

分子调节原理

(中文版)

Principles of Molecular Regulation

[美] P. Michael Conn 著
Anthony R. Means

曹又佳 张翠竹 主译

高等教育出版社

图字: 01 - 2003 - 6884 号

Principles of Molecular Regulation

P. Michael Conn, Anthony R. Means

The original English language work has been published by HUMANA PRESS

Totowa, New Jersey, U. S. A.

2000 by Humana Press. All rights reserved.

图书在版编目(CIP)数据

分子调节原理(中文版)/(美)康恩(Conn, P. M.),
(美)米恩斯(Means, A. R.)著;曹又佳,张翠竹主译.
—北京:高等教育出版社,2004.6

书名原文:Principles of Molecular Regulation

ISBN 7 - 04 - 014586 - 3

. 分... . 康... 米... 曹... 张...
. 分子生物学:细胞学 . Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 032090 号

策划编辑	王 莉	责任编辑	田 军	封面设计	张 楠	责任绘图	朱 静
版式设计	王 莹	责任校对	杨雪莲	责任印制			

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市西城区德外大街 4 号

邮政编码 100011

总 机 010 - 82028899

购书热线 010 - 64054588

免费咨询 800 - 810 - 0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

经 销 新华书店北京发行所

印 刷

开 本 787×1092 1/16

印 张 32.75

字 数 800 000

版 次 年 月第 1 版

印 次 年 月第 次印刷

定 价 66.60 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

主要译者及分工

张翠竹 第 1 ~10、27 章
曹又佳 第 11 ~19、24 ~26 章
石建党 第 20 ~23 章
张 琚 第 20 ~23 章

译者序

本书译自“Principles of Molecular Regulation”。该书主编 P. Michael Conn 和 Anthony R. Means 分别是美国 Oregon 大学和 Duke 大学很有名望的学者。他们成功地集合了一流的科学家,并收集了其最前沿的研究成果。本书旨在阐明存在于细胞常规活动背后的分子机制,条理清晰,重点突出。译者曹又佳博士曾与该书多个章节的作者共事(于 Duke 大学),对他们各自在其研究领域中的水平略有了解。在讲授细胞转导课程的过程中,译者参阅了大量的英文专业原版教材,认为本书既覆盖了信号转导的几个基本方面,又有侧重地展示了该领域前沿的研究内容、方法、结论以及有待解决的问题。适于我国在信号转导研究方面起步较晚,却又奋起直追的特点。因此我们决定将之译成中文,以飨更多的读者。

本书包括了生物调节中众多形式各异内容复杂的基本点,依内容分为六大部分,总共 27 章。书中论述了细胞表面受体(第 1~7 章)、核受体(第 20~23 章)和离子通道(第 8、9 章),除了这些关于信号机制的综合性观点之外,本书还详细讲述了钙离子(第 10、11 章)、脂质分子(第 13 章)、cAMP(第 14~16 章)、蛋白激酶(第 16、17 章)和蛋白磷酸酶(第 18、19 章),以及 NO(第 12 章)的作用,并且把目前热门的细胞生长(第 24 章)与凋亡(第 25 章)及其在免疫方面相关的知识(第 26 章)突出列为一个部分,最后简要介绍了基于细胞信号机制的理性药物设计策略(第 27 章)。

本书可以使读者在短时间内概括性地了解细胞所接受的所有可能的分子信号,所有细胞应答机制,细胞在信号转导过程中产生的有可能导致疾病和死亡的错误,以及细胞信号转导知识在药物发现和疾病治疗方面的应用,从而使读者有机会从一流研究人员的视角纵览细胞信号转导领域的发展。本书适用于探讨生命科学的科学家、研究生、医学院校的学生和从事基础研究的医生。不同的主题安排以及每章后面所列的选读文献使该书成为一本适合高年级本科生以及研究生阅读的参考书。同时,本书还为所阐述的概念配以清晰而丰富的、易于理解的表格与图示,因此可以作为有价值的学习和教学工具。另外,本译著还有助于在海外接受教育的人士与国内业界的交流。

本书是在我们实验室的老师和学生们大力协助下翻译的,在此感谢协助本书翻译和校对的人员:尹洁、周卓、李鑫、许珊、阎志鹏、李晚禾、遇言、赵鹏、张智松、牛艾茹和谢佳等。在本书翻译过程中还得到国外专家们的支持,在此特别感谢原书的作者 Dr. Means 对书中内容的切磋。同时感谢赵宇博士对本书翻译和校对的大力支持和帮助。

本书旨在架设连接我国与国际生命科学研究的通道,缩短我国与西方国家在信号转导研究领域的差距。有些中文尚未统一的名词仍保留其英文形式,且本书的最后部分列出了一些专有名词和缩写词表及其中文翻译,便于读者阅读。书中涉及了生命科学领域迅速发展的前沿问题,其内容和结论还在不断地更新。鉴于水平和时间的限制,书中必定存在不当之处,恳请读者提出宝贵意见。

曹又佳 于南开大学生命科学学院

2003. 11. 3

前 言

经过无数年代的进化,人与线虫在基因组上仍保留有大约一半的共性,且享有相同的基本代谢途径。这些惊人的发现只能引出一个不可避免结论:即大自然造就的有机体无非是对一个主体的不断地修饰。当然,“通一例而晓全局”未免过于简单化,但某些基本法则还是可以通用的。

《分子调节原理》一书旨在补充学科中基本的却又是最新知识,以解释生命现象的基本观点。该书既适用于本领域的初学者,也为熟悉生物调控并为寻求更广泛参考信息的学者提供新的见解。我们期望这本专著的价值能被新入学的研究生和医学院校的学生、医生以及从事临床工作的人员所证明。经验丰富的研究人员也将会发现本书是一本非常有用的参考书。

原文资料翔实且附有清晰易懂的表格和图示,使得《分子调节原理》成为有价值的学习和授课的工具书。

各章节的作者都是在其领域有名望的科学家,也是很好的写作者。我们感谢作者们和出版社为在如此短的时间内出版这部新书而作出的努力。

P. Michael Conn
Anthony R. Means

目 录

第一部分	细胞表面受体的信号机制	1
1	G 蛋白偶联受体和 G 蛋白	2
2	G 蛋白的大、小鸟苷酸结合蛋白: 细胞信息交流的网络系统	25
3	胰岛素受体激酶: 调控和治疗应用	40
4	生长激素的作用: JAK / STAT 偶联受体的信号转导	57
5	超级分子信号转导复合物介导的果蝇光转导的调节	88
6	网柄菌: 研究趋化作用途径和机制的实验模型系统	103
7	gp130 相关的细胞因子	121
第二部分	离子通道、Ca ²⁺ 和脂质介导的信号转导机制	145
8	离子通道	146
9	作为细胞内信使的钙离子: 通路与作用	163
10	Ca ²⁺ 和钙调蛋白介导的调控机制	207
11	蛋白激酶 C	227
12	一氧化氮	243
13	磷脂酶	253
第三部分	环化腺苷酸、蛋白激酶和蛋白磷酸酶	273
14	腺苷酸环化酶	274
15	环式核苷酸磷酸二酯酶	287
16	环式核苷酸依赖性蛋白激酶	304
17	蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶	325
18	蛋白丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶	340
19	蛋白酪氨酸磷酸酶	352
第四部分	核受体起始的信号转导机制	381
20	类固醇激素受体的作用机制	382
21	孤儿核受体	393
22	辅助激活因子和辅助抑制因子	418
23	CREB 结合蛋白——辅助激活因子复合物	431
第五部分	细胞增殖与死亡的分子调控	443
24	细胞周期检验点	444
25	凋亡的分子调节	453
26	T 细胞与免疫抑制	468
第六部分	理性的药物开发	477
27	理性的药物开发与高新技术	478
	中英文名词对照	501

第一部分

细胞表面受体的信号机制

1

G 蛋白偶联受体和 G 蛋白

Alfredo Ulloa-Aguirre and P. Michael Conn

- 目录: 1. 绪论
2. G 蛋白偶联受体的结构与功能的关系
 3. 异源三聚体 G 蛋白家族
 4. 选读文献

1. 绪 论

众多的 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 构成了一个数目庞大、功能各异的细胞膜受体超家族。许多信号级联反应通过 GPCRs 将各种各样的外部和内部刺激, 如光线、气味、离子、激素和神经递质等转换为细胞内的应答反应。在激活剂的结合及受体活化后, GPCRs 与一个或多个鸟苷酸结合的信号转导蛋白 (G 蛋白) 相互作用; G 蛋白的结合与活化通常发生在 GPCRs 的细胞内区域。活化的 G 蛋白携带着由受体接收的信息, 并将这些信息传导至特定的下游效应器, 例如酶和离子通道。作为效应器的酶又产生第二信使, 后者依次对各种各样的细胞过程进行调节, 如细胞的生长和分化等。受体 - G 蛋白信号的选择性和强度的调节是高度复杂和多元化的, 包含精确调节机制的激活, 最终导致高度特异的生物应答。

GPCRs 的基本结构由一个长度各异的单一多肽链组成, 该肽链 7 次穿过磷脂双分子层, 形成了特征性的跨膜螺旋和交替的胞外和胞内序列。基于核苷酸和氨基酸序列的相似性可以把 G 蛋白受体超家族进一步分为三个受体家族, 每个家族中的蛋白质序列具有显著的相似性 (例如, 疏水的跨膜片段中至少有 20% 的序列是相同的)。目前, 三个主要哺乳动物家族的 GPCRs 的特征已被鉴定。与视紫红质 / β - 肾上腺素受体 (A 家族, 表 1) 相关的受体是目前从结构和功能方面研究得最透彻的, 迄今已被鉴定的绝大部分 G 蛋白偶联的受体都属于这一类。组成这一家族的受体可被多种多样的刺激所激活, 包括光子、气味、激素以及具有可变分子结构的神经介质激动剂, 从小分子的生物胺 (儿茶酚胺和组胺) 到多肽 (P 底物和促性腺激素释放激素), 以及复杂的糖蛋白 (比如促性腺激素, 黄体生成素 [LH] 和促卵泡激素 [FSH]) 等 (表 1)。由于和这些受体结合的配体结构各异, 受体在其 -NH₂ (N) 端和 -COOH (C) 端 (而非跨膜区) 长度上可能存在着很大差异。与神经肽及肽激素 (表 1) 结合的肠促胰液素 / 血管活性肠肽 (VIP) 家族 (B 家族), 除了位于第三个跨膜区 (或第一个胞外环的 C 端) 和第二个胞外环之间可形成二硫桥 (图 1) 外, 没有任何视紫红质 / β - 肾上腺素受体家族

的特征。这类受体的特征是具有很长的 N 端,其上至少有 6 个高度保守的半胱氨酸残基,这些残基被认为参与配体的结合。最后一大类型是代谢型谷氨酸受体家族(C 家族),该家族至少包含 6 种紧密相关的受体亚型,这些受体和中枢神经系统(CNS)主要的兴奋型神经递质谷氨酸相结合;所有的受体亚型都有较长的 N 端区域,而 C 端区却长短不一。虽然钙敏感受体在其氨基酸序列上同代谢型谷氨酸受体只有很低的相似性(18% ~24%),但它们在拓扑学上却惊人的一致,由此被划归为这一 GPCR_s 家族中。另外三个包含非哺乳动物受体的家族也可被归入 GPCR_s 超家族(D ~F 家族,表 1)。

表 1 G 蛋白偶联的受体超家族

家 族	分 组					
A: 受体 与视紫红质/ - 肾上腺素 受体相关	嗅受体,腺嘌呤核苷,黑色素皮质激素,大麻素和几种孤儿受体	5 - 羟色胺, - 和 - 肾 上腺素受体, 多巴胺,组 胺,毒蕈碱 的,羟苯乙 醇胺和孤儿 受体	铃蟾素/神经 介素,缩胆囊 肽,内皮素,生 长激素,促分 泌素,神经肽 Y,神经紧张 素,视蛋白,速 激肽,促甲状 腺素 - 释放激 素和孤儿受体	缓激肽,无 脊椎动物视 蛋白和孤儿 受体	血管紧张素,C3a 和 C5a,趋化因 子,conopressin, 类二十烷酸, fMLP, FSH, LH 和 TSH,促生长 激素神经肽, GnRH,白三烯, P2(核苷酸),阿 片样物质,催产 素,血小板激活 因子,凝血酶和 蛋白酶激活的, 生长激素抑制 素,加压素,催产 素和孤儿受体	褪黑素和孤 儿受体
B: 受体 与降钙素以及 甲状旁腺激素 受体相关	降钙素,降钙 素基因相关 的肽,促肾上 腺皮质激素 释放因子,昆 虫利尿激素 和孤儿受体	甲状旁腺激 素/甲状旁腺 激素相关肽 受体,孤儿受 体	胰高血糖素样 肽,胰高血糖 素,肠抑胃肽, 生长激素释放 激素,垂体腺 苷酸环化酶激 活肽,血管活 性肠肽,肠促 胰液素和孤儿 受体	latrotoxin 和 孤儿受体		
C: 受体 与代谢型谷氨 酸受体相关	代谢型谷氨 酸受体	细胞外钙离 子传感器受 体	GABA - B 受 体		推断的信息 素受体	
D: 受体 与 STE2 信息 素受体相关	STE2 - 因子 - 信息 素受体					
E: 受体 与 STE3 信息 素受体相关	STE3 - 因子 - 信息 素受体					
F: 受体 与 cAMP 受体 相关	盘基网柄菌 CAR2 ~CAR4 受体					

尽管受体 - G 蛋白系统是细胞应答大量胞外刺激的极为有效的手段,但是在一些异常情况下,如受体分子或 G 蛋白发生“失去功能”或“获得功能”的突变,都会改变信号转导途径的活性,导致细胞功能的改变,包括异常生长和肿瘤的发生。

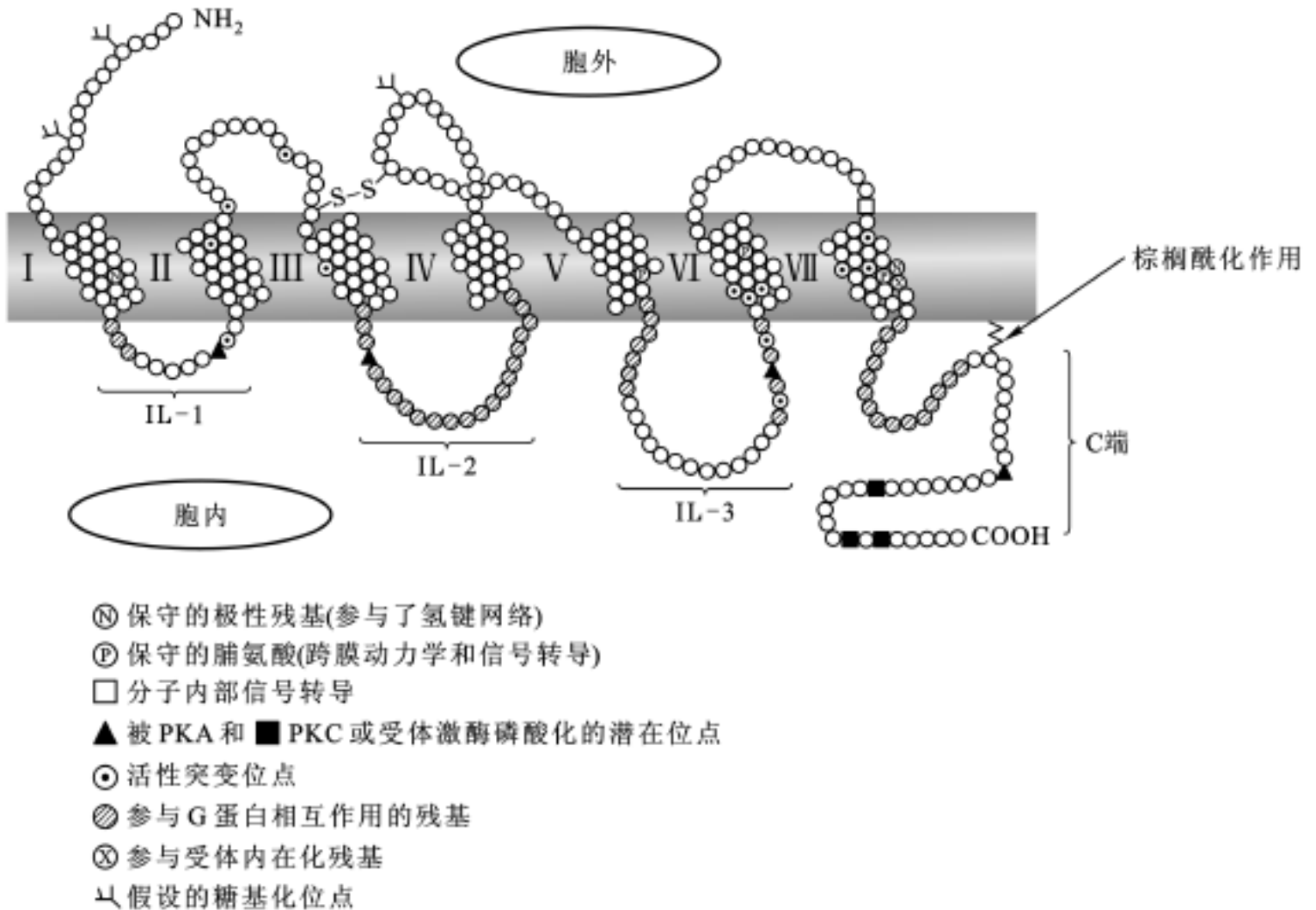


图1 属于视紫红质/ - 肾上腺素家族的 G 蛋白偶联受体的 7 次跨膜结构域模型展示了参与信号转导的一些结构特点,包括推断的糖基化位点和一些参与受体磷酸化、内转化和棕榈酰化的氨基酸残基。这个结构也说明一些自发性产生的位点突变会导致受体的组成型活化(例如,促甲状腺激素,促黑(素细胞)激素,促黄体激素,视紫红质以及肾上腺素受体)。研究也发现,第一个胞内环(IL-1)的 N 端区域参与了通过人降钙素受体和鼠 GnRH 受体激活效应器的反应。

2. G 蛋白偶联受体的结构与功能的关系

2.1. 一般特征

G 蛋白偶联受体家族内具有很高的结构同源性。对主要家族(A 家族)的约 300 个受体蛋白的克隆和测序以及对其一级结构的疏水性分析表明,这类受体均含有 7 段由 20 ~25 个疏水氨基酸组成的片段(图 1)。从细菌视紫红质(来自嗜盐细菌的 7 次跨膜(TM)蛋白,它不与 G 蛋白偶联)的结构推断,这些疏水片段可构成螺旋跨膜区域,其间通过交替的胞内胞外环(据推测,除了第三个胞外环可能由多于 150 个氨基酸残基构成外,其他环的长度

都在 10 ~40 个氨基酸之间) 连接, 构成特异的结合结域。这 7 个跨膜区域呈桶状结构, 方向几乎和膜平面垂直, 并具有一个胞外的 N 端和一个胞内的 C 端。比较该类受体中的各组受体, 绝大多数初级序列同源性结构位于疏水跨膜区。在这一大受体家族(也可能存在于其他家族的成员当中) 成员间, 高度保守的氨基酸残基明显地体现了受体结构和功能的基本结构要素。例如, 在绝大多数属于视紫红质 / β -肾上腺素家族的受体中有两个高度保守的残基, 一个是位于 TM-2 的天冬氨酸残基(Asp), 另一个是位于 TM-7 的天冬酰胺残基(Asn)。这两个残基的确切位置和相互作用对保持螺旋 2 和螺旋 7 的紧密相邻、受体活化以及信号转导(图 2) 是不可缺少的。另一方面, 与配体结合的特异性又要求不同亚类受体的结构要有所区别, 而各亚型间要具有高度的保守性以结合相似的配体。诸如毒蕈碱、肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺的受体, 它们在第三个跨膜区都具有一个高度保守的天冬氨酸残基(Asp), 协助与其对应的配体之间形成离子键(图 3)。而另一方面, 其连接跨膜片段的亲水环以及 N 端和 C 端却有很大的不同。例如光受体、视紫红质和 β_2 -肾上腺素受体中, N 端是由较短的肽链构成的; 促胰液素 /VIP 受体亚家族的成员有中等长度的 N 端肽链; 而促性腺激素受体中和钙感应受体具有很长的 N 端肽链。绝大多数的 G 蛋白偶联受体其 C 端富含丝氨酸和苏氨酸残基(它们是激酶磷酸化而导致 GPCRs 脱敏的潜在位点), 但在一些罕见的例子中, 如哺乳动物的 GnRH 受体, 就有几个物种的受体根本没有胞内 C 端区域。

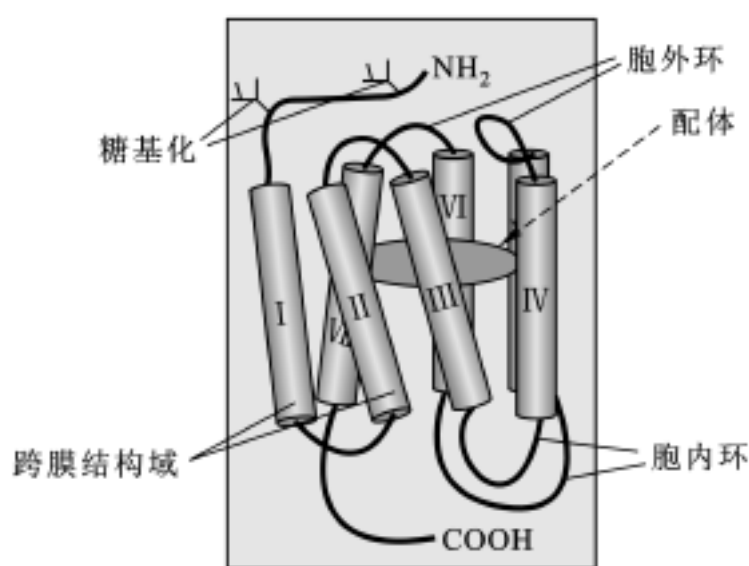


图 2 逆时针方向的 GPCRs 跨膜结构域。这种闭合环结构代表结合小配体的受体, 这些小配体包括生物胺和核苷酸。在这种排列中, 核心主要是由结构域 I、II 和 III 组成的, 而结构域 IV 和 V 被分隔在外缘。螺旋 2 和螺旋 7 彼此靠近是这个 GPCRs 家族的特点。

在视紫红质 / β -肾上腺素受体的各家族中, 受体蛋白普遍存在的结构同源性(一级和三级结构)反映了它们作用的共同机制。比如存在于光受体细胞中的光敏 G 蛋白偶联受体视紫红质和分布广泛的儿茶酚胺受体, 前者共价结合的配体是全顺式视黄醛, 经光子激活后异构化为全反式视黄醛; 这种视黄醛的结构变化引发了一系列视紫红质构象的改变, 从而与一个被称

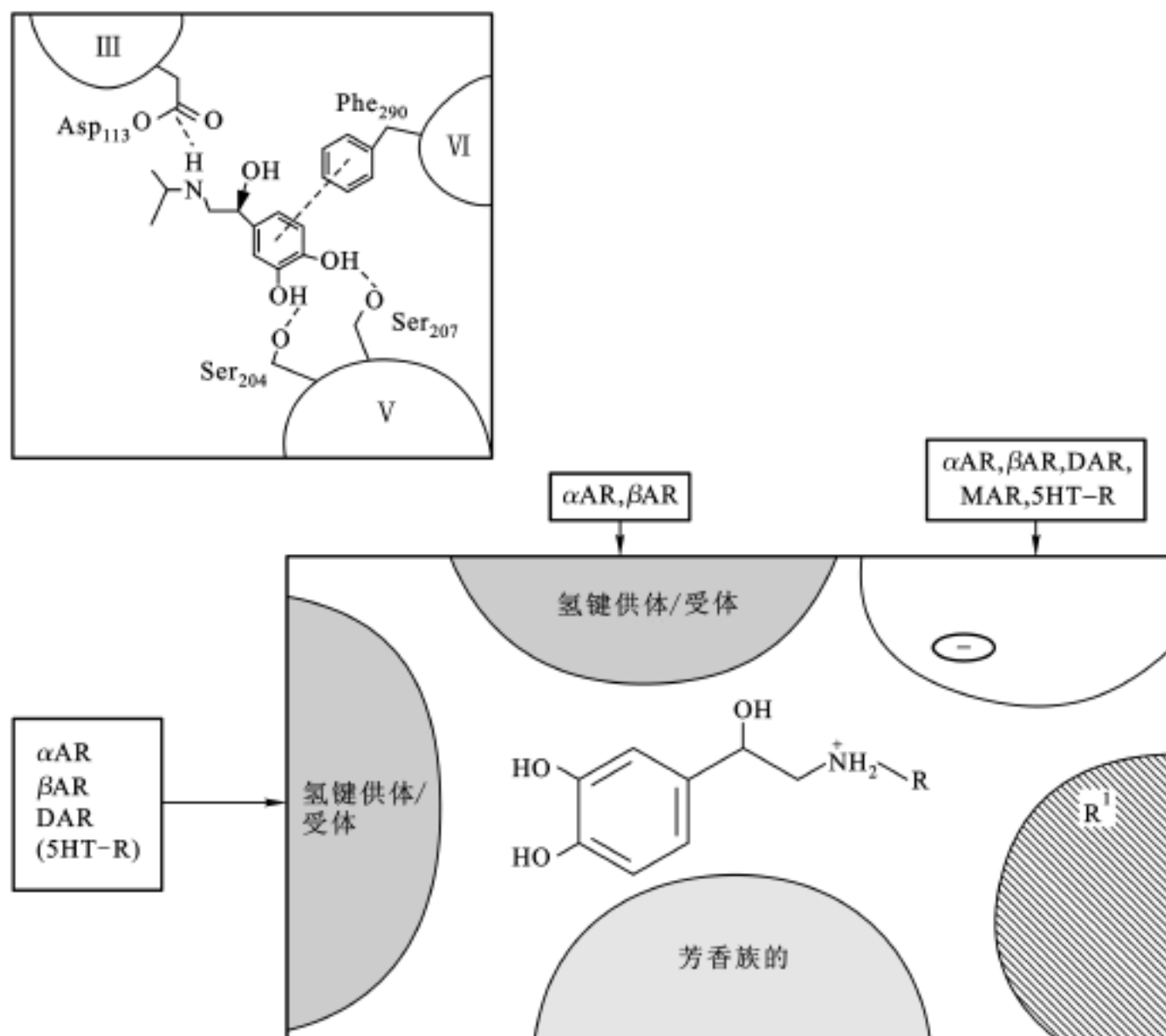


图3 - 肾上腺素受体的儿茶酚胺结合位点的药效基团图示。图示插入到受体跨膜螺旋结合位点中的儿茶酚胺配体。每个大的半圆代表一个受体的跨膜螺旋,其上的标注代表相互作用的结合类型。预期与特异性配体具有相似作用的其他 GPCRs 被标注于每个螺旋旁边的方框里。AR, - 肾上腺素受体; AR, - 肾上腺素受体; DAR, 多巴胺受体; MAR, 毒蕈碱乙酰胆碱受体; 5HT-R, 5-羟色胺受体。内插图内容: - 肾上腺素受体的配体结合位点与激动剂异丙肾上腺素结合的主要作用模型(详见正文)。

为转导素(transducin, G_i)的G蛋白三聚体结合,使之活化。活化的转导素亚基进一步激活其效应酶——cGMP磷酸二酯酶,该酶可以水解GMP,从而降低细胞内的cGMP水平,关闭cGMP控制的膜 Na^+ 通道,使质膜极化,并降低神经递质从突触区域释放的速度;这一系列胞内事件使神经元从神经递质的抑制中得以释放和兴奋。类似的G蛋白偶联的信号转导途径,也会发生在肾上腺素受体,该受体可结合内源的茶酚胺、肾上腺素和去甲肾上腺素,也可以结合大量人工合成的激动剂和拮抗剂。-肾上腺素受体(包括它的 1 、 2 和 3 亚型)与其特异性激动剂的结合可激活刺激型G蛋白(G_s),从而激活其效应因子腺苷酸环化酶;这种酶导致环腺苷酸(cAMP)的形成,是胞外信号的主要胞内媒介之一(图4)(参照3.1节)。

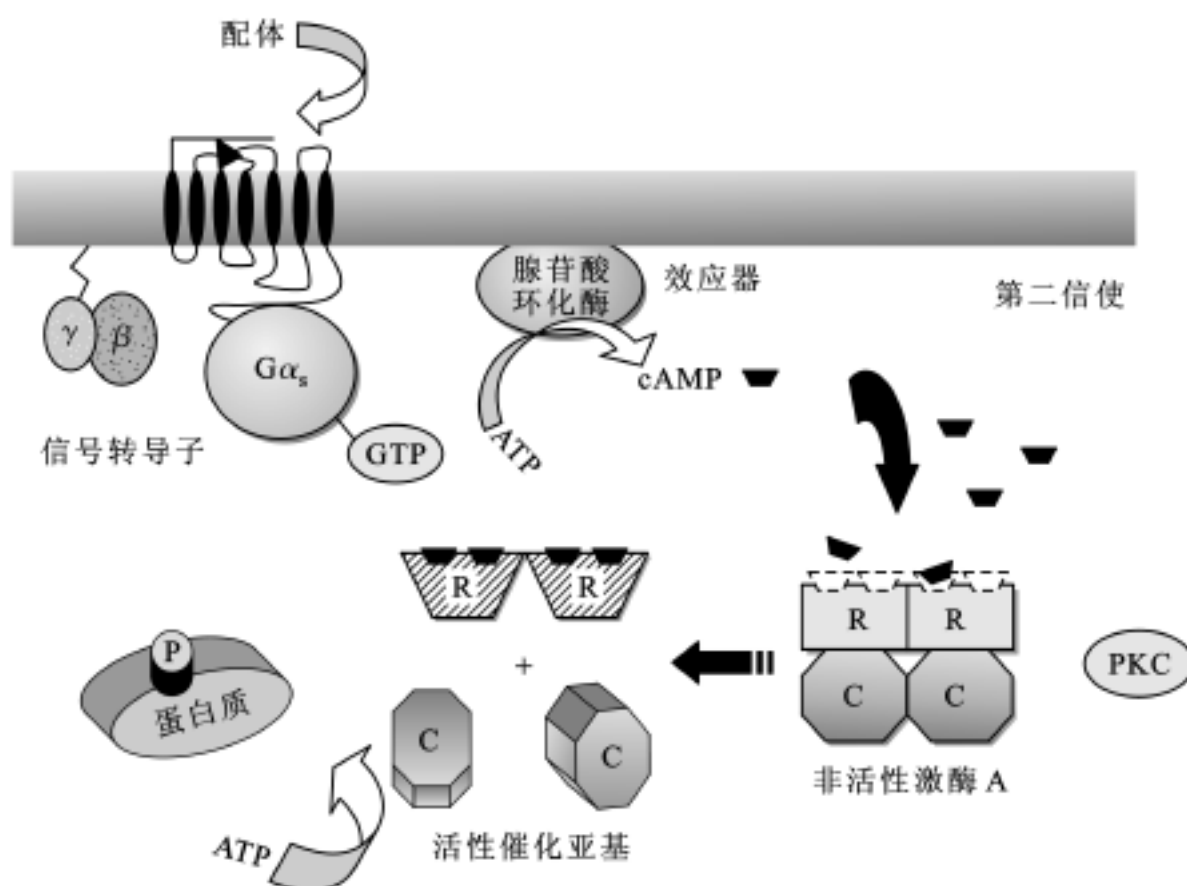


图4 由 G_s 途径介导的信号转导。在配体诱导的受体活化后,处于活化(与 GTP 结合)状态的 G_s 亚基激活了效应酶腺苷酸环化酶并产生第二信使 cAMP,这导致了蛋白激酶A(PKA)的活化以及磷酸化级联放大反应的开始。R,调节亚基;C,催化亚基。

GPCRs 含有不同数目的半胱氨酸(Cys)残基。位于 N 端和胞外环(特别是第一和第二个胞外环)的保守 Cys 残基可以形成二硫键从而稳定功能蛋白的结构(图 1)。事实表明,替换位于₂-肾上腺素受体(Cys¹⁰⁶和 Cys¹⁸⁴)或视紫红质(Cys¹¹⁰和 Cys¹⁸⁷)第一和第二个胞外环的任意一个 Cys 残基都将破坏蛋白质三级结构的稳定性并改变受体的结合特性。对于一些受体而言,配体结合的主要决定簇位于大的胞外 N 端区域(参照 2.2 节),例如钙感应受体、代谢型谷氨酸受体以及糖蛋白激素受体,位于胞外区的多个保守 Cys 残基能参与形成该区域的结构使之成为受体的结合穴,用来结合小分子配体如谷氨酸或 Ca²⁺,或使受体通过胞外的几个不连续区域识别和作用于复杂的配体,如 FSH 或 LH。

大多数 GPCRs 在 C 端的近膜部位有一个或两个 Cys 残基。这些残基非常重要,因为它们容易被棕榈酰化,即 C₁₆ 脂肪酸棕榈酸盐的可逆性硫酯化,从而可提供一个锚定点以形成第四个胞内环(图 1)。据记载许多 GPCR 都被棕榈酰化。这些受体包括视紫红质(事实上,它是第一个被验证为由棕榈酰化修饰的 G 蛋白偶联受体)、₂-和_{2A}-肾上腺素受体、D₁-多巴胺能和 5HT_{1B}-血清素能受体,以及 LH/绒毛膜促性腺激素(CG)受体。所有这些受体在其 C 端的近膜区普遍都有一或两个 Cys 残基。尽管发生共价 S-棕榈酰化的共有序列尚未确定,基于早期的棕榈酰化受体的一级结构,有人提出该共有序列大致为 F/Y(X)_{n1}B(X)_{n2}C^p... (其中 B 代表一个疏水残基,n1、n2 可能是在 0 到 4 之间变动的残基数,C^p 是棕榈酰化的半胱氨酸)。用₂-和_{2A}-肾上腺素受体以及多巴胺-D₁受体证实,激动剂可以调节的受体棕榈酰化;这表明特定信号分子激活受体可通过提高去棕榈酰化的速度,从而影响受体上棕榈酸基团的更新率。对受体棕榈酰化的生理学意义尚未完全了解,然而研究显示,妨碍₂-肾上腺素受体突变促使受体功能的解

联,结果导致 G 蛋白活性的丧失。棕榈酰化能够增加蛋白的疏水性,有利于受体分子在胞膜上的再分布。由于阻止 β_2 -肾上腺素受体的棕榈酰化伴随着依赖于蛋白激酶A(PKA)的受体磷酸化的增加,对于那些棕榈酰化 Cys 残基附近带有磷酸化位点的受体,棕榈酰化、磷酸化和受体的脱敏作用间具有密切的联系(见 2.4.2 节)。虽然也在 μ 鸦片受体的实验中观察到棕榈酰化 Cys 的突变引起 G 蛋白解联,但在诸如视紫红质、 α_A -肾上腺素受体、M2-毒蕈碱受体和 LH/CG 等其他受体中,棕榈酰化的去除并不影响 G 蛋白及效应器的活性。尽管如此,G 蛋白偶联受体亚家族中普遍存在着高度保守的易于被棕榈酰化的 Cys 残基,突出地表明了翻译后修饰对于这些受体功能的重要性。

在大多数 GPCRs 中发现的另一种翻译后修饰是受体上都存在着一个或多个 N-糖基化的共有序列(Asn-Xaa-Ser/Thr)。N-连接的寡糖链通常位于受体分子的 N 端附近,虽然某些受体中预测的糖基化位点也可能位于第一和第二个胞外环。对于一些受体(例如, β -肾上腺素受体和视紫红质),通过抑制糖基化或定点诱变来阻止受体的糖基化均会导致细胞表面受体的表达减少,而受体的结合或功能活性并没有显著的变化。在另外一些受体(例如,GnRH 受体)上,额外的糖基化可以加强细胞表面受体的表达水平。另一方面,尽管 FSH 受体的糖基化并不直接参与受体和激素的结合,但必须有至少一个 N-连接的糖基化位点才能保证受体正确的折叠、膜上的表达以及功能的行使。与之相反,阻碍 LH/CG 受体的糖基化不会显著影响其在细胞表面上的表达和结合能力。由此可见,受体的 N-糖基糖类(碳水化合物)侧链与其配体之间的作用是彼此独立的,对某些 GPCRs 而言,糖基化对于受体的正确运输具有重要作用。一些 GPCRs 中,连接在 N 端区域的寡糖残基会呈现类型上的不均一性或多变性。目前还不清楚这种不均一性对于受体功能和/或表达的影响。

同一亚型中不同受体可能是由各异的 mRNA 剪接产生的。并非所有受体 mRNA 的不同剪接都表达为受体蛋白,但当这种情况出现时,该受体的同型异构体在其功能特性上可能相同或不同。例如,人类 β_1 -肾上腺素受体的不同剪接产生了三种异构体,这些异构体的 C 端不同,但在中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中表达时功能参数方面并无差异。而在其他个案中,受体的不同结构可能会显著改变与配体的结合或 G 蛋白的激活。例如,前列腺素 E 型 EP₃ 受体基因经不同的 mRNA 剪接可产生至少四种异构体,它们虽然仅在 C 端序列上不同,但其功能却有很大区别。其中,EP_{3A} 与 G 蛋白家族的 G_{i/o} 偶联;EP_{3B} 和 EP_{3C} 与 G_s 偶联;EP_{3D} 更易于和 G_{i/o}、G_s 和 G_{q/11} 类 G 蛋白偶联。这些不同的变体对激动剂诱导的脱敏能力也有不同。所以,受体异构体的多样性会影响其受体-G 蛋白系统应答的特异性、灵敏性和强度。

2.2. 配体结合区域

每个受体与其配体结合的区域各异,其结构取决于其所属的 G 蛋白偶联受体亚家族以及配体的大小和化学结构。小分子配体(如生物胺和小肽类)的受体结合其配体的特点是通过一个“口袋”,这个“口袋”是由位于受体中部和胞外第三个疏水跨膜螺旋上的高度保守的氨基酸残基组成(图 2)。另一方面,在钙感应受体和代谢型谷氨酸受体中,构成其配体结合区的主要决定基位于 N 端。对于较大的配体,诸如中等大小和大的肽段以及复杂糖蛋白类等配体,其结合位点通常位于胞外和跨膜结构域之间,或者仅位于胞外的 N 端。事实上,结合大配体的受体通常都具有较长的 N 端。例如,甲状旁腺激素/降钙素亚家族的受体都有大约 100 个残基的胞外 N 端,

其所包含的区域对于配体的结合十分关键。LH/CG 和 FSH 受体都具有较长的 N 端区域, 分别由 338 和 349 个氨基酸残基构成, 即使表达的受体缺少跨膜区域, 或者连接到其他 G 蛋白受体的跨膜区和 C 端的嵌合型受体, 仍会对其原来配体呈现高度的亲和性和特异性。

视紫红质 / β -肾上腺素受体家族结合其小分子配体(如视黄醛和生物胺)的决定簇已被深入地研究。嵌合受体的构建、特定氨基酸残基的替换(定点突变)以及配体的亲和标记等一系列实验, 都已证明这类受体中单一的跨膜区域不能作为配体结合的主要位点。视紫红质结合视黄醛的位点埋藏在受体蛋白的核心, 与之相似, β_2 -和 β_1 -肾上腺素受体中, 其结合儿茶酚胺的“口袋”是由位于几个疏水跨膜区(TM-2 到 -7)的多个位点共同形成的(图 2)。研究表明, 位于 β_2 -肾上腺素受体 TM-5 上的两个特殊残基(Ser^{204} 和 Ser^{207})(两者在儿茶酚胺受体中都是高度保守的)是受体结合激动剂所必需的, 而拮抗剂(非儿茶酚)的结合不需要它们, 这就表明激动剂的儿茶酚羟基基团与两个 Ser 残基的侧链间形成了氢键。该类受体中另外一个重要的结合决定簇是位于 TM-6 的 Phe^{290} 残基; 当激动剂儿茶酚羟基和位于 TM-5 的两个 Ser 残基的侧链间形成氢键时, 含有儿茶酚的芳香环也与 TM-6 中的 Phe^{290} 侧链发生相互作用(图 3)。对 β -肾上腺素受体跨膜区域中带负电荷的残基进行系统性诱变, 揭示了位于 TM-3 的 Asp^{113} 可以起到激动剂和拮抗剂中碱性胺的反离子作用, 该位点恰好与视紫红质 TM-3 的 Glu^{113} 残基相对应。配体和位于 TM-5 和 TM-6 的残基间相互作用对于受体的结合和激活是十分重要的, 相比之下, TM-3 的离子相互作用虽然也是配体和受体蛋白间结合能量的一个重要来源, 但它对于受体的激活却不是必需的。对其他一些生物胺受体(如多巴胺、 β_2 -肾上腺素、毒蕈碱、5-羟色胺和组胺受体)的诱变分析已有力地证明了这些关键氨基酸的位置在配体结合和受体激活过程中的重要性, 当然因配体的化学结构的不同, 某些残基会与预期的有所偏差。综上所述, 小分子配体(例如, 生物胺)和它们相应受体的结合虽然包含了几个跨膜结构域间复杂的相互作用, 但位于 TM-5 和 TM-6 的关键残基对形成配体嵌入的“口袋”才是十分重要的, 这些残基侧链的特殊化学性质决定了激动剂识别的特异性。在诱变、氨基酸替换、医学化学和分子模型相结合的基础上, 根据受体跨膜结构域特异性氨基酸残基以及配体特殊的化学结构, 我们可以构建出药效基团图谱并可由此推断出生物胺和受体跨膜结构域特异性的相互作用(图 3)。

与上述阳离子神经递质受体不同, 结合小肽类配体的 G 蛋白偶联受体其配体结合位点还有待于确定。将该类受体中对应于单胺结合的跨膜区(参照前文)的残基诱变并不完全影响肽类配体的结合。另一方面, 胞外区域的突变却会导致肽类配体结合的显著下降。因此, 肽类配体的结合可能需要更广阔的表面区域, 包括受体的胞外区或跨膜区, 或两者兼有。例如, 促甲状腺素释放激素的结合位于受体的跨膜区域内, 包括 TM-3(Tyr^{106} , Asn^{110}), TM-6(Arg^{283}) 和 TM-7(Arg^{306}) 等一些特定的残基。又如, 十肽 GnRH 的结合除了需要靠近螺旋 2 和螺旋 7 外(视紫红质 / β -肾上腺素受体家族的普遍特性), 还需要十肽的 Arg^8 和受体第三个胞外环的 Glu^{301} 的羧酸侧链之间的离子间相互作用。再一个例子是速激肽受体, 对结合 P 底物的 NK_1 受体进行定点诱变表明, 位于第一个胞外片段的三个残基(Asn^{23} , Gln^{24} , 和 Phe^{25}) 和位于第二个胞外片段的两个残基(Asp^{96} 和 His^{108}) 对于配体的结合是必不可少的; 另外几个位于该受体第二和第七个跨膜区域的残基(TM-2 的 Asn^{85} , Asn^{89} , Tyr^{92} 和 Asn^{96} 及 TM-7 的 Tyr^{287}) 对于受体对其配体的亲和性也是十分重要的。事实上, 经预测位于 TM-2 的这些残基

都在该螺旋区域的同一侧,因而它们的侧链可能形成了一个伸向配体结合位点的氢键层。在其他的肽类结合受体(例如,血管紧张肽、加压素、催产素和神经肽 Y 受体)中,配体也会结合到位于第一个胞外环和几个跨膜区域(TM - 2 到 - 7)的决定簇上,突出了跨膜区域对于 GPCRs 结合其肽类配体的重要性。在多数情况下,与拮抗剂有较高的亲和力的位点未必与结合那些天然的配体的位点一致。

对于其他的一些相对较大的肽类配体和糖蛋白分子来说,受体的 N 端对于结合其相应配体的亲和力起主导作用。在分泌素/VIP 受体亚家族中,受体 N 端区域的保守序列充分表明了该区域在介导受体—配体间相互作用中所起的作用。例如,甲状旁腺素和分泌素受体的 N 端胞外区域在很大程度上决定了对这些激素的亲合性。不过,有些配体也可能同其他胞外区域相互作用。尽管分泌素受体 N 端的前 10 个残基对于配体的结合很关键,但其他的如位于第一个胞外环 C 端以及位于第二个环的 N 端也为配体的结合提供了关键的决定簇。其他一些受体如白介素 - 8 受体、C5a 受体、糖蛋白激素(LH/CH, FSH 和促甲状腺激素[TSH])受体以及凝血酶受体等,它们的 N 端区域对配体的结合起着关键作用。糖蛋白受体较大的胞外区域(长度为 300 ~ 400 氨基酸),可以和相对分子质量为 $28 \times 10^3 \sim 38 \times 10^3$ 的复合配体结合。这些受体的胞外区有很高的氨基酸序列同源性(30% ~ 50%),这些不连续的片段贯穿于整个胞外区域,构成其配体的结合位点并决定着其结合的特异性。有趣的是,促性腺激素受体的胞外区域有多个($n = 14$)富含 Leu 的重复片段,铸成配体结合的高亲和性和特异性。当然其他一些位点对于这些复杂配体的结合也十分重要,如位于第一个胞外环、第二个跨膜区域和第三个胞外连接环的位点。显然,这些位点对于激活和灭活特异的跨膜转导子具有关键作用,这些转导子会导致不同的胞内信号的产生。此外,这些特殊配体的受体有高度的可塑性,从而使受体针对各种不同分子结构的配体进行相应的构象改变;这种改变决定了受体与不同的 G 蛋白偶联。最后,凝血酶受体在其 N 端具有配体结合和受体活化的独特机制,即受体的胞外 N 端包含一个配体特异性的阴离子结合位点和一个特异性蛋白水解酶底物切割位点;凝血酶通过对其受体的切割而暴露,该受体便被其结合的配体不可逆地激活。

2.3. G 蛋白偶联区域

G 蛋白偶联受体特异性地结合 G 蛋白,后者促使受体诱导下游效应器的激活。激动剂结合 G 蛋白偶联受体所激活的第二信使途径基本上取决于 G 蛋白的类型,或者是每个特殊受体所偶联的蛋白类型。从这些受体的拓扑学结构及其同大量不同的 G 蛋白(已经鉴定了至少 17 种基因编码四个主要类型及其大量相关亚型的 G [参照 3.1 节])偶联及相互作用来看,不难预料受体上与 G 蛋白偶联的区域是位于胞内的不同序列。事实上,当特定的配体结合其受体时,对细胞的刺激信号就被由跨膜的螺旋部位递送到胞质的一侧。这些胞内区域,尤其是最靠近质膜的区域、穿膜螺旋的胞内一端的某特定区域,以及 C 端邻近膜的部位,对于受体与 G 蛋白间的相互作用十分重要(图 1)。

在各种各样的 G 蛋白偶联受体家族中,某些类型受体及其相应的亚型会对某种类型的 G 蛋白(G_s 、 G_i/G_o 、 G_q 或 G_{12})有特殊的取向性和特异性。例如,毒蕈碱类受体中的 M2 和 M4 受体优先与对百日咳毒素敏感的 G_i/G_o 类的 G 蛋白偶联,而 M1、M3 和 M6 受体主要激活 G_q/G_{11} 类的百日咳毒素非敏感性 G 蛋白。不同亚类的血清素(5 - 羟色氨[5 - HT])的受体(5 - HT₁ 到

5-HT₇) 与其相应的亚型(例如, 5-HT_{1A} 到 5-HT_{1B} 等) 也有各自特殊的取向: 5-HT₁ 受体与 G_i/G_o 蛋白优先结合, 而 5-HT₂、5-HT₄、5-HT₆ 和 5-HT₇ 亚型分别和 G_q/G₁₁ 及 G_s 类的蛋白偶联。在代谢型谷氨酸受体(mGluR) 家族中, mGluR₁ (包括它的不同剪接型 mGluR₁、mGluR₁ 和 mGluR_{1C}) 和 mGluR₅ 两类型最可能和 G_q/G₁₁ 类 G 蛋白介导的效应有关, 而 mGluR₂、mGluR₃、mGluR₄ 和 mGluR₆ 类则更倾向于 G_i/G_o 类。更为复杂的是, 一个特定家族中的某受体可能会对某类 G 蛋白中的某一个 G 蛋白特异性极强, 例如, C5A 受体优先与 G_q 类中的 G₁₆ 结合。最后, 有些受体可以和不同类型的 G 蛋白结合。如糖蛋白激素(LH/CG, TSH 和 FSH) 受体可分别通过 G_s 和 G_q 激活(虽然是不同程度的) 其对应的 cAMP 和一磷酸肌醇途径; 更有甚者, FSH 受体可显然与三个不同的 G 蛋白(G_s、G_{q/11} 和 G_i) 相偶联。可见这几个受体的信号传递会是极度混乱的。

众所周知, G 蛋白偶联受体的第二和第三个胞外环以及 C 端的近膜区域对于 G 蛋白的偶联和特异性密切相关。在视紫红质中, 第二个和第三个胞内环以及由 C 端近膜部分的 Cys 残基棕榈酰化形成的第四个环, 都参与受体和 G_i 间的相互作用, 这表明位于几个胞内区域的决定簇对于受体和 G 蛋白间的相互作用至关重要。在毒蕈碱和儿茶酚胺受体(也可推广到其他生物胺和肽激素的受体) 中, 第三个胞内环的 N 和 C 端区域是 G 蛋白结合和激活的关键决定因素。具体到 β_2 -AR(和 G_s 蛋白偶联), 删除该受体中第三个胞内环 N 端(222 ~229 残基) 和 C 端(258 ~270 残基) 的部分, 以及构建嵌合的 β_1/β_2 -肾上腺素受体和突变的 β_2 -肾上腺素受体等研究均表明, 这些特定的区域对于 β_2 -肾上腺素受体介导的腺苷酸环化酶的激活是必需的。明显地, 对于 G 蛋白偶联的特异性而言, β_2 -AR 的第三个胞内环的 C 端区域比该环的 N 端更重要, 当用 β_2 -AR(和 G_q/G₁₁ 偶联) 相应的氨基酸残基替换 N 端的 216 ~237 的残基并不影响 β_2 -AR 和 G_s 的偶联, 而替换了 C 端的 263 ~274 残基后, 受体与 G_s 蛋白偶联能力受到严重的损害。但是另一方面研究证明, 位于 β_{1B} 受体第三个胞内环的 N 端有一个由 27 个氨基酸组成的限制性区域, 该区域在决定受体与 G_q/G₁₁ 偶联的选择性上起着主要的作用。所以, 在所有这些受体中, 位于第三个胞内环的 C 端和 N 端的一些特殊的氨基酸残基, 以及这些区域所构成的二级结构(近跨膜区亲水脂螺旋的延伸), 决定了激活某一类型 G 蛋白的特异性、选择性和有效性。

对几种 G 蛋白偶联受体的研究还表明, 受体的第二个胞内环在 G 蛋白的偶联和特异性中也是很重要的。必须强调的是, 这个环的氨基酸序列在 G 蛋白偶联受体超家族中具有极高的保守性, 替换环中部分高度保守的残基会严重影响其与 G 蛋白的偶联。研究表明, 第二个胞内环的意义在于维持受体与 G 蛋白结合的构型, 从而保证 β_2 -AR 和 G_s 间正常的相互作用。另一方面, 用 β_1 -肾上腺素受体的第三个胞内环替换 β_2 受体上的相应环, 所得到的 β_{1B}/β_2 -AR 嵌合受体既可以激活 G_q/G₁₁, 也可以激活 G_s 途径; 类似地, 将通常与 G_i 类蛋白偶联的 M2-毒蕈碱受体的第三个胞内环以 β_2 -AR 相应的环来取代, 所产生的嵌合受体除了能与 G_s 偶联, 仍然保持与 G_i 偶联的能力。因此, 受体中决定 G 蛋白偶联特异性的区域可能位于第三个胞内环以外的区域, 很有可能在第二个胞内环。其他证据也充分证明了第二个胞内环与 G 蛋白的偶联和选择性相关。例如 M1-毒蕈碱受体的突变分析显示, 位于第二个胞内环起始部位的高度保守的 Asp 残基对于 G 蛋白偶联效率非常重要。另一研究也证明了位于 M2-和 M4-毒蕈碱受体第二个胞内环 C 端区域参与了 G_i 偶联的选择和 G_i 的激活。上述这些受体和某些肾上腺素受体(例如,