

粟酒裂殖酵母中 Mmp1 蛋白的功能研究

赵 兰, 黄 鹰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 线粒体是存在于大多数真核细胞中的一种产能细胞器,它参与了细胞内 ATP 的合成、物质的代谢、细胞凋亡等多种生理过程. Mmp1 蛋白被预测为线粒体内膜肽酶复合体催化亚基,但其具体功能尚未得到解析. 通过分子克隆、表型实验、荧光显微观察、线粒体分离提取、实时荧光定量 PCR、蛋白质印迹法等技术,分析了 Mmp1 的定位及其对线粒体功能的影响. 通过荧光定位分析发现 Mmp1 是一个定位在线粒体中的蛋白. 细胞缺失 *mmp1* 无法在非发酵型培养基上生长,暗示缺失 *mmp1* 影响了线粒体的功能. 同时,细胞缺失 *mmp1*,使线粒体基因组编码的呼吸链复合体核心蛋白 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的蛋白水平显著降低. 在对野生型和 $\Delta mmp1$ 菌株线粒体编码的基因的 mRNA 水平进行实时荧光定量实验发现, $\Delta mmp1$ 菌株中的 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的转录水平并未有明显变化. 结果表明, Mmp1 影响了线粒体呼吸链复合体亚基的蛋白水平,对维持线粒体功能的发挥起着重要作用.

[关键词] Mmp1, 线粒体, 实时荧光定量 PCR, 线粒体蛋白提取

[中图分类号] Q78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2022)04-0069-06

Studies on the Function of Mmp1 Protein in *Schizosaccharomyces Pombe*

Zhao Lan, Huang Ying

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

Abstract: Mitochondria are the productive organelles of most eukaryotic cells, which are involved in various physiological processes such as ATP synthesis, substance metabolism and cell apoptosis. Mmp1 protein is predicted to be the catalytic subunit of the mitochondrial endopeptidase complex, but its specific function has not been analyzed. In this paper, the localization of Mmp1 and its effect on mitochondrial function are analyzed by molecular cloning, phenotypic experiment, fluorescence microscopic observation, mitochondrial isolation and extraction, real-time fluorescence quantitative PCR and western-blot. Fluorescence localization analysis reveal that Mmp1 is a protein located in mitochondria. $\Delta mmp1$ strain can not grow on the medium with glycerol as carbon source and can not perform aerobic respiration, suggesting that the deletion of *mmp1* affects mitochondrial function. Meanwhile, the protein levels of Cox1, Cox2, Cox3, Cob1 and Atp6, the core proteins of respiratory chain complex encoded by mitochondrial genome, are significantly reduced when *mmp1* is knock out. The transcriptional levels of Cox1, Cox2, Cox3, Cob1 and Atp6 in $\Delta mmp1$ strain do not change significantly. These results indicate that Mmp1 affects the protein levels of some mitochondrial respiratory chain complex subunits and plays an important role in maintaining mitochondrial function.

Key words: Mmp1, mitochondria, qRT-PCR, mitochondrial protein extraction

线粒体存在于大多数真核生物中,为细胞提供了生存所必需的能量 ATP^[1-2]. 此外,线粒体还参与合成脂肪酸、氨基酸、血红素、铁硫蛋白等生物大分子,同时对细胞内氧化还原稳态、磷脂的代谢、钙信号的转导等多种过程有着重要作用^[3-6]. 在人体中,线粒体功能出现障碍会诱发一系列疾病,例如帕金森综合症、阿尔茨海默症、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿舞蹈病^[7-10]. 因此对线粒体进行深入研究具有十分重要的科学意义.

线粒体内膜上的呼吸链复合体起到了传递氢离子与电子的作用,对线粒体功能的发挥具有重要作用^[11-12]. 线粒体基因组 (mtDNA) 编码了重要的呼吸链蛋白^[12-14]. 在粟酒裂殖酵母中 mtDNA 编码 1 个 RNase P RNA (*rnpB*), 2 个 rRNA (*rnl* 与 *rns*), 8 个 mRNA (Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6、Atp8、Atp9、Var1),

收稿日期: 2022-02-28.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31400012).

通讯作者: 黄鹰, 博士, 教授, 研究方向: 微生物学. E-mail: hyhanghai1965@163.com

25 个 tRNA. 其中 Cox1、Cox2、Cox3 蛋白是组成细胞色素 *c* 氧化酶的亚基, Cob1 蛋白是组成细胞色素 *c* 还原酶的亚基, Atp6、Atp8、Atp9 蛋白是组成 ATP 合酶的亚基^[15-18]. 真核生物的生命活动由线粒体基因组与核基因组共同调控^[19].

在 Pombase 数据库中, Mmp1 蛋白被预测为线粒体内膜肽酶复合体催化亚基, 但 Mmp1 对线粒体的作用还有待深入研究, 本文尝试阐述 Mmp1 蛋白的定位和线粒体功能的影响机制.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

菌株: 粟酒裂殖酵母 yHL6381 (基因型: $h^+ leu1-32 his3-D1 ura4-D18 ade6-M210$), *E. coli* (*Escherichia coli*) Top 10.

质粒: pYJ19.

1.1.2 培养基

YES 培养基(100 mL): Yeast Extract 0.5 g, 葡萄糖 3 g, 腺嘌呤(Adenine) 22.5 mg, 亮氨酸(Leucine) 22.5 mg, 组氨酸(Histidine) 22.5 mg, 尿嘧啶(Uracil) 22.5 mg, 固体需添加 2 g 琼脂粉.

甘油固体培养基(100 mL): Yeast Extract 0.5 g, 葡萄糖 0.1 g, 甘油 3 mL, 腺嘌呤(Adenine) 22.5 mg, 亮氨酸(Leucine) 22.5 mg, 组氨酸(Histidine) 22.5 mg, 尿嘧啶(Uracil) 0.225 g, 2 g 琼脂粉.

EMM-Leuine⁻培养基(100 mL): 邻苯二氢钾 0.3 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.555 g, NH_4Cl 0.5 g, 50×Salt stock 2 mL, 1 000×Vitamin 100 μ L, 1 000×Mineral stock 10 μ L, 腺嘌呤(Adenine) 22.5 mg, 组氨酸(Histidine) 22.5 mg, 尿嘧啶(Uracil) 22.5 mg, 葡萄糖 2 g (葡萄糖需单独灭菌), 固体需添加 2 g 琼脂粉.

LB 培养基(100 mL): Yeast Extract 0.5 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 1 g, 固体需添加 1.5 g 琼脂粉.

1.1.3 试剂与仪器

试剂: PCR 相关试剂、限制性内切酶采购于 Takara 公司, T4 连接酶采购于 ATG, DNA 纯化试剂盒采购于擎科生物有限公司, Mito tracker 染料采购于南京丁贝生物科技有限公司, qRT-PCR 相关试剂采购于南京诺唯赞生物科技有限公司.

仪器: 垂直电泳仪, 转膜仪, 恒温水浴锅, RCR 仪, 高速离心机, 恒温培养箱, 恒温摇床, 蔡司荧光显微镜, qRT-PCR 仪, 凝胶成像仪, Odyssey 激光扫描仪等.

1.2 实验方法

1.2.1 菌株构建

从 Pombase 数据库中获得 *mmp1* 开放阅读框上游、下游约 500 bp 的同源臂基因序列, 从 pK18-HA-natMX6 质粒图谱中获得抗诺尔斯菌素基因序列, 利用 Snap Gene 软件设计融合 PCR 的引物序列. 利用融合 PCR, 获得用 natMX6 敲除 *mmp1* 的同源重组片段, 再利用醋酸锂实验, 将同源重组片段导入 yHL6381 野生型细胞中, 利用抗性筛选, 经验证, 获得 *mmp1* 敲除菌. 查阅 pYJ19 质粒图谱与 *mmp1* 基因序列, 选择 *Pst* I 与 *Sal* I 两个酶切位点, 设计上下游分别带有 *Pst* I 与 *Sal* I 两个酶切位点及保护碱基的引物, 以野生型基因组为模版, 扩增出带有酶切位点的 *mmp1* 片段, 将扩增出的 *mmp1* 片段与 pYJ19 质粒进行双酶切, 割胶纯化之后, 使用 T4 连接酶, 进行酶连, 再进行转化, 将酶连质粒导入到感受态中, 利用抗性筛选、PCR 验证、双酶切验证, 将 *mmp1* 基因片段导入到 pYJ19 质粒中, 再利用 *Nru* I 进行酶切, 使环状质粒变为线性片段, 利用醋酸锂实验, 经营养筛选、Western-blot 验证、荧光检测, 获得 Mmp1-GFP 标签菌株.

1.2.2 表型研究

在固体 YES 培养基上, 活化 yHL6381 与 $\Delta mmp1$ 菌株, 30 °C 培养 2-3 天. 挑取适量菌落, 于 5 mL YES 液体培养基中, 200 rpm 震荡培养 12 h. 转接菌, 使 $OD_{600} = 0.2$, 200 rpm 震荡培养. 每 12 h 取菌一次, 使 $OD = 3$, 将取好的菌按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 逐级稀释, 点圈于 YES 与 YES+3% 甘油固体培养基上, 30 °C 培养 3 天, 观察菌落生长情况.

1.2.3 Mmp1 的荧光定位分析

将构建好的 Mmp1-GFP 标签菌株, 活化于固体 EMM-Leuine⁻上, 30 °C 培养 2-3 天, 后挑取适量菌体于

液体 EMM-Leuine⁻, 200 rpm 震荡培养 12 h, 转接于 10 mL 液体 EMM-Leuine⁻, 使起始 OD₆₀₀ = 0.2, 30 ℃, 200 rpm, 震荡培养 8 h. 取适量菌体, 用 PBS 重悬, 4 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 取 100 μL PBS 重悬菌体, 加入 1 μL Mito tracker 染料, 混匀, 染色 20 s, 快速离心, 弃上清, 加入 20 μL PBS 重悬, 取 1.5 μL 样品制片, 利用荧光显微镜观察定位情况.

1.2.4 利用 Western-blot 研究 Mmp1 对线粒体呼吸链蛋白的影响

分别提取 yHL6381 与 $\Delta mmp1$ 菌株的线粒体, 将提取好的线粒体加入 protein loading, 分成两份. 一份用 100 ℃ 水浴处理 10 min, 用于检测 Hsp60 与 Cox2 蛋白表达水平. 另一份 45 ℃ 水浴处理 5 min, 用于检测高温处理易分解的 Cox1、Cox3、Cox4、Cob1、Atp6 的蛋白表达水平. 用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白的分离, 后经过转膜、封闭后, 再先后进行一抗与二抗的孵育, 用 TBST 洗膜后即可用 Odyssey 激光扫描仪检测结果.

1.2.5 通过 qRT-PCR 研究 Mmp1 对线粒体呼吸链蛋白的 mRNA 的影响

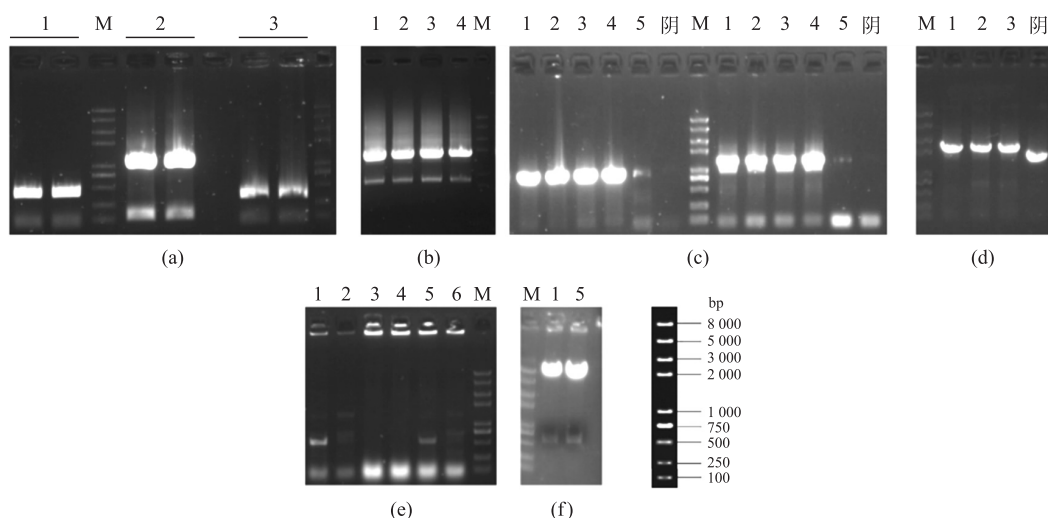
将活化的 yHL6381 与 $\Delta mmp1$ 菌株接入液体培养基中, 30 ℃, 200 rpm, 培养 10–12 h, 转接菌, 使起始 OD₆₀₀ = 0.2, 30 ℃, 200 rpm, 震荡培养 6 h, 利用 Yeast RNA kit 试剂盒抽提 RNA, 利用核酸凝胶电泳检测抽提的 RNA 质量, 反转录, 获得 cDNA, 以此为模版, 进行定量分析.

2 结果与讨论

2.1 菌株与质粒的构建

为探究 Mmp1 对细胞的影响我们利用融合 PCR 与醋酸锂转化实验构建了 *mmp1* 敲除菌. 首先, 以基因组和 pK18-HA-natMX6 为模版, 分别扩增出上、下同源臂和抗性片段. 然后, 以这 3 段为模版, 进行融合 PCR, 获得完整的同源重组片段(如图 1 所示). 利用醋酸锂转化实验, 将同源重组片段导入到 yHL6381 菌株中, 挑选转化子, 并提取转化子的基因组, 进行 PCR 验证, 结果如图 1(c)、图 1(d) 所示, 所扩增的片段大小与设计大小一致, 基因敲除成功.

为探究 Mmp1 在细胞中的定位, 将 *mmp1* 基因序列构建到整合型质粒 pYJ19 中, 该质粒含有 *nmf41* 启动子, 并带有 GFP 标签, 在 Mmp1 加上 GFP 标签的同时, 利用 EMM 培养基培养还可以使 Mmp1-GFP 的表达量提高, 有助于荧光显微镜的观察. 质粒构建的 PCR 验证图如图 1(e) 所示, 质粒酶切验证图如图 1(f) 所示, 质粒构建成功.



M 为 DNA Marker. (a) 中, 1 号为敲除 *mmp1* 的上游同源臂的 PCR 扩增(435 bp), 2 号为 *natMX6* 的 PCR 扩增(1 123 bp), 3 号为下游同源臂的 PCR 扩增(353 bp). (b) 中, 1–4 号为敲除 *mmp1* 的同源重组片段的融合 PCR 扩增产物(1 911 bp). (c) 中, 1–4 号为 4 个不同转化子的上游(952 bp)、下游 PCR 验证(1 398 bp), 阴为 yHL6381 基因组为模版的阴性对照(0 bp). (d) 中, 4 个转化子的全长验证(2 327 bp), 阴为 yHL6381 基因组为模版的阴性对照(1 678 bp). (e) 中, 1–6 号为 6 个不同的 pYJ19-*mmp1*-GFP 重组质粒的 PCR 验证(474 bp). (f) 中, 1 号、5 号为图(e) 中 1 号、5 号质粒的双酶切验证(474 bp).

图 1 菌株与质粒的构建

Fig. 1 Construction of strain and plasmid

2.2 $\Delta mmp1$ 突变菌的表型分析

为探究 $mmp1$ 对细胞生长的影响,将 $\Delta mmp1$ 菌株与 yHL6381 野生型菌株分别在 YES 固体培养基与 YES+3%甘油固体培养基上进行点圈实验,置于 30 ℃ 培养 3-4 天,观察二者在不同培养基上的生长情况. 实验结果表明, $\Delta mmp1$ 菌株在以葡萄糖为碳源的发酵型培养基中,生长状况与野生型基本一致,但在非发酵型 YES+3%甘油固体培养基中, $\Delta mmp1$ 突变体与野生型比较,生长明显被抑制,如图 2 所示. $\Delta mmp1$ 细胞无法在非发酵型培养基中生长,说明 $mmp1$ 的缺失使细胞的线粒体功能受损,无法正常进行有氧呼吸.

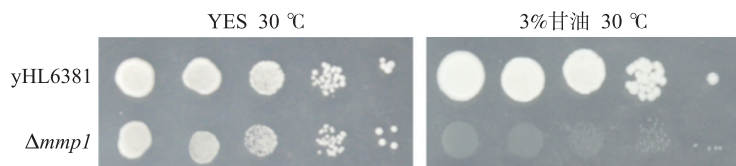


图 2 $\Delta mmp1$ 菌株的表型

Fig. 2 Phenotypic results of $\Delta mmp1$ strain

2.3 荧光定位分析显示 Mmp1 定位于线粒体

点圈实验表明, $\Delta mmp1$ 菌株线粒体功能受到破坏,Mmp1 可能与线粒体功能的发挥相关,因此首先要确认 Mmp1 是否定位于线粒体. 通过给 Mmp1 加 GFP 标签,同时利用 Mito Tracker 染料对线粒体进行染色,显示线粒体位置,将二者结果进行 merge,发现信号几乎完全重叠,证明 Mmp1 定位于线粒体.

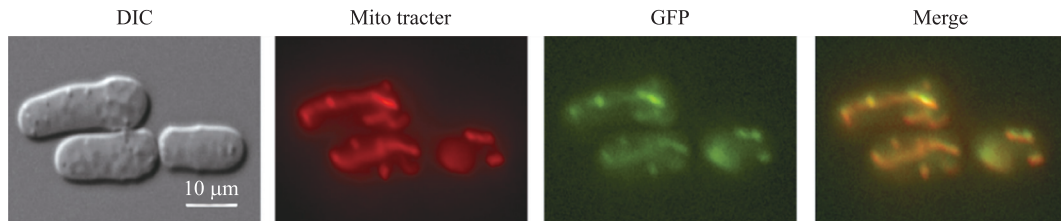


图 3 Mmp1-GFP 的荧光定位结果

Fig. 3 Fluorescence localization results of Mmp1-GFP

2.4 $mmp1$ 缺失使线粒体基因组编码蛋白水平降低

真核生物的有氧呼吸主要依赖于线粒体呼吸链复合体传递电子,偶联氧化磷酸化. 电子传递链的 4 个复合体由核基因编码的蛋白与 mtDNA 编码的蛋白组合而成,其中 mtDNA 编码的 8 个蛋白(Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6、Atp8、Atp9、Var1)对呼吸链的功能发挥起着重要作用. 因为 $\Delta mmp1$ 菌株无法在非发酵型培养基中生长,我们推测 Mmp1 缺失使这些蛋白的合成受影响,我们提取了 $\Delta mmp1$ 菌株和 yHL6381 菌株的线粒体,利用 Western-blot 发现 $\Delta mmp1$ 菌株中 mtDNA 编码的 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的蛋白水平相比于野生型 yHL6381,明显减少,其中 Cob1、Cox3 的下降最为明显,几乎检测不到. Cox1、Atp6 的蛋白水平明显下降. Cox2 的蛋白水平也出现下降,但没有其他蛋白下降明显. 说明 Mmp1 的缺失使部分线粒体呼吸链蛋白无法正常合成,从而使呼吸链无法组装,氧化磷酸化无法进行,细胞无法在非发酵型培养基上生长.

2.5 $mmp1$ 缺失不影响线粒体基因组编码蛋白的 mRNA 水平

$mmp1$ 缺失使部分线粒体基因组编码蛋白水平明显减少,为探究 Mmp1 对这些呼吸链蛋白转录水平的影响,我们提取了 $\Delta mmp1$ 菌株与 yHL6381 菌株的总 RNA,

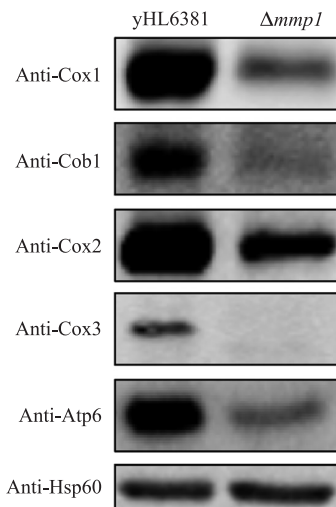


图 4 Western-blot 检测 $\Delta mmp1$ 菌株中线粒体呼吸链蛋白的表达量

Fig. 4 Western-blot for mitochondria respiratory chain protein expression in $\Delta mmp1$ strain

并检测了 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的 mRNA 水平。结果显示,相比于野生型菌株, $\Delta mmp1$ 菌株中 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的 mRNA 水平无明显变化(如图 5 所示),说明 *mmp1* 对线粒体编码的部分呼吸链蛋白(Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6)的转录无影响,而仅仅影响了这些蛋白转录后的过程。

3 结论

粟酒裂殖酵母是生物研究常用的模式生物,它生长周期短、易于培养、操作安全、基因数据库完整,而且许多基因与人中的同源物有保守性,因此在粟酒裂殖酵母中研究基因功能,对研究人类基因功能提供理论依据^[20]。本文通过敲除在野生型粟酒裂殖酵母中的 *mmp1*,探究 Mmp1 蛋白对线粒体功能的影响。

线粒体内膜上的呼吸链复合体承担着传递电子的功能,线粒体产生 ATP 依赖于呼吸链的完整性。有许多蛋白参与了呼吸链蛋白复合体亚基的合成,例如 Ppr10 通过与 Mpa1 形成复合体,共同介导线粒体翻译的起始^[15,21]。线粒体合成蛋白的过程是复杂的,包括转录、翻译及翻译后修饰。为探究哪些蛋白影响了线粒体蛋白的合成,进行了大量的基因敲除与甘油板点圈实验,发现 *mmp1* 的缺失会影响细胞的有氧呼吸,使细胞无法在以甘油为碳源的培养基上正常生长,这暗示了缺失 *mmp1* 使细胞的线粒体功能受损。利用基因克隆和荧光显微技术对 Mmp1 进行了定位观察,确定了 Mmp1 定位在线粒体上。通过提取 $\Delta mmp1$ 细胞的线粒体蛋白,并进行 Western-blot,发现在 $\Delta mmp1$ 细胞中,组成线粒体呼吸链复合体的 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的蛋白水平都明显下降。为探究是否是由于 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 转录水平的下降,而导致蛋白水平的下降,提取 $\Delta mmp1$ 细胞的 RNA,并进行 qRT-PCR 实验,结果显示,在 $\Delta mmp1$ 细胞中,Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的转录水平无明显变化。综上所述,Mmp1 蛋白是由核基因编码,并在线粒体中发挥功能的蛋白,缺失 *mmp1* 对 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的转录水平无影响,但却严重影响了 Cox1、Cox2、Cox3、Cob1、Atp6 的蛋白水平,使细胞线粒体功能受损。Mmp1 影响着线粒体呼吸链复合体亚基的蛋白水平,对维持线粒体功能的发挥起着重要作用,但 Mmp1 具体是通过影响线粒体呼吸链复合体亚基的翻译、翻译后修饰,还是通过影响亚基的稳定性,从而控制呼吸链复合体亚基蛋白水平的,仍有待探究。

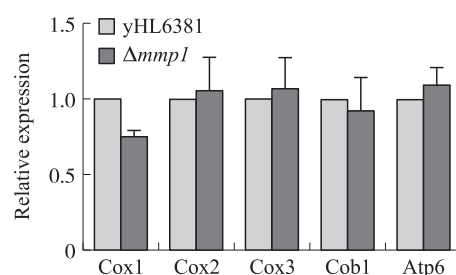


图 5 qRT-PCR 检测 $\Delta mmp1$ 菌株中线粒体呼吸链蛋白的 mRNA 水平

Fig. 5 Detection of mitochondrial respiratory chain mRNA levels in $\Delta mmp1$ strain by qRT-PCR

[参考文献] (References)

- [1] KWON Y Y, CHOI K M, CHO C Y, et al. Mitochondrial efficiency-dependent viability of *Saccharomyces cerevisiae* mutants carrying individual electron transport chain component deletions[J]. *Mol Cells*, 2015, 38(12): 1054–1063.
- [2] NESCI S, PAGLIARANI A, ALGIERI C, et al. Mitochondrial F-type ATP synthase; multiple enzyme functions revealed by the membrane-embedded FO structure[J]. *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 55(4): 309–321.
- [3] COYNE L P, CHEN X J. Consequences of inner mitochondrial membrane protein misfolding[J]. *Mitochondrion*, 2019, 49: 46–55.
- [4] PAGLIARINI D J, RUTTER J. Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry[J]. *Genes & Development*, 2013, 27(24): 2615–2627.
- [5] SPINELLI J B, HAIGIS M C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism[J]. *Nature Cell Biology*, 2018, 20(7): 745–754.
- [6] HUANG M L H, CHIANG S, KALINOWSKI D S, et al. The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases; cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 6392763.
- [7] CHAN D C. Mitochondria; dynamic organelles in disease, aging, and development[J]. *Cell*, 2006, 125(7): 1241–1252.
- [8] JEFFARES D C. The natural diversity and ecology of fission yeast[J]. *Yeast*, 2018, 35(3): 253–260.
- [9] STEFANATOS R, SANZ A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain[J]. *FEBS Letter*, 2018, 592(5): 743–758.

- [10] ANNESLEY S J, FISHER P R. Mitochondria in health and disease[J]. *Cells*, 2019, 8(7): 680.
- [11] SOUSA J S, D'IMPRIMA E, VONCK J. Mitochondrial respiratory chain complexes[J]. *Subcellular Biochemistry*, 2018, 87: 167–227.
- [12] NOLFI-DONEGAN D, BRAGANZA A, SHIVA S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, Oxidant production, and methods of measurement[J]. *Redox Biology*, 2020, 37: 101674.
- [13] YAN C J, DUANMU X Y, ZENG L, et al. Mitochondrial DNA: distribution, mutations, and elimination[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 379.
- [14] HERBERT C J, LABARRE-MARIOTTE S, CORNU D, et al. Translational activators and mitoribosomal isoforms cooperate to mediate mRNA-specific translation in *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(19): 11145–11166.
- [15] LIU J Y, LI Y, CHEN J, et al. The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* Mtf2 is required for mitochondrial Cox1 gene expression[J]. *Microbiology*, 2018, 164(3): 400–409.
- [16] ANZIANO P Q, PERLMAN P S, LANG B F, et al. The mitochondrial genome of the fission yeast *schizosaccharomyces pombe*: I. isolation and physical mapping of mitochondrial DNA[J]. *Current Genetics*, 1983, 7(4): 273–84.
- [17] BULLERWELL C E, LEIGH J, FORGET L, et al. A comparison of three fission yeast mitochondrial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(2): 759–68.
- [18] SHANG J J, YANG Y M, WU L, et al. The *S. pombe* mitochondrial transcriptome[J]. *RNA*, 2018, 24(9): 1241–1254.
- [19] JAJOO R, JUNG Y, HUH D, et al. Accurate concentration control of mitochondria and nucleoids[J]. *Science*, 2016, 351(6269): 169–172.
- [20] MONTANARI A, BESAGNI C, DE LUCA C, et al. Yeast as a model of human mitochondrial tRNA base substitutions: investigation of the molecular basis of respiratory defects[J]. *RNA*, 2008, 14(2): 275–283.
- [21] LUO Y, WANG Y R, HUANG Y. *Schizosaccharomyces pombe* Ppr10 and Mpa1 together mediate mitochondrial translational initiation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 297(1): 100869.

[责任编辑:陈 庆]