



DegU 负调控地衣芽胞杆菌普切明酸的合成及分泌

王冬, 王攀, 何轶慧, 陈守文*

湖北大学生命科学学院, 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

王冬, 王攀, 何轶慧, 陈守文. DegU 负调控地衣芽胞杆菌普切明酸的合成及分泌. 微生物学报, 2022, 62(8): 3190–3199.
Wang Dong, Wang Pan, He Yihui, Chen Shouwen. Pulcherrimic acid synthesis and secretion are negatively regulated by DegU in *Bacillus licheniformis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3190–3199.

摘要: 普切明酸是地衣芽胞杆菌合成并分泌的一种铁离子螯合剂, 是细胞维持铁稳态的重要介质。【目的】揭示转录调控因子 DegU 在调控普切明酸的合成及分泌过程中的作用。【方法】以地衣芽胞杆菌 DW2 为出发菌株, 构建 *degU* 缺失菌株 DW2 Δ *degU* 和过表达菌株 DW2::Pbay-*degU*, 通过产物检测、转录水平检测、凝胶阻滞分析和 GFP 报告蛋白表达分析等方法分析 DegU 对普切明酸合成、分泌及调控因子基因的转录调控机制。【结果】DW2 Δ *degU* 的普切明酸产量相比于 DW2 提高了 56.8%, 而 DW2::Pbay-*degU* 相比于 DW2 菌株则下降 83.7%。同时, *degU* 缺失后, 普切明酸合成酶基因 *yvmC* 和转运蛋白基因 *yvmA* 的转录水平分别上升为 DW2 的 2.85 倍和 2.71 倍, *yvmC* 和 *yvmA* 的负调控因子基因 *yvmB* 的转录水平则下降为 DW2 的 0.35 倍; 而在 DW2::Pbay-*degU* 菌株中, *yvmC* 和 *yvmA* 的转录水平分别下降为 DW2 的 0.47 倍和 0.24 倍, *yvmB* 的转录水平则上升为 DW2 的 1.78 倍。凝胶阻滞分析和 GFP 报告蛋白表达分析表明, DegU 可以直接与 PyvmC 和 PyvmB 启动子结合, 但是与 *yvmA* 基因启动子没有直接相互作用。【结论】DegU 通过 2 种模式调控普切明酸合成基因簇的转录, DegU 可以通过直接与 *yvmC-cypX* 基因簇启动子结合对其进行负调控, 另一方面, DegU 也可以通过直接激活普切明酸合成的负调控因子基因 *yvmB* 的表达对 *yvmC-cypX* 和普切明酸转运蛋白基因 *yvmA* 起到间接负调控的作用。

关键词: 普切明酸; DegU; 地衣芽胞杆菌; 转录调控

基金项目: 国家自然科学基金(31900026); 湖北省烟草公司技术开发项目(027Y2021-023)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31900026) and by the Technology Development Project of Hubei Tobacco Company (027Y2021-023)

*Corresponding author. Tel: +86-27-88666081; E-mail: chenshouwen@hubu.edu.cn

Received: 16 December 2021; Revised: 24 February 2022; Published online: 10 March 2022

Pulcherriminic acid synthesis and secretion are negatively regulated by DegU in *Bacillus licheniformis*

WANG Dong, WANG Pan, HE Yihui, CHEN Shouwen*

State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

Abstract: Pulcherriminic acid synthesized and secreted by *Bacillus licheniformis* is an iron chelator that helps to maintain iron homeostasis by removing Fe^{3+} from the environment. **[Objective]** This study is to investigate the regulatory mechanisms of DegU in the synthesis and secretion of pulcherriminic acid. **[Methods]** Based on the native strain *B. licheniformis* DW2 and its derivative strains DW2 Δ degU (*degU* deletion) and DW2::Pbay-degU (*degU* overexpression), this study excavated the regulatory mechanisms of DegU in the synthesis and secretion of pulcherriminic acid by determining pulcherriminic acid content, real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and green fluorescent protein (GFP) expression assay. **[Results]** The pulcherriminic acid yield of DW2 Δ degU was 56.8% higher than that of DW2, while the yield of DW2::Pbay-degU was 83.7% lower than that of DW2. In addition, after *degU* deletion, compared with the condition of DW2, the transcriptional levels of pulcherriminic acid synthetase genes *yvmC* and transporter gene *yvmA* increased to 2.85 and 2.71 times, respectively, whereas the transcriptional level of *yvmB*, another negative regulator gene of *yvmC* and *yvmA*, decreased to 0.35 times. In DW2::Pbay-degU, the transcription levels of *yvmC* and *yvmA* reduced to 0.47 and 0.24 times, respectively, while the transcription level of *yvmB* rose to 1.78 times that of DW2. EMSA and GFP expression assay showed that DegU could directly bind to PyvmC and PyvmB promoters, but had no direct interaction with the promoter of *yvmA* (PyvmA). **[Conclusion]** DegU regulated the synthesis and secretion of pulcherriminic acid in two ways: on the one hand, DegU negatively regulated *yvmC* by directly binding to the promoter of *yvmC-cypX* cluster; on the other hand, DegU activated the expression of *yvmB* and negatively regulated *yvmC-cypX* and *yvmA* in an indirect way.

Keywords: pulcherriminic acid; DegU; *Bacillus licheniformis*; transcriptional regulation

铁是微生物生长必需的营养元素。过量的铁离子却能够通过催化芬顿反应制造超氧化物,造成细胞内蛋白质、核酸等大分子的氧化性损伤,表现出铁毒性^[1]。因此,通过合成铁离子螯合剂等物质调节胞外及胞内环境中的铁离子浓度,维持细胞铁稳态成为微生物适应环境压力的重要途径。普切明酸(pulcherriminic acid)是由芽胞杆菌和部分酵母菌合成的异羟肟酸型铁离子螯合剂^[2]。在富铁条件下,芽胞杆

菌能够通过合成并分泌普切明酸螯合 Fe^{3+} ,并将其转化为不溶于水的普切明沉淀,避免铁毒害作用^[3]。在芽胞杆菌生物被膜形成过程中,普切明酸则作为胞外铁离子的消耗剂用于控制生物被膜的扩展过程^[4]。同时,普切明酸还能够通过螯合铁离子抑制病原微生物的生长,在采收后水果防腐、农作物土传病害防治等方面表现出较好的应用前景^[5-7]。

在芽胞杆菌中,普切明酸合成基因簇由环

二肽合成酶基因 *yvmC* 和细胞色素 P450 酶基因 *cypX* 组成。在普切明酸合成过程中, L-Leu 首先经亮氨酸氨酰 tRNA 连接酶 LeuRS 催化生成 L-Leu-tRNA。然后, YvmC 以 2 分子 L-Leu-tRNA 为底物通过脱水缩合生成 cyclo(L-Leu-L-Leu)^[8]。最后 cyclo(L-Leu-L-Leu) 经过细胞色素 P450 酶的氧化作用生成普切明酸^[9]。胞内的普切明酸经过类 MFS 超家族(major facilitator superfamily)转运蛋白 YvmA 分泌到胞外^[10]。我们前期的研究已经证明, 合成基因簇 *yvmC-cypX* 受到过渡态转录调控因子 AbrB 和类 MarR 家族(multiple antibiotic resistance regulator family)转录调控因子 YvnA 和 YvmB 的直接负调控, *yvmA* 基因也受到 YvmB 的直接负调控。在该调控网络内部, *yvmA* 基因还受到 AbrB 的负调控, 而 YvnA 又是 *yvmB* 的负调控因子^[10]。

DegU 是双组分调控系统 DegS-DegU 中的响应调节器, 能够被传感器激酶 DegS 磷酸化并激活, 获得与靶基因启动子结合的能力, 并表现出激活或者抑制靶基因转录的功能^[11-12]。DegU 还作为芽胞杆菌生物被膜形成过程中的主要正调控因子之一, 参与对芽胞杆菌鞭毛形成蛋白基因 *flgB*^[13]、 γ -聚谷氨酸合成基因 *pgsB*^[14]、感受态形成因子基因 *comK* 等的调控过程^[15]。然而, DegU 对在芽胞杆菌生物被膜形成过程中发挥重要作用的普切明酸是否具有调控作用还未见报道, 因此, 我们探究了 DegU 对普切明酸前体物供应、合成、分泌及调控相关基因的调控作用, 以期揭示其在普切明酸合成及转运过程中的角色, 为进一步揭示普切明酸在芽胞杆菌生长过程中的作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 培养基和培养条件

普切明酸发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.0,

柠檬酸钠 12.0, (NH₄)₂SO₄ 6.4, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeCl₃·6H₂O 0.04, CaCl₂·2H₂O 0.15, MnSO₄·H₂O 0.01。

培养条件: 挑平板活化的地衣芽胞杆菌菌落接入液体 LB 培养基中, 在 37 °C、230 r/min 摇床中培养 12 h。LB 种子液以 2%接种量接种到普切明酸发酵培养基中, 在 37 °C、150 r/min 摇床中培养 25 h。

1.1.2 菌株和质粒

本研究所用的菌株和质粒见表 1。

1.2 地衣芽胞杆菌基因工程菌株的构建

参考地衣芽胞杆菌基因敲除菌株的构建方法^[16], 得到 *degU* 的缺失菌株 DW2 Δ *degU*。参考地衣芽胞杆菌基因整合表达菌株的构建方法^[17], 得到 *degU(Hy)*整合表达菌株 DW2::Pbay-*degU(Hy)*。DegU(Hy)为 DegU 蛋白的突变体(12 位的组氨酸突变为亮氨酸), 具有在非磷酸化状态下与 DNA 靶位点结合的能力^[18]。

1.3 普切明酸的检测

取摇瓶发酵 1 mL 发酵液, 转速 10 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 沉淀加入 1 mL 2 mol/L NaOH 重悬, 然后 10 000 r/min 离心 5 min, 取全部上清(含普切明酸)用紫外可见分光光度计测定 410 nm 处吸光度值, 并计算普切明酸产量^[19]。参考地衣芽胞杆菌胞内普切明酸含量的检测方法测定胞内未分泌的普切明酸浓度^[20]。

1.4 基因相对转录水平检测

将 *B. licheniformis* DW2、DW2 Δ *degU* 和 DW2::Pbay-*degU* 菌株发酵至对数中期(16 h), 收集细胞, 提取菌株 RNA。参考地衣芽胞杆菌基因实时荧光定量法 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR)分析普切明酸代谢相关基因转录水平的差异^[10]。以 16s rRNA 为内参基因, 通过检测各基因的 C_t 值计算其相对转录水平, 计算方法为: $\Delta C_t = C_{t \text{ 目标基因}} - C_{t16S}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 对照菌株}} - \Delta C_{t \text{ 目标菌株}}$; 基因的相对转录水平 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains or plasmids	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (f 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsd R17 recA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	TaKaRa
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (τ_{B^-} m _{B⁻}) <i>gal dem</i> (DE3)	TaKaRa
<i>Bacillus licheniformis</i>		
DW2	Wild type (CCTCC M2011344)	This study
DW2 Δ <i>degU</i>	Δ <i>degU</i>	This study
DW2::Pbay- <i>degU</i>	Overexpression of the mutant <i>degU</i> (<i>Hy</i>)	This study
Plasmids		
T2(2)-ori	<i>E. coli</i> - <i>B. licheniformis</i> shuttle vector; oripUC/orits; temperature sensitive; Kan ^r	This study
T2- <i>degU</i>	T2(2)-ori derivative containing homologous arms for <i>degU</i> knockout	This study
T2-Pbay- <i>degU</i>	T2(2)-ori derivative for overexpression of the mutant <i>degU</i> (<i>Hy</i>)	This study
pHY300PLK	<i>E. coli</i> - <i>B. licheniformis</i> shuttle vector; Amp ^r , Tc ^r	TaKaRa
300-PyvmB-GFP	pHY300PLK harboring <i>gfp</i> fused with PyvmB promoter	This study
300-PyvmC-GFP	pHY300PLK harboring <i>gfp</i> fused with PyvmC promoter	This study
pET-28a(+)	Protein expression vector in BL21(DE3); Kan ^r	Novagen
pET-28a- <i>degU</i> (<i>Hy</i>)	pET-28a harboring <i>degU</i> (<i>Hy</i>)	This study

1.5 单位菌体 GFP 荧光值检测

发酵液取 200–400 μ L 到 1.5 mL 离心管中, 加入 PBS 缓冲液 1 mL 洗涤菌体, 并将菌体重悬至 PBS 缓冲液中, 使各菌株的菌体 OD_{600} =0.5, 利用 SpectraMax iD5 酶标仪检测 GFP 荧光强度数值和菌体 OD_{600} 数值, 单位菌体 GFP 荧光值=检测 GFP 荧光强度数值/菌体 OD_{600} 数值。

1.6 DegU(Hy)蛋白的诱导表达及纯化

采用 pET-28a(+)质粒构建 DegU(Hy)诱导表达质粒, 并将其转入大肠杆菌 BL21(DE3)菌株。携带 pET-28a-*degU*(*Hy*)质粒的 BL21(DE3)菌株接种到 LB 培养基中, 37 °C、230 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 然后向培养基中添加终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG, 继续培养 6 h。诱导完成后, 蛋白采用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化^[10]。

1.7 凝胶阻滞分析

聚丙烯酰胺凝胶阻滞分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验所用凝胶配方

及电泳条件参考分子克隆与实验指南(第三版)。启动子生物素标记探针设计以 *yvmC* 基因为例, 通过引物 PyvmC-F/R 和模板扩增出 PyvmC 启动子片段(100 bp)。凝胶阻滞实验采用碧云天化学发光 EMSA 试剂盒, 并采用试剂盒说明书所述方法^[10], 为抑制蛋白质与探针之间的非特异性结合反应, 在配制反应体系时额外添加相当于标记探针 100 倍质量的 poly(dI-dC) DNA。

1.8 统计分析

本研究所有实验均重复至少 3 次, 并且每次设置 3 个平行。采用 Origin 和 SPSS 进行数据处理和分析(*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$))。

2 结果与分析

2.1 DegU 负调控普切明酸的合成

为了验证 DegU 是否参与普切明酸的合成调控, 我们在地衣芽胞杆菌 DW2 菌株中构建了 *degU* 缺失菌株 DW2 Δ *degU* 和 *degU*(*Hy*)整合过

表达菌株 DW2::Pbay-*degU*。发酵结果显示, *DegU* 的敲除和整合表达并未显著影响菌株的生长, DW2、DW2 Δ *degU* 和 DW2::Pbay-*degU* 菌株的细胞密度均在接种后 21 h 达到最高, 其细胞 OD_{600} 值分别为 4.9、5.1 和 4.6 (图 1A)。在普切明酸发酵培养基中, 3 株菌株均没有明显的稳定生长期, 到 24 h 时 DW2、DW2 Δ *degU* 和 DW2::Pbay-*degU* 菌株的细胞密度(OD_{600})分别下降为 4.2、4.0 和 3.9。然而, *DegU* 的表达水平变化却对普切明酸合成水平具有较大的影响, 在发酵 25 h 后, DW2 Δ *degU* 菌株胞内和胞外的普切明酸总产量为 55.2 mg/L (图 1B), 相比于 DW2 菌株(35.2 mg/L)提升了 56.8%, 而 DW2::Pbay-*degU* 菌株的普切明酸产量 5.73 mg/L 则比 DW2 菌株下降了 83.7%, 该结果表明 *DegU* 对普切明酸的合成具有负调控作用。

在地衣芽胞杆菌中, 普切明酸首先在胞内合成, 并通过转运蛋白 YvmA 分泌到胞外。当胞内铁离子浓度较高或者普切明酸合成速率上升时, 普切明酸可以在胞内螯合铁离子并形成沉淀^[10]。为了进一步分析各菌株的普切明酸合成速率的差异是否会影响到其普切明酸的分泌过程, 我们测定了各菌株的胞内普切明酸浓度。结果显示, 各个菌株胞内的普切明酸浓度均保持在较低水平, 但 DW2 Δ *degU* 菌株的胞内普切明酸含量达到 18.7 mg/g DCW, 相比于 DW2 菌株 (11.2 mg/g DCW) 提升了 67.0%, 而 DW2::Pbay-*degU* 菌株的胞内普切明酸含量则为 DW2 菌株的 27.8% (3.1 mg/g DCW) (图 1C)。该结果表明, *degU* 的表达水平变化会显著影响普切明酸在胞内的积累水平, 可能的原因是 DW2 Δ *degU* 菌株普切明酸合成水平上升, 导致分泌蛋白 YvmA 过载, 无法及时将普切明酸分泌到胞外。

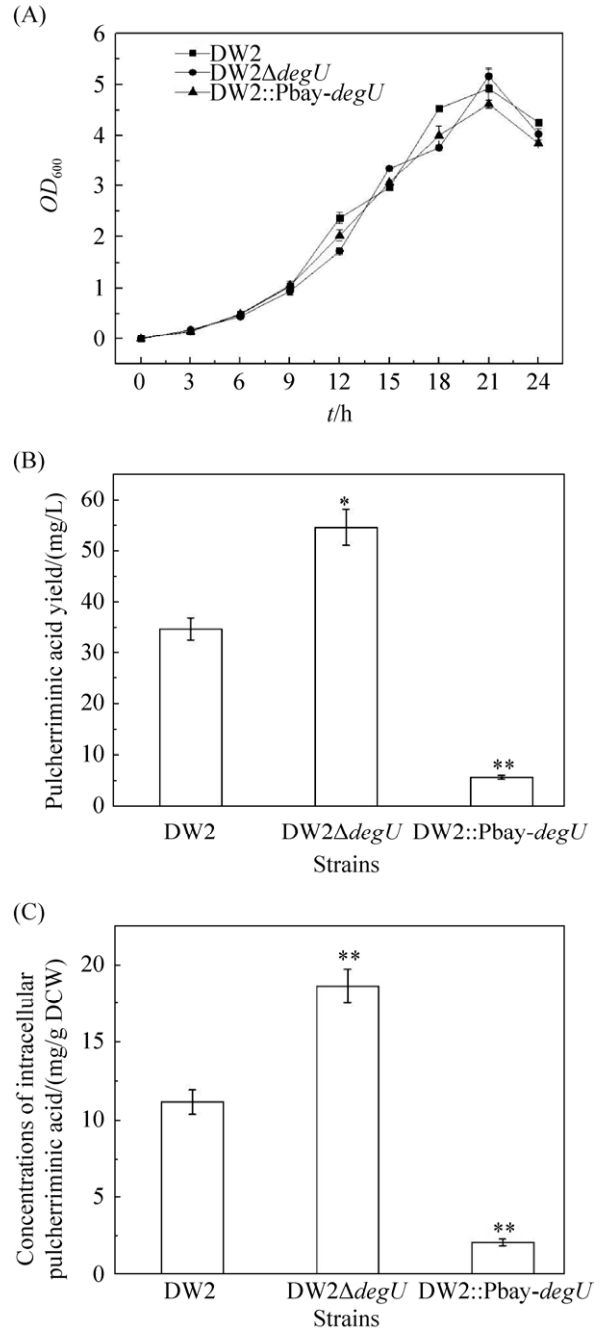


图 1 *DegU* 表达水平变化对菌株生长(A)、细胞内外普切明酸总产量(B)及胞内普切明酸含量(C)的影响

Figure 1 Effects of *degU* deletion and overexpression on cell growth (A), the total content of pulcherrimic acid (B) and the content of intracellular pulcherrimic acid (C). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.2 DegU 对普切明酸合成及分泌相关基因转录的影响

进一步通过 RT-qPCR 分析 *degU* 转录水平变化对普切明酸前体物供应、普切明酸合成、分泌基因及调控因子基因转录水平的影响。结果显示, *degU* 过表达菌株的转录水平上升为原始菌株 DW2 的 4.70 倍, 而 DW2 Δ *degU* 菌株中则无法检测到 *degU* 基因的转录(图 2), 表明工程菌株的构建达到了敲除和强化表达的效果。另外, *degU* 的缺失和过表达对亮氨酸合成基因簇 *ilvBHC*、*leuABCD* 的转录水平均没有显著影响, 说明 DegU 不是通过调控亮氨酸的供应来影响普切明酸合成的。与普切明酸发酵结果相一致的是, 在 *degU* 缺失后 *yvmC* 的转录水平上升为 DW2 菌株的 2.85 倍, 而 DW2::P*bay-degU* 菌株中 *yvmC* 基因的转录水平则下降为 DW2 菌株的 0.47 倍, 表明 DegU 是通过直接或者间接负调控普切明酸合成酶基因簇的表达来控制普切明酸的产量。转运蛋白基因 *yvmA* 的表达水

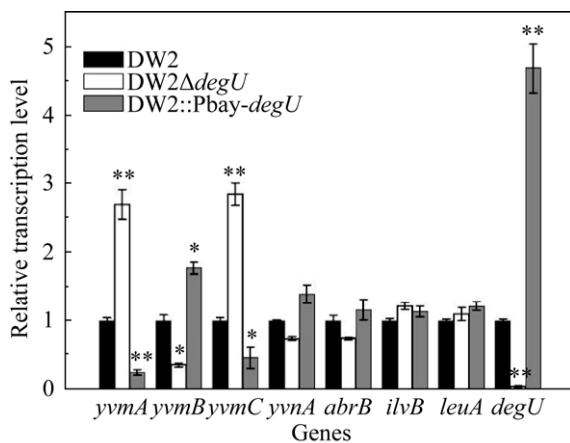


图 2 DegU 表达水平变化对普切明酸代谢相关基因转录水平的影响

Figure 2 Effects of *degU* deletion and overexpression on the transcription levels of metabolism associated genes of pulcherriminic acid. The transcription levels of genes in DW2 were set to 1. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

平也受到了 DegU 的负调控, 在 DW2 Δ *degU* 菌株中其转录水平上升为 DW2 菌株的 2.71 倍, 而在 DW2::P*bay-degU* 菌株中则下降为 DW2 菌株的 0.24 倍。同时, 在 *yvmC* 的 3 个已知的负调控因子基因(*abrB*、*yvnA* 和 *yvmB*)中, 只有 *yvmB* 基因的表达受到 DegU 表达水平的影响, 其转录水平在 DW2 Δ *degU* 菌株中下降为 DW2 菌株的 0.35 倍, 而在 DW2::P*bay-degU* 菌株中则上升为 DW2 中的 1.78 倍。该结果表明, *yvmB* 的转录受到 DegU 的正调控作用, 而 DegU 还可以通过正调控 YvmB 蛋白的表达来间接负调控 *yvmC* 和 *yvmA* 基因的转录。

2.3 DegU 是 *yvmC* 和 *yvmB* 基因的直接调控因子

为进一步明确 DegU 对 *yvmB*、*yvmC* 和 *yvmA* 基因的调控是直接调控还是通过其他转录因子间接调控, 我们表达并纯化了 DegU 蛋白, 并通过凝胶阻滞实验在胞外环境中分析了 DegU 蛋白与 PyvmC、PyvmB 和 PyvmA 启动子片段之间是否具有直接相互作用。如图 3 结果显示, 在添加 DegU 蛋白后, PyvmC 和 PyvmB 启动子探针出现阻滞现象, 表明 DegU 蛋白可以与 PyvmC 或 PyvmB 启动子直接结合。但是, DegU 蛋白的浓度在 200 ng 以内时 PyvmA 启动子探针均没有出现阻滞现象, 该结果表明 DegU 是通过与 *yvmC* 或 *yvmB* 基因启动子结合的方式直接调控其转录的, 但是 DegU 对转运蛋白基因 *yvmA* 的调控是通过 YvmB 间接完成的。

2.4 GFP 表达验证 DegU 对靶基因启动子的调控作用

为了进一步在胞内环境中确定 DegU 对 *yvmC* 和 *yvmB* 基因的调控作用, 我们使用 PyvmC 和 PyvmB 启动子与 *gfp* 基因进行融合, 构建了 GFP 报告蛋白质粒 300-PyvmC-GFP 和 300-PyvmB-GFP, 并将其分别转化到 DW2、DW2 Δ *degU* 和

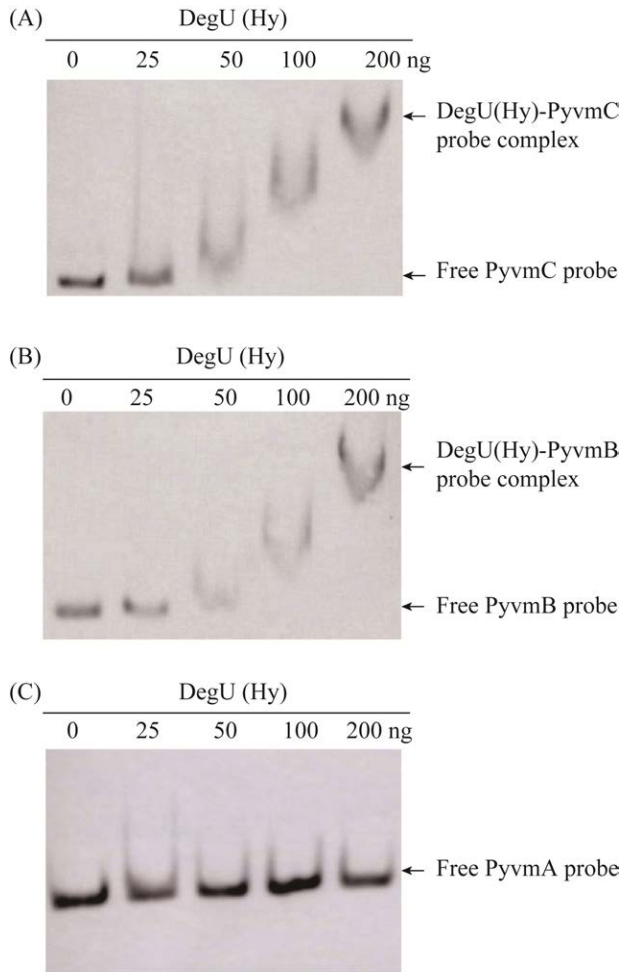


图 3 DegU (Hy)蛋白与 *yvmC*、*yvmB* 和 *yvmA* 启动子探针的结合作用

Figure 3 Binding of the DegU (Hy) protein to the promoter probes of *yvmC*, *yvmB* and *yvmA*. The content of DegU (Hy) was 0, 25, 50, 100 and 200 ng, respectively. The probe (20 ng) was added to each lane. The nonspecific competitor poly(dI-dC) was added to the EMSA binding buffer.

DW2::Pbay-*degU* 菌株中, 采用酶标仪检测菌株 GFP 的表达水平。结果显示, 在整个生长过程中, DW2 Δ *degU*/300-PyvmC-GFP 菌株的单位菌体荧光值较 DW2/300-PyvmC-GFP 显著上升, 其中在 25 h 时上升幅度为 65.2%; 而 DW2::Pbay-*degU*/300-PyvmC-GFP 菌株单位菌体的 GFP 荧光值较 DW2/300-PyvmC-GFP 显著下降, 在 25 h 时降幅

度为 52.2% (图 4A), 该结果进一步表明 DegU 可以通过结合于 *yvmC-cypX* 基因簇启动子区域对其进行负调控。与 *yvmC* 相反的是, 25 h 时, DW2 Δ *degU*/300-PyvmB-GFP 菌株的单位菌体荧光值下降为 DW2/300-PyvmB-GFP 的 32.4%, 而 DW2::Pbay-*degU*/300-PyvmB-GFP 菌株的单位菌体荧光值则上升为 DW2/300-PyvmC-GFP 的 2.11 倍 (图 4B)。该结果进一步表明, 在地衣芽胞杆菌中 DegU 能够通过直接与 *yvmC* 和 *yvmB* 基因启动子结合来调控其表达。

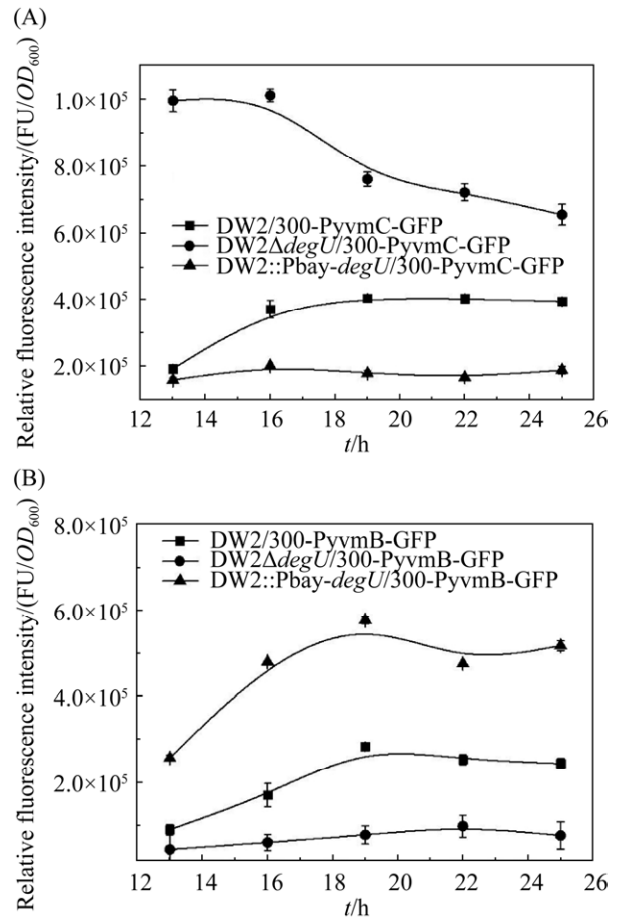


图 4 PyvmC-GFP 和 PyvmB-GFP 转录融合表达验证 DegU 对启动子的调控作用

Figure 4 Expression levels of promoters by PyvmC-GFP (A) and PyvmB-GFP (B) transcriptional fusions.

3 讨论

普切明酸无论是在胞内还是被分泌到胞外, 都能够螯合环境中的铁离子并将其转化为沉淀状态, 因此普切明酸合成菌株需要精确调控普切明酸的合成水平以防止铁离子被过度螯

合导致细胞陷入铁饥饿。前期我们的研究显示, 地衣芽胞杆菌主要通过协调转录调控因子 *AbrB*/*YvnA*/*YvmB* 的表达水平来控制普切明酸的适度合成^[9]。而本研究则进一步证明, *DegU* 也参与了地衣芽胞杆菌中的普切明酸的合成调控, 并在其中起到多重的调控作用(图 5)。

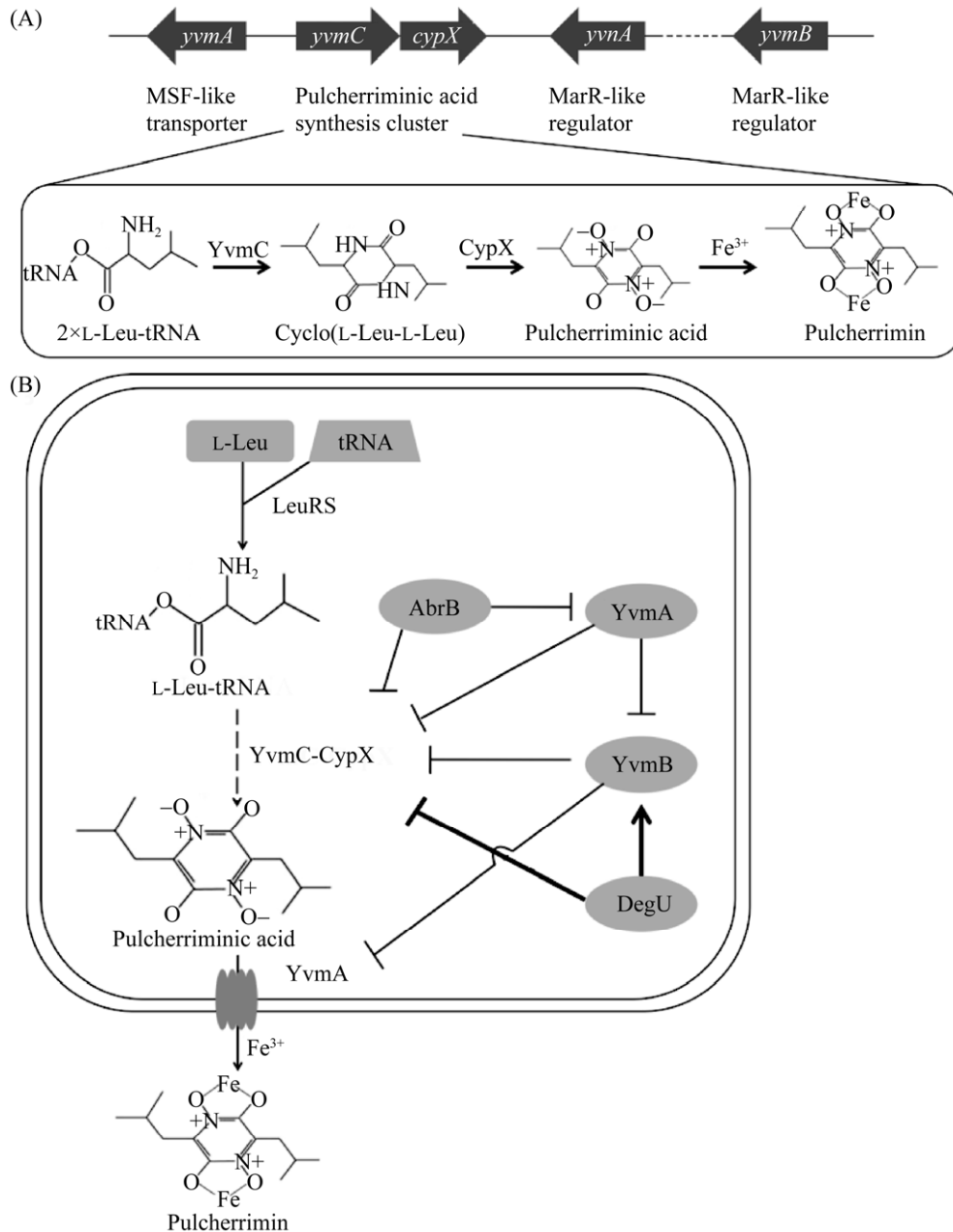


图 5 地衣芽胞杆菌中的普切明酸合成基因簇(A)及其调控网络(B)

Figure 5 The gene cluster of pulcherriminic acid synthetases (A) and the regulatory network for pulcherriminic acid synthesis and secretion in *B. licheniformis* (B). The regulation of *DegU* on *yvmB* and *yvmC* were highlighted as bold lines.

首先, 普切明酸的合成基因受到 DegU 的双重抑制。一方面, DegU 作为负调控因子与 PyvmC 直接结合并抑制其转录; 另一方面, DegU 通过促进 YvmB 的表达进一步强化了对 *yvmC-cypX* 基因簇转录的抑制作用。双重抑制强化了菌株在 DegU 磷酸化后对胞外及胞内环境中铁离子浓度的调节作用。芽胞杆菌的生物被膜的形成需要大量的铁离子^[21-22], 其中大部分铁离子存在于细胞外的生物被膜基质中, 并可以代替氧分子充当电子受体参与到芽胞杆菌的电子传递链中^[23]。DegU 兼具对生物被膜形成过程和普切明酸合成及分泌过程的调控作用, 有利于避免生物被膜形成过程中的铁离子浓度失衡。

在 DW2Δ*degU* 菌株中, 虽然 *yvmA* 的转录水平提高, 但同时普切明酸合成基因的表达也增强, 导致胞内的普切明酸积累量仍然显著增加。然而, 该状况并未对菌株的生长造成明显影响。这可能是由于胞内的普切明沉淀积累仍然较少, 或者地衣芽胞杆菌中存在着普切明酸的分解途径, 能够在胞内普切明沉淀积累过多时将其降解。但是, 目前仍然没有芽胞杆菌中普切明酸降解酶基因被发现的文献报道, 而微生物合成的其他铁离子螯合剂, 如铁载体的降解酶类已被发现广泛存在于各类铁载体合成菌株中。例如, 在芽胞杆菌中, 铁载体 bacillibactin-Fe³⁺ 复合物进入胞内后会迅速被降解酶 YuiL (BesA) 分解, 并释放出其中的 Fe³⁺^[24]。而在烟曲霉中, 铁载体镰菌素 C 的水解则是由 SidJ 蛋白完成的。SidJ 缺乏会导致镰菌素 C 在细胞内的积累增加^[25]。在具有普切明酸合成能力的梅奇酵母 (*Metschnikowia pulcherrima*) 中, Gore-Lloyd 等已经鉴定出 2 种可能的普切明酸降解产物^[7], 这表明普切明酸合成菌株具有普切明降解能力, 为解开普切明酸降解途径的面纱奠定了基

础。这也让我们有理由推测地衣芽胞杆菌中也存在着类似的普切明酸降解途径, 能够帮助其清除胞内的普切明沉淀, 并在胞外铁离子浓度降低时分解普切明释放其中的铁元素供细胞生长。

参考文献

- [1] Eid R, Arab NT, Greenwood MT. Iron mediated toxicity and programmed cell death: a review and a re-examination of existing paradigms. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 2017, 1864(2): 399–430.
- [2] Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology Molecular Biology Review*, 2007, 71(3): 413–451.
- [3] Randazzo P, Aubert-Frambourg A, Guillot A, Auger S. The MarR-like protein PchR (YvmB) regulates expression of genes involved in pulcherriminic acid biosynthesis and in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 190.
- [4] Arnaouteli S, Matoz-Fernandez DA, Porter M, Kalamara M, Abbott J, MacPhee CE, Davidson FA, Stanley-Wall NR. Pulcherrimin formation controls growth arrest of the *Bacillus subtilis* biofilm. *PNAS*, 2019, 116(27): 13553–13562.
- [5] Türkel S, Ener B. Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences*, 2009, 64: 405–410.
- [6] Sipiczki M. *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms*, 2020, 8(7): 1029.
- [7] Gore-Lloyd D, Sumann I, Brachmann AO, Schneeberger K, Ortiz-Merino RA, Moreno-Beltrán M, Schläfli M, Kirner P, Santos Kron A, Rueda-Mejia MP, Somerville V, Wolfe KH, Piel J, Ahrens CH, Henk D, Freimoser FM. Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Molecular Microbiology*, 2019, 112(1): 317–332.
- [8] Belin P, Moutiez M, Lautru S, Seguin J, Pernodet JL, Gondry M. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide

- synthase pathways. *Natural Product Reports*, 2012, 29(9): 961–979.
- [9] Cryle MJ, Bell SG, Schlichting I. Structural and biochemical characterization of the cytochrome P450 CypX (CYP134A1) from *Bacillus subtilis*: a cyclo-L-leucyl-L-leucyl dipeptide oxidase. *Biochemistry*, 2010, 49: 7282–7296.
- [10] Wang D, Zhan Y, Cai D, Li X, Wang Q, Chen S. Regulation of the synthesis and secretion of the iron chelator cyclodipeptide pulcherriminic acid in *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(13): e00262–18.
- [11] Cairns LS, Martyn JE, Bromley K, Stanley-Wall NR. An alternate route to phosphorylating DegU of *Bacillus subtilis* using acetyl phosphate. *BMC Microbiology*, 2015, 15: 78.
- [12] Belas R. When the swimming gets tough, the tough form a biofilm. *Molecular Microbiology*, 2013, 90(1): 1–5.
- [13] Tsukahara K, Ogura M. Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla/che* operon and *sacB*. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 8.
- [14] Ohsawa T, Tsukahara K, Ogura M. *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in gamma-poly-glutamic acid synthesis. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2009, 73(9): 2096–2102.
- [15] Gupta M, Rao KK. Phosphorylation of DegU is essential for activation of *amyE* expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biosciences*, 2014, 39(5): 747–752.
- [16] Cai D, Zhang B, Rao Y, Li L, Zhu J, Li J, Ma X, Chen S. Improving the utilization rate of soybean meal for efficient production of bacitracin and heterologous proteins in the *aprA*-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103: 4789–4799.
- [17] Zhu S, Cai D, Liu Z, Zhang B, Li J, Chen S, Ma X. Enhancement of bacitracin production by NADPH generation via overexpressing glucose-6-phosphate dehydrogenase Zwf in *Bacillus licheniformis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 187: 1502–1514.
- [18] Mordini S, Osera C, Marini S, Scavone F, Bellazzi R, Galizzi A, Calvio C. The role of SwrA, DegU and P(D3) in *fla/che* expression in *Bacillus subtilis*. *PLoS One*, 2013, 8(12): e85065.
- [19] Li X, Wang D, Cai D, Zhan Y, Wang Q, Chen S. Identification and high-level production of pulcherrimin in *Bacillus licheniformis* DW2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 183(4): 1323–1335.
- [20] Wang S, Wang H, Zhang D, Li X, Zhu J, Zhan Y, Cai D, Wang Q, Ma X, Wang D, Chen S. Multistep metabolic engineering of *Bacillus licheniformis* to improve pulcherriminic acid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(9): e03041–19.
- [21] Rizzi A, Roy S, Bellenger JP, Beauregard PB. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(3): e02439–18.
- [22] Rizzi A, Leroux J, Charron-Lamoureux V, Roy S, Beauregard PB, Bellenger JP. *Bacillus subtilis* modulates its usage of biofilm-bound iron in response to environmental iron availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(22): e00944–20.
- [23] Qin Y, He Y, She Q, Larese-Casanova P, Li P, Chai Y. Heterogeneity in respiratory electron transfer and adaptive iron utilization in a bacterial biofilm. *Nature Communication*. 2019, 10(1): 3702.
- [24] Miethke M, Klotz O, Linne U, May JJ, Beckering CL, Marahiel MA. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(6): 1413–1427.
- [25] Gründlinger M, Gsaller F, Schrettl M, Lindner H, Haas H. *Aspergillus fumigatus* SidJ mediates intracellular siderophore hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(23): 7534–7536.

(本文责编 张晓丽)