

嗅觉受体基因和蛋白的研究进展

彭 鹤,赵鲁杭 综述

(浙江大学医学院生物化学与分子生物学实验室,浙江 杭州 310058)

[摘要] 嗅觉感知的起始是由嗅觉受体(olfactory receptor,OR)被气味分子激活,引起细胞内的信号转导,将气味的化学信号转变成电信号,传到更高的脑部结构,完成气味感知。OR基因属于多基因家族,编码的嗅觉受体蛋白(olfactory receptor protein)属于G-蛋白偶联受体超家族,有7个跨膜区域。嗅觉受体蛋白在嗅觉识别气味及信号传导过程中起着重要的作用。

[关键词] 嗅觉受体神经元;受体,有气味性物质/遗传学;嗅觉;信号传导

[中图分类号] R 394.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2012)01-0117-07

Research progress on olfactory receptor

PENG He,ZHAO Lu-hang (Department of Biochemistry and Molecular Biology,Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] The olfactory perception is the process that the olfactory receptor is activated by odorous molecules, which induce the transduction of signal in the cell and the chemical information is transduced into electrical impulses. After the changed signal is transmitted to the brain, the whole perception process completes. OR gene belongs to the multigene family. The coded olfactory receptor proteins belong to the G-protein-coupled receptor (GPCR) superfamily and therefore are invariably seven-transmembrane domain(7TM) protein. Olfactory receptor protein plays an important role in olfactory perception and signal transduction process.

[Key words] Olfactory receptor neurons; Receptors, odorant/genetics; Smell; Signal transduction

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2012,41(1):117-122.]

嗅觉在动物的生命活动中起着重要作用,是生物体感受外界环境的一种生理感觉。生物嗅觉系统可以识别环境中成千上万种不同的气味分子,以获得对外界环境的直观感觉联系。许多动物依赖嗅觉来完成交配、取食、避开天敌、识别有毒物质以及群体交流等。

1991年Buck和Axel首次在小鼠体内克隆了嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)基因并发现了嗅觉受体基因超家族^[1],证明了啮齿类动物大约有1 000种不同类型的嗅觉受体基因。

随后,他们又对嗅觉信号在脑内的传递、修饰和加工进行了深入研究,阐明了嗅觉受体属于7次跨膜的G-蛋白偶联受体家族,在气味识别过

收稿日期:2011-01-10 修回日期:2011-09-21

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31000448)。

作者简介:彭 鹤(1986-),女,硕士研究生。

通讯作者:赵鲁杭(1962-),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事细胞信号转导/分子药理;E-mail: zhaoluhang@263.net

程中起着重要的作用。嗅觉感知起始于嗅觉受体蛋白与气味分子的结合,配体受体结合物活化细胞内的 G-蛋白,活化的 G-蛋白激活腺苷酸环化酶,使细胞内大量的 ATP 转化成 cAMP。cAMP 是细胞内第二信使,可使细胞膜上的核苷酸门控离子通道打开,引起细胞外钙离子等阳离子内流,细胞产生动作电位。由此,将气味分子的化学信号转化成电信号,通过轴突传到更高级的脑部结构,实现嗅觉的感知。这些研究让人们对嗅觉的认识产生了飞跃,Buck 和 Axel 也因此获得了 2004 年诺贝尔生理学或医学奖。

1 OR 基因研究

1.1 OR 基因和假基因化 OR 是由嗅觉细胞表达的一种蛋白质,能够与气味分子结合。而 OR 基因属于数量庞大的多基因超家族,在哺乳动物中仅次于免疫系统编码基因。随着各物种基因组计划的展开,一些物种基因组序列的测序完成,发现人类有 851 个 OR 基因,并成簇地分布在染色体上(除了 20 号和 Y 染色体)^[2];鼠类大约有 1296 个,也成簇地分布在鼠染色体中(除了 12 号和 Y 染色体)^[3,4]。犬的 OR 基因库含有 971 个 OR 基因,而鸡的则由 554 个 OR 基因组成^[5]。相比较而言,鱼类的 OR 基因数目少,仅约 100 个 OR 基因。

研究证明,OR 基因在进化过程中出现了不同程度的假基因化。所谓假基因化(pseudogene)是指基因中含有一个或多个破坏框架(包括移码,片段终止密码,或片段破坏散布重复等)^[6]。Idan 等就 189 个人种中 51 个 OR 基因进行了研究,发现功能基因在这些人群中假基因化有扩大的趋势,还发现 OR 基因在人类基因组中功能种群的多样性,也就是个体之间的差异,揭示了不同的人嗅觉灵敏度不同^[7]。人类 OR 基因中约 50% 的基因为假基因,只有 384 个完整的具有潜在功能的基因^[8],鼠 OR 基因也有约 20% 的假基因化,真正具有功能的 OR 基因约为 1 200 个,是人类的 3 倍多。这可能与鼠的生存对嗅觉依赖度远大于人类有关。

1.2 OR 基因结构及表达调控 OR 是由多基

因超家族编码,每个嗅觉受体基因由约 1 kb 长的编码区域组成,且编码区域内没有内含子,编码区下游是多聚腺苷酸信号约 0.15 ~ 1.5 kb 长。OR 基因的 5'端有数目可变的非编码外显子,从非编码外显子到编码外显子总长在 1 ~ 11 kb 之间,这些非编码外显子在转录过程中是可以选择性断裂拼接,产生不同类型的 ORmRNA,但是最终编码的嗅觉受体蛋白结构却相同^[9]。有研究表明,嗅觉受体基因主要是在嗅觉感觉神经元表面表达,与其它 G-蛋白偶联受体比较,非编码外显子选择性拼接可能调节了 OR 表达的组织特异性。

嗅觉感觉神经元表达嗅觉受体有着严格的规范,1 个嗅觉感觉神经元只表达 OR 基因库中的 1 个 OR 基因,即 One Neuron-One Receptor 原则。而且每种生物的嗅觉表达都遵循这种原则^[10]。OR 基因这种严格表达的形式,一直让人费解。这其中的核心调节机制目前尚不清楚,1 个嗅觉感觉神经元只表达等位基因中的 1 个,这种等位基因排斥是如何在嗅觉系统中完成的也不明确。为了探索这其中的机理,研究者选择基因调控的几个重要位点,如启动子序列、增强子和转录起始结合位点等作为研究的入手点。Sakano 研究小组通过生物信息学发现,在小鼠 MOR28 基因簇的上游有一个长 2 kb 的 DNA 区域,称为“H 区域”(H 源于小鼠基因与人类基因的高度同源),这个区域在啮齿动物和人类的 OR 基因序列中都是保守序列,可能作为一个顺式作用基因座控制区(locus control region, LCR),调控 OR 表达。实验证明,H 区域与 MOR28 下游 OR 基因相互作用,激活 OR 基因库中单个 OR 基因的表达^[11]。Michaloski 等在一些 OR 基因的启动子序列中发现了 1 个高度保守区域 O/E-like 位点,对 OR 基因表达调控可能有增强作用^[12]。Serizawa 等人则用遗传学方法对小鼠的嗅觉感觉神经元进行研究,发现单个 OR 基因选择性表达的这种少见,随机的转录激活形式是由负反馈抑制机制调控^[13],当 1 个 OR 基因在嗅觉神经元中表达蛋白后,这个蛋白通过反馈作用抑制嗅觉神经元内其它 OR 基因的表达。近年,Tobar 研究小组利用生物信息学方法,在人

类 OR 基因的 5'端的非编码区发现 1 个高度保守的区域 (highly conserved regions, HCR)。这个 HCR 位于转录起始位点 (transcription start sites, TSS) 上游,在功能基因和假基因中都存在, Tobar 等采用 T-Coffee 工具对多个 OR 的转录结合位点进行多重序列对齐分析,发现不同的 HCR 基因有不同的 TATA-box 和转录结合位点,这提示 HCR 在不同位置表现的转录作用不同,对 OR 基因转录调控可能有增强功能^[14]。

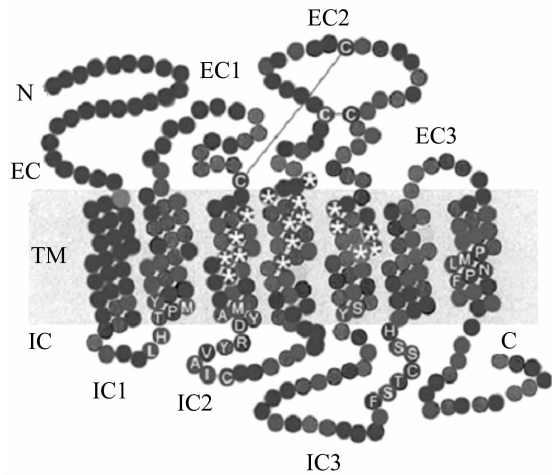
1.3 OR 的分类及进化 目前已知的 OR 基因分为 I 型和 II 型 OR 两类。在研究非洲爪蟾等两栖动物时发现, I 型 OR 能特异性检测水溶性气味,而 II 型 OR 能识别挥发性气味。在哺乳动物中, I 型 OR 只占 10%,而 II 型 OR 明显占大多数。在鱼类中,所有 OR 基因都属于 I 型^[15]。研究发现,在多数物种中大部分 II 型 OR 是假基因,如水生哺乳动物条纹海豚有大量的 II 型受体基因,这些基因都已证明是没有功能的假基因^[16],这可能与条纹海豚的生存环境相关。

比较基因组学研究显示,哺乳动物的嗅觉灵敏度与功能性 OR 基因在基因组中所占比例呈正相关,同时在物种进化过程中,功能性 OR 所占比例与该物种对嗅觉的依赖性相关,与进化论中的“用进废退”原则一致。研究证明,有很大部分的 OR 基因退化为假基因,鼠的嗅觉受体基因大约有 20% 假基因化^[3],而人类基因家族含有更多 (>50%)^[2]。这标志着鼠有更大的选择压力来保持 1 个大的嗅觉受体的功能。研究显示,嗅觉受体基因在人类和灵长类物种中假基因化呈流行趋势,造成这个趋势的主要原因可能是基因漂流,一种基因随机复制和缺失的过程^[17-18]。这种过程也导致了 OR 基因在不同物种中的进化差异,最后才有嗅觉功能的千差万别。

2 OR 蛋白研究

2.1 OR 蛋白的结构 嗅觉受体蛋白是行使嗅觉功能的主要蛋白,它的发现不仅在阐明嗅觉系统的组织和功能中起着不可替代的作用,同时为生物体中的其它化学感受器的研究提供了模板^[19]。嗅觉受体蛋白为 G 蛋白偶联受体,

约含 300 ~ 350 个氨基酸,缺乏 N-末端信号肽序列。序列分析显示它们与 7 次跨膜的 G-蛋白偶联受体含有共同的结构特征,如 7 个疏水性的 α -螺旋跨膜结构 (每个大约有 19-26 个氨基酸),蛋白的 N-末端位于细胞外侧, C-末端位于细胞内侧 (图 1)^[1]。除此之外,嗅觉受体蛋白还有一些特征性的结构:高度同源的细胞外 1 环和 2 环的半胱氨酸之间形成 1 个二硫键 (图 1), N-末端区域有 1 个一致保守的 NXS/T 序列,在细胞内有几个潜在的磷酸化位点和众多的保守短序列^[20]。通过比较分析发现,不同的 OR 氨基酸序列具有一致的高度保守区,如膜内第 1 环的 LHTPMY,第 3 跨膜区末端和膜内第 2 环头端的 MAYDRYVAIC,第 5 跨膜区末端的 SY,第 6 跨膜区头端的 FSTCSSH 以及第 7 跨膜区的 PMLNPF^[21]。除了保守区域外,跨膜的 3、4、5 区都表现出高度的序列多样性,通过与其它 7 次跨膜蛋白 (如 β_2 肾上腺素受体) 结构类比,发现它们是气味分子识别和结合区域的一部分,已经在这些区域确定了 17 个高度可变的氨基酸残基。嗅觉受体跨膜的 3、4、5 区



OR 蛋白是 7 次跨膜蛋白,且 N - 端位于细胞外, C - 端位于细胞内。

EC:细胞外;TM:跨膜区;IC:细胞内。

EC1、EC2、EC3 分别表示细胞外第 1、2、3 环; IC1、IC2、IC3 分别表示细胞内第 1、2、3 环。

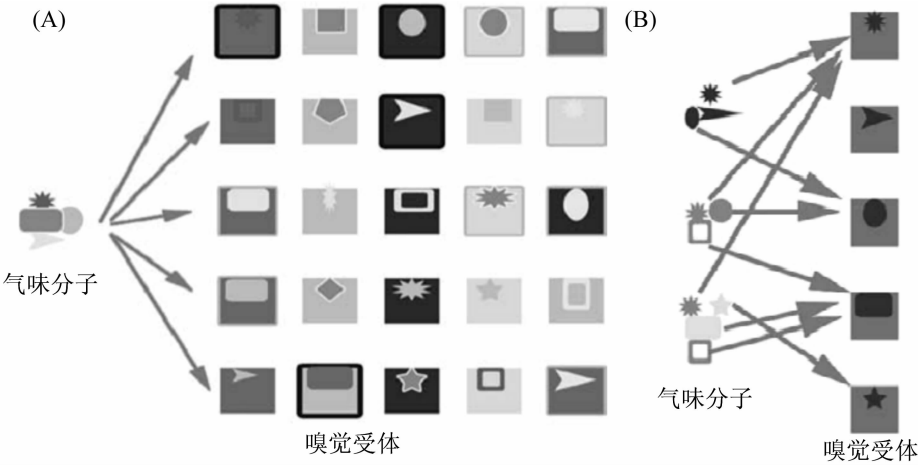
图 1 嗅觉受体蛋白结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of an olfactory receptor

的这些可变的氨基酸残基可能与气味识别多样性相关^[22]。

2.2 嗅觉受体识别气味分子的机制 研究者^[23]通过单个神经细胞的 RT-PCR 实验发现,每 1 个嗅觉神经元只表达 OR 基因家族中 1 个基因,重组嗅觉受体在嗅觉感觉神经元中表达的功能分析及给予相应配体刺激后细胞内钙成像实验发现,单个 OR 可以识别多种气味,1 种气味也可被多个 OR 识别,而且不同的气味可以被不同的嗅觉受体组合所识别,这说明 OR

家族是通过 1 个组合方式来辨别气味分子的。Malnic 等^[24]将脂肪酸和醇类对比研究发现,气味分子在结构或是浓度上的微小变化都会导致嗅觉受体的识别变化及组合代码的变化。不同研究显示,被同一 OR 识别的多种气味分子在结构上有相似之处,比如含有相同的功能基团或脂肪酸的分子长度等,而识别同一气味分子的多个嗅觉受体在结构上可能有着共同的模序(图 2)^[24]。



(A): 1 个气味分子可被多个嗅觉受体识别;1 个气味分子(左边)包含有不同结构特征可以被含有相同结构的嗅觉受体(右边)识别;(B): 同 1 个嗅觉受体可识别多个气味分子,这些气味分子含有相同的结构;嗅觉受体(右边)可以识别含有相同结构的气味分子。

图 2 受体组合代码

Fig. 2 Combinatorial receptor code

2.3 OR 蛋白异源表达 尽管人们对 OR 做了大量的研究,但是到目前为止,对于 OR 的配体确定和信号传导机制的了解有限,OR 家族中只有很少的蛋白确定了其配体,而阻碍 OR 特征性描述的主要原因是这些受体在异源细胞中难以有效表达。

OR 蛋白的 7 次跨膜结构和强疏水性质(膜蛋白),同时缺少 N-末端信号肽定位使得它们在异源细胞中表达时不易定位在质膜上^[25],难于提取纯化。为此,研究者针对嗅觉受体蛋白的结构特点,对其在异源系统中表达做了大量的修饰、选择,例如在嗅觉受体基因的 N-端加信号肽(如 rho-tag)帮助定位在细胞膜上,构

建融合蛋白增加受体蛋白的可溶性,选择易于表达的异源系统如大肠杆菌、人胚胎肾细胞(HEK-293)等^[26-28]。Saito 等人从单个嗅觉感觉神经元的基因表达分析中,发现了 3 种新颖的蛋白质,这 3 种蛋白质可以促进 OR 蛋白在异源系统的表达^[29],分别为受体运输蛋白(receptor transporting protein, RTP)1、2 和受体表达增强蛋白 1(receptor expression enhancing protein 1, REEP1)。另一些研究组则证实一些热休克蛋白作为分子伴侣可以帮助 OR 蛋白的正确折叠^[30]。尽管如此,相对于庞大的 OR 家族这些研究还是有限的,OR 蛋白在异源系统中稳定有效的高表达还需要进一步探索。

3 展 望

嗅觉系统对生物生存具有重要的作用。随着近年来人们在嗅觉方面进行的大量研究,嗅觉受体基因、结构及受体蛋白等方面取得了较大的进展,尽管如此,相对于庞大的嗅觉受体基因家族,这些研究只是冰山一角,许多问题有待解决,比如嗅觉受体基因表达调控的机制还有待进一步探索,嗅觉受体蛋白在异源系统中的表达,因其本身结构的限制,在异源系统中定位不准确,表达量少等问题,嗅觉受体的气味配体的确定等等,还待做更进一步研究。同时,近年来人们将嗅觉受体与生物传感器结合构建了仿生嗅觉传感器,有望在生物医学、疾病诊断与医药分析、环境保护等领域有广泛的应用,但这两方面的结合研究还不够全面和成熟,有待我们的探索和深入研究。尽管如此,相信随着生物技术的发展,嗅觉受体的研究会取得更多的突破,充分发掘嗅觉机能为人类创造价值。

References:

[1] BUCK L, AXEL R. A novel multigene family may encode odorant receptors : a molecular basis for odor recognition [J]. **Cell**,1991,65(1):175-187.

[2] GLUSMAN G, YANAI L, RUBIN L, et al. The complete human olfactory subgenome [J]. **Genome Res**,2001,11(5):685-702.

[3] GODFREY P A, MALNIC B, BUCK L B. The mouse olfactory receptor gene family [J]. **PNAS**,2004,101(7):2156-2161.

[4] ZHANG X M, FIRESTEIN S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse [J]. **Nature Neuroscience**,2002,5(2):124-133.

[5] NIIMURA Y. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: interaction between environments and genomic contents [J]. **Hum Genomics**,2009,4(2):107-118.

[6] LAI P C, BAHL G, GREMIGNI M, et al. An olfactory receptor pseudogene whose function emerged in humans: a case study in the evolution of structure-function in GPCRs [J]. **J Struct Funct Genomics**,2008,9(1-4):29-40.

[7] MENASHE I, MAN O, LANCET D, et al. Different noses for different people [J]. **Nat Genet**,2003,34

(2):143-144.

[8] FLEISCHER J, BREER H, STROTMANM J. Mammalian olfactory receptors [J]. **Frontiers in Cellular Neuroscience**,2009,3(9):1-10.

[9] YOUNG J M, SHYKIND B M, LANE R P. Odorant receptor expressed sequence tags demonstrate olfactory expression of over 400 genes, extensive alternate splicing and unequal expression levels [J]. **Genome Biol**,2003,4(11):R711-R715.

[10] MOMBAERTS P. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited [J]. **Curr Opin Neurobiol**,2004,14(1):31-36.

[11] SERIZAWA S, MIYAMICHI K, and SAKANO H. One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system [J]. **Trends in Genet**,2004,20(12):648-653.

[12] MICHALOSKI J S, GALANTE P A, MALNIC B. Identification of potential regulatory motifs in odorant receptor genes by analysis of promoter sequences [J]. **Genome Res**,2006,16(9):1091-1098.

[13] SERIZAWA S, MIYAMICHI K, SAKANO H. Negative Feedback Regulation Ensures the One Neuron-One Receptor Rule in the Mouse Olfactory System [J]. **Chem Senses**,2005,30(1):99-100.

[14] TOBAR H F, MORENO P A, VELEZ P E. Highly conserved regions in the 5' region of human olfactory receptor genes [J]. **Genetics and Molecular Research**,2009,8(1):117-128.

[15] ZHANG X H, FIRESTEIN S. Genomics of Olfactory Receptors [J]. **Results and Problems in Cell Differentiation**,2009,47(1-12):25-36.

[16] GOTTLIEB A, OLENDER T, LANCET D, et al. Common peptides shed light on evolution of Olfactory Receptors [J]. **BMC Evolutionary Biology**,2009,9(1):1-13.

[17] NIIMURA Y, NEI M. Evolutionary dynamics of olfactory and other chemosensory receptor genes in vertebrates [J]. **J Hum Genet**,2006,51(6):505-517.

[18] NEI M, NIIMURA Y, NOZAWA M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity [J]. **Nature Reviews Genetics**,2008,9(12):951-963.

[19] SPEHR M, MUNGER S D. Olfactory receptors: G

protein-coupled receptors and beyond [J]. **Journal of Neurochemistry**, 2009, 109 (6) : 1570-1583.

[20] MOMBAERTS P. Seven-transmembrane protein as odorant and chemosensory receptors [J]. **Science**, 1999, 286 (5440) : 707-711.

[21] YOUNG J M, TRASK B J. The sense of smell; genomics of vertebrate odorant receptors [J]. **Hum Mol Genet**, 2002, 11 (10) : 1153-1160.

[22] FUCHS T, GLUSMAN G, HORN -SABAN S, et al. The human olfactory subgenome: from sequence to structure and evolution [J]. **Hum Genet**, 2001, 108 (1) : 1-13.

[23] DEMARIA S, NGAI J. The cell biology of smell [J]. **J Cell Biol**, 2010, 191 (3) : 443-452.

[24] MALNIC B, HIRONO J, SATO T. Combinatorial Receptor Codes for Odors [J]. **Cell**, 1999, 96 (5) : 713-723.

[25] BUSH C F, HALL R A . Olfactory receptor trafficking to the plasma membrane [J]. **Cellular and MolecularLife Science**, 2008, 65 (15) : 2289-2295.

[26] KIELY A, AUTHIER A, Kralicek A V, et al. Functional analysis of a *Drosophila melanogaster* olfactory receptor expressed in Sf9 cells [J]. **Journal of Neuroscience Methods**, 2007, 159 (2) : 189-194.

[27] SONG H S, LEE S H, OH E H, et al. Expression, Solubilization and Purification of a Human Olfactory Receptor from *Escherichia coli* [J]. **Current Microbiology**, 2009, 59 (3) : 309-314.

[28] YASUOKA A, EMORI Y, ABE K . Addition of signal leader sequences to the N-termini of olfactory receptor proteins enhances their expression in *Xenopus* oocyte [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2000, 64 (8) : 1688-1695.

[29] SAITO H, KUBOTA M, ROBERTS R W, et al. RTP familymembers induce functional expression of mammalian odorant receptors [J]. **Cell**, 2004, 119 (5) : 679-691.

[30] BUSH C F, HALL R A. Olfactory receptor trafficking to the plasma membrane [J]. **Cell Mol Life Sci**, 2008, 65 (15) : 2289-2295.

[责任编辑 黄晓花]

浙江大学医学院谢幸教授主持的科研成果——“卵巢癌病变进展机制与阻遏策略研究及应用”荣获中华医学科技奖一等奖

由中华医学会主办的 2010 年 - 2011 年度中华医学科技奖颁奖大会于 2012 年 1 月 7 日在北京举行,全国人大常委会原副委员长何鲁丽、全国政协副主席王志珍、卫生部部长陈竺等领导出席颁奖典礼并向获奖代表颁奖。由浙江大学医学院附属妇产科医院谢幸教授主持的科研成果《卵巢癌病变进展机制与阻遏策略研究及应用》获得了 2010 年度中华医学科技奖一等奖,这是浙江大学首次获得该奖项的一等奖。

卵巢癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,也是致死率最高的妇科恶性肿瘤,被称为影响妇女生命和健康的“隐形杀手”。谢幸教授率领研究团队对卵巢癌腹腔局部免疫缺陷和耐药机制进行了系统的研究,揭示了卵巢癌病变进展的特征与形成机制,发现了相关新的治疗靶点,优化了阻遏其病变进展的相关策略,提高了晚期卵巢癌的生存率,产生了良好的社会效益。