



基于微生物共培养的隐性基因簇激活策略

武梦^{1,2}, 刘钢^{1,2,3*}

- 1 中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101
- 2 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049
- 3 中国科学院种子创新研究院, 北京 100864

武梦, 刘钢. 基于微生物共培养的隐性基因簇激活策略. 微生物学报, 2022, 62(11): 4247–4261.

Wu Meng, Liu Gang. Co-culture strategy for activating the cryptic gene cluster in microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4247–4261.

摘要: 微生物次级代谢产物是药物先导化合物的重要源泉之一。随着测序技术的迅猛发展, 越来越多的微生物基因组得以测序完成。伴随着测序技术的进步, 生物信息学也得到了快速发展。基因组序列分析发现, 链霉菌和丝状真菌等微生物中存在大量的已知的或未知的次级代谢物生物合成基因簇(secondary metabolite-biosynthetic gene clusters, SM-BGCs)。然而, 在实验室培养条件下大部分基因簇无法表达或表达量很低, 导致难以发现这些基因簇所对应的代谢产物, 人们将这类基因簇称为“隐性基因簇”或“沉默基因簇”。通过调节基因簇中特异调控基因或基因簇外全局性调控基因的表达, 对代谢途径的定向改造, 以及将基因簇导入异源宿主等策略, 能够激活部分隐性基因簇的表达。通过激活隐性基因簇的表达, 能够发现通过常规实验室培养无法获得的具有独特生物活性的新结构代谢产物, 成为创新药物的重要来源之一。然而, 这些基因簇激活策略都严重依赖于对特定菌株或宿主的遗传操作。近年来, 通过模拟自然混合培养中微生物间相互作用, 开发了通过混合特定微生物菌株在厌氧或好氧条件下激活隐性基因簇的方法, 称之为共培养激活策略。这种策略不依赖于基因组信息, 也不依赖于对特定菌株或宿主的遗传操作技术, 具有操作简单和方便的优点。共培养策略需要混合培养的不同微生物具有相似的生长速度以及不能够产生拮抗等要求, 因而也部分限制了该策略的应用。近期合成微生物组学的出现有可能改变这一限制, 使共培养策略得到更加广泛的应用。本文围绕微生物共培养体系和应用、基于共培养策略的产物挖掘以及可能的激活机制等进行了综述。

关键词: 微生物共培养; 隐性基因簇激活; 微生物间相互作用; 激活机制; 合成微生物组学

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100600)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100600)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64806017; E-mail: liug@im.ac.cn

Received: 29 April 2022; Revised: 25 June 2022; Published online: 15 July 2022

Co-culture strategy for activating the cryptic gene cluster in microorganisms

WU Meng^{1,2}, LIU Gang^{1,2,3*}

1 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 College of Life Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 The Innovative Academy of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China

Abstract: Microbial secondary metabolites are the rich sources of lead compounds. With the booming of genome sequencing techniques, increasing microbial genomes have been sequenced and the corresponding bioinformatics has also developed rapidly. Based on the bioinformatics analysis, a large number of secondary metabolite-biosynthetic gene clusters (SM-BGCs) have been discovered in filamentous microorganisms such as *Streptomyces* and filamentous fungi. However, most of SM-BGCs are dormant or silent under the conventional culture conditions with their corresponding metabolites difficult to be detected, which are regarded as cryptic or silent gene cluster. Through manipulation of the specific regulatory genes in the cluster or global regulatory genes outside the cluster, reconstruction of the metabolic pathways and heterologous expression in other species can activate the expression of cryptic gene clusters. Through activating expression of the cryptic gene clusters, researchers can discover new structural metabolites with unique bioactivities that cannot be obtained through conventional laboratory culture. Activating the cryptic gene clusters is a key approach to produce lead compounds. However, such activation strategies are heavily dependent on the genetic manipulation of the specific strains. Recently, researchers employ co-culture of specific microbial strains under anaerobic or aerobic conditions to activate the cryptic SM-BGCs by mimicking the microbial interactions occurring in natural environments. This strategy does not rely on the genomic information or the genetic manipulation of target strains, and it has the advantage of easy operation. The co-culture strategy requires that the different microorganisms in the mixed culture have similar growth rates and no antagonistic interaction, which partially limits its application. Emergence of the synthetic microbiomes may overcome this limitation and make the co-culture strategy more widely used in future. Here, we overviewed the co-culture systems and applications, the mining of natural products specifically produced in microbial co-culture, and the possible mechanisms underlying this phenomenon.

Keywords: microbial co-culture; activation of cryptic gene cluster; microbial interactions; activation mechanism; synthetic microbiomes

包括真菌和细菌在内的微生物不仅种类繁多,而且分布广泛。微生物与人类的生产和生活息息相关,同时还是活性天然产物的重要来源,特别是在药物发现方面具有重要意义^[1]。

从 20 世纪 40 年代开始人们陆续从土壤微生物中发现了大量的抗感染、抗肿瘤,以及具有免疫抑制活性的化合物。近年来,利用传统方法从土壤微生物中筛选新结构化合物越来越困

难, 研发管道逐渐枯竭。其原因主要是相似的土壤环境导致微生物产生相似的次级代谢产物, 重复筛选率特别高。基因组测序信息显示, 微生物中蕴藏的次级代谢产物生物合成基因簇 (secondary metabolite-biosynthetic gene clusters, SM-BGCs) 数量远高于实际分离得到的次级代谢产物数量^[2]。因此, 微生物仍有极大的潜能产生更多结构新颖和活性各异的次级代谢产物。研究发现, 大量的微生物 SM-BGCs 在常规培养条件下不表达或表达量很低, 代谢产物难以检测, 这些基因簇被称为“隐性基因簇”或“沉默基因簇”^[2-3]。为挖掘新结构化合物, 研究人员陆续开发了转录调控、表观遗传调控、异源表达和单菌多化合物 (one strain many compounds, OSMAC) 等多种方法用于激活这些隐性基因簇 (图 1)。对微生物基因组中特定 SM-BGCs 遗传改造是常用的策略, 通过该策略可以定向激活隐性基因

簇并获得新结构代谢产物, 同时也能够显著提高目标产物的产量, 该策略包括阻断负调控基因、增强正调控基因的转录, 替换限速酶编码基因的启动子, 以及扩增基因簇拷贝数等^[4]。异源表达是微生物次级代谢物挖掘的另一种常用策略, 利用不同微生物细胞生理代谢以及遗传背景的不同, 可以激活隐性基因簇获得新结构代谢产物, 通常利用易于操作、遗传背景清楚的模式微生物来开展异源表达研究。然而, 不管是对特定 SM-BGCs 的遗传改造还是异源表达都需要基因簇的准确信息, 同时依赖于对菌株的遗传操作。微生物共培养激活策略则不依赖于基因簇信息和菌株的遗传操作, 目前在微生物代谢产物挖掘中已崭露头角^[3]。

本文将围绕微生物共培养体系的建立和应用、微生物共培养产物的分离和检测, 以及可能的隐性基因簇激活机制等进行综述。

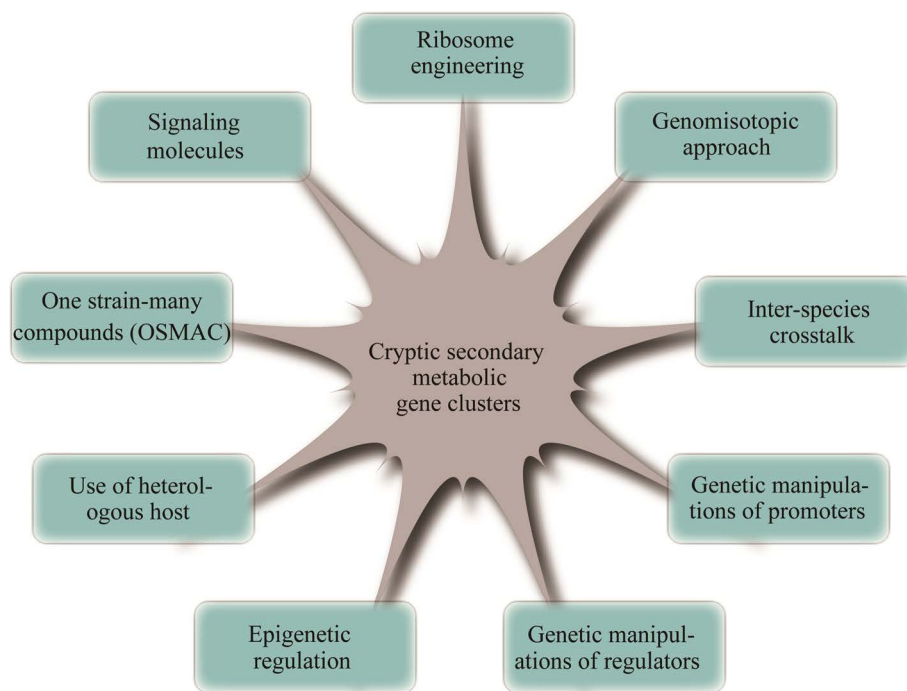


图 1 微生物隐性基因簇激活策略

Figure 1 Strategies for activating the cryptic gene clusters of microorganism.

1 微生物共培养体系的建立和应用

微生物共培养是指模拟天然混合培养中微生物间相互作用,将特定的两种或多种微生物在有限的环境中(厌氧或好氧条件)共同培养。在自然环境中,不同微生物间存在复杂的相互作用,这其中产生的种类繁多的次级代谢产物不仅作为物种间交流信号,还为构成这一群落的不同物种的生长提供了竞争优势。研究发现同种或不同种微生物间存在广泛的相互作用,并在不同层次(如复制、转录、翻译和代谢等)调控该生命共同体的活动^[5]。实际上,微生物产生的多种次级代谢产物都会参与转录调节和表观遗传修饰等活动。研究发现烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)与雷帕链霉菌(*Streptomyces rapamycinicus*)共培养能够激活烟曲霉中由表观遗传控制的隐性基因簇,产生一种不常见的丁烯基多酚^[6]。微生物共培养还可能导致基于竞争的适应进化并激活相应隐性基因簇的表达^[7],甚至导致整个基因片段的交换(水平基因转移),从而产生以前未发现的新结构化合物^[8]。因此,通过模拟自然界微生物间的相互作用,共培养不失为一种行之有效的通过激活隐性基因簇来挖掘新结构代谢产物的方法。

近期, Wakefield 等^[9]将烟曲霉与链霉菌(*Streptomyces* sp.)共同培养,产生了新化合物 luteoride D 和 pseurotin G。Anjum 等^[10]将从海底淤泥样品中获得的两种细菌 *Janthinobacterium* spp. 菌株共培养,诱导产生了两种罕见的聚酮化合物 janthinopolyenemycin A 和 B。在过去的 10 年里,广州的几个研究小组从海洋来源的不同真菌共培养产生的次级代谢产物中发现了一系列结构新颖和活性良好的化合物^[11-13]。

1.1 微生物共培养中的固体和液体培养体系

由于培养条件直接影响微生物次级代谢产

物的产生,因此培养条件的选择对于微生物共培养来说就尤为关键。通常培养基的选择取决于拟培养微生物的类型,丝状真菌通过菌丝延伸确保其生长,而细菌则是附着在培养基表面。由于自然状态下无法直接研究物种间存在的复杂相互作用,因此研究者需在可控条件下研究其相互作用,无论是选择固体培养基或是液体培养基,培养条件必须对参与共培养的双方菌株都适用^[3]。

真菌能够利用菌丝生长来获取更多的营养区域,因此非常适合在固体培养基上生长和分化。从固体琼脂平板的共培养实验中观察到,两种真菌的相互作用可导致 4 种主要的“相互作用类型”,分别是距离抑制(distance inhibition)、区域线(zone lines)、接触抑制(contact inhibition)和覆盖生长(over growth)^[14]。利用真菌在固体基质上的形态变化,可以准确定位发生代谢物诱导的区域。然而,固体培养通常在培养皿规模上进行,这种培养条件下只能提取有限的代谢产物^[15]。因此固体培养通常作为研究真菌间相互作用的初步筛选方法。

在液体培养条件下不同种类微生物的共培养被称为混合发酵。混合发酵能够使微生物菌株充分接触,增强了细胞间的交流,是增加天然产物库的有效途径^[16]。在液体介质中,很难研究不同微生物之间相互作用的方式,但可以监测天然产物的诱导,这就需要高效的检测分析手段。目前混合发酵的共培养方式已经广泛应用在不同微生物的代谢研究中。

除了通过液体混合培养不同微生物寻找新化合物外,固体培养策略也被用来挖掘更多的新型次级代谢产物^[17]。因为固体培养条件与液体培养条件不同,有可能会刺激微生物产生不同的次级代谢产物。此外,固体培养在检测天然产物产生方面具有简便、灵活和低成本的优势。

点。但是, 利用固体培养基大规模生产共培养物仍然是一个相当复杂的过程, 如果需要将规模扩大到工业生产, 使用纯菌株和混合发酵的技术仍然至关重要^[3]。

1.2 微生物共培养的菌株体系

近年来, 共培养在微生物代谢产物挖掘方面得到了广泛应用, 并获得了大量新结构代谢产物, 逐渐成为微生物次级代谢产物挖掘的新途径。微生物共培养体系涉及真菌与真菌之间、真菌与细菌之间及细菌与细菌之间的共培养等。

1.2.1 真菌与真菌的共培养

两个紧密相连的真菌菌落可以通过不同的方式相互作用, 特别是共生作用和竞争作用, 甚至可以从一种相互作用类型转换为另一种相互作用类型。在密闭空间中, 由于营养和空间都非常有限, 真菌种内或种间在近距离生长或者物理接触后都会产生竞争现象^[18]。真菌菌落间会通过水溶性或挥发性的分子进行信号传递以及相互作用, 同时菌丝间的物理接触也是刺激产生新结构代谢产物的前提, 有时还会伴随着菌丝顶端细胞的死亡。真菌间相互作用导致产生多种胞外代谢产物, 特别是酚类和醌类等化合物。近年来, 在木腐菌中发现了大量的次级代谢产物和参与相关代谢的各种酶^[19]。木腐菌的次级代谢产物可以作为其他真菌生长的抑制剂或刺激剂。在共培养条件下, 相互竞争的

真菌可以形成与纯培养在形态上不同的区域线, 这些区域在颜色上的变化暗示发生了显著的代谢活动, 因此可以用来寻找新的代谢产物^[20]。例如, 将分离自一株染病的葡萄植株上的两种真菌 (*Eutypa lata* 和 *Botryosphaeria obtusa*) 在固体培养基上共培养, 发现了具有抗真菌、抗细菌, 以及植物毒素活性的新化合物 *O*-methymllelin (**1-4**, 表 1)^[21]。

1.2.2 细菌与细菌的共培养

细菌通常以种群的方式存在于微生态中, 多个细菌紧密相互作用并在特定生存环境中利用有限的营养生长和繁殖。利用细菌与细菌间的相互作用, 通过两种不同种类的细菌菌株进行共培养能够成功激活一些隐性基因簇, 发现具有生物活性的新结构天然产物。例如, 利用链霉菌 (*Streptomyces* sp.) 菌株与肺冢村氏菌 (*Tsukamurella pulmonis*) 共培养产生了丁烯羟酸内酯 (**5-7**, 表 1)^[22]。将来源于海洋无脊椎动物的红球菌 (*Rhodococcus*) 和小单孢菌 (*Micromonospora*) 共培养产生了蒽环类抗生素 (**8**, 表 1)^[23]。利用从韩国滩涂获得的链霉菌与芽胞杆菌 (*Bacillus* sp.) 共培养产生了新的环状六肽化合物 dentigerumycin E (**9**, 表 1)^[24]。最近发现, 与产生分支菌酸的细菌 (mycolic-acid-containing bacteria, MACB) 共培养, 能够激活多种放线菌中的隐性基因簇, 目前利用该策略已经成功从 12 种放线菌中挖掘到 33 个新结构代谢产物^[25]。

表 1 通过微生物共培养获得的次级代谢产物

Table 1 Secondary metabolites obtained by microbial co-culture

Co-culture system	Microorganisms in co-culture	Compounds obtained by microbial co-culture	References
Fungal communities	<i>Eutypa lata</i> / <i>Botryosphaeria obtusa</i>	1-4	[21]
Bacterial communities	<i>Streptomyces</i> sp./ <i>Tsukamurella pulmonis</i>	5-7	[22]
	<i>Rhodococcus</i> / <i>Micromonospora</i>	8	[23]
	<i>Streptomyces</i> sp./ <i>Bacillus</i> sp.	9	[24]
Bacterial-fungal communities	<i>Pestalotia</i> sp./ <i>Thalassospira</i> sp.	10-11	[26]
	<i>Libertella</i> sp./ <i>Thalassospira</i> sp.	12-15	[27]

1.2.3 真菌与细菌的共培养

从土壤到动物体表,从植物根际到动物口腔或肠道,乃至人的体表和口腔等各种生态环境中都广泛存在真菌和细菌的混合群落。与真菌群落、细菌群落相比,这种真菌与细菌的混合群落更复杂、样式更丰富。这种混合群落中个体和群落的互作和组合方式可能超乎人们的想象。借鉴自然环境中真菌与细菌的共生现象,微生物共培养研究早期也都集中在真菌和细菌之间。在海洋真菌 *Pestalotia* sp. 和海洋细菌 *Thalassospira* sp. 共培养过程中发现了第 1 个共培养产物 pestalone (10–11, 表 1)^[26]。随后通过海洋真菌 *Libertella* sp. 与 *Thalassospira* sp. 共培养又发现了一系列二萜类化合物 libertellenones (12–15, 表 1)^[27]。目前,真菌与细菌的共培养已经成为激活沉默基因簇、诱导产生次级代谢产物的最为活跃的领域之一。

2 通过微生物共培养所获得的代谢产物类型

微生物所具有的海量的 SM-BGCs 表明,微生物在挖掘次级代谢产物方面仍有巨大的潜力。通过微生物共培养分离得到的新型代谢产物结构多种多样。其中大部分次级代谢产物都与聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)和非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)密切相关(图 2)。

2.1 聚酮类化合物

聚酮是微生物产生的最常见的次级代谢产物,如红霉素和阿维菌素等都属于聚酮类化合物。聚酮类化合物是由简单羧酸(如乙酸和丙二酸等)通过类似于脂肪酸的合成方式,经聚酮合酶(PKS)连续缩合而成的一大类结构和生理功能各异的化合物。基因组序列分析表明微生物中存在大量的 PKS 生物合成基因簇,但大部分在常规培养条件下几乎不表达。通过微生物共

培养的方式,能够激活部分隐性的 PKS 基因簇,诱导聚酮的产生。例如,在共培养条件下,构巢曲霉(*A. nidulans*)被诱导产生 2,4-二羟基苯甲酸衍生物以及其二聚体(16–19, 表 2)^[28]。在淡色生赤壳菌(*Bionectria ochroleuca*)和红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)的共培养物中,鉴定出 2,4-二羟基苯甲酸磺化的三聚体类似物(20, 表 2)^[14]。在烟曲霉与细菌的共培养物中鉴定出聚酮 fumicyclines A 和 fumicyclines B (21–22, 表 2)^[6]。在黄色镰孢菌(*Fusarium culmorum*)和细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)的共培养过程中,观察到了玉米烯酮(ZON)产量的上调^[29]。此外,通过共培养策略还发现了具有特殊结构特征的多种聚酮化合物,包括芳香单环化合物、线性骨架和芳香多环等^[3]。

2.2 非核糖体肽类化合物

非核糖体肽是微生物产生的另外一类重要的次级代谢产物,包括人们所熟知的青霉素和头孢菌素等抗感染药物。非核糖体肽生物合成不依赖于核糖体而是基于硫醇模板的组装路线,合成过程包括将多种氨基酸(包括非蛋白质来源的氨基酸及其衍生物)在非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)催化下缩合,形成具有丰富的结构类型及良好活性的化合物。在共培养条件下,一些隐性的 NRPS 基因簇被激活,并诱导产生新结构化合物。例如,将 2 种不同的镰孢菌(*Fusarium*)共培养能够诱导产生两种缩肽类化合物 subenniatins A 和 B (23–24, 表 2)^[30]。烟曲霉和解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) GA40 共培养,产生了脂肽伊枯草菌素(25–27, 表 2)^[31]。不仅如此,科学家们在 21 世纪早期也发现了顶孢霉菌(*Acremonium*)和红丝疣孢霉(*Mycogonerosea*)共培养能够产生新型的脂氨基酸 acremostatins A、B 和 C^[3]。

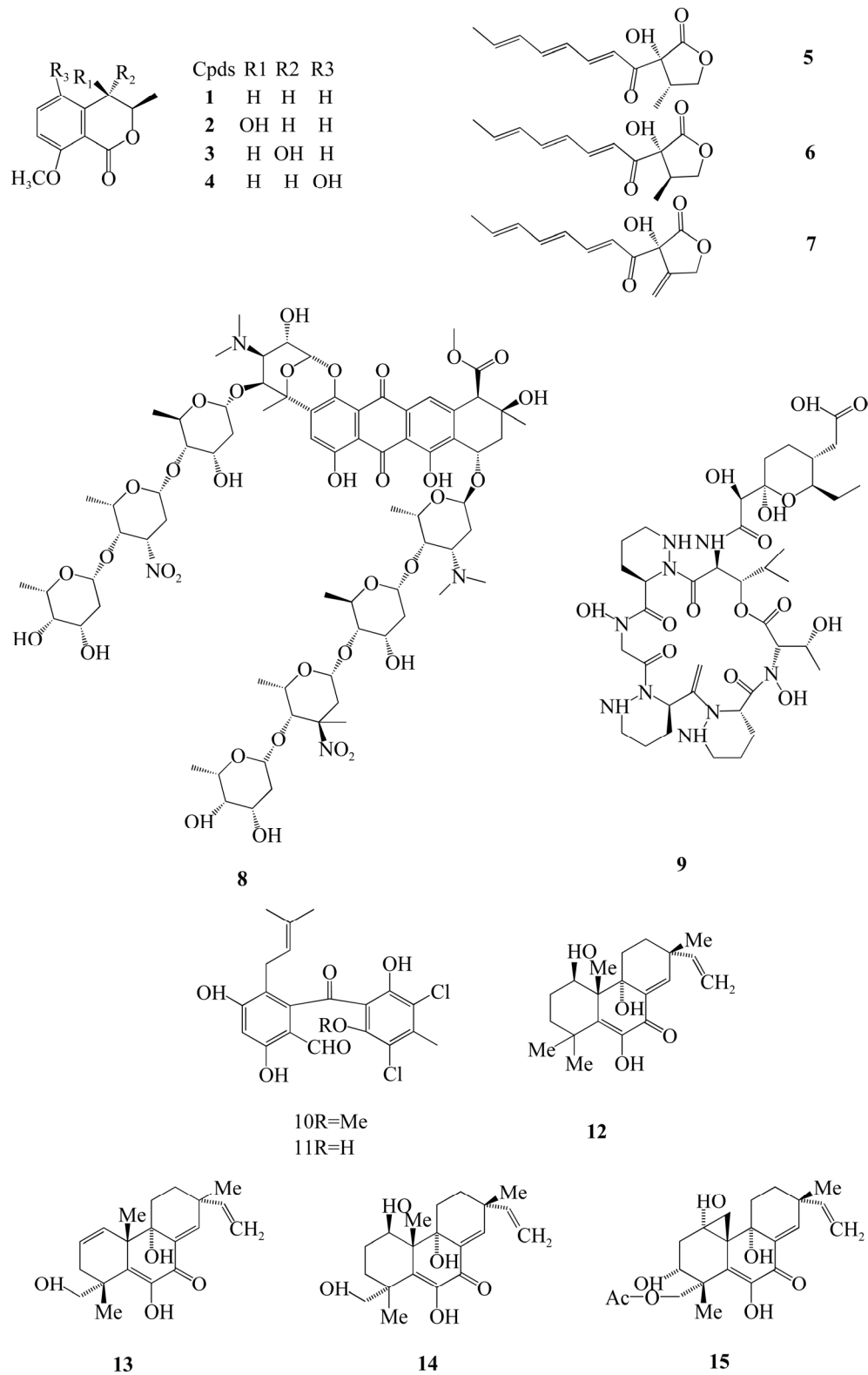


图 2 通过微生物共培养获得的部分次级代谢产物

Figure 2 Structures of some secondary metabolites (SMs) obtained by the microbial co-culture strategy.

两种不同种的曲霉共培养过程中能够激活 NRPS-PKS 杂合基因簇, 诱导产生细胞松弛素^[3]。同样, 烟曲霉与弱小链霉菌(*Streptomyces bullii*)共培养激活产生了肽类化合物特特拉姆酸(28, 表 2)^[3]。研究显示, 激活 PKS-NRPS 基因簇还是 pseurotin 类化合物生物合成所必需的^[32]。

2.3 其他类型化合物

除 PKS 与 NRPS 外, 隐性基因簇的激活还可以导致萜烯化合物的产生。镰孢菌和链格孢菌(*Alternaria*)混合发酵能够产生倍半萜类化合物, 不同混合发酵环境产生的二萜^[3](29–30), 与弱小链霉菌混合发酵的烟曲霉能够产生三萜类化合物(31, 表 2)。此外, 微生物共培养还可以诱导产生多种生物碱、游离脂肪酸(32–33)和糖苷(34–35)类化合物(表 2)^[3]。

通过微生物共培养诱导产生的化合物种类并无明确的倾向, 这可能与目前微生物相互作用的研究不足和用于研究的微生物物种多样性低有关。与基因操作手段相比, 共培养似乎既可以激活特定的基因, 又可能会诱导各种无关途径产生非特定的代谢产物^[3]。因此, 共培养可以被认为是一种非靶向的基因激活方法, 从

而产生结构多样的次级代谢产物。

3 微生物共培养的机制研究

尽管通过微生物共培养可以激活很多隐性基因簇, 但是实现这一目标的分子机制迄今仍知之甚少。目前, 对于通过共培养激活隐性基因簇分子机制的研究主要集中在物种间通过信号分子传递产生的互作以及物种间对营养的竞争等方面(图 3)。

微生物共培养通过物种间的信号分子促进细胞间的交流, 并从而影响细胞内次级代谢产物的产生过程(图 4)。在自然环境下, 由于铁离子的不溶性, 细胞对铁的利用率非常有限。为应对这一情况, 不同微生物细胞具有合成并分泌多种铁载体的能力, 通过螯合铁离子以供自身生长发育所需。因此近年来, 铁载体、离子载体在共培养机制研究中备受关注。例如, 共培养过程处于铁限制的条件下, 黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*)产生的铁载体螯合铁离子能力要强于天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*), 而天蓝色链霉菌感知到胞内铁离子水平的降低从而开始大量合成放线紫红素^[33]。此外, 田无链霉菌

表 2 通过微生物共培养获得的次级代谢产物类型

Table 2 Types of secondary metabolites obtained by microbial co-culture

Types of secondary metabolites	Microorganisms in co-culture	Induced metabolites	References
Polyketides	<i>Aspergillus nidulans</i> / <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	16–19	[28]
	<i>Bionectria ochroleuca</i> / <i>Trichophyton rubrum</i>	20	[14]
	<i>Aspergillus fumigates</i> / <i>Streptomyces rapamycinicus</i>	21–22	[6]
Non-ribosomal peptides	<i>Fusarium tricinctum</i> / <i>Fusarium begoniae</i>	23–24	[30]
	<i>Aspergillus fumigates</i> / <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GA40	25–27	[31]
	<i>Aspergillus fumigates</i> / <i>Streptomyces bullii</i>	28	[3]
Others	<i>Streptomyces cinnabarinus</i> PK209/ <i>Alteromonas</i> sp. KNS-16	29	[3]
	<i>Paraconiothyrium</i> SSM001/ <i>Alternaria</i>	30	[3]
	<i>Aspergillus fumigatus</i> MBC-F1-10/ <i>Streptomyces bullii</i>	31	[3]
	<i>Paraconiothyrium variabile</i> / <i>Fusarium oxysporum</i>	32	[3]
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ITGP14/ITGP17 and ITGP23	33	[3]
	<i>Rhodococcus fascians</i> / <i>Streptomyces padanus</i>	34–35	[3]

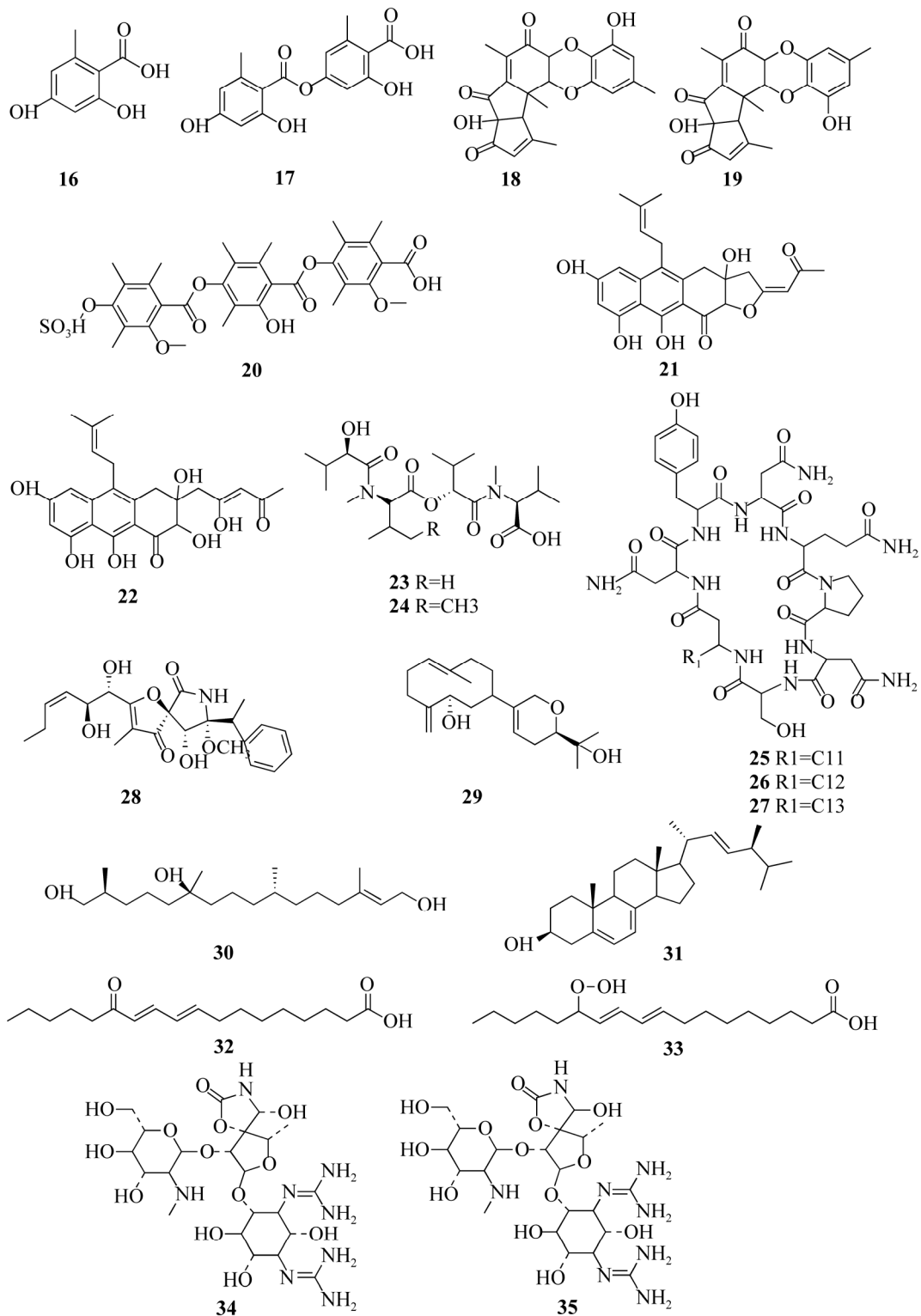


图3 通过微生物共培养获得的次级代谢产物类型

Figure 3 Structures of the different types of compounds obtained by activating the cryptic gene clusters through the microbial co-culture strategy.

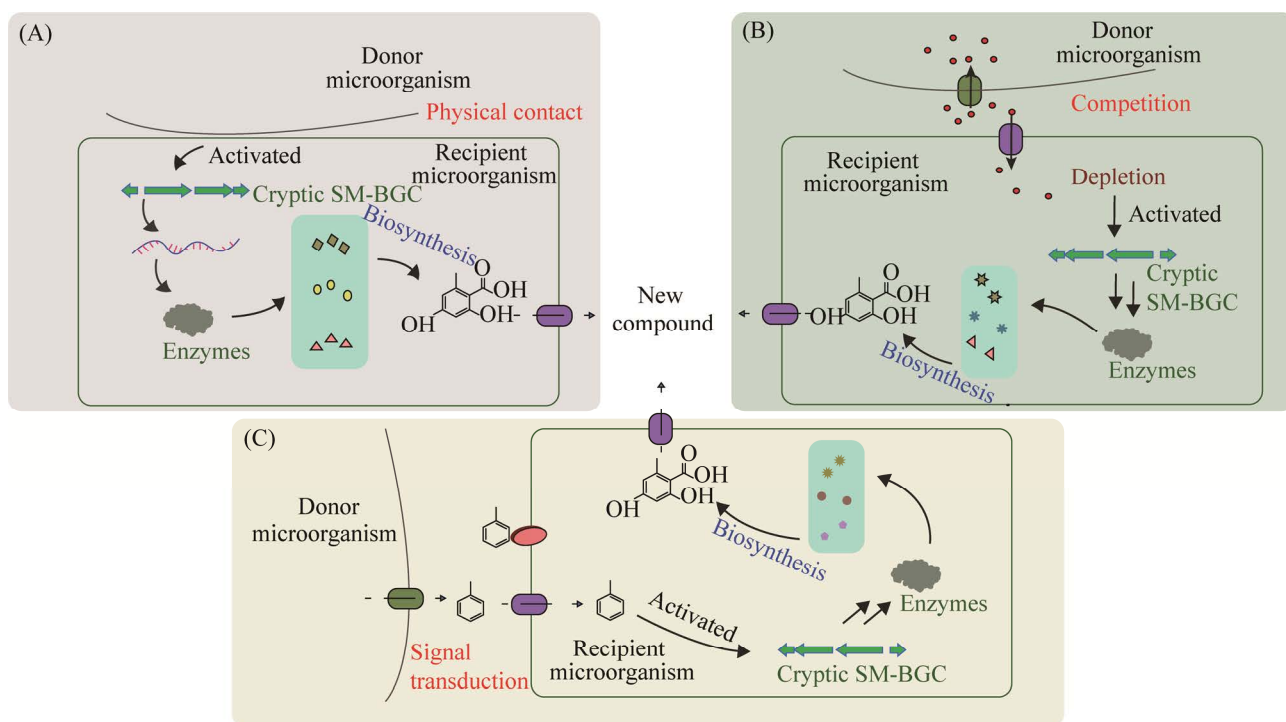


图 4 共培养激活隐性基因簇可能的分子机制

Figure 4 Putative molecular mechanisms of activating the cryptic gene clusters through the microbial co-culture strategy. A: activation of the cryptic gene clusters through the direct physical contact of different microorganisms in the environment; B: activation of the cryptic gene clusters caused by nutritional deficiency through competition of different microorganisms in the same niche; C: activation of the cryptic gene clusters through signal transduction of different microorganisms in the environment.

(*Streptomyces tanashiensis*)本身不能产生铁载体, 当与产生去铁敏(desferrioxamine)的灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)近距离培养时, 其生长发育明显加速^[34]。然而也有研究显示, 由于去铁敏的存在, 一些细菌的生长受到明显抑制^[35]。推测这可能是因为缺乏去铁敏合成能力的不同细菌利用铁离子的机制不同导致的。天蓝色链霉菌与其他不同放线菌共培养产生的化合物大多是独特的, 至少包括 12 种具有不同长度酰基侧链的去铁敏, 这可能是邻近菌株产生的不同铁载体刺激了天蓝色链霉菌产生不同结构的去铁敏^[36]。在链霉菌中发现的离子载体 promomycin 本身具有抗菌活性, 同时还能够刺激一些链霉菌产生抗生素^[37]。莫能菌素(monensin)是一种离子载

体, 被广泛用于防治鸡球虫病, 同时也可以刺激其他链霉菌产生抗生素^[38]。尽管离子载体的诱导机制并不清楚, 但可以确定的是离子载体可以诱导常规培养条件不产生的一些抗生素。此外, ATP 合成抑制剂也具有刺激微生物产生不同抗生素的潜能^[34]。天蓝色链霉菌 M1146 代谢产物能够激活紫色色杆菌 CV31532 中紫色杆菌素的产生, 进一步研究发现来自链霉菌的群感应信号分子 γ -丁酸内酯能够识别紫色色杆菌的群感应信号受体, 从而激活次级代谢产物紫色杆菌素的产生^[39]。

研究发现, 各种化学抑制剂 HDAC 抑制剂、SAHA 和 HAT 抑制剂分别激活或抑制构巢曲霉 *ore* 基因簇的转录, 这表明靶向激活或失活相应

染色质修饰物可以改变真菌中的次级代谢物产生, 并且染色体重构在次级代谢产物生物合成基因簇表达调控中发挥重要作用。Nützmann 等证明了乙酰化在微生物相互作用中起着至关重要的作用, 在构巢曲霉和雷帕链霉菌相互作用中, *ors* 基因簇表达的调节主要依赖于组蛋白乙酰转移酶 GcnE 的活性及其组蛋白 H3K9 和 H3K14 的乙酰化活性, 而这是由于与雷帕链霉菌的物理接触引起的^[40]。

在某些情况下, 沉默途径的激活还需要第 2 种微生物的存在, 单独的代谢产物(灭活的细胞, 无细胞的上清液或提取物)并不总是足以诱导次级代谢物的产生, 细胞间相互作用是次级代谢物产生的必要条件, 这可能与营养竞争、拮抗等微生物间互作有关(见图 4)。Hoshino 等发现含有分支菌酸的细菌(MACB)能使变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)产生色素^[25]。然而将 MACB 的上清培养液加入到变铅青链霉菌中, 以及在两种菌没有物理接触的条件下, 均不产生色素。另外, 色素只在两种菌接触线处产生, 这暗示了菌株的物理接触是必要的而不是简单的化学物质交换。烟曲霉与雷帕链霉菌混合发酵过程中产生了 fumicyclines, 而单独培养雷帕链霉菌并不能产生该类化合物^[6]。此外, 发现构巢曲霉与特定放线菌物理接触也能够激活隐性基因簇, 并导致苔色酸的产生^[41]。值得注意的是, MACB 的代谢产物也使某些放线菌产生了次级代谢产物^[23]。最新研究表明, 在真菌中 VeA (VeA1)功能的部分丧失对共培养引发的化学信号转导至关重要, 构巢曲霉与石斛附球菌共培养激活了 VelB-VeA1-LaeA 复合体, 随后诱导了 ScIB 的表达, 最终激活了沉默的 *pkf* 生物合成基因簇, 并导致了隐性 SMs 的发现。该文探索了不同真菌共培养过程中应答和交流的机制, 为通过真菌共培养策略挖掘新结构代

谢产物提供了理论基础^[42]。此外, 次级代谢产物的产生也与营养环境有关。在某些条件下, 营养不良的培养基中抗生素的产生和孢子的形成更加活跃。类似地, 在共培养实验中, 较小体积的生长培养基诱导产生的代谢物数量也更多^[3]。

4 共培养物中次级代谢产物的检测

微生物共培养涉及到两个甚至多个物种的生长和互作, 所产生的代谢产物较单一物种更为复杂。同时共培养的条件也会显著影响次级代谢物的产生, 不同的培养条件乃至不同的培养时间, 次级代谢产物都可能存在显著差别。因此, 有效的代谢产物分离和检测尤为重要。在某些情况下, 观察到的代谢物能够使用简单的监控方法, 如薄层色谱法或高效液相色谱法就可以轻松检测; 而当没有观察到代谢物明显的改变, 敏感的代谢组学方法以及先进的数据挖掘则是必要的^[43]。近年来, 色谱技术、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)检测等的快速发展, 多种技术的联用, 如 HPLC-UV、GC-FID、HPLC-MS 和 GC-MS 等, 极大提升了新结构化合物的发现能力^[3]。基于代谢产物数据库的代谢组学的发展也为监测微生物共培养物中代谢产物种类和变化提供了有效手段, 靶向代谢组学和非靶向代谢组学等也开始在微生物共培养体系中得到应用。米曲霉(*Aspergillus oryzae*)与鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)是食品发酵行业经常使用的菌株, Liu 等利用超高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱(UPLC-QTOF-MS)解析了当两种微生物混合培养时次级代谢产物的变化, 进一步提升了米曲霉和鲁氏酵母的发酵潜力^[44]。然而微生物共培养是一个动态过程, 其中不同微生物的生长速度、代谢变化等都不一样, 目前还难以对代谢产物进行实时监测, 尤其是对产量不高的次级

代谢产物。此外，对于通过共培养产生的新结构代谢产物也需要提升现有的检测技术或建立新的技术方法。

5 展望

次级代谢产物的生物合成是一个极其耗能的过程，必然也受到生命体复杂调控网络的严格控制，以响应自然环境中各种生物胁迫和非生物胁迫。然而，在实验室常规培养条件下，由于缺乏天然的环境刺激，微生物中的大多数 SM-BGCs 不表达或低水平表达。近年来，研究人员为激活这些隐性基因簇尝试了不同的方法，包括转录调控、表观遗传调控、异源表达和共培养等策略。核糖体工程是激活隐性基因簇的一种常用手段^[4]。我们课题组在链霉菌中发现核糖体成熟因子 RimpP 编码基因的缺失能够显著促进放线紫红素和杰多霉素等多种抗生素产量的提高^[45]。通过敲除无花果拟盘多毛孢 iso-A82775C 的生物合成基因簇中的 *iaceE* 基因，使代谢流发生改变，获得了一系列 chloropestolide 类新结构化合物^[46]。从罗杰氏无性穗霉中克隆了 verticillin 生物合成基因簇并推测了该化合物的合成途径，通过对该基因簇中关键基因阻断等获得了一系列具有良好活性的新结构硫代二酮哌嗪类化合物^[47-48]。虽然这些工作都能够激活隐性基因簇，并获得新结构代谢产物，但都依赖于对菌株的定向改造，费时耗力。因而，上述策略很难应用于缺乏完善基因组信息和遗传操作手段的微生物。

通过模拟自然环境，混合培养两种或两种以上的微生物是激活隐性基因簇的有效策略。这种方式不依赖于基因组信息和遗传操作技术。通过共培养来自海洋和陆地的微生物，如真菌和真菌、真菌和细菌、细菌和细菌都成功发现了新结构次级代谢产物，所发现的次级代

谢产物的类型不仅仅局限在聚酮类和非核糖体肽类化合物中，还涉及萜烯和生物碱等其他化合物。然而，由于参与微生物间交流的分子结构的复杂性，隐性基因簇的激活存在不确定性，从而也导致揭示通过物种相互作用激活隐性基因簇的机制研究受到限制。利用宏基因组的方法，通过系统学分析获得微生物的遗传多样性和分子生态信息，可以促进微生物群落的相互作用以及隐性基因簇激活机制的研究。

进入 21 世纪，合成生物学与微生物组学发展迅速，交汇融合形成合成微生物组学。合成微生物组学与传统的多菌株培养不同，代谢通路经过模块化设计、改造与优化，实现代谢功能，具有很强的目的性^[49]。近年来，共培养策略的研究成果快速增长，但绝大多数共培养体系都是由两种不同的微生物组成，多菌株的共培养体系屈指可数。在共培养体系中，各菌株需要保持恒定生长率，确保菌株共存和体系稳定。如果不加以限制，快速增长的微生物就会取代体系中的其他微生物，造成“一家独大”的现象，最终限制新型次级代谢产物的发现^[50]。由于微生物代谢产物的复杂性以及产量相对较少，产物的鉴定和分析极具挑战。因此，开发更为高效的代谢分析工具将有助于研究微生物间的相互作用。

研究表明，与纯菌株培养物相比，相应的共培养物的提取物具有更高的抗菌活性^[3]。迄今为止，微生物共培养获得的骨架分子多为已知代谢物的衍生物，很少有新颖骨架结构。虽然多数衍生物与其他已知代谢物在生物活性方面尚未发现明显差异，但是也有一些代谢物表现出不同的生物活性。综上所述，微生物共培养具有产生新化合物的巨大潜力，是一种简便易行的微生物次级代谢产物挖掘的方法。

参考文献

- [1] Lam KS. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(6): 279–289.
- [2] Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2016, 43(2/3): 155–176.
- [3] Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(6): 1180–1204.
- [4] Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu GQ, Tan HR. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2013, 77(1): 112–143.
- [5] Ahuja I, Kissen R, Bones AM. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(2): 73–90.
- [6] König CC, Scherlach K, Schroeckh V, Horn F, Nietzsche S, Brakhage AA, Hertweck C. Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem*, 2013, 14(8): 938–942.
- [7] Charusanti P, Fong NL, Nagarajan H, Pereira AR, Li HJ, Abate EA, Su YX, Gerwick WH, Palsson BO. Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33727.
- [8] Kurosawa K, Ghiviriga I, Sambandan TG, Lessard PA, Barbara JE, Rha C, Sinskey AJ. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(4): 1126–1127.
- [9] Wakefield J, Hassan HM, Jaspars M, Ebel R, Rateb ME. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1284.
- [10] Anjum K, Sadiq I, Chen L, Kaleem S, Li XC, Zhang ZZ, Lian XY. Novel antifungal janthinopolyenemycins A and B from a co-culture of marine-associated *Janthinobacterium* spp. ZZ145 and ZZ148. *Tetrahedron Letters*, 2018, 59(38): 3490–3494.
- [11] Li CY, Ding WJ, Shao CL, She ZG, Lin YC. A new diimide derivative from the co-culture broth of two mangrove fungi (strain no. E33 and K38). *Journal of Asian Natural Products Research*, 2010, 12(9): 809–813.
- [12] Li CY, Cox D, Huang S, Ding WJ. Two new cyclopeptides from the co-culture broth of two marine mangrove fungi and their antifungal activity. *Pharmacognosy Magazine*, 2014, 10(40): 410.
- [13] Li CY, Wang JH, Luo CP, Ding WJ, Cox DG. A new cyclopeptide with antifungal activity from the co-culture broth of two marine mangrove fungi. *Natural Product Research*, 2014, 28(9): 616–621.
- [14] Bertrand S, Schumpp O, Bohni N, Bujard A, Azzollini A, Monod M, Gindro K, Wolfender JL. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1292: 219–228.
- [15] Bertrand S, Schumpp O, Bohni N, Monod M, Gindro K, Wolfender JL. *De novo* production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(6): 1157–1165.
- [16] Brakhage AA, Schroeckh V. Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48(1): 15–22.
- [17] Zahn JA, Higgs RE, Hilton MD. Use of direct-infusion electrospray mass spectrometry to guide empirical development of improved conditions for expression of secondary metabolites from actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 377–386.
- [18] Falconer RE, Bown JL, White NA, Crawford JW. Modelling interactions in fungi. *Journal of the Royal Society Interface*, 2008, 5(23): 603–615.
- [19] Chen QH, Krügener S, Hirth T, Rupp S, Zibek S. Co-cultured production of lignin-modifying enzymes with white-rot fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(2): 700–718.
- [20] Bohni N, Schumpp O, Schnee S, Bertrand S, Gindro K, Wolfender JL. Targeted isolation of induced and bioactive metabolites from fungal co-cultures. *Planta Medica*, 2013, 79(13): 1118.

- [21] Glauser G, Gindro K, Fringeli J, De Joffrey JP, Rudaz S, Wolfender JL. Differential analysis of mycoalexins in confrontation zones of grapevine fungal pathogens by ultrahigh pressure liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and capillary nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(4): 1127–1134.
- [22] Hoshino S, Wakimoto T, Onaka H, Abe I. Chojalactones A–C, cytotoxic butanolides isolated from *Streptomyces* sp. cultivated with mycolic acid containing bacterium. *Organic Letters*, 2015, 17(6): 1501–1504.
- [23] Adnani N, Chevrette MG, Adibhatla SN, Zhang F, Yu Q, Braun DR, Nelson J, Simpkins SW, McDonald BR, Myers CL, Piotrowski JS, Thompson CJ, Currie CR, Li LJ, Rajski SR, Bugni TS. Coculture of marine invertebrate-associated bacteria and interdisciplinary technologies enable biosynthesis and discovery of a new antibiotic, keyicin. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(12): 3093–3102.
- [24] Shin D, Byun WS, Moon K, Kwon Y, Bae M, Um S, Lee SK, Oh DC. Coculture of marine *Streptomyces* sp. with *Bacillus* sp. produces a new piperazic acid-bearing cyclic peptide. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6: 498.
- [25] Hoshino S, Onaka H, Abe I. Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic acid-containing bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, 46(3/4): 363–374.
- [26] Cueto M, Jensen PR, Kauffman C, Fenical W, Lobkovsky E, Clardy J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *Journal of Natural Products*, 2001, 64(11): 1444–1446.
- [27] Oh DC, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. Libertellenones A–D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13(17): 5267–5273.
- [28] Schroeckh V, Scherlach K, Nützmann HW, Shelest E, Schmidt-Heck W, Schuemann J, Martin K, Hertweck C, Brakhage AA. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *PNAS*, 2009, 106(34): 14558–14563.
- [29] Müller MEH, Steier I, Köppen R, Siegel D, Proske M, Korn U, Koch M. Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(4): 874–887.
- [30] Wang JP, Lin WH, Wray V, Lai DW, Proksch P. Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begoniae*. *Tetrahedron Letters*, 2013, 54(20): 2492–2496.
- [31] Moree WJ, Yang JY, Zhao XL, Liu WT, Aparicio M, Atencio L, Ballesteros J, Sánchez J, Gavilán RG, Gutiérrez M, Dorrestein PC. Imaging mass spectrometry of a coral microbe interaction with fungi. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, 39(7): 1045–1054.
- [32] Maiya S, Grundmann A, Li X, Li SM, Turner G. Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem*, 2007, 8(14): 1736–1743.
- [33] Lee N, Kim W, Chung J, Lee Y, Cho S, Jang KS, Kim SC, Palsson B, Cho BK. Iron competition triggers antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* during coculture with *Myxococcus xanthus*. *The ISME Journal*, 2020, 14(5): 1111–1124.
- [34] Ueda K, Beppu T. Antibiotics in microbial coculture. *The Journal of Antibiotics*, 2017, 70(4): 361–365.
- [35] Eto D, Watanabe K, Saeki H, Oinuma KI, Otani KI, Nobukuni M, Shiratori-Takano H, Takano H, Beppu T, Ueda K. Divergent effects of desferrioxamine on bacterial growth and characteristics. *The Journal of Antibiotics*, 2013, 66(4): 199–203.
- [36] Traxler MF, Watrous JD, Alexandrov T, Dorrestein PC, Kolter R. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio*, 2013, 4(4): e00459–13.
- [37] Amano SI, Morota T, Kano YK, Narita H, Hashidzume T, Yamamoto S, Mizutani K, Sakuda S, Furihata K, Takano-Shiratori H, Takano H, Beppu T, Ueda K. Promomycin, a polyether promoting antibiotic production in *Streptomyces* spp.. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63(8): 486–491.
- [38] Amano SI, Sakurai T, Endo K, Takano H, Beppu T, Furihata K, Sakuda S, Ueda K. A cryptic antibiotic

- triggered by monensin. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(10): 703.
- [39] Liu X, Wang WX, Li JY, Li Y, Zhang JH, Tan HR. A widespread response of Gram-negative bacterial acyl-homoserine lactone receptors to Gram-positive *Streptomyces* γ -butyrolactone signaling molecules. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(10): 1575–1589.
- [40] Nützmann HW, Doerr D, Ramírez-Colmenero A, Sotelo-Fonseca JE, Wegel E, Di Stefano M, Wingett SW, Fraser P, Hurst L, Fernandez-Valverde SL, Osbourn A. Active and repressed biosynthetic gene clusters have spatially distinct chromosome states. *PNAS*, 2020, 117(24): 13800–13809.
- [41] Schroeckh V, Scherlach K, Nützmann HW, Shelest E, Schmidt-Heck W, Schuemann J, Martin K, Hertweck C, Brakhage AA. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *PNAS*, 2009, 106(34): 14558–14563.
- [42] Wang G, Ran HM, Fan J, Keller NP, Liu ZG, Wu F, Yin WB. Fungal-fungal cocultivation leads to widespread secondary metabolite alteration requiring the partial loss-of-function VeA1 protein. *Science Advances*, 2022, 8(17): eabo6094.
- [43] Nguyen QT, Merlo ME, Medema MH, Jankevics A, Breitling R, Takano E. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. *FEBS Letters*, 2012, 586(15): 2177–2183.
- [44] Liu ZP, Kang B, Duan XR, Hu Y, Li W, Wang C, Li DS, Xu N. Metabolomic profiles of the liquid state fermentation in co-culture of *A. oryzae* and *Z. rouxii*. *Food Microbiology*, 2022, 103: 103966.
- [45] Pan YY, Lu C, Dong HL, Yu LJ, Liu G, Tan HR. Disruption of *rimP-SC*, encoding a ribosome assembly cofactor, markedly enhances the production of several antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 65.
- [46] Pan YY, Liu L, Guan FF, Li EW, Jin J, Li JY, Che YS, Liu G. Characterization of a prenyltransferase for *Iso-A82775C* biosynthesis and generation of new congeners of chloropestolides. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(3): 703–711.
- [47] Wang Y, Hu PJ, Pan YY, Zhu YX, Liu XZ, Che YS, Liu G. Identification and characterization of the verticillin biosynthetic gene cluster in *Clonostachys rogersoniana*. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 103: 25–33.
- [48] Wang Y, Ren JW, Li HH, Pan YY, Liu XZ, Che YS, Liu G. The disruption of *verM* activates the production of gliocladiosin A and B in *Clonostachys rogersoniana*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(28): 6782–6785.
- [49] Zhang HR, Wang XN. Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 2016, 37: 114–121.
- [50] Chan SHJ, Simons MN, Maranas CD. SteadyCom: predicting microbial abundances while ensuring community stability. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(5): e1005539.

刘钢, 博士, 中国科学院微生物研究所研究员, 中国科学院大学岗位教授, 博士生导师。多年来一直从事微生物次级代谢产物的生物合成与调控研究。先后揭示了 Pestheic acid、Iso-A82775C、Verticillin 等次级代谢物的生物合成途径, 通过基因组挖掘发现了多种新结构活性次级代谢产物, 系统研究了尼可霉素、头孢菌素 C 等重要抗生素生物合成的调控机制。目前主要从事通过合成生物学手段重构代谢途径, 提高抗生素产量以及挖掘新结构活性化合物等研究工作。已在 *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, *Microbiology Spectrum*, *Microbial Biotechnology*, *Molecular Microbiology*, *Organic Letters*, *ACS Chemical Biology*, *Microbial Cell Fact* 等国际主流期刊发表 SCI 论文 70 余篇。

