



大自然为什么选择磷主导生命

BOWLER Matthew W.^①, CLIFF Matthew J.^②, WALTHO Jonathan P.^②,
BLACKBURN G. Michael^{②*}

① Structural Biology Group, European Synchrotron Radiation Facility, F-38043 Grenoble, France

② Krebs Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Sheffield University, Sheffield, UK

*通讯作者: E-mail: g.m.blackburn@sheffield.ac.uk

收稿日期: 2010-06-10; 接受日期: 2010-06-24

Blackburn 教授应邀参加了 2009 年 10 月 11~13 日在天津南开大学召开的中国化学会第八届全国磷化学化工学术讨论会. 在会上, 他做了题为“Why has evolution selected phosphate as the chemical core of biology?”的大会报告. 后来, 这个大会报告的内容整理成文, 发表在 *New Journal of Chemistry* 上 (2010, 34: 784–794; DOI: 10.1039/b9nj00718k). 2009 年 11 月, 《中国科学: 化学》开始向磷化学化工界的各位专家学者征集稿件, 准备出版一期“磷化学与化工进展”的专刊, 也向 Blackburn 教授发出了邀请, 并得到他的积极响应. 他请求并获得 Royal Society of Chemistry (RSC) for the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC 授权, 请人将已发表在 *New Journal of Chemistry* 上的文章翻译成中文. 为了让国内的读者更好地了解磷化学及其相关学科在世界上的发展现状, 编委会同意此翻译论文的出版.

摘要 磷酸单酯和双酯被漫长的进化过程选择为生命体的核心. 磷酸酯功能的多样性需要磷酸基转移酶不断地进化来实现. 现今磷酸基转移酶的催化机制已经得到了广泛研究. 通过高分辨 X 射线晶体衍射技术(X-ray)与 ¹⁹F NMR 的联用, 来研究磷酸基转移酶的金属氟化物过渡态类似物, 可以从原子层面上阐述磷酸基转移的机理. 该催化机理充分地解释了磷酸酯的一对相互“矛盾”的性质, 即磷酸酯结构的极其稳定性与磷酸基在信号传导过程中的灵活可调性. 通过对元素周期表中其他元素的含氧酸根及其酯的性质的研究, 目前还无法找出一个更加合适的元素来替代磷的这些重要功能, 因而这些证据都支持了 Todd 的说法: “哪里有生命, 哪里就一定有磷”.

关键词

生物磷酸酯
宇宙中的磷酸盐
磷酸基转移机理
激酶催化机理
磷酸酶催化机理
生命体选择磷酸盐
磷酸酯的稳定性
激酶和磷酸酶的调控

1 引言

磷酸酯的进化发展是生命体中最重要的化学特征之一. 磷酸酯一方面可作为 RNA 和 DNA 的稳定骨架, 另一方面可利用激酶和磷酸酯酶实现蛋白质功能的调控, 利用磷酸酐和磷酸酯, 特别是三磷酸腺苷 (adenosine 5'-triphosphate, ATP) 来实现细胞的生长、分化以及能量的转运. 磷酸单酯和双酯的化学性质极其稳定, 但其 P–O–C 键和 P–O–P 键均可被磷酸基转移酶快速地水解. 这样的性质决定了大自然为何选择磷酸酯或磷酸酐作为普遍的生物功能中心.

20 世纪中期, 对磷酸酯早期的生化研究主要由 Alexander Todd (图 1)和他的同事在剑桥大学展开.



图 1 Alexander Todd (1907~1997), 获 1958 年诺贝尔奖

该小组于 1948 年报道了三磷酸腺苷的首次化学合成^[1], 1955 年首次实现了双核苷磷酸酯 (dinucleoside phosphate, dTpT) 的化学合成^[2]. 基于这些成果 Gobind Khorana 发展了焦磷酸连接方法, 并将其推广到生产维生素和辅酶的应用中^[3], 以及后来 RNA 和 DNA 的化学合成. Todd 在磷酸酯与磷酸酐方面的研究推动发展了一个颇受关注的磷酸化机理, 即偏磷酸单酯 (monomeric metaphosphate ester) 作为中性的三角形 ($R-O-PO_2$) 磷酸基转移过渡态^[4]. Todd 在 1981 年的大阪会议中阐述了磷酸基在生命体中所起的主导作用, 以下是其报告的摘要^[5]:

“让我们总结一下, 大自然要如何竭尽所能, 才能充分利用她所拥有的以碳为基础的建筑单元. 首先她需要一个能形成酸酐的强酸用于能源储存和运输. 假设除磷酸外还有其他酸可以实现这一目的, 但是磷酸酐还可以满足以下其他要求: 这个酸必须是三元酸, 以便同时连接两个基团, 而且还有一个多余的酸性羟基可进行其他反应; 这个酸的强度是非常重要的, 因为其必须辅助碳-碳键的形成; 三元酸本身及其酯可以形成内酐以便作为强的酰化试剂. 元素周期表中只有一种元素同时满足以上这些要求——磷. 唯一具有相似性质的元素是硫, 也可以形成含氧酸, 但只是二元酸, 不完全符合需求. 我相信以上所列的条件对于生命体的进化发展至关重要, 所以我猜想, 如果宇宙的其他地方有生命存在的话, 那么极有可能是发生在具有充足磷元素的地球上.”

这些论述是基于 20 世纪中期对磷认识的基础上的, 50 年后的今天, 我们还是可以看出其具有一定的局限性. 我们现在知道, 不仅磷酸酐水解能产生高能量, 某些磷酸二酯也具备这一功能^[6]. 第三个磷酸羟基的使用仅对磷酸二酯的化学转化过程 (chemical transformations) 比较重要, 但是生物系统中还没有找到对应的例子. 在生物体中大多数的磷酸基离去基团都是二价阴离子形式, 其 pK_a^2 在 7.0 左右, 由此可以看出, 酸的强度看似不是最重要的. 无论怎样, Todd 的大胆猜测还是对我们提出了挑战. 磷酸酯真的是所有生命体都需要的重要组成部分吗? 本文的目的就是阐述 Todd 的理论在他首次提出后的这 30 年里的研究和发展.

2 磷酸的重要作用

在 20 世纪 70 年代, 遗传物质如 DNA 和 RNA

的磷酸二酯骨架结构和脂质中单磷酸的结构得到了充分研究. 但是对激酶组学和大量涌现的蛋白磷酸化现象的研究还没有开始. 30 年后的今天, 磷酸基的生物学功能得到了充分诠释. 以下列出其主要进展:

(1) 基因组的稳定性——DNA 的结构需要化学性质稳定的磷酸二酯作为其骨架, ——生存所需的 DNA 快速修复过程;

(2) RNA 世界——生命似乎首先起源于 RNA, 其次才是 DNA 和蛋白质 (催化 (核酶 ribozymes) 和调节 (核糖开关 riboswitches));

(3) 脂类——细胞膜利用磷脂作为基本组部分;

(4) 骨架结构——骨, 牙齿等. 使用磷酸钙 (磷灰石) 作为主要矿物成分;

(5) 隔离作用 (compartmentalisation)——小分子代谢物, 如阴离子磷酸酯不能自由通过细胞膜, 需要跨膜运输;

(6) 细胞器膜识别——磷酸肌醇;

(7) 能源——“高能磷酸盐”储存和分配生物过程中所需的能量;

(8) 调控和信号传递——许多关键蛋白通过磷酸化调节活性, 第二信使如 cAMP 与 cGMP 对细胞信号传递至关重要, 磷酸化蛋白组学 (phosphoproteomics) 已经发展成为研究蛋白翻译后修饰的一个新兴领域^[7].

以上这些看似有相悖之处, 比如有的磷酸基相当稳定, 在 DNA 中的自发水解半衰期是 3100 万年^[8], 然而有的磷酸基转移的速率在激酶的催化下却是毫秒级, 比如 *Yersinia* 的磷酸化酪氨酸磷酸酶^[9] (phosphotyrosine phosphatase) 的 $k_{cat} = 1000 \text{ s}^{-1}$. 正是因为磷酸(酯)在生物功能上的这些特点, 使得其不能被元素周期表中其他元素的含氧酸替代.

3 磷酸酯稳定的原因

Frank Westheimer (图 2) 及其同事在哈佛大学开创了用物理有机化学的手段来研究磷酸酯转移的化学和生物学机理这一领域, 并研究磷酸乙烯酯 (ethylene phosphate) 这个五元环状二酯不寻常的反应活性, 邻位羟基的潜在作用, 以及可能成“直线型 (in-line)”的磷酸酯水解过渡态的几何构型^[10, 11]. 尽管他和 Todd 一样还是更喜欢用偏磷酸盐^[12], 但他取得的一个主要的理论进展是, 在进化中, 磷酸单酯和双



图2 Frank Westheimer (1912~2007)

酯上的负电荷之所以被选择以起到稳定的作用是因为它可以阻碍亲核试剂的进攻^[13]。

“磷酸非常适合作核酸的骨架, 因为其连接两分子核苷后依然可以带负电荷; 这个负电荷可以防止磷酸二酯水解, 同时也可以使其保留在脂膜内。磷酸的稳定性还可解释其作为中间代谢产物及能量储存体的原因。磷酸根虽带有多个负电荷, 却可以通过中间体 PO_3^- (monomeric metaphosphate ion) 发生反应。因此, 其他任何基团都不能替代它在生物体中的角色。”

已有充分的证据证明磷酸酯的稳定性。最近有研究通过比较磷酸二酯和磷酸三酯的水解速率支持这一观点。与磷酸二甲酯相比, 磷酸三甲酯少一个负电荷, 因此它的水解反应速率加快了 10^9 倍^[8]。此外, 磷酸单甲酯的水解受到两个负电荷的阻滞, 比磷酸三甲酯水解反应速率减少 10^{12} 倍。同样的稳定效果也体现在磷酸二新戊酯上, 由于 C-O 键水解被抑制, 使得我们可以测量它的自发水解速率^[8]为 $7 \times 10^{-16} \text{ s}^{-1}$, 这与 DNA 分子水解的半衰期 3100 万年相符。

相比之下, 在酶催化下, 磷酸酯水解速率得到惊人的提高。在 *Staphylococcus* 二酯酶 (*Staphylococcus* diesterase) 的催化下磷酸二甲酯的水解速率提高 6×10^{14} 倍, 同样, 在 *Yersinia* 单酯酶 (*Yersinia* monoesterase) 的催化下, 苯基磷酸单酯的水解速率提高 2×10^{16} 倍。从这些数据^[8, 15]可以推测, 磷酸酶如 I 型蛋白磷酸酶 (type I protein phosphatase), 果糖二磷酸酶 (fructose biphosphatase), 肌醇磷酸酶 (inositol phosphatase) 催化磷酸单烷基酯底物的水解, 使得水分子进攻磷酸单酯的水解速度增加了 10^{21} 倍。这就相当于酶结合的反应底物在过渡态时的解离常数^[15]大约为 10^{-26} M 。

分子模拟计算可以用来展示磷酰基水解时亲核试剂所受到的排斥力。使用分子动力学计算磷酸与

硫酸单酯、双酯和三酯的电荷分布高斯平面曲线 (Gaussian surface), 结果表明, 在磷酸根周围有导致很强溶剂化作用以及一、二价阴离子强排斥力的局部负电荷 (红色, 图 3)。硫酸酯由于少一个负电荷致使极性大大减弱。磷酸酐上的磷酰基转移需要克服更强大的电荷排斥力, 例如一个具有 4 个负电荷的 ATP 分子与一个具有 2 个负电荷的 AMP 分子形成 2 分子的 ADP, 这一反应必须克服强大的静电斥力 (图 4)。然而该反应在疟疾腺苷酸激酶^[20] (malarial enzyme adenylate kinase) 的催化下其转化速率 k_{cat} 为 35 s^{-1} 。

正是由于磷酸酯的负电荷, 使其可以精确地结合在信号蛋白或酶的活性位点。例如, 锥虫磷酸甘油酸激酶 (trypanosome phosphoglycerate kinase, PGK) 通过利用活性中心的 3 个精氨酸和 1 个赖氨酸与底物 3-磷酸-D-甘油酸 (3-phospho-D-glyceric acid) 形成 6 个氢键, 如同一把“抓磷酸的钳子”紧紧抓住底物, 而

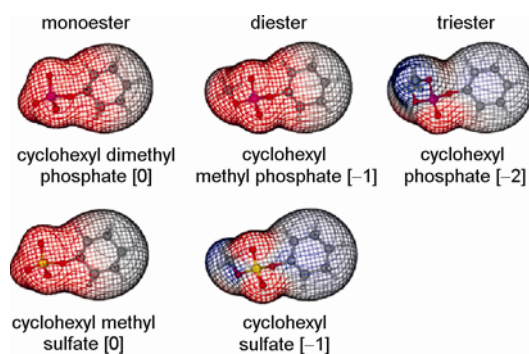


图3 分子动力学 MOE^[19]计算磷酸与硫酸单酯、双酯和三酯的电荷分布高斯平面曲线。(负电性-红色; 正电性-蓝色; 净电荷标示于方括弧内)

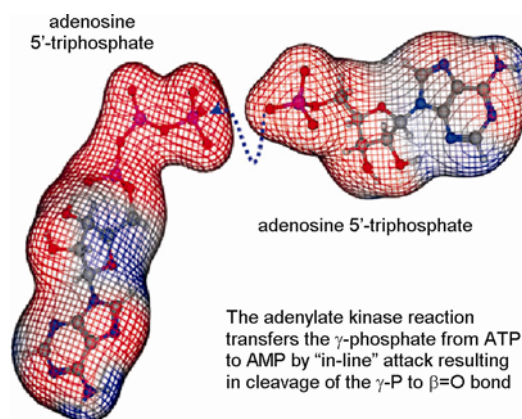


图4 分子动力学 MOE^[19]计算 ATP^{4-} (左) 与 ADP^{2-} (右) 的电荷分布平面曲线。(负电性-红色; 正电性-蓝色)

且酶的这一构象使得底物上的羧基可以准确地通过“直线上(in -line)”的方式接受来自 ATP 的 γ -磷酸基(图 5).

所以,这是大自然的“中心悖论”!在进化中,一方面生命体充分利用了磷酸酯的动力学稳定性,如利用磷酸二酯作为基因组遗传物质并且利用稳定的磷酸单酯作为代谢物;与此同时,自然界还进化发展了优于任何化学水解反应(通常与 4 mol 盐酸共沸)的高效的磷酸酯水解反应的酶催化模型.这些是如何实现的呢?很明显,电荷的中和是这些催化反应的关键所在!

4 酶催化磷酸基的转移

最近已经有许多综述文章报道了磷酸基转移酶的催化机理^[21],他们以物理有机化学为手段并结合酶生物化学,重点放在用反应结合/解离常数来解释酶的催化机理.近来的结构生物学发展,尤其是 X 射线晶体衍射与核磁共振技术的联用对酶结构解析,开启了一个全新的角度来考察研究磷酸基转移酶的催化过程.这使我们可以侧重从电荷平衡的角度比较 3 种磷酸基转移过渡态的稳定性:带负电的亲核基团进攻带负电的离去基团;带负电的亲核基团进攻中性的离去基团;电中性的亲核基团进攻电中性的离去基团.

还可以用另外一种方式描述这 3 类磷酸基转移的过程:磷酸基在两个阴离子之间转移,或者在一个阴离子和一个中性基团之间转移,再者两个中性基团之间转移.接下来就一一举例探讨说明,酶是如

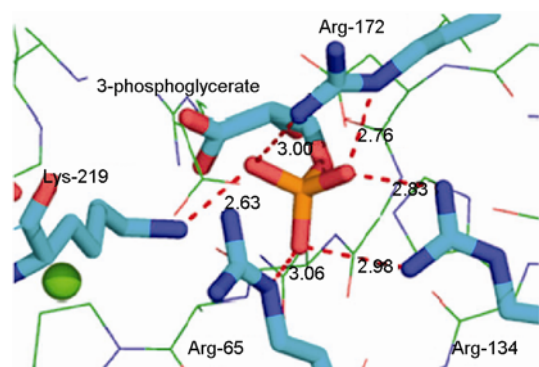


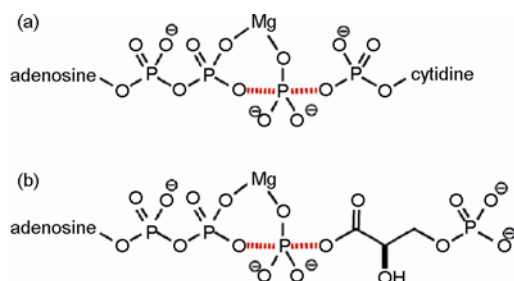
图 5 磷酸甘油酸激酶(PGK)磷酸基“钳子”.底物 3-磷酸-D-甘油酸(3-phospho-D-glyceric acid)与酶活性中心相互作用,图中标示出氢键(红色)与相应键长(黑色)

何克服亲核进攻磷酸酯阴离子时所受电荷斥力的问题.

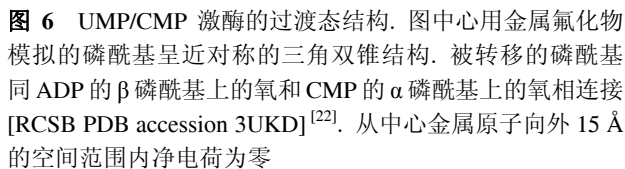
4.1 阴离子亲核基团与阴离子离去基团

这一类型包括两类主要的磷酸基转移酶:专门催化在两个磷酸基阴离子间转移磷酸基的核苷酸激酶,和以磷酸甘油酸激酶(PGK)为代表的催化一个磷酸基阴离子与一个羧基阴离子间的磷酸基转移酶(式 1).多年前人们就发现了 UMP/CMP 激酶、腺苷酸激酶及其他磷酸基转移酶的金属氟化物过渡态类似物. AlF_4^- 阴离子的八面体结构被习惯性地解释为可以模拟磷酸基转移的过渡态,但在几何构型上并不能准确地表达真实的磷酸基转移构型;三角双锥的类似物结构则被解释成是 AlF_3^0 ,但对中心金属离子到底是什么缺少检验^[22].新近对磷酸化丝氨酸磷酸酶的 NMR 研究显示^[23],至少其中一些金属类似物被解释成三氟化镁阴离子(MgF_3^-)能更精确地描述过渡态类似物结构,因为它与三角双锥的磷酸基过渡态是等电子等构型的.更有说服力的是,当 pH 值升高时,因为与三价铝配位的氟会逐渐被氢氧根取代,生成不溶的氢氧化铝^[24],所以 AlF_4^- 会渐渐被 MgF_3^- 所取代.

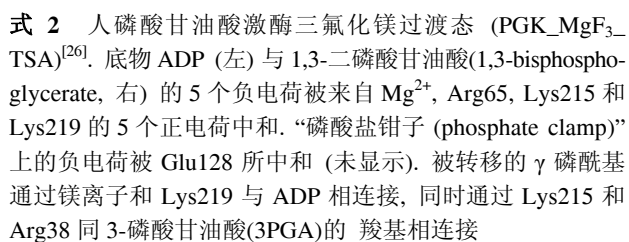
在 UMP/CMP 金属氟化物过渡态类似物中,位于酶活中心的 ADP 和 CMP 的正负电荷中和得非常好^[25].两个核苷酸分子(图 4, RCSB PDB 3UKD)的 6 个负电荷和 2 个天门冬氨酸的 2 个负电荷非常精确地被 8 个正电荷(分别来自催化 Mg^{2+} , 5 个精氨酸和 1 个赖氨酸)所中和(图 6).3 个氟原子正是因为与四周的氢键给体和催化镁离子形成了丰富的氢键网络,才能在赤道平面上形成稳定的三角形结构.轴向的 2 个氧原子之间的距离是 4.2 Å,这比五配位的单偏磷酸中间体轴向 2 个氧原子间的距离(6.5 Å)小很多,



式 1 磷酸基转移酶的过渡态.(a)UMP/CMP 激酶反应,(b)磷酸甘油酸激酶(PGK)反应.(生成和断裂的键用红色标示)

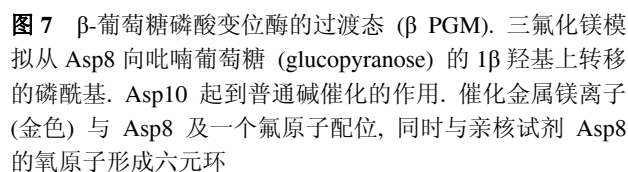


磷酸甘油酸激酶 (PGK) 催化 ATP 与 3-磷酸-D-甘油酸 (3-phospho-D-glyceric, 3pGA) 反应的情况和上面提到的非常相似. 该反应过渡态类似物已经被 X 射线晶体衍射观测到^[26]. 人类 PGK 与 ADP, 3PGA, 和 MgF_3^- 三元复合物结构需要 5 个正电荷平衡来自 ATP 上的 4 个负电荷与磷酸甘油酸上的 1 个负电荷 (式 2). 其中, 3PGA 上带负电的磷酸根 (图 4), 由 2 个正电荷用来固定, 它们来自带正电的精氨酸-85,



还有其他的的情况, 比如有的磷酸酶是利用半胱氨酸阴离子中的硫作为亲核试剂^[27], 牛 PTPase 晶体结构显示, 在活性中心里, 钒酸根共价连接亲核性的半胱氨酸-12 形成三角双锥结构, 相当于水分子进攻水解磷酸化半胱氨酸的过程. 但是, 尽管邻近的精氨酸-18 与赤道平面上的 2 个氧原子形成氢键^[28], 但由于钒酸根的 4 个氧原子的质子化状态不确定, 所以并不能确定净电荷是否中和.

最近有大量研究重新审视这类磷酸基转移酶的机理, 如 β -葡萄糖磷酸变位酶 (β phosphoglucosyltransferase, β PGM) 和磷酸化丝氨酸磷酸酯酶 (phosphoserine phosphatase, PSP) (图 7 和 8). 和其他很多酶一样, 这两个酶使用关键的天冬氨酸上的羧基作为亲核试剂形成磷酰化天冬氨酸中间体, 这个中间体或是被水解 (在 PSP 中) 或是把磷酰基转移给第二个底物的羟基. 早在 1960 年代后期, 这种以羧基进攻磷酸酯^[29]和磷酸酯^[30]的水解模型就已被发现. 在这两个酶的研究中, 我们建立了两个二元复合物过渡态模型结构, 以三氟化镁阴离子作为等电子体模拟磷酰基的转移. 利用 ^{19}F NMR 技术研究分析 *Lactococcus lactis*



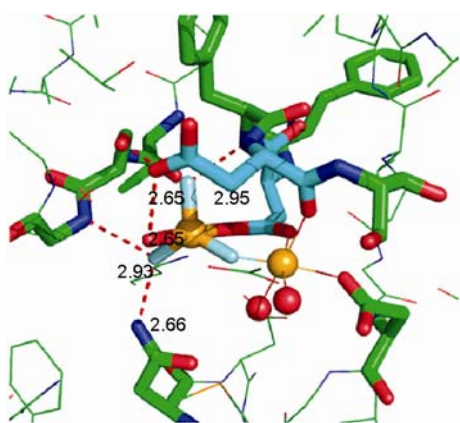
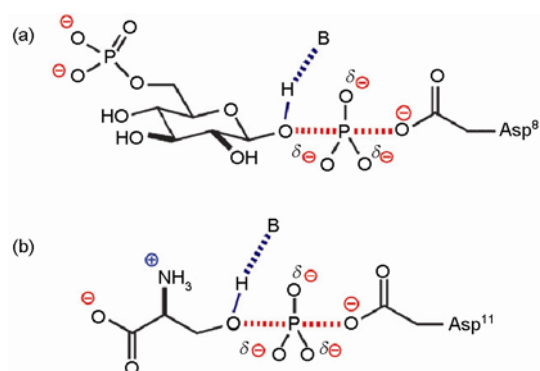


图 8 磷酸化丝氨酸磷酸酯酶 (PSP) 水解过渡态. 三氟化镁模拟被水分子进攻的 Asp11 上的磷酰基. Asp13 起到普通碱催化的作用. 催化金属镁离子 (金色) 与 Asp11 及一个氟原子配位, 同时与亲核试剂 Asp11 的氧原子形成六元环

β -葡萄糖磷酸变位酶的金属氟化物过渡态类似物, 可以发现, 随着 pH 值的变化, 氟的配位从低 pH 值时的八面体四配位构型转变为高 pH 值时的三角双锥三配位构型, 但不是由 AlF_4^- 转换成 AlF_3^0 , 而是随着 pH 值升高 AlF_4^- 逐渐被 MgF_3^- 取代^[23, 31]. 这是由于酶会优先选择正确的负电荷的缘故, 在 pH 值小于 6~8 时, 这些过渡态类似物不得不趋向于形成八面体的 AlF_4^- 结构, 而不是自然状态下的三角双锥结构. 我们观察到 *Methanococcus jannaschii* 磷酸化丝氨酸磷酸酯酶也具有类似的行为. 以上讨论的这两个反应如式 3 所示^[32].

从 β -葡萄糖磷酸变位酶与葡萄糖-6-磷酸三氟化镁复合物的高分辨 X 射线衍射电子密度图 (图 7, PDB 2WF5) 可以看到, 三角双锥的几何结构非常清晰, 可以用于解释 β -葡萄糖磷酸变位酶催化反应是经历了一个协同反应的机理. Asp-8 的羧基和 D-葡萄糖 6-磷酸的 1- β -羟基在磷酰基转移过程中相距 4.27 Å. 其中, 位于赤道平面上的其中 2 个氟原子和 5 个邻近氨基酸形成氢键, 这被 ^{19}F NMR 的 NOE 分析所证实, 第三个氟原子夹在催化镁离子和葡萄糖 2-羟基之间^[32]. 葡萄糖 1 位上磷酸根的 2 个负电荷与起催化作用的天冬氨酸的 1 个负电荷, 被来自于 +2 价的催化镁离子和 +1 价的 Lys-145 中和, 使距磷原子 14 Å 以内净电荷几乎为零 (图 9). Asp-10 的羧基与葡萄糖 1 位的氧原子有一个相距 2.5 Å 的氢键, 在磷酰基转移过程中作用于电中性亲核/离去基团, 起到普通酸碱催化 (general acid-base catalysis) 的作用, 这通过将



式 3 图解磷酰基转移酶催化过程第一步的过渡态. (a) β -葡萄糖磷酸变位酶(β PGM), (b) 磷酸化丝氨酸磷酸酯酶(PSP). 在这两种催化过程中, 均首先生成磷酰化的天冬氨酸 (右), 其随后被水解, 释放出磷酸. 催化中心附近的另一个天冬氨酸 (B) 起到普通酸碱催化的作用, 帮助活化羟基进攻磷酰基团

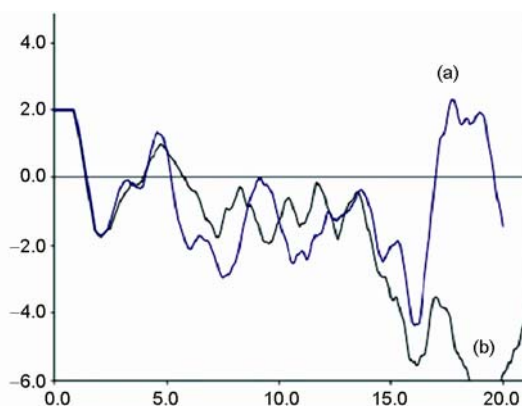


图 9 三氟化镁过渡态复合物以金属镁为中心的空间净电荷分布图. 横坐标为到中心金属镁的距离, 纵坐标为净电荷数. (a) β -葡萄糖磷酸变位酶 (β PGM, 蓝色), (b) 磷酸化丝氨酸磷酸酯酶 (PSP, 黑色)

D10 突变成天冬酰胺使酶失去活性可以证实. 值得注意的是, 远端的己糖磷酸仅被 Lys-49 约束, 并没有被“钳制”的迹象. 可是, 这个酶的活性位点不但能识别 D-葡萄糖-6-磷酸根和 D-葡萄糖-1- β -磷酸根, 还可以结合半乳糖 1- α -磷酸形成过渡态类似物^[33]. 由此可见, 这个酶可以牺牲与底物的结合强度来满足底物的多样性. 第二个羧基与醇羟基之间的磷酰基转移的例子是 *Methanococcus jannaschii* 磷酸化丝氨酸磷酸酯酶(phosphoserine phosphatase). 利用 ^{19}F NMR 技术, 我们已建立了用来研究三角双锥金属氟化物过渡态类似物的方法, 证明该类似物是三氟化镁而不是三

氟化铝 (图8)^[23, 31]. 这个酶的过渡态与上面提到的 β -葡萄糖磷酸变位酶过渡态类似物极其相似. 从三角双锥的几何结构可以清楚地观察到磷酸化丝氨酸磷酸酶采用协同反应作为其催化机理, 因为轴向配位的两个氧原子之间相距 4.24 Å. 氟由于与催化镁离子及相邻氨基酸配位而被固定在赤道平面内. Asp-11 和亲核的水分子是磷酸基转移中轴向上的两个配位基团. 磷酸化天门冬氨酸阴离子的电荷为-2, 被催化镁的+2价中和. 其结果是, 距离活性中心 12 Å 的球面以内净电荷为零 (图9, PDB 1L7N). Asp-13 的羧基与亲核试剂水分子之间有一个相距 2.65 Å 的氢键, 通过普通酸碱催化帮助水分子亲核进攻磷原子, 这可以从失去催化活性的酶突变体 D13N 实验得到证实 (式3).

蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 是这类酶中的第三个例子. 该酶催化 ATP 的 γ -磷酸基转移到底物蛋白的丝氨酸上. 在这个三元的复合物, 底物肽 TTYADFIASGRtGRRASIHD, ADP, “三氟化铝”形成的三角双锥过渡态类似物中, 轴向的两个氧原子距离 4.52 Å, 3个氟原子与3个邻近的残基形成氢键, 同时其中两个氟原子与两个催化镁离子配位. 该反应的6个负电荷 (4个来自 ATP, 2个来自反应中心的 Asp-166 和-184) 被6个正电荷中和 (4个来自两个催化剂镁离子, 另外2个来自 Lys-72 和 Lys-168). 与前两个例子比较可以知道, Asp-166 通过普通酸碱催化, 活化 Ser-21 的羟基作为亲核试剂 (图10, PDB 1L3R)^[34].

4.3 中性亲核性基团和中性离去基团

再举两个第三类磷酸基转移酶的例子. *Escherichia coli* 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 采用 Ser-102 作为亲核试剂形成共价磷酸酯, 紧接着再被水分子水解. 在这个分辨率为 1.9 Å 的共价钒酸盐复合物晶体结构中, 钒酸盐与亲核试剂 Ser-102 的侧链羟基以及第二步进攻的水分子共价形成三角双锥的结构. 在酶的活性位点, 钒酸盐的赤道面上配位的氧原子被 Arg-166 和两个锌离子所固定, 轴向配位的两个氧原子相距 3.63 Å (图11, PDB 1B8J)^[35]. 这个距离比肌球蛋白马达结构域 (myosin motor domain)^[36] 的钒酸盐-ADP-Mg 复合物中的轴向距离 4.36 Å 近了不少, 这更接近于两个轴向氧原子在共价五配位正磷酸的间距. 因此, 在分析这些过渡态类似物的键长

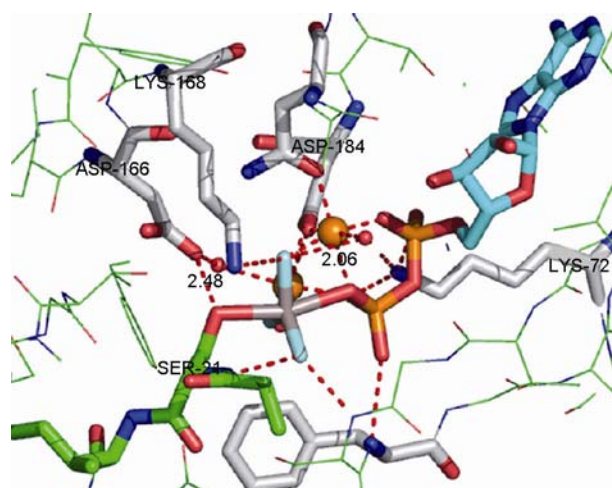


图10 蛋白激酶 A (PKA) 的金属氟化物过渡态复合物结构图^[34]. 来自 ATP 的 4 个负电荷, Asp166 和 Asp184 的 2 个负电荷被来自 2 个镁离子和 2 个赖氨酸的 6 个正电荷所中和. Asp166 起普通酸碱催化的作用, 通过氢键 (2.48 Å) 活化 Ser21 的羟基

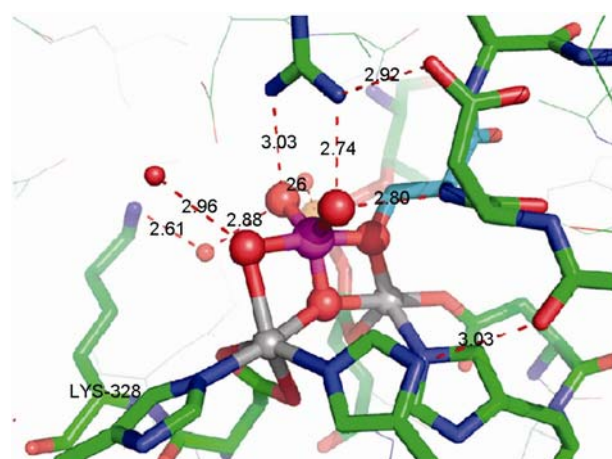


图11 大肠杆菌碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 的钒酸盐复合物结构图^[35]. 钒原子 (紫色) 键合 5 个氧原子成三角双锥结构, 水分子的氧 (左), Ser102 的氧 (右, 青色表示残基) 以及赤道平面的 3 个氧原子. 两个锌原子 (灰色) 与轴向的两个氧原子及赤道面底部的氧原子相配位. Arg166 与赤道面顶部的两个氧原子形成氢键. 后方的镁离子 (金色) 与 Lys328(左)同处于第二配位壳层

时必须谨慎. 虽然钒酸盐复合物的几何构型支持了“线上进攻离去”的反应机理, 但并不一定能说明这个催化反应会经历一个稳定的共价正磷中间体. 同样困难的是如何来解释电荷的中和. Asp-51, Asp-101, Asp-327 共享 3 个负电荷, 待转移的磷酸基阴离子带

一个负电荷, 假如两个锌离子的形式为 RO-Zn^+ , 再加上 Arg-166 和 Lys-328 的两个正电荷, 加起来共 4 个正电荷. 此外, 二价镁离子被用来平衡 Ser-102 与 Glu-322 的两个负电荷. 简而言之, 为了帮助磷酸基转移, 两个锌离子作为路易斯酸催化轴向的两个中性基团的离子化, 同时加强其与磷酸基的亲合力.

最后, 2,3-二磷酸甘油酸变位酶 (2,3-bisphosphoglycerate mutase) 提供了一个更为清晰的例子, 是用一个中性氮原子与中性氧原子参与的磷酸基转移反应. 2.0 Å 分辨率的四氟化铝复合物结构被确定, 提供了详细的过渡态信息 (图 12, PDB 2F90)^[37]. 在反应中, 2,3-二磷酸甘油酸首先结合到酶上作为反应引物, 其 3 位上的磷酸基被转移到中性的 His-11 残基上, 释放出产物 2-磷酸甘油酸. 之后另一分子 3-磷酸甘油酸再结合到酶上, 磷酸化的 His-11 将其上的磷酸基转移到底物的 2 位羟基上, 生成的 2,3-二磷酸甘油酸, 可作为下一次催化循环的引物. 这样的循环过程实现了 3-磷酸甘油酸不停地向 2-磷酸甘油酸的转变.

尽管铝六配位的构型使四氟化铝作为过渡态类似物并不完全贴切, 但是从广义上来理解就相当容易些了. 该复合物结构相当清楚地显示, 轴向上亲核的氧原子与氮原子相距 4.05 Å. 赤道面上配位的氟离子与其邻近的 6 个残基和一个水分子形成氢键. 磷酸酯上的 2 个负电荷被 Arg-10, Arg-62 的两个正电荷

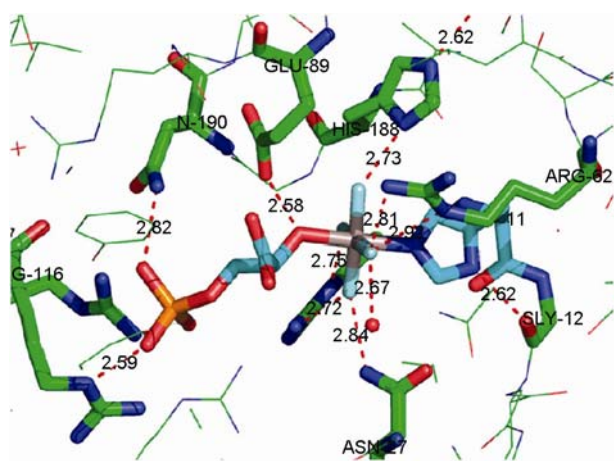


图 12 2,3-二磷酸甘油酸变位酶四氟化铝复合物结构图^[37]. 八面体四氟化铝复合物模拟 3-磷酸甘油酸 (左) 的 2 位羟基进攻 His11 (右) 的磷酸基团. Glu89 (上) 为普通碱催化剂, 反应中心的负电荷被 Arg10 和 Arg62 所中和. 底物 3-磷酸甘油酸被 Arg116 和 Arg117 (左) 所固定

中和. 3 位的磷酸基被 Arg-116 与-117 所固定. 中性的 His-188 与三角双锥过渡态中的一个氧原子配位. 最后, Glu-89 作为普通酸催化试剂 (general acid catalysis), 催化 P-O 键断裂.

5 酶催化总结

以上描述的 8 个酶催化机理都是通过解析结构得到的, 并且它们拥有几个共同的特点. 首先, 所有过渡态的几何构型均采用“直线型(in line)”. 在某些结构中会发现细小的偏差, 这些偏差可能来自于当过渡态类似物模拟真实的处于过渡态的磷酸基的三角双锥构型时的局限性, 或者对电子云密度图 (electron density maps) 分析的不精确性, 或者也许已经精确地描述了真实的过渡态结构. 其次, 在计算过渡态复合物净电荷时, 我们发现磷酸基转移的第一配位壳层 (first co-ordination shell) 净电荷倾向为零, 且通常情况下第二壳层也不带电. 对于某些激酶, 中心磷原子周围 15 Å 的距离内竟然都能保持净电荷为零^[26]. 这就是进化成功赋予磷酸基转移酶的功能, 使其催化磷酸基转移的速率大大加快. 第三, 当碱性的羟基作为亲核试剂的时候, 在催化中心都会有一个普通碱 (general base) 在过渡态中帮助去质子化, 就跟总会有普通酸 (general acid) 催化过渡态的 P-O 键断裂一样. 第四, 三角双锥过渡态的赤道面的 3 个氧能够非常好地形成一个可以拉伸的三角平面, 有利于磷原子顺利地从中穿过从而完成从四面体反应物向四面体产物的转化. 最后, 尽管在前面的讨论中没有强调, 通常水分子会被排除在过渡态复合物内层以外 (少数情况除外), 除非水分子是作为催化金属的配体. 值得注意的是, 那些在酶的催化下转移的磷酸基是被酶活化过的, 与距离酶催化反应中心只有几埃之外的磷酸基截然不同, 它们作为构建生物分子的骨架, 未被酶识别活化, 因此非常稳定. 同样值得一提的是, 羧基进攻磷酸基或者磷酸酐的活性, 与羧酸磷酸酐在蛋白的生物合成上的作用相关. 这使得研究生命起源以前的磷酸基转移的化学进化问题备受关注.

显然, 进化的过程使酶只需要采取相对简单的化学催化手段, 就可加快生物体内为数众多的磷酸单酯的反应速率. 磷酸二酯还没有被深入研究, 但我们可以预测其具有相似的情况. 所以我们又被带回

到了 Todd 猜想的核心^[5]. 如果磷酸酯的超稳定性以及磷酰基转移酶超强的催化活性, 使得地球上生命的进化均以磷为核心, 我们是否可以预测, 对于宇宙中其他星球上的生命, 磷同样会在其进化中起到核心作用?

6 有其他元素可以替代磷吗?

这个问题可以从两个方面来考虑. 首先是, “元素周期表中有可替代磷的元素吗?” 我们知道, 物理定律 (laws of physics) 是宇宙范围内通用的^[38], 元素周期表同样也是通用的. 但是宇宙中化学元素的分布是不均匀的^[39], 所以其次需要考虑的是, “其他星球有足够的磷资源以供原始进化吗?” 先前的分析已经阐明了含氧酸二酯的阴离子是高分子结构稳定所必需的^[13] (表 1). 从对钒酸酯和砷酸酯的研究可知, 尽管它们都可形成带负电荷的酯类, 但是达不到所需要的稳定性 (表 2). 硫酸二酯的稳定性同样很低, 但其单酯的稳定性较好, 可是依然没有磷酸单酯的稳定性高.

那地球进化为什么没能发展一套二元混合模式呢, 即采用磷酸二酯构建生物大分子而采用硫酸单酯于其他用途? 这个问题不是完全无法回答的. 对于这种二元进化模式的争论有以下考虑: 首先, 没有

所谓的“多聚硫酸盐”与作为公认的原始磷酸化试剂来源的多聚磷酸^[40]相对应; 其次 ATP 作为磷酸化试剂, 其结构和进化路径相对于磺酰化试剂——3'-磷酸腺苷 5'-磷磺酸(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, PAPS) 要简单得多 (PAPS 的结构复杂性是区分其与 ATP 所必须的); 再次, 与磷酸单酯二价阴离子相比, 硫酸单酯一价阴离子形成库仑力与氢键的能力大大降低; 还有, 尽管磺酰化是酪氨酸转录后修饰的主要方式, 它只出现在多细胞真核生物中, 并且这一过程通常是不可逆的^[41]. 最后可能相关的一点, 虽然主要但不绝对, 是磷酰基转移催化过程中的镁离子的角色, 因为磷酸镁解离常数是 8.5 mM^[42]而硫酸镁的解离常数为 2.2 μ M^[43].

因此可以看出, 在化学进化上, 磷酸酯在生命体中的统治地位在生命起源前就因其功能多样性而被选择. 那么宇宙中磷的可用量足够吗?

³¹P 起源于恒星内部的物质燃烧爆炸. 当恒星的质量足够大 (大于 15 倍的太阳质量), 内部的液体静态碳燃烧 (hydrostatic C-burning) 所产生的 1.5×10^9 K 的高温, 导致具有爆炸性的氖燃烧 (Ne-burning)^[44], 首先产生 ¹⁶O 和 ²⁴Mg, 其次才产生 ³¹P (产率 2.5 %). 氧燃烧的热核反应生成了硅, 硫, 和少量的磷. 燃烧和爆炸决定了如今宇宙中元素的分布情况, 通过分析宇宙射线^[46], 我们发现在宇宙中可用磷含量比我

表 1 磷酸酯水解的动力学参数

酯	离子	断裂键	$k_{25} \text{ } ^\circ\text{C}$ (s^{-1} 或 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\Delta G \text{ } 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ (kcal mol^{-1})	ΔH (kcal mol^{-1})	$T\Delta H \text{ } 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ (kcal mol^{-1})
单酯						
$\text{H}_2\text{O} + \text{MeOPO}_3\text{H}^-$	monoanion ^[14]	P–O	2.4×10^{-10}	30.6	30.0	0.6
$\text{H}_2\text{O} + \text{MeOPO}_3^-$	dianion ^[15]	P–O	2×10^{-20}	44.3	47.0	2.7
$\text{H}_2\text{O} + \text{PhOPO}_3^-$	dianion ^[15]	P–O	6×10^{-14}	36.0	38.0	7.0
双酯						
$\text{H}_2\text{O} + (\text{MeO})_2\text{PO}_2\text{H}$	neutral ^[16]	C–O	6×10^{-10}	30.0	25.0	5.0
$\text{H}_2\text{O} + (\text{MeO})_2\text{PO}_2^-$	anion ^[17]	C–O	1.6×10^{-13}	34.9	25.9	9.0
(or $\text{HO}^- + (\text{MeO})_2\text{PO}_2\text{H}$) neutral)						
$\text{HO}^- + (\text{MeO})_2\text{PO}_2^-$	anion ^[14]	C–O	3×10^{-11}	31.7	27.6	4.1
$\text{H}_2\text{O} + (\text{NpO})_2\text{PO}_2^-$	anion ^[8]	P–O	7×10^{-16}	38.1	29.5	8.6
$\text{HO}^- + (\text{NpO})_2\text{PO}_2^-$	anion ^[8]	P–O	1.4×10^{-15}	37.7	29.5	8.0
三酯						
$\text{H}_2\text{O} + (\text{MeO})_3\text{PO}$	neutral ^[14]	C–O	2×10^{-8}	28.1	22.6	5.5
$\text{HO}^- + (\text{MeO})_3\text{PO}$	neutral ^[15]	P–O	1.4×10^{-4}	22.7	15.4	7.3
$\text{HO}^- + (\text{EtO})_3\text{PO}$	neutral ^[14]	P–O	9×10^{-6}	24.3	14.1	10.2
单酯酶						
<i>Yersinia</i> PTPase	文献[9]	P–O	1000	–	–	–
双酯酶						
<i>Staphylococcus</i> nuclease	文献[18]	P–O	95	14.7	10.8	3.9

表 2 候选元素及其含氧酸盐和酯^{a)}

元素	元素相对丰度(与 Si 原子数比较)					含氧酸				含氧酸酯					
	地壳	陨石	太阳系	宇宙	人	含氧酸	pKa1	pKa2	pKa3	二酯稳定性 (t1/2)	二酯 电荷	断裂键	单酯稳定性 (t1/2)	单酯 电荷	断裂键
Si	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	H4SiO4	9.5	>13	–	< 1 min	0	Si–O	< 1 min	0	Si–O
P	3 x 10 ⁻³	8.6 x 10 ⁻³	8.4 x 10 ⁻³	8 x 10 ⁻³	38	H3PO3	2.1	7.2	13.1	10 ⁵ y	–1	P–O	10 ¹² y	–2	P–O
V	1 x 10 ⁻⁴	5.2 x 10 ⁻⁴	2.9 x 10 ⁻⁴	3 x 10 ⁻⁴	7 x 10 ⁻⁵	[H3VO4]	3.2	7.8	12.5	< 1 s	–1	V–O	<< 1 s	–1	V–O
As	2 x 10 ⁻⁶	1.6 x 10 ⁻⁵	6.1 x 10 ⁻⁶	4 x 10 ⁻⁶	7 x 10 ⁻⁵	H3AsO4	2.2	7.0	11.5	< 2 min	–1	As–O	6 min	–2	As–O
S	8 x 10 ⁻⁴	0.51	0.445	0.4	6.7	H2SO4	<0	2.0	–	1.7 h	0	C–O	1100 y	–1	C–O

a) 天体物理数据来源: Lodders K. *Astrophys J*, 2003, 591: 1220; 或参见 http://www.webelements.com/periodicity/abundance_universe/index.html; HVO₄ and esters: Tracey AS, Gresser MJ. *Can J Chem*, 1988, 66, 2570.

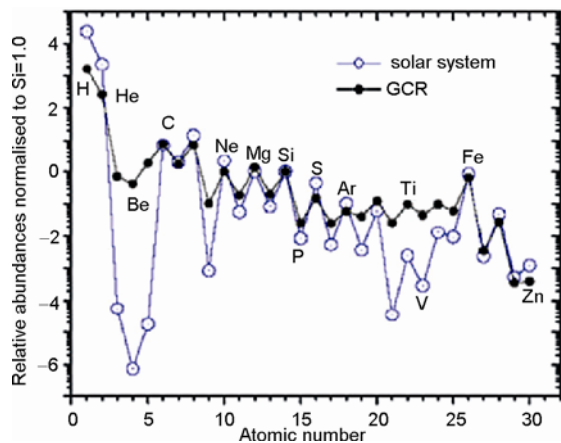


图 13 宇宙和太阳系中的轻元素相对丰度图. George JS 教授授权使用 (*Astrophys J*, 2009, 698, 1666)

们生存的太阳系还高(图 13). 这样一来, 认为生命只起源于磷富集的流星的观点就受到了质疑. 此外, 可以推测宇宙中有水、碳、氮和磷的地方, 生命就很有可能起源. 这一说法正因为以下两个概念得以发展: 星系适居带 (Galactic Habitable Zone, GHZ)^[47] 和星周适居带 (Circumstellar Habitable Zone, CHZ)^[48], 其中有水存在的行星, 生命存在的概率是非常大的 (图 14). 从根本上讲, GHZ 理论认为, 适居的恒星带形成于 80 亿年以前, 离银河系中心大约 25000 光年的距离, 这只包含了银河系中不到 10 % 的恒星. 在这个适居带上的行星可以围绕在某个温度适合的恒星周围, 使其球表温度可维持水成液态. 适居带也被称作“舒适区(comfort zone)”. 适居带上的许多星球都比地球古老, 有的比地球早形成至少十亿年! 此项研究工作的主要成果之一是发现了在距太阳仅 20 光年的天秤座星系的一颗叫格利泽 581 的恒星最外侧的行星格利泽 581d (Gliese 581d). 因为它的质量是地球的 8 倍, 这个星球被称为超级地球. 2009 年 4 月下旬新的

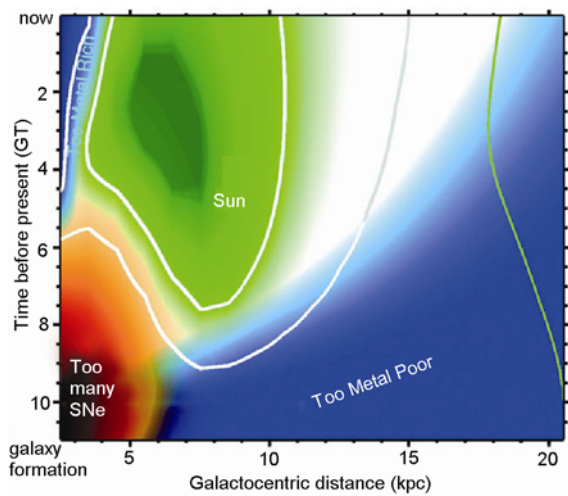


图 14 从银河系形成至今的星系适居带图 (Galactic Habitable Zone, GHZ): 金属丰度 (蓝色), 物种进化时间足够的区域(灰色)超新星爆炸导致物种可能灭绝的区域 (红色). 白色的等高线涵盖了复杂生物体适合繁衍的星球的 68% (内线) 或 95% (外线) 的面积. Charles Lineweaver 教授授权使用

观测结果判断说明该行星位于适居带当中, 这意味着它可能有液态水或生物存在.

人类是否会在哪儿发现以磷为基础的生命呢?

7 结论

在所有含氧酸之中, 只有磷酸形成的链状或环状的缩聚物 (condensed polymers) 可以在温和条件下作为磷酸化试剂^[40]. 由此反应生成的磷酸单酯和双酯结构极其稳定, 不易被水解, 但在磷酰基转移酶的催化下, 水解反应可迅速进行. 虽然 RNA 世界中核酶上 2'-OH 的催化功能也得到了充分研究^[49], 但却使原本值得深入研究的羧基在磷酰基和羧基转移过程中的亲核催化作用被大大地忽视, 尤其是酶催化下羧基对磷酰基转移贡献的研究. 现在, 通过联用

X-ray 与 NMR 技术对磷酸基转移酶过渡态金属类似物结构的研究, 向我们揭示了这些酶催化机理的奥秘. 早在生命起源之初, 磷酸酯就因其稳定的化学性质, 及易被酶催化的可控性被进化所选择. 由于周

期表中其他元素的含氧酸不同时具备以上两种性质, 所以没有元素可以用来替换磷. 由此推测, 如果宇宙中其他地方有生命存在, 那么磷也将在那些生命体中扮演同样重要的角色.

致谢 感谢 Kristian Birchall 博士在 MOE 计算上的帮助, 感谢 BBRSC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council) 和 Wellcome Trust 在资金上的支持. 感谢留筱厦 (厦门大学化学系) 和金轶 (谢菲尔德大学分子生物与生物技术系) 在翻译上所做的贡献.

参考文献

- Baddiley J, Michelson AM, Todd AR. Synthesis of adenosine triphosphate. *Nature*, 1948, 161: 761
- Michelson AM, Todd AR. Nucleotides. XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3',5'-internucleotidic linkage. *J Chem Soc*, 1955, 2632—2638
- Khorana HG, Todd AR. Phosphorylation. XI. The reaction between carbodiimides and acid esters of phosphoric acid. A new method for the preparation of pyrophosphates. *J Chem Soc*, 1953, 2257—2260
- Todd AR. Phosphate chemistry. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1959, 45: 1389—1397
- Todd AR, Lord. Where there's life, there's phosphorus. Kageyama M, Nakamura K, Oshima T. Eds. Tokyo: Japan Sci Soc Press, 1981, 275—279
- Sturtevan JM, Gerlt JA, Westheimer FH. Enthalpy of hydrolysis of simple phosphate diesters. *J Am Chem Soc*, 1973, 95, 8168—8169
- Blagoev B, Ong SE, Kratchmarova I, Mann M. Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nature Biotechnol*, 2004, 22: 1139—1145
- Schroeder GK, Lad C, Wyman P, Williams NH, Wolfenden R. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006, 103: 4052—4055
- Zhang ZY, Wang Y, Dixon JE. Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1994, 91: 1624—1627
- Kumamoto J, Cox JR Jr, Westheimer FH. Barium ethylene phosphate. *J Am Chem Soc*, 1956, 78: 4858—4860
- Dennis EA, Westheimer FH. The geometry of the transition state in the hydrolysis of phosphate esters. *J Am Chem Soc*, 1966, 88: 3432—3433
- Westheimer FH. Monomeric metaphosphates. *Chem Rev*, 1981, 81: 313—326
- Westheimer FH. Why nature chose phosphates. *Science*, 1987, 235: 1173—1178
- Bunton CA, Llewellyn DR, Oldham KG, Vernon CA. Reactions of organic phosphates. I. Hydrolysis of methyl dihydrogen phosphate. *J Chem Soc B: Phys Org*, 1958, 3574—3587
- Lad C, Williams NH, Wolfenden R. The rate of hydrolysis of phosphomonoester dianions and the exceptional catalytic proficiencies of protein and inositol phosphatases. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100: 5607—5610
- Bunton CA, Mhala MM, Oldham KG, Vernon CA. Reactions of organic phosphates. III. Hydrolysis of dimethyl phosphate. *J Chem Soc*, 1960, 3293—3301
- Wolfenden RI, Ridgway C, Young G. Spontaneous hydrolysis of ionized phosphate monoesters and diesters and the proficiencies of phosphohydrolases as catalysts. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 833—834
- Serpensu EH, Shortle D, Mildvan AS. Kinetic and magnetic resonance studies of active-site mutants of staphylococcal nuclease: Factors contributing to catalysis. *Biochemistry*, 1987, 26: 1289—1300
- The software package MOE (Molecular Operating Environment, available from the Chemical Computing Group. <http://www.chemcomp.com/>) was used for calculation of the electrostatic surface and creation of the graphics
- Rahlf S, Koncarevic S, Iozef R, Mwangela Mailu B, Savvides SN, Schirmer RH, Becker K. Myristoylated adenylate kinase-2 of *Plasmodium falciparum* forms a heterodimer with myristoyltransferase. *Mol Biochem Paras*, 2009, 163: 77—84
- Hengge AC. Mechanistic studies on enzyme-catalyzed phosphoryl transfer. *Adv Phys Org Chem*, 2005, 40: 49-108; Cleland WW, Hengge AC. Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. *Chem Rev*, 2006, 106: 3252—3278; Hoff RH, Hengge AC. The use of

- isotopes in the study of reactions of acyl, phosphoryl, and sulfonyl esters. *J Label Comp Radiopharm*, 2007, 50: 1026—1038
- 22 Schlichting I, Reinstein J. Structures of active conformations of UMP kinase from dictyostelium discoideum suggest phosphoryl transfer is associative. *Biochemistry*, 1997, 36: 9290—9296
- 23 Baxter NJ, Blackburn GM, Marston JP, Hounslow AM, Cliff MJ, Bermel W, Williams NH, Hollfelder F, Wemmer DE, Waltho JP. Anionic charge is prioritized over geometry in aluminum and magnesium fluoride transition state analogs of phosphoryl transfer enzymes. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 3952—3958
- 24 Driscoll CT, Schecher WD. The chemistry of aluminum in the environment. *Environ Geochem Health*, 1990, 12: 28-49; Sigel H, Da Costa CP, Martin RB. Interactions of lead(II) with nucleotides and their constituents. *Coord Chem Rev*, 2001, 219-221: 435—461
- 25 But only when interpreted as an MgF₃⁻ complex
- 26 Cliff MJ, Bowler MW, Varga A, Marston JP, Szabo J, Hounslow AM, Baxter NJ, Blackburn GM, Vas M, Waltho JP. Transition state analogue structures of human phosphoglycerate kinase establish the importance of charge balance in catalysis. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 6507—6516
- 27 Denu JM, Stuckey JA, Saper MA, Dixon JE. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell*, 1996, 87: 361—364
- 28 Zhang M, Zhou M, Van Etten RL, Stauffacher CV. Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate. *Biochemistry*, 1997, 36: 15—23
- 29 Blackburn GM, Brown MJ. Mechanism of hydrolysis of diethyl 2-carboxyphenylphosphonate. *J Am Chem Soc*, 1969, 91: 525—526
- 30 Khan SA, Kirby AJ, Wakselman M, Horning DP, Lawlor JM. Intramolecular catalysis of phosphate diester hydrolysis. nucleophilic catalysis by the neighboring carboxy-group of the hydrolysis of aryl 2-carboxyphenyl phosphates. *J Chem Soc B: Phys Org*, 1970, 1182—1187
- 31 There is a strong case for re-examination of all the 34(?) protein structures in the PDB that have been hitherto assigned as AlF₃ simply on interpretation of electron densities. At structural resolutions of ≥ 1.0 Å it is not possible to differentiate AlF₃ from MgF₃⁻ by X-ray diffraction. Either PIXE or ¹⁹F NMR chemical shifts must be employed
- 32 Baxter NJ, Bowler MW, Alizadeh T, Cliff MJ, Hounslow AM, Bin W, Berkowitz DB, Williams NH, Blackburn GM, Waltho JP. Atomic details of near-transition state conformers for enzyme phosphoryl transfer revealed by MgF₃⁻ rather than by phosphoranes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2010, 107: 4555—4560
- 33 Baxter NJ, Hounslow AM, Bowler MW, Williams NH, Blackburn GM, Waltho JP. MgF₃⁻ and -galactose 1-phosphate in the active site of phosphoglucomutase form a transition state analogue of phosphoryl transfer. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 16334—16335
- 34 Madhusudan AP, Xuong N-H, Taylor SS. Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nature Struct Biol*, 2002, 9: 273—277
- 35 Holtz KM, Stec B, Kantrowitz ER. A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *J Biol Chem*, 1999, 274: 8351—8354
- 36 Smith CA, Rayment I. X-ray structure of the magnesium(II) ADP vanadate complex of the dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 1996, 35: 5404—5417
- 37 Wang YL, Liu I, Wei ZY, Cheng ZJ, Lin YJ, Gong WM. Seeing the process of histidine phosphorylation in human bisphosphoglycerate mutase. *J Biol Chem*, 2006, 281: 39642—39648
- 38 Murphy MT, Flambaum VV, Muller S, Henkel C. Strong limit on a variable proton-to-electron mass ratio from molecules in the distant universe. *Science*, 2008, 320: 1611—1613
- 39 Cowan JJ, Sneden C, Burles S, Ivans II, Beers TC, Truran JW, Lawler JE, Primas F, Fuller GM, Pfeiffer B, Kratz K-L. The chemical composition and age of the metal-poor halo star BD +17°3248. *Astrophys J*, 2002, 572: 861—879
- 40 Lohrmann R, Orgel LE. Urea-inorganic phosphate mixtures as prebiotic phosphorylating agents. *Science*, 1971, 171: 490-494; Osterberg R, Orgel LE, Lohrmann R. Urea-catalyzed phosphorylation reactions. *J Mol Evol*, 1973, 2: 231—234
- 41 Huttner WB. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Ann Rev Physiol*, 1988, 50: 363—376; Ouyang YB, Lane WS, Moore KL. Tyrosylprotein sulfotransferase: Purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, 95: 2896—2901
- 42 Smirnova IN, Shestakov AS, Dubnova EB, Baykov AA. Spectral and kinetic studies of phosphate and magnesium ion binding to yeast inorganic pyrophosphatase. *Europ J Biochem*, 1989, 182: 451—456
- 43 Bies DA. An ultrasonic investigation of a chemical kinetics problem: the dissociation of magnesium sulfate. *J Chem Phys*, 1955, 23: 428—434
- 44 Woosley SE, Heger A, Weaver TA. The evolution and explosion of massive stars. *Rev Modern Phys*, 2002, 74: 1015—1071
- 45 Arnett D. *Supernovae and Nucleosynthesis*. Princeton: Princeton University Press, 1996. Oro J, Mills T, Lazcano A. Comets and life in the

- universe. *Adv Space Res.* The official journal of the Committee on Space Research (COSPAR). 1995, 15: 81—90
- 46 ACE News, 2004, October 6th, Advanced Composition Explorer, NASA, USA
- 47 Lineweaver CH, Fenner YS, Gibson BK. The galactic habitable zone and the age distribution of complex life in the Milky Way. *Science*, 2004, 303: 59—62
- 48 von Bloh W, Bounama C, Cuntz M, Franck S. The habitability of super-Earths in Gliese 581. *Astron Astrophys*, 2007, 476:1365—1371
- 49 Joyce GF. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature*, 2002, 418: 214—221; Orgel LE. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2004, 39: 99—123

Why did nature select phosphate for its dominant roles in biology?

Matthew W. Bowler¹, Matthew J. Cliff², Jonathan P. Waltho² & G. Michael Blackburn²

1 Structural Biology Group, European Synchrotron Radiation Facility, F-38043 Grenoble, France

2 Krebs Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Sheffield University, Sheffield, UK

Abstract: Evolution has placed phosphate mono- and diesters at the heart of biology. The enormous diversity of their roles has called for the evolution of enzyme catalysts for phosphoryl transfer that are among the most proficient known. A combination of high-resolution X-ray structure analysis and ¹⁹F NMR definition of metal fluoride complexes of such enzymes, that are mimics of the transition state for the reactions catalysed, has delivered atomic detail of the nature of such catalysis for a range of phosphoryl transfer processes. The catalytic simplicity thus revealed largely explains the paradox of the contrast between the extreme stability of structural phosphate esters and the lability of phosphates in regulation and signaling processes. A brief survey of the properties of oxyacids and their esters for other candidate elements for these vital roles fails to identify a suitable alternative to phosphorus, thereby underpinning Todd's Hypothesis "Where there's life there's phosphorus" as a statement of truly universal validity.

Keywords: biological phosphate esters, phosphate in the universe, phosphoryl transfer mechanisms, mechanism of kinases, mechanism of phosphatases, no alternatives to phosphate in life, associative phosphate mechanisms, phosphate stability vs. phosphate lability

Translated from Matthew W. Bowler, Matthew J. Cliff, Jonathan P. Waltho and G. Michael Blackburn, *New J. Chem.*, 2010, 34: 784–794, DOI: 10.1039/b9nj00718k with permission of the Royal Society of Chemistry (RSC) for the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC.