

马氏钳蝎中性神经毒素 BmK M4 0.20 nm 晶体结构测定^{*}

何小林 刘新奇 曾宗浩 李宏民 王 淼
张 英 王大成^{**}

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 BmK M4 是一种中性蝎神经毒素, 在 BmK 系列中具有中等毒性, 属 Group III α -型毒素. 纯化样品结晶为六方晶体, 空间群为 $P6_1$. 运用 X 射线衍射分析技术, 通过分子置换法在 0.20 nm 分辨率水平测定了 BmK M4 晶体结构, 并对模型结构进行了修正. 最后的晶体学 R 因子为 0.142, 自由 R 因子为 0.173, 模型的标准键长偏差为 0.001 5 nm, 标准键角偏差为 1.753° . 在一个不对称单位里加入了 64 个水分子. 精化的结构显示第 10 位残基含有 1 个反常的非脯氨酸顺式肽键. 将精化后的结构与 Group II α -型蝎毒素 BmK M8(酸性弱毒素)的结构进行比较, 并以此为基础讨论该 *cis* 肽键可能的结构意义.

关键词 蝎神经毒素 中性毒素分子 晶体结构 顺式肽键

蝎广泛存在于世界各地, 常用其尾针攻击人畜引起严重的症状. 这些症状是通过其尾腺所分泌的毒液中多种活性多肽和蛋白作用于动物的神经肌肉系统的可兴奋膜而引起的, 它们属于一类神经毒素. 现在已知, 蝎神经毒素可分为短链和长链两大类. 短链毒素含 30~40 氨基酸残基, 3~4 对二硫键. 长链毒素由 60~70 氨基酸残基经 4 对二硫键交联构成, 专一地结合电位依赖的门控 Na^+ 通道, 影响可兴奋组织细胞 Na^+ 的通透^[1]. 在序列上这些毒素相互具有不同程度的同源性. 依据其对不同动物毒性的专一性, 可将它们分为哺乳动物毒素、昆虫毒素、甲壳动物毒素等类别. 在哺乳动物毒素中, 又依据其对通道电流的不同作用和受体结合的不同特征特性分为 α 和 β 两类^[2]. α 型毒素延缓 Na^+ 电流的失活过程, 结合在 Na^+ 通道受体位置 3; β 型毒素阻遏 Na^+ 电流的激活, 结合在受体位置 4. 在 α 型毒素中, 又根据它们的序列特征和免疫学特性分为 4 个亚类, 分别称为 Group I, II, III, IV^[3]. 由于蝎毒素种类繁多, 功能复杂多样, 因此成为深入研究蛋白质结构与功能关系以及膜受体-配体作用的良好材料.

马氏钳蝎 (*Buthus martensii* Karsch, 以下简称 BmK) 广泛分布于东亚和中国, 具有独特的

1998-12-11 收稿, 1999-05-19 收修改稿

* 国家自然科学基金 (批准号: 39670158) 和国家“八六三”高技术计划 (批准号: 863-13-01-06) 资助项目

** 联系人 (E-mail: wdc@pewdc.ibt.ac.cn)

生物毒性和药理学性质. 世界上其他一些地区的蝎(如北非地区的 *Androctonus australis* Hector, AaH)常侵害人畜致死, 因而形成严重的环境医学问题. 相比而言, BmK 具有较弱的生物毒性, 在中国从未有蝎侵害人畜致死的记载. 与此相反, 全蝎(特别是蝎尾)作为名贵中药材治疗神经性疾病已有上千年历史. 因此, 对 BmK 的研究具有独特的生物学和医学背景, 具有我国自身的资源特色.

近年来, 一方面从 BmK 毒液中发现了一些具有显著药物效应的组分并克隆了它们的基因^[4]; 另一方面从 BmK 中发现并纯化和结晶了一系列活性敏感的神经毒素系列^[5], 筛选、克隆并表达了编码基因^[6,7], 为结构-功能关系研究提供了充分条件. 十分有意义的是, 在这个系列(BmK M1, M2, M4, M8)中, 不仅活性有显著差别(生物活性相差 20 倍), 而且分为不同的 α -毒素组: BmK M1, M2, M4 属 Group III^[8], BmK M8 属 Group II^[9], 从而显示它们具有不同的结合专一性. 此前我们报道了 BmK 中一种酸性毒素 BmK M8 的晶体结构^[9,10], 加上来自北非蝎强毒素 AaH II 的晶体结构^[11], 这是迄今已报道的仅有的两种 α -蝎神经毒素的高分辨率晶体结构, 它们均属于 Group II. 本文报道一种中性中等毒性组分 BmK M4 的 0.20 nm 分辨率的晶体结构的测定与分析工作, 这是第一次报道 Group II 以外的 α 型毒素结构. 有趣的是, 从 BmK M4 的结构中发现一个反常的非脯氨酸的顺式(*cis*)肽键, 这在蝎毒素中还是首次发现, 在一般蛋白质结构中也不多见.

1 材料与方法

1.1 纯化与结晶

BmK M4 依文献[5]所述方法从蝎毒中经多步柱层析而纯化制备. 为了达到长晶体所需的高纯度, 采用缓冲范围 pH 7~10 的多缓冲剂, 应用制备等电聚焦的手段对样品进一步纯化. 通过分析等电聚焦电泳和 HPLC 鉴定, 样品的纯度达到 98% 以上. BmK M4 由 64 个氨基酸组成, 分子量为 7 001. 其序列为 VRDGYIAKPH NCVYECARNE YCNDLCTKDG AKSGYQWVG KYGNGCWCIE LPDNVPIRVP GKCH. 薄层等电聚焦电泳测定结果表明其等电点为 7.53, 为中性毒素. 动物实验表明其对小白鼠具有中等偏弱毒性, 其半致死剂量 LD₅₀ 为 4.0 $\mu\text{g/g}$, 对丽蝇幼虫也具有弱的毒性, 其半收缩效应剂量(CPU₅₀)为 3.0 $\mu\text{g/g}$.

晶体生长依照文献[5], 采用悬滴气相扩散法. 生长温度为室温. 蛋白样品用 1 mmol/L 醋酸溶解为 20 mg/mL, 池液为 4.8 mol/L 醋酸铵. 将 5 μL 蛋白与 5 μL 池液混合, 并对 1 mL 池液平衡. 晶体一般在 1 个星期左右出现, 1 个月后生长完成, 最大线度可以达到 0.6 mm. 晶体为棱柱形, 具有明显的 6 次轴. 在面探测器上测得的晶胞参数为 $a=b=5.558$ nm, $c=3.396$ nm, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$, 空间群可能为 P6₁ 或者 P6₅. 运用 Mathews 统计分析, 按每个不对称单位含 1 个分子计算, 则 $V_m=0.002\ 07$ nm³/u, 晶体含水量为 40.6%, 处于合理统计值范围. 由此推定, 晶胞中每个不对称单位含 1 个 BmK M4 分子.

1.2 衍射数据收集

衍射数据是在室温条件下, 运用 Siemens X-200B 面探测器收集的. X 射线采用单色化的 CuK α 辐射, 光源为 Rigaku RU200 旋转靶发生器(40 kW, 200 mA). 全部数据用一颗晶体完成收集. 数据分辨率优于 0.20 nm. 衍射数据的平均、求比例、合并是用 XENGEN 程序完成的. 最后在 2.93~0.20 nm 范围内, 从 11 618 个观测点中得到 4 091 个独立衍射点, 完整度为

98.9%。合并后的 R_{merge} 仅为 2.79% ($R_{\text{merge}} = \sum (I(i) - \langle I \rangle) / \sum I(i)$, 式中 $I(i)$ 为单个重复测量点的强度值, $\langle I \rangle$ 为这些重复测量点强度平均值), 说明这是一套质量很高的数据。

1.3 结构解析与精化

BmK M4 的结构是运用分子置换法, 采用 CCP4 软件包的 AMoRe 程序解析的。本实验室已经得到酸性毒素 BmK M8 的 0.185 nm 晶体结构^[9] 和碱性毒素 BmK M1 的 0.17 nm 晶体结构(待发表), 序列比较^[3] 显示, BmK M1 与 BmK M4 的同源性较高, 因此采用 BmK M1 作为搜索模型。对搜索模型中与 BmK M4 序列有差异的残基不作任何加工。用 $I/\sigma(I) > 2$ 的衍射数据进行快速旋转函数和平移函数的搜索, 并对可能的解进行刚体修正。所得的解用 TURBO-FRODO 程序检查分子堆积。

经分子置换法得到了未经残基替换的 BmK M4 初始模型, 以此为基础进行模型修正。首先用 FRODO 程序将正确的残基替换过来, 然后运用能量极小化的最小二乘法以及模拟退火修正。以计算相位 (α_c) 和振幅 (F_c) 与观测数据 (F_o) 相匹配, 计算 $(2F_o - F_c)$, $(F_o - F_c)$, 以及 omit ($F_o - F_c$) 电子密度图, 用 TURBO-FRODO 程序进行模型重建。然后再经过能量极小化制约的最小二乘法位置修正以及温度因子修正。用精化后的坐标计算新一轮的电子密度图, 并进行新一轮模型重建。上述晶体学修正过程与模型重建交替进行直至收敛。最后分步加入水分子。将修正后的模型运用 FRODO, PROCHECK 等软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 BmK M4 的分子置换解

以 BmK M1 结构为基础, 采用不同分辨率范围数据进行旋转函数搜索。积分半径定为 0.18 nm, α , β 和 γ 的搜索步长为 3° , 这里的 α , β 和 γ 是 Growth 定义的 Euler 角。结果在分辨率取 1.0~0.4 nm 时, 在 $\alpha = 37.1^\circ$, $\beta = 112.1^\circ$, $\gamma = 181.1^\circ$ 处找到峰值为相关系数 (CC) 20.5 的最高峰, 而次高峰 CC 为 17.5, 最高峰高于本底 4.8σ 。

进行平移函数搜索时, 对 P6₁ 和 P6₅ 两种可能空间群都进行了尝试。以旋转解为基础, 在 1.0~0.35 nm 范围内进行平移函数计算。结果在取空间群 P6₅ 时, 最高峰为 CC 23.8, R 因子 52.2%, 次高峰为 CC 22.7, R 因子 52.8%; 而在取空间群 P6₁ 时, 最高峰 CC 34.6, R 因子 49.7%, 次高峰 CC 21.5, R 因子 52.3%。这表明 P6₁ 是正确的空间群。相应所得的平移函数解为 $T_x = 0.9833$, $T_y = 0.6500$, $T_z = 0.0000$ 。运用 AMoRe 的刚体修正程序对所得的旋转和平移函数解进行精化后, 最后在 $\alpha = 35.70^\circ$, $\beta = 111.01^\circ$, $\gamma = 181.76^\circ$, $T_x = 0.9910$, $T_y = 0.6396$, $T_z = 0.0000$ 处给出了 CC 58.3, R 因子 0.423。运用此解对搜索模型操作后运用 TURBO-FRODO 程序检查分子在晶胞中的堆积, 没有发现过近接触, 同时分子间的距离合理, 证明分子置换的解是正确的。

2.2 晶体学修正和模型重建

以 BmK M1 结构为基础的初始模型, 在 1.0~0.35 nm 分辨率范围内, 其初始晶体学 R 因子为 42.3%。直接用 FRODO 程序将 BmK M4 与 BmK M1 不同的 12 个残基进行替换, 替换后的残基的侧链采取随机取向。随机采用 10% 的数据做交叉验证, 以自由 R 因子 (R_{free}) 为指导对模型进行修正, 在修正过程中加入立体化学制约。由于数据质量好, 取 $I/\sigma(I) > 0$ 的所有数据进行修正。首先扩展分辨率为 1.0~0.30 nm, 经过一轮刚体修正和两轮能量极小化的位置

修正, R 因子和 R_{free} 分别降为 38.6% 和 45.6%。随后在此分辨率范围内, 进行一轮模拟退火 (SA) 修正, R 因子和 R_{free} 分别降至 30.2% 和 37.6%。扩展分辨率至 0.25 nm, 再经一轮位置修正和一轮模拟退火修正后, R 因子和 R_{free} 分别降为 27.4% 和 34.0%。此时扩展分辨率至 1.0 ~ 0.20 nm, 计算 $(2F_o - F_c)$ 和 $(F_o - F_c)$ 电子密度图。对于密度不好的区域, 计算 omit $(F_o - F_c)$ 电子密度图, 在图象系统上对模型进行手工调整。然后对调整后的模型做位置修正和温度因子修正。此后手工调整与位置及温度因子修正交替进行, 直至修正收敛。此时 R 因子和 R_{free} 达到 20.4% 和 24.9%。最后添加低分辨率数据, 在 2.0 ~ 0.20 nm 范围内, 选取电子密度峰肯定、立体化学合理 (能与蛋白质极性原子形成氢键) 的水分子 64 个。经位置修正和温度因子修正后, R 因子和 R_{free} 分别达到 14.2% 和 17.3%。模型的键长平均偏差为 0.001 5 nm, 键角平均偏差为 1.752° 。由此可见数据与模型的拟合程度很高, 且立体化学是非常合理的。晶体学修正过程详见表 1。

表 1 分子动力学修正过程

步骤	R	R_{free}	分辨率范围/ nm	RMSD _{bond} / nm	RMSD _{angle} / ($^\circ$)	备注
0	0.423	—	1.0 ~ 0.35	0.002 0	2.264	分子置换法结果
1	0.386	0.456	1.0 ~ 0.30	0.001 6	1.984	1 轮刚体修正, 2 轮位置修正
2	0.302	0.376	1.0 ~ 0.30	0.001 6	1.813	1 轮模拟退火, 1 轮位置修正
3	0.274	0.340	1.0 ~ 0.20	0.001 6	1.782	1 轮模拟退火, 1 轮位置修正
4	0.204	0.249	1.0 ~ 0.20	0.001 5	1.759	交替进行手工调整和位置、温度因子修正
5	0.142	0.173	2.0 ~ 0.20	0.001 5	1.752	加入 64 个水分子, 位置及温度因子修正, 手工调整

2.3 电子密度图

BmK M4 分子的主链与最终的电子密度图配合非常好。在侧链中, 只有 Lys24, Glu32, Glu50, Lys62 4 个残基的侧链末端在轮廓线取 1.0σ 的 $(2F_o - F_c)$ 电子密度图上不能找到很好的密度, 而这 4 个残基都是长侧链残基且位于分子表面, 本身可能就具有较强的活动性。其他地方的侧链都有很好的电子密度表现。图 1 显示了重要功能残基 Tyr5 附近电子密度与模型的配合情况。从图中可以看出, 芳香环中心已经镂空, 水分子密度呈球状, 表明精化后的结构模型的质量很高。Ramachandran 构象图显示 (图 2), 各个残基的二面角都落在最适区和允许区内, 且最适区的残基占 86.0%, 表明所得结构模型具有很好的立体化学合理性。

2.4 BmK M4 总体结构: 共同的分子骨架

BmK M4 的基本结构框架是由 1 个 α 螺旋和 1 条 3 链的 β 折叠层构成 (图 3), 它们共同形成一个密集的核心。螺旋 (H) 由残基 19 ~ 28 组成, 而 3 个折叠链分别由残基 2 ~ 5 (β I), 残基 31 ~ 39 (β II), 残基 45 ~ 51 (β IID) 组成。4 对二硫键 (S1 ~ S4) [Cys12-Cys63, Cys16-Cys36, Cys22-Cys46, Cys26-Cys48] 将各个二级结构单元共价交联, 由此形成一个由二硫键锁定的 $\beta\alpha\beta$ motif, 构成分子的基本支架 (Scaffold)。这种分子骨架不仅存在于所有蝎毒分子中, 而且也许多功

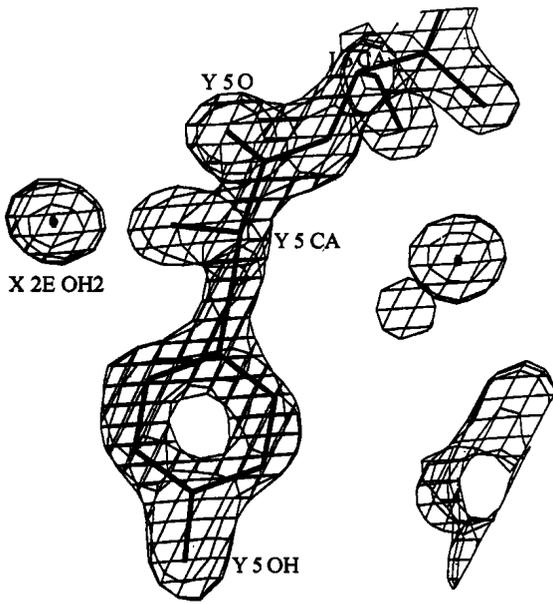


图 1 Tyr5 附近的 $2F_o - F_c$ 电子密度图
轮廓线取 1.5σ

Bmk M4 的结构明确显示第 10 位 Glu 残基前的肽键是顺式的(图 4)。这一反常 *cis* 肽键出现在一个由 8~12 残基构成的回折结构之中。仔细的立体化学分析表明, 这一 *cis* 肽键的形成与第 9 位是 Pro 相关。由于 Pro 对主链结构的特殊制约, 使 9, 10 肽键如取 *trans* 结构则会使第 10 位

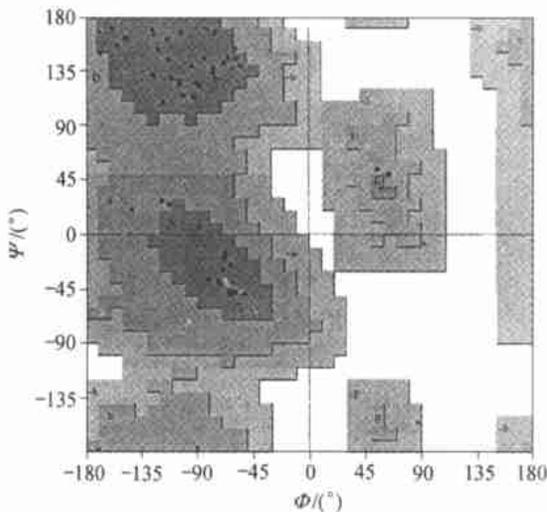


图 2 Ramachandran 构象图
用 PROCHECK 程序产生, 其中 86% 残基
落入核心区, 14% 落入允许区

能完全不同的其他蛋白质(如植物与昆虫防卫素^[12]、甜味蛋白^[13])所采用。作为蛋白质工程极好的天然分子支架, 近年受到越来越多的重视^[14]。以此共同的分子骨架为基础, 3 个环肽区(Loop), 包括 L1(残基 6~18), L2(残基 39~44), L3(残基 52~64), 伸出在分子表面。它们在不同种类的蝎毒分子结构中常常具有不同的构象, 是分子在序列和结构上易变的部分, 可能与不同分子的作用专一性和功能差异性相关。

2.5 不平常的非脯氨酸顺式肽键

由于肽键具有局部双键性质, 因此有顺式(*cis*)和反式(*trans*)两种构型(configuration)。一般 *cis* 结构的能量高于 *trans* 结构, 因此在蛋白质结构中, 肽键主要以 *trans* 结构存在。有报道指出, 在蛋白质中仅有 0.36% 的肽键是顺式的, 而这其中绝大多数出现在脯氨酸前面^[15]。极少数的非脯氨酸顺式肽键的例子都指出, 它的出现总是具有功能或结构上的意义。精化的

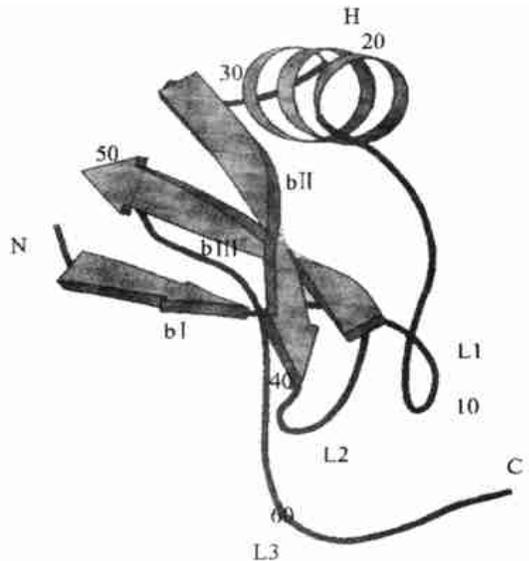


图 3 Bmk M4 结构的条带图
 α 螺旋、 β 折叠和环肽区分别以 H, b, L 表示

的 C β 和 Cys12 的 S γ 发生空间障碍, 从而破坏 Cys12-Cys63 的二硫键. 因此, 9, 10 肽键被迫采取 *cis* 构型.

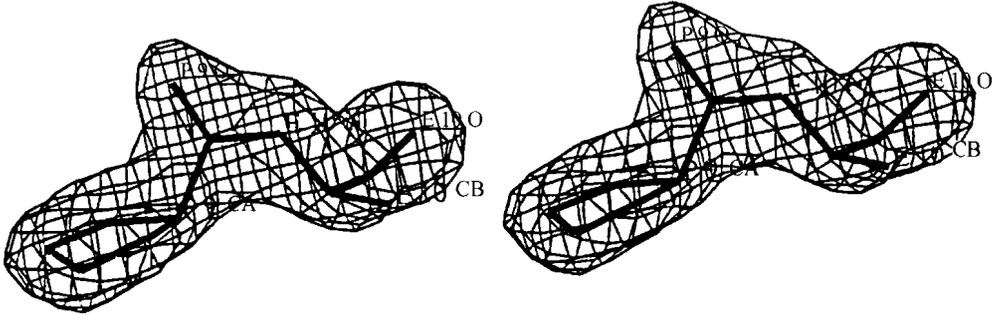


图 4 第 9, 10 位残基主链的 omit ($F_o - F_c$) 电子密度图

轮廓线取 2.5σ , 清楚显示 9, 10 之间的肽键取 *cis* 构型. 计算该图时残基 Pro9 和 Glu10 被略去

2.6 *cis* 肽键出现的结构意义

BnK M4 和 M8 分属 Group II 和 Group II α 型蝎毒素, 其结构均已在高分辨率解析. 基于在 Na⁺ 通道上的竞争性实验, 最近有报道^[3] 指出, 这两组毒素分子可能结合在 Na⁺ 通道的不同位置. 了解这一结合专一性的结构基础具有重要意义. 图 5 示出了 BnK M4 和 BnK M8 C α 叠合比较. 从中可以看出, 两个分子的主要结构差别出现在与 (8~12) 回折相关的 C 端肽段. 在这里, BnK M4 在 9, 10 位置出现 *cis* 肽键, 而在 BnK M8 中是 *trans* 肽键. 与此相应, C 端肽段在这两个分子中有完全不同的空间取向. 在 BnK M4 中, 它的 C 末端指向了与 8~12 肽段靠近的方向. 不仅如此, 末端的 His64 还以两个主链氢键 (H64 O...E10 N, 0.308 nm; H64 N...E10 O, 0.298 nm) 与形成顺式肽键的 Glu10 联系 (图 6). 说明 C 末端的空间位置与顺式肽键有着紧密的联系. 而从 BnKM8 的情况看, 它的 C 末端与 8~12 肽段在空间上是完全分开的.

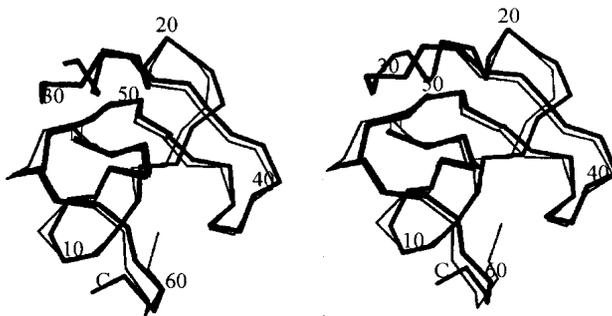


图 5 BnK M4 与 BnK M8 的 C α 立体叠合图

粗线为 BnK M4, 细线为 BnK M8

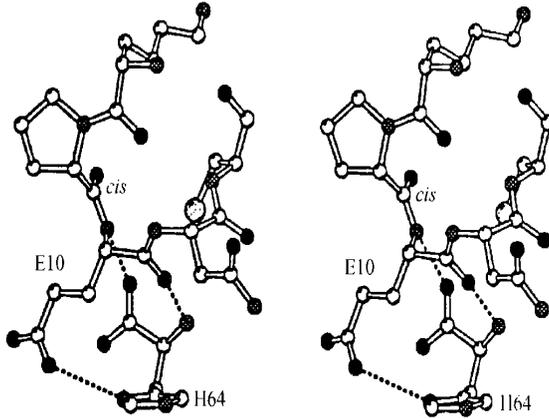


图 6 BmK M4 中第 10 位 *cis* 肽键与末端残基 H64 的氢键联系
氢键以虚线表示

显然, 这可能与毒素分子的受体结合专一性有关。

参 考 文 献

- 1 Rochat H, Benard P, Couraud F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: Cecarelli B, Clementi F, eds. *Advances in Cytopharmacology*, 3. New York: Raven Press, 1979. 357 ~ 376
- 2 Couraud F, Jover E, Debois J M, et al. Two types of scorpion toxin receptor sites: one related to activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon*, 1982, 20: 9 ~ 16
- 3 Gordon D, Matineauclaire M F, Cestele S, et al. Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channel. *J Biol Chem*, 1996, 271: 8 034 ~ 8 045
- 4 Xiong Y M, Ling M H, Lan Z D, et al. The cDNA sequence of an excitatory insect selective neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch with analgesic activity from scorpion BmK. *Toxicon*, 1999, 37: 335 ~ 341
- 5 Li H M, Zhao T, Jin L, et al. A series of bioactivity-variant neurotoxins from scorpion *Buthus martensii* Karsch: purification, crystallization and crystallographic analysis. *Acta Cryst*, 1999, D55: 341 ~ 344
- 6 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: 1 025 ~ 1 031
- 7 熊玉梅, 凌敏华, 赵彤等. 两个东亚钳蝎抗哺乳动物毒素的 cDNA 序列. *生物化学与生物物理学报*, 1997, 29: 200 ~ 207
- 8 Luo M J, Xiong Y M, Wang M, et al. Purification and sequence determination of a new neutral mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon*, 1997, 35: 723 ~ 728
- 9 Li H M, Wang D C, Zeng Z H, et al. Crystal structure of an acidic neurotoxin from scorpion *Buthus martensii* Karsch at 1.85 Å resolution. *J Mol Biol*, 1996, 261: 415 ~ 431
- 10 李宏民, 金雷, 曾宗浩, 等. 马氏钳蝎酸性神经毒素(BmK M8)0.25 nm 分辨率结构测定. *中国科学, B 辑*, 1996, 26(3): 213 ~ 219
- 11 Fontecilla-Camps J C, Habersetzer-Rochat C. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 7 443 ~ 7 447
- 12 Broekaert W F, Terras F R G, Lammie B P A, et al. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1 353 ~ 1 377
- 13 Gao G H, Dai J X, Hu X, et al. Solution conformation of brazzin by ¹H nuclear magnetic resonance: resonance assignment and secondary structure. *Int J Biomacromol*, 1999, 24: 351 ~ 359
- 14 Vita C. Engineering novel proteins by transfer of active site to natural scaffolds. *Curr Opin Biotech*, 1997, 8: 429 ~ 434
- 15 Stewart D E, Sarker A, Wampler J E. Occurrence and role of *cis* peptide bonds in protein structures. *J Mol Biol*, 1990, 214: 253 ~ 260