

代谢调控技术在放线菌生物合成抗生素的应用进展

张亚, 周长林*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 放线菌的次级代谢产物丰富多样, 一直是抗生素及其先导化合物的主要来源之一。通过遗传操作来改造放线菌, 代谢调控其抗生素的生物合成也是近年来微生物次级代谢的研究热点。结合近年来的研究成果, 从调节调控基因表达, 增加基因簇拷贝数及基因簇的异源表达, 过表达抗性基因和转运基因, 提高前体代谢通量和核糖体工程等方面综述了代谢调控技术在放线菌生物合成抗生素的应用进展。

关键词 抗生素; 生物合成; 代谢调控; 放线菌

中图分类号 Q936 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)04-0393-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150402

Application of metabolic regulation in the antibiotic biosynthesis of actinomycetes

ZHANG Ya, ZHOU Changlin*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The secondary metabolites of actinomycetes are rich and diverse, which have become important sources of antibiotics and their lead compounds. The study of microbial secondary metabolism is focused on metabolic regulation of antibiotic biosynthesis in actinomycetes by genetic manipulation. On the basis of the advances of recent years, this paper summarizes the application progress of metabolic regulation used for improving biosynthesis of antibiotics in actinomycetes, concluding of regulating the expression of regulatory genes, increasing the copy numbers of gene clusters and heterologous expression, over-expressing the resistance genes and transfer gene, improving precursor metabolic flux, and ribosome engineering.

Key words antibiotics; biosynthesis; metabolic regulation; actinomycetes

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. ZL2014SK0035) and the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

微生物能够产生多种具有生物活性的次级代谢产物, 其中大部分活性次级代谢产物来源于放线菌^[1], 这些物质具有抗菌、抗肿瘤、杀虫、免疫抑制和免疫激活等功效, 被广泛地应用于医药业、农业、兽业、食品工业等领域。近年来, 随着抗生素耐药菌的不断出现, 深入研究放线菌的次级代谢调控过程, 提高放线菌抗生素的生物合成, 发现和生新抗生素变得越来越迫切。

代谢调控是通过重组 DNA 技术或其他技术, 有目的地改变生物体中已有的代谢网络和表达调

控网络, 改善细胞的性能, 并用于化学转化、能量转移及大分子装配的过程。本文总结了通过代谢调控来提高放线菌抗生素生物合成的不同方法(图1), 主要包括调节调控基因表达, 增加基因簇拷贝数及基因簇的异源表达, 过表达抗性基因和转运基因, 提高前体代谢通量和核糖体工程。

1 调节调控基因的表达

抗生素的生物合成基因一般成簇存在, 除了含有结构基因之外, 通常还包含调控基因以及抗生素

的抗性基因和转运基因。抗性基因、调控基因和转运基因组成了一种协同机制,共同调控抗生素的生物合成。

调控因子是一类在基因表达调控中,能直接或间接地识别或结合在各顺式作用元件序列上,参与调控靶基因转录效率的蛋白质。抗生素生物合成基因簇的转录起始普遍依赖全局或途径特异调控蛋白的调控。全局调控因子不仅调控多种抗生素的产生,还参与放线菌的形态学分化,其调控的方式较为复杂和广泛。而途径特异性调控因子主要参与特定的抗生素的生物合成过程,与全局调控因子相比,其调节的方式更为直接。有些调控因子既可以作为全局调控因子,也可以对抗生素的生物合成进行途径特异性调控。例如 TetR 家族转录调节因子(TetR family transcriptional regulator, TFR)。

TFRs 是一类常见的原核转录调控蛋白家族,参与调控多种代谢和生理过程,如抗生素的生物合成、三羧酸循环和生物膜的形成。TFRs 通常以同源二聚体的形式存在,每一个单体包括一个相对保守的 N 端 DNA 结合(DNB)区域,一个 C 端配体结合和聚合作用(LBD)区域。通常 DNB 区域具有保守的螺旋-转角-螺旋的特征性结构,而 LBD 区域则根据结合配体的不同而表现出序列和结构的多样性。TFRs 的 C 端区域介导自身形成同源二聚体,二聚体化的 TFRs 的 N 端 DNB 结构域与被调控基因的上游启动子区域结合,使 RNA 聚合酶-启动子转录复合物不能转变成有效的转录状态,从而阻止下游受调控基因的转录起始^[3]。但是当 TFRs 与小分子配体结合后,会使构象发生改变并从 DNA 上解离,从而启动下游基因的转录^[4]。

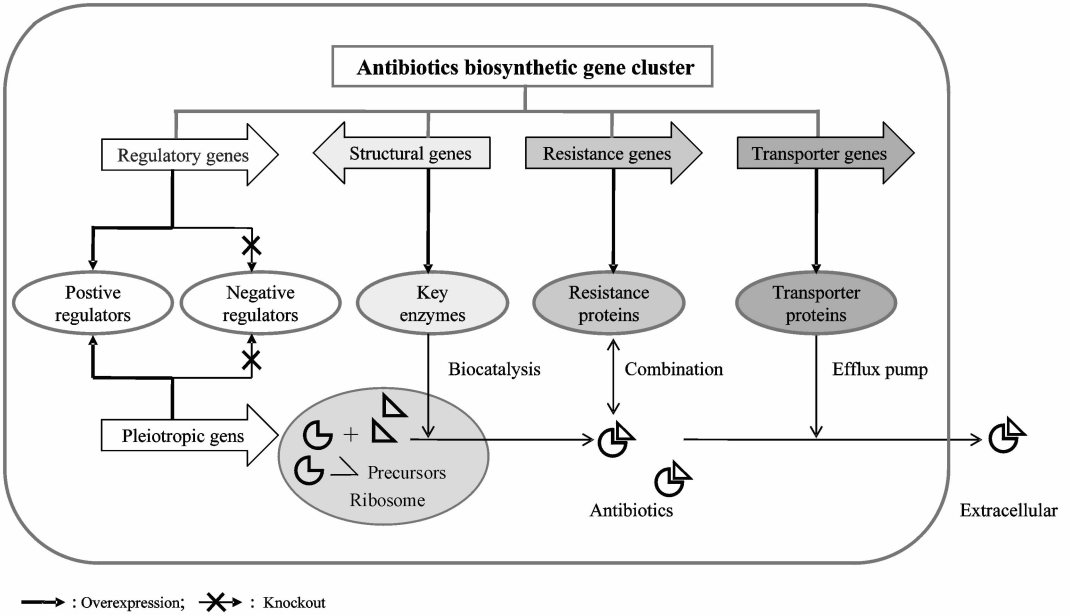


图1 代谢调控技术在放线菌生物合成抗生素的应用进展^[2]

1.1 途径特异性调控因子

途径特异性调控基因一般存在于次级代谢产物的生物合成基因簇内,主要包括链霉菌抗生素调控蛋白(SARP)家族。途径特异性调控因子的作用分为正向调节和负向调节,通过途径特异性正调控基因的过表达,负调控基因的敲除可以提高抗生素的生物合成。近年来,途径特异性调控因子应用于提高放线菌抗生素的生物合成取得了较多的进展(表1)。

Zhu 等^[5]从深海放线菌(*Marinactinospora ther-*

motolerans SCSIO 00652)中发现了一种核苷类抗生素 A201A,利用全基因组扫描(whole-genome scanning)技术,对基因组片段化后建立的基因组文库进行测序,识别并确证了其生物合成基因簇,并通过序列比对分别推测了基因簇中不同基因的功能,查找并验证了一个负向调控基因 *mtdA*。HPLC 分析基因敲除菌株的发酵提取物,发现抗生素 A201A 的产量提高了近 25 倍。

Zhang 等^[6]发现 PapR6 是普那霉素(pristinamycin II)生物合成的一种途径特异性激动剂,

papR6 基因敲除菌株普那霉素的产量明显降低,过表达*papR6* 基因后的菌株普那霉素的合成明显增加。凝胶阻滞实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSAs) 分析表明: PapR6 蛋白与 *snaF* 基因的上游区域发生特异性结合。*snaF* 基因是 *snaFE1E2GHIJK* 操纵子的第 1 个基因,负责前体

异丁酰基辅酶 A 和中间体 C11 α,β -不饱和硫酯的生成。转录分析结果表明, *papR6* 基因敲除后的菌株 *snaFE1E2GHIJK* 操纵子的表达量明显减少。这些结果证明了 PapR6 调控因子通过直接调控结构基因 *snaF* 的表达上升,增加前体和中间体的产生,从而提高普那霉素的生物合成。

表 1 途径特异性调控因子在放线菌生物合成抗生素中的应用

调控基因	调控因子	放线菌菌株	抗生素	参考文献
<i>mtdA</i>	MtdA	<i>Marinactinospora thermotolerans</i> SCSIO 00652	- A201 A	[5]
<i>papR6</i>	PapR6	<i>S. pristinaespiralis</i>	+ Pristinamycin II	[6]
<i>ccaR</i>	CcaR	<i>S. clavuligerus</i>	+ Cephamycin C	[7]
<i>jadR/ jadR2</i>	JadR/ JadR2	<i>S. venezuelae</i> ISP5230	- Jadomycin	[8]
<i>mtmR</i>	MtmR	<i>S. argillaceus</i>	+ Mithramycin	[9]
<i>farR3</i>	FarR3	<i>S. lavendulae</i> FRI-5	+ Indigoidine	[10]
<i>farR4</i>	FarR4	<i>S. lavendulae</i> FRI-5	- Indigoidine	[10]
<i>aur1PR3</i>	Aur1PR3	<i>S. aureofaciens</i> CCM 3239	+ Auricin	[11]
<i>aur1PR4</i>	Aur1PR4	<i>S. aureofaciens</i> CCM 3239	+ Auricin	[12]
<i>sgvR2/sgvR3</i>	SgvR2/SgvR3	<i>S. griseoviridis</i>	+ Griseoviridin; + Viridogrisein	[13]
<i>tmcT</i>	TmcT	<i>Streptomyces</i> sp. CK4412	+ Tautomycetin	[14]

+ :Postive regulation; - :Negative regulation

1.2 全局调控因子

除了途径特异性调控因子以外,全局调控因子则是位于抗生素生物合成基因簇之外,可以调控多种次级代谢途径,并不局限于一种抗生素的生物合

成途径,因此其调控的范围更加广泛、模式更加复杂。近年来,全局调控因子应用于提高抗生素生物合成并取得了较多进展(表 2)。

表 2 全局调控因子在放线菌生物合成抗生素中的应用

调控基因	调控因子	放线菌菌株	抗生素	参考文献
<i>Crp</i>	Crp	<i>S. coelicolor</i>	+ Act; + Red; + CDA	[15]
<i>absA1- absA2</i>	AbsA1- AbsA2	<i>S. flavopersicus</i>	+ Pulvomycin	[16]
<i>abrA1- abrA2</i>	AbrA1- AbrA2	<i>S. coelicolor</i> M145	+ Act; + Red; + CDA	[17]
<i>relA</i>	RelA	<i>S. ghanaensis</i> ATCC 14672	+ Moenomycin	[18]
<i>Sig6</i>	Sig6	<i>S. avermitilis</i>	- Avermectin	[19]
<i>wblA</i>	WblA	<i>S. ghanaensis</i>	- Moenomycin	[22]
<i>wblA</i>	WblA	<i>S. peucetius</i>	- DXR; - DNR	[23]
<i>rok7B7</i>	Rok7B7	<i>S. coelicolor</i>	- Prodigionines; - Siderophores	[24]
<i>adpA</i>	AdpA	<i>Streptomyces</i> sp. FR-008	+ Candididin D	[25]
<i>adpA</i>	AdpA	<i>S. avermitilis</i>	+ Avermitilis	[25]
<i>sabR</i>	SabR	<i>S. ansochromogenes</i>	+ Nikkomycin	[26]

+ :Postive regulation; - :Negative regulation

Crp 是天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 的一种全局调控因子,与菌体的形态学分化有关。Gao 等^[15]首次证明了 Crp 参与了调控链霉菌的次级代谢和抗生素的生物合成。利用染色质免疫共沉淀-芯片 (ChIP-chip) 技术分析 Crp 蛋白的基因结合位点,在 22 个与次级代谢相关的基因簇中,有 8 个是与 Crp 蛋白结合的位点。对这些次级代谢基因进行转录分析,发现基因的转录水平明显受到了影响,其中有 6 个基因簇与 ChIP-chip 技术分析的

Crp 蛋白的结合位点相同。*crp* 基因敲除后的菌株抗生素 Act、Red 和 CDA 的生物合成明显下降。这些数据都表明 Crp 蛋白可以通过与抗生素的生物合成基因簇相互作用,从而影响多种次级代谢过程,在天蓝色链霉菌中作为一种全局正向调控因子,调控多种抗生素的生物合成。

WblA (sco) 是天蓝色链霉菌中的一种全局负调控因子,负调控抗生素 Act、Red 和 CDA 的产生^[20-21]。Rabyk 等^[22]在链霉菌 *Streptomyces gha-*

naensis 中发现了 *wblA* (*gh*) 基因,敲除该基因后,默诺霉素 (moenomycin) 的产量增加了 2.3 倍。Noh 等^[23] 构建了一个阿霉素 (doxorubicin, DXR) 和道诺霉素 (daunorubicin, DNR) 高产菌株的全基因库,以 *wblA* (*sco*) 作为探针,利用种间 DNA 微矩阵分析 (interspecies DNA microarray analysis),发现链霉菌 *Streptomyces peucetius* 中存在 *wblA* (*spe*) 与 *wblA* (*sco*) 具有 95% 的氨基酸序列相似度。基因 *wblA* (*spe*) 敲除后的菌株,DXR 和 DNR 的产量有将近 70% 的增长。这些结果表明:*wblA* (*spe*) 和 *wblA* (*gh*)、*wblA* (*sco*) 一样,是一种全局负调控基因,调控多种抗生素的生物合成。*wblA* 基因广泛存在于各种链霉菌中,负调控各类抗生素的生物合成。

2 调控抗生素生物合成基因簇的表达

2.1 增加抗生素生物合成基因簇的拷贝数

在抗生素的生物合成基因簇已知的条件下,增加基因簇的拷贝数可以达到直接增加抗生素生物合成的目的,但是由于同样受到其他调控因素的影响,抗生素的产量提高有限。

井冈霉素 A (validamycin A, VAL-A) 是一种抗真菌类抗生素,用于治疗水稻和其他植物的纹枯病。Zhou 等^[27] 通过在链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 5008 中集成 *zouA*-介导的 DNA 扩增系统,在 VAL-A 基因簇内部扩增了约 3~5 个 VAL-A 的生物合成基因簇,工程菌摇瓶培养后,VAL-A 的产量比野生菌株提高了 34%。

Liao 等^[28] 在尼克霉素的产生菌 *Streptomyces*

ansochromogenes 7100 的染色体中插入了 35 kb 的尼克霉素生物合成基因簇,工程菌的尼克霉素产量明显提高。其中尼克霉素 X 产量达到 880 mg/L,是野生菌株的 4 倍;尼克霉素 Z 的产量达到 180 mg/L,是野生菌株的 1.8 倍。

达托霉素 (daptomycin) 是链霉菌 *Streptomyces roseosporus* 产生的一种天然的环脂肽类抗生素,具有广谱的革兰阳性菌杀菌活性。Liao 等^[29] 在链霉菌 *Streptomyces roseosporus* 中敲除达托霉素的结构基因 *dptJ*,工程菌的达托霉素的产量降低了 50%,而 *dptJ* 基因加倍的菌株,达托霉素的产量提高了 110%。

2.2 调控抗生素生物合成基因簇的异源表达

由于从自然界中分离的野生菌株对其性质研究有限,代谢网络复杂,中间产物复杂、不稳定或者终产物表达量低,限制了其体内抗生素生物合成途径的研究。构建研究背景清晰的、容易进行基因操作的异源表达的宿主,有利于发掘与研究新抗生素。较为常用的异源表达宿主有 *Streptomyces coelicolor*、*Streptomyces avermitilis* 以及 *Streptomyces lividans* 等。

多种放线菌基因组测序分析结果表明,目前被发现的放线菌次级代谢产物仅为总量的 10%,甚至更少^[30]。基因组挖掘 (genome mining) 通过生物信息学技术分析基因组序列中酶和基因簇的保守区,识别次级代谢生物合成基因簇,并通过基因技术改造菌株,使低产菌株变高产,激活沉默的生物合成基因簇。基因组挖掘与异源表达结合是激活沉默的生物合成基因簇,发现新抗生素的一种有效的方法 (图 2)。

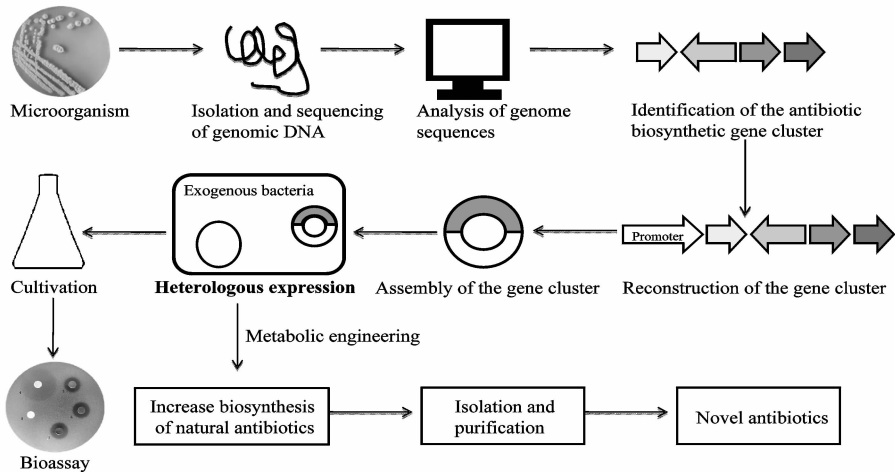


图 2 基因挖掘技术和异源表达应用于发现新抗生素的过程^[36]

Luo 等^[31]应用基因组挖掘技术从链霉菌 *Streptomyces gneseus* 中发现了一个沉默的 PTM (Polycyclic tetramate macrolactam) 生物合成基因簇 SGR810-815, 应用 plug-and-play 的合成生物学方法, 在基因簇上游加入 6 种不同来源的启动子, 将基因簇重新构建和组装后, 在链霉菌 *Streptomyces lividans* 中异源表达, 其中来源于 *Cellulomonas flavigena* 的 *rpsL_p* 启动子使基因簇相比于中等强度的 *hrdB* 启动子表达量提高了 150 倍。通过 HPLC-MS 分析发酵产物, 发现了 3 种新的 PTMs 抗生素。

Komatsu 等^[32]在链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 中外源表达了 20 个次级代谢产物的整个基因簇序列, 结果发现绝大多数基因得到表达, 甚至包括原来沉默的基因, 因此异源表达可以作为唤醒沉默基因表达、发现新抗生素的一种手段。

3 调控抗性基因的表达

抗性基因与菌体对抗生素的耐受性有关, 当大多数的抗性蛋白都与抗生素结合后, 抗生素的量超过宿主菌自身的耐受, 抗性蛋白就会抑制相关基因的表达, 阻止抗生素生物合成过程的继续。因此, 增加抗性基因的表达, 提高菌体对自产抗生素的耐受性, 可以提高抗生素的生物合成。

Jin 等^[33]通过在链霉菌 *Streptomyces pristinaespiralis* 中过表达抗性基因 *ptr*, 筛选得到两株工程菌 SPR1 和 SPR2, 普那霉素的产量分别可以达到 0.11 和 0.15 g/L, 与野生菌 *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486 相比, 抗生素的产量分别提高了 6~8 倍。因此增加抗性基因的拷贝数可以提高放线菌对自身产生的抗生素浓度的耐受性, 作为提高抗生素生物合成的一种手段。

4 调控转运基因的表达

当细胞内抗生素的浓度超过了菌体自身的承受能力, 就会对菌体的生长代谢产生影响, 包括抗生素的生物合成。因此, 及时把合成的抗生素泵出胞外, 使胞内抗生素浓度维持在适度范围, 才能促使菌体不断合成抗生素。抗生素泵出胞外的过程需要转运蛋白的参与, 因此提高转运蛋白的表达量, 可以达到提高抗生素生物合成的目的。

阿维霉素 (avermectins) 是链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 产生的一种大环聚酮类杀虫剂, 操纵子

avtAB 存在阿维霉素生物合成基因簇的上游, 编码一种 ABC 转运蛋白。这种蛋白与哺乳动物的多重耐药泵 Pgp 蛋白有高度的同源性, 负责将胞内的阿维霉素泵出胞外。Qiu 等^[34]通过在链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 中过表达 *avtAB* 基因, 提高转运蛋白 AvtAB 的合成量, 使多余的阿维霉素被泵出胞外, 减少了阿维霉素对其合成基因的反馈抑制, 使阿维霉素的产量提高了约 50%。

OtrC 是链霉菌 *Streptomyces rimosus* 产生的一种土霉素抗性蛋白, 氨基酸序列分析发现 OtrC 可能是一种 ATP-binding cassette (ABC) 转运蛋白蛋白, 有多重耐药功能。将 *otrC* 基因分别在菌株 M4018、SR16 中加倍表达, 菌株的 OTC 产量分别提高了 1.6 和 1.4 倍; *otrC* 敲除后的菌株 OTC 产量下降了 20%^[35]。

5 调控前体的代谢通量

前体是某一代谢中间体的前一阶段的物质, 因此前体的量将成为抗生素生物合成的瓶颈。利用重组 DNA 技术进行对前体代谢途径进行遗传改造, 对初级代谢通量进行重新定向, 尤其是对前体生物合成的关键酶进行操作, 增加特定前体的利用率, 从而增加抗生素的生物合成。

Zabala 等^[36]通过在链霉菌 *Streptomyces argillaceus* 中过表达 *pgm* 基因 (编码磷酸葡萄糖变位酶) 或敲除 *glgCa* 基因 (编码 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶), 提高了前体 1-磷酸葡萄糖的产量, 从而提高了光辉霉素的产量。同时在基因过表达后的菌株发现了 4 种光辉霉素的衍生物, 与光辉霉素相比, 其抗肿瘤活性更好, 毒性更小。

Phenazinomycin 是一种天然产物, 具有抗鼠源肿瘤作用, 对阿霉素耐药的白血病细胞 P388 也有效。Qin 等^[37]在链霉菌 *Streptomyces iakyrus* DSM 41873 中敲除放线菌素 G (actinomycin G) 基因簇中的 *acmG5'* 基因, 阻断了放线菌素 G 的产生, 使前体分支酸的利用减少, 从而增加了 phenazinomycin 的合成。

Ren 等^[38]通过敲除梧宁霉素基因簇中编码 I 型聚酮合酶 (PKS) 的基因 *tmsI*, 抑制了辅酶 A 合成梧宁霉素的过程, 使其更多地合成制霉菌素, 从而使制霉菌素的产量提高了 10 倍以上。因此敲除前体代谢的分支途径, 对前体的代谢通量进行重新

分配,可以提高另一种目标抗生素的产量。

6 调控核糖体相关蛋白的表达

目前抗生素的生物合成途径主要有 PKS、NRPS、RiPPs 等,其中 RiPPs 途径合成的抗生素需要在核糖体中完成,因此与核糖体功能相关的蛋白也影响到其抗生素的生物合成。

核糖体再循环因子(ribosome recycling factor, RRF)是一种负责在翻译终止时将核糖体与 RNA 解离的蛋白,在链霉菌 *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 中过表达基因 *frr*,增加了抗生素丰加霉素的生物合成^[39]。RimP-SC 是一种核糖体组装蛋白,在链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 中敲除 *rimP-SC* 基因,增加了抗生素 Act、CDA 的生物合成;敲除链霉菌 *Streptomyces venezuelae* 中的 *rimP-SV*,同样明显提高了抗生素 jadomycin 的产量^[40]。

7 结 语

放线菌基因组中存在大量沉默的次级代谢产物生物合成基因簇,这些基因簇在试验条件下未表达或者表达量低,放线菌中还存在大量有价值的次级代谢产物,可以作为药物开发的重要来源。随着生物信息学的发展,利用基因组挖掘技术来探测和识别次级代谢生物合成基因簇,通过重组 DNA 技术对基因簇进行改造和组装,异源表达激活沉默的基因簇及发现新抗生素,并通过代谢调控的方法来改造放线菌,提高抗生素生物合成,这些将会成为放线菌抗生素生物合成研究的主要方向。代谢调控技术将会为提高放线菌抗生素生物合成及开发新抗生素带来广泛的应用与前景。

参 考 文 献

- [1] Bérty J. Thoughts and facts about antibiotics; where we are now and where we are heading [J]. *J Antibiot*, 2012, **65** (8): 385–395.
- [2] Olano C, Lombó F, Méndez C, et al. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering [J]. *Metab Eng*, 2008, **10** (5): 281–292.
- [3] Rey DA, Nentwich SS, Koch DJ, et al. The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [J]. *Mol Microbiol*, 2005, **56** (4): 871–887.
- [4] Orth P, Schnappinger D, Hillen W, et al. Structural basis of gene

- regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, **7** (3): 215–219.
- [5] Zhu Q, Li J, Ma J, et al. Discovery and engineered overproduction of antimicrobial nucleoside antibiotic A201A from the deep-sea marine actinomycete *Marinactinospira thermotolerans* SCSIO 00652 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, **56** (1): 110–114.
- [6] Zhang Y, Zou Z, Niu G, et al. JadR and jadR2 act synergistically to repress jadomycin biosynthesis [J]. *Sci China Life Sci*, 2013, **56** (7): 584–590.
- [7] Dun J, Zhao Y, Zheng G, et al. PapR6, a putative atypical response regulator, functions as a pathway-specific activator of pristinamycin II biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* [J]. *J Bacteriol*, 2015, **197** (3): 441–450.
- [8] Alvarez-álvarez R, Rodríguez-García A, Santamarta I, et al. Transcriptomic analysis of *Streptomyces clavuligerus* ΔccaR::tsr: effects of the cephamycin C-clavulanic acid cluster regulator CcaR on global regulation [J]. *Microb Biotechnol*, 2014, **7** (3): 221–231.
- [9] Flórez AB, Alvarez S, Zabala D, et al. Transcriptional regulation of mithramycin biosynthesis in *Streptomyces argillaceus*: dual role as activator and repressor of the PadR-like regulator MtrY [J]. *Microbiology*, 2014, **161** (Pt 2): 272–284.
- [10] Kurniawan YN, Kitani S, Maeda A, et al. Differential contributions of two SARP family regulatory genes to indigoidine biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* FRI-5 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98** (23): 9713–9721.
- [11] Novakova R, Rehakova A, Kutas P, et al. The role of two SARP family transcriptional regulators in regulation of the auricin gene cluster in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 [J]. *Microbiology*, 2011, **157** (Pt 6): 1629–1639.
- [12] Rehakova A, Novakova R, Feckova L, et al. A gene determining a new member of the SARP family contributes to transcription of genes for the synthesis of the angucycline polyketide auricin in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, **346** (1): 45–55.
- [13] Xie Y, Wang B, Liu J, et al. Identification of the biosynthetic gene cluster and regulatory cascade for the synergistic antibacterial antibiotics griseoviridin and viridigrisein in *Streptomyces griseoviridis* [J]. *ChemBiochem*, 2012, **13** (18): 2745–2757.
- [14] Nah JH, Park SH, Yoon HM, et al. Identification and characterization of wblA-dependent tmcT regulation during tautomycin biosynthesis in *Streptomyces* sp. CK4412 [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, **30** (1): 202–209.
- [15] Gao C, Hindra, Mulder D, et al. Crp is a global regulator of antibiotic production in streptomycetes [J]. *MBio*, 2012, **3** (6): pii: e00407-12. doi:10.1128/mBio.00407-12.
- [16] McKenzie NL, Thaker M, Koteva K, et al. Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene *absA1* [J]. *J Antibiot*, 2010, **63** (4):

- 177–182.
- [17] Yepes A, Rico S, Rodríguez-García A, *et al.* Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(5):1371–1381.
- [18] Makitrynssky R, Rebets Y, Ostash B, *et al.* Genetic factors that influence moenomycin production in *Streptomyces* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, **37**(6):559–566.
- [19] Jiang LB, Liu YP, Wang P, *et al.* Inactivation of the extracytoplasmic function sigma factor Sig6 stimulates avermectin production in *Streptomyces avermitilis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, **33**(10):1955–1961.
- [20] Kang SH, Huang J, Lee HN, *et al.* Interspecies DNA microarray analysis identifies WblA as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* [J]. *J Bacteriol*, 2007, **189**(11):4315–4319.
- [21] Fowler-Goldsworthy K, Gust B, Mouz S, *et al.* The actinobacteria-specific gene wblA controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *Microbiology*, 2011, **157**(Pt 5):1312–1328.
- [22] Rabyk M, Ostash B, Rebets Y, *et al.* *Streptomyces ghanaensis* pleiotropic regulatory gene wblA_{gh} influences morphogenesis and moenomycin production [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, **33**(12):2481–2486.
- [23] Noh JH, Kim SH, Lee HN, *et al.* Isolation and genetic manipulation of the antibiotic down-regulatory gene, wblA ortholog for doxorubicin-producing *Streptomyces* strain improvement [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86**(4):1145–1153.
- [24] Świątek MA, Gubbens J, Bucca G, *et al.* The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* [J]. *J Bacteriol*, 2013, **195**(6):1236–1248.
- [25] Wang T, Bai L, Zhu D, *et al.* Enhancing macrolide production in *Streptomyces* by coexpressing three heterologous genes [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2012, **50**(1):5–9.
- [26] Pan Y, Wang L, He X, *et al.* SabR enhances nikkomycin production via regulating the transcriptional level of sanG, a pathway-specific regulatory gene in *Streptomyces ansochromogenes* [J]. *BMC Microbiol*, 2011, **11**:164.
- [27] Zhou TC, Kim BG, Zhong JJ. Enhanced production of validamycin A in *Streptomyces hygroscopicus* 5008 by engineering validamycin biosynthetic gene cluster [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98**(18):7911–7922.
- [28] Liao G, Li J, Li L, *et al.* Cloning, reassembling and integration of the entire nikkomycin biosynthetic gene cluster into *Streptomyces ansochromogenes* lead to an improved nikkomycin production [J]. *Microb Cell Fact*, 2010, **9**:6.
- [29] Liao G, Wang L, Liu Q, *et al.* Manipulation of kynurenine pathway for enhanced daptomycin production in *Streptomyces roseosporus* [J]. *Biotechnol Prog*, 2013, **29**(4):847–852.
- [30] Bachmann BO, Van Lanen SG, Baltz RH. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making [J]? *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, **41**(2):175–184.
- [31] Luo Y, Huang H, Liang J, *et al.* Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster [J]. *Nat Commun*, 2013, **4**:2894.
- [32] Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, *et al.* Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites [J]. *ACS Synth Biol*, 2013, **2**(7):384–396.
- [33] Jin Z, Jin X, Jin Q, *et al.* Conjugal transferring of resistance gene PTR for improvement of pristnamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, **160**(6):1853–1864.
- [34] Qiu J, Zhuo Y, Zhu D, *et al.* Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **92**(2):337–345.
- [35] Yu L, Yan X, Wang L, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of an ATP-binding cassette transporter OtrC from *Streptomyces rimosus* [J]. *BMC Biotechnol*, 2012, **12**:52.
- [36] Zabala D, Braña AF, AB Flórez, *et al.* Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus* [J]. *Metab Eng*, 2013, **20**:187–197.
- [37] Qin Z, Wang X, Rateb ME, *et al.* Disruption of a methyltransferase gene in actinomycin G gene cluster in *Streptomyces iakyrus* increases the production of phenazinomycin [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, **352**(1):62–68.
- [38] Ren J, Cui Y, Zhang F, *et al.* Enhancement of nystatin production by redirecting precursor fluxes after disruption of the tetramycin gene from *Streptomyces ahysgroscopicus* [J]. *Microbiol Res*, 2014, **169**(7/8):602–608.
- [39] Ma Z, Tao L, Bechthold A, *et al.* Overexpression of ribosome recycling factor is responsible for improvement of nucleotide antibiotic-tocamycin in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98**(11):5051–5058.
- [40] Pan Y, Lu C, Dong H, *et al.* Disruption of rimP-SC, encoding a ribosome assembly cofactor, markedly enhances the production of several antibiotics in *Streptomyces coelicolor* [J]. *Microb Cell Fact*, 2013, **12**:65.