

# 粟酒裂殖酵母 Cyc2 定位及功能的研究

杨贵红, 黄 鹰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 芽殖酵母中 CYC2 蛋白与 Cyt c 的装配有关, 对线粒体功能的发挥十分重要. 但该蛋白在粟酒裂殖酵母中的同源蛋白 Cyc2 的功能还未可知, 本文研究了粟酒裂殖酵母中 Cyc2 的定位及其对线粒体功能的影响. 构建  $\Delta cyc2$  菌株后观察其在甘油培养基上的表型, 并构建回补菌株验证表型, 结果发现  $\Delta cyc2$  在甘油板上表现出了生长缺陷; 通过检测  $\Delta cyc2$  菌株内由 mtDNA 编码的呼吸链蛋白的表达量, 结果发现 Cyc2 的缺失并不会影响呼吸链蛋白的表达; 利用生物信息学分析 Cyc2 序列, 发现它的 N 端含有一段线粒体定位序列 (MTS) 且该蛋白没有跨膜区域, 为确定该蛋白在细胞中的具体定位, 分别构建 Cyc-GFP 和 Tom20-Flag/Cyc2-Myc 菌株, 通过荧光观察及生化方法确定该蛋白为线粒体内膜外周蛋白. 综上所述, 粟酒裂殖酵母 Cyc2 为线粒体内膜外周蛋白, 不会影响线粒体呼吸链蛋白的表达, 可能通过其他途径参与线粒体功能的发挥.

[关键词] 粟酒裂殖酵母, 线粒体, Cyc2, 定位

[中图分类号] R331.3+1 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2020)02-0108-06

## Localization and Function of Cyc2 in *Schizosaccharomyces pombe*

Yang Guihong, Huang Ying

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** The CYC2 protein in budding yeast is related to the assembly of Cyt c, which is of great significance to the function of mitochondria. But in *Schizosaccharomyces pombe*, the function of the protein Cyc2 which is the homologous protein of CYC2 has not been known. In this paper, the location and function of Cyc2 were studied. The homologous recombination method was used to construct  $\Delta cyc2$  mutants, it was observed the phenotype of  $\Delta cyc2$  strain on non-fermentation medium (glycerol plate), and construct a complementing strain to verify the phenotype. As a result,  $\Delta cyc2$  showed growth defects on the glycerol plate. By detecting the expression of respiratory streptavidin encoded by the mitochondrial genome, it was found that the deletion of *cyc2* does not affect the expression of respiratory streptavidin. The sequence of Cyc2 was analyzed by bioinformatics and the result showed that the N-terminus of Cyc2 contained a mitochondrial localization sequence (MTS) and the protein has no transmembrane region. In order to determine the specific localization of the protein in the cell, it was constructed Cyc-GFP and Tom20-Flag/Cyc2-Myc strains, respectively, and identified the protein as a mitochondrial inner membrane peripheral protein by fluorescence observation and biochemical methods. To sum up, Cyc2 is a mitochondrial inner membrane peripheral protein, which does not affect the expression of mitochondrial respiratory chain protein, and may affect the function of mitochondria through other channels.

**Key words:** *Saccharomyces pombe*, mitochondrial, Cyc2, location

线粒体是细胞呼吸的主要场所, 其主要作用是通过氧化磷酸化产生细胞活动所需的能量<sup>[1]</sup>, 被称为细胞的“动力车间”. 此外, 线粒体还参与细胞氧化还原、信号转导以及细胞凋亡等生命活动<sup>[2-4]</sup>, 因此深入研究线粒体各种特性对生命科学具有重要意义.

细胞色素 c (Cyt c) 是一种水溶性含铁血红素蛋白<sup>[5]</sup>, 它可以通过改变铁离子的价态在呼吸链复合体之间传递电子, 因此它是线粒体呼吸链的必要成分<sup>[5-6]</sup>. 人们发现, 在真菌、绿藻和动物的线粒体中可以利用细胞色素 c 血红素裂解酶 (CCHL) 将血红素连接到脱辅基细胞色素 c 的半胱氨酸上, 以完成细胞色素 c 的装配<sup>[4-6]</sup>. 脱辅基细胞色素巯基和血红素的还原状态对于细胞色素 c 的装配至关重要<sup>[6]</sup>, 控制血红素与

收稿日期: 2020-03-27.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31770810, 31470778).

通讯作者: 黄鹰, 博士, 教授, 研究方向: 微生物, 生物化学与分子生物学. E-mail: hy858717@163.com

脱辅基细胞色素 c 连接的氧化还原因素在细菌和质体中是已知的<sup>[1,5-6]</sup>,而在芽殖酵母中,CYC2 被认为是细胞色素 c 的装配因子,在 c 型细胞色素的成熟中具有氧化还原功能,在细胞色素 c 的组装过程中发挥重要作用,对线粒体功能的发挥具有重要意义<sup>[7-11]</sup>.

芽殖酵母的 CYC2 含有一个 FAD 结构域,定位于线粒体内膜<sup>[7]</sup>,敲除该基因会使得脱辅基细胞色素 c 的线粒体输入部分缺失从而使细胞色素 c 的表达水平降低约 20%,导致线粒体功能缺陷<sup>[8-9,11-12]</sup>. 通过同源比对发现裂殖酵母 Cyc2 与芽殖酵母的 CYC2 相似性达到 26.78%,目前为止,还尚未有关于 Cyc2 的研究. 因此本文旨在揭示粟酒裂殖酵母中 Cyc2 的定位及相关功能,为线粒体蛋白功能的研究提供一定的理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

实验所用菌种:粟酒裂殖酵母单倍体菌 yHL6381、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ;所用质粒:pFA6a-hphMX、pJK148-myc-hphMX 和 pYJ19.

#### 1.1.2 培养基

YES 培养基(100 mL):酵母粉 0.5 g,葡萄糖 3 g,腺嘌呤、组氨酸、尿嘧啶、亮氨酸为 22.5 mg;YES+6%、3%甘油:培养基的碳源为不同浓度的甘油.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物信息学分析

蛋白序列比对分析使用 AlignX;利用在线预测网站(<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>)分析蛋白是否有线粒体定位序列;利用在线预测网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析蛋白是否有跨膜结构域.

#### 1.2.2 菌种构建

扩增得到 *cyc2* 的上、下游同源臂后,将其构建到 pFa6a-hphMX 质粒上,然后将 *cyc2*(up)-hph-*cyc2*(dw)片段转化到 yHL6381 菌株内得到  $\Delta cyc2$  菌株;扩增 *cyc2* 基因片段,构建到 pYJ19 质粒上,使用 *Nru* I 限制酶切割重组质粒得到线性片段并转入菌株  $\Delta cyc2$  中,得到 Cyc2-GFP 菌株. 将 *cyc2* 基因片段构建到质粒 pJK148-myc-hphMX 上得到重组质粒 pJK148-*cyc2*-myc-hphMX,使用 *Nru* I 限制酶分别切割 pJK148-myc-hphMX 和 pJK148-*cyc2*-myc-hphMX 得到线性片段并转入  $\Delta cyc2$  中,得到空载回补菌株 pJK148 和全长回补菌株 *cyc2*;将 *cyc2*-myc-hph 片段转入 Tom20-Flag 菌株中得到菌株 Tom20-Flag/Cyc2-Myc.

#### 1.2.3 表型实验

实验前 3 d 在 YES 固体培养基上将菌种划线活化. 将菌种接种至 YES 培养基内,初始 OD600 调至 0.2 左右,32  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h. 将菌液 OD600 均调至 3 左右,按 10 倍梯度依次进行稀释. 取 3  $\mu\text{L}$  菌液在固体培养基上点圈,32  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养.

#### 1.2.4 Western blot 检测线粒体蛋白表达量

分别提取菌株  $\Delta cyc2$  和 yHL6381 的线粒体,取等量的线粒体进行处理得到所需的蛋白样品后进行 Western blot 检测.

#### 1.2.5 荧光显微镜观察 Cyc2 定位

将 Cyc2-GFP 菌株在固体培养基上进行划线活化后. 将菌株接种于液体培养基内,培养 12 h 后转接至新鲜培养基并调整 OD600=0.2 后继续培养,大约培养 4 h 后,菌液 OD600 约为 0.6,收菌,用 PBS 缓冲液洗一次后,向菌体内加入 Mitotracker 染料进行染色,时间为 2.5 min,然后使用荧光显微镜进行观察.

#### 1.2.6 线粒体定位实验

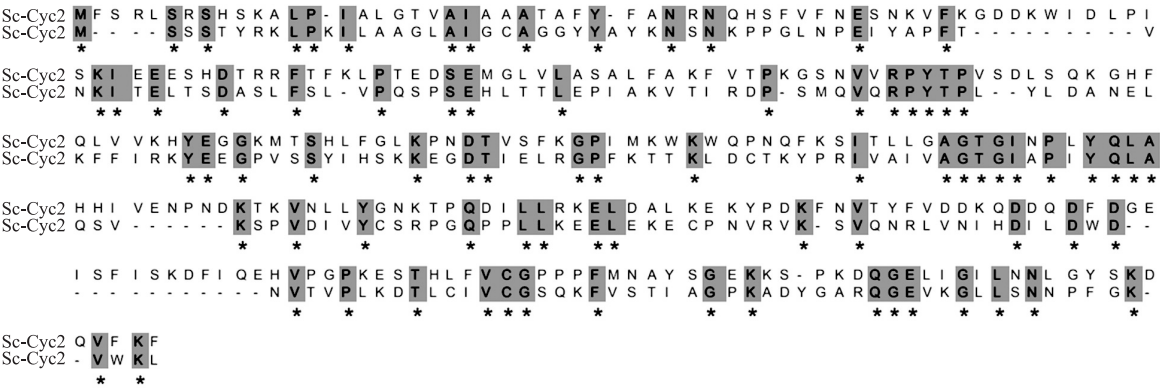
选取细胞核蛋白 *Sla1* 和线粒体基质蛋白 Hsp60 为对照,通过 Western blot 检测菌株 Tom20-Flag/Cyc2-Myc 的线粒体蛋白样品以确定 Cyc2 是否定位于线粒体;以线粒体外膜蛋白 Tom20 和 Hsp60 为对照,分别用 TritonX-100 和 Proteinase K 处理菌株 Tom20-Flag/Cyc2-Myc 的线粒体,以检测 Cyc2 是否定位于线粒体外膜;使用碱性碳酸钠处理 Tom20-Flag/Cyc2-Myc 的线粒体,以线粒体内膜蛋白 Cox1 和 Hsp60 为对照,碳

酸钠破坏线粒体膜,通过高速离心使位于基质和膜间隙的蛋白分布于上清中,而线粒体膜蛋白则会留在沉淀内,以检测 Cyc2 是否为膜结合蛋白。

2 结果与讨论

2.1 粟酒裂殖酵母 Cyc2 生物信息学分析结果

通过在 GeneDB 和 NCBI 数据库的搜索,得到裂殖酵母 *cyc2* 基因序列,其系统名为 SPAC17H9.12c. 该蛋白由 266 个氨基酸残基组成,预测的分子量约为 29.37 kD. 通过序列比对可知芽殖酵母的 CYC2 和裂殖酵母的 Cyc2 相似性达 26.78%,比对结果如图 1.



注:图中加阴影及 \* 的部分为完全相同序列。

图 1 相似性比对结果

Fig. 1 Similarity comparison results

2.2 Δcyc2 菌株的表型研究

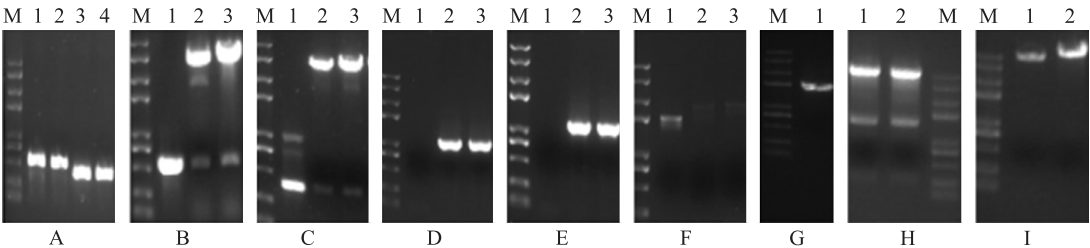
2.2.1 菌种的构建

(1) Δcyc2 的构建和验证

*cyc2* 上、下游同源臂扩增结果如图 2A 所示;转化子的酶切验证结果如图 2B,C 所示. 将含有同源臂及潮霉素基因的片段导入 yHL6381 内,选取几个转化子进行验证,在上游同源臂的上游设计引物记为 P1,在潮霉素基因上设计一对引物记为 P2 和 P3,在下游同源臂的下游设计一个引物记为 P4,使用 P1+P2 进行 PCR,结果如图 2D 所示,使用 P3+P4 进行 PCR,结果如图 2E 所示,使用 P1+P4 进行 PCR,结果如图 2F 所示,结果显示菌株构建成功。

(2) 全长回补菌株 *cyc2* 的构建和验证

PCR 得到 *cyc2* 基因片段(图 2G);重组质粒酶切验证(图 2H);得到片段 *cyc2*-myc-hph-LEU(图 2I)导入 Δ*cyc2* 内,挑选正确转化子进行后续实验。



M:核酸 Marker;A-F 为 Δ*cyc2* 的构建和验证:A 为目的片段 PCR 结果,1-2 为上游片段,3-4 为下游片段;B,C 为酶切验证结果,1 为目的片段,2,3 为酶切结果. D-F 为醋酸锂转化子的基因组 PCR 验证,1 为 WT 基因组 PCR 结果,2,3 为转化子 PCR 结果. G-I 为全长回补菌株 *cyc2* 的构建和验证;G 为目的片段 PCR 结果;H 为酶切验证结果;I 为重组质粒单酶切后的线性片段。

图 2 菌种的构建与验证

Fig. 2 Construction and verification of strains

2.2.2 点圈结果

为了探究 Cyc2 的功能,分别构建了 Δ*cyc2*、pJK148 及 *cyc2* 菌株并在 YES 和甘油培养基上进行点圈,

结果如图 3 所示. 在甘油培养基上,  $\Delta cyc2$  和 pJK148 菌株生长减缓, 而全基因回补菌株 *cyc2* 与野生型生长情况相同. 这说明 *cyc2* 基因的敲除会使得菌株的线粒体呼吸功能受损, 这与芽殖酵母中的 CYC2 的表型不一致, 暗示该基因在两种酵母中的功能可能不一样.

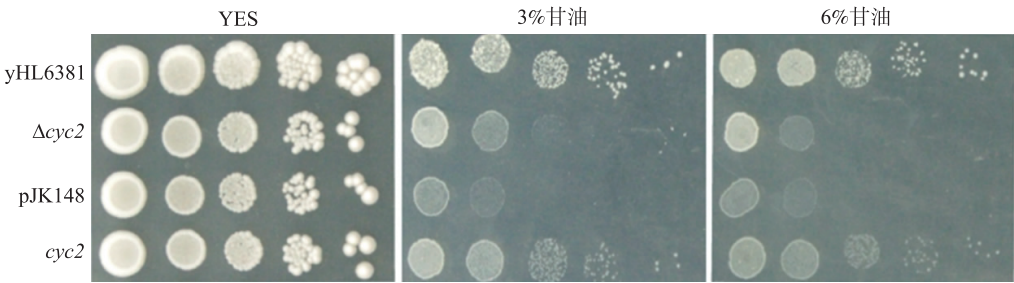


图 3  $\Delta cyc2$  菌株的表型结果  
Figure 3 Phenotypic results of  $\Delta cyc2$  strain

2.3 *Cyc2* 对线粒体呼吸链蛋白的影响

线粒体的呼吸作用主要依赖于内膜上的呼吸链及氧化磷酸化<sup>[1,3,13-16]</sup>. 上述实验已经证明 *Cyc2* 缺失后会影响到线粒体的呼吸功能, 为了探究 *Cyc2* 在线粒体中是如何行使功能的, 分别检测了  $\Delta cyc2$  菌株中由 mtDNA 编码的呼吸链蛋白 Cob1、Cox1、Cox2、Cox3 和 Atp6 的表达量, 以 Hsp60 作为内参. 结果如图 4 所示, 与野生型菌株相比,  $\Delta cyc2$  菌株内线粒体蛋白 Cob1、Cox1、Cox2、Cox3 和 Atp6 表达量没有明显变化, 这说明 *Cyc2* 的缺失不会影响呼吸链蛋白的表达, 猜测 *Cyc2* 可能通过其他途径影响了线粒体功能.

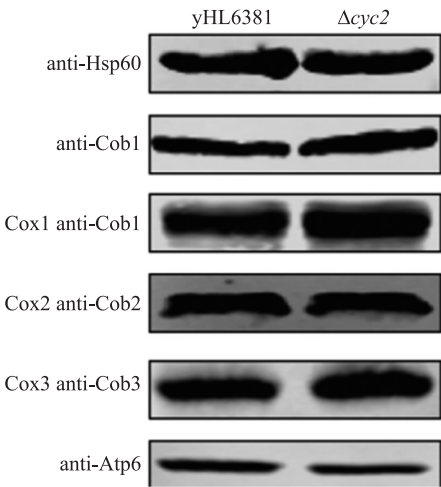


图 4  $\Delta cyc2$  菌株中线粒体呼吸链蛋白表达量的检测  
Fig.4 Detection of mitochondrial respiratory chain protein expression in  $\Delta cyc2$  strain

2.4 *Cyc2* 的定位研究

2.4.1 生物信息学分析

(1) *Cyc2* 线粒体定位序列 (MTS) 的分析

借助在线工具 MitoProt II 对 *Cyc2* 序列进行分析, *Cyc2* 定位于线粒体的概率为 70.68%. 根据预测结果 (表 1) 可知, *Cyc2* 蛋白 N 端的 16aa 残基为线粒体信号肽, 其中含有 5 个碱性残基.

(2) *Cyc2* 跨膜结构域的分析

借助在线预测网站对 *Cyc2* 的跨膜结构域进行分析, 根据预测结果 (表 2 及图 5) 可知, *Cyc2* 跨膜结构域个数为 0, N 端为跨膜序列的可能性为 47.911%, 跨膜氨基酸个数预测为 9.242 8, 综合结果可知, *Cyc2* 没有跨膜结构域.

表 1 *Cyc2* 线粒体定位序列 (MTS) 分析结果

Table 1 Analysis results of mitochondrial localization sequence (MTS) of <i>Cyc2</i>	
Analysis Of parameters	Values of computed parameters
Net charge of query sequence	+8
Analysed region	39
Number of basic residues In targeting sequence	5
Number of acidic residues in targeting sequence	0
Cleavage site	17
Cleaved sequence	MSSSTYRKLPKILAAG
Probability of export to mitochondria	0.706 8

表 2 *Cyc2* 跨膜结构域分析结果

Table 2 Analysis results of transmembrane domain of <i>Cyc2</i>	
	Results
Length	266
Number of predicted TMHs	0
Exp number of AAs in TMHs	9.2428
Exp number, first 60 AAs	8.210 120 000 000 000 01
Total prob of N-in	0.479 11

2.4.2 荧光显微镜观察

通过给 *Cyc2* 蛋白加 GFP 标签来确定蛋白在细胞中的定位, Mitotracker 染料可以将线粒体染成红色,

而 GFP 为绿色,若蛋白定位于线粒体,两种颜色会重叠显示为黄色. 结果如图 6 所示,Cyc2 定位于线粒体.

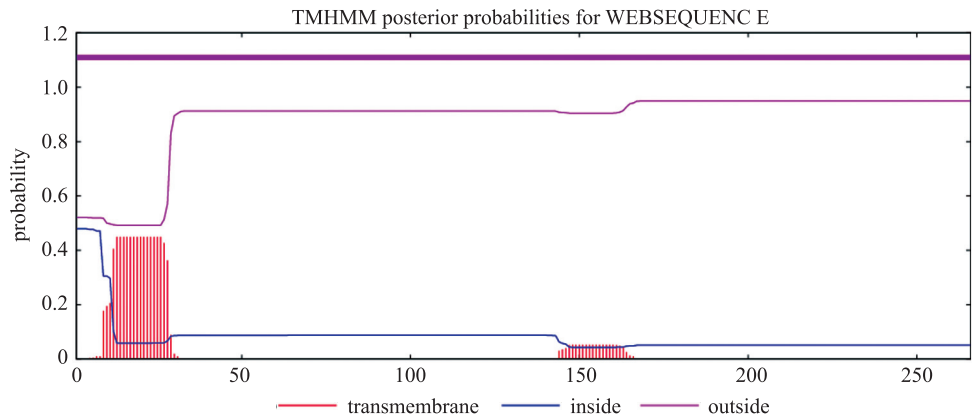


图 5 Cyc2 跨膜结构域预测结果  
Fig. 5 Results of Cyc2 transmembrane domain prediction

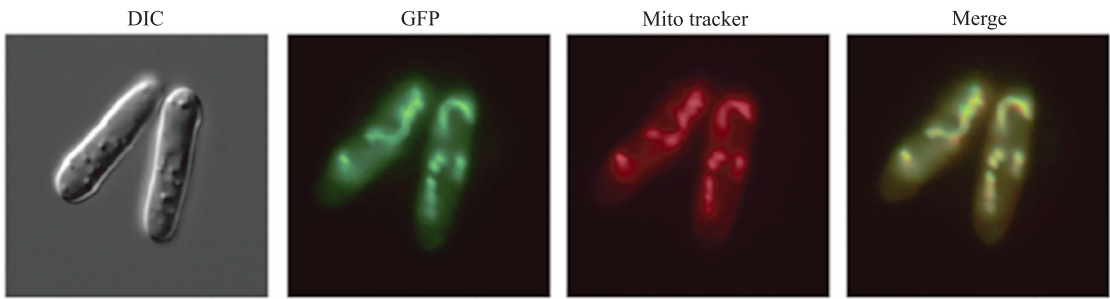


图 6 Cyc2-GFP 的荧光显微镜观察  
Fig. 6 Fluorescence microscope observation of Cyc2-GFP

2.4.3 提取线粒体确定蛋白在细胞中的定位

荧光实验已经证明 Cyc2 定位于线粒体,为了进一步验证这一结果,实验提取了菌株 Tom20-Flag/Cyc2-Myc 的线粒体,并保留全蛋白样品 T、线粒体蛋白样品 Mt 以及除线粒体外其他组分蛋白 PMS,选择 Sla1 和 Hsp60 作为对照,结果如图 7 所示,Cyc2 确实定位于线粒体.

2.4.4 TritonX-100 和蛋白酶 K 处理

已知 Cyc2 定位在线粒体,那么它具体定位于线粒体的哪一部分呢? 为了进一步确定 Cyc2 的定位,以 Tom20 和 Hsp60 为对照. 使用 TritonX-100 和 Proteinase K 处理菌株 Tom20-Flag/Cyc2-Myc 的线粒体,结果如图 8 所示,Cyc2 不是线粒体外膜蛋白,可能为线粒体基质蛋白或者线粒体内膜蛋白.

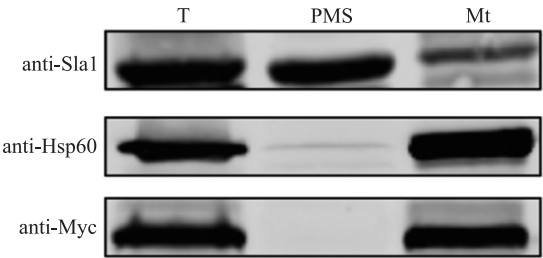


图 7 Cyc2 在细胞中定位结果  
Fig. 7 Results of Cyc2 localization in cells

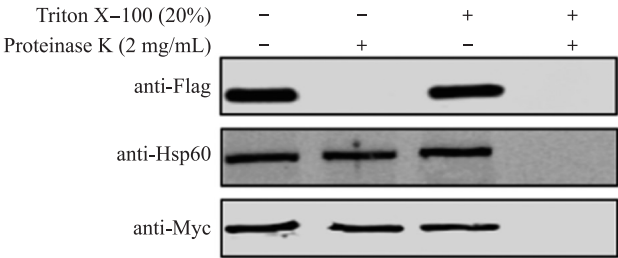


图 8 TritonX-100 和蛋白酶 K 处理线粒体后  
蛋白情况结果示意图  
Fig. 8 Results of protein treatment of mitochondria  
by TritonX-100 and proteinase K

2.4.5 碱性碳酸钠处理线粒体

上述实验证明 Cyc2 定位于线粒体基质或内膜,为进一步确定其定位,使用  $\text{NaCO}_3$  处理菌株 Tom20-Flag/Cyc2-Myc 的线粒体后高速离心,以 Cox2 和 Hsp60 作为对照. 结果显示(图 9),Cyc2 主要分布在沉淀



P 组分中,上清 S 组分中只有少量,与内膜蛋白 Cox2 相似.因此 Cyc2 与线粒体内膜结合,结合跨膜结构预测结果可以确定 Cyc2 为线粒体内膜的外在膜蛋白.

### 3 结论

酵母作为一种模式生物参与基础生物学研究已经有两百多年的历史.其中以酿酒酵母和粟酒裂殖酵母研究最多.粟酒裂殖酵母的全基因组测序工作已经完成,它含有 4 284 个可以编码蛋白质的基因,培养简单快速,在研究基因功能方面具有很大的优势.同时从进化角度来看,粟酒裂殖酵母与人的亲缘关系较亲近,所以研究粟酒裂殖酵母的蛋白功能对于人类的发展具有重要意义.

芽殖酵母的 CYC2 蛋白在细胞色素 c 的组装过程中发挥重要作用,缺失后会影 响细胞色素 c 的成熟<sup>[6,12]</sup>,从而影响呼吸链电子的传递,使线粒体无法正常发挥功能.通过序列比对发现粟酒裂殖酵母中的 Cyc2 蛋白与芽殖酵母的 CYC2 蛋白相似性达 26.78%,且都具有 FAD 结构域,粟酒裂殖酵母的呼吸作用依赖于线粒体内膜上的呼吸链和氧化磷酸化,电子通过呼吸链上的蛋白复合体进行传递并通过氧化磷酸化产生 ATP,呼吸链的蛋白复合体由各种亚基构成,如果有一个或几个亚基无法正常表达,将会引起线粒体呼吸功能紊乱.

本文利用同源重组的方法构建  $\Delta cyc2$  菌株,表型研究发现  $\Delta cyc2$  菌株在以甘油为唯一碳源的培养基上培养时生长受到抑制,这与已报道的 CYC2 的表型不同,暗示 Cyc2 蛋白缺失后会影 响线粒体的呼吸功能.研究结果发现 Cyc2 蛋白的缺失并不会影响线粒体呼吸链蛋白亚基 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1 和 Atp6 的表达,说明  $\Delta cyc2$  菌株并不是通过影响呼吸链组分来影响线粒体呼吸功能的.为了解析 Cyc2 的功能,利用荧光观察和生化方法并结合生物信息学分析来确定该蛋白在细胞中的详细定位.荧光观察结果表明 Cyc2 定位于线粒体,随后的生化实验结果发现它定位于线粒体的内膜,最后生物信息学分析结果表明它没有跨膜区域,最终确定该蛋白定位于线粒体内膜,且为外在膜蛋白.研究认为线粒体内膜外周蛋白 Cyc2 对于粟酒裂殖酵母线粒体的呼吸是必不可少的,但是其具体的影响途径需要后续实验进一步研究.

### [参考文献]

- [1] KWON Y Y, CHOI K M, CHO C, et al. Mitochondrial efficiency-dependent viability of *saccharomyces cerevisiae* mutants carrying individual electron transport chain component deletions[J]. *Molecules and cells*, 2015, 38(12): 1054–1063.
- [2] MALINA C, LARSSON C, NIELSEN J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology[J]. *FEMS yeast research*, 2018, 18(5): 40.
- [3] BAKER B M, HAYNES C M. Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging[J]. *Trends in biochemical sciences*, 2011, 36(5): 254–261.
- [4] BABU M, VLASBLOM J, PU S, et al. Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nature*, 2012, 489(7417): 585–589.
- [5] ALLEN J W. Cytochrome c biogenesis in mitochondria—Systems III and V[J]. *The FEBS journal*, 2011, 278(22): 4198–4216.
- [6] CORVEST V, MURREY D A, BERNARD D G, et al. C-type cytochrome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*: a key residue for apocytochrome c1/lyase interaction[J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 561–571.
- [7] BERNARD D G, QUEVILLON C, MERCHANT S, et al. Cyc2p, a membrane-bound flavoprotein involved in the maturation of mitochondrial c-type cytochromes[J]. *The journal of biological chemistry*, 2005, 280(48): 39852–39859.
- [8] CORVEST V, MURREY D, HIRASAWA M, et al. The flavoprotein Cyc2p, a mitochondrial cytochrome c assembly factor, is a NAD(P)H-dependent haem reductase[J]. *Molecular microbiology*, 2012, 83(5): 968–980.
- [9] PEARCE D A, CARDILLO T S, SHERMAN F. Cyc2p is required for maintaining ionic stability and efficient cytochrome c import and mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS letters*, 1998, 439(21128): 307–311.

(下转第 139 页)

485–509.

- [14] MITZENMACHER M. Compressed bloom filters[J]. IEEE ACM transaction on networking,2002,10(5):604–612.
- [15] BOBBARJUNG D R,JAGANNATHAN S,DUBNICKI C. Improving duplicate elimination in storage systems[J]. ACM Transaction on storage,2006,2(4):424–448.
- [16] JAIN N, DAHLIN M, TEWARI R. Taper: Tiered approach for eliminating redundancy in replica synchronization[C]// Proceeding of the 4th Usenix Conference on File and Technologies. Berkeley:USENIX Association,2005:281–293.
- [17] BORDER A Z. Identifying and filtering near-duplicate documents[C]//Proceeding of the 11th Annual Symp on Combinatorial Pattern Matching. London:Springer-Verlag,2000:1–10.
- [18] 刘文龙,李晖,金东勋. 数字指纹生成方案及关键算法研究[J]. 信息网络安全,2015(2):66–70.
- [19] DOUGLIS F,IYENGAR A. Application-specific delt encoding via resemblance detection[C]//Proceeding of the 2003 USENIX Annual Technical Conference. Berkeley:USENIX Association,2003:113–126.
- [20] KULKARNI P,DOUGLIS F,LAVOIE J D,et al. Redundancy elimination within large collection within large collections of files[C]//Proceeding of the 2004 Usenix Annual Technical Conference. Berkeley:USENIX Association,2004:59–72.

[责任编辑:陆炳新]

---

(上接第 113 页)

- [10] DUMONT M, SCHLICHTER J, CARDILLO T, et al. CYC2 encodes a factor involved in mitochondrial import of yeast cytochrome c[J]. Molecular and cellular biology,1993,13(10):6442–6451.
- [11] MCALLISTER S, POLSON S, BUTTERFIELD D, et al. Validating the Cyc2 neutrophilic iron oxidation pathway using meta-omics of zetaproteobacteria iron mats at marine hydrothermal vents[J]. mSystems,2020,5(1):553–559.
- [12] SANCHEZ N S, PEARCE D A, CARDILLO T S, et al. Requirements of Cyc2p and the porin, Por1p, for ionic stability and mitochondrial integrity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Archives of biochemistry and biophysics,2001,392(2):326–332.
- [13] MAYR J A, HAACK T B, FREISINGER P, et al. Spectrum of combined respiratory chain defects[J]. Journal of inherited metabolic disease,2015,38(4):629–640.
- [14] SOUBANNIER V, VAILLIER J, PAUMARD P, et al. In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(b), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize[J]. The journal of biological chemistry,2002,277(12):10739–10745.
- [15] SOUBANNIER V, RUSCONI F, VAILLIER J. The second stalk of the yeast atp synthase complex; identification of subunits showing cross-links with known positions of subunit 4( Subunit b) [J]. Biochemistry,1991,38(45):15017–15024.
- [16] ZHANG C, WANG R, LIU Z, et al. The plant triterpenoid celastrol blocks PINK1-dependent mitophagy by disrupting PINK1's association with the mitochondrial protein TOM20[J]. The journal of biological chemistry,2019,294(18):7472–7487.

[责任编辑:黄 敏]