

# 头状轮生链霉菌谷氨酰胺合成酶的研究

## II. 酶的性质和调节

崔凤文 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

**摘 要** 头状轮生链霉菌 (*Streptovercillium caespitosus*) 谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 生物活性的最适 pH 为 7。测活系统中必须加入  $Mn^{2+}$  或  $Mg^{2+}$ , 二者分别作激活离子时得到的酶的参数不同。 $Mn^{2+}$  对 GS 有稳定作用。一些金属离子如  $Ca^{2+}$  等强烈地抑制生物活性。GS 的最适温度为  $50^{\circ}C$ , 对 ATP、谷氨酸和  $NH_4Cl$  的  $K_m$  值分别为 1.75、2.78 和  $5mmol/L$ 。 $NH_4Cl$  的浓度小于  $10mmol/L$  时对酶有正协同效应, 大于  $10mmol/L$  时对酶有负协同效应。GS 可被氨阻遏, 比活能被硝酸盐促进。一些代谢物对 GS 有累积反馈抑制作用。发酵过程中加入氨后无“氨休克”现象, 高氨条件下的 GS 不受蛇毒磷酸二酯酶 (SVPDE) 的作用, 所以此酶无腺苷酰化-去腺苷酰化调节。

**关键词** 头状轮生链霉菌, 谷氨酰胺合成酶, 性质与调节

GS 在氨同化过程中起着关键作用, 因此已在多种微生物中进行过研究<sup>[1]</sup>。此外, 某些抗生素的生物合成与 GS 活力密切相关<sup>[2]</sup>。本实验室对丝裂霉素产生菌头状轮生链霉菌的初步研究表明 GS 比活力与丝裂霉素的产量正相关, 硝酸盐对二者均有促进作用。前文对头状轮生链霉菌 GS 同工酶进行了探讨<sup>[3]</sup>, 本文继续报道 GS 的性质和调节。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种: 头状轮生链霉菌 ATCC27422 和星状诺卡氏菌 334 (*Nocardia asteroides* 334), 培养温度同为  $28^{\circ}C$ 。

1.1.2 培养基 1: 见文献[3]。

1.1.3 培养基 2: 见文献[3]。

1.1.4 培养基 3 (%): 葡萄糖 1, 甘油 1, 蛋白胨 0.2, 酵母膏 0.1, 牛肉膏 0.1, pH7。

### 1.2 方法

1.2.1 培养方法: 头状轮生链霉菌见文献[3]。星状诺卡氏菌用培养基 3, 方式同头状轮生链霉菌。

1.2.2 GS 转谷氨酰基酶活 ( $GS_T$ ): 按 Bender 等<sup>[4]</sup>的方法, 于 pH6.7 测  $OD_{549}$ 。一个酶活单位 (U) 定为每分钟催化产生  $1\mu mol$  谷氨酰异羟基肟酸所需的酶量。

本文于1995年1月20日收到。1996年5月16日定稿。

**1.2.3 GS 生物合成酶活 ( $GS_B$ ):** 按 Shapiro 等<sup>[5]</sup>的方法, 于 pH7 测  $OD_{660}$ 。每分钟催化产生 1nmol 无机磷所需的酶量为一个酶活单位(U)。

**1.2.4 蛋白质测定:** Bradford<sup>[6]</sup>法。

**1.2.5 SVPDE 处理:** 缓冲液含 50mmol/L Tris-HCl, 2mmol/L  $MgCl_2$ , pH8。0.05U 的 SVPDE (type III, Sigma) 能处理 3mg 粗提液蛋白。37℃ 保温, 一定时间间隔取样测定。

## 2 结果和讨论

按前文的方法<sup>[3]</sup>纯化头状轮生链霉菌 GS 至电泳纯以进行本文研究, 用粗酶液或整体细胞之处文中另有指出。

### 2.1 GS 的一些基本性质

**2.1.1 pH 值对 GS 活力的影响:** 由图 1 可见,  $GS_T(Mn^{2+})$  的最适 pH 在 6.4~6.7 之间,  $GS_B(Mg^{2+})$  的最适 pH 为 7.0。

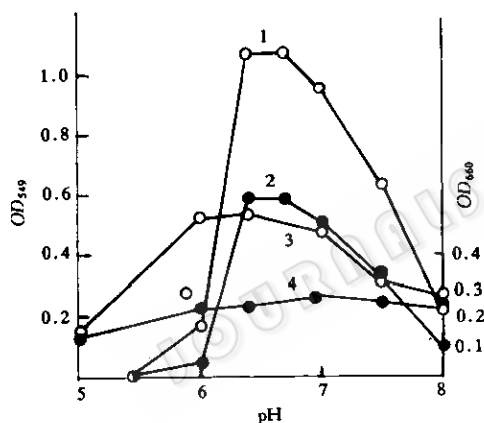


图 1 pH 对 GS 酶活的影响

Fig.1 Effect of pH on GS activity

1.  $GS_T, Mn^{2+}$  [0.8%  $(NH_4)_2SO_4$  作氮源培养 1d 0.8% ammonium sulfate grown];
2.  $GS_T, Mn^{2+}$  (0.3%  $KNO_3$  作氮源培养 1d 0.3% nitrate grown);
3.  $GS_T, Mg^{2+}$  (0.3%  $KNO_3$  作氮源培养 1d 0.3% nitrate grown);
4.  $GS_B (Mg^{2+})$ .

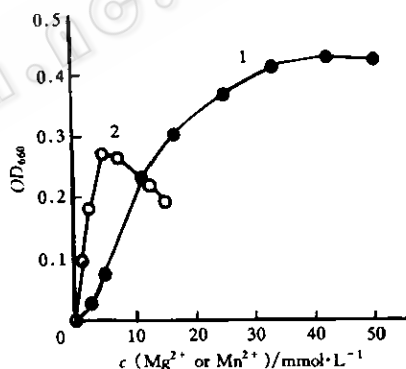


图 2 几种金属离子对  $GS_B$  的影响

Fig.2 Effect of several ions on  $GS_B$

1.  $Mg^{2+}$  作激活离子  $Mg^{2+}$  was used as activator;
2.  $Mn^{2+}$  作激活离子  $Mn^{2+}$  was used as activator.

**2.1.2 金属离子对 GS 的影响:** (1)  $Mn^{2+}$  对 GS 有稳定作用: EDTA 与酶液 (缓冲液含 50mmol/L Tris-HCl 和 1mmol/L  $MnCl_2$ ) 在 60℃ 保温 20min, EDTA 浓度为 40, 5 和 2.5mmol/L 时,  $GS_T$  分别保留 5.3%、12.7% 和 75.5%, 显然整合掉金属离子会降低酶对热的稳定性。EDTA 存在时, 1mol/L NaCl 对稳定性无作用。这一结果与大肠杆菌中 GS 的稳定和催化活性必须靠金属离子支持相符<sup>[7]</sup>。(2) 测活系统中必须有金属离子: 不同浓度的  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  对  $GS_B$  的影响很明显 (图 2), 在特定浓度下, 二者分别能激发出最

大的酶活力,  $\text{Mg}^{2+}$  的作用更强, 无  $\text{Mn}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  则测不出活力。此曲线与谷氨酸微生物<sup>[8]</sup>和吸水链霉菌<sup>[9]</sup>的很相似。(3) 使用不同金属离子对酶参数有影响: 用  $\text{Mn}^{2+}$  时, GS 对谷氨酰胺和羟胺的  $K_m$  值分别为  $11.1\text{mmol/L}$  和  $1.6\text{mmol/L}$ , 用  $\text{Mg}^{2+}$  时分别为  $7.5\text{mmol/L}$  和  $0.96\text{mmol/L}$ ;  $\text{GS}_T$  的 pH 曲线的变化如图 1。  $\text{GS}_B$  中,  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  支持的酶活对抑制剂的反应有不同。(4) 一些重金属离子对酶活有抑制作用: 测活反应体系中加入  $50\text{mmol/L}$  的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  或  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{GS}_B$  均受到强烈抑制, 大肠杆菌<sup>[10]</sup>和地中海拟无枝酸菌<sup>[11]</sup>中有类似的现象。

**2.1.3 GS 的最适温度:** 实验表明, 最适温度为  $50^\circ\text{C}$ 。

**2.1.4 GS 的底物专一性:** 分别以 ATP 和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的结构类似物作底物进行活力测定, 结果见表 1。地中海拟无枝酸菌等菌的底物专一性很强<sup>[1]</sup>, 但头状轮生链霉菌 GS 的较差。ATP 的结构类似物 ADP、GTP、CTP、UTP 代替 ATP 时, GS 均能表现活力, 其中 ADP 甚至超过 ATP 支持的; 以羟胺代替  $\text{NH}_4\text{Cl}$  也能达到正常酶活的 44.5%。据认为这可能与 GS 能催化较多的反应有关<sup>[11]</sup>。

**2.1.5  $\text{GS}_B$  的动力学:** 以  $\text{Mg}^{2+}$  为激活离子时, GS 对底物 ATP 和谷氨酸的动力学遵守典型的米氏方程, 表观  $K_m$  值分别为  $1.75\text{mmol/L}$  和  $2.78\text{mmol/L}$ 。但是 GS 对另一底物  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的饱和曲线较特殊, 如图 3 所示, 当  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的浓度小于  $10\text{mmol/L}$  时, 随着底物浓度的增加反应速度迅速加大,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的浓度大于  $10\text{mmol/L}$  时,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度的增大反而导致酶活下降, 说明  $\text{NH}_4\text{Cl}$  不仅是底物, 也是 GS 的别构调节物。  $\text{NH}_4\text{Cl}$  饱和曲线 Hill 作图是双相的折线(图 4), Hill 系数分别为 1.42 和  $-0.92$ , 表明低浓度的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  对 GS 有正协同效应, 高浓度的有负协同效应。枯草杆菌的 GS 也有此现象<sup>[12]</sup>。头状轮生链霉菌中  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的浓度很低时求得  $K_m$  为  $5\text{mmol/L}$ 。

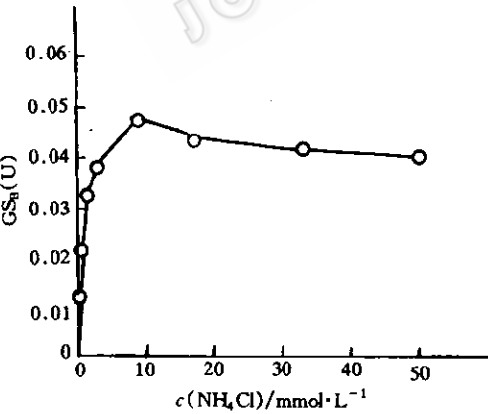


图3  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的饱和曲线

Fig.3 Saturation profile of  $\text{NH}_4\text{Cl}$

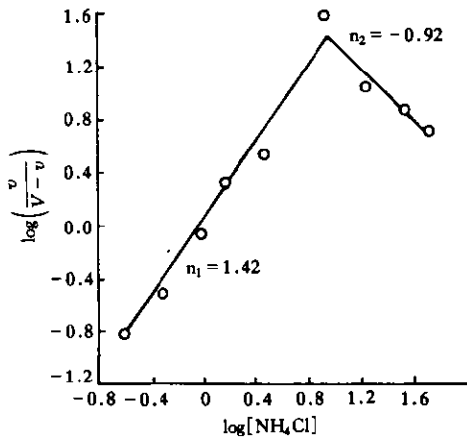


图4 GS 对  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的 Hill 图

Fig.4 Saturation profile of  $\text{NH}_4\text{Cl}$

$V$ : 最大反应速度 Maximum reaction speed;  
 $v$ : 反应速度 Reaction speed;  $n_1$ 、 $n_2$ : 斜率 Slope ratio.

表 1 GS<sub>B</sub> 的底物专一性\*Table 1 Substrate specificity of GS<sub>B</sub>

底物 Substrate	ATP	ADP	GTP	CTP	UTP	NH <sub>4</sub> Cl	Hydroxylamine hydrochloride
相对酶活 Relative activity / %	100	159.3	81.6	27.5	72.5	100	44.5

\* 几种核苷酸的浓度均为 7.5mmol / L, NH<sub>4</sub>Cl 为氨供体, 羟胺为氨供体时使用 ATP。

Concentration of these nucleotides were 7.5mmol / L, NH<sub>4</sub>Cl was another substrate. When hydroxylamine hydrochlorides was used, ATP was another substrate.

## 2.2 GS 的调节

**2.2.1 GS 可被氨阻遏:** 由图 5 可见, 以硝酸盐为氮源时在氮量相差一倍的情况下 GS<sub>T</sub> 比活的峰高差不多; 以氨为氮源时 GS 的比活一直处于很低水平, 表明 GS 的合成可被氨阻遏。

**2.2.2 代谢产物对 GS 的反馈抑制:** 由于 GS 处于代谢的中心地位, 许多产物对其具反馈调节作用, 如表 2 所示。随金属离子不同, 几种抑制剂反馈抑制作用的程度也不同, 但大致平行。选择三种作用较强的抑制剂 Ser, Ala 和 Gly, 试验它们共同作用时的特点。Ser+Ala 的抑制为 50%, Ser+Ala+Gly 的抑制为 57.1%, 与累积反馈抑制的计算值 47.3% 和 59.8% 基本相符, 由此说明 GS 受某些代谢物的累积反馈抑制, 即各种抑制剂分别作用于 GS 上的不同位点, 抑制作用互相独立。此现象与有关的报道<sup>[1,9]</sup>相似。

表 2 不同代谢产物对 GS 的反馈抑制作用(GS<sub>B</sub>)\*Table 2 Feedback inhibition of different metabolites on GS (GS<sub>B</sub>)

反馈抑制剂 Inhibitant	L-Gln	L-Ser	L-Ala	L-Try	L-Gly	$\alpha$ -KG	AMP	CTP	None
Inhibition / %									
Mg <sup>2+</sup>	10	18.5	35.5	11.4	23.5	5.5	13.8	128	0
Mn <sup>2+</sup>	18.2	10.9	32.5		20.8	1.3			0

\* AMP 的浓度为 1mmol / L, 其余的均为 5mmol / L。

Concentration of AMP was 1mmol / L, Those of the rest were 5mmol / L.

**2.2.3 GS 无共价调节:** (1) 高氨(对应腺苷酰化状态)和低氨(对应非腺苷酰化状态)条件下提出的 GS 其 pH 曲线完全相符, 没有漂移(图 1), 电泳迁移率及  $K_m$  等也相同。如有腺苷酰化, 两种状态的酶诸多参数是不同的。(2) 发酵过程中加入氨盐后无“氨休克”现象, 如图 6 所示。具腺苷化调节的菌中此现象通常很明显, 如吸水链霉菌<sup>[9]</sup>。(3) 以 SVPDE 处理高氨条件下得到的 GS, GS<sub>B</sub> 活力无变化, 而对照有变化(表 3), 所以头状轮生链霉菌中 GS 无腺苷化调节。

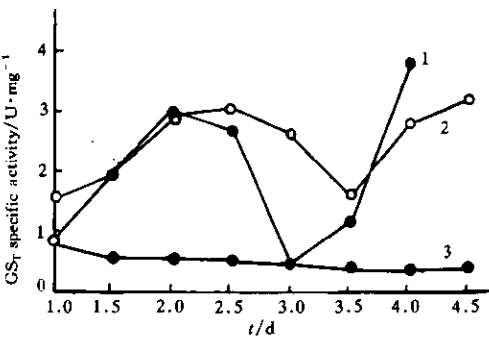


图5 不同氮源条件下GS比活力的变化

Fig.5 Changes of GS specific activity under different nitrogen sources

- 1. 0.3% KNO<sub>3</sub> 作氮源  
0.3% KNO<sub>3</sub> as nitrogen source;
- 2. 0.6% KNO<sub>3</sub> 作氮源  
0.6% KNO<sub>3</sub> as nitrogen source;
- 3. 0.8% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作氮源  
0.8% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as nitrogen source.

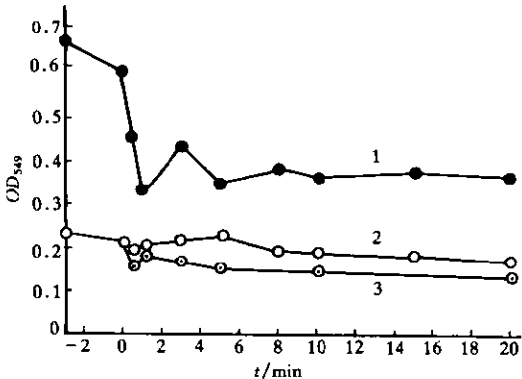


图6 整体细胞酶活无“氨休克”现象(GS<sub>T</sub>)

Fig.6 No “ammonium shock” phenomenon was shown(GS<sub>T</sub>)

- 1. Mn<sup>2+</sup>作激活离子, 40%接种量  
Mn<sup>2+</sup> supported, 40% inoculation;
- 2. Mn<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>作激活离子, 40%接种量  
Mn<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup> supported, 40% inoculation;
- 3. Mn<sup>2+</sup>作激活离子, 10%接种量  
Mn<sup>2+</sup> supported, 10% inoculation.

表3 SVPDE处理对头状轮生链霉菌及星状诺卡氏菌GS的影响(GS<sub>B</sub>)

Table 3 Effect of SVPDE on GS from *Str. caespitosus* and *N. asteroides*

	Mn <sup>2+</sup>		Mn <sup>2+</sup> +Mg <sup>2+</sup>	
	-SVPDE	+SVPDE	-SVPDE	+SVPDE
<i>N. asteroides</i>	0.679	1.312	0.189	0.322
<i>Str. caespitosus</i>	0.657	0.660	0.172	0.170

由以上结果可以看到,头状轮生链霉菌中GS受金属离子、底物和一些代谢产物等多方面的调节,其中氮源是最主要的调节物。

参 考 文 献

[1] 梅百根,焦瑞身.生物化学和生物物理学报,1986,18(6):491~499.

[2] 焦瑞身,刘慈俊,金志坤,等.中国科学(B辑),1983,12:1097~1104.

[3] 崔凤文,焦瑞身.微生物学报,1996,36(1):31~36.

[4] Bender R A, Jassen K A, Resnick A D et al. *J Bacteriol*, 1977, 129: 1001~1009.

[5] Shapiro B M, Stadtman E R. *Ann Rev Microbiol*, 1970, 24: 501~524.

[6] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254.

[7] Stadtman E R, Ginsburg A. The glutamine synthetase of *Escherichia coli*, structure and control. In: Boyer P S ed. *The Enzymes*. New York: Academic Press, 1974. 755~807.

[8] Tachiki T, Wakisaka S, Kumaga H et al. *Agric Biol Chem*, 1981, 45: 1487~1492.

[9] 夏天辉,焦瑞身.中国科学(B辑),1985,11:997~1003.

- [10] Stadtman E R, Ginsburg A, Ciardi J E *et al.* Multiple forms of glutamine synthetase produced by enzyme catalysed adenylation and deadenylation reactions. In: Weber G ed. *Advances in Enzyme Regulation*. Oxford: Pergamon Press, 1970. 8: 99~118.
- [11] Ginsburg A, Stadtman E R. Regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase. In: Prusiner S *et al.* ed. *The Enzymes of Glutamine Metabolism*. New York: Academic Press, 1973. 9~43.
- [12] Deuel T F, Stadtman E R. *J Biol Chem*, 1970, **245**: 5206~5213.

## STUDIES ON GLUTAMINE SYNTHETASE FROM *STREPTOVERTICILLIUM CAESPITOSUS*

### II. PROPERTIES AND REGULATION OF THE ENZYME

Cui Fengwen Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

**Abstract** The activity of purified GS was strongly elevated by  $Mn^{2+}$  or  $Mg^{2+}$ , where other metabolic ions such as  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  were inhibitory.  $Mn^{2+}$  had a pronounced stabilizing effect, so it was incorporated in buffer system for activity study. The optimum pH of  $GS_B$  was 7, and optimum temperature was  $50^{\circ}C$ .  $K_m$  values of GS for ATP, glutamate and  $NH_4Cl$  were 1.75, 2.78 and 5mmol/L, respectively.  $NH_4^+$  exhibited positive homotropic response when its concentration was lower than 10mmol/L, but give negative homotropic response when its concentration was higher than 10mmol/L. Cumulative feedback inhibition of GS by its metabolites was demonstrated. The enzyme was repressed by  $NH_4^+$ , its specific activity could be increased by nitrate. No phenomenon of "ammonium shock" appeared after ammonium was added during cultivation, in addition, GS from high ammonium cultures was not affected by SVPDE, so there is no evidence for adenylation-deadenylation regulation system for GS of *Str. caespitosus*.

**Key words** *Streptovercillium caespitosus*, Glutamine synthetase, Properties and regulation