

固氮螺菌的固氮分子调控研究进展

赵银锁 李季伦

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

摘 要 本文对巴西固氮螺菌固氮基因的结构和调控进行综述。其固氮基因的调控可分为两种水平：通过 DRAT-DRAG 系统的翻译后水平和通过 NifA 蛋白的转录水平。通过 NifA 活性进行调控的机理目前尚不明了。

关键词 巴西固氮螺菌, 肺炎克氏杆菌, 固氮基因

有效地利用生物固氮是减少氮肥使用、缓解环境污染、减低农业生产成本的一条重要途径。根据固氮微生物与植物的相互关系, 固氮微生物可分为三类: 自生固氮菌、联合固氮菌和共生固氮菌。联合固氮菌与植物根部紧密联合在一起, 但不象共生固氮菌那样与植物形成特定的根瘤或茎瘤。固氮螺菌 (*Azospirillum*) 是研究最广泛的联合固氮菌^[1-8]。

固氮螺菌分布范围广泛, 可与多种重要的禾本科作物 (如玉米、水稻、小麦、高粱等) 联合共生。根据表型、生理生化性质、DNA 性质, 固氮螺菌属分为 5 个种, 即: 巴西固氮螺菌 (*A. brasilense*)、产脂固氮螺菌 (*A. lipoferum*)、亚马逊固氮螺菌 (*A. amazonense*)、*A. halopraeferns* 和 *A. irakense*。固氮螺菌为革兰氏阴性, 弧状或短杆状, 有鞭毛。巴西固氮螺菌是固氮螺菌中研究报道最多的一种。巴西固氮螺菌具有趋化性, 趋向根际分泌物并在植物根际富集, 有些菌系可穿透根系组织进入根皮层, 在细胞间隙中生活, 这是与土壤中自生固氮菌的不同之处。它可分解根系分泌物以及果胶和半纤维素 (半纤维素在土壤中大量存在) 作为能源; 这一点在固氮菌中很重要, 因为, 固氮作用需要消耗很多的能量。但是, 巴西固氮螺菌只有在低氮和低氧分压的条件下才能固氮。由于它具有趋向根际低氧分压区域的性质, 因此, 高浓度氮对其固氮的抑制就成为巴西固氮螺菌在农业生产实际应用的一个主要限制因子。该问题的解决有赖于深入地研究其固氮基因的表达调控机制。

肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是固氮菌中有关固氮分子调控研究最多的模式菌, 因此, 在综述巴西固氮螺菌固氮基因的表达调控之前, 先综述肺炎克氏杆菌固氮基因的表达调控。

1 肺炎克氏杆菌固氮基因的结构和调控

肺炎克氏杆菌固氮基因是由 20 个基因组成的, 它们位于染色体上一个连续的区域, 全长约 25kb^[9]。这些基因由 8 个转录单位组成 (如图 1 所示), 其中有两个是重叠的,

即 *nifUSVWZM* 和 *nifM*。*nif* 基因^[10-14]的功能见表 1。

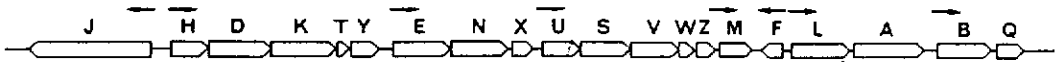


图 1 肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) *nif* 基因的结构

Fig. 1 The physical organization of *nif* genes from *Klebsiella pneumoniae*

Arrows indicate the position and direction for transcription initiation sites^[11]

表 1 肺炎克氏杆菌中 *nif* 基因及其产物的功能^[11]

Table 1 *nif* specific genes of *klebsiella pneumoniae* and their products' known or proposed functions^[11]

基因	产物及其功能
<i>nifH</i>	铁蛋白亚基, 形成同型二聚体 (分子量约 60 000)
<i>nifD</i>	钼铁蛋白 α -亚基, 与 β 亚基形成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体 (分子量约 220 000)
<i>nifK</i>	钼铁蛋白 β -亚基
<i>nifF</i>	黄素氧化蛋白, 为铁蛋白的生理还原剂
<i>nifJ</i>	丙酮酸-黄素氧化蛋白-氧化还原酶, 把丙酮酸的氧化与黄素氧化蛋白的还原偶联起来, 该酶由两个相同亚基组成 (每个亚基的分子量约 120 000)
<i>nifM</i>	活化铁蛋白
<i>nifU</i>	功能未知。似乎主要与铁蛋白的稳定有关
<i>nifS</i>	功能未知。似乎主要与铁蛋白的稳定有关
<i>nifV</i>	可能编码高柠檬酸盐合酶
<i>nifE</i>	铁钼辅因子生物合成所必须, 与 <i>nifN</i> 基因产物形成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体 (分子量约 210 000)
<i>nifN</i>	铁钼辅因子生物合成所必须, 与 <i>nifE</i> 基因产物形成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体
<i>nifB</i>	铁钼辅因子生物合成所必须
<i>nifQ</i>	与铁钼辅因子生物合成有关, 可能作用于早期的步骤
<i>nifW</i>	功能未知。钼铁蛋白的完整活性所必须
<i>nifZ</i>	功能未知。钼铁蛋白的完整活性所必须
<i>nifA</i>	正调节因子
<i>nifL</i>	负调节因子
<i>nifX</i>	功能未确定, 可能为负调节因子
<i>nifT</i>	功能未知。为固氮生物生长的非必须因子
<i>nifY</i>	功能未知。为固氮生物生长的非必须因子

K. pneumoniae 中 *nif* 基因的启动子在上游 -27 和 -11 之间均有 CTGG-N₈-TTGCA 的保守序列, 该区域由 RNA 聚合酶因子 σ^{54} 识别。 σ^{54} 因子是由 *rpoN* 基因 (亦称为 *ntrA* 或 *glnF*) 编码的。具有 σ^{54} 识别位点的基因需要转录激活蛋白才能表达。转录激活蛋白一般结合于基因的上游激活序列 (Upstream Activator Sequence, UAS), 该区域位于转录起始位点的 -80 至 -150。UAS 具有保守序列 TGT-N₁₀-ACA。对于大多数 *nif* 基因, 其转录激活蛋白为 NifA (*nifA* 的表达产物)。

rpoN 基因的转录是组成性的，而且不存在 σ^{54} 翻译后活性的调节。因此，nif 基因的表达或是通过调节 nifA 基因的表达或是通过 NifA 蛋白的活性而控制的。肺炎克氏杆菌的 nifA 是和 nifL 组成一个操纵子，nifLA 操纵子的启动子具有 σ^{54} 和 NtrC（激活蛋白）的结合序列。NtrC 的活性最终是由细胞内铵浓度决定的，因而铵浓度可决定 nifA 基因的表达与否。而铵的调控是通过 ntr 系统实现的。

在肠杆菌和其它许多细菌中存在着 ntr 系统 (General Nitrogen Regulatory System)，控制有关氮代谢的许多基因的表达 (图 2)。ntr 系统由 4 个基因产物组成：glnD 编码的尿苷酰转移酶 (GlnD 或称 UTase)、glnB 编码的四亚基蛋白 (GlnB 或称 P_{II}) 和一

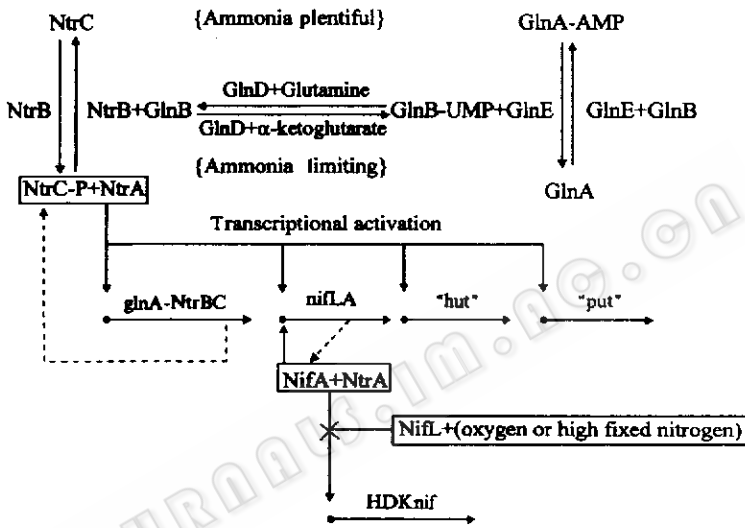


图 2 肺炎克氏杆菌 nif 基因的表达调控示意图^[10]

Fig. 2 Circuitry of nif genes regulation in *Klebsiella pneumoniae*^[10]

对由单操纵子 ntrBC 编码的调节蛋白 (NtrB 和 NtrC)。GlnD 是细胞内结合态氮的初级感受蛋白，受胞内 α -酮戊二酸与谷氨酰胺比例的控制。限铵时，GlnD 调节 GlnB 蛋白的尿苷酰化，尿苷酰化的 GlnB (GlnB-UMP) 通过 NtrB 使 NtrC 磷酸化；磷酸化的 NtrC (NtrC-P) 具有转录激活蛋白的特性，促进依赖于 NtrC 活化的基因的表达，如 glnA-ntrBC 和 nifLA 操纵子。高铵时，这个级联事件被逆转，GlnD 作为脱尿苷酰化酶，使 GlnB-UMP 脱尿苷酰化，而 GlnB 不能诱发 NtrB 的激酶活性，此时，NtrB 促使 NtrC-P 脱磷酸化，脱磷酸化的 NtrC 失去了 DNA 结合功能和转录激活活性，所有依赖于 NtrC 活化的基因就不能转录。另外，ntr 系统通过腺苷酰化而在翻译后水平上调节谷氨酰胺合成酶 (GS，或称 GlnA，由 glnA 基因编码) 的活性。在高铵条件下，GlnB-UMP 促使 GlnA 在 GlnE (腺苷酰转移酶) 作用下腺苷酰化而失去活性，反之在限铵下 GlnB 通过 GlnE 使 GlnA-AMP 脱腺苷酰化而恢复活性。ntr 系统可能是广泛存在于原核生物中的一种感受氮水平的系统。

在肺炎克氏杆菌中，氧也通过 NifL 调节 NifA 的活性。氧浓度影响 nifLA 操纵子的超螺旋状态，从而影响 nifLA 的表达^[15]。外界环境中铵浓度调节 nifLA 操纵子的转录，

NifA 蛋白的活性也由铵和氧浓度调节。氧气和结合态氧浓度的变化是由 NifL 蛋白感知的。NifL 直接作用于 NifA 的中部或 C 末端区域 (蛋白与蛋白结合作用)^[16]。

2 巴西固氮螺菌固氮基因的结构和调控

如图 3 所示, 巴西固氮螺菌固氮基因由两个 nif 基因簇组成, 大片段含 nifHDK, nifEN, nifUS, nifW 和 fixABCX^[17]。小片段含 nifA 和 nifB^[18]。

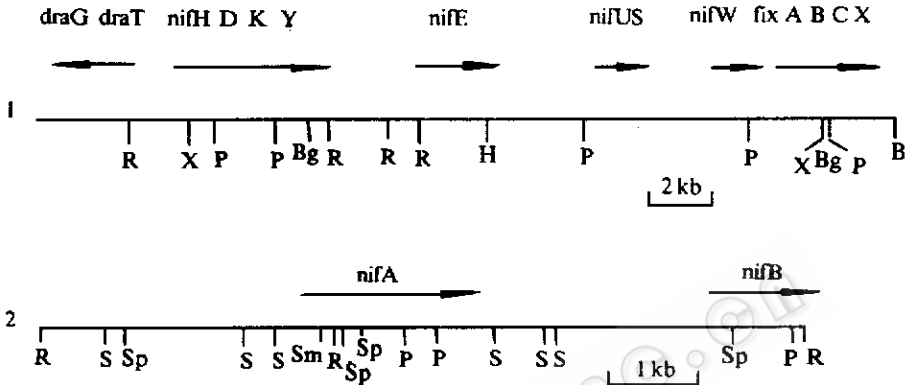


图 3 巴西固氮螺菌的两个 nif 基因簇^[6]

Fig. 3 The two nif cluster of *Azospirillum brasilense*^[6]

巴西固氮螺菌的 nifHDK 基因构成一个转录单位^[19], 它位于染色体上而非内源大质粒上^[18, 20]。其序列已报道^[19, 21, 22]。nifH 基因编码一个由 293 个氨基酸组成分子量为 31.7kDa 的蛋白^[21]。在 nifK 基因下游 nifY 基因上游有一个开放阅读框架 ORF^[22]。nifA^[18, 23], nifW^[24] 和 5' 端的 nifB 基因的序列已测定。fixA 和 fixX 的部分序列已测定 (de Zamarocay, 未发表)。

巴西固氮螺菌的 *draTG* 基因的序列已确定^[25, 26]。它们分别编码 33.7kDa (DRAT) and 32.4kD (DRAG) 的蛋白, 这两个基因与深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)^[25] 有高度的同源性。螺菌中固氮酶的失活是由于固氮酶铁蛋白被 ADP 核糖基化共价修饰的结果, 这种共价修饰是被 DRAT 酶催化的。DRAT 酶是依赖于 NAD 的 ADP 核糖基转移酶。铁蛋白的重新激活由 DRAG 酶催化, 该酶为结合于细胞膜上的糖苷水解酶, 它去除 ADP 核糖基基团 (如图 4 所示)。但这种可逆失活机制在同属的亚马逊固氮螺菌中并不存在^[28]。

巴西固氮螺菌的 *ntfBC* 的序列已报道^[29, 30]。但在巴西固氮螺菌中, 它并不是固氮作用所必须的, 尽管在一定程度上它控制着 nifA 基因的表达 (NifA 对固氮酶的活性是必须的)^[29]。然而, Pedrosa 和 Yates^[31] 认为 *ntfBC* 控制 nifA 的表达。

巴西固氮螺菌的 *glnB* 和 *glnA* 的序列也已测定^[32]。glnB 和 glnA 分别编码 P_{II} 蛋白和谷氨酰胺合成酶。功能分析表明, P_{II} 蛋白对巴西固氮螺菌的固氮作用是必须的^[33] 这与肺炎克氏杆菌和荚膜红细菌 (*R. capsulatus*) 中的情况相反。在不同的氮素水平

下, P_{II} 蛋白通过调节 NifA 的活性来调控固氮作用^[33]。

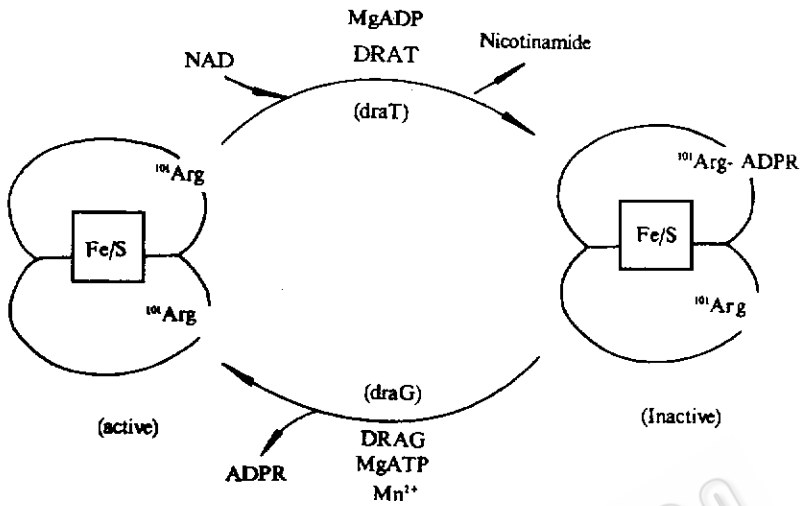


图 4 ADP 核糖基化可逆调控固氮酶活性的模型^[27]

Fig. 4 Model for regulation of nitrogenase activity by reversible ADP-ribosylation^[27]

与其它固氮生物一样, 巴西固氮螺菌的 *nif* 基因也具有依赖于 σ^{54} 的启动子和 1~2 个上游激活区 (UAS)。基因融合实验表明, *nif* 和 *fix* 基因在固氮条件下表达; 但在高氨和高氧情况下, *nif* 和 *fix* 基因的表达受到抑制^[18, 34]。而且这些基因的表达均依赖于 *nifA* 基因的表达, 这表明 NifA 是巴西固氮螺菌中 *nif* 和 *fix* 基因操纵子转录的正调节蛋白^[18], 这一点也是固氮菌的共性。

nifA-lacZ 基因融合实验和 RNA 转录起点的确定, 表明 *nifA* 基因的调控与肺炎克氏杆菌的模型不同^[18]。*nifA* 基因的启动区不存在依赖于 σ^{54} 的启动子。*nifA-lacZ* 融合基因几乎在各种状态均表达, *nifA* 基因的最大转录水平是在固氮条件下, 但在高氨和高氧情况下也有很高的转录水平。这表明 NifA 蛋白是部分组成性翻译的, 但在非固氮条件下没有活性^[18]。虽然 NifA 在高氨下的翻译后调控的具体机制尚不清楚, 但推测可能与 P_{II} 蛋白有关^[33]。但我们实验室提出与这个假说不同的证据^[35]。在巴西固氮螺菌的 *DraT*⁻ 突变株中, 导入 pCK3 质粒 (含组成性表达的 *nifA* 基因), NifA 活性受到氨抑制。因此, 认为在巴西固氮螺菌中可能存在 NifA 的负调控因子。但在该菌中, 没有与肺炎克氏杆菌 *nifL*^[18]、棕色固氮菌 (*Azotobacter vinilandii*) *nifL*^[36] 以及苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) *fixK* (本室未发表结果) 的同源基因。

总之, 巴西固氮螺菌基因的调控可分为两种水平: 通过 DRAT-DRAG 系统的翻译后水平和通过 NifA 蛋白的转录水平。通过 NifA 活性进行调控的机制目前尚不明了。

参 考 文 献

- [1] Okon Y. Trends Biotechnol, 1985, 3: 223~238.
- [2] Elmerich C. In: Broughton W J, Püler A eds. Nitrogen Fixation-Molecular Biology, Clarendon Press, Oxford, 1986, pp. 106~126.

- [3] Döbereiner J, Pedrosa F O. Nitrogen-Fixing Bacteria in Non-Leguminous Crop Plants, Science Tech. Publishers, Madison, 1987.
- [4] Michiels K, Vanderleyden J, Van Gool A. Biol Fertil Soils, 1989, 8: 356~368.
- [5] Elmerich C, Zimmer W, Vieille C. In: Stacey G, *et al* eds. Biological Nitrogen Fixation, Chapman and Hall, New York, 1992, pp. 212~258.
- [6] Elmerich C. In: Hegazi N A, *et al* eds. Nitrogen Fixation with Non-legumes, The American University in Cairo Press, Cairo, 1994, pp. 237~249.
- [7] 何路红, 阎大来, 李季伦. 高技术通讯, 1993, 3: 41~44.
- [8] 阎大来, 何路红, 李季伦. 微生物学通报, 1995, 22: 176~179.
- [9] Arnold W, Rump A, Klip, W *et al.* J Mol Biol, 1988, 203: 715~738.
- [10] Gussin G N, Ronson C W, Ausuber F M. Ann Rev Genet, 1986, 20: 567~591.
- [11] Dean D R, Jacobson M R. In: Stacey G, *et al* eds. Biological Nitrogen Fixation, Chapman and Hall, New York, 1992, pp. 763~834.
- [12] Merrick M J. In: Stacey G, *et al* eds. Biological Nitrogen Fixation, Chapman and Hall, New York, 1992, pp. 835~876.
- [13] Merrick M J. In: Palacios R, *et al* eds. New Horizons in Nitrogen Fixation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, pp. 43~54.
- [14] Ludden P W. In: Palacios R, *et al* eds. New Horizons in Nitrogen Fixation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, pp. 101~104.
- [15] Whitehall S, Austin S, Dixon R. J Mol Biol, 1992, 225: 591~607.
- [16] Drummond M H, Contreas A, Mitchenall L A. Mol Microbiol, 1990, 4: 29~37.
- [17] Galimand M, Perroud B, Delorme F *et al.* J Gen Microbiol, 1989, 135: 1047~1059.
- [18] Liang Y Y, Kaminski P A, Elmerich C. Mol Microbiol, 1991, 5: 2735~2744.
- [19] de Zamarocay M, Delorme F, Elmerich C. Mol Gen Genet, 1989, 220: 88~94.
- [20] 何路红, 李季伦. 微生物学报, 1991, 31: 255~260.
- [21] Fani R, Allotta G, Bazzicalupo M *et al.* Mol Gen Genet, 1989, 220: 81~87.
- [22] Passaglia L M, Numes C L, Zaha C P *et al.* J Med Biol Res, 1991, 24: 649~675.
- [23] Yan D L, He L H, Li J L. In: Palacios R *et al* eds. New Horizons in Nitrogen Fixation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, p.509.
- [24] Milcamps A, Keyers V, Vanderleyden J. Biochim Biophys Acta, 1993, 1173: 237~238.
- [25] Zhang Y P, Burris R H, Roberts G P. J Bacteriol, 1992, 174: 3364~3369.
- [26] Ma L Y, Li J L. In: Tikhonovich I A *et al* eds. Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1995, p 248.
- [27] Roberts G P, Ludden P W. In: Stacey G *et al* eds. Biological Nitrogen Fixation, Chapman and Hall, New York, 1992, pp. 135~165.
- [28] Hartmann A, Fu H, Burris R H. J Bacteriol, 1986, 165: 864~870.
- [29] Liang Y Y, Arsène F, Elmerich C. Mol Gen Genet, 1993, 240: 188~196.
- [30] 阎大来, 何路红, 李季伦. 微生物学报, 1995, 35: 242~249.
- [31] Pedrosa F O, Yates M G. FEMS Microbiol Lett, 1984, 23: 95~101.
- [32] de Zamarocz M, Delorme F, Elmerich C. Mol Gen Genet, 1990, 224: 421~430.
- [33] de Zamaroczy M, Paquelin A, Elmerich C. J Bacteriol, 1993, 175: 2507~2515.
- [34] Milcamps A, Vanderleyden J. FEMS Microbiol Lett, 1991, 77: 385~388.
- [35] 何路红, 阎大来, 马放雁等. 生物工程学报, 1995, 11: 385~388.
- [36] 赵银锁, 张七仙, 李季伦. 北京农业大学学报, 1995, 21 (增刊), 8~13.

Advances in the Regulation of *nif* Genes in *Azospirillum brasilense*

Zhao Yinsuo Li Jilun

(State Key Laboratory for Agrobiotechnology, Beijing Agriculture University, Beijing 100080)

Abstract The structure and regulation of *nif* genes in *Azospirillum brasilense* is reviewed in this article. The expression of *nif* genes is regulated in two levels: post-translational regulation by DRAT-DRAG system and transcriptional regulation by NifA. The mechanism of the regulation of NifA activity is still unclear.

Abstract *Azospirillum brasilense*, *Klebsiella pneumoniae*, *nif* genes