



蛋白质组氨酸磷酸化修饰的调节及功能作用*

刘萧然 邢美宁** 应万涛**

(军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 医学蛋白质组全国重点实验室, 北京蛋白质组研究中心,
国家蛋白质科学中心(北京), 北京 102206)

摘要 组氨酸磷酸化(pHis)在原核和真核生物的生命活动中发挥重要调控作用,并与包括恶性肿瘤在内的多种病理过程相关。pHis修饰中磷酸胺键在高温和低pH下容易断裂,其高度不稳定性导致对pHis修饰的鉴定和研究进展缓慢。近年来,磷酸化蛋白质组学新技术的发展以及pHis特异性抗体的出现,推动了pHis修饰蛋白底物的鉴定和功能研究。首次在哺乳动物细胞中鉴定到超过700个pHis修饰蛋白,并陆续发现黏着斑激酶(FAK)和磷酸甘油酸变位酶1(PGAM1)等蛋白质的pHis修饰能促进肿瘤发展。本文主要探讨组氨酸激酶和组氨酸磷酸酶在调控特定蛋白质pHis修饰中的关键机制及其功能,以期对pHis修饰蛋白的生物学功能研究奠定基础。

关键词 蛋白质磷酸化, 组氨酸激酶, 组氨酸磷酸酶, 组氨酸磷酸化

中图分类号 R730.2

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0264

蛋白质磷酸化修饰是常见的翻译后修饰之一,其受到蛋白激酶和磷酸酶的联合调节,参与信号级联反应,其失调可能与包括癌症在内的多种疾病相关^[1]。在20种天然氨基酸中,有9种可以发生磷酸化修饰,包括丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸在内的O-连接的磷酸化修饰,称为经典磷酸化修饰。然而,发生在组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸等氨基酸残基上的N-连接磷酸化修饰由于键能较高,以及对酸和热的高度敏感使得其在分析过程中极易丢失^[2],导致N-连接磷酸化修饰底物蛋白的鉴定和验证极为困难,限制了相关研究的进展。Makwana等^[3]通过核磁共振波谱分析法测定细胞中组氨酸磷酸化(pHis)的平均含量约为磷酸丝氨酸(pSer)和磷酸苏氨酸(pThr)总含量的1/3,约为磷酸酪氨酸(pTyr)含量的15倍,提示细胞中pHis修饰可能发挥重要作用。而Hunter^[4]根据已有的研究也推测细胞中pHis的含量可能与pTyr含量相媲美,说明pHis修饰在细胞中的含量较为可观。但目前针对蛋白质pHis修饰位点及其功能的研究却远落后于丝/苏/酪氨酸的磷酸化相关研究。

生物体内约1/3的蛋白质为金属结合蛋白,蛋白质中组氨酸残基是自然界中最常见的金属配位体

之一^[5],也是二价金属离子 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 的最常见的配位残基^[6],而磷酸化修饰则会影响组氨酸残基的金属配位能力,进而改变金属蛋白质的功能。pHis广泛存在于细菌、真菌和动植物中,其在细菌细胞的两组分和多组分信号转导系统中起着重要作用^[7]。此外,pHis修饰蛋白还参与重要的哺乳动物细胞过程,如离子通道调控和G蛋白信号转导等^[8-9]。近年来随着磷酸化蛋白质组学技术和pHis特异性抗体的不断发展,对pHis修饰的认识获得了显著进展。随着越来越多的组氨酸激酶和组氨酸磷酸酶被发现,它们在特定底物上的作用机制和功能被阐释,在肿瘤等疾病中的作用也逐步被揭示,pHis修饰的调控及功能的重要性也越发受到关注。

* 国家自然科学基金(32271500),国家重点研发计划(2020YFE0202200)和医学蛋白质组全国重点实验室自主研究课题(SKLP-K202202)资助项目。

** 通讯联系人。

应万涛 Tel: 010-61777000, E-mail: yingwantao@ncpsb.org.cn

邢美宁 Tel: 010-61777000, E-mail: mxing@ncpsb.org.cn

收稿日期: 2024-06-24, 接受日期: 2024-08-29

1 组氨酸磷酸化修饰鉴定方法

近年来, 针对pHis修饰的抗体研究、富集试剂和新材料的开发以及质谱鉴定方法优化等均取得了较大进展, 一定程度上克服了pHis修饰位点或蛋白质鉴定的困难, 从而不断丰富对pHis修饰蛋白及其生物学功能的理解。国内外学者先后发展出一系列针对pHis修饰的富集材料和质谱鉴定方法, 以精准地鉴定和定量pHis修饰位点/蛋白质。基于pHis修饰和非修饰肽电荷差异, 本课题组和其他团队通过强阴离子交换色谱^[10]或强阳离子交换色谱^[11]方法实现pHis修饰肽段的分离富集。基于固相金属离子亲和层析(IMAC)原理, 先后发展出Cu²⁺-IMAC^[12]、Fe³⁺-IMAC^[13]和TiO₂富集^[14-15]方法实现pHis修饰肽的富集。此外, 其他载有金属离子的新材料也被发掘出来, 包括MoS₂-Ti⁴⁺^[16]、SiO₂@DpaZn^[17]和MIP1-MIP3^[18]等材料, 实现含pHis修饰的肽段或蛋白质的富集。也有研究团队采

用pHis类似物免疫兔制备泛特异性抗体用于pHis修饰肽段或蛋白质的富集与检测^[19-20], 使pHis修饰蛋白的鉴定数量首次达到786个, 取得较大突破。尽管pHis修饰位点鉴定的研究取得了一定的进展, 但由于在这些方法的富集鉴定全流程中难以规避酸性条件, 从而限制了上述方法识别pHis修饰位点的特异性和覆盖度, 使得pHis修饰位点的鉴定未能有数量的飞跃, 并且鉴定到的pHis修饰位点的真实性与否也需要进一步验证。也正因如此, 有研究人员陆续开发出一些基于机器学习的算法来识别并预测pHis修饰位点, 包括iPhosH-PseAAC^[21]、PROSPECT^[22]和pHisPred^[23]。但所有这些方法也均基于经实验证实的pHis位点进行模型训练与检验, 也只有依赖更多真实可靠的pHis位点才有可能使基于软件的计算方法更加准确(图1)。尽管上述pHis富集和鉴定技术已经取得了一定的进展, 但对于哺乳动物细胞中pHis修饰功能的研究还刚起步, 同时也期待更稳定高效的方法和试剂来助力推进pHis修饰组学研究。

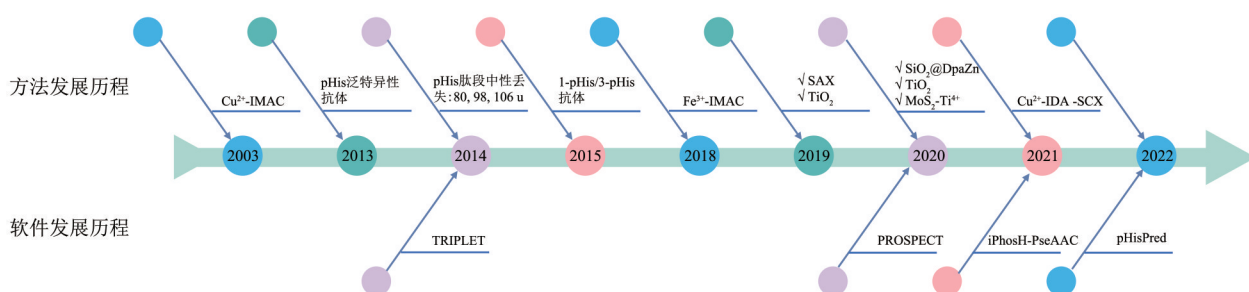


Fig. 1 Development of methods for identification of histidine phosphorylation modification

图1 组氨酸磷酸化修饰鉴定方法发展历程

2 组氨酸激酶及其调控的pHis修饰底物的功能

2.1 组氨酸激酶的主要类型及催化机理

迄今为止, 真核生物中已发现的组氨酸激酶多数都是来源于非转移蛋白(non-metastatic, NME)家族的成员^[9, 24], 即NME1和NME2。 γ 磷酸基团首先从核苷三磷酸(nucleoside triphosphate, NTP)转移到NME1或NME2活性位点的组氨酸残基上, 形成NME-磷酸组氨酸中间体。随后磷酸基团从磷酸组氨酸中间体转移到核苷二磷酸(nucleoside diphosphate, NDP), 形成NTP, 或者直接从NME-

磷酸组氨酸中间体转移到底物蛋白的组氨酸残基上进而调控底物蛋白的功能^[25](图2)。此外, 近期也有研究新证实糖代谢过程的限速酶丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)具有组氨酸激酶活性^[26]。

2.2 组氨酸激酶调控的pHis修饰底物的功能

已有研究显示NME1具有多种底物和功能特异性。NME1可以修饰位于ATP-柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACLY)活性中心的His760^[27-29], 进而促进乙酰辅酶A的生成。在肿瘤组织中, NME1/2的pHis修饰水平在抑制乳腺癌转移的潜在机制途径中也发挥重要作用^[30]。近期有

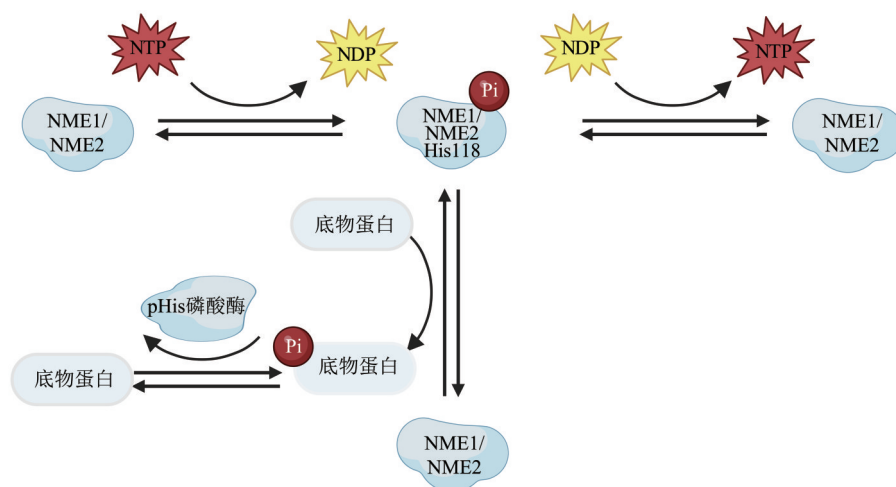


Fig. 2 Mechanism of histidine phosphorylation and dephosphorylation

图2 组氨酸磷酸化和去磷酸化机理

研究通过 pHis 抗体以及 NME1 抗体进行免疫沉淀结合质谱鉴定，在神经母细胞瘤中鉴定到包括 HSPA8、GAPDH 和 ENO1 等在内的 59 个 pHis 修饰底物，富集分析发现这些蛋白质主要参与细胞黏附及糖酵解等过程^[31]。本课题组也在人肝癌细胞系中鉴定到多个受 NME1 调控的 pHis 修饰底物^[32]。以上 pHis 修饰组学数据为深入研究 NME1 调节的 pHis 修饰底物提供了资源。

与 NME1 相比，NME2 调控的 pHis 修饰底物类型较为丰富。NME2 能与异源三聚体 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基形成复合物，并在 G β 亚基上形成 His266 磷酸化中间体，促使高能磷酸基团转移到 GDP 上，调节 cAMP 信号通路的活性，从而激活和稳定异三聚体 Gs 蛋白状态（ β AR 信号进入细胞的关键换能器）^[33]。同样地，NME2 也能直接与中间电导钾离子通道蛋白 KCa3.1 结合并通过磷酸化 His358 残基拮抗铜离子对该通道的抑制，使得该通道处于激活状态，参与 CD4⁺ T 细胞的活化过程^[34-35]，而 G β 和 SK4 在正常心血管功能和乳腺癌等疾病调控中也起重要作用^[36]。类似地，NME2 也能通过磷酸化 His711 残基来激活钙离子通道蛋白 TRPV5 的活性，以调节肾脏对钙离子的重吸收^[37]。此外，Ca²⁺ 依赖的磷脂结合蛋白家族成员膜联蛋白 I（annexins A-I，ANXA1）^[38] 羧基端 His 也受 NME1/2 修饰，且其磷酸化水平受氯离子浓度调节。

也有研究发现 NME1 和 NME2 能影响一些信号

通路的活化状态。例如，NME1 通过自身组氨酸激酶活性在 Ras1 激酶抑制因子 KSR1 上进行磷酸化修饰，降低 KSR1 活性，从而调控 Ras-Raf-ERK-MAPK 信号转导通路发挥转移抑制功能^[39-40]。同样，在肝纤维化和肝星状细胞活化过程中，NME1 和 NME2 的蛋白质表达水平上调，细胞 pHis 修饰水平增加，而沉默 NME1 或 NME2 则可降低 TGF- β 1 诱导的 pHis 修饰水平，并通过降低 Smad2 和 Smad3 的磷酸化水平抑制肝星状细胞的激活^[41]。在食管鳞状细胞癌细胞中发现，葡萄糖以剂量依赖性的方式诱导 NME1 的表达增加，进而促进黏着斑激酶（focal adhesion kinase, FAK）的 His58 磷酸化水平增加，最终激活 PI3K/AKT 通路。而磷酸化的 FAK His58 也能与 RB1 蛋白相互作用并隔离 RB1，从而促进细胞周期进入 G1/S 过渡阶段并促进肿瘤生长^[42-43]。然而，目前仅少数 NME 伴侣蛋白和底物蛋白的相互作用机制被报道（表 1）。

除了 NME1 和 NME2 这些已知的组氨酸激酶外，Vander Heider 等^[44] 研究也发现，在表达 PKM2 的细胞中，丙酮酸激酶活性降低导致磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）依赖的 PGAM1 His11 的磷酸化，从而使三磷酸腺苷的产生与 PEP 介导的磷酸基团转移解耦联，支撑高速糖酵解以满足增殖细胞的合成代谢需求。而在此基础上，Wang 等^[26] 的研究进一步证实了 PKM2 能作为组氨酸激酶以 PEP 依赖的方式催化 PGAM1 His11 磷酸化。

Table 1 Some known NME substrates, modification sites and motifs [7]
表1 部分已知的NME底物蛋白、修饰位点和基序 [7]

蛋白质	pHis位点	pHis序列
NME1	His118	NIIHGSD
NME2	His118	NIIHGSD
TRPV5	His711	TLGHLNL
GNB1	His266	TYSHDNI
KCa3.1	His358	RLKHRKL
ACLY	His760	QFGHAGA
SUCLG1	His299	RMGHAGA
FAK	His58	HGDATDVR
ANXAI	His246或His293	YSKHDMN/NDGTRHKAL

2.3 未知激酶调节的pHis修饰底物的功能

目前, 针对 pHis 修饰底物蛋白质的研究仍在不断探索中, 而对于这些修饰底物的 pHis 激酶及其作用机制, 尚缺乏清晰的认知。例如, 在细胞层面的研究中, Crovello 等 [45] 的研究表明, 当凝血酶或胶原蛋白刺激人血小板时, 介导血小板和内皮细胞、单核细胞和中性粒细胞相互作用的 P-selectin 蛋白胞质部分的 His771 和 His773 发生磷酸化。而 Yang 等 [46] 发现, 细胞合成的 7 肽中组氨酸残基的磷酸化能破坏上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程复合体的形成, 促进 14-3-3 γ 蛋白的核转位, 进而影响缺血组织的血管损伤修复与再生。同时, 在突触质膜中也报道有发生 pHis 修饰的蛋白质 [47]。pHis 修饰不仅参与调节细胞内蛋白质的功能活性, 大多数代谢酶也利用 pHis 作为酶中间体, 使其活性位点的组氨酸残基发生磷酸化, 进而将磷酸基团传递给底物小分子。例如, 在细胞葡萄糖水平调节过程中, 葡萄糖-6-磷酸酶在糖异生和肝糖分解途径中以 His176 为亲核中心将葡萄糖-6-磷酸水解为葡萄糖, 从而调节细胞葡萄糖水平 [48]。在细胞能量代谢方面, 烟酰胺磷酸核糖基转移酶 His247 发生磷酸化后可催化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 生物合成通路的前体物质烟酰胺单核苷酸的形成 [49]。另外, 未知的组蛋白 H4 组氨酸激酶 (HHK) 或可使组蛋白 H4 发生 pHis 修饰。Fujitaki 等 [50] 通过 ³¹P 核磁共振研究发现, 再生肝中的 HHK 可使组蛋白 H4 的 His18 和 His75 磷酸化, 这表明 HHK 活性与细胞增殖密切相关。然而, 这些蛋白质的修饰酶及其功能仍有待充分鉴定和表征。

3 磷酸组氨酸磷酸酶及其调控的pHis修饰底物的功能

3.1 磷酸组氨酸磷酸酶的主要类型及催化机理

pHis 修饰的稳定性较低, 一度被认为磷酸化的组氨酸残基在功能完成后会自发水解, 不需要像丝氨酸等磷酸化氨基酸残基那样需要相应的磷酸酶水解释放磷酸基团。然而, 研究人员陆续发现了少量具有磷酸组氨酸磷酸酶作用的蛋白磷酸酶, 包括蛋白质组氨酸磷酸酶 1 (protein histidine phosphatase 1, PHPT1)、磷酸甘油酸变位酶 5 (phosphoglycerate mutase family member 5, PGAM5) 和磷酸赖氨酸磷酸组氨酸无机焦磷酸磷酸酶 (phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase, LHPP)。目前对于这些磷酸组氨酸磷酸酶活性的功能研究仍十分有限。

2002 年发现第一个磷酸组氨酸磷酸酶——PHPT1 [51]。PHPT1 的活性中心包含一些保守氨基酸残基形成的正电荷区域, 该区域可以与 pHis 修饰蛋白结合 [52]。研究表明, 将该正电荷区域的 His53 和 His102 突变为丙氨酸残基后导致磷酸酶活性降低 [53], 证明这些氨基酸残基对于 PHPT1 酶催化活性的重要性。在去除底物磷酸基团过程中, PHPT1 的 His53 从水分子中提取一个质子, 激活它对底物蛋白的 pHis 进行亲核攻击, 从而释放磷酸基团 [54]。Hiraishi 等 [55] 首次在牛肝中分离出一种新型的 56 ku 的无机焦磷酸酶, 称为 LHPP, 属于卤酸脱卤酶 (HAD) 水解酶超家族。HAD 型磷酸酶的催化特征是两步磷酸天冬氨酰转移酶机制, 具体而言, Asp 作为亲核试剂对底物的磷酸基团发起亲核攻击, 从而形成磷酸天冬氨酰酶中间体并置换

底物的离去基团。随后,水分子对磷酸天冬氨酰酶中间体进行亲核攻击,从而释放游离磷酸基团并再生形成具有催化活性的天冬氨酸^[56]。PGAM5定位于线粒体,其活性位点的His105对底物蛋白的pHis进行亲核攻击,催化位点使用Arg104、Arg152和His230定位底物,而Glu176作为质子供体释放底物组氨酸上的磷酸基团^[57]。

3.2 磷酸组氨酸磷酸酶调控的pHis修饰底物的功能

研究表明,PHPT1能够去磷酸化多种细胞靶点,包括ACLY^[29]、TRPV5^[37]、KCa3.1^[58]、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)^[59]、Gβ^[60]、组蛋白H1^[61]和组蛋白H4^[62],这些靶点涉及DNA调控、细胞信号转导和脂肪酸代谢等方面,提示PHPT1参与调节多种生物途径。近年来,许多针对PHPT1酶活性的小分子抑制剂被开发出来,包括过渡态金属离子铜和锌^[63]以及小分子化合物降斑点酸^[64],这些抑制剂有望推动对PHPT1酶活性及其调控的pHis底物功能的研究。

Hindupur等^[65]首次报道LHPP作为磷酸组氨酸磷酸酶在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中表达水平下调,并且细胞内整体pHis修饰水平上调,而过表达LHPP后则肝肿瘤负荷降低,细胞pHis修饰水平降低,表明LHPP是肿瘤抑制因子且pHis水平升高可能促进HCC发展。此外,Xia等^[66]在胚胎干细胞分化研究中发现,LHPP介导的磷酸组氨酸去磷酸化能通过负调控Wnt/β-catenin通路及下游细胞周期相关基因来抑制胚胎干细胞的自我更新。在抑郁症相关研究中,研究人员发现,小鼠内侧前额叶皮层的LHPP及其调控的pHis修饰水平的变化对于预防压力诱导的抑郁症样行为至关重要,为重度抑郁症的发病机制提供了新的见解^[67]。然而,目前尚无生物学实验证实的LHPP磷酸组氨酸磷酸酶底物,甚至有学者怀疑LHPP是否具有磷酸组氨酸磷酸酶的作用,因为LHPP的X射线晶体结构分析揭示了催化位点的狭窄开口可能会阻止底物蛋白的pHis残基进入催化位点^[68]。近期一项关于结直肠炎的研究也发现,LHPP的缺失不足以促进pHis修饰水平的增加和肠道炎症的发展^[42]。

研究发现,PGAM5可与NME2的His118结合并使其去磷酸化,进而抑制NME2活性及其介导的KCa3.1通道激活,因此PGAM5被认为是CD4⁺T

细胞活化的负调节因子^[58]。在与胰腺肿瘤微环境相关的研究中发现^[69],肿瘤细胞中胞质形式的PGAM5可以去磷酸化线粒体外的pHis底物蛋白,从而导致基质细胞中pHis信号的富集。

3.3 其他研究尚不充分的磷酸组氨酸磷酸酶的功能

除了上文提及的磷酸组氨酸去磷酸化酶,一些丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶也被发现具有这种功能。Kim等^[70]研究表明,真核蛋白磷酸酶PP1、PP2A、PP2C对于催化酵母组蛋白H4组氨酸激酶的磷酸化具有较高的去磷酸酶活性。在食管鳞状癌细胞系中的研究也发现,PP2A能使FAK的pHis修饰水平降低^[43]。这些结果表明,在真核生物细胞中可能存在大量的非专一功能的磷酸组氨酸磷酸酶来调控细胞内的pHis修饰水平,但对这些磷酸酶调控pHis修饰水平的具体功能了解还十分有限。而细胞中pHis修饰水平的平衡维持与组氨酸激酶和磷酸组氨酸磷酸酶的表达水平与活性密切相关,由这些修饰酶水平和活性的异常所导致的细胞pHis修饰水平的异常变化会导致细胞的增殖、活力和运动性等多种恶性进程变化。因此,未来关于组氨酸磷酸酶对功能蛋白pHis修饰水平的调节及影响的研究值得进一步关注。

4 总结与展望

目前已知的组氨酸激酶和组氨酸磷酸酶均为多功能的酶蛋白,本文侧重于阐述组氨酸激酶与组氨酸磷酸酶对蛋白质序列中组氨酸残基的磷酸化与去磷酸化活性,介绍了组氨酸激酶与组氨酸磷酸酶调控下的不同类型pHis修饰的底物及其生物学功能,其总览如图3所示。正如前文所述,pHis修饰在肝癌、乳腺癌、胰腺癌等肿瘤组织中显著高表达,提示其可能广泛参与影响肿瘤发生及发展,pHis修饰调控酶、修饰底物和通路可能是重要的候选肿瘤干预靶标。此外,正常人体组织中细胞内pH值约7.2,略低于细胞外pH值。而在肿瘤组织中,出现了细胞内外pH值颠倒的情况——即细胞内的pH值大于7.4,高于细胞外pH值。而细胞内外pH的变化也为肿瘤细胞的增殖和侵袭等多种恶性行为提供了良好条件,并且在这一过程中细胞内的多种pH“感受器”蛋白也多以组氨酸残基介导响应细胞的pH值变化^[71]。而pHis修饰又天然具有酸和热不稳定性,当肿瘤细胞中pH值出现“颠倒”时,细胞内蛋白质的pHis修饰可能会更加稳定,因此含量

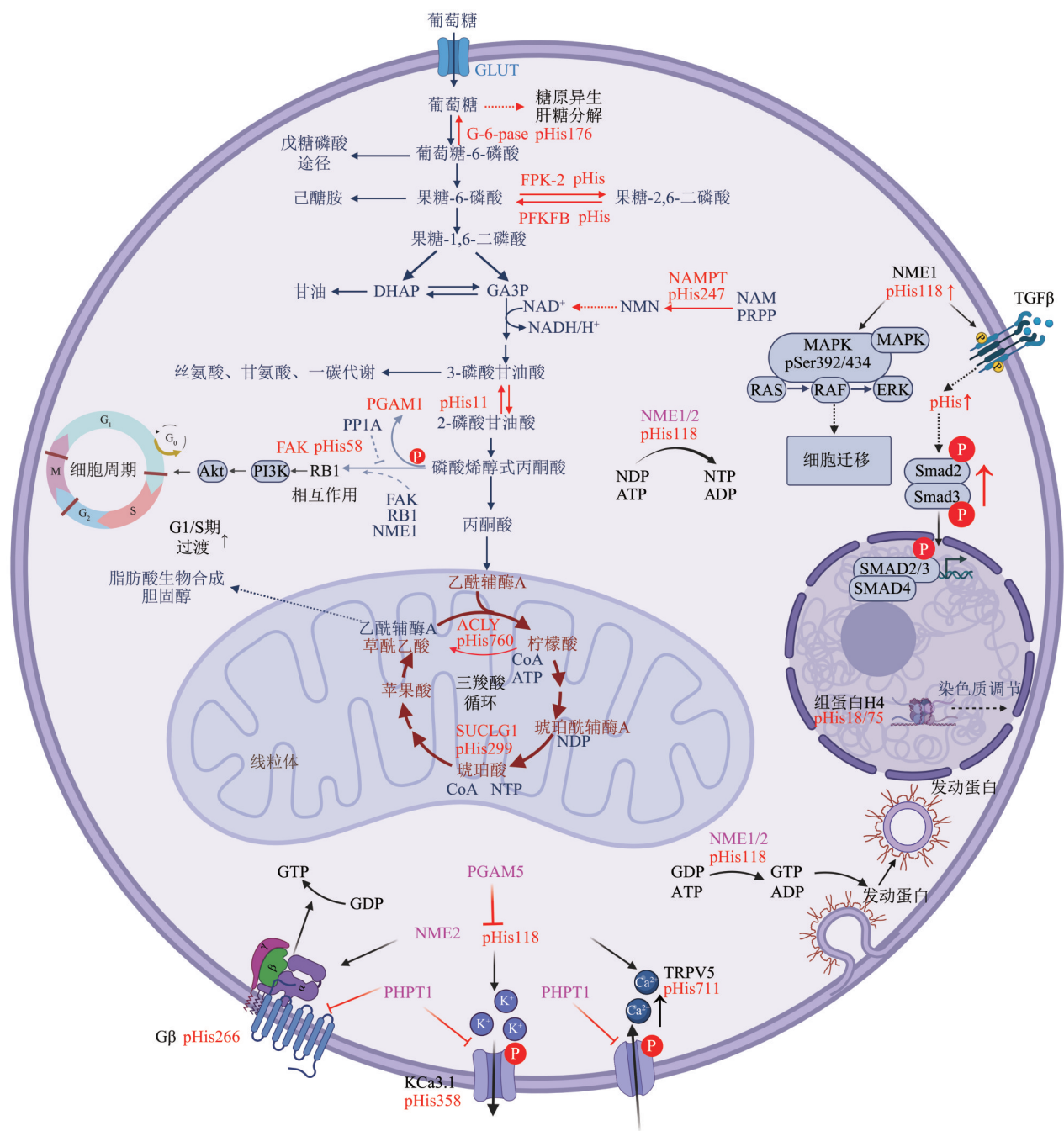


Fig. 3 Diagram of signaling pathways involving pHis-modified proteins and their impact on cellular functions

图3 pHis修饰蛋白参与的信号通路及对细胞功能的影响示意

GLUT: 葡萄糖转运体 (glucose transporter); G-6-pase: 葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase); FPK-2: 果糖-1,6-二磷酸酶2 (fructose-1,6-bisphosphatase 2); PFKFB: 磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶 (Phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase); DHAP: 磷酸二羟丙酮 (dihydroxyacetone phosphate); GA3P: 甘油醛-3-磷酸 (glyceraldehyde 3-phosphate); NMN: 烟酰胺单核苷酸 (nicotinamide mononucleotide); NAMPT: 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase); NAM: 烟酰胺 (nicotinamide); PRPP: 磷酸核糖焦磷酸 (phosphoribosyl pyrophosphate); NAD⁺: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide); NADH: 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)); NME: 核甘二磷酸激酶 (NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase NME/NM23); TGFβ: 转化生长因子β (Transforming growth factor-beta); MAPK: 促细胞分裂激酶 (mitogen-activated protein kinase); RAS: 大鼠肉瘤病毒 (rat sarcoma virus); RAF: 快速加速纤维肉瘤 (rapidly accelerated fibrosarcoma); ERK: 细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase); PGAM: 磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase); PP1A: 蛋白磷酸酶1α (protein phosphatase 1 alpha); FAK: 粘着斑激酶 (focal adhesion kinase); RB1: 视网膜母细胞瘤1 (retinoblastoma 1); PI3K: 磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase); Akt: 丝氨酸/苏氨酸激酶 (AKT serine/threonine kinase AKT); Smad: 蛋白家族 (SMAD family of proteins Smad); NDP: 核甘二磷酸 (nucleoside diphosphate); NTP: 核甘三磷酸 (nucleoside triphosphate); ADP: 腺苷二磷酸 (adenosine diphosphate); ATP: 腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate); GDP: 鸟苷二磷酸 (guanosine diphosphate); GTP: 鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate); CoA: 辅酶A (Coenzyme A); SUCLG1: 琥珀酰辅酶A合成酶 (succinyl-CoA synthetase); Gβ: G蛋白β亚基 (G protein subunit beta 1); PHPT: 磷酸组氨酸磷酸酶 (phosphohistidine phosphatase); KCa3.1: 中间电导钾离子通道蛋白4 (intermediate conductance calcium-activated potassium channel protein 4); TRPV5: 瞬时受体阳离子通道亚家族V成员 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 5)。

也更高。而在这一过程中,细胞内“累积”的pHis修饰蛋白是否发挥促进疾病发展的作用值得深入探究。此外,也有部分报道发现转移位点处具有肿瘤转移抑制功能的NME1蛋白表达水平上调的现象^[72],这些互相矛盾的结果也期待更深入的研究来阐明组氨酸激酶活性及蛋白质pHis修饰调控在肿瘤转移中的作用。

近日,Gary等^[73]在激酶失活的细胞裂解液中通过激酶催化的生物素化方式首次鉴定到7个NME1潜在的磷酸化修饰底物和3个NME2潜在的磷酸化修饰底物。由此可见,目前受限于技术的发展,pHis修饰位点的大量鉴定及在肿瘤中的具体的功能研究依然障碍重重,尤其是对于经这些酶调控的pHis修饰底物及参与的信号通路的了解更少,而它们的异常高表达或者低表达通常又具有重要的肿瘤预后预测潜力。因此,Hunter^[4]针对pHis修饰的生物学功能提出一系列亟需探索的问题,其中排在首位的便是——哪些细胞功能受pHis的调控。

尽管关于pHis的修饰鉴定与功能研究取得一些令人欣慰的进展,但与丝/苏/酪氨酸等氨基酸磷酸化修饰相比,目前适合于pHis修饰的鉴定检测方法仍然存在技术瓶颈,导致对丰度可能更高的pHis的研究还相对不充分。同时Leijten等^[74]对既往pHis位点修饰鉴定数据进行再次分析发现,已报道的超过99%的pHis位点上的磷酸基团可能实际都位于其邻近的丝/苏氨酸残基上,故而数据的真实性或许还有待进一步验证。因此,在未来的研究中一方面需要研究人员开发出更加稳定可靠的pHis修饰检测与鉴定方法,另一方面也需要更多的团队在生物学水平发现并验证更多的pHis修饰底物,进而更加深入了解pHis的功能作用。预计在未来一段时间内,关于pHis位点鉴定及pHis修饰蛋白的功能作用相关的研究将迎来蓬勃发展的局面。

参 考 文 献

- [1] Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, **21**(2): 140-146
- [2] Mukai S, Flematti G R, Byrne L T, *et al.* Stable triazolyphosphonate analogues of phosphohistidine. *Amino Acids*, 2012, **43**(2): 857-874
- [3] Makwana M V, Williamson M P, Jackson R F W, *et al.* Quantitation of phosphohistidine in proteins in a mammalian cell line by 31P NMR. *PLoS One*, 2022, **17**(9): e0273797
- [4] Hunter T. A journey from phosphotyrosine to phosphohistidine and beyond. *Mol Cell*, 2022, **82**(12): 2190-2200
- [5] Mathis C L, Barrios A M. Histidine phosphorylation in metalloprotein binding sites. *J Inorg Biochem*, 2021, **225**: 111606
- [6] Shi W, Chance M R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, **15**(1): 144-148
- [7] Adam K, Ning J, Reina J, *et al.* NME/NM23/NDPK and histidine phosphorylation. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(16): 5848
- [8] Fuhs S R, Hunter T. pHisphorylation: the emergence of histidine phosphorylation as a reversible regulatory modification. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, **45**: 8-16
- [9] Besant P G, Attwood P V. Mammalian histidine kinases. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1754**(1/2): 281-290
- [10] Hardman G, Perkins S, Brownridge P J, *et al.* Strong anion exchange-mediated phosphoproteomics reveals extensive human non-canonical phosphorylation. *EMBO J*, 2019, **38**(21): e100847
- [11] Cui F, Qian X, Ying W. Integrated strategy for unbiased profiling of the histidine phosphoproteome. *Anal Chem*, 2021, **93**(47): 15584-15589
- [12] Napper S, Kindrachuk J, Olson D J H, *et al.* Selective extraction and characterization of a histidine-phosphorylated peptide using immobilized copper(II) ion affinity chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 2003, **75**(7): 1741-1747
- [13] Potel C M, Lin M H, Heck A J R, *et al.* Widespread bacterial protein histidine phosphorylation revealed by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods*, 2018, **15**(3): 187-190
- [14] Gao Y, Kim D, Sung E, *et al.* Global histidine phosphoproteomics in human prostate cancer cells. *Mass Spectrometry Letters*, 2020, **11**(3): 52-58
- [15] Gao Y, Lee H, Kwon O K, *et al.* Profiling of histidine phosphoproteome in danio rerio by TiO₂ enrichment. *Proteomics*, 2019, **19**(9): e1800471
- [16] Liu Y, Xia C, Fan Z, *et al.* Novel two-dimensional MoS₂-Ti⁴⁺ nanomaterial for efficient enrichment of phosphopeptides and large-scale identification of histidine phosphorylation by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2020, **92**(19): 12801-12808
- [17] Hu Y, Jiang B, Weng Y, *et al.* Bis(zinc(II) -dipicolylamine) - functionalized sub-2 μ m core-shell microspheres for the analysis of N-phosphoproteome. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 6226
- [18] Incel A, Díez I A, Wierzbicka C, *et al.* Selective enrichment of histidine phosphorylated peptides using molecularly imprinted polymers. *Anal Chem*, 2021, **93**(8): 3857-3866
- [19] Kee J M, Oslund R C, Perlman D H, *et al.* A pan-specific antibody for direct detection of protein histidine phosphorylation. *Nat Chem Biol*, 2013, **9**(7): 416-421
- [20] Fuhs S R, Meisenhelder J, Aslanian A, *et al.* Monoclonal 1- and 3-phosphohistidine antibodies: new tools to study histidine phosphorylation. *Cell*, 2015, **162**(1): 198-210
- [21] Awais M, Hussain W, Khan Y D, *et al.* iPhosH-PseAAC: identify phosphohistidine sites in proteins by blending statistical moments

- and position relative features according to the Chou's 5-step rule and general pseudo amino acid composition. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*, 2021, **18**(2): 596-610
- [22] Chen Z, Zhao P, Li F, *et al*. PROSPECT: a web server for predicting protein histidine phosphorylation sites. *J Bioinform Comput Biol*, 2020, **18**(4): 2050018
- [23] Zhao J, Zhuang M, Liu J, *et al*. pHisPred: a tool for the identification of histidine phosphorylation sites by integrating amino acid patterns and properties. *BMC Bioinformatics*, 2022, **23**(Suppl 3): 399
- [24] Smtih D L, Bruegger B B, Halpern R M, *et al*. New histone kinases in nuclei of rat tissues. *Nature*, 1973, **246**(5428): 103-104
- [25] Attwood P V, Muimo R. The actions of NME1/NDPK-A and NME2/NDPK-B as protein kinases. *Lab Invest*, 2018, **98**(3): 283-290
- [26] Wang Y, Shu H, Qu Y, *et al*. PKM2 functions as a histidine kinase to phosphorylate PGAM1 and increase glycolysis shunts in cancer. *EMBO J*, 2024, **43**(12): 2368-2396
- [27] Wieland T, Hippe H J, Ludwig K, *et al*. Reversible histidine phosphorylation in mammalian cells: a teeter-totter formed by nucleoside diphosphate kinase and protein histidine phosphatase 1. *Methods Enzymol*, 2010, **471**: 379-402
- [28] Wagner P D, Vu N D. Phosphorylation of ATP-citrate lyase by nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem*, 1995, **270**(37): 21758-21764
- [29] Klumpp S, Bechmann G, Mäurer A, *et al*. ATP-citrate lyase as a substrate of protein histidine phosphatase in vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **306**(1): 110-115
- [30] Khan I, Steeg P S. The relationship of NM23 (NME) metastasis suppressor histidine phosphorylation to its nucleoside diphosphate kinase, histidine protein kinase and motility suppression activities. *Oncotarget*, 2017, **9**(12): 10185-10202
- [31] Adam K, Lesperance J, Hunter T, *et al*. The potential functional roles of NME1 histidine kinase activity in neuroblastoma pathogenesis. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(9): 3319
- [32] 刘萧然, 邢美宁, 陈沛渝, 等. 肝癌细胞中NME1功能研究及调控的pHis修饰底物发现. *现代生物医学进展*, 2024, **24**(13): 2401-2407
- Liu X R, Xing M N, Chen P Y, *et al*. Progress in Modern Biomedicine, 2024, **24**(13): 2401-2407
- [33] Hippe H J, Lutz S, Cuello F, *et al*. Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer via nucleoside diphosphate kinase (NDPK) B and Gbeta subunits. Specific activation of Galpha by an NDPK B. Gbetagamma complex in H10 cells. *J Biol Chem*, 2003, **278**(9): 7227-7233
- [34] Srivastava S, Li Z, Ko K, *et al*. Histidine phosphorylation of the potassium channel $KCa_{3.1}$ by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of $KCa_{3.1}$ and CD4 T cells. *Mol Cell*, 2006, **24**(5): 665-675
- [35] Srivastava S, Panda S, Li Z, *et al*. Histidine phosphorylation relieves copper inhibition in the mammalian potassium channel $KCa_{3.1}$. *eLife*, 2016, **5**: e16093
- [36] Abdelaal G, Carter A, Cheung W, *et al*. Novel iron chelator SK4 drives cytotoxicity through inhibiting mitochondrial metabolism in ovarian and triple negative breast cancer cell lines. *Biomedicines*, 2023, **11**(7): 2073
- [37] Cai X, Srivastava S, Surindran S, *et al*. Regulation of the epithelial Ca^{2+} channel TRPV5 by reversible histidine phosphorylation mediated by NDPK-B and PHPT1. *Mol Biol Cell*, 2014, **25**(8): 1244-1250
- [38] Muimo R, Hornickova Z, Riemen C E, *et al*. Histidine phosphorylation of annexin I in airway epithelia. *J Biol Chem*, 2000, **275**(47): 36632-36636
- [39] Volle D J, Fulton J A, Chaika O V, *et al*. Phosphorylation of the kinase suppressor of ras by associated kinases. *Biochemistry*, 1999, **38**(16): 5130-5137
- [40] Salerno M, Palmieri D, Bouadis A, *et al*. Nm23-H1 metastasis suppressor expression level influences the binding properties, stability, and function of the kinase suppressor of Ras1 (KSR1) Erk scaffold in breast carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(4): 1379-1388
- [41] Gong H, Fan Z, Yi D, *et al*. Histidine kinase NME1 and NME2 are involved in TGF- β 1-induced HSC activation and CCl_4 -induced liver fibrosis. *J Mol Histol*, 2020, **51**(5): 573-581
- [42] Zhang J, Gelman I H, Katsuta E, *et al*. Glucose drives growth factor-independent esophageal cancer proliferation via phosphohistidine-focal adhesion kinase signaling. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, **8**(1): 37-60
- [43] Zhang J, Gelman I H, Qu J, *et al*. Phosphohistidine signaling promotes FAK-RB1 interaction and growth factor-independent proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 2023, **42**(6): 449-460
- [44] Vander Heiden M G, Locasale J W, Swanson K D, *et al*. Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science*, 2010, **329**(5998): 1492-1499
- [45] 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
- [46] Yang J, Moraga A, Xu J, *et al*. A histone deacetylase 7-derived peptide promotes vascular regeneration via facilitating 14-3-3y phosphorylation. *Stem Cells*, 2020, **38**(4): 556-573
- [47] Weller M. Protein-bound histidine, as well as protein-bound serine, residues are sites of phosphorylation in the synaptic plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **509**(3): 491-498
- [48] Ghosh A, Shieh J J, Pan C J, *et al*. The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *J Biol Chem*, 2002, **277**(36): 32837-32842
- [49] Burgos E S, Ho M C, Almo S C, *et al*. A phosphoenzyme mimic, overlapping catalytic sites and reaction coordinate motion for human NAMPT. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(33): 13748-13753
- [50] Fujitaki J M, Fung G, Oh E Y, *et al*. Characterization of chemical

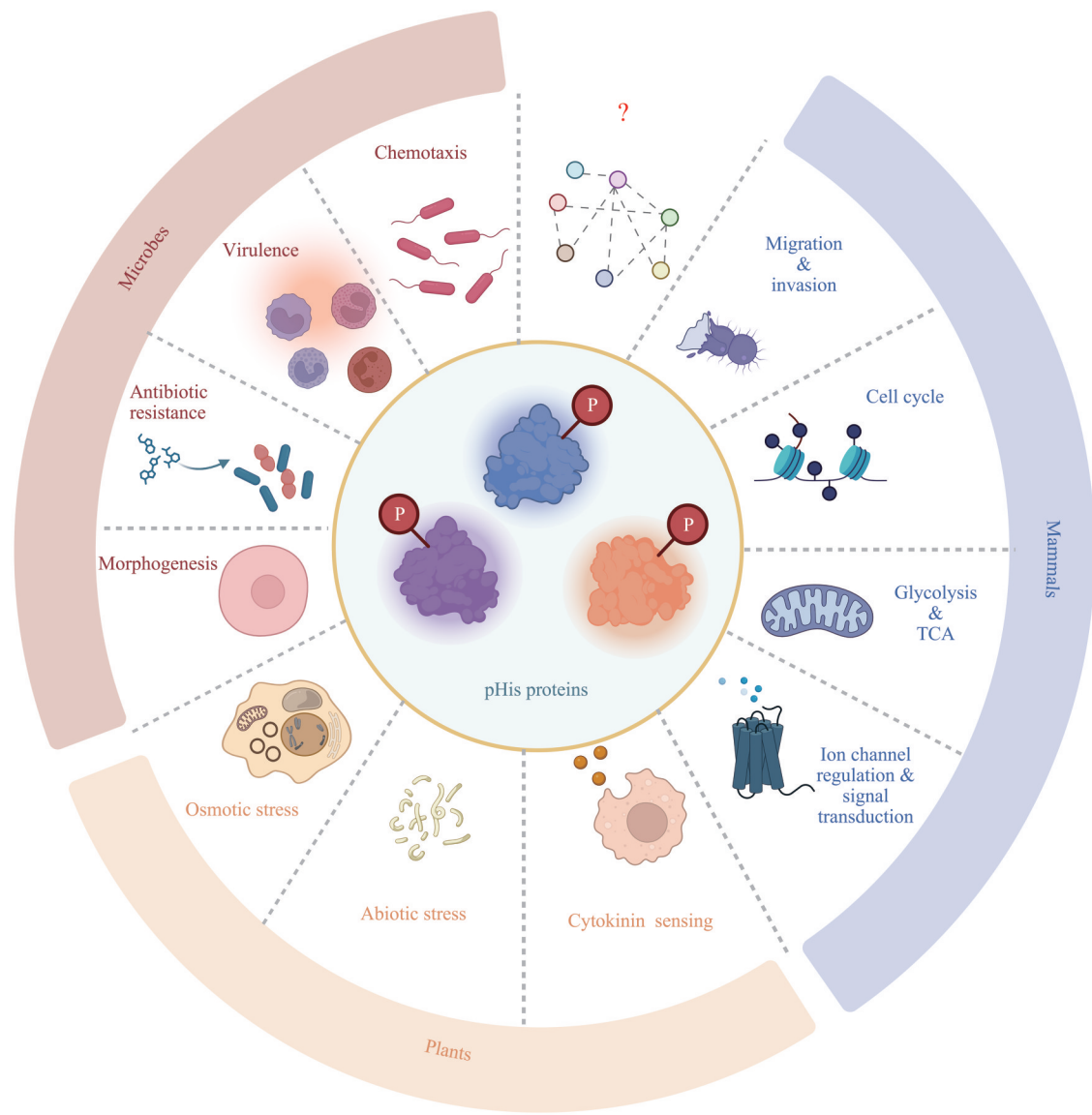
- and enzymatic acid-labile phosphorylation of histone H4 using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 1981, **20**(12): 3658-3664
- [51] Ek P, Pettersson G, Ek B, *et al.* Identification and characterization of a mammalian 14-kDa phosphohistidine phosphatase. *Eur J Biochem*, 2002, **269**(20): 5016-5023
- [52] Busam R D, Thorsell A G, Flores A, *et al.* First structure of a eukaryotic phosphohistidine phosphatase. *J Biol Chem*, 2006, **281**(45): 33830-33834
- [53] Ma R, Kanders E, Sundh U B, *et al.* Mutational study of human phosphohistidine phosphatase: effect on enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **337**(3): 887-891
- [54] Gong W, Li Y, Cui G, *et al.* Solution structure and catalytic mechanism of human protein histidine phosphatase 1. *Biochem J*, 2009, **418**(2): 337-344
- [55] Hiraishi H, Ohmagari T, Otsuka Y, *et al.* Purification and characterization of hepatic inorganic pyrophosphatase hydrolyzing imidodiphosphate. *Arch Biochem Biophys*, 1997, **341**(1): 153-159
- [56] Seifried A, Schultz J, Gohla A. Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS J*, 2013, **280**(2): 549-571
- [57] Chaikwad A, Filippakopoulos P, Marcisin S R, *et al.* Structures of PGAM5 provide insight into active site plasticity and multimeric assembly. *Structure*, 2017, **25**(7): 1089-1099.e3
- [58] Srivastava S, Zhdanova O, Di L, *et al.* Protein histidine phosphatase 1 negatively regulates CD4 T cells by inhibiting the K⁺ channel KCa_{3.1}. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(38): 14442-14446
- [59] Wernicke J. Regulation of EGF Receptor Activation by Phosphohistidine Phosphatase PHPT1[D]. Dortmund: Technische Universität Dortmund, 2017
- [60] Mäurer A, Wieland T, Meissl F, *et al.* The beta-subunit of G proteins is a substrate of protein histidine phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **334**(4): 1115-1120
- [61] Ek P, Ek B, Zetterqvist Ö. Phosphohistidine phosphatase 1 (PHPT1) also dephosphorylates phospholysine of chemically phosphorylated histone H1 and polylysine. *Ups J Med Sci*, 2015, **120**(1): 20-27
- [62] Attwood P V, Ludwig K, Bergander K, *et al.* Chemical phosphorylation of histidine-containing peptides based on the sequence of histone H4 and their dephosphorylation by protein histidine phosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1804**(1): 199-205
- [63] McCullough B S, Barrios A M. Facile, fluorogenic assay for protein histidine phosphatase activity. *Biochemistry*, 2018, **57**(18): 2584-2589
- [64] McCullough B S, Wang H, Barrios A M. Inhibitor screen identifies covalent inhibitors of the protein histidine phosphatase PHPT1. *ACS Med Chem Lett*, 2022, **13**(7): 1198-1201
- [65] Hindupur S K, Colombi M, Fuhs S R, *et al.* The protein histidine phosphatase LHPP is a tumour suppressor. *Nature*, 2018, **555**(7698): 678-682
- [66] Xia R M, Yao D B, Cai X M, *et al.* LHPP-mediated histidine dephosphorylation suppresses the self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 638815
- [67] Lin D, Li L, Chen W B, *et al.* LHPP, a risk factor for major depressive disorder, regulates stress-induced depression-like behaviors through its histidine phosphatase activity. *Mol Psychiatry*, 2023, **28**(2): 908-918
- [68] Gohla A. Do metabolic HAD phosphatases moonlight as protein phosphatases?. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, **1866**(1): 153-166
- [69] Luhtala N, Lytle N, Delgiorno K E, *et al.* Illuminating histidine phosphorylation in the pancreatic tumor microenvironment. *bioRxiv*, 2022. DOI: 10.1101/2022.09.15.508158
- [70] Kim Y, Huang J, Cohen P, *et al.* Protein phosphatases 1, 2A, and 2C are protein histidine phosphatases. *J Biol Chem*, 1993, **268**(25): 18513-18518
- [71] Webb B A, Chimenti M, Jacobson M P, *et al.* Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2011, **11**(9): 671-677
- [72] Andolfo I, De Martino D, Liguori L, *et al.* Correlation of NM23-H1 cytoplasmic expression with metastatic stage in human prostate cancer tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2011, **384**(4/5): 489-498
- [73] Gary C R, Acharige N P N, Oyewumi T O, *et al.* Kinase-catalyzed biotinylation for discovery and validation of substrates to multispecificity kinases NME1 and NME2. *J Biol Chem*, 2024, **300**(8): 107588
- [74] Leijten N M, Heck A J R, Lemeer S. Histidine phosphorylation in human cells; a needle or phantom in the haystack?. *Nat Methods*, 2022, **19**(7): 827-828

Regulation and Function of Protein Histidine Phosphorylation*

LIU Xiao-Ran, XING Mei-Ning**, YING Wan-Tao**

(Beijing Institute of Lifeomics, State Key Laboratory of Medical Proteomics, Beijing Proteome Research Center,
National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing 102206, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32271500), Key Research and Development Program of China (2020YFE0202200) and Independent Research Project of State Key Laboratory of Medical Proteomics (SKLP-K202202).

** Corresponding author.

YING Wan-Tao. Tel: 86-10-61777000, E-mail: yingwantao@ncpsb.org.cn

XING Mei-Ning. Tel: 86-10-61777000, E-mail: mxing@ncpsb.org.cn

Received: June 24, 2024 Accepted: August 29, 2024

Abstract Protein phosphorylation modification is one of the key regulatory mechanisms in cellular signaling transduction and metabolic processes. The phosphorylation state of target proteins is regulated by specific protein kinases and phosphatases, which add or remove phosphate groups. Histidine phosphorylation (pHis) plays a crucial role in both prokaryotes and eukaryotes life activities and is linked to various pathological processes. Unlike the stable phosphorylation of proteins *via* phosphate ester bonds, histidine phosphorylation is linked through phosphoramidate bonds, making it highly sensitive to high temperatures and low pH. This sensitivity has historically impeded progress in identifying and studying histidine phosphorylation. In recent years, the development of new techniques in phosphoproteomics and the emergence of pHis-specific antibodies have promoted the identification and functional research of pHis-modified substrates. For the first time, more than 700 pHis-modified proteins have been identified in mammalian cells, and pHis-modified substrates such as focal adhesion kinase (FAK) and phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1) have been found to promote tumor development. This article mainly reviewed the key mechanisms and functions of histidine kinases and histidine phosphatases in regulating the histidine phosphorylation of specific substrates, and highlights their significant roles in human physiological and pathological processes, aiming to provide guidance for further research into the biological functions of histidine phosphorylation.

Key words protein phosphorylation, histidine kinase, histidine phosphatase, histidine phosphorylation

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0264