



产甲烷菌的辅酶

许宝孝

(上海技术师范学院生物系)

产甲烷菌是迄今所知最严格的厌氧菌：它不仅必须在无氧条件下才能生长，而且只有当氧化还原电位低于-330mV时才产甲烷。它们从简单的碳化合物转化成为甲烷的过程中获得生长所需的能量。产甲烷菌能够利用的基质范围很窄^[1]。绝大多数产甲烷菌从 H₂ 还原 CO₂ 生成甲烷的过程中获取能量。

产甲烷菌在生长和产甲烷过程中有一整套作为 C₁ 和电子载体的辅酶(表 1)^[1]。有些是产甲烷菌与非产甲烷菌所共有的，例如，ATP, FAD, 铁氧还蛋白, 细胞色素和维生素 B₁₂。这些辅酶在甲烷形成过程中的作用似乎不大。

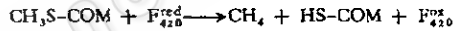
本文就产甲烷菌所独有的辅酶：辅酶 F₄₂₀, 甲烷蝶呤, 甲烷咪唑, 辅酶 M 以及 F₄₃₀ 因子的结构与功能作一综述。

(一) 产甲烷菌特有的辅酶

1. 辅酶 F₄₂₀: 辅酶 F₄₂₀ (以前叫做 F₄₂₂ 因子) 是一种具绿色荧光的化合物^[13]。它是一种去氮黄素衍生

物, 由 7,8-二去甲基-8-羟基-5-去氮核黄素 5'-磷酸, 乳酸和 2 分子谷氨酸缩合而成^[4]。分子中有一条很长的 N-(N-L-乳酰-γ-L-谷氨酰)-L-谷氨酸侧链, 通过磷酸酯键与 7,8-二去甲基-8-羟基-5-去氮核黄素 5'-磷酸相连, 侧链末端为 L-谷氨酸残基(图 1)。因此, 辅酶 F₄₂₀ 与黄素单核苷酸 (FMN) 和叶酸有某些类似性质。

辅酶 F₄₂₀ 是一种低电位电子载体(中点氧化还原电位 E_m⁰ = -340mV), 它参与双电子转移反应(图 2)^[11]。它是氢化酶, 甲酸脱氢酶和 CO 脱氢酶的电子受体, NADP⁺ 还原酶的电子供体。它还是碳素合成时丙酮酸合酶和 α-酮戊二酸合酶催化合成丙酮酸和 α-酮戊二酸时, 和 CO₂ 还原的最后一步, 甲基辅酶 M 还原成甲烷时的电子供体



所以, 辅酶 F₄₂₀ 作为依赖于 NADPH 的氢化酶系统, 甲酸氢解酶系统 (HCOOH ⇌ H₂ + CO₂), 或者丙酮

表 1 产甲烷菌的辅酶^[1]

辅 酶	特征性结构成分	功 能	类 似 物
CO ₂ 还原因子	对位取代的酚, 咪唑, 甲酰胺	甲酰水平上的 C ₁ 载体	无
(四氢)甲烷蝶呤	7-甲基蝶呤, 对位取代的苯胺	甲酰, 甲叉和甲基水平上的 C ₁ 载体	四氢叶酸
辅酶 M	2-巯基乙烷磺酸	甲基水平上的 C ₁ 载体	无
F ₄₃₀ 因子	Ni-四吡咯卟吩型结合	末端步骤中的辅酶	无
辅酶 F ₄₂₀	5-去氮核黄素	电子载体	黄素, NAD
B 组份	未知	末端步骤中的辅酶	未知
因子 III	5-羟苯并咪唑钴胺	甲基水平上的 C ₁ 载体	5,6-二甲苯并咪唑钴胺 (B ₁₂)
细胞色素, 铁氧还蛋白, FAD, ATP		辅酶作用不大	

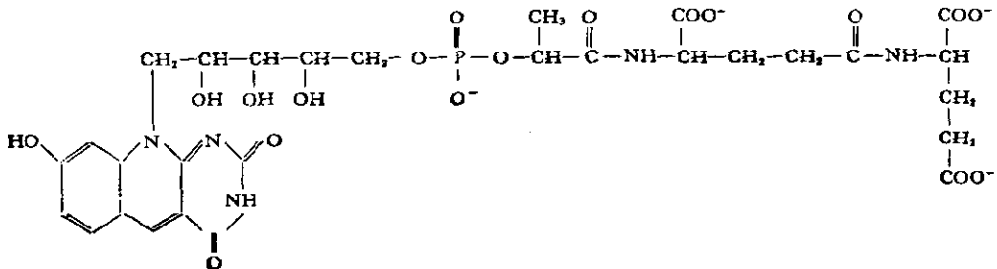


图 1 辅酶 F₄₂₀ 的结构式

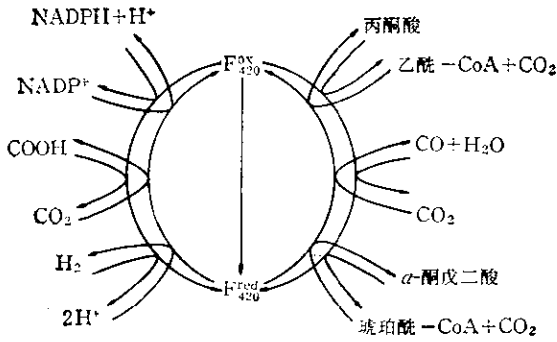


图2 产甲烷菌中有辅酶 F_{420} 参加的反应^[12]

酸或 α -酮戊二酸合酶系统的部分起作用(见图2)。事实上,辅酶 F_{420} 的作用与其它厌氧菌中的铁氧还蛋白是一样的。

辅酶 F_{420} 还是高温自养甲烷杆菌光复活酶的发色团^[6]。

最近发现,辅酶 F_{420} 不是产甲烷菌所独有的。灰色链霉菌,金霉素链霉菌以及鸟分枝杆菌中也有辅酶 F_{420} 。不过,辅酶 F_{420} 在不同生物中所起的作用不一样。

2. 甲烷蝶呤 (Methanopterin):1978年, Gunsalus 和 Wolfe 描述了高温自养甲烷杆菌中有一种新的发蓝色荧光的因子 (F_{342})^[17]。同时, Daniels 和 Zeikus 描述了另外一种新的黄色荧光化合物 (YFC)。他们观察到,用 ^{14}C 作短期(2—20秒)标记试验时,有 25—50% 的标记固定到这种黄色荧光化合物中,这表明, YFC 是早期的一种中间产物^[8]。后来, Keltjens 和 Vogels 指出这些化合物都是新的蝶呤衍生物,并且阐明了彼此之间的关系。在非还原条件下保温时, YFC(5, 10-甲川-5, 6, 7, 8-四氢甲烷蝶呤, 缩写为 5, 10-甲川-THMP) 转变成蓝色荧光化合物——甲烷蝶呤^[9, 10]。 F_{342} 的发色因子是一种天然产物或甲烷蝶呤的前体, 7-甲基蝶呤^[11]。高温自养甲烷杆菌的甲烷蝶呤由核糖醇,核糖-5'-磷酸, 戊二酸, C_6 -与 C_7 -位上取代的蝶呤以及苯胺组成。化学名称为 N-[1'-(2"-氨基-4"-羟基-7"-甲基-6"-蝶啶基)乙基-4[2', 3', 4', 5'-四羟基戊糖-1'-基 (5'→1')0- α -呋喃核糖-5'-磷酸]苯胺, 分子中的磷酸基与 α -羟基戊二酸酯化^[12]。巴氏甲烷八叠球菌的甲烷蝶呤在 α -羟基戊二酸上还连有一个谷氨酸残基^[13]。

甲烷蝶呤与 5, 10-甲川-THMP 不仅在代谢上关系密切,而且在结构上也极其相似。两者之间的区别是,蝶呤部分的还原状态不同,5, 10-甲川-THMP 中还有一个以甲川(=CH-)基存在的 C_1 单位。这个 C_1 单位来自碳酸氢盐。

甲基辅酶 M 促进 CO_2 还原生成甲烷的所谓 RPG

效应需要有两种对热和氧稳定的化合物的协同作用。其中的一种化合物就是甲烷蝶呤^[14]。高温自养甲烷杆菌细胞抽提液在有一种对氧不稳定的辅因子以及所谓的甲醛激活因子 (FAF) 存在的条件下经由甲叉-FAF, 甲酰-FAF 以及甲基-FAF 由甲醛形成甲烷。FAF 及其衍生物实际上就是 5, 6, 7, 8-四氢甲烷蝶呤及其相应的衍生物^[15]。这些结果清楚地表明,甲烷蝶呤是产甲烷菌还原 CO_2 生成甲烷时的 C_1 载体。甲烷蝶呤与叶酸结构上的相似性,和四氢甲烷蝶呤的 5, 10-甲叉, 5, 10-甲川, 10-甲酰以及 5-甲基衍生物是 CO_2 还原成为甲烷过程中的中间产物^[16]表明,甲烷蝶呤以类似于叶酸的生化方式参与作用。甲烷蝶呤衍生物不仅是 C_1 载体,而且还提供细胞碳素合成时的部分材料,除此之外,还可能在有叶酸参与的反应(例如,嘌呤,胸苷酸和丝氨酸等重要物质的合成)中起作用。

3. 甲烷呋喃 (Methanofuran) 或者 CO_2 还原因子: RPG 效应需要两种对热和氧稳定的化合物的协同作用。一种是上面所述的甲烷蝶呤,还有一种是 CO_2 还原所必需的因子,故名 CO_2 还原因子(CDR因子)^[14]。它是 Romesser 和 Wolfe 于 1982 年在高温自养甲烷杆菌中发现的^[11]。这是一种耐热,可透析的新辅酶。1983年, Leigh 弄清了它的结构,它的化学名称是 4-[N-(4, 5, 6, 7-三羧庚酰- γ -L-谷酰- γ -L-谷酰)-P-(β -氨基乙基)苯氧甲基]- α -(氨基)呋喃,简称甲烷呋喃^[14]。CDR 因子以游离胺式和甲酰胺式两种形式存在。甲酰胺式 CDR 因子中的甲酰基来自 CO_2 , 在没有甲烷蝶呤存在的情况下与 H_2/CO_2 一起保温,反应混合物中就有甲酰胺式 CDR 因子积累。这表明,CDR 因子在 THMP 衍生物之前起着 C_1 载体的作用。

因而, CO_2 还原成为甲烷的初级步骤可能包括, CDR 因子甲酰化,然后,甲酰基转移给 THMP 生成 5-甲酰-THMP 或者 10-甲酰-THMP。脱水闭环形成 5, 10-甲川-THMP, 再经过连续两步还原顺序形成甲叉-THMP 和 5-甲基-THMP。

4. 辅酶 M (CoM): 1970年, McBride 和 Wolfe 发现,布氏甲烷杆菌由 H_2/CO_2 生成甲烷的最末一步转甲基反应需要一种辅因子^[17]。1974年, Taylor 和 Wolfe 鉴定它为一种新的辅酶,并称之为辅酶 M。它的化学结构为 2-巯基乙烷磺酸, $HS-CH_2CH_2SO_3^-$ ^[20]。辅酶 M 是已知辅酶中最小的一种,含流量特别高(~45%),强酸性,对热和酸稳定,无荧光,在 260nm 处有最大的吸收值

辅酶 M (简称为 CoM) 以下列 3 种形式存在(表 2)。

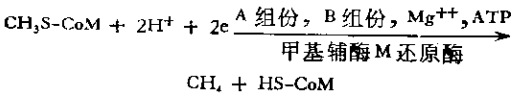
HS-CoM 为 CoM 的原型。CoM 在空气中极易氧化成为 2,2'-二硫二乙烷磺酸(S-CoM)₂。在 NADPH-(S-CoM)₂ 还原酶的作用下, (S-CoM)₂ 还原成为活性 HS-CoM。在转甲基酶的作用下, HS-CoM 甲基化形成

表 2 辅酶 M 的三种形式

简 写	化 学 结 构	化 学 名 称
HS-CoM	HS-CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻	2-巯基乙烷磺酸
(S-CoM) ₂	O ₃ SCH ₂ CH ₂ S-SCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻	2, 2'-二硫二乙烷磺酸
CH ₃ -S-CoM	CH ₃ S-CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻	2-(甲基硫)乙烷磺酸

CH₃S-CoM。

CoM 是甲烷形成时的末端甲基载体，一种转甲基辅酶。CoM 先甲基化形成 CH₃S-CoM，然后，在一个含 CoMF₄₃₀ (一种 CoM-F₄₃₀ 因子复合物，见下面 F₄₃₀ 因子)的甲基还原酶系统的作用下还原成为甲烷^[21-23]



这个反应为一个由酶和辅因子组成的复杂系统所催化^[24]。A 组份是一种具有氢化酶活力的蛋白质复合物。B 组份是一种对氧敏感和对热稳定的辅因子^[25]，分子量为 1000，而且含有腺苷。B 组份是还原酶系统的一个必要组份，不能为任何已知的辅酶所代替，因此，也有人将它单独列为产甲烷菌的一种辅酶(表 1)。

5. F₄₃₀ 因子: F₄₃₀ 因子是由 Gunsalus 和 Wolfe 发现的一种含镍的，低分子量黄色化合物^[27]。它是一种具有镍四吡咯结构的化合物。经羧甲基和羧乙基甲基化修饰的发色团结构^[28]。用温和拍提纯化方法得到的 F₄₃₀ 因子，以及由纯甲基辅酶 M 还原酶分离到的 F₄₃₀ 都含有辅酶 M^[23]，或者甲基辅酶 M^[29]。辅酶 M-F₄₃₀ 因子复合物叫做 CoM F₄₃₀^[23]。它作为辅基与甲基辅酶 M 还原酶紧密结合，F₄₃₀ 作为甲基还原酶系统的一种辅因子参与甲烷形成^[21-23]，但其确切功能尚未确定。

(二) 一个由 H₂ 和 CO₂ 形成甲烷的模型

除了几个例外，迄今所知的所有产甲烷菌都能利用 H₂ 还原 CO₂ 产生甲烷，并从中获取能量。CO₂ 还原经由甲酰，甲醛和甲基的还原水平进行。在这个过程中，这些 C₁ 单位不是以游离的中间产物存在，而是与上述一些产甲烷菌所独有的辅酶结合在一起。

虽然由 CO₂ 生成甲烷的大部分途径可以用有 CDR 因子，THMP 和辅酶 M 衍生物参与的反应得到阐明，但其中 CO₂ 活化和结合的方式，以及后来还原成甲酰状态等方面的问题还不清楚。因为只有 CDR 因子和甲烷蝶呤在辅酶水平上起作用^[31]，所以，CO₂ 一定结合在蛋白质部分上。Wolfé 和 Romesser^[29, 32] 根据 RPG 效应认为，甲烷形成的最后一步与第一步，即甲基辅酶 M 的还原与 CO₂ 活化直接偶联。Keltjens 认

为，CO₂ 活化发生在甲基辅酶 M。他根据现有关于参与甲烷形成的辅酶的知识，CO₂ 活化发生在甲基辅酶 M 的假定，以及 Romesser 原先提出的模型，提出了一个更为详细的模型(图 3)^[30]。

如前所述，甲基辅酶 M 还原酶的辅基 CoMF₄₃₀ 中的 F₄₃₀ 可能以 pM F₄₃₀ 方式存在。如果与 F₄₃₀ 因子的发色团结合的甲基辅酶 M 还原时发生单电子还原，那末，形成甲烷时就留下一个反应活跃的巯基。该基可以与 CO₂ 反应生成一个硫羧基。假如这时发生第 2 次单电子还原，并伴随着与 CDR 因子的反应，那末，CDR 因子的硫代氨基甲酸就与 CoM F₄₃₀ 形成复合物。再经过一次单电子还原，生成甲酰按式 CDR 因子和 1 个巯基。CDR 因子与 CoM F₄₃₀ 形成功能复合物是 Keltjens 模型的关键。

绝大多数产甲烷菌利用 CO₂ 作为电子受体，从 H₂ 的厌氧氧化获得生长所需能量，并产生甲烷。参与

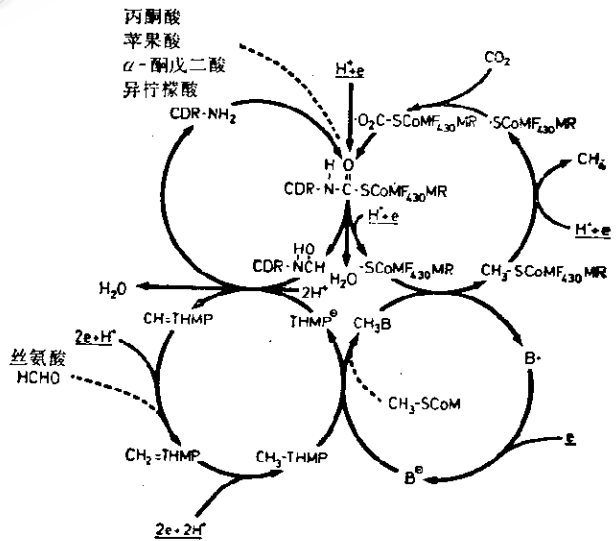


图 3 CO₂ 还原成甲烷的模型^[30]

(CH₃-)S-CoM F₄₃₀MR 为(甲基)辅酶 M F₄₃₀-甲基辅酶 M 还原酶复合物; CDR-NH₂, CDR-NHCHO 分别为胺式和甲酰按式 CDR 因子; CH₂-S-CoM, CH₃-S-CoM, CH₃-THMP 分别为 S, 10-甲川-, 甲叉和甲基-四氢蝶呤; B 为 B 组份

这条 CO₂ 还原途径的一些辅酶的结构与生化功能虽然已经得到阐明,但是,整条途径和其它辅因子在代谢中作用的细节还知道得不多。而对利用 H₂/CO₂ 外的其它基质产甲烷的过程知道得更少。许多在氧化还原方面起作用的辅因子(包括产甲烷菌独有和与真细菌共有的)的鉴定以及它们的功能均有待于进一步阐明。

参 考 文 献

[1] Vogels, G. D. et al.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **50**: 557—567, 1984.

[2] Holder, U. et al.: *Arch. Microbiol.*, **141**: 229—238, 1985.

[3] Cheeseman, P. et al.: *J. Bacteriol.*, **112**: 527—531, 1972.

[4] Eirich, L. D. et al.: *Biochemistry*, **17**: 4583—4593, 1978.

[5] Large, P. J.: *Methylotrophy and Methanogenesis*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1983.

[6] Kiener, A. et al.: *Arch. Microbiol.*, **143**: 147—150, 1985.

[7] Gunsalus, R. P. and R. S. Wolfe: *FEMS Microbiol. Lett.*, **3**: 191—193, 1978.

[8] Daniels, L. and J. G. Zeikus: *J. Bacteriol.*, **136**: 75—84, 1978.

[9] Keltjens, J. T. and G. D. Vogels: *Microbial Growth on C₁ Compounds*. Heyden, London, pp. 152—158, 1981.

[10] Vogels, G. D. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg., Abt. 1, Orig.*, **C3**: 258—264, 1982.

[11] Keltjens, J. T. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **20**: 259—262, 1983.

[12] Van Beelen, P. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **138**: 563—571, 1984.

[13] Van Beelen, P. et al.: *ibid*, **139**: 359—365, 1984.

[14] Leigh, J. A. and R. S. Wolfe: *J. Biol. Chem.*, **258**: 7536—7540, 1983.

[15] Escalante, Semerena, J. C.: *In vitro methanogenesis from formaldehyde. Identification of three C₁ intermediates of the methanogenic pathway*, Ph. D. Thesis, University of Illinois, Urbana, 1983.

[16] Vogels, G. D. et al.: *Microbial Growth on C₁ Compounds*, Washington, D. C. pp. 182—187, 1984.

[17] Romesser, J. A. and R. S. Wolfe: *Zbl. Bakt. Hyg., Abt. 1, Orig.*, **C3**: 271—276, 1982.

[18] Leigh, J. A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **106**: 3636—3640, 1984.

[19] McBride, B. C. and R. S. Wolfe: *Biochemistry*, **10**: 2317—2324, 1971.

[20] Taylor, C. D. and R. S. Wolfe: *J. Biol. Chem.*, **249**: 4879—4885, 1974.

[21] Gunsalus, R. P. and R. S. Wolfe: *J. Bacteriol.*, **135**: 851—857, 1978.

[22] Ellefson, W. L. and R. S. Wolfe: *J. Biol. Chem.*, **255**: 8388—8389, 1980.

[23] Keltjens, J. T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**: 495—503, 1982.

[24] Gunsalus, R. P. and R. S. Wolfe: *J. Biol. Chem.*, **225**: 1891—1895, 1980.

[25] Pfaltz, A. et al.: *Helv. Chim. Acta.*, **65**: 828—865, 1982.

[26] Keltjens, J. T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **743**: 351—358, 1983.

[27] Keltjens, J. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**: 235—253, 1983.

[28] Romesser, J. A.: *The Activation and Reduction of Carbon Dioxide to Methane in Methanobacterium thermoautotrophicum*, Ph. D. Thesis, University of Illinois, Urbana, 1978.

[29] Romesser, J. A. and R. S. Wolfe: *J. Bacteriol.*, **152**: 840—847, 1982.

[30] Keltjens, J. T.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **50**: