



新生物学丛书

新生物学年鉴

2013

《新生物学年鉴2013》编委会 主编

- ▶ G蛋白偶联受体的结构
- ▶ 复杂疾病的早期预测
- ▶ 干细胞研究
- ▶ 表型可塑性
- ▶ RNA介导的DNA甲基化
- ▶ DNA去甲基化机制
- ▶ 植物次生代谢及调控
- ▶ 群落系统发育学
- ▶ 生物多样性信息学



科学出版社

Q-54
2014/
2013

新生物学丛书

新生物学年鉴 2013

《新生物学年鉴 2013》编委会 主编



科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

《新生物学年鉴 2013》为一本由《新生物学丛书》10 位编委组稿并把关、各地大学及研究所骨干研究人员撰写,反映近年来分子生物学、生物化学、细胞生物学等最前沿领域的 10 篇文章组成的文集。这些文章的内容均为撰写者的最新研究成果,因此年鉴可以在一定程度上体现出我国生物学领域的发展现状。

去年的《新生物学年鉴 2012》在社会上引起了较好的反响。今年的《年鉴 2013》秉承了去年的制作理念,并扩充了涉及的生物学子学科,有更多的中国生物学研究领域的中坚力量参与撰写,务求使相关领域的研究人员获得第一手权威的综述性文章。

本书适合各相关领域的高年级本科生、研究生、专业研究人员学习参考。对于希望了解生物学发展现状的科研爱好者,本书也可作为很好的阅读材料。

图书在版编目(CIP)数据

新生物学年鉴. 2013/《新生物学年鉴 2013》编委会主编. —北京:科学出版社, 2014.1

(新生物学丛书)

ISBN 978-7-03-039063-9

I. ①新… II. ①新… III. 生物学-文集 IV. ①Q-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 260702 号

责任编辑:王 静 岳漫宇

责任印制:钱玉芬/封面设计:北京美光制版有限公司

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014 年 1 月第一次印刷 印张:20 1/4

字数:462 000

定价:118.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《新生物学丛书》专家委员会

主 任：蒲慕明

副 主 任：吴家睿

专家委员会成员（按姓氏汉语拼音排序）

昌增益	陈洛南	陈晔光	邓兴旺	高 福
韩忠朝	贺福初	黄大昉	蒋华良	金 力
康 乐	李家洋	林其谁	马克平	孟安明
裴 钢	饶 毅	饶子和	施一公	舒红兵
王 琛	王梅祥	王小宁	吴仲义	徐安龙
许智宏	薛红卫	詹启敏	张先恩	赵国屏
赵立平	钟 扬	周 琪	周忠和	朱 祯

《新生物学年鉴 2013》编委会

主 编：蒲慕明

副 主 编：吴家睿

编 委（按姓氏汉语拼音排序）

陈洛南	中国科学院上海生命科学研究院
康 乐	中国科学院动物研究所
马克平	中国科学院植物研究所
孟安明	清华大学生命科学学院
裴 钢	同济大学生命科学与技术学院
薛红卫	中国科学院植物生理生态研究所
赵立平	上海交大学生命科学技术学院
周 琪	中国科学院动物研究所

丛 书 序

当前，一场新的生物学革命正在展开。为此，美国国家科学院研究理事会于 2009 年发布了一份战略研究报告，提出一个“新生物学”（New Biology）时代即将来临。这个“新生物学”，一方面是生物学内部各种分支学科的重组与融合，另一方面是化学、物理、信息科学、材料科学等众多非生命学科与生物学的紧密交叉与整合。

在这样一个全球生命科学发展变革的时代，我国的生命科学研究也正在高速发展，并进入了一个充满机遇和挑战的黄金期。在这个时期，将会产生许多具有影响力、推动力的科研成果。因此，有必要通过系统性集成和出版相关主题的国内外优秀图书，为后人留下一笔宝贵的“新生物学”时代精神财富。

科学出版社联合国内一批有志于推进生命科学发展的专家与学者，联合打造了一个 21 世纪中国生命科学的传播平台——《新生物学丛书》。希望通过这套丛书的出版，记录生命科学的进步，传递对生物技术发展的梦想。

《新生物学丛书》下设三个子系列：科学风向标，着重收集科学发展战略和态势分析报告，为科学管理者和科研人员展示科学的最新动向；科学百家园，重点收录国内外专家与学者的科研专著，为专业工作者提供新思想和新方法；科学新视窗，主要发表高级科普著作，为不同领域的研究人员和科学爱好者普及生命科学的前沿知识。

如果说科学出版社是一个“支点”，这套丛书就像一根“杠杆”，那么读者就能够借助这根“杠杆”成为撬动“地球”的人。编委会相信，不同类型的读者都能够从这套丛书中得到新的知识信息，获得思考与启迪。

《新生物学丛书》专家委员会

主 任：蒲慕明

副主任：吴家睿

2012 年 3 月

前 言

当前, 生命科学正处于革命性变化的前夜, “新生物学时代” 已经到来。创立《新生物学丛书》的一个主要目的, 就是要及时总结当下最新的科研成果, 展望未来的发展方向。为此, 《新生物学丛书》编委会决定打造中国的生命科学年度报告——《新生物学年鉴》(以下简称《年鉴》)。《年鉴》以综述性文集的形式出版, 系统总结国内外生命科学的研究成果, 重点追踪和评述近年来生命科学各个领域的研究热点和前沿进展。《年鉴》的编委每年从《新生物学丛书》专家委员会中产生, 负责撰写或组织相关领域的专家学者进行评述。

《年鉴》每年出版一期, 涉及的研究领域都是当今生命科学最热点的前沿领域, 参与文章撰写的所有人员均是活跃在科研第一线的权威专家学者, 每篇文章都可以很好地体现出相关领域的前沿进展。我们希望能够将《年鉴》打造成与美国 *Annual Review* 系列一样高水平的中文版综述平台, 及时地报道生命科学的成果和进步。

第一期《年鉴 2012》于 2013 年 2 月顺利出版, 涉及了生物学的 7 个领域, 共 12 篇文章。《年鉴 2012》一经出版, 便获得了广泛的好评, 许多专业研究人员都表示, 通过一篇篇精彩的综述性文章, 了解到了该学科的前沿发展、国际动向, 开阔了视野, 也为自身在该领域中的发展树立了信心。

本期的《年鉴 2013》秉承了去年的制作理念, 并扩充了涉及的生物学子学科。本书涉及 9 个领域, 包括 G 蛋白偶联受体的结构、复杂疾病的早期预测、干细胞研究、表型可塑性、RNA 介导的 DNA 甲基化、DNA 去甲基化机制、植物次生代谢及调控、群落系统发育学、生物多样性信息学, 共 10 篇文章。从动物到植物、从微观到宏观, 更加全面地介绍了新生物学的多个热点学科的最新动向。本期由 10 位丛书编委组稿, 并号召了更多的中国生物学研究领域的中坚力量参与撰写, 务求使相关领域的研究人员获得第一手权威的信息。

本书适合各相关领域的高年级本科生、研究生, 以及专业研究人员学习参考。对于希望了解生物学发展现状和动态的科研爱好者, 本书也是一本很好的阅读材料。

《新生物学年鉴 2013》编委会

2013 年 6 月

目 录

丛书序	i
前言	iii
G 蛋白偶联受体结构分析的近年进展	1
肖鹏、孙金鹏、裴钢	
复杂生物过程中关键节点及关键因子检测 ——基于动态网络标志物的复杂疾病早期预测	29
刘锐、张万纬、陈洛南	
肠道菌群与代谢性疾病之间的关系研究进展	47
赵立平、张旭、张晨虹	
干细胞基础研究与转化应用研究	82
胡宝洋、贾云丹、李伟、刘蕾、项鹏、张映、赵同标、周琪、朱宛宛	
表型可塑性研究	128
陈兵、康乐	
RNA 介导的 DNA 甲基化	156
张衡、杨荣、朱健康	
脊椎动物基因组 DNA 去甲基化及其在发育中的作用	200
吴笛、孟安明	
植物次生代谢及调控的研究进展	215
方欣、杨长青、王凌健、陈晓亚	
群落系统发育学研究进展	266
米湘成、裴男才、马克平	
生物多样性信息学研究进展与发展趋势	290
许哲平、陈彬、王利松、乔慧捷、刘凤红、覃海宁、马克平	

* 策划编辑：裴钢 同济大学

G 蛋白偶联受体结构分析的近年进展

作 者：肖 鹏^{1,2} 孙金鹏^{1,2} 裴 钢^{3,4}

- 1 山东大学实验畸形学教育部重点实验室和山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所
- 2 山东省高校慢性退行性疾病的蛋白质科学重点实验室
- 3 同济大学生命科学与技术学院
- 4 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细胞生物学国家重点实验室

- ▶ 1. 前言 /2
- ▶ 2. GPCR 的结构研究进展 /4
- ▶ 3. 结构分析对下一步药物设计的意义 /20

摘要

G 蛋白偶联受体作为膜蛋白中的最大家族, 承担重要的跨膜信号转导功能, 是现代药靶的核心分子。最近, 随着 G 蛋白偶联受体晶体学研究技术的突破, 以及多种化学标记及其他结构分析方法的进展, 多个 G 蛋白偶联受体, 以及 G 蛋白偶联受体与 G 蛋白复合物的结构获得解析, G 蛋白偶联受体结构的动态变化的细节研究也逐渐深入。这些研究为阐明 G 蛋白偶联受体介导的跨膜信号转导过程和依据 G 蛋白偶联受体的结构信息进行药物设计奠定了基础。本文主要总结近些年来 G 蛋白偶联受体在结构分析方面的进展。

关键词

G 蛋白偶联受体、晶体结构、配体、多重构型、别构调节、药物设计

1. 前言

1.1 GPCR 在信号转导和药物发现中的重要性

由磷脂双分子层组成的细胞膜将细胞内部物质从周围环境中独立出来, 使细胞可以在一个相对封闭的环境开展自主的生命活动。细胞内外并非完全隔绝, 一方面, 细胞膜把相对有害的物质隔绝在周围环境中; 另一方面, 细胞需要和外界进行物质交换, 并感知外界的环境刺激, 因应外界的刺激做出合适的响应。因此, 细胞的跨膜信号转导在细胞的生命活动中有重要的作用。而特征拓扑结构为 7 次跨膜螺旋的 G 蛋白偶联受体 (GPCR), 在人类基因组中拥有 800 多个成员, 是细胞膜蛋白中的最大家族, 在细胞的跨膜信号转导过程中占据核心的位置 (图 1) (Fredriksson et al., 2003)。

正是因为 GPCR 在跨膜信号转导中的重要性, 它一直以来都是药物发现的研究热点。目前, 约 40% 的临床处方药是直接或间接作用在 GPCR 或其介导的信号通路上的 (Wise et al., 2002; Katritch et al., 2012)。而对 GPCR 介导的信号转导机制的研究和药物与 GPCR 相互作用机理的研究, 因也引领了 20 世纪药理学的发展 (肖鹏等, 2012)。以 GPCR 作为靶点的药物可应用于治疗涵盖了人类的多种疾病, 如治疗心脏病的药物心得安、治疗胃溃疡的药物西米替丁, 以及最近成功用于糖尿病的药物利拉鲁肽 (Black et al., 1964; Guth et al., 1979; Buse et al., 2009)。

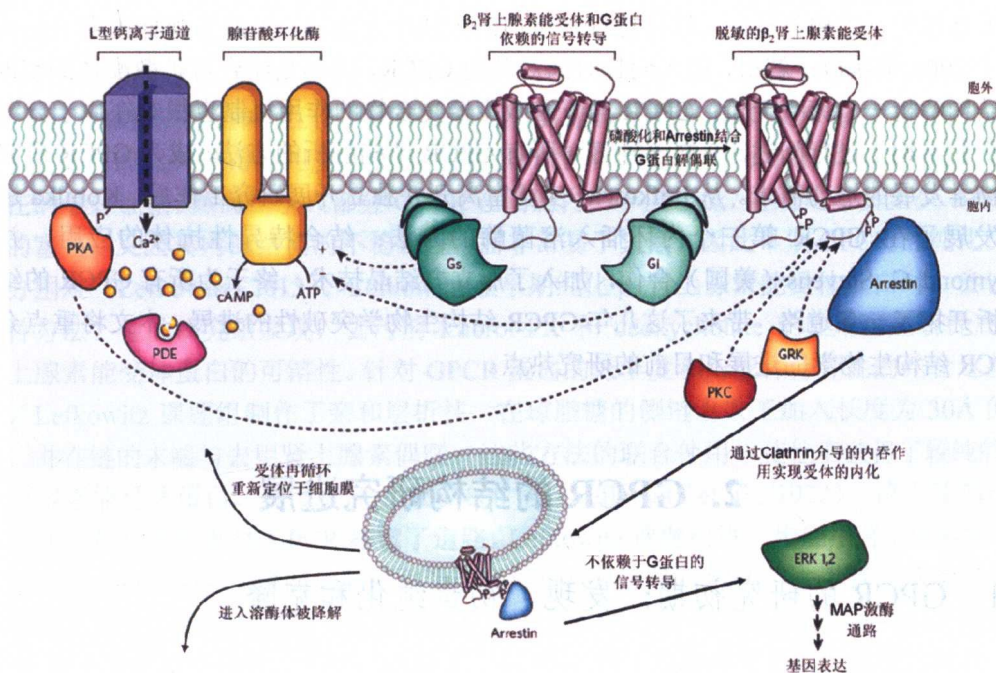


图1 G 蛋白偶联受体介导的跨膜信号转导 (修改自 Rosenbaum et al., 2009)

以肾上腺素能受体激活为例, G 蛋白偶联受体 (GPCR) 所介导的多个信号通路。 β_2 肾上腺素能受体可以分别激活 G_s 和 G_i 两种蛋白。 G_s 蛋白激活后, 增加腺苷酸环化酶活性, 提高细胞内第二信使 cAMP 浓度, 升高蛋白激酶 A (PKA) 的活性。蛋白激酶 A 在体内调控 L 型钙离子通道活力并负反馈调控 β_2 肾上腺素能受体的活性。 β_2 肾上腺素能受体在激活过程中的构象变化激活 G 蛋白偶联受体激酶 (GRK)。GRK 催化受体磷酸化进而推动 Arrestin 与受体结合。Arrestin 一方面与 Clathrin 和 AP-1 相互作用从而介导受体的内吞, 阻碍 G 蛋白结合而终止 G 蛋白信号; 另一方面 Arrestin 也可激活胞外信号调节激酶 (ERK) 等非 G 蛋白依赖的信号转导途径, 独立介导 GPCR 下游的信号转导

1.2 GPCR 研究领域的发展历史及最近的突破

从 20 世纪初 John N. Langley (英国) 提出受体的概念开始, 关于受体的研究已经持续了 130 余年。最初, Langley 的学生 Archibald V. Hill (英国) 用数学方程描述了受体与配体作用的二元模型。此后的 50 多年, 受体的研究主要由化学家和生理学家共同推进。分子生物学家是在 20 世纪 70 年代开始加入对受体的研究的, 延续至今并不断获得突破。由于 Robert J. Lefkowitz (美国) 和 Brian K. Kobilka (美国) 过去 40 年中在 GPCR 分子机制中的奠基性贡献, 包括肾上腺素能受体的同位素标记、纯化和克隆, 配体-受体-效应器三级复合物模型等, 以及 Kobilka 近些年来在 GPCR 结构研究方面的突破, 这两位科学家于 2012 年获得诺贝尔化学奖 (肖鹏等, 2012)。到目前为止, GPCR 涉及的领域已经获得了 10 次诺贝尔奖, 彰显了 GPCR 研究的重要性。

虽然 GPCR 如此重要, 但可为 GPCR 的机制研究奠定基础的 GPCR 结构生物学研究却一直进展缓慢, 主要原因是除视杆色素 (rhodopsin) 外, 大部分 GPCR 蛋白的表达

丰度都很低, 结构不稳定, 纯化过程中蛋白的失活十分迅速。虽然牛视杆色素的晶体结构于 2000 年获得了解析, 但人们长时间对其他 GPCR, 尤其是结合可扩散配体的 GPCR 的结构解析一直束手无策; GPCR 与下游效应器复合物的作用机制也很难在原子分辨率水平的结构上进行阐述。发展一种可对所有 GPCR 结构解析的方法, 成为 GPCR 研究和药理学发展的迫切需求。从 Lefkowitz 实验室离开并独立开展研究工作后, Kobilka 进一步发展了在 GPCR 第三个内环插入溶菌酶的方法; 结合特异性抗体的应用, 并与 Raymond C. Stevens (美国) 合作, 加入了脂立方结晶技术, 终于为所有 GPCR 的结构解析开拓了一条道路, 带来了这几年 GPCR 结构生物学突破性的进展。本文将重点介绍 GPCR 结构生物学的进展和目前的研究热点。

2. GPCR 的结构研究进展

2.1 GPCR 的研究初期: 发现、初步纯化和克隆

早在受体的概念提出之前, 作为 GPCR 超家族成员之一的视杆色素就已经在 19 世纪 70 年代被人们发现。视杆色素在视网膜中大量表达, 相对其他 GPCR 较易获得和纯化。George Wald (美国) 从视杆色素中分离了视黄醛, 并因此获得了 1967 年诺贝尔生理学或医学奖; 但直到 20 世纪 80 年代前, 从来没有人把感光系统与体内激素的生理作用联系起来 (Palczewski, 2006)。受体的概念由英国药学家 John Langley 在 20 世纪初提出。Langley 在研究胆碱能药物和箭毒对骨骼肌和唾液腺作用的机制时, 首次明确提出了“感受物质”(receptive substance) 这一概念。他推测“感受物质”可以通过某种独特的方法与化学物质或神经刺激相结合, 并且可以引起“主要物质”(chief substance) 功能的改变 (Langley, 1905)。该“受体-效应物”理论的提出在当时并未获得广泛的认可, 反而受到不少质疑 (Lefkowitz, 2013)。尽管如此, 配体和受体互作理论在 1920~1970 年这半个世纪之间在 Henry H. Dale (英国)、Alfred J. Clark (英国)、John H. Gaddum (英国)、Robert P. Stephenson (英国)、Raymond P. Alquist (美国)、Everhardus J. Ariëns (荷兰)、James W. Black (苏格兰)、Robert F. Furchgott (美国) 和 Heinz O. Schild (英国) 等人的努力下得到了充分的发展。20 世纪 60 年代是 GPCR 研究历史上的一个重要时期, Earl W. Sutherland (美国) 对腺苷酸环化酶及其产物“第二信使”——cAMP 的研究显示, cAMP 介导激素引起的细胞响应, 很大程度上暗示了受体是物理存在的, 而不仅仅是一个概念。然而受体本身是什么物质, 依然是一团疑云, 充满争议。诺贝尔奖得主 Sutherland 就曾一度认为腺苷酸环化酶本身就是受体 (Robison et al., 1967)。当时在哥伦比亚大学医学院做住院医生的 Lefkowitz 在这时加入到发现受体的研究当中 (Snyderman, 2011)。Lefkowitz 应用放射性同位素 ^{125}I 和 ^3H 分别标记了促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和去甲肾上腺素 (NA), 从而发现在细胞表面上存在可与激素结合的受体 (Lefkowitz et al., 1970; Lefkowitz and Haber, 1971), 而且激素与受体的结合与腺苷酸环化酶的激活是

两个独立的过程 (Lefkowitz et al., 1970)。

虽然同位素标记实验证明了配体(激素)可以直接与膜上的蛋白质选择特异性的相互作用,但这些与配体相互作用的膜蛋白是否就是传递配体信号的物质,还需要进一步证实。分离纯化并获得高纯度的受体,对受体进行性质鉴定和功能分析是证明受体客观存在的最好证据。然而由于大部分 GPCR 在细胞内的丰度极低,其纯化需要至少 100 000 倍的富集,又因其内部结构的不稳定性,而非常易于失活,因此早期 GPCR 的纯化工作十分困难 (Lefkowitz, 2013)。Lefkowitz 在早期纯化 β_2 肾上腺素能受体蛋白时,尝试了多种方法。他的研究组发现,去污剂 Lubrol-PX 和 deoxycholate 的应用可显著提高 β_2 肾上腺素能受体蛋白的可溶性。针对 GPCR 蛋白的低丰度和与配体特异性的结合这些性质, Lefkowitz 课题组制作了亲和层析柱,在琼脂糖的侧链上人工加入长度为 30Å 的糖链,并在链的末端与去甲肾上腺素偶联。这些方法的联合使用,使他们获得了较纯的 β_2 肾上腺素能受体蛋白,纯度提高了 500~800 倍 (Lefkowitz et al., 1972)。该方法的成功为纯化其他扩散性配体 GPCR 拓宽了道路。Lefkowitz 课题组进一步应用肾上腺素能受体的拮抗剂 alprenolol 偶联的琼脂糖作为亲和层析柱的介质,解决了去甲肾上腺素易氧化的问题,建立了更有效的适合大规模纯化受体蛋白的方法 (Caron et al., 1979)。随后,除 β_2 肾上腺素能受体外,当时已知的 β_1 、 α_2 和 α_1 肾上腺素能受体同样被成功纯化。对纯化后的受体研究表明,上述肾上腺素能受体均为高度疏水的糖蛋白单体,分别识别特异的扩散性配体 (Caron et al., 1979; Regan et al., 1982; Shorr et al., 1982; Benovic et al., 1984; Lomasney et al., 1986; Repaske et al., 1987)。GPCR 纯化方法的初步建立为其下一歩的分子克隆和结构解析奠定了基础。

因在视网膜中的高丰度表达和结构的稳定性, GPCR 家族成员中的视杆色素的相关研究一直走在其他 GPCR 研究的前面。然而,在 Lefkowitz 和 Kobilka 推断肾上腺素能受体和视杆色素同属于 GPCR 超家族之前,没有人将二者紧密的联系到一起。依据视杆色素蛋白测序的结果,在 1983 年和 1984 年,牛和人视杆色素蛋白编码基因被成功克隆 (Nathans and Hogness, 1983; Nathans and Hogness, 1984)。序列分析显示视杆色素蛋白与古细菌 *Halobacterium halobium* 中感光的质子传递蛋白 bacteriorhodopsin 均具有 7 次跨膜区域 (Henderson and Unwin, 1975; Ovchinnikov, 1982; Hargrave et al., 1983)。因此,7 次跨膜结构一开始被认为是感光蛋白的特征结构,而没有人把 7 次跨膜与激素受体关联起来。基于 Lefkowitz 研究组纯化的 β_2 肾上腺素能受体蛋白的序列分析结果,以及 Kobilka 大胆的应用基因组 DNA 进行克隆的方法,1986 年,第一个扩散性配体的受体编码基因被成功克隆 (Dixon et al., 1986)。对编码基因序列的分析发现, β_2 肾上腺素能受体具有 7 个富含脯氨酸和芳香族氨基酸的疏水跨膜区域,蛋白 N 端含有多个糖基化位点而 C 端具有多个磷酸化位点 (Dixon et al., 1986),这些结构特点与视杆色素蛋白结构类似。更重要的是,二者均通过与 G 蛋白偶联发挥功能 (Gilman, 1984; Stryer, 1986)。Lefkowitz 和 Kobilka 据此提出了具有 7 次跨膜结构的 G 蛋白偶联受体家族的概念 (Dohlman et al., 1987)。此后的短时间内,包括人类 β_1 、 β_2 、血小板 α_2 在内的肾上腺素能受体和毒蕈硷乙酰胆碱受体 (muscarinic acetylcholine receptor) 等一系列受体编码基因或 cDNA 被成功克隆 (Kubo et al., 1986; Frielle et al., 1987; Kobilka et al., 1987; Kobilka

et al., 1987; Fargin et al., 1988; Buck and Axel, 1991)。7 次跨膜的 GPCR 家族的概念也带来首个“孤儿受体”的发现 (Kobilka et al., 1987)。这个孤儿受体随后被证实为 5 羟色胺 (5HTA_{1A}) 受体 (Fargin et al., 1988), 成为首个“脱孤”受体 (肖鹏等, 2012)。

随着人类基因组计划的开展和完成, 我们发现人类 GPCR 超家族包含超过 800 个成员。系统进化分析确定 G 蛋白偶联受体可分为 5 大类: 类视杆色素受体亚家族、类 Secretin 受体亚家族、Adhesion 受体亚家族、Glutamate 受体亚家族和 Frizzled/Taste2 受体亚家族 (Fredriksson et al., 2003)。类视杆色素亚家族成员众多, 约占已知 GPCR 的 80% 以上, 是目前研究比较集中的一类。现代分子生物学技术可以使大部分 GPCR 获得外源性的过表达, 结合组合化学方法, 许多配体与 GPCR 的相互作用也得到深入的研究。然而, 由于膜蛋白纯化和结晶的技术瓶颈, GPCR 的结构生物学研究进展一直相对缓慢, 为基于 GPCR 进行药物设计和阐明 GPCR 的工作机制带来很大障碍, 直到 Kobilka 和 Stevens 近年取得开创性的突破。

2.2 GPCR 结晶学发展以及技术突破

作为重要的细胞跨膜信号转导分子, 人们一直试图了解 GPCR 将细胞外信号传递至细胞内部的作用机制, 这就必然需要获得 GPCR 与上下游分子相互作用的结构信息。蛋白质晶体结构可以提供原子层级的高分辨率结构信息, 从而回答配体与受体是如何结合的、配体如何诱导受体产生特异性的构象并传递到下游信号分子、受体的构象改变又如何决定下游信号分子的构象等问题。这些信息对人类科学和药物发展具有重大价值。除视杆色素之外, 几乎所有的 GPCR 家族成员在细胞内的表达丰度都很低, 易被降解而失活; GPCR 成员为膜蛋白, 具有复杂柔韧的跨膜疏水性结构, 所以不易结晶; GPCR 构象始终处于不断变化的过程中, 十分不稳定; 这些特点成为制约 GPCR 家族成员结晶的主要因素 (Lefkowitz et al., 2008)。因此解析 GPCR 家族成员高分辨率的晶体结构一度成为在结构生物学和药物学研究中的重大挑战, 在很大程度上限制了对 GPCR 功能的研究, 阻碍了新药的开发, 直到最近获得突破。

视杆色素和 β_2 肾上腺素能受体 (β_2 -adrenergic receptor) 是两个被研究得最多的 GPCR。因为视杆色素的高表达丰度, GPCR 早期的结构生物学研究主要集中于视杆色素。在分离的视杆细胞外段中, 90% 的蛋白质都是视杆色素。纯化后的视杆色素在避光条件下及温和的去污剂中可长期保持稳定, 稳定性达数周之久。所以不需要复杂的纯化技术和外源性的重组蛋白表达, 人们可以非常容易的获得足够的视杆色素蛋白进行结构生物学分析。在编码视杆色素的基因被克隆之前, 人们在 1975 年就观察到细菌感光的质子传递蛋白 bacteriorhodopsin 的电镜图像 (Henderson and Unwin, 1975), 在 1982 年就已经获得了牛视杆色素的晶体 (Corless et al., 1982)。即使这样, 视杆色素的结构分析的进展也比较缓慢。在获得二维晶体结构十多年后, Gebhard F. X. Schertler (奥地利) 和 Paul A. Hargrave (美国) 等才用电镜的手段获知视杆色素 7 次跨膜区域的排布模式和方向 (Schertler et al., 1993; Unger and Schertler, 1995; Unger et al., 1997)。2000 年, Krzysztof Palczewski (波兰) 等在尝试多种去污剂后, 利用 octyl- β -glucoside 和 heptanetriol 成功辅

助结晶了牛视杆色素蛋白, 并通过 X 射线衍射解析获得了第一个 GPCR 的晶体结构, 分辨率为 $2.8\text{\AA}$ (Palczewski et al., 2000)。2004 年, 去污剂 n-octyltetraoxyethylene (Li et al., 2004)、heptylthioglucoside (Okada et al., 2004) 的应用使牛视杆色素蛋白晶体结构分辨率提高到了 $2.2\text{\AA}$ 。在这一时期内, 牛视杆色素蛋白是唯一获得原子层级的高分辨率结构的 GPCR 家族成员 (Palczewski et al., 2000; Teller et al., 2001; Okada et al., 2002; Li et al., 2004; Okada et al., 2004)。

在视杆色素结构解析工作获得进展的同时, 许多 GPCR 领域和蛋白晶体学领域的科学家也在试图发展合适的技术, 用来解析其他低表达丰度的 GPCR 晶体结构。从克隆 β_2 肾上腺素能受体开始, 当时在 Lefkowitz 实验室工作的 Kobilka 就把在原子分辨率水平上揭示 GPCR 工作的原理作为自己的研究目标。在 Kobilka 离开 Lefkowitz 实验室到斯坦福独立开展科研工作后的第三年, Wayne A. Hendrickson (美国) 的学生 Stevens 也来到 Lefkowitz 实验室, 通过合作开始进入 GPCR 的结构生物学领域。其他科学家, 如 Shertler 等也开始对扩散型配体作用的 GPCR 的晶体结构开始感兴趣。所有这些人克服内源 GPCR 低丰度这一特性的方法均采用了异源表达系统。大肠杆菌表达系统首先被用于表达 β_2 肾上腺素能受体 (Marullo et al., 1988; Mancina and Hendrickson, 2007)、5-羟色胺受体 (5HT_{1a}) (Bertin et al., 1992) 等。然而 GPCR 在原核系统中表达量低、易形成包涵体并且缺少磷酸化、糖基化等翻译后修饰机制。这导致许多 GPCR 不适合该表达系统 (Mancina and Hendrickson, 2007)。酵母表达系统虽然属于真核表达系统, 并具有翻译后修饰功能; 然而由于一些其他的限制因素也未被广泛应用于异源 GPCR 的表达 (Minic et al., 2005)。到 2007 年, 第一批用异源表达系统获得的 GPCR 晶体结构采用的是昆虫的表达系统。

GPCR 是 7 次跨膜的受体, 有 3 个胞外环和 3 个胞内环, 尤其第三个胞内环较长, 其构象始终处于不断变化的过程中。这些结构特性使蛋白的稳定性很差, 不易结晶。晶体学家一般对这类问题的解决方法是选择性的对 GPCR 特定位点的氨基酸进行突变, 并检测突变体的热稳定性, 选择热稳定性高的突变进行结晶实验。这种方法所依据的假设是热稳定性高的蛋白质更适合于结晶。根据此方法, 2008 年, β_1 肾上腺素能受体 (β_1 -adrenergic receptor) 的结构获得解析。突变筛选方法的缺点是费时费力, 获得的结构与野生型序列差别较大, 并不能真实地反映野生型的结构。而且对每一个新的 GPCR, 可能需要寻找一系列新的突变才能获得易于结晶的蛋白质。

GPCR 结晶瓶颈的真正突破是 Kobilka 带来的。Kobilka 在 Lefkowitz 实验室研究肾上腺素能受体与 G 蛋白耦联的作用机制时曾发现, 肾上腺素能受体的 N 端和 C 端两个部分若在第三个胞内环分开, 并同时表达在细胞内时, 仍具有受体功能 (图 2a)。这一实验结果说明了两个问题, 一是 GPCR 的第三个内环结构非常不稳定, 二是 GPCR 的第三个内环改变可能不影响 GPCR 整个蛋白的结构。依据此思路, Kobilka 天才的发明了 GPCR 的第三个内环插入溶菌酶的方法来辅助结晶 (图 2b)。这一方法带来了非视杆色素的第一个高分辨率 GPCR (β_2 肾上腺素能受体) 晶体结构的解析, 并被推广应用到后来被解析的 50 多个 GPCR 晶体结构当中。值得一提的是, GPCR 的晶体一般较小, 斯克利普斯研究所 (Scripps Research Institute) 的 Stevens 引入了早先成功应用于其他膜蛋白的脂立方结晶 (lipid cubic phase) 技术和微 X 光射线衍射 (micro-beam) 技术, 从

而克服了衍射的困难 (Cherezov et al., 2007)。除用溶菌酶插入之外, Kobilka 同年还用抗体结合的方法获得了 β_2 肾上腺素能受体的低分辨率晶体结构 (Day et al., 2007), 但这一方法未获广泛的推广。为进一步理解 GPCR 介导细胞跨膜信号转导的机制, 需要 GPCR 激活构型和 GPCR 与 G 蛋白复合物的高分辨率晶体结构。Kobilka 对原有的方法进行了改进, 将溶菌酶插入到 N 端, 并用纳米抗体 (nanobody) 来辅助结晶。这些方法的应用终于让人们看到了高分辨率的 GPCR 激活构型及 GPCR 与 G 蛋白相互作用的细节, 并使 Kobilka 和 Lefkowitz 一起荣获 2012 年诺贝尔化学奖。

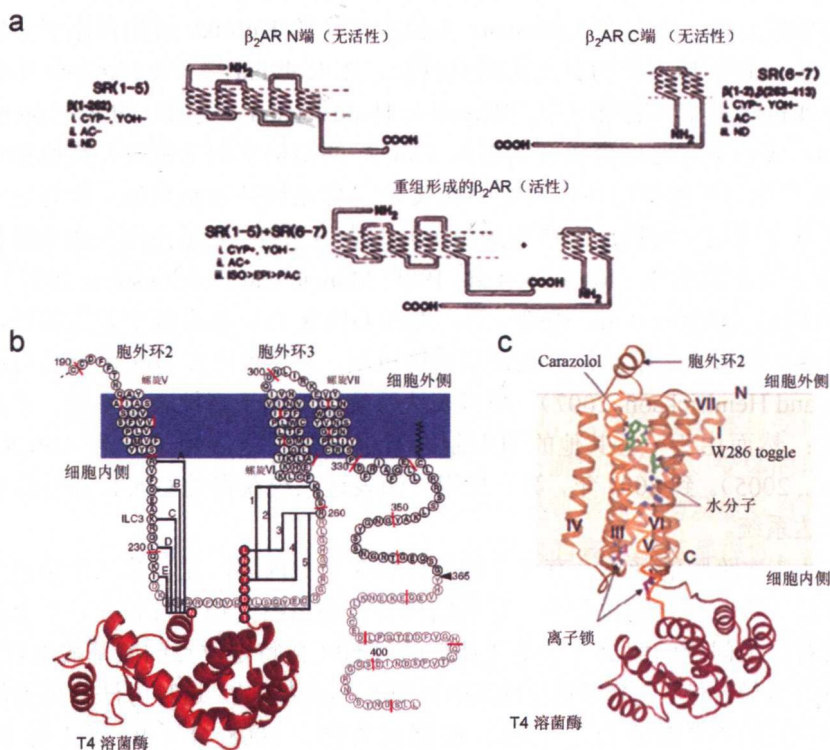


图2 发展溶菌酶插入法辅助 GPCR 的结晶

- a. β_2 肾上腺素能受体 (β_2 AR) 分段示意图 (Kobilka et al., 1988), 单独的 β_2 AR 1~5 跨膜区域 SR (1~5) 或 6~7 跨膜区域 SR (6~7) 不具有 β_2 AR 的活性, 且无法与特异配体结合。细胞内同时转入 β_2 AR 的 1~5 跨膜区域与 6~7 跨膜区域, 可重组成一个有活性的 β_2 AR; b. β_2 AR-T4 溶菌酶融合蛋白构建与优化示意图 (Rosenbaum et al., 2007); c. β_2 AR-T4 溶菌酶融合蛋白结构 (Lefkowitz et al., 2008)

到目前为止, GPCR 的表达、纯化和结晶技术还在日益更新。Kobilka 课题组发现 MNG-3 是一种更好的去垢剂, 而且有效的应用浓度可以比去垢剂 DDM 更低。Stevens 课题组后来用脱辅基细胞色素 (apocytochrome b562RIL) 替换了溶菌酶在 GPCR 的第三个内环进行插入, 也可用于帮助 GPCR 蛋白的结晶。加利福尼亚大学圣迭戈分校 (University of California, San Diego) 的 Park 等 (2012) 成功在大肠杆菌中表达和复性了趋化因子受体 CXCR1, 并解析了其核磁共振 (NMR) 结构。这是原核表达系统被首次成功应用于 GPCR 结构解析。所有这些技术上的进步打破了 GPCR 的结构生物学研究

瓶颈，大批的 GPCR 结构获得了解析。

到目前为止，获得解析的 GPCR 结构有 70 多个，包括 20 多个不同的蛋白质分子。目前高分辨率结构已知的 G 蛋白偶联受体如下：视杆色素蛋白，包括牛视杆色素 (Palczewski et al., 2000)、乌贼视杆色素 (Murakami and Kouyama 2008) 和 channel-视杆色素 (Kato et al., 2012); 胺类 (amine) 受体，包括人类 β_2 肾上腺素能受体 (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007)、D3 多巴胺受体 (Chien et al., 2010)、H1 组胺受体 (Shimamura et al., 2011)、毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M2R (Haga et al., 2012)、5 羟色胺受体 5-HT1B (Wacker et al., 2013; Wang et al., 2013) 和 5-HT2B (Wacker et al., 2013)、火鸡 β_1 肾上腺素能受体 (Warne et al., 2008; Moukhametzianov et al., 2011) 和大鼠毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M3R (Kruse et al., 2012); 核苷酸 (nucleotide) 受体，人类 A_{2A} 腺苷酸受体 (Jaakola et al., 2008; Dore et al., 2011; Xu et al., 2011; Congreve et al., 2012); 肽类 (peptide) 受体，包括人类趋化因子受体 CXCR1 (Park et al., 2012)、CXCR4 (Wu et al., 2010)， κ 鸦片类受体 (Wu et al., 2012)、N/OFQ 鸦片类受体 (Thompson et al., 2012) 和蛋白酶激活受体 PAR1 (Zhang et al., 2012)，老鼠 μ 鸦片类受体 (Manglik et al., 2012) 和 δ 鸦片类受体 (Granier et al., 2012)，大鼠神经降压素受体 NTS1R (White et al., 2012); 脂类 (lipid) 受体，Sphingosin1 phosphate1 受体 (Hanson et al., 2012); 以及首个非视杆色素样 G 蛋白偶联受体的 SMO 受体 (Wang et al., 2013)。这些结构的信息让我们对 GPCR 家族的结构特性有了新的认识，下面我们分享一下从晶体结构获知的 GPCR 结构的一些特点。

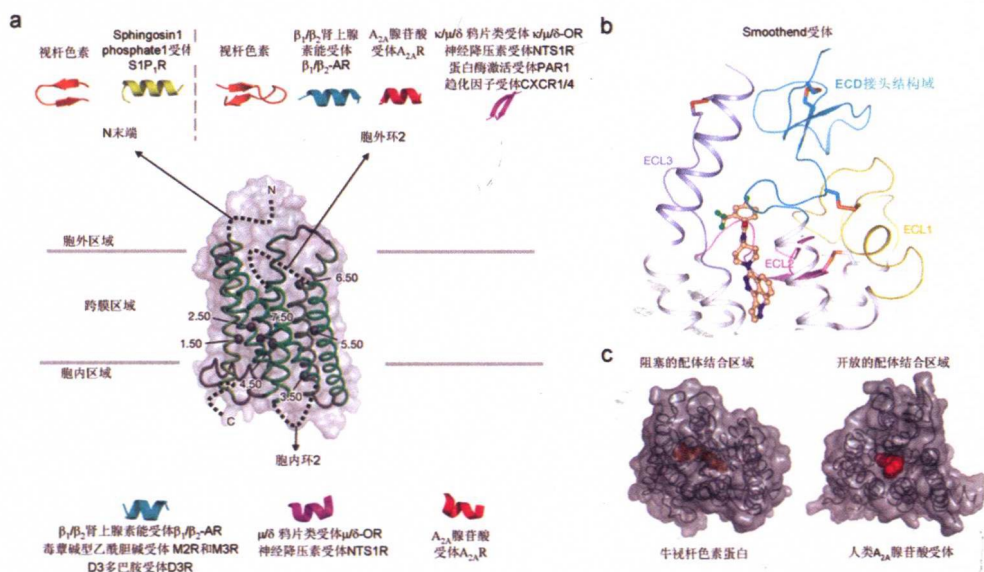


图 3 G 蛋白偶联受体结构特征

a. GPCR 胞外和胞内区域结构多样性示意图 (改编自 Venkatakrishnan et al., 2013); b. Smoothed 受体胞外区结构平面图 (改编自 Wang et al., 2013); c. 牛视紫质蛋白和人 A_{2A} 腺苷酸受体胞外区域结构平面图 (改编自 Venkatakrishnan et al., 2013)