

四碳二羧酸与根瘤菌共生固氮*

李友国 周俊初

(华中农业大学教育部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

摘要: 根瘤菌-豆科植物共生体系进行的共生固氮是一个需要消耗大量能量的生物学过程, 植物提供类菌体将空气中的分子态氮转变为氨必需的光合产物。大量的研究结果证明: 苹果酸、琥珀酸和延胡索酸等四碳二羧酸 (dCAs) 是植物直接供给类菌体以支持共生固氮所需要的碳源及能源 (Finan T M, *et al.*, 1983; Roeson C W, *et al.*, 1984; Vance C P, *et al.*, 1997)。它们必须通过细胞膜和类菌体周膜 (PBM) 两道屏障才能进入类菌体细胞。研究者还发现了一个运输四碳二羧酸的共同系统-Dct 转运系统 (Streeter J G, 1995)。就四碳二羧酸等有机酸的产生、转移、*dct* 基因的结构、功能与表达调控、*dct* 基因与根瘤菌共生固氮的遗传改造等方面作一简单介绍。

关键词: 四碳二羧酸、根瘤菌-豆科植物共生体系, 共生固氮

中图分类号: Q939.114 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0110-06

* 国家高技术“研究发展”计划项目 (“863”项目) (No. 2001AA214021)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA214021)

收稿日期: 2002-09-09, 修回日期: 2002-11-22

1 四碳二羧酸的产生与代谢

植物提供给类菌体的主要光合作用产物是蔗糖,蔗糖在根瘤中被一系列酶催化转变为多种有机酸形式,再通过 Dct 系统运输到类菌体进入三羧酸循环(TCA)产生能量 ATP 及还原力,以支持固氮酶将空气中分子态氮转变为氨(Gordon A J, 1995)。成熟根瘤中含有两种酶:碱性蔗糖酶(AI)和蔗糖裂合酶(SS)。SS催化的反应是可逆的,其降解方向的产物是尿嘧啶核苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和果糖;AI催化的反应不可逆,仅产生己糖。以上二个催化反应的产物均可进入糖酵解途径,进一步在一系列酵解酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和苹果酸脱氢酶(MDH)的共同催化下形成苹果酸。天冬氨酸也可能是类菌体共生固氮的能源之一,因为发现苜蓿根瘤菌中的一个缺乏天冬氨酸氨基转移酶的突变株同时丧失了共生固氮能力。研究者还发现了四碳二羧酸(dCAs)在类菌体中的进一步代谢中需要有一个适应性的高效率途径产生乙酰 CoA,否则 TCA 循环中将大量积累草酰乙酸,影响正常的代谢循环。在由丙酮酸转变为乙酰 CoA 的过程中,苹果酸酶发挥了重要作用。苹果酸酶催化苹果酸的氧化产生丙酮酸、CO₂ 和 NAD(P)H,丙酮酸再被丙酮酸脱氢酶作用转变为乙酰 CoA。另一条产生乙酰 CoA 的途径则涉及 3 个酶的共同催化作用,即磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PCK)、丙酮酸激酶(PYK)和丙酮酸脱氢酶(PDH),但研究表明这一途径在共生固氮的类菌体中不起作用。对苹果酸酶的进一步研究结果表明:苜蓿根瘤菌具有两种类型的苹果酸酶,即是 NAD⁺-依赖型和 NADP⁺-依赖型苹果酸酶,分别由两个不同的基因 *dme* 和 *tme* 所编码。在豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)、大豆慢生根瘤菌(*B. japonicum*)和根瘤菌(*Rhizobium* sp.) NGR234 等多种代表性根瘤菌中均发现了苹果酸酶活性。

β -羟基丁酸(PHB)尽管不是宿生植物提供给类菌体共生固氮所需的能源及碳源,但 PHB 对大豆慢生根瘤类菌体的固氮作用而言仍是重要的代谢产物^[2](Bergersen F J, Turner G L, 1992)。已有的研究结果证明:PHB 可以在根瘤菌细胞内积累或迅速降解,这两个过程的进行方向依赖于提供给类菌体的氧浓度和碳源底物浓度的变化趋势。有理由认为:PHB 可能扮演了 TCA 循环的“缓冲剂”^[1](Bergersen F J, *et al.*, 1991)。PHB 的积累与吸氢酶活性的关系在大豆慢生根瘤菌中得到证实。PHB 的合成与分解和 TCA 循环的紧密关系可进一步参阅综述文献(Streeter J G, 1995),固氮酶不仅需要能量 ATP 同时也需要还原剂将分子态氮转变为氨。在类菌体中 ATP 可通过氧化磷酸化途径产生,然而还原力的产生途径并不十分清楚。在肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia*)中,*nifJ* 的基因产物丙酮酸/黄素氧还蛋白氧化还原酶可将 *nifF* 的编码产物黄素氧还蛋白还原,并将电子传递给固氮酶。但关于 dCAs 代谢如何与还原力的产生相偶联目前不清楚。尽管研究者已发现在苜蓿根瘤菌中需要 NAD⁺-依赖型苹果酸酶参与共生固氮过程,在苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)中是否存在与丙酮酸/黄素氧还蛋白氧化还原酶相类似的酶尚有待深入研究。

2 四碳二羧酸在共生固氮中的生物学功能

研究结果表明(Vance C P, *et al.*, 1997)每固定 1mg N 要消耗宿主植物 6mg C,光合作用产物-蔗糖是共生固氮及氨同化吸收所必需的最终碳源。用同位素¹⁴C 标记的 CO₂

进行的放射标记试验研究表明:蔗糖从宿主植物地上部分于15min内被送到根瘤组织内,并且达到一个稳定浓度值(3.6mg.gfw)。尽管蔗糖在根瘤组织中的初始含量高,但是蔗糖很快被代谢转变成成为苹果酸、琥珀酸和延胡索酸等有机酸。并证实¹⁴C标记的苹果酸和琥珀酸在有效根瘤中可迅速转化,但在不固氮的无效根瘤中却大量积累。大量研究结果证明:糖不是固氮的能源,因为豌豆根瘤菌、苜蓿根瘤菌和三叶草根瘤菌的蔗糖代谢突变株并不影响固氮,根瘤菌属和慢生根瘤菌属中的不能利用葡萄糖和果糖为碳源的突变株仍可在其相应宿主植物根上形成有效根瘤,而不能吸收利用dCAs的突变株则形成无效根瘤(Roson C W *et al.*, 1984; Finan T M, *et al.*, 1983)。而四碳二羧酸(dCAs)是类菌体固氮及氮同化吸收所需的直接碳源,能够满足类菌体代谢和固氮作用的需要。研究结果还表明:三羧酸循环系统和完整的二羧酸转运系统却为固氮所必需,而且三叶草根瘤菌和豌豆根瘤菌的琥珀酸脱氢酶缺陷株均导致无效结瘤(Roson C W, *et al.*, 1981; Finan T M, *et al.*, 1983)。根瘤菌若缺乏苹果酸酶活性则表型为不固氮的Fix⁻[7](Driscoll B T, Finan T M, 1993)。在自生条件下不能转运琥珀酸、苹果酸和延胡索酸的豌豆根瘤菌和两个慢生型根瘤菌突变株,在共生条件下也无固氮活性。在自生条件下不能转运琥珀酸的苜蓿根瘤菌和三叶草根瘤菌的突变株,也不能与宿主有效共生。

研究发现共生体膜(Symbiosome membrane)上具有高度亲合性、高流量的四碳二羧酸等有机酸转运系统,但缺乏对糖源和氨基酸具有亲合性的运输系统。加强由蔗糖向四碳二羧酸的代谢、吸收和利用,反映了类菌体在低氧环境中对碳代谢产能的高度适应性。其宿主植物也表现出相应的适应性:在共生固氮过程中协调地表达和控制蔗糖裂合酶(SS)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和苹果酸脱氢酶(MDH)3个关键性酶的合成(Vance C P, *et al.*, 1997)。

尽管大量的研究结果表明:四碳二羧酸是类菌体进行代谢和固氮的最佳碳源和能源底物。我们应该继续考虑到类菌体可能利用许多其它形式的含碳底物,并不仅仅局限于苹果酸、琥珀酸和延胡索酸等有机酸。还应该估计到提供给类菌体的还原力形式也是不同的。这些不同的表型特性是与不同根瘤菌之间存在的巨大遗传差异性相联系的。支持dCAs作为一种主要碳源及能源底物在类菌体固氮中所发挥的重要作用,其实验证据和结果越来越广泛和具有说服力。其它形式的碳源必须在有多种试验手段及结果的证实情况下才能说明它和dCAs具有类似的生物学功能与地位。

3 *dct* 基因的结构、功能、调节及转运机制

近年来对dCAs在类菌体周膜上的运输研究得最多的是豌豆根瘤菌(*R. Leguminosarum*)和苜蓿根瘤菌。有人报道某些在自生条件下无四碳二羧酸转运活性的突变株在共生条件下仍能固氮。Engelke T等(1987)的研究结果表明苜蓿根瘤菌自生条件下的转运缺陷株,在共生条件下有两种表现:一些突变株完全丧失了转运和固氮能力,另一些突变株的转运和固氮功能降低。Roson C W等(1984)首先克隆到豌豆根瘤菌的四碳二羧酸转移酶基因(*dct*),并进一步证实其由*dctA*, *dctB*和*dctD*3个基因组成。其中*dctA*基因和*dctB*、*dctD*基因呈反向排列,为编码四碳二羧酸转移酶的结构基因,大小为1.3 kb,其表达受*dctB*和*dctD*组成的双组份调控蛋白的调控。*dctA*编码一个可诱导的单一转运蛋白质。*dctA*基因发生突变的苜蓿根瘤菌株在自生和共生条件下都不能转运

dCAs 且形成无效根瘤^[12] (Jording D *et al.*, 1994)。深入的研究进一步证明: DctA 蛋白是四碳二羧酶转移酶蛋白(属于一种透性酶),存在于 BCM 部位,由 12 个跨膜 α 螺旋所组成,且 70% 的部分是亲水性的。*dctA* 基因的转录受控于 *dctB* 和 *dctD* 基因产物的正调控。DctB 是定位于膜上的受体蛋白, DctD 则定位于细胞内, DctB 蛋白可以感知外源四碳二羧酸(dCAs)底物的存在, DctB 与四碳二羧酸结合后发生构象变化而激活,并进一步与 DctD 的 N 端结合以激活 DctD, 激活后的 DctD 蛋白再与 RpoN (σ^4 因子)共同启动 *dctA* 基因的转录与表达。*dctB* 和 *dctD* 基因产物属于双组分调控蛋白体系,其刺激-反应过程的分子机制是通过磷酸基团的转移。在外界环境中存在 dCAs 时, DctB 蛋白可发生自主磷酸化,并且磷酸基团被进一步转移给协同调节蛋白 DctD 而使后者得到激活,调控蛋白的磷酸化状态决定了 *dctA* 基因的转录活性的强度,苜蓿根瘤菌 *dctABD* 基因的结构、功能、和调控 (Giblin L, *et al.*, 1996) 见示意图 1。*dctB* 和 *dctD* 的启动子是低水平组成型表达的, *dctB* 或 *dctD* 基因发生突变的首蓿根瘤菌株在自生条件下丧失 dCAs 的转运能力,并且在共生条件下的固氮能力下降 (Ronson C W *et al.*, 1987; Yarosh O *et al.*, 1989; Birkenhead K *et al.*, 1990)。用 *dctA::lacZY* 进行的融合基因的体外表达试验结果证明,即使 *dctB* 和 *dctD* 双突变的菌株在共生条件下其 *dctA::lacZY* 融合基因仍可被 NifA 启动表达,证明 *dctA* 基因的表达在自生与共生条件下不同^[11,4] (Jiang J *et al.*, 1989; Bolton E *et al.*, 1986)。Watson R J 等 (1988) 用 Tn5 诱变法获得首蓿根瘤菌 Dct 突变株 4F6 并证明其 *dct* 基因定位于共生质粒上,并从基因文库中克隆到含有 *dct* 基因具互补功能的重组质粒 pBB122。Wang Y P 等 (1989) 克隆到首蓿根瘤菌的 *dctABD* 基因,并证明它们在碱基序列上与豌豆根瘤菌的 *dct* 基因同源率为 57.9%。用 *dctA::lacZY* 融合基因进行的表达试验结果证明:在自生条件下, *dctA* 基因的表达完全受 *dctBD* 的调控,但在共生的根瘤中,其表达虽可为 *dctB* 的单基因突变阻遏,但却不受 *dctB* 和 *dctD* 双突变的影响。深入分析发现 *dctA* 启动子区上游存在有 NifA 结合位点,加上 *nifA* 基因突变株不能在共生根瘤中启动 *dctA* 基因表达的结果表明: *nifA* 亦能在共生条件下参与启动 *dctBD* 双突变菌株的 *dctA* 的表达,但在微氧条件下仅靠 NifA 启动的 *dctA* 的表达仍未达到野生型菌株的水平,说明可能仍有其它未知因子参与其表达调控作用。Engelke T 等 (1989) 也克隆到首蓿根瘤菌的 *dct* 基因,并报道用 Tn5 诱变技术可获得两种类型的四碳二羧酸转运酶突变株,其中的 I 类系结构基因 *dctA* 突变,在共生条件下既不能转运四碳二羧酸,也不能固氮。但 II 突变株系调节基因突变,它们仅在共生时降低了四碳二羧酸的转运和固氮能力^[3]。

为满足类菌体固氮对碳源的大量需求,植物的光合产物蔗糖不断地从根瘤内皮层中的韧皮部释放出来并转变为 dCAs 支持类菌体的共生固氮,它们必须过两层屏障-即类菌体周膜 (PBM) 和类菌体细胞质膜 (BCM) 才能进入类菌体细胞质中。类菌体吸收 dCAs 是一个耗能量和逆浓度梯度的主动吸收过程^[9] (Finan T, *et al.*, 1981)。在这个过程中涉及到四碳二羧酸转运系统-Dct 系统、 H^+ -ATPase 和离子通道蛋白的相互作用,共同推动了四碳二羧酸的跨膜运输。PBM 具有选择透性: PBM 具有选择性地吸收和运输苹果酸、琥珀酸和延胡索酸等四碳二羧酸的能力,其速度大大超过吸收糖源、丙二酸盐和氨基酸的速度。但是 dCAs 是如何穿过 PBM 进入共生空间 (symbiosis space) 我们并不十分清楚。人们推测它与一种分子量为 26kD 的蛋白质有关,实际上是一种离子通道。这种 26kD 大小蛋白质是由根瘤中特异表达的结瘤素基因 *nodulin-26* 所编码的。尽

管没有直接的证明,但有人推测:这种离子通道提供了一种可能的 dCAs 跨膜 (PBM) 运输机制。在 PBM 上还存在着一种 ATP 依赖型质子泵,它形成了一种 $[H^+]$ 梯度,从而推动了 dCAs 的跨膜 (BCM) 转运。 $[H^+]$ 质子梯度的建立及 dCAs 的跨膜 (PBM 和 BCM) 转运的偶联机制参见综述文献 (Streeter J G, 1995)。

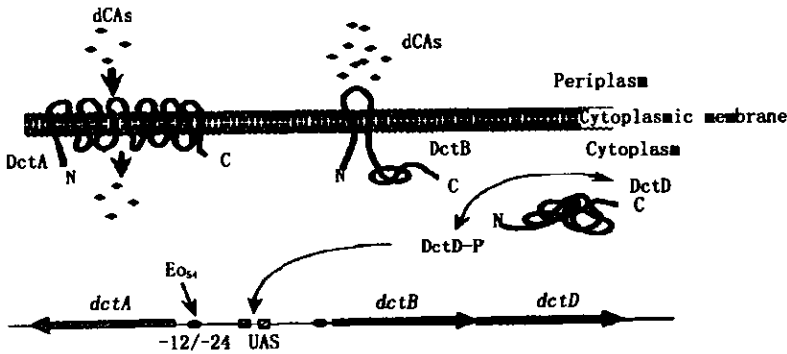


图1 苜蓿根瘤菌 *dctABD* 基因的结构、功能、表达和调节示意图

4 四碳二羧酸转移酶基因与共生固氮的遗传改造

根瘤菌的共生固氮作用需要植物提供还原分子态氮气的能量和还原力, 研究表明根瘤类菌体需要植物提供的四碳二羧酸作为碳源和能源以维持其代谢与固氮作用。有人曾提高空气中的 CO_2 浓度以促进结瘤三叶草植株的固氮作用, 并将它归因于对植物光合作用的提高。Mulder E G 和 Van Veen W L (1960) 也报道在水培盆栽条件下向红三叶草根系统入含有 4% CO_2 的空气也能提高植株的结瘤数量和固氮效率。Hardy R W F 和 Havelka U D (1973) 在大豆的田间试验中通过采用加富 CO_2 的空气使大豆植株的瘤数、瘤重和固氮酶活性成倍增加并延长了其作用时间, 从而使处理植株的固氮量比对照提高 4 倍^[10]。上述结果表明, 提高植物的光合作用效率或采用高光合效率的豆科植物品种将有利于植物加强支持共生固氮作用的碳源和能源供应以提高根瘤菌的共生固氮效率。

Birkenhead K 等 (1988) 将含有苜蓿根瘤菌 *dct* 基因的重组质粒 pRK290: 4: 4b 导入慢生型大豆根瘤菌 (*B. japonicum*) CJ1, 不仅在好气自生条件下提高了转移接合子 CJ1 (pRK290: 4: 4b) 的琥珀酸转运能力, 而且在微氧条件下使转移接合子的固氮酶活性较出发菌株 CJ1 提高了 60%^[3]。Canon F C 等 (1988) 在研究了 *dctA* 基因的组成型表达对根瘤菌共生固氮能力影响的基础上, 深入的试验结果表明导入 *dct* 基因能明显地影响慢生型大豆根瘤菌的固氮效率和植物的生长^[6]。Ronson C W 等 (1990) 进行了导入 *dctABD* 基因的苜蓿根瘤菌与出发菌株的小区田间试验, 并在部分试验地上证实了 *dct* 基因的增效作用^[13]。

Bosworth A H 等 (1994) 以苜蓿根瘤菌 PC 和 2011 为出发菌, 分别构建了 7 株在染色体上克隆有额外拷贝 *dctABD* 或/和 *nifA* 的重组菌, 在美国威斯康星州的 4 个试验地上进行的严格小区田间比较试验结果表明: 同时克隆有 *dctABD* 和 *nifA* 的菌株 RMPBC-2 在土壤有机质和化合态氮素含量较低的 Hancock 试验点上的苜蓿植株生物量较出发菌 PC 高 12.9%、较不接种对照高 17.9%, 其差异已达到统计上的显著性水平。但其余 6 个

重组菌以及该重组菌 RMPBC-2 在另外 3 个试验点上均未见明显的增产效果^[5]。1997 年, Research Seed 公司已向美国环境保护署 (EPA) 申请并获得了生产最高 50 万磅 RMPBC-2 重组苜蓿根瘤菌剂的有效商品化许可证, 这也是根据美国有害物质控制条例 (TSCA) 获得批准的第一个商品化制剂。李友国等 (2000 年) 以 pTR102 和 pLAFR3 为载体构建重组质粒将苜蓿根瘤菌的 *dctABD* 基因导入费氏中华根瘤菌和大豆慢生根瘤菌, 盆栽研究和小区试验结果表明: *dctABD* 的导入可显著提高受体菌的共生固氮效率, *nifA* 的导入主要影响重组根瘤菌的结瘤能力, 导入额外拷贝 *dctABD*、*nifA* 或同时导入 *dctABD* 和 *nifA* 对结瘤和共生固氮效率的促进作用与土壤营养水平、受体根瘤菌和大豆品种等因素有关^[14,15]。

参 考 文 献

- [1] Bergersen F J, Peoples M B, Turner G L. Proc Roy Soc London B, 1991, 245: 59 ~ 64.
- [2] Bergersen F J, Turner G L. Proc Roy Soc London B, 1992, 249: 143 ~ 148.
- [3] Birkenhead K, Manian S S, Ogara F. J Bacteriol, 1988, 17 (1): 184 ~ 189.
- [4] Bolton E, Higgeason B, Harrington A. Arch Microbiol, 1986, 144: 142 ~ 146.
- [5] Bosworth A H, Williams M K, Albrecht K A, et al. Appl Environ Microbiol, 1994, 60 (10): 3815 ~ 3832.
- [6] Cannon F C, Beynon J, Hankinson T. Stuttgart, New York, 1988. 735 ~ 740.
- [7] Driscoll B T, Finan T M. Mol Microbiol, 1993, 7: 865 ~ 873.
- [8] Engelke T, Jording D, Kapp D. J Bacteriol, 1989, 171 (10): 5551 ~ 5560.
- [9] Finan T M, Wood J M, Jordan D C. J Bacteriol, 1983, 154: 1403 ~ 1413.
- [10] Hardy R W F, Havelka U D. Plant Physiol, Baltimore, 1973, 51: suppl. 35.
- [11] Jiang J, Gu B H, Albright L M, et al., J Bacteriol, 1989, 171 (10): 5244 ~ 5253.
- [12] Jording D, Uhde C, Schmidt R et al., Experientia, 1994, 50: 874 ~ 883.
- [13] Ranson C W, Lytleton P, Rogertson J G. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78: 4284 ~ 4288.
- [14] 李友国, 李 杰, 刘墨青, 等. 遗传学报, 2000, 27 (8): 742 ~ 750.
- [15] 李友国, 李 杰, 刘墨青, 等. 高技术通讯, 2000, 10 (5): 1 ~ 7.