

TetR 家族转录调控因子配体的研究进展

吴攀攀^{1,2}, 李博文¹, 陈克涛¹, 吴杭^{1,3}, 张部昌^{1,2,3}

1 安徽大学 物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230601

2 安徽大学 化学与化工学院, 安徽 合肥 230601

3 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230601

吴攀攀, 李博文, 陈克涛, 等. TetR 家族转录调控因子配体的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2379-2392.

Wu PP, Li BW, Chen KT, et al. Ligands of TetR family transcriptional regulators: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2379-2392.

摘 要: TetR 家族转录调控因子 (TetR family transcriptional regulators, TFRs) 广泛分布于细菌与古菌中, 最早被发现的是可控制大肠杆菌四环素外排泵的 TetR。TFRs 拥有 DNA 结合和多样的配体感知能力, 其作用机制复杂。配体小分子诱导 TFRs 产生构象变化, 抑制或促进 TFRs 对其靶点的控制。目前已知的 TFRs 配体种类繁多, 包括糖类、蛋白质、脂肪酸及其衍生物、金属离子等。配体的多样性使得 TFRs 调节范围很广, 包括从基础碳代谢、氮代谢到群体感应、抗生素生物合成等一系列生理过程。文中主要从介导调控角度介绍 TFRs 配体的研究进展, 并结合笔者实验室的研究工作, 重点阐述 TFRs 配体在基础碳代谢、脂肪酸生物合成与降解等初级和次级代谢产物合成过程中的作用机制, 及其在基因线路开发和抗生素合成基因的激活等应用方面的研究进展。

关键词: 细菌, 古菌, TetR 家族转录因子, 配体, 反馈调控, 前馈控制

Ligands of TetR family transcriptional regulators: a review

Panpan Wu^{1,2}, Bowen Li¹, Ketao Chen¹, Hang Wu^{1,3}, and Buchang Zhang^{1,2,3}

1 Institutes of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

3 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

Abstract: TetR family transcriptional regulators (TFRs) are widely distributed in bacteria and archaea, and the first discovered TFR was confirmed to control the expression of tetracycline efflux pump in *Escherichia coli*. TFRs can bind DNAs and ligands. Small molecule ligands can induce conformational changes of TFRs, inhibiting or promoting TFRs to control target gene expression. Currently, TFRs have a wide variety of ligands, including carbohydrates, proteins, fatty acids and their derivatives, metal ions, and so on. Due to the diversity of ligands, TFRs regulate a wide range of physiological processes, from basic carbon metabolism and nitrogen metabolism to quorum sensing and antibiotic biosynthesis. On the basis of the recent studies in our laboratory and the literature, we review here the regulatory mechanism mediated by ligands of TFRs in primary

Received: August 11, 2020; **Accepted:** December 11, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31972930, 31570074), the University Synergy Innovation Program of Anhui Province, China (No. GXXT-2019-035).

Corresponding author: Buchang Zhang. Tel: +86-551-63861965; E-mail: zhbc@ahu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31972930, 31570074), 安徽高校协同创新项目 (No. GXXT-2019-035) 资助。

网络出版时间: 2021-01-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210111.1116.001.html>

and secondary metabolism, as well as the application of ligands for TFRs in the development of gene route and the activation of antibiotic biosynthesis.

Keywords: bacteria, archaea, TetR family transcription factors, ligand, feedback regulation, feed-forward control

原核生物基因组中存在着诸多转录调控因子家族,其中以 TetR 家族转录调控因子 (TetR family transcriptional regulators, TFRs) 数量最多^[1]。“TFR”源自四环素抗性阻遏蛋白 (Tet repressor, TetR),它是第一个被表征的 TetR 家族成员^[1-2]。TFRs 广泛存在于细菌和古菌中,如常见的大肠杆菌 *Escherichia coli* M.、放线菌中的结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* Z.和抗生素产生菌,以及古菌中的硫化叶菌 *Sulfolobus* B.等,它们参与调控诸多生理代谢活动,如生物膜形成、形态分化、抗生素生物合成、细胞通讯等^[2-3]。

TFRs 包含 N 端 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD) 与 C 端配体结合结构域 (Ligand binding domain, LBD),具有 DNA 结合和配体响应的双重能力,这是它们发挥别构调控的结构基础^[4]。TFRs LBD 的一级序列差异很大,暗示 TFRs 配体的结构多样性。已知的 TFRs 配体种类繁多,涵盖糖类、蛋白质、脂肪酸及其衍生物、金属离子等^[2]。这种配体多样性使 TFRs 可以调节的生理过程非常多,包括碳氮代谢、生物膜的形成、群体感应、抗生素的生物合成等^[4]。本文主要综述了 TFRs 配体的研究进展,从配体介导调控角度,揭示配体诱导 TFRs 调控一系列细胞生理过程的分子机制,并阐述了 TFRs 配体在基因线路的开发和抗生素合成的激活等方面的应用研究。

1 TFRs 配体的研究技术

配体作用 TFRs LBD 导致其 DBD 构象变化,以“开关”形式激活或阻遏 TFRs 结合靶点,动态调节靶基因的表达^[5]。配体对 TFRs 发挥别构调控作用至关重要,但其结构多样性与复杂性无疑增加了筛选与鉴别的难度。通常 TFRs 调控邻近基因

表达,其靶基因参与的代谢途径的中间产物可作为 TFRs 潜在的配体,如 AccR 的配体^[6],但这一方法并不适用于大多数的 TFRs。

目前系统基因组学^[7]、结构生物学^[8]和化合物生物合成途径预测^[6]是寻找潜在配体的有效手段。借助于差示扫描荧光法 (Differential scanning fluorimetry, DSF) 可实现对 TFRs 配体的快速、高通量筛选^[9]。而凝胶迁移实验 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)^[10]、表面等离子共振技术 (Surface plasmon resonance, SPR)、等温滴定定量热法 (Isothermal titration calorimetry, ITC)、荧光偏振法 (Fluorescence polarization, FP)、生物膜层干涉技术 (Biolayer interferometry, BLI)^[11-12]、电喷雾质谱法 (Electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)^[13]等分析方法,也为配体与 TFRs 结合亲和力的表征提供了技术保障。

2 TFRs 配体的作用方式

蛋白晶体学研究证实小分子配体至少以 3 种方式进入 TFRs LBD 的内腔疏水区域 (图 1)^[2]。(1)“侧进入”:与 TFRs 二聚化界面侧边入口的氨基酸残基作用进入腔体,例如 ActR^[14]和 FadR_{Sa}^[15];(2)“前进入”:与 TFRs 二聚化界面前端的氨基酸残基结合进入内腔,如 SimR^[16];(3)“顶进入”:与位于 TFRs 二聚体顶端的氨基酸残基作用进入内腔,如 DesT^[17]。有趣的是,谷氨酸棒状杆菌中 TFR RoIR 二聚体蛋白可直接包覆其配体间苯二酚,但尚未发现明显的配体进入位点^[18]。此外,一些 TFRs 的配体结合腔中存在多个小分子作用位点,例如 SimR^[16]和 QacR^[19],特别是作为多药物输出泵的调控因子 QacR,可响应超过 16 种不同的配体,这进一步突显了其介导调控的复杂性^[19]。

3.1 基础碳代谢

TFRs 应答特定配体实现对基础碳代谢的调控。谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* K. 的 *acn* 编码的乌头酸酶可将柠檬酸异构化, 是柠檬酸循环 (TCA cycle) 的关键节点^[20], García-Nafria 等^[21]报道柠檬酸盐能够抑制 TFR AcnR 与 *acn* 启动子的结合。胆固醇是结核分枝杆菌在感染期的主要碳源, TFR KstR 抑制相关酶编码基因的表达, 控制胆固醇的降解, 而降解产物 3OCh-CoA 和 4-BNC-CoA 能够介导 KstR 的调控^[22]。少数 TFRs 应答小分子配体需要辅助蛋白的参与, 例如乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* L. TFR DhaS 调控甘油降解途径中二羟基丙酮 (Dihydroxyacetone, Dha) 激酶的表达, 该激酶的同源物 DhaQ 与 DhaS 形成的复合物在 Dha 存在时会激活 *dha* 操纵子的转录^[23]。

TFRs 参与的碳代谢分解途径中, TFR-DNA 复合物可以感知胞内底物或中间体水平, 形成闭环的控制回路。例如恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* T. 的 TFR NicS 作用 *pa* 启动子区抑制烟酸 (Nicotinic acid, NA) 转化为 6-羟基烟酸 (6-hydroxynicotinic acid, 6HNA), 而 NA 和 6HNA 存在时能够诱导 NicS 与靶点解离, 促进 NA 的分解^[24]。TFR RolR 抑制基因簇 *rol* 调控谷氨酸棒杆菌的间苯二酚分解, 胞内积累的间苯二酚和代谢中间体羟基喹诺酮竞争性结合 RolR, 激活 *rol* 基因转录, 加速间苯二酚代谢^[25]。始旋链霉菌 *Streptomyces pristinaespiralis* R. 的 TFR PaaR 调控苯乙酸的降解途径, 苯乙酰-CoA 是介导其调控的配体^[26]。上述研究表明, 当碳代谢途径的底物、中间体或产物积累到浓度阈值时, 可结合 TFR, 促进或抑制其靶基因转录, 形成局部的自动控制回路, 以浓度依赖方式实现对代谢物的动态调节。

3.2 脂肪酸生物合成与降解

FadR 是一种脂肪酰基-CoA 依赖性转录调控因子, 控制脂肪酸生物合成与降解途径中的多种

基因。Anand 等^[27]报道脂肪酸代谢显著影响结核分枝杆菌的致病性, 作为 FadR 的同系物, TFR Fad35R 调控酰基-CoA 合成酶 (Fad) 的表达, 棕榈酰-CoA 被证实介导这一调控过程, 从而控制脂肪酸活化。大肠杆菌的 FabR 通过调控 *fabA* 和 *fabB* 的表达水平影响不饱和脂肪酸的生物合成^[28], 而铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* S. 的 DesT 结合 *desC* 和 *desB* 启动子实现酰基链的去饱和^[29], 二者调控脂肪酸代谢的不同途径, 它们与各自靶点的结合均能被不饱和酰基-CoA 增强而被饱和酰基-CoA 抑制^[30], 说明其调控功能存在保守性。沙门氏菌 *Shewanella oneidensis* V. 的 FadR_{she} 结合 *fabA* 调控脂肪酸的生物合成, 而大肠杆菌 FabR_{ec} 作为其同源蛋白也可以跨种调控 *fadA*, 二者对 *fadA* 的结合均能被 C16 和 C18 脂肪酰基-CoA 抑制^[31], 表明脂肪酰基-CoA 对 FadR 及其同系物的介导调控可能普遍存在于细菌的脂肪酸代谢中。

古菌具有典型的细菌样转录调节因子^[38]。FadR_{sa} 是 TetR 家族的古菌成员, 它与芽孢杆菌 *Bacillus* C. FadR 表现出较高的序列和功能相似性 (图 2)。例如在嗜酸热硫化叶菌 *Sulfolobus acidocaldarius* B. 中, TFR FadR_{sa} 抑制 *Saci_1103-Saci_1126* 基因簇控制脂肪酸代谢, 月桂酰-CoA 和多种长链脂肪酰基-CoA 是其配体^[15]。FadR_{sa} 同系物可能广泛存在于古菌中 (图 3), 暗示着它们功能上的保守性。

3.3 其他基础代谢

除了参与上述碳基础代谢和脂肪酸代谢, TFRs 配体还控制氮代谢、嘧啶代谢、氨基酸代谢、生物膜形成等诸多生理活动。TFR AmtR 是棒状杆菌氮代谢的主要调控因子, 腺苷酸化的 GlnK 蛋白可以诱导其与靶点的解离^[32]。Lechardeur 等^[33]发现 HrtR 可以响应血红素, 调控乳酸乳球菌血红素的外排。RutR 是大肠杆菌嘧啶代谢的主要调节剂, 配体是尿嘧啶^[34], 其同源蛋白 TFR PydR 同

样控制恶臭假单胞菌嘧啶的降解,并且 RutR 应答尿嘧啶的氨基酸残基在 PydR 中保守,表明 PydR 可能同样对尿嘧啶敏感^[39]。Rey 等^[35]证实 McbR 是谷氨酸棒杆菌中涉及硫代谢的全局调节因子,

直接抑制至少 45 个基因的转录,这些基因涉及(S-腺苷)蛋氨酸和半胱氨酸合成、硫酸盐还原、含硫化合物吸收和利用等,S-腺苷同型半胱氨酸阻止 McbR 结合靶点,调控大分子硫的运输和代谢。

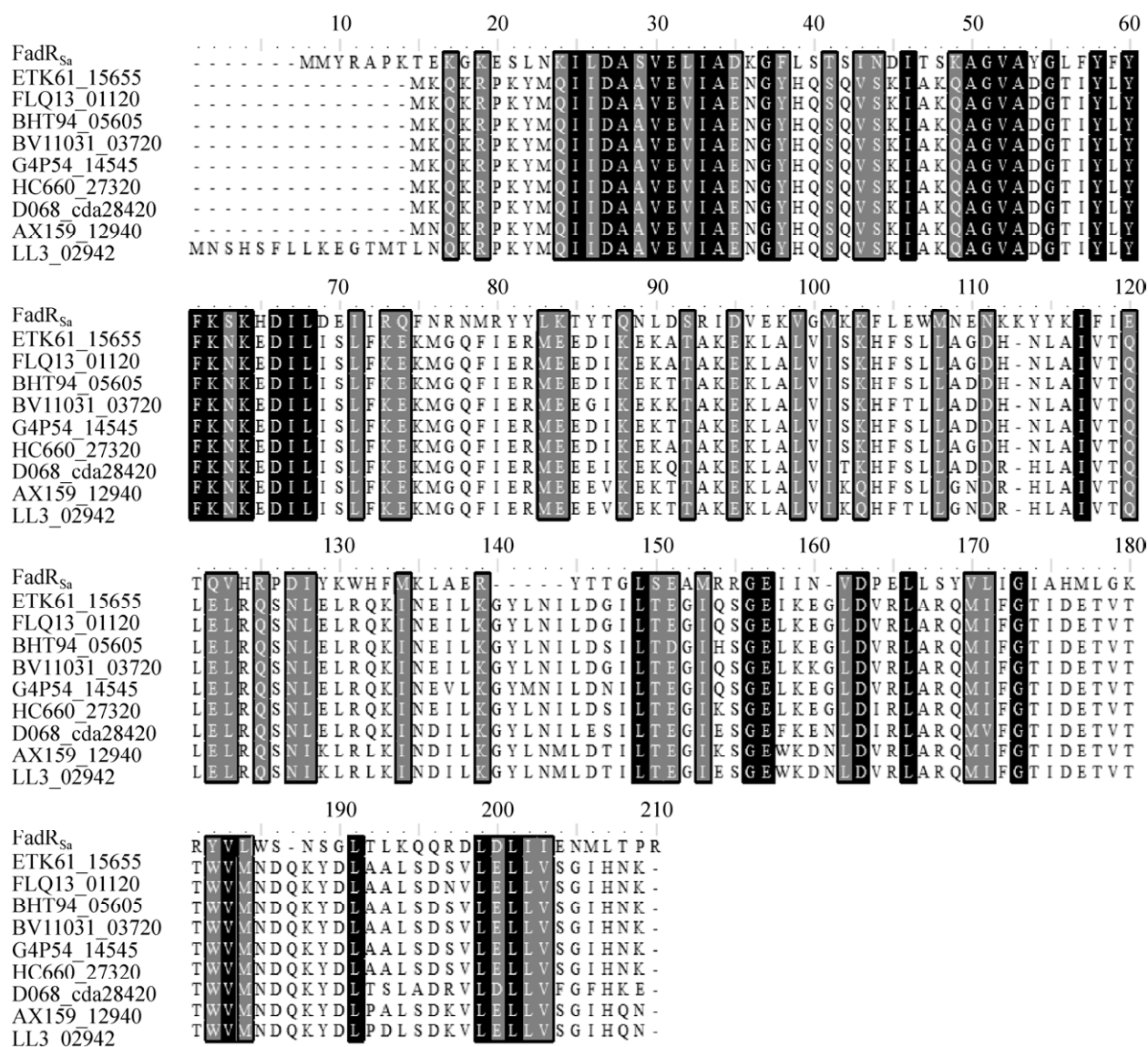


图2 嗜酸热硫化叶菌 FadR_{sa} 与芽孢杆菌中其同源蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of FadR_{sa} in *S. acidocaldarius* and its homologous proteins in *Bacillus* spp.. *S. acidocaldarius* FadR_{sa} (GenBank accession number: AAY80459); *Bacillus subtilis* ETK61_15655 (GenBank accession number: QAW34163); *Bacillus halotolerans* FLQ13_01120 (GenBank accession number: QDK66354); *Bacillus licheniformis* BHT94_05605 (GenBank accession number: OLQ51560); *Bacillus vallismortis* BV11031_03720 (GenBank accession number: QAV07766); *Bacillus tequilensis* G4P54_14545 (GenBank accession number: QIW80929); *Bacillus mojavensis* HC660_27320 (GenBank accession number: QJC97205); *Bacillus atrophaeus* D068_cds28420 (GenBank accession number: AKL85870); *Bacillus nakamurai* AX159_12940 (GenBank accession number: KXZ21325); *Bacillus amyloliquefaciens* LL3_02942 (GenBank accession number: AEB64473).

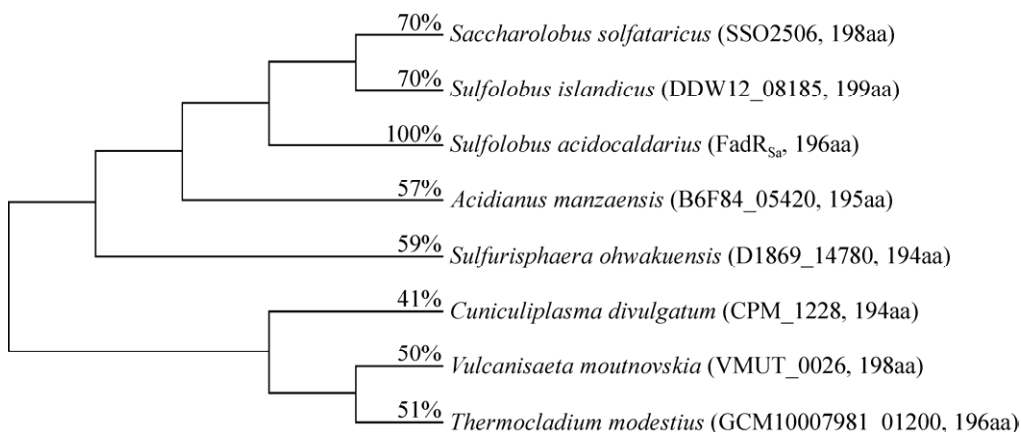


图3 古菌中 **FadR_{Sa}** 及其同系物的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of **FadR_{Sa}** and its homologs in archaea. Percentages represent the identities between **FadR_{Sa}** and its homologs. *Sulfolobus acidocaldarius* **FadR_{Sa}** (GenBank accession number: AAY80459); *Saccharolobus solfataricus* SSO2506 (GenBank accession number: AAK42639); *Sulfolobus islandicus* DDW12_08185 (GenBank accession number: PVU77113); *Acidianus manzaensis* B6F84_05420 (GenBank accession number: ARM75525); *Sulfurisphaera ohwakuensis* D1869_14780 (GenBank accession number: QGR18311); *Cuniculiplasma divulgatum* CPM_1228 (GenBank accession number: SJK85035); *Vulcanisaeta moutnovskia* VMUT_0026 (GenBank accession number: ADY00243); *Thermocodium modestius* GCM10007981_01200 (GenBank accession number: GGP19057).

胍丁胺是铜绿假单胞菌精氨酸降解的中间体, 研究表明 TFR *AguR* 结合 *aguAB* 启动子调控胍丁胺的利用, 反过来又可被胍丁胺诱导, 序列分析显示 *AguR* 在假单胞菌属许多成员中都是保守的^[36]。细胞中存在一类可扩散的信号分子, 在纳摩尔水平即可诱导 TFRs 实现对多种生理活动的灵敏调控, 例如耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* T. 中第二信使环状 di-AMP (Cyclic di-AMP) 介导 TFR *DarR*, 实现对细菌的生物膜形成和运动的控制^[37]。

4 TFRs 配体介导的次级代谢

微生物凭借自身复杂的次级代谢系统, 可以合成诸多生物活性显著、结构多样的抗生素。在抗生素生物合成时, 通常其前体、中间体和终产物以及信号分子充当配体介导 TFR 的调控 (表 2)。

4.1 抗生素生物合成前体

微生物的初级代谢除了维持自身生长需要, 还为其次级代谢物的合成提供了丰富的前体^[5]。研究表明抗生素生物合成前体可充当调控配体, 影响某些特定的代谢通路。例如在红色糖多孢菌

Saccharopolyspora erythraea W. 中, 作为红霉素生物合成的羧酸类前体, 甲基丙二酸介导 TFR *PccD* 对丙酰-CoA 羧化酶基因的调控, 影响甲基丙二酰-CoA 的胞内供应^[40]。而近期 Lyu 等^[6]发现阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* B. 的 TFR *AccR* 抑制酰基-CoA 羧化酶基因 *accD1A1* 的转录, 影响胞内 5 种酰基-CoA 的吸收, 而甲基巴豆酰、丙酰和乙酰-CoA 介导这一调控过程。尽管这 3 种酰基-CoA 不能直接参与阿维菌素生物合成, 却是其他聚酮抗生素生物合成的前体。

4.2 抗生素生物合成中间体

代谢中间体常以前馈或反馈形式介导 TFR 对靶点的控制, 避免物质的过度积累, 稳定抗生素生物合成。Zhang 等^[41]报道 *JadR** 结合杰多霉素 B (*Jadomycin B*, *JdB*) 生物合成簇内基因 *jadY* 等抑制其生物合成, 早期中间体 DHU 和 DHR 抑制 *JadR** 对 *jadY* 启动子的控制。阿维链霉菌中, Liu 等^[42]发现阿维菌素 B1 生物合成后期间中间体 C-5-O-B1 的过多积累会阻遏 TFR *AveT* 结合靶基因。这种相似的诱导调控机制可能普遍存在于产抗生素的放线菌中。

ScbR2 激活 *kasO*, 从而开启 CPK 的生物合成。同样地, 委内瑞拉链霉菌 *Streptomyces venezuelae* E. 的 TFR JadR2 遏制 JadR1 调控 JdB 生物合成, JdB 的存在会干扰 JadR2 对 JadR1 的抑制, 刺激 JdB 生产; JadR2 还可以抑制 JadR1 激活氯霉素 (Chloramphenicol, Cm) 生物合成, 而 Cm 的积累会反馈抑制 JadR2 的 DNA 结合活性。表明不同抗生素可以介导同一 TFR, 实现对自身生物合成

的动态调控, 而这种调控模式广泛存在于抗生素产生菌中^[5] (图 4)。

微生物具备不同抗性系统来抵御毒性分子 (毒物和抗生素等) 侵害。研究表明许多 TFRs 可以应答抗生素调控细胞的耐药性, 如 TFR 家族的首位成员 TetR, 可以响应四环素并调控其外排^[2]。Le 等^[49]发现 TFR SimR 作用外排泵基因 *simX* 实现抗生链霉菌 *Streptomyces antibioticus* W.

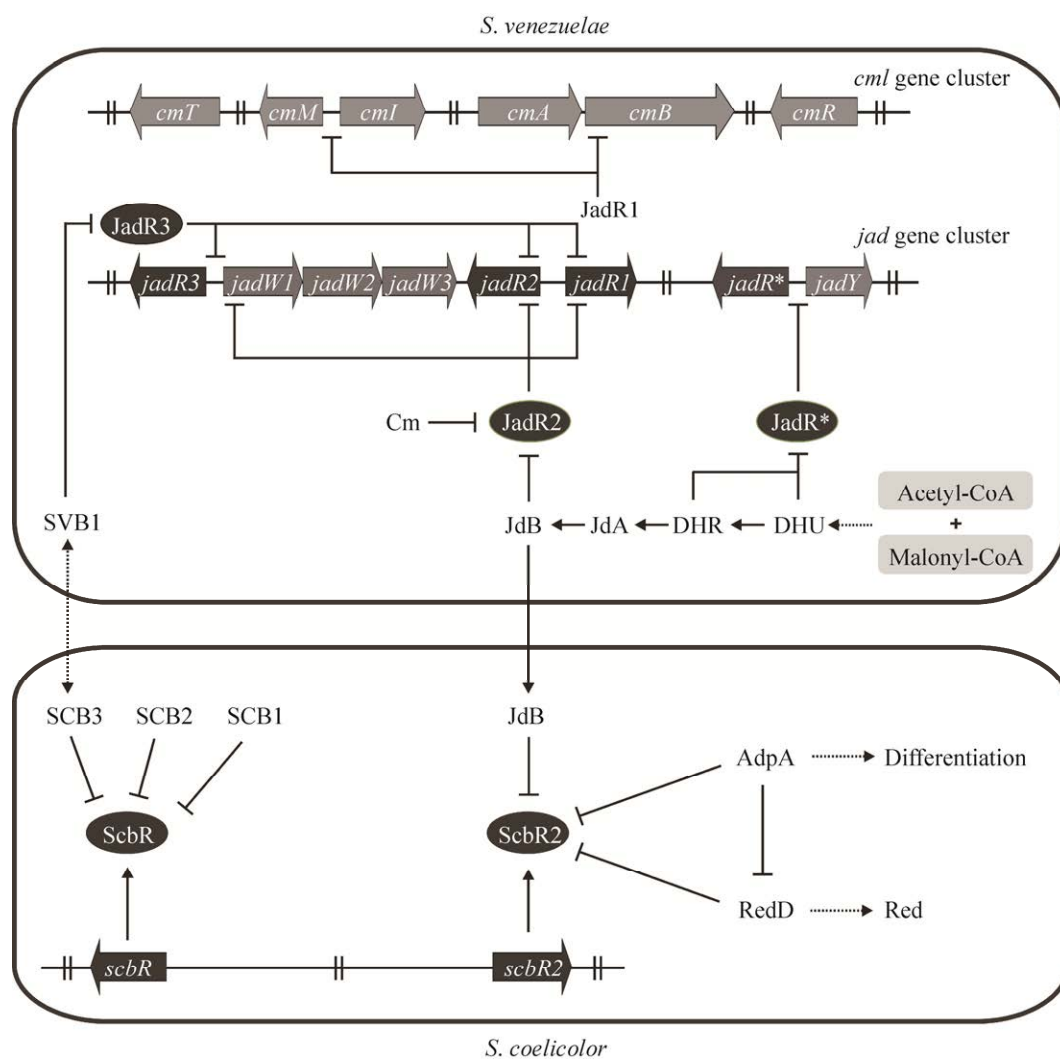


图 4 委内瑞拉链霉菌和天蓝色链霉菌中配体介导 TFRs 的调控^[5]

Fig. 4 Ligand-mediated regulation of TFRs in *S. venezuelae* and *S. coelicolor*^[5]. JadR2, JadR3, JadR*, the TetR family transcriptional regulator in *S. venezuelae*; ScbR, ScbR2, the TetR family transcriptional regulator in *S. coelicolor*. JdB, Jadomycin A; DHU, 2,3-dehydro-UWM6; DHR, dehydrorabelomycin; SCB1, 2-(1'-hydroxy-6-methylheptyl)-3-hydroxymethylbutanolide; SCB2, 2-(1'-hydroxyoctyl)-3-hydroxymethylbutanolide; SCB3, 2-(1'-hydroxy-6'-methyloctyl)-3-hydroxymethylbutanolide.

对 Simocyclinone D8 (SD8) 的耐药性, 而 SD8 及其中间体 simocyclinone C4 能够阻遏 SimR 对 *simX* 的控制; 而随后的研究则从结构水平揭示了 SD8 介导 SimR 调控的更多原子细节^[16]。近期, 笔者实验室发现林可链霉菌 *Streptomyces lincolnensis* M. 的 TFR SLCG_2919 调控 ATP/GTP 结合蛋白基因 *SLCG_2920*, 过表达该基因可提高菌株对林可霉素抗性, 推测林可霉素可能介导 SLCG_2919 的调控^[61]。类似功能的抗生素还有很多, 如利福霉素 B^[50]和弗吉尼亚霉素 S^[51]等。同 TetR/*tetA* 外排系统一样, 这些抗性基因受 TFRs 调控, 当胞内抗生素积累到毒性阈值, 便激活被 TFRs 抑制的泵基因的表达, 实现抗生素外排与其生物合成的偶联, 这或许是许多抗生素生产中的共同特征。

4.4 外源性抗生素

外源性抗生素具有比内源性抗生素更为复杂的介导机制, 它能够实现跨种属的诱导调控, 是细菌进化的一种重要生存策略。例如委内瑞拉链霉菌产生的 JdB 可诱导天蓝色链霉菌产生复杂的生理反应^[48] (图 4)。AdpA 是形态分化和次级代谢的主要调节剂, TFR ScbR2 通过结合 *redD* 和 *adpA* 启动子, 直接调控 Red 生产和菌株形态分化, 同时 AdpA 还直接调控 *redD* 的表达, ScbR2 响应外源 JdB, 在 ScbR2-AdpA-RedD 间形成前馈环, 控制天蓝色链霉菌的形态分化和 Red 生物合成^[48,62]。

4.5 信号分子

灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* K. A 因子 (A-factor) 是细菌中第一个被表征的 γ -丁内酯 (Gamma butyrolactone, GBL) 类信号分子^[52], A 因子诱导一系列级联反应影响链霉素产生和菌株形态分化, 深入研究发现这一级联反应需要 A 因子受体 ArpA、多效调节因子 AdpA 和簇内激活因子 StrR 参与^[53]。得益于 A 因子研究的启发, 更多的激素样信号分子被发现, 例如天蓝色链霉菌中鉴定的 SCB1、SCB2 和 SCB3^[54-55]、委内瑞拉

链霉菌中 TFR JadR3 的配体 SVB1^[56]等。有趣的是, SVB1 和 SCB3 结构相同, 继续研究证实 SVB1/SCB3 可作为种间信号, ScbR 和 JadR3 响应彼此释放的外源性 SVB1/SCB3, 调控内源抗生素的生物合成^[56] (图 4)。越来越多的相关研究不断加深人们对信号分子介导抗生素生物合成级联调控机制的认识。

与 GBL 功能类似的呋喃霉素 (Methylenomycin furan, MMF)、ppGpp、GTP 等, 同样可作为 TFR 的诱导剂。MMFs 特异地诱导天蓝色链霉菌次甲霉素的生物合成^[63]。天蓝色链霉菌中 ppGpp 和 GTP 介导 TFR XdhR 对嘌呤挽救途径的调控^[59]。这种纳摩尔浓度便可发挥作用和可扩散的信号分子, 无疑增加了细菌调控的灵敏性和机动性, 同时也增强了其对多变生境的适应能力。

5 TFRs 配体的开发与应用

5.1 基因线路的开发

TFRs 靶基因和配体可被用作基本的生物零件, 设计构建出像 Tet-Off/On 系统的基因线路, 再利用配体去激活或关闭下游基因表达。例如利用 TFR PhlF 开发的 DAPG-Off/On 触发开关系统可调控酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* H. 中报告基因表达。2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, DAPG) 可以诱导 PhlF 与靶点 (*phlO*) 的解离。DAPG-Off 系统中, 与多聚病毒激活蛋白结构域融合的 PhlF 激活报告基因表达, 当添加 DAPG 时, 该基因的表达被关闭; 与 DAPG-Off 效果相反的 DAPG-On 系统, DAPG 存在会开启报告基因表达^[64]。同样基于 TFR CamR 配体樟脑 (Camphor) 开发的 Camphor-Off 系统应用于激活无樟脑体系中报告基因的表达^[65]。

除了触发开关系统, 基于 TFRs 及其配体开发的自调控基因线路, 可实时监测和动态调控目标产物的生物合成, 为提高“细胞工厂”的生产力

及突破微生物天然产物生物合成的关键瓶颈提供了可能。例如基于 TFR MphR 定向进化构建的基因线路,显著提高了 MphR 对大环内酯类抗生素的敏感性,可应用于大环内酯类抗生素和其结构类似物产生菌的快速筛选^[60];基于丙二酰-CoA 开发的基因线路能够自反馈调节相关代谢物流量、平衡胞内丙二酰-CoA 代谢池^[66];利用大肠杆菌 FadR 响应酰基-CoA 这一特性,在酿酒酵母中构建与基因过表达文库相结合的基因线路,不仅可以鉴定出增强酰基-CoA 水平的基因靶点,还大幅提高了脂肪酸衍生物脂肪醇的产量^[67]。基于合成生物学理念,利用 TFR 及其配体等基本的生物零件开发出可应用的基因线路,俨然成为突破细菌天然产物生物合成瓶颈、提高其代谢效价的一种重要手段。

5.2 抗生素生物合成的激活

GBLs 类信号分子可以作为抗生素生产的诱导剂^[5],但受限于天然 GBLs 的产量,人工合成的 GBLs 及其结构类似物是天然 GBLs 有效替代品。研究发现添加合成的 SCB1 可促进天蓝色链霉菌 Act 的产生^[68]。同样地,在吸水链球菌 *Streptomyces hygroscopicus* J.和螺旋霉素链霉菌 *Streptomyces spiramyceticus* Y.中分别添加化学合成 GBL 类似物 1,4-丁内酯,促进了井冈霉素和双螺旋霉素的生物合成^[69-70]。因此,外源添加信号分子及其结构类似物是一种改善抗生素产量的有效策略^[53]。

6 总结与展望

本文主要阐述了近年来 TFRs 配体的研究进展,旨在更好地了解配体介导 TFRs 调控的分子机制,为应用 TFRs 配体提高活性天然产物的代谢效价提供一定的参考。笔者实验室一直致力于红色糖多孢菌中 TFRs 的调控功能解析^[71-74],构建了基于 TFRs 的微型调控网络,筛选鉴定出多个 TFRs 的小分子配体,并初步揭示了配体诱导 TFRs 调控的分子机制。由于 TFRs 复杂的作用机

制和其配体种类的多样性,仍有大量 TFRs 配体没有被发现。例如作为多种酶促反应必要的辅助因子,生物素的生物合成受到 TFR BioQ 的调控,但目前还没有发现 BioQ 的调控配体^[75]。大肠杆菌的 ComR 和肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* K.的 SczA 都能感应金属离子,但这些相互作用的分子细节尚不清楚^[76-77]。TFR ScbR2 不仅感应内源配体 Act 和 Red,还能被外源的 JdB 诱导^[48];天蓝色链霉菌的 ScbR 和委内瑞拉链霉菌的 JadR3 响应彼此释放的外源性 SVB1/SCB3,调控自身抗生素的生物合成^[56]。这些外源分子或其结构类似物同样能诱导 TFRs 调控,这无疑增加了 TFRs 配体识别的难度。放线菌基因组存在众多的隐性合成基因簇,这些尚未表征的基因簇是新型活性天然产物的重要来源^[78],配体分子可以充当诱导物,激活隐性基因簇,进一步丰富活性天然产物的多样性^[53, 63]。

寻找配体是 TFRs 功能研究中非常重要的一环,建立完善的 TFR 配体库将是配体筛选的关键。近年来,研究人员利用系统基因组学^[7]、结构生物学^[8]、化合物生物合成途径预测^[6]等手段鉴定了很多 TFRs 配体,但配体如何诱导 TFRs 产生别构效应、怎样精确介导其调控仍研究较少,加之配体介导调控的网络尚不清楚;不同配体介导同一 TFR 或同一配体诱导不同 TFRs 的调控中,是否存在竞争性互作的优先级、其信号如何实现级联转导等也需要深入研究。阐明这些配体在次级代谢中的作用,对于改造生物合成途径提高抗生素产量具有重要的现实意义。

利用配体诱导 TFRs 产生的别构调节效应,不但可以开发出具备不同功能模块的基因线路,实现对报告基因表达的人为控制(如 Tet-Off/On 触发开关)和生物传感器系统的自动调整(如反馈调节基因线路),而且能促进医用抗生素和生物燃料等次级产物的生产,同时也有助于激活隐性抗生素生物合成途径。如何突破配体应用的瓶颈,

探索配体开发的新途径, 将配体研究成果应用到合成生物学基因线路的开发、隐性基因簇的激活以及微生物药物的高效制造等方面将是未来的研究热点。

REFERENCES

- [1] Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, et al. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(2): 326-356.
- [2] Cuthbertson L, Nodwell JR. The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(3): 440-475.
- [3] Balhana RJ, Singla A, Sikder MH, et al. Global analyses of TetR family transcriptional regulators in *mycobacteria* indicates conservation across species and diversity in regulated functions. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 479-490.
- [4] Yu Z, Reichheld SE, Savchenko A, et al. A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *J Mol Biol*, 2010, 400(4): 847-864.
- [5] Niu GQ, Chater KF, Tian YQ, et al. Specialised metabolites regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol Rev*, 2016, 40(4): 554-573.
- [6] Lyu MY, Cheng YQ, Han X, et al. AccR, a TetR family transcriptional repressor, coordinates short-chain acyl coenzyme A homeostasis in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(12): e00508-20.
- [7] Zhang H, White-Phillip JA, Melançon 3rd CE, et al. Elucidation of the kijanimicin gene cluster: insights into the biosynthesis of spiroketone antibiotics and nitrosugars. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(47): 14670-14683.
- [8] Frénois F, Engohang-Ndong J, Loch C, et al. Structure of EthR in a ligand bound conformation reveals therapeutic perspectives against tuberculosis. *Mol Cell*, 2004, 16(2): 301-307.
- [9] McClure SM, Ahl PL, Blue JT. High throughput differential scanning fluorimetry (DSF) formulation screening with complementary dyes to assess protein unfolding and aggregation in presence of surfactants. *Pharm Res*, 2018, 35(4): 81-90.
- [10] Aung KM, New SY, Hong SZ, et al. Studying forkhead box protein A1-DNA interaction and ligand inhibition using gold nanoparticles, electrophoretic mobility shift assay, and fluorescence anisotropy. *Anal Biochem*, 2014, 448: 95-104.
- [11] Du X, Li Y, Xia YL, et al. Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 144-177.
- [12] Kairys V, Baranauskiene L, Kazlauskiene M, et al. Binding affinity in drug design: experimental and computational techniques. *Expert Opin Drug Discov*, 2019, 14(8): 755-768.
- [13] Pacholarz KJ, Garlish RA, Taylor RJ, et al. Mass spectrometry based tools to investigate protein-ligand interactions for drug discovery. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(11): 4335-4355.
- [14] Willems AR, Tahlan K, Taguchi T, et al. Crystal structures of the *Streptomyces coelicolor* TetR-like protein ActR alone and in complex with actinorhodin or the actinorhodin biosynthetic precursor (S)-DNPA. *J Mol Biol*, 2008, 376(5): 1377-1387.
- [15] Wang K, Sybers D, Maklad HR, et al. A TetR-family transcription factor regulates fatty acid metabolism in the archaeal model organism *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1542-1557.
- [16] Le TBK, Stevenson CEM, Fiedler H, et al. Structures of the TetR-like simocyclinone efflux pump repressor, SimR, and the mechanism of ligand-mediated derepression. *J Mol Biol*, 2011, 408(1): 40-56.
- [17] Miller DJ, Zhang YM, Subramanian C, et al. Structural basis for the transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(8): 971-975.
- [18] Li DF, Zhang N, Hou YJ, et al. Crystal structures of the transcriptional repressor RolR reveals a novel recognition mechanism between inducer and regulator. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19529-38.
- [19] Takeuchi K, Imai M, Shimada I. Conformational equilibrium defines the variable induction of the multidrug-binding transcriptional repressor QacR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(40): 19963-19972.
- [20] Krug A, Wendisch VF, Bott M. Identification of AcnR, a TetR-type repressor of the aconitase gene *acn* in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem*, 2005, 280(1): 585-595.
- [21] García-Nafría J, Baumgart M, Turkenburg JP, et al. Crystal and solution studies reveal that the

- transcriptional regulator AcnR of *Corynebacterium glutamicum* is regulated by citrate-Mg²⁺ binding to a non-canonical pocket. *J Biol Chem*, 2013, 288(22): 15800-15812.
- [22] Ho NA, Dawes SS, Crowe AM, et al. The structure of the transcriptional repressor KstR in complex with CoA thioester cholesterol metabolites sheds light on the regulation of cholesterol catabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 2016, 291(14): 7256-7266.
- [23] Christen S, Srinivas A, Bähler P, et al. Regulation of the Dha operon of *Lactococcus lactis*: a deviation from the rule followed by the TetR family of transcription regulators. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 23129-23137.
- [24] Jimenez JI, Juarez JF, Garcia JL, et al. A finely tuned regulatory circuit of the nicotinic acid degradation pathway in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol*, 2011, 13(7): 1718-1732.
- [25] Li T, Zhao KX, Huang Y, et al. The TetR-type transcriptional repressor RolR from *Corynebacterium glutamicum* regulates resorcinol catabolism by binding to a unique operator, *rolO*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(17): 6009-6016.
- [26] Zhao YW, Feng RR, Zheng GS, et al. Involvement of the TetR-type regulator PaaR in the regulation of pristnamycin I biosynthesis through an effect on precursor supply in *Streptomyces pristinaespiralis*. *J Bacteriol*, 2015, 197(12): 2062-2071.
- [27] Anand S, Singh VP, Singh AK, et al. Equilibrium binding and kinetic characterization of putative tetracycline repressor family transcription regulator Fad35R from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J*, 2012, 279(17): 3214-3228.
- [28] Yang J, Fang Y, Wang JL, et al. Deletion of regulator-encoding genes *fadR*, *fabR* and *iclR* to increase L-threonine production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(11): 4549-4564.
- [29] Subramanian C, Rock CO, and Zhang YM. DesT coordinates the expression of anaerobic and aerobic pathways for unsaturated fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2010, 192(1): 280-285.
- [30] Feng YJ, Cronan JE. Complex binding of the FabR repressor of bacterial unsaturated fatty acid biosynthesis to its cognate promoters. *Mol Microbiol*, 2011, 80(1): 195-218.
- [31] Zhang HM, Zheng BW, Gao RS, et al. Binding of *Shewanella* FadR to the *fabA* fatty acid biosynthetic gene: implications for contraction of the *fad* regulon. *Protein Cell*, 2015, 6(9): 667-679.
- [32] Beckers G, Strosser J, Hildebrandt U, et al. Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. *Mol Microbiol*, 2005, 58(2): 580-595.
- [33] Lechardeur D, Cesselin B, Liebl U, et al. Discovery of intracellular heme-binding protein HrtR, which controls heme efflux by the conserved HrtB-HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem*, 2012, 287(7): 4752-4758.
- [34] Nguyen P, Bervoets I, Maes D, et al. The protein-DNA contacts in RutR•carAB operator complexes. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(18): 6286-6300.
- [35] Rey DA, Nentwich SS, Koch DJ, et al. The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Mol Microbiol*, 2005, 56(4): 871-887.
- [36] Gilbertsen A, Williams B. Development of a *Pseudomonas aeruginosa* agmatine biosensor. *Biosensors (Basel)*, 2014, 4(4): 387-402.
- [37] Zhang L, Li WH, He ZG. DarR, a TetR-like transcriptional factor, is a cyclic di-AMP-responsive repressor in *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem*, 2013, 288(5): 3085-3096.
- [38] Lemmens L, Maklad HR, Bervoets I, et al. Transcription regulators in archaea: homologies and differences with bacterial regulators. *J Mol Biol*, 2019, 431(20): 4132-4146.
- [39] Hidese R, Mihara H, Kurihara T, et al. *Pseudomonas putida* PydR, a RutR-like transcriptional regulator, represses the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in the pyrimidine reductive catabolic pathway. *J Biochem*, 2012, 152(4): 341-346.
- [40] Xu Z, Wang MM, Ye BC. TetR family transcriptional regulator PccD negatively controls propionyl coenzyme A assimilation in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Bacteriol*, 2017, 199(20): e00281-17.
- [41] Zhang YY, Pan GH, Zou ZZ, et al. JadR*-mediated feed-forward regulation of cofactor supply in jadomycin biosynthesis. *Mol Microbiol*, 2013, 90(4): 884-897.

- [42] Liu WS, Zhang QL, Guo J, et al. Increasing avermectin production in *Streptomyces avermitilis* by manipulating the expression of a novel TetR-family regulator and its target gene product. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(15): 5157-5173.
- [43] Xu Y, Willems A, Au-Yeung C, et al. A two-step mechanism for the activation of actinorhodin export and resistance in *Streptomyces coelicolor*. *mBio*, 2012, 3(5): e00191-12.
- [44] Gou LX, Han TS, Wang XX, et al. A novel TetR family transcriptional regulator, CalR3, negatively controls calcimycin biosynthesis in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2371-2380.
- [45] Li XX, Yu TF, He Q, et al. Binding of a biosynthetic intermediate to AtrA modulates the production of lidamycin by *Streptomyces globisporus*. *Mol Microbiol*, 2015, 96(6): 1257-1271.
- [46] Li Y, Li JJ, Tian ZH, et al. Coordinative modulation of chlorothricin biosynthesis by binding of the glycosylated intermediates and end product to a responsive regulator ChlF1. *J Biol Chem*, 2016, 291(10): 5406-5417.
- [47] Xu GM, Wang J, Wang LQ, et al. "Pseudo" γ -butyrolactone receptors respond to antibiotic signals to coordinate antibiotic biosynthesis. *J Biol Chem*, 2010, 285(35): 27440-27448.
- [48] Wang WS, Ji JJ, Li X, et al. Angucyclines as signals modulate the behaviors of *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(15): 5688-5693.
- [49] Le TBK, Fiedler H, Den Hengst CD, et al. Coupling of the biosynthesis and export of the DNA gyrase inhibitor simocyclinone in *Streptomyces antibioticus*. *Mol Microbiol*, 2009, 72(6): 1462-1474.
- [50] Lei C, Wang JZ, Liu YY, et al. A feedback regulatory model for RifQ-mediated repression of rifamycin export in *Amycolatopsis mediterranei*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 14-22.
- [51] Namwat W, Lee CK, Kinoshita H, et al. Identification of the *varR* gene as a transcriptional regulator of virginiamycin S resistance in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol*, 2001, 183(6): 2025-2031.
- [52] Szilágyi M, Márton É, Lukács D, et al. Mutation in *afsR* leads to A-factor deficiency in *Streptomyces griseus* B2682. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(5): 216-224.
- [53] Kong DK, Wang X, Nie J, et al. Regulation of antibiotic production by signaling molecules in *Streptomyces*. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2927-2937.
- [54] Takano E, Nihira T, Hara Y, et al. Purification and structural determination of SCB1, a γ -butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem*, 2000, 275(15): 11010-11016.
- [55] Hsiao NH, Nakayama S, Merlo ME, et al. Analysis of two additional signaling molecules in *Streptomyces coelicolor* and the development of a butyrolactone-specific reporter system. *Chem Biol*, 2009, 16(9): 951-960.
- [56] Zou ZZ, Du DY, Zhang YY, et al. A γ -butyrolactone-sensing activator/repressor, JadR3, controls a regulatory mini-network for jadomycin biosynthesis. *Mol Microbiol*, 2014, 94(3): 490-505.
- [57] Zhu JY, Chen Z, Li JL, et al. AvaR1, a butenolide-type autoregulator receptor in *Streptomyces avermitilis*, directly represses avenolide and avermectin biosynthesis and multiple physiological responses. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2577-2591.
- [58] Zhu JY, Su D, Liu WS, et al. AvaR2, a pseudo γ -butyrolactone receptor homologue from *Streptomyces avermitilis*, is a pleiotropic repressor of avermectin and avenolide biosynthesis and cell growth. *Mol Microbiol*, 2016, 102(4): 562-578.
- [59] Sivapragasam S, Grove A. *Streptomyces coelicolor* XdhR is a direct target of (p)ppGpp that controls expression of genes encoding xanthine dehydrogenase to promote purine salvage. *Mol Microbiol*, 2016, 100(4): 701-718.
- [60] Kasey CM, Zerrad M, Li YW, et al. Development of transcription factor-based designer macrolide biosensors for metabolic engineering and synthetic biology. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(1): 227-239.
- [61] Xu YR, Ke ML, Li J, et al. TetR-type regulator SLCG_2919 is a negative regulator of lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(1): e02091-18.
- [62] Wolański M, Jakimowicz D, Zakrzewska-Czerwińska J. AdpA, key regulator for morphological differentiation regulates bacterial chromosome replication. *Open Biol*, 2012, 2(7): 120097-120105.
- [63] O'Rourke S, Wietzorrek A, Fowler K, et al. Extracellular signalling, translational control, two repressors and an activator all contribute to the

- regulation of methylenomycin production in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(3): 763-778.
- [64] Ikushima S, Boeke JD. New orthogonal transcriptional switches derived from Tet repressor homologues for *Saccharomyces cerevisiae* regulated by 2,4-diacetylphloroglucinol and other ligands. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(3): 497-506.
- [65] Ikushima S, Zhao Y, Boeke JD. Development of a tightly controlled off switch for *Saccharomyces cerevisiae* regulated by camphor, a low-cost natural product. *G3 (Bethesda)*, 2015, 5(10): 1983-1990.
- [66] Johnson AO, Gonzalez-Villanueva M, Wong L, et al. Design and application of genetically-encoded malonyl-CoA biosensors for metabolic engineering of microbial cell factories. *Metab Eng*, 2017, 44: 253-264.
- [67] Dabirian Y, Gonçalves Teixeira P, Nielsen J, et al. FadR-based biosensor-assisted screening for genes enhancing fatty acyl-CoA pools in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(8): 1788-1800.
- [68] Yang YH, Kim TW, Park SH, et al. Cell-free *Escherichia coli*-based system to screen for quorum-sensing molecules interacting with quorum receptor proteins of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(19): 6367-6372.
- [69] Tan GY, Bai LQ, and Zhong JJ. Exogenous 1,4-butyrolactone stimulates A-factor-like cascade and validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(11): 2984-2993.
- [70] Gao XW, Wang YH, Chu J. A preliminary study on the impact of exogenous A-factor analogue 1,4-butyrolactone on stimulating bitespiramycin biosynthesis. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2019, 42(12): 1903-1913.
- [71] Wu PP, Pan H, Zhang CM, et al. SACE_3986, a TetR family transcriptional regulator, negatively controls erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(7): 1159-1167.
- [72] Wu H, Chen M, Mao YR, et al. Dissecting and engineering of the TetR family regulator SACE_7301 for enhanced erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 158-166.
- [73] Wu H, Wang YS, Yuan L, et al. Inactivation of SACE_3446, a TetR family transcriptional regulator, stimulates erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. *Synth Syst Biotechnol*, 2016, 1(1): 39-46.
- [74] Wu H, Chu ZL, Zhang WX, et al. Transcriptome-guided target identification of the TetR-like regulator SACE_5754 and engineered overproduction of erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Biol Eng*, 2019, 13: 11-22.
- [75] Brune I, Gotker S, Schneider J, et al. Negative transcriptional control of biotin metabolism genes by the TetR-type regulator BioQ in biotin-auxotrophic *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *J Biotechnol*, 2012, 159(3): 225-234.
- [76] Mermod M, Magnani D, Solioz M, et al. The copper-inducible ComR (YcfQ) repressor regulates expression of ComC (YcfR), which affects copper permeability of the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biometals*, 2012, 25(1): 33-43.
- [77] Martin JE, Edmonds KA, Bruce KE, et al. The zinc efflux activator SczA protects *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 D39 from intracellular zinc toxicity. *Mol Microbiol*, 2017, 104(4): 636-651.
- [78] Mao DN, Okada BK, Wu YH, et al. Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 45: 156-163.

(本文责编 陈宏宇)