

线粒体外膜转位酶基因 *tom70* 缺失 对裂殖酵母细胞动力学的影响

袁荣美¹, 丁 祥², 谭秀梅¹, 侯怡铃¹

(1. 西华师范大学生命科学学院, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637009)

(2. 西华师范大学环境科学与工程学院, 四川 南充 637009)

[摘要] *tom70* 基因编码的是线粒体外膜转位酶(Translocase of Outer Mitochondrial, TOM)复合物中的 Tom70 受体, 在线粒体蛋白转入线粒体膜间隙中具有重要作用. 该研究以裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)为材料, 采用活细胞成像的方法, 研究 *tom70* 基因缺失后细胞有丝分裂中动力学的变化. 研究表明, *tom70* 基因缺失会导致细胞间期微管数目和长度异常, *tom70Δ* 细胞中微管长度长于野生型; 同时, 细胞进入分裂期时 *tom70Δ* 纺锤体的形成、生长速率、生长时间、长度和断裂方式都与野生型存在差异. 纺锤体长度统计显示 *tom70Δ* 细胞存在纺锤体延迟断裂现象. 对 *tom70Δ* 进行活细胞成像, 观察 3 种不同的纺锤体断裂行为: 直线型、拱形和 S 型. 综上所述, 线粒体 *tom70* 基因缺失导致细胞动力学缺陷, 包括纺锤体维持缺陷、染色体分离缺陷和纺锤体断裂缺陷.

[关键词] *tom70* 基因, 有丝分裂, 细胞周期, 细胞动力学, 微管

[中图分类号] Q934 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2020)03-0120-09

Loss of *tom70* (Translocase of Outer Mitochondrial 70) Results in Changes of Cell Dynamics in Fission Yeast

Yuan Rongmei¹, Ding Xiang², Tan Xiumei¹, Hou Yiling¹

(1. College of Life Sciences, China West Normal University, Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education), Nanchong 637009, China)

(2. College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, China)

Abstract: The *tom70* encodes the *tom70* receptor of the complex of translocase of outer mitochondrial, which plays an important role in the transfer of mitochondrial protein into the mitochondrial membrane space. *Schizosaccharomyces pombe* was used as material to study the dynamic changes of cell mitosis after *tom70* gene deletion. The results showed that the number and length of microtubules were abnormal in the interphase, and the length of microtubules was longer in the *tom70Δ* cells than in the wild type. At the same time, the formation, growth rate, growth time, length and fracture mode of the spindle were different from those in the wild type. The statistics of spindle length showed that there was a phenomenon of delayed spindle rupture in the *tom70Δ* cells. Three kinds of spindle fracture behaviors were observed, linear, arched and S-shaped. The results showed that the deletion of mitochondrial *tom70* gene led to the defects of cell dynamics, including spindle maintenance, chromosome separation and spindle breakage.

Key words: *tom70*, mitosis, cell cycle, cell dynamics, microtubule

线粒体是两层膜包被的细胞器, 具有重要的生理功能, 如细胞呼吸、脂质、氨基酸和铁的代谢以及细胞凋亡的调节. 线粒体中有 1 000~2 000 种蛋白质, 但很少是由线粒体基因组编码(酵母中有 8 种, 人类中有 13 种)^[1], 绝大多数线粒体蛋白都是在细胞核中编码, 由胞质核糖体翻译, 然后导入线粒体^[2]. 线粒体外膜转位酶(Translocase of Outer Mitochondrial, TOM)复合物包括两个整合的膜导入受体 Tom20 和 Tom70, 以及一个葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide, GIP), 对于核编码的线粒

收稿日期: 2020-04-21.

基金项目: 四川省科技厅应用基础重点项目(2018JY0087)、四川省科技厅重点研发项目(2018NZ0055).

通讯作者: 侯怡铃, 博士, 教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学研究. E-mail: starthlh@126.com.

体蛋白质的翻译后导入至关重要. 线粒体的生物发生和功能取决于前体蛋白通过 TOM 复合物导入线粒体^[2-4].

Tom70 亚基由 *tom70* 基因编码,与 Tom20 共同作用,使 TOM 复合体能够识别沿不同途径运输的各种前体蛋白的靶向信号. 虽然 Tom70 和 Tom20 都通过 N-端疏水序列锚定在 OMM(Outer Membrane of Mitochondrial,线粒体外膜)上,但 Tom70 和 Tom20 的底物特异性有所不同, Tom70 具有一定的特异性,可结合具有内部靶向信号的蛋白^[4-5],而 Tom20 只是参与识别具有可水解的 N-末端前序列的前体蛋白. Tom70 还可与包含多个跨膜片段的载体家族的蛋白质结合^[6],能特异性识别 Hsp90(Heat Shock Proteins 90,热休克蛋白)和 Hsc70(Heatshockcognate70,热激蛋白 70),这是线粒体前体蛋白导入的关键步骤^[7]. 蛋白质导入线粒体基质的缺陷会导致线粒体前体蛋白积聚,从而诱导一系列细胞应激反应^[3]. 有研究表明,*tom70* 基因缺失会导致细胞生长缓慢,在生长过程中端粒伸长^[8],如果将半乳糖作为碳源也会影响细胞的生长^[9]. *tom70* 基因缺失还会导致细胞对钴、镉、砷、过氧化氢和盐胁迫敏感,且在对镉离子做出反应时会导致细胞色素的累积^[10-12]. 而 *tom70* 基因过表达则导致细胞在缺氧时蛋白水平降低、固醇调节元件启动子的转录降低^[13-15]. *tom70* 基因缺失还会降低交配率^[16]. 同时,*tom70* 基因与微管蛋白的正常运转具有重要意义^[17]. 微管是不断聚合和解聚的高度动态的组织,其稳定和正常运转需要线粒体提供能量^[18-19],使得细胞能够正常生长和分裂. 同时,线粒体的定位和运输也依赖于微管的细胞骨架,驱动蛋白及动力蛋白^[20-21]. 研究发现,*tom70* 基因与编码微管相关蛋白的基因具有相互作用. 例如,与 *alp16* 基因(编码 γ 微管蛋白复合物亚基 Alp16)、*mod21* 基因(编码 γ 微管蛋白复合物亚基 Mod21)、*mcp1* 基因(编码微管结合蛋白 Mcp1)、*k1p2* 基因(编码驱动蛋白样蛋白 K1p2)具有正向相互作用(上位性/抑制性相互作用);而与 *mmb1* 基因(编码线粒体-微管结合蛋白 Mmb1)具有负向相互作用(合成病/致死相互作用)^[17].

细胞复制涉及一系列高度进化的保守和调控事件,称为“细胞周期”^[22]. 裂殖酵母是一种单细胞生物,具有多细胞动物的细胞周期特征,且很容易进行遗传操作^[23],是研究检查点控制和细胞周期的重要模式生物^[24]. 大多数有关不同 TOM 亚基的研究都是在酵母中进行的^[4]. 目前,*tom70* 基因缺失对细胞动力学的影响仍未见报道. 因此,本研究以裂殖酵母作为模型来探讨 *tom70* 基因缺失对有丝分裂中细胞动力学的影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*),保存于四川省南充市西华师范大学生命科学学院西南野生动植物资源保护教育部重点实验室,详情见表 1.

表 1 实验菌株及编号
Table 1 Strains and numbers

菌株编号	基因型	菌株编号	基因型
PT. 286	Wt;h-	PT. 2167	Wt;Hht2-GFP;URA4 h+
PT. 287	Wt;h+	HY 1	Wt;Hht2-GFP;URA4/mC-Atb2 h+
HY 568	<i>tom70</i> Δ ;KanR.h+	HY 2	Wt;Hht2-GFP;URA4/mC-Atb2 h-
HY 569	<i>tom70</i> Δ ;KanR.h-	HY 568-1	<i>tom70</i> Δ ;KanR Hht2-GFP;URA4/mC-Atb2 h?
PT. 917	Wt;mC-Atb2 h-		

1.2 主要药品及仪器

酵母提取物(Yeast Extract)购于 Thermo Fisher Scientific 公司,葡萄糖(Glucose)购于 Thermo Fisher Scientific 公司;赖氨酸(L-lysine)、腺嘌呤(Adenine)、组氨酸(L-histidine)、亮氨酸(L-leucine)、尿嘧啶(Uracil)、琼脂(Agar)购于 Thermo Fisher Scientific 公司;EMM-N 培养基购于 Sigma 公司;G418 购于 Thermo Fisher Scientific 公司;-80℃超低温冰箱(Thermo scientific);MSC-Advantage™ II 级生物安全柜(Thermo scientific);恒温培养箱(Thermo scientific);激光共聚焦显微镜(Leica TCS-SP8),荧光正置显微镜(Leica DMI3000B).

1.3 裂殖酵母菌株的构建

构建荧光标记的表达载体时将 mCherry-Atb2, Hht2-GFP 整合到它们自身启动子控制下的 *leu1* 基因

座中,然后挑出单克隆,并在荧光显微镜下镜检,分离带有所需荧光标记的菌株^[25-26].

tom70Δ 菌株的荧光标记通过与带有荧光标记的野生型菌株产孢来实现. 将要进行产孢的菌株从 -80 ℃ 冰箱接种到 YE5S 固体培养基上,25 ℃ 培养;刮取等量的 h+ 和 h- 菌体,在 EMM-N 固体培养基上充分混匀后涂布均匀,于 25 ℃ 条件下培养 24 h,通过在显微镜下观察子囊孢子的形成来确定产孢成功. 从 EMM-N 固体培养基中刮取适量的 h+ 和 h- 产孢后的混合菌体,悬于 100 μL 的葡聚糖酶悬浮液(10 μg/mL)中,在室温下孵育过夜. 通过显微镜镜检,确认细胞及子囊壁完全水解后用蒸馏水洗涤 3 次(去除葡聚糖酶),得到孢子. 用蒸馏水重悬孢子,并取适量的孢子悬液均匀涂布在 YE5S-G418(G418 的终浓度为 0.225 mg/mL)固体培养基上,25 ℃ 培养 3 d. 挑出单克隆,通过荧光显微镜找到带有所需荧光标记的菌体,并进行纯化和保存^[27].

1.4 显微镜镜检

使用 Leica TCS-SP8 激光共聚焦显微镜在 25 ℃ 室温下进行活细胞成像. 为了获得较高质量的图像,在进行活细胞成像时,采用的参数为:11 个 0.5 μm 间距的光学切片,GFP/mCherry 曝光时间为 300 ms ~ 500 ms,间隔 60 s,总时间 90 min.

1.5 数据分析

使用 FIJI image 图像处理软件对细胞有丝分裂期的纺锤体长度、细胞长度以及分裂间期微管的长度进行测量. 使用相同的 VANILE 比值,以减少荧光染料的统计误差.

所有数据均表示为(平均值±SD),并且使用 SPSS 软件单向方差分析对实验组与对照组之间的显著差异进行统计学分析. * $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著. 使用 Kaleidagraph 4.0(<http://www.synergy.com>)作图,箱形图显示所有单独的数据,中位数显示为一条线,每个框的顶部和底部的线表示该组数据的最小值和最大值,异常值为单个点.

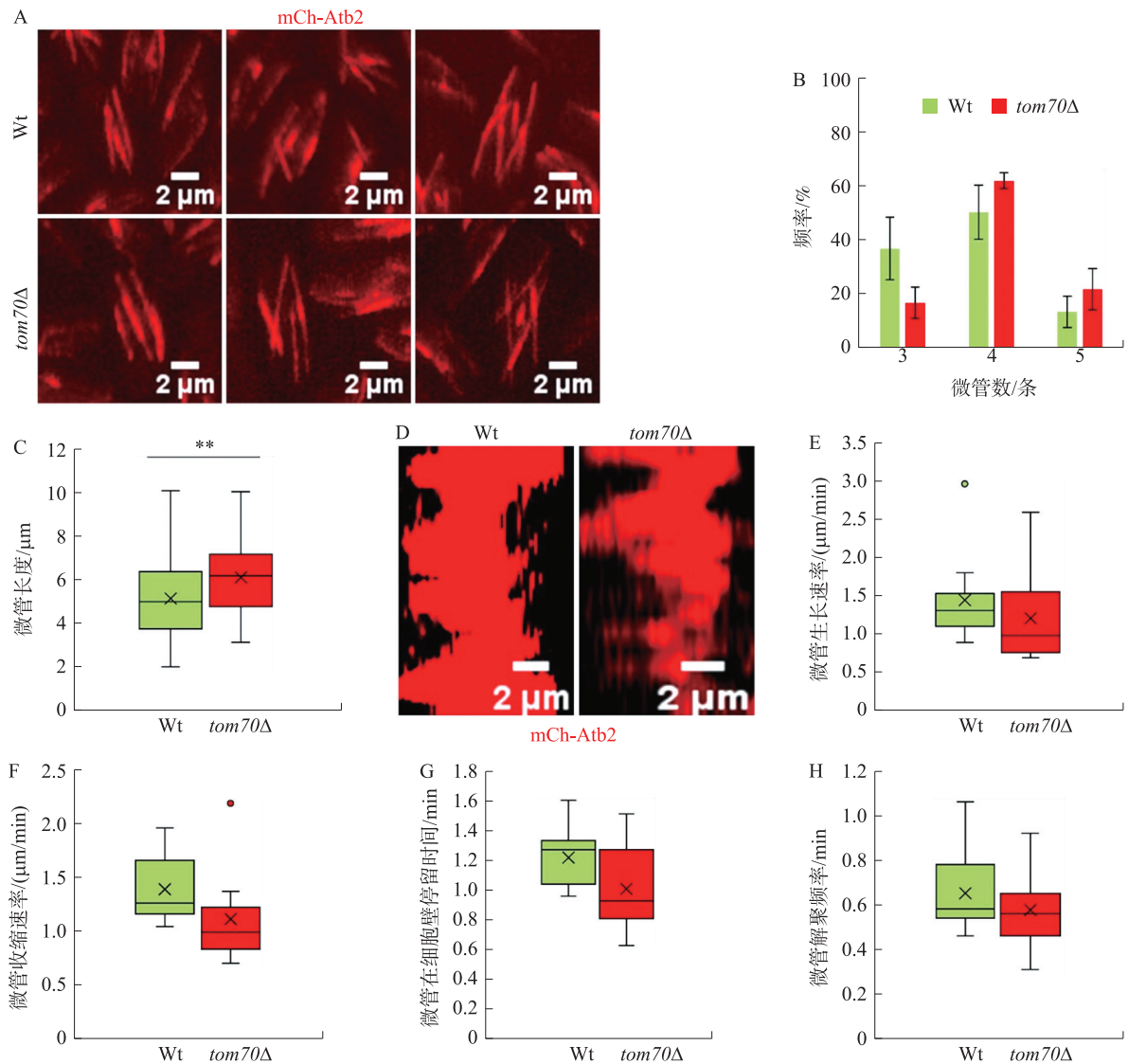
2 结果与讨论

2.1 *tom70* 基因缺失对有丝分裂间期微管数量和长度的影响

微管由微管蛋白组成,具有聚合和解聚的动力学特性,在维持细胞形态、细胞分裂、信号转导及物质输送等过程中起着重要作用. 在分裂间期以微管的形式存在,进入细胞分裂期时微管解聚,形成纺锤体. 结果显示,在有丝分裂间期野生型细胞中 36.67% 有 3 条微管,50% 有 4 条微管,11.33% 有 5 条微管,而 *tom70Δ* 细胞中 16.67% 有 3 条微管,61.66% 有 4 条微管,21.67% 有 5 条微管(图 1A、1B). 值得注意的是,野生型的微管长度为 $(5.14 \pm 1.64) \mu\text{m}$,而 *tom70Δ* 细胞微管长度为 $(6.11 \pm 1.74) \mu\text{m}$,两者间有极显著差异 (** $P < 0.01$)(图 1C). 微管动力学结果显示,在有丝分裂间期野生型微管的生长速率为 $(1.45 \pm 0.55) \mu\text{m}/\text{min}$,收缩速率为 $(1.38 \pm 0.29) \mu\text{m}/\text{min}$,在细胞壁停留的时间为 $(1.21 \pm 0.2) \text{min}$,解聚的频率为 (0.65 ± 0.17) ;而 *tom70Δ* 微管生长速率为 $(1.57 \pm 0.85) \mu\text{m}/\text{min}$,收缩速率为 $(1.10 \pm 0.41) \mu\text{m}/\text{min}$,在细胞壁停留的时间为 $(1.01 \pm 0.26) \text{min}$,解聚的频率为 (0.58 ± 0.18) (图 1D-1H). 其中,微管在细胞壁停留的时间与野生型具有显著差异 (* $P < 0.05$)(图 1G),提示 *tom70* 基因缺失对分裂间期细胞的微管长度和动力学具有显著影响.

2.2 *tom70* 基因缺失对细胞有丝分裂中纺锤体、染色体和细胞长度的影响

在有丝分裂过程中染色体的正确分离离不开纺锤体极体(SPBs)组装的纺锤体. 有丝分裂纺锤体的伸长分为 3 个阶段,分别对应有丝分裂不同阶段. 为了进一步了解 *tom70* 基因缺失对纺锤体组装的影响,通过活细胞成像分析了 *tom70Δ* 和野生型在带有 mCherry-Atb2(mCherry 荧光蛋白标记的 α -微管蛋白)和 Hht2-GFP(绿色荧光蛋白标记的组蛋白 H3)纺锤体组装机动力学. 野生型的纺锤体伸长动力学表现出典型的 4 个阶段:有丝分裂前期(I 期)、中期(II 期)、后期 A(染色单体分离)与后期 B(纺锤体伸长),*tom70Δ* 细胞中则存在一些异常情况(图 2A),包括细胞周期延长、染色体出现不分离等情况. 纺锤体长度统计显示,*tom70Δ* 细胞与野生型在前期和中期并无显著差异,在后期 B 中纺锤体的伸长延迟了 3.4 min,与野生型具有极显著差异 (** $P < 0.01$)(图 2B、2C). 野生型和 *tom70Δ* 细胞的长度分析表明,野生型细胞在纺锤体形成点、前期与中期临界点、中期与后期临界点、后期与末期临界点以及有丝分裂终点的细胞长度分别为 $(12.73 \pm 1.20) \mu\text{m}$ 、 $(12.87 \pm 1.22) \mu\text{m}$ 、 $(13.04 \pm 1.25) \mu\text{m}$ 、 $(13.27 \pm 1.26) \mu\text{m}$ 和 $8.52 \mu\text{m}$,而 *tom70Δ* 的细胞长度分别为



A.微管形态;B.分裂间期微管数统计($n=20$);C.分裂间期微管长度统计($n=20$);D.微管动力学形态图;E.分裂间期微管生长速率($n=11$);F.分裂间期微管收缩速率($n=11$);G.分裂间期微管在细胞壁停留的时间($n=11$);H.微管解聚频率($n=11$), * $P<0.05$,表示差异显著, ** $P<0.01$,表示差异极显著。

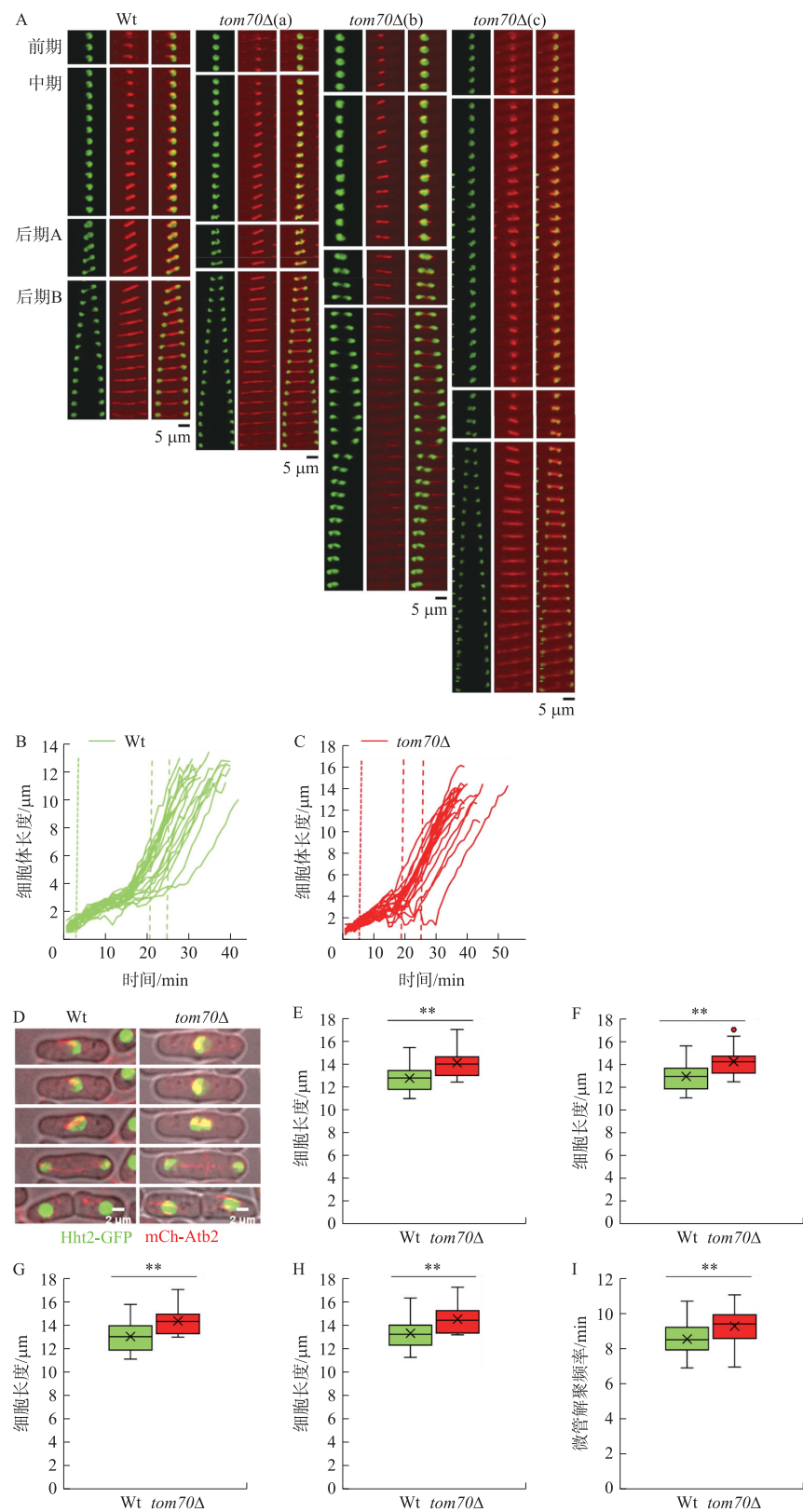
图1 *tom70* 基因缺失对分裂间期微管数量和长度的影响

Fig.1 Effects of *tom70* gene deletion on number and length of microtubules during the mitotic interphase

(14.08 ± 1.20) μm 、(14.17 ± 1.20) μm 、(14.35 ± 1.15) μm 、(14.46 ± 1.15) μm 和 (9.24 ± 1.00) μm (图 2E–2I). *tom70*Δ 细胞中每个时期的细胞长度都比野生型细胞更长,都具有极显著差异 (** $P<0.01$). 以上结果提示 *tom70* 基因敲除影响了细胞的长度以及延迟了有丝分裂后期的时间。

2.3 *tom70* 基因缺失对细胞分裂中纺锤体的影响

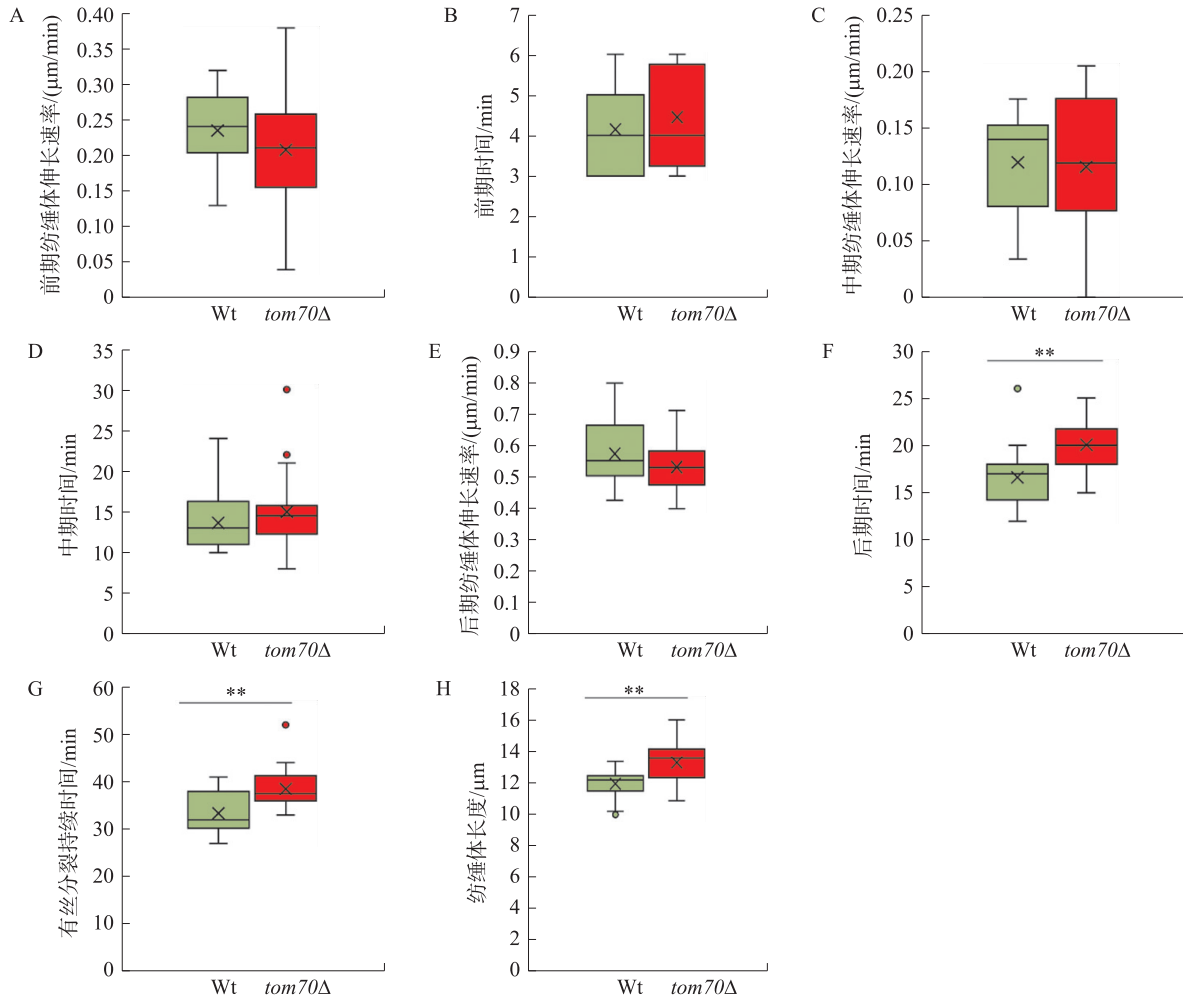
mC-Atb2 和 Hht2-GFP 也用作细胞有丝分裂中的纺锤体伸长和染色体分离动力学研究时的检测信号。野生型细胞的纺锤体在前期伸长速度为 (0.23 ± 0.06) $\mu\text{m}/\text{min}$, 前期的持续时间为 (4.15 ± 1.15) min; 在中期伸长速度为 (0.12 ± 0.05) $\mu\text{m}/\text{min}$, 持续时间是 13.65 min (图 3A–3D). *tom70*Δ 细胞的纺锤体在前期的伸长速度是 (0.21 ± 0.08) $\mu\text{m}/\text{min}$, 持续时间为 (4.45 ± 1.15) min, 进入中期纺锤体伸长速度为 (0.12 ± 0.06) $\mu\text{m}/\text{min}$, 持续时间为 (17.55 ± 4.91) min (图 3A–3D). 野生型和 *tom70*Δ 细胞在前期和中期的伸长速率与时间上没有显著差异。值得注意的是, 野生型纺锤体在后期的伸长速率是 (0.57 ± 0.10) $\mu\text{m}/\text{min}$, 后期持续时间为 (16.65 ± 3.12) min, 而 *tom70*Δ 细胞的纺锤体在后期则以 (0.53 ± 0.08) $\mu\text{m}/\text{min}$ 的速度伸长, 持续时间为 (20.05 ± 2.76) min (图 3E–3F), 在持续时间上与野生型具有极显著差异 (** $P<0.01$). 从整个有丝分裂来看, 野生型持续时间为 (33.5 ± 4.15) min, 纺锤体总长度为 (11.88 ± 0.88) μm ; *tom70*Δ 持续时间为 ($38.5 \pm$



A.细胞动力学形态图;wt:野生型,A-C:*tom70*Δ 细胞形态异常情况;B.野生型细胞分裂时纺锤体的伸长情况($n=20$);C.*tom70*Δ 细胞分裂时纺锤体的伸长情况($n=20$);D.由上到下分别为细胞在纺锤体形成点、前期与中期临界点、中期与后期临界点、后期与末期临界点以及有丝分裂终点的形态;E-I:分别为细胞在纺锤体形成点、前期与中期临界点、中期与后期临界点、后期与末期临界点以及有丝分裂终点的长度($n=20$),* $P<0.05$,表示差异显著,** $P<0.01$,表示差异极显著。

图 2 *tom70* 基因缺失对细胞有丝分裂中纺锤体、染色体和细胞长度的影响
Fig. 2 Effect of *tom70* gene deletion on spindles, chromosome and cell length during the mitotic

4.35) min, 纺锤体总长度为 $(13.23 \pm 1.22) \mu\text{m}$, 差异均为极显著 ($** P < 0.01$) (图 3G–3H). 结果表明, *tom70* 基因敲除导致细胞有丝分裂期纺锤体变长, 同时也延长了有丝分裂的持续时间, 主要表现在后期纺锤体伸长阶段被阻滞.



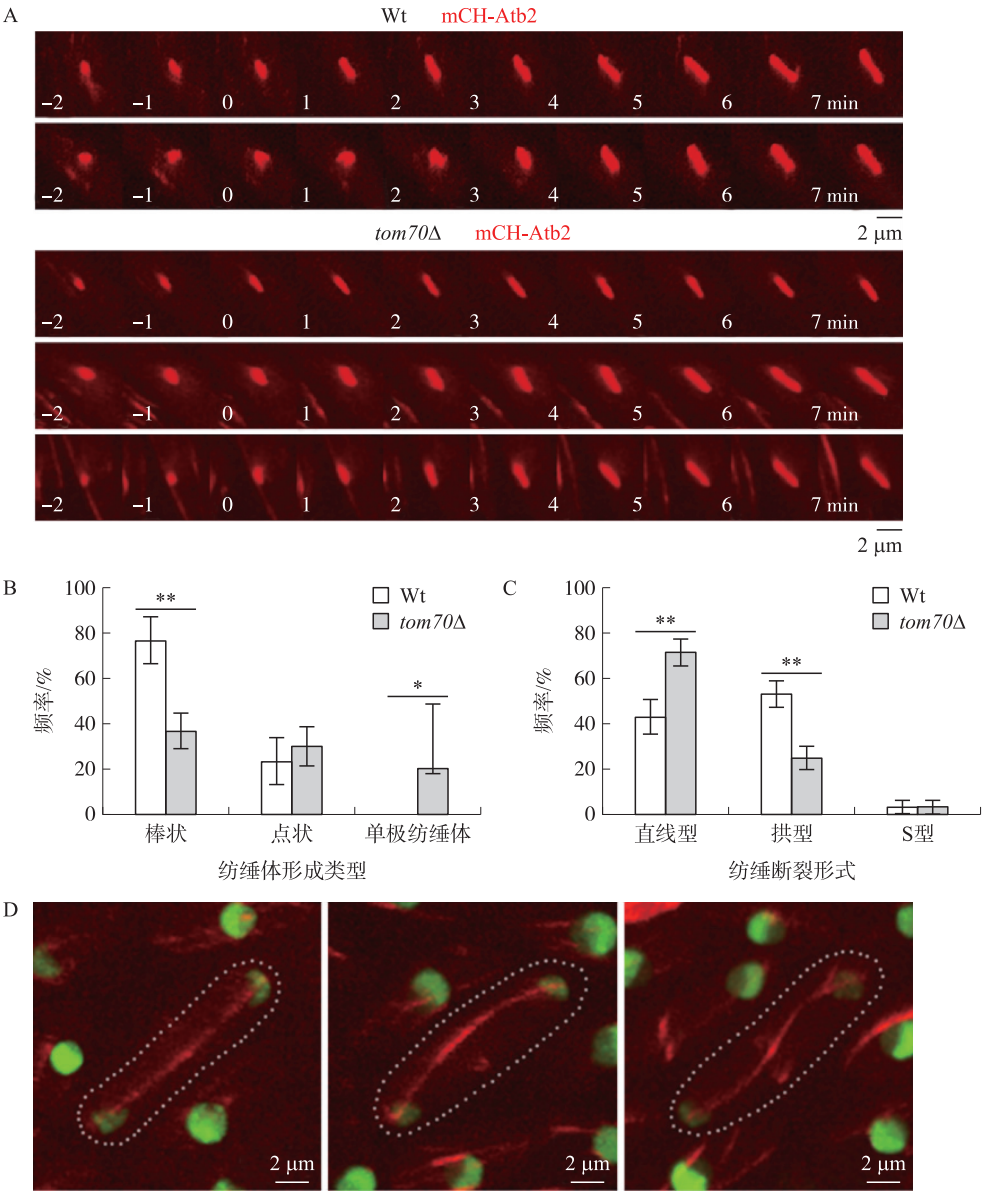
A. 有丝分裂前期纺锤体伸长速率 ($n = 20$); B. 有丝分裂前期的时间 ($n = 20$); C. 有丝分裂中期纺锤体伸长速率; D. 有丝分裂中期的时间 ($n = 20$); E. 有丝分裂后期纺锤体伸长速率 ($n = 20$); F. 有丝分裂后期的时间 ($n = 20$); G. 有丝分裂持续时间 ($n = 20$); H. 有丝分裂纺锤体最终长度 ($n = 20$), * $P < 0.05$, 表示差异显著, ** $P < 0.01$, 表示差异极显著.

图 3 *tom70* 基因缺失对细胞分裂中纺锤体的影响

Fig. 3 Effects of *tom70* gene deletion on spindles during the mitotic

2.4 *tom70* 基因缺失对细胞分裂中纺锤体组装和断裂的影响

通过活细胞成像发现, *tom70Δ* 细胞中纺锤体微管组装和动力学与野生型显著不同. 在野生型细胞中, 进入有丝分裂与细胞质间期微管的解聚同时发生. 为了使有丝分裂时间的测量标准化, 将有丝分裂开始的时间定义为 0 min. 野生型中 80% 的细胞在 0 min 微管形成“棒状”, 而 *tom70Δ* 细胞中 36.67% 的细胞在 0 min 微管形成“棒状”, 与野生型具有极显著差异 ($** P < 0.01$). 23.33% 野生型细胞在 0 min 形成“点状”, 而 30% 的 *tom70Δ* 细胞在 0 min 形成“点状”, 但它们迅速过渡到“棒状”. 值得注意的是, *tom70Δ* 细胞中有 33.33% 在 0 min 形成单极纺锤体, 而野生型并没有形成单极纺锤体, 两者之间差异显著 ($** P < 0.05$) (图 4A–3B). 纺锤体断裂形式统计结果显示, 在野生型细胞中 3.34% 呈 S 型断裂, 43.33% 细胞纺锤体呈直线型断裂, 53.33% 细胞呈拱型断裂; 而 *tom70Δ* 细胞中 3.33% 呈 S 型断裂, 71.67% 呈直线型断裂, 25% 呈拱型断裂, 其中直线和拱型两种断裂形式 *tom70Δ* 细胞均与野生型具有极显著差异 ($** P < 0.01$) (图 4C–4D). 结果表明, *tom70* 基因缺失显著影响了纺锤体的组装和动力学, 同时也会影响纺锤体断裂方式.



A.有丝分裂纺锤体形成类型;B.有丝分裂纺锤体形成类型的统计数据($n=20$);C.有丝分裂纺锤体形成断裂方式($n=20$);D.有丝分裂纺锤体形成断裂方式形态图, * $P<0.05$,表示差异显著, ** $P<0.01$,表示差异极显著。

图 4 *tom70* 基因缺失对细胞分裂中纺锤体组装和断裂的影响

Fig. 4 Effect of *tom70* gene deletion on spindle assembly and breakage during mitotic

3 结论

tom70 编码的蛋白质是位于线粒体外膜上的转位酶(TOM 复合物)中的 Tom70 受体,可结合具有内部靶向信号的蛋白^[4-5],将线粒体前体蛋白导入线粒体基质。Xue 等^[28]人研究表明,Tom70 缺失会加剧线粒体 Ca^{2+} 超负荷,导致线粒体形态破坏,功能受到抑制,导致心肌缺血/再灌注(MI/R)损伤。Filadi R 等^[4]研究发现 Tom70 耗竭后诱导自噬并影响细胞增殖;Li 等^[29]研究发现 Tom70 可充当线粒体反应的分子开关从而确定病理性心脏肥大。微管聚合和解聚的动力学特性,在细胞各个阶段都起着重要作用:在细胞分裂过程中,形成纺锤体,帮助染色体正确分离^[5];在非分裂细胞中组织细胞质,定位细胞核和细胞器。微管还可参与神经元内轴突延伸^[30-31]。Mcintosh^[32]研究发现,缺乏一个基因导致微管变得太长,该基因的产物通常有助于控制微管的长度。微管的功能障碍还会引起神经退行性变,导致帕金森氏病(PD)^[32-35]。实验结果表明,*tom70* 缺失会导致细胞在间期时微管长度显著长于野生型,同时,随着纺锤体长度的变化,*tom70Δ* 细胞中每个时期的细胞长度均比野生型细胞更长,均具有极显著差异(** $P<0.01$)。Kkuger 等^[36]研究发

现,在裂殖酵母中纺锤体的长度与细胞大小成比例,这与实验结果相一致。结果显示,*tom70* 基因编码的蛋白可能与微管的长度控制有关。

Araujo 等^[37]的研究表明,有丝分裂延长会导致细胞死亡或细胞周期停滞。相比于野生型,*tom70Δ* 细胞中微管聚合和解聚的动态稳定发生改变,细胞进入分裂期出现了单极纺锤体现象,纺锤体长度也显著长于野生型,断裂的形式也与野生型具有显著差异,提示 *tom70* 基因在细胞分裂时纺锤体的形成、断裂、长度方面有重要影响。细胞周期成像结果显示,*tom70* 基因敲除后细胞有丝分裂的时间显著长于野生型,提示 *tom70* 基因缺失可能会导致细胞进入 G_0 期或者死亡。

本研究为 *tom70* 基因缺失导致裂殖酵母动力学影响的研究提供了一定的科学依据,但在细胞动力学变化中涉及何种上下游蛋白的参与还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] WESTERMANN B, NEUPERT W. “Omics” of the mitochondrion[J]. *Nature biotechnology*, 2003, 21(3): 239–240.
- [2] FAN A C, GAVA L M, RAMOS C H, et al. Human mitochondrial import receptor Tom70 functions as a monomer[J]. *Biochemical journal*, 2010, 429(3): 553–563.
- [3] MARTENSSON C U, PRIENITZ C, SONG J, et al. Mitochondrial protein translocation-associated degradation[J]. *Nature*, 2019, 569(7758): 679–683.
- [4] FILADI R, LEAL N S, SCHREINER B, et al. TOM70 sustains cell bioenergetics by promoting IP3R3-mediated ER to mitochondria Ca^{2+} transfer[J]. *Current biology*, 2018, 28(3): 369–382.
- [5] STUART R A, ONO H, LANGER T, et al. Mechanisms of protein import into mitochondria[J]. *Cell structure function*, 1996, 21(5): 403–406.
- [6] MELIN J, KILISCH M, NEUMANN P, et al. A presequence-binding groove in Tom70 supports import of Mdl1 into mitochondria[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2015, 1853(8): 1850–1859.
- [7] FAN A C, BHANGOO M K, YOUNG J C. Hsp90 functions in the targeting and outer membrane translocation steps of Tom70-mediated mitochondrial import[J]. *Journal of biological chemistry*, 2006, 281(44): 33313–33324.
- [8] LIU N N, HAN T X, DU L L, et al. A genome-wide screen for *Schizosaccharomyces pombe* deletion mutants that affect telomere length[J]. *Cell research*, 2010, 20(8): 963–975.
- [9] MALECKI M, BITTON D A, RODRIGUEZ-LOPEZ M, et al. Functional and regulatory profiling of energy metabolism in fission yeast[J]. *Genome biology*, 2016, 17(1): 240–257.
- [10] SIDERI T, RALLIS C, BITTON D A, et al. Parallel profiling of fission yeast deletion mutants for proliferation and for lifespan during long-term quiescence[J]. *G3(Bethesda)*, 2015, 5(1): 145–55.
- [11] KENNEDY P J, VASHISHT A A, HOE K L, et al. A genome-wide screen of genes involved in cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Toxicological sciences*, 2008, 106(1): 124–39.
- [12] GUO L, GANGULY A, SUN L, et al. Global fitness profiling identifies arsenic and cadmium tolerance mechanisms in fission yeast[J]. *G3(Bethesda)*, 2016, 6(10): 3317–3333.
- [13] BURR R, STEWART E V, SHAO W, et al. Mga2 transcription factor regulates an oxygen-responsive lipid homeostasis pathway in fission yeast[J]. *Journal of biological chemistry*, 2016, 291(23): 12171–12183.
- [14] ZUIN A, GABRIELLI N, CALVO I A, et al. Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast[J]. *PLoS one*, 2008, 30;3(7): e2842.
- [15] BROOKHEART R T, LEE C Y, ESPENSHADE P J. Casein kinase 1 regulates sterol regulatory element-binding protein (SREBP) to control sterol homeostasis[J]. *Journal of biological chemistry*, 2014, 289(5): 2725–2735.
- [16] DUDIN O, MERLINI L, BENDEZU F O, et al. A systematic screen for morphological abnormalities during fission yeast sexual reproduction identifies a mechanism of actin aster formation for cell fusion[J]. *PLoS genetics*, 2017, 13(4): e1006721.
- [17] COLM J R, ASSEN R, KRISTIN P, et al. Hierarchical modularity and the evolution of genetic interactomes across species[J]. *Molecular cell*, 2012, 46(5): 691–704.
- [18] MELKOV A, ABDU U. Regulation of long-distance transport of mitochondria along microtubules[J]. *Cellular and molecular life sciences*, 2018, 75(2): 163–176.
- [19] FU C, JAIN D, COSTA J, et al. mmb1p binds mitochondria to dynamic microtubules[J]. *Current biology*, 2011, 21(17): 1431–

- 1439.
- [20] DESAI A, MITCHISON T J. Microtubule polymerization dynamics[J]. Annual review of cell and developmental biology, 1997, 13: 83–117.
- [21] VIRVE C, CATERINA F, MARCELLO D' A. Key role of mitochondria in alzheimer's disease synaptic dysfunction[J]. Current pharmaceutical design, 2013, 19(36): 6440–6450.
- [22] SANTOS A, WERNERSSON R, JENSEN L J. Cyclebase 3.0: a multi-organism database on cell-cycle regulation and phenotypes[J]. Nucleic acids research, 2014, 43(Database issue): D1140–D1144.
- [23] LI C, BAI J, HAO X, et al. Multi-gene fluorescence in situ hybridization to detect cell cycle gene copy number aberrations in young breast cancer patients[J]. Cell cycle, 2014, 13: 1299–1305.
- [24] GOMEZ E B, FORSBUR S L. Analysis of the fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle[J]. Methods in molecular biology, 2004, 241: 93–111.
- [25] BAHLER J, WU J Q, LONGTINE M S, et al. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Yeast, 1998, 14(10): 943–951.
- [26] RINCON S A, LAMSON A, BLACKWELL R, et al. Kinesin-5-independent mitotic spindle assembly requires the antiparallel microtubule crosslinker Ase1 in fission yeast[J]. Nature communications, 2017, 17: 15286–15297.
- [27] FORSBUR S L, RHIND N. Basic methods for fission yeast[J]. Yeast, 2006, 23(3): 173–183.
- [28] XUE Q, PEI H, LIU Q, et al. MICU1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury and its control by the importer receptor Tom70[J]. Cell death & disease, 2017, 8(7): e2923.
- [29] LI J, QI M, LI C, et al. Tom70 serves as a molecular switch to determine pathological cardiac hypertrophy[J]. Cell research, 2014, 24(8): 977–993.
- [30] DESAI A, MITCHISON T J. Microtubule polymerization dynamics[J]. Annual review of cell and developmental biology, 1997, 13: 83–117.
- [31] AVILA J. Microtubule functions[J]. Life sciences, 1992, 50(5): 327–334.
- [32] MCINTOSH J R. Assessing the contributions of motor enzymes and microtubule dynamics to mitotic chromosome motions[J]. Annual review of cell and developmental biology, 2017, 33: 1–22.
- [33] CARTELLI D, CAPPELLETTI G. Microtubule destabilization paves the way to Parkinson's disease[J]. Molecular neurobiology, 2017, 54(9): 6762–6774.
- [34] CARTELLI D, GOLDWURM S, CASAGRANDE F, et al. Microtubule destabilization is shared by genetic and idiopathic Parkinson's disease patient fibroblasts[J]. PLoS one, 2012, 7(5): e37467.
- [35] PELLEGRINI L, WETZEL A, GRANNO S, et al. Back to the tubule: microtubule dynamics in Parkinson's disease[J]. Cellular and molecular life sciences, 2017, 74(3): 409–434.
- [36] KKUGER L K, SANCHEZ J L, PAOLETTI A, et al. Kinesin-6 regulates cell-size-dependent spindle elongation velocity to keep mitosis duration constant in fission yeast[J]. Elife, 2019, 8: e42182.
- [37] ARAUJO A R, GELENS L, SHERIFF R S, et al. Positive feedback keeps duration of mitosis temporally insulated from upstream cell-cycle events[J]. Molecular cell, 2016, 64(2): 362–375.

[责任编辑:黄 敏]