



生物固氮研究新进展

梁继红 李佳格

(北京农业大学生物学院)

每隔两年举行一次的国际生物固氮会议,于1990年5月在美国Knoxvill召开。来自51个国家的630名科学家出席了会议,作为会议参加者,我们有幸获知了关于生物固氮研究的最新成就。

豆科植物和根瘤菌共生关系的建立,由植物和细菌双方的遗传信息所决定。例如,在豌豆植物中已发现21个共生基因和3个结瘤基因参与结瘤过程。这些基因在染色体连锁图上的准确位置业已确定。在氮代谢中作用显赫的6个不同谷氨酰胺合成酶基因,也已在染色体上找到了它们的确切位置。在根瘤中促进氧气扩散的豆血红蛋白基因,与其他4个共生基因一起密集地定位于第一号染色体上。目前已发现豌豆根瘤菌的13个基因与结瘤有关,称为结瘤基因,其中许多是近两年来发现的。在其他根瘤菌中,新的结瘤基因也在不断地被发现。这些不同的根瘤菌的结瘤基因,有些是相似的,诸如nodABC,称为共有结瘤基因;而绝大多数是不同的。这些彼此不同的基因称作寄主专一性结瘤基因。

近年来,对于结瘤过程的研究,尤其是植物和根瘤菌之间的信号传递的研究取得了巨大的进展。人们首先发现植物种子及幼苗的根部分泌出一种叫作四羟基黄酮的多环化合物,进而发现根区还分泌一种称为甲氧苯基乙烯酮的化合物,比四羟基黄酮具有更高的生物活性。这些分泌物是植物发出的结瘤信号。根瘤菌接收到这些化学信号后,便启动本身的结瘤基因并予以表达。这些结瘤基因的产物有的被直接分泌到细胞体外,而另一些则参与了根瘤菌结瘤信号分子的合成。由根瘤菌合成的这种信号分子,一旦与植物根部相遇,可以引起植物根毛的分枝、变形直至瘤状物的形成。这种根瘤菌结瘤信号化合物的结瘤以及参与合成这种化合物的结瘤基因已在美国、法国、英国等不同实验室中得到阐明。从苜蓿根瘤菌中分离得到的结瘤信号分子为葡萄糖胺四聚体,其中三个单元的氨基已被乙酰化,另一个单元的氨基被脂酰化,还原端的糖胺还结合有一个硫酸根基因。

根瘤菌接种剂已在世界范围内推广应用。但选育或创造具有高固氮高竞争能力的根瘤菌株,仍是重要课题之一。本次会议上,有报道表明,决定竞争能力的基因已经从根瘤菌中分离出来。将高竞争能力的基因引入低竞争能力的根瘤菌后,后者一跃为竞争中的强

者。这一成果的取得,使人们有可能利用遗传工程技术,创造出具有高固氮竞争能力的优良菌株,为人工接种剂的应用拓展新的局面。

本次会议上,几个实验室提供的数据,进一步证明了根瘤中厌氧环境的存在。根瘤的内皮层细胞排列致密,形成了一道屏障,限制气体分子的扩散。存在于这道屏障之内的根瘤菌,一方面需要一个厌氧的环境来进行固氮,另一方面又需要一定量的氧气进行呼吸,维持生命活动。豆血红蛋白的作用,正是促进有限量的氧气在根瘤中的扩散,以满足根瘤菌及根瘤中植物细胞呼吸的需要。由于内皮层强大的屏障作用,尽管有豆血红蛋白的积极工作,根瘤中的氧仍然供不应求,呼吸强度远不能达到最好水平。因而能量生产成了固氮效率的限制因素。同时,空气中的氮气也不能顺利进入根瘤,伴随固氮而产生的氢气又不易扩散出去,氢气在根瘤内部的积累又会抑制固氮。因此,如何利用生物工程技术改善根瘤的固氮效率,是科学家们面临的一个新的挑战。

固氮酶由钼铁蛋白和铁蛋白两部分组成。钼铁蛋白含有铁钼辅因子,是固氮酶真正起催化作用的活性中心。铁蛋白的功能是为钼铁蛋白传递电子。每传递一个电子,同时伴随着两个ATP分子的水解。英国的生物学家首次报告了实验证明ATP的水解先于电子传递。

这次会议的重要成就之一是关于铁蛋白结构的报告。以圆褐固氮菌中分离到的固氮酶铁蛋白已被纯化并结晶。分辨率为3Å的X-光衍射电子密度图谱,首次揭示了铁蛋白的二级结构。铁硫簇位于铁蛋白分子的表面,并且是连接两个蛋白亚基的枢纽。两个亚基之间形成一条狭缝,ATP结合位点很可能位于这一狭缝的两侧。

近年来开展起来的定位突变技术,为固氮酶结构与功能的研究开辟了新的途径。科学家们根据已经获得的固氮酶的DNA序列,推测某一特定位置上的氨基酸在维持固氮酶结构和功能方面可能起的作用,然后用一个完全不同的氨基酸取而代之,最后用各种生物物理、生物化学方法来测定这一置换是否引起酶结构和功能的变化。譬如,在分离自圆褐固氮菌的钼铁蛋白的 α -亚基中,若将第191位谷氨酰胺换成赖氨酸,

(下转第63页)

(上接第56页)

则新产生的固氮酶的底物专一性发生改变。它的还原乙炔的活性不变,还原氮的活性降低,放氢受一氧化碳的抑制。这些特征和 *nifV* 突变株的表现型非常相似。据此而论,固氮酶的底物专一性也依赖于它本身的结构。

固氮微生物只有在缺乏化合态氮来源的情况下才开始固定空气中的气态氮。否则,它们的固氮基因即处于关闭状态。在一些固氮菌中,除了有基因水平的调控外,还存在蛋白质翻译后的调节机制。只要有微量的氨存在,固氮生物便立即停止固氮,即通常所说的“氨关闭”效应。在深红红螺菌中,这一“氨关闭”机制

已被证明为固氮酶铁蛋白的共价修饰。控制这一过程的两个基因(*draT* 和 *draG*)已经分别从深红红螺菌和固氮螺菌中克隆得到。将这两个基因改造后,在一定浓度的氨存在下,深红红螺菌仍可以固氮,氨关闭机制已被打破。由于固氮螺菌已在很多国家被用于非豆科作物的商品接种剂,将这两个基因作同样的改造,无疑具有重大的应用价值。此外,将含有这两个基因的DNA片段引入肺炎克氏杆菌并得以表达,原来不具有“氨关闭”机制的肺炎克氏杆菌奇迹般地获得了这一机制。这一现象的发现对于进一步弄清“氨关闭”过程中的信号传递具有十分重要的意义。