

林肯链霉菌谷氨酰胺合成酶活力调节的研究*

金 蓓^{1,2} 焦瑞身¹ 毛裕民²

(¹ 中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

(² 复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要: 对不同氮源生长条件下林肯链霉菌无细胞粗提液中谷氨酰胺合成酶(GS)的研究结果表明,高浓度 NH_4^+ 阻遏了 GS 的生物合成。从不同氮源生长条件下林肯链霉菌中分离纯化了 GS,其性质没有差别。以受腺苷化调节的产气克雷伯氏菌 GS 作对照,林肯链霉菌 GS 没有明显的氨休克作用,经蛇毒磷酸二酯酶处理后,其活力没有变化。这些结果都说明林肯链霉菌 GS 不存在腺苷化共价修饰这一调节方式。反馈抑制作用是林肯链霉菌 GS 的一种重要的调节方式,这种抑制作用是以累积的方式进行的,这表明各种抑制剂对 GS 作用位点不同,各种抑制剂对 GS 的抑制作用是相互独立的。由此推测,林肯链霉菌 GS 是一种变构酶。

关键词: 林肯链霉菌, 谷氨酰胺合成酶, 调节

中图分类号: Q559 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 04-0481-08

据报道,大肠杆菌谷氨酰胺合成酶(GS)活力受到四种方式调节:(1)在菌体生长过程中, NH_4^+ 的阻遏作用;(2)代谢产物的反馈抑制作用;(3)二价金属离子对酶活力的影响;(4)共价修饰作用,即腺苷化-去腺苷化调节^[1]。许多研究表明,GS 腺苷化调节广泛存在于 G^- 菌中^[2]。 G^+ 菌,例如微小肝菌(*Bacillus subtilis*),地衣杆菌(*B. licheniformis*)的 GS 不存在共价修饰调节^[3,4]。但是,近年来有人报道 G^+ 菌,如洋兰链霉菌(*Streptomyces cattleya*),吸湿链霉菌井冈变种(*S. hygroscopicus* var. *jinggangensis*)的 GS 活力也经腺苷化-去腺苷化调节^[5,6]。林肯链霉菌 GS 活力与林可霉素合成有关(另文发表)。因此,研究林肯链霉菌 GS 活力的调节机制不仅具有一定的理论意义,而且对实际应用也有指导意义。在报道了该酶的分离纯化、分子特征及酶学性质的基础上^[7],研究了林肯链霉菌 GS 活性的调节方式。

1 材料和方法

1.1 菌种

林肯链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*)Z-512,为华东理工大学惠赠,经中国科学院上海植物生理研究所微生物室多次诱变获得的林可霉素高产菌株。产气克雷伯氏菌(*Klebsilla aerogenes*)MK9000,美国麻省理工学院惠赠。

1.2 培养基

1.2.1 天然培养基:参照文献[8]。

* 本研究得到国家自然科学基金(39630010)和国家高技术发展计划(863102198)资助

作者简介: 金 蓓(1967-),男,山东省济南市人,副教授,中国科学院理学博士,南京大学医药生物技术国家重点实验室博士后,复旦大学遗传工程国家重点实验室博士后,主要从事生物化学与分子生物学、遗传学与遗传工程研究。

收稿日期: 2000-11-04, **修回日期:** 2001-03-12

1.2.2 合成培养基:葡萄糖 30g, 柠檬酸钠 3g, K_2HPO_4 2.5g, NaCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001g, $CaCO_3$ 4g, 定容至 1L, pH7.2。培养基氮源的种类根据实验需要分别使用 $(NH_4)_2SO_4$ 和 Glu, 用量根据各试验要求增减。

1.2.3 产气克雷伯氏菌 MK9000 培养基:葡萄糖 4g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, K_2HPO_4 10.5g, KH_2PO_4 4.5g, 定容至 1L, 氮源配方见实验。

上述培养基中磷酸盐、铵盐和 Glu 用过滤法除菌, 其它成分 0.055MPa 30min 灭菌。

1.3 培养条件与方法

1.3.1 林肯链霉菌:参照文献[8]。

1.3.2 产气克雷伯氏菌:37℃摇床培养。

1.4 无细胞粗提液的制备

发酵 108h, 过滤法收集菌体, 并用含有 100mmol/L KCl 的咪唑-HCl 缓冲液 (50mmol/L, pH7.0) 洗涤 2 次。将湿菌体 50g 悬浮于 400mL 酶缓冲液 (咪唑-HCl 缓冲液: 咪唑 50mmol/L, $MnCl_2$ 1mmol/L, pH7.2) 中。冰浴中超声波处理 30min。4℃ 18000r/min 离心 30min。弃去沉淀, 上清部分为无细胞粗提液。

1.5 蛋白质测定

参考 Bradford 方法^[9], 以牛血清白蛋白为标准。

1.6 酶活力测定

1.6.1 GS 转谷酰基活性:采用 Bender 等^[10]的方法, 略有改动。反应液中含 135mmol/L 咪唑, 18mmol/L 羟胺, 0.27mmol/L $MnCl_2$, 25mmol/L 磷酸钾, 0.36mmol/L ADP 钠盐, pH7.0。取上述反应液 0.4mL, 加 0.05mL 适当浓度酶液, 于 37℃预热 5min, 加入 0.05mL L-Gln (终浓度 20mmol/L), 37℃保温反应 10min; 加入 1mL 反应终止液 (1,000mL 中含 55g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 20g 三氯乙酸, 21mL 浓 HCl) 终止反应, 离心去掉蛋白, 于 540nm 比色, 以不含磷酸钾和 ADP 的反应做空白对照。在此条件下, 1 μ mol 谷氨酰异羟肟酸显色后的 $OD_{540} = 0.532$ 。一个酶活力单位定义为每分钟催化产生 1 μ mol 谷氨酰异羟肟酸的酶量。比活力为: u/mg 蛋白。

1.6.2 GS 生物合成活力:参照 Stadtman 等的方法^[11]。每分钟催化产生 1 μ mol 无机磷的酶量为一个酶活力单位。比活力: u/mg 蛋白。

1.7 电泳方法

采用平板聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)^[12], 分离胶浓度为 7.5%。

1.8 蛇毒磷酸二酯酶处理

反应系统: Tris 50mmol/L, $MgCl_2$ 1mmol/L, pH8.5。蛇毒磷酸二酯酶浓度 100 μ g/mL, 酶液适量。37℃保温, 不同时间间隔取样, 测定 GS 活动。

2 结果和讨论

2.1 高浓度 HN_4^+ 对 GS 生物合成的阻遏作用

分别以 120mmol/L $(NH_4)_2SO_4$ 、30mmol/L Glu 为唯一氮源培养林肯链霉菌。当菌体发酵培养 36h 后, 把 30mmol/L Glu 为氮源的培养菌体分成两组: 其中一组加入 $(NH_4)_2SO_4$ 终

浓度为 120mmol/L,另一组则不加。然后每隔一定时间,三组分别同时取样,收集菌体,制备无细胞粗提液。测定 GS 酶活力,结果见图 1。可以看出,以 30mmol/L Glu 为氮源,菌体 GS 活力处于高水平;以 120mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源,菌体 GS 活力一直很低,培养 120h 后,只有以 Glu 为氮源的 1/7。向 Glu 为氮源的培养液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,GS 活力在 10min 后与对照相比,无大变化;4h 后与对照相比,GS 活力降低 30%;然后逐渐下降,36h 后降到与以 120mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源的相当的水平。

上述结果表明,在林肯链霉菌生长过程中,GS 的活力变化很大。以 Glu 为氮源时,GS 活力较高;相对而言,以氨盐为氮源时,GS 活力始终处于很低的水平,这是酶量降低所致,而并非酶活力的调节。因为生物体代谢的调控十分精确,不会在这么长的时间进程中保持较高量的酶而不让其发挥作用,定量免疫火箭电泳的结果证实了这一结论。另外,在向以 30mmol/L Glu 为氮源的菌体中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后,短时间内(10min)GS 活力无明显变化,这从另一个角度说明,无细胞粗提液中 GS 活力的高低是由 GS 量的多少决定的,而不是由其它因子修饰 GS 所致。从而证明,高浓度 NH_4^+ 阻遏了林肯链霉菌 GS 的生物合成,但没有引起 GS 本身的修饰作用。

在研究中曾发现,林肯链霉菌在限制性氮源生长条件下(如低氮),GS 活力高;在非限制性氮源生长条件下(如高氮),GS 活力低。进一步的实验结果表明,高氮阻遏了林肯链霉菌 GS 的生物合成,在限制性氮源条件下,GS 合成的阻遏被解除。因此,和 *E. coli* GS 一样,阻遏-去阻遏也是林肯链霉菌 GS 的一种调节方式。

2.2 林肯链霉菌谷氨酰胺合成酶不存在腺苷化调节的证据

腺苷化-去腺苷化共价修饰是肠道细菌^[1,10]、固氮菌^[13]和某些放线菌^[5]GS 活力的一种独特的调节方式。因此,我们对林肯链霉菌 GS 是否存在这一调节方式进行了比较深入的研究。

在 GS 的研究过程中,收集菌体制备无细胞粗提液前,加入了 CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide)。CTAB 的加入时间:林肯链霉菌 Z-512 按本文所述各营养条件进行培养,当菌体达到要求的培养时间时,加入 1mL CTAB (1mg/mL),28℃ 摇床继续培养 5min,再收集菌体。CTAB 的作用:增加细胞的渗透性,使反应试剂进入细胞;保持 GS 酶原有的腺苷化状态。

2.2.1 不同氮源生长条件下,GS 纯化后进行比较:为进一步说明在不同氮源生长条件下,GS 本身是否有差异,我们分别从以 120mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、30mmol/L Glu 为唯一氮培养的林肯链霉菌菌体中分离纯化 GS,并将两种来源的 GS 进行比较。

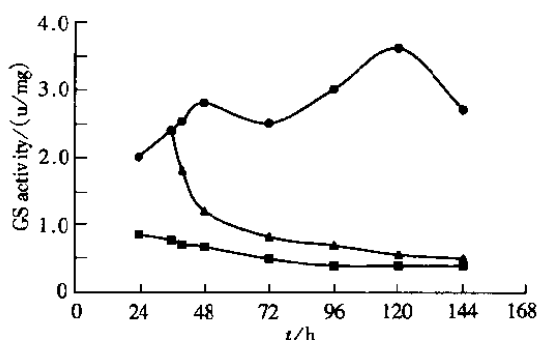


图 1 不同氮源生长条件下林肯链霉菌 GS 活力的变化

Fig. 1 Specific activity changes of glutamine synthetase from *Streptomyces lincolnensis* grown in different nitrogen sources

—●— 30mmol/L Glu; —■— 120mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
—▲— 30mmol/L Glu added 120mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

①比活力基本相同:从表 1 可见,从两种氮源培养的菌体中得到的 GS 纯化后,比活力基本相同。② $-Mg^{2+}/+Mg^{2+}$ GS 活力比相近:据报道,不同氮源生长条件下,大肠杆菌 GS 转谷酰基活力(分析系统中有 Mn^{2+} 存在时)对 Mg^{2+} 敏感程度不同。GS 腺苷化程度高,加 Mg^{2+} 时,转谷酰基活性就低。因此 $-Mg^{2+}/+Mg^{2+}$ 活力比成为判别 GS 腺苷化状态的一个重要参数^[1]。采用同样的方法,比较了不同氮源生长条件下,林肯链霉菌 GS 纯化后转谷酰基活力,结果见表 2。两者 $-Mg^{2+}/+Mg^{2+}$ 活力比相近。③pH 曲线相同:不同氮源培养的林肯链霉菌的 GS 的转谷酰基酶活的最适 pH 均在 6.8~7.2 之间,且两 pH 曲线的形状也是一样的,见图 2。林肯链霉菌 GS 不存在等活性点。④电泳迁移率相同:将两种氮源培养条件下纯化的 GS,在聚丙烯酰胺凝胶上同时电泳,结果显示两者的迁移率完全相同。而那些腺苷化调节的 GS 经腺苷化后,带电性质发生改变,虽然分子量变化不大,但电泳迁移率会随之改变。⑤ K_m 相同:两种氮源培养条件下纯化的 GS 对各种底物的 K_m 值都相同,而腺苷化后的 GS,其 K_m 值应有所改变。⑥紫外吸收光谱相同:两种氮源培养条件下纯化的 GS,最大吸收峰均在 278nm。而且 OD_{280}/OD_{260} 的比值均大于 1.7(高氨和 Glu 条件下比值分别为 1.83 和 1.86)。如果 GS 分子经共价修饰联结 5'-AMP,转变为腺苷化状态时,那么 GS 在 260nm 处光吸收就会增加^[1]。显然,林肯链霉菌 GS 分子中不含有核苷类基团。

表 1 不同氮源生长条件下林肯链霉菌 GS 纯化后比活力比较

Table 1 Comparison of specific activity between glutamine synthetases purified from different nitrogen source cultures

Nitrogen sources	Specific activity of GS/(u/mg protein)	
	Biosynthetic activity	γ -glutamyltransferase activity
120mmol/L $(NH_4)_2SO_4$	4.72	142
30mmol/L Glu	4.96	149

表 2 不同氮源生长条件下林肯链霉菌 GS 纯化后转谷酰基活力的比较

Table 2 Comparison of glutamine synthetase purified from different nitrogen sources cultures on γ -glutamyltransferase activity

Nitrogen sources	γ -glutamyltransferase specific activity/(u/mg protein)		
	Control($-Mg^{2+}$)	+ Mg^{2+} in assay	$-Mg^{2+}/+Mg^{2+}$
120mmol/L $(NH_4)_2SO_4$	142	120	1.18
30mmol/L Glu	149	124	1.20

大肠杆菌 GS 腺苷化状态随氮源情况不同而不同。在非限制性氮源情况下,GS 高度腺苷化;在限制性氮源情况下,GS 腺苷化程度很低或处于非腺苷化状态^[1]。从不同氮源生长条件下林肯链霉菌中分离纯化的 GS 比较结果看,它们的比活力、二价离子的依赖性、最佳 pH、动力学行为都相同。而且紫外吸收光谱一致, OD_{280}/OD_{260} 的值均大于 1.7,表明在两种氮源条件下,GS 中均不含有核苷类化合物。

2.2.2 发酵过程中加入氨盐看不到“氨休克”现象:在大肠杆菌中,氨不仅能阻遏 GS 的生物合成,而且对 GS 活力有瞬时调节作用。在限制氮源的生长条件下,如果向培养基中加入高浓度 NH_4^+ ,GS 迅速腺苷化,其活力在几分钟内,甚至几十秒内迅速下降,这就是所谓“氨休克(ammonia shock)作用”^[14]。

Klebsiella aerogenes GS 是经过腺苷化共价调节的, Magasanik 等对此进行了比较深入的研究^[10]。我们采用该菌种为对照, 对林肯链霉菌 GS 是否存在腺苷化调节进行了研究。

K. aerogenes 和林肯链霉菌以 30mmol/L Glu 为氮源, 分别发酵培养 8h 和 36h, 加入 (NH₄)₂SO₄ 120mmol/L, 然后定时取样, 制备无细胞粗提液, 测 GS 转谷酰基活力。结果见图 3。从图上可以看到, *K. aerogenes* GS 的氨休克作用十分明显, 1min 内 GS 活力下降了 90%。但是, 林肯链霉菌 GS 的氨休克作用不明显。

2.2.3 蛇毒磷酸二酯酶(SVPDE)处理高氮条件下得到的 GS, 酶活力没有变化: 蛇毒磷酸二酯酶能水解腺苷化 GS 分子上的 5'-AMP, 使其转变为非腺苷化状态, 酶活力提高^[10]。图 4 表明, *K. aerogenes* GS 经 SVPDE 处理后, 转谷酰基活性(分析系统加 Mg²⁺)提高 4~6 倍。而林肯链霉菌 GS 活力没有变化。

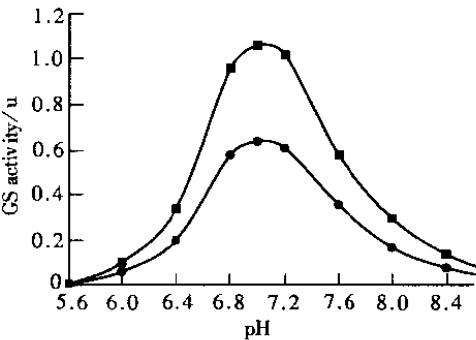


图 2 不同氮源生长条件下林肯链霉菌 GS 的 pH 曲线

Fig.2 pH-profiles of glutamine synthetase from *Streptomyces lincolnensis* grown in different nitrogen sources
—●— 120mmol/L (NH₄)₂SO₄; —■— 30mmol/L Glu.

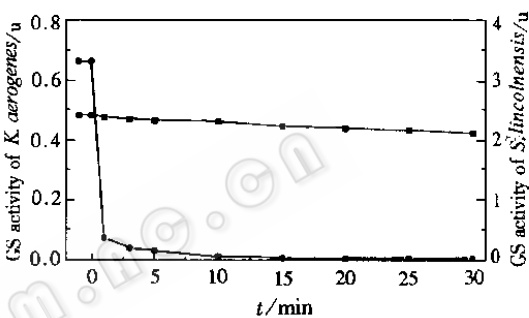
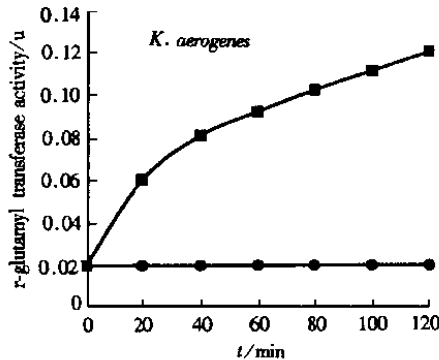


图 3 克雷伯氏菌和林肯链霉菌 GS 的氨休克现象
Fig.3 Ammonia shock to glutamine synthetase activity from *K. aerogenes* & *S. lincolnensis* (in the presence of 60mmol/L MgCl₂)

—●— *K. aerogenes*; —■— *S. lincolnensis*.

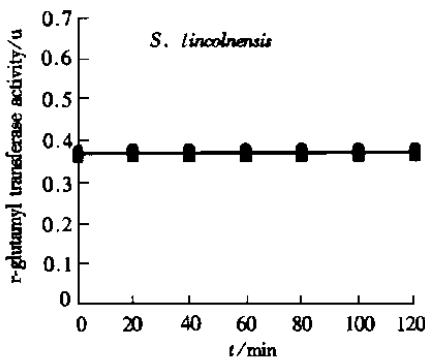


图 4 蛇毒磷酸二酯酶对 GS 活力的影响

Fig.4 The effects of snake venom phosphodiesterase on GS (in the presence of 60mmol/L MgCl₂)

—●— Control; —■— Incubated with snake venom phosphodiesterase.

上述结果都未发现林肯链霉菌 GS 存在腺苷化共价修饰这一调节方式。

2.3 林肯链霉菌谷氨酰胺合成酶的反馈抑制

反馈抑制作用在酶活力的调节上是一个比较普遍的现象,由于 GS 处于代谢的中心地位,它的调节十分复杂,许多末端产物对其具有反馈抑制。已研究过的各种来源的 GS 几乎都受终产物的反馈抑制作用。为了研究反馈抑制作用是否是林肯链霉菌 GS 一个重要的调节方式,参照 *E. coli*、*B. subtilis* GS 的反馈抑制剂^[15],研究了 9 种抑制剂的作用,其中 Gln 是 GS 反应的产物,其它几种化合物与 Gln 代谢有关。所得结果见表 3。

从表 3 可以看出,不同抑制剂对 GS 的抑制作用不同。而且激活离子不同,同一种抑制剂对 GS 的抑制作用也有差异。当激活离子为 Mn^{2+} 时,在底物饱和情况下,Ala、Gly 和 Ser 对 GS 活力的抑制作用与底物限制条件下的抑制作用相等或更强些。按照 Deuel 等的解释^[15],这表明 Ala、Gly 和 Ser 对 GS 活力的抑制作用可能与底物是非竞争性的。GS 生物合成的产物 Gln 对 GS 具有抑制作用。在底物饱和情况下,其抑制作用较弱。但在 NH_4Cl 、Glu 限制情况下,抑制作用有所加强。因此可以推测 Gln 与底物 NH_4Cl 、Glu 是竞争性的抑制。同样可以推测 AMP、ADP 与底物 ATP、Glu 是竞争性的抑制。His、 α -酮戊二酸对 GS 的抑制作用只有在 Glu 限制条件下才表现较强,因而推测它们与 Glu 是竞争性的抑制。Try 在四种分析条件下对 GS 的抑制作用都不强,所以这种抑制作用可能是非竞争性的。

表 3 抑制剂对林肯链霉菌 GS 活性的影响

Table 3 Effects of inhibitors ofn glutamine synthetase activity from *Streptomyces lincolnensis*

Assay condition	Remaining activity/ %									
	Control	Ala	Gly	Ser	α -KG	His	Gln	Try	AMP	ADP
Mn^{2+} as activator										
Substrates saturated	100	68	72	81	96	93	92	90	98	88
(NH_4^+ 50mmol/L, Glu 100mmol/L, ATP 7.5mmol/L)										
NH_4^+ limited (0.5mmol/L)	100	82	80	84	90	96	78	88	98	88
Glu limited (1mmol/L)	100	68	72	81	80	81	81	90	60	56
ATP limited (0.5mmol/L)	100	76	86	90	100	96	94	92	50	36
Mg^{2+} as activator										
Substrates saturated	100	86	80	86	66	96	96	91	54	48
(NH_4^+ 50mmol/L, Glu 100mmol/L, ATP 7.5mmol/L)										
NH_4^+ limited (0.5mmol/L)	100	96	87	90	72	94	90	90	60	50
Glu limited (1mmol/L)	100	88	81	86	31	86	94	86	36	31
ATP limited (0.5mmol/L)	100	90	90	97	68	98	99	93	24	18

Concentration of inhibitors was 5mmol/L.

当激活离子为 Mg^{2+} 时,Ala、Gly、Ser 和 Gln 对林肯链霉菌 GS 活力的抑制作用减弱,AMP、ADP、 α -酮戊二酸的抑制作用有所加强,His 和 Try 的抑制作用变化不大。

Ala、Ser 和 Gly 对 GS 的抑制作用是一种简单反馈抑制方式^[16]。特别有趣的是,Ala 对 GS 的反馈抑制作用。林肯链霉菌同化氮主要有两条途径,即 GS/谷氨酸合酶途径和丙氨酸脱氢酶(ADH)途径。高氮培养条件下,ADH 活力高,GS 活力低;低氮培养条件下,ADH 活力低,GS 活力高(另文发表)。Ala 作为 ADH 的产物,能够抑制 GS 的活力,表明 Ala 参与了林肯链霉菌两条氮同化途径的调节。对于这一点,已经在 *Streptomyces clavuligeras* 中得到证实^[17]。

表 4 列出 5 种抑制剂对林肯链霉菌 GS 活力的累积反馈抑制作用。Stadtman 等认为^[11],这种累积反馈抑制作用是由于不同代谢产物与 GS 作用的结合位点不同,即各种抑制剂分别作用于 GS 的不同抑制位点上。因此,各种抑制剂对 GS 的抑制作用都是有限的,相互独立的。一个抑制物作用后,酶的剩余活力可被其它的抑制剂继续作用。只有当所有代谢产物同时过量存在时,方可完全抑制其活力。这一特点与 *E. coli* 等 GS 酶相似^[18,19]。因此,累积反馈抑制作用具有重要的生理意义。

表 4 抑制剂对林肯链霉菌 GS 活性的累积反馈抑制作用

Table 4 Cumulative feedback inhibition of inhibitors on glutamine synthetase activity from *Streptomyces lincolnensis*

Inhibitor	GS activity inhibited/%		
	Observed	Calculated	
		Cumulative inhibition	Additive inhibition
Control	0		
Ala(A)	32		
Gly(B)	28		
Ser(C)	19		
His(D)	7		
Try(E)	10		
A + B	48	51.0	60
B + C	40	41.7	47
C + A	43	44.9	51
A + B + C	60	60.3	79
A + B + C + D	62	63.1	86
A + B + C + D + E	66	66.8	96

Mn²⁺ As cofactor, concentration of inhibitors was 5mmol/L.

可见,反馈抑制作用是林肯链霉菌 GS 一种重要的调节方式。林肯链霉菌 GS 象 *B. subtilis* GS 一样,是一种变构酶^[15]。

参 考 文 献

[1] Kustu S, Hirschman J, Burton D, et al. *Mol Gen Genet*, 1984, **197**(2): 309 ~ 317.
[2] Magasanik B, Stadtman E R. *Prog Clin Biol Res*, 1980, **40**: 337 ~ 43.
[3] Deuel T F, Stadtman E R. *J. Biol Chem*, 1970, **245**(20): 5206 ~ 5213.
[4] Hubbard J S, Stadtman E R. *J Bacteriol*, 1967, **94**(4): 1007 ~ 1015.
[5] Streicher S L, Tyler B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(1): 229 ~ 233.
[6] Xia J H, Jiao R S. *Sci Sin*(Series B), 1986, **29**(4): 379 ~ 88.
[7] 金 菁, 杨蕴刘, 焦瑞身. *微生物学报*, 1998, **38**(6): 441 ~ 448.
[8] Jin Zhe, Jiao Ruishen. *Science in China*(Series C), 1998, **41**(1): 37 ~ 46.
[9] Kruger N J. *Methods Mol Biol*, 1994, **32**: 9 ~ 15.

- [10] Bender R A, Janssen K A, Resnick A D, et al. *J Bacteriol*, 1977, **129**(2): 1001 ~ 1009.
- [11] Stadtman E R, Hohman R J, Davis J N, et al. *Mol Biol Biochem Biophys*, 1980, **32**: 144 ~ 56.
- [12] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. USA: John Wiley & Sons Inc. 1997. 10.2.4 ~ 10.6.8.
- [13] Engelhardt H, Klemme J H. *Z Naturforsch (C)*, 1981, **36**: 407 ~ 410.
- [14] Burton Z F, Eisenberg D. *Arch Biochem Biophys*, 1980, **205**(2): 478 ~ 488.
- [15] Deuel T F, Stadtman E R. *J Biol Chem*, 1970, **245**: 5206 ~ 5213.
- [16] Deuel T F, Prusiner S. *J Biol Chem*, 1974, **249**: 257 ~ 264.
- [17] Brana A F, Mendez C, Diaz L A, et al. *J Gen Microbiol*, 1986, **132**: 1305 ~ 1317.
- [18] Woolfolk G A, Stadtman E R. *Arch Biochem Biophys*, 1967, **118**: 736 ~ 755.
- [19] Bancroft S, Rhee S G, Neumann C et al. *J Bacteriol*, 1978, **134**: 1046 ~ 1055.

STUDIES ON REGULATION OF GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITY FROM *STREPTOMYCES LINCOLNENSIS* *

Jin Zhe^{1,2} Jiao Ruishen¹ Mao Yumin²

(¹ Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;

² State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Glutamine synthetase in crude extracts from *Streptomyces lincolnensis* growing under different nitrogen sources were studied. The results showed that NH_4^+ in high concentration repressed the biosynthesis of the enzyme. To determine whether *Streptomyces lincolnensis* has undergone covalent modification, a comparison of the glutamine synthetase isolated from cells grown on different nitrogen sources was made. No significant difference was observed in specific activity, pH optima, divalent cation response, and ultraviolet absorption spectra. Glutamine synthetase activity was not influenced by ammonia shock or snake venom phosphodiesterase treatment. Under these conditions, the activity of glutamine synthetase from *K. aerogenes* was markedly changed. There was therefore no evidence for enzymatic adenylation of glutamine synthetase from *Streptomyces lincolnensis*. Glutamine synthetase was subject to feedback inhibition by end products of glutamine metabolism. Cumulative feedback inhibition of the Mn^{2+} -dependent glutamine synthetase activity was demonstrated. These results suggest that glutamine synthetase from *Streptomyces lincolnensis* is an allosteric enzyme.

Key words: *Streptomyces lincolnensis*, Glutamine synthetase, Regulation

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39630010) and supported by project of Chinese National Programs for High Reserarrch and Development(863102198)