



世界农业
丛刊

生物固氮译丛

(三)

农业出版社

生物固氮译丛

(三)

尤崇杓 主编

农业出版社

世界农业丛刊
生物固氮译丛(三)

尤崇杓 主编

• • •

责任编辑 李永庆

农业出版社出版(北京朝阳区枣营路)
新华书店北京发行所发行 北京市密云县印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 8 印张 198 千字
1988 年 2 月第 1 版 1988 年 2 月北京第 1 次印刷
印数 1—1,200 册 定价 2.00 元
ISBN 7-109-00120-2/S·85

目 录

固氮的生物化学.....	W. G. Zumft (1)
固氮细菌中 N_2 和 NH_4^+ 同化的调节和途径.....	D. Kleiner等 (9)
ATP在固氮酶机理中的作用证据:	
关于金属与核苷酸络合MoFe蛋白的质子核磁共振弛豫效应的研究	
.....	S. J. Kimber等 (15)
固氮作用的生化遗传.....	W. J. Brill (26)
根瘤菌的遗传学和遗传分析.....	A. A. Baev等 (36)
豆科植物的识别机理及感染过程.....	T. V. Bhuvaneswari (46)
豆科植物氮再循环的现状.....	H. J. Evans (57)
细菌与热带禾本科植物根联合固氮作用的评价.....	P. Van. Berkum等 (67)
水稻土中的异养固氮作用.....	T. Yoshida等 (87)
异型胞中的固氮作用.....	P. Fay (100)
直接测定圆褐固氮菌 (<i>Azotobacter chroococcum</i>) 的呼吸作用、氢酶和固氮酶	
活性间相互关系的质谱法.....	P. A. Lespinat等 (118)
固氮巴西螺菌 (<i>Azospirillum brasilense</i> sp. 7) 培养中体内固氮酶和氢酶活性	
的质谱动力学研究.....	Y. M. Berlier等 (120)

固氮的生物化学

W. G. Zumft

1. 引言

关于 N_2 还原代谢途径的生化研究已获得了大量的资料。在此, 仅提出有关酶本身研究的近期结果。作者在1975年和1976年对这一问题已作了两次详尽的讨论, 至于与许多权威性评述相同的内容, 此文拟不再赘述。两年一次的固氮会议文献汇编是重要的资料来源。此外, 还有三本专著提供了酶在化学和物理化学领域外的较全面的信息。最近关于钼是氮还原作用中的重要微量金属元素的化学问题亦已汇编成册, 在许多个人的评述中也包含了这方面的内容。

2. 酶及其它组分

固氮酶曾被酶学委员会看作为还原的铁氧还蛋白: 固氮氧化还原酶 (ATP——水解作用) [E. C. 1.18.2.1] 现在已分离得到。固氮酶的两个组分现在称为固氮酶还原酶 (通常称为铁蛋白) 和固氮酶 (通常称为钼铁蛋白)。这一命名将在催化作用一节中论及。

最近补充描述了有关固氮酶组分的特性, 即有关圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*)、多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*)、自养棒状杆菌 (*Xanthobacter autotrophicus*) 的固氮酶组分的特性, 首次鉴定了蓝细菌柱胞鱼腥藻酶的主要特性, 证实了有关酶的高度保守性。到目前为止, 对固氮酶的修饰仅包括了三种光合细菌和非光合细菌中产脂螺菌 (*Spirillum lipoferum*) [见后]。在生态学上从桉木根瘤菌中得到无细胞固氮酶的活性是一个突破。这种根瘤是由 *Frankia* 类型的放线菌引起的。其它被认为具有生化影响的主要菌种, 是甲烷氧化细菌和杆菌属中单一的固氮菌种硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*), 这些菌至今尚未进行无细胞系统的研究。在以前认为不能固氮的假单胞菌属中, 也报道了其中一种能够固氮。生长在温泉中的绿藻也有类似现象。

实际上所有固氮酶的分离过程与常用的方法相似, 只是在氧的作用下因蛋白极不稳定而遭到破坏。最近为了试图减轻这种氧的危害, 在乙二醇存在和零下低温时, 采用免疫吸附层析法, 使固氮酶的纯化方法得到进一步发展。但是这种方法还有待于其它实验室的确认。专性好气的棕色固氮菌的酶复合体在与低分子量的铁硫蛋白结合时, 具有“氧稳定”的特性 (在空气中 $t_{1/2} > 4$ 天)。

不同有机体固氮酶组分的体外重组形成了异种互补。Emerich 和 Burris (1978) 进行了广泛的酶互补的研究。用 8 种纯化的或接近均一的固氮酶组分进行了 55 个组合的 (可能是 56 个组合) 种间互补, 并分析了酶的活性。发现在 49 个组合中两组分形成了复合体, 其中 45 个组合具有全部或部分的酶活性。这些互补中有专性好气的和专性厌气的、光合的和共生的细

菌，以及微好气的和兼性厌气的，它们都显示出酶在进化过程中具有高度稳定性。在无活性的互补中总是含有巴氏梭菌的一个组分，说明了它的固氮酶在体内必定具有不同的结合特性。然而巴氏梭菌和柱胞鱼腥藻、巴氏梭菌和肺炎克氏杆菌间的互补反应具有催化活性。异种复合体的活性依赖于pH、组分比、蛋白浓度，这些因素在同种固氮酶重组中也具有一定的作用。这些异种互补即使无活性也同样提供了有关固氮酶的准计量、电子传递体的性质、限速步骤、ATP作用等方面的资料。他们对肺炎克氏杆菌和圆褐固氮菌、肺炎克氏杆菌与巴氏梭菌之间的互补以及棕色固氮菌与巴氏梭菌间所形成的无催化活性的复合体也都进行了机理方面的研究。

铁蛋白的分子量约为60000〔包括辅基在内的梭菌铁蛋白氨基酸组分计算为57674〕，即约为钼铁蛋白的1/4。在溶液中两个相同的亚基紧密地结合在一起构成蛋白质单体。已经确定了铁蛋白亚基的一级结构，其具有273个氨基酸残基。但尚未揭示其与细菌铁氧还蛋白间的联系（现已不使用固氮铁氧还蛋白的名称了）。分子中含有6个半胱氨酸残基，它们随机分布在氨基酸链中，而与铁硫簇相结合的半胱氨酸残基的位置保持一定。蛋白中也有许多二次或三次重复的氨基酸顺序。

钼铁蛋白的分子量略高于200000，它是由4个亚基聚集而成的。通过肽谱和末端顺序法确定了肺炎克氏杆菌、棕色固氮菌、巴氏梭菌中钼铁蛋白的组分，其分子结构为 $\alpha_2\beta_2$ 。仅用SDS电泳得到的结论是不足以确定钼铁蛋白的4级结构的。通过电泳或先进行预处理再经离子交换层析可以大量地分离亚基。梭菌中 α 亚基尽管仅含有3个色氨酸残基，但仍能通过光谱，很容易地与较小的 β 亚基（不含色氨酸）区别开来。

3. 铁 中 心

铁蛋白的化学分析与光谱研究能够提供令人信服的有关辅基中铁—硫特性的证据。

每个铁蛋白二聚体都含有4个铁原子和等量的无机硫。确定铁—硫结构的好方法是铁硫簇置换或挤出法。用硫醇置换铁硫中心并用已知簇和挤出物进行光谱比较，证明了可以从蛋白质中挤出接近全部的铁，以及铁蛋白中存在的一个 Fe_4S_4 簇。由于铁蛋白的两条多肽链是相同的，因此除非铁硫簇在生物合成嵌入中一开始就是不对称的以外，铁硫簇总是等量的与两条链结合，并保持分子的对称性。从结构和准计量上看，梭菌铁蛋白是一个单电子载体，如果与梭菌氧还蛋白相比较，后者在结构上是一个单电子载体，但总共传递两个电子。

Orme-Johnson对来自不同种的铁蛋白的EPR谱的低积分（0.2~0.45自旋/毫升）已作了详尽地讨论，他特别指出了第二个顺磁中心。肺炎克氏杆菌EPR谱的计算机模拟预示了存在另一个中心，如果确实的话，它的性质尚有待确定。

Thorneley等（1976）发现圆褐固氮菌在动力学反应阶段中有第二个电子运输给铁蛋白，然而解释它并非是一个物理过程。亲和法（如核苷酸、染料配位体或铁氧还蛋白的基质）已应用于铁蛋白的纯化，用以获得全部金属中心。用向菲罗啉磺酸盐除去梭菌中具较高催化活性的铁蛋白（ $1.7\mu\text{mol}/\text{分钟}/\text{毫克蛋白}$ ）中的铁，证明了只有略超过一半的蛋白是呈活性态的。

尽管对于这种极不稳定的铁硫蛋白（梭菌铁蛋白在空气中的 $t_{1/2} \approx 20$ 秒）的低积分值和可运输电子的总数（最终与铁有关）的数据分析还存在某些不同看法，但是现在仍然将铁蛋白作为单电子传递体、其具有一个 Fe_4S_4 簇、可能在 $(\text{Fe}_4\text{S}_4)^{2+}$ 和 $(\text{Fe}_4\text{S}_4)^{3+}$ 间摆动、有两个

MgATP²⁻结合部位、准计量为每水解2摩尔ATP传递1摩尔电子等等,这些现象都综合在当前对固氮酶催化的知识中。

钼铁蛋白铁硫中心的性质则更为复杂。特别是这个组分中包含有混合的铁钼中心。在用定量穆斯鲍尔谱进行的对生物结构的研究中,钼铁蛋白是一个好例子。用这一方法来确定铁的环境要精确2%以上^⑧。在光谱上有区别的四个组分中有三个在物理学上作为可分离的铁硫簇,它分成4个Fe₄S₄簇(称为P簇),两个属于混合型簇(称为M簇),较小的1个称为S簇。这些工作提供了确凿的证据,证明了钼铁蛋白中铁原子的数量为30±2。Fe₄S₄簇中铁原子具有两种类型的光谱,比例为1:3,而且在电性方面与细菌铁氧还蛋白的Fe₄S₄簇略有区别。这在圆二色散特征谱上也是明显的。尽管P簇为蛋白环境所修饰,但仍然能够用硫醇将它挤出,并证明是Fe₄S₄簇结构。一种可行的方法是用o-二甲苯-a, a'-硫醇将簇挤出,随后用P-三氟苯甲基硫醇配位置换,再与合成的标准模型物的¹⁹F NMR谱的化学位移相比较确定簇为Fe₄S₄。十分有趣的是不能通过硫醇将钼铁蛋白中的钼铁硫复合物(M簇)挤出。除了穆斯鲍尔谱对铁硫簇的证明以外,在CO抑制固氮酶的瞬间态中也能观察到EPR信号,这与低分子量的铁硫蛋白的EPR信号相似,并且很有可能这个信号并非由M簇所引起。

4. 铁钼辅因子

可以用酸处理钼铁蛋白将其中低分子量化合物中的钼提取出来。由于这个领域的研究进展在早期有关梭菌中钼铁蛋白中钼组分的分离的论文中已有论述,所以尽管它实际上可能是辅基部分,但还是把固氮酶中含钼部分叫做辅因子。在所有含钼酶中关于钼辅因子的可互换性假说没有相反的实验证据,并已将固氮酶和其它含钼酶区别开来。不能合成含钼辅因子的钼铁蛋白的钼化合物缺陷型的突变种已经分离出来,它可用于溶剂提取低分子量钼辅因子的试验系统,而且可以预计到它在生物无机化学这一领域中迅速发展的重要性。

连二亚硫酸盐还原的钼铁蛋白的EPR特征信号(用这种谱甚至可以鉴定在整体细胞内的固氮酶)是S=3/2系统,这是铁钼辅因子引起的。钼铁蛋白含有两个这样的辅因子,假设它的中心组成为MoFe₆S₆。(光谱和分析数据与这并不一致)。铁钼辅因子至少包含了30个铁原子中的12个,并且代表了一种新的结合的钼—铁—硫簇。

从酸碱处理的梭菌钼铁蛋白中已分离得到具高度特征光谱的钼化合物,最近确定为钼的4-或3-硫醇复合物。这些化合物的分离条件不允许天然蛋白的残基再合成,从而得出结论,钼铁蛋白含有一个与铁硫簇结合的钼的4-硫醇化合物。剧烈的分离步骤仅留下钼周围的核心结构,没有完整的铁硫组分,这导致了在突变种试验中重组能力的丧失和乙炔还原活性的丧失。用硼氢化合物不能使铁钼辅因子在原位上还原乙炔(已证明单独的钼铁蛋白没有活性),然而一旦从蛋白中分离出来,其产生的活性为完全固氮酶系统的8%(按Mo计算)。与固氮酶不同,应用BH₄⁻铁钼辅因子也能还原环丙烯,但只能形成环丙烷而没有丙烯。

随着X射线吸收光谱在实验和理论中的发展,钼铁蛋白成为第一个金属蛋白予以检测。钼的吸收边能约为2.015V,尤其是扩展吸收边精细结构(EXAFS)可以提供有关吸收原子、数量以及在吸收剂第一配位体内的原子距离等信息。可是这种方法不能提供有关空间排列和略超出第一配位体范围的信息。这是一种迂回的方法,在试图设计模型或在用蛋白质来

与模型化合物相比较时，必须记住这一点。近来确定的黄嘌呤氧化酶和其它含钼酶的钼辅因子为喋啶衍生物就是一个显著的例子。

对巴氏梭菌和棕色固氮菌的钼铁蛋白及其分离出的铁钼辅因子进行了X射线吸收谱的分析，三种物质的光谱极为相似，并得出如下结论：钼与3个或4个硫原子相配位，其间距为2.35Å，有1个或2个硫原子相距略远些，2个或3个铁原子距离为2.73Å。

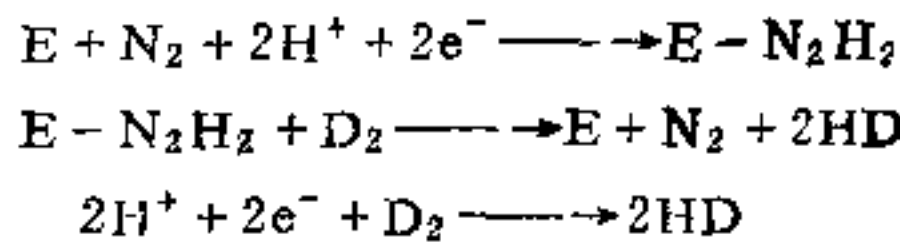
已分离出来的铁钼辅因子具有氧化还原活性，它可被染料氧化，并且也能被连二亚硫酸盐所还原。假设通过光还原反应可获得全还原态，即EPR—静止态（也称为超还原），但至今尚不能做到，相反在光反应系统中用EDTA作为还原剂则呈EPR—静止态。向已分离的铁钼辅因子中加入苯磺酸，它的EPR信号峰变陡，与天然的钼铁蛋白谱更为相似。

$[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_9(\text{SC}_2\text{H}_5)_9]^{3-}$ 或 $[\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_9(\text{SPh})_9]^{3-}$ 是合成的类似于铁钼辅因子结构的立方烷铁硫簇。和上面模型物一样，在这些复合物中一个钼原子在簇的角上取代了一个铁原子，并且通过3个外加的硫配位体桥联到第二个相同的簇上。这些复合物的EXAFS数据与天然钼铁蛋白的数据极为相似。开放式模型（上右）也已合成，它呈 $(\text{Ph}_4\text{D})_2[\text{Cl}_2\text{FeS}_2\text{MoS}_2\text{FeCl}_2]$ 复合物形式。另一种只含有 MoS_4 核心的较小单元，与一个 FeS_2 基因相连 $[(\text{S}_5)\text{FeS}^2\text{MoS}_2]^{2-}$ ，它与酸/碱处理的梭菌钼铁蛋白在光谱分析上极为相似。从这种复合物中可获得硫醇复合物。另一个尝试是把目前可利用的数据汇集在一起构成一个适宜的模型，所以提出这样一个结构，它通过钼的4-硫醇单元与 Fe_4S_4 簇相接。

5. 催化作用

固氮酶底物的多样性有利于对这种酶进行全面的实际的研究。可选择的底物主要发现在六十年代中期。其中乙炔更为有用，这是由于它很容易被固氮酶还原并且容易分析。除了母体化合物以外，尤其是腈、异腈和炔系物方面所有底物的还原是非常缓慢的，它与氮的还原速率相比要低几个数量级。丙烯仍能还原，但丙烷则不能被还原活性部位所接受。环丙烯是最近新补充的固氮酶底物。提纯后的酶、整体细胞以及分离出的铁钼辅因子都能迅速地将环丙烯还原。由于人们对还原作用的立体化学感兴趣，所以它还可以用作为固氮酶和铁钼辅因子活性部位的探针。在 $^2\text{H}_2\text{O}$ 中，多于90%的环丙烯形成〔顺式-1,2- $^2\text{H}_2$ 〕，如果可能的话，反式异物体将少于5—10%。但是丙烷的形成则不能说明具有这种高度的立体选择性，因为所得到的〔反式-1,3- $^2\text{H}_2$ 〕丙烷，〔顺式-1,3- $^2\text{H}_2$ 〕丙烷和〔2,3- $^2\text{H}_2$ 〕丙烷的比例为2:1:1。

曾一再提出，二氮杂苯和胼在氮还原作用中，是作为与酶结合的中间产物。用对二甲基氨基苯醛反应鉴定了在氮气下（而不是在氩气下或用氰化物作为底物时）完整的固氮酶系统中加入酸或碱可形成胼。初期酶结合的中间产物主要还是胼，它是在水解过程中形成的。这一发现启示了有可能存在二氮一氢化合物作为中间产物。随着氮还原作用中二氮杂苯—胼途径的进一步证明，将证实Bulen发现的胼是固氮酶的底物。通过对固氮酶形成的HD的详尽研究提出了在二氮杂苯水平上存在中间产物的间接证据。弄清固氮酶催化“交换”反应的关键是HD的形成需要电子这一事实。流经氮（固氮条件下）、氩（放氢条件下）以及氮加氢（固氮但抑制氢的条件）中全部电子均保持恒定。在 D_2 存在时，可用形成的产物来说明全部电子流，电子流的恒定性仅能从一个电子分配给另一个形成HD分子的事实来加以证实。从机理上看，电子的分配是根据下面设想的二氮杂苯为中间产物的方程提出来的。



存在一个耗能的和消耗还原物的无效循环过程是这一机制的特征。如果存在这种无效循环,那末对于在氢和氮中自生长的氢细菌将会产生明显的影响。一般由有机体提供一个分子来抑制这个反应是不可能的。氮的还原与氢的形成之间的普遍联系都说明与此相反。固氮酶的活性部位由于产生氢阱而起到了间接的保护作用,这是由氢酶在能量代谢和氢的再循环作用外提供的。由于固氮酶在被氢抑制时需要电子传递和ATP水解,所以对于氢分压(pH_2)改变时氢细菌会有什么影响方面有以下几种预想:较高氢分压可导致氢酶水平或活性的提高。当固氮酶反应ATP/ $2e^-$ 比例下降时,需要供给细胞更多的能量。为了补偿能量增加的需求,氮气下生长的自养菌对氧的消耗也随着较高的 pH_2 而增加。因此这些结果可简单地被认为:一旦 pH_2 提高到超过这些菌的调节能力,必然导致对自养细菌的抑制作用,而对于以氮作为氮源生长的细菌则没有这种影响。尽管选择某些单一参数来解释这种状况是可能的,但反应仍支持以上在细胞水平上对于氢机制解释的论述。文献中少量零碎的数据确实可用来作为支持这一想法的初步证据。

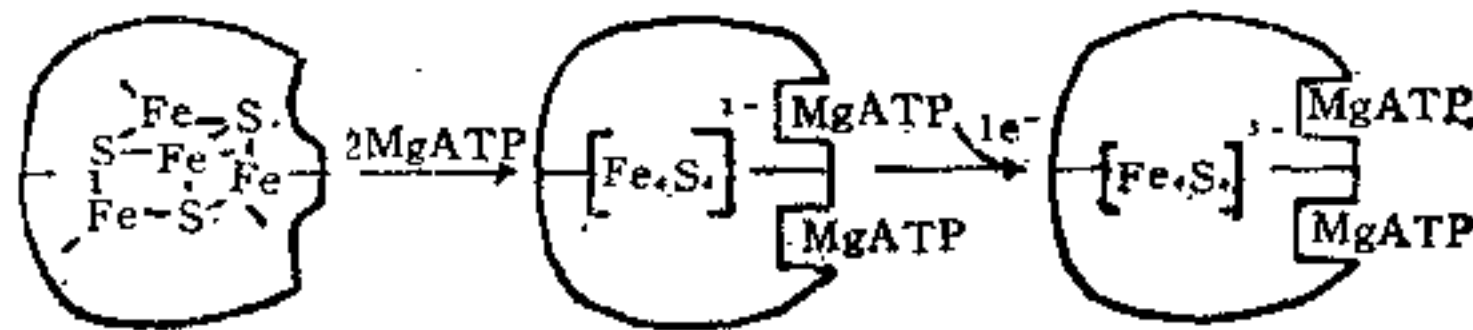


图1 铁蛋白的起始反应简图

图1描述了固氮酶催化作用的起始部位在铁蛋白上。通过凝胶过滤和EPR证实了在铁蛋白上有两个MgATP的结合部位,铁蛋白构型的变化是由于与核苷酸结合所致。在用向菲罗啉磺酸盐研究需核苷酸的铁螯合的速度时,Ljones和Burris的结论提出在铁蛋白构型变化以前,两个ATP结合部位必须占满,并且两个结合部位对MgADP⁻具有不同的亲和力。用质子NMR已证明了Mg²⁺有4个相同的结合部位($K_a = 1.7 \pm 0.3 \text{ mM}$)以及可以形成三元金属蛋白核苷酸复合物。由于这一结论与其它方法所证明的两个结合部位的结论相矛盾,所以提出了结合两个MgATP²⁻分子(每个亚基一个)时,在空间上将掩盖另外两个与金属核苷酸复合物结合的部位。

动力学研究所提供的证据表明,MgATP²⁻的结合是在铁蛋白还原之前。在没有MgATP²⁻存在时,用SO₂⁻使氧化的铁蛋白还原的速率($K > 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$)比在固氮酶催化期间利用SO₂⁻来还原的速率($K = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$)明显大得多。反之MgADP⁻通过连二亚硫酸盐来抑制氧化的铁蛋白的还原。不同的速率说明,在铁蛋白中存在限速的构型变化,尤其是在稳态期间当大量的氧化态存在时,快速还原作用受到了限制。

从铁蛋白到钼铁蛋白的电子传递需要先形成复合物。普遍的看法是,在这种复合物中电子传递是与ATP水解作用密切相连的。用铁蛋白滴定钼铁蛋白或反过来滴定,都可依据结合比1:1和2:1(铁蛋白/钼铁蛋白数)的稳定的和瞬间的复合物来加以阐明。试验数据与假设的两个固氮酶组分的瞬间复合物是相符合的,具有1:1和2:1两种有活性的复合物。从放氢所显示的酶变率延迟期这一事实可得出结论:每传递一个电子后,这种复合物

即分离，而ATP水解从反应开始呈线性。发现这一延迟期的出现，是由于钼铁蛋白而不是由于铁蛋白。在这一延迟期中，钼铁蛋白的EPR信号下降，这就反过来表明在形成瞬间复合物时电子从铁蛋白随机地被传递给钼铁蛋白分子的库中。根据这一概念，铁蛋白只不过作为钼铁蛋白的还原酶，而钼铁蛋白的作用是底物的还原。这一争论证实了上面提到的固氮酶组分的新命名法。然而在这里仍沿用习惯命名法。

电子传递与ATP水解的直接联系已从预稳态时磷酸盐释放与铁蛋白的氧化（在420nm下用分光光度法跟踪）的相同速率中得到证明。棕色固氮菌固氮酶每传递两个电子，其ATP分子水解的最低数量为4。这一数值也为肺炎克氏杆菌中的酶所证实。ATP/2e⁻的比率受温度和pH的影响很大，以致在低温和低pH条件下电子传递与ATP水解不偶联。ATP是固氮酶催化必不可少的，所以近20年来这一课题一直吸引了许多研究人员。一度曾设想出各种各样的机理，其中大多数都认为通过ATP的水解作用负自由能变化的积累形成了一种高还原状态。这一假说近来得到了进一步的阐述。

尽管一直缺少可利用的数据，但固氮酶催化部位肯定是可以从电位观点来加以理解的。如果对固氮酶采取严格的电位观察，那么无论什么时候只要一达到酶所需要的低电位氧化还原态，则都会使底物还原。在这一机制中，其它固氮酶反应的必需物（包括ATP）仅仅是为了获得较低的氧化还原态。与通常认为的ATP降低氧化还原电位相反，还有人提出它的作用在于相反的一面，即提高氧化还原电位到不太低的负值以允许电子在两个组分之间传递。氧化的和还原的假设都是根据能量转换的氧化还原系统这一相同的概念。

Stiefel (1977) 提出的还原态具有极低的氧化还原电位是合理的。他确认如果二氮杂苯是固氮酶还原作用的中间产物，那么电位是在-1.0V附近。铁蛋白氧化还原电位在-0.3V附近（其ATP复合物形式则为-0.4V——这一变化很可能是溶剂对氧化还原基团的影响，也许这并不是所有铁蛋白的性质）。它不会还原氧化还原电位低于-0.4V的还原态，很可能存在一个高的还原态确实是固氮酶催化的部分，这是由于测量到的临界电位约-0.4V，而一旦高于-0.4V就没有固氮酶活性。然而，尽管铁钼辅因子的氧化还原电位尚未测出，但它存在着一个所谓“超还原态”，用于将底物还原的电子分配给低氧化还原电位的钼铁蛋白中的氧化态和还原态（等于超还原态）（图2）。由于我们还不知道在金属中心存在的氧化平衡是哪一种类型，所以有意地回避了关于电子供体怎样更准确的分配给钼铁蛋白不同金属基团中哪一个的问题。这种低电位氧化还原对是不容易靠近铁蛋白的电子供体的，所以称为“表观电子接受对”。提出假设的主要条件在于（图2）：ATP给氧化态的钼铁蛋白提供能量从而提高氧化还原电位。这一过程产生了有效的电子接受对，即给氧化的——

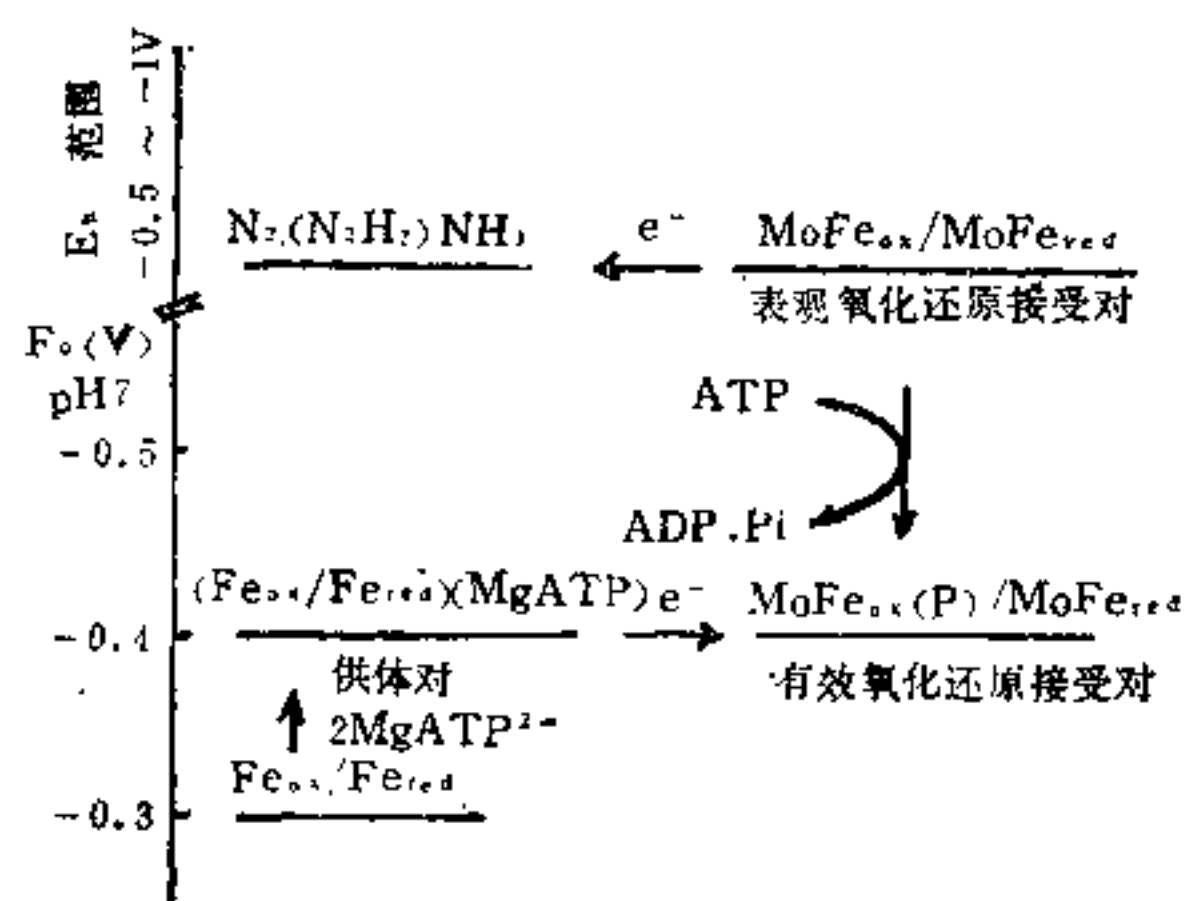


图2 ATP在固氮酶催化作用中作用的模式

MoFe_{ox}: 钼铁蛋白氧化态 MoFe_{red}: 钼铁蛋白还原态

还原的(超还原的)钼铁蛋白提供能量，铁蛋白提供它的同电位电子。这里使用的“氧化的钼铁蛋白”一词与连二亚硫酸盐还原态(也叫半还原态)或染料氧化态是同义的，因为这一概念包括生理的氧化还原循环中所显示的两种形态。钼铁蛋白的能量供给可以设想为瞬间的磷酸

化（通过钼铁蛋白磷酸交换至ATP，在这个方面是十分有趣的，还有在梭菌的钼络合物中存在磷）作为一种构象变化或作为两种结果的结合。由于所提出的钼铁蛋白超还原态和供能态是短寿命的，所以研究它或用实验证明这个还原的假说将是困难的。更多的有关在钼铁蛋白上ATP的相互作用的证据将进一步在探讨ATP作用后才能证实。

6. 光合自养细菌的固氮酶和谷酰胺合成酶

由于光合自养固氮菌的固氮酶在获得最大催化活性时需要一个活化组分，所以给予单独的讨论。许多场合中都将这一附加组分误称为“第三固氮酶组分”。它一旦完成了激活作用，在维持固氮酶催化活性中就不需这一组分的作用了。这一组分不像固氮酶的两个组分那样参与酶的转换，因此它不是氮还原所必需的第三组分。

到目前为止仅有深红螺菌固氮酶的分子参数可以利用。它的钼铁蛋白分子为四聚体，分子量约为230000（用凝胶过滤法测定），然而与所有其它的铁蛋白不同，用SDS电泳观察到两个亚基的分子量分别为30000和31500。无活性铁蛋白的紫外吸收光谱除蛋白质的最大吸收峰外，在没有氨基酸残基的268nm处还有第二最大吸收峰。

最早观察到的光合自养细菌固氮酶的独特性质是它的非线性动力学反应，并且还证明了活性需要锰。在光合细菌的破碎细胞中，固氮酶多数处于无活性形式。用盐溶液冲洗色素膜，可以溶解出某一因子，它作用于铁蛋白并使铁蛋白转变成具有催化活性的形态。以上提到的活化组分也在沼泽红假单胞菌（*Rhodospseudomonas palustris*）荚膜红假单胞菌（*Rhodospseudomonas capsulata*）和非光合细菌含脂螺菌（*A. lipoferum*）中得到其存在的证明。

活化组分还未能提纯到揭示它的分子性质的程度，但从Ludden和Burris的工作中证实了它是一种酶，能从铁蛋白中移走一种类似腺嘌呤的分子。激活过程需要ATP，但它不水解，仅通过构象变化将它移出，从而打开修饰基团的部位。磷和戊糖也是铁蛋白上非蛋白部分，可是它构成了没有AMP和ADP的残基。这无疑地暗示了激活组分的相反方面是将修饰基团加到铁蛋白上而使其钝化。虽然还不存在进一步系统的物理证据，但这一假设已列于光合细菌固氮酶调节的图表中（图3）。

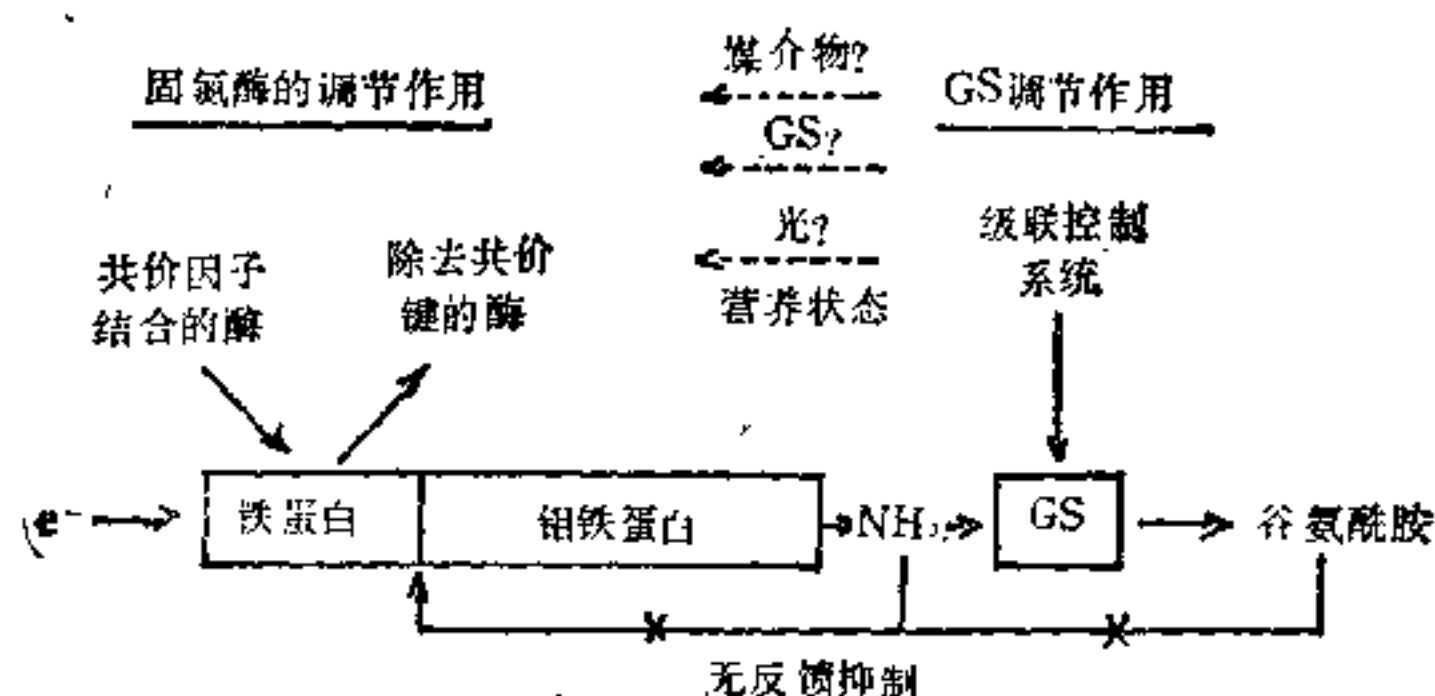


图3 光合细菌固氮酶调节的假设机理
(GS为谷酰胺合成酶)

固氮酶活性调节因子的表达既没有完全弄清也没有完全确定。发现谷氨酸中生长的分离破碎的细胞或氮中生长的细胞内都没有活性。相反“氮饥饿细胞”（即解阻抑固氮酶，但不能固氮和同化氮的细胞，除内部氮能转换外）具有全部的活性，可以得到非正常的固氮酶。

无论是间接的还是更直接的通过关闭光合作用的途径，光在钝化作用中都起着重要的作用。这还有待继续研究它的可能性。

低浓度的氨 ($<5\text{mM}$) 能使固氮酶活性立即停止，这是光合细菌固氮酶所独特的，而棕色固氮菌则可能是例外。我们已考虑到了加入氨时固氮酶的失活现象以及在氨耗尽后固氮酶再活化的“开”“关”效应，并且强调了光合细菌固氮酶是一种可逆的非活化过程的酶。以上所讨论的活化因子就是这一现象的解释。氨同化的关键酶——谷酰胺合成酶，被认为可能是氨和固氮酶活性调节的中间体。谷酰胺合成酶和固氮酶的调节作用，可能是谷酰胺合成酶的级联控制系统将信号传到固氮酶的这样一种相互交织的途径，从而经钝化机制将其关闭。因此在适当的控制信号下，活化组分将再一次活化固氮酶。由于这些问题仍在探索中，所以这些描述仍属推论。由于氨使固氮酶在体内失活时在体外还有活性，所以它需要活化组分来获得最大活性，或者是活化组分不再起活化作用。

要了解两个调节系统之间可能的联系，有必要在光合自养细菌谷酰胺合成酶的分子水平和调节性质方面扩充我们的知识。在沼泽红假单胞菌中谷酰胺合成酶是一个十二聚体的分子，其分子量为670000。十二个亚基在空间上排列成两个堆垛似的六角形，与大肠杆菌和其它细菌中所描述的结构相似。沼泽红假单胞菌中的酶通过腺苷化作用进行共价修饰，这可以从纯酶样品中AMP的移出看到。谷酰胺合成酶的腺苷化及去腺苷化对不同的pH梯度、金属及动力学性质方面的反应都是不同的。在有 Mn^{2+} 存在时，腺苷化态具有最大活性，而去腺苷化态是需要 Mg^{++} 的。当酶处于腺苷化时，谷氨酸盐的 K_m 值提高了5倍。去腺苷化态对于氨和ATP分别有两个 K_m 值，在这些底物反应中，显示了酶存在两种构型。除共价修饰外，沼泽红假单胞菌中谷酰胺合成酶是由丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸负反馈控制的。荚膜红假单胞菌 (*R. capsulata*) 中不完全纯化的谷酰胺合成酶的活化作用通过磷酸二酯酶的处理后也证明了在这个菌中腺苷化/去腺苷化机制是不同的。

除光合自养细菌对于外界氧化反应显示的固氮酶的一个短暂的钝化过程外，还在棕色固氮菌中看到这个现象。在棕色固氮菌中固氮酶活性与谷酰胺合成酶活性是相矛盾的。是近证明氮对于质子驱动力的电子组分 ($\Delta\psi$) 略有影响。通过去除还原当量流可降低约25mV (原初为106mV)，这就完全抑制了固氮酶活性。如果这是固氮酶对氨反应的唯一控制机制，那么将表明在光合自养细菌中具有极为复杂的、特殊的调节系统。因此可以推断，细胞不能调节底物氨的进入，固氮酶的调节作用是有一特殊范围的。因此对于固氮酶的产物氨一定有一个控制信号，然而并不是氨或谷酰胺的简单的反馈 (把它们看作为反馈抑制剂是错误的)，这并不是需还原态氮的其它代谢途径的总和。假设它的调节作用是通过同化系统来操纵的，谷酰胺合成酶的控制使一些特定的代谢信号结合在一起。由于氮对于固氮酶的重要性，因此氮还原中所必需的能量和还原剂，无论是二者之一还是二者同时存在，都能够作为调节的手段。

原载 “Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur” pp. 116—130, 1981.

李继平译 尤崇杓校

固氮细菌中 N_2 和 NH_4^+ 同化的调节和途径

D. Kleiner S. Phillips E. Fitzke

1. 绪 言

固氮微生物能利用各种氮源, 这些氮源主要是无机化合物如 NH_4^+ 、 NO_3^- 和 N_2 。虽然已发现的固氮细菌在生物学上属于极不相同的种, 但是其无机氮同化的主要途径即谷酰胺。谷氨酸和氨甲酰磷酸盐途径在所有菌中都是非常相似的。主要和次要的途径的基本状况将在第一部分概述。

第二部分将讨论一些调节的问题。一种重要的调节作用是降解产物的抑制作用。所有的菌种在结合氮介质中都同化 NH_4^+ (或 NO_3^-), 而不固定氮。一般情况下 NH_4^+ 抑制了固氮酶的合成。

2. 途 径

(1) 自生异养生物

无机氮同化的主要途径综述于下图。部分酶列于表1, 表2是在含 N_2 (固氮酶解阻遏) 或 NH_4^+ 情况下 (固氮酶受抑制) 生长时, 细胞内某些代谢产物的浓度。三种菌研究结果表明, 它们在能量代谢上有很大差别: *Azotobacter vinelandii* (严格好气), *Klebsiella pneumoniae* (兼性, 但在厌氧条件下几乎不固氮) 和*Clostridium pasteurianum* (严格厌氧)。

所有生物的最佳氮源是 NH_4^+ , 在*C. pasteurianum*、*A. vinelandii*和*K. pneumoniae*中已发现有专性载体可通过膜把 NH_4^+ 运入细胞。 NH_4^+ 的吸收是集成的, 已发现 NH_4^+ 在细胞内外的浓度差为100倍。

在*A. vinelandii*和*K. pneumoniae*中发现硝酸/亚硝酸还原酶的偶联作用, 它们把细胞外的 NO_3^- 转化为 NH_4^+ , 但在*C. pasteurianum*中它们却不存在。在固氮条件下*K. pneumoniae* (厌氧生长) 的膜结合复合物把 NO_3^- 还原到胞外的 NH_4^+ , 而*A. vinelandii* (好气生长) 的细胞质复合物则直接产生胞内 NH_4^+ 。

N_2 很可能是通过膜进行扩散, 并为固氮酶复合物还原成 NH_3^+ 。

第一个酶反应的同化产物, 是细胞内的 NH_4^+ 。直到1970年还假设它进一步代谢, 可能主要是直接掺入谷氨酸的 α -氨基, 这是谷氨酸脱氢酶中介的反应 (Glu-DH)。然而, 这个酶仅在*K. pneumoniae*中测出, 它是在大量供给 NH_4^+ 和 NO_3^- 的情况下被诱导出来的, 一般它不存在于*A. vinelandii*和*C. pasteurianum*中。在固氮的条件下的*K. pneumoniae*中它被抑制, 在发现谷氨酸循环后就证实了*C. pasteurianum*和*A. vinelandii*在所有生长的条

件下及*K. pneumoniae*在固氮的条件下,大量的 NH_4^+ 首先掺入到谷酰胺的酰胺基中去,这个需ATP的反应为谷酰胺合成酶(GS)所催化,对 NH_4^+ ,它具有低的 K_m 值(表1)。相反,谷氨酸脱氢酶却具有很高的 K_m 值,因此这个酶不适合于同化由固氮酶作用所产生的低浓度 NH_4^+ (表2)。然而,它可以把谷酰胺的酰胺基当作“活化”的 NH_4^+ ,因为它的传递电位比游离态高14.2焦耳/分子。它能提供外加的热力学驱动力供以后使用。下一步氮的代谢有类似的酶,它们把游离的 NH_4^+ 或“活化”的 NH_4^+ 传递到相同的受体分子上去。转移酰胺基最重要的酶,谷氨酸合成酶是一种类似于谷氨酸脱氢酶的酶。这种酶在所有异养固氮菌中都有,在*C. pasteurianum*中是NAD专性的,而在*K. pneumoniae*和*A. vinelandii*中是NADP专性的。酰胺基转移到 α -酮戊二酸,这就完成了谷氨酸的循环(谷酰胺合成酶/谷氨酸合成酶途径)。

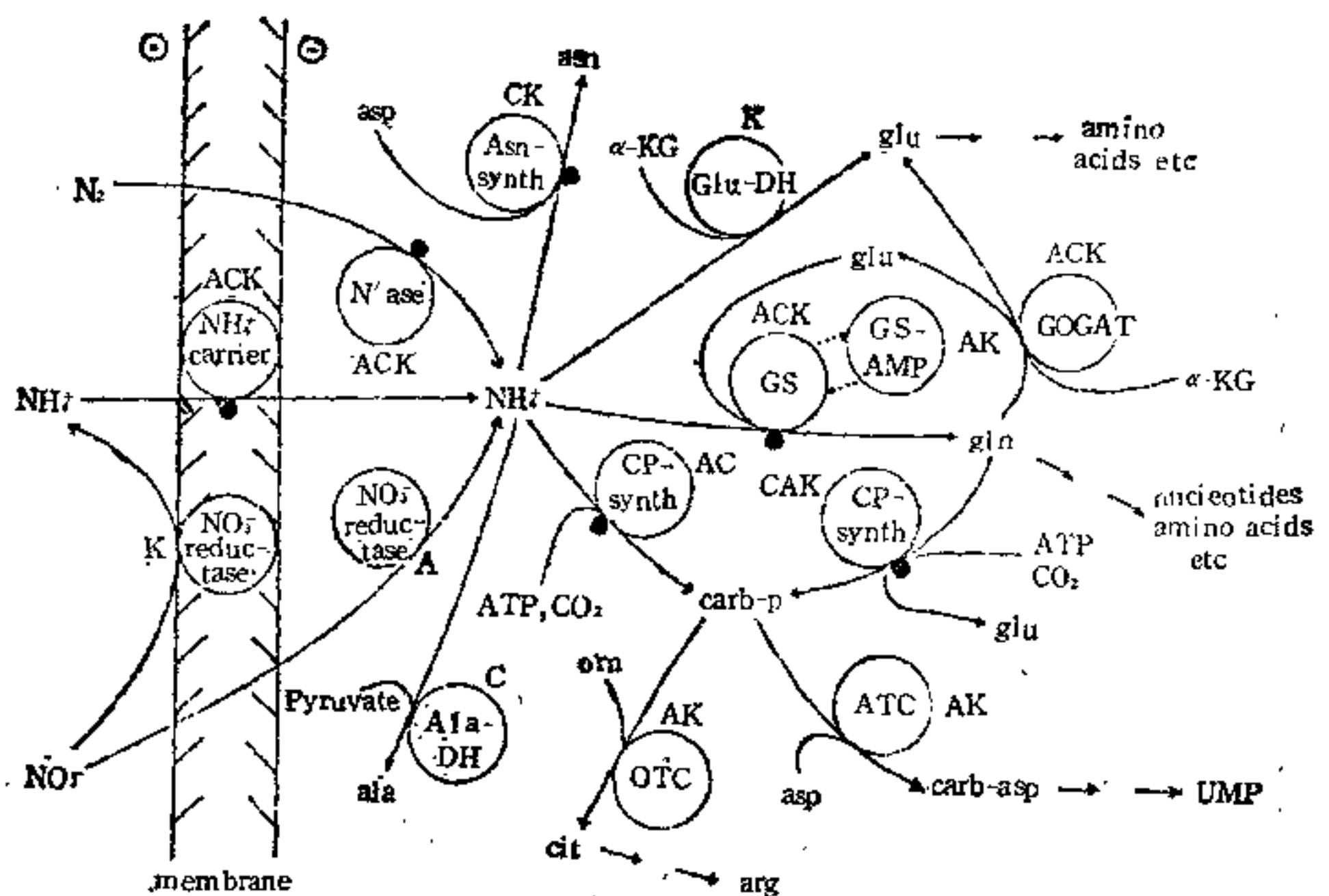


图 *Azotobacter vinelandii*(A); *Klebsiella pneumoniae*(K) 和 *Clostridium pasteurianum*(C) 中 N_2 、 NH_4^+ 和 NO_3^- 同化的主要和次要途径

Ala-DH——丙氨酸脱氢酶; Asn-synth——天门冬酰胺合成酶; ATC——天门冬氨酸转氨酶; Cp-synth——氨甲酰磷酸合成酶; Glu-DH——谷氨酸脱氢酶; GOGAT——谷氨酸合成酶; GS, GS-AMP——非腺苷化的和腺苷化的谷酰胺合成酶; N⁺ase——固氮酶; OTC——鸟氨酸转氨酶; α -KG- α —— α -酮戊二酸; Carb-p——氨甲酰磷酸; 还原当量省略了, 圆圈内为需能反应。

ala——丙氨酸; asp——天门冬氨酸

cit——瓜氨酸; arg——精氨酸;

Pyruvate——丙酮酸;

NO_3^- reductase—— NO_3^- 还原酶; NH_4^+ Carrier—— NH_4^+ 载体。

另一个氮当量分配的主要库是氨甲酰磷酸, 它特别适合于精氨酸和尿苷酸途径。存在着二种氨甲酰磷酸合成酶, 用谷酰胺或是 NH_4^+ 作给体。我们可以用*A. vinelandii*的粗提物证明二者的活性(一个酶有两个专性)。但在*K. pneumoniae*中只有需谷酰胺的一种, Mortenson报道了在*C. pasteurianum*中已发现这些酶。

在*C. pasteurianum*中也测出丙氨酸脱氢酶催化的丙酮酸的胺基化。

我们实验室的研究证明: 在*C. pasteurianum*和*K. pneumoniae*存在需 NH_4^+ 的天门冬

酰胺合成酶，但它不存在于 *A. vinelandii* 中，它的酶可能是需谷酰胺的。

(2) 光自养细菌

Munson和Burris观察到 *Rhodospirillum rubrum* 的固氮培养物吸收胞外的 NH_4^+ 可低于 $1\mu\text{m}$ 。如果我们假定在这种细菌中细胞内 NH_4^+ 的浓度接近于非光合种，而且谷酰胺合成酶的 K_m 值是在这范围内（表1和2），则可以推断活性 NH_4^+ 运输的存在。

Brown和Herbert用几个种的光自养细菌进行了比较研究表明，在固氮条件下，所有的菌都含有高水平的谷酰胺合成酶。在多数种中也可测出谷氨酸合成酶和谷氨酸脱氢酶，但在这些种中，彼此间的核苷酸特性是不同的。

(3) 蓝细菌

目前，尚无关于蓝细菌吸收 NH_4^+ 的研究的报道。弄清这一点将有助于了解在联合共生中 NH_4^+ 释放的机理。

现已确定谷酰胺合成酶/谷氨酸合成酶途径在几乎所有蓝细菌中都是主要的途径，与细菌中的酶不同的是，光合细菌的谷氨酸合成酶需要还原的铁氧还蛋白作还原剂。谷氨酸脱氢酶（大多是NADP—专性的）的水平较低，但某些菌种中含有高水平的丙氨酸脱氨酶，它，在高 NH_4^+ 供应下是 NH_4^+ 同化的主要途径。 NH_4^+ 和需谷酰胺的氮甲酰基磷酸合成酶的活性，二者都曾在 *Anabaena cylindrica* 中测出。

(4) 共生微生物

关于非豆科植物的结瘤作用引起内共生体的 NH_4^+ 的同化，是一无所知的。所以，这里只简述对根瘤菌和蓝细菌的研究。

①根瘤菌 自生根瘤菌是不能由固氮来满足本身所需要的氮，它需要外加氮源。少数几种可利用 NH_4^+ ，而大多数需要谷氨酸。这种需求很可能是由于根瘤菌的膜对 NH_3 有高度的渗透性，导致固定氮的排出。因为根瘤菌像其它的菌一样用一种碱性物质通过膜以保持pH梯度，并根据下式将 NH_4^+ 累积在细胞外面。

$$\begin{aligned} [\text{NH}_4^+]_{\text{外部}}/[\text{H}^+]_{\text{外部}} &= [\text{NH}_4^+]_{\text{内部}}/[\text{H}^+]_{\text{内部}} \\ ([\text{NH}_3]_{\text{外部}} &= [\text{NH}_3]_{\text{内部}}) \end{aligned}$$

当与寄主植物共生时，这个排出在生理学上是很重要的，可能是为在胞液质中保持高浓度 NH_4^+ 的缘故。

所有的自生根瘤菌都含有谷酰胺合成酶和谷氨酸合成酶。在根瘤中只发现有低水平的细菌谷酰胺合成酶，而谷氨酸合成酶和谷氨酸脱氢酶的水平是不相同的。通常，设想在类菌体中由于未同化的 NH_3 排泄物进入到植物胞液质中而使谷酰胺合成酶缺失。但是，如上所讨论，根瘤菌膜对 NH_3 的高度渗透性和适合的pH梯度是类菌体 NH_3 耗尽的结果。这种损失由重要的氨基酸来补偿。

在根瘤菌中已测出丙氨酸脱氨酶。关于氮甲酰基磷酸的代谢还没有报道过。

②蓝细菌 自生蓝细菌常常释放固定氮，主要是 NH_4^+ 。在联合共生中，这种分泌物对菌的生活是很重要的。最好的研究体系是红萍 (*Anabaena-Azolla*) 的联合共生体，一些地衣和地钱在寄主内共生体中 NH_4^+ 代谢的相互作用，增加了菌在共生体内 NH_4^+ 的分泌。如果是控制谷酰胺合成酶，同时 NH_4^+ 是通过蓝细菌膜运输的，那么就和自生异养细菌一样，随着膜电位 $\Delta\psi$ 而产生。那么 $\Delta\psi$ 的降低（如像大肠杆菌素K那样化合物的作用）将导致 NH_4^+ 的可现的损失。

3. 调节状况

图上所列的代谢途径的大多数酶是在不同水平上被调节的。在这些调节中某些代谢产物起了多重的作用，表明了一个复杂的控制网的存在。图中标明圆圈的所有反应均是需能的和为能量消耗或为个别核苷酸水平所控制的假定位置，这说明了氮和能量代谢间的关联。

下面简要综述和讨论一些酶的调节特性。

(1) 铵的运输

在*A. vinelandii*、*C. pasteurianum*和*K. pneumoniae*中，膜电位 $\Delta\psi$ （内部为负的）驱动高浓度的 NH_4^+ 的吸收，已有很好的证明，这暗示了 a) NH_4^+ （但不是 NH_3 ）是运输分子，b) $\Delta\psi$ 的大小影响了吸收的多少和可能的吸收（和释放）速率。

在*K. pneumoniae*中，但在*C. pasteurianum*中，高浓度 NH_4^+ 抑制了 NH_4^+ 的载体，这类似于在低等真菌中那样。在根瘤菌中没有 NH_4^+ 载体，在蓝细菌中可能也缺乏。

(2) 谷酰胺合成酶

这个酶的控制包括 NH_4^+ 的抑制、含氮代谢产物的反馈抑制和腺苷化作用——去腺苷化作用的化学修饰。

① NH_4^+ 抑制

表1 一些酶的选择性

酶	来源	NH_4^+ 或谷氨酸的 K_m (mM)	NH_4^+ 可诱导的(+) 抑制的(-) 无作用的(0)
NH_4^+ 载体	<i>C. pasteurianum</i>	0.009	0
	<i>K. pneumoniae</i>	0.007	—
固氮酶	所有菌种	0.002	—
	(野生型)	0.012	—
谷酰胺合成酶	<i>A. vinelandii</i>	0.15	0
	<i>R. palustris</i>	0.2—0.5	0
	<i>A. cylindrica</i>	1	(—)
	<i>K. pneumoniae</i>	0.33	—
谷氨酸合成酶	<i>K. pneumoniae</i>	1.0	(0)
谷氨酸脱氢酶	<i>K. pneumoniae</i>	12	+

表2 在 N_2 和 NH_4^+ 下生长时细胞内某些代谢产物的浓度(mM)

代谢物	<i>C. pasteurianum</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. vinelandii</i>	
	N_2	NH_4^+	N_2	NH_4^+	N_2	NH_4^+
NH_4^+	0.2—0.4	—	0.3—0.4	—	0.6	(0.6)
α -酮戊二酸	0.7	0.7	—	—	—	—
谷氨酰胺	0.8	6.2	0.2	0.6	0.45	0.5—2.0
谷氨酸	5.2	8.0	4.5	4.0	6.6	9.2
氨甲酰辅酶A	0.060	0.104	—	—	—	—

谷酰胺合成酶的抑制,主要存在于那些具有 NH_4^+ 掺入不同途径的菌中,特别是具有谷氨酸脱氢酶的菌中。自生微生物*A. vinelandii*和*C. pasteurianum*都不合成谷氨酸脱氢酶,因而,它们的谷酰胺合成酶不被抑制。相反,*K. pneumoniae*中的谷酰胺合成酶是被 NH_4^+ 所抑制的,而谷氨酸脱氢酶是被诱导的。另外,具有可被抑制谷酰胺合成酶的有机体中有一些是光自养微生物和所有的根瘤菌及一些蓝细菌。

②反馈抑制作用 曾报道过一些菌种的谷酰胺合成酶为某些代谢产物所反馈抑制。*A. vinelandii*中酶动力学的详细分析,揭示了一些代谢产物的抑制能力和底物的可利用性之间的相当复杂的关系。这就提供了氮当量沿着这条途径极有效的调节作用。

③化学修饰 用*E. coli*的研究表明,这种有机体中的谷酰胺合成酶在AMP参与后而发生酶学上的修饰,从而导致谷酰胺合成酶的活性迅速降低。这种修饰酶的体系是在严格的代谢条件下为一些代谢产物主要是谷酰胺和 α -酮戊二酸所控制,这种机理保证了活性的快速和稳定的变化。

在*K. pneumoniae*、*A. vinelandii*和*Rhodopseudomonas palustris*中已证明了谷酰胺合成酶的腺苷化作用。对于*R. capsulata*、*Azospirillum brasiliense*和根瘤菌的这种控制已有很好的证明。对于*C. pasteurianum*和蓝细菌则尚未发现。

(3) 谷氨酸合成酶

已经报道过在根瘤菌中的 NH_4^+ 或谷氨酸抑制谷氨酸合成酶,到目前为止,对其它微生物还没有结论性的数据。根瘤菌中谷氨酸合成酶对氨基酸的抑制作用是非常灵敏的。

(4) 固氮酶

固氮酶的合成及活性在不同水平上被调节,这就表明,固氮作用的控制是非常严密的,大概是由于这个反应需要很高能量的缘故。固氮酶活性的调节包括ADP和氨甲酰磷酸的反馈抑制及固氮酶一个组分的修饰、 O_2 可逆地“开—关”和还原剂流的控制。固氮酶的合成可能受氧和钼的浓度、温度和 NH_4^+ 的供给的控制。在一些情况下出现了转变数的增长。

在这里只讨论 NH_4^+ 抑制的几种情况,这种控制发生在转录水平上,已在所有野生型菌种中至少是在一定生长的条件下观察到。一般要完全抑制,根瘤菌比自生固氮菌所需 NH_4^+ 的浓度要高。可能这是由于缺乏 NH_4^+ 载体,从而增大了细胞内 NH_4^+ 的浓度和调节化合物的浓度。后者的特性尚未鉴定。一个值得注意的理论是,脱腺苷化的谷酰胺合成酶直接包括在nif基因的转录中,但最近发现这种假设应该放弃。一种化合物可能包括在合成调节作用中,谷酰胺合成酶的腺苷化在nif基因的表达中起了主要的作用。最近的研究集中在还未鉴定出的gln F基因的产物上。Ausubel等(1979年)还考虑到nif基因的解阻遏不一定需要谷酰胺合成酶。

在这里要讨论两个迄今还不被人们所注意的问题。

1. 在所有的有机体中, NH_4^+ 抑制nif表达的机理是否相同,或者在进行过程中有所变化?

2. 是否只有一种调节途径,或者在不同水平上 NH_4^+ 控制了固氮酶的合成?

第一个问题,几乎全部是从*K. pneumoniae*的遗传研究中得到的,它涉及到gln F产物(或谷酰胺合成酶修饰系统的其它因子)。

这里有4种可能性:

- a)至少有两组在机理上是不同的;
- b)这种假设已被修饰;