基取代, 改造后的 16 肽具有很强抑制 PC 酶的活性, 活性提高 500 倍左右(图 2), 将双元环外 N-与 C-端的残基移去, 不影响抑制活性. 最后得到的双九元环 16 肽易于合成, 有潜在的临床应用价值^[11]. 因很多由 HIV, SARS, 登革热等病毒所引起的疾病, 在病毒复制加工过程中 PC 酶是必需的, 因此往往选择 PC 酶作为药物的靶标, 寻找其理想的抑制剂. 此外, 我们从猪肝中找到 3 个内源性 PC 酶的小肽抑制剂, 经证实它们都是组蛋白 H1.2 的 C-端碎片^[12], 进一步确定了它们抑制活性中心的位置, 在此基础上合成一更小的 36 肽, 也具有对 PC 酶很强的抑制活性. 若活性中心以 PC 酶偏爱的残基取代, 最后合成的一 14 肽类似物, 其 K_i 也可达到 10⁻⁸ mol/L^[13].

2 多肽毒素

生物在亿万万年进化过程中为了自己的生存(防卫和捕食), 形成了一套完整的自我保护体系, 有的甚至具有专一的毒腺器官, 储存与分泌各种活性高、专一性强的生物毒素, 作用于各种相应的重要靶器官, 如各种离子通道、专一的神经递质受体, 它们是不可取代的理想生物材料, 可用于生物化学、生理学、药

理学的基础研究和创新药物的开发. 20 世纪 60 年代, 研究人员利用银环蛇毒素首次分离出乙酰胆碱能受体, 从而真正确立了受体的概念, 才有后来各种重要受体研究的蓬勃开展. 体内各种离子通道及受体的亚型, 极大多数也都是靠生物毒素加以鉴定的. 生物毒素有大分子的蛋白毒素(如肉毒毒素、炭疽杆菌毒素等)和小分子的多肽毒素, 后者有的已开发成为临床药物, 如作用于 N-型钙通道的 ω -芋螺毒素, 已应用于临床, 是一种不成瘾的镇痛药物, 不少多肽毒素已处于临床前试用阶段. 多肽毒素由于分子量小、容易改造, 常作为创新药物的先导化合物, 这是目前国际多肽药物研究的热点.

2.1 大肠杆菌耐热肠毒素

由大肠杆菌耐热肠毒素所引起的腹泻是发展中国家中常见的疾病, 在儿童中的发病率很高. 据世界卫生组织统计每年有 500 万儿童死于此病, 占儿童死亡率的 1/3 至 1/2. 从发达国家到卫生环境差的第三世界国家去旅游的游客也往往由于缺乏该肠毒素相应的抗体而引起腹泻, 因而又称之为旅行性腹泻. 20 世纪 80 年代中期, 我们从上海儿童医院患者粪便中分离出产该毒素的大肠杆菌, 并从中分离纯化了毒素, 测定了它的氨基酸序列. 它是一个由 19 个残基所组成的小肽(NSSNYCCELCCNPACTGCTY), 含 3 对二硫键^[14]. 我们在此基础上进行了基因克隆. 由 cDNA 推导的氨基酸序列表明, 它由 22 个残基的信号肽、31 个残基的前体肽及 19 个残基的成熟肽所组成^[15]. 在蛋白质与基因水平上同时阐明多肽的结构, 这在国内可认为是最早的.

2.2 蝎毒毒素

蝎毒中主要组分是作用于 Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 及 Cl⁻ 等各种离子通道的神经毒素. 我们所研究的蝎毒来自我国的东亚马氏钳蝎(*Buthus martensi* Karsch, BmK), 它的毒性远比北美、中东、非洲的蝎毒弱, 对人没有生命危险. 早在宋代, 已作为名贵中药, 用来治疗多种神经性疾病. 此外, 蝎毒神经毒素也是研究离子通

	P ₆ P ₄ P ₁ P _{1'}	K _i /mol · L ⁻¹
M ₀ :	EPSCDSSRCTKSIPPQCHCAN	(2.48±0.05)×10 ⁻⁶
M ₁ :	EPSCDSSRCKRSIPPQCHCAN	(3.53±0.31)×10 ⁻⁸
M ₂ :	EPSCDRSRCKRSIPPQCHCAN	(6.21±0.29)×10 ⁻⁹
M ₃ :	CDRSRCKRSIPPQCHC	(2.45±0.28)×10 ⁻⁹

图 2 Lys 活性碎片双九元环的不同突变体对前体蛋白转换酶的抑制活性

序列中以粗体表示的即为取代的残基, 由于 P₄ 位原来即为碱性氨基酸 Arg, 就仍保持不变, K_i 为抑制常数

道的重要工具,很多离子通道的亚型是通过蝎毒素鉴定的.蝎毒素可分为长链与短链毒素,前者作用于 Na^+ 和 Ca^{2+} 通道,后者则作用于 K^+ 和 Cl^- 通道.

我们从20世纪90年代中期开展了东亚马氏钳蝎(BmK)中各种离子通道毒素的研究,在蛋白质及基因水平上确定了它们的结构,用NMR或X射线衍射阐明了它们的构象,并利用基因工程手段研究它们结构与功能的关系^[16-37].由于蝎毒的钠通道毒素所含的残基一般都接近或超过60,属于小分子蛋白质范畴,在本文中就不再赘述,只介绍属于短链的钾、氯离子通道毒素.

(i) 钾通道毒素. 在各种离子通道中,钾通道是最复杂的,有近百种亚型之多,分属于电压依赖与钙离子依赖型,后者又有大电导(big conductance) BK_{Ca} 与小电导(small conductance) SK_{Ca} 钾通道之分.在蝎毒中含有多种作用于不同钾通道亚型的毒素,它们一般含30~40个氨基酸,有3~4对二硫键.我们研究BmK蝎毒中多种钾通道毒素,并进行了序列测定、基因及基因组的克隆以及溶液和晶体构象的解析,深入研究了某些钾通道毒素的结构与功能关系.

(1) 多肽序列、基因组序列、cDNA及构象的研究. 已研究的BmK钾通道毒素由29~38残基所组成,它们的序列如图3所示.其中BmTx3A及BmKTX为电压门控的钾通道毒素,BmBKTx1为钙离子依赖的 BK_{Ca} 钾通道毒素,BmP01, BmP03, BmP05及BmSKTx1为 SK_{Ca} 钾通道毒素.它们都具有3对二硫键,具有典型的由二硫键稳定的 α/β 骨架.

在测定多肽序列基础上,我们克隆了它们的cDNA基因,进一步确定测序是否正确^[21-24,27],并判断肽的C-端是否酰胺化,C-端后的残基是否被蛋白酶后加工移去.在cDNA可读框架若在肽的C-端有一Gly残基,它可作为C-末端残基酰胺化的供体,而自身消失.它们的基因组结构表明,信号肽在20~28残基之间,不含前体肽,都含有一个内含子,大小在

80~94 bp 之间,BmTx3A的内含子最小,仅65 bp.内含子都位于信号肽内,在成熟肽前-6或-10的位置.

用NMR解析了BmBKTx1的溶液构象,获得了典型的半胱氨酸稳定的 α/β 折叠结构,该结构由一个 α 螺旋结构(残基5~15)、一个转折(残基24~26)及两个反平行的 β 片层结构(残基20~29)所构成(图4)^[32].同时也得到了BmBKTx1的X射线衍射晶体结构,分辨率达到1.72 Å,这是第2个被阐明的短链蝎毒钾通道阻断剂的晶体结构^[33].由NMR或X光衍射所解得的构象彼此符合.

(2) 结构与功能关系的研究. BmTx3A能抑制电压门控A型钾电流,但它却同时能阻断hERG电流,该电流对心律不齐有密切关系.经分析表明,阻断A电流的功能区位于C-端的 β 折叠区,因该区有一碱性氨基酸K-27与芳香族氨基酸Y-36的功能对,这是钾通道阻断剂中典型的洞孔抑制模式中所必需的条件(毒素的碱性残基与通道洞孔中的酸性残基形成离子对,而芳香族残基则与通道相应的残基形成很强的疏水键).若删除C末端两残基Y-36及P-37,BmTx3A对A电流的阻断功能丧失,但不影响对hERG通道的功能,推测阻断hERG电流的功能区可能位于N-端的 α 螺旋区,因该区存在有双碱性残基R-18及K-19. BmTx3A既具有 α -KTx家族毒素抑制A型电流的功能,又具有 γ -KTx家族毒素抑制hERG电流的功能,这在蝎毒毒素中为首次报道.对整个蝎钾通道毒素的进化树进行了分析,此毒素正好处于钾通道毒素两大家族(α -KTx和 γ -KTx)的过渡态中^[34].

BmBKTx1为钙离子依赖的 BK_{Ca} 钾通道毒素,是一高碱性的毒素,含6个碱性氨基酸,一个酸性氨基酸,除二硫键外与其他同类毒素无同源性(图4).序列比较(图3)表明,BmBKTx1序列虽更接近 SK_{Ca} 钾通道毒素,但对 SK_{Ca} 通道活性却不高,即使浓度达 $1 \mu\text{m}$ 也仅部分抑制,相反它是 BK_{Ca} 通道很强的阻断剂,对pslo(蟑螂)和dslo(果蝇) BK_{Ca} 通道的 IC_{50} 分别为82

BmTx3A	ZVETNVK C QGG S -CASVCRKAIGVAAGKCINGRCVCYP
BmKTX	VGINVKCKHSGQ C LPCKDAGMRF-GKCINGKCDCTPKG
BmBKTx1	AACYSS-DCRVKCVAMGFSS-GKCINSKCKCYK
BmP01	ATCED---CPEHCATQNARA--KCDNDKCVCEPK
BmP03	VGCEE---CPMHCKGKNANPT--CDDGVNCNPNV
BmP05	AVCNLKR-CQLSCRSLGLL--GKCIGDKCECVKH
BmSKTx1	TPFAIKCATNADCSRKCPGNPP----CRNGFCACT

图3 各种BmK钳蝎钾通道毒素的序列比较

保守的二硫键骨架用阴影表示

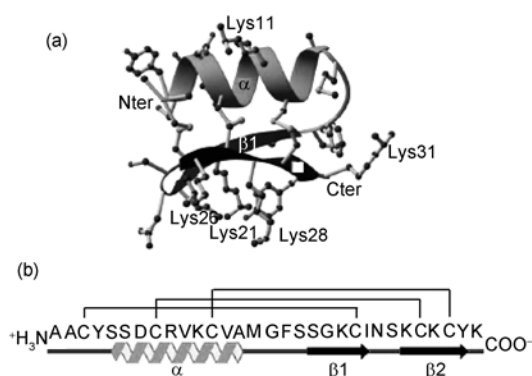


图 4 蝎毒 BmBKTx1 的空间结构

(a) 分子走向和 5 个极性 Lys 的位置; (b) 二硫键配对及二级结构的分布

及 194 nm, 但不作用于人的 hsl α 通道, 也不作用于其他 K ν 通道, 因而是专一的昆虫毒素^[35]. 对该毒素的溶液构象和 X 光衍射晶体结构进行分析(图 4), 在此基础上利用基因工程及定点突变, 研究分别作用于 SK Ca 和 BK Ca 通道的功能区. 结果表明, C-端突变体(K21A, Y30A)对 BK Ca 通道的阻断活性明显丧失, 但并不影响对 SK Ca 通道的活性, 也即它们是独立的不同功能区, 对 BK Ca 通道的功能区位于毒素 C-端的 β 片层, 有碱性残基 K-21 和芳香族残基 Y-30 的功能对(dyad). 至于作用于 SK Ca 钾通道的功能区, 很可能位于 N-端 α 螺旋区. 蝎毒的 SK Ca 毒素(如 BmP05)其功能区即位于 N-端, 有一对碱性残基, 两碱性残基相隔 7 个残基, 它们的侧链基团能形成钳子状的构象, 但在 BmBKTx1 中由于两碱性残基靠得太近, 仅相隔一个残基, 且侧链基团的方向相反, 难形成钳子状构象, 这也许可说明为什么 BmBKTx1 对 SK Ca 通道的活性不高^[34].

BmP01, BmP03 及 BmP05 都是属于 SK Ca 钾通道毒素, 在蝎毒中 BmP05 的含量最低, 但活性却最高. 由 cDNA 推导的成熟肽分别含 29, 28 及 33 残基^[21,24], BmP05 的 C-端为酰胺化. 由于 BmP05 活性最强, 我们着重研究了它的结构与功能. 利用酵母表达体系制备纯化了它的 6 种突变体, 分别检测它们对小鼠的毒性及电生理活性^[26]. 实验结果表明: 1) 由于酵母没有 C-端酰胺化后加工的功能, 重组表达的 rBmP05 毒性约是天然的 56%; 2) 位于 α 螺旋区的碱性残基 Lys6 及 Arg13 是与 SK Ca 通道结合所必需的, 单突变后活性均丧失 80%以上, 双突变后活性全丧失; 3) 螺旋区中残基 Gln9 若突变成 Pro 后, 螺旋结构被破坏, 活性也就几乎全丧失, 也即说明此螺旋区构象是必需的; 4) C-端残基 His 对与通道的结合也有一定的辅助作用, 若

被 Ala 取代后, 活性约丧失 55%; 5) 连接两反平行 β 折叠片段的转折区中的残基 Ile-Gly-Asp (22~24)若突变为电压门控 K $^+$ 通道毒素中相对应的保守残基 Met-Asn-Gly, 则该突变体的毒性丧失约 2/3, 对 SK Ca 电流的抑制活性也仅是原来的 1/2.5, 但值得指出的是, 它却能部分抑制 K ν 电流, 但最大只能是 20%左右, 这表明 β 转折区是与毒素对通道的专一性有关^[26].

(ii) 氯通道毒素. 蝎氯毒素能特异性阻断氯离子通道, 大小在 35~38 氨基酸残基之间, 在蝎毒中含量很低. 蝎氯毒素能以高亲和力结合恶性胶质瘤细胞膜上的基质金属蛋白酶 2 (MMP-2), 从而能专一地靶向恶性胶质瘤, 是特异的靶向多肽. 我们从 BmK 蝎毒中也找到一氯毒素 BmKCT, 含 35 残基, 包括 4 对二硫键. 它的 cDNA 与基因组也已经被克隆, 内含一 93 bp 的内含子, 位于信号肽 C-端的第 6 位^[23]. BmKCT 的融合蛋白能成功地在大肠杆菌体系中表达, 最后纯化得到的重组 BmKCT 用同位素 ^{131}I 标记, 并证实能特异性结合到恶性胶质瘤细胞. 未标记和标记的 BmKCT 对瘤细胞都有杀伤作用, 呈剂量线性关系, 标记的杀伤力更高, 这是由于放射性 ^{131}I 本身对细胞也有杀伤作用, 浓度小于 2 $\mu\text{g/mL}$ 对胶质瘤细胞的抑制率即达 70%以上, 未标记的 BmKCT 所需浓度要高 10 倍以上^[37]. 该工作为 BmKCT 有可能用于治疗恶性胶质瘤打下了基础.

2.3 芋螺毒素

自 20 世纪 90 年代以来, 芋螺毒素在国际上受到了高度的重视, 成为研究热点. 由于它们的分子量小(一般由 10~40 aa 所组成)、结构稳定、作用靶点广(作用于体内各种离子通道和神经递质和肽的受体)、序列的超变异和超修饰、功能专一、组织特异性强等优点, 较之其他来源的多肽毒素有更多的优越性. 芋螺毒素不仅可作为体内重要生理功能靶点的“解密器”, 也可作为新药的先导化合物或直接开发成新药, 如作用于 N-型钙通道的 ω -MVIIA (Ziconotide)已于 2004 年经 FDA 批准上市, 用于治疗慢性疼痛, 较之吗啡疗效好, 不成瘾. 鉴于上述因素, 我们从 20 世纪 80 年代对蛇毒蛋白、90 年代对蝎毒素近年来转向对芋螺毒素的研究.

芋螺属于腹足纲软体动物, 生活在热带海洋的浅水区, 至今发现的芋螺有 500 多种, 它们的外形如芋头, 因而得名(图 5). 芋螺的花纹及色彩彼此有明显差异, 并常以此命名分类. 芋螺按食性可分为 3 类:

食虫的芋螺数量最多, 占70%左右, 其次是食软体动物和食鱼芋螺. 它们的毒腺管中约含 50~200 种多肽毒素, 不同种的芋螺由于食性和所处环境不同所含的活性肽也就都不同, 即使同一种芋螺因季节不同, 毒腺中所产的活性多肽也不同. 理论上芋螺中至少有 5 万多种活性多肽, 至今结构与功能都清楚的仅百种左右, 留下很大待发展的空间, 是非常宝贵的天然多肽宝库^[38].

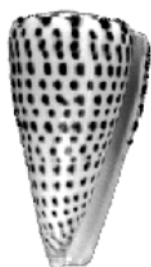


图5 豹芋螺

芋螺毒素种类繁多, 生物活性广泛, 一级结构多变. 具有类似的功能, 可有不同序列, 反之, 具有不同的功能, 却可有类似序列, 因而它们的分类与命名很独特, 不同于蝎毒毒素, 仅以其靶标分类, 较为简单, 分为钠、钾、钙通道毒素. 尽管芋螺毒素的序列和活性可千差万异, 但从基因角度分析, 它们的信号肽为数却不多, 且序列非常保守, 前体肽也相当保守, 因而将芋螺毒素按有相同的保守信号肽序列分为几个基因超家族, 在此基础上, 根据每超家族中毒素的半胱氨酸骨架, 结合其药理活性, 再进一步分为若干亚家族. 由于同一超家族芋螺毒素有极保守的信号肽序列, 可用基因扩增的方法得到同一超家族不同组分的基因, 并可由此推导出成熟肽的序列. 这样就可绕过由于目的肽在毒液中含量低, 难分离纯化的困境, 这是研究其他来源毒素都没有的优越性. 对已知功能的芋螺毒素其命名规则包括: 一个希腊字母, 表示其药理活性; 一个或两个字母代表芋螺种属; 一个罗马字母表明其半胱氨酸骨架编号, 一个大写字母表示其变异体, 如 μ -GIIIa, μ 代表作用于钠通道, G 代表地纹芋螺 *C. geographus*, III 代表半胱氨酸骨架编号(==CC==C==C==CC==). 若出现在同一超家族, 两者功能相同, 但半胱氨酸骨架不同, 如作用于 nACh 受体的芋螺毒素, 以 α 和 α A 相区分, 前者半胱氨酸骨架为 CC==C==C (编号 1), 后者为 CC==C==C==C==C (编号 4). 若功能不清楚的小肽, 仅用一个

或两个小写字母代表芋螺种属, 阿拉伯数字代表半胱氨酸骨架编号, 一个小写字母代表变异体, 如 vx6a, vx6b, 字母 vx 代表菖蒲芋螺 *C. vexillum*, 6 代表半胱氨酸骨架编号(C==C==CC==C==C), a 和 b 表示两个不同变异体. 若用克隆基因得到的成熟肽序列, 则以大写字母 Vx6.1, Vx6.2 表示.

我国海南岛具有丰富的芋螺资源优势, 约有 100 多种芋螺, 若能从中找到结构、性能特异的多肽, 并开发成药物, 将有自己的知识产权, 这在理论与实际上都有重大意义. 我们对南海 16 种芋螺进行了研究, 其中食鱼的 2 种: 线纹芋螺(*C. striatus*)、花玛瑙芋螺(*C. achatinus*); 食软体动物的 2 种: 大理石芋螺(*C. marmoreus*)、织锦芋螺(*C. textile*); 食虫的 12 种: 桶形芋螺(*C. betulinus*)、菖蒲芋螺(*C. vexillus*)、堂皇芋螺(*C. imperialis*)、信号芋螺(*C. litteratus*)、勇士芋螺(*C. miles*)、芝麻芋螺(*C. pulicarius*)、红砖芋螺(*C. tessulatus*)、处女芋螺(*C. virgo*)、犊纹芋螺(*C. vitulinus*)、豹芋螺(*C. leopardus*)、槲芋螺(*C. quercinus*)及唐草芋螺(*C. characteristicus*). 纯化了 50 多个结构新的芋螺毒素, 克隆了 134 个新基因(包括氨基酸序列已测定的), 分析了 6 个基因组结构, 对某些芋螺毒素进行了构象与功能的研究, 主要成果扼要叙述如下^[39~59].

(i) 新超家族的确定. 芋螺毒素研究的开拓者 Olivera 在 2004 年一篇重要综述中将芋螺毒素归分为 A, M, O, I, P, S, T 等 7 个超家族^[39], 而今刚迅速增加了 9 个新超家族, 半胱氨酸骨架编号也由 11 增至 22. 我们实验室确定了 3 个新超家族, 分别命名为 V, Y 和 K 超家族^[54,55,59], 它们相应的半胱氨酸骨架编号分别定为 15, 17, 21, 如表 1 所示.

此外, 我们对已知的 S, I, M 超家族的信号肽序列进行了增补和说明. 以往在文献中仅提到有两个 S 超家族成员, 有新的半胱氨酸骨架, 含 10 个彼此分隔的半胱氨酸残基, 编号为 8, 分子量较大, 功能也特殊, 其中 σ -GVIIIa 作用于 5 羟色氨受体, 但并未克隆到相应的基因, 没能确定其信号肽序列. 我们从唐草芋螺中分离纯化到一芋螺毒素 ca8a, 其序列中有与 S 超家族相似的半胱氨酸骨架. 克隆了 ca8a 及其他相关的基因 Ca8.2, Ca8.3, 并从织锦与花玛瑙芋螺中也克隆到 Tx8.1 和 Ac8.1, 它们都属于 S 超家族, 信号肽序列为 MMLKMGAMFVLLLLFILPSSQ, 明显不同与其他超家族的信号肽, 从而对 S 超家族中的信

表 1 本实验室所发现的螺毒素新超家族及其半胱氨酸骨架^{a)}

超家族	信号肽序列	二硫键骨架及编号	超家族成员	物种来源
V	MMPVILLLLSLAIRCADG	C=C=CC=C=C=C=C (15)	vi15a, Vt15.1, ca15a	处女芋螺、犊纹芋螺等
Y	MQKATVLLLALLLLPLSTA	C=C=CC=C=CC=C (17)	ca16a (ca17a)	唐草芋螺
I ₂	MMFRVTSVGCLLLVIVFLNLVVPTSA	C=C=CC=CC=C=C (11)	κ-Btx., (κ-Bt11a), ca11a, ca11b, Pu11.1, Pu11.2	桶形芋螺
I ₃	MKLVLAIVVILMLLSLSTGA			唐草芋螺、芝麻芋螺
K	MIMRMTLTLFVLVVMTAASASG	C=C=C=CC=C (21)	im21a, im21b, Im21.1, Im21.2, Im21.3	帝王芋螺

a) Y 超家族的半胱氨酸骨架编号原为 16, 今国际芋螺毒素命名组织将其改为 17. 我们命名 κ-Btx 是在 I 超家族未确定之前, 现应改为 κ-Bt11a

号肽作了增补^[56].

在芋螺毒素超家族中有时可出现 2 个甚至 3 个不同的信号肽, 这可能在生物进化过程中是为了适应合成新功能活性多肽的需要. 已知芋螺 I 超家族中有两个不同信号肽序列 I₁ 与 I₂, 由它们编码的毒素分别作用于钠通道和钾通道, 成熟肽的后加工也不同, I₂ 的多肽其前体肽位于成熟肽之后^[40]. 我们从唐草芋螺中分离纯化到了 ca11a 和 ca11b, 它们的半胱氨酸骨架都为 I 超家族属所编号的 11, 但信号肽却完全不同, 命名为 I₃ 超家族. 同时我们还克隆到其他相关的基因, Ca11.3 及芝麻芋螺中的 Pu11.1 和 Pu11.2(表 1), 它们的功能很有可能不同与 I₁ 与 I₂ 属中的多肽^[57].

M 超家族中的芋螺毒素, 按其第 3 个二硫键环中 1~4 个残基数, 分为 M₁, M₂, M₃ 与 M₄ 4 个分支, 我们从豹芋螺、大理石及槲芋螺中分别克隆到属于 M₁ 与 M₃ 分支的基因, 其信号肽序列含 24 残基, 为 MLKMGVVL--, 明显不同于 M₂ 与 M₄ 分支, 后者含 25 残基, 为 MMSKLGVL--, 从它们的二硫键配对、密码子的偏爱、进化树的分析来看, M₁ 与 M₃ 分支接近, M₂ 与 M₄ 分支接近^[51].

(ii) 新半胱氨酸骨架及二硫键配对的确定. 除我们所确定的新半胱氨酸骨架(编号 15, 17, 21)外, 最近又从堂皇芋螺中分离纯化到一多肽 im22a, 其半胱氨酸骨架也是新的(C=C=CC=CC=C=C=C=C=C), 我们将此编号为 22, 也是最新的编号^[59]. 由于还没有克隆到其相应的基因, 未能最后肯定其保守的信号肽, 暂时未列入新的基因超家族行列中. 正如一个超家族中的芋螺毒素, 可有不只一种的保守信号肽序列, 它们的半胱氨酸骨架也不止一种, 即使是同一种骨架, 二硫键也可有不同的配对. 在 A 超家族中有 4 种半胱氨酸骨架, 最常见的骨架为 CC=C=C (编号 1), 一般是 1-3; 2-4 配对. 我们从大理石芋螺中分离纯化到了 mr1e, 含 11 个残基, 是属于 α4/3 芋螺

毒素, 但其二硫键配对却是 1-4; 2-3 配对^[52]. 在 M 超家族中属于 M₂ 与 M₄ 分支中的芋螺毒素, 它们的 3 对二硫键的配对已知分别为 1-6; 2-4; 3-5 及 1-4; 2-5; 3-6, 而我们从大理石及织锦芋螺中分离纯化到的 mr3e 与 tx3a 属于 M₁ 分支, 它们的二硫键配对却是 1-5; 2-4; 3-6^[45]. 不同的二硫键配对导致多肽的不同构象, 利用 NMR 研究了分别属于 M₁ 的 mr3e 和属于 M₂ 的 mr3a, 它们的溶液构象由于不同的二硫键配对有明显的不同, mr3e 的构象中有两个典型的 β-转折, 整个分子相对较松散, 极性残基暴露在分子表面, 而 mr3a 则有 3 个 β-转折, 形成紧密的球状分子, 暴露在分子表面的是疏水性残基^[49]. 由于构象不同, 它们经脑室注射后对小鼠的整体行为的反应也不同, 前者没有什么反应, 而后者则引起打滚、痉挛, 反应强烈.

(iii) 一级结构的超变异、独特的模板、复杂的翻译后修饰. 芋螺毒素即使来自同一种类, 属于同一超家族、同一分支, 具有相同的信号肽和半胱氨酸骨架, 它们的氨基酸序列可差异很大. 我们从菖蒲芋螺中纯化到属于 O-超家族的 vx6a 与 vx6b, 分别由 27 和 36 残基所组成, 序列除半胱氨酸骨架外无共同之处. 肽的极性也不同, 前者是碱性, 后者是强酸性. 与来自于其他种类同一超家族的芋螺毒素相比, 它们间序列的相同性都低于 20%^[46]. 同样, 我们从大

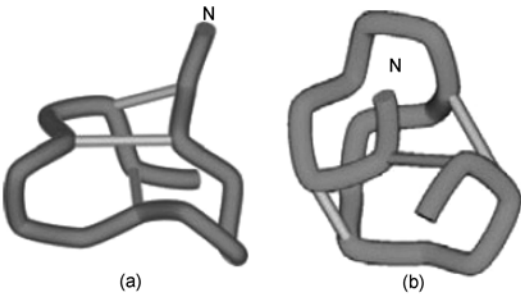


图 6 不同的二硫键配对形成不同的溶液构象 (a) mr3e (属于 M1 分支); (b) mr3a (属于 M2 分支)

理石芋螺纯化到的属于 T-超家族的 mr5a 仅含 10 个残基, 并由此克隆到 6 个相关基因, 推导出它们相应的成熟肽序列, 彼此差异也很大, 与来自于其他种类芋螺的相同性就更低^[42]。

芋螺毒素不仅在序列上可差异很大, 某些序列中还出现独特的模板(motif)。我们从菖蒲芋螺中纯化到 21 肽的 vx2, 根据其信号肽序列应属于 M-超家族, 但其半胱氨酸骨架不是最常见的 CC==C==C==CC (编号 3), 而是 CCC==C==C==C (编号 4), 而且它有一特殊的模板 CCCGGGC, 3 个连在一起的 Cys 与 3 个连在一起的 Gly 相连, 这样的模板在已知的蛋白序列库中未曾出现过^[43]。特殊的模板需要特殊的多肽折叠方式, 这反映在 vx2 的前体肽中。此前体肽的序列明显与其他 M 超家族毒素的不同, 因前体肽是参与分子的折叠和构象的形成, 特殊的折叠需要特殊的前体肽。另一例子, 我们从处女芋螺中纯化到属于 O 超家族的 vi6a, 由 32 个氨基酸残基组成(DC-GGQGE~~CYTQOCCOGLRCRGGGTGGG~~VCQL), 其中甘氨酸却占 11 个, 若扣除二硫键骨架中保守的 6 个半胱氨酸, 约占总残基的 42%。序列中甘氨酸含量之高, 再加上独特的模板 GGGTGGG, 这在蛋白质序列中也是没有先例的^[58]。研究人员用 NMR 研究了 vi6a 的溶液构象, 由于分子中太多的甘氨酸, 不能形成二级结构, 主要靠 3 对二硫键固定, 分子中没有由疏水键形成的核心, 整个分子较松散, 类似卷曲(coil)结构^[58]。

芋螺毒素除了序列的超变异、模板的独特外, 它们的翻译后修饰也是最复杂的, 有时在很短的肽段内修饰频率可以很高。除一般天然蛋白质常见的翻译后加工外, 如 N-末端谷氨酰胺的环化、C-末端的酰胺化、Pro 的羟基化、Glu 的羧基化等, 还出现其他物种罕见的修饰, 如 D-氨基酸, 溴代-Trp, 糖基化-Thr, 磺基化-Tyr 等。最典型的例子, 如来源于光环芋螺(*C. radiatus*) 8 肽的 Bromocontryphan (GCOWEPW-C), 它属于芋螺多肽(conopeptide)一类, 只含一对或没有二硫键, 没有超家族之分。序列中第 3 位的 Pro 被羟基化, 第 4 位的 Trp 被 D 型化, 第 7 位的 Trp 被溴化, 最后的 C-末端 Cys 被酰胺化, 这可能是已知多肽中翻译后加工频率最高最复杂的^[60]。每一种修饰都有特定的专一加工酶, 还需要序列中酶的识别位点。我们从大理石芋螺中纯化到一 15 肽 conomarphan

(DWEYHAHPKONSFWT), 不含二硫键, 根据基因克隆所得到的保守信号肽序列, 它应属于 M 超家族, 而不属于 conopeptide 一类。经证实, 除第 10 个残基 Pro 被羟基化外, 其 C-末端的第 3 位是 D 型 Phe, 这是芋螺毒素(conotoxin)中首先被发现含有 D 型氨基酸的多肽^[53]。分别化学合成了 Phe 为 L 型和 D 型的 conomar, 并用 NMR 解析它们的溶液构象。构象表明, 天然含 D-Phe 的多肽有明显的溶液构象, 在肽段中部有一由残基 6 至 10 所组成的稳定环状结构, 某些多肽的活性位点往往就位于类似的环内。C-末端有一短的 3¹⁰-螺旋, 但在含 L-Phe 的多肽中却没有此环状的构象, 这说明芋螺毒素的翻译后修饰, 是为了形成功能所需要的构象。

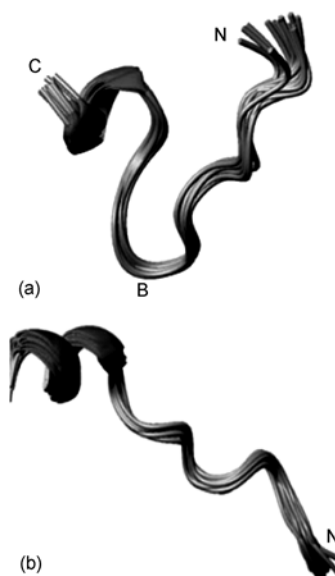


图 7 Phe 为 L 型和 D 型 conomarphan 的溶液构象

(a) Phe 为 D 型; (b) Phe 为 L 型

(iv) 基因组结构中很长的内含子及其保守的 5' 与 3' 端保守序列。从食鱼的花玛瑙芋螺、食软体动物的大理石芋螺及食蠕虫的芝麻、豹、槲芋螺中克隆到 8 个 A-超家族的 α -芋螺毒素基因组。它们都有一个很长的内含子, 从 791~1441 bp, 都插入于前体肽第 6 位 Ala 中。外显子 1 (包括信号肽及前体肽的前部份) 其突变速率远低于外显子 2 (包括前体肽的后部份及成熟肽)。值得指出的是, 它们内含子 5' 与 3' 端的序列都非常保守, 特别是, 在 3' 端处有一完全相同的序列(5'-GGTTCTGGGTCCAG-3')。在内含子中部则有二核苷“GT”, “GA”, “CA”或三核苷“CAT”的重复序列, 其长度有的可超过 80 bp。在 Pu1.1 基因中发现有一

长度在 140~150 bp 之间、5 个几乎相同的重复序列, 其保守性逐渐从 5' 到 3' 端递减^[47].

蝎毒的钠、钾通道毒素其基因组内也有一个内含子, 但都很短, 在 80~90 bp 之间, 不超过 100 bp^[21,24,27], 其长度仅是芋螺毒素内含子的十分之一, 而肽段的长度却是芋螺毒素的一倍以上, 它们序列的变异远没芋螺毒素这么明显. 这在基因水平上可说明, 芋螺毒素基因组中很长的内含子是为了满足肽段序列快速变异的需要, 创造更多基因突变、缺失、复制、重组的可能性.

基于芋螺毒素基因组它们内含子的 3' 端有一非常保守的序列, 以基因组 DNA 作为模板, 此保守序列为正向引物, 3 端非翻译区序列为反向引物(图 8), 克隆到包括部分前体肽 C 端片段在内的 16 个 A-超家族芋螺毒素的基因, 其中 5 个基因序列与以 cDNA 作模板得到的序列相同. 这表明用 DNA 手段克隆基因有更大的优越性, 能得到更多的新基因, 因芋螺并不是同时表达所有多肽毒素, 用基因组 DNA 作模板就不存在此问题. 值得指出的是, 克隆到的 α -芋螺毒素除半胱氨酸骨架为(CC==C==C)外, 还得到 3 个 κ -A 芋螺毒素的新基因, 其半胱氨酸骨架编号为 4 (CC==C==C==C==C, 作用钾通道). 这表明 α -芋螺毒素与 κ -A 芋螺毒素其内含子 3' 端和 3' 端非翻译区有相同的保守的序列, 它们都共同属于 A 超家族^[47].

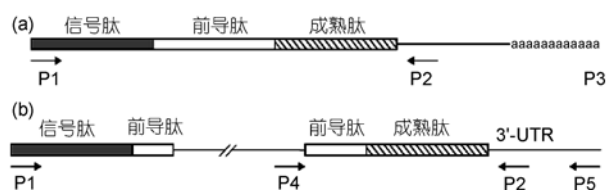


图 8 用 cDNA 或基因组 DNA 克隆新基因

a) 用 cDNA 作模板; (b) 用基因组 DNA 作模板. P1~P5 为正向或反向引物, 如箭头所示

(v) 某些芋螺毒素的生理功能. 我们虽从不同种芋螺中分离纯化了不少新结构的多肽毒素, 有的有特殊的模板、罕见的翻译后加工, 有的是新的二硫键配对或新的骨架, 有的是属于全新的超家族, 但真正搞清它们的生理功能及所作用的靶标却不多, 在所研究的芋螺毒素中今仅列举个别例子.

(1) κ -Btx. 我们于 2000 年从桶形芋螺中纯化到一新的多肽毒素, 含 31 个残基, 4 对二硫键, 并克隆了它的基因. 继后研究了它的生理功能, 确定它是一钾

通道激动剂. 由于其信号肽序列是新的, 半胱氨酸骨架也是新的, 当时未对此新家族定名, 因而未能按超家族正规的命名法命名, κ -Btx 只表明从桶形芋螺(*C. betulinus*)中得到的作用于钾通道的多肽毒素^[40]. 直至 2004 年国外也找到类似的芋螺毒素, 并正式命名为 I 超家族, 半胱氨酸骨架编号为 11, 因而 κ -Btx 正规的命名现应改为 κ -Bt11a. 对 κ -Btx 的特性有两点值得指出的: 1) 该毒素是高电导钾通道(BK_{Ca})的激动剂, 而不是阻断剂. 一般离子通道毒素都是阻断剂, 这是有关钾离子通道激动剂的首例报道. 2) κ -Btx 的基因结构表明, 它没有一般位于信号肽及成熟肽之间的前体肽, 而其 C 端却含有一个 13 残基的片段, 其作用可能起前体肽的作用, 参与 κ -Btx 的翻译后加工, 该毒素所含的 3 个 Glu 都被羧基化, 一个 Pro 被羟基化, C 端被酰胺化, 后来在其他 I 超家族的芋螺毒素中也找到类似的例子, 并将它们归为 I 超家族中的第 2 亚族.

(2) μ -SIII A. 从线纹芋螺中找到另一新的芋螺毒素, 含 20 个残基, 3 对二硫键. 它能选择性抑制大鼠背根神经节细胞上对河豚毒素(TTX)不敏感的钠通道. 它的功能与从 *C. stercusmuscarum* 提取的 SmIII A 相似, 但序列不同, 肽段更短. 这是至今已知的第 2 个能作用于 TTX 不敏感的 Na⁺ 通道毒素^[44]. 鉴于 TTX 不敏感的钠通道在持续痛觉中发挥着重要作用, μ -SIII A 有望作为先导化合物用于新的镇痛药物的开发.

(3) α -芋螺毒素. 它们由两对二硫键组成, 根据 2 个二硫环内的残基数, 可分为 α 3/5, α 4/7, α 4/4, α 4/6 等亚型, 前二者为主要组分. α 3/5 作用于肌肉型乙酰胆碱受体(nAChR), 而 α 4/7 则作用于神经型 nA-ChR. 我们所研究的食鱼花玛瑙芋螺(*C. achatinus*) Ac1.1a 与 Ac1.1b 都属于 α 3/5-芋螺毒素, 两者都是 15 肽, 仅一个残基的差异. 电生理研究表明, 它们都偏爱肌肉型 nAChR 中由 α 与 δ 两亚基间所构成的结合位点, 而不是 α 与 γ 亚基间的结合位点^[48]. 食虫豹芋螺(*C. leopardus*)的 Lp1.1 和 Lp1.4 则属于 α 4/7 芋螺毒素, C 末端都酰胺化. 前者主要作用于神经型 nAChR 的 α 3 β 2 亚型, 而后者则主要作用于 α 1 β 1 γ δ 亚型. 另一 α 4/7-芋螺毒素来自大理石芋螺(*C. marmoreus*)的 Mr1.1 能抑制神经型 nAChR 的 α 7 受体^[58]. 澳大利亚科学家企图将 α 4/7-芋螺毒素(α -Vc1.1)开发成为临床有效的镇痛药物, 我们也正在努力寻找有应用开发前景的芋螺毒素.

上述工作在时间上跨度近30年,有30多人参与,点滴的成果都应归功于集体的劳动与智慧,这里就不一一致谢。最后想借此表达一下本人的宿愿。我国在多肽研究的领域曾创造过辉煌的历史。1965年我国首先人工合成牛胰岛素,先合成21肽的A链和30肽的B链,再重组而成。这是国际上公认的重大成果,站在多肽研究的领先地位。继后结合临床与生产实

践所需,又先后合成了催产素、加压素、促黄体素释放激素,为社会作出重大贡献。而今这些前辈功臣们有的已过世,有的已年迈体弱(资深院士),有的已退休,深有后人无继之感,本人深切期望年轻的科研人员,若有志于多肽研究领域,这个国际上非常有前景又是科研热点的领域,能为我国再创以往曾有的多肽研究辉煌。

参考文献

- Chi C W, Wang M Y, Lo S S, et al. Structure-function study on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Agkistrodon halys Pallas*). In: Fritz H, Back N, Dietze G, et al, eds. Recent Progress on Kinins. Basel, Boston: Birkhäuser Verlag, 1982. 282—288
- Chi C W, Wang S Z, Xu L G, et al. Structure-function study on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Agkistrodon halys Pallas*). Peptides, 1985, 3: 339—342
- Qian Y W, Tan F L, Qi Z W, et al. Study on natural and modified peptide *Trichosanthes* trypsin inhibitor. Scient Sin, 1990, 33: 599—605
- Huang Z F, Wu M L, Chi C W. Total synthesis of the *Trichosanthes* trypsin inhibitor and its analogue. Scient Sin, 1990, 33: 1192—1199
- Chen X M, Qian Y W, Gan K D, et al. Chemical synthesis, molecular cloning, and expression of the gene coding for the *Trichosanthes* trypsin inhibitor—a squash family inhibitor. J Biochem, 1992, 112: 45—51
- Ling M H, Qi H Y, Chi C W. Protein, cDNA, and genomic DNA sequences of the towel gourd trypsin inhibitor—a squash family inhibitor. J Biol Chem, 1993, 268: 810—814
- Tan F L, Shi Q L, Wang L X, et al. Reduction and reoxidation of the disulfide bonds of the lysine active fragment of mung bean trypsin inhibitor. Scient Sin, 1984, 27: 918—925
- Li Y L, Huang Q C, Zhang S W, et al. Studies on an artificial trypsin inhibitor peptide derived from the mung bean trypsin inhibitor: Chemical synthesis, refolding, and crystallographic analysis of its complex with trypsin. J Biochem, 1994, 116: 18—25
- 祁瑞峰. 绿豆胰蛋白酶抑制剂活性片段结构与功能研究. 博士学位论文. 上海: 同济大学蛋白质研究所, 2009
- Luckett S, Garcia R S, Barker J J, et al. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. J Mol Biol, 1999, 290: 525—533[doi]
- Tao H, Zhang Z, Shi J, et al. Template-assisted rational design of peptide inhibitors of furin using the lysine fragment of the mung bean trypsin inhibitor. FEBS J, 2006, 273: 3907—3914 [doi]
- Han J B, Zhang L, Shao X X, et al. The potent inhibitory activity of histone H1.2 C-terminal fragments on furin. FEBS J, 2006, 273: 4459—4469 [doi]
- Wang S M, Han J B, Wang Y F, et al. Design of peptide inhibitors for furin based on the C-terminal fragment of histone H1.2. Acta Biochim Biophys Sin, 2008, 40: 848—854 [doi]
- 赵彪, 戚正武, 承炎, 等. 大肠杆菌热稳定性肠毒素的分离纯化和氨基酸顺序测定. 中国生物化学与分子生物学报, 1986, 2: 101—107
- Zhou X, Shen L P, Chi C W. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *E. coli*. Toxicon, 1990, 28: 453—456[doi]
- Luo M J, Xiong Y M, Wang M, et al. Purification and sequence determination of a new neutral mammalian neurotoxin from scorpion *Buthus martensii* Karsch. Toxicon, 1997, 35: 723—731 [doi]
- Xiong Y M, Ling M H, Wang D C, et al. The cDNA and genomic DNA sequences of a mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. Toxicon, 1997, 35: 1025—1031[doi]
- Xiong Y M, Ling M H, Lan Z D, et al. The cDNA sequence of an excitatory insect selective neurotoxin from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. Toxicon, 1999, 37: 335—341 [doi]
- Lan Z D, Dai L, Zhuo X L, et al. Gene cloning and sequencing of BmK AS and BmK As-1. Two novel neurotoxins from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. Toxicon, 1999, 37: 815—823[doi]
- Xiong Y M, Lan Z D, Wang M, et al. Molecular characterization of a new excitatory insect neurotoxin with an analgesiceffect on mice from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. Toxicon, 1999, 37: 1165—1180[doi]
- Wu J J, Dai L, Lan Z D, et al. Genomic organization of three neurotoxins active on small conductance Ca^{++} -activated potassium channels from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. FEBS Lett, 1999, 452: 360—364[doi]
- Shao F, Xiong Y M, Zhu R H, et al. Expression and purification of the BmK M1 neurotoxin from the *Buthus martensi* Karsch. Protein Expr Purif, 1999, 17: 358—365[doi]
- Wu J J, Dai L, Lan Z D, et al. The Gene Cloning and sequencing of Bm-12, a chlorotoxin-like peptide from the scorpion *Buthus mar-*

- tinsi* Karsch. *Toxicon*, 2000, 38: 661—668[[doi](#)]
- 24 Dai L, Wu J J, Gu Y H, et al. Genomic organization of three novel toxins from the scorpion *Buthus martinsi* Karsch that are active on potassium channels. *Biochem J*, 2000, 346: 805—809[[doi](#)]
- 25 Wang C G, He X L, Shao F, et al. Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 2480—2485 [[doi](#)]
- 26 Wu J J, He L L, Zhou Z, et al. Gene expression, mutation and structure-function relationship of scorpion toxin BmP05 active on SK_{Ca} channels. *Biochemistry*, 2002, 41: 2844—2849 [[doi](#)]
- 27 Goudet C, Chi C W, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, 2002, 40: 1239—1258[[doi](#)]
- 28 Wang C G, Gilles N, Hamon A, et al. Exploration of the functional site of a scorpion alpha-like toxin by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 2003, 42: 4699—4708[[doi](#)]
- 29 Xu C Q, Zhu S Y, Chi C W, et al. Turret and pore block of K⁺ Channels: What is the different? *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24: 446—449 [[doi](#)]
- 30 Xu C Q, He L L, Brône B, et al. A novel scorpion toxin blocking small conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel. *Toxicon*, 2004, 43: 961—971[[doi](#)]
- 31 Wang C G, Cai Z, Lu W, et al. A novel short-chain peptide BmKX from the Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch, sequencing, gene cloning and structure determination. *Toxicon*, 2005, 45: 309—319 [[doi](#)]
- 32 Cai Z, Xu C, Xu Y, et al. Solution structure of BmBKTx1-a new BKCa channel blocker from the Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Biochemistry*, 2004, 43: 3764—3771 [[doi](#)]
- 33 Szyk A, Lu W Y, Xu C Q, et al. Structure of the scorpion toxin BmBKTx1 solved from single wavelength anomalous scattering of sulfur. *J Struct Biol*, 2004, 145: 289—294 [[doi](#)]
- 34 Huys I, Xu C Q, Wang C Z, et al. BmTx3, a scorpion toxin with two putative functional faces separately active on A-type K⁺ and HERG currents. *Biochem J*, 2004, 378: 745—752 [[doi](#)]
- 35 Xu C Q, Brône B, Wicher D, et al. BmBKTx1, a novel BK channel blocker purified from scorpion *Buthus martensi* Karsh. *J Biol Chem*, 2004, 279: 34562—34569 [[doi](#)]
- 36 Wang S, Huang L, Wicher D, et al. Structure-function relationship of bifunctional scorpion toxin BmBKTx1. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008, 40: 955—9634 [[doi](#)]
- 37 邵晓霞. 蝎氯毒素的重组表达与纯化及质谱在芋螺毒素序列测定中的应用. 硕士学位论文. 上海: 同济大学蛋白质研究所, 2009
- 38 Wang C Z, Chi C W. Conus-a rich pharmaceutical treasure. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, 36: 713—723
- 39 Terlau H, Olivera B M. Conus venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol Rev*, 2004, 84: 41—68 [[doi](#)]
- 40 Fan C X, Chen X K, Zhang C, et al. A novel conotoxin from *Conus betulinus*, κ -BtX, unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator. *J Biol Chem*, 2003, 278: 12624—12633[[doi](#)]
- 41 Wang C Z, Jiang H, Ou Z L, et al. cDNA cloning of a superfamily conotoxins from *Conus striatus*. *Toxicon*, 2003, 42: 613—619[[doi](#)]
- 42 Han Y H, Wang Q, Jiang H, et al. Sequence diversity of T-superfamily conotoxins from *Conus marmoreus*. *Toxicon*, 2005, 45: 481—487[[doi](#)]
- 43 Jiang H, Wang C Z, Xu C Q, et al. A novel M-superfamily conotoxin with a unique motif from *Conus vexillum*. *Peptides*, 2006, 27: 682—689[[doi](#)]
- 44 Wang C Z, Zhang H, Jiang H, et al. A novel conotoxin from *Conus striatus*, μ -SIII A, selectively blocking mammalian tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Toxicon*, 2006, 46: 122—132[[doi](#)]
- 45 Han Y H, Wang Q, Jiang H, et al. Characterization of novel M-superfamily conotoxins with new disulfide linkage. *FEBS J*, 2006, 273: 4972—4982[[doi](#)]
- 46 Jiang H, Xu C Q, Wang C Z, et al. Two novel O-superfamily conotoxins from *Conus vexillum*. *Toxicon*, 2006, 47: 425—436[[doi](#)]
- 47 Yuan D D, Han Y H, Wang C G, et al. From the identification of gene organization of α -conotoxins to the cloning of novel toxins. *Toxicon*, 2007, 49: 1135—1149[[doi](#)]
- 48 Liu L, Chew G, Hawrot E, et al. Two potent α 3/5 conotoxins from piscivorous *Conus achatinus*. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2007, 39: 438—444[[doi](#)]
- 49 Du W H, Han Y H, Huang F J, et al. Solution structure of an M-1 conotoxin mr3e with a novel disulfide linkage. *FEBS J*, 2007, 274: 2596—2602[[doi](#)]
- 50 Peng C, Wu X, Han Y, et al. Identification of six novel T-1 conotoxins from *Conus pulicarius* by molecular cloning. *Peptides*, 2007, 28: 2116—2124 [[doi](#)]
- 51 Wang Q, Jiang H, Han Y H, et al. Two different groups of signal sequence in M-superfamily conotoxins. *Toxicon*, 2008, 51: 813—822[[doi](#)]
- 52 Wang Y F, Shao X X, Li M, et al. mr1e, a conotoxin from *Conus marmoreus* with a novel disulfide pattern. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2008, 40: 391—396[[doi](#)]
- 53 Han Y, Huang F, Jiang H, et al. Purification and structural characterization of a D-amino acid containing conopeptide, conomarphin, from *Conus marmoreus*. *FEBS J*, 2008, 275: 1976—1987[[doi](#)]

- 54 Peng C, Liu L, Shao X, et al. Identification of a novel class of conotoxins defined as V-conotoxins with a unique cysteine pattern and signal peptide sequence. *Peptides*, 2008, 29: 985—991[[doi](#)]
- 55 Yuan D D, Liu L, Shao X X, et al. Isolation and cloning of a conotoxin with a novel cysteine pattern from *Conus characteristicus*. *Peptides*, 2008, 29: 1521—1525[[doi](#)]
- 56 Liu L, Wu X, Yuan D, et al. Identification of a novel S-superfamily conotoxin from vermivorous *Conus characteristicus*. *Toxicon*, 2008, 51: 1331—1337[[doi](#)]
- 57 Yuan D D, Liu L, Shao X X, et al. New conotoxins define the novel I₃-superfamily. *Peptides*, 2009, 30: 861—865[[doi](#)]
- 58 彭灿. 中国南海新型芋螺毒素的克隆、纯化、结构和功能的研究. 博士学位论文. 上海: 同济大学蛋白质研究所, 2009
- 59 叶铭宇. 中国南海新超家族芋螺毒素的鉴定及功能研究. 博士学位论文. 上海: 同济大学蛋白质研究所, 2009
- 60 Jimenez E C, Craig A G, Watkins M, et al. Bromocontryphan: Post-translation bromination of tryptophan. *Biochemistry*, 1997, 36: 989—994 [[doi](#)]

Research retrospect on small molecule protease inhibitors and peptide toxins

CHI ChengWu

Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;
Institute of Protein Research, Tong Ji University, Shanghai 200092, China

This paper is a retrospect of our research works on small molecular weight protease inhibitors and peptide toxins, all of them are active peptides. The Lysin active fragment of the double headed mung bean trypsin inhibitor has been intensively studied. The approaches of sequence determination, gene expression and mutagenesis as well as peptide synthesis are used to indicate that the essential core of the inhibitor is composed of two conjugated disulfide loops each with nine-residues, which shares high homology with the cyclic peptide sun flower trypsin inhibitor. Another described inhibitor is the *Trichosanthes* trypsin inhibitor belonging to the squash family, its gene sequence was first reported in this family. The studied peptide toxins include scorpion toxins and conotoxins. Many novel potassium channel toxins were found from the scorpion *Buthus martensi* Karsch, including the calcium dependent BK or SK potassium channel toxins and voltage dependent toxins. Some of them have two deferent functions displaying at separated region, their structure-function relationships were elucidated. The expressed recombinant scorpion chloride toxin has a potential in treatment of malignant gliomas. From 16 species of cone snail 50 novel conotoxin peptides were identified, and 134 novel conotoxin genes were cloned. Three unreported superfamilies were characterized, designated as V, Y, K superfamily, respectively; some new disulfide frame and arrangement, unique motif, D-form residue in the toxin primary structures were found; the genomic structure of A superfamily was analysed, in the intro there is a very conserved sequence at the 3'end which could be used as a primer to clone more new conotoxin genes; the biological function of some conotoxins were elucidated.

active peptides, bradykinin potentiating peptide, squash family protease inhibitor, Bowman-Birk family protease inhibitor, *E. coli* heat-stable enterotoxin, scorpion toxins from *Buthus martensi* Karsch, conotoxins from South Sea China

doi: 10.1360/972009-1582