



嗜热丁烷氧化古菌 *Candidatus Syntrophoarchaeum* 烷基转移酶 MtaA 催化丁基辅酶 M 的分子机制研究

王瑾 田晓翩 李政新 陈海峰 王风平*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

摘要:【背景】嗜热古菌 *Candidatus Syntrophoarchaeum* 可以与硫酸盐还原细菌共生,通过逆转产甲烷途径进行正丁烷的氧化,但在该过程中负责催化丁基辅酶 M 氧化的酶尚未确定。【目的】利用分子动力学模拟证明 *Ca. Syntrophoarchaeum* 中 *mtaA* 基因编码的蛋白可以特异性催化丁基辅酶 M 中丁基的转移,并非转移甲基。【方法】使用 *Methanosarcina mazei* 辅酶 M 甲基转移酶 MtaA 的晶体结构(PDB ID: 4ay8)作为模板,对 MtaA_1 (GenBank 登录号 OFV65993.1)和 MtaA_2 (GenBank 登录号 OFV65678.1)进行同源建模。使用分子对接得到两者分别结合 $\text{CH}_3\text{-CoM}$ 和 $\text{C}_4\text{H}_9\text{-CoM}$ 时的结构,并用 AMBER18 进行分子动力学模拟。【结果】当 MtaA_1 和 MtaA_2 分别结合 $\text{C}_4\text{H}_9\text{-CoM}$ 时,表现出与 4ay8 晶体结构类似的 TIM-Barrel 折叠三维结构,但在活性中心形状、 Zn^{2+} 与底物距离以及活性位点附近氨基酸配位方式等方面存在差异,这可能是导致 *Ca. Syntrophoarchaeum* 中 *mtaA* 基因编码的蛋白催化丁基辅酶 M 氧化的原因。其中 MtaA_2 与 4ay8 结构更相似,活性中心氨基酸配位更完整,暗示其更可能具备催化活性。然而当 MtaA_1 和 MtaA_2 分别结合 $\text{CH}_3\text{-CoM}$ 时,整体结构不合实际,活性中心 Zn^{2+} 与底物距离过远,表明底物几乎不可能与酶结合。【结论】*Ca. Syntrophoarchaeum* 中的 MtaA_1 和 MtaA_2 很可能是特异性的丁基转移酶,而非催化甲基的转移,其中 MtaA_2 具备活性的可能性更高。

关键词: *Candidatus Syntrophoarchaeum*, 丁烷厌氧氧化, 烷基转移酶, 分子动力学模拟

Molecular mechanism of the alkyl-transferase MtaA catalyzing butyl-CoM in the thermophilic butane-oxidizing archaea *Candidatus Syntrophoarchaeum*

WANG Jin TIAN Xiaopian LI Zhengxin CHEN Haifeng WANG Fengping*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Thermophilic archaea *Candidatus Syntrophoarchaeum* was found to coexist with sulfate-reducing bacteria and oxidize n-butane by the reverse methanogenesis pathway. However, in this

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0310803); National Natural Science Foundation of China (91751205, 41867057)

*Corresponding author: E-mail: fengpingw@sjtu.edu.cn

Received: 15-03-2021; Accepted: 18-03-2021; Published online: 30-03-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0310803); 国家自然科学基金(91751205, 41867057)

*通信作者: E-mail: fengpingw@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-03-15; 接受日期: 2021-03-18; 网络首发日期: 2021-03-30

process, the enzyme responsible for catalyzing the oxidation of butyl-CoM has not been determined yet.

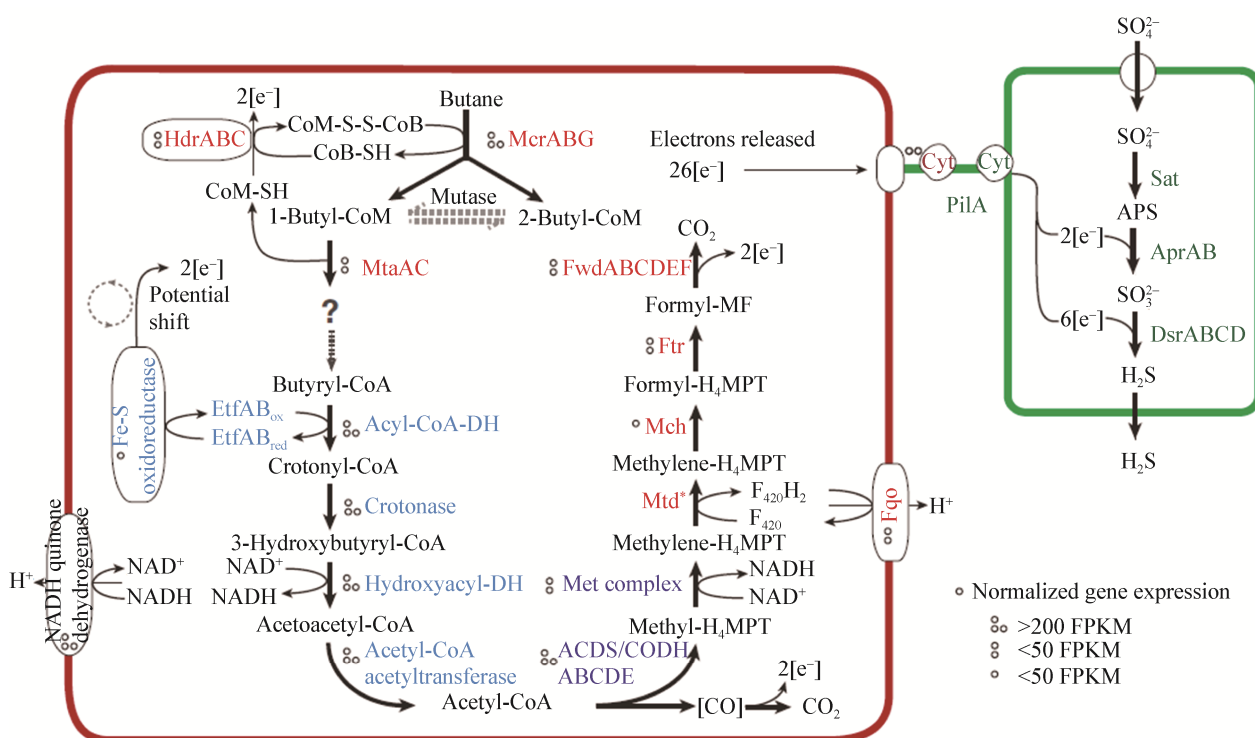
[Objective] Using molecular dynamics simulation to prove that the enzymes encoded by *mtaA* genes found in *Ca. Syntrophoarchaeum* can specifically catalyze the transfer of butyl in butyl-CoM, and they are not methyltransferases. **[Methods]** Using the crystal structure of *Methanosarcina mazei* coenzyme M methyltransferase MtaA (PDB ID: 4ay8) as a template, homology modeling of MtaA_1 (GenBank ID: OFV65993.1) and MtaA_2 (GenBank ID: OFV65678.1) was performed. Molecular docking was used to obtain the structure when they were combined with CH₃-CoM and C₄H₉-CoM respectively, and AMBER18 was used for molecular dynamics simulation. **[Results]** When combined with C₄H₉-CoM, MtaA_1 and MtaA_2 exhibited a TIM-barrel-like three-dimensional structure similar to the fold of 4ay8. However, there are differences in the shape of the active site, the distance between Zn²⁺ and the substrate, and the coordination of amino acid residues around the active site. These differences may be the reason why the enzymes encoded by *mtaA* genes found in *Ca. Syntrophoarchaeum* catalyze the oxidation of butyl-CoM. The overall structure of MtaA_2 is more similar to 4ay8, and the coordination of residues around the active site is complete, suggesting that MtaA_2 is more likely to be active. When MtaA_1 and MtaA_2 bind to CH₃-CoM respectively, their overall structures are unrealistic, and the coordinated Zn²⁺ is too far away from the substrate, indicating that CH₃-CoM is almost impossible to bind to the enzyme. **[Conclusion]** MtaA_1 and MtaA_2 of *Ca. Syntrophoarchaeum* are likely to be specific butyl-transferases rather than catalyzing the transfer of methyl groups, and MtaA_2 is more likely to be active.

Keywords: *Candidatus Syntrophoarchaeum*, anaerobic oxidation of butane, alkyl-transferase, molecular dynamics simulation

挥发性碳氢化合物, 例如甲烷和短链多碳烷烃(乙烷、丙烷和丁烷等)广泛存在于海洋环境中, 这些烃类化合物的产生和转化对海洋碳循环和全球气候变化产生了深远的影响^[1-3]。在海洋沉积物中, 古菌和细菌通过与丰富的电子受体(如硫酸盐)的还原反应耦联, 将这些小分子烷烃氧化。其中, 含量最丰富的甲烷的厌氧氧化(Anaerobic Oxidation of Methane, AOM)过程, 通常是由甲烷厌氧氧化古菌(Anaerobic Methanotrophic Archaea, ANME)和硫酸盐还原细菌(Sulfate-Reducing Bacteria, SRB)共同作用^[4-5]。在第一步反应中, ANME 中的甲基辅酶 M 还原酶(Methyl-CoM Reductase, MCR)将甲烷活化成甲基辅酶 M^[6]。再由四氢甲蝶呤(H₄MPT)——甲基转移酶(Tetrahydromethanopterin S-Methyltransferase, MTR)将辅酶 M 上的甲基转移至 H₄MPT^[7-8]。然后通过逆转产甲烷途径的酶链, 产物将被进一步氧化为 CO₂^[9], 同时电子被转移至共生的 SRB^[10]。

尽管甲烷是海洋天然气的主要成分, 但短链多碳烷烃在海底的含量也很丰富, 可高达 20%, 其中包括乙烷(多达 15%)、丙烷和丁烷^[1,11]。长期以来,

人们一直认为在厌氧环境中多碳烷烃的氧化只能由细菌进行, 例如, δ -变形菌 BuS5 被证实可以在厌氧条件下通过添加延胡索酸分子来进行丙烷(C₃H₈)和正丁烷(C₄H₁₀)的氧化^[12-14]。然而, Laso-Pérez 等^[15]2016 年的研究颠覆了这一观念。研究证实, 一类富集培养的广古菌门古菌 *Candidatus Syntrophoarchaeum* spp. BOX1&BOX2, 可以与硫酸盐还原细菌共生, 通过逆向产甲烷途径进行正丁烷和丙烷的厌氧氧化^[15]。在丁烷氧化途径中, 测得的化学计量平衡表明, 在 MCR 活化丁烷后, 与辅酶 M 结合的丁基完全降解为 CO₂ (图 1), 预计只有小部分进入生物合成^[15]。然而, 与 ANME 及乙烷厌氧氧化古菌 *Ca. Argoarchaeum*^[16]和 *Ca. Ethanoperedens*^[17]不同的是, 丁烷氧化古菌 *Ca. Syntrophoarchaeum* 中并没有 MTR^[15], 负责催化丁基辅酶 M 氧化的酶尚未确定。因此, 解决丁基 CoM 到丁酰 CoA 这一重要代谢过程, 是完善丁烷厌氧氧化途径的关键。Laso-Pérez 等^[15]和 Wang 等^[18]都针对这一问题提出假设: 丁基 CoM 到丁酰 CoA 之间的转化, 很可能是由在所有 *Ca. Syntrophoarchaeum* 中都发现的甲

图 1 基于分析的硫酸盐型丁烷厌氧氧化途径^[15]Figure 1 Metabolic scheme proposed for butane oxidation with sulfate based on molecular analyses^[15]

注: *Ca. Syntrophoarchaeum* (红色细胞)利用逆转产甲烷途径(红色标记)活化丁烷,并氧化亚甲基- H_4 MPT生成 CO_2 。催化丁酰辅酶 A 氧化的酶是与 SRB (蓝色标记)共享的。乙酰辅酶 A 通过逆向 Wood-Ljungdahl 途径氧化(紫色标记)。还原的等价电子被转移到硫酸盐还原的 HotSeep-1 细菌(绿色细胞和标记)中。粗体标记的酶表示在蛋白质提取物中检测到;虚线箭头标记未检测到基因的假设途径; *mtd 仅在更完整的 *Ca. S. caldarius* 基因组中检测到。符号 $[e^-]$ 表示与蛋白质的血红素或 $[FeS]$ 簇结合或与未知载体结合的电子^[15]

Note: *Ca. Syntrophoarchaeum* (red cell) uses the reverse methanogenesis pathway (red labels) to activate butane and to oxidize methylene- H_4 MPT to CO_2 . Butyryl-CoA oxidation is catalyzed by enzymes shared with syntrophic bacteria (blue labels). Acetyl-CoA is oxidized by a reverse Wood-Ljungdahl pathway (violet labels). Reducing equivalents are transferred to the sulfate reducing HotSeep-1 partner bacterium (green cell and labels). Enzyme names in bold indicate their detection in protein extracts; dotted arrows mark hypothetical pathways without detected genes; *mtd has only been detected in the more complete genome of *Ca. S. caldarius*. Symbol $[e^-]$ indicates electrons bound to haem or $[FeS]$ clusters in proteins, or to unknown or non-specified carriers^[15]

基钴胺酰胺——CoM 甲基转移酶(Methylcobamide: CoM Methyltransferase, MtaABC)的同系物催化的。本文也将首次对这一假设提供分子动力学模拟证据支持。

可溶性的甲基转移酶复合物 MtaABC 广泛存在于甲醇营养型产甲烷古菌(特别是 *Methanosarcina*),并直接参与辅酶 M 的甲基化过程^[19]。整个反应由 2 个可逆的半反应组成。前半反应是由 MtaB 裂解甲醇,并将甲基转移至 MtaC;在后半反应中, MtaA 催化 CH_3 -MtaC 进行脱甲基化,并转移甲基到 HS-CoM 上形成 CH_3 -CoM (图 2)^[20-23],其中 MtaA

和 MtaB 都是依赖 Zn^{2+} 的酶^[21-22]。在 *Ca. Syntrophoarchaeum* 基因组中,也发现了编码 MtaA 和 MtaC 同系物的基因^[15,18],其中 *mtaA* 基因编码的蛋白很可能催化丁基辅酶 M 中丁基的转移(推测的丁基转移反应见公式 1)。然而目前尚无证据表明 MtaA 具有丁基转移能力。因此,本文采用分子动力学模拟的方法,参照 *M. mazei* 中 MtaA 的晶体结构^[23],分析了 *Ca. Syntrophoarchaeum* 中 *mtaA* 基因编码的蛋白分别结合 CH_3 -CoM 和 C_4H_9 -CoM 时的结构,以期验证丁烷氧化古菌中 *mtaA* 基因编码的蛋白更倾向于与 C_4H_9 -CoM 反应,而并非转移甲基,

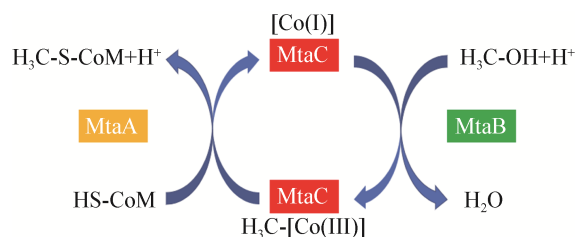
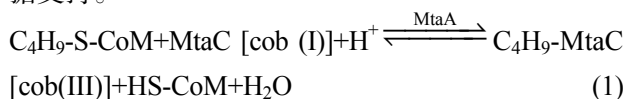


图2 *Methanosarcina* 中 MtaABC 复合物的催化反应过程示意图^[20-23]

Figure 2 Schematic representation of the reactions catalyzed by the MtaABC complex of *Methanosarcina*^[20-23]

为 *Ca. Syntrophoarchaeum* 代谢过程中丁基 CoM 由 MtaA 同系物催化这一观点提供分子动力学模拟证据支持。



1 材料与方法

1.1 蛋白质结构建模

Ca. Syntrophoarchaeum 中 2 个 *mtaA* 基因编码的蛋白分别命名为 MtaA_1 (GenBank ID 为 OFV65993.1, 包含 355 个氨基酸) 和 MtaA_2 (GenBank ID 为 OFV65678.1, 包含 358 个氨基酸)^[15]。使用 Swiss-Model 对 2 个蛋白进行同源建模, 模板参照 *M. mazei* 中 SeMet-MtaA 的晶体结构(PDB ID: 4ay8, 以下称为 4ay8), 含有 340 个氨基酸, 结合的底物为 HS-CoM^[23]。MtaA_1 和 MtaA_2 与 4ay8 的氨基酸序列相似性分别为 35% 和 39%。辅酶 M 的结构来自 4ay8 的晶体结构, 通过 SYBYL-X 软件生成 CH₃-CoM 和 C₄H₉-CoM 小分子配体, 随后对小分子进行初始结构优化。使用 Schrodinger Suite 中的 Maestro 软件同源建模^[24], 得到的 2 个 MtaA 结构和 1 个对照结构 4ay8。MtaA_1 和 MtaA_2 分别与 CH₃-CoM 和 C₄H₉-CoM 小分子配体结构进行分子对接, 将其对接至活性位点, 得到复合物体系结构。

1.2 分子动力学模拟

使用 AMBER18 对上述复合物体系分别进行

200 ns 的分子动力学模拟。首先使用 AMBER18 中的 LEaP 模块生成分子动力学模拟所需要的初始拓扑文件: 添加适量的 Na⁺ 和 Cl⁻ 使体系维持电中性, 将体系浸泡在截断的正八面体 TIP3P 水模型的盒子中, 盒子厚度设置为 10 Å。然后模拟使用 Particle Mesh Ewald (PME) 方法来约束长程的静电相互作用, 使用 SHAKE 算法约束体系中的氢原子。再使用最陡下降法和共轭梯度下降法对体系进行优化; 在 NVT 系综(恒温恒压)中对体系进行加热, 至温度 298.15 K; 在 NPT 系综(恒温恒容)中对体系进行平衡。加热和平衡时采用 AMBER 默认的 Langevin 恒温设置^[25]。最后的分子动力学模拟过程用 Berendsen 恒温设置进行^[26], 时间步长为 2 fs。

2 结果与分析

2.1 蛋白整体结构

当 MtaA_1 和 MtaA_2 分别结合 C₄H₉-CoM 时, 表现出与 4ay8 晶体结构^[23] 类似的 TIM-barrel 折叠三维结构(图 3)。除此以外, 在 MtaA_1 和 MtaA_2 的 N-末端, 都包含由 3 个 α 螺旋组成的结构基序, 这与 4ay8 晶体结构一致, 但是都缺乏了 2 个反向平行的 β 折叠片结构。MtaA_1 和 MtaA_2 整体结构也略有不同, MtaA_1 结构更为松散, 而 MtaA_2 的 TIM-Barrel 折叠更为紧实。4ay8 晶体结构显示, 其活性中心位于 C 末端的浅漏斗底部, 漏斗狭窄有利于 HS-CoM 的绑定^[23]。MtaA_1 和 MtaA_2 的活性中心也靠近 C 末端, 但都没有形成漏斗结构。相比而言, MtaA_2 的活性中心孔穴形状比 MtaA_1 更深更窄, 更利于结合底物发生反应。三者活性中心形状的差异暗示各自的生理底物不同, MtaA_1 和 MtaA_2 结合的 C₄H₉-CoM 要比 4ay8 结合的 HS-CoM 多一个丁基片段, 反应时需要更大空间。将两者分别于 4ay8 晶体结构叠合(图 4), 发现 MtaA_2 三维结构与 4ay8 相似性更高, 这与 MtaA_2 的氨基酸序列相似性和 4ay8 更高(39%) 而 MtaA_1 的相似性略低(35%) 的结果相一致。然而, 当 MtaA_1 和 MtaA_2 分别结合 CH₃-CoM 时, 发现模

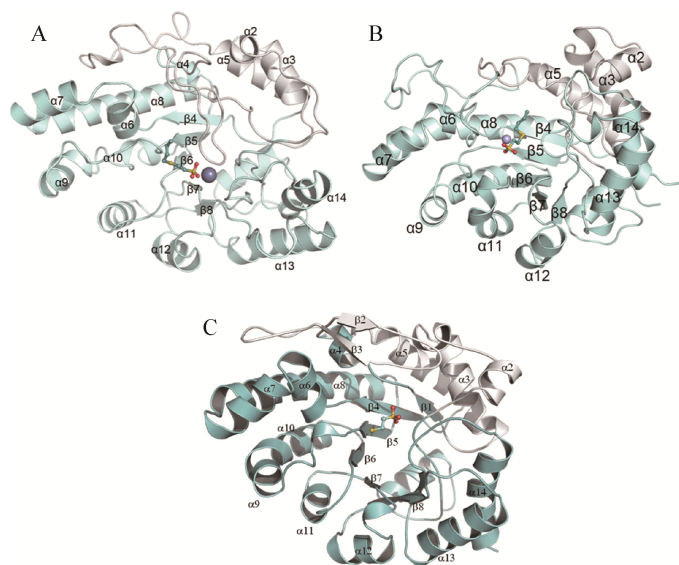


图3 MtaA_1 与 MtaA_2 分别结合 C_4H_9 -CoM (A、B) 和 4ay8 结合 HS-CoM (C)^[23] 的结构示意图

Figure 3 Ribbon representation of MtaA_1 and MtaA_2 from *Ca. Syntrophoarchaeum* with bound C_4H_9 -CoM (A, B) and ribbon representation of 4ay8 from *M. mazei* with bound HS-CoM (C)^[23]

注: TIM-Barrel 结构域以浅蓝色显示, 其他 N 端二级结构以白色显示。锌离子表示为紫色球状。 C_4H_9 -CoM 和 HS-CoM 用球棍模型表示; C 原子为浅蓝色, O 原子为红色, S 原子为黄色。二级结构注释与 4ay8 结构注释一致

Note: TIM-barrel-like fold is shown in light blue and the additional N-terminal secondary-structure elements are shown in white. Zinc ions are the purple balls. C_4H_9 -CoM and HS-CoM are shown in ball-and-stick representation; C atoms are colored light blue, O atoms red and S atoms yellow. The numbering of the secondary-structure elements is consistent with that of the structural alignment with 4ay8

拟结果与实际不符合, 出现底物与活性中心 Zn^{2+} 距离过远的情况。这暗示了 MtaA_1 和 MtaA_2 或许并不催化 CH_3 -CoM 中甲基的转移, 而是特异性地转移丁基。

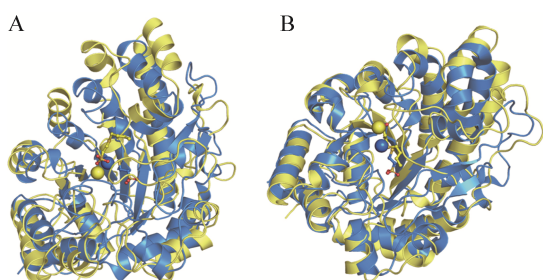


图4 MtaA_1 (A)和 MtaA_2 (B)分别与 4ay8 结构^[23]的叠合比较

Figure 4 Superposition of MtaA_1 (yellow, A) and MtaA_2 (yellow, B) with 4ay8 (blue)^[23]

注: C_4H_9 -CoM 和 HS-CoM 都用球棍模型表示, 锌离子用球形表示

Note: C_4H_9 -CoM and HS-CoM are shown in ball-and-stick representation. Zinc ions are shown in ball representation

2.2 活性中心 Zn^{2+} 与底物距离

与 4ay8 一样, MtaA_1 和 MtaA_2 的活性中心都包含一个 Zn^{2+} , 但是在结合底物时小分子配体的方向不同。MtaA_1 和 MtaA_2 分别结合 C_4H_9 -CoM 时, 都是辅酶 M 部分指向 Zn^{2+} ; 而在 4ay8 中, HS-CoM 水平位于 TIM-Barrel 的顶部, 并暴露于蛋白质表面, 其中硫醇基(-HS)指向 Zn^{2+} (图 3C, 图 5)^[23]。这可能与不同底物大小或 Zn^{2+} 位置变化有关。另外, Zn^{2+} 与底物距离也有差别。在分子模拟过程中, MtaA_1 和 MtaA_2 的 Zn^{2+} 与 C_4H_9 -CoM 的距离均稳定在 2.5–3.5 Å 之间(图 6), 很有利于底物的结合和反应。并且, 当 MtaA_1 和 MtaA_2 添加 CH_3 -CoM 为底物时, 该距离在 10–40 Å 之间剧烈波动, 底物基本没有结合到活性位点的可能, 进一步表明了 MtaA_1 和 MtaA_2 催化丁基转移而非甲基。然而在 4ay8 结合 HS-CoM 时, 所有 S 原子和 Zn^{2+} 的距离都是 2.4 Å, N 原子距离 Zn^{2+} 均

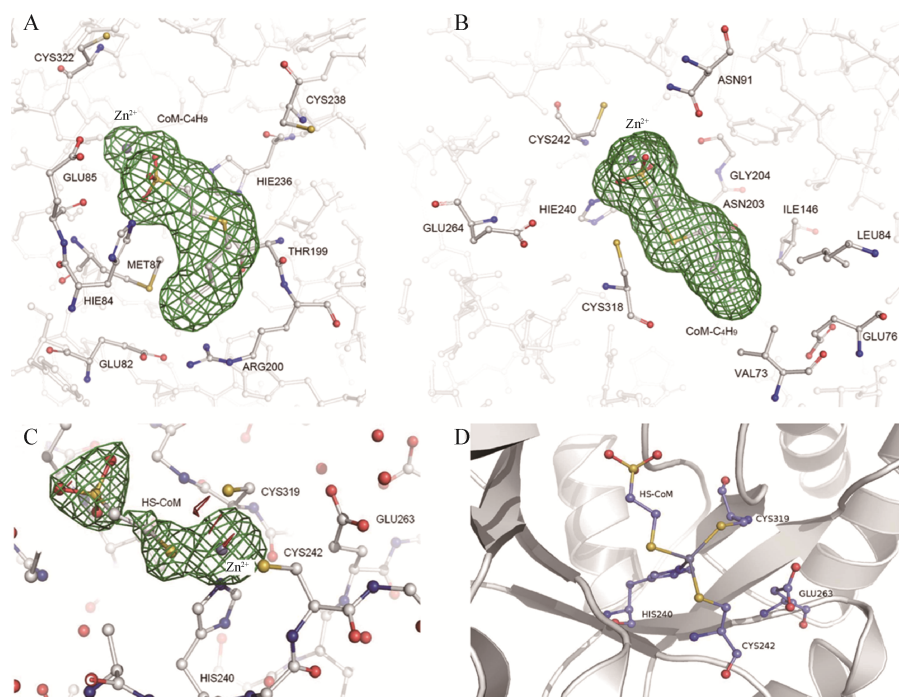


图 5 MtaA_1 (A)、MtaA_2 (B)和 4ay8 (C)^[23]活性位点代表性氨基酸残基的电子密度图及与 HS-CoM 结合时 4ay8 活性位点的 Zn²⁺ 配位图(D)^[23]

Figure 5 Representative electron-density map detail around the active-site residues of substrate-bound MtaA_1 (A), MtaA_2 (B), 4ay8 (C)^[23] and Zn²⁺ coordination in the active site of substrate-bound 4ay8 (D)^[23]

注：绿色代表正差异密度，红色代表负差异密度。C₄H₉-CoM 和 HS-CoM 在球棒模型中显示。C 原子为白色，N 原子为蓝色，O 原子为红色，S 原子为黄色。锌离子是灰色的球。蛋白质主链显示为带状。配位侧链残基以球棒模型表示

Note: Green represents positive difference density and red represents negative difference density. C₄H₉-CoM and HS-CoM are shown in ball-and-stick model. C atoms are colored white, N atoms blue, O atoms red and S atoms yellow. Zinc ions are the grey balls. The protein main chains are shown as ribbons. The coordinating side-chain residues are shown in ball-and-stick representation.

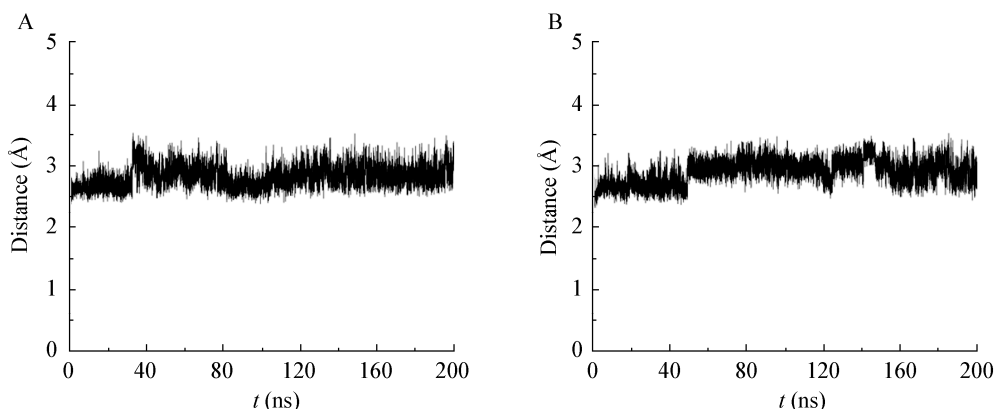


图 6 在 200 ns 的分子模拟过程中，MtaA_1 (A)和 MtaA_2 (B)的 Zn²⁺与 C₄H₉-CoM 的距离变化

Figure 6 The change of distance between Zn²⁺ and C₄H₉-CoM of MtaA_1 (A) and MtaA_2 (B) during 200 ns

是 2.1 Å^[23]。活性中心 Zn²⁺与底物之间距离与 4ay8 的差别，也许是导致 *Ca. Syntrophoarchaeum* 中 *mtaA* 基因编码蛋白特异性结合 C₄H₉-CoM 的原因之一。

2.3 活性位点附近关键氨基酸

M. mazei 的 4ay8 晶体结构显示，活性中心 Zn²⁺ 通过 His240、Cys242 和 Cys319 以四面体配位，在

无底物时, 第 4 个配体是 Glu263 (图 5C、5D)^[23]。HS-CoM 的结合导致 Glu263 的 O 配体交换成 S 配体, 锌的几何构型发生了颠倒^[23]。MtaA_2 的模拟结构显示出相似的结果, 添加 C₄H₉-CoM 时, 活性中心 Zn²⁺ 由 Hie240、Cys242 和 Cys318 配位(图 5B), 其中 Hie 是 His 中的 ϵ 位置 N 原子质子化的状态。MtaA_2 中底物与氨基酸位置与 4ay8 基本一致, 但未形成四面体, 这可能与底物不同有关。并且 MtaA_2 中也存在 Glu264, 推测在无底物时起关键性作用。然而在 MtaA_1 中, 活性中心 Zn²⁺ 由 Hie236、Cys238 和 Cys322 配位, 与 4ay8 相比偏离 4 个氨基酸位置, 并且无 4ay8 中 Glu264 对应的氨基酸, 可能是其他氨基酸代替其行使功能。另外, *M. mazei* 中锌结合基序为 His-X-Cys-X₂₀-Glu-X₅₅-Cys, 符合 His-X-Cys-X_n-Glu-X_m-Cys, 这种基序同样存在于 *M. barkeri*、*M. acetovorans* 和 *Moorella thermoacetica* 的 MtaA 中^[23,27]。对应的 MtaA_1 和 MtaA_2 锌结合基序分别为 Hie-X-Cys-X₈₃-Cys 和 Hie-X-Cys-X₂₁-Glu-X₅₃-Cys。其中 MtaA_2 基序与目前研究的大多数 MtaA 相符, 这暗示了 MtaA_2 更可能有活性, 行使丁基转移酶的功能。4ay8 和 MtaA_2 对底物的特异性, 可能是由 His 与 Hie 质子化状态不同或活性位点附近氨基酸的配位方式不同导致的, 具体原因还需进一步探索。

3 讨论与结论

本研究中分子动力学模拟结果表明, *Ca. Syntrophoarchaeum* 中的 *mtaA* 基因编码的蛋白 MtaA_1 和 MtaA_2 很可能是特异性的丁基转移酶, 并非催化甲基的转移, 其中 MtaA_2 与 4ay8 结构更加相似, 具备催化活性的可能性更高。此外, 模拟结果显示, 丁烷氧化古菌和产甲烷古菌中 MtaA 的催化特性存在显著差异, 这很可能是由活性中心形状、Zn²⁺ 与底物距离以及活性位点附近氨基酸配位方式不同导致的。该结果首次为丁烷厌氧氧化过程中 C₄H₉-CoM 由 MtaA 同系物催化这一观点提供了分子动力学模拟证据支持, 对完善微生物多碳烷烃

厌氧代谢途径具有重要意义。

根据 Laso-Pérez 等^[15]的结果, *Ca. Syntrophoarchaeum* 中也包含了 2 个编码 MtaC 同系物的基因^[15], 可能和 MtaA 同系物组成了完整的半反应来催化烷基的转移(公式 1)。该反应的终产物是烷基化的 MtaC 和 HS-CoM, 未直接形成丁酰辅酶 A, 这说明需要有其他酶介导进一步氧化。经过基因组学和酶学分析, 发现 *Ca. Syntrophoarchaeum* 中存在的基因能编码 2 个完整的乙酰辅酶 A 脱羧酶/合酶: CO 脱氢酶 (Acetyl-CoA Decarboxylase/Synthase: CO Dehydrogenase, ACDS/CODH)^[15]。该酶在 Wood-Ljungdahl (WL)途径中行使重要功能, 催化乙酰辅酶 A 氧化成 CO₂, 实现 CO₂ 的固定过程, 并且反应是可逆的。因此, 我们猜测, 在丁烷氧化过程中, 其中一个 ACDS/CODH (*cdhA-E*)负责将 β -氧化生成的乙酰辅酶 A 氧化成 CO₂, 另一个合酶则很有可能在上述丁酰辅酶 A 的生成过程中发挥关键作用。

因为 *Ca. Syntrophoarchaeum* 是严格厌氧微生物, 富集培养困难, 为了进一步确定 *mtaA* 基因编码蛋白的功能和活性, 后续研究可以进行体外异源表达, 并在厌氧条件下解析酶反应机制。目前已有研究证实, 厌氧产甲烷古菌 *M. barkeri* 中的 MtaA 可以在 *Escherichia coli* 中有氧表达, 并且纯化出具备甲基转移活性的酶, 说明该古菌中的 MtaA 在有氧条件下也相对稳定^[28]。因此, *Ca. Syntrophoarchaeum* 中 *mtaA* 基因编码蛋白也可以尝试类似方法进行表达、纯化和酶活性分析, 并解析晶体结构, 为其催化丁基转移提供更多证据支持, 继续完善丁烷氧化通路。

REFERENCES

- [1] Claypool GE, Kvenvolden KA. Methane and other hydrocarbon gases in marine sediment[J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 1983, 11(1): 299-327
- [2] Hunt JM. Origin of gasoline range alkanes in the deep sea[J]. Nature, 1975, 254(5499): 411-413
- [3] Leifer I, Boles JR, Luyendyk BP, Clark JF. Transient discharges from marine hydrocarbon seeps: spatial and

- temporal variability[J]. *Environmental Geology*, 2004, 46(8): 1038-1052
- [4] Boetius A, Wenzhöfer F. Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps[J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6(9): 725-734
- [5] Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gieseke A, Amann R, Jørgensen BB, Witte U, Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane[J]. *Nature*, 2000, 407(6804): 623-626
- [6] Scheller S, Goenrich M, Boecher R, Thauer RK, Jaun B. The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane[J]. *Nature*, 2010, 465(7298): 606-608
- [7] Hallam SJ, Putnam N, Preston CM, Detter JC, Rokhsar D, Richardson PM, DeLong EF. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics[J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1457-1462
- [8] Timmers PHA, Welte CU, Koehorst JJ, Plugge CM, Jetten MSM, Stams AJM. Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea[J]. *Archaea*, 2017, 2017: 1654237
- [9] Meyerdierks A, Kube M, Kostadinov I, Teeling H, Glöckner FO, Reinhardt R, Amann R. Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(2): 422-439
- [10] McGlynn SE, Chadwick GL, Kempes CP, Orphan VJ. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 531-535
- [11] Tissot B, Welte D. *Petroleum Formation and Occurrence*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1978
- [12] Kniemeyer O, Musat F, Sievert SM, Knittel K, Wilkes H, Blumenberg M, Michaelis W, Classen A, Bolm C, Joye SB, et al. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria[J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 898-901
- [13] Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63(1): 311-334
- [14] Rabus R, Wilkes H, Behrends A, Armstroff A, Fischer T, Pierik AJ, Widdel F. Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl) succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(5): 1707-1715
- [15] Laso-Pérez R, Wegener G, Knittel K, Widdel F, Harding KJ, Krukenberg V, Meier DV, Richter M, Tegetmeyer HE, Riedel D, et al. Thermophilic archaea activate butane via alkyl-coenzyme M formation[J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 396-401
- [16] Laso-Pérez R, Hahn C, Van Vliet DM, Tegetmeyer HE, Schubotz F, Smit NT, Pape T, Sahling H, Bohrmann G, Boetius A, et al. Anaerobic degradation of non-methane alkanes by “*Candidatus Methanoliparia*” in hydrocarbon seeps of the gulf of Mexico[J]. *mBio*, 2019, 10(4): e01814-19
- [17] Hahn CJ, Laso-Pérez R, Vulcano F, Vaziourakis KM, Stokke R, Steen IH, Teske A, Boetius A, Liebeke M, Amann R, et al. “*Candidatus Ethanoperedens*”, a thermophilic genus of archaea mediating the anaerobic oxidation of ethane[J]. *mBio*, 2020, 11(2): e00600-20
- [18] Wang YZ, Feng XY, Natarajan VP, Xiao X, Wang FP. Diverse anaerobic methane- and multi-carbon alkane-metabolizing archaea coexist and show activity in Guaymas Basin hydrothermal sediment[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(4): 1344-1355
- [19] Keltjens JT, Vogels GD. Conversion of Methanol and Methylamines to Methane and Carbon Dioxide[A]// *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*[M]. Boston, MA: Springer, 1993: 253-303
- [20] Sauer K, Thauer RK. Methyl-coenzyme M formation in methanogenic archaea. Involvement of zinc in coenzyme M activation[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(9): 2498-2504
- [21] Sauer K, Thauer RK. Methanol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Zinc dependence and thermodynamics of the methanol: cob(I)alamin methyltransferase reaction[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 249(1): 280-285
- [22] Sauer K, Harms U, Thauer RK. Methanol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 243(3): 670-677
- [23] Hoepfner A, Thomas F, Rueppel A, Hensel R, Blankenfeldt W, Bayer P, Faust A. Structure of the corrinoid: coenzyme M methyltransferase MtaA from *Methanosarcina mazei*[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2012, 68(Pt 11): 1549-1557
- [24] Schrödinger LLC. Schrödinger Release 2021-1: Maestro[CP]. New York, NY, 2021
- [25] Loncharich RJ, Brooks BR, Pastor RW. Langevin dynamics of peptides: the frictional dependence of isomerization rates of N-acetylalanine-N'-methylamide[J]. *Biopolymers*, 1992, 32(5): 523-535
- [26] Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1984, 81(8): 3684-3690
- [27] Das A, Fu ZQ, Tempel W, Liu ZJ, Chang J, Chen LR, Lee D, Zhou WH, Xu H, Shaw N, et al. Characterization of a corrinoid protein involved in the C1 metabolism of strict anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*[J]. *Proteins*, 2007, 67(1): 167-176
- [28] Harms U, Thauer RK. 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]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235(3): 653-659