



# 基于N-磷酸化氨基酸探讨激酶磷转移机制

傅松森<sup>1</sup>, 李福来<sup>1</sup>, 黄碧玲<sup>1</sup>, 蔡华欢<sup>1</sup>, 倪锋<sup>1</sup>, 应见喜<sup>1</sup>, 刘艳<sup>2</sup>, 付川<sup>2</sup>, 高祥<sup>3</sup>, 李艳梅<sup>4</sup>, 赵玉芬<sup>1,2,4\*</sup>

1. 宁波大学新药技术研究院, 宁波 315211

2. 厦门大学化学化工学院, 厦门 361005

3. 厦门大学药学院, 厦门 361102

4. 清华大学化学系, 北京 100084

\*通讯作者, E-mail: zhaoyufen@nbu.edu.cn

收稿日期: 2022-10-29; 接受日期: 2022-12-05; 网络版发表日期: 2023-02-24

国家自然科学基金(编号: 91856126, 22107055, 20972130, 21778042, 22274136, 22237003, 42003062, 41876072)、宁波市自然科学基金(编号: 2021J131)、宁波大学科研经费(编号: 215-432000282)和宁波市顶尖人才项目(编号: 215-432094250)资助

**摘要** N-磷酸化的 $\alpha$ -氨基酸可以发生多种磷转移反应, 而且只有 $\alpha$ -氨基酸可以被磷激活. 在生命系统中, 磷的转移在生物信息传递中扮演了关键角色. 双组分系统(two-component system, TCS)是细菌感应并响应外界复杂环境最为重要的信号传导系统, 其分子基础为磷酸根从ATP依次传递到组氨酸激酶的组氨酸(P-N键)和下游调控蛋白的天冬氨酸(P-OCO键); 在高等生物中, ATP经激酶将磷酸根传递到底物蛋白的羟基(P-O键), 催化中心中高度保守的酸性和碱性氨基酸不可或缺. 如果N-磷酸化氨基酸是微型的TCS模型, 那么高等生物激酶是否利用类似TCS的磷传递机制? 本文总结了N-磷酸化 $\alpha$ -氨基酸和激酶介导的磷转移过程, 探讨N-磷酸化氨基酸模型作为磷转移系统“分子化石”的可能性, 希望为激酶催化机制及基于激酶的新药研发提供新思路.

**关键词** N-磷酸化氨基酸, 激酶, 磷转移, 双组分系统

## 1 引言

生命是从哪儿来的? “地外说”认为是外太空带来了生命的种子. 但是自从Miller反应后, 科学家们认为生命从地球上起源是有可能的, 而磷可能在生物大分子的起源和进化中扮演了关键的角色. 现代生命体是围绕磷组织起来的, 从生物大分子到功能性小分子, 磷几乎无处不在<sup>[1]</sup>. 遗传信息的载体DNA和RNA、生物膜的主要成分磷脂分子、生物体中参与信号转导的磷酸化蛋白以及能量分子ATP、信号分子GTP和

cAMP等, 都有磷的身影. 磷酸单酯和双酯在漫长的进化过程中被选择成为生命体的核心分子组件<sup>[2]</sup>, 并被磷酸基转移酶不断地进化来实现其功能的多样性<sup>[3]</sup>. 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合适的元素来替代磷的这些重要功能<sup>[4]</sup>.

磷的转移极大地促进了生命信息和能量的交换传递. 人类大约有30000个基因<sup>[5]</sup>, 但是这些基因数量远远不能满足复杂生命活动的要求. 蛋白质翻译后的磷酸化修饰极大地丰富了蛋白质的功能多样性<sup>[6]</sup>. 目

引用格式: Fu S, Li F, Huang B, Cai H, Ni F, Ying J, Liu Y, Fu C, Gao X, Li Y, Zhao Y. Exploration of kinase phosphotransfer mechanism based on N-phosphoryl amino acids. *Sci Sin Chim*, 2023, 53: 338–348, doi: 10.1360/SSC-2022-0208

前, 在人类细胞中, 已知有超过6万个蛋白磷酸化位点, 它们由500余种蛋白激酶和190种蛋白磷酸酯酶分别负责蛋白上磷的添加和擦除<sup>[7]</sup>. 利用激酶、磷酸酯酶实现蛋白功能的扩展, 利用磷酸酐、磷酸酯, 特别是ATP来调节细胞的生长、分化以及能量的传递. 原核生物中, 双组分系统(two-component system, TCS)是细菌感应并响应外界复杂环境最为重要的信号传导系统, 其分子基础为磷酸根从ATP依次传递到组氨酸激酶的组氨酸(P-N键)和调控蛋白的天冬氨酸(P-OCO键); 在高等生物中, 磷酸根由ATP经激酶传递到底物蛋白的羟基(P-O键), 催化中心中高度保守的酸性和碱性氨基酸不可或缺.

磷酸化氨基酸是生物分子演化以及磷转移的模型. 通过对*N*-二烷氧基磷酸化氨基酸的化学性质进行系统研究, 发现当 $\alpha$ -氨基酸的氨基接上磷酸基团后, 在室温下可以发生自身活化而自组装成肽、成酯、磷上酯交换及N $\rightarrow$ O磷酸基转位等仿生反应. 研究还表明, *N*-磷酸化 $\beta$ -和 $\gamma$ -氨基酸在相同条件下都相当稳定, 不生成肽反应. 这说明*N*-磷酸化对氨基酸的结构具有高度的选择性, 在多肽的前生源合成和蛋白质的生物合成中, 很可能是磷选择了 $\alpha$ -氨基酸. *N*-磷酸化氨基酸所介导的磷转移与上述TCS及高等生物激酶的磷转移过程有异曲同工之妙.

因此, 本文探讨*N*-磷酸化氨基酸模型作为生物体中激酶磷转移系统“分子化石”的可能性, 为激酶催化机制及基于激酶的新药研发提供新思路.

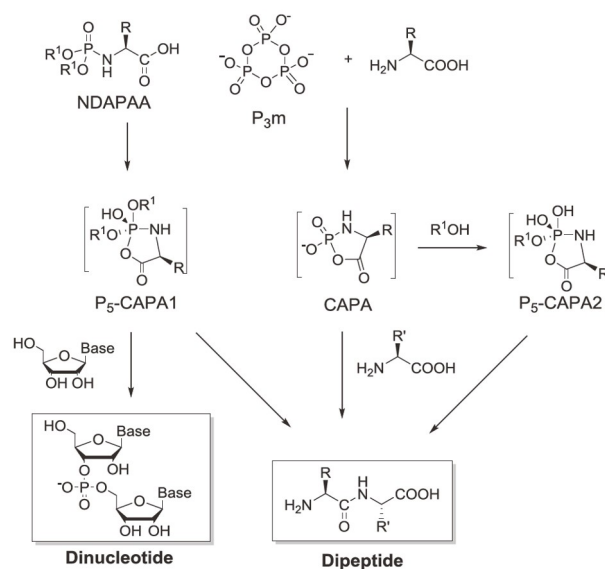
## 2 *N*-磷酸化氨基酸与生命起源

生命起源的过程本质上应遵循达尔文进化理论, 即从简单到复杂的化学和生物进化过程. 具体来讲, 是由无机小分子生成有机小分子(氨基酸、核苷、糖及脂类等), 有机小分子通过聚合作用生成具有自我代谢和复制功能的生物大分子(蛋白质、核酸及脂类等), 继而出现生命后, 由低等生物进化到高等生物的过程.

通过模拟早期地球可能的环境条件, 如放电、高温、矿物质催化和干湿循环等, 已基本实现生物小分子(如氨基酸、核苷、脂类等)的前生源合成<sup>[8]</sup>. 比如, 1953年, Miller<sup>[9]</sup>进行了著名的“火花放电”实验, 利用小分子如氨、氢气、甲烷和水, 在模拟前生源条件下合成了11种氨基酸. 王文清等<sup>[10]</sup>引入原始地球大气中

可能存在的PH<sub>3</sub>重复了该实验, 发现无PH<sub>3</sub>时, 只有丙氨酸和缬氨酸等6种简单的氨基酸, 而加入PH<sub>3</sub>后, 则检测到19种氨基酸. 这一实验说明了磷元素可能在氨基酸起源过程中起着重要作用.

在前生源时期, 生物小分子是如何组装成具有基本功能的生物大分子(如多肽和寡聚核酸)是生命起源研究领域重点探究的课题. 赵玉芬等<sup>[11,12]</sup>从蛋白质起源与进化的角度出发, 以*N*-磷酸化氨基酸作为模型底物, 对其化学性质进行了深入、系统的研究. 实验发现, *N*-二烷氧基磷酸化氨基酸(NDAPAA)酸在温和条件下, 能够产生核苷酸和寡肽<sup>[13]</sup>, 因而提出了蛋白-核酸共同起源的理论(图1). 通过硅醚衍生法, 成功捕获了*N*-磷酸化氨基酸反应经历的五配位磷中间体(P<sub>5</sub>-CAPA1)<sup>[14]</sup>. *N*-单烷氧基磷酸化氨基酸和*N*-磷酸化



**图1** *N*-磷酸化氨基酸介导的多肽和核酸生成. *N*-二烷氧基磷酸化氨基酸(NDAPAA)自活化得到环状中间体(P<sub>5</sub>-CAPA1), 进而与核苷或氨基酸反应分别生成二核苷酸或二肽. P<sub>3</sub>m与氨基酸反应可以产生环状的氨基酸-磷酸混酐中间体(CAPA), CAPA可以与醇反应经开环、关环得到P<sub>5</sub>-CAPA2, 并可以进一步与氨基酸反应得到二肽. 反应可以继续延伸产生寡聚核酸和多肽

**Figure 1** The formation of peptides and nucleic acids mediated by *N*-phosphoryl amino acids. *N*-dialkylphosphoryl amino acids (NDAPAA) could be self-activated to form circular intermediates (P<sub>5</sub>-CAPA1) which can react with nucleosides or amino acids to generate dinucleotides or dipeptides, respectively. The reaction of P<sub>3</sub>m with amino acid can produce cyclic amino acid-phosphoric anhydride intermediate (CAPA). CAPA can react with alcohol to give P<sub>5</sub>-CAPA2 through ring opening and ring closing, and can further react with amino acid to synthesize dipeptide. The reaction can be extended to produce oligonucleic acids and polypeptides.

氨基酸也可以进行成肽反应<sup>[15,16]</sup>, 且经历类似的环状的氨基酸-磷酸混酐中间体. 此外, N-磷酸化氨基酸可以在早期地球上通过氨基酸与高能化合物(如火山口存在的P<sub>3</sub>m和DAP等)的反应生成<sup>[17,18]</sup>. 但是, β-氨基酸、γ-氨基酸却不能发生类似的反应, 并且只有磷酸盐能够活化α-氨基酸, 而硫酸盐和碳酸盐则不能起作用. 这表明可能是磷元素选择了α-氨基酸向今天的蛋白质进化. 此外, 研究还发现 N-磷酸化丝氨酸与组氨酸在温和条件下可以产生丝组二肽, 这种二肽能够切割磷酸二酯键(DNA、RNA)<sup>[19,20]</sup>、羧酸二酯键以及酰胺键<sup>[21]</sup>, 可以作为水解酶的原始雏形<sup>[19]</sup>. 之后, 其他研究组还发现丝组二肽可以催化肽键<sup>[22,23]</sup>及磷酸二酯键<sup>[24]</sup>的生成, 因此, 丝组二肽还可能是原始的连接酶.

### 3 N-磷酸化氨基酸与磷转移

在现代生命体中, 磷存在于多种重要的生物分子中, 如遗传信息的载体DNA和RNA、生物膜的主要成分磷脂分子、参与信号转导的磷酸化蛋白等. 在这些相关化合物中, 磷上都连接至少一个氧负离子, 这使得其被静电保护而免受亲核攻击, 在一般条件下非常稳定, 这种保护在地球漫长的进化过程中极其重要. 然而, 当生命有序组织起来后, 这种静电保护可以在酶的活性中心被有效屏蔽, 使磷对特定位置的亲核试剂具有高度反应性<sup>[6]</sup>. 因此, 针对模拟酶催化的磷转移过程, NDAPAA是一个比较接近的模型. 通过高能磷试剂(如磷酰氯、氢磷烷)与氨基酸反应制备得到这类化合物(path a). 实验表明, NDAPAA可以发生多种磷转移反应(图2), 如通过酯交换得到P-O键(path b)<sup>[25]</sup>, 通过开环和与羧酸反应得到P-OCO键(path d, e). 此外, N-磷酸化丝氨酸十分活跃, 极易发生分子内的N→O转位(path c)<sup>[26]</sup>, 类似地也可以发生N→S磷酰基迁移<sup>[27]</sup>. 这与当今激酶催化的多种磷酸化过程有相似之处: 高能P-X化合物对应ATP, N-磷酸化氨基酸对应激酶, path b-e对应各种底物磷酸化过程(O-、N-、S-和酰基-磷酸化). 因此, N-磷酸化氨基酸可能是生物体中激酶的雏形, 可称为“微型激酶”.

### 4 激酶的磷转移过程

激酶(kinase)是一类磷转移酶(phosphotransferase),

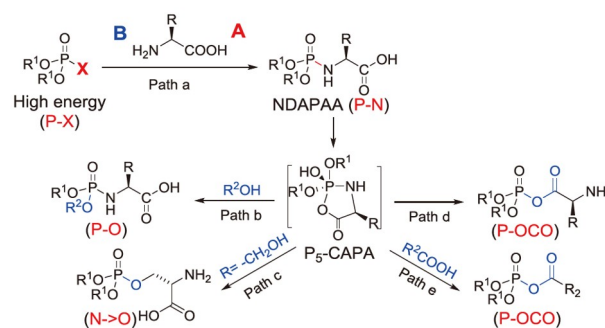


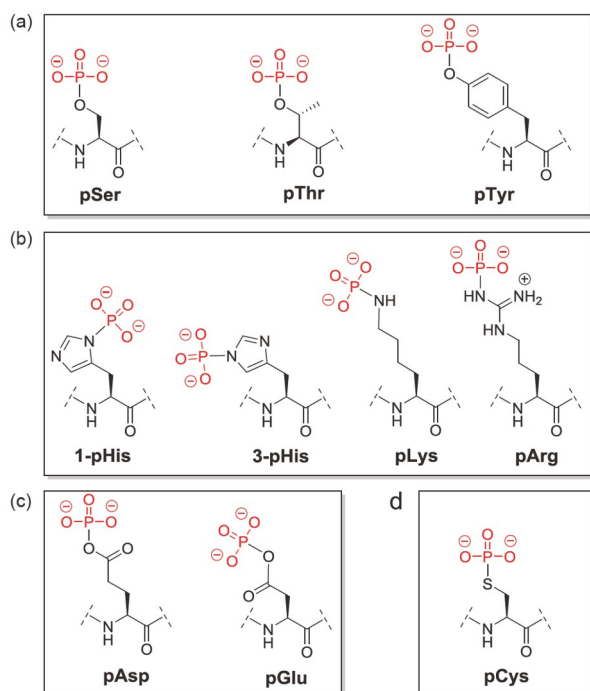
图2 N-磷酸化氨基酸介导的磷转移类型. Path a: 高能P-X键转移到P-N键; path b: 通过酯交换, 从P-N键转移到P-O键; path c: 通过N→O转位, 从P-N键转移到P-O键; path d: 通过开环, 从P-N键转移到P-OCO键; path e: 通过与羧酸反应, 从P-N键转移到P-OCO键. A: Acidic (酸性基团); B: Basic (碱性基团)(网络版彩图)

Figure 2 Phosphotransfer Types mediated by N-phosphoryl amino acids. Path a: high-energy P-X bond transfers to P-N bond; path b: transfer from P-N bond to P-O bond via transesterification; path c: transfer from P-N bond to P-O bond by N→O transposition; path d: transfer from P-N bond to P-OCO bond through ring open. path e: transfer from P-N bond to P-OCO bond by reaction with carboxylic acid. A: acidic group; B: basic group (color online).

催化ATP上的γ-磷酸根转移到底物杂原子上. 根据底物不同, 可以分为蛋白激酶和小分子激酶两大类. 蛋白质磷酸化可发生在9种氨基酸残基上(图3), 其中发生在丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸上的磷酸化因磷酸基团与氧原子直接相连, 被称为O-磷酸化, 发生在组氨酸、赖氨酸和精氨酸上的磷酸化因磷酸基团与氮原子直接相连, 被称为N-磷酸化, 发生在天冬氨酸和谷氨酸的磷酸化被称为酰基磷酸化, 而半胱氨酸磷酸化被称为S-磷酸化. 哺乳动物细胞中大约有2/3的蛋白质可以被磷酸化修饰, 主要参与信号转导, 调控许多重要的生理过程, 如神经活动、肌肉收缩和细胞增殖分化等, 同时与包括肿瘤发生的多种疾病相关. 小分子激酶主要催化包括糖、脂质、核苷酸等的磷酸化, 主要涉及细胞的新陈代谢途径. 下面主要对几种研究相对较多的激酶磷转移过程进行介绍. 由于我们专注于磷转移过程, 特别关注激酶催化中心与ATP的γ-磷酸根以及底物磷受体基团有相互作用的氨基酸残基, 因此下述模型只讨论这类氨基酸残基.

#### 4.1 N-磷酸化激酶的磷转移过程

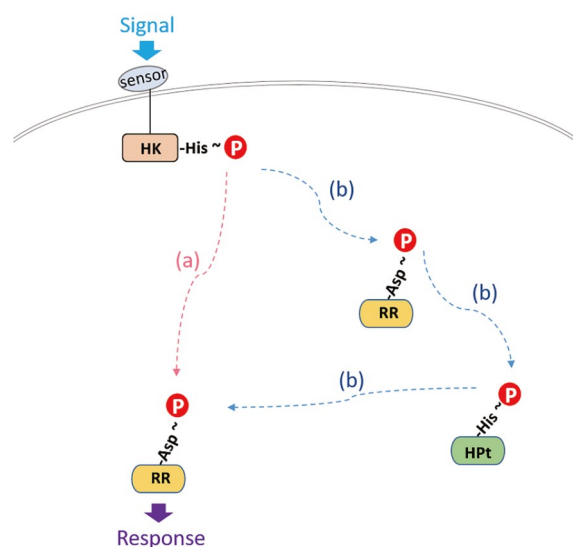
双组分系统(TCS)是细菌感应并响应外界复杂环境最为重要的应激信号传导系统<sup>[28]</sup>, 几乎存在于所有基因组已测序的细菌中, 且在生命的进化中高度保



**图 3** 蛋白上的磷酸化类型. (a) *O*-磷酸化, 发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的侧链羟基上; (b) *N*-磷酸化, 发生在组氨酸、赖氨酸和精氨酸的侧链咪唑基、氨基和胍基上; (c) 酰基-磷酸化, 发生在天冬氨酸和谷氨酸的侧链羧基上; (d) *S*-磷酸化, 发生在半胱氨酸的侧链巯基上(网络版彩图)

**Figure 3** Types of phosphorylation on proteins. (a) *O*-phosphorylation, occurring on the side chain hydroxyl groups of serine, threonine, and tyrosine; (b) *N*-phosphorylation, occurring on the side chain imidazolyl group of histidine, amino group of lysine, and guanidine group of arginine; (c) acyl-phosphorylation, occurring on the side chain carboxyl groups of aspartic acid and glutamic acid; (d) *S*-phosphorylation, occurring on the side chain sulfhydryl group of cysteine (color online).

守<sup>[29]</sup>. 除细菌外, TCS还存在于古菌、真菌和植物中. TCS一般由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)与应答调控蛋白(response regulator, RR)构成, 两者之间通过磷酸化进行信号传递. TCS包括两种类型(图4): 一种是经典的一步磷转移信号传导模式(磷酸基团从HK直接传递给RR), 另一种是级联的磷转移模式(phosphorelay). 级联磷转移过程除涉及典型的RR, 一般还包括杂合的组氨酸激酶(hybrid histidine kinase)、孤立的组氨酸磷转移单元(histidine phosphotransfer domain, HPT)或(和)单一的N端接收域(receiver domain, REC)结构域, 信号传递过程一般遵循His-Asp-His-Asp路径<sup>[30,31]</sup>. HK由传感域(sensor)、跨膜区、二聚和组氨酸磷转移结构域(dimerization and histidine phosphotransfer, DHp)和催化结构域(catalytic domain, CA)组成. RR由两部分组

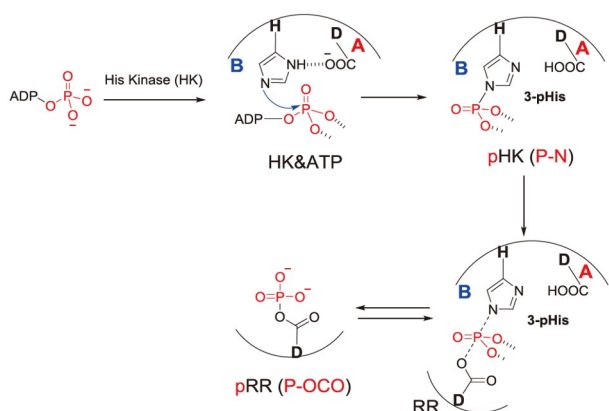


**图 4** (a) 典型的TCS磷转移(phosphorelay)模式: 磷酸基团从HK直接传递给RR; (b) 级联磷转移模式: 磷酸基团从HK经多步传递到RR, 中间经历RR、HK或HPT等接力传递步骤(网络版彩图)

**Figure 4** (a) Typical TCS phosphorelay pattern: phosphate group is transferred directly from HK to RR; (b) cascade phosphotransfer pattern: phosphate group is transferred from HK to RR with relay (s) by RR, HK or HPT (color online).

分, 即保守的REC与多变的C端效应域. 根据效应域产生响应的性质, 可将RR超家族分为五类, 其中70% RR含有DNA结合域而常作为转录因子, 如已被广泛研究的OmpR、NarI和LytR等; 而仅有1% RR含有RNA结合域, 如AmiR. 另外, 17%为单一REC结构域, 如趋化因子CheY与Spo0F, 13% RR具有酶活, 3% RR可与其他蛋白结合<sup>[32]</sup>. 当响应域接收外界刺激信号时, HK发生组氨酸自磷酸化, 随后HK将组氨酸His上的磷酸基转移至RR的REC上的天冬氨酸Asp形成pREC. 该磷酸化作为开关控制效应域的功能.

大量研究表明, HK催化中心的关键残基及作用如图5所示, 谷氨酸与组氨酸咪唑的1位N形成氢键, 使3位N的亲核性增强, 从而进攻ATP生成3-位磷酸化组氨酸<sup>[33-35]</sup>. HK自磷酸化后, 该磷酸化组氨酸可以转移到调控蛋白的天冬氨酸上, 这种磷酸基团从P-N键到P-OCO键的转移过程是自发进行的. 有研究表明, 在级联磷转移过程中, 组氨酸和天冬氨酸可能与磷酸根形成了一种非解离式的中间体<sup>[36,37]</sup>, 即五配位磷的过渡态. 因此, 磷也可以可逆地从天冬氨酸转移回到组氨酸.

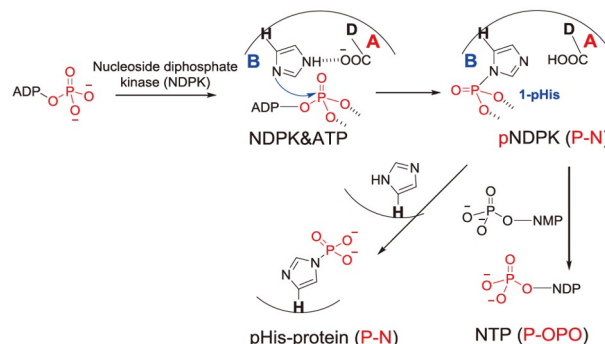


**图 5** 两组分系统中组氨酸激酶(HK)和调控蛋白(RR)之间的磷转移过程。在天冬氨酸的活化下, HK催化中心的组氨酸可以进攻ATP的 $\gamma$ -磷酸基而发生磷酸化修饰, 该磷酸基团可以进一步传递到RR的天冬氨酸上, 而天冬氨酸的磷酸根也可以传递给HK或HPT上的组氨酸。A: Acidic(酸性基团); B: Basic(碱性基团) (网络版彩图)

**Figure 5** Phosphotransfer between histidine kinase (HK) and regulatory protein (RR) in a two-component system. Under the activation of aspartic acid, the histidine in the catalytic center of HK can attack the  $\gamma$ -phosphate group of ATP and be phosphorylated. The phosphate group can be further transferred to the aspartic acid of RR, and the phosphate on aspartic acid can also be transferred to the histidine on HK or HPT. A: acidic group; B: basic group (color online).

尽管TCS在更高等真核生物中尚未发现, 蛋白组氨酸的磷酸化已被发现广泛存在于哺乳动物细胞中<sup>[38]</sup>, 且已发现核苷二磷酸激酶家族中的两个成员NDPK-A和NDPK-B具有蛋白组氨酸激酶的功能<sup>[39]</sup>。NDPK酶的催化机理与HK有一定的相似性, 但其有自磷酸化功能, 先将磷加到自身咪唑的1位N原子, 进而将磷传到小分子底物核苷二磷酸NDP或者底物蛋白的组氨酸的咪唑上<sup>[40]</sup>(图6)。

在生物体中, 包括精氨酸、肌酸、乙酸胍、脒基牛磺酸、蚯蚓磷脂和亚牛磺酰胺在内的多种含胍基的小分子均可以被磷酸化, 这类磷酸化小分子统称为磷酸原。其中磷酸化精氨酸和磷酸肌酸主要分别存在于无脊椎动物和脊椎动物中, 是功能类似的、重要的能量分子, 可以互补缓冲ATP的浓度, 帮助维持需要高能量供应的组织内(如肌肉)的能量稳态<sup>[41]</sup>。负责催化精氨酸和肌酸磷酸化的激酶称为精氨酸激酶(arginine kinase, AK)和肌酸激酶(creatine kinase, CK)。其中肌酸激酶是在骨骼肌疾病及心肌疾病中常用的诊断标志物。序列分析表明, 所有胍基小分子激酶都由同一个祖先进化而来, 从系统发育学可分为AK (只有精氨酸)和



**图 6** 核苷二磷酸激酶NDPK催化的底物磷酸化过程。NDPK首先将ATP的 $\gamma$ -磷酸基转移到自身组氨酸上, 进而可以将其传递到底物蛋白的组氨酸或者小分子核苷二磷酸。A: Acidic (酸性基团); B: Basic (碱性基团) (网络版彩图)

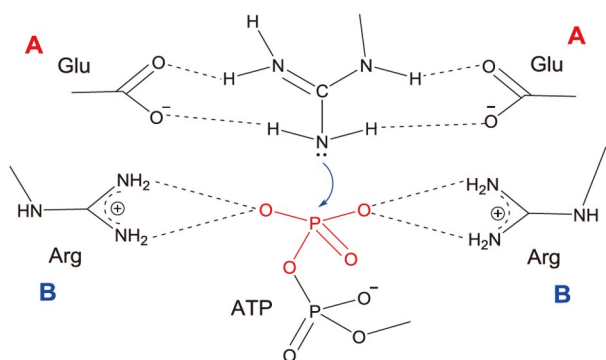
**Figure 6** Substrate phosphorylation catalyzed by nucleoside diphosphate kinase (NDPK). NDPK first transfers the  $\gamma$ -phosphate group of ATP to its own histidine, which can then be delivered to the histidine of the substrate protein or small molecule nucleoside diphosphate. A: acidic group; B: basic group (color online).

CK (包括肌酸和其他小分子)两类<sup>[42]</sup>。

磷酸原激酶(phosphagen kinases, PhKs)的催化机制主要依赖于一组适当排列的带正电荷和负电荷的残基对ATP的 $\gamma$ -磷酸化基团和底物胍基进行精确的立体电子导向<sup>[43,44]</sup>。关键残基包括与ATP的 $\beta$ -和 $\gamma$ -磷酸基配位的5个精氨酸残基、与底物的胍基作用的两个谷氨酸残基和一个半胱氨酸残基。2019年, 基于蛋白精氨酸激酶McsB的晶体结构, 研究人员解析了其催化机理<sup>[45]</sup>。结果表明, 尽管McsB和PhKs的整体系列相似性低, 但其催化中心的8个关键氨基酸残基结构取向保守。局部磷转移部分的精细作用模式如图7所示: 激酶的两个精氨酸和ATP的 $\gamma$ -磷酸基作用, 一般认为是起到中和电荷的作用; 激酶的两个谷氨酸与底物胍基形成盐桥, 起到定位和碱催化的作用。当前认为该磷酸化过程为胍基直接进攻 $\gamma$ -磷酸基形成P-N键。蛋白质谱的证据表明, 枯草芽孢杆菌McsB的其中一个精氨酸Arg29可以被自磷酸化, 由于该位点处于催化中心而不是溶剂可及区, 因此该磷酸化过程应该是分子内发生的, 暗示底物胍基的磷酸化也可能是由激酶自身磷酸化中间体(P-N或P-OCO)传递而来的。

## 4.2 O-磷酸化激酶的磷转移过程

生命体中, 可以接受磷的羟基包括两大类: 小分子, 主要是碳水化合物及其衍生物(如葡萄糖、核糖、甘油、丙酮酸、肌醇等)和蛋白上氨基酸残基(丝氨

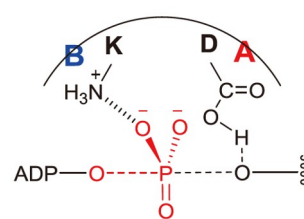


**图 7** 胍基激酶催化的磷转移的局部作用模式图。激酶的2个精氨酸与ATP的 $\gamma$ -磷酸基作用、2个谷氨酸与底物胍基作用, 达到中和电荷和精准导向的作用。A: Acidic (酸性基团); B: Basic (碱性基团) (网络版彩图)

**Figure 7** Local diagram of phosphotransfer action mode catalyzed by guanidine kinase. The two arginines of the kinase interact with the  $\gamma$ -phosphate group of ATP and the two glutamic acids interact with the guanidine group of substrate molecule to achieve charge neutralization and precise alignment. A: acidic group; B: basic group (color online).

酸、苏氨酸和酪氨酸)。蛋白O-磷酸化的丰度非常高, 特别是在真核细胞中。约50%的人类蛋白至少会发生一次磷酸化, 约30%蛋白在任何给定时间都保持着磷酸化修饰。对人类癌细胞系进行的磷酸化蛋白质组学研究显示, 有75%的蛋白质发生了O-磷酸化修饰<sup>[46]</sup>。哺乳动物细胞中, 大约有2/3的蛋白质可以被磷酸化修饰, 这些磷酸化修饰的蛋白参与信号转导, 调控许多重要的生理过程, 如神经活动、肌肉收缩和细胞增殖分化等, 同时与包括肿瘤发生的多种疾病相关。因揭示丝氨酸磷酸化参与糖代谢调控而开创了“蛋白可逆磷酸化”研究领域, Krebs和Fischer分享了1992年的诺贝尔生理学 and 医学奖。

已有大量研究表明, 羟基激酶的催化中心是十分保守的, 在直接参与磷转移的区域, 分别需要一个酸性和一个碱性氨基酸残基。其中丝氨酸/苏氨酸激酶采用活性中心为赖氨酸和天冬氨酸, 而酪氨酸激酶使用则是精氨酸和天冬氨酸。在所有O-磷酸化激酶中, 蛋白丝氨酸激酶PKA的催化亚基受到广泛、深入的研究。一些计算化学的研究提出了“乒乓”机理<sup>[47,48]</sup>: 天冬氨酸作为一个质子抓取者, 使得丝氨酸上的氧负进攻ATP上的磷, 最后ATP上 $\gamma$ -磷酸基会转移到受体蛋白的丝氨酸残基上。在整个过程中, 赖氨酸只是起着辅助ATP和接近底物的作用, 中间有五配位过渡态的形成(图8)。



**图 8** “乒乓”模型磷酸根转移过渡态。天冬氨酸接受底物羟基质子氢后, 氧阴离子进攻ATP上的 $\gamma$ -磷酸基, 形成五配位过渡态。赖氨酸中和磷酸根负电荷。A: Acidic (酸性基团); B: Basic (碱性基团) (网络版彩图)

**Figure 8** Phosphotransfer transition state of Ping-Pong model. After aspartic acid accepts the hydroxyl proton hydrogen of the substrate, the oxygen anion attacks the  $\gamma$ -phosphate group of ATP to form a penta-coordinated transition state. Lysine neutralizes the negative charge of phosphate. A: acidic group; B: basic group (color online).

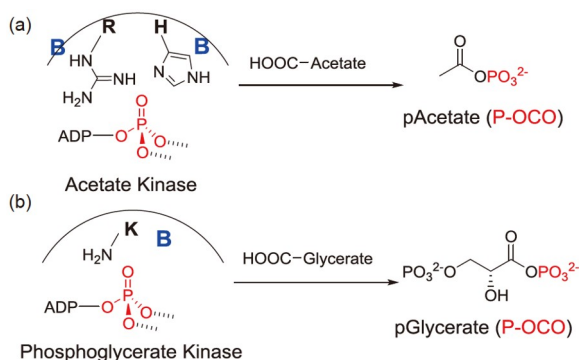
### 4.3 酰基磷酸化激酶的磷转移过程

在生物体中, 已知多种含羧基的小分子可以被磷酸化, 包括醋酸、丙酸、丁酸和甘油磷酸等。此外, 多种不同种类的蛋白上的酸性氨基酸的侧链羧基也可以发生磷酸化, 包括TCS的响应蛋白RR、ATP酶、磷酸异构酶和羧酸激酶等。

醋酸激酶和甘油酸磷酸激酶的催化机理相对比较清楚。醋酸激酶于1944年发现<sup>[49]</sup>, 是已知的最早的磷酸化转移酶之一。长期以来, 关于其催化机理提出了两种猜想: (1) ATP的 $\gamma$ -磷酸基直接在线转移到醋酸酯<sup>[50,51]</sup>; (2) 涉及两个共价磷酸中间产物的三重置换机制<sup>[52]</sup>。2005年, Gorrell等<sup>[53]</sup>解析了酶与底物和ATP类似物(ADP,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{F}^-$ )的共晶结构, 表明ADP- $\text{Al}_3\text{F}$ -醋酸呈线性排列。该结构还显示, 在底物及 $\gamma$ -磷酸根附近, 精氨酸和组氨酸起了关键作用(图9a)。甘油酸磷酸激酶也解析了共晶结构, 提出了类似的催化机理, 且显示其催化中心的一个赖氨酸在磷转移过程中有重要作用(图9b)。

综合各类激酶催化中心的关键氨基酸可以发现(表1), 除了含羧酸根底物的激酶外, 其他激酶的催化中心都有酸性和碱性氨基酸作为维持催化活性的关键氨基酸。其中特别值得注意的是, 在TCS的第二步过程中, P-N键可以转位为P-COO键, 其羧酸激酶的催化中心只需要碱性氨基酸的参与。此外, 在葡萄糖磷酸化的异构酶中, 观察到P-COO直接转位到P-O键的中间体<sup>[3]</sup>。

因此, 在激酶催化中心的酸性和碱性氨基酸有可



**图 9** (a) 醋酸激酶和(b) 甘油酸磷酸激酶催化的磷转移过程. 醋酸激酶的催化口袋中与磷转移直接相关的关键氨基酸为精氨酸和组氨酸, 甘油酸磷酸激酶的为赖氨酸, 没有酸性氨基酸的参与. B: Basic (碱性基团) (网络版彩图)

**Figure 9** Phosphotransfer processes catalyzed by (a) acetate kinase and (b) glycerate phosphokinase. The key amino acids directly related to phosphotransfer in the catalytic pocket of acetate kinase are arginine and histidine, whereas lysine for glycolate phosphokinase, both without the involvement of acid amino acids. B: basic group (color online).

**表 1** 激酶催化中心关键氨基酸<sup>a)</sup>

**Table 1** Key amino acids in kinase catalytic center<sup>a)</sup>

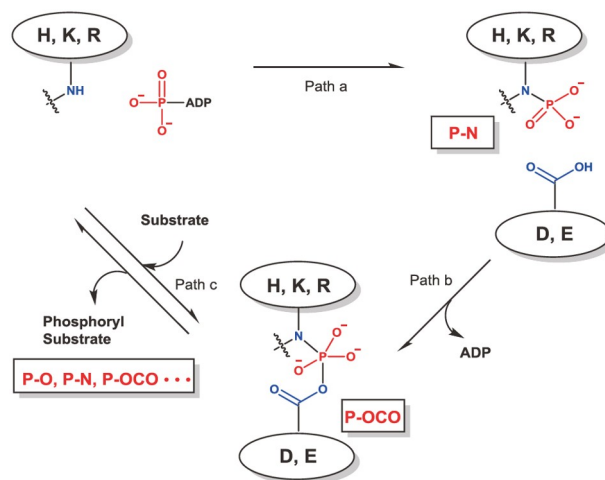
| 磷酸根受体 | 激酶            | 碱性(B)   | 酸性(A) |
|-------|---------------|---------|-------|
| 咪唑    | 原核组氨酸激酶(HK)   |         |       |
| 磷酸基   | 真核组氨酸激酶(NDPK) | His     | Glu   |
| 胍基    | 精氨酸激酶         |         |       |
|       | 肌酸激酶          | Arg     | Glu   |
|       | 蛋白精氨酸激酶       |         |       |
| 羧基    | 乙酸激酶          | Arg/His |       |
|       | 甘油磷酸激酶        | Lys     |       |
| 羟基    | 葡萄糖激酶         | Lys     | Asp   |
|       | 丝氨酸/苏氨酸激酶     | Lys     | Asp   |
|       | 酪氨酸激酶         | Arg     | Asp   |

a) <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>

能是以成键方式来参与ATP的磷转移. 其催化过程可能是以三步的“排球机理”来完成的, 具体如下: 激酶先将ATP的 $\gamma$ -磷酸基转移至活性中心的保守碱性氨基酸赖氨酸或精氨酸形成P-N键(path a), 进而转移至保守酸性氨基酸形成P-OCO键(path b), 最后磷再转至底物完成催化过程(path c) (图10). 这种激酶蛋白中的P-N键也存在于生命体中并发挥重要生物学功能.

## 5 生命体中的N-磷酸化

蛋白质N-磷酸化修饰已被证明是生命体内普遍存



**图 10** 基于P-N和P-OCO传递的激酶催化磷转移过程. Path a: ATP的高能磷酸酯键转移到P-N键; Path b: P-N键转移到P-OCO键; Path c: P-OCO键转移到底物(P-O, P-N, P-OCO键等)(网络版彩图)

**Figure 10** Kinase catalysed phosphotransfer process based on P-N and P-OCO transfer. Path a: high energy phosphoester bond of ATP transfers to P-N bond; Path b: P-N bond transfer to P-OCO bond. Path c: P-OCO bond transfer to substrate (P-O, P-N, P-OCO bond, etc.) (color online).

在的一种蛋白质磷酸化修饰形式, 且在生命的代谢调节过程中发挥着重要的生物学功能<sup>[54~59]</sup>. 2009年, Fuhrmann等<sup>[60]</sup>证实McsB作为枯草芽孢杆菌中的蛋白质精氨酸激酶可以使底物蛋白CtsR发生磷酸化以响应外界的热刺激, 是转录调控的“分子开关”. 蛋白质精氨酸激酶McsB介导的CtsR核酸结合结构域中的精氨酸(R62)磷酸化启动 $clpC$ 热休克操纵子以及 $clpE$ 和 $clpP$ 基因的转录以响应外界的热刺激. 此外, 蛋白质精氨酸磷酸化修饰也是枯草芽孢杆菌中蛋白质降解的标签<sup>[61]</sup>. 蛋白质精氨酸磷酸酶YwIE介导的去磷酸化修饰影响着一系列基因的转录, 从而调控着细胞的生长与代谢<sup>[62~65]</sup>. 在哺乳动物中, 蛋白质组氨酸激酶(NDPK-A/B)和磷酸酶(PHPT1、PGAM5和LHPP)介导的底物蛋白上组氨酸动态磷酸化修饰与细胞信号的传导、离子运输以及疾病密切相关<sup>[66~70]</sup>. 然而, 目前无论是原核生物还是真核生物中明确证实的N-磷酸化相关的激酶或磷酸酶种类较少(表2), 而一些鉴定到的具有激酶活性组分的具体信息也不明确, 如组蛋白激酶等<sup>[71,72]</sup>. 蛋白质精氨酸激酶(McsB)和磷酸酶(YwIE和PtpB)的研究目前主要集中在原核生物中, 真核生物中的蛋白质精氨酸激酶和磷酸酶均不明确. 而无论是真核生物还是原核生物中调控蛋白质赖氨酸磷酸化修饰的激酶和

表 2 蛋白质N-磷酸化激酶和磷酸酶<sup>a)</sup>  
Table 2 Kinases and phosphatases responsible for protein N-phosphorylation<sup>a)</sup>

| 类型   | 激酶           |                     | 磷酸酶          |                        |
|------|--------------|---------------------|--------------|------------------------|
|      | 原核           | 真核                  | 原核           | 真核                     |
| pHis | HKs<br>(TCS) | NME1<br>NME2<br>HHK | MapA<br>SixA | PHPT1<br>PGAM5<br>LHPP |
| pArg | McsB         | ?                   | YwlE<br>PtpB | ?                      |
| pLys | ?            | ?                   | ?            | ?                      |

a) ? 表示未知

磷酸酶均未见报道。激酶和磷酸酶信息的缺失严重阻碍了N-磷酸化研究的进展，因此，急需开发各类研究蛋白N-磷酸化的工具和分析方法。

6 总结与展望

磷酸化氨基酸在生物分子的前生命起源中扮演了关键角色，同时在磷转移过程中可以进行许多仿生化

反应，生成了包括N-磷酸化、S-磷酸化、酰基磷酸化等化合物。这些反应模拟了激酶催化的磷转移反应，特别是与TCS中涉及的P–N与P–OCO转移过程非常类似。总地来看，激酶的活性中心都有酸性和碱性氨基酸，是否激酶的磷转移过程普遍采用了与TCS类似的两步机理呢？这个机理的阐明过程，需要在非O-磷酸化领域方面进行深入研究，特别是N-磷酸化方向。尽管N-磷酸化领域已取得了可喜进展，但仍然亟需国内外多学科背景的科学家如化学家、生物学家和生物信息学家的通力合作。

O-磷酸化激酶是最重要的一类药物靶点之一。一方面，通过对机理的详细过程的进一步阐明，可能会对当前的激酶药物研究产生重要的影响，特别是在解决药物骨架有限和耐药性困境方面。另一方面，随着其他磷酸化形式的生物学功能的揭示、激酶酯酶以及磷酸化修饰位点的系统发现，可以为药物研发提供更多的探索方向，比如新靶点、新机制等。总之，非O-磷酸化特别是N-磷酸化研究领域有非常广阔的研究和应用前景。

致谢 感谢宁波大学王永教授对文稿撰写提出宝贵意见和修改建议。

参考文献

1 Duve DC. *Blueprint for a Cell: The Nature and Origin of Life*. Burlington: N. Patterson, 1991

2 Lad C, Williams NH, Wolfenden R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 5607–5610

3 Lahiri SD, Zhang G, Dunaway-Mariano D, Allen KN. *Science*, 2003, 299: 2067–2071

4 Westheimer FH. *Science*, 1987, 235: 1173–1178

5 Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Francesco VD, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang ZY, Wang A, Wang X, Wang J, Wei MH, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu SC, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratt E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B,

- Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooshep S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays AD, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. *Science*, 2001, 291: 1304–1351
- 6 Kamberlin SCL, Sharma PK, Prasad RB, Warshel A. *Quart Rev Biophys*, 2013, 46: 1–132
- 7 Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, Alpi E, Bowler-Barnett EH, Britto R, Bursteinas B, Bye-A-Jee H, Coetzee R, Cukura A, Da Silva A, Denny P, Dogan T, Ebenezer TG, Fan J, Castro LG, Garmiri P, Georghiou G, Gonzales L, Hatton-Ellis E, Hussein A, Ignatchenko A, Insana G, Ishtiaq R, Jokinen P, Joshi V, Jyothi D, Lock A, Lopez R, Luciani A, Luo J, Lussi Y, MacDougall A, Madeira F, Mahmoudy M, Menchi M, Mishra A, Moulang K, Nightingale A, Oliveira CS, Pundir S, Qi G, Raj S, Rice D, Lopez MR, Saidi R, Sampson J, Sawford T, Speretta E, Turner E, Tyagi N, Vasudev P, Volynkin V, Warner K, Watkins X, Zaru R, Zellner H, Bridge A, Poux S, Redaschi N, Aimo L, Argoud-Puy G, Auchincloss A, Axelsen K, Bansal P, Baratin D, Blatter MC, Bolleman J, Boutet E, Breuza L, Casals-Casas C, de Castro E, Echouk K, Coudert E, Cuhe B, Doche M, Dornevil D, Estreicher A, Famiglietti ML, Feuermann M, Gasteiger E, Gehant S, Gerritsen V, Gos A, Gruaz-Gumowski N, Hinz U, Hulo C, Hyka-Nouspikel N, Jungo F, Keller G, Kerhornou A, Lara V, Le Mercier P, Lieberherr D, Lombardot T, Martin X, Masson P, Morgat A, Neto TB, Paesano S, Pedruzzi I, Pilboud S, Pourcel L, Pozzato M, Pruess M, Rivoire C, Sigrist C, Sonesson K, Stutz A, Sundaram S, Tognolli M, Verbregue L, Wu CH, Arighi CN, Arminski L, Chen C, Chen Y, Garavelli JS, Huang H, Laiho K, McGarvey P, Natale DA, Ross K, Vinayaka CR, Wang Q, Wang Y, Yeh LS, Zhang J, Ruch P, Teodoro D. *Nucl Acids Res*, 2021, 49: D480–D489
- 8 Kitadai N, Maruyama S. *Geosci Front*, 2018, 9: 1117–1153
- 9 Miller SL. *Science*, 1953, 117: 528–529
- 10 Wang WQ, Kobayashi K, Ponnampereuma C. *Sci Bull*, 1985, 2: 281
- 11 Cheng CM, Liu XH, Li YM, Ma Y, Tan B, Wan R, Zhao YF. *Orig Life Evol Biosph*, 2004, 34: 455–464
- 12 Ni F, Fu C, Gao X, Liu Y, Xu P, Liu L, Lv Y, Fu S, Sun Y, Han D, Li Y, Zhao Y. *Sci China Chem*, 2015, 58: 374–382
- 13 Zhou W, Ju Y, Zhao Y, Wang Q, Luo G. *Origins Life Evol Biosphere*, 1996, 26: 547–560
- 14 Fu H, Li ZL, Zhao YF, Tu GZ. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 291–295
- 15 Gao X, Ni F, Bao J, Liu Y, Zhang Z, Xu P, Zhao Y. *J Mass Spectrom*, 2010, 45: 779–787
- 16 Ni F, Gao X, Zhao ZX, Huang C, Zhao YF. *Eur J Org Chem*, 2009, 2009: 3026–3035
- 17 Rabinowitz J, Flores J, Krebsbach R, Rogers G. *Nature*, 1969, 224: 795–796
- 18 Gibard C, Bhowmik S, Karki M, Kim EK, Krishnamurthy R. *Nat Chem*, 2018, 10: 212–217
- 19 Liu Y, Li Y, Gao X, Yu Y, Liu X, Ji Z, Ma Y, Li Y, Zhao Y. *Amino Acids*, 2018, 50: 69–77
- 20 Wan R, Wang N, Zhao G, Zhao YF. *Chem J Chin U*, 2000, 21: 1864–1866
- 21 Chen J, Wan R, Liu H, Cheng C, Zhao Y. *Lett Peptide Sci*, 2000, 7: 325–329
- 22 Gorlero M, Wiczorek R, Adamala K, Giorgi A, Schininà ME, Stano P, Luisi PL. *FEBS Lett*, 2009, 583: 153–156
- 23 Adamala K, Szostak JW. *Nat Chem*, 2013, 5: 495–501
- 24 Wiczorek R, Dörr M, Chotera A, Luisi PL, Monnard PA. *ChemBioChem*, 2013, 14: 217–223
- 25 Ma XB, Zhao YF. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem*, 1992, 66: 107–114
- 26 Xue CB, Yin YW, Zhao YF. *Tetrahedron Lett*, 1988, 29: 1145–1148
- 27 Yang HJ, Liu J, Zhao YF. *Int J Peptide Protein Res*, 1993, 42: 39–43
- 28 Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 183–215
- 29 Cock PJA, Whitworth DE. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 2355–2357
- 30 Jung K, Fried L, Behr S, Heermann R. *Curr Opin Microbiol*, 2012, 15: 118–124
- 31 Hoch JA. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3: 165–170
- 32 Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H. *J Mol Biol*, 2016, 428: 3752–3775
- 33 Mechaly AE, Sassoon N, Betton JM, Alzari PM. *PLoS Bio*, 2014, 12: e1001776

- 34 Marsico F, Burastero O, Defelipe LA, Lopez ED, Arrar M, Turjanski AG, Marti MA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498: 305–312
- 35 Casino P, Miguel-Romero L, Marina A. *Nat Commun*, 2014, 5: 1–12
- 36 Zapf J, Sen U, Madhusudan U, Hoch JA, Varughese KI. *Structure*, 2000, 8: 851–862
- 37 Varughese KI, Tsigelny I, Zhao H. *J Bacteriol*, 2006, 188: 4970–4977
- 38 Makwana MV, van Meurs S, Hounslow AM, Williamson MP, Jackson RF, Muimo R. *BioRxiv*, 2020, 409540
- 39 Attwood PV, Wieland T. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2015, 388: 153–160
- 40 Xu YW, Morera S, Janin J, Cherfils J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3579–3583
- 41 Newsholme EA, Beis I, Leech AR, Zammit VA. *Biochem J*, 1978, 172: 533–537
- 42 Uda K, Fujimoto N, Akiyama Y, Mizuta K, Tanaka K, Ellington WR, Suzuki T. *Comp Biochem Physiol Part D*, 2006, 1: 209–218
- 43 Li QJ, Fan S, Li XY, Jin YY, He WQ, Zhou JM, Cen S, Yang ZY. *Sci Rep*, 2016, 6: 1–10
- 44 Zhou G, Somasundaram T, Blanc E, Parthasarathy G, Ellington WR, Chapman MS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 8449–8454
- 45 Suskiewicz MJ, Hajdusits B, Beveridge R, Heuck A, Vu LD, Kurzbauer R, Hauer K, Thoeny V, Rumpel K, Mechtler K, Meinhardt A, Clausen T. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 510–518
- 46 Sharma K, D'Souza RCJ, Tyanova S, Schaab C, Wiśniewski JR, Cox J, Mann M. *Cell Rep*, 2014, 8: 1583–1594
- 47 Cheng Y, Zhang Y, McCammon JA. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 1553–1562
- 48 Valiev M, Kawai R, Adams JA, Weare JH. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 9926–9927
- 49 Lipmann F. *J Biol Chem*, 1944, 155: 55–70
- 50 Blattler WA, Knowles JR. *Biochemistry*, 1979, 18: 3927–3933
- 51 Bowman CM, Valdez RO, Nishimura JS. *J Biol Chem*, 1976, 251: 3117–3121
- 52 Spector LB. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 2626–2630
- 53 Gorrell A, Lawrence SH, Ferry JG. *J Biol Chem*, 2005, 280: 10731–10742
- 54 Schmidt A, Trentini DB, Spiess S, Fuhrmann J, Ammerer G, Mechtler K, Clausen T. *Mol Cell Proteom*, 2014, 13: 537–550
- 55 Prust N, van Breugel PC, Lemeer S. *Mol Cell Proteom*, 2022, 21: 100232
- 56 Fu S, Fu C, Zhou Q, Lin R, Ouyang H, Wang M, Sun Y, Liu Y, Zhao Y. *Sci China Chem*, 2020, 63: 341–346
- 57 Hu YC, Jiang B, Weng YJ, Sui ZG, Zhao BF, Chen YB, Liu LK, Wu Q, Liang Z, Zhang LY, Zhang YK. *Nat Commun*, 2020, 11: 1–12
- 58 Fuhs SR, Meisenhelder J, Aslanian A, Ma L, Zagorska A, Stankova M, Binnie A, Al-Obeidi F, Mauger J, Lemke G, Yates III JR, Hunter T. *Cell*, 2015, 162: 198–210
- 59 Fuhs SR, Hunter T. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 8–16
- 60 Fuhrmann J, Schmidt A, Spiess S, Lehner A, Turgay K, Mechtler K, Charpentier E, Clausen T. *Science*, 2009, 324: 1323–1327
- 61 Trentini DB, Suskiewicz MJ, Heuck A, Kurzbauer R, Deszcz L, Mechtler K, Clausen T. *Nature*, 2016, 539: 48–53
- 62 Elsholz AKW, Turgay K, Michalik S, Hessling B, Gronau K, Oertel D, Mäder U, Bernhardt J, Becher D, Hecker M, Gerth U. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 7451–7456
- 63 Fuhrmann J, Mierzwa B, Trentini DB, Spiess S, Lehner A, Charpentier E, Clausen T. *Cell Rep*, 2013, 3: 1832–1839
- 64 Zhou B, Semanjski M, Orlovetskie N, Bhattacharya S, Alon S, Argaman L, Jarrous N, Zhang Y, Macek B, Sinai L, Ben-Yehuda S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 14228–14237
- 65 Ogura M. *Front Microbiol*, 2020, 11: 590828
- 66 Panda S, Srivastava S, Li Z, Vaeth M, Fuhs SR, Hunter T, Skolnik EY. *Mol Cell*, 2016, 63: 457–469
- 67 Hindupur SK, Colombi M, Fuhs SR, Matter MS, Guri Y, Adam K, Cornu M, Piscuoglio S, Ng CKY, Betz C, Liko D, Quagliata L, Moes S, Jenoe P, Terracciano LM, Heim MH, Hunter T, Hall MN. *Nature*, 2018, 555: 678–682
- 68 Cai XJ, Srivastava S, Surindran S, Li Z, Skolnik EY. *Mol Bio Cell*, 2014, 25: 1244–1250
- 69 Gong H, Fan Z, Yi D, Chen J, Li Z, Guo R, Wang C, Fang W, Liu S. *J Mol Hist*, 2020, 51: 573–581
- 70 Linder M, Liko D, Kancherla V, Piscuoglio S, Hall MN. *BioRxiv*, 2020, PPR224384
- 71 Smith DL, Bruegger BB, Halpern RM, Smith RA. *Nature*, 1973, 246: 103–104
- 72 Smith DL, Chen CC, Bruegger BB, Holtz SL, Halpern RM, Smith RA. *Biochemistry*, 1974, 13: 3780–3785

## Exploration of kinase phosphotransfer mechanism based on N-phosphoryl amino acids

Songsen Fu<sup>1</sup>, Fulai Li<sup>1</sup>, Biling Huang<sup>1</sup>, Huahuan Cai<sup>1</sup>, Feng Ni<sup>1</sup>, Jianxi Ying<sup>1</sup>, Yan Liu<sup>2</sup>, Chuan Fu<sup>2</sup>, Xiang Gao<sup>3</sup>, Yanmei Li<sup>4</sup>, Yufen Zhao<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Drug Discovery Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China

<sup>2</sup> College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

<sup>3</sup> School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China

<sup>4</sup> Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China

\*Corresponding author (email: [zhaoyufen@nbu.edu.cn](mailto:zhaoyufen@nbu.edu.cn))

**Abstract:** Multiple phosphotransfer reactions can occur on N-phosphoryl  $\alpha$ -amino acids, and only  $\alpha$ -amino acids can be activated by phosphorylation. In today's living systems, the transfer of phosphorus still plays a dominant role in the information transmission. In prokaryotes, two-component system (TCS) is the most important signaling system for bacteria to sense and response the complex external environment. The molecular basis is that the phosphates delivered from histidine of histidine kinase (P–N bond) to aspartate of regulatory proteins (P–OCO bond). In higher organisms,  $\gamma$ -phosphate of ATP is transferred to the hydroxyl group of the substrate protein (P–O bond) *via* a kinase with highly conserved acidic and basic amino acids in its catalytic center. If N-phosphoryl amino acids are miniature models of TCS, do kinases of higher organisms utilize a phosphotransfer mechanism similar to TCS? This review summarizes the phosphotransfer processes mediated by N-phosphoryl  $\alpha$ -amino acids and kinases, discussing the possibility of the N-phosphoryl amino acid model as a “molecular fossil” of today's phosphotransfer system, and hopes to provide new insights for the kinase catalytic mechanism and kinase development based on new drugs.

**Keywords:** N-phosphoryl amino acids, kinase, phosphotransfer, two-component systems

**doi:** [10.1360/SSC-2022-0208](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0208)