



专论与综述

信号分子在链霉菌天然产物发现 and 开发中的应用研究进展

刘鑫鑫^{Δ1} 张雨薇^{Δ2,3} 王敏^{2,3} 周迎⁴ 段燕文^{1,5,6} 黄勇^{*1,6} 颜晓晖^{*1,7}

1 中南大学湘雅国际转化医学联合研究院 湖南 长沙 410013

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

3 中国科学院大学 北京 100049

4 天津中医药大学国际学院 天津 301617

5 湖南省组合生物合成与天然工程研究中心 湖南 长沙 410205

6 新药组合生物合成国家地方联合工程研究中心 湖南 长沙 410205

7 天津中医药大学组分中药国家重点实验室 天津 301617

摘要: 链霉菌具有巨大的合成次级代谢产物的潜力,但在实验室常规培养条件下链霉菌中大部分生物合成基因簇是沉默的,或者表达量极低。链霉菌中信号分子可调节形态分化和代谢产物的生物合成。通过对编码这些信号分子合成酶或受体的基因进行操作,或在发酵液中添加信号分子,可以激活链霉菌中的沉默生物合成基因簇,发现新的天然产物,或者提升已发现的天然产物产量。本文以 γ -丁内酯和 γ -丁烯内酯两类信号分子为例总结了过去十余年中信号分子在链霉菌天然产物发现和产量提升中的应用,以期为微生物天然产物的开发提供借鉴。

关键词: 链霉菌, 信号分子, 调控网络, 沉默基因簇, 产量提升

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81872779); Central South University Graduate Research Innovation Project (2020zzts836)

^Δ对本文贡献相同

***Corresponding authors:** E-mail: HUANG Yong: jonghuang@csu.edu.cn; YAN Xiaohui: yanxh@tjutcm.edu.cn

Received: 02-02-2021; **Accepted:** 08-04-2021; **Published online:** 20-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81872779); 中南大学研究生科研创新项目(2020zzts836)

^ΔThese authors equally contributed to this work

***通信作者:** E-mail: 黄勇: jonghuang@csu.edu.cn; 颜晓晖: yanxh@tjutcm.edu.cn

收稿日期: 2021-02-02; **接受日期:** 2021-04-08; **网络首发日期:** 2021-04-20

Application of signal molecules in the discovery and development of *Streptomyces* natural products: a review

LIU Xinxin^{Δ1} ZHANG Yuwei^{Δ2,3} WANG Min^{2,3} ZHOU Ying⁴ DUAN Yanwen^{1,5,6}
HUANG Yong^{*1,6} YAN Xiaohui^{*1,7}

1 Xiangya International Academy of Translational Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China

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

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 International Education College, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 301617, China

5 Hunan Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis and Natural Product Drug Discovery, Changsha, Hunan 410205, China

6 National Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis for Drug Discovery, Changsha, Hunan 410205, China

7 State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: *Streptomyces* has great potential to produce novel natural products, but most of their biosynthetic gene clusters (BGCs) are silent or expressed in an extremely low level under laboratory conditions. Signal molecules are used to regulate phenotypic differentiation and biosynthesis of secondary metabolites. Manipulation of genes encoding the synthetases or receptors for signal molecules, or addition of exogenous signal molecules into the fermentation medium relieves the repression of signal molecule receptors on the expression of *Streptomyces* BGCs. This strategy can be used to activate silent BGCs to discover novel natural products or to increase the titer of known secondary metabolites. In this review we used γ -butyrolactones (GBLs) and γ -butenolides as examples to summarize the application of signal molecules in the discovery and titer improvement of *Streptomyces* secondary metabolites, to provide a reference for the development of microbial natural products.

Keywords: *Streptomyces*, signal molecules, regulatory network, silent biosynthetic gene cluster, titer improvement

链霉菌产生的次级代谢产物,如生物碱、萜类、聚酮类、多肽类、糖苷类等一直都是抗感染和抗肿瘤药物的重要来源^[1-2]。在过去的几十年中,从链霉菌中发现的具有新骨架或新作用机制的药物越来越少,但基因组测序表明链霉菌具有巨大的生物合成潜力^[3]。在实验室常规培养条件下,链霉菌中大部分生物合成基因簇(Biosynthetic Gene Clusters, BGCs)是沉默的,或者表达量极低,这是因为其次级代谢产物的生物合成受到严格调控,这些在常规培养条件下不表达或者表达水平极低的基因簇被称为沉默基因簇^[4]。如何有效激活链霉菌中的沉默基因簇、发掘新的次级代谢产物是当前微生物天然产物研究的热点和难点。目前激活链霉菌中沉默基因簇主要通过 2 种策略:一是通过改变原始宿主的

基因型或发酵培养条件以解除对基因簇中基因的转录及次级代谢物生物合成过程中前体、辅因子、抗逆元件生产的抑制,主要包括核糖体工程、对原始菌的基因操作、共培养、单菌株多化合物(One Strain Many Compounds, OSMAC)等^[5];二是将目标基因簇导入异源表达宿主中进行异源表达,以避免原始菌中复杂的调控体系,这一过程中使用的技术包括细菌人工染色体^[6]、Cas9 辅助的目标基因簇直接克隆^[7-9]、外切酶与 RecET 联合使用介导的 DNA 高效克隆(Exonuclease Combined with RecET Recombination, ExoCET)^[10]技术、途径重构^[11-13]、链霉菌底盘细胞改造^[14]、引入强启动子^[15-16]等。

链霉菌中次级代谢产物生物合成的调控机制具有多层级、网络化特征,主要由全局性调控因子

和途径特异性调控因子组成^[17]。群感效应(Quorum Sensing, QS)起初作为一种细菌群体之间的信息交流机制被发现,近年来越来越多的研究发现群感效应在链霉菌次级代谢调控中也发挥着重要作用,进一步提高了链霉菌天然产物生物合成调控网络的复杂性^[18-20]。链霉菌群感效应是通过其内源性信号分子起作用的,这些信号分子可以在链霉菌菌丝之间及细胞膜内外自由扩散;当信号分子的浓度达到阈值时,就会与受其调控的转录调节蛋白结合,形成转录调节蛋白-信号分子复合物,使蛋白从靶基因的启动子上脱离,从而调节靶基因的转录,调节链霉菌形态分化或次级代谢物的生物合成;因信号分子在链霉菌的形态分化和次级代谢产物的调控中起着关键作用,而且其有效浓度通常在纳摩尔级别,因此又被称为链霉菌的“激素”^[21]。通过对信号分子的合成基因或编码其受体蛋白的基因进行操作,或者外源添加合成的信号分子,可以激活链霉菌中的沉默基因簇或提升其次级代谢产物的产量,对于链霉菌天然产物的发现和开发有着重要意义。

1 链霉菌中信号分子的结构

目前发现的链霉菌信号分子根据其化学结构可分为五大类: γ -丁内酯(Gamma-Butyrolactones, GBLs, **1-19**)、 γ -丁烯内酯(Gamma-Butenolides, **20-29**)、PI因子(Pimaricin-Inducer Factor, PI Factor, **30**)、二酮哌嗪(Diketopiperazine, **31**)和呋喃(Methylenomycin Furans Factors, MMFs, **32-36**)^[22](图1)。GBLs是链霉菌中分布最广、数目最多的一类信号分子, γ -丁烯内酯也在许多链霉菌中被发现^[23],而目前对PI因子、二酮哌嗪和呋喃类信号分子的研究远少于前2类,因此,本综述以GBLs和 γ -丁烯内酯类信号分子为例,介绍了它们的结构、作用机制以及在链霉菌天然产物发现和开发中的应用。

从链霉菌中鉴定的GBLs包括:灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)中的A因子(Autoregulatory Factor, A-Factor, **1**),天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中的SCB1-8(**2-9**),维吉尼亚链霉菌

(*Streptomyces virginiae*)中的VB A-E(**10-14**),淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)中的IM-2(**15**),比基尼链霉菌(*Streptomyces bikenensis*)和蓝微褐链霉菌(*Streptomyces cyaneofuscatus*)中的3个Gräfe's Factors(**16-18**),以及绿色产色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)中的Factor 1(**19**)^[22,24]。这些GBLs都具有2,3-二取代的 γ -丁内酯结构,除了Factor 1是目前发现的唯一具有(3S)构型的GBL之外,其他化合物均具有(3R)构型,在C-2位具有不同的侧链,根据6位上基团的不同可分为3类:第1种类型为A因子,其C-6位上是酮基;第2种类型是以SCBs为代表的IM-2型分子,结构特征是C-6位具有一个 β -羟基;第3种类型是以VBs为代表的VB型,结构特征是其C-6位是一个 α -羟基^[25]。目前发现的链霉菌的 γ -Butenolides类信号分子共有10种,包括阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)中的阿维内酯(Avenolide, **20**)^[26]、娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)中的SRB1(**21**)和SRB2(**22**)^[27-28]、白色链霉菌(*Streptomyces albus*)J1074中的4个丁烯酸内酯(Butenolides, **23-26**)^[29]、圈卷产色链霉菌(*Streptomyces ansiochromogenes*)中的SAB1-3(**27-29**)^[30](图1)。

2 信号分子调控网络简介

链霉菌信号分子调控网络包括信号分子、信号分子合成酶和受体蛋白3个部分^[31]。信号分子合成酶负责信号分子的生物合成^[32]。目前鉴定的信号分子合成酶以AfsA蛋白和Aco蛋白为代表^[26,30,33]。信号分子受体属于TetR(The Tetracycline Repressor, TetR)家族,其序列由N端的DNA结合结构域DBD(DNA-Binding Domain)和C端的配体结合域LBD(Ligand-Binding Domain)组成;TetR蛋白通常以同源二聚体的形式结合在目标DNA的启动子区域^[18,21]。此外,还有一种TetR蛋白与信号分子受体具有较高的相似度,但其配体不是信号分子,而是链霉菌产生的其他内源性代谢物,称为“假受体”或“伪受体”^[34-36]。表1列出了目前发现的信号分子及其受体^[37-38]。目前我们对一些链霉菌中的

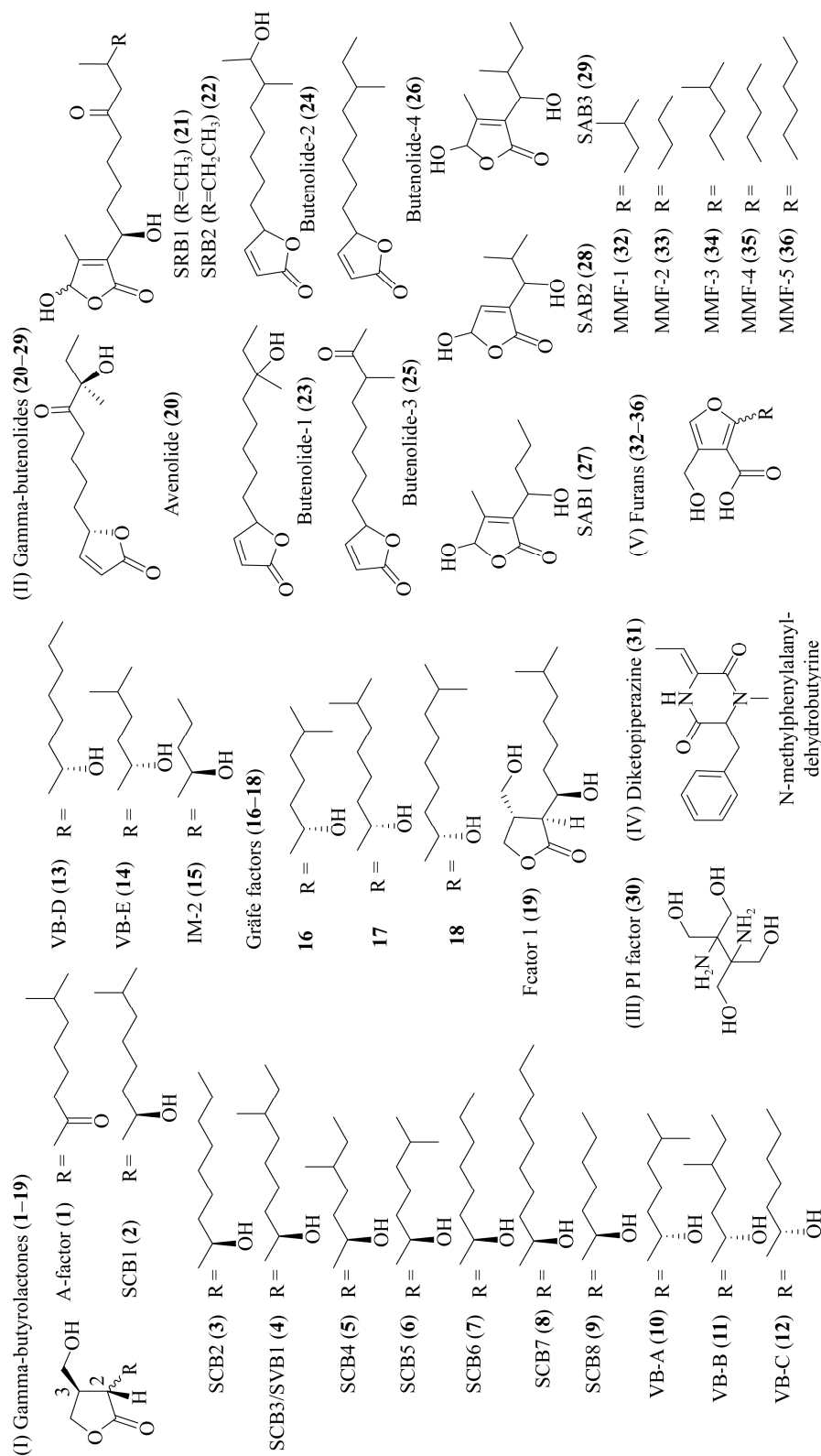


图 1 链霉菌中信号分子的化学结构

Figure 1 Chemical structures of characterized signal molecules from *Streptomyces*

表 1 链霉菌中信号分子及其合成酶和受体

Table 1 Signal molecules from *Streptomyces* and their respective synthetases and receptors

菌株 Strains	信号分子 Signal molecules	信号分子合成酶 Synthetase	信号分子受体 Receptor	假受体 Pseudo receptor	受调控抗生素 Antibiotics	参考文献 References
<i>S. virginiae</i>	VB A-E	BarX	BarA	BarB	Virginiamycin	[35]
<i>S. coelicolor</i>	SCB1-3	ScbA	ScbR	ScbR2	Coelimycin P-1, Act and Red	[39]
<i>S. scabies</i>	/	SscA	SscR	SscF	Thaxtomin	[40]
<i>S. fradiae</i>	/	Aco	TylP	TylQ	Tylosin	[41]
<i>S. ambofaciens</i>	/	Aco	AlpZ	AlpW	Kinamycins, Alpomycin	[42]
<i>S. rochei</i>	SRB1-2	SrrX	SrrA	SrrB	Lankamycin	[27]
<i>S. griseus</i>	A-factor	AfsA	ArpA	/	Streptomycin, Grixazone	[43]
<i>S. tsukubaensis</i>	/	BulS1	BulR1	BulR2	Tacrolimus	[44]
<i>S. venezuelae</i>	SVB1	JadW1	JadR3	JadR2	Jadomycin	[45]
<i>S. aureofaciens</i>	/	SagA	SagR	Aur1R	Auricin	[46]
<i>S. chattanoogensis</i>	/	ScgA	SprA, SngR	/	Natamycin	[47-48]
<i>S. avermitilis</i>	Avenolide	Aco	AvaR1, AvaR3	AvaR2	Avermectins	[49]
<i>S. lavendulae</i>	IM-2	FarX	FarA	FarR2	Showdomycin	[50]
<i>S. ansochromogenes</i>	SAB1-3	SabA	SabR1	SabR2	Nikkomycin	[30]
<i>S. coelicolor</i>	MMFs	MmFL	MmFR	/	Methylenomycin	[51]

注: /: 信号分子结构未确定

Note: /: Signal molecules unknown

信号分子,如灰色链霉菌中的 A 因子、天蓝色链霉菌中的 SCBs 以及维吉尼亚链霉菌中的 VB 等的调控网络有了较为深入的了解,这里以 A 因子级联调控网络为例介绍链霉菌中信号分子调控网络的作用机制。

1967 年前苏联科学家 Khokhlov 等首次从灰色链霉菌中发现一种可以促进产孢和诱导链霉素合成的 γ -丁内酯化合物,并将其命名为 A 因子^[52-53]。后续的研究^[54]发现灰色链霉菌 A 因子的级联调控主要包括 4 个部分: (1) A 因子及其合成酶 AfsA; (2) A 因子特异受体 ArpA; (3) 受 ArpA 调控的全局性转录激活子 AdpA (A-Factor Dependent Protein); (4) 受 AdpA 调控的一系列下游基因。其中, A 因子受体 ArpA 具有双重能力,既能结合 A 因子作为特定配体,又能作为转录抑制因子结合到 *adpA* 启动子中;在整个调控网络中, AfsA 负责合成 A 因子,当细胞内的 A 因子浓度达到阈值时就与 ArpA 结合,导致 ArpA 从 *adpA* 的启动子区域脱离下来,

从而启动 *adpA* 的转录, AdpA 随即激活受其调控的包括参与形态分化和次级代谢产物生物合成的一系列基因的转录(图 2)^[54]。这意味着来自 ArpA 的信号在这一调控步骤通过 AdpA 被极大地放大和发散,从而控制了大量参与形态分化和次级代谢的基因的表达^[25]。

目前已知的 AdpA 蛋白的调节子可分为两类:一类是参与形态分化的蛋白,例如 AdsA (AdpA-Dependent Sigma Factor)、类似于细菌双组分调节系统中的调控蛋白 AmfR、孢子隔膜形成所必需的小酸性蛋白 SsgA 以及参与气生菌丝形成的 SgiA 等;另一类是次级代谢产物基因簇中途径特异性的转录调控蛋白,如链霉素(Streptomycin)、黄色素(Grixazone)和未知聚酮基因簇中的 StrR、GriR 和 Orf1 等^[54]。AdpA 还可结合自身的启动子区域,将胞内的 AdpA 浓度维持在一个稳定的水平;灰色链霉菌通过 *adpA* 基因的自我控制来有序调控 AdpA 调节子的基因转录,以控制复杂的生理

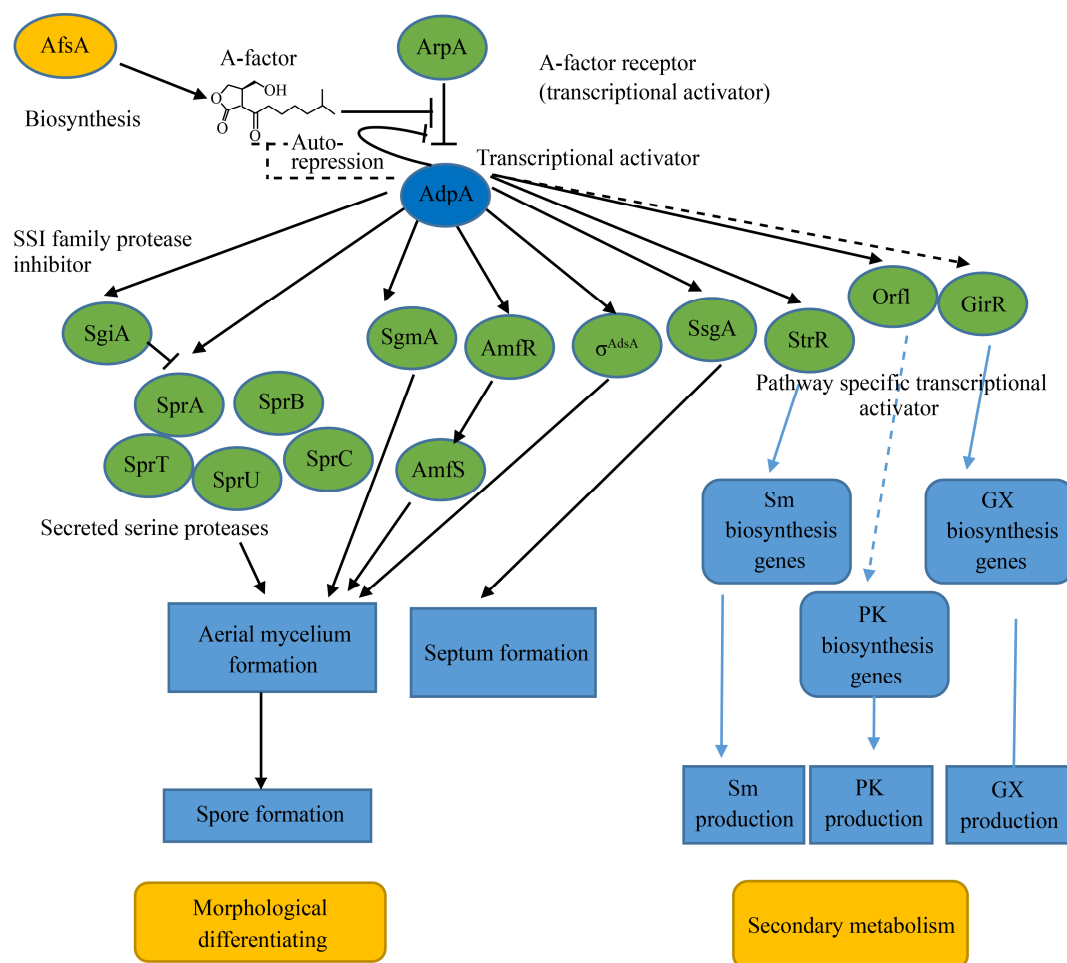


图2 灰色链霉菌中A因子级联调节网络^[54]

Figure 2 The A-factor regulatory cascade network in *Streptomyces griseus*^[54]

Note: Sm: Streptomycin; GX: Grixazone; PK: A polyketide compound. Solid arrows indicate direct activation, dashed arrows indirect activation, and solid arrows indicate direct inhibition

和形态分化过程^[54]。在这一信号系统中,从A因子受体蛋白 ArpA 开始的单一信号通路被分成不同的多个靶点,参与链霉菌中次生代谢和形态分化等各种细胞功能,ArpA 的靶标只限于单一的全局性转录激活因子 *adpA*,而 AdpA 控制着许多下游基因的表达^[54]。其他链霉菌的 GBL 调控系统与灰色链霉菌中的 A 因子调控网络不同,灰色链霉菌中 AdpA 位于信号分子调控网络的中枢位置,而在天蓝色链霉菌和维吉尼亚链霉菌中,GBL 受体蛋白起着中枢调控蛋白的作用,而且 SCB 和 VB 等信号分子对于抗生素产生的调控比 A 因子更为精细^[54]。

3 信号分子在激活链霉菌沉默基因簇中的应用

在了解链霉菌中信号分子的结构及其作用机制的基础上,通过对编码信号分子合成酶或信号分子受体的基因进行操作,或外源添加链霉菌合成的信号分子,有可能解除信号分子受体对沉默生物合成基因簇的转录抑制,从而发现其合成的次级代谢产物。

3.1 通过敲除信号分子受体激活沉默基因簇

SCBs 是天蓝色链霉菌中的信号分子,敲除 SCBs 受体基因 *scbR2* 的突变株可以产生一种新的

具有抗菌活性的抗生素 Coelimycin A (37)和一种黄色次级代谢物 Coelimycin P2 (38)^[55]。尽管产二素链霉菌(*Streptomyces ambofaciens*) ATCC 23877 中的信号分子未确定,但其 *alp* 基因簇上的调控基因 *alpZ* 是 GBL 受体同源基因, *alpW* 是另一个调控基因,推测可能编码伪 GBL 受体, *alpZ* 负调控自身的表达及 *alpW* 的表达;从这一菌株中原来只发现 2 种抗生素杀刚果锥虫素(Congocidine)和螺旋霉素(Spiramycin),在敲除 *alpW* 后,从突变株里分离出 3 种已知化合物醌那霉素(Kinamycin) D、C 和 FL-120B (39–41);进一步研究揭示 AlpW 作为一种转录抑制因子可以抑制 *alp* 基因簇在产二素链霉菌生长后期的表达,而在 $\Delta alpW$ 突变株中这 3 种化合物的生物合成基因簇被激活^[42]。除了 AlpW 外,天蓝色链霉菌中的伪 GBL 受体 ScbR2 也在生长后期关闭抗生素的产生^[55]。

娄彻氏链霉菌 7434AN4 具有与灰色链霉菌类似的 GBLs 调节系统,其中 SrrX 合成信号分子 SRB1 (21)和 SRB2 (22),而 SrrB 是 SRBs 的受体;在正常培养条件下娄彻氏链霉菌主要产生 2 种结构不同的聚酮类抗生素兰卡杀菌素(Lankacidin C)和兰卡霉素(Lankamycin)^[56]。敲除兰卡霉素基因簇中 II 型硫酸酯酶基因 *lkmE* 后,兰卡霉素的产量降低 70%,而敲除兰卡杀菌素基因簇聚酮合酶(Polyketide Synthase, PKS)基因 *lkcF* 中的 *KR1* 结构域基因后,突变株不再产生兰卡杀菌素^[57–58]。在同时敲除 *srrB*、*lkmE* 和 *lkcF-KR1* 之后,从突变株 KA57 中分离出一种氮氧烯化合物 KA57-A (42)^[56]。阿维链霉菌中也存在信号分子级联调节网络,阿维内酯(20)是其中的信号分子;在这一调控网络中, AvaR1 是阿维内酯的受体, AvaR2 和 AvaR3 是 AvaR1 的同源蛋白, AvaR2 的功能目前还不清楚,而 AvaR3 在阿维链霉菌的次生代谢和形态分化中起着重要作用,其对阿维菌素(Avermectin)和菲律宾菌素(Filipin)的生产起正调控作用,敲除 *avaR3* 的阿维链霉菌突变株中产生了一个新的聚酮化合物

Phthoxazolin A (43),表明 AvaR3 在激活阿维菌素生产的同时还抑制 Phthoxazolin A 的生物合成^[59]。

3.2 通过添加外源信号分子合成酶或信号分子激活沉默基因簇

信号分子在不同链霉菌种间可以相互作用。供体链霉菌产生的可扩散信号分子化合物能被其他种类的受体链霉菌识别,从而激活受体链霉菌的次级代谢基因簇表达。在天蓝色链霉菌 M145 中,信号分子 SCB3 (4)调控放线紫红素(Actinorhodin, 44)和十一烷基灵菌红素(Undecylprodigiosin, 45)的生物合成,而委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)中信号分子 SVB1 (4)调控杰多霉素(Jadomycin) A (46)、B (47)的生物合成^[60],随后的研究发现这 2 种信号分子 SVB1 和 SCB3 的结构相同,在委内瑞拉链霉菌中, *jadW123* 编码信号分子 4 的合成酶,敲除 *jadW123* 的委内瑞拉链霉菌中不再产生杰多霉素,而当将委内瑞拉链霉菌 $\Delta jadW123$ 突变株与天蓝色链霉菌 M145 共培养之后可恢复杰多霉素的产生,在委内瑞拉链霉菌发酵培养基中直接添加天蓝色链霉菌 M145 的发酵液后也可以恢复杰多霉素的产生^[61]。同样地,SVB1 也可诱导天蓝色链霉菌 M145 中放线紫红素和十一烷基灵菌红素的产生。浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 SVB1 能最大限度地诱导这 2 种抗生素的产生,进一步提高 SVB1 的浓度则会抑制它们的产生^[61]。

不同链霉菌之间可以通过信号分子相互影响。白色链霉菌 J1074 可产生 4 种不同的阿维内酯类信号分子(23–26),而敲除编码酰基辅酶 A 氧化酶 *aco* 基因的阿维链霉菌突变株失去了生产阿维内酯和阿维菌素的能力;当将白色链霉菌 J1074 与敲除 *aco* 基因后的阿维链霉菌突变株共培养后,在发酵液中可检测到阿维菌素,说明白色链霉菌中产生的阿维内酯能刺激阿维链霉菌中阿维菌素(48)的产生^[29]。

异源表达信号分子合成酶基因也可激活沉默基因簇。微白黄链霉菌(*Streptomyces albidoflavus*)

J1074 有 GBL 受体基因 XNR_4681,但是没有 GBL 生物合成基因^[62]。通过将天蓝色链霉菌 M145 中 SCBs 的生物合成基因(*scbA*、*scbB*、*scbC*)在微白黄链霉菌 J1074 中异源表达后,微白黄链霉菌 J1074 中合成了 SCBs (主要是 SCB1 和 SCB2) (2–3),并激活了其染色体上糖苷类抗生素保罗霉素(Paulomycins)的基因簇,产生了 Paulomenol A (49)、B (50)和 Paulomycin A (51)、B (52)^[62–63]。虽然 XNR_4681 与天蓝色链霉菌 M145 中 SCBs 的受体 ScbR 相似度仅为 26.8%,但微白黄链霉菌中保罗霉素的产生说明了利用 GBL 生物合成酶基因或其受体基因异源表达来激活沉默的天然产物生物合成基因簇是可行的。表 2 列出了近年来通过这些策略发现的部分链霉菌天然产物,图 3 列出了被激活的化合物结构。

4 信号分子在天然产物产量提升上的应用

4.1 通过添加化学合成的信号分子提升天然产物产量

虽然信号分子具有较为严格的种属特异性,但它们的一些类似物可以通过化学合成的方法获得,通过在发酵培养基中外源添加这些类似物,有可能调控信号分子网络下游基因的表达,提高天然产物的产量。在天蓝色链霉菌中添加外源合成的 SCB

分子能显著刺激放线紫红素和十一烷基灵菌红素的合成^[60,64]。在维吉尼亚链霉菌发酵 11.5 h 时加入 300 pg/L 化学合成的 VB-C,维吉尼亚霉素 M 和 S 均提升了 9 倍^[65]。井冈霉素是一种能高效防治水稻纹枯病的农用抗生素^[66],在吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) 5008 发酵 12 h 时添加 10 mmol/L 化学合成的 A 因子结构类似物 1,4-Butyrolactone (1,4-BL)可提高井冈霉素的产量 30%左右;在发酵罐实验中,添加 1,4-BL 使井冈霉素的产量提高约 30%;在工业菌株 TL01 (5008 的高产诱变菌株)的发酵实验中,添加 1,4-BL 显著促进了井冈霉素的合成;进一步的转录数据表明添加 1,4-BL 能提高 *adpA-H* 等 A 因子级联调控相关同源基因和井冈霉素基因簇的转录水平^[67]。必特螺旋霉素(Bitespiramycin)是由螺旋链霉菌(*Streptomyces spiramyceticus*)产生的大环内酯抗生素,在螺旋链霉菌 WS1-195 发酵 12 h 时添加 1,4-BL (1 mmol/L)发酵 3 d 后其产量提升 27%^[68]。普那霉素(Pristinamycin)由普那霉素 I (Pristinamycin I, PIA, 占 30%)和普那霉素 II (Pristinamycin II, PIIA, 占 70%)组成,在其产生菌始旋链霉菌(*Streptomyces pristinaespiralis*)发酵 48 h 添加 1,4-BL (2 mmol/L)时普那霉素 I 的产量提升了约 30%,普那霉素 II 的产量提升了

表 2 通过操作信号分子相关基因或共培养激活的链霉菌沉默基因簇

Table 2 Activation of silent *Streptomyces* BGCs by manipulating signal molecule-related genes or cocultivation

信号分子 Signal molecules	菌株 Strains	信号分子合成酶 Synthetase	信号分子受体 Receptor	使用策略 Strategy	产生的抗生素 Antibiotics	参考文献 References
SCB1	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	ScbA	ScbR2	Deletion of <i>scbR2</i>	Coelimycin P2	[55]
/	<i>S. ambofaciens</i>	Aco	AlpW	Deletion of <i>alpW</i>	Kinamycins	[42]
SCB3	<i>S. venezuelae</i> Δ jadW123	ScbA	ScbR2	Cocultivation with <i>S. coelicolor</i> M145	Jadomycin	[45]
SCBs	<i>S. albidoflavus</i> J1074	/	XNR_4681	Heterologous expression of GBL biosynthetic genes	Paulomycins	[62]
SRBs	<i>S. rochei</i> 7434AN4	SrrX	SrrA	Deletion of <i>srrB</i> , <i>lkmE</i> and <i>lkcF</i>	KA57A	[56]
Avenolide	<i>S. avermitilis</i>	/	AvaR3	Deletion of <i>avaR3</i>	Phthoxazolin A	[59]
Butenolides	<i>S. avermitilis</i> Δ aco	Aco and Cyp17	AvaR1	Co-culture with <i>S. albus</i> J1074	Avermectin	[29]

注: /: 信号分子或信号分子合成酶未确定

Note: /: The structure or the synthetase for signal molecule remains unknown

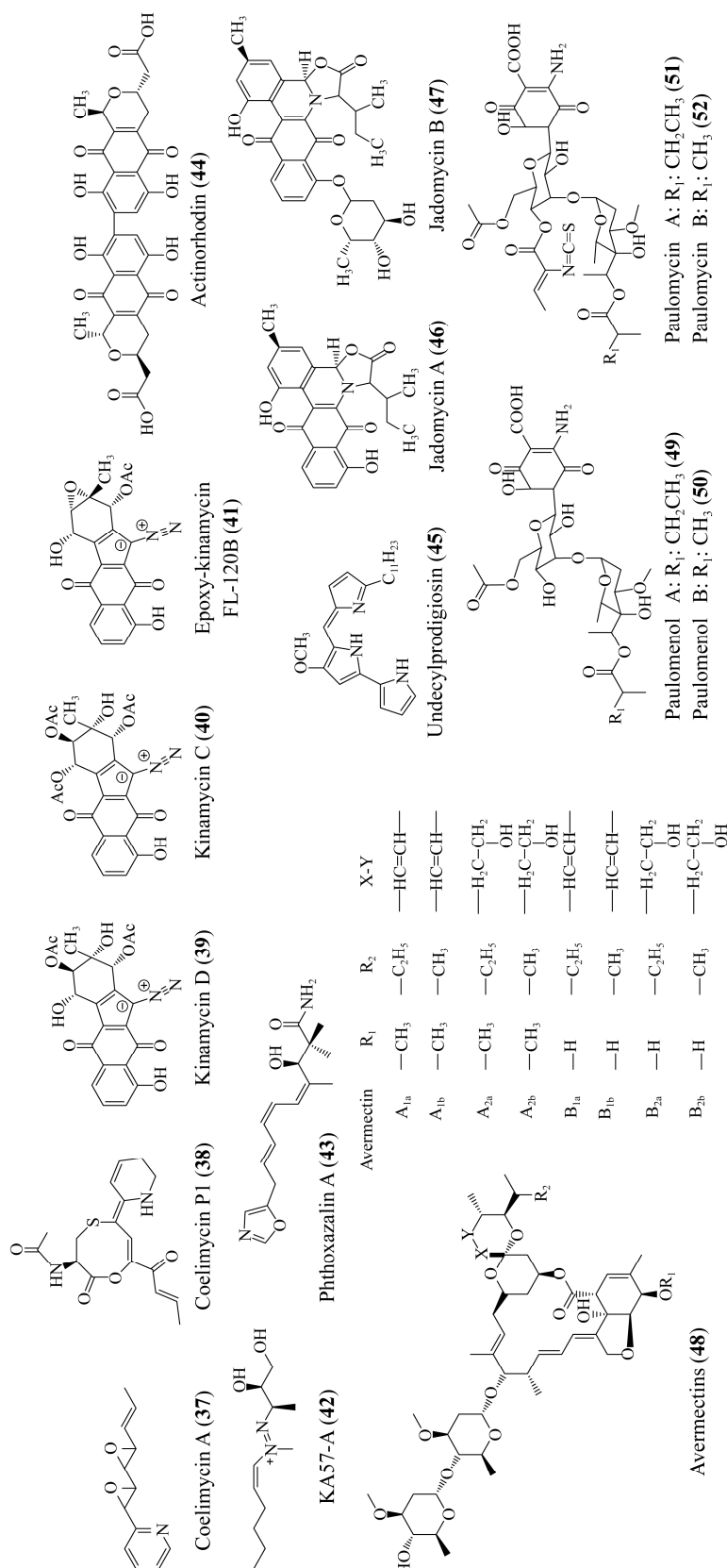


图 3 通过操作信号分子相关基因或外源添加信号分子激活链霉菌基因簇分离的天然产物的化学结构

Figure 3 Chemical structures of natural products isolated by activation of silent *Streptomyces* BGCs via genetic manipulation of signal molecules-related genes or exogenous addition of signal molecules

约 40%^[69]。信号分子阿维内酯(**20**)在浓度超过 4 nmol/L 时开始诱导阿维菌素产生,在阿维链霉菌 Δaco 突变株中添加 150 nmol/L 的阿维内酯后阿维菌素产量达到了野生型菌株的 1.8 倍^[26]。

4.2 通过敲除信号分子受体提升天然产物产量

敲除信号分子受体或同源受体是提升天然产物产量的有力手段。在天蓝色链霉菌 A3(2)中敲除 *scbA* 之后不产生 GBLs,但是提升了放线紫红素和十一烷基灵菌红素的产量^[70]。在阿维链霉菌 M0 中敲除 *avaR1* 后,阿维菌素的产量提升了 1.75 倍^[71]。由此表明敲除信号分子受体及同源物是实现提高工业菌种抗生素产量这一目标更为直接有效的方法。在始旋链霉菌 Pr11 中敲除 *papR5* 后,普那霉素的产量提升了 3 倍^[72]。在吸水链霉菌 5008 中敲除受体基因 *shbR1* 或 *shbR3* 后,井冈霉素产量分别增加了 26% 和 20%,同时敲除 *shbR1/R3* 的突变株中井冈霉素生物合成相关基因的转录水平有了明显提高,井冈霉素的产量较野生型提高了 55%^[73]。在恰塔努加链霉菌 (*Streptomyces chattanoogensis*)中敲除 *sngR* 后,纳他霉素(Natamycin)的产量提高了 4.6 倍^[48]。在娄彻氏链霉菌中敲除 *srrB* 后,兰卡霉素的产量提升了 6 倍,兰卡杀菌素的产量提升了 9.9 倍^[37]。

4.3 过表达信号分子合成酶提升天然产物产量

他克莫司(Tacrolimus or Fujimycin, FK506)是由筑波链霉菌 (*Streptomyces tsukubaensis*) NRRL18488 产生的一种大环内酯类抗生素,广泛应用于自身免疫性疾病的治疗。链霉菌抗生素调控蛋白(*Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein, SARP)家族调控因子 BulZ 对筑波链霉菌的孢子分化和他克莫司的产生起正向调控作用,敲除 *bulZ* 之后他克莫司产量下降 47.5%,孢子分化延迟;研究还发现 BulZ 能直接激活 *bulZ* 和编码 GBL 合成酶的 *bulS2* 基因的转录,并间接激活调控基因 *tcs7*、*fkbN* 以及 GBL 受体基因 *bulR1* 的转录;在筑波链霉菌 NRRL 18488 中过表达 *bulS2* 后他克莫司的产量提升了 44.6%,过表达 *bulZ* 后他克莫司的产量

提升了 38%,同时过表达 *bulZ* 和 *bulS2* 后,他克莫司的产量提升了 67.4%;在他克莫司高产菌株 TJ-04 中共表达 *bulZ* 及其靶基因 *bulS2* 后他克莫司产量提高了 36%^[44]。尼莫克汀(Nemadectin)是由蓝灰链霉菌(*Streptomyces cyaneogriseus*) NMWT1 产生的大环内酯抗生素,临床上被用作抗寄生虫药物^[74]。尼莫克汀基因簇中存在与阿维链霉菌中同源的信号分子合成基因(*scyA1*)及受体基因(*scyR1*),虽然 ScyA1 和 ScyR1 分别与阿维链霉菌中 Aco 和 AvaR1 具有较高的同源性(相似度分别为 63%和 70%),但它们调控次级代谢物生物合成的机制又不同于 Aco 和 AvaR1;在阿维链霉菌中,信号分子合成酶 Aco 对阿维菌素生物合成起正调控作用,受体 AvaR1 抑制阿维菌素的生产,而在尼莫克汀生物合成过程中 ScyA1 和 ScyR1 均为正调控作用,它们的过表达分别将尼莫克汀的产量提升了 56%和 29%^[33]。

虽然信号分子合成酶通常对次级代谢产物的生产起正调控作用,一些信号分子合成酶的缺失也能提升链霉菌中次级代谢物的产量。淡紫链霉菌(*Streptomyces lavendulae*) FRI-5 中 *farX* 编码信号分子 IM-2 (**15**)的合成酶,敲除 *farX* 的突变株中 D-环丝氨酸(D-Cycloserine)产量提高了 5 倍,表明信号分子 IM-2 在 D-环丝氨酸的生物合成中起负调控作用^[75](表 3)。

4.4 异源表达 A 因子依赖蛋白 Sgr3394 提升天然产物产量

Protein-D 是一种在 A 因子产生菌株灰色链霉菌 IFO 13350 的发酵液中检测到的胞外蛋白,该蛋白根据氨基酸序列被确定为 Sgr3394;在 A 因子缺失的灰色链霉菌突变株 HH1 中失去了产生 Sgr3394 的能力,表明该蛋白的表达具有 A 因子依赖性;将灰色链霉菌 IFO 13350 中的 *sgr3394* 基因在变铅青链霉菌 TK21 和天蓝色链霉菌 A3(2)中用高拷贝质粒进行过表达后,在抑制宿主形态分化的同时提升了宿主中放线紫红素和十一烷基灵菌红素的产量(表 3),进一步研究发现 *sgr3394* 的转录

表 3 利用添加信号分子或操作信号分子相关基因来提升链霉菌天然产物产量的应用
Table 3 Improving the titers of *Streptomyces* natural products by adding signal molecules or manipulating signal molecule-related genes

信号分子 Signal molecules	菌株 Strains	产生的抗生素 Antibiotics	产量提升倍数 Titer improved	使用策略 Methods	参考文献 References
1,4-BL	<i>S. hygroscopicus</i> 5008	Validamycin	30%	Exogenous addition	[67]
	<i>S. spiramyceticus</i> F21	Bitespiramycin	29%	Exogenous addition	[68]
	<i>S. pristinaespiralis</i> Pr11	Pristinamycin	30% (PIA) and 40% (PIIA)	Exogenous addition	[69]
A-factor	<i>S. hygroscopicus</i> 5008	Validamycin	55%	Deletion of <i>shbR1/shbR3</i>	[73]
Avenolide	<i>S. avermitilis</i>	Avermectin	1.8-fold	Exogenous addition	[26]
	<i>S. avermitilis</i>	Avermectin	1.75-fold	Deletion of <i>avaR1</i>	[71]
	<i>S. pristinaespiralis</i> Pr11	Pristinamycin	3-fold	Deletion of <i>papR5</i>	[72]
IM-2	<i>S. lavendulae</i> FRI-5	D-cycloserine	5-fold	Deletion of <i>farX</i>	[75]
SCB1	<i>S. coelicolor</i>	Actinorhodin and Undecylprodigiosin	~4-fold	Exogenous addition	[64]
	<i>S. coelicolor</i>	Actinorhodin and Undecylprodigiosin	10-fold	Deletion of <i>scbA</i>	[70]
SRBs	<i>S. rochei</i> 7434AN4	Lankacidin and lankamycin	9.9- and 6-fold	Deletion of <i>srrB</i>	[37]
VB-C	<i>S. virginiae</i>	Virginiamycin M and S	9-fold	Exogenous addition	[65]
/	<i>S. chattanoogensis</i>	Natamycin	4.6-fold	Deletion of <i>sngR</i>	[48]
/	<i>S. tsukubaensis</i>	Tacrolimus	1.36-fold	Expression of <i>bulZ</i> and <i>bulS2</i>	[44]
/	<i>S. cyaneogriseus</i> NMWT1	Nemadectin	56% and 29%	Overexpression of <i>scyA1</i> and <i>scyR1</i>	[28]

注: /: 信号分子结构未确定
Note: /: Structures of signal molecules remain unknown

受到 AdpA 级联调控下游的一个蛋白控制;BLAST 结果显示 Sgr3394 仅有 8 个同源蛋白, 这些同源蛋白都是分泌蛋白且均来源于链霉菌属, 因此推测 Sgr3394 及其同源蛋白是链霉菌属特有的蛋白, 它们的功能可能与链霉菌次级代谢和形态分化紧密相关^[76]。

5 结论及展望

链霉菌有巨大的生物合成潜力, 目前我们只能发现其合成的一小部分天然产物。许多链霉菌中的生物合成基因簇因受到宿主细胞的严密调控, 在实验室常规培养条件下是沉默的, 或其表达水平极低。近年来科学家们在持续不断地解析链霉菌形态分化和次级代谢产物生产背后的调控机制, 相关的发现也促进了链霉菌中沉默基因簇的激活和新天然产物的发现。群感效应起初作为一种协调细菌群体行为的信号传递机制被发现, 后续的研究发现链

霉菌中也存在着群感效应, 这一效应是通过链霉菌自身分泌的自诱导信号分子介导的。这些信号分子与链霉菌形态分化和次级代谢产物的调控密切相关, 也成为激活链霉菌中沉默的生物合成基因簇或提升已分离产物产量的一个有效手段。天蓝色链霉菌 A3(2)中的呋喃类信号分子MMFs调控次甲霉素 A (Methylenomycin A)的生物合成, 最近有研究应用 X 射线晶体衍射和单颗粒冷冻电镜技术获得了转录抑制因子 MmfR-MMFs 复合物和 MmfR- DNA 复合物的三维结构, 阐明了在信号分子存在下 ArpA 类转录抑制因子识别配体、发生信号传导并调控抗生素表达的分子机制^[77]。运用 X 射线晶体衍射和单颗粒冷冻电镜等技术解析信号分子相关蛋白的三维结构, 将促进我们对链霉菌中信号分子的产生、传导和识别机制的理解, 为链霉菌天然产物的开发提供指导。

本综述在简要介绍链霉菌中信号分子的结构和调控机制的基础上,以 GBL 和 γ -Butenolide 两大类信号分子为例,展示了它们在激活链霉菌中沉默生物合成基因簇和提升已发现天然产物产量方面的应用。通过过表达信号分子生物合成酶基因或缺失在次级代谢产物调控网络中起负调控作用的信号分子受体基因,会对链霉菌的形态分化和次级代谢产物的合成产生较大的影响。除了 GBL 和 γ -Butenolide 外,链霉菌中其他种类的信号分子也可应用于天然产物开发和产量提升。如在纳塔爾链霉菌(*Streptomyces natalensis*)发酵 48 h 时添加 210 nmol/L 化学合成的 PI 因子后纳他霉素的产量提升了 2.2 倍^[78]。在金褐链霉菌(*Streptomyces aureofuscus*) SYAU0709 发酵 96 h 时添加 0.4 mmol/L PI 因子结构类似物丙三醇后金褐霉素(Aureofuscin)的产量提高了 1.5 倍^[79]。在世里北里孢菌(*Kitasatospora setae*)中敲除假信号分子受体基因 *ksbC* 后,突变株中产生了 2 种新的化合物 β -咔啉生物碱类化合物 Kitasetaline 和 JBIR-133,表明在链霉菌中获得的利用信号分子来激活沉默基因簇的方法也可以应用于其他类型的放线菌^[80]。此外,在培养基中外源添加化学合成的信号分子或其类似物,或者异源表达其他链霉菌中已鉴定的信号分子生物合成基因,有望成为一种快速、高效激活不同链霉菌中沉默生物合成基因簇的策略;结合生物信息学分析^[81]和基于质谱的代谢物快速检测技术^[82],可以极大地提高链霉菌中新天然产物发现的效率。但是,由于信号分子在链霉菌中产生量较低,依靠传统的大规模发酵积累产量分离并不总是可行的,化学合成信号分子是制备的另外一种方法。然而这种方法很容易产生大量外消旋的信号分子,这也说明了用确定的立体化学方法分离信号分子仍然具有挑战性。有研究表明,为了简化激活过程,通过在微白黄链霉菌 J1074 中外源添加合成的 SCBs 并未激活保罗霉素的产生,这说明了在链霉菌中外源添加信号分子在开发天然

产物和提升产量方面的局限性,因此有必要开发天然和化学合成的信号分子库^[62]。目前,可以通过敲除信号分子合成酶的抑制基因^[20]、利用敲除信号分子合成酶基因的菌株作为指示菌株的生物测定^[83],以及在模式菌株中异源表达信号分子合成酶^[25]来发现新的信号分子。这些方法在开发新的信号分子方面提供了有力支撑,为信号分子在链霉菌天然产物发现和开发中的应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Zhang Q, Qian SY. Progress in research on alkaloids and pharmacological activities from *Streptomyces*[J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(8): 1461-1473 (in Chinese)
张权, 钱声艳. 链霉菌来源生物碱及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(8): 1461-1473
- [2] Zhao JH, Fang H, Zhang DW. Research progress in biosynthesis of secondary metabolites of microorganisms[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(11): 141-147 (in Chinese)
赵江华, 房欢, 张大伟. 微生物次级代谢产物生物合成的研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(11): 141-147
- [3] Li KM, He WQ. Cloning and heterologous expression of biosynthetic gene clusters of microbial secondary metabolites[J]. Chemistry of Life, 2021, 41(3): 420-427 (in Chinese)
李可萌, 赫卫清. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇的克隆与异源表达[J]. 生命的化学, 2021, 41(3): 420-427
- [4] Liu ZY, Zhao YT, Huang CQ, Luo YZ. Recent advances in silent gene cluster activation in *Streptomyces*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 632230
- [5] Ren HQ, Wang B, Zhao HM. Breaking the silence: New strategies for discovering novel natural products[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 48: 21-27
- [6] Xu M, Wang YM, Zhao ZL, Gao GX, Huang SX, Kang QJ, He XY, Lin SJ, Pang XH, Deng ZX, et al. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters through heterologous expression of a whole-genome bacterial artificial chromosome library in *Streptomyces* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(19): 5795-5805
- [7] Jiang WJ, Zhao XJ, Gabrieli T, Lou CB, Ebenstein Y, Zhu TF. Cas9-Assisted Targeting of CHromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8101
- [8] Kang HS, Charlop-Powers Z, Brady SF. Multiplexed CRISPR/Cas9- and TAR-mediated promoter engineering of natural product biosynthetic gene clusters in yeast[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(9): 1002-1010

- [9] Tao WX, Chen L, Zhao CH, Wu J, Yan DZ, Deng ZX, Sun YH. *In vitro* packaging mediated one-step targeted cloning of natural product pathway[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(9): 1991-1997
- [10] Wang HL, Li Z, Jia RN, Yin J, Li AY, Xia LQ, Yin YL, Müller R, Fu J, Stewart AF, et al. ExoCET: exonuclease *in vitro* assembly combined with RecET recombination for highly efficient direct DNA cloning from complex genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(5): 2697
- [11] Freestone TS, Ju KS, Wang B, Zhao HM. Discovery of a phosphonoacetic acid derived natural product by pathway refactoring[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(2): 217-223
- [12] Zhu YG, Zhang QB, Fang CY, Zhang YL, Ma L, Liu ZW, Zhai SL, Peng J, Zhang LP, Zhu WM, et al. Refactoring the concise biosynthetic pathway of cyanogranamide unveils spirooxindole formation catalyzed by a P450 enzyme[J]. Angewandte Chemie: International Ed. in English, 2020, 59(33): 14065-14069
- [13] Bauman KD, Li J, Murata K, Mantovani SM, Dahesh S, Nizet V, Luhavaya H, Moore BS. Refactoring the cryptic streptophenazine biosynthetic gene cluster unites phenazine, polyketide, and nonribosomal peptide biochemistry[J]. Cell Chemical Biology, 2019, 26(5): 724-736.e7
- [14] Myronovskiy M, Luzhetskyy A. Heterologous production of small molecules in the optimized *Streptomyces* hosts[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(9): 1281-1294
- [15] Horbal L, Marques F, Nadmid S, Mendes MV, Luzhetskyy A. Secondary metabolites overproduction through transcriptional gene cluster refactoring[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 299-315
- [16] Myronovskiy M, Luzhetskyy A. Native and engineered promoters in natural product discovery[J]. Natural Product Reports, 2016, 33(8): 1006-1019
- [17] Martín JF, Liras P. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(3): 263-273
- [18] Biarnes-Carrera M, Breitling R, Takano E. Butyrolactone signalling circuits for synthetic biology[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2015, 28: 91-98
- [19] Liu M, Li AY. Quorum sensing involved in the regulation of secondary metabolism in streptomycetes: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(5): 571-578 (in Chinese)
刘明, 李爱英. 群感效应与链霉菌次级代谢调控[J]. 微生物学报, 2011, 51(5): 571-578
- [20] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2001, 55: 165-199
- [21] Han XW, Shen YM. TetR family proteins in regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*[J]. Microbiology China, 2013, 40(10): 1831-1846 (in Chinese)
韩晓伟, 沈月毛. TetR 家族调控链霉菌次级代谢的机制[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1831-1846
- [22] Niu GQ, Chater KF, Tian YQ, Zhang JH, Tan HR. Specialised metabolites regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* spp.[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2016, 40(4): 554-573
- [23] Sidda JD, Corre C. Gamma-butyrolactone and furan signaling systems in *Streptomyces*[J]. Methods in Enzymology, 2012, 517: 71-87
- [24] Sidda JD, Poon V, Song LJ, Wang WS, Yang KQ, Corre C. Overproduction and identification of butyrolactones SCB1-8 in the antibiotic production superhost *Streptomyces* M1152[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2016, 14(27): 6390-6393
- [25] Tan GY. An A-factor-like signaling cascade involved in validamycin fermentation[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2014 (in Chinese)
谭高翼. 类 A 因子级联系统对井冈霉素合成的调控[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2014
- [26] Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K, Uchida M, Nagamitsu T, Omura S, Ikeda H, et al. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2011, 108(39): 16410-16415
- [27] Arakawa K, Tsuda N, Taniguchi A, Kinashi H. The butenolide signaling molecules SRB1 and SRB2 induce lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*[J]. Chem Bio Chem: a European Journal of Chemical Biology, 2012, 13(10): 1447-1457
- [28] Arakawa K. Genetic and biochemical analysis of the antibiotic biosynthetic gene clusters on the *Streptomyces* linear plasmid[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(2): 183-189
- [29] Nguyen TB, Kitani S, Shimma S, Nihira T. Butenolides from *Streptomyces albus* J1074 act as external signals to stimulate avermectin production in *Streptomyces avermitilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(9): e02791-17
- [30] Wang WX, Zhang JH, Liu X, Li D, Li Y, Tian YQ, Tan HR. Identification of a butenolide signaling system that regulates nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(52): 20029-20040
- [31] Nishida H, Ohnishi Y, Beppu T, Horinouchi S. Evolution of gamma-butyrolactone synthases and receptors in *Streptomyces*[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(8): 1986-1994
- [32] Kato JY, Funa N, Watanabe H, Ohnishi Y, Horinouchi S.

- Biosynthesis of γ -butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2007, 104(7): 2378-2383
- [33] Liu H, Zhang YY, Li SS, Wang JB, Wang XJ, Xiang WS. Elucidation of the activation pathways of ScyA1/ScyR1, an Aco/ArpA-like system that regulates the expression of nemadectin and other secondary metabolic biosynthetic genes[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 589730
- [34] Kitani S, Iida A, Izumi TA, Maeda A, Yamada Y, Nihira T. Identification of genes involved in the butyrolactone autoregulator cascade that modulates secondary metabolism in *Streptomyces lavendulae* FRI-5[J]. Gene, 2008, 425(1/2): 9-16
- [35] Matsuno K, Yamada Y, Lee CK, Nihira T. Identification by gene deletion analysis of *barB* as a negative regulator controlling an early process of virginiamycin biosynthesis in *Streptomyces virginiae*[J]. Archives of Microbiology, 2004, 181(1): 52-59
- [36] Cuthbertson L, Nodwell JR. The TetR family of regulators[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(3): 440-475
- [37] Misaki Y, Yamamoto S, Suzuki T, Iwakuni M, Sasaki H, Takahashi Y, Inada K, Kinashi H, Arakawa K. SrrB, a pseudo-receptor protein, acts as a negative regulator for lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1089
- [38] Xu GM, Yang SQ. Regulatory and evolutionary roles of pseudo γ -butyrolactone receptors in antibiotic biosynthesis and resistance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23/24): 9373-9378
- [39] Takano E. Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation[J]. Current Opinion in Microbiology, 2006, 9(3): 287-294
- [40] Kitani S, Hoshika M, Nihira T. Disruption of *sscR* encoding a gamma-butyrolactone autoregulator receptor in *Streptomyces scabies* NBRC 12914 affects production of secondary metabolites[J]. Folia Microbiologica, 2008, 53(2): 115-124
- [41] Cundliffe E. Control of tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(9): 1485-1491
- [42] Bunet R, Song LJ, Mendes MV, Corre C, Hotel L, Rouhier N, Framboisier X, Leblond P, Challis GL, Aigle B. Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of Kinamycins[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(5): 1142-1153
- [43] Horinouchi S. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(2): 283-299
- [44] Ma DX, Wang C, Chen H, Wen JP. Manipulating the expression of SARP family regulator BulZ and its target gene product to increase tacrolimus production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(11): 4887-4900
- [45] Nodwell JR. Are you talking to me? A possible role for γ -butyrolactones in interspecies signalling[J]. Molecular Microbiology, 2014, 94(3): 483-485
- [46] Mingyar E, Feckova L, Novakova R, Bekeova C, Kormanec J. A γ -butyrolactone autoregulator-receptor system involved in the regulation of auricin production in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(1): 309-325
- [47] Zhou ZX, Xu QQ, Bu QT, Liu SP, Yu P, Li YQ. Transcriptome-guided identification of SprA as a pleiotropic regulator in *Streptomyces chattoanoogensis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(3): 1287-1298
- [48] Lee KM, Lee CK, Choi SU, Park HR, Kitani S, Nihira T, Hwang YI. Cloning and *in vivo* functional analysis by disruption of a gene encoding the γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces natalensis*[J]. Archives of Microbiology, 2005, 184(4): 249-257
- [49] Zhu JY, Sun D, Liu WS, Chen Z, Li JL, Wen Y. AvaR2, a pseudo γ -butyrolactone receptor homologue from *Streptomyces avermitilis*, is a pleiotropic repressor of avermectin and avenolide biosynthesis and cell growth[J]. Molecular Microbiology, 2016, 102(4): 562-578
- [50] Kurniawan YN, Kitani S, Iida A, Maeda A, Lycklama a Nijeholt J, Lee YJ, Nihira T. Regulation of production of the blue pigment indigoidine by the pseudo γ -butyrolactone receptor FarR2 in *Streptomyces lavendulae* FRI-5[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(4): 372-379
- [51] Daniel-Ivad M, Pimentel-Elardo S, Nodwell JR. Control of specialized metabolism by signaling and transcriptional regulation: opportunities for new platforms for drug discovery?[J]. Annual Review of Microbiology, 2018, 72: 25-48
- [52] Khokhlov AS, Tovarova II, Borisova LN, Pliner SA, Shevchenko LN, Kornitskaia Ela, Ivkina NS, Rapoport IA. The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*[J]. Doklady Akademii Nauk SSSR, 1967, 177(1): 232-235
- [53] Horinouchi S, Beppu T. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes[J]. Annual Review of Microbiology, 1992, 46: 377-398
- [54] Horinouchi S, Beppu T. Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*[J]. Proceedings of the Japan Academy Series

- B, Physical and Biological Sciences, 2007, 83(9/10): 277-295
- [55] Gottelt M, Kol S, Gomez-Escribano JP, Bibb M, Takano E. Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Microbiology: Reading, England, 2010, 156(Pt 8): 2343-2353
- [56] Kunitake H, Hiramatsu T, Kinashi H, Arakawa K. Isolation and biosynthesis of an azoxyalkene compound produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*[J]. Chembiochem: a European journal of chemical biology, 2015, 16(15): 2237-2243
- [57] Arakawa K, Cao ZS, Suzuki N, Kinashi H. Isolation, structural elucidation, and biosynthesis of 15-norlankamycin derivatives produced by a type-II thioesterase disruptant of *Streptomyces rochei*[J]. Tetrahedron, 2011, 67(29): 5199-5205
- [58] Tatsuno S, Arakawa K, Kinashi H. Extensive mutational analysis of modular-iterative mixed polyketide biosynthesis of lankacidin in *Streptomyces rochei*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(12): 2712-2719
- [59] Suroto DA, Kitani S, Miyamoto KT, Sakihama Y, Arai M, Ikeda H, Nihira T. Activation of cryptic phthoxazolin A production in *Streptomyces avermitilis* by the disruption of autoregulator-receptor homologue AvaR3[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 124(6): 611-617
- [60] Hsiao NH, Nakayama S, Merlo ME, De Vries M, Bunet R, Kitani S, Nihira T, Takano E. Analysis of two additional signaling molecules in *Streptomyces coelicolor* and the development of a butyrolactone-specific reporter system[J]. Chemistry & Biology, 2009, 16(9): 951-960
- [61] Zou ZZ, Du DY, Zhang YY, Zhang JH, Niu GQ, Tan HR. A γ -butyrolactone-sensing activator/repressor, JadR3, controls a regulatory mini-network for jadomycin biosynthesis[J]. Molecular Microbiology, 2014, 94(3): 490-505
- [62] Zhang YW, Wang M, Tian J, Liu J, Guo ZY, Tang W, Chen YH. Activation of paulomycin production by exogenous γ -butyrolactone signaling molecules in *Streptomyces albidoflavus* J1074[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(4): 1695-1705
- [63] Olano C, García I, González A, Rodríguez M, Rozas D, Rubio J, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Méndez C, Salas JA. Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074[J]. Microbial Biotechnology, 2014, 7(3): 242-256
- [64] Yang YH, Kim TW, Park SH, Lee K, Park HY, Song E, Joo HS, Kim YG, Hahn JS, Kim BG. Cell-free *Escherichia coli*-based system to screen for quorum-sensing molecules interacting with quorum receptor proteins of *Streptomyces coelicolor*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6367-6372
- [65] Yang YK, Morikawa M, Shimizu H, Shioya S, Suga K, Nihira T, Yamada Y. Maximum virginiamycin production by optimization of cultivation conditions in batch culture with autoregulator addition[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 49(4): 437-444
- [66] Wright GD, Poinar H. Antibiotic resistance is ancient: Implications for drug discovery[J]. Trends in Microbiology, 2012, 20(4): 157-159
- [67] Tan GY, Bai LQ, Zhong JJ. Exogenous 1,4-butyrolactone stimulates A-factor-like cascade and validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 5008[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(11): 2984-2993
- [68] Gao XW, Wang YH, Chu J. A preliminary study on the impact of exogenous A-factor analogue 1, 4-butyrolactone on stimulating bitespiramycin biosynthesis[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(12): 1903-1913
- [69] Handel F, Kulik A, Mast Y. Investigation of the autoregulator-receptor system in the pristnamycin producer *Streptomyces pristinaespiralis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 580990
- [70] Takano E, Chakraborty R, Nihira T, Yamada Y, Bibb MJ. 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
- [71] Wang JB, Zhang F, Pu JY, Zhao J, Zhao QF, Tang GL. Characterization of AvaR1, an autoregulator receptor that negatively controls avermectins production in a high avermectin-producing strain[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(4): 813-819
- [72] Mast Y, Guezguez J, Handel F, Schinko E. A complex signaling cascade governs pristnamycin biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(19): 6621-6636
- [73] Tan GY, Peng Y, Lu CY, Bai LQ, Zhong JJ. Engineering validamycin production by tandem deletion of γ -butyrolactone receptor genes in *Streptomyces hygroscopicus* 5008[J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 74-81
- [74] Mounsey KE, Walton SF, Innes A, Cash-Deans S, McCarthy JS. *In vitro* efficacy of moxidectin versus ivermectin against *Sarcoptes scabiei*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(8): e00381-17
- [75] Kitani S, Doi M, Shimizu T, Maeda A, Nihira T. Control of secondary metabolism by farX, which is involved in the γ -butyrolactone biosynthesis of *Streptomyces lavendulae* FRI-5[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192(3): 211-220
- [76] Chi WJ, Jin XM, Jung SC, Oh EA, Hong SK. Characterization of Sgr3394 produced only by the A-factor-producing *Streptomyces griseus* IFO 13350, not by the A-factor deficient mutant[J]. The Journal of

- Microbiology, 2011, 49(1): 155-160
- [77] Zhou SS, Bhukya H, Malet N, Harrison PJ, Rea DA, Belousoff MJ, Venugopal H, Sydor PK, Styles KM, Song LJ, et al. Molecular basis for control of antibiotic production by a bacterial hormone[J]. Nature, 2021, 590(7846): 463-467
- [78] Kou MC. PI factor promotes synthesis of natamycin by *Streptomyces natalensis* and optimization of its fermentation process[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese)
寇美辰. PI 因子促进纳塔耳链霉菌合成纳他霉素及其发酵工艺优化[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2018
- [79] Xu DX. The study on the regulation of *aurJ3M* and *aurT* gene on the biosynthesis of aureofuscin[D]. Shenyang: Master's Thesis of Liaoning University, 2019 (in Chinese)
许德馨. *aurJ3M*、*aurT* 基因对金褐霉素生物合成的调控作用研究[D]. 沈阳: 辽宁大学硕士学位论文, 2019
- [80] Aroonsri A, Kitani S, Hashimoto J, Kosone I, Izumikawa M, Komatsu M, Fujita N, Takahashi Y, Shin-ya K, Ikeda H, et al. Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(22): 8015-8024
- [81] Blin K, Shaw S, Kautsar SA, Medema MH, Weber T. The antiSMASH database version 3: increased taxonomic coverage and new query features for modular enzymes[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D639-D643
- [82] Nguyen DD, Wu CH, Moree WJ, Lamsa A, Medema MH, Zhao XL, Gavilan RG, Aparicio M, Atencio L, Jackson C, et al. MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2013, 110(28): E2611-E2620
- [83] Thao NB, Kitani S, Nitta H, Tomioka T, Nihira T. Discovering potential *Streptomyces* hormone producers by using disruptants of essential biosynthetic genes as indicator strains[J]. The Journal of Antibiotics, 2017, 70(10): 1004-1008