

GPR158 四聚体结构初步解析*

刘旋¹, 范恒新¹, 周宁坤², 张影¹

1. 中山大学附属第七医院, 广东 深圳 518107
2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东 广州 510530

摘要: 作为 C 家族 GPCR 的一员, GPR158 近年来因其在神经传递及情绪调控中的独特作用而备受关注。GPR158 与 RGS7-Gβ5 复合物的相互作用在抑郁症等神经精神疾病的病理过程中展现出潜在的重要价值。为更好地了解 GPR158 与 RGS7-Gβ5 是如何相互作用的, 本研究利用昆虫细胞表达系统, 共表达并纯化出 GPR158-RGS7-Gβ5 复合物, 对其进行冷冻电镜结构研究。在结构解析过程中, 发现部分 GPR158 以同源四聚体的方式与 RGS7-Gβ5 相结合。由于 RGS7 和 Gβ5 电子密度的缺失, 最终获得了 1 个分辨率为 0.422 nm 的 GPR158 同源四聚体结构。该结构显示, GPR158 是以二聚体肩并肩的方式形成四聚体。同时, 该结构是首个被解析的 GPCR 四聚体结构, 为后续 GPCR 寡聚体的结构研究奠定了基础。

关键词: G 蛋白偶联受体; GPR158; 四聚体; 冷冻电镜; 结构解析

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2025)05-0001-10

Preliminary structure determination of GPR158 tetramer

LIU Xuan¹, FAN Hengxin¹, ZHOU Ningkun², ZHANG Ying¹

1. The Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China
2. Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China

Abstract: GPR158, a member of class C GPCRs, has attracted much attention for its unique roles in neurotransmission and emotion regulation recently. The interaction between GPR158 and RGS7-Gβ5 complex has shown potential values in the pathological process of neuropsychiatric diseases such as depression. To better understand how GPR158 interacts with RGS 7-Gβ5, in the study, we coexpressed the GPR158-RGS 7-Gβ5 complex by using baculovirus expression system, and then purified for Cryo-EM sample preparation. During data processing, some GPR158 were found to form homotetramers and interacted with RGS7-Gβ5 unexpectedly, and a GPR158 homotetramer structure with a resolution of 0.422 nm was finally obtained. The structure shows that two pairs of GPR158 dimers are arranged side by side. Meanwhile, the structure of GPR158 tetramer, as the first one to be resolved in GPCR family, lays the foundation for subsequent structural research of GPCR oligomers.

Key words: GPCR; GPR158; tetramer; Cryo-EM; structure determination

* 收稿日期: 2025-01-21 录用日期: 2025-06-09 网络首发日期: 2025-07-16

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515110060)

作者简介: 刘旋(1999年生), 女; 研究方向: GPCR的结构与功能; E-mail: liux563@mail3.sysu.edu.cn

通信作者: 张影(1986年生), 男; 研究方向: BAF复合物的结构与功能;

E-mail: Zhangy856@mail.sysu.edu.cn

全文阅读



ZR20250017

G 蛋白偶联受体(GPCR, G protein-coupled receptor)是人体内最大的细胞膜表面受体家族,目前已经发现有 800 多个成员,由人类基因组中大约 4% 的基因编码而成(Bjarnadóttir et al., 2006)。GPCR 被认为是细胞外信号向细胞内传递的“桥梁”,可感知多种多样的胞外刺激信号,包括光、不同化学性质的气味分子、离子、氨基酸、多肽、脂质、核苷酸和蛋白质等(Bockaert et al., 1999; Rosenbaum et al., 2009; Trzaskowski et al., 2012)。GPCR 被其天然配体激活后,进一步激活胞内的信号转导蛋白(主要为 G 蛋白),从而激活下游信号通路并引起细胞的生理反应。G 蛋白信号的终止涉及多个蛋白家族,其中有一类被称为 G 蛋白信号调控因子(RGS, regulator of G protein signaling)(Abramow-Newerly et al., 2006)。RGS 是一类 GTP 酶激活蛋白,能够加速 G 蛋白 α 亚基上 GTP 的水解,使 G 蛋白从激活态迅速转变为非激活态(Almutairi et al., 2020)。因此,RGS 蛋白既可促使 G 蛋白信号快速终止,又为 G 蛋白信号的重新激活奠定了基础,这一循环机制保证了细胞能够对外界刺激做出快速反应。

GPR158 是 C 家族 GPCR,在神经系统中表达丰富,是大脑前额叶皮层(PFC, prefrontal cortex)中表达最丰富的 3 个 GPCR 之一(Mantas et al., 2022)。研究表明 GPR158 与抑郁症、前列腺癌、脑胶质瘤、记忆衰退等疾病紧密相关(Patel et al., 2015; Kosmidis et al., 2018; Li et al., 2018; Sutton et al., 2018; Lin et al., 2022)。RGS7 是 G 蛋白信号调节因子 R7 家族的成员,可显著提高 G 蛋白将 GTP 水解为 GDP 的能力,是神经系统中调控 G 蛋白信号终止的关键蛋白之一(Orlandi et al., 2015)。GPR158 通过招募 RGS7 及其结合辅助蛋白 G β 5,形成 GPR158-RGS7-G β 5 复合物,在慢性压力诱导的抑郁症致病过程中扮演着重要角色(Orlandi et al., 2019; Darira et al., 2022)。因此,对 GPR158-RGS7-G β 5 进行结构和功能研究,不仅有助于揭示相关疾病的发病机制,也可为开发新的治疗策略提供潜在靶点。

在初期研究阶段,GPCR 通常被认为以单体的形式发挥功能,但是随着鉴定分子相互作用的技术不断发展,越来越多的实验数据表明 GPCR 可形成同源或者异源的二聚体或多聚体(Ferré et al., 2014; Milligan et al., 2019)。利用单分子全内反射荧光显微技术(TIRFM, total internal reflection

fluorescent microscope),研究人员发现在细胞膜上的 GPCR 二聚体和多聚体的形成和解离处于一种动态平衡状态(Hern et al., 2010; Kasai et al., 2011; Calebiro et al., 2013; Calebiro et al., 2018)。其中,A 家族糖蛋白激素受体(GpHRs, glycoprotein hormone receptors)的二聚化和寡聚化已被证明能在细胞、生理乃至病理生理学层面调节其信号活性(Fanelli et al., 2020)。Golebiewska et al. (2011)发现 A 家族阿片类受体 μ OR (μ -opioid receptor)与 δ OR (δ -opioid receptor)会形成异源四聚体,而啡啡会影响 μ OR 寡聚化的程度以及 μ OR 与 G 蛋白的结合,这表明 μ OR 的功能特性与其寡聚化状态有关。近年来的研究发现,严格以二聚体形式存在的 C 家族 GPCR 受体也会形成多聚体。Møller et al. (2018)利用 SNAP 标签对 mGluR2 进行荧光波动成像技术分析,发现当 mGluR2 受体在激动剂与正向变构调节剂(PAM, positive allosteric modulator)的共同作用下,或仅在负向变构调节剂(NAM, negative allosteric modulator)存在的情况下,会倾向于形成寡聚体。GABA $_B$ R 也被发现可以通过 2 个异源二聚体的 GABA $_{B1}$ 亚基形成四聚体,这种四聚体不仅在转染细胞中可以检测到,也可以在生理状态下的大脑中检测到(Comps-Agrar et al., 2011; Stewart et al., 2018)。越来越多研究表明 GPCR 的多聚化在受体蛋白成熟、信号调节、下游信号传递以及受体内化过程中可能扮演着至关重要的角色(González-Maeso, 2011; 薛礼等, 2015; Farran, 2017)。

目前对于不同家族 GPCR 四聚体形成的分子机制研究,均只停留在生理生化实验层面,在蛋白质结构层面的证据尚处于空白。本研究在尝试解析 GPR158-RGS7-G β 5 复合物结构的过程中,意外发现有相当一部分 GPR158 是以四聚体的形式与后两者结合的。为了从结构角度揭示 GPCR 寡聚化的分子机制,本文对 GPR158 四聚体进行了结构解析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 昆虫细胞表达载体 pFBDM 和 pFUGG,大肠杆菌 *DH5 α* 和 *DH10bac* 感受态细胞, *Sf9* 昆虫细胞均为实验室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 Q5 DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, Infusion 连接试剂盒购自南京诺唯赞公司, Sf-900™ II SFM 培养基购自 Thermo Fisher 公司, 去垢剂月桂基麦芽

糖新戊二醇 (LMNG, lauryl maltose neopentyl glycol)、GDN (glyco-diosgenin) 和胆固醇 (CHS, cholesterol) 购自 Anatrace 公司, 蛋白纯化相关填料和层析柱购自 Cytiva 公司, 蛋白酶抑制剂 cocktail 购自 Bimake 公司, 抗生素等购自源叶生物公司, FuGENE 转染试剂购自 Promega 公司, 7.5 mg/mL 甲酸双氧铀负染染色液为实验室保存, 其他化学试剂均为国产或者进口分析纯试剂。普通碳支持膜、QuantiFoil Cu R2/2 载网购于北京中镜科仪有限公司, 120 kV 负染透射电镜、200 和 300 kV 冷冻电镜由中国科学院广州生物医药与健康研究院电镜平台和南方科技大学冷冻电镜平台提供。

1.2 方法

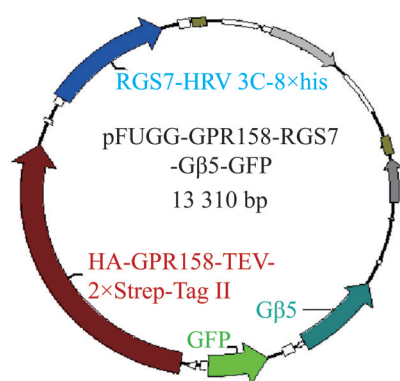
1.2.1 目的基因的合成和表达质粒的构建 人源野生型 GPR158 (UniProt ID: Q5T848)、RGS7 (UniProt ID: P49802) 和 G β 5 (UniProt ID: O14775) 的蛋白序列分别从 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 获取, 由苏州金唯智生物科技有限公司针对昆虫细胞表达系统进行密码子优化后合成于 pUC57 克隆质粒上。

在 GPR158 的 N 端用 HA 信号肽

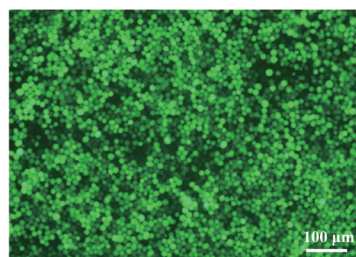
(MKTIIALSYIFCLVFA) 替换 GPR158 原有信号肽, 并在 C 端引入 TEV 酶切位点和 2 \times Strep-Tag II 标签, 构建至 pFBDM 载体的 ph 启动子下, 同时在 p10 启动子下插入绿色荧光蛋白 GFP, 以便于后续观察病毒感染效率。在 RGS7 的 C 端融合 8 \times his tag 标签, 构建至 pFUGG 载体的 ph 启动子下, 将 G β 5 构建至 pFUGG 的 p10 启动子下。利用 MultiBac 系统, 将 pFBDM 载体上的 GPR158 和 GFP 片段构建至 RGS7 和 G β 5 在的 pFUGG 载体上, 实现单质粒表达三元复合物 (质粒图谱见图 1a) (Berger et al., 2019)。所有 PCR 采用 Q5 DNA 聚合酶扩增, 同源重组采用 Infusion 连接试剂盒, 黏性末端连接采用 T4 DNA 连接酶。将连接产物转化至 *DH5 α* 感受态细胞中, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养过夜, 次日挑取单克隆进行测序以筛选阳性克隆。

1.2.2 杆粒的制备 取 1 μ L 质粒转化至 30 μ L 大肠杆菌 *DH10Bac* 感受态细胞中, 冰浴 25 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 45 s, 加入 200 μ L 无抗 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 活化 4 h 以上, 涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素、100 μ g/mL X-gal 和 40 μ g/mL IPTG 的平板, 于 37 $^{\circ}$ C 避光倒置培养 48 h。经过蓝

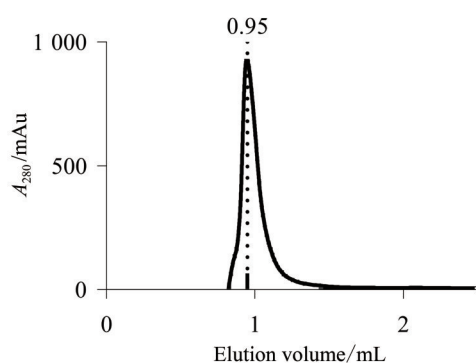
(a) 表达质粒图谱



(b) 杆状病毒感染96 h后*Sf9*细胞荧光成像



(c) 凝胶过滤色谱



(d) SDS-PAGE

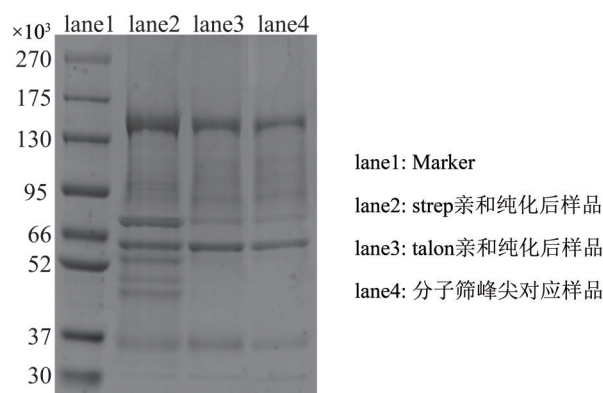


图1 GPR158-RGS7-G β 5复合物的表达与纯化

Fig. 1 Expression and purification of GPR158-RGS7-G β 5 complex

白斑筛选及菌落 PCR 鉴定出阳性克隆。挑取阳性克隆于上述三抗 LB 液体培养基中小摇过夜,次日利用异丙醇沉淀 DNA 的方法抽提阳性克隆菌的重组杆粒。

1.2.3 杆状病毒的制备 利用 FuGENE 转染试剂,将 2.5 μg 杆粒转染至 3 mL 0.5×10^6 cells/mL 的 *sf9* 细胞中,27 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 4 d 后,获得 P0 代杆状病毒。1:13 接种,27 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养 3 d 后,获得 P1 代杆状病毒。1:50 接种,27 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养 2 d 获得 P2 代杆状病毒。可利用荧光显微镜观察细胞中 GFP 的表达情况,以便于监测杆状病毒制备效率。

1.2.4 重组蛋白的表达 以 1:25 的比例,加入 P2 代病毒至 2.0×10^6 cells/mL 的 *sf9* 细胞中,27 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min 培养 48 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 1 000 r/min 离心 20 min 收集细胞。用 $1 \times \text{PBS}$ 温和重悬细胞沉淀,再次离心

收集细胞用于蛋白纯化。

1.2.5 重组蛋白的纯化 在收集的细胞中加入 Lysis buffer 1,放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的旋转混合仪上孵育 1.5 h,加入等体积的 Lysis buffer 2,溶膜 2~3 h。4 $^{\circ}\text{C}$,160 000 $\times g$ 离心 1 h,收集上清,上样至 Strep column,用 Strep wash buffer 进行洗杂,Strep elution buffer 进行洗脱。在洗脱液中加入终浓度为 5 mmol/L 的咪唑,加入 Talon beads,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。离心收集 Talon beads 于重力柱中,用 Talon wash buffer 进行洗杂,每次 2~3 倍柱体积,至少 20 倍柱体积,接着用 Talon elution buffer 进行洗脱,利用 100 000 的浓缩超滤管对蛋白样品进行浓缩。使用 superdex 200 increase 3.2/300 与 SEC buffer 进行凝胶过滤层析,经 SDS-PAGE 确定不同出峰位置的蛋白成分。上述纯化缓冲液配方见表 1。

表 1 GPR158-RGS7-G β 5 复合物纯化相关缓冲液
Table 1 Buffers for purification of GPR158-RGS7-G β 5 complex

缓冲液	配方
Lysis buffer 1	20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl ₂ , 1 \times cocktail
Lysis buffer 2	20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 5.0 mg/mL LMNG, 0.5 mg/mL CHS
Strep wash buffer	20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.1 mg/mL LMNG, 0.01 mg/mL CHS, 1 mg/mL glycerol
Strep elution buffer	20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.1 mg/mL LMNG, 0.01 mg/mL CHS, 1 mg/mL glycerol, 3 mmol/L D-Desthiobiotin
Talon wash buffer	20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.1 mg/mL LMNG, 0.01 mg/mL CHS, 1 mg/mL glycerol, 25 mmol/L imidazole
Talon elution buffer	20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.1 mg/mL LMNG, 0.01 mg/mL CHS, 1 mg/mL glycerol, 300 mmol/L imidazole
SEC buffer	20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.02 mg/mL LMNG, 0.002 mg/mL CHS

1.2.6 冷冻电镜样品制备 GPR158-RGS7-G β 5 复合物的冷冻样品制备使用赛默飞公司的 FEI Vitrobot,样品室温度为 4 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 100%。取 3 μL 复合物蛋白溶液加在经亲水化处理的 Quantifoil Cu R2/2 载网上,用滤纸吸去表面多余溶液,经液态乙烷快速冷冻后,转移至液氮罐中保存。

1.2.7 数据的收集、处理和模型搭建 使用 200 kV 冷冻电镜对冷冻样品进行筛样和初步数据收集,使用配有 Gatan Bioquantum K3 直接电子探测器的 Titan Krios G3i 300 kV 冷冻电镜对高质量样品进行数据收集。使用 EPU 软件的超分辨模式,放大倍数 105 000,像素尺寸 0.085 5 nm/pix,欠焦范围 -0.8 ~ -2.6 μm 。通过 cryoSPARC 4.0 和 RELION 4.0 等软件对数据进行处理 (Punjani et al., 2017;

Kimanius et al., 2021),具体结构解析流程参见图 2c。基于 GPR158 四聚体的电子密度,利用 Coot 和 Phenix 软件进行结构模型的搭建和修正 (Emsley et al., 2004; Adams et al., 2010)。本文使用 UCSF Chimera X 和 Pymol 软件进行结构分析和作图。

2 结果

2.1 GPR158-RGS7-G β 5 复合物的表达和纯化

将携带 *GPR158*、*RGS7*、*G β 5* 和 *GFP* 基因的杆粒转染至 *sf9* 昆虫细胞,用于包装杆状病毒。转染后 96 h 的 *sf9* 细胞荧光成像图 (图 1b) 显示大部分细胞均呈现绿色荧光,表明病毒包装效率高。经过多次纯化条件优化,最终确定先利用 GPR158 C 端携带的 2 \times Strep-Tag II 标签进行初步纯化,而后利用

RGS7 C端携带的 $8 \times \text{his tag}$ 进行钴离子亲和纯化,可成功纯化复合物。将钴柱洗脱后的样品利用50 000超滤管进行浓缩,经高速离心后上样至superdex 200 increase 3.2/300,进行分子筛纯化,结果显示蛋白聚集峰较小(图1c),目的蛋白复合物峰出峰位置在0.9~1.1 mL,该出峰位置对应相对分子质量约为669 000的球状蛋白。由于GPR158受去垢剂包裹,其大小较理论值更大,因而GPR158-RGS7-G β 5复合物在该位置出峰较为合理。取峰尖收集的样品进行SDS-PAGE电泳检测分析(图1d),可以清晰观察到GPR158(~135 000)、RGS7(~60 000)和G β 5(~39 000)条带,其中GPR158因其胞外N端具有多个糖基化位点,遂其在SDS-PAGE上的条带会高于其理论值,RGS7和G β 5的条带与理论大小基本相符。纯化结果表明样品质量较好,可用于后续冷冻电镜样品制备。

2.2 GPR158四聚体的发现和结构解析

将经分子筛纯化后的GPR158-RGS7-G β 5蛋白样品用于冷冻电镜制样。首先,使用200 kV冷冻电镜初步筛样,冷冻电镜图片(图2a)显示蛋白颗粒分散性和均一性良好,然后利用300 kV冷冻电镜对冷冻样品进行数据收集。利用cryoSPARC 4.0和RELION 4.0软件对数据进行处理,对收集的28 338张电镜图片进行CTF校正,从中挑选2 872 230个蛋白颗粒进行2D分类,意外地发现了GPR158四聚体这一分类(图2b绿色方框所示)。经过多轮Ab-Initio reconstruction、hetero-refinement和non-uniform refinement后,获得168 884个有效颗粒进行3D重构,最终获得整体分辨率为0.422 nm的GPR158四聚体电子密度图(图2d)。GPR158蛋白可以分为胞外区、跨膜区和胞内区。胞内区密度较差,无法建模。在SWISS-MODEL网站利用GABA $_B$ R(PDB: 6w2x)的结构,对GPR158的跨膜区(388~647位氨基酸)进行同源建模。将获得的模型匹配至GPR158四聚体的电子密度图中,其中由于TM4和TM5之间胞外环ECL2(522~551位氨基酸)的密度不清晰,未能对该区域进行建模,经模型搭建和修正,获得了GPR158四聚体跨膜区的结构模型。在GPR158四聚体胞外区的电子密度图中,只有1对同源二聚体的分辨率较好,因而利用该二聚体尝试对GPR158胞外区的结构进行建模。利用AlphaFold2预测GPR158的胞外区结构,将预测的结构与GPR158四聚体的电子密度图进行叠合,再利用Coot和Phenix软件对GPR158胞外区进行结构搭建

和修正。然而由于胞外区某些区域的电子密度不清晰,暂无法准确地完成对胞外区模型的搭建。最终将同源二聚体胞外区搭建的模型与跨膜区搭建的模型进行整合,可获得GPR158四聚体的结构模型。

2.3 GPR158四聚体的整体结构

GPR158四聚体包含4个GPR158单体,单体A和B、单体C和D分别组成2对同源二聚体,2个GPR158二聚体并列形成GPR158四聚体,长、宽、高分别为9.74、9.05和16.09 nm(图3a~b)。GPR158单体包含胞外结构域和跨膜结构域,二者之间由1个灵活的“stalk”结构连接(图3a)(Patil et al., 2022)。同Jeong et al.(2021)和Patil et al.(2022)所报道的结构一样,GPR158胞外区的N端包含1个独特的“cache”样结构域,跨膜区则包含7根跨膜螺旋,而“stalk”结构域中不仅包含C家族GPCR传统的富含半胱氨酸结构域(CRD, cysteine-rich domain),还包含1个独特的类表皮生长因子结构域(EGF-like, epidermal growth factor-like domain)。GPR158通过胞外结构域和跨膜区结构域介导二聚体相互作用。由于胞外区搭建的模型侧链准确性差,因而无法判断其相互作用的界面,而跨膜区模型显示1个单体的TM4和TM5与另一个单体的TM4和TM5共同形成了二聚体界面(图3c)。每个GPR158单体的跨膜区几乎相同,其均方根偏差(r.m.s.d., root-mean-square deviation)范围为0.005 2~0.068 7 nm。然而,整个GPR158单体之间存在显著差异,GPR158单体A和B之间的r.m.s.d.相差0.172 9 nm。总体而言,GPR158结构在胞外区、连接结构域以及跨膜螺旋的排列方式中采用了独特的拓扑结构,与其他C类GPCR不同(图3c~d)。

3 讨论

GPCR多聚化现象的研究中,多聚体内单体的排列方式是研究人员较为关注的内容。对于GPCR四聚体来说,研究人员根据生物学信息分析提出,GPR158四聚体的结合方式可能有3种,分别是紧密型(compact)、线型(linear)和Z字型(zigzagged)(图4a)(Cordomí et al., 2015)。对于C家族GPCR四聚体,GABA $_B$ 受体的异源二聚体(GABA $_{B1}$ 和GABA $_{B2}$)已被证实能够形成四聚体。研究人员通过功能实验推测,GABA $_B$ 四聚体中单体是以Z字方式结合,单体间通过GABA $_{B1}$ 的TM5和TM6相互结合(图4b)(Xue et al., 2019)。在本研究中,通过冷冻电镜技术成功揭示了GPR158四聚体结构,2对

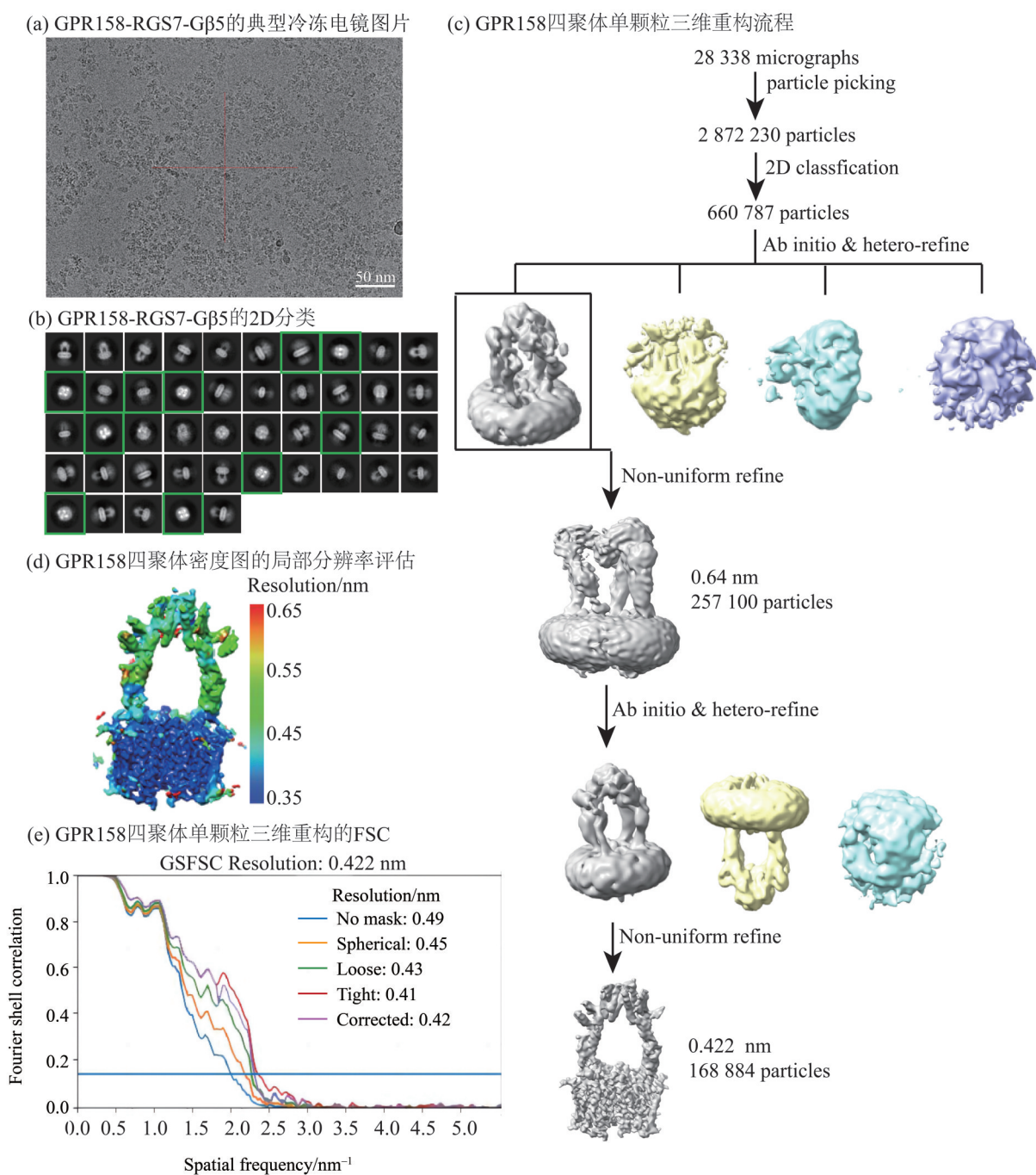


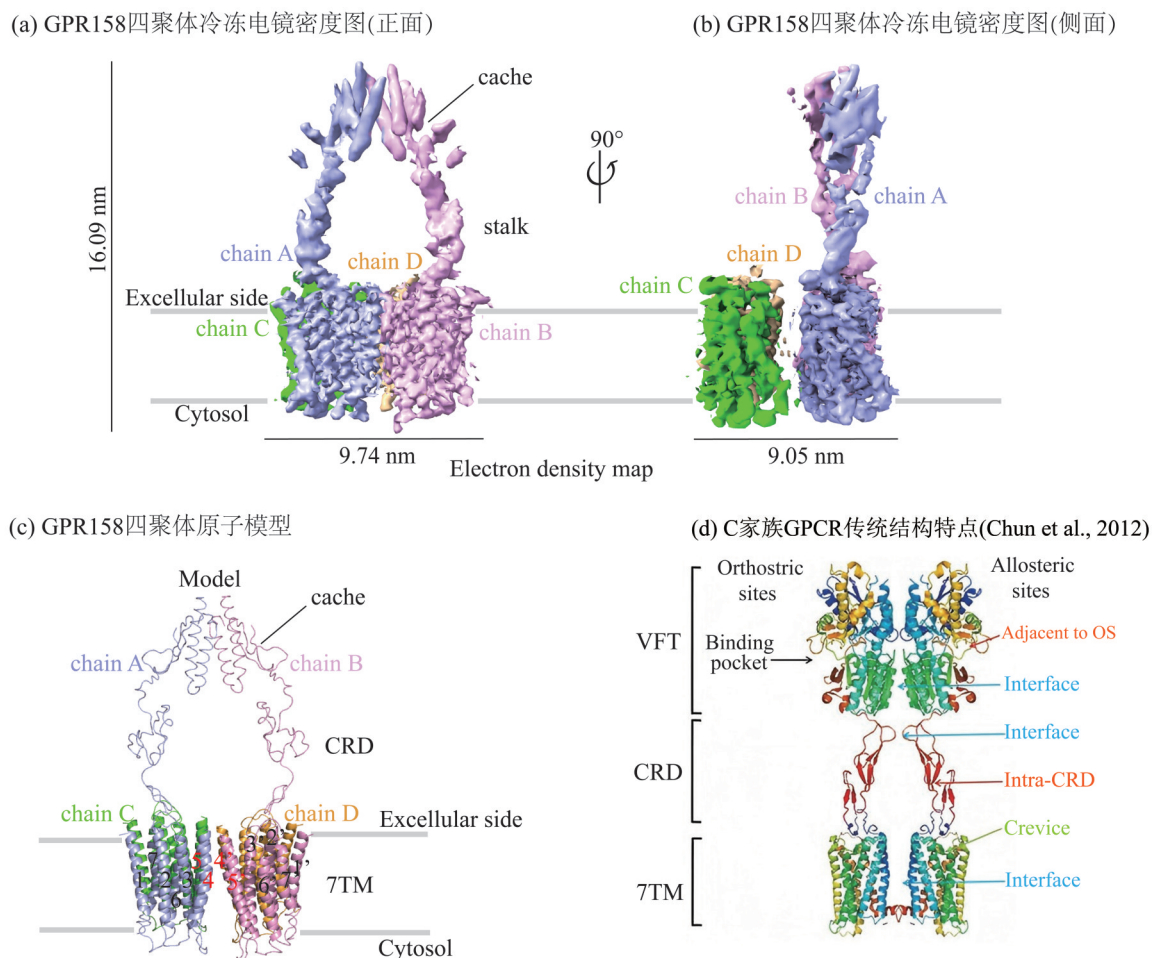
图2 GPR158四聚体的冷冻电镜单颗粒三维重构

Fig. 2 Cryo-EM single-particle reconstruction of GPR158 tetramer

同源二聚体以肩并肩的方式排列(图4c),与Cordomí et al. (2015)提出的四聚体结合机制中的“Compact”模式较为相符。对GPR158四聚体中2对二聚体之间的跨膜区进行相互作用分析,仅发现B链TM4残基Y497和D链TM5残基R578距离为0.4 nm,其他的跨膜螺旋之间距离相隔较远(>0.8 nm),表明跨膜区大概率不参与GPR158四聚体的形成(图4c)。依据GPR158四聚体电子密度图揭示的2对二聚体胞外区的接触密度(图4d红色方

框所示),及Jeong et al. (2021)和Patil et al. (2022)等研究者解析的胞内区截短的GPR158结构中未发现GPR158四聚体的结果,我们推测二聚体形成四聚体的主要作用力可能在胞外区或者胞内区,而非传统观点所认为的跨膜区。

在2D分类中,侧面分类中的GPR158四聚体胞内段含有较多弥散的电子密度(图5a),我们推测该电子密度大概率为GP158胞内区与RGS7-Gβ5异源二聚体的电子密度。胞内区多为无规则卷曲结



a~c: 紫色、粉色、绿色和橙色分别代表GPR158 A、B、C、D的4个单体, 细胞外侧为上, 细胞质侧为下。

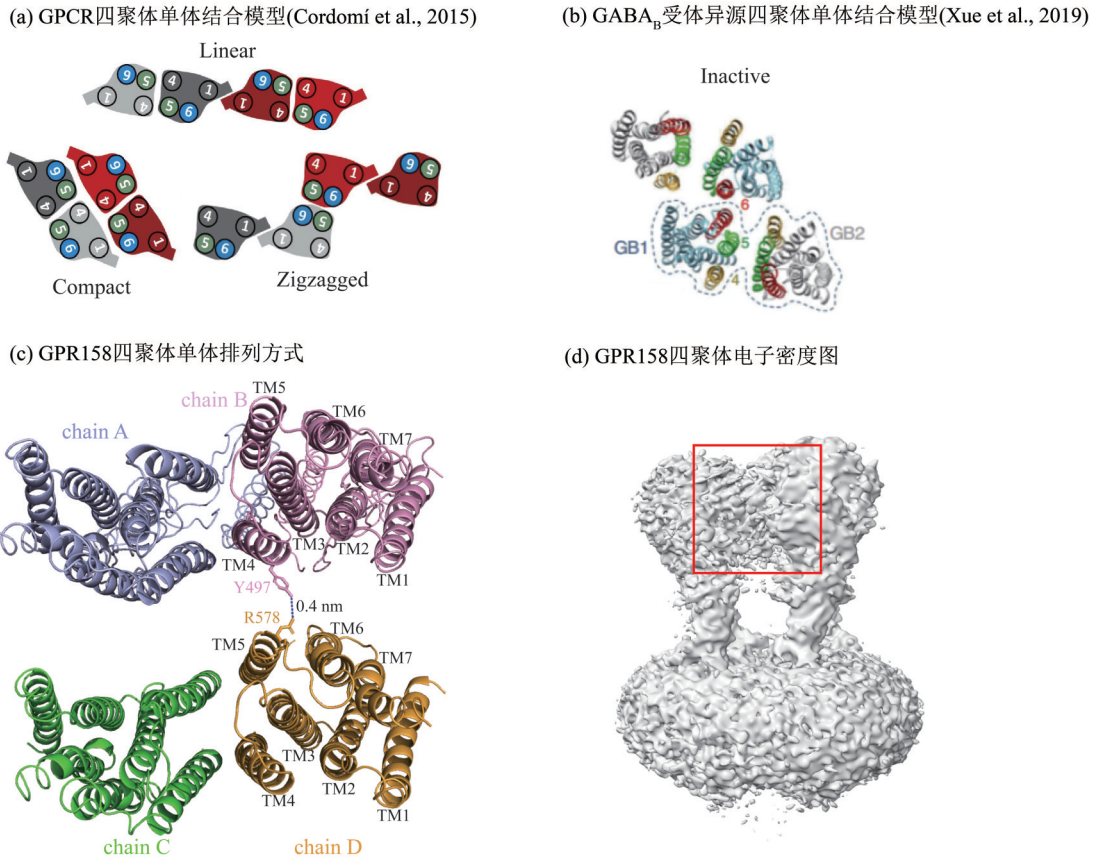
图3 GPR158四聚体的整体结构

Fig. 3 Overall structures of GPR158 tetramer

构, 柔性较大, 导致该区域电子密度不够清晰, 因此我们未能解析出这部分结构。Jeong et al. (2021)发现 GPR158 同源二聚体可以结合 1 个或者 2 个 RGS7-Gβ5。将 GPR158 四聚体结构与 2GPR158-2RGS7-2Gβ5 (PDB: 7EWR) 的结构进行比对, 发现 GPR158 四聚体中的 1 个 GPR158 二聚体结合的 2 个 RGS7-Gβ5 会延伸至另一个 GPR158 二聚体的下方, 导致后者没有足够的空间结合其他 RGS7-Gβ5 (图 5b~d)。由此推测, GPR158 四聚体与 GPR158 二聚体一样, 能够结合的 RGS7-Gβ5 数量最多为 2 个。纯化后的蛋白胶图 (图 1d) 也显示 GPR158 条带的颜色明显较 RGS7 和 Gβ5 更深, 表明 GPR158 的含量较 RGS7 和 Gβ5 更多, 该结果进一步佐证了我们的推测。

有文献报道 GPR158 能够增强 RGS7 的 GAP 活性, 而 RGS7 能显著加速 Gαo 蛋白水解 GTP 的速度, 因而 GPR158-RGS7-Gβ5 复合物被认为能够加速那

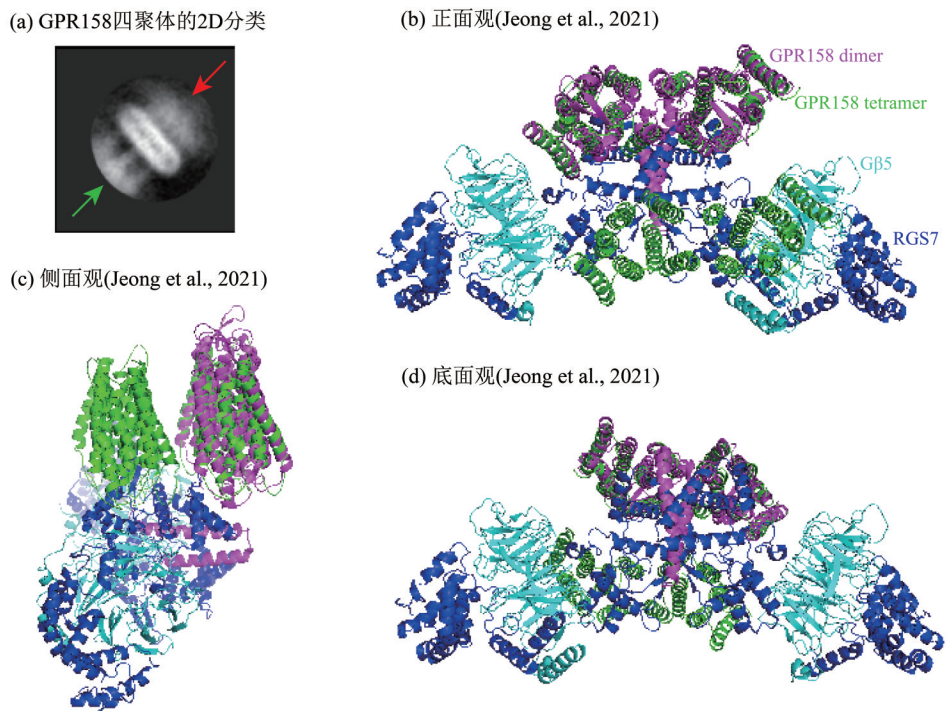
些通过 Gαo 传递胞外信号的 GPCR 信号通路的失活 (Patil et al., 2022; Laboute et al., 2023)。目前有关 GPCR 形成四聚体或者低阶寡聚体的生物学意义的探讨, 大都认为四聚体可能在生理活动中扮演着受体功能负调控的作用。例如, GABA_B 四聚体中有 2 个可以偶联 G 蛋白的 GABA_{B2} 亚基, 但只能偶联 1 个 G 蛋白。当在表达野生型 GABA_B 受体的细胞中, 引入干扰野生型 GABA_B 四聚体形成的 GABA_{B1} 或者 GABA_{B2} 突变体时, 发现引入的突变体可以显著提高 GABA_B 受体的激活效率, 表明 GABA_B 四聚体的存在对其异源二聚体的受体功能具有负调控作用 (Comps-Agrar et al., 2011)。同理, 我们推测由 2 对 GPR158 二聚体形成的四聚体可能执行与 GPR158 二聚体相同的功能, 因而从某种程度上来说, GPR158 四聚体的存在可能限制了 GPR158 的受体功能。



c: 紫色、粉色、绿色和橙色分别代表GPR158 A、B、C、D的4个单体，细胞外侧为上，细胞质侧为下。

图4 GPCR四聚体的排列方式

Fig. 4 The arrangement of monomers in GPCR tetramers



a: 红色箭头为胞内区密度，绿色箭头为胞外区密度；b~d: 绿色为GPR158四聚体的结构，紫色为7EWR中GPR158的结构，蓝色为RGS7的结构，靛青色为Gβ5的结构。

图5 基于空间结构预测GPR158四聚体与RGS-Gβ5的结合形式

Fig. 5 The possible form of GPR158 tetramer binding with RGS-Gβ5 based on structure analysis

4 结 论

本研究通过 Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统实现了 GPR158 及其下游结合蛋白 RGS7 和 G β 5 的共表达, 在利用冷冻电镜技术解析 GPR158-RGS7-G β 5 结构的过程中, 意外地发现了 GPR158 四聚体的存在, 对其进行结构解析, 最终获得了 1 个整体分辨率为 0.422 nm 的四聚体结构, 其中 2 对 GPR158 二聚体以肩并肩的方式排列。这是首个被解析的 GPCR 四聚体结构, 直观地展示了

GPCR 四聚体单体间的排列方式, 验证了以往的 GPCR 四聚体排列理论模型, 为 GPCR 寡聚体的结构研究奠定了基础。最后, 通过结构比对和文献调研, 我们对 GPR158 与下游蛋白二聚体 RGS7-G β 5 的结合方式以及 GPCR 寡聚体的潜在功能进行了初步探讨。

致谢:感谢中国科学院广州生物医药与健康研究院电镜平台和南方科技大学冷冻电镜平台对本研究提供的技术支持。

参考文献:

- 薛礼, 赵菡, 刘俊科, 等, 2015. G 蛋白偶联受体寡聚体结构研究进展[J]. 现代生物医学进展, 15(8): 1547-1552.
- ABRAMOW-NEWERLY M, ROY A A, NUNN C, et al, 2006. RGS proteins have a signalling complex: Interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins[J]. Cell Signal, 18(5): 579-591.
- ADAMS P D, AFONINE P V, BUNKÓCZI G, et al, 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 66(Pt 2): 213-221.
- ALMUTAIRI F, LEE J K, RADA B, 2020. Regulator of G protein signaling 10: Structure, expression and functions in cellular physiology and diseases[J]. Cell Signal, 75: 109765.
- BERGER I, TÖLZER C, GUPTA K, 2019. The MultiBac system: A perspective[J]. Emerg Top Life Sci, 3(5): 477-482.
- BJARNADÓTTIR T K, GLORIAM D E, HELLSTRAND S H, et al, 2006. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse[J]. Genomics, 88(3): 263-273.
- BOCKAERT J, PIN J P, 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: An evolutionary success[J]. EMBO J, 18(7): 1723-1729.
- CALEBIRO D, RIEKEN F, WAGNER J, et al, 2013. Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 110(2): 743-748.
- CALEBIRO D, SUNGKAWORN T, 2018. Single-molecule imaging of GPCR interactions[J]. Trends Pharmacol Sci, 39(2): 109-122.
- CHUN L, ZHANG W H, LIU J F, 2012. Structure and ligand recognition of class C GPCRs[J]. Acta Pharmacol Sin, 33(3): 312-323.
- COMPS-AGRAR L, KNIAZEFF J, NØRSKOV-LAURITSEN L, et al, 2011. The oligomeric state sets GABA(B) receptor signalling efficacy[J]. EMBO J, 30(12): 2336-2349.
- CORDOMÍ A, NAVARRO G, AYMERICH M S, et al, 2015. Structures for G-protein-coupled receptor tetramers in complex with G proteins[J]. Trends Biochem Sci, 40(10): 548-551.
- DARIRA S V, SUTTON L P, 2022. The interaction, mechanism and function of GPR158-RGS7 cross-talk[M]//G Protein-Coupled Receptors(Part A). Amsterdam; Elsevier: 167-176.
- EMSLEY P, COWTAN K, 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 60(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
- FANELLI F, HANYALOGLU A C, JONAS K, 2020. Chapter Five Integrated structural modeling and super-resolution imaging resolve GPCR oligomers[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 169: 151-179.
- FARRAN B, 2017. An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers[J]. Pharmacol Res, 117: 303-327.
- FERRÉ S, CASADÓ V, DEVI L A, et al, 2014. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: Functional and pharmacological perspectives[J]. Pharmacol Rev, 66(2): 413-434.
- GOLEBIEWSKA U, JOHNSTON J M, DEVI L, et al, 2011. Differential response to morphine of the oligomeric state of μ -opioid in the presence of δ -opioid receptors[J]. Biochemistry, 50(14): 2829-2837.
- GONZÁLEZ-MAESO J, 2011. GPCR oligomers in pharmacology and signaling[J]. Mol Brain, 4(1): 20.

- HERN J A, BAIG A H, MASHANOV G I, et al, 2010. Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(6): 2693–2698.
- JEONG E, KIM Y, JEONG J, et al, 2021. Structure of the class C orphan GPCR GPR158 in complex with RGS7–Gβ5[J]. *Nat Commun*, 12(1): 6805.
- KASAI R S, SUZUKI K G N, PROSSNITZ E R, et al, 2011. Full characterization of GPCR monomer–dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging[J]. *J Cell Biol*, 192(3): 463–480.
- KIMANIUS D, DONG L, SHAROV G, et al, 2021. New tools for automated cryo-EM single-particle analysis in RELION-4.0[J]. *Biochem J*, 478(24): 4169–4185.
- KOSMIDIS S, POLYZOS A, HARVEY L, et al, 2018. RbAp48 protein is a critical component of GPR158/OCN signaling and ameliorates age-related memory loss [J]. *Cell Rep*, 25(4): 959–973.e6.
- LABOUE T, ZUCCA S, HOLCOMB M, et al, 2023. Orphan receptor GPR158 serves as a metabotropic *Glycine receptor*: mGlyR [J]. *Science*, 379 (6639) : 1352–1358.
- LI N, ZHANG Y, SIDLAUSKAS K, et al, 2018. Inhibition of GPR158 by microRNA-449a suppresses neural lineage of glioma stem/progenitor cells and correlates with higher glioma grades[J]. *Oncogene*, 37(31): 4313–4333.
- LIN J, LI Q, LEI X, et al, 2022. The emerging roles of GPR158 in the regulation of the endocrine system [J]. *Front Cell Dev Biol*, 10: 1034348.
- MANTAS I, SAARINEN M, XU Z D, et al, 2022. Update on GPCR-based targets for the development of novel antidepressants[J]. *Mol Psychiatry*, 27(1): 534–558.
- MILLIGAN G, WARD R J, MARSANGO S, 2019. GPCR *Homo*-oligomerization [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 57: 40–47.
- MØLLER T C, HOTTIN J, CLERTÉ C, et al, 2018. Oligomerization of a G protein-coupled receptor in neurons controlled by its structural dynamics [J]. *Sci Rep*, 8(1): 10414.
- ORLANDI C, SUTTON L P, MUNTEAN B S, et al, 2019. Homeostatic cAMP regulation by the RGS7 complex controls depression-related behaviors [J]. *Neuropsychopharmacology*, 44(3): 642–653.
- ORLANDI C, XIE K, MASUHO I, et al, 2015. Orphan receptor GPR158 is an allosteric modulator of RGS7 catalytic activity with an essential role in dictating its expression and localization in the brain [J]. *J Biol Chem*, 290(22): 13622–13639.
- PATEL N, ITAKURA T, JEONG S, et al, 2015. Expression and functional role of orphan receptor GPR158 in prostate cancer growth and progression [J]. *PLoS One*, 10 (2) : e0117758.
- PATIL D N, SINGH S, LABOUE T, et al, 2022. Cryo-EM structure of human GPR158 receptor coupled to the RGS7–Gβ5 signaling complex[J]. *Science*, 375(6576) : 86–91.
- PUNJANI A, RUBINSTEIN J L, FLEET D J, et al, 2017. cryoSPARC: Algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination [J]. *Nat Methods*, 14 (3) : 290–296.
- ROSENBAUM D M, RASMUSSEN S G F, KOBILKA B K, 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors[J]. *Nature*, 459(7245): 356–363.
- STEWART G D, COMPS-AGRAR L, NØRSKOV-LAURITSEN L B, et al, 2018. Allosteric interactions between GABAB1 subunits control orthosteric binding sites occupancy within GABAB oligomers [J]. *Neuropharmacology*, 136: 92–101.
- SUTTON L P, ORLANDI C, SONG C, et al, 2018. Orphan receptor GPR158 controls stress-induced depression [J]. *eLife*, 7: e33273.
- TRZASKOWSKI B, LATEK D, YUAN S, et al, 2012. Action of molecular switches in GPCRs—Theoretical and experimental studies[J]. *Curr Med Chem*, 19(8): 1090–1109.
- XUE L, SUN Q, ZHAO H, et al, 2019. Rearrangement of the transmembrane domain interfaces associated with the activation of a GPCR hetero-oligomer[J]. *Nat Commun*, 10(1): 2765.

(责任编辑 张冰)