



蓝灰链霉菌中 Aco 类信号分子合酶 ScyA1 全局性功能的研究

叶岚^{1,2#}, 刘辉^{1,2#}, 李珊珊¹, 向文胜^{1,2*}, 张艳艳^{1*}

1 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

2 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

叶岚, 刘辉, 李珊珊, 向文胜, 张艳艳. 蓝灰链霉菌中 Aco 类信号分子合酶 ScyA1 全局性功能的研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 717-730.

YE Lan, LIU Hui, LI Shanshan, XIANG Wensheng, ZHANG Yanyan. Global function characterization of an Aco-like autoregulator synthase ScyA1 in *Streptomyces cyaneogriseus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 717-730.

摘要: 【目的】研究蓝灰链霉菌中 Aco 类群感效应信号分子合酶基因 *scyA1* 缺失对细胞生理代谢和调控网络造成的广泛性扰动, 揭示 ScyA1 对细胞生命活动的全局性调控作用。【方法】通过测定细胞干重确定 *scyA1* 缺失对液体发酵条件下细胞生长的影响。采用 RNA-Seq 比较分析探究蓝灰链霉菌 *scyA1* 突变株和野生型 NMWT1 发酵培养 3 d 和 6 d 全基因组范围内的显著差异表达基因。【结果】*scyA1* 缺失不影响液体发酵条件下细胞生物量的积累。比较转录组分析显示 *scyA1* 缺失后, 糖酵解和三羧酸循环途径基因表达表现出双向显著差异变化趋势; L-半乳糖形成 UDP-葡萄糖途径、戊糖磷酸途径、氨基酸(L-缬氨酸、L-异亮氨酸和 L-色氨酸)合成途径和嘌呤核苷酸降解途径相关基因均表现出显著上调趋势。众多次级代谢生物合成基因簇、保守转录调控因子和菌丝体结构性蛋白组分编码基因表达显著下调, 而少数则表达水平显著上调。【结论】ScyA1 广泛影响了菌株的初级代谢、次级代谢、保守调控因子和菌丝体结构相关基因的表达。总之, 本研究丰富了我们对 Aco 类群感效应信号分子合酶功能的认知。

关键词: 蓝灰链霉菌; Aco; ScyA1; 转录组分析; 全局性功能

资助项目: 国家自然科学基金(31872936)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872936).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: XIANG Wensheng, xiangwensheng@neau.edu.cn; ZHANG Yanyan, yzhang@ippcaas.cn

Received: 2022-06-16; Accepted: 2022-08-31; Published online: 2022-08-23

Global function characterization of an Aco-like autoregulator synthase ScyA1 in *Streptomyces cyaneogriseus*

YE Lan^{1,2#}, LIU Hui^{1,2#}, LI Shanshan¹, XIANG Wensheng^{1,2*}, ZHANG Yanyan^{1*}

1 State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of deletion of an Aco-like autoregulator synthase gene, *scyA1*, on the physiological metabolism and regulatory network of cells, and thus to reveal the global roles of ScyA1 in cellular activities. **[Methods]** Dry cell weight was measured to determine the effect of *scyA1* deletion on the growth of cells in liquid fermentation. Comparative RNA-Seq analysis between the *scyA1* mutant and the wild type NMWT1 was performed to explore the genome-wide differentially expressed genes after 3 and 6 days of fermentation. **[Results]** The deletion of *scyA1* did not affect the biomass of cells in liquid fermentation. After the deletion of *scyA1*, the expression of the genes involved in glycolysis and tricarboxylic acid cycle showed significant bidirectional differences, and the expression levels of the genes involved in the pathway from L-galactose to UDP-glucose, the pentose phosphate pathway, amino acid (L-valine, L-isoleucine, and L-tryptophan) biosynthesis, and purine nucleotide degradation were significantly upregulated. Moreover, the expression levels of a variety of gene clusters for the biosynthesis of secondary metabolites and the genes encoding conserved transcriptional regulators and mycelium structural proteins were significantly downregulated, while those of a few were significantly upregulated. **[Conclusion]** ScyA1 affected primary metabolism, secondary metabolism, and expression of conserved regulatory factors and mycelium structure-related genes of the test strain. The results of this study demonstrated new details of the global function of the Aco-like autoregulator synthase in *Streptomyces*.

Keywords: *Streptomyces cyaneogriseus*; Aco; ScyA1; transcriptome analysis; global function

链霉菌具有非常出色的次级代谢产生能力，目前超过 70% 的具有商业价值的药用次级代谢产物都是由链霉菌产生，在农业、畜牧业和医药领域发挥着举足轻重的作用^[1]，因此链霉菌也被称为微生物药物的生产工厂。次级代谢产物的合成受到细胞复杂调控网络的严谨控制，其中不同家族的调控蛋白同外界环境营养信号和自身生理信号相互作用，进而协调细胞行为控制次级代谢的产生^[2]。在该调控网络中，

最普遍存在于链霉菌且能够广泛影响次级代谢产生的一类调控成员当属群感效应系统^[3]。群感效应系统由群感效应信号分子和信号分子受体(ArpA 同源蛋白)组成。到目前为止，已经鉴定到 36 种群感效应信号分子；基于它们的结构可以分为 5 大类，包括 γ -丁酸内酯(γ -butyrolactones, GBLs)类、丁烯羧酸内酯(butenolides)类、呋喃类(furans)、PI 因子(pimaricin-inducer factor)以及二酮哌嗪类化合物(比如 N-methylphenylalanyl-

dehydrobutyrine diketopiperazine)等^[2]。然而已经报道的信号分子合酶则只有 2 种, 包括能够产生 GBL、丁烯羟酸内酯或者咪喃类的 AfsA 同源蛋白以及主要产生丁烯羟酸内酯类信号分子的 Aco 同源蛋白。A 因子是链霉菌中第一个被鉴定的 GBL 类群感效应信号分子。早在 1967 年, 人们就在灰色链霉菌中发现了 A 因子^[4]; 10 年后, A 因子化学结构得到阐明^[5], 然而直到 2007 年, Horinouchi 等科学家才通过一系列生化实验确定 A 因子合成关键酶为 AfsA^[6]。据推测, 至少 60% 的链霉菌具有 AfsA 同源蛋白编码基因和合成 GBL 的能力^[3]。丁烯羟酸内酯类信号分子和对应合酶 Aco 的发现要晚于 GBL 和 AfsA, 但发现过程相对顺利。2011 年, Kitani 等在具有重要医用和农用价值的阿维菌素产生菌——阿维链霉菌中发现了这种结构不同于 GBL 的丁烯羟酸内酯类信号分子——avenolide, 并鉴定到该化合物关键合成酶为 Aco (acyl-CoA 氧化酶) 和 Cyp17 (细胞色素 P450 羟化酶); *aco* 突变后导致菌株不能合成 avenolide, 进而导致菌株失去阿维菌素产生能力; 当将纳摩尔浓度的 avenolide 添加到 *aco* 突变株中后, 菌株恢复了阿维菌素的产生^[3]。有研究者通过 BLAST search 对 415 株链霉菌进行分析, 发现有约 17.8% (74 株) 的链霉菌具有 Aco 同源蛋白编码基因^[7]; 将白色链霉菌 J1074 的 *aco* 同源基因敲除后, 菌株失去 avenolide 类化合物产生能力, 而将从白色链霉菌 J1074 中分纯得到的 avenolide 类化合物添加到阿维链霉菌 *aco* 突变株中则可观察到阿维菌素恢复产生^[8], 这表明 avenolide 类化合物也是一种常见于链霉菌的群感效应信号分子, 而 Aco 及其同源蛋白则代表了一类不同于 *afsA* 的新型信号分子合酶编码基因。近年来, 群感效应系统调控次级代谢产生的作用机制已经有非常详细的报

道^[3,9]; 多数研究表明, 群感效应信号分子(也可以说是 AfsA 或者 Aco 类信号分子合酶)对于次级代谢的合成起着关键激活作用, 而信号分子受体(ArpA 同源蛋白)则一般抑制次级代谢的产生^[10]。然而, 随着对不同 ArpA 类受体功能研究的增多, 也有报告显示在某些链霉菌中, ArpA 能够正调控次级代谢的产生^[10-11]。此外, 转录组分析显示天蓝色链霉菌中 ScbA (AfsA 同源蛋白) 不仅调控次级代谢产物如黄色色素、放线紫红素和十二烷基灵菌红素的产生, 还能够影响初级代谢和菌株发育分化, 这表明 ScbA 发挥了全局性的调控作用, 拓展了我们对 AfsA 类信号分子合酶功能的了解^[12]。然而, 到目前为止有关 Aco 类信号分子合酶的全局性功能认知还非常有限。

蓝灰链霉菌(*Streptomyces cyaneogriseus* ssp. *noncyanogenus*) NMWT1 是重要绿色生物杀虫剂——尼莫克丁的产生菌。在前期研究中, 我们从 NMWT1 鉴定到一对 Aco/ArpA 类型群感效应系统 ScyA1/ScyR1。ScyA1 为 Aco 的同源蛋白, ScyR1 则为 ArpA 的同源蛋白。缺失 *scyA1* 或抑制 *scyR1* 的表达均导致菌株的产孢和气生菌丝产生能力明显减弱且尼莫克丁产量大幅下降^[2]。进一步的研究表明 ScyA1 能够通过激活 *scyR1* 的表达而控制尼莫克丁生物合成基因簇的表达和尼莫克丁的产生。可见, *ScyA1* 是一个影响菌株发育分化和次级代谢产生的多效性调控因子。ScyA1 对 NMWT1 显示出非常重要的调控功能, 那么其在基因表达水平是如何影响菌株的生命活动的呢? 为了探究这一问题, 本研究在确定 *scyA1* 的缺失并不影响菌株在液体培养环境中细胞生长的前提下, 通过比较转录组分析在基因表达层面阐明了 *scyA1* 缺失后对菌株初级代谢、次级代谢、转录调控网络和菌丝体结构性成分的影响。

1 材料与方 法

1.1 菌株、培养基和培养条件

本研究使用的野生型尼莫克丁产生菌蓝灰链霉菌 (*Streptomyces cyaneogriseus* ssp. *noncyanogenus*) NMWT1 为本实验室保存菌株^[13]。Δ*scyA1* 为实验室前期构建的 Aco 类信号分子合酶基因 *scyA1* 缺失菌株^[2]。蓝灰链霉菌培养使用的产孢、种子和发酵培养基均参照文献^[13] 配制。蓝灰链霉菌产孢培养条件为 37 °C, 种子液和发酵液中培养温度为 28 °C。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 Ultrapure RNA Kit, 康为世纪有限公司; HPLC 分析所用色谱纯甲醇、乙腈等试剂, Fisher 公司。

1.3 尼莫克丁、寡霉素的发酵与 HPLC 分析

尼莫克丁、寡霉素的发酵与 HPLC 分析按照文献^[13]的方法进行。

1.4 细胞生物量的测定

吸取 5 mL 的全发酵液, 室温 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 收集菌体, 55 °C 烘干至恒重。

1.5 转录组分析

收集蓝灰链霉菌 NMWT1 和 *scyA1* 发酵 3 d 和 6 d 的各 3 个生物学重复的菌体样本, 经过液氮速冻交给诺禾致源生物信息科技有限公司进行总 RNA 提取、反转录、PCR 扩增及测序, 测序平台为 NovaSeq 6000。使用 HISAT2 构建参考基因组的索引, 并使用 HISAT2 将配对末端 clean reads 与参照基因组(GenBank 登录号: NZ_CP010849)^[14] 比对。用 FPKM (每百万碱基对测序的转录本序列片段的每千碱基片段的预期数量) 值来表示基因的表达水平。利用 R 语言 DESeq2 进行基因差异表达分析。显著差异变化基因的筛选条件为 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 和

$P < 0.05$ 。韦恩图制作使用在线网站 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>。本研究使用的 NMWT1 和 Δ*scyA1* 比较转录组数据已提交至国家微生物科学数据中心(编号: NMDCX0000122)。

2 结果与分析

2.1 液体发酵中 *scyA1* 缺失株细胞生长、尼莫克丁和寡霉素产生分析

实验室前期研究表明与野生型菌株 NMWT1 比较, *scyA1* 缺失株(Δ*scyA1*) 在 ISP3 产孢平板上表现为产孢量锐减, 气生菌丝生长显著弱化, 且分泌到培养基中的色素明显减少; 而在液体发酵中尼莫克丁产量也从 299 mg/L 大幅下降到 22 mg/L^[2]。这些结果表明 *scyA1* 是蓝灰链霉菌的全局性调控子, 能够影响菌株发育分化和次级代谢产物的合成。本研究中, 我们接着对 Δ*scyA1* 和野生型菌株 NMWT1 发酵过程中的细胞生长和尼莫克丁产生情况进行了详细追踪。结果显示, 相比野生型 NMWT1, Δ*scyA1* 在各个时间点的细胞生物量并无显著变化(图 1A), 且 Δ*scyA1* 中尼莫克丁产量在整个发酵过程中都是显著降低(图 1B)。这表明 Δ*scyA1* 中尼莫克丁产量的降低, 并不是由细胞生物量的变化导致, 而是由于 *scyA1* 缺失所导致的产量减少。通过对 HPLC 数据的分析, 我们还发现 *scyA1* 缺失也导致了寡霉素 A 类似物合成的明显下降(图 1C), 说明 *ScyA1* 正调控了寡霉素的生物合成。

2.2 野生型菌株 NMWT1 和 Δ*scyA1* 转录组数据初步分析

为了更加全面地了解 *scyA1* 的全局性功能, 采集了 Δ*scyA1* 和野生型菌株 NMWT1 液体培养 3 d 和 6 d 的菌体样品, 提取总 RNA 并进行转录组数据采集和比较分析。统计分析显示, 在

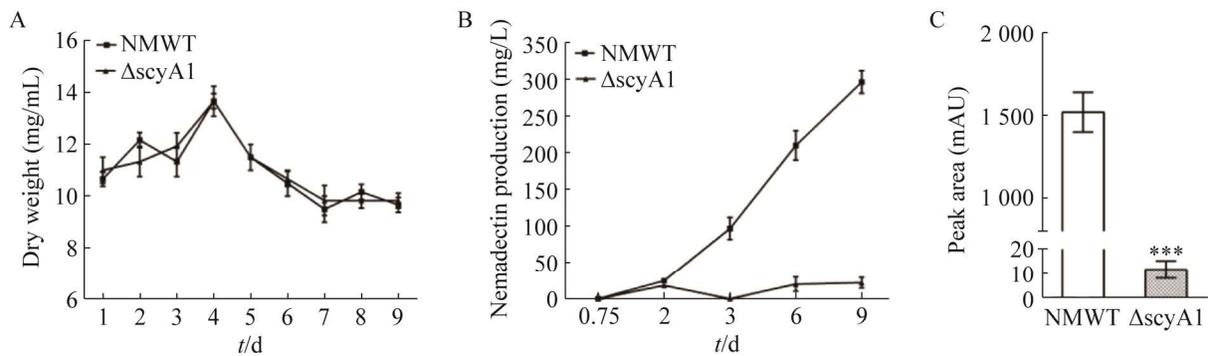


图1 *scyA1* 缺失对细胞生长(A)、尼莫克丁(B)和寡霉素(C)合成的影响

Figure 1 Effects of *scyA1* deletion on cell growth, nemadectin production and oligomycin production. A: Growth curves of strains NMWT1 and Δ*scyA1*. B: Comparative nemadectin production in strains NMWT1 and Δ*scyA1*. C: Comparative oligomycin production in strains NMWT1 and Δ*scyA1*. Error bars show standard deviations. *P*-value was determined by Student's *t*-test. ***: *P*<0.001.

Δ*scyA1* 中, 第3天共有 2 552 个显著差异表达基因, 其中 1 120 个基因表达显著上调, 1 432 个基因表达显著下调; 第6天有 1 989 个基因表达差异显著, 其中 726 个基因表达显著上调, 1 263 个基因表达显著下调(图 2A)。KEGG 通路富集分析显示这些显著差异变化的基因主要位于碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、次级代谢(metabolism of terpenoids and polyketides; biosynthesis of other secondary metabolites)和膜转运(membrane transport)通路中(图 2B)。

2.3 *scyA1* 缺失对中心碳代谢途径相关基因表达的影响

KEGG 通路富集分析显示 *scyA1* 缺失后表达水平显著差异变化的基因处于碳水化合物代谢通路的最多。此外, 本研究的组学数据采集使用的是产尼莫克丁发酵培养基, 培养基中碳源为葡萄糖(5%)和乳糖(2.5%); 乳糖是由一分子葡萄糖和一分子半乳糖构成的二糖。因此我们首先关注了乳糖降解和中心碳代谢途径相关基因的变化情况。分析发现负责将乳糖(lactose)分解为 D-葡萄糖和 D-半乳糖的 β-半乳糖苷酶编码基因(EC: 3.2.1.23)表达水平在 Δ*scyA1* 中显著上调(图 3)

(附件 1 已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000134); 此外, D-半乳糖(D-galactose)经过 4 步酶学反应生成 UDP-葡萄糖(UDP-glucose)的相关途径酶编码基因表达水平也显著上调; 然而负责将 UDP-葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸(α-D-glucose-6P)继而进入糖酵解途径的葡萄糖磷酸变位酶(EC: 5.4.2.2)基因 *tu94_01215* 在 Δ*scyA1* 中彻底不表达(图 3 和附件 1), 暗示着由 D-半乳糖进入糖酵解的途径可能被阻断。

在糖酵解由 α-D-葡萄糖(α-D-glucose)形成丙酮酸的一系列反应中, 有 6 步生化反应的酶基因在 Δ*scyA1* 中表达水平显著上调, 显示出活跃的糖酵解代谢活性(图 3 和附件 1)。然而与此不一致的是, 糖酵解途径中催化 β-D-果糖-6-磷酸(β-D-fructose-6P)磷酸化形成 β-D-果糖-1,6-二磷酸(β-D-fructose-1,6P₂)的关键限速酶——磷酸果糖激酶(EC: 2.7.1.11)编码基因 *tu94_22805* 在第 6 天时表达水平显著下调(图 3 和附件 1), 这可能使得 β-D-果糖-1,6-二磷酸积累不足, 不能够维持糖酵解反应途径的顺利进行。这些结果表明在发酵开始的相当一段时间内, 糖酵解途径非常活跃, 而大约在第 6 天之后, 糖酵解反应过程可能逐渐减弱。

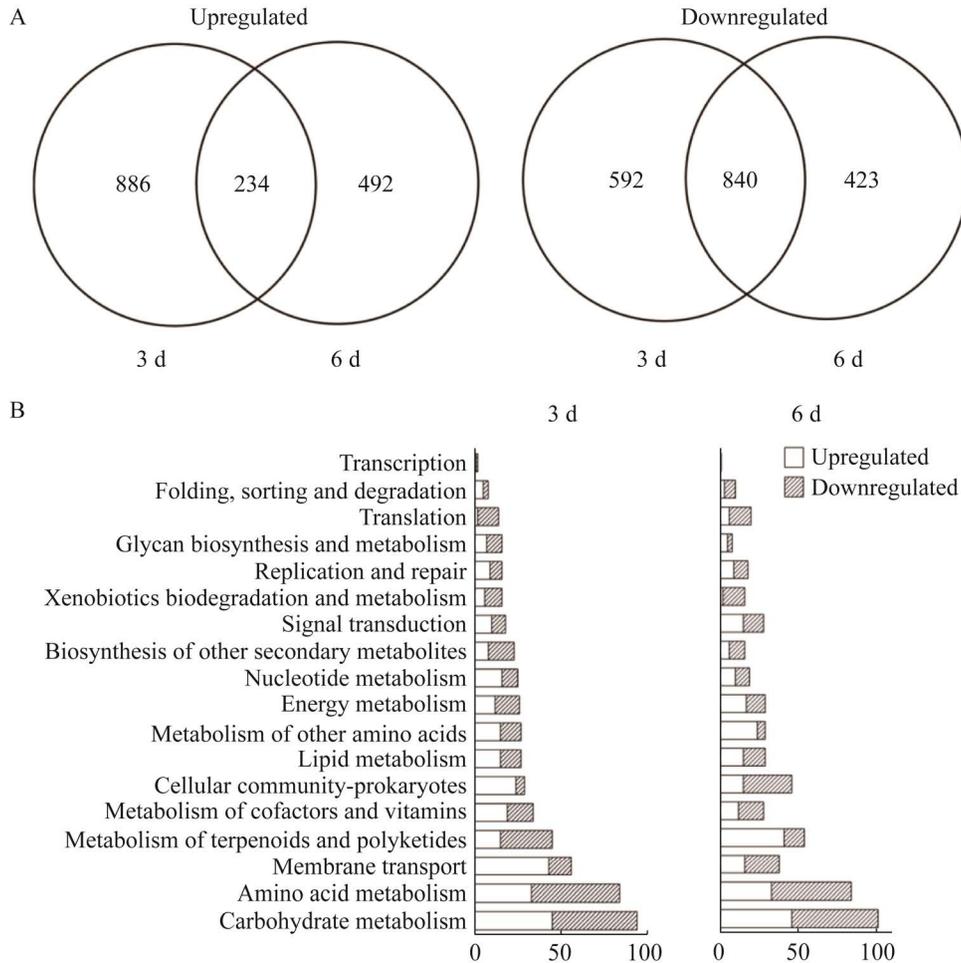


图 2 野生型菌株 NMWT1 和 Δ scyA1 的比较转录组初步分析

Figure 2 Preliminary transcriptome analysis of strains NMWT1 and Δ scyA1. A: Comparative transcriptome analysis of the significantly differentially expressed genes (SDEGs) between strains NMWT1 and Δ scyA1 after cultivation for 3 and 6 days. B: Functional categories of annotated significantly differentially expressed genes between NMWT1 and Δ scyA1 according to the KEGG pathway.

葡萄糖经糖酵解后形成 2 分子丙酮酸 (pyruvate), 随后丙酮酸在丙酮酸脱氢酶复合体作用下形成乙酰-CoA (acetyl-CoA)。在 Δ scyA1 中, 丙酮酸脱氢酶组分 (EC: 1.2.4.1) 基因 *tu94_09500* 和二氢硫辛酸脱氢酶 (EC: 1.8.1.4) 基因 *tu94_26040* 表达水平在第 3 天时显著上调 (图 3 和附件 1), 表明由丙酮酸转变为乙酰-CoA 的过程被强化。

乙酰-CoA 进入三羧酸循环的第一步是在柠檬酸合酶 (EC: 2.3.3.1) 催化下, 与草酰乙酸

(oxaloacetate) 缩合形成柠檬酸 (citrate)。柠檬酸合酶为三羧酸循环的限速酶; 在 Δ scyA1 中, 该酶编码基因 *tu94_14530* 和 *tu94_11915* 在第 3 天时表达水平显著下调 (图 3 和附件 1); 此外, 负责将琥珀酸 (succinate) 脱氢形成延胡索酸 (fumarate) 的琥珀酸脱氢酶 (EC: 1.3.5.1/1.3.5.4) 基因 (*tu94_21200*、*tu94_30370*、*tu94_21195* 和 *tu94_30375*) 也表现出显著下调的趋势 (图 3 和附件 1)。与此相反的是, 在由柠檬酸生成琥珀

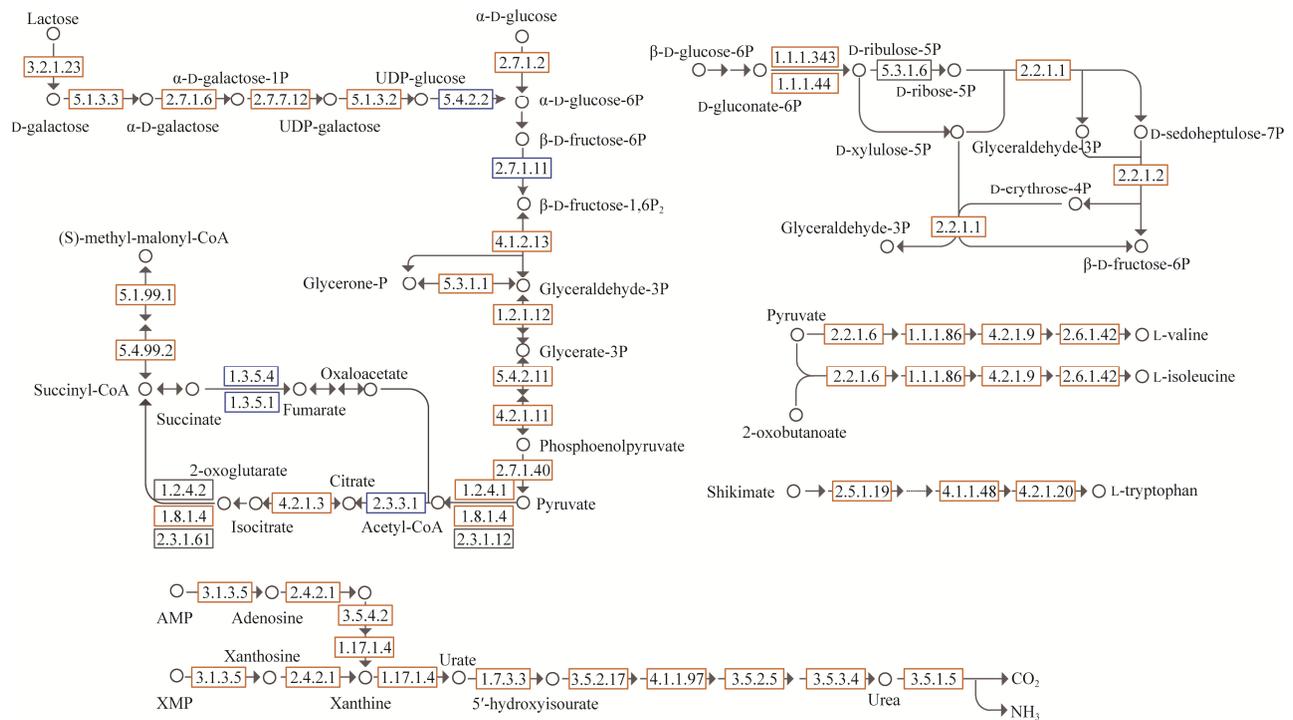


图3 *scyA1* 缺失后影响的若干初级代谢途径总览

Figure 3 Schematic view of several primary metabolic pathways affected by *scyA1* deletion. The orange box indicates a significant upregulation, the blue box indicates a significant downregulation, and the dark gray box indicates not significant.

酰-CoA (succinyl-CoA) 的 3 步反应中, 有 2 步反应的酶 (EC: 4.2.1.3 和 EC: 1.8.1.4) 基因 (*tu94_25500* 和 *tu94_26040*) 表达水平则表现出显著上调趋势(图 3 和附件 1); 负责琥珀酰-CoA 与甲基丙二酸单酰-CoA (methyl-malonyl-CoA) 相互转化的反应酶 (EC: 5.4.99.2 和 EC: 5.1.99.1) 基因 (*tu94_19950* 和 *tu94_22690*) 也表现出表达水平显著上调的趋势。

在 Δ *scyA1* 中, 戊糖磷酸途径显著强化, 具体表现为戊糖磷酸氧化阶段的第 3 步反应, 也就是负责将 D-6-磷酸葡萄糖酸(D-gluconate-6P) 氧化脱酸生成 D-5-磷酸核酮糖(D-ribulose-5P) 的反应中, 负责该催化步骤的 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (EC: 1.1.1.44/1.1.1.343) 基因 *tu94_16490* 表达水平显著上调; 此外, 负责非氧化反应阶段的转

酮酶 (EC: 2.2.1.1) 和转醛酶 (EC: 2.2.1.2) 编码基因表达丰度均显著上调(图 3 和附件 1)。

紧接着, 我们对组学数据中其他初级代谢通路的变化情况进行了探究, 发现 *scyA1* 缺失后对脂肪酸生物合成与降解通路的影响不明了, 但对某些氨基酸代谢途径(L-缬氨酸合成、L-异亮氨酸合成、L-色氨酸合成和 L-苯丙氨酸降解) 和嘌呤降解途径则具有非常显著的影响。

2.4 *scyA1* 缺失对氨基酸代谢相关途径基因的影响

丙酮酸族氨基酸 L-缬氨酸(L-valine) 和 L-异亮氨酸(L-isoleucine) 的生物合成过程使用相同的酶。*scyA1* 缺失后, 负责将丙酮酸和 α -酮丁酸(2-oxobutanoate) 催化生成 L-缬氨酸和 L-异亮氨酸的所有反应过程酶基因均表现出显著上调

的趋势(图 3 和附件 1); 由莽草酸(shikimate)形成 L-色氨酸(L-tryptophan)的多步反应中, 也有 3 步的酶基因表现出表达水平显著上调的趋势(图 3 和附件 1); 此外, 在由 L-苯丙氨酸(L-phenylalanine)降解形成乙酰-CoA 和琥珀酰-CoA 的多达 12 步反应中, 3 步反应的酶基因表达表现出显著上调趋势(附件 1)。这些结果表明 ScyA1 负调控了 3 种氨基酸(L-缬氨酸、L-异亮氨酸和 L-色氨酸)的合成和一种氨基酸(L-苯丙氨酸)的降解途径。

2.5 scyA1 缺失对嘌呤降解途径基因的影响

scyA1 缺失也显著影响了嘌呤核苷酸的降解过程。我们发现负责将黄嘌呤核苷酸(XMP)经多步反应彻底分解为氨(NH₃)和二氧化碳(CO₂)的众多酶基因均表现出显著上调的趋势(图 3 和附件 1); 从腺嘌呤核苷酸(AMP)经黄嘌呤途径彻底分解为氨和二氧化碳的代谢途径酶基因表达也表现出显著上调趋势(图 3 和附件 1)。这表明 ScyA1 是嘌呤降解途径的重要抑制子。

2.6 scyA1 缺失对蓝灰链霉菌基因组中次级代谢生物合成基因表达的影响

尼莫克丁和寡霉素是蓝灰链霉菌在实验室发酵条件下可以产生的 2 种重要次级代谢产物。因此, 在探究 *scyA1* 缺失对基因组中所有次级代谢生物合成基因表达的影响时, 我们首先关注了这 2 种化合物生物合成基因簇的表达变化趋势。由前述可知, *scyA1* 缺失后, 尼莫克丁产量大幅下降(图 1); 与此现象一致, 发酵第 3 和第 6 天的组学数据显示 Δ *scyA1* 中尼莫克丁生物合成基因簇的所有基因表达丰度显著下调(表 1), 表明 ScyA1 为尼莫克丁生物合成基因簇表达关键正调控子。在 Δ *scyA1* 中, 寡霉素的产量也有明显下降趋势; 与此结果一致, 组学数据显示负责寡霉素合成的大多数基因(*tu94_22445-tu94_22505*)在发酵第 3 天时转录

水平显著下调(表 1), 这表明 ScyA1 也是寡霉素生物合成的激活子, 通过正调控寡霉素生物合成基因簇的表达水平而促进寡霉素产生。

众所周知, 链霉菌次级代谢生物合成基因簇多数位于基因组染色体的两臂区; 我们发现 *scyA1* 缺失后, 染色体两臂区域 *tu94_00005-01935* (454 kb)和 *tu94_32150-32435* (91 kb)内所有基因表达几乎都检测不到, 表明 ScyA1 对基因组这 2 个区域基因表达的关键激活作用。在这 2 个彻底不表达的区域, 分别含有 1 个 I 型聚酮-非核糖体肽(polyketides-nonribosomal peptides, PKS-NRPS)生物合成基因簇(*tu94_00740-01005*)、1 个萜类(terpene)生物合成基因簇(*tu94_01425-01535*)和 1 个 NRPS 生物合成基因簇(*tu94_32305-32425*)。随后, 进一步分析了基因组中其他位置编码 PKS、NRPS、PKS-NRPS、萜类和其他类型次级代谢产物合成基因在 *scyA1* 缺失后的表达变化情况。如表 1 所示, 除尼莫克丁和寡霉素生物合成基因簇, 以及位于两臂彻底不表达区域的 3 个生物合成基因簇外, 还有 13 个次级代谢产物的合成基因(簇)表达水平发生显著变化。其中有 10 个簇表达水平显著下调和 3 个簇表达水平显著上调。这 10 个表达水平显著下调的基因簇包含了产物结构未知的 PKS、NRPS、PKS-NRPS 和萜类化合物合成基因以及产物结构清楚的孢子色素(spore pigment)、四氢嘧啶(ectoine)和土溴素(geosmin)等化合物合成基因。3 个显著上调表达的基因簇(*tu94_02935-03130*、*tu94_04235-04320* 和 *tu94_29680-29690*)则分别编码 NRPS 和 PKS-NRPS 类化合物。这些结果表明 ScyA1 是蓝灰链霉菌基因组中很多次级代谢产物合成基因簇的关键激活子, 但同时也是少数次级代谢产物合成基因簇的负调控子, 这反映了 ScyA1 对不同次级代谢生物合成基因簇的差异化调控行为。

表 1 *scyA1* 缺失后表达水平发生显著变化的次级代谢生物合成基因簇Table 1 Secondary metabolic biosynthetic gene clusters with significant expression change after deletion of *scyA1*

Biosynthetic genes	Product type	log ₂ (fold change) of Δ <i>scyA1</i> /NMWT1	
		3 d	6 d
<i>nemR-A4</i>	Nemadectin	-7.9 to -4.3	-2.1 to -5.9
<i>tu94_22445-22505</i>	Oligomycin	-2.3 to -1.1	-
<i>tu94_00740-01005</i>	Type I PKS-NRPS	-24.0 to -8.6	-26.0 to -6.5
<i>tu94_01425-01535</i>	Terpene	-23.4 to -13.3	-21.2 to -10.4
<i>tu94_02315-02345</i>	Spore pigment	-2.1 to -1.0	-
<i>tu94_02935-03130</i>	Type I PKS-NRPS	1.2 to 6.1	1.2 to 8.3
<i>tu94_04235-04320</i>	NRPS	1.7 to 5.1	1.1 to 1.5
<i>tu94_04875-04945</i>	Type III PKS	-8.5 to -1.1	-3.9 to -1.5
<i>tu94_07915-07930</i>	Ectoine	-3.3 to -1.9	-1.4
<i>tu94_11780-11860</i>	Melanin	-6.1 to -1.4	-3.0 to -1.4
<i>tu94_12170-12185</i>	Siderophore	-1.1	-2.0 to -2.4
<i>tu94_24590-24595</i>	Siderophore	-2.8 to -2.1	-
<i>tu94_25990</i>	Geosmin	-6.3	-4.4
<i>tu94_27830-27875</i>	Type I PKS	-8.9 to -4.2	-3.0 to -1.7
<i>tu94_29680-29690</i>	PKS-NRPS	1.6	1.0 to 1.5
<i>tu94_31215</i>	NRPS	-4.3	-3.2
<i>tu94_31805-31845</i>	Type II PKS	-2.9 to -1.2	-1.7 to -1.2
<i>tu94_32305-32425</i>	NRPS	-20.4 to -14.8	-21.0 to -9.6

-: Not significant.

2.7 *scyA1* 缺失对蓝灰链霉菌基因组中一些保守调控基因表达的影响

在对Δ*scyA1* 和野生型 NMWT1 进行组学数据比较分析时, 发现链霉菌中一些高度保守转录调控蛋白编码基因的表达水平也发生显著变化。在这些调控蛋白中, 有相当部分的调控因子其直系同源蛋白在其他链霉菌中的功能已经得到详细研究(表 2)。比如, 在Δ*scyA1* 中表达水平显著下调的基因 *tu94_19815*、*tu94_15145* 和 *tu94_12220* 分别与模式菌株天蓝色链霉菌中 *bldM*、*bldG* 和 *adpA* 高度同源, 而这 3 个调控基因都是链霉菌由基质菌丝向气生菌丝转变过程中非常关键的调控子^[1,15], 它们的突变都能够导致气生菌丝无法产生, 从而使菌落呈现光秃表型。不仅如此, 一些负责由气生菌丝形成成熟孢子的关键调控基因在Δ*scyA1* 中也表现出表达水平的显著下调, 如突变后导致气生菌丝分隔异常的基因 *tu94_24715* (*whiH*)、晚期产孢基因 *tu94_19810* (*whiD*)、细胞壁肽聚糖合成重要调控因子 *tu94_06385* 和 *tu94_16730* (*ssgA*), 以及孢子细胞壁加厚和孢子色素形成所必需的基因 *tu94_21880* (*sigF*) (表 2)。Wbl (WhiB-like) 家族转录调控子 WblE 编码基因 *tu94_21865* 在Δ*scyA1* 中表达水平显著下调(表 2)。在阿维链霉菌中, WblE 被证实是发育分化的关键调控因子^[16]。这些结果表明 *ScyA1* 控制着蓝灰链霉菌由基质菌丝到气生菌丝, 直至形成成熟孢子过程的多个关键调节因子的表达。

在变铅青链霉菌 TK24 中, *wbII* 过表达可促进放线紫红素和十二烷基灵菌红素的产生,

表 2 *scyA1* 缺失后表达水平发生显著变化的保守调控基因Table 2 Conserved regulatory genes with significant expression change after deletion of *scyA1*

Gene ID	Product type	Reported homolog	\log_2 (fold change) of Δ <i>scyA1</i> /NMWT1	
			3 d	6 d
<i>tu94_06385</i>	SsgA	SsgA	-2.3	-
<i>tu94_08185</i>	ArsR	Unknown	-3.1	-
<i>tu94_12220</i>	AraC	AdpA	-	-1.7
<i>tu94_14785</i>	Lsr2	Lsr2	1.4	1.2
<i>tu94_15145</i>	Anti-anti- σ factor	BldG	-1.3	-
<i>tu94_16730</i>	SsgA	SsgA	-6.8	-1.6
<i>tu94_16755</i>	LacI	Unknown	-4.9	-4.9
<i>tu94_17140</i>	MarR	Unknown	6.3	1.9
<i>tu94_17590</i>	TetR	AtrA	2.8	3.1
<i>tu94_17830</i>	TCS	GlnR	1.5	-1.1
<i>tu94_18600</i>	DeoR	Unknown	-1.7	1.2
<i>tu94_19810</i>	Wbl	WhiD	-	-1.4
<i>tu94_19815</i>	TCS	BldM	-1.4	-
<i>tu94_20590</i>	DeoR	FruR	-3.3	-
<i>tu94_21050</i>	Wbl	WbII	-2.4	-2.1
<i>tu94_21865</i>	Wbl	WblE	-2.4	-
<i>tu94_21880</i>	σ factor	SigF	-3.3	-
<i>tu94_21885</i>	Anti- σ factor	RsbW	-3.4	-
<i>tu94_21910</i>	Crp/Fnr	Unknown	-6.7	-1.7
<i>tu94_24715</i>	GntR	WhiH	-6.5	-2.6
<i>tu94_28710</i>	DNA-binding	Unknown	3.2	-

—: Not significant.

同时抑制黄色色素和孢子色素的产生^[17], 表明 WbII 差异化影响变铅青链霉菌中次级代谢的产生。在本研究中, *scyA1* 突变导致 WbII 编码基因 *tu94_21050* 表达水平显著下调(表 2), 表明 ScyA1 正调控蓝灰链霉菌中 *wbII* 同源基因的表达。

虽然 Δ *scyA1* 中多个转录调控因子表达表现出显著下调趋势, 也有少数基因表达表现出上调的趋势, 比如拟核结合蛋白(Lsr2)编码基因 *tu94_14785* 和 TetR 家族调控蛋白 AtrA 编码基因 *tu94_17590* (表 2)。Lsr2 对链霉菌基因组多数次级代谢基因簇表达起着广泛的抑制作用^[18], 而 AtrA 则可以作为激活子或抑制子普遍参与次级代谢合成的调控^[19]。这些结果表明 ScyA1

负调控了蓝灰链霉菌中 *lsr2* 和 *atrA* 同源基因的表达。

除以上详细描述的重要调控因子外, 其他功能可预测的保守调控因子如抗 σ 因子 RsbW 编码基因 *tu94_21885*、氮代谢全局性调控子 GlnR 编码基因 *tu94_17830* 以及一些功能未知的保守调控因子(*tu94_08185*、*tu94_16755*、*tu94_17140*、*tu94_18600*、*tu94_21910* 和 *tu94_28710*) 也表现出显著上调或下调的趋势(表 2)。由此可见, ScyA1 作为正或负调控子差异化影响了蓝灰链霉菌中众多高度保守转录调控因子的表达, 为我们理解 ScyA1 扰动的转录调控网络提供了更多的详细信息。

2.8 *scyA1* 缺失对菌丝体结构性蛋白编码基因的影响

通过对组学数据的进一步分析,我们还发现一些菌丝结构性蛋白编码基因如编码气生菌丝和孢子疏水外鞘的 *chaplin* 基因(*tu94_07045*、*tu94_07050* 和 *tu94_11800*)和细胞分裂蛋白 DivIVA 编码基因(*tu94_22680*)的表达也都表现出显著下调甚至不表达的情况(表 3)。这些基因的显著下调表达很可能影响菌丝体的形成。确实,在固体产孢培养基中,与野生型菌株 NMWT1 相比较, Δ *scyA1* 不仅气生菌丝量少,极少产孢,且菌落整体呈现出薄薄的一层^[2]。然而,*scyA1* 缺失并不影响液体发酵条件下细胞生物量的积累。猜测原因如下:首先,Chaplin 蛋白是链霉菌基质菌丝突破固体培养基表面张力分化为气生菌丝所必需的疏水性物质,其表达的显著下降可能并不影响液体环境中菌体的生长;其次,DivIVA 对菌丝体顶端生长非常重要,然而基因组上存在着功能冗余的基因,如 *tu94_12730* 和 *tu94_21345*,它们的表达水平在 Δ *scyA1* 中变化不大,这可能保证了液体培养条件下 Δ *scyA1* 菌体的正常生长。

表 3 *scyA1* 缺失后表达水平发生显著变化的菌丝体结构性蛋白编码基因

Table 3 Mycelium structural protein genes with significant expression change after deletion of *scyA1*

Gene ID	Homolog	\log_2 (fold change) of Δ <i>scyA1</i> /NMWT1	
		3 d	6 d
<i>tu94_07045</i>	Chaplin	-6.7	-2.2
<i>tu94_07050</i>	Chaplin	-7.8	-2.1
<i>tu94_11800</i>	Chaplin	-4.1	-3.0
<i>tu94_22680</i>	DivIVA	-1.6	-

-: Not significant.

3 讨论与结论

Aco 类群感效应信号分子合酶是近十年来发现的一种新颖信号分子合酶^[3],在链霉菌次级代谢生物合成过程中发挥着非常重要的正调控作用。目前,对其功能的研究仅局限于次级代谢方面,缺乏系统全面的认知。本研究以产生生物杀虫剂尼莫克丁的蓝灰链霉菌野生型菌株 NMWT1 为出发菌,在前期鉴定的一个影响尼莫克丁产生和菌株发育分化的 Aco 类信号分子合酶 ScyA1 基础之上,进一步利用转录组分析全面探究 ScyA1 对菌株生理代谢和调控网络的全局性影响。比较转录组分析结果表明,无论是在第 3 或第 6 天,*scyA1* 的缺失都可导致 2 000 个左右的基因表达水平显著改变,并且显著下调的基因数多于显著上调的基因数量。KEGG 富集分析显示 ScyA1 广泛影响了菌株的初级代谢包括中心碳代谢(糖酵解、三羧酸循环和戊糖磷酸途径)、氨基酸(L-缬氨酸、L-异亮氨酸和 L-色氨酸)生物合成和嘌呤核苷酸的降解;其次,ScyA1 差异化影响了基因组中众多次级代谢生物合成基因簇的表达;再者,ScyA1 还能够差异化影响细胞转录调控网络中诸多保守(全局性)调控因子的表达;最后,ScyA1 也是某些重要菌丝体结构性组分(如 Chaplin 和 DivIVA)的正调控子。以上为我们全面认识 ScyA1 的调控功能提供了非常详细的信息。

链霉菌中已经报道的保守全局/多效性次级代谢调控因子其调控行为往往具有差异化的特点,即全局性调控因子对不同菌中的已知次级代谢产物或者同一株菌中不同的次级代谢产物合成可能是激活也可能是抑制作用^[20]。比如,在模式菌株天蓝色链霉菌中,保守全局性调控子 WblA 为十二烷基灵菌红素(undecylprodigiosin, Red)和放线紫红素(actinorhodin, ACT)的抑制

子,其过表达导致 Red 和 ACT 产量显著下降^[21];而在圈卷产色链霉菌中, WblA 则能够发挥激活作用,其失活导致尼可霉素彻底不产生^[22],这反映了特定全局性调控子对不同链霉菌来源次级代谢产物合成的差异调控行为。圈卷产色链霉菌中全局性调控基因 *adpA* 的失活可以导致尼可霉素彻底不产生;然而在该突变株中,又检测到了一种新的能够抗革兰氏阳性菌的次级代谢产物——oviedomycin,表明 AdpA 既正调控尼可霉素的产生又能够负调控 oviedomycin 的产生^[23],反映出一种全局性调控因子对同一株菌中不同次级代谢产物产生的差异调控行为。*sabA* 为圈卷产色链霉菌群感效应信号分子合酶基因,将其突变后菌株失去尼可霉素生产能力;然而,若将培养基中的碳源由甘露醇替换为葡萄糖,*sabA* 突变株则能够大量产生 oviedomycin;转录分析发现 oviedomycin 大量产生条件下,对应生物合成基因簇表达水平显著上调,这表明 *sabA* 缺失株在葡萄糖作为碳源条件下能够激活隐性 oviedomycin 生物合成基因簇的表达进而促进 oviedomycin 的产生^[24]。由此可见,全局性调控因子(如 AdpA 和 SabA)差异化影响次级代谢的特点,使得操作全局性调控因子逐渐成为隐性基因簇激活研究中常用的手段。在本研究中,*scyA1* 缺失导致尼莫克丁和寡霉素产量的大幅下降,并且 ScyA1 还能够正调控蓝灰链霉菌中 13 个次级代谢(不包含尼莫克丁和寡霉素)基因簇的表达和负调控 3 个次级代谢产物基因簇的表达,这表明 ScyA1 在次级代谢调控过程中主要发挥激活作用,但对少数次级代谢也具有抑制作用,体现了 ScyA1 的差异化调控特点。然而,在本研究中,虽然我们通过组学数据发现 3 个在转录水平显著上调的次级代谢基因簇,但并未检测到新的次级代谢产物产生,猜测可能还缺乏其他重要因素(比

如培养条件),导致虽然基因簇得到有效表达但化合物仍然不能够有效产生。总之,基于 SabA 以及本文中 ScyA1 的详细研究,可以认为对群感效应信号分子合酶基因进行遗传操作可作为隐性次级代谢基因簇激活的常用手段之一。

群感效应系统以及众多高度保守存在的转录调控因子是链霉菌复杂调控网络的主要组成成员。解析该调控网络转录调控因子之间的相互作用关系将有助于理解调控网络的复杂性。众所周知,群感效应信号分子合酶能够产生信号分子(autoregulator),产生的信号分子作用于与之匹配的蛋白受体(autoregulator receptor, ArpA),于是解除 ArpA 对下游靶点启动子区的控制,继而开启或关闭一系列细胞生命活动过程^[25]。因此,ArpA 直接作用的靶基因也可以理解为信号分子合酶控制的靶基因。人们对信号分子合酶功能的认识最早是在灰色链霉菌中,GBL 类信号分子合酶 AfsA 通过解除 ArpA 对全局性调控基因 *adpA* 启动子的抑制而激活 *adpA* 的表达,表达的 AdpA 进而开启与形态分化和次级代谢生物合成相关基因的表达^[25]。也就是说在灰色链霉菌中 AfsA 通过控制 *adpA* 的表达而实现对形态分化和次级代谢的调控。圈卷产色链霉菌中信号分子合酶 SabA 合成的 butenolide 信号分子能够解除受体 SabR1 对 *cprB* 启动子的抑制,进而级联激活 CprB-AdpA-SanG 信号通路并开启尼可霉素的合成^[9]。这 2 个例子清晰表明信号分子合酶可以通过影响转录调控网络中的多效或者全局性调控因子表达而发挥其功能。在本研究中,我们发现 *scyA1* 缺失显著影响了更多数量的功能已知或未知的链霉菌保守调控因子的表达,广泛扰动了细胞的转录调控网络,这为我们理解链霉菌转录调控网络的复杂性提供了更多具体的信息。

参考文献

- [1] LIU G, CHATER KF, CHANDRA G, NIU GQ, TAN HR. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 112-143.
- [2] LIU H, ZHANG YY, LI SS, WANG JB, WANG XJ, XIANG WS. Elucidation of the activation pathways of Sc_vA1/Sc_vR1, 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.
- [3] KITANI S, MIYAMOTO KT, TAKAMATSU S, HERAWATI E, IGUCHI H, NISHITOMI K, UCHIDA M, NAGAMITSU T, OMURA S, IKEDA H, Nihira T. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(39): 16410-16415.
- [4] KHOKHLOV AS, TOVAROVA II, BORISOVA LN, PLINER SA, SHEVCHENKO LN, IA KE, 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.
- [5] KLEINER E, ONOPRIENKO VV, PLINER SA, SOIFER VS, KHOKHLOV AS. The synthesis of racemic A-factor, a bioregulator from *Streptomyces griseus*[J]. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 1977, 3: 424-426.
- [6] KATO JY, FUNA N, WATANABE H, OHNISHI Y, HORINOUCHE S. Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(7): 2378-2383.
- [7] AHMED Y, REBETS Y, TOKOVENKO B, BRÖTZ E, LUZHETSKYY A. Identification of butenolide regulatory system controlling secondary metabolism in *Streptomyces albus* J1074[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9784.
- [8] 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-e02717.
- [9] WANG W, ZHANG J, LIU X, LI D, LI Y, TIAN Y, TAN H. Identification of a butenolide signaling system that regulates nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Journal Of Biological Chemistry*, 2018, 293(52): 20029-20040.
- [10] HE H, YE L, LI C, WANG H, GUO X, WANG X, ZHANG Y, XIANG W. SbbR/SbbA, an important ArpA/AfsA-like system, regulates milbemycin production in *Streptomyces bingchenggensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1064.
- [11] 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.
- [12] D'ALIA D, EGGLE D, NIESELT K, HU WS, BREITLING R, TAKANO E. Deletion of the signalling molecule synthase ScbA has pleiotropic effects on secondary metabolite biosynthesis, morphological differentiation and primary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(2): 239-251.
- [13] LI C, HE HR, WANG JB, LIU H, WANG HY, ZHU YJ, WANG XJ, ZHANG YY, XIANG WS. Characterization of a LAL-type regulator NemR in nemadectin biosynthesis and its application for increasing nemadectin production in *Streptomyces cyaneogriseus*[J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62(3): 394-405.
- [14] WANG H, LI C, ZHANG B, HE H, JIN P, WANG J, ZHANG J, WANG X, XIANG W. Complete genome sequence of *Streptomyces cyaneogriseus* ssp. *noncyanogenus*, the thermotolerant producer of commercial antibiotics nemadectin[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 204: 1-2.
- [15] BIGNELL DRD, WARAWA JL, STRAP JL, CHATER KF, LESKIW BK. Study of the bldG locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation the GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF134889 and AL035636[J]. *Microbiology*, 2000, 146(9): 2161-2173.
- [16] LIU XC, CHENG YQ, LYU MY, WEN Y, SONG Y, CHEN Z, LI JL. Redox-sensing regulator Rex regulates aerobic metabolism, morphological differentiation, and avermectin production in *Streptomyces avermitilis*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44567.

- [17] YAN L, ZHANG QZ, VIROLLE MJ, XU DL. In conditions of over-expression, WblI, a WhiB-like transcriptional regulator, has a positive impact on the weak antibiotic production of *Streptomyces lividans* TK24[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174781.
- [18] ZHANG XF, ANDRES SN, ELLIOT MA. Interplay between nucleoid-associated proteins and transcription factors in controlling specialized metabolism in *Streptomyces*[J]. *mBio*, 2021, 12(4): e0107721.
- [19] CHEN L, LU YH, CHEN J, ZHANG WW, SHU D, QIN ZJ, YANG S, JIANG WH. Characterization of a negative regulator Avel for avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(2): 277-286.
- [20] YANG X, ZHANG YY, LI SS, YE L, WANG XJ, XIANG WS. SspH, a novel HATPase family regulator, controls antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Antibiotics*: Basel, Switzerland, 2022, 11(5): 538.
- [21] KANG SH, HUANG JQ, LEE HN, HUR YA, COHEN SN, KIM ES. Interspecies DNA microarray analysis identifies WblA as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(11): 4315-4319.
- [22] LU C, LIAO G, ZHANG J, TAN H. Identification of novel tylosin analogues generated by a wblA disruption mutant of *Streptomyces ansochromogenes*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 173.
- [23] XU JJ, ZHANG JH, ZHUO JM, LI Y, TIAN YQ, TAN HR. Activation and mechanism of a cryptic ovidomycin gene cluster via the disruption of a global regulatory gene, *adpA*, in *Streptomyces ansochromogenes*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(48): 19708-19720.
- [24] LI JY, WANG WX, LIU X, TIAN YQ, TAN HR, ZHANG JH. A butenolide signaling system synergized with biosynthetic gene modules led to effective activation and enhancement of silent ovidomycin production in *Streptomyces*[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 289-296.
- [25] FLÄRDH K, BUTTNER MJ. *Streptomyces morphogenetics*: dissecting differentiation in a filamentous bacterium[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(1): 36-49.