

G 蛋白偶联受体失敏的分子机制^y

肖贞良¹, 夏前明², 钱桂生¹

(1. 第三军医大学 新桥医院呼吸内科研究所, 中国重庆 400037; 2. 成都军区总医院呼吸科, 中国四川 成都 610083)

摘要: G 蛋白偶联受体(GPCRs)受到激动剂持续刺激时易发生失敏, 受体内化是GPCRs 失敏重要分子机制。GPCRs 在 G 蛋白偶联受体激酶(GRKs)、第二信使调节激酶等作用下发生磷酸化, 磷酸化的 GPCRs 与抑制蛋白(arrestins)结合后导致受体与 G 蛋白失偶联, 并通过胞吞由细胞膜表面向膜内转移, 从而因 GPCRs 的内化而表现为失敏。

关键词: 失敏; G 蛋白偶联受体; 磷酸化; 内化; 胞吞

中图分类号: Q372; R363

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2003)01-0015-05

Molecular Mechanism of G Protein-coupled Receptors Desensitization

XIAO Zhen-liang, XIA Qian-ming, QIAN Gui-sheng

(1. Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

2. Department of Respiratory Diseases, Chengdu Army General Hospital, Chengdu 610083, Shichuan, China)

Abstract: Desensitization may occur in G protein-coupled receptors(GPCRs) when agonists exist continuously. Internalization is an important mechanism of GPCRs desensitization. Phosphorylation of GPCRs happens under the action of G protein-coupled receptor kinases(GRKs) or the second messenger dependent kinases. The combination of phosphorylated GRCPs and arrestins leads to the decoupling of GRCPs with G protein, then GRCPs transfer to the internal surface of cell membrane and thus desensitization of GRCPs occurs.

Key words: desensitization; G protein-coupled receptor; phosphorylization; internalization; endocytosis

(Life Science Research, 2003, 7(1): 015~ 019)

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCRs)是一大类具有重要生理功能的受体。GPCRs 如阿片受体、5-羟色胺受体、肾上腺素能受体等在激动剂持续刺激时易发生转导信号的快速衰减, 称为失敏(desensitization)。GPCRs 失敏的发生机制包括受体磷酸化后与 G 蛋白失偶联、受体内化、受体 mRNA 和蛋白合成减少以及受体降解增加。本文将扼要综述近年来 GPCRs 失敏的分子机制特别是受体内化的研究进展。

1 GPCRs 的磷酸化

细胞内激酶对受体共价修饰的结果是受体的磷酸化, GPCRs 磷酸化后即与异三聚体的 G 蛋白发生快速失偶联。目前普遍认为, 第二信使调节激酶(如 PKA、PKC)和 G 蛋白偶联受体激酶(G protein-coupled receptor kinases, GRKs)均可使位于细胞内环 GPCRs 羧基端尾区的丝氨酸、苏氨酸残基磷酸化。GRKs 家族成员选择性地作用于激动剂活

^y 收稿日期: 2002-11-22; 修回日期: 2003-01-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070334); 国家自然科学基金资助项目(39730210)

作者简介: 肖贞良(1965-), 男, 四川邛崃市人, 第三军医大学呼吸内科学博士研究生, 主要从事急性肺损伤发病机制的研究, Tel: + 86-023-68755320, E-mail: xiaozhenliang2001@yahoo.com.cn

化的受体并使之磷酸化,从而促进抑制蛋白与受体结合,导致受体与异三聚体 G 蛋白失偶联^[1]. 与之不同,第二信使调节激酶不仅可以使激动剂活化的受体磷酸化,也可以使未活化的受体磷酸化;第二信使调节激酶介导的受体磷酸化可能是低浓度激动剂引起 GPCRs 失敏的主要机制.但第二信使调节激酶和 GRKs 的活性并非相互独立,因为在嗅觉系统,抑制其中任一家族激酶均导致嗅觉受体失敏的消失^[2].

1.1 第二信使调节激酶介导的受体磷酸化

第二信使调节激酶 PKA 和 PKC 属磷酸基转移酶,能催化 ATP 的磷酸基转移至含特异性氨基酸共同序列蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基. GPCRs 活化使细胞内 cAMP、Ca²⁺ 和二酰甘油含量增高,第二信使调节激酶被活化,并通过介导下游目的蛋白磷酸化而参与 GPCRs 的信号转导.这些激酶也对位于细胞内环和羧基末端尾区的 GPCRs 磷酸化位点进行反馈调控.例如 β_2 -AR 活化的 PKA 至少对受体两个磷酸化位点之一产生应答,导致受体失敏.一个位点在 β_2 -AR 第三细胞内环的 G 蛋白结合区,另一位点在 β_2 -AR 羧基尾部近端. PKC 活化也导致许多与 Gi 和 Gq 蛋白偶联的 GPCRs 磷酸化和失敏.尽管如此,第二信使调节激酶介导的受体失敏机制也远不如 GRKs 介导的受体失敏机制那样重要.

1.2 GRKs 介导的受体磷酸化

1.2.1 GRKs 的结构和分类

GRKs 由 7 个结构上有同源序列的家族成员组成.每种 GRK 都含有共同的功能结构,包括一个中心催化区、一个底物识别和含有 G 蛋白信号调节蛋白(regulators of G protein signaling, RGS)-样结构的氨基末端区、以及一个作用于胞膜的羧基末端区.根据序列和功能的相似性可分为三个亚家族.

第一个亚家族包括 GRK1 和 GRK7. GRK1 是视紫质(rhodopsin)激酶,仅存在于视网膜的光受体细胞,作用底物是视网膜的视蛋白.人 GRK7 的基因位于染色体 3q21,长度约 10 kb,由 4 个外显子组成.仅在视网膜表达,包括所有的视网膜神经元和椎体外节段. GRK1 和 GRK7 在人视椎细胞均有表达.人椎体外节段表达 GRK7 而小鼠不表达,提示在 GRK7 可能为 GRK1 基因缺失的小口氏病(一种夜盲症)患者提供正常的光觉^[3].

第二个亚家族的 GRK2、GRK3 又分别称为 β

肾上腺素能受体激酶 1(β ARK1)和 β 肾上腺素能受体激酶 2(β -ARK2).将 GRK2、GRK3 的单抗加入家兔心肌细胞,异丙肾上腺诱导的受体磷酸化 77% 受到抑制;而 GRK4 的单抗却无抑制作用.鸡神经元也可表达 GRK3 样蛋白.

第三个亚家族包括 GRK4、GRK5 和 GRK6. GRK4 仅在睾丸有高水平的表达. GRK5、GRK6 是两种相关激酶,它们与 GRK2、GRK3 一样在全身各组织均有表达.该亚家族成员的作用底物更广,并具有重复的底物特异性.

1.2.2 GRKs 的膜向移位

受体未活化时 GRK1-3 存在于胞浆;受体活化后 GRK1-3 转移至胞膜并与目的受体结合.钙感受器蛋白 recoverin 可调节 GRK1 的活性,但对 GRK2-6 的活性无调节作用.未异戊二基化的 GRK2 和 GRK3 的活性仍部分受异三聚体 G 蛋白亚基的调节. GRK2、GRK3 与 G 蛋白亚基间的作用是由激酶羧基末端 125 个氨基酸的亚基结合区介导的,该区的氨基酸序列与血小板-白细胞-C 激酶底物(pleckstrin)同源区十分相似. GRK2 羧基末端结合区的过量表达对内源性 GRK2 的膜向移位有一定影响,其机制可能是对游离 G 蛋白亚基有扣押作用.已有人用该区表达产物在培养细胞和转基因小鼠阻断 GRKs 介导的失敏^[4]. 4, 5-二磷酸磷酸酯酰肌醇与羧基末端 pleckstrin 同源区的结合,也对该酶的膜向移位有影响.最近证实,分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)导致的 GRK2 羧基末端磷酸化,可减低 GRK2 与 GPCRs 底物的结合.与之相反,PKC 引起的丝氨酸磷酸化和 e-*Src* 引起的酪氨酸磷酸化则可增强 GRK2 的活性和膜向移位.因而 GRK2 的活性受一系列复杂的蛋白磷酸化调节.

在 GPCRs 未活化的条件下,GRK4、GRK5 和 GRK6 也表现出膜向移位. GRK4 和 GRK6 的棕榈化发生在羧基末端的胱氨酸残基.由于蛋白棕榈化是一种可逆性的翻译后蛋白修饰,GRK4 和 GRK6 棕榈化的动态变化对这些激酶的功能活性有重要影响. GRK5 与胞膜间的作用目前认为是通过该激酶含 46 个氨基酸残基的羧基末端与质膜磷脂间的静电作用介导的. GRK5 的活性不仅受该酶羧基末端丝氨酸、苏氨酸残基磷酸化影响,也受该酶与膜磷脂作用的影响^[5]. 与 GRK2 不同,PKC 介导的磷酸化会减低 GRK5 的活性.另外,钙调蛋白直接作用于 GRK5 的氨基末端区,不仅减

弱了该激酶与受体和磷脂结合的能力,也抑制了该酶的活性。

1.2.3 GRKs 的磷酸化位点

GRKs 在 GPCRs 上的磷酸化位点位于细胞内第三环或羧基末端尾区的丝氨酸和苏氨酸残基。 β_2 -AR 和 M2 乙酰胆碱能受体只有短的羧基末端,丝氨酸和苏氨酸残基含量相对较少,但扩大的细胞内第三环区含多个丝氨酸和苏氨酸残基;同样,一些受体如视紫质和 β_2 -AR 细胞内第三区相对较短,但它们的长羧基末端含有数个丝氨酸和苏氨酸残基。 β_2 -AR 羧基末端丝氨酸、苏氨酸残基和 m2 mAChR 细胞内第三环的突变均能消除 GRKs 介导的受体磷酸化。虽然尚不能清楚地识别 GRKs 磷酸化基序,但已知位于磷酸化位点近端的酸性氨基酸有利于 GRK2 介导的磷酸化的发生。GRKs 介导的受体磷酸化可发生在多个位点,其中任一位置磷酸化均可导致受体失敏^[6]。抑制蛋白与视紫质、 β_2 -AR 的高亲和力结合需要 GRKs 介导的磷酸化参与,但体内外识别的主要 GRKs 磷酸化位点是不一样的;而次要 GRKs 磷酸化位点的磷酸化,可以补偿 GRKs 主要磷酸化位点的磷酸化失败。

1.3 其它激酶介导的 GPCRs 磷酸化

GPCRs 除了作为 PKA、PKC 和 GRKs 磷酸化的底物,也可以是其它激酶的磷酸化底物。在受体被激动剂激活的情况下,酪蛋白激酶 1a 可介导 m3 mAChR 细胞内第三环区的磷酸化。另外,酪蛋白激酶 1a 介导的 m3 mAChR 磷酸化可被无催化活性的酪蛋白激酶 1a 突变体或一种针对受体细胞内第三环区的多肽阻断。酪蛋白激酶 1a 介导受体磷酸化的机制仍未完全阐明。

2 抑制蛋白

GRKs 介导的视紫质或 β_2 -AR 磷酸化尚不足以使这些 GPCRs 全部失活,GPCRs 失活还需要抑制蛋白的参与。第一种抑制蛋白的分子量为 48 kDa,现在称为视抑制蛋白(visual arrestin),它能与光活化的视紫质结合。另一种视抑制蛋白样蛋白称为 β -抑制蛋白 1,它是体外 GRK2 介导 β_2 -AR 失敏所需的辅助因子。抑制蛋白参与 GPCRs 失敏的机制是与磷酸化的 GPCRs 结合导致受体与异三聚体 G 蛋白失偶联,并促进 GPCRs 内化。

2.1 抑制蛋白家族成员

至今已发现 4 种抑制蛋白家族成员,根据序

列同源性、功能和组织分布可将其分为两类:1) 视抑制蛋白(S 抗原)和椎抑制蛋白(X 抑制蛋白或 G 抑制蛋白);2) β 抑制蛋白(β 抑制蛋白 1 和 β 抑制蛋白 2)。可能还存在第三类抑制蛋白,因为已有部分 D 抑制蛋白和 E 抑制蛋白 cDNA 克隆的报道^[7]。

视抑制蛋白主要存在于视网膜,在松果腺有少量表达。G 抑制蛋白在视网膜和松果腺均有高表达,但主要存在于视网膜椎体光受体。牛视抑制蛋白含 404 个氨基酸,并有两种变异多肽。一种变异体(p44)的最后 35 个氨基酸残基被一个丙氨酸残基所取代;另一种变异体缺乏由外显子 13 编码的 338~345 氨基酸残基。p44 视抑制蛋白变异体特异性地定位于视杆外节段,它对视紫质潜在的抑制性是正常视抑制蛋白的数倍^[8]。视抑制蛋白羧基末端区是与其它同分异构体相互区别的特征性结构。

β 抑制蛋白在视网膜以外有广泛表达,但以神经组织和脾脏表达最为丰富。 β 抑制蛋白存在于几种神经通路;免疫电镜发现 β 抑制蛋白与 GRKs 一样主要集中在神经原的突轴,以便调节神经原的功能。与视抑制蛋白相似, β 抑制蛋白 1 和 β 抑制蛋白 2 至少各有一种变异体表达^[2,3]。 β 抑制蛋白 1 的变异体在第 333 和 334 位氨基酸之间插入了 8 个氨基酸残基; β 抑制蛋白 2 的变异体则在第 361 和 362 位氨基酸之间插入了 11 个氨基酸残基^[9]。

2.2 抑制蛋白与受体间的结合

抑制蛋白结合的对象是被激动剂激活和 GRKs 磷酸化的 GPCRs,以拮抗第二信使调节激酶的磷酸化和非磷酸化的受体。GRKs 磷酸化发生在第三个细胞内环区或受体的羧基末端^[10]。

要结合并阻断不同 GPCRs 亚型的信号转导,抑制蛋白必须识别并与不同受体的特异区域结合。支持这种观点的证据有:1) 视抑制蛋白与视紫质间的相互作用可被代表视紫质细胞内第一和第三环的合成肽阻断;2) β 抑制蛋白可与 m3 mAChR 和 5-羟色胺 2A 受体的细胞内三环区共免疫沉淀;3) β_2 -AR 羧基末端并非 β 抑制蛋白结合所必须。

视抑制蛋白的分子结构分为 3 个功能区 and 2 个调节区。功能区包括一个受体活化识别区、一个受体活化第二识别区和一个磷酸盐感受区。2 个调节区分别为氨基末端调节区和羧基末端调

节区。

视抑制蛋白有两个主要的功能区,每个功能区为7条绳状的三明治样结构^[10];这两个区即N区和C区分别构成受体活化识别区和第二受体识别区。视抑制蛋白羧基末端尾部由一个韧性连接器(flexible linker)与C区相连,羧基末端与抑制蛋白N区和C区形成不同作用形式来调节它们的结构。磷酸盐感受器构成的极性核在基础状态下埋植于N区与C区间形成抑制蛋白分子的支点。抑制蛋白的极性核结构可能是一个高度保守的结构。氨基末端和羧基末端调节区的残基也参与了视抑制蛋白极性核的构成。从视抑制蛋白的诱变研究和晶体结构推测,羧基末端与极性核间的相互作用稳定了视抑制蛋白的基态结构^[10]。但与受体结合后,磷酸化受体尾部侵入极性核,因而破坏了极性残基并释放出羧基末端的尾部。这就导致N区和C区沿极性核形成的支点重新定向,有利于受体-抑制蛋白复合物的形成^[10]。

3 GPCRs的内化

受体内化也称作活化受体的细胞膜内扣押,是近年来的研究热点。GPCRs内化可能有多种胞吞(endocytosis)机制参与。

3.1 GPCRs胞吞的分子机制

观察发现,肾上腺素能激动剂处理后,蛙红细胞表面肾上腺素能受体识别位点丢失;也就是说受激动剂活化后,GPCRs从细胞表面消失了^[11]。

位于细胞表面和内化的 β_2 -AR结合位点可以通过它们在蔗糖梯度溶液中不同的沉降率或它们的亲水和疏水性配基加以区别^[12]。内化受体存在于胞膜的轻泡组份("light vesicular" fraction),而细胞表面受体则存在于胞膜的重泡组份("heavy vesicular" fraction);同样,内化 β_2 -AR易与疏水配基结合而不易与亲水配基结合^[12]。免疫组化证实,激动剂活化后细胞表面 β_2 -AR发生重新分布。不同GPCRs的实验结果表明GPCRs的内化率具有不同的受体特异性。例如A1腺苷受体内化($t(1/2) = 90$ min)就比A3腺苷受体内化($t(1/2) = 19$ min)慢,提示GPCRs内化可能由多种胞吞机制介导,或者受体亚型间的异质性参与调节了它们与胞吞衔接器蛋白(endocytic adaptor proteins)结合的亲和力^[13]。

3.2 GRKs与GPCR胞吞

有学者提出了受体磷酸化可能参与GPCRs

胞吞。但实验发现,缺乏第二信使调节激酶和GRKs介导受体磷酸化位点的 β_2 -AR突变体,与野生型的内化无明显差异^[14]。PKA和GRKs抑制剂处理A431细胞也得出类似的结果。可见受体磷酸化不是GPCRs胞吞过程所必须的。

早期实验证实,受体第三环区丝氨酸和苏氨酸残基突变可减少m2 mAChR内化;野生型GRK2的过度表达可增加m2 mAChR内化,而COS7细胞非显性GRK2突变体的受体磷酸化和内化都受到了损害。后来发现,GRK2蛋白在不同细胞的表达水平是不一样的,COS7细胞中表达最低,其次是造血干细胞的衍化细胞。

GRK2在m2 mAChR内化中起一定的作用,但 β_2 -AR突变体缺乏GRK2磷酸化位点,推测依赖GRK2的受体内化对Gi偶联受体具有特殊性^[15]。研究已证实GRK2介导的磷酸化在GPCRs内化中起一定的作用,如内皮素A受体和D2多巴胺受体。 β_2 -AR-Y326A突变体的受体在激动剂作用后,GRK2、GRK3、GRK5和GRK6可促进其内化,GRK4则可促进未被激动剂活化的受体内化。不同亚型GRKs在促进mAChR亚型内化中的作用则更复杂。GRK2促进人m2-m5 mAChR内化,却不能促进m1 mAChR内化。GRK4、GRK5和GRK6促进mAChR内化的能力在不同mAChR亚型和细胞系有所差异。总之,GRKs介导的磷酸化并非所有GPCRs内化所必需,但磷酸化稳定了GPCRs与其它细胞成份相互作用的结构状态,有利于受体内化发生。

4 结束语

受体内化是GPCRs失敏的重要分子机制。抑制蛋白和GRKs是两类介导受体脱敏的重要可溶性蛋白,由它们介导的受体胞吞过程是GPCRs内化所必需的,但具体机制并不十分清楚,在某些方面还存在分歧。由于GPCRs是一大类具有重要生理功能的受体,GPCRs失敏与许多疾病和病理生过程有着密切的联系,因此有关GPCRs内化的分子机制有待进一步深入研究。

参考文献(References):

- [1] AUDREY C, STEPHANE A L, MARC G C, *et al.* Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins[J]. Prog Neurobiol, 2002, 66(2): 64-79.
- [2] SCHLEICHER A, BOEKHOFF I, ARRIZA J, *et al.* A β -adrenergic

- kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 1420-1424.
- [3] CHEN C K, ZHANG K, CHURCH-KOPISH J, *et al.* Characterization of human GRK7 as a potential cone opsin kinase[J]. Mol Vis, 2001, 7: 305-313.
- [4] DICKER F, QUITTERER U, WINSTEL R, *et al.* Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 5476-5481.
- [5] KUNAPULI P, GUREVICH V V, BENOVIĆ J L. Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 10209-10212.
- [6] OHGURO H, PALCZEWSKI K, ERICSSON L H, *et al.* Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites[J]. Biochemistry, 1993, 32: 5718-5724.
- [7] CRAFT C M, WHITMORE D H, WIECHMANN A F. Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 4613-4619.
- [8] PALCZEWSKI K, BUCZYLSKI J, OHGURO H, *et al.* Characterization of a truncated form of arrestin isolated from bovine rod outer segments[J]. Protein Sci, 1994, 3: 314-324.
- [9] STERNE-MARR R, GUREVICH V V, GOLDSMITH P, *et al.* Polypeptide variants of β -arrestin and arrestin3[J]. J Biol Chem, 1993, 268: 15640-15648.
- [10] HIRSCH J A, SCHUBERT C, GUREVICH V V, *et al.* The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: A model for arrestin's regulation[J]. Cell, 1999, 97: 257-269.
- [11] CHUANG D M, COSTA E. Evidence for internalization of the recognition site of β -adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by isoproterenol[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 3024-3028.
- [12] STAEHELIN M, SIMONS P. Rapid and reversible disappearance of β -adrenergic cell surface receptors[J]. EMBO J, 1982, 1: 187-190.
- [13] YOU M K, JEFFREY L B. Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking[J]. J Biol Chem, 2002, 277(34): 30760-30768.
- [14] HAUSDORFF W P, BOUVIER M, O'DOWD B F, *et al.* Phosphorylation sites on two domains of the β -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization[J]. J Biol Chem, 1989, 264: 12657-12665.
- [15] TSUGA H, OKUNO E, KAMEYAMA K, *et al.* Sequestration of human muscarinic acetylcholine receptor hm1-hm5 subtypes: Effect of G protein-coupled receptor kinases GRK2, GRK4, GRK5 and GRK6[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1998a, 284: 1218-1226.

· 简 讯 ·

《生命科学研究》征稿启事

21 世纪是生命科学的世纪。生命科学研究将是人类下一个世纪的主要实践活动。《生命科学研究》是经国家新闻出版署和国家科委批准, 面向全世界公开发行的反映国内外生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊。

《生命科学研究》已全文进入中国核心期刊(遴选)数据库、《中国学术期刊(光盘版)》、中国期刊网及中国科技信息所万方数据资源网, 进入中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国科技论文统计源数据库, 部分文摘已进入中国学术期刊文摘、中国生物学文摘、中国水产文摘、中国林业文摘、美国化学文摘、俄罗斯文摘杂志、美国生物学文摘数据库、美国剑桥科学文摘、中文生物医学期刊文献数据库, 全部题录进入全国报刊索引(科技版)。是被湖南省科委、湖南省新闻出版局所公开评定的学术类一级期刊。

《生命科学研究》由国内外著名的专家、学者 50 人组成编辑委员会, 其中国内编委 39 人, 国外编委 11 人, 分布在美、英、日、瑞典等国家。由国内著名专家邹承鲁、袁隆平、戚正武、刘以训、顾孝诚、翟中和、刘筠、姚开泰、姚守拙、尹长民、刘德富教授担任学术顾问。

《生命科学研究》主要刊登生物科学、农业科学、基础医学等学科具有创造性的学术论文, 刊登少量反映国内外重大进展或热点问题的快讯或综述性文章, 开设“研究进展与综述”、“研究论文”、“研究简报”等栏目。快讯一般在 3 个月内刊登; 反映国内外最新研究成果的论文、国家自然科学基金资助的论文、获省级以上科研成果奖的论文将优先发表, 最多不超过 6 个月。

编辑部地址: 410081 湖南师范大学生命科学学院内

电 话: (0731) 8872616

E-mail: sky@mail.hunnu.edu.cn; smky6688@yahoo.com.cn

欢迎从事生命科学研究的广大读者赐稿! 欢迎订阅《生命科学研究》杂志!