



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АЗОТФИКСАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Гуменко Р.С.¹, Кашапова Г.М.², Владимировна А.А.¹, Кагирова А.С.², Баймиев Ан.Х.¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия,

²Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

e-mail: r.gumenko@yandex.ru

Резюме

Биологическая фиксация азота, связанная с ферментативным переводом атмосферного газообразного азота в минеральный азот в виде аммиака, является важным процессом поддержания плодородия почвы и жизни на Земле. Комплекс *nif*-генов (от англ. *nitrogen fixation*), которые кодируют синтез и регуляцию фермента нитрогеназы, имеется лишь у прокариотических организмов. Азотфиксирующие микроорганизмы имеют широкий ареал обитания, от свободноживущих форм в почве и до симбиотических в клубеньках на корнях бобовых растений. Поэтому, у данных микроорганизмов образовались сложные регуляторные сети, которые управляются многочисленными экологическими сигналами. В данной работе были рассмотрены некоторые механизмы регуляции процесса бактериальной азотфиксации.

Ключевые слова: азотфиксация, свободноживущие азотфиксаторы, нитрогеназа, фиксация азота, *nif*-гены, *sym*-гены

GENETIC REGULATION OF NITROGEN FIXATION IN BACTERIA

Gumenko R.S.¹, Kashapova G.M.², Vladimirova A.A.¹, Kagirova A.S.², Baymiev An.Kh.¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia

e-mail: r.gumenko@yandex.ru

Resume

Biological fixation of nitrogen, associated with the enzymatic transfer of atmospheric gaseous nitrogen to mineral nitrogen in the form of ammonia, is an important process for maintaining soil fertility and life on Earth. The complex of *nif*-genes (from *nitrogen fixation*) that code for the synthesis and regulation of the enzyme nitrogenase is present only in prokaryotic organisms. Nitrogen-fixing microorganisms have a wide range of habitats, from free-living forms in the soil and to symbiotic in the nodules on the roots of leguminous plants. Therefore, these microorganisms have formed complex regulatory networks that are controlled by numerous environmental signals. In this paper, some mechanisms of regulation of the bacterial nitrogen fixation process were considered.

Key words: nitrogen fixation, free-living nitrogen fixers, nitrogenase, nitrogen fixation, *nif*-genes, *sym*-genes

В процессе азотфиксации важнейшую роль играет генетическая регуляция экспрессии *nif*-генов (от англ. *nitrogen fixation*), кодирующих белки-ферменты нитрогеназного комплекса,

непосредственно участвующие в процессе фиксации азота. Филогенетическое положение *nif*-генов, как свободноживущих, так и симбиотических азотфиксаторов, весьма разнообразно и не всегда

коррелирует с положением других *nut*-генов, что может говорить об их различном эволюционном происхождении.

У свободноживущих азотфиксаторов уровень азотфиксации регулируется несколькими путями. Первым из них является количество мочевины или других азотистых соединений в среде. При их повышенном содержании происходит ингибирование процесса азотфиксации [Karr, 2015].

У протеобактерий главными регуляторами генов белков, участвующих в процессе фиксации азота являются RpoN и NifA. Альтернативный сигма-фактор 54 (RpoN) используется многими бактериями для транскрипции генов, участвующих в широком спектре клеточных функций, таких как использование азота, вирулентность, реакции стресса и биосинтез жгутиков. RpoN связывается с промоторами -24 / -12-типа с консенсусной последовательностью TGGCACGNNNNTTGC [De Meuer, 2016]. Однако для инициирования транскрипции ему требуется наличие энхансер-связывающего белка (EBP), которым является регулятор транскрипции NifA. Также NifA играет центральную роль в качестве активатора транскрипции для экспрессии гена нитрогеназы (*nifHDK*) [Thiel, 2017]. Ген *nifA* широко распространен в аэробах (исключение - *Cyanobacteria*), но практически не встречается у анаэробов (основное исключение - *Chlorobi*). Активность белка NifA контролируется уровнем O₂ и NH₄⁺, а также концентрацией 2-оксиглутарата [Lee, 2014; De Vriijn, 2015]. Однако, у некоторых *Gammaproteobacteria* существует механизм регуляции активации *nifA* через NifL, который является регуляторным белком, и ведет себя как репрессор σ54-зависимого белка-активатора NifA. Белки NifL и NifA функционируют вместе в ответ на изменение окислительно-восстановительного, азотного и углеродного статуса бактерии и далее контролируются трансдукционным белком GlnK. Ген *nifL* находится непосредственно перед *nifA*. Мутации, вызывающие нарушения экспрессии гена *nifL* в опероне *nifLA*, приводят к повышенной азотфиксации [Remigi, 2016; Gao, 2016].

Существует также два вспомогательных *nif*-ассоциированных комплекса (Rnf и Fix): комплекс Rnf отвечает за фиксацию азота у *Rhodobacter* и комплекс FixAB связан с электронтранспортным флавопротеином (Etf), а FixCX связан с Etf-хинонредуктазой. Кроме того, белок Rnf1 играет важную роль в работе электрон-транспортных систем [Hui, 2014].

Биологическая фиксация азота является энергозатратным процессом и требует большого количества АТФ. Для этого, например, у некоторых

бактерий есть специфический кластер гена АТФ-синтазы. Продукт экспрессии данного генного кластера обеспечивает повышенный синтез АТФ [Terpolilli, 2016; Nova-Franco, 2015].

Фермент нитрогеназы состоит из гомодимерного белкового компонента NifH (Fe белка), который передает электроны в гетеротетрамёрный белок NifDK (белок MoFe), который содержит O₂-чувствительный железо-молибденовый кофактор (FeMo-кофактор), сайт восстановления субстрата [Suganuma, 2014]. Мо-содержащий белок нитрогеназы содержит несколько важных металлов-кофакторов, включая FeMo-кофактор [Udvard, 2013]. Повышенное содержание молибдена в среде приводит к повышению уровня азотфиксации. Доступность металлов является важным фактором, ограничивающим уровень транскрипции *nif*-генов. Гены, кодирующие Fe-содержащий белок (*nifH*) и MoFe-белок (*nifDK*), обладают повышенным уровнем транскрипции, что приводит к повышенной выработке белков NifH и NifDK. Эти металлсодержащие белки относятся к числу самых сложных белковых кластеров, известных в природе, и требуют значительного уровня содержания железа в среде [Cheng, 2016]. В дополнение к этим структурным белкам нитрогеназы, кластеры *nif*-генов могут кодировать белки, участвующие в регуляции азотфиксации (NifAL112), переносе электронов (NifFJ) и биосинтезе FeMo-кофактора (NifXENBQUVYS), а также белков с еще неопределенными функциями. В филогении NifHDK кластера четко прослеживается эволюционное разделение между аэробами и анаэробами, которое выражается в образовании двух различных ветвей. Функциональный состав кластеров *nif*-генов значительно различается среди таксонов, где они варьируют от минимального состава генов, которые кодируют активную нитрогеназу (*nifHDKEB*), а также несколько регуляторных белков (*Methanocaldococcus sp.*), до бактерий, которые содержат более 20 генов (*Azotobacter vinelandii*). Показано, что Nif-белки появились у метаногенных бактерий, а в процессе эволюции их число увеличилось [Nelson, 2015].

По всей видимости O₂ оказал значительное влияние на эволюцию Nif-белков путем набора конкретных вспомогательных белков, которые участвуют в регуляции ферментов и их созревании. Важные изменения в структуре *nif*-генов произошли при переходе бактерий-азотфиксаторов из анаэробных условий существования к аэробным [Mus, 2016].

В результате эволюционного отбора образовался улучшенный FeMo-кофактор. Белок NifZ был включен в биосинтетический Р кластер в MoFe-

белке и может участвовать в репарации этого кластера у *A. vinelandii* и *Klebsiella pneumoniae*. Белок NifW образует комплекс с MoFe-белком при воздействии O₂, и может участвовать в защите нитрогеназы от инактивации O₂. Гены *nifZ* и *nifW*, улучшают созревание нитрогеназы и её ферментативную стабильность, *nifQ* требуется для активности Mo-нитрогеназы в *A. vinelandii* и *K. pneumoniae* при выращивании в условиях среды, содержащей Mo для биосинтеза FeMo-кофактора [Walker, 2015; Maróti, 2014; De Mita, 2014].

Ген *nifW* встречается у всех аэробных diaзотрофов, включая *Actinobacteria*. Белок NifW образует комплекс с MoFe белком при воздействии O₂. Ген *nifX* также присутствует во всех аэробных геномах и в некоторых анаэробных протеобактериальных геномах. Вероятно, ген *nifX* появился до перехода от анаэробной к аэробной фиксации N₂. Белок NifX связывает FeMo-кофактор когда не нужна Mo-зависимая фиксация N₂. Гены *nifT* и *nifZ* содержатся в настоящее время во всех родах, за исключением *Actinobacteria*, вероятно эти гены появились после разделения родов. По неизвестным причинам гены *nifA* и *nifQ* отсутствуют в актинобактериях и цианобактериях. Переход нитрогеназы от анаэробной к аэробной среде был связан с переходом от пострасляционного регулирования в анаэробах (Nif112) к регуляции на уровне транскрипции (NifA) у облигатных аэробов и факультативных анаэробов.

Ризобии представляют из себя группу микроорганизмов, способных к симбиотической фиксации азота в симбиозе с бобовыми растениями. Из-за чувствительности нитрогеназного комплекса к кислороду, для фиксации азота ему требуются условия с низким содержанием кислорода. У азотфиксирующих бактерий требование к низкому содержанию кислорода окружающей среды и потребности в дыхании для производства АТФ является парадоксальным [Barron, 2009; Foster, 2011]. У большинства ризобий экспрессию *fix*-генов, регулирует двухкомпонентная система FixL-FixJ (TCS) [Herridge, 2008; González, 2014].

Эксперименты показывают, что для индукции экспрессии *nifA* гена в вегетативном росте у быстрорастущих видов *Sinorhizobium* sp. достаточно микроаэробных условий (*S. meliloti*). Когда концентрация кислорода снижается до соответствующих уровней, экспрессия гена *nifA* индуцируется до уровней, больших, чем те, которые наблюдаются в клубеньках люцерны. Промоторы в *S. meliloti* (P1 и P2), активирующие экспрессию гена *nifA*, могут индуцироваться спонтанно. Экспрессия гена *nifA*, и функции белка NifA практически не зависят от наличия в среде фиксированного азота. В

клубеньках бобовых низкая концентрация свободного O₂ достигается действием белка леггемоглобина, который является симбиотическим специфическим растительным белком, сходным с бактериальными цитохромами [De Meyer, 2016]. Это одновременно защищает нитрогеназу от необратимого ингибирования кислородом и обеспечивает достаточное количество кислорода для бактериального дыхания и выработки энергии. Для штаммов медленно растущих ризобий, которые, способны к несимбиотической фиксации азота, для индукции также необходимы микроаэробные условия. Микроаэробная индукция экспрессии гена *nifA* может происходить в присутствии фиксированных источников азота. Это происходит потому, что ризобии фиксируют азот в основном для экспорта к их симбиотическому хозяину, а не для поддержания вегетативного роста.

У бактерий, относящихся к роду *Sinorhizobium*, гены *fixL* и *fixJ* закодированы в одном опероне в симбиотической плазмиде *pSymA*. Ген *fixL* кодирует каноническую гистидинкиназу, которая прикрепляется к клеточной мембране. Аутофосфорилирующая и фосфатазная активности белка FixL регулируются концентрацией кислорода и активностью антикиназного регулятора FixT [Diaz, 2017; Kneip, 2007]. Белок FixL воспринимает кислород через гем-фрагмент, связанный с консервативным доменом PAS [Lechene, 2007]. Когда концентрация кислорода низкая, фосфатная группа в белке FixL может быть передана регулятору реакции ответа FixJ. В этих условиях белок FixJ-P отвечает за активацию генов *nifA* и *fixK* [Rondon, 2007]. FixK является индуктором оперона *fixNOQP*, который кодирует *cbb3* цитохромоксидазу.

В других ризобиях, таких как *Bradyrhizobium japonicum* регулирование *nifA* и *fixK* разделяется на два сегмента. Сегмент двухкомпонентной системы RegS-RegR активирует ген *nifA*, а сегмент FixL-FixJ отвечает за активацию гена *fixK* [Scott, 2010]. Интересно, что не все ризобии используют белки двухкомпонентной системы FixL-FixJ для активации экспрессии гена *fixK* и FixK регулона. В *Rhizobium etli* и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* белок FixL представляет собой гибридную гистидинкиназу (hFixL) без трансмембранных сегментов. Этот ген расположен на плазмиде *pCFN42f* в области, которая содержит копии генов *fixK*, *fixNOQP* и *fixG* [Sohm, 2011]. У *R. etli* белок hFixL инициирует регуляторную цепочку *fix* генов в координации с белком FxkR, принадлежащим к семейству OmpR / PhoB, без участия белка FixJ [Stucke, 2017]. У *R. etli* белок FxkR непосредственно активирует экспрессию гена *fixKf* в ответ на низкую концентрацию кислорода путем связывания с определенной

последовательностью, называемой K-box (GTTACANNNGTTACA), расположенной в регулоне *fixKf*. Белок hFixL *R. etli* содержит, в дополнение к N-терминальному гемсвязывающему PAS домену, второй домен без гемсвязывающего PAS домена и C-концевой домен. Биохимические исследования показывают, что этот белок обладает очень низким сродством к O₂. Мутантные штаммы бактерий, не имеющие гемсвязывающего PAS домена или обладающие ошибочно фосфорилированными сайтами (Asp) в C-концевом домене обладают повышенной аффинностью белка к O₂ [Larmola, 2014]. Подобные hFixL и FxkR-белки, располагающиеся в непосредственной близости от гена *fixKf*, были обнаружены у нескольких альфапротеобактерий, включая *S. meliloti* [Yan, 2008]. Гены *hfixL*, *fxkR* и *fixKf*-подобный ген расположены на *pSymA* [Zehr, 2011]. Однако ген *fxkR* имеет мутацию, связанную с рамкой считывания, которая приводит к образованию нефункционального регулятора экспрессии. Эта мутация рамки считывания отсутствует в геноме штамма *S. meliloti* SM11, который относится к доминирующим аборигенным штаммам, выделенным из клубеньков люцерны в Германии [Franck, 2015; Maserepohl, 2017]. Геном этого штамма состоит из хромосомы, двух мегаплазмид (*pSmeSM11c* и *pSmeSM11d*) и двух меньших плазмиды (*pSmeSM11a* и *pSmeSM11b*) [Knoth, 2014]. Геном *S. meliloti* SM11 кодирует как уникальные гены, так и повторяющиеся *fix* гены. Оперон *fixL-fixJ*, а также три *fix*-оперона NOQP, два гена *fixT* и *fixK* и один оперон *fixGHIS* кодируются на мегаплазмиде *pSmeSM11c*. Этот репликон также содержит усеченную копию *fixJ*, расположенную перед опероном *fixNOQP-2* и генами *fixH*, *fixI* и *fixS*, расположенными ниже по направлению от *fixNOQP-3*. Отсутствие анаэробокса (TTGNNNNNNNCAA) в регуляторной области оперона *fixNOQP-3* предполагает, что он не находится под контролем Fnr-подобного регулятора. Регулирующий регион *fixKa* имеет консервативный K-бокс. Установлено, что промотор *fixKa* объединен с геном *uidA*, который индуцируется в микроаэробных условиях у *R. etli*. Экспрессия гена *fixKa* в этом случае зависит от наличия hFixL и FxkR. Обнаружено, что в *S. meliloti* SM11 двухкомпонентная система hFixL-FxkR отрицательно регулирует экспрессию генов *fixNI*, *fixKI* по неизвестному механизму.

Еще одной интересной особенностью этого регуляторного каскада является наличие небольшого белка FixT, который действует как ингибитор киназной активности белка FixL. Белок FixK активирует ген *fixT*, кодирующий автономный принимающий белковый домен, который ингибирует белок FixL [DeLuca, 2008].

Таким образом, генетическая регуляция азотфиксации осуществляется сложным комплексом генов. Состав и структура данных генов, а также способы их регуляции различаются у свободноживущих и симбиотических азотфиксирующих бактерий. Это связано прежде всего с эволюционным развитием данных бактерий и сменой условий обитания, т.е. переходом от анаэробных к аэробным условиям жизни, что привело к усложнению генетической системы азотфиксации. Поэтому дальнейшее изучение регуляторных механизмов азотфиксации и их понимание имеет важное значение для создания растительно-микробных систем, ценных для человечества.

Литература

1. Cheng G. et al. Multiplicity of sulfate and molybdate transporters and their role in nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Rlv3841 // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2016. V. 29. P. 143-152. doi:10.1094/MPMI-09-15-0215-R
2. De Bruijn F. J. Biological nitrogen fixation // Principles of Plant-Microbe Interactions. – Springer International Publishing. 2015. P. 215-224. doi:10.1007/978-3-319-08575-3_23
3. De Meyer S. E. et al. Symbiotic *Burkholderia* species show diverse arrangements of *nif/fix* and *nod* genes and lack typical high-affinity cytochrome cbb3 oxidase genes // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2016. V. 29. P. 609-619. doi: 10.1094/MPMI-05-16-0091-R
4. De Mita S. et al. Evolution of a symbiotic receptor through gene duplications in the legume-rhizobium mutualism // New phytologist. 2014. V. 201. P. 961-972. doi: 10.1111/nph.12549
5. Gao J. et al. Quorum sensing in nitrogen fixation // Springer India. 2015. P. 51-60. doi: 10.1007/978-81-322-1982-8_5
6. Gao M. et al. Regulation of *fixLJ* by Hfq Controls Symbiotically Important Genes in *Sinorhizobium meliloti* // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2016. V. 29. P. 844-853. doi:10.1094/MPMI-09-16-0182-R
7. Geddes B. A., Oresnik I. J. The mechanism of symbiotic nitrogen fixation // The Mechanistic Benefits of Microbial Symbionts. Springer International Publishing. 2016. P. 69-97. doi: 10.1007/978-3-319-28068-4_4
8. Hui K. Metabolism and host specificity in the *Rhizobium leguminosarum* species complex. // University of York. 2014. 228 P.

9. Krapp A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces // *Current Opinion in Plant Biology*. 2015. V. 25. P. 115-122. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.010
10. Lee S. G., Krishnan H. B., Jez J. M. Structural basis for regulation of rhizobial nodulation and symbiosis gene expression by the regulatory protein NolR // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2014. V. 111. P. 6509-6514. doi: 10.1073/pnas.1402243111.
11. Maróti G., Kondorosi É. Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? // *Frontiers in Microbiology*. 2014. V. 5. 326 P. doi: 10.3389/fmicb.2014.00326
12. Mus F. et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes // *Appl. Environ. microbiol.* 2016. V. 82. P. 3698-3710. doi: 10.1128/AEM.01055-16
13. Nelson M. S., Sadowsky M. J. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes // *Frontiers in Plant Science*. 2015. V. 6. 491 P. doi: 10.3389/fpls.2015.00491
14. Nova-Franco B. et al. The micro-RNA172c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-Rhizobium etli nitrogen fixation symbiosis // *Plant Physiology*. 2015. V. 168. №. 1. P. 273-291. doi: 10.1104/pp.114.255547
15. Oldroyd G. E. D., Dixon R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. V. 26. P. 19-24. doi: 10.1016/j.copbio.2013.08.006
16. Remigi P. et al. Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts // *Trends in microbiology*. 2016. V. 24. P. 63-75. doi:10.1016/j.tim.2015.10.007
17. Suganuma N. *Lotus* genes involved in nodule function and nitrogen fixation // *The Lotus japonicus Genome*. Springer Berlin, Heidelberg. 2014. P. 79-84. doi: 10.1007/978-3-662-44270-8_8
18. Sulieman S., Tran L. S. P. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: Metabolism and regulatory mechanisms. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V.15. № 11. P.19389-19393. doi: 10.3390/ijms151119389
19. Terpolilli J. J. et al. Lipogenesis and redox balance in nitrogen-fixing pea bacteroids // *Journal of Bacteriology*. 2016. V. 198. P. 2864-2875. doi:10.1128/JB.00451-16
20. Thiel T., Pratte B. S. Regulation of three nitrogenase gene clusters in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 // *Life*. 2014. V. 4. №. 4. P. 944-967. doi:10.3390/life4040944.
21. Udvardi M., Poole P. S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses // *Annual Review of Plant Biology*. 2013. V. 64. P. 781-805. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235
22. Walker R. et al. Symbiotic nitrogen fixation in legumes: perspectives on the diversity and evolution of nodulation by *Rhizobium* and *Burkholderia* species // *Biological Nitrogen Fixation*. 2015. P. 913-925.