

# 天蓝色链霉菌调控基因-*terA* 功能的初步研究

柳金满<sup>1,2</sup> 杨克迁<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 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 100080)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘 要** 天蓝色链霉菌的开放阅读框 SCO5433 编码一个含有 TPR (Tetratricopeptide repeat) 结构域的调控蛋白。该基因的阻断突变株表现出孢子颜色加深和色素产量增加的表型变化。孢子颜色的加深在以葡萄糖或甘露醇为碳源的 MM 培养基上表现明显;色素产量的增加在以甘露醇为碳源的 MM 培养基和 MS 培养基上表现最为明显。插片培养结合光学显微镜观察并没有发现突变株在形态分化上有显著变化,这些发现预示着可能存在一个 SCO5433 参与的调控途径,在一定条件下,这一途径对天蓝色链霉菌次级代谢可能起着负调控作用,而与形态分化无关。

**关键词** SCO5433;TPR;次级代谢

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)01-0033-06

链霉菌(*Streptomyces*)是一类高 G+C 含量革兰氏阳性细菌,具有复杂的形态分化周期。伴随着形态分化,链霉菌能够产生种类繁多的次级代谢产物,如抗生素、酶抑制剂、免疫调节剂和色素等。目前已发现的 12000 余种抗生素中约 70% 是由链霉菌产生的,其中许多在医药、农业或畜牧业中都得到应用。天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2) 是链霉菌属的模式菌株,该菌株的基因组测序已于 2002 年完成<sup>[1]</sup>,全长 8667507bp,推测含有 7825 个基因,为大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 1.7 倍,比推测有 6000 个基因的真核生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的基因数还多<sup>[1]</sup>。此外,该基因组包含的调控基因的比例高达 12.3%,预示着链霉菌的基因表达调控机制比简单细菌更为复杂。因此,链霉菌是研究原核生物基因表达调控的良好材料。

TPR (Tetratricopeptide repeat) 是一个含 34 个氨基酸的蛋白重复序列,编码一个  $\alpha$  螺旋-转角- $\alpha$  螺旋的二级结构片段。TPR 通常以前后串连的形式重复出现在蛋白结构中,重复次数从 3 到 16 次不等<sup>[2]</sup>。前后相连的 TPR 折叠形成一个介导蛋白之间相互作用的区域。含 TPR 结构域的蛋白广泛分布于原核和真核生物中,在细胞中行使各种各样的功能<sup>[2~5]</sup>。

由于 TPR 氨基酸序列保守模式特点鲜明,因此可以根据基因组序列预测其中所有包含 TPR 的蛋白。通过对 *S. coelicolor* A3(2) 基因组序列的分析,

我们发现了多个含有 TPR 结构域的蛋白,其中功能研究比较清楚的是次级代谢的全局性调控蛋白 AfsR<sup>[6]</sup>,其它都是未知功能的蛋白。我们感兴趣的是含 TPR 结构域的蛋白在链霉菌中是否也都行使着重要的功能?本研究选择了其中一个基因-SCO5433 进行研究。根据核酸序列预测,SCO5433 编码一个 761 个氨基酸的蛋白,在蛋白的 C 端含有 TPR 结构域;另外,蛋白序列比对表明,该蛋白与 AfsR 具有较高的同源性,可能是一个类似 AfsR 的调控因子,因此我们将这个蛋白命名为 TerA (TPR containing regulator A)。我们通过对 *terA* 进行插入失活,首次对该基因的生理功能进行了研究。结果表明,*terA* 在 *S. coelicolor* A3(2) 中条件性地负调控色素类次级代谢产物的生成。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) A3(2) 的野生型菌株 M145 (SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>-</sup>),大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pKC1139 和 pSET152,分别用作破坏载体和互补载体的构建,为本所谭华荣研究员惠赠。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 由本实验室保存。

**1.1.2 培养基及培养条件** 链霉菌培养基 YEME、MS、MM 的配制参见链霉菌遗传操作手册<sup>[7]</sup>。其中,MM 培养基灭菌以后分别加入单独灭菌的 3 种不同

基金项目:中国科学院知识创新工程项目

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62652318; E-mail: yangkq@im.ac.cn

作者简介 柳金满(1980-),女,河北人,硕士研究生,主要从事链霉菌调控蛋白及相关复合物的研究。E-mail: liujinman1980@yahoo.com.cn

收稿日期 2005-05-12 接受日期 2005-05-30 修回日期 2005-06-24

碳源:甘露醇、葡萄糖和甘油;三者 in MM 培养基中的终浓度分别为 5g/L、10g/L 和 5mL/L。大肠杆菌培养基 LB 的配制参见分子克隆操作指南<sup>[8]</sup>。卡那霉素、安普霉素在 YEME、MS、MM 培养基中的使用浓度均为 10 $\mu$ g/mL,氯苄青霉素、卡那霉素、安普霉素、氯霉素在 LB 培养基中使用浓度各为 100 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、25 $\mu$ g/mL。链霉菌和大肠杆菌的培养温度分别为 30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C。

**1.1.3 酶和试剂** 限制性内切酶、连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 均购自 TaKaRa ;*Pfu* DNA 聚合酶购自 Sangon。DNA 回收试剂盒购自 Omega Bio-Tek ;DIG DNA Labelling and Detection Kit 购自 Roche。

## 1.2 DNA 基本操作

链霉菌基因组 DNA 和质粒的提取、接合转移参见链霉菌遗传操作手册<sup>[7]</sup>;大肠杆菌转化和质粒提取参见分子克隆操作指南<sup>[8]</sup>。Southern 杂交及 DNA 探针的标记参照 DIG DNA Labelling and Detection Kit 操作手册。

## 1.3 蛋白序列比对和分析

蛋白序列比对使用 NCBI 数据库中的 BLASTP 程序;蛋白序列分析使用的软件为 CDART (The Conserved Domain Architecture Retrieval Tool)。

## 1.4 引物合成和序列测定

本研究所用引物的合成及克隆片段的序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

## 1.5 *tcrA* 基因破坏重组质粒 pJM2 的构建

以 *S. coelicolor* M145 基因组 DNA 为模板, p1 (5'-GGAATTCAGACATCGCGAAGCGGC-3', 下划线处为 *EcoR* I 位点)和 p2 (5'-GC TCTAGATCCACGCGCCCGACTTG-3', 下划线处为 *Xba* I 位点)为引物,利用 *Taq* DNA 聚合酶扩增得到含有部分 *tcrA* 的 1.9 kb DNA 片段。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2min45s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 8min。用 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物,经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切,回收后与经过相同酶切的 pKC1139 连接,得到重组质粒 pJM1;将 1.0 kb 的卡那霉素抗性基因片段插入重组质粒 pJM1 上 *tcrA* 内部的 *Bam*H I 位点,得到用于 *tcrA* 破坏的重组质粒 pJM2。

## 1.6 *tcrA* 阻断突变株遗传互补重组质粒 pJM3 的构建

以 *S. coelicolor* M145 基因组 DNA 为模板, p3 (5'-GGCTCGCCGCGCAGGTCGTG-3') 和 p4 (5'-CACGGCCGCGGGGTGCG-3') 为引物,利用高保真的 *Pfu* DNA 聚合酶扩增得到包含完整 *tcrA* 及其上下游

一定区域的 2.5 kb DNA 片段。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2min45s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 8min。PCR 产物回收后克隆到 pSET152 的 *EcoR* V 位点,得到重组质粒 pJM3。

## 1.7 插片培养和表型观察

将野生株和 *tcrA* 阻断突变株分别接种到 MS 培养基和分别以甘露醇、葡萄糖和甘油为碳源的 3 种 MM 培养基上,然后将灭过菌的盖玻片倾斜地插入培养基中。30 $^{\circ}$ C 培养。分别取 24h、48h、60h、72h 和 84h 培养后的插片,用光学显微镜 (Motic BA400) 观察气生菌丝及孢子产生情况<sup>[7]</sup>。将野生株、*tcrA* 阻断突变株和遗传互补株在上述 4 种培养基上培养 5d 后,用数码相机 (Nikon 4500) 分别从正面和背面对平板进行拍照。

# 2 结果和分析

## 2.1 *TcrA* 与 *AfsR* 氨基酸序列比对结果

利用 BLASTP 程序对 *TcrA* 与 *AfsR* 的氨基酸序列进行比对,发现二者的一致性 (Identities) 为 29%, 相似性 (Positives) 为 39%, 推测二者在功能上也可能存在相似性。

## 2.2 *tcrA* 阻断突变株的构建

为了研究 *tcrA* 的功能,通过同源双交换将卡那霉素抗性基因 (*kan*) 插入靶基因内部,使其表达被阻断,然后根据阻断突变株的表型判断该基因的功能。

首先,采用大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pKC1139 作为载体构建用于 *tcrA* 破坏的重组质粒 pJM2。pKC1139 含有一个温度敏感型的复制子<sup>[9]</sup>,当温度高于 34 $^{\circ}$ C 时,在链霉菌中不能正常复制,利用这一特性可以通过 42 $^{\circ}$ C 高温培养进行重组子的筛选。pJM2 的构建过程见 1.5。将 pJM2 转入 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中去除甲基化修饰,再通过接合转移将 pJM2 转入 *S. coelicolor* M145,以安普霉素和卡那霉素为筛选标记得到了几十个接合子。挑取其中 10 个接合子,提取质粒进行酶切验证。将其中一个正确的接合子转接至含有卡那霉素的 MM 培养基 (注:不特别说明时的 MM 培养基以甘露醇为碳源) 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养,收集孢子制成孢子悬液,做梯度稀释后涂布在含有卡那霉素的 MM 培养基平板上,42 $^{\circ}$ C 高温培养。在 42 $^{\circ}$ C 培养时,只有 pKC1139 上外源片段与染色体上相应的同源区域发生重组的菌株才能在含有卡那霉素的 MM 培养基上生长。挑取长出的单菌落分别接至含有卡那霉素和安普霉素的 MM 培养基平板上,30 $^{\circ}$ C 培养,挑取  $Km^r Am^r$  ( $Km^r$  表

示对卡那霉素有抗性,Am<sup>s</sup>表示对安普霉素敏感,以下同)的菌落,这种菌落可能为发生了双交换的*tcrA* 阻断突变株(图版 I -A),该突变株命名为 LJ1。

### 2.3 *tcrA* 阻断突变株的验证

为了在分子水平上证明*tcrA* 阻断突变株的正确性,随机挑取 4 个 Km<sup>r</sup>Am<sup>s</sup> 的单菌落,在 YEME 中培养 30h 后提取基因组 DNA,利用引物 p1 和 p2 进行 PCR 扩增,正确的*tcrA* 阻断突变株(LJ1)应得到 2.9kb 的 DNA 片段,而野生型菌株基因组 DNA 在同样条件下应得到 1.9kb 的 DNA 片段。PCR 结果与预期一致(图 1),说明卡那抗性基因片段已经插入到*tcrA* 基因的内部。

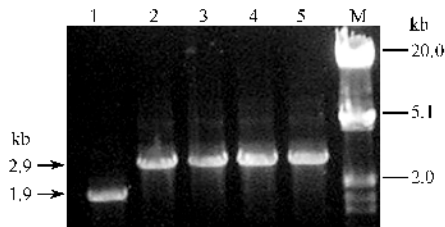


图 1 *tcrA* 阻断突变株的 PCR 验证

Fig.2 PCR analyses of chromosomal DNAs from *tcrA* disruption mutants  
1. PCR product from chromosomal DNA of wide-type strain; 2~5. PCR products from chromosomal DNAs of *tcrA* disruption mutants; M. DNA marker.

为了进一步证实*tcrA* 阻断突变的发生,进行了 Southern 杂交实验。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pJM1,电泳回收 0.55 kb 的 DNA 片段,用非放射性地高辛标记作为 Southern 杂交的探针(图 1)。将经 PCR 验证的两株 LJ1 和野生株 M145 的基因组 DNA 用 *Bgl* II 和 *Pst* I 进行双酶切,电泳,并进行 Southern 杂交。LJ1 应在 2.3 kb 处给出阳性信号,野生株 M145 应在 1.3 kb 处给出阳性信号。Southern 杂交结果与预期一致(图 2),进一步证实*tcrA* 阻断突变株 LJ1 的构建是成功的。

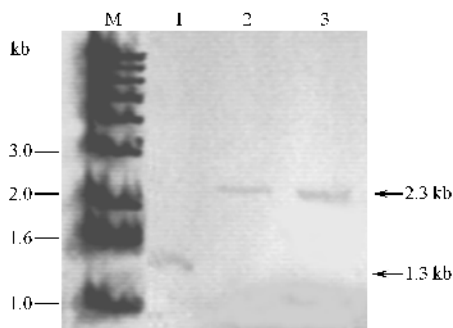


图 2 *tcrA* 阻断突变株的 Southern 杂交验证

Fig.2 Southern hybridization analyses of *tcrA* disruption mutants  
M. DNA marker; 1. Wide-type strain; 2 and 3. *tcrA* disruption mutants.

### 2.4 *tcrA* 阻断突变株的表型分析

在以甘露醇为碳源 MM 培养基上培养 5d 后,发现 LJ1 比野生株 M145 具有更深的孢子颜色(图版 I -B-a);从平板背面观察,LJ1 比 M145 在培养基中产生更多的色素(图 I -B-b)。在 *S. coelicolor* A3(2)中,孢子色素及培养基中的色素类物质都是其次级代谢产物<sup>[10~12]</sup>,因此,推测*tcrA* 可能参与 *S. coelicolor* A3(2)次级代谢的调控过程,并且起负调控作用。

同时,在含不同碳源(甘油、葡萄糖)的 MM 培养基及 MS 培养基也进行了表型观察,方法同上。发现在以葡萄糖为碳源的 MM 培养基上,LJ1 比野生株 M145 产生更多的孢子色素(图版 I -B-c),而培养基中的色素产量无明显差别;在 MS 培养基上,与 M145 相比,LJ1 在培养基中的色素产量明显提高(图版 I -B-d),而孢子颜色与 M145 无明显差别;而在以甘油为碳源的 MM 培养基上,突变株与野生株在孢子色素及培养基中色素的产量上都无明显差异。这些结果表明,在 *S. coelicolor* A3(2)中,*tcrA* 对次级代谢的负调控作用在一定的营养条件下才发生。

在以上培养条件下,通过对野生株和突变株进行插片培养和不同时间取样做光学显微镜观察,没有发现二者在形态分化上有显著差别,说明*tcrA* 可能不参与 *S. coelicolor* A3(2)的形态分化过程。以上结果都经过了 3 次以上的重复。

### 2.5 LJ1 的遗传互补

为了排除 LJ1 的表型是由于极性效应或染色体上其它基因位点突变所造成的可能性,进行了突变株的遗传互补实验。

用 PCR 扩增出含有完整*tcrA* 及其上下游一定区域的片段,插入 pSET152,构建用于遗传互补的重质粒 pJM3。pSET152 在大肠杆菌中能自主复制,在链霉菌中则以单拷贝的形式整合到染色体的 *attB* 位点<sup>[13]</sup>。pJM3 构建方法见 1.6。

将 pJM3 通过 *E. coli* ET12567/pUZ8002 去除甲基化修饰,接合转移至 LJ1 中,利用安普霉素作为抗性筛选标记,得到*tcrA* 阻断突变株 LJ1 的遗传互补菌株,命名为 LJ2。在相同条件下培养,观察发现互补株的表型恢复到野生型的状态(图版 I -B),从而进一步证明*tcrA* 阻断突变株的表型变化确实是由于*tcrA* 的破坏引起的。

### 3 讨论

在 *S. coelicolor* A3(2) 基因组中发现了十多个含有 TPR 结构域的蛋白, 其中 TcrA 与 AfsR 的同源性较高。Horinouchi 等<sup>[6]</sup>和 Lee 等<sup>[14]</sup>研究发现 AfsR 是具有 ATPase 活性的转录激活因子, 在天蓝色链霉菌中正调控着放线紫红素、十一烷基灵菌红素等次级代谢产物的生成<sup>[6, 14]</sup>, 而对菌株形态分化没有调控作用。

用 CDART (The Conserved Domain Architecture Retrieval Tool) 程序对 TcrA 与 AfsR 的氨基酸序列进行分析, 发现二者在结构域组织方式上十分相似(图 3)。二者都具有 ATPase 结构域和 TPR 结构域, 不同之处在于 AfsR 的 N 端还有一个转录激活结构域 - BTAD, 而 TcrA 缺少这个结构域。与二者结构相似性一致的是, 我们的研究结果表明二者在功能上也很相似, TcrA 和 AfsR 对 *S. coelicolor* A3(2) 次级代谢产物的生成均有调控作用, 而对菌株的形态分化没有影响。与 AfsR 不同的是, TcrA 起负调控作用。

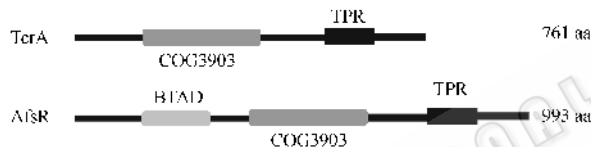


图 3 TcrA 与 AfsR 的结构域组织方式

Fig.3 Conserved domain architecture of TcrA and AfsR

TPR, tetratricopeptide repeat domain; COG3903, predicted ATPase domain; BTAD, predicted bacterial transcriptional activator domain.

TcrA 缺少转录激活结构域, 它是如何发挥调控功能的呢? 以前的研究表明, TPR 主要介导蛋白-蛋白之间的相互作用<sup>[2]</sup>, 因此我们推测 TcrA 可能是通过 TPR 结构域与其它转录因子相互作用, 从而间接地影响相关基因的表达。枯草芽孢杆菌中, 含有 TPR 结构域的蛋白 RapC 就是通过与转录因子 ComA 的相互作用, 从而间接的发挥调控功能的<sup>[15]</sup>。因此, 找出 TcrA 的互作蛋白对于进一步阐明 TcrA 参与的调控途径非常关键。目前, 成功应用的寻找互作蛋白的方法有: 酵母双杂交<sup>[16]</sup>、Far Western<sup>[16]</sup>、GST Pulldown<sup>[16]</sup>、TAP (tandem affinity purification)<sup>[17, 18]</sup>等。本实验室正在摸索在链霉菌中建立 TAP 方法, 为进一步阐明 TcrA 参与的调控途径奠定了基础。

总之, 本研究发现 *S. coelicolor* A3(2) 中一个新调控基因-tcrA, 负调控色素类次级代谢产物的生成, 这种调控作用在特定营养条件下才表现出来。对于

TcrA 参与的调控途径的阐明, 还有待进一步深入的研究。

致谢 感谢本实验室王胜兰老师和汪志军博士在研究工作中给予的帮助和鼓励。

### 参 考 文 献

- [1] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, **417**: 141 - 147.
- [2] Blatch GL, Lassle M. The tetratricopeptide repeat: structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays*, 1999, **21**: 932 - 939.
- [3] D'Andrea LD, Regan L. TPR proteins: the versatile helix. *TIBS*, 2003, **28**: 655 - 662.
- [4] Das AK, Cohen PW, Barford D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J*, 1998, **17**: 1192 - 1199.
- [5] Wilson CM, Kajander T, Regan L. The crystal structure of NlpI - a prokaryotic tetratricopeptide repeat protein with a globular fold. *FEBS Journal*, 2005, **272**: 166 - 179.
- [6] Horinouchi S, Kito M, Nishiyama M, et al. Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 1990, **95**: 49 - 56.
- [7] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Li W, Liu G, Tan H. Disruption of *sabR* affects nikkomycin biosynthesis and morphogenesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**: 1491 - 1497.
- [10] Bibb M. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 1996, **142**: 1335 - 1344.
- [11] Davis NK, Chater KF. Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol Microbiol*, 1990, **4**: 1679 - 1691.
- [12] Kelemen GH, Brian P, Flardh K, et al. Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 1998, **180**: 2515 - 2521.
- [13] Paranthaman S, Dharmalingam K. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. Strain C5: chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chic* gene. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 84 - 91.
- [14] Lee PC, Umeyama T, Horinouchi S. afsS is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 2002, **43**: 1413 - 1430.

- [ 15 ] Core L , Perego M. TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis* . *Mol Microbiol* , 2003 , **49** : 1509 – 1522 .
- [ 16 ] Sambrook J , Russell DW. Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 3<sup>rd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001 .
- [ 17 ] Rigaut G , Schevchenko A , Rutz B , *et al.* A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration . *Nature Biotechnology* , 1999 , **17** : 1030 – 1032 .
- [ 18 ] Puig O , Caspary F , Rigaut F , *et al.* The tandem affinity purification method : a general procedure of protein complex purification . *Methods* , 2001 , **24** : 218 – 222 .

## Functional analyses of TcrA-a TPR-containing regulatory protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

LIU Jin-man<sup>1 2</sup> , YANG Ke-qian<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

(<sup>2</sup> Graduate School of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China )

**Abstract :** In *Streptomyces coelicolor* A3(2) , SCO5433 encodes a TPR domain containing protein designated TcrA ( TPR containing regulator A ). TcrA is similar in amino acid sequence to AfsR , a well-characterized global regulatory protein in *S. coelicolor* A3(2) . Disruption of *tcrA* enhanced the production of spore pigment on MM containing glucose or mannitol and also resulted in more diffusible pigment production on MM containing mannitol or MS agar medium , but no significant effects on morphological differentiation were observed . Complementation of *tcrA* mutation restored the phenotype of *tcrA* mutant to that of the wild-type strain . These results suggest that *tcrA* is involved in the regulation of secondary metabolism under defined conditions . In *S. coelicolor* A3(2) , the AfsK/AfsR system positively regulates the production of secondary metabolites while the results of our work suggest that there might be a TcrA-dependent pathway that negatively regulates secondary metabolism .

**Keywords :** SCO5433 , TPR , Secondary metabolism

Foundation item : Knowledge Innovation Fund of Chinese Academy of Sciences

\* Corresponding author . Tel/Fax : 86-10-62652318 ; E-mail : yangkq@im.ac.cn

Received 23 May 2005 / Accepted 30 May 2005 / Revised 24 June 2005