

Streptomyces griseus의 특이적 포자형성에 관여하는 유전자의 전사량 분석

지원재*

국립생물자원관 생물자원활용부 유용자원분석과

Received: July 26, 2016 / Revised: September 5, 2016 / Accepted: October 1, 2016

Transcriptional Analysis of Genes Involved in Ectopic Sporulation in *Streptomyces griseus*

Won-Jae Chi*

Biological and Genetic Resources Assessment Division, National Institute of Biological Resource, Incheon 22689, Republic of Korea

Two *Streptomyces griseus* strains, a wild-type strain and an A-factor-dependent transcriptional activator mutant strain harboring multiple copies of a gene, *dasA*, that encodes a substrate-binding protein of the ATP-binding cassette transporter, showed severe ectopic sporulation of young substrate hyphae in response to glucose. The effect of *dasA* overexpression on the ectopic sporulation of *Streptomyces* strains was evaluated by comparing the transcriptomes of the strain harboring multiple copies of *dasA* and a strain harboring empty vector. By DNA microarray, 4 genes (SGR794, SGR2469, SGR3656, and SGR3657) and 3 clusters (SGR795-797, SGR2377-2378, and SGR6997-6998) were differentially expressed by more than 2-fold in *S. griseus* strains harboring *dasA*. The DNA microarray result was validated by low-resolution S1 nuclease mapping.

Keywords: *Streptomyces griseus*, ectopic sporulation, DNA microarray, low resolution S1 nuclease mapping, RT-PCR

서 론

방선균은 토양미생물로서 항생제, 항암제, 면역억제제, 각종 효소를 비롯한 수많은 생리활성물질을 생산하는 중요한 산업적 균군으로 알려져 있다. 또한 방선균은 생육환경이 나쁠 때는 포자로 존재하다가 주위 환경이 좋아지면 발아하여 기저균사를 형성하고 기중균사를 거쳐 다시 포자를 형성하는 생활사를 갖고 있다. 이와 같은 이차대사 생산의 생리적 분화와 형태적 분화는 서로 밀접하게 관련되어 복잡한 조절 메커니즘에 의해서 조절받고 있는 것으로 알려져 있다[5].

예를 들면, 방선균 *Streptomyces griseus*는 세포의 소분자 신호전달물질(A-factor)에 의한 조절[1, 3], 긴축감응인자(ppGpp)에 의한 조절, 단백질 인산화 시스템(Ser/Tyr/Thr phosphorylation system, two component regulatory system,

sugar phosphotransferase system)에 의한 조절 등에 의해서 cross talk 또는 별개의 기작으로 이차대사 생산과 형태 분화가 조절된다. 이외에도 방선균의 이차대사 생산과 형태 분화가 DasR과 같은 global transcriptional regulator에 의해서 tight 하게 조절된다고 보고된 바 있다[14].

S. griseus 변이주들 중에서 NP4 균주는 glucose가 함유된 고체배지에서 기저균사로부터 특이적인 포자형성(ectopic sporulation) 과정을 거치는데, 이렇게 형성된 특이적 포자(ectopic spore)는 기중균사로부터 형성된 일반적인 포자와는 다른 특징들(크기, 모양, 세포벽의 두께, 라이소자임과 열에 대한 민감성)을 갖고 있는 것으로 알려져 있다[16]. NP4 균주는 ATP-binding cassette (ABC) transporter gene의 DasR 조절 시스템이 UV에 의해서 변이가 유도된 균주인데, 이 균주에 ABC transporter의 substrate-binding protein인 DasA를 과발현시키면 생육 초기의 기저균사로부터 특이적인 포자형성이 촉진된다. 또한 Seo 등은 DasA를 코딩하는 유전자인 *dasA*를 pIJ486 벡터에 삽입하여 *dasA* 과발현벡터(pES1)를 제작한 후 *S. griseus* 야생주에 형질전환하였을 때에도 형질전환체가 glucose의 존재하에서 기저균사로부터

*Corresponding author

Tel: +82-32-590-7113, Fax: +82-32-590-7472

E-mail: wjchi76@korea.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

특이적 형태분화가 진행되는 것을 관찰하였다[16]. 이러한 특이적 포자형성에 관여하는 유전자의 확인은 방선균이 주변 환경에 반응하여 복잡한 형태분화를 유도하는 조절 메커니즘을 이해하는데 중요한 단서이다. 본 연구에서는 *S.*

griseus 야생주에서 *dasA* 유전자의 과발현에 의해서 유도된 기저균사의 비특이적 형태분화에 관여하는 유전자군을 DNA microarray 법과 low resolution S1 nuclease mapping 법을 이용한 전사량 분석을 통하여 알아보고자 하였다.

Table 1. Primers used in this study.

Primer	Target gene	Position (5') ^a	Sequence (5' to 3')
For RT-PCR			
SGR795-RTF	SGR795	+509	CGGAGGCGGTGAAATCCACGGCGG
SGR795-RTR		+583	GGAGCATCGCGTTCGAGGTGTCGG
SGR795(6)-RTF	SGR795-6	+519 (SGR795)	CTCCTGTGTGGCTTCGGCGGCAC
SGR795(6)-RTR		+347 (SGR796)	CGGGTGACGATCGGTTGGCCTCG
SGR796-RTF	SGR796	+392	CGATGGCCACGCAGGAGATCGGCC
SGR796-RTR		+1040	CCGGCCCGTTCGTACTCCGGACAG
SGR796(7)-RTF	SGR796-7	+1285 (SGR796)	GCCGGCGTGATGAGGTGCCCCAGG
SGR796(7)-RTR		+250 (SGR797)	GGACACCGACGCTGCGGGCTCCCC
SGR797-RTF	SGR797	+18	CGACACGGTGCTCGGCCGCATCAG
SGR797-RTR		+568	CGATGTCCGAGGTGGCGGAGGGAC
SGR2377-RTF	SGR2377	+159	CAAGAGCGCCTTCGCCATGTCGGC
SGR2377-RTR		+770	GTGAGGGTCGAGGGCACCCGGTTC
SGR2377(8)-RTF	SGR2377-8	+167 (SGR2377)	CGCGAGAACTCCGCCCGACCCGC
SGR2377(8)-RFR		+54 (SGR2378)	CATGGCGAAGGCGCTCTTGAGGCG
SGR2378-RTF	SGR2378	+27	CGAAGACTCCGCACCAACCGCGAC
SGR2378-RTR		+579	CGAACGGTGCTTGAGCGCCTTGCG
SGR6997-RTF	SGR6997	+160	GTCACCGTGTGGCGGCCTTCGCG
SGR6997-RTR		+787	CAGGAGACGGCGCAGCTCGTCCAG
SGR6997(8)-RTF	SGR6997-8	+726(SGR6997)	GCCGAGGGAGATGGTCACGGCGCT
SGR6997(8)-RTR		+219(SGR6998)	CTGCCGGGTGATTCGCGGGTGGC
SGR6998-RTF	SGR6998	+88	GTGATCACGACCCCGTGGACGGC
SGR6998-RTR		+637	CGTAGCGAAGACGGCCGCTTGGC
For low-resolution S1 nuclease mapping			
SGR794-S1F	SGR794	-345	CCTCAGGTCAGGCCGGGAAGCGGC
SGR794-S1R		+52	GTGGAACAAGGCTGACCAGGGCGG
SGR795-S1F	SGR795	-319	CGGCACGGGGCGGGGCGAACCAGG
SGR795-S1R		+96	CACCTCGTGGCCAGGCGGCCAG
SGR2378-S1F	SGR2378	-321	GTCTGCCGTTGGCGGTAATGACC
SGR2378-S1R		+47	GTCGCGGTTGGTGGGAGTCTTCG
SGR2469-S1F	SGR2469	-356	CGGGCGATCGCACTGTTGCAACCG
SGR2469-S1R		+42	GCCGACATTCGGCAGACCGACGAT
SGR3656-S1F	SGR3656	-355	GGCGGGCTGATCGCCAGGTCGTC
SGR3656-S1R		+44	CGACGAGCGAAGGCCAACGACCGG
SGR3657-S1F	SGR3657	-338	TACGCCCTGGACGCGGGAGAGCTC
SGR3657-S1R		+69	GCGATCCAATTACCCACCAGGGC
SGR6997-S1F	SGR6997	-333	ACGCGGTGGTGCTCTGGAACCTT
SGR6997-S1R		+74	GTCCTGCGGGACAGATCCCTACG

^aThe position of primer has been calculated from the translation start codon.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

pES1은 DasA를 코딩하는 유전자인 *dasA*를 pIJ486 벡터에 삽입하여 제작하였다[16]. *Streptomyces griseus* IFO13350 야생주에 pES1을 형질전환하여 *dasA*가 과발현된 *S. griseus/pES1*을 제작하였고 대조균주로서 pIJ486 벡터가 형질전환된 *S. griseus/pIJ486* 형질전환체를 제작하였다. 방선균 균주들은 YMPD 고체배지(0.2% yeast extract, 0.2% Meat extract, 0.4% Bacto peptone, 0.5% NaCl, 0.2% MgSO₄·7H₂O, 1% glucose, 2% agar, pH7.2) 및 28°C의 조건에서 배양되었다. R2YE 배지는 방선균 형질전환시 재생에 위해 사용하였다[8]. Thiostrepton (50 µg/ml)은 필요시에 방선균 배지에 첨가하여 사용하였다.

Total RNA 추출 및 DNA microarray 분석

DNA microarray 분석을 위한 total RNA 준비는 다음과 같은 방법을 통하여 준비하였다. 우선, *S. griseus/pES1* 형질전환체와 대조균주 *S. griseus/pIJ486* 형질전환체의 total RNA는 YMPD 고체배지에 cellophane 지를 깔고 그 위에 접종하여 배양한 후 균체만을 긁어 회수하여 RNAqueous (Ambion, USA)을 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA 샘플은 DNA microarray를 수행하기 전에 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)를 사용하여 순도를 측정하였다. DNA 탐침은 6 µg의 RNA 샘플로부터 amino allyl dUTP (GE Healthcare, USA)의 존재하에서 역전사효소를 이용하여 생합성하였으며, Ohnishi 등[13]에 의해서 서술된 방법에 따라 Cy3와 Cy5로 표지하였다. 마지막으로, 50 pmol의 Cy3-labeled cDNA probe와 Cy5-labeled DNA probe를 모든 hybridization 반응에 사용하였다. 총 7,138개의 유전자가 포함된 microarray 및 실험절차와 데이터 분석 등은 모두 Ohnishi 등[12]의 방법에 따랐다. 참고로 microarray 분석결과, 발현량이 2배 이상 증가한 유전자만을 선별하여 다음 단계의 연구를 진행하였다.

RT-PCR을 위한 역전사 반응

DNA microarray 결과 선택된 유전자들의 오페론 형성 여부를 알아보기 위해서, Table 1의 프라이머들을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. Total RNA 시료는 YMPD 고체배지에 배양된 *S. griseus/pES1* 형질전환체로부터 준비하였다. DNase 처리를 통해 DNA가 완전히 제거된 RNA 샘플로 SuperScript III RT-PCR system (Invitrogen, USA)을 이용하여 다음과 같은 방법으로 cDNA를 합성하였다. 1 µg의 total RNA와 random hexamer를 포함하는 총 부피 14 µl의 혼합물을 65°C에서 5분간 열을 가하고 얼음에서 식힌 후 역

전사 효소를 첨가하였다. 혼합물의 총 부피는 20 µl가 되도록 하며 50°C에서 30분간 반응 후 RNase H를 처리하여 RNA를 제거하였다. 합성된 cDNA로부터 1 µl를 취하여 RT-PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 이 때 역전사 효소를 처리하지 않은 반응물을 DNA 오염 판별을 위한 standard로 사용하였다. 증폭된 DNA 단편은 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 관찰하였다.

Low resolution S1 nuclease mapping

RNA 샘플은 고체 배양으로부터 회수된 균체로부터 ISOGEN (Nippon gene, Japan)을 사용하여 추출하였다. 탐침용 DNA 단편을 얻기 위해서 Table 1의 프라이머와 *S. griseus* IFO13350 야생주의 염색체 DNA를 주형으로 하는 PCR 반응을 수행하였으며 증폭된 DNA 단편은 1.2% 아가로스 겔에 전기영동 후 정제하여 준비하였다. *hrdB* (SGR1701)는 사용된 RNA의 양과 순도를 측정하는 standard로 사용하였다. 방사성 동위원소로 수식된 탐침을 제작하기 위해 T4 polynucleotide kinase를 처리하여 DNA 단편의 5' 말단에 [γ -³²P]ATP (220 TBq/mmol) (Amersham Bioscience, USA)를 표지하고 agarose gel 전기영동 후 정제하여 준비하였다. Low-resolution S1 nuclease mapping은 Kato 등[7]에 의해서 서술된 방법에 따라 수행되었다. S1 nuclease 분해로 생성된 DNA fragment는 Maxam-Gilbert 법에 따라 6% polyacrylamide DNA sequencing 겔에 전기영동하여 분석하였다.

결과 및 고찰

pIJ486 vector가 삽입된 *S. griseus/pIJ486* 형질전환체는 YMPD 고체배지에서 배양 2일째 기균사를 형성하여 흰색을 띠지만, *dasA*가 과발현된 *S. griseus/pES1* 형질전환체는 주름이 많은 기저균사의 형태를 간직하고 있었다(Fig. 1A). 이러한 특이적 형태분화는 주사전자현미경(SEM)으로 표면을 관찰하면 일반적인 기저균사보다 짧고 거친 균사체를 갖고 있는 것을 알 수 있다(Fig. 1B).

pES1에 의해서 유도되는 특이적 형태분화에 관련하는 유전자를 분석하기 탐색하기 위해서, pES1이 형질전환된 *S. griseus/pES1*의 RNA 샘플로부터 준비된 전사체를 pIJ486 벡터만 형질전환된 *S. griseus/pIJ486*으로부터의 전사체와 각각 비교하였다. 형질전환체는 YMPD 액체 배지에서 배양하여 균체를 회수하였으며, 이들로부터 RNA를 회수하여 DNA microarray를 수행하였다. *t*-검정법으로 분석하여 발현량이 2배 이상 증가(2-fold change)하고 *p*-value가 0.05 미만(*p*-value < 0.05)인 유전자를 선별하였다. 또한 오페론(또는 polycistronic unit)에서 일부 유전자만 증폭이 된 경우에

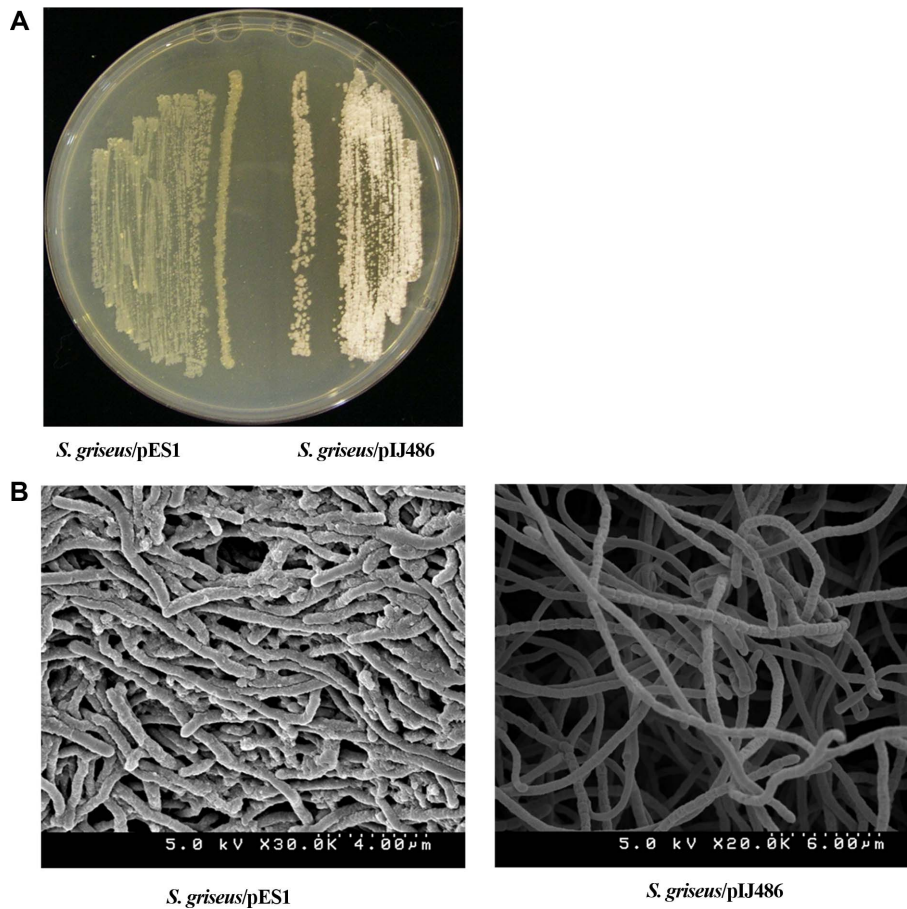


Fig. 1. Phenotype of *Streptomyces griseus* IFO13350 containing multicopies of *dasA*. (A) Photograph of agar plate. The strains were cultivated at 28°C for 2 days on YMPD solid medium. (B) Scanning Electron Microscopy analysis. Photograph was taken after growth at 28°C for 2 days.

Table 2. Identify of genes showing >2% fold altered mRNA ratios in the *S. griseus/pES1* compared with the *S. griseus/pIJ486*.

Gene ID	Predicted function	Fold change
SGR2281	DasA, Sugar transporter sugar-binding protein	12.1
SGR794	Putative L-Lactate permease	4.02
SGR795	Putative fumarate reductase related protein	28.7
SGR796	Putative iron sulfur protein	13.4
SGR797	Conserved hypothetical protein	3.82
SGR2377	Conserved hypothetical protein	2.45
SGR2378	Putative RNA polymerase ECF-subfamily sigma factor	3.28
SGR2469	Putative GTP-binding protein	16.6
SGR3656	Ssfr, ICIR family transcriptional regulator	2.35
SGR3657	Putative membrane protein	3.29
SGR6997	Putative two-component system sensor kinase	5.15
SGR6998	Putative two-component system response regulator	4.73

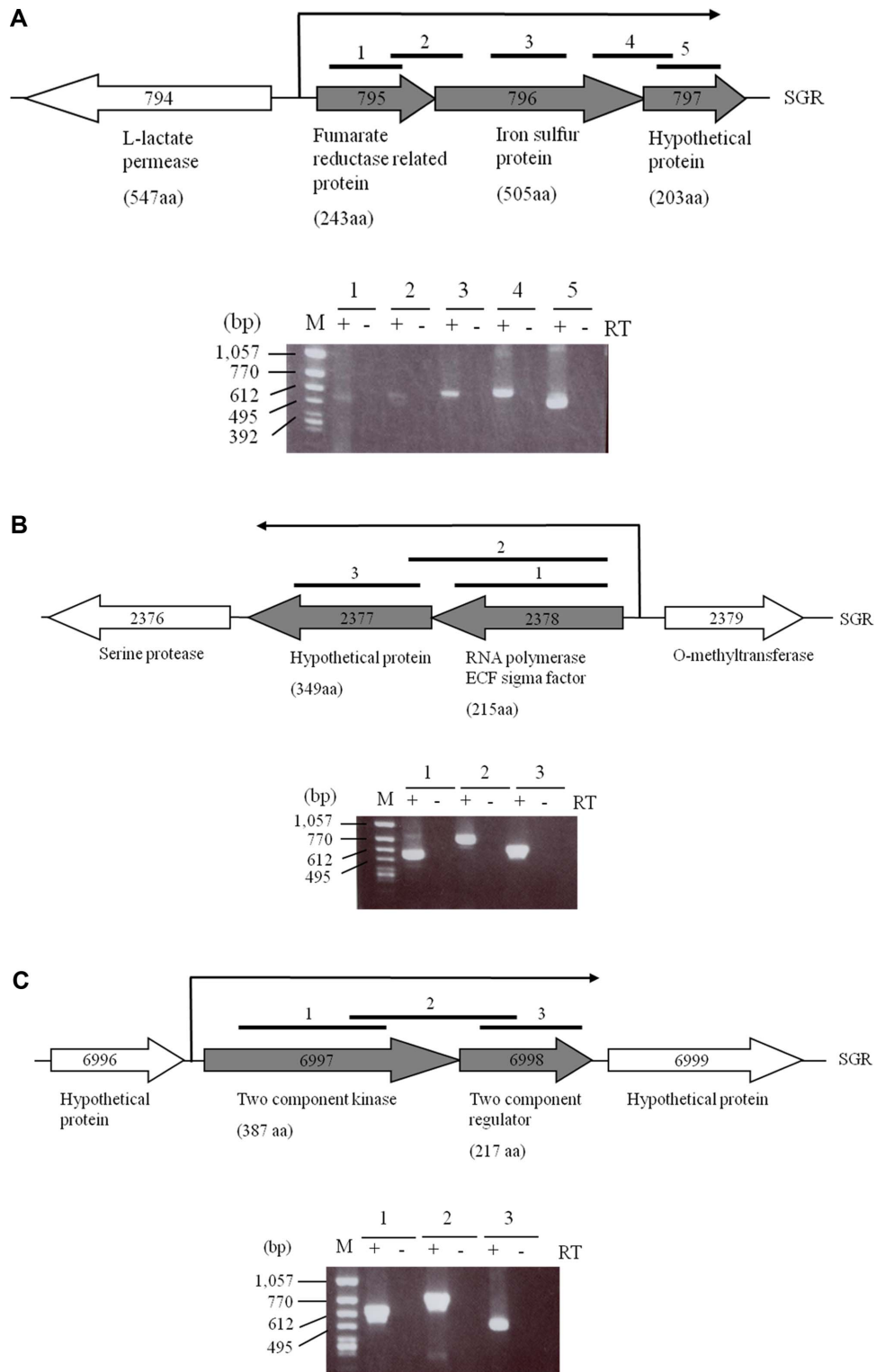


Fig. 2. Determination of polycistronic transcriptional unit by RT-PCR. RNA samples were prepared from cells of *S. griseus*/pES1 grown at 28 °C for 4 days on YMPD solid medium. (A) RT-PCR analysis of the SGR795-797. 1, SGR795; 2, SGR795-796; 3, SGR796; 4, SGR796-797; 5, SGR797. (B) RT-PCR analysis of the SGR2377-2378. 1, SGR2378; 2, SGR2377-2378; 3, SGR2377. (C) RT-PCR analysis of the SGR6997-6998. 1, SGR6997; 2, SGR6997-6998; 3, SGR6998.

는 “false positive”로 간주하였으며, 그 기능이 추정 불가능한 유전자의 경우에도 다음 단계의 실험에는 제외시켰다.

예상대로 DNA microarray에서 SGR2281 (*dasA*)의 mRNA 비율은 pES1 형질전환체에서 12.1배 증가한 걸로 관찰되었다. 이는 형질전환체에서 *dasA* 유전자의 전사가 이뤄지고 있으며, microarray가 적절히 수행된 것을 의미한다. DNA microarray 결과로부터, *dasA* 유전자 외에 4개의 유전자 (SGR794, SGR2469, SGR3656, SGR3657)와 3개의 cluster (SGR795-797, SGR2377-2378, SGR6997-6998)가 선별되었다. 선별된 유전자들에 대한 정보는 Table 2에 나타났다. 각각의 cluster를 구성하는 유전자들은 RT-PCR 분석을 통하여 cluster 내 모든 유전자들이 하나의 전사체를 형성하며 전사되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

발현량이 증가된 7종(*dasA* 제외)에 대한 RNA 발현량을 low resolution S1 nuclease mapping 법으로 분석하였으며, 분석된 모든 유전자들은 DNA microarray 결과와 마찬가지로 pES1 형질전환체에서 발현량이 증가된 것으로 확인되었다(Fig. 3). 특히, SGR794와 SGR795의 경우에는 배양기간에 상관없이 pES1 형질전환체에서만 발현이 증가되었는데, 이들 유전자들은 pES1에 의해서 유도되는 특이적 형태분화에 중요한 역할을 담당하고 있을 것으로 추정된다.

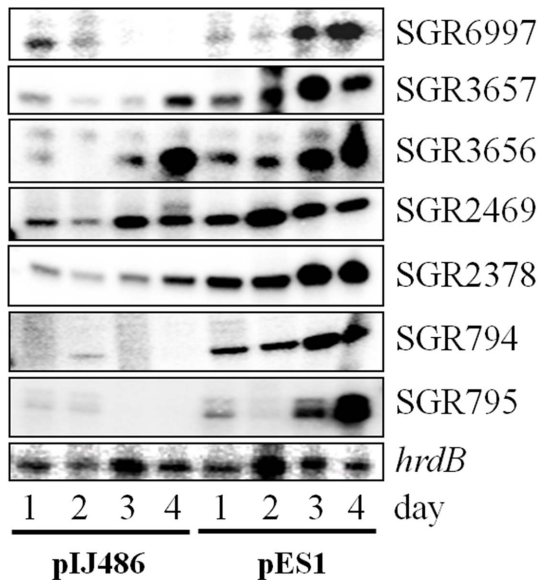


Fig. 3. Validation of DNA microarray result by low-resolution S1 nuclease mapping. RNA samples were prepared from cells grown on YMPD solid medium. Transcription of *hrdB* encoding a principle sigma factor was determined as an internal control. SGR794, L-lactate permease; SGR795, Fumarate reductase-related protein; SGR2378, RNA polymerase ECF subfamily sigma factor; SGR2469, GTP-binding protein; SGR3656, IclR family transcriptional regulator; SGR3657, membrane protein; SGR6997, two component system sensor kinase.

SGR2469가 코드하는 GTP-binding protein은 *S. viridochromogenes* Tue57과 *S. coelicolor* A3(2)와 *S. avermitilis* MA4680 등의 GTP-binding protein들과 84–88%의 높은 아미노산 서열의 상동성을 보였다. *S. coelicolor* A3(2)의 GTP-binding protein은 aerial mycelium 형성에 밀접하게 관여하는 것으로 알려져 있다[11].

SGR3656이 코드하는 SsfR (IclR family transcriptional regulator)은 Jiang 등[6]에 의해 *S. griseus*에서 포자형성단계에 관여하는 조절인자로 보고되었다.

다양한 물질수송을 담당하는 ABC transporter protein들은 방선균의 이차대사생산과 형태분화 등에 밀접하게 관여하고 있다는 연구결과들이 보고되고 있다[4, 9]. 특히, *S. griseus*와 *S. coelicolor*에서 공통적으로 ATP-binding cassette (ABC) transporter 구성 단백질들은 세포막 또는 세포내에 위치하며 sugar의 세포내 유입 및 대사에 관련하여 방선균에서 이차대사생산과 형태분화에 관여한다고 알려져 있다[2, 4, 9, 14, 16]. 또한 방선균은 세포외부의 다양한 금속이온들에 의해서 형태분화가 촉진되거나 억제되는 것으로 알려져 있다[8]. 이러한 선행 연구결과들로부터 SGR794 유전자와 SGR795-797 cluster는 막 또는 그 주변에 위치하여 세포외부의 변화에 반응하는 방선균의 형태분화에 밀접하게 관련하고 있을 것으로 추정된다. 또한 SGR3657은 70개의 아미노산으로 구성된 막단백질로서 아미노산 상동성 검색결과 방선균에 특이적으로 분포하는 단백질로서 그 기능은 알려져 있지 않으나 방선균 특이적 형태분화에 관련한 막의 변화와 연관되어 있을 것으로 추정된다.

RNA polymerase ECF-subfamily sigma factor는 박테리아에서 세포외부의 다양한 스트레스에 반응하여 많은 유전자들의 전사를 조절하는 것으로 알려져 있는데, 특히 방선균에서는 질소, 인, UV, 삼투압, 산소 등의 세포외부의 환경변화에 반응하여 이차대사생산과 형태분화를 조절하는 중요한 조절인자로 알려져 있다[12]. 이를 토대로 SGR2377-2378 cluster는 외부 환경조건에 따른 형태분화에 긴밀하게 작용할 것으로 기대된다.

Two component regulatory system은 미생물에서 포유류까지 다양한 생물내에 존재하며 다양한 세포외부 신호를 세포내로 전달하는 중요한 기능을 담당하는 것으로 잘 알려져 있다. 특히, 방선균의 이차대사생산과 형태분화가 이러한 two component regulatory system에 의해서 강하게 조절되는 것으로 보고되고 있다[15, 17]. 본 연구에서 선별된 SGR6997-6998 cluster는 two component regulatory system을 구성하며, 세포외부의 다양한 자극에 반응하는 특정 신호전달기작을 조절하여 형태분화 및 이차대사생산에 관여할 것으로 기대된다.

전사량이 2배 이상 감소된 유전자는 pES1 형질전환체에

서 전사량이 2배 이상 증가한 유전자들의 선별기준을 적용하여 선별하였다. 그 결과, 1개의 cluster (SGR4445-4446)와 3개의 유전자(SGR1103, SGR6081, SGR6264)가 pES1에 의해서 전사에 영향을 받은 것으로 관찰되었다. SGR4445 (-4.08배)와 SGR4446 (-4.57배)은 각각 ATP-binding cassette (ABC) transporter 구성 단백질인 ABC transporter permease protein와 ATP-binding protein을 코딩하며, 하나의 전사체를 형성하며 전사될 것으로 추정된다. SGR1103 (-2.03배)과 SGR6081 (-4.55배)과 SGR6264 (-2.29배)는 각각 putative bromoperoxidase와 putative transmembrane transport protein과 putative RNA polymerase ECF subfamily sigma factor를 코딩하였다. pES1 대량발현에 의한 특정 유전자들의 전사량 감소는 *S. griseus*의 복잡한 발달과정에 영향을 미침으로써 특이적 형태분화를 유도할 것으로 추정된다.

본 연구로부터 방선균의 특이적 형태분화에 관여할 것으로 추정되는 다양한 유전자들을 확인하였다. 이들 유전자들이 방선균의 특이적 형태분화를 유도하는 조절기작 및 기능의 규명은 방선균이 주변환경의 변화에 대응하고 적응하여 성장하는 복잡한 형태분화를 이해하는데 유용할 것으로 기대된다.

요약

S. griseus wild type에서 *dasA* 유전자의 과발현에 의해 유도된 기저균사의 ectopic sporulation 관련 유전자를 알아보기 위해서, empty vector가 삽입된 균주와 *dasA*가 과발현된 균주의 전사체를 DNA microarray법으로 비교하였다. DNA microarray 결과를 토대로 *dasA* 유전자 과발현 균주에서 2배 이상 발현량이 증가되었으며 *p*-value가 0.05 미만 (*p*-value < 0.05)인 유전자들 중에서 false positive를 제외시키는 작업을 통하여 최종적으로 4개의 유전자(SGR794, SGR2469, SGR3656, SGR3657)와 3개의 cluster (SGR795-797, SGR2377-2378, SGR6997-6998)를 선별하였다. 이들의 전사량은 low resolution Sl nuclease mapping 법을 통하여 *dasA* 유전자 과발현 균주에서 증가된 것을 확인하였다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR201629101).

References

- Akanuma G, Hara H, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2009. Dynamic changes in the extracellular proteome caused by absence of a pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **73**: 898-912.
- Chi WJ, Lee SY, Lee J. 2011. Functional analysis of SGR4635-induced enhancement of pigmented antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol.* **49**: 828-833.
- Hara H, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2009. DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **155**: 2197-2210.
- Hillerich B, Westpheling J. 2006. A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon source. *J. Bacteriol.* **188**: 7477-7487.
- Horinouchi S. 2007. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus streptomyces. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 283-299.
- Jiang H, Kendrick KE. 2000. Characterization of *ssfR* and *ssgA*, two genes involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **182**: 5521-5529.
- Kato JY, Chi WJ, Ohnishi Y, Hong SK, Horinouchi S. 2005. Transcriptional control by A-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**: 286-295.
- Keiser BJ, van Wezel GP, Canters GW, Kieser T, Vijgenboom E. 2000. The ram-dependence of *Streptomyces lividans* differentiation is bypassed by copper. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 565-574.
- Li M, Chen Z, Zhang X, Song Y, Wen Y, Li J. 2010. Enhancement of avermectin and ivermectin production by overexpression of the maltose ATP-binding cassette transporter in *Streptomyces avermitilis*. *Bioresour. Technol.* **101**: 9228-9235.
- Nazari B, Kobayashi M, Saito A, Hassaninasab A, Miyashita K, Fujii T. 2013. Chitin-induced gene expression in secondary metabolic pathways of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 707-713.
- Ochi K, Okamoto S. 1998. An essential GTP-binding protein functions as a regulator for differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **30**: 107-119.
- Ohnishi Y, Seo JW, Horinouchi S. 2002. Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **216**: 1-7.
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, et al. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO13350. *J. Bacteriol.* **190**: 4050-4060.
- Rigali S, Nothaft H, Noens EE, Schlicht M, Colson S, Müller M, et al. 2006. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol. Microbiol.* **61**: 1237-1251.
- Rozas D, Gullón S, Mellado RP. 2012. A novel two-component system involved in the transition to secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* **7**: e31760. doi: 10.1371/journal.pone.0031760.
- Seo JW, Ohnishi Y, Hirata A, Horinouchi S. 2002. ATP-binding cas-

sette transport system involved in regulation of morphological differentiation in response to glucose in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **184**: 91-103.

17. Yu Z, Zhu H, Zheng G, Jiang W, Lu Y. 2014. A genome-wide tran-

scriptomic analysis reveals diverse roles of the two-component system DraR-K in the physiological and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 9351-9363.