

· 综 述 ·

芋螺毒素的翻译后修饰

张 玲¹, 袁多多², 戚正武^{1,2}

(1. 同济大学 蛋白质研究所, 中国上海 200092 ;

2. 中国科学院 上海生命科学研究院 生物化学与细胞生物学研究所, 中国上海 200031)

摘 要: 芋螺毒素是一类由芋螺毒液管分泌的生物活性小肽, 能特异地作用于各种离子通道和神经递质受体. 芋螺毒素的一个显著特点是具有高度的翻译后修饰, 包括 Glu 的 γ 羧基化、L 型氨基酸到 D 型氨基酸的异构化、Pro 等的羟基化、Trp 的溴代等. 这些翻译后修饰在提高芋螺毒素分子多样性的同时, 也增强了芋螺毒素的功能. 现主要针对芋螺毒素中的各种翻译后修饰的发现、分布、功能和参与反应的酶系统进行综述.

关键词: 芋螺毒素; 活性多肽; 翻译后修饰; 谷氨酸 γ 羧基化; 氨基酸异构化

中图分类号: Q71; R996.3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)03-0258-10

Review on Posttranslational Modification of Conotoxin

ZHANG Ling¹, YUAN Duo-duo², CHI Cheng-wu^{1 2}

(1. *Institute of Protein Research, Tongji University, Shanghai 200092, China*; 2. *Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

Abstract: Conotoxins are neuropharmacologically active peptides secreted by the venom ducts of cone snails, which can potently and specifically inhibit different types of ion channels and neurotransmitter receptors. One of the striking features of conotoxins is the high density of posttranslational modification (PTM), including carboxylation of glutamic acid, epimerization of an L- to D-amino acid, hydroxylation of proline, bromination of tryptophan and so on. Those various types of PTMs can greatly increase the molecular diversity and improve physiological functions of conotoxins. The discovery, distribution and function of PTMs, as well as the involved enzyme systems are reviewed.

Key words: conotoxin; active peptides; posttranslational modification; γ carboxylation of glutamic acid; amino acid epimerization

(*Life Science Research* 2009, 13(3) 258~267)

芋螺属于腹足纲软体动物, 外形呈圆锥形或芋头状, 并因此而得名. 芋螺多数生活在热带海洋中的浅水区, 利用毒素为主要武器进行捕食, 目前已发现了 500~700 种芋螺, 而每种芋螺能产生 100~200 种不同的芋螺毒素, 因此自然界中存

在着几万到几十万种芋螺毒素.

芋螺毒素是芋螺毒液管壁细胞生产和分泌出来的一类活性小肽, 能作用于细胞膜上的钠、钾、钙等多种离子通道和神经递质的受体, 以此来干扰细胞或神经中的信号传递. 大多数的芋螺

收稿日期: 2008-10-17; 修回日期: 2009-03-16

基金项目: 国家“973”计划项目(2004CB719904)

作者简介: 张玲 (1986-), 女, 安徽黄山人, 硕士研究生, 主要从事多肽毒素研究, Tel: 021-65988805, Fax: 021-65988403, E-mail: zhangling19860116@hotmail.com; 袁多多 (1980-), 女, 河南遂平人, 助理研究员, 主要从事活性多肽结构与功能的研究; 戚正武 (1932-), 男, 浙江宁波人, 上海生命科学研究院生化细胞所研究员, 同济大学蛋白质研究所所长及化学系主任, 中国科学院院士, 第三世界科学院院士, 从事活性多肽及胰蛋白酶结构和功能的研究

毒素只有 10~40 个氨基酸,是分子质量较小的一类多肽毒素,而蛇、蜘蛛及海葵等物种的毒液中所含的神经毒素则有 40~80 个氨基酸左右。根据高度保守的信号肽序列,将芋螺毒素分为若干个超家族。在此基础上,根据每个成员保守的半胱氨酸骨架,结合其药理学活性,将之进一步分为若干个家族,例如 ω -超家族包括 ω -、 $\mu\omega$ -、 δ -和 κ -芋螺毒素, T-超家族包括 τ -和 χ -芋螺毒素, A-超家族包括 α -、 αA 和 κA -芋螺毒素等。

芋螺毒素是迄今为止所发现的翻译后加工最为复杂的多肽,除了具有常见的翻译后修饰如成熟肽的蛋白酶剪切和 C 末端酰胺化外,还具有一些其他物种罕见的修饰,如 γ -Glu 的 γ 羧基化修饰、L 型氨基酸到 D 型氨基酸的异构化、Pro 等的羟基化、Glu 的环化、Trp 的溴代化, Ser 或 Thr 糖基化及 Tyr 的磺基化等(图 1、表 1)。其中有些翻译后修饰是首次在芋螺毒素中报道,如 Trp 的溴代修饰,因此研究芋螺毒素可以更好地

了解多肽的翻译后修饰。芋螺毒素中翻译后修饰的分布极度不均一,有些家族,如 ω -、 δ 和 μ 家族的芋螺毒素很少有翻译后修饰,而有些家族的芋螺毒素却存在高度的翻译后修饰。例如, Bromocontryphan-R 共有 8 个氨基酸^[1],其中一个 Trp 被溴代修饰,另一个 Trp 被差向异构化成 D 型 Trp,另外还有两个羟基化的 Pro; tx5a 的 13 个氨基酸中有 4 个残基分别被 γ 羧基化、溴代、糖基化和羟基化修饰^[2]。

1 常见的翻译后修饰

芋螺毒素的基因在毒液管壁细胞中表达产物是包括高度保守的 pre 区、pro 区和高度变异的成熟肽的前体 (prepropeptide),而在分泌至毒液管之前,所有芋螺毒素的 prepropeptide 均会被蛋白酶剪切加工成成熟肽(图 2)。这种翻译后加工发生在 pro 区和成熟肽之间,且蛋白酶酶切的 P6~P1 位点具有一定的规律性,因此这种翻译后

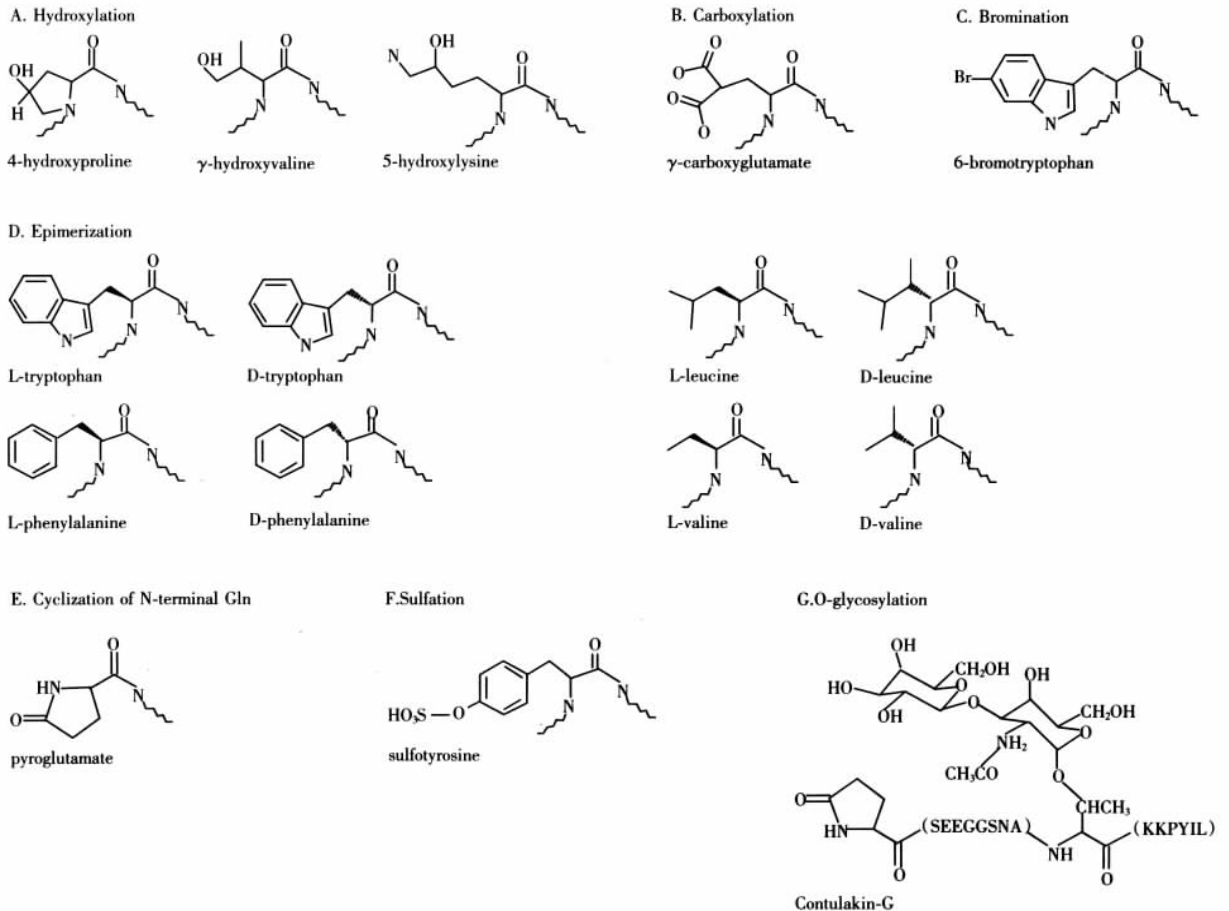


图 1 芋螺毒素中各种翻译后修饰的氨基酸的结构示意图^[3]

Fig.1 Review of the structures of posttranslationally modified amino acids documented in *Conus* peptides^[3]

修饰具有极高的可预测性^[3]。77%的 P1 位点为 Arg, 40%的 P2 位点为 Lys, 其它的为疏水性氨基酸, 如 Val、Leu 和 Ile, P4 位点 40%为 Leu. 因此, 芋螺毒素的 prepropeptide 的信号序列(pre 区)后的第一个 Cys 前如果存在---LXKR ↓ X, ---LXXR ↓ X, ---XXKR ↓ X 或 ---XXXR ↓ X 的序列, 这些序列的 Arg 后通常会被蛋白酶酶切, 形成成熟肽. 但值得注意的是, 如果上述的特征序

列出现在 Cys 之后, 则不会导致蛋白酶酶解, 这可能是由于二硫键形成后, 芋螺毒素紧凑的结构阻止了进一步的蛋白酶酶解反应. 之前有研究人员报道了参与这种翻译后修饰的蛋白酶——属于 CRISP 家族的 Tex31 蛋白酶^[4], 但随后本实验室的研究人员否认了该结论, 认为 Tex31 并不具有蛋白水解酶的活性^[13].

表 1 芋螺毒素的各种翻译后修饰
Table 1 Posttranslational modifications of conotoxins

Modification	Peptide	Sequence	Enzyme	References
Proteolytic processing	σ-TxVIA	DDSKNGLENHFWKARDEMKNREASKLDDK EACYAPGTFGGIKPGLCCSEFLPGVCFGG	Proprotein convertase	[4]
Disulfide bridge formation	Tx3a	CCSWDVCDDHPSCTCCG	Disulfide isomerase	[5]
Amidation of C-terminus	MI	GRCCHPACGKNYS*	Protein amidating Monooxygenase	[6]
Hydroxylation	GIIIA	RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA*	Proline hydroxylase	[7]
Carboxylation of glutamic acid	Conantokin-G	GEγγLQVNQγLIRγKSN*	γ-Glutamate carboxylase	[8]
Bromination of tryptophan	Bromocontryphan	GCOωEPWC*	Bromo peroxidase	[1]
Isomerization of tryptophan	Contryphan	GCOωEPWC*	Tryptophan epimerase	[9]
Cyclization of N-terminal Glu	SmIIIA	ZRCCNGRRGSSRWCRDHSRCC*	Glutaminy cyclase	[10]
Sulfation of tyrosine	EpI	GCCSDPRCNMNNPY‡C*	Tyrosyl sulfotransferase	[11]
O-glycosylation	SIVA	ZKSLVPS‡VITTCGGYDOGTMCOOCRCTNSC*	Polypeptide HexNAC transferase	[12]

注: *: C 末端酰胺化; γ: 羧基化谷氨酸; O: 羟基化脯氨酸; ω: 溴代色氨酸; W: D 型色氨酸; Y‡: 磺基化酪氨酸; S‡: 糖基化丝氨酸; 阴影部分为芋螺毒素成熟时被蛋白酶酶切掉的前体序列.

Notes: *: C-terminal amidation; γ: carboxylated glutamic acid; O: hydroxylated proline; ω: brominated tryptophan; W: D-tryptophan; Y‡: sulfated tyrosine; S‡: glycosylated serine; the shadowed sequences are pre and pro regions that would be removed by proteases during the maturation of conotoxins.

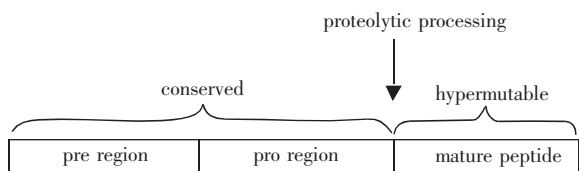


图 2 芋螺毒素前体序列组成示意图
Fig.2 Composition of conotoxin prepropeptides

除了成熟肽的蛋白酶剪切外, 另一种芋螺毒素中常见的翻译后修饰是 C 末端的酰胺化. 这种翻译后修饰是将成熟肽 C 末端的 Gly 剪切掉而成. C 末端的酰胺化具有很高的可预测性^[3]: 如果 C 末端是以---XG(X1)_n 结尾, 其中 X1 为 Lys 或 Arg, n 介于 0~4 之间, 则这条多肽的 C 末端极有可能会被酰胺化. C 末端酰胺化对芋螺毒素的结构有一定的影响. α 芋螺毒素中除了 GID 之外, C 末端都被酰胺化了, 而与 α 家族有着相似分子质量的 λ 和 χ 家族成员的 C 末端却大多数是游离的. 有意思的是, α 芋螺毒素的二硫键配对方式为 1-3、2-4, 而 λ 或 χ 家族为 1-4、2-3. 这

促使 Kang 等着手研究 C 末端酰胺化对芋螺毒素的折叠以及二硫键配对方式的影响^[14]. 他们的研究表明未被酰胺化的 C 末端带负电荷, 这有助于 1-4、2-3 这种配对方式的形成, 而酰胺化的 C 末端则会促进 1-3、2-4 配对方式的形成.

芋螺毒素中二硫键的形成是另一种常见且重要的翻译后修饰, 因为绝大多数芋螺毒素含有 1~5 对二硫键, 这些二硫键可以使芋螺毒素形成良好的刚性结构, 发挥高效的生理功能. 在富含二硫键的芋螺毒素中, 半胱氨酸的正确配对显得尤为重要, 因为只有正确配对的芋螺毒素才能有相应的生理功能, 而只有复杂而精确的酶系统才能保证二硫键的正确形成. Wang 等从大理石芋螺中克隆出了蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 的基因, 发现大理石芋螺中的 PDI 与其他物种的 PDI 具有很高的相似性^[5]. PDI 的基因在大肠杆菌中的表达产物具有氧化和异构酶的活性, 能有效地催化芋螺毒素的氧化折叠和二硫键导向.

2 谷氨酸的 γ 羧基化修饰

Glu 的 γ 羧基化修饰需要谷氨酸 γ 羧基化酶、氧气、二氧化碳和还原性的维生素 K, 反应时 Glu γ 碳上的质子被 CO_2 分子取代而形成 γ 羧基 Glu (Gla) [3,15,16](图 3). 这种维生素 K 依赖的 Glu 的 γ 羧基化修饰最早发现于凝血因子中 [17], 随后又在参与骨新陈代谢的蛋白以及基质蛋白中发现 [18,19]. 在芋螺毒素 conatokin-G 被发现之前, 人们一直认为 Glu 的 γ 羧基化修饰只存在于

哺乳动物系统中. 到目前为止, 芋螺是唯一发现含有 Gla 的非脊椎动物. conatokin-G [8] 是第一个在无脊椎动物中发现的含有 Gla 的多肽, 含有 5 个 Gla 残基且不含二硫键, 是 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA)的阻断剂. Conatokin 家族的很多成员如 conatokin T [20]、conatokin R [21]、conatokin L [22] 都含有 Gla. 除了 conatokin 家族外, 还有很多家族的芋螺毒素含有 Gla, 如 O 超家族的 bromosleeper peptide [23]、P 超家族的 spasmodic peptide [24]、T 超家族的 ϵ -Tx [25] 和 contryphan [26](表 2).

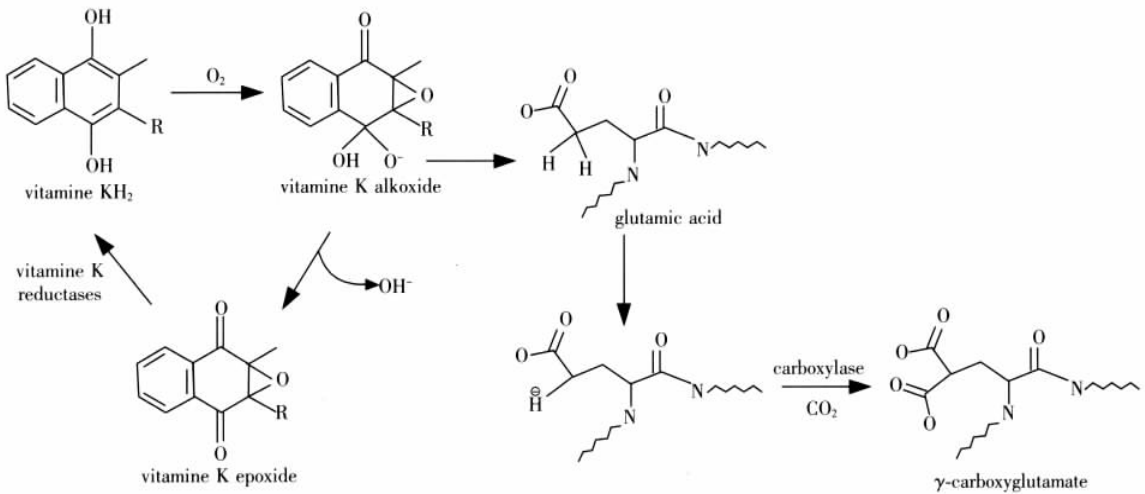


图 3 谷氨酸 γ 羧基化的修饰过程 [3]

Fig.3 Biosynthetic pathway for vitamin K-dependent synthesis of γ -carboxyglutamic acid [3]

表 2 含有 Gla 的各超家族芋螺毒素

Table 2 Conotoxins containing Gla from different superfamilies

Superfamily	Peptide	Sequence	References
Conatokin	Conatokin-R	GE $\gamma\gamma$ LQVNQ γ LIR γ KSN*	[21]
O	Bromosleeper peptide	ω ATID γ C $\gamma\gamma$ TCNVTFKTC CGOOGDWQCV γ ACPV	[23]
T	ϵ -Tx	γ CC γ RG ω CCT \S AAO	[25]
P	Spasmodic peptide	RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA*	[24]
A	GID	IRD γ CCSNPACRVNNOHVC	[33]
I	Gla-TxX	CIP γ GSSCSSGSCCHKSCCRWTCNQPC LIP*	[30]
Contryphan	Glacontryphan-M	N γ S γ CP \underline{W} HPWC	[26]

注: *: C 末端酰胺化; γ : 羧基化谷氨酸; O: 羟基化脯氨酸; ω : 溴代色氨酸; W: D 型色氨酸; \S : 糖基化苏氨酸.

Notes: *: C-terminal amidation; γ : carboxylated glutamic acid; O: hydroxylated proline; ω : brominated tryptophan; \underline{W} : D-tryptophan; \S : glycosylated threonine.

Glu 的 γ 羧基化修饰需要 γ 羧基化酶的作用. Stanley 等第一次在芋螺的微体组分 (microsomal fraction) 中检测到了 γ 羧基化酶的活性, 并且证明芋螺和哺乳动物中的 γ 羧基化酶具有很多相似性, 比如都需要还原性的维生素 K, 且都能被硫酸铵激活 [27]. 但凝血因子 IX 尽管

是牛 γ 羧基化酶的底物却不能被芋螺的 γ 羧基化酶羧基化, 说明这两种酶要求不同的 γ 羧基化识别位点或结构. Czerwiec 等利用 γ 羧基化酶的保守序列克隆出织锦芋螺中 γ 羧基化酶的 cDNA, 并且该基因在真核细胞中的表达产物具有 γ 羧基化酶活性 [28]. 实验证明, γ 羧基化酶具有

两个活性位点, 一个为底物结合位点, 另一个为调控位点。

γ 羧基化酶除了在芋螺中发现之外, 近年来通过 cDNA 克隆的方法从成年果蝇中也得到 γ 羧基化酶的 cDNA, 并且该基因在真核细胞中的表达产物具有明显的 γ 羧基化酶的活性^[29]。Bandyopadhyay 等通过对人、果蝇和芋螺的 γ 羧基化酶的基因结构和翻译后的蛋白序列进行比较, 发现它们具有很高的相似性。从进化角度上说, 这种翻译后修饰的存在要早于这些物种的进一步分化^[16]。

芋螺毒素中 Glu 的 γ 羧基化修饰需要有 γ 羧基化的识别序列(γ -CRS)。 γ -CRS 存在于芋螺毒素的 pro 区, 其中的一些疏水性氨基酸起到决定性作用^[15]。近年的研究表明, 芋螺毒素的 γ -CRS 并不都存在于 pro 区^[30], 例如两种芋螺毒素 Gla-TxX 和 Gla-TxXI 都含有 Gla, 但它们的 cDNA 前体序列并没有 pro 区, 而在 C 末端成熟肽之后有一段称为 postpeptide 的延伸, 在 Gla-TxX 和 Gla-TxXI 成熟时, postpeptide 会被剪切掉。当加入 Gla-TxXI 的 postpeptide 时, 芋螺毒素的 γ 羧基化酶对 FLEEL 和 conantokin-G 这两种底物的 K_m 值降低了 440 倍, 证明这两种毒素的 γ -CRS 存在于 postpeptide 中。

Glu 的 γ 羧基化修饰在芋螺毒素的很多家族中广泛存在, 有些多肽甚至含有 4~5 个 Glu, 并且 γ 羧基化酶在脊椎、软体和节肢动物中也普遍存在, 说明这种翻译后修饰有着重要的功能。实验证明 Glu 的 γ 羧基化修饰能使 conatokin G 发生构象的改变^[31]。当 Glu 与 Ca^{2+} 离子结合时, conatokin G 从无规则的曲线转变成线性的 α 螺旋, 从而暴露螺旋反面的疏水性氨基酸, 形成有生理活性的结构。此外, 有实验证明 Glu 在 Ca^{2+} 离子存在的情况下能促进芋螺毒素的氧化折叠, 但并不能增加已折叠肽的生理活性^[31]。除了能改善多肽的结构之外, Glu 对多肽的功能也有很大影响。电生理实验表明 glacontryphan-M 能有效抑制 L 型的钙离子通道, 而当 glacontryphan-M 中的 Glu 被替换成 Glu 时, 该芋螺毒素就散失了对钙离子通道的阻断活性。glacontryphan-M 的生理活性依赖于 Ca^{2+} 离子, 可能是因为只有当 Glu 能结合 Ca^{2+} 后, glacontryphan-M 才能形成良好的构象, 进而与钙离子通道发生相互作用^[26]。

3 L 型氨基酸到 D 型氨基酸的差向异构化

差向异构化是指肽链上的某个氨基酸从 L 构型转变成 D 构型。这是一种最微妙最难检测的翻译后修饰, 现有的蛋白质组学的方法如 Edman 测序或质谱很难检测。越来越多的实验证明差向异构在生物界里广泛存在, 比如在脊椎、节肢以及软体动物中都被发现。

这种翻译后修饰最早在蛙皮里的 dermorphin 中发现^[34], 随后又在多种毒素或多肽里发现, 如蜘蛛毒素 ω -agatoxin^[35]、澳大利亚鸭嘴兽的 C 型促尿钠排泄的多肽^[36]、非洲巨型蜗牛中的 fulicin^[37] 以及芋螺毒素。Contryphan-R^[9] 是首次被发现含有 D 型氨基酸的芋螺毒素。迄今为止, 已发现了一系列的 contryphan 含有 D 型氨基酸。除此之外, I 超家族^[38]、conophan^[39]、conomap^[40] 以及 conomaphin^[41] 家族的一些成员也被发现含有 D 型氨基酸。

差向异构化在短肽中的出现遵循着位置原则 (position rule), 即异构化只发生在 3 个位置: N 端的第 2 位(+2)、C 端的倒数第 3(-3) 和第 5 位(-5)(r11c 除外^[38], 表 3)。值得注意的是, +2、-3、和 -5 位这 3 个位置的异构化在芋螺毒素中均有发现, 如 conomap^[40] 的 +2 位, conomarphin^[41] 和 r11a^[38] 的 -3 位以及 contryphan^[9] 的 -5 位, 而在其他物种中, 异构化修饰绝大部分都发生在 +2 位。这也许因为芋螺已经进化出了一套复杂的系统才能在这 3 个位置都进行异构化修饰。然而目前还不清楚不同位置的异构化修饰是否由同一个酶系统完成。值得一提的是 D 型异构化在芋螺中进行得比较彻底, 即一条肽只存在一种构型, 而在澳大利亚的鸭嘴兽的防御肽以及促尿钠分泌肽中却存在 L 型和 D 型两种异构体^[36]。目前在芋螺中还没有关于差向异构酶的报道, 但在鸭嘴兽和蜘蛛中已经检测并验证了这种酶的存在^[42,43]。

目前已有一些研究阐明芋螺毒素中差向异构化修饰的生物学功能。本实验室的 Han 等通过实验证明芋螺毒素 conomarphin 中 -3 位的 D 型 Phe 对该多肽结构的形成发挥着重要的作用^[41]。天然的 conomarphin 在溶液里有很好的空间构象: 第 8 位 Pro 周围有一紧凑的 loop 结构, C 末端有一个 3^{10} 螺旋, 而当 -3 位的 D 型 Phe 被替换成 L 型 Phe 时, loop 结构就会消失, 肽链也会变直。Dutertre 等从 *conus vitulinus* 的毒液中发

现了一条含有 D 型氨基酸的多肽 conomap-Vt^[40]. conomap-Vt 是高效的兴奋剂,然而当将第 2 位的 D 型 Phe 替换成 L 型 Phe 时,其活力与天然的相比明显下降,说明 D 型氨基酸能提高该多肽的生物活性. 又如 r11b, r11c 的-3 位分别是 D 型 Phe 和 D 型 Leu. 天然的 r11b 和 r11c 仅需 20

pmol 就能引起小鼠兴奋症状(竖尾、快速行走、转圈、触觉敏感),而对于它们的 L 型异构体来说,则需要 100 pmol. 另外,天然的 r11a 和 r11b 能够在神经细胞中引发重复性动作电位,而它们的 L 型异构体却没有此活性^[38].

表 3 含有 D 型氨基酸的芋螺毒素序列以及位置规则
Table 3 Conotoxins containing D type amino acids and the position rule

Superfamily	Peptide	Sequence	Epimerization site	References
Contryphan	Contryphan-Sm	GCOW <u>Q</u> PWC*	-5	[45]
	Contryphan-P	GCOW <u>D</u> PWC*	-5	[45]
	Contryphan-R	GCOW <u>E</u> PWC*	-5	[9]
	Contryphan-Vn	GDCP <u>W</u> KPWC*	-5	[46]
	Bromocontryphan	GCOW <u>E</u> ωC*	-5	[1]
	Contryphan-Tx	GCOW <u>Q</u> PYC*	-5	[47]
	Leu-Contryphan-P	GCV <u>L</u> LPWC	-5	[48]
	Leu-Contryphan-Tx	CV <u>L</u> YPWC	-5	[47]
	Glacontryphan-M	NγSγCP <u>W</u> HPWC	-5	[26]
I ₁	r11a	GOSFCKADEKOC _{EY} HADCCN <u>C</u> LSGICAOSTNWILPGCSTSS <u>F</u> FKI	-3	[38]
	r11b	GOSFCKANGKOC _{SY} HADCCN <u>C</u> LSGICKOSTNVILPGCSTSS <u>F</u> FRI	-3	[38]
	r11c	GOSFCKADEKOC _{KY} HADCCN <u>C</u> LGICKOSTSWGCTNV <u>L</u> FT	-2	[38]
Conophan	gld-V*	AOANS <u>γ</u> WS	-3	[39]
	gld-V	AOANS <u>γ</u> WS	-3	[39]
	mus-V*	SOANS <u>γ</u> WS	-3	[39]
	mus-V	SOANS <u>γ</u> WS	-3	[39]
Conomap	Conomap-Vt	AFVKGSAQRVAHG <u>Y</u>	+2	[40]
Conomarphin	Conomarphin	DWEYHAHPKONS <u>F</u> WT	-3	[41]

注: *: C 末端酰胺化; γ: 羧基化谷氨酸; O: 羟基化脯氨酸; ω: 溴代色氨酸; γ: D 型羟基化缬氨酸; 标有下划线的氨基酸表示 D 型氨基酸.

Notes: *: C-terminal amidation; γ: carboxylated glutamic acid; O: hydroxylated proline; ω: brominated tryptophan; γ: D-hydroxylated valine; the underlined amino acids are D type amino acids.

由于异构化修饰很难检测, Buczek 等希望能单从基因序列上预测这种修饰^[44]. 他们根据已知的含有 D 型氨基酸的 I 超家族 3 条芋螺毒素 r11a、r11b 和 r11c, 利用该家族保守的基因序列, 克隆出了该基因超家族的上百条 cDNA 序列, 并通过假设和实验验证总结出了 I 超家族芋螺毒素中 D 型氨基酸存在的规律: 首先, 该氨基酸应该位于前体序列 (prepropeptide) 的-3 位; 其次, 该氨基酸附近的氨基酸能为其提供合适的环境. 虽然上述的规律在 I 超家族芋螺毒素中得到了较好的验证, 但在其它家族的芋螺毒素中并不适用, 因此单从基因序列上预测芋螺毒素中的差向异构化修饰仍是一个难题.

4 羟基化

羟基化修饰在芋螺毒素中极为常见, 绝大多数发生在 Pro 的 γ 位上. 羟基化 Pro(Hyp) 最早在 μ-conotoxin GIIIA 中发现^[49], 随后又在大多数家族中被发现. M 超家族的芋螺毒素有多个 Hyp 残基, 在 α 芋螺毒素的第一个环中高度保守的 Pro 一般都不会被羟基化.

非脯氨酸的 γ 羟基化非常少见, 因为氨基酸 (Pro 除外) γ 位的羟基容易对邻近的肽键进行亲核攻击而形成稳定的五元环内酯, 而 Pro 独特的环结构能阻止内酯化. 但近年在芋螺毒素中也发现非脯氨酸的 γ 羟基化修饰. Pisarewicz 等在芋螺毒素 gld-V* 和 mus-V* 中发现羟基化的 D 型

Val(Hyv),这是第一次在芋螺毒素中发现 Hyv^[39]. Hyv 之所以能在芋螺毒素中稳定存在也许是由于 Val 中 α 碳的 D 型构象能与邻近的 L 型氨基酸发生特异的相互作用. Aguilar 等第一次从芋螺毒素 de13a 中发现羟基化 Lys^[50]. 这种翻译后修饰在胶原蛋白中也有些报道,它们是多糖的结合靶点,同时也能增强分子间的胶连作用. de13a 的第 18 位和第 25 位的 Lys 都被羟基化修饰,推测 Hy1 可以与靶分子间形成额外的氢键.

Pro 的羟基化修饰在植物和动物来源的蛋白质中均有发现,但对这种翻译后修饰的研究主要集中在胶原蛋白,而其在芋螺毒素中的功能则研究甚少,到目前为止,只有一篇文献报道了此方面的研究. Lopez-Vera 等通过对 μ 、 ω 和 α 家族芋螺毒素的研究发现 Pro 的羟基化能影响芋螺毒素的体外氧化折叠和它们的生理活性^[51]. 例如, μ -GIIIA 的 Pro 羟基化修饰能增加该毒素对钠离子通道 $\text{Na}_v1.4$ 的阻断活性但并不影响该毒素的折叠,而 ω -MVIIIC 中的 Pro 羟基化修饰对其氧化折叠有很大的影响却不影响其生理功能. 对于 α 家族的毒素 ImI 和 GI 来说,Pro 羟基化修饰能促进它们的氧化折叠但却会削弱它们的生理活性.

5 糖基化修饰

目前在芋螺毒素中发现的糖基化修饰均发生在 Ser 或 Thr 残基上,都为 O 型连接. 最早发现含有糖基化修饰的芋螺毒素是 κ A-S A^[12]. κ A-S A 由 30 个氨基酸残基组成,具有在血型糖蛋白存在的 O 连接糖基化的特征序列(general motif),其第 2 位 Ser 残基上有一个 O 连接的五糖. Contulakin-G 是第 2 个被证明含有糖基化修饰的芋螺毒素^[52],却是第一个多肽和糖基的结构都弄清楚的 O 糖基化芋螺毒素,它的 Ser 上结合了一个二糖 β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow).

糖基化修饰的确切功能目前尚不清楚,但一些初步实验证明这种翻译后修饰能增强多肽的生理功能. κ A-S A 能在蛙的神经和肌肉组织中引起重复性突触电位,是钾离子通道的阻断剂(但随后又有实验证明它是钠离子通道而不是钾离子通道阻断剂^[52]). 当注射到小鼠体内时,不含糖链的 κ A-S A 较之天然含糖链的 κ A-S A 活性要低^[12]. 另外,作为 1 型神经紧张素(neurotensin receptor type 1, hNTR1) 的高效拮抗剂,带有糖基的合成肽 Contulakin-G 的活力较之不含

糖基的合成肽 Contulakin-G 要强 10 倍^[52]. 这些例子说明 O 连接的糖基化修饰能有效地增强毒素对神经转导受体的抑制活性.

除了能提高多肽的活性外,糖基化修饰还能辅助多肽形成良好的结构. 例如 ε -TxIX 的第 10 位 Ser 被糖基化修饰,NMR 的结构分析表明^[25], ε -TxIX 中第 1 和第 4 位的两个 Gla,第 10 位的糖基化 Ser,第 13 位的羟基化 Pro 能在多肽分子的表面形成一个空洞(cavity),这个带负电荷的空洞可以更好地与受体形成静电相互作用. 由于二糖复合体本身具有很大的柔性,它可以填补空洞并排除受体介导的相互作用,从而使得 ε -TxIX 能与受体发生微弱而又可逆的相互作用.

虽然目前还没有从芋螺中找到糖基化酶,但 Craig 等利用哺乳动物中的糖基化酶 ppGalNAc-transferase 间接地研究芋螺中糖基化修饰酶的性质^[53]. 他们的研究发现,不含糖基的 contulakin-G ([Thr¹⁰] contulakin-G) 以及前体 contulakin-G(pre-contulakin-G₃₀₋₆₆) 都是 ppGalNAc-transferase 的底物,并且这种酶能特异地糖基化修饰第 10 位 Thr 而不是第 2 位或第 7 位的 Ser. 对于 pre-contulakin-G₃₀₋₆₆ 而言,ppGalNAc-transferase 可以识别成熟肽中的 Thr,而不是位于 pro 区的 Thr. 这些结果表明芋螺中用于糖基化 contulakin-G 的酶与哺乳动物中的糖基化酶具有相似的底物特异性.

6 溴代修饰

芋螺毒素中的溴代 Trp 最早在 bromocontryphan^[1]、heptapeptide 和 bromosleeper peptide^[23] 中发现,当时在 Edman 蛋白质序列分析时发现这些肽的某些氨基酸不能形成标准的 PTH-氨基酸衍生物,而该氨基酸残基的分子质量为 265 Da,此外这些肽在 280 nm 有很强的光吸收值,并且分子质量呈罕见的同位素分布(isotopomer distribution). 随后通过蛋白酶解,合成肽共洗脱才最终证明 Trp 是被溴代修饰的. 在 bromocontryphan 等被发现之前,人们一直以为多肽中的 6Br-Trp 是来自于海洋的自然环境中,而不是一种翻译后修饰,但 bromotryphan 的 cDNA 序列发现并被证明 6Br-Trp 是由标准的 Trp 密码子 UGG 编码的,才确定 6Br-Trp 是一种翻译后修饰.

芋螺毒素中广泛存在的溴代修饰意味着芋

螺中存在溴过氧化酶(bromoperoxidase)和乳过氧化酶(lactoperoxidase)。虽然到目前为止芋螺中溴代修饰的酶系统还不为人知,但关于这种翻译后修饰的生物学特性有一些研究和推测。在 bromocontryphan 中,其第 7 位而不是第 4 位 Trp 被溴代修饰,并且没有溴代修饰的 contryphan 和被溴代修饰 bromocontryphan 在芋螺体内同时存在^[1],于是有些学者认为多肽中存在识别信号序列以便溴代修饰酶进行特异识别和修饰,且生物体内存在一种控制这种翻译后修饰的调控机制。Jimenez 等通过 bromocontryphan 以及另一含有 6Br-Trp 的 cDNA 序列发现,虽然它们的成熟肽没有同源性,但 pro 区一段含 5 个氨基酸的相似序列——NVI(L)RR,可能是识别信号序列^[1]。但随后发现的含 6Br-Trp 的芋螺毒素的 pro 区并无这段可能的识别信号序列。因此关于溴代修饰的识别信号序列等特性还有待进一步的研究。

对于芋螺毒素溴代修饰的生物学功能只有一些初步的研究结果。 σ -conotoxin GVIIIA,是 5-羟色胺 3 型受体(5-HT₃)的拮抗剂,但其没有溴代修饰的类似物却无此活性^[54]。芋螺毒素利用这种溴代的翻译后修饰来增强肽的活性。此外,有研究表明溴代修饰能增强多肽的亲脂性和血脑屏障穿透力^[55]。

7 磺基化修饰

磺基化 Tyr 最早在 α -EpI^[11]中发现。实际上一些具有生理活性的磺基化多肽在其他的生物系统中也有报道,如 caerulein^[56]、gastrin^[57]和 cholecystokinin^[58],它们 Tyr 的羟基被酪氨酸转移酶(tyrosylsulfotransferase)修饰成磺基化 Tyr。在 α -conotoxin EpI 被发现之前, α -PnIB 被怀疑含有磺基化修饰的残基,因为它的实际分子量比理论分子量大 80 Da^[59],随后的实验证明 α -PnIB 以及 α -PnIA 的 Tyr 也都是被磺基化修饰的^[60]。

到目前为止,只发现 6 个含有磺基化修饰的芋螺毒素^[11,60,61],且都是来自于 α 家族。在所有报道的磺基化修饰的序列中 C 末端有一段非常保守的序列 NPDY(S)C-NH₂,这可能意味着 tyrosyl sulfotransferase 能识别特异的序列位点进行磺基化修饰。

磺基化修饰在芋螺毒素中的确切功能仍不清楚,但初步的研究表明这种翻译后修饰对芋螺毒素的功能起到一定的作用。例如,较之天然

的 AnIB,没有磺基化修饰的 AnIB 对 $\alpha 3\beta 2$ 和 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)的活力分别下降 2 倍和 10 倍。天然的 α -PnIB 较之没有磺基化修饰的 α -PnIB,其对 $\alpha 7$ nAChR 的活力要高 4 倍^[61]。

8 谷氨酸的环化

Glu 的环化是指多肽 N 端 Glu 的 γ 位羧基与自身游离的氨基形成酰胺键而构成一个五元环,形成焦谷氨酸。这种翻译后修饰最早是在 bromoheptapeptide 中被发现^[23],当时该多肽在化学测序时没有信号,于是推测 N 端有个焦谷氨酸,用焦谷氨酸氨肽酶酶解后不仅在色谱上的保留时间有所变化,而且用 Edman 测序也恢复正常。目前在芋螺毒素中,Glu 环化的功能以及参与修饰的酶系统都没有任何研究。但在其它物种中不但纯化到了谷氨酸环化酶,还发现 N 端的焦谷氨酸能稳定蛋白质的结构,防止被蛋白酶水解^[62]。

9 总结和展望

芋螺毒素的一个显著特征是其复杂的翻译后修饰。到目前为止已经发现有 10 种翻译后修饰,涉及 15 种不同的修饰酶系统。这些翻译后修饰对芋螺毒素的结构和功能都有着一定的影响,研究者们开始模仿芋螺毒素中的翻译后修饰来研制更有效的药物。例如,为了提高神经活性药物穿透血脑屏障的效果,Witt 等通过研究发现溴代和糖基化等翻译后修饰能有效增强药物的穿透力^[55]。芋螺毒素中复杂多样的翻译后修饰不仅为研究分泌性蛋白翻译后修饰提供了一个很好模型,也为开发高效而特异的神经药物打下了很好的基础,因此具有重大的研究意义。

参考文献(References):

- [1] JIMENEZ E C, CRAIG A G, WATKINS M, *et al.* Bromocontryphan: post-translational bromination of tryptophan [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(5): 989-994.
- [2] WALKER C S, STEEL D, JACOBSEN R B, *et al.* The T-superfamily of conotoxins [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(43): 30664-30671.
- [3] BUCZEK O, BULAJ G, OLIVERA B M. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(24): 3067-3079.
- [4] MILNE T J, ABBENANTE G, TYNDALL J D, *et al.* Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 31105-31110.

- [5] WANG Z Q, HAN Y H, SHAO X X, *et al.* Molecular cloning, expression and characterization of protein disulfide isomerase from *Conus marmoreus*[J]. *Febs J*, 2007, 274(18) : 4778-4787.
- [6] MCINTOSH M, CRUZ L J, HUNKAPILLER M W, *et al.* Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1982, 218(1) : 329-334.
- [7] CRUZ L J, GRAY W R, OLIVERA B M, *et al.* *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels[J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(16) : 9280-9288.
- [8] MCINTOSH J M, OLIVERA B M, CRUZ L J, *et al.* Gamma-carboxyglutamate in a neuroactive toxin[J]. *J Biol Chem*, 1984, 259(23) : 14343-14346.
- [9] JIMENEZ E C, OLIVERA B M, GRAY W R, *et al.* Contryphan is a D-tryptophan-containing *Conus* peptide[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(45) : 28002-28005.
- [10] WEST P J, BULAJ G, GARRETT J E, *et al.* Mu-conotoxin SmIIIa, a potent inhibitor of tetrodotoxin-resistant sodium channels in amphibian sympathetic and sensory neurons[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(51) : 15388-15393.
- [11] LOUGHNAN M, BOND T, ATKINS A, *et al.* Alpha-conotoxin EpI, a novel sulfated peptide from *Conus episcopatus* that selectively targets neuronal nicotinic acetylcholine receptors[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(25) : 15667-15674.
- [12] CRAIG A G, ZAFARALLA G, CRUZ L J, *et al.* An O-glycosylated neuroexcitatory conus peptide[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(46) : 16019-16025.
- [13] QIAN J, GUO Z Y, CHI C W. Cloning and isolation of a *Conus* cysteine-rich protein homologous to Tex31 but without proteolytic activity[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(2) : 174-181.
- [14] KANG T S, VIVEKANANDAN S, JOIS S D, *et al.* Effect of C-terminal amidation on folding and disulfide-pairing of alpha-conotoxin Iml[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(39) : 6333-6337.
- [15] BUSH K A, STENFLO J, ROTH D A, *et al.* Hydrophobic amino acids define the carboxylation recognition site in the precursor of the gamma-carboxyglutamic-acid-containing conotoxin epsilon-TxIX from the marine cone snail *Conus textile*[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(44) : 14660-14666.
- [16] BANDYOPADHYAY P K, GARRETT J E, SHETTY R P, *et al.* Gamma-Glutamyl carboxylation: An extracellular posttranslational modification that antedates the divergence of molluscs, arthropods, and chordates[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(3) : 1264-1269.
- [17] FURIE B, FURIE B C. The molecular basis of blood coagulation[J]. *Cell*, 1988, 53(4) : 505-518.
- [18] PRICE P A, OTSUKA A A, POSER J W, *et al.* Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73(5) : 1447-1451.
- [19] PRICE P A, FRASER J D, METZ-VIRCA G. Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(23) : 8335-8339.
- [20] HAACK J A, RIVIER J, PARKS T N, *et al.* Conantokin-T. A gamma-carboxyglutamate containing peptide with N-methyl-aspartate antagonist activity [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(11) : 6025-6029.
- [21] WHITE H S, MCCABE R T, ARMSTRONG H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* characterization of conantokin-R, a selective NMDA receptor antagonist isolated from the venom of the fish-hunting snail *Conus radiatus*[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292(1) : 425-432.
- [22] JIMENEZ E C, DONEVAN S, WALKER C, *et al.* Conantokin-L, a new NMDA receptor antagonist: determinants for anticonvulsant potency[J]. *Epilepsy Res*, 2002, 51(1-2) : 73-80.
- [23] CRAIG A G, JIMENEZ E C, DYKERT J, *et al.* A novel post-translational modification involving bromination of tryptophan. Identification of the residue, L-6-bromotryptophan, in peptides from *Conus imperialis* and *Conus radiatus* venom[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(8) : 4689-4698.
- [24] LIRAZAN M B, HOOPER D, CORPUZ G P, *et al.* The spasmodic peptide defines a new conotoxin superfamily[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(7) : 1583-1588.
- [25] RIGBY A C, LUCAS-MEUNIER E, KALUME D E, *et al.* A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(10) : 5758-5763.
- [26] HANSSON K, MA X, ELIASSON L, *et al.* The first gamma-carboxyglutamic acid-containing contryphan. A selective L-type calcium ion channel blocker isolated from the venom of *Conus marmoreus*[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(31) : 32453-32463.
- [27] STANLEY T B, STAFFORD D W, OLIVERA B M, *et al.* Identification of a vitamin K-dependent carboxylase in the venom duct of a *Conus* snail[J]. *FEBS Lett*, 1997, 407(1) : 85-88.
- [28] CZERWIEC E, BEGLEY G S, BRONSTEIN M, *et al.* Expression and characterization of recombinant vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase from an invertebrate, *Conus textile*[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(24) : 6162-6172.
- [29] WALKER C S, SHETTY R P, CLARK K, *et al.* On a potential global role for vitamin K-dependent gamma-carboxylation in animal systems. Evidence for a gamma-glutamyl carboxylase in *Drosophila*[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11) : 7769-7774.
- [30] BROWN M A, BEGLEY G S, CZERWIEC E, *et al.* Precursors of novel Gla-containing conotoxins contain a carboxy-terminal recognition site that directs gamma-carboxylation[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(25) : 9150-9159.
- [31] RIGBY A C, BALEJA J D, LI L, *et al.* Role of gamma-carboxyglutamic acid in the calcium-induced structural transition of conantokin G, a conotoxin from the marine snail *Conus geographus*[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(50) : 15677-15684.
- [32] BULAJ G, BUCZEK O, GOODSSELL I, *et al.* Efficient oxidative folding of conotoxins and the radiation of venomous cone snails[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(Suppl 2) : 14562-14568.
- [33] NICKE A, LOUGHNAN M L, MILLARD E L, *et al.* Isolation, structure, and activity of GID, a novel alpha 4/7-conotoxin with an extended N-terminal sequence[J]. *J Biol*

- Chem, 2003, 278(5): 3137-3144.
- [34] MONTECUCCHI P C, HENSCHEN A. Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of *Phyllomedusa sawagei*[J]. Int J Pept Protein Res, 1981, 18(2): 113-120.
- [35] KUWADA M, TERAMOTO T, KUMAGAYE K Y, et al. Omega-agatoxin-TK containing D-serine at position 46, but not synthetic omega-[L-Ser46]agatoxin-TK, exerts blockade of P-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons[J]. Mol Pharmacol, 1994, 46(4): 587-593.
- [36] TORRES A M, MENZ I, ALEWOOD P F, et al. D-Amino acid residue in the C-type natriuretic peptide from the venom of the mammal, *Ornithorhynchus anatinus*, the Australian platypus[J]. FEBS Lett, 2002, 524(1-3): 172-176.
- [37] OHTA N, KUBOTA I, TAKAO T, et al. Fulicin, a novel neuropeptide containing a D-amino acid residue isolated from the ganglia of *Achatina fulica*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 178(2): 486-493.
- [38] BUCZEK O, YOSHIKAMI D, WATKINS M, et al. Characterization of D-amino-acid-containing excitatory conotoxins and redefinition of the I-conotoxin superfamily[J]. Febs J, 2005, 272(16): 4178-4188.
- [39] PISAREWICZ K, MORA D, PFLUEGER F C, et al. Polypeptide chains containing D-gamma-hydroxyvaline[J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(17): 6207-6215.
- [40] DUTERTRE S, LUMSDEN N G, ALEWOOD P F, et al. Isolation and characterisation of conomap-Vt, a D-amino acid containing excitatory peptide from the venom of a vermivorous cone snail[J]. FEBS Lett, 2006, 580(16): 3860-3866.
- [41] HAN Y, HUANG F, JIANG H, et al. Purification and structural characterization of a D-amino acid-containing conopeptide, conomarphin, from *Conus marmoreus*[J]. Febs J, 2008, 275(9): 1976-1987.
- [42] BANSAL P S, TORRES A M, CROSSETT B, et al. Substrate specificity of platypus venom L-to-D-peptide isomerase[J]. J Biol Chem, 2008, 283(14): 8969-8975.
- [43] SHIKATA Y, WATANABE T, TERAMOTO T, et al. Isolation and characterization of a peptide isomerase from funnel web spider venom[J]. J Biol Chem, 1995, 270(28): 16719-16723.
- [44] BUZEK O, JIMENEZ E C, YOSHIKAMI D, et al. I₁-superfamily conotoxins and prediction of single D-amino acid occurrence[J]. Toxicon, 2008, 51(2): 218-229.
- [45] JACOBSEN R, JIMENEZ E C, GRILLEY M, et al. The contryphans, a D-tryptophan-containing family of *Conus* peptides: interconversion between conformers[J]. J Pept Res, 1998, 51(3): 173-179.
- [46] MASSILIA G R, SCHININA M E, ASCENZI P, et al. Contryphan-Vn: a novel peptide from the venom of the Mediterranean snail *Conus ventricosus*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(4): 908-913.
- [47] JIMENEZ E C, WATKINS M, JUSZCZAK L J, et al. Contryphans from *Conus textile* venom ducts[J]. Toxicon, 2001, 39(6): 803-808.
- [48] JACOBSEN R B, JIMENEZ E C, DE la Cruz R G, et al. A novel D-leucine-containing *Conus* peptide: diverse conformational dynamics in the contryphan family[J]. J Pept Res, 1999, 54(2): 93-99.
- [49] STONE B L, GRAY W R. Occurrence of hydroxyproline in a toxin from the marine snail *Conus geographus*[J]. Arch Biochem Biophys, 1982, 216(2): 765-767.
- [50] AGUILAR M B, LOPEZ-VERA E, ORTIZ E, et al. A novel conotoxin from *Conus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues[J]. Biochemistry, 2005, 44(33): 11130-11136.
- [51] LOPEZ-VERA E, WALEWSKA A, SKALICKY J J, et al. Role of hydroxyprolines in the *in vitro* oxidative folding and biological activity of conotoxins[J]. Biochemistry, 2008, 47(6): 1741-1751.
- [52] CRAIG A G, NORBERG T, GRIFFIN D, et al. Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin[J]. J Biol Chem, 1999, 274(20): 13752-13759.
- [53] CRAIG A G, PARK M, FISCHER W H, et al. Enzymatic glycosylation of contulakin-G, a glycopeptide isolated from *Conus* venom, with a mammalian ppGalNAc-transferase[J]. Toxicon, 2001, 39(6): 809-815.
- [54] ENGLAND L J, IMPERIAL J, JACOBSEN R, et al. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails[J]. Science, 1998, 281(5376): 575-578.
- [55] WITT K A, GILLESPIE T J, HUBER J D, et al. Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability[J]. Peptides, 2001, 22(12): 2329-2343.
- [56] MIGNOGNA G, SEVERINI C, ERSAMER G F, et al. Tachykinins and other biologically active peptides from the skin of the Costa Rican phyllomedusid frog *Agalychnis callidryas*[J]. Peptides, 1997, 18(3): 367-372.
- [57] HUEBNER V D, JIANG R L, LEE T D, et al. Purification and structural characterization of progastrin-derived peptides from a human gastrinoma[J]. J Biol Chem, 1991, 266(19): 12223-12227.
- [58] FEKETE M, BALAZS M, PENKE B, et al. Influence of sulfated and unsulfated cholecystokinin octapeptide on conditioned feeding behaviour in rats[J]. Peptides, 1981, 2(4): 385-388.
- [59] FAINZILBER M, HASSON A, OREN R, et al. New mollusc-specific alpha-conotoxins block *Aplysia* neuronal acetylcholine receptors[J]. Biochemistry, 1994, 33(32): 9523-9529.
- [60] WOLFENDER J L, CHU F, BALL H, et al. Identification of tyrosine sulfation in *Conus pennaceus* conotoxins alpha-PnIA and alpha-PnIB: further investigation of labile sulfo- and phosphopeptides by electrospray, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 1999, 34(4): 447-454.
- [61] LOUGHNAN M L, NICKE A, JONES A, et al. Chemical and functional identification and characterization of novel sulfated alpha-conotoxins from the cone snail *Conus anemone*[J]. J Med Chem, 2004, 47(5): 1234-1241.
- [62] SCHILLING S, WASTERNAK C, DEMUTH H U. Glutaminyl cyclases from animals and plants: a case of functionally convergent protein evolution[J]. Biol Chem, 2008, 389(8): 983-991.