



生物细胞中颗粒状多聚磷酸盐细胞器的结构与功能

樊梓豪¹, 范丹丹², 王梦梦², 赵庆顺¹, 杨柳燕^{2*}

1 南京大学医学院, 模式动物研究所, 江苏 南京 210031

2 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏 南京 210023

樊梓豪, 范丹丹, 王梦梦, 赵庆顺, 杨柳燕. 生物细胞中颗粒状多聚磷酸盐细胞器的结构与功能. 微生物学报, 2022, 62(12): 4713–4730.

Fan Zihao, Fan Dandan, Wang Mengmeng, Zhao Qingshun, Yang Liuyan. Structure and function of granular polyphosphate organelle in biological cells. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4713–4730.

摘要: 多聚磷酸盐(polyphosphat, poly P)是一种由数十个或上百个磷酸根聚合而成的生物大分子, 以颗粒状、胶体状和溶解状等多种状态存在于各类生物细胞中。生物体中的 poly P 能够通过分解提供能量; 螯合金属离子来调节细胞内渗透压, 维持质膜稳定; 与蛋白质或 DNA 结合稳定其结构, 减轻细胞应激损伤。颗粒状多聚磷酸盐细胞器主要指细胞中用于贮存颗粒状 poly P、金属阳离子以及蛋白质、氨基酸和少量水等物质的细胞器。在寄生虫细胞中颗粒状聚磷细胞器常称为酸性钙体, 而细菌或者其他微生物细胞中则称为异染颗粒, 但是随着研究的不断深入, 发现酸性钙体和异染颗粒都具有相似的结构特征, 遂将其统一定义为颗粒状多聚磷酸盐细胞器。颗粒状聚磷细胞器的发现拓展了生物共同祖先(last universal common ancestor, LUCA)的学说, 丰富了原核生物细胞器认知, 我们相信该细胞器在生命起源、抗环境胁迫、生物互作和代谢调控等方面具有重要功能, 在疾病治疗以及磷生物地球化学循环过程中发挥重要作用。

关键词: 酸性钙体; 异染颗粒; 多聚磷酸盐; 细胞应激; 颗粒状多聚磷酸盐细胞器

基金项目: 国家自然科学基金(41871082); 江苏省生态环境厅科研课题(2020019, 2021005)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41871082) and by the Ecological Environment Research Project of Jiangsu Province (2020019, 2021005)

*Corresponding author. Tel: +86-25-89680257; E-mail: yangly@nju.edu.cn

Received: 14 March 2022; Revised: 13 August 2022; Published online: 25 August 2022

Structure and function of granular polyphosphate organelle in biological cells

FAN Zihao¹, FAN Dandan², WANG Mengmeng², ZHAO Qingshun¹, YANG Liuyan^{2*}

¹ Model Animal Research Center, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210031, Jiangsu, China

² State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, Jiangsu, China

Abstract: Polyphosphate (poly P) is a polymer of tens to hundreds of phosphate residues, which is found in various biological cells in granular, colloidal, and dissolved forms. It has been verified that poly P can be an energy source and regulate intracellular osmotic pressure to maintain the stability of membrane. In addition, it binds to protein and DNA to stabilize them and protects cells from stress injury. Granular poly P organelle stores poly P granules, metal cations, proteins, amino acids, and water in cells. The poly P granules in the parasite are called acidocalcisomes and those in bacteria or other microorganisms are named metachromatic granules. Further research shows that they have similar structures and thus they are both called granular poly P organelles. Crucially, this organelle is thought to be the only one preserved from prokaryotes to humans and may even be last universal common ancestor (LUCA). It is crucial for the origin of life, anti-stress, biological interaction, and metabolism regulation. It is meaningful to develop this organelle in pharmaceutical research and biogeochemical cycle of phosphorus.

Keywords: acidocalcisome; metachromatic granule; polyphosphate; cellular stress; granular polyphosphate organelle

颗粒状多聚磷酸盐细胞器(granular polyphosphate organelle)是一种由膜包裹的亚细胞结构单位, 内含多聚磷酸盐、磷酸、金属阳离子以及蛋白质、氨基酸和水等物质, 膜上镶嵌多种跨膜蛋白, 光学显微镜下为黑色的致密颗粒, 故又称为电子致密型细胞器(electron-dense organelle), 最早从锥虫(*Trypanosoma*, 一种血鞭毛原虫, 营寄生生活, 为锥虫病病原体)中分离得到, 称为酸性钙体(acidocalcisome)^[1-2], 其主要成分为多聚磷酸盐(polyphosphate, poly P), 多聚磷酸盐是一种通过高能磷酸酐键连接并由 3-1 000 个磷酸根基团组成的线性、支链状或环状聚合物。国内对于颗粒状多聚磷酸盐细胞器的研究较少, 许多微生物学的教科书都将其归为具有贮磷功能的内含物, 这一认知使其更类似于细胞

的液泡, 而不是拥有一定功能的细胞器, 它不是在多数微生物的细胞内普遍存在, 而只是在微生物生长到一定阶段才出现在细胞内。但是, 随着研究的不断深入, 在真细菌、古菌与真核生物细胞内都发现存在颗粒状聚磷细胞器。新的分子生物学研究方法的应用使人们也不断探明这一过去被忽视的细胞器在生物细胞内的功能。

对颗粒状聚磷细胞器的研究最早可追溯到 1895 年, 第一个在细胞中发现的亚细胞结构为异染颗粒(metachromatic granule), 当使用甲苯胺蓝进行细胞染色时, 多聚磷酸盐与碱性染料发生反应, 导致其吸收光谱向长波偏移, 故采用光学显微镜观察和紫外分光光度计测定时, 均出现“异染”这一状况^[3], 这一特征也被用于对特殊细菌的鉴定。然而, 在后续研究中人们发

现这一亚细胞结构普遍存在于原核生物和低等真核生物中。20世纪70年代开始,人们采用X射线微区分析(X-ray microanalysis)技术对异染颗粒的内部组成进行分析,发现其属于细胞内富钙酸性功能区(原核生物仅有),遂命名为酸性钙体^[4-5]。

不同生物学者的视角不同,对含有颗粒状聚磷的亚细胞结构有不同的命名,例如,异染颗粒、聚磷颗粒(polyphosphate granule)、螺菌颗粒(volutin granule)、多聚磷酸盐液泡(polyphosphate vacuole)和酸性钙体等,均认为其作用与功能局仅限于贮藏磷源和能量,是降低细胞渗透压的一类细胞内含物或液泡。然而,随着研究的深入,分离得到了纯的颗粒状聚磷细胞器,发现其存在于大部分原核生物以及部分真核生物

中,具有相似的形态特征^[6],例如有包裹的膜和电子致密的基质,基质的主要组成为多聚磷酸盐、正磷酸盐和金属阳离子。直至人们在人血小板细胞内发现了与其十分类似的致密颗粒,颗粒状聚磷细胞器才被认为是唯一从原核生物保留至人体细胞的细胞器(表1)。颗粒状聚磷细胞器的结构较为简单,作为保守细胞器在原核与真核生物中保留下来,但是却拥有较为复杂的生理功能。因此,在微生物学教科书中把富含 poly P 的异染颗粒定义为“细胞内储磷内含物”这一说法有待商榷。正如细菌和古菌细胞中核糖体一样,这种细胞器在细胞内也具有重要的生物学意义。目前看来,拥有这类细胞器的细胞在环境胁迫下能够更好地存活,并且面对不同的胁迫表现出多样的应对策略。

表1 颗粒状聚磷细胞器从异染颗粒到人类血小板致密颗粒^[5]

Table 1 Progress in granular polyphosphate organelle from metachromatic granules to human platelet dense granules^[5]

Year	Research	References
1895	Metachromatic granules were observed in bacteria for the first time	[7]
1902	Volutin granules were widely observed in plant, bacterial and fungal cells and their shape is same to metachromatic granules	[8]
1904	A methylene blue staining method based on particle stability was designed and the name volutin granules were widely used	[9]
1907	Volutin granules were found in protozoans, such as <i>Trypanosomes</i> , <i>Coccidioides</i> , etc.	[10]
1952	“Graham salt” was isolated from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and identified as a long-chain inorganic phosphate, and these volutin granules were renamed “polyphosphate vacuoles”	[11]
1977	The polyphosphate vacuoles were studied by X-ray microanalysis and shown to contain high concentrations of P, Ca and Zn	[12]
1995	Acidocalcisome were first used to refer to organelles capable of transporting protons and Ca ²⁺	[4]
1997	Acidocalcisome and volutin granules have similar structures and are considered to be the homogenous organelles of different cells	[13]
2000	³¹ P NMR studies show that polyphosphate, inorganic phosphate and pyrophosphate are the only phosphorus compounds in acidocalcisomes	[14]
2000	The first gene for v type H ⁺ -PPase localized to acidocalcisomes, is identified in <i>T. cruzi</i> and functionally expressed in <i>Saccharomyces</i>	[15]
2004	The dense granules in human platelets were considered to be highly similar to acidocalcisome	[16]
2012	Acidocalcisomes were found in egg yolk of chicken	[17]

1 颗粒状聚磷细胞器的形状与在细胞内分布

颗粒状聚磷细胞器的基质含有多聚磷酸盐等物质, 通过电镜观察的细胞器形态取决于样品的制备方式。如果使用标准染色法, 这些基质因为外膜破坏而流失, 在电镜下仅能观察到附着少部分基质的空液泡。用氟化钾与其中的钙质形成共沉淀, 可以有效观察该细胞器的形状。目前认为最完整呈现酸性钙体形态的处理方式为高压冷冻蚀刻法, 采用液氮对细胞进行速冻, 然后对样品进行蚀刻, 再用扫描电镜观察。也有学者使用碳包被网格为载体干燥细胞, 并采用具能量过滤器的电镜观察, 呈现的酸性钙体细胞器较为完整^[18], 本课题组也发现了使用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色法可直接对细胞内的 poly P 进行定位与定量^[19]。

以往认为细菌仅有一个被细胞壁约束的质膜, 内含 DNA、核糖体与细胞质, 而在原核生物内发现的酸性钙体挑战了这一认知, 古菌细胞内也含有酸性钙体, 其形态与 100 年前 Meyer 所描述的螺旋体十分相似, 自此颗粒状聚磷细胞器也成为已知的、普遍存在于细菌、古菌和

真核生物三大域生物细胞内的细胞器(图 1)。

颗粒状聚磷细胞器很容易通过染色鉴定, 常用的染色剂有吡啶橙和 DAPI, 其形状会根据生物体生长环境的不同而有所变化。例如, 在锥虫(*Trypanosoma*)^[5]中其形状大多为圆球形, 直径为 0.2 μm , 而在利士曼原虫(*Leishmania*)^[22]中, 其形状为细棍状, 直径为 0.6 μm 。细胞内新的颗粒状聚磷细胞器是通过类似出芽方式形成, 其数量取决于生物的种类, 并且同一种生物在不同生长阶段颗粒状聚磷细胞器的数量差异较大。例如, 在克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)的无鞭毛体中含有 40 个左右颗粒状聚磷细胞器, 而有鞭毛克氏锥虫中颗粒状聚磷细胞器数量则少得多(15 个)^[5], 但是这些颗粒状聚磷细胞器的大小并没有显著差异。我们课题组构建的转 *ppk* 聚磷基因的弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)工程菌形成的颗粒状聚磷细胞器为椭圆形, 由于合成的聚磷数量多导致颗粒状聚磷细胞器直径大于野生型弗氏柠檬酸杆菌的直径, 数量为 1-2 个^[20]。

颗粒状聚磷细胞器在细胞内分布存在一定的规律。在锥虫中常常分布在细胞中心的伸缩泡两端或者鞭毛上, 这似乎更有利于锥虫对宿主的入侵^[23]。而在细菌中则更倾向于分布在细

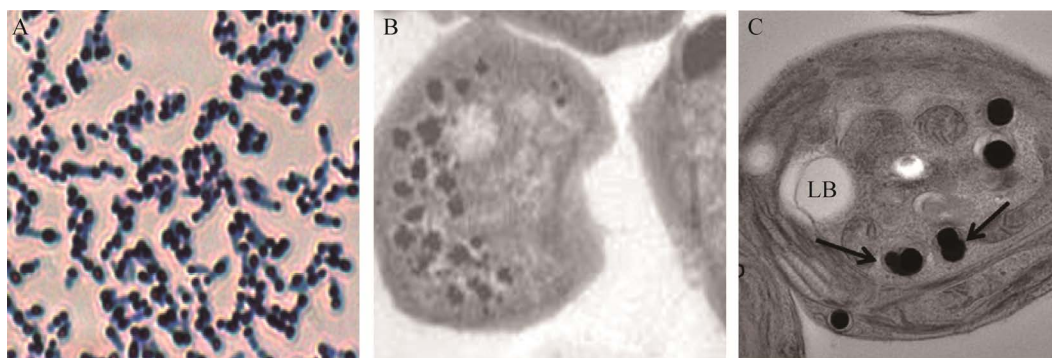


图 1 显微镜下的颗粒状聚磷细胞器^[20]

Figure 1 Granular polyphosphate organelles under microscope^[20]. A: *Citrobacter freundii*; B: *Methanosarcina acetivorans*; C: *Chlamydomonas reinhardtii*.

胞的两端, 呈现一定的对称性, 有学者推测可能是由同性电荷相斥造成的^[24]。过表达 *ppk1* 聚磷基因的弗氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*)工程菌形成的颗粒状聚磷细胞器就分布在两端(本课题组未发表结果)。在真核生物细胞中, 颗粒状聚磷细胞器的分布与其他细胞器的相互作用有关, 目前发现颗粒状聚磷细胞器与线粒体、脂质包涵体、细胞核和膜下微管相接触, 至于颗粒状聚磷细胞器与这些细胞器是否存在物质交换和调控通路, 则有待进一步探索。

2 颗粒状聚磷细胞器的组成

2.1 颗粒状聚磷细胞器的膜组分

2.1.1 膜的化学组成

酸性钙体外膜结构的发现, 是对原核生物内膜系统研究的重大突破。尽管大多数的生物教材阐述原核细胞时, 认为其细胞内膜系统十分不发达, 这也是区分原核与真核生物的重要依据。但是在细菌细胞内发现的膜包裹的细胞器越来越多, 例如磁小体(magnetosomes)、类囊体(thylakoids)、载色体(chromatophore)、聚羟基脂肪酸颗粒(polyhydroxyalkanoate granule)^[25]等。最初, 人们认为异染颗粒是没有膜约束的多聚磷酸盐聚合物, 但是多聚磷酸盐是水溶性的, 并且极易水解, 其含量会随着细胞内环境的变化而改变, 这显然不符合人们对异染颗粒的观察, 因此, 推测异染颗粒也是有膜包裹的。后有学者通过吉姆沙染色, 第一次观察到了膜结构^[26]。通过分析测定, 这类细胞器的膜厚大约 8 nm, 其化学成分为磷脂双分子层和蛋白质, 与细胞质膜类似。通过对克氏锥虫(*T. cruzi*)酸性钙体膜的高效提纯分析, 证实其化学组成为一类糖肌醇磷脂(GIPL), 与普通微粒包膜的 GIPL 不同, 虽然二者的糖类含量相似, 但是与其他单糖相比, 其半乳糖呋喃和肌醇的含量较

低, 故酸性钙体膜的化学组成与其他细胞器膜化学组成不同^[10]。此外, 酸性钙体膜上还存在着少量 3-羟基甾醇, 这一物质是酸性钙体转运质子和钙离子的关键。膜上还存在着大量钙泵(Ca^{2+} -ATPase)、液泡型质子泵(V-H^{+} -ATPase, V-H^{+} -PPase)以及金属离子与质子的交换体(exchangers), 表明在细胞新陈代谢中该细胞器发挥着重要的功能(图 2)。

2.1.2 膜上蛋白通道

在颗粒状聚磷细胞器膜上至少存在着数个离子泵、交换体和一个蛋白通道, 这也是其作为细胞器最主要的标志。

钙离子泵(Ca^{2+} -ATPase)最早被定位于锥虫细胞的酸性钙体上, 随后发现大部分寄生虫的酸性钙体膜上都含有钙离子泵。克氏锥虫(*T. cruzi*)的钙离子泵由 *tcal* 基因编码^[4], 而布氏锥虫(*T. brucei*)的钙离子泵由 *TbPMCI* 基因编码, 克隆上述酸性钙体膜上的钙离子泵基因, 在酵母细胞的 *PMCI* 基因(液泡钙离子泵)突变的菌株中表达, 可以使突变体恢复钙离子泵的功能, 因此, 酸性钙体上钙离子泵与质膜钙离子泵家族(plasma membrane calcium ATPase, PMCA)高度同源^[30]。在刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)和阿米巴原虫(*Entamoeba histolytica*)中具有相似的研究结果^[5], 这些钙离子泵基因的中心序列高度保守。

颗粒状聚磷细胞器膜上拥有 2 种类型的液泡型质子泵, 即 ATP 质子泵(V-H^{+} -ATPase)和焦磷酸质子泵(V-H^{+} -PPase), 它们的作用是向细胞器内泵入大量质子, 中和多聚磷酸盐的负电荷, 并使细胞器维持酸性环境。其中, 焦磷酸(PP)质子泵是颗粒状聚磷细胞器分离纯化时的重要识别物^[31]。以克氏锥虫(*T. cruzi*)为例, 它的 PP 质子泵(TcPPase)是一类 K^{+} 依赖的质子泵(type I), 由 816 个氨基酸组成, 在基因水平上与拟南

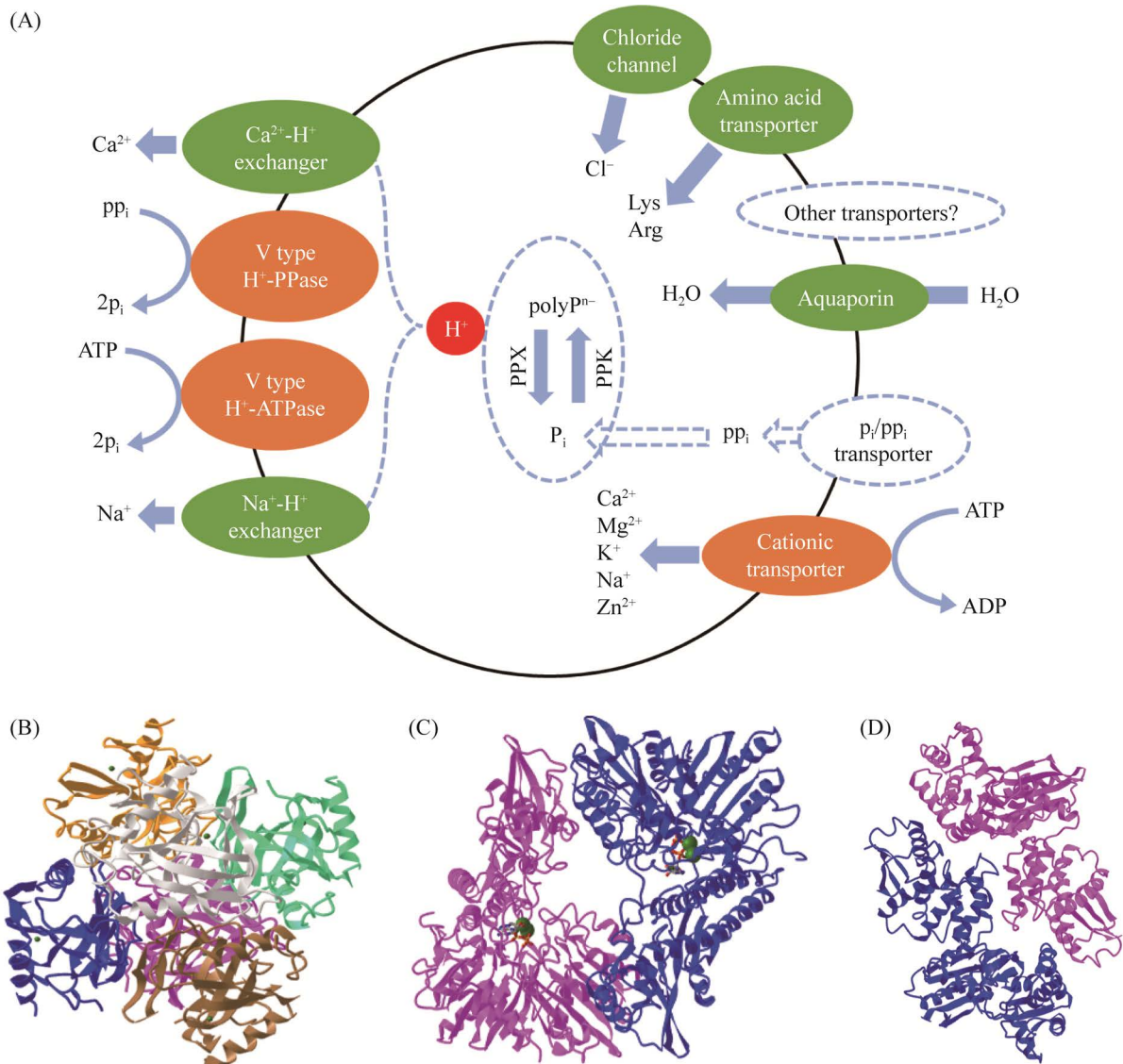


图 2 颗粒状聚磷细胞器的结构示意图(改进自参考文献[5])与相关酶的蛋白结构

Figure 2 The schematic structure diagram of granular polyphosphate organelle. A: the arrows mean the direction of transport; PPK is polyphosphate kinase; PPX is polyphosphate exonuclease. B: protein structure diagram of proton pump of pyrophosphate (PPase, *Sulfolobus acidocaldarius*); each asymmetric unit is composed of homologous hexamer; each subunit is 20 kDa; the green dot represents the active site of sulfate radical and Mg^{2+} . C: secondary structure diagram of PPK (*E. coli*); PPK asymmetric unit structure is A dimer (dimensions: $152 \text{ \AA} \times 152 \text{ \AA} \times 150 \text{ \AA}$). D: the secondary structure of PPX (*E. coli*), whose asymmetric unit contains four copies ($45 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 96 \text{ \AA}$) in which the n-terminal has 10 residues and the C-terminal has 7 residues.

芥(*Arabidopsis*)有 67%的相似性,与恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)有 61%的相似性,与深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)有 53%的相似性^[31],这种质子泵在原核生物和真核生物细胞

内都存在,但是在哺乳动物细胞中还未发现。对于为什么会存在 2 种类型的质子泵,还无法解释,但是从能量利用的角度分析,这无疑会更加节省转运质子所需的能量。

钙离子和钠离子的交换体($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, Na^+/H^+), 即浓度梯度通道, 也存在于部分生物的酸性钙体上, 这些通道被认为主要参与钙离子与钠离子的被动运输, 与胞内信号传导有关^[32-33]。

大部分真核生物的颗粒状聚磷细胞器膜上都存在水通道蛋白, 这是一种连接伸缩泡与颗粒状聚磷细胞器内部的蛋白质, 最早在克氏锥虫(*T. cruzi*)的酸性钙体上发现。水通道蛋白通过主动运输(液泡型质子泵)的方式特异性地转运水分子, 参与生物细胞渗透压的调节^[34]。

2.2 颗粒状聚磷细胞器的内部组分

颗粒状聚磷细胞器在膜包裹的腔内含有各种有机和无机物, 包括水、多聚磷酸盐、磷酸、焦磷酸, 还有氨基酸、蛋白质等有机物。

2.2.1 无机物

在许多原核生物和低等真核生物中, 颗粒状聚磷细胞器含有钙, 其中钙含量大约是细胞质的 10 倍。伴随环境的变化与细胞自身的需要, 也会含有锰、钾、铁和锌等金属阳离子, 这些离子含量多处于毫摩尔或摩尔级^[35]。颗粒状聚磷细胞器含有最多的是磷酸盐类物质。1997 年, 研究者采用 ^{31}P 同位素标记法, 对颗粒状聚磷细胞器中磷的形态进行分析, 发现为多聚磷酸盐、焦磷酸盐和无机磷酸盐等种类^[13]。其中, 焦磷酸盐为多种生物合成反应的副产物, 例如核酸、辅酶和脂肪酸合成等, 但是并没有在酸性钙体内发现上述反应的反应产物或转运通道, 故推测焦磷酸盐作为反应物基质存在于颗粒状聚磷细胞器内。此外, 颗粒状聚磷细胞器内还含有水分, 根据对锥虫的酸性钙体相对密度(胶体金颗粒)计算^[20], 其相对密度大约 1.3 ± 0.1 , 显著高于细胞质(0.4 ± 0.2)与伸缩泡(0.9 ± 0.1), 这表明酸性钙体内水含量较少, 颗粒状聚磷细胞器内渗透压高于细胞质。

2.2.2 有机物

颗粒状聚磷细胞器内含有高浓度的游离氨基酸, 其中超过 90% 是碱性的精氨酸和赖氨酸。对颗粒状聚磷细胞器进行分离纯化, 发现还有少量的硫, 表明其中含有蛋白质, 但是由于颗粒状聚磷细胞器没有内吞作用, 因此, 很难用内吞标记物对其内含蛋白质进行研究。对提取后的颗粒状聚磷细胞器进行分析, 发现含有多聚磷酸激酶(PPK)和外切多聚磷酸酶(PPX), 在颗粒状聚磷细胞器内催化磷酸盐与多聚磷酸盐之间的相互转化^[36]。

3 颗粒状聚磷细胞器的一般功能

3.1 多聚磷酸盐的代谢

有研究表明, 颗粒状聚磷细胞器中 PPK 主要分为 PPK1 和 PPK2, 其中 PPK1 为 ATP-多聚磷酸激酶, 其作用是催化 ATP 生成 ADP 和 poly P。PPK1 含有一个磷脂酶 D 的结构域, 其一端有一个 ATP 结合位点, 结合 ATP 后通过管道将磷酸盐基团转运到另一端, 生成长链 poly P。在大部分含有颗粒状聚磷细胞器的原核生物和真核生物细胞中, 在缺乏有机物时, 都能观察到细胞内长链和短链多聚磷酸盐含量显著增加的现象, 因此, 颗粒状聚磷细胞器的存在与生物的能量代谢紧密相关^[28,37]。PPK2 或为 PPK1 突变, 它们都具有核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDK)的活性, 不同的是 PPK1 偏向于合成并积累 poly P, 而 PPK2 则偏向于分解 poly P, 以 NDP 为底物合成 NTP。有研究者从 *Silicibacter pomeroyi* 的颗粒状聚磷细胞器中鉴定出一种 PPK3, 其 NDK 催化活性比 PPK1 和 PPK2 高^[38]。此外, 真核生物颗粒状聚磷细胞器中可能存在数个酶相互作用的情况, 例如酵母细胞就存在着液泡转运伴侣复合物(vacuolar transporter chaperone complex, VTC complex),

其中一个亚单位 VTC4 具有多聚磷酸盐激酶活性。人体细胞中是否存在 PPK 尚不明确,但是人体各组织中都检测有大量 poly P^[39],因此,可以推断 poly P 对于生物生存普遍有着重要意义。不同生物细胞中 PPK 氨基酸序列具有特异性,随着生物的进化,原本颗粒状聚磷细胞器的功能可能由细胞质或细胞质膜上同工酶代替,颗粒状聚磷细胞器只有在胁迫条件下才形成。

原核生物中除了 PPK 之外,也检测到 PPX 的活性,并且 PPK 与 PPX 构成上下游调控的关系,PPX 优先酶切长链 poly P,对短链 poly P 没有酶解作用。PPX 活性被鸟苷酸五磷酸 (pppGpp) 抑制,在富磷环境中细胞会产生 pppGpp,而在磷匮乏环境中,pppGpp 水解,不

再抑制 PPX 的活性, poly P 分解后作为磷源 (图 3)。真核生物的颗粒状聚磷细胞器内还存在内切多聚磷酸酶 (PPN),催化长链 poly P 生成短链 poly P,不同长度的 poly P 具有不同的生物学功能^[40-41]。

3.2 贮存金属离子功能

颗粒状聚磷细胞器是主要贮存多聚磷酸盐和金属阳离子的细胞器。这些金属阳离子的存在主要用于中和 poly P 的负电荷,同时作为细胞内信号分子贮存。例如克氏锥虫 (*T. cruzi*) 的酸性钙体内存在大量的钙离子,通过去除上鞭毛体克氏锥虫酸性钙体内的钙离子,可以有效降低其对宿主细胞的感染性^[42]。因此,对细胞外钙离子的感受和吸收功能可能是原动物颗

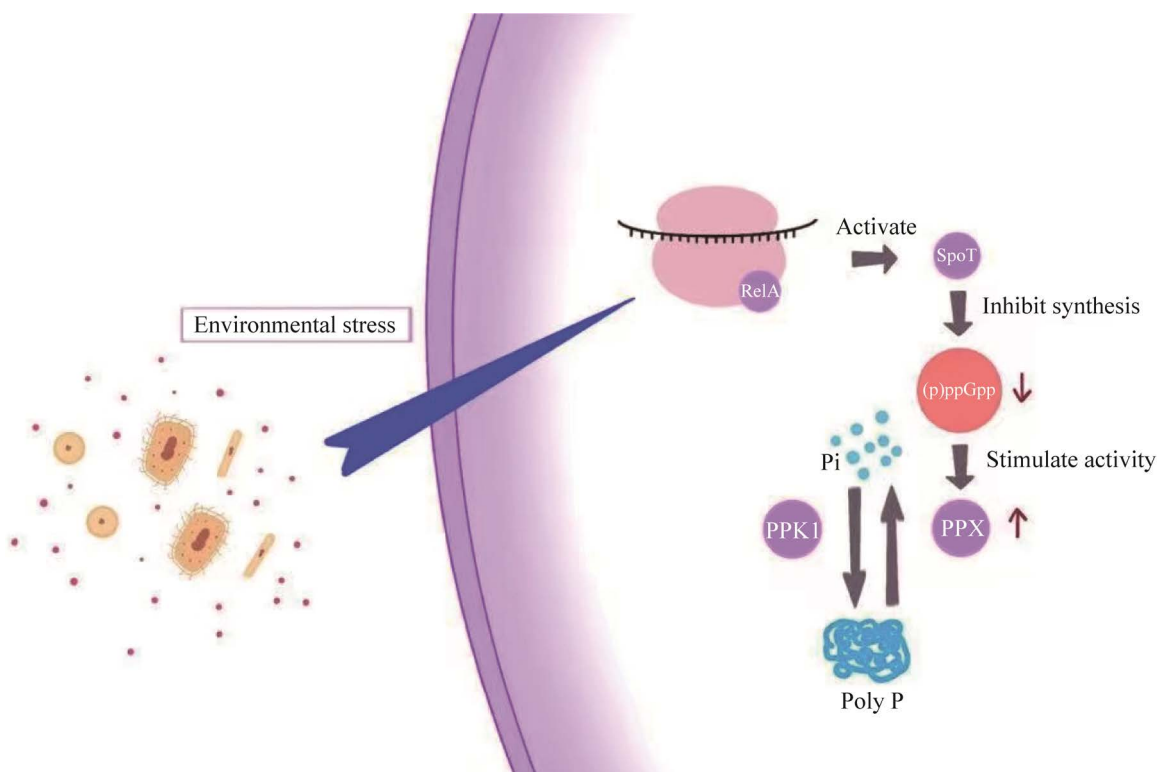


图 3 环境胁迫或营养物质受限时大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 合成 poly P 的调控通路

Figure 3 Schematic diagram of phosphorus metabolism pathway in *Escherichia coli* under stress or nutrient restriction. In the case of the nutrient restriction, the glycogen of the *E. coli* is used to activate the protein RelA, which activates SpoT to promote (p)ppGpp synthesis.

粒状聚磷细胞器进化出的功能,可以更好地从环境获得细胞生存必需的元素并加以贮存。此外,颗粒状聚磷细胞器还可能是其他重金属离子螯合贮存的场所,将其与颗粒状聚磷细胞器中 poly P 结合形成复合物,减轻重金属离子的毒性,从而抵御重金属离子对细胞的损害^[43]。

3.3 调节细胞 pH 值

颗粒状聚磷细胞器主要通过质子浓度的化学浓度梯度来转运质膜内外的质子,从而调节质膜内部的 pH 环境。这种维持内外 pH 稳态的功能,是早期生命体为了应对外部高酸或高碱环境所共有的特征。因为各种生物大分子的延伸都离不开脱水缩合,以形成磷酸二酯键。在自然状态下,磷酸二酯键的标准自由能大约为 +5.3 kJ/mol,即磷酸二酯键很难自发形成,需要较高的温度(70–90 °C)和稳定的 pH,而事实证明 poly P 可以与 H⁺形成较好的缓冲体系,以维持生物膜两侧 H⁺的化学浓度差,因此, poly P 对于维持细胞和细胞器内 pH 的稳定非常重要。颗粒状聚磷细胞器膜上 2 种液泡型质子泵(V-H⁺-ATPase 和 V-H⁺-PPase)消耗 ATP 或者焦磷酸(PPi)转运 H⁺,使颗粒状聚磷细胞器所在细胞区域呈酸性,利用膜内外浓度差来转运质子的方式,较为原始但却十分可靠^[44–45],而细胞器内阳离子-磷酸盐螯合物起到了很强的缓冲作用,抵御高达 2.5 单位的 pH 值变化。采用 RNA 干扰技术(RNAi)沉默布氏锥虫(*T. brucei*)酸性钙体上液泡型质子泵,发现虫体失去了调节自身 pH 的能力^[46–47],其他真核生物细胞中也有相似的过程,例如,杜氏盐藻(*Dunaliella salina*,一种大量人工繁殖用于提取类胡萝卜素的藻)会在正常生长时合成颗粒状聚磷以累积 poly P。当受到碱性胁迫时,酶解 poly P 为三聚磷酸盐(tripolyphosphates),并产生质子中和氢氧根离子,以此形成一个高容量的缓冲系统,维持

液泡中脂肪胺和质子的浓度^[48]。

3.4 调节细胞渗透压

调节细胞渗透压是液泡型细胞器的基本功能,在面对高浓度金属离子胁迫时,长链电负性结构的聚磷作为强力的金属离子螯合剂,对胞内金属离子起很强的螯合作用,因此,颗粒状聚磷细胞器的渗透压调节功能也可以看作是对金属离子的胁迫产生的应激反应。不同生物中金属离子与 poly P 结合的生理功能是不一样的,例如,植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*,缺乏超氧化物歧化酶),其抗氧化作用由 Mn²⁺-poly P 复合物替代^[49]。生物合成多聚磷酸盐用于螯合钙离子,由于钙离子除了是生物体内重要的结构物质外,也是信号分子,很大程度影响细胞的抗菌性或者生物的毒性,从而影响生物的存活,因此,钙离子的储存非常重要。以锥虫为例,其宿主都为昆虫或脊椎动物,为适应宿主的低渗透压(锥虫细胞质钙离子浓度大约为哺乳动物的 2–3 倍),通常会选择释放一定量的氨基酸和钙离子,同时颗粒状聚磷细胞器膜上水通道蛋白也把水转到收缩泡,维持锥虫渗透压平衡^[50]。

4 颗粒状聚磷细胞器的应激功能

从环境胁迫应激调节的角度看待颗粒状聚磷细胞器的功能显得更为合理。由于 poly P 的电负性长链结构与 DNA 和 RNA 类似,使得其更易被碱性蛋白调控(如组蛋白),这些蛋白拥有碱性结构域,通过影响 poly P 的代谢通路进而正向或者负向调节细胞生长与分裂状态,例如,本课题组就发现在低硝态氮浓度下,蓝藻水华会加快 poly P 的积累,达到正常培养的 20–50 倍^[51]。影响的方面包含颗粒状聚磷细胞器对环境胁迫因子应答以及与其他细胞组分的协同作用等。

4.1 营养物质限制的细胞调节

环境中碳源、磷源、氮源和氧气等缺乏都有可能引起生物细胞产生应激。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 累积 poly P 的研究结果发现, 在正常环境中, 细胞内 PPK 和 PPX 活性变化较小。当营养源缺乏产生胁迫时, 诱导形成大量 pppGpp 或 ppGpp, 由于 (p)ppGpp 具有强烈抑制 PPX 酶解 poly P 的作用, 但不影响 PPK 活性, poly P 合成速率不变而分解速率降低, 导致微生物在营养限制下 poly P 累积(图 3)^[51]。因此, 一切影响 pppGpp 合成或者水解的外界胁迫都会影响细胞中 poly P 含量, 这一点在污水微生物除磷领域早已得到广泛应用。在有氧(氧气和亚硝酸盐)条件下碳源限制, 微生物分解聚 β-羟基丁酸(PHB)合成聚磷, 在缺氧条件下碳源丰富, 微生物分解多聚磷酸盐合成 PHB。在分解 PHB 时, 根据电子受体的不同, 可以将细菌分为聚磷菌(氧气, PAOs)与反硝化聚磷菌(亚硝酸盐, DNPAOs)^[52-53]。基于微生物有氧聚磷而缺氧释磷的生物学机制, 开发了批序式活性污泥法(sequencing batch reactor activated sludge process, SBR)的污水处理工艺。从活性污泥中分离的聚磷菌株多为不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、俊片菌属(*Lampropediaa*)和产碱杆菌属(*Alcaligenes*)等^[54], 染色镜检均可以观察到 poly P 颗粒的存在。本课题组对弗氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*)进行多聚磷酸激酶(PPK1)的过表达促进细菌吸收磷酸盐, 在 SBR 反应器中磷干重占细胞总重的 12.7%。在碳源限制条件下, 与野生型弗氏柠檬酸杆菌相比, 过表达多聚磷酸激酶的弗氏柠檬酸杆菌细胞内颗粒状聚磷细胞器的数量更多, 体积更大^[23]。

Poly P 可能具有替代 ATP 的功能, 在胁迫条件下, poly P 能够成为 AMP、ADP、葡萄糖、糖衍生物(如核苷和辅酶前体)和蛋白质磷酸化

的磷酸盐供体^[55]。在钙磺胺基菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)的核糖体小体中, 观察到有一种蛋白质以 poly P 作为磷酸盐供体被磷酸化^[56], 在古菌中, 酸性钙体虽然很少提及, 但是相似结构的致密颗粒一直有报道, 这也证实了不论是细菌与真核生物, 还是古菌, 对 poly P 的利用具有相似性。因此, 对于生物细胞内颗粒状聚磷细胞器的研究可以揭示生物体对能量利用方式的演化进程。

线粒体是细胞内合成 ATP 对生物供能的细胞器, 但是在某些特殊情况下会出现线粒体功能不全, 即呼吸链不完整或者无法进行氧化磷酸化。很多研究表明这种情形是由 Ca^{2+} 介导调节的, 对低等生物而言, 颗粒状聚磷细胞器是贮存 Ca^{2+} 的主要器官, 因此会影响生物产能。电镜观察发现前循环型布氏锥虫(procyclic form, *T. bruzi* 的非寄生形态)的线粒体可以进行自主呼吸, 拥有完整的呼吸功能, 而血液型布氏锥虫(bloodstream form, *T. bruzi* 的寄生形态)的线粒体却失去了完整的呼吸链, 无法进行氧化磷酸化, 其原因是肌醇-1,4,5-三磷酸受体(InsP₃R)没有被钙离子激活^[57]。进一步研究血液型布氏锥虫的能量转化方式, 发现其线粒体外膜上保留着膜电势差通道(VDAC)与线粒体钙离子通道(MCU), 通过膜接触位点(MCS)与酸性钙体形成钙离子通道, 使线粒体内钙离子浓度增加了 8 倍, 从而激活了氧化磷酸化过程(图 4)^[58-59]。此外, 酸性钙体膜上的 V-H⁺-ATPase 与线粒体内膜上的 F-H⁺-ATPase 质子流向恰好相反, 因此, 推断在某些胁迫环境中酸性钙体可能与线粒体构成质子-磷酸盐循环, 以合成 ATP 来提供维持生物基本生命活动所需要的能量。

4.2 促进 DNA 修复

生物体中聚磷有着保护和修复 DNA 的功能。三磷酸核苷酸(NTPs)是合成 DNA 和 RNA

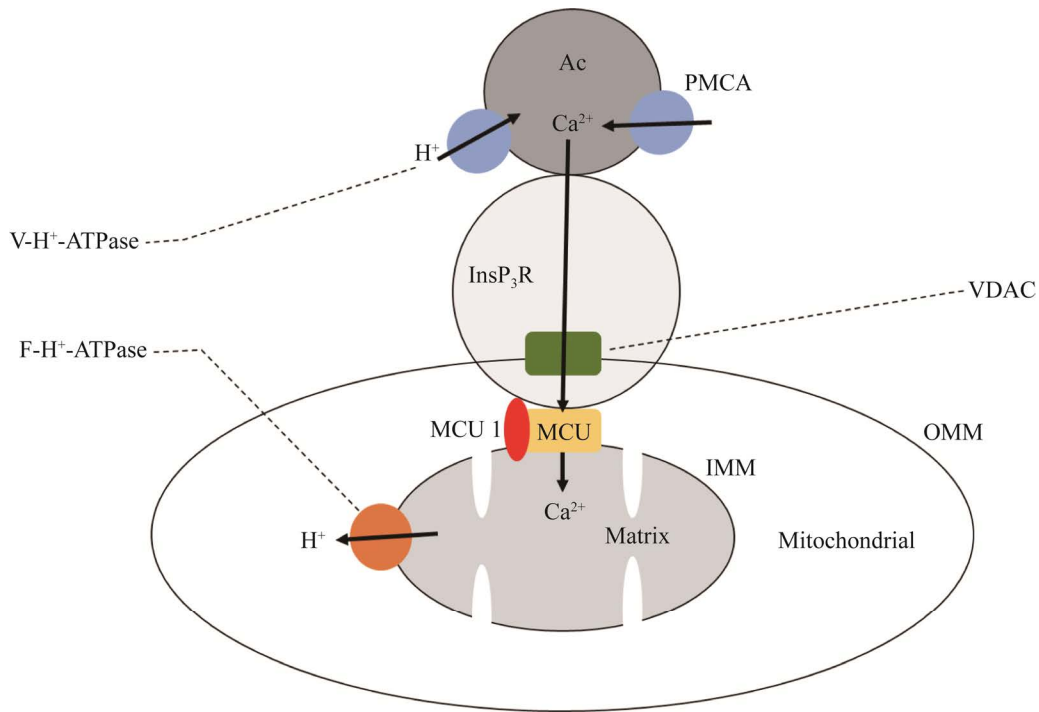


图4 酸性钙体调控布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)线粒体呼吸链机制(改进自参考文献[57])

Figure 4 The mechanism of acidocalcisomes regulates the mitochondrial respiratory chain in *Trypanosoma brucei*. The arrows mean the direction of transport; the scheme shows Ac is the acidocalcisome; PMCA is a kind of plasma membrane type Ca^{2+} -ATPase; InsP₃R means the inositol 1,4,5-triphosphate receptor; VDAC is a voltage dependent anion channel; MCU (MCU1) is a Ca^{2+} uptake transporter named mitochondrial Ca^{2+} uniporter and its ligand; OMM and IMM represent mitochondrial outer and inner membrane, respectively.

的主要原料, 而 poly P 除了提供合成 NTPs 所需能量以外, 其磷酸基团也是合成 NTPs 的底物。在原核生物中, 已经有报道 poly P 可以通过调控 DNA 损伤的大肠杆菌(*E. coli*)的 Y 家族聚合酶和 RecA (DNA 保护蛋白), 激活细胞的旁路途径, 即当大肠杆菌的 DNA 链受损时, Rec A 蛋白促进 Lex A 阻遏酶的水解, 从而激活 SOS 通路, 快速地对缺失的核苷酸进行修复, 修复受损的 DNA 片段^[60-61]。同样对于真核生物而言, 当酵母细胞受到紫外照射时, VTC4 (膜转运蛋白伴侣, 酵母细胞的多聚磷酸聚合酶)缺失的菌株比野生型存活率下降了 50%。相似的试验结果也出现在人胚肾细胞 HEK293 (受到

紫外照射极易发生癌变)中, 通过过表达磷酸外切酶(PPX1), 人体细胞的 poly P 含量下降 70%, 存活率也下降 20%^[62]。对哺乳动物而言, 颗粒状聚磷细胞器是否广泛存在尚不清楚, 其合成多 poly P 的途径也不明确(无法确定合成酶 PPK 种类), 但是可以肯定的是 poly P 参与到哺乳动物 DNA 的损伤应激中, 例如, 在人体肺部细胞 DNA 损伤时, 出现的应激颗粒(stress granule)与本文所涉及的颗粒状聚磷细胞器十分相似^[63]。因此, 开展细胞颗粒状聚磷细胞器的研究, 对于癌症治疗具有重要意义。

4.3 与蛋白质结合

多聚磷酸盐能够与细胞中碱性蛋白, 如组

蛋白或含有碱性结构域的蛋白质发生非特异性的结合,因此,在这一点上多聚磷酸盐与核酸类多聚阴离子很相似。由于细胞中 RNA 和 DNA 会与特异性的组蛋白结合,由此可以推测多聚磷酸盐在不同细胞中发挥相似的作用,也应该有相应的特异性结合蛋白。已有的研究表明,通过 100 倍的 poly P 树脂从大肠杆菌(*E. coli*)的细胞碎片中分离纯化到一种特异性的碱性结合蛋白,这种蛋白质优先与 poly P 相结合(相较于 DNA 和 RNA),并且与长链 poly P 的亲合性要高于短链。50-kDa 的纯化蛋白可以结合 30–50 mol 的 poly P 分子(每个 poly P 分子的无机磷酸盐链长为 750),通过与蛋白质的结合,这样的 poly P 在胞内不溶,且聚团成与酸性钙体大小类似的颗粒,因此, poly P 特异性结合蛋白在颗粒状聚磷细胞器形成过程中发挥关键作用^[40]。

4.4 维持质膜稳定

在原核和真核生物中, poly P 参与质膜的形成和功能的稳定。缺乏 poly P 导致微生物质膜失稳,使其病原体致病性降低。例如,相对于野生型菌株,缺乏颗粒状聚磷细胞器的奈瑟氏菌(*Neisseria*)菌株感染的成功率显著降低^[64]。此外,细胞质膜上 poly P 带有大量负电荷,能够对外源性阳离子进行螯合。通过测量细胞对培养基中阳离子染料 9-氨基丙烷(9AA)的吸收率,可以间接地观测质膜上多聚磷酸盐含量。缺磷培养的酵母细胞吸收 9AA 的能力显著低于富磷培养,如果让缺磷培养后的酵母再在富磷培养基中培养,其对 9AA 的吸收率要显著高于一直富磷培养的酵母,这表明在磷限制的胁迫下,细胞中 *PPK* 基因被激活并且过度表达,这与颗粒状聚磷细胞器的应激调节相类似^[65]。

在原核和真核细胞中都检测到多聚磷酸钙和聚羧基丁酸(poly P/PHB)复合物。它们在磷脂

双分子膜间形成了电压激活的钙离子通道,增加了磷脂双分子层的刚性。这些复合物的作用原理类似于磷酸离子泵,在膜的一侧合成长链的多聚磷酸盐并延伸到膜的另一侧,再通过 PPX 的作用将另一端末尾的正磷酸盐基团剪切下来,这种磷酸的转运方向取决于 poly P 合成与水解酶的活性。颗粒状聚磷细胞器在许多生物细胞内都有发现,合成 poly P 的优点在于能够不依赖质膜上浓度梯度通道实现磷酸盐的积累,并且能够快速地与其他细胞器进行磷酸根的交流^[66–67],因此,不同生物细胞的质膜的稳定性在一定程度上与细胞内 poly P 含量的多寡有关。Poly P/PHB 复合物也被认为是一种古老的离子跨膜通道,在进化过程中被保留下来。目前,使用质粒转化细菌以达到基因克隆或者敲除的目的是常见的生物学试验方法,在操作过程中,通常会使用氯化钙处理细胞以提高其细胞膜的通透性,然而,对于大分子量 DNA 如何穿过磷脂双分子膜的机理依旧不清楚。有研究指出,在质膜上存在这种以 poly P/PHB 复合物为中介介质的通道,这可能是质粒 DNA 通过非蛋白通道穿过细胞膜的方式。目前,尚未在人细胞内发现合成 poly P 的途径,但是在人血小板细胞膜上分离出了一种钙离子 ATP 泵,这种钙泵同时具有 ATP-poly P 转移酶和 poly P-ADP 转移酶的活性。此外,这种钙离子泵分子结构是全新的,但其功能与酸性钙体膜上钙离子泵的功能类似,这表明 poly P 促进质膜形成和稳定的机制广泛存在于古菌、细菌和真核生物中,对于细胞质膜上 poly P/PHB 复合物的研究有助于发现新的生物跨膜转运机制。

4.5 促进凝血

无论是内源性凝血还是外源性凝血,都是血小板细胞以及免疫细胞等相关细胞产生的应激反应。血小板细胞中颗粒状聚磷细胞器类似

结构的发现证实了多聚磷酸盐与凝血相关^[68]。2000年,在人类血小板细胞中发现了大量的致密颗粒,这种由外膜包裹的致密颗粒内含有大量的ATP、ADP、焦磷酸、poly P和钙离子,并且其膜上发现了与酸性钙体高度同源的液泡型质子泵(V-H⁺-ATPase)^[15]。这些致密颗粒在凝血过程中的作用为:ATP可以作为内皮细胞的P2Y受体,促进环前列腺素合成和一氧化氮的释放,从而促使血管舒张;ADP是血小板细胞的活化剂,在外源性凝血时,ADP促进更多血小板细胞发生趋化下的细胞迁移;血清素的作用是招募更多的血小板,同时收缩血管从而降低血流速度;钙离子可以促进纤维蛋白与血小板受体相结合,此外血液中钙离子也是一种重要的化学信号,免疫细胞通过质膜上钙离子信号传感器(calcium sensing receptor, CaSR)接收信号,发生趋化与定向迁移。有研究表明poly P经凝血酶刺激后,从血小板细胞中释放出来,能激活凝血因子,同时其负电性可提高纤维蛋白的稳定性^[69]。当全血血小板全部活化时,poly P浓度可达1-2 mol/L(参考血液中磷酸盐值)。当人体血小板中致密颗粒缺陷时,人体血液中poly P含量比常人降低约10倍,这类患者具有出血倾向。小鼠胚胎细胞敲除酵母细胞同源的肌醇己磷酸激酶1(Ip6k1),导致小鼠的凝血功能减弱,并且不易形成血栓,但是其详细的机理尚不明确。如果将原核生物中酸性钙体与哺乳动物中致密颗粒相比,发现其膜结构、基质组成略有不同,这些区别表明颗粒状聚磷细胞器可能在与细胞协同进化时,产生了其他功能。例如,血小板中poly P是凝血级联的有效调节剂,可加速凝血酶的生成,逆转各种天然抗凝剂(TFPI)和抗凝药物(肝素和Xa因子和凝血酶的直接抑制剂)的抗凝活性,增强纤维蛋白凝块结构和血栓对纤维蛋白溶解的抵抗^[70]。poly P

作为天然凝血剂具有很高的特异性,是凝血和抗炎症药物开发的新方向。

5 研究展望

5.1 颗粒状聚磷细胞器的演化

对颗粒状聚磷细胞器及其类似结构研究发现,颗粒状聚磷细胞器是一种高度保守的细胞器,存在于原核生物与真核生物分化之前^[71],甚至可能是现存生物的共同祖先。首先,这类细胞器膜上存在液泡型质子泵(V-H⁺-PPase),这种质子泵含有高度保守的蛋白质序列。有学者分析了根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)酸性钙体上质子泵的蛋白质结构域(Pfam)^[13],结果显示该域中存在一个独立的焦磷酸酶活性位点PF03030,其核心区域的57个氨基酸序列高度保守。通过贝叶斯分析(Bayesian analysis),该结构域存在于231种细菌、17种古菌以及31种真核生物中,这种质子泵在各种生物细胞内广泛存在,可能是由于基因水平转移(lateral gene transfer)造成的。其次,有学者诱导当利士曼原虫(*Leishmania major*)酸性钙体上液泡分选蛋白41(VSP41p)发生缺陷突变,发现影响了AP3-载体的合成,这种蛋白亚基是溶酶体相关细胞器(LROs)生物合成的重要原料,表明颗粒状聚磷细胞器与LROs有着较高同源性^[72]。因此,开展颗粒状聚磷细胞器演化过程及机理研究,能够拓展poly P在地球早期生命体形成与进化中作用的认识。关于生命起源的理论中,缺乏从多肽到活性蛋白质的热力学驱动的解释,难以解释长链的蛋白质和核酸等生物大分子的形成过程,而借助颗粒状多聚磷酸盐细胞器的形成机制研究,则可以探究最初的LUCA细胞形成过程,同时,研究不同生物体内颗粒状聚磷细胞器结构与分布,分析颗粒状多聚磷酸盐细胞器如何从LUCA逐步演化为“应变体”,能够

阐明面对生存环境胁迫时生物体选择的应对策略与进化方向。

5.2 颗粒状聚磷细胞器与疾病

生物细胞内 poly P 含量多寡与维持质膜以及蛋白质、核酸的稳定有关,因此, poly P 合成缺陷会导致外界胁迫下细胞的存活率下降,从而使一些致病微生物的毒性和传染性降低。例如,通过敲除刚地弓形虫(*T. gondii*)颗粒状聚磷细胞器膜钙泵基因 *TgAl*,导致颗粒状聚磷细胞器成分缺失,无法发挥全部生理功能,从而降低了寄生虫对寄主的感染能力^[73]。此外,人体血细胞和中性粒细胞中颗粒状聚磷细胞器类似结构都与人类疾病的发生有着密切联系,通过血小板致密颗粒来提高人体血液中 poly P 含量能够促进凝血因子和凝血酶的活化,从而加快凝血过程。近年来,由于颗粒状聚磷细胞器和 poly P 在生物细胞中分布范围未知且分离较困难,国内外对颗粒状聚磷细胞器和 poly P 的研究较少,因此,建立一套能够快速分离、鉴别细胞内颗粒状聚磷细胞器的方法显得十分重要。拥有颗粒状聚磷细胞器的生物能够在恶劣环境下拥有较高的存活率,这对于病原微生物来说是提高其传染性与毒力的生理机制;而对于药物开发来说,利用 poly P 这一跨膜大分子的特性,可作为许多药物的载体。随着研究的深入,颗粒状聚磷细胞器将会与许多疾病的发生、治疗联系起来。

5.3 颗粒状聚磷细胞器与磷生物地球化学循环

磷生物地球化学循环对地球生态系统至关重要,自然条件下磷循环总是缓慢而定向的,磷循环过程中磷浓度及其分布与生态系统的稳定性息息相关。人为干预打破了磷生物地球化学循环过程,如生活污水与工业废水中过量的磷酸盐(每年全球大约有 1.5 亿 t)进入水体导致

水体富营养化,这种富营养化破坏生物环境与生态系统功能,因此这种因为水体富磷而导致的富营养化正成为世界范围内水环境问题之一^[74]。本课题组通过研究太湖蓝藻水华的聚磷机制,一定程度上解释了水华爆发的原因,同时也提供了相应的解决策略^[75]。利用微生物去除水体中磷是目前主要的污水处理方法。微生物合成大量 poly P 是强化生物除磷(enhanced biological phosphorus removal, EBPR)的关键。这些聚磷微生物(PAOs)吸收超过自身生长所需要的磷并将其合成 poly P,但是由于物种的差异,EBPR 系统常常会面临无法预料的劣化与系统性能下降。这是因为相对于 EBPR 系统的复杂程度,人们对于这些 PAOs 的相关酶的鉴定、poly P 的原位转化以及调控机制缺乏深刻认识。在 EBPR 系统中,PAOs 会经历缺氧/有氧的交替处理过程,然而这不仅仅是触发 poly P 积累的要素之一,通过对颗粒状聚磷细胞器功能的研究,发现许多环境胁迫都能够触发微生物生成 poly P^[76],因此,利用替代触发器(环境胁迫)诱导微生物多聚磷酸盐积累的策略具有较大的发展前景。本课题组通过在日本晴水稻中转入了来自铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的 *ppk* 基因,建立了单拷贝品系(ETRS)和双拷贝体(ETRD)表达 *ppk* 的转基因水稻(ETR),显著提高了水稻的聚磷效率和谷物产量^[77]。在任何条件下, poly P 的生物合成与积累对微生物的生存是必要的(或至少使拥有 poly P 的细胞具有生存优势),从而增强废水中磷酸盐的去除。对微生物合成多聚磷酸盐机理的了解,可提高工业和生活废水生物除磷效率,或提供更好的替代处理办法。同时,在湖泊水体沉积物和土壤环境中,也发现大量聚磷微生物,开展土壤和水体中微生物多聚磷酸盐代谢的研究,不仅丰富磷生物地球

化学循环过程, 而且为控制水体富营养化和提升土壤肥力提供理论支撑。

参考文献

- [1] Coppens I, Baudhuin P, Opperdoes FR, Courtoy PJ. Role of acidic compartments in *Trypanosoma brucei*, with special reference to low-density lipoprotein processing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993, 58(2): 223–232.
- [2] 程莎莎, 郝文波, 罗树红. 酸性钙体的研究进展. 国际医学寄生虫病杂志, 2013, 40(2): 104–109.
Cheng SS, Hao WB, Luo SH. Research advance on acidocalcisomes. *International Journal of Medical Parasitic Diseases*, 2013, 40(2): 104–109. (in Chinese)
- [3] Widra A. Metachromatic granules of microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 1959, 78(5): 664–670.
- [4] Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, 1995, 310(Pt 3): 1005–1012.
- [5] Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SNJ. Acidocalcisomes conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(3): 251–261.
- [6] 石廷玉, 王园媛, 董兴高. 多聚磷酸盐: 不仅是异染粒. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(2): 153–161.
Shi TY, Wang YY, Dong XG. Polyphosphates: beyond the volutin. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 34(2): 153–161. (in Chinese)
- [7] Babes V. Beobachtungen über die metachromatischen körperchen, sporenbildung, verzweigung, kolben- und kapselbildung pathogener bakterien. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1895, 20: 412–437.
- [8] Grimme A. Die wichtigsten methoden der bakterenfärbung in ihrer wirkung auf die membran, den protoplasten und die einschlüsse der bakterienzelle. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkd Infektionskrankheiten und Hygiene*, 1902, 32: 161–165.
- [9] Meyer A. Orientierende untersuchungen über verbreitung. *Morphologie, und chemie des volutins*. *Bot. Zeit*, 1904, 62: 113–152.
- [10] Swellengrebel N. La volutine chez les trypanosomes. *CR Soc Biol Paris*, 1908.
- [11] Ebel J. * recherches sur les polyphosphates contenus dans diverses cellules vivantes. 2. etude chromatographique et potentiométrique des polyphosphates de levure. *Bulletin De La Societe De*, 1952, 34: 330.
- [12] Vickerman K, Tetley L. Recent ultrastructural studies on trypanosomes. *Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale*, 1977, 57(4/5): 441–457.
- [13] Scott DA, Docampo R, Dvorak JA, Shi SL, Leapman RD. *In situ* compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(44): 28020–28029.
- [14] Moreno B, Urbina JA, Oldfield E, Bailey BN, Rodrigues CO, Docampo R. ^{31}P NMR spectroscopy of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(37): 28356–28362.
- [15] Hill JE, Scott DA, Luo S, Docampo R. Cloning and functional expression of a gene encoding a vacuolar-type proton-translocating pyrophosphatase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, 2000, 351(Pt 1): 281–288.
- [16] Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(43): 44250–44257.
- [17] Ramos IB, Miranda K, Ulrich P, Ingram P, LeFurgey A, Machado EA, De Souza W, Docampo R. Calcium- and polyphosphate-containing acidocalcisomes in chicken egg yolk. *Biology of the Cell*, 2010, 102(7): 421–434.
- [18] Goodenough U, Heiss AA, Roth R, Rusch J, Lee JH. Acidocalcisomes: ultrastructure, biogenesis, and distribution in microbial eukaryotes. *Protist*, 2019, 170(3): 287–313.
- [19] 王鑫, 张文, 陈旭, 朱雯, 杨柳燕. DAPI 染色直接定量测定细菌胞内多聚磷酸盐. 环境监测管理与技术, 2015, 27(6): 40–43.
Wang X, Zhang W, Chen X, Zhu W, Yang LY. Direct quantitative determination method of bacterial polyphosphate. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2015, 27(6): 40–43. (in Chinese)
- [20] Wang X, Wang XM, Hui KM, Wei W, Zhang W, Miao AJ, Xiao L, Yang LY. Highly effective polyphosphate synthesis, phosphate removal, and concentration using engineered environmental bacteria based on a simple solo medium-copy plasmid strategy. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(1): 214–222.

- [21] Seufferheld MJ, Kim KM, Whitfield J, Valerio A, Caetano-Anollés G. Evolution of vacuolar proton pyrophosphatase domains and volutin granules: clues into the early evolutionary origin of the acidocalcisome. *Biology Direct*, 2011, 6: 50.
- [22] Miranda K, Docampo R, Grillo O, Franzen A, Attias M, Vercesi A, Plattner H, Hentschel J, De Souza W. Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites. *Histochemistry and Cell Biology*, 2004, 121(5): 407–418.
- [23] Salto ML, Kuhlenschmidt T, Kuhlenschmidt M, De Lederkremer RM, Docampo R. Phospholipid and glycolipid composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2008, 158(2): 120–130.
- [24] Lu HG, Zhong L, De Souza W, Benchimol M, Moreno S, Docampo R. Ca^{2+} content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18(4): 2309–2323.
- [25] Seufferheld M, Vieira MCF, Ruiz FA, Rodrigues CO, Moreno SNJ, Docampo R. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(32): 29971–29978.
- [26] 黄金玲, 魏峥, 于常海. 多聚磷酸相关蛋白结构及生物学功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(2): 115–124.
Huang JL, Wei Z, Yu CH. The structure and biological function of polyphosphate-related proteins. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 30(2): 115–124. (in Chinese)
- [27] Leppänen VM, Nummelin H, Hansen T, Lahti R, Schäfer G, Goldman A. *Sulfolobus acidocaldarius* inorganic pyrophosphatase: structure, thermostability, and effect of metal ion in an archaeal pyrophosphatase. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 1999, 8(6): 1218–1231.
- [28] Zhu Y, Lee SSK, Xu WQ. Crystallization and characterization of polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 305(4): 997–1001.
- [29] Rangarajan ES, Nadeau G, Li YG, Wagner J, Hung MN, Schrag JD, Cygler M, Matte A. The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 359(5): 1249–1260.
- [30] Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Ewinger L, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Howe KL, Marshall M, Sonnhammer EL. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 276–280.
- [31] Seufferheld M, Lea CR, Vieira M, Oldfield E, Docampo R. The H^{+} -pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(49): 51193–51202.
- [32] Vercesi AE, Rodrigues CO, Catisti R, Docampo R. Presence of a $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Letters*, 2000, 473(2): 203–206.
- [33] Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SNJ, Docampo R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(34): 22151–22158.
- [34] Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(37): 38673–38682.
- [35] Kulaev I, Kulakovskaya T. Polyphosphate and phosphate pump. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 709–734.
- [36] Moreno B, Rodrigues CO, Bailey BN, Urbina JA, Moreno SNJ, Docampo R, Oldfield E. Magic-angle spinning ^{31}P NMR spectroscopy of condensed phosphates in parasitic protozoa: visualizing the invisible. *FEBS Letters*, 2002, 523(1/2/3): 207–212.
- [37] Jahid IK, Silva AJ, Benitez JA. Polyphosphate stores enhance the ability of *Vibrio cholerae* to overcome environmental stresses in a low-phosphate environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7043–7049.
- [38] Nahálka J, Pätöprstý V. Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK₃). *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(9): 1778–1780.
- [39] Ogawa N, Tzeng CM, Fraley CD, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(23): 6687–6693.
- [40] Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 1999, 68: 89–125.

- [41] Andreeva NA, Kulakovskaya TV, Kulaev IS. High molecular mass exopolyphosphatase from the cytosol of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the *PPN1* gene. *Biochemistry: Moscow*, 2006, 71(9): 975–977.
- [42] Neira I, Ferreira AT, Yoshida N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *International Journal for Parasitology*, 2002, 32(4): 405–414.
- [43] Montgomery DM, Dean AC, Wiffen P, MacAskie LE. Phosphatase production and activity in *Citrobacter freundii* and a naturally occurring, heavy-metal-accumulating *Citrobacter* sp.. *Microbiology: Reading, England*, 1995, 141 (Pt 10): 2433–2441.
- [44] Moreno SN, Zhong L. Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochemical Journal*, 1996, 313(Pt 2): 655–659.
- [45] Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*, 2004, 304(5668): 253–257.
- [46] Lemercier G, Dutoya S, Luo SH, Ruiz FA, Rodrigues CO, Baltz T, Docampo R, Bakalara N. A vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(40): 37369–37376.
- [47] Castrol CD, Koretsky AP, Domach MM. NMR-observed phosphate trafficking and polyphosphate dynamics in wild-type and *vph1-1* mutant *Saccharomyces cerevisiae* in response to stresses. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(1): 65–73.
- [48] Pick U, Weiss M. Polyphosphate hydrolysis within acidic vacuoles in response to amine-induced alkaline stress in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, 1991, 97(3): 1234–1240.
- [49] Archibald FS, Fridovich I. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1982, 215(2): 589–596.
- [50] 陈成, 郑超群, 王梦梦, 杨顺清, 杨柳燕. 低浓度硝态氮促进微囊藻累积多聚磷酸盐. *湖泊科学*, 2022, 34(3): 766–776.
Chen C, Zheng CQ, Wang MM, Yang SQ, Yang LY. Low concentration nitrate-nitrogen improves polyphosphate accumulation in *Microcystis*. *Journal of Lake Sciences*, 2022, 34(3): 766–776. (in Chinese)
- [51] Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(50): 52270–52281.
- [52] 王春丽, 马放, 王强. 一株耐低温反硝化聚磷菌的筛选及其特性研究. *环境工程学报*, 2007, 1(4): 21–24.
Wang CL, Ma F, Wang Q. Screening of a low temperature-resistant denitrifying polyphosphate-accumulating organisms and its characteristics. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2007, 1(4): 21–24. (in Chinese)
- [53] 石廷玉, 董兴高, 谢建平. 多聚磷酸盐及其在分枝杆菌中的生理功能. *微生物学报*, 2016, 56(12): 1840–1846.
Shi TY, Dong XG, Xie JP. Polyphosphate and its physiological function in mycobacteria—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(12): 1840–1846. (in Chinese)
- [54] Ahn J, Daidou T, Tsuneda S, Hirata A. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Research*, 2002, 36(2): 403–412.
- [55] Shiba T, Tsutsumi K, Yano H, Ihara Y, Kameda A, Tanaka K, Takahashi H, Munekata M, Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *PNAS*, 1997, 94(21): 11210–11215.
- [56] Guan ZQ, Meyer BH, Albers SV, Eichler J. The thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* contains an unusually short, highly reduced dolichyl phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1811(10): 607–616.
- [57] Potapenko E, Negrão NW, Huang GZ, Docampo R. The acidocalcisome inositol-1,4,5-trisphosphate receptor of *Trypanosoma brucei* is stimulated by luminal polyphosphate hydrolysis products. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(27): 10628–10637.
- [58] King-Keller S, Moore CA, Docampo R, Moreno SNJ. Ca²⁺ regulation of *Trypanosoma brucei* phosphoinositide phospholipase C. *Eukaryotic Cell*, 2015, 14(5): 486–494.
- [59] Eisenberg-Bord M, Shai N, Schuldiner M, Bohnert M. A tether is a tether is a tether: tethering at membrane contact sites. *Developmental Cell*, 2016, 39(4): 395–409.
- [60] Foster PL. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 42(5): 373–397.

- [61] Tsutsumi K, Munekata M, Shiba T. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Gene Structure and Expression*, 2000, 1493(1/2): 73–81.
- [62] Bru S, Samper-Martín B, Quandt E, Hernández-Ortega S, Martínez-Láinez JM, Garí E, Rafel M, Torres-Torronteras J, Martí R, Ribeiro MPC, Jiménez J, Clotet J. Polyphosphate is a key factor for cell survival after DNA damage in eukaryotic cells. *DNA Repair*, 2017, 57: 171–178.
- [63] Choi S, Choi S, Choi Y, Cho N, Kim SY, Lee CH, Park HJ, Oh WK, Kim KK, Kim EM. Polyhexamethylene guanidine phosphate increases stress granule formation in human 3D lung organoids under respiratory syncytial virus infection. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 229: 113094.
- [64] Tinsley CR, Gotschlich EC. Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutants. *Infection and Immunity*, 1995, 63(5): 1624–1630.
- [65] Ivanov AI, Bagabov VM, Fomchenkov VM, Kulaev IS. Effect of cell wall polyphosphates on the sensitivity of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* to the damaging action of cetyltrimethylammonium bromide. *Mikrobiologiya*, 1996, 65(5): 607–612.
- [66] Reusch RN, Huang RP, Kosk-Kosicka D. Novel components and enzymatic activities of the human erythrocyte plasma membrane calcium pump. *FEBS Letters*, 1997, 412(3): 592–596.
- [67] Reusch RN. Polyphosphate/poly-(R)-3-hydroxybutyrate ion channels in cell membranes. *Inorganic Polyphosphates*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999: 151–182.
- [68] 杨正慧, 彭亮, 黄慕芳, 曹虹. 多聚磷酸盐在细菌和哺乳动物细胞中的作用. *微生物学通报*, 2015, 42(11): 2223–2228.
Yang ZH, Peng L, Huang MF, Cao H. The role of polyphosphate in bacteria and mammalian cells. *Microbiology China*, 2015, 42(11): 2223–2228. (in Chinese)
- [69] Chang FJ, Kim JM, Choi Y, Park K. MTA promotes chemotaxis and chemokinesis of immune cells through distinct calcium-sensing receptor signaling pathways. *Biomaterials*, 2018, 150: 14–24.
- [70] Morrissey JH, Smith SA. Polyphosphate as modulator of hemostasis, thrombosis, and inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 2015, 13 Suppl 1(1): S92–S97.
- [71] 魏峥, 聂琰晖, 刘乐庭, 卢洁, 于常海. 多聚磷酸盐在原核和真核生物中的研究进展. *生理科学进展*, 2009, 40(3): 197–202.
Wei Z, Nie YH, Liu LT, Lu J, Yu CH. Progress in functional polyphosphate in prokaryotic and eukaryotic living organisms. *Progress in Physiological Sciences*, 2009, 40(3): 197–202. (in Chinese)
- [72] Besteiro S, Tonn D, Tetley L, Coombs GH, Mottram JC. The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania*. *Journal of Cell Science*, 2008, 121(Pt 5): 561–570.
- [73] Luo SH, Ruiz FA, Moreno SNJ. The acidocalcisome Ca²⁺-ATPase (TgA1) of *Toxoplasma gondii* is required for polyphosphate storage, intracellular calcium homeostasis and virulence. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(4): 1034–1045.
- [74] McGrath JW, Quinn JP. Microbial phosphate removal and polyphosphate production from wastewaters. *Advances in Applied Microbiology*, 2003, 52: 75–100.
- [75] 杨柳燕, 杨欣妍, 任丽曼, 钱新, 肖琳. 太湖蓝藻水华暴发机制与控制对策. *湖泊科学*, 2019, 31(1): 18–27.
Yang LY, Yang XY, Ren LM, Qian X, Xiao L. Mechanism and control strategy of cyanobacterial bloom in Lake Taihu. *Journal of Lake Sciences*, 2019, 31(1): 18–27. (in Chinese)
- [76] McGrath JW, Cleary S, Mullan A, Quinn JP. Acid-stimulated phosphate uptake by activated sludge microorganisms under aerobic laboratory conditions. *Water Research*, 2001, 35(18): 4317–4322.
- [77] Wei RP, Wang X, Zhang W, Shen JN, Zhang HF, Gao Y, Yang LY. The improved phosphorus utilization and reduced phosphorus consumption of *ppk*-expressing transgenic rice. *Field Crops Research*, 2020, 248: 107715.