

根瘤菌中固氮正调节基因 *nifA* 的研究

张勇丽, 姚振华 (万博科技职业学院生物技术与环境工程系, 安徽合肥 230031)

摘要 *nifA* 是共生固氮的正调节基因。*nifA* 基因调节固氮基因的表达伴随着一系列信号交换过程, 在植物根部形成特定的器官——根瘤, 将大气中的 N_2 还原成铵供给植物作为生长的氮源。同时, 植物向类菌体提供光合产物和氨基酸作为其生长的碳源。固氮基因在 *nifA* 产物 NfA 激活下表达, 固氮过程由此开始。*nifA* 为固氮基因 *nif/fix* 的正调节基因。针对 *nifA* 基因的位置及其产物 NfA 的结构和功能作一综述。

关键词 *nifA* 基因; 共生固氮; 正调节; 激活转录

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2007) 19 - 05666 - 02

自然界中只有少数微生物和藻类具有将大气中游离的氮元素(氮气)转变为化合态氮元素(如铵、硝酸盐)的功能。这些固氮生物可分为自生固氮和共生固氮两类。长期以来, 共生固氮被认为是有机体中氮元素来源的主要方式。共生固氮是微生物依赖与植物之间的相互作用而建立起来的共生关系。共生关系的形成起始于2个共生体之间的信号交换过程。以宿主豆科植物分泌的异黄酮、类黄酮等物质作为化学趋化剂能吸引固氮根瘤菌趋向于植物根部运动并诱导其结瘤基因(Nod Genes)的表达。nod 基因的产物合成一类具有种属专一性的脂质寡聚糖, 称为结瘤因子(Nod Factor)。这些信号分子能引发宿主植物根部的特异反应, 如根毛的变形、卷曲。根部皮层细胞的分裂最终导致根瘤原基的形成。而根瘤菌附着于变形卷曲的根毛, 并通过向内凹陷生长的侵染线进入根部组织, 在根细胞内部分裂、分化成具有固氮功能的类菌体^[1]。类菌体能把空气中游离的氮气还原为铵, 以提供给宿主植物作为氮源, 同时植物向类菌体供应光合产物和氨基酸作为微生物生长的碳源和氮源。

共生固氮需要根瘤菌某些特定基因的表达。这些基因的产物主要参与结瘤因子的合成、根瘤发育、合成固氮酶组件及类菌体的代谢等。另外, 一些植物基因(结瘤素基因)也在根瘤菌的相互作用中被诱导表达^[2]。因此, 有效根瘤的形成要求宿主和细菌基因在时间和空间上协调表达。这种基因的协调表达在共生早期是由特异的化学信号交换而引起; 而在共生后期, 随着根瘤的发育形成, 特定的细菌基因通过外界环境中氧浓度的降低而被激活。植物组织中的特定细胞起到氧扩散屏障的作用, 同时豆血红蛋白可逆地结合游离氧。随着植物细胞中生理条件的变化, 根瘤菌中固氮基因和与环境条件改变相关的基因开始表达。在根瘤的发育和固氮过程中, *nifA* 基因是一个中心调节因子。*nifA* 基因的表达受外界环境变化的调节, 其产物又能调节其他有关基因的表达。笔者对苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)及其他根瘤菌的 *nifA* 基因表达的调节及其产物的功能作一概述。

1 苜蓿根瘤菌中 *nifA* 基因表达的调节

1.1 苜蓿根瘤菌中 *nifA* 基因的位置 苜蓿根瘤菌携带2个大质粒(Megaplasids), 大小分别约为1 400 kb(pSyma)和1 700 kb(pSymb)。与固氮有关的基因大都分布在pSyma上(图1), 形成两大基因簇^[3]。基因簇I上有 *nifHDKE*、*nifN*、

fixABCX、*nifAB* 和 *fdxN*; 基因簇 位于 *nifHDK* 操纵子下游约 220 kb 处, 包括 *fixLJ*、*fixK*、*fixNOQP* 和 *fixGHS*, 转录方向与基因簇I相反。*nod* 基因位于 *nifE* 和 *nifN* 间的约 30 kb 区域。其他建立和维持共生关系所需的基因则位于 pSymb 和染色体上。苜蓿根瘤菌中的 *nifA* 基因处在 *fixABCX* 操纵子和 *nifB* 基因之间, 与其下游的 *nifB* 基因、*fdxN* 基因和一个功能不详的开放阅读框 ORF3 组成一个操纵子^[4]。苜蓿根瘤菌 *nifHDKE* 和 *fixABCX* 操纵子分别有一个能被 NfA 蛋白激活的启动子, 称为 P_1 和 P_2 。这2个操纵子编码主要的固氮酶结构基因是 NfA 调控的主要靶基因。

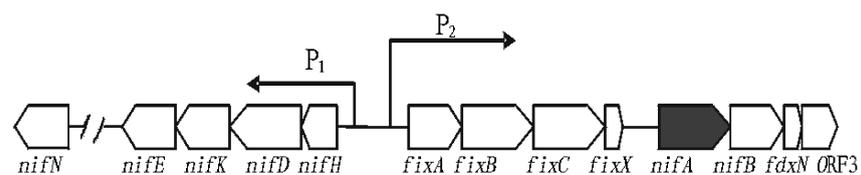


图1 苜蓿根瘤菌中固氮基因的位置和 NfA 作用的两个启动子

1.2 苜蓿根瘤菌 *nifA* 基因表达的调节 因为固氮需要较高的能量供应, 而且固氮酶具有高度的氧敏感性, 所以固氮微生物都具备一套精密的调控机制以确保细菌能感知最适合固氮的外界环境, 并将该信号传递至基因表达水平。一般来说, 外源氮元素和氧浓度是调节固氮酶表达的重要信号。而在根瘤菌中固氮基因的表达主要受细胞内氧浓度的调节, 因为共生固氮是发生在根瘤中的。根瘤是一个存在化合态氮的生理环境。类菌体在固氮时已接受宿主植物提供的化合态氮。所以, 根瘤菌中固氮基因的表达不受严格的氮元素控制。

固氮微生物中一般都存在2个级联调节机制, 以控制不同的靶基因的表达。包含 NfA 的调节机制控制固氮酶结构基因和其他固氮相关基因的表达, 调节方式与 *Klebsiella pneumoniae* 类似, 即通过依赖 RpoN 的 24/-12 启动子激活转录^[5]。而另一个由 *HxLJ* 组成的调节机制是根瘤菌所特有的。*HxLJ* 是普遍存在的双组分调节系统成员。感受蛋白 *HxL* 的胞质结构域上结合的卟啉环能感知细胞内氧浓度, 进而修饰其 C 端结构域的激酶和磷酸酶活性^[6]。低氧条件引起 C 端 Hs 残基的自身磷酸化而激活激酶活性, 引起 *HxJ* 的磷酸化, 再由 *HxJ* 激活靶基因的转录。氧浓度升高时, *HxJ* 上的磷酸基被磷酸酶水解而失活(图2)。苜蓿根瘤菌中 *nifA* 基因的表达主要由依赖于 *HxLJ* 的启动子(*pnifA*)直接控制。*pnifA* 位于 *fixABCX* 操纵子和 *nifA* 之间, 具体结构尚不清楚。启动子活性受 -39 ~ -54 区域的点突变影响。与其他根瘤菌的 *nifA* 启动子序列的比较可以看出, 在 -30 ~ -40 之间的富含 A/T 区域可能是重要的启动子元件。

作者简介 张勇丽(1978-), 女, 山东滕县人, 助教, 从事生物化学方面的研究。

收稿日期 2007-04-26

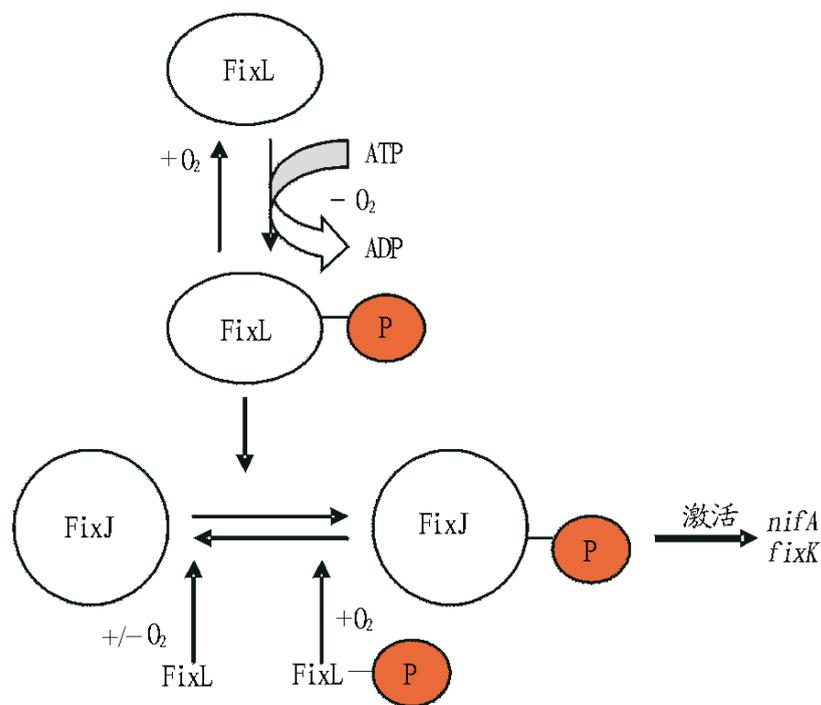


图2 **FixLJ** 介导的首蓿根瘤菌 *nifA* 基因受氧浓度调节的表达机理

自生有氧状态下 *p_{nifA}* 的表达水平很低。而在自生微氧状态或类菌体中, **FixJ** 的磷酸化诱导 *p_{nifA}* 转录并导致 **NfA** 的合成, 进而激活 *fixABCX* 和其他受 **NfA** 调节的基因的转录。这个诱导过程与细胞内氮元素无关。从 *fixABCX* 启动子起始的转录通读至 *nifA*, 也可造成 *nifA* 基因表达的进一步升高^[7]。据估计, 至少 50% 从 *fixABCX* 启动子起始的转录本包含 *nifA* 基因, 而 *nifA* 基因的通读对共生固氮并不是必需的。

除了正调节, 首蓿根瘤菌 *nifA* 基因还受 **FixK** 的负调节, 以防止不利的 *nifA* 基因过度表达。另外, *nifA* 基因也可由 *ntrC* 基因产物在激活 *fixABCX* 启动子转录时诱导表达。

2 首蓿根瘤菌 *nifA* 基因产物 **NfA** 蛋白活性的调节

NfA 激活 *nif* 基因表达的作用首先在 *Klebsiella pneumoniae* 中被研究, 随后以 *Klebsiella pneumoniae* 中的 *nifA* 基因作为探针发现了 *nifA* 基因也存在于其他固氮微生物中。所有 **NfA** 序列具有相似的长度(519 ~626 aa), 除了三叶草(*Rhizobium trifolii*)。序列比较发现, 不同 **NfA** 的不同结构域保守性不同。**NfA** 与其他依赖于 ⁵⁴-RNA 聚合酶的转录激活蛋白有着一些共同特征。

2.1 NfA 蛋白的结构 首蓿根瘤菌 **NfA** 的 N 端结构域由 164 个氨基酸残基组成, 也是与其他根瘤菌 **NfA** 同源性最低的, 其中缺少被磷酸化的 **Asp** 残基, 说明 **NfA** 并非像其他转录调节因子那样是由磷酸化来调节活性的。该结构域的缺失并不影响 **NfA** 的激活 *nif* 基因启动子的活性和氧敏感性^[8]。首蓿根瘤菌 **NfA** 的 N 端结构域与中心结构域之间有短的连接区。这种连接区常见于细菌的信号转导系统成分。其中富含 **Gln** 和其他亲水氨基酸, 被称为 **Qlinker**。**Qlinker** 的缺失不影响激活功能, 中心结构域由 240 个氨基酸残基组成, 与其他根瘤菌 **NfA** 的序列有高度同源性。已证明, 单独的中心结构域仍具有转录激活能力^[8]。**NfA** 蛋白激活基因表达需要含 ⁵⁴ 因子的 RNA 聚合酶。中心结构域被认为与 ⁵⁴RNA 聚合酶直接相互作用。

NfA 的 C 末端结构域是 DNA 结合结构域, 包含一个高度同源的螺旋-转角-螺旋二级结构。第 1 个螺旋结构在所有依赖 ⁵⁴ 转录激活因子中高度同源, 而第 2 个螺旋有 **NfA** 蛋白特异性。体外的 **DNaseI** 消化保护试验表明, 单独的 *Klebsiella pneumoniae* **NfA** 的 C 末端结构域能在体外与 DNA

结合。在首蓿根瘤菌中, **NfA** 蛋白 C 末端结构域也通过一个连列区与中心结构域相连, 其特征是具有 2 个 **Cys** 残基。这对维持 **NfA** 的活性非常重要。

2.2 NfA 蛋白激活转录的机理 **NfA** 激活依赖于 ⁵⁴ 因子的启动子的机制在所有根瘤菌中都是相同的。**NfA** 结合于其靶基因保守的上游激活序列(Upstream Activator Sequence, **UAS**)。**UAS** 位于 **NfA** 激活的启动子上游约 80 ~150 核苷酸处, 一般具有 5'-TGT-N10-ACA-3' 的保守序列。**UAS** 的功能可能是在于提高 **NfA** 在 σ^{54} 启动子附近的局部浓度或帮助 **NfA** 更有效地与 ⁵⁴ 作用。然而缺失 **UAS** 或 C 末端结构域缺失的 **NfA** 蛋白都保留转录激活功能, 表明 **NfA** 也能直接与 ⁵⁴RNA 聚合酶作用。**UAS** 的数量和位置可能是 *nif* 和 *fix* 基因表达、精细调节的一种方式。结合 **UAS** 的 **NfA** 与 ⁵⁴-RNA 聚合酶形成的转录复合物涉及 **UAS** 和 σ^{54} 启动子之间的 DNA 的成环。这个 DNA 的弯曲过程被认为是由整合宿主因子(Integration Host Factor, **IHF**) 诱导引起的^[9](图 3)。**DNaseI** 保护试验证明了 **IHF** 结合与包括 *nifH* 在内的很多受 **NfA** 激活的启动子区域。体外试验也证明, **IHF** 能刺激 **NfA** 调节的 *nifH* 启动子的转录。所以, **IHF** 在依赖 **NfA** 的基因表达过程中起重要的调节作用。

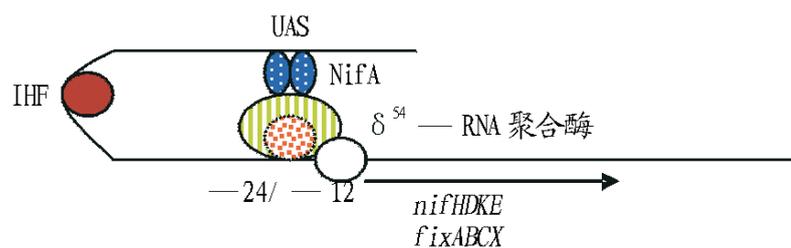


图3 依赖 **NfA** 的转录起始复合物的各组成成分

2.3 NfA 蛋白活性的调节 *Klebsiella pneumoniae* 与根瘤菌 **NfA** 结构的差异在于没有富含 **Cys** 残基, 与之相对应, 在没有调节蛋白 **NfL** 的存在时, *Klebsiella pneumoniae* **NfA** 无论在体外还是体内对氧都不敏感。而根瘤菌中, **NfA** 的体内活性被氧抑制, 表明根瘤菌中所有的 **NfA** 都有氧敏感性。

很多调节蛋白都有金属离子结合结构域, **NfA** 中富含的 **Cys** 残基可能也是结合金属离子所需的, 因为根瘤菌中 **NfA** 体内活性对 **EDTA** 等螯合剂敏感, 并且螯合剂的抑制作用可被二价金属离子如 Fe^{2+} 所逆转。在低氧状态下, 处于还原状态的金属离子可能通过 **Cys** 残基使 **NfA** 的中心结构域和 DNA 结合结构域处于合适位置。在有氧状态时, 金属离子被氧化而使 **NfA** 失活或者还原状态的 **Cys** 上的巯基可能参与二硫键的形成, 而细胞中的氧影响 **NfA** 的结构^[10]。最后, **NfA** 在从有氧的无活性转变到无氧的活性状态时还可能涉及寡聚体的形成。

还有研究表明, 首蓿根瘤菌的 **NfA** 在大肠杆菌中有氧生长时被降解。这可能是 **NfA** 翻译后活性调节的一种方式。而 **NfA** 的降解还不能确定是有氧失活的原因还是结果。体外突变的首蓿根瘤菌 *nifA* 在引入体内可筛选出氧耐受性 *nifA* 突变株。这种突变株在 **NfA** 中心结构域中结合核苷酸位点的 **Met-217** 突变为 **Ile**。这可能是突变造成核苷酸结合位点的构象被锁定而使其无论在有氧还是无氧条件下都能结合、水解 **ATP**。而在野生型中, 这种作用在有氧时被金属离子氧化

(下转第 5675 页)

(上接第5667页)

导致构象转变而被抑制。

3 小结

NifA 无论在共生还是自生固氮菌中都是固氮的中心调节因子。它起到联系外界环境和内部固氮基因表达的作用,一直以来都是作为固氮调节基因。最近的研究表明,nifA 在除共生固氮外的其他方面都有功能,并且发现很多受 NifA 调节的新的基因。随着基因芯片技术的应用,比较 nifA 突变株和野生型苜蓿根瘤菌的表达发现很多基因表达存在明显的差异,包括一些可能与固氮无关的基因。这对进一步阐述 nifA 基因参与除固氮外的其他功能有重要意义。

参考文献

- [1] HRSH A M. Developmental biology of nodulation[J]. *New Phytol*,1992,122: 211 - 237.
- [2] SANCHEZ F, PADILLA J E, PEREZ H, et al. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*,1991,42:507 - 528.
- [3] WATSON R J. Molecular genetics of *Rhizobium noduli* symbiotic nitrogen fixation[J]. *Biotech*,1989,7:31 - 45.
- [4] KLIPP W, REHLER H, SCHLUTER A, et al. The *Rhizobium noduli* fdxN gene encoding a ferredoxin-like protein is necessary for nitrogen fixation and is cotranscribed with nifA and nifB[J]. *Mol Gen Genet*,1989,216:293 - 302.
- [5] MARTINEZ ARGUDO I, IITILE R, SHEARER N, et al. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals[J]. *J Bacteriol*,2004,186:601 - 610.
- [6] HSCHER H M. Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes[J]. *Trends Microbiol*,1996,4:317 - 320.
- [7] KIM C H, HELINSKI D R, DITTA G. Overlapping transcription of the nifA regulatory gene in *Rhizobium noduli*[J]. *Gene*,1986,50:141 - 148.
- [8] HUALA E, AUSUBEL F M. The central domain of *Rhizobium noduli* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. noduli* nifH promoter[J]. *J Bacteriol*,1989,171:3354 - 3365.
- [9] SANTERO E, HOOVERT, KEENER J, et al. In vitro activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA[J]. *Proc Natl Acad Sci*,1989,86:7346 - 7350.
- [10] HSCHER H M, BRUDERER T, HENNECKE H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding[J]. *Nucleic Acids Res*,1988,16:2207 - 2224.