

第二种固氮酶系统的确证与研究进展

毛先枝 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所)

生物固氮是由固氮微生物中的固氮酶系统催化的。棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 是一种自生固氮菌。许多研究表明: 它含有人们所熟知的固氮酶系统。此系统由固氮酶(一种含 Fe 和 Mo 的蛋白)和固氮酶还原酶(一种含 Fe 蛋白)组成。固氮酶是一种分子量约 245000 的四亚基蛋白。它含有分子量约 61000 的 α 、 β 两种不同的亚基各两个, 并含有 4 个 4Fe-4S 原子簇和 2 分子 FeMo 辅因子。固氮酶还原酶是一个分子量为 60500、有两个相同亚基的双体蛋白, 亚基分子量为 30000, 两个亚基间有一个 4Fe-4S 原子簇桥。

多年来, 人们一直认为上述的固氮酶系统是众多固氮微生物中起固氮作用的唯一系统。然而, 棕色固氮菌 Nif^- 突变体(其 *nifD* 和 *nifK* 损伤, 这两个基因分别编码固氮酶的 α 、 β 亚基)的回复突变体 (Nif^+) 具有一些不寻常的特性, 促使美国科学家 Bishop 等人提出, 在棕色固氮菌中存在着第二种固氮酶系统。

(一) 第二种固氮酶系统的确证

1. Nif^+ 伪回复突变: Bishop 等人分离了两株 Nif^- 的回复突变体, 发现它们缺少固氮酶的 α 和 β 亚基。但双向电泳研究的结果表明, 回复突变体中新出现了 4 种 NH_4^+ 抑制性蛋白。原来, 这些回复突变是假的, 因为它们仍然携带着跟亲本 Nif^- 突变体相同的 *nif* 突变^[1]。当用生长在 $1 \mu M MoO_4^{2-}$ 固氮条件下的 Nif^+ 伪回复突变体的整细胞作材料, 在 $g = 3.65$ 处并未检测到顺磁共振信号, 而这个信号是常规固氮酶活性中心存在的标志^[2]。这说明伪回复突变体中的固氮酶的活性中心与野生型的不同。

2. Nif^+ 伪回复突变体在 $1 mM WO_4^{2-}$ 存在的固氮条件下仍能生长。因为 WO_4^{2-} 是固氮作用中钨(Mo)发挥功能的竞争性抑制剂, 既然伪回复突变体在有 WO_4^{2-} 、固氮条件下仍能生长, 说明它们在固氮条件下生长并不需要 $Mo^{(1)}$ 。

3. 双向电泳的结果表明: 在伪回复突变体的细胞抽提物中新出现的 NH_4^+ 抑制性蛋白也存在于缺 Mo 条件下生长的野生型细胞抽提物中^[3]。

4. 伪回复突变体仅在缺 Mo 条件下才具有同化

$^{15}N_2$ 的能力^[4]。

5. Nif^- 突变体在有 Mo 条件下不表现常规的固氮酶还原酶活性, 但生长在无 Mo 条件下时却具有固氮酶还原酶活性。这说明存在着两种受 Mo 调控的固氮酶还原酶^[5]。

6. 缺失了常规固氮酶系统的结构基因 (*nifHDK*) 的突变体仍能在缺 Mo 固氮的条件下生长, 并能还原乙炔, 同化 $^{15}N_2$ ^[6]。

7. 用缺失突变体进行连续培养实验的结果^[7]表明: 乙炔 (C_2H_2) 并不是第二种固氮酶系统的合适底物, 因为用 C_2H_2 还原法测得的固氮酶活性仅为其真实固氮酶活性的 10% 左右。用野生株在缺 Mo 条件下进行连续培养也得到了类似的结果^[8]。更令人惊奇的是 C_2H_2 并不抑制第二种固氮酶系统催化的释 H_2 作用。在一系列不同的稀释度下, 约有 50% 的电子被用来还原质子, 这与常规固氮酶系统有着明显的差别。

上述结果无可辩驳地说明, 在棕色固氮菌中的确存在着非 *nifHDK* 基因簇编码的固氮酶系统——第二种固氮酶系统。该系统在钼饥饿条件下得以表达, 而有钼时其表达则受到抑制。

(二) 第二种固氮酶系统的有关组份

Hales 等^[9]在用质粒 pDB12 转化野生型棕色固氮菌 UW 菌株时得到了不能合成常规固氮酶系统结构蛋白(固氮酶和固氮酶还原酶)的 LS10 菌株。同时, 他们还分离到了一个自发突变株 LS15, 它在无论有无 Mo 或 W 存在下均能固氮生长。显然, LS15 菌株只能用第二种固氮酶系统固氮, 它能产生与常规固氮酶还原酶相似的蛋白。该蛋白分子量为 62,000, 含有 4Fe-4S 原子簇。免疫实验证明, 它与常规固氮酶还原酶有相似的抗原性。

最近, Hales 等^[10]证明, 上述 LS15 菌株是一种缺失了常规固氮酶系统结构蛋白之基因 (*nifHDK*) 的突变体。初步实验结果证明: LS15 菌株中的固氮酶系统——第二种固氮酶系统也是一种双蛋白系统。其固氮酶还原酶与常规的相似(如上述), 但其固氮酶含量却很少。不过, 当在培养基中加入偏钒酸钠后, 第二种

固氮酶含量升高。这种固氮酶有二条多肽, 分子量为 200,000 含钒(V)和铁(Fe), V与Fe之比为 1:13, 不含Mo。它的 ESR 波谱与常规固氮酶的也不同。这种固氮酶能还原 N_2 , H^+ 和 C_2H_2 , 但只能用其电子总量的 10—15% 还原 C_2H_2 。这与用完整细胞的连续培养物所做的实验结果相似, 而且 C_2H_2 并不抑制相对较高的释 H_2 作用。

用几种不同的限制性内切酶处理, 对 *nifHDK* 缺失突变株的基因组进行分子杂交实验的结果^[1]表明: 这些缺失突变体在两个区域含有与 *nifH* (编码固氮酶还原酶)同源的区域, 但并未发现含有与 *nifD* 和 *nifK* 同源的区域。对缺 Mo 条件下生长的缺失突变体的 mRNA 进行 Northern 转移分析的结果表明: 细胞中合成了与 *nifH* 同源的转录本, 大小分别为 1.2Kb 和 1.8Kb。这些转录本的表达与培养基中 Mo 的浓度呈负相关性, 且在 $1 \mu M MoO_4^{2-}$ 存在下并未检测到 *nifH* 转录本。由此可知: Mo 对第二种固氮酶系统的调节作用至少对某些基因来讲发生在转录水平。

(三) 第二种固氮酶系统的遗传背景

目前, 有关遗传背景尚未弄清。不过, Bishop 等^[10,11]采用自杀性质粒 pSUP 1011 和 Tn5 诱变技术分离了多株 Tn5 插入突变体。这些突变体可以分为四种类型。第 I 型突变体在有 Mo 时呈 *Nif*⁻ 表型, 无 Mo 或有 V_2O_5 时呈 *Nif*⁺ 表型。*nifK* 突变和影响常规固氮酶系统调节作用的突变属于此类。第 II 型突变体在所有情况下均为 *Nif*⁻ 表型。铁钼辅因子 (FeMo-co) 阴性突变 (*nifB*⁻) 属此类。这说明 *nifB* 与两种固氮酶系统都有关。第 III 型突变体无 Mo 时不能进行固氮生长。大部分这类突变体在有 $1 \mu M MoO_4^{2-}$ 存在时固氮作用受到影响。它们的 C_2H_2 还原速率仅为野生株的 28—52%。将这类突变体的 *Kan*^r 遗传标记转移至 *nifHDK* 或 *nifK* 缺失突变体中所构建的重组菌株中, 仅在在有 V_2O_5 存在下才能进行固氮生长。这说明, 有 V_2O_5 条件下的生长与无 Mo 条件下的生长是两种不相互依赖的现象。第 IV 型突变体在有 Mo 条件下表现出与野生型菌株一样高的固氮酶活性, 但在有 $50 nM V_2O_5$, 而无 Mo 时其固氮酶活性仅为野生株的 10%。在有钒和缺钼两种条件下, 突变株与野生株的生长速率相同, 钒并不刺激突变株的固氮酶活性。这个突变体在缺 Mo 或有 V_2O_5 时仍能表达常规固氮酶的 α 、 β 两种亚基。然而, 双向电泳结果表明: 这些条件下在野生株和 *Nif*⁻ 突变株中常常见到的 NH_4^+ -和 Mo- 抑制性蛋白在这个突变株中却未能检测到。这些事实都说明, 在第 IV 类突变体中由于 Tn5 的插入使得第二种固氮酶系统的必需组份不能表达, 因而使得该突变体仅能依靠常规的固氮酶系统固氮, 即使在缺 Mo 条件下该突变体仍能表达其常规固氮酶系统的基因。因此, 在这个突变体中并不表现出钒效应。这些

突变体是研究两种生物固氮酶系统的良好材料。上文提到的两处与 *nifH* 同源的区域已被克隆, 正在进行序列分析。这两处的序列也许并不相同, 因为它们的杂交相对强度并不一致。这种现象曾在圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 中发现过。^[13,14]

Robson^[15] 采用基因置换技术构建了圆褐固氮菌染色体缺失突变株。该突变株中的 *nifHDK* 基因被一个卡那霉素抗性基因所替代。他发现这个缺失突变株在缺 Mo 条件下能固氮, 一些自发产生的抗钨酸盐的衍生突变株也能固氮。与生长在有 Mo 培养基上的亲本相比, 突变株在固氮条件下生长较慢, 而且其 C_2H_2 还原速率与释 H_2 作用强度不成比例, 前者相对低些, 这种释 H_2 作用对 C_2H_2 也不敏感。用圆褐固氮菌 *nifK* DNA 片段作探针进行分子杂交的结果表明: 无论亲本株还是缺失突变株中都存在类似 *nifK* 的基因序列。Jones 等^[13]、Robson 等^[14] 还证明在圆褐固氮菌中存在着两种不同且不毗邻的 *nifH* 基因, 分别称为 *nifH* 和 *nifH**。从其核苷酸序列来推断, 圆褐固氮菌 *nifH* 的产物, 除一个氨基酸残基外, 与棕色固氮菌常规固氮酶还原酶的一级结构相同。*nifH** 是一个与 *nifH* 有同源性的结构基因。Robson 等已克隆了包含 *nifH** 的 DNA 片段, 并测定了与 *nifH* 同源的区域及其附近的核苷酸顺序。他们发现, 在此区域有两个转录阅读框架。一个是编码一个有 289 个氨基酸残基的蛋白。该蛋白与圆褐固氮菌 *nifH* 的产物——常规固氮酶还原酶相比有 30 处不同的氨基酸残基, 并少 4 个较酸的氨基酸残基。因此, *nifH** 的产物碱性较大。这种现象在棕色固氮菌表达其第二种固氮酶系统时有过报道^[3]。另一个阅读框架编码一个有 63 个氨基酸残基的蛋白。该蛋白有 9 个半胱氨酸残基。它与一些厌氧细菌中发现的具有低氧化还原电势的小分子铁硫蛋白——铁氧还蛋白有同源性。这是固氮酶系统的结构基因与铁氧还蛋白基因相连的第一个报道。核酸序列分析的结果暗示, 这两个基因组成一个操纵子。实验表明: 即使提供多个 *nifA* 拷贝(其产物在肺炎克氏杆菌中是 *nif* 基因簇表达的激活物), 克隆在大肠杆菌中的 *nifH** 的启动子也不能被激活。这意味着 *nifH* 与 *nifH** 的转录调控机理是不同的。上述实验结果都暗示, 在圆褐固氮菌中也存在着第二种固氮酶系统。

(四) 第二种固氮酶系统的分离纯化

最近, Robson 等^[16] 在圆褐固氮菌中分离纯化到了第二种固氮酶系统。他们证明, 第二种固氮酶系统是一种双蛋白系统, 发挥固氮作用时必需钒。两种固氮酶系统的部分理化性质比较见表 1。

第二种固氮酶系统的发现及其固氮酶的特性在生物固氮研究中提出了一系列生理生化、遗传与进化等方面的问题, 如它的底物专一性, 氧气敏感性, 它与 H_2 、ATP 的关系, 它的金属和酸性不稳定硫的含量与

表1 固氮菌中两种固氮酶系统的理化性质比较

			金属含量 (g atoms mol ⁻¹)		比活 (n mol 产物/min · mg 蛋白)		
	Mr	亚基 Mr	Mo	V	H ₂	NH ₃	C ₂ H ₄
Ac1*	210000	55000 50000	0.107	1.6	1374	350	516
Ac1	227000	60000	1.9	ND	2138	1521	1924
Ac2*	60000	31500	0.012	0.04	1107	507	999
Ac2	64000	30000	0.2	ND	1993	1361	1830

Ac1*: 第二种固氮酶, Ac2*: 第二种固氮酶还原酶, Ac1: 常规固氮酶, Ac2: 常规固氮酶还原酶, ND: 未测定, 固氮酶活性测定按互补实验方法进行

结构, 它的还原酶和其他任何相关蛋白的性质等一系列问题均需进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Bishop, P. E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7742—46, 1980.
- [2] Davis, L. C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 256: 512—23, 1972.
- [3] Premakumar, R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 797: 64—70, 1984.
- [4] Bishop, P. E. et al.: *Science*, 232: 92—94, 1986.
- [5] Bishop, P. E. et al.: in *Nitrogen Fixation Research Progress* (Evans, H. J., Bottomley, P. J. and Newton, W. E., eds), p622 Martinus Nijhoff, 1985.
- [6] Eady, R. R. and Robson, R. L.: *Biochem. J.*, 224: 853—862, 1984.
- [7] Hales, B. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 261: 15301—06, 1986.
- [8] Hales, B. J. et al.: *Biochemistry*, 25: 7251—55, 1986.
- [9] Jacobson, M. R. et al.: in *Nitrogen Fixation Research Progress* (Evans, H. J., Bottomley, P. J. and Newton, W. E., eds), p524, Martinus Nijhoff, 1985.
- [10] Joerger, R. D. et al.: *J. Bacteriol.*, 168: 673—82, 1986.
- [11] Kennedy, C. et al.: in *Nitrogen Fixation Research Progress* (Evans, H. J., Bottomley, P. J. and Newton, W. E., eds), p469—76, Martinus Nijhoff, 1985.
- [12] Joerger, R. D. et al.: in *Nitrogen Fixation Research Progress* (Evans, H. J., Bottomley, P. J. and Newton, W. E., eds), p525, Martinus Nijhoff, 1985.
- [13] Jones, R. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 197: 318—27, 1984.
- [14] Robson, R. et al.: *EMBO J.*, 5: 1159—63, 1986.
- [15] Robson, R. L. et al.: *Arch. Microbiol.*, 146: 74—79, 1986.
- [16] Robson, R. L. et al.: *Nature* (London), 322: 388—390, 1986.