

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-020

达托霉素生物合成过程的调控机制研究进展

方教乐^{1,2}, 吕中原^{1,2}, 孙晨番^{1,2}, 刘一帆^{1,2}, 徐炜锋^{1,2}, 毛旭明^{1,2}, 李永泉^{1,2}(¹ 浙江大学药物生物技术研究所, 浙江 杭州 310058; ² 浙江省微生物生化与代谢工程重点实验室, 浙江 杭州 310058)

摘要: 微生物是天然产物类药物的重要来源之一, 其中许多链霉菌来源的抗生素类药物一直活跃在对付细菌感染的前沿阵地。然而随着“超级细菌”的陆续发现, 以及新药研发速度的滞缓, 人类尚缺乏“超级细菌”的最终治疗手段。达托霉素是由玫瑰孢链霉菌 (*Streptomyces roseosporus*) 经发酵产生的一种新型环脂肽类抗生素, 由于其独特的结构及特殊的药物机制, 被视为多重耐药革兰阳性细菌引起的重症感染的最后一道防线。然而在工业发酵过程中, 达托霉素的生物合成水平很低, 有极高的提升潜力。本文总结了近年来国内外相关达托霉素合成的调控机制研究, 包括调控蛋白的挖掘、途径特异性调控机制、级联调控途径、脂酰前体合成途径、GBL信号途径与磷酸双组分系统及其协同调控机制等, 揭示了次级代谢调控网络的复杂性, 并阐述了通过调控通路重构实现达托霉素优质高产的策略。

关键词: 达托霉素; 生物合成; 调控网络; A因子级联调控途径; 磷酸双组分系统

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

An overview on regulatory mechanism of daptomycin biosynthesis

FANG Jiaole^{1,2}, LYU Zhongyuan^{1,2}, SUN Chenfan^{1,2}, LIU Yifan^{1,2}, XU Weifeng^{1,2}, MAO Xuming^{1,2},
LI Yongquan^{1,2}(¹Institute of Pharmaceutical Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; ²Zhejiang Provincial Key Laboratory for Microbial Biochemistry and Metabolic Engineering, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: Daptomycin is a new cyclic lipopeptide antibiotic, produced by *Streptomyces roseosporus*, with strong resistance to Gram-positive bacteria. Due to its special manner to block the biosynthesis of peptidoglycan, it is difficult for bacteria to develop resistance to daptomycin. Therefore, daptomycin is also known as the ‘last line of defense’ after vancomycin. After approval of daptomycin for injection (brand name cubicin) used to treat infections caused by some sensitive Gram-positive strains, domestic daptomycin products still mainly rely on imports to keep up with demand. In response to this urgent need, there have been many studies on the structure,

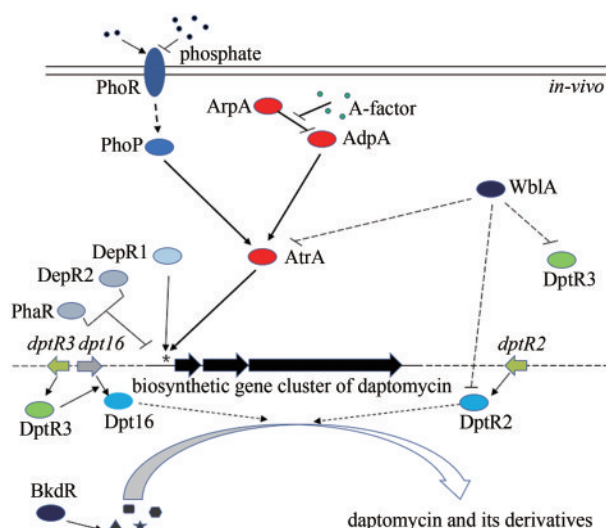
收稿日期: 2020-03-10 修回日期: 2020-11-05

基金项目: 国家新药创制重大专项 (2018ZX09711001-006-013); 国家自然科学基金 (3173002和31520103901)

引用本文: 方教乐, 吕中原, 孙晨番, 刘一帆, 徐炜锋, 毛旭明, 李永泉. 达托霉素生物合成过程的调控机制研究进展[J]. 合成生物学, 2020, 1(6): 722-731

Citation: FANG Jiaole, LYU Zhongyuan, SUN Chenfan, LIU Yifan, XU Weifeng, MAO Xuming, LI Yongquan. An overview on regulatory mechanism of daptomycin biosynthesis[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(6): 722-731

physicochemical properties, functional mechanisms and synthesis of daptomycin. The biosynthetic pathway of daptomycin has no typical pathway-specific regulators, suggesting that its synthetic regulation may have a unique mechanism. Based on analysis of daptomycin biosynthetic gene cluster, this article mainly summarizes researches on the regulatory mechanism during daptomycin biosynthesis. Screening and identifying regulatory pathways for daptomycin biosynthesis is of great significance for enriching the secondary metabolic regulation of streptomyces, and will also provide important candidate targets for improving daptomycin production. This review aims to give directions for the targeted transformation to obtain high-yield strains more efficiently, and to provide a theoretical reference for the improved biosynthesis of daptomycin. The regulation of microbial secondary metabolism can be divided into three levels, namely global regulation, pleiotropic regulation and pathway-specific regulation. Through analyzing and constructing a regulatory network for the synthesis of secondary metabolites, we can see the key targets of genetic transformation and provide an entry point for high-yield strategies for secondary metabolism, thereby helping us to more effectively carry out targeted high-yield transformation of bacteria and increase the yield of metabolites. With the identifications of gene functions in the daptomycin synthesis gene cluster and the clarification of the daptomycin biosynthesis regulatory network, more genetically targeted transformation and breeding optimization methods have emerged. At the same time, with the development and optimization of the fermentation process, the goal of greatly increasing production of daptomycin biosynthesis in China can be achieved.



Keywords: daptomycin; biosynthesis; regulatory network; A-factor; PhoR-PhoP

20世纪70年代青霉素的发现, 以及之后不断研发出来的抗生素, 成为对付病菌感染的有效武器; 但抗生素的过度使用, 导致了致病菌特别是革兰阳性菌产生耐药性, 形势日益严峻。且现阶段新药研发越来越难, 一旦感染“超级细菌”, 或将无药可治, 急需更新更有效的抗感染药物。

达托霉素是继万古霉素之后发现的新型抗生

素 [图1(a)], 其化学结构含多个非蛋白氨基酸^[1-2], 系通过非核糖体肽(NRPS)途径生物合成的一种环脂肽类药物。达托霉素最初由美国礼来公司从玫瑰孢链霉菌的发酵液中分离提取获得, 在2003年和2006年分别被美国和欧盟批准为用于治疗由革兰阳性菌包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)引起皮肤结构感染和菌血

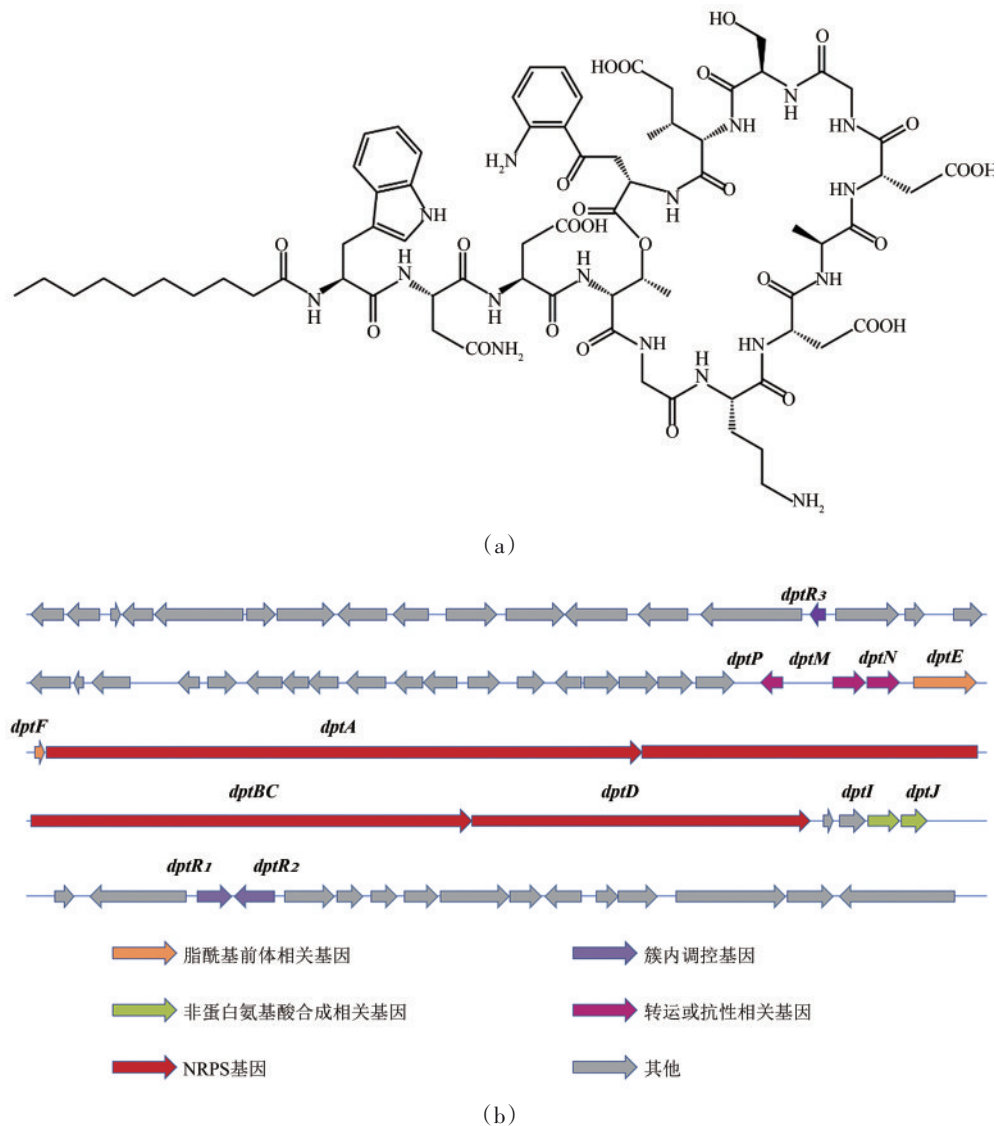


图1 达托霉素化学结构 (a) 和达托霉素的合成基因簇 (b)

Fig. 1 Structural formula of daptomycin (a) and biosynthetic gene clusters of daptomycin (b)

症^[3-4]，目前达托霉素国际市场年销售已达20亿美元。达托霉素存在一个特殊的EF-手性模块，与Ca²⁺结合后，插入到细菌的磷脂双分子层并寡聚化，在细胞膜上形成大孔隙引发钾离子外流，导致细胞死亡^[5-6]。其特殊的结构与作用机制，减少了与其他抗生素产生交叉耐药的概率，因此在临床上具有较高的应用价值，是治疗多重耐药革兰阳性细菌引起的重症感染的高端微生物药物。

然而，达托霉素生产菌发酵水平一直比较低，生产成本高，同时发酵产物存在多种同系物杂质影响药品质量。Baltz等^[2]对达托霉素生物合成相关机制[图1(b)]进行了系统研究，对其合成途

径及调控通路的认识也逐渐清晰。本文较为全面地总结了国内外有关达托霉素合成过程的调控机制研究，包括调控蛋白的挖掘、级联调控途径、脂酰前体合成途径调控、GBL信号途径与磷酸双组分系统协同调控机制等，揭示了次级代谢调控网络的复杂性，并阐述了通过调控途径重构达托霉素调控通路实现生产菌优质高产的策略。

1 链霉菌次级代谢调控因子的挖掘

原核生物的转录调控因子大约有50余种^[7]，

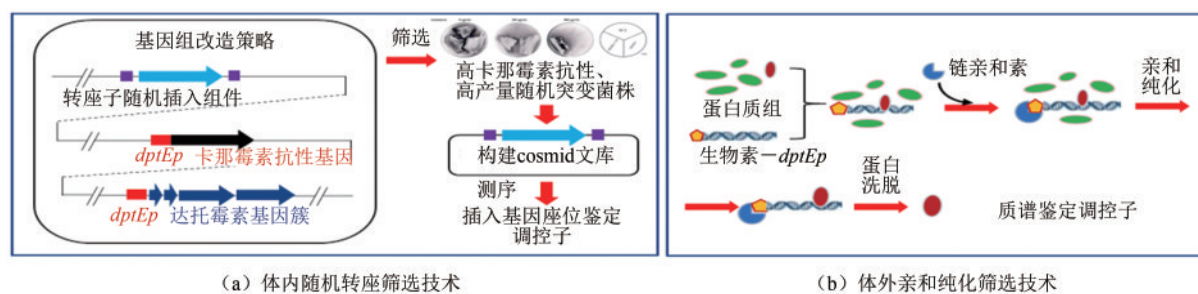


图2 体内随机转座与体外亲和纯化的调控元件筛选技术

Fig. 2 Workflow for identification of regulatory elements by random transposition and affinity purification

分为初级代谢相关的转录因子和次级代谢相关的转录调控因子。链霉菌次级代谢调控网络是微生物药物合成过程的管理系统^[8]，由全局调控、多效调控、途径特异性调控等蛋白组成，全局调控和特异性调控蛋白往往已知，因此挖掘多效调控因子是解析调控网络的关键。

Luo等^[9]构建了卡那霉素抗性报告系统结合Himar1转座子介导的基因组随机突变筛选调控蛋白技术，同时建立了利用启动子DNA与调控蛋白相互作用钓取多个调控蛋白的体外亲和纯化技术(图2)；以达托霉素合成基因簇唯一启动子*dptEp*为诱饵，利用体外亲和纯化和转座突变技术，筛选和鉴定到调控蛋白PhaR(MerR家族)^[9]、AtrA^[10]、DepR1(TetR家族)^[11]和DepR2(ArsR家族)^[12]。

TetR家族转录调节因子是最常见的原核转录调控因子之一，其名来源于四环素抗性阻遏蛋白(Tet repressor, TetR)，一般参与抗生素合成、转运以及环境应答等过程^[13-16]。TetR家族蛋白通常可与自身启动子结合，且结合位点具有高度序列相似性^[15]。Yuan等^[11]研究发现敲除*depR1*完全不生产达托霉素，而*depR1*高表达菌株达托霉素产量高于野生型；*depR1*在玫瑰孢链霉菌形态发育过程中发挥重要作用，*depR1*敲除株出现孢子缺陷型，回补菌株孢子形态恢复正常，*depR1*高表达菌株形态发育较野生型提前。

大多数原核生物AsrR蛋白家族调控因子的主要功能是感应环境中金属离子浓度和细菌致病性^[17-18]。Mao等^[12]发现DepR2可以与*dptEp*直接结合，并通过直接抑制达托霉素合成基因簇的转录从而负调控达托霉素的合成；*depR2*缺失突变株的达托霉素发酵水平显著增加，特别

是发酵4 d时，*depR2*缺失株的达托霉素发酵水平达到50.8 mg/L，比野生型高2.5倍；*depR2*回补菌株发酵水平和野生型相近，同时该基因簇合成的3种同系物A21978C₁₋₃在*depR2*缺失株的发酵水平均远高于野生型^[19]。

MerR家族调控因子一般参与环境因子应答、重金属胁迫以及抗生素合成^[20-22]。Luo等^[9]通过CRISPR/Cas9构建*phaR*缺失菌株，发现PhaR蛋白直接负调控达托霉素生物合成途径，缺失株中*dptE*的转录水平较野生型提升了2.68倍。研究发现*phaR*也具有自身正调控功能，对形态发育的试验表明，*phaR*缺失菌株在平板上的菌丝形态发育较野生型及回补菌株有明显的延迟。由此可见，PhaR是一个多效调控因子。

2 转录调控因子

链霉菌次级代谢的转录调控因子，主要参与调控簇内途径特异性调控基因或直接调控合成基因转录水平，进而调控生产菌的形态分化和药物的生物合成^[7]。玫瑰孢链霉菌中达托霉素合成基因簇附近发现了编码3个不同家族的转录调控因子*dptR1*、*dptR2*、*dptR3*，它们分别编码LuxR、DeoR、MarR家族蛋白，并推测可能参与达托霉素生物合成的途径特异性调控^[23]。

Jin等^[24]通过同源重组方式对*dptR1*进行了敲除，发现*dptR1*对达托霉素的合成没有太大影响。*dptR2*编码的调控蛋白属于DeoR家族，大多数DeoR家族调控形态发育和抗生素生物合成^[25-27]。Wang等^[28]发现*dptR2*缺失突变株不产达托霉素，但未发现调控靶点。但是DptR2可以

直接正调控自身的转录；推测 DptR2 调控达托霉素合成的方式可能是通过影响葡萄糖的代谢过程，从而调控达托霉素合成的氨基酸前体供应。

dptR3 是一个属于 MarR 家族的多效调控基因，该家族调控因子大多数参与耐药性、应激反应、毒性以及芳香族化合物分解代谢，且其转录调控因子的结合位点一般都具有回文序列^[29-31]。迄今为止，细菌和古细菌基因组中发现超过 12 000 种类似 MarR 家族的蛋白^[28]，但在链霉菌中只有少数被报道^[32-33]。Zhang 等^[34]研究发现 *dptR3* 不能与达托霉素合成基因簇上的启动子结合，缺失株达托霉素产量降低，并出现气生菌丝生长、孢子成熟延迟的表型；DptR3 直接正调控自身转录并间接正调控达托霉素的生物合成，同时直接负调控与其转录方向相反的上游基因 *dptR16*（编码 ABC 转运蛋白 ATP 结合蛋白）；进一步研究表明，DptR3 的主要靶基因 *dptR16* 对达托霉素的生物合成有积极的正效应。

放线菌中存在两类特有的转录调控因子，分别是 SARP 和 WhiB 家族^[7]，其中 WhiB 家族的调控因子与链霉菌形态分化与抗生素合成相关^[35]。Huang 等^[36]发现 WhiB 家族转录调控因子 WblA 是一个多效调控因子，*wblA* 缺失株孢子发育被阻断，同时达托霉素产量有 51% 的提升，且关键合成酶 *dptE* 及关键调控基因 *atrA*、*dptR2* 和 *dptR3* 的表达量均显著上升；但没有直接证据表明 WblA 可直接调控上述基因表达，推测 WblA 可能通过参与其他细胞进程影响达托霉素生物合成相关通路。

3 GBL 信号级联调控通路

γ -丁酮内酯 (γ -butyrolactone)^[37] 是一种链霉菌中普遍存在的信号分子，参与调控以抗生素为代表的次级代谢产物生物合成与细菌形态发育，可分为 A 因子 (A-factor) 型、维基尼丁烯羟酸内酯 (virginiae butanolide, VB) 型和 IM-2 型等三类^[38-40]，统称为 GBL 信号分子。灰色链霉菌的 A 因子信号调控途径研究比较清晰，Ohnishi 等^[41]发现其在链霉菌形态分化及次级代谢调控中均扮演着重要角色。菌体生长阶段，A

因子浓度低，A 因子信号受体蛋白 ArpA 结合于中心调控蛋白 AdpA 的启动子区域，抑制其转录发生；当菌体达到一定密度，A 因子大量积累，与 ArpA 蛋白结合并使后者从启动子区释放，解除对 *adpA* 基因的阻遏作用，AdpA 的大量翻译推动了次级代谢过程的启动。

玫瑰孢链霉菌中，A 因子信号通路参与调控达托霉素的合成和形态分化过程。敲除受体蛋白基因 *arpA*，达托霉素产量比野生型提高了 2.5 倍，且菌丝发育提前；敲除 *adpA* 的突变株不再产生达托霉素及色素，且菌丝发育不全，不再产生孢子。Mao 等^[10]通过转座子随机突变筛选得 A 因子通路调控的下游受体蛋白 AtrA，其受 AdpA 激活转录并被自身蛋白反馈调控，且 AtrA 参与正调控下游达托霉素合成基因簇转录进程，对达托霉素合成有正调控作用。综合上述研究结果，Mao 等^[10]提出了玫瑰孢链霉菌达托霉素生物合成的级联调控模式（图 3）。

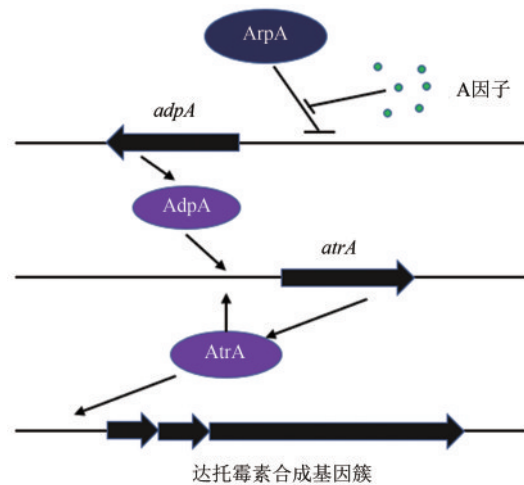


图3 达托霉素 A 因子级联调控通路

Fig. 3 The model of the regulation of A-factor regulatory cascade on daptomycin biosynthesis

4 磷酸双组分系统

链霉菌中，双组分系统是一类十分重要的全局调控系统^[42]，一般包括激酶和应答调控蛋白，前者接受各种环境信号后激活后者，后者将信号传递到下游受调控基因，比较典型的双组分系统有 PhoR-PhoP^[43]、AbsA1-AbsA2^[44]、AfsQ1-

AfsQ2^[45]、AfsK-AfsR^[46]。玫瑰孢链霉菌中，磷酸双组分系统 PhoR-PhoP 能够感应环境中磷酸盐浓度，通过胞内信号转导传递信号最终影响达托霉素合成^[47]。Zheng 等^[48] 研究发现内磷酸双组分系统与 A 因子信号途径存在交互调控（图4），PhoP 与 AdpA 均能与 *atrA* 启动子区域进行结合，从而产生竞争效应。低磷酸盐浓度下，PhoR-PhoP 被激活并发挥主要作用，从而提高下游受调控基因表达，进而提高达托霉素产量；高浓度下该系统则受到抑制。由此提出了 A 因子级联调控通路与磷酸双组分系统交叉调控的模型。由于磷营养代谢关联了微生物发酵过程的碳源和氮源的营养代谢，因此通过应答磷酸双组分系统和 A 因子级联调控通路，可进行针对性的发酵培养基与发酵条件优化，从而克服传统的发酵工艺优化的盲目性。

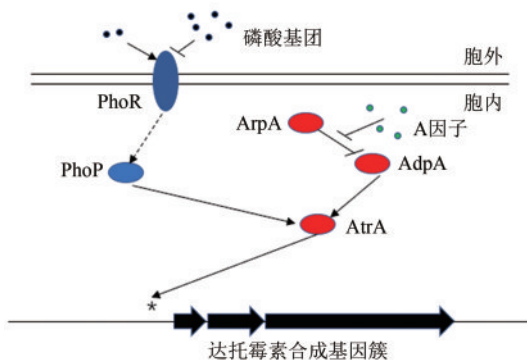


图4 GBL 信号通路与磷酸双组分系统交叉调控模型

Fig. 4 Crosstalk of A-factor regulatory cascade and two-component system PhoRP

5 脂酰前体合成途径

达托霉素合成过程中脂酰基前体的结构多样性是产生同系物杂质的根源，达托霉素合成起始于一个脂酰基转移蛋白，而脂酰基侧链不同则导致非目标产物的产生^[19]。达托霉素的同系物 A21978C_{1,3} 合成前体均来自支链脂肪酸，其产量远超达托霉素^[49]，严重影响了目标产品的质量。

研究表明，*bkdR* 是支链氨基酸转氨酶和支链 α -酮酸脱氢酶复合体 (BCDH complex) 的合成基因簇 *bkdA1B1C1* 的簇内转录调控激活因子，

其对自身有负调控作用，且加入达托霉素可以特异性消除 BkdR 对自身启动子的结合，从而消除该反馈作用。Luo 等^[50] 研究发现，敲除 *bkdR* 不仅会消除同系物 A21978C_{1,3}，同时达托霉素也会消失，回补菌株产量部分回复，而高表达菌株则不会表现出高产；*bkdR* 缺失株同时表现出气生菌丝发育提前与色素产生滞后现象，BkdR 蛋白可响应氨基酸代谢、孢子形态发育以及菌丝的形态分化^[51]，说明 *bkdR* 是一个全局调控因子（图5）。因此，解析脂酰前体支链脂肪酸合成途径，可对同系物合成途径进行定向改造，有助于达托霉素的优质高产和后续纯化。

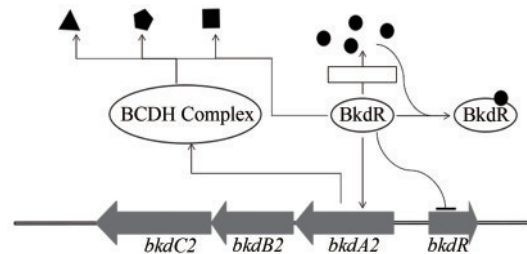


图5 BkdR对支链脂肪酸合成通路的调控模型

Fig. 5 Regulatory of BkdR on the production of branched-chain fatty acid

6 总结与应用

微生物药物的生物合成不仅受控于全局调控、多效调控、途径特异性调控等组成的复杂次级代谢调控网络^[8]，也受控于糖代谢、脂肪酸合成、氨基酸合成等初级代谢相关通路交互网络。在达托霉素的生物合成过程中，我们得以一窥微生物次级代谢调控网络的冰山一角，其中不仅有磷酸双组分与 A 因子信号途径的交叉调控作用，也有其他多效调控因子的级联调控，还包括脂酰基前体相关合成途径的簇内调控，整个系统在微生物体内和谐有序运行。通过剖析复杂的次级代谢调控网络，可以明晰生产菌遗传改造的关键靶点，为药物高产改造策略提供切入点。同时，针对调控途径的关键蛋白对发酵环境的响应，可精准地进行发酵工艺优化，从而克服传统工艺研究的盲目性。

基于上述机制研究，浙江大学李永泉课题组通过组合敲除 *arpA*、*phaR*、*depR2* 和高表达

depR1、重构 A 因子级联调控通路 *ArpA-AdpA-AtrA*，获得的高产菌 50 L 罐发酵水平达 0.93 g/L；通过调控脂酰前体合成途径，敲除其基因簇 *bkdA1B1C1*，消除了同系物杂质 A21978C_{1,3} 合成；基于合成生物体系对环境应答构建了优质高产发酵工艺，结合流加补料癸酸，达托霉素 10 t 罐发酵水平达 2.23 g/L，并在杭州中美华东制药有限公司实现了产业化，该公司是国内首家获批新药证书的支撑企业，填补了我国重症感染临床用药的空白，阻碍了国际原研美国 Cubist 制药公司进军我国临床用药市场。

7 展 望

抗生素的优质高产是一个系统性工程，不仅要考虑到菌种本身的遗传改造水平，也应关注环境因子的相关作用，以及发酵过程中的碳/氮源比例及成本。本文总结的一部分，不过是微生物来源的抗生素工业化优质高产过程中的一小部分工作，后续工作路阻且长。毕竟从实验室走进工厂，是梦想照进现实的过程，中间的每一步，都需缜密的思考及不懈的努力。

本文聚焦于达托霉素生物合成过程的调控机制研究，从多个层次的转录调控、级联调控通路、多信号途径的协同调控，探究达托霉素生物合成的关键调控节点。同时通过解析同系物杂质合成调控机制，消减旁路代谢产物以减少杂质合成，解除达托霉素合成的关键限制因素，为实现达托霉素高效生物合成提供理论依据。

纵观已有达托霉素相关调控研究报道，主要集中于基因转录水平的机制研究，着眼点在于次级代谢的信号通路的关键基因。但真正发挥调控作用的是调控通路，如玫瑰孢链霉菌初级代谢过程不到 50 h，而其达托霉素的生物合成过程历时 200 h 左右，正是调控通路支撑了如此漫长的次级代谢生物合成过程。在如此漫长的发酵过程中，不管是单个链霉菌还是整个种群，其生长形态及代谢水平均有着显著的差异，远非某一个基因或某一条调控通路的表达水平的改变所能解释。生命是动态而复杂的，而抗生素的合成只不过是细菌代谢过程中的一个重要

的副产物。因此，我们不仅要关注基因转录水平，更需对关键蛋白全生命过程进行追踪分析，揭示其时序调控机制。

另外，以往的很多研究表明，很多关键基因的遗传改造往往牵一发而动全身，并且很多高产改造也往往得不到最佳的改造效果。这是因为细菌的生理代谢进程如同一个黑盒子，我们无法看到其中的关联性与复杂度，很容易顾此失彼。随着科技的不断发展，新的技术不断涌现，我们得以从更加微观的空间尺度及更加精密的时间尺度上一窥细胞中正在发生的生理进程，这有助于我们摆脱传统研究中盲人摸象的困境，从而更好地进行创新和改革。

因此，对调控通路中关键调控蛋白的鲁棒性需要进一步探究，包括调控蛋白的修饰与降解机制，以及从动力学角度对级联调控通路进行解剖。从基因转录水平转向蛋白水平，是放线菌次级代谢调控领域研究全新的角度，这样才能更加深入理解达托霉素生物合成过程的调控网络复杂性。在前期的研究基础之上，借助大数据的挖掘，构建一个囊括整个次级代谢通路的调控网络，实时跟踪每个节点蛋白的表达水平，从而最终形成一个从基因转录到次级代谢生物合成的动态蛋白组学图谱网络，由点及面，深入直观地体现放线菌中复杂而动态的生理代谢进程，通过计算机技术进行辅助模拟设计，挖掘隐藏的关键节点，探索最佳组合策略，从而为优质高产改造提供更为精准的工具。

参 考 文 献

- [1] HUBER F M, PIEPER R L, TIETZ A J. The synthesis of A21978C analogs by *Streptomyces roseosporus* cultivated under carbon limitation and fed fatty acids [J]. *Journal of Biotechnology*, 1990, 7: 283-292.
- [2] DOEKEL S, COËFFET-LE GAL M F, GU Jianqiao, et al. Non-ribosomal peptide synthetase module fusions to produce derivatives of daptomycin in *Streptomyces roseosporus* [J]. *Microbiology*, 2008, 154(9): 2872-2880.
- [3] SAUERMAN R, ROTHENBURGER M, GRANINGER W, et al. Daptomycin: a review 4 years after first approval [J]. *Pharmacology*, 2008, 81: 79-91.

- [4] SMITH J R, CLAEYS K C, ZASOWSKI E J, et al. Daptomycin resistance [M]// MAYERS D L, SOBEL J D, OUELLETTE M, et al. Antimicrobial drug resistance: mechanisms of drug resistance. Springer International Publishing; 2017: 307-317.
- [5] PERSECHINI A, MONCRIEF N D, KRETSINGER R H. The EF-hand family of calcium-modulated proteins [J]. Trends in Neurosciences, 1989, 12(11): 462-467.
- [6] ROBBEL L, MARAHIEL M A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(36): 27501-27508.
- [7] ROMERO-RODRÍGUEZ A, ROBLEDO-CASADOS I, SÁNCHEZ S. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2015, 1849(8): 1017-1039.
- [8] LIU Gang, CHATER K F, CHANDRA G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(12): 112-143.
- [9] LUO Shuai, CHEN Xin'ai, MAO Xuming, et a. Transposon-based identification of a negative regulator for the antibiotic hyper-production in *Streptomyces* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(15): 6581-6592.
- [10] MAO Xuming, LUO Shuai, ZHOU Richeng, et al. Transcriptional regulation of the daptomycin gene cluster in *Streptomyces roseosporus* by an autoregulator, AtrA [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(12): 7992-8001.
- [11] YUAN Penghui, ZHOU Richeng, CHEN Xuepeng, et a. DepR1, a TetR family transcriptional regulator, positively regulates daptomycin production in an industrial producer, *Streptomyces roseosporus* SW0702 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(6): 03002.
- [12] MAO Xuming, LUO Shuai, LI Yongquan. Negative regulation of daptomycin production by DepR2, an ArsR-family transcriptional factor [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(6): 1653-1658.
- [13] RAMOS J L, MARTÍNEZ-BUENO M, MOLINA-HENARES A J, et al. The TetR family of transcriptional repressors [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005, 69(2): 326-356.
- [14] XU Delin, SEGHEZZI N, ESNAULT C, et al. Repression of antibiotic production and sporulation in *Streptomyces coelicolor* by overexpression of a TetR family transcriptional regulator [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(23): 7741-7753.
- [15] LIU Wenshuai, ZHANG Qinling, GUO Jia, et al. Increasing avermectin production in *Streptomyces avermitilis* by manipulating the expression of a novel TetR-family regulator and its target gene product [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(15): 5157-5173.
- [16] WEI Junhong, TIAN Yuqing, NIU Guoqing, et al. GouR, a TetR family transcriptional regulator, coordinates the biosynthesis and export of gougerotin in *Streptomyces graminearus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(2): 714-722.
- [17] BUSENLEHNER L S, PENNELLA M A, GIEDROC D P. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(23): 131-143.
- [18] KIM Hae Mi, AHN Bo-Eun, LEE Ju-Hyung, et al. Regulation of a nickel-cobalt efflux system and nickel homeostasis in a soil actinobacterium *Streptomyces coelicolor* [J]. Metallomics, 2015, 7(4): 702-709.
- [19] ZMIJEWSKI M J, BRIGGS B, OCCOLOWITZ J. Role of branched chain fatty acid precursors in regulating factor profile in the biosynthesis of A21978C complex [J]. The Journal of Antibiotics, 1986, 39(10): 1483-1485.
- [20] TARDU M, BULUT S, KAVAKLI I H. MerR and ChrR mediate blue light induced photo-oxidative stress response at the transcriptional level in *Vibrio cholerae* [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40817.
- [21] BROWN N L, STOYANOV J V, KIDD S P, et al. The MerR family of transcriptional regulators [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(2): 145-163.
- [22] SCHUMACHER M A, DEN HENGST C D, BUSH M J, et al. The MerR-like protein BldC binds DNA direct repeats as cooperative multimers to regulate *Streptomyces development* [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1139.
- [23] MIAO V, COËFFET-LE GAL M F, BRIAN P, et al. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry [J]. Microbiology, 2005, 151(5): 1507-1523.
- [24] 靳旭, 魏维, 饶敏, 等. 链霉菌 HCCB10043 中调控基因 *dptR1*、*dptR2* 及 *dptR3* 对 A21978C 合成的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(7): 490-493.
- JIN Xu, WEI Wei, RAO Min, et al. Influence of regulatory genes *dptR1*, *dptR2* and *dptR3* on A21978C production in *Streptomyces sp.* HCCB10043 [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2014, 39(7): 490-493.
- [25] ULANOVA D, KITANI S, FUKUSAKI E, et al. SdrA, a new DeoR family regulator involved in *Streptomyces avermitilis* morphological development and antibiotic production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(24): 7916-

- 7921.
- [26] GE Beibei, LIU Yan, LIU Binghua, et al. Characterization of novel DeoR-family member from the *Streptomyces ahngroscopicus* strain CK-15 that acts as a repressor of morphological development [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(20): 8819-8828.
- [27] JEON Jong-Min, CHOI Tae-Rim, LEE Bo-Rahm, et al. Decreased growth and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by deletion of a highly conserved DeoR family regulator, SCO1463 [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2019, 24(4): 613-621.
- [28] WANG Feng, REN Nini, LUO Shuai, et al. DptR2, a DeoR-type auto-regulator, is required for daptomycin production in *Streptomyces roseosporus* [J]. Gene, 2014, 544(2): 208-215.
- [29] MARTIN R G, ROSNER J L. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(12): 5456-5460.
- [30] INOKA C P, GROVE A. Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2010, 2(5): 243-254
- [31] GROVE A. Regulation of metabolic pathways by MarR family transcription factors [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2017, 15: 366-371.
- [32] OH So-Young, SHIN Jung-Ho, ROE Jung-Hye. Dual role of OhrR as a repressor and an activator in response to organic hydroperoxides in *Streptomyces coelicolor* [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(17): 6284-6292.
- [33] HUANG Hao, GROVE A. The transcriptional regulator TamR from *Streptomyces coelicolor* controls a key step in central metabolism during oxidative stress [J]. Mol. Microbiol., 2013, 87(6): 1151-1166.
- [34] ZHANG Qinling, CHEN Qiong, ZHUANG Shuai, et al. A MarR family transcriptional regulator, DptR3, activates daptomycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces roseosporus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(11): 3753-3765.
- [35] BUSH M J, BIBB M J, CHANDRA G, et al. Genes required for aerial growth, cell division, and chromosome segregation are targets of WhiA before sporulation in *Streptomyces venezuelae* [J] mBio, 2013, 4(5): e00684-00613.
- [36] HUANG Xingwei, MA Tingmei, TIAN Jun, et al. wblA, a pleiotropic regulatory gene modulating morphogenesis and daptomycin production in *Streptomyces roseosporus* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 669-677.
- [37] NISHIDA H, OHNISHI Y, BEPPU T, et al. Evolution of γ -butyrolactone synthases and receptors in *Streptomyces* [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(8): 1986-1994.
- [38] OHNISHI Y, HORINOUCHE S. The A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces* [J]. Biofilms, 2004, 1(4): 319-328.
- [39] KIM Hyun Soo, NIHIRA T, TADA H, et al. Identification of binding protein of virginiae butanolide C, an autoregulator in virginiamycin production, from *Streptomyces virginiae* [J]. The Journal of Antibiotics, 1989, 42(5): 769-778.
- [40] HASHIMOTO K, NIHIRA T, SAKUDA S, et al. IM-2, a butyrolactone autoregulator, induces production of several nucleoside antibiotics in *Streptomyces* sp. FRI-5 [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, 73(6): 449-455.
- [41] OHNISHI Y, YAMAZAKI H, KATO J, et al. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(3): 431-439.
- [42] RODRÍGUEZ H, RICO S, DÍAZ M, et al. Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. [J] Microbial Cell Factories, 2013, 12(1): 127.
- [43] SOLALANDA A, MOURA R S, MARTIN J F. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003, 100(10): 6133-6138.
- [44] BRIAN P, RIGGLE P, SANTOS R A, et al. Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(11): 3221-3231.
- [45] WANG Rui, MAST Y, WANG Jin, et al. Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor* [J]. Molecular Microbiology, 2013, 87(1): 30-48.
- [46] UMEYAMA T, LEE Ping-Chin, UEDA K, et al. An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus* [J]. Microbiology, 1999, 145

(9): 2281-2292.

- [47] MARTIN J F. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(16): 5197-5201.
- [48] ZHENG Yang, SUN Chenfan, FU Yu, et al. Dual regulation between the two-component system PhoRP and AdpA regulates antibiotic production in *Streptomyces* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(5): 725-737.
- [49] DEBONO M, BARNHART M, CARRELL C B, et al. A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1987, 40(6): 761-777.
- [50] LUO Shuai, CHEN Xin'ai, MAO Xuming, et al. Regulatory and biosynthetic effects of the *bkd* gene clusters on the production of daptomycin and its analogs A21978C1-3 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(4): 271-279.
- [51] SPRUSANSKY O, STIRRETT K, SKINNER D D, et al. The *bkdR* gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(2): 664-671.



通讯作者: 李永泉(1962—),男,博士,求是特聘教授,研究方向为微生物合成生物学、微生物次级代谢调控和微生物制药。
E-mail: lyq@zju.edu.cn



通讯作者: 毛旭明(1978—),男,博士,教授,研究方向为基于合成生物学的微生物药物开发、微生物药物生物合成的调控机制研究、基于多组学的新活性和新结构微生物天然产物挖掘、微生物天然产物生物合成的酶学机制和化学机制研究。
E-mail: xmmao@zju.edu.cn



第一作者: 方教乐(1991—),男,博士研究生,研究方向为微生物次级代谢产物调控,链霉菌隐性基因簇激活,表观遗传学研究。
E-mail: fjl20@live.cn

广告索引:武汉国家生物产业基地(后彩一)/Cell Signaling Technology(后彩二)/诚志生命科技有限公司(封三)