

β 肾上腺素受体的结构与功能域

吕志良 张惟杰

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

提 要

β 肾上腺素受体具有视紫红质样结构, 包括由膜两侧亲水环相互联结 7 个疏水性跨膜 α 螺旋结构, N 端无信号序列而含有 2 个 N-糖基化位点, C 端富含丝氨酸和苏氨酸残基。7 个跨膜结构构成配基结合位点。 β 受体细胞膜内侧环状序列形成两亲 α 螺旋结构, 与 G 蛋白相互作用。C 端及第 3 个内侧环的丝氨酸及苏氨酸残基构成受体磷酸化位点, 参与受体功能调控。

关键词 β 肾上腺素受体, 结构及功能域, 鸟苷酸结合调节蛋白(G 蛋白)

很大一部分激素、神经递质和药物都通过作用于细胞膜特异性受体, 刺激受体与 G 蛋白(鸟苷酸结合调节蛋白)的相互作用, 使 G 蛋白活化, 从而激活效应器, 如: 腺苷酸环化酶, 磷酸二酯酶, 磷脂酶 A_2 , 磷脂酶 C, Ca^{2+} 或 K^+ 通道等, 产生一系列生理生化效应。1986 年以来, 一些 G 蛋白偶联受体如 α 和 β 肾上腺素受体, M 乙酰胆碱受体, 5-羟色胺受体, K 物质受体以及视紫红质(光受体)的基因及/或 cDNA 相继被分离纯化, 并从中推演出它们的一级结构序列。这些受体的氨基酸序列存在着显著的同源性, 并具有相似的高级结构, 同属于 G 蛋白偶联受体家族。这样受体的研究进入到从分子水平探索受体的本质以及受体与配基、G 蛋白相互作用的结构基础这一崭新的领域^[1]。 β 肾上腺素受体因有明确的信号传递系统介导一系列重要的生理生化反应, 对其生化特性和调节机制了解最多, 故已成为研究 G 蛋白偶联受体具有代表性的模型。

1 β 肾上腺素受体的结构

β 肾上腺素受体(以下简称 β 受体)为镶嵌于细胞膜脂质双层中的整合糖蛋白, 需用洋地黄皂苷等去垢剂才能使之溶脱。应用高度特异

性的琼脂糖心得舒亲和层析结合高效液相空间排阻色谱法, 已纯化出高纯度的 β 受体, 为分子量约 64000 的单链蛋白质。将此纯化的 β 受体与 G 蛋白重组于脂质泡, 表现出完整的配基结合特性及激活 G 蛋白的能力。纯化的 β 受体能与固相植物凝集素结合, 并完全有效地保存 β 受体的生物活性, 说明 β 受体为糖蛋白。

疏水分析(hydrophobicity analysis)以及重组于脂质泡的纯化受体的酶有限水解法发现 β 受体与视紫红质具有相似的高级结构。图 1 扼要地描出了 G 蛋白偶联受体在细胞膜中的排列结构, 可以看到三个显著性特征: a. 7 个(M_1-M_7)平行排列的跨膜 α 螺旋结构, 每个 α 螺旋均由 20—28 个疏水氨基酸残基组成, 这个区域的氨基酸残基, 同源性 & 序列保守性最高。b. N 端无信号序列而含有 2 个 N-糖基化位点, $M-I-M-III$, $M-IV-M-V$, $M-VI-M-VII$ 之间为三个亲水性联结环(分别称为 E-I, E-II 和 E-III), 位于细胞膜外侧。c. C 端及 $M-I-M-II$, $M-III-M-IV$, $M-V-M-VI$ 之间的亲水性环状序列(C-I, C-II 和 C-III)位于细胞膜内侧, 其中 C-III 环和 C 端富含丝氨酸

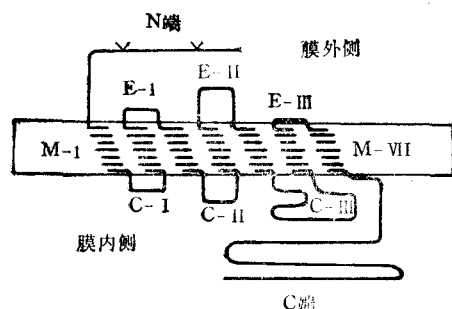


图 1 G 蛋白偶联受体在细胞膜中的排列结构

M_1-M_7 代表 7 个跨膜结构, N 端及 E-I, E-II 和 E-III 位于膜外侧, C 端及 C-I, C-II 和 C-III 位于膜内侧

和苏氨酸残基, 构成潜在的磷酸性调节位点(见后文)。

7 个跨膜 α 螺旋结构首先在细菌视紫红质中, 被高分辨电子衍射技术证实。圆二色、红外及中子衍射技术证实脊椎动物的视紫红质也存在上述结构。但有关 β 受体结构的资料主要来源于疏水分析和有限酶解法。从人 β 受体的 cDNA 推出的氨基酸序列中也可看到 7 个疏水氨基酸集中的区域, 仓鼠 β 受体的疏水分析图谱与视紫红质非常接近^[2]。用胰蛋白酶处理重组于脂质泡的仓鼠 β_2 受体, 可得到二个分子量各为 38kD (N 端) 和 26kD (C 端) 的水不溶性

片段, 其中 N 端片段具有配基结合位点以及对内切糖苷酶 F 敏感的糖基化位点。C 端片段有 cAMP 依赖的蛋白激酶 A (PKA) 和 β 受体激酶 (β ARK) 催化磷酸化位点; 用羧肽酶 Y 处理 β 受体可得到 57 kD 的糖蛋白, 并失去大部分磷酸化位点, 用内切糖苷酶处理可进一步除去寡糖链^[3], 可见 β 受体也具有视紫红质样的多个跨膜结构。

在细胞膜内侧环状区与跨膜域的交界处为带正电荷的氨基酸残基所分隔, 如人 β_2 受体为 Lys-60, Arg-131, Lys-149, Arg-221, Lys-273, Arg-328。这些带正电荷的氨基酸残基与带负电荷的膜磷脂极性端相互作用, 有助于使受体蛋白准确地排列在细胞膜脂质双层中。

2 β 受体的功能域

2.1 跨膜结构域 在 G 蛋白偶联受体中, 7 个跨膜域中氨基酸的同源性和保守性最高。目前认为这些跨膜域共同参与形成一个“口袋”状配基结合位点, 任何一个跨膜结构或其与膜外侧环状区之间的联结序列缺失或突变, 均可影响 β 受体的折叠, 如位于 VI, VII 跨膜结构上的第 274—330 个氨基酸缺失的仓鼠 β_2 突变受体不能与配基结合。如果从 7 个跨膜结构中

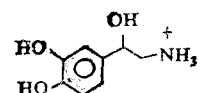
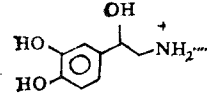
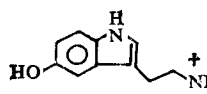
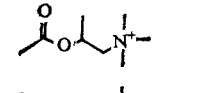
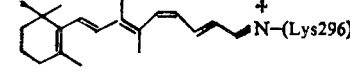
配基	受体
	α 肾上腺素受体
	β 肾上腺素受体
	5-羟色胺受体
	M 乙酰胆碱受体
	视紫红质
$NH_2-HKTDSFVGLM-NH_2$	K 物质
$NH_2-DRVYIHPF-COO$	血管紧张素

图 2 一级结构已知的 G 蛋白偶联受体配基的结构特征及代表性激动剂

间平截 β 受体分子,其配基结合能力完全丧失。但膜两侧的亲水性环状区氨基酸缺失的突变受体一般不改变配基结合特性^[4]。可见这些跨膜结构为维持 β 受体高级结构所必需,且构成了配基结合位点。用胰蛋白酶处理 ¹²⁵I_pBABC 光亲和标记的仓鼠 β_2 受体,发现其烷基化共价结合位点位于 M-II 的 His-93 或 Ser-92 残基上^[5]。M-II, M-III 和 M-VII 个别氨基酸残基的改变,也会显著地影响配基结合特性,如位于 M-II 上的 Asp-79 用 Asn 或 Ala 取代后,对激动剂的亲和力下降,但不影响拮抗剂的结合能力;位于 M-III 上的 Asp-113 被 Asn 或 Glu 取代后,对激动剂和拮抗剂的亲和力均下降,但 Asp-79 和 Asp-113 残基改变不影响 β 受体的折叠以及与 G 蛋白腺苷酸环化酶之间的偶联。Asp-113 残基在所有的以具有潜在质子化的氨基化合物为特异配基的受体(图 2)中呈高度保守性,说明其酸性氨基酸侧链很可能与质子化的氨基阳离子配基形成离子键结合。对 β 受体与配基相互作用的构效关系研究表明,激动剂分子中的儿茶酚结构为必需基团,其中的酚羟基可能与 M-V、M-VII 上的 Ser-204, Ser-207 或 Ser-319 侧链上的羟基形成氢键结合;芳环结构可与 β -受体 M-VI、M-VII 跨膜结构上的 Phe-289, Phe-290 或 Tyr-326 的疏水侧链形成疏水键结合^[6]。至此,已初步勾划出了 β 受体与配基结合的结构基础(图 3)。

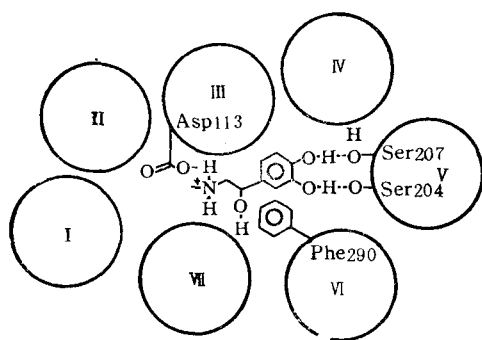


图 3 β 肾上腺素受体配基结合模型
细胞膜外表面视图, I—VII 为 7 个跨膜 α 螺旋结构

Pro 和 Gly 在某些跨膜结构中也呈高度

保守,如 Pro-323 被 Ser 取代后,可引起 β -受体高级结构的改变。Pro 和 Gly 可诱导跨膜 α 螺旋结构发生弯折 (bend),与其它氨基酸残基如: Glu-122, Asp-79, Asp-113, His, Cys, Ser-204, Phe-290 等共同构成一个袋状配基结合位点。Pro 还可通过静电效应增强配基与受体的结合能力,并且可通过 Z-Pro 肽键的顺-反异构导致受体构象的变化^[7]。

2.2 β 受体的氨基端和膜外侧环 β 受体 N 端和 C 端分别具有二个典型的糖基化位点 (Asn-6, Asn-15 和 Asn-410, Asn-414); 但只有位于膜外侧的 N 端加有糖基,并对内切糖苷酶 F 敏感,这些寡糖基可能是混合型、复杂型或高甘露糖型。这些寡糖链不参与受体与配基的识别和结合过程,但能增加受体的分子量,影响受体蛋白的折叠,促进新生受体插入细胞膜。此外,受体糖基化可以保护受体分子免受蛋白酶作用而过早降解。用衣霉素 (tunicamycin, 一种能抑制蛋白质糖基化的抗生素) 处理 A431 细胞株后,主要表达出一种分子量为 40000 的肽,即未糖基化的 β 受体,具有正常的配基结合特性,但缺乏激活 G 蛋白的能力^[8]。

G 蛋白偶联受体含有 10—15 个半胱氨酸残基,位于 E-I 上的 Cys-106 和 E-II 上的 Cys-184 在几乎所有的 G 蛋白偶联受体中是绝对保守的,它们在 E-I 和 E-II 之间形成二硫键,对维持受体三级结构有重要作用,若被其它氨基酸取代,可使受体结合特性发生显著变化。E-II 环上的第 179—187 个氨基酸残基缺失的仓鼠 β_2 突变受体,不能形成二硫键,从而导致配基与突变受体亲和力降低。

2.3 β 受体的羧基端和膜内侧结构域 细胞膜内侧亲水性环状序列及/或羧基端的一个重要功能是构成 G 蛋白偶联域,这与 G 蛋白所处位置(细胞膜内侧)相符合。C-I、C-II 环的氨基酸残基在 G 蛋白偶联受体中的保守性也较高,说明它们在受体与各种 G 蛋白相互作用的特异性方面无决定性作用。C-I 上的第 63—65 位的 Arg-Leu-Gln 3 个氨基酸残基被 Gly-Gly-Leu 取代后,可导致拮抗剂结合能力下降,

其原因可能是影响了 β -受体的折叠,但仍具有激活腺苷酸环化酶的能力;C-II 上的第 144—148 位的 5 个氨基酸残基被取代后,对配基的结合特性及腺苷酸环化酶的激活能力均无影响,可见,C-I 和 C-II 都不直接参与受体同 G 蛋白的偶联反应。

C-III 环的氨基酸残基以及环的长短在不同的 G 蛋白偶联受体中变化最大,提示它们在受体与 G 蛋白相互作用的特异性方面起着关键性作用。在光信号传递系统中已经证实,视紫质的 C-III 环以及羧基末端序列的 N 端直接参与视紫质与 G 蛋白(Gt)的偶联过程。 β 受体 C-III 环的 C 端第 267—273 位的-Lys-Glu-His-Lys-Ala-Leu-Lys-7 个氨基酸缺失,或 269—272 位的 4 个氨基酸被-Lys-Arg-Phe-Ile-取代的人 β_2 突变受体,介导激动剂活化腺苷酸环化酶的能力大大下降;C 端第 330—331 位的-Pro-Asp-被-Glu-Phe-取代同时 332—334 位的 Phe-Arg-Ile-缺失的突变受体,也能影响受体与 G 蛋白的偶联^[1]。C-III 环的 N 端(222—229)或 C 端(258—270)的氨基酸残基缺失的仓鼠 β_2 受体,都不能与 G 蛋白偶联,并丧失腺苷酸环化酶激活能力^[9]。可见,在 β 受体腺苷酸环化酶系统中, β 受体的 C-III 环和 C 端序列参与受体同 G 蛋白的相互作用。

但事情也并不像上面所说的那么简单,现已观察到克隆的 G 蛋白偶联受体可以以不同的亲和力与多种 G 蛋白发生偶联,如甲氨酰胆碱低浓度时,通过 M_2 -和 M_4 -乙酰胆碱受体抑制腺苷酸环化酶,高浓度时也可刺激肌醇磷酸酯的代谢。说明 G 蛋白与受体偶联的特异性并不是绝对的,在某些环境下,可改变受体与 G 蛋白的偶联形式。

在 β_2 受体与 G_s 蛋白偶联中绝对必需的 221—228 位氨基酸残基,在不同来源同样作用于 G_s 蛋白的 β_1 和 β_2 受体中并非绝对保守,那么在这些功能域中是否存在另一种比一级结构更重要的物理/化学属性呢? 根据二级结构推算, β_2 受体的 221—228 位氨基酸残基在溶液中能形成一种双亲 α 螺旋结构(amphiphilic

α -helix)(图 4)^[10]。最近, Higashijima 等发现, mastoparan (一种能模拟受体激活 G_0 蛋白的黄蜂毒肽)具有双亲 α 螺旋,可直接激活 G_0 蛋白^[11]。作用于 G_i 蛋白的 α_2 受体,也可在 218—225 位形成双亲 α 螺旋,其中的带正电荷氨基酸残基与 β 受体中的相似。 β 受体 C-III 上第 221—228, 258—273 位的氨基酸残基及/或 C 端序列的 327—336 位氨基酸残基均可形成 α 螺旋。G 蛋白与受体的偶联域位于 G 蛋白的 C 端,这个 C 端也能形成双亲 α 螺旋,两种螺旋的差别在于 G 蛋白的双亲 α 螺旋不仅有带正电荷的氨基酸残基,也有带负电荷的氨基酸残基。显然,双亲 α 螺旋结构在受体与 G 蛋白的偶联过程中具有重要作用,受体与激动剂结合,导致受体构象变化,从而使 α 螺旋结构适应 G 蛋白偶联反应。

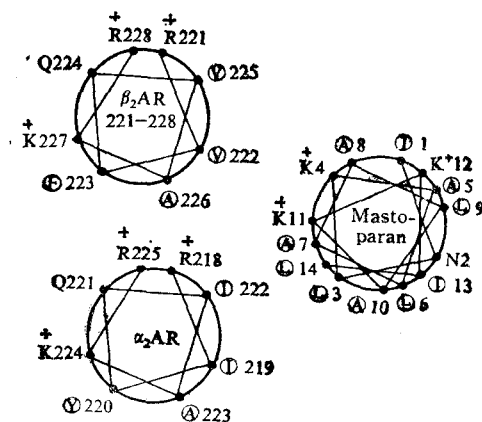


图 4 β_2 受体、 α_2 受体及 mastoparan 的双亲 α 螺旋结构

+表示带正电荷的氨基酸残基,“O”表示疏水性氨基酸残基

β 受体 C 端富含丝氨酸和苏氨酸残基,当激动剂与 β 受体结合后,可促进胞浆 β ARK 转移至胞膜上的受体部位,这种转移是由该酶已在受体上暴露的磷酸化位点所介导,结果使结合了激动剂的 β 受体磷酸化。受体磷酸化导致受体与 G 蛋白功能性脱偶联^[12],解释了激动剂特异性失敏的本质。 β ARK 能催化 β 受体 C 端多个 Ser, Thr 残基磷酸化,用羧肽酶 Y 处理可除去绝大多数 β ARK 催化磷酸化位点,C 端 48 个氨基酸缺失的人 β_2 突变受体,能抑制激动剂

介导的受体磷酸化,并延迟失敏的发生^[43],但可促进受体从细胞膜转移到细胞内(受体内隐),说明 β 受体的C端具有抑制受体内隐的作用。多聚阴离子(polyanion)如肝素和一些合成肽能抑制 β ARK,阻止受体磷酸化和失敏^[44]。 β ARK也可催化C端不含Ser和Thr的 α_2 受体及M-受体C-III上的Ser或Thr磷酸化,但对 β ARK的识别位点目前尚不清楚,一些研究表明,这些磷酸化部位可能存在相似的三维结构。

β 受体中尚存在二个PKA催化磷酸化位点,一是C-III上的Arg-259-Arg-Ser-Ser-Lys-263,另一是C端的Arg-343-Arg-Ser-Ser-Ser-Lys-348,这种磷酸化作用不依赖激动剂,但受体与激动剂的结合可加速磷酸化速率。切除 β 受体分子C-III及/或C端的PKA磷酸化位点,可抑制受体磷酸化和激动剂非特异性失敏。此外,蛋白激酶C也可催化 β 受体磷酸化。由于多种激素和药物在体内可激活PKA和PKC,它们催化 β 受体磷酸化,导致受体与G蛋白脱偶联,可能是不同信息传递途径之间的交互调节方式之一。

受体磷酸化降低了受体与G蛋白的偶联能力,还需要某些蛋白质参与才能充分表达这一效应。在光信号传递系统中,视紫质被视紫质激酶磷酸化后,即与一种称之为arrestin的蛋白质(48kD)结合,降低视紫质与 G_t 蛋白的偶联能力。在其它组织中也可能存在类似48kD蛋白质,协同 β ARK调节受体功能^[15]。磷酸化受体可被高分子量的磷酸蛋白磷酸酶完全脱磷酸化。显然,受体磷酸化和脱磷酸化具有

调节 β 受体功能的重要作用。

结 语

β 受体具有7个跨膜 α 螺旋结构,构成袋状配基结合位点;膜内侧亲水环通过双亲 α 螺旋与G蛋白偶联,当受体与激动剂结合后,诱导受体变构,从而激活G蛋白与效应器,完成信息从胞外到胞内的跨膜传递过程。 β 受体C-III及C端的Ser和Thr构成 β ARK和PKA催化ATP磷酸化位点,受体磷酸化在激动剂特异性和非特异性失敏中都具有重要作用。G蛋白偶联受体的高度保守性及高级结构的相似性,提示来自于 β 受体的有关信息同样适用于其它G蛋白偶联受体。今后对受体及其亚型与配基结合的高度特异性及受体与G蛋白偶联特异性的结构基础的研究,仍是一个十分活跃的领域。

参 考 文 献

- 1 O'Dowd B F *et al.* *Ann Rev Neurosci*, 1989; 12: 67
- 2 Dixon R A F *et al.* *Nature*, 1986; 321: 75
- 3 Dohlman H G *et al.* *J Biol Chem*, 1987; 262: 14282
- 4 Dixon R A F *et al.* *Nature*, 1987; 326: 73
- 5 Dohlman H G *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 1813
- 6 Strader C D *et al.* *FASEB J*, 1989; 3: 1825
- 7 Dohlman H G *et al.* *Biochemistry*, 1987; 26: 2657
- 8 Boege F *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 9040
- 9 O'Dowd B F *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 15985
- 10 Cheung A H *et al.* *Mol Pharmacol*, 1989; 34: 132
- 11 Higashijima T *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 6491
- 12 Benovic J L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 2797
- 13 Bouvier M *et al.* *Nature*, 1988; 333: 370
- 14 Lohse M J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 3011
- 15 Lefkowitz R J *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 4993