

G 蛋白及其偶联信号传导途径的研究进展

陈巨莲^{1*} Ge-zhi WENG² 倪汉祥¹

(中国农科院植保所,北京 100094)

(纽约大学西奈山医学中心药理系,纽约 NY10029)

摘 要 G 蛋白偶联信号传导系统是一类重要的细胞跨膜信号传导途径之一。在有关生化及药理学的医学研究中发现许多药剂都是通过 G 蛋白偶联信号传导途径对动物起作用的。对 G 蛋白结构与功能的系统研究是新型药剂研制与开发的基础。G 蛋白在物种进化过程中具有高度保守性,植物和昆虫中的 G 蛋白及其偶联组份研究将有助于明确作物抗病虫机理以及昆虫毒理。

关键词 G 蛋白及其偶联组份,植物和昆虫细胞信号传导,G 蛋白结构与功能

中图分类号 Q512 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2001)02-0113-05

细胞信号传导是所有活生物体具有的一种十分重要的生理功能。80 年代 Rodbell 等发现跨膜信号传导需要 GTP 的存在,后来 Gilman 等人发现 G_s (刺激型 G 蛋白)在细胞信号传导途径中的作用及其功能,两人并由此于 1994 年获诺贝尔医学生理学奖^[1]。大量研究还发现 G 蛋白偶联信号传导系统是一类重要的细胞信号传导途径,其在高等动物、简单真核生物、昆虫及植物中普遍存在。目前对该系统各组份的不断研究和发现已成为生物化学和分子生物学领域的研究热点。

1 G 蛋白的基本结构和种类

1.1 G 蛋白

G 蛋白(G protein/GTP binding protein)是能与鸟嘌呤核苷酸结合,具有水解 GTP 生成 GDP,即具有 GTP 酶(GTPase)活性的蛋白。G 蛋白是一个超级家族(GTP-binding proteins superfamily),包括膜受体偶联的异源三聚体 G 蛋白(Heterotrimeric GTP binding protein)和小 G 蛋白(Small GTP-binding Proteins)。异源三聚体 G 蛋白,分子量(100kD 左右),是受鸟嘌呤核苷酸调控的超级家族的信号传导分子^[2],而小 G 蛋白,分子量小(20~30kD),为单体,可能与细胞信号传导无直接联系。本文仅对与信号传导有关的异源三聚体 G 蛋白研究进展进行综述。

1.2 基本结构

异源三聚体 G 蛋白在 SDS 电泳图上可看到 α 、 β 、 γ 3 种亚基。 α 亚基单体分子量为 39~52kD, β 和 γ 亚基分子量为 35~37kD 和 6~10kD,不同的 G 蛋白由不同的基因编码^[3]。

β 、 γ 亚基尽管是两个不同基因的产物,但在自然状态下 β 与 γ 亚基以非共价紧密结合,只有在变性条件下才能分开^[3]。G 蛋白在结构上尽管没有跨膜蛋白的特点,但它们可以通过其亚基上氨基酸残基的脂化修饰将其锚定在细胞膜上^[1]。

1.3 种类:

G 蛋白的分类最初是以其对靶酶作用结果为依据的,例如激活腺苷酸环化酶的 G 蛋白称为刺激型 G 蛋白(G_s),而抑制该酶的 G 蛋白称为抑制型 G 蛋白(G_i)。目前已把 G 蛋白的结构、氨基酸序列及其进化相似性与功能等结合起来作为分类依据。迄今为止已分离鉴定的 G 蛋白有 4 个主要类型,至少有 21 种不同的 α 亚基,5 种 β 亚基和 8 种 γ 亚基^[2]。

2 G 蛋白偶联的信号传导系统及各组份的结构和功能

G 蛋白偶联的信号传导系统由 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptors 即 GPRs)、G 蛋白和效应器(Effector)分子组成。G 蛋白是一个分子开关,传导由 GPRs 接收的信号,再以 G 蛋白解离亚基作为传导物,活化相应酶和离子通道,产生重要的第二信使,从而引起胞内相应的生物反应。当特异的活化剂存在时,活化的受体激活特异的 G 蛋白,催化 α 亚基结合的鸟苷二磷酸(GDP)转变为鸟苷三磷酸(GTP),从而 α 亚基构象改变,降低 α 亚基和 $\beta\gamma$ 亚基的亲和力,使三聚体分离为 G α (GTP)和 G $\beta\gamma$ 。解离的 G α (GTP)和 G $\beta\gamma$ 通过直接调控下游各自的效应器将信号传到细胞质和细胞核中,当 G α 亚基与 GDP 结合时,再结合 G $\beta\gamma$,抑制信号传导。G 蛋白直接调控腺苷酸环化酶(Adenyl cyclase)、磷

脂酶 (Phospholipase, C), Ca^{2+} 、 K^+ 通道以及 β 肾上腺素受体激酶等。GPR、G 蛋白和效应器的不断发现, 已成为两个世纪以来的研究热点^[2,4]。

2.1 G 蛋白偶联受体 (GPRs) 的结构和功能

GPRs 是一类重要的细胞表面受体, 跨过细胞双磷脂层, 并能传导各种细胞外信号的蛋白质超家族。图 1 所示 GPRs 的特点是有 7 个序列高度相似的疏水跨膜区域 (Transmembrane domain, TMDs) 的多肽, 具有结合并激活 G 蛋白的能力。

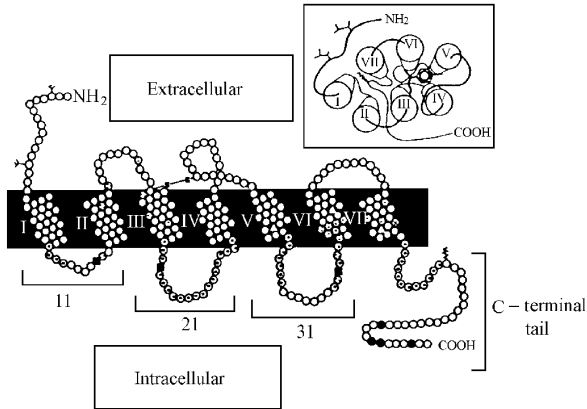


图 1 假想细胞膜上 G 蛋白偶联受体 (GPRs) 的拓扑结构图^[2]

Fig. 1 Putative membrane topography of G protein coupled receptors (GPRs)

GPR 与 G 蛋白的偶联区位于受体胞内区。而 GPR 与配体相互作用和特异性决定的重要场所在质膜最近的跨膜区域以及 C-末端离膜近端的特异区域。因此胞内环区域在确定受体对 G 蛋白的选择性、G 蛋白与受体的相对亲和力、以及在活化受体和传递信号等方面具有重要意义。

2.2 G 蛋白各亚基结构和功能关系

2.2.1 $G\alpha$ 亚基 ($G\alpha$ GTP) 亚基 是许多效应器的激活剂。从其初级结构分析得知, 它们具有一致的保守区和多变区。 α 亚基至少有 45%~80% 相似的氨基酸, 高度同源区域主要参与形成鸟核苷酸结合袋 (Guanosine-binding pocket)^[5]。绝大多数 $G\alpha$ 蛋白的三维结构是未知的, 但 $G_{\alpha t}$ 和 $G_{\alpha i}$ 的结构特征揭示了该亚基结构与功能关系^[2]。

由图 2 可知, $G_{\alpha t}$ 是由一条深的鸟核苷酸结合沟的两个单独区域组成: 一个区域 (GTPase 区) 含有 GTP 结合基元, 这个区域参与 GTPase 结合。此外, 有磷酸结合环, Mg^{2+} 结合区和鸟苷环结合区等共同序列。另一个区域即完整的 α 螺旋区域是由一个长的中心螺旋和 5 个短的螺旋组成^[2,5]。

$G\alpha$ 亚基的 N-末端特别是前 60 个氨基酸残基, 可能是与 $G\beta\gamma$ 二聚体互作的位点之一。 $G\alpha$ 亚基与 $G\beta\gamma$ 二聚体相互作用的另一个可能位点在开关区 (Switch I, II) 内, 该区域的 Cys 可能是与 $\beta\gamma$ 形成化学交联, $G_{\alpha s}$ 的 Gly226 变为 Ala 会阻止开关区 II 的 GTP 诱导的构象变化, 也可防止 $G\alpha$ 亚基从 $G\beta\gamma$ 二聚体上解离^[2]。

2.2.2 $G\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$ 亚基) 是通过非共价键的疏水作用紧密结合在一起的。这两个亚基若单独表达时会导致 $G\beta$ 亚基的不稳定和 $G\gamma$ 亚基不折叠。 $G\beta$ 亚基之间同源率为 58%~

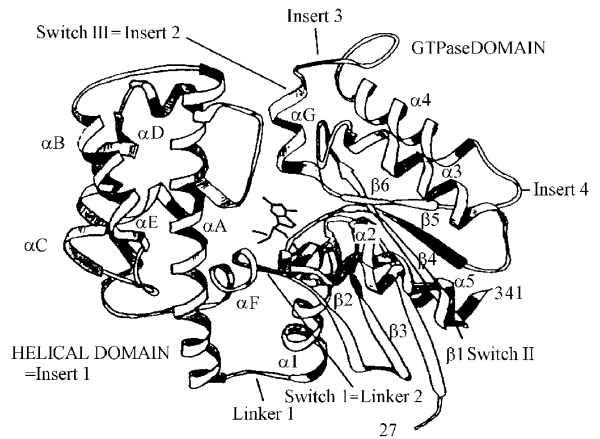


图 2 $G_{\alpha t}$ -GDP 的晶体结构^[5]

Fig. 2 Crystal structure of $G_{\alpha t}$ -GDP

90% 而 $G\gamma$ 亚基之间变化更大。 $G\beta$ 亚基的初级结构中, 相对保守的 N-末端一个双亲性 α -卷曲螺旋与 $G\gamma$ 的 N-末端螺旋平行且相互作用; 两个亚基的 Cys 残基可以进行化学交联, 并且 $G\beta$ 的 Glu₁₀ 是 $G\beta\gamma$ 二聚化所必需的。 $G\beta$ 第二个区由 7 个 40~43 个氨基酸残基的重复片段组成, 含有特定的色氨酸和天冬氨酸对, 称为 WD₄₀。 $G\beta$ 的 WD 重复区域可能参与调控 β 亚基与 γ 亚基的选择性地特异结合^[6,7]。

$G\beta\gamma$ -二聚体是通过 $G\gamma$ 亚基和 $G\alpha$ 亚基之间的异戊二烯化与 α 亚基结合成三聚体。 $G\beta\gamma$ 复合物与它识辨的受体通过 γ 亚基的 C-末端结合^[6]。 $G\beta\gamma$ -二聚体是 $G\alpha$ 亚基与质膜, 以及 $G\alpha$ 亚基与受体有效结合所必须的^[8]。此外, $G\beta\gamma$ 复合物还调控许多效应物活性^[6]。

2.3 G 蛋白主要效应器的研究

2.3.1 腺苷酸环化酶系统 腺苷酸环化酶系统是发现最早、研究最多的由 G 蛋白调节的系统之一。ATP 环化酶由 G_s 激活而被 G_i 抑制, 这种环化酶同工型, AC_2 和 AC_4 是被 $G\beta\gamma$ 和 $G_{\alpha s}$ 共同激活; AC_1 型被 $G_{\alpha s}$ 激活而被 $G\beta\gamma$ 抑制, 因此不能被 G 蛋白活化; AC_3 、 AC_5 、 AC_6 和 AC_9 不能与 $G\beta\gamma$ 直接作用^[9]。

2.3.2 磷脂酶 C (phospholipase C PLC): PLC 是以 G 蛋白为传导物的一个重要信号途径, PLC β 是 G 蛋白的直接效应器。此酶至少存在 4 个同工型。 $G_{\alpha q}$ 和 $G\beta\gamma$ 均能与 PLC β 相互作用, $G_{\alpha q}$ 类中 $G_{\alpha q}$ 、 $G_{\alpha 11}$ 、 $G_{\alpha 14}$ 和 $G_{\alpha 16}$ 都可激活 PLC β 同工酶, 激活程度为 PLC β_1 \geq PLC β_3 $>$ PLC β_2 ^[9], PLC β_4 也能被 $G_{\alpha q}$ 激活。而 $G\beta\gamma$ 亚基对该酶激活顺序为 PLC β_3 \geq PLC β_2 \gg PLC β_1 。 $G\beta\gamma$ 不能改变 PLC β_4 的活性^[10]。

2.3.3 G 蛋白调节离子通道: $G_{\alpha s}$ 亚基在重组系统中被证明可调节至少两种离子通道, 即骨骼肌细胞中的 Ca^{2+} 通道和抑制心肌 Na^+ 通道, 而 $G_{\alpha i}$ 也能抑制 Ca^{2+} 通道而激活 K^+ 通道, 在心肌毒蕈型 K^+ 通道的激活能力上 $G\beta\gamma$ 比 $G_{\alpha i}$ 更有效^[2]。

此外, 所有 G 蛋白可以长期地调节基因表达和细胞生长作用^[11]。由同源三聚体 G 蛋白途径传导的信号最终传给核转录因子的磷酸化, 启动控制细胞生长基因的转录是 G

蛋白活化的 Ras 调控的 MAPK 递级反应,引起一系列蛋白-蛋白的互作和磷酸化^[12]。G 蛋白偶联受体可能还存在潜在的效应器。其功能不仅在于细胞表面刺激的跨膜传导,还参与调控高尔基体膜和内质网膜上的信号传导^[11]。

3 G 蛋白基因克隆及基因工程

3.1 G 蛋白基因克隆

动物生物化学和药理学的广泛研究积累了大量的 G 蛋白结构及功能的关系的资料。近年来,应用分子克隆手段克隆了已发现 G 蛋白的基因。建立了人和鼠总 DNA 文库;人脑、T 细胞、单核细胞(Monocytes)、成粒细胞(Granulocytes)、肝和视网膜等 7 个 cDNA 文库;牛脑、肾上腺、大脑皮质和脑垂体等 7 个 cDNA 文库;鼠(Rat)脑、嗅觉上皮等 4 个 cDNA 文库和鼠(Mouse)的 4 个 cDNA 文库^[13]。

最先从牛脑中分离了编码 $G_{\alpha s}$ 的基因^[13]。尔后根据 G 蛋白 α 亚基一些高度保守区域核苷酸同源性高的特点,设计引物,进行 PCR 克隆了 G_{α} 亚基的 4 个亚族的至少 21 个成员。此外运用 Northern 杂交的方法,进行各种 G_{α} 亚基在组织和细胞中定位;1985 年从牛的 cDNA 中克隆了 β_1 亚基,然后分离编码 β_2 基因;1984 年编码 G_{γ} 亚基从视网膜中分离并从 cDNA 克隆 γ_1 基因^[13]。

3.2 G 蛋白的基因工程及体外表达系统

由于编码 G 蛋白各个亚基的 cDNA 序列都为已知,许多科学家采用基因工程方法构建各种不同的重组质粒,在离体的细胞中表达相应的蛋白,以便进一步开展该蛋白的结构和功能的关系的研究等。作为重组 G 蛋白表达系统通常有:①大肠杆菌表达系统;②昆虫细胞表达系统:以杆状病毒(Baculovirus)的表达载体重组质粒与杆状病毒共转染,然后感染昆虫细胞(如 Sf9 或 H5),大量表达 G 蛋白;③哺乳动物细胞表达系统:以腺病毒(Adenovirus)的表达载体重组质粒与腺病毒共转染,然后去感染哺乳动物细胞如 NIH3T3 或 293 细胞等,从而表达 G 蛋白。

4 G 蛋白偶联信号传导系统在植物保护方面的研究

植物细胞必须对大量的环境信号(如光、湿、温、重力和病原物)和其它细胞信号(如激素和营养)作出反应。有研究表明,在植物蛋白酶抑制素的创伤诱导机制中存在 G 蛋白偶联信号传导途径^[14]。因此 G 蛋白在植物信号传导途径中可能起到重要作用。

4.1 植物 G 蛋白的生化研究

植物信号传导机制知之不多,但是许多研究者根据 G 蛋白在生物进化过程中具有高度保守性,以动物和一些简单真核生物 G 蛋白共有特性来鉴定植物体中是否存在 G 蛋白。方法一:GTP 结合测定(GTP-binding assay):

通常用一个非水解 GTP 类似物如 GTP_{rs} 来检测。一般而言,GTP 结合测定可以鉴定异源三聚体和其它 GTP 结合蛋白,在植物提取物中出现有结合活性的情况相当复杂,该

方法只能作为初步判别方法,还需要其它测定来证明 G 蛋白是否存在。

方法二:GTPase 测定:

因为异源三聚体 G 蛋白具有内在 GTPase 酶活性,因而 GTPase 活性测定不失为 G 蛋白鉴定有效方法。该方法的局限在于它对 G 蛋白类型无特异性。

方法三:利用细胞毒素将 ADP-ribose moiety 与异源三聚体 G 蛋白一些 α 亚基特殊氨基酸残基共价结合来鉴定 G 蛋白。这一方法主要用于异源三聚体 G 蛋白,常用的细菌毒素有百日咳毒素(Pertussis toxin)和霍乱毒素(Cholera toxin),用这些毒素或放射性 NAD⁺ 标记 G_{α} 亚基,作为 ADP-ribose 基团供体。对百日咳毒素敏感的 G 蛋白 α 亚基(包括 G_{i1} 和转导素),在 C-末端附近有一个半胱氨酸,因此被百日咳毒素 ADP-核糖基化更复杂。

方法四:用抗已知 G 蛋白部分多肽的抗血清作免疫杂交来鉴定 G 蛋白。

这是一个十分有效的方法,许多抗 G 蛋白 α 亚基保守肽的抗体都已生产出来了。将该方法与 GTP 结合测定结合起来为植物 G 蛋白鉴定提供一个强有力的证据。抗体研究的局限性在于它要求抗体和植物蛋白的交叉反应(cross-reactivity)。总之应用上述的一个或多个的离体的生化技术,已从 17 种植物的不同器官中分离出有 GTP 结合活性的蛋白 40 多种^[14-17]。

4.2 植物 G 蛋白的分子研究

G 蛋白的生化研究为植物 G 蛋白的存在提供充分证据,但要了解 G 蛋白的结构与功能关系,及其在植物信号传导途径中作用,以及进一步蛋白质分离纯化,则必须从分子水平了解这些蛋白质。最先分离的植物 G 蛋白的基因 GPA1 源于 *Arabidopsis thaliana*^[18]。在已知的 G 蛋白 α 亚基的保守肽的基础上用简并的寡核苷酸作 PCR 得到的。GPA1 基因编码的蛋白与哺乳动物 G_i 的转导素有 36% 同源性,并且有异源三聚体 G 蛋白 α 亚基共有 GTP 结合区^[18]。后来用 GPA1 作探针,采用严格性低的杂交方法(low-stringency hybridization)方法从西红柿中分离同源基因 TGA1^[19]。这两个蛋白的同源性达 84%。最近,从大豆^[20]、莲藕^[17]、玉米^[14]中分离出与 GPA1 同源基因,这些基因编码的蛋白很相似(氨基酸同源序列达 75% 以上)。此外还克隆了大豆^[20]、水稻^[16]、小麦^[21]编码 G_{α} 亚基的基因。

已克隆的植物 G 蛋白基因除了 6 种 G_{α} 基因外,还从玉米(ZG β_1)和 *Arabidopsis thaliana*(AG β_1)等植物中分离出 5 个 G β 基因^[14],但是迄今为止还没有发现植物 G γ 基因。

4.3 G 蛋白参与的植物及昆虫信号传导途径

4.3.1 在植物信号传导中的作用研究:

①光刺激的信号传导途径:在 Lemna 和豆(pea)核膜和燕麦黄化苗质膜证实 GTP 结合蛋白参与光刺激的信号传导。由此推断红光/远红光受体植物光敏素可能包括有一个或多个 G 蛋白调控途径^[14]。

- of TGA1 cDNAs encoding a tomato G protein α subunit, *Gene*, 1991, **107**:189~195
- [20] Kim WoeYeon ,Cheong NaEun ,Lee Dongchul *et al.* Cloning and sequencing analysis of a full length cDNA encoding a G protein alpha subunit SGA1 ,from soybean ,*Plant Physiology* ,**108**(3): 1315~1316 ,1995
- [21] Nato A ,Mirshahi A ,Tichtinsky G *et al.* Immunological detection of potential signal transduction proteins expressed during wheat somatic tissue culture ,*Plant Physiology* ,1997 ,**13**(3) :801~807
- [22] Wegner L H ,Boer A H-de ,De Boer A H. Two inward K^+ channels in the xylem parenchyma cells of barley roots re regulated by G-protein modulators through a membrane delimited pathway , *Planta* ,1997 ,**203**(4) :506~516
- [23] Hooley R ,Chun N H ,Hetherington A M *et al.* Plant hormone perception and action : a role for G-protein signal transduction ? Molecular basis of signal transduction in plants. Proceedings of a discussion meeting held 18 ~ 19 February 1998 ,London ,UK. Philosophical transactions of the royal society of London Series B ,*Biological Science* , 1998 ,**353**(1374) :1425~1430
- [24] Pingret J L ,Journet E P ,Barker D G. Rhizobium Nod factor signaling :Evidence for a G protein-mediated transduction mechanism ,*Plant Cell* ,1998 ,**10**(5) :659~671
- [25] Vera Estrella R ,Higgins V J ,Blumwald ,E. Plant defense response to fungal pathogens :II. G-protein mediated change in host plasma membrane redox reactions ,*Plant Physiology* ,1994 ,**106**(1) :97~102
- [26] Meller V H ,Gibert L I. Occurrence ,quaternary structure and function of G protein subunits in an insect endocrine gland , *Molecular and cellular Endocrinology* ,1990 ,**74**(2) :133~141
- [27] Laue M ,Maida R ,Redkozubov A. G-protein activation ,identification and immunolocalization in pheromone sensitive sensilla trichodea of moths ,*Cell and Tissue Research* ,1997 ,**288**(1) :149~158
- [28] Jurgen K ,Heinz B. Olfactory reception in invertebrates ,*Science* , 1999 ,**286**:720~723.
- [29] Rafaeli A ,Gileadi C. Down regulation of pheromone biosynthesis :cellular mechanisms of pheromonostatic responses , *Insect Biochemistry and molecular biology* ,1996 ,**26**(8~9) :797~807
- [30] Shimabukuro M ,Xu J ,Sugiyama M *et al.* Signal transduction for cecropin B gene expression in adherent hemocytes of the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera :Bombycidae) ,*Applied Entomology and Zoology* ,1996 ,**31**(1) :135~143
- [31] Nicksisch R E von ,Krieger J ,Kubick S *et al.* Cloning of biogenic amine receptors from moths (*Bombyx mori* and *heliiothis virescens*) ,*Insect Biochemistry and Molecular Biology* ,1996 ,**26**(8~9) :817~827
- [32] Horst D J van der ,Vroemen S F ,Marrewij W J A van *et al.* Metabolism of stored reserves in insect fat body :hormonal signal transduction implicated in glycogen mobilization and biosynthesis of the lipophorin system ,*Comparative Biochemistry and Physiology. B Biochemistry and Molecular Biology* ,1997 ,**117**(4) :463~474
- [33] Vroemen S F ,Jonge H de ,Marrewijk W J A van *et al.* The phospholipase C signaling pathway in locust fat body is activated via Gq and not affected by camp ,*Insect Biochemistry and Molecular Biology* ,1998 ,**28**(7) :483~490

The Advancement of G Protein and Coupled Signal Transduction Pathways

CHEN Ju-Lian¹ Ge-Zhi WENG² NI Han-Xiang¹

¹(Institute of Plant Protection ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100094 ,China)

²(Department of Pharmacology ,Mount Sinai School of Medicine ,New York University ,New York ,NY10029)

Abstract G protein coupled signal transduction system is one major transmembrane signaling pathways in cell. Research of biochemistry and pharmacology in medicine showed that a lot of medicines play their role through G protein coupled signaling pathways. Thus ,systematic study on G protein structure and functions had very important effects on new medicine producing. In the process of creature evolution ,there are highly conserved amino-acid sequences in G protein. Study on G protein and coupled signal components in plants and insects signaling processes may benefit to determine the mechanism of crop resistance to disease and pest insect and resistant chemicals effect on insect behavior and physiology. This paper reviews the research progress and prospect of practical use in recent studies of G protein and coupled components in animal insect and plant signaling pathways.

Key words G protein and coupled components , cell signal transduction in plant and insect , G protein structure and function

Received August 24 2000

This work was supported by Grant from National Project of 973 (G20000162102).

* Corresponding author. Tel 86-10-62815934 ; Fax 86-10-62896114 , E-mail: chenjl@public.east.cn.net <http://journals.im.ac.cn>