

双组分系统(TCS)在链霉菌次级代谢过程中发挥着全局性调控作用,许多 TCS 基因的缺失或过表达可以显著影响次级代谢产物的生物合成。鉴于链霉菌在抗生素产业中的重要地位,全面揭示该菌 TCS 介导的次级代谢分子调控网络不仅具有理论意义,而且有巨大的潜在应用价值。

姜卫红

## 链霉菌次级代谢调控相关的双组分系统研究进展

芦银华 姜卫红\*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 中国科学院合成生物学重点实验室  
上海 200032)

**摘要:** 链霉菌具有强大的次级代谢能力,能够产生众多具有生物活性的次级代谢产物,如目前广泛应用的抗生素、抗肿瘤药物以及免疫抑制剂等。在链霉菌中,次级代谢产物的生物合成受到包括途径特异性、多效性以及全局性调控基因在内的多层次严格调控。关键调控基因的缺失或过表达可以显著影响次级代谢产物的生物合成,提示对于链霉菌次级代谢重要调控基因的功能及其作用机制的研究具有巨大的潜在应用价值。其中,作为细菌信号传导系统的双组分系统(Two-component system, TCS)一直是大家研究的关注点。越来越多的研究表明 TCS 在链霉菌次级代谢过程中发挥着全局性的调控功能。本文重点介绍链霉菌模式菌株——天蓝色链霉菌中 TCS 参与次级代谢调控的研究进展。这些 TCS 的功能鉴定及机制解析为工业链霉菌的定向遗传改造以提高重要次级代谢产物的含量提供了理论依据。

**关键词:** 链霉菌, 次级代谢, 双组分系统, 调控机制

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970033, 31121001)

\*通讯作者: Tel: 86-21-54924172; ✉: whjiang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2013-02-05; 接受日期: 2013-04-15

# Perspectives on two-component systems involved in regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*

LU Yin-Hua JIANG Wei-Hong\*

(CAS Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** *Streptomyces* is characterized by its strong ability to produce an impressive array of secondary metabolites with important biological activities, such as antibiotics, anti-tumor drugs and immunosuppressors widely used clinically. In streptomycetes, the biosynthesis of secondary metabolites is under strict, multilevel regulation involving pathway-specific, pleiotropic as well as global regulators. Inactivation or overexpression of some important regulatory genes could greatly influence the production of secondary metabolites, implying that a better understanding how regulatory genes function in secondary metabolism will have great potential application values. Among them, two-component system (TCS) as the signal transduction system in bacteria has been the research focus in the past few years. Increasing evidences demonstrate that TCS plays a global regulatory role during secondary metabolic processes in *Streptomyces*. This review summarizes the research progress of TCS, including typical TCS, orphan histidine kinases (HKs) and response regulators (RRs), involved in the regulation of secondary metabolism in the model strain of *Streptomyces*, *Streptomyces coelicolor*. The functional identification and the mechanistic characterization of these TCS have provided a valuable theoretical basis for the directed genetic engineering to improve the yield of important secondary metabolites in industrial streptomycetes.

**Keywords:** *Streptomyces*, Secondary metabolism, Two-component system, Regulatory mechanism

信号传导系统是生物体感应、传导内外信号并在不断改变的环境中得以生存所必须的。尽管生物体感应的信号多种多样,但是信号在体内传导的机制却是有规律可寻的,其中蛋白质磷酸化是真核和原核生物中普遍存在的一种信号传导机制。蛋白质磷酸化由蛋白激酶催化,根据对底物专一性的不同,激酶可分为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、酪氨酸蛋白激酶和组氨酸蛋白激酶等。组氨酸蛋白激酶系统,又被称为双组分系统(Two-component system, TCS),普遍

存在于原核生物中,是细菌重要的信号传导系统<sup>[1]</sup>,调控着细菌的绝大多数生理过程,包括细菌的趋化性<sup>[2]</sup>、渗透压<sup>[3-4]</sup>、孢子形成<sup>[5]</sup>、营养元素的代谢以及次级代谢产物的生物合成<sup>[6]</sup>等,也包括病原菌的毒力、生物膜(Biofilm)和群体感应(Quorum sensing)等致病相关过程<sup>[7-13]</sup>,可以说 TCS 的功能覆盖了细胞行为调控的各个方面。研究表明, TCS 起源于细菌,然后会以基因水平转移方式辐射至少数古细菌和真核生物类群中,如酵母、高等植物,甚至哺乳动物中也

有 TCS 存在的报道<sup>[1,14-15]</sup>。

典型的 TCS 由两个组分组成, 即组氨酸激酶 (Histidine kinase, HK) 和应答调控蛋白 (Response regulator, RR) (图 1)。多数 HK 为跨膜蛋白, 主要由 3 个功能结构域组成, 即信号感应域 (Sensing domain)、信号传递域 (Transmitter domain) 和 ATP 酶域 (ATPase domain)<sup>[16]</sup>; 其中信号感应域一般位于胞外, 与监测环境刺激有关, 该区域的序列具有高度的多样性, 参与信号的专一识别; 信号传递域具有激酶活性, 它通过自身磷酸化作用, 将来自于 ATP 上的  $\gamma$  高能磷酸基团转移到自身保守的组氨酸 (His) 残基上 (该残基是 HK 自身磷酸化所必需的), 从而将外界刺激转化为细胞内的化学信号; ATP 酶域是 ATP 的结合区域, 它含有 N、G1、F 和 G2 四个相对保守的序列框。RR 位于细胞质内, 用于传递和编译 HK 上传来的信号。与 HK 相比, RR 在长度和组成上都相对保守, 它由 N 端含有 Asp 残基的高度保守的信号接受域 (Receiver domain) 以及 C 端的效应结构域 (Effector domain) 两部分组成。在整个信号传递过程中, HK 上的信号感受域一旦感应到外界信号, 即引发信号传递域的构象改变, 使 ATP 酶域与信号传递域的相对位置发生改变, ATP 酶域向 HK 的磷酸化位点 (组氨酸残基) 靠近, 从而触发自身磷酸化反应; 同时, ATP 酶域的位置移动会

暴露出 HK 上的 RR 结合表面 (Docking surface), 从而可以结合 RR, 并将高能磷酸基团转移至 RR 信号接收域上的磷酸化位点 (天冬氨酸残基), 使 RR 处于激活或失活状态, 从而通过调控下游目的基因的表达来调节细胞的适应性反应 (图 1)。另外, 需要指出的是, HK 和 RR 的二聚体化可能是它们行使功能所必需的。RR 的磷酸化水平受到 HK 活性状态的调节, 在细胞内维持着磷酸化和脱磷酸化两种状态的动态平衡<sup>[1,17]</sup>。

链霉菌是一类广泛分布的土壤细菌, 具有复杂的形态分化周期及强大的次级代谢能力, 能够产生众多具有生物活性的次级代谢产物, 如目前广泛应用的各类抗生素、抗肿瘤药物以及免疫抑制剂等。据统计, 已知的微生物来源的天然抗生素中有近 60% 是由链霉菌产生的, 凸显出链霉菌在医药产业中所处的重要地位。链霉菌次级代谢产物的生物合成受到多层次的严格调控, 包括途径特异性、多效性以及全局性调控<sup>[18-19]</sup>。研究显示, 一些调控基因的缺失或过表达可以极大地影响次级代谢产物的生物合成, 提示对于链霉菌次级代谢重要调控基因及其机制的研究具有巨大的潜在应用价值。作为信号传导系统的 TCS 一直是大家研究的重点, 越来越多的研究证实, 其在链霉菌次级代谢过程中发挥着全局性的调控作用。

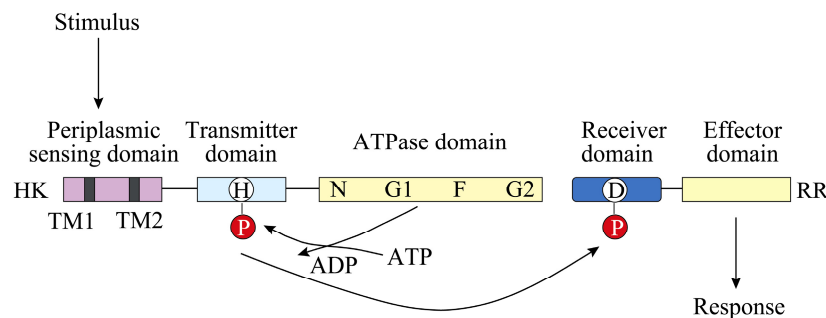


图 1 典型双组分系统的信号传导模式图

Fig. 1 Scheme of the signal transduction of typical two-component system (TCS)

目前,对于链霉菌中 TCS 参与次级代谢的分子调控研究主要是在模式菌株——天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中完成的。该菌能产生包括十二烷基灵菌红素(RED)、放线紫红素(ACT)、亚甲霉素(Mmy)、钙依赖的抗生素(CDA)以及黄色色素 yCPK 等在内的已知次级代谢产物。全基因组序列已于 2002 年测定完毕,生物信息学分析显示,其基因组编码大量与信号传导相关的基因<sup>[20]</sup>。尤其值得注意的是,其含有非常丰富的 TCS 编码基因,包括 84 个 HK 以及 80 个 RR 基因,占了整个基因组的约 2%,其中 67 个 HK 与 RR 匹配成对,在基因组上前相邻分布,组成典型的 TCS,其余的为孤立的 HK (17 个)和 RR (13 个)<sup>[6]</sup>。经过多年研究,已经在天蓝色链霉菌中鉴定了一系列具有重要功能的 TCS 并对其分子调控机制进行了深入的解析,证实 TCS 参与了链霉菌生长发育的各个阶段,包括初级/次级代谢、形态分化发育、渗透压以及细胞壁完整性等<sup>[6]</sup>。限于篇幅的原故,本文将重点介绍 TCS,包括典型 TCS 以及孤立 HK 和 RR,参与链霉菌次级代谢分子调控的研究进展,希望通过本文的论述能够进一步加深大家对于链霉菌中次级代谢调控相关 TCS 的认识和理解。

## 1 典型双组分系统(Typical TCS)

目前,在天蓝色链霉菌已有 10 多个与次级代谢密切相关的典型 TCS 被鉴定(表 1)。下面,我们将重点介绍研究得比较清楚的 4 对 TCS,包括 AbsA1/A2、PhoR/P、AfsQ1/Q2 以及 DraR-K,其中 AbsA1/A2 和 PhoR/P 为抗生素合成的负调控因子,而 AfsQ1/Q2 为正调控因子;有趣的是,DraR-K 对抗生素合成具有双重调控功能,对 ACT 的合成行使正调控功能,而对 yCPK 以及 RED 则执行负调控作用。

### 1.1 AbsA1/A2 (SCO3225/3226)

AbsA1/A2 编码基因位于 CDA 的生物合成基因簇内部,但该 TCS 不仅对 CDA 的生物合成行使负调控功能,而且还参与另外 3 种已知抗生素 ACT、RED 与 Mmy 合成的负调控<sup>[21-23]</sup>。AbsA1 与其它许多典型 HK 仅在 N 端有 2 个跨膜结构域不同,它在 N 端和 C 端可能均存在跨膜区,N 端有 4 个(位于 29-162 位氨基酸之间),C 端有 1 个(467-489 位氨基酸),预示其信号感应机制可能比较复杂。AbsA2 为 NarL 家族成员,其 C 端效应结构域(Effector domain)含有一个 DNA 结合结构域(HTH)。absA1/A2 基因的缺失可以导致 4 种已知抗生素(ACT, RED, CDA 以及 Mmy)的过量产生。深入研究证明,磷酸化的 AbsA2 可以直接结合于途径特异性调控基因 *actII-ORF4*、*redZ* 和 *cdaR* 的启动子区域,行使转录负调控功能,进而影响相应抗生素的合成。但对于 AbsA2 具体的 DNA 结合序列尚不清楚。除虫链霉菌中 *absA1/A2* 的同源基因 (*aveR1/R2*)起着类似的负调控功能,其缺失可以使阿维菌素的产量提高 3.1-3.4 倍<sup>[24]</sup>。

生化实验证实, AbsA1 具有激酶与磷酸酶双重活性,作用对象分别是非磷酸化的 AbsA2 及磷酸化的 AbsA2 (AbsA2~P)<sup>[25]</sup>。当 AbsA1 发生氨基酸点突变(如 H202A)致使 AbsA1 激酶活性受损时,导致 AbsA2 处于无活性的非磷酸化状态,不能对 *actII-ORF4*、*redZ* 和 *cdaR* 的转录产生负调控作用,从而出现抗生素过量产生的表型;当突变(如 L253A)损害 AbsA1 磷酸酶活性时, AbsA2~P 始终处于高水平,持续抑制途径特异性调控基因的转录表达,导致抗生素的合成受阻。这些研究结果暗示,在 AbsA1 感受信号存在条件下, AbsA2 的磷酸化与脱磷酸化可能保持着一种动态平衡,从而使天蓝色链霉菌中的抗生素合成处于一个合理的水平;而在

表 1 天蓝色链霉菌中已知的参与次级代谢调控的双组分系统(TCS)一览表

Table 1 Two-component systems (TCSs) known to be involved in the regulation of secondary metabolism in *S. coelicolor*

序号 No.	TCS 名称 TCS name	基因编号 Gene No. (SCO)	功能 Function	分子机制 Molecular mechanism	文献 Ref.
典型 TCS Typical TCS					
1	AbsA1/A2	SCO3225/3226	编码基因位于 CDA 生物合成基因簇内部; 对 ACT, RED 以及 CDA 的合成行使负调控功能	磷酸化的 AbsA2 结合于 <i>actII-ORF4</i> , <i>redZ</i> 以及 <i>cdaR</i> 的启动子区域抑制基因转录, 进而负调控相应抗生素的产生	[21-23, 25]
2	PhoR/P	SCO4229/4230	为磷代谢的全局调控因子; 参与抗生素合成的负调控; 与抗生素合成激活蛋白 AfsR 存在交叉调控	PhoP 与 AfsR 竞争结合 <i>afsS</i> 的启动子区域, 阻遏 AfsR 对 <i>afsS</i> 的转录激活作用, 从而抑制 ACT, RED 的合成	[26-28]
3	AfsQ1/Q2	SCO4907/4906	在高浓度谷氨酸钠的基本培养基 (MM) 条件下, 参与 ACT、RED、CDA 以及 yCPK 合成的正调控	AfsQ1 与 <i>actII-ORF4</i> , <i>redD</i> 以及 <i>cdaR</i> 的启动子区域结合, 激活基因转录, 从而正调控相应抗生素的合成; 而对 yCPK 的调控作用可能是 AfsQ1/Q2 直接激活 yCPK 生物合成基因 <i>cpkA/D</i> 所致	[42-43]
4	DraR/K	SCO3063/3062	在含有高氮的 MM 培养基上, 激活 ACT 产生的同时抑制 RED 以及 yCPK 的合成; 与 AfsQ1/Q2 协同调控 ACT 的生物合成。除虫链霉菌中的 <i>draR-K</i> 同源基因起着类似的差异调控作用	DraR 可以与 <i>actII-ORF4</i> 与 <i>cpkO</i> 的启动子区域结合, 分别参与这 2 种途径特异性调控基因的正负转录调控; 对 RED 的调控是间接作用的结果, 可能与前体的供应有关	[44]
5	CutR/S	SCO5862/5863	为链霉菌中第一个被鉴定的 TCS; 对天蓝色以及变铅链霉菌中 ACT 的合成起负调控作用	机制尚不明确	[45]
6	OsaA/B	SCO5748/5749	OsaA 为杂合型 HK, 可能参与信号的级联传递; 与渗透压适应性的调节相关; 在含有 10% 蔗糖或 25 mmol/L KCl 培养条件下, 负调控 ACT 和 RED 的合成	机制尚不明确	[46]
7	EcrA1/A2	SCO2518/2517	参与 RED 合成的正调控	机制尚不明确	[47]
8	RapA1/A2	SCO5403/5404	正调控 ACT 以及 yCPK 的合成	机制尚不明确	[48]
9		SCO5784/5785	对 ACT 和 RED 的生物合成行使正调控功能	机制尚不明确	[49]
10		SCO0203/0204	负调控 ACT 的合成	机制尚不明确	[50]
11	AbrA1/A2	SCO1744/1745	负调控 ACT, RED 以及 CDA 的生物合成	机制尚不明确	[51]
孤立 HK Orphan HK					
12	OhkA	SCO1596	抑制 5 种已知次级代谢产物 ACT, RED, CDA, yCPK 以及倍半萜类抗生素 Albaflavenone 的生物合成	未鉴定到与 OhkA 匹配的 RR, 目前无法开展其参与次级代谢调控的分子机制研究	[52]

(待续)

				(续表)
孤立 RR Orphan RR				
13	RedZ	SCO5881	编码基因中含有 TTA 密码子, 翻译依赖于 <i>bldA</i> 的转录本 Leu-tRNA; 为 RED 生物合成的途径特异性激活蛋白	其对 RED 生物合成的激活作用主要是通过直接调控另一个途径特异性调控基因 <i>redD</i> 的转录来实现的 [53]
14	GlnR	SCO4159	为全局性氮代谢调控因子; 参与氮代谢及次级代谢全局调控	机制尚不清楚。推测 GlnR 影响抗生素的合成是由其参与氮代谢全局调控所间接导致的 [54-55]
15		SCO3818	负调控 ACT 的合成; 与典型 TCS SCO0203/0204 存在交叉信号传导, HK SCO0203 可以磷酸化 SCO0204 以及 SCO3818	机制尚不明确 [50]
其它特殊 TCS Other special TCS				
16	AbrC1/C2/C3	SCO4596/4597/4598	含有 2 个 HK AbrC1 和 AbrC2; 正调控 ACT, RED 以及 CDA 的合成	机制尚不明确; 另外, 2 个 HK 是否都参与磷酸化 RR AbrC3 目前也不知道 [51]

信号消失后, AbsA1 将可能主要行使磷酸酶活性, 使 AbsA2 处于非活性的去磷酸化状态。

## 1.2 PhoR/P (SCO4229/4230)

PhoR/P 为链霉菌中非常重要的全局性调控因子, 参与次级代谢以及包括磷、氮代谢在内的初级代谢全局调控<sup>[18,26-28]</sup>。Martin 实验室对天蓝色链霉菌来源的 PhoR/P 的分子调控机制进行了深入研究, 鉴定了 PhoP 直接调控的靶基因集群(即 *pho regulon*), 其中最主要的是磷代谢相关的基因, 包括 *phoA* 和 *phoD* (编码碱性磷酸酶)、*pstSABC* 和 *pitH2* (编码磷转运系统)、*phoU* (编码磷转运调控蛋白)以及 *phoR/phoP* 自身等<sup>[29]</sup>。磷酸化的 PhoP 通过结合靶基因启动子区域的 PHO box 对其靶基因进行转录调控。根据 PHO box 相对于启动子-10、-35 区的位置不同, PhoP 行使正负双重调控功能; 如位于-35 区或其上游附近, PhoP 的结合会起到招募 RNA 聚合酶的作用, 促进基因转录; 但如果 PHO box 位于-10 区附近, 则 PhoP 将成为 RNA 聚合酶结合的 Road-block, 阻止靶基因的转录<sup>[27]</sup>。PhoR/P 介导的调控机制在革兰氏阳性及阴性菌

中广泛存在, 主要参与磷代谢调控, 不过在致病菌中它往往还与致病性及毒力密切相关<sup>[30-32]</sup>。此外, 在其它菌中, 对该 TCS 的命名上有一些不同, 很多被称为 PhoR/B<sup>[31]</sup>。

PhoR/P 对链霉菌次级代谢行使负调控功能。以天蓝色链霉菌为例, PhoR/P 参与 ACT 和 RED 生物合成的负调控, 但其作用机制与 AbsA1/A2 截然不同, PhoP 对 ACT 和 RED 的负调控不是由途径特异性调控基因直接介导的, 在 *actII-ORF4* 以及 *redZ/D* 的启动子区域不存在 PHO box, 凝胶阻滞实验也证实 PhoP 不能与这 2 个基因的启动子区结合。但有趣的是, PhoP 可以与抗生素合成相关的全局性正调控因子 AfsR 拮抗, 竞争性地结合于共同靶基因 *afsS* 的启动子区域, 阻止 AfsR 对 *afsS* 的转录激活, 进而抑制 *afsS* 的转录表达, 实现对抗生素合成的负调控<sup>[28,33]</sup>。AfsR 是 ACT 和 RED 合成的正调控因子; AfsS 为  $\sigma$  样调控因子, 是 AfsR 的下游靶基因之一, 对 *actII-ORF4* 和 *redD* 行使正调控功能<sup>[34]</sup>。因此, 推测 AfsR 可能通过直接激活 *afsS* 的转录, 进而促进 *actII-ORF4* 和 *redD* 的转

录以及 ACT 和 RED 的生物合成。目前, 对于 *afsS* 分子调控机制尚不清楚。由于 AfsR/S 以及 PhoR/P 在链霉菌属中广泛存在, 可以预计 PhoR/P 介导的抗生素合成调控机制在链霉菌属是相当保守的。另外, PhoP 还能直接参与 RNA 聚合酶  $\omega$  因子 *rpoZ* 的转录负调控, 而 *rpoZ* 的缺失可以导致天蓝色链霉菌中 ACT 和 RED 的合成显著下降, 因此, PhoR/P 对抗生素的负调控作用可能部分是由 *rpoZ* 介导的<sup>[33,35]</sup>。

最近, Allenby 等<sup>[36]</sup>通过 ChIP on chip 技术对 PhoP 的 Regulon 进行了更深入的解析, 从中我们得知 PhoR/P 对于抗生素合成的调控远比之前了解的要复杂。他们的研究显示, 除了直接调控 *afsS* 基因的转录以外, PhoP 还可以直接负调控 *bldA*、*cdaR* 以及 *scbA* 等重要抗生素合成调控基因的表达。*bldA* 基因编码链霉菌中识别稀有密码子 TTA 的 tRNA (亮氨酸-tRNA)<sup>[37]</sup>, PhoP 负调控 *bldA* 的转录将使其从转录水平(由 *afsS* 介导)和翻译水平上同时抑制 *redZ* 以及 *actII-ORF4* 的表达。*scbA* 为信号分子  $\gamma$ -丁内酯的合成基因, 该信号分子也参与抗生素(ACT、RED 以及 yCPK)的合成调控<sup>[38-39]</sup>, 表明 PhoP 可能通过 ScbR/A 调控机制间接影响这些抗生素的生物合成。*cdaR* 为 CDA 合成的途径特异性调控基因, 表明 PhoP 也参与了 CDA 抗生素合成的负调控。同时, 有意思的是, 在 ChIP 富集的靶 DNA 中, 3 个位于 yCPK 生物合成基因 *cpkB* 和 *cpkC* (编码聚酮合成酶, PKS)的内部, 暗示 PhoP 对于 yCPK 生物合成的影响可能是多条调控路径综合作用的结果。另外, 研究显示, *atrA* 也是 PhoP 的靶点之一, 由于 *atrA* 为 *actII-ORF4* 的上游调控基因之一<sup>[40]</sup>, 进一步证实 PhoP 可能通过多条调控路径共同影响抗生素的合成。

### 1.3 AfsQ1-Q2 (SCO4907/4906)

AfsQ1/Q2 的功能最早是在变铅链霉菌

(*Streptomyces lividans*)中被鉴定的, *afsQ1/Q2* 基因在变铅链霉菌中的过表达可以促进隐性抗生素 ACT 和 RED 以及 A 因子的生成; 但是, 如对天蓝色链霉菌中的 *afsQ1/Q2* 进行敲除, 则既不影响形态分化, 又没有影响抗生素的合成<sup>[41]</sup>。有趣的是, 笔者及其同事们在对许多 TCS 基因缺失突变体进行表型筛选的时候发现, 当 *afsQ1/Q2* 突变体培养于含有高浓度谷氨酸钠 (75 mmol/L)的基本培养基(MM)上时, ACT、RED 和 CDA 的产量都明显下调, 从而证实 AfsQ1/Q2 确实是抗生素合成的正调控基因, 但其发挥功能是培养条件依赖的<sup>[42-43]</sup>。研究还发现, AfsQ1/Q2 参与激活 *sigQ* 基因 (紧邻 *afsQ1/Q2* 基因, 转录方向相反, 两者间隔 349 bp) 的转录。不过, 有意思的是, *sigQ* 的缺失却出现与 *afsQ1/Q2* 突变体完全相反的表型变化, 表现为 ACT、RED 等抗生素提前并过量产生; 但如果 *afsQ1/Q2/sigQ* 同时缺失又出现与 *afsQ1/Q2* 突变体一样的表型<sup>[42]</sup>。这些结果预示 *afsQ1/Q2* 与 *sigQ* 共同参与抗生素的合成调控, 其中 *sigQ* 对 *afsQ1/Q2* 的功能起着拮抗作用, 从而使天蓝色链霉菌中抗生素的合成处于一个合理的水平。对于 *sigQ* 如何参与拮抗 AfsQ1/Q2 的功能的分子机制还在进一步研究中。

我们还进一步对 AfsQ1/Q2 参与次级代谢的调控机制进行了深入研究。结果显示, AfsQ1 可以直接结合于 *actII-ORF4*、*redZ*、*cdaR* 以及 *sigQ* 的启动子区域, 行使转录激活功能, 证明 AfsQ1/Q2 参与 ACT、RED 以及 CDA 合成的调控是由途径特异性调控基因直接介导的; 确定了 AfsQ1 DNA 结合位点的一致序列(Consensus sequence), 为一个间隔 6 bp 的 5 bp 正向重复序列 (5'-GTnAC-n<sub>6</sub>-GTnAC-3'), 该特征性序列存在于 *redZ*、*cdaR* 以及 *sigQ* 的启动子区域, 但 *actII-ORF4* 的上游缺乏类似的序列, 暗示

AfsQ1 结合位点存在一定的多样性<sup>[43]</sup>；鉴定了 AfsQ1 直接参与调控的靶基因集群(Regulon)，发现 AfsQ1 可以直接结合于 *cpkA/D* 的基因间隔区，促进 *cpkA* (编码一种 I 型 PKS 亚基)和 *cpkD* (编码一种分泌蛋白)的转录，预示 AfsQ1/Q2 可能还参与激活 yCPK 生物合成。表型分析证实，在 75 mmol/L 谷氨酸钠的 MM 培养基上，*afsQ1/Q2* 缺失突变体中 yCPK 产量急剧下降<sup>[43]</sup>。由此推测，AfsQ1/Q2 对于 yCPK 合成的调控作用可能是直接调控生物合成结构基因转录的结果，而并不依赖于途径特异性调控基因 *cpkO*，因为 AfsQ1 并不能与 *cpkO* 的启动子区域结合。

#### 1.4 DraR-K (SCO3063/3062)

DraR-K 是在天蓝色链霉菌中最新被鉴定的一对参与抗生素合成差异调控的新型双组分系统<sup>[44]</sup>，这项研究是由笔者所在课题组完成的。*draR-K* 双缺失或 *draR*, *draK* 单缺失突变体在常用培养基上(如 R2YE 与 MS)均未出现明显的表型变化。但是，有趣的是，当培养于添加了各种高浓度氮源的 MM 上时，呈现出 ACT 产量大幅度减少，而 RED 产量却明显提高的表型变化；此外，当培养于添加了 75 mmol/L 谷氨酸钠的 MM 上时，突变体分泌的黄色色素 yCPK 也明显增加。这些研究结果表明，DraR-K 只有在含有高浓度氮源的 MM 条件下才被激活，参与抗生素合成的差异调控。进一步研究显示，DraR-K 对 ACT 与 yCPK 生物合成的正负调控作用是由 *actII-ORF4* 以及 *cpkO* 直接介导的，然而 DraR-K 对 RED 产量的影响却并不依赖于途径特异性基因 *redD/Z*。这是首次报道链霉菌中存在由 TCS 介导的抗生素合成的差异调控<sup>[44]</sup>。

我们发现，在含有不同氮源的 MM 上，DraR-K 对 ACT 生物合成存在不同的调控模式：在含有谷氨酰胺的 MM 上，DraR-K 对 ACT 生物合成起主导作用，*draR-K* 的缺失导致 *actII-ORF4*

转录基本完全停止，ACT 产量的下降也最为明显；而在以谷氨酸钠为氮源的 MM 上，DraR-K 与另一双组分系统 AfsQ1/Q2 一起协同调控 ACT 的生物合成。通过 DNA footprinting 精确定位了 DraR 的 DNA 结合位点，分别位于 *actII-ORF4* 和 *kasO* 启动子上距离相应转录起始位点的-124 至 -98 nt 及-1 至-23 nt 的区域<sup>[44]</sup>，推测这些结合位点相对于启动子-10 与-35 区的位置决定着差异调控作用，进而对不同抗生素合成行使不同的调控功能。另外，由于 RED 与 ACT 存在共同的合成前体，因此，推测 ACT 合成减少导致的前体增加可能是 RED 生物合成上升的原因所在。

除虫链霉菌 NRRL-8165 中 *draR-K* 同源基因 *draR-Ksav* (*SAV\_3480/3481*)的缺失可以导致阿维菌素产量大幅度提高，而寡霉素的产量却下降<sup>[44]</sup>。这意味着由 DraR-K 介导的抗生素合成的差异调控机制在链霉菌中可能是保守的。

## 2 孤立的应答调控蛋白(Orphan RR)

通常情况下，典型 RR 的磷酸化口袋(Phosphorylation pocket)具有多个特征性的保守氨基酸残基，包括位于 N 末端的 2 个相邻的天冬氨酸(DD，至少含有其中一个)、1 个位于 54 位附近的天冬氨酸(D54)、1 个 82 位附近的羧基化残基(一般为丝氨酸或苏氨酸，S/T82)以及 1 个位于 105 位附近的赖氨酸残基(K105)<sup>[6]</sup>。而对于非典型的 RR，其磷酸化口袋缺乏上述 2 个或多个保守氨基酸残基。天蓝色链霉菌基因组共编码 13 个孤立的 RR，到目前为止，共有 6 个的功能被明确鉴定，其中 3 个与抗生素合成有关(表 1)，分别为 RedZ<sup>[53]</sup>、SCO3818<sup>[50]</sup>以及 GlnR<sup>[55]</sup>；而其余 3 个是在形态分化不同阶段发挥作用的 BldM<sup>[56]</sup>、WhiI<sup>[57-58]</sup>和 RamR<sup>[59-60]</sup>。下面重点介绍 RedZ 以及 GlnR 参与抗生素合成调控的研究进展。



## 2.1 RedZ (SCO5881)

RedZ 是天蓝色链霉菌中第一个被鉴定的参与抗生素合成调控的孤立 RR, 为 RED 生物合成的途径特异性激活蛋白, 其调控作用是通过提高另一个途径特异性调控基因 *redD* 的转录水平来实现的<sup>[61]</sup>。*redZ* 中含有 1 个 TTA 稀有密码子, 其只有在 *bldA* 编码的 tRNA (Leu-tRNA) 存在情况下才能有效翻译, 因此, *redZ* 的表达绝对依赖于 *bldA* 基因<sup>[53,61]</sup>。RedZ 的磷酸化口袋中缺乏保守的成对 Asp (11, 12-Asp)、Lys 以及磷酸化位点 Asp, 因此被称为非典型的 RR<sup>[6]</sup>。对于其活性调控方式一直是悬而未决的问题。最近, 中国科学院微生物研究所谭华荣和杨克迁研究员课题组的研究证实, RedZ 的活性受到其调控途径的终产物 RED 抗生素的调节, 从而揭示了一种全新的小分子配体介导的 RR 活性调节方式<sup>[62]</sup>。

## 2.2 GlnR (SCO4159)

GlnR 属于 OmpR 类调控蛋白家族, 序列比对显示 GlnR 仅有保守的位于 50 位的磷酸化位点(Asp)以及 79 位的苏氨酸(Thr)<sup>[63]</sup>, 因此, GlnR 应归类于非典型的孤立 RR。

在天蓝色链霉菌中, GlnR 的 Regulon 已经被鉴定, 共有超过 14 个氮代谢相关基因的转录受其直接调控, 并已确定了 GlnR 的 DNA 结合基序(GlnR binding box), 该 Binding box 可分为两个位点: 结合亲和力较低的 a-site 和亲和力较高的 b-site, GlnR 以 2 个二聚体的形式结合在两个 a-b-a-b 重复的 Binding box 上<sup>[54]</sup>。这种调控模式使 GlnR 可以根据细胞内氮源水平的不同, 精细调控下游不同氮代谢基因的转录。研究显示, GlnR 介导的氮代谢调控在放线菌十分保守<sup>[54,64]</sup>。除了天蓝色链霉菌外, 目前已对地中海拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)<sup>[65]</sup>、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)<sup>[66]</sup>、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)<sup>[64]</sup>和委内瑞

拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)<sup>[67]</sup>中 GlnR 的调控功能进行较为深入的研究。尤其在委内瑞拉链霉菌中, GlnR 被证实可以直接激活或者抑制 36 个靶基因的转录, 其中大部分为天蓝色链霉菌的同源氮代谢基因<sup>[67]</sup>。

目前, 越来越多的研究证据显示, 在产抗放线菌中 GlnR 也是一个重要的抗生素生物合成调控因子。例如, 在天蓝色链霉菌 M145 中, *glnR* 基因中断突变体基本不产生 ACT 和 RED, 蛋白质组学分析显示, 与原始株相比, *glnR* 突变体中两个参与 ACT 生物合成的基因编码蛋白 SCO5075 和 SCO5078 表达显著下调<sup>[55]</sup>。在地中海拟无枝菌酸菌 U32 中, GlnR 不仅参与调控氮代谢, 而且还与利福霉素(Rifamycin)的生物合成密切相关<sup>[65]</sup>。此外, 在委内瑞拉链霉菌中, 杰多霉素(Jadomycin)生物合成基因簇中的 2 个调控基因 *jadR1* 和 *jadR2* 之间的间隔序列可以被 GlnR 识别; 在氮限制培养条件下, 原始株中 *jadR1* 的转录提高 3.3 倍, 而 *glnR* 突变体中 *jadR1* 的表达则下降 1.7 倍<sup>[67]</sup>。对于 GlnR 介导的抗生素合成调控机制知之甚少, 大家推测 GlnR 对抗生素合成的影响可能是其全局调控氮代谢间接导致的。

## 3 孤立组氨酸蛋白激酶(Orphan HK)

天蓝色链霉菌基因组上共编码 17 个孤立 HK, 对于这类 HK 的研究非常少。笔者率先开展了孤立 HK 的功能研究, 鉴定了一个与抗生素合成密切相关的孤立 HK OhkA。该激酶是目前在链霉菌中唯一一个被功能鉴定的孤立 HK<sup>[52]</sup>。研究显示, OhkA (SCO1596)参与 ACT、RED、CDA、 $\gamma$ CPK 以及倍半萜类抗生素 Albaflavenone 等 5 种次级代谢产物合成的全局负调控。芯片结果显示, *ohkA* 的缺失不仅影响抗生素生物合成基因簇的转录, 而且还导致抗生素合成前体

丙二酰 CoA 合成酶基因(*accA2/B/E*)的转录显著下调。但由于目前尚未鉴定到与其匹配的 RR, 所以至今对其分子机制的了解很少。*ohkA* 的同源基因广泛存在于不同链霉菌中, 除虫链霉菌中 *ohkA* 同源基因(*SAV\_6741*)的缺失导致寡霉素 A 的大量合成, 预示 OhkA 是链霉菌中一个保守的抗生素合成负调控因子<sup>[52]</sup>。

## 4 结束语

目前, 对于天蓝色链霉菌中参与次级代谢调控的重要 TCS 的研究已经比较深入, 但总体上来看, 天蓝色链霉菌中 TCS 的研究还很不完善。一方面, 绝大多数的 TCS (70%以上)功能至今尚未知晓, 尤其是孤立 HK 的研究明显滞后, 到目前为止仅有一个功能被鉴定; 另外, 即使有些 TCS 的功能已明确, 但对其 HK 感受何种信号、RR 参与调控哪些靶基因以及作用机制是什么等问题尚未明了; 另一方面, 如前面提到的那样, 有这么多的 TCS 参与次级代谢调控, 那它们到底如何协调一致, 以及如何与其它类型的重要调控因子共同参与次级代谢调控的呢? 但随着研究的深入, 尤其是高通量 DNA-蛋白质相互作用分析技术(如 ChIP on chip)以及荧光标记 Footprinting 技术等的广泛应用, 必将极大地推动 TCS 的相关研究。鉴于链霉菌在次级代谢产业中的重要地位, 全面揭示链霉菌中 TCS 介导的次级代谢分子调控网络具有巨大的潜在应用价值。

## 参考文献

[1] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction[J]. Annual Review of Biochemistry, 2000(69): 183-215.  
[2] Falke JJ, Bass RB, Butler SL, et al. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal

transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1997(13): 457-512.  
[3] Cai SJ, Inouye M. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(27): 24155-24161.  
[4] Matsubara M, Mizuno T. EnvZ-independent phosphotransfer signaling pathway of the OmpR-mediated osmoregulatory expression of OmpC and OmpF in *Escherichia coli*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(2): 408-414.  
[5] Hoch JA. Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. Annual Review of Microbiology, 1993(47): 441-465.  
[6] Hutchings MI, Hoskisson PA, Chandra G, et al. Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt9): 2795-2806.  
[7] Calera JA, Calderone R. Histidine kinase, two-component signal transduction proteins of *Candida albicans* and the pathogenesis of candidosis[J]. Mycoses, 1999, 42(Suppl 2): 49-53.  
[8] Bretl DJ, Demetriadou C, Zahrt TC. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, 75(4): 566-582.  
[9] Calva E, Oropeza R. Two-component signal transduction systems, environmental signals, and virulence[J]. Microbial Ecology, 2006, 51(2): 166-176.  
[10] Chancey ST, Wood DW, Pierson LS 3rd. Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2294-2299.  
[11] Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(7):

- 1666–1681.
- [12] Ma Q, Wood TK. OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(10): 2735–2746.
- [13] Senadheera D, Cvitkovitch DG. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008(631): 178–188.
- [14] Koretke KK, Lupas AN, Warren PV, et al. Evolution of two-component signal transduction[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(12): 1956–1970.
- [15] Besant PG, Attwood PV. Mammalian histidine kinases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1754(1/2): 281–290.
- [16] West AH, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(6): 369–376.
- [17] Laub MT, Goulian M. Specificity in two-component signal transduction pathways[J]. *Annual Review of Genetics*, 2007(41): 121–145.
- [18] Martin JF, Liras P. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Current Opinion of Microbiology*, 2010, 13(3): 263–273.
- [19] 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.
- [20] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141–147.
- [21] Anderson TB, Brian P, Champness WC. Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(3): 553–566.
- [22] McKenzie NL, Nodwell JR. Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(14): 5284–5292.
- [23] Ryding NJ, Anderson TB, Champness WC. Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(3): 794–805.
- [24] Brenda SP, Stutzman-Engwall KJ. *Streptomyces avermitilis* regulatory genes for increased avermectin production. EP0997528A1[P], 2000-05-03.
- [25] Sheeler NL, MacMillan SV, Nodwell JR. Biochemical activities of the *absA* two-component system of *Streptomyces coelicolor*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(2): 687–696.
- [26] Sola-Landa A, Moura RS, Martin JF. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(10): 6133–6138.
- [27] Martin JF, Sola-Landa A, Santos-Beneit F, et al. Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(2): 165–174.
- [28] Santos-Beneit F, Rodriguez-Garcia A, Sola-Landa A, et al. Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(1): 53–68.
- [29] Sola-Landa A, Rodriguez-Garcia A, Apel AK, et al. Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(4): 1358–1368.
- [30] Wanner BL. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1993, 51(1): 47–54.
- [31] Lamarche MG, Wanner BL, Crepin S, et al. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(3): 461–473.
- [32] Hulett FM. The signal-transduction network for

- Pho regulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 19(5): 933–939.
- [33] Martin JF, Liras P. Cascades and networks of regulatory genes that control antibiotic biosynthesis[J]. *Subcellular Biochemistry*, 2012(64): 115–138.
- [34] Lee PC, Umeyama T, Horinouchi S. *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1413–1430.
- [35] Santos-Beneit F, Barriuso-Iglesias M, Fernandez-Martinez LT, et al. The RNA polymerase omega factor RpoZ is not essential for growth but is required for normal actinorhodin and undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*: Binding of PhoP to its promoter region[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(21): 7586–7594.
- [36] Allenby NE, Laing E, Bucca G, et al. Diverse control of metabolism and other cellular processes in *Streptomyces coelicolor* by the PhoP transcription factor: genome-wide identification of *in vivo* targets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(19): 9543–9556.
- [37] Hopwood DA. The Leeuwenhoek lecture, 1987. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production[J]. *Proceedings of the Royal Society of London- Series B: Biological Sciences*, 1988, 235(1279): 121–138.
- [38] Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, et al. A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(2): 465–479.
- [39] Takano E, Chakraborty R, Nihira T, et al. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 41(5): 1015–1028.
- [40] Uguru GC, Stephens KE, Stead JA, et al. Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(1): 131–150.
- [41] Ishizuka H, Horinouchi S, Kieser HM, et al. A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp.[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(23): 7585–7594.
- [42] Shu D, Chen L, Wang WH, et al. *afsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 81(6): 1149–1160.
- [43] Wang R, Mast Y, Wang J, et al. Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(1): 30–48.
- [44] Yu ZY, Zhu H, Dang FJ, et al. Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 85(3): 535–556.
- [45] Tseng HC, Chen CW. A cloned *ompR*-like gene of *Streptomyces lividans* 66 suppresses defective *melCI*, a putative copper-transfer gene[J]. *Molecular Microbiology*, 1991, 5(5): 1187–1196.
- [46] Bishop A, Fielding S, Dyson P, et al. Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production[J]. *Genome Research*, 2004, 14(5): 893–900.
- [47] Li YQ, Chen PL, Chen SF, et al. A pair of two-component regulatory genes *ecrA1/A2* in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Journal of Zhejiang University Science*, 2004, 5(2): 173–179.
- [48] Lu YH, Wang WH, Shu D, et al. Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(3): 625–635.
- [49] Rozas D, Gullon S, Mellado RP. A Novel two-component system involved in the transition to secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31760.

- [50] Wang WH, Shu D, Chen L, et al. Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 294(2): 150–156.
- [51] Yepes A, Rico S, Rodriguez-Garcia, et al. Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19980.
- [52] Lu YH, He JM, Zhu H, et al. An orphan histidine kinase, OhkA, regulates both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(12): 3020–3032.
- [53] Guthrie EP, Flaxman CS, White J, et al. A response-regulator-like activator of antibiotic synthesis from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with an amino-terminal domain that lacks a phosphorylation pocket[J]. Microbiology, 1998, 144 (Pt3): 727–738.
- [54] Tiffert Y, Supra P, Wurm R, et al. The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes[J]. Molecular Microbiology, 2008, 67(4): 861–880.
- [55] Tiffert Y, Franz-Wachtel M, Fladerer C, et al. Proteomic analysis of the GlnR-mediated response to nitrogen limitation in *Streptomyces coelicolor* M145[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010(89): 1149–1159.
- [56] 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.
- [57] Tian Y, Fowler K, Findlay K, et al. An unusual response regulator influences sporulation at early and late stages in *Streptomyces coelicolor*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(7): 2873–2885.
- [58] Ainsa JA, Parry HD, Chater KF. A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Molecular Microbiology, 1999, 34(3): 607–619.
- [59] Nguyen KT, Willey JM, Nguyen LD, et al. A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(5): 1223–1238.
- [60] O'Connor TJ, Kanellis P, Nodwell JR. The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(1): 45–57.
- [61] White J, Bibb M. *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(3): 627–633.
- [62] Wang L, Tian X, Wang J, et al. Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(21): 8617–8622.
- [63] Fink D, Weissschuh N, Reuther J, et al. Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(2): 331–347.
- [64] Amon J, Titgemeyer F, Burkovski A. Common patterns-unique features: nitrogen metabolism and regulation in Gram-positive bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(4): 588–605.
- [65] Yu H, Yao Y, Liu Y, et al. A complex role of *Amycolatopsis mediterranei* GlnR in nitrogen metabolism and related antibiotics production[J]. Archive of Microbiology, 2007, 188(1): 89–96.
- [66] Amon J, Brau T, Grimrath A, et al. Nitrogen control in *Mycobacterium smegmatis*: nitrogen-dependent expression of ammonium transport and assimilation proteins depends on the OmpR-type regulator GlnR[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(21): 7108–7116.
- [67] Pullan ST, Chandra G, Bibb MJ, et al. Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes[J]. BMC Genomics, 2011(12): 175.