

综述与专论

蛋白组氨酸磷酸酶研究进展

马瑞欣^{1)*} 耿美玉¹⁾ 李晋萍^{2)**}¹⁾中国海洋大学医药学院, 海洋药物与食品研究所, 青岛 266003;²⁾Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala S-75123, Sweden)

摘要 主要概括磷酸酶的种类, 原核细胞磷酸组氨酸生物功能及调控, 哺乳动物组氨酸残基磷酸化、去磷酸化, 以及组氨酸磷酸酶及其底物的最新研究进展. 信号转导在生长发育及细胞功能中起极其重要的作用. 无论在原核还是真核细胞, 蛋白质磷酸化是细胞内信号转导的关键机制. 研究最多的可逆的真核蛋白磷酸化, 主要发生在含有羟基的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上. 不同的激酶和磷酸酶受不同机制的调节, 而调节过程中出现的差异是人类很多疾病的潜在基础. 与大量有关羟基磷酸化氨基酸的报道相比, 有关氨基磷酸化氨基酸的报道甚少. 据估计, 自然界中存在的磷酸组氨酸比磷酸酪氨酸多 10~100 倍, 但不如磷酸丝氨酸丰富. 虽然对脊椎动物蛋白质中存在磷酸组氨酸的认识可以追溯到 20 世纪 60 年代初, 但由于研究手段的限制, 至今对脊椎动物蛋白组氨酸激酶及组氨酸磷酸酶的结构及功能知之甚少. 但是, 近几年的研究有突破性的发现, 克隆和重组表达哺乳动物组氨酸磷酸酶为研究氨基磷酸化氨基酸的生物功能翻开新的一章.

关键词 信号转导, 组氨酸, 激酶, 磷酸酶

学科分类号 Q55

40 年前, Boyer 和他的同事首次在大鼠肝脏线粒体检测到琥珀酰辅酶 A 上与蛋白质结合的磷酸组氨酸^[1]. 几十年以来, 基于很多原因, 主要是磷酸组氨酸的酸不稳定性, 有关组氨酸磷酸酶的报道甚少. 由于研究手段的限制, 至今对组氨酸磷酸酶的分子结构及生物学机制不十分了解. 近年的研究有所突破, 越来越多的证据表明, 可逆的蛋白组氨酸残基磷酸化在真核细胞信号转导中起非常重要的作用. 组氨酸磷酸酶在生物体的广泛存在及在某些组织如骨骼肌、心肌的表达都表明此酶有重要的生物功能^[2]. 本综述的目的之一就是使组氨酸磷酸酶的重要性得到大家的认识, 从而促进对此酶的深入研究.

1 蛋白磷酸酶种类

蛋白质的磷酸化 - 去磷酸化循环有效地调控生物细胞过程的各个方面. 在传统的蛋白质磷酸化的研究领域, 通常认为激酶 (kinase) 起主要作用, 而磷酸酶 (phosphatase) 的功能只是逆转激酶的作用. 然而, 随着研究的深入发现, 蛋白质分子磷酸化的稳态水平既依赖于激酶, 也受磷酸酶的调节, 说明这两种酶在调节细胞功能中同样重要.

根据目前所知, 蛋白磷酸酶可分成以下几个主要家族.

最大的家族是丝氨酸或苏氨酸磷酸酶, 分为 1 型、2A 型、2B 型和 2C 型 (PP1、PP2A、PP2B、PP2C). 据报道, PP1 和 PP2A 在细胞凋亡中起关键作用, PP2B 是一种钙依赖性磷酸酶, 又称神经钙蛋白 (calcineurin), PP2C 则是一种镁依赖性蛋白丝氨酸或苏氨酸磷酸酶. 虽然这些酶催化机制相似, 但它们的分子结构完全不同. 分子克隆揭示, PP1、PP2A 和 PP2B 属于 PPP 家族, 而 PP2C 是 PPM 酶的代表, 与丙酮酸脱氢酶磷酸酶 (pyruvate dehydrogenase phosphatase) 有相似性.

另一个家族是酪氨酸磷酸酶 (PTPs). 这一家族的特点是在它们的活性位点上都有一个半胱氨酸, 与磷酸底物形成共价中间体. PTPs 具有受体样跨膜结构, 在某些信号转导通路中起重要作用. PTPs 能够调控粘着斑动态学 (focal adhesion dynamics)、细胞间的粘附、胰岛素信号传递等不同的生理过程, 而 PTPs 自身的活性又受二聚体形成、磷酸化及可逆的氧化作用的调节.

*永久地址: 青岛大学医学院附属医院内分泌科.

** 通讯联系人.

Tel: 0046-18-4714241, Fax: 0046-18-4714209

E-mail: jin-ping.li@imbim.uu.se

收稿日期: 2005-07-29, 接受日期: 2005-08-31

酸接力传递过程(His-Asp-His-Asp). 该系统除含有 HPK 和 RR 蛋白两种成分外, 还同时含有一个磷酸接受器结构域和一个含组氨酸的磷酸转移结构域(HPT). 在细菌中经典系统占主导地位, 而非经典系统在真核细胞中多见. 许多细菌的二组分组氨酸激酶具有双重调节功能, 既具有激酶活性(作用于组氨酸), 又具有磷酸酶活性(作用于磷酸天冬氨酸). RR 蛋白是组氨酸激酶磷酸酶的靶点, 它经常将细胞受到的外刺激如改变渗透压浓度, 改变氧、氮或磷水平与基因调控联系起来, 并且影响细胞分化和其他功能, 如趋化性.

在绝大多数细菌中, 二组分磷酸化系统表达很高, 至少有 1% 的基因编码这个蛋白质家族. 大肠杆菌的基因组编码 62 种二组分蛋白质. 二组分系统在革兰氏阳性及革兰氏阴性细菌中均存在. 除持家功能 (housekeeping functions) 外, 它们也控制毒素及其他重要的与发病有关的蛋白质表达.

细菌组氨酸蛋白激酶的催化结构域 (catalytic domains) 不同于丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸激酶^[16]. 组氨酸激酶的结构域与 II 型拓扑异构酶旋转酶 B (type II topoisomerase gyrase B) 和伴侣蛋白 Hsp90 (chaperone Hsp90) 的 ATP 酶结构域 (ATPase domains) 相似. 推测这些蛋白质中高度保守的谷氨酸残基参与 ATP 酶的催化机制, 而在组氨酸激酶活性中心没有发现谷氨酸. 以上结构特点可以解释为什么这个超家族的成员中有些有激酶的功能, 而有些有 ATP 酶的功能. HPK 的主要功能是催化 ATP 依赖的自身磷酸化反应, 使二聚体结构域特异的 His 残基磷酸化, 进而作为磷酸供体使 RR 蛋白的 Asp 残基磷酸化. 此外, HPK 还能使其相关的 RR 蛋白表现出磷酸酶活性, 通过使 RR 蛋白去磷酸化, 可作为调节细胞内磷酸化的 RR 蛋白水平的另外一种途径.

截至目前, 虫、蝇和人类基因组中仍然没有发现编码二组分蛋白质的基因. 因此有人提出以低等生物中的二组分构件 (building blocks) 为靶点发展抗菌素, 有可能找到一类全新的抗菌药物直接对抗脊椎动物真菌及细菌的致病原.

4 哺乳动物组氨酸磷酸化及去磷酸化

尽管没有证据表明脊椎动物中存在二组分系统, 但关于脊椎动物组氨酸磷酸化的报道却屡见不鲜. 对哺乳动物磷酸组氨酸的描述始于 20 世纪 60 年代. 继之发现了大鼠核蛋白激酶可以使组蛋白 H4

(histone H4) 的组氨酸残基磷酸化^[4]. 20 世纪 90 年代, 分别在研究 p36 和 p38 蛋白的过程中发现, 这两个可能相同的蛋白质都在 Ras 蛋白和鸟嘌呤核苷酸存在时被磷酸化, 并且磷酸化发生在组氨酸残基上^[5,17].

进一步研究发现, 有两种真核基因的产物 (BCKDH kinase 和 pyruvate dehydrogenase kinase) 与细菌组氨酸蛋白激酶在结构上存在一定的同源性, 然而迄今无法证明功能上的同源性. 1992 年, 克隆编码侧链 α -酮酸脱氢酶激酶 (BCKDH kinase) 的基因显示这个酶的序列与其他真核蛋白激酶没有相似性, 而与细菌中的组氨酸蛋白激酶有相似性^[18]. BCKDH 激酶能够在丝氨酸上自动磷酸化 (autophosphorylate) 其生理底物 (physiological substrate) α -酮酸脱氢酶, 但没有发现 BCKDH 激酶能使组氨酸磷酸化的有力证据. 另外, 大鼠的丙酮酸脱氢酶激酶 (pyruvate dehydrogenase kinase) 与细菌组氨酸蛋白激酶也有一些相似性, 在羟基氨基酸上磷酸化蛋白质.

1995 年, 发现在配体诱导的级联反应 (ligand-induced cascade) 的过程中, 在血小板上能够产生磷酸组氨酸, 是脊椎动物中一种新的依赖激活的信号转导通路. 除了已知的在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化, 凝血酶和胶原蛋白也能导致在 P-选择蛋白 (P-selectin) 胞质尾区 (the cytoplasmic tail) 上的组氨酸磷酸化^[19]. 然而, 这种在 P-选择蛋白组氨酸残基上发生的磷酸化常常出现和消失得非常迅速, 不易被检测到.

2000 年, 发现呼吸道上皮的一种 37 ku 蛋白在组氨酸上磷酸化, 这个膜联蛋白 I (annexin I)^[20]属于 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白家族, 其磷酸化受氯离子浓度调节. 膜联蛋白 I 不能自动磷酸化, 表明它是一种特异的未知组氨酸激酶的底物.

总之, 如前所述, 组氨酸是很多酶催化中心的一种非常重要的活性氨基酸, 在催化过程中常常被共价修饰, 因此现在发现的某些磷酸组氨酸也可能是中间体, 而并非真正的具有调节功能的磷酸化组氨酸蛋白.

5 哺乳动物组氨酸磷酸酶及其底物

尽管近期研究表明, 在一些真核蛋白中存在磷酸组氨酸, 但真正鉴定的含磷酸组氨酸的蛋白质还是很少, 如 P-选择蛋白、组蛋白 H4、膜联蛋白 I、还有结合鸟嘌呤核苷酸的调节蛋白 β -亚单位 (G_β)^[21].

由于检测和分离磷酸化组氨酸方法的局限性,在哺乳动物体内还没有找到一个特异性的组氨酸激酶,因此关于脊椎动物的蛋白组氨酸磷酸酶的研究大都是用组蛋白 H4 作为底物,用从酵母中纯化的组氨酸激酶对组蛋白 H4 进行磷酸化的^[10].

在经典的真核蛋白磷酸酶中,PTPs、PP2B 不能对组氨酸残基上磷酸化的 H4 去磷酸化,而 PP1、PP2A、PP2C 对组蛋白 H4 的磷酸组氨酸有相当高的活性.有趣的是,用细菌组氨酸激酶 CheA 激活的组蛋白上第 48 位组氨酸残基作为底物,没有一个丝氨酸/苏氨酸磷酸酶显示出去磷酸化的活性,提示了特异性组氨酸磷酸酶的存在.

大肠杆菌 SixA 是第一个被鉴定的细菌组氨酸磷酸酶,分子质量为 17 ku,由 161 个氨基酸组成.与其他组氨酸磷酸酶家族成员相同,该酶在 N 端具有一个精氨酸-组氨酸-甘氨酸(RHG)结构,在磷酸基团由组氨酸转移到天冬氨酸的过程中发挥关键作用^[2].最近发表的晶体结构研究结果显示:与其他 RHG 磷酸酶相比,SixA 在活性部位上缺少一个由额外的 α 螺旋亚结构域组成的鞘,因此形成了一个较浅的沟,而这个沟对组氨酸激酶 ArcB C 端含有组氨酸的磷酸转移功能域(HPt domain)有非常重要的调节功能^[23].虽然在哺乳动物中没有发现其氨基酸序列具有同源性,但该项研究成果将为脊椎动物组氨酸磷酸酶结构与作用机制的研究提供重要的理论依据.

2002年,瑞典乌普萨拉大学医学生化与微生物系研究小组,用含有磷酸组氨酸的肽(succinyl-Ala-His(P)-Pro-Phe-*p*-nitroanilided)作为底物,在猪肝匀浆中检测到一种不同于 PP1、PP2A、PP2C 的磷酸酶活性,纯化后得到一个 14 ku 的蛋白质.继之用人胚胎肾细胞(HEK 293) cDNA 文库进行分子克隆得到人的相应蛋白质.此基因经重组表达,纯化的重组蛋白对于以上提到的磷酸肽底物显示出更高的活性. RNA 印迹分析结果显示,人组氨酸磷酸酶 mRNA 在人大多数器官中均有表达,尤其在心肌与骨骼肌中表达最高.这些结果为研究真核生物组氨酸磷酸化及去磷酸化提供了新的工具^[2].

同年, Klumpp 组也鉴定了一个脊椎动物蛋白组氨酸磷酸酶,用细菌自动磷酸化的组氨酸激酶 cheA 作底物可以检测到组氨酸磷酸酶的活性.有趣的是,这种组氨酸磷酸酶在神经系统发育中起重要作用^[24].

脊椎动物蛋白组氨酸磷酸酶的氨基酸序列与目

前已知的任何磷酸酶没有相似性.但在不同种属中同源性很高,包括线虫、斑马鱼等.而且,作用于磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、磷酸酪氨酸残基的磷酸酶抑制剂对它也不起作用.

新近发现 ATP-柠檬酸裂解酶(ACL)也是一种含有磷酸组氨酸的蛋白质.现有的数据提示,这种蛋白质为上述 14 ku 蛋白组氨酸磷酸酶的一个生理底物,作用点在第 760 位组氨酸残基上^[25,26].最新的体外及细胞研究表明,异源三聚体 G 蛋白的 β -亚单位(β -subunit of heterotrimeric G protein)是 PHPT 的底物^[27].

6 小 结

与对细菌蛋白组氨酸残基磷酸化方面的认识相比,我们对脊椎动物可逆的组氨酸磷酸化知之甚少.而与蛋白丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸酶相比,对于组氨酸磷酸酶的了解更是凤毛麟角.早在 20 世纪 60 年代初,就有人提出在脊椎动物蛋白质中存在磷酸组氨酸,20 世纪 70 年代又有人在兔肝中发现酸不稳定的磷酸化组蛋白 I 和 IV,而且据估计,真核生物中 6% 的蛋白质磷酸化可能发生在组氨酸残基上.然而直到今天,已经鉴定的用于脊椎动物组氨酸残基具有共价键修饰的底物仍然很少. a. 膜联蛋白 I, 分子质量 37 ku, 是 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白家族成员之一,据报道,在呼吸道上皮细胞中的膜联蛋白 I 上发生组氨酸磷酸化; b. P-选择蛋白,一种白细胞附着分子,在血小板被凝血酶或胶原激活后,此蛋白质的组氨酸可被磷酸化; c. 结合鸟嘌呤核苷酸的调节蛋白 β -亚单位(G_{β}),在人白血球过多症的细胞以及胰岛素分泌细胞中,此蛋白质的组氨酸残基被磷酸化.这些发现表明,磷酸组氨酸在脊椎动物信号转导通路中有重要的、多重作用.

丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 1, 2A 和 2C 型能够在体外使^[32P]标记的组蛋白 H4 上的组氨酸残基去磷酸化.但直到 2002 年,脊椎动物 PHPT 才同时被我们实验室^[24]和 Klumpp 组^[24]纯化和克隆.尽管两个实验室用于检测组氨酸磷酸酶活性的方法不同,即分别用磷酸肽和细菌自动磷酸化的组氨酸激酶 CheA 作为底物,但是最后证实从人肾细胞和兔肝克隆的具有组氨酸磷酸酶活性的蛋白质是同一种分子.

为了进一步了解脊椎动物 PHPT 生理底物的结构与功能的关系,我们实验室最近用点突变的方法

来探讨 PHPT 的催化机理和分子作用机制, 揭示了参与催化反应的活性氨基酸 (印刷中). 正在进行的晶体结构研究将会在突变的基础上进一步明确其活性中心的三维结构, 为更深入地研究提供很好的手段和依据.

参 考 文 献

- Bieber L L, Boyer P D. ^{32}P -labeling of mitochondrial protein and lipid fractions and their relation to oxidative phosphorylation. *J Biol Chem*, 1966, **241** (22): 5375~5383
- Ek P, Pettersson G, Ek B, *et al.* Identification and characterization of a mammalian 14-kDa phosphohistidine phosphatase. *Eur J Biochem*, 2002, **269** (20): 5016~5023
- Chen C C, Smith D L, Bruegger B B, *et al.* Occurrence and distribution of acid-labile histone phosphates in regenerating rat liver. *Biochemistry*, 1974, **13** (18): 3785~3789
- Fujitaki J M, Fung G, Oh E Y, *et al.* Characterization of chemical and enzymatic acid-labile phosphorylation of histone H4 using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 1981, **20** (12): 3658~3664
- Motojima K, Goto S. Histidyl phosphorylation and dephosphorylation of P36 in rat liver extract. *J Biol Chem*, 1994, **269** (12): 9030~9037
- Ohmori H, Kuba M, Kumon A. Two phosphatases for 6-phospholysine and 3-phosphohistidine from rat brain. *J Biol Chem*, 1993, **268** (11): 7625~7627
- Yokoyama K, Ohmori H, Kumon A. Isolation of N omega-phosphoarginine hydrolase from rat liver and its physical properties. *J Biolchem*, 1993, **113** (2): 236~240
- Wang S P, Sharma P L, Schoenlein P V, *et al.* A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (2): 630~634
- Kim Y, Huang J, Cohen P, *et al.* Protein phosphatases-1, phosphatases-2a, and phosphatases-2c are protein histidine phosphatases. *J Biol Chem*, 1993, **268** (25): 18513~18518
- Huang J M, Wei Y F, Kim Y H, *et al.* Purification of a protein histidine kinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the first member of this class of protein kinases. *J Biol Chem*, 1991, **266** (14): 9023~9031
- Matthews H R, Mackintosh C. Protein histidine phosphatase activity in rat liver and spinach leaves. *FEBS Lett*, 1995, **364** (1): 51~54
- Kim Y, Pesis K H, Matthews H R. Removal of phosphate from phosphohistidine in proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1268** (2): 221~228
- Matthews H R. Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmac Ther*, 1995, **67** (3): 323~350
- Hess J F, Bourret R B, Simon M I. Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature*, 1988, **336** (6195): 139~143
- West A H, Stock A M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26** (6): 369~376
- Bilwes A M, Alex L A, Crane B R, *et al.* Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell*, 1999, **96** (1): 131~141
- Hegde A N, Das M R. Ras proteins enhance the phosphorylation of a 38 kDa protein (p38) in rat liver plasma membrane. *FEBS Lett*, 1987, **217** (1): 74~80
- Popov K M, Zhao Y, Shimomura Y, *et al.* Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. Molecular cloning, expression, and sequence similarity with histidine protein kinases. *J Biol Chem*, 1992, **267** (19): 13127~13130
- Crovello C S, Furie B C, Furie B. Histidine phosphorylation of P-selectin upon stimulation of human platelets: a novel pathway for activation-dependent signal transduction. *Cell*, 1995, **82** (2): 279~286
- Muimo R, Hornickova Z, Riemen C E, *et al.* Histidine phosphorylation of annexin I in airway epithelia. *J Biol Chem*, 2000, **275** (4): 36632~36636
- Kowluru A, Seavey S E, Rhodes C J. A novel regulatory mechanism for trimeric GTP-binding proteins in the membrane and secretory granule fractions of human and rodent beta cells. *Biochem J*, 1996, **313** (Pt 1): 97~107
- Matsubara M, Mizuno T. The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 2000, **470** (2): 118~124
- Hamada K, Kato M, Shimizu T. Crystal structure of the protein histidine phosphatase SixA in the multistep His-Asp phosphorelay. *Genes to Cells*, 2005, **10** (1): 1~11
- Klump S, Hermesmeier J, Selke D. Protein histidine phosphatase: a novel enzyme with potency for neuronal signaling. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, **22** (12): 1420~1424
- Potapova I A, El-Maghrabi M R, Doronin S V, *et al.* Phosphorylation of recombinant human ATP: citrate lyase by cAMP-dependent protein kinase abolishes homotropic allosteric regulation of the enzyme by citrate and increases the enzyme activity. Allosteric activation of ATP-citrate lyase by phosphorylated sugars. *Biochemistry*, 2000, **39** (5): 1169~1179
- Klump S, Bechmann G, Maurer A, *et al.* ATP-citrate lyase as a substrate of protein histidine phosphatase in vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **306** (1): 110~115
- Maurer A, Wieland T, Meissl F, *et al.* The β -subunit of G protein is a substrate of protein histidine phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **334** (4): 1115~1120

Protein Histidine Phosphatases

MA Rui-Xin^{1)*}, GENG Mei-Yu¹⁾, LI Jin-Ping^{2)**}

¹⁾Marine Drug & Food Institute, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

²⁾Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala S-75123, Sweden)

Abstract Signal transduction is vitally important for development and cell survival of all animals. Most of signaling processes involve phosphorylation and dephosphorylation of amino acid residues in proteins. The kinases and phosphatases involved in signaling processes are regulated by different mechanisms. So far, the studies on protein phosphorylation almost exclusively limited to protein serine/threonine and tyrosine phosphorylation, phosphorylation of histidine has only been sparsely reported. However, phosphorylation of histidine residues has been extensively studied in prokaryotes. It is estimated that histidine phosphorylation may account for 6% of total protein phosphorylation in eukaryotes, 10- to 100-fold more than phosphotyrosine, though less abundant than phosphoserine. Although the presence of phosphohistidine in vertebrate protein was described as early as in the 1960s, accumulated knowledge in vertebrates so far is still limited to O-phosphates. The protein phosphatases were introduced, and the knowledge on the key mechanisms of the bacterial two-component system was summarized. Most importantly, novel mechanisms of phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues are described. Finally, the recent studies about histidine phosphatases are discussed.

Key words signal introduction, histidine, kinase, phosphatase

*Permanent address: Department of Endocrinology and Metabolism, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China.

**Corresponding author . Tel: 0046-18-4714241, Fax: 0046-18-4714209, E-mail: jin-ping.li@imbim.uu.se

Received: July 29, 2005 Accepted: August 31, 2005