

耐热嗜酸古细菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 谷氨酰胺合成酶的表达调控和性质研究*

殷志敏** 陈群英 司马健 吴一凡 张双全

(南京师范大学生命科学学院生物化学与生物制品研究所, 南京 210097)

摘要 古细菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 细胞内谷氨酰胺合成酶的表达量随着培养条件的改变有较大差异, RNA 印迹表明, 该差异是在 mRNA 水平受到调控. 经 DEAE-Sepharose 和 Sephacryl S-300 两步分离酶蛋白, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和凝胶过滤测定分子质量, 表明该酶为 12 个相同亚基组成, 分子质量为 630 ku 的多聚体. 该酶的最佳 pH 为 7.3; 对羟胺、谷氨酰胺、ADP 和 Mn^{2+} 的 K_m 值分别为 3.5 mmol/L、1.3 mmol/L、0.15 mmol/L 和 0.24 mmol/L; 其 γ -谷氨酰转移酶活性和生物合成酶活性的最佳温度均为 90°C. Arrhenius 曲线表明, γ -谷氨酰转移酶的活化能为 47 kJ/(mol · K), 生物合成酶的活化能分别为 29 kJ/(mol · K) (40 ~ 75°C) 和 10 kJ/(mol · K) (55 ~ 90°C). 对该酶的抑制剂研究发现, 与其他来源的谷氨酰胺合成酶不同, 甘氨酸、L-丙氨酸能明显抑制 *S. acidocaldarius* 谷氨酰胺合成酶的活性, 而常规的抑制剂如 L-色氨酸、L-组氨酸、5'-AMP 却没有抑制作用, 甘氨酸、L-丙氨酸的抑制作用为竞争性抑制, 推断该酶的活性调节与绝大多数革兰氏阳性菌一样不受腺苷酰化的影响.

关键词 古细菌, 谷氨酰胺合成酶, 分离纯化, 热稳定性, 抑制剂

学科分类号 Q93

谷氨酰胺合成酶 (L-谷氨酸: 氨连接酶, glutamine synthetase GS EC6.3.1.2) 是细胞中最古老、最广泛存在的酶类^[1]. 它参与了生物体的氮代谢, 是多种氨基酸合成时氮源的供体, 因而成为生物体必不可少的重要酶类. 在细菌和真核生物中, 该酶及其基因已被广泛研究^[2~6].

根据 GS 氨基酸序列的同源性分析将其分为三类: GS-I, GS-II 和 GS-III, 其中 GS-I 型又可进一步划分为 GS-I α 和 GS-I β (受磷酸腺苷酰化共价修饰) 两大亚型.

在原核生物中, 来源于革兰氏阴性菌如 *Escherichia*, *Salmonella* 和 *Klebsiella* 的 GS 调控十分复杂, 酶活主要受到腺苷酰化 (adenylation/deadenylation) 共价修饰影响^[7]. 绝大多数来源于革兰氏阳性菌如 *Bacillus* 等的 GS 则不被腺苷酰化共价修饰^[8].

目前, 有关古细菌 GS 的性质和调控机制的报道很少^[9,10], 我们已在耐热嗜酸古细菌 *Sulfolobus acidocaldarius* GS (Sac-GS) 基因的克隆、序列测定及在大肠杆菌中的诱导表达等方面开展了一些工作^[11], 本文着重对于该酶的一些特性 (如最佳酶活条件、对各种抑制剂的敏感度及其腺苷酰化共价修饰等方面) 进行了探讨, 这些方面的研究对揭示古细菌 GS 的调控机制有重要意义, 并对阐明生物演变过程也有很好的参考价值.

1 材料和方法

1.1 试剂

Sephacryl S-300、DEAE-Sepharose 和 Hybond N⁺ 尼龙膜等为 Pharmacia 公司产品, 其他分析纯试剂为 Sigma 公司和 Merck 公司产品.

1.2 细菌培养

正常实验中 *S. acidocaldarius* (DSM639) 按 Hettmann 等^[12]的方法进行培养, 生长条件对比实验中用 10 mmol/L 谷氨酸或谷氨酰胺取代 10 mmol/L 和 1.5 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$.

1.3 RNA 印迹

将在不同培养条件下生长的 *S. acidocaldarius* 菌体经破壁后用常规异硫氰酸胍法提取总 RNA, 取不同量进行 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳后转到 Hybond N⁺ 膜上, 以地高辛标记的来源于 *S. acidocaldarius* GS 基因的 RNA 为探针 (约 600 nt), 68°C 杂交过夜, 用化学发光法检测结果.

1.4 活性测定

GS 合成谷氨酰胺的活性测定参考 Bender

* 南京师范大学高学历人才启动基金资助项目 (2001SWXXGQB914).

** 通讯联系人.

Tel: 025-3598216, E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com

收稿日期: 2003-01-13, 接受日期: 2003-03-05

等^[13]的方法, 用谷氨酸 (glutamate)、 NH_4^+ 、和 ATP 在生成谷氨酰胺时释放无机磷的量来衡量. 由于 *S. acidocaldarius* 的 GS 是嗜热酶, 所以反应温度为 $40 \sim 100^\circ\text{C}$, 反应时间为 15 min 或更少. GS 的 γ -谷氨酰转移酶 (γ -glutamyl transferase) 活性测定是在 $40 \sim 100^\circ\text{C}$ 反应温度下, 参照 Shapiro 等^[14]的方法进行.

1.5 分子质量测定

S. acidocaldarius GS 单体的分子质量通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 按 Laemmli^[15]的方法测定, 天然蛋白的分子质量通过 Sephacryl S-300 凝胶过滤柱进行测定.

1.6 去除共价修饰的腺苷基团

将部分纯化或完全纯化的 *S. acidocaldarius* GS 在 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)、1 mmol/L MgCl_2 缓冲液条件下, 用 50 μg 蛇毒磷酸二酯酶 (SVP, phosphodiesterase I) 37°C 处理 3 h, 以去除共价修饰的腺苷基团 (adenylation).

2 结 果

2.1 不同碳氮源条件下 *S. acidocaldarius* 的生长

S. acidocaldarius 通常生长在以葡萄糖为碳源和 NH_4Cl 为氮源的培养基中. 实验发现, 当用谷氨酸或谷氨酰胺作为唯一的碳源和氮源时, 该菌也能生长, 但生长周期延长, 细菌数加倍的时间由原来的 9 h 增加到 12 h (谷氨酸为唯一碳、氮源) 和 18 h (谷氨酰胺为唯一碳、氮源) (图 1).

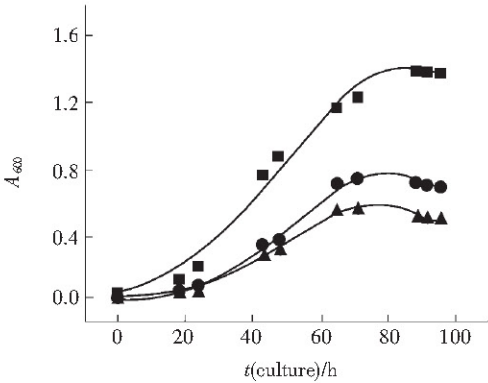


Fig. 1 The growth curves of *S. acidocaldarius* on different substrates

■—■: 5 mmol/L sucrose + 1.5 mmol/L ammonium sulfate + minimal medium ; ●—●: 10 mmol/L glutamate + minimal medium; ▲—▲: 10 mmol/L glutamine + minimal medium.

2.2 不同生长条件下 GS mRNA 表达量的差异

2.1 的实验结果显示在不同碳源和氮源条件下, *S. acidocaldarius* 的生长情况有所不同. 根据已有的文献认为细胞内 GS 的表达量和活性与此密切相关, 我们在先前的研究中也发现在以谷氨酰胺为唯一碳源和氮源时, *S. acidocaldarius* GS 的表达量明显减少. RNA 印迹结果表明在加入谷氨酰胺时, GS 基因的表达在转录水平受到了抑制 (图 2).

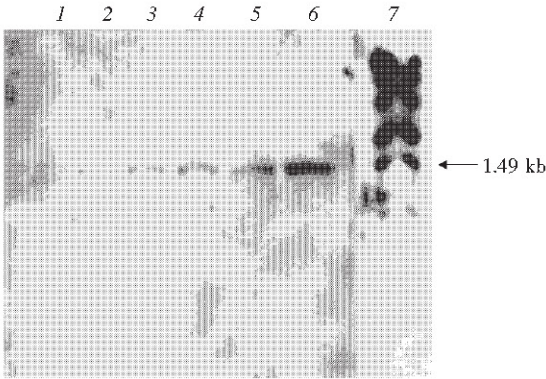


Fig. 2 Northern blot analysis of the GS mRNA transcripts under different culture condition

1 ~3: 2 μg , 4 μg and 6 μg RNA from glutamine cultured cells; 4 ~6: 2 μg , 4 μg and 6 μg RNA from glucose and ammonium sulfate cultured cells; 7: $\lambda\text{Sty I}$ marker.

2.3 GS 天然蛋白分子质量的测定

从 *S. acidocaldarius* 细胞中经 DEAE-Sephacryl 和 Sephacryl S-300 柱分离纯化得到电泳纯的 GS 蛋白, SDS-PAGE 分析其分子质量为 53 ku (已发表)^[9]. 图 3 表明, 通过 Sephacryl S-300 凝胶过滤

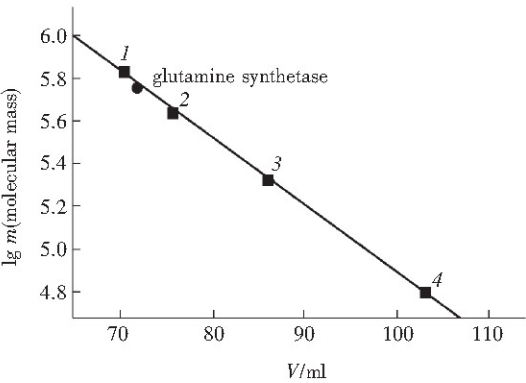


Fig. 3 Molecular mass of GS determined by gel filtration standard proteins : 1 : thyroglobulin (669 ku) ; 2 : ferritin (440 ku); 3 : catalase (232 ku); 4 : albumin (66 ku).

测定的 GS 天然蛋白分子质量约为 630 ku. 根据两种方法测得分子质量的倍比关系, 我们认为该酶是由 12 个亚基组成的多聚体, 这与其他原核生物来源的 GS 的特性完全符合.

2.4 GS 的最佳 pH

虽然 *S. acidocaldarius* 生长在酸性很强的环境中, 但其 GS γ -谷氨酰转移酶活性的最佳 pH 在 37℃ 时为 7.3, 这一 pH 值与 *S. acidocaldarius* 细胞内的生理 pH 值 6.5 基本一致^[16].

2.5 GS 的最适温度和活化能

实验结果表明: GS 的最佳谷氨酰胺合成酶活性和最佳 γ -谷氨酰转移酶活性均在 90℃ 左右^[11], 当温度低于 50℃ 时, 谷氨酰胺合成酶活性和 γ -谷氨酰转移酶活性均很低, 50~90℃ 之间为线性增长, 90℃ 后酶活明显下降. 经 Arrhenius 图分析发现 (图 4), γ -谷氨酰转移酶的活化能为 47 kJ/(mol·K) (40~90℃), 生物合成酶的活化能分别为 29 kJ/(mol·K) (40~75℃) 和 10 kJ/(mol·K) (55~90℃), 说明该酶在 40~90℃ 的温度变化时有一个构象转变过程.

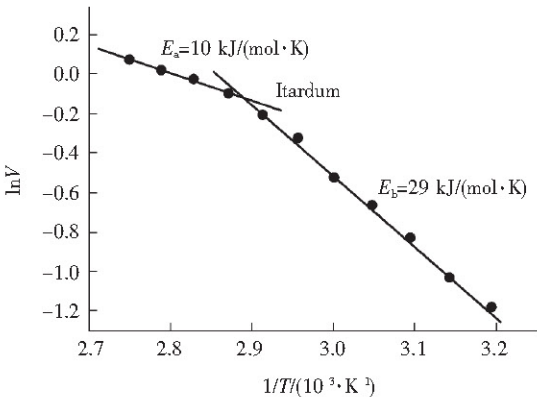


Fig. 4 Arrhenius plot for the biosynthetic reaction

2.6 GS 的酶促动力学和抑制剂研究

我们利用 Lineweave-Burk 曲线研究了各种底物浓度的变化对 *S. acidocaldarius* GS γ -谷氨酰转移酶活性的影响, 结果表明: 羟胺 (hydroxylamine)、谷氨酸、ADP 和 Mn^{2+} 的 K_m 值分别为 3.5 mmol/L、1.3 mmol/L、0.15 mmol/L 和 0.24 mmol/L (图略).

抑制剂研究表明, 甘氨酸、L-丙氨酸能明显抑制 *S. acidocaldarius* GS 的酶活, 而常规的原核生物 GS 抑制剂如 L-色氨酸、L-组氨酸、5'-AMP 对该酶没有抑制作用 (表 1), 通过甘氨酸、L-丙氨酸对

谷氨酰胺的 Lineweave-Burk 曲线表明该抑制作用为竞争性抑制 (图 5).

Table 1 Comparison of the effects of feedback inhibitors on the GS activity of *S. acidocaldarius* with those reported from other archaeal and bacterial GS

Inhibitors	c/ (mmol·L ⁻¹)	Inhibitor of GS activity/%				
		<i>S. acidocaldarius</i>		Published results		
		a	b	<i>M. iwanovi</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
L-alanine	10	97	52	65	30	75
glycine	10	92	54	38	10	51
L-tryptophan	5	0	0	30	15	6
L-histidine	5	0	0	17	9	16
5'-AMP	10	0	10	23	30	95

a: transferase activity with Mn^{2+} as cofactor; b: biosynthetic activity with Mg^{2+} as cofactor.

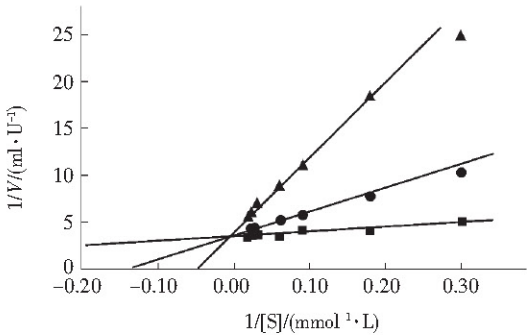


Fig. 5 Lineweave-Burk-plots for glutamine and in the presence of L-alanine and glycine

▲—▲: 0.28 mmol/L L-alanine; ●—●: 0.28 mmol/L glycine; ■—■: no addition.

2.7 GS 的腺苷酰化研究

通常 $MgCl_2$ 仅对腺苷酰化的 GS γ -谷氨酰转移酶活性产生抑制作用. 因此可通过 $MgCl_2$ 对该酶活性的抑制程度来估算该酶被腺苷酰化的程度^[17]. 蛇毒磷酸二酯酶 (SVP) 能去除腺苷酰化的共价修饰, 用 SVP 处理过的 GS 不再被 $MgCl_2$ 抑制, 用此方法可判别 GS 是否被腺苷酰化共价修饰.

本实验对不同培养条件下的 *S. acidocaldarius* GS 用 SVP 处理, 发现 SVP 并不能改变 GS 的 γ -谷氨酰转移酶活性. 通过对各种原核生物来源的 GS 腺苷酰化共价修饰位点酪氨酸附近的保守序列进行比较, 发现 *S. acidocaldarius* GS 的保守序列与其他

被腺苷酰化共价修饰的保守序列同源性很低, 18 个氨基酸中仅有 6 个氨基酸相同 (表 2). 到目前为止, 该段保守序列同源性低于 15 个氨基酸的 GS 均不被腺苷酰化共价修饰.

Table 2 Comparison of amino acid sequences of the site responsible for adenylylation

Tyrosine position	Strain	Amino acid sequence of adenylylation site	Amino acid similarity
398	<i>Ec</i>	IHPGEAMDKNLYDLPPEE	18/18 *
398	<i>St</i>	*****P*****Y*****	17/18 *
397	<i>Tf</i>	***AT*****Y***A**	15/18 *
402	<i>An</i>	*****PL***IYES****	13/18
373	<i>Bs</i>	LEAPAPI * R * IYVMSK **	5/18
372	<i>Ca</i>	LQ *PAEVEA *IFAMTE *Q	3/18
400	<i>Ss</i>	*D**DPV *E *IYHLT ** K	8/18
402	<i>Sa</i>	LD **DPV *E *IYHMSK * K	6/18
384	<i>Hv</i>	LDCPDVRE *IYEFDEVI	2/18
358	<i>Pf</i>	*D *FSYVEE *VYEMSE * K	5/18

Ec: *E. coli*; *St*: *Salmonella typhimurium*; *Tf*: *Thiobacillus ferrooxidans*; *An*: *Anabaena* sp; *Bs*: *Bacillus subtilis*; *Ca*: *Clostridium acetobutylicum*; *Ss*: *S. solfataricus*; *Sa*: *S. acidocaldarius*; *Hv*: *Haloferax volcanii*; *Pf*: *Pyrococcus furiosus*. The tyrosine residue potentially accessible to adenylylation is shown in bold type. * designate the enzymes which are regulated by adenylylation.

3 讨 论

已有研究表明, 培养基中糖类与氮源的比例是决定大肠杆菌 GS 表达的关键, GS 的转录是受细胞内的谷氨酰胺和 2-酮戊二酸比例的控制^[18]. 我们的实验结果显示, *S. acidocaldarius* 细胞能在谷氨酸或谷氨酰胺作为唯一碳氮源的条件下生长, 但在该条件下 GS 的表达明显受到抑制, 在上述培养基中加入葡萄糖或蔗糖, 细胞生长明显加快, GS 的表达量也明显增加 (表 1). 糖类与氮源的比例对 GS 表达的调控主要是在 mRNA 水平上进行 (图 2), 说明在 *S. acidocaldarius* 细胞中, 谷氨酰胺合成酶的转录也与大肠杆菌相同, 受细胞内的谷氨酰胺和 2-酮戊二酸比例的控制.

来源于 *S. acidocaldarius* 的 GS 最适酶活温度为 90℃. 在温度低于 40℃ 时, 该酶几乎没有活性; 当温度从 40℃ 升至 90℃ 时, 该酶很快被活化. 这一特性与它来源于嗜热古细菌相吻合. 虽然其最适酶活温度为 90℃, 但只有在加入 Mn²⁺ 或 Mg²⁺ 时才能维持稳定, 说明二价阳离子在稳定 GS 蛋白中具

有十分重要的作用.

GS 受谷氨酰胺的代谢产物如: L-色氨酸, L-组氨酸, 5'-AMP, L-丙氨酸和甘氨酸等的反馈抑制, 这在所报道的微生物中是普遍现象. 在大肠杆菌细胞中, 由于 GS 主要受腺苷酰化 (adenylylation) 共价调节, 因此受以上抑制剂的影响不大 (表 1). 但在革兰氏阳性菌如枯草杆菌中, 由于其 GS 不受腺苷酰化共价调节, 受以上抑制剂的影响很大. *S. acidocaldarius* 的 GS 主要受 L-丙氨酸和甘氨酸的强烈抑制, 并且这种抑制具有协同效应, 该酶几乎不受其他 3 种抑制剂的影响, 表现出十分独特的调节类型. 我们通过氨基酸序列的分析发现 *S. acidocaldarius* 的 GS 虽然像 GSI-β (受腺苷酰化共价修饰) 一样具有一段插入序列^[9], 但又不具有腺苷酰化共价修饰所必需的保守氨基酸序列, 因此 *S. acidocaldarius* 的 GS 属于一种完全独特的并且知之不多的类型. 这一特征与其区别于 GS-α 和 GS-β 的独特基因类型是否相一致还有待于进一步探讨.

参 考 文 献

1 Kumada Y, Benson D R, Hillemann D, *et al.* Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (8): 3009 ~3013

2 Prusiner S, Stadtman E R. The terminal quinol oxidase of the hyperthermophilic archaeon *Acidianus ambivalens* exhibits a novel subunit structure and gene organization. *J Bacteriol*, 1973, **179** (4): 1344 ~1353

3 Alef K, Burkhardt H J, Horstmann H J, *et al.* Molecular characterization of glutamine synthetase from the nitrogen-fixing phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Z Naturforsch*, 1981, **36c**: 246 ~254

4 Streicher S L, Tyler B. Purification of glutamine synthetase from a variety of bacteria. *J Bacteriol*, 1980, **142** (1): 69 ~78

5 Sampaio M J, Rowell P, Stewart W D P. Purification and some properties of glutamine synthetase from nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena cylindrica* and *Nostoc* sp. *J Gen Microbiol*, 1979, **111** (1): 181 ~191

6 Stacey G, Van Baalen C, Tabita F R. Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacterium: regulation of glutamine synthetase. *Arch Biochem Biophys*, 1979, **194** (3): 457 ~467

7 Mangum J H, Magni G, Stadtman E R. Regulation of glutamine synthetase adenylylation and deadenylylation by the enzymatic uridylylation and deuridylylation of the P II regulation protein. *Arch Biochem Biophys*, 1973, **158** (3): 514 ~525

8 Deuel T F, Prusiner S. Regulation of glutamine synthetase from *Bacillus subtilis* by divalent cation, feedback inhibitors and L-glutamine. *J Biol Chem*, 1974, **249** (1): 257 ~264

9 Zhimin Y, Werner G P, Guenter S, *et al.* The glutamine synthetase from the hyperthermo-acidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*: isolation, characterization and sequencing of the gene. *Biol Chem*, 1998, **379** (11): 1349 ~1354

10 Brown J R, Masuchi Y, Robb F T, *et al.* Evolutionary relationship of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes. *J Mol Evol*, 1994, **38** (4): 566 ~576

- 11 殷志敏, 闫淑珍, 戴谷, 等. 耐热嗜酸古细菌谷氨酰胺合成酶基因的克隆、诱导表达和活性测定. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (5): 745~749
Yin Z M, Yan S Z, Dai G, et al. Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (5): 745~749
- 12 Hettmann T, Schmidt C L, Anemüller S, et al. Cytochrome b_{558/566} from the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*: a novel, highly glycosylated, membrane-bound b-type hemoprotein. J Biol Chem, 1998, **273** (20): 12032~12040
- 13 Bender R A, Janssen K A, Resnick A D, et al. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol, 1977, **129** (4): 1001~1009
- 14 Shapiro B M, Stadtman E R. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). Methods Enzymol, 1970, **17A**: 910~922
- 15 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, **227** (259): 680~685
- 16 Moll R, Schaefer G. Chemiosmotic H⁺ cycling across the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. FEBS Lett, 1988, **232** (3): 359~363
- 17 Ginsburg A, Yeh J, Hennig S B, et al. Some effects of adenylation on the biosynthetic properties of glutamine synthetase. Biochemistry, 1970, **9** (3): 633~649
- 18 Reitzer L J, Magasanik B. Ammonium assimilation and biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagines, L-alanine, and D-alanine. In: Neidhart F C, eds. *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*. Washington DC: Cellular and Molecular Biology American Society for Microbiology, 1987. 302~320

The Expression Regulation and Characterization of Glutamine Synthetase From The Hyperthermoacidophilic Crenarcheon *Sulfolobus acidocaldarius**

YIN Zhi-Min**, CHEN Qun-Ying, SIMA-Jian, WU Yi-Fan, ZHANG Shuang-Quan

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract The amount of GS in *Sulfolobus acidocaldarius* can be regulated up by different growth medium, this difference is regulated at mRNA level. The GS was purified by DEAE-Sepharose and Sephacryl S-300 to homogeneity. The molecular mass was determined to be dodecameric protein (630 ku) composed of identical subunits of 53 ku. The optical pH of this enzyme is about 7.3, the optical temperature of both γ -glutamyl transferase activity and biosynthetic activity is 90°C, the Arrhenius plots show that the active energy is 47 kJ/ (mol • K) for transferase activity and 29 kJ/ (mol • K) (40~55°C), 10 kJ/ (mol • K) (55~90°C) for biosynthetic activity respectively. GS was stable at 78°C in the presence of Mn²⁺, the K_m values were 3.5 mmol/L, 1.3 mmol/L, 0.5 mmol/L and 0.24 mmol/L for hydroxylamine, glutamine, ADP and Mn²⁺ respectively. The inhibitors experiments showed that the catalytic activity of GS from *Sulfolobus acidocaldarius* unlike that of others was regulated solely by feed-back inhibition through L-alanine and glycine, the normal inhibitors such as L-tryptophan, L-histidine and 5'-AMP have no inhibitory effect on this enzyme. L-alanine and glycine have shown synergistic effect on catalytic activity of GS. The post-translation modification like other gram positive bacteria is not regulated by adenylation/deadenylation system.

Key words archaeobacteria, glutamine synthetase, isolation and purification, thermostability, inhibitor

* This work was supported by a grant from The Nanjing Normal University (2001SWXXGQB914).

** Corresponding author. Tel: 86-25-3598216, E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com