

热激信号转导中的钙-钙调素途径

周人纲

(河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要:大量证据证明钙-钙调素(Ca^{2+} -CaM)信号系统参与植物的热激信号转导。用激光共聚焦扫描显微镜研究小麦胞内 Ca^{2+} 浓度的变化, 37℃热激可引起小麦胞内自由 Ca^{2+} 浓度的迅速提高。在 Ca^{2+} 存在条件下, 热激也引起小麦CaM基因CaM1-2的表达及细胞内CaM蛋白含量的提高。用 CaCl_2 处理小麦幼苗明显提高小麦热激基因hsp26和hsp70的表达和热激蛋白的合成, 而 Ca^{2+} 的螯合剂EGTA, Ca^{2+} 通道阻断剂异博定和 LaCl_3 、CaM抑制剂W7、TFP和CPZ明显降低了热激基因hsp26和hsp70的表达和热激蛋白的合成。EGTA、易博定、TFP或CPZ的处理也阻止小麦耐热性的获得。小麦CaM基因与热激基因的表达动力学研究表明CaM位于热激信号转导的上游, 而 Ca^{2+} 是热激启动的胞内关键因子。凝胶阻滞分析提出 Ca^{2+} -CaM在热激信号转导中的作用是通过激活热激转录因子的DNA结合活性来实现的。提出在植物细胞内存在一条新的热激信号转导途径: 钙-钙调素途径。

关键词: 钙离子; 钙调素; 热激蛋白; 热激转录因子; 信号转导

中图分类号: S51.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)院庆专辑-0024-06

Ca^{2+} -CaM Pathway of Heat Shock Signal Transduction

ZHOU Ren-gang

(Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of
Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Laboratory studies by the author showed the involvement of calcium and calcium-activated calmodulin (Ca^{2+} -CaM) in heat shock (HS) signal transduction. Using Fluor-3/AM and Laser Scanning Confocal Microscopy, it was found that the increase of intracellular free calcium ion concentration started within 1 min after a 37℃ HS in wheat. The levels of CaM mRNA and protein increased during HS at 37℃ in the presence of Ca^{2+} . The expression of hsp26 and hsp70 genes, synthesis of heat shock proteins were up-regulated by addition of CaCl_2 , and down-regulated by the Ca^{2+} chelator EGTA, the Ca^{2+} channel blockers LaCl_3 and verapamil, or the CaM antagonists W7, CPZ and TFP. The acquired thermotolerance developed by HS at 37℃ was eliminated by treatment with EGTA, verapamil, CPZ and TFP. The temporal expression of the CaM1-2 gene, and the hsp26 and hsp70 genes, demonstrated that CaM is located upstream in HS signal transduction, and Ca^{2+} is the key factor turning on HS signal transduction pathway. The results obtained by gel mobility shift assay demonstrated that Ca^{2+} -CaM is involved in HS signal transduction by regulating DNA-binding activity of HS transcription factor. Based on above findings, a new pathway, Ca^{2+} -CaM pathway of HS signal transduction, was proposed.

Key words: Calcium ion; Calmodulin; Heat shock proteins; Heat shock transcription factor; Signal transduction

近年来, 细胞信号转导的研究已成为生命科学 中最前沿的研究领域之一, 环境刺激的信号转导是

收稿日期: 2003-07-06

基金项目: 国家自然科学基金(30270796); 河北省自然科学基金(301447)资助项目

作者简介: 周人纲(1946-), 女, 上海市人, 硕士, 研究员, 主要从事热激蛋白和热激信号转导方面的研究工作。

植物信号转导研究的一个重要部分,它主要研究环境刺激对生物体细胞基因表达的调控以及调控这一过程的分子途径。植物对逆境因素胁迫的反应是一个多基因控制的复杂过程,植物抗逆性的研究不是搞清楚一两个蛋白或基因能解决的,而研究植物抗逆调控基因或植物信号转导途径将更有意义。

热激能诱导生物产生热激蛋白(Heat shock proteins, Hsps),并使生物获得耐热性,这个现象已在几乎所有被研究过的生物中证实了。但生物机体如何感受并传导热激信号,即热激信号通过什么途径激活热激蛋白基因的表达、引起热激蛋白的合成并诱导耐热性的机理还不完全清楚。近些年发现,热激基因的表达能够被一些信号转导物所调节,例如:胞内 pH 值、 $3', 5'$ -环腺苷酸(cAMP)、 Ca^{2+} 、钙调素(Calmodulin, CaM)、1, 4, 5-三磷酸肌醇(IP_3)、蛋白激酶和蛋白磷酸酶等。本文根据我们实验室的研究工作结合国内外的研究动态讨论 Ca^{2+} -CaM 参与的热激信号转导。

1 Ca^{2+} -CaM 信号系统位于热激信号转导的上游

Ca^{2+} 是目前植物细胞中被证实的主要胞内信使,许多环境胁迫如干旱和盐胁迫、低温、氧化胁迫及机械伤害均可引起细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的增加。CaM 是植物细胞中 Ca^{2+} 最重要的多功能受体蛋白,是 Ca^{2+} 参与的信号转导途径中的重要成员。近年来已证实 Ca^{2+} -CaM 信号转导系统在植物对环境信号的感受、转导、响应过程中起重要作用。许多环境刺激信号像光、风、触摸、冷激和机械刺激都能诱导 CaM 或 CaM 相关基因的表达。

热激诱导细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加已有报道:热激能引起果蝇、中国仓鼠、HeLa 细胞中胞质 Ca^{2+} 浓度的提高^[1, 2]。在植物方面的研究结果也证明这一点, Biyaseheva 等^[3]测定到热激能使豌豆叶原生质体胞质自由 Ca^{2+} 浓度增加 4 倍; Gong 等^[4]用能表达水母发光蛋白的转基因烟草为材料,发现热激时胞质中 Ca^{2+} 水平迅速而短暂地升高。热激既动员质外体中的钙向胞质中流动又可动员胞内钙库内质网中的钙向胞质中流动。热激在使植物细胞质 Ca^{2+} 浓度升高的同时,也使细胞中 CaM 浓度升高。玉米幼苗在热激时细胞中 CaM 蛋白含量有明显提高,并且这种提高是依赖 Ca^{2+} 的^[5]。

最近我们实验室用荧光染料 Fluo- 3/AM 染色

小麦叶鞘组织细胞,在激光共聚焦扫描显微镜观察小麦细胞内自由钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的变化。结果表明 37 °C 热激可引起小麦细胞质 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的迅速提高,热激时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的时间动力学研究显示热激后 1 min 内细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 就明显升高,4 min 时达到最高值,此时细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 是未热激时的 3 倍。胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的提高引起胞内 CaM 基因的表达和 CaM 蛋白浓度的增加,以小麦 CaM 基因 CaM 1- 2 为探针的 Northern 分析结果表明, CaM 1- 2 是组成型表达的,在非热激温度时有基础的表达水平,37 °C 热激 10 min 即可引起 CaM 1- 2 表达的提高,20 min 达到最大值,热激 1 h 它的 mRNA 值又回到基础的表达水平。小麦幼苗中 CaM 蛋白含量检测表明:水处理的小麦细胞中 CaM 的浓度随着热激时间的延长而提高,90 min 达到最高值,是未经热激的 2 倍,90 min 以后,细胞内 CaM 含量又逐渐降低。用 CaCl_2 预处理的小麦幼苗热激后 CaM 含量有更大幅度提高,热激 90 min 时细胞内 CaM 的含量是未经热激的 3 倍,而 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 处理的幼苗中 CaM 浓度无明显增加。证明小麦热激过程也伴随着 CaM 的积累,而且这种积累是依赖 Ca^{2+} 的。热激引起细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的快速上升说明 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化是热激信号转导过程中非常早期的一步,在热激反应的早期 CaM 基因的表达及其对 Ca^{2+} 的依赖,进一步表明 Ca^{2+} -CaM 信号系统位于热激信号转导的上游。如果在非热激温度 22 °C 时,用不同浓度的 CaCl_2 溶液处理小麦幼苗,能提高小麦 CaM 基因 CaM 1- 2 的表达,而 MgCl_2 处理不能影响 CaM 1- 2 基因的表达。这表明 Ca^{2+} 在促进 CaM 基因表达方面的作用是特异的,它能代替热激诱导 CaM 基因的表达^[6]。

2 热激信号转导的下游事件:热激基因表达的调控

国际上热激信号转导研究当前的热点是热激基因表达的调控即热激信号转导的下游事件^[7, 8]。真核生物中,有一种转录调节因子在热激条件下可以激活热激基因的表达,被称为热激转录因子(heat shock transcription factor, HSF)。在热激基因中,启动子中有一小段特异的 DNA 识别序列($5' - \text{nGAAnnTT CnnGAAn} - 3'$),是 HSF 的结合位点,称为热激元件(Heat shock element, HSE),热激时

HSF 被激活并与 HSE 结合,启动热激基因的表达。因此热激诱导的热激基因表达是由 HSF 参与的,HSF 的活性调节是热激基因表达转录调节的中心机制。

细胞中 HSF 存在无活性的单体及具有 DNA 结合活性的同源三聚体二种形式,而 HSF 的三聚化是 HSF 活化的必要条件,在非热激条件下,HSF 在细胞中是以钝化的单体形式存在,热激引起细胞中的 HSF 由无转录活性的单体向能与 HSE 结合的活性三聚体转化,进而诱导热激基因的表达,热激恢复时,HSF 的活性三聚体又解聚为无活性的单体形式^[9, 10]。HSF 的核转位是激活 HSF 活性的一个环节,在 HeLa 细胞和番茄中的研究都表明,在正常条件时,HSF 分散在细胞质和细胞核中,热激引起 HSF 向核内的迅速集中形成大的核颗粒。热激恢复时,颗粒消散,部分 HSF 又分散到细胞质中^[11, 12]。HSF 的活性也受磷酸化和脱磷酸化的调节,HSF 的磷酸化是它活性的一个主要的翻译后调节机制。HSF 的磷酸化不是简便地用于激活或关闭它的活性,一个复杂的多位点磷酸化来调节 HSF 的活性,HSF 的磷酸化也有组成型和诱导型二种^[13, 14]。热激基因的表达也受热激蛋白自身的反馈抑制,在多种真核生物包括植物拟南芥中已发现热激蛋白 70(Hsp70)在热激反应的自动调节中起重要作用,在热激后的细胞提取物中已检测到 Hsp70 与 HSF 三聚体形成的复合物,此外,在细胞中也检测到 Hsp90 与 HSF 三聚体的复合物,Hsp90 也可能参与了热激反应的调节。也有实验表明,多伴侣复合体(Hsp70、Hsp90 和 Hdj1)一起作为 HSF 的负调节物^[15~21]。

以上是热激信号转导的上游和下游事件,但是关于 Ca^{2+} -CaM 对热激蛋白基因表达的调控,即热激信号转导中的上游与下游事件之间的联系研究目前几乎是空白。

3 钙-钙调素参与热激信号转导

我们实验室主要研究热激信号转导中的 Ca^{2+} -CaM 信号系统的上游事件与热激基因表达的下游事件之间的联系,从不同水平(基因的表达、蛋白质的合成及其功能)为 Ca^{2+} -CaM 参与热激信号转导提供证据。

3.1 Ca^{2+} -CaM 信号系统与热激基因表达

RNA 杂交实验表明,37℃的热激明显提高了小麦幼苗热激基因 hsp26 和 hsp70 的表达,10 mmol/L

CaCl_2 的处理更促进了 hsp26 和 hsp70 的表达,而 5 mmol/L Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 处理则降低了它们的表达, Ca^{2+} 通道阻断剂异博定和 LaCl_3 也抑制了 hsp26 的表达。CaM 拮抗剂 W7 和氯丙嗪(Chlorpromazine, CPZ)的处理也都降低了 hsp26 和 hsp70 的 mRNAs 水平。对照实验表明,药物本身并不影响 hsp26 和 hsp70 的表达。这些药物在热激时影响热激蛋白基因的表达,说明 Ca^{2+} 和 CaM 参与热激基因的表达^[22]。此外在非热激温度 22℃下,外源 CaCl_2 溶液处理小麦幼苗不仅能提高小麦 CaM 基因 CaM 1-2 的表达,也引起热激蛋白基因 hsp26 表达的明显增加,而 MgCl_2 处理不增加 hsp26 基因的表达。这表明 Ca^{2+} 能代替热激诱导热激基因的表达。

3.2 Ca^{2+} -CaM 信号系统涉及热激基因表达的体内(in vivo)证据

用转 HSP18.2 启动子/GUS 基因(一种报告基因)的转基因拟南芥为材料,经处理后测定 GUS(β -葡萄糖苷酸酶)的活性。在热激时(37℃)加入一定量的 CaCl_2 处理能促进转基因拟南芥中 GUS 的表达,在正常生长条件下(22℃)用 CaCl_2 处理,也能启动 GUS 的表达。而 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA、 Ca^{2+} 通道阻断剂异博定和 LaCl_3 都能明显抑制热激时 GUS 的活性且有剂量依赖性。W7 是一种专一的 CaM 拮抗剂,不同浓度 W7 处理使 GUS 在热激时的表达量下降,且随 W7 浓度的增加抑制程度增加,另外两种 CaM 拮抗剂三氟拉嗪(Trifluoperazine, TFP)和 CPZ 也同样抑制热激时 GUS 的表达。这些体内实验结果也为 Ca^{2+} 和 CaM 参与了热激蛋白基因的表达提供了更有力证据。

3.3 Ca^{2+} -CaM 信号系统与热激蛋白诱导合成

Kuznetsov 等^[23]结果显示,在热激诱导甜菜细胞内自由 Ca^{2+} 浓度增加的同时,也诱导热激蛋白的合成和耐热性的获得。我们实验室以小麦为实验材料表明 Ca^{2+} 和 CaM 在小麦热激蛋白的诱导合成及耐热性获得方面的作用。

小麦幼苗在 37℃热激并用 ^{35}S -蛋氨酸标记,以诱导热激蛋白的合成。放射自显影照片显示,与对照相比,37℃的热激诱导热激蛋白的合成,其中合成量较大的热激蛋白的分子量分别为 80, 70 和 15~17 kD。 CaCl_2 处理明显提高了热激蛋白的合成,特别是 90 kD 和 26~28 kD 热激蛋白合成的增加。5 mmol/L EGTA 处理明显降低了热激蛋白的合成量。50 $\mu\text{mol/L}$ CPZ 和 25 $\mu\text{mol/L}$ TFP 处理也

减少了热激蛋白的合成。在 Ca^{2+} 存在时, 热激蛋白的合成提高, 而 Ca^{2+} 螯合剂或 CaM 拮抗剂的处理都抑制热激蛋白的合成, 表明 Ca^{2+} 和 CaM 参与了热激蛋白的诱导合成^[24]。

3.4 Ca^{2+} -CaM 信号系统与热激诱导的小麦幼苗耐热性获得

用红四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 法测定小麦幼苗生活力作为小麦幼苗耐热性的研究指标。未经热激的幼苗在 50 °C 处理 40 min 后, 生活力下降 90%, 而经热激的幼苗同样处理后, 仍能保持一定的生活力, 仅下降 40%, 表明热激引起小麦幼苗耐热性的提高。分别用 5 mmol/L EGTA 或 0.5 mmol/L 易博定预处理的幼苗经 37 °C 热激后又在 50 °C 水浴处理 40 min 后, 生活力分别下降 80% 或 90%, 接近未经热激的小麦。这些结果表明 EGTA 和易博定的预处理阻止了由热激引起的耐热性的提高。10 mmol/L CaCl_2 的预处理比水处理的幼苗耐热性略有提高。用 50 $\mu\text{mol/L}$ CPZ 及 25 $\mu\text{mol/L}$ TFP 预处理的小麦幼苗在 50 °C 高温处理 40 min 后, 生活力分别下降了 70% 和 80%, 接近了未经热激的幼苗。用膜的伤害度表示的细胞膜稳定性作为小麦幼苗耐热性的指标与上面相同, EGTA、易博定、CPZ 和 TFP 的预处理提高了膜的伤害度, 降低了膜稳定性。以上数据可以表明 Ca^{2+} 和 CaM 参与热激诱导的耐热性的获得^[24]。

4 在 37 °C 热激时, 钙调素基因 CaM 1-2、热激基因 hsp26 和 hsp70 的表达动力学

为了确定 Ca^{2+} 和 CaM 在热激信号转导中的作用位置, 我们进行了 CaM 基因和热激基因的时间表达比较研究。小麦 CaM 基因 CaM 1-2 在 22 °C 下有低水平的基础表达, 37 °C 热激 10 min 即引起 CaM 1-2 表达的提高, 20 min 达到最大值, 热激 1 h 它的 mRNA 值又回到基础的表达水平。而热激基因 hsp26 在 22 °C 下不表达, 37 °C 热激 10 min 不能引起 hsp26 的表达, 热激 20 min 后才有少量表达, 以后 hsp26 的 mRNA 量随着热激时间的延长而增加。hsp70 与 hsp26 有同样的表达程序, 热激 20 min 后才表现表达水平的提高。小麦钙调素基因 CaM 1-2 在热激 10 min 时表达明显增加, 而热激基因 hsp26、hsp70 在热激 20 min 后才表现表达量的增加, 这时间表达的先后进一步为 CaM 位于热激信

号转导的上游提供实验证据。

如果将小麦幼苗在 37 °C 下热激后, 再在 22 °C 下恢复一段时间, 热激基因 hsp26 的表达表明仅 5 min 的热激, 然后在 22 °C 下恢复一段时间, 即可诱导热激基因 hsp26 的表达。说明 hsp26 基因的转录并不需要持续 20 min 的热激, 较短时间的热激 (5 min) 就能启动细胞内某一关键因子, 随后引起一系列生理生化反应 (这一系列生理生化反应在恢复温度 22 °C 下即可进行), 到 20 min 后才导致热激基因的转录。前面提到热激引起细胞内 Ca^{2+} 浓度的迅速升高 (1 min 之内), 我们提出 Ca^{2+} 可能是启动热激反应的胞内关键因子^[6]

5 钙、钙调素对热激转录因子 (HSF) 的 DNA 结合活性的调节

早在 1990 年 Mosser 等^[25] 发现 Ca^{2+} 能激活 HeLa 细胞中 HSF 的与 HSE 的结合活性, 我们实验室的工作在多种植物中证明了不仅 Ca^{2+} 而且 CaM 都能提高 HSF 的 DNA 结合活性。

5.1 Ca^{2+} 对 HSF 的 DNA 结合活性的激活作用

用玉米幼苗提取全细胞提取液进行凝胶阻滞分析结果显示 44 °C 热激提高 HSF 的 DNA 结合活性, 但如向全细胞提取液中加入 5 mmol/L EGTA, 能明显降低 HSF 的 DNA 结合活性。而回加 1 mmol/L 和 5 mmol/L CaCl_2 能明显恢复 HSF 的 DNA 结合活性。在非热激温度 22 °C 时, 向全细胞提取液中直接加入 1 mmol/L 和 10 mmol/L CaCl_2 均可激活 HSF 的 DNA 结合活性, 其中 1 mmol/L CaCl_2 的作用最显著。而相同浓度的 MgCl_2 无此作用。表明 Ca^{2+} 对 HSF 激活的功能是特异的, 可代替热激激活 HSF 的 DNA 结合活性。

5.2 CaM 对 HSF 的 DNA 结合活性的影响

在 44 °C 热激条件下, 以 CaM 专一拮抗剂 W7 处理全细胞提取液, 150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ W7 有较明显的抑制作用, 而一种 W7 的结构类似物 W5 无明显的作用, 另一种 CaM 拮抗剂 CPZ 也抑制 HSF 的活性。进一步的实验表明, 如向全细胞提取液中加入不同稀释倍数 (1: 200, 1: 100, 1: 50) 的 CaM 抗血清, 可抑制 HSF 的 DNA 结合活性。CaM 抗血清浓度越大, 抑制作用越强, 1: 50 的 CaM 抗血清几乎完全抑制了 HSF 的 DNA 结合活性。如果在加入 1: 50 的 CaM 抗血清后再回加 10^{-8} 或 10^{-7} mol/L 的 CaM, 则可恢复 HSF 的活性, 这实验为 CaM 激活

HSF 的 DNA 结合活性提供直接证据。随后的证据是在非热激温度 (27 °C) 或热激温度 (44 °C) 下, 向玉米全细胞提取液中直接加入不同浓度的 CaM 均能促进 HSF 的活性。而以同样浓度梯度的 BSA 处理对 HSF 的活性无明显的促进作用。进一步证明了 CaM 可以激活 HSF 的 DNA 结合活性。在小麦、番茄中也有同样的激活作用^[26], 说明 CaM 对 HSF 的激活作用在植物中具有普遍意义。基于这些结果结合前面的研究工作, 我们认为 CaM 在热激信号转导中的作用是通过激活 HSF 的 DNA 结合活性来实现的。

6 讨论

以生物素标记的 CaM, 用凝胶覆盖技术检测发现玉米细胞质 Hsp70 在 1 mmol/L Ca^{2+} 存在下能与 CaM 结合。用 5 mmol/L 的 EGTA 代替 Ca^{2+} , 不能获得 Hsp70 与 CaM 的结合带。竞争性酶学实验表明 Hsp70 能抑制 CaM 依赖的 NAD 激酶的活性, 进一步证明 Hsp70 与 CaM 的结合, 并且这种结合是依赖 Ca^{2+} 的^[27]。我们还证明了玉米细胞质 Hsp70 分子中, 261–281 位置的氨基酸序列为 CaM 结合区域^[28]。Hsp70 是热激反应的负调节剂, 它能与 CaM 结合是我们研究 Ca^{2+} -CaM 参与热激信号转导的依据。

热激信号转导主要研究热刺激对生物体细胞基因表达的调控以及调控这一过程的分子途径, 这过程涉及到蛋白与蛋白分子间的相互作用及转录后修饰等多个环节, 因此可能存在几种不同的信号转导途径交互或协同作用, 形成一个精确的信号转导系统。此前已有人提出一些关于热激信号转导途径的假说, Ananthan^[29] 在 1986 年提出胁迫变性蛋白的积累可能是诱导热激基因表达的信号, 变性蛋白通过与热激蛋白 70(Hsp70) 结合引起 Hsp70–HSF 复合体释放 HSF。Mosser^[25] 提出 Ca^{2+} 及其他一些生化条件引起蛋白质构型改变而激活 HSF。热激诱导的膜流动性改变也可能代表感受热信号的位点, 细胞膜可能通过细胞骨架、 Ca^{2+} 流及钙依赖的蛋白激酶(CDPK) 传递信息并活化促分裂原活化蛋白激酶(MAPK) 而激活 HSF^[30, 31]。这里根据我们的实验结果, 提出在植物细胞内还存在一条新的热激信号转导途径: 钙–钙调素途径^[6]。在 HeLa 细胞内发现, 由一种 Ca^{2+} /CaM 依赖的蛋白激酶(CaMK II) 引起的 HSF 分子调节域中丝氨酸 230 的磷酸化能激活 HSF 的转录活性^[14], 他们的结果为我们提出

的热激信号转导的钙–钙调素途径提供有力支持。

CaM 如何调节热激转录因子活性? 这是我们下一步要进行的工作。途径可能有 2 条, 其一是 CaM 通过影响胞内 Ca^{2+} /CaM 依赖的蛋白激酶或蛋白磷酸酶的活性来调节 HSF 的磷酸化状态, 从而达到 HSF 的活化。其二是 CaM 通过与 Hsp70 的结合调节 HSF 的活性状态: 热激引起的胞内 Ca^{2+} 浓度的提高促进了 CaM 与 Hsp70 的结合, 使 HSF 从与 Hsp70 的结合状态中释放出来三聚化而激活, 随着 Hsp70 的积累和胞内 CaM 浓度的下降, Hsp70 再与 HSF 结合造成 HSF 的活性的抑制。这里可能是 1 条途径, 也可能是 2 条途径同时存在。CaM 作用途径的工作正在进行。CaM 的作用途径研究对阐明植物热激信号转导分子传递链有重要意义, 植物热激信号转导分子传递链的确定为进一步发现调节热激基因的表达及作物耐热性的关键基因提供线索。

参考文献:

- [1] Stenvenson M A, Calderwood S K, Hahn G M. Rapid increases in inositol triphosphate and intracellular Ca^{2+} after heat shock[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 137: 826–833.
- [2] Calderwood S K, Stevenson M A, Hahn G M. Effects of heat on cell calcium and inositol lipid metabolism[J]. *Radiation Res*, 1988, 113: 414–425.
- [3] Biyaseheva A E, Molotkovskii Y G, Mamonov L K. Increase of free Ca^{2+} in the cytosol of plant protoplasts in response to heat shock as related to Ca^{2+} homeostasis[J]. *Russian Plant Physiol*, 1993, 40: 540–544.
- [4] Gong M, van der Luit A H, Knight M R. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance[J]. *Plant Physiology*, 1998, 116: 429–437.
- [5] Gong M, Li Y J, Dai X. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize[J]. *J Plant Physiology*, 1997, 150: 615–621.
- [6] Liu H Y, Li B, Zhou R G, *et al.* Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1186–1195.
- [7] Schöffl F, Prandl R, Reindl A. Regulation of the heat shock response[J]. *Plant Physiology*, 1998, 117: 1135–1141.
- [8] Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Poles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock

- response and beyond[J]. FASEB J, 2001, 15: 1118–1131.
- [9] Wu C. Heat shock transcription factor: structure and regulation[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995, 11: 441–469.
- [10] Morimoto R I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators[J]. Genes and Dev, 1998, 12: 3788–3796.
- [11] Sarge K D, Murphy S P, Morimoto R I. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA–binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13: 1392–1407.
- [12] Lyck R L, Harmening U, Höhfeld I, *et al.* Intracellular distribution of the nuclear localization signals of two plant heat shock transcription factor[J]. Planta, 1997, 202: 117–125.
- [13] Reindl A, Schöfl F, Schell J, *et al.* Phosphorylation by a cyclin dependent kinase modulates DNA binding of the Arabidopsis heat shock transcription factor HSF1 in vitro[J]. Plant Physiol, 1997, 115: 93–100.
- [14] Holmberg C I, Hietakangas V, Mikhailov A, *et al.* Phosphorylation of Serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1[J]. EMBO J, 2001, 20: 3800–3810.
- [15] Shi Y, Mosser D D, Morimoto R I. Molecular chaperones as HSF1 specific transcriptional repressors[J]. Genes and Dev, 1998, 12: 654–666.
- [16] Zou J, Guo Y, Guettouche T, *et al.* Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress sensitive complex with HSF1[J]. Cell, 1998, 94: 471–480.
- [17] Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek K N. Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 in vivo[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19: 8033–8041.
- [18] Bonner J J, Carlson T, Fackenthal D L, *et al.* Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor[J]. Mol Biol Cell, 2000, 11: 1739–1751.
- [19] Marchler G, Wu C. Modulation of *Drosophila* heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone DROJ1[J]. EMBO J, 2001, 20: 499–509.
- [20] Morimoto R I. Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones[J]. Cell, 2002, 110: 281–284.
- [21] Kim B H, Schöfl F. Interaction between Arabidopsis heat shock transcription factor 1 and 70 KDa heat shock proteins[J]. J Exp Bot, 2002, 53: 371–375.
- [22] 刘宏涛, 赵 和, 周人纲, 等. 钙—钙调素对小麦热激蛋白 26 基因表达的影响[J]. 植物学报, 2001, 43(6): 766–768.
- [23] Kuznetsov V V, Andreev I M, Trofimova M S. The synthesis of HSPs in sugar beet suspension culture cells under hyperthermia exhibits differential sensitivity to calcium[J]. Biochem Mol Biol Int, 1998, 45: 269–278.
- [24] 樊志和, 周人纲, 李晓芝, 等. 钙—钙调素与小麦苗中热激蛋白的诱导[J]. 植物生理学报, 2000, 26(4): 331–336.
- [25] Mosser D D, Kotzbauer P T, Sarge K D. *In vitro* activation of heat shock transcription factor DNA binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 3748–3752.
- [26] 李 冰, 刘宏涛, 周人纲, 等. 钙调素对植物热激转录因子的 DNA 结合活性的影响[J]. 科学通报, 2002, 47(10): 1578–1581.
- [27] 孙旭彤, 周人纲, 汤文强, 等. 玉米细胞质 HSC70: 一种钙调素结合蛋白[J]. 植物学报, 1998, 40(3): 288–290.
- [28] Sun X T, Li B, Zhou R G, *et al.* Binding of the maize cytosolic hsp70. to calmodulin, and identification of calmodulin–binding site in hsp70[J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41: 804–810.
- [29] Ananthan J, Goldberg A L, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes[J]. Science, 1986, 232: 522–524.
- [30] Sangwan V, Örvär B L, Beyerly J, *et al.* Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways[J]. The Plant J, 2002, 31: 629–638.
- [31] Sung D Y, Kaplan F, Lee K J, *et al.* Acquired tolerance to temperature extremes[J]. TRENDS in Plant Science, 2003, 8: 179–187.