

产甲烷古菌甲基转移酶研究进展

杨清^{1,2}, 白丽萍^{1,2}

(1. 农业农村部成都沼气科学研究所, 成都 610041; 2. 农业农村部可再生能源开发利用重点实验室, 成都 610041)

摘要: 产甲烷古菌是一类能够通过产甲烷代谢生长的严格厌氧微生物。甲基营养型产甲烷古菌主要通过利用甲基类化合物如甲醇、甲胺、甲硫醚、甲氧基芳香族化合物等产 CH_4 。除了 H_2 依赖性甲基还原途径外, 其余所有产甲烷途径中均含有 MtrA-H 甲基转移酶, 而甲基营养型产甲烷途径还包含底物特异性的甲基转移酶, 负责裂解底物产生甲基并将其转移到一碳载体 HS-CoM 或 H_4MPT 。这些甲基转移酶在识别底物的蛋白结构上存在差异, 但它们都含有高度保守的类咕啉结合蛋白以及辅因子 cobalamin。总结了产甲烷古菌中甲基转移酶的分类、生理功能、结构特征及催化机制的研究进展, 并对未来甲基转移酶的研究方向进行了展望。

关键词: 产甲烷古菌; 甲基转移酶; 蛋白结构; 催化机制

中图分类号: Q55; S216.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-1166(2024)02-0003-10

DOI: 10.20022/j.cnki.1000-1166.20240325

Advances in Methyltransferases from Methanogens / YANG Qing^{1,2}, BAI Liping^{1,2} / (1. Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 61004, China)

Abstract: Methanogenic archaea are strictly anaerobic organisms that grow by producing methane. Methylotrophic methanogenic archaea predominantly generate CH_4 by metabolizing methyl compounds such as methanol, methylamine, methyl sulfide, and methylated aromatic substances. Except for the hydrogen-dependent methylotrophic pathway, MtrA-H methyltransferases exist in all methane-producing pathways, methylotrophic pathways moreover contain substrate-specific methyltransferases that are responsible for both cleaving and transferring methyl groups to HS-CoM or H_4MPT . Despite significant adjustments to the protein architectures involved in substrate recognition between methyltransferases, they all contain highly conserved corrinoid-binding proteins and the cofactor cobalamin. This article outlines the classification, biological functions, structural properties, and catalytic mechanisms of methyltransferases in methanogenic archaea, and also discusses future directions in methyltransferase research.

Key words: methanogens; methyltransferases; protein Structure; catalytic Mechanism

CH_4 无论是作为温室气体还是清洁能源, 都对人类社会产生重要影响^[1]。地球上 70% ~ 90% 的 CH_4 由产甲烷古菌产生^[2-3], 产甲烷古菌参与厌氧环境中有机物分解的最后一步^[4], 并产生大量的生物成因 CH_4 ^[5-6]。产甲烷途径主要分为 3 种, 分别是乙酸营养型、氢营养型和甲基营养型。随着最近的研究发现基于甲基的产甲烷作用, 是各种环境中 CH_4 的重要来源^[7-8], 例如海洋沉积物、胃肠道和极端环境中^[9-11]。基于甲基的产甲烷依赖于底物特异性的甲基转移酶。为了更加系统全面的了解产甲

烷古菌中甲基转移酶, 本文对产甲烷古菌中甲基转移酶的分类、生理功能、结构特征及催化机制等方面进行综述, 以期能够更加深刻的理解甲基转移酶在产甲烷古菌中的重要作用, 并为更好地研究产甲烷古菌的生命活动、揭示碳循环机制提供基础。

1 产甲烷古菌甲基转移酶的分类

1.1 甲醇: 辅酶 M 甲基转移酶

Methanosarcina barkeri DSM800 能转化甲醇生成 CH_4 ^[12-14], 以 $\text{CH}_3\text{-CoM}$ 作为中间产物。催化 HS-

收稿日期: 2024-02-27

项目来源: 国家自然科学基金(31970066); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2021XK06); 四川省国际科技创新合作项目(2021YFH0049); 中国农业科学院基本科研业务费(1610032019001-03101)。

作者简介: 杨清(1996-), 女, 研究实习生, 主要从事蛋白结构功能与催化机制研究等工作。

通信作者: 白丽萍(1987-), 女, 四川阆中人, 博士, 特聘研究员, 主要从事能源微生物新型代谢途径和功能蛋白等生物大分子研究等工作。

CoM 与甲醇形成 $\text{CH}_3\text{-CoM}$ 的酶由甲醇:5-羟基苯并咪唑基甲基转移酶 (MT1) 和甲钴胺:辅酶 M (CoM) 甲基转移酶 (MT2) 组成^[15-16], MT1 对氧气敏感, MT2 对氧气不敏感。MT1 由 MtaB (49 kDa) 和 MtaC (24 kDa) 组成^[17], 其中 MtaC 与辅因子 5-羟基苯并咪唑基钴酰胺紧密结合^[18]。MT2 是一种 34 kDa 的单体蛋白 (MtaA)^[19], 不具有辅因子。

1.2 甲胺:辅酶 M 甲基转移酶

除了甲醇之外, *M. barkeri* DSM800 还能利用三甲胺 (TMA)、二甲胺 (DMA) 和单甲胺 (MMA) 生长。1984 年 Evelyn Naumann^[20] 等人发现以 TMA 为底物生长的细胞提取物存在三甲胺:辅酶 M 甲基转移酶。Donald Jayferguson^[21] 在 1997 年使用三种纯化的多肽实现了三甲胺依赖性辅酶 M 甲基化的重建, 该酶由分子量为 52 kDa 的 MtbB, 26 kDa 的 MtbC 和 40 kDa 的 MtbA 组成。同年在体外重组了单甲胺:辅酶 M 甲基转移酶并测定活性, 该蛋白由 52 kDa 的单甲胺甲基转移酶 MtmB, 29 kDa 的单甲胺类咕啉蛋白 MtmC 和 40 kDa 的甲钴胺:辅酶 M (CoM) 甲基转移酶的同工酶 MtbA 组成^[22]。2000 年首次仅使用高度纯化的蛋白质 MtbB1、MtbC 和 MtbA 在体外实现了二甲胺依赖性辅酶 M 甲基化的重组^[23]。对于所有 3 种甲胺的甲胺:辅酶 M 甲基转移, RamA (一种 60 kDa 单体铁硫蛋白) 是 ATP 依赖性甲胺还原激活所必需的^[24]。

1.3 四甲基铵:辅酶 M 甲基转移酶

Methanococcoides sp. NaT1、*M. mazei* 和 *Methanomethylovorans* 属的 NY-STAYD 菌株都能利用四甲基铵产甲烷^[25-27]。调节四甲基铵和 HS-CoM 之间甲基转移的酶为四甲基铵:辅酶 M 甲基转移酶简称 Mtq, 从 *Methanococcoides* sp. NaT1 中纯化获得, Mtq 由 3 个部分组成, 分别为 50 kDa 的亚基 MtqB, 22 kDa 的类咕啉蛋白 MtqC, 40 kDa 的亚基 MtqA, 该蛋白的活性依赖于柠檬酸钛 (III) 和 ATP 的存在^[27]。

1.4 甲基化硫化合物:辅酶 M 甲基转移酶

人们发现二甲基硫醚 (DMS) 和硫醇丙酸甲酯 (MMPA) 等甲基化硫醇也是甲基营养型产 CH_4 前体^[28]。*M. barkeri* 在乙酸底物上生长能够表达催化其它产甲烷底物的酶, 比如催化单甲胺的酶, 还发现了能将二甲基硫化物 (DMS) 和硫基丙酸甲酯 (MMPA) 转化为 CH_4 的酶, 在三甲基胺或甲醇上生长的细胞或提取物没有利用 DMS 或 MMPA 的酶^[29-30]。

以二甲基硫化物为底物的产甲烷途径需要辅酶 M 的甲基化, 这个反应由甲硫醇:辅酶 M 甲基转移酶催化产生等摩尔的甲基钴胺素和甲硫醇 (MT), 该转移酶是一个由分子量为 40 kDa 的 MtsA 和 30 kDa 的类咕啉蛋白 MtsB 两个部分组成的分子量为 480 kDa 复合物^[29-30]。*M. acetivorans* 也可以使用 DMS 作为唯一能源生长, 但分析发现不是 MtsA 与 MtsB 而是 MtsD、MtsF 和 MtsH (MA0859、MA4384 和 MA4558) 的特定甲基转移酶与在 DMS 上生长的能力有关^[31-32]。经过进一步分析表明, MtsD 的首选底物是 DMS, 而 MtsF 的首选底物是 MT, MtsH 可以接受 DMS 和甲硫醇这两种底物^[31-33]。MtpCAP-MsrH 是 *M. acetivorans* 在 MMAP 上生长所必须的, 缺乏 *mtpC* 或 *mtpA* 的突变体在 MMPA 培养基中表现出严重的生长缺陷, 但在其他基质上生长期间未受影响^[33]。

1.5 甘氨酸甜菜碱:辅酶 M 甲基转移酶

环境中丰富的季胺 (QAs) 是 CH_4 生成的主要来源。2015 年 Tomislav Ticak 实验室从河口沉积物中分离出一株能够利用甘氨酸甜菜碱生长产甲烷的古菌 *Methanobolus vulcani* B1d^[34]。通过不同底物 (甲醇、三甲胺、甘氨酸甜菜碱) 培养 *M. vulcani* B1d, 然后进行蛋白组分析, 发现与在甲醇和三甲胺为底物生长时相比, *M. vulcani* B1d 在甘氨酸甜菜碱上生长时 MV8460 高表达, 推测该蛋白是来自 COG5598 超级家族 MtbB 的缺乏吡咯氨酸 (Pyl) 的同系物^[35-36]。此外, MV8465, MV10335 和 MV10360 的表达也在蛋白质水平显著增加, 使用重组 MV8460 (MtgB)、MV8465 (MtgC)、MV10335 (RamM) 和 MV10360 (MtgA) 在体外完全重建甘氨酸甜菜碱:辅酶 M 途径^[36]。

1.6 甲氧基化芳香族化合物:辅酶 M 甲基转移酶

甲氧基化芳香族化合物是木质素和煤的重要成分, 存在于大多数地下沉积物中^[37]。2007 年分离自我国胜利油田的产甲烷菌 *Methermicoccus shengliensis* ZC-1 能利用甲醇、甲胺和多种甲氧基化芳香族化合物产甲烷^[38-39]。通过转录组和蛋白质组分析发现了一个类似于产乙酸菌所使用的一种 O-去甲基化/甲基转移酶系统, 由 MtoB1B2CA 组成^[37], 其中 MtoB1 (48 kDa) 和 MtoB2 (47 kDa) 的序列相似性为 57%, MtoC (22 kDa) 是一个类咕啉结合蛋白, MtoA 与膜结合蛋白 MtrH 相似。

2023 年, Tiantian Yu^[40] 等人发现来自沿海沉积

物中的 *Candidatus* Baizosediminiarchaeum ligniniphilus DL1 YTT001 (*Ca. B. ligniniphilus*) 可以在中温缺氧条件下以木质素作为唯一有机碳源生长, 表达新型甲基转移酶 MtgB。MtgB 仅存在于深古菌门中, 与已知的微生物甲基转移酶没有相似性。MtgB1 和 MtgB2 的相似性为 44.85%, 和类咕啉蛋白 MtgC 以及 MT2 (MtgA) 形成新的甲基转移酶系统, 催化甲氧基化底物 (包括愈创木酚和香草醛) 的去甲基化, 以

及 H₄MPT 甲基化生成 CH₃-H₄MPT^[40]。

以上述自然化合物为底物的甲基转移酶在产甲烷代谢途径中发挥着重要作用, 表 1 总结了目前已经通过实验验证的产甲烷古菌甲基转移酶的类型。随着近年来组学技术的发展, 除了上述 Euryarchaeota 之外, 还在 Halobacteriota, Thermoplasmatota, Verstraetearchaeota 和潜在的 Crenarchaeota 发现了基于甲基的产甲烷作用^[8, 41]。

表 1 产甲烷古菌中已鉴定的甲基转移酶

甲基转移酶名称	蛋白名称	菌株	文献
甲醇: 辅酶 M 甲基转移酶	MtaBCA	<i>M. barkeri</i>	[43]
单甲胺: 辅酶 M 甲基转移酶	MtmBCA	<i>M. barkeri</i>	[44]
二甲胺: 辅酶 M 甲基转移酶	MtbBCA	<i>M. barkeri</i>	[24]
三甲胺: 辅酶 M 甲基转移酶	MttBCA	<i>M. barkeri</i>	[22]
四甲基铵: 辅酶 M 甲基转移酶	MtqBCA	<i>M. sp. NaT1</i>	[28]
甲硫醇: 辅酶 M 甲基转移酶	MtsAB MtsDFH	<i>M. barkeri</i> <i>M. acetivorans</i>	[30–31]
甘氨酸甜菜碱: 辅酶 M 甲基转移酶	MtgBCA	<i>M. vulcani</i> B1d	[37]
硫基丙酸甲酯: 辅酶 M 甲基转移酶	MtpCAP MtsAB	<i>M. acetivorans</i> <i>M. barkeri</i>	[45–46]
甲氧基化芳香族化合物: H ₄ MPT 甲基转移酶	MtoB1B2CA	<i>M. shengliensis</i>	[38]
愈创木酚/香草醛: H ₄ MPT 转移酶	MtgB1B2CA	<i>Ca. B. ligniniphilus</i>	[41]

2 甲基转移酶的生物学功能

早在 1983 年 Vander Meijden^[16] 等就研究了甲醇催化辅酶 M 甲基化的酶系统, 分为 2 步反应, 第一步是 MT1 结合的 cobalamin 被甲基化, 第二步是 MT2 甲基化 HS-CoM, 其中 MtaB 识别并转移底物甲醇上的甲基基团到 cobalamin 并将其甲基化生成 CH₃-cobalamin, MtaA 转移来自 CH₃-cobalamin 的甲基基团并氧化 HS-CoM 生成 CH₃-CoM。经研究发现, 甲胺类甲基转移酶 MttBCA、MtbBCA 以及 MtmBCA 中的 MttB、MtbB、MtmB 分别可以转移三甲胺、二甲胺和单甲胺上的甲基与高度同源的类咕啉结合蛋白 MttC、MtbC 和 MtmC 上的钴结合, 生成甲基化类咕啉蛋白, 生成的这 3 个甲基化类咕啉蛋白, 由同一个酶 MtbA 催化并甲基化 HS-CoM 为 CH₃-CoM^[21]。识别不同甲胺底物的 MttB、MtbB 和 MtmB 没有表现出显著的序列同源性, 但他们都含有新型氨基酸吡咯赖氨酸^[43, 45, 46]。MtgBCA 以甘氨酸甜菜碱为底物甲基化 HS-CoM 生成 CH₃-CoM 和二甲基甘氨酸 (不能作为产甲烷的底物)^[47]。其中 MtgB 识别并转移来自甘氨酸甜菜碱上的甲基到使 MtgC 类咕啉结合

蛋白甲基化, MtgA 是甲基咕啉: CoM 甲基转移酶^[36]。MtqB 能够催化四甲基铵, H⁺ 和类咕啉结合蛋白 MtqC 生成甲基化类咕啉蛋白和三甲胺, 三甲胺可以继续作为底物进行产甲烷。接下来, 由 *mtqA* 编码的第二种甲基转移酶 MtqA 催化 HS-CoM 与甲基-Co(III) 四甲基铵特异性类咕啉蛋白的甲基化反应, 产生 CH₃-CoM、H⁺ 和 Co(I) 四甲基铵特异性类咕啉蛋白^[7, 27]。

在 *M. barkeri* 中, DMS、MMPA 和 MT 的产甲烷路径类似, 只有一种甲基转移酶 MtsA 存在, 并且它催化类咕啉蛋白 MtsB 的甲基化和去甲基化, 区别与以上 6 种描述的产甲烷途径^[7, 30]。在 DMS 产甲烷过程中, MtsA 首先催化 DMS、H⁺ 和 MtsB 蛋白反应生成甲基化 MtsB 蛋白。然后 MtsA 催化甲基化 MtsB 蛋白与 HS-CoM 反应形成 CH₃-CoM、H⁺ 和去甲基化的 MtsB 蛋白, 并循环回到第一步反应。此外, MtsA 还可以催化 MT 和 MtsB 形成甲基化 MtsB 和 H₂S^[7, 30], 以及催化 MMPA 和 H⁺ 甲基化 MtsB, 形成 3-巯基丙酸。在 *M. acetivorans* 中, DMS、MMPA 和 MT 对应的甲基转移酶分别是 MtsDFH、MtqPCA 和 MtsA^[7]。

目前发现的产甲烷古菌中以甲氧基化芳香族化

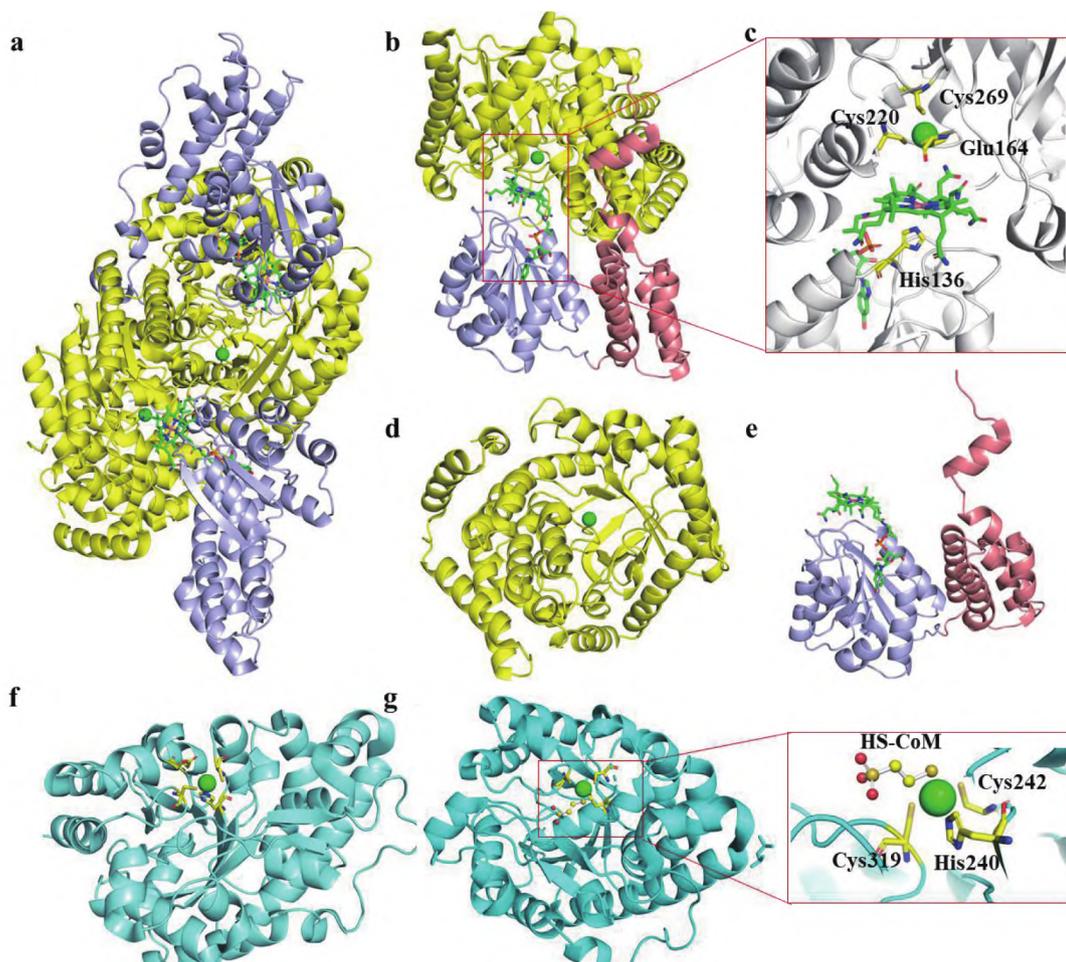
合物为底物的甲基转移酶 MtoB1B2CA 和 Mt-gB1B2CA 都是由 4 个亚基组成,区别于其它甲基转移酶,该类酶含有两个 MT1 拷贝,推测可能与底物大小和底物偏好性选择相关^[37, 40]。MtoB1B2 可以催化 2-甲氧基苯甲酸甲基化 MtoC 并生成 2-羟基苯甲酸,然后 MtoA 结合甲基化 MtoC 与 H₄MPT,生成 CH₃-H₄MPT 与还原状态的 MtoC,并进入一个新的循环^[37]。Mt-gB1B2 可以识别底物愈创木酚并甲基化 MtgC 同时生成愈创木酚, MtgA 的功能和 MtoA 相似^[40]。

3 甲基转移酶的结构

3.1 甲醇甲基转移酶 MtaBCA

M. barkeri 中的甲醇:辅酶 M 甲基转移酶 MtaC-

BA,由 3 个亚基组成,其中 MtaC 含有 5-羟基苯并咪唑基钴胺辅因子,可与甲醇结合供体甲基转移酶 MtaB 和辅酶 M 结合受体甲基转移酶 MtaA 相互作用。Zn 是 MtaB 和 MtaA 发挥活性的必须因子,被认为介导底物的亲电活化。Hagemeier^[48]等在 2006 年首次解析了来自 *M. barkeri* 中的甲醇激活酶 MtaBC 的复合体蛋白结构(PDB:2I2X),这是一个分辨率为 2.5 Å 的异源四聚体(见图 1a)。MtaB 折叠成一个 TIM 桶,并包含一个新颖的 Zn 结合基序。Zn²⁺ 位于 C 端 β-桶末端形成的漏斗底部,并连接到两个半胱氨酸硫(Cys-220 和 Cys-269)和一个羧酸氧(Glu-164)(见图 1b, c, d)^[48]。MtaC 与来自大肠杆菌的甲硫氨酸合酶 MetH 的钴胺素结合结构域的氨基酸



a. (MtaBC)₂ 的异源四聚体结构,黄色和紫色分别表示 MtaB、MtaC,Zn²⁺用绿色球形模型显示,辅因子 5-羟基苯并咪唑基钴胺用球棍模型展示;b. 在 MtaBC 单元中 MtaC 的 Rossmann 结构域(紫色)仅与其螺旋结构域(洋红色)和 MtaB 松散结合;c. MtaBC 的活性位点区域。Zn²⁺ 与 Glu164, Cys220 和 Cys269 连接,形成新型锌配位基序。His136 作为轴向配体与 cobalamin 的钴及进行五配位;d. MtaB 单体结构,含有一个 TIM 桶;e. MtaC 由 C 端 Rossmann 结构域(紫色)和 N 端螺旋结构域(洋红色)2 部分组成。MtaC 的 C 端 β 折叠片以暴露的方式结合辅因子 5-羟基苯并咪唑基钴胺;f. MtaA 含有 Zn²⁺ 的结构以及 Zn²⁺ 的 4 个配位氨基酸(以黄色棒状模型表示);g. MtaA 含有 HS-CoM(球棍模型表示)和 Zn²⁺ 的共晶结构,MtaA 包含一个 TIM 桶装折叠。

图 1 甲醇甲基转移酶 MtaBC 和 MtaA 结构^[48, 49]

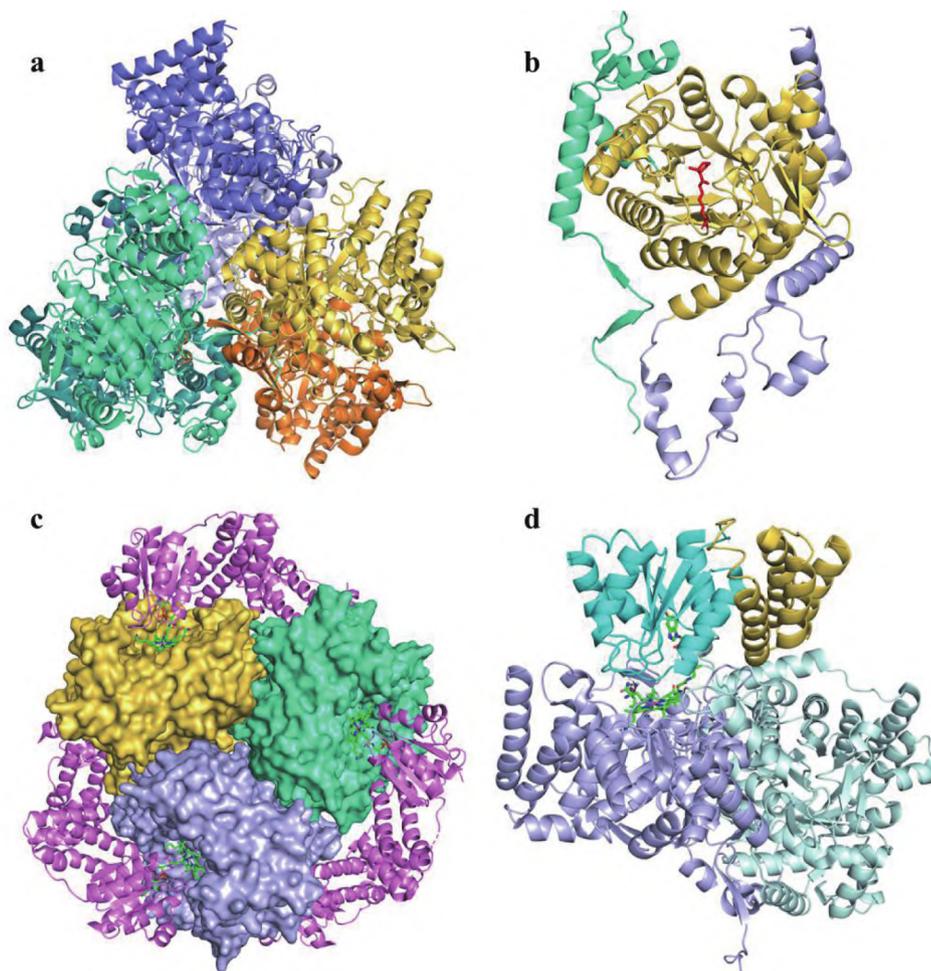
序列相似性为 35%, 类咕啉辅因子位于 MtaC 的 Rossmann 结构域顶部并深入到 MtaB 的漏斗中(见图 1b, e), 定义了 Zn^{2+} 和类咕啉钴之间的区域, 该区域推测是甲醇的结合位点^[48], 类咕啉的 α 位由 MtaC 上的 His136 连接(见图 1c)。

2012 年 Astrid Hoepfner^[49] 等解析了来自 *M. mazei* 的类咕啉: 辅酶 M 甲基转移酶 MtaA 含有 Zn^{2+} 和 HS-CoM 的共晶结构(PDB: 4ay7, 4ay8)(见图 1g, f)。与所有其他催化硫醇基烷基化的锌酶一样, MtaA 也含有 TIM 桶状折叠。MtaA 的活性位点位于漏斗的狭窄底部, 使得 HS-CoM 的硫醇盐基团指向 Zn^{2+} 。MtaA 活性位点中的 Zn^{2+} 与 His240、Cys242、Glu263 和 Cys319 配位, 当底物 HS-CoM 结合时, 会导致 Zn^{2+} 的配体 Glu263 的 O-配体变为 HS-CoM 的

S-配体(见图 1g), 同时锌几何结构发生反转^[49]。

3.2 三甲胺甲基转移酶和类咕啉蛋白复合体 MttBC

MttB 的 2.5 Å 结构表明该蛋白质以 D_3 对称同源六聚体的形式存在(PDB: 7XCL)(见图 2a)^[50]。与其他类咕啉辅因子相关蛋白相似^[48, 51], MttB 也含有由蛋白质序列中的中心残基(残基 82-395)组成的 TIM 桶状结构^[50]。与 MtmB 不同, MttB 还有 N 端 β 链和 C 端二聚环(见图 2b), 用于负责稳定 MttB 堆积, 二聚环不仅稳定二聚体形成, 还有助于与 MttC 的相互作用。在 MtmB 的结构中, 吡咯赖氨酸(Pyl202)锚定在 TIM 桶状折叠内的 β 链上^[46], 而在 MttB 结构中, 吡咯赖氨酸(Pyl334)位于 β 桶上方, 其关键吡咯侧链横向指向活性位点空腔^[50]。



a. MttB 同源六聚体图, 其中二聚体对颜色更相似(黄色、橙色; 青色、绿色; 蓝色、紫色); b. MttB 单个亚基的结构, 绿色表示 N 端的 β 链, 黄色表示 TIM 桶状结构, 紫色表示 C 端二聚环, 吡咯赖氨酸以红色棒状模型表示; c. MttBC 同源十二聚体结构。MttB 用黄色、绿色和紫色显示, MttC 显示为紫红色, 辅因子类咕啉显示为绿色棒状, 位于 MttB 亚基的活性位点凹槽中; d. 每个 MttC 亚基与 MttBC 复合物中的 MttB 二聚体对相互作用。MttC 的核心结构域用蓝色表示, 螺旋帽结构域用黄色表示。MttB 分别用紫色和浅青色表示。

图 2 MttB 与 MttBC 复合体的结构^[55]

MttBC 复合体(PDB:7XCM)的结构显示一个完整的 MttB 六聚体与六个 MttC 单体结合(见图 2c),在不对称单元中具有近似 D_3 对称性。MttC 也和其类的类咕啉蛋白相似,由两个结构域组成,分别是采用 Rossmann 折叠的 α/β 核心结构域和螺旋帽结构域(见图 2d)^[50, 52]。已知类咕啉蛋白在与甲基转移酶结合后会发​​生构象变化。在天然状态下,螺旋帽结构域阻断类咕啉的 β 面^[52],但在甲基转移酶结合后,帽结构域发生移动以暴露类咕啉辅因子,以便其可以参与甲基转移酶反应^[53, 54]。在 MttBC 复合物中观察到帽结构域远离类咕啉辅因子的类似定位^[50]。这种定位暴露了类咕啉辅助因子的 β 面,并使其能够与 MttB 的 TIM 桶形成的空腔结合,从而将其直接放置在吡咯赖氨酸氨基酸上。

4 甲基转移酶的催化机制

4.1 MtaBCA 的催化机制

甲醇活化机制具有普遍化学意义,因为甲醇的-OH 是较差的离去基团,而 CH_3^+ 是非常不利的碳阳离子。根据生化和化学研究^[42, 55],高度惰性的甲醇的异裂是通过超亲核试剂 Co(I) 和强亲电试剂 Zn^{2+} 的联合作用完成的。MtaBC 的结构分析证实了这一发现,并揭示了反应的几何框架。 Zn^{2+} 、类咕啉的 Co(I) 和 His136 上的氮几乎位于一条直线上,且垂直于类咕啉平面(见图 1c)^[48]。推测当甲醇位于 Zn^{2+} 和 Co(I) 之间时,通过其-OH 与 Zn^{2+} 连接,并以其甲基指向钴。在闭合构象中,甲醇的甲基受到强路易斯酸 Zn^{2+} 支持的 Co(I) 的亲核攻击,从而激活-OH 基团^[48]。线性排列与所提出的 S_N2 机制最佳兼容。在该机制中,将 Co(I) 的甲基化归因于催化三联体(His136、Asp134 和 Thr187)^[48],因为游离的 Co(I) 与 MtaB 催化的甲醇甲基化速率完全不一样,所以轴向配体 His136 对于 MtaBC 复合体的催化功能至关重要^[56, 57]。

甲醇的甲基转移至 MtaC 的 Co(I) 酰胺后,必须通过 MtaA 进一步转移至 HS-CoM 以完成催化循环。因此提出了 MtaBCA 的“shake, rattle and roll”模型并加以修改^[58],在该模型中,MtaC 只有高度移动性

的含有咕啉的 Rossmann 结构域在 MtaB 和 MtaA 之间进行移动,而 MtaC 螺旋结构域和 N 端臂均多重锚定到蛋白质上,防止 MtaC 在反应循环期间从蛋白质复合物解离^[48]。

4.2 MttBC 的催化机制

基于 MttB 的结构^[50],TMA 与吡咯赖氨酸加成至 MttB 的机制可能是吡咯啉亚胺氮与单个水形成氢键,该水又与 Tyr364 的羟基和 Gly110-Thr111 肽键的主链羰基形成氢键^[50]。一种可能性是 Tyr364-水-Pyl334 形成质子穿梭,有助于通过形成酪氨酸阴离子来生成带正电的 TMA-吡咯赖氨酸加合物。Y364F 突变体的较低活性与此推测一致。天然 MttB 结构中吡咯啉亚胺氮形成氢键的水在亚硫酸盐键 MttB 结构和 MttBC 复合物中都不存在。这可能表明,在周转过程中,TMA 向吡咯赖氨酸的添加可能先于 MttC 结合^[50]。

MttBC 复合物中,Gly110-Thr111 肽键与咕啉环的酰胺羰基氧—O28 形成氢键。Gly110-Thr111 酰胺肽键在 MttBC 复合物中类咕啉结合中的作用,以及它们肽键的羰基在与水形成氢键时可能有助于介导 MttB 结构中 TMA 添加,可能表明形成 TMA 与吡咯赖氨酸相结合和 MttC 与 MttB 结合有一定关联^[50]。在 MttBC 复合物中,吡咯赖氨酸侧链似乎与活性位点袋中的其他氨基酸没有氢键相互作用。吡咯赖氨酸的亚胺碳与类咕啉钴之间的距离约为 7Å。基于 MttBC 复合物结合口袋内的 TMA-吡咯赖氨酸加合物的分子建模得出结论,结合的 TMA 可以最接近 MttBC 结构中的咕啉钴,约为 4.5Å。鉴于 Co(III)-甲基距离约为 2.0Å,似乎需要进行结构改变才能将类咕啉辅因子和 TMA 结合的吡咯赖氨酸结合在一起,以便发生甲基转移步骤^[50]。在 MtaB-MtaC 结构中也观察到甲基激活位点与咕啉钴之间的距离较长。这可能表明可能存在一种共同的机制来弥补这一距离。值得注意的是,在甲基转移反应过程中,类咕啉从 MttBC 和 MtaBC 结构观察到的非活性 Co(II) 状态还原为能够接收甲基的活性 Co(I) 状态^[50]。允许甲基转移发生的一个可能机制是,在还原过程中,中心钴离子通过配体三联体中组氨酸

β -配体的解离,伴随着组氨酸通过配体三联体质子化,将其从五配位的 Co(II) 状态转变为四配位的 Co(I) 状态。这种转变可能导致类咕啉辅因子更靠近吡咯赖氨酸,从而促进甲基从 MttB 的 TMA-吡咯赖氨酸加合物转移到 MttC 辅因子^[50]。

5 总结与展望

产甲烷古菌底物依赖性甲基转移酶的研究,为更好地了解甲基营养型产甲烷古菌的生命活动提供了很好的支持。但是目前研究过的比较完整的甲基转移酶结构只有 MtaBCA 和 MttBC 这两个,其余的甲基转移酶复合体结构还未见报道,同时目前还没有完整的甲基转移酶与底物结合的三元复合体结构解析,这对进一步探究各甲基转移酶的催化机制造成了很大的阻碍。此外,近年来发现的新型甲基转移酶 MtoB1B2CA 和 MtgB1B2CA 区别于其余甲基转移酶^[37, 40],利用 H₄MPT 作为一碳载体接受来自底物的甲基,主要是通过 MtoA 微弱的活性确定,因此还需要更进一步的酶活性和结构证据支撑。同时这 2 个酶区别于传统甲基转移酶都含有 2 个相似性较高的 B 亚基,目前对这 2 个 B 蛋白的具体作用还不明确,有望通过各亚基活性测定和底物谱测定,确定其功能。未来产甲烷古菌甲基转移酶的研究有望通过结合最新的产甲烷古菌遗传操作体系、高分辨率冷冻电子显微镜技术以及基于大数据和深度计算的 AlphaFold 人工智能结构预测等技术对其结构以及详细的催化机制进行研究。

参考文献:

- [1] IPCC. Climate Change 2023: Synthesis Report [R/OL]. [2024-02-27]. <https://www.ipcc.ch/report/sixth-assessment-report-cycle/>.
- [2] LYU Z, SHAO N, AKINYEMI T, WHITMAN W B. Methanogenesis[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(13): R727-R32.
- [3] COSTA K C, LEIGH J A. Metabolic versatility in methanogens[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 29: 70-75.
- [4] CONRAD R. Importance of hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: A mini review[J]. *Pedosphere*, 2020, 30(1): 25-39.
- [5] CONRAD R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved[J]. *Env Microbiol Rep*, 2009, 1(5): 285-292.
- [6] STAVERT A R, SAUNOIS M, CANADELL J G, et al. Regional trends and drivers of the global methane budget[J]. *Global Change Biology*, 2022, 28(1): 182-200.
- [7] BUENO DE MESQUITA C P, WU D, TRINGE S G. Methyl-based methanogenesis: an ecological and genomic[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2023, 87(1): e0002422.
- [8] SÖLLINGER A, URICH T. Methylotrophic methanogens everywhere-physiology and ecology of novel players in global methane cycling[J]. *Biochemical Society Transactions* 2019, 47(6): 1895-907.
- [9] SPRENGER W W, HACKSTEIN J H, KELTJENS J T. The competitive success of *Methanomicrococcus blatticola*, a dominant methylotrophic methanogen in the cockroach hindgut, is supported by high substrate affinities and favorable thermodynamics[J]. *FEMS microbiology ecology*, 2007, 60(2): 266-75.
- [10] ANTONY C P, MURRELL J C, SHOUCHE Y S. Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanobolus* sp. as active methylotrophic archaea in Lonar crater lake sediments[J]. *FEMS microbiology ecology*, 2012, 81(1): 43-51.
- [11] CADENA S, GARCÍA-MALDONADO J Q, LÓPEZ-LOZANO N E, et al. Methanogenic and sulfate-reducing activities in a hypersaline microbial mat and associated microbial diversity[J]. *Microb Ecol*, 2018, 75(4): 930-40.
- [12] HUTTEN T J, DE JONG M H, PEETERS B P, et al. Coenzyme M derivatives and their effects on methane formation from carbon dioxide and methanol by cell extracts of *Methanosarcina barkeri* [J]. *Journal Of Bacteriology*, 1981, 145(1): 27-34.
- [13] SHAPIRO S, WOLFE R S. Methyl-coenzyme M, an intermediate in methanogenic dissimilation of C1 compounds by *Methanosarcina barkeri* [J]. *Journal Of Bacteriology*,

- 1980, 141(2): 728–34.
- [14] HUTTEN T J, BONGAERTS H C, VAN DER DRIFT C, et al. Acetate, methanol and carbon dioxide as substrates for growth of *Methanosarcina barkeri* [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1980, 46(6): 601–10.
- [15] VAN DER MEIJDEN P, HEYTHUYSEN H J, SLIEPENBEEK H T, et al. Activation and inactivation of methanol: 2-mercaptoethanesulfonic acid methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* [J]. *Journal Of Bacteriology*, 1983, 153(1): 6–11.
- [16] VAN DER MEIJDEN P, HEYTHUYSEN H J, POWELLS A, et al. Methyltransferases involved in methanol conversion by *Methanosarcina barkeri* [J]. *Arch Microbiol*, 1983, 134(3): 238–42.
- [17] SAUER K, HARMS U, THAUER R K. Methanol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MTI [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 243(3): 670–7.
- [18] P. VAN DER MEIJDEN, L. P. J. M. JANSEN, DRIFT C V D, et al. Involvement of corrinoids in the methylation of coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) by methanol and enzymes from *Methanosarcina barkeri* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1983, 19(2–3): 247–51.
- [19] HARMS U T R. Methylcobalamin: coenzyme M methyltransferase isoenzymes MtaA and MtbA from *Methanosarcina barkeri*-Cloning, sequencing and differential transcription of the encoding genes, and functional overexpression of the mtaA gene in *Escherichia coli* [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 235(3): 653–9.
- [20] NAUMANN E, FAHLBUSCH, K., GOTTSCHALK, G. Presence of a trimethylamine HS-coenzyme M methyltransferase in *Methanosarcina barkeri* [J]. *Arch Microbiol*, 1984, 138: 79–83.
- [21] FERGUSON D J, KRZYCKI J A. Reconstitution of trimethylamine-dependent coenzyme M methylation with the trimethylamine corrinoid protein and the isozymes of methyltransferase II from *Methanosarcina barkeri* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(3): 846–52.
- [22] BURKE S A, KRZYCKI, J A. Reconstitution of monomethylamine: coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri* [J]. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(27): 16570–7.
- [23] FERGUSON D J, JR., GORLATOVA N, GRAHAME D A, et al. Reconstitution of dimethylamine: coenzyme M methyl transfer with a discrete corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri* [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(37): 29053–60.
- [24] FERGUSON T, SOARES J A, LIENARD T, et al. RamA, a protein required for reductive activation of corrinoid-dependent methylamine methyltransferase reactions in methanogenic archaea [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2009, 284(4): 2285–95.
- [25] HU T H, WHANG L M, HUANG C Y. Methanogenic degradation of tetramethylammonium hydroxide by *Methanomethylivorans* and *Methanosarcina* [J]. *Journal of hazardous materials*, 2018, 357: 180–6.
- [26] IGUCHI A, TAKEMURA Y, DANSHITA T, et al. Isolation and physiological properties of methanogenic archaea that degrade tetramethylammonium hydroxide [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2023, 107(9): 3047–56.
- [27] ASAKAWA S, SAUER K, LIESACK W, et al. Tetramethylammonium: coenzyme M methyltransferase system from *Methanococcoides* sp [J]. *Arch Microbiol*, 1998, 170(4): 220–6.
- [28] MAAREL M V D, HANSEN T A. Dimethylsulfoniopropionate in anoxic intertidal sediments: A precursor of methanogenesis via dimethyl sulfide, methanethiol, and methylolpropionate [J]. *Marine Geology*, 1997, 137(1–2): 5–12.
- [29] TALLANT T C, PAUL, L, KRZYCKI, J A. The MtsA subunit of the methylthiol: coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina barkeri* catalyses both half-reactions of corrinoid-dependent dimethylsulfide: Coenzyme M methyl transfer [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276(6): 4485–93.
- [30] TALLANT T C, KRZYCKI J A. Methylthiol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethylsulfide and methylmercaptopropionate [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(22): 6902–11.
- [31] OELGESCHLÄGER E, ROTHER M. In vivo role of three

- fused corrinoid/methyl transfer proteins in *Methanosarcina acetivorans* [J]. *Mol Microbiol*, 2009, 72(5): 1260 – 72.
- [32] OELGESCHLÄGER E, ROTHER M. Influence of carbon monoxide on metabolite formation in *Methanosarcina acetivorans* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 292(2): 254 – 60.
- [33] FU H, METCALF W W. Genetic basis for metabolism of methylated sulfur compounds in *Methanosarcina* species [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(8): 1515 – 24.
- [34] TICAK T, HARIRAJU D, ARCELAY M B, et al. Isolation and characterization of a tetramethylammonium-degrading *Methanococcoides* strain and a novel glycine betaine-utilizing *Methanobolus* strain [J]. *Arch Microbiol*, 2015, 197(2): 197 – 209.
- [35] TICAK T, KOUNTZ, D J, et al. A nonpyrrolysine member of the widely distributed trimethylamine methyltransferase family is a glycine betaine methyltransferase [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(43): E4668 – E76.
- [36] CREIGHBAUM A J, TICAK, T, et al. Examination of the glycine betaine-dependent methylotrophic methanogenesis pathway: insights into anaerobic quaternary amine methylotrophy [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10(2572): 1 – 12.
- [37] KURTH J M, NOBU M K, TAMAKI H, et al. Methanogenic archaea use a bacteria-like methyltransferase system to demethoxylate aromatic compounds [J]. *ISME*, 2021, 15(12): 3549 – 65.
- [38] CHENG L, QIU, T L, et al. *Methermicoccus shengliensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen isolated from oil-production water, and proposal of *Methermicocaceae* fam. nov [J]. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(12): 2964 – 9.
- [39] MAYUMI D, MOCHIMARU H, TAMAKI H, et al. Methane production from coal by a single methanogen [J]. *Science*, 2016, 354(6309): 222 – 4.
- [40] YU T, HU2 H, ZENG X, et al. Widespread *Bathyaerchaia* encode a novel methyltransferase utilizing lignin-derived aromatics [J]. *mLife*, 2023, 2(3): 272 – 82.
- [41] VANWONTERGHEM I, EVANS P N, PARKS D H, et al. Methylotrophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota* [J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1(12): 16170.
- [42] SAUER K, THAUER, R K. Methanol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*-zinc dependence and thermodynamics of the methanol: cob(I) alamin methyltransferase reaction [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 249(1): 280 – 5.
- [43] PAUL L, FERGUSON D J, KRZYCKI J A. The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri* contain in-frame and read-through amber codons [J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(9): 2520 – 9.
- [44] FU H, GOETTGE M N, METCALF W W. Biochemical characterization of the methylmercaptopropionate: cob(I) alamin methyltransferase from *Methanosarcina acetivorans* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(12): 1 – 11.
- [45] BURKE S A, LO S L, KRZYCKI J A. Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine [J]. *Journal of Bacteriology* 1998, 180(13): 3432 – 40.
- [46] HAO B, GONG W M, FERGUSON T K, et al. A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase [J]. *Science*, 2002, 296(5572): 1462 – 6.
- [47] KURTH J M, OP DEN CAMP, H J M, et al. Several ways one goal-methanogenesis from unconventional substrates [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2020, 104(16): 6839 – 54.
- [48] HAGEMEIERS C H, KRER M, THAUER R K, et al. Insight into the mechanism of biological methanol activation based on the crystal structure of the methanol-cobalamin methyltransferase complex [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(50): 18917 – 22.
- [49] HOEPPNER A, THOMAS F, RUEPPEL A, et al. Structure of the corrinoid: coenzyme M methyltransferase MtaA from *Methanosarcina mazei* [J]. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 2012, 68(Pt 11): 1549 – 57.
- [50] LI J, KANG P T, JIANG R, et al. Insights into pyrrolysine function from structures of a trimethylamine methyltransferase and its corrinoid protein complex [J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 54.

- [51] EVANS J C, HUDDLER D P, HILGERS M T, et al. Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(11): 3729–36.
- [52] DRENNAN C L, HUANG S, DRUMMOND J T, et al. How a protein binds B12: A 3.0 Å X-ray structure of B12-binding domains of methionine synthase [J]. *Science*, 1994, 266(5191): 1669–74.
- [53] DATTA S, KOUTMOS M, PATTRIDGE K A, et al. A disulfide-stabilized conformer of methionine synthase reveals an unexpected role for the histidine ligand of the cobalamin cofactor [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(11): 4115–20.
- [54] KOUTMOS M, DATTA S, PATTRIDGE K A, et al. Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(44): 18527–32.
- [55] SCHNYDER A, DARBRE T, KEESE R. Methyl transfer from methanol to co-cobyrinate: a model for the coenzyme B(12) dependent Methyltransferase? [J]. *Angew Chem Int Edit*, 1998, 37(9): 1283–5.
- [56] SAUER K, THAUER R K. Methanol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*-substitution of the corrinoid harbouring subunit MtaC by free cob(I) alamin [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 261(3): 674–81.
- [57] JENSEN K P, RYDE U. The axial N-base has minor influence on Co-C bond cleavage in cobalamins [J]. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2002, 585(1): 239–55.
- [58] MATTHEWS G. Cycling the synapse: scenic versus direct routes for vesicles [J]. *Neuron*, 2004, 44(2): 223–6.