

• 综 述 •

# 辅因子 *S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸甲基类似物及其应用

王文瑞, 董敏\*

天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

王文瑞, 董敏. 辅因子 *S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸甲基类似物及其应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4428-4444.

WANG Wenrui, DONG Min. Synthesis and application of the methyl analogues of *S*-adenosyl-*L*-methionine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4428-4444.

**摘 要:** 甲基化在生物学过程中发挥着重要作用。*S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸(*S*-adenosyl-*L*-methionine, SAM)作为一种广泛存在于生命体中的辅因子,是大多数生物甲基化反应的甲基供体。SAM 依赖型甲基转移酶(methyltransferases, MTase)通过将甲基从 SAM 分子特异性转移到底物,从而改变底物分子的各种理化性质和生物活性。近年来,许多具有替代甲基取代基的 SAM 类似物被合成并应用于甲基转移酶,以将不同修饰的基团特异性地转移到甲基转移酶的底物上,从而引入标记官能团或者新的烷基修饰。本文主要综述了近年来该领域不同 SAM 甲基类似物在合成和应用方面取得的进展,并对这一领域未来的研究方向进行展望。

**关键词:** 甲基转移酶; *S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸甲基类似物; 生物催化; 甲基化; 烷基化

## Synthesis and application of the methyl analogues of *S*-adenosyl-*L*-methionine

WANG Wenrui, DONG Min\*

Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

**Abstract:** Methylation plays a vital role in biological systems. SAM (*S*-adenosyl-*L*-methionine), an abundant cofactor in life, acts as a methyl donor in most biological methylation reactions. SAM-dependent methyltransferases (MTase) transfer a methyl group from SAM to substrates, thereby altering their physicochemical properties or biological activities. In recent years, many SAM analogues with alternative methyl substituents have been synthesized and applied to methyltransferases that specifically transfer different groups to the substrates. These include

资助项目: 天津市自然科学基金面上项目(20JCYBJC01100)

This work was supported by the Tianjin Natural Science Foundation of General Project (20JCYBJC01100).

\*Corresponding author. E-mail: mindong@tju.edu.cn

Received: 2023-04-11; Accepted: 2023-05-25

functional groups for labeling experiments and novel alkyl modifications. This review summarizes the recent progress in the synthesis and application of SAM methyl analogues and prospects for future research directions in this field.

**Keywords:** methyltransferase; *S*-adenosyl-*L*-methionine methyl analogues; biocatalysis; methylation; alkylation

甲基化是生命体表观遗传学中一种重要的修饰, DNA、RNA、蛋白质以及代谢小分子都含有大量的甲基化修饰。生命体借助甲基化修饰调控生物大分子和小分子代谢物的性质,进而调控基因表达、蛋白质修饰、脂质生物合成以及其他各种代谢途径<sup>[1]</sup>。在药物的开发过程中,也常常通过引入甲基基团来优化药物的亲脂性、代谢稳定性、药物对靶标蛋白的选择性等,从而提高药物药效,这种“神奇的甲基效应”通常可以将药物的药效提高几个数量级<sup>[2]</sup>。

生命体的甲基转移反应是通过大量高特异性的甲基转移酶完成<sup>[3]</sup>。而辅因子 *S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸(*S*-adenosyl-*L*-methionine, SAM)在绝大多数生物甲基化反应中充当甲基供体的角色,是甲基基团的主要来源<sup>[4]</sup>。SAM 是一种由三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)和甲硫氨酸(*L*-Met)杂合而成的化合物。SAM 的硫鎓结构的不对称取代使其具有手性中心,因此 SAM 具有 *S* 型和 *R* 型两种差向异构体。SAM 是生命体内除 ATP 之外的第二大辅助因子,它的代谢与平衡关乎生命体生长、健康、衰老等各个方面<sup>[5]</sup>。

研究发现,由 SAM 充当甲基供体的酶促甲基化反应主要以亲核机制进行。SAM 中的硫鎓结构由于缺乏电子,使得相连的 3 个 C-S 键都不稳定。由于甲基基团具有最小的空间位阻,所以容易受 *O*-、*N*-、*S*-等亲核试剂进攻,发生甲基转移反应<sup>[6]</sup>。利用这一性质, SAM 依赖型甲基转移酶通过典型的  $S_N2$  机制将甲基从 SAM 分子转移到蛋白、核酸、代谢小分子等底物,并生成 *S*-腺苷同型半胱氨酸(*S*-adenosylhomocysteine,

SAH)作为副产物<sup>[7-9]</sup>(图 1)。

对于一些非亲核性底物(包括惰性碳原子或磷原子等),自然界还通过使用自由基机制来补充  $S_N2$  机制的甲基化反应<sup>[10-18]</sup>。已知的由自由基介导的甲基转移酶都属于 SAM 自由基酶超家族,该家族成员均含有辅因子 SAM 和至少 1 个[4Fe-4S]簇<sup>[6,10,13]</sup>。在 SAM 自由基酶的作用下,[4Fe-4S]簇通过触发 SAM 发生还原裂解生成 5'-脱氧腺苷自由基(5'-deoxyadenosine radical, 5'-dA $\cdot$ )来启动基于自由基中间体的甲基转移反应。根据反应机理的不同,可将 SAM 自由基甲基转移酶分为原位生成 SAM 甲基自由基和 B12 依赖的甲基转移酶两大类。相关内容有综述文章做了很好的总结<sup>[19]</sup>。

近年来, SAM 依赖型甲基转移酶这种高度特异性催化底物甲基化的能力引起人们的广泛关注,人们设想如果可以利用其实现更多化学官能团的转移,则将成为一种极具吸引力的分子工具<sup>[20]</sup>。经研究发现,大多数 MTase 确实具有一定的杂泛性,可以利用辅因子 SAM 以及具有替代 *S*-甲基取代基的 SAM 类似物进行高区域选择性的烷基化反应,从而向活性底物分子转移大量不同的官能团<sup>[21-22]</sup>。在此背景下,本文主要综述了近年来在不同 SAM 甲基类似物合成以及应用方面取得的进展,以期该方法未来更广泛的发展应用提供一些参考。

## 1 SAM 类似物的简介

目前,针对 SAM 的化学结构进行修饰与改造后所得的 SAM 类似物一般分为两大类:第一类

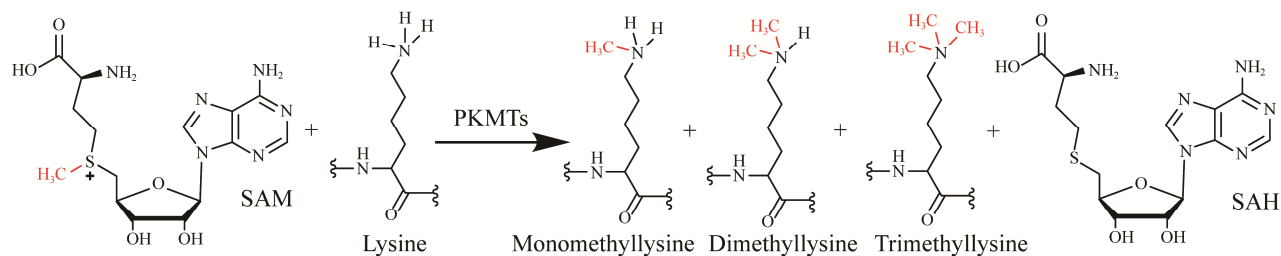
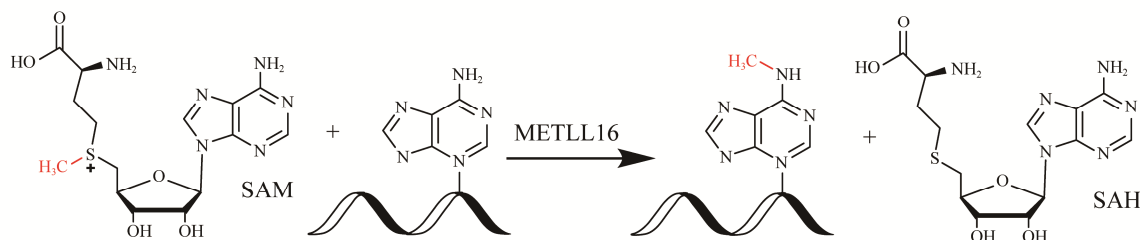
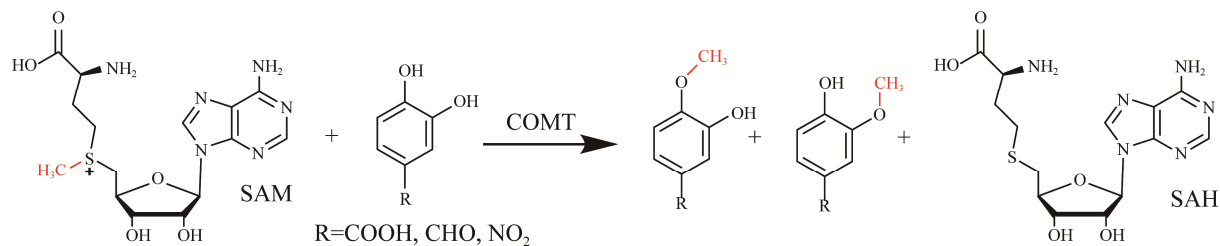
A Continuous *N*-methylation of lysine catalyzed by methyltransferase PKMTsB *N*-methylation of RNA *m*<sup>6</sup>A catalyzed by methyltransferase METLL16C *O*-methylation of catechol compounds catalyzed by methyltransferase COMT

图 1 SAM 依赖型甲基转移酶催化的代表性反应

Figure 1 Representative reactions catalyzed by SAM-dependent methyltransferases.

是对构成 SAM 分子中 3 个 C-S 键的对应结构进行改造后所得的 SAM 类似物。例如 Dalhoff 等<sup>[23]</sup>在探索 DNA 甲基转移酶催化底物 DNA 的不同烷基修饰时合成了各种替代 *S*-甲基取代基的 SAM 类似物(SAM 甲基类似物)。除此之外, Burgos 等<sup>[24]</sup>曾对 SAM 的碱基部分进行改造, 最终合成了碱基部分为鸟嘌呤、胞嘧啶结构的 SAM 类似物(SCM 和 SGM); Grogan 等<sup>[25]</sup>在探究 SAM 中氨基酸部分的羧基基团对酶促甲基化反应的影响时合成了羧基基团被四氮唑取代的 SAM 类似物(tet-SAM)。第二类 SAM 类似物

主要针对 SAM 结构中不稳定的硫鎓中心进行改造, 例如 SAM 中 S 原子被 C 原子或 N 原子取代后生成的 SAM 类似物具备了更强的化学稳定性<sup>[26-27]</sup>; 而 S 原子被 Se 原子取代后所生成的 *Se*-SAM 则成为比 *S*-SAM 更好的烷基供体<sup>[21]</sup>, 因此许多研究人员也致力于探索各种 *Se*-SAM 甲基类似物的合成, 以利用其实现更高效的酶促烷基化反应。鉴于 SAM 主要发挥甲基供体的作用, 目前应用最广泛的 SAM 类似物通常是指 SAM 甲基类似物, 本文也主要针对 SAM 甲基类似物在当前的合成与应用现状进行了综述。

## 2 SAM 甲基类似物的合成

### 2.1 SAM 甲基类似物的化学合成

对于化学法制备 SAM 及其甲基类似物,最经典的方法是利用 SAM 的去甲基产物 SAH 与卤代烃的亲核取代机制进行合成。SAH 中 S 原子的孤对电子具有较强的亲核性,在卤代烃等亲电试剂的作用下反应生成具有硫鎓结构的 SAM 甲基类似物。2006 年, Dalhoff 等<sup>[23]</sup>根据此方案首次化学合成了各种替代 S-甲基取代基的 SAM 类似物。该方法将 SAH 与卤代烃或三氟甲磺酸酯在 HCOOH/AcOH 的酸性条件中实现了 SAH 的烷基化,生成了相应的 SAM 甲基类似物(图 2A)。随后, Stecher 等<sup>[28]</sup>以及 Wang 等<sup>[29]</sup>在此方法的基础上对反应条件进行了改进,通过加入 AgOTf 或 AgClO<sub>4</sub> 促进了 SAH 与卤代烃的烷基化反应。目前,该合成策略已经能够合成超过 30 种化学性质不同的 S/Se 烷基化的 SAM 甲基类似物(图 2B)。然而,此类方法由于反应时间较长且收率不高而具有一定的局限性,尤其当 SAH 与一些反应性较差的卤代烃反应时,往往需要添加大量的卤代烃(20–200 eq)才能推动反应进行<sup>[30]</sup>。2020 年, Hofkens 等<sup>[30]</sup>通过先合成不同烷基取代基的 5'-脱氧-5'-甲硫腺苷(5'-deoxy-5'-methylthioadenosine, MTA)类似物,继而连接半胱氨酸部分与丝氨酸内酯反应,最终合成了氨基酸部分少一个 C 的 SAM 类似物(图 2C)。这种通过改变取代基与 S 原子连接顺序的合成方案,也为将来提高不同 SAM 甲基类似物的合成产率提供了更多选择方案。

然而,化学合成方案容易生成 SAM 硫鎓中心差向异构体的混合物。已有研究表明,由 MTase 催化的酶促甲基化反应具有立体选择性,其中只有 S 型异构体可以被 MTase 接受,

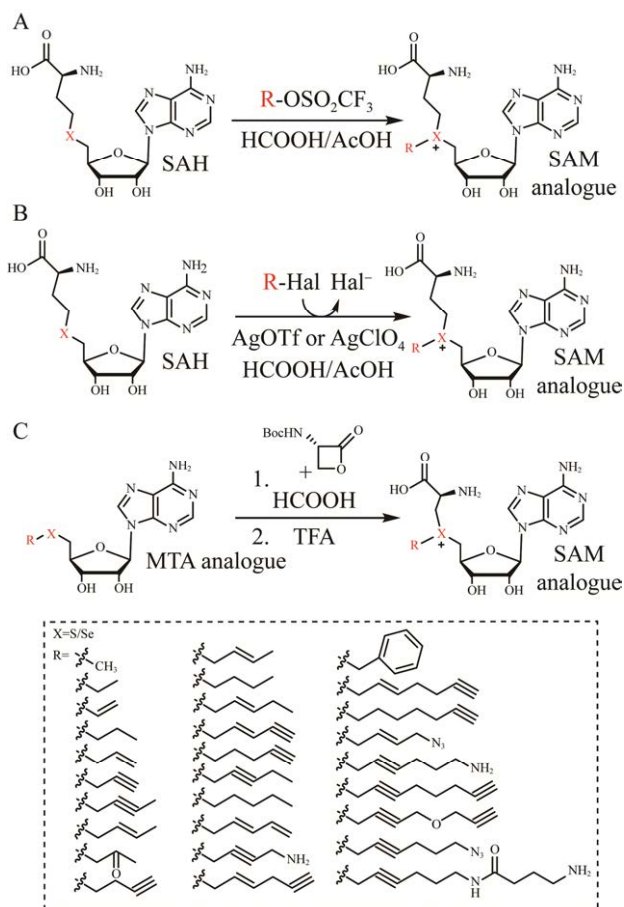


图 2 化学法合成 SAM 类似物汇总

Figure 2 Chemical synthesis of SAM analogues.

而 R 型异构体则会抑制 MTase 的活性<sup>[21]</sup>。因此,这样的合成方案给实验增加了一定的复杂性。

### 2.2 SAM 甲基类似物的酶法合成

除了上述化学合成 SAM 甲基类似物的方法之外,研究人员还通过使用生物体内的 SAM 合成酶以及一些 SAM 依赖型酶的逆反应成功实现了 SAM 及其甲基类似物的酶法合成。酶催化反应专一性地产生 S 型异构体,从这一角度来说比化学合成更高效。然而,酶法制备 SAM 类似物容易受到酶对类似物识别能力的限制,在一些类似物制备中需要进行酶工程改造。目前 SAM 及其甲基类似物的酶法合成主要涉及 3 种

不同的酶：SAM 合酶、卤代酶以及卤素甲基转移酶(图 3)。

### 2.2.1 SAM 合酶

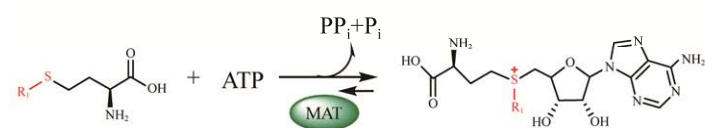
SAM 合酶(*S*-adenosyl-L-methionine synthetases, methionine adenosyltransferases, MAT)是自然界中生产 SAM 的主要策略,同时也是目前报道合成 SAM 及其甲基类似物最常用的生物合成方法。MAT 通过催化 ATP 和 L-Met 来生成 SAM。研究发现,来自不同生物体的 MAT 具有一定的底物宽泛性,可以接受广泛的 L-Met 类似物,从而与 ATP 反应生成相应的 SAM 甲基类似物<sup>[31]</sup>。2014 年, Singh 等<sup>[21]</sup>合成了 44 种非天然的 S/Se 烷基化的 L-Met 类似物,并利用它们探索了来自 5 种不同种属的 MAT 的底物特异性。其中来自人源的 MAT2A II (*Human* MAT2A II, hMAT2A II)被认为是混杂性最强的酶,可以接受并合成 29 种非天然的 SAM 甲基类似物(图 3A)。与此同时, Luo 等<sup>[32]</sup>利用 hMAT2A II 的晶体结构对 hMAT2A II 进行了一系列突变改造,其中实验筛选出的 I117A-hMAT2A II 变体通过增大 L-Met 的结合腔,

可以接受更大的 L-Met 类似物并生成相应的 SAM 甲基类似物,例如(E)戊-2-烯-4-炔基-SAM 以及(E)-己-2-烯-5-炔基-SAM(图 3A)。目前已经有几十种 L-Met 类似物可以被多种野生型或突变型 MAT 接受作为非天然底物,并实现非天然 SAM 甲基类似物的生产,并且大部分还被报道可和下游的烷基转移反应偶联使用<sup>[33-34]</sup>。

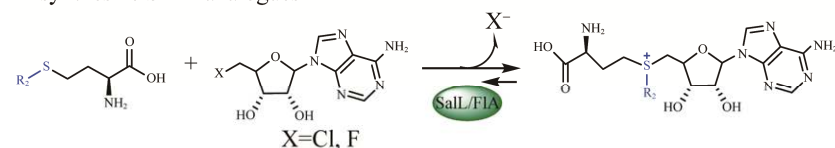
### 2.2.2 卤化酶

来自海洋微生物的卤化酶 5'-氯-5'-脱氧腺苷合成酶<sup>[35]</sup> (5'-chloro-5'-deoxyadenosine synthase, SalL)以及 5'-氟-5'-脱氧腺苷合成酶<sup>[36]</sup> (5'-fluoro-5'-deoxyadenosine synthase, FIA)被报道分别切割 SAM 以产生 L-Met 和 5'-氯或 5'-氟-5'-脱氧腺苷(5'-chloro or 5'-fluoro-5'-deoxyadenosine, 5'-CIDA 或 5'-FDA)。研究发现,此类酶还可以在逆反应方向上利用相应的 L-Met 和 5'-CIDA 或 5'-FDA 合成 SAM,且反应效率比正反应更高。Thomsen 等<sup>[37]</sup>以一系列 L-Met 类似物和 5'-CIDA 或 5'-FDA 作为底物,探索了 SalL 和 FIA 的底物宽泛性。尽管与 MAT 相比活性较弱<sup>[38]</sup>,但 SalL 和 FIA

A. MAT utilizes L-Met analogues and ATP to synthesize SAM analogues



B. SalL/FIA utilizes L-Met analogues and 5'-CIDA/5'-FDA to synthesize SAM analogues



C. HMT uses SAH and haloalkane to synthesize SAM analogues

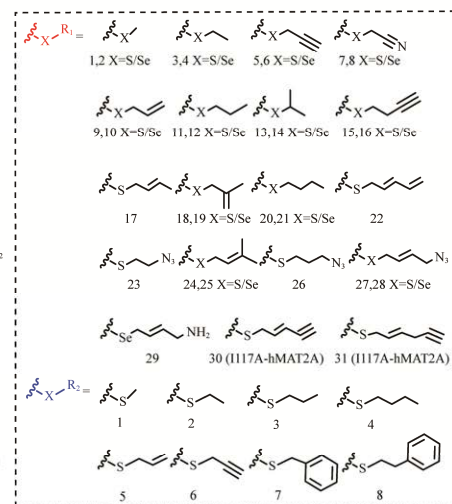
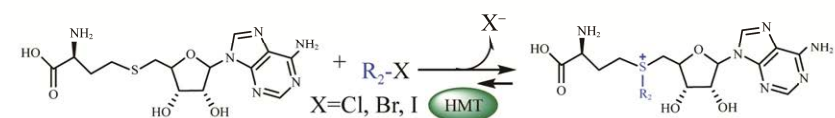


图 3 酶法合成 SAM 甲基类似物的不同方法

Figure 3 Different methods for enzymatic synthesizing SAM analogues.



对一系列 L-Met 类似物也表现出一定的催化活性,且活性通常随着取代基大小的增加而降低(图 3B)。与 MAT 一样,由卤化酶催化的 SAM 甲基类似物的生产也成功地与部分下游 MTase [例如:精氨酸甲基转移酶 1 (PRMT1)、DNA 甲基转移酶(HhaI)、天然产物甲基转移酶(MtfA)]进行了偶联反应,反应显示生成了相应的烷基化产物<sup>[37,39]</sup>。尽管如此,卤化酶作为一类特殊利用卤素的酶,其种类较少,且由于反应动力学较差以及需要昂贵的前体(5'-CIDA 或 5'-FDA),使得其在 SAM 甲基类似物合成方面受到较大的限制。

### 2.2.3 卤素甲基转移酶

氯化物甲基转移酶是一种在真菌、海洋藻类和卤生植物中发现的新型酶,是一种产生大气中氯甲烷的生物催化剂,该酶使用 SAM 作为甲基供体甲基化氯离子生成氯甲烷以及副产物 SAH。Hager 等<sup>[40-41]</sup>首次在大肠杆菌中异源表达该酶基因并进行重组酶的动力学测定时发现,这种氯化物甲基转移酶的重组酶对除氟以外的其他卤素离子(Cl<sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>和 I<sup>-</sup>)都具有较强的结合能力,也就意味着该酶还可以催化产生碘甲烷、溴甲烷等其他甲基卤化物。因此,该酶被后续重新命名为卤素甲基转移酶(halide methyltransferases, HMT)。2019 年,Seebeck 等<sup>[42]</sup>在研究中发现, HMT 在生理条件下可以利用 SAH 和碘甲烷逆反应生成 SAM。利用此特性,研究者开发了一种 HMT 的环酶级联反应<sup>[42]</sup>。在该环酶级联反应体系中, HMT 催化 SAH 与碘甲烷反应生成 SAM,第二种 MTase 使用 SAM 甲基化相应的受体底物,与此同时, SAH 再生。随后, Bornscheuer 等<sup>[43]</sup>开发了一种基于碘的高通量测定方法用于 HMT 的定向进化,并使用它鉴定了一个来源于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 V140T-AtHMT 变体,该变体可以

接受乙基、丙基和烯丙基并产生相应的 SAM 甲基类似物(15 mg SAH 的转化率分别为 90%、50%和 70%)。同时, V140T-AtHMT 还被用于和下游的 O-甲基转移酶(IeOMT 或 COMT)进行酶级联反应,反应最终实现了 Luteolin 的区域选择性乙基化和 3,4-二羟基苯甲醛的烯丙基化。除 V140T-AtHMT 外,近年来,各种研究相继报道了来自不同种属 HMT 的强混杂性,它们可以接受多种不同的烷基卤化物并生成相应的 SAM 甲基类似物<sup>[44]</sup>(图 3C)。2021 年, Peng 等<sup>[45]</sup>更证明了 HMT 催化 SAH 氟甲基化生成氟甲基 S-腺苷-L-甲硫氨酸(fluoromethyl-S-adenosine-L-methionine, F-SAM)的能力。尽管由于 F-SAM 的不稳定性未进行鉴定和表征,但通过与下游甲基转移酶的环酶级联反应最终实现了一些底物的氟甲基化。

事实上,这种由 HMT 催化的环酶级联反应与前两种酶的级联反应相比更为显著的优势在于:该反应仅需要烷基卤化物和微量的 SAH 作为起始原料便可实现 SAM 及其甲基类似物的循环再生以及底物的高效烷基化,有效避免了烷基供体的不可逆损失以及下游烷基转移反应中 SAH 的积累导致的反馈抑制作用。有研究发现,该系统的催化循环次数可超过 500 次<sup>[42]</sup>。该系统有望实现特定非天然 SAM 甲基类似物的大规模制备。

## 3 SAM 甲基类似物的应用

在通过以上各种化学合成和酶法策略制备了多种 SAM 甲基类似物后,这些类似物也在多个领域得到了应用。2006 年, Weinhold 等<sup>[23]</sup>以及 Thorson 等<sup>[46]</sup>首次报告了非天然 SAM 甲基类似物在 MTase 催化反应中的开创性应用,他们分别证明了 SAM 甲基类似物在 DNA 的非天然烷基化以及天然产物吡嗪唑瑞巴霉素的非

天然修饰方面取得的成果,这大大推动了 SAM 甲基类似物的后续创新性发展,也为其更广阔的应用打开了新思路。目前, SAM 甲基类似物在 MTase 催化反应中的应用主要包括作为核酸和蛋白质的生物正交探针工具、对天然产物的修饰以及作为甲基转移酶的抑制剂三大类。下文简要总结了这些非天然 SAM 甲基类似物在这三方面应用的代表性实例。

### 3.1 生物正交探针工具

SAM 甲基类似物作为生物正交探针工具的研究主要发生在核酸和蛋白质的烷基化修饰过程中。众所周知,核酸甲基化即 DNA/RNA 甲基化是一种由 DNA/RNA 甲基转移酶(DNA/RNA methyltransferase, DNMTs/RNMTs)使用 SAM 作为甲基供体催化的表观遗传修饰<sup>[47]</sup>。大量研究表明, DNA/RNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变,从而起到调控基因表达的作用,这在生物和医学研究中具有重要意义<sup>[48-53]</sup>。而蛋白质甲基化是蛋白质翻译后修饰的一种重要形式。在蛋白质甲基化反应中,组蛋白是被研究最多的一类。在蛋白甲基转移酶(proteomethyltransferase, PMTs)的催化下, SAM 分子的甲基被转移到组蛋白上。某些组蛋白残基也被发现通过甲基化可以抑制或激活基因表达,从而形成表观遗传<sup>[29,54-59]</sup>。在此背景下,近年来有大量研究报道发现, DNMTs、RNMTs 和 PMTs 均能够接受一些非天然的 SAM 甲基类似物作为辅因子,从而有效地将一些功能化的标签转移到受体底物上,实现对底物分子的标记<sup>[23]</sup>。其中,这些被转移的官能团除了可以是同位素取代的甲基<sup>[60-69]</sup>,还可以是一些活化基团。例如,2018 年 Rentmeiste 等<sup>[70]</sup>首次描述了含有光笼基团(photocaging groups, PC)的 SAM 类似物的合成,其可以在甲基转移酶

M.TaqI 存在的情况下将 PC 基团转移到相应的 DNA 分子上,从而阻断了底物 DNA 与 R.TaqI 限制性内切酶的结合。接着经过紫外线(365 nm)照射 10–30 min 后,这种光笼基团就会被去除。因此,使用这类 SAM 类似物可以模拟生命体中酶促甲基化和去甲基化的自然过程,并及时调节这些过程。在此基础上,研究者又开发了一种工程改造的 MAT 变体(PCMAT),以将带有 PC 基团的 L-Met 类似物直接转化为相应的 SAM 类似物后又与不同的混杂 Mtase [例如 DNMTs (MTaqI)、RNMTs (Ecm1)]进行级联反应,最终在 MTase 目标分子中成功引入 PC 基团并通过光诱导去除<sup>[71]</sup>。这项工作是实现原位生成的 SAM 甲基类似物在表观遗传学研究中的重要一步(图 4)。

点击化学反应是一种非常重要的分子连接方式。因其反应迅速高效、选择性高、条件温和及副反应少等优点,在新药研发、蛋白质组学分析中都有十分广泛的应用。点击化学的代表性反应为铜催化的叠氮-炔基 Huisgen 环加成反应。SAM 类似物作为一个烷基转移的媒介工具,如果能够实现以高区域选择性向目标官能团引入炔基基团,则可以进一步利用点击化学对药物、核酸、蛋白等底物分子进行精确修饰和标记。基于此设想,2006 年,Weinhold 等<sup>[72]</sup>首次报道了这种新型 SAM 甲基类似物的合成,其中甲基被烯丙基或炔丙基取代(图 5)。与此同时,实验还研究尝试了使用 DNA 甲基转移酶(M.TaqI)催化目标官能团从 SAM 类似物转移到底物 DNA 上。实验结果显示,尽管存在空间位阻,但官能团从 SAM 类似物转移到底物的反应速率仅仅比天然 SAM 慢了一个数量级,尤其是该酶对于官能团炔丙基的转移表现出良好的反应活性<sup>[23]</sup>。事实证明,尽管转移较大官能团不利于 S<sub>N</sub>2 反应的进行,但引入一个额外的

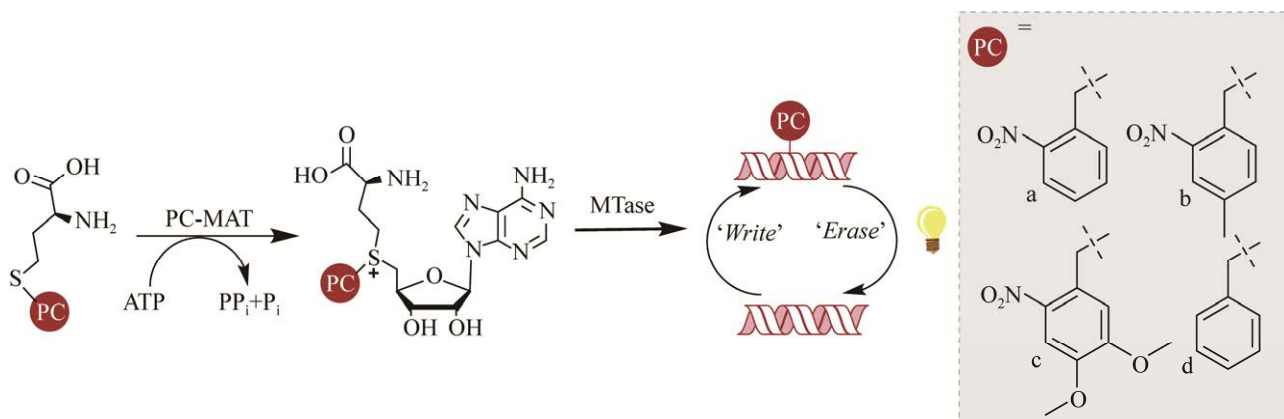


图 4 SAM 类似物的原位生成以及用 PC 基团酶法实现 DNA 标记<sup>[71]</sup>

Figure 4 *In situ* generation of SAM analogues and labeling of DNA by PC groups with methyltransferase<sup>[71]</sup>.

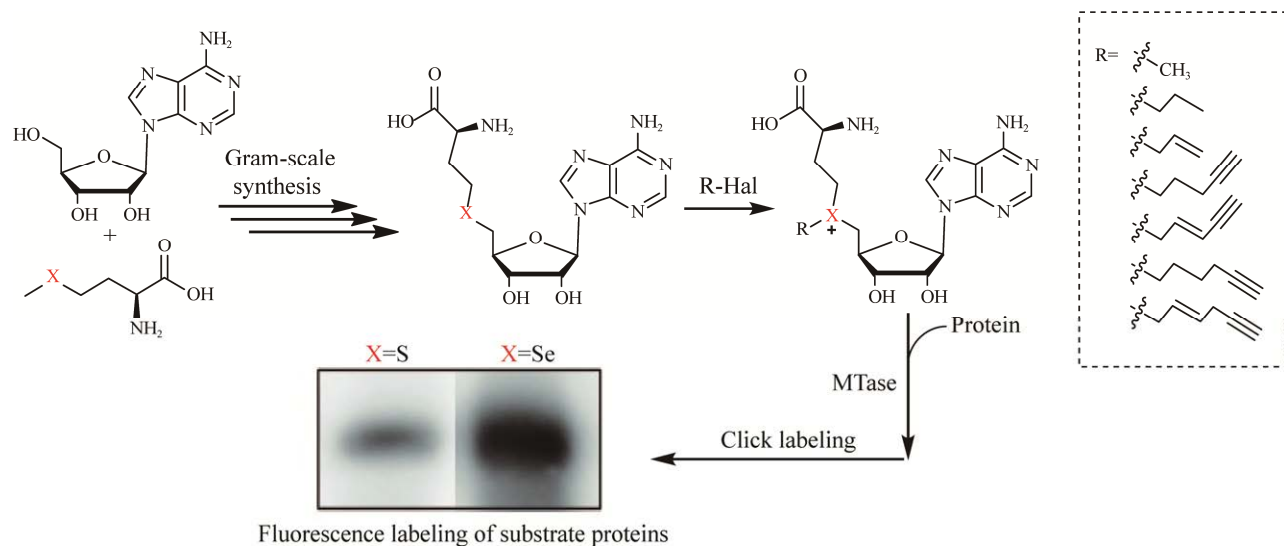


图 5 ProSeAM 与 ProSAM 类似物反应活性对比

Figure 5 Comparison of the reactivity of ProSeAM versus ProSAM analogue.

活化双键或三键，其电子效应可以极大地促进 MTase 催化的反应速率<sup>[20]</sup>。随后，研究人员又利用点击化学实现了对底物 DNA 的进一步修饰和标记<sup>[73-76]</sup>。然而，在研究过程中人们发现炔丙基 SAM 类似物 (propargyl-S-adenosine-L-methionine, ProSAM) 的稳定性极低。在此基础上，Klimasauskas 等<sup>[77]</sup>研究了各种烷基取代的 SAM 甲基类似物的稳定性，他们发现在 pH 7.5 的生理条件下，这些 SAM 类似物的半衰期均

在 3 min 至 5 h 范围内，其中 ProSAM 沿着炔烃水合的路径快速降解。后来，Luo 等<sup>[78]</sup>提出用 Se 取代 SAM 中的 S 原子，经过由蛋白赖氨酸甲基转移酶 (protein lysine methyltransferase, PKMTs) 催化的炔丙基化反应证实，炔丙基-SeAM 类似物 (propargyl-Se-adenosine-L-methionine, ProSeAM) 的稳定性和反应性确实高于其硫类似物，这大大增加了官能团的酶转移效率<sup>[79-80]</sup> (图 5)。

此外，Zhou 等<sup>[81]</sup>利用 SAH 与溴丙酮首次



合成了酮基 SAM 类似物(keto-*S*-adenosyl-L-methionine, keto-SAM), 并在硫嘌呤-*S*-甲基转移酶(thiopurine-*S*-methyltransferase, TPMT)的催化作用下, 酮基从 keto-SAM 以较高的反应活性转移到底物分子上。由于核酸和蛋白质中并不存在酮基修饰, 而酮基可以与 Alexa Fluor 647 染料的羟胺衍生物发生正交反应, 且得到的产物具有一定的稳定性, 因此该类似物也被后续发展为一个分子探针工具应用于生物标记研究中(图 6)。

### 3.2 天然产物的修饰

天然产物甲基化是一种非常普遍的生物合成反应, 其中天然产物甲基转移酶(natural product methyltransferase, NPMTs)利用 SAM 作为甲基供体催化天然产物发生区域特异性的 *O*-甲基化、*N*-甲基化、*S*-甲基化和 *C*-甲基化等, 这些甲基化反应可有助于天然产物理化性质以及生物活性的调节<sup>[82-83]</sup>。根据底物的修饰原子不同对 NPMTs 进行分类, 可分为 *O*-甲基转移酶、*N*-甲基转移酶、*S*-甲基转移酶、*C*-甲基转移酶以及其他甲基转移酶<sup>[84-87]</sup>, 而这些甲基转移酶也陆续被报道可以接受非天然的 SAM 甲基类似物从而实现天然产物的不同官能团修饰。

自然界中存在一种羧甲基-SAM (carboxy-*S*-adenosyl-L-methionine, cxSAM), 它是人们在研究 RNA 碱基 5-氧乙酰尿苷修饰的生物合成

中意外发现的一种天然化合物。这种 cxSAM 由羧甲基-SAM 合酶(ComA)催化 SAM 和预苯酸反应制得, 并在羧甲基转移酶(CmoB)的作用下进一步羧甲基化修饰底物 tRNA<sup>[88-89]</sup>。2020 年, Micklefield 等<sup>[90]</sup>研究发现, 广泛存在的 *N*-甲基转移酶 CNMT 和 *O*-甲基转移酶 COMT 可以利用这种 cxSAM 作为非天然辅因子催化相应的底物四氢异喹啉和邻苯二酚类化合物发生羧甲基化反应。在经过新一轮的定点突变筛选后, 实验得到了对 cxSAM 具有良好偏好性的突变体——羧甲基转移酶, 并且这些突变体可以有效地将 cxSAM 与天然 SAM 进行区分, 从而避免了底物的甲基化。随后实验还将这些羧甲基转移酶与 CmoA 进行偶联, 实现了更为高效和更具选择性的羧甲基化反应。事实上这种新的 cxSAM 策略改变了传统认识, 因为它天然存在于生物体内, 是对天然 SAM 系统的补充(图 7)。

除此之外, 由于羧甲基本身的极性特性, 反应得到的羧甲基化产物可能会具有特殊的理化性质和更为新颖的生物活性。与此同时, 羧甲基还具有后续衍生化的潜力, 可以实现类似炔烃点击化学的反应, 从而对羧甲基化产物实现进一步的衍生化修饰或标记。然而目前这一设想的开发应用还受 MTase 特异性的限制, 在未来有望突破并取得实质性的研究成果。

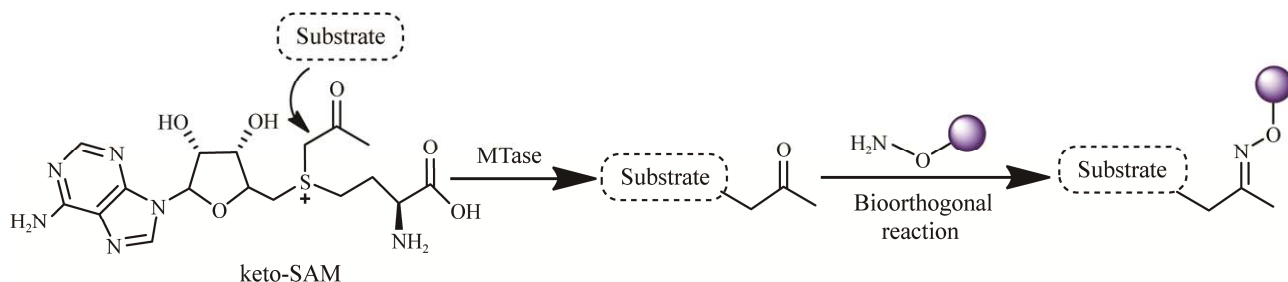


图 6 甲基转移酶催化的酮基转移反应<sup>[81]</sup>

Figure 6 Methyltransferase-catalyzed keto transfer reaction<sup>[81]</sup>.

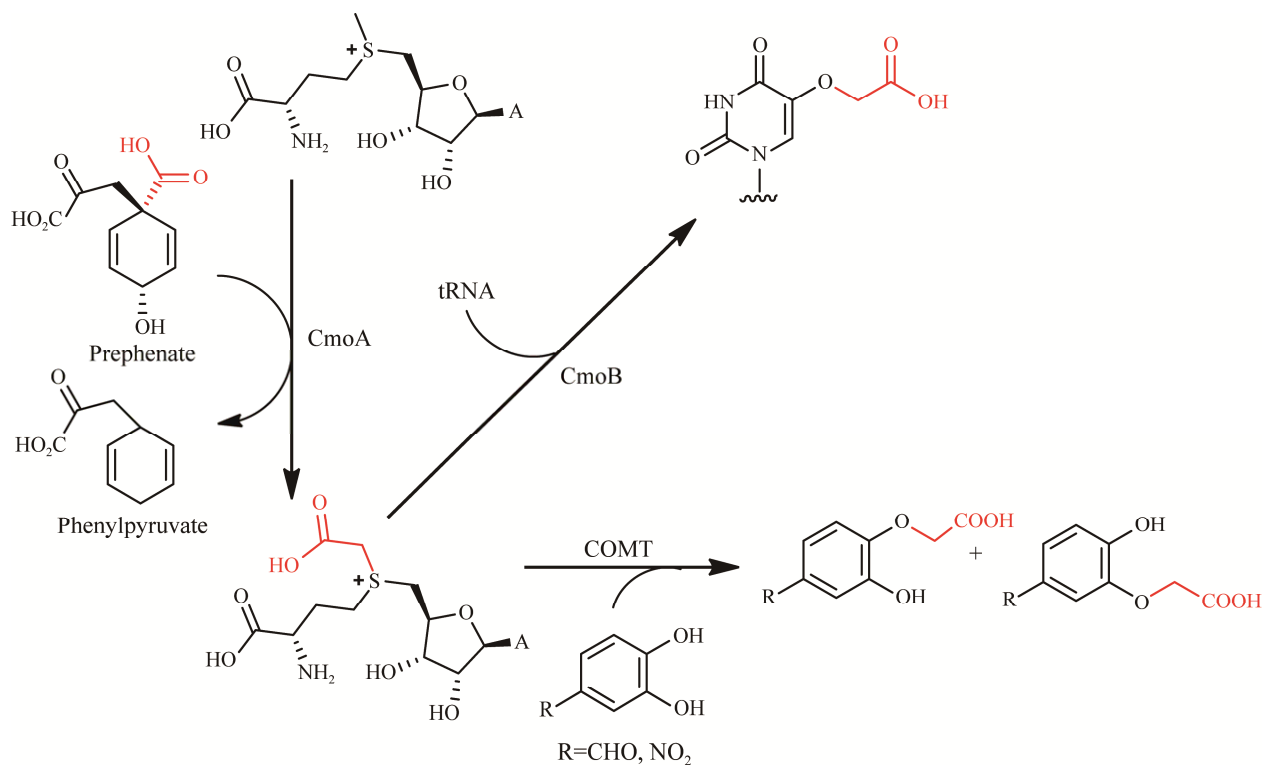


图 7 COMT 催化羧甲基化反应<sup>[90]</sup>

Figure 7 COMT catalyzes carboxymethylation reaction<sup>[90]</sup>.

杂原子化合物的区域选择性烷基化和功能化反应一直是化学合成中一项艰巨的挑战，尤其是对于吡唑这类容易发生互变异构的化合物，其所产生的产物混合物往往分离困难。酶催化在这种具有挑战性的反应中实现了出色的选择性，它们的活性位点往往能够提供高水平的分子识别能力。但目前关于吡唑这类化合物的甲基转移酶还并不为人所知<sup>[40,91]</sup>。2021 年，Hammer 等<sup>[92]</sup>在研究中发现野生型的烟酰胺 N-甲基转移酶(nicotinamide N-methyltransferase, NNMT)可以识别吡唑作为非天然底物并生成 2 种不同 N 原子取代的甲基化产物。在这个基础上实验人员对 NNMT 进行了工程化改造，利用一种新型的酶库设计算法工具 Funclib 在一轮诱变和筛选中将混杂的 NNMT 转换为吡唑烷基化酶的小型酶家族。其中，存在部分突变体能以大于

99%的高区域选择性区分互变异构的两种底物，并生成相应的甲基化产物。接着，研究人员又利用环酶级联催化吡唑烷基化反应。在这个环酶级联系统中，混杂酶 AcIHMT 使用卤代烃作为前体来产生非天然的 SAM 类似物，工程化的 NNMT 高选择性地将不同烷基以 C-N 键的形式转移到吡唑底物上，最终该酶系统以前所未有的区域选择性和活性实现了吡唑的烷基化反应(甲基化、乙基化、丙基化)(图 8)。

### 3.3 甲基转移酶的抑制剂

除了在生物正交探针工具以及天然产物修饰方面的应用外，研究人员还基于酶反应机制设计出 SAM 甲基类似物用于甲基转移酶抑制剂的开发，例如乙烯基 SAM 类似物(vinyl-S-adenosine-L-methionine, AdoVin)<sup>[93]</sup>。Zhou 等<sup>[94]</sup>在探索硫

嘌呤甲基转移酶 TPMT 对 AdoVin 的催化活性时并未观察到理论乙烯基化产物的生成,而是监测到了一种 AdoVin 与亲核底物(还原的 Ellman 试剂-TNB)共价结合的双底物加合物(图 9)。在通过利用超滤或固定金属离子亲和层析法(重组 TPMT 含有 6×His 标签)对产生的双底物加合物与甲基转移酶的紧密结合程度研究时发现,该加合物与 MTase 结合十分紧密。此外,在存在大量天然竞争试剂 SAM 和 SAH 的情况下,

该加合物仍然结合在酶上,这进一步证明了双底物加合物与 MTase 之间存在较强的结合亲和力。因此,所得双底物加合物可以有效抑制 MTase 的催化活性。除 TPMT 外,研究发现 AdoVin 还可以被 DNMTs 等多种 MTase 识别并产生相应的双底物加合物。因此,AdoVin 可以作为一种通用的甲基转移酶抑制剂而被广泛应用,特别是对于 DNMTs、PMTs、COMT 等可以作为药物靶点的甲基转移酶。

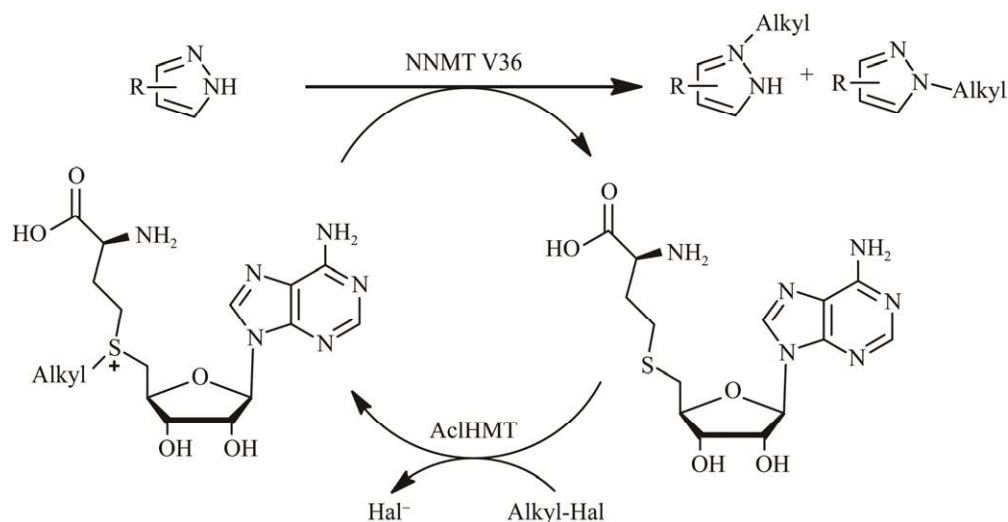


图 8 AclHMT 和 NNMT 变体级联催化吡唑烷基化反应<sup>[92]</sup>

Figure 8 Cascade of AclHMT and NNMT variants catalyzes pyrazole alkylation<sup>[92]</sup>.

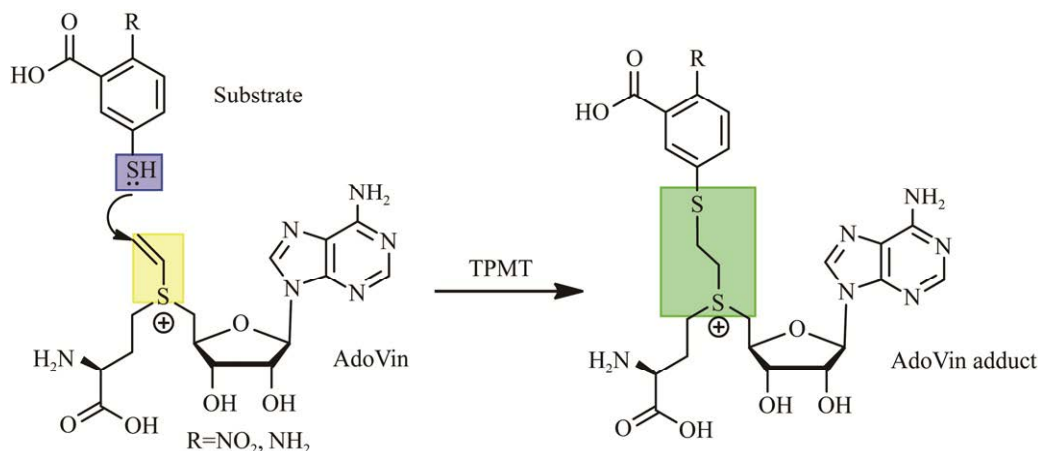


图 9 TPMT 催化 AdoVin 和底物形成双底物加合物<sup>[94]</sup>

Figure 9 TPMT catalyzes AdoVin and substrate to form bisubstrate adduct<sup>[94]</sup>.

与此同时,实验在利用表达重组 TPMT 的大肠杆菌粗细胞裂解液探究加合物的生成与否则发现,仅在添加底物 TNB 的阳性对照组中观察到了这种双底物加合物的生成,并且实验还伴随有另一新加合物的产生。经鉴定发现,这种新加合物为原有加合物的硝基基团被还原成胺后所形成的产物,可能的原因是大肠杆菌中存在的硝基还原酶催化作用的结果。同时,实验发现这种 2-氨基-5-巯基苯甲酸(2-amino-5-mercaptobenzoic acid, AMBA)可以作为 TPMT 的底物,在 SAM 作为甲基供体的情况下,TPMT 催化 AMBA 很好地发生了甲基化反应。因此,利用 AdoVin 等这类 SAM 甲基类似物不仅可以作为广泛使用的甲基转移酶抑制剂,还可以用来捕捉和鉴定 MTase 的未知底物,这在药物开发以及 MTase 的研究领域都将具有更广阔的应用前景。

## 4 结论

目前报道的利用 SAM 甲基类似物的甲基转移酶的相关研究证明: SAM 甲基类似物在探索 MTase 及其底物功能以及制备甲基化产物类似物等诸多方面都具有重要的价值,并且未来关于新型 SAM 甲基类似物的制备以及应用仍然有巨大的研究空间。结合在该领域的研究经验,关于 SAM 甲基类似物还有以下几个问题有待解决。首先,在 SAM 甲基类似物的化学合成方面,目前的合成方法在反应效率和专一性上还有待进一步提高,继而可以使得酶法不能识别的 SAM 甲基类似物获得更高效的制备。其次,由于 SAM 自身的结构和性质,导致目前制备得到的 SAM 甲基类似物仍然存在稳定性的问题,这大大限制了此类化合物更广泛的工业应用。因此,设计合成结构更稳定、依然能被甲基转移酶识别的 SAM 类似物是该领域未来

一个重要的研究方向。最后,目前已报道的 SAM 甲基类似物的种类还比较有限,未来有待开发更为丰富的取代基和对应 SAM 甲基类似物。相信随着研究的不断深入,会有更多不同类型 SAM 甲基类似物的报道以及它们在生物化学、生物制造等更多领域的广泛应用。

## REFERENCES

- [1] ZHANG Q, van der DONK WA, LIU W. Radical-mediated enzymatic methylation: a tale of two SAMs[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2012, 45(4): 555-564.
- [2] SCHÖNHERR H, CERNAK T. Profound methyl effects in drug discovery and a call for new C-H methylation reactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(47): 12256-12267.
- [3] HUBER TD, JOHNSON BR, ZHANG JJ, THORSON JS. AdoMet analog synthesis and utilization: current state of the art[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 189-197.
- [4] CANTONI GL. S-adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1953, 204(1): 403-416.
- [5] BAUERLE MR, SCHWALM EL, BOOKER SJ. Mechanistic diversity of radical S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(7): 3995-4002.
- [6] O'HAGAN D, SCHMIDBERGER JW. Enzymes that catalyse  $S_N2$  reaction mechanisms[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(6): 900-918.
- [7] MAŁECKI JM, DAVYDOVA E, FALNES PØ. Protein methylation in mitochondria[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(4): 101791.
- [8] FALNES PØ, JAKOBSSON ME, DAVYDOVA E, HO A, MAŁECKI J. Protein lysine methylation by seven- $\beta$ -strand methyltransferases[J]. *The Biochemical Journal*, 2016, 473(14): 1995-2009.
- [9] LAW BJC, BENNETT MR, THOMPSON ML, LEVY C, SHEPHERD SA, LEYS D, MICKLEFIELD J. Effects of active-site modification and quaternary structure on the regioselectivity of catechol-O-methyltransferase[J]. *Angewandte Chemie*, 2016, 128(8): 2733-2737.

- [10] YAN F, LAMARRE JM, RÖHRICH R, WIESNER J, JOMAA H, MANKIN AS, FUJIMORI DG. RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(11): 3953-3964.
- [11] YAN F, FUJIMORI DG. RNA methylation by radical SAM enzymes RlmN and Cfr proceeds via methylene transfer and hydride shift[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(10): 3930-3934.
- [12] GROVE TL, BENNER JS, RADLE MI, AHLUM JH, LANDGRAF BJ, KREBS C, BOOKER SJ. A radically different mechanism for *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases[J]. *Science*, 2011, 332(6029): 604-607.
- [13] FREY PA, HEGEMAN AD, RUZICKA FJ. The radical SAM superfamily[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 43(1): 63-88.
- [14] WANG SC, FREY PA. *S*-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32(3): 101-110.
- [15] WOODYER RD, LI GY, ZHAO HM, van der DONK WA. New insight into the mechanism of methyl transfer during the biosynthesis of fosfomycin[J]. *Chemical Communications*, 2007(4): 359-361.
- [16] van der DONK WA. Rings, radicals, and regeneration: the early years of a bioorganic laboratory[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2006, 71(26): 9561-9571.
- [17] BOOKER SJ, GROVE TL. Mechanistic and functional versatility of radical SAM enzymes[J]. *F1000 Biology Reports*, 2010, 2: 52.
- [18] LIN H. *S*-adenosylmethionine-dependent alkylation reactions: when are radical reactions used?[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2011, 39(5/6): 161-170.
- [19] JIN WB, WU S, XU YF, YUAN H, TANG GL. Recent advances in HemN-like radical *S*-adenosyl-L-methionine enzyme-catalyzed reactions[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(1): 17-28.
- [20] KLIMAŠAUSKAS S, WEINHOLD E. A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases[J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25(3): 99-104.
- [21] SINGH S, ZHANG JJ, HUBER TD, SUNKARA M, HURLEY K, GOFF RD, WANG GJ, ZHANG W, LIU CM, ROHR J, van LANEN SG, MORRIS AJ, THORSON JS. Facile chemoenzymatic strategies for the synthesis and utilization of *S*-adenosyl-L-methionine analogues[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(15): 3965-3969.
- [22] WINTER JM, CHIOU G, BOTHWELL IR, XU W, GARG NK, LUO MK, TANG Y. Expanding the structural diversity of polyketides by exploring the cofactor tolerance of an inline methyltransferase domain[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(14): 3774-3777.
- [23] DALHOFF C, LUKINAVIČIUS G, KLIMAŠAUSKAS S, WEINHOLD E. Direct transfer of extended groups from synthetic cofactors by DNA methyltransferases[J]. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(1): 31-32.
- [24] BURGOS ES, SHECHTER D. Chemoenzymatic synthesis of *S*-nucleosyl amino acids (SNA) analogs of *S*-adenosyl-L-methionine and *S*-adenosyl-L-homocysteine and uses thereof: US20200239921[P]. 2020-07-30.
- [25] MCKEAN IJW, SADLER JC, CUETOS A, FRESE A, HUMPHREYS LD, GROGAN G, HOSKISSON PA, BURLEY GA. *S*-adenosyl methionine cofactor modifications enhance the biocatalytic repertoire of small molecule *C*-alkylation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(49): 17583-17588.
- [26] TALUKDAR A, MUKHERJEE A, BHATTACHARYA D. Fascinating transformation of SAM-competitive protein methyltransferase inhibitors from nucleoside analogues to non-nucleoside analogues[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(3): 1662-1684.
- [27] PETERLI-ROTH P, MAGUIRE MP, LEON E, RAPOPORT H. Syntheses of 6-deaminosinefungin and (*S*)-6-methyl-6-deaminosinefungin[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1994, 59(15): 4186-4193.
- [28] STECHER H, TENG M, UEBERBACHER BJ, REMLER P, SCHWAB H, GRIENGL H, GRUBER-KHADJAWI M. Biocatalytic Friedel-Crafts alkylation using non-natural cofactors[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(50): 9710-9712.
- [29] WANG R, ZHENG WH, YU HQ, DENG HT, LUO MK. Labeling substrates of protein arginine methyltransferase with engineered enzymes and matched *S*-adenosyl-L-methionine analogues[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(20): 7648-7651.
- [30] GOYVAERTS V, van SNICK S, D'HUYLS L, VITALE R, HELMER LAUER M, WANG S, LEEN V, DEHAEN W, HOFKENS J. Fluorescent SAM analogues for methyltransferase based DNA labeling[J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(22): 3317-3320.

- [31] KOMOTO J, YAMADA T, TAKATA Y, MARKHAM GD, TAKUSAGAWA F. Crystal structure of the S-adenosylmethionine synthetase ternary complex: a novel catalytic mechanism of S-adenosylmethionine synthesis from ATP and Met[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(7): 1821-1831.
- [32] WANG R, ISLAM K, LIU Y, ZHENG WH, TANG HP, LAILLER N, BLUM G, DENG HT, LUO MK. Profiling genome-wide chromatin methylation with engineered posttranslation apparatus within living cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(3): 1048-1056.
- [33] ZANO SP, BHANSALI P, LUNI WAL A, VIOLA RE. Alternative substrates selective for S-adenosylmethionine synthetases from pathogenic bacteria[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013, 536(1): 64-71.
- [34] WIJAYASINGHE YS, BLUMENTHAL RM, VIOLA RE. Producing proficient methyl donors from alternative substrates of S-adenosylmethionine synthetase[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(9): 1521-1526.
- [35] EUSTÁQUIO AS, POJER F, NOEL JP, MOORE BS. Discovery and characterization of a marine bacterial SAM-dependent chlorinase[J]. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(1): 69-74.
- [36] O'HAGAN D, SCHAFFRATH C, COBB SL, HAMILTON JTG, MURPHY CD. Biosynthesis of an organofluorine molecule[J]. *Nature*, 2002, 416(6878): 279.
- [37] THOMSEN M, VOGENSEN SB, BUCHARDT J, BURKART MD, CLAUSEN RP. Chemoenzymatic synthesis and *in situ* application of S-adenosyl-L-methionine analogs[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013, 11(43): 7606-7610.
- [38] ANDEXER JN, RICHTER M. Emerging enzymes for ATP regeneration in biocatalytic processes[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16(3): 380-386.
- [39] LIPSON JM, THOMSEN M, MOORE BS, CLAUSEN RP, la CLAIR JJ, BURKART MD. A tandem chemoenzymatic methylation by S-adenosyl-L-methionine[J]. *ChemBioChem*, 2013, 14(8): 950-953.
- [40] WUOSMAA AM, HAGER LP. Methyl chloride transferase: a carbocation route for biosynthesis of halometabolites[J]. *Science*, 1990, 249(4965): 160-162.
- [41] NI X, HAGER LP. Expression of *Batis maritima* methyl chloride transferase in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(7): 3611-3615.
- [42] LIAO CS, SEEBECK FP. S-adenosylhomocysteine as a methyl transfer catalyst in biocatalytic methylation reactions[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(8): 696-701.
- [43] TANG QY, GRATHWOL CW, ASLAN-ÜZEL AS, WU SK, LINK A, PAVLIDIS IV, BADENHORST CPS, BORNSCHEUER UT. Directed evolution of a halide methyltransferase enables biocatalytic synthesis of diverse SAM analogs[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(3): 1524-1527.
- [44] SCHÜLKE KH, OSPINA F, HÖRNSCHEMEYER K, GERGEL S, HAMMER SC. Substrate profiling of anion methyltransferases for promiscuous synthesis of S-adenosylmethionine analogs from haloalkanes[J]. *ChemBioChem*, 2022, 23(4): e202100632.
- [45] PENG J, LIAO C, BAUER C, SEEBECK FP. Fluorinated S-adenosylmethionine as a reagent for enzyme-catalyzed fluoromethylation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(52): 27178-27183.
- [46] ZHANG CS, WELLER RL, THORSON JS, RAJSKI SR. Natural product diversification using a non-natural cofactor analogue of S-adenosyl-L-methionine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(9): 2760-2761.
- [47] SMITH ZD, MEISSNER A. DNA methylation: roles in mammalian development[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(3): 204-220.
- [48] VRANKEN C, DEEN J, DIRIX L, STAKENBORG T, DEHAEN W, LEEN V, HOFKENS J, NEELY RK. Super-resolution optical DNA mapping *via* DNA methyltransferase-directed click chemistry[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(7): e50.
- [49] LEVY-SAKIN M, GRUNWALD A, KIM S, GASSMAN NR, GOTTFRIED A, ANTELMAN J, KIM Y, HO SO, SAMUEL R, MICHALET X, LIN RR, DERTINGER T, KIM AS, CHUNG S, COLYER RA, WEINHOLD E, WEISS S, EBENSTEIN Y. Toward single-molecule optical mapping of the epigenome[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(1): 14-26.
- [50] NEELY RK, DEDECKER P, HOTTA JI, URBANAVIČIŪTĖ G, KLIMAŠAUSKAS S, HOFKENS J. DNA fluorocode: a single molecule, optical map of DNA with nanometre resolution[J]. *Chemical Science*, 2010, 1(4): 453-460.
- [51] MOTORIN Y, BURHENNE J, TEIMER R, KOYNOV K, WILLNOW S, WEINHOLD E, HELM M.



- Expanding the chemical scope of RNA: methyltransferases to site-specific alkynylation of RNA for click labeling[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(5): 1943-1952.
- [52] TOMKUVIENĖ M, CLOUET-D'ORVAL B, ČERNIAUSKAS I, WEINHOLD E, KLIMAŠAUSKAS S. Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(14): 6765-6773.
- [53] PLOTNIKOVA A, OSIPENKO A, MASEVIČIUS V, VILKAITIS G, KLIMAŠAUSKAS S. Selective covalent labeling of miRNA and siRNA duplexes using HEN1 methyltransferase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(39): 13550-13553.
- [54] PETERS W, WILLNOW S, DUISKEN M, KLEINE H, MACHEREY T, DUNCAN KE, LITCHFIELD DW, LÜSCHER B, WEINHOLD E. Enzymatic site-specific functionalization of protein methyltransferase substrates with alkynes for click labeling[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(30): 5170-5173.
- [55] OSBORNE T, WELLER ROSKA RL, RAJSKI SR, THOMPSON PR. *In situ* generation of a bisubstrate analogue for protein arginine methyltransferase 1[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(14): 4574-4575.
- [56] ISLAM K, ZHENG WH, YU HQ, DENG HT, LUO MK. Expanding cofactor repertoire of protein lysine methyltransferase for substrate labeling[J]. *ACS Chemical Biology*, 2011, 6(7): 679-684.
- [57] ZHANG YX, PAN YB, YANG W, LIU WJ, ZOU HF, ZHAO ZK. Protein arginine allylation and subsequent fluorophore targeting[J]. *ChemBioChem*, 2013, 14(12): 1438-1443.
- [58] ZHANG YX, PAN YB, LIU WJ, ZHOU YJ, WANG KY, WANG L, SOHAIL M, YE ML, ZOU HF, ZHAO ZK. *In vivo* protein allylation to capture protein methylation candidates[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(40): 6689-6692.
- [59] SHIMBA S, BOKAR JA, ROTTMAN F, REDDY R. Accurate and efficient N<sup>6</sup>-adenosine methylation in spliceosomal U6 small nuclear RNA by HeLa cell extract *in vitro*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(13): 2421-2426.
- [60] WANG FB, SINGH S, ZHANG JJ, HUBER TD, HELMICH KE, SUNKARA M, HURLEY KA, GOFF RD, BINGMAN CA, MORRIS AJ, THORSON JS, PHILLIPS GN JR. Understanding molecular recognition of promiscuity of thermophilic methionine adenosyltransferase sMAT from *Sulfolobus solfataricus*[J]. *The FEBS Journal*, 2014, 281(18): 4224-4239.
- [61] SIEGRIST J, NETZER J, MORDHORST S, KARST L, GERHARDT S, EINSLE O, RICHTER M, ANDEXER JN. Functional and structural characterisation of a bacterial O-methyltransferase and factors determining regioselectivity[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(2): 312-321.
- [62] GOLOVINA AY, SERGIEV PV, GOLOVIN AV, SEREBRYAKOVA MV, DEMINA I, GOVORUN VM, DONTSOVA OA. The *yfiC* gene of *E. coli* encodes an adenine-N<sup>6</sup>-methyltransferase that specifically modifies A37 of tRNA<sub>I<sup>Val</sup></sub>(cmo<sup>5</sup>UAC)[J]. *RNA*, 2009, 15(6): 1134-1141.
- [63] MENDEL M, CHEN KM, HOMOLKA D, GOS P, PANDEY RR, MCCARTHY AA, PILLAI RS. Methylation of structured RNA by the m<sup>6</sup>A writer METTL16 is essential for mouse embryonic development[J]. *Molecular Cell*, 2018, 71(6): 986-1000.e11.
- [64] RUBIN RA, MODRICH P. *EcoR* I methylase: physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252(20): 7265-7272.
- [65] HEVEL JM, PRICE OM. Rapid and direct measurement of methyltransferase activity in about 30 min[J]. *Methods*, 2020, 175: 3-9.
- [66] WU J, XIE N, FENG Y, ZHENG YG. Scintillation proximity assay of arginine methylation[J]. *SLAS Discovery*, 2012, 17(2): 237-244.
- [67] ERO R, PEIL L, LIIV A, REMME J. Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli*[J]. *RNA (New York, NY)*, 2008, 14(10): 2223-2233.
- [68] LIU JZ, YUE YN, HAN DL, WANG X, FU Y, ZHANG L, JIA GF, YU M, LU ZK, DENG X, DAI Q, CHEN WZ, HE C. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(2): 93-95.
- [69] MORVAN D, DEMIDEM A, GUENIN S, MADELMONT JC. Methionine-dependence phenotype of tumors: metabolite profiling in a melanoma model using L-[methyl-<sup>13</sup>C] methionine and high-resolution magic angle spinning <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C nuclear magnetic

- resonance spectroscopy[J]. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2006, 55(5): 984-996.
- [70] MUTTACH F, MÄSING F, STUDER A, RENTMEISTER A. New AdoMet analogues as tools for enzymatic transfer of photo-cross-linkers and capturing RNA-protein interactions[J]. *Chemistry-a European Journal*, 2017, 23(25): 5988-5993.
- [71] MICHAILIDOU F, KLÖCKER N, CORNELISSEN NV, SINGH RK, PETERS A, OVCHARENKO A, KÜMMEL D, RENTMEISTER A. Engineered SAM synthetases for enzymatic generation of AdoMet analogs with photocaging groups and reversible DNA modification in cascade reactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(1): 480-485.
- [72] DALHOFF C, LUKINAVIČIUS G, KLIMAŠAUSKAS S, WEINHOLD E. Synthesis of S-adenosyl-L-methionine analogs and their use for sequence-specific transalkylation of DNA by methyltransferases[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(4): 1879-1886.
- [73] JALALI E, THORSON JS. Enzyme-mediated bioorthogonal technologies: catalysts, chemoselective reactions and recent methyltransferase applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 69: 290-298.
- [74] TOMKUVIENĖ M, MICKUTĖ M, VILKAITIS G, KLIMAŠAUSKAS S. Repurposing enzymatic transferase reactions for targeted labeling and analysis of DNA and RNA[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 55: 114-123.
- [75] MUTTACH F, RENTMEISTER A. One-pot modification of 5'-capped RNA based on methionine analogs[J]. *Methods*, 2016, 107: 3-9.
- [76] DEEN J, VRANKEN C, LEEN V, NEELY RK, JANSSEN KPF, HOFKENS J. Methyltransferase-directed labeling of biomolecules and its applications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(19): 5182-5200.
- [77] LUKINAVIČIUS G, TOMKUVIENĖ M, MASEVIČIUS V, KLIMAŠAUSKAS S. Enhanced chemical stability of AdoMet analogues for improved methyltransferase-directed labeling of DNA[J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(6): 1134-1139.
- [78] BOTHWELL IR, LUO MK. Large-scale, protection-free synthesis of Se-adenosyl-L-selenomethionine analogues and their application as cofactor surrogates of methyltransferases[J]. *Organic Letters*, 2014, 16(11): 3056-3059.
- [79] IWIG DF, GRIPPE AT, MCINTYRE TA, BOOKER SJ. Isotope and elemental effects indicate a rate-limiting methyl transfer as the initial step in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(42): 13510-13524.
- [80] WILLNOW S, MARTIN M, LÜSCHER B, WEINHOLD E. A selenium-based click AdoMet analogue for versatile substrate labeling with wild-type protein methyltransferases[J]. *ChemBioChem*, 2012, 13(8): 1167-1173.
- [81] LEE BWK, SUN HG, ZANG TZ, KIM BJ, ALFARO JF, ZHOU ZS. Enzyme-catalyzed transfer of a ketone group from an S-adenosylmethionine analogue: a tool for the functional analysis of methyltransferases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(11): 3642-3643.
- [82] 李元玉, 陈万生, 肖莹. 植物咖啡酸-O-甲基转移酶的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(6): 2187-2200.
- LI YY, CHEN WS, XIAO Y. Advances in plant caffeic acid-O-methyltransferase[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(6): 2187-2200 (in Chinese).
- [83] WESSJOHANN LA, KEIM J, WEIGEL B, DIPPE M. Alkylating enzymes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17(2): 229-235.
- [84] PENG Y, FENG QP, WILK D, ADJEI AA, SALAVAGGIONE OE, WEINSHILBOUM RM, YEE VC. Structural basis of substrate recognition in thiopurine S-methyltransferase[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(23): 6216-6225.
- [85] CARNEY AE, HOLDEN HM. Molecular architecture of TylM1 from *Streptomyces fradiae*: an N,N-dimethyltransferase involved in the production of dTDP-D-mycaminose[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(5): 780-787.
- [86] LOMAX C, LIU WJ, WU LY, XUE K, XIONG JB, ZHOU JZ, MCGRATH SP, MEHARG AA, MILLER AJ, ZHAO FJ. Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms[J]. *New Phytologist*, 2012, 193(3): 665-672.
- [87] 张香燕, 申晓林, 孙新晓, 王佳, 袁其朋. 甲基转移酶在微生物合成天然产物中的应用[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1869-1886.
- ZHANG XY, SHEN XL, SUN XX, WANG J, YUAN QP. Application of methyltransferases in microbial synthesis of natural products[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(6): 1869-1886 (in Chinese).
- [88] KIM J, XIAO H, BONANNO JB, KALYANARAMAN

- C, BROWN S, TANG XY, AL-OBADI NF, PATSKOVSKY Y, BABBITT PC, JACOBSON MP, LEE YS, ALMO SC. Structure-guided discovery of the metabolite carboxy-SAM that modulates tRNA function[J]. *Nature*, 2013, 498(7452): 123-126.
- [89] KIM J, XIAO H, KOH J, WANG YK, BONANNO JB, THOMAS K, BABBITT PC, BROWN S, LEE YS, ALMO SC. Determinants of the CmoB carboxymethyl transferase utilized for selective tRNA wobble modification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(9): 4602-4613.
- [90] HERBERT AJ, SHEPHERD SA, CRONIN VA, BENNETT MR, SUNG R, MICKLEFIELD J. Engineering orthogonal methyltransferases to create alternative bioalkylation pathways[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(35): 14950-14956.
- [91] MAHATTHANANCHAI J, DUMAS AM, BODE JW. Catalytic selective synthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(44): 10954-10990.
- [92] BENDEL LL, ABERLE B, EGLER-KEMMERER AN, KIENZLE S, HAUER B, HAMMER SC. Engineered enzymes enable selective N-alkylation of pyrazoles with simple haloalkanes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(10): 5554-5560.
- [93] ZHOU ZS, QU WL, BAI TY. Compositions and methods for the inhibition of methyltransferases: US20150057243[P]. 2015-02-26.
- [94] QU WL, CATCOTT KC, ZHANG K, LIU SS, GUO JJ, MA JS, PABLO M, GLICK J, XIU Y, KENTON N, MA XY, DUCLOS RI JR, ZHOU ZS. Capturing unknown substrates *via in situ* formation of tightly bound bisubstrate adducts: *S*-adenosyl-vinylthionine as a functional probe for AdoMet-dependent methyltransferases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(9): 2877-2880.

(本文责编 陈宏宇)