

学术动态

生物固氮研究的现况和展望

——记生物固氮发现一百周年纪念学术会议

为了纪念生物固氮发现一百周年,英国皇家学会于 1986 年 10 月 22—23 日在伦敦举办了“生物固氮研究一世纪:现况与展望”的国际性学术讨论会。笔者有幸参加了这个会议。现将见闻介绍于后。会议由澳大利亚的 F. J. Bergersen 博士和英国的 J. R. Postgate 教授两位英国皇家学会会员主持。来自英国、埃及、法国、丹麦、叙利亚、荷兰、瑞典、美国、巴西、印度、奥地利、西德、以色列、西班牙、葡萄牙、加拿大、澳大利亚、比利时、秘鲁和中国共二十个国家的一百多位学者出席了会议。会上由英国、美国、澳大利亚和法国的十三位学者分四个专题作了报告。同时还举办了小型展览会,展出了 1847 年以来的有关文献,历次国际生物固氮学术会议的概况、各种固氮生物实物及标本,以及一些研究装置。

生物固氮研究的历史 共生生物固氮是一百年前由两位德国学者 Hellriegel 和 Wilfarth 用豆科植物首先发现的,两年后发表了全部结果,从而结束了长达 60 年的争论,开创了现代生物固氮研究的新纪元。他们证明了豆科植物的根瘤能固定空气中的氮;它的活性在不同的土壤中有差异;温和地加热、干旱以及大量的结合态氮都能破坏这种活性。P. S. Nutman 博士(已从英国 Rothamsted 试验站退休)在他的关于百周年纪念报告中回顾了这段历史后分析:为什么在这以前 Bunsingault, Lawes, Gilbert 等人曾作了不少工作,但是未能证明豆科植物可同化空气中的氮?他认为,那些早期研究者主要过多地考虑了排除化学污染和微生物存在,作了过分的处理。而 Hellriegel 和 Wilfarth 曾在土壤贫瘠的德国北部工作,那里必需施氮肥,对有无豆科植物生长的效果看得很清楚,这种经验有助于他们理解豆科植物的固氮作用。在概述了一百年来化学、生物学和农业中生物固氮的研究后, Nutman 博士认为至今还未看到这个领域的研究有减弱的趋势,而其对人类将产生的影响,尚难以预测。他认为尽管已取得了重要的进展,但是许多基本问题仍不清楚,尤其是它的遗传学与生理学,对于固氮生物种类的调查尚待完善,有些固氮生物急需保护。

“自然界中固氮系统的基本特性” 在这一专题中, J. I. Sprent 博士(英国 Dundee 大学)报告了固氮

有机体的生物学, D. E. Smith 博士(英国 Sussex 大学)报告了固氮酶的生物化学。迄今,只发现原核生物具有固氮酶。虽然本世纪初已经确定了大多数原核固氮生物的种类,最近五十年来又对它们的生物化学和遗传学作了大量研究;但是近年来人们又把兴趣回到固氮有机体的生物学上来,这是由于已经意识到共生固氮生物是具最重要经济价值的自然固氮系统。作者比较了各种固氮生物的优缺点后比较推崇豆科植物和满江红,并认为在船蛆与纤维细菌间的共生十分有趣。她指出,目前一方面是在探索新的固氮体系,另一方面在研究结瘤作用和侵染过程的机理,后者也许有助于探索创造新的共生体系。

固氮酶系由两种对氧敏感的金属蛋白组成:铁蛋白的分子量为 60000—70000,它是含有 $[4Fe-4S]$ 簇的 α_2 双体;另一个蛋白是 $\alpha_2\beta_2$ 四合体,分子量为 200000—220000,含有铁及对酸不稳定的硫,以及钼或钒。关于这两种蛋白的多肽的编码基因已经搞清楚。虽然对含钼的系统已经研究了好几年,但含钒的系统近年才得到鉴定和提纯。在前一系统中连结底物的位置上含有一个可提取的、结构尚不清楚的铁-钼辅助因子。已经得到了关于含钼系统功能的详细的计算机模式。电子传递到固氮酶有铁氧还蛋白和黄素氧还蛋白参与。

“遗传学及固氮和有关基因的调节” 在这一专题中有七个报告,涉及克氏菌、固氮细菌、蓝细菌、固氮螺菌和根瘤菌等固氮系统。至今,对固氮的分子遗传学了解较多的是 *Klebsiella pneumoniae*, 它的固氮专一地需要十七个基因,并形成了复杂的调节子,这些调节子又组成了八个转录单位。R. A. Dixon 博士(英国 Sussex 大学)指出,在 *K. pneumoniae* 中 *nif* 基因的转录是正相关控制的,并有两个需求:(1) *ntrA* 基因产物,它很可能取代 RNA 聚合酶的、由 *rpo* 编码的 Sigma 亚基,以使可能辨识 *nif* 启动基因的顺序;(2) 调节氮的基因 *ntrC* 或者专一的 *nif* 调节基因 *nifA* 的产物,这两者都是转录的激活剂。*nif* 转录的阻遏有 *ntrB* 和 *nifL* 基因的产物参与,它们又与氨、氧或固定的氮存在有关。所有五种调节基因的核苷酸顺序的测定已促进了对其产物结构与功能的分析。*nif* 启

动基因是一类新启动基因的代表,这种启动基因缺乏通常在原核启动基因中可看到的同感顺序 (consensus sequences)。大多数 *nif* 启动基因在 *nifA* 参与的激活中需要一个上流 (upstream) 活化剂顺序。

C. Kennedy 博士(英国 Sussex 大学)报告了固氮细菌 (*Azotobacter chroococcum* 和 *A. vinelandii*) 中固氮和吸氢的遗传分析。应用对突变种的互补作用和生化分析, DNA 杂交和顺序分析,已经鉴定了固氮细菌中固氮酶和氢酶所必需的基因。 *nif* 基因包括那些为常规的含钼固氮酶所需的,以及某些与含钼固氮酶有关。鉴定的其他基因涉及到这两种固氮酶活性表达的调节。 *A. chroococcum* 中的氢酶系统已用三类突变种作了分析,它们可以互补并可用克隆的 DNA 修正。这些克隆的 DNA 与 *Rhizobium japonicum* 中已鉴定的 *hup* 基因相当一致。

丝状的蓝细菌(蓝藻)含有进行正常光合作用的营养细胞和主要固氮作用的异形胞。当蓝细菌培养在有氧环境中又耗尽了结合态氮时,这种特异化的异形胞会以一定的间隔出现在蓝细菌的丝状体中。异形胞可为固氮创造一个厌氧环境。一般异形胞是从营养细胞分化而来的。R. Haselkorn 博士(美国 Chicago 大学)介绍了他们实验室关于蓝细菌异形胞分化中 *nif* 基因的重新排列的研究。 *Anabaena* 营养细胞 DNA 中, *nifD* 是编码固氮酶 α 亚单位的,它被插入了一个含有 11000 碱基对的 DNA 片段。当从营养细胞分化成异形胞时,这个 11-Kb 的片段为位置专一的重新组合所切去。这种重组是在这个片段的两端的、直接复制的短 DNA 顺序之间进行的。这种切除恢复了 *nifD* 的编码顺序和完整的 *nifHDK* 转录单位。在 11-Kb 片段中已经鉴定出一个基因,它可能负责编码那个与切除这个片段有关的、位置专一的重组酶。在 *Anabaena* 中还观察到第二个调节重排列的基因,它存在于 *nifs* 附近,包含着另一套复制顺序。这种观察表明,这里有另一个位置专一的重组系统。

固氮螺菌 (*Azospirillum*) 属的细菌是自由生活的固氮生物,它们可以从牧草的根或根部得到。法国巴斯德研究所的 C. Elmerich 博士用 *A. brasilense* Sp7 作了固氮的遗传分析。他们克隆了一个含 25Kb、包含固氮结构基因 (*nif* HDK)、*nifE* 和 *nifV/M* 的 DNA 片段。此外,与 *nif* 调节有关的谷氨酰胺合成酶的结构基因也已被克隆和测定了顺序。为了鉴定与根集群过程有关的细菌基因,与 *Rhizobium* 结瘤基因 (*nod* 和 *hsn*) 进行了 DNA-DNA 杂交。测定了同源性,并分离了含有与 *hsn* 基因同源的 DNA 片段的克隆。 *Azospirillum* 含有大的质粒,初步结果表明,与 *hsn* 同源的 DNA 区域定位于 Sp7 品系的 90MDa 质粒上。

根瘤菌与豆科植物共生关系的复杂性 根瘤菌 (*Rhizobium*) 和豆科植物之间的共生是复杂的。这种

复杂性反映在侵染过程中双方在形态上和生化上的分化,也反映在寄主植物和细菌中许多基因是专一地参与固氮根瘤的形成。英国 John Innes 研究所的 A. W. B. Johnston 博士报告了后一方面的研究,也介绍了这种共生的分子生物学与遗传学的最近进展。对寄主植物已经分离出几类突变种或自然存在的变种,其中有些不能结瘤,有些可结瘤但不能固氮,还有一些产生比正常的多得多的根瘤。然而尚未对这种缺陷的生物化学基础作过分析。有一种新的途径是鉴定“成瘤素”(nodulins),这是寄主在根瘤中专门合成的一类多肽。几个与这类成瘤素有关的基因已被克隆和分析,在某些情况下(例如豆血红蛋白、谷氨酰胺合成酶和脲酶)一种特殊成瘤素的功能已被确定。在分析 *Rhizobium* 共生基因方面,已证明有几个为固氮所需的基因是与 *Klebsiella pneumoniae* 中已定义的 *nif* 基因是同源的,从而有助于对它们的分离和分析。在许多快速生长的 *Rhizobium* 种类中,这些 *nif* 基因在大的“共生”质粒上,并与结瘤与决定寄主专一性的基因相连接。这些 *nod* 基因已在几种 *Rhizobium* 中作了详尽的研究。在这个实验室中,已测定了八种 *nod* 基因的顺序,以及突变对它们的影响。十分明显的是 *nod* 基因的顺序与它们的相对定位是高度保守的,甚至在不同寄主范围内也是如此。虽然大多数 *nod* 基因的功能尚未确定,但已知其中一种 *nodD* 是可调节的。在 *R. leguminosarum* 中, *nodD* 在正常介质中即可被转录,但是另外两种 *nodFE* 和 *nodABC1J* 在高水平上(比背景高 70 倍)才可被转录,这种诱导取决于 *nodD* 的存在。与这种诱导有关的化合物是各种黄酮和黄烷酮。由植物产生的另一些化合物可以拮抗这种 *nod* 基因表达的诱导。美国和澳大利亚的学者还证明,当 *nodD* 和某些类黄酮存在时,大多数 *nod* 基因才发生诱导。

豆科植物-根瘤菌共生体系的固定氮和利用氮也是复杂的。它涉及共生体相互作用的过程及有关基因,寄主植物在 *Rhizobium* 侵染时合成的豆血红蛋白与其他蛋白(如成瘤素)的作用以及共生固氮产物的同化。美国 Oregon 州立大学的 H. J. Evans 教授报告了关于少数 *Rhizobium* 品系进行的与固氮有关的,氧化固氮时产生的氢的生物化学和分子生物学。用离体实验已经证明了氢再循环的潜在好处;但是豆科植物的生长试验比较能与不能再循环氢的品系,得到了矛盾的结果。作者认为利用 *Bradyrhizobium japonicum* 再循环氢品系作为大豆的接种物,所增加的固氮量是肯定的;而许多实验是得到了无源吸力的结果,他们利用的接种物不是等基因的品系。最近 *B. japonicum* 中氧化氢所需的基因已被克隆,并已转移到缺乏再循环氢能力的种类中得到了表达。已分离出一个 DNA 的片段,它包含有 *B. japonicum* 氢酶的 60000 和 30000KDa

亚单位的结构基因。已经在除去了内源产生过氧化物的根瘤中,测出了一系列酶促反应。在这种系统中,电子从还原的 NADP 传递到过氧化物,其通过的途径中包括谷胱甘肽还原酶、去氢抗坏血酸还原酶以及抗坏血酸过氧化物酶。这后两种酶的活性以及根瘤中谷胱甘肽的含量,在根瘤形成的早期与大豆固氮速率成正相关。这个由寄主植物产生的成分所催化的过程似乎是不稳定的固氮酶系的重要保护机构。

从 1972 年首次把 *nif* 基因从 *Klebsiella pneumoniae* 转移到 *Escherichia coli* 中,组建了固氮生物以来,把 *nif* 基因放入一个异己的原核生物环境中已成为常规的操作。许多 *K. pneumoniae nif* 簇的基本遗传学是以 *E. coli* 作背景来阐明的。英国 Sussex 大学的 Potgate 教授在“在异己环境中的 *nif* 基因”报告中指出,把基因转移到新的种或属可了解 *nif* 基因的稳定性,特别是有关它们表达的条件。他举例说明 *nif* 部分表达或根本不表达的接受者是特别有用的。新组建的原核固氮生物为实际应用提供了一线希望,然而它们的组建应对组建真核固氮生物预期发生的问题要提出预先警告,同时也可能对固氮生物的进化提供线索。

未来的研究和应用 在“未来研究和应用的目标”专题中的三个报告涉及蓝细菌、豆科植物和合成系统的进一步研究和应用。英国 Dundee 大学的 W. D. P. Stewart 教授指出,由于蓝细菌是一类放氧的光合固氮生物,它是一种潜在的不依赖于化合燃料的生物氮肥来源。近年来已更多地注意选择品系以增加农业生产率。他们实验室的基础研究着重于探索自由生活和共生蓝细菌中氮同化、固氮和氮调节。现在他们正在基于这些基础研究结果作应用研究。

澳大利亚 Murdoch 大学的 M. J. Dilworth 博士在“现在到哪里去?”的报告中指出,虽然理论上对固氮

过程的研究已取得了迅速的进展,但是这些进展很少应用于实践去提高作物的产量,因此我们未来的研究方向应该强调应用。然而困难之一是怎样来应用我们新技术去创造的固氮系统或共生体,以及改善目前存在的固氮生物。在豆科植物研究中,这方面还是行动迟缓的。他建议考虑下述问题:

i) 在操纵 *Sym* 和 *nif* 基因表达能力上,我们将作些什么?

ii) 豆科植物根瘤菌对酸的忍耐性是一个主要问题,什么是发展这种忍耐性的条件,怎样能了解它并开发它。

iii) 豆科植物根瘤菌的固氮作用取决于寄主植物供应的二羧基,可见根瘤受寄主的控制,如果大量供应二羧基能改善固氮吗?还有其他底物可大量地用于促进根瘤菌吗?

iv) 现在已知有另一种固氮酶;它能在现存或新创造的固氮系统中用得更好吗?

人工合成的固氮系统包括从简单而有效到复杂而精致的各种类型。美国加州西部地区研究中心的 W. E. Newton 博士介绍了这些系统的现况,其中包括钛系统、钛-钼系统、钒系统和光化学系统等,既有纯粹的化学氧化还原,又有对生物固氮系统的模拟。他讨论了它们的催化特性、能量需求和潜在的应用目标。在生物学方面将着重于固氮酶系统及有关过程的模型化,较新的研究是关于它的溶性中心,铁-钼辅助因子的氧化还原及其协调性。在非生物系统中,将研究 N_2 在空气中的等离子诱导氧化以及一些新合成的化合物,这将在不同程度上模拟自然系统中的结构和反应。

【中国科学院植物研究所 施定基
于英国伦敦大学英皇学院】

(上接第 80 页)

某些致癌的动物病毒中发生,并已在人类的肿瘤中发现了它们的激活态。因此,对各类生长因子的研究有重要的理论价值和不可估量的实际意义。

参 考 文 献

- [1] *Science* **31**, 543, 1986.
- [2] *Trends in Neurosciences* **9**, 570, 1986.

【生物物理研究所 肖悦梅 编译】