

卡西霉素生物合成基因簇中调控基因 *calR1* 的功能苟丽霞¹, 蔡楠¹, 刘孟欣¹, 汪志军², 韩铁生^{*3}

1 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

2 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

3 华北理工大学公共卫生学院 河北省煤矿卫生与安全重点实验室, 河北 唐山 063210

苟丽霞, 蔡楠, 刘孟欣, 汪志军, 韩铁生. 卡西霉素生物合成基因簇中调控基因 *calR1* 的功能[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1195-1204.

GOU Lixia, CAI Nan, LIU Mengxin, WANG Zhijun, HAN Tiesheng. Functional analysis of the regulatory gene *calR1* in calcimycin biosynthetic gene cluster[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1195-1204.

摘要: 【背景】卡西霉素(calcimycin)是重要的离子载体抗生素, 其生物合成基因簇已从酿酒链霉菌 NRRL3882 的基因组 DNA 中成功克隆, 但基因簇内的部分生物合成基因及调控基因的功能有待研究。【目的】研究卡西霉素产生菌酿酒链霉菌 NRRL3882 中编码 Ty1R 家族同源转录调控蛋白的 *calR1* 基因的功能。【方法】通过 PCR-targeting 的方法, 构建 *calR1* 基因敲除突变株及回补菌株, 对突变菌株及回补菌株进行发酵, 通过 HPLC 分析其代谢产物。利用荧光定量 PCR 检测 $\Delta calR1$ 突变菌株和野生菌株的生物合成基因转录水平。【结果】*calR1* 基因敲除突变株丧失产生卡西霉素的能力, 但仍有中间产物噻唑霉素的积累, 回补菌株中卡西霉素的产量有一定程度的恢复。RT-qPCR 结果表明, 卡西霉素合成相关的一些重要基因 *calC*、*calG*、*calU3* 等基因的表达量明显改变。【结论】Ty1R 家族转录调控基因 *calR1* 是卡西霉素生物合成的调控基因。

关键词: 卡西霉素; Ty1R 家族; 调控基因; 生物合成

资助项目: 国家自然科学基金(31700083); 河北省自然科学基金(H2020209001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31700083) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2020209001).

*Corresponding author. E-mail: ts_han@163.com

Received: 2022-06-09; Accepted: 2022-08-18; Published online: 2022-10-08

Functional analysis of the regulatory gene *calR1* in calcimycin biosynthetic gene cluster

GOU Lixia¹, CAI Nan¹, LIU Mengxin¹, WANG Zhijun², HAN Tiesheng^{*3}

¹ College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei, China

² State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

³ Hebei Provincial Key Laboratory of Occupational Health and Safety for Coal Industry, School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei, China

Abstract: [Background] Calcimycin is an essential ionophoric antibiotic. The gene cluster for calcimycin biosynthesis has been cloned from the genome of *Streptomyces chartreusis* NRRL3882, but functions of some biosynthetic genes and regulatory genes in calcimycin biosynthesis remain unclear. **[Objective]** To study the functions of the putative regulatory gene *calR1* encoding TylR-family transcriptional regulator in the biosynthetic gene cluster of calcimycin. **[Methods]** The *calR1*-knockout mutant and complementary strain were constructed by PCR-targeting and fermented, and their metabolites were analyzed by HPLC. The transcriptions of biosynthetic genes in Δ *calR1* mutant and wild-type strain were analyzed by RT-qPCR. **[Results]** Δ *calR1* mutant lost the ability to produce calcimycin, while the accumulation of cezomycin was observed. The complementary strain restored the production of calcimycin to a certain degree. The transcriptions of some essential genes, including *calC*, *calG*, and *calU3*, were substantially changed in Δ *calR1* mutant compared with those in the wild-type strain. **[Conclusion]** The putative TylR-family transcription regulatory gene *calR1* is involved in calcimycin biosynthesis.

Keywords: calcimycin; TylR-family; regulatory gene; biosynthesis

卡西霉素(calcimycin, A23187, 图 1)是1972年Reed等在链霉菌NRRL3882中发现的聚醚类化合物,其结构由 α -酮基吡咯、螺缩酮及苯并噁唑3部分组成^[1-2]。卡西霉素是重要的离子载体抗生素,目前已有17 000多篇文献对其报道,其能与生理上重要的阳离子如钙离子、镁离子等结合,形成脂溶性复合物通过生物膜,进而发挥药理作用^[3]。近年来,研究者发现卡西霉素通过将细胞外的钙离子逆浓度梯度泵入卵母细胞,从而有效激活卵母细胞,因此广泛应用于辅助生殖的临床实践中^[4-5]。基于卡西霉素独特的结构特征和广泛的生理活

性^[6-8],其生物合成途径的研究引起科学家的广泛关注。

对卡西霉素生物合成途径的研究始于1980年^[9-10]。2011年,Wu等^[11]从链霉菌NRRL3882中克隆到负责合成卡西霉素的基因簇。根据生物信息学预测,*calA1-A5*是5个聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS)基因,负责螺缩酮的合成;*calN1-N3*负责 α -酮基吡咯的合成;*calT*为抗性基因;*calR1-R3*为3个调控基因;*calU1-U5*为未知功能基因。2013年,我们通过基因敲除及喂养实验证实基因簇上的*calB1-B4*基因负责3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA, 苯并噁

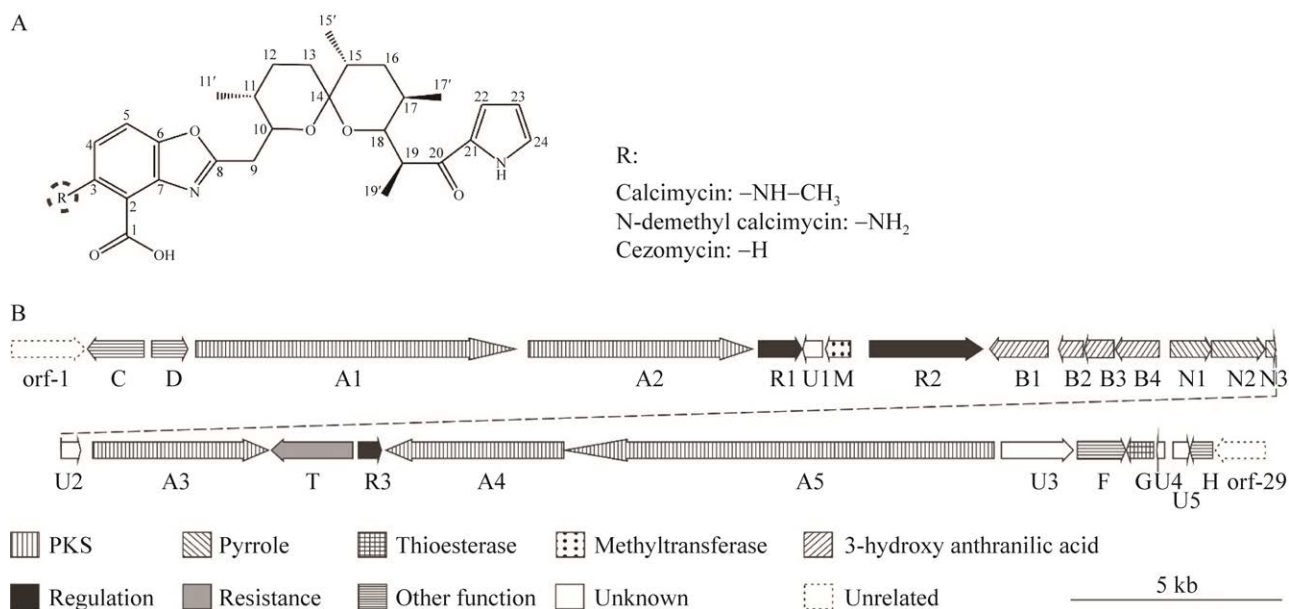


图 1 卡西霉素化学结构(A)及生物合成基因簇(B)^[1]

Figure 1 Structure (A) and biosynthetic gene cluster (B) of calcimycin^[1].

啉环的前体物)的生物合成^[12], 并通过体外催化实验证实 CalM 负责卡西霉素中苯并咪唑结构的氮甲基化^[13]。2018 年, Wu 等通过体内实验证实了 CalC 是一种 ATP 依赖的 cezomycin-CoA 连接酶^[14], 而硫酯酶 CalG 催化 cezomycin-CoA 复合物的解离^[15]。

卡西霉素生物合成基因簇上共有 3 个可能的转录调控基因 *calR1*、*calR2* 和 *calR3*, 分别属于 TylR、LuxR 和 TetR 家族。前期工作中, 我们通过基因敲除、回补及体外催化实验证实 *calR3* 是卡西霉素生物合成中的负调控基因, *calR3* 基因缺失突变株的卡西霉素产量提高了 7 倍^[16]。通过构建 *calR2* 基因缺失突变菌株并对其代谢产物及突变株基因转录水平分析, 证实 *calR2* 在卡西霉素的生物合成中起正调控作用^[1]。

本研究以另一个潜在的调控基因 *calR1* 为研究对象, 生物信息学比对分析发现, CalR1 与泰乐菌素(tylosin)生物合成基因簇中的调控因子 TylR 及碳霉素(carbomycin)生物合成基因

簇的调控因子 AcyB2 均具有较高的相似性。本研究通过 PCR-targeting 的方法, 构建 *calR1* 基因中断的突变株、利用整合型回补质粒 pJTU2170 载体构建 $\Delta calR1:calR1$ 的回补菌株, 对 $\Delta calR1$ 突变菌株及回补菌株的发酵产物进行 HPLC 分析, 并比较分析在野生型及突变型菌株中卡西霉素生物合成关键基因的转录差异, 以期初步阐明 *calR1* 基因对卡西霉素产量的影响, 为卡西霉素生物合成调控网络的研究提供有力依据, 并为后续利用分子生物学手段提高卡西霉素产量奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

Escherichia coli ET12567/pUZ8002 用于接合转移, BW25113/pIJ790 用于 PCR-targeting 敲除宿主目的基因, 整合型质粒 pJTU2170 用于突变株的回补, 以上菌株及质粒均来自上海交通

大学分子微生物学实验室, 具体信息见表 1。

1.1.2 培养基

LA 及 LB 培养基^[13]用于大肠杆菌培养; TSBY 培养基^[13]用于链霉菌总 DNA 及 RNA 的提取; SFM 固体培养基^[13]及 SFM 液体培养基分别用于链霉菌的培养及发酵。

1.1.3 主要试剂和仪器

KOD plus 和 *rTaq*, TOYOBO 公司; 限制性内切酶, New England Biolabs 公司; RNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、FastQuant RT Kit 和 SuperReal qPCR PreMix (SYBR Green) 试剂盒, 天根生化科技有限公司; 卡西霉素标准品, Sigma-Aldrich 公司。抗生素、如氨基苄霉素、卡那霉素、阿泊拉霉素、氯霉素的浓度及 HPLC、LC/MS 条件见文献[1]。

恒温摇床 ZWF-200、恒温培养箱 ZXRD-B2050, 上海智城分析仪器制造有限公司; 用于 DNA 定量的 ScanDrop200, 耶拿分析仪器股份公司; 用于 RT-qPCR 的 ABI7900HT, 应用生物系统公司; HPLC (Agilent 1200)、LC/MS (Agilent 6410) 及 ZORBAX SB-C18 色谱

柱(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm), 安捷伦科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CalR1 蛋白的序列比对分析

CalR1 (GenBank 登录号为 AEH42475.1)、TylR (GenBank 登录号为 AAF29380.1)、AcyB2 (GenBank 登录号为 ALK28498.1) 的氨基酸序列采用 Clustal Omega 工具进行序列比对^[18], 采用 Needleman-Wunsch BLAST 方法进行一致性和相似性的两两比较。

1.2.2 *calR1* 基因敲除突变菌株的构建

本研究中, *calR1* 基因敲除采用的是 PCR-targeting 方法。设计引物 R1-F1 和 R1-F2 (表 2), PCR 扩增用于敲除 *calR1* 基因的替换片段。通过 *Escherichia coli* BW25113/pIJ790 的 λ-RED 重组系统将含有阿泊拉霉素抗性基因及 *oriT* 的 cassette 与柯斯质粒 p16F9 上的 *calR1* 基因进行双交换同源重组, 获得重组质粒 pJTU3789。pJTU3789 的接合转移及接合子筛选条件同文献[1]。挑取接合子扩大培养, 提取其基因组 DNA, 采用引物 R1-F3 和 R1-F4 (表 2) 进行 PCR

表 1 菌株及质粒特性

Table 1 Characteristics of strains and plasmids

Strain or plasmid	Characteristics	Resource
Strain		
<i>E. coli</i>		
BW25113/pIJ790	<i>RepA101(ts)</i> , <i>araBp-gam-be-exo</i> , <i>araC</i> , Cml	[17]
ET12567/pUZ8002	Kan, CmL, <i>dcmdam hsdS</i> Tra ⁺	[17]
DH10B	<i>lacZ ΔM15F⁻recA</i>	Invitrogen
<i>Streptomyces chartreusis</i>		
NRRL3882	Wild type	NRRL
GLX24	<i>calR1</i> disruption mutant	This study
GLX27	GLX24 complemented with <i>calR1</i>	This study
Plasmid		
p16F9	CmL, <i>repE ori2 oriV</i>	[11]
pJTU3789	p16F9 derived plasmid carrying a defective <i>calR1</i> , Apr	This study
pJTU2170	<i>aac(3)IV</i> , <i>lacZ</i> , <i>rep^{puc}</i> , <i>attΦC31</i> , <i>oriT</i>	[11]
pJTU2170-R1	pJTU2170 containing <i>calR1</i>	This study

表 2 本研究所用 PCR 引物

Table 2 PCR primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Size (bp)	Usage
RTC-F1	CGGCTGGGGTCATTGTT	17	<i>calC</i> RT-qPCR
RTC-F2	AAGGCGTTCGACTTGTA	17	
R1-F1	TTGCCCCGACGCGACCAGCGCGGGCGCGGCTCGACTACATTCCGG GGATCCGTCGACC	59	Disruption of <i>calR1</i>
R1-F2	CCGGCGCACCGGGTCGCCCAGCCAGACACCCGACAGCAGTGTAGG CTGGAGCTGCTTC	58	
R1-F3	CCGTGCGACCGATCGAAC	18	GLX24 and GLX27
R1-F4	GCACCGCACACATCTCCA	18	validation
R1-F5	GGAGTTCATATGATCACCGGACACGACCTCGAAG	35	
R1-F6	CCGGAATTCGAGAACGACATCCTGCTGACCCT	32	

扩增验证。链霉菌基因组 DNA 的提取方法及 PCR 反应体系、条件见文献[1]。

1.2.3 *calR1* 基因回补菌株的构建

设计引物 R1-F5 和 R1-F6 (表 2), 以酿酒链霉菌 NRRL3882 的基因组 DNA 为模板, 通过高保真的 KOD-plus DNA 聚合酶扩增完整的 *calR1* 基因。PCR 产物通过限制性内切酶 *Nde* I 及 *Eco*R I 酶切后连接到 pJTU2170 上, 构建回补质粒 pJTU2170-R1。在辅助质粒 pUZ8002 的协助下, 通过大肠杆菌和链霉菌之间的两亲本接合转移, 将 pJTU2170-R1 导入到 $\Delta calR1$ 突变株中, 采用卡那霉素抗性筛选, 并使用 PCR 扩增回补菌株的总 DNA 以验证回补是否成功。

1.2.4 菌株发酵及发酵产物分析

将野生菌株 NRRL3882、突变菌株 GLX24 及回补菌株 GLX27 ($\Delta calR1:calR1$) 的孢子接种培养。种子液及发酵的培养条件、发酵液的收集、萃取、浓缩, 以及 HPLC 或 LC/MS 检测分析条件见文献[1], 其中色谱检测程序: 0–5 min, 70% 甲醇等梯度洗脱; 6–20 min, 70%–90% 甲醇洗脱; 21–40 min, 90%–100% 甲醇洗脱; 41–45 min, 100% 甲醇洗脱。

1.2.5 链霉菌总 RNA 的提取和反转录

将野生 NRRL3882 菌株和突变菌株 GLX24 的孢子接种于 TSBY 培养基中, 30 °C、220 r/min

培养 5 d, 吸取少量菌液于 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。然后按照 Total RNA Isolation Kit 操作说明提取 RNA, 之后将去除 DNA 的 RNA 反转录为 cDNA, 根据 FastQuant RT Kit 的操作说明书进行, 详见文献[1]。

1.2.6 卡西霉素生物合成基因转录水平检测

采用荧光定量 PCR 分析野生菌株及 *calR1* 中断的突变株的卡西霉素生物合成相关基因的转录水平。以 cDNA 为模板, 16S rRNA 基因为内参, 根据 $\Delta\Delta C_t$ 的计算公式^[1], 通过比较 C_t 值计算目标基因在突变菌株和野生菌株的转录水平差异。根据卡西霉素生物合成相关基因的功能及其在基因簇上的分布筛选了 14 个目标基因, 其中 *calC* 的 RT-qPCR 引物序列见本文表 2, 其他基因的引物见文献[1]的表 2。根据 SuperReal qPCR PreMix 试剂盒配制 20 μ L Real-time PCR 反应体系: 10 μ L Super Real SYBR Green PreMix, 上、下游引物(300 nmol/L)各 3 μ L; 模板 cDNA (4 ng/ μ L) 4 μ L。PCR 反应条件见文献[1]。

2 结果与分析

2.1 CalR1 的生物信息学分析

如图 2 的氨基酸序列比对显示, CalR1 与兽药抗生素泰乐菌素生物合成基因簇中的调控因

```

CalR1 -----MITGHDLEGPGL-DAGAGSVDEVLDLDCDAIFASLPRSDQGRGLDYHLHGLIHARGRKSIRNIAISLFGGRAAEQR 74
TylR  MSAVTGATPVTEPWFVLPGRASVPAVRTPDAAGDPCAAGDLCTDVLATLRRSDQRRKGERYVHGLLHTFGRKTIRNIAAWIGEHAGEQS 89
AcyB2  MHSIPCGSKPSASMWDT-----GVHDDFDTHISETCSELFSSIRRADQRRKGEQYVRGLLTAQGRKTARNLAAFVGEAADQN 78

CalR1  LHHFVCGSTWRWDPMRAALAGYVAAVEPPAAWVVRPVIPIKTEGENSVGVERDASPAL----YACRAVGVWLASERLACPVNWRLLISGVW 160
TylR  LHHFTSSSTWDLRRLRRLARLRLEQELAPRAWVVRFMVVPKAGTQSVGVERRYPHLRQTVNSQHSWGLWYASESGAVPWNWQLSTIGDGW 179
AcyB2  LHHFVAGSTWDRSVRAALARYADQTVRGLAWVIRPMVVYKAGGRSVGVGRRFVVDLGRVVSQQSYGLWLASDAMSAFVNWHLLTGGGP 168

CalR1  LGDVFRRRAQAGIPAGACPESEMCAVQASVRVARGWGLTARPVVVDVPEVDTLAVLGRIRTAGLRRLLVVRVDGGLRLAAADAALFVRS-D 249
TylR  LGDEGLRRRAAIPRELRARPSEAVAAGIV-GETAGWGLPRKPLVMDARELPVASLIRALS-AAGQPFMLRIDNGTLLAPGLSGAGRP-- 265
AcyB2  GDRHD-RQ-----LSAYGEEKLVDLVAELTRSRLVLRPVVMDARIATLPLRLVRLS-AADQSFLRVSGDLPLALAGSRGQLDRRA 249

CalR1  RYRSAGEIMRAAAPLRRFPYWRAPVVSPPGGRGGLLAARVVRVPAASLGAGA-----AGRHGDLLLLCLAGPGEQWFGELWLT 326
TylR  VTATAARLAEELARSQRRFVWVDPFAEPAVPTSLALLPVCWPGLLPVPGTVARPGGAAGNGTRRPPARSLVLAEWQPDVSRVVELWVT 355
AcyB2  QVWFVQHLMEQLKRLRFPVWQGSISFVAPCN-----VVLTDLQLPQRTLLLFVWRANRRRPADLWLT 312

CalR1  DSVSAPADLRLTQLVRRVSRDAVEISEQVGRDFVGRSFTGWHRHMTLASAAHAVQALARPSSGQPGAVS----- 398
TylR  NMTDAGRGILLRLGKFLRRVETGSACAGHDVGLRDFEGRSYEGWHRHWTLASLAHAMWVLAAPD-----TFAAGRRATA 430
AcyB2  DLTSWNRGALLRLAAMLTCRVDADFVSLVGVIRDFGRSFTGWHRHWTLASLAHALRLSCTDTARTPTAPALSR----- 387

```

图 2 CalR1 蛋白和同源蛋白氨基酸序列比对 CalR1 (GenBank 登录号为 AEH42475.1)来源于 *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882; TylR (GenBank 登录号为 AAF29380.1)来源于 *Streptomyces fradiae*; AcyB2 (GenBank 登录号为 ALK28498.1)来源于 *Streptomyces thermotolerans*

Figure 2 Amino acid sequence alignment of CalR1 with its homologous proteins. CalR1 (GenBank accession No.: AEH42475.1) from *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882; TylR (GenBank accession No.: AAF29380.1) from *Streptomyces fradiae*; AcyB2 (GenBank accession No.: ALK28498.1) from *Streptomyces thermotolerans*.

子 TylR^[19-21], 以及源自耐热链霉菌(*Streptomyces thermotolerans*)的碳霉素生物合成基因簇的调控因子 AcyB2^[22-25]均具有较高的相似性。其中 CalR1 与 TylR 的一致性和相似性分别为 38%和 49%, 与 AcyB2 的一致性和相似性分别为 37%和 49%。这提示我们, CalR1 可能为卡西霉素生物合成途径的调控因子。

2.2 calR1 基因敲除突变菌株与回补菌株的构建

为了确认 *calR1* 基因的功能, 通过 PCR-targeting 技术, 对教酒链霉菌 NRRL3882 基因组上的 *calR1* 基因进行敲除及回补实验, 通过双交换同源重组构建了用于敲除 *calR1* 基因的基因敲除质粒 pJTU3789, 见图 3A。将 pJTU3789 转入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002, 接着与野生菌株接合转移, 筛选含阿泊拉霉素抗性的接合子。通过 PCR 验证接合子的基因型, 其中双交换突变株 GLX24 的 PCR 扩增片段为 1 760 bp,

而野生菌株的扩增片段为 750 bp, 结果见图 3B, 与预期相吻合。

将本研究构建的 *calR1* 基因回补质粒 pJTU2170-R1 导入到突变菌株 GLX24 ($\Delta calR1$) 中获得回补菌株 GLX27($\Delta calR1:calR1$), 提取回补菌株 GLX27 的 DNA, PCR 扩增验证。因为 pJTU2170 为整合型质粒, 所以回补菌株含有 750 bp 的野生型条带及 1 760 bp 的重组条带(图 3C)。

2.3 菌株代谢产物分析

将 *S. chartreusis* NRRL3882、GLX24 及 GLX27 分别进行液体发酵, 30 °C、220 r/min 培养 7 d, 采用 HPLC 分析发酵产物, 以 calcimycin 标准品作为阳性对照。HPLC 结果见图 4, 野生菌株产生卡西霉素及 cezomycin^[12], 突变菌株 GLX24 失去产生卡西霉素的能力, 但有 cezomycin 的积累, 结合文中 2.1 的生物信息学预测结果, 说明 *calR1* 基因可能在卡西霉素的生物合成中起

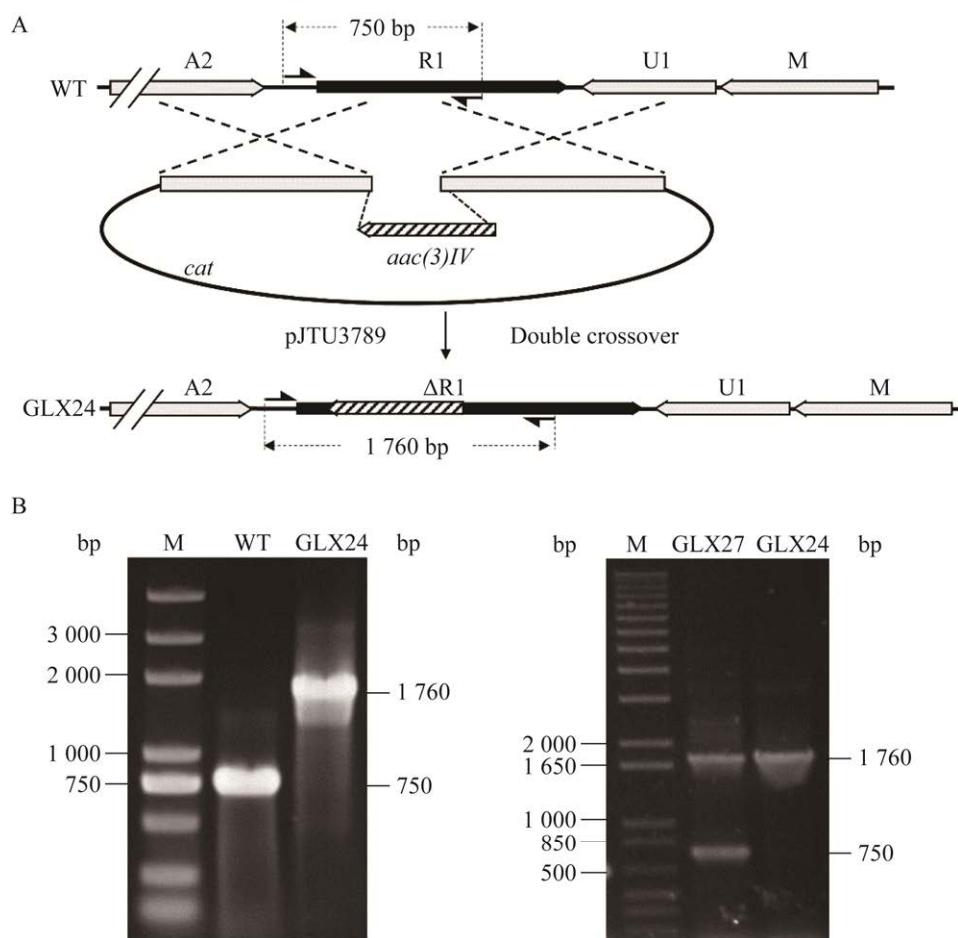


图3 突变菌株 GLX24 的构建及 GLX24 与回补菌株 GLX27 的 PCR 验证 A: 通过基因置换用 *aac(3)IV* 抗性基因中断 *calR1* 基因得到突变菌株 GLX24. B: 突变株 GLX24 与回补菌株 GLX27 的 PCR 验证. M: DNA molecular weight marker; WT: 以野生菌株的总 DNA 为模板的扩增产物; GLX24: 以突变株 GLX24 的总 DNA 为模板的扩增产物; GLX27: 以回补菌株 GLX27 的总 DNA 为模板的扩增产物

Figure 3 Construction of the GLX24 mutant, and PCR verification of the mutant GLX24 and the complementation strain GLX27. A: A schematic diagram elucidating the generation of GLX24. B: Validation of the mutant strain GLX24 and complementation strain GLX27 by PCR analysis. M: Marker; WT: PCR product using total DNA of wild-type strain as template; GLX24: PCR product using total DNA of the mutant GLX24 as template; GLX27: PCR product using total DNA of the complementation strain GLX27 as template.

调控功能, 可能负责从 *cezomycin* 至卡西霉素之间的转化。*calR1* 基因对突变株 GLX24 进行回补后, 回补菌株 GLX27 恢复产生卡西霉素的能力, 表明 *calR1* 基因中断对卡西霉素产量的影响并不是由极性效应产生, 进一步说明 *calR1* 基因在卡西霉素生物合成中的调控作用。

2.4 RT-qPCR 分析卡西霉素生物合成相关基因转录水平

通过 RT-qPCR 分析 *calR1* 基因对卡西霉素合成相关基因的转录调控, 提取培养 96 h (平台期)^[16] 的 *S. chartreusis* NRRL3882 与 GLX24 的总 RNA, 分析卡西霉素生物合成基因簇上 14 个

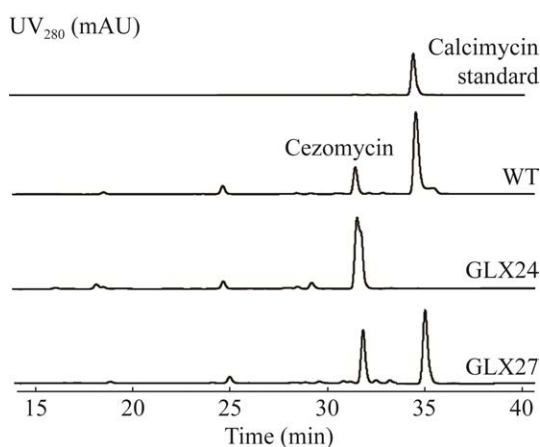


图4 野生菌株(WT)、GLX24 (突变株)与 GLX27 (回补菌株)发酵产物的 HPLC 检测 卡西霉素标准品作参照

Figure 4 HPLC analysis of the metabolites of wild-type, *calR1* knock-out mutant strain GLX24 and complementary strain GLX27. Calcimycin standard as control.

不同功能基因(图 5)的转录水平,测定这些基因在突变菌株与野生菌株的转录差异,各基因的分布及预测的功能见图 1B。

结果如图 5 所示,与野生型相比,突变株

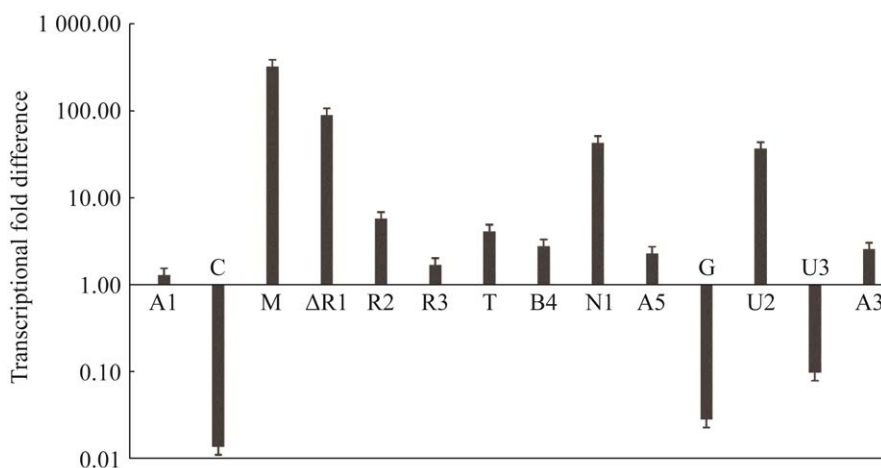


图5 GLX24 与野生型菌株的目标基因转录水平差异分析 纵轴为各基因在 GLX24 中相较于野生型菌株中的转录水平差异倍数

Figure 5 Detection of the difference of transcription level between the wild-type strain and GLX24 mutant. The vertical axis is the fold difference in the transcription level of each gene in GLX24 relative to the wild-type strain.

中 *calC*、*calG* 和 *calU3* 的转录水平显著下降,而其他 11 个基因的转录水平均有明显上升。由图 4 可知, *calR1* 基因的敲除导致中间产物 *cezomycin* 大量积累,几乎不产生终产物 *calcimycin*。因此,在野生型菌株中, *calR1* 可能通过正调控 *calC*、*calG* 及 *calU3* 的转录水平,促进 *cezomycin* 向 *calcimycin* 的转化。

3 讨论与结论

calR1 在生物信息学预测中属于 Ty1R 家族基因,但该家族基因的实验研究较少,目前只有泰乐菌素生物合成基因簇中的 *tylR* 及碳霉素生物合成基因簇的 *acyB2* 有研究报道。本研究通过将 *calR1* 基因进行敲除及回补,通过代谢产物比较分析,证实其负责调控从中间产物 *cezomycin* 向终产物卡西霉素的转化。卡西霉素在 3 位上比 *cezomycin* 多一个甲氨基(图 1A),因此 *calR1* 可能负责调控 *cezomycin* 的 3 位氨基化。

通过对基因簇中 14 个代表性基因进行转录水平差异检测,发现敲除 *calR1* 后, *calC*、

calG、*calU3* 的转录水平均显著下降(分别下降约 0.013、0.028、0.01 倍)。最近的研究报道显示, CalC 与 *cezomycin* 在 3 位的活化有关^[14], 而 CalG 催化 CalC 的逆反应^[15]。*Cezomycin* 经 CalC 活化后, 可能经过多步反应在 CalU3 等蛋白作用下 3 位氨基化(CalU3 功能研究待发表), 然后由 CalM 进一步甲基化^[13], 形成终产物卡西霉素。因此 *calC* 转录水平的显著下调将阻碍 *cezomycin* 的进一步反应, 这与本研究观察到的敲除 *calR1* 前后基因转录水平差异结果相一致。

敲除 *calR1* 后, *calM* 等 11 个基因的转录水平均有不同程度的上升, 显示 *calR1* 是一个识别位点较宽泛的转录调控因子, 该性质与 *tylR* 相似。在 *Streptomyces fradiae* 中敲除 *tylR* 后, 泰乐菌素生物合成基因簇中有至少 19 个基因转录水平下调或不表达, 同时至少有 13 个基因转录水平上调^[19]。这种生物合成途径内的“全局性”调控现象, 可能与 CalR1 或 TylR 的 DNA 结合结构域的认识特异性有关。

敲除 *calR1* 后, *calR2*、*calR3* 的转录水平均有不同程度上升(图 5), 显示 3 个调控基因之间可能具有相互作用。已有的研究显示, 敲除 *calR2* 后, *calR1*、*calR3* 的转录水平基本无变化, 而 *calA1*、*calA3*、*calA5*、*calM*、*calB4*、*calT*、*calU2* 等基因均显著下调, 导致完全不产卡西霉素及 *cezomycin*^[1]。敲除 *calR3* 后, *calR2* 转录水平约上升 3 倍, *calR1* 基本不变, 除了 *calA1* 略有下降, 其余关键基因的转录水平均有不同程度上升, 其中 *calT* 的转录水平大约上升 170 倍, 导致卡西霉素的产量上升了约 8 倍^[16]。综合以上基因转录差异数据, 可推测 *calR1* 负调控 *calR3* 及 *calR2*, *calR3* 也负调控 *calR2*, 但该推测还需要进一步实验验证, 因其可能并非直接调控关系, 可能涉及中间产物产量变化等导致的间接调控。关于高产菌株改造, *calR1* 及 *calR2*

与卡西霉素的高产关系还不明确, 需要进一步研究, 而敲除 *calR3* 的突变株产量提升明显, 有望改造成工业发酵高产菌株。综上所述, 本研究通过基因敲除回补、代谢产物比较分析、基因转录差异检测等鉴定了 *calR1* 为卡西霉素生物合成途径中的调控因子, 其可能通过调控 *calC*、*calG* 及 *calU3* 的表达, 催化中间产物 *cezomycin* 转化为卡西霉素。本研究将为揭示卡西霉素的 3 位甲氨基化修饰机制打下良好基础。

REFERENCES

- [1] 盖婧璇, 韩铁生, 刘文秀, 武策, 汪志军, 苟丽霞. 卡西霉素生物合成调控基因 *calR2* 的功能[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 1518-1526.
- [2] GE JX, HAN TS, LIU WX, WU C, WANG ZJ, GOU LX. Function of the regulatory gene *calR2* involved in calcimycin biosynthesis[J]. Microbiology China, 2018, 45(7): 1518-1526 (in Chinese).
- [3] REED PW, LARDY HA. A23187: a divalent cation ionophore[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(21): 6970-6977.
- [4] REED PW. Effects of divalent cation ionophore A23187 on potassium permeability of rat erythrocytes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1976, 251(11): 3489-3494.
- [5] XU ZW, YAO GD, NIU WB, FAN HY, MA XS, SHI SL, JIN HX, SONG WY, SUN YP. Calcium ionophore (A23187) rescues the activation of unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and chromosome analysis of blastocyst after activation[J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 692082.
- [6] SAMPAIO B, ORTIZ I, RESENDE H, FELIX M, VARNER D, HINRICHS K. Factors affecting intracellular calcium influx in response to calcium ionophore A23187 in equine sperm[J]. Andrology, 2021, 9(5): 1631-1651.
- [7] HOLLAND DR, STEINBERG MI, ARMSTRONG WM. A23187: a calcium ionophore that directly increases cardiac contractility (38704)[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N. Y.), 1975, 148(4): 1141-1145.
- [8] MATSUSHIMA K, OPPENHEIM JJ. Calcium ionophore (A23187) increases interleukin 1 (IL-1)

- production by human peripheral blood monocytes and interacts synergistically with IL-1 to augment concanavalin A stimulated thymocyte proliferation[J]. *Cellular Immunology*, 1985, 90(1): 226-233.
- [8] KAN KS, COLEMAN R. The calcium ionophore A23187 increases the tight-junctional permeability in rat liver[J]. *The Biochemical Journal*, 1988, 256(3): 1039-1041.
- [9] ZMIJEWSKI MJ Jr. Biosynthesis of antibiotic A23187. incorporation of precursors into A23187[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1980, 33(4): 447-450.
- [10] DAVID L, EMADZADEH S. Biosynthesis of the ionophorous antibiotic A23187[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1982, 35(11): 1616-1617.
- [11] WU QL, LIANG JD, LIN SJ, ZHOU XF, BAI LQ, DENG ZX, WANG ZJ. Characterization of the biosynthesis gene cluster for the pyrrole polyether antibiotic calcimycin (A23187) in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(3): 974-982.
- [12] GOU LX, WU QL, LIN SJ, LI XM, LIANG JD, ZHOU XF, AN DR, DENG ZX, WANG ZJ. Mutasynthesis of pyrrole spiroketal compound using calcimycin 3-hydroxy anthranilic acid biosynthetic mutant[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 8183-8191.
- [13] WU QL, GOU LX, LIN SJ, LIANG JD, YIN J, ZHOU XF, BAI LQ, AN DR, DENG ZX, WANG ZJ. Characterization of the N-methyltransferase CalM involved in calcimycin biosynthesis by *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. *Biochimie*, 2013, 95(7): 1487-1493.
- [14] WU H, LIANG JD, WANG JL, LIANG WJ, GOU LX, WU QL, ZHOU XF, BRUCE IJ, DENG ZX, WANG ZJ. Cezomycin is activated by CalC to its ester form for further biosynthesis steps in the production of calcimycin in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(12): e00586-e00518.
- [15] WU H, LIANG JD, GOU LX, WU QL, LIANG WJ, ZHOU XF, BRUCE IJ, DENG ZX, WANG ZJ. Recycling of overactivated acyls by a type II thioesterase during calcimycin biosynthesis in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(12): e00587-e00518.
- [16] GOU LX, HAN TS, WANG XX, GE JX, LIU WX, HU F, WANG ZJ. A novel TetR family transcriptional regulator, CalR3, negatively controls calcimycin biosynthesis in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2371.
- [17] KIESER T, BIBB MJ, BUTTNER MJ, CHATER KF, HOPWOOD DA. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. John Innes Foundation, Norwich, 2000.
- [18] MADEIRA F, PARK YM, LEE J, BUSO N, GUR T, MADHUSOODANAN N, BASUTKAR P, TIVEY ARN, POTTER SC, FINN RD, LOPEZ R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools *APIs* in 2019[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W636-W641.
- [19] STRATIGOPOULOS G, BATE N, CUNDLIFFE E. Positive control of tylosin biosynthesis: pivotal role of TyrR[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(5): 1326-1334.
- [20] BATE N, BIGNELL DRD, CUNDLIFFE E. Regulation of tylosin biosynthesis involving ‘SARP-helper’ activity[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(1): 148-156.
- [21] CUNDLIFFE E. Control of tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(9): 1485-1491.
- [22] ARISAWA A, KAWAMURA N, TSUNEKAWA H, OKAMURA K, TONE H, OKAMOTO R. Cloning and nucleotide sequences of two genes involved in the 4"-O-acylation of macrolide antibiotics from *Streptomyces thermotolerans*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57(12): 2020-2025.
- [23] ZHONG JJ, LU ZL, DAI JL, HE WQ. Identification of two regulatory genes involved in carbomycin biosynthesis in *Streptomyces thermotolerans*[J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(7): 1023-1033.
- [24] 刘娟娟, 张妍, 赫卫清. 利用 CRISPR-Cas9 系统与核糖体工程获得新型可利霉素产生菌[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 2116-2126.
- LIU JJ, ZHANG Y, HE WQ. Construction of a novel carrimycin-producing strain by using CRISPR-Cas9 and ribosome engineering techniques[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(6): 2116-2126 (in Chinese).
- [25] DAI JL, WANG YG, LIU JJ, HE WQ. The regulatory genes involved in spiramycin and bitespiramycin biosynthesis[J]. *Microbiological Research*, 2020, 240: 126532.