

- Sci USA, 2001, 98: 361-366.
- [18] Sch neberg T, Schultz G, Gudermaun T. Structural basis of G-protein coupled receptor function[J]. Mol Cell Endocrinol, 1999, 151: 181-193.
- [19] Arcus K K, Cheng Z, Catt K J. Mutations of the conserved DRS motif in the second intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor affect expression, activation, and internalization[J]. Mol Endocrinol, 1997, 11: 1203-1212.
- [20] Arcus K K, Cheng Z, Catt K J. Dependence of agonist activation on an aromatic moiety in the DPLIY motif of the gonadotropin releasing hormone receptor[J]. Mol Endocrinol, 1996, 10: 979-986.
- [21] Myburgh D B, Miller R P, Haggood J P. Alanine-261 in intracellular loop III of the human gonadotropin-releasing hormone receptor is crucial for G-protein coupling and receptor internalization[J]. Biochem J, 1998, 331: 893-896.
- [22] Lavevi-Sivan B, Avitan A. Sequence analysis, endocrine regulation, and signal transduction of GnRH receptors in teleost fish[J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 142: 67-73.
- [23] Traskie B E, Haggood J P, Miller R P, et al. Complementary deoxyribonucleic acid cloning, gene expression, and ligand selectivity of a novel gonadotropin-releasing hormone receptor expressed in the pituitary and midbrain of *Xenopus laevis*[J]. Endocrinology, 2000, 141: 1764-1771.
- [24] Davidson J S, Flanagan C A, Zhou W, et al. Identification of N-glycosylation sites in the gonadotropin-releasing hormone receptor; role in receptor expression but not ligand binding[J]. Mol Cell Endocrinol, 1995, 107: 241-245.
- [25] Davidson J S, McArdle C A, Davies P, et al. Asn¹⁰⁰ of the gonadotropin-releasing hormone receptor is a critical determinant of potency for agonists containing C-terminal glycineamide[J]. J Biol Chem, 1996, 271: 15510-15514.
- [26] Liu F, Usui I, Evans L G, et al. Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277, 32099-32108.
- [27] Oh D Y, Wang L, Ahn R S, et al. Differential G protein coupling preference of mammalian and nonmammalian gonadotropin-releasing hormone receptors[J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 205: 89-98.
- [28] Alok D, Kumar R S, Trant J M, et al. Recombinant perlecan GnRH-R activates divergent signaling pathways in fish and mammalian heterologous cell lines[J]. Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol, 2001, 129: 375-380.
- [29] Blommeir M, Bogard J, Leurs R, et al. Differences in structure-function relations between nonmammalian and mammalian gonadotropin-releasing hormone receptors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238: 517-522.
- [30] Lin X, Janovick J A, Brothens S, Blommestein M, et al. Addition of catfish gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor intracellular carboxyl-terminal tail to rat GnRH receptor alters receptor expression and regulation[J]. Mol Endocrinol, 1998, 12: 161-171.
- [31] Heding A, Vreel M, Bogard J, et al. Gonadotropin-releasing hormone receptors with intracellular carboxyl-terminal tails undergo acute desensitization of total inositol phosphate production and exhibit accelerated internalization kinetics[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 11472-11477.
- [32] Sparks A B, Rider J E, Howman N G, et al. Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCγ, Crk, and Grb2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 1540-1544.
- [33] Miller R P, Lu Z L, Pownson A J, et al. Gonadotropin-releasing hormone receptors[J]. Endocr Rev, 2004, 25: 235-275.
- [34] Gur G, Bonfil D, Safarian H, et al. GnRH signaling pathways regulate differentially the tilapia gonadotropin subunit genes[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 189: 125-134.
- [35] Pei-San Tsai. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: Structure, function, and evolution[J]. Gen Comp Endoc, 2005 (in press corrected proof).

牙鲆脑中促性腺激素释放激素受体的克隆和鉴定

房保海^{1,2}, 郑法新¹, 孙修勤², 曲凌云², 张进兴²

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学院, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要: GnRH(gonadotropin-releasing hormone)是下丘脑-垂体-性腺轴中重要的十肽信息分子,在所有的脊椎动物的生殖神经内分泌调控中具有重要的作用。GnRH成熟的十肽沿着轴突被运送到下丘脑正中隆起(median eminence)末端,然后进入下丘脑垂体门脉循环(hypothalamo-hypophyseal portal circulation)(四足动物)或直接通过轴突末梢(大多数硬骨鱼)把信号传递给刺激性腺的细胞,与特异性受体结合,刺激促性腺激素(GnHs, gonadotropins)的合成与释放,参与脊椎动物繁殖的起始和维持正常生殖功能。伴随着 GnRH 的研究,研究者对鱼类 GnRH 受体的研究也越来越感兴趣,牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是中国重要的海水养殖鱼类,本研究从牙鲆脑组织中克隆得到全长的 Type I GnRH 受体,并对其组织特异性表达作了分析,为牙鲆的神经生殖内分泌研究奠定了一定的基础。

在本研究中,以海水养殖牙鲆为材料,从牙鲆脑组织中采用巢式 PCR、5'-和 3'-RACE 技术克隆得到了 1671 bp 牙鲆促性腺激素释放激素受体(GnRH-R)全长 cDNA 序列,包括 147 bp 的 5'-UTR、1 248 bp 的开放阅读框和 276 bp 的 3'-UTR,GenBank 登录号是 DQ011872。牙鲆 GnRH-R 和其他物种 GnRH-R 的氨基酸序列的多序列比对结果显示,其存在许多保守的特征,牙鲆 GnRH-R 显示有 3 个主要的功能区域:1 个 N 端胞外结构域(1~44 个氨基酸残基)、1 个大的跨膜结构域(45~324 个氨基酸残基)和 1 个 C 端胞内区域(325~415 个氨基酸残基)。空间结构预测显示牙鲆 GnRH-R 跨膜区域包含 7 个高度保守的跨膜 α 螺旋(45~64、76~95、114~135、156~176、207~224、267~286、305~324),这些 α 螺旋是受体锚定到细胞膜上必需的。

氨基酸序列系统进化分析表明,牙鲆 GnRH-R 与硬骨鱼 GnRH-R1 具有高度同源性(85% 同源性)。已知的硬骨鱼 GnRH-R 基因的系统进化分析表明,存在两种类型的 GnRH-R 基因:Type I GnRH-R 和 Type II GnRH-R 基因。在牙鲆 GnRH-R 的氨基酸序列中,具有 Type I GnRH-R 共有的典型基序:CAFVT(TM III)和 DLEGKVSHSLTH(TM VII 开始的序列处),表明克隆得到的牙鲆 GnRH-R 属于 Type I GnRH-R。

GnRH-R 跨膜 α 螺旋之间的区域形成了胞内或胞外 loops,这些区域参与受体信号转导和肽选择性功能上。牙鲆 GnRH-R 在 TM III 的胞质边界处具有一个保守的 DRQSAI(DRXXXI/V)基序,这个基序被认为参与 G 蛋白偶联信号转导和 GnRH 肽诱导受体的激活;另一个保守的区域是位于 TM VII 内的 NPXXY 或 DPXXY 基序同样存在于牙鲆中(DPVIY),这个基序参与一些 GPCRs(包括 GnRH-R)的内在化(internalization),同时这个基序特别是基序中的 Tyr 残基对于受体激活和信号转导起到关键作用。在第三个胞内 loop 中,鱼类 GnRH-R 有个保守的 Ala 残基(在牙鲆中为 Ala²³⁸),其也在 G 蛋白偶联和受体内在化方面具有重要作用。

在哺乳动物或非哺乳动物 GnRH-R 中,在第一个和第二个胞外 loop 之间由 2 个 Cys 形成 1 个保守二硫桥,是受体的正确折叠必需的。和其他的 GnRH-R 一样,牙鲆 GnRH-R 在第一个和第二个胞外 loop 之间存在由 2 个 Cys(Cys¹¹²和 Cys¹³⁰)可以形成的潜在的二硫桥。这个二硫桥的完全缺失将会影响受体的结构完整性和降低鱼类 GnRH-R 对 GnRH 肽的选择性。

GnRH-Rs 的 NH₂-末端区域不是很保守,但含有糖基化位点,是 GnRH-Rs 表达、GnRH-Rs 穿梭到细胞膜表面或受体稳定必需的。将 mouse 的 GnRH-R 糖基化位点引进到牙鲆 GnRH-R 中,可以增加受体的数量,但不影响受体结合力或肽选择性^[23-26]。牙鲆 Type I GnRH-R 中在 NH₂-末端含有 3 个潜在的糖基化位点(N¹¹SSW、N¹⁵GSS 和 N²⁷WTA),此外,在第一个胞外 loop 和第二个胞外 loop 中分别存在 1 个糖基化位点(N¹⁰⁰ITV 和 N¹⁷⁸VTI),牙鲆 Type I GnRH-R 含有的糖基化位点比哺乳动物要多,牙鲆糖基化位点的数目是否/怎样影响牙鲆 GnRH-R 的表达、降解率或亲和力,应该进一步研究。

在牙鲆 GnRH-R 的第一个胞内 loop 中,存在 1 个和 rGnRH-R III 基序(⁶⁰KRKSH⁶⁴)一致的基序(⁶⁰KRKSH⁶⁴),这个基序是 G_s 识别基序(BBXOB, B 代表碱性氨基酸, X 代表任何一种氨基酸)。已经证明这个基序和 cAMP 产生相关, cGnRH-II 能通过 cAMP-PKA 途径提高 sbGnRH-R 在 COS7 细胞中的活性。

和其他非哺乳动物 GnRH-Rs 相似,牙鲆 GnRH-R 含有 1 个 C-末端胞内尾巴。这种胞内尾巴是鱼类 GnRH-Rs 功能必需的,在第三个胞内 loop 中,牙鲆 GnRH-R 含有 2 个 PKC 磷酸化位点(²³³SKR²³⁵和²⁶²TLK²⁶⁴);在 C 端尾巴中,存在 1 个 PKC 磷酸化位点(⁴⁰⁵TAR⁴⁰⁶)。牙鲆 GnRH-R C-末端尾巴中含有鱼类 GnRH-R 具有的 Src 同源区 3(SH3)结合区域(PxxP 序列)(³⁴⁰PPAP),能够潜在地传递偶联的能力到丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs),GnRH 通过 PKC 和 PKA 调控 G_h 和 LH 转录,二者都集中于 MAPK 水平。

RT-PCR 分析表明,GnRH-R 在牙鲆脑和垂体有表达,暗示牙鲆 GnRH-R 参与到生殖行为如产卵行为;RT-PCR 也检测到牙鲆 GnRH-R 在卵巢和睾丸中有表达,其能与牙鲆 cGnRH-II 和 sbGnRH 在卵巢中共表达,GnRH 肽在卵巢中具有自分泌/旁分泌功能,对牙鲆卵巢中的 GnRH 受体可能起到调控作用。[中国水产科学,2006,13(4):536-546]

关键词:牙鲆;促性腺激素释放激素;促性腺激素释放激素受体

通讯作者:孙修勤, E-mail:xiuqin_sun@fio.org.cn