

## 植物细胞器钙信号研究进展

郑远\*, 陈兆进

南阳师范学院生命科学与技术学院, 河南南阳473061

**摘要:** 钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )作为细胞内重要的第二信使, 在植物生长发育以及外界信号响应方面具有重要作用。当植物受到外界环境刺激时, 细胞质中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度出现特异性升高, 细胞通过这些钙信号将信息传递到下游, 从而产生正确的应答反应。目前, 植物中的钙信号研究主要集中于 $\text{Ca}^{2+}$ 在细胞中的转运以及对钙信号的解码等方面。而越来越多的研究表明, 细胞器作为细胞重要的 $\text{Ca}^{2+}$ 储存场所, 在钙信号产生过程中具有重要的作用。许多细胞器不仅自身存在特异的钙信号, 还能参与胞质中钙信号的形成。本文就钙信号途径中植物细胞器功能的最新研究进展进行了综述。

**关键词:** 钙信号; 植物; 细胞器; 细胞壁

## Organellar Calcium Signaling in Plants

ZHENG Yuan\*, CHEN Zhao-Jin

School of Life Science & Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China

**Abstract:** Plants have adopted the calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) as a versatile second messenger in the regulation of plant development and environmental responses. Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) elevation induced by various signals is responsible for appropriate downstream responses. So far in plants, most of the research on calcium signaling has been focused on the transport mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$  as well as the components involved in decoding of calcium signals. Recently, increasing evidence suggests that organelles which serve as calcium stores in plants not only undergo calcium regulation themselves, but also are able to influence the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cytoplasm. This review provides a brief overview of calcium regulation in different cellular compartments and emerging roles of organelles in calcium signaling.

**Key words:** calcium signaling; plants; organelle; cell wall

$\text{Ca}^{2+}$ 作为细胞中必不可少的离子, 不仅参与维持细胞结构和细胞内离子平衡, 还可以作为第二信使传递各种信号。研究发现, 冰冻、干旱、高盐等非生物胁迫以及病毒、细菌等病原体的生物胁迫都能够诱导植物细胞产生特异的钙信号。细胞器作为胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的储存场所, 不仅能够在自身内部形成特异的钙信号, 还可以通过 $\text{Ca}^{2+}$ 通道以及 $\text{Ca}^{2+}$ 转运蛋白调节细胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的变化, 进而参与调控细胞内的信号传递。目前有很多证据表明, 植物特有的细胞器液泡以及叶绿体在钙信号的形成过程中具有重要作用。本文就钙信号途径中植物细胞器功能的研究新进展做一综述。

### 1 钙信号的形成与解码

$\text{Ca}^{2+}$ 在植物细胞的生理和生化过程中具有非常重要的作用, 但高浓度的 $\text{Ca}^{2+}$ 可以与磷酸根离子结合形成沉淀, 因此植物细胞中大部分的 $\text{Ca}^{2+}$ 都被储存在细胞外以及细胞内的各种细胞器中(Ber-ridge 2005)。在静息条件下, 细胞质中游离钙离子

浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ )维持在100~200 nmol·L<sup>-1</sup>之间, 而细胞外和某些细胞器内的储存的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度可以达到胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>倍。这种巨大的浓度差, 使 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 能够发生迅速变化, 为 $\text{Ca}^{2+}$ 作为第二信使传递信号提供了可能(Kudla等2010)。目前, 在激素、光、盐等非生物胁迫以及病原菌侵染等生物胁迫信号途径中都报道了 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化。而对应不同的外界环境刺激, 细胞可以产生各种在时间及空间上存在差异的钙信号, 这些钙信号具有不同的亚细胞定位、时间间隔、振幅和频率, 因此被称为钙标签( $\text{Ca}^{2+}$  signature)(Dodd等2010)。

植物细胞中的钙信号, 主要是由细胞壁以及细胞器内储存的 $\text{Ca}^{2+}$ , 通过细胞膜或细胞器膜上特异的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道、 $\text{Ca}^{2+}$ 泵以及 $\text{Ca}^{2+}$ 转运蛋白流入细胞

收稿 2015-03-03 修定 2015-07-22

资助 自然科学基金项目(31400264)。

\* 通讯作者(E-mail: zhengyuan051@163.com)。

质中产生的。目前在植物中发现的这些蛋白主要包括定位在细胞膜的非特异性阳离子通道如环核苷酸门控离子通道(cyclic nucleotide-gated ion channels, CNGCs)、类谷氨酸受体(glutamate-like receptors, GLRs)蛋白通道、高渗门控 $\text{Ca}^{2+}$ 通道(hyperosmolality-gated calcium-permeable channel)、annexin转运蛋白以及定位在液泡膜的双孔通道(two pore  $\text{Ca}^{2+}$  channels, TPC)(贾如等2014; Steinhilber和Kudla 2013, 2014; Yuan等2014)。而钙信号的解码则是通过各种 $\text{Ca}^{2+}$ 结合蛋白实现。在植物中,  $\text{Ca}^{2+}$ 结合蛋白主要分为响应元件(sensor responder)和传感元件(sensor relay)两类蛋白。前者通过与 $\text{Ca}^{2+}$ 的结合改变自身激酶活性或构象直接调控下游, 主要包括钙依赖蛋白激酶(calcium dependent protein kinase, CDPK); 后者与 $\text{Ca}^{2+}$ 结合后, 还必须与目标蛋白相互作用才能调控下游信号, 主要包括钙调素(CaM)和钙调磷酸酶B类似蛋白(calcineurin B-like, CBL)。这些蛋白通过与 $\text{Ca}^{2+}$ 的结合, 改变自身或目标蛋白的活性, 进而调控下游目的基因的表达, 最终使细胞能够产生特异的信号响应(沈金秋等2014; Batistic和Kudla 2012)。

## 2 钙信号的检测

对细胞内以及细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化的实时监测是研究钙信号的基础。目前主要通过水母发光蛋白(aequorin)和YC3.6 (yellow cameleons 3.6)两种 $\text{Ca}^{2+}$ 荧光蛋白探针来测定 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度。水母发光蛋白具有3个可与 $\text{Ca}^{2+}$ 结合的EF-hand结构域, 在与 $\text{Ca}^{2+}$ 结合后, 其构象发生变化, 可催化腔肠荧光素(coelenterazine)发生氧化反应, 同时发射出波长为469 nm的蓝光。在整个反应过程中, 水母发光蛋白发射的光子数与 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度呈正相关, 通过检测荧光强度可间接测定细胞内钙信号的变化(Mithofer和Mazars 2002)。YC3.6是将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术相结合的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度指示蛋白。Cameleon分子呈哑铃形, 其中心为可与 $\text{Ca}^{2+}$ 结合的CaM, CaM的一端连接荧光供体青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP), 另一端通过CaM结合蛋白M13连接荧光受体黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)。CaM在结合 $\text{Ca}^{2+}$ 后发生构象变化, 其两端的YFP和CFP向

中间靠拢从而发生FRET。在用 $440 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的激光激发时, 会出现CFP的青色荧光( $480 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )减弱而YFP的黄色荧光( $530 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )增强的现象, 通过检测YFP和CFP荧光强度的比值( $R=F_{\text{YFP}}/F_{\text{CFP}}$ )同样可以间接测定细胞内钙信号的变化(Horikawa等2010)。

目前, 通过各种信号肽的引导, 水母发光蛋白以及YC3.6已经可被特异地表达在细胞壁、细胞质、细胞核、线粒体、叶绿体、内质网以及细胞膜上, 从而监测胞内以及胞外特定位置的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化情况(Bonza等2013; Krebs等2012; Loro等2012; Mehlmer等2012)。而且随着激光共聚焦扫描显微技术(confocal laser scanning microscopy, CLSM)以及选择性平面照明显微技术(selective plane illumination microscopy, SPIM)在钙信号监测中应用的不断成熟(Costa等2013; Krebs等2012), 人们对钙信号的认识也在不断加深。

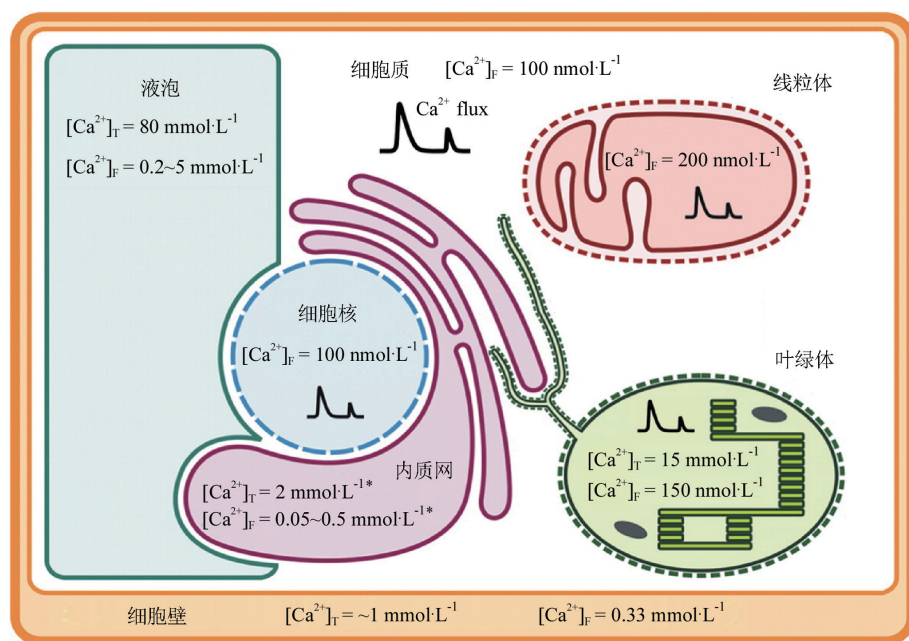
## 3 细胞器与钙信号

在动物细胞中, 内质网与线粒体通过参与调节钙信号的形成在肌肉细胞收缩以及细胞凋亡过程中具有重要作用。但在植物细胞中, 植物细胞特有的中央大液泡以及叶绿体在钙信号转导过程中可能具有更加重要的地位。

### 3.1 液泡

中央大液泡是植物细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 最主要的储存地点。液泡中包含的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度可高达 $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)叶肉细胞液泡中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度约为 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Conn等2011), 但液泡中大部分的 $\text{Ca}^{2+}$ 通过与螯合物以及蛋白相结合的方式被储存起来, 游离的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度只有 $0.2 \sim 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图1)(Conn和Gilliam 2010)。研究表明, 液泡中储存的 $\text{Ca}^{2+}$ 可以参与胞质中钙信号的形成, 而这主要依赖于定位在液泡膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道(Schönknecht 2013)。

1,4,5-三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-trisphosphate,  $\text{IP}_3$ )和环二磷酸腺苷核糖(cyclic ADP-ribose, cADPR)都可以诱导液泡释放 $\text{Ca}^{2+}$ , 表明液泡膜可能存在配体门控通道(ligand-gated channels) (Pottosin和Schönknecht 2007)。在拟南芥保卫细胞中, 二磷酸腺苷核糖基环化酶(ADP-ribosyl cyclase, ADPRC)在cADPR的生成过程中具有重要作用。当用烟碱(nicotinamide)抑制cADPRC的表达时, 脱落酸(ab-

图1 植物细胞器内的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度Fig.1 Organellar  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in plant cell

参照Stael等(2012)文献修改。\*:  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度参考动物细胞;  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{r}}$ : 细胞内所含有的全部 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度;  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{f}}$ : 游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度。

scisic acid, ABA)诱导的胞质内钙信号的形成以及气孔的关闭都会受到抑制(Leckie等1998)。在鸭跖草(*Catocala communis*)中, 抑制磷酸肌醇特异磷酸酶C (phosphoinositide-specific phospholipase C, PI-PLC)的活性可以减少 $\text{IP}_3$ 的含量, 而同时ABA诱导的胞质内钙信号形成以及气孔关闭同样会受到抑制(Staxen等1999)。在植物细胞中, 盐胁迫可以诱导细胞内 $\text{IP}_3$ 含量以及胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高, 但当PI-PLC活性被抑制时, 这些过程同样会受到抑制(DeWald等2001)。这些证据都表明, 液泡上可能存在着配体门控通道参与细胞内钙信号的形成, 但由于这两种通道蛋白在植物细胞中的功能尚未被证实, 所以它们在钙信号途径中的作用还有很多争议。

目前, 已被证实的定位在液泡膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道只有拟南芥中的TPC1 (Peiter等2005)。TPC1属于电压门控通道(voltage-gated channels), 已被证明是液泡膜上主要的 $\text{Ca}^{2+}$ 释放通道, 但其作为慢速液泡膜(slow vacuolar, SV)通道, 在钙信号形成中的作用一直饱受争议(Pottosin等2009)。高浓度的外源钙离子( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ )可以诱导气孔的关闭, 以及 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高。在*tpc1*突变体中, 虽然 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ 诱导的气孔关

闭受到抑制, 但突变体中 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高与野生型并无差异(Islam等2010)。而且在冷、盐以及病菌侵染等多种胁迫刺激下, 突变体具有与野生型相同的钙信号, 这些都表明TPC1作为 $\text{Ca}^{2+}$ 通道, 可能并未参与这些信号途经下胞质内钙信号的形成(Ranf等2008)。但最近有证据表明, TPC1的确参与了胞质内钙信号的形成。在植物细胞受到外界伤害时, 会将一种长距离信号(long-distance signaling)传递给远处的细胞, 使其产生植物激素茉莉酮酸酯(jasmonate, JA), 用于抵抗外界的伤害。研究表明, 在这个过程中, 细胞会产生连续的钙信号, 从受伤的细胞传递到远处的细胞, 而TPC1在这个过程中具有非常重要的作用。在*tpc1*突变体中, 钙信号波的传递速度会降低25倍, 而当过量表达TPC1基因时, 钙信号波的传递速度则会升高1.7倍(Choi等2014)。综上所述, 液泡作为胞内最主要的钙库, 参与了胞内钙信号形成, 但具体的作用机制还需要进一步的探索。

### 3.2 内质网

在动物细胞中, 内质网作为钙库的功能已经研究得比较清楚, 光面内质网通过调节胞质内的钙信号在肌肉收缩过程中起着至关重要的作用

(Rossi和Dirksen 2006)。但在植物细胞中,因为缺少动物细胞中内质网离子通道的同源蛋白,内质网在钙信号途径中的功能还不清楚。目前研究得较为清楚的是定位在内质网上的钙网蛋白(calreticulin)。钙网蛋白作为植物细胞中主要的 $\text{Ca}^{2+}$ 储存蛋白,在植物细胞调节 $\text{Ca}^{2+}$ 平衡方面具有重要作用。在烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞中过量表达钙网蛋白,可以增加内质网对 $\text{Ca}^{2+}$ 的储存能力。在拟南芥中,降低钙网蛋白的表达会导致植物对低浓度 $\text{Ca}^{2+}$ 以及水分胁迫的敏感(Kim等2013; Persson等2001)。综上所述,与动物细胞相比,植物细胞内质网在钙信号形成过程中的作用并不清楚,还需要继续对内质网上的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道进行进一步鉴定。

### 3.3 叶绿体

叶绿体中储存的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度可高达 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,但在叶绿体基质中, $\text{Ca}^{2+}$ 浓度却和细胞质中一样,约为 $150 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图1) (Nomuraa和Shiina 2014)。这是因为高浓度的 $\text{Ca}^{2+}$ 会抑制光合作用并沉淀基质中的磷酸盐,所以大部分的 $\text{Ca}^{2+}$ 以与钙结合蛋白相结合的方式被储存在类囊体膜或基质中。

早期的电生理学实验发现,大豆(*Pisum sativum*)叶绿体内膜存在电压依赖的 $\text{Ca}^{2+}$ 转运活性,而绿藻中叶绿体周围可发生光依赖的细胞质 $\text{Ca}^{2+}$ 清空,这些都表明叶绿体膜上可能存在着 $\text{Ca}^{2+}$ 转运蛋白(Nomuraa和Shiina 2014)。目前,在拟南芥中已鉴定了两个可能定位于叶绿体膜的 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase转运蛋白——AtACA1 (auto-inhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1)和AtHMA1 (heavy metal ATPase 1)。但前者只在根中表达,并被证明可能定位在液泡膜或内质网上(Dunkley等2006),而后者则被证明更加倾向于转运重金属离子(Seigneurin-Berny等2006)。叶绿体膜上还存在着两个可能的机械敏感性 $\text{Ca}^{2+}$ 通道——MSL2 (MscS-like 2)和MSL3 (MscS-like 3),它们对于叶绿体的渗透调节具有重要作用,但还没有证据证明它们可以特异性地转运 $\text{Ca}^{2+}$  (Wilson等2011)。而在类囊体膜上同样可能存在 $\text{Ca}^{2+}$ 转运蛋白,用于将基质中的 $\text{Ca}^{2+}$ 储存在类囊体中。在动物细胞中表达豌豆(*Pisum sativum*)类囊体蛋白PPF1可以增加 $\text{Ca}^{2+}$ 的内流,表明PPF1可能是一个 $\text{Ca}^{2+}$ 转运蛋白,但其在类囊体上的作用目前还没有被证实(Wang等2003)。

许多非生物胁迫都可以诱导叶绿体内部产生特异的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度波动,表明叶绿体基质中同样存在着钙信号。在灯光关闭后,叶绿体基质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度会立刻升高,并会持续几十分钟;高浓度的盐刺激会导致叶绿体基质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度瞬时升高,而渗透胁迫则会导致基质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的震荡(Nomuraa和Shiina 2014)。在生物胁迫方面,病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)激发子可以被细胞膜上的PAMP受体识别,在胞质内迅速引起 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高。研究发现,flg22、几丁质和隐地蛋白等PAMP激发子同样可以诱导烟草和拟南芥叶绿体基质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的持续升高,而 $\text{Ca}^{2+}$ 感受器(calcium sensor, CAS)在这个过程中具有非常重要的作用。CAS是定位在类囊体膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ 结合蛋白,在cas突变体中,flg22诱导产生的叶绿体基质中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高、水杨酸(salicylic acid, SA)合成、气孔关闭、胼胝质沉积以及防御基因的表达都受到抑制(Nomura等2012)。同时,CAS介导的钙信号还参与了光信号转导。在衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中,敲除CAS基因可以抑制强光诱导LHCSR3 (light-harvesting complex stress-related protein 3)基因的表达,但通过在培养基中添加高浓度的 $\text{Ca}^{2+}$ 可以恢复LHCSR3的表达(Petroutsos等2011);在拟南芥中CAS可以被定位于类囊体的蛋白激酶STN8 (state transition 8)磷酸化,这个过程同样依赖于光照强度(Vainonen等2008)。近期的研究发现,拟南芥甲基转移酶CAU1 (calcium underaccumulation 1)可以通过改变CAS染色质H4R3sme2的甲基化水平调节CAS基因的表达,影响叶绿体基质内的钙信号,从而参与气孔对外源 $\text{Ca}^{2+}$ 的信号响应(Fu等2013)。

另一方面,叶绿体还参与调控胞质内钙信号的形成。在拟南芥中,叶绿体定位的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道蛋白PPF1可能通过改变胞质内钙信号的响应速度,参与调节植物开花、细胞程序性死亡以及细胞衰老等过程(Nomuraa和Shiina 2014)。而越来越多的证据表明CAS同样参与胞质内钙信号的形成,在 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ 诱导 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高(external  $\text{Ca}^{2+}$ -induced cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  increase)以及气孔关闭过程中具有至关重要的作用(Nomura等2008)。CAS定位于类囊体膜上,其羧基端含有EF-hand结构域,可结合基

质内的 $\text{Ca}^{2+}$ 。当受到外源 $\text{Ca}^{2+}$ 信号刺激时, CAS可能将固定在类囊体膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ 释放到基质中, 而后基质中的 $\text{Ca}^{2+}$ 又会被转移到胞质内, 最终导致胞质中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的瞬间升高, 进而调节气孔的开闭。但目前CAS参与调节钙信号的分子机制还不清楚。CAS作为一个类囊体蛋白, 可以通过调节叶绿体基质以及胞质内的钙信号, 参与调控光、干旱以及植物对病原菌侵染的抵抗等多个过程, 证明叶绿体在钙信号形成过程中的重要作用。

### 3.4 线粒体

在动物细胞中, 线粒体在钙信号途径中的功能已经比较清楚。首先, 线粒体和内质网通过释放自身的 $\text{Ca}^{2+}$ 和吸收胞质内的 $\text{Ca}^{2+}$ , 共同调节胞质内钙信号的形成(Clapham 2007)。另一方面, 线粒体自身内部也存在着独特的钙信号。当线粒体中的 $\text{Ca}^{2+}$ 上升到一定浓度时, 线粒体内的ATP合成就会受到影响, 而当线粒体内积累过量的 $\text{Ca}^{2+}$ 时, 线粒体就会释放出细胞凋亡因子, 从而导致细胞的程序性死亡(Giacomello等2007)。

在植物细胞中, 线粒体在钙信号形成过程中同样具有重要的作用。线粒体内部为了维持ATP合成的正常进行, 游离的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度通常保持在 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下, 这和胞质内的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度基本相同(图1)(Logan和Knight 2003)。冷、渗透胁迫以及氧化胁迫都能够引起线粒体内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的变化, 表明植物细胞线粒体同样具有自身的钙信号。但Giacomello等(2007)发现, 线粒体内部产生的钙信号与胞质内的钙信号完全不同, 表明了两者的可能具有不同的作用机制。在动物细胞中, 线粒体可以通过定位在内膜上的线粒体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)从胞质中吸收 $\text{Ca}^{2+}$ , 而MICU1 (mitochondrial calcium uptake 1)通过与MCU的相互作用, 调节MCU的活性(Baughman等2011; Perocchi等2010)。拟南芥中有6个MCU同源蛋白和1个MICU1同源蛋白, 但这些蛋白在线粒体中的定位及功能目前尚不清楚(Stael等2012)。拟南芥中还具有线粒体 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运体LETM1 (leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1)的同源蛋白AtLETM1和AtLETM2, 这两个蛋白都定位在线粒体中, 任何蛋白功能的缺失都会导致植株的死亡, 表明它们在线粒体中具有

重要的作用(Zhang等2012)。对AtLETM1和AtLETM2在 $\text{Ca}^{2+}$ 转运过程中功能的研究, 能让我们对植物中线粒体如何参与调节钙信号有更加深入的了解。

线粒体同时也参与胞质内钙信号的形成。在拟南芥根毛细胞中, 微丝蛋白的解聚会导致线粒体内 $\text{Ca}^{2+}$ 释放到细胞质中, 从而引起胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高(Wang等2010)。近期的研究发现, 微丝相关蛋白2/3 (actin-related protein 2/3, Arp2/3)复合体参与了这个过程。*arp2*突变体在盐胁迫下, 胞质内会产生 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的异常升高。突变体中含有异常的细胞骨架, 同时线粒体的运动也受到抑制, 使线粒体膜通道打开以及膜电势降低, 从而导致盐胁迫下线粒体内 $\text{Ca}^{2+}$ 外流, 使胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度异常升高。而当线粒体膜通道被抑制时, 胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的异常升高同样会受到抑制(Zhao等2013)。这些证据直接证明线粒体参与了细胞质内钙信号的形成, 但具体分子机制尚不清楚。

### 3.5 细胞核

细胞核作为控制基因表达的场所, 在钙信号途径中具有非常重要的作用。细胞核内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度与胞质内基本相同, 约为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图1)(Mazars等2009)。不仅胞质内产生的钙信号可以传递到细胞核内, 细胞核内同样可以产生自己的钙信号, 这些钙信号通过改变转录因子的活性调节基因的基因表达, 从而响应外界环境的改变。在细胞核的核膜上存在着核孔复合体等许多通道, 它们在细胞核与细胞质的物质交换过程中具有非常重要的作用。以往人们认为胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度改变的同时可以通过这些通道改变细胞核内 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度, 不过, 越来越多的证据表明, 两者的关系并没有这么简单。烟草细胞中, 盐胁迫会导致细胞质内和细胞核内会产生不同的钙信号; 而在更高浓度的盐胁迫条件下, 只有细胞质内会发生 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的改变。当用隐地蛋白刺激烟草细胞时, 细胞核内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的改变比细胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的改变要晚15 min (Mazars等2011)。而在JA的刺激下,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的改变只在细胞核内出现(Walter等2007)。这些证据表明细胞核内钙信号的形成可能独立于胞质内的钙信号, 同时还表明, 细胞核核膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道和 $\text{Ca}^{2+}$ 转运蛋白在细胞核钙信号产生过程中

有着非常重要的作用。在百脉根(*Lotus japonicus*)细胞中,离子通道蛋白Castor和Polux被发现定位在核膜上。在Castor和Polux突变体中,核周围的钙信号受到抑制,表明其在细胞核钙信号形成过程中具有重要作用(Charpentier等2008; Chen等2009)。目前已经发现许多定位于核膜的Ca<sup>2+</sup>通道和Ca<sup>2+</sup>转运蛋白,但它们在细胞核钙信号途径中的功能尚不清楚。而对于钙信号如何调节细胞核内基因的表达,研究发现Ca<sup>2+</sup>可以通过与转录因子、转录因子结合蛋白以及可以磷酸化转录因子的蛋白激酶CDPK结合,激活这些蛋白的活性,从而调控基因的表达(Stael等2012)。而这些受钙信号调控的基因,往往含有ABA响应原件(abscisic acid-responsive element, ABRE),用于非生物胁迫的响应(Hirayama和Shinozaki 2010)。

#### 4 细胞壁

在细胞内部,细胞器通过释放自己储存的Ca<sup>2+</sup>影响胞内钙信号的形成。而在细胞膜外的细胞壁,同样储存了大量的Ca<sup>2+</sup>,它们通过细胞膜上的Ca<sup>2+</sup>通道进入细胞内,能够迅速引起胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的升高,是胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高的主要来源之一。拟南芥细胞壁中游离的Ca<sup>2+</sup>浓度约为0.33 mmol·L<sup>-1</sup>,而处于结合状态的Ca<sup>2+</sup>浓度约为0.5 mmol·L<sup>-1</sup>(图1)(Conn等2011)。细胞壁中虽然储存了大量的Ca<sup>2+</sup>,但细胞壁中的Ca<sup>2+</sup>浓度却受到非常精确的调控。一方面是因为高浓度胞外Ca<sup>2+</sup>会导致气孔的运动失常,另一方面Ca<sup>2+</sup>要用于联合果胶分子形成细胞壁结构,因此细胞壁中大部分的Ca<sup>2+</sup>都处于与果胶或草酸盐结合的状态。

细胞壁中储存的Ca<sup>2+</sup>可以通过细胞膜上的CNGCs、GLRs和高渗门控Ca<sup>2+</sup>通道参与胞质内钙信号的形成。在拟南芥中,CNGCs和GLRs都含有20个家族成员。目前拟南芥CNGC18已被证实是一个Ca<sup>2+</sup>通道蛋白。研究发现,当在人体肾脏上皮细胞HEK293T中表达CNGC18蛋白时,外源的Ca<sup>2+</sup>可以特异诱导CNGC18通道的开放进而引起胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度的升高,并且CNGC18通道能够被环鸟苷酸(cGMP)和环腺苷酸(cAMP)诱导打开,这些都证明CNGC18是一个可被环核苷酸诱导的Ca<sup>2+</sup>选择性内流通道(Gao等2014)。CNGC18在植物细胞发育过程中同样具有重要作用,在cngc18突变体

中,花粉管不能正常形成,导致突变体的雄性不育(Frietsch等2007)。GLR1.2通道蛋白可以通过调节花粉管发育过程中Ca<sup>2+</sup>的跨质膜内流,从而维持花粉管顶端Ca<sup>2+</sup>浓度梯度。在glr1.2突变体中,花粉管胞外Ca<sup>2+</sup>的流入以及花粉管的发育都受到严重的影响(Michard等2011)。GLR3.4则被证明是一个可被天冬酰胺、甘氨酸和丝氨酸诱导开放,具有高度选择性的Ca<sup>2+</sup>通道蛋白,在细胞钙信号的形成过程中具有非常重要的作用(Vincill等2012)。最近有研究表明, GLR3.2、GLR3.3和GLR3.6作为Ca<sup>2+</sup>释放通道,在植物长距离信号转导过程中同样具有十分重要的作用(Mousavi等2013)。拟南芥高渗门控Ca<sup>2+</sup>通道OSCA1 (reduced hyperosmolality-induced Ca<sup>2+</sup> increase 1)定位于细胞膜上,在渗透胁迫条件下可以介导Ca<sup>2+</sup>的流入(Yuan等2014)。综上所述,细胞壁内储存的Ca<sup>2+</sup>通过细胞膜上的Ca<sup>2+</sup>释放通道CNGCs、GLRs和OSCA1,参与胞质内钙信号的形成,从而调节植物生长和发育。

此外,细胞膜上还存在着调控细胞内钙信号的受体蛋白。ATP作为细胞的能源物质,外源添加ATP能够诱导细胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度的迅速升高。近期研究发现,拟南芥细胞膜上存在凝集素受体激酶(lectin receptor kinase) DORN1 (does not respond to nucleotides 1),它对ATP具有高度的亲和性,可以通过结合胞外的ATP,介导ATP诱导的细胞内钙信号的产生、胞外信号调节激酶的激活以及下游基因的表达(Choi等2014)。肽类激素RALF (rapid alkalization factor)同样能够诱导细胞质中Ca<sup>2+</sup>浓度迅速升高,而FERONIA作为类受体激酶,可以通过结合RALF从而启动下游的磷酸化信号途径,进而调控细胞的伸长(Haruta等2008, 2014)。

#### 5 结语与展望

细胞器作为细胞内重要的Ca<sup>2+</sup>储存场所,在钙信号产生过程中具有非常重要的作用。但目前对这些细胞器在钙信号途径中的功能研究还处于起步阶段。这一方面是由于在动物细胞中已发现的许多Ca<sup>2+</sup>通道蛋白,有的在植物细胞中并未发现同源蛋白,而有的虽然具有同源蛋白,但却并不行使Ca<sup>2+</sup>通道的功能;另一方面,细胞器在钙信号途径中的功能在动植物细胞中也并不完全相同。线粒体以及内质网在动物细胞钙信号途径中具有重要

作用,而目前研究发现叶绿体、液泡以及细胞壁在植物细胞中可能具有更加重要的作用。这表明植物细胞可能拥有自己独特的钙信号调控体系,但这也使植物细胞中钙信号的研究进展较为缓慢。与此同时,植物钙信号途径的研究还是有很大进展,新离子通道的鉴定以及关键元件功能的研究使我们对植物细胞钙信号的了解不断增加,相信随着研究的不断深入,我们对植物细胞器在钙信号调控中的作用会有更加清楚的认识。

### 参考文献

- 贾如,雷梦琦,徐佳妮,鲁瑞琪,黄萱(2014). 植物细胞中钙通道的分布及其在植物抗逆机制中作用的研究进展. 植物生理学报, 50 (12): 1791~1800
- 沈金秋,郑仲仲,潘伟槐,潘建伟(2014). 植物CBL-CIPK信号系统的功能及其作用机理. 植物生理学报, 50 (4): 641~650
- Batistic O, Kudla J (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. Biochim Biophys Acta, 1820: 1283~1293
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL et al (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. Nature, 476: 341~345
- Berridge MJ (2005). Unlocking the secrets of cell signaling. Annu Rev Physiol, 67: 1~21
- Bonza MC, Loro G, Behera S, Wong A, Kudla J, Costa A (2013). Analyses of  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation and dynamics in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* root cells using a genetically encoded Cameleon sensor. Plant Physiol, 163: 1230~1241
- Charpentier M, Bredemeier R, Wanner G, Takeda N, Schleiff E, Parniske M (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. Plant Cell, 20: 3467~3479
- Chen C, Fan C, Gao M, Zhu H (2009). Antiquity and function of CASTOR and POLLUX, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. Plant Physiol, 149: 306~317
- Choi J, Tanaka K, Cao Y, Qi Y, Qiu J, Liang Y, Lee SY, Stacey G (2014). Identification of a plant receptor for extracellular ATP. Science, 343: 290~294
- Choi WG, Toyota M, Kim SH, Hilleary R, Gilroy S (2014). Salt stress-induced  $\text{Ca}^{2+}$  waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 111: 6497~6502
- Clapham DE (2007). Calcium signaling. Cell, 131: 1047~1058
- Conn S, Gilliam M (2010). Comparative physiology of elemental distributions in plants. Ann Bot, 105: 1081~1102
- Conn SJ, Gilliam M, Athman A, Schreiber AW, Baumann U, Moller I, Cheng NH, Stancombe MA, Hirschi KD, Webb A et al (2011). Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. Plant Cell, 23: 240~257
- Costa A, Candeo A, Fieramonti L, Valentini G, Bassi A (2013). Calcium dynamics in root cells of *Arabidopsis thaliana* visualized with selective plane illumination microscopy. PLoS ONE, 8: e75646
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H (2001). Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. Plant Physiol, 126: 759~769
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010). The language of calcium signaling. Ann Rev Plant Biol, 61: 593~620
- Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C et al (2006). Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 6518~6523
- Frietsch S, Wang YF, Sladek C, Poulsen LR, Romanowsky SM, Schroeder JI, Harper JF (2007). A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. Proc Natl Acad Sci USA, 104: 14531~14536
- Fu YL, Zhang GB, Lv XF, Guan Y, Yi HY, Gong JM (2013). *Arabidopsis* histone methylase CAU1/PRMT5/SKB1 acts as an epigenetic suppressor of the calcium signaling gene *CAS* to mediate stomatal closure in response to extracellular calcium. Plant Cell, 25: 2878~2891
- Gao QF, Fei CF, Dong JY, Gu LL, Wang YF (2014). *Arabidopsis* CNGC18 is a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel. Mol Plant, 7: 739~743
- Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T (2007). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  as a key regulator of cell life and death. Cell Death Differ, 14: 1267~1274
- Haruta M, Monshausen G, Gilroy S, Sussman MR (2008). A cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. Biochemistry, 47: 6311~6321
- Haruta M, Sabat G, Stecker K, Minkoff BB, Sussman MR (2014). A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. Science, 343: 408~411
- Hirayama T, Shinozaki K (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. Plant J, 61: 1041~1052
- Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, Kobayashi K, Hashimoto M, Matsu-ura T, Miyawaki A, Michikawa T, Mikoshiba K, Nagai T (2010). Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive  $\text{Ca}^{2+}$  indicators, yellow Cameleon-Nano. Nat Methods, 7:

- 729~732
- Islam MM, Munemasa S, Hossain MA, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2010). Roles of AtTPC1, vacuolar two pore channel 1, in *Arabidopsis* stomatal closure. *Plant Cell Physiol*, 51: 302~311
- Kim JH, Nguyen NH, Nguyen NT, Hong SW, Lee H (2013). Loss of all three calreticulins, *CRT1*, *CRT2* and *CRT3*, causes enhanced sensitivity to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 32: 1843~1853
- Krebs M, Held K, Binder A, Hashimoto K, Den Herder G, Parniske M, Kudla J, Schumacher K (2012). FRET-based genetically encoded sensors allow high-resolution live cell imaging of  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics. *Plant J*, 69: 181~192
- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*, 22: 541~563
- Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ, Sanders D, Hetherington AM (1998). Absciscic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 15837~15842
- Logan DC, Knight MR (2003). Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol*, 133: 21~34
- Loro G, Drago I, Pozzan T, Schiavo FL, Zottini M, Costa A (2012). Targeting of Cameleons to various subcellular compartments reveals a strict cytoplasmic/mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  handling relationship in plant cells. *Plant J*, 71: 1~13
- Mazars C, Bourque S, Mithofer A, Pugin A, Ranjeva R (2009). Calcium homeostasis in plant cell nuclei. *New Phytol*, 181: 261~274
- Mazars C, Briere C, Bourque S, Thuleau P (2011). Nuclear calcium signaling: an emerging topic in plants. *Biochimie*, 93: 2068~2074
- Mehlmer N, Parvin N, Hurst CH, Knight MR, Teige M, Vothknecht UC (2012). A toolset of aequorin expression vectors for in planta studies of subcellular calcium concentrations in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 63: 1751~1761
- Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu LH, Obermeyer G, Feijo JA (2011). Glutamate receptor-like genes form  $\text{Ca}^{2+}$  channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*, 332: 434~437
- Mithofer A, Mazars C (2002). Aequorin-based measurements of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signatures in plant cells. *Biol Proced Online*, 4: 105~118
- Mousavi SA, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013). *GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE* genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500: 422~426
- Nomura H, Komori T, Kobori M, Nakahira Y, Shiina T (2008). Evidence for chloroplast control of external  $\text{Ca}^{2+}$ -induced cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients and stomatal closure. *Plant J*, 53: 988~998
- Nomura H, Komori T, Uemura S, Kanda Y, Shimotani K, Nakai K, Furuichi T, Takebayashi K, Sugimoto T, Sano S et al (2012). Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 3: 926
- Nomuraa H, Shiina T (2014). Calcium signaling in plant endosymbiotic organelles: mechanism and role in physiology. *Mol Plant*, 7: 1094~1104
- Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D (2005). The vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$ -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*, 434: 404~408
- Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. *Nature*, 467: 291~296
- Persson S, Wyatt SE, Love J, Thompson WF, Robertson D, Boss WF (2001). The  $\text{Ca}^{2+}$  status of the endoplasmic reticulum is altered by induction of calreticulin expression in transgenic plants. *Plant Physiol*, 126: 1092~1104
- Petroutsos D, Busch A, Janssen I, Trompelt K, Bergner SV, Weinl S, Holtkamp M, Karst U, Kudla J, Hippler M (2011). The chloroplast calcium sensor CAS is required for photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 23: 2950~2963
- Pottosin I, Wherrett T, Shabala S (2009). SV channels dominate the vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$  release during intracellular signaling. *FEBS Lett*, 583: 921~926
- Pottosin II, Schönknecht G (2007). Vacuolar calcium channels. *J Exp Bot*, 58: 1559~1569
- Ranf S, Wunnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P (2008). Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J*, 53: 287~299
- Rossi AE, Dirksen RT (2006). Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve*, 33: 715~731
- Schönknecht G (2013). Calcium signals from the vacuole. *Plants*, 2: 589~614
- Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, Mazard C, Kraut A, Finazzi G, Grunwald D, Rappaport F, Vavasseur A, Joyard J et al (2006). HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J Biol Chem*, 281: 2882~2892
- Stael S, Wurzinger B, Mair A, Mehlmer N, Vothknecht UC, Teige M (2012). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *J Exp Bot*, 63: 1525~1542
- Staxen I, Pical C, Montgomery LT, Gray JE, Hetherington AM, McAinsh MR (1999). Absciscic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 1779~1784
- Steinhorst L, Kudla J (2013). Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiol*, 163: 471~485

- Steinhorst L, Kudla J (2014). Signaling in cells and organisms—calcium holds the line. *Curr Opin Plant Biol*, 22: 14~21
- Vainonen JP, Sakuragi Y, Stael S, Tikkanen M, Allahverdiyeva Y, Paakkari V, Aro E, Suorsa M, Scheller HV, Vener AV et al (2008). Light regulation of CaS, a novel phosphoprotein in the thylakoid membrane of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J*, 275: 1767~1777
- Vincill ED, Bieck AM, Spalding EP (2012).  $\text{Ca}^{2+}$  conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiol*, 159: 40~46
- Walter A, Mazars C, Maitrejean M, Hopke J, Ranjeva R, Boland W, Mithofer A (2007). Structural requirements of jasmonates and synthetic analogues as inducers of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in the nucleus and the cytosol of plant cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46: 4783~4785
- Wang D, Xu Y, Li Q, Hao X, Cui K, Sun F, Zhu Y (2003). Transgenic expression of a putative calcium transporter affects the time of *Arabidopsis* flowering. *Plant J*, 33: 285~392
- Wang Y, Zhu Y, Ling Y, Zhang H, Liu P, Baluska F, Samaj J, Lin J, Wang Q (2010). Disruption of actin filaments induces mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  release to the cytoplasm and  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  changes in *Arabidopsis* root hairs. *BMC Plant Biol*, 10: 53
- Wilson ME, Jensen GS, Haswell ES (2011). Two mechanosensitive channel homologs influence division ring placement in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*, 23: 2939~2949
- Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, Zhang J, Theprungsirikul L, Shrift T, Krichilsky B et al (2014). OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*, 514: 367~371
- Zhang B, Carrie C, Ivanova A, Narsai R, Murcha MW, Duncan O, Wang Y, Law SR, Albrecht V, Pogson B et al (2012). LETM proteins play a role in the accumulation of mitochondrially encoded proteins in *Arabidopsis thaliana* and AtLETM2 displays parent of origin effects. *J Biol Chem*, 287: 41757~41773
- Zhao Y, Pan Z, Zhang Y, Qu X, Zhang Y, Yang Y, Jiang X, Huang S, Yuan M, Schumaker KS et al (2013). The actin-related protein2/3 complex regulates mitochondrial-associated calcium signaling during salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 4544~4559