



羊毛硫肽 SapB 类多肽促进链霉菌形态分化作用的研究

单泓俊, 王俊博, 林百欣, 王柯惠, 邓子新, 由德林, 孔令新*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030

单泓俊, 王俊博, 林百欣, 王柯惠, 邓子新, 由德林, 孔令新. 羊毛硫肽 SapB 类多肽促进链霉菌形态分化作用的研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 268-282.

SHAN Hongjun, WANG Junbo, LIN Baixin, WANG Kehui, DENG Zixin, YOU Delin, KONG Lingxin. SapB-like peptides promote morphological differentiation of *Streptomyces*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 268-282.

摘要: 【目的】链霉菌属于革兰氏阳性菌, 以复杂的形态分化过程和强大的次级代谢产物合成能力为主要特征。链霉菌的形态分化与次级代谢产物的产生密切相关。III型羊毛硫肽 SapB 能够促进天蓝色链霉菌气生菌丝体形成, 暗示这类多肽可以作为靶标用于形态分化改造工程开发。本研究表征了 SapB 类多肽对多种链霉菌形态分化的影响, 为该类多肽的工程化应用提供理论基础。

【方法】生物信息学分析多个链霉菌基因组中 SapB 类多肽的生物合成基因簇, 构建 SapB 类多肽的异源表达载体, 利用接合转移方法导入不同链霉菌中进行异源表达, 探究 SapB 类多肽对链霉菌形态分化的影响。【结果】SapB 类多肽在不同程度上促进了多个链霉菌由营养菌丝向气生菌丝分化, 表现为气生菌丝体数量的增多和分化速度的加快, 缩短了链霉菌形态分化周期。【结论】SapB 类多肽的过表达有助于缩短链霉菌形态分化周期, 可用于针对链霉菌形态分化的工程改造。

关键词: 链霉菌; 形态分化; 气生菌丝; 羊毛硫肽; SapB

资助项目: 国家自然科学基金(32170077, 32170075); 上海交通大学“新进青年教师启动计划”(21X010500720)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170077, 32170075) and the Start-up Fund for Young Faculty at Shanghai Jiao Tong University (21X010500720).

*Corresponding author. Tel: +86-21-62932943, E-mail: konglingxin7@sjtu.edu.cn

Received: 2023-06-16; Accepted: 2023-08-17; Published online: 2023-08-21

SapB-like peptides promote morphological differentiation of *Streptomyces*

SHAN Hongjun, WANG Junbo, LIN Baixin, WANG Kehui, DENG Zixin, YOU Delin, KONG Lingxin*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Objective] *Streptomyces* is a genus of Gram-positive aerobic bacteria characterized by complex morphological differentiation and potent secondary metabolite-producing ability. SapB, a class III lanthipeptide, promotes the morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*, which suggests that SapB-like peptides might be developed as targets for engineering of morphological differentiation. In this study, we characterized the effects of SapB-like peptides on the morphological differentiation of multiple *Streptomyces* species, aiming to provide a theoretical basis for the engineering of these peptides. [Methods] Bioinformatics tools were used to analyze the gene clusters for the synthesis of SapB-like peptides in the genomes of *Streptomyces* spp.. The plasmids for heterologous expression were constructed and introduced into *Streptomyces* spp. through conjugation. The colony and mycelial morphology were compared to reveal the effects of these peptides on the morphological differentiation of *Streptomyces*. [Results] SapB-like peptides promoted the differentiation of *Streptomyces* from vegetative to aerial mycelia. Specifically, they increased the aerial mycelia and accelerated the differentiation, thus shortening the morphological differentiation cycle. [Conclusion] SapB-like peptides can help shorten the morphological differentiation cycle of *Streptomyces*, demonstrating the potential for the morphological differentiation engineering of *Streptomyces*.

Keywords: *Streptomyces*; morphological differentiation; aerial mycelium; lanthipeptide; SapB

链霉菌属(*Streptomyces*)是基因组 DNA 中高鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)含量的革兰氏阳性丝状细菌,具有复杂的形态分化周期和强大的次级代谢产物合成能力,大多数链霉菌生命周期的大部分时间都是半休眠的孢子状态^[1-2]。多细胞丝状链霉菌的生命周期起始于孢子(spore)的萌发,孢子在一端或两端生长形成发芽孢子,之后继续沿顶端生长形成多分枝多核的营养菌丝体(vegetative mycelium)^[3]。营养菌丝体在培养基中生长,形成菌落和菌苔。在营养枯竭等不利环境条件或信号分子的刺激下,大部分营养菌丝细胞

发生不规则的程序性死亡,积累了氨基酸、氨基糖、核苷酸和脂质等大量营养物质,小部分营养菌丝利用这些营养物质开始冲破培养环境的表面张力向空中延伸生长,分化形成直立的气生菌丝体(aerial mycelium)^[4-5]。气生菌丝赋予了链霉菌菌落特征性的蓬松外观,并逐步发育形成螺旋状、波浪状等不同形态的细丝,这些细丝之后被高度规则间隔的隔膜分开形成多个孢子, DNA 也被分配和封闭到每个孢子中,隔膜最终断裂,并将单倍体的孢子释放出来^[6]。固体培养环境中,次级代谢产物的产生通常发生在营养菌丝向

气生菌丝和孢子分化的过渡时期^[7]。在这个时期产生的抗生素为链霉菌程序性死亡产生的大量营养物质提供了重要的保护屏障,这些营养物质也为链霉菌进一步的发育分化提供了能量^[8]。链霉菌在不同的培养和调控条件下会呈现不同的菌丝形态,菌丝形态的差异也会对次级代谢产物的种类和产量产生很大的影响^[9-10]。

营养菌丝生长分化为气生菌丝的时期是链霉菌形态分化的关键时期。气生菌丝的形成依赖于大多数已知的气生菌丝形态发生所必需的“光秃(bald)”基因^[11-12]。“光秃”基因的缺失会在不同程度上阻止气生菌丝的形成,从而产生了类似于裸露无毛的“光秃”表型。除了受到 *bld* 家族基因的调控,气生菌丝的形成还需要疏水性的生物表面活性剂参与。天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) 中已知的表面活性分子包括 *chaplin*^[13-15]、*rodlin*^[16-18] 和 spore-associated polypeptide B (SapB)^[19-20], 这些生物表面活性剂能够降低菌落-空气界面处的表面张力,促使新气生菌丝的出现和生长。细胞表面蛋白 *chaplin* (ChpA-H) 和 *rodlin* (RdlAB) 是气生菌丝体和孢子的组成部分,两者共同参与了疏水鞘的形成。疏水鞘能够给菌丝提供膨胀压力,促使气生菌丝向空中生长^[16]。SapB 和部分 *chaplin* (如 ChpE) 则在气生菌丝形成开始之前就被分泌到细胞外,它们分布于细胞外的培养环境中,或是附着于菌丝和孢子的表面,形成一层疏水的膜结构,从而能够大大降低培养基、土壤、水与空气之间的表面张力,为气生菌丝的空中生长提供条件^[13,21-22]。

SapB 是一类由核糖体合成、经过位点特异性裂解和翻译后修饰、含有羊毛硫氨酸或 β -甲基羊毛硫氨酸的 III 型羊毛硫肽,最早在天蓝色链霉菌中发现^[23-25]。SapB 合成的激活依赖于气生菌丝形态发生所必需的 *bld* 基因的多重级联调控,因而被认为是气生菌丝合成的起点^[24-25]。目前主要在天蓝色链霉菌中发现 SapB 能够调节菌

株的形态分化^[26-28]。为了充分利用和挖掘 SapB 类多肽用于菌体形态分化工程化改造的潜能,本研究分析和获取了 SapB 类多肽的生物合成基因序列,构建了 SapB 类多肽的表达质粒。在变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) TK24、金黄链霉菌(*Streptomyces auratus*) DSM 41897、拟无枝酸菌(*Amycolatopsis regifaucium*) DSM 45072 和链霉菌(*Streptomyces* sp.) CICC 204980 中的异源表达,证明了这些多肽具有促进菌体形态分化的功能,为以 SapB 为靶标进行气生菌丝形态分化的控制提供了良好的研究材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株、质粒和引物

本研究采用的实验菌株如表 1 所示,包含天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)、变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) TK24、藤黄生孢链霉菌(*Streptomyces luteosporus*) NRRL 2401、金黄链霉菌(*Streptomyces auratus*) DSM 41897、拟无枝酸菌(*Amycolatopsis regifaucium*) DSM 45072、链霉菌(*Streptomyces* sp.) CICC 204980、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH10B、*E. coli* ET12567/pUZ8002 和本研究构建的 8 个异源表达菌株。本研究采用的质粒有 pIB139、pIB139-HEA 和 pIB139-HEB,其中 pIB139 为含有 *ermE*、*oriT*、*attP*、 ϕ C31 *int* 和 *aac(3)IV* 的整合型质粒,由上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保藏,pIB139-HEA 和 pIB139-HEB 分别为含有 SapB 及其类似物基因的 pIB139 质粒,由本研究构建。本研究采用的引物如表 2 所示,由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.1.2 主要试剂和仪器

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)所用的高保真 DNA 聚合酶 Phanta Master Mix 和多片段一步克隆试剂盒 ClonExpress MultiS

表 1 本研究所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strain	Source and relevant characteristic
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Type strains, source of SapB BGC
<i>Streptomyces luteosporus</i> NRRL 2401	Wild type strain from NRRL, source of SapB analogues BGC
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	Type strains
HE1	SapB heterologous expression strain derived from TK24
HE2	SapB analogues heterologous expression strain derived from TK24
<i>Streptomyces</i> sp. CICC 204980	Wild type strain from CICC
HE3	SapB heterologous expression strain derived from CICC 204980
HE4	SapB analogues heterologous expression strain derived from CICC 204980
<i>Streptomyces auratus</i> DSM 41897	Wild type strain from DSMZ
HE5	SapB heterologous expression strain derived from DSM 41897
HE6	SapB analogues heterologous expression strain derived from DSM 41897
<i>Amycolatopsis regifaucium</i> DSM 45072	Wild type strain from DSMZ
HE7	SapB heterologous expression strain derived from DSM 45072
HE8	SapB analogues heterologous expression strain derived from DSM 45072
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F^- , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80dlacZ\Delta M15\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara, leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> λ^- , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>
<i>Escherichia coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>recF</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , Cm^R , Str^R , Tet^R , Km^R

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequences (5'→3')
HEA-1-F	GGTTGGTAGGATCCACATATGGTGACAGCCGCAACTGTCCG
HEA-1-R	GCACCCAGGTAGGGCATGGTGCGCCAGCC
HEA-2-F	ACCATGCCCTACCTGGGTGCCGGCAGT
HEA-2-R	TGCGGCAACCGGCGTACGAAGCCGTCGGC
HEA-3-F	TTCGTACGCCGTTGCCGCACGGCTAC
HEA-3-R	AATTCGATATCGCGCGCGGCCGCTCACGAGTTCCAGTGTCC
HEB-1-F	GGTTGGTAGGATCCACATATGATGGAGAAGCGGTACGAGGTC
HEB-1-R	GCGAGGTAGTCGTCGAGCACCGCGCCAAT
HEB-2-F	TCGACGACTACCTCGCCACCGCCCCGACGA
HEB-2-R	CGCCGATCGTCTCCCCAGCAGCG
HEB-3-F	GAGACGATCGGCGACACGATC
HEB-3-R	AATTCGATATCGCGCGCGGCCGCTGTACTGGCCGCC
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
HEA-V-R	ACTCCGGGATGCGGAA
HEB-V-R	GTCGGTGCAGTAGCGG

为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品, DNA 聚合酶 *Taq* PCR Master Mix 为生工生物工程(上海)股份有限公司产品。质粒快速提取和琼脂糖凝胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品, 限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *Not* I 为 Thermo Fisher

Scientific 公司产品, 1 kb Plus DNA Ladder 为 Invitrogen 公司产品。振荡摇床为上海知楚仪器有限公司产品, 高速离心机为 Thermo Fisher Scientific 公司产品, 高分辨场发射扫描电子显微镜 Sirion 200 和 VEGA3 由上海交通大学分析

测试中心提供。

1.1.3 培养基和培养条件

(1) 大豆饼粉甘露醇培养基 (soybean mannitol medium, SFM 或 MS) (g/L): 灭菌过滤的黄豆饼粉 20, 甘露醇 20, 琼脂 18, 调节 pH 至 7.2, 121 °C 灭菌 20 min, 使用时补加 0.01 mol/L 氯化镁^[29]。(2) 国际链霉菌计划 (International *Streptomyces* Projects) 4 号培养基 (ISP4) (g/L): 糊化的可溶性淀粉 10, 七水合硫酸镁 1, 氯化钠 1, 硫酸铵 2, 碳酸钙 2, 琼脂 18, 微量盐溶液 1 mL/L, 调节 pH 至 7.2, 121 °C 高压灭菌 20 min。(3) Luria-Bertani (LB) 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 121 °C 高压灭菌 20 min。(4) 酵母提取物-麦芽提取物培养基 (yeast extract malt extract medium, YEME) (g/L): 酵母提取物 3, 麦芽提取物 3, 细菌蛋白胨 5, 葡萄糖 10, 蔗糖 103, 115 °C 高压灭菌 20 min, 灭菌后补加 5 mmol/L 的氯化镁。(5) 胰酶大豆肉汤 (tryptic soy broth, TSB) 培养基 (g/L): 胰酶大豆肉汤 30, 121 °C 灭菌 20 min。

S. coelicolor A3(2)、*S. lividans* TK24、*S. luteosporus* NRRL 2401、*S. auratus* DSM 41897、和 *A. regifaucium* DSM 45072 使用 YEME 培养基和 MS 培养基进行培养, *Streptomyces* sp. CCCC 204980 使用 LB 培养基和 MS 培养基进行培养, *E. coli* DH10B 和 *E. coli* ET12567/pUZ8002 使用 LB 培养基进行培养^[30]。链霉菌和拟无枝酸菌的培养温度为 30 °C, 大肠杆菌的培养温度为 37 °C, 液体培养的振荡速度为 200–220 r/min。

1.2 SapB 类多肽异源表达载体的构建

利用整合型载体 pIB139 构建 SapB 及其类似物的异源表达质粒^[31]。首先, 使用限制性内切酶 *Nde* I、*Not* I 酶切消化 pIB139, 获取约 6 kb 的 pIB139 线性化载体。然后, 分别设计 3 对多片段一步克隆引物, 其中 HEA-1/2/3-F/R 用于扩

增 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 的 *ramCSAB* 基因, HEB-1/2/3-F/R 用于扩增 *Streptomyces luteosporus* NRRL 2401 的 *ramCSAB* 基因(表 1)。接下来, 使用高保真 DNA 聚合酶 Phanta Master Mix 分别扩增长度约 2 kb 的 6 个插入片段 HEA-1/2/3 和 HEB-1/2/3, 利用一步克隆重组酶 ClonExpress MultiS 分别将 HEA 和 HEB 的 3 个插入片段和 pIB139 线性化载体连接起来, 将一步克隆产物转化至大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中。最后, 通过抗性筛选含有重组质粒的单克隆, 分别对其进行 PCR 电泳二次筛选, 将电泳验证正确的质粒送北京擎科生物科技有限公司测序, 确保重组质粒和野生型菌株的基因序列完全一致。

1.3 大肠杆菌及放线菌菌丝体的属间接合转移

将构建好的表达质粒载体转化进入 *E. coli* ET12567/pUZ8002 (供体菌), 与野生型的放线菌 (受体菌) 进行双亲本结合转移^[32-33]。首先, 将低温保藏的受体菌接种至对应的液体培养基中 30 °C 振荡 48 h, 取 5 mL 菌液转接至 50 mL 的 TSB 培养基中培养过夜, 取 1 mL 菌液转接至 3 mL 的 TSB 培养基中培养 4 h, 与此同时, 将携带目的质粒的供体菌接种至含有对应抗性的 LB 培养基中 37 °C 振荡过夜, 取 0.5 mL 菌液转接至 5 mL 的 LB 培养基中培养 3 h。然后, 将受体菌和供体菌的菌液分装至 EP 管中, 3 500 r/min 离心 10 min 收集菌体, 使用 TSB 培养基清洗菌体 2 次, 将清洗后的受体菌和供体菌按 100:1、10:1、1:1 和 0.1:1 的比例混合, 均匀涂布于无抗性的 ISP4 培养平板上, 30 °C 培养 16–20 h, 使用阿泊拉霉素和茶啶酮酸进行覆盖, 30 °C 培养 5–10 d。最后, 挑取 ISP4 平板上生长的接合子涂布至另一含有阿泊拉霉素和茶啶酮酸的 ISP4 平板扩大培养, 30 °C 培养 3 d, 接种至含有阿泊拉霉素和茶啶酮酸的种子培养液中 30 °C 振荡培养 3 d 至菌体黏稠, 提取

链霉菌基因组 DNA 进行 PCR 和测序验证。

1.4 扫描电镜样品的制备及观察

将冷冻的链霉菌置于相应的液体培养基中 30 °C 活化 2 d, 接种至含有 MS 固体培养基的 12 孔板中, 30 °C 培养 4 d。使用 2.5% 戊二醛固定至少 2 h, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液置换 4 次, 使用锇酸后固定 1.5–2 h, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液置换 3 次, 30% 乙醇置换 2 次, 50%、70%、90% 乙醇依次置换 1 次, 无水乙醇置换 3 次, 每次置换 10–15 min。将样品从 12 孔板中取出, 使用 CO₂ 临界点干燥仪干燥脱水。使用导电胶将样品固定在样品台上, 使用高真空镀膜仪对每个样品进行钨/金金属溅射镀膜 30 s。使用高分辨场发射扫描电子显微镜 Sirion 200 和 VEGA3 对样品的菌丝形态进行观察。

1.5 生物信息学分析

利用 antiSMASH bacterial version 6.1.1 对基因组的生物合成基因簇进行在线分析预测, 利用美国国家生物信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 在线分析平台对基因簇中的功能基因进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 SapB 类多肽生物合成基因的生物信息学分析

SapB 是 III 型羊毛硫肽家族的多肽, 由快速气生菌丝体 (rapid aerial mycelium, ram) 基因簇编码合成, 该基因簇包含 1 个由 4 个生物合成基因 (*ramCSAB*) 组成的操纵子和 1 个调控基因 *ramR*^[24]。在 *ramC*、*ramS*、*ramA* 和 *ramB* 这 4 个基因组成的操纵子下游是编码 LuxR 家族调控蛋白的 *ramR* 基因, RamR 蛋白可以与 *ramCSAB* 操纵子的 DNA 启动子区域结合, 从而激活 SapB 的合成^[25](图 1A)。*ramS* 编码 SapB 前

体肽, 该前体肽由前导序列和核心序列两部分组成, 同时在这两部分之间还存在蛋白酶切割位点。*ramC* 位于 *ram* 基因簇的最上游, 编码 *ram* 基因簇中唯一具有催化功能的酶。该酶包含 3 个不同的蛋白结构域, 分别是丝氨酸/苏氨酸激酶 (Ser/Thr kinase) 结构域、磷酸丝氨酸/磷酸苏氨酸裂解酶 (pSer/pThr lyase) 结构域和环化酶 (cyclase) 结构域。*ramA* 和 *ramB* 位于 *ramS* 的下游, 两者都编码 ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter, ABC transporter), 这 2 个 ABC 转运蛋白的 N 端具有跨膜结构域, C 端具有 ATP 结合结构域, 可以将 SapB 运输至菌丝表面并分散到培养基中, 为菌体提供疏水环境^[26]。随着测序技术的发展, 许多 SapB 类似多肽编码的基因簇得到鉴定, 这些基因簇编码氨基酸序列高度相似的 SapB 类多肽^[27–28]。这些多肽的核心肽部分具有保守的 S-XX-S-XXX-C 基序, 该基序可以形成酸性稳定的硫醚羊毛硫氨酸 (Lan) 大环结构^[34](图 1B)。

为了验证和探究 SapB 类多肽促进形态分化的功能, 对本研究室现有菌株 *S. coelicolor* A3(2)、*S. luteosporus* NRRL 2401、*S. auratus* DSM 41897 和 *A. regifaucium* DSM 45072 的基因组进行序列分析, 并利用次级代谢生物合成基因簇预测在线软件 antiSMASH 进行预测以挖掘 SapB 类多肽的生物合成基因簇。在 *S. coelicolor* A3(2) 和 *S. luteosporus* NRRL 2401 的基因组中, 发现了负责编码 SapB 类多肽的基因簇(图 1A), 而在 *S. auratus* DSM 41897 和 *A. regifaucium* DSM 45072 并未发现与 *ramCSAB* 类似的生物合成基因簇。在 *S. luteosporus* NRRL 2401 菌株中编码 SapB 类多肽的基因簇其基因组成和基因排列都与 *S. coelicolor* A3(2) 中编码 SapB 的基因簇高度相似(图 1A)。使用 antiSMASH 对 2 个基因簇进行比较, 两者的相似度为 75%。该基因簇

共由 5 个基因组成,按照基因排列分别与多功能合成酶编码基因 *ramC*、前体肽编码基因 *ramS*、ABC 转运蛋白编码基因 *ramAB* 和调控基因 *ramR* 相对应(图 1A)。使用 Protein Blast (BLASTP)对 *S. coelicolor* A3(2)和 *S. luteosporus* NRRL 2401 的 *ram* 基因簇进行比对,发现 RamC、RamS、RamA、RamB 和 RamR 这 5 个蛋白都具有较高的氨基酸序列相似性(identity),分别为 57.77%、46.34%、54.42%、52.01%和 47.06%。*S. luteosporus* NRRL 2401 编码的前体肽同样由前导肽和核心肽 2 个部分组成,其前导肽 N 端含有 1 个保守的 M-X-L-X-DLQ 基序,核心肽中含有 2 个保守的 S-XX-S-XXX-C 基序,核心肽部分还包含有较多的丝氨酸、亮氨酸和缬氨酸,这些疏水性氨基酸很可能在降低表面张力等方面发挥作用。这些基因簇的发现为探究 SapB 类多肽的功能提供了研究材料。

2.2 SapB 类多肽异源表达载体的构建

为了探讨 SapB 类多肽对形态分化的影响,

首先构建了 SapB 及其类似物的异源表达载体,选取天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) A3(2)和藤黄生孢链霉菌(*S. luteosporus*) NRRL 2401 作为对象,用于获取编码 SapB 类多肽的 *ramCSAB* 基因簇。*S. coelicolor* A3(2)和 *S. luteosporus* NRRL 2401 的基因组中 *ramCSAB* 基因簇大小分别为 6 728 bp 和 6 517 bp。为了获得完整的 DNA 片段,将基因簇分成长度约 2 000 bp 的 3 段序列进行 PCR 扩增,这些片段分别为 HEA I (2 384 bp)、HEA II (2 081 bp)、HEA III (2 347 bp)和 HEB I (2 237 bp)、HEB II (1 907 bp)、HEB III (2 449 bp),每段序列的上下游均含有 15–20 bp 的同源臂。将获取的片段与 *Nde* I/*Not* I 线性化的 pIB139 载体进行同源重组,以分别构建 SapB 类多肽的异源表达载体 pIB139-HEA 和 pIB139-HEB。对得到的单克隆进行 PCR 验证,电泳分析得到的 PCR 产物,大小分别为 963 bp 和 767 bp (图 2A、2B),初步证实了这些克隆的正确性。为了确定克隆片段序列上的真实性,将电泳验证正确的质粒送北

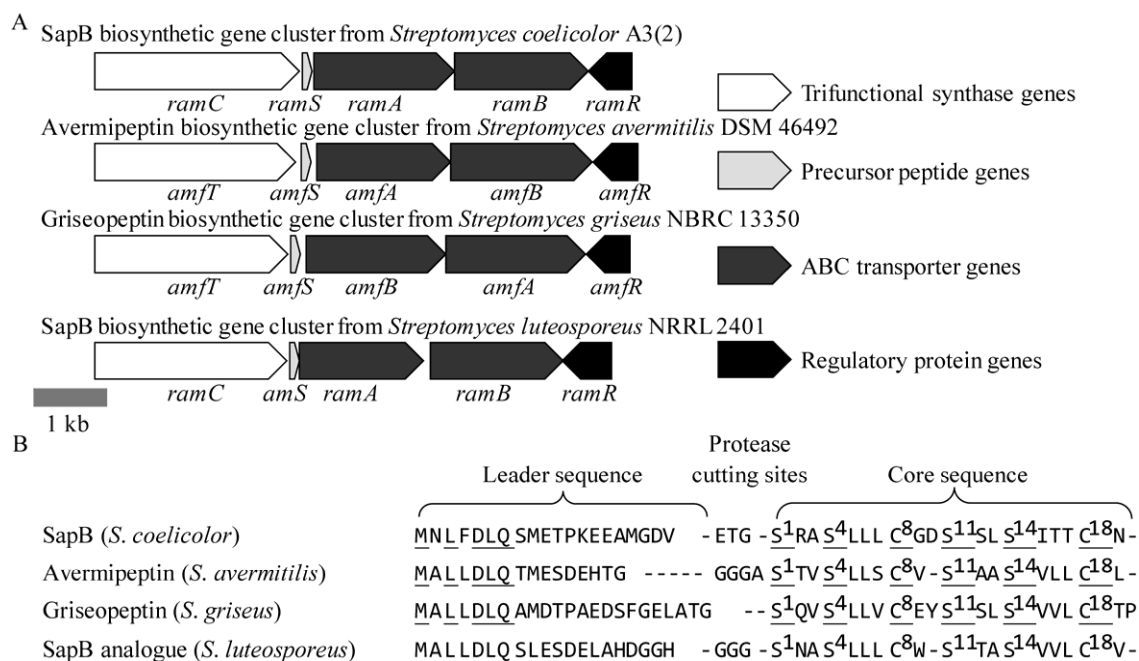


图 1 SapB 类多肽的生物合成基因簇(A)和氨基酸序列比对(B)

Figure 1 Biosynthetic gene clusters (A) and amino acid sequence alignment of SapB-like peptides (B).

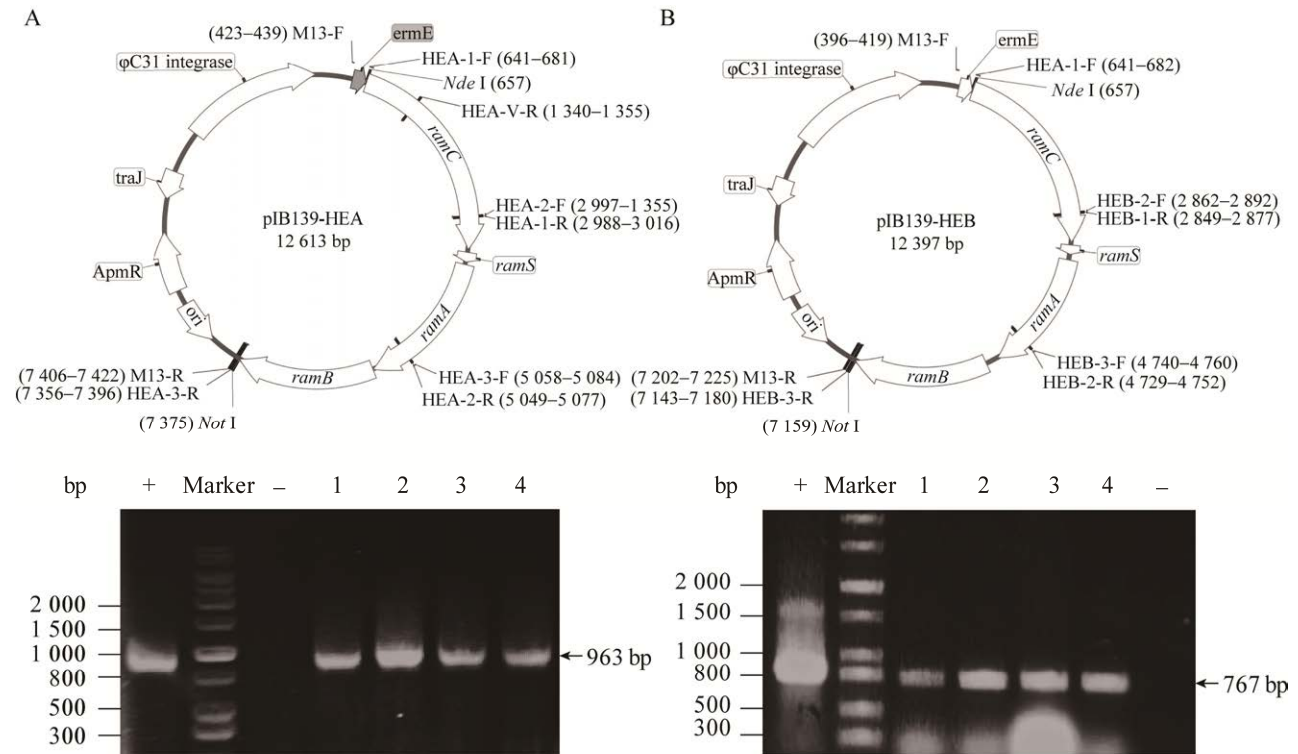


图 2 pIB139-HEA (A)及 pIB139-HEB (B)的质粒图谱和电泳验证

Figure 2 Plasmid profile and electrophoretic verification of pIB139-HEA (A) and pIB139-HEB (B). +: Positive control, using genome DNA of wild type strain as template; -: Negative control, using pIB139 vector as template; 1-4: Different clones carrying pIB139-HEA or pIB139-HEB as template.

京擎科生物科技有限公司测序,测得的 DNA 序列与质粒图谱序列完全一致,说明成功构建了含有 *ramCSAB* 基因的重组质粒 pIB139-HEA 和 pIB139-HEB。

为了验证 SapB 类多肽能否促进链霉菌的形态分化,选用链霉菌模式菌株变铅青链霉菌(*S. lividans*) TK24 进行验证。通过双亲本接合转移的方法,将重组质粒 pIB139-HEA 和 pIB139-HEB 分别转入 *S. lividans* TK24 中,利用阿泊拉霉素抗性筛选和 PCR 验证,得到了异源表达菌株 HE1 和 HE2。将 *S. lividans* TK24 及其异源表达菌株 HE1 和 HE2 分别在 MS 固体培养基上培养并观察这些菌株的形态分化差异。从图 3A 可以看出,相较于 TK24, HE2 的菌苔形态没有明显差异,而 HE1 的菌苔显著增白增厚,形成了气

生菌丝特征性的蓬松外观,菌苔上白色颗粒物的数量显著增加。这一结果表明, SapB 的过表达在一定程度上促进了链霉菌向气生菌丝分化的能力,验证了异源表达质粒的有效性,为利用 SapB 进行其他链霉菌形态分化研究奠定了基础。

2.3 SapB 类多肽促进“光秃”链霉菌 (*Streptomyces* sp.) CPCC 204980 形态分化

营养菌丝向气生菌丝分化是链霉菌形态的分化过程中重要的一步,为了考察 SapB 类多肽能否适用于促进其他缺失内源 SapB 类多肽基因簇的菌株进行形态分化,将 pIB139-HEA 和 pIB139-HEB 引入到不含有 SapB 类多肽基因簇的“光秃”链霉菌(*Streptomyces* sp.) CPCC 204980 中。*Streptomyces* sp. CPCC 204980 是多环氧杂萜酮类化合物 cervinomycins 的产生菌,同时还能

够产生大量暗绿色和黑色的生物活性色素^[35-36]。利用菌丝体属间结合转移的方法,将重组质粒 pIB139-HEA 和 pIB139-HEB 转入 *Streptomyces* sp. CPCC 204980, 得到异源表达菌株 HE3 和 HE4。将 CPCC 204980、HE3 和 HE4 分别接种到 MS 平板培养基上培养 6 d, 连续观察菌株在培养平板上的菌苔形貌(图 3B)。HE3 和 HE4 相较于 CPCC 204980, 菌苔显著增厚, 黑色和暗绿色坚硬光滑的菌膜被白色的粉末状物质覆盖, 部分菌苔上形成了白色蓬松的颗粒样隆起。其中黑色和暗绿色的菌膜含有大量 CPCC 204980 分泌的生物活性色素, 白色蓬松的颗粒样隆起可能是直立生长的气生菌丝体。

为了进一步确认 HE3 和 HE4 的气生菌丝体状态, 将 CPCC 204980、HE3 和 HE4 分别接种

到含有 MS 培养基的 12 孔板中培养 4 d, 经戊二醛-锇酸固定和钨-金金属溅射镀膜后, 使用高分辨场发射扫描电子显微镜 Sirion 200 对这些菌的菌丝体进行观察(图 3C)。HE3 在培养的第 4 天可以观察到大量粗细不一、具有多个分枝的气生菌丝, 以及少量具有隔膜结构的链状孢子丝, 而 CPCC 204980 和 HE4 在培养的第 4 天则观察不到发育茂盛的气生菌丝, 但是可以观察到错综复杂的多分枝的营养菌丝体和球状突起。这些球状突起很可能是已经程序性死亡的营养菌丝体, 在球状突起的表面还可以观察到一些已经分枝化的菌丝, 部分菌丝已经脱离营养菌丝体, 开始向空中生长, 形成气生菌丝。从图 3C 中可以看出, HE4 显然比 CPCC 204980 具有更多的球状突起和气生菌丝, 而 HE3 已经形成了大量气生菌丝和

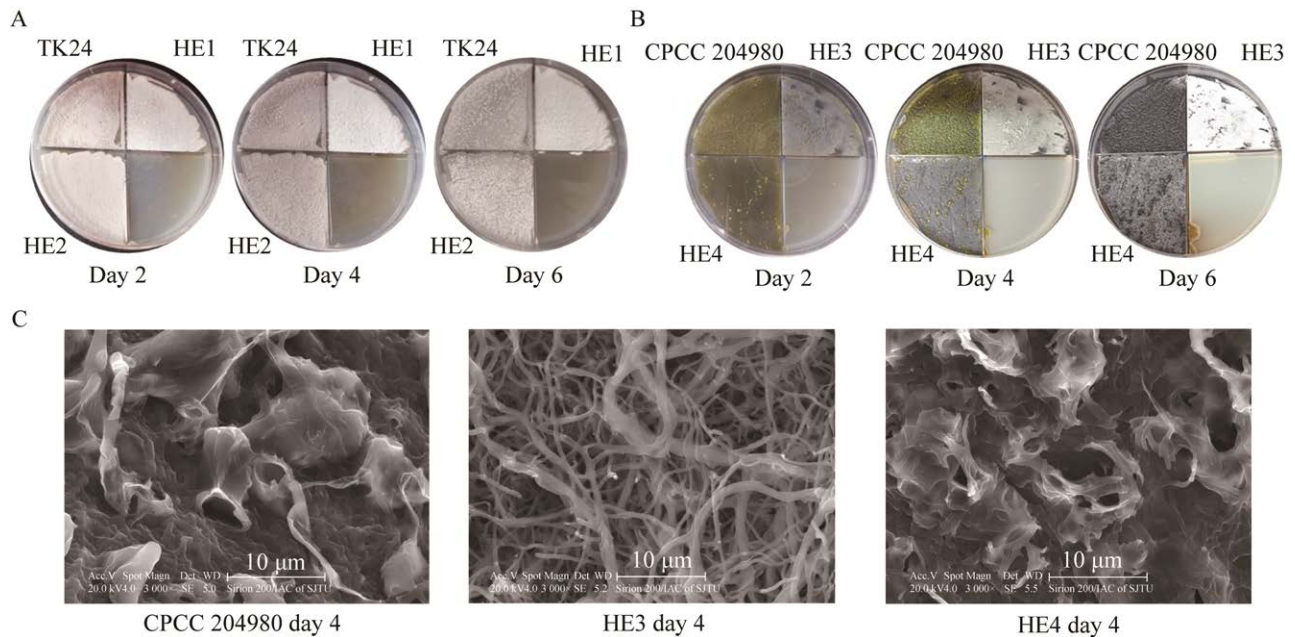


图 3 *Streptomyces lividans* TK24 和 *Streptomyces* sp. CPCC 204980 及其突变株的菌苔形态

Figure 3 The morphologic observation of *Streptomyces lividans* TK24 and *Streptomyces* sp. CPCC 204980 carrying the expression plasmid of SapB and its analogue. A: Time course morphology of *S. lividans* TK24 and its derivative strains HE1 and HE2. B: Time course morphology of *Streptomyces* sp. CPCC 204980 and its derivative strains HE3 and HE4. C: Scanning electron microscope morphology of *Streptomyces* sp. CPCC 204980 and its derivative strains HE3 and HE4. All the microscope photographs were taken at 3 000× magnification with accelerating voltage at 20 kV.

少量孢子丝, 表明 SapB 类多肽能够促进“光秃”链霉菌 CICC 204980 中营养菌丝向气生菌丝体形态分化。

2.4 SapB 类多肽在其他分化缓慢放线菌中的拓展应用

上述 SapB 类多肽促进气生菌丝体增多、菌苔变厚的现象暗示这类多肽可以用作促进链霉菌形态分化的通用工具。为了评估 SapB 类多肽

是否可以用作形态工程化改造的工具, 选取分化缓慢的 *S. auratus* DSM 41897 进行进一步的探索。*S. auratus* DSM 41897 是多环氧杂萜酮类化合物 lysolipins 的生产菌株, 该菌株形成气生菌丝体和孢子需要 10 d 左右^[37]。将重组质粒 pIB139-HEA 和 pIB139-HEB 转入 *S. auratus* DSM 41897, 得到异源表达菌株 HE5 和 HE6。从图 4A 可以看出, 相较于野生型的 DSM 41897,

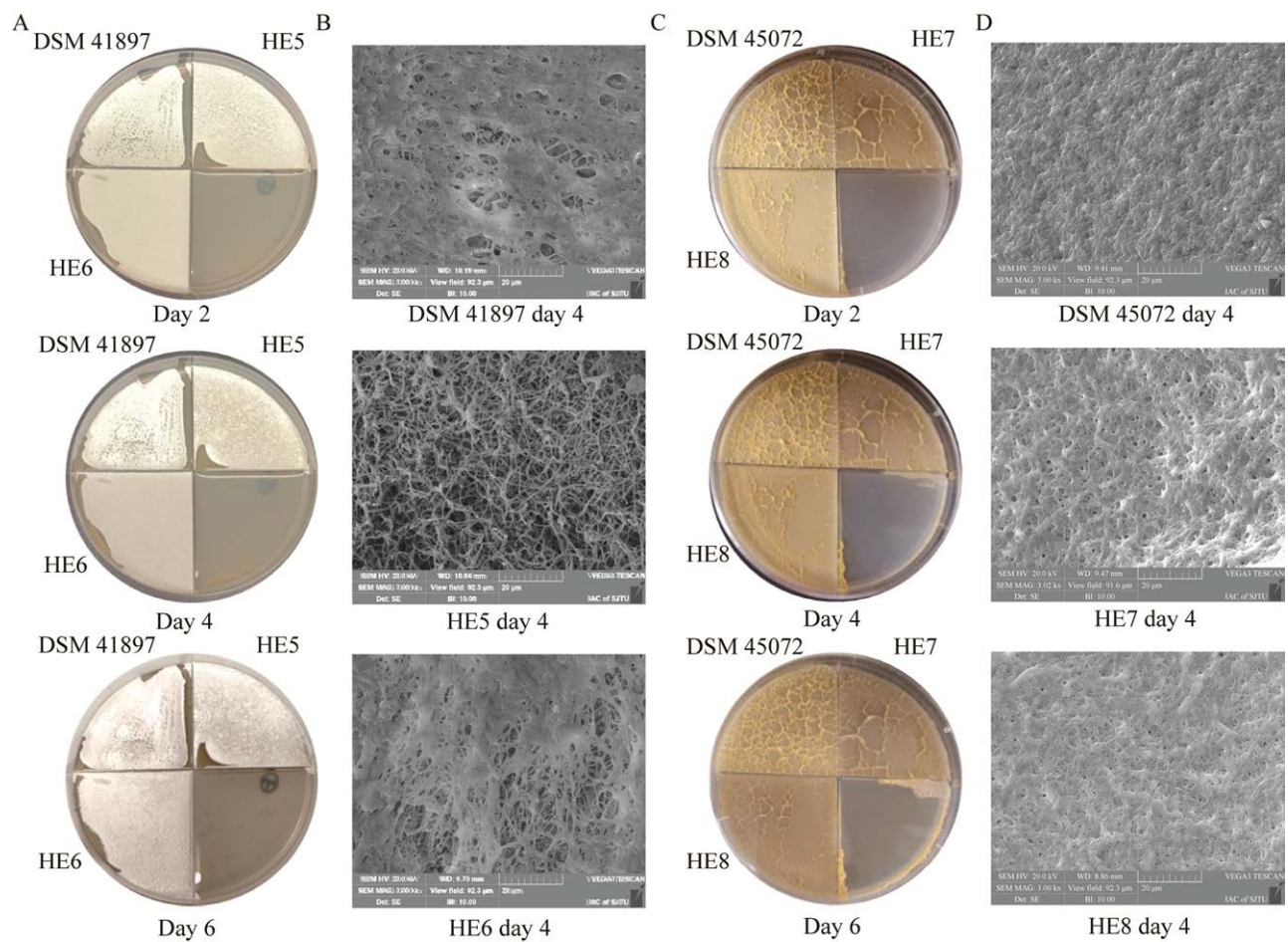


图 4 *Streptomyces auratus* DSM 41897 和 *Amycolatopsis regifaucium* DSM 45072 及其突变株的菌苔形态
Figure 4 The morphologic observation of *Streptomyces auratus* DSM 41897 and *Amycolatopsis regifaucium* DSM 45072 carrying the expression plasmid of SapB and its analogue. A: Time course morphology of *S. auratus* DSM 41897 and its derivative strains HE5 and HE6. B: Scanning electron microscope morphology of *S. auratus* DSM 41897 and its derivative strains HE5 and HE6. C: Time course morphology of *A. regifaucium* DSM 45072 and its derivative strains HE7 and HE8. D: Scanning electron microscope morphology of *A. regifaucium* DSM 45072 and its derivative strains HE7 and HE8. All the microscope photographs were taken at 3 000× magnification with accelerating voltage at 20 kV.

HE5 和 HE6 产生了更厚的菌苔, 培养 4 d 后可以在 HE5 的菌苔上观察到大量细小的白色颗粒, 培养 6 d 后 HE6 和 DSM 41897 也相继产生了相同的白色颗粒, 这些白色颗粒可能是链霉菌向空中生长的气生菌丝。在扫描电子显微镜 VEGA3 下观察, HE5、HE6 和 DSM 41897 向气生菌丝分化的程度依次递减(图 4B)。DSM 41897 多为营养菌丝结构, HE5 多为气生菌丝结构, 而 HE6 介于两者之间。这一结果与先前的实验结果类似, 证实 SapB 加快了 *S. auratus* DSM 41897 向气生菌丝分化的速度, 有助于缩短 *S. auratus* DSM 41897 的形态分化周期。

除了链霉菌以外的其他放线菌也是活性次级代谢产物的重要来源, 这其中有许多放线菌因为不具备像链霉菌一样的形态分化过程, 难以在培养过程中获得气生菌丝体和孢子, 使得对这些菌株的保藏和遗传操作比较困难。为了拓展 SapB 类多肽促进气生菌丝体分化的应用范围, 选取一株不具备明显分化特征和很少产生色素的拟无枝酸菌(*A. regifaucium*) DSM 45072 进行了分化表型观察^[38]。将重组质粒 pIB139-HEA 和 pIB139-HEB 转入 *A. regifaucium* DSM 45072, 得到异源表达菌株 HE7 和 HE8。从图 4C 可以看出, 相较于野生型菌株 DSM 45072, 突变株 HE7 和 HE8 的菌苔褶皱减少, 菌苔表面颜色加深, 但未见明显菌苔增厚、颗粒样隆起等现象。在扫描电子显微镜 VEGA3 下观察发现, HE7 和 HE8 比 DSM 45072 的菌丝体聚集性增强, 并且具有明显的分枝现象(图 4D)。在 *A. regifaucium* DSM 45072 中的尝试展示了 SapB 类多肽可能也具有微弱促进其他类型放线菌菌丝体分化的功能, 未来需要进行深度优化以实现菌丝体分化的目的。

3 讨论与结论

链霉菌是天然次级代谢产物的重要生产者,

是优秀的微生物合成“工厂”, 在工业、农业、畜牧业、食品和药物等多个领域发挥着极为重要的作用^[1]。早期对链霉菌的分子操作手段主要集中于次级代谢产物生物合成基因簇的改造和调控上, 而很少考虑到链霉菌细胞自身形态的影响。链霉菌的形态分化是一个复杂的生理过程, 涉及到多种细胞形态相关蛋白, 包括细胞分裂蛋白、细胞骨架蛋白、细胞壁合成和水解蛋白。同时, 细胞形态分化也受到复杂的网络调控, 包括 *bldA* 的全局调控^[39-40]、MacRS 和 PhoPR 双组分调控^[41-42]、拟核结合蛋白 Lsr2 调控^[43]等多个方面。随着对链霉菌生长周期、形态分化以及次级代谢产物产生调控机制研究的不断深入, 研究者逐渐认识到菌丝体形态与次级代谢产物的种类和产量有着密切的关联^[44]。如通过调整转速和搅拌速度以改变菌丝体形态可以提高拉达霉素甲酯的产量^[9]; 过表达枯草杆菌蛋白酶类丝氨酸蛋白酶 APASM_4187 促进菌丝体断裂和分散, 有效提高了氨丝菌素 P-3、盐霉素和井冈霉素的产量^[10]。与细胞形态分化相关的蛋白通常是微生物生长必需的, 该蛋白的表达量直接影响微生物的生长速率和生命周期。通过调控链霉菌的形态和分化的相关蛋白, 可以帮助链霉菌突破自身的生理性能限制, 更好地发挥链霉菌的催化潜力。然而, 菌丝体形态与产量之间的关系是由次级代谢产物的种类及菌株特性共同决定的。通过发酵工艺优化来改变菌丝体形态以提高目的产物产量的方法通常是针对某一特定菌株的优化, 而并不具备普适性。通过遗传改造改变菌丝体形态并使其利于目标代谢产物的产生, 可能是一种具有更加优越稳定性和可操作性的手段。目前已经有许多利用遗传改造改变链霉菌形态以提升次级代谢产物产量的研究。例如, 过表达发育因子 *ssgA*, 能够使菌丝体变成疏松的菌体团, 加快菌丝体生长速度从而提高酪氨酸酶产量^[45]。敲除 Mat 蛋

白编码基因 *matA* 或 *matB*, 能够导致链霉菌的菌丝体分散, 从而加快菌丝体生长并提高酪氨酸酶的产量^[46]。过表达能加快菌丝体分化并促进孢子形成的调控基因 *adpA*, 有助于提高 *Streptomyces venezuelae* 的氯霉素产量^[47]。考虑到链霉菌形态分化的复杂性, 其他形态分化相关的蛋白也是潜在的形态改造靶点。

表面活性分子 SapB、chaplin 和 rodlin 在链霉菌的形态分化过程中扮演着极为关键作用的, 它们能够有效降低菌落、水和空气界面之间的表面张力(chaplin 和 SapB 分别能将水的表面张力从 72 mJ/m²降低到 26 mJ/m²和 32 mJ/m²^[13,21-22]), 赋予菌丝体疏水性的气生菌丝体结构。Rodlin 不存在于正常发育的野生型阿维链霉菌的基因组中, 敲除 rodlin 合成相关基因(*rdlA* 和 *rdlB*)后天蓝色链霉菌的形态分化未见异常, 气生菌丝和孢子的疏水性也不受影响, 表明了 rodlin 在链霉菌的形态分化功能上的冗余性^[16]。Chaplin 在疏水鞘的形成过程中发挥关键作用, 但 8 个 chaplin 基因(*chpA-H*)的功能同样存在冗余, 敲除其中特定 4 个 chaplin 基因的天蓝色链霉菌依然能够维持正常的形态分化功能^[13,17]。尽管 SapB 最初是从孢子表面分离得到的, 但它并不作为气生菌丝和孢子的一部分发挥作用, 而是分泌到细胞外, 在体外形成一层疏水的膜结构, 导致 SapB 既存在于气生菌丝和孢子的表面, 也存在于链霉菌生长的培养基中。已有的研究还发现, SapB 的生产似乎依赖于培养基的成分, SapB 能够在一些营养丰富的培养基中生产, 而不能在基本培养基中生产^[19]。由于 SapB 具有溶解性差、产量低且不稳定、分离纯化难度高等特性, 导致外源添加 SapB 的工程化应用存在诸多困难。与此同时, SapB 生物合成基因(*ramCSAB*)的长度合适、结构简单、功能明确, 对该生物合成基因簇的异源表达可以大大降低以 SapB 为靶标的形态学工

程改造的难度和突变株生理特征的不确定性, 也展示出以 SapB 为靶标的形态学工程化应用的潜力。

本研究选取几株难以形态分化和产孢的链霉菌, 通过外源引入 SapB 类多肽的生物合成基因簇, 探索了 SapB 类多肽促进异源链霉菌形态分化的功能, 具体表现为这些菌株气生菌丝分化数量的增多和分化速度的加快, 链霉菌的形态分化周期缩短(图 3 和图 4A、4B)。与此同时, 为了拓展 SapB 类多肽的应用范围, 本研究还选取了拟无枝酸菌(*A. regifaucium*) DSM 45072 考察 SapB 类多肽是否能够促进其分化。研究结果表明, SapB 类多肽也能发挥微弱的刺激菌丝体分化的作用(图 4C 和图 4D), 未来可以考虑继续构建其他 SapB 类多肽的表达菌株以深入考证这些多肽在其他放线菌中的应用。考虑到链霉菌从营养菌丝向气生菌丝分化的时期也是众多抗生素产生的时期, 考察了 TK24 中次级代谢产物合成情况, 初步结果显示 SapB 类多肽的表达也影响了次级代谢产物的合成。未来还将系统评估以 SapB 为靶标的形态学工程改造对链霉菌次级代谢产物产量和种类的影响, 期望能有助于实现对链霉菌形态分化周期的工程化控制。与此同时, 这种细胞形态学改变是否可以诱导其他新型次级代谢产物的产生, 也将是未来工作的内容, 从而期望能拓展形态学遗传改造在代谢产物挖掘方面的应用。

参考文献

- [1] BARKA EA, VATSA P, SANCHEZ L, GAVEAU-VAILLANT N, JACQUARD C, MEIER-KOLTHOFF JP, KLENK HP, CLÉMENT C, OUHDOUCH Y, van WEZEL GP. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(1): 1-43.

- [2] 薛正莲, 王珊, 孙俊峰, 王芳, 周健. 链霉菌形态分化与次级代谢产物合成的研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(12): 3870-3886.
XUE ZL, WANG S, SUN JF, WANG F, ZHOU J. Research progress on morphological differentiation and secondary metabolite biosynthesis of *Streptomyces*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3870-3886 (in Chinese).
- [3] FLÄRDH K. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(6): 564-571.
- [4] FLÄRDH K, BUTTNER MJ. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(1): 36-49.
- [5] JONES SE, ELLIOT MA. 'Exploring' the regulation of *Streptomyces* growth and development[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 42: 25-30.
- [6] JYOTHIKUMAR V, TILLEY EJ, WALI R, HERRON PR. Time-lapse microscopy of *Streptomyces coelicolor* growth and sporulation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(21): 6774-6781.
- [7] BIBB MJ. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(2): 208-215.
- [8] van WEZEL GP, McDOWALL KJ. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances[J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(7): 1311-1333.
- [9] XIA X, LIN SJ, XIA XX, CONG FS, ZHONG JJ. Significance of agitation-induced shear stress on mycelium morphology and lavendamycin production by engineered *Streptomyces flocculus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(10): 4399-4407.
- [10] WU YT, KANG QJ, ZHANG LL, BAI LQ. Subtilisin-involved morphology engineering for improved antibiotic production in *Actinomyces*[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 851.
- [11] CLAESSEN D, de JONG W, DIJKHUIZEN L, WÖSTEN HAB. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky![J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(7): 313-319.
- [12] BIGNELL DRD, FRANCIS IM, FYANS JK, LORIA R. Thaxtomin A production and virulence are controlled by several *bld* gene global regulators in *Streptomyces scabies*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(8): 875-885.
- [13] CLAESSEN D, RINK R, de JONG W, SIEBRING J, de VREUGD P, BOERSMA FGH, DIJKHUIZEN L, WÖSTEN HAB. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(14): 1714-1726.
- [14] ELLIOT MA, KAROONUTHAISIRI N, HUANG JQ, BIBB MJ, COHEN SN, KAO CM, BUTTNER MJ. The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(14): 1727-1740.
- [15] BOKHOVE M, CLAESSEN D, de JONG W, DIJKHUIZEN L, BOEKEMA EJ, OOSTERGETEL GT. Chaplins of *Streptomyces coelicolor* self-assemble into two distinct functional amyloids[J]. *Journal of Structural Biology*, 2013, 184(2): 301-309.
- [16] CLAESSEN D, STOKROOS I, DEELSTRA HJ, PENNINGA NA, BORMANN C, SALAS JA, DIJKHUIZEN L, WÖSTEN HAB. The formation of the rodlet layer of *Streptomyces* is the result of the interplay between rodlines and chaplins[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 433-443.
- [17] CLAESSEN D, WÖSTEN HAB, van KEULEN G, FABER OG, ALVES AMCR, MEIJER WG, DIJKHUIZEN L. Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 44(6): 1483-1492.
- [18] YANG W, WILLEMSE J, SAWYER EB, LOU F, GONG WB, ZHANG H, GRAS SL, CLAESSEN D, PERRETT S. The propensity of the bacterial rodlin protein RdlB to form amyloid fibrils determines its function in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42867.
- [19] WILLEY J, SANTAMARIA R, GUIJARRO J, GEISTLICH M, LOSICK R. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*[J]. *Cell*, 1991, 65(4): 641-650.
- [20] WILLEY J, SCHWEDOCK J, LOSICK R. Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*[J]. *Genes & Development*, 1993, 7(5): 895-903.

- [21] TILLOTSON RD, WOSTEN HAB, RICHTER M, WILLEY JM. A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(3): 595-602.
- [22] WÖSTEN HAB, WILLEY JM. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air[J]. *Microbiology*, 2000, 146(4): 767-773.
- [23] ONGPIPATTANAKUL C, DESORMEAUX EK, DiCAPRIO A, van der DONK WA, MITCHELL DA, NAIR SK. Mechanism of action of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(18): 14722-14814.
- [24] KODANI S, HUDSON ME, DURRANT MC, BUTTNER MJ, NODWELL JR, WILLEY JM. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(31): 11448-11453.
- [25] KEIJSER BJB, van WEZEL GP, CANTERS GW, VIJGENBOOM E. Developmental regulation of the *Streptomyces lividans ram* genes: involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(16): 4420-4429.
- [26] UEDA K, OINUMA KI, IKEDA G, HOSONO K, OHNISHI Y, HORINOUCI S, BEPPU T. AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(5): 1488-1492.
- [27] KODANI S, LODATO MA, DURRANT MC, PICART F, WILLEY JM. SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the *Streptomyces*[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(5): 1368-1380.
- [28] GASKELL AA, GIOVINAZZO JA, FONTE V, WILLEY JM. Multi-tier regulation of the *Streptomyces* morphogenetic peptide SapB[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(3): 501-515.
- [29] SHEN JF, KONG LX, LI Y, ZHENG X, WANG Q, YANG W, DENG ZX, YOU DL. A LuxR family transcriptional regulator AniF promotes the production of anisomycin and its derivatives in *Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2019, 4(1): 40-48.
- [30] LI Y, KONG LX, SHEN JF, WANG Q, LIU Q, YANG WN, DENG ZX, YOU DL. Characterization of the positive SARP family regulator PieR for improving piericidin A1 production in *Streptomyces piomogues* var. *Hangzhouwanensis*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2019, 4(1): 16-24.
- [31] WANG Q, KONG LX, ZHENG XQ, SHEN JF, WANG JB, ZHANG DS, QIAO YJ, WANG JJ, DENG ZX, YOU DL. Acyltransferase AniI, a tailoring enzyme with broad substrate tolerance for high-level production of anisomycin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(14): e00172-21.
- [32] ZHENG XQ, CHENG QX, YAO F, WANG XZ, KONG LX, CAO B, XU M, LIN SJ, DENG ZX, CHOOI YH, YOU DL. Biosynthesis of the pyrrolidine protein synthesis inhibitor anisomycin involves novel gene ensemble and cryptic biosynthetic steps[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(16): 4135-4140.
- [33] KONG LX, ZHANG WK, CHOOI YH, WANG L, CAO B, DENG ZX, CHU YW, YOU DL. A multifunctional monooxygenase XanO4 catalyzes xanthone formation in xantholipin biosynthesis via a cryptic demethoxylation[J]. *Cell Chemical Biology*, 2016, 23(4): 508-516.
- [34] HEGEMANN JD, SÜSSMUTH RD. Matters of class: coming of age of class III and IV lanthipeptides[J]. *RSC Chemical Biology*, 2020, 1(3): 110-127.
- [35] HU XW, HU XX, HU XM, LI SF, LI LL, YU LY, LIU HY, YOU XF, WANG Z, LI L, YANG BB, JIANG BY, WU LZ. Cytotoxic and antibacterial cervinomycins B₁₋₄ from a *Streptomyces* species[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(8): 2337-2342.
- [36] KONG LX, DENG ZX, YOU DL. Chemistry and biosynthesis of bacterial polycyclic xanthone natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(11): 2057-2095.
- [37] GOODFELLOW M, KUMAR Y, LABEDA DP, SEMBIRING L. The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for *Streptomyces* with rugose ornamented spores[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 92(2): 173-199.
- [38] TAN GYA, ROBINSON S, LACEY E, BROWN R, KIM W, GOODFELLOW M. *Amycolatopsis regifaucium* sp. nov., a novel actinomycete that produces kigamicins[J]. *International Journal of*

- Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(11): 2562-2567.
- [39] CHATER KF, CHANDRA G. The use of the rare UUA codon to define “expression space” for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*[J]. The Journal of Microbiology, 2008, 46(1): 1-11.
- [40] 范佳奕, 王恩多. 链霉菌调控因子 bldA 的作用机制研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(6): 527-533.
FAN JY, WANG ED. Advance of mechanism of the regulator bldA in *Streptomyces*[J]. China Industrial Economics, 2019, 31(6): 527-533 (in Chinese).
- [41] LIU M, ZHANG PP, ZHU YP, LU T, WANG YM, CAO GX, SHI M, CHEN XL, TAO MF, PANG XH. Novel two-component system MacRS is a pleiotropic regulator that controls multiple morphogenic membrane protein genes in *Streptomyces coelicolor*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(4): e02178-18.
- [42] GALPERIN MY. Diversity of structure and function of response regulator output domains[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(2): 150-159.
- [43] GEHRKE EJ, ZHANG XF, PIMENTEL-ELARDO SM, JOHNSON AR, REES CA, JONES SE, HINDRA, GEHRKE SS, TURVEY S, BOURSALIE S, HILL JE, CARLSON EE, NODWELL JR, ELLIOT MA. Silencing cryptic specialized metabolism in *Streptomyces* by the nucleoid-associated protein Lsr2[J]. eLife, 2019, 8: e47691.
- [44] 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.
- [45] van WEZEL GP, KRABBEN P, TRAAG BA, KEIJSER BJF, KERSTE R, VIJGENBOOM E, HEIJNEN JJ, KRAAL B. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5283-5288.
- [46] van DISSEL D, WILLEMSE J, ZACCETTI B, CLAESSEN D, PIER GB, van WEZEL GP. Production of poly- β -1,6-N-acetylglucosamine by MatAB is required for hyphal aggregation and hydrophilic surface adhesion by *Streptomyces*[J]. Microbial Cell, 2018, 5(6): 269-279.
- [47] PŁACHETKA M, KRAWIEC M, ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA J, WOLAŃSKI M. AdpA positively regulates morphological differentiation and chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(3): e01981-21.