

植物膜 Ca^{2+} 运输系统与逆境应答

韩宁¹ 綦翠华^{1,2} 丁同楼¹ 王宝山^{1,*}

¹ 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ² 济南大学食品科学系, 济南 250002

The Membrane-bound Ca^{2+} Transporters in Plants and Stress Responses

HAN Ning¹, QI Cui-Hua^{1,2}, DING Tong-Lou¹, WANG Bao-Shan^{1,*}

¹ College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; ² Department of Food Science, Jinan University, Jinan 250002, China

提要 主要介绍了细胞膜 Ca^{2+} 运输系统的种类、分子结构及调控机制, 并通过膜 Ca^{2+} 运输系统与胞质 Ca^{2+} 水平变化之间的关系评述了细胞膜 Ca^{2+} 运输系统在植物应答逆境中的作用。

关键词 植物细胞膜 Ca^{2+} 运输系统; 分子结构; Ca^{2+} ; 逆境应答

信号转导在调节生物生长、发育、代谢及适应环境中都有作用^[1]。细胞中的信号有多种, 其中研究较早、了解最多的是胞质游离 Ca^{2+} 。当刺激如冷击、干旱、盐胁迫和病原物侵染等作用于植物细胞时都会引起胞质 Ca^{2+} 浓度的变化^[2], 其变化的位置、幅度、频率及持续的时间则取决于接受信号的细胞类型及刺激性质, 即用胞质钙浓度变化的差异解码不同的刺激从而使细胞做出不同的反应^[1]。静息条件下, 胞质中 Ca^{2+} 需维持较低的浓度(约 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[3]以避免与胞质内无机磷酸盐(ATP的合成原料)形成沉淀从而影响细胞正常的生理活动, 而细胞间隙和细胞器才是储存 Ca^{2+} 的主要部位。胞质中低 Ca^{2+} 水平的维持及刺激作用下胞质 Ca^{2+} 的瞬息变化主要是由细胞膜上 Ca^{2+} 运输系统共同作用的结果。本文主要通过膜 Ca^{2+} 运输系统与胞质 Ca^{2+} 水平变化之间的关系来论述细胞膜 Ca^{2+} 运输系统在植物对逆境应答中的作用。

1 膜 Ca^{2+} 运输系统

细胞膜 Ca^{2+} 运输系统主要分为: Ca^{2+} 通道(calcium channel, 介导 Ca^{2+} 被动转运)和 Ca^{2+} 主动运输系统。下面分别阐述其结构及分子特性。

1.1 Ca^{2+} 通道

1.1.1 Ca^{2+} 通道的类型及电生理特性 高等植物细胞膜有多种具有不同的空间分布和不同开放调控机制的 Ca^{2+} 通道, 参与各种不同的刺激-偶联反应^[4]。不同的刺激通过活化不同的 Ca^{2+} 通道产生具有特定时间和空间特征的 Ca^{2+} 信号, 保证刺激与反应之间的高度特异性^[1]。植物细胞质膜和液泡膜都有钙通道。目前发现在质膜上主要有 2 种钙通

道: 一类是电压依赖型(voltage-dependent)钙通道, 当膜电位去极化时被激活; 另一类是牵张(stretch)激活钙通道。液泡膜上也有 2 类 Ca^{2+} 通道: 一类是电压依赖型, 受液泡膜两侧膜电位控制, 当液泡内与细胞质之间的膜电势差为正值时, 通道打开; 另一类是配位体活化(ligand-activated)型, 包括受环腺苷二磷酸核糖(cADPR)门控的 Ca^{2+} 通道和受三磷酸肌醇(IP_3)门控的 Ca^{2+} 通道^[4]。

电压依赖型钙通道在质膜及液泡膜中均存在。Thuleau等^[5]用膜片钳技术在胡萝卜悬浮培养细胞原生质体膜中发现了可以由质膜去极化激活的钙通道。这些通道对 Ca^{2+} 比对 K^+ 有更高的通透性, 同时对 Mg^{2+} 及 Ba^{2+} 也表现出很高的通透性。这是第1次在高等植物细胞质膜上直接发现的电压依赖型的钙通道。采用放射性同位素和膜片钳技术在液泡膜上也发现了电压依赖型的钙离子通道^[6]。液泡膜电压接近于 0 mV 时, 该通道保持关闭状态; 在体内生理水平的电势范围内, 细胞质比液泡中带有更多的负电荷(超极化)时被激活。此类通道对 Ca^{2+} 的通透性超过 K^+ 。

配位体活化的钙通道只存在于液泡膜上, 包括 2 类: 受 IP_3 门控的 Ca^{2+} 通道^[7] 及受 cADPR 门控的 Ca^{2+} 通道。受 IP_3 门控的 Ca^{2+} 通道又称 IP_3 活

收稿 2005-01-31 修订 2005-07-20

资助 国家自然科学基金(30270793) 国家“863”项目(2001AA244081)。

*通讯作者(E-mail: bswang@sdsu.edu.cn, Tel: 0531-86180197)。

化的钙离子释放通道(IP_3 -activated Ca^{2+} release channel)。过去,用膜片钳技术在甜菜中发现 IP_3 能够从液泡中动员 Ca^{2+} 释放。在这个实验中,跨液泡膜电流由 IP_3 专一性诱导产生,而且膜片钳记录到的电流是由 Ca^{2+} 流动引起的。这充分说明 IP_3 是通过激活位于液泡膜上的 Ca^{2+} 通道而从液泡中动员 Ca^{2+} 释放。对 IP_3 从富含液泡膜的微粒体中动员 Ca^{2+} 的运输动力学及液泡膜上的 IP_3 受体特性的研究表明,植物细胞也含有与动物细胞中相似的 IP_3 受体^[7]。显微注射 IP_3 的结果表明, IP_3 可能参与气孔开关、细胞渗透势、运动细胞膨压的调节以及花粉自交不亲和反应等生理过程。说明 IP_3 激活的钙通道可能参与植物体内许多生理过程的调节。

液泡膜上发现的另一种配位体活化的钙离子通道是由cADPR控制的,称为cADPR活化的钙释放通道(cADPR activated Ca^{2+} release channel)。cADPR刺激该通道开放,提高胞质中 Ca^{2+} 浓度,其 K_m 值为 $20\sim 25\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,这一结果从放射性同位素和膜片钳技术都得到了印证。cADPR对通道的激活作用可受钿红抑制。cADPR控制的 Ca^{2+} 通道的活性有赖于液泡膜两侧生理范围内的膜电压, Ca^{2+} 比 K^+ 有更高的通透性。cADPR也是普遍存在于动物和植物体内的一种第二信使分子,显微注射cADPR引起保卫细胞胞质中 Ca^{2+} 水平升高,在某些信号刺激下细胞内首先合成cADPR,从而引起细胞内钙离子水平升高。Leckie等^[8]向保卫细胞内注射cADPR后,细胞内钙离子浓度升高,以致气孔关闭。Bauer等^[9]发现咖啡因可诱导单细胞绿藻细胞质中钙离子产生振荡,这一振荡引起膜电压的振荡,加入咖啡因的类似物异咖啡因、茶碱、异茶碱都会导致膜电压的振荡,这与这些药物在动物细胞内与cADPR受体结合后产生的效果相似,揭示在这一植物材料中可能存在着可以对cADPR起反应的受体。

Cosgrove和Hedrich^[10]在蚕豆细胞质膜上发现了对牵张刺激敏感的 Ca^{2+} 通道(stretch-activated calcium channel)。这种对机械敏感的通道具有较短的平均开放时间、较为严格的离子选择性、较小的电流值。近年来,对此类钙通道研究的进展不大,虽然已经发现某些刺激因素(如膨压、触动以及某些金属离子等)可以导致细胞内钙离子升高,并且推测它们可能会激活牵张活化的钙离子

通道,但是牵张活化的钙通道激活导致某些生理反应的证据还不足。

1.1.2 Ca^{2+} 通道的分子特点 由于受蛋白质提纯等技术的限制, Ca^{2+} 通道结构的研究进展较慢。最近,从拟南芥克隆到编码 Ca^{2+} 通道的基因 TPC1 (At4g03560)并对此蛋白的结构进行预测。认为此蛋白具有两个像摇动器(shaker-like)的区域(即:2×6跨膜区,每6个跨膜区组成1个“孔”)并由1个亲水区相连,亲水区含有2个EF手型域。 TPC1 在酵母 Ca^{2+} 通道缺失突变体中表达可提高 Ca^{2+} 的吸收^[11]。有证据表明, TPC1 无论过量表达或反义表达增加或减少胞质 Ca^{2+} 都是蔗糖诱导的膜去极化引起的^[11]。因此推测 TPC1 是电压依赖型通道,但尚没有直接证据。

拟南芥基因组中至少存在20个环式核苷酸出入通道(cyclic nucleotide-gated channel, CNGC)家族成员^[12]。其C末端有钙调素和环核苷酸的结合区,并相互重叠。到目前为止,植物中还没有有关环式核苷酸活化通道活性的报道,只是在拟南芥根中发现存在受cAMP和cGMP抑制的非选择性阳离子通道(non selective cation channel, NSCC)。

拟南芥基因组中有约30个谷氨酸受体(glutamate receptor, GLR)家族成员。谷氨酸可触发拟南芥根胞质 Ca^{2+} 浓度的增加及膜去极化,此反应是谷氨酸特异性的。过表达 AtGLR2 基因引起 Ca^{2+} 亏缺症状及其它离子的缺失,但增加外源 Ca^{2+} 浓度可缓解此症状。 AtGLR2 表达分析表明,它与 Ca^{2+} 从木质部导管的卸载有关。尽管植物中有关GLR的质膜定位还尚未明确,但它可能具有活化非选择性阴离子通道的生理功能。

到目前为止,还没有克隆到编码内膜 Ca^{2+} 释放通道的基因。因此,尽快搞清楚植物细胞内钙通道的分子结构和开关机制,并将细胞内某些钙通道的活化与具体的生理学反应联系起来,是阐明不同钙信号对植物细胞代谢、生长发育影响的重点研究内容。

1.2 Ca^{2+} 主动运输体系

1.2.1 Ca^{2+} 主动运输体系的类型及生理生化特性

Ca^{2+} 主动运输体系主要包括两大类: $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 逆转运蛋白($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter)和 Ca^{2+} 泵(Ca^{2+} -ATPase)。此体系主要有3种功能:(1)随着 Ca^{2+} 的释放, Ca^{2+} 主动运输体能恢复 Ca^{2+} 静息状态的浓度以终结

Ca²⁺ 信号; (2) 能将 Ca²⁺ 逆浓度梯度运输到内膜系统如内质网和液泡中, 作为 Ca²⁺ 库来调控 Ca²⁺ 释放; (3) 将 Ca²⁺ 供应给各个器官以维持各器官正常的生理生化功能, 如内质网(endoplasmic reticulum, ER) 内需高 Ca²⁺ 水平来维持其中蛋白质的正常折叠、加工等。

Ca²⁺/H⁺ 逆转运蛋白依赖于 H⁺-ATPase 或 H⁺-PPase 产生的跨膜质子梯度来驱动 Ca²⁺ 的运输, 属于次级主动运输(secondary active transport)。Ca²⁺/H⁺ 逆向转运体是低亲和 ($K_m=10\sim 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、高容量的载体, 胞质中 Ca²⁺ 水平很高时发挥生理功能。植物中第 1 个被克隆出来并进行功能性表达的 Ca²⁺/H⁺ 逆转运蛋白是 CAX1 (calcium exchanger 1) [13]。CAX1 能在低 Ca²⁺ 水平下转运 Ca²⁺ (K_m 约为 $13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 与燕麦根等液泡 Ca²⁺/H⁺ antiporter 活性动力学曲线相一致 [14]。开始时人们认为 Ca²⁺/H⁺ antiporter 定位于液泡膜上, 但后来有证据表明 Ca²⁺/H⁺ antiporter 也位于质膜上 [15]。

在拟南芥中已克隆出 12 个与 CAX1 功能相似的基因 [12], 但还不能确定这些基因编码的蛋白是否都能运输 Ca²⁺, 如 CAX2 除运输 Ca²⁺ 外, 还能运输 Mn²⁺ [16]。这些蛋白的亚细胞定位还有待进一步研究。最近, 我们实验室从盐生植物碱蓬 (*Suaeda salsa* L.) 中克隆出编码 Ca²⁺/H⁺ antiporter 的基因 *SsCAX1* (AY 518204), 根据其编码序列预测 *SsCAX1* 有 11 个跨膜区, 分子量约为 48.8 kD, 它能恢复高 Ca²⁺ 条件下酵母 Ca²⁺ 运输体缺失突变体 K667 的生长, 我们初步认为 *SsCAX1* 可能定位于液泡膜上 (未发表资料)。作为盐生植物的 Ca²⁺ 转运体对植物抗盐反应有何意义, 其与非盐生植物如拟南芥的 Ca²⁺/H⁺ antiporter 的特性是否不同, 值得深入研究。

钙泵即 Ca²⁺-ATPase, 属于 P 型 ATPase 家族, 直接利用 ATP 驱动离子转运。它每消耗 1 个 ATP 可实现 2 个 Ca²⁺ 逆电势梯度转运。Ca²⁺-ATPase 对 Ca²⁺ 有较高的亲和性 ($K_m=0.1\sim 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但容量低 [3]。这表明此转运体可精细调节细胞质中的 Ca²⁺ 水平。钙泵有两种存在状态: E1 态 (Ca²⁺ 高亲和态) 和 E2 态 (Ca²⁺ 低亲和态)。E1、E2 通过与 Ca²⁺ 的结合、释放, 进行不同的反应, 伴随其 Asp 的磷酸化而将 ATP 的能量储存在蛋白质中, 并在以后的水解过程中将能量释放出来。根

据蛋白质序列分析结果, 植物 Ca²⁺ 泵可分为两类: IIA 和 IIB 型, 分别包括 ER 型 Ca²⁺-ATPase (ER-type calcium ATPase, ECA) 和自抑制的 Ca²⁺-ATPase (autoinhibited calcium ATPase, ACA)。

在生化特点上 ACA 与 ECA 有 3 点不同: (1) 有无 N 末端自抑制区; (2) 是否通过耦联钙/钙调素 (calcium/calmodulin, Ca/CaM) 活化; (3) 对 cyclopiazonic acid 和 thapsigargin 是否敏感 [17]。有趣的是, 在玉米中有一种 Ca²⁺ 泵兼有 ECA 和 ACA 的特性 [18]。但在拟南芥基因组中相应的基因尚未发现。这种 Ca²⁺ 泵可能并非存在于所有陆生植物中。

拟南芥中已克隆出 4 种 ECA 型和 10 种 ACA 型 Ca²⁺ 泵 [19]。通过膜分离和免疫检测技术将 ECA1 定位于 ER [20], 但并不排除定位于其他膜上的可能性, 如有证据表明番茄的 ER 型 Ca²⁺-ATPase (LCA1) 定位于液泡膜和质膜上。

植物 ACA 型 Ca²⁺-ATPase 与动物质膜 Ca²⁺-ATPase 结构和激活方式相似, 然而他们有两个明显的不同: (1) 自抑制区位置不同, 植物的位于 N 末端, 而动物位于 C 末端; (2) 亚细胞定位不同, 植物 ACA 型 Ca²⁺-ATPase 不仅仅位于质膜上, 还定位于其他内膜系统, 而动物的只定位于质膜上。

1.2.2 Ca²⁺主动运输体系的分子特性 *CAX1* 是第 1 个被克隆出来并功能性表达的植物 Ca²⁺/H⁺ 逆转运体。它编码的蛋白是单链跨膜蛋白, 有 8 个跨膜区, 含有 1 个亲水中心区, 富集酸性氨基酸残基 [13]。

Pittman 和 Hirschi [21] 发现 *CAX1* 的活性受 N 末端自抑制区调控。在烟草中表达“去 N 末端”的 *CAX1* 可引起体内 Ca²⁺ 的增加并伴有 Ca²⁺ 逆转运活性的增加。但植物却表现出 Ca²⁺ 亏缺症状。此外, 植物还表现出对 K 和 Mg 的过敏感且对各种胁迫 (如盐和冷胁迫) 的敏感性增加。因此认为植物发育和胁迫耐性依赖于对 *CAX1* 活性的调控。

植物中已克隆出的编码 IIA 型 Ca²⁺ 泵基因有番茄的 *LCA1* [22]、水稻的 *OCA1* [23] 和拟南芥的 *ECA1/ACA3* [20] 等。这些 IIA 型泵由 1 条多肽链组成, 分子量约为 115~116 kD。Wimmers 等 [22] 分析 *LCA1* 的结构结果表明, *LCA1* 蛋白由 1 048 个氨基酸残基组成, 分子量约为 116 kD, 有 8 个跨膜区, 在第 450~750 氨基酸间存在 1 个胞质环。Liang 等 [20] 也发现, *ECA1* 所编码的多肽分子量约为 106 kD, 该多肽含有 10 个跨膜区, 跨膜区域 4 (TM4)

和跨膜区域5(TM5)间有1个天冬氨酸磷酸化位点和2个ATP结合位点。

编码植物IIB型Ca²⁺泵的基因也已经克隆,如拟南芥 *ACA1*^[24]和 *ACA2*^[25]、花椰菜的 *BCA1*^[26]等。*BCA1p*具有N末端的CaM结合区(Ala19~Leu43)^[27]。拟南芥 *ACA2*在酵母中功能性表达显示出受Ca²⁺/CaM调控的特性,而且CaM结合区位于N末端的第36个氨基酸残基处,N末端的自抑功能已从基因分析及N末端(Δ 2-80)的酶解生化分析中得到证实。

拟南芥 *ACA4p*的氨基酸序列与花椰菜 *BCA1p*有很高的同源性,受CaM激活,CaM结合于N末端。根据蔡磺化的CaM荧光测试技术得到的结果可以断定CaM与 *ACA4p*N末端相互作用^[25]。有证据表明,盐胁迫下 *ACA4p*在钙信号传递中起作用,此蛋白的修饰可引起盐敏感性改变。*BCA1p*和 *ACA2p*及其它同源物都是CaM刺激的Ca²⁺-ATPase。它们与CaM的结合区位于N末端,定位在细胞内膜上,分子量约111~116 kD,有10个跨膜区^[25]。

总之,细胞膜Ca²⁺运输体主要负责Ca²⁺进出胞质,引起胞内Ca²⁺的波动,在维持胞质Ca²⁺的稳态和响应环境刺激中起作用。

2 Ca²⁺信号与胁迫应答

2.1 解码Ca²⁺信号

植物细胞中用Ca²⁺作为信号传递刺激的反应很多,细胞是怎样区分不同的刺激并作出相应的反应是近年来人们研究的热点。许多人认为,不同的刺激引起的胞质中Ca²⁺浓度变化的区域和幅度不同是植物对不同刺激反应的结果^[28]。仅是Ca²⁺一种信号如何可以携带多种复杂的信息?关键是应考虑刺激引起的Ca²⁺浓度变化的位置、幅度、频率及持续的时间,还要考虑Ca²⁺与其他细胞成分之间的相互作用和信号传递路线。

Ca²⁺信号是通过Ca²⁺通道让Ca²⁺从电化学势高的Ca²⁺库流入电化学势低的胞质产生的。而Ca²⁺库中高Ca²⁺电化学势的维持则由各种Ca²⁺-ATPase和Ca²⁺/H⁺ antiporter完成。内流通道及外流泵和载体的相互作用决定了胞内Ca²⁺浓度波动的特异性。Sanders等^[1]提出,细胞质中Ca²⁺的不同进出路线均能影响胞内Ca²⁺的动态变化。这一论点有助于解释同一种信使如何对不同刺激做出应答。以前的研究发现,在非洲爪蟾卵母细胞中Ca²⁺泵数量的增加或活性提高都能改变信号的转导^[29,30]。

因此可以认为,这些Ca²⁺通道和主动运输体的调控对解码不同的胁迫起到关键的作用。

2.2 Ca²⁺信号与上游刺激和下游反应的关系

植物对外界环境的适应与Ca²⁺的信号转导系统活性有关^[31]。越来越多的事实表明,特定的刺激能引起胞内Ca²⁺水平瞬息变化。如触摸、冷击、氧化胁迫、渗透胁迫、盐胁迫等均能引起胞内Ca²⁺的瞬息增加^[32,33]。Lynch等^[34]证实,盐胁迫可诱导玉米原生质中Ca²⁺水平提高,并持续几分钟,这与高温胁迫相似。触摸和冷激在15 s内引起植物细胞质中Ca²⁺水平呈现一个尖峰,缺氧可诱导胞质中Ca²⁺水平提高达几小时。各种逆境因素诱导的胞质中Ca²⁺水平变化在时空和程度上的差异可能是植物细胞区分逆境因素类型、诱导不同基因表达以及适应相应逆境的机制之一。盐胁迫诱导的Ca²⁺水平变化依赖于盐浓度,当介质中NaCl浓度为90~120 mmol·L⁻¹时,烟草悬浮细胞的Ca²⁺水平陡然上升,超出这个浓度范围变化则不明显,表明胁迫信号感受系统受特殊的胁迫水平所激活。提高胞外Ca²⁺浓度可以缓解盐的抑制作用^[35]。干旱和盐可诱导依赖Ca²⁺的蛋白激酶(calcium dependent protein kinase, CDPK)、钙结合蛋白和Ca²⁺-ATPase基因的表达,这间接证明了Ca²⁺在这些过程中起作用。

Zhu等^[36]用分子生物学方法分离盐敏感(salt overly sensitive, SOS)突变体来确定耐盐决定子。采用此方法在拟南芥中已发现一个耐盐必需基因 *SOS3*。此基因突变可引起植物对NaCl和LiCl超敏感,增加介质中的Ca²⁺浓度可降低其对盐的敏感度。*SOS3*编码的蛋白质具有与EF手型Ca²⁺结合区同源的区域,且与蛋白磷酸酶B (calcineurin B, CnB)亚基序列高度同源。在酵母 *Sacharomyces cerevisiae*中calcineurin为Ca/CaM依赖性丝/苏氨酸磷酸酶,是重要的信号中间体,它可调节盐渍条件下的K⁺、Na⁺稳恒态^[37,38]。高盐可诱导酵母 *S. cerevisiae*的 *ENA1/PMR2A*基因的表达,编码质膜上的Na⁺-ATPase,有利Na⁺外排, K⁺吸收系统也由静息状态的低K⁺亲和性和K⁺/Na⁺选择性(相当于植物K⁺吸收系统2)转变为高K⁺亲和性和高K⁺/Na⁺选择性(相当于植物K⁺吸收系统1)。这两种变化都可限制胞质中Na⁺积累,并都受Ca²⁺依赖型的calcineurin调节^[37]。活化的calcineurin与转录

因子 TCN/CRZ1 相互作用可诱导 *ENAI* 和其它 calcineurin 依赖性基因的转录^[39, 40]。盐胁迫可引起胞质中 Ca^{2+} 水平的快速增加, 升高的 Ca^{2+} 可启动信号级联反应, 从而调节植物盐适应性。SOS3 蛋白和 CnB 的序列高度同源表明 SOS3 受 Ca^{2+} 激活后活化 SOS2 (蛋白激酶), SOS3/SOS2 激酶复合体激活质膜 SOS1 (Na^+/H^+ exchanger), 促进胞质 Na^+ 外排, 而且 SOS3/SOS2 复合体也可能活化或抑制其他有关运输体以维持胞质中 Na^+ 的稳态^[41], 从而提高植物的抗盐性。

Ca^{2+} 信号引起下游反应大小的最简单的依据是认为刺激的大小决定了 Ca^{2+} 瞬息变化的大小, 从而决定了反应的大小。Malho 等^[42]比较 11 种不同刺激所引起的 Ca^{2+} 瞬息变化的结果认为每种 Ca^{2+} 水平的变化可分为停滞期、上升期和持续期。这 3 个时期对不同的刺激做出差异应答。例如, 烟草细胞对风和触摸刺激的停滞期是检测不到的, 上升期为 1 s, 持续期仅 15 s。渗透胁迫的停滞期为 30 s, 上升期为 60 s, 持续期为 150 s。渗透胁迫引起烟草 Ca^{2+} 的瞬息增加可分两个时期: 小规模缓慢的上升和紧接着大规模快速上升。这两个时期都依赖于胞外 Ca^{2+} 的参与, 并且表现出对 V-ATPase 抑制剂 bafilomycin 及蛋白激酶抑制剂 K-252a 敏感性的不同, 说明这两个时期 Ca^{2+} 水平增加的机制不同。Cessna 等^[43]提出, Ca^{2+} 水平初期的增加是胞外 Ca^{2+} 进入胞质的结果, 而随后大规模的增加则是胞内 Ca^{2+} 库释放的结果。

植物中 Ca^{2+} 信号和下游反应之间的关系复杂。渗透和盐胁迫引起 Ca^{2+} 的瞬息变化和持续时间是相似的, 但 *p5cs* (脯氨酸合成酶基因) 表达水平则有明显不同, 表明除 Ca^{2+} 以外还有其他因素影响这两条通路。

尽管刺激能引起植物胞质中 Ca^{2+} 浓度变化的报道已很多^[44], 但其中很少是能确定引起下游特异性反应的。看来, 某些刺激引起胞质 Ca^{2+} 水平的变化可能仅仅是对胞质 Ca^{2+} 稳态的干扰而非特异性反应。

3 展望

今后, 膜 Ca^{2+} 运输系统与植物逆境应答的机制将集中在以下几个方面: (1) 继续克隆和确定不同的 Ca^{2+} 运输系统基因, 并且确定这些基因特性, 表达与环境应答的关系。例如, 生化实验

已证明在质膜上存在 CaM 调控的 Ca^{2+} 泵^[45], 但相应的基因还未发现。现在我们面临的更大障碍是不能从分子水平上研究 Ca^{2+} 通道, 因为低丰度、大通量的 Ca^{2+} 通道很难从 cDNA 文库中筛选, 但未来这些基因将随着基因测序计划和功能鉴定的完成而得到。(2) 植物体或细胞是如何接受不同胁迫因子和如何通过 Ca^{2+} 信号系统做出响应的分子机制还不清楚。(3) 确定不同 Ca^{2+} 运输载体和通道的特定功能, 精确研究 Ca^{2+} 水平的变化是如何在细胞特定部位受调控的, 确定每一个运输体和通道的亚细胞定位、生化活性及调控特点等。

参考文献

- Sanders D, Brownlee C, Harper JF. Communicating with calcium. *Plant Cell*, 1999, 11: 691~706
- 章文华, 陈亚华, 刘友良. 钙在植物细胞盐胁迫信号中的作用. *植物生理学通讯*, 2000, 36: 146~153
- Bush DR. Calcium regulation in plant cell and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 95~122
- 尚忠林, 孙大业. 植物细胞内的钙通道. *植物生理学通讯*, 2002, 38: 625~630
- Thuleau P, Ward JM, Ranjeva R. Voltage-dependent calcium-permeable channels in the plasma membrane of a higher plant cell. *EMBO J*, 1994, 13: 2970~2975
- Gelli A, Blumwald E. Calcium retrieval from vacuolar pools. Characterization of a vacuolar calcium channel. *Plant Physiol*, 1993, 102: 1139~1146
- Allen GJ, Sanders D. Osmotic stress enhances the competence of *Beta vulgaris* vacuoles to respond to inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Plant J*, 1994, 6: 687~695
- Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ et al. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15837~15842
- Bauer CS, Simonis W, Schoenknecht G. Different xanthenes cause membrane potential oscillations in a unicellular green alga pointing to a ryanodine/cADPR receptor Ca^{2+} channel. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40: 453~456
- Cosgrove DJ, Hedrich R. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta*, 1991, 186: 143~153
- Furuichi T, Cunningham KW, Muto SA. Putative two-pore channel AtTPC1 mediates Ca^{2+} flux in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 900~905
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1646~1667
- Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW et al. CAX1, an $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 1996, 93: 8782~8786
- 14 Schumaker KS, Sze H. Calcium transport into the vacuole of oat roots. Characterization of H⁺/Ca²⁺ exchange activity. *J Biol Chem*, 1986, 261: 12172~12178
- 15 Kasai M, Muto S. Ca²⁺ pump and Ca²⁺/H⁺ antiporter in plasma membrane vesicles isolated by aqueous two-phase partitioning from corn leaves. *J Membrane Biol*, 1990, 114: 133~142
- 16 Hirschi KD, Korenkov VD, Wilganowski NL et al. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol*, 2000, 124: 125~134
- 17 Sze H, Liang F, Hwang I et al. Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: Insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 433~462
- 18 Subbiah CC, Sachs MM. Maize cap1 encodes a novel SERCA-type calcium-ATPase with a calmodulin-binding domain. *J Biol Chem*, 2000, 275: 21678~21687
- 19 Axelsen KB, Palmgren MG. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 696~706
- 20 Liang F, Cunningham KW, Harper JF et al. ECA1 complements yeast mutants defective in Ca²⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca²⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 8579~8584
- 21 Pittman JK, Hirschi KD. Regulation of CAX1, an *Arabidopsis* Ca²⁺/H⁺ antiporter. Identification of an N-terminal auto-inhibitory domain. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1020~1029
- 22 Wimmers LE, Ewing NN, Bennett AB. Higher plant Ca²⁺-ATPase: Primary structure and regulation of mRNA abundance by salt. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9205~9209
- 23 Chen X, Chang M, Wang B et al. Cloning of a Ca²⁺-ATPase gene and the role of Ca²⁺ cytosolic in the gibberellin-independent signaling pathway in aleurone cells. *Plant J*, 1997, 11: 363~371
- 24 Huang L, Berkelman T, Franklin AE et al. Characterization of a gene encoding a Ca²⁺-ATPase like protein in the plastid envelope. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10066~10070
- 25 Harper JF, Hong B, Hwang I et al. A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal auto-inhibitory domain. *J Biol Chem*, 1998, 273: 1099~1106
- 26 Malmström S, Askerlund P, Palmgren MG. A calmodulin-stimulated Ca²⁺-ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus. *FEBS Lett*, 1997, 400: 324~328
- 27 Evans DE, Williams LE. P-type calcium ATPase in higher plants—biochemical, molecular and functional properties. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1376: 1~25
- 28 McAinsh MR, Hetherington AM. Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 32~36
- 29 Lechleiter JD, John LM, Camacho P. Ca²⁺ wave dispersion and spiral wave entrainment in *Xenopus laevis* oocytes overexpressing Ca²⁺-ATPases. *Biophys Chem*, 1998, 72: 123~129
- 30 Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca²⁺ oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol*, 2000, 149: 1235~1248
- 31 Epstein E. How calcium enhances plant salt tolerant. *Science*, 1998, 280: 1906~1907
- 32 Taylor AR, Manison NFH, Fernandez C et al. Spatial organization of calcium signaling involved in cell volume control in the *Fucus rhizoid*. *Plant Cell*, 1996, 8: 2015~2031
- 33 Takahashi K, Isobe M, Knight MR et al. Hypo-osmotic shock induces increases in cytosolic Ca²⁺ in tobacco suspension culture cells. *Plant Physiol*, 1997, 113: 587~594
- 34 Lynch J, Polite VS, Lauchli A. Salinity stress increases cytoplasmic Ca activity in maize root protoplasts. *Plant Physiol*, 1989, 90: 1271~1274
- 35 Liu J, Zhu JK. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 1998, 280: 1943~1945
- 36 Zhu JK, Liu L, Xiong L. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 1998, 10: 1181~1191
- 37 Mendoza I. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1994, 269: 8792~8796
- 38 Mendoza I, Quintero FJ, Bressan RA et al. Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *J Biol Chem*, 1996, 271: 23061~23067
- 39 Matheos DP. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 1997, 11: 3445~3458
- 40 Stathopoulos AM, Cyert MS. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1 encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev*, 1997, 11: 3432~3444
- 41 Qiu QS, Guo Y, Quintero F et al. Regulation of vacuolar membrane Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the SOS pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279: 207~215
- 42 Malho R, Moutinho A, Van der Luit A et al. Spatial characteristics of calcium signaling: The calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signaling. *Phil Trans R Soc Lond*, 1998, 353: 1463~1473
- 43 Cessna SG, Chandra S, Low PS. Hypo-osmotic shock of tobacco cells stimulates Ca²⁺ fluxes deriving first from external and then internal Ca²⁺ stores. *J Biol Chem*, 1998, 273: 27286~27291
- 44 Evans NH, McAinsh MR, Hetherington AM. Calcium oscillations in higher plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 415~420
- 45 Hwang I, Ratterman DM, Sze H. Distinction between endoplasmic reticulum-type and plasma membrane-type Ca²⁺ pumps. *Plant Physiol*, 1997, 113: 535~548