

链霉菌次级代谢调控机制进展*

张艳娟 洪 斌**

(中国医学科学院 中国协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要 链霉菌除具有复杂的形态分化特征外,还可以产生多种具有重要应用价值的次级代谢产物,这两个过程密切相关。因此,链霉菌存在着原核生物中罕见的庞大而复杂的调控网络。链霉菌在遗传水平有三个层次的调控,分别是:途径特异性调控、多效调控和全局调控。阐明这些调控网络将为利用代谢工程手段提高次级代谢产物的产量并对其进行结构改造奠定理论基础,还将有助于发现新的有价值的天然产物。

关键词 链霉菌 次级代谢 调控机制

链霉菌 (*Streptomyces*) 是一种革兰氏阳性丝状放线菌,可产生多种类型的具有重要应用价值的次级代谢产物,如抗生素、免疫调节剂等,这些次级代谢产物的产生与细胞复杂的分化密切相关。因此,链霉菌存在着原核生物中罕见的庞大而复杂的调控网络。在遗传水平,链霉菌次级代谢调控有三个层次,分别是:途径特异性调控 (pathway specific regulation)、多效调控 (pleiotropic regulation) 和全局调控 (global regulation)。研究次级代谢调控的分子机制将对利用代谢工程手段得到理想的天然产物和提高其产量具有极大的促进作用。如可以利用增加正调控基因的表达或抑制负调控基因表达等方法提高终产物的产量,或通过改造细胞内现存的代谢途径,控制代谢物质流,产生传统途径中的中间产物或经修饰的终产物。本文就近年来链霉菌次级代谢调控机制的研究进展进行综述。

1 途径特异性调控

次级代谢产物的生物合成基因常位于同一基因簇中,目前研究较多的是抗生素生物合成基因簇。在基因簇中常包含一个或多个途径特异性调控基因,它们一般调控一种抗生素或几种具有某些共同生物合成途径的抗生素的生物合成。这种调控依赖于细胞生长周期。

目前在链霉菌中发现了很多途径特异性基因参与次级代谢的调控,如天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) 中 *actII-of 4* 调控放线紫红素 (actinorhodin) 生物合成; *redD* 调控十一烷基灵菌红素 (undecylprodigiosin) 的生物合成^[1]; 波赛链霉菌 (*S. peucetius*) 中, *dnrI* 是柔红霉素 (daunorubicin) 生物合成的激活因子^[2]; Kawachi 等^[3] 在维基尼链霉菌 (*S. virginiae*) 中发现了维基尼霉素 (virginiamycin, VM) 生物合成的途径特异性调控基因——*vmSR* 基因。

链霉菌中途径特异性调控因子不断发现,形成了一个调控蛋白家族——链霉菌抗生素调控蛋白家族 (*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins, SARP)。该家族成员 N 端含有一个 OmpR 样 DNA 结合结构域^[4]。如 *actII-of 4*、*redD* 和 *dnrI* 等基因编码的蛋白都属于此家族。

随着链霉菌次级代谢调控机制研究的不断深入,在弗氏链霉菌 (*S. fradiae*) 中发现大环内酯类抗生素泰乐菌素 (tylosin) 的生物合成基因簇中至少存在五个途径特异性调控基因,分别是 *tylP*、*tylQ*、*tylS*、*tylT* 和 *tylR*^[5]。在目前已知的抗生素生物合成基因簇中,含有如此多的调控基因非常罕见,这些调控基因之间存在着互相调控的网络 (见图 1)。因此,弗氏链霉菌调控基因的研究已引起人们极大关注。*TylP* 是 γ -丁酮内酯受体^[6], 除抑制 *tylQ* 和 *tylS* 的表达, *TylP* 还作用于其自身编码基因进行自我调节; *TylQ* 通过调控 *tylR* 的表达抑制泰乐菌素的生成^[7]; *TylR* 是泰乐菌素生物合成结构基因的总

收稿日期: 2004-06-10 修回日期: 2004-09-03

* 教育部“优秀青年教师资助计划”资助项目

** 通讯作者, 电子信箱: binhong69@hotmail.com

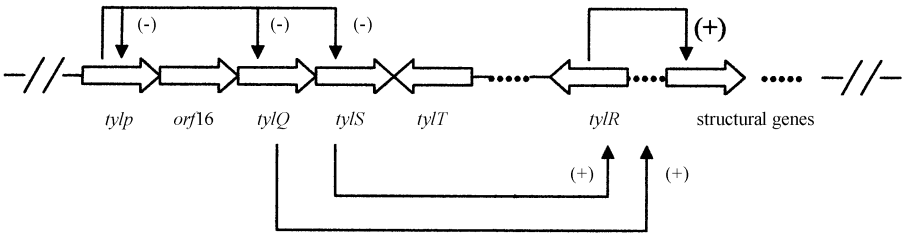


图 1 泰乐菌素生物合成基因簇的途径特异性调控基因调控网络示意图

(+): 激活 (-): 抑制

Fig. 1 A model for the regulation of the pathway specific regulatory genes of tylosin biosynthetic gene cluster

(+): activate (-): repress

激活因子^[5]; TyIS 和 TyIT 两个蛋白是 SARP 家族成员, TyIS 直接或者间接调控 *tylR* 的表达, TyIT 不是合成泰乐菌素必需的因子^[8]。此调控网络的最终阐明将有助于研究其它链霉菌的次级代谢调控网络。

球孢链霉菌 G-1027(*S. globisporus* G-1027) 由我所分离得到, 可产生一种新型的烯二炔类抗肿瘤抗生素——力达霉素(lidamycin), 目前已进入临床研究。本实验室对其生物合成过程中的途径特异性调控基因进行了研究。力达霉素生物合成基因簇已被克隆^[9], 根据氨基酸序列比对分析, 推测其中至少存在三个途径特异性调控基因: *sgcR1*、*sgcR2* 和 *sgcR3*。*SgcR1* 蛋白与 *StrR* 具有高度同源性, *StrR* 是灰色链霉菌中链霉素生物合成的转录激活蛋白; *SgcR2* 属于 AraC 家族, 此家族成员均为转录调控因子; *SgcR3* 与泰乐菌素生物合成的调控蛋白 TyIR 具有高度同源性, 它们可能是力达霉素生物合成中重要的转录调控因子。目前正在采用基因中断等方法研究这三个基因的功能以及它们之间的级联调控关系。生物合成调控网络的阐明将为提高力达霉素产量及结构改造奠定理论基础。

2 多效调控

在某些链霉菌中发现了一类小分子物质—— γ -丁酮内酯(γ -butyrolactone), 可多效调控抗生素和色素等次级代谢产物的合成, 有些还参与细胞形态分化过程, 被认为是链霉菌体内的“激素”。至今已发现十几种 γ -丁酮内酯分子, 根据其结构的细微差别, 可分为三类: A 因子(A-factor)型、维基尼丁烯羟酸内酯(virginiae butanolide, VB)型和 IM-2 型。各类型成员及存在的链霉菌见表 1。

表 1 γ -丁酮内酯各类型成员及存在的菌株

Tab 1 Three groups of γ -butyrolactones in *Streptomyces*

γ -丁酮内酯	成员	存在菌株
A 因子型	A 因子	灰色链霉菌(<i>S. griseus</i>)
VB 型	VB A、VB B、VB C、 VB D 和 VB E 三种 G α fe s 因子	维基尼链霉菌(<i>S. virginiae</i>) 比基尼链霉菌(<i>S. bikiniensis</i>) 蓝微褐链霉菌(<i>S. cyaneofuscatus</i>)
IM-2 型	IM-2 SCB1 因子 I	浅紫灰链霉菌(<i>S. lavendulae</i>) 天蓝色链霉菌(<i>S. coelicolor</i>) 绿色产色链霉菌(<i>S. viridochromogenes</i>)

2.1 A 因子对次级代谢的调控

A 因子存在于灰色链霉菌中, 调控灰色链霉菌的链霉素和黄色色素的产生以及链霉素抗性等, 同时也参与了细胞分化过程^[10]。当细胞进入生长稳定期, A 因子浓度到达一定临界值时, 与 A 因子受体蛋白(A-factor receptor protein, ArpA)结合, 启动调控网络。ArpA 是一种 DNA 结合蛋白, 以二聚体形式结合在 *adpA* 启动子-35 和-10 区, 抑制其转录。A 因子与 ArpA 结合后, 复合物从 DNA 序列上脱离, *adpA* 开始转录。*AdpA* 通过以下几个途径将 A 因子信号放大:

- (1) *AdpA* 激活 *strR*。*strR* 编码途径特异性激活因子 *StrR*, 激活链霉素的生物合成;
- (2) *AdpA* 激活 *aphD* 的转录。*AphD* 使灰色链霉菌获得自身抗性;
- (3) *AdpA* 同时也增强了 *ornA* 的转录。*ornA* 位于 *adpA* 下游, *OrnA* 具有 3'~5' 外切核糖核酸酶活性, 可将非必需 mRNA 降解, 为刚开始的转录快速提供单核苷酸^[11]。
- (4) 一种 *AdpA* 依赖的 DNA 结合蛋白参与了黄色色素的产生。

2.2 VB 对次级代谢的调控

维基尼链霉菌可产生五种 γ -丁酮内酯——VB 族, VB 参与了维基尼霉素 M1 和 S 两种抗生素生物合成的调控。目前, 对 VB 参与的调控网络尚不清楚, 但其中部分基因的功能已被阐明。

当 VB 浓度低于一定临界值时, VB 特异性受体 BarA 结合在 DNA 靶序列上, 抑制靶基因转录。BarA 可抑制其自身合成, 形成自我调节环路, 感受细胞内 VB 浓度, 使其维持在一定水平。当细胞进入指数生长后期时, VB 浓度不断增大, 与 BarA 结合后, 使 BarA 脱离 DNA, 被抑制的基因开始转录, 环路被破坏, BarA 也逐渐增多。BarX 与 BarA 通过蛋白与蛋白之间的相互作用, 加强 BarA 的 DNA 结合能力, 是 BarA 的协同抑制子^[12]。

将 BarA 的 HTH 结构域破坏得到的突变株 NH1 不再产生 VB; 将 BarA 的 C 端破坏但保留 HTH 结构域得到的突变株 NH2 仍然产生 VB, 但在 VB 结合实验中未显示与 VB 结合的活性。这些说明 VB-BarA 途径调控 VB 的生物合成, 并且 HTH 结构域对于 VB 的生物合成至关重要^[13]。

BarA 的靶基因除其自身的编码基因 *barA* 外, 还有 *barB*、*varS* 和 *varM* 等基因。BarA 特异结合到 *barB* 上游靶序列, BarB 抑制途径特异性调控基因 *vmsR* 的转录, 所以 Matsuno 等^[14]推测在 *barA* 调控的下游至少还存在一个基因(*gene X*), 可激活 *vmsR* 转录。这样, 由 BarB 和蛋白 X 来共同决定 *vmsR* 是否开始转录。

varS 和 *varM* 是维基尼链霉菌的自身抗性基因, 两基因转录后, 使细胞耐受自身产生的抗生素。*varR* 与 *varS* 共用同一个转录单位, VarR 结合在 *varS* 的启动子区, 当链霉菌刚刚产生维基尼霉素 S 时, 维基尼霉素 S 与 VarR 结合, 后者脱离 DNA, *varS* 开始转录^[15]。

2.3 IM2 对次级代谢的调控

浅紫灰链霉菌在生长初期产生抗生素 D-环丝氨酸 (D-cycloserine), 但在后期产生核苷抗生素焦土霉素 (showdomycin) 和最小霉素 (minimycin) 以及蓝色色素。IM-2 与其受体 FarA 结合对浅紫灰链霉菌次级代谢过程的信号传导起重要调控作用。Kitani 等^[16]提出了 IM-2 介导的信号传导途径。FarA 作为转录抑制因子抑制其自身编码基因 *farA* 的转录, 形成自我调节环路, 这与维基尼链霉菌中的 VB-BarA 环路相似。核苷抗生素和蓝色色素的

生物合成由 FarA 负调控。*farA* 突变株的 D-环丝氨酸的产量明显上升, 可能是因为未结合 IM-2 的 FarA 抑制了 D-环丝氨酸的生物合成过程中的抑制因子, 或者激活了此过程中的激活因子。

3 全局调控

链霉菌中存在两种类型的双组分调节系统, 分别是原核型和真核型双组分调节系统, 它们对次级代谢和形态分化进行全局调控。全局调控基因一般位于抗生素生物合成基因簇之外。

原核型双组分调节系统一般包括一个组氨酸蛋白激酶和一个应答调控子。组氨酸蛋白激酶结合在细胞膜上, 感受环境变化, 并在组氨酸残基上发生自我磷酸化, 进而应答调控子发生磷酸化, 并被激活, 将信号传递给下游靶基因。原核型双组分调节系统有 *absA* 1/A2, *cutR*/S, *gfsQ* 1/Q2 等。*absA* 1/A2 调控天蓝色链霉菌四种次级代谢产物的生物合成, *cutR*/S 和 *gfsQ* 1/Q2 分别对变铅青链霉菌 (*S. lividans*) 和天蓝色链霉菌放线紫红素的生物合成进行全局调控。近来, Solar Landa 等^[17]在变铅青链霉菌中又发现了一对新的双组分调节系统——*phoR*-*phoP*。PhoR 是结合在膜上的感受蛋白, 而 PhoP 可与 DNA 结合, 是 OmpR 家族成员。*phoR*-*phoP* 系统是碱性磷酸酶表达所必需的。

真核型双组分调节系统主要是由丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化调节, 此调节系统在链霉菌中普遍存在, 类似于在真核细胞中发现的信号传导。AfsK/AfsR 是天蓝色链霉菌和灰色链霉菌中的一个双组分调节系统。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AfsK 位于细胞内膜, 可发生自我磷酸化。AfsR 是一种 DNA 结合蛋白, 结合在 *gfsS* 的启动子区, AfsR 的 ATPase 活性是启动 *gfsS* 转录所必需的, 因此 AfsR 是一种独特的转录因子^[18]。AfsR 的 DNA 结合活性和 ATPase 活性是由丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化调节的。在天蓝色链霉菌 A3(2) 中, *gfsK* 上游区域的一个开放阅读框编码蛋白 KbpA。KbpA 结合在非磷酸化的 AfsK 的具有激酶催化活性的 N 端, 抑制 AfsK 的丝氨酸/苏氨酸残基自我磷酸化。当外界信号刺激使 KbpA 与 AfsK 脱离后, 后者发生自我磷酸化, 继而使 AfsR 磷酸化, 调控次级代谢和细胞分化。Umeyama 等^[19]又发现了另外两种可将 AfsR 丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化的激酶。这些 AfsK 同源物识别各自信号, 并通过磷酸化将信号传递给

AfsR, AfsR 将这些信号进行整合后传递到下游基因。AfsK/AfsR 调控天蓝色链霉菌放线紫红素的生物合成, 将 *afsK* 或 *afsR* 功能中断后, 放线紫红素的产量下降。

4 展望

目前, 天蓝色链霉菌和阿维链霉菌 (*S. avermectilis*) 基因组测序已完成, 在天蓝色链霉菌中发现了 24 个编码色素等次级代谢产物的基因簇, 在阿维链霉菌中也发现 30 个这样的基因簇^[20]。这个数字远远多于在这两种链霉菌中已发现的次级代谢产物的数量, 只是利用现有的培养条件和筛选方法还不能得到如此多的天然产物, 而链霉菌次级代谢调控分子机制的阐明将为发现更多天然产物提供理论依据。随着基因组学和蛋白质组学等领域的新技术的不断涌现和应用, 可以对链霉菌基因组和蛋白质组进行分析, 建立生理学和数学模型, 定量分析调控基因在时间和空间上的表达, 链霉菌次级代谢调控分子机制的研究将得到突飞猛进的发展。对链霉菌基因组以及次级代谢调控网络的研究必将促进更多新型天然产物的发现。

参考文献

- [1] Sevcikova B, Komaneec J. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3 (2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. Arch Microbiol, 2004, 181(5): 384~ 389
- [2] Tang L, Grimm A, Zhang Y-X, et al. Purification and characterization of the DNA binding protein DnrI, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces paucatus*. Mol Microbiol, 1996, 22(5): 801~ 813
- [3] Kawachi R, Wangchaisonthom U, Nihira T, et al. Identification by gene deletion analysis of a regulator, VmsR, that controls virginiamycin biosynthesis in *Streptomyces virginiae*. J Bacteriol, 2000, 182(21): 6259~ 6263
- [4] Arias P, Fernández Moreno M A, Malpartida F, et al. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) as a DNA-binding protein. J Bacteriol, 1999, 181(22): 6958~ 6968
- [5] Bate N, Burler A R, Gandeche A R, et al. Multiple regulatory genes in the tylosin biosynthetic cluster of *Streptomyces fradiae*. Chem Biol, 1999, 6(9): 617~ 624
- [6] Stratigopoulos G, Gandeche A R, Cundliffe E. Regulation of tylosin production and morphological differentiation in *Streptomyces fradiae* by TyP, a deduced γ -butyrolactone receptor. Mol Microbiol, 2002,

45(3): 735~ 744

- [7] Stratigopoulos G, Cundliffe E. Expression analysis of the tylosin biosynthetic gene cluster: pivotal regulatory role of the *tylQ* product. Chem Biol, 2002, 9(1): 71~ 78
- [8] Bate N, Stratigopoulos G, Cundliffe E. Differential roles of two SARP encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis. Mol Microbiol, 2002, 43(2): 449~ 458
- [9] Liu W, Christenson S D, Sandage S, et al. Biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic G-1027. Science, 2002, 297(5584): 1170~ 1173
- [10] Ohnishi Y, Kameyama S, Onaka H, et al. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. Mol Microbiol, 1999, 34(1): 102~ 111
- [11] Ohnishi Y, Nishiyama Y, Sato R, et al. An oligonucleotide gene in *Streptomyces griseus*. J Bacteriol, 2000, 182(16): 4647~ 4653
- [12] Kawachi R, Akashi T, Kamitani Y, et al. Identification of an AfsA homologue (BarX) from *Streptomyces virginiae* as a pleiotropic regulator controlling autoregulator biosynthesis, virginiamycin biosynthesis and virginiamycin M1 resistance. Mol Microbiol, 2000, 36(2): 302~ 313
- [13] Nakano H, Takehara E, Nihira T, et al. Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae* *barA* gene encoding the butyrolactone autoregulator receptor reveals that the BarA acts as a repressor in virginiamycin biosynthesis. J Bacteriol, 1998, 180(13): 3317~ 3322
- [14] Matsuno K, Yamada Y, Lee G-K, et al. Identification by gene deletion analysis of *barB* as a negative regulator controlling an early process of virginiamycin biosynthesis in *Streptomyces virginiae*. Arch Microbiol, 2004, 181(1): 52~ 59
- [15] Namwat W, Lee G-K, Kinoshita H, et al. Identification of the *varR* gene as a transcriptional regulator of virginiamycin S resistance in *Streptomyces virginiae*. J Bacteriol, 2001, 183(6): 2025~ 2031
- [16] Kiani S, Yamada Y, Nihira T. Gene replacement analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) reveals that FarA acts as a novel regulator in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae* FRF-5. J Bacteriol, 2001, 183(14): 4357~ 4363
- [17] Solar-Landa A, Moura R S, Martí n J F. The two component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. PNAS, 2003, 100(10): 6133~ 6138
- [18] Lee P-C, 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). Mol Microbiol, 2002, 43(6): 1413~ 1430
- [19] Umeyama T, Horinouchi S. Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK binding protein. J Bacteriol, 2001, 183(19): 5506~ 5512
- [20] Hopwood D A. The *Streptomyces* genome—be prepared! Nat Biotechnol, 2003, 21(5): 505~ 506

(下转第47页)

- [27] Bridge A J, Pebernard S, Ducraux A, et al. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genetics*, 2003, 34: 263~ 264
- [28] Sledz C A, Holko M, de Veer M J, et al. Activation of the interferon system by short interfering RNAs. *Nature cell biology*, 2003, 9: 834 ~ 839
- [29] Peter S, Ryszard K. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest*, 2003, 112: 481~ 486
- [30] Watanabe T, Sullenger B A. Induction of wild type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8490~ 8494

Progress in the Studies of Antisense Technologies

WANG Bo CHEN Mei-hong

(National Laboratory of Medical Biology, Institute of Basic Medical Science,
Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100005, China)

Abstract Antisense technologies inhibit the expression of a target gene in a sequence specific manner, with DNA or RNA molecules binding complementally to the target mRNA via Watson Crick base pairing. As a result, the target mRNA is either degraded or blocked for translation by various mechanisms. Compared with other loss of function studying methods such as gene knockout, antisense technologies exhibit advantages such as low cost, short period, and easy operation etc. This review briefly summarizes the latest progress and problems in antisense technologies that are in common use, and compares the advantages and disadvantages of these technologies.

Key words Antisense technologies Antisense oligonucleotides Ribozymes DNazymes RNA interference siRNA

(上接第 42 页)

Regulatory Mechanism of Secondary Metabolism in *Streptomyces*

ZHANG Yarr Juan HONG Bin*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract *Streptomyces* is Gram positive, filamentous, soil inhabiting bacteria, which is characterized by the complex morphological differentiation and the ability to produce various valuable secondary metabolites, including compounds used as antimicrobial, antiviral, antitumor, antiparasitic and immunosuppressive drugs. There are huge and complicated regulatory networks of secondary metabolism in *Streptomyces*. These networks can be classified into three levels in genetics. The lowest level is pathway specific regulation. The regulatory genes are cluster linked and regulate transcription of antibiotic biosynthetic genes. This regulation is growth phase dependent. The middle one is pleiotropic regulation. γ -butyrolactone is a low-weight molecule, which is expected to be the “hormone” of *Streptomyces*. The signalling systems in which γ -butyrolactone is involved control more than one pathway of secondary metabolism and/or morphological differentiation. The highest one is global regulation, regulating both cell differentiation and secondary metabolites production. These genes usually lie beyond the biosynthetic gene cluster. Two-component-type signal transduction systems are global regulators in *Streptomyces*. With the new developed technologies, including microarray applying to the research of the secondary metabolism regulation, more regulatory networks will be elucidated. These knowledge will provide the basis for elevating the yields of secondary metabolites by the method of metabolic engineering, optimizing their structure and investigating more novel and useful agents.

Key words *Streptomyces* Secondary metabolism Regulatory mechanism