

转录调控因子 BldD 调控链霉菌形态分化和次级代谢的研究进展

董胜男¹, 何浩洋¹, 陈徽¹, 宋明瑞¹, 高洁¹, 李杰^{*2}, 刘静^{*1}

¹ 安徽农业大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230036

² 安徽大学 物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230601

董胜男, 何浩洋, 陈徽, 宋明瑞, 高洁, 李杰, 刘静. 转录调控因子 BldD 调控链霉菌形态分化和次级代谢的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3255-3267.

DONG Shengnan, HE Haoyang, CHEN Hui, SONG Mingrui, GAO Jie, LI Jie, LIU Jing. Progress in the regulation of morphological differentiation and secondary metabolism of *Streptomyces* by the transcriptional regulator BldD[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3255-3267.

摘要: 链霉菌(*Streptomyces* sp.)是一种具有复杂形态分化和生命周期的革兰氏阳性土壤细菌, 同时具有强大的次级代谢能力。链霉菌的次级代谢产物种类丰富, 其中最重要的就是抗生素类药物。在链霉菌形态分化和次级代谢过程中常常伴随着复杂的调控机制, 包括特异性调控、多效性调控和全局性调控等。“*bld*”是一类链霉菌正常发育所必需的调节基因, 因其缺失后能够引起菌株出现“光秃”(bald)的表型而得名。在“*bld*”类基因编码的诸多转录因子中, BldD 作为全局性调控因子, 能够显著地调控链霉菌的形态分化和次级代谢。本文主要综述了转录调控因子 BldD 的结构特征, 以及代表性的链霉菌中 BldD 调控菌株形态分化和次级代谢的分子机制, 为深入探讨 BldD 调控模式的普适性和特异性提供参考。

关键词: BldD; 链霉菌; 形态分化; 次级代谢; 调控机制

资助项目: 国家自然科学基金(32370076, 31800057); 安徽省高等学校自然科学基金(2022AH050914)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32370076, 31800057) and the Natural Science Foundation of Universities of Anhui Province (2022AH050914).

*Corresponding authors. E-mail: LI Jie, q20101010@stu.ahu.edu.cn; LIU Jing, liujing9261@ahau.edu.cn

Received: 2024-01-06; Accepted: 2024-04-10; Published online: 2024-05-13

Progress in the regulation of morphological differentiation and secondary metabolism of *Streptomyces* by the transcriptional regulator BldD

DONG Shengnan¹, HE Haoyang¹, CHEN Hui¹, SONG Mingrui¹, GAO Jie¹, LI Jie^{*2}, LIU Jing^{*1}

1 School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

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

Abstract: *Streptomyces* is a genus of Gram-positive soil bacteria with complex morphological differentiation and life cycle. It has strong secondary metabolic capacity and can produce a variety of antibiotics. The growth of *Streptomyces* is often associated with morphological differentiation and secondary metabolism, which involve complex regulatory mechanisms, including pathway-specific regulation, pleiotropic regulation, and global regulation. The *bld* gene family is essential for the normal morphological development of *Streptomyces* and named since its deletion causes the “blad” phenotype. BldD, a global regulator encoded by a member of the *bld* family, can significantly regulate the morphological differentiation and secondary metabolism of *Streptomyces*. This review introduces the structure of BldD and the effects of BldD on the morphological differentiation and secondary metabolism of representative strains of *Streptomyces*, providing a reference for revealing the molecular regulatory mechanism of BldD in *Streptomyces*.

Keywords: BldD; *Streptomyces*; morphological differentiation; secondary metabolism; regulatory mechanism

链霉菌(*Streptomyces* sp.)是一种 G+C 含量高达 70%以上的革兰氏阳性丝状细菌,迄今为止已经鉴定出超过 900 种链霉菌^[1]。链霉菌能产生众多结构复杂、功能多样的次级代谢产物,其中许多次级代谢产物由于具有高效的抗病原体活性而被广泛应用于医药和畜牧等行业,其中链霉菌来源的抗生素约占自然界中天然抗生素的三分之二^[2]。链霉菌中次级代谢产物的生物合成通常发生在菌株形态分化的起始,因而形态分化的进程对次级代谢产物的合成具有重要影响^[3]。

在链霉菌形态分化和次级代谢过程中常常伴随着复杂的调控机制,包括特异性调控、多效性调控和全局性调控等^[3]。特异性调控:链霉菌中抗生素的合成基因大多数以簇的形式分布在

染色体上,每个基因簇中通常包含一个或多个能专一性地调控对应抗生素生物合成的簇内调控因子(cluster-situated regulator, CSR)^[4]。CSR 的调控作用属于典型的特异性调控,然而 CSR 的调控活性也受制于更高级别的复杂调控网络和信号通路^[5]。多效性调控:除了 CSR,位于抗生素生物合成基因簇之外,还存在更高水平的调控作用,如天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中多效调控因子 DasR 不仅直接抑制 CSR 基因 *actII-ORF4* 调控放线紫红素(Act)的合成,而且直接抑制另一 CSR 基因 *redZ* 调控十一烷基灵菌红素(Red)的合成^[3]。全局性调控:相较于多效性调控因子,全局性调控因子的作用靶点更多,分子机制更复杂,往往具备更高级的调控网络。例如,

全局性调控因子 BldD 能够显著地调控链霉菌的形态分化过程和次级代谢物的生物合成,以及其他相关联的生理过程^[3]。

链霉菌的生命周期包括 3 个成熟的发育阶段营养菌丝、气生菌丝和孢子^[6]。链霉菌在固体培养基上生长时,通常会形成气生菌丝和孢子,这种形态分化的过程主要受到光秃型基因(*bld*)和白基因(*whi*)这两类基因的调控,*bld* 主要与气生菌丝的形成相关,*whi* 主要与孢子链的成熟相关。通常,*bld* 和 *whi* 基因的缺失突变也会显著影响链霉菌中次级代谢产物的合成^[7]。*bld* 基因种类较多,以天蓝色链霉菌为例(表 1),包括 *bldA* (编码 tRNA)、*bldK* (编码 ABC 转运系统)、*bldN* (编码 sigma factor)、*bldG* (编码 anti-anti-sigma factor)以及 *bldB/bldC/bldD/bldH/bldM* (编码转录调控因子),其中 *bldD* 基因编码的转录调控因子 BldD 处于链霉菌调控网络的较高节点,其调控功能与机制研究得最为清楚^[8-9]。本文主要综述了转录调控因子 BldD 调控链霉菌形态分化和次级代谢的机制,为深入研究 BldD 的调控功能和分子机制提供参考。

1 BldD 蛋白的结构特征

天蓝色链霉菌 BldD 是一种具有 167 个氨基酸的 DNA 结合蛋白,属于外源物质响应元件(xenobiotic response element, XRE)家族^[10]。BldD

蛋白通常以同源二聚体的形式发挥活性,每个单体由 2 个不同的结构域组成,位于 N-端(NTD, 残基 1-79)的螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)结构参与 DNA 的识别与结合^[10-11]。天蓝色链霉菌 BldD 能够直接结合靶基因的启动子区,包括自身基因 *bldD*、*bldN* (编码 ECF sigma 因子)、*whiG* (编码孢子形成相关的 sigma 因子)和 *sigH* (编码应激反应相关的 sigma 因子)等,从而调控孢子形成和次级代谢产物合成相关基因的转录水平^[10,12-13]。

BldD 蛋白 C 端(CTD, 残基 80-167)由 2 个(β - α - α)重复序列和 1 个短 C 端螺旋组成^[14]。在委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)中,四聚体 c-di-GMP 能将 2 个 BldD-CTD 交联在一起,影响 BldD 的寡聚状态,进而影响 BldD 与 DNA 的结合(图 1)^[15]。第二信使 c-di-GMP 是细菌中最重要的信号分子之一,由 2 个 GTP 分子通过双胍酸环化酶合成^[16]。c-di-GMP 与效应蛋白结合可以影响单细胞鞭毛细菌中的黏附、毒力、运动性和生物膜形成等多种过程^[17-19]。在委内瑞拉链霉菌中,胞内 c-di-GMP 的含量影响菌株生长发育的时间点,c-di-GMP 含量增加会延迟形态分化,c-di-GMP 含量降低则会加速形态分化,有利于孢子形成(图 1),表明第二信使 c-di-GMP 在营养生长阶段对菌丝-孢子的转变过程具有至关重要的作用^[15]。

表 1 天蓝色链霉菌中 *bld* 基因的功能

Table 1 Function of *bld* genes in *Streptomyces coelicolor*

Gene	Protein	Predicted function
SCO5968	BldA	Leucyl tRNA
SCO5723	BldB	Small DNA binding protein
G6W51_21745	BldC	Developmental transcriptional regulator
SCO1489	BldD	DNA binding transcriptional regulator
SCO3549	BldG	Anti-anti-sigma factor
SCO2792	BldH	AraC/XylS family transcriptional regulator
SCO5112	BldK	ABC transport system integral membrane protein
SCO2686	BldM	LuxR family transcriptional regulator
SCO0159	BldN	Extracytoplasmic function (ECF) sigma factor

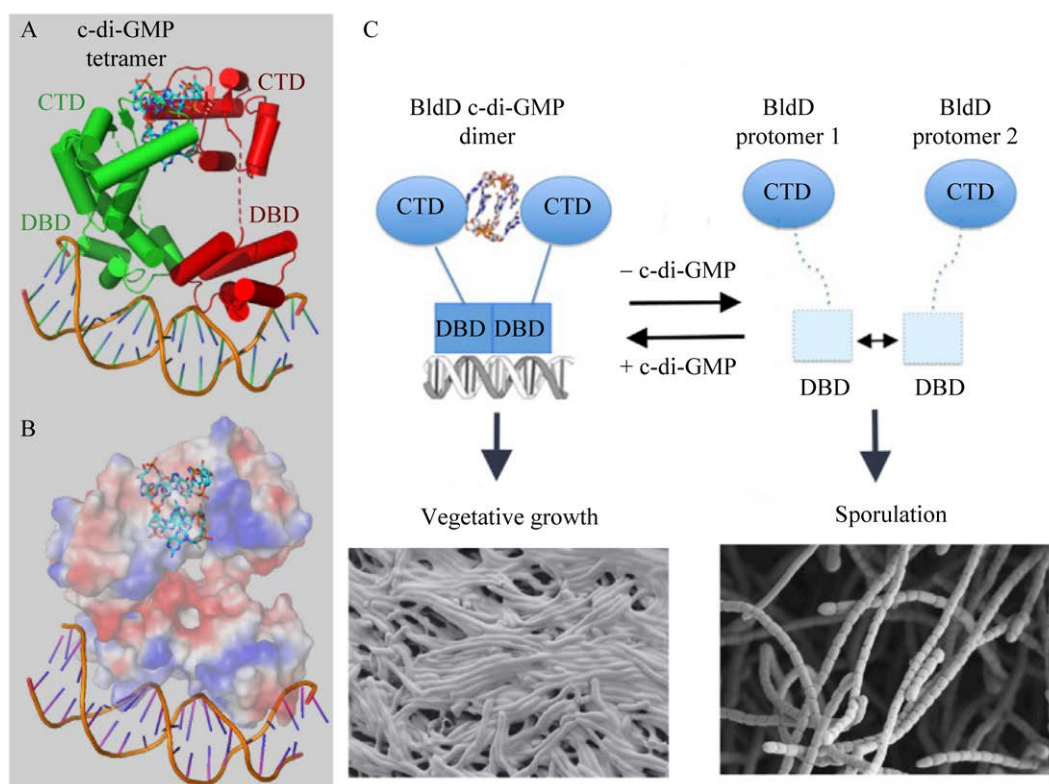


图 1 c-di-GMP 通过介导 BldD 与 DNA 结合来调控链霉菌发育的分子机制^[15] A: 委内瑞拉链霉菌 BldD-(c-di-GMP)-DNA 复合物的结构. B: BldD-(c-di-GMP)-DNA 复合物结构的静电表面图. C: c-di-GMP 介导 BldD 与 DNA 的结合从而抑制链霉菌发育的模型图. CTD 表示 C 末端结构域; DBD 表示 DNA 结合结构域

Figure 1 The molecular mechanism of c-di-GMP regulating the development of *Streptomyces* by mediating the binding of BldD to DNA^[15]. A: Structure of the *Streptomyces venezuelae* BldD-(c-di-GMP)-DNA complex. B: Electrostatic surface representation of the BldD-(c-di-GMP)-DNA complex structure. C: Model diagram of c-di-GMP mediated binding of BldD to DNA and inhibition of *Streptomyces* development. CTD indicates C-terminal domain; DBD indicates DNA-binding domain.

2 BldD 调控链霉菌的形态分化和次级代谢

不同链霉菌来源的 BldD 蛋白在氨基酸序列上具有高度的相似性(图 2)。天蓝色链霉菌、林可链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*)、玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)、阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)、委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)、加纳链霉菌(*Streptomyces ghanaensis*)和疮痂病链霉菌

(*Streptomyces scabies*)在其生长发育的过程中伴随着不同的次级代谢物质的产生,这些次级代谢产物的生物合成都受到 BldD 蛋白的调控(表 2)。

2.1 天蓝色链霉菌 BldD_{sco}

天蓝色链霉菌是链霉菌中的模式菌株,至少产生 4 种抗生素,包括聚酮类抗生素放线紫红素(Act)、十一烷基灵菌红素(Red)、钙依赖性抗生素(CDA)和亚甲基霉素(Mmy)。在天蓝色链霉菌中缺失 *bldD_{sco}* 基因后,菌株不仅失去产孢能力,而且各抗生素的产量也受到显著影响^[12,20]。



图 2 各链霉菌中 BldD 蛋白的氨基酸序列比对

Figure 2 Amino acid sequence alignment of BldD homologies in *Streptomyces*.

表 2 各链霉菌中 BldD 同源蛋白的相关信息

Table 2 Related information of BldD homologies in *Streptomyces*

<i>Streptomyces</i>	Gene (designation)	Secondary metabolites
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>SCO1489 (bldDSCO)</i>	Act, Red, CDA, Mmy
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	<i>SLCG_1664 (bldDsl)</i>	Lincomycin
<i>Streptomyces roseosporus</i>	<i>IAG44_33165 (bldDsro)</i>	Daptomycin
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>SAV_6861 (bldDsav)</i>	Avermectin
<i>Streptomyces venezuelae</i>	<i>VENE_05285 (bldDsve)</i>	Jadomycin, chloramphenicol
<i>Streptomyces ghanaensis</i>	<i>EFE70643 (bldDsgh)</i>	Moenomycin A
<i>Streptomyces scabies</i>	<i>SCAB_75171 (bldDssc)</i>	Thaxtomin A

除调控自身基因的表达外, BldDSCO 还能够调控天蓝色链霉菌中许多重要靶基因的表达, 包括形态发育基因、转录调控基因和氨基酸代谢基因等, 从而最终调控孢子形成, 并影响次级代谢产物的生物合成(图 3)。通过 ChIP-chip 技术分析发现, BldDSCO 作为一个全局性转录调控因子可以调控多达 167 个转录单元, 其中 20 多个转录单元分布在形态发育和/或次级代谢相关基因(包括 *bldN*、*bldM*、*bldC*、*whiG*、*nsdA*、*leuA* 等)中^[12]。*bldN* 编码一种启动气生菌丝体形成的 ECF sigma 因子^[21], 相较于野生型菌株, $\Delta bldDSCO$ 缺失突变株中 *bldN* 的表达大幅度降低^[12]。BldDSCO 可以结合 *bldM* 启动子区域, *bldM* 编码一种气生菌丝体形成所需的 LuxR 家族转录调控因子^[22]。相较于野生型菌株, $\Delta bldDSCO$ 缺失突变体中 *bldM* 的转录显著降低 90%^[12]。*bldC* 编码一个小

DNA 结合蛋白家族的成员, 该家族与转录激活因子 MerR 家族的 DNA 结合结构域有关^[23]。BldDSCO 可以结合 *bldC*, 影响天蓝色链霉菌的气生菌丝体的形成^[12]。*whiG* 可以影响气生菌丝体分化成孢子链^[24], 在 $\Delta bldDSCO$ 缺失突变株生长的后期, *whiG* 的转录水平显著下降^[13]。*nsdA* 是一种转录调控基因, *nsdA* 基因缺失后能够导致天蓝色链霉菌中放线紫红素、亚甲基霉素和钙依赖性抗生素产量提高, 而 BldDSCO 能够直接结合 *nsdA* 的启动子区域从而通过“级联调控”(或称“分层调控”)最终影响抗生素的生物合成^[25-26]。在 $\Delta bldDSCO$ 突变株中, 支链氨基酸生物合成所需的基因 *leuA*、*leuB* 和 *leuC* 的表达量显著下调, 并且 BldDSCO 可直接结合 *leuA* 的启动子区域, 而支链氨基酸作为 II 型聚酮前体乙酸盐的来源, 对放线紫红素的生物合成具有重要作用^[27-28]。

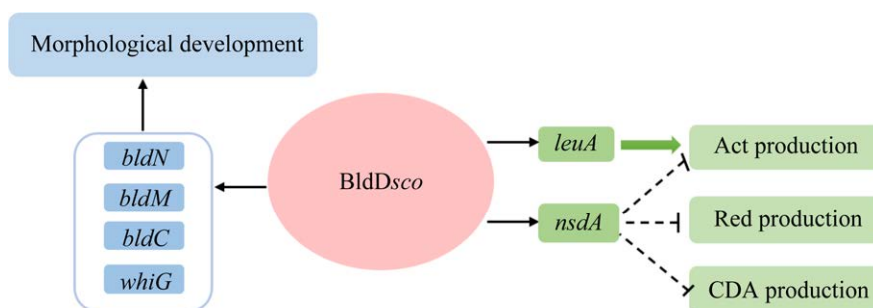


图3 天蓝色链霉菌中 BldDSCO 调控模型 平箭头表示抑制；尖箭头表示激活；实线表示直接调控；虚线表示间接调控；粗箭头表示放线紫红素的生成

Figure 3 Regulatory model of BldDSCO in *Streptomyces coelicolor*. Flat-headed arrow indicates repression; Pointed arrow indicates activation; Solid line indicates direct regulation; Dotted line indicates indirect regulation; Thick arrow indicates the production of Act.

2.2 林可链霉菌 BldDsl

林可链霉菌的主要次级代谢产物为林可霉素。林可霉素是一种林可酰胺类抗生素，主要用于治疗由革兰氏阳性菌引起的感染，也对一些抗生素耐药菌具有很好的抑菌效果^[29]。

相较于野生型菌株，林可链霉菌中 $\Delta bldDsl$ 突变株失去产孢子能力，呈现光秃表型，并且 $\Delta bldDsl$ 突变株的生长明显比野生型菌株延迟，因此，*bldDsl* 不仅影响林可链霉菌的形态分化，还影响菌株的生长^[30]。相较于野生型菌株，*bldDsl* 基因缺失后，突变株形态分化相关基因 *amfC*、*ftsZ*、*whiB* 的转录水平明显下降，表明 BldDsl 是林可链霉菌生长发育的关键正调控因子^[30]。

对野生型菌株和 $\Delta bldDsl$ 突变株中林可霉素产量进行分析， $\Delta bldDsl$ 突变株的林可霉素产量较野生型菌株发生巨幅下降，几乎失去产林可霉素的能力^[30]。林可霉素合成基因簇长约 35 kb，包含 29 个开放阅读框，其中 26 个基因(*lmb*)为合成基因及簇内调控基因 *lmbU*^[31]，另外 3 个基因(*lmr*)为抗性基因^[32]。相较于野生型菌株，*bldDsl* 基因缺失后，突变株内林可霉素结构基因簇中基因的转录水平显著下降^[30]。凝胶迁移试验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

表明，BldDsl 蛋白可以直接结合生物合成基因簇(*lin* cluster)中多个基因(包括 *lmrA*、*lmbA*、*lmbC*、*lmbD*、*lmbE*、*lmbV*、*lmbW*、*lmbK*、*lmrB*、*lmbU*、*lmrC*)的启动子区(图 4)，证实 BldDsl 通过控制这些基因的转录，从而直接正调控林可霉素的生物合成^[30]。

2.3 玫瑰孢链霉菌 BldDsro

玫瑰孢链霉菌产生的达托霉素是一种环脂肽抗生素，通常用于临床治疗多重耐药革兰氏阳性菌引起的感染^[33]。BldDsro 在玫瑰孢链霉菌中具有双重作用，一方面作为抑制因子可以抑制玫瑰孢链霉菌的生长发育；另一方面作为激活因子可以激活达托霉素的合成^[34]。

在玫瑰孢链霉菌中缺失 *bldDsro* 基因，相较于野生型菌株，缺失突变体 $\Delta bldDsro$ 产孢能力增强，加速了孢子的形成；通过扫描电镜观察第 2、4 天孢子的生长状态，第 2 天的野生型菌株的菌落几乎由纯的营养菌丝组成，而缺失突变株含有孢子链，第 4 天时野生型菌株含有气生菌丝和孢子链，而缺失突变株 $\Delta bldDsro$ 的气生菌丝消失，已发育为成熟孢子^[34]。通过 RT-qPCR 分析显示，在缺失突变株 $\Delta bldDsro$ 中，与形态分化相关的基因 *whiB*、*whiD*、*bldM*、*bldN*、*bldC*、*ssgB*、*smeA* 和 *sffA* 的转录水平都显著提高；

EMSA 分析显示,除 *ssgB* 外, BldDsro 能够直接结合其他所有基因的启动子,表明 BldDsro 对玫瑰孢链霉菌中形态分化相关基因具有直接抑制的作用,这与其他链霉菌中的情况相反^[34](图 5)。

玫瑰孢链霉菌中 *bldDsro* 的缺失显著降低了达托霉素的产量,表明 BldDsro 在达托霉素合成中起到激活或促进的作用^[34]。达托霉素生物合

成基因簇(*dpt* cluster)包含至少 12 个基因: *dptA*、*dptBC*、*dptD*、*dptE*、*dptF*、*dptG*、*dptH*、*dptI*、*dptJ*、*dptM*、*dptN* 和 *dptP*^[35-37]。RT-qPCR 和 EMSA 分析显示, BldDsro 能够直接激活 *dptE*、*dptF*、*dptA*、*dptBC*、*dptD*、*dptG* 和 *dptH* 基因的转录,而间接激活 *dpt* 生物合成基因簇中其他结构基因的表达^[34](图 5)。

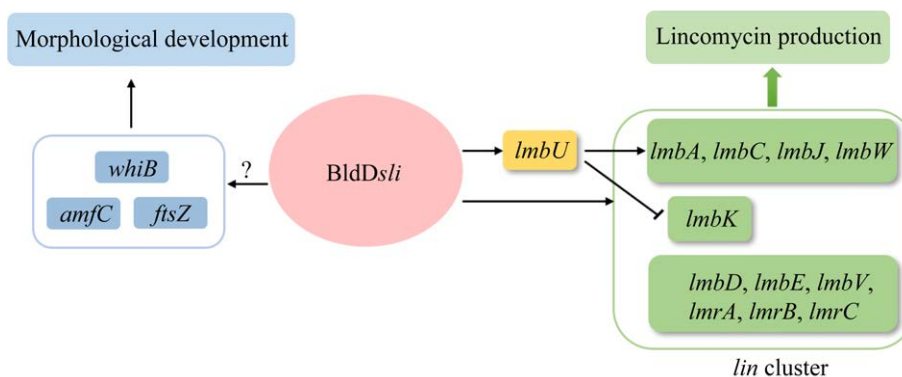


图 4 林可链霉菌中 BldDsli 调控模型 平箭头表示抑制;尖箭头表示激活;实线表示直接调控;问号表示未解析其调控关系为直接还是间接;粗箭头表示林可霉素的生成

Figure 4 Regulatory model of BldDsli in *Streptomyces lincolnensis*. Flat-headed arrow indicates repression; Pointed arrow indicates activation; Solid line indicates direct regulation; The question mark indicates that it is unclear whether the regulation effect is direct or indirect; Thick arrow indicates the production of lincomycin.

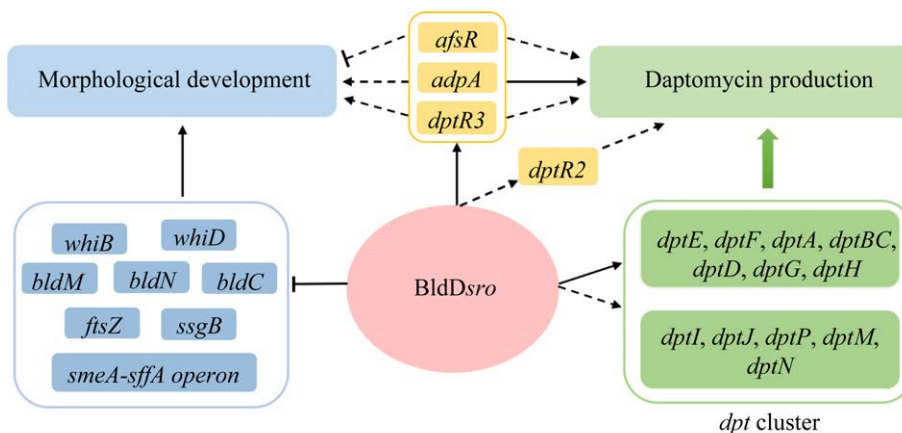


图 5 玫瑰孢链霉菌中 BldDsro 调控模型 平箭头表示抑制;尖箭头表示激活;实线表示直接调控;虚线表示间接调控;粗箭头表示达托霉素的生成

Figure 5 Regulatory model of BldDsro in *Streptomyces roseosporus*. Flat-headed arrow indicates repression; Pointed arrow indicates activation; Solid line indicates direct regulation; Dotted line indicates indirect regulation; Thick arrow indicates the production of daptomycin.

DptR2 和 DptR3 是邻近 *dpt* 生物合成基因簇的 2 个调控因子,二者都能够正调控达托霉素的生物合成。其中,DptR2 只调控自身基因的转录,并不调控 *dpt* 簇中的结构基因,而 DptR3 作为全局性调控因子,不仅调控自身基因和 *dpt* 簇中结构基因的转录,而且显著影响玫瑰孢链霉菌的形态分化^[38-40]。RT-qPCR 分析显示,在 $\Delta bldDsro$ 缺失突变株中,*dptR2* 和 *dptR3* 的转录水平都发生显著下降;而 EMSA 分析显示,BldDsro 只结合 *dptR3* 的启动子,不结合 *dptR2* 的启动子^[34]。另外,AdpA 和 AfsR 是广泛存在于链霉菌中参与调控次级代谢和形态发育的全局性调控因子^[3,5]。EMSA 分析显示,BldDsro 也可以与 *adpA* 和 *afsR* 的启动子直接结合;RT-qPCR 显示,在 $\Delta bldDsro$ 缺失突变株中,*adpA* 和 *afsR* 的转录水平均显著降低^[34]。这些表明 BldDsro 还可以通过直接调控与达托霉素生物合成相关的全局性调控基因(*dptR3*、*adpA* 和 *afsR*)从而影响达托霉素的产量^[34](图 5)。

2.4 阿维链霉菌 BldDsav

阿维菌素由阿维链霉菌产生,是一类具有杀虫、杀螨、杀线虫活性的十六元大环内酯化合物,具有结构新颖、农畜两用的特点,因此广泛应用于农牧业领域^[41]。

在阿维链霉菌中,相较于野生型菌株, $\Delta bldDsav$ 缺失突变株中阿维菌素的产量降低了约 55%,因此 BldDsav 在激活阿维菌素合成中起着重要作用^[34]。阿维菌素生物合成基因簇包含一个 CSR 基因 *aveR*,它编码一种 LuxR 家族调控因子,负责激活 *ave* 基因簇中结构基因的表达^[42-43]。通过 EMSA 分析显示,BldDsav 蛋白可以与位于 *ave* 基因簇内的启动子探针 *aveRp*、*aveFp*、*aveA1_aveD*、*aveA4p* 和 *aveBVIIIp* 直接结合;RT-qPCR 显示,相较于野生型菌株,

$\Delta bldDsav$ 突变株中 BldDsav 的靶基因 *aveR*、*aveF*、*aveA1*、*aveD*、*aveA4* 和 *aveBVIII* 转录水平都显著下降,证实阿维链霉菌中 BldDsav 通过直接调控 *aveR* 和 *ave* 结构基因的表达而激活阿维菌素的合成^[34](图 6)。

2.5 加纳链霉菌 BldDsgh

加纳链霉菌产生的默诺霉素 A (monomycin A, MmA)又被称为黄霉素(flavomycin)、黄磷脂醇(flavophospholipid)和斑堡霉素(bambermycin),是一种寡糖类抗生素,被用作动物饲料添加剂促进动物生长^[44]。

相较于加纳链霉菌野生型菌株, $\Delta bldDsgh$ 缺失突变株不仅孢子形成明显延迟,而且生长早期的生物量积累明显下降,表明 BldDsgh 对加纳链霉菌的形态分化和菌株生长具有促进作用^[45]。LC-MS 分析显示, $\Delta bldDsgh$ 缺失突变株几乎丧失了产 MmA 的能力;通过半定量 RT-PCR 和 Glucuronidase assay (GusA)实验^[46]分析显示,*bldDsgh* 的缺失显著抑制了 MmA 生物合成相关基因的转录^[45]。另外,MmA 生物合成的正调控因子 AdpA^[47]和负调控因子 WblA^[48]的基因转录水平在 $\Delta bldDsgh$ 缺失突变株中也发生显著变化,*adpA* 的转录下降,而 *wblA* 的转录上升;进一步通过 EMSA 分析显示,BldDsgh 蛋白可以直接结合调控基因 *adpA* 和 *wblA* 的启动子而实现对 MmA 生物合成的级联调控作用^[45](图 7)。

2.6 疮痂病链霉菌 BldDssc

疮痂病链霉菌作为整个链霉菌属中数量非常少的具有致病性的代表,能够引起马铃薯疮痂病,对马铃薯等作物产业造成严重危害。疮痂病链霉菌次级代谢产生的 thaxtomins 类化合物具有植物毒性,能够非常显著地抑制植物纤维合成酶的活性,是马铃薯疮痂病的主要致病原因,其中 thaxtomin A 活性最强^[49]。

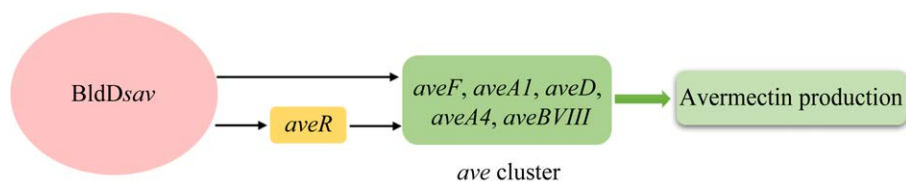


图 6 阿维菌素中 BldDsav 调控模型 尖箭头表示激活；实线表示直接调控；粗箭头表示阿维菌素的生成

Figure 6 Regulatory model of BldDsav in *Streptomyces avermitilis*. Pointed arrow indicates activation; Solid line indicates direct regulation; Thick arrow indicates the production of avermectin.

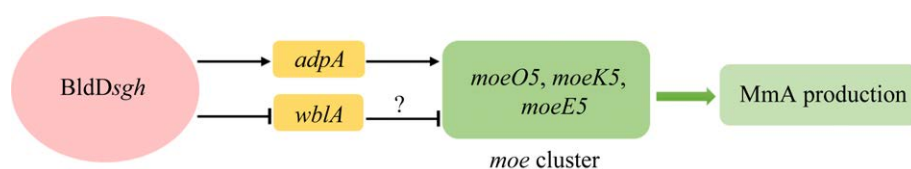


图 7 加纳链霉菌中 BldDsgh 调控模型 平箭头表示抑制；尖箭头表示激活；实线表示直接调控；问号表示未解析其调控关系为直接还是间接；粗箭头表示默诺霉素 A 的生成

Figure 7 Regulatory model of BldDsgh in *Streptomyces ghanaensis*. Flat-headed arrow indicates repression; Pointed arrow indicates activation; Solid line indicates direct regulation; The question mark indicates that it is unclear whether the regulation effect is direct or indirect; Thick arrow indicates the production of MmA.

早期研究显示,相较于疮痂病链霉菌野生型菌株, $\Delta bldDssc$ 缺失突变株中 thaxtomin A 的产量明显减少;通过毒性侵染实验发现,相较于野生型菌株, $\Delta bldDssc$ 缺失突变株对萝卜幼苗和马铃薯块茎的致病表型如组织坏死或根茎发育迟缓等情况明显减弱^[50]。RT-qPCR 分析显示,相较于野生型菌株, $\Delta bldDssc$ 突变株中 thaxtomin A 合成基因簇中结构基因 *txtA* 和 *txtD* 的转录水平都显著降低,表明 BldDssc 通过调控 thaxtomin A 合成基因簇中结构基因 *txtA* 和 *txtD* 的转录水平,从而影响 thaxtomin A 的生物合成^[50]。此外,相较于野生型菌株, $\Delta bldDssc$ 突变菌株中负责激活 thaxtomin A 生物合成基因簇表达的 CSR 基因 *txtR* 的转录水平也显著降低,这表明 BldDssc 还通过调控 CSR 基因 *txtR* 的转录水平而影响 thaxtomin A 的生物合成^[50]。然而

BldDssc 对 thaxtomin 生物合成基因和 CSR 基因的调控作用是直接还是间接、具体的结合位点是否与其他链霉菌中已鉴定的保守结合位点一致、BldDssc 在疮痂病链霉菌中是否同样调控形态发育等,这些具体的调控机制尚未见报道。

许莹等^[51]近年来一直致力于疮痂病链霉菌中 thaxtomins 生物合成的分子调控研究,已取得较好的研究进展^[52],目前已经证实 BldDssc 不仅能够特异性结合 thaxtomin 生物合成基因 *txtA* 和 *txtE* (其中 *txtA*-*txtB*-*txtH*-*txtC* 和 *txtE*-*txtD* 已鉴定分别为共转录单元^[53]),以及 CSR 基因 *txtR* 的启动子区,而且能够结合典型的形态分化相关基因如 *anfC* 的启动子区,说明 BldDssc 不仅直接调控 thaxtomin 的生物合成,而且直接调控疮痂病链霉菌的形态分化过程,BldDssc 更加精细的分子调控模型仍需进一步深入的研究论证(图 8)。

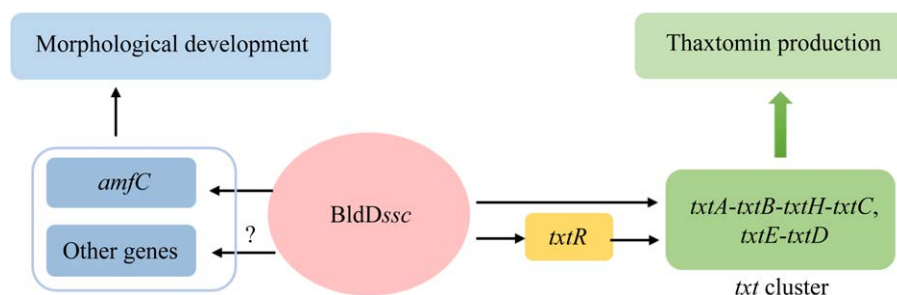


图8 疮痂病链霉菌中 *BldDsc* 调控模型 尖箭头表示激活, 实线表示直接调控; 问号表示未解析其调控关系为直接还是间接; 粗箭头表示 thaxtomin 的生成

Figure 8 Regulatory model of *BldDsc* in *Streptomyces scabies*. Pointed arrow indicates activation, and solid line indicates direct regulation. The question mark indicates that it is unclear whether the regulation effect is direct or indirect. Thick arrow indicates the production of thaxtomin.

3 总结与展望

链霉菌以其能够产生多种生物活性化合物的能力而闻名, 其中抗生素类药物在医药和农业领域使用广泛。链霉菌的形态分化与次级代谢物的产生密切相关, 这些活动的递进过程通常受到全局性或特异性转录调控因子的控制。*BldD* 蛋白作为链霉菌复杂形态分化和次级代谢物合成的激活因子或者抑制因子, 是链霉菌中最重要的全局性转录调控蛋白, 能够直接控制细胞中多个生理过程^[12]。研究不同链霉菌中 *BldD* 调控功能和分子机制后可以得出以下结论: (1) 不同链霉菌中 *BldD* 蛋白的氨基酸序列具有高度相似性; (2) 不同链霉菌中 *BldD* 对于次级代谢物的生物合成全部呈正调控作用; (3) 不同链霉菌中 *BldD* 对于菌株形态分化的调控作用并不一致, 例如玫瑰孢链霉菌中 *BldDsro* 负调控形态分化基因, 这与其他链霉菌中情况是相反的。这些普适性和特异性的研究与分析, 不仅有利于在理论上全面深刻地认知链霉菌完整的分子调控网络, 而且有利于挖掘开发相关调控元件应用于实际的生产和生活中。

目前, 链霉菌中 *BldD* 调控功能和分子机制的研究已经取得了较好的进展, 但是在特殊类群

的链霉菌中其调控机制的研究还不够深入, 具体调控模式也不够清楚, 例如链霉菌中极少数具有致病性的疮痂病链霉菌, 虽然早期研究证实 *BldD* 对疮痂病链霉菌的形态分化和次级代谢有影响, 但具体调控机制并未深入解析。

REFERENCES

- [1] CUOZZO S, de MORENO de LeBLANC A, LeBLANC JG, HOFFMANN N, TORTELLA GR. *Streptomyces* genus as a source of probiotics and its potential for its use in health[J]. Microbiological Research, 2023, 266: 127248.
- [2] de LIMA PROCÓPIO RE, da SILVA IR, MARTINS MK, de AZEVEDO JL, de ARAÚJO JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*[J]. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2012, 16(5): 466-471.
- [3] LIU G, CHATER KF, CHANDRA G, NIU GQ, TAN HR. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(1): 112-143.
- [4] van WEZEL GP, McDOWALL KJ. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances[J]. Natural Product Reports, 2011, 28(7): 1311-1333.
- [5] YAN Y, LIU N, TANG Y. Recent developments in self-resistance gene directed natural product discovery[J]. Natural Product Reports, 2020, 37(7): 879-892.
- [6] JONES SE, ELLIOT MA. 'Exploring' the regulation of

- Streptomyces* growth and development[J]. Current Opinion in Microbiology, 2018, 42: 25-30.
- [7] FLÄRDH K, BUTTNER MJ. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7: 36-49.
- [8] FU Y, DONG YQ, SHEN JL, YIN BC, YE BC, YOU D. A meet-up of acetyl phosphate and c-di-GMP modulates BldD activity for development and antibiotic production[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(13): 6870-6882.
- [9] HALTE M, WÖRMANN ME, BOGISCH M, ERHARDT M, TSCHOWRI N. BldD-based bimolecular fluorescence complementation for *in vivo* detection of the second messenger cyclic di-GMP[J]. Molecular Microbiology, 2022, 117(3): 705-713.
- [10] ELLIOT MA, LOCKE TR, GALIBOIS CM, LESKIW BK. BldD from *Streptomyces coelicolor* is a non-essential global regulator that binds its own promoter as a dimer[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 225(1): 35-40.
- [11] LEE CJ, WON HS, KIM JM, LEE BJ, KANG SO. Molecular domain organization of BldD, an essential transcriptional regulator for developmental process of *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Proteins, 2007, 68(1): 344-352.
- [12] den HENGST CD, TRAN NT, BIBB MJ, CHANDRA G, LESKIW BK, BUTTNER MJ. Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth[J]. Molecular Microbiology, 2010, 78(2): 361-379.
- [13] ELLIOT MA, BIBB MJ, BUTTNER MJ, LESKIW BK. BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Molecular Microbiology, 2001, 40(1): 257-269.
- [14] KIM JM, WON HS, KANG SO. The C-terminal domain of the transcriptional regulator BldD from *Streptomyces coelicolor* A3(2) constitutes a novel fold of winged-helix domains[J]. Proteins, 2014, 82(6): 1093-1098.
- [15] TSCHOWRI N, SCHUMACHER MA, SCHLIMPERT S, CHINNAM NB, FINDLAY KC, BRENNAN RG, BUTTNER MJ. Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development[J]. Cell, 2014, 158(5): 1136-1147.
- [16] CHAN C, PAUL R, SAMORAY D, AMIOT NC, GIESE B, JENAL U, SCHIRMER T. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(49): 17084-17089.
- [17] JENAL U, REINDERS A, LORI C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15: 271-284.
- [18] RÖMLING U, GALPERIN MY, GOMELSKY M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(1): 1-52.
- [19] CHOU SH, GALPERIN MY. Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(1): 32-46.
- [20] ELLIOT M, DAMJI F, PASSANTINO R, CHATER K, LESKIW B. 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.
- [21] BIBB MJ, MOLLE V, BUTTNER MJ. Sigma (BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(16): 4606-4616.
- [22] MOLLE V, BUTTNER MJ. Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages[J]. Molecular Microbiology, 2000, 36(6): 1265-1278.
- [23] HUNT AC, SERVÍN-GONZÁLEZ L, KELEMEN GH, BUTTNER MJ. The *bldC* developmental locus of *Streptomyces coelicolor* encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(2): 716-728.
- [24] CHATER KF, BRUTON CJ, PLASKITT KA, BUTTNER MJ, MÉNDEZ C, HELMANN JD. The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility sigma factor of *B. subtilis*[J]. Cell, 1989, 59(1): 133-143.
- [25] LI WC, YING X, GUO YZ, YU Z, ZHOU XF, DENG ZX, KIESER H, CHATER KF, TAO MF. Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(24): 8368-8375.
- [26] WANG XJ, GUO SL, GUO WQ, XI D, XIANG WS. Role of *nsdA* in negative regulation of antibiotic production and morphological differentiation in

- Streptomyces bingchengensis*[J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62(6): 309-313.
- [27] SPRUSANSKY O, STIRRETT K, SKINNER D, DENOYA C, WESTPHELING J. The *bkdR* gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(2): 664-671.
- [28] STIRRETT K, DENOYA C, WESTPHELING J. Branched-chain amino acid catabolism provides precursors for the type II polyketide antibiotic, actinorhodin, via pathways that are nutrient dependent[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(1): 129-137.
- [29] SPÍŽEK J, ŘEZANKA T. Lincomycin, clindamycin and their applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(4): 455-464.
- [30] LI J, WANG N, TANG YQ, CAI XL, XU YR, LIU RH, WU H, ZHANG BC. Developmental regulator BldD directly regulates lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 518(3): 548-553.
- [31] HOU BB, LIN YW, WU HZ, GUO MJ, PETKOVIC H, TAO LY, ZHU XY, YE J, ZHANG HZ. The novel transcriptional regulator LmbU promotes lincomycin biosynthesis through regulating expression of its target genes in *Streptomyces lincolnensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2017, 200(2): e00447-e00417.
- [32] ZHAO QF, WANG M, XU DX, ZHANG QL, LIU W. Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A[J]. Nature, 2015, 518: 115-119.
- [33] BALTZ RH. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2009, 13(2): 144-151.
- [34] YAN H, LU XR, SUN D, ZHUANG S, CHEN Q, CHEN Z, LI JL, WEN Y. BldD, a master developmental repressor, activates antibiotic production in two *Streptomyces* species[J]. Molecular Microbiology, 2020, 113(1): 123-142.
- [35] MIAO V, COEFFET-LEGAL MF, BRIAN P, BROST R, PENN J, WHITING A, MARTIN S, FORD R, PARR I, BOUCHARD M, SILVA CJ, WRIGLEY SK, BALTZ RH. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 5): 1507-1523.
- [36] WITTMANN M, LINNE U, POHLMANN V, MARAHIEL MA. Role of DptE and DptF in the lipidation reaction of daptomycin[J]. The FEBS Journal, 2008, 275(21): 5343-5354.
- [37] LIAO GJ, SHI TY, XIE JP. Regulation mechanisms underlying the biosynthesis of daptomycin and related lipopeptides[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2012, 113(3): 735-741.
- [38] WANG F, REN NN, LUO S, CHEN XX, MAO XM, LI YQ. DptR2, a DeoR-type auto-regulator, is required for daptomycin production in *Streptomyces roseosporus*[J]. Gene, 2014, 544(2): 208-215.
- [39] YUAN PH, ZHOU RC, CHEN XP, LUO S, WANG F, MAO XM, LI YQ. DepR1, a TetR family transcriptional regulator, positively regulates daptomycin production in an industrial producer, *Streptomyces roseosporus* SW0702[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(6): 1898-1905.
- [40] ZHANG QL, CHEN Q, ZHUANG S, CHEN Z, WEN Y, LI JL. A MarR family transcriptional regulator, DptR3, activates daptomycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces roseosporus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(11): 3753-3765.
- [41] BURG RW, MILLER BM, BAKER EE, BIRNBAUM J, CURRIE SA, HARTMAN R, KONG YL, MONAGHAN RL, OLSON G, PUTTER I, TUNAC JB, WALLICK H, STAPLEY EO, OIWA R, OMURA S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1979, 15(3): 361-367.
- [42] GUO J, ZHAO JL, LI LL, CHEN Z, WEN Y, LI JL. The pathway-specific regulator AveR from *Streptomyces avermitilis* positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2010, 283(2): 123-133.
- [43] KITANI S, IKEDA H, SAKAMOTO T, NOGUCHI S, NIHIRA T. Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(6): 1089-1096.
- [44] PFALLER MA. Flavophospholipol use in animals: positive implications for antimicrobial resistance based on its microbiologic properties[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2006, 56(2): 150-154.

- 115-121.
- [45] MAKITRYNSKYY R, TSYPIK O, NUZZO D, PAULULAT T, ZECHEL DL, BECHTHOLD A. Secondary nucleotide messenger c-di-GMP exerts a global control on natural product biosynthesis in streptomycetes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(3): 1583-1598.
- [46] MYRONOVSKIY M, WELLE E, FEDORENKO V, LUZHETSKYY A. Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(15): 5370-5383.
- [47] MAKITRYNSKYY R, OSTASH B, TSYPIK O, REBETS Y, DOUD E, MEREDITH T, LUZHETSKYY A, BECHTHOLD A, WALKER S, FEDORENKO V. Pleiotropic regulatory genes *bldA*, *adpA* and *absB* are implicated in production of phosphoglycolipid antibiotic moenomycin[J]. *Open Biology*, 2013, 3(10): 130121.
- [48] RABYK M, OSTASH B, REBETS Y, WALKER S, FEDORENKO V. *Streptomyces ghanaensis* pleiotropic regulatory gene *wblA_{gh}* influences morphogenesis and moenomycin production[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(12): 2481-2486.
- [49] DEES MW, WANNER LA. In search of better management of potato common scab[J]. *Potato Research*, 2012, 55(3): 249-268.
- [50] BIGNELL DRD, FRANCIS IM, FYANS JK, LORIA R. Thaxtomin A production and virulence are controlled by several bld gene global regulators in *Streptomyces scabies*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(8): 875-885.
- [51] 许莹, 董胜男, 张青阳, 何浩洋, 张部昌, 刘静. 植物毒素 thaxtomins 生物合成及其分子调控研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(3): 1281-1290.
- XU Y, DONG SN, ZHANG QY, HE HY, ZHANG BC, LIU J. Biosynthesis and molecular regulation of phytotoxin thaxtomins: a review[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(3): 1281-1290 (in Chinese).
- [52] LIU J, WANG YX, HE HY, DONG SN, TANG LJ, YANG ED, WANG WY, ZHANG BC. The leucine-responsive regulatory protein SCAB_Lrp modulates thaxtomin biosynthesis, pathogenicity, and morphological development in *Streptomyces scabies*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2023, 24(2): 167-178.
- [53] LI ZL, HUANG PJ, WANG MY, WANG X, WANG LQ, KONG DK, NIU GQ. Stepwise increase of thaxtomins production in *Streptomyces albidoflavus* J1074 through combinatorial metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 187-198.