

链霉菌调控蛋白 DasRABC 的研究进展

白利平 李元*

(中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要: 越来越多的研究证明 DasR 及其相邻的 DasABC 转运蛋白超家族在链霉菌代谢和形态分化中发挥重要调控作用。就 DasR 的结构、调控序列特点及其与 DasABC 的关系、DasRABC 调控链霉菌发育及次生代谢、DasRABC 与链霉菌营养利用等几方面讨论调控蛋白 DasRABC 的研究进展。

关键词: DasR, DasABC, 链霉菌

Study of DasRABC in *Streptomyces*

BAI Li-Ping LI Yuan*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: DasR and adjacent DasABC transporter play an important role in both metabolism and morphological differentiation of *Streptomyces*. In this article we review current understanding of DasRABC in *Streptomyces* as the followings: structure, regulatory sequence features of DasR and its relationship with DasABC; Function of DasRABC in development and the secondary metabolites of *Streptomyces*; DasRABC for the uptake of nutrient in *Streptomyces*.

Keywords: DasR, DasABC, *Streptomyces*

链霉菌属于放线菌,在已知医用抗生素中,大约有 2/3 为链霉菌的次生代谢产物^[1]。研究表明链霉菌次生代谢物的产生与复杂的形态分化密切相关,研究链霉菌形态分化和次生代谢的调控机制,有利于优化产生菌和新型药物的研究^[2]。近年来的研究表明,链霉菌中 DasR 作为一个全局调节蛋白,与其相邻的 DasABC 转运蛋白超家族,在调节链霉菌营养生长、孢子分化和次生代谢物的产生过程中发挥着重要作用。本文就链霉菌 DasRABC 研究的最新进展进行综述。

1 DasR 的结构、调控序列特点及与 DasABC 的关系

DasR 属于葡萄糖酸操纵子的负调节蛋白 (A negative regulator of the gluconate operon, GntR 家族),作为转录因子, GntR 家族一般由两部分组成, N 端的 DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, DBD) 及 C 端的效应物结合结构域 (Effector-binding domains, EBD)^[3]。原核生物中,不同来源的 GntR 家族 N 端 DNA 结合结构域在二级结构上相对保守,由 3 个 α 螺旋和 2 个 β 折叠按照 $\alpha_1\alpha_2\alpha_3\beta_1\beta_2$ 的顺序排列

在相似的位置, 其中 $\alpha_2\alpha_3$ 螺旋处形成转录因子典型的螺旋-环-螺旋(Helix-turn-helix, HTH)结构。GntR 家族转录因子识别不同序列进而行使不同功能主要依赖于与 DBD 结合的 EBD 的不同, 根据 EBD 的不同, GntR 家族转录因子可以分为 4 个亚家族: FadR、HutC、MocR 和 YtrA。DasR 属于 HutC 亚家族, 其 C 端的 EBD 由 α 螺旋和 β 折叠按照 $\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha\alpha\beta\alpha\beta\beta$ 的顺序排列组成^[4]。

天蓝色链霉菌中受 DasR 调控的基因上游具有 1-3 个不等的 DasR 反应元件(DasR-responsive elements, dre), 序列特点为 GT-N(1)-TA-N(1)-AC^[5]。

体外实验证明 DasR 能与这些序列直接结合; 体内实验也证实 DasR 能调控具有此序列特点相关基因的表达, 如 *dasA*、磷酸转移酶系统(Phosphotransferase system, PTS)相关基因及壳多糖酶(Chitinase gene)基因等。最近研究显示, 天蓝色链霉菌 DasR 的生成受 *ssrA* 基因编码的 tmRNA (Transfer-messenger RNA)调控, 在 *ssrA* 基因突变株中对 *dasR* 的转录产物和 DasR 进行半定量 RT-PCR 和 Western blotting 检测, 结果证明 tmRNA 不影响 *dasR* 的转录, 但其翻译却受 tmRNA 的严格调控^[6]。

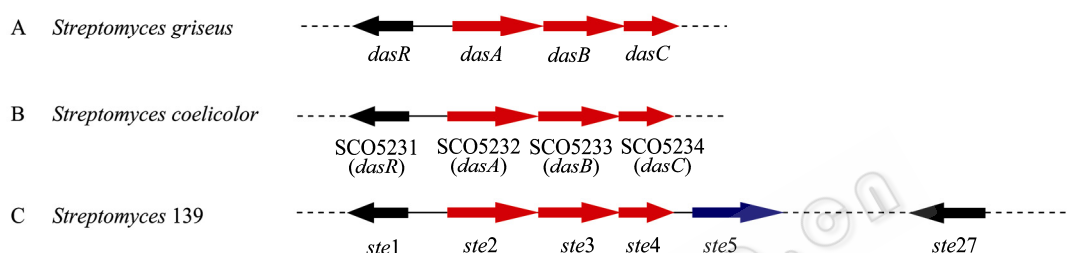


图 1 不同链霉菌中 *dasRABC* 的比较
Fig. 1 Analysis of *dasRABC* in different streptomyces

天蓝色链霉菌和灰色链霉菌的 *dasRABC* 中, *dasR* 和 *dasABC* 位置相邻, 但二者各自转录且转录方向相反(图 1A, 1B)。RT-PCR 结果证明 *dasABC* 共有 2 个转录单位, 其中 *dasA* 基因单独转录, *dasBC* 作为 1 个转录单位共同转录^[7-8]。凝胶阻滞实验证明, DasR 能与 *dasA* 上游 16 bp 序列 ACTGGTCTAC ACCATT 结合^[3], *dasR* 基因阻断突变株 *dasA* 基因转录水平提高一倍以上^[9], 说明 *dasABC* 的表达受到 DasR 的阻遏。

2 DasRABC 调控链霉菌发育及次生代谢

大量研究工作已证实, 链霉菌次生代谢开始与气生菌丝生长同步或稍早于气生菌丝发育, 同时与菌株的营养状态密切相关^[10]。与次生代谢产物合成相关的基因常呈簇排列, 在产生次生代谢物过程中这些基因簇大多受特定基因调控。在这些调控基因中, 有些还与链霉菌的营养利用、气生菌丝形成及孢子分化相关, 如 *bld* 基因^[11]。因此研究链霉菌次生代谢调控和形态分化的分子机制, 将对通过代谢工程手段获得理想的天然产物并提高其产量具有极大的促进作用。

2.1 DasRABC 调控灰色链霉菌发育及次生代谢

Seo^[8]等最早在灰色链霉菌中发现了 *dasRABC* 基因簇, 并对其与灰色链霉菌形态分化的关系进行了深入研究。灰色链霉菌 *dasR* 和 *dasA* 基因的各自阻断突变株不能形成气生菌丝和孢子, 在基内菌丝中形成链霉菌中罕见的规律性间隔。*dasR* 和 *dasA* 基因阻断突变株的形态缺陷是葡萄糖依赖性的, 在葡萄糖作为唯一碳源的培养基上不能观察到气生菌丝和孢子, 而在其他如麦芽糖、半乳糖、甘露醇和甘油等作为碳源的培养基上能正常发育。*dasR* 和 *dasA* 基因阻断突变株导致菌株最终形态缺陷结果基本相同, 但两者间还有一定区别。如灰色链霉菌野生株一般 2 d 左右生长基内菌丝, 然后基内菌丝与气生菌丝混合生长, 最后在 4 d 左右孢子形成。与野生株相比, *dasR* 基因阻断突变株 4 d 左右生长基内菌丝并形成间隔, 基内菌丝光滑; 而 *dasA* 基因阻断突变株则在 1 d 左右就已经生长基内菌丝并形成间隔, 基内菌丝比较粗糙。*dasR* 和 *dasA* 基因的转录水平分析结果也与形态分化结果相符, 同时可以在 *dasR* 基因阻断突变株检测到次生代谢物链霉素的产生。

2.2 DasRABC 调控天蓝色链霉菌发育及次生代谢

Rigali^[12]等研究天蓝色链霉菌发现, 在葡萄糖作为唯一碳源的培养基上, *dasR* 基因阻断突变株(BAP29) 同样不能生成气生菌丝和孢子, 据此他们将 *dasR* 命名为一个新的 *bld* 基因。将不同的 *bld* 基因突变株、天蓝色链霉菌野生株菌落分别与 BAP29 菌落靠近培养, 发现天蓝色链霉菌野生株、*bld* 基因突变株中的 *bldA*、*bldB*、*bldC* 和 *bldF* 能够诱导 BAP29 形成气生菌丝, 而 *bldD*、*bldG*、*bldH*、*bldJ* 和 *bldK* 等则不能诱导 BAP29 形成气生菌丝; 同时 BAP29 不能诱导任何 *bld* 基因突变株恢复生成气生菌丝。这说明 *dasR* 基因阻断突变株中缺失气生菌丝生长的有关信号, DasR 是调控气生菌丝初始生长的一个重要起始因子。BAP29 虽然不能使 *bld* 基因突变株恢复生成气生菌丝, 却可以诱导其中 *bldA*、*bldB*、*bldD* 和 *bldH* 产生抗生素。进一步研究发现, 由于 *dasR* 基因缺失, BAP29 生成的次生代谢产物十一烷基灵菌红素和放线紫红素产量与天蓝色链霉菌野生株相比有很大提高^[13]。据此我们推断, 在天蓝色链霉菌次生代谢产物抗生素的产生中, DasR 起负调控作用。

Colson^[9]等随后在研究天蓝色链霉菌 *dasA* 基因时发现, *dasA* 基因缺失后在葡萄糖作为主要碳源的培养基上培养不能形成气生菌丝和孢子, 而在甘露醇作为主要碳源的培养基上可以形成气生菌丝和异常孢子, 并在异常孢子上形成规律分支, 基于以上结果认为 *dasA* 也是一个 *bld* 基因, 该基因仅在葡萄糖作为碳源时表现显型。同时用半定量 PCR 验证 *dasR* 基因阻断突变株(BAP29)和天蓝色链霉菌野生株中 *dasA* 的转录水平, 发现前者要比后者提高 2 倍以上, 证明了 *dasA* 基因表达受到 DasR 的抑制。虽然没有有关 *dasA* 基因和次生代谢产物产生的相关报道, 但综合以上结果以及下述 *dasA* 基因在营养利用中的功能, 我们推测, *dasA* 与其后两个基因 *dasBC* 组成的 DasABC 转运蛋白超家族可能以正调控方式调节链霉菌次生代谢物的生成。

3 DasRABC 与链霉菌营养利用

土壤中含有极丰富的纤维素、木糖和壳多糖等是链霉菌主要的营养来源, 在链霉菌生长及孢子形成的转换中起重要作用^[14]。纤维素和木糖是重要的

碳源, 其主要来源于植物细胞壁。源于真菌、霉菌细胞壁和介虫、昆虫表皮的壳多糖则既可作为碳源又可作为氮源, 由 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)以 β 1-4 连接成为多聚体, 最终分解产物为 N-乙酰葡萄糖胺二聚体^[7,9]。N-乙酰葡萄糖胺的利用与受 DasR 调控的磷酸转移酶系统 (PTS)有关^[12], 而 N-乙酰葡萄糖胺二聚体[N,N''-diacetylchitobiose, (GlcNAc)₂]及 N-乙酰葡萄糖胺三聚体聚体 [N,N',N''-triacetylchitotriose, (GlcNAc)₃]则主要与 DasABC 转运蛋白超家族相关^[7]。

3.1 DasR 与 GlcNAc

在天蓝色链霉菌的研究中发现, 胞外 GlcNAc 是其发育及次生代谢产物生成的一个重要节点(Checkpoint)。当胞外 GlcNAc 浓度超过 20 mmol/L 时, 光秃型的菌落大量出现, 同时引发次生代谢产物十一烷基灵菌红素和放线紫红素产生^[13]。在小棒链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*)、山丘链霉菌(*S. collinus*)、灰色链霉菌(*S. griseus*)、吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*)和委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae*)也同样发现了胞外 GlcNAc 对这些菌种产生抗生素的刺激效应^[13]。

天蓝色链霉菌中 GlcNAc 的摄取主要通过磷酸转移酶系统完成, 该系统由 IIC (*nagE2* 编码)、IIB (*malX2* 编码)、IIA (*crr* 编码)、HPr (*ptsH* 编码)和 EI (*ptsI* 编码) 5 种蛋白组成(图 2)。序列分析结果显示除 *ptsI* 外, 其余 4 种基因上游具有 1-2 个不等的 DasR 反应元件, 体外凝胶阻滞实验研究证明, 在磷酸转移酶系统中, 带 6 个组氨酸标签的重组 DasR 蛋白能够与 *crr*、*malX2*、*nagE2* 和 *ptsH* 基因的上游序列结合^[3]。天蓝色链霉菌 *dasR* 基因阻断后, 与野生株相比 GlcNAc 的摄取呈一种组成性状态, 磷酸转移酶系统中 *nag* 和 *pts* 基因的转录水平也显著增强。说明 DasR 以类似阻遏的方式调控这些基因的转录, 对胞外 GlcNAc 浓度信号转导起到非常关键的作用^[12]。

3.2 DasABC 与(GlcNAc)₂、(GlcNAc)₃

研究天蓝色链霉菌发现 DasA 参与 (GlcNAc)₂ 及 (GlcNAc)₃ 的摄取, 用 1 mmol/L 的 (GlcNAc)₂ 及 (GlcNAc)₃ 诱导天蓝色链霉菌菌株 2 h, *dasA* 基因的转录水平显著提高, 蛋白印迹检测 DasA 蛋白的表达也得到类似结果。重组 DasA 蛋白在体外对 (GlcNAc)₂ 及 (GlcNAc)₃ 显示极高的亲和力。体内

dasA 基因阻断后, 突变株对(GlcNAc)₂ 及(GlcNAc)₃ 利用率显著降低。同时用(GlcNAc)₂ 及(GlcNAc)₃ 诱导时, 检测到 *dasR* 和 *dasB* 的转录水平也有一定升高^[7,9]。这说明 DasABC 在天蓝色链霉菌初级代谢以及孢子分化过程中都发挥了重要作用。

链霉菌不同寡糖摄取系统的编码基因已被鉴定, 如网链霉菌摄取纤维二糖和纤维三糖的 *cebEFG*^[15]、天蓝色链霉菌摄取麦芽糖的 *malEFG*^[16] 及摄取海藻糖和蜜二糖的 *aglEFG*^[17]、橄榄绿链霉菌摄取 GlcNAc 和 (GlcNAc)₂ 的 *ngcEFG*^[18]、*Streptomyces thermoviolaceus* 中摄取木二糖的 *bxlEFG*^[19]。所有这些基因与 *dasABC* 一样, 都以 ABC 转运蛋白超家族的形式行使其功能, 其中 *E* 基因的编码产物为糖结合蛋白, *FG* 基因的编码产物为两个膜蛋白。目前虽然尚无 DasBC 参与寡糖转运的直接实验证据, 但综合前述实验结果和以上不同链霉菌的 ABC 转运蛋白超家族发挥功能的形式, 推断 DasABC 可能以下列方式行使功能: DasA 负责结合胞外糖, 将信号传递至两个膜蛋白(*dasBC* 的编码产物), 使由膜蛋白构成的转运通道开放, 在 MsiK^[20] 协助下转运糖分子进入胞内(图 2)。

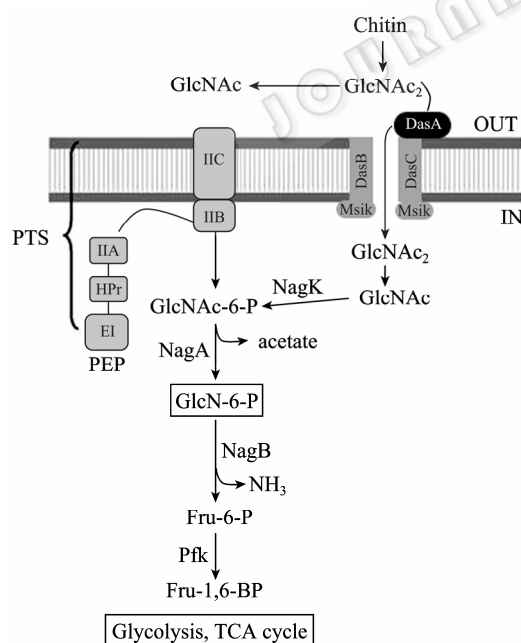


图 2 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰葡萄糖胺二聚体相关的酶学反应

Fig. 2 GlcNAc and GlcNAc₂ related enzymatic reactions

Note: NagK: GlcNAc kinase; NagA: GlcNAc-6-P deacetylase; NagB: GlcN-6-P isomerase; Pfk: Phosphofructokinase.

4 展望

在已经公布的天蓝色链霉菌、阿维链霉菌和灰色链霉菌的全基因组序列中, 发现了超过 20 个隐性次生代谢产物生物合成基因簇(Cryptic secondary metabolite biosynthetic gene cluster), 远高于已确定的次生代谢产物数量^[21-22]。如何使这些隐性次生代谢产物生物合成基因簇表达, 以获得新活性产物, 主要有 3 种方法: 一是异源表达隐性次生代谢产物生物合成基因簇; 二是进行化学诱导; 三是活化隐性次生代谢产物生物合成基因簇的特异调控基因。与前两种方法相比, 后一种方法相对简单^[23-25]。在天蓝色链霉菌已发现隐性聚酮化合物合成基因簇的表达依赖于特异调控基因 *kasO*, γ -丁酸内酯能活化该基因表达, 进而激活隐性聚酮化合物合成基因簇表达活性产物^[26]; 研究灰色链霉菌发现 *rsmG* 基因突变后, 链霉素产量提高 2-3 倍, 且隐性次生代谢产物生物合成基因簇被活化^[27]。这说明已知抗生素合成基因簇的负调控基因, 也可能对隐性次生代谢产物生物合成基因簇起负调控作用。

现在普遍认为, 多数隐性次生代谢产物生物合成基因簇呈沉默状态, 除受途径特异调控基因调节激活外, 还与环境信号密切相关^[28-29]。DasR 蛋白不但能够调节途径特异调控基因, 且能同 DasABC 一起感应外环境营养信号, 进而调节胞内其他基因的表达。随着 DasRABC 研究的深入, 将会确定其在激活隐性次生代谢产物生物合成基因簇表达中的重要作用。

本实验室在研究链霉菌胞外多糖生物合成基因簇时, 发现^[30]该基因簇调控基因 *ste1234* 与天蓝色链霉菌的 *dasRABC* 序列一致性达到 70%以上, 与灰色链霉菌的 *dasRABC* 序列一致性在 30%以上(图 1C)。目前本实验室正在研究 Ste1234 蛋白是否以类似 DasRABC 的调控方式调节胞外多糖的生成, 以及在该产生菌形态分化和营养利用中的作用, 以确定 DasRABC 在链霉菌胞外多糖的产生过程中是否也发挥调控功能。

参考文献

- [1] Chater KF. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006, **361**(1469): 761-768.
- [2] 雷健, 赫卫清, 王以光. 链霉菌形态分化和次级代谢调

- 控机制的研究进展. 药物生物技术, 2007, **14**(3): 225–229.
- [3] Rigali S, Schlicht M, Hoskisson P, *et al.* Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new cis/trans relationships. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(11): 3418–3426.
- [4] Resch M, Schiltz E, Titgemeyer F, *et al.* Insight into the induction mechanism of the GntR/HutC bacterial transcription regulator YvoA. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(7): 2485–2497.
- [5] Colson S, Stephan J, Hertrich T, *et al.* Conserved cis-acting elements upstream of genes composing the chitinolytic system of *streptomyces* are DasR-responsive elements. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2007, **12**(1/2): 60–66.
- [6] Barends S, Zehl M, Bialek S, *et al.* Transfer-messenger RNA controls the translation of cell-cycle and stress proteins in *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 2010, **11**(2): 119–125.
- [7] Saito A, Shinya T, Miyamoto K, *et al.* The *dasABC* gene cluster, adjacent to *dasR*, encodes a novel ABC transporter for the uptake of N,N'-diacetylchitobiose in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(9): 3000–3008.
- [8] Seo JW, Ohnishi Y, Hirata A, *et al.* ATP-binding cassette transport system involved in regulation of morphological differentiation in response to glucose in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol*, 2002, **184**(1): 91–103.
- [9] Colson S, van Wezel GP, Craig M, *et al.* The chitobiose-binding protein, DasA, acts as a link between chitin utilization and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, 2008, **154**(2): 373–382.
- [10] Horinouchi S. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, **71**(2): 283–299.
- [11] Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol*, 2005, **8**(2): 208–215.
- [12] Rigali S, Nothaft H, Noens EE, *et al.* The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol*, 2006, **61**(5): 1237–1251.
- [13] Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, *et al.* Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 2008, **9**(7): 670–675.
- [14] Chater KF, Biró S, Lee KJ, *et al.* The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, **34**(2): 171–198.
- [15] Schlösser A, Jantos J, Hackmann K, *et al.* Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and celotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(6): 2636–2643.
- [16] van Wezel GP, White J, Bibb MJ, *et al.* The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. *Mol Gen Genet*, 1997, **254**(5): 604–608.
- [17] Hillerich B, Westpheling J. A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon source. *J Bacteriol*, 2006, **188**(21): 7477–7487.
- [18] Xiao X, Wang F, Saito A, *et al.* The novel *Streptomyces olivaceoviridis* ABC transporter Ngc mediates uptake of N-acetylglucosamine and N,N'-diacetylchitobiose. *Mol Genet Genomics*, 2002, **267**(4): 429–439.
- [19] Tsujibo H, Kosaka M, Ikenishi S, *et al.* Molecular characterization of a high-affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. *J Bacteriol*, 2004, **186**(4): 1029–1037.
- [20] Saito A, Fujii T, Shinya T, *et al.* The *msiK* gene, encoding the ATP-hydrolysing component of N,N'-diacetylchitobiose ABC transporters, is essential for induction of chitinase production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 2008, **154**(11): 3358–3365.
- [21] Challis GL. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, 2008, **154**(6): 1555–1569.
- [22] Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, *et al.* Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol*, 2008, **190**(11): 4050–4060.
- [23] Baltz RH. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(12): 1533–1540.
- [24] Brakhage AA, Schuermann J, Bergmann S, *et al.* Activation of fungal silent gene clusters: a new avenue to drug discovery. *Prog Drug Res*, 2008, **66**(1): 3–12.
- [25] Fisch KM, Gillaspay AF, Gipson M, *et al.* Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, **36**(9): 1199–1213.
- [26] Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, *et al.* A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2005, **56**(2): 465–479.
- [27] Tanaka Y, Tokuyama S, Ochi K. Activation of secondary metabolite-biosynthetic gene clusters by generating *rsmG* mutations in *Streptomyces griseus*. *J Antibiot (Tokyo)*, 2009, **62**(12): 669–673.
- [28] 王琳琪, 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.
- [29] Commichau FM, Forchhammer K, Stülke J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol*, 2006, **9**(2): 167–172.
- [30] Wang LY, Li ST, Li Y. Identification and characterization of a new exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **220**(1): 21–27.