

链霉菌次生代谢中双因子调控系统的研究进展

官彩霞^{1,2} 李爱英^{1,2*}

(1. 华中师范大学生命科学学院 湖北 武汉 430079)

(2. 华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室 湖北 武汉 430079)

摘要: 链霉菌次生代谢产物的生物合成受到严格和复杂的调控, 而双因子调控系统是其中重要的一类调控因子, 在链霉菌中广泛存在, 且存在作用方式的多样性和作用机制的复杂性。就近些年研究较多的参与链霉菌次生代谢的两类双因子调控系统(真核型和原核型)的研究状况做了综述, 重点阐明其作用机制, 并对其研究趋势以及在药物代谢工程中的应用前景进行了展望。

关键词: 链霉菌, 次生代谢, 合成调控, 双因子调控系统

Biosynthetic Regulation of Secondary Metabolites in Streptomycetes by Two-component Regulatory Systems

GONG Cai-Xia^{1,2} LI Ai-Ying^{1,2*}

(1. The College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

(2. Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

Abstract: A vast number of secondary metabolites are produced in Streptomycetes under the tight control by many regulators, including two-component regulatory systems. Two-component regulatory systems with high diversity are widely distributed in Streptomycetes and perform positive or negative regulation by different and complex modes during secondary metabolites biosynthesis. Here, we reviewed some research advances on these systems involved in secondary metabolites accumulation in streptomycetes, mainly focusing on the clarification of their action modes. We also prospected the research trends in this field and application of two-component regulatory systems in the metabolic engineering of natural products.

Keywords: Streptomycetes, Secondary metabolite, Biosynthetic regulation, Two-component regulatory system

链霉菌是土壤中广泛分布的革兰氏阳性细菌, 在一些极端环境中也有分布, 具有相对复杂的形态分化和代谢过程, 同时能够产生大量的具有不同生

物学活性的次生代谢产物。这些天然产物被广泛应用于农、医、药等各个行业。

链霉菌的次生代谢产物的合成调控一直备受关

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30770036); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20070511004); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

* 通讯作者: Tel: 86-27-67862431; ✉: ayli@mail.ccnu.edu.cn
收稿日期: 2010-01-03; 接受日期: 2010-03-01

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

注, 现在认为有许多调控因子参与链霉菌的次生代谢调控, 并形成复杂的网络系统: 具有多效性的全局调控因子不仅调控多种次生代谢产物的产生, 而且还参与链霉菌的形态分化, 例如 BldA (链霉菌中稀有的 TTA-tRNA)、A 因子(A-factor, 能起到细菌荷尔蒙作用的小分子物质)及级联系统、双因子调控系统(Two-component regulatory system)等; 而途径专一性的调节因子主要参与特定的代谢产物的生物合成过程, 包括 SARP 家族(*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins)、LuxR 家族、LysR 家族等^[1]。还有很多调控因子以未知方式参与次生代谢产物的生物合成[比如, 作者正在研究的美达霉素生物合成基因簇中的新型调控基因 *med-ORF10* (未发表), 以及作者参与研究的放线紫红素(Actinorhodin, ACT)合成途径中的调控基因 *actVI-ORF4* 可能代表一类新型的转录调控基因^[2]]。最近研究发现同一菌株内不同代谢途径之间也存在着交流对话(Cross-talk)^[3], 群感效应(Quorum sensing)也参与这些代谢途径^[4], 可见链霉菌次生代谢的调控远比目前已知的更为复杂。

双因子调控系统又称为双因子信号传导系统(Two-component signal transduction systems), 是通过两个蛋白组分将外界信号从体外传递到细胞内, 从而控制细胞生理代谢过程, 在链霉菌次生代谢中起到全局调控的功能, 属于多效调节因子。相对于链霉菌次生代谢中的其他的调控模式而言, 双因子调控系统是一种更为精细的信号调控模式, 且存在调控机制的多样性、复杂性和分布的普遍性。在这里作者结合自己在国内外研究工作, 就链霉菌次生代谢中双因子调控系统的研究进展进行综述。

1 双因子调控系统的概述

1.1 双因子调控系统在生物界普遍存在

双因子调控系统是生物细胞中常见的信号传导系统之一。该系统广泛存在于细菌、古细菌及真核生物中, 而细菌中发现的最多(2005 年根据细菌基因组测序结果统计的双因子调控系统的数目是 4000 个, 目前随着数以千计的细菌基因组测序的完成, 发现的双因子调控系统的数目也在成倍上升)^[5-7], 仅大肠杆菌基因组中就有 62 个双因子调控系统, 分别参与渗透压调节、物质运输等多种生理过程^[5]。

双因子调控系统由两个蛋白组成, 其一是定位于细胞质膜上的负责感应和接受环境信号的感应因子——感应激酶(Sensor Kinase, SK); 其二是位于胞内的负责接受感应因子传导的环境信号并进行应答的效应因子——应答调节蛋白(Response Regulator, RR)。这两个蛋白组分通过依次磷酸化的形式完成细胞内外信号传递和基因调控: 首先环境信号分子结合在感应因子 N-末端的特定结构域上; 其次, 在 ATP 供能下, 感应因子特定氨基酸残基发生磷酸化; 再其次, 感应因子将磷酸基团转移给应答调节蛋白, 导致后者磷酸化而活化; 最后, 磷酸化的应答调节蛋白结合到靶基因的启动子区域, 激活或者抑制基因的转录, 从而对生理代谢途径进行调节。双因子调控系统具有多样性, 有的感应因子可以调节多种效应因子以及多步磷酸基团转移过程, 有的效应因子可以对多种感应因子传递的外界信号做出感应^[8]。

1.2 链霉菌中存在双因子调控系统

在链霉菌中, 双因子调控系统是一类非常重要的调控因子, 参与胞内渗透压调节、新陈代谢、细胞生长及分化等许多生理代谢过程, 尤其与链霉菌复杂的形态分化和次生代谢调控有着密切的关系。基因组测序结果分析揭示链霉菌基因组中存在大量双因子调控系统: 例如, 模式菌株天蓝色链霉菌 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)]基因组中存在 67 个双因子调控系统(感应激酶基因和相应的应答调节蛋白基因在染色体上彼此相邻成对); 另外, 其基因组中未成对的感应激酶基因和应答调节蛋白基因分别还有 7 个和 13 个^[9]。在除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)基因组中发现的 67 个感应激酶基因和 68 个应答调节蛋白基因中, 只有 14 个未成对的感应激酶基因和 15 个未成对的应答调节蛋白基因^[10]; 在灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)基因组中也存在大量的双因子调控系统^[11]。

根据氨基酸序列、立体结构以及作用模式的不同, 链霉菌中的双因子调控系统可分为两种形式: (1) 原核型双因子调控系统, 也称为组氨酸-天冬氨酸磷酸化蛋白调控系统, 其中感应因子(组氨酸激酶)保守的组氨酸残基是自体磷酸化的位点(且是效应蛋白的磷酸供体), 而效应因子保守性相对较差, 但一般至少有 2 个天冬氨酸残基和 1 个赖氨酸残基

作为磷酸受体,因此,通过两步蛋白磷酸化反应来传递外界信号,完成对靶基因的表达调控。组氨酸激酶中的 ATPase 结构域和效应因子中的 CheY (磷酸化位点)结构域都非常保守^[9]; (2) 真核型双因子调控系统,即丝氨酸/苏氨酸-酪氨酸磷酸化蛋白调控系统,在环境信号刺激下,其中两个蛋白组分中保守的丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸残基会发生可逆的磷酸化或去磷酸化的一系列级联反应,来完成信号传递。这类信号传递中磷酸化反应存在可逆性,所以可以随时打开或关闭,对环境信号的感应和调节更加灵活^[12]。这些含丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸的蛋白组分中都存在一个较为保守的核心催化功能结构域,由 250–300 个氨基酸组成,并可进一步分成 12 个亚功能结构域^[13]。

在链霉菌中,这两类系统中的感应激酶在氨基酸序列和立体结构上没有相似性,各属于不同的超家族;而效应因子多是些转录调控因子,根据序列保守性和结构域,可以分属于不同的转录因子家族。

2 参与链霉菌次生代谢的双因子调控系统

双因子调控系统在链霉菌次生代谢中的功能和机制已经展开研究近 20 年,其中有一些研究得较为清楚。在链霉菌中,已有研究的这些双因子调控系统多为原核型双因子调控系统,分别以正效或负效方式参与次生代谢的调控。下面对几种与链霉菌次生代谢直接相关的研究较多或较为重要的双因子调控系统的研究情况做些介绍(涉及到的系统统一描述为:效应蛋白组分/感应蛋白组分)。

2.1 参与链霉菌次生代谢的原核型双因子调控系统

(1) CutR/CutS: 这是在链霉菌中发现的第一个双因子调控体系,基因成对位于变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)基因组中。CutR/CutS 对抗生素合成起负调控作用:把其中任一因子的基因进行缺失突变都会导致变铅青链霉菌中原本沉默表达的放线紫红素大量表达;而把 *cutr/cuts* 基因引入到天蓝色链霉菌中进行过量表达则会抑制放线紫红素的合成。*cutS* 编码的组氨酸激酶作为感应因子位于细胞膜上,而 *cutR* 编码的效应因子是一个转录调控因子,含有 OmpR 转录因子家族保守的 DNA 结合位

点^[14],所以推测 CutR 可以直接结合在靶基因的启动子区而抑制靶基因转录,但这方面研究未见详细报道。在除虫链霉菌基因组中也存在 CutR/CutS 系统的同源基因,但还未进行功能验证^[10]。

(2) AbsA2/AbsA1: 这是目前研究最为透彻的链霉菌双因子调控系统,位于天蓝色链霉菌基因组中,是链霉菌中首个被证实的多效性双因子调控系统,可以同时负调控四种抗生素生物合成(这 4 种抗生素包括放线紫红素、十一烷基灵菌红素、钙依赖抗生素和次甲基霉素)。*absA1* 编码的感应激酶 AbsA1 (组氨酸激酶)含有 5 个跨膜结构域,同时具有激酶和磷酸酯酶活性,介导应答调节蛋白 AbsA2 (由 *absA2* 编码)的磷酸化和脱磷酸化反应。对其激酶活性进行失活,则能够增强抗生素合成能力^[15],说明 AbsA1 的激酶活性导致 AbsA2 磷酸化是 AbsA2 发挥负调控功能所必需的。转录调控因子 AbsA2 因磷酸化而激活后可通过与抗生素生物合成基因簇中途径专一性调控基因(如放线紫红素、十一烷基灵菌红素和钙依赖抗生素合成途径中的途径专一性调控基因 *actII-ORF4*、*redD* 和 *cdaR*)的直接结合作用,来抑制抗生素的合成。如果用其他启动子替换 *actII-ORF4* 和 *redD* 的天然启动子后, AbsA2 就失去对这 3 种抗生素合成的负调控作用^[16],说明 AbsA2 对靶基因启动子识别具有序列特异性,但识别序列的特征还有待研究。

absA2/absA1 的同源基因在各类不同的链霉菌中都有发现,且都位于抗生素生物合成基因簇中:这个系统在天蓝色链霉菌基因组中位于钙依赖抗生素基因簇中^[17–18],在弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)中位于脂肽抗生素 A54145 生物合成基因簇中^[19],在 *Streptomyces griseochromogenes*、*Streptomyces cinnamoneus* 和 *Streptomyces fungicidicus* 中分别位于杀稻瘟菌素(Blasticidin S)、肉桂霉素(Cinnamycin)和持久杀菌素(Enduracidin)生物合成基因簇中^[20–22]。这几种抗生素多是肽类抗生素(核苷类杀稻瘟菌素虽例外,但结构中也含有肽键),所以推测链霉菌细胞获得这种调控系统有可能是随着此类抗生素合成基因簇的横向转移来完成的。

(3) AfsQ1/AfsQ2: 这是一类作用机制特殊的正效双因子调控体系,最初在天蓝色链霉菌 A3(2)中克隆到,在其基因组中,二者彼此相邻(且存在 4 个

碱基的重叠,可能存在翻译的耦联现象)。把这个系统引入到变铅青链霉菌中,能刺激变铅青链霉菌中多种原本沉默表达的抗生素大量合成(包括放线紫红素和十一烷基灵菌红素等产物),认为感应激酶 AfsQ2 第 249 位的 His 残基自我磷酸化,使应答调节蛋白 AfsQ1 的 52 位 Asp 残基磷酸化,接着磷酸化的 AfsQ1 启动一系列靶基因的转录。但是在天然宿主天蓝色链霉菌中,对染色体上的基因 *afsQ1* 或 *afsQ2* 进行突变失活,却并不能影响抗生素的产生,也不影响形态分化。Shu D 等对这一奇怪现象展开深入研究后发现,在天蓝色链霉菌中, AfsQ1/AfsQ2 系统是培养基依赖(A medium-dependent manner)的正调控系统,通过一种直接或间接方式作用于一些调控抗生素合成的途径专一性调节基因: *afsQ1/afsQ2* 失活突变株培养在谷氨酸作为唯一氮源的 MM 培养基上时,放线紫红素、十一烷基灵菌红素和钙依赖抗生素的合成会大幅度减少(同时气生菌丝快速生长),而负责这几个抗生素合成的途径专一性调节基因(*actII-ORF4*、*redD* 和 *cdaR*)的转录水平也急剧下降^[23]。这说明这些途径专一性调节基因是 AfsQ1/AfsQ2 调控系统直接或间接作用的靶位点。

Shu D 等还发现,在 *afsQ1/afsQ2* 上游区域存在一个反向转录的编码 SigQ (即 Sigma 因子)的 *sigQ* 基因。在同样的培养基依赖模式下, SigQ 也调控抗生素合成(以及形态分化),但作用和 AfsQ1/AfsQ2 刚好相反,并且 *sigQ* 的表达受控于 AfsQ1/AfsQ2,而 *sigQ* 突变后导致几个抗生素合成的途径专一性调节基因(*actII-ORF4*、*redD* 和 *cdaR*)的转录水平增强。这些实验表明, AfsQ1/AfsQ2 和 SigQ 形成一个级联系统,可以通过级联作用来调控抗生素生物合成和形态分化(在这个级联系统中, AfsQ1/AfsQ2 位于 SigQ 的上层)^[23]。但在这个级联系统中是否还存在其它成分的参与, SigQ 与靶基因(途径专一性调节基因)之间是直接作用还是间接作用,以及 AfsQ 是否还可以直接作用于这几个靶基因都还未知。

(4) PhoP/PhoR: 这也是较早在天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌中发现的双因子调控系统,参与放线紫红素和十一烷基灵菌红素生物合成的负效调控。PhoR 是感应激酶, PhoP 是反应调控蛋白,也属于 OmpR 家族^[24]。Sola-Landa A 等研究发现在天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌中, PhoP/PhoR 对于碱性磷

酸酶基因(*phoA*)的表达是必需的: PhoP 的 DNA 结合域可以分别结合在天蓝色链霉菌中与磷酸盐次生代谢调控相关的 3 个基因(*pstS*、*phoRP* 和 *phoU*)启动子上,因此直接参与了信号分子磷酸盐对抗生素合成的调控。这 3 个靶基因启动子上游都含有一个保守的序列—PHO 盒(PHO boxes),由 6 个正向重复序列(GG/TTCAYYYRG/CG)构成,并且这个正向重复序列的数目和长度对于 PhoP 的 DNA 结合活性都是非常重要的^[25], PHO 盒的发现为确定 PhoP/PhoR 更多的调控靶基因提供了方便:在天蓝色链霉菌中已经发现了 100 多个这样的保守序列,现已克隆了其中 20 个,并且通过凝胶电泳阻滞分析显示 PhoP 均可以结合到相应的启动子上,表明 PhoP 作用的靶基因有很多^[26]。

在其他菌株中也克隆到了这套系统,比如在纳塔耳链霉菌(*Streptomyces natalensis*)中,其同源系统的失活突变可以增加匹马菌素的产量(增加了 80%),同时对磷酸盐的敏感度大大降低,匹马菌素的 4 种生物合成基因 *pimS1*、*pimS4*、*pimC* 和 *pimG* 的表达量均增加,然而并未在这 4 种基因的启动子区域发现 PHO 盒的存在,表明这些基因的调控是由 PhoP/PhoR 间接介导的^[27]。

2.2 链霉菌次生代谢中的真核型双因子调控系统

真核型双因子调控系统在链霉菌中也普遍存在:利用真核型双因子调控系统中的感应激酶保守的核心结构域进行 PCR 扩增,可以在多种链霉菌中扩增出同源基因;而链霉菌基因组测序结果也证明,仅在公开发表的天蓝色链霉菌、灰色链霉菌以及除虫链霉菌基因组中就有多达 70 个丝氨酸/苏氨酸激酶基因^[13]。然而,在这类双因子调控系统中,除天蓝色链霉菌的 AfsR/AfsK 研究较为深入外,只有几个仅限于体外功能分析(如天蓝色链霉菌中的 PkaB/PkaA,以及仅一个组分得到鉴定的 PkaG 以及新近发现的 PkaD),绝大部分系统还未展开深入研究。

(1) AfsR/AfsK: 这是链霉菌中发现的第一个真核型的正效双因子调控系统,最早在天蓝色链霉菌中克隆到,其基因失活突变会导致天蓝色链霉菌中放线紫红素、钙依赖抗生素的产量明显下降,导入变铅青链霉菌中能促进原本沉默表达的放线紫红素、十一烷基灵菌红素的产生^[28]。

AfsK 是位于细胞内膜的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可被星孢菌素(真核生物蛋白激酶抑制剂)抑制, 其重要特点是 Ser 和 Thr 残基可被双重磷酸化^[29]。AfsR 是一个多效转录调控因子, N-端有 OmpR 家族的两个特征结构域(DNA 结合结构域和转录激活结构域), 同时还含有可以结合 ATP 的保守 motif, 在其 C-端包含有与蛋白相互作用相关的 TPR (Tetratricopeptide repeat)重复区。AfsR 的磷酸化对于其 DNA 结合功能至关重要。通过磷酸化信号转导作用, AfsR 可以同时多种抗生素进行调控。*afsK* 上游区域还有一个基因, 其编码的 KbpA 蛋白可以结合在 AfsK 具有激酶催化活性的 N-端, 抑制后者磷酸化; 当有外界信号时, KbpA 与 AfsK 脱离, 然后 AfsK 发生自体磷酸化, 并转移磷酸基团给 AfsR, 使 AfsR 发生磷酸化; 磷酸化后的 AfsR 呈现出更高的 DNA 结合活性, 结合在靶基因启动子区, 启动其转录。目前 AfsR 调控的靶基因已经鉴定为 *afsS* (编码一个小蛋白 AfsS)。虽然这个仅含 64 个氨基酸的小蛋白 AfsS 功能尚未确定, 但它的存在可以显著地增强放线紫红素、钙依赖抗生素和十一烷基灵菌红素的合成^[30], 推测与 AfsR/AfsK 构成一个级联系统, 来调控抗生素的合成。2009 年, Lee HN 对来自天蓝色链霉菌中的基因(*SCO6569*)(同源性分析推测是 AfsS 的靶基因)进行研究, 发现其编码一个分泌型的可溶蛋白, 可以负效调控放线紫红素生物合成中途径专一性调控基因 *actII-ORF4* 的转录, 进一步表明 AfsR/AfsK 对抗生素的合成调控作用实际是通过层层级联方式来发挥功能^[31]。

变铅青链霉菌中也存在 AfsR/AfsK 的同源系统。蛋白质组学研究揭示变铅青链霉菌中 AfsR/AfsK 的靶基因 *afsR2* 也是个多效调节基因(其产物 AfsR2 与天蓝色链霉菌中的 AfsS 高度同源, 推测它们的靶基因也同源), 参与包括抗生素合成在内的多个生理代谢途径的调控^[31-32]。

(2) PkaB/PkaA: 这也是研究较早的链霉菌真核型双因子调控系统, 1995 年由 Urabe 等根据丝氨酸/苏氨酸激酶基因序列相似性, 从天蓝色链霉菌基因组中 PCR 扩增得到。其中感应因子 PkaA 和效应因子 PkaB 的 N-端一半与真核生物丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶高度同源; PkaA 的 C-端还富含 Pro 和 Gln 残基。通过蛋白表达和体外功能实验表明: PkaB 和 PkaA

的 Thr 残基都可以被磷酸化; 而 PkaA 的 Ser 残基还可以发生微弱的磷酸化, 而其 C-端对于其磷酸激酶活性是不重要的。对于这个系统的体内功能研究工作还未展开^[13]。

除天蓝色链霉菌之外, 与 PkaB/PkaA 高度同源的双因子调控系统在灰色链霉菌 B2682 基因组中也通过 PCR 扩增到了, 但也还没有功能分析的报道^[13]。

(3) 其他: 基因组学分析表明在链霉菌中应该还存在很多潜在的真核型双因子调控系统, 但目前只有几个仅通过初步的功能分析鉴定出一个组分, 其对应的另一组分还未确定: 例如, 2008 年 Urabe D 等在天蓝色链霉菌中克隆到的 PkaD 编码一个真核型膜蛋白激酶, 其 N-端具有典型的真核型蛋白激酶结构域, 在催化活性结构域下面还有穿膜结构域, 所以推测为一个感应因子; 体外酶学实验证明这个蛋白产物在 Thr 和 Tyr 残基上会发生自体磷酸化反应; 体内转录分析证明它在细胞整个生命周期都有表达, 其缺失突变则会导致放线紫红素的产量大幅度减少。所以这个激酶也参与了抗生素生物合成的调控^[33]。同样有过功能分析的还有来自天蓝色链霉菌的 PkaG 和 AfsL, 体外实验证明这两个真核型蛋白激酶可以发生自体磷酸化, 并且还可以导致以上 AfsR/AfsK 系统中的 AfsR 的磷酸化; 在体内它们是否会导致 AfsR 的磷酸化还未知, 但在体内通过突变实验已经证明 PkaG 能参与放线紫红素的生物合成调控^[34]。

2.3 链霉菌次生代谢中双因子调控系统调控机制的复杂性(级联网络式的调控模式)

从前面不同的双因子调控系统的介绍可以看出: 链霉菌中参与次生代谢的双因子调控系统就其作用效果来划分是属于多效性的调控系统, 调控不止一种抗生素的生物合成; 从调控的方式来看, 只有少数效应因子可以直接作用于抗生素合成途径中的途径专一性调控基因(如 AbsA2/AbsA1), 而大部分是以层层级联的方式间接调控抗生素的生物合成。例如, 在天蓝色链霉菌中, 许多双因子调控系统对放线紫红素的合成调控模式都是以级联方式最终作用于其特定的途径专一性调控因子 ActII-ORF4 的: $AfsK \rightarrow AfsR \rightarrow AfsS \rightarrow SCO6569 \rightarrow X \rightarrow ActII-ORF4$ ^[31-32]、 $AfsQ2 \rightarrow AfsQ1 \rightarrow SigQ \rightarrow X \rightarrow ActII-ORF4$ ^[23], 其中 X

代表级联系统中还未鉴定部分。

另外, 还可以看到, 不同双因子调控系统之间也存在交叉对话(Cross-talk), 即不同双因子调控系统之间存在相互联系和相互作用, 导致抗生素生物合成的调控网络系统更为复杂:

(1) 体外实验发现来自不同双因子调控系统中的感应激酶可以共同催化同一个效应蛋白。比如, AfsR/AfsK 系统中的效应蛋白 AfsR 在体外实验中, 不仅可以被 AfsK 磷酸化, 还可以被 PkaG 和 AfsL 磷酸化^[34]; 而从链霉菌基因组分析结果来看, 虽然链霉菌基因组上大多数感应蛋白都与相邻的效应蛋白相匹配, 但还是存在不少孤立的感应激酶, 找不到对应的效应蛋白^[9-11], 所以不排除在细胞体内多个双因子调控系统可能会共同利用同一个效应蛋白。

(2) 体内实验发现在链霉菌细胞内, 不同双因子调控系统所形成的级联系统之间可以在某些步骤上发生交联。例如, 2008 年 Lian W 通过生物芯片分析发现在天蓝色链霉菌中, AfsS (位于 AfsK→AfsR→AfsS→SCO6569→X→ActII-ORF4 级联系统中的因子) 突变后, 导致另一个双因子调控系统 PhoP/PhoR 基因的表达以及 PhoP 调控的靶基因(与磷酸盐调控有关的基因)的表达都有明显变化, 说明 PhoP/PhoR 和 AfsR/AfsK 以不同程度参与了磷酸盐饥饿导致的放线紫红素和十一烷基灵菌红素的合成调控, 参与过程中二者存在交联, 或形成一定的级联关系^[35]。其他一些实验现象也证明不同双因子调控系统之间可能存在着交联: 当 AfsQ1/AfsQ2 系统中的组分 AfsQ1 或 AfsR/AfsK 系统发生高拷贝表达时, 均可使 AbsA2/AbsA1 突变株(激活突变)恢复产生放线紫红素的能力; 2004 年 Hutchings MI 进行的体内双突变实验也表明 AbsA2/AbsA1 和 CutR/CutS 系统可能也存在某种程度的交联或级联关系^[9]。

3 研究展望

近些年利用组合生物合成手段, 以不同抗生素生物合成相关的调控基因作为研究对象, 可以改造细胞内某些代谢途径、控制代谢物质流、提高终产物的产量、甚至产生传统途径中的中间产物^[1], 所以链霉菌中参与次生代谢的这些双因子调控系统也都是潜在的研究靶点, 为利用代谢工程的方法对菌株

进行定向改造积累了丰富的基因资源。

从基因组学研究结果来看, 双因子调控系统在链霉菌中存在数量是非常大的, 暗示它们在生理学上必然起着重要的作用^[9-11,36], 而越来越多实验证据也表明, 在链霉菌次生代谢调控这个复杂的级联网络系统中, 双因子调控系统占有不可低估的作用。但目前已经研究的双因子调控系统的数目却比细胞内实际存在的数目要少得多。而双因子调控系统在调控模式上又存在明显的级联模式, 且不同系统之间也存在不同程度的交联, 这进一步增加了链霉菌次生代谢调控的复杂性, 所以阐明这些系统的机制可以使我们更好地了解链霉菌次生代谢产物合成过程中复杂的调控模式。

天蓝色链霉菌作为链霉菌的模式菌株, 且又是第一个得到全基因组测序的链霉菌, 因此不难理解文中提到的几种双因子调控系统都是在这个菌株(或其近缘菌株变铅青链霉菌)中首先克隆到的, 研究也相对更深入(相对于其它菌株中同源的双因子调控系统而言)。由于目前更多链霉菌基因组已经得到测序, 且已经有 3 个链霉菌基因组序列公开发表^[9-11], 所以预计更多链霉菌菌株来源的双因子调控系统将得到研究。

在 20 多年研究过程中, 体内遗传学实验和体外活性检测等实验方法为这些双因子调控系统的机制研究奠定了基础; 而近些年, 生物芯片技术、转录组学和蛋白质组学等通量研究手段逐渐得到更多应用。因具有传统研究方法无可比拟的优势, 这些新技术手段的运用对于阐明双因子调控系统的机制无疑具有更大的促进作用^[32,35]。

参 考 文 献

- [1] 王琳淇, 谭华荣. 微生物次生代谢的分子调控. 微生物学报, 2009, 49(4): 411-416.
- [2] Taguchi T, Okamoto S, Lezhava A, et al. Possible involvement of ActVI-ORFA in transcriptional regulation of actVI tailoring-step genes for actinorhodin biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 269(2): 234-239.
- [3] Song JY, Kim ES, Kim DW, et al. A gene located downstream of the clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 encodes a putative response regulator that affects clavulanic acid production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(2): 301-311.
- [4] Vicente CM, Santos-Aberturas J, Guerra SM, et al. PimT,

- an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimaricin-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis*. *Microb Cell Fact*, 2009(8): 33.
- [5] Kim D, Forst S. Genomic analysis of the histidinkinase family in bacteria and archaea. *Microbiology*, 2001, **147**(5): 1197–1212.
 - [6] Thomason P, Kay R. Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J Cell Sci*, 2000, **113**(18): 3141–3150.
 - [7] Mizuno T. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69**(12): 2263–2276.
 - [8] 邱全胜. 双组分系统—细胞识别渗透胁迫信号的感应器. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27**(6): 593–596.
 - [9] Hutchings MI, Hoskisson PA, Chandra G, *et al.* Sensing and responding to diverse extracellular signals: analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 2004, **150**(9): 2795–2806.
 - [10] Wei W, Wang W, Cao Z, *et al.* Comparative analysis of two-component signal transduction system in two streptomycete genomes. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2007, **39**(5): 317–325.
 - [11] Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, *et al.* Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO13350. *J Bacteriol*, 2008, **190**(11): 4050–4060.
 - [12] 张艳娟, 洪斌. 链霉菌次级代谢调控机制进展. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(12): 39–47.
 - [13] 杨旭, 关东明, 王胜兰, 等. 链霉菌真核型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的研究进展. *微生物学报*, 2008, **48**(1): 126–131.
 - [14] Chang HM, Chen MY, Shieh YT, *et al.* The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol*, 1996, **21**(5): 1075–1085.
 - [15] Sheeler NL, MacMillan SV, Nodwell JR. Biochemical activities of the *absA* two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 2005, **187**(2): 687–696.
 - [16] McKenzie NL, Nodwell JR. Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J Bacteriol*, 2007, **189**(14): 5284–5292.
 - [17] Anderson TB, Brian P, Champness WC. Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2001, **39**(3): 553–566.
 - [18] Ryding NJ, Anderson TB, Champness WC. Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol*, 2002, **184**(3): 794–805.
 - [19] Miao V, Brost R, Chapple J, *et al.* The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, **33**(2): 129–140.
 - [20] Cone MC, Yin X, Grochowski LL, *et al.* The blasticidin S biosynthesis gene cluster from *Streptomyces griseochromogenes*: sequence analysis, organization, and initial characterization. *ChemBiochem*, 2003, **4**(9): 821–828.
 - [21] Widdick DA, Dodd HM, Barraille P, *et al.* Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus* DSM 40005. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(7): 4316–4321.
 - [22] Yin X, Zabriskie TM. The enduracidin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fungicidicus*. *Microbiology*, 2006, **152**(10): 2969–2983.
 - [23] Shu D, Chen L, Wang W, *et al.* *AfsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **81**(6): 1149–1160.
 - [24] Sola-Landa A, Moura RS, Martin JF. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(10): 6133–6138.
 - [25] Sola-Landa A, Rodriguez-Garcia A, Franco-Dominguez E, *et al.* Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol*, 2005, **56**(5): 1373–1385.
 - [26] Sola-Landa A, Rodriguez-Garci A, Apel AK, *et al.* Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(4): 1358–1368.
 - [27] Mendes MV, Tunca S, Antón N, *et al.* The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. *Metab Eng*, 2007, **9**(2): 217–227.
 - [28] Horinouchi S, Kito M, Nishiyama M, *et al.* Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 1990, **95**(1): 49–56.
 - [29] Hong SK, Matsumoto A, Horinouchi S, *et al.* Effects of protein kinase inhibitors on *in vitro* protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *Mol Gen Genet*, 1993, **236**(2/3): 347–354.
 - [30] Tanaka A, Takano Y, Ohnishi Y, *et al.* AfsR recruits RNA

- polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *J Mol Biol*, 2007, **369**(2): 322–333.
- [31] Lee HN, Im JH, Lee MJ, *et al.* A putative secreted solute binding protein, SCO6569 is a possible AfsR2-dependent down-regulator of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Process Biochem*, 2009, **44**(3): 373–377.
- [32] Kim CY, Park HJ, Kim ES. Proteomics-driven identification of putative AfsR2-target proteins stimulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2005, **10**(3): 248–253.
- [33] Urabe H, Aoyagi N, Ogawara H, *et al.* Expression and characterization of the *Streptomyces coelicolor* serine/threonine protein kinase PkaD. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, **72**(3): 778–785.
- [34] Sawai R, Suzuki A, Takano Y, *et al.* Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 2004, **9**(334): 53–61.
- [35] Lian W, Jayapal KP, Charaniya S, *et al.* Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics*, 2008(9): 56.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、名师名课(原名师讲堂)、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的手稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 4 页以内,研究报告 4–7 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2010-00-00; 接受日期: 2010-00-00

(下转 p.936)