

## 研究报告



## 洛蒙德链霉菌 S015 中 *cutR/cutS* 双组分调控系统对洛蒙真菌素合成的调控

严若冰 王威\* 张雪洪

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

**摘要:**【背景】*cutR/cutS* 双组分调控系统在链霉菌次级代谢过程中起重要作用。【目的】通过同源重组的方法在野生型 S015 菌株中分别敲除 *cutR* 和 *cutS*, 构建单基因缺失突变株, 研究 *cutR/cutS* 双组分调控系统对洛蒙真菌素合成的调控。【方法】对突变株及野生型菌株的发酵产物进行高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)分析, 通过 qPCR 测定基因表达量的变化。【结果】HPLC 产物分析发现, S015 $\Delta$ *cutR* 和 S015 $\Delta$ *cutS* 中洛蒙真菌素产量分别达到了 128.1 $\pm$ 26.4 mg/L 和 61.8 $\pm$ 4.5 mg/L, 分别为野生型 S015 产量的 11.5 倍和 5.5 倍。qPCR 检测发现, S015 $\Delta$ *cutR* 突变株中 *lomo14*、*lomo10*、*lphzB*、*lphzC*、*lphzE* 和 *lphzG* 的表达量分别达到野生型的 1151.7 $\pm$ 88.8、110.5 $\pm$ 5.8、129.3 $\pm$ 7.7、380.2 $\pm$ 34.6、348.2 $\pm$ 42.1 和 299.8 $\pm$ 38.2 倍; S015 $\Delta$ *cutS* 突变株中 *lomo14*、*lomo10*、*lphzB*、*lphzC*、*lphzE* 和 *lphzG* 的表达量分别达到野生型的 4.3 $\pm$ 0.5、2.2 $\pm$ 0.2、9.3 $\pm$ 0.9、10.3 $\pm$ 0.6、20.7 $\pm$ 1.5 和 20.4 $\pm$ 0.8 倍。【结论】*cutR/cutS* 双组分调控系统在洛蒙德链霉菌的洛蒙真菌素合成过程中对其合成途径核心基因和侧链修饰基因的表达有抑制作用, 从而抑制其合成。

关键词: 链霉菌, 双组分调控系统, 洛蒙真菌素

## Function of *cutR/cutS* two component system in lomofungin biosynthesis in *Streptomyces lomondensis* S015

YAN Ruo-Bing WANG Wei\* ZHANG Xue-Hong

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

**Abstract:** [Background] The *cutR/cutS* two component system plays a significant role in secondary metabolite in *Streptomyces*. [Objective] The aim of the study is to investigate the function of the *cutR/cutS* two component system in the production of lomofungin in *Streptomyces lomondensis* S015. [Methods] HPLC was used to analysis fermentation production, meanwhile accessing quantitative real-time PCR to monitor the levels of gene expression. [Results] HPLC results indicated that the yield of lomofungin in S015 $\Delta$ *cutR* and S015 $\Delta$ *cutS* reach the total amount of 128.1 $\pm$ 26.4 mg/L and 61.8 $\pm$ 4.5 mg/L respectively,

Foundation item: Shanghai Science and Technology Commission Scientific Research Project (16ZR1416700)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34207047; E-mail: weiwang100@sjtu.edu.cn

Received: 28-04-2018; Accepted: 28-05-2018

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(16ZR1416700)

\*通信作者: Tel: 021-34207047; E-mail: weiwang100@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-28; 接受日期: 2018-05-28

that is 11.5 and 5.5 times of the yield of wild type. Results of qPCR indicated that in S015 $\Delta$ *cutR* mutant the relative gene expression of *lomo14*, *lomo10*, *lphzB*, *lphzC*, *lphzE* and *lphzG* reached respectively 1 151.7 $\pm$ 88.8, 110.5 $\pm$ 5.8, 129.3 $\pm$ 7.7, 380.2 $\pm$ 34.6, 348.2 $\pm$ 42.1 and 299.8 $\pm$ 38.2 times of the wild type, and in S015 $\Delta$ *cutS* mutant the relative gene expression of *lomo14*, *lomo10*, *lphzB*, *lphzC*, *lphzE* and *lphzG* were respectively 4.3 $\pm$ 0.5, 2.2 $\pm$ 0.2, 9.3 $\pm$ 0.9, 10.3 $\pm$ 0.6, 20.7 $\pm$ 1.5 and 20.4 $\pm$ 0.8 times. **[Conclusion]** The study shows that the *cutR* and *cutS* negatively regulate several main synthetic genes and side-chain modification genes of lomofungin production in *S. lomondensis*, thereby reducing the production.

**Keywords:** *Streptomyces*, Two-component system, Lomofungin

土壤中分离的链霉菌、假单胞菌等微生物可以生产具有广谱抗菌、抑菌活性的吩嗪类次级代谢产物, 吩嗪及其衍生物对引起小麦全蚀病、水稻枯萎病等的植物病原菌有显著的抑制作用<sup>[1]</sup>, 也可用于肺结核及麻风病等疾病的治疗<sup>[2]</sup>。因此, 这类化合物在农业和医药领域越来越受到人们的重视。

大部分天然吩嗪类化合物是以前体物质吩嗪一羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)或吩嗪-1,6-二羧酸(Phenazine-1,6-dicarboxylate, PDC)为基础, 经过不同的修饰酶添加侧链基团形成。假单胞菌中吩嗪类化合物生物合成前体为 PCA, 而在链霉菌中合成的吩嗪类化合物除了以 PCA 为前体, 还可以由 PDC 作为前体物质<sup>[3]</sup>。研究表明, 作为吩嗪化合物合成前体的 PCA 和 PDC 主要来源于莽草酸途径<sup>[4]</sup>。

我们实验室前期在洛蒙德链霉菌 (*Streptomyces lomondensis*) S015 中分离鉴定出一种新型吩嗪类次级代谢产物——洛蒙真菌素(Lomofungin)。与假单胞菌相比, 链霉菌中吩嗪合成基因簇相关研究较少。在洛蒙德链霉菌中鉴定得到核心吩嗪合成基因簇 *lphzGFEDCB*, 经证明与假单胞菌的吩嗪合成基因簇具有高度相似性<sup>[5]</sup>。在假单胞菌的莽草酸代谢途径中, 由 *phzABCDEFG* 7 个基因组成的核心基因簇对吩嗪化合物合成起重要作用。在吩嗪化合物生物合成途径中, *phzC* 基因编码的 DAHP 合成酶 PhzC 催化 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate, DAHP)的生成。DAHP 进一步经莽草酸途径形成分支酸(Chorismic acid), 经 PhzE 催化<sup>[6]</sup>转变为 2-氨基-4-脱氧分支酸

(2-amino-2-desoxyisochorismic acid, ADIC)。ADIC 经 *phzD* 编码的异构分支酶催化水解得到 2,3-二氢-3-羟基邻氨基苯甲酸(Trans-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilic acid, DHHA), DHHA 经 PhzG、PhzF 等蛋白催化, 随后发生一系列二聚化反应、氧化反应和脱羧反应, 最终得到 PCA 和 PDC<sup>[7-9]</sup>。洛蒙德链霉菌 S015 的洛蒙真菌素生物合成过程中, 分支酸经吩嗪合成基因簇作用得到吩嗪合成前体 PDC, 推测在这个过程中 *lphzB* 和 *lphzG* 与吩嗪化合物前体物质成环相关, *lphzC* 作用于分支酸形成, *lphzE* 则编码蛋白催化分支酸生成 ADIC。中间产物 PDC 经侧链修饰反应获得各类吩嗪化合物。前期研究表明, *lomo10* 和 *lomo14* 为洛蒙真菌素侧链修饰过程中的侧链羟甲基化基因, PDC 经一系列反应生成洛蒙真菌素生物合成过程中的前体物质, 1-甲酯-6-甲酰-4,9-二羟基吩嗪(1-carbomethoxy-6-formyl-4,9-dihydroxyphenazine, CMFDP)<sup>[5]</sup>, 该前体经 *lomo10* 和 *lomo14* 的侧链修饰及其他反应生成洛蒙真菌素, 推测的洛蒙德链霉菌 S015 中洛蒙真菌素合成途径见图 1。

自然界中链霉菌、假单胞菌合成吩嗪类衍生物的产量较低。因此, 本实验希望通过基因工程手段改变菌种次级代谢调控网络, 以提高次级代谢产物的生物合成。双组分调控系统普遍存在于链霉菌次级代谢产物调控系统中, 这些双组分体系通常由膜相关组氨酸激酶、传感器以及在细胞质中作用的反应调节剂组成。传感器检测环境信号或压力, 调节蛋白触发细胞通过基因转录调节完成应答<sup>[10]</sup>。双组分调控系统广泛参与细胞的次级代谢调控过程,

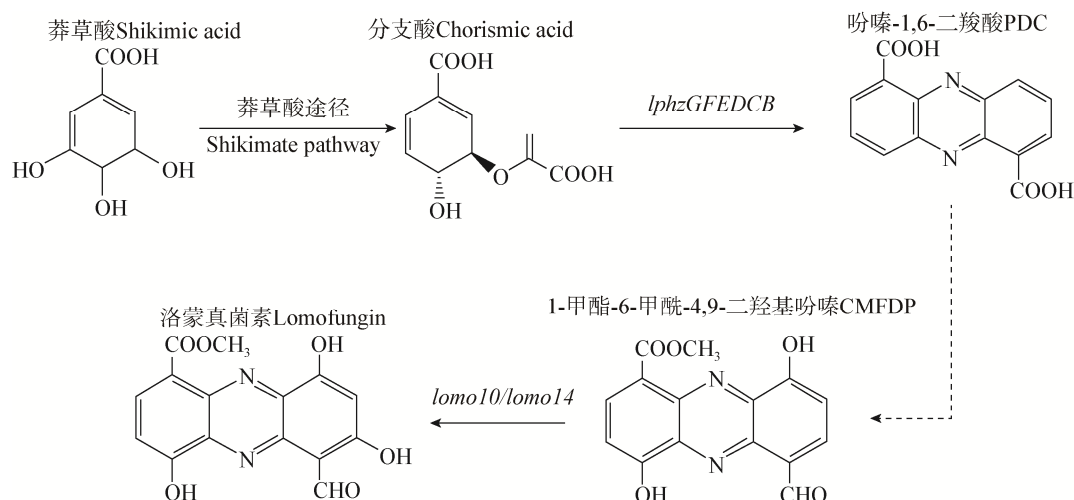


图 1 推测的洛蒙德链霉菌 S015 中洛蒙真菌素合成途径  
Figure 1 Proposed lomofungin biosynthetic pathway in *Streptomyces lomondensis* S015

*cutR/cutS* 双组分调控系统是链霉菌中最早被鉴定的双组分调控系统, 首先在变青链霉菌(*Streptomyces lividans*)中被发现并鉴定<sup>[11]</sup>。研究表明, *cutR/cutS* 双组分调控系统在链霉菌模式菌株天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)中对其主要次级代谢产物放线紫红素(Actinorhodin, ACT)起负调控作用<sup>[12]</sup>, 在变青链霉菌(*S. lividans*)中同样会抑制次级代谢产物的生成<sup>[13]</sup>。目前关于 *cutR/cutS* 双组分调控系统的研究报道较少, 关于该系统对链霉菌次级代谢的调控机

制尚未有详细阐述。本研究发现在洛蒙德链霉菌 S015 中该双组分调控系统对洛蒙真菌素的合成起负调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

本研究所使用的菌株及质粒见表 1。

#### 1.1.2 引物

本研究所使用的引物见表 2。

表 1 菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids involved in the study

菌株和质粒 Strains & plasmids	描述 Characteristics	来源 References
<i>Streptomyces lomondensis</i>		
S015	Wild type	Our lab
S015Δ <i>cutR</i>	In frame deletion of <i>cutR</i>	This study
S015Δ <i>cutS</i>	In frame deletion of <i>cutS</i>	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	For transformation	TransGen biotech
ET12567(pUZ8002)	For conjugation, Km <sup>R</sup> , Chl <sup>R</sup>	[14]
Plasmids		
pKC1139	Apr <sup>R</sup>	[15]
pKC1139-RH	Fused <i>cutR</i> homologous arms inserted in to pKC1139	This study
pKC1139-SH	Fused <i>cutS</i> homologous arms inserted in to pKC1139	This study

表 2 引物信息

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	用途 Purpose
R-UF	AAATTTAAGCTTTGAGGAGCCCTGTGACCGAC	<i>cutR</i> left homologous arm clone
R-UR	CACCGCATCGGCGAGCAGTT	
R-DF	CTGCTCGCCGATGCGGTGCGCCCGTCATCGTCACCGTC	<i>cutR</i> right homologous arm clone
R-DR	AAATTTTCTAGATCGACACCCAACCGGACTCCTC	
S-UF	AAATTTAAGCTTCCCCTTCGTACGGCCTGAT	<i>cutS</i> left homologous arm clone
S-UR	TGCCGCCGACGATCTTGAAG	
S-DF	TCAAGATCGTCGGCGGCACGGTCACATCTACGCCAGC	<i>cutS</i> right homologous arm clone
S-DR	AAATTTTCTAGATCTCGTCTCGCTGCGGTTTCAG	

### 1.1.3 培养基及抗生素

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15.0 (固体培养基), pH 7.5。

YEME 液体发酵培养基(g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽糖提取物 10.0, 葡萄糖 4.0, pH 7.0。

MS 固体培养基: 黄豆饼粉 30.0 g, 加适量水加热至沸腾, 煮沸 1 h 后用 6 层纱布过滤, 向滤液中加入甘露醇和琼脂各 20.0 g, 定容至 1 L。

2×YT 孢子预萌发培养基(g/L): 氯化钠 5.0, 酵母提取物 10.0, 胰蛋白胨 15.0, pH 7.5。

抗生素浓度(mg/L)如下: 氨苄青霉素(Ampicillin, Am) 100, 安普霉素(Apramycin, Apr) 50, 卡那霉素(Kanamycin, Km) 50, 氯霉素(Chloramphenicol, Chl) 25, 萘啶酮酸(Nalidixic acid) 40。

## 1.2 主要试剂及仪器

乙腈、2-丁酮、甲酸、丙三醇, 上海国药集团; 蛋白胨、酵母提取物, Oxoid 公司; 氯化钠、甘露醇、氯化钙, 上海凌峰化学试剂有限公司; 黄豆饼粉, 上海五四有限公司; 麦芽糖提取物, 北京索莱宝有限公司; 限制性内切酶, 大连宝生物工程有限公司。高效液相色谱分析仪、色谱柱, 安捷伦科技有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 菌株培养

所有大肠杆菌的培养均采用 LB 培养基。洛蒙德链霉菌 S015 的培养方法参考文献[16]: 液体培养或发酵采用 YEME 培养基, 培养温度为 28 °C, 摇床转速为 220 r/min; 固体培养采用 MS 固体培养基,

培养温度为 28 °C。

### 1.3.2 基因缺失菌株的构建及筛选验证

(1) 洛蒙德链霉菌 S015 全基因组 DNA 的提取  
根据 Tiangen 试剂盒说明书进行基因组 DNA 的提取。

#### (2) 接合转移

接合转移供体菌为 *E. coli* ET12567(pUZ8002), 受体菌为 *S. lomondensis* S015。接合转移操作方法参照文献[17]。

#### (3) 双交换基因缺失突变菌株的筛选和验证

参照文献[17]进行基因缺失突变株的筛选及验证。PCR 反应体系: ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL, DMSO 1.25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.75 μL, DNA 模板 1.25 μL, PrimerSTAR Max Premix 12.5 μL。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 20 s, 59 °C 45 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

### 1.3.3 生长曲线测定及产物分析

#### (1) 生长曲线测定

每 24 h 对发酵液进行取样测定生长曲线。取 200 μL 发酵菌液置于 EP 管中, 12 000×g 离心 5 min, 弃去上清, 以 1 mL ddH<sub>2</sub>O 重悬。稀释 3 倍后以 ddH<sub>2</sub>O 为空白对照, 利用紫外分光光度计测定 OD<sub>450</sub> 值。以发酵时间为横坐标, 以 OD<sub>450</sub> 值为纵坐标绘制菌株生长曲线。

#### (2) HPLC 分析

发酵液预处理: 取培养 4 d 的发酵液 2 mL, 12 000×g 离心 3 min, 吸取上层清液 1 mL, 以 6 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 2.0, 加入 1 mL 2-丁酮,

振荡混匀 5 min 萃取, 以  $12\ 000\times g$  离心 5 min。取上层有机相至洁净 1.5 mL 离心管中,  $33\ ^\circ\text{C}$  真空旋转蒸发仪旋转蒸干后, 溶于 1 mL 乙腈和 0.1% 甲酸水 1:1 (体积比) 混合液中, 振荡使之充分溶解, 使用  $0.22\ \mu\text{m}$  有机相滤头过滤至洁净 HPLC 小瓶中, 用于产物的 HPLC 分析。

产物的 HPLC 分析参照文献[18]。以 0.1% 甲酸溶液(A)和乙腈(B)为流动相, 1–4 min, A:B=8:2; 4–20 min, A:B=6:4; 20–30 min, A:B=8:2。检测波长为 270 nm, 流速 1 mL/min, 柱温  $30\ ^\circ\text{C}$ , 使用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )检测洛蒙真菌素, 保留时间为 18 min 左右时的产物为洛蒙真菌素。依据峰面积和洛蒙真菌素标准曲线( $y=0.015\ 4x-6.936\ 4$ ,  $R^2=0.991\ 8$ ; 其中  $y$  为产物浓度, 单位为 mg/L, 变量  $x$  为峰面积)进行产物定量。

### (3) qPCR 分析

取 1 mL 发酵 48 h 的菌液  $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $8\ 000\times g$  离心 5 min 收集菌丝体, 用带有直径为  $1\ \mu\text{m}$  玻璃珠的 Redzol 溶液悬浮菌丝体, 在细胞破碎仪上将菌丝体破碎(6 500 r/min, 20 s, 间歇 20 s, 振荡 2–3 个循环), 室温放置 2–3 min。匀浆后样品  $8\ 000\times g$  离心 3 min, 向上清中加入 200  $\mu\text{L}$  苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1 (体积比)的混合液以去除蛋白,  $12\ 000\times g$  离心 10 min 并向上清中加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿混匀;  $12\ 000\times g$  离心 10 min, 向上清中加入 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇混匀并加

入离心柱中;  $12\ 000\times g$  离心 2 min 后向离心柱中加 50  $\mu\text{L}$  DEPC-water 溶解 RNA,  $12\ 000\times g$  离心 1 min 收集样品。使用 Fermentas 公司的 RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 进行 RNA 反转录操作, cDNA 的 Real-time PCR 用 SYBR Green Real-time PCR 方法<sup>[19]</sup>进行。对 *lomo14*、*lomo10*、*lphzB*、*lphzC*、*lphzE* 和 *lphzG* 6 个基因设计引物, 以野生型 S015 的 16S rRNA 基因为内参基因, 进行 qPCR 实验。

### (4) 统计学分析方法

显著性计算采用双总体  $t$  检验方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 S015 $\Delta cutR$ 和 S015 $\Delta cutS$ 突变株的构建

使用同框敲除的原理构建 *cutR*、*cutS* 单基因缺失突变菌株。使用 UF/UR 和 DF/DR 引物对进行 PCR 扩增分别获取目的基因的上、下游同源臂片段, 对获得的上、下游同源臂片段进行融合 PCR, 通过内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切体系同时酶切片段和 pKC1139 载体, 酶切产物使用 LigationMix 酶连体系进行连接, 构建了敲除质粒。将敲除质粒转化至大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)作为接合转移供体菌, 与野生型 S015 进行接合转移, 挑取长出的接合子培养, 并用对应引物进行验证, 获得正确的目的基因缺失菌株, 其基因敲除原理如图 2 所示。

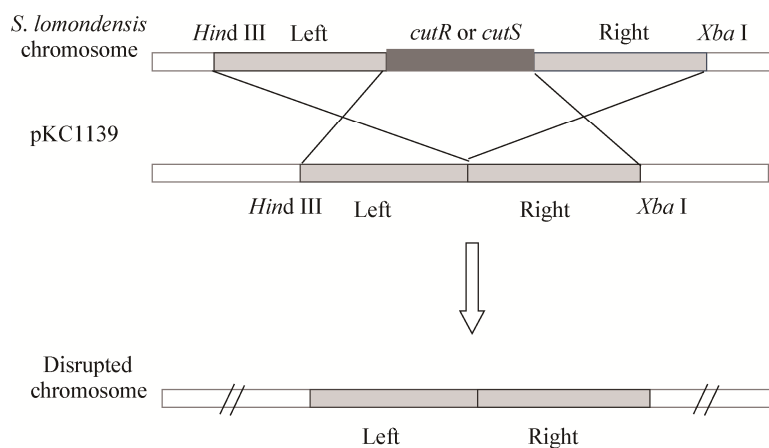


图 2 *cutR* 及 *cutS* 基因敲除原理

Figure 2 Mechanism of *cutR* and *cutS* knock-out

设计引物时,在 *cutR* 上游同源臂引物 R-UF 和下游同源臂引物 R-DR 的 5'端分别引入 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点及保护碱基,在下游同源臂引物 R-DF 的 5'端引入一段上游同源臂引物 R-UR 的 Overlap 序列以进行后续的融合 PCR 实验。上游同源臂片段为 1 597 bp,下游同源臂片段为 1 587 bp,同源臂总长度为 3 184 bp,预计敲除 *cutR* 基因片段长度为 562 bp。

按照同样的方法设计了 *cutS* 引物。*cutS* 上游同源臂片段长度为 1 517 bp,下游同源臂片段长度为 1 566 bp,同源臂总长度为 3 083 bp,预计敲除 *cutS* 基因片段长度为 952 bp。

其中 *cutR* 基因缺失菌株采用 R-UF/R-DR 引物对进行验证,预计野生型菌株的 PCR 扩增产物条带长度为 3 746 bp, *cutR* 基因缺失菌株对应条带长度为 3 184 bp,其 PCR 扩增验证电泳图谱如图 3A 所示; *cutS* 基因缺失菌株采用 S-UF/S-DR 引物对进行 PCR 验证,预计野生型菌株的 PCR 扩增产物条带长度为 4 035 bp, *cutS* 基因缺失菌株对应条带长度为 3 083 bp,其 PCR 扩增验证电泳图谱如图 3B 所示。电泳结果与预期相符, *cutR* 和 *cutS* 单基因敲除成功,敲除菌株分别命名为 S015 $\Delta$ *cutR* 和 S015 $\Delta$ *cutS*。

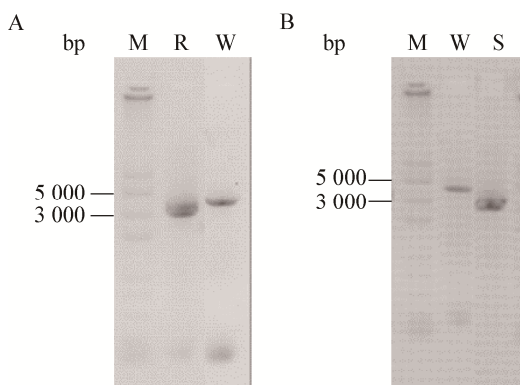


图3 *cutR* (A)及 *cutS* (B)基因敲除 PCR 扩增验证电泳图谱  
Figure 3 PCR validation of *cutR* (A) and *cutS* (B) gene deletion

注: M: DNA marker 2K Plus II; W: Wild-type S015; R: S015 $\Delta$ *cutR* 突变株; S: S015 $\Delta$ *cutS* 突变株。

Note: M: DNA marker 2K Plus II; W: Wild-type S015; R: S015 $\Delta$ *cutR* mutant; S: S015 $\Delta$ *cutS* mutant.

## 2.2 *cutR/cutS* 对洛蒙真菌素生物合成的影响

将洛蒙德链霉菌 S015 野生型菌株、S015 $\Delta$ *cutR* 及 S015 $\Delta$ *cutS* 突变株接种至 YEME 液体培养基中, 28 °C、220 r/min 发酵条件下培养, 在洛蒙真菌素产量达到最高(培养至 4 d)时取样进行 HPLC 分析, 3 株菌株发酵产物对应的 HPLC 实测图见图 4。

每 24 h 对发酵液取样测定细胞生长曲线, 如图 5A 所示, S015 $\Delta$ *cutS* 突变菌株与 S015 野生型菌株细胞生长没有明显区别, 说明 *cutS* 基因对细胞生长没有显著影响; S015 $\Delta$ *cutR* 发酵培养前 4 天的细胞生长较 S015 野生型菌株有所下降, 说明 *cutR* 基因的敲除对前期细胞生长有一定抑制作用。

依据洛蒙真菌素标准曲线对发酵 4 d 时的产物进行定量, 如图 5B 所示, 发酵 4 d 时 S015 $\Delta$ *cutR* 和 S015 $\Delta$ *cutS* 洛蒙真菌素产量分别达到 128.1 $\pm$ 25.4 mg/L 和 61.8 $\pm$ 4.5 mg/L, 分别是野生型菌株产量的 11.5 倍和 5.5 倍。

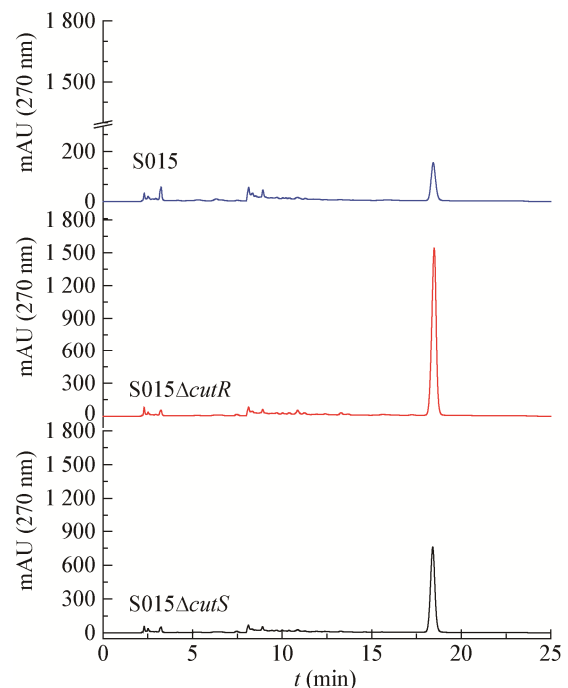


图4 菌株的发酵产物 HPLC 实测图

Figure 4 HPLC profiles of fermentation products from different strains



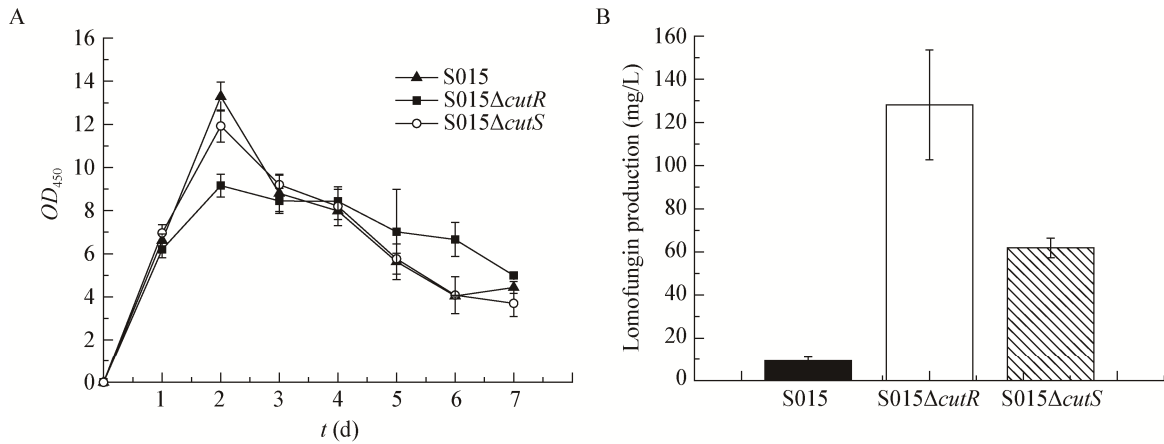


图 5 基因敲除对细胞生长(A)和洛蒙真菌素产量(B)的影响  
Figure 5 Effects of gene deletion on cell growth (A) and lomofungin production (B)

2.3 *cutR* 和 *cutS* 对洛蒙真菌素合成基因的转录影响

为考察 *cutR* 和 *cutS* 两个基因在转录水平上对链霉菌次级代谢的影响。取发酵 48 h 菌液, 用前述方法提取 RNA 并转录 cDNA, 以野生型 S015 的 16S rRNA 为内参基因, 对 *lomo14*、*lomo10*、*lphzB*、*lphzC*、*lphzE* 和 *lphzG* 合成基因进行 qPCR 分析, 所得结果如图 6 所示。S015Δ*cutR* 突变株中 *lomo14*、*lomo10*、*lphzB*、*lphzC*、*lphzE* 和 *lphzG* 的表达量分别达到野生型的 1 151.7±88.8、110.5±5.8、129.3±7.7、380.2±34.6、348.2±42.1 和 299.8±38.2 倍; S015Δ*cutS* 突变株中 *lomo14*、*lomo10*、*lphzB*、*lphzC*、*lphzE* 和 *lphzG* 的

表达量分别达到野生型的 4.3±0.5、2.2±0.2、9.3±0.9、10.3±0.6、20.7±1.5 和 20.4±0.8 倍, 均较野生型菌株有所提高。

3 讨论与结论

本文研究了 *cutR* 和 *cutS* 两个基因对洛蒙德链霉菌 S015 洛蒙真菌素合成的影响。发现 *cutR* 和 *cutS* 这两个基因对洛蒙德链霉菌洛蒙真菌素的合成起负调控作用。为进一步研究 *cutR* 和 *cutS* 对洛蒙真菌素合成的调控机制, 我们研究了这两个基因对洛蒙真菌素合成基因 *lomo14*、*lomo10*、*lphzB*、*lphzC*、*lphzE* 和 *lphzG* 转录水平的影响。其中 *lphzB*、*lphzC*、

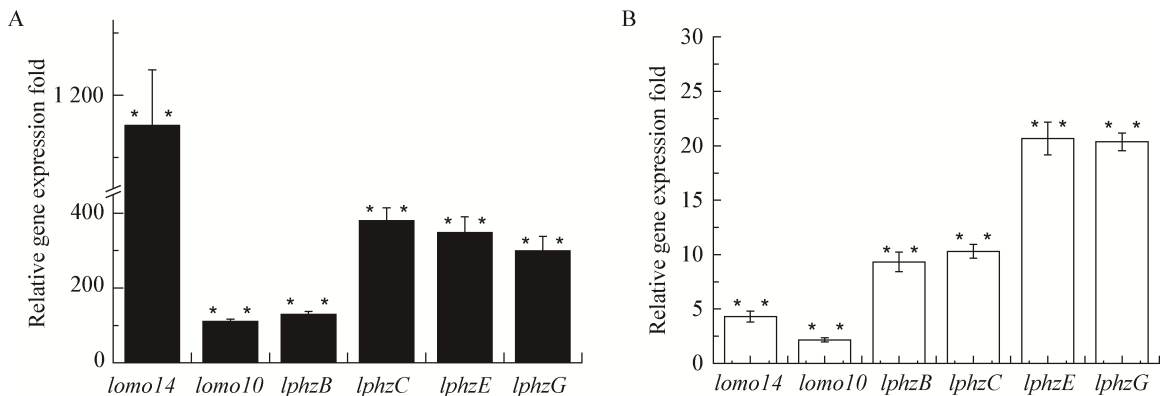


图 6 敲除株 S015Δ*cutR* (A) 及 S015Δ*cutS* (B) 中合成基因的相对转录活性  
Figure 6 Relatively transcriptional level of biosynthesis genes in strain S015Δ*cutR* (A) and S015Δ*cutS* (B)

注: \*\*: *t* 检验结果极显著。

Note: \*\*: The results of *t* test were extremely significant.

*lphzE* 和 *lphzG* 是 *lphz* 基因簇上基因, 该基因簇作用于吩嗪类化合物合成重要前体物质 PDC 的生物合成; *lomo10* 和 *lomo14* 则是洛蒙真菌素合成过程中其侧链羟基修饰相关的基因。S015 $\Delta$ *cutR* 和 S015 $\Delta$ *cutS* 突变株洛蒙真菌素合成过程中 *lomo14*、*lomo10*、*lphzB*、*lphzC*、*lphzE* 和 *lphzG* 表达水平均相对上调, 说明 *cutR* 和 *cutS* 对这些基因的表达有抑制作用。推测 *cutR* 和 *cutS* 均可抑制吩嗪中间产物合成及洛蒙真菌素合成的侧链修饰过程, 从而抑制洛蒙真菌素合成, 其调控机制有待进一步研究。

双组分调控系统普遍存在于链霉菌次级代谢产物调控系统中, 并广泛参与细胞次级代谢产物的合成调控。*cutR/cutS* 双组分调控系统已被证明分别在 *S. coelicolor*<sup>[8]</sup> 和 *S. lividans*<sup>[9]</sup> 中抑制其次级代谢产物 ACT 的生成, 但关于该双组分调控系统对链霉菌次级代谢的调控机制尚未有详细阐明。本文首次在洛蒙德链霉菌中鉴定出 *cutR/cutS* 双组分调控系统, 研究发现其对次级代谢产物洛蒙真菌素具较强的调控作用, 初步阐释了该双组分系统在洛蒙德链霉菌 S015 中调控洛蒙真菌素合成的机理, 为进一步对洛蒙德链霉菌进行基因工程改造奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Xu S, Pan XY, Luo JY, et al. Effects of phenazine-1-carboxylic acid on the biology of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2015, 117: 39-46
- [2] Laursen JB, Nielsen J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity[J]. Chemical Reviews, 2004, 104(3): 1663-1686
- [3] Kim CG, Yu TW, Fryhle CB, et al. 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC<sub>7</sub>N units in rifamycin and related antibiotics[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(11): 6030-6040
- [4] Qu L, Liu HZ, Hu HB, et al. The biosynthesis of natural phenazine[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2010, 35(3): 168-174 (in Chinese)  
屈丽, 刘宏志, 胡洪波, 等. 天然吩嗪化合物的生物合成[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(3): 168-174
- [5] Zhang CX, Sheng CL, Wang W, et al. Identification of the lomofungin biosynthesis gene cluster and associated flavin-dependent monooxygenase gene in *Streptomyces lomondensis* S015[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e136228
- [6] Parsons JF, Greenhagen BT, Shi K, et al. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Biochemistry, 2007, 46(7): 1821-1828
- [7] Gibson J, Sood A, Hogan DA. *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(2): 504-513
- [8] Mentel M, Ahuja EG, Mavrodi DV, et al. Of two make one: the biosynthesis of phenazines[J]. ChemBiochem, 2009, 10(14): 2295-2304
- [9] Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV, et al. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(3): 866-879
- [10] Cui CY, Yang CX, Song SH, et al. A novel two-component system modulates quorum sensing and pathogenicity in *Burkholderia cenocepacia*[J]. Molecular Microbiology, 2018, 108(1): 32-44
- [11] Tseng HC, Chen CW. A cloned *ompR*-like gene of *Streptomyces lividans* 66 suppresses defective *melC1*, a putative copper-transfer gene[J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(5): 1187-1196
- [12] Rodriguez H, Rico S, Diaz M, et al. Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 127
- [13] Chang HM, Chen MY, Shieh YT, et al. The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin[J]. Molecular Microbiology, 1996, 21(5): 1075-1085
- [14] Macneil DJ, Gewain KM, Ruby CL, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector[J]. Gene, 1992, 111(1): 61-68
- [15] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. Gene, 1992, 116(1): 43-49
- [16] Wang W, Wang HS, Hu HB, et al. Overexpression of *afsR* and optimization of metal chloride to improve lomofungin production in *Streptomyces lomondensis* S015[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(5): 672-680
- [17] Sheng CL, Wang W, Hu HB, et al. Function of a methyltransferase gene *lomo3* involved in the biosynthesis of lomofungin[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 575-582 (in Chinese)  
盛超兰, 王威, 胡洪波, 等. 一个甲基转移酶基因 *lomo3* 在洛蒙真菌素生物合成途径中的功能[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 575-582
- [18] Li S, Ye QM, Wang W, et al. High-performance liquid chromatography analysis of lomofungin in *Streptomyces lomondensis*[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013, 36(15): 2059-2068
- [19] Xie K, Peng HS, Hu HB, et al. OxyR, an important oxidative stress regulator to phenazines production and hydrogen peroxide resistance in *Pseudomonas chlororaphis* GP72[J]. Research in Microbiology, 2013, 168(10): 646-653