

根瘤菌脂壳寡糖结瘤因子研究概况

张 林 维

(安徽大学生命科学学院 合肥 230039)

关键词: 根瘤菌, 脂壳寡糖结瘤因子

中图分类号: Q936 文献标识码: C 文章编号: 0253-2654-(1999)-06-0440-03

共生固氮是根瘤菌与豆科植物相互作用的结果,它在农业上有重要意义。结瘤与固氮包括一系列复杂的生物学过程,它涉及微生物与植物间专一性识别、信息交换和基因协同表达等方面。近些年研究已经揭示出根瘤菌与豆科植物相互作用分子基础的基本框架。在根瘤的形成过程中,植物与根瘤菌之间首先进行信息交换,促使根瘤菌产生脂壳寡糖类物质。这类脂壳寡糖类物质能引起植物形成根瘤,因此被称为脂壳寡糖结瘤因子(Lipochitin oligosaccharides)或结瘤因子(nod factors)^[1]。脂壳寡糖结瘤因子的发现、结构与功能及其产生基因调控的阐明是近十年来生物固氮研究的重要进展之一。

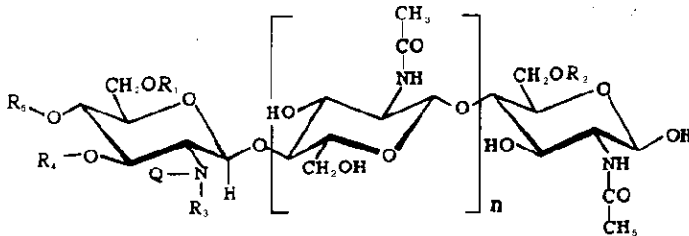
1 脂壳寡糖结瘤因子的发现及其结构的阐明

根瘤菌侵染豆科植物经由根毛进行。首先细菌附着在根毛表面,随后引起根毛发生卷曲,这是早期侵染阶段的特征。人们发现用根瘤菌的消毒过滤物培养植物也引起根毛的卷曲(Yao P Y, et al 1976),说明这种使根毛卷曲的早期侵染特征反应同某些小分子物质相关,因而他们提出了细菌胞外因子作用的概念。后来

Denarice, J 等人用过滤膜将根瘤菌与其相应的宿主分开培养,引起植物形成空瘤^[2],这一事实进一步证明植物结瘤是由于能透过滤膜的胞外因子作用的结果。在没有根瘤菌侵染的情况下,植物可以产生根瘤说明植物具有根瘤器官发生的遗传程序,根瘤细菌的作用就是通过其胞外信号分子打开植物的结瘤遗传程序。

根瘤菌的胞外因子首先是从苜蓿根瘤菌中分离得到的^[1],通过 HPLC 层析和紫外检测分析得到两个吸收峰,经质谱和核磁共振波谱分析证实这两个峰物质为 α 、 β 同分异构体。结构分析表明它们是一个脂酰化的几丁四糖,其非还原性末端的氨基葡萄糖单体上的 N 原子是一个十六碳的烯脂酰基(16:2, $\Delta^{2,9}$),其它各单体糖基都是 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNHAc)。还原性末端 GlcNHAc 的 C₆ 位有一个硫酸基团,这个氨基葡萄糖残基的异构头碳原子构型不同,形成 α 和 β 异构体。

人们不仅研究了苜蓿根瘤菌的脂壳寡糖因子,而且又从豌豆根瘤菌及广寄主范围的根瘤菌 *Rhizobium* sp. NGR234 中分离纯化了胞外脂壳寡糖结瘤因子。这些脂壳寡糖结瘤因子都具有如下图所示的结构通式。



从以上结构通式可以看出,能引起豆科植物结瘤的结瘤因子是几丁质寡糖的衍生物,由于这些寡糖是 N-脂酰化和 O-脂酰化的,因而它们都是脂壳寡糖类物质。寡糖的组成单体 N-乙酰氨基葡萄糖的数量(n)、脂

酰基(Q)的长度和双键数量及位置以及寡糖骨架上各取代基团(R₁、R₂、R₃、R₄和R₅)在不同的脂壳寡糖结

收稿日期: 1998-11-19, 修回日期: 1999-03-08

瘤因子中是不同的。

2 脂壳寡糖结瘤因子的作用

在没有根瘤菌存在的情况下,脂壳寡糖结瘤因子可使对应的宿主植物出现根毛分支、弯曲及膨胀等变形现象(*root-hair deformation*,简称 Had)。纯化的苜蓿根瘤菌脂壳寡糖结瘤因子在极低浓度($10^{-4} \sim 10^{-6}$ $\mu\text{mol/L}$)就可使苜蓿出现 Had 表型^[3]。引起 Had 表型所需的时间差异较大,有的只需数分钟,有的需要数小时或几天,有的甚至需要几周。由于 Had 表型是易于观察的,所以研究中常用 Had 实验法检测脂壳寡糖结瘤因子的活性^[4]。

脂壳寡糖结瘤因子引起宿主根毛出现 Had 表型,只是一个肉眼可见的形态变化,实际上脂壳寡糖的真正作用在于促进植物皮层细胞有丝分裂,引起根瘤原基及根瘤的形成。Truchet 等人发现苜蓿根瘤菌的脂壳寡糖结瘤因子在 10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ 浓度时就可以诱导皮层细胞的分裂及根瘤的形成,并且由脂壳寡糖结瘤因子引发的根瘤同根瘤菌侵染形成的根瘤有着相同之处,主要表现有三点:(1)两者皆发源于皮层;(2)两者具有相似的解剖结构;(3)两者具有某些相同的生理特性,如根瘤的形成都受硝酸盐的抑制^[5]。

为了对脂壳寡糖结瘤因子结构与功能进行研究,通常采用化学的或遗传学的方法对其进行结构修饰。化学的方法包括酰化、加氢、硫酸酯化或去硫酸酯化等。遗传学方法主要通过控制脂壳寡糖结瘤因子合成的基因突变体对脂壳寡糖进行结构修饰。苜蓿根瘤菌的脂壳寡糖结瘤因子被去除 O 醋酸基团后,导致结瘤能力降低^[3,5]。去除硫酸基团,减少末端糖和使 N-长链脂酰基链上的双键发生氢化作用,都可大大降低诱导根瘤的能力。脂壳寡糖结瘤因子在根瘤菌与豆科植物共生过程的不同阶段起作用,包括对结瘤早期阶段中植物基因的转录作用,如豌豆早期结瘤素 PsENOD₃ 基因(编码阿拉伯半乳糖蛋白)和 PsENOD₃ 基因(编码富脯氨酸蛋白)在根毛侵入线和皮层细胞分裂位点等处都有表达。

脂壳寡糖结瘤因子的结构决定根瘤菌侵染和结瘤的专一性。苜蓿根瘤菌脂壳寡糖分子的还原性末端 C₆ 位是硫酸酯化的,它只对苜蓿起作用,对豌豆没有作用。这种脂壳寡糖结瘤因子被除去硫酸基团以后,对苜蓿没有作用而对豌豆根毛起作用。苜蓿根瘤菌的 *nod*

Q 基因突变体既产生有硫酸基团的脂壳寡糖结瘤因子,也产生不带硫酸基团的脂壳寡糖分子,这种突变体对苜蓿和豌豆都起作用^[6]。

植物凝集素可能是脂壳寡糖结瘤因子的受体分子。早期人们的研究已经表明根瘤菌与豆科植物相互作用同凝集素紧密相关,后来人们将豌豆凝集素基因转到三叶草中,结果豌豆根瘤菌能使三叶草受侵染和结瘤^[7],更进一步说明植物凝集素参与了根瘤菌和豆科植物专一性识别作用。植物凝集素在根毛的顶端特别丰富,它是一种能专一性识别糖基的分子,在糖和蛋白质分子相互作用中起重要作用,因此植物凝集素可以作为脂壳寡糖结瘤因子的受体分子。

3 与脂壳寡糖结瘤因子合成相关的基因

脂壳寡糖结瘤因子是基因的间接产物,根瘤细菌通过 *nod* 基因(结瘤基因)的表达产生各种 Nod 蛋白,从而控制脂壳寡糖结瘤因子的合成。根瘤菌之所以能侵染宿主植物而使植物结瘤,并且这种侵染具有专一性,就是因为 *nod* 基因及其产物 Nod 蛋白作用的结果。*nod* 基因按功能的不同可分为三类:*nod D* 调节基因,共同的 *nod* 基团和宿主专一的 *nod* 基因。

nod D 调节基因在不同的根瘤菌中具有同源性(Appelbaum ER *et al.*, 1988),但不同菌株的 *nod D* 基因拷贝数不相同。豌豆根瘤菌只有一个 *nod D* 基因,而苜蓿根瘤菌有 3 个 *nod D* 基因^[9]。*nod D* 调节基因的作用机制是通过其产物 Nod D 蛋白激活其它 *nod* 基因,Nod D 蛋白同 *nod* 操纵子上游启动区的保过序列 *nod* 盒结合,从而激活该操纵子使其转录^[10]。

共同的结瘤基因 *nod A*、*nod B* 和 *nod C*,它们结构保守,编码 Nod A、Nod B 和 Nod C 蛋白,控制脂壳寡糖结瘤因子糖链骨架的合成。Nod C 蛋白与几丁质合成酶同源,可能与合成几丁糖骨架有关^[11]。Nod B 蛋白参与几丁糖非还原末端 GlcNHAc 的去乙酰化作用。Nod A 蛋白催化长链脂酰基转移到氨基葡萄糖的氮原子上。*nod A*、*nod B* 和 *nod C* 基因失活,就不能侵染植物,表型总是 Nod。共同的结瘤基因 *nod I* 和 *nod J* 的突变体一般表现为结瘤推迟。

宿主专一性的 *nod* 基因控制脂壳寡糖结瘤因子骨架以外基因形成。豌豆根瘤菌的 *nod L* 基因产生 Nod L 蛋白,它与 *E.coli* 的乙酰基转移酶同源,它可能是使脂壳寡糖乙酰化^[12]。苜蓿根瘤菌的 *nod L* 突变体产生的

脂壳寡糖因子还还原端糖 C₆位缺少 O-乙酰基,也说明 Nod L 具有乙酰基转移酶的功能。nod F 和 nod E 基因产生 Nod F 和 Nod E 蛋白,它们同脂壳寡糖分子上长链不饱和脂酰基(18:4, $\Delta^{2,4,6,11}$)的形成有关,分别起着脂酰基载体和 β -酮脂酰基合酶的作用^[15]。

根瘤菌一种宿主专一 nod 基因突变,另一种 nod 基因不能对其互补,产生不同结构的脂壳寡糖结瘤因子,导致宿主范围的变化(Delelle F *et al.*, 1986)。苜蓿根瘤菌有 nod G、nod H、nod P 和 nod Q 基因。nod G 基因是它专有的基因,其产物 Nod G 与乙醇脱氢酶同源,它可能与长链脂酰基的专一脱氢有关。Nod P 蛋白和 Nod Q 蛋白与大肠杆菌 ATP-硫酸化酶高度同源,体内外实验也证明它们具有 ATP-硫酸化酶活性,它们的功能是产生 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)。PAPS 的化学性质很活泼,在 Nod H 蛋白的作用下将脂壳寡糖还原性末端 C₆位硫酸酯化。nod H 突变体只产生不含硫酸基团的脂壳寡糖结瘤因子,因而失去了使原宿主苜蓿的结瘤能力,而使豌豆结瘤。nod Q 突变体产生部分是硫酸化的脂壳寡糖结瘤因子,部分是去硫酸化的脂壳寡糖结瘤因子,因而它既可以使苜蓿结瘤,也可以使豌豆结瘤^[6]。

4 脂壳寡糖结瘤因子基因工程的展望

在豆科植物同根瘤菌相互作用过程中,宿主植物产生类黄酮类信号,使 nod D 调节基因表达, Nod D 蛋白激活共同的结瘤基因和宿主专一的结瘤基因,产生相应的蛋白质,从而产生脂壳寡糖结瘤因子,促使早期结瘤素的产生,引起结瘤和固氮。因此,人们通过对脂壳寡糖结瘤因子基因及其它与固氮相关的 *nif*、*fix* 和 *exo* 基因的研究,有希望将根瘤菌的宿主范围扩大到非豆科植物,特别是禾本科粮食作物。

实现非豆科植物结瘤,从脂壳寡糖结瘤因子基因操作考虑,基本出发点有二。其一,利用不依赖于类黄酮活化的 nod D 调节基因,使共同结瘤基因和专一结瘤基因表达。Spaink H P 等人已从豌豆根瘤菌中得到了这种基因,其产物对多种根瘤菌的 nod 盒有活性(Spaink H P *et al.*, 1989)。其二,研究脂壳寡糖结

与其生物学功能之间的关系,筛选出对非豆科植物具有生物学效应的寡糖,再根据各结瘤基因在合成脂壳寡糖结瘤因子中的作用,构建一个理想的工程菌株,使其能产生适用于非豆科植物的脂壳寡糖结瘤因子。

生物固氮是微生物与植物相互作用的结果,对微生物基因组的研究只是一个方面,还要注重研究植物基因组中与结瘤相关基因包括结瘤素基因的表达和调控机制。通过这些研究进一步推动生物固氮的研究向深度和广度发展。这一切不仅能逐步实现共生固氮体系作为研究信号分子识别、传递、基因表达与调控最佳模型的科学价值,也有助于建立真正有经济意义的农田共生固氮体系。

参 考 文 献

- [1] Lerouge P, Roche P, Faucher C *et al.* Nature, 1990, 344: 78~784.
- [2] Denrie J, Roche P. Molecular Signals in Plant-Microbe Communication, Boca Raton, Ann Arber, London: CRC Press, 1991, 296~324.
- [3] Roche P, Faucher C, Denarie J *et al.* Cell, 1991, 67: 1131~1143.
- [4] 杨国平,朱 军,徐苏芸等. 微生物学通报, 1996, 23(1): 56~57.
- [5] Truchet G, Roche P, Lerouge P *et al.* Nature, 1991, 351: 670~5499.
- [6] Faucher C, Mailliet F, Vasse J M *et al.* J. Bacteriol, 1988, 170: 5484~5499.
- [7] Diaz C L, Melchers L S, Hooykaas P J J *et al.* Nature, 1989, 338: 579~581.
- [8] Kurkdjian A C. Plant Physiol, 1995, 107: 783~790.
- [9] Mulligan J T, Long S R. Genetics, 1989, 122: 7~18.
- [10] Fisher R F, Long S R. J. Bacteriol, 1989, 171: 5492~5499.
- [11] Spaink H P, Sheeley D M, Van Brussel A A N *et al.* Nature, 1991, 354: 125~130.
- [12] Fisher R F, Long S R. Nature, 1992, 357: 655~660.
- [13] Stokkermans T J W. Planta, 1994, 193: 413~420.
- [14] Van Brussel A A N, Recourt K, Pees E *et al.* J. Bacteriol, 1990, 172: 5394~5401.
- [15] 清元孝. 生命的化学, 1997, 17(1): 17~19.