



## (p)ppGpp——“魔斑”核苷酸在细菌中的研究进展

宋阳<sup>#</sup>, 王译婕<sup>#</sup>, 王瑞, 申屠旭萍<sup>\*</sup>, 俞晓平

中国计量大学生命科学学院 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 浙江 杭州 310018

宋阳, 王译婕, 王瑞, 申屠旭萍, 俞晓平. (p)ppGpp——“魔斑”核苷酸在细菌中的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 378-390.

SONG Yang, WANG Yijie, WANG Rui, SHENTU Xuping, YU Xiaoping. (p)ppGpp—“magic point” nucleotide in bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(2): 378-390.

**摘要:** 鸟苷四磷酸(guanosine tetraphosphate, ppGpp)/鸟苷五磷酸(guanosine pentaphosphate, pppGpp)是细菌严谨反应的信号分子, 其合成和水解由 Rel/SpoT 同系物(RelA/SpoT homologue, RSH)家族的蛋白质合成和水解活性控制。(p)ppGpp 介导的严谨反应能够提高细菌对营养匮乏的适应能力和抗生素抗性。近年来发现(p)ppGpp 与细菌生长和细胞分裂、抗生素合成等都密切相关, 是细胞内重要的全局调控因子。(p)ppGpp 在细菌细胞中有许多靶点, 使其可以调节 DNA 复制、转录、细胞周期、核糖体生物合成以及抗生素合成基因簇的表达。然而, (p)ppGpp 如何控制转录和其他代谢过程取决于细菌种类, 并在不同的微生物中通过不同的机制调节相同的过程。因此, 本文通过综述(p)ppGpp 的合成/水解酶的种类和调节机制, (p)ppGpp 对微生物代谢调控机制、对细胞周期的影响机制, 以及(p)ppGpp 对抗生素合成和耐受性的调控机制, 为细菌耐药性研究和细胞生理学研究奠定基础。

**关键词:** (p)ppGpp; 细菌细胞周期; 代谢调控; 严谨反应; 抗生素耐药性

资助项目: 国家自然科学基金(32372628, 31901930, U21A20223); 浙江省自然科学基金(LGN22C140006); 浙江省属高校基本科研业务费(2022YW17); 浙江省“三农九方”科技协作计划(2023SNJF034); 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2023C02030, 2022C02047)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32372628, 31901930, U21A20223), the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LGN22C140006), the Basic Research Business Fund of Zhejiang Provincial Universities (2022YW17), the “Three Rural Nine Parties” Science and Technology Collaboration Program (2023SNJF034), and the “Pioneer” and “Leading Goose” Research and Development Program of Zhejiang (2023C02030, 2022C02047).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-571-86876237, E-mail: stxp@cjlu.edu.cn

Received: 2023-07-19; Accepted: 2023-10-09; Published online: 2023-11-13

## (p)ppGpp—“magic point” nucleotide in bacteria

SONG Yang<sup>#</sup>, WANG Yijie<sup>#</sup>, WANG Rui, SHENTU Xuping<sup>\*</sup>, YU Xiaoping

Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

**Abstract:** Guanosine tetraphosphate (ppGpp)/guanosine pentaphosphate (pppGpp) is a signaling molecule in the bacterial stringent response, whose synthesis and hydrolysis are controlled by the synthesis and hydrolysis activities of proteins in the RelA/SpoT homologue (RSH) family. The (p)ppGpp-mediated stringent response enhanced bacterial adaptation to nutrient deprivation and antibiotic resistance. In recent years, (p)ppGpp has been found to associate with bacterial growth, cell division, and antibiotic synthesis, which was an important global regulator in the bacteria. (p)ppGpp has many target sites in the cell, which allow it to regulate DNA replication, transcription, cell cycle, ribosome biosynthesis, and the expression of antibiotic synthesis gene clusters. However, how (p)ppGpp controls transcription and other metabolic processes depends on the bacterial species, and (p)ppGpp regulates the same processes in different bacteria species through different mechanisms. Therefore, this manuscript reviewed the types of (p)ppGpp synthetic and hydrolytic enzymes, the mechanisms of (p)ppGpp regulation on microbial metabolism and the cell cycle, as well as the regulation mechanisms of antibiotic synthesis and tolerance, which lays the foundation for bacterial resistance and cell physiology researches.

**Keywords:** (p)ppGpp; bacterial cell cycle; metabolic regulation; stringent response; antibiotic resistance

在细菌中普遍存在 4 种核苷类信号分子——环腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, c-AMP)、环二腺苷酸 (cyclic di-adenosine monophosphate, c-di-AMP)、环二鸟苷酸 (cyclic di-guanosine monophosphate, c-di-GMP)、五磷酸鸟苷和四磷酸鸟苷 [guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate, 统称为 (p)ppGpp], 这些多效性信号分子在细菌中发挥全局调控作用<sup>[1]</sup>。细菌在面对营养缺乏、氨基酸匮乏等环境压力时会产生 (p)ppGpp, 它能够抑制 DNA、RNA、核糖体蛋白质和膜成分的合成, 激活应激、糖酵解和氨基酸合成的全局调控信号分子, 实现对细胞资源的重新分配和利用, 促进细菌适应不利环境。(p)ppGpp 主要由 (p)ppGpp 合成水解酶 (RelA/SpoT homolog, RSH)

家族, 催化 GTP/GDP/GMP 和 ATP 为底物合成 (图 1)<sup>[2-3]</sup>。

(p)ppGpp 调节细胞内的物质合成和能量分配主要依赖 2 种不同的调节方式。一种是“分级”调节, 通过改变基因表达 (与 RNA 聚合酶结合、与核糖开关结合等) 以及蛋白质和/或 mRNA 分子的共价修饰 (乙酰化、磷酸化、甲基化等) 来改变活性蛋白质的丰度; 而另一种“代谢”调节, 则是通过对蛋白质活性的直接影响来改变代谢物如底物、产物和效应物 (激活剂、抑制剂、变构调节剂) 的浓度<sup>[4]</sup>, 2 种调节以独立或协同的方式进行。此外, (p)ppGpp 在不同微生物中通过不同的调节方式调控次级代谢。例如在革兰氏阴性菌中 (p)ppGpp 通过与 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP) 相互作用以及与转录调节因

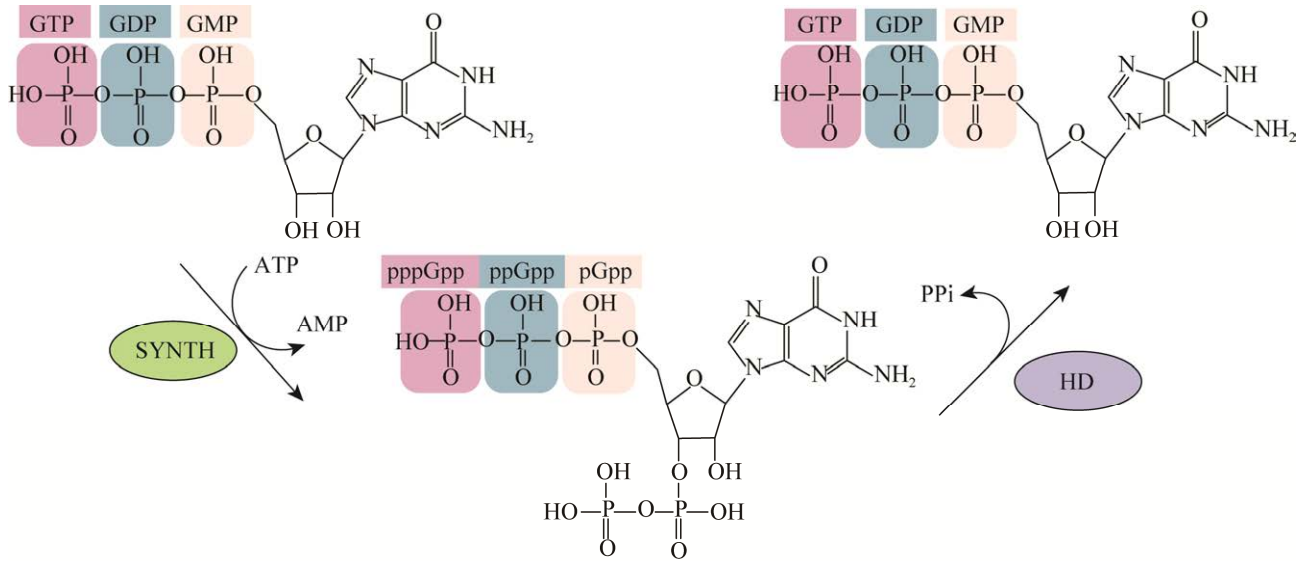


图 1 RSH 家族合成和水解结构域催化磷酸基团转移合成(p)ppGpp<sup>[2-3]</sup>

Figure 1 Synthesis and hydrolysis of (p)ppGpp with phosphoric acid group transfer by RSH family<sup>[2-3]</sup>.

子 DnaK 抑制蛋白(DnaK suppressor protein, DksA)配对来控制全局基因转录<sup>[5]</sup>；而在革兰氏阳性菌中，(p)ppGpp 通过调节细胞内嘌呤浓度从而改变转录起始核苷酸的可用性，间接影响革兰氏阳性菌中的基因转录<sup>[6]</sup>。然而，关于(p)ppGpp 的合成与水解、(p)ppGpp 调节微生物生理生化特征[特别是(p)ppGpp 在细菌中对抗生素耐受性以及细胞周期的影响]等方面的综述较少。本综述将具体阐述调控(p)ppGpp 合成和水解的酶，(p)ppGpp 对微生物功能的影响机制，以及(p)ppGpp 与抗生素合成和耐受的关系。

## 1 (p)ppGpp 合成与水解

### 1.1 (p)ppGpp 合成与水解酶概述

细胞中(p)ppGpp 含量决定细菌是否对环境胁迫产生应激反应，(p)ppGpp 水平的高低受到其合成酶和水解酶 RelA/SpoT 同源蛋白(RelA/SpoT homologue, RSH)合成和水解催化活性的调节。发生营养胁迫时，RSH 催化 ATP 的焦磷酸基团转移到 GTP 或 GDP 核糖的 3'羟基合成 pppGpp

或 ppGpp<sup>[7]</sup>；反之，在有  $Mn^{2+}$  存在时，RSH 水解 (p)ppGpp 3'位置的二磷酸基团，具有 (p)ppGpp 水解酶活性和微弱的合成酶活性(图 1)<sup>[8]</sup>。

常见的 RSH 家族蛋白有 2 种类型，一种是具有多个结构域的“长”酶(long enzyme)，一种是具有单个结构域的“短”酶(short enzyme)。“长”酶由 N 端的催化结构域和 C 端的水解结构域 2 个结构域组成(图 2)，其中催化结构域又分为水解结构域和合成结构域，因此 RSH 同时具备合成和水解双功能，通过调节水解和合成双功能区域的活力来维持胞内(p)ppGpp 水平的稳定。当胞内 ATP 和 GTP 结合到合成结构域时，RSH 发挥合成功能；当(p)ppGpp 结合到水解结构域时，RSH 出现构象变化，发挥水解功能。C 端的调控功能区域具有 TGS (ThrRS、GTPase 和 SpoT) 区域、 $\alpha$  螺旋区、锌指结构域和保守的半胱氨酸区域(Zinc refers to the domain and conserved cysteine region, ZFD/CC)以及天冬氨酸激酶、分支域、TyrA 和 RNA 识别区(aspartate kinases, clades, TyrA, and RNA recognition regions, ACT/RRM)

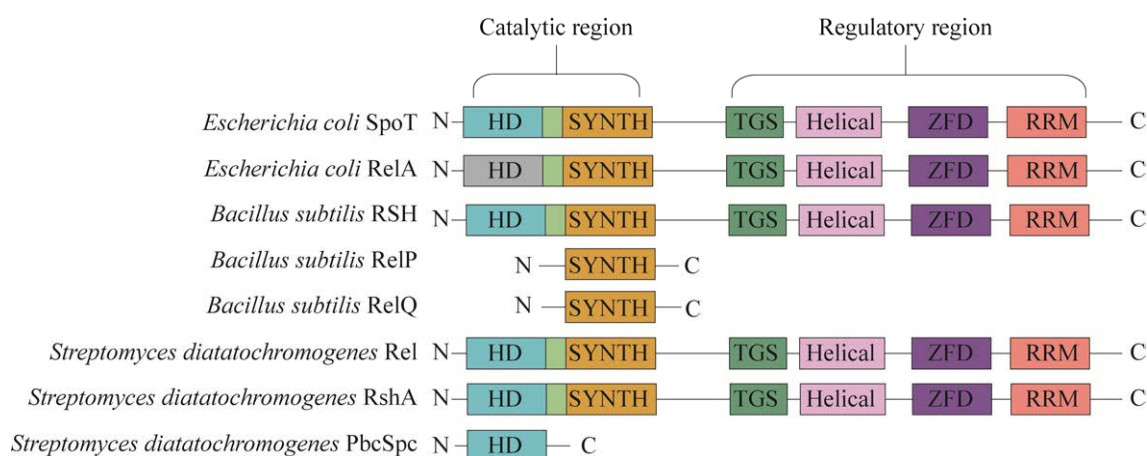


图 2 不同菌株 RSH 家族成员类型及调控结构

Figure 2 Types and regulatory structures of RSH family members in different strains.

4 个结构域, 这 4 个区域共同作用感知核糖体的结构变化, 进而改变 RSH 的构象, 实现 (p)ppGpp 含量调节<sup>[9]</sup>。“短”酶由单功能的 (p)ppGpp 合成结构域 (small alarmone synthetases, SASs) 或 (p)ppGpp 水解结构域 (small alarmone hydrolase, SAHs) 组成, 发挥单一的合成或水解功能, 其活性高低受到基因转录以及转录调控作用的影响<sup>[10]</sup>。因此, 微生物细胞内存在多种调控方式来调节不同的 (p)ppGpp 合成酶和水解酶活性, 使得 (p)ppGpp 能够适时适量地合成, 诱导微生物进行营养代谢转变和形态分化。

在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、链霉菌等微生物中普遍存在一种或多种 (p)ppGpp 合成水解酶, 共同调控胞内 (p)ppGpp 的含量。例如在大肠杆菌中存在具有合成和水解双活性的 SpoT, 以及只有合成活性的 Rel。在枯草芽孢杆菌中存在 1 个长的 RSH 和 2 个短 SASs。在淀粉酶产生链霉菌中发现具有 2 个长酶 Rel 和 RshA, 以及 1 个单水解活性的 PbcSpo<sup>[11-14]</sup>。

## 1.2 (p)ppGpp 的合成酶

RSH 酶的合成酶结构域 (synthase domain) 催

化一个焦磷酸 (PPi) 从 ATP 转移到 GDP 或 GTP 核糖的 3'-OH 位置, 分别生成 ppGpp 或 pppGpp<sup>[15]</sup>, 以及生成 AMP 和 GMP 或 GDP 作为副产物 (图 1)。在 (p)ppGpp 合成酶中, 可以根据其大小和结构域组织分为三大类: 多结构域单功能 (p)ppGpp 合成酶 RelA、多结构域双功能 (p)ppGpp 合成酶 SpoT<sup>[16]</sup> 以及单结构域单功能 (p)ppGpp 合成酶 (small alarmone synthetases, SASs)<sup>[15]</sup>。多结构域单功能 (p)ppGpp 合成酶 RelA 只能合成 (p)ppGpp<sup>[17]</sup>, 而多结构域双功能 (p)ppGpp 合成酶 SpoT 同时具有合成和水解活性, 并能感知许多其他环境压力, 如碳、铁、磷酸盐和脂肪酸饥饿反应<sup>[18-20]</sup>。RelA 和 SpoT 在蛋白质结构域上存在明显不同 (图 2), 虽然 RelA 保留了水解结构域 (hydrolase domain) 的痕迹, 但它与 SpoT 的结构域高度不同, 并且缺乏水解活性<sup>[21]</sup>。单结构域单功能 (p)ppGpp 合成酶 SAS 与多结构域 RSHs 相比, 缺乏多结构域 RSHs 中存在的 C 端调节结构域和依赖  $Mn^{2+}$  的水解酶结构域<sup>[10]</sup>。迄今为止的证据表明,  $\beta$ -和  $\gamma$ -变形菌门中的一些革兰氏阴性菌通常利用 2 种同源的“长”酶 RelA 和 SpoT 来合成 (p)ppGpp<sup>[14]</sup>, 而革兰氏阳性细菌, 包括金黄色葡萄

萄球、枯草芽孢杆菌、粪肠球菌、变异链球菌和谷氨酸棒杆菌中，含有 SAS 类型的单功能合成酶 RelP 和 RelQ<sup>[22]</sup>，以及一个双功能酶 RSH 发挥(p)ppGpp 的水解功能。RSH 如何感知氨基酸匮乏条件合成(p)ppGpp 的机制解析较为透彻，RSH 是一种核糖体相关蛋白，通过直接监测细胞的翻译能力来感知氨基酸饥饿。在氨基酸充足的生长时期，氨基酸以氨基酰化 tRNA 分子的形式到达核糖体受体位点，并在合成新生多肽时添加到新生多肽中。在氨基酸饥饿过程中，脱酰化的 tRNAs 积累并进入到核糖体受体位点，被 RSH 的 C 端察觉并引起 RSH 的 C 端与核糖体结合，形成了 tRNA、RelA 与核糖体的三元复合物 (RelA-脱酰化的 tRNA-70S 核糖体)<sup>[18]</sup>，实现 RSH 构象由关闭到打开的状态，激活 RSH 的合成酶活性<sup>[14]</sup>，从而合成(p)ppGpp。关于三元复合物结构合成(p)ppGpp 的机制目前有 2 种模型，一种是“跳跃”模型<sup>[23]</sup>，该模型认为 RelA 与核糖体复合物在合成(p)ppGpp 的过程中被转移走，并通过在核糖体之间的一次“跳跃”，生成一个 (p)ppGpp；另一个是“短跳跃时间”模型，该模型认为 RelA 在结合 70S 核糖体的同时合成 (p)ppGpp<sup>[24]</sup>。综上所述，不论什么模型，都需要 RelA 的调控结构域感知核糖体 A 位点的氨基酸匮乏，进而激活 RelA 合成酶活性。

### 1.3 (p)ppGpp 的水解

与(p)ppGpp 的水解过程相关的酶分为三大类，多结构域双功能(p)ppGpp 水解酶 SpoT、单结构域单功能(p)ppGpp 水解酶 (small alarmone hydrolases, SAHs) 和非特异性水解酶，如 Nudix 水解酶<sup>[10]</sup>。SpoT 和 SAHs 能水解 pppGpp 和 ppGpp 的 3'-OH 位焦磷酸部分，分别生成 PPi、GTP 和 GDP<sup>[25-27]</sup> (图 1)。SpoT 作为一种具有 (p)ppGpp 合成酶(S)和水解酶(H)活性的双功能蛋白，其蛋白结构与细长结构的 RelA/Rel 的活

性调节机制不同，该过程不依赖核糖体而进行<sup>[28-30]</sup>。目前关于水解酶活性变化的研究较少，通过蛋白结构解析发现，鲍曼不动杆菌的水解酶 SpoT (SpoT<sub>ab</sub>)具有紧凑的  $\tau$  型结构，调控结构域位于控制酶构象状态的核心结构域周围，C 端调控结构域(C-terminal domain, CTD)通过核心结构域自动激活水解酶(hydrolase, HD)活性，CTD 通过控制  $\tau$  型 HD 活性和 HD 非活性松弛构象之间的平衡来控制 SpoT<sub>ab</sub> 的水解活性，从而调节 (p)ppGpp 水解活力高低<sup>[31]</sup>，但该  $\tau$  型结构在其他菌种中尚未被证实。同时非特异性水解酶对于维持细胞内(p)ppGpp 平衡生长水平也很重要，在某些细菌物种中，尽管缺少 RSHs 水解酶，但是非特异性水解酶也能保证菌体正常生长。在大肠杆菌的研究中发现，缺乏 SpoT 水解酶活性的菌株在过表达非特异性水解酶 Nudix 后，能够在氨基酸匮乏的条件下生长，但是会降低严谨反应的强度<sup>[30]</sup>。

## 2 (p)ppGpp 对微生物代谢的机制

(p)ppGpp 在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中存在不同的调控机制。在革兰氏阴性菌中，(p)ppGpp 的 2 种焦磷酸与 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)的  $\omega$  亚基相互作用，鸟苷碱基与  $\beta'$ 亚基相互作用，引起 RNAP 的构象变化，改变 RNAP 与 DNA 的结合效率，促进或抑制了转录的开始<sup>[32]</sup>。此外，细胞内的转录调控因子 DksA 也参与到(p)ppGpp 的调控过程，它能够作为“助手”协助(p)ppGpp 控制基因转录过程。在革兰氏阳性菌中，(p)ppGpp 不通过和 DksA 协同作用来控制全局基因转录<sup>[11]</sup>，而是通过调节细胞内嘌呤浓度改变转录起始核苷酸的可用性，从而间接影响革兰阳性基因转录<sup>[6]</sup>。

例如在革兰氏阴性菌大肠杆菌中，(p)ppGpp 可以调节 7 个  $\sigma$  因子对 RNAP 的竞争性结合。

正常情况下, 大肠杆菌细胞中的(p)ppGpp 浓度维持在较低水平, RNAP 与  $\sigma^{70}$  结合进行稳定的转录。当细菌处于营养缺乏条件时, (p)ppGpp 水平不断积累, 抑制了 RNAP 与  $\sigma^{70}$  结合, 游离的 RNAP 将与其他  $\sigma$  因子  $\sigma^{32}$  和  $\sigma^{38}$  结合<sup>[14]</sup>, 激活适应热休克和营养缺乏的基因, (p)ppGpp 和 DksA 促进了细菌对环境的适应(图 3)。许多学者认为 RNAP 是大肠杆菌中(p)ppGpp 的主要靶点, 但有学者表明(p)ppGpp 也会直接结合并调节其他蛋白靶点。例如, 在肠道沙门氏菌中, (p)ppGpp 与 SlyA 相互作用, SlyA 是肠道沙门氏菌细胞内毒力程序的转录激活因子, 促进其与目标启动子结合<sup>[33]</sup>。(p)ppGpp 结合的蛋白靶点中也有一些是 GTP 结合蛋白, 它们在复制和翻译中担任核心角色, (p)ppGpp 通过与 GTP 竞争而抑制酶的

功能<sup>[18]</sup>, 随着(p)ppGpp 的产生, GTP 池在不断减少, 影响 GTP 结合蛋白的活性。例如 rRNA 合成基因(*rrn* 操纵子)的启动过程受到 GTP 的调控, 当(p)ppGpp 累积时导致 GTP 含量下降间接抑制 rRNA 合成基因的转录<sup>[18,34]</sup>。

在革兰氏阳性菌中, (p)ppGpp 可能影响嘌呤生物合成的多个成分来调节 GTP 水平, 从而间接调控转录<sup>[6]</sup>。在枯草芽孢杆菌的研究中, (p)ppGpp 通过与嘌呤代谢途径的蛋白(如 PurF、Gmk、GuaB 等)相互作用抑制 GTP 的合成, 导致与 GTP 结合的蛋白活性改变, 例如间接抑制 rRNA 的产生<sup>[35]</sup>(图 3)。此外, CodY 是一种营养敏感的转录调节因子, 也是 GTP 响应调节器, 随着(p)ppGpp 的产生, GTP 池在不断减少, 这直接影响了 CodY 的活性, 因此(p)ppGpp

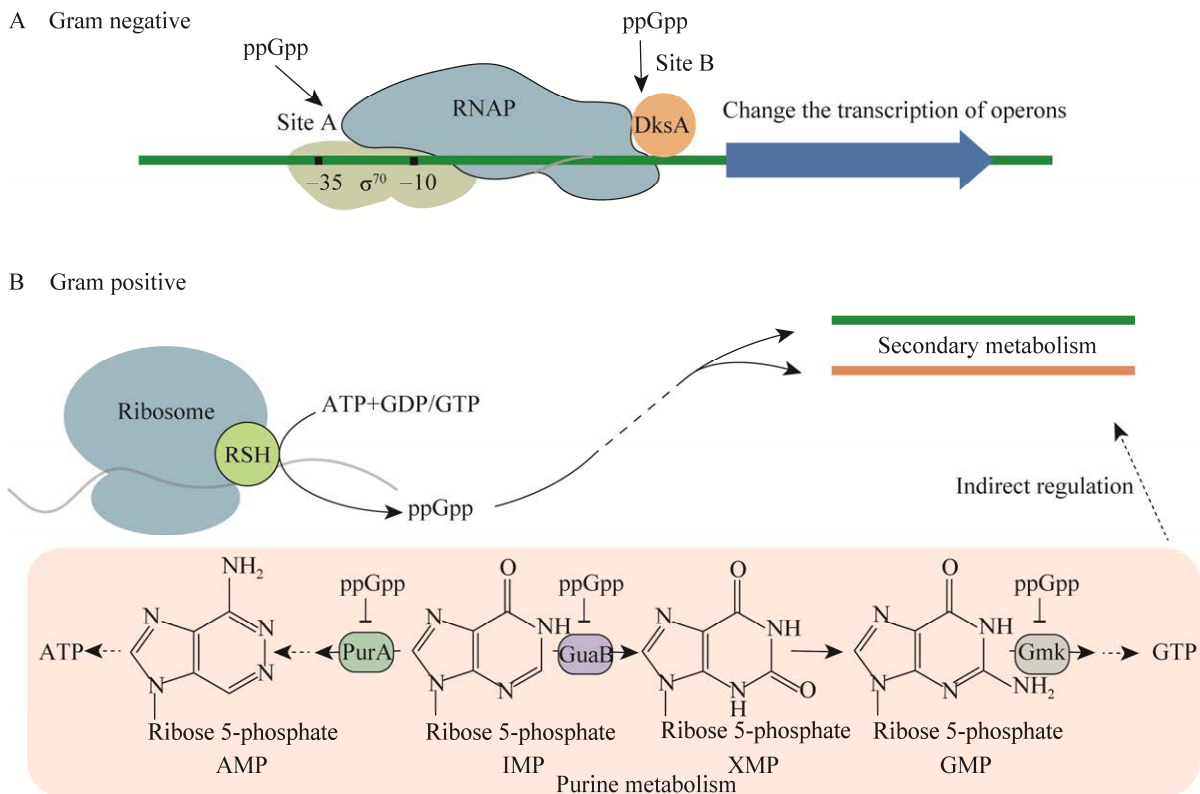


图 3 (p)ppGpp 调控微生物代谢的作用机制

Figure 3 Mechanism of (p)ppGpp regulating microbial metabolism.



和 CodY 之间存在反比关系<sup>[36]</sup>。在金黄色葡萄球菌中, (p)ppGpp 的积累通常导致 CodY 活性降低进而增加细菌毒力<sup>[37]</sup>。

### 3 (p)ppGpp 对细菌细胞周期的调控

在缓慢生长条件下, 细菌细胞周期至少可以分为 3 个不同的阶段: B 阶段是新细胞的诞生到染色体复制开始之间的时期, 类似于真核细胞的 G1 期; C 阶段为染色体复制所需的周期, 类似于真核细胞 S 期; D 阶段则是染色体复制完成到细胞分裂完成之间的周期<sup>[38-39]</sup>。C 阶段(染色体复制所需的周期)和 D 阶段(复制结束到分裂完成之间的周期)是细菌细胞周期中的 2 个关键阶段<sup>[40]</sup>。有研究发现细菌细胞大小与生长速率和

细胞周期进展(C+D 周期)密切相关, (p)ppGpp 对细菌细胞大小及生长速率的作用间接调控了细菌细胞周期<sup>[41]</sup> (图 4)。

细胞生长包括 2 个部分, 即质量积累和数量增加<sup>[42]</sup>。质量积累指的是蛋白质、RNA、DNA 和脂类等大分子的生物合成。由于蛋白质占干质量的一半以上, 其合成消耗了细胞总能量的 2/3, 因此质量积累的核心是蛋白质和核糖体的合成<sup>[43]</sup>。在大肠杆菌的研究中, (p)ppGpp 直接抑制 rRNA 的合成, 从而影响核糖体的合成。同时 (p)ppGpp 还可以正向调控各种核糖体冬眠因子如 Rmf、Hpf 和 RaiA 的表达, 进一步使核糖体失活。尽管 (p)ppGpp 通过与 DksA 协同作用于 RNAP, 激活了氨基酸的生物合成; 但是由于 (p)ppGpp 的存在导致核糖体合成量的大幅度减少, 进而减慢了细胞的质量积累<sup>[44]</sup>。

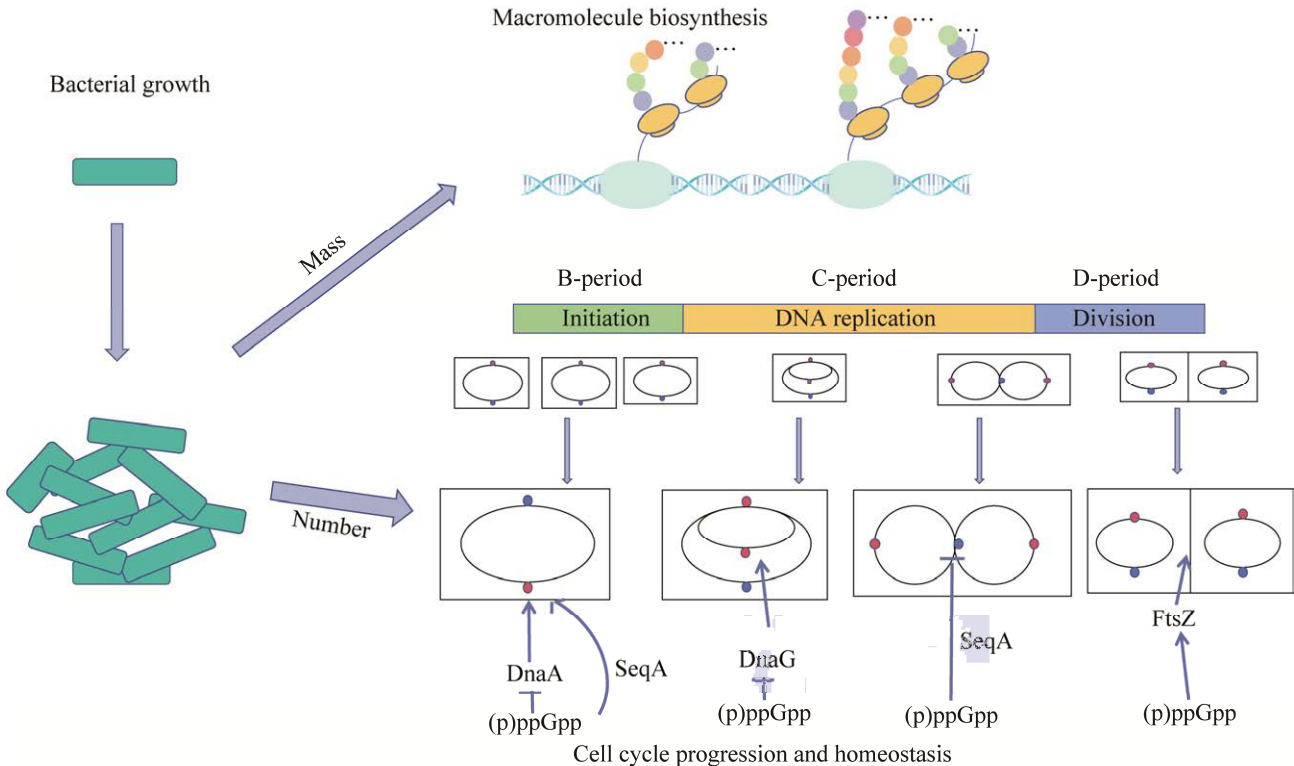


图 4 (p)ppGpp 调控细菌细胞周期的机制

Figure 4 The regulation of (p)ppGpp on the bacterial cell cycle.

细菌数量的增加主要取决于生长速率的高低,并且生长速率与细菌大小、细胞周期密切相关<sup>[45]</sup>。正常的生长条件下,大肠杆菌的复制起始发生在 *oriC* 位点,终止在 *ter* 位点, *ori/ter* 与生长速率呈正相关<sup>[46]</sup>。大肠杆菌的 *ori/ter* 比率随着生长速度的增加而显著增加,这是由于在快速生长期,染色体复制发生了重叠复制。在缺失(p)ppGpp 的突变株(p)ppGpp<sup>0</sup> 中, *ori/ter* 与生长速率之间的正相关性基本消失,该菌株即使在缓慢生长期 *ori/ter* 比率也维持在较高水平<sup>[38]</sup>。说明(p)ppGpp 能够降低 *ori/ter* 比率(由于 ppGpp 的作用靶点主要在转录起始过程,即降低启动子启动速率 *ori*)。ppGpp 通过抑制复制启动蛋白 DnaA 的转录发挥对 B 阶段的调控过程<sup>[41]</sup>, DnaA 蛋白含量降低抑制了 DNA 的复制,使得起点的数目和每单位质量的 DNA 含量降低,起始阶段的细胞质量增加<sup>[47]</sup>,进而抑制了新一轮的复制。此外,复制起始可以由除 DnaA 外的机制控制。例如, *seqA* 的敲除会导致细胞增大、C 周期持续时间和 D 周期持续时间增加,但 SeqA 如何对 ppGpp 作出反应尚不清楚<sup>[40]</sup>。这些研究表明(p)ppGpp 抑制并且延迟了染色体复制的起始(延长了 B 阶段)。

此外,营养缺乏条件下的(p)ppGpp<sup>0</sup> 菌株的 C 阶段比生长速率相近的野生型菌株的 C 阶段要长得多,说明染色体复制的延伸过程也受到(p)ppGpp 的调控<sup>[48]</sup>。DNA 引物酶(DnaG)是 DNA 复制的重要组成部分,负责合成 RNA 引物,启动前链和后链 DNA 合成。细菌 DnaG 的活性可由(p)ppGpp 调控,有研究认为(p)ppGpp 对枯草芽孢杆菌 DnaG 起始、扩展和保真度皆有影响。虽然(p)ppGpp 只是轻微影响 DnaG 的起始,但会强烈抑制引物的延伸,降低 DnaG 的加工能力,导致延伸的终止,高浓度的(p)ppGpp 与低浓度的 GTP 对 DnaG 的活性有协同抑制作用,体外

分析也表明(p)ppGpp 能够抑制多种细菌 DnaG 活性<sup>[49-50]</sup>。在金黄色葡萄球菌中, (p)ppGpp 与 DnaG 的部分结合位点与 NTP 底物的位点重叠,说明(p)ppGpp 模糊了 DnaG 的活性位点,直接阻碍了 NTP 的结合。由于 DnaG 活性与复制解旋酶活性、复制叉稳定性密切相关<sup>[51]</sup>, (p)ppGpp 对 DnaG 的调控也间接地影响了细菌细胞复制周期。

(p)ppGpp 通过调节细胞分裂蛋白 FtsZ 含量调节细菌的分裂过程(D 阶段)。缺乏(p)ppGpp 的大肠杆菌 ppGpp<sup>0</sup> 在营养下降的过程中形成丝状,表明(p)ppGpp 在细胞分裂过程中发挥作用<sup>[19]</sup>。随后发现(p)ppGpp 可以直接或间接调控 FtsZ 操纵子的转录。与野生型相比, ppGpp<sup>0</sup> 的细胞直径明显增大,单位细胞质量的 FtsZ 含量减少,表明在正常生长条件下,基础(p)ppGpp 对 FtsZ 有正调控作用<sup>[32,52-53]</sup> (图 4)。这些结果表明(p)ppGpp 在调节细菌细胞大小的同时间接调控了细胞周期。

## 4 (p)ppGpp 促进抗生素耐受和抗生素合成

(p)ppGpp 是严谨反应的效应分子,许多研究表明, (p)ppGpp 与抗生素耐药性密切相关<sup>[3]</sup>。相比于激活严谨反应所需的(p)ppGpp 水平, (p)ppGpp 的基础水平(低于激活严谨反应所需的水平)除了与细菌毒力相关外,还有助于抗生素耐受<sup>[54]</sup>。Rodionov 和 Ishiguro 早在 1995 年报道了(p)ppGpp 在诱导  $\beta$ -内酰胺类抗生素即青霉素耐药中的重要性<sup>[55]</sup>。Koskiniemi 等将肠道沙门氏菌细胞用氨基糖苷类抗生素处理时, (p)ppGpp 介导的氨基糖苷腺苷转移酶基因 *aadA* 表达上调,从而表现出对链霉素的耐药性<sup>[56]</sup>。(p)ppGpp 基础水平的增加后,可以直接调节编码青霉素结合蛋白 PBPs 或外排泵的基因表达谱来促进抗



生素耐药<sup>[57]</sup>。在干扰(p)ppGpp 的合成基因后,例如敲除单结构域单功能(p)ppGpp 合成酶基因 *relQ<sub>sa</sub>* 后,干扰了 *mecA* 基因表达,从而降低了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)对  $\beta$ -内酰胺类抗生素的耐受<sup>[58]</sup>。c-di-AMP 和(p)ppGpp 也能够同时调控 *mecA*/青霉素结合蛋白 PBP2a 介导的  $\beta$ -内酰胺类药物的耐药性<sup>[59]</sup>。类似结果也在链霉菌中发现,在(p)ppGpp<sup>0</sup> 菌株中几种抗生素的耐受性急剧降低<sup>[60]</sup>。研究表明,细菌细胞内(p)ppGpp 基础水平较高时,对通过干扰核酸生物合成或损伤而起作用的抗生素表现出更强的耐药性<sup>[36]</sup>。综上所述,(p)ppGpp 在抗生素耐受方面发挥作用,这可能是治疗耐药菌的一个潜在靶点。

链霉菌是存在于土壤中的革兰氏阳性细菌,可产生多种次级代谢产物,其中许多次级代谢物作为抗生素在临床和农业中起重要作用。(p)ppGpp 作为严谨反应信号分子,在核糖体工程和基因组重排后,能够激活(p)ppGpp 的合成<sup>[61-62]</sup>。早在 1987 年就有学者发现,灰色链霉菌的(p)ppGpp 合成缺陷突变菌株中,链霉素的产量降低,由此认为(p)ppGpp 的合成与次级代谢之间可能存在着某些联系<sup>[63]</sup>。在后来的其他菌种研究中,也证明这种联系的确存在。例如在氮限制条件下,天蓝色链霉菌 A3(2)中(p)ppGpp 的合成与十一烷基菌红素(undecylprodigioidin, Red)和放线菌紫素(actinorhodin, Act)呈正相关,当敲除了与(p)ppGpp 合成所相关的 *relA* 基因时,突变株  $\Delta relA$  未能产生 Red 和 Act<sup>[64]</sup>。当(p)ppGpp 积累时,调节因子 ActII-ORF4 和 RedD 激活了编码生物合成酶的基因。与 *actII-ORF4* 启动子结构域结合的转录调节因子 XdhR 是(p)ppGpp 的配体,(p)ppGpp 的累积使得 XdhR 与 *actII-ORF4* 启动子分离,从而促进 Act 的生物合成<sup>[65]</sup>。在

2008 年 Wang 等的研究中发现,由于(p)ppGpp 的积累,野生型天蓝色链霉菌中 Act 产量增加了 180 倍<sup>[66]</sup>。在淀粉酶产生链霉菌 1628 中,突变株  $\Delta relA$  抑制了抗生素基因簇的表达以及丰加霉素和四霉素 P 的产生<sup>[13]</sup>。同时,也有研究发现,(p)ppGpp 对次级代谢有负调控作用,在棒状链霉菌中,突变株  $\Delta relA$  中克拉维酸和头霉素 C 的产量比野生型菌株显著增加,克拉维酸的产量增加了 3-4 倍,而头霉素 C 的产量增加了约 2.5 倍<sup>[67]</sup>。然而(p)ppGpp 如何调控抗生素合成途径的机制尚未明确,而且(p)ppGpp 如何选择性提高某些抗生素产量而抑制某些抗生素途径的研究尚未解析。目前仅能证实(p)ppGpp 的代谢可以影响抗生素的产生,但是具体机制仍需要进一步解析。

## 5 展望

(p)ppGpp 介导的严谨反应广泛分布于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、链霉菌和金黄色葡萄球菌等细菌中。严谨反应赋予菌株抵抗环境应激、毒性、长期耐受性和生物膜形成能力。在严谨反应中,(p)ppGpp 的合成和水解由 Rel/SpoT 同系物(RSH)家族的蛋白质控制。(p)ppGpp 在细胞中许多靶点,使其可以重编程 DNA 复制、转录、核糖体生物合成和功能以及脂质代谢。但是,(p)ppGpp 如何控制转录和其他代谢过程取决于细菌种类,并在不同的微生物中通过不同的机制调节相同的过程。对大肠杆菌的研究揭示了(p)ppGpp 在细菌细胞周期和细胞大小的各个方面的调节作用,包括质量累积、数量增加、起始质量和 DNA 复制过程。(p)ppGpp 可能具有多个下游靶点,这些靶点协同作用对细胞周期和细胞大小调控产生影响。然而,还需要更多的工作来确定(p)ppGpp 下游的效应因子。此外,还不清楚(p)ppGpp 是否能调节其他物种如丝状细菌放线菌的细胞大小以及调节机制。

近年来, 直接感知翻译延伸率(elongation rate, ER)已被证明是大肠杆菌重要的营养感知机制, 可调节细胞(p)ppGpp 池以实现生长的速率控制。然而, ER 影响(p)ppGpp 池的机理仍然不完整。有研究发现在大肠杆菌中确实有 *relA* 基因后, 在指数生长阶段,  $\Delta relA$  缺失既不影响 (p)ppGpp 水平也不影响 ER 水平, 说明 RelA 蛋白的功能不需要这种传感机制<sup>[68]</sup>。因此推测 SpoT 可以感知 ER, 并在大肠杆菌指数生长过程中进一步调控(p)ppGpp 的合成/水解, 但其机制仍是一个有待解决的问题。

除此之外, (p)ppGpp 信号通路通过控制中枢代谢调整来应对环境波动, 激活应激反应, 并协调经典毒力因子的表达, 从而提高细胞适应性, 但其机制仍然需要进一步地探究。同时, (p)ppGpp 对毒力的影响也开始应用于疫苗的研究, 这成为疫苗研究的新思路。更有趣的是 (p)ppGpp 对链霉菌抗生素产生的影响, 可以利用(p)ppGpp 途径提高抗生素产量, 但相关研究相对较少, 其机制也需要更进一步地研究。

## 参考文献

- [1] STEINCHEN W, ZEGARRA V, BANGE G. (p)ppGpp: magic modulators of bacterial physiology and metabolism[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2072.
- [2] PETCHIAPPAN A, GOTTESMAN S. How does the alarmone ppGpp change bacterial cell metabolism? From genome-wide approaches to structure to physiology[J]. *Molecular Cell*, 2020, 80(1): 1-2.
- [3] IRVING SE, CHOUDHURY NR, CORRIGAN RM. The stringent response and physiological roles of (pp)Gpp in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(4): 256-271.
- [4] VOGELEER P, LÉTISSE F. Dynamic metabolic response to (p)ppGpp accumulation in *Pseudomonas putida*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 872749.
- [5] WOLZ C, GEIGER T, GOERKE C. The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in *Firmicutes*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(2/3): 142-147.
- [6] KRIEL A, BITTNER AN, KIM SH, LIU KQ, TEHRANCHI AK, ZOU WY, RENDON S, CHEN R, TU BP, WANG JD. Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance[J]. *Molecular Cell*, 2012, 48(2): 231-241.
- [7] BANGE G, BRODERSEN DE, LIUZZI A, STEINCHEN W. Two P or not two P: understanding regulation by the bacterial second messengers (p)ppGpp[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2021, 75: 383-406.
- [8] TRAXLER MF, ZACHARIA VM, MARQUARDT S, SUMMERS SM, NGUYEN HT, STARK SE, CONWAY T. Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the 'feast to famine' gradient in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(4): 830-845.
- [9] PAUSCH P, ABDEL SHAHID M, STEINCHEN W, SCHÄFER H, GRATANI FL, FREIBERT SA, WOLZ C, TURGAY K, WILSON DN, BANGE G. Structural basis for regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase and hydrolase within the stringent response orchestrator Rel[J]. *Cell Reports*, 2020, 32(11): 108157.
- [10] GACA AO, COLOMER-WINTER C, LEMOS JA. Many means to a common end: the intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(7): 1146-1156.
- [11] DAS B, BHADRA RK. (p)ppGpp metabolism and antimicrobial resistance in bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 563944.
- [12] SRIVATSAN A, HAN Y, PENG JL, TEHRANCHI AK, GIBBS R, WANG JD, CHEN R. High-precision, whole-genome sequencing of laboratory strains facilitates genetic studies[J]. *PLoS Genetics*, 2008, 4(8): e1000139.
- [13] SONG Y, ZHANG XL, ZHANG ZX, SHENTU XP, YU XP. Physiology and transcriptional analysis of ppGpp-related regulatory effects in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(1): e0120022.
- [14] ATKINSON GC, TENSON T, HAURYLIUK V. The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23479.

- [15] ELIZABETH CHAU NY, AHMAD S, WHITNEY JC, COOMBES BK. Emerging and divergent roles of pyrophosphorylated nucleotides in bacterial physiology and pathogenesis[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(5): e1009532.
- [16] BAI KH, YAN HY, CHEN X, LYU QY, JIANG N, LI JQ, LUO LX. The role of RelA and SpoT on ppGpp production, stress response, growth regulation, and pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(3): e0205721.
- [17] HASELTINE WA, BLOCK R, GILBERT W, WEBER K. MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis[J]. *Nature*, 1972, 238(5364): 381-384.
- [18] HAURYLIUK V, ATKINSON GC, MURAKAMI KS, TENSION T, GERDES K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(5): 298-309.
- [19] SEYFZADEH M, KEENER J, NOMURA M. spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(23): 11004-11008.
- [20] XIAO H, KALMAN M, IKEHARA K, ZEMEL S, GLASER G, CASHEL M. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(9): 5980-5990.
- [21] SINHA AK, WINTHER KS. The RelA hydrolase domain acts as a molecular switch for (p)ppGpp synthesis[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 434.
- [22] RUWE M, KALINOWSKI J, PERSICKE M. Identification and functional characterization of small alarmone synthetases in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1601.
- [23] WENDRICH TM, BLAHA G, WILSON DN, MARAHIEL MA, NIERHAUS KH. Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA[J]. *Molecular Cell*, 2002, 10(4): 779-788.
- [24] LI WT, BOUVERET E, ZHANG Y, LIU KQ, WANG JD, WEISSHAAR JC. Effects of amino acid starvation on RelA diffusive behavior in live *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 99(3): 571-585.
- [25] RUWE M, RÜCKERT C, KALINOWSKI J, PERSICKE M. Functional characterization of a small alarmone hydrolase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 916.
- [26] WANG BY, DAI P, DING D, DEL ROSARIO A, GRANT RA, PENDELUTE BL, LAUB MT. Affinity-based capture and identification of protein effectors of the growth regulator ppGpp[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(2): 141-150.
- [27] KITZENBERG DA, LEE JS, MILLS KB, KIM JS, LIU L, VÁZQUEZ-TORRES A, COLGAN SP, KAO DJ. Adenosine awakens metabolism to enhance growth-independent killing of tolerant and persister bacteria across multiple classes of antibiotics[J]. *mBio*, 2022, 13(3): e0048022.
- [28] HOGG T, MECHOLD U, MALKE H, CASHEL M, HILGENFELD R. Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response[J]. *Cell*, 2004, 117(1): 57-68.
- [29] RICHTER D. Uncharged tRNA inhibits guanosine 3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase [ppGppase], the *spoT* gene product, from *Escherichia coli*[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1980, 178(2): 325-327.
- [30] SANYAL R, VIMALA A, HARINARAYANAN R. Studies on the regulation of (p)ppGpp metabolism and its perturbation through the over-expression of nudix hydrolases in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 562804.
- [31] TAMMAN H, ERNITS K, ROGHANIAN M, AINELO A, JULIUS C, PERRIER A, TALAVERA A, AINELO H, DUGAUQUIER R, ZEDEK S, THUREAU A, PÉREZ J, LIMA-MENDEZ G, HALLEZ R, ATKINSON GC, HAURYLIUK V, GARCIA-PINO A. Structure of SpoT reveals evolutionary tuning of catalysis via conformational constraint[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(3): 334-345.
- [32] ZUO YH, WANG YM, STEITZ TA. The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex[J]. *Molecular Cell*, 2013, 50(3): 430-436.
- [33] YANG DZ, KONG Y, SUN W, KONG W, SHI YX. A dopamine-responsive signal transduction controls transcription of *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence genes[J]. *mBio*, 2019, 10(2): e02772-e02718.
- [34] KOLMSEE T, DELIC D, AGYENIM T, CALLES C, WAGNER R. Differential stringent control of *Escherichia coli* rRNA promoters: effects of ppGpp,

- DksA and the initiating nucleotides[J]. *Microbiology* (Reading, England), 2011, 157(Pt 10): 2871-2879.
- [35] ROSS W, SANCHEZ-VAZQUEZ P, CHEN AY, LEE JH, BURGOS HL, GOURSE RL. ppGpp binding to a site at the RNAP-DksA interface accounts for its dramatic effects on transcription initiation during the stringent response[J]. *Molecular Cell*, 2016, 62(6): 811-823.
- [36] KUNDRA S, COLOMER-WINTER C, LEMOS JA. Survival of the fittest: the relationship of (p)ppGpp with bacterial virulence[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 601417.
- [37] GEIGER T, WOLZ C. Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304(2): 150-155.
- [38] MU HY, HAN F, WANG Q, WANG YL, DAI XF, ZHU ML. Recent functional insights into the magic role of (p)ppGpp in growth control[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2023, 21: 168-175.
- [39] CLARK DJ. The regulation of DNA replication and cell division in *E. coli* B-r[J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1968, 33: 823-838.
- [40] ZHANG Q, ZHANG ZC, SHI HL. Cell size is coordinated with cell cycle by regulating initiator protein DnaA in *E. coli*[J]. *Biophysical Journal*, 2020, 119(12): 2537-2557.
- [41] NAZIR A, HARINARAYANAN R. (p)ppGpp and the bacterial cell cycle[J]. *Journal of Biosciences*, 2016, 41(2): 277-282.
- [42] BELLIVEAU NM, CHURE G, HUESCHEN CL, GARCIA HG, KONDEV J, FISHER DS, THERIOT JA, PHILLIPS R. Fundamental limits on the rate of bacterial growth and their influence on proteomic composition[J]. *Cell Systems*, 2021, 12(9): 924-944.e2.
- [43] DAI XF, ZHU ML. Coupling of ribosome synthesis and translational capacity with cell growth[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2020, 45(8): 681-692.
- [44] TRAVIS BA, SCHUMACHER MA. Diverse molecular mechanisms of transcription regulation by the bacterial alarmone ppGpp[J]. *Molecular Microbiology*, 2022, 117(2): 252-260.
- [45] SI FW, LI DY, COX SE, SAULS JT, AZIZI O, SOU C, SCHWARTZ AB, ERICKSTAD MJ, JUN YG, LI XT, JUN S. Invariance of initiation mass and predictability of cell size in *Escherichia coli*[J]. *Current Biology*, 2017, 27(9): 1278-1287.
- [46] COOPER S, HELMSTETTER CE. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1968, 31(3): 519-540.
- [47] LØBNER-OLESEN A, SKARSTAD K, HANSEN FG, von MEYENBURG K, BOYE E. The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12[J]. *Cell*, 1989, 57(5): 881-889.
- [48] POTRYKUS K, MURPHY H, PHILIPPE N, CASHEL M. ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(3): 563-575.
- [49] KRAEMER JA, SANDERLIN AG, LAUB MT. The stringent response inhibits DNA replication initiation in *E. coli* by modulating supercoiling of *oriC*[J]. *mBio*, 2019, 10(4): e01330-e01319.
- [50] GIRAMMA CN, DEFOER MB, WANG JD. The alarmone (p)ppGpp regulates primer extension by bacterial primase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(19): 167189.
- [51] MONACHINO E, JERGIC S, LEWIS JS, XU ZQ, LO ATY, O'SHEA VL, BERGER JM, DIXON NE, van OIJEN AM. A primase-induced conformational switch controls the stability of the bacterial replisome[J]. *Molecular Cell*, 2020, 79(1): 140-154.e7.
- [52] VINELLA D, JOSELEAU-PETIT D, THÉVENET D, BOULOC P, D'ARI R. Penicillin-binding protein 2 inactivation in *Escherichia coli* results in cell division inhibition, which is relieved by FtsZ overexpression[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(20): 6704-6710.
- [53] NAZIR A, HARINARAYANAN R. Inactivation of cell division protein FtsZ by Sula makes lon indispensable for the viability of a ppGpp<sup>0</sup> strain of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(4): 688-700.
- [54] BRYSON D, HETTLE AG, BORASTON AB, HOBBS JK. Clinical mutations that partially activate the stringent response confer multidrug tolerance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020, 64(3): e02103-e02119.
- [55] RODIONOV DG, ISHIGURO EE. Direct correlation between overproduction of guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) and penicillin tolerance in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(15): 4224-4229.
- [56] KOSKINIEMI S, PRÄNTING M, GULLBERG E, NÄSVALL J, ANDERSSON DI. Activation of cryptic aminoglycoside resistance in *Salmonella enterica*[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 80(6): 1464-1478.
- [57] AEDO S, TOMASZ A. Role of the stringent stress response in the antibiotic resistance phenotype of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(4): 2311-2317.
- [58] BHAWINI A, PANDEY P, DUBEY AP, ZEHRA A, NATH G, MISHRA MN. RelQ mediates the expression of  $\beta$ -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 339.
- [59] NOLAN AC, ZEDEN MS, KVIATKOVSKI I, CAMPBELL C, URWIN L, CORRIGAN RM, GRÜNDLING A, O'GARA JP. Purine nucleosides interfere with c-di-AMP levels and act as adjuvants to re-sensitize MRSA to  $\beta$ -lactam antibiotics[J]. *mBio*, 2023, 14(1): e0247822.
- [60] KIM N, SON JH, KIM K, KIM HJ, SHIN M, LEE JC. DksA modulates antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(12): 1472.
- [61] SONG Y, ZHANG ZX, ZHANG XL, YAO JY, YU XP, SHENTU XP. Genome shuffling mutant of *Streptomyces diastatochromogenes* for substantial improvement of toyocamycin production[J]. *Fermentation*, 2022, 8(10): 535.
- [62] FAN JX, SONG Y, TANG G, OCHI K, SHENTU XP, YU XP. Substantial improvement of tetraene macrolide production in *Streptomyces diastatochromogenes* by cumulative drug resistance mutations[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232927.
- [63] OCHI K. Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(8): 3608-3616.
- [64] CHAKRABURTTY R, BIBB M. The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(18): 5854-5861.
- [65] SIVAPRAGASAM S, GROVE A. The link between purine metabolism and production of antibiotics in *Streptomyces*[J]. *Antibiotics*, 2019, 8(2): 76.
- [66] WANG GJ, HOSAKA T, OCHI K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(9): 2834-2840.
- [67] GOMEZ-ESCRIBANO JP, MARTÍN JF, HESKETH A, BIBB MJ, LIRAS P. *Streptomyces clavuligerus relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2008, 154(Pt 3): 744-755.
- [68] WU C, BALAKRISHNAN R, BRANIFF N, MORI M, MANZANAREZ G, ZHANG Z, HWA T. Cellular perception of growth rate and the mechanistic origin of bacterial growth law[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(20): e2201585119.