



圈卷产色链霉菌 *san7324* 和 *san7324L* 基因阻断对形态分化和尼可霉素产生的影响

孙军^{1,2}, 李敬敬², 李月², 王川⁴, 蔡原^{1*}, 谭华荣^{2,3*}

¹ 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

² 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

³ 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

⁴ 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

摘要:【目的】圈卷产色链霉菌全局性调控基因 *wblA* 阻断突变后, 尼可霉素不再产生。RNA-seq 和转录分析表明 *san7324* 基因在野生型菌株中可以正常转录, 而在 *wblA* 阻断突变株($\Delta wblA$)中不能转录, 为此本文旨在揭示 *san7324* 与尼可霉素产生的关系。【方法】利用同源双交换策略对 *san7324* 进行基因阻断, 而后通过基因遗传回补及对尼可霉素生物合成相关基因的转录分析等方法研究 *san7324* 的功能。

【结果】在相同培养条件下, 阻断突变株 $\Delta san7324$ 与野生型菌株相比失去了合成尼可霉素的能力。我们通过同源比对发现圈卷产色链霉菌中还存在一个与 *san7324* 同源的基因 *san7324L*, 该基因的阻断导致尼可霉素产量降低。当 *san7324* 和 *san7324L* 两个基因同时被阻断后, 得到的突变株 $\Delta san7324-san7324L$ 生长稀疏而且不能正常发育分化形成灰色表型的孢子或孢子链, 只能形成白色表型的气生菌丝, 同时也丧失了合成尼可霉素的能力。当这两个基因(*san7324-san7324L*)回补双突变株后, 则恢复了野生型的表型(能形成孢子链并恢复尼可霉素的产生)。进一步的研究初步表明 *san7324* 和 *san7324L* 的阻断主要影响了尼可霉素生物合成基因簇中途径特异性调控基因 *sanG* 的转录水平, 从而影响圈卷产色链霉菌的发育分化和尼可霉素的产生。【结论】该结果为链霉菌形态分化与生理代谢关系的研究提供了更多的证据, 同时为多效调控基因 *wblA* 作用机制的阐明奠定了基础。

关键词: 圈卷产色链霉菌, 基因阻断, 形态分化, 尼可霉素

随着越来越多耐药菌株的出现和新疾病的发生, 人类急需大量的新药来应对这种危机和挑战。

虽然目前临床上使用的抗生素的 60% 来源于链霉菌, 但随着测序技术的快速发展和大量链霉菌基

基金项目: 国家自然科学基金(31771378, 31571281)

*通信作者: 蔡原, E-mail: caiyuan@gsau.edu.cn; 谭华荣, E-mail: tanhr@im.ac.cn

收稿日期: 2018-03-06; 修回日期: 2018-03-19; 网络出版日期: 2018-04-24

因组的序列分析,人们发现链霉菌基因组中所含有的次级代谢产物生物合成基因簇的数量远大于已经阐明其产物结构的次级代谢产物合成基因簇。这些在实验室条件下不表达或其产物难以被检测到的基因簇,被称为隐性基因簇。激活这些天然存在的隐性基因簇,是获得新型抗生素的重要手段。目前微生物来源的一万多种天然抗生素只占到了自然界中可能存在的抗生素总量的极少部分^[1-2]。激活隐性基因簇的方法有多种^[3],其中对调控基因的遗传操作是最为直接和有效的。调控基因在抗生素的生物合成中起到了一个开关的作用,它可决定一种抗生素生物合成的起始与终止的精细调控过程。其中正调控基因的高效表达不但可以激活相关隐性基因簇的表达,而且还可提高抗生素的产量^[4-5]。同时,负调控基因的敲除可以使相关隐性基因簇解除阻遏而表达,同时也可使相关抗生素产量提高^[6]。因此,调控基因在抗生素生物合成中的作用仍然是值得关注和发展的研究课题。

链霉菌具有复杂的发育分化周期,关键过程之一即气生菌丝分隔形成孢子链并释放出游离孢子。如果该过程中相关基因被阻断,链霉菌就不能正常发育分化形成灰色的成熟孢子而只能形成白色的气生菌丝。此过程是由多个基因控制的,这些基因被命名为 *whi* 基因^[7-8]。其中 *whiB* 作为发育调控相关基因最先在天蓝色链霉菌中被发现^[9],通过基因组序列分析表明在链霉菌中大量存在类似于 *whiB* 的基因(*whiB*-like, *wbl*)如 *wblA*,而且这一类基因只存在于放线菌中^[7-9]。*wblA* 的破坏或缺失不仅能够导致链霉菌形成白色表型,而且提高了放线紫红素(*actinorhodin*, Act)、十一烷基灵菌红素(*undecylprodigiosin*)、阿霉素

(*doxorubicin*)、*tautomycetin* 和默诺霉素(*moenomycin*)的产量^[9-12]。而在恰塔努链霉菌(*Streptomyces chattanoogensis* L10)中,*wblA* 的破坏则导致纳他霉素(*natamycin*)不能合成^[13]。通过与天蓝色链霉菌的序列比对,发现在圈卷产色链霉菌(*Streptomyces ansochromogenes*)的基因组中存在一个和 *whiB* 类似的基因,且它编码的蛋白和天蓝色链霉菌中的 *WblA* 的序列同源性非常高(一致性为 96%),因此这个基因也被命名为 *wblA*^[14]。为了研究圈卷产色链霉菌中 *wblA* 的功能,我们通过同源双交换获得了 *wblA* 阻断突变株。通过表型观察、活性检测以及 HPLC 分析,揭示了 *wblA* 阻断突变导致尼可霉素(*nikkomycin*)不能产生,而激活了一种隐性抗生素的合成。质谱和核磁共振分析证实,得到的三种新化合物的化学结构与泰乐菌素的结构类似。抑菌活性检测结果表明,这 3 个化合物对肺炎链球菌的抑菌活性比泰乐菌素高 10 倍左右^[15]。

为了阐明 *wblA* 突变激活基因簇表达的分子机制,通过使用 RNA-seq^[16]和 DACA (DNA affinity capture assay)方法^[17],发现与野生型(wild-type, WT)菌株相比,在 $\Delta wblA$ 突变株中有很多基因明显地出现转录上调和下调,其中 *san7324* 基因在野生型菌株中可正常转录,而在突变株 $\Delta wblA$ 中不能转录。同时发现圈卷产色链霉菌基因组上还存在一个与 *san7324* 同源性较高的基因 *san7324L*(一致性为 72%)^[17]。在上述工作的基础上,本文通过对 *san7324* 和 *san7324L* 基因的阻断突变研究它们在形态分化和尼可霉素生物合成中的功能,为阐明多效调控基因 *wblA* 作用的分子机制提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 圈卷产色链霉菌 7100 (*S. ansochromogenes* 7100) 做为本研究的主要研究材料, 为本实验室保存; 白色念珠菌 (*Candida albicans*) 用于尼可霉素生物活性检测指示菌, 为本实验室保存; 用于基因遗传操作的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 (*dam⁻ dcm⁻ hsdM*) 和 JM109 (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F['][traD36, proAB+lacIq, lacZΔM15]*) 均为本实验室保存; 大肠杆菌-链霉菌穿梭载体 pKC1139 (*Apr^r*), 含有链霉菌温度敏感 pSG5 复制子, 用于基因破坏; pSET152 (*Apr^r*), 链霉菌整合型质粒, 用于基因互补; pSJ101,

pKC1139 衍生质粒, 用于 *san7324* 阻断; pSJ102, pKC1139 衍生质粒, 用于 *san7324L* 阻断。

1.1.2 培养基和培养条件: 培养大肠杆菌使用 LB 培养基, 培养圈卷产色链霉菌使用 MS 培养基、YEME 培养基和 MM^[15,18] (甘露醇为唯一碳源) 培养基。尼可霉素发酵培养基使用 SP^[15,18]。培养白色念珠菌的是 PDA (取去皮的土豆 100 g, 加 900 mL 蒸馏水, 煮沸 15–20 min, 四层纱布过滤, 滤液中加入 10 g 葡萄糖, 并定容至 1000 mL。固体 PDA 培养基中加入 1% 的琼脂) 培养基。大肠杆菌的培养温度为 37 °C, 链霉菌的培养温度为 28 °C, 白色念珠菌在固体 PDA 培养基上 28 °C 培养 5 d, 而在 37 °C 时, 过夜培养即可^[15]。

1.1.3 引物: 本文所用引物都由 Thermo Fisher Scientific 试剂公司合成, 引物序列见表 1。

表 1. 本研究所用引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences(5'→3')	Restriction sites
san7324-up-F	GCTCTAGATGAAGTTTCCCGAGCTACGTGATGG	<i>Xba</i> I
san7324-up-R	CGCGGATCCCGTCATCCGCCCAACTGGTC	<i>Bam</i> H I
san7324-dn-F	CGCGGATCCCGCCCGGTACGCCATCCTCGACATCA	<i>Bam</i> H I
san7324-dn-R	CCGGAATTCTGGGCAGCCCGTCGCTGTGGAC	<i>Eco</i> R I
san7324-ex-F	GGAATTCCATATGCCCGAGCAGGACGCGGCCGTATC	<i>Nde</i> I
san7324-ex-R	ATAAGAATGCGGCCGCCGGATGCTCTCATTCGCGTGCGCC	<i>Not</i> I
san7324L-up-F	GCTCTAGACGGGCATATCCGCCAGCACCTTC	<i>Xba</i> I
san7324L-up-R	AAC <u>TGCAG</u> CAGGGCGTCGAGCACGGCCTTGCC	<i>Pst</i> I
san7324L-dn-F	AAC <u>TGCAG</u> GAGTGCCTCGTCTCCGGCATC	<i>Pst</i> I
san7324L-dn-R	CCCAAGCTTGAACCGACTCGCACCTGACGC	<i>Hind</i> III
san7324L-F	TCCCCGAAGGGGGAGGCGTA	
san7324L-R	ACACGACCGGGCATGAAGTCGAT	
RTsanG-F	GGAGGTCATCCGTGTCAACT	
RTsanG-R	GGAAGTCCATCTGGTCCGAG	
RTsanO-F	TCCGCCGTGAACCGCTACTTC	
RTsanO-R	GGCACGCTCAGGAAGGTCGT	
RTsanN-F	GACCTGACGCCAGCAGAGT	
RTsanN-R	TCGAGGTTTCAGTCGTGAGGCG	
RTsanF-F	GAACCTCGTGGACCTCATCGT	
RTsanF-R	TGGTCGGCTTGTCCCTTGTGT	
23S-F	CTCACCTACTAACCGCTTGGT	
23S-R	CAGGGTAAGTCGGGACCTAA	

The underlines are restriction enzyme sites.

1.1.4 抗生素、酶及试剂: 卡那霉素(100 mg/mL H₂O), 安普霉素(100 mg/mL H₂O), 氯霉素(25 mg/mL 100%乙醇), 萘啶酮酸(100 mg/mL 0.1 mol/L NaOH)作为储备液于-20 °C 保存。在 LB 培养基中, 卡那霉素、安普霉素的使用浓度都为 100 µg/mL, 氯霉素为 25 µg/mL, 萘啶酮酸在 MS 中的使用浓度是 25 µg/mL, 卡那霉素和安普霉素在 MS 培养基、YEME 培养基和 MM 培养基中的使用浓度均为 5 µg/mL, X-gal 和 IPTG 用于大肠杆菌转化子的筛选, 使用浓度为 40 µg/mL。实验中所用到的各种限制性内切酶购自 TaKaRa 和 NEB 公司; 高保真 KOD-plus DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司; T4 DNA ligase 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 用于 RNA 提取的 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 用于 RNA 提取的试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司; 荧光定量 RT-PCR 试剂 2×SuperReal PreMix 购自天根生化科技有限公司; DNA 污染清除试剂购自普利莱基因技术有限公司; 甲醇、乙腈以及反转录所用 Maxima RNA 反转录酶和 RNase 抑制剂购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 庚烷磺酸钠和己烷磺酸钠购自 Fisher Chemical 公司。

1.2 DNA 基本操作与分析

微生物学和分子生物学基本操作参照分子克隆实验指南^[19], 链霉菌基因组的提取参照链霉菌遗传操作手册^[18]。

1.3 基因阻断突变株的构建

为了构建 *san7324* 阻断突变株, 首先用引物 *san7324-up-F/R* 和 *san7324-dn-F/R*(表 1)对圈卷产色链霉菌 7100 基因组 DNA 分别进行 PCR 扩增得到两段均为 2.0 kb 同源臂片段, 得到的这两个同

源臂片段中除含有部分 *san7324* 的片段外, 还含有 *san7324* 两侧的其他基因, 同时分别用 *Xba* I/*Bam*H I 和 *Bam*H I/*Eco*R I 酶切, 连接在被 *Xba* I/*Eco*R I 酶切后的温度敏感型质粒 pKC1139 上, 得到的重组质粒命名为 pSJ101。采用同样的载体构建策略, 对 *san7324L*(圈卷产色链霉菌中的 *san7324* 同源基因, 氨基酸序列一致性为 72%)阻断突变株进行了构建, 得到的重组质粒命名为 pSJ102, 所构建的质粒均由 Thermo fisher Scientific 公司进行了测序。参照链霉菌遗传手册中的方法通过同源双交换的策略分别获得了 *san7324* 和 *san7324L* 的阻断突变株 Δ *san7324* 和 Δ *san7324L*。同时在 PCR 扩增验证正确的突变株 Δ *san7324* 中敲除了 *san7324L*, 获得双基因阻断突变株 Δ *san7324-san7324L*, 并通过引物 *san7324L-F* 和 *san7324L-R* 进行了 PCR 验证。

1.4 阻断突变株的表型和形态观察

把圈卷产色链霉菌野生型菌株和双基因阻断突变株分别接种在 MS、MM^[15,18](甘露醇为碳源)固体培养基的表面, 在 28 °C 条件下培养, 在不同的培养时间通过肉眼和扫描电子显微镜分别观察基质菌丝、气生菌丝、孢子链形成及色素产生的表型和形态特征, 用扫描电子显微镜观察菌丝体和孢子链时, 放大倍数为 5000 倍。

1.5 尼可霉素的 HPLC 分析和生物活性检测

将野生型和突变株的孢子分别接种到 YEME 液体培养基中, 在 28 °C 摇床(220 r/min)中培养 48 h 作为种子液。将 0.5 mL(1% V/V)种子液加入到装有 50 mL SP 液体培养基的摇瓶中, 在 28 °C 摇床(200 r/min)中培养 5 d 后离心获得发酵液, 然后用微孔膜(0.2 µm)过滤, 得到的滤液用高效液相

色谱法(HPLC)分析尼可霉素在 290 nm 处的紫外吸收波长^[20]。以白色念珠菌作为尼可霉素生物活性检测指示菌, 具体操作步骤参照文献[21]。

1.6 基因的转录分析

收集发酵培养 24、48 h 的菌体提取总 RNA, 具体操作步骤参照文献[4,22]方法。cDNA 合成以及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)的操作参照文献[22]方法进行。

2 结果和分析

2.1 *san7324* 阻断突变株的构建及验证

将构建好的重组质粒 pSJ101 转化到大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态细胞中, 通过接合转移将该质粒转移至圈卷产色链霉菌 7100 中, 利用同源双交换的策略对 *san7324* 进行基因阻断(图 1-A)。通过安普霉素抗性筛选得到正确的接合子, 28 °C 培养 5 d 后, 制备孢子悬浮液, 在含有安普

霉素抗性的 MS 平板上分别涂布 10⁴、10⁵ 和 10⁶ 个孢子/皿, 于 40 °C 培养。由于 pKC1139 是温度敏感型载体, 40 °C 时在链霉菌中不能自主复制, 需通过同源单交换将其同源序列重组整合到染色体上。接下来将筛选正确的单交换子涂布于无抗平板上于 28 °C 传代 2 次, 此时温度降低, 同源臂发生第二次单交换同时携带安普抗性的 pKC1139 在此过程中丢失。将稀释后生长出的多个单菌落分别先后涂布在安普霉素抗性平板和无抗平板上, 将 Apr^S 且无抗板生长的菌落进行 PCR 筛选得到阻断突变株 Δ san7324。获得阻断突变株 Δ san7324 后, 用引物 san7324-ex-F 和 san7324-ex-R 进行 PCR 验证, 结果显示以野生型基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增所获得的条带大小为 888 bp, 而以 Δ san7324 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增所获得的条带大小为 527 bp, 比野生型相对应的条带小了 361 bp, 与预期结果一致, 表明获得了正确的基因阻断突变株 Δ san7324(图 1-B)。

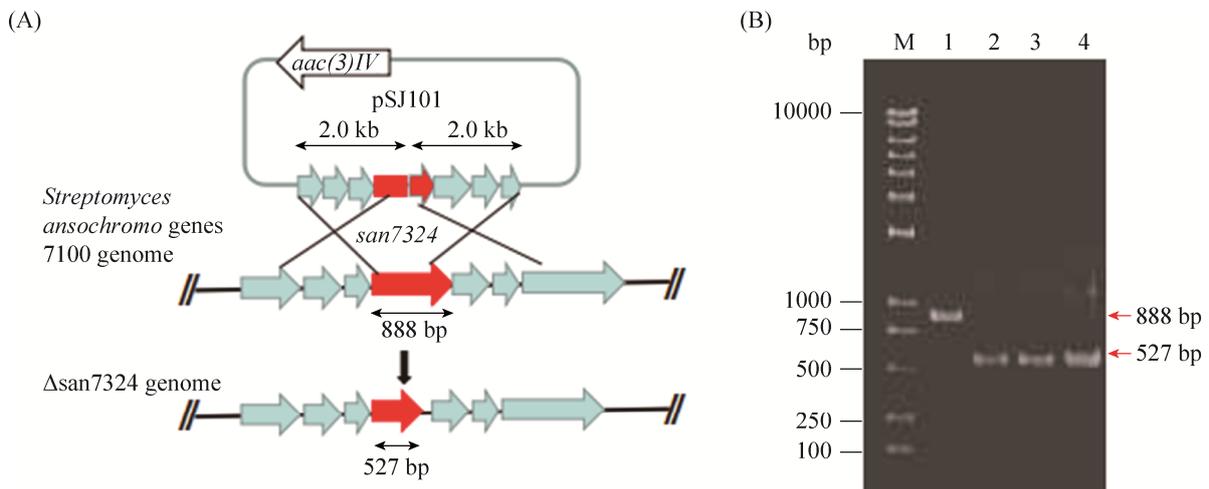


图 1. *san7324* 阻断突变株的构建和验证示意图

Figure 1. Construction and confirmation of *san7324* disruption mutant Δ san7324. A: Construction of *san7324* disruption mutant Δ san7324; B: Confirmation of Δ san7324 by PCR amplification; M: 1 kb Plus DNA molecular weight ladder; lane 1: PCR product of genomic DNA from wild-type *S. ansochromogenes* 7100; lane 2-4: PCR product of genomic DNA from Δ san7324.

2.2 *san7324* 和 *san7324L* 双阻断对圈卷产色链霉菌形态分化的影响

同源比对发现圈卷产色链霉菌中存在一个与 *san7324* 同源性较高的基因 *san7324L*。采用相同的同源双交换策略将敲除载体 pSJ102 导入到突变株 $\Delta san7324$ 中, 按照上述步骤阻断 *san7324L*, 并通过引物 *san7324L-F* 和 *san7324L-R* 对 $\Delta san7324$ 和双基因突变株进行了 PCR 验证, 结果显示以双基因突变株 $\Delta san7324-san7324L$ 的基因组 DNA 为模板进行的 PCR 扩增产物比突变株 $\Delta san7324$ 中的小了 546 bp, 与预期结果一致, 由此获得了正确的双基因阻断突变株 $\Delta san7324-san7324L$ (图 2)。

在以甘露醇为碳源的 MS 培养基上培养菌株, 由于野生型能够产生成熟的孢子而呈现灰色表型, 单基因阻断突变株 $\Delta san7324$ 和 $\Delta san7324L$ 的形态分化并没有受到影响, 而双突变株 $\Delta san7324-$

san7324L 不能产生灰色孢子而且生长稀疏, 即使在延长培养时间的条件下也只能形成白色表型的气生菌丝(图 3-A), 与野生型菌株 7100 比较,

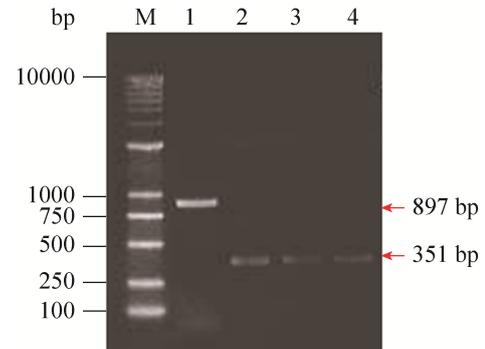


图 2. *san7324* 和 *san7324L* 双阻断突变株的验证

Figure 2. Confirmation of *san7324* and *san7324L* disruption mutant $\Delta san7324-san7324L$. M: 1 kb Plus DNA molecular weight ladder; lane 1: PCR product of genomic DNA from $\Delta san7324$; lane 2–4: PCR product of genomic DNA from $\Delta san7324-san7324L$.

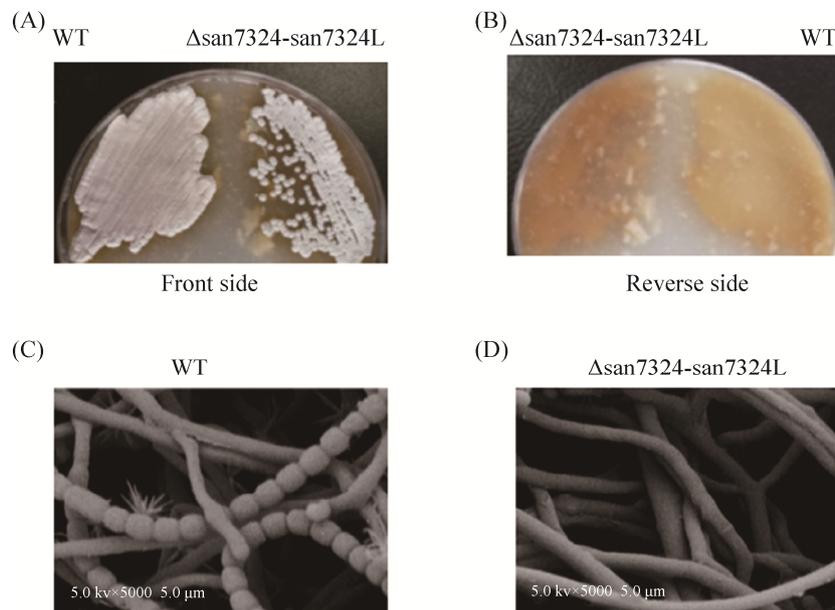


图 3. *san7324* 和 *san7324L* 双阻断对圈卷产色链霉菌表型和形态的影响

Figure 3. Effects of the both *san7324* and *san7324L* disruption on the phenotype and morphology of *S. ansochromogenes*. A and B: Effects of the both *san7324* and *san7324L* disruption on the phenotype; C and D: morphology of *san7324* and *san7324L* disruption mutant $\Delta san7324-san7324L$ was observed by scanning electron microscope (SEM, $\times 5000$).

Δ san7324-san7324L 在固体培养基上产生了颜色更深扩散性更好的棕色色素(图 3-A, B)。同时对相同培养条件下的野生型菌株 7100 和 Δ san7324-san7324L 进行了扫描电镜观察(放大倍数为 5000 倍), 结果表明野生型菌株能产生成熟的孢子链(图 3-C), 而双突变株 Δ san7324-san7324L 不能产生孢子链或孢子, 只能形成长的气生菌丝(图 3-D)。此外, 用 *san7324-san7324L* 回补双突变株(Δ san7324-san7324L)后, 可以恢复野生型的表型(结果未显示)。

2.3 *san7324* 和 *san7324L* 是尼可霉素生物合成的正调控基因

圈卷产色链霉菌 7100 产生的尼可霉素是一种

具有广泛生物活性的核苷肽类抗生素^[22], 在本实验室已经研究多年, 其关键结构基因的功能都被阐明。将 *san7324* 的同源基因 *san7324L* 在圈卷产色链霉菌 7100 中进行了基因敲除, 并通过高效液相色谱法(HPLC)和生物活性检测实验分析了突变株 Δ san7324、 Δ san7324L 和 Δ san7324-san7324L 产生尼可霉素的情况。将发酵液用 HPLC 分析, 结果显示, 在紫外波长 290 nm 下, 在野生型和 Δ san7324L 菌株中均能够清楚地检测到尼可霉素 Z 和 X 的吸收峰, 但 Δ san7324L 中尼可霉素的吸收峰相比野生型有所降低, 突变株 Δ san7324 和 Δ san7324-san7324L 中检测不到尼可霉素 Z 和 X 的吸收峰(图 4-A)。以白色念珠菌作为指示菌对发

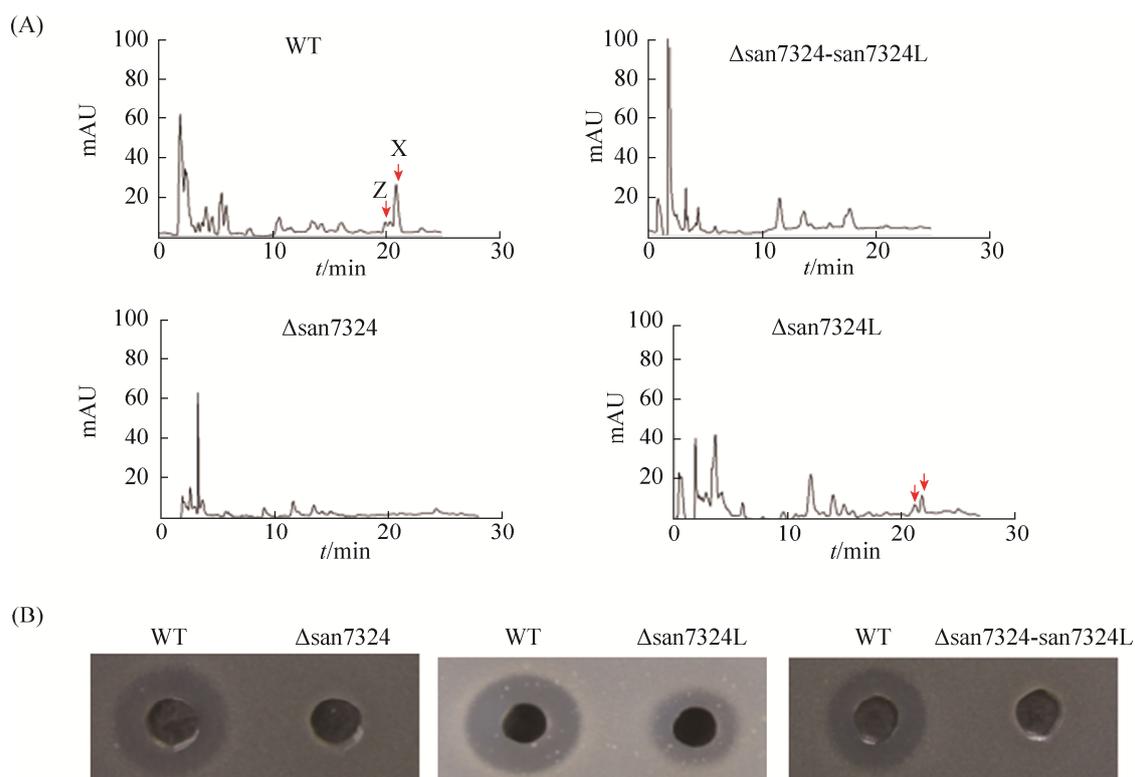


图 4. 尼可霉素的 HPLC 分析和生物活性检测

Figure 4. HPLC analysis and bioassay of nikkomycin production. A: HPLC analysis of nikkomycin production, Nikkomycin Z and X have the same peptidyl hydroxypyridine homo threonine (HPHT), but their nucleoside moiety is different; Nikkomycin X is 4-formyl-4-imidazole-2-ketone, and nikkomycin Z is uracil. B: The bioassay of nikkomycin against *Candida albicans*.

酵液进行了生物活性检测,结果显示,野生型发酵液有明显的抑菌圈,突变株 $\Delta san7324L$ 发酵液的抑菌圈较野生型小,而突变株 $\Delta san7324$ 和 $\Delta san7324-san7324L$ 的发酵液则没有抑菌圈(图 4-B),生物活性检测结果与 HPLC 分析结果一致。以上结果表明 *san7324* 单阻断、*san7324* 和 *san7324L* 双阻断均导致尼可霉素不能被生物合成。

2.4 尼可霉素生物合成基因簇中相关基因的转录分析

为了更进一步阐明双突变株 $\Delta san7324-san7324L$ 对尼可霉素生物合成基因簇的影响,通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析尼可霉素生物合成基因簇的转录情况。尼可霉素生物合成基因簇中有 1 个途径特异性正调控基因(*sanG*)和 3 个转录单元 *sanO-V*、*sanN-I* 和 *sanF-X*。其中 *sanG* 是尼可霉素

生物合成途径中最关键的正调控基因,而结构基因 *sanO*、*sanN* 和 *sanF* 分别是 3 个转录单元中的第一个基因,因此这 3 个基因的转录情况可代表 3 个转录单元的转录情况。以 23S rRNA 的编码基因作为内参基因进行的荧光定量 PCR 结果显示, *sanG*、*sanO* 和 *sanN* 在 $\Delta san7324-san7324L$ 中的转录受到了很大影响。其中在 24 h 和 48 h 时, $\Delta san7324-san7324L$ 中 *sanG* 的转录比野生型中的转录水平均降低了 1 倍之多,而 *sanO* 和 *sanN* 的转录水平在 24 h 时比野生型而言也分别有近 1.5 倍和 4 倍左右的降低(图 5-A, B, C)。此外, $\Delta san7324-san7324L$ 和野生型中的 *sanF* 的转录水平没有显著差异(图 5-D)。上述结果表明 *san7324-san7324L* 阻断主要影响了尼可霉素生物合成途径特异性正调控基因 *sanG* 和结构基因 *sanO-V* 与 *sanN-I* 的转录。

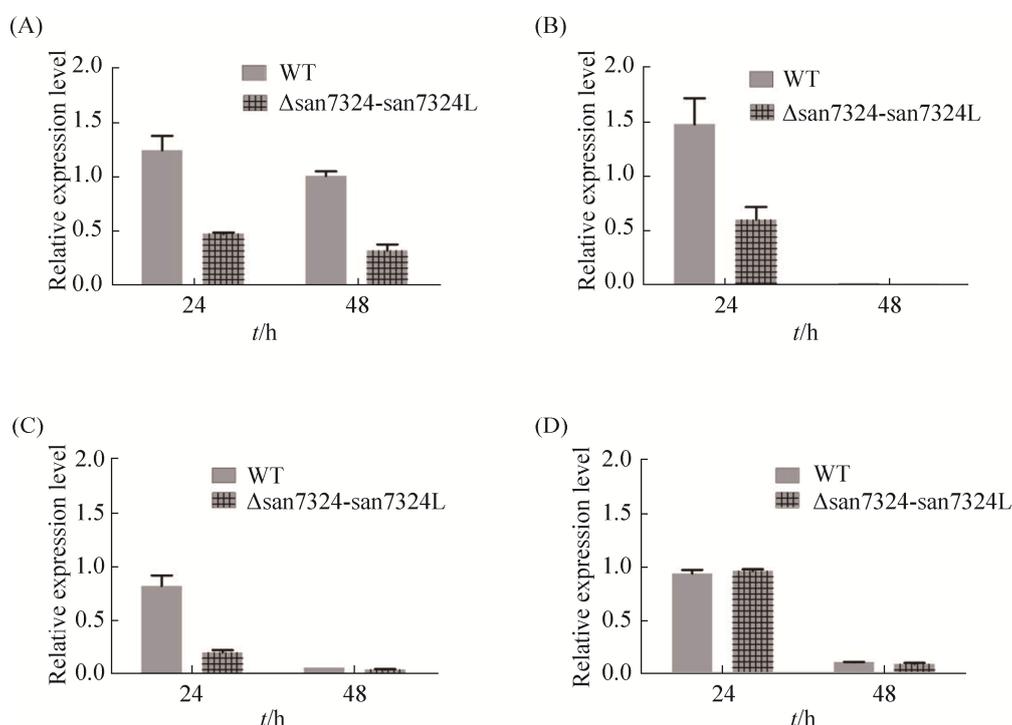


图 5. 圈卷产色链霉菌野生型菌株及 $\Delta san7324-san7324L$ 中尼可霉素生物合成相关基因的转录分析

Figure 5. Transcriptional analysis of the related genes in *nik* cluster of *S. ansochromogenes* 7100(WT) and $\Delta san7324-san7324L$. A: *sanG*; B: *sanO*; C: *sanN*; D: *sanF*.

3 讨论

链霉菌因具有复杂的发育分化周期和无与伦比的合成众多次级代谢产物的能力而被人们所青睐。WblA 是放线菌发育分化和次级代谢产物生物合成中广泛存在的一种全局性或多效性调控蛋白,不同链霉菌种间 WblA 的序列一致性达到 95% 以上,其含有 4 个保守的半胱氨酸残基可形成氧化敏感的 [4Fe-4S] 结构。对其编码基因进行遗传操作,是激活隐性基因簇发现新化合物的有效手段。WblA 首先在 1992 年由 Chater 等在天蓝色链霉菌中发现^[8]。2007 年 Kim 等通过 DNA microarray 和高表达的方式,确定了 *wblA* 是放线紫红素和阿霉素生物合成基因簇的负调控基因^[23]。在 2011 年,Chater 等对天蓝色链霉菌中的多个 *wbl* 基因 (*wblA*, *wblC*, *wblE*, *wblH*, *wblI*, *wblJ*, *wblK*, *wblL* 和 *wblM*)进行了破坏^[9],结果显示只有 *wblA* 的破坏能够影响次级代谢产物的产量,这与 Kim 等的实验相吻合。到目前为止,除圈卷产色链霉菌 *wblA* 突变株中被激活的泰乐菌素类似物外,在 *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 中,*wblA* 突变可激活隐性 α -吡喃酮类化合物 violapyrone B (VLPB) 的合成^[24],同时 *wblA* 在多株链霉菌中都作为负调控基因而存在^[10-11],但浙江大学李永泉教授实验室则发现 *wblA* 在恰塔努链霉菌中对纳他霉素的生物合成起到了正调控的作用^[13],敲除 *wblA* 导致纳他霉素不能合成。中国科学院微生物研究所谭华荣研究员实验室对圈卷产色链霉菌中的 *wblA* 敲除后,导致尼可霉素不能合成,而且激活了泰乐菌素类似物生物合成基因簇^[15]。与之前的报道不同^[9,23],圈卷产色链霉菌中 *wblA* 的敲除

导致菌体不能产生灰色孢子而呈现白色表型^[15],说明 WblA 不但作为次级代谢产物生物合成的调控因子,而且也在发育分化调控中扮演了重要角色,是一个类似于 AdpA 的多效调控子^[13]。

到目前为止,有关 WblA 调控蛋白直接的靶基因还没有任何报道。虽然之前本实验室通过对圈卷产色链霉菌 7100 及 *wblA* 突变株进行 RNA-seq 分析,得到了大量转录受 WblA 影响的基因,但通过 EMSA 实验未能检测到 WblA 与靶基因启动子区的结合。推测是由于 WblA 氧化敏感的 [4Fe-4S] 结构使得该蛋白在体外被氧化而失去了 DNA 结合活性^[25]。Bush 等最新研究发现,在委内瑞拉链霉菌中 WhiB 与 WhiA 形成异源二聚体,对下游靶基因行使调控作用,单独的 WhiB 蛋白不能与靶基因启动子区结合^[25]。WblA 与 WhiB 氨基酸序列一致性为 50%,不排除 WblA 与其他蛋白形成异源复合物进而发挥调控作用的可能。在圈卷产色链霉菌中对 *whiA* 进行缺失突变后发现 *whiA* 突变株仍然产生尼可霉素,因此排除了 WblA 与 WhiA 形成异源二聚体的可能性。

由本实验室之前的结果^[15,17]可知,尼可霉素产量变化与其生物合成基因在 *wblA* 突变株中的转录变化基本一致。在 $\Delta wblA$ 中,我们发现 *san7324* 不转录。在 $\Delta san7324$ 中,尼可霉素不再产生。推测 WblA 可能通过激活 *san7324* 的转录间接地激活了尼可霉素的生物合成^[17]。但在 $\Delta san7324$ 中,在尼可霉素不再合成的情况下,泰乐菌素类似物的合成并未被激活。为此,我们推测野生型圈卷产色链霉菌中可能存在与 *san7324* 同源的其他基因,在 *san7324* 缺失突变后,仍然可抑制泰乐菌素类似物的生物合成。我们进一步通过基因组数

数据库的分析发现圈卷产色链霉菌 7100 中确实存在 *san7324* 同源基因 *san7324L*^[17], 二者编码的氨基酸序列一致性(identity)达到 72%, 且与 *san7324* 类似, 在 $\Delta wblA$ 中 *san7324L*基本上也不转录。本研究进行了 *san7324* 和 *san7324L* 双基因阻断突变菌株 $\Delta san7324-san7324L$ 的构建, 结果揭示该突变株在不能产生尼可霉素的同时也不能分化形成灰色的成熟孢子, 在延长培养条件的情况下仍然保持白色气生菌丝的表型。但与我们所期望不同的是在双突变株中未检测到泰乐菌素类似物的产生。在将来的工作中, 可进一步尝试采用不同培养基对 $\Delta san7324-san7324L$ 进行发酵, 检测该双突变株中泰乐菌素类似物是否在某些营养条件下可以合成。本实验室早期结果表明 *sanG* 基因的阻断导致尼可霉素不能生物合成, 同时也不能正常发育分化形成灰色的成熟孢子链, 只能形成白色的气生菌丝^[4]。因此, *san7324-san7324L* 双基因阻断导致的结果与 *sanG* 阻断的结果是一致的, 从而影响圈卷产色链霉菌的发育分化和尼可霉素合成。然而 *san7324-san7324L* 与 *sanG* 基因之间是怎样的调控关系, 调控的机制是什么? 尚需进一步深入研究。上述研究为阐明链霉菌中广泛存在的多效调控基因 *wblA* 在抗生素生物合成和形态分化中作用的分子机制, 为众多隐性次级代谢产物生物合成基因簇激活和得到新型抗生素提供重要的依据。

参考文献

- [1] Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65(8): 385–395.
- [2] Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schäberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millett WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen C, Lewis K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 2015, 517(7535): 455–459.
- [3] Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu GQ, Tan HR. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 112–143.
- [4] Liu G, Tian YQ, Yang HH, Tan HR. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(6): 1855–1866.
- [5] Niu GQ, Tan HR. Nucleoside antibiotics: biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(2): 110–119.
- [6] Jiang LJ, Wang L, Zhang JH, Liu H, Hong B, Tan HR, Niu GQ. Identification of novel mureidomycin analogues via rational activation of a cryptic gene cluster in *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14111, doi: 10.1038/srep14111.
- [7] Chater KF. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Current Opinion Microbiology*, 2001, 4(6): 667–673.
- [8] Davis NK, Chater KF. The *Streptomyces coelicolor whiB* gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Molecular General Genetics*, 1992, 232(3): 351–358.
- [9] Fowler-Goldsworthy K, Gust B, Mouz S, Chandra G, Findlay KC, Chater KF. The actinobacteria-specific gene *wblA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 2011, 157(5): 1312–1328.
- [10] Nah JH, Park SH, Yoon HM, Choi SS, Lee CH, Kim ES. Identification and characterization of *wblA*-dependent *tmcT* regulation during tautomycin biosynthesis in *Streptomyces* sp CK4412. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(1): 202–209.
- [11] Noh JH, Kim SH, Lee HN, Lee SY, Kim ES. Isolation and genetic manipulation of the antibiotic down-regulatory gene,

- wblA* ortholog for doxorubicin-producing *Streptomyces* strain improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(4): 1145–1153.
- [12] Rabyk M, Ostash B, Rebets Y, Walker S, Fedorenko V. *Streptomyces ghanaensis* pleiotropic regulatory gene *wblA_{gh}* influences morphogenesis and moenomycin production. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(12): 2481–2486.
- [13] Yu P, Liu SP, Bu QT, Zhou ZX, Zhu ZH, Huang FL, Li YQ. *WblA_{ch}*, a pivotal activator of natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis* L10, is positively regulated by *AdpA_{ch}*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(22): 6879–6887.
- [14] 路程. 调控基因 *wblA* 和 *rimP* 破坏对链霉菌相关抗生素合成的影响. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 2015.
- [15] Lu C, Liao GJ, Zhang JH, Tan HR. Identification of novel tylosin analogues generated by a *wblA* disruption mutant of *Streptomyces ansochromogenes*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 173.
- [16] Wang C, Jin CL, Zhang JH, Bao QY, Liu B, Tan HR. Transcriptomic analysis of *Thermoanaerobacter tengcongensis* grown at different temperatures by RNA sequencing. *Journal of Genetics and Genomics*, 2015, 42(6): 335–338.
- [17] 李敬敬. 诺西肽和泰乐菌素类似物生物合成调控基因的功能研究. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 2017.
- [18] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [19] Sambrook P, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. (请核对出版信息)
- [20] Liao GJ, Li JN, Li L, Yang HH, Tian YQ, Tan HR. Cloning, reassembling and integration of the entire nikkomycin biosynthetic gene cluster into *Streptomyces ansochromogenes* lead to an improved nikkomycin production. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 6.
- [21] Feng C, Ling HB, Du DY, Zhang JH, Niu GQ, Tan HR. Novel nikkomycin analogues generated by mutasynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 59.
- [22] Du DY, Zhu Y, Wei JH, Tian YQ, Niu GQ, Tan HR. Improvement of gougerotin and nikkomycin production by engineering their biosynthetic gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6383–6396.
- [23] Kang SH, Huang JQ, Lee HN, Hur YA, Cohen SN, Kim ES. Interspecies DNA microarray analysis identifies *WblA* as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(11): 4315–4319.
- [24] Huang HM, Hou LK, Li HY, Qiu YH, Ju JH, Li WL. Activation of a plasmid-situated type III PKS gene cluster by deletion of a *wbl* gene in deepsea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 116.
- [25] Bush MJ, Chandra G, Bibb MJ, Findlay KC, Buttner MJ. Genome-wide chromatin immunoprecipitation sequencing analysis shows that *WhiB* is a transcription factor that cocontrols its regulon with *WhiA* to initiate developmental cell division in *Streptomyces*. *mBio*, 2016, 7(2): e00523–16.

Effects of *san7324* and *san7324L* disruption on morphological differentiation and nikkomycin production of *Streptomyces ansochromogenes*

Jun Sun^{1,2}, Jingjing Li², Yue Li², Chuan Wang⁴, Yuan Cai^{1*}, Huarong Tan^{2,3*}

¹ Institute of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

² State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ College of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

⁴ Institute of Animal Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] *wblA* disruption mutant of *Streptomyces ansochromogenes* fails to produce nikkomycin. RNA-seq and transcriptional analysis revealed that the *san7324* could be transcribed normally in *S. ansochromogenes* (wild-type), whereas not transcribed in the *wblA* (a global regulatory gene) disruption mutant ($\Delta wblA$). This research aims to reveal the function of *san7324* in nikkomycin production. [Methods] To investigate the role of *san7324* in nikkomycin biosynthesis, a *san7324* disruption mutant was constructed via homologous recombination, and was subsequently confirmed by genetic complementation. The transcriptional levels of selected genes in the nikkomycin biosynthetic cluster were analyzed. [Results] The mutant ($\Delta san7324$) lost ability to produce nikkomycin under the same culture conditions compared with the wild-type strain. Disruption of *san7324L* (a *san7324* homologous gene) caused the decrease of nikkomycin production. However, when *san7324* and *san7324L* were disrupted, the double mutant ($\Delta san7324$ -*san7324L*) failed to form grey spores or spore chains but conferred a white phenotype of aerial hyphae, and no nikkomycin production was observed in comparison with wild-type strain. In addition, the nikkomycin production and morphological differentiation could be restored by the complementation of *san7324*-*san7324L* in $\Delta san7324$ -*san7324L*. Further studies preliminarily indicated that disruption of *san7324* and *san7324L* mainly affected the transcriptional level of pathway-specific regulatory gene *sanG* in *nik* cluster, affected the morphological differentiation and nikkomycin biosynthesis in *S. ansochromogenes*. [Conclusion] These results provided more evidence for investigating the relationship between morphological differentiation and physiological metabolism in *Streptomyces*, and lay the foundation for elucidating the regulatory mechanism of the pleiotropic regulatory gene *wblA*.

Keywords: *Streptomyces ansochromogenes*, gene disruption, morphological differentiation, nikkomycin

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31771378, 31571281)

*Corresponding author. E-mail: Yuan Cai, caiyuan@gsau.edu.cn; Huarong Tan, tanhr@im.ac.cn

Received: 6 March 2018; Revised: 19 March 2018; Published online: 24 April 2018