

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49 (12) :1564 - 1570 ; 4 December 2009  
ISSN 0001 - 6209 ; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

## 细菌中钙信号的作用

任晓慧<sup>1,2#</sup>, 王胜兰<sup>2#</sup>, 文莹<sup>1\*</sup>, 杨克迁<sup>2\*</sup>

( 中国农业大学生物学院 农业生物技术国家重点实验室 北京 100193 )

( 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101 )

**摘要** 越来越多的实验证明二价钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 在细菌中有重要调控作用。本文从  $\text{Ca}^{2+}$  信号对细菌生理的影响、细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度及测定方法、细菌中  $\text{Ca}^{2+}$  的运输和  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白四个方面综述了目前细菌中钙信号的研究进展。

**关键词** : 钙信号 细菌 自由钙离子浓度 调控

**中图分类号** : Q935 **文献标识码** : A **文章编号** : 0001-6209 (2009) 12-1564-07

二价钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 是生物体内重要的第二信使, 细胞内部自由钙离子浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) 一般保持在  $10^{-7}$  mol/L, 远低于细胞外部环境的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。正是这种浓度梯度赋予了  $\text{Ca}^{2+}$  传递信息的能力, 从而使其广泛地参与多种细胞生命过程, 如细胞分裂周期的调控、运输、运动、发病机理等。细菌和真核生物相似, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度也维持在较低水平 (100 ~ 300 nmol/L), 但细菌中钙信号调控研究却远落后于真核生物。尽管细菌中  $\text{Ca}^{2+}$  的功能仍不十分明确, 但科学家们对  $\text{Ca}^{2+}$  调控研究兴趣却与日俱增<sup>[1]</sup>。

### 1 $\text{Ca}^{2+}$ 对细菌生理的影响

有关原核生物中  $\text{Ca}^{2+}$  的研究已经进行了近 50 年<sup>[2]</sup>, 其中  $\text{Ca}^{2+}$  对细菌生理的影响研究涉及到趋化性和运动性<sup>[3-4]</sup>、细胞循环和复制起始<sup>[5]</sup>、孢子和异形胞形成<sup>[6]</sup>、发病机理<sup>[7]</sup>、群体感应<sup>[8-9]</sup>等。常态细胞  $[\text{Ca}^{2+}]$  很低, 比细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度要低近 4 个数量

级。外界刺激可以引起细胞  $[\text{Ca}^{2+}]$  的瞬时改变, 有假说认为这种瞬时改变可以以钙波的形式进行传导, 依靠这种信号的振幅、持续时间、频率和定位, 多种信息可以在此过程中被携带和传递, 以激发系列的磷酸化反应, 激活相关调控蛋白表达, 进而引起相应的生理反应<sup>[1]</sup>。

1997 年 Pitta 等发现海洋无鞭毛蓝细菌聚球藻 (*Synechococcus*) 在环境中没有  $\text{Ca}^{2+}$  的情况下停止运动, 外加  $\text{Ca}^{2+}$  后又可完全恢复运动性。镧系金属 Te 可以占据  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点, 以此阻碍该细菌的运动性。而  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EGTA 或 EDTA 也能明显阻碍细胞的运动。此实验说明  $\text{Ca}^{2+}$  很可能和海洋蓝细菌的运动机制有关<sup>[10]</sup>。

能证明  $\text{Ca}^{2+}$  介导细胞对刺激反应的最直接证据就是趋化现象。1977 年 Ordal 已经证明细胞  $[\text{Ca}^{2+}]$  控制着枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的鞭毛旋转方向<sup>[11]</sup>。Matsushita 在 1988 年通过多种  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻断剂表明  $\text{Ca}^{2+}$  可以抑制大肠杆菌 (*Escherichia*

基金项目 : 国家自然科学基金 (30400259)

\* 通信作者。文莹, Tel: +86-10-62732715, E-mail: wen@cau.edu.cn; 杨克迁, Tel: +86-10-64807459, Fax: +86-10-64807457, E-mail: yangkq@im.ac.cn

作者简介: # 并列第一作者。任晓慧 (1983 - ), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要从事链霉菌次级代谢研究, E-mail: huixr@163.com。王胜兰 (1971 - ), 女, 河北人, 助理研究员, 主要从事天蓝色链霉菌中钙结合蛋白功能研究, E-mail: wangsl@im.ac.cn

收稿日期: 2009-04-15; 修回日期: 2009-06-02

*coli* 的趋化性<sup>[2]</sup>。但直到 1995 年  $\text{Ca}^{2+}$  结合荧光染料 fura-2 和  $\text{Ca}^{2+}$  结合荧光蛋白被用于检测大肠杆菌细胞  $[\text{Ca}^{2+}]$  浓度后,才有证据表明对细菌增加排斥力,可导致细胞质  $[\text{Ca}^{2+}]$  瞬时增加和细胞翻滚,而增加吸引力可使细胞质  $[\text{Ca}^{2+}]$  瞬时降低和细胞平移<sup>[3]</sup>,而趋化性受体缺失突变株并没有  $[\text{Ca}^{2+}]$  变化。

FtsZ (filamentous temperature-sensitive protein Z) 是一种在细菌和古菌中广泛存在并在细胞分裂过程中起关键作用的蛋白质。细菌细胞分裂时,在未来细胞分裂的位点处, FtsZ 通过形成环状结构——FtsZ 环 (FtsZ ring) 来指导细菌细胞的分裂。体外实验证明, 10 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  可以促使 FtsZ 聚合<sup>[5]</sup>,但体内实验证据目前还不明确。大肠杆菌细胞分裂时  $[\text{Ca}^{2+}]$  也有显著变化, Chang 等在 1986 年利用电子探针分析发现在不分裂的细胞中,膜上  $\text{Ca}^{2+}$  浓度比细胞质内高 25 倍,但是在细胞分裂过程中,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度会显著升高近 4 倍<sup>[4]</sup>。这些实验表明  $\text{Ca}^{2+}$  可能在细菌细胞分裂时起着传递信号的作用。

2004 年 Torrecilla 等发现蓝细菌 (cyanobacterium) *Anabaena* sp. PCC7120 在剥夺了化合态氮源的早期有  $[\text{Ca}^{2+}]$  的瞬时变化,而氮剥夺能引起菌丝分化形成异形胞。在此基础上他们在培养基中加入能把外部  $\text{Ca}^{2+}$  转入内部的  $\text{Ca}^{2+}$  载体 Calcimycin (A23187 复合物),测定到氮剥夺早期  $[\text{Ca}^{2+}]$  瞬间显著提高到最大值  $0.74 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$ , 5 h 后才缓慢回落到常态水平,而且不再分化异形胞;加入真核生物 Calmodulin (钙调节蛋白钙调素) 抑制剂三氟啦嗪 (TFP) 后,  $[\text{Ca}^{2+}]$  瞬间提高到最大值  $0.72 \pm 0.27 \mu\text{mol/L}$  后不再回落到常态水平,也不再分化异形胞;加入细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 BAPTA-AM 后,  $[\text{Ca}^{2+}]$  没有显著变化,但表现出对异形胞分化早期的抑制。当氮剥夺消失 (大约 6 h) 后,再加入这些拮抗剂不再有  $[\text{Ca}^{2+}]$  的瞬时改变<sup>[9]</sup>。另外他们还证明了  $\text{Ca}^{2+}$  浓度瞬时增加时大量的  $\text{Ca}^{2+}$  来源于细胞内部。由该实验推测  $\text{Ca}^{2+}$  在异形胞分化早期可能起着抑制作用。

链霉菌气生菌丝的生长和孢子萌发也受到培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化的影响。本课题组的研究证实提高培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度可以促进天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 气生菌丝产生及孢子萌发,而降低培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度则使气生菌丝生长受到抑制<sup>[5]</sup>。但培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化是否引起相应的

链霉菌菌丝  $[\text{Ca}^{2+}]$  的变化,以及链霉菌菌丝细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化和菌丝形态发育之间的关系还没有相应的研究。

原核生物中  $\text{Ca}^{2+}$  对细菌生理影响的早期研究都还不太深入,相关的直接证据还不太充分。近几年随着实验技术的改进,以及人们对原核生物中  $\text{Ca}^{2+}$  认识的加深,一些新的实验结果进一步证明了  $\text{Ca}^{2+}$  的调控作用。口腔变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 中的 *ciaXRH* 操纵子负责调控生物膜形成、细菌素产生等基因的表达。2004 年 He 等研究变异链球菌的 *ciaRH* 操纵子时,发现  $\text{Ca}^{2+}$  是抑制 *ciaRH* 操纵子进行激活状态表达的外界环境信号,并且另外存在一个 CiaX 蛋白,与 CiaR、CiaH 共同组成一个三组分信号传导系统以适应外界环境变化。他们认为外界环境中的  $\text{Ca}^{2+}$  可与 CiaX 结合,使 CiaX 构象改变而失去与 CiaH 作用的能力,进而抑制了此信号传导途径<sup>[6]</sup>。Bap 蛋白是金黄色葡萄球菌生物膜形成必不可少的表面蛋白,可以促进细胞间黏合。实验证明,当在液体培养基中加入过量  $\text{Ca}^{2+}$  时,生物膜形成受到抑制,产生与 *bap* 缺失突变株相同的表型特征。而  $\text{Ca}^{2+}$  并不抑制 Bap 的表达,推测高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  存在时,可能与 Bap 结合后使其构象改变,失去形成生物膜的能力<sup>[7]</sup>。

综上所述,  $\text{Ca}^{2+}$  参与了原核生物的多种生命过程。目前有关  $\text{Ca}^{2+}$  对原核生物生理影响的研究范围较广但还需进一步深入,缺乏具体直接的实验证据。

## 2 细菌中 $\text{Ca}^{2+}$ 水平及测定方法

原核细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的相关研究进展缓慢,关键在于原核生物中  $[\text{Ca}^{2+}]$  的测定还面临很多问题,除了细胞本身因素如细胞壁和细胞膜等的特殊结构、试剂的毒性作用外,试剂和玻璃器皿中的  $\text{Ca}^{2+}$  污染及螯合剂等也会影响其测定的准确性。目前,细胞  $[\text{Ca}^{2+}]$  的测定方法主要有两种:一种是和  $\text{Ca}^{2+}$  结合后发出荧光的钙荧光染料法;一种是和  $\text{Ca}^{2+}$  结合后发出荧光的钙荧光蛋白法。

钙荧光染料 Fura-2 最早被应用,但其应用于原核生物存在很多问题,如染料自发荧光,易渗漏,对细菌有毒性,不同细胞组织不易区分等。随着 DNA 分子技术的发展,用细胞内组成表达的荧光蛋白检测  $[\text{Ca}^{2+}]$  已被成功运用,其中来自水母的钙荧光蛋白 Aequorin 应用得最为普遍,通过 Aequorin 与  $\text{Ca}^{2+}$

结合后发出的荧光可以检测细胞质  $[Ca^{2+}]$  变化。但 Aequorin 对  $[Ca^{2+}]$  瞬时变化感应相对较慢,且易受  $Mg^{2+}$  的干扰。目前新发现了另一种  $Ca^{2+}$  荧光蛋白 Obelin<sup>[8]</sup> 则相对克服了这些缺点,在原核生物中应用日益广泛。

1987年,Gangola和Rosen最早尝试测定细菌中  $Ca^{2+}$  浓度,他们用荧光染料 Fura-2 方法测定大肠杆菌中  $Ca^{2+}$  浓度为  $90 \pm 10$  nmol/L<sup>[9]</sup>。用 Aequorin 测  $Ca^{2+}$  浓度比 Fura-2 灵敏度高 2-3 倍,测得大肠杆菌中  $Ca^{2+}$  浓度为 200-300 nmol/L。细胞  $[Ca^{2+}]$  随着细胞生长和外界条件变化会有波动,2000年 Torrecilla 用 Aequorin 方法测定蓝细菌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度,常态时大约在 100~200 nmol/L,当外界  $Ca^{2+}$  浓度升高时,胞内  $[Ca^{2+}]$  在快速下降后,出现瞬时爆发,然后又缓慢回落到常态水平,当在培养基中添加 Calcimycin 时,  $Ca^{2+}$  浓度瞬时爆发峰比外加  $Ca^{2+}$  高,  $[Ca^{2+}]$  瞬时变化时间也拉长。与此相反,培养基中添加 EGTA ( $Ca^{2+}$  螯合剂)则抑制此现象,当外部  $Ca^{2+}$  浓度升至 1 mmol/L 时,细胞内  $Ca^{2+}$  浓度才有小幅度升高,由此也更加证实了外部  $Ca^{2+}$  变化可引起细胞  $[Ca^{2+}]$  的瞬时变化。同时,他们证明细胞受热刺激后,细胞  $[Ca^{2+}]$  在 2 min 内升至  $1.14 \pm 0.17$   $\mu$ mol/L,20 min 后达到最大值  $3.10 \pm 0.25$   $\mu$ mol/L,之后又慢慢回落到  $1.22 \pm 0.59$   $\mu$ mol/L。持续冷激所激发的  $[Ca^{2+}]$  升高要低于热激,10 min 后达到最大值  $1.04 \pm 0.23$   $\mu$ mol/L,由此证明外界冷热刺激可引起蓝细菌内部  $[Ca^{2+}]$  的瞬时改变<sup>[10]</sup>。Herbaud 等推测枯草芽孢杆菌和大肠杆菌中的  $Ca^{2+}$  浓度相似,大约 90 nmol/L。他们用相似的实验把枯草芽孢杆菌细胞悬浮于 0.5 mmol/L EGTA 中,细胞  $[Ca^{2+}]$  瞬时降低,继续添加  $Ca^{2+}$ ,10 s 内  $[Ca^{2+}]$  瞬时升高,当  $[Ca^{2+}]$  达到 4.5 mmol/L 时,细胞  $[Ca^{2+}]$  可瞬时达到常态的 200 倍,40 s 内又缓慢恢复至常态水平<sup>[11]</sup>。由此可见,常态细胞内自由  $Ca^{2+}$  水平较低且相对稳定,当受到外界相关刺激时,细胞  $[Ca^{2+}]$  会出现瞬时的剧烈变化,以此产生另一种细胞内钙信号。本课题组正尝试用 Obelin 方法测定天蓝色链霉菌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度。

### 3 细菌中 $Ca^{2+}$ 的跨膜运输

细胞  $[Ca^{2+}]$  的维持和改变是受细胞对  $Ca^{2+}$  的跨膜运输影响的。细胞对离子的跨膜运输分为主动

运输和被动运输。主动运输的特点是逆离子梯度,需要消耗能量,而被动运输是顺离子梯度,不需要消耗能量。对于真核生物,外界环境、细胞内质网及高尔基体中自由  $Ca^{2+}$  浓度远大于细胞质基质中  $Ca^{2+}$  浓度。细胞质基质内  $Ca^{2+}$  外排或被运送到内质网及高尔基体中为主动运输形式,起到维持细胞内常态  $Ca^{2+}$  浓度的作用,主要由膜上的  $Ca^{2+}$  ATPases 和  $Ca^{2+}$  离子交换器完成;而环境或内质网中  $Ca^{2+}$  是  $Ca^{2+}$  通道以被动运输的方式运送到细胞质中的,引起细胞内  $Ca^{2+}$  浓度升高及生理反应。目前这两种方式在原核生物中均有发现。

$Ca^{2+}$  ATPases 利用分解 ATP 获得的能量将  $Ca^{2+}$  排出细胞外或运送到内质网及高尔基体中,维持细胞内低浓度  $Ca^{2+}$  状态。真核生物内质网型  $Ca^{2+}$  ATPases 负责将细胞内  $Ca^{2+}$  转移到内质网上,而高尔基体型  $Ca^{2+}$  ATPases 负责将细胞内  $Ca^{2+}$  转移到高尔基体中。基因序列分析结果显示,细菌中也存在这类基因。枯草芽孢杆菌中 *yloB* 在基因序列上和真核高尔基体型  $Ca^{2+}$  ATPases 相似性很高。枯草芽孢杆菌孢子中  $Ca^{2+}$  浓度较高,*yloB* 破坏后对枯草芽孢杆菌的菌丝生长和孢子形成没有影响,但孢子的抗逆性消失<sup>[21]</sup>。人体宿主内高的  $Ca^{2+}$  浓度对肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*) 是有毒的,它在人体内的存活依赖于 CaxP,CaxP 在氨基酸序列上相似于真核生物中的内质网型  $Ca^{2+}$  ATPases。CaxP 被破坏后,细菌细胞内积累高浓度的  $Ca^{2+}$ ,影响它的寄生过程<sup>[23]</sup>。经序列搜索,可能的内质网型  $Ca^{2+}$  ATPases 在以下各种革兰氏阳性菌中也有发现,包括化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*),肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*),炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*),粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*),嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 和枯草芽孢杆菌<sup>[21]</sup>。 $Ca^{2+}$  离子交换器包括  $Ca^{2+}/H^{+}$  antiporter 和  $Ca^{2+}/Na^{+}$  antiporter,最早发现的细菌中的  $Ca^{2+}/H^{+}$  antiporter 基因是大肠杆菌中的 *chaA*,它可以互补  $Na^{+}/H^{+}$  antiporter 基因 *nhaA* 和 *nhaB* 缺失后引起对环境  $Na^{+}$  敏感突变。*chaA* 是一个 pH 依赖的  $Ca^{2+}/H^{+}$  antiporter 基因,它的过表达可以解除环境中  $Ca^{2+}$  及  $Na^{+}$  对细菌生长的抑制<sup>[24]</sup>。蓝藻中也存在两个可能的  $Ca^{2+}/H^{+}$  antiporter 基因:集胞藻 (*Synechocystis sp.* PCC 6803) 中的 *synCAX* 和嗜盐隐杆藻 (*Aphanothece halophytica*) 中的 *apCAX*,它们和 *chaA* 的序列相似性较低,而和植物气泡中的  $Ca^{2+}$  离子交换器有很大相

似性。对环境  $\text{Ca}^{2+}$  敏感的大肠杆菌中表达这两个基因可以使敏感性消失。*synCAX* 基因被破坏后,细胞对环境盐浓度敏感,将  $\text{Ca}^{2+}$  泵出细胞的能力减弱,*synCAX* 基因过表达后可使细胞对环境盐的耐受性增强<sup>[25]</sup>。YrbG 是大肠杆菌的一种膜内蛋白,具有独特的跨膜拓扑结构,推测其为  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  交换器<sup>[26]</sup>。通过生物信息学分析,NCBI 存在 147 个  $\text{Ca}^{2+}$  离子交换器基因,其中有 42 个存在细菌中<sup>[27]</sup>。

$\text{Ca}^{2+}$  channel 主要控制  $\text{Ca}^{2+}$  的细胞内排,是形成细胞内钙信号的主要原因。在细菌中,添加  $\text{Ca}^{2+}$  channel 的拮抗剂对原核生物的生长分化有显著影响,预示着  $\text{Ca}^{2+}$  channel 可能在原核生物中担负有重要的功能。和真核生物不同的是,原核生物中存在的  $\text{Ca}^{2+}$  channel 是聚-3-羟基丁酸 (Poly-3-hydroxybutyrate) 和多聚磷酸 (polyphosphate) 形成的复合物,Reusch 和 Scadoff 第一次提出这种复合物行使  $\text{Ca}^{2+}$  channel 功能<sup>[28]</sup>。在 pH 大于多聚磷酸的 pK2 时,PHB/poly P 选择二价离子,而 pH 小于 pK2 时,PHB/poly P 选择性消失<sup>[29]</sup>。PHB 和  $\text{CaPPi}$  复合物形成的钙泵同样可被真核细胞钙泵抑制剂抑制。

## 4 细菌中 $\text{Ca}^{2+}$ 结合蛋白

钙结合蛋白是可以结合  $\text{Ca}^{2+}$  的蛋白的统称。根据结构特征,可以分为含 EF-hand motif 的钙结合蛋白和不含 EF-hand motif 的钙结合蛋白。而钙调蛋白,在真核生物中特指含 EF-hand,并具有调控功能的钙结合蛋白。这类蛋白最少含有 2 个串联 EF-hands。

EF-hand 由 helix-loop-helix 结构单元构成,其中两个 helix 近似垂直,loop 区若干保守氨基酸上的 6~7 个氧原子以配位键结合一个  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[30]</sup>。根据 Loop 区的不同,EF-hand 可以分为 canonical EF-hand 和 pseudo EF-hand 两类。通过对已知的 EF-hand motif 蛋白序列比对,Zhou 分别建立了 canonical EF-hand 和 pseudo EF-hand 的搜索模式,用这两个模式从非冗余 REFERENCE 蛋白数据库的细菌蛋白序列中搜索到 467 个含有 canonical EF-hand motif 的蛋白,其中 39 个蛋白含有 2~6 个 EF-hand motifs,其他只含有一个 EF-hand motif,根据序列相似性分析,这 39 个蛋白可归为 3 个类群。但未搜索到含 pseudo EF-hand motif 的蛋白质<sup>[31]</sup>。含 EF-hand 的钙结合蛋白在真核生物中分布广泛,参与细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的调节和生理过程复杂多样的调控。原核生物中,含

EF-hand 的钙结合蛋白最早在红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 中发现。对该蛋白 (Calerythrin) 的一级结构分析表明它由 4 个 EF-Hand 构成,其中 3 个有结合  $\text{Ca}^{2+}$  的能力<sup>[32]</sup>。Calerythrin 的结构和在真核生物中起调节  $\text{Ca}^{2+}$  浓度作用的 NSCP (Neresis Sarcoplasmatic Calcium binding Protein) 蛋白的结构最相似,因此 Calerythrin 也被认为可能起钙缓冲的作用<sup>[33]</sup>。Calsymin 是在豆根瘤菌 (*Rhizobium etli*) 中发现的钙结合蛋白,由 6 个 EF-hand 构成,它在豆根瘤菌的生活史中起着重要调控作用,编码 Calsymin 的 *casA* 被破坏后豆根瘤菌失去了在宿主植物细胞中生活的能力<sup>[34]</sup>。以上钙结合蛋白整体和真核钙调蛋白同源,被认为是与真核钙调蛋白有近缘关系。另外,梭菌、瘤胃细菌和拟杆菌中的几种细胞外多糖分解酶 C 末端 dockerin domain 中也包含一个或两个 EF-hand, dockerin domain 正确折叠需要  $\text{Ca}^{2+}$  与其 EF-hand 结合,  $\text{Ca}^{2+}$  可以起到稳定结构的作用<sup>[35]</sup>。这些蛋白虽然含 EF-hand,可以结合钙离子,但不是真正意义的钙调蛋白。

在细菌中,与真核细胞同源的 EF-hand 钙调蛋白主要存在于高 G+C 复杂放线菌中。几乎所有基因组序列已知的链霉菌中都发现 EF-hand 钙调蛋白。其它复杂放线菌,如糖多孢菌也有这类蛋白。在链霉菌中,已对 3 个含有 EF-hand 的钙调蛋白功能做了研究,即天蓝色链霉菌中的 CabB 和 CabC 及生二素链霉菌 (*Streptomyces ambofaciens*) 中的 CabA。这 3 个钙结合蛋白都被认为是调节细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的 buffer 蛋白,其中以 CabC 对链霉菌发育分化的影响最为显著。*cabA* 敲除后对生二素链霉菌形态发育没有影响<sup>[36]</sup>,而 *cabB* 敲除后的天蓝色链霉菌在  $\text{Ca}^{2+}$  浓度超过 20 mmol/L 的基本培养基上生长受到抑制<sup>[37]</sup>。本课题组的研究证实 *cabC* 敲除后可以引起气生菌丝提早产生,气生菌丝顶端膨大,产生短而密的小分枝,孢子链上孢子提早萌发。而 *cabC* 过表达会引起气生菌丝生长受到抑制,气生菌丝表面有颗粒状突起。培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高可以引起和 *cabC* 基因敲除相似的表型变化,而培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度降低可以引起和 *cabC* 过表达相似的表型变化<sup>[35]</sup>。

虽然含 EF-hand 的钙调蛋白数量众多,起重要的调控功能,但不含 EF-hand 的钙结合蛋白也广泛存在。原核生物中不含 EF-hand 的钙结合蛋白在几种革兰氏阴性菌中都有发现,它们都是外泌蛋白及

细菌致病和共生过程的决定因子,这类蛋白包括大肠杆菌、普通变形杆菌、摩根摩根菌以及牛莫拉菌的溶血素和豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 及一种中华根瘤菌 (*Sinorhizobium* sp. BR816) 的 NodO 蛋白等<sup>[5]</sup>。以上蛋白可能参与钙依赖的细菌与宿主的识别过程,但并不影响细菌发育分化。

蓝细菌中的 CcbP 也是一个不含 EF-hand 的钙结合蛋白,它在蓝细菌异形胞的发育分化中起着重要的作用。蓝细菌在缺少化合态氮源时分化形成异形胞,异形胞具有特殊形态结构并呈规律性分布,是生物固氮的场所。CcbP 的每个蛋白分子可以结合两个  $\text{Ca}^{2+}$ 。在异形胞分化过程中 HetR 特异性分解 CcbP,在依赖  $\alpha$ -酮戊二酸的情况下 NtcA 负调控 *ccbP* 的表达。在 HetR 和 NtcA 的联合作用下异形胞中 CcbP 量降低。CcbP 结合的  $\text{Ca}^{2+}$  释放后导致了细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度上升,使分化继续。成熟的异形胞内自由  $\text{Ca}^{2+}$  浓度可以是营养细胞中的几倍<sup>[8, 39]</sup>。但  $\text{Ca}^{2+}$  作为信号分子如何参与异形胞分化调控还不清楚。

综上所述,在原核生物中存在不含 EF-hand 和含 EF-hand 的钙结合蛋白,这两类蛋白在细胞内可通过影响细胞内自由  $\text{Ca}^{2+}$  浓度而影响细胞的发育分化。有些钙结合蛋白本身没有调控功能。

## 5 展望

由于实验技术的限制,原核生物中的  $\text{Ca}^{2+}$  信号研究进展远落后于真核生物中的研究。但近 20 年,细菌中  $\text{Ca}^{2+}$  信号相关研究的大门正在逐步被打开。目前的研究结果表明  $\text{Ca}^{2+}$  参与了细菌对温度、盐、渗透压的早期感应,以及运动性、趋化性、细胞分裂、基因表达和细胞分化等多种生命过程。但外界刺激如何引起  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的瞬时变化? 阻断  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化这一信号传递过程会引起什么生理反应?  $\text{Ca}^{2+}$  如何将浓度瞬时变化的信号传递给相应的蛋白? 诸多疑问还需进一步的深入研究。

## 参考文献

[1] Dominguez DC. Calcium signalling in bacteria. *Molecular Microbiology*, 2004, 54 (2): 291 – 297.

[2] Norris JR, Jensen HL. Calcium requirements of *Azotobacter*. *Nature*, 1957, 180 (4600): 1493 – 1494.

[3] Tisa LS, Adler J. Calcium ions are involved in *Escherichia coli* chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (24): 11804 – 11808.

[4] Watkins NJ. Free calcium transients in chemotactic and non-chemotactic strains of *Escherichia coli* determined by using recombinant aequorin. *Biochemical Journal*, 1995, 306 (Pt 3): 865 – 869.

[5] Yu XC, Margolin W.  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO Journal*, 1997, 16 (17): 5455 – 5463.

[6] O'Hara MB, Hageman JH. Energy and calcium ion dependence of proteolysis during sporulation of *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172 (8): 4161 – 4170.

[7] Rose RK, Dibdin GH, Shellis RP. A quantitative study of calcium binding and aggregation in selected oral bacteria. *Journal of Dental Research*, 1993, 72 (1): 78 – 84.

[8] Werthen M, Lundgren T. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and kinase activity during acylated homoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia liquefaciens*. *Journal of Biochemistry*, 2001, 276 (9): 6468 – 6472.

[9] Torrecilla I, Leganes F, Bonilla I, et al. A calcium signal is involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Microbiology*, 2004, 150 (Pt 11): 3731 – 3739.

[10] Pitta TP, Sherwood EE, Kobel AM, et al. Calcium is required for swimming by the nonflagellated cyanobacterium *Synechococcus* strain WH8113. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (8): 2524 – 2528.

[11] Ordal GW. Calcium ion regulates chemotactic behaviour in bacteria. *Nature*, 1977, 270 (5632): 66 – 67.

[12] Matsushita T, Hirata H, Kusaka I. Calcium channel blockers inhibit bacterial chemotaxis. *FEBS Letters*, 1988, 236 (2): 437 – 440.

[13] Tisa LS, Adler J. Cytoplasmic free- $\text{Ca}^{2+}$  level rises with repellents and falls with attractants in *Escherichia coli* chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92 (23): 10777 – 10781.

[14] Chang CF, Shuman H, Somlyo AP. Electron probe analysis, X-ray mapping, and electron energy-loss spectroscopy of calcium, magnesium, and monovalent ions in log-phase and in dividing *Escherichia coli* B cells. *Journal of Bacteriology*, 1986, 167 (3): 935 – 939.

[15] Wang SL. *CabC*, an EF-hand calcium-binding protein, is involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated regulation of spore germination and aerial hypha formation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (11): 4061 – 4068.

[16] He X, Wu C, Yarbrough D, et al. The *cia* operon of *Streptococcus mutans* encodes a unique component required

- for calcium-mediated autoregulation. *Molecular Microbiology*, 2008, 70 (1): 112 – 126.
- [17] Arrizubieta MJ, Toledo-Arana A, Amorena B, et al. Calcium inhibits bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (22): 7490 – 7498.
- [18] Campbell AK. Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid *Obelia geniculata*. *Biochemical Journal*, 1974, 143 (2): 411 – 418.
- [19] Gangola P, Rosen BP. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 1987, 262 (26): 12570 – 12574.
- [20] Torrecilla I, Leganes F, Bonilla I, et al. Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacterial. *Plant Physiology*, 2000, 123 (1): 161 – 175.
- [21] Herbaud ML, Guiseppi A, Denizot F. Calcium signalling in *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1448 (2): 212 – 226.
- [22] Raeymaekers L. Expression of a P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase in *Bacillus subtilis* during sporulation. *Cell Calcium*, 2002, 32: 93 – 103.
- [23] Rosch JW, Sublett J, Gao G. Calcium efflux is essential for bacterial survival in the eukaryotic host. *Molecular Microbiology*, 2008, 70 (2): 435 – 444.
- [24] Ivey DM, Guffanti AA, Zemsky J. Cloning and characterization of a putative  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter-deficient strains by the overexpressed gene. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (15): 11296 – 11303.
- [25] Das S. Proof for a nonproteinaceous calcium-selective channel in *Escherichia coli* by total synthesis from (R)-3-hydroxybutanoic acid and inorganic polyphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94 (17): 9075 – 9079.
- [26] Saaf A, Baars L, Heijne G. von. The internal repeats in the  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger-related *Escherichia coli* protein YrbG have opposite membrane topologies. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (22): 18905 – 18907.
- [27] Cai X, Lytton J. The cation/ $\text{Ca}^{2+}$  exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21 (9): 1692 – 1703.
- [28] Reusch RN, Huang R, Bramble LL. Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 1995, 69 (3): 754 – 766.
- [29] Das S, Reusch RN. pH regulates cation selectivity of poly-(R)-3-hydroxybutyrate/polyphosphate channels from *E. coli* in planar lipid bilayers. *Biochemistry*, 2001, 40 (7): 2075 – 2079.
- [30] Grabarek Z. Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 359 (3): 509 – 525.
- [31] Zhou Y, et al. Prediction of EF-Hand Calcium-Binding Proteins and Analysis of Bacterial EF-Hand Proteins. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 65: 643 – 655.
- [32] Swan DG. A bacterial calcium-binding protein homologous to calmodulin. *Nature*, 1987, 329 (6134): 84 – 85.
- [33] Tossavainen H, Permi P, Annala A, et al. NMR solution structure of calyerythrin, an EF-hand calcium-binding protein from *Saccharopolyspora erythraea*. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270 (11): 2505 – 2512.
- [34] Xi C. Symbiosis-specific expression of *Rhizobium etli* *casA* encoding a secreted calmodulin-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97 (20): 11114 – 11119.
- [35] Michiels J, Xi C, Verhaert J, et al. The functions of  $\text{Ca}^{2+}$  in bacteria: a role for EF-hand proteins? *Trends in microbiology*, 2002, 10 (2): 87 – 93.
- [36] Yonekawa T, Ohnishi Y, Horinouchi S. A calcium-binding protein with four EF-hand motifs in *Streptomyces ambifaciens*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2001, 65 (1): 156 – 160.
- [37] Yonekawa T, Ohnishi Y, Horinouchi S. A calmodulin-like protein in the bacterial genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 244 (2): 315 – 321.
- [38] Zhao Y, Shi Y. CebP, a calcium-binding protein from *Anabaena* sp. PCC 7120, provides evidence that calcium ions regulate heterocyst differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102 (16): 5744 – 5748.
- [39] Shi Y, Zhao W. Regulation of intracellular free calcium concentration during heterocyst differentiation by HetR and NtcA in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (30): 11334 – 11339.

## An update of calcium signaling in bacteria – A review

Xiaohui Ren<sup>1,2</sup>, Shenglan Wang<sup>2</sup>, Ying Wen<sup>1\*</sup>, Keqian Yang<sup>2\*</sup>

(College of Biological Sciences and State Key Laboratory for Agro-biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

(<sup>2</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** In eukaryotes,  $\text{Ca}^{2+}$  is an important second messenger and regulates diverse cellular activities ranging from muscle contraction to fertilization. In bacteria, growing evidence suggests that  $\text{Ca}^{2+}$  also plays important regulatory roles in various physiological processes. Here we review current understanding of calcium regulation in bacteria from the following aspects: 1) the concept of bacterial  $[\text{Ca}^{2+}]$  and its determination; 2) cellular processes affected by  $[\text{Ca}^{2+}]$  changes; 3) transportation of  $\text{Ca}^{2+}$  across bacterial membrane; 4) eukaryotic calcium binding proteins in bacteria and their functions.

**Keywords**: calcium signaling; bacteria;  $[\text{Ca}^{2+}]$ ; regulation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400259)

\* Corresponding authors. Tel: +86-10-62732715, E-mail: wen@cau.edu.cn; Tel: +86-10-64807459, Fax: +86-10-64807457, E-mail: yangkq@im.ac.cn

Received: 15 April 2009/Revised: 2 June 2009

### 1953 年创刊以来所有文章全文上网

2008 年 1 月中旬,《微生物学报》自 1953 年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文!

建立全文数据库的工作是从 2007 年初开始的,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史悠久,其间经历了期刊的变化,变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

#### 《微生物学报》刊、期统计表

2009 年 12 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 ~ 1956	半年刊	1 ~ 4	1 ~ 2
1957 ~ 1958	季刊	5 ~ 6	1 ~ 4
1959	季刊	7	1 ~ 2
1959 ~ 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 ~ 4
1963 ~ 1965	季刊	9 ~ 11	1 ~ 4
1966	季刊	12	1 ~ 2
1966 ~ 1972	停刊 6 年半		
1973 ~ 1988	季刊	13 ~ 28	1 ~ 4
1989 ~ 2007	双月刊	29 ~ 47	1 ~ 6
2008	月刊	48	1 ~ 12
2009	月刊	49	1 ~ 12