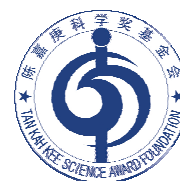


2018 年度陈嘉庚科学奖专辑



陈嘉庚青年科学奖——生命科学奖获奖人

**吴蓓丽**

中国科学院上海药物研究所研究员，主要从事 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 的结构、功能研究和药物研发。近 5 年，解析多种 GPCR 的三维结构，为理解 GPCR 的信号转导机制提供重要依据，在 *Science*, *Nature* 和 *Cell* 发表 9 篇研究论文，其中通讯作者 6 篇。获“中国青年女科学家奖”等多个奖项。

相关成果名称: G 蛋白偶联受体的结构研究与药物研发

G 蛋白偶联受体(GPCR)是人体内最大的膜受体蛋白家族，在细胞信号转导中发挥关键作用，与人体疾病密切相关，是最大的药物靶标蛋白家族，40%以上的上市药物以其为作用靶点。GPCR 的结构是其功能研究的重要基础，也是药物研发的迫切需求，但其结构解析极具挑战性。吴蓓丽研究团队成功解析了艾滋病毒(HIV)共受体 CCR5 的晶体结构，揭示了 HIV 与人体细胞的作用机制，并阐明不同药物的抗病毒机理，对于深入理解 HIV 感染机制和指导抗 HIV 新药研发具有重大意义；随后开展基于 CCR5 结构的药物研发，已获得药效优于上市药物的候选药物。测定了重要的抗血栓药物靶标 P2Y₁R 和 P2Y₁₂R 的结构，首次发现位于受体分子外表面的全新配体结合位点，颠覆了对于 GPCR 配体结合模式的传统认知；并阐明两种受体与不同药物的作用机制，将极大推动抗血栓新药研发。解析了首个 B 类 GPCR 全长蛋白的晶体结构，揭示胰高血糖素受体 GCGR 不同结构域对其活化的协作调控机制，对于全面理解 GPCR 的结构与功能关系具有重要意义。首次测定了 GCGR 与多肽配体结合的复合物结构，阐明该受体与多肽配体的精细结合模式，为深入理解 B 类 GPCR 对细胞信号的识别机制提供了重要依据，并有助于 2 型糖尿病的新药研发。上述成果极大促进了 GPCR 信号识别、转导和调控机制等关键问题的突破性解决，并为相关药物发现提供了结构基础。

G蛋白偶联受体的结构研究与药物研发

杨振霖¹, 吴蓓丽^{1,2*}

1. 中国科学院上海药物研究所, 中国科学院受体结构与功能重点实验室, 上海 201203;

2. 上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210

* 联系人, E-mail: beiliwu@simm.ac.cn

2018-03-30 收稿, 2018-04-17 修回, 2018-04-18 接受, 2018-05-09 网络版发表

中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB08020000)和国家自然科学基金优秀青年科学基金(31422017)资助

摘要 G蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs)是人体内最大的膜受体蛋白家族, 具有保守的7次跨膜螺旋结构. GPCR可识别细胞外的各种信号分子, 如激素、神经递质、离子、光、气味分子等, 与之结合后发生构象改变, 随后与细胞内的效应蛋白(包括G蛋白、GPCR激酶GRK和阻遏蛋白)相互作用, 从而诱导各种细胞反应. 作为分布最广泛的细胞表面蛋白, GPCR在所有重要的生理活动中发挥不可或缺的功能作用, 是心血管疾病、神经系统疾病、炎症、代谢性疾病、癌症等多种疾病的重要药物靶点. 美国食品药品监督管理局(FDA)批准的药物中约34%以GPCR为作用靶点, 2011~2015年间, GPCR药物的销售份额占据全球上市药物的27%. 近年来, GPCR的结构生物学研究取得了长足的发展, 研究成果揭示了GPCR对配体识别和信号转导的分子机制, 并为基于结构的药物研发提供了重要信息. 本文详细介绍GPCR的结构研究与药物研发进展, 并就GPCR结构和功能研究的未来发展方向提出建议.

关键词 G蛋白偶联受体, 药物靶标, 三维结构, 配体, 基于结构的药物研发

1 G蛋白偶联受体(GPCR)的结构研究

1.1 GPCR的分类

根据国际药理学联合会(IUPHAR)网站(<http://www.guidetopharmacology.org/>)的数据统计, 人体中已发现的GPCR有800多种, 超过半数GPCR与嗅觉、味觉等感觉功能相关, 另外350余种与感觉功能无关的GPCR是大多数临床药物的作用靶点. 最初, 科学家根据序列相似性将GPCR分成A~F共6个家族, 分别是A家族(rhodopsin-like, 类视紫红质)、B家族(secretin receptor, 分泌素受体)、C家族(metabotropic glutamate, 亲代谢性谷氨酸受体)、D家族(fungal mating pheromone receptors, 真菌交配信息素受体)、E家族(cyclic AMP receptors, cAMP受体)和F家族

(frizzled/smoothened)^[1]. 由于脊椎动物中没有D和E家族受体, Schiöth和Fredriksson^[2]将脊椎动物中存在的GPCR归为5大类: Rhodopsin、Adhesion(黏附素受体)、Secretin、Glutamate和Frizzled/Taste 2. Rhodopsin类受体是最大的GPCR家族, 其约670个成员又被分成 α 、 β 、 δ 、 γ 4个分支, 可识别并结合小分子、多肽甚至蛋白质等多种类型的配体; 与Secretin类受体结合的天然配体为含有27-141氨基酸的多肽类激素; Glutamate受体一般以同源或异源二聚体的形式存在, 其胞外结构域(extracellular domain, ECD)负责结合配体; Frizzled受体则结合Wnt糖蛋白^[3]. 其中Rhodopsin被称为A家族, Adhesion和Secretin被合称为B家族, Glutamate为C家族, Frizzled/Taste 2被称为F家族. A家族受体N端相对较短, B、C、F家族N端较长, 形成

引用格式: 杨振霖, 吴蓓丽. G蛋白偶联受体的结构研究与药物研发. 科学通报, 2018, 63: 1362–1373

Yang Z L, Wu B L. Structural studies and drug discovery of G protein-coupled receptors (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 1362–1373, doi: 10.1360/N972018-00307

胞外结构域。4个家族的结构示意图及配体识别方式见图1^[4]。

1.2 GPCR结构研究概况

GPCR的三维结构解析对于理解GPCR的信号传导机制和基于结构的药物设计具有十分重要的意义。2000年, Palczewski等人^[5]从天然组织中提取牛视紫红质蛋白, 解析了其于11-cis-retinal结合的复合物晶体结构, 这是第一个被解析的GPCR结构。随后, GPCR的结构研究进入了停滞期, 究其原因包括蛋白表达量低、体外环境中蛋白构象不均一以及结晶过程中缺乏亲水接触面等因素^[6]。直到2007年, 第一个利用体外重组技术表达纯化的GPCR—— β_2 肾上腺素受体(β_2 -adrenergic receptor, β_2 AR)的结构才被解析^[7]。此后, GPCR结构研究进入了快速发展的时期。截至2018年3月15日, 国际晶体学数据库中(protein database, PDB)共计收录了48种GPCR与不同配体结合的228个复合物结构(表1), 包括41种A家族受体与不同配体结合的202个复合物结构, 4种B家族受体与不同配体结合的13个复合物结构, C家族的mGlu1和mGlu5的跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)与不同配体结合的6个复合物结构、以及来自F家族的smoothen受体与不同配体结合的7个结构。

GPCR结构研究的突破得益于蛋白改造和膜蛋白结晶技术的改进^[6,8,9]。为了提高蛋白稳定性和在晶

体堆积中提供更多的亲水表面, Rosenbaum等人^[10]率先尝试在 β_2 AR的第3个胞内环区(intracellular loop 3, ICL3)插入T4溶菌酶(T4 lysozyme, T4L), 成功解析了 β_2 AR的高分辨率结构。此后, 人们筛选出rubredoxin、bRIL、PGS、miniT4L等融合蛋白^[11~13], 帮助解析了包括CCR5(ICL3-rubredoxin)和CB₁(ICL3-flavodoxin)在内的多个GPCR的结构^[14,15]。此外, 氨基酸突变和二硫键等蛋白改造的方式也被成功地运用在GPCR的结构解析工作中^[16,17]。在纯化过程中添加高亲和力、高选择性的配体或者抗体有助于将蛋白稳定在某一构象状态, 提高蛋白的均一度^[18,19]。脂立方相(lipidic cubic phase, LCP)的*in meso*的蛋白质结晶方法可以模拟天然状态下膜蛋白所处的脂双分子层环境, 并且利于甾醇等脂分子的添加, 对GPCR的结晶至关重要^[20], 被运用于绝大多数GPCR的结构解析中。X-射线自由电子激光技术的发展(X-ray free-electron laser, XFEL)极大地促进了利用微米级别甚至更小尺寸的晶体获得高分辨率衍射数据的可能性^[21]。近年来蓬勃发展的冷冻电子显微镜(cryo-electron microscopy, cryo-EM)技术加速了GPCR与下游蛋白复合物的结构研究。

1.3 GPCR结构特点

分析已解析的GPCR结构, 可以将GPCR蛋白分子划分成3部分: (1) 胞外区, 包含N端和3段胞外环

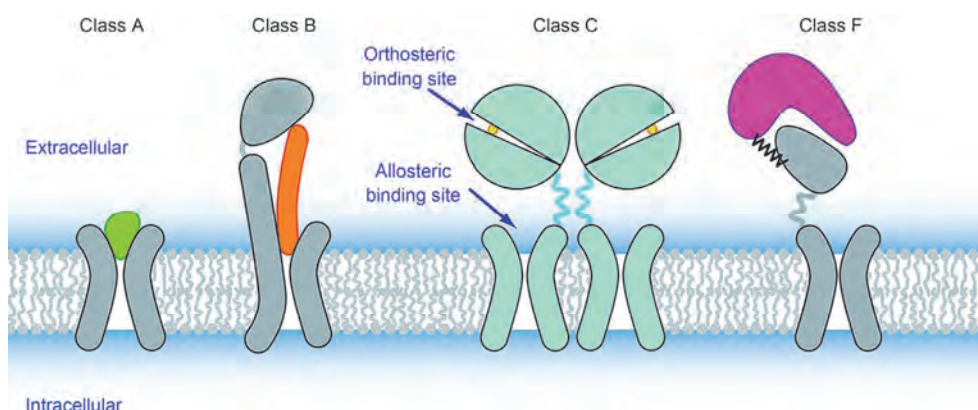


图1 不同家族GPCR的结构和内源性配体识别方式示意图^[4]。大多数A家族GPCR的内源性配体(绿色模块)的结合位点位于跨膜结构域中。B家族的内源性配体(橘色模块)同时与胞外结构域和跨膜结构域结合。C家族的内源性小分子配体(黄色圆圈)结合在胞外VFD(venus flytrap domain)结构域。脂蛋白WNT(紫色模块)结合在F家族Frizzled受体的胞外CRD(cysteine rich domain)结构域

Figure 1 Cartoon models for structure and endogenous ligand recognition in different GPCR classes^[4]. For class A, in most cases, the endogenous ligand (green) binds to the transmembrane domain (TMD). For class B, the endogenous peptide ligand (orange) binds to both ECD and TMD. For class C, the endogenous small-molecule ligands (yellow circle) are recognized by the orthosteric sites in the VFDs. For class F, lipoprotein WNT (magenta) binds the CRD domain of the receptors

表1 GPCR结构统计表

Table 1 Statistic table of GPCR structures

受体家族	受体	结构数量	PDB号码
A家族	Rhodopsin	39	1F88, 1HZX, 1L9H, 1GZM, 1U19, 2HPY, 2G87, 2I37, 2I35, 2I36, 2J4Y, 2PED, 2ZIY, 2Z73, 3CAP, 3C9L, 3C9M, 3DQB, 3OAX, 3PQR, 3PXO, 2X72, 3AYN, 3AYM, 4A4M, 4BEZ, 4BEY, 4J4Q, 4PXF, 4WW3, 4ZWJ, 4X1H, 5DGY, 5DYS, 5EN0, 5TE3, 5TE5, 5W0P, 5WKT
	β_1 -adrenoceptor	18	2VT4, 2Y00, 2Y01, 2Y02, 2Y03, 2Y04, 2YCW, 2YCX, 2YCY, 2Y CZ, 4AMI, 4AMJ, 4GPO, 3ZPQ, 3ZPR, 4BVN, 5A8E, 5F8U
	β_2 -adrenoceptor	21	2RH1, 2R4S, 2R4R, 3D4S, 3KJ6, 3NYA, 3NY9, 3NY8, 3PDS, 3P0G, 3SN6, 4GBR, 4LDE, 4LDO, 4LDL, 4QKX, 5D5A, 5D5B, 5JQH, 5D6L, 5X7D
	H ₁ R	1	3RZE
	D ₂ R	1	6CM4
	D ₃ R	1	3PBL
	D ₄ R	2	5WIU, 5WIV
	5-HT _{1B}	3	4IAQ, 4IAR, 5V54
	5-HT _{2B}	4	4IB4, 4NC3, 5TVN, 5TUD
	M ₁ R	1	5CXV
	M ₂ R	3	3UON, 4MQT, 4MQS
	M ₃ R	4	4DAJ, 4U14, 4U15, 4U16
	M ₄ R	1	5DSG
	NOP	3	4EA3, 5DHH, 5DHG
	δ -OR	4	4EJ4, 4N6H, 4RWA, 4RWD
	k-OR	1	4DJH
	u-OR	2	4DKL, 5C1M
	A ₁ AR	2	5UEN, 5N2S
	A _{2A} AR	33	3EML, 3QAK, 2YDO, 2YDV, 3PWH, 3REY, 3RFM, 3VGA, 3VG9, 3UZA, 4E1Y, 4UHR, 4UG2, 5IUB, 5IU8, 5IU4, 5IU7, 5IUA, 5G53, 5K2A, 5K2B, 5K2C, 5K2D, 5UIG, 5UVI, 5JTB, 5MZJ, 5MZF, 5N2R, 5NLX, 5NM2, 5NM4, 5VRA
	AT ₁ R	2	4YAY, 4ZUD
	AT ₂ R	3	5UNF, 5UNH, 5UNG
	BLT ₁ R	1	5X33
	CB ₁	4	5TGZ, 5U09, 5XR8, 5XRA
	P2Y ₁ R	2	4XNV, 4XNW
	P2Y ₁₂ R	3	4NTJ, 4PY0, 4PXZ
	PAR1	1	3VW7
	PAR2	3	5NJ6, 5NDZ, 5NDD
	OX ₁ R	2	4ZJ8, 4ZJC
	OX ₂ R	3	4S0V, 5WQC, 5WS3
	APJ	1	5VBL
	NTS ₁ R	8	4GRV, 3ZEV, 4BUO, 4BWB, 4BV0, 4XEE, 4XES, 5T04
	ET _B	4	5GLI, 5GLH, 5XPR, 5X93
	US28	2	4XT1, 4XT3
	CXCR4	6	3OE0, 3OE8, 3ODU, 3OE6, 3OE9, 4RWS
	CCR2	1	5T1A
	CCR5	2	4MBS, 5UIW
	CCR9	1	5LWE
	FFA ₁ R	3	4PHU, 5TZY, 5TZR
	LPA ₁	3	4Z34, 4Z35, 4Z36
	LPA ₆	1	5XSZ
	S1P ₁	2	3V2W, 3V2Y
B家族	CRF ₁ R	2	4K5Y, 4Z9G
	GLP-1R	5	5VEX, 5VAI, 5VEW, 5NX2, 6B3J
	GCGR	5	4L6R, 5EE7, 5XF1, 5XEZ, 5YQZ
	CTR	1	5UZ7
C家族	mGlu1	1	4OR2
	mGlu5	5	4OO9, 5CGC, 5CGD, 6FFH, 6FFI
F家族	SMO	7	4JKV, 4N4W, 4O9R, 4QIN, 4QIM, 5L7D, 5L7I

区(extracellular loops, ECL1-3); (2) 跨膜区, 包含7段跨膜 α 螺旋(TM1-7); (3) 胞内区, 包含3段胞内环区(intracellular loops, ICL1-3)、胞内第8根螺旋(helix 8)和羧基端(C端)^[22]。胞外区域负责识别信号分子, 跨膜区形成整个蛋白的骨架并负责结合配体、传递信号, 胞内部分与G蛋白、GRKs、arrestin等下游信号分子结合。以下就这3部分结构特点作详细描述。

GPCR氨基酸序列分析结果显示其N端及胞外环区极不保守, 在长度和氨基酸组成上具有复杂多样性。A家族受体的N端一般很短, 只有几十个氨基酸, 另外几个家族蛋白都含有较大的N端结构域且N端参与配体结合^[3]。ECL2是大多数GPCR分子中最长的胞外环区, 在不同的受体中呈现不同的二级结构, 在某些受体如肾上腺素受体中形成 α -螺旋, 而在多肽受体中呈 β -发卡构象。在绝大多数已解析的GPCR结构中, ECL2中的一个半胱氨酸(Cys)通过与TM3靠胞外端的Cys^{3,25}(上标显示为根据Ballesteros-Weinstein系统定义的氨基酸位置^[23], 小数点前面的数字为跨膜螺旋的编号, 后面的数字为在该跨膜螺旋中的位置, 每根跨膜螺旋最保守的氨基酸为50, 在此氨基酸前一位的为49, 后一位为51, 依次类推)形成二硫键, 起限制ECL2的构象变化、稳定胞外区构象的作用^[22]。在rhodopsin和磷酸鞘氨醇受体S1P₁的结构中, ECL2如盖子一般遮住配体结合口袋, 阻断了结合区域与胞外亲水区的联系, 保护了这两种疏水性配体的

疏水环境, 提示ECL2可能参与了配体的识别与结合^[5,24]。分子动力学模拟结果显示ECL2参与 β 肾上腺素受体(β -ARs)的配体识别和选择^[25]。相较于ECL2, ECL1和ECL3较短, 通常没有二级结构。

尽管不同GPCR具有相似的7次跨膜螺旋结构, 但是它们的配体结合口袋却在形状、大小、位置和电荷性质上存在差异。与小分子配体(如胺类、核酸等)结合的受体的配体结合口袋相对较小且位置较深; 相反, 识别较大配体(如肽类)的受体的配体口袋体积较大, 同时也更靠近受体的胞外侧, 而结合脂类分子的结合口袋往往被胞外N端或胞外环区盖住以保证疏水环境。天然配体的结合位点被称为正构位点(orthosteric site), 结合在该位点与天然配体竞争性结合的配体即正构配体, 正构配体的结合口袋相对比较保守, 通常位于7次跨膜螺旋内部靠近胞外一侧。与正构位点不同的位点称为变构位点(allosteric site), 根据结合在变构位点的变构调节剂功能的不同, 变构调节剂又分成促进激动剂激活效应的正向变构调节剂(也称变构激活剂, positive allosteric modulator, PAM)和抑制激动剂效应的反向变构调节剂(也称变构抑制剂, negative allosteric modulator, NAM)。变构调节剂的结合位点千差万别, 就目前解析的结构看可出现在7次跨膜螺旋的胞外侧、中部、胞内侧和外表面(图2)。在毒蕈碱受体M₂R(M₂ muscarinic receptor)结构中, 正向变构调节剂LY2119620位于胞外区,

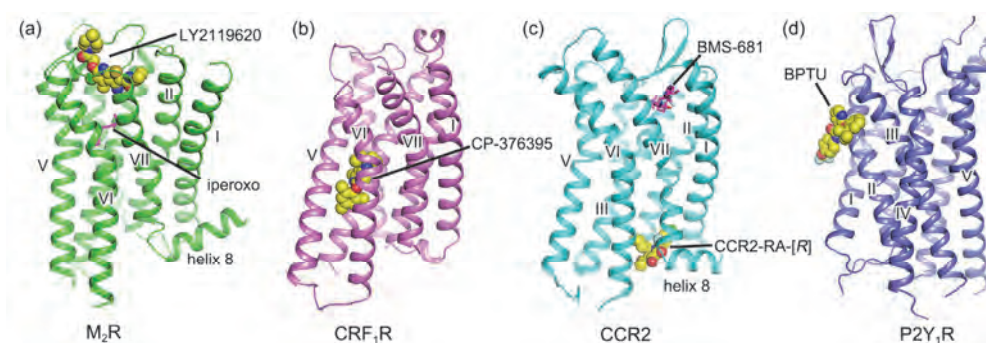


图 2 不同的GPCR变构调节剂结合位点. (a) M₂R与其激动剂iperoxo、正向变构调节剂LY2119620 结合的复合物结构(PDB ID: 4MQT). (b) CRF₁R与其变构抑制剂CP-376395 结合的复合物结构(PDB ID: 4K5Y). (c) CCR2 与正构抑制剂BMS-681、变构抑制剂CCR2-RA-[R]结合的三元复合物结构(PDB ID: 5T1A). (d) P₂Y₁R与变构抑制剂BPTU结合的复合物结构(PDB ID: 4XNV). 受体以飘带图显示, 正构配体以紫色棍显示, 变构配体以黄色球显示

Figure 2 Different binding sites of allosteric modulators in GPCR structures. (a) The structure of M₂R bound to the orthosteric agonist iperoxo and the allosteric positive allosteric modulator LY2119620 (PDB ID: 4MQT). (b) The structure of CRF₁R bound to the allosteric antagonist CP-376395 (PDB ID: 4K5Y). (c) The structure of CCR2 bound to orthosteric (BMS-681) and allosteric (CCR2-RA-[R]) antagonists (PDB ID: 5T1A). (d) The structure of P₂Y₁R in complex with allosteric antagonist BPTU (PDB ID: 4XNV). M₂R, CRF₁R, CCR2 and P₂Y₁R are shown in cartoon representation and colored in green, magenta, cyan and blue, respectively. Orthosteric ligands are shown in stick representation with magenta carbons and allosteric modulators are shown in sphere representation with yellow carbons

处于正构配体iperoxo的上方^[26]。趋化因子受体CCR5 (chemokine receptor)的变构抑制剂maraviroc和CRF₁R的拮抗剂配体CP-376395位于7次跨膜螺旋中靠近胞内侧的位置^[14,27]。而在趋化因子受体CCR2与正构配体BMS-681、变构抑制剂CCR2-RA-[R]的三元复合物结构中, CCR2-RA-[R]位于受体的胞内侧, 占据了G蛋白的结合位置^[28], 这一结合模式也存在于另一趋化因子受体CCR9-vercirnon的结构中^[29]。更令人惊讶的是, 嘌呤能受体P2Y₁R的配体BPTU以及GCGR的配体MK0893和NNC0640的结合位点位于7次跨膜螺旋的外表面^[19,30,31]。这些GPCR的结构信息极大地促进了人们对于GPCR配体结合机制的认识, 为后续的药物设计提供了全新的思路。

GPCR的胞内区域负责与下游效应蛋白结合以传递信号。在已解析的GPCR结构中, 胞内环区一般不具有二级结构或只形成短的 α -螺旋。比较特殊的是, 在 δ -阿片受体(δ -opioid receptor, δ -OR)与拮抗剂naltrindole结合的高分辨率晶体结构中, ICL3伸入跨膜区并通过水分子与TM5、TM6的氨基酸形成氢键相互作用, 稳定了TM5和TM6的构象, 同时起抑制受体激活的作用^[32]。一些GPCR的胞内侧发现了由3~4圈含有[F(RK)xx(FL)xxx](x代表任意氨基酸)保守序列的 α -螺旋构成的helix 8, 研究认为helix 8参与结合下游效应蛋白, 在受体激活过程中扮演着重要的角色^[33,34]。绝大多数GPCR结构中的helix 8与膜平面平行, 但是在血管紧张素II受体(angiotensin II type 2 receptor, AT₂R)分别与拮抗剂compound 1和2结合的复合物结构中, helix 8通过与TM3、TM5、TM6的胞内侧部分形成相互作用, 将AT₂R稳定在类似激活态的构象, 同时由于其占据了下游蛋白的结合位置, 阻止了G蛋白和arrestin的招募, 以一种自我抑制的方式抑制AT₂R的激活; 功能实验表明, 当helix 8被修饰并结合到细胞膜上后, 由于结合位点的暴露, AT₂R可以重新招募下游蛋白, 完成信号传递。因此, helix 8扮演着“守门员”的角色, 可以根据其修饰状态和周围环境调控受体的活性状态^[35]。

1.4 GPCR的激活机制

传统的观点认为GPCR只存在激活和非激活两种构象^[36], 然而, 后期的研究表明GPCR不会以一种单一的激活或者非激活状态存在, 而是受结合的配体以及下游效应蛋白的种类的影响处于多种构象动

态平衡状态^[37,38]。利用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)和双电子共振(double electron-electron resonance, DEER)光谱检测发现没有结合配体的 β_2 AR主要以两种非激活态存在, 这两种状态之间转换速度不到1 ms。即使加入反向激动剂也只是改变了平衡, 却不能将受体稳定在某一种构象。当加入激动剂时, 构象状态更加多样化, 以抑制状态、中间状态和激活状态3种状态共存, 只有加入模拟G蛋白的单链抗体才能将 β_2 AR稳定在激活态, 即便如此, 其他两种状态的蛋白仍然存在^[37]。

按照传统观点, G蛋白、GRK和arrestin结合具有相同构象的激活态GPCR, 显然无法解释GPCR对下游信号的选择机制。尽管目前没有直接的结构信息, 但是研究人员认为结合不同的下游效应蛋白时存在多种构象的激活态GPCR。且一些研究表明某些配体能够偏向性地激活下游G蛋白通路或者arrestin通路, 这些配体被称为偏向性激动剂(biased agonist)^[39]。

近年来, GPCR与下游效应蛋白的复合物结构研究取得了较大的进展, 已有数种结构被解析, 包括 β_2 AR-Gs^[40]、rhodopsin-arrestin^[41]、A_{2A}R-mini-G的复合物晶体结构^[42]以及B家族GPCR——降钙素受体CTR和GLP1R与Gs蛋白结构的复合物电子显微镜结构^[43-45]。分析这些结构, 可以发现一个共同的规律, 即处于激活状态的GPCR分子的TM6胞内一端向外扩张, 在胞内侧形成可以结合G蛋白或arrestin的口袋。比较某些A家族GPCR的分别处于非激活状态和激活状态的晶体结构, 可以发现这些受体具有相似的激活机制。具有非激活构象的rhodopsin和腺苷受体(adenosine A_{2A} receptor, A_{2A}AR)结构中, 两个氨基酸R^{3.50}与E^{6.30}之间形成离子键, 将受体锁定在非活性状态, 而在这两种受体的激活状态结构中, 该离子键断开, 以利于TM6的构象变化及其与下游效应蛋白的结合^[17,46]。在内皮素受体(endothelin-1 receptor, ET_B)等受体的结构中^[47], 激动剂与W^{6.48}的相互作用促使W^{6.48}侧链向下翻转, 可能是激动剂诱导TM6向外打开的源动力, 因此W^{6.48}也被认为是受体激活的开关(switch)。

最近, 我们解析的胰高血糖素受体(glucagon receptor, GCGR)全长蛋白的三维结构, 揭示了B家族GPCR对信号分子的特异性结合模式以及该受体的活化调控机制, 首次观察到受体在激活过程中, 受体分子中连接ECD和TMD的连接结构域(linker domain,

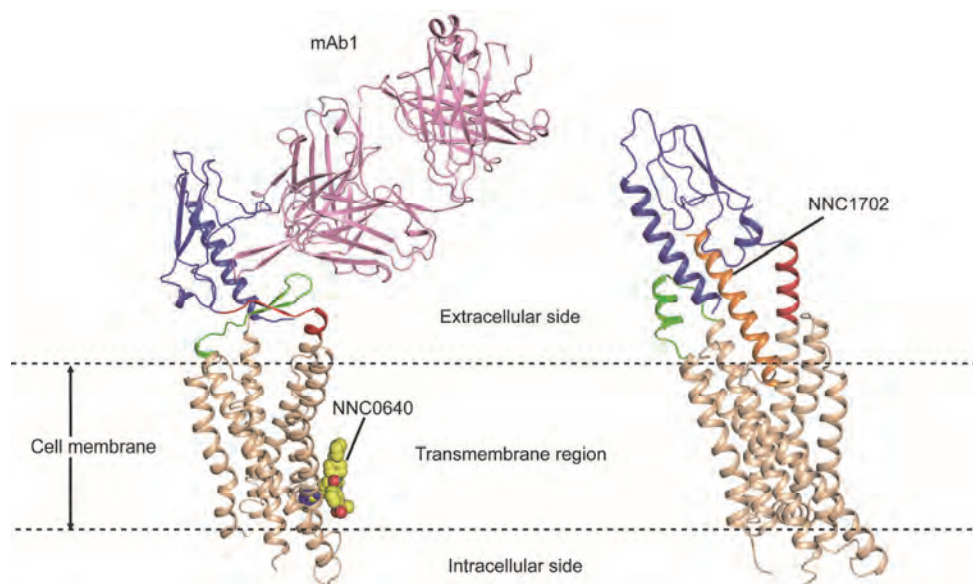


图 3 GCGR全长蛋白结构示意图。左图为全长GCGR蛋白与小分子变构抑制剂NNC0640 以及拮抗性抗体mAb1 结合的复合物晶体结构(PDB ID: 5XEZ)。右图为全长GCGR蛋白与多肽配体NNC1702 结合的复合物晶体结构(PDB ID: 5YQZ)。结构以飘带图表示。GCGR的跨膜结构域显示为浅橙色, 胞外结构域为蓝色, 连接域为红色, 第一个胞外环区为绿色。NNC0640 以黄色显示(左图), 抗体mAb1 以粉红色显示(左图), NNC1702 以橙色显示(右图)。两条虚线代表细胞膜平面

Figure 3 Crystal structures of full-length (FL) GCGR. The crystal structures of FL GCGR in complex with a negative allosteric modulator NNC0640 and an inhibitory antibody mAb1 (left, PDB ID: 5XEZ), as well as with a glucagon analogue NNC1702 (right, PDB ID: 5YQZ) are shown in cartoon representation. The ECD and TMD of GCGR are colored blue and light orange, respectively. The linker domain (LD) is colored red. ECL1 is colored green. NNC0640 and mAb1 in the left figure are colored yellow and pink, respectively. NNC1702 in the right figure is colored orange. The two dashed lines indicate cell membrane surfaces

LD)发生了显著的构象变化(图3)^[31,48]。在GCGR与小分子抑制剂NNC0640以及拮抗性抗体mAb1共同结合的复合物结构中, LD与受体TMD的胞外环区相互接触, 并与ECD紧密结合, 将受体稳定在非活性状态; 而在GCGR与多肽配体NNC1702结合的复合物结构中, LD发生了显著的构象变化, 其二级结构由GCGR-mAb1-NNC0640结构中的 β 折叠转变为 α 螺旋, 并伴随结构的迁移, 使受体的TMD和ECD结构域之间的相对取向发生了巨大变化, 从而促进受体与多肽配体的紧密结合, 导致受体激活。此外, 该连接肽通过与多肽配体中段区域的相互作用对受体跨膜结构域的构象进行精细调节, 进而调控受体活化。这种对受体活化的多结构域协作调控机制, 有助于进一步深入理解GCGR的信号转导机制。

2 GPCR药物研发进展

2.1 靶向GPCR的药物概况

GPCR参与调节人体内几乎所有重要的生理功能, 并且由于其位于细胞表面, 易于与药物分子作

用, 因此GPCR是最受关注的药物靶标蛋白家族。根据最新的统计数据, FDA批准上市的药物中共有475种药物(约占FDA批准药物的34%)靶向GPCR^[49]。2011~2015年间, GPCR药物销售额达9170亿美元, 销售份额全球占比约27%^[50]。在过去的5年间, 共有69种靶向GPCR的药物获批上市, 且尚有321种候选药物处于临床阶段^[49]。Hauser等人^[49]统计获批药物和临床候选药物作用靶点时发现, 胺类受体如组胺受体(histamine receptors)、多巴胺受体(dopamine receptors)、肾上腺受体(adrenoceptors)、乙酰胆碱受体(acetylcholine receptors)等为最大的药物靶点, 475种获批药物中的314种作用在该类受体上(图4)。

2.2 GPCR药物种类研发趋势

近年来, 受体药理学和结构生物学的发展为GPCR的药物发现开辟了新的途径, 生物药(单克隆抗体、多肽等)、别构调节剂以及偏向性配体类药物的研发得到了快速的发展。

生物药由于其自体可代谢的安全性受到各大药企的青睐, 在2014~2016年间, FDA批准的新药中有

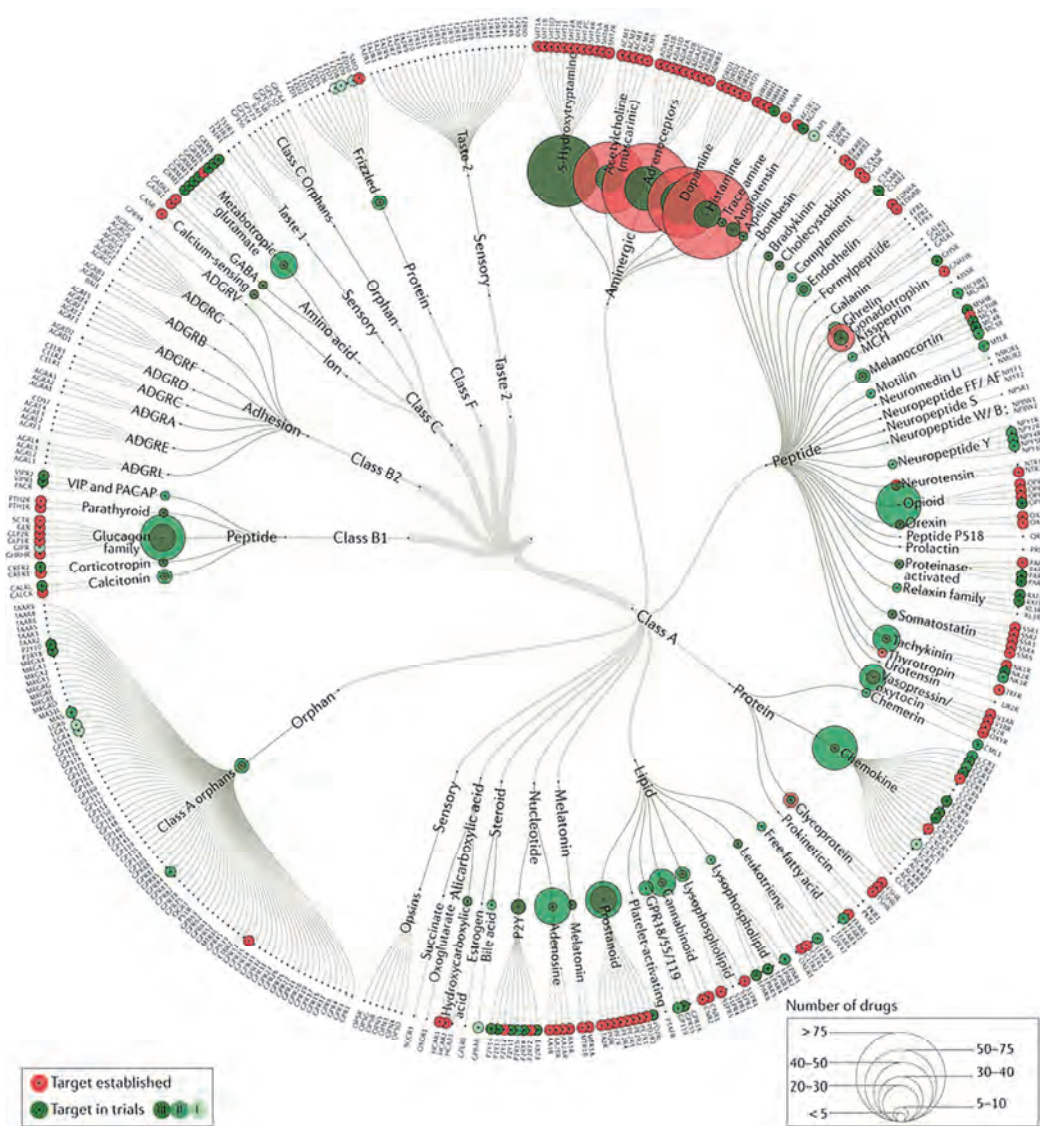


图4 GPCR药物靶点^[49]。上市药物以红色圆圈表示, 临床I-III期候选药物以绿色圆圈表示。圆圈的大小表示药物数量(右下角)。上市药物按FDA的药物数据库(<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>)统计, 临床研究的药物资料来自Clinical Trials(<http://www.centerwatch.com>), OpenTargets(<https://www.targetvalidation.org>), Drugbank(<https://www.drugbank.ca>), Pharos(<https://pharos.nih.gov/idg/index>)和FDA的company press releases(<https://www.fda.gov/forpatients/approvals/drugs/ucm405622.htm>)数据库

Figure 4 GPCR drug targets^[49]. Established targets have approved drugs as defined in the Drugs@FDA database, and targets of agents in clinical trials were collected from manual annotation of CenterWatch's Drugs in Clinical Trials database, OpenTargets, Drugbank, Pharos and company press releases. Established (red) and phase I-III (green) targets across the G protein-coupled receptor (GPCR) classes, ligand types and receptor families (from the centre to the outer ring) are shown. The sizes of the circles represent the number of agents

27%~33%为生物药。尽管目前尚无靶向GPCR的单克隆抗体药物, 但是已有16种治疗癌症、炎症、神经和代谢性疾病的靶向GPCR的单克隆抗体处于临床研究阶段^[51]。靶向GPCR的多肽药物由来已久, 主要以B家族的胰高血糖素样多肽受体GLP-1R为靶点, 如治疗2型糖尿病的exenatide、liraglutide、lixisenatide、albiglutide和dulaglutide^[52]。其他一些多肽, 如breme-

lanotide(黑皮质素受体非选择性激动剂, 治疗女性功能障碍)和setmelanotide(黑皮质素受体MC₄特异性激动剂, 治疗肥胖)等目前处于临床III期阶段。

已经获批的变构调节剂药物包括靶向钙受体(calcium-sensing receptor, CaSR)用于治疗甲状腺功能亢进的cinacalcet, 以及靶向CCR5用于抵抗艾滋病毒入侵的maraviroc。对于正构配体开发难度较大

的B家族受体,变构调节剂也是一种选择^[53]。截至2018年3月,Allosteric数据库(ASD, <http://mdl.shsmu.edu.cn/ASD>)中列出了28000多种靶向GPCR的变构调节剂,其中某些已经进入临床I或II期^[54]。I期临床中的候选药物以正向别构调节剂居多,且一些变构调节剂需要与正构配体联合用药来治疗神经系统疾病^[55]。

特异性地激活某一条下游通路的偏向性激动剂为设计副作用更低的药物提供了思路,最成功的当属目前处于临床III期的 μ 型阿片受体(μ -opioid receptor, μ -OR)的配体 oliceridine (TRV130), TRV130与 μ -OR的结合不诱导下游的 β -arrestin通路,避免了呼吸衰竭和便秘的副作用^[56]。由于它在止痛方面的功效,被FDA冠以“突破性治疗”方案设计殊荣^[57]。相反的,用于治疗急性心衰的靶向AT₁R的偏向性配体TRV027特异性地激活 β -arrestin通路,而不影响G蛋白通路^[58]。相较于其他类型配体,偏向性激动剂的研究尚处于起步阶段,需要更多的有关GPCR信号通路的结构和功能信息来发掘偏向性配体的潜力,以及帮助选择性地调节细胞内反应以达到更好的治疗效果。

2.3 GPCR药物治疗疾病领域方向

统计结果显示,靶向GPCR的药物治疗疾病领域由以往的热门领域如高血压、过敏、止痛、精神分裂等转向以代谢性疾病和神经系统疾病为主。全球目前约有4.15亿糖尿病患者,90%为2型糖尿病,相较于1型糖尿病患者对胰岛素的依赖,2型糖尿病的治疗方式包括刺激胰岛素分泌和增加胰岛素受体对胰岛素的敏感程度。如前所述,第一个靶向GPCR治疗2型糖尿病的药物是2005年上市的GLP-1R激动剂 exenatide,以后陆续获批了其他4种GLP-1R的肽类激动剂。口服的GLP-1R小分子激动剂,如TTP273目前也正处于临床研发阶段。传统的糖尿病治疗仅局限于以GLP-1R为作用靶点,寻找新的药物靶点成为药物研发的难点,目前靶向诸如GPR119、FFA1R等受体均有在研药物。而靶向多巴胺受体D2的药物 bromocriptine 已经获批成为控制血糖和治疗葡萄糖耐受的抗2型糖尿病药物^[59]。对靶向GPCR的药物进行分类,可以发现26%的获批准药物和25%的临床候选药物被用于治疗中枢神经系统疾病,其中以阿尔兹海默病、亨廷顿病和脆性X综合征为主要治疗疾病类型。在过去的5年间,GPCR也被用于治疗多发性硬

化、短肠综合征和低血钙症等新的疾病领域。

2.4 基于GPCR结构的药物设计

基于结构的药物设计对于药物研发具有十分重要的意义,尤其是靶向蛋白酶受体的药物,如HIV蛋白酶抑制剂 indinavir^[60]、酪氨酸激酶抑制剂 imatinib^[61]和蛋白酶体抑制剂 carfilzomib^[62]。由于GPCR结构解析的难度大,导致基于其结构的药物设计起步较晚,目前尚无基于结构研发的GPCR药物成功上市。尽管如此,仍然有一些基于结构设计的药物候选分子的成功案例。例如,利用 μ -OR结构进行分子对接实验获得的Gi蛋白偏向性激动剂PZM21,小鼠体内实验证明其具有与吗啡相似的止痛功效以及更低的副作用^[63]。来自北卡罗来纳大学的Wang等人^[64]利用高分辨率多巴胺D4受体结构结合计算机虚拟筛选技术,获得了高亲和力、高选择性且具有arrestin偏向性激动的全新配体UCSF924。我们研究组在2013年解析CCR5与maraviroc结合的复合物晶体结构后,立即与中国科学院上海药物研究所柳红研究员、蒋华良研究员等课题组合作,设计并筛选获得了亲和力和药代动力学性质优于maraviroc的抗HIV的小分子配体,目前正处于临床前研究阶段。英国的Heptares公司制定了针对10余种GPCR的基于结构的药物设计计划,其中包括靶向M₁和M₄毒蕈碱受体(治疗阿尔兹海默症)、靶向mGlu₅(治疗精神疾病)、靶向CGRP(治疗偏头痛)、靶向OX₂(治疗嗜睡症)受体、靶向PAR2(治疗特应性皮炎)和A_{2A}受体(治疗癌症)的配体(<https://www.heptares.com/pipeline/>)^[65]。得益于近10年间GPCR结构生物学的突飞猛进,越来越多的GPCR的结构被解析,为基于结构的药物设计提供大量的模型,相信在不久的将来这项技术将极大地促进靶向GPCR的药物研发效率。

3 总结与展望

作为人体内最大的膜受体家族和最重要的药物靶点之一,GPCR的结构研究与药物研发是各大药物研发企业和研究机构追逐的热点。近10年间,随着技术的不断进步,GPCR结构生物学研究进入了飞速发展的时代,利用X-射线晶体学获得的GPCR结构呈指数增长态势。同时,借助冷冻电子显微镜技术的发展,越来越多的GPCR与下游效应蛋白复合物的结构被解析。这些结构揭示了GPCR多样化的配体结合模

式和信号转导机制,促进了人们对其结构-功能关系的理解. 由于越来越多的药物靶点的发现以及结构生物学、药理学的推动, GPCR的药物研发进入了崭新的时代. 变构配体、偏向性配体为新型药物的研发带来机遇, 基于结构的药物设计也将推动GPCR药物研发进程.

然而, 结构已知的GPCR仅约占整个家族的5%, 仍然有很多重要的GPCR的结构亟待解析. GPCR与

下游效应蛋白结合的复合物结构十分有限, 尚无与其他3种G蛋白(G_i 、 G_q 、 $G_{12/13}$)以及GRK结合的复合物结构被测定. 此外, 在生命活动中扮演重要功能的GPCR的同源和异源二聚体结构解析领域仍为空白. 同时, 我们期待获得更多的GPCR与变构调节剂、偏向激动剂的结构信息来揭示GPCR与不同信号蛋白结合时的构象变化以及偏向性信号通路的基础, 促进靶向GPCR的药物研发.

参考文献

- Kolakowski L F Jr. GCRDb: A G-protein-coupled receptor database. *Recept Channel*, 1994, 2: 1–7
- Schioth H B, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 142: 94–101
- Lagerstrom M C, Schioth H B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 339–357
- Wu H, Wang C, Gregory K J, et al. Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science*, 2014, 344: 58–64
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 2000, 289: 739–745
- Lu M, Wu B. Structural studies of G protein-coupled receptors. *IUBMB Life*, 2016, 68: 894–903
- Cherezov V, Rosenbaum D M, Hanson M A, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 2007, 318: 1258–1265
- Caffrey M. Crystallizing membrane proteins for structure-function studies using lipidic mesophases. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39: 725–732
- Chae P S, Rasmussen S G, Rana R R, et al. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods*, 2010, 7: 1003–1008
- Rosenbaum D M, Cherezov V, Hanson M A, et al. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 -adrenergic receptor function. *Science*, 2007, 318: 1266–1273
- Chun E, Thompson A A, Liu W, et al. Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure*, 2012, 20: 967–976
- Yin J, Mobarec J C, Kolb P, et al. Crystal structure of the human OX_2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant. *Nature*, 2015, 519: 247–250
- Thorsen T S, Matt R, Weis W I, et al. Modified T4 lysozyme fusion proteins facilitate G protein-coupled receptor crystallography. *Structure*, 2014, 22: 1657–1664
- Tan Q, Zhu Y, Li J, et al. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science*, 2013, 341: 1387–1390
- Hua T, Vemuri K, Pu M, et al. Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB_1 . *Cell*, 2016, 167: 750–762 e714
- Serrano-Vega M J, Magnani F, Shibata Y, et al. Conformational thermostabilization of the β_1 -adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 877–882
- Standfuss J, Edwards P C, D'Antona A, et al. The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*, 2011, 471: 656–660
- Ring A M, Manglik A, Kruse A C, et al. Adrenaline-activated structure of β_2 -adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature*, 2013, 502: 575–579
- Zhang X, Stevens R C, Xu F. The importance of ligands for G protein-coupled receptor stability. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40: 79–87
- Landau E M, Rosenbusch J P. Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 14532–14535
- Liu W, Wacker D, Gati C, et al. Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors. *Science*, 2013, 342: 1521–1524
- Venkatakrishnan A J, Deupi X, Lebon G, et al. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 2013, 494: 185–194

- 23 Ballesteros J A, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In: Stuart C S, ed. *Methods in Neurosciences*. Holand: Academic Press, 1995. 366–428
- 24 Hanson M A, Roth C B, Jo E, et al. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science*, 2012, 335: 851–855
- 25 Gonzalez A, Perez-Acle T, Pardo L, et al. Molecular basis of ligand dissociation in β -adrenergic receptors. *PLoS One*, 2011, 6: e23815
- 26 Kruse A C, Ring A M, Manglik A, et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 2013, 504: 101–106
- 27 Hollenstein K, Kean J, Bortolato A, et al. Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature*, 2013, 499: 438–443
- 28 Zheng Y, Qin L, Zacarias N V, et al. Structure of CC chemokine receptor 2 with orthosteric and allosteric antagonists. *Nature*, 2016, 540: 458–461
- 29 Oswald C, Rappas M, Kean J, et al. Intracellular allosteric antagonism of the CCR9 receptor. *Nature*, 2016, 540: 462–465
- 30 Jazayeri A, Dore A S, Lamb D, et al. Extra-helical binding site of a glucagon receptor antagonist. *Nature*, 2016, 533: 274–277
- 31 Zhang H, Qiao A, Yang D, et al. Structure of the full-length glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2017, 546: 259–264
- 32 Fenalti G, Giguere P M, Katritch V, et al. Molecular control of δ -opioid receptor signalling. *Nature*, 2014, 506: 191–196
- 33 Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, et al. Structure-function analysis of helix 8 of human calcitonin receptor-like receptor within the adrenomedullin 1 receptor. *Peptides*, 2011, 32: 144–149
- 34 Wess J, Han S J, Kim S K, et al. Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29: 616–625
- 35 Zhang H, Han G W, Batyuk A, et al. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature*, 2017, 544: 327–332
- 36 Samama P, Cotecchia S, Costa T, et al. A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor: Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*, 1993, 268: 4625–4636
- 37 Manglik A, Kim T H, Masureel M, et al. Structural insights into the dynamic process of β_2 -adrenergic receptor signaling. *Cell*, 2015, 161: 1101–1111
- 38 Yao X J, Velez Ruiz G, Whorton M R, et al. The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 9501–9506
- 39 Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: Detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12: 205–216
- 40 Rasmussen S G, DeVree B T, Zou Y, et al. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 2011, 477: 549–555
- 41 Kang Y, Zhou X E, Gao X, et al. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*, 2015, 523: 561–567
- 42 Carpenter B, Nehme R, Warne T, et al. Structure of the adenosine A_{2A} receptor bound to an engineered G protein. *Nature*, 2016, 536: 104–107
- 43 Liang Y L, Khoshouei M, Radjainia M, et al. Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex. *Nature*, 2017, 546: 118–123
- 44 Zhang Y, Sun B, Feng D, et al. Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature*, 2017, 546: 248–253
- 45 Liang Y L, Khoshouei M, Glukhova A, et al. Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor-Gs complex. *Nature*, 2018, 555: 121–125
- 46 Xu F, Wu H, Katritch V, et al. Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science*, 2011, 332: 322–327
- 47 Shihoya W, Nishizawa T, Okuta A, et al. Activation mechanism of endothelin ET_B receptor by endothelin-1. *Nature*, 2016, 537: 363–368
- 48 Zhang H, Qiao A, Yang L, et al. Structure of the glucagon receptor in complex with a glucagon analogue. *Nature*, 2018, 553: 106–110
- 49 Hauser A S, Attwood M M, Rask-Andersen M, et al. Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 829–842
- 50 Oprea T I, Bologa C G, Brunak S, et al. Unexplored therapeutic opportunities in the human genome. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, doi: 10.1038/nrd.2018.52
- 51 Hutchings C J, Koglin M, Olson W C, et al. Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 787–810
- 52 Oh D Y, Olefsky J M. G protein-coupled receptors as targets for anti-diabetic therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15: 161–172
- 53 Wootten D, Miller L J, Koole C, et al. Allostery and biased agonism at class B G protein-coupled receptors. *Chem Rev*, 2017, 117: 111–138

- 54 Shen Q, Wang G, Li S, et al. ASD v3.0: Unraveling allosteric regulation with structural mechanisms and biological networks. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: D527–D535
- 55 Nickols H H, Conn P J. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiol Dis*, 2014, 61: 55–71
- 56 Bohn L M, Lefkowitz R J, Gainetdinov R R, et al. Enhanced morphine analgesia in mice lacking β -arrestin 2. *Science*, 1999, 286: 2495–2498
- 57 Viscusi E R, Webster L, Kuss M, et al. A randomized, phase 2 study investigating TRV130, a biased ligand of the μ -opioid receptor, for the intravenous treatment of acute pain. *Pain*, 2016, 157: 264–272
- 58 Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, et al. Biased agonism of the angiotensin II type I receptor. *Int Heart J*, 2015, 56: 485–488
- 59 Lopez Vicchi F, Luque G M, Brie B, et al. Dopaminergic drugs in type 2 diabetes and glucose homeostasis. *Pharmacol Res*, 2016, 109: 74–80
- 60 Wlodawer A, Vondrasek J. Inhibitors of HIV-1 protease: A major success of structure-assisted drug design. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1998, 27: 249–284
- 61 Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, et al. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 493–502
- 62 McCormack P L. Carfilzomib: In relapsed, or relapsed and refractory, multiple myeloma. *Drugs*, 2012, 72: 2023–2032
- 63 Manglik A, Lin H, Aryal D K, et al. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature*, 2016, 537: 185–190
- 64 Wang S, Wacker D, Levit A, et al. D4 dopamine receptor high-resolution structures enable the discovery of selective agonists. *Science*, 2017, 358: 381–386
- 65 Jazayeri A, Andrews S P, Marshall F H. Structurally enabled discovery of adenosine A_{2A} receptor antagonists. *Chem Rev*, 2017, 117: 21–37

Summary for “G 蛋白偶联受体的结构研究与药物研发”

Structural studies and drug discovery of G protein-coupled receptors

Zhenlin Yang¹ & Beili Wu^{1,2*}

¹ CAS Key Laboratory of Receptor Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

² School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China

* Corresponding author, E-mail: beiliwu@simm.ac.cn

G protein-coupled receptors (GPCRs) constitute the largest membrane protein family in human body. Over 800 kinds of GPCRs have been characterized in human and are divided into Rhodopsin, Adhesion, Secretin, Glutamate and Frizzled/Taste 2 families. GPCRs can be stimulated by a variety of cell signal molecules, including hormones, neurotransmitters, ions, light etc. As the most widely distributed membrane proteins, GPCRs play important roles in almost all of the physiological activities and serve as drug targets for many diseases, such as cardiovascular diseases, central nervous disorders, inflammation, metabolic diseases and cancer.

Despite their pivotal roles in the physiological and pharmaceutical fields, structure determination of GPCRs remains to be extremely challenging due to low protein yield when expressed *in vitro*, poor protein stability and multiple conformational states. To date, structures of 48 GPCRs have been determined, accounting for ~5% of characterized GPCRs. The most important developments of technique include fusion partner insertion and lipidic cubic phase (LCP) crystallization. Fusion partners, such as T4 lysozyme, thermo-stabilized apocytochrome b562RIL and flavodoxin etc, are inserted into the N terminus or intracellular loops to replace the unstable regions and provide hydrophilic contact for crystal packing. LCP is essential for crystallization as it mimics native environment of membrane proteins and is used to solve most of GPCR structures. Besides, stabilization mutations and disulfide-bond engineering are also widely used for GPCR structure determination. The X-ray free-electron laser (XFEL) and cryo-electron microscopy (EM) pave the way for obtaining high-resolution protein structure information from small size crystals or without the need for crystallization.

According to the solved structures, GPCRs share a canonical seven transmembrane architecture despite their sequence diversity. However, the ligand binding pockets of different GPCRs vary in shape, size, location and electrostatics. The binding sites of orthosteric and allosteric ligands locate at extracellular, middle, intracellular and even outside of the transmembrane region. The diversity of the binding pockets provides structural basis for recognizing various ligands.

Upon activation, GPCRs undergo conformational changes including a large outward movement of TM6 on the intracellular side, which exposes a pocket and engages downstream signal proteins. Three classes of downstream signal proteins have been reported, namely G proteins, G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and arrestins.

Approximate 34% of the US Food and Drug Administration approved drugs act at GPCRs. During 2011–2015, drugs targeting GPCRs accounted for about 27% of the global therapeutic drugs market share. Biologics, allosteric modulators and biased ligands are increasing in clinical trials targeting GPCRs, while major disease indications for GPCRs-targeted drugs show a shift from traditional popular areas such as allergy and hypertension toward diabetes, oncology and central nerves system disorders etc.

Recent breakthroughs on GPCR structural determination provide insights into the mechanisms of ligand recognition and signal transduction, and facilitate structure-based drug design. However, more structural information is needed, including the interaction patterns of GPCR with other G proteins and basis of biased ligand signaling, to fully understand the superfamily membrane proteins. Here, we summarize the recent progresses on GPCR structural studies and drug discovery, and give suggestions for future research directions.

G protein-coupled receptor, drug target, 3D structure, ligand, structure-based drug discovery

doi: 10.1360/N972018-00307