

14S-16S

2 852-858

2 Kossiakoff AA et al. Biochem Soc Trans, 1993; 21: 614-618

4 Fuh G et al. Science, 1992; 256 1677-1680

3 de Vos AM et al. Curr Opin Struct Biol, 1992;

(收稿日期: 1995-11-28)

G蛋白偶联受体及其配体的结构与功能分析

中国医学科学院放射医学研究所(天津, 300192) 袁洪卫编译 林 汉审校

摘要: G蛋白偶联的受体是介导跨膜信号转导的一组多样性蛋白质,它们具有显著的同源性及由七个跨膜螺旋组成的相同的膜结构。异源基因表达和位点诱变相结合的方法是将来对 G蛋白偶联受体进行结构-功能分析的起点。通过对结合配体的主要结构进行研究,已建立了受体蛋白异源表达的模型,并结合位点诱变实验认证了配体结合中有功能作用的氨基酸序列。这些研究以及试图得到受体晶体结构的努力,为设计更适用于放射性核素显像和治疗的配体提供了可能性。

关键词: G蛋白偶联受体 放射性核素显像 位点诱变 下调作用

细胞表面受体是联结外部刺激与细胞内生化变化的完整膜蛋白。根据其基本结构和作用机制,这些蛋白质可分为三大类:①结合生长因子的受体;②配体门控离子通道,例如尼克酸、 γ -氨基丁酸(GABA)和甘氨酸的受体;③与鸟苷酸结合调节蛋白相连接的受体。

上述第③类 G蛋白偶联受体是一组多样性蛋白质,它包括受肽类激素、神经递质或

环境刺激激活的不同受体亚类

1 G蛋白偶联受体的结构特性

虽然 G蛋白偶联受体的生理激活剂不同,但它们具有两种相同特性:

1. 每种蛋白质包括七个高度疏水性螺旋,构成跨膜区段。可以认为,这一类型的所有受体具有相似的膜结构(见图 1)。

图 1 G蛋白偶联受体七螺旋跨膜结构示意图(以 β -肾上腺素受体为例)

2. 在每个系统中,受体刺激引起质膜的胞液面上 G蛋白三聚体的激活。因此,与 G蛋白的反应是信号级联反应的共同的第一步。激动剂结合 G蛋白偶联受体引起受体与不同种类 G蛋白杂三聚体偶联,催化 G蛋白 α -亚基上结合鸟苷二磷酸(GDP)变为鸟苷三磷酸(GTP) GTP与 α -亚基结合引起 α -亚基从 $\beta\gamma$ 亚基复合物上解离。根据受体及其结合 G蛋白的不同, G-GTP亚基激活或抑制一个或更多细胞内效应酶,导致细胞内代谢变化的多样性。乙酰胆碱结合到毒蕈碱乙酰

胆碱受体亚类 M_1 和 M_2 上,去甲肾上腺素和肾上腺素结合到 α -和 β -肾上腺素能受体亚类上。受体激活的效应酶包括①腺苷酸环化酶(AC),它将腺苷三磷酸(ATP)转化成环腺苷酸(cAMP)并激活蛋白激酶 A(PKA);②磷脂酶 C(PLC),它水解磷脂酰肌醇产生肌醇三磷酸酯(IP₃)和甘油二酯(DG)(IP₃增加细胞内钙水平,DG激活蛋白激酶 C活性);③磷脂酶 A₂,它水解膜上酯类产生花生四烯酸;④其它蛋白质,如离子通道,可调节跨膜离子流(图 2)

图 2 G蛋白偶联受体的信号转导机制示意图

药理学分析提示,许多受体实际上是一组紧密相关的异构体。一种特异配体,例如乙酰胆碱,能引发不同组织中的不同的生化反应,而且受体对激动剂或拮抗剂的敏感性因实验材料而异。通过编码 G蛋白偶联受体的 200多种基因的克隆也证实了这种推测。对相应蛋白序列的比较提示,大多数受体可能是包括多达 6种异构体的多基因家族的一部分,除此之外,低严谨性筛选和新的分子克隆技术的应用导致了药理学研究未料到的新受体亚类的发现。

以上的发现使放射性显像和诊断药物发展中最具挑战性的问题更加突出,即如何设计和检验对特定受体异构体特异的药物。要适当地阐明这个问题,必须搞清:特定受体引

发哪种第二信使级联反应?不同的激动剂如何影响这个应答?从体内受体的不均一性可同样明显地看出,要搞清这些问题需要开发能确定每种受体亚类特性的新实验系统

2 异源表达

受体蛋白的异源表达有两大优点:①可以单独分析一种受体亚类;②研究药物与人受体的相互作用时,筛选药物不再需要动物组织。Fraser的研究虽然着重于毒蕈碱乙酰胆碱受体,对其受体-配体相互作用的观察结果却与多种 G蛋白偶联受体有相关性。这说明在这超基因家族中存在一些结构和功能的共同性。

已有 5种不同的毒蕈碱乙酰胆碱受体基

因被克隆 测序,编号为 M_1 到 M_5 ,其中 M_1 、 M_3 和 M_5 亚类优先刺激由激动剂结合引起的磷脂酰肌醇水解,而 M_2 和 M_4 则优先抑制腺苷酸环化酶。然而,每种受体均能在适当条件下激活细胞内不止一种信号转导途径。例如,已证明磷脂酰肌醇结合的毒蕈碱受体可介导细胞内 cAMP 的增加,也能刺激花生四烯酸从膜上释放。

同样有趣的是:激活同一种第二信使级联反应的受体,其引发应答的量级也有差别。

M_1 和 M_3 异构体刺激肌醇磷脂途径,然而对中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中表达的 M_1 和 M_3 亚类进行比较表明:由激动剂结合 M_1 毒蕈碱受体引起的肌醇磷脂反应总是比结合 M_3 受体者更强。这种差别并非由基因表达水平的差异所致,因为在质膜上两种受体以同等密度存在。现在尚不清楚这种差别是反映了两种受体亚型对不同 G 蛋白的结合,还是反映了两种受体亚型对同一种 G 蛋白有不同结合。但无论如何,这些结果提示:不同受体亚型与同一生化途径偶联时,或许具有与生理学相关的差别。

Fraser 等还观察到细胞内信号转导途径的激动剂特异性激活作用:检测了三种毒蕈碱激动剂——卡巴胆碱、毛果芸香碱和 AF102B 在 M_1 毒蕈碱受体转染的 CHO 细胞中激活磷脂酰肌醇水解,产生 cAMP 和释放花生四烯酸的能力,结果前二者对磷脂酰肌醇水解产生最强的刺激作用。监测花生四烯酸的释放也得到相似结果。相反,只有卡巴胆碱能引起胞液中 cAMP 水平的增加,毛果芸香碱和 AF102B 对此途径无影响。这些结果支持了用 M_1 毒蕈碱受体在其它研究中的发现。

通过分析激动剂的化学结构似乎可合理地解释 M_1 受体的不同应答:卡巴胆碱是一个最柔韧的化合物,能形成四、五种具有相似最低能量的构象状态,这就可引起不同的受体-配体相互作用,从而导致生化应答的多样

性;而毛果芸香碱和 AF102B 的化学结构刚性较大,可能限制它们完全刺激 M_1 受体的能力。据此,有人提出 AF102B 作为不完全激动剂起作用的能力或许在治疗上具有重要意义,因为病人不会对其产生耐药性。日本有人已将它试用于老年性痴呆症的治疗。

3 下调作用

受体的下调现象及其与药物对受体的关系在治疗学发展过程中是个严重问题。有证据表明,多种 G 蛋白偶联受体长时间与激动剂孵育会引起细胞表面受体蛋白数量减少,这个过程叫做受体下调作用。其临床表现之一便是快速脱敏,如给病人长期应用 β 肾上腺素能激动剂(例如支气管扩张剂),最终会引起病人对激动剂的有益效应不应答。在动物实验中,犬在连续滴注吗啡 8 小时期间就能对药物的行为抑制作用产生耐受性。

Fraser 等检验了用 M_1 毒蕈碱乙酰胆碱受体、 α_2 肾上腺素能受体和 β_2 肾上腺素能受体转染的 CHO 细胞受体下调现象的生化 and 分子特性。与未同卡巴胆碱孵育的转染的 CHO 细胞相比,卡巴胆碱同转染的 CHO 细胞孵育 24 小时后会引引起磷脂酰肌醇水解量的减少。有趣的是,加入一种 β 肾上腺素能激动剂——异丙基肾上腺素也导致毒蕈碱受体这种由卡巴胆碱介导的磷脂酰肌醇水解量的减少。因此,长时间激活任何一种 G 蛋白偶联受体(毒蕈碱受体或 β 肾上腺素能受体)均导致毒蕈碱受体的下调现象。细胞表面受体密度的降低与对毒蕈碱受体特异的信使核糖核酸 (mRNA) 水平的降低有关。

以上结果表明,受体下调在某些方面是一种生化反馈过程,是应答受体刺激而使基因转录水平减少的过程,这些发现或许对应用某些这类激动剂进行疾病的长期治疗具有重要意义,同时也为放射性核素显像提供一种可能的有效试剂,来监测组织受体水平的变化。

4 位点诱变

有的实验室还用异源表达系统证明了受体蛋白内与功能有关的重要结构。其方法为首先进行位点诱变,然后在转染的细胞内表达突变受体,从而确定配体结合、被激动剂激活、与 G 蛋白相互作用的受体区域、确定进行翻译后修饰(例如可能对正常的受体功能必需的糖苷化作用)的氨基酸残基

Fraser 等主要研究了高度保留在所有 G 蛋白偶联受体中且其位置接近于发生配体结合的细胞外膜表面的一些氨基酸残基。这种实验方法的一个缺点是:一个点突变有可能引起蛋白质构象的大范围改变,在这种情况下,受体不应性就可能由蛋白质错误的折叠引起或是因为突变残基对受体功能起关键作用。为了将这种影响减至最小,他们采用了保守的氨基酸置换法,即用一个大小和(或)疏水性相似的残基替换原来的残基

大多数 G 蛋白偶联受体结构上最引人注目特点之一是两个保守的半胱氨酸残基,它们分别位于螺旋 II 和 III 之间、螺旋 IV 和 V 之间的细胞外链上。生物化学研究表明,这些半胱氨酸可能形成二硫键,将两个细胞外链共价连接起来。在毒蕈碱乙酰胆碱受体中,对每个这种位置上的半胱氨酸进行突变,即将半胱氨酸残基换成丝氨酸残基,经 Northern 分析都证明转染的细胞表达出突变的受体蛋白,但观察不到激动剂介导的磷脂酰肌醇水解的增加。

上述结果与以前的生化研究相符,说明二硫键的形成对保持识别配体和激活受体所需的正确的蛋白构象是必要的,但配体结合部位的准确位置还要继续确定。

早期的工作发现, β 肾上腺受体可在细胞外或胞液中的链上大量缺失而不影响配体受体的结合。这说明配体有可能结合于跨膜区域。将一些 G 蛋白偶联受体的已知氨基酸顺序加以排列,可发现在与含正电荷氮的配

体相结合的所有受体中,螺旋 III 内都绝对地保留有一个天冬氨酸。这些受体包括:与乙酰胆碱结合的毒蕈碱受体,与肾上腺素和去甲肾上腺素结合的肾上腺素能受体、多巴胺受体、5 羟色胺受体、组胺受体等,根据推测,这一带负电荷的天冬氨酸对结合配体共有的带正电荷的氮起作用。为了检验天冬氨酸的这种作用,有人在 α 和 β 肾上腺素能受体和毒蕈碱乙酰胆碱受体中,用天冬酰胺替换了天冬氨酸,结果三种突变型受体均不能结合放射性标记的配体,而野生型则表现出对特异配体的高亲和力饱和性结合,确证了 Hulme 等人的结果,即毒蕈碱型受体上的这个天冬氨酸与放射性标记的亲探针丙基二苯乙醇酰胆碱芥子气发生共价连接。

另有一些研究提示:跨膜苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸残基也可能参与激动剂结合过程,虽然目前尚不清楚这些残基是否直接参加受体-配体相互作用。这些氨基酸均位于细胞膜同一平面上,即从细胞膜外表面起 α 螺旋的 1 到 2 个螺圈之处,支持了激动剂结合是发生在跨膜螺旋的上三分之一处的推测。

异源基因表达和位点诱变相结合的方法是将来 G 蛋白偶联受体的结构-功能分析的起点。如果再进一步得到受体的晶体结构,有可能为放射性核素显像和治疗设计出更有选择性的配体。

参 考 文 献

- 1 Fraser CM et al. J Nucl Med, 1995; 36(Suppl): 17S-21S
- 2 Savarese TM et al. Biochem J, 1992; 283: 1-19
- 3 Hulme EC et al. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1990; 30: 633-673
- 4 Kurtenbach E et al. J Biol Chem, 1990; 265: 13702-13708
- 5 Gurwitz D et al. Eur J Pharmacol, 1994; 267: 21-31

(收稿日期: 1995-12-18)