



微生物源甲硫氨酸 γ -裂解酶的研究进展

谭非凡¹, 朱丽雯¹, 周成², 张桂敏³, 贾开志^{1*}

- 1 湖北工业大学, 发酵工程教育部重点实验室, 湖北省工业微生物重点实验室, 湖北省工业发酵协同创新中心, 天然药物生物制造科学中心, 湖北 武汉 430068
- 2 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101
- 3 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

谭非凡, 朱丽雯, 周成, 张桂敏, 贾开志. 微生物源甲硫氨酸 γ -裂解酶的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(2): 421–433.
Tan Feifan, Zhu Liwen, Zhou Cheng, Zhang Guimin, Jia Kaizhi. Research progress of methionine γ -lyase from microorganism. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 421–433.

摘要: 甲硫氨酸 γ -裂解酶(methionine γ -lyase, MGL)催化甲硫氨酸 γ 位 C-S 键的裂解反应, 生成等摩尔的 α -酮丁酸、甲基硫醇和氨。MGL 降低胞内甲硫氨酸浓度, 显著抑制恶性肿瘤细胞的生长和迁移, 激发正常细胞的抗氧化反应, 开发高效的 MGL 已成为肿瘤治疗和抗衰老研究的热点。MGL 广泛存在于微生物中, 而在哺乳动物中不存在, MGL 是开发抗致病微生物感染药物的重要靶标。产物甲基硫醇及其衍生物是构成食品香味的主体成分, 其组分和浓度决定了食品整体香味的形成, 系统阐明 MGL 的催化机制和活性调节机制将推动食品品质及其稳定性的精准控制。本文总结了微生物源 MGL 的挖掘、催化机制和改造方面的最新进展, 讨论了 MGL 在癌症治疗、抗衰老、抗致病微生物感染以及食品香味合成和制造领域的应用情况, 展望了 MGL 的发展前景与挑战。

关键词: 甲硫氨酸 γ -裂解酶; 肿瘤治疗; 抗衰老; 抗感染; 食品香味

基金项目: 国家自然科学基金(31570054, 21838002); 发酵工程教育部重点实验室开放课题(202009FE18)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570054, 21838002) and by the Open Project Funding of the Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), China (202009FE18)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-59750483; E-mail: kaizhijial@163.com

Received: 22 April 2021; Revised: 4 June 2021; Published online: 11 June 2021

Research progress of methionine γ -lyase from microorganism

TAN Feifan¹, ZHU Liwen¹, ZHOU Cheng², ZHANG Guimin³, JIA Kaizhi^{1*}

1 Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Natural Medicine Biomufacturing Science Center, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: Methionine γ -lyase (MGL) catalyzes the cleavage of C-S bond in methionine, which produces equimolar products including α -ketobutyric acid, methanethiol and ammonia. MGL reduces the intracellular concentration of methionine, which significantly inhibits the growth and migration of malignant tumor cells and triggers the antioxidant response in normal cells. Engineering MGL for enhancing its catalytic efficiency is the focus for tumor therapy and anti-aging. MGL widely exists in microorganisms, but not in mammals. MGL is an important target for the development of antimicrobial drugs toward microbial pathogens. Methanethiol and its derivatives are the main components of food aroma, and the composition and concentration of methanethiol and its derivatives determine the formation of food aroma. Elucidating the catalytic mechanism and identifying the key elements control the activity of MGL will promote the precise control of food quality and its stability. In this paper, the latest advances in the discovery, catalytic mechanism and engineering of MGL from microorganisms were summarized. The applications of MGL in tumor therapy, anti-aging, anti-microbial infection and synthesis and manufacturing of food aroma were discussed, and then the development and challenge of MGL were prospected.

Keywords: methionine γ -lyase; tumor therapy; anti-aging; anti-microbial infection; food aroma

甲硫氨酸 γ -裂解酶(methionine γ -lyase, MGL)是一种依赖 5'-磷酸吡哆醛(PLP)、催化甲硫氨酸 γ 位 C-S 键裂解反应的功能酶;催化合成的产物为甲基硫醇、 α -酮丁酸和氨,该酶促反应是构成甲硫氨酸分解的重要途径之一^[1-3]。MGL 广泛存在于多种微生物中,而在哺乳动物组织中却未发现^[4]。挖掘微生物来源的 MGL,通过食品添加 MGL 或者体内注射 MGL 以降低哺乳动物胞内甲硫氨酸浓度成为一项极具发展潜力治疗甲硫氨酸依赖肿瘤的重要手段^[5-8]。正常细胞对胞内甲硫氨酸浓度降低具有一定的耐受性,且甲硫氨酸浓度降低将减少

胞内活性氧的种类,延长正常细胞的生命、提高抗胁迫、代谢适应以及抗氧化功能^[7-8]。因此,利用 MGL 降低正常细胞胞内甲硫氨酸含量成为抗衰老研究的热点。MGL 催化反应产物甲基硫醇进一步通过自由基反应快速合成二甲基硫、二甲基二硫和二甲基三硫等挥发性有机含硫化合物(VOSCs)^[9-15]。VOSCs 嗅阈值低、香味活性值高,是构成发酵食品香味的主体成分^[9-10]。精细调控发酵微生物胞内 MGL 的表达是控制食品品质的关键环节。对于一些病原微生物而言,如引起口臭细菌牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、齿密螺旋体

(*Treponema dentium*)和连翘坦纳氏菌(*Tannerella forsythia*), 其通过胞内的甲基氧化酶进一步将甲基硫醇转化成活性化合物甲醛、过氧化氢和硫化氢; 而 MGL 催化产物氨是口臭气味的另外一个重要来源^[16]。因此, 从源头上开发 MGL 活性抑制剂是治疗口腔细菌感染的一个重要手段。此外, MGL 也是作为治疗阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)等致病性微生物感染的药物靶标^[2]。基于 MGL 及其催化产物在医药和食品领域的重要性, 本文通过系统综述甲硫氨酸裂解酶的挖掘、催化机制和改造方面最新进展, 为治疗多种恶性甲硫氨酸依赖性肿瘤、抗衰老和抗致病微生物感染等医疗方面提供优良的酶制剂或者酶抑制剂, 同时推动 VOSCs 绿色制造技术的开发及其动态、精细化调控技术的研制。

1 MGL 的挖掘

Kreis 等于 1973 年首次从生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)获得高纯度的 MGL, 并发现 MGL 具有抗肿瘤活性^[17]。随后的研究从阴道毛滴虫、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[18]、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)^[19]等微生物中纯化出天然甲硫氨酸裂解酶并解析了其结构(附表 1)。一些 MGL 具有较宽泛的底物杂泛性, 例如来源于恶臭假单胞菌^[18]、卵状假单胞菌(*Pseudomonas ovalis*)^[20]、扩展短杆菌 BL2 (*Brevibacterium linens* BL2)^[21]、链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)^[22]、弗氏柠檬酸杆菌^[23]和溶组织内阿米巴^[24]的 MGL 能催化 L-半胱氨酸及其衍生物 β 位 C-S 键的裂解反应。目前研究最为系统的是来源于恶臭假单胞菌的甲硫氨酸 γ -裂解酶(pMGL), 其对甲硫氨酸表现出

较高的结合能力和催化能力, 因此广泛应用于通过降低胞内甲硫氨酸浓度治疗恶性肿瘤的研究中^[25-26]。

MGL 从属于胱硫醚 γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CGL)亚群, 聚类分析发现原核和真核微生物来源的 MGL 分别聚类于 2 个不同的分支(图 1), 值得注意的是来源于原生动物的阴道毛滴虫的 MGL 与原核微生物的 MGL 聚类在一起, 而来源于棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)的 MGL 却位于真核胱硫醚 γ -裂解酶亚群与胱硫醚 β -裂解酶亚群之间, 暗示微生物来源的 MGL 在自然进化过程中的多样性(图 1)。胱硫醚 γ -裂解酶具有特异催化 L-胱硫醚、L-甲硫氨酸、L-同型半胱氨酸等含硫氨基酸 γ 位 C-S 键裂解的功能^[27]。然而模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中与原核 MGL 同源的功能酶 CYS3 却不能催化甲硫氨酸 γ 位 C-S 键的裂解反应^[11]; STR3 被注释为胱硫醚 β -裂解酶编码基因, 体外功能鉴定其亦不具有裂解甲硫氨酸的功能^[11,28]。Jia 等从名贵食用真菌黑孢块菌的子实体中分离到一株重寄生真菌红粉粘帚霉 Tang19 (*Clonostachys rosea* Tang19), 来源于红粉粘帚霉的 STR3 同源蛋白能够裂解甲硫氨酸合成甲基硫醇, 但其活性很弱, 底物谱测定表明 STR3 同源蛋白能够高效催化含硫化合物(L-djenkolate、L-胱氨酸、S-甲基-L-半胱氨酸) β 位 C-S 键的裂解反应, 推测 STR3 同源蛋白催化甲硫氨酸 γ 位 C-S 键裂解的功能与其杂泛性有关^[29]。STR3 同源蛋白能够分解甲硫氨酸转氨产物 4-甲硫基-2-氧丁酸(KMBA)合成甲基硫醇等 VOSCs 组分^[29]。这条路线需要两步酶促反应, 没有一步分解甲硫氨酸合成甲基硫醇等 VOSCs 组分的路线更为经济、高效(图 2)。

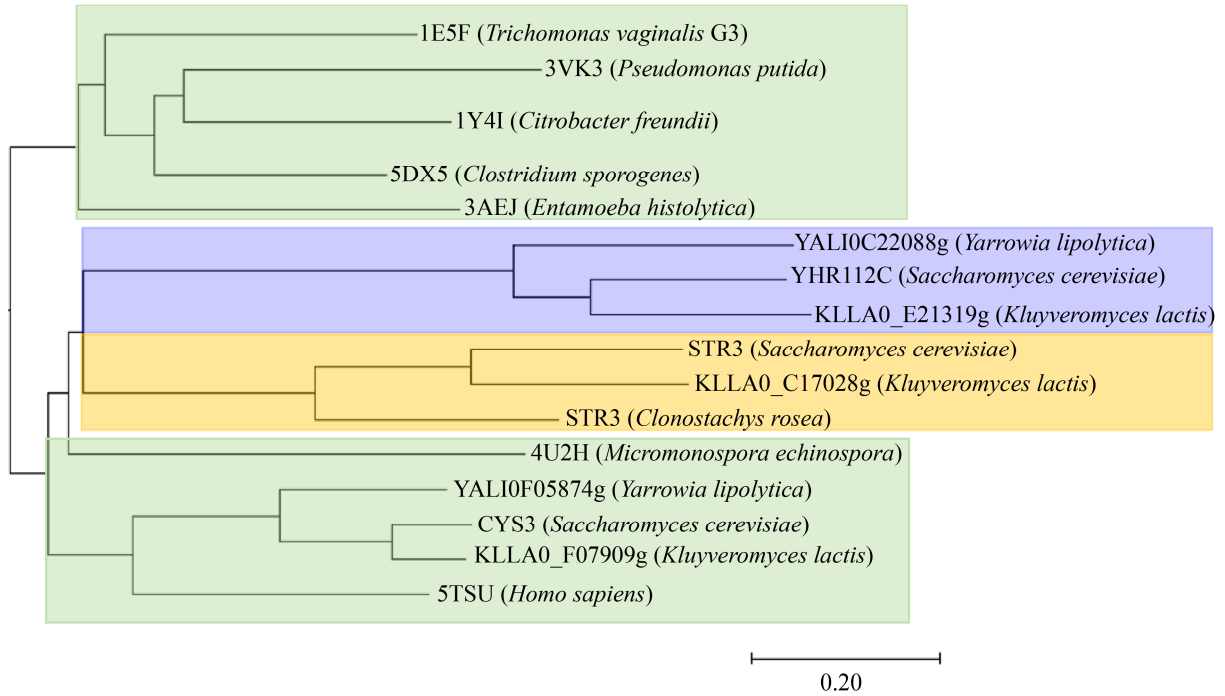


图 1 不同来源 MGL 的进化分析

Figure 1 Evolutionary analysis of MGLs. PDB IDs or entry names from bacteria, yeast, protozoon and human were provided, cystathionine γ -lyase was marked in green, cystathionine β -lyase was marked in yellow, cystathionine γ -lyase identified recently in yeast was marked in blue.

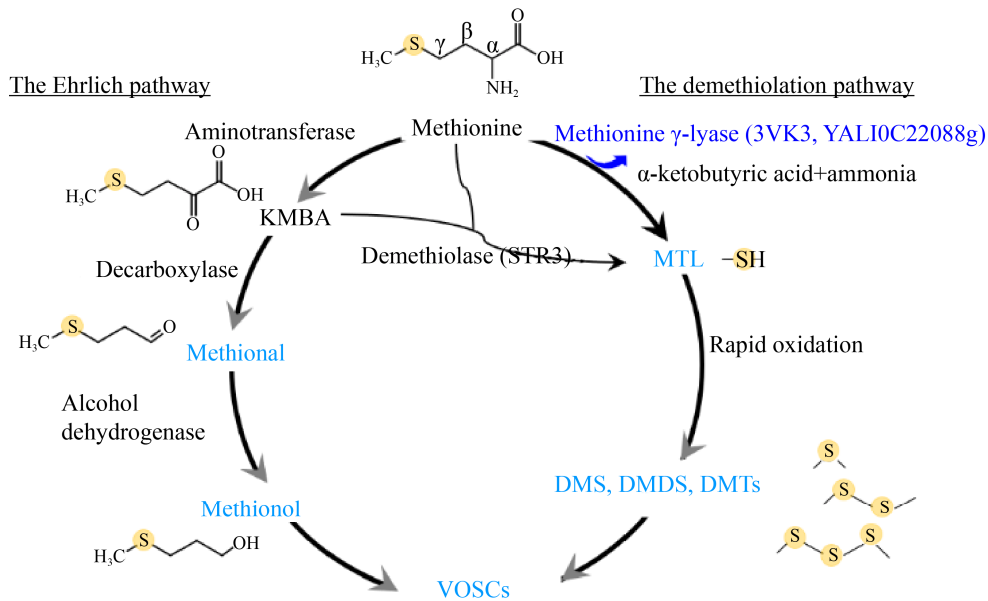


图 2 微生物分解甲硫氨酸合成 VOCs 途径

Figure 2 The pathway for catabolizing L-methionine into VOCs by microorganisms. 3VK3 is the PDB ID of pMGL from *Pseudomonas putida*, YALI0C22088g was a MGL from *Y. lipolytica*.

本实验室前期通过途径分析挖掘酵母(酿酒酵母、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*))基因组中参与甲硫氨酸代谢的功能酶,发现未知功能蛋白 YHR112C、KLLA0-E21319g 和 YALI0C22088g 聚类距离胱硫醚 β -裂解酶亚群较近,而距离胱硫醚 γ -裂解酶亚群较远^[9](图 1)。体外功能鉴定发现来源于解脂耶氏酵母的 YALI0C22088g 具有一步分解甲硫氨酸合成甲基硫醇的活性,且活性明显高于来源于红粉粘帚霉的 STR3 同源蛋白;而来源于酿酒酵母的 YHR112C 具有微弱的裂解甲硫氨酸合成甲基硫醇活性,表明该聚类是一类新型的 MGL^[9]。

不同来源 MGL 的生化性质非常相似。MGL 的氨基酸序列长度通常为 400 个氨基酸左右,序列之间具有明显的同源性。MGL 的物理性质也较为相似,例如,最适 pH 在 7.0–8.0 之间, pH 稳定性在 5.0–9.0 之间,最适温度为 30 °C。该酶在 278 nm 和 420 nm 处有吸收峰,在 330 nm 附近有一个肩峰,且吸收峰不随 pH 而改变。裂解酶为四聚体,含有一个较大的 PLP 结合结构域和较小的 C-端结构域,其中辅因子 PLP 在静息态(resting stage)时与多肽链中心部分的赖氨酸(Lys)残基连接,形成内部 Schiff 碱^[27,30–32]。

2 MGL 的催化机制

利用计算化学和结构生物学等研究手段解析 MGL 与底物甲硫氨酸、辅因子 PLP 的相互作用方式,揭示 MGL 催化甲硫氨酸一步分解合成 VOSCs 的分子机制,可以为理性设计和改造 MGL 提供理论基础。

2.1 动力学模拟解析 MGL 的催化机制

量子力学、分子力学结合伞形取样的研究表明, MGL 与底物甲硫氨酸结合后经过

4 个阶段共 19 步反应,将甲硫氨酸裂解为甲基硫醇、 α -酮丁酸和氨^[33]。阶段 1 (transamination reaction of PLP, PLP 的转氨反应): 是一个加成-消除反应,底物甲硫氨酸加成至 C_{PLP} , 随后消除 Lys211 上的 N_{Lys} , 导致底物甲硫氨酸取代 Lys211, 甲硫氨酸与 PLP 之间形成外部 Schiff 碱。阶段 2 (E1cB elimination of methyl mercaptan, E1cB 消除反应): 遵循去质子化-消除途径,即 N_{Lys} 和磷酸基团充当碱,去除甲硫氨酸 C_{α} 和 C_{β} 的质子,反应中间体进一步通过 E1cB 机制消除 MeS^{-} 。阶段 3 (tautomerization and hydrolysis, 互变异构化和水解): 是一个耦合亲核加成—消除过程的水解反应,连接 C_{PLP} 和 PLP 环的共价 π -键被打断, C_{α} 原子的亲电活性增强; 当一个水分子攻击高亲电性的 C_{α} 即可发生亲核加成反应; O_{wat} 上的一个质子转移至 N_{Met} , N_{Met} 随即被从 C_{α} 原子消除,产生第二个产物 α -酮丁酸。阶段 4 (return to the resting state of the enzyme, 恢复酶的静息态): N_{Lys} 上的质子转移至来自甲硫氨酸的氨基基团 N_{Met} , 导致 N_{Met} 离去能力增强、随后被消除,产生氨(NH_4^{+}), 酶恢复静息态(图 3)。PLP 在酶促甲硫氨酸裂解反应开始时通过外部的醛亚胺结构与底物甲硫氨酸共价结合,继而通过共振效应稳定不同类型反应中间体的阴离子; 最新的研究表明 PLP 还具有利用羟基基团和磷酸基团帮助质子转移或者临时储存一些中间体产生的额外质子的功能^[33–34]。

2.2 控制 MGL 催化活性的关键氨基酸残基

酶的底物特异性和反应类型通常是由活性中心的一系列氨基酸残基决定,而不是结构上的折叠^[35]。通过对 YALI0C22088g 与结构解析的胱硫醚 γ -裂解酶 CYS3 (PDB ID: 1N8P, 来源于酿酒酵母)^[27]、甲硫氨酸裂解酶 5TSU (PDB ID, 人源胱硫醚 γ -裂解酶 CTH 突变体)^[36–38]和

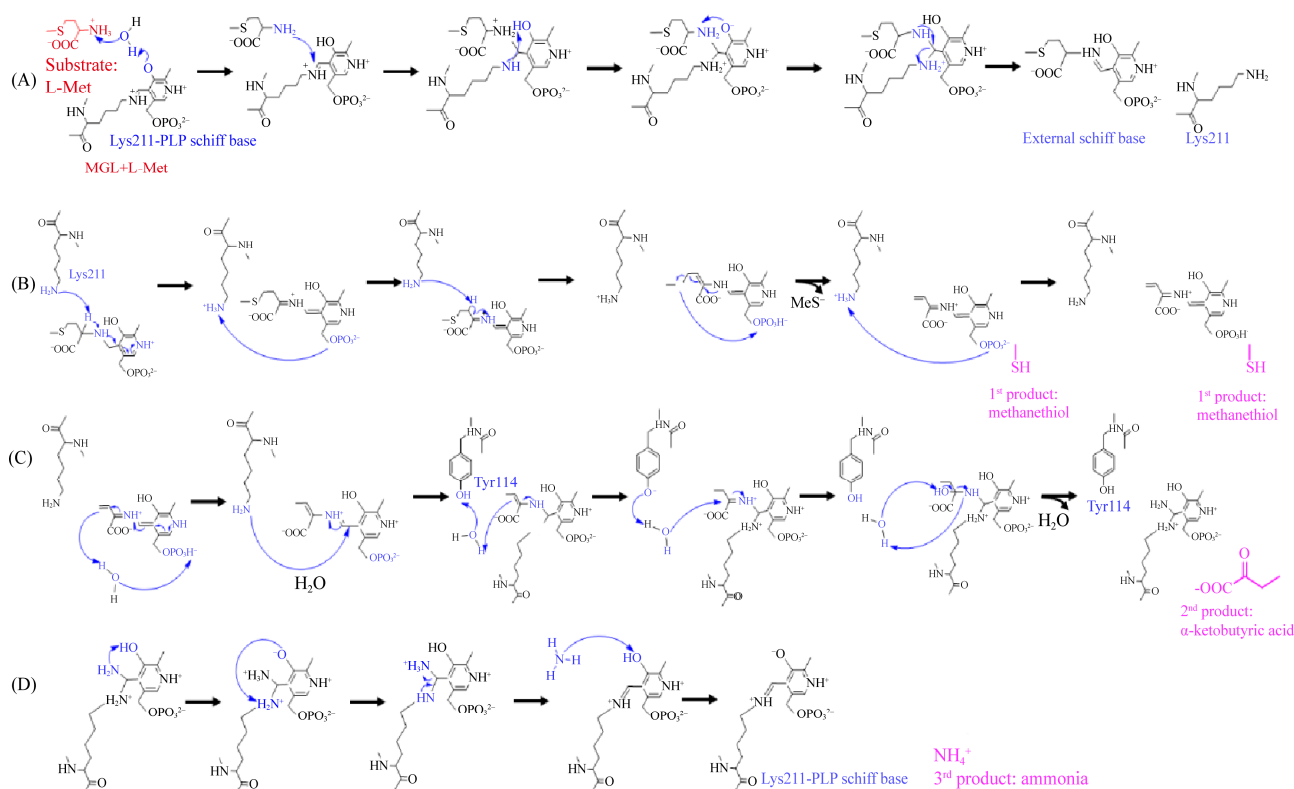


图3 动力学模拟 MGL 的催化机制

Figure 3 Kinetic simulation of catalytic mechanism for MGL. A: First stage of the reaction: transamination reaction of PLP; B: Second stage of the reaction: ElcB elimination of methyl mercaptan; C: Third stage of the reaction: tautomerization and hydrolysis; D: Fourth stage of the reaction: return to the resting state of the enzyme.

3VK3 (PDB ID, 来源于恶臭假单胞菌 C116)^[18] 以及拟南芥胱硫醚 β -裂解酶 1IBJ (PDB ID)^[32] 在氨基酸水平上的保守性进行分析,发现胱硫醚 β -裂解酶与胱硫醚 γ -裂解酶活性中心的氨基酸残基高度保守,暗示在活性中心之外存在决定裂解酶对底物 C-S 键裂解的区域选择性的关键因子。CYS3、人源胱硫醚 γ -裂解酶 CTH 和 3VK3 同属胱硫醚 γ -裂解酶亚群,然而 CYS3 和 CTH 均不具有裂解甲硫氨酸的功能。人源胱硫醚 γ -裂解酶 CTH 的突变体 5TSU 能够高效裂解甲硫氨酸,比较 CTH 与 5TSU 等突变体结构上的差异,推测位于活性中心入口处 loop 的运动性增强、入口处于开放状态导致突变体高效裂解甲硫氨酸^[36-38]。然而这段 loop 序列在 YALI0C22088g

以及其他裂解酶中并不保守^[9]。3VK3 具有分解甲硫氨酸的功能,其中 H116 控制 C-S 键裂解的区域选择特性, H116、K240 和 D241 之间形成的氢键网络控制了裂解反应的底物特异性, H116、K240 和 D241 特异存在于 3VK3^[18], 在 YALI0C22088g 以及其他裂解酶中亦不保守。这些数据暗示不同来源的甲硫氨酸裂解酶控制底物特异性的分子机制可能存在很大差异。

底物甲硫氨酸需要通过入口和通道才能进入活性中心参与催化反应,对入口、通道和活性中心的氨基酸残基进行功能分析可以快速鉴定控制甲硫氨酸裂解酶底物选择性和催化活性的关键氨基酸残基。基于 YALI0C22088g 裂解甲硫氨酸的酶活是 YHR112C 的 25.23 倍,而

KLLA0-E21319g 不具有裂解甲硫氨酸功能^[9], Zhao 等提出假设: YAL10C22088g 在入口、通道和活性中心与 YHR112C、KLLA0-E21319g 存在变异的氨基酸残基可能是控制 YAL10C22088g 催化活性的关键氨基酸残基^[9]。通过对 YAL10C22088g、YHR112C 和 KLLA0-E21319g 氨基酸序列进化的保守性和变异性进行分析,在 YAL10C22088g 入口、通道和活性中心结构共找到 12 个变异氨基酸残基^[9], 利用丙氨酸扫描结合酶催化活性测定, 共在 YAL10C22088g 入口和通道处找到 8 个关键氨基酸残基, 其功能可能与底物特异结合、入口和通道瓶颈相关^[9]。

底物位阻和构型也是影响 MGL 底物识别的重要因素。来源于卵状假单胞菌 MGL 不能催化胱氨酸和胱硫醚的裂解反应, 对 S-(β -氨基乙基)-L-半胱氨酸催化活性较弱^[20]。推测这些底物结构中 ω -羧基基团或者 ω -氨基基团可能限制了 MGL 与底物的特异结合, 阻碍了裂解反应的发生^[20]。另外, MGL 不能催化正亮氨酸、戊氨酸以及甲硫氨酸和半胱氨酸 D 异构体的裂解反应, 表明该酶的活性中心只能与 α 碳为 L 构型的底物进行结合^[16]。

3 MGL 的改造及其应用

MGL 催化甲硫氨酸一步分解反应有效降低胞内甲硫氨酸浓度, 是治疗甲硫氨酸依赖性癌症的一种极具发展潜力的方法^[36-40]。MGL 广泛存在于微生物中, 而在哺乳动物中不存在, MGL 是开发抗致病微生物感染药物的重要靶标^[2,16]。MGL 催化合成的甲基硫醇等 VOSCs 组分是构成食品香味的主体物质, 其组分和浓度决定了食品的品质^[12-15]。通过改造 MGL 以及研究 MGL 活性调控机制将推动其在医疗健康和食品工业领域中的应用。

3.1 MGL 在医疗健康中的应用

甲硫氨酸而非其他氨基酸的浓度降低将阻碍胞内甲基化反应, 抑制甲硫氨酸依赖性肿瘤细胞的生长和繁殖, 进而破坏肿瘤干细胞的自发更新能力^[41-44]。正常细胞对胞内甲硫氨酸浓度降低具有耐受能力, 同时甲硫氨酸浓度降低将减少胞内活性氧的种类, 从而延长正常细胞的寿命、提高抗胁迫、代谢适应以及抗氧化功能^[7-8,45]。注射 MGL 和食品添加 MGL 均有效降低甲硫氨酸浓度, 且该方法用于癌症治疗不需要考虑药物跨越血脑屏障问题^[36-38]。因此, MGL 成为治疗癌症的一种极具发展潜力的酶制剂。

目前, 用于癌症治疗研究最为深入的 pMGL 来自恶臭假单胞菌。模式动物体内试验表明 pMGL 能够降低血浆中甲硫氨酸浓度, 严重抑制肿瘤生长。限制 pMGL 进一步应用的主要因素是其在血液中的稳定性很差、引发动物的免疫反应^[38]。利用酶工程改造 pMGL 将在一定程度上缓解上述问题^[18,46-47]。开发来源于人类的 MGL 可以克服 pMGL 的缺点^[18,46-47]。然而, 人类组织中不存在天然 MGL。人源 CGL 与 pMGL 在氨基酸水平具有 61% 的一致性, 且具备结构相似性^[38]。但是人源 CGL 不具有裂解甲硫氨酸的功能。Stone 等将 CGL 与来源于阴道毛滴虫的 MGL 进行蛋白结构上的覆盖分析, 发现 CGL 侧链结构中 E59、R119 和 E339 可能是控制底物取向的 3 个关键氨基酸残基。Stone 等利用组合成对饱和和突变策略对 CGL 侧链结构中 E59、R119 和 E339 进行改造, 通过比色法检测产物 α -酮丁酸与 3-甲基苯并噻唑酮腈的反应物, 从文库中筛选获得具有催化甲硫氨酸 γ 位 C-S 键裂解功能的突变体(CGL (E59N、R119L、E339V))^[38]。CGL (E59N、R119L、E339V) 在血液中的稳定性和抗神经母细胞瘤

的活性明显优于 pMGL^[38]。Lu 等随后通过饱和突变结合高通量筛选方法将 CGL (E59N, R119L, E339V) 升级改造为 CGL (E59I/S63L/L91M/R119A/K268R/T311G/E339V/I353S), 新突变体的催化效率(k_{cat}/K_m)较 CGL (E59N、R119L、E339V)提高了 9 倍^[36]。模式动物体内试验表明新突变体的应用更为高效, 只需要一次腹腔给药, 就能将血液中甲硫氨酸浓度降低至 75%以下, 且维持时间超过 3 d; 同时, 被试动物对血液中甲硫氨酸浓度降低表现出更好的耐受能力, 且不会出现体重下降、肝酶异常以及其他毒性。血液中的甲硫氨酸浓度降低至阈值 5 $\mu\text{mol/L}$ 左右时, 肿瘤细胞将不能存活^[38]。新突变体在处理第 2 天和第 3 天只能将血液甲硫氨酸浓度降低至 17 $\mu\text{mol/L}$ 和 26 $\mu\text{mol/L}$, 杀死肿瘤细胞需要开发更为高效的甲硫氨酸裂解酶突变体, 提高突变体结合和裂解甲硫氨酸的功能^[36]。解脂耶氏酵母被认为是食品安全微生物, 分离来自解脂耶氏酵母的甲硫氨酸裂解酶 YALI0C22088g 具有低免疫潜力, 其结合甲硫氨酸底物的能力显著高于 pMGL^[9]; 将位于 YALI0C22088g 入口处的 Y59 突变成丙氨酸, YALI0C22088g 通道瓶颈半径尺寸由 1.5 提高至 2.0, 突变体 YALI0C22088g (Y59A) 结合甲硫氨酸的功能明显高于 CGL (E59I/S63L/L91M/R119A/K268R/T311G/E339V/I353S)^[9]。进一步通过酶工程改造其活性中心等关键结构, 将有可能推动 YALI0C22088g 突变体在临床上的应用。

MGL 是开发抗致病微生物感染药物的重要靶标, 寻找抑制 MGL 酶活的化合物将推动治疗口腔细菌感染、滴虫病和阿米巴病药物的开发^[2,16]。炔丙基甘氨酸和 3-氟-L-甲硫氨酸在体外和体内试验中均表现出高效抑制 MGL 的功能, 其中 3-氟-L-甲硫氨酸的作用机制归因于其 γ 位裂解产物硫代羰基二氟化物抑制了阴道毛

滴虫、牙龈卟啉单胞菌、溶组织内阿米巴菌的生长^[16,48-49]。从密花树组织中提取获得的化合物麦西那酸 B (myrsinoic acid B) 显著抑制具核梭杆菌 JCM8532 (*Fusobacterium nucleatum* JCM8532)、牙龈卟啉单胞菌 W83 以及对龋垢密螺旋体 ATCC35405 (*T. denticola* ATCC35405) MGL 的活性^[50]。Batuev 等人通过对商业化合物库进行筛选, 获得两个抑制 MGL 活性的化合物 ((R)-5-胍基-2-(1-(4-甲苯磺酰氨基)环己烷甲酰胺)-戊酮酸和 (N-(5-氨基-2-羟苯基)甲苯磺酰氨基)^[51]。最近的研究发现含硫氨基酸亚砷化合物是 MGL 的自杀式底物, 这类物质与 MGL 作用生成产物硫代磺酸盐, 硫代磺酸盐能够氧化 MGL 的 Cys115, 破坏 Tyr113 与 Cys115 的相互作用, 从而导致 Tyr113 不能催化甲基硫醇的消除反应^[52]。

3.2 MGL 在食品工业中的应用潜力

天然香味物质拥有巨大的市场需求, 通过微生物发酵或者酶催化天然底物合成香味物质是天然香味物质的重要生产方式之一^[53]。MGL 分解甲硫氨酸合成的甲基硫醇及其衍生物是构成食品香味的主体成分。复杂微生物体系参与了食品发酵过程中甲硫氨酸的分解过程^[12-15]。筛选生产 VOSCs 的优良菌株并对其进行代谢工程改造将快速推动食品风味的改良, 提升食品品质。Sreekumar 等将益生菌德氏乳杆菌 ATCC4749 (*Lactobacillus delbrueckii* ATCC4797)、植物乳杆菌 ATCC14917 (*Lactobacillus plantarum* ATCC14917) 等菌株分别与半胱氨酸和甲硫氨酸混合培养, 会发现不同菌株生产 VOSCs 的产量存在很大差异, 其中植物乳杆菌 299v 和嗜酸乳杆菌 NCFM (*Lactobacillus acidophilus* NCFM) 比乳酸球菌 MG1363 (*Lactococcus lactis* MG1363) 能产生更多的 VOSCs^[54]。Hanniffy 等通过在乳酸杆菌中异源表达亚麻短杆菌 BL21 的 MGL 基

因, 提高了 L-甲硫氨酸、L-半胱氨酸、L-胱硫氨酸和 L-胱氨酸等含硫化合物的降解效率, 甲基硫醇的生成量远远高于其氧化衍生物(二甲基二硫和二甲基三硫)^[21]。鉴于乳酸菌在发酵食品风味开发中的重要意义, 调控乳酸菌生理代谢改善发酵乳制品的风味和质地不仅能满足人们消费需求, 更能提高我国发酵剂产业的竞争力。因此, 使用具有提高 VOSCs 合成效率的乳酸菌是促进乳酪风味开发的有效途径之一。

甲基硫醇等 VOSCs 组分和浓度决定了食品的品质, 通过控制 MGL 的表达精确调控 VOSCs 的合成是控制食品香味的关键环节。Zhang 等利用抑制消减杂交技术构建了红粉粘帚霉 cDNA 文库, 用于筛选外源添加甲硫氨酸引发 VOSCs 生物合成的调控因子, 发现过表达 E3 泛素-蛋白连接酶 HUWE1 显著增强了甲基硫醇及其衍生物的生物合成, 而完全抑制了竞争途径埃利希(Ehrlich)途径产物的合成, 实现了对两条通路的方向性调节, 研究结果暗示 VOSCs 的生物合成在转录水平存在复杂的调控机制^[55]。转录因子通过影响 RNA 聚合酶与启动子的结合介导合成酶基因在转录水平的表达, 是控制合成酶基因在转录水平表达的关键环节。Xu 等通过生物信息学分析结合启动子上游序列的突变和缺失, 发现 GLN3 结合位点(GLN3 binding site, -512/-508)、MSN2 基序(MSN2 motif, -1 160/-1 156)和 MSN2 基序(-1 255/-1 251)分别是控制脱硫基途径主效酶基因 *STR3* 及其竞争途径氨基转移酶基因 *ARO8-2*、脱羧酶基因 *PDC* 在转录水平表达的关键上游调控元件; MSN2 基序和 GLN3 结合位点是位于氮阻遏信号系统下游的两个关键启动子调节元件, 据此推测 VOSCs 的生物合成受氮阻遏信号系统调控^[56]。解脂耶氏酵母具有分解甲硫氨酸合成

VOSCs 的功能, 对奶酪典型风味的形成发挥关键作用^[9]。精细控制解脂耶氏酵母发酵产品品质, 需要阐明外源甲硫氨酸触发合成酶基因在转录水平表达的分子机制。来源于解脂耶氏酵母的甲硫氨酸裂解酶 YALI0C22088g 编码基因响应外源甲硫氨酸添加在转录水平出现上调^[9], 该现象与之前在红粉粘帚霉中研究获得的结果(脱硫基酶 *STR3* 编码基因响应外源甲硫氨酸添加而在转录水平的表达出现下调)相反, 推测解脂耶氏酵母中甲硫氨酸直接分解合成甲基硫醇及其衍生物途径可能存在新的调控机制^[9]。解析甲硫氨酸分解合成 VOSCs 途径酶基因在转录和转录后水平的表达调控机制, 将推动 VOSCs 组分和浓度精细调控技术的开发, 为食品香味的精确调控提供理论基础。

4 展望

近 70 年来, 研究人员在 MGL 的挖掘、酶学性质、催化机制及应用等方面进行了大量的探索, MGL 在癌症治疗、抗衰老以及食品香味合成和制造方面表现出巨大的应用潜力。pMGL 在癌症治疗研究中表现出的问题主要为半衰期短、引起机体强烈的免疫反应^[36-38]。通过酶工程改造人源 MGL 有效解决了上述问题, 模式动物体内试验显示改造后的人源 MGL 显著抑制肿瘤细胞的生长, 且未表现出毒性^[36]。杀死肿瘤细胞、减少酶制剂的使用量需要进一步通过酶工程提高人源 MGL 结合和裂解甲硫氨酸的功能, 或者挖掘并改造其他具有低免疫潜力的 MGL。降低机体从环境中摄取外源甲硫氨酸能够延长机体寿命, 利用 MGL 降解环境中的甲硫氨酸需要解决 MGL 在不同复杂环境中的稳定性和保持高催化活性问题。MGL 是设计抗致病微生物感染药物的重要靶标, 基于不同来源的

MGL 特异识别底物的机制存在很大差异, 今后需要利用计算化学和结构生物学手段解析不同致病微生物 MGL 特异识别底物的分子机制, 进而理性设计靶向特定 MGL 的抑制剂, 达到特异拮抗致病微生物的目的。MGL 作用底物甲硫氨酸是合成机体胞内调控分子 S-腺苷甲硫氨酸的前体。近期研究表明 Covid-19 RNA 帽子结构的甲基化依赖宿主胞内 S-腺苷甲硫氨酸的浓度, 因此利用 MGL 降低宿主胞内甲硫氨酸浓度可能成为治疗新冠病毒感染的一种辅助手段^[57]。MGL 催化甲硫氨酸分解产物甲基硫醇及其衍生物是构成食品香味的主体成分, 其组分和浓度决定了食品品质和稳定性, 解析食品微生物中 MGL 在转录和转录后水平的调控机制将推动食品品质的精准控制; 另外, 进一步利用酶工程提高 MGL 的催化活性也将推动食品香味绿色制造技术的开发。

随着合成生物学和计算化学的发展, 研究人员在理解 MGL 催化甲硫氨酸裂解的具体机制基础上, 通过理性设计 MGL 入口、通道和活性中心等关键结构, 将进一步增强 MGL 对底物 L-甲硫氨酸的特异性识别, 提高酶促反应效率。研究结果将推动 MGL 在癌症治疗、抗衰老、抗致病微生物感染、抗新冠病毒以及食品香味合成和制造等方面的应用。

参考文献

- [1] Raboni S, Revtovich S, Demitri N, Giabbai B, Storici P, Cocconcelli C, Faggiano S, Rosini E, Pollegioni L, Galati S, Buschini A, Morozova E, Kulikova V, Nikulin A, Gabellieri E, Cioni P, Demidkina T, Mozzarelli A. Engineering methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii* for anticancer activity. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Proteines and Proteomics*, 2018, 1866(12): 1260–1270.
- [2] Foo TC, Terentis AC, Venkatachalam KV. A continuous spectrophotometric assay and nonlinear kinetic analysis of methionine γ -lyase catalysis. *Analytical Biochemistry*, 2016, 507: 21–26.
- [3] El-Sayed AS. Microbial l-methioninase: production, molecular characterization, and therapeutic applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(2): 445–467.
- [4] Morozova EA, Kulikova VV, Rodionov AN, Revtovich SV, Anufrieva NV, Demidkina TV. Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfonates. *Biochimie*, 2016, 128/129: 92–98.
- [5] Pokrovsky VS, Yu Anisimova N, Zh Davydov D, Bazhenov SV, Bulushova NV, Zavilgelsky GB, Kotova VY, Manukhov IV. Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts. *Investigational New Drugs*, 2019, 37(2): 201–209.
- [6] Strelakova E, Malin D, Good DM, Cryns VL. Methionine deprivation induces a targetable vulnerability in triple-negative breast cancer cells by enhancing TRAIL receptor-2 expression. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(12): 2780–2791.
- [7] Lee BC, Kaya A, Ma SM, Kim G, Gerashchenko MV, Yim SH, Hu Z, Harshman LG, Gladyshev VN. Methionine restriction extends lifespan of *Drosophila melanogaster* under conditions of low amino-acid status. *Nature Communications*, 2014, 5: 3592.
- [8] Ruckenstuhl C, Netzberger C, Entfellner I, Carmona-Gutierrez D, Kickenweiz T, Stekovic S, Gleixner C, Schmid C, Klug L, Sorgo AG, Eisenberg T, Büttner S, Mariño G, Koziel R, Jansen-Dürr P, Fröhlich KU, Kroemer G, Madeo F. Lifespan extension by methionine restriction requires autophagy-dependent vacuolar acidification. *PLoS Genetics*, 2014, 10(5): e1004347.
- [9] Zhao QL, Wang ZL, Yang L, Zhang S, Jia KZ. YALI0C22088g from *Yarrowia lipolytica* catalyses the conversion of L-methionine into volatile organic sulfur-containing compounds. *Microbial Biotechnology*, 2021: 00. DOI: 10.1111/1751–7915.13796.
- [10] Hébert A, Forquin-Gomez MP, Roux A, Aubert J, Junot C, Heilier JF, Landaud S, Bonnarne P, Beckerich JM. New insights into sulfur metabolism in yeasts as revealed by studies of *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(4): 1200–1211.
- [11] Holt S, Cordente AG, Williams SJ, Capone DL, Jitjaroen W, Menz IR, Curtin C, Anderson PA. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to release

- 3-mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an *S. cerevisiae* gene, *STR3*, for improvement of wine aroma. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3626–3632.
- [12] Liu J, Wu Q, Wang P, Lin JC, Huang L, Xu Y. Synergistic effect in core microbiota associated with sulfur metabolism in spontaneous Chinese liquor fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(24): e01475–e01417.
- [13] Splivallo R, Ottonello S, Mello A, Karlovsky P. Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist*, 2011, 189(3): 688–699.
- [14] Dzialo MC, Park R, Steensels J, Lievens B, Verstrepen KJ. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(Supp_1): S95–S128.
- [15] Heitmann M, Zannini E, Arendt E. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(7): 1152–1164.
- [16] Kandalam U, Ledra N, Laubach H, Venkatachalam KV. Inhibition of methionine gamma lyase deaminase and the growth of *Porphyromonas gingivalis*: a therapeutic target for halitosis/periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 2018, 90: 27–32.
- [17] Kreis W, Hession C. Biological effects of enzymatic deprivation of L-methionine in cell culture and an experimental tumor. *Cancer Research*, 1973, 33(8): 1866–1869.
- [18] Fukumoto M, Kudou DZ, Murano S, Shiba T, Sato D, Tamura T, Harada S, Inagaki K. The role of amino acid residues in the active site of L-methionine γ -lyase from *Pseudomonas putida*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2012, 76(7): 1275–1284.
- [19] Mamaeva DV, Morozova EA, Nikulin AB, Revtovich SV, Nikonov SV, Garber MB, Demidkina TV. Structure of *Citrobacter freundii* L-methionine gamma-lyase. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 2005, F61: 546–549.
- [20] Tanaka H, Esaki N, Soda K. Properties of L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas ovalis*. *Biochemistry*, 1977, 16(1): 100–106.
- [21] Hanniffy SB, Philo M, Peláez C, Gasson MJ, Requena T, Martínez-Cuesta MC. Heterologous production of methionine-gamma-lyase from *Brevibacterium linens* in *Lactococcus lactis* and formation of volatile sulfur compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(8): 2326–2332.
- [22] Kudou DZ, Yasuda E, Hirai Y, Tamura T, Inagaki K. Molecular cloning and characterization of L-methionine γ -lyase from *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 120(4): 380–383.
- [23] Revtovich SV, Faleev NG, Morozova EA, Anufrieva NV, Nikulin AD, Demidkina TV. Crystal structure of the external aldimine of *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase with glycine provides insight in mechanisms of two stages of physiological reaction and isotope exchange of α - and β -protons of competitive inhibitors. *Biochimie*, 2014, 101: 161–167.
- [24] Sato D, Shiba T, Karaki T, Yamagata W, Nozaki T, Nakazawa T, Harada S. X-ray snapshots of a pyridoxal enzyme: a catalytic mechanism involving concerted [1,5]-hydrogen sigmatropy in methionine γ -lyase. *Scientific Reports*, 2017, 7: 4874.
- [25] Yang ZJ, Wang JH, Lu Q, Xu JB, Kobayashi Y, Takakura T, Takimoto A, Yoshioka T, Lian CG, Chen CM, Zhang DD, Zhang Y, Li SK, Sun XH, Tan YY, Yagi S, Frenkel EP, Hoffman RM. PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates. *Cancer Research*, 2004, 64(18): 6673–6678.
- [26] Sun XH, Yang ZJ, Li SK, Tan YY, Zhang N, Wang XE, Yagi S, Yoshioka T, Takimoto A, Mitsushima K, Suganaka A, Frenkel EP, Hoffman RM. *In vivo* efficacy of recombinant methioninase is enhanced by the combination of polyethylene glycol conjugation and pyridoxal 5'-phosphate supplementation. *Cancer Research*, 2003, 63(23): 8377–8383.
- [27] Messerschmidt A, Worbs M, Steegborn C, Wahl MC, Huber R, Laber B, Clausen T. Determinants of enzymatic specificity in the cys-met-metabolism PLP-dependent enzyme family: crystal structure of cystathionine γ -lyase from yeast and intrafamilial structure comparison. *Biological Chemistry*, 2003, 384(3): 373–386.
- [28] Holt S, Cordente AG, Curtin C. *Saccharomyces cerevisiae* STR3 and yeast cystathionine β -lyase enzymes. *Bioengineered*, 2012, 3(3): 180–182.
- [29] Jia KZ, Zhang Q, Sun LY, Xu YH, Li HM, Tang YJ. *Clonostachys rosea* demethiolase STR3 controls the conversion of methionine into methanethiol. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21920.

- [30] Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R. Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation. *Chemical Reviews*, 2018, 118(3): 1253–1337.
- [31] Sagong HY, Kim B, Joo S, Kim KJ. Structural and functional characterization of cystathionine γ -lyase from *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(51): 15267–15274.
- [32] Breiting U, Clausen T, Ehlert S, Huber R, Laber B, Schmidt F, Pohl E, Messerschmidt A. The three-dimensional structure of cystathionine beta-lyase from *Arabidopsis* and its substrate specificity. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 631–642.
- [33] Li Z, Zhao YS, Zhou HF, Luo HB, Zhan CG. Catalytic roles of coenzyme pyridoxal-5'-phosphate (PLP) in PLP-dependent enzymes: reaction pathway for methionine- γ -lyase-catalyzed L-methionine depletion. *ACS Catalysis*, 2020, 10(3): 2198–2210.
- [34] Toney MD. Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Proteines and Proteomics*, 2011, 1814(11): 1407–1418.
- [35] Song HG, Xu R, Guo ZH. Identification and characterization of a methionine γ -lyase in the calicheamicin biosynthetic cluster of *Micromonospora echinospora*. *ChemBioChem*, 2015, 16(1): 100–109.
- [36] Lu WC, Saha A, Yan WP, Garrison K, Lamb C, Pandey R, Irani S, Lodi A, Lu XY, Tiziani S, Zhang YJ, Georgiou G, DiGiovanni J, Stone E. Enzyme-mediated depletion of serum l-Met abrogates prostate cancer growth via multiple mechanisms without evidence of systemic toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(23): 13000–13011.
- [37] Yan WP, Stone E, Zhang YJ. Structural snapshots of an engineered cystathionine- γ -lyase reveal the critical role of electrostatic interactions in the active site. *Biochemistry*, 2017, 56(6): 876–885.
- [38] Stone E, Paley O, Hu J, Ekerdt B, Cheung NK, Georgiou G. *De novo* engineering of a human cystathionine- γ -lyase for systemic L-methionine depletion cancer therapy. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(11): 1822–1829.
- [39] Sharma B, Singh S, Kanwar SS. L-methionase: a therapeutic enzyme to treat malignancies. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 506287.
- [40] Chaturvedi S, Hoffman RM, Bertino JR. Exploiting methionine restriction for cancer treatment. *Biochemical Pharmacology*, 2018, 154: 170–173.
- [41] Wang ZX, Yip LY, Lee JHJ, Wu ZW, Chew HY, Chong PKW, Teo CC, Ang HYK, Peh KLE, Yuan J, Ma SM, Choo LSK, Basri N, Jiang X, Yu Q, Hillmer AM, Lim WT, Lim TKH, Takano A, Tan EH, Tan DSW, Ho YS, Lim B, Tam WL. Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. *Nature Medicine*, 2019, 25(5): 825–837.
- [42] Miao YX, Yang H, Levorse J, Yuan SP, Polak L, Sribour M, Singh B, Rosenblum MD, Fuchs E. Adaptive immune resistance emerges from tumor-initiating stem cells. *Cell*, 2019, 177(5): 1172–1186.e14.
- [43] Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, 2017, 23(10): 1124–1134.
- [44] Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metabolism*, 2014, 19(5): 780–794.
- [45] Yin J, Ren WK, Chen S, Li YY, Han H, Gao J, Liu G, Wu X, Li TJ, Woo Kim S, Yin YL. Metabolic regulation of methionine restriction in diabetes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(10): 1700951.
- [46] Sato D, Shiba T, Yunoto S, Furutani K, Fukumoto M, Kudou DZ, Tamura T, Inagaki K, Harada S. Structural and mechanistic insights into homocysteine degradation by a mutant of methionine γ -lyase based on substrate-assisted catalysis. *Protein Science*, 2017, 26(6): 1224–1230.
- [47] Kudou DZ, Misaki S, Yamashita M, Tamura T, Esaki N, Inagaki K. The role of cysteine116 in the active site of the antitumor enzyme L-methionine γ -lyase from *Pseudomonas putida*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(7): 1722–1730.
- [48] Coombs GH, Mottram JC. Trifluoromethionine, a prodrug designed against methionine γ -lyase-containing pathogens, has efficacy *in vitro* and *in vivo* against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(6): 1743–1745.
- [49] Sato D, Kobayashi S, Yasui H, Shibata N, Toru T, Yamamoto M, Tokoro G, Ali V, Soga T, Takeuchi T, Suematsu M, Nozaki T. Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine against the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010,

- 35(1): 56–61.
- [50] Ito S, Narise A, Shimura S. Identification of a methioninase inhibitor, myrsinoic acid B, from *Myrsine seguinii* Lév., and its inhibitory activities. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(9): 2411–2414.
- [51] Batuev EA, Lisunov AY, Morozova EA, Klochkov VV, Anufrieva NV, Demidkina TV, Polshakov VI. NMR screening of potential inhibitors of methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*. *Molecular Biology*, 2014, 48(6): 896–905.
- [52] Revtovich S, Morozova E, Kulikova V, Koval V, Anufrieva N, Nikulin A, Demidkina T. Sulfoxides of sulfur-containing amino acids are suicide substrates of *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase. Structural bases of the enzyme inactivation. *Biochimie*, 2020, 168: 190–197.
- [53] Che YX, Yin S, Wang H, Yang HQ, Xu RX, Wang Q, Wu YP, Boutet J, Huet R, Wang CT. Production of methionol from 3-methylthiopropionaldehyde by catalysis of the yeast alcohol dehydrogenase Adh4p. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(16): 4650–4656.
- [54] Sreekumar R, Al-Attabi Z, Deeth HC, Turner MS. Volatile sulfur compounds produced by probiotic bacteria in the presence of cysteine or methionine. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(6): 777–782.
- [55] Zhang Q, Jia KZ, Xia ST, Xu YH, Liu RS, Li HM, Tang YJ. Regulating Ehrlich and demethiolation pathways for alcohols production by the expression of ubiquitin-protein ligase gene *HUWE1*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20828.
- [56] Xu YH, Jia KZ, Tang YJ. Regulatory networks governing methionine catabolism into volatile organic sulfur-containing compounds in *Clonostachys rosea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(22): e01840-18.
- [57] Hoffman RM, Han QH. Oral methioninase for Covid-19 methionine-restriction therapy. *In vivo: Athens, Greece*, 2020, 34(3 Suppl): 1593–1596.

(本文责编 张晓丽)

补充材料

附表 1 不同微生物来源的甲硫氨酸 γ -裂解酶的性质

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。