

感受态还是芽胞? 细胞命运决定的遗传调控网络

卢争辉¹, 周玉玲¹, 张晓舟², 张桂敏¹

1 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心 湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉 430062

2 青岛蔚蓝生物集团有限公司, 山东 青岛 266001

卢争辉, 周玉玲, 张晓舟, 等. 感受态还是芽胞? 细胞命运决定的遗传调控网络. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1543-1552.

Lu ZH, Zhou YL, Zhang XZ, et al. Sporulation or competence development? A genetic regulatory network model of cell-fate determination in *Bacillus subtilis*. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1543-1552.

摘 要: 枯草芽胞杆菌作为一般认为安全 (GRAS, Generally recognized as safe) 菌株, 被广泛应用于饲料、食品、生物防治等领域, 同时, 枯草芽胞杆菌作为表达宿主在工业酶的应用中扮演重要角色。然而, 低效的芽胞形成率与感受态效率极大限制了枯草芽胞杆菌的应用潜力。尽管已有大量关于芽胞形成与感受态形成的分子遗传机制的研究报道, 但是通过遗传改造提高枯草芽胞杆菌芽胞形成率与感受态效率的研究报道并不多。可能的原因是芽胞形成与感受态形成作为枯草芽胞杆菌生长后期两个主要的发育事件, 受胞内复杂的遗传调控机制操纵, 且两个遗传通路之间存在相互调控关系, 对遗传改造工作形成挑战。随着基因工程与代谢工程研究的不断发展, 积累了大量关于细胞生长、代谢与发育等方面的遗传信息, 通过综合这些遗传信息构建细胞遗传调控网络, 用于指导生产实践, 已经成为当前研究的热点之一。基于此, 本文简要概述了枯草芽胞杆菌芽胞形成和感受态形成的遗传通路, 初步探讨了芽胞形成与感受态形成之间的遗传调控网络, 及细胞在生长后期的遗传决定机制, 并讨论了该遗传调控网络对枯草芽胞杆菌及其近缘种应用研究的指导作用。

关键词: 芽胞形成, 感受态发育, 遗传调控网络

Received: December 5, 2014; **Accepted:** January 4, 2015

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021303-04), National Natural Science Foundation of China (No. 31170068), Natural Science Foundation Key Project of Hubei Province (No. 2011CDA00302).

Corresponding author: Guimin Zhang. Tel: +86-27-88663882; E-mail: zhangguimin6@hotmail.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA021303-04), 国家自然科学基金 (No. 31170068), 湖北省自然科学基金重点项目 (No. 2011CDA00302) 资助。

网络出版时间: 2015-03-20

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150320.1236.002.html>

Sporulation or competence development? A genetic regulatory network model of cell-fate determination in *Bacillus subtilis*

Zhenghui Lu¹, Yuling Zhou¹, Xiaozhou Zhang², and Guimin Zhang¹

¹ Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

² Qingdao Vland Biotech Inc, Qingdao 266001, Shandong, China

Abstract: *Bacillus subtilis* is a generally recognized as safe (GRAS) strain that has been widely used in industries including fodder, food, and biological control. In addition, *B. subtilis* expression system also plays a significant role in the production of industrial enzymes. However, its application is limited by its low sporulation frequency and transformation efficiency. Immense studies have been done on interpreting the molecular mechanisms of sporulation and competence development, whereas only few of them were focused on improving sporulation frequency and transformation efficiency of *B. subtilis* by genetic modification. The main challenge is that sporulation and competence development, as the two major developmental events in the stationary phase of *B. subtilis*, are regulated by the complicated intracellular genetic regulatory systems. In addition, mutual regulatory mechanisms also exist in these two developmental events. With the development of genetic and metabolic engineering, constructing genetic regulatory networks is currently one of the most attractive research fields, together with the genetic information of cell growth, metabolism, and development, to guide the industrial application. In this review, the mechanisms of sporulation and competence development of *B. subtilis*, their interactions, and the genetic regulation of cell growth were interpreted. In addition, the roles of these regulatory networks in guiding basic and applied research of *B. subtilis* and its related species were discussed.

Keywords: sporulation, competence development, genetic regulatory network

枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*, 以下简称枯草杆菌, 是一类广泛分布于各种不同生活环境中的革兰氏阳性杆状好氧细菌, 能产生抗逆性极强的内生芽胞, 已被美国食品药品监督管理局 (FDA) 认定为 GRAS (Generally recognized as safe) 菌株。因此, 枯草杆菌在工业中具有广泛的应用, 一方面作为活菌剂被广泛应用于食品、饲料、生防、环保等领域; 另一个方面作为表达系统在外源蛋白尤其是工业酶的生产中发挥重要作用^[1]。

枯草杆菌作为活菌剂, 因为能分泌大量酶类和产生抗菌物质, 具有改善动物肠道功能、

预防疾病和维持肠道生态平衡的作用^[2], 是我国允许使用的饲料微生物菌种; 另外, 由于枯草杆菌具有安全性和能产生多种抗菌物质, 又被广泛应用于生物防治中, 目前国内外都有获得商品化或有限商品化的枯草芽胞杆菌生防菌株。同时, 枯草杆菌制剂还被用于净化水体、改善水产养殖环境等方面^[3]。由于枯草杆菌产生的芽胞抗逆性极强, 可承受工业机械化生产及高温干燥等过程, 在适宜条件下又能迅速复活, 因此, 在上述工业化应用中, 为了延长产品的货架期与稳定性, 需要通过发酵使枯草杆菌营养细胞转变成具有强抗逆性的芽胞。

工业酶是工业生物技术的重要组成部分,产值占有酶制剂的 50%以上。枯草杆菌表达系统在工业酶的生产中具有重要作用,枯草杆菌生产的蛋白酶和淀粉酶是工业酶中应用最为广泛的酶制剂,约占整个工业酶制剂市场的 50%^[4]。与大肠杆菌相比,枯草杆菌表达系统具有如下优势:1) 能将外源蛋白直接分泌到胞外,简化下游纯化步骤;2) 为非致病菌,属于 GRAS 菌株,可用于生产食品、医药用蛋白质;3) 没有明显的密码子偏爱性,不需要进行密码子优化。目前,已有多种外源蛋白、多肽在枯草杆菌体内成功表达^[5-7]。

然而,枯草杆菌在产业化应用中还存在一些问题。一是枯草杆菌在工业生产过程中的芽胞形成率不高^[8]。目前国内的研究主要是在实验室摇瓶阶段通过优化培养基成分如氮源、碳源、 Mn^{2+} 等提高芽胞形成率^[8-9],由于不同菌株的产胞条件不一样,所以培养基优化的方法不仅工作量大,而且不具普适性,更严重的是在摇瓶阶段获得的培养参数很难复制到大规模工业生产中。二是枯草杆菌的感受态效率远不如大肠杆菌,不能满足蛋白质工程(如定向进化)的要求,这限制了有些不能利用大肠杆菌进行蛋白质工程的工业酶的分子改造。

枯草杆菌生长后期细胞发育的两个主要途径就是感受态形成与芽胞形成,这两个途径是细胞高度有序的遗传调控的结果^[10],因此,通过代谢工程改造细胞遗传通路,将会为上述问题的解决提供一种简便、普适性方法。基于此,我们拟从枯草杆菌生长后期的遗传调控网络出发,分析细胞感受态形成与芽胞形成的遗传通路,及细胞在感受态形成与芽胞形成中的遗传

决定机制,为枯草杆菌的菌种改造、降低生产成本提供理论基础。

1 群体感应系统起始芽胞形成与感受态发育

形成感受态和芽胞是枯草杆菌在长期的自然进化过程中形成的生态适应能力。当枯草杆菌生长环境出现细胞密度增加、营养物质匮乏等生存压力时,细胞首先通过三种途径来减轻环境压力,一是激活鞭毛运动,通过趋化性寻找新的食物;二是分泌抗生素和其他化学物质,清除同一生境中的竞争性微生物;三是分泌大量水解酶类,降解胞外蛋白质和糖类。对 *B. subtilis* 168 的研究显示,如果上述 3 种途径没有减轻环境压力,50%–70%的细胞将进入芽胞形成途径^[11],形成抗逆性极强的芽胞。在形成芽胞的过程中,少数细胞($\leq 20\%$)进入感受态形成途径^[12]。感受态细胞能吸收外源 DNA,这些 DNA 可作为食物被细胞降解,也可用作 DNA 修复,或作为遗传物质使细胞获得新性状,从而能在不利条件下存活^[13]。

作为枯草杆菌两个重要的发育途径,一些调控蛋白同时参与到芽胞形成和感受态形成这两个发育途径中,并且具有类似的发育调控策略^[12,14]。枯草杆菌有效起始芽胞或感受态的形成依赖于生境中高的细胞密度,即在相同的环境下,高细胞密度比低细胞密度形成芽胞或感受态的效率更高^[15],对枯草杆菌起始感受态发育和芽胞形成的分子机制研究,表明其属于群体感应行为,即细胞感应自身生理状况并向胞外分泌信号分子,细胞的群体感应系统感应这些信号分子的浓度(与细胞密度成正比),当其

达到一定值后,通过信号转导通路激活或抑制相关基因的表达,使细胞进入不同发育途径。

1.1 起始感受态形成的机制

枯草杆菌的自然感受态在对数生长后期开始形成,大约有 10%的细胞会形成感受态^[12]。已有的研究表明 ComX 信息素和胞外信号分子 CSF (Competence stimulating factor) 对于起始感受态的有效形成至关重要^[15]。在枯草杆菌染色体上, *comX* 位于 *comQ* 下游,且两个基因部分重叠, *comX* 编码 55 个氨基酸的 ComX 前体, ComX 前体被 ComQ 蛋白加工处理后,变成 10 个氨基酸组成的成熟信息素 ComX,随后成熟的 ComX 转运到胞外^[16]。枯草杆菌细胞对胞外 ComX 的应答依赖于跨膜组氨酸蛋白激酶 ComP 和转录因子 ComA 组成的双组分群体感应系统, *comP* 与 *comA* 在染色体上相邻,且可能受同一个启动子通读转录^[16]。ComX 作用于 ComP,使 ComP 自磷酸化激活磷酸激酶活性,使 ComA 磷酸化^[15],具体过程见图 1。

胞外信号分子 CSF 是 5 个氨基酸组成的短肽 (ERGMT)^[17],由基因 *phrC* 编码产生的前体在跨膜转运中形成成熟的 CSF,与 ComX 不同,转到胞外的 CSF 又通过寡肽透性酶 Spo0K 进入胞内,一般认为 CSF 通过激活其他磷酸激酶或抑制磷酸酶的方式调节磷酸化 ComA (ComA^P) 的水平^[18] (图 2)。

由上可知,枯草杆菌细胞通过两个不同的感应途径应答信号分子 ComX 和 CSF,并且两个感应途径在 ComA 位点汇聚,共同调节 ComA^P 的水平,ComA^P 直接作用于操纵子 *srfA* 的启动子,激活其中的 ComS 基因的转录^[14],促进其感受态形成相关基因的表达 (图 1)。

1.2 起始芽胞形成的机制

枯草杆菌的芽胞形成最初发现是一种应对营养缺乏压力的单细胞分化行为,后来研究发现一些因子能诱导芽胞的产生,并且当细胞密度较低时,即使培养基中营养物质缺乏,细胞也不能有效形成芽胞^[19-20]。目前对于诱导细胞起始形成芽胞的机理还不是很清楚,1988 年 Grossman 和 Losick 将枯草杆菌培养至高密度后 ($OD_{600} > 1.5$),离心去除细胞得到的上清液能刺激低密度细胞有效地形成芽胞,说明当细胞密度达到一定值后在培养基中积累了某种物质,能刺激芽胞的形成,他们将这种物质称为 EDF-A (Extracellular differentiation factor A)。上清液用链霉菌蛋白酶 (Pronase) 处理或透析后,丧失刺激芽胞形成活性,说明 EDT-A 可能是一种寡肽。此外,在 *spo0A* 和 *spo0B* 突变的菌株中 EDT-A 的产量急剧降低^[19]。1993 年 Waldburger 等^[21]对培养上清液进行抽提、纯化,得到了部分纯化的 SF (Sporulation factor),SF 与 EDF-A 具有类似的刺激芽胞形成的作用。生化表征发现 SF 的相对分子量在 1 000–5 000 之间,具有良好的热稳定性和蛋白酶抗性等。因为 SF 具有蛋白酶抗性,且在所有 *spo* 突变的测试菌株培养上清液中都分离得到了 SF,证明 SF 与 EDF-A 属于不同的物质,这也表明可能存在多种能刺激细胞有效形成芽胞的胞外信号分子。

虽然还未确定刺激细胞起始芽胞形成的胞外信号分子,一般认为细胞通过某种感应系统应答胞外信号分子,将其转化为胞内磷酸级联反应,激活芽胞形成相关基因的表达。枯草杆菌细胞内至少有 5 种不同的组氨酸激酶 (KinA-E),这些组氨酸激酶感应不同的胞外压

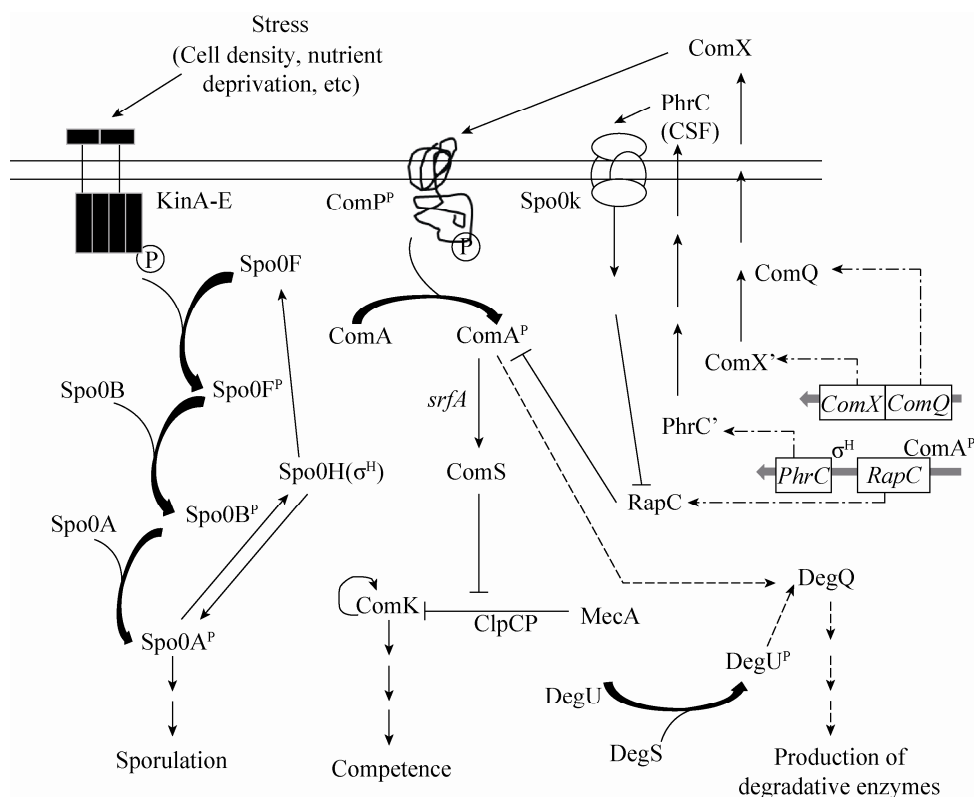


图 1 细胞群体感应系统应答胞外信号起始芽胞和感受态的形成

Fig. 1 Quorum sensing system controlling the initiation of sporulation and competence development by response to extracellular signal factors. Lines with arrows (\rightarrow) and lines with bars (\dashv) indicate positive and negative interactions respectively; \curvearrowright represent phosphorylation; \dashrightarrow indicate gene expression.

力, 水解 ATP 使 Kin 自身磷酸化, Kin^{P} 将磷酸基团转移给 Spo0F 的精氨酸残基, 再通过磷酸级联反应, 将磷酸基团传递给 Spo0B, 最后使 Spo0A 磷酸化, Spo0A^{P} 作为转录因子促进芽胞形成后期相关基因表达^[10] (图 1)。因此, Kin-Spo0F 类似于 ComA-ComP 双组分群体感应体系, 对胞外信号分子作出应答, 调控细胞的发育进程。

2 感受态发育和芽胞形成的调节器: ComK 和 Spo0A

枯草杆菌芽胞形成和感受态形成都依赖于单个关键转录因子的激活: ComK (感受态发育) 和 Spo0A (芽胞形成)。转录因子 ComK 和 Spo0A 的激活受多基因控制, 是不同信号通路共同作用的结果。

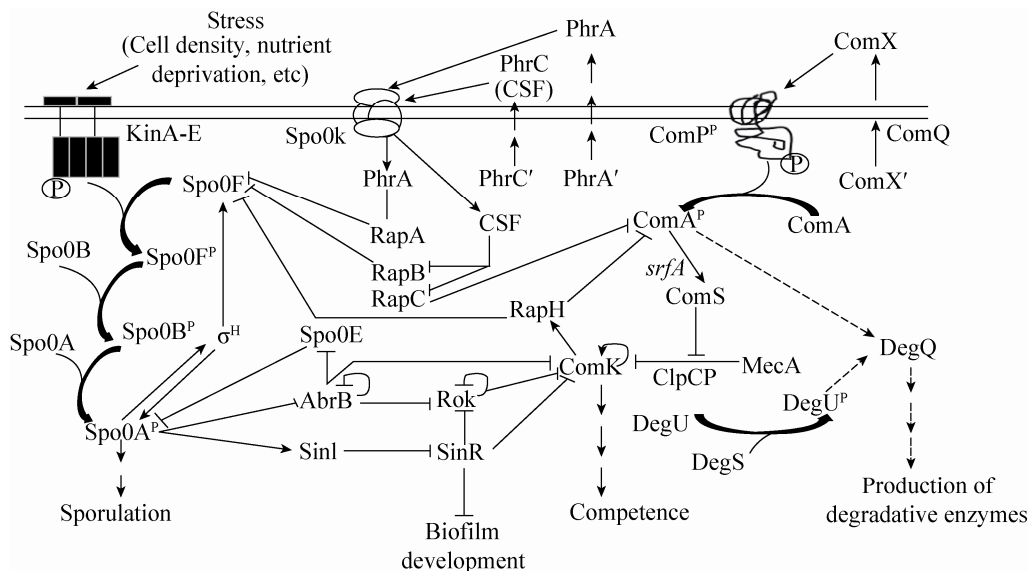


图 2 芽胞形成与感受态形成通路之间的相互作用

Fig. 2 Interactions between sporulation and competence development.

2.1 感受态因子 ComK 的激活

在营养细胞中, CodY、AbrB 和 Rok 结合在 *comK* 的启动子区, 抑制 *comK* 的转录^[22]。此外, MecA 能将 ComK 靶向 ClpCP 蛋白复合体, 降解 ComK^[23], 使胞内 ComK 的浓度维持在较低水平。当细胞进入对数生长末期, 胞外感受态相关信息素 CSF 和 ComX 浓度增加, 细胞的群体感应系统应答这些信号, 使 ComA 磷酸化, ComA^P 起始转录 *comS*, ComS 能与 MecA 蛋白结合, 干扰 ClpCP 对 ComK 的降解, 使胞内 ComK 的浓度上升^[24] (图 1)。ComK 的浓度达到一定值后, 又通过自激活方式使自身浓度快速增加, 调控与细胞形态变化、外源 DNA 吸收等相关的感受态发育后期基因的表达, 使细胞进入感受态通路^[25-27]。

2.2 芽胞形成因子 Spo0A 的激活

Spo0A 属于细菌应答调节蛋白家族, 类似于 ComK 在感受态形成中的作用, 是芽胞形成中关键的转录因子^[28]。Spo0A 基因可由两个启动子 (P_V 和 P_S) 转录, σ^A 识别 P_V 启动子, 维持 Spo0A 在营养细胞中的本底转录水平。 σ^H 识别 P_S 启动子, σ^H 由 *spo0H* 编码, 在细胞的对数生长中期, Spo0H 的转录水平很低, 当细胞进入对数生长末期后, *spo0H* 的转录水平提高, σ^H (Spo0H) 识别 P_S 启动子, 使细胞中 Spo0A 的含量增加^[29]。但是 Spo0A 的转录激活活性还依赖于磷酸化^[30], 当细胞生长至对数末期, Kin-Spo0F 感应系统识别胞外信号分子, 组氨酸蛋白激酶 Kin 磷酸化, 并通过磷酸级联反应使 Spo0A 磷酸化^[10] (图 1), Spo0A^P 促进芽胞形成

后期相关基因的表达,使细胞进入芽胞形成通路^[31]。

3 细胞命运决定:感受态还是芽胞?

3.1 Rap 系统与群体感应系统起始芽胞/感受态形成

Rap 系统包括多种 Rap 蛋白,是芽胞和感受态形成起始阶段信号通路的主要整合模块。Rap 蛋白是一类天冬氨酸磷酸酶,能够对磷酸化的 Spo0F (Spo0F^P) 与 ComA (ComA^P) 去磷酸化,使它们处于失活状态^[32]。Rap 蛋白通常与位于其下游对应的 Phr 信息素共转录,如 *RapC-PhrC* 能被 ComA^P 共转录。此外, *phrC* 前面还有一段启动子区,能被 σ^H (Spo0H) 识别^[11],当细胞进入对数生长末期后,胞内 σ^H 含量上升,转录 *phrC* 形成 CSF,CSF 通过抑制 RapC 和 RacB 等磷酸酶的活性^[33],使 ComA^P 与 Spo0F^P 的浓度增加 (图 2)。一方面,ComA^P 直接作用于操纵子 *srfA*,激活 *comS* 基因的表达,从而为细胞进入感受态发育通路提供了可能。另一方面,ComA^P 共转录 *rapA-phrA*,PhrA 能够抑制 RapA 的磷酸化酶活性,解除 RapA 对 Spo0F^P 的阻遏作用^[34],使胞内 Spo0F^P 的含量上升,Spo0F^P 通过磷酸化级联作用使胞内 Spo0A 磷酸化,为细胞形成芽胞奠定了基础 (图 2)。

3.2 命运决定阶段: AbrB-Rok 系统与转录因子 Spo0A 和 ComK 的激活

细胞中 ComK 的浓度受多重调控,如 AbrB 和 Rok 能结合 *comK* 的启动子阻遏 *comK* 的转录^[22],进行转录水平调控。MecA 能将 ComK 蛋白靶向 ClpCP 蛋白复合体,进行翻译后水平

调控^[11]。通过基因芯片法研究 ComK 的靶蛋白,发现大部分靶蛋白的转录激活依赖于 ComK 的浓度^[27],即 ComK 的浓度较高时才能激活它们的转录,说明只有胞内 ComK 的浓度达到一定阈值后才能使细胞最终进入感受态形成通路。对 ComK 转录水平调控的研究发现,当 ComK 的浓度达到一定值后,能通过激活自身转录作用大量转录,从而短时间内大幅提高胞内 ComK 的浓度^[26]。因此,细胞进入感受态形成通路首先需要解除 AbrB/Rok 的转录阻遏作用,使胞内 ComK 浓度达到自我转录激活水平。

AbrB/Rok 作为感受态发育和芽胞形成决定阶段的整合模块,不仅调控感受态形成,而且参与芽胞形成过程^[11]。Spo0A^P 能抑制 *abrB* 的转录,解除 AbrB 对磷酸酶 Spo0E 的阻遏作用,而 Spo0E 又能抑制 Spo0A^P 的活性 (去磷酸化作用),所以 Spo0A-AbrB-Spo0E 组成了一个调控回路^[35] (图 2)。营养细胞通过这个调控回路维持细胞中 Spo0A^P 浓度相对恒定。当细胞生长进入稳定期后,细胞的群体感应细胞将胞外信号转化为胞内磷酸级联反应,使 Spo0A 磷酸化。因为 Spo0A^P 具有类似于 ComK 的自身激活作用,即可以通过激活 *spo0H* (σ^H) 的转录促进 *spo0F* 和 *spo0A* 的大量表达^[29] (图 2)。胞内 Spo0A^P 含量大幅上升后,抑制 *abrB* 的转录,同时 Rok 被 SinR 抑制,从而解除了 AbrB/Rok 对 ComK 的转录阻遏作用^[10],使胞内 ComK 的含量达到自我激活的阈值,从而使细胞进入感受态发育通路。另一方面,Spo0A^P 作为芽胞形成的关键转录因子,通过促进芽胞形成后期相关基因的表达使细胞进入芽胞形成通路 (图 2)。

3.3 细胞命运决定的调控策略

上文提到细胞中 Spo0A^{P} 含量上升后, 通过促进芽胞形成相关基因的表达, 使细胞进入芽胞形成通路。同时, Spo0A^{P} 通过解除 AbrB/RoK 对 ComK 的转录阻遏作用提高 ComK 的浓度, 另一方面 Spo0A^{P} 能促进 SinI 的表达, 解除 SinR 对 Rok 的抑制作用, 使 Rok 能阻遏 comK 的转录, 即 Spo0A 对 ComK 具有正、负两面的调控作用 (图 2)。那么, 形成感受态的这一小部分细胞是如何“逃脱”芽胞形成通路的?

在对转录因子 Spo0A 的研究中, 发现 Spo0A^{P} 对靶蛋白的作用类似于 ComK , 具有浓度依赖性^[36], 很多芽胞形成后期相关基因如 SinI , SpoIIG 等的表达依赖于较高的 Spo0A 浓度 (设为 S_h)。但是较低水平的 Spo0A^{P} (设为 S_l) 抑制 AbrB 的转录, 加之 AbrB 不稳定, 使 AbrB 的浓度急剧下降。当细胞内 Spo0A^{P} 浓度处于 $S_l \leq S < S_h$ 范围时, Spo0A^{P} 抑制 abrB , 使其浓度急剧下降, 但 Spo0A^{P} 的浓度还不足以促进 SinI 等基因的表达。因此, 在这段短暂的时间内, 小部分细胞内 ComK 的浓度达到自我转录激活水平, 大幅提高胞内 ComK 浓度, 使细胞形成感受态。随着 Spo0A^{P} 浓度的进一步提高, 当 $S \geq S_h$ 时, 一方面使 ComK 的含量降低 (如 SinI 解除 SinR 对 Rok 的抑制作用), 阻止细胞继续形成感受态, 另一方面, 促进芽胞形成相关基因表达, 使细胞进入芽胞形成通路, 最终形成芽胞。因此, 枯草杆菌细胞在芽胞形成和感受态发育过程中, 把 Spo0A^{P} 的浓度作为监测点, 通过 Spo0A^{P} 浓度的变化, 使细胞进入不同的发育途径^[37-38]。

4 总结与展望

枯草杆菌安全无毒, 在工业酶表达、饲料添加和生物防治等领域广泛应用, 已开展了大量的研究工作进一步提高枯草杆菌的应用价值。Zhang 等通过过量表达感受态转录因子 ComK , 使多聚体质粒的转化效率达到 10^4 PFU/ng DNA, 因而成功地以枯草杆菌为宿主通过定向进化改造了纤维素酶^[39]。Fujita 等证实提高调节因子 Spo0A 的浓度, 将有助于细胞形成芽胞^[40]。然而, 研究表明 ComK 与 Spo0A 参与调控细胞中几十种不同类型蛋白质的表达^[27,36], 对它们的调控势必会影响细胞其他的生理过程。随着基因工程与代谢工程研究的不断发展, 积累了大量关于细胞生长、代谢与发育等方面的信息, 通过综合这些遗传信息构建细胞遗传调控网络, 用于指导生产实践, 已经成为当前研究的热点之一^[41-43]。本文概述了枯草杆菌感受态与芽胞形成的遗传调控网络, 为提高枯草杆菌感受态效率和芽胞形成率提供了理论参考。总的来说, 该调控网络在枯草杆菌的应用研究中具有如下 4 点作用, 一是直观地展示细胞感受态与芽胞形成通路之间的相互作用关系与遗传调控策略; 二是能为枯草杆菌细胞感受态形成和芽胞形成相关的遗传改造工作提供理论指导, 并且能从代谢网络的角度了解基因间的互作与动态变化; 三是能简便地拓展到其他代谢通路中, 如双组分调节系统 DegS-DegU 在胞外物质分泌中具有重要作用, ComA^{P} 能促进 DegQ 的表达, 间接调节 DegS-DegU 的磷酸化状态 (图 2), 进而影响细胞的分泌表达能力; 四是对枯草杆菌近缘种如

地衣芽胞杆菌的遗传改造具有借鉴作用。

REFERENCES

- [1] Wu SC, Wong SL. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol*, 1999, 72(3): 185–195.
- [2] Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol*, 2011, 28(2): 214–220.
- [3] Bulut Y, Gül A, Baysal Z, et al. Adsorption of Ni (II) from aqueous solution by *Bacillus subtilis*. *Desalin Water Treat*, 2012, 49(1/3): 74–80.
- [4] Lu Z, Tian C, Li A, et al. Identification and characterization of a novel alkaline α -amylase Amy703 belonging to a new clade from *Bacillus pseudofirmus*. *J Ind Microbiol Biot*, 2014, 41(5): 783–793.
- [5] Verma D, Satyanarayana T. Production of cellulase-free xylanase by the recombinant *Bacillus subtilis* and its applicability in paper pulp bleaching. *Biotechnol Progr*, 2013, 29(6): 1441–1447.
- [6] Pohl S, Bhavsar G, Hulme J, et al. Proteomic analysis of *Bacillus subtilis* strains engineered for improved production of heterologous proteins. *Proteomics*, 2013, 13(22): 3298–3308.
- [7] Liu L, Liu Y, Shin HD, et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. *Appl Microbiol Biot*, 2013, 97(14): 6113–6127.
- [8] Guo XL, Di YN, Wang Y. Optimization of sporulation conditions of *Bacillus subtilis*. *Soil Fert Sci China*, 2012(3): 99–103 (in Chinese).
郭夏丽, 狄源宁, 王岩. 枯草芽胞杆菌产芽孢条件的优化. *中国土壤与肥料*, 2012(3): 99–103.
- [9] Wang SX, Li SN, Li HY. Optimization of spore production conditions of strain of producing phytase *Bacillus subtilis* ZX-29. *Hubei Agric Sci*, 2014, 25(1): 160–163 (in Chinese).
王树香, 李术娜, 李红亚. 产植酸酶枯草芽胞杆菌 ZX-29 产芽孢条件的优化. *湖北农业科学*, 2014, 25(1): 160–163.
- [10] Grossman AD. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet*, 1995, 29(1): 477–508.
- [11] Schultz D, Wolynes PG, Ben JE, et al. Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(50): 21027–21034.
- [12] Kaufenstein M, van Der Laan M, Graumann PL. The three-layered DNA uptake machinery at the cell pole in competent *Bacillus subtilis* cells is a stable complex. *J Bacteriol*, 2011, 193(7): 1633–1642.
- [13] Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(3): 241–249.
- [14] Oslizlo A, Stefanic P, Dogsa I, et al. Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1586–1591.
- [15] Shank EA, Kolter R. Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(6): 741–747.
- [16] Dubnau D. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev*, 1991, 55(3): 395–424.
- [17] Solomon JM, Lazazzera BA, Grossman AD. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Gene Dev*, 1996, 10(16): 2014–2024.
- [18] Core L, Perego M. TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2003, 49(6): 1509–1522.
- [19] Grossman AD, Losick R. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(12): 4369–4373.
- [20] Tan IS, Ramamurthi KS. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Env Microbiol Rep*, 2014, 6(3): 212–225.
- [21] Waldburger C, Gonzalez D, Chambliss GH. Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1993, 175(19): 6321–6327.
- [22] Van Sinderen D, Luttinger A, Kong L, et al. ComK encodes the competence transcription factor, the

- key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 1995, 15(3): 455–462.
- [23] Nanamiya H, Shiomi E, Ogura M, et al. Involvement of ClpX protein in the post-transcriptional regulation of a competence specific transcription factor, ComK protein, of *Bacillus subtilis*. *J Biochem*, 2003, 133(3): 295–302.
- [24] D'souza C, Nakano MM, Zuber P. Identification of comS, a gene of the srfA operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(20): 9397–9401.
- [25] Smits WK, Eschevins CC, Susanna KA, et al. Stripping *Bacillus*: ComK auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development. *Mol Microbiol*, 2005, 56(3): 604–614.
- [26] Van Sinderen D, Venema G. ComK acts as an autoregulatory control switch in the signal transduction route to competence in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1994, 176(18): 5762–5770.
- [27] Ogura M, Yamaguchi H, Kobayashi K, et al. Whole-genome analysis of genes regulated by the *Bacillus subtilis* competence transcription factor ComK. *J Bacteriol*, 2002, 184(9): 2344–2351.
- [28] Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(6): 579–586.
- [29] Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological reviews*, 1993, 57(1): 1–33.
- [30] Chastanet A, Vitkup D, Yuan G-C, et al. Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(18): 8486–8491.
- [31] Molle V, Fujita M, Jensen ST, et al. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2003, 50(5): 1683–1701.
- [32] Henke JM, Bassler BL. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(11): 648–656.
- [33] Pottathil M, Lazazzera BA. The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front Biosci*, 2003, 8: 32–45.
- [34] Diaz AR, Core LJ, Jiang M, et al. *Bacillus subtilis* RapA phosphatase domain interaction with its substrate, phosphorylated Spo0F, and its inhibitor, the PhrA peptide. *J Bacteriol*, 2012, 194(6): 1378–1388.
- [35] Shafikhani SH, Leighton T. AbrB and Spo0E control the proper timing of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol*, 2004, 48(4): 262–269.
- [36] Fujita M, Gonzalez-Pastor JE, Losick R. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2005, 187(4): 1357–1368.
- [37] Mirouze N, Desai Y, Raj A, et al. Spo0A^P imposes a temporal gate for the bimodal expression of competence in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet*, 2012, 8(3): e1002586.
- [38] Nakano MM, Zuber P. The primary role of comA in establishment of the competent state in *Bacillus subtilis* is to activate expression of srfA. *J Bacteriol*, 1991, 173(22): 7269–7274.
- [39] Zhang XZ, Zhang Y. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. *Microb Biotechnol*, 2011, 4(1): 98–105.
- [40] Fujita M, Losick R. Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Gene Dev*, 2005, 19(18): 2236–2244.
- [41] Ishida T, Kurata T, Okada K, et al. A genetic regulatory network in the development of *Trichomes* and root hairs. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 365–386.
- [42] Peter I, Zhu Y, Davidson EH. Use of gene regulatory network logic for transformation of cells: US 20140234974 A1. 2014-08-20.
- [43] Guisbert E, Czyz DM, Richter K, et al. Identification of a tissue-selective heat shock response regulatory network. *PLoS Genet*, 2013, 9(4): e1003466.

(本文责编 陈宏宇)