

PAS 结构域介导 Org35 蛋白与 NifA 之间相互作用

涂然 崔艳华 陈三凤* 李季伦

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; 中国农业大学农业部农业微生物环境和资源重点实验室, 北京 100094; 中国农业大学生物学院, 北京 100094. * 联系人, E-mail: chensf@cau.edu.cn)

摘要 在巴西固氮螺菌中, 氧和铵是调节固氮基因表达的主要环境因子, 即高浓度的氧和铵抑制固氮作用. NifA 蛋白(*nifA* 基因的产物)是所有固氮基因(*nif* 基因)的转录激活蛋白. 目前, 在该菌中, 氧和铵对 NifA 蛋白的表达和活性的调节机制仍然不清楚. 本研究从巴西固氮螺菌中克隆到编码含有 PAS 结构域蛋白的 *org35* 全基因, 将根据 *org35* 的核苷酸序列推测的 Org35 蛋白氨基酸序列在 NCBI 网上进行同源性比较, 结果表明, Org35 蛋白属于杂合双组分调节系统, 包括 3 个结构域, 即 N-端 PAS 结构、中间组氨酸激酶结构域(HPK)和 C-端响应调节蛋白结构域(RR). 并通过酵母双杂交系统证明了 Org35 蛋白与 NifA 蛋白之间的相互作用是由 PAS 结构域介导的.

关键词 巴西固氮螺菌 酵母双杂交系统 NifA 蛋白 PAS 结构域 杂合双组分调节系统

氧和铵是调节固氮细菌中固氮基因表达的主要环境因子, 即高浓度的氧和铵抑制固氮作用. NifA 蛋白(*nifA* 基因的产物)是所有固氮基因(*nif* 基因)的转录激活蛋白, 是固氮调控中的核心因子. 环境因子氧和铵对固氮作用的影响即是通过调控 *nifA* 基因的表达和 NifA 蛋白的活性来实现的. 有关氧和铵的信号传导途径及固氮调节机制研究最清楚的是苜蓿根瘤菌和棕色固氮菌. 在苜蓿根瘤菌中, *nifA* 基因和 *fix* 基因的表达受 FixL/FixJ 双组分调节系统诱导^[1]. FixL 是一个含 PAS 结构域的组氨酸蛋白激酶, 血红素与位于 PAS 结构域内的组氨酸残基连在一起. 氧从 PAS 结构域解离后, 使 PAS 结构域的构型发生改变, 从而提高了其 C 端的自我磷酸化活性. 接着 FixL 催化磷酸基团转移到响应调节蛋白 FixJ 上, 磷酸化的 FixJ 作为转录激活因子激活与固氮过程有关的基因 *nifA* 基因和 *fix* 基因的表达. 在棕色固氮菌中, 固氮作用受 *nifA* 和 *nifL* 这一对非典型的双组分系统的调控^[2,3]. NifL 是一种负调节蛋白, 其 N 端含有 PAS 结构域, 并在 PAS 结构域中结合着 FAD 辅基. 外界环境中的氧信号通过 PAS 结构域进行感知, 并进行信号传导. 当氧浓度高时, NifL 蛋白通过与 NifA 蛋白之间的直接相互作用, 从而抑制 NifA 的转录激活活性.

巴西固氮螺菌是一种联合固氮菌. 与其他固氮细菌一样, 在巴西固氮螺菌中, NifA 蛋白(*nifA* 基因的产物)是所有固氮基因(*nif* 基因)的转录激活蛋白. 但在该菌中, 既没有发现类似 FixL/J 双组分调节系统, 也没有发现 NifL 蛋白. 因此, 氧和铵对 NifA 蛋白活

性的调节机制仍然还不清楚.

最近本室以 NifA 蛋白为诱饵, 利用酵母双杂交系统从巴西固氮螺菌 Sp7 染色体 DNA 文库中筛选到与 NifA 蛋白有直接相互作用的 4 个阳性克隆^[4]. 我们对其中一个克隆即 S35(质粒 pGAD-S35)非常感兴趣, 因为该克隆所含有的 1341 bp 的插入片段区编码与信号传导有关的 PAS 结构域^[4], 并将该基因命名为 *org35*. 本研究对 *org35* 的全基因进行了克隆, 在此基础上对其推测的蛋白结构进行了分析, 并再次用酵母双杂交系统研究了各推测的 Org35 蛋白各结构域与 NifA 相互作用. 在本研究中, 所有载体的构建及分子操作参考文献^[5], 酵母双杂交方法主要参考文献^[6], β -半乳糖苷酶活性分析参考文献^[7]. 为了获得全长的 *org35* 基因, 首先将用 *EcoR* 和 *Pst* 双酶切质粒 pGAD-S35, 回收 1341 bp *org35* 片段, 并克隆到自杀质粒载体 pPHU281(带有四环素抗性, Tc)上, 形成重组质粒 pUS35. 然后将 pUS35 导入到巴西固氮螺菌中, 通过四环素抗性筛选获得 pUS35 质粒整合在宿主染色体上的单交换突变株. 从单交换突变株中提取染色体 DNA, 并用 *EcoR* (1341 bp 片段中不含该位点)进行完全酶切, 酶切产物进行自连, 然后将自连产物转化大肠杆菌 DH10B 菌株, 从中筛选带有 Tc 抗性的转化子, 再从该转化子中分离质粒, 其中一个质粒(被命名为 pUSE35)含有 6.3 kb 插入片段, 包括原来的 1341 bp 片段和 5 kb 上游片段, 并用染色体步行方法进行核苷酸序列分析. 以同样方法, 用 *Sph* 对单交换突变株染色体 DNA 进行酶切、自连、转化, 筛选到

含有 9.3 kb 插入片段的质粒(命名为pUSS35), 包括原来的 1341 bp片段和 8 kb下游片段. 通过测序拼接, 最终获得了 5298 bp DNA序列(GenBank登录号是 DQ145724). 其中*org35* 编码区的长度为 2211 bp, 编码的蛋白由 736 个氨基酸组成(78.4 kD). 序列比较分析表明, Org35 蛋白含有可分成 3 个独立的结构域(图 1). N端(100~200 氨基酸)是PAS结构域, 与苜蓿根瘤菌FixL, 棕色固氮菌NifL及大肠杆菌趋化蛋白Aer中的PAS结构域有较高的同源性, 这些蛋白中的PAS结构域主要参于氧信号的传导(图 2); 中间区(340~580 氨基酸)是组氨酸激酶结构域(HPK), 含有保守的组氨酸位点, 这一结构域与双组分调节系统中的组氨酸激酶(histidine protein kinase, HPK)如NtrB同源性很高; C端(612~719 氨基酸)是响应调节蛋白结构域(RR), 含有保守的天冬氨酸位点, 这一结构域与双组分调节系统中的信号响应调节蛋白(response regulator, RR)如NtrC同源性很高(图 2). 这说明Org35 是一个含有PAS结构域的杂合双组分调节系统, 杂合双组分调节系统是双组分调节系统中的一个亚类, 典型的双组分调节系统由两个不同的蛋白组成, 即组氨酸激酶如NtrB和响应调节蛋白如NtrC; 而在杂合双组分调节系统中, 组氨酸激酶和响应调节蛋白是作为两个结构域存在于同一个蛋白中^[8]. 这是在巴西固氮螺菌

中首次发现的杂合双组分系统.

为了进一步确定Org35 蛋白 3 个结构域中哪一个结构域与 NifA 有直接相互作用, 我们将包括 PAS 结构域的全长 *org35* 基因, 缺失 PAS 结构域的 *org35* 基因, 组氨酸激酶结构域(HPK)和响应调节蛋白结构域(RR)经过 PCR 扩增后, 以正确的可读框分别构建在酵母双杂交载体 pGAD-C1 或 pGAD-C3 上, 形成以下几种不同的重组融合质粒: pGAD-*org35*, pGAD-*org35*ΔPAS, pGAD-*org35*HPK 和 pGAD-*org35*RR(图 3). 同时为了确证相互作用的特异性, 将 *org35* 基因从可读框正确的载体 pGAD-C1 上克隆至 pGAD-C3 上形成 *org35* 发生移码突变的重组质粒 pGAD-*org35'*. 将上述这些新构建的重组质粒分别与携带有 *nifA* 的质粒 pGBD-*nifA* 组合, 分别共转化酵母, 并以 pGAD-C1/pGBD-C2 组合和原克隆 S35 即 pGAD-S35/pGBD-*nifA* 组合共转化酵母做负对照和正对照. 将共转化子分别涂布在 SD/-Trp-Leu (简称为 SD/-LT)平板和 SD/-Trp-Leu-Ade-His(简称为 SD/- AHLT)平板上, 根据转化子在平板上的生长情况来确定蛋白之间的相互作用. 结果表明所有转化子均能在 SD/-Trp-Leu 平板上生长, 说明被 pGAD 携带的 *Leu* 基因和被 pGBD 所携带的 *Trp* 基因被启动表达, 表明这些转化子都是

```

1  MVESLDHGRL FTALARLRDS GQWTRQEFYAF VGAHSAIDGL TDAKVVLELA GPDGVDRKDV
61  LLTIIDVTER NAWVSELQDA RDEAERTRAA YHHILQAVAD GICGLDARGA VTFWNAAAQS
121  MTCFGASELV GRSFAALIGG DAEBEGRPAL TSLADGLVR QVGDGRLRRQ CGEDFVAELT
181  VSPILQNGAI TGAUVVAFRDV TARRAAEQAL AESERRHRTL VQSLSEGLVM RSGDGTVMVA
241  NAMAERLMAG PACVLLDPIA RPFESRKPGD RAGRAARRRF IGADGARLTG LPPAAKAVDS
301  GKPVIEQIVG IAEGDEAAAP TRWLRVSSHV VPCPDGQPEA VVSSVTDISA IKSMERDLNV
361  ALDAKERFMA AASHDLRQPA QALTLLSGLL LKEPIPEDAR RIATQLRDTV ASLGLLDCL
421  LDISKLEAGL VTPHSAPVEV CSIMERLHGE FRAVAASSGL TLRTVPVRLG VCTDGGLLER
481  VLRNLLTNAI RYTRQGFVLF GARRRGGALR FEVWDTGIGI PESQIDRIFQ DFYQIGNVAR
541  DRREGLGMGL SIARRLVHML GGTIEVTSAP GKGSCFAVTL PQGAILDERH CGDSPDSSAA
601  GSCEVDGDAS VLLVEDDAVI RMAALMLDG WGYRVTEAGS VAEALELVDC TLAPDLVLTD
661  YRLPDGDTGL MLMDTLRRRF GPDLPGVLLT GDTSSDRLRE AAGAQCALLH KPIQPDDLRR
721  TVRASLEHRD VETEAT
    
```

图 1 Org35 蛋白的氨基酸组成及 3 个结构域
3 个结构域分别用方框表示, 星号表示磷酸化位点

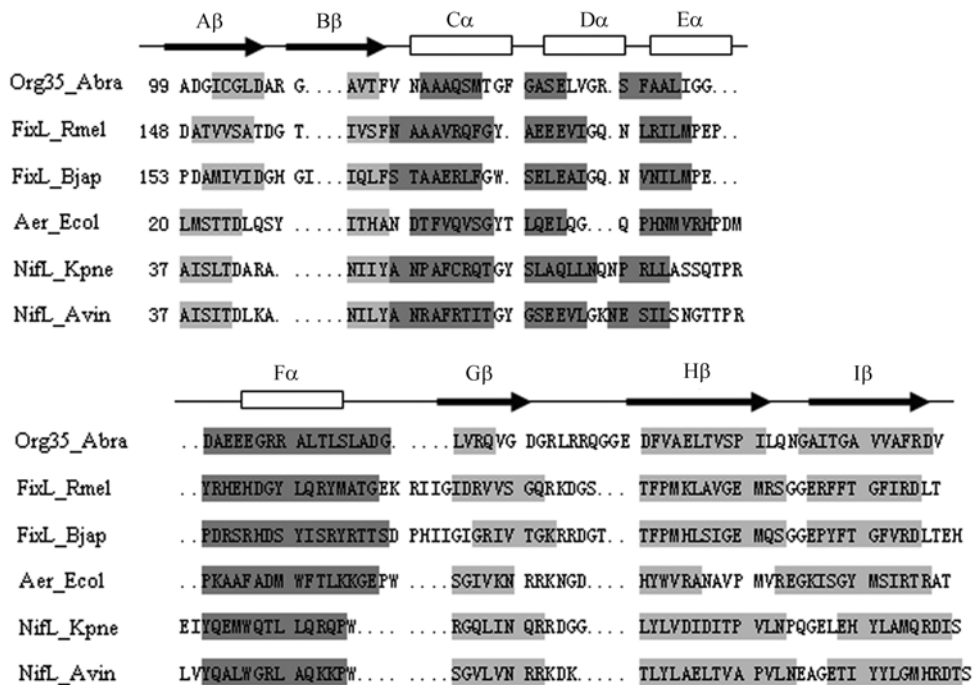


图 2 Org35 蛋白 PAS 结构域与来源于其他蛋白的相应 PAS 结构域的氨基酸序列比较

PAS 结构域中有 5 个 β-链和 4 个 α-螺旋结构. Org35_Abra, *Azospirillum brasilense* Org35; FixL_Rmel, *Rhizobium meliloti* FixL; FixL_Bjap, *Bradyrhizobium japonicum* FixL; Aer_Ecol, *Escherichia coli* Aer; NifL_Kpne, *Klebsiella pneumoniae* NifL; NifL_Avin, *Azotobacter vinelandii* NifL

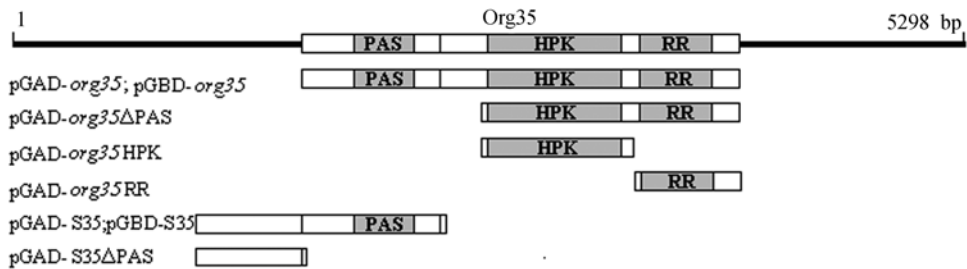


图 3 *org35* 的遗传图谱和本研究所构建的重组质粒所包含的外源片段

共转化的结果. 而在 SD/-Trp-Leu-Ade-His 并添加 X-gal 的平板上生长, 只有 pGAD-*org35*/pGBD-*nifA* 组合和原克隆 S35, 即 pGAD-S35/pGBD-*nifA* 组合的共转化子可以生长和变蓝, 说明 Ade, His 和 lacZ 这几个报告基因被启动表达, 表明含有 PAS 结构域的 Org35 蛋白与 NifA 之间在酵母体内存在着直接相互作用, 而缺失 PAS 结构域的 Org35 与 NifA 没有相互作用; 组氨酸激酶结构域 (HPK) 和响应调节蛋白结构域 (RR) 都与 NifA 没有相互作用, 移码突变的 Org35 与 NifA 也没有相互作用 (表 1). 为了进一步验证 Org35 蛋白与 NifA 之间相互作用的特异性, 又将 *org35* 以正确的可读框构建在 pGBD-C1 载体上形成 pGBD-*org35* 质粒,

并与已经构建好的 pGAD-*nifA* 共转化酵母细胞, 结果仍然证明 Org35 蛋白与 NifA 有相互作用. 液体法测定的 β-半乳糖苷酶活性结果与平板生长情况相一致. 如图 3 所示, 从巴西固氮螺菌染色体文库中以 NifA 为诱饵筛选出的原克隆 S35 (即质粒 pGAD-S35) 除含有 PAS 结构域外, 还包括 *org35* 上游的部分序列, 将 *org35* 基因上游区域克隆到 pGAD-C3 载体上形成可读框正确的融合质粒 pGAD-S35ΔPAS. 将原克隆质粒 pGAD-S35, *org35* 上游的部分序列质粒 pGAD-S35ΔPAS 及原 S35 克隆发生移码突变的质粒 pGAD-S35^[4], 分别与 pGBD-*nifA* 组合后共转化酵母, 同时将原克隆 S35 中的插入片段

表1 酵母双杂交系统共转化子在SD平板上的生长情况及β-半乳糖苷酶活性

相互作用的蛋白对	在选择培养基上的生长情况		β-半乳糖苷酶活性 /U ^{a)}	有无相互作用
	SD/-AHLT+X-gal+BU	SD/-LT		
pGAD-S35/pGBD- <i>nifA</i>	生长良好, 变蓝	生长良好	22±3	有
pGAD- <i>nifA</i> /pGBD-S35	生长良好, 变蓝	生长良好	22±4	有
pGAD-S35/pGBD- <i>nifA</i>	不生长	生长良好	4±1	无
pGAD-S35ΔPAS/pGBD- <i>nifA</i>	不生长	生长良好	7±2	无
pGAD- <i>org35</i> /pGBD- <i>nifA</i>	生长良好, 变蓝	生长良好	21±2	有
pGAD- <i>nifA</i> /pGBD- <i>org35</i>	生长良好, 变蓝	生长良好	17±4	有
pGAD- <i>org35</i> /pGBD- <i>nifA</i>	不生长	生长良好	4±2	无
pGAD- <i>org35</i> ΔPAS/pGBD- <i>nifA</i>	不生长	生长良好	6±2	无
pGAD- <i>org35</i> HK/pGBD- <i>nifA</i>	不生长	生长良好	7±1	无
pGAD- <i>org35</i> RR/pGBD- <i>nifA</i>	不生长	生长良好	9±2	无
pGAD-C1/pGBD-C2	不生长	生长良好	2±1	无

a) 3次测定平均结果

克隆到pGBD-C3 中形成pGBD-S35, 并与pGAD-*nifA* 组合后共转化酵母. 与上述方法一样, 将共转化子涂布在缺失不同氨基酸的SD基本培养基平板, 根据共转化子的生长情况和β-半乳糖苷酶活性来确定蛋白之间的相互作用. 结果发现含有PAS结构域的原克隆S35 和互换载体后的S35 都与NifA有直接相互作用, 而Org35 上游区与NifA没有相互作用, 移码突变的原克隆S35 也没有相互作用, 这个结果进一步说明Org35 与NifA之间的相互作用是由PAS结构介导的. 这一结果与国外报道的PAS结构域介导蛋白与蛋白之间的相互作用相一致^[9].

在巴西固氮螺菌中, NifA 的活性调节机制一直还不很清楚. 本研究所克隆到的 *org35* 是一个非常新奇的基因, 它的产物是含有 PAS 结构域的杂合双组分调节系统. Org35 的 PAS 结构域是怎样对外界信号进行感知和传导, 而调节 NifA 蛋白的活性呢? 这些问题将是我们今后的研究重点.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 30470028).

参 考 文 献

1 de Philip P, Batut J, Boistard P. *Rhizobium meliloti* FixL is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti nifA* and *fixK* genes dif-

ferently in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1990, 172: 4255-4262

2 Hill S, Austin S, Eydmann T, et al. *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2143-2148[DOI]

3 Dixon R. The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in γ -Proteobacteria. *Arch Microbiol*, 1998, 169: 371-380[DOI]

4 陈三凤, 管乐, 涂然, 等. 用酵母双杂交系统筛选与NifA相互作用的蛋白质. *科学通报*, 2005, 50(6): 540-545[摘要]

5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

6 James P, Halladay J, Craig E A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 1996, 144: 1425-1436

7 Miller J H. *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1972

8 Acuña G, Shi W, Trudeau K, et al. The 'CheA' and 'CheY' domains of *Myxococcus xanthus* FrzE function independently in vitro as an autokinase and a phosphate acceptor, respectively. *FEBS Lett*, 1995, 358: 31-33[DOI]

9 Huang Z J, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*, 1993, 364: 259-263[DOI]

(2005-11-09 收稿, 2006-02-24 接受)