



氢营养型产甲烷代谢途径研究进展

冷欢, 杨清, 黄钢锋, 白丽萍*

农业农村部沼气科学研究所, 四川 成都 610041

摘要: 产甲烷古菌是一类极端厌氧的古菌域微生物, 可以利用 CO_2 、甲醇、乙酸等简单化合物产甲烷并获得能量。目前能够培养的氢营养型(CO_2/H_2)产甲烷古菌的种类较多, 而且在三类产甲烷代谢类型中, 氢营养型产甲烷途径的产能效率最高, 并具有多种模式的特殊能量利用系统。近年来, 随着质谱、光谱和晶体技术的发展与运用, 人们对产甲烷代谢途径的研究进一步深入, 尤其是对氢营养型产甲烷途径的生化机制有了新的认识, 揭示了产甲烷古菌在能量极限条件下独特、高效的能量利用模式。本文从能量储存、代谢途径、蛋白功能与催化机制等方面概述产甲烷古菌利用 CO_2/H_2 产甲烷的详细过程, 并对产甲烷古菌代谢途径的研究方向与技术发展进行展望。

关键词: 产甲烷古菌, CO_2 还原途径, 能量保存, 蛋白结构, 催化机制

产甲烷古菌是生命进化史上最古老的单细胞生命体^[1], 在生命起源、物种进化等研究领域起着至关重要的作用^[2]。产甲烷古菌广泛存在于各种生境中, 包括深海、湿地、地热温泉、动物瘤胃等, 作为降解末端碳链的微生物参与地球化学元素循环^[3–4]。产甲烷古菌利用简单化合物产甲烷, 这一独特的生理现象使之成为生物能源、全球变暖等关键领域的研究对象^[5]。因此, 长期以来产甲烷古菌引起了科学界广泛的关注。国内外无数科研学者致力于产甲烷古菌在

系统进化、代谢途径、遗传体系构建等方面的研究。如德国 Thauer、Gottschalk、美国 Wolfe 等团队多年来对 CO_2 还原代谢途径进行了大量的研究工作^[6–8]; 美国 Kyzycki 一直致力于甲基裂解途径关键酶蛋白的功能研究^[9]; 美国 Whiteman、Leigh 等实验室建立了产甲烷古菌的遗传操作体系^[10–11]; 在国内学术界中, 产甲烷古菌的研究主要集中在基于宏基因组分析的系统发育、生态分布、分离培养等方面, 而产甲烷代谢途径的研究相对较少。

基金项目: 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(Y2019XK23-02); 成都农业科技中心地方财政专项资金(NASC2019TI01)

*通信作者。Tel: +86-28-85228239; E-mail: bailiping@caas.cn

收稿日期: 2019-12-07; 修回日期: 2020-04-03; 网络出版日期: 2020-06-15

1 产甲烷古菌的分类与生理特征

迄今为止,已发现的产甲烷古菌共有 7 个目,包括 *Methanomicrobiales*、*Methanobacteriales*、*Methanococcales*、*Methanocellales*、*Methanopyrales*、*Methanosarcinales* 以及近年发现的 *Methanomassiliicoccales*, 均属于广古菌门 *Euryarchaeota*^[3,12]。最近发现一些深古菌门 *Ca. Bathyarchaeota* 及 *Ca. Verstraetearchaeota* 的古菌类群也具有产甲烷的能力^[13]。产甲烷古菌的系统分类、形态特征、底物利用范围等在前人的综述中已有详尽的阐述,本文不再系统分析^[12,14-15]。

根据代谢底物类型将产甲烷古菌可分为三类:乙酸营养型、甲基营养型以及以 CO_2/H_2 为底物的氢营养型^[2]。除了部分专性乙酸营养型与甲基营养型产甲烷古菌外,在目前已培养的模式菌株中,有 3/4 以上的产甲烷古菌属于利用 CO_2 产甲烷的氢营养型^[12]。相较于其他两类产甲烷途径,氢营养型产甲烷途径有更高的能量获取效率。在标准热力学状态下,1 mol CO_2 还原产甲烷释放出 131 kJ 的能量,高于甲醇产甲烷(-106 kJ)与乙酸产甲烷(-36 kJ)释放的能量^[2,16]。 CO_2 还原产甲烷代谢途径的复杂性、中间反应的多样性、能量储存模式的特殊性,使得氢营养型产甲烷古菌成为广泛研究的模式物种。

2 氢营养型产甲烷古菌及其生长特性

如上所述,大部分产甲烷古菌都能利用 CO_2/H_2 进行产甲烷生长。根据细胞膜结构的不同,将其分为两类:一类是细胞膜上含有细胞色素(Cytochrome)和甲烷吩嗪(Methanophenazine)的

Methanosarcinales^[16-17]。它们利用 CO_2/H_2 产甲烷过程的氢分压一般高于 10 Pa,代时一般大于 10 h,基本是中温菌;另一类氢营养型产甲烷古菌细胞膜上不含细胞色素和 MP,只能以 CO_2/H_2 或甲酸为底物产甲烷,其代时最短可低至 1 h,可以忍耐环境中较低的氢分压^[17]。

研究发现,有细胞色素的氢营养型产甲烷古菌在生长过程中表现出较高的 ATP 得率(得率约 1.5,无细胞色素的类群得率约为 0.5)^[17-20]。当我们把 CO_2 还原与 ATP 合成相偶联($4\text{H}_2+\text{CO}_2+n\text{ADP}+n\text{Pi}=\text{CH}_4+n\text{ATP}+3\text{H}_2\text{O}$)时发现,若反应达到平衡,ATP 得率 n 为 0.5 时,可推算出氢分压为 2 Pa,而 n 为 1 时,氢分压增至 30 Pa^[17,21]。这一计算结果恰好解释了含细胞色素的产甲烷古菌具有较高的 ATP 得率和氢分压,也解释了为什么 *Methanosarcina* 在低氢分压环境下没有利用 CO_2/H_2 产甲烷的能力。产甲烷古菌在极低的 ATP 得率下,如何维持细胞的正常生命活动,能量代谢正常运转时接近热力学平衡的极限是什么,这些问题使产甲烷代谢途径的研究引起科学界的长期关注。

3 氢营养型产甲烷古菌能量代谢特征

产甲烷代谢是产甲烷古菌获取能量的唯一方式,其独特的能量保存方式清晰地体现在产甲烷代谢途径的各类酶反应中。其中大部分酶反应都是氧化还原、基团转移等,催化每一步反应的酶均是分子量庞大的复合体,并涉及到一系列含不同金属的辅因子^[7,22](详见第 5 部分)。产甲烷古菌巧妙地利用并保存反应过程中形成的 ATP、膜内

外离子梯度、还原力，并偶联于耗能反应，弥补 ATP 得率低的缺陷。

在产甲烷途径中，唯一能直接偶联 ATP 合成的反应只有 Mtr 催化的甲基转移反应。该复合体酶在催化过程中向膜外转移 2 个 Na^+ 并形成膜内外离子梯度，通过离子泵偶联膜上的 ATP 酶将离子梯度转化合成 ATP^[23–26] (详见 5.7)。此外，产甲烷古菌还利用膜蛋白催化过程偶联质子转运，形成膜内外质子梯度，这一电化学形式的能量既可用于 ATP 合成，也可用于推动耗能反应的发生。如催化甲烷生成的 Hdr/Vht 酶系向膜外转运 2 个 H^+ ，这一电化学梯度的能量用于 Ech 酶系合成还原力 $\text{Fd}_{\text{red}}^{2-}$ (+16 kJ/mol)^[16,27]，详见 5.10 部分。在不含细胞色素的产甲烷古菌中，催化甲烷生成的 Hdr/Mvh 复合体位于胞质中，不能建立膜内外离子梯度^[28]。因此，Hdr/Mvh 采用特殊的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)通过电子歧化方式合成还原的 $\text{Fd}_{\text{red}}^{2-}$ ，用于 CO_2 还原及其他代谢活动^[29–30]，详见 5.9 部分。

4 氢营养型甲烷途径概述

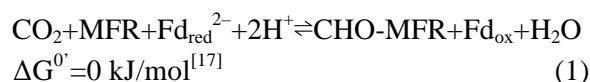
有无细胞色素的产甲烷古菌的 CO_2 还原产甲烷代谢途径相似，只有部分酶促反应不同。 CO_2 还原产甲烷途径以 H_2 为电子供体， CO_2 通过一碳载体 Methanofuran (MFR)、Tetrahydromethanopterin (H_4MPT)、Coenzyme M (CoM) 的传递并被逐级还原，最终形成甲烷，如图 1 所示。每还原 1 分子 CO_2 ，需要消耗 4 分子 H_2 ，分别用于还原 Fd_{ox} 、 F_{420} 以及 CoM-S-S-CoB ^[2,7,22,27]。产甲烷代谢途径涉及众多的酶促反应、一碳载体、金属辅酶。催化过程的酶主要包括脱氢酶、还原酶、转移酶。辅酶主要包括[Fe-S]簇、FAD、 F_{420} 、

F_{430} 、Tungstenpterin、Cobalamin、Cytochrome 等。到目前为止，产甲烷途径的主要酶促反应已经基本明确，但部分酶蛋白的三维结构、催化机制等关键问题还需进一步的探索。 CO_2 还原途径中各步酶促反应的详细过程在第 5 部分详细阐述。

5 CO_2 还原途径酶促反应

5.1 Formylmethanofuran-脱氢酶 (Fmd/Fwd)

CO_2 还原途径起始于 CO_2 的固定，催化该反应的酶复合体是甲酰基呋喃脱氢酶(Fmd 或 Fwd)^[32–33]，反应过程如公式(1)所示。



在产甲烷古菌中有两类脱氢酶，根据催化中心金属离子的不同，分为 Mo-脱氢酶(Fmd)和 W-脱氢酶(Fwd)^[32,34]。部分产甲烷古菌仅含有 Mo-脱氢酶，如 *Methanopyrus kandleri*^[35]，也有一些产甲烷古菌能同时表达两种含不同金属的脱氢酶，如 *Methenobacterium thermoautotrophicum*、*Methanothermobacter wolfei* 等^[33,36]。组学分析表明 Mo-脱氢酶是金属离子诱导型表达蛋白，而 W-脱氢酶则不受金属离子的影响，且 Mo-脱氢酶的诱导表达不受 W-脱氢酶的影响^[35,37]。

Wagner 等解析了 *M. wolfei* 的 Fwd 蛋白结构，结果显示 Fwd 是由 6 个亚基组成的同源四聚体 $\text{Fwd}(\text{ABCD})_4$ 。四聚体结构中不仅有金属离子 W、Zn、Fe 等，还首次发现了多达 46 个 [4Fe-4S]簇形成的长链电子传递体系(图 2-A)。数量众多的链式[Fe-S]簇不仅保证了 CO_2 还原所需的低电势，也极有可能是古菌动态储存还原力的一种方式^[38]。

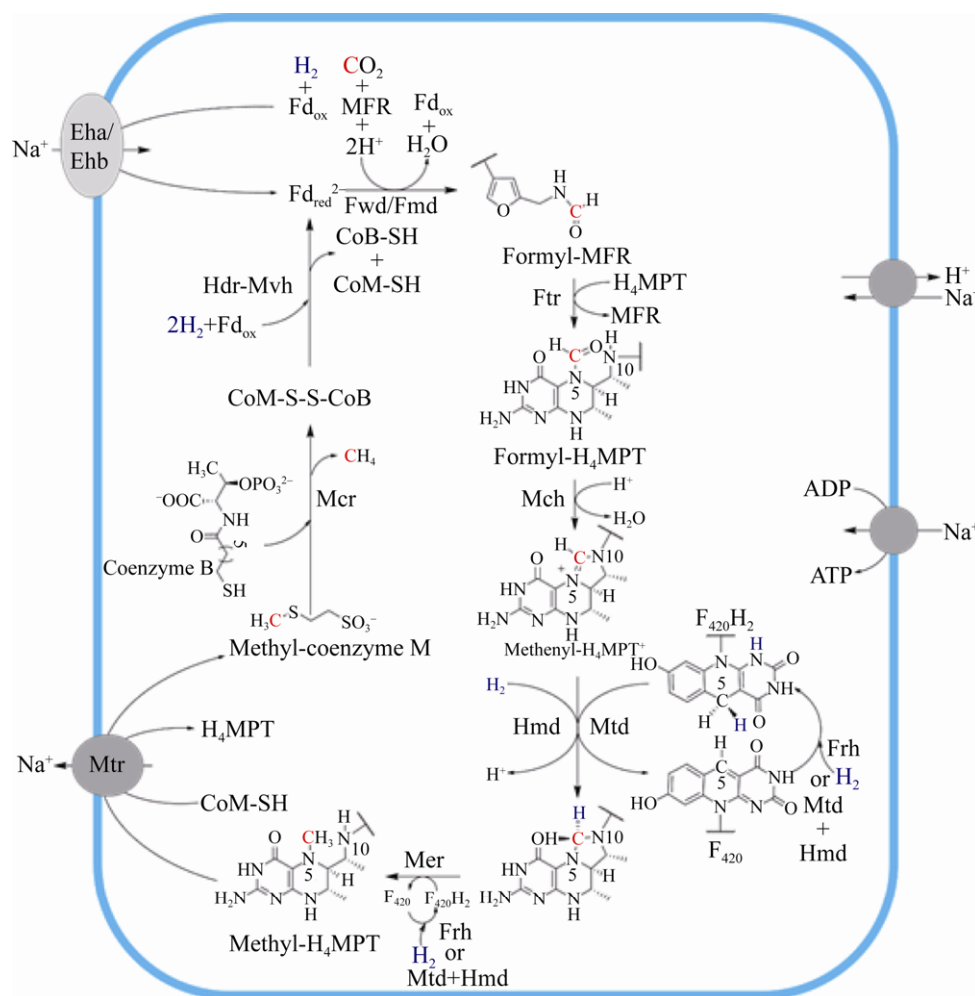
图 1. 氢营养型产甲烷途径示意图^[27,31]

Figure 1. Hydrogenotrophic methanogenesis^[27,31]. MFR: methanofuran; H₄MPT: tetrahydromethanopterin; CHO-MFR: formyl-MFR; CHO-H₄MPT: formyl-H₄MPT; CH≡H₄MPT⁺: methenyl-H₄MPT⁺; CH₂=H₄MPT: methylene-H₄MPT; CH₃-H₄MPT: methyl-H₄MPT; CoB-SH: coenzyme B; CoM-SH: coenzyme M; CoM-S-S-CoB: heterodisulfide; Fd_{red}²⁻: reduced ferredoxin; Fd_{ox}: oxidized ferredoxin; F₄₂₀: oxidized coenzyme F₄₂₀; F₄₂₀H₂: reduced coenzyme F₄₂₀; Fwd: tungsten-dependent formylmethanofuran dehydrogenase; Fmd: molybdenum-dependent formylmethanofuran dehydrogenase; Ftr: formyltransferase; Mch: methenyl-H₄MPT⁺ cyclohydrolase; Frh: F₄₂₀-reducing [NiFe]-hydrogenase; Mtd: F₄₂₀-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase; Hmd: [Fe]-hydrogenase; Mer: F₄₂₀-dependent methylene-H₄MPT reductase; Mcr: methyl-coenzyme M reductase; Hdr-Mvh: heterodisulfide-reductase/[NiFe]-hydrogenase complex; Eha/Ehb: energy-converting [NiFe]-hydrogenases; Mtr: membrane-associated methyltransferase complex (MtrA-H).

Fwd 的复合体结构由甲酸脱氢酶和金属水解酶两个催化核心组成^[38]。其中, FwdB 和 FwdD 共同组成甲酸脱氢酶的催化单位。FwdBD 活性中心的 W 共价结合到嘌呤核苷酸的 4 个巯基端、

Cys118 及元素硫原子上, 形成 W-嘌呤(tungstopterin)催化中心。FwdA 的功能类似于金属水解酶, 这类酶的显著特点是在由(α/β)₈ 构成的一个 TIM 结构域入口处包含 1 个双锌的金属

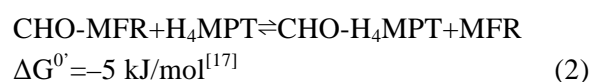
活性中心。FwdC 在结构上与谷氨酸合成酶的 C-末端相似,在整个复合体中起稳定结构的支撑功能。FwdF 包含 4 个相似的 Fd 结合域,每一部分均携带 2 个[4Fe-4S]簇,以 T 字形分布。整个[4Fe-4S]簇、金属结合点、活性中心残基、金属原子结合模式都非常保守地分布在 FwdBD 与 FwdA 上。

FwdABCD 复合体从催化功能上可以分为 1 个电子供应中心 FwdFG 和 1 个催化中心 FwdABCD。首先,CO₂通过一个狭长的疏水性气体通道(40 Å)到达 FwdBD 的 W 中心。深埋在蛋白内部的金属 W 中心与[4Fe-4S]簇相连,有效地转移 CO₂还原所需的电子。在 W 中心,CO₂被还原成甲酸(E⁰=−430 mV),还原反应所需的电子来自 Fd_{red}^{2−} (E⁰=−500 mV)。还原生成的甲酸通过 FwdBD 与 FwdA 之间的一个亲水通道(43 Å)转移到 FwdA 的双锌[ZnZn]中心,甲酸共价结合到甲烷呋喃 MFR 的氨基,最终生成 CHO-MFR (图 2-B)。该

甲酸通道将 CO₂还原的放能反应(ΔG⁰=−15 kJ/mol)与 HCHO 转移的耗能反应(ΔG⁰=+15 kJ/mol)偶联^[39],这也体现了产甲烷古菌巧妙利用局部能量推动复杂反应的特点。

5.2 甲酰基转移酶 Ftr

产甲烷途径的第二步反应,是在甲酰基转移酶 Ftr 的作用下将 CHO-MFR 的甲酰基转移到一碳载体 H₄MPT,形成 N⁵-CHO-H₄MPT^[40]。反应过程如公式(2)所示。



M. kandleri、*M. barkeri* 等产甲烷古菌的 Ftr 蛋白结构已相继被解析^[41–42]。研究发现, Ftr 在低盐浓度条件下以非活性状态的单聚体存在,而在高盐时以二聚体或四聚体的活性状态存在^[43–44]。高盐条件下 Ftr 的稳定性主要因为蛋白表面大量酸性氨基酸聚集分布,避免了蛋白因盐析而聚集沉淀^[42,45–46]。

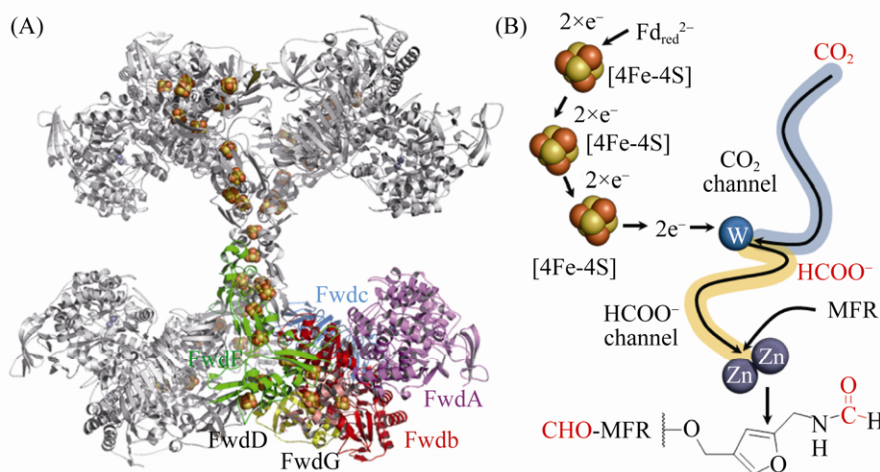


图 2. Fwd 四聚体结构及催化机制示意图

Figure 2. Structure of Fwd tetrameric complex and the proposed catalytic mechanism. A: Crystal structure of the tetramer Fwd(ABCD)₄ (PDB: 5T61^[28]). The subunits and iron-sulfur cluster are shown with stick and cartoon model, respectively. B: Catalytic mechanism of Fwd. Tungsten accepts two electrons which delivered by [4Fe-4S] cluster, resulting W(IV). Then CO₂ is reduced into formate with the two electrons from Fd_{red}^{2−} at the tungsten center. The formate is transferred into [ZnZn] center, where it reacts with MFR to form CHO-MFR.

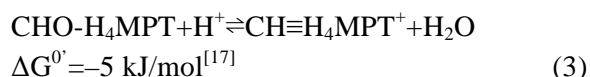
Ftr 的活性功能单位以二聚体或四聚体出现, 这一推论在 Ftr 与底物 CHO-MFR 和 H₄MPT 共结晶的结构中得以证实^[47]。从 *M. kandleri* Ftr 的结构发现, 底物 CHO-MFR 和 H₄MPT 分别结合在不同的亚基上。CHO-MFR 的结合中心位于两个亚基相互作用表面形成的狭长缝隙, 主要靠疏水作用结合在蛋白上, 而 H₄MPT 松散地结合在单亚基中央 β 折叠片结构域的表面(图 3-A)。

Ftr 四聚体结构显示该复合体由 4 个相同的亚基(32 kDa)构成。活性中心 Ser209 与底物 CHO-MFR 的甲酰胺 N、Glu245 与 CHO-MFR 的甲酰胺 O 以及 H₄MPT 喋呤环 N3 以氢键相连。这两个关键氨基酸在活性中心非常保守, 且对 Ftr 的催化过程起重要作用^[47]。Ftr 催化甲酰基转移的过程类似包含三元中间态的 S_N2 反应: Ser209 与 CHO-MFR 的甲酰胺 N 之间形成的氢键、Glu245 质子化的羧基 COO⁻与甲酰胺 O 之间形成的氢键, 都增加了甲酰基 C 的电负性, 使其对 H₄MPT 的 N5 进行亲核攻击, 形成 MFR-CHO/Ftr/H₄MPT 的

三元中间态。随后, 质子转移到 MFR 的氨基 N, 最终生成 CHO-H₄MPT, 如图 3-B 所示。

5.3 环化水解酶 Mch

在产甲烷途径中, Mch 催化 CHO-H₄MPT 到 CH=H₄MPT⁺的可逆缩合反应^[48-49], 反应过程如公式(3)所示。



Mch 的蛋白晶体结构首次通过 *M. kandleri* Mch 的异源表达获得^[50-51]。由于尚未得到 *M. kandleri* Mch 酶与底物的复合体结构, 用于催化机制研究的 Mch 来源于高温硫还原菌 *Archaeoglobus fulgidus* (aMch)^[52]。Mch(35 kDa)以同源三聚体的方式出现, 不携带任何辅基。单聚体在结构上由紧密结合的两个结构域 A 与 B 组成。底物 N⁵-CHO-H₄MPT 结合在两个结构域之间的狭缝中, 喋呤环深埋在狭缝的底部, 而酚尾端面向蛋白表面的入口, 底物的结合导致蛋白结构的局部构象改变(图 4-A)。CH=H₄MPT⁺通过氢键

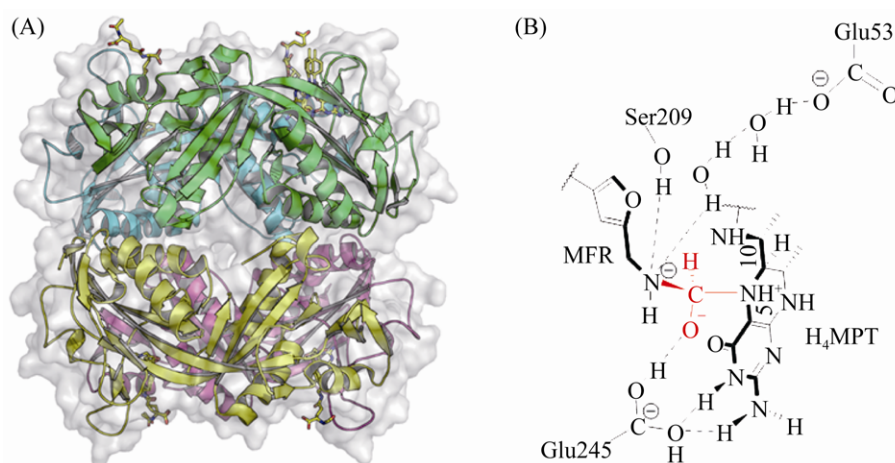


图 3. Ftr 晶体结构及反催化反应中间态结构

Figure 3. Structure of Ftr and catalytic mechanism. A: Tetramer of Ftr with CHO-MFR and H₄MPT (PDB: 2FHJ^[47]). The substrates are shown with stick mode. Four subunits are shown with green, yellow, cyan, pink, respectively. B: Proposed catalytic mechanism of Ftr. The active formyl group of MFR is shown in red.

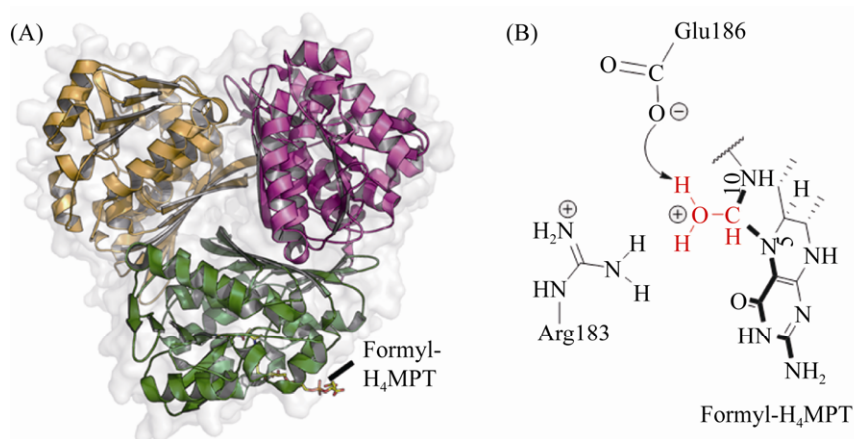


图 4. Mch 晶体结构及催化反应中间态

Figure 4. Structure of homotrimer Mch and the catalytic intermediates. A: Trimer of Mch with CHO-H₄MPT (PDB: 4GVQ^[52]). Substrate is shown with stick mode and the different subunits are shown with green, yellow, purple, respectively. B: catalytic intermediate state of Mch. The active methenyl group is shown in red.

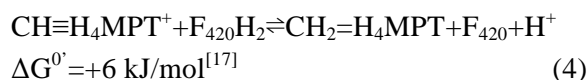
结合到多个氨基酸残基上: H₄MPT 的 N5、N10 与 Arg183、Glu186、Thr187 形成稳定结合状态, 且周围存在活性水分子。突变体 E186Q、R183Q 等完全失去酶活性, 严重影响 Mch 的催化功能^[52], 证实这些关键氨基酸在催化过程中的重要作用。

从活性中心底物结合状态可以推测 Mch 的催化机制^[52]: 首先, Arg183 和 Glu186 捕获水分子对 CH≡H₄MPT⁺的 C14 发起亲核攻击, 形成中间过渡态, 同时 Glu186 成为能够获得质子的通用碱。质子化的 Glu186 贡献出从水分子获得的质子, 并转移给邻近的 H₄MPT 的 N10。相对于接近 Arg183 的 N5、N10 通过氢键与 Glu186 相连, 因此, N5 成为最理想的离去基团。第二步反应中, C14 与 N10 形成的局部环断裂, 并形成 N⁵-CHO-H₄MPT (图 4-B)。

5.4 F₄₂₀-dependent methylene-H₄MPT 脱氢酶 (Mtd)

Mtd 催化氢负离子从 F₄₂₀H₂ 转移到 CH≡H₄MPT⁺形成 CH₂=H₄MPT^[53-56] (图 5-A)。反应

过程如公式(4)所示。



M. kandleri 的 Mtd 的蛋白晶体结构显示其不含任何辅基, 由 3 个同源二聚体组成^[57-58] (图 5-B)。高温古菌的蛋白通常在高盐环境下才能保持热稳定性, 而 Mtd 在低盐浓度条件下已具有热稳定性。Mtd 的复合体结构或许能解释这一反常行为: Mtd 六聚体的亚基紧密互作, 超过 36% 单亚基表面被包埋在六聚体内部。其次, Mtd 每个残基之间的平均离子对是 0.14, 远高于中温蛋白和 *M. kandleri* 其他蛋白的平均值 0.04, 大量的残基离子对稳定了 Mtd 的表面^[59]。

Mtd 的底物结合中心位于单亚基 α/β 结合域与 α-螺旋区组成的狭缝中^[60]。两种底物 CH≡H₄MPT⁺与 F₄₂₀H₂ 以面对面的方式结合在活性中心, F₄₂₀H₂ 的杂环部分与 H₄MPT 的嘌呤部分正面对, 二者的尾部直接延伸到狭缝的入口处。底物与蛋白氨基酸残基之间的结合主要依靠分子

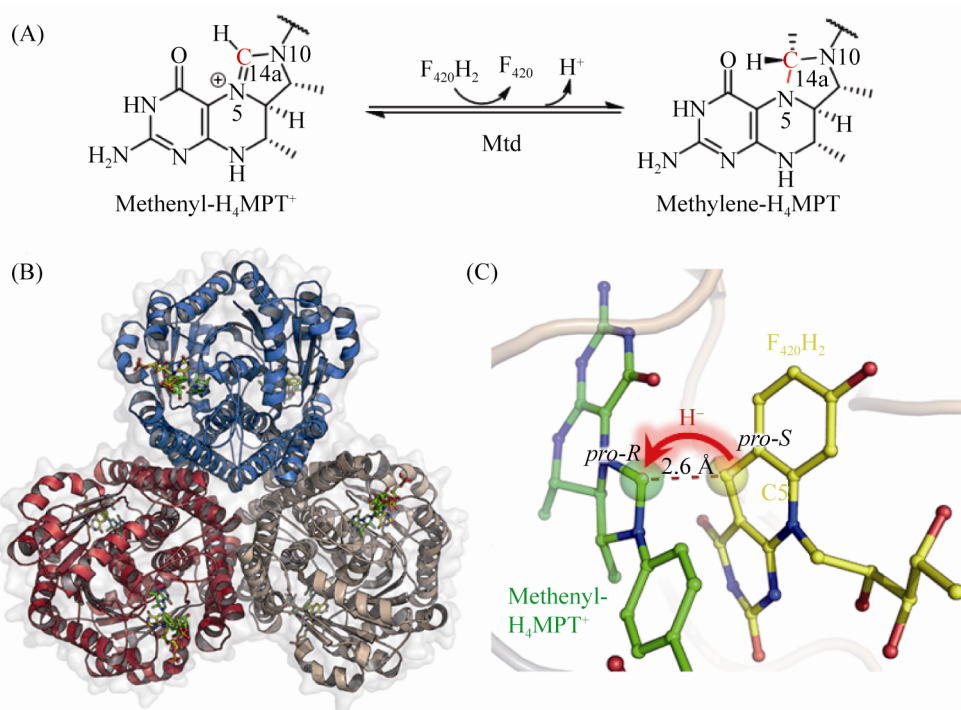


图 5. Mtd 催化反应及其晶体结构与催化机制

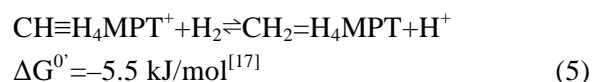
Figure 5. The reaction catalyzed by homohexameric Mtd and its active site with binding substrate. A: The reverse reaction catalyzed by Mtd (PDB: 3IQF^[60]). B: Crystal structure of Mtd hexamer. The substrates are shown as stick mode with green carbon. C: substrate binding site of Mtd and catalytic mechanism. H₄MPT was show in green carbon and F₄₂₀H₂ with yellow carbon mode.

之间的范德华力, 且底物的结合未引起蛋白结构构象的变化。如图 5-C 所示, CH≡H₄MPT⁺以 re-face 的方向面对 F₄₂₀H₂ 的 si-face 方向, 而且, F₄₂₀H₂ 的 C5 与 CH≡H₄MPT⁺的 C14 之间的距离仅 2.6 Å, 因此氢负离子能够直接从 F₄₂₀H₂ 的 C5 转移到 CH≡H₄MPT⁺的 C14, 形成 CH₂=H₄MPT。

5.5 H₂-forming methylene-H₄MPT 脱氢酶 Hmd

细胞色素缺失的产甲烷古菌如果生长环境中 Ni 浓度过低, Mtd 催化的正向反应被 Ni 诱导型蛋白 Hmd 替代。在低浓度 Ni 条件下, Hmd 与 Mtd 的活性分别增加了 6 倍和 4 倍, 而 F₄₂₀ 还原酶的活性降低了 20 倍^[61-62]。同位素示踪实验发现 Hmd 催化氢分子的异裂后, 直接转移氢负离子到底物

CH≡H₄MPT⁺上生成 CH₂=H₄MPT^[31,63-65], Mtd 则逆向氧化亚甲基获得电子并还原 F₄₂₀, 为下一步反应提供还原力^[60]。Afting 等还发现在 *M. marburgensis* 中存在 Hmd 的同源蛋白 HmdII 与 HmdIII (序列同源为 18.8%、17.6%)。但无酶活性的 HmdII 与 HmdIII 的表达并不受 Ni 的调控, 其功能至今尚不明确^[62]。Hmd 催化的反应过程如公式(5)所示。

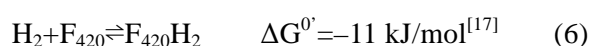


Hmd 的最小催化单位是同源二聚体, C-末端结构域相互缠绕并形成中央结构域, N-末端结构域和中央结构域形成 2 个活性位点裂隙

该酶具有开放和闭合的两种构象,其特征为 N 末端结构域的刚体运动^[79]。在开放构象中,FeGP 的 Fe 中心与 H₄MPT 的 C14a 之间的距离为 9.3 Å,不能直接发生反应(图 6-A)^[80]。但通过结合 CH₂=H₄MPT 可以诱导闭合构象的形成,在闭合构象中,Fe 中心与 C14a 之间的距离为 3.8 Å^[79],且活性位点裂隙中的大多数水分子被挤出。特别是结合在 Fe 中心的水配体由于封闭活性位点裂隙而被去除,使 Fe 中心产生了一个用于结合 H₂ 的空配位,同时吡啶环上的 2-OH 基团去质子化,由此激活 Hmd。随后, H₂ 进入活性中心并被捕捉到 Fe 的空配位上,异裂形成的 Fe-H 中间体将氢负离子转移至 CH≡H₄MPT⁺ 的 C14a 上生成 CH₂=H₄MPT,质子被吡啶环上的去质子化 2-OH 接收,然后经质子传递链转移出催化活性中心(图 6-C)。闭合状态的酶-底物复合体晶体结构的 QM/MM 动力学模拟也支持了该预测模型^[79]。

5.6 F₄₂₀-reducing [NiFe]-氢酶 Frh

大多数产甲烷古菌中存在 Frh^[81]。Frh 以 H₂ 为电子供体,催化形成还原型的 F₄₂₀H₂,此还原当量用于 Mtd 和 Mer 的催化反应。如公式(6)所示。

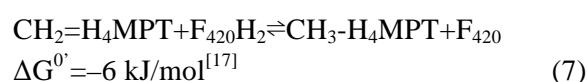


Frh 的功能形式由 FrhAGB 的三聚体组成,FrhA 与 FrhG 亚基分别是氢酶的大亚基和小亚基^[27,82]。FrhA 含有双金属 Ni-Fe 活性中心,不同于其他普通氢酶的[3Fe-4S]簇,FrhG 包含 3 个用于传递电子的[4Fe-4S]簇^[83]。此外,活性中心近端[FeS]簇的 1 个硫原子与 Asp 相连,而不是常见的 Cys,推测可能与其氧化状态有关^[84-85]。Frh 中[4Fe-4S]簇的标准电动势低于-400 mV,明显低于其他氢酶的[FeS]簇,这可能与 Frh 的双向催化功能有关^[86],如图 7 所示。

在 Frh 的晶体结构中,FrhAGB 的同源二聚体组合形成一个六聚体,底物氢分子和 F₄₂₀ 结合到位于蛋白六聚体表面的结合位点上,这一特点表明六聚体结构的核心区域可能不是 Frh 的催化中心^[84]。然而,底物结合状态下的复合体结构尚未获得,Frh 的详细催化机制也有待进一步的研究。

5.7 methylene-H₄MPT 还原酶 Mer

Mer 广泛存在于产甲烷古菌和硫还原菌中,Mer 在硫还原菌中参与乙酸氧化生成 CO₂ 的过程^[87]。在产甲烷途径中,Mer 催化 CH₂=H₄MPT 到 CH₃-H₄MPT 的可逆反应^[88-89](图 8-A)。反应公式如公式(7)所示。



M. marburgensis、*M. kandleri*、*M. barkeri* 等古菌的 Mer 蛋白结构相继被解析^[90]。*M. kandleri* 的 Mer 的晶体结构显示 Mer 是不包含任何辅基的单亚基蛋白,以同源二聚体或四聚体的形式存在^[90](图 8-B)。Mer 属于细菌荧光素酶大家族(luciferase),该类酶蛋白以 FMN、F₄₂₀ 等为反应底物,TIM 结合域是该类酶蛋白保守的底物结合中心^[91]。Aufhammer 等解析的 Mer 与 F₄₂₀ 结合的共结晶结构显示 F₄₂₀ 结合在 TIM 区域^[92]。F₄₂₀ 的核心嘧啶环通过 Gly61、Val62、His36 等氨基酸以微折叠的平面结构固定在结合中心(cis-face),F₄₂₀ 侧链深入蛋白内部中,在结构上与 F₄₂₀ 依赖的乙醇脱氢酶相似^[93](图 8-C)。然而,目前 Mer 与底物 H₄MPT 的结合还未报道。通过对 *M. barkeri* 的 Mer 的结构模型分析发现,TIM 结合域与 IR1、IR3 结合域相互形成的狭缝空间可以结合 H₄MPT^[90,92]。Mer 的催化机制也因底物结合状态的结构缺失而尚不明确。

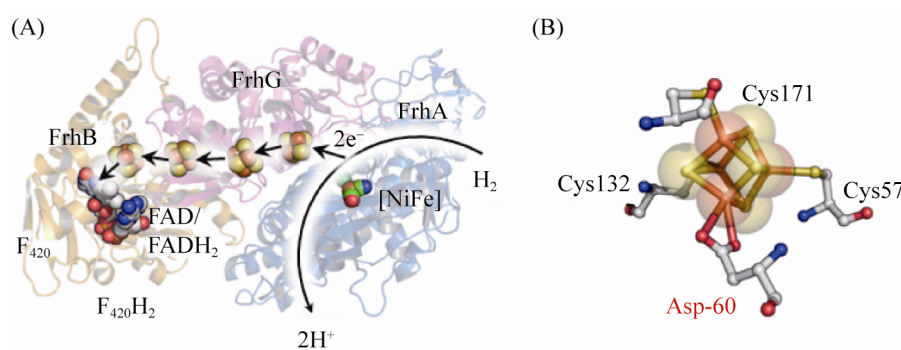


图 7. FrhABG 蛋白结构以及近端 Fe-S 簇结构

Figure 7. Structure of FrhABG and special proximal [4Fe-4S] cluster in the active center. A: FrhABG monomer structure (PDB: 4OMF^[84]). The hydrogen is cleavage into two protons and electrons at the active center of FrhA. Then electrons are transferred into FAD via [Fe-S] cluster to form $FADH_2$. B: Mode of proximal [4Fe-4S] cluster, which bond to protein by cysteine and aspartate.

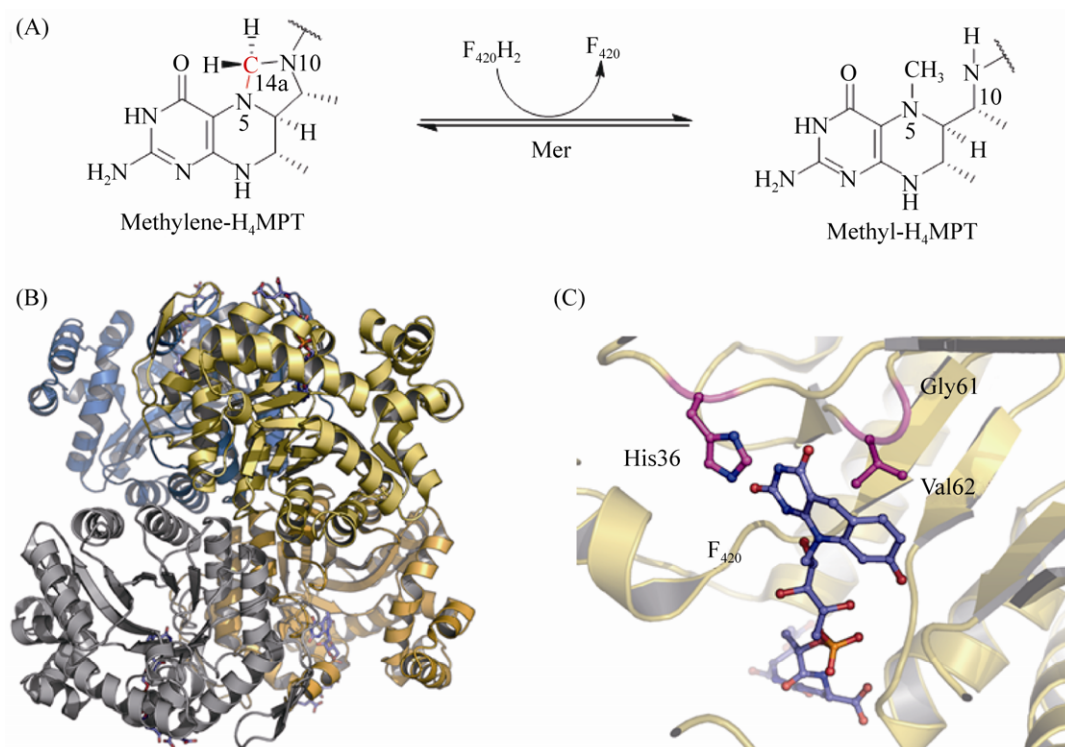
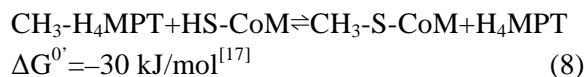


图 8. Mer 催化的酶促反应及其蛋白结构

Figure 8. The reaction catalyzed by Mer and the tetramer structure of Mer. A: The reduction of methylene group with $F_{420}H_2$ catalyzed by Mer. B: Structure of Mer homotetramer (PDB: 1Z69^[92]). C: Binding site of F_{420} which show with stick model in the active site.

5.8 H₄MPT:CoM 甲基转移酶 Mtr

膜蛋白甲基转移酶 MtrA-H 复合体催化甲基从 H₄MPT 转移到 CoM^[94-95]。反应过程如公式(8)所示。



早期研究发现,除 H₂ 作为还原力的甲醇产甲烷途径不依赖 Na⁺外^[96], 乙酸途径、CO₂ 还原途径以及甲基裂解途径都具有 Na⁺依赖性。由此推测甲基从 H₄MPT 转移到 CoM 的过程是 Na⁺依赖的反应, 催化该反应的 Mtr 也发挥离子泵的作用^[24,97-98]。Lienard 等测得 *Methanosarcina mazei* 纯化的 Mtr 酶反应活性达 7.0 μmol/(min·mg), 每转移 1 mol 的甲基, 向膜外泵出约 1.7 mol 的 Na⁺^[99]。由 8 个亚基组成的 Mtr (760 kDa) 在 *M. marburgensis* 中首次纯化获得^[100-102], 其序列分析表明 Mtr 在产甲烷古菌中高度保守^[103-104]。

目前, MtrA-H 复合体的完整蛋白结构还未见报道。基于蛋白序列的结构预测显示, MtrC、MtrD 以及 MtrE 是通过 6-7 个跨膜螺旋结合到膜上, MtrA、MtrB、MtrF 和 MtrG 只有一个跨膜螺旋。MtrH 与其他亚基结合锚定在膜的内侧, 它是唯一缺乏跨膜疏水区的亚基, 也是唯一能从 Mtr 复合体中分离出来的亚基(图 9-A)。纯化的 MtrH 能催化甲基从 H₄MPT 转移到 MtrA 的钴胺素(cobalamin, 维生素 B12)的 Co 原子上^[24,105]。

MtrA 包含一个辅因子钴胺素, Co 原子以六配位的形式存在^[23]。与其他含 cobalamin 的蛋白类似, MtrA 由 α/β 折叠组成的 Rossmann 核心结构域组成, 类钴啉环覆盖在 Rossmann 结构域的表面, 而核苷酸尾部则深入 α/β 折叠区内部的疏水区域, 通过氢键与氨基酸残基相结合。Co 离子通过氢键与活性中心关键氨基酸 His84 的咪唑基 N 相

连, 氧化状态的 cobamide(II)与蛋白的结合状态呈 base-off/His-on 构型(图 9-B)。

研究发现, Mtr 只有在 cobamide(I)的状态下才有活性, 且氧化状态的 Co^{II}-cobalamin 与 CH₃-Co^{III}-cobalamin 都有一个轴向的配基, 而未甲基化的 Co^I-cobalamin 却没有轴向配基。同位素追踪发现, 该轴向配基是活性中心 His84 上的咪唑 N^[100]。因此, 推测 MtrA 辅因子 Co^I-cobalamin 甲基化形成 CH₃-Co^{III}-cobalamin 的过程引起 MtrA 蛋白构像的变化, 使 Co 与 His 结合。随后 CH₃-Co^{III}-cobalamin 的脱甲基化又使得蛋白构象逆转^[23]。

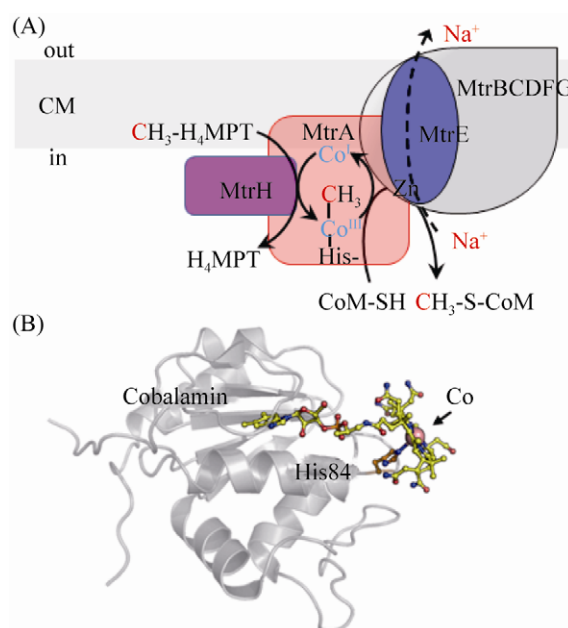


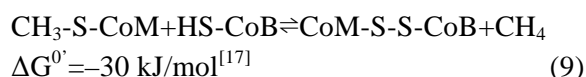
图 9. MtrA-H 复合体模型以及单亚基 MtrA 晶体结构
Figure 9. The complex model of membrane protein MtrA-H and the crystal structure of MtrA. A: MtrA-H packing model and the catalytic mechanism model. The methyl group is transferred into cobalt through MtrH, then it moved into MtrE, where the methyl-CoM formed. B: Crystal structure of MtrA with cofactor cobalamin (PDB: 5LAA^[23]). Cobalt in cobalamin is shown with ball.

紧接 MtrA 的催化产物, MtrE 催化甲基从 $\text{CH}_3\text{-Co-MtrA}$ 转移到 CoM, 形成 $\text{CH}_3\text{-CoM}$, 该反应高度依赖 Na^{+} [105]。这一预测主要基于两个原因: 首先, MtrE 有最大的细胞质区结构域, 第一和第二跨膜螺旋之间的 loop 有 62 个氨基酸, 且这一连接区包含一个保守的 Zn 结合位点 ($\text{Asp26-XGlu28-X22-His51-X9-Glu61}$) [106]。目前所知的所有催化巯基烷基化的蛋白都具有保守的 Zn 结合位点。其次, MtrE 包含一个含有天冬氨酸的跨膜螺旋。研究发现 Asp 对跨膜螺旋转运 Na^{+} 至关重要 [107]。

Mtr 不仅能催化甲基从 H_4MPT 转移到 cobalamin 的可逆过程 ($\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT} + \text{Cob(I)alamin} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{-Cob(I)alamin} + \text{H}_4\text{MPT}$, $\Delta G^0 = -15 \text{ kJ/mol}$), 还能催化 $\text{CH}_3\text{-Co}^{\text{III}}\text{-MtrA}$ 到 CoM 的可逆反应 ($\text{CH}_3\text{-Cob(I)alamin} + \text{HS-CoM} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{-S-CoM} + \text{Cob(I)alamin}$, $\Delta G^0 = -15 \text{ kJ/mol}$) [95,108]。甲基转移过程触发 MtrA 蛋白构型的改变, 并将能量传递给 MtrE 促使 Na^{+} 从膜内转移到膜外, 形成膜内外电动势梯度, 进而偶联 ATP 的合成, 完成能量保存。

5.9 $\text{CH}_3\text{-CoM}$ 还原酶 Mcr

在已知的三条产甲烷代谢途径中, 最后一步反应均为 $\text{CH}_3\text{-CoM}$ 还原生成甲烷, 催化这一反应的还原酶是 Mcr (图 10-A)。反应过程如公式(9)所示。



在甲烷氧化菌中, 该酶也可以逆向催化甲烷的氧化 [109]。Mcr 在产甲烷古菌中是较为保守的蛋白, 其序列同源性较高 (61%–69%) [110]。因此, Mcr 的编码基因也成为产甲烷古菌鉴定的标志基因 [111]。

M. marburgensis、*M. wolfeii*、*M. barkeri* 等古菌的 Mcr 的蛋白结构已获得解析 [110,112–113]。Mcr 复合体是由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成的同源二聚体 ($\alpha\beta\gamma$)₂ (图 10-B), 每一个 $\alpha\beta\gamma$ 单位活性中心均存在含 Ni 的辅因子 F_{430} , EPR 分析显示在完整催化过程中, Ni 的氧化价态分为 Ni(I)、Ni(II)、Ni(III) 三种 [114–118]。Mcr 单聚体不足以完成整个反应, 由 $\alpha\beta\gamma\alpha'$ 或 $\alpha'\beta'\gamma'\alpha$ 组成的催化单元形成直通蛋白表面的狭窄通道, F_{430} 结合在通道的底部, 两个 F_{430} 活性中心距离约为 50 \AA [112–113,119]。 F_{430} 通过与氨基酸残基形成氢键结合在活性中心, Ni 的第五个配位与 Gln147 连接形成轴向基团, 第六配位面向通道入口, 也是催化反应过程中的关键配位。此外, 底物 CoM 结合在 F_{430} 的上方, CoM 的巯基距离 Ni 约 2.4 \AA , 其磺酸基通过盐键、氢键与活性中心氨基酸残基结合。底物 CoB 主要通过盐键结合在狭窄通道的上半部分, 这一狭窄通道也因为 CoB 的结合而处于完全封闭的状态 [110,119–120]。

Mcr 的另一个显著特点是活性中心氨基酸残基的翻译后修饰 [121]。在 *M. marburgensis* 的 Mcr 活性中心发现 4 个甲基化的氨基酸、1 个巯基化的甘氨酸、以及 1 个醛基化的天冬氨酸 (图 10-C)。翻译后修饰的氨基酸在所有的 Mcr 中并不保守, 表明这些氨基酸残基的修饰对催化活性不是必需的, 可能有助于提高催化效率以及活性中心的稳定性 [119,122–123]。

根据 Mcr 的结构分析预测其催化机制如下: 辅因子 F_{430} 的 Ni(I) 攻击 $\text{CH}_3\text{-CoM}$ 产生 $\text{CH}_3\text{-Ni(III)}$ 和 CoM 阴离子, 电子从 CoM 转移到 $\text{CH}_3\text{-Ni(III)}$ 形成 $\text{CH}_3\text{-Ni(II)}$ 以及 CoM-S 自由基(radical), 1 个氢原子从 CoB-SH 转移到 $\text{CH}_3\text{-Ni(II)}$ 生成甲烷 (图 10-D) [124–125]。这种催化机制类似于 cobalamin

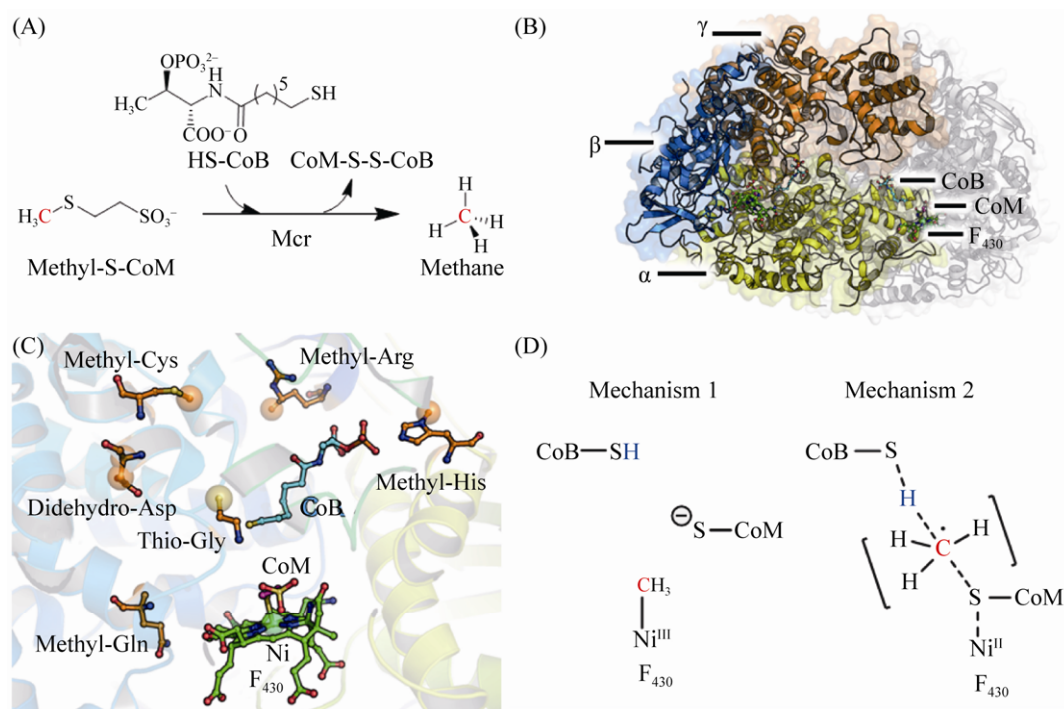


图 10. Mcr 催化反应、晶体结构、活性位点及催化机制

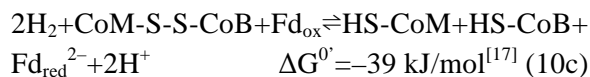
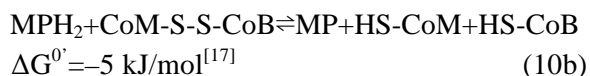
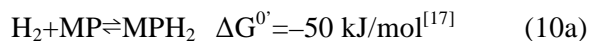
Figure 10. The catalytic reaction, crystal structure, binding site and mechanism of Mcr. A: Methyl-CoM reduced into methane with CoB catalyzed by Mcr. B: Crystal structure of Mcr homodimer with cofactor F₄₃₀/CoM/CoB (PDB: 5A8K^[119]). The subunits and cofactor are shown in cartoon and stick model. C: Active site of Mcr with F₄₃₀, CoM and CoB. Several post-transcriptional modified amino acids are arranged surrounding the active site. D: Hypothesized two type of catalytic mechanism of Mcr^[122].

依赖的其他酶，催化过程中形成 CH₃-Co 的中间态。通过 DFT 的计算预测 Mcr 的反应过程也可能基于自由基催化。另一种催化理论是 Ni(I)攻击 CH₃-S-CoM，生成甲基自由基和 CoM-S-Ni(II)，随后，甲基自由基接受 CoB-SH 的氢原子生成甲烷。为避免甲基自由基的快速消旋，C-S 的断裂与 C-H 的形成同时发生^[122,126-127]。

5.10 异二硫化物还原酶/[NiFe]-氢酶复合体

在产甲烷途径的最后一步反应中，异二硫化物被还原重新生成 CoM 与 CoB 后才能参与新的 CoM 转甲基反应^[2]。在细胞色素缺失的产甲烷古菌中，CoM-S-S-CoB 还原由异二硫化物还原

酶(Hdr)和[NiFe]-氢酶复合体(HdrABC-MvhAGD)完成，反应过程如公式(10c)所示。而在含细胞色素的产甲烷古菌中，由 HdrDE-VhtACG 复合体催化完成^[128-129]，反应过程如公式(10a-b)所示。不同的是 HdrABC-MvhAGD 复合体是细胞质蛋白，以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为基础的电子歧化完成氧化还原反应并偶联能量储存。而 HdrDE-VhtACG 复合体位于细胞膜上，通过电子载体 MPH₂ 和细胞色素传递电子，以形成质子泵的方式产生能量^[17,29-30]。CoM-S-S-CoB 还原反应的不同体现了两类产甲烷古菌在能量保存方式上的差异。



异二硫化物还原酶 Hdr 与氢酶 Mvh 在胞质中形成紧密结合的复合体。其中, MvhA 是[NiFe]-氢酶的大亚基, 活性中心结合 Ni-Fe 辅因子, MvhG 为氢酶的小亚基, 含有 3 个传递电子的[Fe-S]簇, MvhD 亚基含有 1 个[2Fe-2S]簇, 推测该亚基是传递电子到 Hdr 的通道蛋白。HdrA 包含有 1 个 FAD 辅因子结合位点、4 个[4Fe-4S]簇、4 个空间保守的半胱氨酸。HdrB 的 N 端结构域含有 1 个 Zn 结合位点以及 2 个富含半胱氨酸的肽段 CX31-39CCX35-36CXXC, 该片段被认为是[4Fe-4S]簇的结合位点, HdrB 也包含 CoM-S-S-CoB 还原的活性中心。HdrC 包含有 2 个[4Fe-4S]

簇, 被认为是连接 HdrA 与 HdrB 的电子传递通道蛋白。各亚基以 1:1 的比例组成 Hdr-Mvh 复合体, 通过纯化获得的活性复合体约为 500 kDa, 因此复合体的功能单位以二聚体的形式存在^[28]。

在生理条件下, 铁氧还蛋白 Fd 的电动势 E^0 为 -500 mV, 而质子/氢分子电对 $2\text{H}^+/\text{H}_2$ 的电势 E^0 为 -400 mV, 因此 Fd_{ox} 很难从电势较低的氢分子中得到电子。而在 HdrABC-MvhAGD 催化的还原反应中, 氢分子裂解后产生的电子转移至电子载体 FAD, 通过 FAD 的转移作用, 一半电子用于还原 CoM-S-S-CoB (E^0 为 -140 mV), 一半电子用于还原 Fd_{ox} (E^0 为 -500 mV), 这种现象称之为电子歧化^[28,30]。HdrABC-MvhAGD 复合体采用电子歧化的方式还原 CoM-S-S-CoB 并获得还原力 $\text{Fd}_{\text{red}}^{2-}$, 直接用于产甲烷途径起始过程中 CO_2 的固定, 以及其他生物合成反应, 以此偶联能量保存, 如图 11 所示。

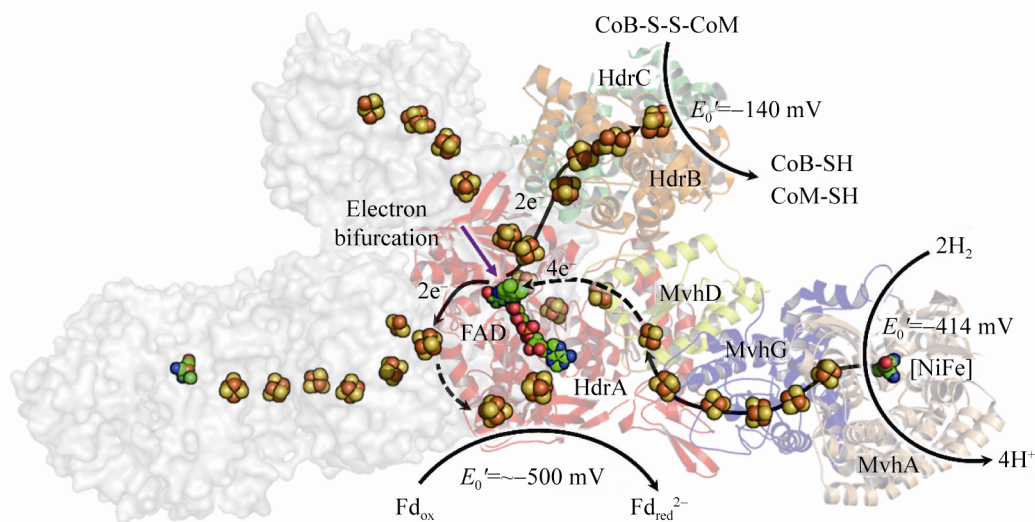


图 11. HdrABC-MvhAGD 晶体结构及催化机制

Figure 11. Crystal structure of HdrABC-MvhAGD homodimer complex and its catalytic mechanism. The structure (PDB: 5ODR^[28]) complex is shown with cartoon and surface model in different color, and the [Fe-S] cluster and FAD are shown with ball. MvhAGD, [NiFe]-hydrogenase, oxidize 2H_2 , producing 4H^+ and 4 electrons. The electrons are transferred into FAD center via [Fe-S] cluster, where two electrons are used for ferredoxin reduction and another two electrons for CoM-S-S-CoB reduction.

在含有细胞色素的产甲烷古菌中, HdrDE-VhtACG 催化 CoM-S-S-CoB 的还原。虽然氢酶 Vht 与还原酶都位于细胞膜上, 但并不形成紧密结合的复合体, 在两者的催化过程中, 甲烷吩嗪 MP 是氢酶与还原酶之间的电子传递物质^[25,130-131]。VhtACG 催化氢气裂解产生的电子通过细胞色素传递给 MP, 生成还原型 MPH₂, MPH₂ 通过自身二次氧化把获得的电子传递给还原酶 HdrDE, 用于还原 CoM-S-S-CoB。该还原反应释放的能量与质子的膜内外转移(耗能反应)相偶联, 由此形成膜内外质子梯度并用于 ATP 的合成, 进而完成能量保存^[16,26-27]。

根据序列分析发现, 在氢酶 VhtACG 复合体中, VhtA 是[NiFe]-氢酶的大亚基, 包含[NiFe]活性中心^[132], VhtG 是氢酶的小亚基。复合体中的[NiFe]活性中心面向细胞周质, 因此催化氢分子裂解产生的质子直接释放到膜外^[133-134]。而 VhtC 是包含细胞色素 b 的跨膜蛋白, 其功能是作为从氢酶传递电子到还原酶 HdrDE 的电子通道。HdrDE 复合体的 HdrE 是包含细胞色素的膜整合蛋白, 而另一个亚基 HdrD 是通过蛋白结合作用锚定在 HdrE 上的胞质蛋白。亚基 HdrE 通过细胞色素再次氧化 MPH₂, 并将获得的电子转移给 HdrD 用于 CoM-S-S-CoB 的还原^[131,135]。氢酶 VhtACG 与还原酶 HdrDE 的蛋白结构目前还尚未解析, 其详细的催化机制也有待进一步的深入研究。

5.11 [NiFe]-氢酶 Eha、Ehb、Ech

在细胞色素缺失的产甲烷途径中, Fd_{red}²⁻产生于 CoM-S-S-CoB 还原反应的电子歧化过程, 部分用于产甲烷途径起始 CO₂ 的固定, 部分用于其他代谢途径。为补偿消耗的还原力, 膜蛋白氢酶复合体 EhaA-T、EhbA-Q 也参与 Fd_{red}²⁻的生成^[136]。

这两类氢酶以氢分子(-414mv)为电子供体, 催化 Fd_{ox} 的还原(-500 mV), 这一耗能反应由膜内外 Na⁺梯度推动完成^[137]。氢酶 EhaA-T、EhbA-Q 是无细胞色素产甲烷古菌中的两类同源蛋白, 而在有细胞色素的产甲烷古菌中, 膜蛋白复合体 EchA-F 代替 Eha 或者 Ehb 的功能^[27]。反应过程如公式(11)所示。



具有能量储存功能的氢酶 EhaA-T、EhbA-Q 与 EchA-F 在结构上具有一定的同源性。这类膜蛋白[NiFe]-氢酶复合体亚基众多, 除了 6 个保守的核心亚基之外, 还有高达 14 个成熟蛋白^[27]。*M. barkeri* 纯化得到的复合体 EchA-F 由 6 个亚基组成, 其中 EchA、EchB 是 2 个跨膜整合蛋白, 推测其功能与膜内外的离子转运有关^[138-139]。该预测通过质子转运抑制剂 DCCD 实验和同位素标记实验得到证实。EchE 是包含[NiFe]中心的氢酶大亚基, EchC 是包含 1 个[4Fe-4S]簇的氢酶小亚基, EchF 包含 2 个[4Fe-4S]簇, EchD 不包含任何辅因子结构, 其功能尚不清楚。

EhaA-T 与 EhbA-Q、EchA-F 具有同源性和相似的催化功能, 由此推测其催化机制也类似。不同的是, 在有细胞色素的产甲烷古菌中, 推动 Ech 合成 Fd_{red}²⁻的不是 Na⁺而是 H⁺^[16]。由于膜蛋白复合体的分离纯化和晶体生长难度极大, 目前还没有获得完整的蛋白结构, 其催化机制也尚不清楚。

6 展望

产甲烷古菌的研究始于 1936 年, Barker 首次发现在微生物的作用下 CO₂ 还原产甲烷的现象, 随后分离出第一株产甲烷古菌。随着 Hungate 厌氧培养方法的建立, 越来越多的产甲烷古菌被

发现,同时还发现了产甲烷古菌在不同底物条件下产甲烷的特殊生理现象^[2]。经过长达半个世纪的探索,基本明确了不同的产甲烷途径,以及中间产物、酶复合体和能量代谢模式等。

在过去的 20 年中,产甲烷古菌的研究主要集中在产甲烷途径中的酶蛋白。基于对蛋白结构的解析,揭示了各种酶复合体的结构特征与催化机制^[22]。然而,由于产甲烷古菌极端厌氧、难培养以及复合体蛋白难纯化等特点,部分产甲烷途径的蛋白结构(尤其是膜蛋白复合体)还尚未解析,这些蛋白的催化机制也没有完全确定。例如,偶联能量合成的膜蛋白 MtrA-H 复合体结构也亟待解析;复合体 Hdr/Mvh 电子歧化过程的详细机制尚不清楚,这需要更高分辨率的复合体结构去解析。此外,CH₃-CoM 还原酶 Mcr 的反应机制仍有很多疑问待解决,CoM-S-Ni(II)中间体表明其催化机制可能是基于甲基自由基的反应,然而还需进一步验证^[122]。目前预测的催化机制都是基于 Mcr 非活性状态的蛋白结构,因此,活性状态下的蛋白结构对催化机理的分析显得尤为重要,此外 Mcr 活性中心较多的转录后修饰氨基酸的功能仍待解析。

生化和光谱分析表明,产甲烷途径的酶蛋白在催化循环中构象变化很大,特别是 HdrABC-MvhAGD、Mcr 以及 MtrA-H 等复合体。将来,利用冷冻电子显微镜捕获催化反应中间体和酶蛋白构象变化,对产甲烷酶复合体的结构研究会发挥重要的作用。同时,构建完善稳定的古菌遗传体系也将会大量用于代谢途径调控机制、蛋白体外重组等多方面的研究中^[11]。

此外,在针对产甲烷的生物能源应用研究中,产甲烷古菌广谱代谢底物和关键酶蛋白的研

究也是未来重要的研究方向。本课题组正在研究的一株产甲烷古菌 *Methermicoccus shengliensis* 能够代谢甲氧基芳香化合物产甲烷,我们通过对新型底物特异的酶蛋白结构进行人工改造,可使其代谢众多结构类似的非特异底物,进而提高底物利用效率。另外,辅酶和辅基的生物合成途径对于全面了解酶蛋白催化机制起关键作用。更重要的是,在合成途径的研究基础上,通过合成生物学体外构建人工酶、代谢途径是未来代谢研究的重要方向,也是促进甲烷生产的新途径。

参 考 文 献

- [1] Bapteste E, Brochier C, Boucher Y. Higher-level classification of the archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea*, 2005, 1: 353–363.
- [2] Ferry JG. *Methanogenesis*. Chapman Hali, Springer Science+Business Media, 1993: 207–406.
- [3] Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, Butterfield CN, Hermsdorf AW, Amano Y, Ise K, Suzuki Y, Dudek N, Relman DA, Finstad KM, Amundson R, Thomas BC, Banfield JF. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 1–6.
- [4] Vanwonterghem I, Evans PN, Parks DH, Jensen PD, Woodcroft BJ, Hugenholtz P, Tyson GW. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 1–9.
- [5] Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 285–292.
- [6] Thauer RK. My lifelong passion for biochemistry and anaerobic microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 2015, 69: 1–30.
- [7] Shima S, Warkentin E, Thauer RK, Ermler U. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(6): 519–530.
- [8] Dimarco AA, Bobik TA, Wolfe RS. Unusual coenzymes of methanogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 1990, 59: 355–394.
- [9] Ferguson DJ, Longstaff DG, Krzycki JA. Assay of

- methylotrophic methyltransferases from Methanogenic archaea. *Methods Enzymology*, 2011, 494: 139–158.
- [10] Moore BC, Leigh JA. Markerless mutagenesis in *Methanococcus maripaludis* demonstrates roles for alanine dehydrogenase, alanine racemase, and alanine permease. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(3): 972–979.
- [11] Lyu Z, Chou CW, Shi H, Wang L, Ghebream R, Phillips D, Yan Y, Duin EC, Whitman WB. Assembly of methyl coenzyme M reductase in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(7): 717–746.
- [12] Cheng L, Zheng ZZ, Wang C, Zhang H. Recent advances in methanogens. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1143–1164. (in Chinese)
承磊, 郑珍珍, 王聪, 张辉. 产甲烷古菌研究进展. 微生物学通报, 2016, 43(5): 1143–1164.
- [13] Evans PN, Parks DH, Chadwick GL, Robbins SJ, Orphan VJ, Golding SD, Tyson GW. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science*, 2015, 350(6259): 434–438.
- [14] Fang XY, Li JB, Rui JP, Li XZ. Research progress in biochemical pathways of methanogenesis. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 2015, 21(1): 1–9. (in Chinese)
方晓瑜, 李家宝, 芮俊鹏, 李香真. 产甲烷生化代谢途径研究进展. 应用与环境微生物学报, 2015, 21(1): 1–9.
- [15] Duan CH, Zhang CJ, Sun YH, Li M. Recent advances on the novel methanogens. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 51(6): 981–995. (in Chinese)
段昌海, 张翠景, 孙艺华, 李猛. 新型产甲烷古菌研究进展. 微生物学报, 2019, 51(6): 981–995.
- [16] Welte C, Deppenmeier U. Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetoclastic methanogens. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1837(2014): 1130–1147.
- [17] Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 579–591.
- [18] Weimer PJ, Zcikus JG. One carbon metabolism in methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology*, 1978, 119: 49–57.
- [19] Morii H, Koga Y, Nagai S. Energetic analysis of the growth of *Methanobrevibacter arborophilus* A2 in hydrogen-limited continuous cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, XXIX: 310–315.
- [20] Heijnen JJ, Dijken JPV. In search of a thermodynamic description of biomass yields for the chemotrophic growth of microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991, 39: 833–858.
- [21] Thauer RK, Jungermann K, Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 1977, 41(1): 100–180.
- [22] Wagner T, Watanabe T, Shima S. Handle book of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Switzerland, Springer Nature, 2018: 1–29.
- [23] Wagner T, Ermler U, Shima S. MtrA of the sodium ion pumping methyltransferase binds cobalamin in a unique mode. *Scientific Reports*, 2016, 6: 1–10.
- [24] Gottschalk G, Thauer RK. The Na^+ -translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1505(1): 28–36.
- [25] Deppenmeier U. The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2004, 36(1): 55–64.
- [26] Deppenmeier U, Müller V. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 2008, 45: 123–152.
- [27] Thauer RK, Kaster AK, Goenrich M, Schick M, Hiromoto T, Shima S. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H_2 storage. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 507–536.
- [28] Wagner T, Koch J, Ermler U, Shima S. Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane $[\text{4Fe-4S}]$ clusters for reduction. *Science*, 2017, 357(6352): 699–703.
- [29] Buckel W, Thauer RK. Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chemical Reviews*, 2018, 118(7): 3862–3886.
- [30] Buckel W, Thauer RK. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/ Na^+ translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1827(2013): 94–113.
- [31] Bai LP, Fujishiro T, Huang GF, Koch U, Takabayashi A, Yokono M, Tanaka A, Xu T, Hu XL, Ermler U, Shima S. Towards artificial methanogenesis: biosynthesis of the $[\text{Fe}]$ -hydrogenase cofactor and characterization of the semisynthetic hydrogenase. *Faraday Discussions*, 2017, 198: 37–58.

- [32] Hochheimer A, Schmitz RA, Thauer RK, Hedderich R. The tungsten formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* contains sequence motifs characteristic for enzymes containing molybdopterin dinucleotide. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 234(3): 910–920.
- [33] Bertram PA, Karrasch M, Schmitz RA, Böcher R, Albracht SPJ, Thauer RK. Formylmethanofuran dehydrogenases from methanogenic archaea substrate specificity, EPR properties and reversible inactivation by cyanide of the molybdenum or tungsten iron-sulfur proteins. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 220: 477–484.
- [34] Hochheimer A, Linder D, Thauer RK, Hedderich R. The molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase operon and the tungsten formylmethanofuran dehydrogenase operon from *Methanobacterium thermoautotrophicum* - structures and transcriptional regulation. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 242(1): 156–162.
- [35] Vorholt JA, Vaupel M, Thauer RK. A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Molecular Microbiology*, 1997, 23(5): 1033–1042.
- [36] Schmitz RA, Albracht SPJ, Thauer RK. A molybdenum and a tungsten isoenzyme of formylmethanofuran dehydrogenase in the thermophilic archaeon *Methanobacterium wolfei*. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 209: 1013–1018.
- [37] Hochheimer A, Hedderich R, Thauer RK. The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*: induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme. *Archives of Microbiology*, 1998, 170(5): 389–393.
- [38] Wagner T, Ermler U, Shima S. The methanogenic CO₂ reducing-and-fixing enzyme is bifunctional and contains 46 [4Fe-4S] clusters. *Science*, 2016, 354(6308): 114–117.
- [39] Bertram PA, Thauer RK. Thermodynamics of the formylmethanofuran dehydrogenase reaction in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 226(3): 811–818.
- [40] Shima S, Weiss DS, Thauer RK. Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase (Ftr) from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* - Cloning, sequencing and functional expression of the ftr gene and one-step purification of the enzyme overproduced in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 230(3): 906–913.
- [41] Shima S, Thauer RK, Michel H, Ermler U. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri*. *Proteins: Structure Function and Genetics*, 1996, 26(1): 118–120.
- [42] Mamat B, Roth A, Grimm C, Ermler U, Tziatzios C, Schubert D, Thauer RK, Shima S. Crystal structures and enzymatic properties of three formyltransferases from archaea: environmental adaptation and evolutionary relationship. *Protein Science*, 2002, 11(9): 2168–2178.
- [43] Ermler U, Merckel MC, Thauer RK, Shima S. Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability. *Structure*, 1997, 5(5): 635–646.
- [44] Kunow J, Shima S, Vorholt JA, Thauer RK. Primary structure and properties of the formyltransferase from the mesophilic *Methanosarcina barkeri*: comparison with the enzymes from thermophilic and hyperthermophilic methanogens. *Archives of Microbiology*, 1996, 165(2): 97–105.
- [45] Shima S, Thauer RK, Ermler U, Durchschlag H, Tziatzios C, Schubert D. A mutation affecting the association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* and its influence on the enzyme's activity and thermostability. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(22): 6619–6623.
- [46] Shima S, Tziatzios C, Schubert D, Fukada H, Takahashi K, Ermler U, Thauer RK. Lyotropic-salt-induced changes in monomer/dimer/tetramer association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* in relation to the activity and thermostability of the enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 258(1): 85–92.
- [47] Acharya P, Warkentin E, Ermler U, Thauer RK, Shima S. The structure of formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase in complex with its coenzymes. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 357(3): 870–879.
- [48] Klein AR, Breitung J, Linder D, Stetter KO, Thauer RK. N⁵,N¹⁰-methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase

- from the extremely thermophilic sulfate reducing *Archaeoglobus fulgidus*: comparison of its properties with those of the cyclohydrolase from the extremely thermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Archives of Microbiology*, 1993, 159(3): 213–219.
- [49] Brommelstroet BW, Hensgens CMH, Geerts WJ, Keltjens JT, Drift C, Vogels GD. Purification and properties of 5,10-methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 175: 564–571.
- [50] Grabarse W, Vaupel M, Vorholt JA, Shima S, Thauer RK, Wittershagen A, Bourenkov G, Bartunik HD, Ermler U. The crystal structure of methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Methanopyrus kandleri*. *Structure*, 1999, 7(10): 1257–1268.
- [51] Vaupel M, Vorholt JA, Thauer RK. Overproduction and one-step purification of the N^5,N^{10} -methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase (Mch) from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Extremophiles*, 1998, 2(1): 15–22.
- [52] Upadhyay V, Demmer U, Warkentin E, Moll J, Shima S, Ermler U. Structure and catalytic mechanism of N^5,N^{10} -methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase. *Biochemistry*, 2012, 51(42): 8435–8443.
- [53] Klein AR, Thauer RK. Re-face specificity at C14a of methylenetetrahydromethanopterin and Si-face specificity at C5 of coenzyme F_{420} for coenzyme F_{420} -dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 227(1/2): 169–174.
- [54] Klein AR, Berk H, Purwantini E, Daniels L, Thauer RK. Si-face stereospecificity at C5 of coenzyme F_{420} for F_{420} -dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* and F_{420} -dependent alcohol dehydrogenase from *Methanoculleus thermophilicus*. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 239(1): 93–97.
- [55] Smmelstroet B, Geerts WJ, Keltjens JT, Drift C, Vogels GD. Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase and 5,10-methylenetetrahydromethanopterin reductase, two coenzyme F_{420} -dependent enzymes, from *Methanosarcina barkeri*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1079: 293–302.
- [56] Schworer B, Breitung J, Klein AR, Stetter KO, Thauer RK. Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase and N^5,N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from the sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*: similarities with the enzymes from methanogenic Archaea. *Archives of Microbiology*, 1993, 159(3): 225–232.
- [57] Klein AR, Thauer RK. Overexpression of the coenzyme- F_{420} -dependent N^5,N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase gene from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 245(2): 386–391.
- [58] Klein AR, Koch J, Stetter KO, Thauer RK. Two N^5,N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenases in the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*: characterization of the coenzyme F_{420} -dependent enzyme. *Archives of Microbiology*, 1993, 160(3): 186–192.
- [59] Hagemeyer CH, Shima S, Thauer RK, Bourenkov G, Bartunik HD, Ermler U. Coenzyme F_{420} -dependent methylenetetrahydro-methanopterin dehydrogenase (Mtd) from *Methanopyrus kandleri*: a methanogenic enzyme with an unusual quaternary structure. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 332(5): 1047–1057.
- [60] Ceh K, Demmer U, Warkentin E, Moll J, Thauer RK, Shima S, Ermler U. Structural basis of the hydride transfer mechanism in F_{420} -dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase. *Biochemistry*, 2009, 48(42): 10098–10105.
- [61] Afting C, Hochheimer A, Thauer RK. Function of H_2 -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F_{420} reduction with H_2 . *Archives of Microbiology*, 1998, 169(3): 206–210.
- [62] Afting C, Kremmer E, Brucker C, Hochheimer A, Thauer RK. Regulation of the synthesis of H_2 -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd) and of HmdII and HmdIII in *Methanothermobacter marburgensis*. *Archives of Microbiology*, 2000, 174(4): 225–232.
- [63] Klein AR, Fernandez VM, Thauer RK. H_2 -forming N^5,N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase: mechanism of H_2 formation analyzed using hydrogen isotopes. *FEBS Letters*, 1995, 368(2): 203–206.
- [64] Hartmann GC, Santamaria E, Fernandez VM, Thauer RK. Studies on the catalytic mechanism of H_2 -forming

- methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase: *para-ortho* H₂ conversion rates in H₂O and D₂O. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1996, 1(5): 446–450.
- [65] Klein AR, Hartmann GC, Thauer RK. Hydrogen isotope effects in the reactions catalyzed by H₂-forming N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from methanogenic Archaea. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 233(1): 372–376.
- [66] Shima S, Pilak O, Vogt S, Schick M, Stagni MS, Meyer-Klaucke W, Warkentin E, Thauer RK, Ermler U. The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science*, 2008, 321(5888): 572–575.
- [67] Schick M, Xie XL, Ataka K, Kahnt J, Linne U, Shima S. Biosynthesis of the iron-guanylylpyridinol cofactor of [Fe]-hydrogenase in methanogenic archaea as elucidated by stable-isotope labeling. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(6): 3271–3280.
- [68] Hiromoto T, Ataka K, Pilak O, Vogt S, Stagni MS, Meyer-Klaucke W, Warkentin E, Thauer RK, Shima S, Ermler U. The crystal structure of C176A mutated [Fe]-hydrogenase suggests an acyl-iron ligation in the active site iron complex. *FEBS Letters*, 2009, 583(3): 585–590.
- [69] Fujishiro T, Bai LP, Xu T, Xie XL, Schick M, Kahnt J, Rother M, Hu XL, Ermler U, Shima S. Identification of HcgC as a SAM-Dependent Pyridinol Methyltransferase in [Fe]-Hydrogenase Cofactor Biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(33): 9648–9651.
- [70] Fujishiro T, Kahnt J, Ermler U, Shima S. Protein-pyridinol thioester precursor for biosynthesis of the organometallic acyl-iron ligand in [Fe]-hydrogenase cofactor. *Nature Communications*, 2015, 6(6895): 1–8.
- [71] Bai LP, Wagner T, Xu T, Hu XL, Ermler U, Shima S. A water-bridged H-bonding network contributes to the catalysis of the SAM-dependent C-methyltransferase HcgC. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(36): 10806–10809.
- [72] Shima S, Thauer RK. A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *The Chemical Record*, 2007, 7(1): 37–46.
- [73] Lubitz W, Ogata H, Rudiger O, Reijerse E. Hydrogenases. *Chemical Reviews*, 2014, 114(8): 4081–4148.
- [74] Hidese R, Ataka K, Bill E, Shima S. Cu^I and H₂O₂ inactivate and Fe^{II} inhibits [Fe]-hydrogenase at very low concentrations. *Chembiochem*, 2015, 16(13): 1861–1865.
- [75] Shima S, Ataka K. Isocyanides inhibit [Fe]-hydrogenase with very high affinity. *FEBS Letters*, 2011, 585(2011): 353–356.
- [76] Tamura H, Salomone-Stagni M, Fujishiro T, Warkentin E, Meyer-Klaucke W, Ermler U, Shima S. Crystal structures of [Fe]-hydrogenase in complex with inhibitory isocyanides: implications for the H₂-activation site. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(37): 9656–9659.
- [77] Lyon EJ, Shima S, Buurman G, Chowdhuri S, Batschauer A, Steinbach K, Thauer RK. UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(1): 195–204.
- [78] Buurman G, Shima S, Thauer RK. The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Letters*, 2000, 485(2/3): 200–204.
- [79] Huang GF, Wagner T, Wodrich MD, Ataka K, Bill E, Ermler U, Hu X, Shima S. The atomic-resolution crystal structure of activated [Fe]-hydrogenase. *Nature Catalysis*, 2019, 2(6): 537–543.
- [80] Hiromoto T, Warkentin E, Moll J, Ermler U, Shima S. The crystal structure of an [Fe]-hydrogenase-substrate complex reveals the framework for H₂ activation. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(35): 6457–6460.
- [81] Alex LA, Reeve JN, Orme-Johnson WH, Walsh CT. Cloning, sequence determination, and expression of the genes encoding the subunits of the nickel-containing 8-hydroxy-5-deazaflavin reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H. *Biochemistry*, 1990, 29(31): 7237–7244.
- [82] Vaupel M, Thauer RK. Two F₄₂₀-reducing hydrogenases in *Methanosarcina barkeri*. *Archives of Microbiology*, 1998, 169(3): 201–205.
- [83] Bingemann R, Klein A. Conversion of the central [4Fe-4S] cluster into a [3Fe-4S] cluster leads to reduced hydrogen-uptake activity of the F₄₂₀-reducing hydrogenase of *Methanococcus voltae*. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267: 6612–6618.
- [84] Vitt S, Ma K, Warkentin E, Moll J, Pierik AJ, Shima S, Ermler U. The F₄₂₀-reducing [NiFe]-hydrogenase complex from *Methanothermobacter marburgensis*, the first X-ray structure of a group 3 family member. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(15): 2813–2826.
- [85] Mills DJ, Vitt S, Strauss M, Shima S, Vonck J. De novo modeling of the F₄₂₀-reducing [NiFe]-hydrogenase from a

- methanogenic archaeon by cryo-electron microscopy. *Elife*, 2013, 2: 1–21.
- [86] Thauer RK. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology*, 1998, 144: 2377–2406.
- [87] Thauer RK. Sulfate-reducing bacteria, *Biotechnology Handbook*. New York, Springer, 1995: 33–48.
- [88] Ma K, Thauer RK. Purification and properties of N^5 , N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 191(1): 187–193.
- [89] Ma K, Linder D, Stetter KO, Thauer RK. Purification and properties of N^5 , N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin reductase (coenzyme F_{420} -dependent) from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*. *Archives of Microbiology*, 1991, 155(6): 593–600.
- [90] Shima S, Warkentin E, Grabarse W, Sordel M, Wicke M, Thauer RK, Ermler U. Structure of coenzyme F_{420} dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from two methanogenic archaea. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 300(4): 935–950.
- [91] Fisher AJ, Thompson TB, Thoden JB, Baldwin TO, Rayment I. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. *Journal of Biology Chemistry*, 1996, 271(36): 21956–21968.
- [92] Aufhammer SW, Warkentin E, Ermler U, Hagemeyer CH, Thauer RK, Shima S. Crystal structure of methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) in complex with coenzyme F_{420} : architecture of the F_{420} /FMN binding site of enzymes within the nonprolyl cis-peptide containing bacterial luciferase family. *Protein Science*, 2005, 14(7): 1840–1849.
- [93] Aufhammer SW, Warkentin E, Berk H, Shima S, Thauer RK, Ermler U. Coenzyme binding in F_{420} -dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family. *Structure*, 2004, 12(3): 361–370.
- [94] Fischer R, Gartner P, Yeliseev A, Thauer RK. N^5 -methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase in methanogenic archaeobacteria is a membrane protein. *Archives of Microbiology*, 1992, 158(3): 208–217.
- [95] Weiss DS, Gartner P, Thauer RK. The energetics and sodiumion dependence of N^5 -methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase studied with cob(I)alamin as methyl acceptor and methylcob(III)alamin as methyl donor. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 226(3): 799–809.
- [96] Müller V, Blaut M, Gottschalk G. The transmembrane electrochemical gradient of Na^+ as driving force for methanol oxidation in *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry*, 1988, 172(3): 601–606.
- [97] Peinemann S, Blaut M, Gottschalk G. ATP synthesis coupled to methane formation from methyl-CoM and H_2 catalyzed by vesicles of the methanogenic bacterial strain Gö1. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 186(1): 175–180.
- [98] Becher B, Müller V, Gottschalk G. N^5 -methyl-tetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is an $Na(+)$ -translocating membrane protein. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(23): 7656–7660.
- [99] Lienard T, Becher B, Marschall M, Bowien S, Gottschalk G. Sodium ion translocation by N^5 -methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gö1 reconstituted in ether lipid liposomes. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 239(3): 857–864.
- [100] Harms U, Thauer RK. Identification of the active site histidine in the corrinoid protein MtrA of the energy-conserving methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 250(3): 783–788.
- [101] Harms U, Weiss DS, Gartner P, Linder D, Thauer RK. The energy conserving N^5 -Methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum* is composed of eight different subunits. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 228(3): 640–648.
- [102] Gartner P, Ecker A, Fischer R, Linder D, Fuchs G, Thauer RK. Purification and properties of N^5 -methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 213(1): 537–545.
- [103] 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*. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235(3): 653–659.
- [104] Harmer U, Thauer RK. The corrinoid-containing 23-kDa subunit MtrA of the energy-conserving

- N⁵-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermionutotrophicum*-EPR spectroscopic evidence for a histidine residue as a cobalt ligand of the cobamide. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 241: 149–154.
- [105] Hippler B, Thauer RK. The energy conserving methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase complex from methanogenic archaea: function of the subunit MtrH. *FEBS Letters*, 1999, 449(2-3): 165–168.
- [106] Vallee BL, Auld DS. Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 89: 220–224.
- [107] Berardino MD, Dimroth P. Aspartate 203 of the oxaloacetate decarboxylase β -subunit catalyses both the chemical and vectorial reaction of the Na⁺ pump. *The EMBO Journal*, 1996, 15(8): 1842–1849.
- [108] Gartner P, Weiss DS, Harms U, Thauer RK. N⁵-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 226(2): 465–472.
- [109] Friedmann HC, Klein A, Thauer RK. Structure and function of the nickel porphinoide, coenzyme F₄₃₀ and of its enzyme, methyl coenzyme M reductase. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, 7(3): 339–348.
- [110] Grabarse WG, Mahlert F, Shima S, Thauer RK, Ermler U. Comparison of three methyl-coenzyme M reductases from phylogenetically distant organisms: unusual amino acid modification, conservation and adaptation. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 303(2): 329–344.
- [111] Evans PN, Boyd JA, Leu AO, Woodcroft BJ, Parks DH, Hugenholtz P, Tyson GW. An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 219–232.
- [112] Ermler U, Grabarse W, Shima S, Goubeaud M, Thauer RK. Crystal structure of methyl coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science*, 1997, 278(5342): 1457–1462.
- [113] Grabarse W, Mahlert F, Duin EC, Goubeaud M, Shima S, Thauer RK, Lamzin V, Ermler U. On the mechanism of biological methane formation: structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 309(1): 315–330.
- [114] Mahlert F, Grabarse W, Kahnt J, Thauer RK, Duin EC. The nickel enzyme methyl-coenzyme M reductase from methanogenic archaea: in vitro interconversions among the EPR detectable MCR-red1 and MCR-red2 states. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2002, 7(1-2): 101–112.
- [115] Finazzo C, Harmer J, Jaun B, Duin EC, Mahlert F, Thauer RK, Doorslaer VS, Schweiger A. Coenzyme B induced coordination of coenzyme M via its thiol group to Ni(I) of F₄₃₀ in active methyl-coenzyme M reductase. *Journal of American Chemical Society*, 2003, 125(17): 4988–4989.
- [116] Finazzo C, Harmer J, Jaun B, Duin EC, Mahlert F, Thauer RK, Doorslaer VS, Schweiger A. Characterization of the MCR_{red2} form of methyl-coenzyme M reductase: a pulse EPR and ENDOR study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2003, 8(5): 586–593.
- [117] Duin EC, Signor L, Piskorski R, Mahlert F, Clay MD, Goenrich M, Thauer RK, Jaun B, Johnson MK. Spectroscopic investigation of the nickel-containing porphinoide cofactor F₄₃₀. Comparison of the free cofactor in the +1, +2 and +3 oxidation states with the cofactor bound to methyl-coenzyme M reductase in the silent, red and ox forms. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2004, 9(5): 563–576.
- [118] Goenrich M, Mahlert F, Duin EC, Bauer C, Jaun B, Thauer RK. Probing the reactivity of Ni in the active site of methyl-coenzyme M reductase with substrate analogues. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2004, 9(6): 691–705.
- [119] Wagner T, Kahnt J, Ermler U, Shima S. Didehydroaspartate modification in methyl-coenzyme M reductase catalyzing methane formation. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(36): 10630–10633.
- [120] Shima S, Krueger M, Weinert T, Demmer U, Kahnt J, Thauer RK, Ermler U. Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*, 2012, 481(7379): 98–101.
- [121] Kahnt J, Buchenau B, Mahlert F, Krueger M, Shima S, Thauer RK. Post-translational modifications in the active site region of methyl-coenzyme M reductase from methanogenic and methanotrophic archaea. *FEBS Journal*, 2007, 274(18): 4913–4921.
- [122] Thauer RK. Methyl (alkyl)-coenzyme M reductases: nickel F₄₃₀-containing enzymes involved in anaerobic methane

- formation and in anaerobic oxidation of methane or of short chain alkanes. *Biochemistry*, 2019: 1–23.
- [123] Selmer T, Kahnt J, Goubeaud M, Shima S, Grabarse W, Ermler U, Thauer RK. The biosynthesis of methylated amino acids in the active site region of methyl-coenzyme M reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(6): 3755–3760.
- [124] Harmer J, Finazzo C, Piskorski R, Bauer C, Jaun B, Duin EC, Goenrich M, Thauer RK, Van Doorslaer S, Schweiger A. Spin density and coenzyme M coordination geometry of the ox1 form of methyl-coenzyme M reductase: a pulse EPR study. *Journal of American Chemical Society*, 2005, 127(50): 17744–17755.
- [125] Harmer J, Finazzo C, Piskorski R, Ebner S, Duin EC, Goenrich M, Thauer RK, Reiher M, Schweiger A, Hinderberger D, Jaun B. A nickel hydride complex in the active site of methyl-coenzyme M reductase: implications for the catalytic cycle. *Journal of American Chemical Society*, 2008, 130(33): 10907–10920.
- [126] Wongnate T, Sliwa D, Ginovska B, Smith D, Wolf MW, Lehnert N, Raugei S, Ragsdale SW. The radical mechanism of biological methane synthesis by methylcoenzyme M reductase. *Science*, 2016, 352(6288): 953–958.
- [127] Pelmeshnikov V, Blomberg MRA, Siegbahn PEM, Crabtree RH. A mechanism from quantum chemical studies for methane formation in methanogenesis. *Journal of American Chemical Society*, 2002, 124: 4039–4049.
- [128] Setzke E, Hedderich R, Heiden S, Thauer RK. H₂: heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum* composition and properties. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 220(1): 139–148.
- [129] Kaster AK, Moll J, Parey K, Thauer RK. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(7): 2981–2986.
- [130] Heiden S, Hedderich R, Setzke E, Thauer RK. Purification of a cytochrome b containing H₂:heterodisulfide oxidoreductase complex from membranes of *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 213(1): 529–535.
- [131] Heiden S, Hedderich R, Setzke E, Thauer RK. Purification of a two-subunit cytochrome-b-containing heterodisulfide reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 221(2): 855–861.
- [132] Deppenmeier U, Blaut M, Schmidt B, Gottschalk G. Purification and properties of a F₄₂₀-nonreactive, membrane-bound hydrogenase from *Methanosarcina* strain Gö1. *Archives of Microbiology*, 1992, 157(6): 505–511.
- [133] Deppenmeier U, Blaut M, Lentjes S, Herzberg C, Gottschalk G. Analysis of the vhoGAC and vhtGAC operons from *Methanosarcina mazei* strain Gö1, both encoding a membrane-bound hydrogenase and a cytochrome b. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 227(1/2): 261–269.
- [134] Deppenmeier U. Different structure and expression of the operons encoding the membrane-bound hydrogenases from *Methanosarcina mazei* Gö1. *Archives of Microbiology*, 1995, 164(5): 370–376.
- [135] Kunkel A, Vaupel M, Heim S, Thauer RK, Hedderich R. Heterodisulfide reductase from methanol-grown cells of *Methanosarcina barkeri* is not a flavoenzyme. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 244(1): 226–234.
- [136] Tersteegen A, Hedderich R. *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 264: 930–943.
- [137] Bott M, Thauer RK. Proton-motive-force-driven formation of CO from CO₂ and H₂ in methanogenic bacteria. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 168(2): 407–412.
- [138] Kunkel A, Vorholt JA, Thauer RK, Hedderich R. An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 252(3): 467–476.
- [139] Meuer J, Bartoschek S, Koch J, Kunkel A, Hedderich R. Purification and catalytic properties of ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265(1): 325–335.

Recent advances in hydrogenotrophic methanogenesis

Huan Leng, Qing Yang, Gangfeng Huang, Liping Bai*

Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Abstract: Methanogens are a group of extremely anaerobic microorganisms affiliated with the archaeal domain. They use simple compounds such as carbon dioxide, acetate and methyl compounds as substrate to grow. Hydrogenotrophic methanogens is the main type in all the cultured species. Among the three major methanogenic pathways, the hydrogenotrophic methanogenesis shows the highest energy productivity and includes a special energy metabolism system. In recent years, with the development and application of mass spectrum, spectroscopy and crystallization technology, the research on the methanogenic pathway has been further studied, especially in the biochemical mechanism of hydrogenotrophic methanogenesis, which revealing a unique and efficient way of energy conversation under extreme environment. Based on the massive research results, this review summarizes the details of hydrogenotrophic methanogenesis from the aspects of energy storage, metabolic pathways, enzyme structures and catalytic mechanism of enzymatic reactions. The prospect for the future research and technological development in the field of methanogenesis is also proposed in this review.

Keywords: methanogens, hydrogenotrophic methanogenesis, energy conservation, protein structure, catalytic mechanism

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970066), by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (Y2019XK23-02) and by the The National Agricultural Science and Technology Center, Chengdu (NASC2019TI01)

*Corresponding author. Tel: +86-28-85228239; E-mail: bailiping@caas.cn

Received: 7 December 2019; Revised: 3 April 2020; Published online: 15 June 2020