

研究报告

terC 基因对天蓝色链霉菌抗生素合成和菌丝体生长的影响

周敏^{1,2*} 覃重军²

(1. 浙江海正药业股份有限公司 浙江 台州 318000)

(2. 上海生命科学研究院 植物生理生态研究所 上海 200032)

摘要:【目的】研究天蓝色链霉菌中 *terC* (SCO2366) 基因的功能。【方法】通过敲除天蓝色链霉菌中 *terC* 基因, 检测其对放线紫红素合成和菌丝体生长的影响。【结果】敲除天蓝色链霉菌中的 *terC* 基因后, 放线紫红素提前合成, 同时菌丝体长度变短。【结论】*terC* 在天蓝色链霉菌中对放线紫红素的合成有负调控作用, 同时影响菌丝体生长发育。

关键词: 抗生素合成, *terC*, 菌丝体生长

Effects of *terC* on antibiotics biosynthesis and mycelium development in *Streptomyces coelicolor* M145

ZHOU Min^{1,2*} QIN Zhong-Jun²

(1. Zhejiang Hisun Pharmaceutical, Co. Ltd., Taizhou, Zhejiang 318000, China)

(2. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: [Objective] To study the function of *terC* (SCO2366) in *Streptomyces coelicolor* M145. [Methods] Through knocking out the *terC* in *S. coelicolor* M145, we detected its effects on actinorhodin biosynthesis and mycelium development. [Results] After knocking out the *terC* in *S. coelicolor* M145, the synthesis of actinorhodin began earlier than the wild type strain, and the length of mutant's mycelium got shorter. [Conclusion] *terC* in *S. coelicolor* M145 has negative effect on actinorhodin biosynthesis, meanwhile affects mycelium development.

Keywords: Antibiotics biosynthesis, *terC*, Mycelium development

链霉菌是富含 G+C 的革兰氏阳性菌, 具有复杂的生活周期, 并产生大量具有重要价值的代谢产物。目前临床上应用的抗生素约 2/3 来源于链霉菌, 其有用的次生代谢物还包括抗肿瘤剂、免疫抑制剂

和杀虫剂等^[1]。天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 是链霉菌属的一个模式菌株, 至少合成 4 种抗生素: 蓝色的聚酮类抗生素放线紫红素 (Act)、红色的十一烷基菌红素 (Red)、钙依赖抗生素

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31121001)

*通讯作者: ✉: zhoumin@hisunpharm.com

收稿日期: 2015-01-08; 接受日期: 2015-03-20; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2015-04-08

(CDA)和质粒 SCP1 上编码合成的次甲霉素(Mmy)^[2], 这几种抗生素, 特别是有颜色的抗生素为研究抗生素的表达调控提供了实验上的便利。大量研究表明抗生素的合成与其他生物学过程密切相关。抗生素的调控大致可以分为3个层次: 最低层次的调控方式是途径特异性调控, 抗生素合成基因簇中常包含一个或多个途径特异性调控基因, 它们调控一种或几种具有共同生物合成途径的抗生素的生物合成, 比如 *actII-orf4*^[3]、*redD*^[4]、*cdar*^[5]; 全局性调控是高层次的调控方式, 全局性调控因子具有多效性效应, 不仅能同时影响多种抗生素的合成, 甚至还能影响链霉菌的分化发育, 比如 *absA*^[6]、*absB*^[7]、*afsR*^[8]、*afsS*^[9]、*afsQ1/afsQ2*^[10]、*bldA*^[11]、*bldB*^[12]、*bldD*^[13]、*bldG*^[14]; 介于这2个层次之间的是交互调控^[15]。

抗生素调控因子的多样性表明抗生素的调控非常复杂, 也暗示还有很多未知的影响抗生素表达的基因有待鉴定。鉴定这些未知的基因对研究抗生素的表达调控以及工业应用都极为重要。本实验鉴定了一个影响天蓝色链霉菌抗生素合成和菌丝体发育的新基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物: 实验所用的菌株、质粒和引物见表1。*Escherichia coli* BW25113/pIJ790 用于PCR中断宿主, ET12567用于接合转移。pHY773由pIJ773衍生而来, 没有 *oriT* 序列(因为本实验用

来构建天蓝色链霉菌 Cosmid 文库的载体含有 *oriT*), pFX101 由 pSET152^[16]衍生而来, 用壮观霉素抗性基因(*aadA*)取代了阿普拉霉素抗性基因 [*aac(3)IV*], 用于突变株的回补, 可以位点特异性地整合进天蓝色链霉菌染色体。

1.1.2 培养基和抗生素: MS 固体培养基^[17]用于接合转移以及抽提 RNA 时培养链霉菌, YEME 液体培养基^[16]培养链霉菌以抽提 DNA。各种抗生素的浓度(mg/L): 氨苄青霉素 50, 阿普拉霉素 50, 壮观霉素 50, 氯霉素 34, 卡拉霉素 50, 硫链丝菌素 50。

1.2 方法

1.2.1 突变体的构建与突变体的回补: 天蓝色链霉菌的 Cosmid N3-68、N3-49 和 4-73 中分别有一个 *terC* 或类似 *terC* 的基因。这几个 Cosmid 用 PCR 中断系统在大肠杆菌中构建成中断载体, 然后经接合转移至天蓝色链霉菌中。因为 Cosmid 含有硫链丝菌素抗性基因, 敲除的目标基因用阿普拉霉素抗性基因替代, 所以筛选到硫链丝菌素敏感, 对阿普拉霉素有抗性的菌株即是基因敲除菌株(图1)。*tipA* 启动子与 *SCO2366* 的编码区经中间克隆连接在一起后, 再克隆到 pFX101 得到质粒 pDZ97。pDZ97 经接合转移到突变体菌株中, 最后用壮观霉素筛选回补菌株。

1.2.2 RT-PCR 检测: 将链霉菌涂布于预先覆盖在 MS 培养基上的玻璃纸上, 30 °C 培养。在不同的时间点取样并提取天蓝色链霉菌的 RNA, RNA 样品

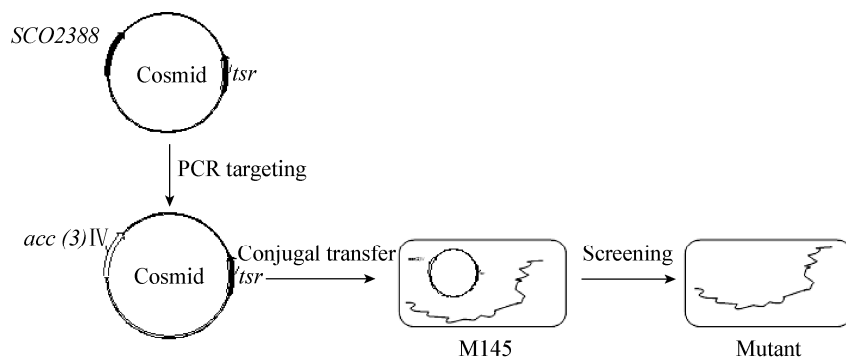


图1 天蓝色链霉菌基因敲除示意图

Figure 1 Schematic diagram of gene knockout in *Streptomyces coelicolor* M145

表 1 本研究所用的菌株、质粒和引物
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒和引物 Strains, plasmids and primers	特性描述 Descriptions	来源或用途 Sources or usages
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1-, SCP2-	[17]
△2366	<i>SCO2366</i> is knocked out in M145, <i>SCO2366</i> -, <i>apraR</i>	This study
△0562	<i>SCO0562</i> is knocked out in M145, <i>SCO0562</i> -, <i>apraR</i>	This study
△6313	<i>SCO6313</i> is knocked out in M145, <i>SCO6313</i> -, <i>apraR</i>	This study
△2370	<i>SCO2365</i> – <i>2370</i> is knocked out in M145, <i>SCO2365</i> – <i>2370</i> -, <i>apraR</i>	This study
△2366C	△2366 containing plasmid pDZ95	This study
DH5α	F [–] <i>recA</i> <i>lacZ</i> ΔM15	[18]
BW25113	BW25113 containing temperature-sensitive plasmid pIJ790 which encoding the λRED recombination system, CmlR	[17]
ET12567	<i>dam</i> <i>dcm</i> <i>hsdS</i>	[18]
pHY773	Plasmid containing the apramycin resistance gene <i>aac(3)IV</i> and without <i>oriT</i> , flanked by FRT sites	Our lab
pHY642	Cloning vector for constructing knock-out plasmid, Amp ^R , Thio ^R	Our lab
pFX101	Modified pSET152 vector after replacing the apramycin resistance gene <i>aac(3)IV</i> with the spectinomycin resistance gene <i>aadA</i>	Our lab
4-73	Cosmid containing <i>SCO6313</i> and <i>oriT</i>	Our lab
N3-49	Cosmid containing <i>SCO0562</i> and <i>oriT</i>	Our lab
N3-68	Cosmid containing <i>SCO2366</i> and <i>oriT</i>	Our lab
pDZ97	Containing <i>SCO2366</i> coding region and <i>tipA</i> promoter	This study
2366TR	GCGCACCGGGGCGCGCCCCGGCCGGGATCAAGGGTT TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Used for <i>SCO2366</i> deletion
2366TF	GGCGCGGGGAGCCCCGTACACACACGATTGGGTAGCCA ATTCCGGGGATCCGTCGACC	Used for <i>SCO2366</i> deletion
562TF	CGCCCCGTACGGCACGACGACAGGAATGAGTGGCCGGTG ATTCCGGGGATCCGTCGACC	Used for <i>SCO0562</i> deletion
562TR	GGCTTCTACCGGGTGCGCGGTGACATCAGGCGCCTGCGG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Used for <i>SCO0562</i> deletion
6313TF	CATCCTCTGACGGCCGGATGACGAACGGGCGCGGCAGC ATTCCGGGGATCCGTCGACC	Used for <i>SCO6313</i> deletion
6313TR	CAGGTCGGCTACCAGAGCTGGGCGCCGCAATGGCGCTTA TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Used for <i>SCO6313</i> deletion
2366CF	TGCTCTAGACTTCTGAAAACCTTCGGCTGG	Amplification of <i>SCO2366</i> coding region
2366CR	CCCAAGCTTCCGGGGATCAAGGGTTTCACA	Amplification of <i>SCO2366</i> coding region
562VF	TGGGACACGAACGGCTCAA	Verification of <i>SCO562</i> mutant
562VR	ACGTGGTCGATGCGCTGC	Verification of <i>SCO562</i> mutant
2366VF	ACCAGGGCGAGTGGAAGT	Verification of <i>SC2366</i> mutant
2366VR	CCGGGGATCAAGGGTTTCAC	Verification of <i>SC2366</i> mutant
6313VF	CGTCCTGCTCATCACCAAAGA	Verification of <i>SCO6313</i> mutant
6313VR	CGATGCCATGAACGACCC	Verification of <i>SCO6313</i> mutant
actIIF	AGGAGTTGTGGGCGGACC	Used for RT-PCR
actIIR	CCCATCAGTTTGGCGTGC	Used for RT-PCR
hrdBF	GCGCACCCGAAAGAGCGTCGCAG	Used for RT-PCR
hrdBR	CGGCGGGAGCGGTCGCCTTCC	Used for RT-PCR

经 DNA 酶(RNase-free, TaKaRa)处理以去除可能污染的基因组 DNA。经分光光度计定量后,使用“Revert Acid First Strand cDNA Synthesis”试剂盒(MBI Fermentas)将 RNA 反转录为 cDNA。取相同量的 PCR 产物进行电泳检测。所用引物见表 1。PCR 方法参考文献[19]。

1.2.3 扫描电镜观测: 将链霉菌涂布于预先覆盖在 MS 培养基上的玻璃纸上,在 30 °C 培养 2 d 左右,将玻璃纸剪成大约 1 cm×1 cm 的小块。制作扫描电子显微镜下观察的样品时,链霉菌细胞用 2%的戊二醛(pH 7.2)和 1%的四氧化锇固定。样品脱水后,样品中的乙醇用醋酸戊酯替代。用超临界干燥方法在自动干燥仪 HCP-2 (Hitachi)中干燥后,样品在自动精细溅射镀膜仪 JFC-1600 中镀金(Jeol)。制作好的样品在 JSM-6360LV 扫描电镜下观察(Jeol)。

2 结果与分析

2.1 *terC* 突变体的放线紫红素提前合成

terC 基因最初是在细菌 IncHI2 的质粒 pMER610 上作为砷抗性基因簇上的一个编码膜蛋白的基因被克隆^[20]。*terC* 基因广泛分布在细菌、古细菌、藻类以及植物中^[21]。在天蓝色链霉菌中,*SCO2366* 位于一个砷抗性基因簇中(*SCO2365*–*2370*)。由于 *SCO2366* 与其他砷抗性基因簇中的 C 基因同源,所以把 *SCO2366* 命名为 *terC*。*terC* 编码一个有 380 个氨基酸的蛋白质,这个蛋白除了拥有跨膜结构域外,还含有一个功能未知的结构域 DUF475。通过 PCR-targeting 的方法敲除 *SCO2366* 后,*aac(3)IV* 插入到相应位置得到突变体 $\Delta 2366$ 。突变体经 PCR 验证(图 2)。在 MS 固体培养基上培养时, $\Delta 2366$ 的放线紫红素(Act)合成大幅提前,培养至第 2 天时就明显变蓝,而野生型 M145 却没有(图 3)。把受启动子 *tipA* 控制的 *SCO2366* 克隆到整合质粒 pFX101 上得到 pZH97,然后回补到突变体 $\Delta 2366$ 中,得到回补菌株 $\Delta 2366C$ 。回补菌株 $\Delta 2366C$ 的表型得到恢复(图 3),表明这种表型变化不是极性效应引起的。同时在天蓝色链霉菌基因

组中还有 2 个基因与 *SCO2366* 的一致性超过 80%,*SCO0562* (84%)和 *SCO6313* (95%),但是这两个基因的敲除突变体($\Delta 562$ 和 $\Delta 6313$)却没有类似的表型变化(图 3)。

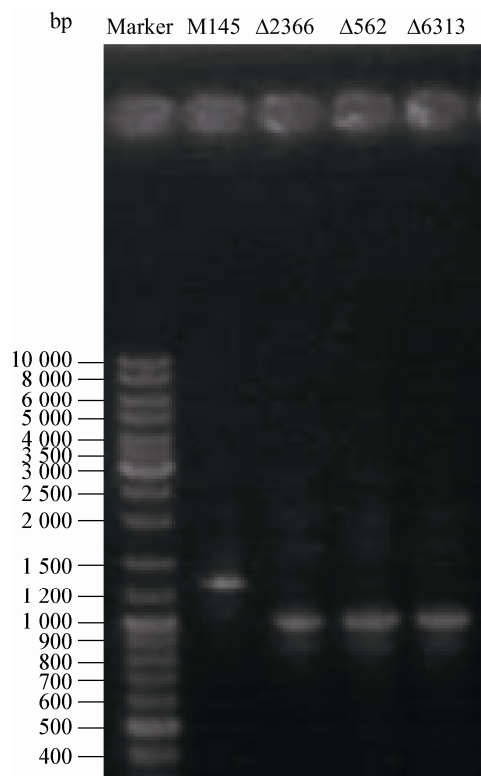


图 2 突变体的 PCR 验证结果

Figure 2 PCR verification results of mutant

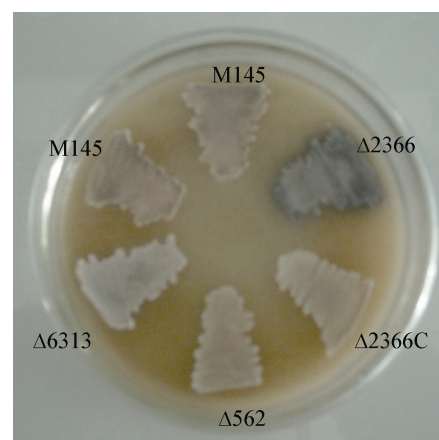


图 3 *terC* 突变体产 Act 的表型

Figure 3 Phenotypic display of antibiotic production in *terC* null mutant

2.2 *terC* 突变体中途径特异性调控因子 *actII-orf4* 转录提前

在链霉菌中很多抗生素的表达是由途径特异性调控因子控制的。在天蓝色链霉菌中 *actII-orf4* 被证明是 Act 合成途径的特异性调控因子，*actII-orf4* 的过量表达将促进 Act 的合成，从而提高 Act 的产量^[22]。通过抽提在 MS 培养基上培养不同时间段(24、36 和 48 h)的菌体中的总 RNA 对 *actII-orf4* 的转录水平进行检测，以 *hrdB* 作为内参。结果表明，与 M145 相比， $\Delta 2366$ 中 *actII-orf4* 转录时间提前(图 4)。这个结果可能表明 *terC* 在天蓝色链霉菌中间接调控 *actII-orf4* 的转录来影响 Act 的产量。

2.3 *terC* 突变体影响菌丝体生长

$\Delta 2366$ 的突变体在 MS 培养基上培养 2 d 后进行扫描电镜观察，结果发现 $\Delta 2366$ 的菌丝体生长变差，菌丝体长度变短，而对照 M145 的菌丝体很长，回补菌株 $\Delta 2366C$ 能恢复野生型的表型(图 5)。这表明 *terC* 在天蓝色链霉菌中影响菌丝体的生长发育。

3 讨论

terC 基因广泛分布在细菌、古细菌、藻类以及植物中。BLAST 分析表明这类基因编码的蛋白在链霉菌中高度保守。过去对 *terC* 的研究集中在与砷抗性相关的领域。但是本实验却发现 *terC* 的缺失除了对天蓝色链霉菌的砷抗性有影响外(数据未给出)，还对 Act 的合成和菌丝体的生长发育有明显影响。

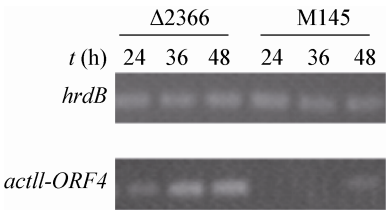


图 4 $\Delta 2366$ 中 *actII-orf4* 的转录水平大幅上调
Figure 4 The transcription of *actII-orf4* in $\Delta 2366$ increased greatly

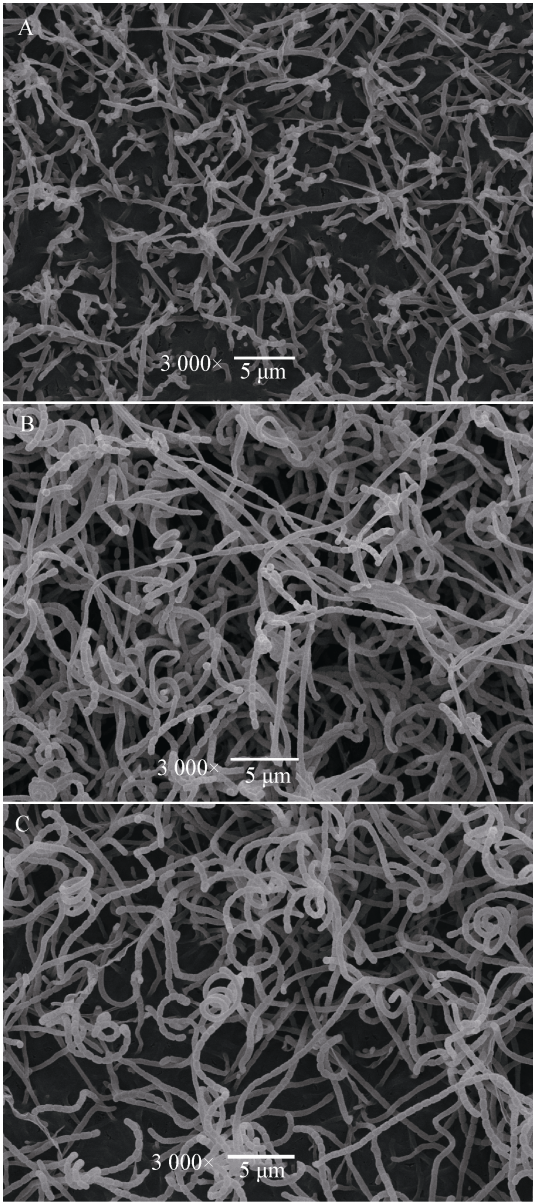


图 5 *terC* 突变体抑制菌丝体生长
Figure 5 Mycelium development is depressed in $\Delta 2366$ mutant
Note: A: $\Delta 2366$; B: M145; C: $\Delta 2366C$.

$\Delta 2366$ 中 *actII-orf4* 的转录提前可能表明 *terC* 抑制了 Act 生物合成基因簇的转录。这种作用应该是间接的，因为 TerC 除了拥有跨膜结构域外，没有其他有明确功能的结构域，所以不可能直接与 *actII-orf4* 的调控序列结合调控 Act 生物合成基因簇的转录。*terC* 对天蓝色链霉菌菌丝体生长发育的影

响机理不明确。在拟南芥中, *terC* 的插入突变结果表明在拟南芥叶绿体发育的早期, *terC* 对类囊体膜和类囊体的形成起着关键的作用, 推测 TerC 作为蛋白转运体系的组成单位协助整合和转运类囊体膜蛋白进入类囊体^[23]。因此我们猜测 *terC* 在天蓝色链霉菌中有某种类似的功能, 从而影响菌丝体的生长发育。

参 考 文 献

- [1] Challis GL, Hopwood DA. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(2): 14555-14561
- [2] Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Nature, 2002, 417(6885): 141-147
- [3] Fernández-Moreno MA, Caballero JL, Hopwood DA, et al. The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*[J]. Cell, 1991, 4(66): 769-780
- [4] Takano E, Gramajo HC, Strauch E, et al. Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(19): 2797-2804
- [5] Ryding NJ, Anderson TB, Champness WC. Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(3): 794-805
- [6] Brian P, Riggle PJ, Santos RA, et al. Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(11): 3221-3231
- [7] Hara O, Horinouchi S, Uozumi T, et al. Genetic analysis of A-factor synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces griseus*[J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(9): 2939-2944
- [8] 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)[J]. Gene, 1990, 95(1): 49-56
- [9] Matsumoto A, Ishizuka H, Beppu T, et al. Involvement of a small ORF downstream of the *afsR* gene in the regulation of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Actinomycetologica, 1995, 9: 37-43
- [10] Izuka H, Horinouchi S, Kieser HM, et al. A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp.[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(23): 7585-7594
- [11] Fernández-Moreno MA, Caballero JL, Hopwood DA, et al. The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*[J]. Cell, 1991, 66(4): 769-780
- [12] Eccleston MR, Ali A, Seyler R, et al. Structural and genetic analysis of the BldB protein of *Streptomyces coelicolor*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(15): 4270-4276
- [13] Elliot M, Damji F, Passantino R, et al. The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(6): 1549-1555
- [14] Bignell DR, Warawa JL, Strap JL, et al. Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation[J]. Microbiology, 2000, 146(9): 2161-2173
- [15] Huang J, Shi J, Molle V, et al. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*[J]. Molecular Microbiology, 2005, 58(5): 1276-1287
- [16] Kieser T, Bibb MJ, Butter MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000: 235
- [17] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(4): 1541-1546
- [18] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 125
- [19] Xie P, Zeng A, Qin Z. cmdABCDE, a cluster of genes encoding membrane proteins for differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 157-169
- [20] Jobling MG, Ritchie DA. The nucleotide sequence of a plasmid determinant for resistance to tellurium anions[J]. Gene, 1988, 66(2): 245-258
- [21] Kormutakova R, Klucar L, Turna J. DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of *Escherichia coli* and identification of essential genes[J]. Biometals, 2000, 13(2): 135-139
- [22] Arias P, Fernandez-Moreno MA. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(22): 6958-6968
- [23] Kwon KC, Cho MH. Deletion of the chloroplast-localized AtTerC gene product in *Arabidopsis thaliana* leads to loss of the thylakoid membrane and to seedling lethality[J]. The Plant Journal, 2008, 55(3): 428-442