

天然产物 *O*-甲基转移酶应用的研究进展

周林俊, 瞿旭东

(武汉大学药学院, 武汉 430071)

摘要: 甲基化是所有生命体中普遍存在的反应, 通常由 *S*-腺苷甲硫氨酸 (*S*-adenosyl-*L*-methionine, SAM) 依赖的甲基转移酶催化完成。*O*-甲基转移酶 (*O*-methyltransferases, OMTs) 是天然产物甲基转移酶家族中数量最庞大的一类, 通过对分子中的羟基或羧羟基氧原子进行甲基化修饰, OMTs 可以极大地改善天然产物的性质。目前, 天然产物 OMTs (natural product OMTs, NPOMTs) 已经广泛应用于医药、化工和能源等诸多领域, 展现出了巨大的应用价值和广阔的应用前景。本文从精细化学品生产、生物活性分子合成及生物柴油合成三个方面对 NPOMTs 的应用进行综述, 以为 NPOMTs 的进一步发展提供有益借鉴。

关键词: 分子生物学; 天然产物; 综述; *O*-甲基转移酶; 应用

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1674-2850(2019)04-0610-13

Application progress of natural product *O*-methyltransferases

ZHOU Linjun, QU Xudong

(School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Methylation is a ubiquitous reaction in all living organisms, which is usually catalyzed by *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAM) dependent methyltransferases. *O*-methyltransferases (OMTs) are the most abundant natural product methyltransferase. By methylating hydroxyl or carboxyhydroxyl oxygen atoms in the molecule, OMTs can greatly improve the properties of natural products. At present, the natural product OMTs (NPOMTs) have been widely used in many fields such as medicine, chemical industry and energy, and showing great application value and broad application prospects. In this paper, the application of NPOMTs was reviewed from three aspects: fine chemical production, bioactive molecular synthesis and biodiesel synthesis in order to provide useful reference for their further development.

Key words: molecular biology; natural product; review; *O*-methyltransferases; application

0 引言

植物、动物及微生物在生命活动尤其是次级代谢活动中产生了一系列结构各异的天然产物。这些天然产物包括激素、抗生素、色素和生物碱等, 不仅对生物自身具有重要意义, 而且提取后可以作为产品或原料, 直接或间接地用于人类的生产生活, 具有很高的应用价值。SAM 依赖的甲基转移酶催化的甲基化在天然产物合成中扮演着重要角色。NPOMTs, 顾名思义, 是一类以天然产物氧原子为甲基受体的甲基转移酶, 是甲基转移酶家族中数量最多的一类, 占甲基转移酶总数的 54% 以上^[1]。NPOMTs 催化的反应类型以 S_N2 为主, 甲基化过程如图 1 所示。天然产物分子中的氧原子作为亲核试剂在 NPOMTs 的催化下接受 SAM 提供的甲基, 产生甲基化产物和副产物 *S*-腺苷-*L*-高半胱氨酸 (*S*-adenosyl-*L*-homocysteine, SAH)。天然产物分子中的甲氧基能显著改善其溶解性、稳定性等理化性质和生物活性, 且羟基或羧基受

作者简介: 周林俊 (1994—), 男, 硕士, 主要研究方向: 生物催化

通信联系人: 瞿旭东, 教授, 主要研究方向: 生物催化、生物合成. E-mail: quxd@whu.edu.cn

甲基保护后降低了反应活性，避免了不利反应的发生。

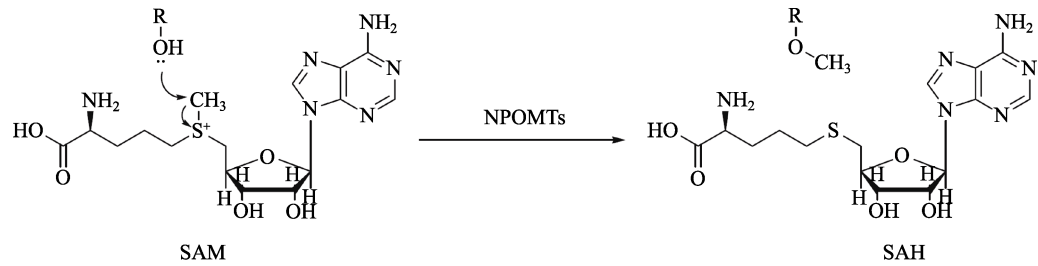


图 1 NPOMTs 催化的甲基化过程
Fig. 1 NPOMTs-catalyzed methylation

目前，对于 NPOMTs 的研究已经取得了一系列的进展，基于这些研究，本文对 NPOMTs 的应用进行综述，但对于生物大分子 OMTs 如蛋白质 OMTs、DNA OMTs 本文不做讨论。

1 NPOMTs 的来源、结构与分类

目前发现的 NPOMTs 大多存在于植物和细菌的代谢通路中（如表 1^[1]所示），动物和酵母等真菌中发现较少，例如白杨（*Populus* sp.）中已发现多达 26 种 NPOMTs^[2]。而在人体和酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中分别都只发现了两例 NPOMTs，即人体邻苯二酚 *O*-甲基转移酶（catechol *O*-methyltransferase, COMT）和人体 *N*-乙酰血清素（*N*-acetyl-serotonin）*O*-甲基转移酶以及酵母顺乌头酸甲基转移酶（*trans*-aconitate methyltransferase, TMT1）和斑蝥素（cantharidin）甲基转移酶^[3-4]。NPOMTs 在结构上属于 I 类甲基转移酶，与其他 I 类甲基转移酶一样，几乎所有的 NPOMTs 结构中都拥有 α 螺旋和 β 片层，并在第一个 β 片层附近有按“GxGxG”顺序排列的 9 个富含甘氨酸的高度保守的氨基酸序列，该序列是蛋白与 SAM 结合的重要位点，也是预测甲基转移酶的重要依据。对大量 NPOMTs 晶体结构的分析表明，NPOMTs 氨基酸一级序列的相似性可能不高，但都具有类似 Rossmann 折叠的三级结构，在结构上具有高度的一致性^[1]。

表 1 部分三级结构已报道的 NPOMTs^[1]
Tab. 1 Part of NPOMTs with reported tertiary structures^[1]

名称	宿主	代谢途径	底物类型
RebM	细菌	产气列契瓦尼氏菌（ <i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> ）	蝴蝶霉素（rebeccamycin）
NcsB1		制癌链霉菌（ <i>Streptomyces carzinostaticus</i> ）	新制癌菌素（neocarzinostatin）
DnrK		波赛链霉菌（ <i>S. peucetius</i> ）	道诺霉素（daunorubicin）
NovP		类球形链霉菌（ <i>S. spheroides</i> ）	新生霉素（novobiocin）
CalO1		棘孢微单孢菌（ <i>Micromonospora echinospora</i> LL6600）	卡里奇霉素（calicheamicin）
MmcR		淡紫灰链霉菌（ <i>S. lavendulae</i> ）	丝裂霉素（mitomycin）
ChOMT	植物	蒺藜苜蓿（ <i>Medicago truncatula</i> ）	查尔酮（chalcone）
MtCaOMT		紫花苜蓿（ <i>Medicago sativa</i> ）	苯丙烷（phenylpropanoid）
SAMT		仙女扇（ <i>Clarkia breweri</i> ）	水杨酸（salicylic acid）
CCoAOMT		紫花苜蓿（ <i>Medicago sativa</i> ）	咖啡酰辅酶 A（caffeoyl-CoA）
IAMT		拟南芥（ <i>Arabidopsis thaliana</i> ）	吲哚乙酸（indole acetic acid）
PFOMT		冰叶日中花（ <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ）	苯丙烷（phenylpropanoid）
COMT	动物	褐家鼠（ <i>Rattus norvegicus</i> ）	邻苯二酚（catechol）

一般而言，NPOMTs 可分为 3 类，第 I 类和第 II 类 NPOMTs 以酚羟基为底物，而第 III 类 NPOMTs 甲基化羧基产生甲酯^[5-6]。在植物中，NPOMTs 按照结构可分为两个主要类别，第 I 类植物 NPOMTs 分

子量通常较低 (23~27 ku), 催化活性依赖于 Mg^{2+} , 咖啡酰辅酶 A OMT (caffeoyl coenzyme A OMT, CCoAOMT) 是这类酶的典型代表^[7-8]。IBDAH 等^[7]在冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum*) 的叶片中发现了一类新型的 Mg^{2+} 依赖的 NPOMTs, 并将它归为第 I 类植物 NPOMTs 的亚类, 该酶与 CCoAOMT 具有明显的区别, 不仅对苯丙烷酯如咖啡酸酯和黄酮醇具有偏好性, 而且有意思的是该酶在大肠杆菌中重组蛋白的催化活性更倾向于依赖 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 和 Zn^{2+} , 这很可能暗示了一种新的蛋白结构和催化机制。第 II 类植物 NPOMTs 的分子量较高 (38~43 ku), 催化活性不依赖于金属离子^[7], 咖啡酸、类黄酮和生物碱 OMTs 是此类酶中最突出的几种。表 1 列出了部分三级结构已报道的 NPOMTs。相信随着蛋白质晶体技术的发展, 将会有更多的 NPOMTs 结构得到解析。

2 利用 NPOMTs 生产精细化学品

COMT 是一类镁离子依赖的, 催化邻苯二酚羟基发生甲基化的 OMTs。1958 年, 医学家发现嗜铬细胞瘤患者的尿液中存在甲基化的邻苯二酚胺, 随后证实了人体中存在 COMT^[9]。事实上, COMT 广泛存在于动植物及酵母菌中^[10]。在人体内, 除参与邻苯二酚胺的分解代谢外, COMT 在儿茶酚雌激素 (catecholesterogen, CE), 含邻苯二酚结构的外源物质如儿茶素和生物黄酮素, 以及黑色素新陈代谢产生的吲哚中间体的失活过程中都扮演着重要角色。COMT 与许多疾病包括癌症、心血管疾病、神经系统疾病及激素类疾病有关, 也因此成为了许多药物的靶标^[11]。

香草醛 (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) 是一种重要的风味化合物, 在每年全球市场上的价值超过了 1.8 亿美元^[12]。此外, 香草醛还是医药化工中重要的中间体, 用于生产药品、除草剂和消泡剂^[13]。长期以来, 香草醛依赖于从香草 (*Vanilla planifolia*) 中提取, 这也导致其供不应求。利用哺乳动物 COMT 合成香草醛的研究始于 20 世纪 90 年代 (如图 2^[14]所示), 在这项研究中, 研究者们首先敲除了大肠杆菌体内的莽草酸脱氢酶基因, 并在其基因组上插入 3-去氢莽草酸脱氢酶基因, 使该大肠杆菌合成 3-去氢莽草酸, 在 3-去氢莽草酸脱氢酶的催化下转化成原儿茶酚酸, 随后将带有 COMT 的表达质粒转入大肠杆菌中, 催化原儿茶酚酸甲基化形成香草酸和异香草酸。最后, 香草酸和异香草酸经过提取, 在芳醛脱氢酶的作用下, 于大肠杆菌体外分别被转化成了香草醛和异香草醛^[14]。这项研究无疑具有突破性意义, 但受限于当时的知识和技术水平, COMT 的潜力并没有得到充分的发掘, 原儿茶酚酸转化过程中大量剩余, 香草醛的产率很低。

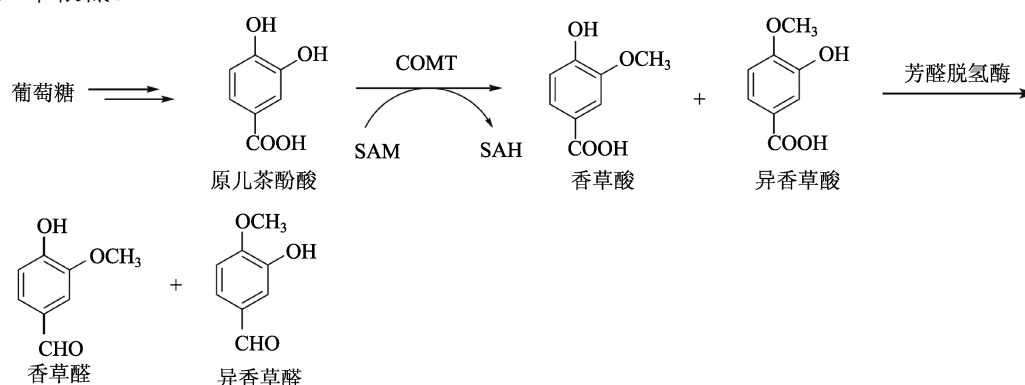


图2 利用 COMT 生产香草醛^[14]

Fig. 2 Production of vanillin using COMT^[14]

2009 年, HANSEN 等^[12]在裂殖酵母或称非洲啤酒酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 及酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中开展了相似的研究, 他们在酵母菌体内同样引入了 3-去氢莽草酸脱氢酶

和 COMT, 不同的是将来自于诺卡氏菌属的芳香羧酸还原酶 (aromatic carboxylic acid reductase, ACAR) 构建到了酵母菌中, 并通过共表达谷氨酸棒杆菌磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶实现了 ACAR 在酿酒酵母中的磷酸泛酰巯基乙胺活化。同时, 为防止香草醛被还原为香草醇, 他们敲除了宿主醇脱氢酶。此外, 在裂殖酵母中, 为降低香草醛对宿主的毒性, 提高积累量, 他们还做了进一步的改造, 引入了拟南芥家族 1-二磷酸尿核苷 (uridine diphosphate, UDP)-糖基转移酶将香草醛转化为香草醛 β -D-葡萄糖苷。经过一系列的代谢改造, 通过提供葡萄糖作为原料, 香草醛在裂殖酵母和啤酒酵母中的产量分别达到了 65 mg/L 和 45 mg/L。然而, COMT 催化的原儿茶酚酸到香草酸的转化仍然是限制香草醛产量的关键步骤, 于是 BROCHADO 等^[15]在酿酒酵母中对 COMT 进行了超表达, 香草素的产量得到了进一步提升, 甚至在 Evolva 公司实现了商业化^[16]。最近, KUNJAPUR 等^[17]对携带 COMT 等基因的大肠杆菌重组菌株体内的 SAM 合成基因进行了超表达, 并阻断反馈抑制因子的合成, 使得该大肠杆菌能大量合成 SAM, 当提供外源的 SAM 合成原料甲硫氨酸时, 香草醛的产量达到了 (419 \pm 58) mg/L。该研究更加充分地挖掘了 COMT 的潜力, 使得香草醛的产量到达了一个新高度。

除催化效率外, 区域选择性是影响 COMT 生产香草醛的另一重要因素。COMT 对邻苯二酚的 3-羟基具有位点偏爱, 但这一区域选择性并不严格^[14], 导致催化产生的香草醛中掺杂有异香草醛 (4-methoxy-3-hydroxybenzaldehyde), 这为后续的分选纯化增添了难度。针对这一问题, LAW 等^[18]根据 COMT 的蛋白结构对其活性位点进行了一系列突变, 其中突变体 Y200L 在催化活性基本不变的情况下与野生型 COMT 相比, 区域异构体过量, 从 58%提高到了 90%。他们进一步地用该突变体催化 SAM 类似物——乙基腺苷甲硫氨酸与 3,4-二羟基苯甲醛反应, 得到了另一种具有重要商业价值的精细化学品——乙基香兰素, 收率达到了 58%。另外, 根据 LAW 等^[18]的研究, 蛋白寡聚物形式是影响 COMT 区域选择性的重要因素, COMT 二聚体对 3-羟基的选择性比单体更高。LAW 等^[18]的研究展现了蛋白质改造的意义, 为利用 COMT 高效生产香草醛提供了一条新思路。最近, SUN 等^[19]在石蒜属植物 (*Lycoris aurea*) 中发现了一例咖啡酸 OMTs, 该酶具有与 COMT 相似的催化活性, 或许将来也可以用于香草醛的生产。

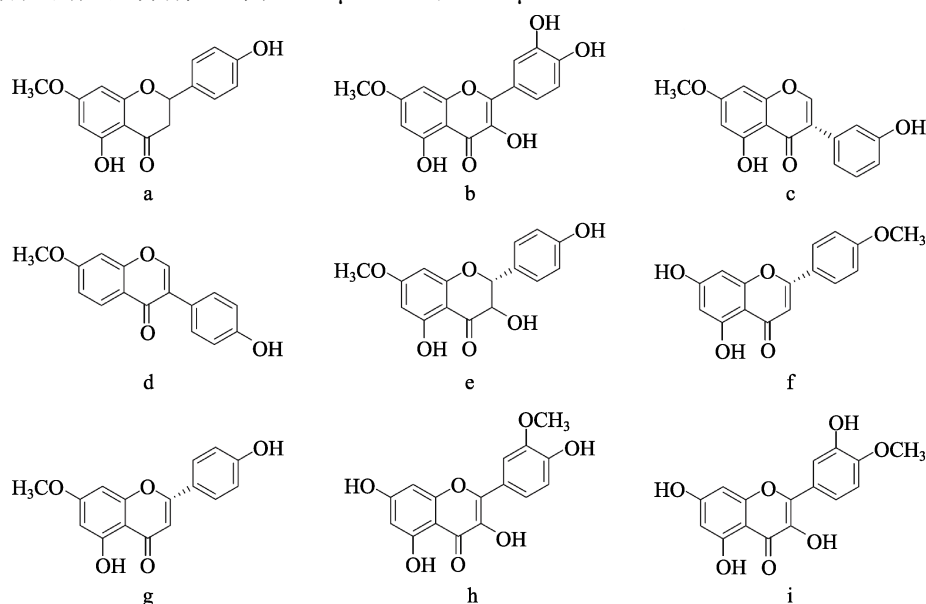
3 NPOMTs 用于生物活性分子的合成

3.1 利用类黄酮 OMTs 合成类黄酮化合物

类黄酮 (flavonoid) 是一类由植物产生的天然产物, 分为黄酮、黄酮醇、黄烷酮、黄烷、黄烷醇、异黄酮和花色素等。目前已经发现了超过 8 000 种黄酮, 其广泛存在于植物的叶、茎、种子和其他器官组织中, 人们在日常食用的蔬菜和水果中就含有丰富的此类化合物^[20]。类黄酮化合物具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、抑癌、抗肥胖、神经保护和抗过敏等功能^[21~26], 一些典型的类黄酮化合物如槲皮素 (quercetin)、芸香苷 (rutin)、芹菜素 (apigenin) 等以单一化合物或混合物的形式被广泛用于功能性食品、化妆品和药品, 如 Quercetin B5 Plus Complex (Viridian)、芦丁和维生素 C (Lamberts) 等已经成为了在世界范围内流通的商品^[5]。

研究表明, 对类黄酮分子中的自由羟基进行甲基化可以显著改善其代谢稳定性和细胞膜穿透性等生理学性质和生物学活性^[27~28], 因此如何简单、高效地获取类黄酮及类黄酮羟基甲基化成为重要的研究课题。显然, 直接从宿主体内提取这些化合物远远无法满足需求, 而利用植物生物技术如转基因和组织培养也面临着许多难题, 如植物种类限制、植物代谢复杂、难以改造、对设备要求高等^[29~30]; 至于化学合成, 由于反应复杂、副产物明显、收率低等问题也无法得到推广^[31]。针对这些问题, 微生物和类黄酮 OMTs (flavonoid OMTs, FOMTs) 的应用提供了良好的解决方案。一方面, 微生物是天然产物合成的优

良宿主；另一方面，FOMTs 具有严格的区域选择性^[32]，对类黄酮特定位置羟基的甲基化与化学合成相比具有极大的优势。因此，目前许多关于类黄酮化合物合成的研究都集中在微生物代谢改造及 FOMTs 的应用上。KIM 等^[33]利用 7-*O*-甲基转移酶（POMT7）在大肠杆菌体内对芹黄素和槲皮素进行生物转化得到产物 7-甲氧基芹黄素（7-*O*-methyl-apigenin）（如图 3a 所示）和 7-甲氧基槲皮素（7-*O*-methyl-quercetin）（如图 3b 所示），转化率达到了 90%，通过优化 POMT7 的表达及增强辅因子 SAM 的合成，7-甲氧基槲皮素的产量达到了 111 mg/L^[34]。最近，KOIRALA 等^[35]利用 FOMTs 重组大肠杆菌生产 7-甲氧基染料木素（7-*O*-methyl-genistein）（如图 3c 所示）和 7-甲氧基黄豆苷元（7-*O*-methyl-daidzein）（如图 3d 所示），当染料木素和黄豆苷元在培养基中的投料浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 时，7-甲氧基染料木素和 7-甲氧基黄豆苷元的产量分别达到了 164 $\mu\text{mol/L}$ 和 382 $\mu\text{mol/L}$ 。

图3 *O*-甲基化的类黄酮化合物Fig. 3 *O*-methylated flavonoids

a—7-甲氧基芹黄素；b—7-甲氧基槲皮素；c—7-甲氧基染料木素；d—7-甲氧基黄豆苷元；e—7-甲氧基香橙素；f—4'-甲氧基柚皮素；g—7-甲氧基柚皮素；h—3'-甲氧基槲皮素；i—4'-甲氧基槲皮素
a-7-*O*-methyl-apigenin; b-7-*O*-methyl-quercetin; c-7-*O*-methyl-genistein; d-7-*O*-methyl-daidzein; e-7-*O*-methyl-aromadendrin; f-4'-*O*-methyl-naringenin; g-7-*O*-methyl-naringenin; h-3'-*O*-methyl-quercetin; i-4'-*O*-methyl-quercetin

7-甲氧基香橙素（7-*O*-methyl-aromadendrin, 7-OMA）（如图 3e 所示）是一种前景广阔的抗癌药，对于 II 型糖尿病也有潜在的疗效^[36]。基于对类黄酮合成途径的认识，MALLA 等^[36]将系统代谢工程策略应用到大肠杆菌生产中。在这项研究中，一系列类黄酮生物合成基因被克隆到大肠杆菌体内，以实现从对香豆酸到柚皮素和二氢山奈酚的转化。同时，还强化了大肠杆菌丙二酰辅酶 A[查尔酮合酶（chalcone synthase, CHS）的前体]的合成，随后，黄烷酮-3-羟化酶和链霉菌（*S. avermitilis* MA4680）来源的 *O*-甲基转移酶（SaOMT）被转入工程菌体内，产生中间体樱花素和终产物 7-OMA。这项研究中，通过改变对香豆酸的投料浓度，7-OMA 实现了 30 mg/L 的 24 h 产率。酪氨酸是合成查尔酮的前体，为得到樱花素和 4'-甲氧基柚皮素（4'-*O*-methyl-naringenin）（如图 3f 所示），KIM 等^[37]利用与类黄酮生物合成基因相似的基因，如酪氨酸氨解酶（tyrosine ammonia-lyase, TAL）、4-香豆酰辅酶 A 连接酶（4-coumaroyl CoA ligase, 4CL）、查尔酮合酶（CHS）生成柚皮素作为中间体，同时为增加辅酶 A 的供应，敲除异柠檬酸脱氢酶。最后，利用 OMTs 催化，7-甲氧基柚皮素（7-*O*-methyl-naringenin）（如图 3g 所示）和

4'-甲氧基柚皮素的最大产量分别达到了 42.5 mg/L 和 40.1 mg/L。

FOMTs 的底物选择性是影响其应用的重要因素。WILLITS 等^[32]在大肠杆菌中重组表达了 6 个来自薄荷 (*Mentha × piperita*) 的 OMTs (MpOMTs), 该工程菌可以对类黄酮底物不同位置的羟基进行甲基化, 表现出松弛的底物特异性, 例如 MpOMT1A, MpOMT3, MpOMT4 可以分别选择性地甲基化模型底物槲皮素 7-, 3'-, 4'-羟基 (产物如图 3b、图 3h、图 3i 所示)。许多细菌来源的 OMTs 本身就具有宽泛的底物选择性, 例如 SaOMT 可以催化甲基化包括大豆苷元、染料木素、芹黄素、槲皮素、柚皮素等一系列类黄酮化合物^[38]。最近有报道了一例链霉菌来源的 OMTs, 其可以催化 7,8-二羟基黄酮等 7 种黄酮类化合物发生甲基化^[7]。宽泛的底物选择性无疑扩大了 FOMTs 的应用范围, 已经解析的 FOMTs 如 ChOMT (如表 1 所示) 的蛋白质结构也为 FOMTs 蛋白质改造、提高其选择性和催化效率奠定了基础, 相信在不久的将来, 利用 FOMTs 将实现类黄酮化合物的工业化生产。

3.2 激素、抗生素或生物碱合成中的 NPOMTs

褪黑素 (melatonin) 是哺乳动物松果腺产生的一种激素, 在动物的昼夜节律调节中扮演着重要的角色, 可用于治疗睡眠障碍也可作为强效的抗氧化剂添加在人类日常饮食中。目前, 商业化的褪黑色素产品绝大部分由复杂的化学反应合成, 生产中通常需要用到昂贵的仪器设备和有毒、危险的化学试剂^[39-41]。为改变这一局面, 2016 年, GERMANN 等^[39]和 BYEON 等^[42]分别在酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和大肠杆菌中重建了褪黑素生物合成途径, 实现了褪黑素的生物合成。然而, 不论是酵母菌还是大肠杆菌, 褪黑素的产率都很低 (分别为 (14.5 ± 0.57) mg/L 和 1.46 mg/L), *O*-甲基转移酶 (*N*-乙酰复合胺 *O*-甲基转移酶和咖啡酸 *O*-甲基转移酶) 催化的 *N*-乙酰复合胺向褪黑素的转化被证明是生产的瓶颈。于是 WANG 等^[40]对咖啡酸 OMTs 的底物结合口袋进行了蛋白质工程改造, 增强了它与 *N*-乙酰复合胺底物的相互作用力, 使甲基化活性提高了 9.5 倍。将此改造后的 NPOMTs 应用于褪黑素生产将有可能极大地提高褪黑素产量。

竹桃霉素 (oleandomycin) 是链霉菌 (*S. antibioticus*) 产生的一种大环内酯类抗生素, 具有重要的医用价值。竹桃霉素的结构中含有两个糖基——*L*-夹竹桃糖和 *D*-红霉脱氧糖胺。RODRÍGUEZ 等^[43]在其生物合成过程的研究中发现了一例 OMTs (OleY), 该酶能够催化 *L*-橄榄糖由红霉内脂 B 糖基上的 3-羟基甲基化形成 *L*-夹竹桃糖由红霉内脂 B (如图 4a 所示)。随后的研究发现, OleY 对于类似的底物如鼠李糖基/*L*-碳霉糖基由红霉内脂 B 也具有甲基化的功能^[43]。此外, OLANO 等^[44]发现对于蒽环类抗生素硫霉素 (steffimycin), OleY 可甲基化修饰其脱氧己糖产生 3'-*O*-甲基甾烷霉素, 改善其抗肿瘤活性, 这表明 OleY 具有很强的底物宽泛性, 而除竹桃霉素和硫霉素外, 许多其他抗生素都含有糖基结构, OleY 的底物宽泛性为这些抗生素的结构修饰提供了可能。道诺霉素 (daunorubicin) 也是一种蒽环类抗生素, 结构和功能与硫霉素相似, 合成过程中需要甲基转移酶 DnrK 参与甲基化修饰, 与 OleY 不同的是, DnrK 催化蒽环上的 4-羟基发生甲基化 (如图 4b 所示)。2004 年, JANSSON 等^[45]对 DnrK 蛋白和催化底物三元复合体的晶体进行了解析, 揭示了 DnrK 的蛋白质三级结构和催化机理; GROCHOLSKI 等^[46]将 DnrK 和羟化酶 RdmB 的结构进行了比较, 在 DnrK 蛋白的特定位置插入一个丝氨酸残基, 成功将其转变成了羟化酶。这项研究对于改造 NPOMTs 使其具备新功能具有启发意义。

新抑癌菌素 (neocarzinostatin) 是临床上使用的一种抗癌药物, 用于治疗多种癌症如白血病、胃癌、胰腺癌等。萘酸衍生物是新抑癌菌素结构的一部分, 合成过程中需要 *O*-甲基转移酶 (NcsB1) 参与修饰。研究表明, NcsB1 具有严格的区域选择性, 能特异性地催化 2,7-二羟基-5-甲基-1-萘酸的 7-羟基发生甲基化 (如图 4c 所示); 此外, NcsB1 还具有一定的底物宽泛性, 对其他一些双羟基萘酸化合物也有催化活性^[47]。为阐明 NcsB1 底物宽泛性的结构基础, COOKE 等^[48]对 NcsB1 的蛋白质晶体结构进行了解析, 鉴定出了

关键的氨基酸残基。这些研究为 NcsB1 的结构改造和新抑菌素类似物的生物合成提供了有益参考。

堆囊粘菌素 (myxin) 属于吩嗪类天然产物, 是一种著名的抗生素, 具有极强的抗菌活性, 用其制成的铜迈星 (cuprimyxin) 作为广谱的兽用抗细菌和抗真菌药物已经被使用了数十年。JIANG 等^[49]鉴定出了堆囊粘菌素产生菌 (*Lysobacter antibioticus* OH13) 中负责对堆囊粘菌素进行结构修饰的 OMTs (LaPhzM), 该酶催化碘菌素 (iodinin) 转化成堆囊粘菌素 (如图 4d 所示), 而且对于吩嗪类化合物具有一定的底物宽泛性, 负责所有从菌株 OH13 中分离到的吩嗪类化合物的单甲氧基或双甲氧基的合成。JIANG 等^[49]在体外利用 LaPhzM 实现了 myxin 的一锅法合成, 随后还对 LaPhzM 的蛋白质晶体结构进行了解析, 揭示了 LaPhzM 活性和选择性的结构基础。目前, 已经分离或合成出了超过 6 000 种吩嗪化合物, 这些研究为通过代谢工程改造和化学酶法合成这些化合物提供了便利。

雷帕霉素 (rapamycin) 是链霉菌 (*S. rapamycinicus*) 产生的一种大环内脂类抗生素, 同时也是一种强效的免疫抑制剂。雷帕霉素骨架是由聚酮合酶合成的, 成熟过程中需要 3 个 OMTs (RapI、RapM 和 RapQ) 参与后修饰, 这 3 个酶分别先后甲基化雷帕霉素前体的 39-, 16-, 27-羟基 (如图 4e 所示), 具有高度的区域选择性^[50]。LAW 等^[50]在体外验证了 RapM 的区域选择性, 并且发现重组 RapM 可以接受 SAM 类似物作为辅因子催化去甲基雷帕霉素的 16-羟基发生乙基化和烯丙基化, 考虑到雷帕霉素类似物如依维莫司 (everolimus) 在临床上的重要应用价值, 这一发现无疑为雷帕霉素类新药的研发开辟了道路。

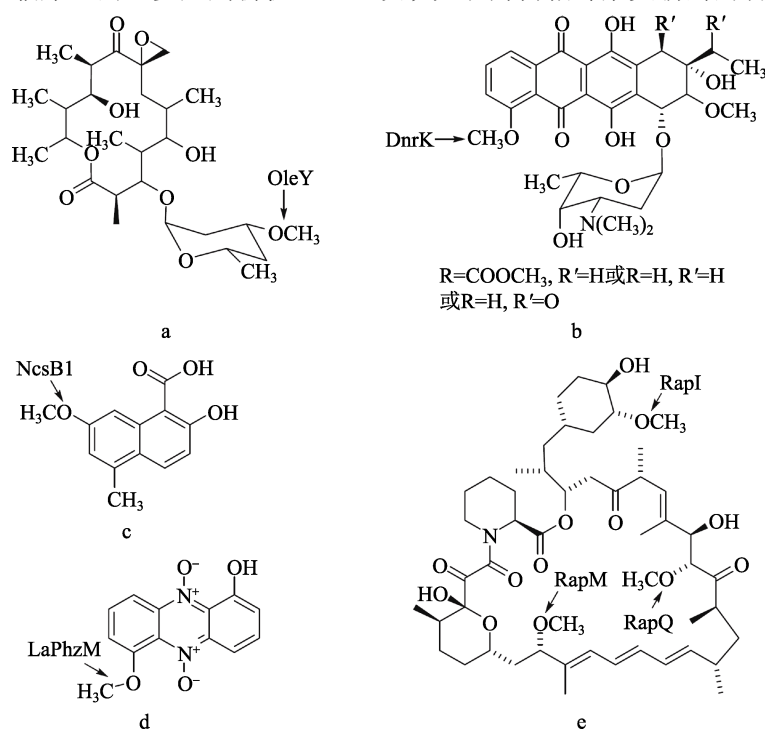


图4 NPOMTs 催化的抗生素 O-甲基化

Fig. 4 Antibiotics O-methylation catalyzed by NPOMTs

a—*L*-夹竹桃糖由红霉内脂 B; b—道诺霉素; c—7-甲氧基-2-羟基-5-甲基-1-萘酸; d—堆囊粘菌素; e—雷帕霉素
a-*L*-oleandrosyl-erythronolide B; b-Daunorubicin; c-7-methoxy-2-hydroxy-5-methyl-1-naphthalic acid; d-Myxin; e-Rapamycin

生物碱是一类含氮的次级代谢产物, 具有强烈的生物学活性, 许多生物碱的合成需要 OMTs 的参与。链黑菌素 (streptonigrin) 是一种氨基醌类生物碱, 具有广谱的抗肿瘤和抗菌生物活性。XU 等^[51]对链黑菌素产生菌 (*S. flocculus* CGMCC4.1223) 的链黑菌素生物合成基因簇进行了鉴定, 发现不仅 OMTs 负责催化链黑菌素结构中的 3 个甲氧基生成, 而且羧甲基转移酶 (StnF2) 在前体 lavendamycin 的转化过程中也

扮演了重要角色(如图 5a 所示)。这项研究表明,对于一些具有活泼官能团的天然产物,其合成过程中极有可能需要 NPOMTs 参与保护。番红霉素(saframycin)是一种异喹啉类生物碱,NELSON 等^[52]在其生物合成途径中发现了一例 *O*-甲基转移酶(SafC),该酶催化非酚类邻苯二酚衍生物的酚羟基发生甲基化,*L*-二羟基苯基丙氨酸(*L*-dopa)是其最适底物(如图 5b 所示)。有趣的是,SafC 对于化合物如 5'-methyl-*L*-dopa 和多巴胺等底物的 4'-羟基都具有专一的区域选择性,但对于咖啡酸,这种专一性被打破,3'-羟基也能被催化甲基化。这说明 SafC 的蛋白结构很可能与第 2 节中提到的 COMT 相似,同 COMT 类似的蛋白质改造或许也可以用于 SafC 拓宽其用途。

诺司卡品(noscapine)(如图 5c 所示)是罂粟(*Papaver somniferum*)产生的一种苯酞异喹啉(phthalideisoquinoline)类生物碱,具有潜在的抗癌疗效。LI 等^[53]在酿酒酵母中重建了诺司卡品的生物合成途径,发现诺司卡品的 4'-甲氧基由两个 OMTs——PsMT2 和 PsMT3 组成的异源二聚体催化产生,因为绝大多数 OMTs 在催化过程中都是以同源二聚体的形式存在,而异源二聚体通常不具有催化活性,所以这种催化形式在 OMTs 中十分罕见。此外,在这项研究中,LI 等^[53]还发现 PsMT2 和 PsMT3 异源二聚体的功能可以被 *P. somniferum* 体内另一个 *O*-甲基转移酶——norcoclaurine 6-*O*-甲基转移酶(norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase, N6OMT)执行。

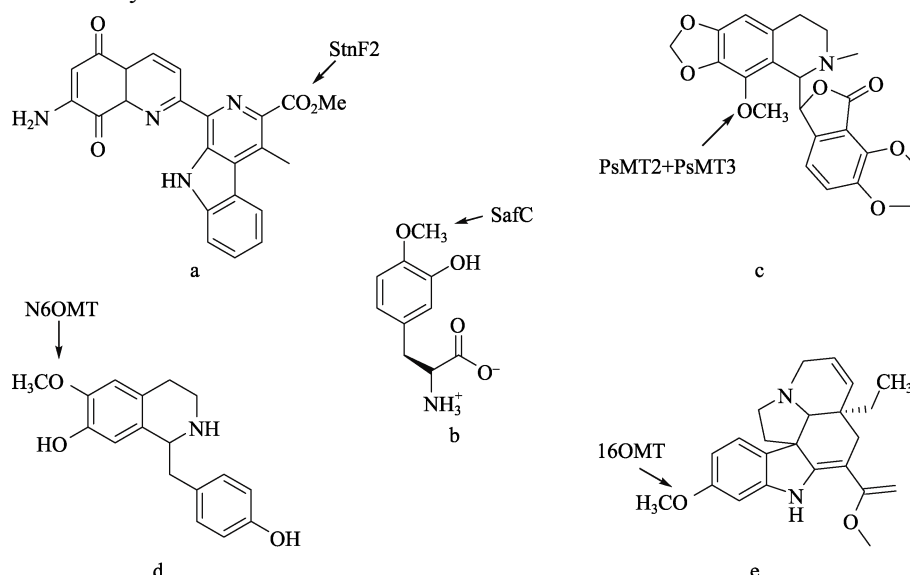


图 5 NPOMTs 催化的生物碱 *O*-甲基化

Fig. 5 Alkaloids *O*-methylation catalyzed by NPOMTs

a—7-甲氧基 lavendamycin; b—4-甲氧基 *L*-dopa; c—诺司卡品; d—乌药碱; e—16-甲氧基水甘草碱
a-7-methoxy lavendamycin; b-4-methoxy *L*-dopa; c-Noscapine; d-Coclaurine; e-16-methoxytabersonine

norcoclaurine 是许多苄基异喹啉生物碱包括吗啡的前体,N6OMT 催化的 norcoclaurine 6-羟基甲基化形成乌药碱(coclaurine)(如图 5d 所示)常常是这些苄基异喹啉生物碱生物合成的限速步骤,INUI 等^[54]通过过表达黄连(*Coptis japonica*)来源的 N6OMT 使栽培的加州罂粟花(*Eschscholzia californica*)中的生物碱含量提高了 7.5 倍。2016 年,ROBIN 等^[55]对 *Thalictrum flavum* 来源的 N6OMT 蛋白质晶体结构进行了解析,展示了 N6OMT 的活性位点和催化机理,为 N6OMT 的改造奠定了结构基础。文朵灵(vindoline)是长春花(*Catharanthus roseus*)产生的一种单萜类吲哚生物碱,是合成抗肿瘤药物长春花碱(vinblastine)和长春新碱(vincristine)的重要前体,但由于缺少相关的代谢途径,一直无法通过长春花发根培养生产大量的文朵灵。最近,SUN 等^[56]尝试在长春花发根中转入文朵灵生物合成途径中的水甘草碱 16-*O*-甲基

转移酶(16OMT)基因和16-羟化酶基因,结果发现发根中产生了文朵灵代谢中间产物16-甲氧基水甘草碱(16-methoxytabersonine)(如图5e所示),此外发根中原本产生的一些生物碱含量减少,说明转入的酶使发根中的代谢通路发生转移,证实了通过转基因利用发根生产文朵灵的可能性。

4 利用 NPOMTs 合成生物柴油

随着人类社会对能源消耗的日益增长,加上各国对能源独立性和安全性的需求,生物燃料作为潜在的可持续能源获得了越来越多的关注。生物柴油是由脂肪酸单烷基酯组成的混合物,是一种高级的生物燃料。与传统的化石燃料相比,生物柴油具有生物可降解性和低毒性的优点,而且由于生物柴油中碳的最终来源是植物,根据碳平衡,使用生物柴油不会增加大气中的温室气体的含量^[57]。此外,生物柴油和矿物柴油性质相似,用作发动机燃料时发动机无需进行大的改造^[58]。目前,生产生物柴油的主要原料是植物油和动物脂肪。植物油和动物脂肪中含有大量的脂肪酸甘油三酯,在催化剂存在下脂肪酸甘油三酯与醇进行酯交换产生长链脂肪酸烷基酯和甘油。然而,这种生产方式原料成本较高,且植物油和动物脂肪含有水和脂肪酸,降低了反应效率并且使得产物不纯,这给生物柴油的经济性和环境效益造成了不利影响^[59]。

为降低生物柴油的生产能耗,提高产品的质量,首先需要解决原料供应问题,其次是开发适宜的合成方法。脂肪酸甲酯和乙酯是生物柴油的最常见成分,一些实验室已经设计用微生物大量生产脂肪酸前体^[60],而脂肪酸O-甲基转移酶(fatty acid O-methyltransferases, FAMTs)可以催化脂肪酸的甲酯化,因此成为了生物柴油合成中重要的催化剂。2011年,NAWABI等^[61]成功鉴定了分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)中的一个FAMT(MmFAMT),通过将该酶和具有特定底物选择性的脂肪酸合成酶转入大肠杆菌,获得了一株产脂肪酸甲酯的工程菌,强化该菌的SAM合成后,脂肪酸甲酯的产量得到了进一步提升。该研究展现了FAMTs用于微生物合成生物柴油的潜力。于是,2015年PETRONIKOLOU等^[58]对MmFAMT的晶体结构进行了描述,揭示了其在结构上和植物天然产物代谢途径中甲基转移酶的一致性,为后续MmFAMT蛋白改造、扩宽底物范围提供了有益借鉴。

为进一步提高微生物合成生物柴油的产量,2016年SAKEN等^[62]将黑腹果蝇保幼激素酸O-甲基转移酶(*drosophila melanogaster* juvenile hormone acid O-methyltransferase, DmJHAMT)转入产中/长链脂肪酸的大肠杆菌工程菌中表达,同时增强SAM的合成,中/长链脂肪酸甲酯的滴度达到了0.56 g/L。由于这条代谢途径涉及的酶较少,因此可以很容易地转入其他微生物如酵母菌中,使脂肪酸甲酯的产量得到进一步提升。

5 结论与展望

天然产物OMTs是自然界广泛存在的一类酶,甲基化能显著改善天然产物的功能。底物宽泛性和区域选择性是影响NPOMTs应用的重要性质。随着生物学技术尤其是微生物代谢工程和酶工程的发展,越来越多的NPOMTs得到发掘,应用也越来越广泛。最近报道了一例甲基转移酶-卤素酶复合酶(AoiQ),该酶可以依次催化底物卤化和甲基化^[63],对这例双功能酶的研究将为NPOMTs的应用添加素材。近年来,研究者们已经开始将目光投向SAM类似物的合成^[64-66],利用这些类似物,NPOMTs可以催化除甲基化外更多的烷基化反应,如乙基化、烯丙基化等,这极大地拓展了NPOMTs的用途。当然,由于这些类似物并非NPOMTs的天然底物,对天然的NPOMTs进行改造提高它们对SAM类似物的选择性和催化效率成为了重要研究方向。目前,对SAM稳定性的研究已经取得了一系列的进展^[63],但SAM的体外循环再生仍然是限制NPOMTs体外应用的主要因素。许多辅因子如NADPH、ATP等都已经实现了体外循环,

相信不久的将来类似的体外循环也可以在 SAM 上取得成功, 届时, NPOMTs 的应用将再上一个台阶。

[参考文献] (References)

- [1] LISCOMBE D K, LOUIE G V, NOEL J P. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1238-1250.
- [2] BARAKAT A, CHOI A, YASSIN N B, et al. Comparative genomics and evolutionary analyses of the *O*-methyltransferase gene family in *Populus*[J]. *Gene*, 2011, 479(1-2): 37-46.
- [3] LISSINA E, YOUNG B, URBANUS M L, et al. A systems biology approach reveals the role of a novel methyltransferase in response to chemical stress and lipid homeostasis[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(10): e1002332.
- [4] WLODARSKI T, KUTNER J, TOWPIK J, et al. Comprehensive structural and substrate specificity classification of the *Saccharomyces cerevisiae* methyltransferome[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23168.
- [5] NOEL J P, DIXON R A, PICHESKY E, et al. Chapter two structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules[J]. *Recent Advances in Phytochemistry*, 2003, 37: 37-58.
- [6] KOIRALA N, THUAN N H, GHIMIRE G P, et al. Methylation of flavonoids: chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2016, 86: 103.
- [7] IBDAH M, ZHANG X H, SCHMIDT J, et al. A novel Mg^{2+} -dependent *O*-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(45): 43961.
- [8] PARAJULI P, PANDEY R P, NGUYEN T H T, et al. Substrate scope of *O*-methyltransferase from *Streptomyces peucetius* for biosynthesis of diverse natural products methoxides[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2018, 184(4): 1404-1420.
- [9] AXELROD J, SENOH S, WITKOP B. *O*-methylation of catechol amines *in vivo*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1958, 233(3): 697-701.
- [10] BONIFÁCIO M J, PALMA P N, ALMEIDA L, et al. Catechol-*O*-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease[J]. *CNS Drug Reviews*, 2010, 13(3): 352-379.
- [11] BASTOS P, GOMES T, RIBEIRO L. Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): an update on its role in cancer, neurological and cardiovascular diseases[J]. *Reviews of Physiology Biochemistry & Pharmacology*, 2017, 173: 1-39.
- [12] HANSEN E H, MØLLER B L, KOCK G R, et al. De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, 75(9): 2765-2774.
- [13] WALTON N J, MAYER M J, NARBAD A. Vanillin[J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(5): 505-515.
- [14] LI K, FROST J W. Synthesis of vanillin from glucose[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(40): 10545-10546.
- [15] BROCHADO A R, PATIL K R. Overexpression of *O*-methyltransferase leads to improved vanillin production in baker's yeast only when complemented with model-guided network engineering[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2013, 110(2): 656-659.
- [16] HAYDEN E C. Synthetic-biology firms shift focus[J]. *Nature*, 2014, 505(7485): 598.
- [17] KUNJAPUR A M, HYUN J C, PRATHER K L J. Deregulation of *S*-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the *E. coli* de novo vanillin biosynthesis pathway[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 61.
- [18] LAW B J C, BENNETT M R, THOMPSON M L, et al. Effects of active-site modification and quaternary structure on the regioselectivity of catechol-*O*-methyltransferase[J]. *Angewandte Chemie*, 2016, 128(8): 2733-2737.
- [19] SUN B, WANG P, WANG R, et al. Molecular cloning and characterization of a meta/para-*O*-methyltransferase from *Lycoris aurea*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1911.
- [20] VERVERIDIS F, TRANTAS E, DOUGLAS C, et al. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: chemical diversity, impacts on plant biology and human health[J]. *Biotechnology Journal*, 2007, 2(10): 1214-1234.

- [21] CASTRILLO J L, VANDEN D B, CARRASCO L. 3-methylquercetin is a potent and selective inhibitor of poliovirus RNA synthesis[J]. *Virology*, 1986, 152(1): 219-227.
- [22] USTÜN O, OZÇELİK B, AKYÖN Y, et al. Flavonoids with anti-helicobacter pylori activity from *Cistus laurifolius* leaves[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 108(3): 457-461.
- [23] NISHIHORI Y, KATO K, TANAKA M, et al. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2004, 20(Suppl.): 95.
- [24] SATO T, KOIKE L, MIYATA Y, et al. Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix metal[J]. *Cancer Research*, 2002, 62(4): 1025-1029.
- [25] TOMINARI T, HIRATA M, MATSUMOTO C, et al. Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2012, 119(4): 390-394.
- [26] LI R W, THERIAULT A G, AU K, et al. Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters[J]. *Life Sciences*, 2006, 79(4): 365-373.
- [27] CAO H, JING X, WU D, et al. Methylation of genistein and kaempferol improves their affinities for proteins[J]. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 2013, 64(4): 437-443.
- [28] WALLE T. Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2007, 4(6): 826-832.
- [29] WULF L W, NAGEL C W. Identification and changes of flavonoids in merlot and cabernet sauvignon wines[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 45(3): 479-484.
- [30] BIMAKR M, RAHMAN R A, TAIP F S, et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves[J]. *Food & Bioproducts Processing*, 2011, 89(1): 67-72.
- [31] KŘEN V, KUBISCH J, SEDMERA P, et al. Glycosylation of silybin[J]. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1997(17): 2467-2474.
- [32] WILLITS M G, GIOVANNI M, PRATA R T, et al. Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of *in vivo* diversification of secondary metabolites[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(1): 31-41.
- [33] KIM B G, KIM H, HUR H G, et al. Regioselectivity of 7-*O*-methyltransferase of poplar to flavones[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(2): 241-247.
- [34] LEE S, SHIN S Y, LEE Y, et al. Rhamnetin production based on the rational design of the poplar-methyltransferase enzyme and its biological activities[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21(13): 3866-3870.
- [35] KOIRALA N, THUAN N H, GHIMIRE G P, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of isoflavonoid-7-*O*-methoxides and their biological activities[J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 2015. doi:10.1002/bab.1452.
- [36] MALLA S, KOFFAS M A G, KAZLAUSKAS R J, et al. Production of 7-*O*-methyl aromadendrin, a medicinally valuable flavonoid, in *Escherichia coli*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(3): 684.
- [37] KIM M J, KIM B G, AHN J H. Biosynthesis of bioactive *O*-methylated flavonoids in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2013, 97(16): 7195-7204.
- [38] BONGGYU K, BORA J, YOUNGSHIM L, et al. Regiospecific flavonoid 7-*O*-methylation with *Streptomyces avermitilis* *O*-methyltransferase expressed in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2006, 54(3): 823-828.
- [39] GERMANN S M, BAALLAL JACOBSEN S A, SCHNEIDER K, et al. Glucose-based microbial production of the hormone melatonin in yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(5): 717-724.

- [40] WANG W, SU S, WANG S, et al. Significantly improved catalytic efficiency of caffeic acid *O*-methyltransferase towards *N*-acetylserotonin by strengthening its interactions with the unnatural substrate's terminal structure[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2019, 125: 1-5.
- [41] SUN T, CHEN L, ZHANG W. Microbial production of mammalian melatonin-a promising solution to melatonin industry[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(5): 601-602.
- [42] BYEON Y, BACK K. Melatonin production in *Escherichia coli* by dual expression of serotonin *N*-acetyltransferase and caffeic acid *O*-methyltransferase[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(15): 6683-6691.
- [43] RODRÍGUEZ L, RODRÍGUEZ D, OLANO C, et al. Functional analysis of OleY *L*-oleandrosyl 3-*O*-methyltransferase of the oleandomycin biosynthetic pathway in *Streptomyces antibioticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(18): 5358.
- [44] OLANO C, ABDELFAHATTAH M S, GULLON S, et al. Glycosylated derivatives of steffimycin: insights into the role of the sugar moieties for the biological activity[J]. *ChemBioChem*, 2008, 9(4): 624-633.
- [45] JANSSON A, KOSKINIEMI H, MÄNTSÄLÄ P, et al. Crystal structure of a ternary complex of DnrK, a methyltransferase in daunorubicin biosynthesis, with bound products[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(39): 41149-41156.
- [46] GROCHOLSKI T, DINIS P, NIIRANEN L, et al. Divergent evolution of an atypical *S*-adenosyl-*L*-methionine-dependent monooxygenase involved in anthracycline biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(32): 9866.
- [47] LUO Y, LIN S, ZHANG J, et al. Regiospecific *O*-methylation of naphthoic acids catalyzed by NcsB1, an *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic neocarzinostatin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(21): 14694-14702.
- [48] COOKE H A, GUENTHER E L, LUO Y, et al. Molecular basis of substrate promiscuity for the SAM-dependent *O*-methyltransferase NcsB1, involved in the biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic neocarzinostatin[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(40): 9590-9598.
- [49] JIANG J, GUIZA D B, SCHACHT A, et al. Functional and structural analysis of phenazine *O*-methyltransferase LaPhzM from *Lysobacter antibioticus* OH13 and one-pot enzymatic synthesis of the antibiotic myxin[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(4): 1003-1012.
- [50] LAW B, STRUCK A W, BENNETT M R, et al. Site-specific bioalkylation of rapamycin by the RapM 16-*O*-methyltransferase[J]. *Chemical Science*, 2015, 6(5): 2885-2892.
- [51] XU F, KONG D, HE X, et al. Characterization of streptonigrin biosynthesis reveals a cryptic carboxyl methylation and an unusual oxidative cleavage of a N—C bond[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(5): 1739-1748.
- [52] NELSON J T, LEE J, SIMS J W, et al. Characterization of SafC, a catechol 4-*O*-methyltransferase involved in saframycin biosynthesis[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73(11): 3575-3580.
- [53] LI Y, SMOLKE C D. Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12137.
- [54] INUI T, TAMURA K, FUJII N, et al. Overexpression of *Coptis japonica* norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase overcomes the rate-limiting step in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in cultured *Eschscholzia californica*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2007, 48(2): 252-262.
- [55] ROBIN A Y, GIUSTINI C, GRAINDORGE M, et al. Crystal structure of norcoclaurine-6-*O*-methyltransferase, a key rate-limiting step in the synthesis of benzyloisoquinoline alkaloids[J]. *Plant Journal*, 2016, 87(6): 641-653.
- [56] SUN J, ZHAO L, SHAO Z, et al. Expression of tabersonine 16-hydroxylase and 16-hydroxytabersonine-*O*-methyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2018, 115(3): 673-683.
- [57] ATADASHI I M, AROUA M K, AZIZ A A. High quality biodiesel and its diesel engine application: a review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14(7): 1999-2008.
- [58] PETRONIKOLOU N, NAIR S K. Biochemical studies of mycobacterial fatty acid methyltransferase: a catalyst for the

- enzymatic production of biodiesel[J]. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(11): 1480-1490.
- [59] LEUNG D Y C, WU X, LEUNG M K H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification[J]. *Applied Energy*, 2010, 87(4): 1083-1095.
- [60] KUNG Y, RUNGUPHAN W, KEASLING J D. From fields to fuels: recent advances in the microbial production of biofuels[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(11): 498-513.
- [61] NAWABI P, BAUER S, KYRPIDES N, et al. Engineering *Escherichia coli* for biodiesel production utilizing a bacterial fatty acid methyltransferase[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 8052-8061.
- [62] SAKEN S, KORMAN T P, CLARKE S G, et al. Production of FAME biodiesel in *E. coli* by direct methylation with an insect enzyme[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24239.
- [63] CHANKHAMJON P, TSUNEMATSU Y, ISHIDA-ITO M, et al. Regioselective dichlorination of a non-activated aliphatic carbon atom and phenolic bismethylation by a multifunctional fungal flavoenzyme[J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2016, 55(39): 11955-11959.
- [64] SINGH S, ZHANG J, HUBER T D, et al. Facile chemoenzymatic strategies for the synthesis and utilization of *S*-adenosyl-(*L*)-methionine analogues[J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, 53(15): 3965-3969.
- [65] THOMSEN M, VOGENSEN S B, BUCHARDT J, et al. Chemoenzymatic synthesis and *in situ* application of *S*-adenosyl-*L*-methionine analogs[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013, 11(43): 7606-7610.
- [66] BENNETT M R, SHEPHERD S A, CRONIN V A, et al. Recent advances in methyltransferase biocatalysis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 37: 97-106.

(责任编辑: 肖书笑)