



专论与综述

多烯大环内酯类抗生素生物合成基因簇中调控因子的研究进展

张博^{1,2} 周奕腾^{1,2} 黄恺^{1,2} 樊林鸽^{1,2} 柳志强^{*1,2}

1 浙江省生物有机合成技术研究重点实验室 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学生物工程学院 浙江 杭州 310014

摘要: 多烯大环内酯类抗生素具有良好的抗真菌活性, 广泛应用于医疗卫生、食品加工和农业生产领域。随着高通量测序技术和生物信息学技术的发展, 越来越多的链霉菌抗生素生物合成基因簇被发现和鉴定, 调控因子作为生物合成基因簇中的重要组成部分, 在庞大复杂的调控网络中起着至关重要的作用。本文总结了链霉菌中重要的调控因子类型, 综述了多烯大环内酯类抗生素生物合成基因簇中调控因子的生物学功能、结合位点、作用机制等研究进展, 并展望了后续研究工作。

关键词: 链霉菌, 多烯大环内酯抗生素, 生物合成基因簇, 调控因子, 途径特异性调控

Research progress of regulators in polyene macrolide antibiotic biosynthetic gene clusters

ZHANG Bo^{1,2} ZHOU Yi-Teng^{1,2} HUANG Kai^{1,2} FAN Lin-Ge^{1,2} LIU Zhi-Qiang^{*1,2}

1 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

2 College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

Abstract: Polyene macrolide antibiotics, as effective antifungal agents, are widely used in the treatment of fungal infections, food preservatives and agricultural aspects. With the development of next-generation sequencing technology and bioinformation, numerous antibiotic biosynthetic gene clusters of *Streptomyces* have been identified. A variety of regulators encoded by regulatory genes play a crucial role in the regulatory network of *Streptomyces*. This article summarizes the important types of regulatory factors of *Streptomyces* and reviews the progress of regulatory factors of the biosynthetic gene cluster of polyene macrolide antibiotics. Combining with the functions of regulatory factors, structural binding site and regulatory mechanisms, the potential relationship and research are summarized and prospected.

Keywords: *Streptomyces*, Polyene macrolide antibiotics, Biosynthetic gene clusters, Regulators, Pathway specific regulation

Foundation items: Project from Department of Education of Zhejiang Province (Y201636181); Postdoctoral Science Foundation of China (2016M601962)

***Corresponding author:** E-mail: microliu@zjut.edu.cn

Received: 12-02-2018; **Accepted:** 07-05-2018; **Published online:** 04-06-2018

基金项目: 浙江省教育厅项目(Y201636181); 中国博士后科学基金(2016M601962)

***通信作者:** E-mail: microliu@zjut.edu.cn

收稿日期: 2018-02-12; **接受日期:** 2018-05-07; **网络首发日期:** 2018-06-04

放线菌(Actinomycetes)是发掘次级代谢产物的宝库,目前已报道的万余种天然产物是从中提取的活性物质,主要应用于人类药物、动物健康和植物保护等诸多方面,其中约有 75% 来源于链霉菌属(*Streptomyces species*)^[1]。链霉菌能够合成内酯、蒽醌、生物碱及酚类等结构复杂多样的代谢物,这些代谢物具有抗真菌、抗细菌、抗肿瘤、免疫抑制等活性^[2]。临床上使用的红霉素(Erythromycin)、万古霉素(Vancomycin)、卡那霉素(Kanamycin)和两性霉素 B (Amphotericin B)等抗生素药物均由链霉菌合成^[3]。

抗生素按照化学结构可分为 β -内酰胺类、氨基糖苷类、酰胺醇类、大环内酯类、多肽类和四环素类抗生素等多种类型,不同类型的抗生素通过不同的作用机制抑制或杀死其他微生物。多烯大环内酯类抗生素属于大环内酯类抗生素,具有多个共轭双键、羟基侧链基团及大环内酯骨架等结构;该类抗生素对细菌无作用,对真菌有抑制作用,能与真菌细胞膜上的甾醇形成复合物孔洞,使细胞内容物小分子与离子从跨膜孔洞逸出,最终造成真菌细胞的死亡^[4-5]。这种独特的抗菌机制能避免真菌产生耐药性,是治疗全身真菌感染的重要药物,具有重要的临床意义。

近年来,随着高通量测序技术的飞速发展,越来越多的链霉菌全基因组和抗生素的生物合成基因簇信息得到解析^[6-7]。在已报道的链霉菌各类次级代谢产物生物合成基因簇中,发现除合成、转运、氧化基因外,还存在大量调控基因。这些基因编码的调控因子对链霉菌的调控多属途径特异性调控(Pathway specific regulation)^[8]。随后各国学者采用基因敲除与回补、RT-PCR、DNA 足迹法(DNA footprinting)和 DNA 凝胶迁移分析(EMSA)等实验^[9],对部分调控基因的功能与机制进行研究,使链霉菌中庞大且复杂的调控网络逐渐得到解析。研究发现调控因子不仅影响生物合成基因簇中各基因的转录,还可以调节初级代谢过程和其他次级代谢途径,例如能量代谢、碳水化合物与脂类代谢、DNA

代谢和其他生物合成基因簇代谢等。本文总结了链霉菌中常见的调控因子,以及多烯大环内酯类抗生素生物合成基因簇中调控因子的研究进展,综述了这些调控因子的结构、功能和调控机制。

1 链霉菌调控因子

1.1 调控因子简介

链霉菌抗生素的生物合成基因簇中常包含一个或多个调控基因,调控作用多属于途径特异性调控,少数调控因子对链霉菌的调控属多效性调控(Pleiotropic regulation)^[10-11]。此类调控发生在转录水平,而且调控方式不仅仅通过调控因子与 DNA 靶序列简单结合,有时调控因子能够与多个基因的靶序列结合,甚至调控基因相互之间也存在级联调控作用。例如在链霉菌 *Streptomyces fradiae* 中, *tylP*、*tylQ*、*tylS*、*tylR*、*tylU* 和 *tylT* 是泰乐霉素(Tylosin)的 6 个途径特异性调控基因, *TylP* 能够抑制 *tylQ* 和 *tylS* 的表达,同时自身是 γ -丁酮内酯的受体,可进行自我调控; *TylQ* 能够抑制 *tylR* 基因表达, *TylS* 能够促进基因 *tylU* 和 *tylR* 表达, *TylU* 能够促进基因 *tylR* 表达; *tylR* 是泰乐霉素生物合成基因簇的正调控基因,同时受到 *TylQ*、*TylS* 和 *TylU* 这 3 个调控蛋白的调控^[12-13]。

1.2 调控因子的结构与功能

在鉴定出的众多链霉菌调控因子中,不同种类调控因子的结构与功能截然不同,但结构上的共性是都能与双链 DNA 结合。其中螺旋-转角-螺旋 HTH (Helix-Turn-Helix)是最常见的结合方式,锌指、螺旋-环-螺旋、 β 折叠也存在于各类调控因子中^[14]。除与 DNA 结合的结构域外,有些调控因子存在能结合其他信号因子的区域,因此根据各类调控因子结构和功能的特点,将其分为 SARP、LAL、PAS-LuxR、TetR 和 AraC 等不同家族,如图 1 所示。

SARP 家族(*Streptomyces antibiotic regulatory proteins*)是较早发现的调控因子,通常 N 端含有 TRC (Transcriptional regulatory protein, C terminal) DNA 结合域 HTH, C 端为细菌转录激活域 BTAD

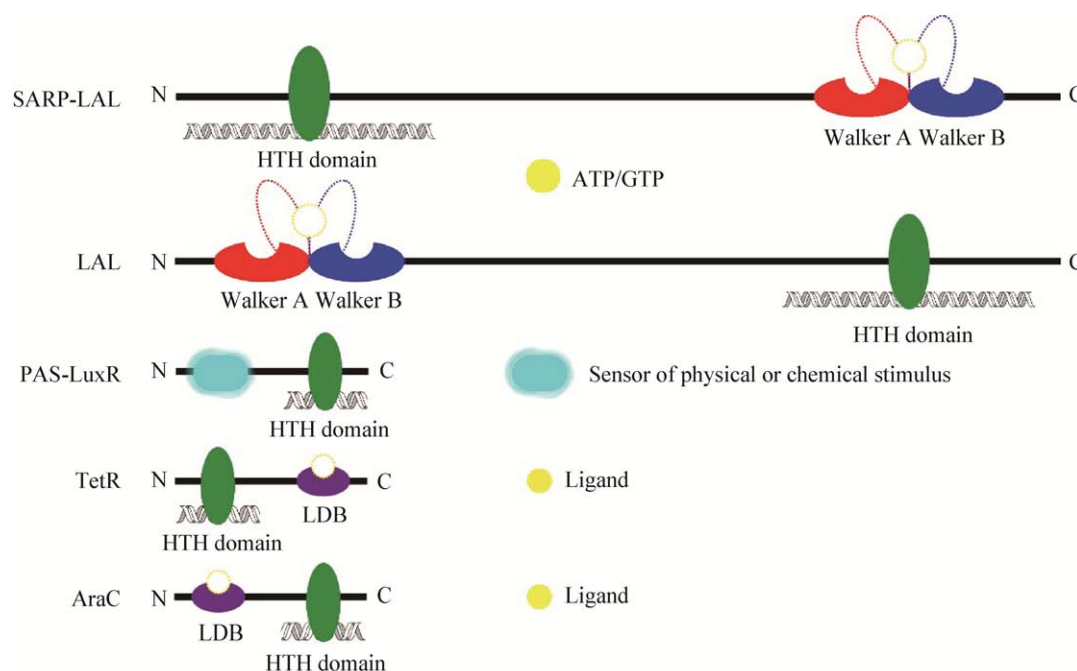


图1 链霉菌中部分调控因子示意图

Figure 1 Structures of several regulators in *Streptomyces*

(Bacterial transcriptional activator domain), 用于激活靶向基因。最典型的例子是天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中的 *redD* 和 *actII-orf 4*^[15], 分别是合成十一烷基灵菌红素(Undecylprodigiosin)和放线紫红素(Actinorhodin)的正调控基因, 两者编码的调控因子均属于 SARP 家族, 后者可以激活放线紫红素的生物合成基因簇。除此之外还有泰乐霉素中的 *TyIS* 和 *TyIT*^[12-13]、柔红霉素中的 *DnrI*^[16-17]和缬丙霉素中的 *VlmI*^[18]等也属于 SARP 家族。

上述都是 SARP 家族典型的调控因子, 通常含有 250–400 个氨基酸。同时还有一类“SAPR-LAL”型调控蛋白, 含有 1 000–1 300 个氨基酸, 与典型的 SARP 类似, N 端含有 TRC-BTAD 结构域, C 端为一段 AAA 结构域, 该结构域包含保守 Walker A 和 Walker B 的 ATP/GTP 结构域, 能够结合 ATP 参与多种细胞活动, 通常为正向调控因子。例如: 匹马霉素/纳他霉素(Pimaricin/Natamycin)中的 *PimR*^[19]和 *ScnRI*^[20], 尼克霉素(Nikkomycin)中的 *SanG*^[21], 放线菌酮(Cycloheximide)中的 *ChxA*, iso-MGS

(Iso-migrastatin)中的 *MgsA*^[22]。这些调控因子同生物合成基因簇的启动子区结合, 进而产生调控作用, 也有研究表明 SARP 家族调控蛋白存在跨基因簇调控的作用, 如将 *ChxA* 和 *MgsA* 在原始菌株中过表达, 对放线菌酮和 iso-MGS 的产量没有明显影响, 但是将这 2 个基因分别在 *Streptomyces amphibiosporus* ATCC 53964 中过表达, 能使 LTM (Lactimidomycin)产量提高 5 倍^[22]。

LAL 家族(Large ATP-binding regulators of the LuxR family)是一类 LuxR 家族中能与 ATP 结合的大型调控因子, 结构特征是 N 端含有保守的 Walker A 和 Walker B 的 ATP/GTP 结构域, C 端为 DNA 结合域 HTH, 含有 900–1 000 个氨基酸。已在多个生物合成基因簇中发现 LAL 调控因子, 比如: 苦霉素(Pikromycin)中的 *PikD*^[23], 雷帕霉素(Rapamycin)中的 *RapH*^[24], 以及制霉菌素(Nystatin)中 *NysI*、*NysII*、*NysIII*^[25]等。LAL 家族调控因子通常为正向调控因子, 并起到转录激活作用, 敲除上述调控因子的菌株无法产生对应的次级代谢产物或者产量大

幅下降, 基因回补后产量恢复到一定水平, 证明上述 LAL 调控因子是生物合成基因簇中不可或缺的正调控基因。目前也有研究发现 LAL 调控因子能够激活沉默基因簇, 在 *Streptomyces ambofaciens* 中, 把 LAL 型调控因子 *samR0484* 过表达后, 激活了一条约 150 kb 的沉默基因簇, 表达出一种 51 元环的糖基化大环内酯产物, 检测证明其具有抗癌活性^[26]。

PAS-LuxR 家族调控因子较小, 一般为 200–400 个氨基酸。N 端为 PAS 感应模块, C 端为 LuxR 型 DNA 结合域 HTH。PAS 感应模块广泛存在于自然界^[27], 与其他感应模块不同的是, PAS 结构域不仅存在于细胞质中感应胞内信号, 也能够穿过细胞膜感应环境因子, 响应各类物理或化学刺激, 如光照、氧化还原能力、溶氧、细胞能量水平、各类小分子配体、氨基酸, 以及其他正负调控因子等^[28], 最经典的模型就是匹马霉素中的 PimM^[29–30]。

TetR 家族(The tetracycline repressor)调控因子是链霉菌中较大的家族之一, 目前已发现超过 100 个 TetR 家族的基因, 通常含有 200–300 个氨基酸, 一般起到负调控作用^[31]。例如该家族的四环素调控因子 TetR^[32]是四环素外排泵 *tetA* 基因的阻遏蛋白, 还能抑制次级代谢产物合成基因以及与细胞渗透压相关的基因。其结构特征是 N 端含有约 50 个氨基酸的 DNA 结合域, C 端含有与配体结合的二聚体结构 LBD (Ligand-binding and dimerization), 多变的二聚体结构能够感应各类配体分子的刺激, 如次级代谢产物、乙醇、 γ -丁酸内酯等^[33]。上文所述泰乐霉素中的 *tylP* 便属于 TetR 家族, 编码的调控因子 TylP 位于级联调控的顶部, 作为 γ -丁酸内酯受体抑制 *tylQ* 和 *tylS* 的表达^[9]。

AraC 家族调控因子 C 端具有保守的 DNA 结合域 HTH, N 端与 TerR 家族 C 端相同, 含有用于结合配体的多变二聚体结构域 LBD。大部分 AraC 调控因子起到正调控作用, 涉及各类生理生化代谢, 如碳代谢、应激反应、形态分化与次级代谢等^[34–35]。

例如雷帕霉素 (Rapamycin) 中的 *rapG*^[24] 和 Thaxtomin 中的 *txtR*^[36] 及南昌霉素中的 *nanR4*^[37], 前两者均为生物合成基因簇的正调控因子, 而后者为南昌霉素的负调控因子。

2 多烯大环内酯类抗生素基因簇中的调控因子

2.1 多烯大环内酯类抗生素与生物合成基因簇

多烯大环内酯类抗生素 (Polyene macrolide antibiotics) 多为两性物质, 含有亲脂性的多烯区域以及亲水性的大环内酯环外多元醇区域, 还可能含有环外羧基、糖基配体等结构。如两性霉素 B (Amphotericin B) 为七烯类大环内酯抗生素, C8 位为羟基, C16 位为羧基, C19 为氨基海藻糖基团^[7,38]。其他多烯大环内酯类抗生素成员还有四烯的匹马霉素/纳他霉素 (Pimaricin/Natamycin)、龟裂菌素 (Rimocidin)、四霉素 (Tetramycin)、金褐霉素 (Anreofuscin), 五烯的菲律宾菌素 (Filipin), 六烯的制霉菌素 A1 (Nystatin A1) 和七烯的杀念菌素 (Candididin) 等, 分子结构如图 2 所示。

除结构上的共性外, 多烯大环内酯类抗生素的生物合成过程也十分相似, 均为 PKS I 型 (Polyketide synthase) 聚酮合成酶合成的抗生素。聚酮合成酶由各类模块组合将丙二酰辅酶 A 和甲基丙二酰辅酶 A 等前体合成多元大环内酯骨架, 环化后再经过糖基化、羧基化、氧化还原化等后修饰步骤形成最终产物^[39]。在上述多烯大环内酯类抗生素中, 除金褐霉素^[40]外, 匹马霉素^[41–42]、龟裂菌素^[43]、CE-108^[44]、四霉素^[45]、菲律宾菌素^[46]、制霉菌素^[47]、杀念菌素^[48–49]和两性霉素^[50–51]的生物合成基因簇均已被报道。生物合成基因簇中编码有构筑大环聚酮的 PKS 基因, 以及细胞色素 P450 单加氧酶、铁氧化还原、糖基合成等后修饰基因, 部分基因簇中还编码有 ABC 转运蛋白基因^[52–53]。除此之外, 在每个生物合成基因簇中都发现了编码调控因子的基因, 这些调控因子大多属于途径特异性调控作用, 如表 1 所示。

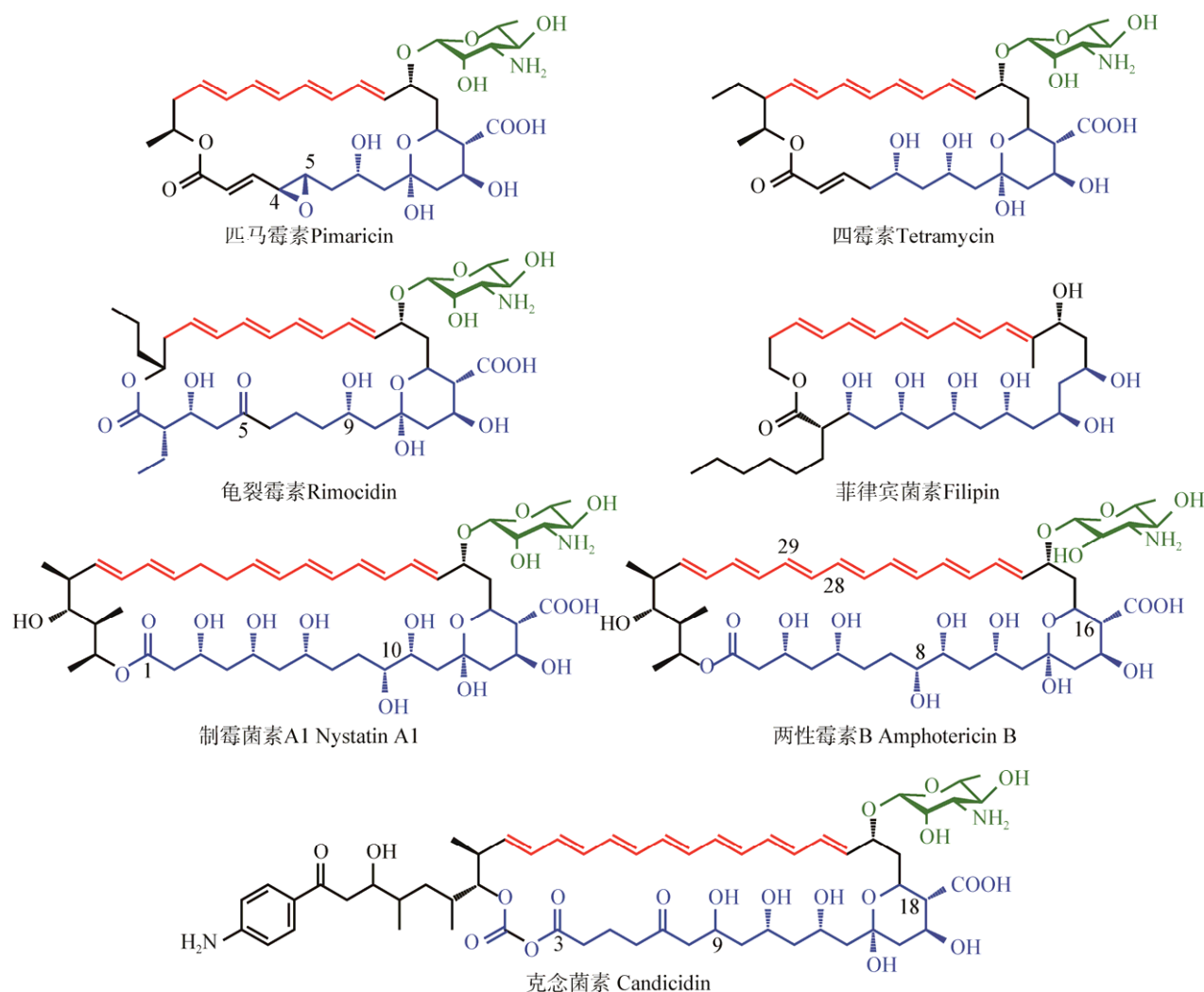


图 2 多烯大环内酯类抗生素的化学结构

Figure 2 Structures of several polyene macrolide antibiotics

2.2 生物合成基因簇中调控因子的结构与序列分析

在所有生物合成基因簇中,合成基因簇越长,大环内酯骨架越大,结构越复杂,基因簇的调控因子也逐渐增多。但是四霉素较为特殊,虽为四烯类抗生素,但编码调控基因的数目多达 4 个。将上述调控因子按同源性与结构主要分为三类家族,分别属于 PAS-LuxR、LAL 和 SARP-LAL 家族。

PAS-LuxR 家族在多烯大环内酯类抗生素生物合成基因簇中均有分布且研究较为透彻。含有 192–243 个氨基酸, N 端 PAS 结构域与 C 端 HTH

DNA 结合域高度保守。PimM 是该家族中最典型的模型,研究发现 PimM 调控因子能与操纵子启动子–35 区结合,结合位点为 5'-CTVGGGAWWTCCCBAG-3',该位点不仅在匹马霉素生物合成基因簇内被发现,在基因簇外甚至其他链霉菌中也有出现,如在合成菲律宾霉素的链霉菌基因组中,能与 PimM 结合的位点多达百个^[30]。该类调控因子不仅作为途径特异性调控因子激活次级代谢产物,还作为多效性调控因子影响初级代谢及其他次级代谢途径。

LAL 以及 SARP-LAL 家族的调控因子较大,约 900–1 200 个氨基酸。两者均含有 HTH DNA 结

表 1 多烯大环内酯类抗生素生物合成基因簇中编码的调控因子
Table 1 Regulators encoded in the polyene macrolide biosynthesis gene clusters

菌株 Strains	抗生素 Antibiotic	基因簇 Gene cluster	调控因子 Regulators	调控家族 Family of regulators
<i>S. natalensis</i>	纳他霉素	Pim (85 kb)	PimR	SAPR-LAL
	Natamycin		PimM	PAS-LuxR
<i>S. chattanoogensis</i>	纳他霉素	Scn (92 kb)	ScnRI	SAPR-LAL
	Natamycin		ScnRII	PAS-LuxR
<i>S. avermitilis</i>	菲律宾菌素	Pte (81 kb)	PteR	SAPR-LAL
	Filipin		PteF	PAS-LuxR
<i>S. filipinensis</i>	菲律宾菌素	Fil (14 kb partial)	FilR	SAPR-LAL
	Filipin		FilF	PAS-LuxR
<i>S. hygroscopicus</i>	四霉素 Tetramycin	Ttm (94 kb)	TtmRI	LAL
			TtmRII	LAL
			TtmRIII	LAL
			TtmRIV	PAS-LuxR
<i>S. noursei</i>	制霉菌素 Nystatin	Nys (124 kb)	NysRI	LAL
			NysRII	LAL
			NysRIII	LAL
			NysRIV	PAS-LuxR
<i>S. nodosus</i>	两性霉素 Amphotericin	Amph (135 kb)	AmphRI	LAL
			AmphRII	LAL
			AmphRIII	LAL
			AmphRIV	PAS-LuxR
			AmphRVI	LAL
<i>S. sp. FR-008</i>	杀念菌素 Candididin	Fsc (137 kb)	FscRI	PAS-LuxR
			FscRII	LAL
			FscRIII	LAL
			FscRIV	LAL
<i>S. aureofuscus</i>	金褐霉素 Anreofuscin	Unknown	AURJ3M	PAS-LuxR

合域和 Walker A、B 的 ATP/GTP 结构域,但方向不同,前者 HTH-LuxR 在 C 端,后者 HTH-TRC 在 N 端并拥有激活靶向基因的 BTAD。在调控因子的另一侧, Walker A 区含有甘氨酸和赖氨酸,保守序列为 GXXGXGK (X 表示任意氨基酸)。Walker B 区含有缬氨酸和天冬氨酸,保守序列为 LVXXVDD。Walker A 与 B 两区域间有约 100 个氨基酸间隔,能够使两区域间有足够的空间折叠,使活性中心与 ATP/GTP 结合。PAS-LuxR、LAL 和 SARP-LAL

三类家族调控因子的序列与结构域如图 3 所示。

通过 DNAMAN 软件对不同家族调控因子的氨基酸序列进行同源性分析,发现 PAS-LuxR 家族调控因子相似性为 66.98%,SARP-LAL 家族调控因子相似性高达 88.66%,LAL 家族调控因子相似性为 40.27%。随后用 MEGA 7.0 软件构建多烯大环内酯类抗生素所有调控因子的系统发育进化树,如图 4 所示,可以将多烯大环内酯类抗生素的调控因子分为上述 3 个家族。

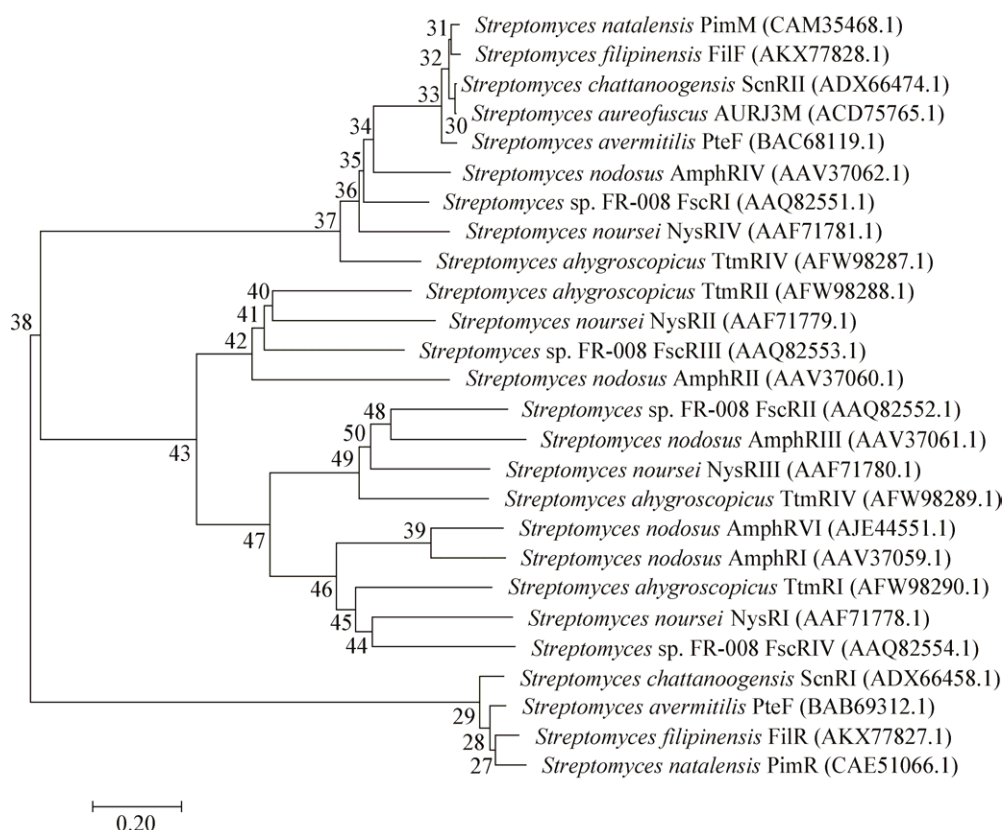


图 4 多烯大环内酯类抗生素调控因子的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of polyene macrolide biosynthesis regulators

2.3 生物合成基因簇中调控因子的功能作用

目前匹马霉素、制霉菌素、杀念菌素以及菲律宾霉素中调控因子的调控机制研究得较为清晰。其中以四烯类抗生素匹马霉素为例, 次级代谢产物匹马霉素的合成受到群感效应、环境因子和物理化学信号等一系列复杂因素的影响, 其调控因子 PimR^[54] 和 PimM^[55] 是关键作用因素之一, 如图 5 所示。Anton 等通过 RT-PCR 分析 $\Delta pimR$ 和 $\Delta pimM$ 敲除突变株基因簇中各基因的转录情况, 发现在 $\Delta pimR$ 敲除突变株中, 基因转录水平低, 除 *pimE* 基因不发生转录外, 其他基因均能转录, 无匹马霉素产生; 在 $\Delta pimM$ 敲除突变株中, 除 *pimE*、*pimH*、*pimM*、*pimR* 转录不受影响外, 簇内其他基因转录均下调, 与 $\Delta pimR$ 敲除菌株相同, 无次级代谢产物匹马霉素产生; 将 *pimM* 回补入 $\Delta pimM$ 突变株后, 匹马霉素能够恢复合成。将 *pimM* 与其天然启动子整合到野

生型菌株 *Streptomyces natalensis* 基因组后, 匹马霉素产量提高为原菌株的 2.4 倍, 菌体生长没有明显变化。PimM 属于 PAS-LuxR 家族的调控因子, 所有多烯大环内酯类抗生素均含有该类调控因子。Santosaberturas 等^[56]研究发现在产多烯大环内酯类抗生素的链霉菌中, 利用强启动子 *ermE***p* 过表达调控因子 PimM, 可以提高菌株中两性霉素、菲律宾霉素和龟裂霉素的含量, 分别提高 60%、100% 和 24%。

在合成菲律宾霉素的 *Streptomyces avermitilis* 中, 将与 *pimM* 相似性 94% 的 *pteF* 敲除后, 发现 $\Delta pteF$ 敲除突变株的菲律宾霉素产量下降为原来的 38%, 同时平板上孢子形成时间延迟。随后将 *pteF* 基因回补或导入 *pimM* 后, 菲律宾菌素产量和孢子形成又恢复到原来水平, 说明该类调控因子不仅具有特异性调控特性, 还具有多效性调控行为。Aparicio 等

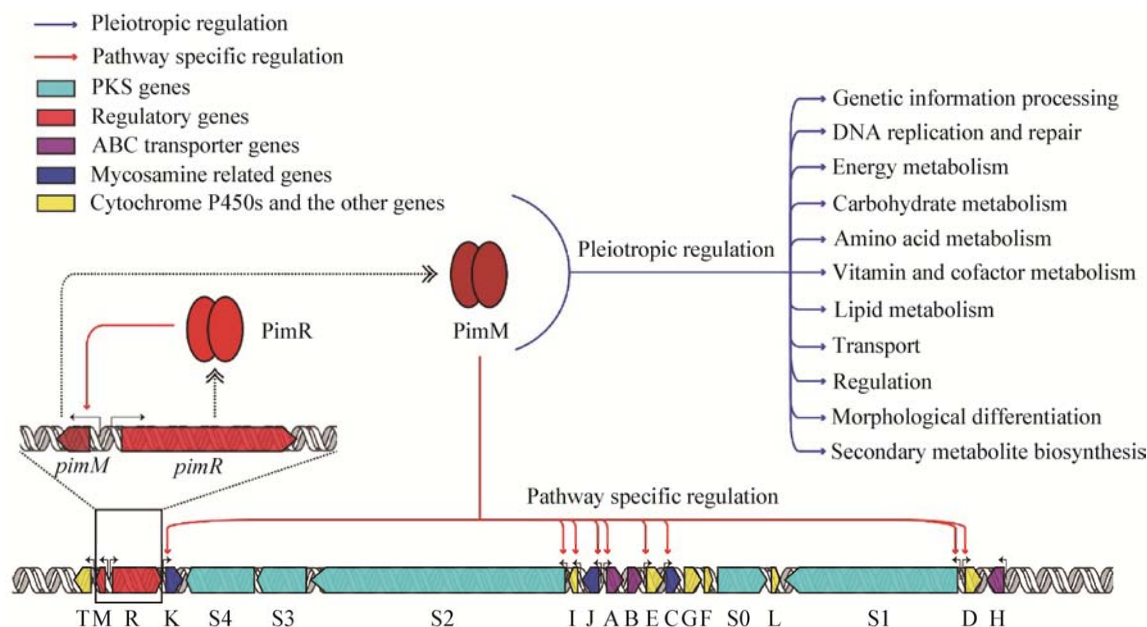


图5 匹马霉素生物合成中的调控体系

Figure 5 The pathway specific and pleiotropic regulation net in pimarin biosynthesis

随后分析 PimM/PteF 调控因子与 DNA 启动子的结合位点,发现在菲律宾霉素生物合成基因簇外还有 97 个结合位点,其中 2 个位于寡霉素(大环内酯络合物)的生物合成基因簇中,这些启动子涉及 DNA 复制修复、遗传信息处理、氨基酸、脂类、碳水化合物代谢以及形态分化等诸多基因^[30]。将 *pteF* 整合到 *S. avermitilis* 基因组增加拷贝数后,寡霉素的产量在 48 h 时提高 100%,证明 PAS-LuxR 家族的调控因子能够影响链霉菌的初级代谢与次级代谢途径,作为正调控因子激活并影响自身生物合成基因簇,还能跨途径影响其他代谢物的合成,因此部分学者猜测,这类调控因子能激活链霉菌其他沉默基因簇^[57]。

制霉菌素、两性霉素、克念菌素和四霉素的生物合成基因簇中均有 LAL 家族的调控基因,已研究报道的 LAL 家族调控基因有制霉菌素 *NysRI*、*NysRII*、*NysRIII* 和四霉素 *ttmRI*、*ttmRII*、*ttmRIII* 及克念菌素 *FscIV*。与敲除 PAS-LuxR 类调控因子(*TtmRIV*、*NysRIV*、*FscI*)的表型不同,分别敲除上述任意一个 LAL 家族的调控基因不会导致产物完

全丧失,但抗生素的产量均明显降低^[24]。如制霉菌素的敲除突变株中, $\Delta NysRI$ 、 $\Delta NysRII$ 和 $\Delta NysRIII$ 菌株的产量分别为野生菌株的 0.5%、7.0% 和 9.0%,随后的基因回补实验发现制霉菌素产量增加或能恢复到原始水平。又如在两性霉素中,与导入空载体相比,利用强启动子 *ermE***p* 过表达 LAL 家族的调控基因 *AmphRI* 和 *AmphRII*,两性霉素产量分别提高 7% 和 10%;过表达 PAS-LuxR 家族的调控基因 *AmphRIV*,两性霉素产量能提高 24.2%。证明这些调控基因在生物合成过程中均属于途径特异性激活因子,能够调控各自的生物合成基因簇^[56]。

LAL 家族的调控基因也存在着类似匹马霉素的分级调控体系,如在产四霉素菌株 *Streptomyces ahgrosopicus* 中,利用 RT-PCR 与 EMSA 分析发现, *TtmRI*、*TtmRII*、*TtmRIII* 和 *TtmRIV* 存在复杂的自调控、联级调控和协同调控, *TtmRIV* 能直接或间接调控生物合成基因簇中的合成、转运和后修饰基因,而不能调控其他 3 个 *ttmRI*、*ttmRII*、*ttmRIII* 基因的表达,而这 3 个调控基因均能调控 *ttmRIV* 的表达。*ttmRI*、*ttmRII*、*ttmRIII* 形成的转录单元受到

TtmRI、TtmRII、TtmRIII 的调控^[58]。学者还发现 *ttmRII* 不仅能调控四霉素的生物合成, 还对链霉菌孢子色素的合成具有调控作用。 $\Delta ttmRII$ 敲除突变株的菌苔为白色, 回补菌株与原始菌株均为灰色, 这也是首次报道 LAL 家族的调控因子具有多效性调控作用, 但目前 LAL 调控因子间相互作用及其与 RNA 聚合酶的作用机制还有待研究。

3 展望

由于链霉菌生物合成基因簇中普遍含有调控基因, 因此深入研究各类调控因子的结构、生物学功能和作用机制, 不仅能够解析链霉菌庞大复杂的调控网络, 而且还能让研究者们有的放矢地改造各类菌株, 提高抗生素的生产能力, 达到工业生产要求。目前在多烯大环内酯类抗生素中, 对匹马霉素生物合成调控机制的解析最为清晰, 制霉菌素、克念菌素、菲律宾霉素和四霉素的调控机制仍在不断完善中, 而有关两性霉素的调控机制鲜有报道。

关于调控因子的大多数研究集中在改变调控基因的表达水平, 以及通过分析基因簇内其他基因的转录水平和次级代谢产物的变化情况, 确定调控因子的自调控、联级调控和协同调控作用。但目前的研究发现部分调控因子还有多效调控作用, 不仅能够调控生物合成基因簇, 还能改变菌体形态和代谢水平, 调控初级代谢途径和其他次级代谢途径, 因此簇内调控因子对簇外基因的调控作用需要进一步的研究。同时, 有关调控因子与结合位点的研究仍存在阻碍, 主要由于 LAL 家族调控蛋白较大, 在大肠杆菌中难以正确折叠复性, 因此不能进行 DNA 凝胶迁移分析(EMSAs)确定启动子结合位点, 但近年来发展了很多用于研究 DNA 与蛋白相互作用的新兴技术, 如染色质免疫共沉淀测序(ChIP-seq)^[59]和 ALPHA 技术(Amplified luminescent proximity homogeneous assay)^[60]为获得精确的启动子结合位点提供可能。此外, 有关调控因子与 RNA 聚合酶、小分子化合物和其他调控因子间相互作用的研究较少, 阻碍了对链霉菌调控网络的进一步解析。相

信随着检测技术的发展, 研究者们能够更加深入精准地研究调控因子和调控机制。

综上所述, 尽管链霉菌的调控机制仍需进一步剖析, 但调控因子已经为我们提供了提高多烯大环内酯类抗生素产量的改造策略, 如增加生物合成基因簇内正调控因子的拷贝数、敲除非目标基因簇的激活因子以及结合多效调控和全局调控间的代谢途径等, 通过改变链霉菌基因的调控水平进而提高抗生素产量, 对生产菌株的遗传改良具有较高的应用价值。

REFERENCES

- [1] Watve MG, Tickoo R, Jog MM, et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?[J]. Archives of Microbiology, 2001, 176(5): 386-390
- [2] Olano C, Lombó F, Méndez C, et al. Improving production of bioactive secondary metabolites in *actinomycetes* by metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(5): 281-292
- [3] Baltz RH. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other *Actinomycetes*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(2/3): 343-370
- [4] Yamamoto T, Umegawa Y, Tsuchikawa H, et al. Role of polyol moiety of amphotericin B in ion channel formation and sterol selectivity in bilayer membrane[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015, 23(17): 5782-5788
- [5] Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(5): 400-406
- [6] Sweeney P, Murphy CD, Caffrey P. Exploiting the genome sequence of *Streptomyces nodosus* for enhanced antibiotic production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(3): 1285-1295
- [7] Caffrey P, De Poire E, Sheehan J, et al. Polyene macrolide biosynthesis in *Streptomyces* and related bacteria: recent advances from genome sequencing and experimental studies[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(9): 3893-3908
- [8] Aceti DJ, Champness WC. Transcriptional regulation of *Streptomyces coelicolor* pathway-specific antibiotic regulators by the *absA* and *absB* loci[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(12): 3100-3106
- [9] Ray S, Maitra A, Biswas A, et al. Functional insights into the mode of DNA and ligand binding of the TetR family regulator TylP from *Streptomyces fradiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(37): 15301-15311
- [10] Guyet A, Gominet M, Benaroudj N, et al. Regulation of the *clpP1clpP2* operon by the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces lividans*[J]. Archives of Microbiology, 2013, 195(12): 831-841
- [11] Huang X, Ma T, Tian J, et al. *wblA*, a pleiotropic regulatory

- gene modulating morphogenesis and daptomycin production in *Streptomyces roseosporus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 669-677
- [12] Bibb M. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(2): 208-215
- [13] Cundliffe E, Bate N, Butler A, et al. The tylosin-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2001, 79(3/4): 229-234
- [14] Romero-Rodríguez A, Robledo-Casados I, Sánchez S. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms, 2015, 1849(8): 1017-1039
- [15] Sevcikova B, Kormanec J. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions[J]. Archives of Microbiology, 2004, 181(5): 384-389
- [16] Prija F, Srinivasan P, Das S, et al. DnrI of *Streptomyces peucetius* binds to the resistance genes, *drmAB* and *drmC* but is activated by daunorubicin[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(10): 862-872
- [17] Malla S, Niraula NP, Liou K, et al. Improvement in doxorubicin productivity by overexpression of regulatory genes in *Streptomyces peucetius*[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(2): 109-117
- [18] Garg RP, Parry RJ. Regulation of valanimycin biosynthesis in *Streptomyces viridifaciens*: characterization of VlmI as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP)[J]. Microbiology, 2010, 156(2): 472-483
- [19] Santos-Aberturas J, Vicente CM, Payero TD, et al. Hierarchical control on polyene macrolide biosynthesis: PimR modulates pimaricin production via the PAS-LuxR transcriptional activator PimM[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38536
- [20] Du YL, Li SZ, Zhou Z, et al. The pleiotropic regulator AdpA_{ch} is required for natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis*[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 5): 1300-1311
- [21] Du DY, Zhu Y, Wei JH, et al. Improvement of gougerotin and nikkomycin production by engineering their biosynthetic gene clusters[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(14): 6383-6396
- [22] Zhang B, Yang D, Yan YJ, et al. Overproduction of lactimidomycin by cross-overexpression of genes encoding *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(5): 2267-2277
- [23] Mo S, Yoon YJ. Interspecies complementation of the LuxR family pathway-specific regulator involved in macrolide biosynthesis[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(1): 66-71
- [24] Kuscer E, Coates N, Challis I, et al. Roles of *rapH* and *rapG* in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(13): 4756-4763
- [25] Sekurova ON, Brautaset T, Sletta H, et al. In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(5): 1345-1354
- [26] Laureti L, Song LJ, Huang S, et al. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(15): 6258-6263
- [27] Vogt JHM, Schippers JHM. Setting the PAS, the role of circadian PAS domain proteins during environmental adaptation in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 513
- [28] Hefti MH, François KJ, De Vries SC, et al. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(6): 1198-1208
- [29] Santos-Aberturas J, Payero TD, Vicente CM, et al. Functional conservation of PAS-LuxR transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(6): 756-767
- [30] Vicente CM, Payero TD, Santos-Aberturas J, et al. Pathway-specific regulation revisited: cross-regulation of multiple disparate gene clusters by PAS-LuxR transcriptional regulators[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 5123-5135
- [31] Bhukya H, Jana AK, Sengupta N, et al. Structural and dynamics studies of the TetR family protein, CprB from *Streptomyces coelicolor* in complex with its biological operator sequence[J]. Journal of Structural Biology, 2017, 198(2): 134-146
- [32] Bhukya H, Anand R. TetR regulators: a structural and functional perspective[J]. Journal of the Indian Institute of Science, 2017, 97(2): 245-259
- [33] Berens C, Hillen W. Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(15): 3109-3121
- [34] Liu G, Chater KF, Chandra G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(1): 112-143
- [35] Brautaset T, Lale R, Valla S. Positively regulated bacterial expression systems[J]. Microbial Biotechnology, 2009, 2(1): 15-30
- [36] Joshi MV, Bignell DRD, Johnson EG, et al. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 66(3): 633-642
- [37] Yu Q, Du AQ, Liu TG, et al. The biosynthesis of the polyether antibiotic nanchangmycin is controlled by two pathway-specific transcriptional activators[J]. Archives of Microbiology, 2012, 194(6): 415-426
- [38] Caffrey P, Aparicio JF, Malpartida F, et al. Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2008, 8(8): 639-653
- [39] Martín JF, Aparicio JF. chapter 10 Enzymology of the polyenes pimaricin and candicidin biosynthesis[J]. Methods in Enzymology, 2009, 459(9): 215-242
- [40] Wei J, Song W, Shi J. The properties of Aureofuscin and its production research progress [J]. Journal of Liaoning University (Natural Science Edition) 2014, 41(3): 275-280 (in Chinese)

- 魏杰, 宋威, 石佳. 金褐霉素的特性及生产研究进展[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2014, 41(3): 275-280
- [41] Aparicio JF, Fouces R, Mendes MV, et al. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*[J]. Chemistry & Biology, 2000, 7(11): 895-905
- [42] Liu SP, Yuan PH, Wang YY, et al. Generation of the natamycin analogs by gene engineering of natamycin biosynthetic genes in *Streptomyces chattanoogensis* L10[J]. Microbiological Research, 2015, 173: 25-33
- [43] Seco EM, Pérez-Zúñiga FJ, Rolón MS, et al. Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in *Streptomyces diastaticus* var. 108[J]. Chemistry & Biology, 2004, 11(3): 357-366
- [44] Escudero L, Alrefai M, Nieto C, et al. New rimocidin/CE-108 derivatives obtained by a crotonyl-CoA carboxylase/reductase gene disruption in *Streptomyces diastaticus* var. 108: substrates for the polyene carboxamide synthase PcsA[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135891
- [45] Ren J, Cui YQ, Fan Z, et al. Enhancement of nystatin production by redirecting precursor fluxes after disruption of the tetramycin gene from *Streptomyces ahyscopicus*[J]. Microbiological Research, 2014, 169(7/8): 602-608
- [46] Vicente CM, Santos-Aberturas J, Payero TD, et al. PAS-LuxR transcriptional control of filipin biosynthesis in *S. avermitilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(22): 9311-9324
- [47] Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, et al. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway[J]. Chemistry & Biology, 2000, 7(6): 395-403
- [48] Chen S, Huang X, Zhou XF, et al. Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex[J]. Chemistry & Biology, 2003, 10(11): 1065-1076
- [49] Campelo AB, Gil JA. The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570[J]. Microbiology, 2002, 148(1): 51-59
- [50] Caffrey P, Lynch S, Flood E, et al. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes[J]. Chemistry & Biology, 2001, 8(7): 713-723
- [51] Zhang B, Zhang HD, Zhou YT, et al. Researches on the gene clusters of amphotericin B and its combinatorial biology[J]. Science & Technology Review, 2017, 35(19): 74-80 (in Chinese)
- 张博, 张海东, 周奕腾, 等. 两性霉素 B 合成基因簇及其组合生物学进展[J]. 科技导报, 2017, 35(19): 74-80
- [52] Sletta H, Borgos SEF, Bruheim P, et al. Nystatin biosynthesis and transport: *nysH* and *nysG* genes encoding a putative ABC transporter system in *Streptomyces noursei* ATCC 11455 are required for efficient conversion of 10-deoxynystatin to nystatin[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(11): 4576-4583
- [53] Liu J, Jiang CY, Zhang BC, et al. Involvement of ABC transporter genes *slnTI* and *slnTII* in salinomycin biosynthesis[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 58-66 (in Chinese)
- 刘静, 姜春艳, 张部昌, 等. ABC转运蛋白基因 *slnTI* 和 *slnTII* 与盐霉素生物合成的相关性[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 58-66
- [54] Antón N, Mendes MV, Martín JF, et al. Identification of PimR as a positive regulator of pimaricin Biosynthesis in *Streptomyces natalensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(9): 2567-2575
- [55] Antón N, Santos-Aberturas J, Mendes MV, et al. PimM, a PAS domain positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*[J]. Microbiology, 2007, 153(Pt 9): 3174-3183
- [56] Aparicio JF, Barreales EG, Payero TD, et al. Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: biosynthesis and its regulation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(1): 61-78
- [57] Mclean TC, Hoskisson PA, Seipke RF. Coordinate regulation of antimycin and candicidin biosynthesis[J]. mSphere, 2016, 1(6): e00305-16
- [58] Cui H, Ni XP, Shao W, et al. Functional manipulations of the tetramycin positive regulatory gene *ttmRIV* to enhance the production of tetramycin A and nystatin A1 in *Streptomyces ahyscopicus*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(9): 1273-1282
- [59] Ribarska T, Gilfillan GD. Native chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq) from low cell numbers[A]//Visa N, Jordán-Pla A. Chromatin Immunoprecipitation. New York, NY: Humana Press, 2018, 1689: 157-166
- [60] Kirsch J, Siltanen C, Zhou Q, et al. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine[J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(22): 8733-8768