



专论与综述

结瘤基因研究新进展

覃筱婷 陈文新

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

根瘤菌能侵入相应寄主结瘤, 根瘤可以固定大气中的氮, 所以人们一直对此类菌很感兴趣。随着分子生物学的发展, 人们对结瘤基因的了解也越来越多。马庆生^[1,2], 葛诚^[3]曾先后就此做过综述。此后, 结瘤基因的研究又取得了不少的进展。结瘤基因分为三类: 普通结瘤基因 (nod ABC), 寄主专一性基因 (nod E.F.G.H……), 调控基因 (nod D), 此三类基因相互联系, 协同作用, 现分述如下。

(一) 普通结瘤基因 (nod ABC)

nod ABC 是根瘤菌中最为保守、最有代表性的基因, 许多根瘤菌的 nodABC 已经定位并已测定了序列, 它们的同源性比较有如下特点^[4,5]: 种内同源性极大 (90% 以上), 有的只有几个碱基的差异, 如 *Rhizobium meliloti*; 同一属内不同种间同源性也很大, 大约为 70% 左右, 如 *R. meliloti* 与 *R. leguminosarum*; 根瘤各属之间也有一定的同源性。如 *Bradyrhizobium japonicum* 与 *R. leg. bv. viceae* 的 nodA. nodB. nodC 的同源性分别为 42.9%, 53%, 60%。由此可知: 处于不同分类水平, 亲缘关系不同的根瘤菌, nodABC 的同源性是不同的。

nodABC 的功能是诱导根毛卷曲及根尖表皮细胞分裂。不同种的根瘤菌功能是可以互补的^[2,3]。到现在为止, nodABC 蛋白还没有完全从根瘤菌中分离出来, 人们通过 *E. coli* 的体外转录翻译体系翻译 nodABC 蛋白, 并利用不同基因的突变株研究蛋白功能。Jürgen^[6] 及 Schmidt^[7] 体外翻译 *R. meliloti* 的 nodABC 发现: nodA 编码一小分子量的物质, 此物质位

于细胞质内, 它可以诱导根尖表皮细胞分裂, 启动瘤的形成, 此诱导活性是低水平的。当 nodA 蛋白被 nodB 蛋白修饰, 则诱导活性大大加强。一系列化学分析得知 NodA 与 NodB 共同合成的该活性成分是一种分子量小于 1000Da、热稳定的、可扩散的、带有部分疏水键的、类似细胞分裂素的化合物。Jürgen 推测此化合物可能是硫酸葡萄糖一类的物质。它不仅能诱导寄主的根尖细胞分裂, 而且还可以诱导别的植物根尖细胞分裂, 如胡萝卜、烟草等。

nodC 没有参与上述活性物质合成, 它位于细胞膜上, 有一个类似于真核细胞受体的蛋白结构, 是一个潜在可转移诱导因子。当 nodC 突变时根毛也不能卷曲, 即使有 nodAB 产生的细胞分裂促进因子也不能诱导根毛卷曲^[10]。

Banfalvi^[9] 发现 nodABC 除可以诱导根尖细胞分裂外还有更为复杂的功能。*R. meliloti* 的 nodABC 与 nodH、nodPQ 可以共同产生一个共生信号因子 (NodRm-1)。化学分析推测此化合物为: N-酰基-三-乙酰-1,4-D 葡萄糖胺^[10]。

此共生信号因子与寄主植物的识别和结瘤的开始有关。无 nodH 存在时 nodABC 的产物不能诱导特定寄主的根毛卷曲; 当 nodH 加入时则诱导根毛卷曲的作用明显。由此可以推测 nodABC 合成共生信号因子的前体^[9], 此前体可被 nodH 的产物修饰产生 NodRm-1。nodPQ 也参与 NodRm-1 的形成^[11]。

寄主的识别及结瘤的启动的机制还没有完全弄明白, 现在的研究材料认为大体过程是^[9]: 植物分泌诱导物 (黄酮类物质) 与 NodD-nod-

box 的复合体结合,诱导结瘤基因的表达。nod ABC 及 nodH. nodPQ 表达合成共生信号因子 (NodRm-1)。共生信号因子与寄主植物相互识别,使菌体只向特定的寄主靠近,诱导根毛卷曲,启动结瘤。由于黄酮类物质种类不是很多,不同植物可以产生相同的根际诱导物,因此菌体最初可以选择的寄主范围很广,当菌体共生信号因子形成时,此因子调节菌体只向特定的寄主靠近,诱导根毛卷曲,寄主范围缩小。总之,寄主植物的识别与结瘤的启动是双信号效应(即植物分泌的黄酮类物质与细菌共生信号因子)。进一步的研究发现, NodRm-1 正好是植物凝集素 (Lectin) 的配位基。

共生信号因子并不同于上述由 nodA. nod B 产生的小分子的活性化合物,它不是 NodAB 与 NodC 的简单叠加,此两种化合物的关系有待于进一步研究。用 *R. leguminosarum* 的 nod ABC 体外翻译也有相似的信号因子存在^[12]。

(二) 寄主专一性基因 (nod E. F. G. H. I. J. K. L.....)

了解到的寄主专一性基因的数量正在增多,不同的根瘤菌中此类基因不同。基因种类复杂,机制不清,现列举一些主要的寄主专一性基因的功能^[13]:

nodE: 它的序列与 *E. coli* 的 fabB 相似, fabB 是脂肪酸合成酶的酶原基因,编码膜蛋白。nodE 突变则影响膜表面多糖的合成^[14,15]。

nodF: 核酸序列与酰基携带蛋白基因相似^[14,15,16]。

nodG: 序列与脱氢酶基因相似^[14,15]。

nodH: 能修饰由 NodABC 产生的共生信号因子^[9,10],功能是合成表面转移酶,用于合成 NodRm-1。

nodI: 核酸序列与 ATP 相关的转移蛋白基因相似^[17]。

nodJ: 编码膜蛋白,作用时与 nodI 联合,组成一个膜转移系统^[17]。

nodK: 只在慢生菌中发现,功能不明^[18]。

nodL: 序列与乙酰转移酶基因相似^[19]。

nodM: 序列与氨基转移酶相似^[19]。

nodN: 编码葡萄糖胺合成酶基因,用于合成 NodRm-1^[19]。

nodO: 编码分泌蛋白,可以吸附钙离子。该蛋白与 *E. coli* 的溶血素的成分有同源性,说明它可能与菌体吸附到植物表面有关^[20]。

nodP: 功能不详,但可以与 *E. coli* 的 DNA 杂交^[13]。

nodQ: 序列与 GTP 吸附蛋白相似,它能修饰 NodABC 产生的共生信号因子^[11]。

nodR: 只在三叶草根瘤菌中有发现,功能不详^[21]。

nodS: 功能不详^[13]。

nodT: 功能不详^[13]。

nodU: 功能不详^[13]。

nodV: 只在 *B. japonicum* 中有报道,功能不详^[13]。

nodW: 只在 *B. japonicum* 中有报道,功能不详^[13]。

nodX: 只在 *R. leguminosarum* 中与阿富汗豌豆 (*Afghanista n. pea*) 结瘤的菌株中发现^[22]。

nodY: 只在 *B. japonicum* 中发现^[13]。

nodZ: 功能不详^[13]。

nolA nolB 和 nolC 这些基因均功能未知。

(三) 调控基因

nodD 在根瘤菌中普遍存在,是一个调节基因,具有两方面的功能^[2,3]:

a. 它能组成型地转录翻译自己的蛋白。

b. 在有根际诱导物存在的情况下,激活 nodABC 及其它结瘤基因的表达。

现已判明,在共生状况时,结瘤基因的表达需要三方面的条件^[23]:

(1) 一个可诱导的 nod 基因的启动子。

(2) nodD, 当 nodD 被激活转录翻译时,它的产物可以做为一个正调控物。

(3) 植物分泌诱导物与 nodD 产物结合诱导别的结瘤基因表达。

天然黄酮类物质存在于植物的根组织中。NodD 与不同的黄酮类物质反应, NodD

的碳末端决定着黄酮类物质的类型,因而也决定着寄主专一性范围^[24]。Maxwell^[25]发现不同的植物分泌诱导物不同,处于植物不同器官的诱导物成分也不一样,如紫花苜蓿的种子和根部分泌的诱导物就不同;同一植物的同一器官在菌体靠近的前后诱导物成分也会发生变化。

nodD 在结瘤基因的表达过程中起着关键作用,它是通过 nod-box 来调节其它结瘤基因的表达。在 nodABC 及 nodHnodF 的上游区有一段高度保守的序列称其为 nod-box,这段序列大约为 25—50bp,不同的根瘤菌 nod-box 的碱基数目不一样,它是结瘤基因转录激活所必须的。结瘤基因的转录的起始位点一般位于 nod-box 的下游区 25—28bp^[26]。

目前主要以 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 与 *R. meliloti* 做材料研究结瘤调控机制。两种根瘤菌的调控方式不同。

R. leg bv *viciae* 的 nodD 只有一个拷贝, nodD 突变,则结瘤失败。*E. coli* 的体外转录体系研究表明:此 nodD 能自我调控。无诱导物时, nodD 组成型表达自己的蛋白。NodD 与 nod-box 结合,使 nodABC 为非转录状态;当诱导物存在时,诱导物与 NodD-nod-box 的复合体结合,复合体的分子构型发生改变,启动 nodABC 转录,此时, NodD 反馈阻遏自身蛋白的表达。诱导后 NodABC 的浓度至少是诱导前的 100 倍^[27]。

R. meliloti 有三个拷贝的 nodD。利用 nodABC-nodD1 的体外转录发现,当只有一个拷贝的 nodD 时, nodABC 被诱导后的表达水平是很低的;三个拷贝的 nodD 存在时, nodABC 表达水平大大提高^[28]。有些菌株如 AK631 被诱导后的表达水平明显低于 Rm1021 的被诱导表达水平。在 *R. meliloti* 的菌株中, nodD 没有自我调控机制,即 nodABC 蛋白转录后, nodD 仍可以转录。

Kondorosi^[29] 认为在 *R. meliloti* 中为双重调控机制即 NodD 的正调控和一种可转移因子的负调控。他们在 AK631 中分离出一种可转移的负调控因子 (repressor), 并在染色

体基因组上克隆了这段序列。此负调控因子能吸附到 nodABC 转录起始位点的上游大约 33 bp 长度的片段上。针对上述研究成果他们设计一个调控模型^[29]。

Rm1021 为无负调控因子存在的菌株, 当无诱导物存在时, nodD 为组成型表达, nodD 与 nod-box 结合, nodABC 处于非转录状态。当有诱导物时, 诱导物与 nod-box-NodD 复合体结合, 使复合体的分子构型发生改变, nodABC 开始转录。但此转录表达水平不高仍允许 nodD 转录, 此菌株诱导后的 nodABC 与 nodD 为中等水平表达。

AK631 是有负调控因子存在的菌株。无诱导物时, 负调控因子与 RNA 聚合酶竞争启动子的结合位点, 使得 nodD 的表达水平低, nodD-nod-box 的复合体结构松散; 当诱导物存在时, 诱导物与复合体结合, 复合体分子构型发生变化, nodABC 开始转录, 此时负调控因子转而与 nodABC 的 RNA 聚合酶竞争启动子的结合位点, nodABC 表达水平不高。

R. meliloti 的基因组中, 有三个拷贝的 nodD, 它们能独立调节结瘤基因的表达, 但调节的方式各不相同^[30]。nodD1 与 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 的 nodD 相似, 调节需要植物分泌诱导物的存在; nodD2 突变对结瘤的影响不大, 当它独立调节时, 即有根际诱导物存在, 寄主的结瘤量也减少且结瘤延迟, nodD1 与 nodD3 独立调节时, 则没有这种现象发生; nodD3 调节较为特殊, 需要 Syrm 因子存在, 有 Syrm 因子时, nodD3 调控结瘤基因的表达不需要植物分泌诱导物的存在。Syrm 因子的功能还不是很清楚, 它不仅能影响结瘤基因的表达, 还可以调节 *exo* 基因, *exo* 的产物为胞外多糖, 胞外多糖是根瘤菌侵入植物根部所必须的, 现推测 Syrm 因子起一个中心调节体的作用。

总之, 对根瘤菌的遗传学基础还不是很了解, 目前的研究热点是不断鉴定新的结瘤基因, 探索结瘤基因的结瘤机制和结瘤基因的调控机制。随着分子生物学的发展, 人们将对根瘤菌

的了解越来越多,并将利用它造福人类。

参 考 文 献

1. 马庆生: 细胞生物学杂志, 7:13—15, 63—65, 1985。
2. 马庆生: 微生物学杂志, 7:54—57, 1987。
3. 葛 诚: 微生物学通报, 14:77—80, 1987。
4. Torok J, Kondorosi E: *Nucleic Acids Research*, 12: 9509—9523, 1984。
5. Rossen L, Johnston A W B: *Nucleic Acids Research*, 12: 9497—9508, 1984。
6. Jurgens S, Rutn W: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 25: 8578—8582, 1988。
7. Schmidt John M: *EMBO*, 7: 583—588, 1988。
8. Cathrine F, Fabienne M: *J. Bacteriology*, 170: 5469—5499, 1988。
9. Banfalvi Z, Kondorosi A: *Plant Molecular Biology*, 13: 1—12, 1989。
10. Patrice L, Philippe R: *Nature*, 344: 781—784, 1990。
11. Schwedoex J, Long S R: *Mol. Plant-Microbe Int.*, 2: 181—194, 1989。
12. Zaat S A et al.: *J. Bacteriology*, 169: 3388—3391, 1987。
13. Gresshoff, Roth, Stacey & Newton (eds): Nitrogen Fixation achievements and objectives, Campan and Hall, New York, London p. 239—244, 1990。
14. Djordjevic M A, Innes R W: *Plant Mol. Biol.*, 6: 389—394, 1986。
15. Horvath B G, Kondorosi E: *Cell*, 46: 335—343, 1986。
16. Shearman C A, Rossen L: *EMBO*, 5: 647—652, 1986。
17. Evans I J, Downie J A: *Gene*, 43: 95—101, 1986。
18. Canter-Cremers N C J, Spaink H P: *Plant Mol Biol.*, 13: 163—174, 1989。
19. Surin B P, Downie J A: *Mol. Microbiol.*, 2: 173—183, 1988。
20. Economou A et al.: *EMBO J.*, 9: 349—354, 1990。
21. Downie J A: *Mol. Microbiol.*, 3: 1649—1651, 1989。
22. Gottfert M, Grob P: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2680—2684, 1990。
23. Gresshoff, Roth, Stacey & Newton (eds): Nitrogen fixation: Achievement and objectives Chapman and Hall Sharon. R. L, p. 215—218, 1990。
24. Rossen L, Elavine O: *TIBS*, 12: 430—434, 1987。
25. Maxwell C A, Hartwig U A: *Plant physiol*, 91: 842—847, 1991。
26. Robert F et al.: *The Journal of Biological Chemistry*, 262(14): 6848—6855, 1987。
27. Rossen L, Shearman C A: *Johnston. A. W. B. The EMBO*, 13(A): 3369—3373, 1985。
28. Honma M A, Ausubel M A: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8558—8562, 1987。
29. Kondorosi E et al.: *The EMBO*, 8(5): 1331—1340, 1989。
30. Jonh T M, Sharon R: *Genetics*, 122: 7—18, 1989。