PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2012, 39(11): ~11
www.pibb.ac.cn

G 蛋白偶联受体家族的发现和结构机理研究
——2012 年诺贝尔化学奖解读

PENG Xiao[1,3] LE Yang[1,3,4] CHENG Zhang[5] 王江云[2)*] 孙金鹏[1,3,4)*]

([1)] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University*;
[2)] 中国科学院生物物理研究所，北京 100101;
[3)] *Key Laboratory for Experimental Teratology of the Ministry of Education*;
[4)] *Shandong Provincial Hospital*; [5)] *Stanford University*)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00515

2012 年 10 月 10 日，2012 年诺贝尔化学奖(The Nobel Prize in Chemistry)在瑞典皇家科学院揭晓，由于在 G 蛋白偶联受体研究领域("for studies of G-protein-coupled receptors")中的重要贡献，诺贝尔奖委员会宣布将诺贝尔化学奖授予两位美国生物化学家：霍华德•休斯医学研究所、杜克大学医学中心的罗伯特•莱夫科维茨(Robert J. Lefkowitz)和斯坦福大学医学院的布莱恩•克比尔卡(Brian K. Kobilka)(图 1). 其中 Lefkowitz(出生于 1943 年)年长 Kobilka(出生于 1955 年)12 岁，后者于 20 世纪 80 年代在 Lefkowitz 实验室做博士后研究，两人长期以来一直保持紧密的联系. 诺贝尔奖委员会首先通知了 Kobilka，而 Lefkowitz 几乎同时接到了诺贝尔奖委员会的电话和 Kobilka 通过 Skype 视频传来的获奖消息.

在过去 40 年的时间里，Lefkowitz 和 Kobilka 等众多优秀科学家通过种种努力，不断丰富着我们对 G 蛋白偶联受体(GPCR)的了解(图 1). G 蛋白偶联受体是人类基因组中最大的膜蛋白家族，约包含 800～1000 个成员，在视觉、嗅觉、味觉以及神经传递等人类各项生理代谢活动过程中发挥着重要的作用. 目前的处方药中，以 G 蛋白偶联受体为药物靶点的药物约占一半以上. 长期以来的研究表明，肾上腺素等可扩散的细胞外激素具有重要作用，介导体内一系列生理、生化和代谢反应，调控血压和心率等. 很多激素不能穿透细胞膜，因此人们开始怀疑这些激素作用在细胞表面的成分上，称为接受物质(receptive substance). 在 20 世纪 60～70 年代以前，人们对细胞是如何感知激素等可扩

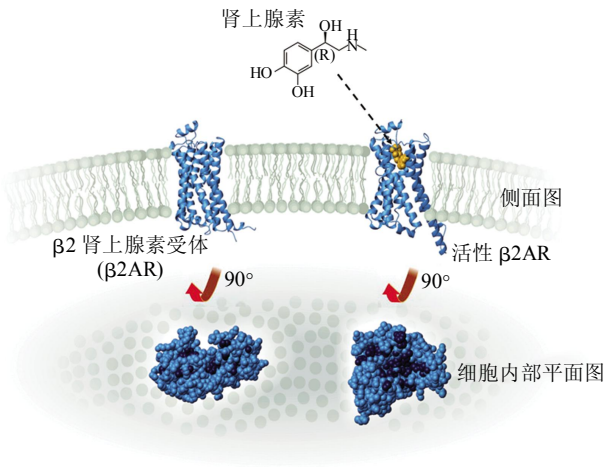

Fig. 1 The structures of β2 adrenergic receptors
(Modified from Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2012)
图 1 β2 肾上腺素受体结构
(改自 Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2012)
左侧未与肾上腺素结合的 β2 肾上腺素受体 β2AR(蓝色)处于未被激活状态，右侧与肾上腺素(黄色)结合的 β2AR(蓝色)构象发生改变，处于活性状态.

* 通讯联系人.
Tel: 010-64852570, E-mail: jwang@ibp.ac.cn
收稿日期：2012-10-22，接受日期：2012-10-23

散化合物的信号以及这些信号是如何传递至细胞内部的机制存在很多争论，许多资深的科学家甚至怀疑细胞表面受体是否真的存在，也有人认为化合物直接作用的对象就是腺苷酸环化酶(AC). 1968～1971 年间，Lefkowitz 采用放射性标记的方法标记了糖皮质激素和肾上腺素，证明了受体独立于腺苷酸环化酶(AC)的存在(图 2a，b)[1–4]. 通过逐步摸索受体分离的方法，Lefkowitz 研究小组纯化了 β2 肾上腺素能受体(β2-adrenergic receptor)，并证明将其放回细胞中后有受体活性，从而最终使所有人都相信了受体的存在[5–8].

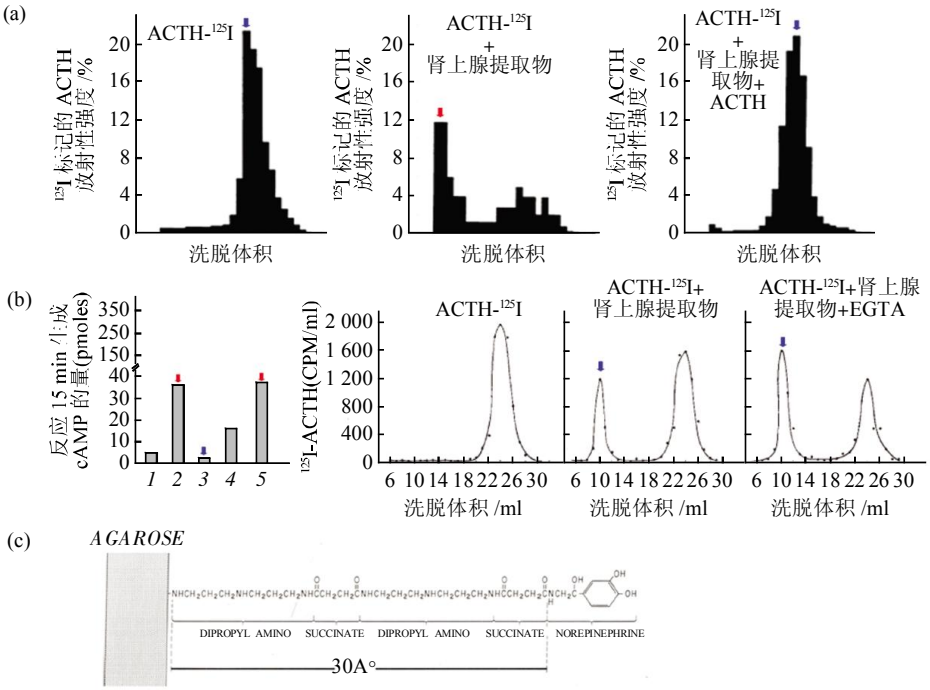

Fig. 2 Discovery of GPCR by radio labeling and the purification of the receptor

图 2 通过放射性标记 G 蛋白偶联受体

(a) ^{125}I 标记的 ACTH 与肾上腺抽提物的结合情况(改自 Lefkowitz, Roth *et al*., 1970)[3]，洗脱体系中仅有 ^{125}I 标记的 ACTH(左图)或为 ^{125}I 标记的 ACTH、未标记的 ACTH 与肾上腺抽提物的混合物时(右图)，放射性强度峰值出现在一半洗脱体积(蓝色箭头所示)；洗脱体系中含有 ^{125}I 标记的 ACTH 与肾上腺抽提物的混合物时(中图)，由于 ^{125}I 标记 ACTH 与受体结合而提前被洗脱下来，因此放射性强度峰值提前(红色箭头所示). (b) 腺苷酸环化酶活性实验(左图)显示金属离子螯合剂 EGTA 添加抑制了细胞内腺苷酸环化酶活性；以及放射性标记的 ACTH 与肾上腺抽提物的结合情况(右图)，该图显示 EGTA 的添加不影响 ^{125}I 标记的 ACTH 与肾上腺抽提物中的蛋白质结合[1]. 1: Control; 2: ACTH; 3: ACTH+EGTA; 4: ACTH+EGTA+0.5 mmol/L Ca^{2+}; 5: ACTH+EGTA+1 mmol/L Ca^{2+}. (c) 亲和层析柱介质的化学结构示意图[5].

20 世纪 80 年代，β2 肾上腺素能受体的蛋白质被成功分离后，Lefkowitz 实验室试图鉴定编码 β2 肾上腺素能受体的基因，在那时 Kobilka 加入了 Lefkowitz 的实验室. Kobilka 成功克隆了编码仓鼠和人类 β2 肾上腺素能受体的基因，并发现 β2 肾上腺素能受体含有 7 个 α 螺旋，该结构与视网膜中负责感应光的视紫质(rhodopsin)的结构相类似，从而第一次将光能感应和激素感应的受体直接联系起来(图 3)[9–10]. Lefkowitz 以及其研究小组认为 β2 肾上腺素能受体和视紫质蛋白同属于一个尚未发现的蛋白质家族，该蛋白质家族以 7 个 α 螺旋为标志，并可能大部分都可偶联 G 蛋白. 这一推断很快得到 Lefkowitz 自己实验室和其他实验室克隆的一系列受体所证实，揭示了包括很多孤儿受体在内的 800～1000 个成员的 GPCR 信号转导超家族，从而改变了早期化学家们只能通过合成与天然荷尔蒙或神经传递素结构相类似的分子来制造 G 蛋白偶联受体药物的局面.

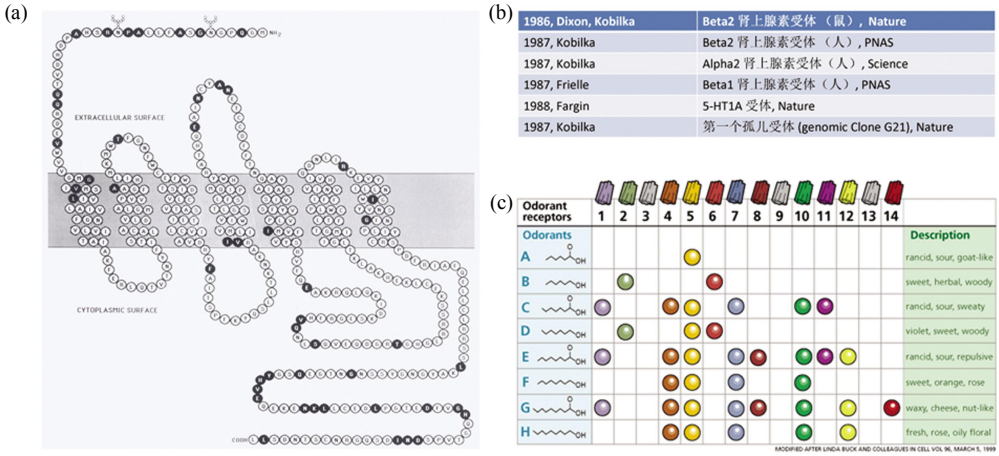

Fig. 3　Cloning of the GPCR

图 3　GPCR 基因的克隆

(a) 根据克隆所得的人类 β2AR 基因序列得到的氨基酸序列以及跨膜区域[10]. (b) 随后 Lefkowitz 实验室克隆的 GPCR. (c) 继而 Axel 和 Linda Buck 克隆的嗅觉受体以及其识别的气味分子(取自 Nobel Poster from the Nobel Committee for Physiology or Medicine).

在纯化和克隆 β2 肾上腺素能受体的同时，Lefkowitz 及其小组成员也对受体工作的原理展开研究．通过同位素标记的配体结合等实验，Lefkowitz 提出配体 - 受体 - 效应器相互作用的三级复合物模型，阐明磷酸化、GRK 和 Arrestin 介导的受体脱敏的机制，并于近年来发现了非 G 蛋白依赖的 Arrestin 介导的信号途径(图 4，5).

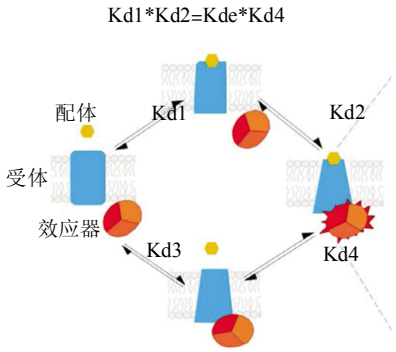

Fig. 4　Ternay complex model of ligand-receptor-effector

(Modified from Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2012)

图 4　配体-受体-效应器相互作用的三级复合物模型

(改自 Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2012)

Kobilka 在创建自己的实验室后，为进一步阐明 GPCR 的工作原理，独立奋斗了 15 年，找到了通过抗体结合和在受体细胞内第三环中插入溶菌酶，从而使大部分低丰度的扩散型配体的 GPCR

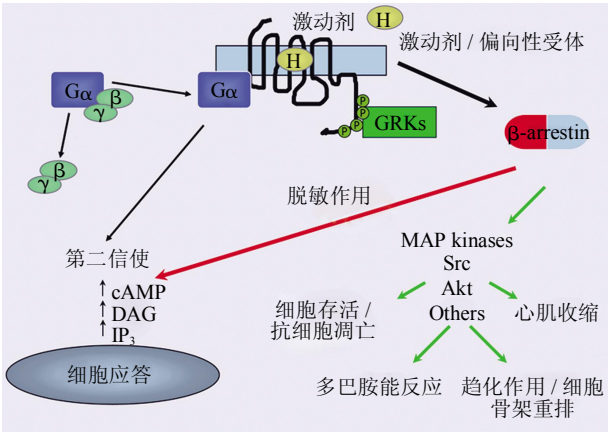

Fig. 5　Traditional signal tranduced by 7TMRs

图 5　GPCR (7 次跨膜受体) 介导的信号转导和脱敏机制

G 蛋白和 Arrestin 两种不同的机制参与 GPCR的信号转导．激动剂与受体结合，激动偶联于受体上的异源三聚体 G 蛋白．活化的 G 蛋白从受体上解离，并进一步激活经典的第二信使(如 cAMP、DAG 和 IP_3 等)通路．受体在活化过程中的构象变化激活 GRK，GRK 催化受体磷酸化进而推动 Arrestin 与受体结合．Arrestin 一方面可终止 G 蛋白信号(图中红色箭头所示)，另一方面也可独立进行信号转导，并行使细胞骨架重排，多巴胺反应等生理功能.

可以结晶的方法[11](图 6)．进而，Kobilka 于 2011 年解析了 β2 肾上腺素能受体与 G 蛋白三聚体复合物的晶体结构，第一次在原子分辨率阐明了 GPCR 参与信号转导的机制(图 7)[12]．Lefkowitz 和 Kobilka 的工作从根本上改变了人类对 GPCR 受体和跨膜信号传递的认识，对现代药物设计的方式有重要影响.

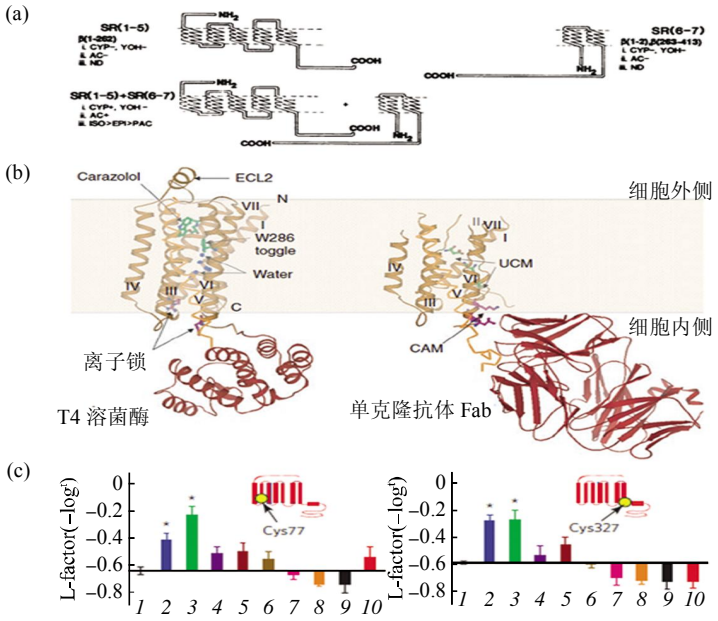

Fig. 6　Crystal Structure of GPCR for diffusive ligands

图 6　扩散型配体的 GPCR 晶体结构解析

(a) 受体分段示意图[13]，单独的 β2AR 1~5 跨膜区域 SR (1~5)或 6~7 跨膜区域 SR (6~7)因缺少 β2AR 活性而无法与特异配体结合．细胞中同时转入 β2AR 1~5 跨膜区域与 6~7 跨膜区域，重组成一个有活性的 β2AR．(b) 非激活状态 β2AR 蛋白结构[14]，左侧显示的是 β2AR-T4 溶菌酶融合蛋白结构，右侧显示的为 β2AR-Fab 复合物晶体结构．(c) 应用质谱的方法发现不同配体作用于 β2AR 后会导致 β2AR 中的 Cys 对 IAA 的反应敏感度不一样，从而揭示多种配体引起 GPCR 的多种构型[15]. *1*: None; *2*: Iso; *3*: Thrx; *4*: Salb; *5*: Salm; *6*: Prop; *7*: Pind; *8*: Caraz; *9*: ICl; *10*: Carv.

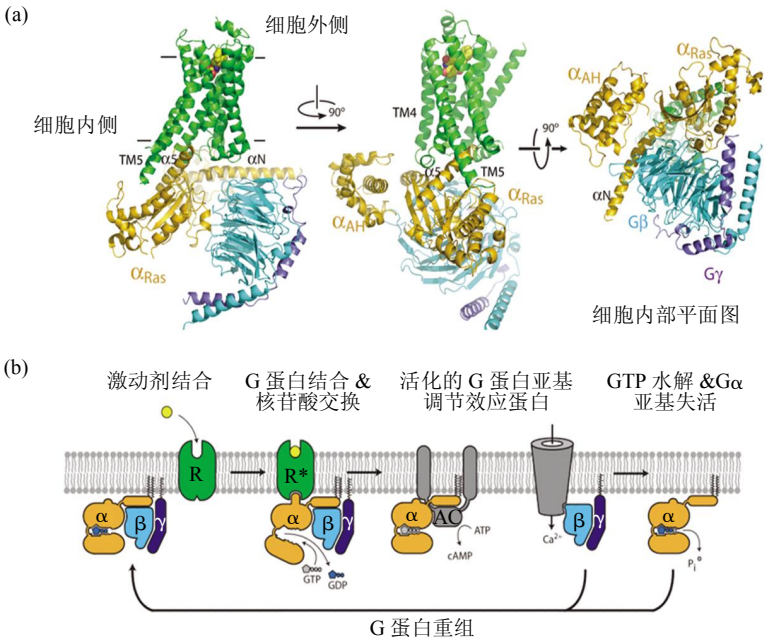

Fig. 7　Structure of the β2AR Gs complex[12]

图 7　β2AR Gs 复合物结构[12]

(a) β2AR 与 G 蛋白复合物结构．(b) β2AR-Gs 蛋白复合物中 G 蛋白循环示意图．G 蛋白聚合过程与 GPCR 与效应分子通过膜结合的异源三聚体(α 亚基、β 亚基、γ 亚基)G 蛋白相偶联．激动剂与受体结合导致受体构象变化，G 蛋白结合至活化的 GPCR(第 5 亲水域氨基末端与第 6 疏水域羧基末端)上．结合后的 G 蛋白发生核苷酸交换(GDP 解离，GTP 结合至该位点)，得以活化．活化的 G 蛋白 α 亚基解离，Gα 激活下游效应分子腺苷酸环化酶(adenylate cyclase)等．随后 GTP 水解，Gα 失活，与 β 亚基、γ 亚基重组为 G 蛋白．

1 标记并分离纯化扩散型配体 (diffusive ligand) 的 G 蛋白偶联受体

在 Lefkowitz 的工作之前，人们在 1870 年就发现了对光敏感的视紫质(rhodopsin)，并在 1933 年由 George Wald 发现了视紫红质，获得了 1967 年的诺贝尔奖，但从没有人把感光系统与体内激素的生理作用联系起来．受体的理论也早在 20 世纪初由 Langley 和 Hill 提出并描述，并在 1920～1970 年这半个世纪得到充分发展，然而受体本身是什么物质依然是一团疑云，充满争论．随着 Sutherland 在 20 世纪 60 年代发现 cAMP 在激素响应中的重要作用，很多人也认为腺苷酸环化酶就是受体，以至于 1971 年 Sutherland 在诺贝尔奖的演讲中，还提到激素也可能就是作用在腺苷酸环化酶(AC)上，这已经是 Lefkowitz 证明受体和腺苷酸环化酶(AC)是分开的物质一年以后了．

Lefkowitz 的科学生涯起源于 20 世纪 60 年代末，作为医生的 Lefkowitz 加入了 NIH 的医生研究实习计划，开始用同位素标记一些激素．1970 年，Lefkowitz 使用放射性 ^{125} 碘(^{125}I)标记促肾上腺皮质激素(ACTH)，发现了与促肾上腺皮质激素具有一定亲和力的受体物质，而具有生物活性的未被 ^{125}I 标记的促肾上腺皮质素可以抑制 ^{125}I 标记的促肾上腺皮质激素与受体的特异结合(图 2a)[3]．根据这些实验结果，Lefkowitz 使用促肾上腺皮质激素受体检测血浆中促肾上腺皮质激素受体的含量，建立了一套快速灵敏检测血浆中具有生物活性肽类激素的新方法[2]．同年，Lefkowitz 关于钙离子对促肾上腺皮质激素的激活作用的研究表明促肾上腺皮质激素受体存在，激素受体的结合与腺苷酸环化酶的激活是两个独立的过程(图 2b)[1]．这些结果表明细胞的表面具有可与细胞外激素结合的受体，但那时依然存在着质疑，怀疑者认为促肾上腺皮质素和去甲肾上腺素所结合的受体很可能是腺苷酸环化酶．

Lefkowitz 随后将他的研究转向至具有重大生理学意义的肾上腺素和去甲肾上腺素，尝试发现肾上腺素受体．1971 年，Lefkowitz 通过使用放射性 ^{3}氢(^{3}H)标记的去甲肾上腺素(norepinephrine)证明，在狗心室心肌组织 8 000 *g* 离心的微粒体(78 000 *g* microsomal fraction)中可能存在肾上腺素的受体(实验表明，与之前促肾上腺皮质激素与受体结合相类似，与去甲肾上腺素相类似的儿茶酚胺类物质可竞争性阻断去甲肾上腺素与受体的结合)[4]．1972 年，Lefkowitz 使用去污剂显著提高了 β2 肾上腺素能受体蛋白的可溶性，并在此基础上首次制作了亲和层析柱，将琼脂糖的侧链上人工加入一个长度为 30-A 的糖链，并通过该链将琼脂糖与去甲肾上腺素偶联(图 2c)[5]．Lefkowitz 等利用该层析柱成功部分纯化获得了 β2 肾上腺素的受体蛋白，从而建立了可广泛应用的纯化扩散型配 体 G 蛋白偶联受体的方法．通过该方法纯化 β2 肾上腺素的受体蛋白纯度提高了约 500～800 倍[5]．

随着实验室不停地继续摸索，1979 年 Lefkowitz 实验室再度改进了 β2 肾上腺素能受体蛋白的纯化方法，他们使用拮抗剂 alprenolol 偶联的琼脂糖作为介质制作亲和层析柱，建立了更加便捷有效的纯化方法，该方法适合大规模纯化受体蛋白[16]．几年后，他们把纯化后的可与肾上腺素结合的细胞表面蛋白导入不响应肾上腺素的细胞后，发现细胞的表现与具有肾上腺素受体的细胞一致[7-8]．这项实验结果使人们真正相信了细胞表面受体的独立存在．

2 肾上腺素受体 (扩散型配体的 GPCR) 的基因克隆

能拿到纯化的肾上腺素受体蛋白，就可以通过测序获得部分蛋白质的序列信息，为克隆肾上腺素受体的基因打开了大门．虽然 1984 年视紫质(rhodopsin)的基因获得了克隆，但没有人将光感受体与可扩散的激素受体相关联起来，而激素受体表达的低丰度为工作带来了很大困难．从 1986 年开始，当时在实验室做助理研究的 Kobilka 加入并领导了这项工作．起始的工作非常困难，用 cDNA 文库反复进行实验却得不到正确克隆．Kobilka 于是大胆提出了使用基因组文库进行克隆．经过了组内热烈的讨论后，Lefkowitz 同意了这一“疯狂”的研究方式．1986 年，Lefkowitz 实验室首次成功克隆了编码仓鼠 β2 肾上腺素能受体蛋白(β2-adrenergic receptor，β2AR)的基因并进行了测序分析[9](图 3a)．对编码基因的序列的分析发现，β2AR 与牛“光受体”视紫质蛋白(Rhodopsin)的氨基酸序列具有显著的相似性，二者都具有 7 次跨膜的区域[9, 17]．Lefkowitz 和 Kobilka 很快推断出 Rhodopsin 和 β2AR 可能属于同一家族，这一家族可能编码很多重要的激素受体．这一工作旋即被毒蕈碱乙酰胆碱受体(muscarinic acethylcholine receptor)的克隆所证实(Numa *et al.*，1986)．基于这

一推论，Lefkowitz 实验室的 Kobilka 等很快成功克隆了编码人类 β2 肾上腺素受体蛋白(β2AR)的 cDNA，编码人类 β1 肾上腺素受体、人类血小板 α2 肾上腺素受体、5- 羟色胺(5HTA1A)受体以及第一个孤儿受体(orphan receptor)等在内的一系列受体的基因(图 3b)[10, 18–19, 20–21]. 工作中得到的信息和技术也帮助了嗅觉受体(odorant receptor)这一超家族的发现和克隆[22]，该项成果荣获 2004 年诺贝尔生理学或医学奖(图 3c).

3 GPCR 工作机制研究

20 世纪 60 年代，Sutherland 发现 cAMP 介导激素引起的细胞响应，于 1971 年获得诺贝尔奖，1986 年 Gilman 分离纯化得到了 G 蛋白，并获得了 1993 年诺贝尔奖，这些都是 GPCR 信号转导的重要机制. 除以上信号机制以外，Lefkowitz 实验室和一些其他实验室也在 GPCR 的工作机制研究中做了重要贡献，包括提出并发展三元复合物模型，阐明受体磷酸化和脱敏机制，以及独立于 G 蛋白的 β - 抑制蛋白(β-arrestin)介导的信号转导系统等.

3.1 三元复合物模型的提出和发展

应用体外蛙红细胞中的 β2 肾上腺素受体模型，Lefkowitz 等观察到 Gpp(NH)p、GTP 以及其他嘌呤核酸在不与受体结合的状态下降低受体的亲和力[23]. 在此基础上，D-lean 应用同位素标记的配体与受体的结合实验结果而提出“三元化合物”模型(ternary complex model). 三元化合物模型包括激素 H、受体 R 和细胞膜成分 X，而鸟苷酸可使三元化合物 HRX 中细胞膜成分 X 从受体 R 上解离出来，导致配体亲和能力的降低(图 4)[24]. 实验室的 Kent 进一步通过计算机模拟系统收集 β- 肾上腺素受体与配体结合的信息，发现激动剂与受体之间有高亲和力和低亲和力两种不同的状态，而鸟苷酸可介导两种状态之间的转换，并且鸟苷酸的作用有剂量依赖性[25]. 这一模型的提出在药理学工作中有广泛应用，既帮助了 GPCR 下游效应器的鉴定也帮助了发展高效亲和力的配体. 该模型后来被实验室进一步发展为扩展型三级复合物模型，并在利用组成型激活突变体研究 GPCR 和 GPCR 的偏向性配体研究中得到广泛应用[26].

3.2 受体脱敏，磷酸化和其他后修饰

现代药物学发现受体的脱敏是重要的药理学现象. Lefkowitz 实验室 Mukherjee 于 1975 年报道了持续激活蛙的肾上腺素受体可导致受体特异性脱敏[27]. 受体脱敏表现在异丙肾上腺素激活腺苷酸环化酶最大效应下降 25%，而 1/2 最大效应浓度并没有改变. 进一步的研究发现了 β- 肾上腺素受体脱敏的主要特点：a. 只有激动剂可导致受体脱敏的发生，而抑制剂能阻断激动剂与受体结合所致的脱敏；b. 激动剂导致的 β2 肾上腺素能受体的灭活有时间和浓度依赖性[28–29]. 依据这些实验结论可推断受体脱敏并非由受体与配体亲和力降低所造成，而应该是受体数目和活力的影响. 几年后，同实验室的 Stadel 等证实了在脱敏的过程中存在受体结构变化[30]. Stadel 进一步应用 ^{32}P 同位素标记的磷酸盐预温育方法，得到磷酸化的 β2 肾上腺素能受体[31]. 在体外，重组的纯化火鸡红细胞肾上腺素受体在 ATP 和 cAMP 依赖的蛋白激酶(PKA)作用下也可达到磷酸化[32]. 这一系列的实验揭示了磷酸化在受体脱敏过程中起到重要的调控作用. 同年，Strulovici 应用体外磷酸化的 β2 肾上腺素受体再植入受体缺失细胞，进一步证实受体磷酸化与重构系统中膜受体功能减退之间的直接联系[33]. 1984 年，Benovic 从仓鼠肺脏中成功提取 β2 肾上腺素受体，通过高效液相胰蛋白酶肽色谱分析方法，明确阐明了受体中的两个磷酸化位点，证实 PKA 参与单个 β 肾上腺素受体功能的调节[32]. 继而，研究组提出了同源脱敏和异源脱敏的概念：同源脱敏是指脱敏受体对其特异性配体反应减弱，而其他受体的效能不受影响；异源脱敏是指当细胞暴露于一种激动剂时，可使多种受体介导的反应减弱[34].

在证明磷酸化以及 PKA 在受体磷酸化和脱敏中的作用后，实验组进一步的工作发现 β- 肾上腺素受体激酶(βARK)也介导受体的脱敏[35]. 1990 年，Lohse 的实验数据表明 βARK 发挥受体脱敏的作用需要一个辅因子的参与，该辅因子与稍早先发现的视觉 arrestin 蛋白高度同源，所以命名为 β-arrestin[36]. 1991 年，Lorenz 等克隆出 β- 肾上腺素受体激酶(βARK)，发现 β- 肾上腺素受体激酶(βARK)和催化反应的视紫红质激酶(RK)在氨基酸序列上有高度同源性[37]. 通过对两者共同结构的归纳研究及一些功能实验，实验室推断并克隆出特异介导 GPCR 脱敏的一个新的蛋白激酶家族 GRK(G protein coupled receptor kinase)[38–41]

综上所述，通过对 β2 肾上腺素能受体脱敏的研究，Lefkowitz 研究小组与其他小组一起阐明了磷酸化、PKA、GRK 和 β-arrestin(β- 抑制蛋白)在受体脱敏中的作用，发现了 GRK 家族(图 5). 除磷

酸化介导的脱敏外，进入 21 世纪，实验室也率先发现了受体的其他后修饰在细胞信号转导过程中的作用，包括泛素化等[42].

3.3 β-抑制蛋白 (β-arrestin) 介导的独立于 G 蛋白的信号转导系统

β -arrestin 最早是在受体脱敏的研究中被发现的，它可以介导受体内吞并终止 G 蛋白的信号途径，但近十几年的研究发现它也可以独立介导信号转导．1999 年，Lefkowitz 实验组的 Luttrell 发现 β-arrestin 作为衔接蛋白，同时与激动剂结合受体和 c-Src 结合，起到“募集”并激活 c-Src 的作用[43]．继而，实验室相继发现 β-arrestin 可介导 JNK3、ERK2、PDE4 和 DGK 等重要信号转导因子的激活以及它们介导的下游生理功能，而实验室蛋白质组学的研究丰富了这一发现(图 5)[44-48]．针对同一个受体，不同的配体可能会引起不同的受体磷酸化，从而引起不同的 arrestin 构型改变．其中，以血管紧张素受体Ⅱ (A1TaRⅡ)为模型，arrestin 独立的 ERK 激活以及其下游途径得到了详尽的阐释，最终导致了偏向性配体概念的提出并应用到新型的药物发展当中[49-51].

4 β2 肾上腺素能受体 (扩散型配体的 GPCR) 的晶体结构

自 G 蛋白偶联受体被发现以来，人们一直试图了解这些蛋白质传递胞外信号至细胞内部的作用机制，这就必然需要获得关于它们结构的信息．而蛋白质晶体结构可以提供原子层级的高分辨率结构信息，具有重大价值．除视紫质(rhodopsin)之外，G 蛋白偶联受体家族成员在细胞内的丰度很低，容易被降解而失活，且具有复杂柔韧的跨膜结构，因此 GPCR 家族成员高分辨率的晶体结构一直未能被解析，从而在很大程度上制约了我们对 G 蛋白偶联受体功能的研究，阻碍了新药的研发，成为长期以来在结构生物学和药物学研究中的重大挑战[14].

4.1 序曲

获得纯化的肾上腺素能受体以后，Lefkowitz 就开始尝试结晶 GPCR 的可能性．而从克隆肾上腺素能受体开始，Kobilka 也把肾上腺素能受体的结构分析作为自己下一个奋斗的主要目标．Kobilka 从离开 Lekfowitz 实验室始，开始了 15 年的独自奋斗解析肾上腺素能受体结构的历程.

扩散型配体的 GPCR 丰度很低，在纯化过程中很快失活．1979 年，Lefkowitz 实验室成功建立了一套便捷快速高效的肾上腺素受体亲和层析的方法，也发展了肾上腺素受体的抗体，可以用于大规模制备具有活性的肾上腺素受体[6, 52]．此外，Kobilka 在 Lefkowitz 实验室工作时，通过构建 α 和 β 肾上腺能受体的融合蛋白和拆分其不同片段，不仅阐明了 GPCR 受体的第 5 个 α 螺旋的氨基端到第 6 个 α 螺旋羧基端的区域对 G 蛋白的结合起关键作用，而第 7 个跨膜结构域与激动剂和阻断剂的结合密切相关；也发现重组表达非共价键相连的肾上腺素能受体 1～5 跨膜区域与 6～7 跨膜区域两个片段可重组为有活性的受体(图 6a)[13]．这些工作为日后 GPCR 蛋白结构的研究，尤其是在受体的第三个胞内环插入溶菌酶这一天才型的想法做了重要的铺垫(图 6b)[14].

4.2 突破

除肾上腺素能受体自身的研究，蛋白质晶体学领域也在进展，包括 1997 年 Mackinon 用抗体的方法制备了离子通道的晶体，以及脂立方(lipid cubic phase)技术的发展，使获得高分辨率的肾上素能受体晶体结构成为可能.

Kobilka 同时通过与抗体共结晶和在第三个细胞内环插入溶菌酶两个手段，几乎同时获得了 β2 肾上腺素能受体的晶体(图 6b)．其中溶菌酶插入的晶体利用了脂立方技术，与 Stevens 一起合作完成．这一系列文章几乎在同一个月先后发表在 *Nature*，*Science* 和 *Nature Method* 上[1152-54-55]．在 Kobilka 实验室成功解析了除视紫质(rhodopsin)之外的第一个 GPCR 晶体结构后，利用溶菌酶插入技术，G 蛋白偶联受体晶体结构的研究进入了一个活跃期，大量 G 蛋白偶联受体或者受体复合物的结构被解析，其中包括：人类 A2A 腺苷受体、人类多巴胺 D3 受体、乙酰胆碱受体和鸦片受体等[56-63].

4.3 G 蛋白偶联受体的激活构型和多重构型

激动剂(agonist)作用于细胞受体后，会显著改变受体的构象，从而将信息传递下去，这种与激动剂结合的受体构象通常被称为 GPCR 的激活构型．GPCR 受体激活结构的获得主要存在两个方面的困难：第一，在 G 蛋白未与 GPCR 结合的情况下，受体与配体的亲和力较弱，并且配体解离的速度很快，很难捕捉到他们共存；第二，受体激活的构型相对于失活的构型非常不稳定，不利于结晶．为克服这些困难，Kobilka 实验小组同时采用了共价修饰的 β2 肾上腺素能受体激动剂和应用羊驼产生的纳米抗体(nanobody)结合的方法，得到了激动

剂结合的激活状态的受体结构，观察到跨膜螺旋发生了显著重构，以及受体的细胞第二内环变构为 α 螺旋[64-65].

在设法解析与激动剂结合的受体激活状态的同时，Kobilka 实验小组应用荧光标记和核磁共振技术，Lefkowitz 实验小组应用质谱解析技术，证明了多个不同的肾上腺素能受体的配体可以引起受体的多种不同构型[15, 66-67](图 6c).

5 β2肾上腺素能受体与 G 蛋白复合物的晶体结构

受体与激动剂结合后，不仅自己发生构型改变，还必须与下游效应器分子进行偶联，并诱使其结构发生改变，从而将生物信号传递到细胞内．原子分辨率的晶体结构对理解这一重要生命活动至关重要.

Kobilka 小组在获得 β2肾上腺素能受体的晶体结构后，就开始向解析受体与 G 蛋白复合物的结构开始迈进．GPCR 激活后，会与 GDP 结合的 G 蛋白三聚体结合，然后 G 蛋白三聚体解离，G 蛋白与 GTP 结合(图 7b)．G 蛋白三聚体与 GPCR 的结合非常短暂，其复合物的结构很难捕捉．除了应用解析 GPCR 活性状态结构所用的能与 GPCR 形成共价键的激动剂以及纳米抗体之外，Kobilka 还采用了三种新的手段，包括：a．将溶菌酶放在蛋白的 N 端；b．在受体与 G 蛋白三聚体复合物结合后，应用 Aprase 将 GDP 除去；c．应用了一种新发现的去垢剂 MNG-3．这些新方法的应用终于使 Kobilka 成功获得了受体与 G 蛋白复合物的晶体结构(图 7a)[12]．与受体激活的状态相似，GPCR 与 G 蛋白复合物的结构中胞内第二内环重构为螺旋，而跨膜螺旋发生了重排．复合物的结构进一步揭示了 G 蛋白的 N 端和 C 端的 α 螺旋介导了主要 G 蛋白构型变化，尤其是 α 螺旋 5 移动了 6Å，并插入 β2 肾上腺素能受体，并最终导致 GαsAH 亚基旋转 127°，从而打开 G 蛋白的核酸结合口袋．Kobilka 的这一成就使人类第一次看到了 GPCR 与 G 蛋白结合的分子细节，对理解生命中细胞水平上的信息传递机制具有重要意义，其揭示的一些内容需要在未来的研究中得到进一步消化和理解.

6 展　望

虽然人们对 GPCR 信号转导和功能的认识逐步加深，但 GPCR 家族中还存在许多孤儿受体，其配体未知，而已知受体可能还有未被发现的配体．阐明这些受体的配体，发现它们介导的信号转导机制具有重要的生理学意义和药理学价值，需要投入大量的研究资源．同一 GPCR 受体往往可以激活一段时间，可以同时偶联几种 G 蛋白，也会与 Arrestin 等其他蛋白质相互作用．GPCR 的偏向性配体的概念经 Lefkowitz 实验室提出后，已经成为 GPCR 药物发现的下一个研究热点[69-73]．偏向性配体可能不止涵盖于不同的 G 蛋白、Arrestin，也可包括许多未发现的蛋白质，值得我们进一步深入研究和利用.

在结构方面，虽然第一个 G 蛋白与 GPCR 的复合物已经得到解析，但该结构不能解释受体与 G 蛋白偶联的选择性和识别的保守序列，这些需要其他 GPCR 与更多的 G 蛋白，包括 Gq、Gi 等复合物的结构解析．受体与 Arrestin 形成复合物及受体内吞复合物的结构也期待解析．G 蛋白偶联受体相应配体结合会有多重构象，其动态构象变化还可能有多种形式(图 8)[68]．这些知识对我们理解生命现象，阐释生命本质具有重要意义.

G 蛋白偶联受体(7 次跨膜受体)在信号转导过程和药物开发中占据着核心的位置，关于 GPCR 的研究极大改变了我们对生命活动的认识以及革新了现代医药研究．这次的诺贝尔化学奖，不仅是对这两位生物化学家在 G 蛋白偶联受体发现、鉴定及结构生物学研究重要贡献的褒奖，同时也是对有机化学家和药物化学家创造性工作的肯定．目前的处方药中，有 50%以上的药物靶点是 G 蛋白偶联受体．正是由于有机化学家和药物化学家合成并筛选了大量的药物分子，才使得 G 蛋白偶联受体研究走出实验室，为人类创造了巨大的福祉．没有有机化学家和药物化学家的贡献，G 蛋白偶联受体的研究只能停留在基础研究阶段．与 GPCR 有关的研究已经获得了 5 次诺贝尔奖，但还有许多重要问题没有解决．例如：怎样依据 G 蛋白偶联受体结构及动态构象变化信息，设计筛选出更加高效，副作用更小的药物？G 蛋白偶联受体是通过怎样的动态构象变化，将膜外的信息传递到膜内的？科学家们将进一步努力，更好地阐明 GPCR 的作用机制和功能，我们期待 GPCR 领域的下一个诺贝尔奖.

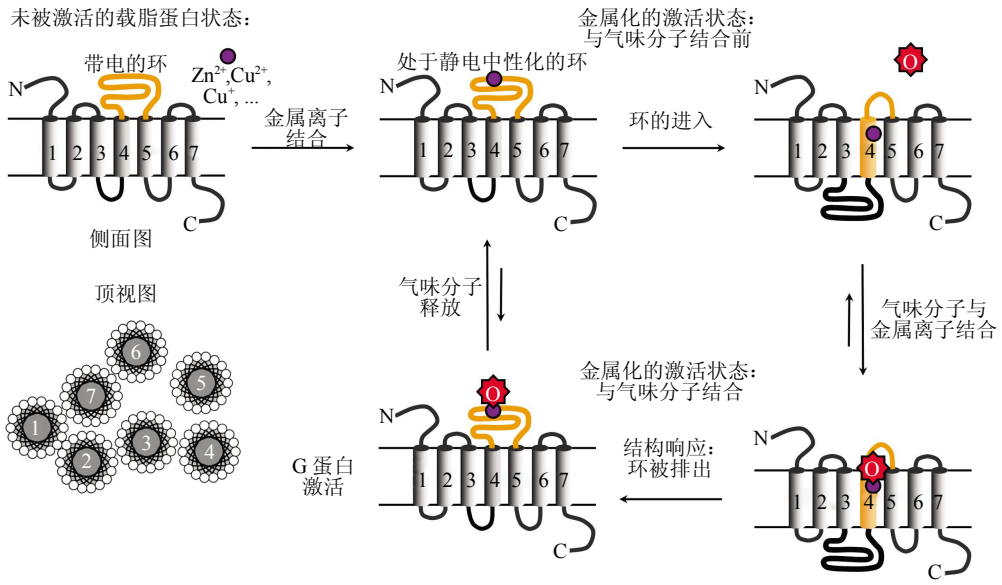

Fig. 8　The mechanism of metal ion depented olfactory response (modified from Wang, Luthey-Schulten *et al*., 2003)[68]

图 8　金属离子依赖的嗅觉受体响应气味分子的机制(改自 Wang, Luthey-Schulten *et al*., 2003)[68]

带负电的连接嗅觉受体第 4 和 5 跨膜区域的细胞外环与金属离子结合后呈电中性状态，随后内化进入细胞膜并导致第 4 跨膜区域进入细胞内，形成包埋环构型(embedded loop conformation)，当气味分子与环上的金属离子结合后，由于局部电荷平衡的改变，受体构象发生变化，环被排出细胞膜，原第 4 跨膜区域重新进入细胞膜内．随后，气味分子由原先的结合位点被释放．

参　考　文　献

[1] Lefkowitz R J, Roth J, *et al*. Effects of calcium on ACTH stimulation of the adrenal: separation of hormone binding from adenyl cyclase activation. Nature, 1970, **228**(5274): 864−866

[2] Lefkowitz R J, Roth J, *et al*. Radioreceptor assay of adrenocorticotropic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma. Science, 1970, **170**(3958): 633−635

[3] Lefkowitz R J, Roth J, *et al*. ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenyl cyclase. Proc Natl Acad Sci USA, 1970, **65**(3): 745−752

[4] Lefkowitz R J, Haber E. A fraction of the ventricular myocardium that has the specificity of the cardiac beta-adrenergic receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, **68**(8): 1773−1777

[5] Lefkowitz R J, Haber E, *et al*. Identification of the cardiac beta-adrenergic receptor protein: solubilization and purification by affinity chromatography. Proc Natl Acad Sci USA, 1972, **69**(10): 2828−2832

[6] Caron M G, Limbird L E, *et al*. Biochemical characterization of the beta-adrenergic receptor of the frog erythrocyte. Mol Cell Biochem, 1979, **28**(1−3): 45−66

[7] Cerione R A, Strulovici B, *et al*. Pure beta-adrenergic receptor: the single polypeptide confers catecholamine responsiveness to adenylate cyclase. Nature, 1983, **306**(5943): 562−566

[8] Cerione R A, Strulovici B, *et al*. Reconstitution of beta-adrenergic receptors in lipid vesicles: affinity chromatography-purified receptors confer catecholamine responsiveness on a heterologous adenylate cyclase system. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, **80**(16): 4899−4903

[9] Dixon R A, Kobilka B K, *et al*. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. Nature, 1986, **321**(6065): 75−79

[10] Kobilka B K, Dixon R A, *et al*. cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84**(1): 46−50

[11] Rosenbaum D M, Cherezov V, *et al*. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. Science, 2007, **318**(5854): 1266−1273

[12] Rasmussen S G, DeVree B T, *et al*. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. Nature, 2011, **477**(7366): 549−555

[13] Kobilka B K, Kobilka T S, *et al*. Chimeric alpha 2-,beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. Science, 1988, **240**(4857): 1310−1316

[14] Lefkowitz R J, Sun J P, *et al*. A crystal clear view of the beta2-adrenergic receptor. Nat Biotechnol, 2008, **26**(2): 189−191

[15] Kahsai A W, Xiao K, *et al*. Multiple ligand-specific conformations of the beta2-adrenergic receptor. Nat Chem Biol, 2011 , **7** (10): 692−700

[16] Caron M G, Srinivasan Y, *et al*. Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor. J Biol Chem, 1979, **254**(8): 2923−2927

[17] Nathans J, Hogness D S. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, **81**(15): 4851−4855

[18] Frielle T, Collins S, *et al*. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1987 , **84** (22): 7920−7924

[19] Kobilka B K, Frielle T, *et al*. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. Nature, 1987, **329**(6134): 75−79

[20] Kobilka B K, Matsui H, *et al*. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platel*et al*pha 2-adrenergic receptor. Science, 1987, **238**(4827): 650−656

[21] Fargin A, Raymond J R, *et al*. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT1A receptor. Nature, 1988, **335**(6188): 358−360

[22] Linda B, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell, 1991, **65**(1): 175−187

[23] Lefkowitz R J, Mullikin D, *et al*. Regulation of beta-adrenergic receptors by guanyl-5'-yl imidodiphosphate and other purine nucleotides. J Biol Chem, 1976, **251**(15): 4686−4692

[24] De Lean A, Stadel J M, *et al*. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. J Biol Chem, 1980, **255**(15): 7108−7117

[25] Kent R S, De Lean A, *et al*. A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. Mol Pharmacol, 1980, **17**(1): 14−23

[26] Samama P, Cotecchia S, *et al*. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. J Biol Chem, 1993, **268**(7): 4625−4636

[27] Mukherjee C, Caron M G, *et al*. Catecholamine-induced subsensitivity of adenylate cyclase associated with loss of beta-adrenergic receptor binding sites. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, **72**(5): 1945−1949

[28] Mickey J, Tate R, *et al*. Subsensitivity of adenylate cyclase and decreased beta-adrenergic receptor binding after chronic exposure to (minus)-isoproterenol *in vitro*. J Biol Chem, 1975, **250** (14): 5727−5729

[29] Mukherjee C, Lefkowitz R J. Desensitization of beta-adrenergic receptors by beta-adrenergic agonists in a cell-free system: resensitization by guanosine 5'- (beta, gamma-imino)triphosphate and other purine nucleotides. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, **73**(5): 1494−1498

[30] Stadel J M, Nambi P, *et al*. Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase.Structural alterations in the beta-adrenergic receptor revealed by photoaffinity labeling. J Biol Chem, 1982, **257**(16): 9242−9245

[31] Stadel J M, Nambi P, *et al*. Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the beta-adrenergic receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, **80**(11): 3173−3177

[32] Benovic J L, Pike L J, *et al*. Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. J Biol Chem, 1985, **260**(11): 7094−7101

[33] Strulovici B, Cerione R A, *et al*. Direct demonstration of impaired functionality of a purified desensitized beta-adrenergic receptor in a reconstituted system. Science, 1984, **225**(4664): 837−840

[34] Strasser R H, Lefkowitz R J. Homologous desensitization of beta-adrenergic receptor coupled adenylate cyclase. Resensitization by polyethylene glycol treatment. J Biol Chem, 1985, **260** (8): 4561−4564

[35] Benovic J L, Mayor Jr F, *et al*. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by beta-adrenergic receptor kinase. Nature, 1986 , **321** (6073): 869−872

[36] Lohse M J, Benovic J L, *et al*. Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. Science, 1990, **248** (4962): 1547−1550

[37] Lorenz W, Inglese J, *et al*. The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, **88** (19): 8715−8719

[38] Arriza J L, Dawson T M, *et al*. The G-protein-coupled receptor kinases beta ARK1 and beta ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain. J Neurosci, 1992, **12**(10): 4045−4055

[39] Lefkowitz R J, Inglese J, *et al*. G-protein-coupled receptors: regulatory role of receptor kinases and arrestin proteins. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1992, **57**: 127−133

[40] Pei G, Tiberi M, *et al*. An approach to the study of G-protein-coupled receptor kinases: an in vitro-purified membrane assay reveals differential receptor specificity and regulation by G beta gamma subunits. Proc Natl Acad Sci USA, 1994 , **91** (9): 3633−3636

[41] Pei G, Kieffer B L, *et al*. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. Mol Pharmacol, 1995, **48** (2): 173−177

[42] Shenoy S K, McDonald P H, *et al*. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. Science, 2001, **294**(5545): 1307−1313

[43] Luttrell L M, Ferguson S S, *et al*. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. Science, 1999, **283**(5402): 655−661

[44] Luttrell L M, Roudabush F L, *et al*. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98**(5): 2449−2454

[45] McDonald P H, Chow C W, *et al*. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. Science, 2000, **290**(5496): 1574−1577

[46] Perry S J, Baillie G S, *et al*. Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. Science, 2002, **298** (5594): 834−836

[47] Nelson C D, Perry S J, *et al*. Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. Science, 2007, **315**(5812): 663−666

[48] Xiao K, Sun J, *et al*. Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). Proc Natl Acad Sci USA, 2010, **107**(34): 15299−15304

[49] Wei H, Ahn S, *et al*. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin Ⅱ activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(19): 10782−10787

[50] Ahn S, Shenoy S K, *et al*. Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin Ⅱ receptor. J Biol Chem, 2004, **279**(34): 35518−35525

[51] Shukla A K, Violin J D, *et al*. Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(29): 9988−9993

[52] Caron M G, Srinivasan Y, *et al*. Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor and characterization of antibodies raised against purified receptor preparations. Adv Biochem Psychopharmacol, 1980, **21**: 151−158

[53] Cherezov V, Rosenbaum D M, *et al*. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science, 2007, **318**(5854): 1258−1265

[54] Day P W, Rasmussen S G, *et al*. A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. Nat Methods, 2007, **4**(11): 927−929

[55] Rasmussen S G, Choi H J, *et al*. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature, 2007, **450** (7168): 383−387

[56] Wu B, Chien E Y, *et al*. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. Science, 2010, **330**(6007): 1066−1071

[57] Granier S, Manglik A, *et al*. Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. Nature, 2012, **485**(7398): 400−404

[58] Haga K, Kruse A C, *et al*. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. Nature, 2012, **482** (7386): 547−551

[59] Hanson M A, Roth C B, *et al*. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. Science, 2012, **335**(6070): 851−855

[60] Manglik A, Kruse A C, *et al*. Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. Nature, 2012, **485** (7398): 321−326

[61] Thompson A A, Liu W, *et al*. Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. Nature, 2012, **485** (7398): 395−399

[62] Wu H, Wacker D, *et al*. Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. Nature, 2012, **485**(7398): 327−332

[63] Kruse A C, Hu J, *et al*. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. Nature, 2012, **482** (7386): 552−556

[64] Rasmussen S G, Choi H J, *et al*. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. Nature, 2011, **469**(7329): 175−180

[65] Rosenbaum D M, Zhang C, *et al*. Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. Nature, 2011, **469**(7329): 236−240

[66] Yao X, Parnot C, *et al*. Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. Nat Chem Biol, 2006, **2**(8): 417−422

[67] Bokoch M P, Zou Y, *et al*. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. Nature, 2010, **463**(7277): 108−112

[68] Wang J. *et al*. Is the olfactory receptor a metalloprotein? Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**: 3035−3039

[69] Violin J D, Lefkowitz R J. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. Trends Pharmacol Sci, 2007, **28** (8): 416−422

[70] Gesty-Palmer D, Flannery P, *et al*. A beta-arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation. Sci Transl Med, 2009, **1**(1): 1ra1

[71] Boerrigter G, Soergel D G, *et al*. TRV120027, a novel beta-arrestin biased ligand at the angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor, unloads the heart and maintains renal function when added to furosemide in experimental heart failure. Circ Heart Fail, 2012, **5**(5): 627−634

[72] Dong J H, Chen X, *et al*. Beta2-adrenergic receptor and astrocyte glucose metabolism. J Mol Neurosci, 2012, **48**(2): 456−463

[73] Kim K S, Abraham D, *et al*. beta-Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, **303**(8): H1001−1010