

·综述·

多聚磷酸相关蛋白结构及生物学功能

黄金玲^{1),2)}, 魏 峥^{1),2)}, 于常海^{1),2),3),4)}*

(¹⁾北京大学神经科学研究所,北京大学基础医学院神经生物学系,北京 100191; (²⁾教育部/国家卫生和计划生育委员会神经科学重点实验室,北京 100191; (³⁾北京大学感染病中心,北京 100191; (⁴⁾北京大学系统生物医学研究所转化医学研究室,北京 100191)

摘要 多聚磷酸(polyphosphate, polyP)是由几个到数百个磷酸基通过高能磷酸酐键连接而成的链状多聚体,存在于所有细胞生物中.多聚磷酸相关蛋白包括多聚磷酸相关酶和多聚磷酸结合蛋白.多聚磷酸相关酶如多聚磷酸激酶(polyphosphate kinase, PPK)催化 polyP_n生成 polyP_{n+1}的可逆反应;外切聚磷酸酶(exopolyphosphatase, PPX)、内切聚磷酸酶(endopolyphosphatase, PPN)能将 polyP 水解成磷酸残基;多聚磷酸依赖的激酶将 polyP 的磷转移到生物小分子上,如葡萄糖和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD),使其分别磷酸化为 6-磷酸葡萄糖和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP).多聚磷酸结合蛋白可与多聚磷酸结合,发挥各种生物学功能.本文将简要介绍多聚磷酸相关蛋白的结构与主要生物学功能,以阐述多聚磷酸参与的细胞内生化过程.

关键词 多聚磷酸;多聚磷酸相关蛋白;能量代谢;磷酸化

中图分类号 Q71

The Structure and Biological Function of Polyphosphate-related Proteins

HUANG Jin-Ling^{1),2)}, WEI Zheng^{1),2)}, YU Albert Cheung-Hoi^{1),2),3),4)}*

(¹⁾Neuroscience Research Institute & Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; (²⁾Key Laboratory for Neuroscience, Ministry of Education/National Health and Family Planning Commission, Peking University, Beijing 100191, China; (³⁾Infectious Diseases Center, Peking University, Beijing 100191, China; (⁴⁾Laboratory of Translational Medicine, Institute of Systems Biomedicine, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Polyphosphate (polyP), comprising several to hundreds of phosphate (P_i) residues linked by phosphoanhydride bonds, the same type of bond that links the phosphates in ATP, has been found in every cell examined, from bacteria to mammals. PolyP-related proteins include polyP-related enzymes and polyP-binding proteins. PolyP-related enzymes, such as polyP kinase (PPK) which catalyzes the reversible synthesis of polyP from the terminal phosphate of ATP, and exopolyphosphatase (PPX) and endopolyphosphatase (PPN) which hydrolyze polyP to shorter chains or P_i, have been identified in a variety of micro-organisms. PolyP-dependent kinases that transfer a phosphate from polyP to small molecules such as glucose and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) have also been described. PolyP-binding proteins bind polyP and exert many physiological effects. We speculate on the roles of polyP in biological process are to understand the structures and biological functions of polyP-related proteins.

Key words polyphosphate; polyphosphate-related protein; energy metabolism; phosphorylation

收稿日期: 2013-07-10; 接受日期: 2013-09-11

国家重点基础研究发展计划(973 计划, No. 2011CB504400), 国家自然科学基金项目(No. 31070974, No. 31171009, No. 81221002), 高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20100001110054)

* 联系人 Tel: 010-82805813; Fax: 010-82805188; E-mail: achy@hsc.pku.edu.cn

Received: July 10, 2013; Accepted: September 11, 2013

Supported by Major State Basic Research Development Program of China (973 program, No. 2011CB504400) and National Natural Science Foundation of China (No. 31070974, No. 31171009, No. 81221002), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20100001110054)

* Corresponding author Tel: 010-82805813; Fax: 010-82805188; E-mail: achy@hsc.pku.edu.cn

组成生命体的 6 种基本元素中,磷元素的研究较少. 磷酸(包括磷酸酯和磷酸盐等)是所有生命体及细胞内生化过程所必需的,特别是在能量代谢和信号转导过程中尤为重要. 磷酸的聚体形式多聚磷酸(*polyphosphate*, PolyP),于 1888 年发现,含有几个至数百个正磷酸残基通过高能磷酸苷键相连形成直链^[1]. 在无机环境及细菌、真菌、原虫到植物、哺乳动物在内的有机生命体内都存在着 polyP. 研究显示,细菌内的 polyP 能够有效地抵抗恶劣环境,触发保护性严谨反应(*stringent response*),促进生物膜形成,参与微生物掠夺行为和细菌毒力的构成. 此外, polyP 还是钙离子的重要结合分子,参与调控细胞内钙离子的贮存和释放. 直到 1995 年, polyP 存在于哺乳动物细胞内才得到证实^[2]. 此后, polyP 在高等生物中发挥生理功能的角色不断被揭示,例如脊椎动物骨骼矿化过程^[3,4]、肠道稳态的维持^[5]、凝血调节^[6,7]和神经系统内 P2 受体的拮

抗剂^[8]等. 除此之外, polyP 被报道可能与某些人类疾病发生发展的细胞内环境有关,例如肿瘤细胞增殖^[9,10]、转移侵袭的阻断^[11]、心肌坏死和神经退变过程^[12-14],以及因线粒体功能异常所致的能量缺乏^[15-18].

目前,在低等生物中研究较多的多聚磷酸相关蛋白,大多在高等生物中找不到同源的基因,这为 polyP 在高等生物中的研究带来了困难. 目前研究发现, polyP 相关蛋白(Fig. 1)主要包括 polyP 相关酶和 polyP 结合蛋白. polyP 相关酶包括 3 类:多聚磷酸激酶类,多聚磷酸酶类和多聚磷酸依赖的激酶类(Table 1). 而 polyP 结合蛋白中除了碱性成纤维细胞生长因子和凝血酶等,其它大都存在于低等生物. 本文将从与 polyP 存在相互作用的蛋白质和代谢酶出发,围绕 polyP 参与细胞内磷和能量贮存库以及结合多聚磷酸的分子机制,阐明 polyP 参与的细胞内生化过程和研究意义.

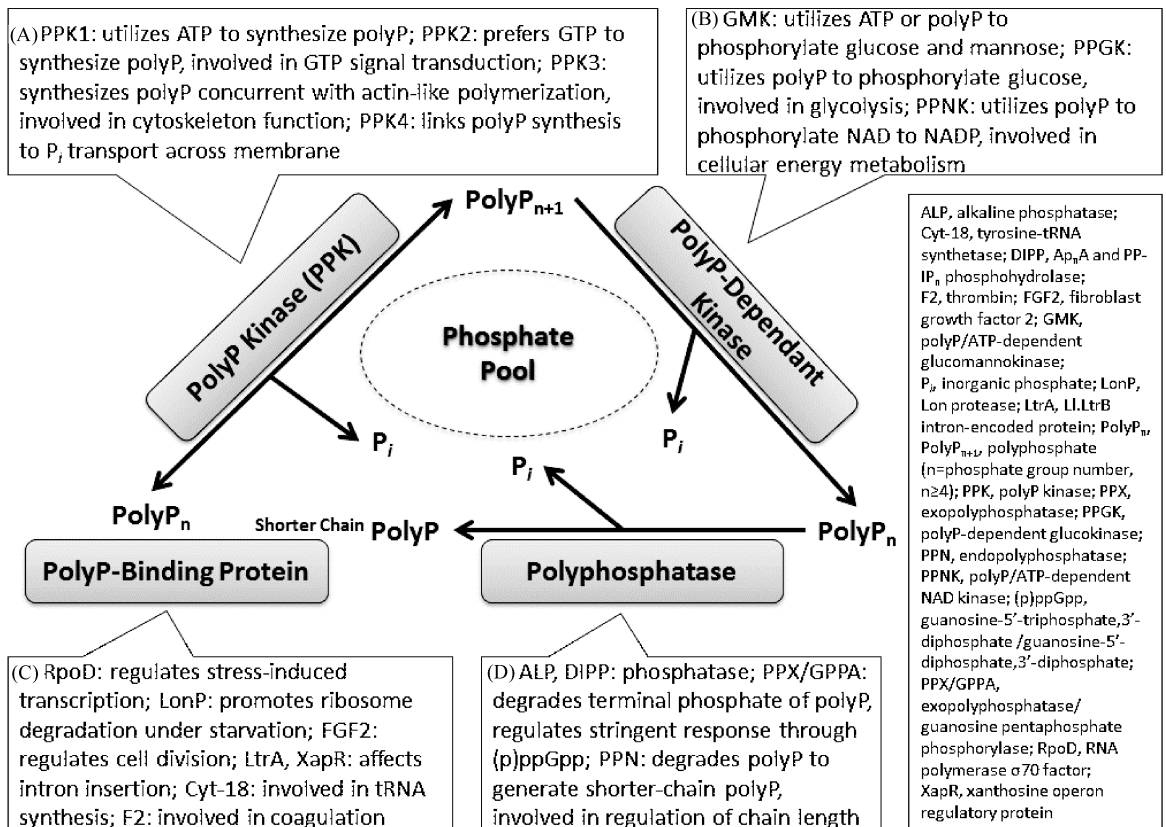


Fig. 1 Summaries of the involvement of polyP-related proteins in biological processes. Arrows indicate the metabolism of polyP and inorganic phosphate through functional polyP-related proteins. Four groups of polyP-related proteins are involved in the regulatory functions for the dynamic phosphate pool. (A) PolyP kinase group; (B) PolyP-Dependant kinase group; (C) PolyP-binding protein group; (D) Polyphosphatase group

1 多聚磷酸激酶类

多聚磷酸激酶(polyphosphate kinase, PPK)具有合成 polyP 的功能. 目前发现的多聚磷酸激酶有 4 个家族,即多聚磷酸激酶 1 至 4(PPK1 至 4).

1.1 多聚磷酸激酶 1

最早发现的多聚磷酸激酶(EC 编号为 2.7.4.1),系统名为 ATP-多聚磷酸磷酸转移酶(ATP-polyphosphate phosphotransferase),催化 ATP 和 polyP_n生成 ADP 和 polyP_{n+1}的可逆反应. 此酶属于多聚磷酸激酶家族(polyphosphate kinase family),在细菌中非常保守. PPK1 包含 1 个保守的磷脂酶 D 结构域(phospholipase D domain),含有这个结构域的蛋白质通常参与氧化磷酸化过程. 含有该结构域蛋白包括心磷脂合成酶(cardiolipin synthetase, EC 编号为 2.7.8.-)、磷脂酰甘油磷酸合成酶(phosphatidyl glycerophosphate synthase, EC 编号为 2.7.8.5)、磷脂酶 D(phospholipase D, EC 编号为 3.1.4.4)、磷脂酰丝氨酸合酶(phosphatidyl serine synthase, EC 编号为 2.7.8.8)和某些病毒的大囊膜蛋白等. 磷脂酶 D(phospholipase D, PLD)为一种脂质磷酸酶(lipid phosphatase),通过激活蛋白激酶 C(protein kinase C)参与人类乳腺癌的细胞信号转导过程,其升高是恶性肿瘤活动的信号之一^[19]. 虽然缺乏序列同源性, *Ec*PPK1 的 C1 和 C2 结构域类似于 PLD 的催化结构域,某些 PLD 超家族的活性位点模体(组氨酸-X-赖氨酸-XXXX-天冬氨酸-XXXXXX-甘氨酸-丝氨酸-X-天冬酰胺)和 *Ec*PPK1 的活性位点有空间相似性^[20]. *Ec*PPK1 和 PLD 家族可能是由共同的祖先在早期演化产生的分支.

*Ec*PPK1 酶分子生物学技术应用于 ATP 再生系统. *Ec*PPK1 合成由高达 750 个磷酸基团组成的 polyP₇₅₀ 长链,通过聚合的磷酸基团,以相连的高能磷酸键的形式储存能量. PPK1 是目前研究最为深入的多聚磷酸激酶,其理化性质在不同物种中具有不同特点. 低等真核生物盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)的 *Dd*PPK1 与 *Ec*PPK1 相比, N 端多出尚未找到同源序列的 370 个氨基酸,经实验证实与 *Dd*PPK1 的酶活性、细胞定位和生理功能有重要关系^[21]. 盘基网柄菌的 *Ppk1* 突变株,其细胞分裂过程中的细胞浆运动(cytokinesis)受到严重影响. 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)来源的 *Vc*PPK1 与 *Ec*PPK1 相比,其催化反应的动力学参数不同,如 *K_m* 为 0.2 mmol/L 而 *Ec*PPK1 为 2 mmol/L,但足以通过 polyP

抵抗低磷环境^[22]. 而好氧异养硝化菌(*Acinetobacter* sp.)的 PPK1 与 *Ec*PPK1 相比,其催化反应只有一个方向,只生成 polyP 而不降解 polyP^[23]. 新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)的 *Cc*PPK1 的 C 端具有正电荷分布的短尾(short positively-charged tail)结构,参与了染色体重排和分离等功能^[24].

*Ec*PPK1 二聚体结构中包含 2 个长度为 687 个氨基酸,分子量为 80 kD 的单体,由 4 个结构域(N、H、C1 和 C2)组成 L 形结构(L-shaped structure). 由于 PPK1 合成 polyP 反应的第 1 步为该酶中组氨酸残基的自身磷酸化,且 *Ec*PPK1 的 C1 结构域的 His435 是自身磷酸化位点^[20],因此,PPK1 也被认为是组氨酸激酶(histidine kinase). *Ec*PPK1 晶体结构显示,其高度保守的管道(tunnel)有 ATP 结合口袋(ATP-binding pocket),ATP 可能从管道的一端进入,而 polyP 链从另一端生成. 这种合成反应与在管道里合成链状产物的 RNA 聚合酶(RNA polymerase)相似,因此, *Ec*PPK1 可以当作没有模板的聚合酶. PolyP 在微生物中的重要调节作用提示, PPK1 能作为潜在的抗微生物的药物靶标,并且 PPK1 活性与霉菌的抗生素制造密切相关^[25]. 其结构研究或许能够提供更有力的线索.

1.2 多聚磷酸激酶 2

在 *Ppk1* 基因突变的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* PAO1)的 polyP 含量为野生型的 20%. 由此发现,能使用 polyP 作为供体将 GDP 磷酸化为 GTP 的 PPK2 酶^[26]. PPK2 在合成 polyP 时能使用 GTP 或 ATP,不同于 PPK1 只能使用 ATP. 除此之外,PPK2 使用 polyP 生成 GTP 是其逆反应的 75 倍,而 PPK1 催化 polyP 合成是逆反应的 4 倍. PPK2 合成 GTP 的最适底物为含有 30 至 50 个磷酸基团的中链 polyP, PPK1 则使用 15 至 700 个磷酸基团的 polyP. PPK1 和 PPK2 具有核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDK)活性,通过调节 NTP(如 ATP 和 GTP 等)和 dNTP 的多少在细胞稳定增长期参与细胞分裂和生存等过程.

P. aeruginosa 基因组的 BLAST 查询发现,有 2 个单域(Ordered Locus 基因名为 PA0104 和 PA2428)和 1 个双域(Ordered Locus 基因名为 PA3455) *Pa*PPK2^[27]. 单域 PPK2 具有 polyP 依赖的 ADP 磷酸化酶活性(PPK2D 或 diphosphate-specific PPK2),生成 ATP;而双域 PPK2 表现为 polyP 依赖的 AMP 磷酸化酶活性(PPK2M 或 monophosphate-specific PPK2). 单域和双域 PPK2 也能将 GMP 磷酸

化为 GDP,或将 GDP 磷酸化为 GTP,但这一活性比腺苷核苷酸(AMP 和 ADP 等)低约 3 倍。

PPK2 与胸苷酸激酶(thymidylate kinase, TK)具有共同的进化起源和催化机制。与 TK 相似, *Pa*PPK2 结构域的晶体结构显示,其具有 α -螺旋/ β -折叠/ α -螺旋二级结构组成的 3 个层面三明治褶皱(sandwich fold),并具有 α -螺旋盖子。TK 的重要催化位点在 PPK2 中也很保守,为 Walker A(甘氨酸-XXXX-甘氨酸-赖氨酸)模体和 Walker B(天冬氨酸-精氨酸)模体。有意思的是,三明治褶皱与 α -螺旋盖子相近的部分共同构成 1 个类似管道结构,通过蛋白质表面静电学分析(surface electrostatics analysis)发现,沿管道内壁具有很强的正电荷分布。这些特征与链状带负电的 polyP 理化性质相配合,有助于与 polyP 的相互作用。这类特征管道包含有上述催化位点,并且仅存在于有催化活性的 PPK2 结构域中^[27]。

PA3455 (*Pa*PPK2) 和约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii* 210AA)中发现的 polyP: AMP 磷酸转移酶(polyP: AMP polyphosphotransferase, PAP)有 40% 的序列一致性,以及相同的核苷酸结合模体(nucleotide-binding motif),同属于 P 环(P-Loop)蛋白家族。PAP 催化 polyP 的磷酸基团转移到 AMP,完成磷酸化反应生成 ADP 的过程。由于腺苷酸激酶(adenylate kinase, ADK)催化 2 个分子的 ADP 生成 1 分子的 ATP 和 1 分子的 AMP,因此 PAP 与 ADK 或与 PPK1 及 PPK2 偶联,使 polyP 参与细胞内 ATP 的再生。PAP 催化底物为不同核苷单磷酸时的反应活性也不尽相同,为 AMP > GMP > UMP > CMP^[28]。由于 PAP 包含 2 个融合的 PPK2 结构域,因此 PAP 也被认为是一个 PPK2。

1.3 多聚磷酸激酶 3

在盘基网柄菌的 *Ppk1* 突变株中发现了 *Dd*PPK2,即 PPK3^[29]。PPK3 是包含 α , β 和 ξ 的 3 个肌动蛋白相关蛋白(actin-related protein, ARP)亚基的蛋白复合体,具有 ARP 家族蛋白的保守序列。PPK3 可聚合成微丝样结构,其球状到丝状的组装与可逆的 polyP 合成反应同时进行,反应式为 $ARP(G) + nATP \leftrightarrow ARP(F) + polyP + nADP$ 。

某些推测认为,细胞在迁移和代谢需要时,微丝极性增长并以 polyP 的形式储存 ATP 和能量。PPK3 与肌肉肌动蛋白(muscle actin)在氨基酸序列上有 60% 的相似性,并且在分子大小和球状/丝状结构组装等方面与微丝类似^[29],微丝特有的抑制剂鬼笔环

肽(phalloidin)和脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)均能抑制 PPK3 合成 polyP。与盘基网柄菌在物种进化上远源的衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)属于微藻(microalga)的一种,被发现具有 PPK3 样活性,也可被鬼笔环肽抑制。原核生物也含有类似于微丝与微管蛋白的细胞骨架,参与细胞形态和一系列细胞生物学功能^[30],其中某些需要依靠 polyP,如在铜绿假单胞菌 PPK1 合成 polyP 时有丝状组装形成, polyP 的合成同样证实可被鬼笔环肽抑制,但又与 PPK3 不尽相同。

PPK3 极有可能位于钙酸体(acidocalcisome)内^[31]。如果 polyP 颗粒因内共生起源产生了钙酸体等结构的假说成立, polyP 这种古老的能源物质参与形成原细胞(proto-cell)的假设是非常可能的。原细胞是地球最原始生命的模型,拥有最简单的结构,只需 *Ppk* 和 *Ppx* 两个基因便可将 polyP 作为能源物质,为合成生物学中的最小细胞(minimal cell)的设计提供重要的理论依据^[32]。最小细胞将在人工培养环境下,使用 polyP 提供能量完成最少的生物学功能,维持自身的生长和繁殖。

1.4 多聚磷酸激酶 4

在真核生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)液泡膜上,发现液泡转运伴侣(vacuolar transporter chaperone, VTC)复合体的第 4 个亚单位 VTC4 具有多聚磷酸激酶活性^[33]。根据 PPK 的发现顺序,将其命名为多聚磷酸激酶 4(PPK4)。PPK4 和 RNA 三磷酸酶(RNA triphosphatase)Cet1p 蛋白结构相似^[23]。

PPK4 的晶体结构具有 1 个管道形口袋(tunnel-shaped pocket),为 ATP 的结合区域。值得注意的是,在磷酸结合结构(phosphate-bound structure)中可见沿管道成链形排列的磷酸聚合体形式^[33],其结构证实, polyP 通过蛋白质中正电荷分布的管道结构发生相互作用,对于 polyP 相关蛋白的分子生物学和结构生物学研究具有重要意义。

2 多聚磷酸酶类

此类酶的作用是选择性地降解 polyP,类似于核酸酶降解核酸链,根据作用位置不同,分为外切聚磷酸酶(exopolyphosphatase, PPX)和内切聚磷酸酶(endopolyphosphatase, PPN)。PPX 在多聚磷酸外部逐一切断磷酸酐键,脱去磷酸残基,而 PPN 则从内部切断多聚磷酸链。

2.1 外切聚磷酸酶

外切聚磷酸酶(EC 编号为 3.6.1.11),系统名

为多聚磷酸磷酸水解酶 (polyphosphate phosphohydrolase), 它催化 polyP_n 和 H_2O 生成 polyP_{n-1} 和磷酸的反应. PPX 广泛存在于低等生物中. 某些 PPX 蛋白属于 *Gppa/Ppx* 基因家族, 家族中还包括鸟苷五磷酸磷酸水解酶 (guanosine pentaphosphate phosphohydrolase); 另外一些蛋白质则属于 PPase class C 家族, 家族中还包括锰依赖的无机焦磷酸酶 (manganese-dependent inorganic pyrophosphatase) 和 Prune 蛋白同源物等. 此外, 细菌稳定期存活蛋白 SurE 具有外切聚磷酸酶活性, 属于 SurE 核苷酸酶家族, 家族中还包括酸性磷酸酶 (acid phosphatase) 和 5'-核苷酸酶等.

大肠杆菌 *EcPPX*, 其编码基因位于编码 PPK 基因的操纵子 (operon) 下游, 优先酶切长链的 polyP_{750} , 对 ATP 和短链 polyP 没有活性. *EcPPX* 含 513 个氨基酸, 分子量为 58 kD, 其发挥最大活性需要 Mg^{2+} 和 KCl, 在最适条件下的催化产物只含有 P_i 和 PP_i . PPX/GPPA 具有 PPX 和鸟氨酸五磷酸磷酸化酶的双重活性. GPPA 将鸟苷五磷酸 (guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate, pppGpp) 水解为鸟苷四磷酸 (guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate, ppGpp), ppGpp 作为细胞内信号分子或警报素 (alarmone), 在氨基酸等营养缺乏引发的严紧反应时参与调节转录、蛋白质合成和降解等过程^[34].

真核生物中的 PPX 可能分布于各种细胞器内. 酿酒酵母菌胞质中存在 45 kD 低分子量的 PPX (*ScPPX1*), 而在液泡、线粒体膜、细胞核以及在细胞浆中存在高分子量 (约 1 000 kD) 的 PPX^[35], 但尚未鉴定出编码基因. 细胞内含有的 PPX 有不同的底物亲和性, 与高分子量 PPX 相比, 低分子量 PPX 更倾向于短链 polyP . 酿酒酵母菌 *Ppx* 基因的突变将使细胞内缺乏短中链的 polyP , 胞质内可溶型 polyP 的含量也明显降低^[36]. *ScPPX1* 在 37 °C 时 1 个酶分子每分钟能释放 3 万个偏磷酸残基, 此作用是大肠杆菌 PPX 的 40 倍, 因此常用 *ScPPX1* 作为研究 polyP 功能的工具酶. 在 MCF-7 乳腺癌细胞系中插入酵母 *Ppx* 基因, 观察到转染细胞不能激活 mTOR (mammalian target of rapamycin), 通路中 PHAS-1 不能被磷酸化.

EcPPX 有 2 个功能结构域 (N 端和 C 端). N 端为催化结构域 (I 和 II), 包含该酶活性位点如 P-环结构, C 端结构域 (III 和 IV) 包含有 polyP 结合结构域, 而没有水解活性, 其与二聚体的形成有关^[37]. PPX 二聚体中存在 1 个 S 形峡谷 (S-shaped canyon)

结构, 帮助结合长链 polyP ^[38]. I 和 II 结构域与 *AaPPX/GPPA* 结构相似, I 和 II 结构域间的裂隙 (cleft) 具有单铰链区域, 为催化活性位点^[39]. 这类酶属于 ASKHA (acetate, 醋酸酯; sugar kinase, 糖激酶; HSP70, 热激蛋白 70; actin, 肌动蛋白) 磷酸转移酶超家族 (ASKHA phosphotransferase superfamily), 其中与外核苷三磷酸二磷酸水解酶 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases) 结构最为相近, 第 3 个结构域形成 6-螺旋爪结构, 和真核生物的环境核苷酸磷酸二酯酶 (cyclic nucleotide phosphodiesterases) 的催化中心同源. 酿酒酵母菌 PPX/GPPA 属于 DHH 磷酸酯酶家族 (DHH phosphoesterase family), DHH 家族都含有相同的天冬氨酸-组氨酸-组氨酸保守模体. *ScPPX1* 与革兰氏阳性菌属的焦磷酸酶家族蛋白有较高序列相似性, 最保守区域是酶活性位点, 两者被认为有相似的催化机制, 不同的是 *ScPPX1* 的结构表面带有 1 个 18 Å 长度的通道 (channel), 通道的一端形成 1 个大的极性洞穴 (polar cavity) 容纳底物并进行催化反应^[40].

酶 h-prune 是首个在哺乳动物里发现的 PPX, 并且 h-prune 受到 polyP 的调节^[41], h-prune 蛋白分子量为 50 kD, 是人类与果蝇 prune 同源的蛋白, 突变 prune 后导致眼睛颜色由棕色向紫色改变, 过表达 h-prune 使肿瘤细胞的侵袭能力增强, 其参与乳腺癌、胃癌等肿瘤的发生发展.

2.2 内切聚磷酸酶

内切聚磷酸酶 (EC 编号为 3.6.1.10), 系统名为多聚磷酸多聚磷酸水解酶 (polyphosphate polyphosphohydrolase), 催化 polyP 和 H_2O 从内部逐步裂解生成大量的 polyP 短链. PPN 活性很可能通过切割长链 polyP , 进而调节 polyP 的链长, 不同的底物协助发挥不同的生物学效应^[42].

酵母 *ScPPN1* 由 78 kD 的前体多肽经蛋白酶活化生成同源四聚体^[43]. 该基因突变株酵母内积累了大量长链 polyP ^[44]. *ScPPN1* 能够有效地调节细胞内磷的含量, 但在高等生物中未找到同源基因.

酵母细胞质中 DDP1 (diadenosine and diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase, DDP1) 以及哺乳动物中的同源基因 DIPP1、DIPP2 和 DIPP3a/b 也被发现具有 PPN 活性^[45], 属于 Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X) 水解酶家族, 含有 MutT 模体, 又称 Nudix 盒的催化结构域^[46]. 这类酶还可水解焦磷酸肌醇多磷酸 PP-IP_n, 参与细胞信号转导过程. 此外, PP-IP_n 可能参与胞

内 polyP 水平的调节.

在酵母 PPN1/PPX1 基因的突变株中,还存有胞质中 PPN 活性,与 DDP1 对氟敏感,而锰会使其失活的特性不同,据此推测,在酵母中可能有第 3 种 PPN^[47].

3 多聚磷酸依赖的激酶类

这类酶能够利用 polyP 作为磷供体,并磷酸化小分子底物.目前研究较多的有 4 类:polyP 依赖葡萄糖激酶(polyP-dependent glucokinase),polyP/ATP 依赖葡萄糖激酶(polyP/ATP-dependent glucokinase, PPGK),polyP/ATP 依赖葡萄糖甘露糖激酶(polyP/ATP-dependent glucomannokinase, PPGMK)和 polyP/ATP 依赖 NAD 激酶(polyP/ATP-dependent NAD kinase, PPNK).

3.1 葡萄糖激酶类

多聚磷酸依赖的葡萄糖激酶(EC 2.7.1.63),系统名为多聚磷酸:葡萄糖 6-磷酸转移酶(polyphosphate:D-glucose 6-phosphotransferase),催化 polyP_n和葡萄糖反应生成 polyP_{n-1}和葡萄糖 6-磷酸.这个酶属于转移酶家族,这个家族的多数成员都参与糖酵解和糖异生过程.最早在草分枝杆菌(*Mycobacterium phlei*)中发现,其使用 polyP 或 ATP 作为磷酸基团供体,催化底物葡萄糖接受转移的末端磷酸残基,生成葡萄糖 6-磷酸,激活葡萄糖参与后续生化反应.结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)来源的 polyP/ATP 依赖的葡萄糖激酶 MtPPGK,能使用 GTP、UTP 和 CTP 作为磷酸基团供体(phosphoryl donors).

从细菌 *Arthrobacter* sp. Strain KM 纯化的 polyP/ATP 依赖的葡萄糖甘露糖激酶(glucomannokinase, GMK)为 30 kD 的单聚体蛋白质,能优先磷酸化葡萄糖^[48],其一级结构和 polyP 或 polyP/ATP 依赖的葡萄糖激酶,及其它革兰氏阳性菌来源的葡萄糖激酶有较高相似性,而与革兰氏阴性菌中的葡萄糖激酶及真核生物中的己糖激酶(hexokinase, HK)不同.推测认为,葡萄糖的磷酸化过程在生命早期的细菌中使用的磷酸基团供体是 polyP,而当环境中出现 ATP 后,葡萄糖激酶可能逐渐进化为使用 ATP^[49].和 polyP 相比,这些分子更小、更加容易相互作用、结构更稳定等,因此,具有作为磷酸基团供体的某些优点.在积磷小月菌(*Microlunatus phosphovorus* strain NM-1)中发现,只使用 polyP 而不能使用 ATP 作为磷酸基团供体的葡萄糖激酶,与 MtPPGK 序列

相似,基因起源相近^[50].

3.2 PolyP/ATP 依赖 NAD 激酶

多聚磷酸依赖的 NAD⁺ 激酶(EC 编号为 2.7.1.23),催化 NAD⁺ 辅酶和 polyP_n生成 polyP_{n-1}和 NADP⁺ 辅酶. NADP⁺ 辅酶为生物合成提供了还原能力. NADP⁺ 辅酶属于 NAD⁺ 激酶家族,家族成员还包括 NADH 激酶(EC 编号为 2.7.1.86)和 NAD⁺ 激酶(EC 编号为 2.7.1.23).

PPNK 使用 polyP 或 ATP 作为供体,催化 NADP⁺ 从头合成的最后 1 个反应,即 NAD⁺ 的磷酸化反应. NADP⁺ 是许多还原生物合成反应的重要因子,并且是细胞对抗氧化应激机制的重要组成部分. NAD⁺ 激酶属于磷酸果糖激酶(6-phosphofructokinase, PFK)、二酰基甘油酸激酶(diacylglyceride kinase)和鞘氨醇激酶(sphingosine kinase)超家族,这些酶有相似的磷酸基团供体的结合位点,例如结核分枝杆菌 NAD⁺ 激酶,具有富含甘氨酸的保守区域,存在于 N 端结构域和 C 端结构域间裂隙的铰链区域,其与催化活性相关,也和 NAD⁺、NADP⁺ 和 ATP 的结合有关^[51].

4 多聚磷酸结合蛋白

低等生物中的多聚磷酸结合蛋白(polyphosphate-binding protein)在高等生物中未找到同源的基因.目前报道与 polyP 具有相互作用的蛋白质有:RNA 聚合酶 σ 70 因子(RNA polymerase σ 70 factor, σ 80)、Ll. LtrB 内含子编码蛋白(Ll. LtrB intron-encoded protein, LtrA)、酪氨酸-转运 RNA 合成酶(tyrosine-tRNA synthetase, Cyt-18)、黄嘌呤核苷操纵子调节蛋白(xanthosine operon regulatory protein, XapR)、Lon 蛋白酶、碱性成纤维细胞生长因子和凝血酶等,这些蛋白质分子通过与 polyP 的结合发挥着重要的功能.除了碱性成纤维细胞生长因子和凝血酶外,其他大都存在于低等生物中.

4.1 RNA 聚合酶 σ 70 因子

细菌中转录多数是经 σ 因子与 RNA 聚合酶的核心酶结合而启动, σ 因子识别转录起始位点,使 RNA 聚合酶结合在启动子部位,调控不同应激条件下特定调节子(regulator)的激活^[52].与大肠杆菌相比,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)的基因组较小,转录机制相对简单,缺少调控营养缺乏和应激反应的 σ S、 σ H 和 σ E 因子,只有 σ 80、 σ 28 和 σ 54 因子. *H. pylori* 的 σ 80 因子是 σ 70 蛋白家族成员之一,与 *E. coli* 的 σ 70 相比, σ 80 的 N 端结构域多了 70 个

Table 1 Summaries of major polyP-related proteins

Enzyme	Sequence similarity	Structural information	Multifunctional activity
PPK1	Monomer contains a region similar to PLD domain and conserved autophosphorylation site	Four domains (N, H, C1, C2), central tunnel is ATP-binding pocket and where polyP is synthesized	Catalyzes conversion between NDP and NTP
PPK2	Monomer contains Walker A and Walker B motifs	α -Helix/ β -strand/ α -helix sandwich fold, central five or six β -strands parallel β -sheet, flanked by α -helix	Prefers GDP to generate GTP
PPK3	Contains ATP/gelsolin/ profilin binding sites	Three subunits, belonging to ARP family	Synthesizes polyP chain concurrent with actin-like autopolymerization
PPK4/VTC4	Contains SPX domain	Anti-parallel β -strands constitutes tunnel-shaped active region	Transports polyP across membrane
PPX1	Belongs to DHH family	N/C terminal domain contains three-layer $\alpha/\beta/\alpha$, central five β -strands parallel β -sheet	
PPX/GPPA	Belongs to ASKHA phosphatase superfamily	Four domains (I, II, III and IV), functional dimer surface forms S-shaped channel	Degrades pppGpp to generate ppGpp
PPN/DIPP	Belongs to Nudix hydrolase family	Classical Nudix fold contains mixed β -sheet, anti-parallel β -sheet and short helix	Degrades PP-IPn
GMK	Belongs to transferase family	N/C terminal domain contains five β -strands mixed β -sheet, the second β -strand is anti-parallel	Phosphorylates glucose to generate glucose-6-phosphate
PPNK	Belongs to NADase family	N terminal core contains four β -strands, parallel β -sheet and four α -helices, C terminal core contains nine β -strands in two layers	Catalyzes NAD^+ to generate NADP^+

According to bioinformatics databases, we summarized the sequence, structural and functional features of polyP-related enzymes

氨基酸,富含可与 polyP 结合的带正电赖氨酸区域,提示在幽门螺杆菌营养缺乏以及应激反应时,polyP 则有可能作为第二信使调节基因表达和细胞代谢^[53]。

4.2 Ll. LtrB 内含子编码蛋白

在真核生物中的 II 型内含子不仅具有逆转录活性的催化功能,而且是可移动的逆转录元件。近年的研究发现,细菌中也有可移动的 II 型内含子,它们能够逆转录归巢插入到同源无内含子的等位基因位点,或者逆转录转座插入到非等位基因位点。II 型内含子(mobile group II intron)包含具有催化作用的内含子 RNA(intron RNA),以及具有反转录酶活性的内含子编码蛋白(intron-encoded protein),在内含子移动时促进 DNA 的整合。在 *E. coli* 中过表达乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的 Ll. LtrB 内含子,其编码蛋白 LtrA 能单独或与内含子 RNA 共同形成核酸核蛋白颗粒(ribonucleoprotein particles, RNP),并定位于细胞两极,帮助内含子插入到 *E. coli* 的复制起始位点 *OriC* 和复制终止区域 *Ter*。而当 polyP 和 LtrA 结合时,导致这种极性定位发生改变,从而影

响内含子插入位点的位置^[54]。当 *E. coli* 细胞处于应激状态或进入稳定期时,胞内积累升高的 polyP 则可能改变 *E. coli* 内具有调控作用的蛋白质的定位,影响基因转录和信号转导。

4.3 酪氨酸-转运 RNA 合成酶和黄嘌呤核苷操纵子调节蛋白

粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)的线粒体酪氨酸-转运 RNA 合成酶 Cyt-18 蛋白,*E. coli* 的 HTH 型转录调节子 XapR 蛋白,在 *Gppa* 和 *Ppx* 基因突变株中呈弥散型分布,而在野生型和 *Ppk* 突变株中是极性分布(pole-localized distribution)^[54]。这说明通过与碱性蛋白质的直接结合,polyP 能改变蛋白质的定位,改变细胞内环境。

4.4 Lon 蛋白酶

细菌发生严紧反应时,rRNA 和 tRNA 的合成随即受到抑制,避免核糖体不必要的翻译过程,是一种自我保护和生存保障的机制。此时,核糖体结合蛋白质中某些“严紧因子”(stringent factor)被激活,如 RelA 蛋白的激活能加速催化焦磷酸从 ATP 转移到 GTP 合成 pppGpp,pppGpp 经 GPPA 催化水解生成

ppGpp,两者通过和 RNA 聚合酶 β 亚单位的结合调节细菌内转录过程^[55]. 大肠杆菌内 ppGpp 和 ppGpp 可竞争性抑制 PPX 的活性,导致 polyP 的升高. 大肠杆菌在严紧反应时具有催化蛋白质降解功能的 Lon 蛋白酶能够与 polyP 结合,激活降解核糖体蛋白. 菌体能够通过形成 Lon 蛋白酶、核糖体蛋白和 polyP 三者的复合体,最终影响核糖体蛋白质的降解过程,参与蛋白质翻译后水平的调控^[56].

4.5 碱性成纤维细胞生长因子

在哺乳动物中,通过与 polyP 结合,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF 或 FGF2)可避免迅速被降解,得以延长半衰期并持续处于生物活性状态,与细胞表面受体酪氨酸激酶(tyrosine kinase)结合^[57]. 硫酸肝素(heparin sulfate)可以促进 FGF2 与酪氨酸激酶受体结合,并促进受体二聚体的形成最终参与调控信号传导,polyP 与 FGF2 的结合位点可能与肝素结合位点存在重叠,且 polyP 的生长刺激作用要比肝素强^[57].

4.6 凝血酶

存在于人类血小板致密颗粒中的 polyP,可在血小板激活过程中被释放分泌. 研究发现,polyP 参与了血液凝固的调节,加速凝血因子 FV 向活化型 FVa 的转化,通过正反馈调节作用使凝血酶(thrombin)增加. 结构分子生物学研究发现,polyP 与凝血酶外位点 II(exosite II)通过静电作用力结合. 凝血酶外位点 II 与外位点 I 相比表面呈碱性,和许多具有阴离子活性的糖胺聚糖(glycosaminoglycans)如肝素等结合. 值得注意的是,肝素和 polyP 与凝血酶外位点 II 的结合点有部分重合,但 polyP 没有影响肝素的抗凝作用^[58].

5 问题与展望

作为生命进化过程中的古老物质,polyP 与生命起源有关,在进化过程中一直扮演着能量源和磷酸基团供体的角色,同时还可能具有更多的细胞调控功能^[59-60]. 多聚磷酸相关蛋白通过控制 polyP 的合成、降解或者受到与 polyP 结合的影响,完成基因转录、逆转录、细胞有丝分裂、核糖体蛋白降解和蛋白质翻译等过程的调节. 此外,polyP 很可能参与磷酸化蛋白质组的调控. 尝试使用生物信息学技术方法,追踪这些酶来认知高能磷酸供体和其参与构成的细胞能量贮存库,将揭示 polyP 这个普遍常见的能量提供分子具有其他潜在的功能. 目前针对 polyP 结合蛋白调节 polyP 的机制研究仍有待深入,这些

工作的开展有助于推动 polyP 生物化学与分子生物学基础研究,开拓广阔的应用前景.

致谢 在本文撰写期间,特别感谢北京大学生命科学学院,教育部细胞增殖与分化重点实验室陈建国教授和曹文渊博士的指导和悉心帮助,感谢北京大学神经科学研究所 Greg Vatcher 博士的校稿工作.

参考文献 (References)

- [1] Lieberman L. Uber das Nuclein der Hefe und Kunstliche Darstellung eines Nucleus Eiweiss und Metaphosphatsaure[J]. Ber Chem-Ges, 1888, **21**: 598-607
- [2] Kumble K D, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues[J]. J Biol Chem, 1995, **270**(11): 5818-5822
- [3] Omelon S, Georgiou J, Henneman Z J, et al. Control of vertebrate skeletal mineralization by polyphosphates[J]. PLoS One, 2009, **4**(5): e5634
- [4] Hoac B, Kiffer-Moreira T, Millán J L, et al. Polyphosphates inhibit extracellular matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures[J]. Bone, 2013, **53**(2): 478-486
- [5] Segawa S, Fujiya M, Konishi H, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway[J]. PLoS One, 2011, **6**(8): e23278
- [6] Puy C, Tucker E I, Wong Z C, et al. Factor XII promotes blood coagulation independent of factor XI in the presence of long-chain polyphosphates[J]. J Thromb Haemost, 2013, **11**(7): 1341-1352
- [7] Smith S A, Choi S H, Collins J N, et al. Inhibition of polyphosphate as a novel strategy for preventing thrombosis and inflammation[J]. Blood, 2012, **120**(26): 5103-5110
- [8] Holmstrom K M, Marina N, Baev A Y, et al. Signalling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain[J]. Nat Commun, 2013, **4**: 1362
- [9] Wang L, Fraley C D, Faridi J, et al. Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, **100**(20): 11249-11254
- [10] Hernandez-Ruiz L, González-García I, Castro C, et al. Inorganic polyphosphate and specific induction of apoptosis in human plasma cells[J]. Haematologica, 2006, **91**(9): 1180-1186
- [11] Han K Y, Hong B S, Yoon Y J, et al. Polyphosphate blocks tumour metastasis via anti-angiogenic activity[J]. Biochem J, 2007, **406**(1): 49-55
- [12] Abramov A Y, Fraley C, Diao C T, et al. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, **104**(46): 18091-18096
- [13] Kim D, Cavanaugh E J. Requirement of a soluble intracellular factor for activation of transient receptor potential A1 by pungent chemicals: role of inorganic polyphosphates[J]. J Neurosci,

- 2007, **27**(24): 6500-6509
- [14] Yu S P, Wei Z, Wei L. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy[J]. *Transl Stroke Res*, 2013, **4**(1): 76-88
- [15] Aschar-Sobbi R, Abramov A Y, Diao C, *et al.* High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach[J]. *J Fluoresc*, 2008, **18**(5): 859-866
- [16] Pavlov E, Aschar-Sobbi R, Campanella M, *et al.* Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(13): 9420-9428
- [17] Seidlmayer L K, Gomez-Garcia M R, Blatter L A, *et al.* Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes [J]. *J Gen Physiol*, 2012, **139**(5): 321-331
- [18] Fraga A, Moraes J, da Silva J R, *et al.* Inorganic polyphosphates regulate hexokinase activity and reactive oxygen species generation in mitochondria of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* embryo[J]. *Int J Biol Sci*, 2013, **9**(8): 842-852
- [19] Uchida N, Okamura S, Nagamachi Y, *et al.* Increased phospholipase D activity in human breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, **123**(5): 280-285
- [20] Zhu Y, Huang W J, Lee S S, *et al.* Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis[J]. *EMBO Rep*, 2005, **6**(7): 681-687
- [21] Zhang H, Gomez-Garcia M R, Shi X, *et al.* Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum* with a role in cytokinesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**(42): 16486-16491
- [22] Jahid I K, Silva A J, Benitez J A. Polyphosphate stores enhance the ability of *Vibrio cholerae* to overcome environmental stresses in a low-phosphate environment [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(11): 7043-7049
- [23] Trelstad P L, Purdhani P, Geissdorfer W, *et al.* Polyphosphate kinase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1: purification and characterization of the enzyme and its role during changes in extracellular phosphate levels [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(9): 3780-3786
- [24] Henry J T, Crosson S. Chromosome replication and segregation govern the biogenesis and inheritance of inorganic polyphosphate granules[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, **9**(8): 842-852
- [25] Diaz M, Sevillano L, Rico S, *et al.* High level of antibiotic production in a double polyphosphate kinase and phosphate-binding protein mutant of *Streptomyces lividans* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, **342**(2): 123-129
- [26] Ishige K, Zhang H, Kornberg A. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(26): 16684-16688
- [27] Nocek B, Kochinyan S, Proudfoot M, *et al.* Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(46): 17730-17735
- [28] Shiba T, Itoh H, Kameda A, *et al.* Polyphosphate: AMP phosphotransferase as a polyphosphate-dependent nucleoside monophosphate kinase in *Acinetobacter johnsonii* 210A [J]. *J Bacteriol*, 2005, **187**(5): 1859-1865
- [29] Gomez-Garcia M R, Kornberg A. Formation of an actin-like filament concurrent with the enzymatic synthesis of inorganic polyphosphate [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(45): 15876-15880
- [30] Carballido-Lopez R, Errington J. The bacterial cytoskeleton; in vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis* [J]. *Dev Cell*, 2003, **4**(1): 19-28
- [31] Ramos I B, Miranda K, Ulrich P, *et al.* Calcium- and polyphosphate-containing acidocalcisomes in chicken egg yolk [J]. *Biol Cell*, 2010, **102**(7): 421-434
- [32] Achbergerova L, Nahalka J. Polyphosphate—an ancient energy source and active metabolic regulator [J]. *Microb Cell Fact*, 2011, **10**: 63
- [33] Hothorn M, Neumann H, Lenherr E D, *et al.* Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase [J]. *Science*, 2009, **324**(5926): 513-516
- [34] Artsimovitch I, Patlan V, Sekine S, *et al.* Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp [J]. *Cell*, 2004, **117**(3): 299-310
- [35] Andreeva N A, Kulakovskaya T V, Kulaev I S. Purification and properties of exopolyphosphatase from the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae* not encoded by the PPX1 gene [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2004, **69**(4): 387-393
- [36] Lichko L P, Kulakovskaya T V, Kulaev I S. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in different cell compartments of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2006, **71**(11): 1171-1175
- [37] Bolesch D, Keasling J D. Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(43): 33814-33819
- [38] Alvarado J, Ghosh A, Janovitz T, *et al.* Origin of exopolyphosphatase processivity: Fusion of an ASKHA phosphotransferase and a cyclic nucleotide phosphodiesterase homolog [J]. *Structure*, 2006, **14**(8): 1263-1272
- [39] Kristensen O, Ross B, Gajhede M. Structure of the PPX/GPPA phosphatase from *Aquifex aeolicus* in complex with the alarmone ppGpp [J]. *J Mol Biol*, 2008, **375**(5): 1469-1476
- [40] Ugochukwu E, Lovering A L, Mather O C, *et al.* The crystal structure of the cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the basis for substrate specificity [J]. *J Mol Biol*, 2007, **371**(4): 1007-1021
- [41] Tammenkoski M, Koivula K, Cusanelli E, *et al.* Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase [J]. *Biochemistry*, 2008, **47**(36): 9707-9713
- [42] Zollo M, Andrè A, Cossu A, *et al.* Overexpression of h-prune in breast cancer is correlated with advanced disease status [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(1): 199-205
- [43] Shi X, Kornberg A. Endopolyphosphatase in *Saccharomyces*

- cerevisiae* undergoes post-translational activations to produce short-chain polyphosphates [J]. *FEBS Lett*, 2005, **579**(9): 2014-2018
- [44] Sethuraman A, Rao N N, Kornberg A. The endopolyphosphatase gene; essential in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**(15): 8542-8547
- [45] Lonetti A, Szigyarto Z, Bosch D, *et al.* Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases [J]. *J Biol Chem*, 2011, **286**(37): 31966-31974
- [46] Thorsell A G, Persson C, Graslund S, *et al.* Crystal structure of human diphosphoinositol phosphatase 1 [J]. *Proteins*, 2009, **77**(1): 242-246
- [47] Lichko L P, Kulakovskaya T V, Kulaev I S. Properties of partially purified endopolyphosphatase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2010, **75**(11): 1404-1407
- [48] Mukai T, Kawai S, Matsukawa H, *et al.* Characterization and molecular cloning of a novel enzyme, inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase, of *Arthrobacter* sp. strain KM [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(7): 3849-3857
- [49] Mukai T, Kawai S, Mori S, *et al.* Crystal structure of bacterial inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase. Insights into kinase evolution [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(48): 50591-50600
- [50] Tanaka S, Lee S O, Hamaoka K, *et al.* Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microlunatus phosphovorus* [J]. *J Bacteriol*, 2003, **185**(18): 5654-5656
- [51] Poncet-Montange G, Assairi L, Arold S, *et al.* NAD kinases use substrate-assisted catalysis for specific recognition of NAD [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(47): 33925-33934
- [52] Murakami K S. X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 holoenzyme [J]. *J Biol Chem*, 2013, **288**(13): 9126-9134
- [53] Yang Z X, Zhou Y N, Yang Y, *et al.* Polyphosphate binds to the principal sigma factor of RNA polymerase during starvation response in *Helicobacter pylori* [J]. *Mol Microbiol*, 2010, **77**(3): 618-627
- [54] Zhao J, Niu W, Yao J, *et al.* Group II intron protein localization and insertion sites are affected by polyphosphate [J]. *PLoS Biol*, 2008, **6**(6): e150
- [55] Chatterji D, Ojha AK. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4**(2): 160-165
- [56] Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, *et al.* Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli* [J]. *Science*, 2001, **293**(5530): 705-708
- [57] Shiba T, Nishimura D, Kawazoe Y, *et al.* Modulation of mitogenic activity of fibroblast growth factors by inorganic polyphosphate [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(29): 26788-26792
- [58] Mutch N J, Myles T, Leung L L, *et al.* Polyphosphate binds with high affinity to exosite II of thrombin [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, **8**(3): 548-555
- [59] 魏峥, 聂琰晖, 刘乐庭, 等. 多聚磷酸盐在原核和真核生物中的研究进展 [J]. *生理科学进展* (Wei Z, Nie Y H, Liu L T, *et al.* Progress in functional polyphosphate in prokaryotic and eukaryotic living organisms [J]. *Prog Physiol Sci*, 2009, **40**(3): 197-201
- [60] Whitehead M P, Hooley P, W Brown M R. Horizontal transfer of bacterial polyphosphate kinases to eukaryotes; implications for the ice age and land colonisation [J]. *BMC Res Notes*, 2013, **6**: 221