

鸟苷酸结合蛋白信号转导的分子机制

周 宝 宏

(同济医科大学病理生理学教研室, 武汉)

提 要

鸟苷酸结合蛋白, 具有信号转导作用, 它涉及到第二信使的控制、细胞生长的调节、离子通道的开关、嗅、视觉和其它信号转导系统等多种功能。本文简述 G 蛋白的类型及其信号转导的分子机制。

鸟苷酸结合蛋白 (G 蛋白), 亦称为鸟苷酸调节蛋白 (N 蛋白), 其基本作用是将受体和效应分子偶联起来。受体及起到类似功能的分子被称为信号检测元件 (signal detector element), 效应分子被称为效应元件 (effector element)。G 蛋白大致有以下几种, 其基本特征如表 1 所示。

1. 腺苷环化酶系统 G_s 、 G_i (分为 G_i' 和 G_i'')、2. 磷酸肌醇系统: G_p 、 $G_r(?)$ 、3. 视觉系统: G_t 、4. 胰岛素系统: G_{ins} 、5. 细胞分泌系统: G_c 、6. 离子通道系统: G_k 、 G_o 、 G_{ca} 、7. 其它系统: ras 蛋白家族、管蛋白 (tubulin)、EF-Tu、 G_c 、 G_{ho}

一、G 蛋白信号转导的分子机制

(一) G 蛋白信号转导机制的一般模型

如图 1 所示^[1], 1 到 2 步: G 蛋白 $\alpha\beta\gamma$ 三聚体与受体反应, 提高受体对激动剂的亲和力 (R 为低亲和力状态, R^* 为高亲和力状态)。2 到 3 步: 激动剂与 R^* 结合, 诱导 α 亚基构象变

化, 促进 GDP 与 GTP 的交换, 此步需 Mg^{2+} 。3 到 4 步: GTP 结合导致 G 蛋白激活, $\beta\gamma$ 与 α 亚基分开, α 亚基与膜上效应元件的胞浆部分结合, α 亚基在胞液中亦有效应元件, 由于 $\beta\gamma$ 亦可作用于相应的效应元件, 因而提出双效应元件模型。此时 R^* 又回到 R 状态。4 到 1 步: α^* 有 GTP 酶活性, 水解 GTP, 则 G 蛋白失活,

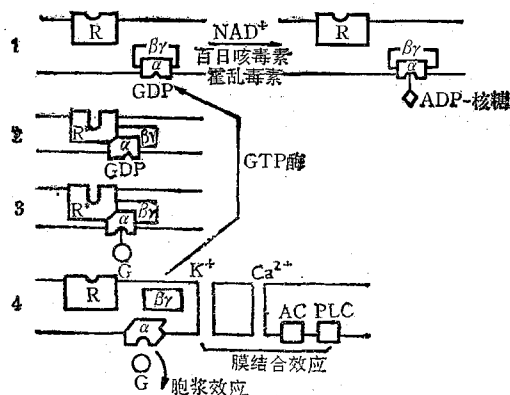


图 1 G 蛋白作用机理的一般模型

AC——腺苷环化酶; R——受体;
PLC——磷脂酶 C

- 917, 9.
- [8] Mitchel, Y. B. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 917, 324.
- [9] Oswald, B. and Quarfordt, S.: *J. Lipid Res.*, 1987, 28, 798.
- [10] Windler, E. et al.: *J. Lipid Res.*, 1985, 26, 556.
- [11] Gustafson, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 834, 308.
- [12] Fidge, N. H. et al.: *FEBS Lett.*, 1986, 199, 265.

- [13] Graham, J. L. and Oram, J. E.: *Arteriosclerosis*, 1986, 6, 537a.
- [14] Havel, R. J.: *Ann. Rev. Physiol.*, 1986, 48, 119.
- [15] Oram, J. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 2405.
- [16] 梅美珍: 《衡阳医学院学报》, 1987年增刊, 15(4), 29.
- [17] Brinton, E. A. et al.: *Arteriosclerosis*, 1985, 5, 324.
- [18] Bachorik, P. S. et al.: *Arteriosclerosis*, 1985, 5, 142.

[本文于1988年4月25日收到]

表 1 几种 G 蛋白的基本特征

G 蛋白	Mr. (kD)	细菌毒素	主要功能
$G_s \begin{cases} G_{s1} \\ G_{s2} \end{cases}$	$\alpha_{s1}: 46$ $\alpha_{s2}: 44.5$	霍乱毒素(激活 G_s) 同上(同上)	激活 AC
$G_i \begin{cases} G_{i1}' \\ G_{i1}'' \text{ (即 } G_{p'}) \end{cases}$	$\alpha_{i1}: 40.5$ 参见下面	百日咳毒素(抑制 G_i')	抑制 AC
G_o	$\alpha: 39$	百日咳毒素(抑制 G_o)	抑制 Ca^{2+} 流
$G_t \begin{cases} G_{t1} \\ G_{t2} \end{cases}$	$\alpha_{t1}: 40$ $\alpha_{t2}: 40.5$	百日咳毒素和霍乱毒素 同上	激活 cGMP. PDE, 在 ROS 上 同上, 在视锥上
$G_p \begin{cases} G_p \\ G_{p'} \text{ (即 } G_{i1}'') \end{cases}$	— —	对毒素不敏感 百日咳毒素(抑制 $G_{p'}$)	介导肌醇磷酸的代谢 同上
$G_{t?}$			
G_c	—	—	—
G_k	$\alpha_k: 40$	—	刺激 K^+ 通道的开放
G_{ca}	—	—	介导内浆网的 Ca^{2+} 释放
G_e	—	对百日咳毒素不敏感	介导细胞颗粒的分泌
G_{ins}	$\alpha_{ins}: 25$	霍乱毒素(激活 G_{ins}) 百日咳毒素(抑制胰岛素 对 AC 的抑制)	抑制 AC
$G_{\beta\gamma}$	$\beta: 37$ (有报导 β 以 36kD 35kD 两形式出现) $r: 8$	对毒素不敏感 同上	①与受体反应有关 ②在 AC 系统中, 竞争结合 G_s 的 α 亚基 ③介导 K^+ 流 ④ G_s 、 G_i 、 G_o $\beta\gamma$ 亚基相似, G_i 的 $\beta\gamma$ 与其它 $\beta\gamma$ 不同
ras 蛋白家族	~ 21	—	细胞转化和正常调节
EF-Tu	—	—	蛋白合成
管蛋白	—	—	—

注: ? 表示作用不肯定 — 表示目前属空白研究 AC 腺苷环化酶 ROS 视杆细胞外段

表 2 G 蛋白与 AC 的催化亚基 (C) 的结合形式及其活性

复合物	活 性
1. $\beta\alpha_sCa_i\beta\gamma$	无 活 性
2. $\alpha_sCa_i\beta\gamma$ GTP	有
3. $\beta\alpha_sCa_i$ GTP	无
4. $\alpha_sC\alpha_i$ GTP GTP	无(?)
5. $C\alpha_i\beta\gamma$	有 (cyc ⁻ 细胞即无 G_s 的瘤细胞株)
6. $C\alpha_i$ GTP	无 (cyc ⁻ 细胞)

此步需 Mg^{2+} 。 G_i 激活时, 其 2 到 3 步需 Na^+ 和 Mg^{2+} , 而 G_s 、 G_o 激活时, 此步只需 Mg^{2+} 。细菌毒素可使 G 蛋白 ADP-糖基化, 其机理为: 细菌毒素催化 NAD (烟酰胺酰腺嘌呤二核苷酸) 上的 ADP-核糖部分转移到 G 蛋白上的 GTP 结合位点的半胱氨酸残基上, 毒素具有酶样作用, 仅一个毒素分子便可使任何一个细胞上毒素靶分子进行 ADP 糖基化作用。ADP 糖基化激活了 G_s , 而抑制 G_i 的功能。体内同时存在有内源性 ADP-糖基化作用, 是由 G_i 介导的, 此效应需要腺苷存在。G 蛋白与腺苷环化酶 (AC) 的催化亚基 (C) 结合, 其结合方式如表 2 所示。

(二) G蛋白亚基分离机制模型

1. 分离模型

如图2所示,此模型主要基于 G_s 、 G_i 、 G_t 等在 GTP 类似物作用下,形成的 α 亚基·GTP 类似物复合物足以激活效应酶分子的试验结果,这一模型是由 Katada 提出的,其主要内容如下:①AC 的激活:激动剂 (H_s) 与刺激性受体 (R_s) 结合催化 G_s 的 GDP-GTP 交换, G_s

分离为 α_s^{GTP} 和 $\beta\gamma$, α_s^{GTP} 激活 AC 的催化亚基 (C),使 C 发挥功能。然后 GTP 水解, α_s^{GDP} 与 C 分开,重新形成 GDP 结合的三聚体 $\alpha_s^{GDP}\beta\gamma$, $\beta\gamma$ 与 C 竞争结合 α_s 。② AC 的抑制:激动剂 (H_i) 与抑制性受体 (R_i) 结合, G_i 的 GDP 与 GTP 交换, G_i 分离为 α_i^{GTP} 和 $\beta\gamma$, 导致 $\beta\gamma$ 升高,因此 AC 被抑制。

这一模型的特点是:①5种成份 (R_s 、 R_i 、

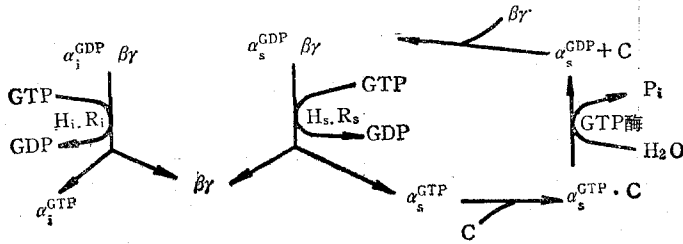


图2 G蛋白亚基分离模型

H: 激动剂; R: 受体; S: 刺激性; i: 抑制性

G_s 、 G_i 和 C) 是相互独立的,在物理结构上并不结合在一起,②酶 C 是自然形式,活化形式为 $\alpha^{GTP} \cdot C$; ③提出了 $\beta\gamma$ 亚基的一种功能;④ G_i 不必形成 G_i-C , 就能抑制 AC。

2. 分离修饰模型

一些试验结果并不符合上一模型。生化研究表明,要分开 G_s 与 C, 必需高浓度盐和非常

子去污剂。进一步研究火鸡红细胞的 AC, 发现 α_s , 甚至 G_s 附着于 C 形成一个非常稳定的复合物,且在光激活视紫红质的整个周期中 G_i 与磷酸二酯酶 (PDE) 结合在一起。因而提出分离修饰模型(图3)^[2],此模型认为: G蛋白的 α 亚基附在催化亚基 (C) 上,酶活性形式是 $\alpha_s^{GTP} \cdot C$, 失活形式为 $\alpha_s^{GDP} \cdot C$, 同样 $\beta\gamma$ 亚基水平决

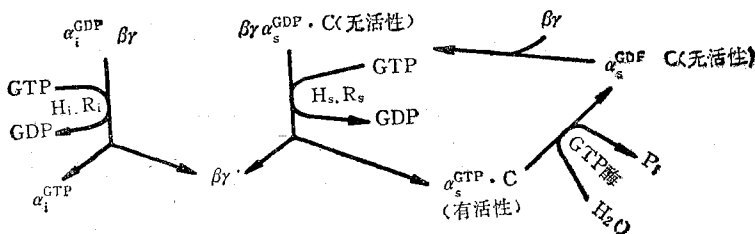


图3 G蛋白亚基分离修饰模型

H: 激动剂 R: 受体 S: 刺激性 i: 抑制性

定 AC 的活性水平。

(三) G蛋白亚基不分离模型

Codina 表明 G_s 和 G_i 是以亚基未分离的 $Gpp^{(NH)}p$ 活性形式存在的, NaF 和 Mg^{2+} 可逆地激活 G 蛋白时无亚基分离^[3]。 G_s 和 G_i 作用于 C 上不同部位。亦有其它证据表明 G 蛋白激活时亚基未分离,因而提出亚基不分离模型(图

4)^[8]。此模型基于下列假说: ① G_s 激活时亚基不分离;② G_s 与 C 有高亲和力, G_s 与 C 一直相连;③ $G_s \cdot C$ 复合物与 R 相互反应,激动剂在 $G_s \cdot C$ 上催化 GTP-GDP 交换;④一个受体能催化多个 $G_s \cdot C$ 的激活;⑤ G_i 直接抑制 C 或同 G_s 结合,以一种非竞争性方式来抑制 C。模型 A: 这是 G_s 、 G_i 与 C 反应模型, G_s 与

G_i 对 C 的作用并不对称, G_i 与 C 产生一个较弱的结合力, G_s 与 C 产生一个较强的结合力。模型 B: G_i 并不与 C 相互反应, 而是 G_i 与 G_s 相互反应, G_i 与 G_s 反应较弱, G_s 与 C 反应较强。A、B 两模型均说明 G_s 、 G_i 对 C 的非竞争性。

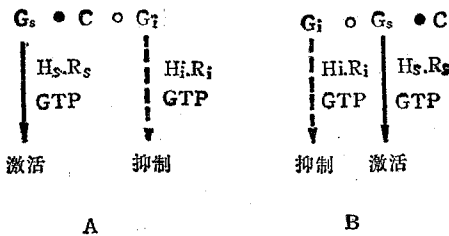


图 4 G 蛋白亚基不分离模型

H: 激动剂 R: 受体 ●表示作用较强
i: 抑制性 S: 刺激性 ○表示作用较弱

(四) G 蛋白 α 亚基的结构和功能模型

1. 鸟苷酸结合区 (binding domain)

已经鉴定了 4 个 α 链 α_s 、 α_0 、 α_{11} 、 α_{12} 的序列, 最近又鉴定了 α_i 序列 (小鼠 α_i 有 355, 酵母 α_i 有 472 个氨基酸)^[4]。Halliday 指出蛋白质合成过程中的延长因子 EF-Tu 的鸟苷酸结合区的三维结构中, 有四个氨基酸序列突 (stretch), 这四个序列突与 ras 蛋白有极高的同源性, 他把这些区分别称为 A、C、E、G 区, 每一个序列突位于 β 片层和 α 螺旋之间的一个螺圈上, 这一螺圈附近的侧链上的特异氨基酸与 GDP 相互反应。GDP 与鸟苷酸结合区的保守天冬氨酸结合, α_{11} 第 196 位上的天冬氨酸。EF-Tu 第 8 位 (C 区) 天冬氨酸通过 Mg^{2+} 与 GDP 上磷酸基形成一个盐桥, 在 EF-Tu 上第 24 位赖氨酸 (A 区) 也与 GDP 磷酸基结合。 α_{11} 第 268 位天冬氨酸与鸟嘌呤环上的氨基结合, EF-Tu 第 135 位天冬酰胺、第 138 位天冬氨酸 (G 区) 与鸟嘌呤环的酮基、氨基结合。GTP 与 GDP 交换时, α_{11} 的二个天冬氨酸间的距离增大, 同样, EF-Tu 第 80 位天冬氨酸与第 135、138 位天冬氨酸的距离增大, 增加了 G 蛋白与效应元件的亲合力。

P^{21} 蛋白 (即 ras 蛋白) 第 12 位甘氨酸 (A

区中央, 在 β 磷酸基结合部位附近相当于 α_{11} 第 38 位甘氨酸) 的突变, 降低 ras 蛋白的 GTP 酶活性, 但增强其转化能力。 P^{21} 蛋白另二个突变是: 在 P^{21} 蛋白上与 EF-Tu 第 24 位赖氨酸相对应的赖氨酸被天冬氨酸替代, 则促进 GTP 与 GDP 的交换速度; 在 P^{21} 蛋白上与 EF-Tu 第 138 位、 α_{11} 第 268 位天冬氨酸相对应的天冬氨酸被丙氨酸代替时, 便降低 P^{21} 蛋白对 GTP、GDP 的亲合力, 但升高了刺激酵母 AC 的能力^[2]。鸟苷酸结合区有一保守 (consensus) 序列。它由三个保守单元 (element): GXXXGK、DXXG、NKXD 构成, 其中 G、K、D、N、X 为氨基酸单个表示符号, G 为甘氨酸, K 为赖氨酸, D 为天冬氨酸, N 为天冬酰胺, X 为其它氨基酸^[6]。第一、二单元之间的间隔为 40—80 或 130—170 个氨基酸, 第二、三单元之间的间隔为 40—80 个氨基酸, 若 NKXD 被 NKXW (W 为色氨酸) 代替, 则 G 蛋白可利用 ITP 和 GTP^[7]。

2. α 链上的其它结合区

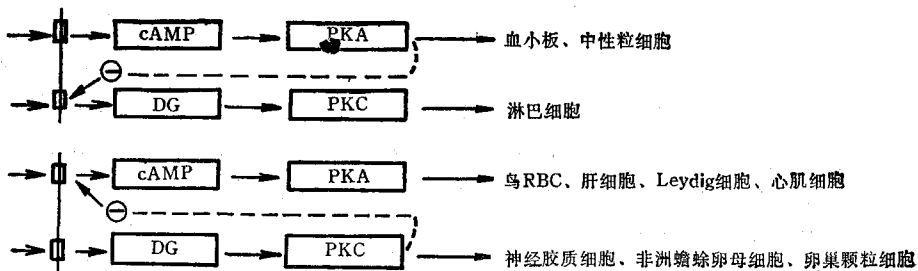
α 链除了鸟苷酸结合区外, 其它部分可分为三区。第 I 区, 包括 GDP 结合区前的 α 链 N 末端残基 (在 α_{11} 上是 1—31 残基), 在所有 α 链上, 这一区是亲水性的, 有一个 α 螺旋结构, 此区涉及到 α 链与 $\beta\gamma$ 相互反应。用胰蛋白酶切掉 α_{11} N 端 18 个残基, 则 $\beta\gamma$ 不能与 α_{11} 结合, 且 α_{11} 失去了 GTP 酶活性, 百日咳毒素也不能催化第 347 位半胱氨酸的 ADP 糖基化, 因为 GTP 水解和 ADP 糖基化需要 $\beta\gamma$ 亚基。但第 I 区不可能含有 $\beta\gamma$ 结合的全部部位, 因为五个 α 链 N 端序列变异性很大, 而这种变异性与 $\beta\gamma$ 的高度保守性不相符合。第 II 区, 此区在 α_{11} 第 50—178 残基之间, 位于鸟苷酸结合区的磷酸基结合处和 Mg^{2+} 结合区之间, 它的二级结构包括兼性 (即含有疏水性和亲水性) α 螺旋和 β 片层, 在所有 α 链中, α_{11} 第 II 区比其它 α 链第 II 区长, EF-Tu 的第 II 区有 41 个氨基酸, p^{21ras} 蛋白第 II 区有 18 个残基。此区含有 α 链与效应元件反应的部位。在 EF-Tu 中, 此区与氨酰 tRNA 反应, P^{21ras} 此区突变, 则 ras 蛋白转化和刺激 AC 的能力消失, 认为 GTP 改

变此区构象,使其刺激效应分子。GTP 与 α 链结合也改变了 α 链与 $\beta\gamma$ 的亲合力,导致 α 与 $\beta\gamma$ 分离, α 链与 $\beta\gamma$ 的部分结合部位亦在此区。第 III 区,这一区包括 α 链远端到鸟苷酸结合部位 (α_{11} 第 271—350 残基之间),此区二级结构为一个高比例 β 片层和 C 末端 25 残基的 α 螺旋。此区,特别是最后 21 个氨基酸是 G 蛋白与信号检测元件反应的部位^[9]。 α_{11} 、 α_{12} 第 III 区与视网膜阻遏蛋白 (arrestin) 的一个序列区具有同源性,因而阻遏蛋白与 G_t 第 III 区竞争结合视紫红质,阻止 G_t 的光激活。另外百日咳毒素使第 III 区的保守半胱氨酸 ADP 糖基化,阻止 G 蛋白与信号检测元件偶联。 α_{11} 和 α_i 第 III 区中与信号检测元件结合的 21 残基有 90% 同源性,光解的视紫红质快速刺激 α_{11} 和 α_i 的 GTP 水解。 α_s 第 III 区与 α_{11} 、 α_i 第 III 区显著不同,因而 G_s 很少与视紫红质反应,而较易与 β 肾上腺素受体反应。

二、G 蛋白介导的信号转导系统的相互调节

现在至少已确定了四个信号转导系统:通过磷酸二酯酶控制 cGMP 的视紫红质系统;调节 AC 的两个分支系统;磷酸肌醇系统。每个系统均有 G 蛋白的介入。由信号转导激活的胞内信号不仅调节多种细胞功能,而且调控信号转导系统的活性状态,这些调控可发生于同一转导系统或不同的转导系统,这些调控与 G 蛋白有关,G 蛋白可通过下列方式调节受体-效应分子偶联:①受体与 G 蛋白反应能力的改变,②G 蛋白结合 GTP 能力的改变,③G 蛋白作为 GTP 酶活性的改变,④G 蛋白 α 亚基与效应分子反应能力的改变,⑤细胞上 G 蛋白数量的改变,⑥细胞上 G 蛋白类型的改变。如在一些细胞中,磷酸肌醇代谢增强了激动剂刺激的 cAMP 的形成,这可能由于蛋白激酶 C

双向控制系统:



单向控制系统:

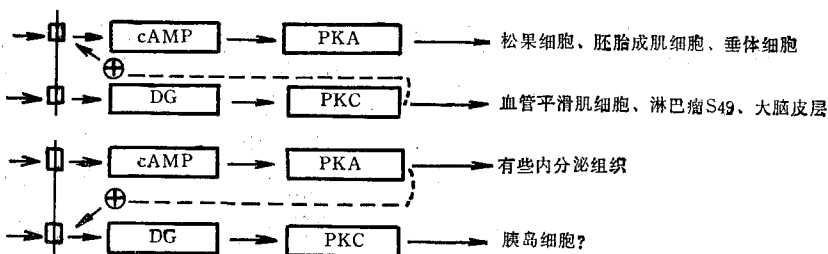


图5 膜 PKA 和 PKC 的相互作用

PKA: cAMP 依赖性蛋白激酶; PKC: 蛋白激酶 C

在双向控制系统中,两类蛋白激酶的调节是相互对抗的,在单向控制系统中,一类蛋白激酶常常促进另一类

(PKC) 使 G_i 磷酸化,而在另一些细胞中,磷酸肌醇代谢产生的 Ca^{2+} 激活磷酸二酯酶,使

cAMP 浓度下降;同样, cAMP 依赖性蛋白激酶即蛋白激酶 A(PKA) 使血小板膜上 G_p 磷

酸化, PKA 与 PKC 的关系如图 5 所示^[8]。许多资料表明, PKC 可作为甘油二酯 (DG, 是 PKC 的内源激活剂) 形成的负反馈调节蛋白, 因为 PKC 可使 G_p 磷酸化^[9]。

有的激动剂, 如胰高血糖素, 有两个受体 GR_1 、 GR_2 , 它们分别与不同的 G 蛋白偶联, GR_1 与 G_p 偶联, GR_2 与 G_s 和 G_i 偶联, GR_1 受体刺激磷酸肌醇代谢产生 DG, DG 使 GR_2 受体脱敏, 可能由于: ① DG 激活 PKC, PKC 使 GR_2 磷酸化或使 G_s 磷酸化, 致 GR_2 或 G_s 脱偶联; ② G_i 磷酸化激活 (与 G_s 磷酸化作用相反) 后, 间接抑制了 GR_2 或 G_s 对 AC 的刺激 (图 6)^[10]。

总之, G 蛋白介导的信号转导途径相互调节机制如下: ① G 蛋白通过 $\beta\gamma$ 亚基进行 G 蛋白之间的交流; ② PKC 使 AC、G 蛋白、受体等磷酸化; ③ 受体激酶使 G 蛋白磷酸化; ④ 受

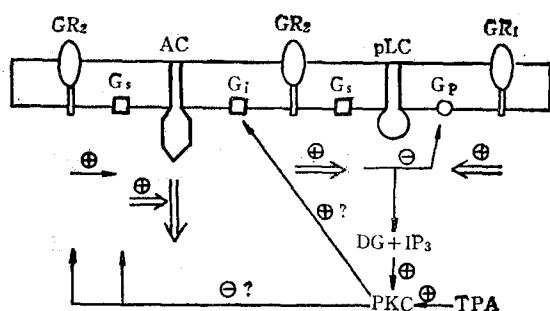


图 6 胰高血糖素的 GR_1 和 GR_2 受体与不同的信号转导系统偶联

TPA: 佛波酯; PKC: 蛋白激酶 C; $\oplus$ 表示刺激;
 $\ominus$ 表示抑制; DG: 甘油二酯; IP_3 : 三磷酸肌醇;
 GR_1 , GR_2 为胰高血糖素受体

体之间如胰岛素和胰岛素样因子间的交叉活性 (图 7)^[11]。G 蛋白还有其它作用。如 G 蛋白参与 IL-2^[12] 和 T 细胞抗原受体^[13,15] 的信号转导。G 蛋白在疾病中亦有应用, 如在 I 型糖尿病中 G_i 活性消失^[14]。

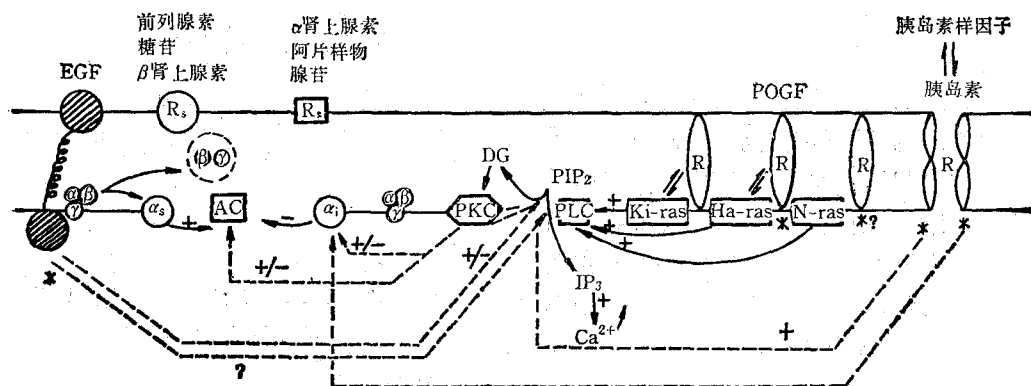


图 7 G 蛋白介导的信号转导途径相互调节

* 为受体酪氨酸激酶, ? : 表示不肯定, R: 受体 AC: 腺苷环化酶, PKC: 蛋白激酶 C, PLC: 磷脂酶 C, DG: 甘油二酯, PIP_2 : 二磷酸磷脂酰肌醇, PDGF: 血小板衍生的生长因子, EGF: 表皮生长因子, IP_3 : 三磷酸肌醇 然而也有资料报道胰岛素受体的酪氨酸激酶不能使 G_i 、 G_o 、 P^{21} 蛋白磷酸化^[12]

参 考 文 献

[1] Dalphin, A. C.: *TINS*, 1987, 10, 53.
[2] Levitzki, A.: *FEBS Lett.*, 1987, 211, 113.
[3] Codina, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 11408.
[4] Nakafuku, M. et al.: *PNAS*, 1987, 84, 2140.
[5] Bourne, H. R. et al.: *Biochem. Soci. Trans.*, 1987, 15, 35.
[6] 周宝宏: 《国外医学-分子生物学分册》, 1987, 9, 282.
[7] Dever, T. E. et al.: *PNAS*, 1987, 84, 1814.
[8] Nishizuka, Y. et al.: *Science*, 1986, 233, 305.

[9] Bauer, S. et al.: *Biochem. Soci. Trans.*, 1987, 15, 24.
[10] Fouslay, M. D. et al.: *Biochem. Soci. Trans.*, 1987, 15, 21.
[11] Pennington, S. R.: *Nature*, 1987, 327, 188.
[12] Francisco, S.: *Nature*, 1987, 326, 833.
[13] Mustelin, T.: *FEBS Lett.*, 1987, 213, 199.
[14] Gawler, D. et al.: *Nature*, 1987, 327, 229.
[15] 周宝宏: 《国外医学-分子生物学分册》, 1988, 10(3), 101.

【本文于1988年4月14日收到】