



多聚磷酸盐聚合酶 VTC 复合体的结构和功能*

刘伟叶升**

(天津大学生命科学学院, 天津 300072)

摘要 磷酸盐 (P_i) 稳态在所有生物体中都是一个受严格调控的过程, 其功能障碍会导致人类肾范科尼综合征 (Fanconi syndrome)、植物生长迟缓和微生物致死等多种功能紊乱。为了在 P_i 的生物合成需求和胞质 P_i 浓度过高的风险之间实现平衡, 细胞以无机多聚磷酸盐 (polyP) 的形式将 P_i 储存在膜结合的酸钙小体样细胞器中。酿酒酵母液泡转运蛋白伴侣 (vacuolar transporter chaperone, VTC) 复合体作为已知的真核生物多聚磷酸盐聚合酶, 利用 ATP 在胞质中合成 polyP, 并将其转运到液泡中储存起来以维持细胞内 P_i 稳态。本文从结构特征、polyP 合成及 polyP 转运机制等方面介绍了 VTC 复合体结构和功能的最新研究进展, 着重介绍了最近发表的完整 VTC 复合体的结构信息, 并探讨了 VTC 的激活机制。

关键词 P_i 稳态, VTC 复合体, PolyP, 结构特征, 偶联 polyP 的合成和转运

中图分类号 Q518

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0155

磷在生命活动中扮演核心角色, 它是生物遗传物质核酸和细胞膜磷脂的重要组成成分, 是生物细胞能量代谢的载体物质三磷酸腺苷 (ATP) 的结构元素, 还是动物骨骼和牙齿的主要成分。自然界中大多数磷以不溶性的无机磷存在于矿物、土壤、岩石中, 只有少量的可溶性磷, 主要以无机磷酸盐 (P_i) 的形式为生命所利用。细胞对磷酸盐的需求随着细胞生理情况的变化而变化, 在细胞分裂间期的 S 期因 DNA 复制而达到峰值。然而磷酸盐是所有核苷酸降解反应的产物, 细胞质中过量的磷酸盐会改变核苷酸降解反应的平衡, 降低反应的自由能, 从而影响相关的细胞生理。细胞质磷酸盐供应不足会影响细胞的生长和分裂, 而磷酸盐过量则会抑制细胞生理活动从而对细胞造成伤害。因此, 细胞需要维持细胞质中磷酸盐的稳态, 在满足自身对磷酸盐需求的同时防止细胞质中产生过多的磷酸盐对细胞造成伤害。磷酸盐稳态在所有生物体中都是一个受严格调控的过程, 其功能障碍会导致人类肾范科尼综合征 (Fanconi syndrome)^[1]、植物生长迟缓^[2-3] 和微生物致死^[4] 等多种功能紊乱。

生物体从多个层次维持机体的磷酸盐稳态。在机体层面, 多细胞生物 (如人类) 可以通过肾脏的过滤和重吸收维持体液循环中的 P_i 浓度^[5-6]。他们

可以获取骨骼中的磷灰石作为巨大的 P_i 储备。同时, 人类组织在质膜中广泛表达受调节的 P_i 输出者 (XPR1)^[7], 这表明它们也可能保持对胞浆 P_i 峰值的保护。有趣的是, XPR1 也被发现与 P_i 在肾脏肾小管的重吸收有关^[1]。对于植物来说, 植物生长需要大量的 P_i , 但大多数土壤中的 P_i 水平是有限的, 并且不断变化^[8]。为了在自然界中生存克服这种 P_i 营养“胁迫”, 植物不仅进化出了强大的 P_i 吸收和转运能力, 还进化出了复杂的调控机制^[9], 将多余的 P_i 储存在液泡中, 以应对土壤 P_i 的变化状态。事实上, 大部分 (>90%) 游离的 P_i 储存在植物细胞的典型液泡中^[10]。在单细胞生物如酿酒酵母中, P_i 的感知、获取和储存主要由磷酸响应信号通路 (称为 PHO 通路) 介导^[11]。在 P_i 缺乏的情况下, PHO 操纵子被触发, 该操纵子控制一组旨在提高 P_i 摄入和 P_i 利用的基因。在酿酒酵母中, P_i 获取系统由 4 个定位在细胞膜的 P_i 转运蛋白组成, 其中 2 个低亲和力 P_i 转运蛋白质, 即 Pho87、Pho90 普遍表达^[12], 而 2 种高亲和力 P_i 转运蛋白 Pho84 和

* 国家自然科学基金 (31971127) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 18858196912, E-mail: sye@tju.edu.cn

收稿日期: 2023-04-06, 接受日期: 2023-04-20

Pho89由PHO途径调节^[13]。最初被认为是低亲和力 P_i 摄取系统的Pho91最近被证明位于液泡膜上,并参与将 P_i 从液泡输出到细胞质^[14]。有趣的是,Pho87、Pho90和Pho91都具有SPX结构域,该结构域通常存在于参与调节 P_i 稳态的蛋白质中^[15]。

为了在 P_i 的生物合成需求和胞质 P_i 浓度过高的风险之间实现微妙的平衡,细胞以无机多聚磷酸盐(polyP)的形式将 P_i 储存在膜结合的酸钙小体样细胞器中^[16]。酸钙小体是从细菌到哺乳动物都保守的一类膜结合细胞器,但其功能尚不清楚。酵母细胞有一个类似的酸钙小体样细胞器,即液泡,它携带所有集中在酸钙小体中化合物的转运蛋白^[17]。polyP是由数十至数百个正磷酸盐残基通过高能磷酸酐键连接而成,存在于所有生物中。polyP参与真核生物中的许多过程,包括激活炎症反应^[18-19]、促进血液凝固^[20]、促进软骨的发育和再生^[21]、诱导癌细胞凋亡^[22]、蛋白质多聚磷酸化修饰^[23]以及调节离子通道活性^[24]等。polyP储存在酸性钙小体管腔中,同时多磷酸酶(Ppn1/Ppn2)也位于该管腔中。假设这些酶可以水解polyP,这可能允许释放的 P_i 再输出进入细胞质^[25-26]。因此,酸钙小体样细胞器可能是胞浆 P_i 的重要缓冲装置。

酿酒酵母液泡转运蛋白伴侣(vacuolar transporter chaperone, VTC)复合体作为已知的真核生物多聚磷酸盐聚合酶,利用ATP在胞质中合成polyP,并将其转运到液泡中储存起来以维持细胞内 P_i 稳态。近年来,随着VTC复合体的聚合酶和转位酶功能被鉴定^[27-28],polyP合成和转运的偶联机制也被确定^[29]。虽然目前已经获得了一些结构域的结构^[27-28],但是有限的信息限制了生理状态下VTC复合体的组装、调控以及激活机制的研究。最近发表的完整VTC复合体的结构极大地推动了对VTC复合体结构和功能的理解。

1 VTC复合体的研究现状

酿酒酵母VTC复合体包含了至少4个亚基:Vtc1、Vtc2、Vtc3和Vtc4,同源蛋白质在其他低等生物中也已经被发现^[30-31]。Vtc1是一个仅包含3次跨膜螺旋的小整合膜蛋白。Vtc2、Vtc3和Vtc4在序列上高度同源,在C端与Vtc1共享类似的跨膜结构域,并具有在 P_i 稳态中起关键作用的N端SPX(Syg1/Pho81/XPR1)结构域和隧道形状的中心结构域(图1)。酵母中Vtc4的中心结构域(Vtc4¹⁸⁹⁻⁴⁸⁰)已经被证实具有多聚磷酸盐聚合酶活

性,而Vtc2或Vtc3的中心结构域是无催化活性的^[27]。最近还发现了VTC复合体可能的第5个亚基Vtc5^[32],该亚基由具有和Vtc2、Vtc3和Vtc4相似的结构域组成,但是序列相似性很低。Vtc5对VTC复合体的活性不是必需的,表明它是一个可选的调节亚基^[32]。

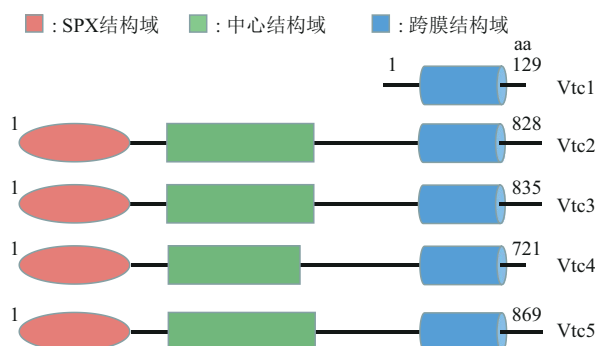


Fig. 1 Domain composition of VTC complex subunits
图1 VTC复合体亚基的结构域组成

Vtc4的中心结构域(Vtc4¹⁸⁹⁻⁴⁸⁰)的结构揭示了一个隧道状的催化合成口袋(图2),而且重组表达的Vtc4中心结构域具有聚合酶活性,能够利用ATP合成polyP^[27]。Vtc4中心结构域的隧道状口袋分布着众多保守的碱性氨基酸(K200、R264、R266、K281、R361、K458)、丝氨酸(S457)和酪氨酸(Y359),这些氨基酸已经被证实在polyP合成中发挥着重要作用。Vtc4¹⁸⁹⁻⁴⁸⁰与 P_i 、 PP_i 、底物类似物AppNHp(adenosine-5'-[(β , γ)-imido] triphosphate)和polyP的晶体结构也已经被获得^[27]。从 P_i 、 PP_i 、AppNHp到polyP,这些晶体结构或许暗示着VTC复合体利用ATP合成polyP并将其转运的过程。同时, PP_i 能够高度刺激Vtc4催化结构域的polyP合成活性, P_i 和 PPP_i 刺激效果较弱。因此, PP_i 可能提供启动合成polyP链的引物。Vtc4的催化结构域对ATP和dATP具有相似的亲和力,对CTP和GTP的亲和力仅仅低5倍。在晶体结构中,核苷部分没有结构,蛋白质仅与底物三磷酸腺苷的三磷酸部分发生相互作用。polyP结合在Vtc4的隧道内,该隧道由保守的碱性残基组成,并包含活性位点。Vtc4的中心结构域在结构上与RNA三磷酸酶Cet1相似^[27]。虽然这些晶体似乎暗示着polyP合成和转运的过程,但是由于缺乏完整VTC复合体的结构,难以确定生理状态下的polyP合成和转运过程。

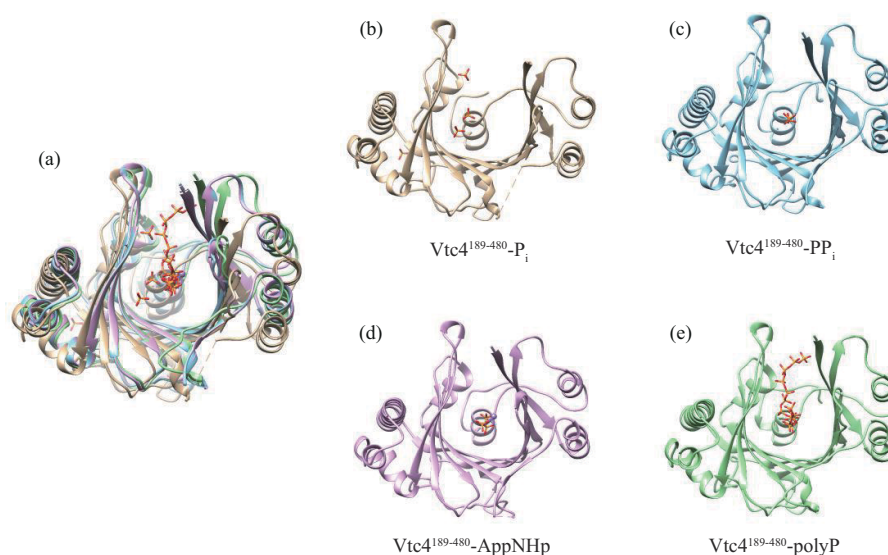


Fig. 2 The crystal structure of the central domain of Vtc4 that combines different substrates and products

图2 Vtc4的中心结构域与不同底物和产物的晶体结构

(a) Vtc4的中心结构域与P_i、PP_i、AppNHp和polyP的晶体结构的比较。(b) Vtc4的中心结构域与P_i的晶体结构 (PDB ID: 3G3T)。(c) Vtc4的中心结构域与PP_i的晶体结构 (PDB ID: 3G3U)。(d) Vtc4的中心结构域与AppNHp的晶体结构 (PDB ID: 3G3R)。(e) Vtc4的中心结构域与polyP的晶体结构 (PDB ID: 3G3Q)。

尽管VTC蛋白的跨膜结构域和中心结构域列在多细胞生物中并不保守，但是位于N端的SPX结构域在植物、苍蝇和哺乳动物中都被发现。包含SPX结构域的蛋白质已经被发现在调控P_i稳态方面发挥着重要作用。Vtc4 SPX结构域的晶体结构显示包含6个 α 螺旋，其中2个小螺旋 α I和 α II形成N

端螺旋发夹，以及由2个长螺旋 α III和 α IV以及C端2个较小的螺旋 α V和 α VI形成的三螺旋束^[28]。SPX结构域具有一个大的带正电荷的表面，分布着众多的赖氨酸残基，这些赖氨酸残基在不同物种含SPX结构域的蛋白质中是高度保守的 (图3)。

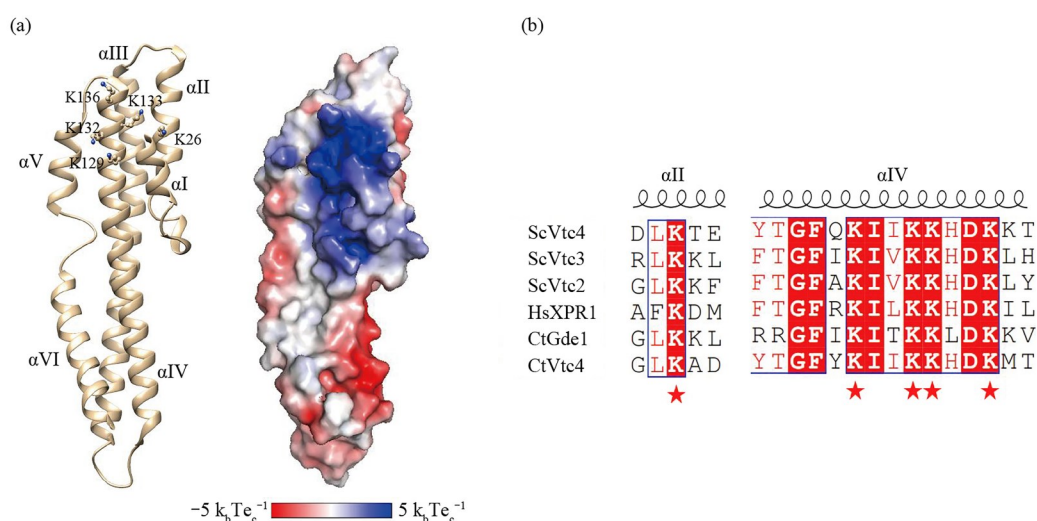


Fig. 3 The structure of SPX^{ScVtc4} reveals a conserved ligand binding surface

图3 SPX^{ScVtc4}的结构揭示了保守的配体结合表面

(a) SPX^{ScVtc4}的晶体结构 (PDB ID: 5IIG) 及表面电势图。(b) 不同物种中SPX结构域的序列比对。红色五角星指示保守的赖氨酸残基。

SPX 结构域能够与含磷酸盐的配体相互作用, 但对 P_i 本身表现出很小的特异性和选择性。InsP₆ 激酶 Kcs1 (其产生肌醇焦磷酸 (PP-InsP) 信号分子) 的缺失消除了 VTC 产生的 polyP 储存, PP-InsP 可能调控体内 polyP 的积累^[33]。Gerasimaite 等^[34] 化学合成了 5-InsP₇, 一种 Kcs1 反应产物, 并发现它在浓度高于 100 nmol/L 时能够显著刺激 VTC 催化合成 polyP。相反, P_i 和 SO₄²⁻ 仅在毫摩尔浓度下才能激活 VTC 复合体, InsP₅、InsP₄ 或 InsP₃ 不能刺激 VTC 催化合成 polyP^[28]。后续体内和体外证据都表明, 5-InsP₇ 是 SPX 依赖性 VTC 复合物的生理相关刺激因子。由于化学合成的 5-InsP₇ 含量很低, 同时 SPX 结构域对 5-InsP₇ 和 InsP₆ 具有相似的亲和力, 因此 InsP₆ 可以当做 5-InsP₇ 的商业化替代品用于后续功能和结晶实验。SPX 结构域保守的碱性表面簇残基突变降低了 VTC 复合体的 polyP 合成活性, 相反发现唯一一对突变 Vtc3^{K126A}/Vtc4^{K129A} 显著增强了 VTC 复合体的 polyP 合成活性^[28]。研究还发现, Vtc3^{K126A}/Vtc4^{K129A} 双突变也增加了酵母细胞内 polyP 含量^[34], 这或许暗示双突变的 VTC 复合体可能处于激活状态。

VTC 复合体可能以两种稳定的亚复合体形式存在, Vtc4/Vtc2/Vtc1 复合体和 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体。荧光定位实验显示: Vtc3 主要位于液泡膜上; Vtc2 的位置随环境中 P_i 浓度变化而变化^[27]。当细胞处于 P_i 饥饿状态, Vtc2 主要定位在液泡膜上; 当细胞处于 P_i 丰富的环境中, Vtc2 在细胞内分布比较分散, 分布在内质网膜、细胞核膜、线粒体膜和细胞膜等^[27]。细胞可能需要存在两种不同的 VTC 亚复合体以创建具有不同调节的 polyP 池来响应不同的应急压力。与此相一致, polyP 不仅被发现集中在酸钙小体样液泡中, 在细胞核中也有一个独特的 polyP 池, 通过多聚磷酸化控制拓扑异构酶 1 (Top1) 的定位和活性^[23]。

近年来, 关于 VTC 复合体的研究取得了长足的进步, 但是几个相关的基本问题仍然悬而未决。首先, 生理状态下的 VTC 复合体是如何组装的? 虽然 Vtc2 和 Vtc4 中心结构域的结构^[27] 以及 Vtc4 SPX 结构域的结构^[28] 陆续被获得, 然而这些结构提供了有关 VTC 复合体的化学计量比和组装的有限信息。因此, 获得完整 VTC 复合体的结构将有助于很好地理解 VTC 复合体的组装。其次, VTC 复合体的功能完整性。VTC 复合体不仅是一种 polyP 聚合酶, 也是一种 polyP 易位酶。为了避免

polyP 在细胞质中积累的毒性, polyP 合成和立即转运到液泡中是耦合的^[29]。然而, 这种耦合机制仍是不清楚的。最后, VTC 复合体是如何调控 polyP 的合成? 当胞浆 P_i 浓度足够高时, VTC 复合体应合成 polyP; 而当胞浆 P_i 浓度较低时, VTC 复合体应关闭 polyP 的合成, 以避免从胞浆中耗尽 P_i 。VTC 复合体的活性受到肌醇磷酸信号分子的调节, 包括高度磷酸化、可扩散的肌醇多磷酸盐 (InsPs) 和肌醇焦磷酸盐 (PP-InsPs)^[28, 34]。但是, 目前尚不清楚这种调控机制。最近发表的完整 VTC 复合体的结构对以上科学问题提出了见解, 下面将着重介绍。

2 VTC复合体的结构

近年来, Vtc2 和 Vtc4 中心结构域的结构^[27] 以及 Vtc4 SPX 结构域的结构^[28] 陆续被获得, 然而这些结构提供了有关 VTC 复合体的化学计量比和组装的有限信息。最近, 完整 VTC 复合体的结构被发表, 包括本实验室解析的处于非激活态 (apo state) 的 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体^[35] 以及华中农业大学刘主课题组^[36] 解析的结合 InsP₆ 的激活态 Vtc4^{R264A/R266A/E426N}/Vtc3/Vtc1 复合体。这两篇文章都报道了 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体的结构, 结构揭示了一个意想不到的异源五聚体, 包含 1 个 Vtc4、1 个 Vtc3 和 3 个 Vtc1 亚基 (图 4)。每个亚基的 3 次跨膜螺旋 (TM1~3) 以胰对称的方式组装, 形成圆柱形五聚体跨膜结构域。Vtc3 的胞质结构域和 Vtc4 的胞质结构域形成非对称的异源二聚体。考虑到 Vtc2 和 Vtc3 在序列上是高度同源的, Vtc4/Vtc2/Vtc1 复合体可能采取和 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体相似的化学计量比和组装方式。

在本课题组的文章中, 基于结构分析和功能数据, 对 polyP 的合成和转运、polyP 通道的门控机制及 VTC 复合体的激活机制进行了研究。结构和体外 polyP 合成实验都支持 VTC 偶联 polyP 聚合酶和转位酶活性。同时, 利用纯化的液泡和 5-InsP₇ 以及 1,5-InsP₈ 等生理性配体对 VTC 的功能展开了研究。结果发现, 纯化的 VTC 复合体以 ATP-和肌醇多聚磷酸盐 (PP-InsPs) 依赖的方式合成 polyP。进一步分析发现, 只有 Vtc4 的 SPX 结构域对于 polyP 的合成和 PP-InsPs 调控是至关重要的, 而 Vtc3 主要通过磷酸化的 loop 来调控 polyP 的合成。该结构中, 跨膜区形成一个 polyP 选择性通道, 可能采用静息态构象, 其中 Vtc4 的门锁状水平螺旋

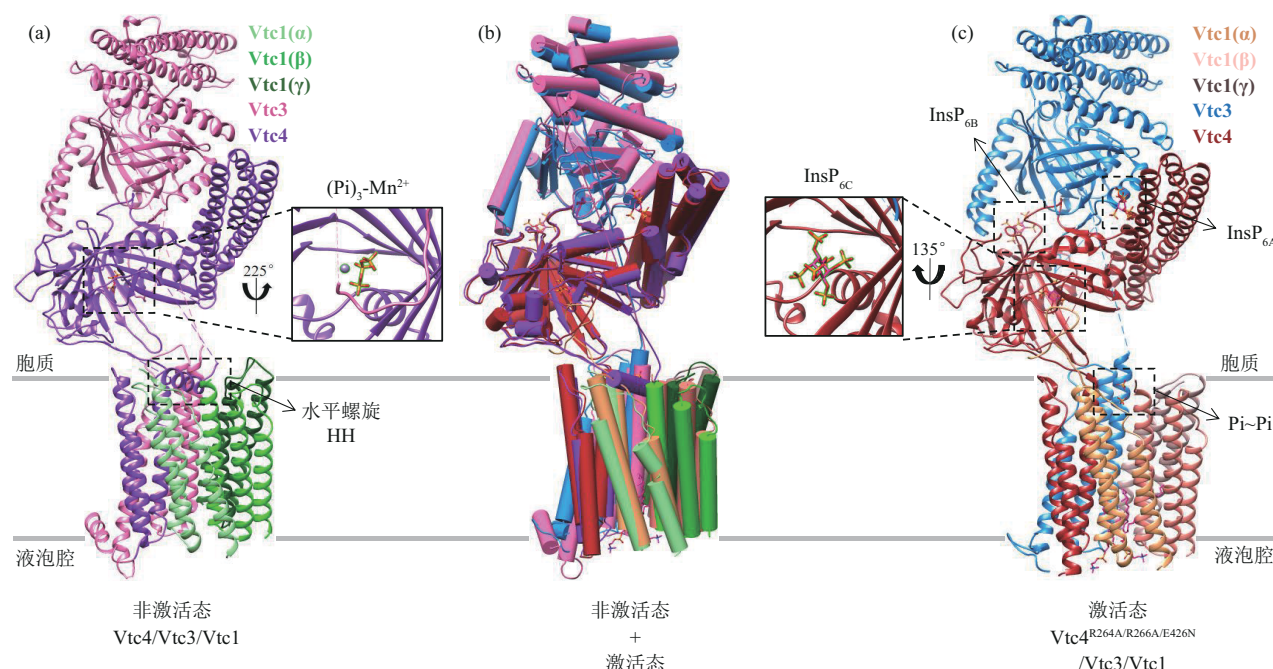


Fig. 4 Structure of the intact VTC complex

图4 完整VTC复合体的结构

(a) 非激活态 (Apo state) 的Vtc4/Vtc3/Vtc1复合体结构 (PDB ID: 8I6V)。(b) 比较非激活态 (apo state) 和激活态 (InsP₆-activated state) 的Vtc4/Vtc3/Vtc1复合体结构。(c) 激活态 (InsP₆-activated state) 的Vtc4^{R264A/R266A/E426N}/Vtc3/Vtc1复合体结构 (PDB ID: 7YTJ)。

(HH) 限制了 polyP 的进入。Vtc4 的催化中心结构域位于膜对称 polyP 通道的顶部，为新合成的 polyP 创造了一个强正电性通路，该通路可以将合成与易位耦合。Vtc4 的水平螺旋以及亚基间多对保守的盐桥形成的“离子锁”有助于探究 polyP 通道的门控机制。基于以上结构和功能信息，推测了一个简化的 VTC 激活机制模型。

在华中农业大学刘主课题组的文章中，作者利用 Vtc4 中心结构域的三突变 (R264A/R266A/E426N) 和 PP-InsPs 的商业化替代品 InsP₆ 解析了处于激活态的 VTC 的结构。他们发现，PP-InsP 只是特异性结合在 SPX^{Vtc4}，而非 SPX^{Vtc3}，暗示只有 SPX^{Vtc4} 发挥感知 PP-InsP 信号的功能。同样地，作者也证实 VTC 偶联 polyP 的合成和转运。此外，作者运用 smFRET 技术，在单分子水平研究了 VTC 感知 PP-InsP 信号后结构的动态变化。研究发现，PP-InsP 作为信号分子，它结合 Vtc4，通过别构调控，诱导 VTC 的构象发生变化，使 polyP 的合成结构域向跨膜通道靠近，VTC 从抑制态转变为激活态，开启 polyP 的合成与转运。

虽然这两个结构是高度相似的，但是也存在一些差异。首先，在 apo state 中，Vtc4 中心结构域的

隧道状口袋中包含三磷酸盐-Mn²⁺，这可能与复合体的内源性表达相关，相反，在 InsP₆ 结合的激活态中，Vtc4 中心结构域的隧道状口袋被一个 InsP₆ 分子占据，这或许是因为 1 mmol/L 的 InsP₆ 并非生理浓度而导致的非特异性结合。除此之外，结构中还包含另外 2 个 InsP₆ 分子，1 个结合在 Vtc4 SPX 结构域的肌醇多磷酸盐 (PP-InsPs) 结合表面，另外 1 个结合在 Vtc3 和 Vtc4 的中心结构域之间，可能促进了这两个结构域的结合 (图 4)。其次，在靠近胞质侧转运通道的入口处，在 apo state 中，Vtc4 的一段水平螺旋 (horizontal helix, HH) 横跨在入口，堵塞 polyP 的进入，相反，在 InsP₆ 结合的激活态中，两个磷酸盐分子在通道入口处 (图 4)。再次，在 apo state 中，由 Vtc1 的 M42、Vtc3 的 L716 和 Vtc4 的 L640 组成了转运通道的最窄点，直径仅有 4 Å，小于 polyP 的鲍林半径 (3 Å)，不允许 polyP 通过，而在 InsP₆ 结合的激活态中，Vtc1 的 R31、Vtc3 的 R709 和 Vtc4 的 R629 组成了转运通道的最窄点，直径仅有 3 Å，同样地不允许 polyP 通过。最后，在 apo state 中，内源性表达的 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体具有完全的 polyP 合成活性，相反，在 InsP₆ 结合的激活态中，包含 3 个突变的

Vtc4^{R264A/R266A/E426N}/Vtc3/Vtc1复合体的polyP合成活性被完全废除。这两个处于不同状态的结构展示了完整VTC复合体的化学计量比和组装方式,极大地推动了后续VTC复合体的功能研究。

3 VTC复合体的功能

酵母中polyP聚合酶是一种大型膜蛋白复合物,最初被命名为VTC^[30]。在其polyP聚合酶的催化活性被确定之前,VTC复合物被发现是V-ATP酶稳定性和运输、酵母液泡膜融合和微自噬所必需的^[31, 37-38],但是目前并不清楚是polyP还是VTC复合物本身参与了这些过程。VTC复合体作为唯一已知的真核生物polyP聚合酶,利用ATP在胞质中合成polyP,并将其转运到液泡中储存,以维持细胞内 P_i 稳态。因此,VTC复合体具有polyP聚合酶和转位酶的双重功能。在细胞内,VTC复合物的活性受到肌醇磷酸盐信号分子的调节,包括高度磷酸化、可扩散的肌醇多磷酸盐(InsPs)和肌醇焦磷酸盐(PP-InsPs)^[28, 34]。具体研究详述如下。

3.1 VTC复合体偶联polyP的合成和转运

VTC复合体不仅是一个polyP聚合酶,还是一

个polyP转位酶。为了避免polyP在胞质中的积累对细胞造成的毒害作用,polyP的合成和立即转运到液泡是偶联的^[29, 39]。最近获得的两个完整Vtc4/Vtc3/Vtc1复合体的结构都清晰地支持这种偶联机制^[35-36]。

在完整Vtc4/Vtc3/Vtc1复合体的结构中,Vtc4的中心结构域和跨膜结构域是共价连接的(图5)。Vtc4作为催化亚基,负责polyP的合成,Vtc4敲除显著降低细胞内polyP含量^[40]。Vtc4中心结构域的隧道状口袋分布着众多保守的碱性氨基酸(K200、R264、R266、K281、R361、K458)、丝氨酸(S457)和酪氨酸(Y359),这些氨基酸已经被证实实在polyP合成中发挥着重要作用^[27, 35]。一段由众多碱性氨基酸(R196、R253、K256、K291、K294、R373、K428、K455、R618)组成的蜿蜒曲折通道连接了Vtc4中心结构域的活性位点和跨膜通道入口,暗示新生的polyP可能从此通道行进到跨膜孔,从而完成跨膜转运。这一结构信息为polyP合成和转运的偶联机制提供了理论支持。同时,这些碱性氨基酸突变成酸性氨基酸也已经被证实能够显著降低细胞内polyP的含量^[35]。

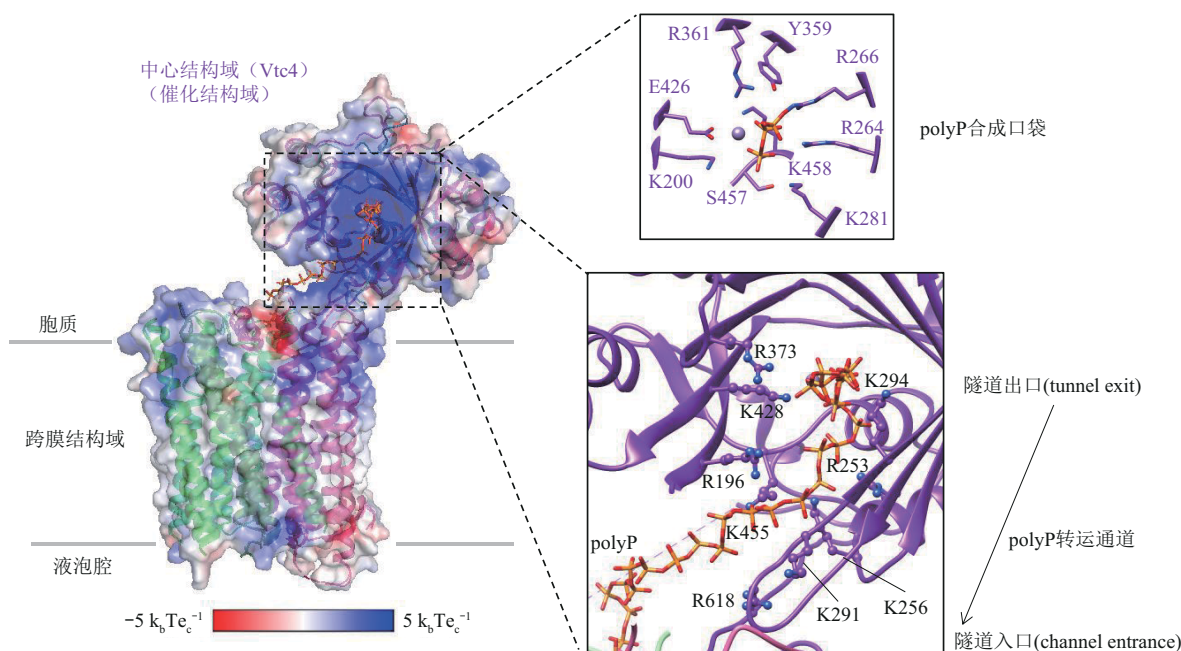


Fig. 5 The structure of the Vtc4/Vtc3/Vtc1 complex supports a coupled mechanism of polyP synthesis and transport

图5 Vtc4/Vtc3/Vtc1复合体的结构支持polyP合成和转运的偶联机制

Vtc4/Vtc3/Vtc1复合体的结构来自apo state (PDB ID: 8I6V)。PolyP的结构来自polyP结合的Vtc4的中心结构域的晶体结构 (PDB ID: 3G3Q)。

Vtc4、Vtc3和3个Vtc1的跨膜螺旋以膜对称的方式排列成异源五聚体。每个亚基的TM1螺旋形成圆柱体的内环作为polyP转运的核心通道,每个亚基的TM2和TM3螺旋形成圆柱体的外环包裹着内环。在apo state和InsP₆-activated state结构中,由于最窄点直径都小于polyP直径,因此,跨膜转运通道都不允许polyP通过。同时也发现,在靠近胞质侧转运通道的入口处,在apo state中,Vtc4的一段HH横跨在入口,堵塞polyP的进入,相反,在InsP₆结合的激活态中,2个磷酸盐分子在通道入口处(图4)。由于2个结构被捕获在不同的功能状态,因此结构差异也是合理的。

生化实验也显示,单独表达的Vtc4中心结构域表现出很低的polyP合成活性,而完整的VTC复合体在体内具有很高的活性^[27, 29],而且相比于去垢剂溶解的VTC复合体,携带VTC复合体的液泡表现出超过100倍的polyP合成活性^[29],这表明VTC复合体的完全催化活性需要一个完整的膜环境。因此,提出polyP合成和转运的偶联机制也是合理的,其中来自跨膜区域的驱动力将新生的polyP链拉入跨膜通道进行转运,从而将带负电的聚合物从带正电的催化中心排出,并允许添加新的磷酸盐残基。

3.2 肌醇多磷酸盐(PP-InsPs)调控polyP的合成

VTC复合体精确调控polyP的合成对于维持细胞内P_i稳态是必需的。包含SPX结构域的蛋白质已经被发现在调控P_i稳态方面发挥着重要作用^[41]。单独表达的SPX结构域能够与含磷酸盐的配体发生相互作用,但对P_i本身表现出很小的特异性和选择性^[28]。PP-InsPs也被发现在控制酵母和哺乳动物细胞磷酸盐稳态中发挥着重要作用^[42-43]。VTC复合体的polyP合成活性在体内收到肌醇焦磷酸盐(5-InsP₇和1,5-InsP₈等)的调控^[28],同时肌醇磷酸盐(InsP₆)也被发现在体外能够刺激VTC复合体合成polyP^[28, 35-36]。

SPX结构域存在于所有真核生物中,并具有共同的序列和结构特征,保守的赖氨酸残基形成肌醇多磷酸盐和焦磷酸盐的高亲和力(亚微摩尔)结合位点^[28]。纯化的SPX结构域在结合不同的肌醇多磷酸盐或焦磷酸盐异构体方面表现出相对较低的选择性,并且它们的亲和力随化合物的净电荷降低而降低(InsP₈>InsP₇>InsP₆)^[34]。与低选择性形成鲜明对比的是,不同异构体的激动剂性质差异很大。例如,VTC复合体被1,5-InsP₈强烈激活,但被携带

相同数量磷酸基团的5-PPP-InsP₃激活效果非常弱^[34]。同样地,5-InsP₇激活VTC,而InsP₆几乎没有作用^[34]。因此,尽管肌醇多磷酸盐具有极高的电荷密度及其类似的结合亲和力,SPX结构域必须解码配体的精确结构特征,并将其转化为不同程度的活性。

酿酒酵母的基因组包含10个编码SPX结构域的蛋白质,其中8种蛋白质具有与P_i代谢相关的功能。它们分别是:2个低亲和力P_i转运蛋白质Pho87和Pho90定位在细胞膜上^[13, 44];Pho91位于液泡膜上并参与将P_i从液泡输出到细胞质^[14];细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂Pho81^[45];甘油磷酸胆碱磷酸二酯酶1(Gde1),可水解甘油磷酸胆碱,从而释放胆碱和甘油3-磷酸,可作为P_i来源^[46];酵母gpa1抑制剂(Syg1)^[47]和Ydr089(最近被鉴定为Vtc5)^[32];多聚磷酸盐聚合酶VTC复合体的3个亚基Vtc2、Vtc3和Vtc4^[48]。除了Syg1和Ydr089之外,所有含有SPX结构域的酵母蛋白都被证明是维持酵母中P_i稳态的关键调节因子。

Vtc3和Vtc4 SPX结构域的结构是高度相似的,135个C_α原子的均方根偏差为1.7 Å。相比于Vtc4,Vtc3的SPX结构域在C端还包含1个额外的螺旋αVII,与αIV和αVI螺旋形成疏水相互作用(图6)。两个SPX结构域都具有由螺旋αII和αIV上的多个保守赖氨酸残基形成的带正电荷的表面(图6),并且可以与含磷酸盐的配体相互作用,在之前的研究中猜测两者都是PP-InsPs的受体^[28]。最新的研究发现,不论是对SPX结构域进行截断^[35],还是对SPX结构域上的保守赖氨酸残基突变^[36],携带突变体的VTC复合体体外polyP合成实验结果都表明,只有Vtc4的SPX结构域能够作为PP-InsPs感受器,响应polyP合成和PP-InsPs调节。与此相一致,在InsP₆-activated state结构中,InsP₆只结合在Vtc4的SPX结构域上(InsP_{6A})^[36]。同时,在Vtc3和Vtc4的中心结构域之间也发现了一个InsP_{6B},可能促进了这两个结构域的结合^[36]。

除此之外,研究人员还发现,Vtc3通过磷酸化的loop调控polyP的合成^[35]。在Vtc3的非催化中心结构域中存在一段不同寻常的loop(残基234~292),在该loop的C端包含一簇磷酸化位点。研究人员通过取代6个丝氨酸残基(S263、S265、S267、S269、S270、S274)为丙氨酸或天冬氨酸来模拟该loop的非磷酸化和磷酸化状态,证实该loop的磷酸化对polyP的合成具有负调节作用。结

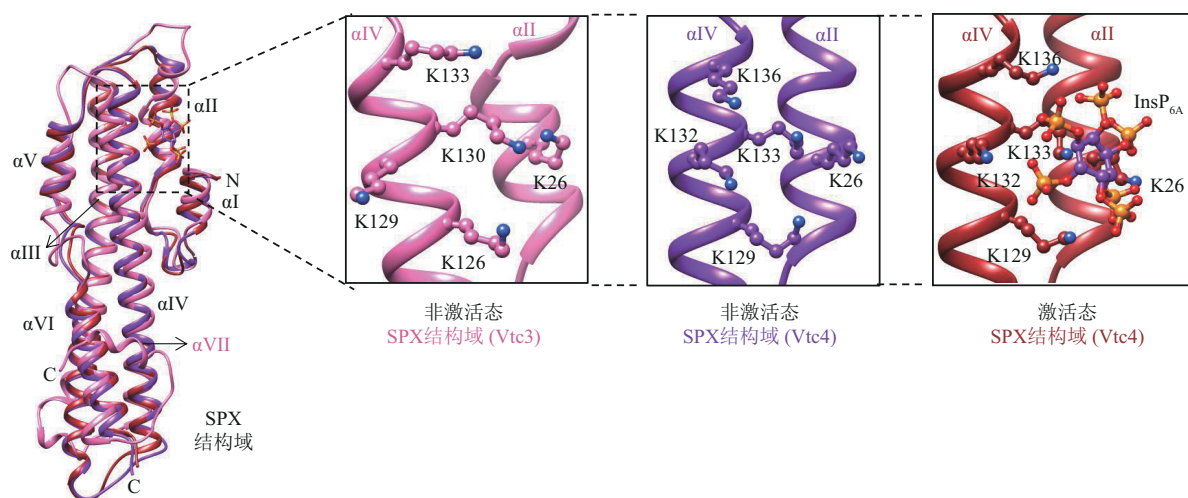


Fig. 6 Structure of the SPX domain of the VTC complex

图6 VTC复合体的SPX结构域的结构特征

合 PP-InsPs 对 VTC 复合体的调控作用, 该 loop 可以增强 VTC 调节 polyP 合成活性的动态范围, 支持在 P_i 缺乏的情况下完全停止 polyP 合成, 同时在 P_i 充足时保持完全激活的潜力。

3.3 VTC复合体的激活机制

完整 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体的结构揭示了一个意想不到的异源五聚体组装, 包含 1 个 Vtc4、1 个 Vtc3 和 3 个 Vtc1 亚基。Vtc4 中心结构域与跨膜区的连接以及二者之间形成的转运通道结构清晰地支持 polyP 合成和转运的偶联机制。Vtc4 的 SPX 结构域作为 PP-InsPs 感受器, 响应 polyP 合成和 PP-InsPs 调节。Vtc3 通过磷酸化的 loop 调控 polyP 的合成。基于这两个处于不同功能状态的 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体结构和功能信息, 允许大家合理地推测一个 VTC 复合体的激活机制。

在 apo state 结构中, 研究人员提出了一种可能的 polyP 通道门控机制^[35]。首先, 作者发现由 TM1 螺旋组成的 polyP 通道的五重对称性被破坏。同时, 观察到形成界面的 2 个跨膜结构域具有不同的相对位置, 其中 Vtc1(β)-Vtc1(γ)和 Vtc3-Vtc4 紧密堆积, Vtc1(γ)-Vtc3 松散堆积, Vtc1(α)-Vtc1(β)和 Vtc4-Vtc1(α)介于二者之间。相应地, Vtc3-Vtc4 掩埋了最多的蛋白质表面积 (4 150 Å²), 接下来分别是 Vtc1(β)-Vtc1(γ) (2 920 Å²)、Vtc4-Vtc1(α) (2 870 Å²)和 Vtc1(α)-Vtc1(β) (2 660 Å²)。Vtc1(γ)-Vtc3 相互作用界面掩埋了最少的蛋白质表面积 (2 350 Å²), 这一数据也与观察到的 VTC 通道

不对称性相一致。有趣的是, 在以疏水相互作用为主的亚基相互作用界面中心发现了几对特殊的盐桥, 将其命名为亚基间“离子锁”。其中 Vtc1 的 E30 和 R83、Vtc3 的 E704 和 R762, 以及 Vtc4 的 E628 和 R681 都是非常保守的 (图 7a)。基于此, 作者假设 polyP 通道在静息状态下被捕获, 入口由 Vtc4 的闭环状水平螺旋固定。Vtc4 的水平螺旋在通道入口处的不对称排列对 polyP 通道施加了不对称的力, 导致亚基间相互作用界面的相对位置不同。3 个松散堆积的亚基间相互作用界面, 加上 2 个紧密堆积的亚基间相互作用界面, 使得由 TM1 螺旋形成的通道直径从胞质侧向液泡内侧逐渐变窄, 形成一个可能用作门控的最窄点。亚基间的“离子锁”可以将各亚基维持在一起。然而, 在 polyP 通道打开期间, 水平螺旋闭环被抬起, VTC 复合体的各亚基被“离子锁”拉在一起, 可能导致亚基之间形成所有的 5 个“离子锁”。在这种状态下, TM1 螺旋可能在胞质侧向内倾斜, 在液泡侧向外倾斜, 从而打开通道 (图 7b)。

相反, 在 InsP₆-activated state 结构中, 作者认为 PP-InsPs 的结合使得 Vtc4 的中心结构域向跨膜通道入口靠近, 从而偶联 polyP 的合成和转运^[36]。作者认为 Vtc4 中心结构域的取向主要由 Vtc4 中心结构域与跨膜结构域间的连接以及与 Vtc1(α)的 N 端 (残基 1~21) 之间相互作用来维持。其中 Vtc1(α) N 端的敲除会降低 VTC 复合体的催化活性, 完全废除液泡 polyP 的产生。为了阐明 Vtc1 的 N 端缺

失是否会导致 Vtc4 催化结构域的运动, 作者进行了单分子荧光共振能量转移 (smFRET) 分析, 这是一种单分子水平表征蛋白质动力学和构象变化的方法。实验结果显示, InsP₆ 的结合使得 Vtc4 的中心结构域靠近跨膜结构域, 远离跨膜结构域。而且, Vtc1 的 N 端缺失会导致 VTC 复合体不再被 InsP₆ 激活。

基于处于不同功能状态的 2 种 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体的结构, 本课题组推测了一个可能的 VTC 复合体的激活机制 (图 7c)。我们认为 VTC 复合体包含 1 个 polyP 聚合酶和 1 个 polyP 通道, 并在非活

性状态和活性状态之间平衡存在。在非活性状态, Vtc4 的中心结构域远离跨膜通道, polyP 合成和转运的偶联机制被破坏, 具有很低的聚合酶活性, 同时 Vtc4 的水平螺旋 HH 堵塞在通道入口使得 polyP 转运通道处于关闭状态; 在肌醇磷酸等信号分子的刺激下, Vtc4 的中心结构域在 Vtc1(α) N 端的帮助下靠近 polyP 转运通道, 完成 polyP 合成和转运的偶联, 同时, Vtc4 的水平螺旋 HH 远离通道入口使得 polyP 转运通道处于开放状态, VTC 复合体从非活性状态快速转变成活性状态, 高效催化 ATP 合成 polyP。

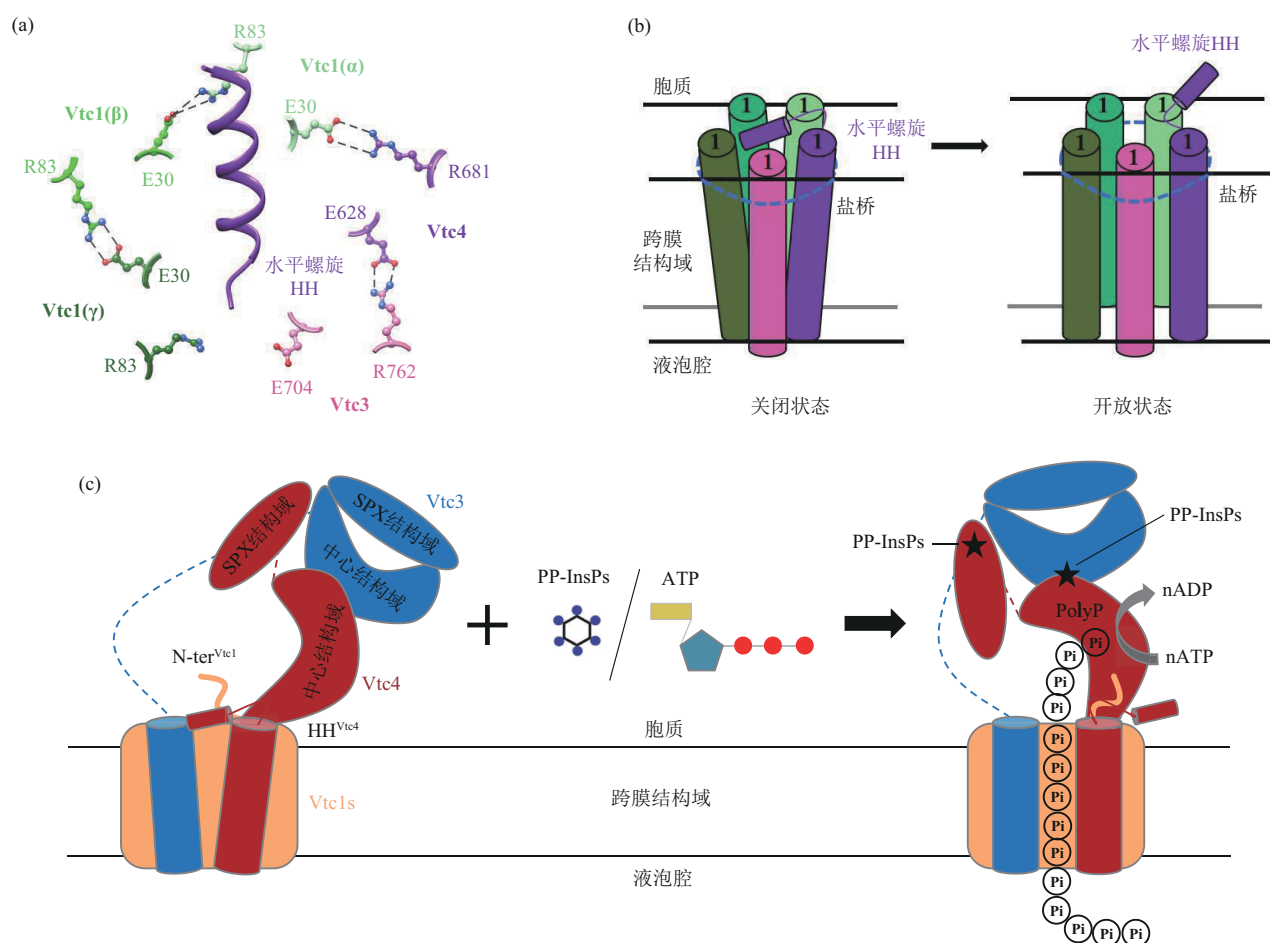


Fig. 7 Activation mechanisms of the VTC complex

图7 VTC复合体的激活机制

(a) VTC复合体的亚基间界面形成多对保守的盐桥。Vtc1 (γ) 的R83和Vtc3的E704相隔8 Å, 太远而无法形成盐桥。(b) 推测的polyP通道门控机制的模型。示意图表明polyP通道在闭合和开发状态之间的构象变化。虚线指示亚基间形成的盐桥。数字1表示VTC复合物的每个亚基的TM1螺旋。(c) 推测的VTC复合体的分子机制模型。黑色五角星指示PP-InsPs结合位点。

进一步, 之前的研究也报道了液泡 polyP 的合成需要一个跨膜电化学势能, 可能由位于液泡上的 V-ATPase 提供^[29, 49]。在体内, 通过添加 V-ATPase 的抑制剂可以抑制液泡 polyP 的合成; 同时, V-ATPase 亚基 Vph1 的敲除会使得酵母细胞内 polyP 含量降低 20% (相比野生型)^[29]。基于 polyP 合成缺陷突变体的高通量筛选已经识别了超过 250 种相关基因, 其中也包括 V-ATPase 的几个亚基^[50]。因此, 跨膜区内外的质子梯度及其对细胞应激的变化或许将调节 VTC 的活性, 如通道本身的构象变化, 从而刺激 polyP 的合成和跨膜转运。

4 总结与展望

酿酒酵母 VTC 复合体作为已知的真核 polyP 合成酶, 通过偶联 polyP 的合成和转运过程来维持细胞内 P_i 稳态。近十年来, 随着 VTC 复合体的相关研究逐渐增多, 其结构信息和作用机制也越来越清晰。最近发表的完整 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体的结构极大地推动了对 VTC 复合体结构和功能的理解。完整 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体的结构揭示了一个异源五聚体组装, 结构和功能信息都支持 polyP 合成和转运的偶联机制。Vtc4 的 SPX 结构域作为 PP-InsPs 感受器, 响应 polyP 合成和 PP-InsPs 调节, 同时 Vtc3 通过磷酸化的 loop 调控 polyP 的合成。基于 Vtc2 和 Vtc3 在序列上的高度同源, Vtc4/Vtc2/Vtc1 复合体可能采取和 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体相似的化学计量比和组装方式。目前还不清楚酵母细胞内为什么存在两种 VTC 复合体。相比 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体只定位在液泡膜上, Vtc4/Vtc2/Vtc1 复合体在酵母细胞的定位随环境中 P_i 的浓度而发生变化, 这种广泛的分布 (细胞核膜、线粒体膜、细胞膜和液泡膜等) 或许暗示 Vtc4/Vtc2/Vtc1 复合体不仅具有 polyP 聚合酶和转位酶活性, 或许还参与细胞内其他生物学功能。因此, 解析 Vtc4/Vtc2/Vtc1 复合体的结构对于理解 VTC 复合体的作用机制也是十分有帮助的。最近, 虽然发表了处于两种不同功能状态的 Vtc4/Vtc3/Vtc1 复合体结构, 但是二者结构的高度相似性或许暗示 VTC 复合体的激活可能不需要大的构象转变, 目前的结构信息还不足以阐明 VTC 复合体的分子作用机制。因此, 未来获得其他功能状态的结构 (包括 polyP 催化合成的不同阶段以及转运通道完全开放状态的结构等) 对于理解 VTC 复合体的分子作用机制是十分重要的。

参 考 文 献

- [1] Ansermet C, Moor M B, Centeno G, *et al.* Renal fanconi syndrome and hypophosphatemic rickets in the absence of xenotropic and polytropic retroviral receptor in the nephron. *J Am Soc Nephrol*, 2017, **28**(4): 1073-1078
- [2] Liu J, Yang L, Luan M, *et al.* A vacuolar phosphate transporter essential for phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(47): E6571-E6578
- [3] Puga M I, Mateos I, Charukesi R, *et al.* SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of phosphate starvation response 1 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(41): 14947-14952
- [4] Sethuraman A, Rao N N, Kornberg A, *et al.* The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(15): 8542-8547
- [5] Sabbagh Y. Phosphate as a sensor and signaling molecule. *Clin Nephrol*, 2013, **79**(1): 57-65
- [6] Biber J, Hernando N, Forster I. Phosphate transporters and their function. *Annu Rev Physiol*, 2013, **75**: 535-550
- [7] Giovannini D, Touhami J, Charnet P, *et al.* Inorganic phosphate export by the retrovirus receptor XPR1 in metazoans. *Cell Rep*, 2013, **3**: 1866-1873
- [8] Shen J, Yuan L, Zhang J, *et al.* Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol*, 2011, **156**(3): 997-1005
- [9] Shi J, Zhao B, Zheng S, *et al.* A phosphate starvation response-centered network regulates mycorrhizal symbiosis. *Cell*, 2021, **184**(22): 5527-5540. e5518
- [10] Pratt J, Boisson A M, Gout E, *et al.* Phosphate (Pi) starvation effect on the cytosolic Pi concentration and Pi exchanges across the tonoplast in plant cells: an *in vivo* 31P-nuclear magnetic resonance study using methylphosphonate as a Pi analog. *Plant Physiol*, 2009, **151**(3): 1646-1657
- [11] Mouillon J M, Persson B L. New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2006, **6**(2): 171-176
- [12] Auesukaree C, Homma T, Kaneko Y, *et al.* Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **306**(4): 843-850
- [13] Wykoff D D, O'Shea E K. Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2001, **159**(4): 1491-1499
- [14] Hurlimann H C, Stadler-Waibel M, Werner T P, *et al.* Pho91 is a vacuolar phosphate transporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2007, **18**(11): 4438-4445
- [15] Secco D, Wang C, Arpat B A, *et al.* The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis. *New Phytol*, 2012, **193**(4): 842-851
- [16] Docampo R, Huang G. Acidocalcisomes of eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, **41**: 66-72
- [17] Austin S, Mayer A. Phosphate homeostasis - a vital metabolic equilibrium maintained through the INPHORS signaling pathway. *Front Microbiol*, 2020, **11**: 1367

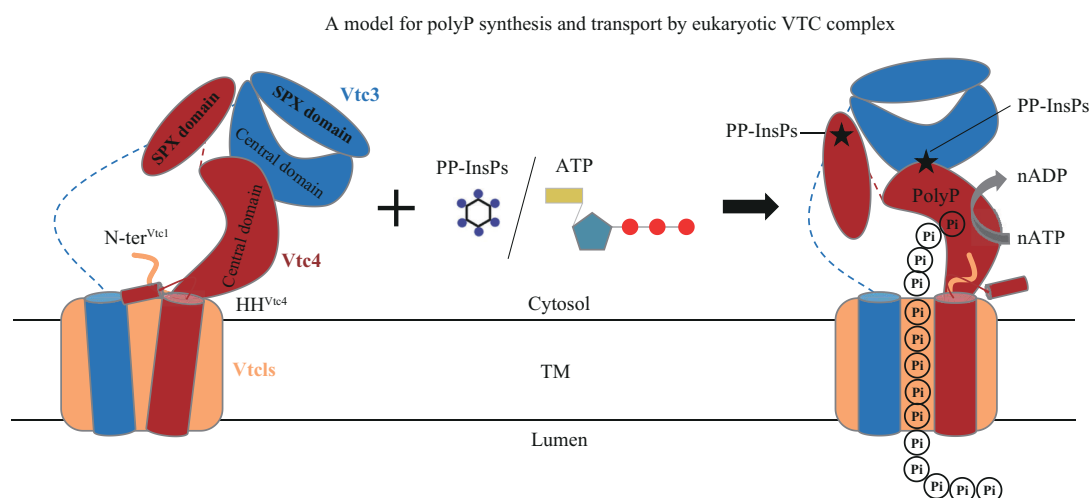
- [18] Hassanian S M, Dinarvand P, Smith S A, *et al.* Inorganic polyphosphate elicits pro-inflammatory responses through activation of the mammalian target of rapamycin complexes 1 and 2 in vascular endothelial cells. *J Thromb Haemost*, 2015, **13**: 860-871
- [19] Moreno-Sanchez D, Hernandez-Ruiz L, Ruiz F A, *et al.* Polyphosphate is a novel pro-inflammatory regulator of mast cells and is located in acidocalcisomes. *J Biol Chem*, 2012, **287**: 28435-28444
- [20] Smith S A, Mutch N J, Baskar D, *et al.* Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(4): 903-908
- [21] Wang Y, Li M, Li P, *et al.* Progress and applications of polyphosphate in bone and cartilage regeneration. *Biomed Res Int*, 2019, **2019**: 5141204
- [22] Hernandez-Ruiz L, Gonzalez-Garcia I, Castro C, *et al.* Inorganic polyphosphate and specific induction of apoptosis in human plasma cells. *Haematologica*, 2006, **91**(9): 1180-1186
- [23] Azevedo C, Livermore T, Saiardi A, *et al.* Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate. *Mol Cell*, 2015, **58**(1): 71-82
- [24] Zakharian E, Thyagarajan B, French R J, *et al.* Inorganic polyphosphate modulates TRPM8 channels. *PLoS One*, 2009, **4**(4): e5404
- [25] Gerasimaite R, Mayer A. Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles. *Biochem Soc Trans*, 2016, **44**(1): 234-239
- [26] Gerasimaite R, Mayer A. Ppn2, a novel Zn(2+) -dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole. *J Cell Sci*, 2017, **130**: 1625-1636
- [27] Hothorn M, Neumann H, Lenherr E D, *et al.* Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase. *Science*, 2009, **324**(5926): 513-516
- [28] Wild R, Gerasimaite R, Jung J Y, *et al.* Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science*, 2016, **352**(6288): 986-990
- [29] Gerasimaite R, Sharma S, Desfougères Y, *et al.* Coupled synthesis and translocation restrains polyphosphate to acidocalcisome-like vacuoles and prevents its toxicity. *J Cell Sci*, 2014, **127**(Pt 23): 5093-5104
- [30] Cohen A, Perzov N, Nelson H, *et al.* A novel family of yeast chaperons involved in the distribution of V-ATPase and other membrane proteins. *J Biol Chem*, 1999, **274**(38): 26885-26893
- [31] Muller O, Bayer M J, Peters C, *et al.* The vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V(0) trans-complex formation. *EMBO J*, 2002, **21**(3): 259-269
- [32] Desfougères Y, Gerasimaite R U, Jessen H J, *et al.* Vtc5, a novel subunit of the vacuolar transporter chaperone complex, regulates polyphosphate synthesis and phosphate homeostasis in yeast. *J Biol Chem*, 2016, **291**(42): 22262-22275
- [33] Auesukaree C, Tochio H, Shirakawa M, *et al.* Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis, are essential for phosphate regulation and polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2005, **280**(26): 25127-25133
- [34] Gerasimaite R, Pavlovic I, Capolicchio S, *et al.* Inositol pyrophosphate specificity of the SPX-dependent polyphosphate polymerase VTC. *ACS Chem Biol*, 2017, **12**(3): 648-653
- [35] Liu W, Wang J, Miserez V C, *et al.* Cryo-EM structure of the polyphosphate polymerase VTC reveals coupling of polymer synthesis to membrane transit. *EMBO J*, 2023, **42**(8): e113320
- [36] Guan Z, Chen J, Liu R, *et al.* The cytoplasmic synthesis and coupled membrane translocation of eukaryotic polyphosphate by signal-activated VTC complex. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 718
- [37] Muller O, Neumann H, Bayer M J, *et al.* Role of the vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking. *J Cell Sci*, 2003, **116**(Pt 6): 1107-1115
- [38] Uttenweiler A, Schwarz H, Neumann H, *et al.* The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy. *Mol Biol Cell*, 2017, **18**(1): 166-175
- [39] McCarthy L, Abramchuk I, Wafy G, *et al.* Ddp1 cooperates with Ppx1 to counter a stress response initiated by nonvacuolar polyphosphate. *MBio*, 2022, **13**(4): e0039022
- [40] Tomashevsky A, Kulakovskaya E, Trilisenko L, *et al.* VTC4 polyphosphate polymerase knockout increases stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biology (Basel)*, 2021, **10**(6): 487
- [41] Secco D, Wang C, Shou H, *et al.* Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. *FEBS Lett*, 2012, **586**(4): 289-295
- [42] Wilson M S, Jessen H J, Saiardi A, *et al.* The inositol hexakisphosphate kinases IP6K1 and -2 regulate human cellular phosphate homeostasis, including XPR1-mediated phosphate export. *J Biol Chem*, 2019, **294**(30): 11597-11608
- [43] Azevedo C, Saiardi A. Eukaryotic phosphate homeostasis: the inositol pyrophosphate perspective. *Trends Biochem Sci*, 2017, **42**(3): 219-231
- [44] Bun-ya M, Shikata K, Nakade S, *et al.* Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1996, **29**(4): 344-351
- [45] Schneider K R, Smith R L, O'Shea E K. Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science*, 1994, **266**(5182): 122-126
- [46] Fisher E, Almaguer C, Holc R, *et al.* Glycerophosphocholine-dependent growth requires Gde1p (YPL110c) and Git1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2005, **280**(43): 36110-36117
- [47] Spain B H, Koo D, Ramakrishnan M, *et al.* Truncated forms of a novel yeast protein suppress the lethality of a G protein alpha subunit deficiency by interacting with the beta subunit. *J Biol Chem*, 1995, **270**(43): 25435-25444
- [48] Ogawa N, DeRisi J, Brown P O, *et al.* New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell*, 2000, **11**(12): 4309-4321
- [49] Kakinuma Y, Ohsumi Y, Anraku Y. Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1981, **256**(21): 10859-10863
- [50] Freimoser F M, Hurlimann H C, Jakob C A, *et al.* Systematic screening of polyphosphate (poly P) levels in yeast mutant cells reveals strong interdependence with primary metabolism. *Genome Biol*, 2006, **7**(11): R109

Structure and Function of Polyphosphate Polymerase VTC Complex*

LIU Wei, YE Sheng**

(School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Graphical abstract



- The intact VTC complex is a heteropentamer composed of one Vtc4, one Vtc3 and three Vtc1 subunits.
- VTC complex coupled polyP polymerase and translocase.
- PP-InsPs serve as high affinity stimulatory ligands to regulate polyP synthesis.

Abstract Phosphate (P_i) homeostasis is a tightly regulated process in all organisms. Dysfunction of P_i homeostasis leads to renal Fanconi syndrome in humans, severe growth retardation in plants, and lethality in microorganisms. To achieve a delicate balance between the biosynthetic requirements for P_i and the risks of excessive cytoplasmic P_i , unicellular organisms maintain important P_i stores in membrane-bound, acidocalcisome-like organelles in the form of inorganic polyphosphates (polyP). As the only known eukaryotic polyP synthetase, *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar transporter chaperone (VTC) complex synthesizes polyP from adenosine triphosphate (ATP) and translocates polyP across the vacuolar membrane to maintain an intracellular P_i homeostasis. In this article, the latest progress on the structure and function of VTC complexes were reviewed from the aspects of structural characteristics, polyP synthesis, and polyP transport mechanism. The focus is on the recently published intact structural of VTC complexes and exploring the activation mechanism of VTC.

Key words P_i homeostasis, VTC complex, PolyP, structural characteristics, coupled polyP synthesis and translocation

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0155

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31971127).

** Corresponding author.

Tel: 86-18858196912, E-mail: sye@tju.edu.cn

Received: April 6, 2023 Accepted: April 20, 2023