

谷酰胺合成酶在生物固氮中的作用

钱世钧

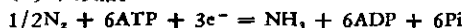
(中国科学院微生物研究所,北京)

谷酰胺合成酶(Glutamine Synthetase E. C. 6. 3. 1. 2, 简称 GS)是催化从谷氨酸和氨合成谷酰胺的一个酶,它在自然界氮的循环,细胞氮的代谢里起着关键的作用。因此,很多对生物固氮作用感兴趣的生物学家很自然地把 GS 与固氮作用联系起来,研究 GS 在微生物固氮中所起的作用。

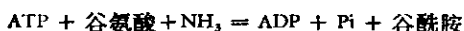
一、自生固氮细菌

1. GS 是自生固氮菌氨同化作用的关键酶:在自生固氮菌的氨的同化作用里,主要涉及三个反应:

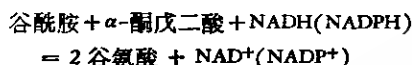
(1) 固氮酶



(2) 谷酰胺合成酶



(3) 谷氨酸合成酶(简称 GOGAT)



由于 GS 对氨的高度的亲和力,且通过 GOGAT 的催化合成谷氨酸,使得这些酶的结合作用沟通了氨同化作用的主要途径。这条氨同化途径的路线就是: $NH_4^+ \rightarrow$ 谷酰胺 \rightarrow 谷氨酸,而 GS 和 GOGAT 则是这条氨同化途径的关键酶。

从反应式(1)很容易看出, NH_4^+ 是固氮酶的一个强的阻遏剂。不少学者发现^[1,2],在有些自生固氮菌里,随着培养基里 NH_4^+ 浓度的增加,固氮酶活性也随之成比例地被阻遏,甚至能引起固氮酶的迅速失活。但是, NH_4^+ 的这种作用只是间接作为固氮酶的一个阻遏剂,起更大作用的则归于 GS。Nagatani 曾分离出肺炎克氏杆菌的一些变异株^[3],它们在高浓度 NH_4^+ 下生长时,只有很低 GOGAT 活力及没有生物合成活性的 GS,没有上述氨同化途径的这些变种,不仅不能固氮,而且,细胞里许多含氮化合物的代谢都受到严重阻塞,至少有 20 种不同化合物的利用受到影响。可见,这条氨同化作用途径对于含氮化合物代谢是重要的,也是固氮作用所必需的,而在这条途径里的第一个酶 GS,对于从 NH_4^+ 到有机氮全部流量的改变,显然处于举足轻重的位置。

氨基酸也是固氮酶的抑制剂。在一些能抗 NH_4^+ 阻遏而能合成固氮酶的肺炎克氏杆菌的变异株里,高

浓度的氨基酸能重新恢复对 NH_4^+ 的敏感度,抑制了固氮酶的合成,同时 GS 的活性也受到阻遏^[4]。氨基酸的这种作用是与这条氨同化作用途径相联系的。 NH_4^+ 对固氮酶的阻遏作用的整个机制涉及到从 NH_4^+ 转换成谷氨酸,继而转换成一些氨基酸,氨基酸又是 GS 的一个效应物,GS 的负的调节功能是简单提供这些氨基酸,所以氨基酸对固氮酶的作用实际上也完全与 GS 有关(图 1)。

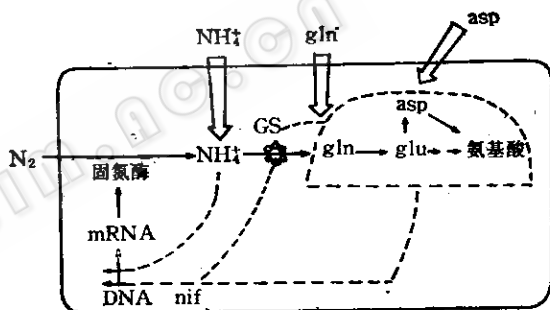


图 1 肺炎克氏杆菌固氮酶生物合成调节作用的工作模型
虚线内的氨基酸表示细胞里的氨基酸库

在这条氨同化途径里,GS 的主要贡献在于合成谷酰胺,同时,胞内谷酰胺水平也反作用于 GS 活性。Michalski 等^[5]在用同位素标记法检测了球形红毛杆菌的固氮作用及氨的同化作用以后证明了这点。

GS 是一个可阻遏可调节的酶,它在氨同化途径里,酶活力的主要调节方式是通过腺苷转移酶作用,使酶存在二种状态:酶的腺苷酰化时失去活性,而在脱腺苷酰化时又恢复了活性。如 $[NH_4^+]$ 浓度的增加能促使 GS 成腺苷酰化,使 GS 失去活性,也阻遏了固氮酶活性。但是,腺苷转移酶活性是否与大肠杆菌 GS 一样,受另一个调节蛋白质,通过尿苷化-脱尿苷化控制,还不清楚。

2. GS 是许多同 NH_4^+ 代谢有关的操纵子的调节剂,也是固氮基因 *nif* 的一个调节因子:通过噬菌体 P₁ 转导及 R 因子的接合作用的初步研究已经表明,固氮基因 *nif* 位于肺炎克氏杆菌的染色体组氨酸操纵子附近。*nif* 基因群在组氨酸操纵子的操纵基因末端与莽

草酸透酶基因 (Shi A) 之间。一些酶, 包括利用组氨酸的酶 (*hut* 操纵子) 和脯氨酸氧化酶的活力水平受 NH_4^+ 部分控制, 而阻遏 *hut* 操纵子表达速度的能力同 GS 有关。缺乏 GS 营养缺陷型 (Gln^- 表型) 在限氮生长中不能解脱 *hut* 操纵子表达的阻遏。与 NH_4^+ 代谢密切相关的固氮酶基因 *nif* 是否也一样与 GS 有关呢?

对此, Streicher 等^[47]做了出色的工作。他们用 P₁ 中间转导作用, 使引起 GS 合成的突变 (Gln^- 表型), 并从产气克氏杆菌转到肺炎克氏杆菌。所得菌株能合成 GS, 三株菌中有二株在 NH_4^+ 下也能连续合成固氮酶, 而在同样 NH_4^+ 浓度下, 野生株的固氮酶合成则完全被阻遏。可以认为, Gln^- 表型的突变作用改变了 GS 的结构, 由于突变作用发生的部位不同, 所产生的 GS 也就不同, 而活化 *nif* 操纵子的能力当然也就不同了, 结果是三株变异株对固氮酶合成有不同效应。在另一组试验里, 谷酰胺营养缺陷型 (Gln^- 表型) 变异株在限 NH_4^+ 和无氧条件下, 也不产生有活性 GS, 同时也不合成固氮酶。这些变异菌株在通过大肠杆菌附加基因的互补作用后, 恢复了 GS 活性, 同时也具有合成固氮酶能力。可见, 影响 GS 催化活性的突变同时, 也破坏了酶的调节功能。特别感兴趣的是只有脱腺苷酰化的 GS 才具有基因活化剂的功能。

3. 一个尚需深入研究的问题: 对于 GS 是固氮基因 *nif* 的一个调节因子的观点, 目前, 仍没有统一的想法。

Anzabel 等分离出一个变异株^[17], 它被命名为 Gln^- ($\text{Nif}^-, \text{Hut}^-$), 在少量 NH_4^+ 存在下生长时, 它具有反常的 *nif* 和 *hut* 脱阻遏作用, 这说明这株菌改变了 GS 对 *nif* 和 *hut* 的调节功能, 仍保留了 GS 的生物合成活性, GS 的腺苷酰化程度不与固氮酶的脱阻遏作用有关。由此推论, GS 不是 *nif* 脱阻遏所绝对需要, 可能还存在另一个对 *nif* 调节有影响的系统。但也有另一解释, Gln^- 变异株的突变损伤处靠近 GS 的结构基因处, Gln^- 生物活性与它的调节功能是分开的, Gln^- 的 *nif* 调节性质变化是由于 GS 对 *nif* 启动子结合部位的亲和力降低引起。

Shanmugum 等^[13]也分离了一些脱阻遏的固氮酶变异菌株, 在 NH_4^+ 存在下, 都产固氮酶, 且与没有 NH_4^+ 存在时所生成的固氮酶活性一样高, 但是它们的固氮基因的生化特征, GS 的性质却各不相同。他们把这些变种分成三类: (1) 需在谷氨酸存在下生长, 能合成固氮酶和 GS; (2) 需在谷酰胺存在下生长, 能合成固氮酶和没有催化活性, 但用免疫方法可检测到的 GS; (3) 需在谷酰胺存在下生长, 能合成固氮酶, 合成既没有催化活性在免疫扩散上也没有交叉反应的 GS 蛋白质。这就提出这样一个问题, 一些作为 Gln^- 分离出的脱阻遏的固氮酶变异株, 为什么检测不出 GS 蛋白质? 但

为什么有些变异株又能合成 GS 呢?

这些矛盾的结果可能涉及到实验条件、方法, 但更关系到对固氮酶调节机制的真正了解。正如 Postgate^[57]所指出, 在一些实验室里, *nif* 的调节作用是一个很活跃的研究项目, 而企图对此作一个详细的概论是不明智的, 因为它肯定还会有变化。

二、共生固氮菌

共生固氮菌主要是指根瘤菌属。与自生固氮菌相反, 许多根瘤菌的固氮是同豆科植物根部一个高度分化的器官—根瘤相联系。根瘤的唯一功能就是供给植物可利用的氮。虽然根瘤菌也能在自生状态下产生固氮酶, 但不能在 N_2 中生长。被分化的类菌体是根瘤里细菌的固氮形式, 它把固定的 N_2 以 NH_4^+ 输送给植物组织, 在那里, 再转换成含氮的物质。

类菌体或根瘤菌的 GS 在固氮过程中不表现出同化氮的功能。但 GS 的调节功能是否有呢? 由于共生体同它的寄主植物之间复杂的相互作用, 所以共生固氮作用的遗传调节机制比较难于研究。目前, 对上述问题的回答也说法不一。

1. 认为 GS 与固氮作用无关: 不少学者提出了 GS 与固氮酶合成的调节没有关系的证据。Scowcroft 等^[10]发现豇豆根瘤菌 32 H₁ 在琼脂培养基里, 固氮酶的活性很快被 NH_4^+ 所抑制, 在此条件下, GS 和 GOGAT 的活性却基本上不受影响。Kurz 等^[11]研究了豌豆类菌体里同固氮作用有联系的酶, 他们发现, 在整个植物生长过程中, GOGAT 活性很低, GS 活性虽很高, 但在固氮酶活性消失以后, GS 活性却没有降低。O'Gara 等^[12]用同位素 ^{15}N 标记方法, 发现根瘤菌能排出大部分它们固定的氮, 这明显不同于自生固氮菌。

以上的实验都证明, GS 在固氮酶的调节中不起作用。有人提出这样的假设, 在共生固氮作用里, 一些涉及 NH_4^+ 同化作用的关键酶可能被寄主植物所提供的氨基酸所阻遏, 根瘤菌仅利用少量所固定的氮, 大部分都以 NH_4^+ 形式输出, 与此同时, 脱阻遏了 NH_4^+ 的 *Nif* 基因, 却阻遏了 NH_4^+ 同化作用基因。

2. 认为 GS 对自生状态下根瘤菌的固氮酶活性起调节作用: 另一些科学家提出相反证据。Kondorosi^[13]发现在高浓度 NH_4^+ 下, 苜蓿根瘤菌培养液里, 测不出谷氨酸脱氢酶活性, 所以氮的同化途径只能通过 GS/GOGAT 途径, 而 GS 就是该菌氮代谢的一个控制因子。Bergersen 和 Turner^[14]在对豇豆根瘤菌 CB 756 限氧连续培养中发现产生高活性的固氮酶, 而当限氧作用被部分解除时, 固氮酶活性被阻遏了。同时, GS 的腺苷化程度也增加了。这说明, 高活性的固氮酶是与低腺苷化程度的 GS 相联系。Ludwig 和 Signer^[15]把豇豆根瘤菌 32 H₁ 作为研究对象, 发现无论在培养基里还是在根瘤里, 它都有很高的固氮酶活性。它们的谷酰胺营养缺陷型没有 GS 活性, 同时也失去了固

氮酶活性。从营养缺陷型分离出的 6 株回复突变型, 有 2 株能类似 32 H₂ 结瘤, 且有固氮酶活性。另外 4 株也能结瘤, 却没有固氮酶活性。这说明有二类 Gln⁺ 回复突变型, 一类有催化和调节功能, 另一类仅保持催化活性。这结果证明了 GS 在固氮酶活性调节中所起的作用, 只是调节机制还不清楚。

3. 根瘤菌 GS 的二种形式: 根瘤菌的 GS 存在着二种形式 GSI 和 GSII。其中 GSI 具有与大肠杆菌 GS 相类似的性质, 而 GSII 在许多方面却不同于大肠杆菌 GS。它们的性质差异见表 1^[16]。

Ludwig^[17] 研究了 NH₄⁺ 对根瘤菌 32 H₂ 二种 GS 的不同影响, 由于 NH₄⁺ 的阻遏, GSI 的合成减少了二倍, 而 GSII 的合成减少了 50 倍, GSI 由于可逆的腺苷酰化而失活, 还没有证据说明 GSII 腺苷酰化。氮的同化作用似乎是脱腺苷酰化 GSI 的功能, 而 GSII 没有这方面功能, 它只是在嘌呤生物合成中起作用。Rao 也报道^[18], 大豆根瘤菌 61 A76 的 GSI 和 GSII 的相对浓度同自生固氮作用相联系。

在所研究的根瘤菌属里有一例外, 根瘤菌 SPORS 571 能在以 N₂ 为唯一氮源的培养基里生长^[19], GS/GOGAT 是该菌固氮同化作用的唯一途径。更令人奇怪的是它只含 GSI。它的这个生理特征是否与它的氮同化途径有直接联系呢?

表 1 GSI 和 GSII 在一些性质上差别

GSI	GSII
类似于肠道菌 GS	不同于肠道菌 GS
12 个亚基	分子量未知
SDSMW 59000	SDSMW 36000
腺苷酰化作用	无腺苷酰化作用
结合 DNA	不能结合 DNA
稳定(热, 尿素)	不稳定(热, 尿素)
对 NH ₄ ⁺ 反应有限	对 NH ₄ ⁺ 反应强烈
在固氮条件下腺苷化	在固氮条件下活性消失

GSI 和 GSII 在结构功能上的一些差别已有报道, 但是它们与固氮酶活性之间有何种关系还没确定。有人认为, 在肠道菌单个 GS 所具有的催化调节功能分存于根瘤菌的 GSI 和 GSII 之中。GSI 在固氮条件下腺苷化, 失去了催化活性, 但在脱阻遏条件下, 具有维持固氮酶活力的能力。GSII 在固氮中失活, 因而保证固氮酶产生的 NH₄⁺ 输入到植物组织中去。在自生状态, 外界 NH₄⁺ 浓度相当低时, 主要通过 GSII 来同化 NH₄⁺。

也有人假设, GSI 和 GSII 原来是二个催化的实体, 但有不同的生化途径, 类似于二种同功酶, 它们对反馈抑制剂有不同反应。再有一种假设, GSII 可能还有一些未知功能, 可能是催化, 可能是调节, 可能是二者兼有, 也可能仅与植物组织相接触。这些假设哪一种更符合实际呢? 我们相信, 对 GSI 和 GSII 的彻底研究将会有助于阐明 GS 与共生固氮菌的固氮作用的关系。

参 考 文 献

- [1] Tubb, R. S. and Postgate, J. R.: *J. Gen. Microbiol.*, 70: 103—117, 1973.
- [2] Neilson, A. M. and Nordlund, S.: *J. Gen. Microbiol.*, 91: 53—62, 1975.
- [3] Nagatani, H. et al.: *Arch. Microbiol.* 70: 164—175, 1971.
- [4] Shanmugam, K. T. and Morandi, C.: *Biochim. Biophys. Acta.* 437: 322—332, 1976.
- [5] Michalski, W. P. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 1069—1077 1984.
- [6] Streicher, S. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 120(2): 815—821, 1974.
- [7] Ausubel, F. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 140(2): 597—606, 1979.
- [8] Shanmugam, K. T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 408: 101—111, 1975.
- [9] Postgate, J. R.: *The fundamentals of nitrogen fixation*, Cambridge university press, Cambridge London New York, 1982, 103—130.
- [10] Scowcroft, W. R. et al.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 73(2): 516—523, 1976.
- [11] Kurz, W. G. W. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 21: 1009—1012, 1975.
- [12] O'Gara, F. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 437: 313—321, 1976.
- [13] Kondorosi, A. et al.: *Molec. Gen. Genet.*, 151: 221—226, 1977.
- [14] Bergersen, F. J. and Turner, G. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 73(2): 524—531, 1976.
- [15] Ludwig, R. A. and Signer, E. R.: *Nature*, 267: 245—248, 1977.
- [16] Darrow, R. A.: *Glutamine, Metabolism. Enzymology and Regulation*, Academic Press Inc, New York, 1980, 139—166.
- [17] Ludwig, R. A.: *J. Bacteriol.*, 141(3): 1209—1216, 1980.
- [18] Rao, V. R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81: 224—231, 1978.
- [19] Robert, G. K. et al.: *J. Bacteriol.*, 158(3): 1144—1151, 1984.