



甲烷氧化菌素研究进展

龙朝琳^{1†}, 李守杰^{1†}, 康博², 程伟^{1,2*}

1. 四川大学华西医院呼吸与危重症医学科, 疾病分子网络前沿科学中心, 呼吸感染与干预研究室, 成都 610041;

2. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 成都 610041

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: chengwei669@scu.edu.cn

2023-01-03 收稿, 2023-03-30 修回, 2023-03-31 接受, 2023-04-03 网络版发表

国家自然科学基金(32225001, 81930125)资助

摘要 甲烷氧化菌素(methanobactin, Mbn)最早发现于甲烷氧化菌, 是一类由核糖体合成的翻译后修饰肽, 其特征是特定的半胱氨酸残基被修饰成恶唑酮-硫代酰胺基团. Mbn对铜离子具有高度亲和性, 在甲烷氧化菌的铜稳态生理调控中发挥了重要的作用. 近年, 在其他种属的细菌中也发现了Mbn操纵子的存在, 并根据系统发育分析将其分为五大类(groups I–V). 目前已经分离鉴定的Mbn既有结构的保守性, 也有序列的特异性. 除了铜整合特性, Mbn还被证明具有氧化酶活性、解汞毒能力以及抑菌作用等, 尤其在治疗铜代谢相关疾病、细菌感染性疾病等方面具有潜在的开发价值. 本文对Mbn的种类、结构、生物合成机制和生物学功能等方面的研究成果进行综述, 并展望其应用前景, 旨在为Mbn的开发应用提供理论指导和科学支撑.

关键词 甲烷氧化菌素, 铜稳态, 结构与功能, 生物合成

甲烷氧化菌素(methanobactin, Mbn)是一种核糖体产生的翻译后修饰肽类天然产物(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs), 通过恶唑酮-硫代酰胺基团与铜离子高度亲和, 是一种金属整合剂^[1–3]. Mbn最早发现于甲烷氧化菌*Methylosinus(Ms) trichosporium* OB3b中, 随着研究的深入, 越来越多的Mbn被分离鉴定, 近期通过生物信息学手段发现Mbn操纵子也存在于多种非甲烷氧化细菌中^[4,5]. 研究人员通过对操纵子核心组分*mbnA*、*mbnB*和*mbnC*的系统发育与相邻基因的组成、排列方式的分析将Mbn操纵子分为五大类(groups I–V). 此外, 一些物种中同时含有几类不同的Mbn^[5]. MbnA是Mbn前体肽, 由N端的前导肽(lead peptide, LP)和C端的核心肽(core peptide, CP)组成; MbnB是一种含铁酶, 直接参与MbnA的翻译后修饰; MbnC主要参与MbnA的识别和结合^[6,7]. MbnB

和MbnC以蛋白复合体的形式组成Mbn生物合成核心蛋白机器, 负责对MbnA CP上的半胱氨酸(cysteine)及其相邻残基进行恶唑酮-硫代酰胺基团的装配, 修饰后的MbnA LP被切除, 生成具有生物学活性的Mbn, 然而, 切除机制尚不清晰^[6,7].

迄今为止, 研究人员已经从I类和II类甲烷氧化菌发酵液中分离鉴定了近10种Mbn. 来自不同菌株的Mbn虽然具有序列差异性, 其结构却高度保守, 均含有与铜离子相互作用的恶唑酮-硫代酰胺基团^[3,8–11]. 目前, 研究最深入的是来自于甲烷氧化菌*Ms. trichosporium* OB3b的Mbn(MsMbn), 当菌体缺乏铜时, Mbn被分泌到胞外结合环境中的铜离子, 然后以Mbn-Cu复合物形式将铜离子运送至菌体内, 调控铜稳态. 除了参与菌体铜稳态的调控, Mbn还具有其他广泛的功能活性^[1–3]. 如Mbn-Cu复合物已被证明具有氧化酶、超氧化物歧化

引用格式: 龙朝琳, 李守杰, 康博, 等. 甲烷氧化菌素研究进展. 科学通报, 2023, 68: 2737–2747

Long C L, Li S J, Kang B, et al. Advances in methanobactin (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 2737–2747, doi: [10.1360/TB-2023-0006](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0006)

酶和过氧化氢还原酶活性^[12]。有研究显示, Mbn具有结合金、汞等重金属的能力, 在生态环境治理方面具有应用价值^[13~17]; 并且它还对一些革兰氏阳性菌表现出生长抑制作用, 有望被开发为临床抗菌药物^[2,18,19]; 同时, 一些临床前研究表明, 其可被应用于金属离子紊乱引起的临床疾病, 如威尔逊氏病(Wilson's disease, WD)^[20~23]。本文从Mbn的种类、结构、生物合成及生物学功能等方面进行综述, 旨在为Mbn的生物工程合成提供科学支撑, 加速Mbn的开发和实际应用。

1 Mbn的结构特征

前期, 研究人员使用X射线晶体学和/或核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)对几种来自甲烷氧化菌的 I 类和 II 类Mbn进行了结构表征^[3,8~11], 初步表明了其化学修饰的多样性, 也为研究Mbn的生物合成途径提供了初步的线索。

1.1 Mbn的结构异同性

2004年, Kim等人^[1]在铜饥饿的条件下从*Ms. trichosporium* OB3b中提纯到第一个Mbn, 分子量大小为1172 Da。通过X射线晶体衍射初步确定了其结构: 分子式为 $C_{45}N_{12}O_{14}H_{62}Cu$ 。此多肽骨架包含两个发色基团, 这两个发色基团起初被鉴定为羟基咪唑酮环-硫代羰基, 其中一个与异丙酯相邻, 另一个连接到吡咯烷环, 两个修饰基团提供的 N_2S_2 位点与单个 Cu^I 离子配位, 呈现扭曲的四面体^[1,24,25]。随后, Behling等人^[3]利用NMR、质谱和化学手段对MsMbn的结构进行了修正, 将两个发色基团的核心确定为恶唑酮而非之前的咪唑酮(图1), 修正后的结构与质谱结果一致。这些恶唑酮-硫代酰胺基团直接参与Mbn和 Cu^I 或其他金属的结合, 它们的精确结构对准确和详细地了解Mbn的生化活性至关重要。

目前为止, 科学家从多种甲烷氧化菌中分离到Mbns, 包括*Ms. trichosporium* OB3b(Group I)、*Methylocystis* sp. SB2(Group II a)、*Methylocystis hirsuta* CSC1(Group II a)、*Methylocystis rosea* SV97(Group II a)、*Methylocystis* sp. M(Group II a)、*Methylosinus* sp. LW4(Group I)和*Methylosinus* sp. LW3(Group I)^[3,8~11]。通过结构测定发现, 所有的Mbns均可与铜离子配位。图2展示了2个Mbn-Cu的结构, 包括图1展示的MsMbn在内, 这些Mbn的结构共性是一对双齿配体, 每

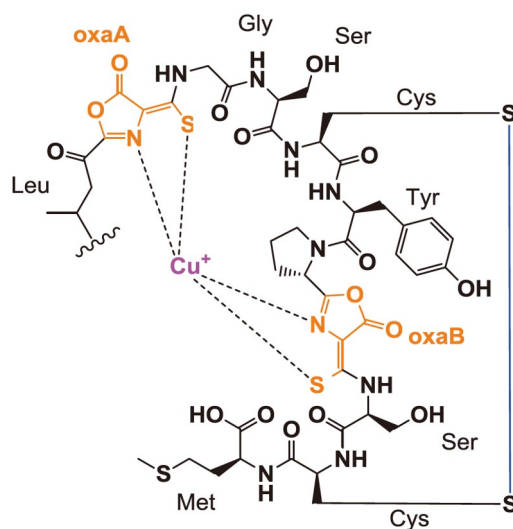


图1 Mbn的代表结构。橙色: 恶唑酮-硫代酰胺; 黑色虚线: Mbn与 Cu^I 形成的配位键; 蓝色实线: 二硫键

Figure 1 Representative structure of Mbn. Orange indicates oxazalone-thioamide; the black dotted line indicates the coordination bond formed by Mbn and Cu^I ; the blue solid line indicates the disulfide bond

个配体包含一个杂环与邻近的硫代酰胺偶联, 都以极高的亲和力结合铜。两个杂环中一个是五元恶唑酮环, 另一个是五元环恶唑酮或咪唑酮, 或六元环吡嗪二酮, 每种杂环都具有相关的硫代酰胺基团, 两个修饰基团之间一般间隔2~5个氨基酸。除了上述杂环和硫代酰胺基团外, Mbns还可能具有磺化苏氨酸、分子内二硫键、N端羰基以及其他尚未确定的修饰。综上所述, Mbn构成了一组结构多样的肽衍生分子, 它们均含有一对具有硫代酰胺基团的氮杂环, 能够结合、还原和稳定铜离子。

1.2 Mbn的特征性吸收光谱

El Ghazouani等人^[26]研究了Mbn的吸收光谱特性: 未结合铜离子的Mbn在紫外-可见光吸收光谱上具有两个明显的吸收峰, 分别在340和394 nm处, 推测是源于恶唑酮B和恶唑酮A的形成。LW3 Mbn由于吡嗪二酮的存在, 还具有387 nm处的吸收峰^[11]。当暴露在过量铜离子中, Mbn的恶唑酮和吡嗪二酮吸收峰均下降且峰形变宽, 460 nm处开始出现铜吸收峰^[8,11,27]。恶唑酮环在酸性环境下易被水解, 特征性吸收峰逐渐降低至完全消失^[8,10]。不同的吸收光谱特征预示着不同的结构、功能或稳定性, 这些特征有助于新型Mbn的快速鉴定和分类。

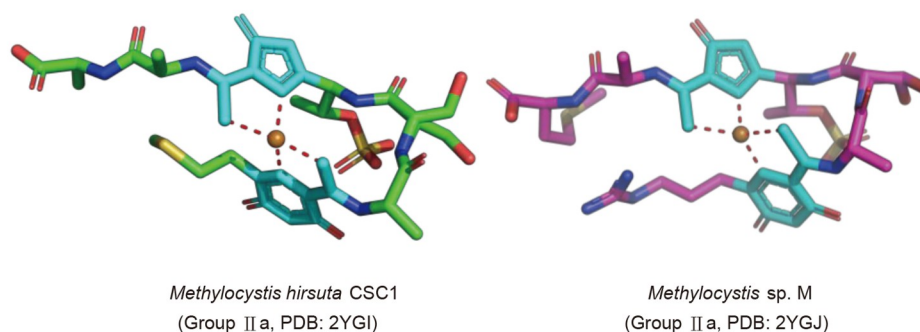


图2 两种菌株来源的Mbn-Cu的结构. 青色: 修饰的残基; 红色虚线: Mbn与Cu^I形成的配位键

Figure 2 The structure of copper-chelated Mbn from two strains. Cyan indicates modified residues; the red dotted line indicates the coordination bond formed by Mbn and Cu^I

2 Mbn的生物合成

Mbn的结构除了含氮杂环-硫代酰胺基团外, 其余部分均是由氨基酸组成的肽骨架, 属于肽类天然产物. 肽类天然产物包括RiPP和多模块合成的非核糖体肽(non-ribosomal peptide, NRP)^[28]. 尽管Mbn被发现近30年, 但其合成机制一直不明确. 随着各类Mbn的结构解析、基因组大规模测序的开展以及生物信息学的发展, 编码Mbn底物前体、修饰酶等元件的基因簇被挖掘, 为Mbn生物合成机制的阐明奠定了基础.

2.1 Mbn前体肽挖掘与分类

RiPP类天然产物的前体肽由核糖体合成, 包含一个N端区域LP和一个C端区域CP. LP通常介导底物和修饰酶的结合, 修饰完成后会经蛋白水解去除, 而CP以位点特异性方式进行翻译后修饰, 最终转化为成熟的RiPP. 根据MsMbn的晶体结构, Behling等人^[3]提出其起始肽序列为LSGSCYPSSCM. 后来在*Ms. trichosporium* OB3b的基因组中鉴定到一段基因的编码产物“MTVKIAQKKVLPVIGRAAALCGSCYPCSCM”C端序列(LCGSCYPCSCM)与MsMbn的主链序列一致, 通过基因敲除验证了这段序列即为MsMbn的前体肽, 确认MsMbn属于RiPP家族, 前体肽基因被注释为*mbnA*^[29].

生物信息学、遗传和生化数据为Mbn多样性、运输和生物合成及其在甲烷氧化铜开关机制中的潜在应用提供了重要的见解. 2013年, 研究人员充分挖掘新测序的细菌基因组信息, 鉴定系列Mbn前体肽基因及功能相关的生物合成基因簇^[4]. 随着基因组数据增加, 更多的操纵子被预测出来. 截至2017年, 从甲烷氧化菌和

众多非甲烷氧化菌中已经挖掘到74个Mbn操纵子, 其中有些物种包含不止一类Mbn操纵子^[5]. MsMbn操纵子(*mbnIRTABCMNPH*)中所有基因都可被铜离子下调, 同时也受可溶性甲烷单加氧酶(soluble methane mono-oxygenase, sMMO)相关基因(*mmoRGXYBZDC*)的共同调节^[30].

Mbn操纵子的核心由*mbnA*和两个预测的生物合成基因*mbnB*、*mbnC*组成. 基于对*mbnA*、*mbnB*和*mbnC*序列的系统发育分析, 并根据相关调控基因的存在或排布, 将Mbn操纵子分为I~V类(图3)^[5]. 其中第I类操纵子不仅含有核心基因*mbnA*、*mbnB*、*mbnC*, 还含有与调控相关的基因*mbnI*和*mbnR*、与运输相关的基因*mbnT*和*mbnM*, 以及一些功能还未阐释清楚的基因*mbnP*、*mbnH*和*mbnF*等. 第II类进一步细分为两个亚类: II a和II b类, II a类的特殊之处在于*mbnA*的编码框在ECF σ 因子末端且含有多种附属基因; II b类所含基因较少, 相比II a类多了一个功能未知的基因*mbnD*. 第III类操纵子的基因组成与第I类相似, 但附加基因数量更少, 不含*mbnI*、*mbnR*、*mbnF*基因. 第IV类操纵子的*mbnP*、*mbnH*基因的位置相较于第I类差别较大. 第V类操纵子的核心基因区最特殊, 在*mbnA*和*mbnB*之间还存在一个*mbnX*基因, 预测也与生物合成相关, 但目前没有关于这个基因的功能研究. 上文提到的*Ms. trichosporium* OB3b属于第I类; *Methylocystis* sp. SB2属于第II类. 第V类Mbn操纵子主要来源于革兰氏阳性菌^[5]. I、II a和II b类仅存在于甲烷氧化菌中, III~V类所涵盖的物种繁多, 均为非甲烷氧化菌, 非甲烷氧化菌中的Mbn操纵子数量显著超过甲烷氧化菌.

与前期发现的RiPP分子类似, Mbn前体肽MbnA由LP和CP组成, 包含20~35个氨基酸残基(图4)^[5]. MbnA

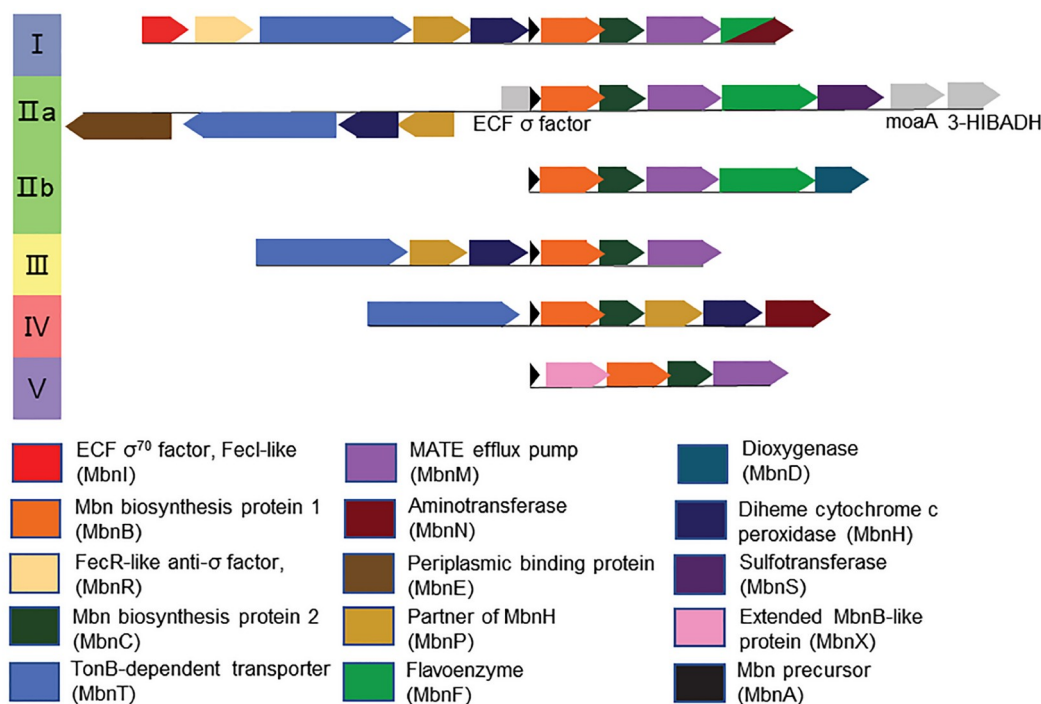


图 3 I~V 类的 Mbn 操纵子示意图

Figure 3 Operon schematics for Mbn from groups I~V

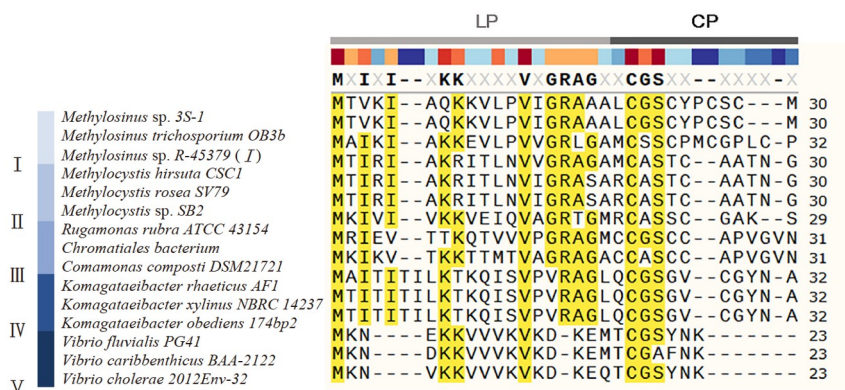


图 4 ClustalW 比对来自 I~V 类的 MbnA

Figure 4 ClustalW alignment of MbnA sequences from groups I~V

序列内被恶唑酮环占据的位置是CP中的半胱氨酸^[8]。I~V类的MbnA均含有至少1个半胱氨酸残基, 由于位于CP的第2个残基在各物种中十分保守(均为半胱氨酸), 推测是翻译后修饰的高频位点。与这个半胱氨酸C端相邻的残基也相对保守, 通常为甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸。修饰半胱氨酸之间的间距、附加半胱氨酸的存在和整体氨基酸组成则是高度可变的。第I类或第III类的一些MbnA含4个半胱氨酸残基, 但根据当前

解析的结构显示, 仅其中两个残基会发生翻译后修饰(图2); 第II类和第IV类MbnA的CP均含有2个半胱氨酸残基; 第V类仅含有1个可修饰的半胱氨酸位点且CP含有的氨基酸残基数相较于其他类别更少。目前, 尚未从细菌中分离到含有单个恶唑酮-硫代酰胺修饰的Mbn, 因此不清楚第V类独特的CP序列是否影响翻译后修饰以及修饰后的Mbn是否具有与双齿铜配体相似的生物活性。

2.2 Mbn的核心合成机器

Mbn的生物合成机制在已知的RiPP家族中是独一无二的。虽然杂环形成在RiPP天然产物中很常见,但Mbn操纵子中的基因簇与目前已知的RiPP生物合成酶不存在结构或序列上的同源^[31],凸显了Mbn生物合成机制的新颖性。含有氨基酸衍生杂环的化合物也相对常见,尤其在噻唑或恶唑修饰的细菌素(thiazole/oxazole-modified microcin, TOMM)家族,但尚未发现酶促恶唑酮生物合成的先例^[32,33]。硫代酰胺在天然产物中较少出现,文献报道的两个代表是硫脲(thioviridamide)和氯硫胺(closthioamide)^[34,35]。有学者提出,YcaO家族酶可能负责噻唑类产物或硫代酰胺的生物合成,但Mbn操纵子中的蛋白与这些酶都没有二级序列或三维结构的相似性^[34~37]。

操纵子核心蛋白MbnB和MbnC被推测作为Mbn的生物合成核心机器。MbnB是一种未被鉴定的DUF692家族的成员,被预测具有磷酸丙酮异构酶(triose-phosphate isomerase, TIM)样的桶状结构,与之最相似的酶包括木糖异构酶和核酸内切酶IV。而MbnC是一种功能未知的较小蛋白质,不属于任何已知的家族^[4]。尽管功能未知,但根据它们在所有Mbn操纵子中的保守性可以预测这两种蛋白质在Mbn生物合成中发挥重要作用^[4]。2018年,Kenney等人^[6]证实,MbnB和MbnC形成一种全新的异源二聚体含铁酶(MbnBC),对MbnA底物进行四电子氧化,在半胱氨酸残基上安装恶唑酮和硫代酰胺基团。铁活性位点位于MbnB亚基中,关于活性辅因子的组成和氧化态仍不确定,推测存在耦合的双核或三核铁中心。

为了确定 $mbnC$ 的功能,研究人员在*Ms. trichosporium* OB3b菌株中构建了一个缺失突变,并对 $\Delta mbnC$ 突变体产生的Mbn进行了纯化和结构鉴定^[38]。结果表明,从Pro-Cys二肽形成C端吡咯烷基-恶唑酮-硫代酰胺基团需要MbnC,但从N端二肽Leu-Cys形成N端的3-甲基丁醇-恶唑酮-硫代酰胺基团不依赖MbnC。由于尚无结构数据,MbnBC如何组装、催化MbnA的翻译后修饰仍不明确。

我们的最新研究解析了两个不同物种来源的MbnABC复合物晶体结构,即RrMbnABC(*Rugamonas rubra* (Rr) ATCC 43154,代表第Ⅲ类)和VcMbnABC(*Vibrio caribbenthicus* (Vc) BAA-2122,代表第Ⅴ类)^[7]。该研究首次发现并鉴定了MbnBC活性中心由3个Fe离子组成。进一步对活性中心与Fe离子配位的关键氨基

酸突变体进行分析,揭示了三铁活性中心对于MbnBC催化功能的必要性。结合穆斯堡尔谱、电子顺磁共振波谱等物理化学方法揭示了Fe离子在催化过程中展现的不同价态在电子传递以及原子重排中的关键化学作用,并提出了可能的催化模型,阐明了第Ⅲ类和第Ⅴ类的MbnBC全酶具有底物识别、结构及进化的保守性。结构表明,底物MbnA的LP与MbnC结合以募集MbnBC全酶,而MbnA的CP位于MbnB-MbnC相互作用产生的具有特征性的三铁簇催化腔中。同时其中一个铁离子和底物关键残基半胱氨酸的巯基互作,进而实现双氧依赖性的恶唑酮-硫代酰胺基团装配反应。基于蛋白机器结构分析和生化功能研究,确定了催化保守碱基天冬氨酸残基Asp240,阐明了多物种MbnBC复合物结构和功能的相似性。然而,不同物种来源的MbnBC对MbnA的修饰也具有特异性。经RrMbnBC修饰的RrMbnA(RrMbnAoxa)具有335 nm附近的特征性吸收峰和铜离子螯合特性,与其他已鉴定的Mbn相似^[3,8~11]。而VcMbnBC修饰的VcMbnA(VcMbnAoxa)具有与RrMbnAoxa一致的质量变化(-4 Da),但吸收光谱却截然不同:VcMbnAoxa在280 nm附近具有一个较宽的吸收峰(图5)。这种特异的产物是如何产生的以及是否具有不同的结构和功能,该问题正在被深入地研究。

2.3 Mbn的其他修饰蛋白

除 $mbnB$ 、 $mbnC$ 以外,Mbn操纵子中的其他基因也被预测具有生物合成功能,并且这些基因编码的蛋白都位于细胞质中。编码磷酸吡哆醛依赖性转氨酶的基因(注释为 $mbnN$)存在于一些Ⅰ类和所有Ⅳ类Mbn操纵子中^[4,5],MbnN介导的转氨反应被认为是一些Mbn合成的最后一步。MbnN在体外和体内都能够催化Mbn生物合成的转氨基步骤,如果没有这一修饰,Mbn在生理条件下的稳定性会显著下降^[39,40]。磺基转移酶(MbnS)的编码基因 $mbnS$ 仅在Ⅱa类Mbn操纵子中被发现^[4],该操纵子编码含有磺化苏氨酸的Mbn^[8,9],MbnS被预测对这类Mbn进行磺化修饰。依赖NAD(P)H的黄酮酶(MbnF)可能在某些Ⅰ和Ⅱ类的Mbn杂环合成中发挥作用,催化恶唑酮A转化为(羟基)吡嗪酮类。在Ⅱb类操纵子中,与 $mbnF$ 相邻的基因 $mbnD$ 被注释为双加氧酶,但其在Mbn生物合成中的作用难以被预测。

3 Mbn的生物学功能和应用前景

Mbn是微生物合成和分泌的一类天然产物,广泛

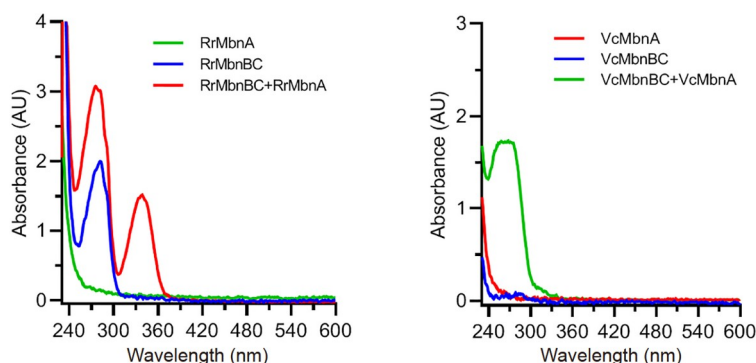


图5 修饰产物的紫外-可见光吸收光谱检测

Figure 5 UV-Vis spectra detection of the modified products

参与菌体自身生理调控过程,在人类铜代谢紊乱性疾病治疗方面也具有很好的开发前景,如科研工作者正在努力尝试将其应用于威尔逊氏病的治疗^[20~23]。除此之外,Mbns还具有多种应用功能,包括氧化酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢还原酶活性,同时可以对汞、银、金、铬和硒等重金属进行解毒以及作为抗菌剂,具有宝贵的开发价值^[2,13~19,41]。

3.1 铜稳态调节

铜是许多关键蛋白质和酶的重要组分,如细胞色素氧化酶、NADH脱氢酶和超氧化物歧化酶等的活化需要铜的参与,这些蛋白在生命体的生长代谢与调控中发挥重要作用^[42]。自1980年以来,人们就知道铜能调节甲烷氧化菌的生长代谢,当时未能在这些微生物中找到铜摄取相关的元件,后来Mbn被证实参与了摄取铜的过程^[43~47]。甲烷氧化菌以甲烷为唯一碳源和能源来源,在此过程中涉及甲烷氧化反应,其机制为:甲烷氧化菌利用甲烷单加氧酶(methanemonooxygenase, MMO)分裂氧分子的O-O键,对甲烷进行氧化,其中一个氧原子被还原形成H₂O,另一个被结合到甲烷中形成CH₃OH。在甲烷氧化菌中发现了两种主要形式的MMO:一种是可溶性MMO(sMMO),另一种是颗粒或膜结合的MMO(pMMO)。铜是调控sMMO和pMMO多肽编码基因表达的关键因素。由于其在MMO中的作用,铜的获取对甲烷氧化菌至关重要^[43]。

Mbn能够高效收集铜以支持甲烷氧化反应。研究证实Mbn直接调控甲烷氧化的铜开关:破坏*mbnA*基因会抑制铜添加对sMMO和pMMO操纵子的影响^[29]。另外,Mbn不仅能够从溶液、矿物和腐殖质来源中获取铜,甚至可以从硼硅酸盐玻璃中夺取铜^[48]。Mbn通过恶

唑酮-硫代酰胺基团特异性螯合环境中的Cu^I或Cu^{II}(Cu^{II}在体内被还原为Cu^I),形成高亲和力的Mbn-Cu^I复合体。结合铜的Mbn通过主动运输过程被吸收^[49],进入机体内促进铜开关的转换(图6):铜离子浓度增加将促进pMMO活性并抑制sMMO活性。

3.2 威尔逊氏病治疗

威尔逊氏病(WD)是一种与铜代谢有关的常染色体隐性遗传疾病,由ATP酶铜转运β(ATPase copper transporting beta, ATP7B)基因突变引起^[50,51]。ATP7B作为铜转运ATP酶,介导机体多余的铜排泄到胆汁中,其功能丧失使肝细胞维持铜稳态的能力严重受损,导致铜在肝细胞中持续积累,引发慢性肝病和暴发性肝功能衰竭^[51]。迄今为止,美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration)和欧洲药品管理局(European Medicines Agency)批准的药物治疗无法恢复急性肝衰竭WD患者的铜稳态,WD的治疗也常常需要进行肝脏移植,在此情况下,新型高亲和性铜离子螯合剂有望成为一种可行的替代疗法^[51~53]。

ATP7b基因缺陷型大鼠具有WD的典型表型,包括肝损伤、高水平的肝铜积累以及血清天冬氨酸氨基转移酶异常升高(serum aspartate aminotransferase, AST)等^[54]。2011年,Summer等人^[20]在WD大鼠模型上应用了Mbn。结果显示,Mbn处理组大鼠血清AST值恢复到基础水平,肝脏组织病理学恢复正常,给药后大鼠的体内铜水平也显著下降。体外细胞实验表明,Mbn可以竞争性争夺肝细胞金属硫蛋白中的铜,证实Mbn在细胞水平具有有效的铜螯合活性。2016年的另一项研究^[55]也证实,与未经治疗的大鼠相比,Mbn的治疗可有效逆转模型大鼠的肝脏铜积累和肝损伤,这种效果与肝细胞

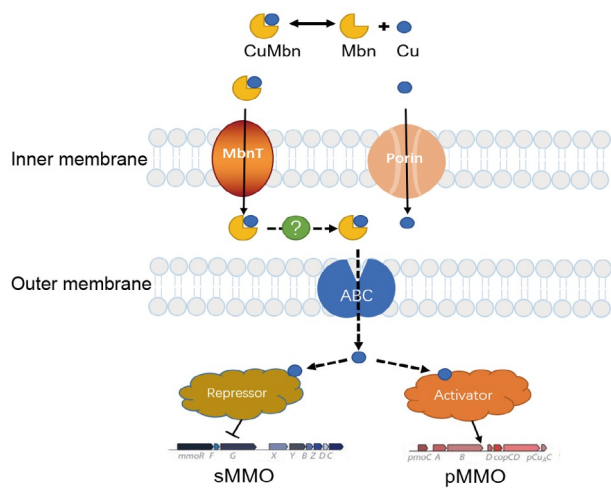


图 6 Mbn-Cu摄入和调控模型
Figure 6 Hypothesized uptake and regulation mechanisms for Mbn-Cu

线粒体中铜的消耗有关。Mbn的短期治疗推迟了急性肝衰竭发作的时间，表明Mbn具有治疗急性WD的潜力。Müller等人^[56]进一步证实，在Mbn治疗停止后7周，与未处理的对照动物相比，肝脏铜浓度仍然较低，说明Mbn可高效地消耗过量肝铜并具有持续的治疗效果。

3.3 金属解毒作用

除了螯合铜离子外，Mbn还会以还原方式结合铜以外的一些金属。如Mbn可与Au^{III}结合，将其还原为Au⁰，从而介导金纳米粒子的产生^[16]。Mbn也可有效结合HgCl₂中的Hg^{II}，用于预防和治疗机体汞中毒^[14,15]。此外，Mbn还能降解环境中毒性更大的甲基汞(MeHg)，尽管目前还没有证据表明产生Mbn的物种与高水平重金属污染的环境之间有相关性^[14]。研究发现，*Methylocystis* sp. SB2 Mbn和*Ms.trichosporium* OB3b Mbn的金属结

合特异性与亲和力存在差异^[15]，这种Mbn序列或结构不同导致的功能差异，可为开发具有更强金属解毒活性的新型Mbn提供基础支撑和指导。

3.4 抗菌活性

Johnson^[18]发现，Mbn-Cu能有效抑制脑心浸液肉汤 (brain heart infusion, BHI)培养基中的单核球增多性李斯特菌。抑菌效果受生长培养基的pH影响：最佳抑菌pH为6.0，此时Mbn-Cu的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值为4.11 mmol/L；正常BHI培养基(pH 7.3)中的MIC为6.58 mmol/L；在pH为6.5和5.5时，Mbn-Cu的MIC为7.40 mmol/L。Xing和Xin^[19]研究了Mbn-Cu对芽孢杆菌的抑菌作用。他们通过倍比稀释法测定了枯草芽孢杆菌的MIC为5 mg/mL Mbn-Cu。36℃条件下72 h培养后，平板中Mbn-Cu的最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC)为10 mg/mL。此外，他们还考察了温度、pH、金属离子和紫外照射对Mbn-Cu抑菌活性的影响。

由于缺乏更多数据，目前仍不清楚未与铜离子结合的Mbn是否有抑菌作用、Mbn是否特异性抑制革兰氏阳性菌以及抑菌机制如何。Mbn是含有硫代酰胺的细菌天然产物之一，研究表明，一些硫代酰胺类天然产物发挥抗菌活性^[57]。因此，Mbn不仅对威尔逊氏病有治疗效果，也有潜力成为新型抗菌肽的储备资源。表1对上述Mbn的功能活性进行了总结。

4 总结与展望

Mbn及其类似物具有广泛的生物活性，如金属离子螯合、氧化还原酶、抑菌等，享有重要的工业和医用价值，是一类极具开发价值的RiPP类天然产

表 1 Mbn的功能活性
Table 1 The functional activity of Mbn

功能活性	作用机理和效果	参考文献
调控铜稳态	甲烷氧化菌在缺乏可利用的铜离子时，自身合成并分泌Mbn，Mbn能够高效收集铜以支持甲烷氧化反应	[43,44,48,49]
治疗威尔逊氏病	Mbn对铜离子具有高亲和力，可整合体内异常积累的铜离子：在威尔逊氏病大鼠模型上应用Mbn，能够有效逆转模型大鼠的肝脏铜积累和肝损伤，Mbn的短期治疗也推迟了急性肝衰竭发作的时间	[20,54~56]
金属解毒作用	Mbn可以还原方式结合铜以外的一些金属：Mbn有效结合HgCl ₂ 中的Hg ^{II} ，用于预防和治疗机体汞中毒，Mbn还能降解环境中毒性更大的甲基汞	[14~16]
抑菌活性	Mbn-Cu能有效抑制单核球增多性李斯特菌，抑菌效果受生长培养基的pH影响：最佳抑菌pH为6.0，最低抑菌浓度为4.11 mmol/L；对芽孢杆菌的最低抑菌浓度为5 mg/mL，最低杀菌浓度为10 mg/mL	[18,19]

物^[8-11,17-23]。然而,Mbn的开发仍面临多重挑战。目前,关于Mbn的功能研究主要集中于甲烷氧化菌的生理调控,其在抑菌、金属离子代谢性疾病等方面的报道相对较少^[1-3]。同时,当前用于研究的Mbn均来自细菌发酵液,提取流程复杂、成本高、产量低且易水解,对其成药性也提出了挑战^[3,8-11]。另外,被鉴定的Mbn仅为自然界冰山一角,大量未知的Mbn有待深入发现和阐明,并且很多含有Mbn操纵子的罕见微生物在实验室条件下无法分离、培养,均严重限制了Mbn的开发应用^[4,5]。虽然前期研究已证实Mbn前体肽在生物合成全酶

MbnBC的催化作用下可形成具有生物活性的酶促产物,但其催化机制仍待完善: VcMbnAoxa和RrMbnAoxa的特征性吸收峰不一致,表明它们的分子结构不同,具体的生物合成分子机制上应存在差异,这些决定了它们可能有截然不同的生物学功能^[6,7]。此外,Mbn LP端的切除机制未见报道,可能与Mbn操纵子中一些功能未知的基因相关,这些也需要进一步研究^[4,5]。

因此,未来研究方向将集中在Mbn生物合成机制的深度解析、Mbn大规模制备、优化改造以及应用转化,重点是临床应用转化。

参考文献

- Kim H J, Graham D W, DiSpirito A A, et al. Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. *Science*, 2004, 305: 1612–1615
- DiSpirito A A, Zahn J A, Graham D W, et al. Methanobactin: A copper binding compound having antibiotic and antioxidant activity isolated from methanotrophic bacteria. US Patent, US7199099. 2007-04-03
- Behling L A, Hartsel S C, Lewis D E, et al. NMR, mass spectrometry and chemical evidence reveal a different chemical structure for methanobactin that contains oxazolone rings. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 12604–12605
- Kenney G E, Rosenzweig A C. Genome mining for methanobactins. *BMC Biol*, 2013, 11: 17
- Dassama L M K, Kenney G E, Rosenzweig A C. Methanobactins: From genome to function. *Metallomics*, 2017, 9: 7–20
- Kenney G E, Dassama L M K, Pandelia M E, et al. The biosynthesis of methanobactin. *Science*, 2018, 359: 1411–1416
- Dou C, Long Z, Li S, et al. Crystal structure and catalytic mechanism of the MbnBC holoenzyme required for methanobactin biosynthesis. *Cell Res*, 2022, 32: 302–314
- Krentz B D, Mulheron H J, Semrau J D, et al. A comparison of methanobactins from *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylocystis strain* SB2 predicts methanobactins are synthesized from diverse peptide precursors modified to create a common core for binding and reducing copper ions. *Biochemistry*, 2010, 49: 10117–10130
- El Ghazouani A, Baslé A, Gray J, et al. Variations in methanobactin structure influences copper utilization by methane-oxidizing bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 8400–8404
- Kenney G E, Goering A W, Ross M O, et al. Characterization of methanobactin from *Methylosinus* sp. LW4. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 11124–11127
- Park Y J, Roberts G M, Montaser R, et al. Characterization of a copper-chelating natural product from the methanotroph *Methylosinus* sp. LW3. *Biochemistry*, 2021, 60: 2845–2850
- Choi D W, Semrau J D, Antholine W E, et al. Oxidase, superoxide dismutase, and hydrogen peroxide reductase activities of methanobactin from types I and II methanotrophs. *J Inorg Biochem*, 2008, 102: 1571–1580
- Choi D W, Do Y S, Zea C J, et al. Spectral and thermodynamic properties of Ag(I), Au(III), Cd(II), Co(II), Fe(III), Hg(II), Mn(II), Ni(II), Pb(II), U(IV), and Zn(II) binding by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J Inorg Biochem*, 2006, 100: 2150–2161
- Vorobev A, Jagadevan S, Baral B S, et al. Detoxification of mercury by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 5918–5926
- Baral B S, Bandow N L, Vorobev A, et al. Mercury binding by methanobactin from *Methylocystis strain* SB2. *J Inorg Biochem*, 2014, 141: 161–169
- Xin J, Cheng D, Zhang L, et al. Methanobactin-mediated one-step synthesis of gold nanoparticles. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 21676–21688
- Xin J Y, Lin K, Wang Y, et al. Methanobactin-mediated synthesis of gold nanoparticles supported over Al₂O₃ toward an efficient catalyst for glucose oxidation. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 21603–21620
- Johnson C L. Methanobactin: A potential novel biopreservative for use against the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. Doctor Dissertation. Ames: Iowa State University, 2006
- Xing H L, Xin J Y. Antimicrobial efficacy of methanobactin against *Bacillus subtilis*. In: Proceedings of the 2015 International Conference on Management, Education, Information and Control. Amsterdam: Atlantis Press, 2015. 305–309

- 20 Summer K H, Lichtmanegger J, Bandow N, et al. The biogenic methanobactin is an effective chelator for copper in a rat model for Wilson disease. *J Trace Elem Med Biol*, 2011, 25: 36–41
- 21 Erlinger S. A microbial peptide to rescue severe and fulminant Wilson disease? *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2016, 40: 647–649
- 22 Kaler S G. Microbial peptide de-coppers mitochondria: Implications for Wilson disease. *J Clin Invest*, 2016, 126: 2412–2414
- 23 Ranucci G, Polishchuck R, Iorio R. Wilson's disease: Prospective developments towards new therapies. *World J Gastroenterol*, 2017, 23: 5451–5456
- 24 Choi D W, Antholine W E, Do Y S, et al. Effect of methanobactin on the activity and electron paramagnetic resonance spectra of the membrane-associated methane monooxygenase in *Methylococcus capsulatus* Bath. *Microbiology*, 2005, 151: 3417–3426
- 25 Hakemian A S, Tinberg C E, Kondapalli K C, et al. The copper chelator methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b binds copper(I). *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 17142–17143
- 26 El Ghazouani A, Baslé A, Firbank S J, et al. Copper-binding properties and structures of methanobactins from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Inorg Chem*, 2011, 50: 1378–1391
- 27 Choi D W, Zea C J, Do Y S, et al. Spectral, kinetic, and thermodynamic properties of Cu(I) and Cu(II) binding by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemistry*, 2006, 45: 1442–1453
- 28 Dang T, Süßmuth R D. Bioactive peptide natural products as lead structures for medicinal use. *Acc Chem Res*, 2017, 50: 1566–1576
- 29 Semrau J D, Jagadevan S, DiSpirito A A, et al. Methanobactin and MmoD work in concert to act as the 'copper-switch' in methanotrophs. *Environ Microbiol*, 2013, 15: 3077–3086
- 30 Kenney G E, Sadek M, Rosenzweig A C J M. Copper-responsive gene expression in the methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Metallomics*, 2016, 8: 931–940
- 31 Arnison P G, Bibb M J, Bierbaum G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Metallomics*, 2013, 30: 108–160
- 32 Cox C L, Doroghazi J R, Mitchell D A. The genomic landscape of ribosomal peptides containing thiazole and oxazole heterocycles. *BMC Genomics*, 2015, 16: 778
- 33 Ortega M A, van der Donk W A. New insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 31–44
- 34 Banala S, Süßmuth R D. Thioamides in nature: In search of secondary metabolites in anaerobic microorganisms. *ChemBioChem*, 2010, 11: 1335–1337
- 35 Lincke T, Behnken S, Ishida K, et al. Closthioamide: An unprecedented polythioamide antibiotic from the strictly anaerobic bacterium *Clostridium cellulolyticum*. *Angew Chem Int Edit*, 2010, 49: 2011–2013
- 36 Dunbar K L, Melby J O, Mitchell D A. YcaO domains use ATP to activate amide backbones during peptide cyclodehydrations. *Nat Chem Biol*, 2012, 8: 569–575
- 37 Izawa M, Kawasaki T, Hayakawa Y. Cloning and heterologous expression of the thioviridamide biosynthesis gene cluster from *Streptomyces olivoviridis*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 7110–7113
- 38 Dershwitz P, Gu W, Roche J, et al. MbnC is not required for the formation of the N-terminal oxazolone in the methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl Environ Microbiol*, 2022, 88: e0184121
- 39 Gu W, Baral B S, DiSpirito A A, et al. An aminotransferase is responsible for the deamination of the N-terminal leucine and required for formation of oxazolone ring A in methanobactin of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 83: e02619-16
- 40 Park Y J, Kenney G E, Schachner L F, et al. Repurposed HisC aminotransferases complete the biosynthesis of some methanobactins. *Biochemistry*, 2018, 57: 3515–3523
- 41 McCabe J W, Vangala R, Angel L A. Binding selectivity of methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b for copper(I), silver(I), zinc(II), nickel(II), cobalt(II), manganese(II), lead(II), and iron(II). *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28: 2588–2601
- 42 Ridge P G, Zhang Y, Gladyshev V N. Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS One*, 2008, 3: e1378
- 43 Semrau J D, DiSpirito A A, Yoon S. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34: 496–531
- 44 Chan S I, Yu S S F. Controlled oxidation of hydrocarbons by the membrane-bound methane monooxygenase: The case for a tricopper cluster. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 969–979
- 45 Lieberman R L, Rosenzweig A C. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature*, 2005, 434: 177–182
- 46 Martinho M, Choi D W, DiSpirito A A, et al. Mössbauer studies of the membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath: Evidence for a diiron center. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 15783–15785
- 47 Rosenzweig A C, Frederick C A, Lippard S J, et al. Crystal structure of a bacterial non-haem iron hydroxylase that catalyses the biological

- oxidation of methane. [Nature](#), 1993, 366: 537–543
- 48 Kulczycki E, Fowle D A, Knapp C, et al. Methanobactin-promoted dissolution of Cu-substituted borosilicate glass. *Geobiology*, 2007, 5: 251–263
- 49 Balasubramanian R, Kenney G E, Rosenzweig A C. Dual pathways for copper uptake by methanotrophic bacteria. [J Biol Chem](#), 2011, 286: 37313–37319
- 50 Tanzi R E, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. [Nat Genet](#), 1993, 5: 344–350
- 51 Gitlin J D. Wilson disease. *Gastroenterology*, 2003, 125: 1868–1877
- 52 European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson’s disease. *J Hepatol*, 2012, 56: 671–685
- 53 Weiss K H, Stremmel W. Evolving perspectives in Wilson disease: Diagnosis, treatment and monitoring. [Curr Gastroenterol Rep](#), 2012, 14: 1–7
- 54 Zischka H, Lichtmannegger J, Schmitt S, et al. Liver mitochondrial membrane crosslinking and destruction in a rat model of Wilson disease. [J Clin Invest](#), 2011, 121: 1508–1518
- 55 Lichtmannegger J, Leitzinger C, Wimmer R, et al. Methanobactin reverses acute liver failure in a rat model of Wilson disease. [J Clin Invest](#), 2016, 126: 2721–2735
- 56 Müller J C, Lichtmannegger J, Zischka H, et al. High spatial resolution LA-ICP-MS demonstrates massive liver copper depletion in Wilson disease rats upon methanobactin treatment. *J Trace Elem Med Biol*, 2018, 49: 119–127
- 57 Kloss F, Chiriac A I, Hertweck C. Mapping of the modular closthoamide architecture reveals crucial motifs of polythioamide antibiotics. [Chem Eur J](#), 2014, 20: 15451–15458

Summary for “甲烷氧化菌素研究进展”

Advances in methanobactin

Zhaolin Long^{1†}, Shoujie Li^{1†}, Bo Kang² & Wei Cheng^{1,2*}

¹ Respiratory Infection and Intervention Laboratory of Frontiers Science Center for Disease-related Molecular Network, Division of Respiratory and Critical Care Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China;

² State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: chengwei669@scu.edu.cn

Methanobactins (Mbns), first discovered in methanotrophs, constitute a class of ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides characterized by specific cysteine residues modified with oxazolone-thioamide moieties. Mbns have a high affinity for copper and play an important role in copper homeostasis in methanogenic bacteria. With continued research, an increasing number of Mbns have been isolated and identified. In recent years, Mbn operons have also been found in a much wider range of bacteria. According to phylogenetic analysis of the core components of the operon, *mbnA*, *mbnB* and *mbnC*, as well as the composition and arrangement of adjacent genes, researchers have divided the Mbn operons into five groups (Groups I – V). In addition, some species contain several different types of Mbn simultaneously. MbnA is a precursor peptide of Mbn and is composed of an N-terminal lead peptide (LP) and a C-terminal core peptide (CP); MbnB is an iron-containing enzyme that directly participates in the posttranslational modification of MbnA; MbnC is mainly involved in the recognition and binding of MbnA. MbnB and MbnC are assembled into an Mbn core protein machine that is responsible for the generation of oxazolone-thioamide moieties on the cysteine and its adjacent residues on the MbnA CP. The LP of modified MbnA is excised and becomes a biologically active Mbn. However, the removal mechanism is not clear. To date, researchers have isolated and identified nearly ten kinds of Mbns from the fermentation broth of methanotrophs. These Mbns are structurally conserved, but there is limited sequence conservation, and all contain oxazolone-thioamide moieties that interact with copper ions. At present, the most well studied Mbn is MsMbn from the methanotroph *Methylosinus* (Ms) *trichosporium* OB3b, which is secreted to bind copper ions in the environment when the bacterium is deficient in copper and then to transport the copper to the bacterium in the form of a Mbn-Cu complex to regulate copper homeostasis. In addition to participating in the regulation of bacterial copper homeostasis, Mbn also has various other functional activities. For example, the Mbn-Cu complex has been proven to have oxidase, superoxide dismutase and hydrogen peroxide reductase activities. Some studies have shown that Mbn also has the ability to chelate heavy metals such as mercury and gold, which may have use in ecological environment management applications. Moreover, it also has a growth inhibition effect on some gram-positive bacteria, indicating that it has potential to be developed as a clinical antibacterial drug. At the same time, some preclinical studies have shown that it can be applied to treat clinical diseases caused by metal ion disorders, such as Wilson's disease (WD). This paper reviews the species, structures, biosynthesis and biological functions of Mbn and proposes applications, aiming to provide theoretical guidance and scientific support for the development and application of Mbn.

methanobactin, copper homeostasis, structure and function, biosynthesis

doi: [10.1360/TB-2023-0006](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0006)