

缺乏固氮活性的浑球红假单胞菌谷氨酸合成酶突变株

宋鸿遇 吴永强 郁宝麟

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

光合细菌浑球红假单胞菌 601 菌株, 经过 NTG 诱变获得谷氨酸缺陷型 204 菌株。生化分析表明, 突变株 204 缺乏谷氨酸合成酶活性(GOGAT⁻), 谷氨酰胺合成酶活性比亲株低, 用放氢和乙炔还原法未测出固氮酶活性。此外, 突变株 204 不能在多种氮源上生长, 例如: 氨、尿素、组氨酸、丝氨酸、精氨酸和腺嘌呤, 表现出氮素代谢上多效缺陷的表型。从含氨基培养基或充氮气的低限培养基上分离回复子, 自发回复突变频率均为 2×10^{-9} 。回复子的固氮酶和 GS 活性恢复到亲株的水平, 同时重新获得利用上述各种氮源的能力。胞内游离氨基酸库分析表明, 突变株的谷氨酰胺含量是亲株的 16 倍, 外源谷氨酰胺加入培养基也抑制固氮活性。从上述结果推论, 浑球红假单胞菌具有对固氮酶调节高度敏感的反馈系统, 它随代谢中间产物而变化, 胞内谷氨酰胺的含量是固氮酶活性反馈调节的关键成份。

关键词 浑球红假单胞菌; 谷氨酸合成酶

浑球红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas sphaeroides*) 是一种紫色非硫光合细菌。这类菌的光合调节有它独特的特征。某些固氮产物能迅速地关闭固氮作用^[1,2], 当氨除去后酶活恢复。固氮作用和氨同化是连续反应^[3-5]。GS 在固氮调节中起重要的作用。但 GOGAT 对固氮的调节方式目前尚不清楚。

迄今关于紫色非硫光合细菌固氮变种研究的报道不多^[6,7], 我们通过诱变处理, 分离并鉴定了浑球红假单胞菌的 GOGAT⁻ 突变株, 由于 GOGAT 缺失, 氨同化中断, 胞内 Glu 累积。GOGAT⁻ 突变株既不催化固氮也不催化光合放氢, 在氮素代谢上表现明显的多效缺陷。本文还对 GOGAT 调节固氮活性的机理作了初步的探讨。

材料与 方法

(一) 菌种

浑球红假单胞菌 (*R. sphaeroides*) 菌株 601 由澳大利亚 J. M. Pemberton 博士惠赠。

(二) 培养基及培养条件

RCVBN 培养基按 Weaver^[8]。光照厌氧培养时, 光照强度约 3000 lx, 抽气后充氮气或氩气。在暗处好氧培养时, 于 28℃ 温箱中静置培养。

(三) 诱变处理

野生型菌株 601 在 RCVBN 培养基中光照厌氧培养, 长至对数期末期, 用含 100μg/ml NTG 的磷酸缓冲液 (pH6.8), 28℃ 处理 30 分钟。再在完全培养基中光照厌氧培养, 使突变株表型分离。用 0℃ 无氮源的基础培养基洗涤菌体三次, 在暗处饥饿培养 6 小时, 然后加入氨苄青霉素钠, 使最终浓度为 100μg/ml, 富集培养 18 小时, 离心弃上清液, 适当稀释平皿, 筛选并纯化 Glu 缺陷型。

(四) 酶活性测定方法

1. 光合固氮及光合放氢活性测定: 用乙炔还原法测定固氮活性; 用 100 型气相层析仪分析放氢活性, 参照宋鸿遇^[2]报道的方法。

2. GS 活性测定: 菌体长至对数生长后期, 加入十六烷基三甲基溴化胺, 最终浓度为 100μg/ml, 混匀后在 5000 lx 下继续光照 5 分钟, 用 1% KCl 洗涤菌体, 重悬于 pH 7.5 咪唑缓冲液内, 按 Wall^[9] 法测定活性。

3. 细胞抽提液的 GOGAT 活性测定: 超声波破碎菌体 3 分钟, 经 140,000g/min 离心 90 分钟,

本文于 1982 年 9 月 9 日收到。

本文采用以下缩写: NTG: N-甲基-N'-亚硝基-N'-硝基胍; GS: 谷氨酰胺合成酶; GOGAT: 谷氨酸合成酶; N₂ase: 固氮酶; Glu: 谷氨酰胺; Glu: 谷氨酸。

取上清液,参照 Johansson^[13] 和 Meers^[10] 法测定。在反应系统中加入 0.2ml 酶液。

4. 蛋白质含量测定: 按 Lowry^[11] 法。用牛血清蛋白作标准曲线。

(五) 胞内游离氨基酸库成份的分析

菌体在光照条件下生长 28 小时,达平稳期的初期。冷冻离心收集菌体,菌体蛋白质含量约为 5mg。用 0℃ 10 mM 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 洗涤菌体三次,重悬于 0℃, 0.25M 过氯酸中, 4℃ 静置 10 分钟,离心收集游离氨基酸抽提液,反复抽提三次,合并后定容为 5 ml。参照 Tempest^[12] 方法,用 LKB 氨基酸分析仪测定。

结 果

(一) Glu 缺陷型的获得

浑球红假单胞菌野生型 601,经过 NTG 处理和氨苄青霉素富集培养,约有 7% 的存活株为氨基酸缺陷型,其中有一部分是 Glu 缺陷型。它们在含氮的基础培养基上不生长,仅在含 Glu 的基础培养基上生长。以 Glu 缺陷型 204 菌株为例,当它在含 7.5 mM 硫酸铵的基础培养基中培养时,菌量的增加完全取决于添加 Glu 的浓度(见图 1),没有 Glu 则 204 突变株不长,而野生型

表 1 菌株 601 及突变株 204 的世代时间*

Table 1 Doubling times of strain 601 and mutant 204*

氮 源 ^b Nitrogen source ^b	世代时间(小时) Doubling time (h)	
	601	204
谷氨酸 Glutamate	8.2	8.2
硫酸铵和谷氨酸 (NH ₄) ₂ SO ₄ and glutamate	3.4	8.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.3	—*

* 一不生长 no growth

a. 菌株在以苹果酸为碳源的基础培养基上生长 28℃。

Strains were grown photosynthetically at 28℃ in minimal medium containing malate as carbon source.

b. 谷氨酸浓度为 0.1%,硫酸铵浓度为 7.5 mM。0.1% glutamate and 7.5 mM (NH₄)₂SO₄

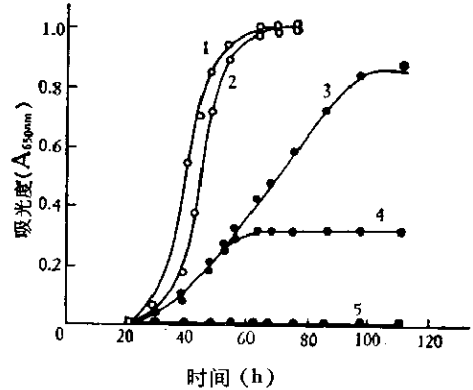


图 1 浑球红假单胞菌突变株 204 在不同浓度谷氨酸培养基中的生长情况

Fig. 1 Growth of *R. sphaeroides* mutant 204 as a function of glutamate concentration

添加不同浓度谷氨酸的基础培养基以苹果酸为碳源,内含 7.5mM 硫酸铵
Glutamate added to minimal medium containing malate as carbon source and 7.5 mM (NH₄)₂SO₄

○—○ 菌株 601 Strain 601

●—● 突变株 204 Mutant 204

1,3 加入谷氨酸 5mM Added 5mM glutamate

2,4 加入谷氨酸 1mM Added 1mM glutamate

5 不加谷氨酸 Without glutamate

菌体量的增长与 Glu 浓度无关。

世代时间研究表明,当以 Glu 为唯一氮源时,野生型 601 及突变株 204 的世代时间均为 8.2 小时(见表 1)。当在 Glu 中添加 NH₄⁺ 时,601 的世代时间缩短为 3.4 小时,比以 NH₄⁺ 为唯一氮源时还少 1 小时左右;而 204 的世代时间仍为 8.2 小时。

(二) Glu 缺陷型的酶活特征

对突变株 204 及野生型 601 的 GOGAT, GS 和固氮酶的比活作了比较。突变株 204 无论在光照厌氧条件下生长或者在暗处好氧下生长均无可检测的 GOGAT 活性,而野生型 601 在这两种情况下均有此酶活性,这表明 Glu 缺陷型 204 菌株是 GOGAT⁻ 突变株(见表 2)。

用整体细胞分析 GS 活性(γ-谷酰基转移酶分析),结果表明,当野生型 601 在含 Glu 的基础培养基中生长时,其 GS 活性

是突变株 204 的 6.2 倍,脱腺苷酰化 GS 的比活约为突变株的 29 倍。当野生型 601 在含氮的基础培养基中生长时,其 GS 比活和腺苷化程度与突变株 204 相似。

缺失 GOGAT 的突变株中几乎测不出固氮活性。固氮酶活性的动态分析表明(见图 2),野生型 601 生长进入对数期时,出现固氮酶活性,它催化乙炔还原和光合放氢。生长达到平稳期后,固氮活性逐渐下降直至零。但是 GOGAT⁻ 突变株不表现

培养四天后只能在 Glu 平板上生长,其生长速度与野生型差不多;生长至第十天,突变株 204 在脯氨酸、天冬氨酸、Glu 和丙氨酸为唯一氮源的培养基上生长微弱;在组氨酸、丝氨酸、精氨酸、甘氨酸、腺嘌呤、尿素和硫酸铵为唯一氮源的培养基上则完全不能生长,在氮素代谢上表现了明显的多效缺陷(表 3)。

(四) 自发回复突变频率

分离突变株 204 的回复子,采用不含 Glu 的基础培养基通 N₂ 或者补充 NH₄⁺。在这两种氮源上,突变株 204 都不长,而经过第二次自发回复突变产生的回复子则能生长。回复突变的频率为 2.0—2.1 × 10⁻⁹,这说明突变株 204 缺失 GOGAT 是由于点突变引起的。回复子 R407 和 R408 都由 GOGAT⁻ 变成 GOGAT⁺,它们同时获得在上述各种氮源上生长的能力(见表 3),它们的固氮酶比活和 GS 比活也和野生型 601 相似(见表 2)。

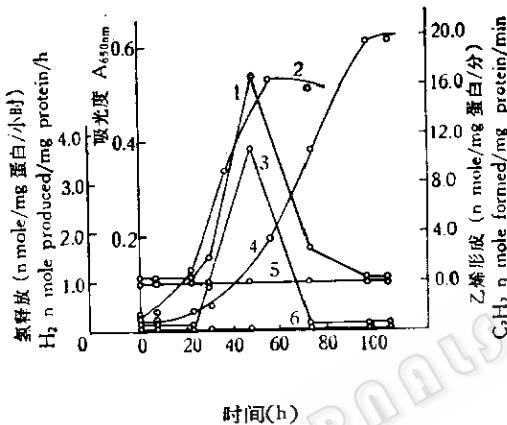


图2 野生型 601 及 GOGAT⁻ 突变株 204 乙炔还原和放氢的动态分析

Fig. 2 Kinetics of acetylene reduction and hydrogen production of *R. sphaeroides* 601 and the *glu*⁻ mutant 204

采用无氮 RCVBN 培养基,补充 0.1% 谷氨酸,菌体在 28℃ 培养光照强度 2200 lx

- 1. 601 固氮酶活性 601 N₂ase activity
- 2. 601 生物量 601 biomass A₄₅₀
- 3. 601 放氢 601 H₂ produced
- 4. 204 生物量 204 biomass A₄₅₀
- 5. 204 固氮酶活性 204 N₂ase activity
- 6. 204 放氢 204 H₂ produced

出乙炔还原和放氢活性。

(三) GOGAT⁻ 突变株对不同氮源的利用

在含各种氮源的固体培养基上研究突变株的氮源利用,观察到野生型 601 能分别利用脯氨酸、组氨酸、腺嘌呤、尿素等多种氮源,并且生长迅速。但是突变株 204

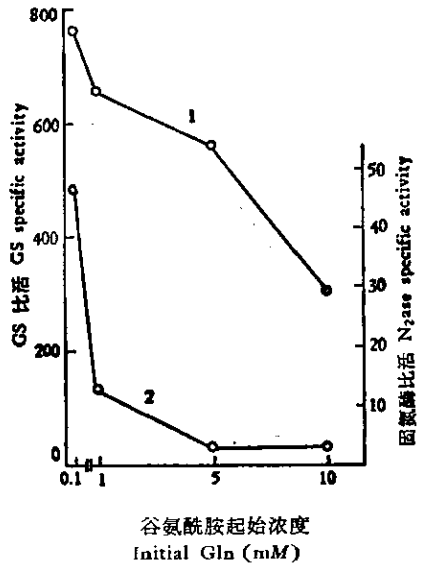


图3 谷氨酰胺对固氮酶和 GS 活性的影响

Fig. 3 Effect of glutamine on activity of nitrogenase

- 1. GS 比活 GS specific activity
- 2. 固氮酶比活 N₂ase specific activity

表 2 突变株 204、亲本菌株 601 和回复子的 GOGAT、GS 以及固氮酶的活性
Table 2 GOGAT, GS and nitrogenase activities of mutant 204, its parental strain 601 and revertants.

菌株 Strain	表型 Phenotype	氮源 Nitrogen source	酶 活 性 ^a Enzyme activities				
			GOGAT	GS			N ₂ ase
				-Mg ²⁺	+Mg ²⁺	+Mg ²⁺ / -Mg ²⁺ (%)	
601	GOGAT ⁺	谷氨酸 Glutamate	1.10	967	574	59.4	18.6
		(NH ₄) ₂ SO ₄	3.45	189	24.5	12.8	0.00
204	GOGAT ⁻	谷氨酸 Glutamate	0.00	155	20.0	12.9	0.00
R407 ^b	GOGAT ⁺	谷氨酸 Glutamate	1.83	938	554	59.1	26.7
R408	GOGAT ⁺	谷氨酸 Glutamate	1.41	841	568	67.5	24.7

a. GOGAT 活性以 n mole NADPH 氧化/分·毫克蛋白表示; GS活性以 n mole γ- 谷酰基氧肟酸/分·毫克蛋白表示;固氮酶活性以 n mole 乙烯/分·毫克蛋白表示。
GOGAT activities are expressed as n mole NADPH oxidized min⁻¹ (mg protein), GS activities as n mole γ-glutamyl hydroxamate formed min⁻¹ (mg protein), and nitrogenase activities as n mole C₂H₄ formed min⁻¹ (mg protein).

b. R407 和 R408 是突变株 204 的回复子,它们从含苹果酸并通氮气的生长条件下筛选获得。
R407 and R408 were the revertants of mutant 204 selected for ability to grown on malate-N₂.

表 3 野生型 601, 突变株 204 和 204 的回复子在不同氮源培养基上的生长情况^a
Table. 3 Growth of *Rps. sphaeroides* 601 (wild type), mutant 204, and the revertants of mutant 204 on various compounds as sole nitrogen source^a

菌株 Strain	野生型 (wild type) 601	突变株 (mutant)204	回 复 子 (revertant) R407 or R408
氮源 Nitrogen source			
脯氨酸 Pro	+	-	+
组氨酸 His	+	-	+
谷氨酸 Glu	+	+	+
谷氨酰胺 Gln	+	-	+
丝氨酸 Ser	+	-	+
丙氨酸 Ala	+	-	+
精氨酸 Arg	+	-	+
甘氨酸 Gly	+	-	+
天冬氨酸 Asp	+	-	+
腺嘌呤 Adenine	+	-	+
尿素 Urea	+	-	+
硫酸铵 Ammonium sulfate	+	-	+
酪蛋白 Casein			
水解物 hydrolysate	+	+	+

+ ,生长 Growth; - ,不长^b No growth
a. 在无氮 RCVBN 培养基中分别添加 400 μg/ml 的氮源。
The medium was RCVBN lacking ammonium salts supplemented 400 μg/ml of nitrogen source.
b. 在 30℃ 培养 4 天后测定生长情况。
Growth was estimated similarly after 4 day incubation at 30℃.

表 4 突变株 204 游离氨基酸库成份的分析及其与野生型 601 的比较

Table 4 The comparison of the content and composition of free amino acid between mutant 204 and wild type 601

氨基酸 Amino acid	胞内游离氨基酸的浓度 (n mole/mg 菌体蛋白质) Intracellular free amino acid concentration (n mole/mg of cell protein)	
	突变株 204 Mutant 204	野生型 601 Wild type 601
谷氨酰胺 Glutamine	12.23	0.77
谷氨酸 Glutamate	31.53	33.48
甘氨酸 Glycine	1.07	1.50
丙氨酸 Alanine	0.75	0.96
胱氨酸 Cystine	4.48	0.88
缬氨酸 Valine	3.64	0.49
异亮氨酸 Isoleucine	0.36	—
亮氨酸 Leucine	0.48	0.54
赖氨酸 Lysine	1.44	4.18
氨 Ammonium	6.36	19.72
精氨酸 Arginine	0.88	—
总氨基酸及氨库 Total free amino acid and ammonium pool	63.22	62.52

表 5 谷氨酰胺作为浮球红假单胞菌固氮系统的反馈抑制剂

Table 5 Glutamine as the feedback inhibitor of nitrogenase system in *Rps. sphaeroides*

加入的谷氨酰胺* (毫克分子) Glutamine added* (mM)	乙炔形成 Ethylene formation	
	毫微克分子/分·毫克蛋白质 n mole/min per mg protein	(%)
0.0	28.8	100
0.1	6.14	21
1.0	0.614	2
5.0	0.656	2
10	0.558	2

* 菌体在以谷氨酸为唯一氮源的培养基中光照厌氧生长, 离心收集菌体, 用基础盐-磷酸缓冲液 (pH 6.8) 洗两次, 洗涤过的菌体重悬于缓冲液中, 饥饿半小时, 加入不同浓度的谷氨酰胺, 然后测定固氮酶的活性。

Cells were grown anaerobically in the light on minimal medium with glutamate as sole N source. Culture was harvested by centrifugation and washed twice with basal salts-phosphate buffer (pH 6.8). The washed cells were resuspended in the buffer, starved for half an hour, and then various concentrations of glutamine were added.

(五) 突变株游离氨基酸库成份的变化

GOGAT⁻ 突变株上述表型的改变很可能与菌体内环境的变化有关。我们对突变株 204 和野生型 601 的胞内游离氨基酸库成份作了比较。结果表明 (见表 4), 突变株内 Gln 浓度高达 12—23 n mole/mg 菌

体蛋白, 它是野生型的 16 倍。这两个菌株的 Glu 含量与许多细菌一样, 分别占总游离氨基酸和氨含量的 50% 左右。

(六) Gln 的反馈调节

将菌株 601 培养在含不同浓度 Gln 的基础培养基 (即无氮的 RCVBN 培养基) 中, 至对数生长期, 分别测定固氮酶和 GS

活性,结果表明,随着 Gln 浓度增高,固氮酶和 GS 活性下降,两者下降的趋势一致(图 3)。此外,外源 Gln 对浑球红假单胞菌静止细胞的乙炔还原活性也有抑制作用,当无氮的 RCVBN 培养基中含 Gln 浓度为 0.1mM 时,乙炔还原活性只有原来的 1/5,当 Gln 浓度大于 1mM 时,乙炔还原活性几乎为零(表 5)表明 Gln 在某一浓度范围内,对固氮酶及 GS 有反馈阻遏或反馈抑制作用。其作用方式有待进一步研究。

讨 论

自 1970 年 Meers^[10] 发现 GOGAT 以来,已在多种细菌内发现此酶。本工作表明,浑球红假单胞菌也存在 GOGAT,它与固氮活性的调节密切相关。

前人曾分离了克氏杆菌和巴氏固氮螺菌的 GOGAT 基因突变种^[13],但是对这种突变株的固氮调节机制尚未见报道。试验表明,浑球红假单胞菌 GOGAT⁻ 突变株,由于 GOGAT 缺失,氨同化代谢中断,胞内游离氨基酸库内 Gln 浓度明显增高;与此同时 GS 活性明显下降,固氮酶活性丧失;当外源 Gln 浓度增高时,GS 活性与固氮酶活性下降的趋势一致;推测浑球红假单胞菌 GOGAT⁻ 突变株固氮酶活性的调节可能是通过 GS 或谷氨酰胺基因产物起作用的。

令人感兴趣的是,当浑球红假单胞野生型菌株在含氨的培养基中生长时,其 GS 活性下降,此时 GS 比活和腺苷化程度与 GOGAT⁻ 突变株的相一致。尽管目前对氨阻遏机制还没完全搞清楚,但一般认为,氨阻遏固氮酶的合成是以 GS 为中介的^[14]。如

果 Gln 对 GS 及固氮酶的影响与氨对它们的影响相似,这将为进一步研究紫色非硫细菌氨的瞬间可逆调节提供了线索。

1981 年 Brown^[15] 分离的绿脓杆菌 GOGAT⁻ 突变株具有氮素代谢的多效性缺陷。试验表明,浑球红假单胞菌的 GOGAT⁻ 突变株也具有氮素代谢多效缺陷的表型。尽管 Magasanik^[16] 认为,在氮源缺乏的条件下,GS 参与多种氮代谢酶的调节。但是,目前要说清楚这些现象看来还是比较困难的。

参 考 文 献

- [1] Neilson, A. H.: *J. Gen. Microbiol.*, **91**: 53—62, 1975.
- [2] 宋鸿遇: 植物生理学, **5**: 141—150, 1979.
- [3] Johnson, B. C.: *Bact.*, **128**: 683—688, 1976.
- [4] Tubbs, R. S.: *Nature*, **251**: 481—485, 1974.
- [5] Leonardo, J. M.: *J. Bact.*, **142**: 99—110, 1980.
- [6] Wall, J. D.: *Nature*, **258**: 630—631, 1975.
- [7] Siefert, E.: *Biochimie*, **60**: 261—265, 1978.
- [8] Wall, J. D.: *J. Bact.*, **137**: 1459—1463, 1979.
- [9] Weaver, P. F.: *Arch. Microbiol.*, **105**: 207—216, 1975.
- [10] Meers, J. L.: *J. Gen. Microbiol.*, **64**: 187—194, 1970.
- [11] Lowry, D. H.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [12] Tempest, D. W.: *J. Gen. Microbiol.*, **64**: 171—185, 1970.
- [13] Bani, D.: *J. Gen. Microbiol.*, **119**: 239—244, 1980.
- [14] Shanmugan, K. T.: Iron-Sulfur proteins Vol. 3, Lovenberg, W. ed., Academic press, N. Y., 1977, 1—13.
- [15] Brown, P. R.: *J. Bact.*, **147**: 193—197, 1981.
- [16] Magasanik, B.: *Trends in Biochemical Sciences*, **2**: 9—12, 1977.

GLUTAMATE SYNTHETASE MUTANT LACKING NITROGENASE ACTIVITY IN *RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES*

Song Hongyu Wu Yongqiang Yu Baolin

(Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

A glutamate auxotrophy strain 204 was isolated from photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides* strain 601 after mutagenesis with NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine). Biochemical analysis revealed that the mutant 204 was deficient in glutamate synthetase activity (asm^-). In comparison with parent strain the mutant had a low activity of glutamine synthetase and no nitrogenase activity as measured by hydrogen production and acetylene reduction. Furthermore, the mutant 204 was unable to grow on various sources of nitrogen such as ammonia, urea, histidine, serine, arginine, glycine, and adenine. This might reflect a defective pleiotrophic phenotype in nitrogen metabolism. With the frequency 2×10^{-9} spontaneous revertants of mutant 204 were selected on NH_4^+ -solid basal medium or minimal medium under nitrogen atmosphere. It was shown that both nitrogenase and glutamate synthetase activities were restored to the levels of the parent strain.

In addition, the revertants regained their abilities to utilize various nitrogen compounds as sole nitrogen source. Measurements of intracellular amino acid pool showed that the glutamine content in the mutant was higher than in the parent strain by 16 times. The introduction of extracellular glutamine to the medium caused markedly inhibits the nitrogenase activity. From above-mentioned results we conclude that *Rps. sphaeroides* possesses a highly responsive feedback system for the modulation of the function of nitrogenase in response to changes in pools of metabolic intermediates; and the intracellular level of glutamine is the key to the feedback modulation of nitrogenase activity.

Key words

Rhodopseudomonas sphaeroides; glutamate synthetase