

天蓝色链霉菌中抗生素合成相关双组分调控系统
AfsQ1/Q2上游信号传导机制的研究*陈允亮¹⁾ 杨云鹏²⁾ 李国权¹⁾ 毛雪芳¹⁾ 贾卫东¹⁾ 施爱平^{1)**} 芦银华^{3)**}¹⁾ 江苏大学农业工程学院, 镇江 212013; ²⁾ 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 上海 200031;³⁾ 上海师范大学生命科学学院, 上海 200234)

摘要 链霉菌是重要的工业微生物, 能够合成众多具有生物活性的次级代谢产物, 如抗生素、抗肿瘤药物以及免疫抑制剂等. 次级代谢产物的合成受到多层次严格调控, 深入开展相关机制研究将对工业菌株的高效育种提供重要理论指导. 链霉菌中存在的两类关键信号传导系统, 包括双组分系统 (two-component system, TCS) 和胞质外功能 σ 因子 (extracytoplasmic function σ , ECF- σ), 它们在次级代谢过程中发挥着重要的调控功能, 但至今对于它们如何协同调控次级代谢的分子机制知之甚少. 在前期研究工作中, 我们在链霉菌模式菌株——天蓝色链霉菌中鉴定了一个参与抗生素生物合成调控的基因簇 *sigQ-afsQ1-4*, 其中 *sigQ* 编码 ECF- σ 因子 (σ^Q), *afsQ1/Q2* 编码一对 TCS, *afsQ3/Q4* 分别编码脂蛋白和跨膜蛋白. 研究证实, TCS AfsQ1/Q2 为抗生素生物合成的激活因子, *sigQ* 的转录受到 AfsQ1/Q2 的直接调控, 但 σ^Q 的功能正好相反, 参与抗生素合成的负调控, 即 σ^Q 对 AfsQ1/Q2 的功能存在拮抗作用. 在前期工作基础上, 本研究通过基因缺失突变体构建、转录分析等对 *sigQ/afsQ1-4* 基因簇内的基因功能及其相互作用关系进行了系统研究, 并对 σ^Q 参与 AfsQ1/Q2 功能的拮抗机制进行了深入研究. 结果显示, *sigQ* 的缺失可显著下调膜蛋白基因 *afsQ4* 的表达, 而在 *sigQ* 缺失突变体 ($\Delta sigQ$) 中导入 *afsQ4* 可以很好回补突变体表型, 由此表明 *afsQ4* 是 σ^Q 的下游调控靶点, σ^Q 的调控功能可能一定程度上是通过 AfsQ4 来实现. 进一步体外磷酸化实验分析发现, 组氨酸蛋白激酶 AfsQ2 的磷酸化水平在 *afsQ4* 的基因缺失突变体显著降低, 表明 σ^Q 可以借助膜蛋白 AfsQ4 拮抗 AfsQ1/Q2 的功能, 最终协同调控抗生素的生物合成.

关键词 双组分系统, ECF- σ , 膜蛋白 AfsQ4, 交叉互补, 磷酸化**中图分类号** Q5, Q7, Q93**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0285

细菌需要依赖其自身信号传导系统及时监测环境信号从而对不断变化的环境变化作出适应性应答, 以维持其正常的生长代谢^[1-3]. 细菌中共存在3大类重要信号传导系统, 包括单组分系统 (one-component system, OCS)^[4-6]、双组分系统 (two-component system, TCS)^[6-11] 以及胞质外功能 σ 因子 (extracytoplasmic function σ , ECF- σ)^[12-19] (一大类选择性 σ 因子). 其中, 双组分系统 (TCS) 研究得最为深入, 它一般由一个跨膜的组氨酸蛋白激酶 (histidine kinase, HK) 和与之配对的胞内应答调控蛋白 (response regulator, RR) 组成. 组氨酸激酶主要由3个功能结构域构成, 包含信号感受结构域 (DHp)、二聚化和组氨酸磷转移结构域和 ATP 结合催化结构域 (CA). 当组氨酸激酶感受信

号后会改变 DHp 结构域的活力, 从而在 DHp 结构域中一个保守的组氨酸 (His) 残基上发生自体磷酸化. 磷酸化后的组氨酸激酶会将组氨酸残基上的磷酸基团传递给相应的应答调控蛋白, 使其信号接收结构域 (signal-receiving domain, REC) 中一个保守的天冬氨酸 (Asp) 残基发生磷酸化. 磷酸化的应答调控蛋白质构象发生改变, 与其他蛋白质或 DNA 的相互作用能力也会随之改变, 从而实现对不同基因的差异性调控, 以对外界刺激作出应答

* 镇江市重点研发计划(NY2020024)资助项目.

** 通讯联系人.

施爱平. Tel: 15952866677, E-mail: shap@ujs.edu.cn

芦银华. Tel: 18918100208, E-mail: yhlu@shnu.edu.cn

收稿日期: 2020-08-06, 接受日期: 2020-10-10

反应. 在信号转导过程中将伴随发生 HK 自身磷酸化以及 HK-RR 之间的磷酸基团转移过程^[20-25]. 而单组分系统 (OCS) 则由双组分系统中 HK 的信号输入功能域 (input domain) 和 RR 的输出功能域 (output domain) 融合在一条肽链上, 无需经过磷酸化及磷酸转移过程即可行使信号传递功能^[4-6]. 但不管是 TCS 还是 OCS, 它们主要的功能都是调控基因表达, 通常是在基因转录起始的水平上进行调控. 细菌行使转录起始水平调控的另一种手段是通过 ECF- σ 来实现, 这类 σ 因子只有在合适诱因存在情况下才被活化. σ 因子是依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶的一个亚基, 决定着 RNA 聚合酶对启动子识别的特异性^[26-27]. 所有的细菌都具有一个基础的 (housekeeping) σ 因子来负责多数基因的基础水平表达^[28-30]. 此外, 许多细菌的基因组, 尤其是那些具有复杂生活史的细菌, 编码了许多 ECF- σ , 这些 σ 因子可以替换基础 σ 因子指导 RNA 聚合酶选择性地起始转录某些启动子^[31].

链霉菌是重要的工业微生物, 能够合成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. 现有研究表明, 链霉菌中次级代谢受到包括 TCS 和 ECF- σ 在内信号传导系统的分子调控, 相关的研究工作主要是在模式菌天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中完成^[32-39]. 天蓝色链霉菌能够产生多种抗生素, 如放线紫红素 (ACT)、灵菌红素 (RED)、钙依赖抗生素 (CDA) 等. 在前期研究工作中, 本实验室在全基因组水平筛选参与天蓝色链霉菌次级代谢调控的双组分系统过程中, 鉴定到一对参与双组分系统调控蛋白 AfsQ1/Q2. 在以

75 mmol/L 谷氨酸钠为唯一氮源的基本培养基 (MM-GluNa) 上, *afsQ1/Q2* 基因缺失突变株 ($\Delta afsQ1/Q2$) 的抗生素 ACT、RED 和 CDA 的产量显著下降, 而且与原始菌株 M145 相比, 其气生菌丝发育和孢子形成明显提前. 进一步研究表明, AfsQ1/Q2 通过直接控制相应抗生素合成的途径特异性调控基因 *actII-ORF4*、*redD* 和 *cdaR* 的转录, 参与 ACT、RED 和 CDA 生物合成的调控. 另外, AfsQ1/Q2 还控制着 *sigQ* 的转录, *sigQ* 编码一个可能的 ECF- σ 因子, 位于 *afsQ1/Q2* 操纵子上游, 转录方向与 *afsQ1/Q2* 相反 (图 1). *afsQ1/Q2* 的缺失导致 *sigQ* 转录表达明显下降, 但是 *sigQ* 的缺失却引起抗生素的提前大量合成以及气生菌丝和孢子发育的延迟, 而 *afsQ1/Q2* 和 *sigQ* 基因的共同缺失出现与 $\Delta afsQ1/Q2$ 一样的表型^[40]. 因此, 认为 AfsQ1/Q2 及 σ^Q 共同参与抗生素合成的调控, 其中 σ^Q 对 AfsQ1/Q2 的功能发挥拮抗作用. 但是, 至今对于 σ^Q 如何反向拮抗 AfsQ1/Q2 功能的具体机制尚不清楚.

为此, 本研究通过基因缺失突变体构建、转录分析等技术手段对 *sigQ/afsQ1-Q4* 基因簇内的基因功能及其相互作用关系进行了系统研究. 结果显示, 位于 *afsQ1/Q2* 下游的 *afsQ3* (SCO4905, 编码脂蛋白) 和 *afsQ4* (SCO4904, 编码膜蛋白) 的缺失出现与 *sigQ* 缺失突变体类似的表型变化, 预示 *afsQ3/Q4* 可能与 *sigQ* 和 *afsQ1/Q2* 组成一个相对复杂的调控网络, 共同参与抗生素的生物合成调控. 进一步研究表明, *afsQ4* 是 σ^Q 的下游调控靶点, σ^Q 的调控功能可能是由 AfsQ4 介导完成. 通过本研究, 深入解析了 σ^Q 拮抗 AfsQ1/Q2 的调控机制.

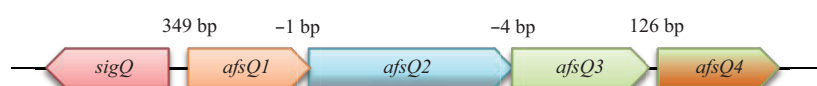


Fig. 1 Organization of *sigQ-afsQs* gene cluster in the *S. coelicolor* genome

The lengths of the intergenic regions between two adjacent genes are as indicated.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与培养基

本研究使用的菌株和质粒见表 1. 大肠杆菌 *Escherichia coli* 用液体或固体 LB 培养. 天蓝色链霉

菌野生型菌株 M145 及其突变株的孢子悬液制备采用固体 MS 培养基^[41]. 在 MM-GluNa 培养基上 (含有 75 mmol/L 谷氨酸钠的基本培养基), M145 及其突变体产生 ACT (呈现蓝色) 的表型最为明显. 因此, 本文在研究野生型 M145 和相关突变体的 ACT 生物合成表型时皆采用 MM-GluNa^[41] 培养基. 抗

生素的使用浓度为氨苄青霉素 100 mg/L、卡那霉素 200 mg/L、硫链丝菌素 50 mg/L、萘啶酮酸 50 mg/L、安普拉霉素 50 mg/L、潮霉素 B 25 mg/L。

Table 1 Plasmids and strains used in this work

Strains or plasmids	Relevant characteristics	References
<i>E. coli</i> strains		
DH5 α	<i>F-80dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK-mK⁺) supE44λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Gibco-BRL
BL21(DE3)	<i>F-ompT hsdS gal dcm (DE3)</i>	Novagen
BW25113	K-12 derivative; Δ araBAD Δ rhaBAD	[42]
BW25113/pIJ790	BW25113 containing temperature-sensitive plasmid pIJ790, which encodes the λ RED recombination system	[17]
ET12567	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM</i>	[43]
ET12567/pUZ8002	ET12567 containing RP4 derivative plasmid pUZ8002	[17]
<i>S. coelicolor</i> strains		
M145	Parental strain; SCP1- SCP2- <i>pgl</i> ⁺	[41]
Δ <i>afsQ1</i>	Mutant with an in-frame deletion of the <i>afsQ1</i> gene	This work
Δ <i>afsQ2</i>	Mutant with an in-frame deletion of the <i>afsQ2</i> gene	This work
Δ <i>afsQ1-Q2</i>	Mutant with an in-frame deletion of the <i>afsQ1-Q2</i> genes	This work
Δ <i>afsQ3</i>	Mutant with an in-frame deletion of the <i>afsQ3</i> gene	This work
Δ <i>afsQ4</i>	Mutant with an in-frame deletion of the <i>afsQ4</i> gene	This work
Δ <i>afsQ1-Q4</i>	Mutant with an in-frame deletion of the <i>afsQ1-Q4</i> genes	This work
Δ <i>afsQ1-Q3</i>	Mutant with an in-frame deletion of the <i>afsQ1-Q3</i> genes	This work
Δ <i>sigQ</i>	Mutant with an in-frame deletion of the <i>sigQ</i> gene	This work
Δ <i>sigQ/afsQ1-Q2</i>	Mutant with an in-frame deletion of both <i>sigQ</i> and <i>afsQ1-Q2</i>	This work
M145/pIB139	M145 with the control vector pIB139	This work
Δ <i>afsQ3</i> /pIB139	Δ <i>afsQ3</i> with the control vector pIB139	This work
Δ <i>afsQ4</i> /pIB139	Δ <i>afsQ4</i> with the control vector pIB139	This work
Δ <i>afsQ1-Q4</i> /pIB139	Δ <i>afsQ1-Q4</i> with the control vector pIB139	This work
Δ <i>sigQ</i> /pIB139	Δ <i>sigQ</i> with the control vector pIB139	This work
Δ <i>afsQ3</i> /pIB- <i>afsQ3</i>	Δ <i>afsQ3</i> with the complementation vector pIB- <i>afsQ3</i>	This work
Δ <i>afsQ4</i> /pIB- <i>afsQ4</i>	Δ <i>afsQ4</i> with the complementation vector pIB- <i>afsQ4</i>	This work
Δ <i>sigQ</i> /pIB- <i>sigQ</i>	Δ <i>sigQ</i> with the complementation vector pIB- <i>sigQ</i>	This work
Δ <i>sigQ</i> /pIB- <i>afsQ4</i>	Δ <i>sigQ</i> with the complementation vector pIB- <i>afsQ4</i>	This work
Δ <i>afsQ1-Q4</i> /pIB- <i>afsQ3</i>	Δ <i>afsQ1-Q4</i> with the complementation vector pIB- <i>afsQ3</i>	This work
Δ <i>afsQ1-Q4</i> /pIB- <i>afsQ4</i>	Δ <i>afsQ1-Q4</i> with the complementation vector pIB- <i>afsQ4</i>	This work
Δ <i>afsQ1-Q4</i> /pIB139- <i>afsQ1-Q4</i>	Δ <i>afsQ1-Q4</i> with the complementation vector pIB- <i>afsQ1-Q4</i>	This work
Plasmids		
pIJ773	Plasmid containing the apramycin resistance gene <i>aac(3)IV</i> and <i>oriT</i> of plasmid RP4, flanked by <i>FRT</i> sites; Amp ^r	[17]
pIJloxP Δ <i>oriT</i>	Modified pIJ773 in which the <i>oriT</i> fragment was removed and the <i>FRT</i> sites were replaced by loxP sequences	This work
pHAQ31	Cosmid vector, Amp ^r Tsr ^r melC cos <i>oriT</i>	Xia (unpublished)
3-65	pHAQ31 containing the sequences from 5319844 to 5364180 bp of the <i>S. coelicolor</i> M145 genome	Xia (unpublished)
pALCRE	Plasmid containing the synthetic cre(a) gene, Tsr ^r , Hyg ^r	[41]
pIB139	Expression vector for <i>Streptomyces</i> , contains the ϕ C31 integrase, Apr ^r , Tsr ^r	[44]

1.1.2 试剂

PCR产物纯化试剂盒、小量胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自上海华舜或Axygen; DNA引物由上海生工合成; 实验中使用的限制性内切酶和核酸分子质量标准GeneRuler™ 1 kb DNA ladder plus购自Fermentas; KOD-plus DNA聚合酶购自ToYoBo; T4 polynucleotide kinase、T4 DNA ligase、Taq polymerase、sperm DNA和反转录相关试剂购自TaKaRa; RNA反转录试剂盒购自Invitrogen; iQTM SYBR Green Supermix购自Bio-rad; Ni-NTA蛋白纯化镍柱购自GE Healthcare.

1.1.3 仪器

多功能成像扫描系统FLA-9000 (Fujifilm), 细胞压榨破碎仪, Nanodrop2000 (Thermo), 分光光度计DU730 (Beckman), MyiQ2 two-color real-time PCR仪 (Bio-Rad) .

1.2 方法

1.2.1 从大肠杆菌到链霉菌的DNA接合转移

从大肠杆菌到链霉菌的DNA接合转移按照Kieser介绍的方法进行^[41]. 为了避免宿主限制修饰系统的作用, 采用甲基化缺陷的大肠杆菌ET12567/pUZ8002作为质粒供体菌.

1.2.2 sigQ-afsQs基因簇中基因同框缺失突变体的构建

运用Gust建立的PCR-targeting系统(略作修

改)构建相关基因的同框缺失突变体^[17]. 具体步骤简述如下: 将原先系统中的位点特异性重组元件FRT-FLP替换成Cre-loxP. 实验中用到的黏粒(cosmid)由合成生物学实验室的覃重军老师课题组提供. 将经过验证带有目的基因的cosmid 3-65电转入BW25113/pIJ790, 获得含有cosmid 3-65的大肠杆菌, 并制备电击感受态细胞. 以质粒pIJloxPΔoriT(将pIJ773中的FRT位点替换成loxP序列且不含oriT基因片段)为模板, 通过PCR扩增出目的基因缺失的中断盒(引物见表2), 电转化导入含有相应cosmid 3-65的BW25113/pIJ790感受态中, 抗性筛选获得基因缺失转化子(Apr^r), 提取目的基因中断的cosmid突变体. 然后通过接合转移转入*S. coelicolor* M145中, 筛选双交换子(Apr^r、Tsr^r), 获得目的基因突变株, 突变株以PCR(引物见表2)实验验证. 为了将Apra抗性基因从突变体中消除以获得同框缺失突变体, 将表达Cre蛋白的质粒pALCRE通过接合转移转入目的基因缺失中, 筛选Tsr^r转化子. 然后将转化子分别点板至无抗性的MS和含有Apra的MS板上进行二次筛选. 那些在含有Apra的MS板上不能生长(Apr^s), 而在无抗性的MS板生长的转化子就是Apra抗性基因已经环出的同框缺失突变体. 为了丢失质粒pALCRE, 需将突变体在无抗板上连续传代三次.

Table 2 List of the primers used in this study

Primers	Sequences	Description
DsigQ-for	5'-GAGCACCGCTCCCTGTCGGAGGCGGAGTTCACCGCCTACATTCC-GGGGATCCGTCGACC-3'	For the amplification of the <i>sigQ</i> disruption cassette
DsigQ-rev	5'-CTGGTTCACGCCGAAGCTGAGGACCTCGTCTCGCGCAGGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	
DafsQ1-for	5'-ACGACGACGCCATCCGTACGGCCCTGGAGCTCTCCCTGAATTCC-GGGGATCCGTCGACC-3'	For the amplification of the <i>afsQ1</i> disruption cassette
DafsQ1-rev	5'-CGGATCCAGCCGGTAGCCGACACCGCGCACGGTACGGATGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	
DafsQ2-for	5'-ATCGCGTACTGGCTGAACCGGGAGGCGGTGCTGACCCGTATTCC-GGGGATCCGTCGACC-3'	For the amplification of the <i>afsQ2</i> disruption cassette
DafsQ2-rev	5'-ACCGAGCCCGCTGCCCTCGGAGCGCGGCCGGGAGGCGCTGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	
DafsQ3-for	5'-TGCGGCATCCGCGCCACCGAGGTGCCCACCGACTACGGTATTCC-GGGGATCCGTCGACC-3'	For the amplification of the <i>afsQ3</i> disruption cassette
DafsQ3-rev	5'-CGGTTCGTTGCTGCCCGGCGGGCCCGGACCTCGTCCGTGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	

Continued to Table 2

Primers	Sequences	Description
DafsQ4-for	5'-CATGGGTTCTCGGCGGCAGCGCCGCGCTCCGCATCCGTATTCCGGGGATCC-GTCGACC-3'	For the amplification of the <i>afsQ4</i> disruption cassette
DafsQ4-rev	5'-AGCGGGCTCCTCCTGGAGGAGGCCCTCCCGCCCGCCCTGGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	
DafsQ1-for	5'-ACGACGACGCCATCCGTACGGCCCTGGAGCTCTCCCTGAATTCC-GGGGATCCGTCGACC-3'	For the amplification of the <i>afsQ1-Q2</i> disruption cassette
DafsQ2-rev	5'-ACCGAGCCCGCTGCCCTCGGAGCGCGCCGGGAGGCGCTGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	
DafsQ1-for	5'-ACGACGACGCCATCCGTACGGCCCTGGAGCTCTCCCTGAATTCC-GGGGATCCGTCGACC-3'	For the amplification of the <i>afsQ1-Q3</i> disruption cassette
DafsQ3-rev	5'-CGGTTCTGTTGCTGCCCGGCCGGCCCGGACCTCGTCCGTGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	
DafsQ1-for	5'-ACGACGACGCCATCCGTACGGCCCTGGAGCTCTCCCTGAATTCC-GGGGATCCGTCGACC-3'	For the amplification of the <i>afsQ1-Q4</i> disruption cassette
DafsQ4-rev	5'-AGCGGGCTCCTCCTGGAGGAGGCCCTCCCGCCCGCCCTGGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	
DsigQter-for	5'-TTCGGCCGTGACCAGGAGGACGCCTTCGGCGAACTGGTCATTCC-GGGGATCCGTCGACC-3'	For the amplification of the <i>sigQ/afsQ1-Q2</i> disruption cassette
DafsQ2-rev	5'-ACCGAGCCCGCTGCCCTCGGAGCGCGCCGGGAGGCGCTGTGTAGGCTG-GAGCTGCTT-3'	
JD- <i>sigQ</i> -afsQs-for	5'-GCACGTCTGTCAGACGCGTGA-3'	For the verification of the Δ <i>sigQ</i> - <i>afsQs</i> mutants
JD- <i>sigQ</i> -afsQs-rev	5'-CTCCTCGGACGGGAGCAGGAT-3'	
JD-1-for	5'-ACTGCGCTGGTGTGGT-3'	For the verification of the Δ <i>afsQ1-Q3</i> and Δ <i>afsQ1-Q4</i> mutants
JD-4-rev	5'-CTCGGACGGGAGCAGGAT-3'	
comp- <i>sigQ</i> -for	5'-GGAATTCCATATGACGGTGGTTGACGGAACA-3'	For the amplification of the <i>sigQ</i> ORF for the construction of the complementation vector pIB- <i>sigQ</i>
comp- <i>sigQ</i> -rev	5'-CGGAATTCTCAGGCGACCAGTTCGCCGA-3'	
comp-afsQ3-for	5'-GGAATTCCATATGACCGTACGCCGTCTGCCGGCCCT-3'	For the amplification of the <i>afsQ3</i> ORF for the construction of the complementation vector pIB- <i>afsQ3</i>
comp-afsQ3-rev	5'-CGGAATTC TCAGCCGCCCGTGACCTCGT-3'	
comp-afsQ4-for	5'-GGAATTCCATATGGTGCAGCGTCATGGGTTCT-3'	For the amplification of the <i>afsQ4</i> ORF for the construction of the complementation vector pIB- <i>afsQ4</i>
comp-afsQ4-rev	5'-CGGAATTCCTACGGGGCGATACCGACCCT-3'	
comp-afsQ1-for	5'-GGAATTCCATATGGTGCCTTCCCTGTTGCTGATCGA-3'	For the amplification of the <i>afsQ1-Q4</i> ORFs for the construction of the complementation vector pIB- <i>afsQ1-Q4</i>
comp-afsQ4-rev	5'-CGGAATTCCTACGGGGCGATACCGACCCT-3'	
RT-afsQ4-for	5'-CGCCGGAATCCGCGCCGACCT-3'	RT-PCR analysis of <i>afsQ4</i> transcription
RT-afsQ4-rev	5'-CGTGCAGCCGCCCGCCGGCCA-3'	
RT-afsQ3-for	5'-CAGGTGTTCTGCTGTGCGGCT-3'	RT-PCR analysis of <i>afsQ3</i> transcription
RT-afsQ3-rev	5'-CAGCAGCCCCCTGGGCCACCAGCA-3'	
RT-afsQ2-for	5'-GCTGAAGCCCGTGACCCGGCT-3'	RT-PCR analysis of <i>afsQ2</i> transcription
RT-afsQ2-rev	5'-GGTTCTCGGCGCACTGTTGA-3'	

Continued to Table 2

Primers	Sequences	Description
RT-afsQ1-for	5'-GCATCCGGCGCACCGACCAGCT-3'	RT-PCR analysis of <i>afsQ1</i> transcription
RT-afsQ1-rev	5'-GGCGTCGAGCACCCGGCCCT-3'	
RT-sigQ-for	5'-GCCTACCACCTACCGGCCGA-3'	RT-PCR analysis of <i>sigQ</i> transcription
RT-sigQ-rev	5'-CGGCGGAGGTATCCGCCGA-3'	
hrdB-for	5'-GTCCGACGAGGACGAGGACGA-3'	Internal control
hrdB-rev	5'-CTCCTGCTCGGCGTTGAGCAGA-3'	
Exp-sigQ-for	5'-CGGGATCCACGGTGGTTGACGCGAACA-3'	σ^Q expression
Exp-sigQ-rev	5'-CCAAGCTTTCAGGCGACCAGTTCGCCGA-3'	
P4904-for	5'-GCTACTCCTGCACGGACGA-3'	Amplify <i>afsQ4</i> promoter sequence
P4904-rev	5'-CACTTCCTGTCACACGGAT-3'	
Cy5-P4904-for	5'-AGCCAGTGGCGATAAGGCTACTCCTGCACGGACGA-3'	Amplify Cy5-labelled <i>afsQ4</i> promoter sequence
Cy5-P4904-rev	5'-AGCCAGTGGCGATAAGCACTTCTGTGTCACACGGAT-3'	

1.2.3 互补实验

为了排除缺失突变体的表型变化是由极性效应引起的, 我们进行了相关突变体的基因互补实验. 以 *S. coelicolor* 基因组 DNA 为模板, PCR 获得相关基因的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 经 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切, 连接至 pIB139 组成为红霉素启动子下游. 将构建好的互补质粒以结合转移方式导入相关突变体中, 筛选获得具有 Apr 抗性的结合子即为相关突变体的基因互补株.

1.2.4 抗生素 (ACT) 的测定

野生型菌株 M145、突变株及相关基因互补株的孢子经预萌发后, 取等量的孢子悬液 ($A_{450} \approx 0.5$) 涂布于铺有玻璃纸的 MM-GluNa 培养基, 30°C 培养, 分别于 36、48、60、72 h 收集菌体称重. 用 1 ml 1N KOH 水溶液处理样品, 充分混匀, 室温放置 2 h, 3 000 g 离心 5 min, 取上清测定 A_{640} , 计算每克菌体抽提的 A_{640} 值, 粗略估算抗生素 ACT 的合成量.

1.2.5 RNA 制备

将相同 A_{450} 的孢子悬液 (M145 与 $\Delta afsQs$) 分别涂布于含有 75 mmol/L Glu 的 MM 上, 培养至 36、48、72 h 后取样, 于研钵内低温研碎 (加液氮), 立即加入 Trizol™ (Invitrogen) 重悬, 室温放置 5 min 后加入 1/5 体积氯仿抽提两次. 将上清移入新的离心管, 加入等体积异丙醇沉淀 RNA. RNA 样品进行后续处理, 主要包括去 DNA 处理、RNA 纯化 (QIAGEN RNeasy mini kit) 等实验. 通过 A_{260}/A_{280} 及琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 的浓度、纯度及完整性, 如符合要求, 即可将一定量的 RNA 反转录为 cDNA, 备用.

1.2.6 实时荧光定量 PCR 实验 (real-time RT-PCR, qRT-PCR)

取等量 M145 及相关基因缺失突变体的 cDNA 为 qPCR 模板, 每个样品设 3 个平行重复, *S. coelicolor hrdB* 基因作为内参基因. 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的转录变化 (突变株/原始株). 平均值和标准差的计算来源于不同批次的 RNA 样品进行的两次 qRT-PCR 生物学重复实验. qRT-PCR 验证所用的引物见表 2.

1.2.7 σ^Q 蛋白表达纯化

使用 pET28a 作为 σ^Q 蛋白的表达载体. PCR 扩增出 *sigQ* 的 ORF (引物见表 2), 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切回收 *sigQ* 片段连接到表达载体 pET28a 上, 获得重组质粒 pET28a-*sigQ*. 然后转入 *BL21* 宿主细胞中, 以终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 进行 20°C 诱导过夜. 收集菌体压榨裂解. 使用 Ni-NTA 层析柱纯化 His-tagged- σ^Q 蛋白 (His6- σ^Q), 并分别用含 10、20、50、90 mmol/L 咪唑的蛋白质纯化缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 10% Glycerol) 进行梯度洗脱. 纯化蛋白质过程中洗脱液用 Bradford 法检测, 最后用含 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液收集目的蛋白质, 其纯度用 SDS-PAGE 电泳判断.

1.2.8 凝胶阻滞实验 (EMSA)

Cy5 标记探针制备^[45]: 用特异性引物 (表 2) 扩增出含有启动子区域的 DNA 片段, 引物的 5' 端引入一段非 *S. coelicolor* 来源的 16 bp DNA 序列 (下划线标记序列). 然后用 5' 端标记 Cy5 的 16 bp 序列为引物进行第二轮 PCR 反应, 即可得到 Cy5 标记的 DNA 探针. 探针浓度稀释至 10 mg/L 用于后

续的EMSA实验.

EMSA 总体系为 20 μ l, 包括不同浓度的 His₆- σ^o 蛋白 1 μ l、标记探针 1 μ l、2 g/L sperm DNA 1 μ l、5 $\times$ EMSA buffer 4 μ l、超纯水 (ddH₂O) 13 μ l. 室温 (25 $^{\circ}$ C) 反应 20 min, 进行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用 FLA-9000 多功能成像仪扫描胶, 观察 EMSA 结果. 为确定 DNA 与蛋白质结合的特异性, 加入 200 倍的未标记特异性或者非特异性探针作为对照.

5 $\times$ EMSA buffer 配制方法: 100 mmol/L Tris (pH 7.9), 5 mmol/L dithiothreitol (DTT), 150 mmol/L KCl, 50 mmol/L MgCl₂, 0.2 g/L 小牛血清白蛋白, 25% glycerol.

1.2.9 Phos-tag聚丙烯酰胺凝胶制备

在制备常规聚丙烯酰胺凝胶的基础上加入终浓度为 25 μ mol/L phos-tag 和 MnCl₂, 用于分离磷酸化形式与非磷酸化形式并存的同一种蛋白质.

1.2.10 蛋白质印迹 (Western blot) 实验

蛋白质样品在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结束后, 以电转 (恒流 300 mA, 45 min) 的方式将电泳胶中的蛋白质样品转移至硝酸纤维膜上, 随后经封闭、一抗孵育、洗脱、二抗孵育、洗脱后, 在膜表面 (含有蛋白质一面) 滴加显色液 (Thermo Fisher SCIENTIFIC), 以 ImageQuant CCD-based imagers (GE healthcare) 检测膜表面的化学发光信号并生成图像.

2 结 果

2.1 *sigQ-afsQs* 基因簇中各基因同框缺失突变体的构建与验证

为了系统研究 *sigQ-afsQs* 基因簇中各基因功能及其相互关系, 本研究首先运用基于 λ -Red 重组原理的 PCR-targeting 结合 Cre-loxP 系统, 分别重新构建了 *afsQ1*、*afsQ2*、*afsQ1/Q2*、*sigQ*、*afsQ3* 以及 *afsQ4* 的同框缺失突变体 Δ *afsQ1*、 Δ *afsQ2*、 Δ *afsQ1/2*、 Δ *sigQ*、 Δ *afsQ3* 和 Δ *afsQ4*. 以一对横跨 *sigQ-afsQs* 基因簇两端的鉴定引物对各突变体的基因型进行了 PCR 验证 (图 2a). 随即, 对各突变体的 ACT 产量变化进行了肉眼观察, 与之前的研究结果相似, 在 MM-GluNa 培养基上, Δ *afsQ1* 和 Δ *afsQ2* 突变体几乎不产生 ACT, 而 Δ *sigQ*、 Δ *afsQ3* 和 Δ *afsQ4* 相比野生型 M145, ACT 产量 (蓝色色素) 明显上调 (图 2b).

为了进一步确认这些突变体的 ACT 产量变化确实是由相应基因的缺失所致, 我们进行了互补实验, 并对 Δ *sigQ*、 Δ *afsQ3*、 Δ *afsQ4* 及各自相关基因互补株的 ACT 产量变化进行进一步的定性和定量检测. 结果显示, 在 Δ *sigQ*、 Δ *afsQ3* 和 Δ *afsQ4* 突变体中 ACT 产量均大幅上调, 而相应互补株的 ACT 产量则回复至野生型相当水平, 表明 σ^o 、脂蛋白 AfsQ3 及膜蛋白 AfsQ4 对 ACT 的生物合成均行使负调控作用 (图 3a~f).

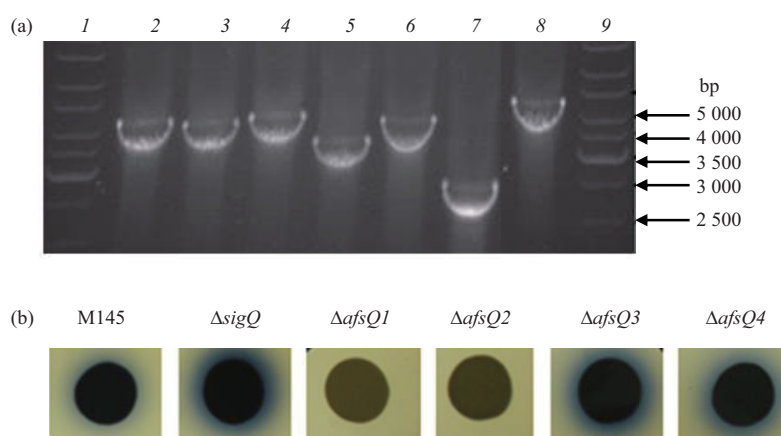


Fig. 2 Construction of the mutants with the in-frame deletion of each gene from the *sigQ-afsQs* gene cluster

(a) Verification of the mutant construction by PCR analysis. Lane 1 and 9: DNA marker; lane 2: Δ *afsQ3* (4 215 bp); lane 3: Δ *sigQ* (4 229 bp); lane 4: Δ *afsQ4* (4 239 bp); lane 5: Δ *afsQ2* (3 459 bp); lane 6: Δ *afsQ1* (4 093 bp); lane 7: Δ *afsQ1/Q2* (2 663bp); lane 8: M145 (4 578 bp). (b) Phenotypic analysis of the mutants by observing the blue color (representing ACT production).

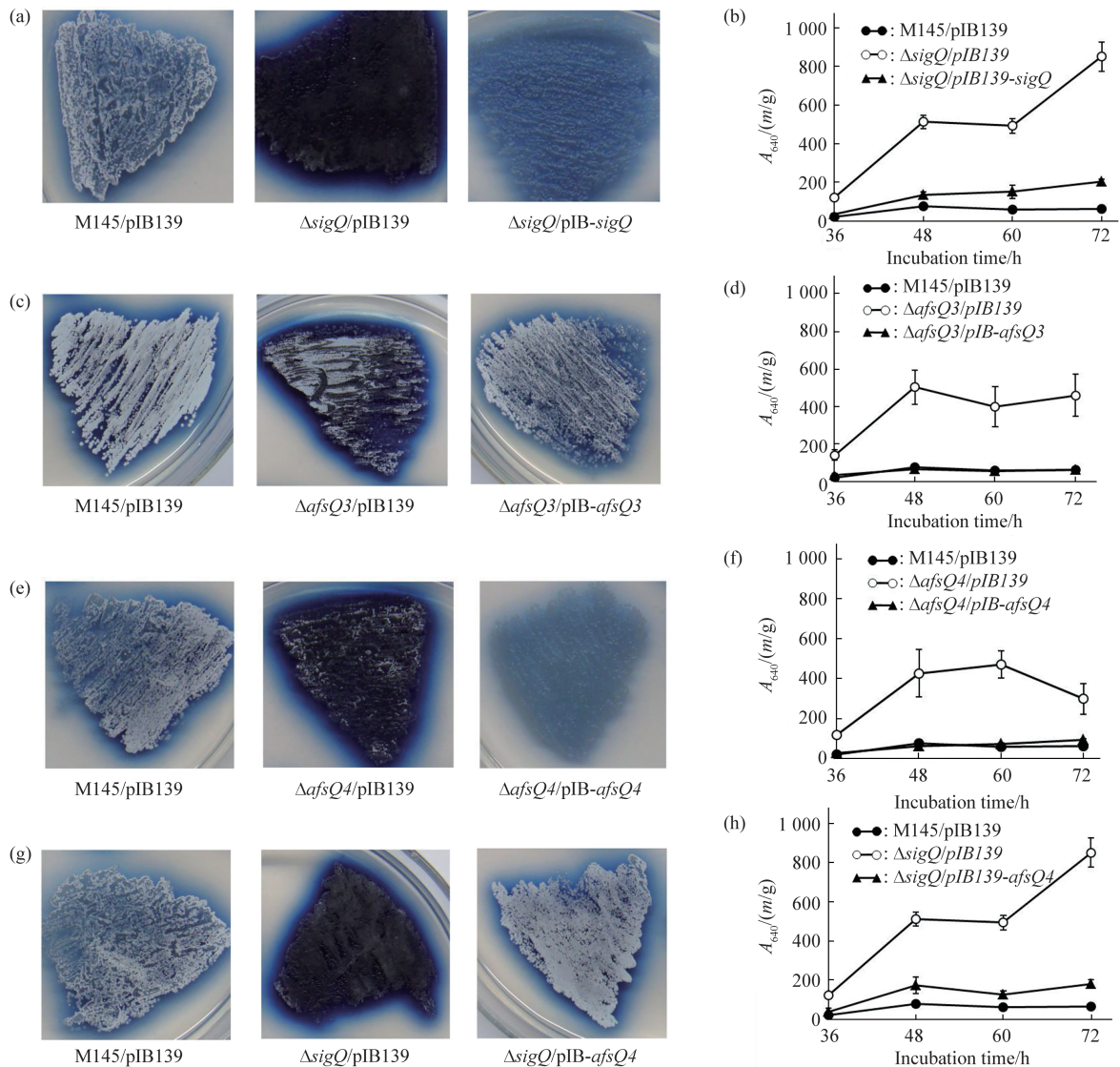


Fig. 3 Qualitative (a, c, e, g) and quantitative (b, d, f, h) determination of ACT production in the mutants of $\Delta sigQ$, $\Delta afsQ3$ and $\Delta afsQ4$ and their corresponding complemented strain

2.2 $sigQ$ - $afsQs$ 中各基因缺失后对基因簇中其他基因转录的影响

对基因簇中各基因缺失突变体中其他基因的转录情况做系统的RT-PCR分析,以进一步了解基因簇中各基因之间的内部联系. RT-PCR半定量结果表明:在 $\Delta afsQ1$ 和 $\Delta afsQ2$ 的缺失突变体中, $afsQ4$ 基因转录水平无明显变化,受AfsQ1/Q2直接转录调控的 $sigQ$ 基因下调比较明显;在 $\Delta afsQ2$ 缺失突变体中, $afsQ3$ 基因转录水平有一定上调;在 $\Delta sigQ$ 缺失突变体中 $afsQ4$ 基因转录下调显著,其他各基因转录水平无明显变化;在 $\Delta afsQ3$ 和 $\Delta afsQ4$ 缺失突变体中,其他各基因的转录水平无明显变化.对

RT-PCR分析有差异的基因进行重复实验,结果完全一致(图4a, b).

随后,运用荧光定量PCR定量分析 $sigQ$ - $afsQs$ 基因簇中各基因的分别缺失对基因簇中其他基因的转录影响,选取的时间点为36、60 h.由于 $\Delta afsQ1$ 及 $\Delta afsQ2$ 缺失突变体的表型和 $\Delta afsQ1/Q2$ 同时缺失时的表型相似(图2),均表现为不产生ACT,因此为了方便,本研究分析了 $\Delta sigQ$ 、 $\Delta afsQ1/Q2$ 、 $\Delta afsQ3$ 以及 $\Delta afsQ4$ 四个突变体的转录变化.结果与上述RT-PCR结果基本一致(图4d, e),各基因的转录变化在时间进程上无明显差异.令人意外的是,当 $afsQ1/Q2$ 同时缺失时, $afsQ3$ 的转录显著上

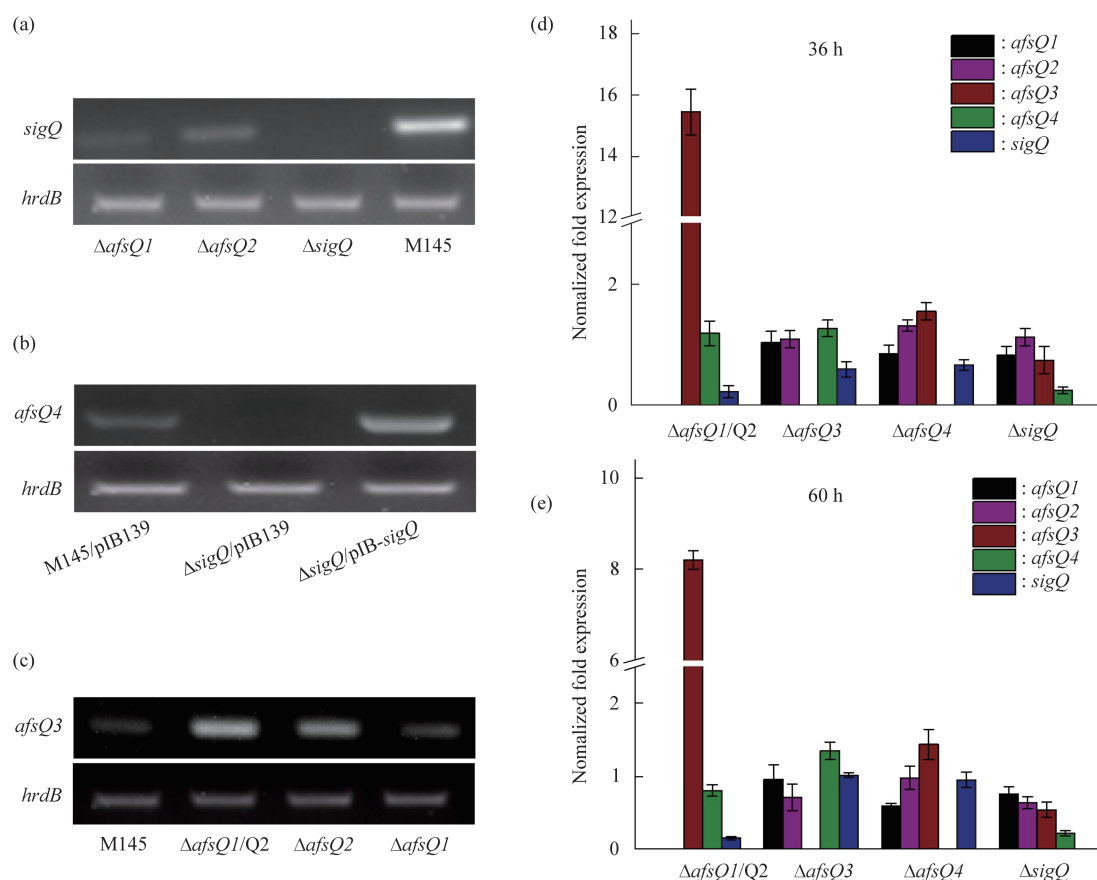


Fig. 4 Transcriptional analysis of other four genes upon the respective deletion of each gene in the *sigQ-afsQs* gene cluster

(a) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *sigQ* transcription in $\Delta afsQ1/Q2$ mutant. (b) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *afsQ4* transcription in $\Delta sigQ$ mutant. (c) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *afsQ3* gene in $\Delta afsQ1$, $\Delta afsQ2$ and $\Delta afsQ1/Q2$ mutant respectively. (d,e) Real-time RT-PCR analysis of the other four genes upon the respective deletion of each gene in the *sigQ-afsQs* gene cluster at two time points, 36h(d) and 60 h(e).

调，而之前的 RT-PCR 分析，在 $\Delta afsQ2$ 突变体中，*afsQ3* 仅略微上调，但并不显著。为进一步确认这种现象，我们重新对 $\Delta afsQ1/Q2$ 、 $\Delta afsQ1$ 和 $\Delta afsQ2$ 突变体中 *afsQ3* 的转录情况进行比较。与之前结果相似，半定量 RT-PCR 结果表明在 *afsQ1/Q2* 同时缺失时 *afsQ3* 转录水平最高，*afsQ2* 单独缺失时次之，*afsQ1* 缺失对 *afsQ3* 的转录水平则无明显变化（图 4c）。*afsQ1* 的终止密码子和 *afsQ2* 的起始密码子以及 *afsQ2* 的终止密码子和 *afsQ3* 的起始密码子分别具有 4 bp 与 1 bp 的重叠（图 1），因此 *afsQ1/Q2/Q3* 三者由同一操纵子（operon）共转录而来，推测可能处于 *afsQ3* 上游的 *afsQ1/Q2* 同时缺失，使得 *afsQ3* 距离 *afsQ1* 上游共同的启动子更近，从而引起转录加强的缘故。

至此，对比 *sigQ-afsQs* 基因簇中各突变体的表型分析以及基因簇中各基因的缺失对其他基因转录影响的结果发现，其中 *afsQ4* 基因的转录可能依赖

于 σ^Q ，而 $\Delta afsQ4$ 和 $\Delta sigQ$ 突变体又具有相似表型，均表现为 ACT 的过量产生。因此，猜测 $\Delta sigQ$ 突变体的 ACT 产量增加可能是由其可能的靶基因 *afsQ4* 来实现的。

2.3 *sigQ* 对抗生素生物合成的负调控功能可能是由 *afsQ4* 介导

为了验证上述假设，本研究向 $\Delta sigQ$ 突变体中交叉互补加入 *afsQ4* 基因（其表达由组成型启动子 *ermEp** 驱动），获得互补菌株 $\Delta sigQ$ /pIB-*afsQ4* 并对其 ACT 的产量进行鉴定（图 3g, h）。和预期一致，向 $\Delta sigQ$ 突变体中导入 *afsQ4* 基因能够使其 ACT 产量回复至野生型相当水平。这一结果，可以在一定程度上解释， σ^Q 可能通过其潜在的靶基因 *afsQ4* 来拮抗 AfsQ1/Q2 的功能。

生物信息学分析显示， σ^Q 属于 σ^{70} 家族类的 ECF- σ ，为一大类选择性 σ 因子，这类 σ 因子可以替换基础 σ 因子重新指导 RNA 聚合酶选择性地起

始转录某些启动子, 进而特异性地调控某些基因的转录^[17]. 为了验证 σ^0 是否直接参与 $afsQ4$ 的转录, 我们以不同浓度梯度的 σ^0 蛋白和 $afsQ4$ 可能启动子区域的DNA序列P4904进行EMSA实验分析. 结果表明, σ^0 蛋白体外不能直接结合于 $afsQ4$ 启动子区域. 由于 σ 因子不同于常规的调控因子 (一般具有DNA结合结构域), 它只是在转录起始负责识别启动子并招募RNA聚合酶核心酶, 形成转录起始复合物. 当转录开始后, σ 因子则会从转录起始复合物中脱离, 因此 σ 因子与靶DNA之间形成的是一种弱的、暂时的相互作用, 所以上述EMSA实验也不能完全排除 σ^0 直接参与 $afsQ4$ 转录调控的可能性.

2.4 $sigQ$ - $afsQs$ 基因簇各基因在调控通路中的上下位关系研究

总结之前的研究表明, 在 $sigQ$ - $afsQs$ 编码的蛋白质中, AfsQ1/Q2直接调控 σ^0 的转录, 而 σ^0 可能通过其下游靶蛋白AfsQ4拮抗AfsQ1/Q2的功能, 而位于AfsQ1/Q2下游的脂蛋白AfsQ3 ($afsQ1/Q2/Q3$ 共转录组成一个operon) 与 σ^0 及AfsQ4具有相似功能, 均能抑制ACT的生物合成.

为了确定 $sigQ$ - $afsQs$ 基因簇中各基因的上下位调控关系, 我们构建了一系列多基因缺失突变体及相关基因互补株. 这些菌株包括 $\Delta afsQ1-Q2$ 、 $\Delta afsQ1-Q3$ 、 $\Delta afsQ1-Q4$ 、 $\Delta afsQ1-Q2/sigQ$ 、 $\Delta afsQ1-Q4/pIB-afsQ4$ (等同于 $\Delta afsQ1/Q2/Q3$ 基因型)、 $\Delta afsQ1-Q4/pIB-afsQ3$ (等同于 $\Delta afsQ1/Q2/Q4$ 基因型)、 $\Delta afsQ1-Q4/pIB-afsQ1-Q4$ (等同于野生型基因型). 随后对上述各突变体中的ACT产量进行检测 (图5). 结果表明, 在 $sigQ$ - $afsQs$ 基因簇中, $afsQ1/Q2$ 的缺失导致突变体不再产生ACT, 在 $\Delta afsQ1/Q2$ 突变体的基础上再缺失其他基因如 $afsQ3$ 、 $afsQ4$ 或 $sigQ$, 都不会影响其表型, 皆表现为不产生ACT. 这一现象充分地说明, 在 $sigQ$ - $afsQs$ 这一基因簇中, AfsQ1/Q2是直接影响ACT生物合成的决定性因子, 为整个调控通路的上位基因, 基因簇中其他基因则为下位基因, $afsQ1/Q2$ 的缺失能够掩盖基因簇中其他任意基因缺失所引起的ACT产量增加表型. $afsQ3$ 和 $afsQ4$ 分别编码可能的脂蛋白和膜整合蛋白, 它们很可能通过与跨膜激酶AfsQ2发生直接的相互作用, 影响AfsQ1/Q2的磷酸化信号传递而最终影响ACT的产量.

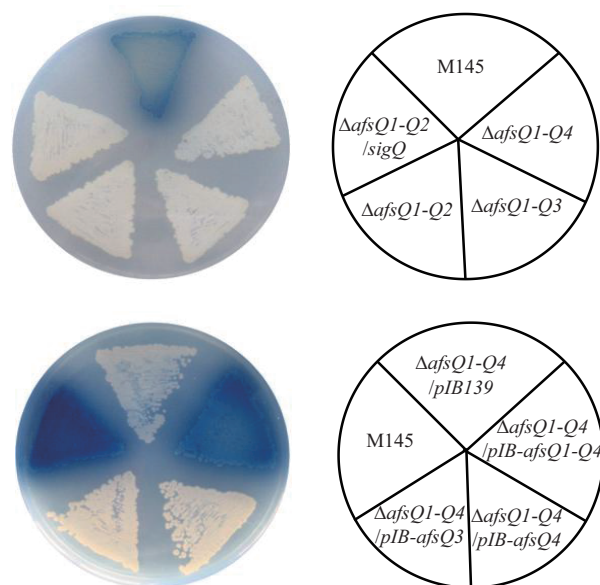


Fig. 5 Phenotypological analysis of ACT production of the mutants with partial or complete deletion of the $sigQ$ - $afsQs$ gene cluster and the corresponding genetic complementary strains

2.5 Phos-Tag实验验证膜蛋白AfsQ4对激酶AfsQ2自磷酸化活性的影响

通过蛋白质跨膜结构域分析软件TMpred软件预测发现, $sigQ$ - $afsQs$ 基因簇中各基因编码的蛋白质, 除应答调控蛋白AfsQ1和 σ^0 为胞内蛋白外, 其他3个蛋白AfsQ2/Q3/Q4均为膜关联蛋白 (图6). 其中AfsQ2是可能含有2次跨膜结构域, 膜外有1个loop结构的跨膜蛋白质; AfsQ4可能为具有4次跨膜结构域的膜整合蛋白; 而AfsQ3为定位于细胞膜外膜的脂蛋白, 在其氮端具有保守的信号肽序列, 帮助蛋白质正确锚定在细胞膜的外膜, 随后会被信号肽酶切除.

在 $sigQ$ - $afsQs$ 基因簇编码的蛋白质中, AfsQ1/Q2为抗生素生物合成的正调控因子, 而基因簇中

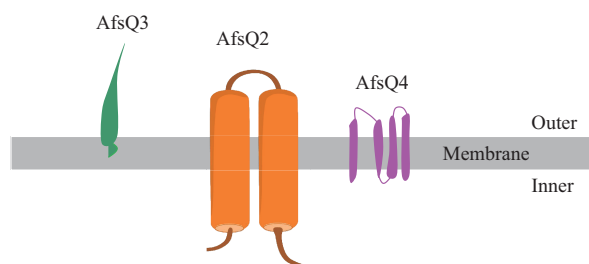


Fig. 6 Schematic plot of the location of three membrane-associated proteins AfsQ2/Q3/Q4

其他蛋白质可能是通过影响 AfsQ1/Q2 的功能而间接影响 ACT 的生物合成. 而同为膜关联蛋白的脂蛋白 AfsQ3 和膜蛋白 AfsQ4 很可能与跨膜激酶 AfsQ2 发生了某种相互作用, 进而影响 AfsQ1/Q2 的磷酸化状态并最终反映在 ACT 生物合成的产量变化上.

为了验证膜蛋白 AfsQ4 是否能够影响跨膜激酶 AfsQ2 的磷酸化状态, 我们利用 Phos-tag 结合 Western blot 方法对野生型 M145 和 Δ afsQ4 突变体中的组氨酸蛋白激酶 AfsQ2 的磷酸化状态进行比较分析. Phos-tag 方法工作原理^[46-49]为: 商品化生产的 Phos-tag 能够特异地与蛋白质中的磷酸基结合, 每个 Phos-tag 上还能再结合 2 个锰离子. 基于这一原理, 在常规 SDS-PAGE 中无法分离开的具有磷酸化与非磷酸化的同一种蛋白质, 在 Phos-tag-Mn²⁺-SDS-PAGE 中由于磷酸化的蛋白质结合 Phos-tag-Mn²⁺后在 SDS-PAGE 中泳动速率低于该蛋白质的非磷酸化形式而可以分开, 因此可用该方法检测某一具有磷酸化活性蛋白质的磷酸化水平. 为了便于观察 AfsQ4 缺失后 AfsQ2 的磷酸化水平, 将 C 端带有 Flag 标签的 *afsQ2* 基因克隆至整合载体 pIB139 的组成型红霉素启动子 (*ermEp**) 下游, 并分别导入野生型 M145 和 Δ afsQ4 进行表达, 在 M145 中导入 pIB139 空载体, 作为阴性对照菌株. 以液体 MM-GluNa 培养的 M145/pIB139、M145/pIB-*afsQ2*-flag、 Δ afsQ4/pIB-*afsQ2*-flag 的细胞裂解液为研究对象, Western Blot 检测 AfsQ2-Flag 蛋白 (~58.4 ku) 的表达状况. 结果表明, AfsQ2-Flag 蛋白在野生型菌株和 Δ afsQ4 突变体中均有表达 (图 7a). 随后对上述样品进行 Phos-tag-Mn²⁺-SDS-PAGE 电泳分离并结合 Western blot 检测, 结果显示, AfsQ2-Flag 蛋白在野生型 M145 中可能主要以磷酸化形式存在,

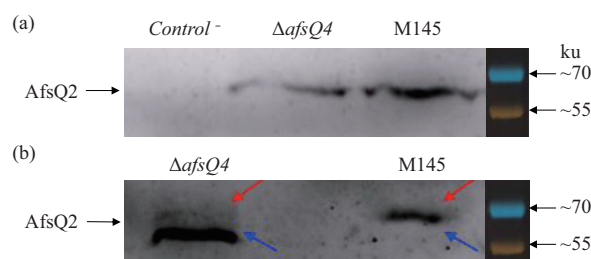


Fig. 7 Analysis of the AfsQ2 phosphorylation status in the Δ afsQ4 mutant by the Phos-tag strategy

(a) The C-terminal flagged-AfsQ2 protein from the cell lysates can be detected by Western blot. (b) The phosphorylated and unphosphorylated AfsQ2 protein can be separated by Phos-tag-Mn²⁺-SDS-PAGE. The "red arrow" indicates phosphorylated AfsQ2 protein, the "blue arrow" indicates unphosphorylated AfsQ2 protein.

而在 Δ afsQ4 突变体中 AfsQ2-Flag 蛋白则可能主要以非磷酸化形式存在 (图 7b). 以上实验结果表明, 膜蛋白 AfsQ4 可能通过影响跨膜激酶 AfsQ2 的磷酸化水平进而体现在菌体的抗生素产量表型上.

通过以上研究表明, 在 *sigQ-afsQs* 基因簇的编码蛋白质中膜蛋白 AfsQ4 可能通过影响跨膜激酶 AfsQ2 的磷酸化状态的方式而最终影响菌体的 ACT 产量.

3 讨 论

本研究首次在链霉菌中发现 ECF- σ 通过其转录调控的膜蛋白拮抗双组分系统功能的可能机制, 并在生化水平上表明: 膜蛋白可能通过影响 TCS 的磷酸化信号传递这一方式来拮抗其功能. 本研究具体在以下 2 个方面的研究取得了进展: a. *sigQ-afsQs* 基因簇中 TCS AfsQ1/Q2 是 ACT 生物合成过程中关键的直接调控因子; b. 确定了 σ^0 对 AfsQ1/Q2 的拮抗功能是由 AfsQ4 直接介导的.

结合本课题之前的研究结果和现有实验数据, 我们提出以下可能的调控模型 (图 8): 在基因簇 *sigQ-afsQs* 所编码的蛋白质中, AfsQ1/Q2 不仅通过直接调控抗生素生物合成的途径特异性调控基因 (如 *actII-ORF4*、*redZ* 以及 *cdaR*) 的转录, 从而控制抗生素 ACT、RED 以及 CDA 的生物合成, 还直接参与 *sigQ* 基因 (编码 ECF- σ 因子) 的转录; 而 σ^0 反过来可能通过其参与转录起始的下游靶基因 *afsQ4* 所编码的膜蛋白拮抗 AfsQ1/Q2 的功能; 脂蛋白 AfsQ3 辅助膜蛋白 AfsQ4, 协同调控 AfsQ2 的磷酸化活性, 最终影响 *S. coelicolor* ACT 的生物合成. *sigQ-afsQs* 基因簇编码的 5 个蛋白质, 它们既包含了全局性调控因子 TCS AfsQ1/Q2 和 σ 因子 (σ^0), 也有膜蛋白 (AfsQ4) 和脂蛋白 (AfsQ3); 既包含了定位于细胞膜上的膜关联蛋白 (AfsQ2/Q3/Q4), 也包括了可游离在胞质内的重要调控因子 (AfsQ1/ σ^0), 它们构成一个复杂的调控环路, 从而对菌体所处环境的应激作出迅速的应答, 以使抗生素的产量维持在一个合适的水平. 经过同源序列比对发现, *sigQ-afsQs* 基因簇广泛地存在于多种链霉菌中, 包括诸如除虫链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*)、吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 等重要的工业链霉菌. 在这些链霉菌中 *sigQ-afsQs* 是否具有类似功能目前还不清楚, 早先的研究表明在变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 中表达 AfsQ1/Q2 能够促进其 ACT 和 RED

的产量. 本研究还提供了以下几点启示: 在工业链霉菌的遗传改造过程中, 除了次级代谢生物合成基因簇的结构基因和途径特异性调控基因改造以外, 还可以从一些刺激抗生素合成的可能信号分子入手, 促进目标化合物的合成产量; 另外, 对响应信

号的全局性调控因子 (如 TCS 和 ECF- σ) 的信号通路改造可能效果更为显著, 对一些重要的全局性调控因子的靶基因进行改造可能在提高目标化合物产量的同时又能降低对菌体自身的影响 (如本研究中受 *sigQ* 调控的 *afsQ4* 基因)。

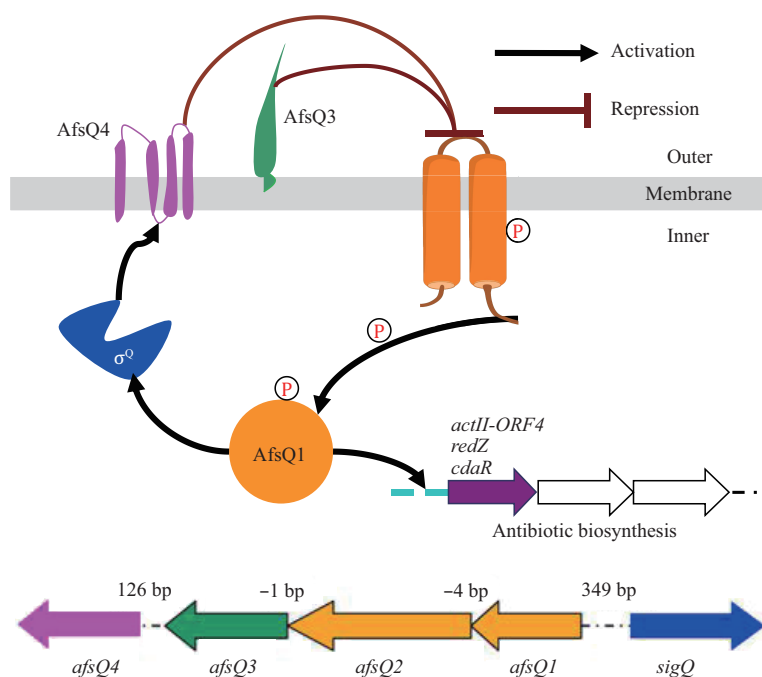


Fig. 8 The proposed model of the *sigQ-afsQs* gene cluster involved in the regulation of antibiotic biosynthesis in *S. coelicolor*

参 考 文 献

- [1] Staron A, Sofia H J, Dietrich S, *et al.* The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol Microbiol*, 2009, **74**(3): 557-581
- [2] Hong H J, Paget M S B, Buttner M J. A signal transduction system in *Streptomyces coelicolor* that activates expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Mol Microbiol*, 2002, **44**(5): 1199-1211
- [3] Hutchings M I, Hong H J, Buttner M J. The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2006, **59**(3): 923-935
- [4] Maurer J, Jose J, Meyer T F. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1997, **179**(3): 794-804
- [5] Mao D. A novel one-component system, XvgA involved in regulation of bacterial growth and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, **5**(25): 9
- [6] Boudes M, Lazar N, Graille M, *et al.* The structure of the NasR transcription antiterminator reveals a one-component system with a NIT nitrate receptor coupled to an ANTAR RNA-binding effector. *Mol Microbiol*, 2012, **85**(3): 431-444
- [7] Liang H, Deng X, Bosscher M, *et al.* Engineering bacterial two-component system PmrA/PmrB to sense lanthanide ions. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(6): 2037-2039
- [8] Celik H, Blouzard J C, Voigt B, *et al.* A two-component system (XydS/R) controls the expression of genes encoding CBM6-containing proteins in response to straw in *Clostridium cellulolyticum*. *Plos One*, 2013, **8**(2): e56063
- [9] Zhang H, Du H, Ji X, *et al.* OmpR may regulate the putative YehU/YehT two-component system in *Salmonella enterica* serovar Typhi under hypotonic growth condition. *Curr Microbiol*, 2012, **64**(3): 283-289
- [10] Zeng Q, Chisholm S W. Marine viruses exploit their host's two-component regulatory system in response to resource limitation. *Curr Biol*, 2012, **22**(2): 124-128
- [11] Jeong D W, Cho H, Jones M B, *et al.* The auxiliary protein complex SaePQ activates the phosphatase activity of sensor kinase SaeS in the SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2012, **86**(2): 331-348
- [12] Huang X, Gaballa A, Cao M, *et al.* Identification of target

- promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. *Mol Microbiol*, 1999, **31**(1): 361-371
- [13] Missiakas D, Raina S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol*, 1998, **28**(6): 1059-1066
- [14] Manganelli R, Voskuil M I, Schoolnik G K, *et al.* Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol*, 2002, **45**(2): 365-374
- [15] Minnig K, Barblan J L, Kehl S, *et al.* In *Bacillus subtilis* W23, the duet sigmaXsigmaM, two sigma factors of the extracytoplasmic function subfamily, are required for septum and wall synthesis under batch culture conditions. *Mol Microbiol*, 2003, **49**(5): 1435-1447
- [16] Oguiza J A, Kiil K, Ussery D W. Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas syringae*. *Trends Microbiol*, 2005, **13**(12): 565-568
- [17] Helmann J D, Chamberlin M J. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem*, 1988, **57**: 839-872
- [18] Paget M S. Bacterial sigma factors and anti-Sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules*, 2015, **5**(3): 1245-1265
- [19] Szafranski P. On the evolution of the bacterial major sigma factors. *J Mol Evol*, 1992, **34**(5): 465-467
- [20] Stock A M, Robinson V L, Goudreau P N. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 183-215
- [21] Skerker J M, Perchuk B S, Siryaporn A, *et al.* Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell*, 2008, **133**(6): 1043-1054
- [22] Szurmant H, White R A, Hoch J A. Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, **17**(6): 706-715
- [23] Galperin M Y. Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol*, 2010, **13**(2): 150-159
- [24] Szurmant H, Hoch J A. Statistical analyses of protein sequence alignments identify structures and mechanisms in signal activation of sensor histidine kinases. *Mol Microbiol*, 2013, **87**(4): 707-712
- [25] Jung K, Fried L, Behr S, *et al.* Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol*, 2012, **15**(2): 118-124
- [26] Kazmierczak M J, Wiedmann M, Boor K J. Alternative Sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiology & Molecular Biology Reviews Mmbr*, 2005, **69**(4): 527-543
- [27] Kill K, Binnewies T T, Sicheritz-Ponten T, *et al.* Genome update: sigma factors in 240 bacterial genomes. *Microbiology*, 2005, **151**(Pt 10): 3147-3150
- [28] Feklistov A, Darst S A. Promoter recognition by bacterial alternative sigma factors: the price of high selectivity?. *Genes Dev*, 2009, **23**(20): 2371-2375
- [29] Schnider U, Keel C, Blumer C, *et al.* Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J Bacteriol*, 1995, **177**(18): 5387-5392
- [30] Hashimoto M, Yu T, Kamiya Y, *et al.* Induction of ECF sigma factors and reduction of housekeeping sigma factor caused by the reduction of negative charge on cell surface in *Bacillus subtilis*. *Genes & Genetic Systems*, 2011, **86**(6): 398
- [31] Ait-Ouazzou A, Manas P, Condon S, *et al.* Role of general stress-response alternative sigma factors sigma(S) (RpoS) and sigma(B) (SigB) in bacterial heat resistance as a function of treatment medium pH. *Int J Food Microbiol*, 2012, **153**(3): 358-364
- [32] Bentley S D, Chater K F, Cerdeno-Tarraga A M, *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, **417**(6885): 141-147
- [33] Yu Z, Zhu H, Dang F, *et al.* Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2012, **85**(3): 535-556
- [34] 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*. *Mol Microbiol*, 2013, **87**(1): 30-48
- [35] He J M, Zhu H, Zheng G S, *et al.* Direct involvement of the master nitrogen metabolism regulator GlnR in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *J Biol Chem*, 2016, **291**(51): 26443-26454
- [36] Li L, Zheng G, Chen J, *et al.* Multiplexed site-specific genome engineering for overproducing bioactive secondary metabolites in actinomycetes. *Metab Eng*, 2017, **40**: 80-92
- [37] Li L, Jiang W, Lu Y. New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products. *Biotechnol Adv*, 2017, **35**(8): 936-949
- [38] Li L, Jiang W, Lu Y. A novel two-component system, GluR-K, involved in glutamate sensing and uptake in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 2017, **199**(18): UNSP e00097-17
- [39] Tian J, Yang G, Gu Y, *et al.* Developing an endogenous quorum-sensing based CRISPRi circuit for autonomous and tunable dynamic regulation of multiple targets in *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(14): 8188-8202
- [40] Shu D, Chen L, Wang W H, *et al.* afsQ1-Q2-sigQ is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, **81**(6): 1149-1160
- [41] Hutchings M I, Hong H J, Leibovitz E, *et al.* The sigma(E) cell envelope stress response of *Streptomyces coelicolor* is influenced by a novel lipoprotein, CseA. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(20): 7222-7229
- [42] 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. *Mol Microbiol*, 2008, **67**(4): 861-880
- [43] Hoskisson P A, Hutchings M I. MtrAB-LpqB: a conserved three-component system in actinobacteria?. *Trends Microbiol*, 2006, **14**(10): 444-449
- [44] Wilkinson C J, Hughes-Thomas Z A, Martin C J, *et al.* Increasing

- the efficiency of heterologous promoters in actinomycetes. J Mol Microb Biotech, 2002, **4**(4): 417-426
- [45] 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. Mol Microbiol, 2008, **67**(4): 861-880
- [46] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Phos-tag technology for phosphoproteomics. Bunseki Kagaku, 2012, **61**(6): 469-487
- [47] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Sugiyama Y, *et al.* Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin. Proteomics, 2012, **12**(7): 932-937
- [48] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions. Proteomics, 2012, **12**(2): 192-202
- [49] Yang L, Xue Z, He Y, *et al.* A Phos-tag-based approach reveals the extent of physiological endoplasmic reticulum stress. Plos One, 2010, **5**(7): e11621

Investigation Into The Upstream Signal Transduction Pathway of AfsQ1/Q2, a Two-component Regulatory System Involved in Regulation of Antibiotic Synthesis in *Streptomyces coelicolor**

CHEN Yun-Liang¹⁾, YANG Yun-Peng²⁾, LI Guo-Quan¹⁾, MAO Xue-Fang¹⁾,
JIA Wei-Dong¹⁾, SHI Ai-Ping^{1)**}, LU Yin-Hua^{3)**}

¹⁾School of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

²⁾Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

³⁾College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract Based on the powerful secondary metabolism of *Streptomyces*, they have been used to synthesize many biologically active secondary metabolites, such as antibiotics, anti-tumor drugs and immunosuppressants. Due to the fact that the synthesis of these products is often strictly regulated at multiple levels, therefore, the study of the mechanism of secondary metabolism regulation of *Streptomyces* can not only deepen our understanding of the metabolic regulation network of *Streptomyces*, but also provide important reference and guidance for the construction of industrial producing strains from the perspective of metabolism. There are two key types of signal transduction system in *Streptomyces*: two-component system (TCS) and extracytoplasmic function σ (ECF- σ). Both of them play important regulatory functions in the process of antibiotic biosynthesis. Studies have shown that there are a large number of TCS and ECF- σ coding genes in the genome of *Streptomyces coelicolor*, a model *Streptomyces* strain. In our previous studies, we have showed that, under certain conditions, the *sigQ-afsQs* gene cluster in *S. coelicolor* is involved in the regulation of the biosynthesis of ACT (actinorhodin), RED (undecylprodigiosin) and CDA (calcium-dependent antibiotic) antibiotics. Based on the early stage research on the regulation function of the TCS system *afsQ1/Q2*, a detailed study of the upstream regulation mechanism toward *afsQ1/Q2* was carried out in this work. Through gene function verification experiments, it was found that the loss of *sigQ* can significantly down-regulate the expression of the membrane protein gene *afsQ4* in the *sigQ-afsQs* gene cluster, and at the same time complementation *afsQ4* can restore the phenotype of the *sigQ* deletion mutant ($\Delta sigQ$), which indicates that *afsQ4* is the downstream regulatory target of *sigQ*. Further analysis of *in vitro* phosphorylation experiments showed that the phosphorylation level of the transmembrane kinase AfsQ2 of TCS was significantly reduced in *afsQ4* gene deletion mutant, indicating that *sigQ* can negatively regulate the TCS *afsQ1/Q2* through membrane protein AfsQ4, and finally coordinate antibiotic synthesis.

Key words two-component system, ECF- σ , membrane protein AfsQ4, cross complementation, phosphorylation

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0285

* This work was supported by a grant from Key R&D Plan of Zhenjiang City(NY2020024).

** Corresponding author.

SHI Ai-Ping. Tel: 86-15952866677, E-mail: shap@ujs.edu.cn

LU Yin-Hua. Tel: 86-18918100208, E-mail: yhlu@shnu.edu.cn

Received: August 6, 2020 Accepted: October 10, 2020