
中国科学技术大学 博士学位论文



拟南芥脂肪酸转运蛋白 CTS 的结构 与功能研究

作者姓名： 查志慧

学科专业： 生物化学与分子生物学

导 师： 陈宇星教授

完成时间： 2025 年 7 月 18 日

University of Science and Technology of China
A dissertation for doctor's degree



**Structural and functional
studies on *Arabidopsis thaliana*
fatty acid transporter CTS**

Author: Zhihui Zha

Speciality: Biochemistry and Molecular Biology

Supervisor: Yuxing Chen professor

Completion date: July, 2025

中国科学技术大学学位论文原创性声明

本人声明所呈交的学位论文,是本人在导师指导下进行研究工作所取得的成果。除已特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含任何他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名: 李立志

签字日期: 2026.5.19

中国科学技术大学学位论文授权使用声明

作为申请学位的条件之一,学位论文著作权拥有者授权中国科学技术大学拥有学位论文的部分使用权,即:学校有权按有关规定向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅,可以将学位论文编入《中国学位论文全文数据库》等有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人提交的电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

控阅的学位论文在解除后也遵守此规定。

☒ 公开 ☐ 控阅 (____ 年)

作者签名: 李立志

导师签名: 陈宁

签字日期: 2026.5.19

签字日期: 2026.5.20

创新性说明

拟南芥 CTS (Comatose) 蛋白是一种定位于过氧化物酶体膜上的 ATP 结合盒式 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白, 负责将一系列不同的底物从细胞质基质转运到过氧化物酶体中进行 β 氧化, 包括脂肪酸、生长素吲哚乙酸 (3-indoleacetic acid, IAA) 前体吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid, IBA)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 前体 12-氧代植物二烯酸 (12-oxophytodienoic acid, OPDA) 及除草剂 2,4-二氯苯氧丁酸 (2,4-dichlorophenoxy butyric acid, 2,4-DB) 等。

本研究首次表达及大量纯化拟南芥 CTS 蛋白, 不同长度的脂肪酰基辅酶 A 可以显著提高 CTS 蛋白的 ATPase 活性。此外, 辅酶 A 修饰的 IBA (IBA-CoA) 以及 2,4-DB (2,4-DB-CoA) 可以显著提高 CTS 的 ATPase 活性, 这表明 CTS 的生理底物是 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA。

基于生化实验, 本研究首次解析了无配体状态、C12:0-CoA 结合、IBA-CoA 结合、2,4-DB-CoA 结合以及 ATP 结合的 CTS 结构。结构分析表明, 三个底物分子均折叠成“U”形结合在相同的两亲性口袋, 通过广泛的极性以及疏水相互作用, 底物结合口袋可以高特异性地识别 CoA 基团, 并且同时容纳一系列酰基链, 包括不同长度及饱和度的脂肪酸以及激素前体。具体而言, CoA 基团的嘌呤环与 Thr350、Asn784 以及 Ser806 形成氢键; 核糖的 3'-磷酸与 Lys345 和 Arg773 形成盐桥, 此外还与 Tyr346、Ser777 形成氢键; 二磷酸基团除了与 Arg1035 形成盐桥, 还与 Ser1039 形成氢键相互作用。此外, 连接 3'-磷酸 ADP 与酰基链的泛酸和半胱胺在 Phe134 与 Trp1007 形成的弓形疏水腔处向后弯曲, 使得酰基链结合在一个由异亮氨酸簇 (I356、I381 以及 I389) 形成的大疏水腔中。这些与底物相互作用的氨基酸残基在油料植物中高度保守, 暗示着 CTS 转运底物的分子机制也是保守的。在此基础上, 本研究推测 OPDA-CoA 分子将以相同的方式结合在底物口袋, 并且利用分子动力学模拟证明 OPDA-CoA 可以稳定结合在该口袋。生化实验以及拟南芥生理实验揭示了底物转运过程中的关键残基, 当 Lys345、Tyr346、Arg382、Arg773、Ser810 及 Arg1035 发生突变时, 拟南芥种子的萌发被抑制, 幼苗无法正常生长, 对 IBA 的响应降低, 以及对 2,4-DB 的抗性增加。

本研究的成果阐释了 CTS 识别及转运广谱性底物的分子机制, 为理解植物脂质代谢与激素稳态调控过程提供了帮助。

摘 要

β 氧化是一种发生在过氧化物酶体与线粒体中的代谢分解过程，通过将脂肪酸进行分解从而为机体提供能量。在植物中， β 氧化只发生在过氧化物酶体，为多个重要的生理过程提供碳骨架以及能量。

拟南芥 CTS (Comatose) 蛋白定位于过氧化物酶体膜上，是一种 ATP 结合盒式 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白，属于 ABCD 亚家族的成员。利用水解 ATP 的能量，CTS 可以将一系列不同的底物分子从细胞质基质转运到过氧化物酶体中进行 β 氧化，包括脂肪酸、生长素吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 前体吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid, IBA)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 前体 12-氧代植物二烯酸 (12-oxophytodienoic acid, OPDA)。此外，CTS 也可以转运选择性除草剂 2,4-二氯苯氧丁酸 (2,4-dichlorophenoxy butyric acid, 2,4-DB) 进入过氧化物酶体进行 β 氧化代谢为活性成分 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 2,4-D)。当 CTS 功能缺陷时，植物将出现种子休眠、发芽受损、侧根减少以及黑暗条件下叶片坏死等多种不同的生长发育缺陷表型。然而，目前 CTS 蛋白的结构并未被解析，其识别底物的分子基础以及转运机制仍未被揭示。

本研究首先将 CTS 蛋白表达于哺乳动物细胞系中，生化实验证明纯化的 CTS 蛋白具有活性。ATPase 活性实验表明，生理底物脂肪酰辅酶 A 可以显著提高 CTS 的 ATPase 活性；IBA 与 2,4-DB 不能显著增强 CTS 的 ATPase 活性，这说明二者不是 CTS 的底物。随后，本研究化学合成了辅酶 A 修饰的 IBA (IBA-CoA) 以及 2,4-DB (2,4-DB-CoA)，二者可以显著增强 CTS 的 ATPase 活性，且该增强效果呈现底物浓度依赖性。为了获得足够量的 CTS 蛋白以进行结构解析，本研究构建了表达量更高的线虫-拟南芥嵌合体 CTS 蛋白 (chimeric CTS, chCTS)，通过优化纯化与制样条件，获得了高均一性、颗粒分布均匀的冷冻电镜样品。利用冷冻电镜单颗粒技术，本研究解析了无配体状态、ATP 结合的 chCTS 结构，分辨率均为 3.2 Å，以及三种底物包括 C12:0-CoA、IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 结合的 chCTS 结构，分辨率分别为 3.4 Å、3.2 Å 以及 3.5 Å。由于在解析的所有结构中中线虫嵌合部分的结构因柔性摆动而缺失，因此本研究解析的 chCTS 结构是拟南芥 CTS 蛋白的核心结构。

CTS 蛋白是一种全转运体 ABC 转运蛋白，由两个跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD) 以及两个核酸结合结构域 (nucleotide-binding domain, NBD) 组成。CTS 是一种 IV 型 ABC 转运蛋白，两个 TMD 发生跨膜螺旋 (transmembrane

helix, TM) 交换。无配体状态 CTS 呈现向内封闭 (inward-occluded) 构象, TM3-5 与 TM9-11 相互靠近, 使得底物的易位腔 (Translocation cavity) 闭合, 两个 NBD 也相互靠近却并未发生二聚化。C12:0-CoA、IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 结合的 CTS 均呈现向内开口 (inward-facing) 构象, 位于 TMDs 之间的底物转运通道打开, 使得底物结合口袋向细胞质基质开放。每个底物分子均结合在相同的两亲性口袋, 其中 CoA 部分主要通过氢键和盐桥被特异性识别, 而酰基链主要通过疏水相互作用以不特异的方式结合。生化实验表明, 与 CoA 相互作用的氨基酸残基突变会显著降低 CTS 的 ATPase 活性。拟南芥生理实验表明, 关键残基 Lys345、Arg382、Arg773 及 Arg1035 发生突变会影响种子的萌发与幼苗的生长发育, 降低植株对 IBA 及 2,4-DB 的敏感性。ATP 结合的 CTS 呈现为向过氧化物酶体侧闭合 (outward-occluded) 的中间构象, ATP 的结合引起 NBDs 二聚化, 接着耦合螺旋将 NBDs 的构象变化传递给 TMDs, 从而引起 TMDs 相互靠近, 最终使得底物的结合口袋被挤压, 底物被释放进入过氧化物酶体, 过氧化物酶体基质侧的底物易位通道阀门部分关闭。

基于不同构象下的 CTS 蛋白结构, 结合 CTS 单点突变体的 ATPase 活性实验及拟南芥生理实验, 本研究阐释了拟南芥 CTS 蛋白识别底物的分子机制并提出了 CTS 独特的底物结合模式。本研究的成果不仅揭示了 CTS 在植物脂质与激素代谢中的重要作用, 还为理解 CTS 转运底物的分子机制提供结构基础, 以及为新型生长调节剂的开发提供了理论依据。

关键词: 脂肪酸; β 氧化; IBA; 2,4-DB; OPDA; 拟南芥 CTS; chCTS; 冷冻电镜

ABSTRACT

The β -oxidation is a catabolic process taking place in mitochondria and peroxisome by which fatty acids are broken down to generate energy. In plants, the β -oxidation is executed in the peroxisomes, which provides the carbon skeletons and energy for multiple important physiological processes.

Arabidopsis thaliana CTS (Comatose) is located on the peroxisomal membrane, which belongs to the D subfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporter. Utilizing the energy from ATP hydrolysis, CTS transport a series of various substrates from the cytoplasm matrix into peroxisome for β -oxidation, including fatty acids, indole-3-butyric acid (IBA) and 12-oxo-phytodienoic (OPDA), the precursor of indole-3-acetic acid (IAA) and jasmonic acid (JA), respectively. Moreover, CTS could also transport the selective herbicide 2,4-dichlorophenoxy butyric acid (2,4-DB) into peroxisomes for β -oxidation to be metabolized into the active component 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). When CTS function is deficient, plants will exhibit various defects in growth and development, such as seed dormancy, damaged germination, reduced lateral roots, and leaf necrosis under dark conditions. However, the structure of the CTS has not yet been resolved, and the molecular basis for substrate recognition and transport mechanism remains to be elucidated.

In this study, we first expressed the full-length CTS in mammalian cell lines and demonstrated that our purified CTS protein has activity through biochemical experiments. The ATPase activity experiments showed that the physiological substrate fatty acyl-CoAs can stimulate the ATPase activity of CTS but IBA and 2,4-DB not, indicating that IBA and 2,4-DB are not substrates of CTS. Next, we prepared CoA modified IBA (IBA-CoA) and 2,4-DB (2,4-DB-CoA) through chemical synthesis, which could significantly enhance the ATPase activity of CTS in a concentration dependent manner. To obtain a sufficient amount of CTS protein for structural determination, we constructed a chimeric protein named chCTS with higher expression level. By optimizing the conditions of purification and sample preparation, we obtained a cryo-electron microscopy (cryo-EM) sample with high homogeneity and uniform distribution. Utilizing single-particle cryo-EM, we determined the apo-form and ATP-bound chCTS structures both at 3.2 Å, and three substrate-bound structures including C12-CoA-bound at 3.4 Å, IBA-CoA-bound at 3.2 Å, and 2,4-DB-CoA-bound at 3.5 Å,

respectively. The fused N-terminal segment of PMP-4 is missing in all these structures because of its high flexibility. Therefore, these structures indeed represent the core structure of *A. thaliana* CTS.

CTS is a full-length ABC transporter and consists of two transmembrane domains (TMDs) and two nucleic acid binding domains (NBD). CTS is a typical type-IV ABC transporters with the swapped transmembrane helix (TM) between two TMDs. The apo-form CTS adopts an inward-occluded conformation and TM3-5 from TMD1 approaches TM 9-11 from TMD2, resulting in the closure of the translocation cavity while NBDs are not dimerized yet. The CTS bound to C12:0-CoA, IBA-CoA, and 2,4-DB-CoA all adopt an inward-facing conformation with the opening translocation channel for substrate between TMDs, allowing the substrate-binding pocket to access to the cytoplasmic matrix. Each substrate binds to the same amphiphilic pocket, where the CoA is specifically recognized mainly via hydrogen bonds and salt bridges, while the acyl chain is embraced mainly by hydrophobic interactions in a less specific manner. Biochemical experiments have shown that the mutations of the amino acid residue that interact with CoA significantly reduce the ATPase activity of CTS. The physiological experiments in *Arabidopsis* have shown that mutations of the key residues Lys345, Arg382, Arg 773 and Arg1035 could affect seed germination, seedling development, reduce the sensitivity to IBA and 2,4-DB in *Arabidopsis*. The ATP-bound CTS adopts an outward-occluded transient intermediate conformation. ATP binding induced the dimerization of NBDs, and the coupling helix transmitted the conformational changes from NBDs to TMDs, causing them to approach each other. The substrate-binding pocket was extruded to release the substrate into the peroxisome and translocation cavity gate towards the peroxisomal matrix was partly closed.

Based on CTS structures in three different conformations, ATPase activity and physiological experiments of mutants, our study explains the molecular mechanism of substrate recognition by *A. thaliana* CTS and proposes a unique substrate binding mode of CTS. Our results of this study not only reveal the important role of CTS in plant lipid and hormone metabolism, but also provide a structural basis for understanding the molecular mechanism of CTS substrate transport and a theoretical basis for the development of new growth regulators.

KEY WORDS: Fatty acids, β -oxidation, IBA, 2,4-DB, OPDA, *Arabidopsis thaliana* CTS, chCTS, Cryo-EM

目录

创新性说明.....	I
摘 要.....	II
ABSTRACT.....	IV
目录.....	VI
主要符号说明.....	IX
第 1 章 研究背景.....	1
1.1 ABC 转运蛋白	1
1.1.1 ABC 转运蛋白概述	1
1.1.2 ABC 转运蛋白亚家族分类	5
1.1.3 ABCD 亚家族概述	6
1.2 CTS 的鉴定与亚细胞定位	9
1.3 CTS 参与脂肪酸代谢	11
1.3.1 脂肪酸的分类.....	11
1.3.2 脂肪酸的合成.....	12
1.3.3 三酰甘油的生物合成.....	14
1.3.4 脂肪酸 β 氧化.....	16
1.3.5 CTS 转运脂肪酸进入过氧化物酶体进行 β 氧化	19
1.4 CTS 参与生长素 IAA 合成	24
1.4.1 生长素 IAA 的生物合成	25
1.4.2 IAA 信号通路	26
1.4.3 IBA 通过 β 氧化转化为 IAA.....	28
1.4.4 除草剂 2,4-DB 的作用机制.....	29
1.4.5 CTS 转运 IBA 进入过氧化物酶体生成 IAA	30
1.5 CTS 参与茉莉酸的生物合成	32
1.5.1 茉莉酸的生物合成.....	33
1.5.2 茉莉酸代谢.....	34
1.5.3 茉莉酸信号通路.....	35
1.5.4 CTS 转运 OPDA 进入过氧化物酶体生成 JA.....	36
1.6 研究目的与意义.....	38

第 2 章 实验材料、仪器设备与方法.....	40
2.1 实验材料.....	40
2.1.1 质粒、菌株和细胞系.....	40
2.1.2 实验仪器设备.....	40
2.1.3 实验试剂与耗材.....	41
2.2 实验方法.....	42
2.2.1 重组质粒构建.....	42
2.2.2 重组质粒的大量提取、转染以及表达.....	47
2.2.3 重组蛋白的纯化.....	49
2.2.4 常温负染样品的制备.....	53
2.2.5 冷冻电镜样品制备.....	54
2.2.6 冷冻电镜样品观察.....	55
2.2.7 冷冻电镜数据收集与处理.....	56
2.2.8 蛋白质结构模型搭建.....	58
2.2.9 ATPase 活性实验	59
2.2.10 拟南芥生理实验.....	60
2.2.11 分子动力学模拟实验.....	62
第 3 章 实验结果.....	63
3.1 拟南芥 CTS 蛋白的表达与纯化	63
3.1.1 表达载体的筛选.....	63
3.1.2 表达条件以及纯化去垢剂筛选.....	64
3.1.3 表达体系的筛选.....	66
3.2 拟南芥-线虫 CTS 嵌合体蛋白的表达与纯化	67
3.3 拟南芥 CTS 的 ATPase 活性检测	68
3.4 拟南芥-线虫 CTS 嵌合体的 ATPase 活性检测.....	71
3.5 拟南芥 CTS 底物浓度依赖的 ATPase 活性	72
3.6 CTS 蛋白的冷冻电镜结构解析与整体结构分析	76
3.6.1 CTS 蛋白的冷冻电镜结构解析	76
3.6.2 CTS 蛋白的结构模型搭建	78
3.6.3 CTS 蛋白的整体结构分析	80
3.7 CTS 与底物复合物的冷冻电镜结构解析与整体结构分析	82
3.7.1 CTS 与 C12:0-CoA 复合物冷冻电镜结构解析与结构模型搭建.....	82
3.7.2 CTS 与 C12:0-CoA 复合物的整体结构分析.....	86
3.7.3 CTS 与 IBA-CoA 复合物的冷冻电镜结构解析与结构模型搭建	90

3.7.4 CTS 与 2,4-DB-CoA 复合物的冷冻电镜结构解析与结构模型搭建 ..	93
3.7.5 CTS 与 IBA-CoA 复合物、2,4-DB-CoA 复合物的整体结构分析	96
3.7.6 CTS 与不同酰基辅酶 A 结合复合物的整体比对	99
3.8 CTS 与核苷酸复合物的冷冻电镜结构解析与整体结构分析	100
3.8.1 CTS 与核苷酸复合物的冷冻电镜结构解析与结构模型搭建	100
3.8.2 CTS 与核苷酸复合物的整体结构分析	104
3.9 分子动力学模拟预测 OPDA-CoA 结合模式	106
3.10 拟南芥生理实验揭示底物转运的关键残基	108
3.11 拟南芥 CTS 与人类 ABCD1/3 不同的底物结合模式	112
第 4 章 讨论与展望	115
4.1 拟南芥 CTS 蛋白的研究总结与讨论	115
4.2 CTS 转运酰基辅酶 A 的分子机制	118
4.3 未来展望	119
参考文献	123
附录 A 拟南芥 CTS 蛋白的氨基酸序列	143
附录 B 秀丽隐杆线虫 PMP-2/4 蛋白的氨基酸序列	144
附录 C 拟南芥各突变体 CTS 蛋白的荧光定位结果	145
致谢	146
在读期间取得的科研成果	148

主要符号说明

13-LOX	13-Lipoxygenase	13-脂氧合酶
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-二氯苯氧乙酸
2,4-DB	2,4-Dichlorophenoxy butyric acid	2,4-二氯苯氧丁酸
3-HPOT	(13S)-Hydroperoxyoctadecatrienoic acid	13-羟基十八碳三烯酸
4-Cl-IAA	4-Chloroindole-3-acetic acid	4-氯吲哚-3-乙酸
4ME C16	Phytanic acid	植烷酸
ABA	Abscisic acid	脱落酸
ABC	ATP-binding cassette	ATP 结合盒式
ACC	Acetyl-CoA carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
ACC	1-Aminoacyclop propane-1-carboxylate	1-氨基环丙烷-1-羧酸
ACN2	Acetate non-utilization 2	不利用乙酸蛋白 2
ACO	Aconitase	顺乌头酸酶
ACS	Acyl-CoA synthetase	酰基辅酶 A 合成酶
ACX	Acyl-CoA oxidase	酰基辅酶 A 氧化酶
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
AOC	Allene oxide cyclase	环氧丙烷环化酶
AOS	Allene oxide synthase	氧化丙烯合成酶
ARF	Auxin response factor	生长素响应因子
ASK	Suppressor of kinetochore protein	拟南芥 SKP 亚基
AT	ACP transacylase	ACP 转酰基酶
ATGL	Adipose triglyceride lipase	脂肪组织甘油三酯脂肪酶
BC	Biotin carboxylase	生物素羧化酶
BCCP	Biotin carboxyl carrier protein	生物素羧基载体蛋白
BR	Brassinosteroid	油菜素内酯

CGI-58	Comparative Gene Identificaiton-58	比较基因鉴定蛋白-58
CH	Coupling helix	耦合螺旋
chCTS	Chimeric CTS	嵌合体 CTS
CMC	Critical micelle concentration	临界胶束浓度
COI1	Coronatine insensitive 1	冠菌素不敏感蛋白 1
CTF	Contrast transfer function	衬度传递函数
CTK	Cytokinin	细胞分裂素
CTS	Comatose	脂肪酸转运蛋白
CUL1	Cullin 1	支架蛋白 1
DDM	N-dodecyl β -D-maltoside	N-十二烷基 β -D-麦芽糖苷
DGAT	Diacylglycerol: acyl-coa acyltransferase	酰基辅酶 A 酰基转移酶
DHCA	Di-hydroxycholesterol	二羟基胆固醇
ECF	Energy-coupling factor	能量耦合因子
ECH2	Enoyl-coa hydratase 2	烯酰基辅酶 A 水解酶 2
ER	Enoyl-ACP reductase	烯基-ACP 还原酶
ET	Ethylene	乙烯
FA	Fatty acid	脂肪酸
FAc	Fluoroacetic acid	氟乙酸
FAD	FA desaturase	脂肪酸去饱和酶
FAD	Flavin adenine dinucleotide	黄素腺嘌呤二核苷酸
FAE	FA elongase	脂肪酸延伸酶
FAS	FA synthase	脂肪酸合成酶
FAT	FA thioesterases	脂肪酸硫酯酶
FBP	F-box protein	F-box 蛋白
FF8	Fluorinated fos-choline-8	氟化 fos-胆碱-8

主要符号说明

FOM	Fluorinated octyl-maltoside	氟化辛基麦芽糖苷
G3P	Glycerol-3-phosphate	甘油-3-磷酸
GA	Gibberellin	赤霉素
GDN	Glyco-diosgenin	糖薯蓣皂苷元
HD	β -Hydroxyacyl-ACP dehydrase	β -羟基酰基-ACP 脱氢酶
HDA	Histone deacetylase 6	组蛋白去乙酰化酶 6
HEK293F	Human embryonic kidney 293f	人胚胎肾细胞
HUGO	Human genome organization	人类基因组组织
IAA	Indole-3-acetic acid	吲哚乙酸
IAH	IAA amidohydrolase	酰胺水解酶
IAM	Indoleacetamide	吲哚乙酰胺
IAOx	Indole-3-acetaldoxime	吲哚-3-乙醛肟
IBA	Indole-3-butyric acid	吲哚丁酸
IBR1	Indole-3-butyric acid response 1	短链脱氢酶/还原酶
ICL	Isocitrate lyase	异柠檬酸裂解酶
IF	Inward-facing	向内构象
IPyA	Indole-3-pyruvic acid	吲哚-3-丙酮酸
JA	Jasmonic acid	茉莉酸
JAR1	JA-amino acid synthetase	JA-Ile 合成酶
JAs	Jasmonates	茉莉酸盐
JAT1	JA-Ile transporter 1	JA-Ile 转运蛋白 1
JAZ	Jasmonate zinc-finger inflorescence domain	茉莉酸锌指花序结构域
JMT	JA methyltransferase	JA 甲基转移酶
KAS	β -Ketoacyl-ACP-synthases	β -酮酰基-ACP 合酶
KAT	3-Ketoacyl-coa thiolase	3-酮酰基辅酶 A 硫解酶
KR	β -Ketoacyl-ACP reductase	β -酮酰基-ACP 还原酶

主要符号说明

LACS	Long-chain acyl-coenzyme A synthetase	长链酰基合成酶
LB	Luria-bertani	大肠杆菌培养基
LCFA	Long chain fatty acids	长链脂肪酸
LD	Lipid droplet	脂滴
LDAO	Lauryldimethylamine oxide	月桂基二甲胺-N-氧化物
LH	Linker helix	连接螺旋
LMNG	Lauryl maltose neopentyl glycol	月桂基麦芽糖新戊二醇
LRR	Leucine-rich repeat	富含亮氨酸重复序列结构域
MAH1	Midchain alkane hydroxylase	中链烷烃羟化酶
MBP	Maltose-binding protein	麦芽糖结合蛋白
MCFA	Medium chain fatty acids	中长链脂肪酸
MED25	Mediator 25	中介体蛋白 25
MeJA	Methyl jasmonate	茉莉酸甲酯
MFP	Multifunctional protein	多功能蛋白
MS	Malate synthase	苹果酸合酶
MUFA	Monounsaturated fatty acids	单不饱和脂肪酸
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
NBD	Nucleotide-binding domain	核酸结合结构域
NBS	Nucleotide-binding site	核酸结合位点
NINJA	Novel interactor of JAZ	JAZ 新型相互作用因子
NS	Negative staining	负染色
OF	Outward-facing	向外构象

主要符号说明

OG	Octyl glucoside	辛基葡萄糖苷
OPC-8	3-Oxo-2-(cis-2-pentenyl)- cyclopentane-1-octanoic acid	3-氧-2（顺-2-戊烯基）-环戊烷-1-辛酸
OPDA	12-Oxophytodienoic acid	12-氧代植物二烯酸
OPR3	OPDA reductase 3	OPDA 还原酶 3
PAA	Phenylacetic acid	苯基乙酸
PCR	Polymerase chain reation	聚合酶链式反应
PDAT	Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase	二酰甘油酰基转移酶
PED3	Peroxisome defective 3	过氧化物酶体缺陷蛋白 3
PEI	Poly ethylene imine	聚乙烯亚胺
PEP	Phosphoenolpyruvate	磷酸烯醇式丙酮酸
PGIP	Polygalacturonase inhibiting protein	多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白
PhA	Pheophorbide a	脱镁叶绿酸 a
PLA1	Phospholipase A1	磷脂酶 A1
PLD	Peroplasmic domain	周质结构域
PMP	Peroxisome membrane protein	过氧化物酶体膜蛋白
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3- PC	1-棕榈酰基-2-油酰基卵磷脂
PTS	Peroxisomal targeting signal	过氧化物酶体靶向信号
PUFA	Polyunsaturated fatty acids	多不饱和脂肪酸
PXA1	Peroxisomal ABC transporter 1	过氧化物酶体 ABC 转运蛋白 1
RBX1	Ring box 1	CUL1 调节蛋白
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SA	Salicylic acid	水杨酸
SACPD	Stearoyl-ACP desaturases	硬脂酰-ACP 去饱和

		酶
SBP	Substrate-binding protein	底物结合蛋白
SCFA	Short chain fatty acids	短链脂肪酸
sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> cell	昆虫卵巢细胞
SFA	Saturated fatty acids	饱和脂肪酸
SL	Strigolactone	独角金内酯
SRP	Signal recognition particle	信号识别颗粒
ST2A	12-OH-JA sulfotransferase	12-OH-JA 磺基转移酶
TAA	Trp aminotransferase of Arabidopsis	拟南芥色氨酸氨基转移酶
TAG	Triacylglycerols	三酰甘油
TCA	Tricarboxylic acid cycle	三羧酸循环
TF	Transcription factor	转录因子
THCA	Tri-hydroxycholesterol	三羟基胆固醇
TIR1	Transport inhibitor response 1	IAA 受体
TM	Transmembrane helix	跨膜螺旋
TMD	Transmembrane domain	跨膜结构域
TPL	Topless	转录辅抑制因子
Ub	Ubiquitin	泛素
VLCFA	Very long chain fatty acids	超长链脂肪酸
α -LeA	α -Linolenic acid	α -亚麻酸

第 1 章 研究背景

1.1 ABC 转运蛋白

ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporters) 是一类古老的膜蛋白质超家族, 广泛存在于各种生物中。利用 ATP 水解释放的能量, ABC 转运蛋白将不同种类的底物分子进行跨膜运输, 包括脂质、糖类、氨基酸、多肽以及药物分子等^[1]。

1.1.1 ABC 转运蛋白概述

ABC 转运蛋白由四个核心结构域组成, 包括两个嵌入膜双层的跨膜结构域 (transmembrane domains, TMDs) 以及两个位于细胞质的核酸结合结构域 (nucleotide-binding domains, NBDs)^[2] (图 1.1A)。根据底物转运方向的不同, 将 ABC 转运蛋白分为向内转运蛋白 (importer) 以及向外转运蛋白 (exporter)。在细菌等原核生物中, 四个核心结构域通常在不同的肽链中, 需要形成异源多聚体才能发挥功能; 在真核生物中, 两个 TMD 和两个 NBD 融合成一条肽链形成全转运体 (full transporter), 或者一个 TMD 与一个 NBD 融合成一条肽链形成半转运体 (half-transporter), 最终二聚化形成完整的转运蛋白。此外, 一些原核生物向内转运的 ABC 转运蛋白还需要底物结合蛋白 (substrate-binding protein, SBP) 来帮助结合底物, 如营养物质和微量元素^[3,4]。

ABC 转运蛋白的 NBD 在结构与序列上高度保守, 由 RecA 型的 ATP 结合核心、ABC 转运蛋白特有的三股反平行 β 片结构 (ABC β) 以及 α 螺旋结构 (ABC α) 组成^[5-7] (图 1.1B)。RecA 型的 ATP 结合核心由六股 β 片环绕四个 α 螺旋组成, 形成 Walker A 基序、Walker B 基序、D 环 (D-loop)、Q 环 (Q-loop) 以及 H 开关 (H-switch) 等结构元件; ABC α 包含 ABC 转运蛋白的特征基序 (Signature motif); ABC β 包含 A 环 (A-loop)^[8-10] (图 1.1C、D)。A 环与 Walker A 基序中保守序列 GxxGxGK (S/T) 形成的 P 环 (P-loop) 共同介导核酸分子结合, 其中核酸碱基与 A 环中的芳香族残基形成 π - π 堆叠, β 磷酸与 γ 磷酸与 P 环中赖氨酸主链的酰胺 NH 基团以及侧链的 ϵ 氨基结合。P 环中的丝氨酸/苏氨酸、Walker B 基序中的天冬氨酸、Q 环中保守的谷氨酰胺以及负责亲和攻击的水分子共同参与 Mg^{2+} 的配位。当 ATP 水解时, D 环对处于攻击状态的水分子进行定位, Walker B 基序中保守的谷氨酸则负责将攻击的水分子极化^[11]。H 开关中的组氨酸在稳定催化过渡状态中起核心作用。特征基序由保守的 LSGGQ 序列组成, 在 ATP 结合时诱导 NBD 二聚化。当 NBD 二聚化时, 两个核酸结合位点 (nucleotide-binding site,

NBS) 呈中心对称, 每个 NBS 由一个 NBD 的 Walker A 基序、Walker B 基序、A 环、D 环、Q 环、H 开关以及另一个 NBD 的特征基序构成。当 ATP 水解后, 磷酸根被释放, 伴随着 NBD 二聚化解离, 耦合螺旋 (Coupling helix, CH) 将 NBD 的构象改变传递给 TMD^[12,13], 使得 TMD 在向内 (inward-facing, IF) 与向外 (outward-facing, OF) 构象之间进行转换, 将底物分子进行跨膜易位^[1]。

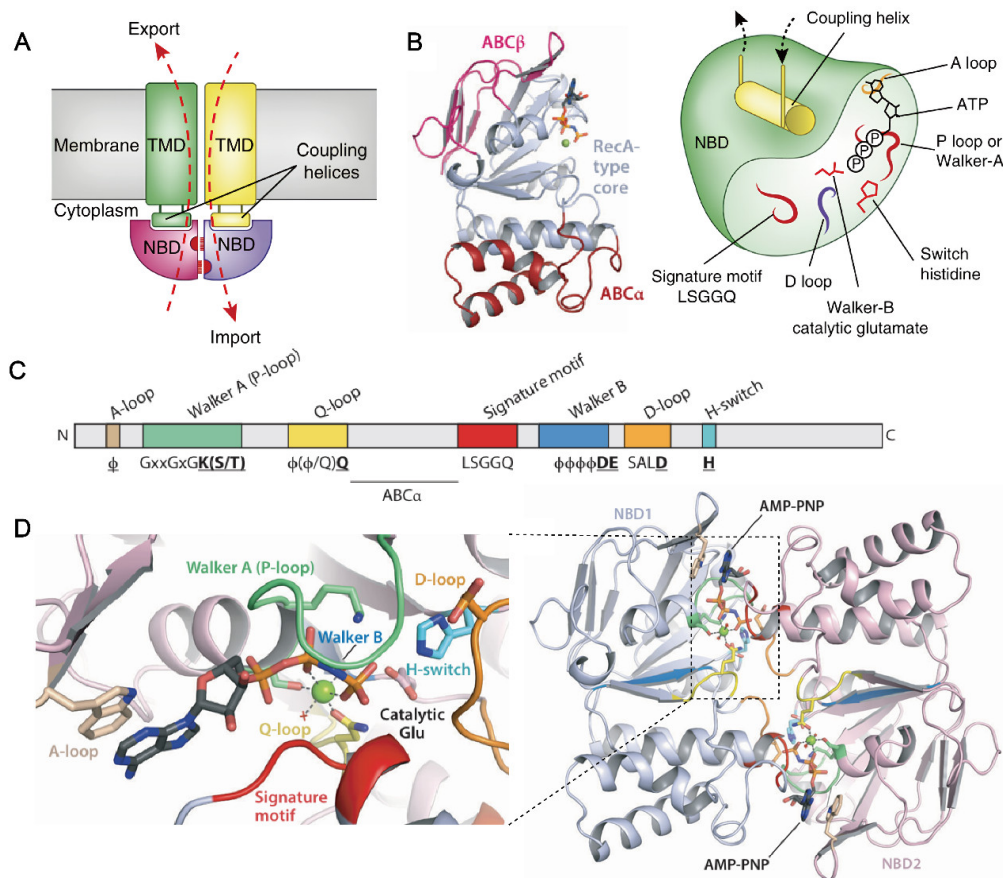


图 1.1 ABC 转运蛋白的结构^[1,2]

图注: A. ABC 转运蛋白结构域的排列。两个 NBD 之间的红色半圆与虚线分别表示 Walker A 基序中的 P 环与特征基序。B. 左图为来自麦芽糖转运蛋白 MalFGK2 (PDB: 3RLF) 的 NBD 结构, ATP 类似物腺苷酰亚胺二磷酸盐 (adenylyl-imidodiphosphate, AMP-PNP) 和 Mg^{2+} 以棒状结构和绿色球体展示; 右图为 NBD 的结构简图。C. NBD 中各结构元件的氨基酸序列排列。ϕ 表示疏水残基, x 表示任意残基。D. MalFGK2 蛋白 NBD 二聚化界面。参与 ATP 结合与水解过程的残基以棒状表示, 虚线表示与 Mg^{2+} 的相互作用。

与 NBD 不同, TMD 的折叠方式具有多样性^[14-20]。根据 TMD 的折叠方式与序列同源性, ABC 转运蛋白可分为七种类型 (I-VII) (图 1.2) ^[1,21]。

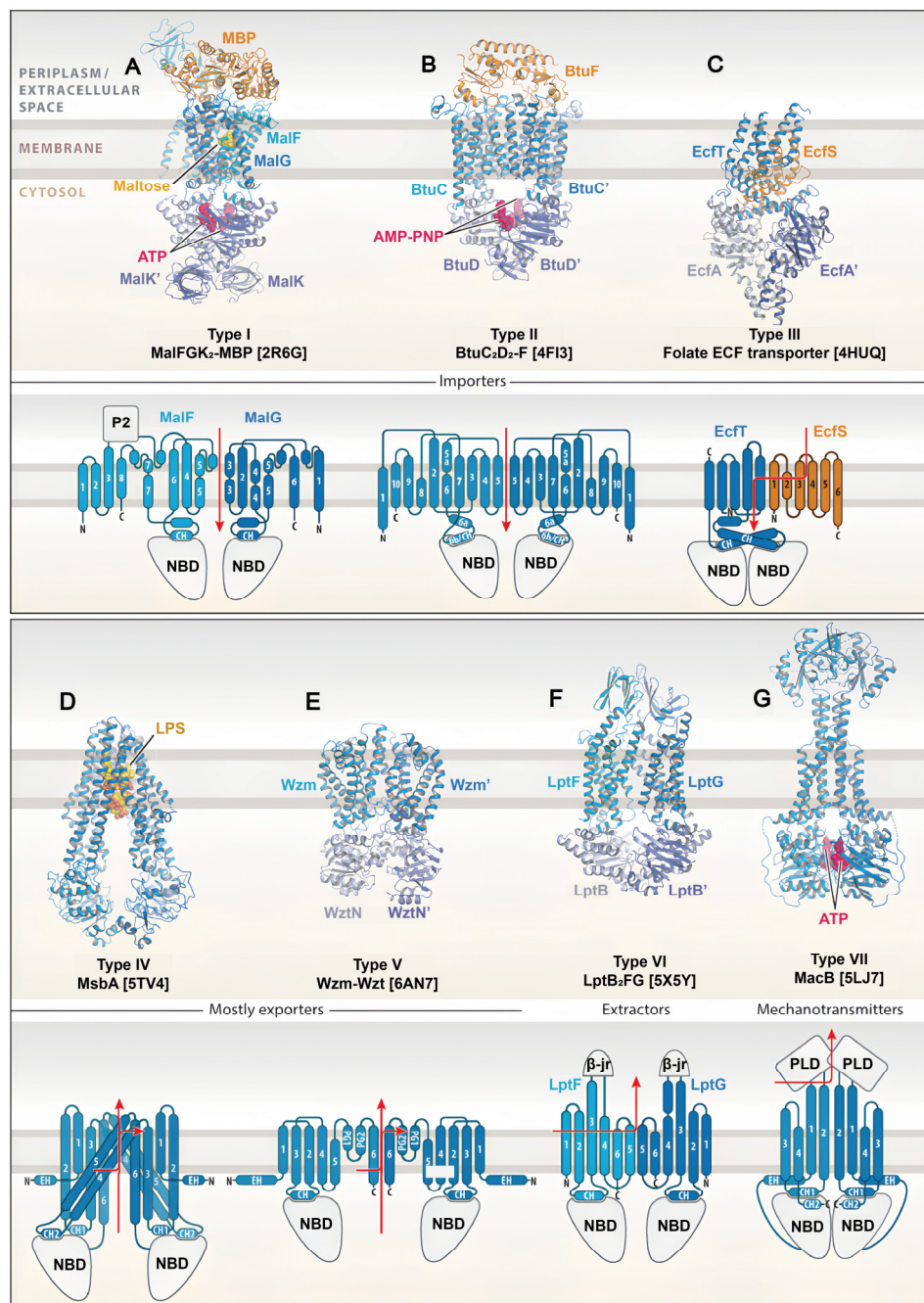
I型和II型 ABC 转运蛋白通常都是向内转运蛋白, 其中I型 ABC 转运蛋白每个 TMD 至少由五个跨膜螺旋 (transmembrane helix, TM) 组成 (图 1.2A), 负

负责摄取糖和氨基酸等代谢物，如大肠杆菌麦芽糖转运蛋白 MalFGK₂；II型 ABC 转运蛋白每个 TMD 由十个跨膜螺旋组成（图 1.2B），负责摄取维生素 B₁₂ 和血红素等微量营养素，如大肠杆菌维生素 B₁₂ 转运蛋白 BtuC₂D₂。两者都通过耦合螺旋来进行 TMD 和 NBD 之间的构象传递。此外，这两种 ABC 转运蛋白都需要 SBP 将底物传递给 TMD，一些 SBP 可以结合多种的底物，一些 ABC 转运蛋白可以识别多种 SBP^[22,23]。

III型 ABC 转运蛋白是一种能量耦合因子（energy-coupling factor, ECF）向内转运蛋白，与II型类似，参与摄取微量营养素的吸收，如金属离子 Ni²⁺、Co²⁺ 以及色氨酸^[24]。与其它 ABC 转运蛋白不同，III型 ABC 转运蛋白的两个 TMD 在结构和功能上有很大差异：保守性差的跨膜亚基 EcfT 由四至八个跨膜螺旋以及两个长交叉的耦合螺旋组成（图 1.2C），后者介导 EcfT 与两个核酸结合蛋白 EcfA 之间的相互作用；结构保守的底物结合蛋白 EcfS 由六个呈圆柱形排列的 α 螺旋组成^[25]。许多 ECF 转运蛋白可以通过 EcfT 中的长交叉耦合螺旋介导与多种 EcfS 结合^[1]。

IV型和V型 ABC 转运蛋白多数是向外转运蛋白。这两种 ABC 转运蛋白的 TMD 在结构上十分保守，每个 TMD 由六个跨膜螺旋组成，在 TMD 的 N 末端都具有一个短的肘螺旋（elbow helix），其功能可能是稳定蛋白的结构（图 1.2D、E）。不同的是，IV型 ABC 转运蛋白的 TMD 有两个跨膜螺旋交换到另一个 TMD。因此，在IV型 ABC 转运蛋白中有两种耦合螺旋，耦合螺旋 CH1 可以与同侧的 NBD 或者两个 NBD 相互作用，耦合螺旋 CH2 只与对面的 NBD 相互作用（图 1.2D）；V型 ABC 转运蛋白只含有一个耦合螺旋，与同侧的 NBD 相互作用（图 1.2E）。此外，IV型 ABC 转运蛋白的跨膜螺旋更长，延伸至细胞质中，使得 NBD 以及耦合螺旋与膜双层的距离更远^[1]。

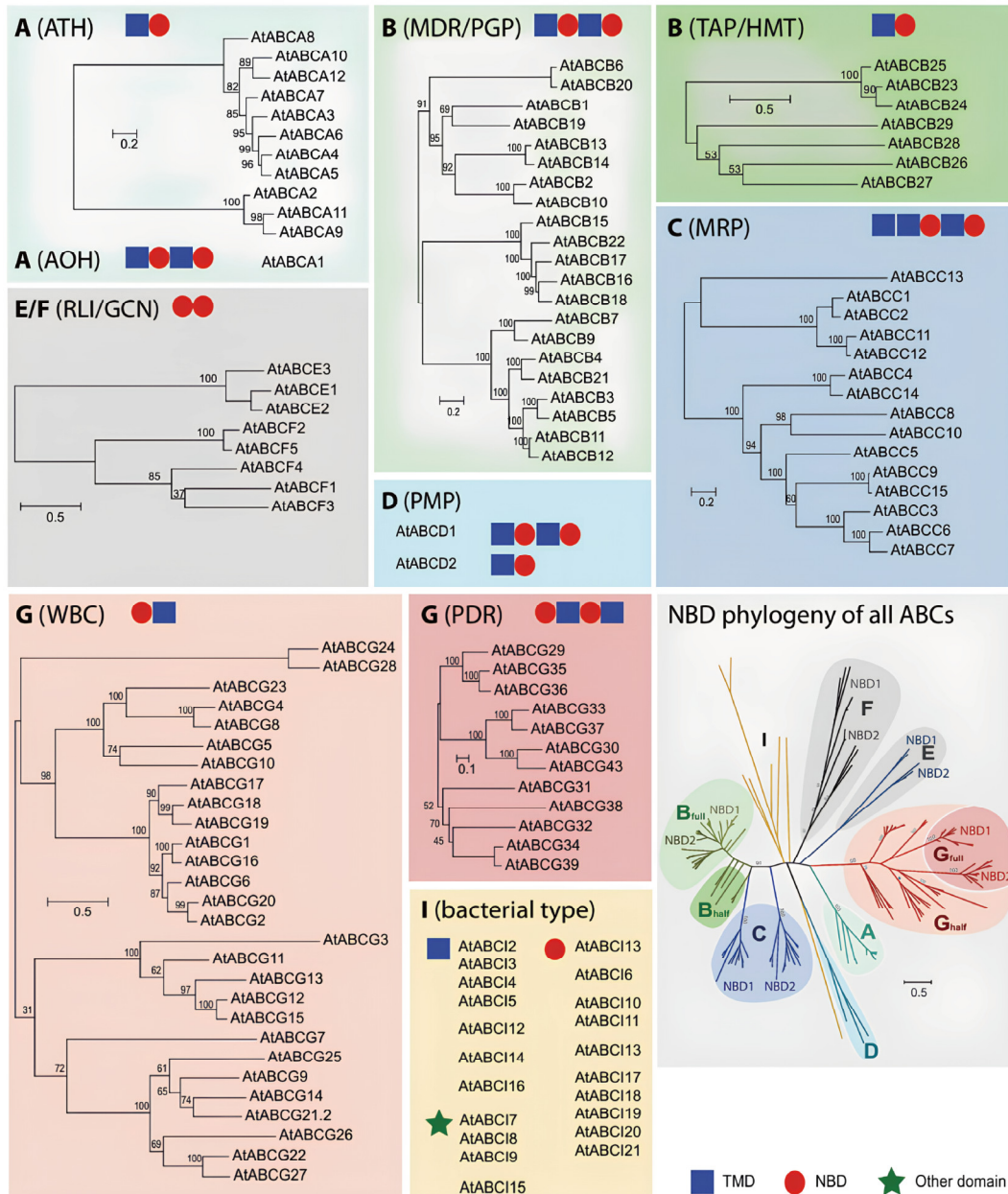
VI型以及VII型 ABC 转运蛋白通常不单独发挥功能，而是参与形成动态的超分子复合物。VI型 ABC 转运蛋白是多层膜组分外排系统的组成部分（图 1.2F），TMD 的折叠方式与V型类似，不同的是其 N 末端无肘螺旋并且在 TM5 与 TM6 之间没有胞外螺旋，但在 TM3 与 TM4 之间具有位于周质的 β -果冻结构域（ β -jellyroll domain）。VII型 ABC 转运蛋白参与形成跨周质空间的机械信号转导复合物，如大肠杆菌中的抗生素外排泵 MacAB^[26]。这类 ABC 转运蛋白的特点是具有大的周质结构域（periplasmic domain, PLD），TMD 由四个跨膜螺旋组成，TMD 与 NBD 之间的构象变化信息由两个耦合螺旋进行传递（图 1.2G）。与IV型 ABC 转运蛋白不同，VII型的两个耦合螺旋均与同一侧的 NBD 相互作用。

图 1.2 ABC 转运蛋白的分类^[1]

图注：红色箭头表示底物的主要转运方向。A. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中麦芽糖向内转运蛋白 MalFGK₂ 与麦芽糖结合蛋白 (maltose-binding protein, MBP) 复合物的晶体结构。B. 大肠杆菌 (*E. coli*) 中维生素 B₁₂ 向内转运蛋白 BtuC₂D₂ 与底物结合蛋白 BtuF 复合物的晶体结构。C. 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 中叶酸能量耦合因子向内转运蛋白的晶体结构。D. 大肠杆菌 (*E. coli*) 中脂多糖转位酶 MsbA 的冷冻电镜结构。E. 嗜嗜热菌 (*Aquifex aeolicus*) O-抗原翻转通道蛋白 Wzm-Wzt 的晶体结构。WztN 为 Wzt 的 N 端，缺少碳水化合物结合结构域。F. 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 脂多糖外排蛋白 LptB₂FG 的晶体结构。G. 伴放线菌聚集菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 外排蛋白 MacB 的晶体结构。

1.1.2 ABC 转运蛋白亚家族分类

为了统一动物与植物的命名系统，按照人类基因组组织（Human Genome Organization, HUGO）提供的亚家族分类，对比 NBD 的氨基酸序列并进行系统发育分析，将真核生物 ABC 蛋白分为八大类（A-H），对于植物而言，进一步将大多数动物基因组中不存在的原核生物来源的 ABC 转运蛋白分为 I 亚家族^[27]（图 1.3）。

图 1.3 拟南芥 ABC 蛋白亚家族分类^[28]

图注：对 NBD 的氨基酸序列进行系统发育分析并绘制进化树，将拟南芥 ABC 转运蛋白分为 8 个亚家族，包括亚家族 A-G 及亚家族 I。

人类 ABC 转运蛋白家族有 49 个成员，属于 A-G 七个亚家族^[29]，其中 A 与 G 亚家族属于 V 型 ABC 转运蛋白，B-D 亚家族属于 IV 型 ABC 转运蛋白。E 与 F 亚家族无 TMD，不参与转运过程而是参与 mRNA 的翻译调控^[30]。陆生植物比高等动物拥有更多的 ABC 转运蛋白，这可能是在进化过程中发生了基因复制与功能多样化事件从而使植物能够适应陆地环境^[31]。在模式生物拟南芥中有 130 种 ABC 转运蛋白，按照结构域排列以及系统发育关系将拟南芥 ABC 转运蛋白分为 A-G 以及 I 八个亚家族^[27]（图 1.3）。A-D 亚家族具有“正向”的结构域排列即 TMD-NBD；G 亚家族的结构域排列相反，为 NBD-TMD；E 与 F 亚家族无 TMD，由两个 NBD 组成；I 家族基因编码单个 TMD 或 NBD 的结构域，最终组装形成多亚基 ABC 转运蛋白，类似于原核生物。这些 ABC 转运蛋白参与植物表面角质层的分泌、防御信号分子的转运、细胞器间次级代谢物的运输、激素分子的运输、外源物质在液泡内的隔离以及种子萌发的控制。

1.1.3 ABCD 亚家族概述

ABCD 亚家族蛋白几乎存在于所有真核生物中。目前，人类 ABCD 亚家族已经鉴定出 4 个成员（图 1.4），分别是 ABCD1（ALDP）^[32]、ABCD2（ALDRP）^[33]、ABCD3（PMP70）^[34]以及 ABCD4（P70R）^[35]。

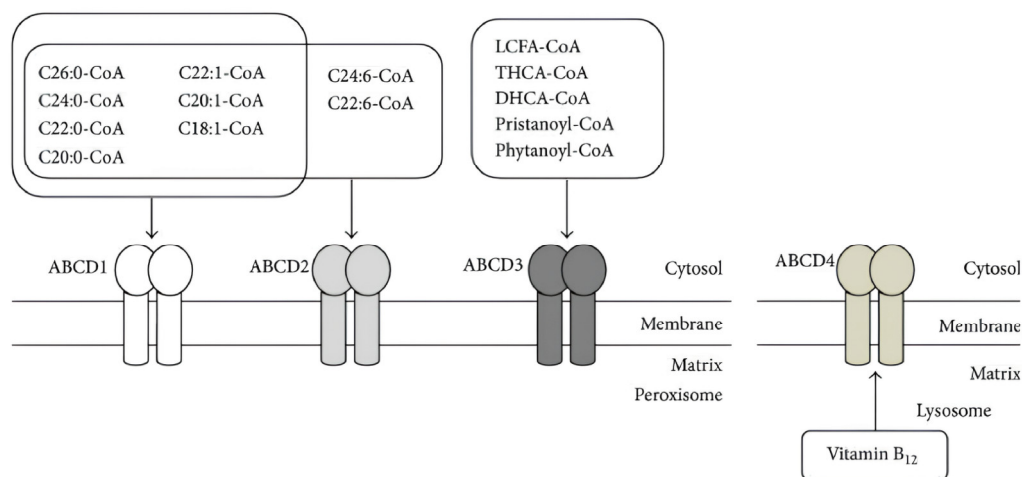


图 1.4 人类 ABCD 亚家族转运蛋白的底物特异性^[36]

图注：LCFA，长链脂肪酸（long-chain fatty acid）；DHCA，二羟基胆固醇（di-hydroxycholesterol）；THCA，三羟基胆固醇（tri-hydroxycholesterol）。

ABCD1-4 均是半转运蛋白，需要形成同源二聚体才能发挥功能，其中 ABCD1、ABCD2 以及 ABCD3 均定位于过氧化物酶体，ABCD4 定位于溶酶体（图 1.4）。由于它们的亚细胞定位不同，功能也不同。ABCD1 和 ABCD2 均参与长链以及超长链脂肪酰基辅酶 A（LCFA-CoA 和 VLCFA-CoA）向过氧化物酶

体转运, ABCD2 还负责转运多不饱和超长链脂肪酰基辅酶 A^[37,38]; ABCD3 负责转运支链脂肪酰基辅酶 A、胆汁酸中间体二羟基胆甾酰辅酶 A (DHCA-CoA) 以及三羟基胆甾酰辅酶 A (THCA-CoA) 进入过氧化物酶体^[39]; ABCD4 负责将维生素 B₁₂ 从溶酶体转运到细胞质中^[40,41]。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中 ABCD 亚家族存在 2 个成员, 分别为 Pxa1p 与 Pxa2p, 二者需要形成异源二聚体才能发挥转运长链脂肪酸进入过氧化物酶体的功能^[42,43] (图 1.5)。此外, 秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) ABCD 亚家族存在 5 个成员, 包括 PMP-1、PMP-2、PMP-3、PMP-4 以及 PMP-5, 均为半转运蛋白。其中 PMP-1、PMP-2 以及 PMP-4 定位于过氧化物酶体, PMP-5 定位于内质网上, PMP-3 的亚细胞定位还未被确定^[44]。

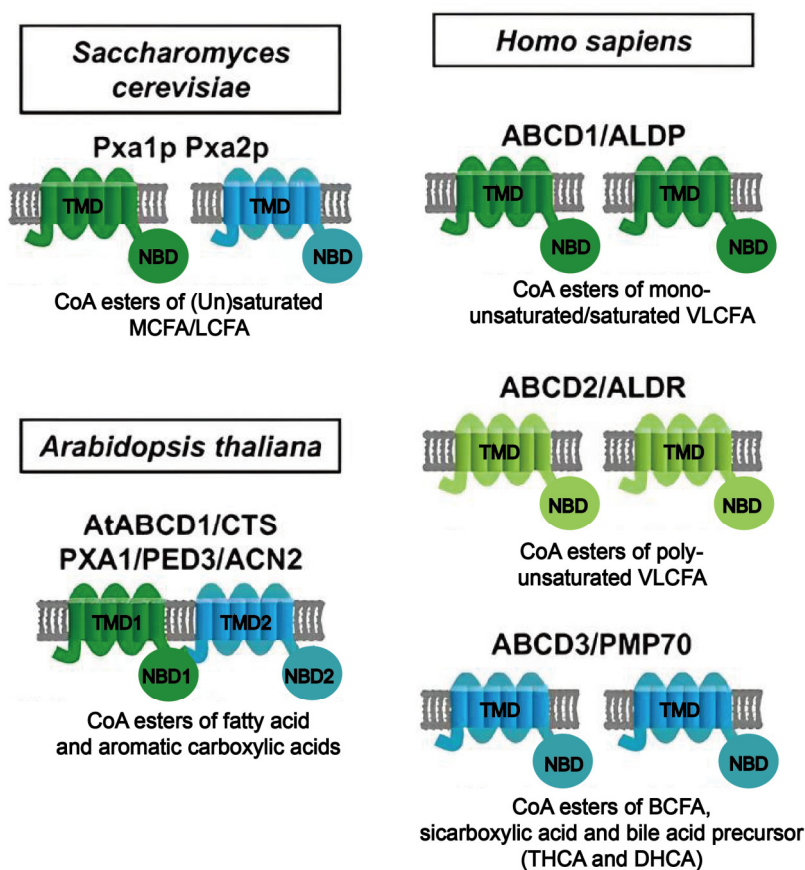


图 1.5 过氧化物酶体 ABC 转运蛋白的拓扑结构以及底物特异性^[45]

图注: 酿酒酵母、人类和拟南芥过氧化物酶体 ABCD 亚家族蛋白的拓扑结构。偏好性底物在每个转运蛋白下面标示。

在拟南芥中, ABCD 亚家族已经鉴定出 2 个成员, 包括 CTS (也称为 AtABCD1/PED3/PXA1/ACN2) ^[46-48] 以及 AtABCD2 (也称为 PMP1) ^[49]。CTS 定位于过氧化物酶体^[47,50], 可以将脂肪酰基辅酶 A 转运到过氧化物酶体中进行 β 氧化, 从而为种子萌发以及幼苗生长提供能量^[47,48,50,51]。当 CTS 蛋白功能缺陷时,

种子萌发以及幼苗生长受到抑制，呈现出“休眠”的状态^[46-48,50]。此外，CTS 还参与生长素 IAA 以及茉莉酸 JA 的生物合成^[52]，调控植物生长发育。AtABCD2 定位于叶绿体，蓝藻中存在其同源物，目前对 AtABCD2 的研究较少，暂不清楚其生理功能^[53]。值得注意的是，人类的 ABCD1-3 以及酵母的 Pxa1p 和 Pxa2p，每条肽链上只包含一个 NBD 和一个 TMD，必须形成同源或异源二聚体才能发挥功能；CTS 是全长转运蛋白，四个结构域位于一条肽链上，形成“TMD1-NBD1-TMD2-NBD2”形式的拓扑结构^[45]（图 1.5）。这种拓扑结构上的不同可能暗示着底物结合以及转运方式的不同。

随着冷冻电镜技术的发展，越来越多的膜蛋白结构被解析。2022 年，陈志鹏等人解析了人类 ABCD1 在生理底物超长链脂酰辅酶 A（C22:0-CoA）结合、内源脂质磷脂酰乙醇胺（PE）结合以及 ATP 结合构象的结构^[54]（图 1.6A），此外也有课题组解析了人类 ABCD1 无配体结合的 apo 构象、生理底物油酸酰基辅酶 A（Oleoyl-CoA）结合以及内源脂质磷脂酰胆碱（PC）结合的结构^[55-58]（图 1.6A）。2024 年，李阳等人解析了人类 ABCD3 在生理底物支链脂酰辅酶 A（4ME C16:0-CoA）结合以及 ATP 结合构象下的结构^[59]（图 1.6A）。从结构上看，无配体结合的 hABCD1 apo 构象向细胞质侧开口，展现可以与底物结合的口袋；hABCD1 需要形成同源二聚体来行使功能，因此可以对称结合两分子底物，如 C22:0-CoA、Oleoyl-CoA。类似地，hABCD3 也结合两分子 4ME C16:0-CoA；此外，类似于脂肪酰辅酶 A 的两亲性脂质 PC 以及 PE 也可以对称结合在底物结合口袋。在 ATP 结合的构象中，hABCD1 开口朝向过氧化物酶体侧，转运空腔在细胞质侧闭合，处于 ATP 结合后底物释放的状态。

结合 hABCD1 在不同状态下结构及活性实验结果，陈志鹏等人提出了 hABCD1 介导 VLCFA-CoA 的转运模型^[54]（图 1.6B）。在静息状态下，hABCD1 采用向细胞质侧开口构象，通过 C 端交叉螺旋调控两个 NBD 维持在适当的距离；底物结合时，两个 TMD 相互靠近，形成一个狭窄的内向转运空腔，并伴随着 C 端交叉螺旋的解离，因此两个 NBD 相互靠近，在 ATP 结合后二聚化；随后 hABCD1 开口向过氧化物酶体侧，导致底物结合口袋塌陷，使得底物被释放到过氧化物酶体基质中；最后，伴随着 ATP 水解为 ADP 并释放磷酸 Pi，hABCD1 发生构象变化重新回到静息状态，进入另一个转运周期。

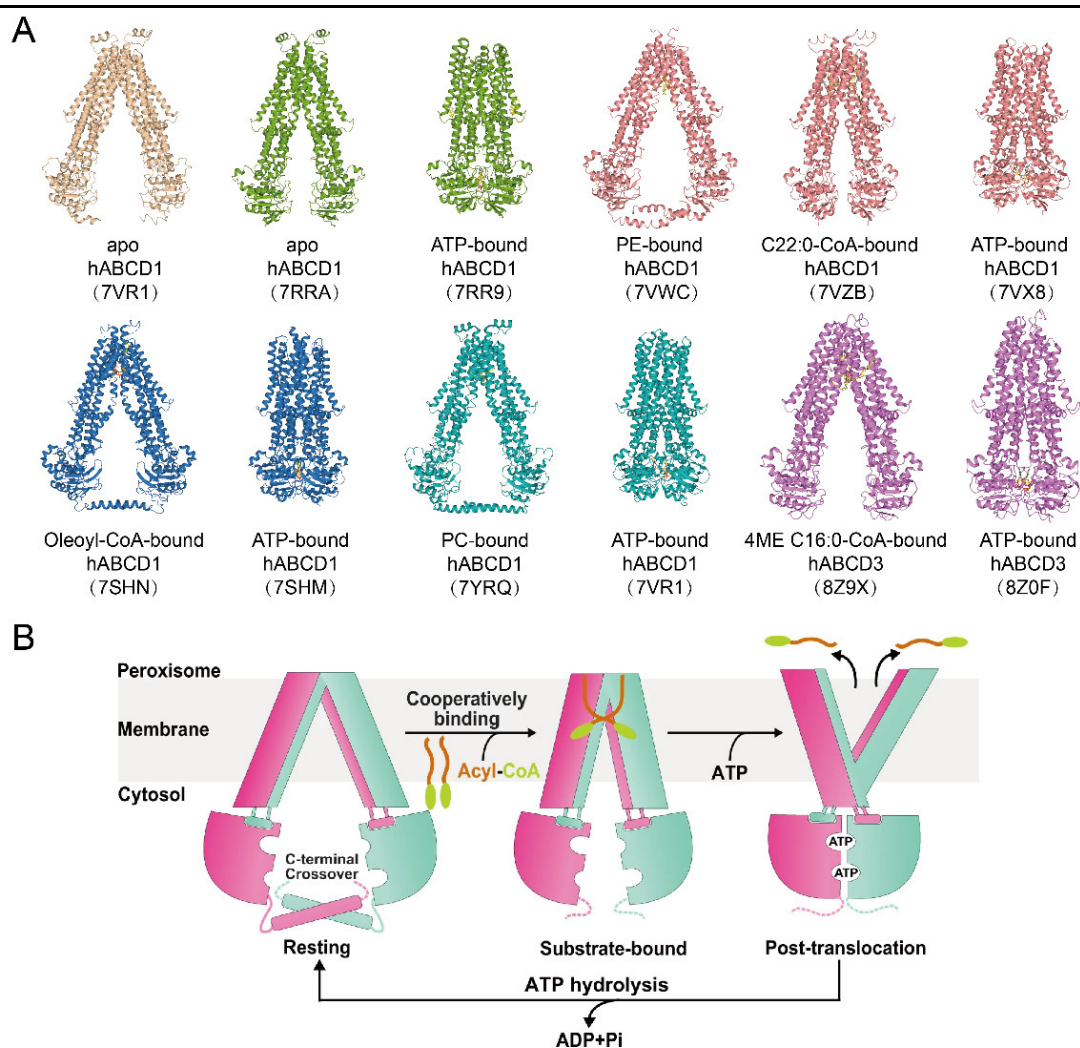


图 1.6 人类 ABCD 家族蛋白的冷冻电镜结构^[54-59]以及 ABCD1 转运机制^[54]

图注：A. 人类 ABCD1 和 ABCD3 的冷冻电镜结构，结合的配体以及 PDB 号均在下方标识，其中配体用黄色棒状形式展现。B. ABCD1 介导脂酰辅酶 A 转运的机制模型。脂酰辅酶 A 的辅酶 A 部分和脂肪酰基链部分分别用绿色椭圆和棕色曲线表示。

1.2 CTS 的鉴定与亚细胞定位

CTS 最早在 1998 年被 Makoto Hayashi 等人鉴定与拟南芥过氧化物酶体脂肪酸 β 氧化过程有关^[48]。在高等植物中，2,4-DB 可以在过氧化物酶体中通过 β 氧化代谢为除草剂 2,4-D^[60]，因此作者在 2,4-DB 毒性浓度条件下筛选具有 β 氧化缺陷的拟南芥幼苗突变体，发现一些突变体需要添加蔗糖才能在发芽后生长（图 1.7）。由于脂肪酸 β 氧化的作用是在幼苗生长阶段将储存的脂质转化为蔗糖^[61]，因此这些突变体在脂肪酸 β 氧化方面存在缺陷。通过遗传分析，这些突变体(LR43 与 LR81)在 *cts* 基因发生突变。此后，科学家们对 CTS 的功能进行了大量研究。

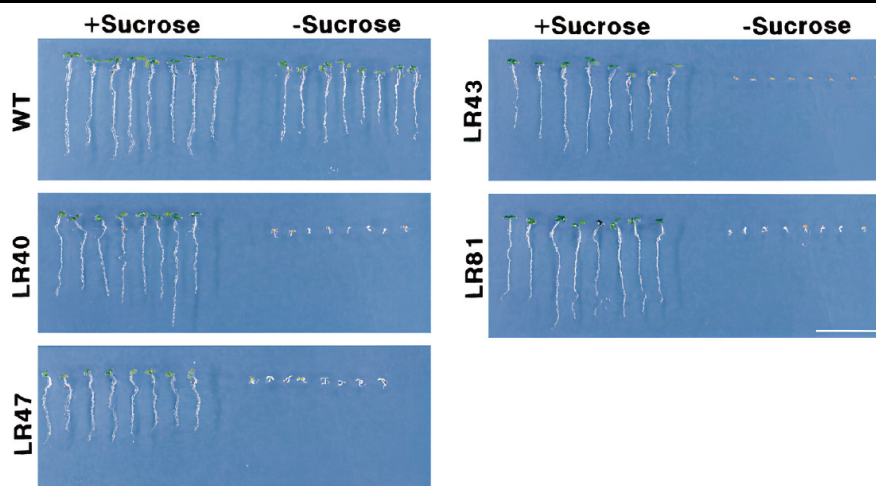


图 1.7 蔗糖对野生型和突变体幼苗生长的影响^[48]

图注: WT 为野生型幼苗, LR40、LR43、LR47 以及 LR81 为不同突变体幼苗, 其中 LR40 幼苗为 *ped1* 突变体, *ped1* 编码 3-酮酰辅酶 A 硫醇酶, 参与脂肪酸的 β 氧化; LR47 为 *ped2* 突变体, *ped2* 编码 PEX14 蛋白, 参与过氧化物酶体蛋白靶向的膜蛋白; LR43 与 LR81 为 *ped3* 突变体, *ped3* 编码 CTS 蛋白。

2002 年, Makoto Hayashi 等人对 CTS 的氨基酸序列进行测定^[50], 发现 CTS 由 1337 个氨基酸残基组成, 分子量约 149 kD, 且与哺乳动物中过氧化物酶体膜蛋白 ABCD1 以及 ABCD3 具有显著的序列相似性, 表明 CTS 是一种 ABC 转运蛋白。同年, Steven Footitt 等人通过对拟南芥莲座叶细胞进行蔗糖梯度离心与免疫印迹分析证明拟南芥 CTS 是过氧化物酶体膜蛋白^[47]。

由于过氧化物酶体不含 DNA, 所有过氧化物酶体基质蛋白以及膜蛋白都由细胞核 DNA 编码, 在翻译后进入过氧化物酶体。对于基质蛋白而言, 通常含有两种过氧化物酶体靶向信号 (peroxisomal targeting signal, PTS): PTS1 以及 PTS2。PTS1 位于蛋白 C 端, PTS2 位于蛋白 N 端, 分别被受体蛋白 Pex5 与 Pex7 识别。Pex7 可被 Pex5L (Pex5 的另一种 mRNA 剪切亚型) 识别, 最终结合了基质蛋白的 Pex5/Pex5L 蛋白被膜上受体 Pex13 以及 Pex14 识别并易位到过氧化物酶体腔内^[62]。对于过氧化物酶体膜蛋白 (peroxisome membrane protein, PMP) 而言, 靶向过氧化物酶体的机制是这些蛋白具有膜 PTS (mPTS), 可以被 Pex19 蛋白识别^[63], 进而与过氧化物酶体膜上的受体 Pex3/Pex16 相互作用, 最终正确定位 (图 1.8)。研究表明, 定位于过氧化物酶体的 ABCD 亚家族成员氨基末端具有疏水的 H0 基序^[44], 该 H0 基序在真核生物中十分保守。对于人类 ABCD 亚家族而言, ABCD1-3 具有 H0 基序, 可以被定位过氧化物酶体, 而 ABCD4 缺乏 H0 基序, 无法与 Pex19p 相互作用, 因而被某些信号识别颗粒 (signal recognition particle, SRP) 识别并整合到内质网中, 最终定位于溶酶体^[36]。在拟南芥中, CTS 具有 H0 基序, 定位于过氧化物酶体, 这也与上述亚细胞定位研究结果一致^[47,50];

AtABCD2 则缺乏 H0 基序因而定位于叶绿体。此外,酿酒酵母 Pxa1p 和 Pxa2p 以及秀丽隐杆线虫 PMP-1、PMP-2 和 PMP-4 的氨基末端也具有 H0 基序^[44],因此也定位于过氧化物酶体。

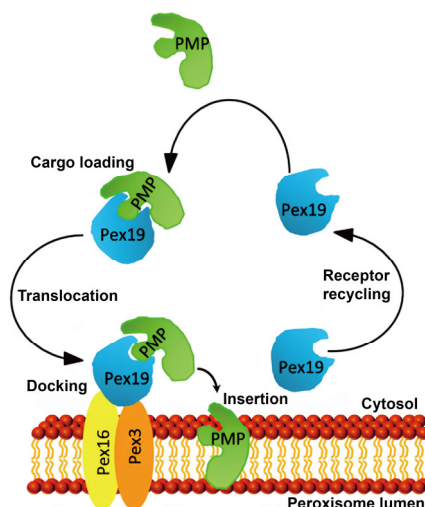


图 1.8 过氧化物酶体膜蛋白输入机制示意图^[64]

图注: Pex19 是一种可溶性分子伴侣, 它可以结合过氧化物酶体膜蛋白 PMP (peroxisome membrane protein), 通过与复合物 Pex3/Pex16 相互作用将过 PMP 转运到过氧化物酶体膜上。随着 PMP 正确定位于过氧化物膜上, Pex19 被回收到胞质中重新利用。

1.3 CTS 参与脂肪酸代谢

脂肪酸 (fatty acid, FA) 是通过天然脂肪的水解获得的脂肪族单羧酸。它们由碳、氢、氧组成, 是中性脂肪酸、磷脂以及糖脂的主要成分。在氧气充足时, 脂肪酸可被完全氧化并分解为 CO_2 和 H_2O , 释放出大量能量, 因此成为生物体的主要能量来源之一。

1.3.1 脂肪酸的分类

绝大多数天然存在的脂肪酸是偶数直链脂肪酸, 植物中约有 400 种脂肪酸存在^[65]。根据国际纯粹与应用化学联合会 (IUPAC) 的命名规则, 通常使用三种方法对脂肪酸进行命名, 即简写法、俗名法以及系统命名法^[66]。根据碳链长度不同, 脂肪酸通常分为短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFA, $\text{C}_2 \sim \text{C}_4$)、中长链脂肪酸 (medium chain fatty acids, MCFA, $\text{C}_6 \sim \text{C}_{12}$)、长链脂肪酸 (long chain fatty acids, LCFA, $\text{C}_{14} \sim \text{C}_{20}$) 以及超长链脂肪酸 (very long chain fatty acids, VLCFA, $\text{C} > 20$)。生物体内的脂肪酸通常含有偶数个碳原子, 含有奇数个碳原子的脂肪酸仅存在于植物、海洋生物、反刍动物、以及石油酵母。

根据碳链饱和度不同,脂肪酸可以分为三类:饱和脂肪酸(saturated fatty acids, SFA),在碳链中不存在不饱和键;单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFA),也称为油酸,在碳链中存在一个不饱和键;多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA),在碳链中存在两个或两个以上不饱和键。动物只能合成饱和以及单不饱和脂肪酸,无法合成多不饱和脂肪酸,因此只能从植物中获取,这类脂肪酸称为必需脂肪酸,常见的有亚麻酸、亚油酸。

1.3.2 脂肪酸的合成

在植物中,脂肪酸的生物合成仅发生在质体中,由乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)和脂肪酸合成酶(FA synthase, FAS)催化合成。ACC 是一种包含生物素的酶,催化脂肪酸生物合成的第一步反应。自然界中 ACC 有异质和同质两种形式,两者都包含四种组分:生物素羧基载体蛋白(biotin carboxyl carrier protein, BCCP)、生物素羧化酶(biotin carboxylase, BC)、羧基转移酶(carboxyltransferase)的 α 亚基以及 β 亚基^[67]。对于异质 ACC 而言,四种酶组分作为单个亚基表达,最终结合形成多酶复合物^[68],主要存在于原核生物以及藻类、苔藓植物、蕨类植物、裸子植物、非禾本科单子叶植物和双子叶植物的质体中^[68-70]。对于同质 ACC 而言,四种酶组分表达在一条肽链上,存在于动物和真菌细胞质以及禾本科单子叶植物的质体中。此外,所有植物的胞质中也存在一种同质 ACC 亚型,其作用是为脂肪酸延伸、聚酮生物合成、丙二酰化反应以及其他特殊代谢过程提供丙二酰辅酶 A^[71]。ACC 利用碳酸氢盐、ATP、乙酰辅酶 A 以及辅因子生物素来生成丙二酰辅酶 A^[72,73]。首先,生物素与生物素羧基载体蛋白结合,随后生物素羧化酶利用 ATP 作为能量来源、 HCO_3^- 作为原料,将生物素羧化,接着在羧基转移酶作用下,将活化的羧基基团转移到乙酰辅酶 A 上生成丙二酰辅酶 A^[74] (图 1.9)。

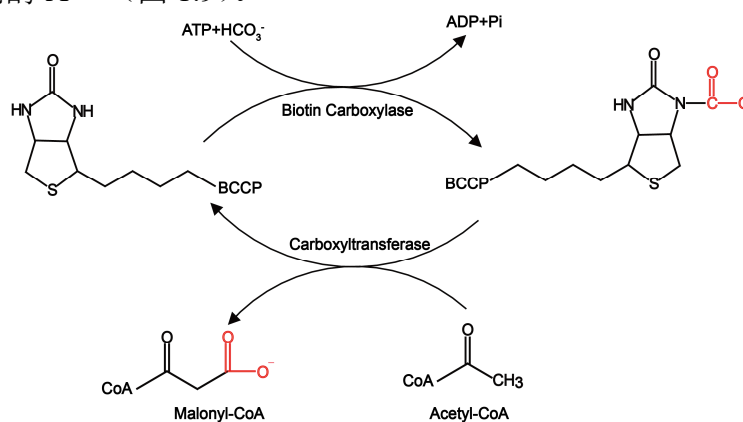
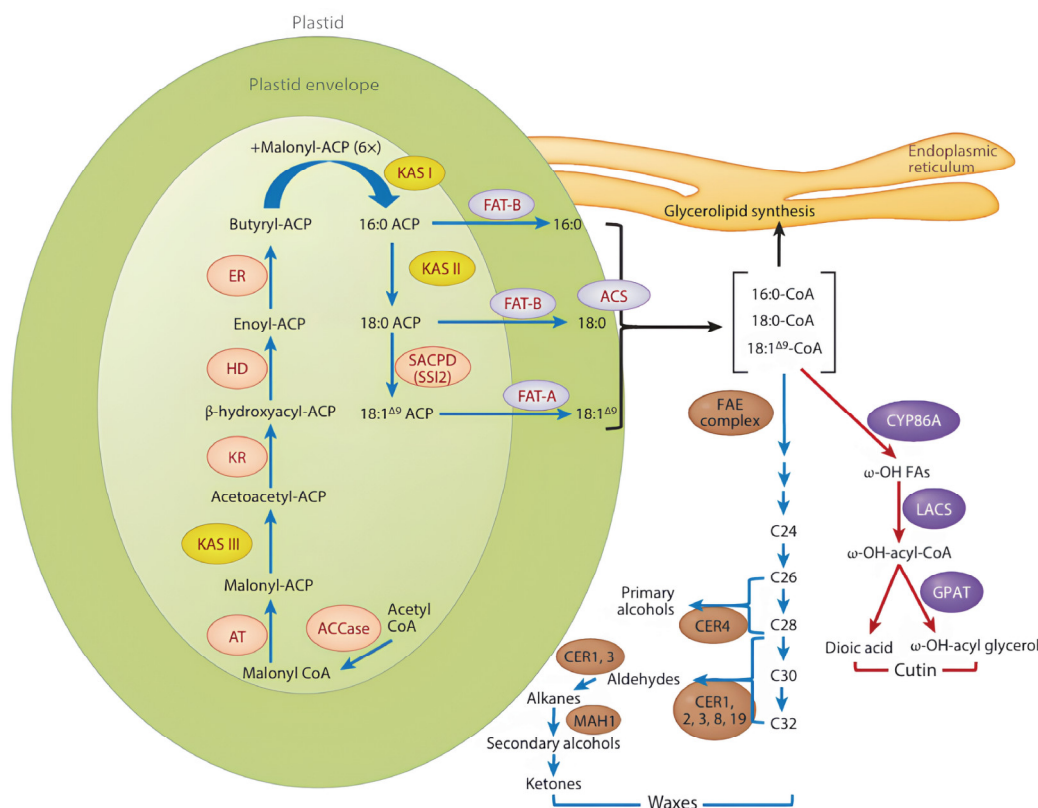


图 1.9 乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC 的反应机制^[74]

图注:乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC 以乙酰辅酶 A、 HCO_3^- 为原料合成丙二酰辅酶 A 的过程。BCCP, 生物素羧基载体蛋白(biotin carboxyl carrier protein)。

植物脂肪酸合成酶 FAS 是一种多酶复合物，参与酰基转移、碳链增加以及反应终止过程，每个循环连续转移两个碳，最终合成不同长度的脂肪酸^[75]（图 1.10）。首先，ACP 转酰基酶（ACP transacylase, AT）催化乙酰基或者丙二酰基从 CoA 转移到 ACP，生成乙酰基-ACP 或者丙二酰基-ACP^[76]。三种 β -酮酰基-ACP 合酶（ β -ketoacyl-ACP-synthases, KASs）催化丙二酰-ACP 延伸成脂肪酸^[77]：KAS III 催化初始缩合反应生成丁酰基-ACP；KAS I 催化 C4-ACP 缩合成 C16-ACP；KAS II 催化 C14-ACP 以及 C16-ACP 与丙二酰-ACP 缩合。乙酰基-ACP 与丙二酰基-ACP 在 KAS III 催化下缩合生成 β -酮酰基-ACP，随后在 β -酮酰基-ACP 还原酶（ β -ketoacyl-ACP reductase, KR）作用下还原成 β -羟基酰基-ACP，接着在 β -羟基酰基-ACP 脱氢酶（ β -Hydroxyacyl-ACP dehydrase, HD）作用下去除一个水分子生成烯基-ACP，最后在烯基-ACP 还原酶（enoyl-ACP reductase, ER）作用下生成丁酰基-ACP。丁酰基-ACP 通过 6 轮延伸反应生成 C16-ACP^[76]，随后在脂肪酸硫酯酶（FA thioesterases, FAT）作用下水解 ACP 与酰基之间的硫酯键来催化链终止反应，其中，FATA 负责水解不饱和酰基-ACP（C18:1-ACP），FATB 负责水解饱和酰基-ACP（C16:0/C18:0-ACP）^[78]（图 1.10）。游离脂肪酸被酰基辅酶 A 合成酶（acyl-CoA synthetase, ACS）激活为辅酶 A 酯，进而被转运到细胞质中，随后进入内质网开始真核途径的脂质生物合成^[76,79]。

在质体基质中，不饱和脂肪酸的生成由硬脂酰-ACP 去饱和酶（stearoyl-ACP desaturases, SACPD）催化，在酰基-ACP 的第 9 位碳上引入顺式双键^[80,81]，从而生成单不饱和脂肪酸油酸（C18:1）以及棕榈油酸（C16:1）^[82,83]（图 1.10）。生成的 C18:1-ACP 通过裂解释放 ACP，生成的游离 C18:1 可以被辅酶 A 修饰以 C18:1-CoA 形式转出质体，也可以与甘油-3-磷酸（glycerol-3-phosphate, G3P）发生反应，通过叶绿体原核途径开始脂质生物合成。对于膜脂质中的脂肪酸而言，不饱和化是由膜结合的脂肪酸去饱和酶（FA desaturase, FAD）催化。此外，脂肪酸碳链的延伸发生在内质网中，以丙二酰辅酶 A 作为碳链供体，C16-CoA 和 C18-CoA 在脂肪酸延伸酶（FA elongase, FAE）催化形成超长链脂肪酸（VLCFA）（图 1.10）。超长链脂酰辅酶 A 随后在超长链醛脱羧酶 CER4 作用下转化为伯醇，或者在 CER1/2/3/8/19 作用下转化为醛，随后在 CER1/3 作用下转化为烷烃，最终在中链烷烃羟化酶（midchain alkane hydroxylase, MAH1）作用下转化为仲醇和酮。这些超长链疏水化合物后续参与形成植物的蜡层（图 1.10）。C16:0 和 C18:1 还可以在细胞色素 P450 单加氧酶 CYP86A 催化发生 ω -羟基化，并在长链酰基合成酶（long-chain acyl-coenzyme A synthetase, LACS）作用下转化为 ω -OH C16:0-CoA，用于二酸以及 ω -羟基酰基甘油的生成，最终转移到植物角质层。

图 1.10 脂肪酸合成示意图^[75]

图注：乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）和脂肪酸合成酶（FAS）合成脂肪酸的过程。初始缩合反应由 KAS III（ β -酮酰基-ACP 合酶）催化，接下来的六个缩合反应由 KAS I 催化生成 C16:0-ACP，随后通过 KAS II 延伸得到 C18:0-ACP，最终通过脂肪酸硫酯酶 FAT 作用下水解为游离脂肪酸。ACP，乙酰载体蛋白（acyl carrier protein）；ACS，酰基辅酶 A 合成酶（acyl-CoA synthase）；AT，ACP 转酰基酶（ACP transacylase）；ER，烯基-ACP 还原酶（enoyl-ACP reductase）；CER，超长链醛脱羧酶（very-long-chain aldehyde decarbonylase）；GPAT，甘油-3-磷酸酰基转移酶（G3P acyltransferase）；HD， β -羟基酰基-ACP 脱氢酶（ β -Hydroxyacyl-ACP dehydrogenase）；KAS， β -酮酰基-ACP 合酶（ β -ketoacyl-ACP-synthase）；KR， β -酮酰基-ACP 还原酶（ β -ketoacyl-ACP reductase）；LACS，超长链酰基合成酶（long-chain acyl-coenzyme A synthase）；MAH1，中链烷烃羟化酶（midchain alkane hydroxylase）；SACPD，硬脂酰-ACP 去饱和酶（stearoyl-ACP desaturase）。

1.3.3 三酰甘油的生物合成

三酰甘油（triacylglycerols, TAG）又称甘油三酯、油脂，是甘油的三个羟基分别与三个脂肪酸分子脱水缩合后形成的甘油酯，是一种中性脂肪。在向日葵、油菜、大豆和棉花等油料作物种子中，TAG 是一种重要的能量储备，在种子萌发以及幼苗建立过程中提供脂肪酸用于产生能量以及合成碳水化合物^[84,85]。

TAG 合成的主要场所在内质网，以内质网中生成的 DAG 作为前体（图 1.11）。在植物中，TAG 合成也发生在质体。在大多数种子中，TAG 合成所需的 DAG 主

要由 PC 转化而来^[86]；在拟南芥叶片中，TAG 合成所需的 DAG 则主要由 PA 去磷酸化生成^[87]。在植物和酵母中，DAG 酯化生成 TAG 通过酰基辅酶 A 依赖性以及非依赖性两种途径进行^[86,88,89]。酰基辅酶 A 依赖性的 TAG 合成由二酰基甘油：酰基辅酶 A 酰基转移酶（diacylglycerol: acyl-CoA acyltransferase, DGAT）催化，以酰基辅酶 A 和 DAG 为底物合成 TAG。酰基辅酶 A 非依赖途径则是由磷脂：二酰甘油酰基转移酶（phospholipid: diacylglycerol acyltransferase, PDAT）催化，以磷脂作为酰基供体、DAG 作为酰基受体，生成 TAG 和溶血磷脂（lysophospholipid）。

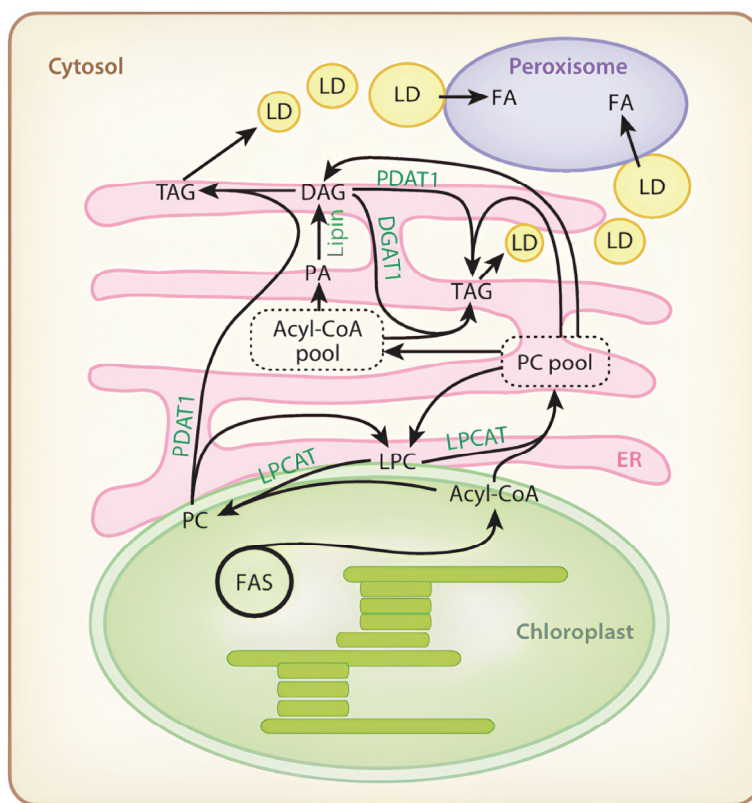


图 1.11 叶肉细胞中 TAG 代谢通路示意图^[90]

图注：参与 TAG 代谢的蛋白用绿色字体表示。CoA，辅酶 A（coenzyme A）；LD，脂滴（lipid droplet）；DGAT1，二酰甘油：酰基辅酶 A 酰基转移酶 1（diacylglycerol: acyl-CoA acyltransferase）；LPC，溶血磷脂酰胆碱（lysophosphatidylcholine）；PDAT1，磷脂：二酰甘油酰基转移酶（phospholipid: diacylglycerol acyltransferase）；LPCAT，溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶（lysophosphatidylcholine acyltransferase）。

由于缺乏极性头部基团，合成的 TAG 首先被隔离在内质网膜内外小叶之间的疏水区域，从而导致内质网膜双分子层膨胀，最终包含 TAG 的脂滴（lipid droplets, LDs）以出芽的方式从内质网进入细胞质^[91,92]。脂滴表面镶嵌一组特定的疏水蛋白，包括油酸素（oleosins）、钙素（caleosins）以及甾醇素（steroleosins）等^[90]。油酸素存在于种子中，对于稳定和调节 LD 大小十分重要^[93,94]。钙素和甾醇

醇素表达在营养组织中。在病理状态下，钙素参与形成抗真菌化合物植物抗菌素（phytoalexin），在植物防御病原体方面起重要功能^[95]。甾醇素则参与油菜素内酯的生物合成以及信号转导过程^[96]。

1.3.4 脂肪酸 β 氧化

过氧化物酶体是一种形态和代谢高度动态的细胞器，存在于真核细胞中，其核心功能之一是对长链脂肪酸、支链脂肪酸以及芳香族羧酸进行 β 氧化（ β oxidation）^[45]。在哺乳动物细胞中，短链、中长链、长链脂肪酸的 β 氧化发生在线粒体中^[97]，超长链脂肪酸、支链脂肪酸以及双羧酸的 β 氧化则发生在过氧化物酶体中；而在植物和真菌中，脂肪酸的 β 氧化只发生在过氧化物酶体^[64]。在高等植物中，过氧化物酶体至少分化为三种不同的类别：乙醛酸酶体、叶过氧化物酶体以及非特化过氧化物酶体^[98]。每种过氧化物酶体中都包含一组独特的酶，发挥特殊的功能。叶过氧化物酶体广泛存在于光合器官的细胞中，包含一些参与光呼吸过程的酶。根、茎等其他器官的细胞中含有功能未鉴定的非特化过氧化物酶体^[99]。乙醛酸酶体存在于贮藏器官的细胞中，如油籽植物发芽后生长期间的胚乳和子叶，以及衰老器官中^[99]。乙醛酸酶体包含脂肪酸 β 氧化和乙醛酸循环的酶，在脂质转化为蔗糖的过程中起重要作用。

脂肪酸 β 氧化是指在一列酶的作用下，脂肪酸在 α 碳原子和 β 碳原子之间断裂， β 碳原子被氧化成酰基，生成乙酰辅酶 A 和少两个碳原子的脂肪酰基辅酶 A，因此称为 β 氧化（图 1.12）。首先脂肪酸在胞质中被活化，游离脂肪酸具有化学惰性，因此需要在脂酰辅酶 A 合成酶催化下被辅酶 A 修饰，转化为相应的脂酰辅酶 A，随后被转运进入过氧化物酶体。在过氧化物酶体中，直链饱和脂酰辅酶 A 经历氧化、水合、氧化和硫解这四步反应生成乙酰辅酶 A^[100]（图 1.12）。首先，以黄素腺嘌呤二核苷酸（flavin adenine dinucleotide, FAD）为辅因子，在酰基辅酶 A 氧化酶（acyl-CoA oxidase, ACX）作用下^[101]，脂酰辅酶 A 在 α 碳原子和 β 碳原子处脱氢生成双键，产生反式-2-烯酰基辅酶 A（trans-2-enoyl-CoA）与 FADH_2 ，生成的 FADH_2 被黄素蛋白脱氢酶氧化为 H_2O_2 ；随后在多功能蛋白（multifunctional protein, MFP）作用下，在反式双键处加入一个水分子转化为 β -羟基酰基辅酶 A，然后以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+ ）辅因子， β -羟基酰基辅酶 A 脱氢生成 3-酮酰基辅酶 A（3-ketoacyl-CoA）并产生 NADH 与 H^+ ；最后在硫解酶（3-ketoacyl-CoA thiolase, KAT）作用下进行硫解，生成乙酰辅酶 A 和少两个碳原子的脂肪酰基辅酶 A。生成的乙酰辅酶 A 可以进入线粒体呼吸链或者乙醛酸循环^[52]。然而，TAG 中的脂肪酸多数是不饱和的，这些不饱和键是顺式构型，不能直接加水生成 β -羟基酰基辅酶 A。因此，

对于不饱和脂肪酸而言，还需要异构酶与还原酶将其转化为 β 氧化的底物^[100]。对于奇数脂肪酸而言， β 氧化生成的丙酰辅酶 A 需要通过丙酰辅酶 A 羧化酶引入 HCO_3^- 生成甲基丙二酰辅酶 A，随后在差向异构酶以及维生素 B_{12} 作用下转化为琥珀酰辅酶 A，从而进入三羧酸循环被利用^[100]。

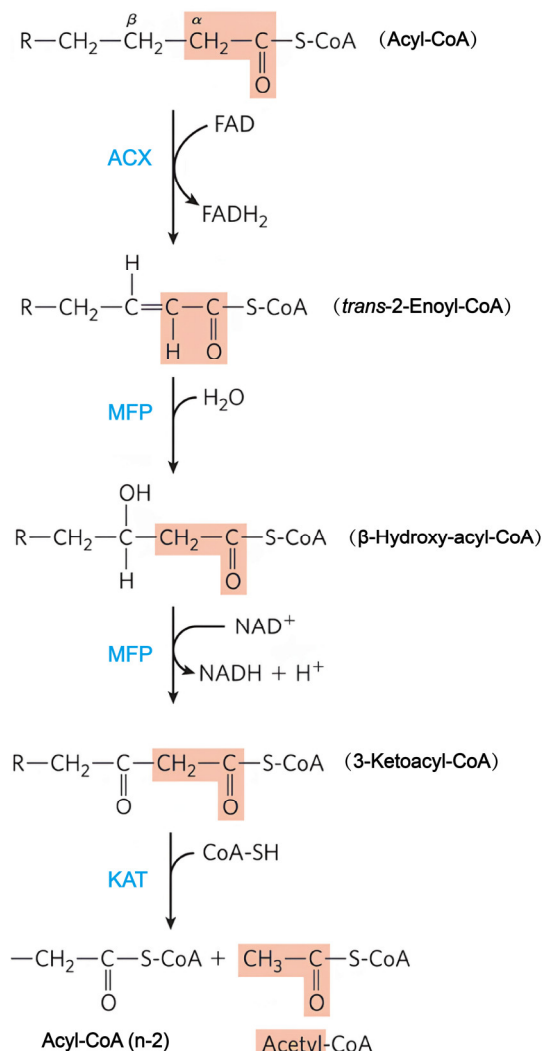


图 1.12 植物直链饱和脂肪酸的 β 氧化过程^[52,100]

图注：脂肪酸 β 氧化包括四步反应，分别是氧化、水合、氧化和硫解，从而生成乙酰辅酶 A 以及少两个碳原子的酰基辅酶 A。参与脂肪酸 β 氧化的酶用蓝色字体标出。通过 β 氧化减少的碳原子用橙色背景标出。ACX，酰基辅酶 A 氧化酶（acyl-CoA oxidase）；MFP，多功能蛋白（multifunctional protein）；KAT，硫解酶（3-ketoacyl-CoA thiolase）。

乙醛酸循环（glyoxylate cycle）最早在假单胞菌和大肠杆菌等微生物^[102]以及发芽的蓖麻籽^[103]中发现，它能够将醋酸盐、乙醇等二碳化合物转化为细胞所需的成分，为细胞提供生长所需的碳源。乙醛酸循环包含两种专用酶：异柠檬酸裂解酶（isocitrate lyase, ICL）和苹果酸合酶（malate synthase, MS），通常被认为

是三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle, TCA）的辅助途径。ICL 催化异柠檬酸的羟醛裂解为琥珀酸盐和乙醛酸盐，随后 MS 催化乙醛酸和乙酰辅酶 A 合成苹果酸盐，接着苹果酸在苹果酸脱氢酶作用下转化为草酰乙酸，生成的草酰乙酸与乙酰辅酶 A 在柠檬酸合酶作用下转化为柠檬酸，最后顺乌头酸酶将柠檬酸转化为异柠檬酸（图 1.13）。通过乙醛酸循环，两个乙酰辅酶 A 分子可以转化为一个琥珀酸盐，从而绕过了 TCA 循环的氧化脱羧步骤，保留了碳骨架用于生物合成^[104]。

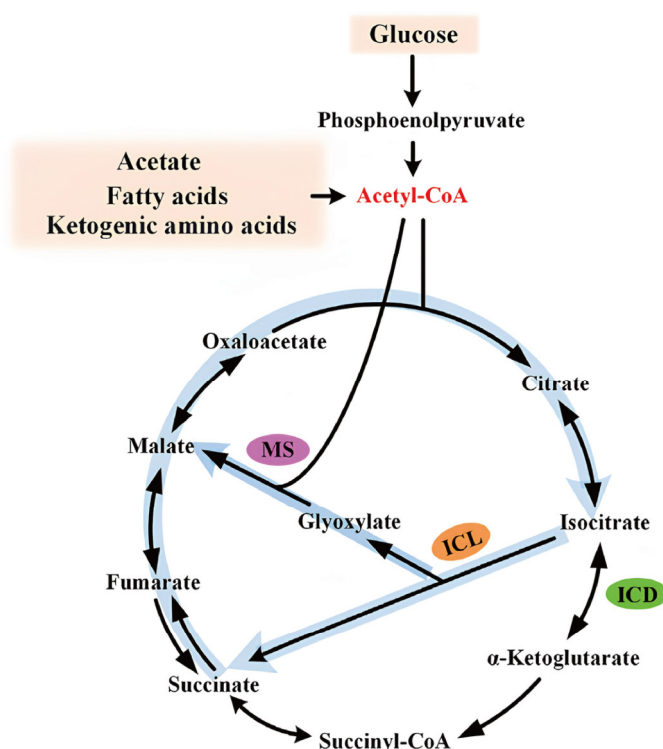


图 1.13 乙醛酸循环示意图^[104]

图注：乙醛酸循环由浅蓝色的粗箭头表示。乙酰辅酶 A 与乙醛酸在苹果酸合酶催化下转化为苹果酸，随后在苹果酸脱氢酶作用下转化为草酰乙酸，接着与乙酰辅酶 A 在柠檬酸合酶催化下转化为柠檬酸，然后顺乌头酸酶将柠檬酸转化为异柠檬酸，最后在异柠檬酸裂解酶作用下裂解为乙醛酸和琥珀酸。ICL，异柠檬酸裂解酶（isocitrate lyase）；MS，苹果酸合酶（malate synthase）；ICD，异柠檬酸脱氢酶（isocitrate dehydrogenase）。

通过脂肪酸 β 氧化和乙醛酸循环，植物可以将储存的脂质转化为蔗糖用于种子萌发以及幼苗生长的能量来源（图 1.14）。储存在脂滴中的三酰甘油在脂肪酶 SDP1 催化下水解并释放脂肪酸^[105]；随后，脂肪酸被活化，在脂酰辅酶 A 合成酶催化下被辅酶 A 修饰，转化为相应的脂酰辅酶 A，进而被转运进入过氧化物酶体；在过氧化物酶体中，脂酰辅酶 A 进行 β 氧化生成乙酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 进入乙醛酸循环转化为琥珀酸；接着，琥珀酸从过氧化物酶体进入线粒体，通过三羧酸循环转化为苹果酸，然后被转运到细胞质中；随后，苹果酸在苹果酸脱氢

酶作用下转化为草酰乙酸，磷酸烯醇式丙酮酸（phosphoenolpyruvate, PEP）羧基酶催化草酰乙酸转化为 PEP，最终通过糖异生途径生成己糖，用于细胞壁生物合成或者转化为蔗糖被转运到生长中的幼苗组织，在植物进行光合自养前提供能量来源^[84,106]。

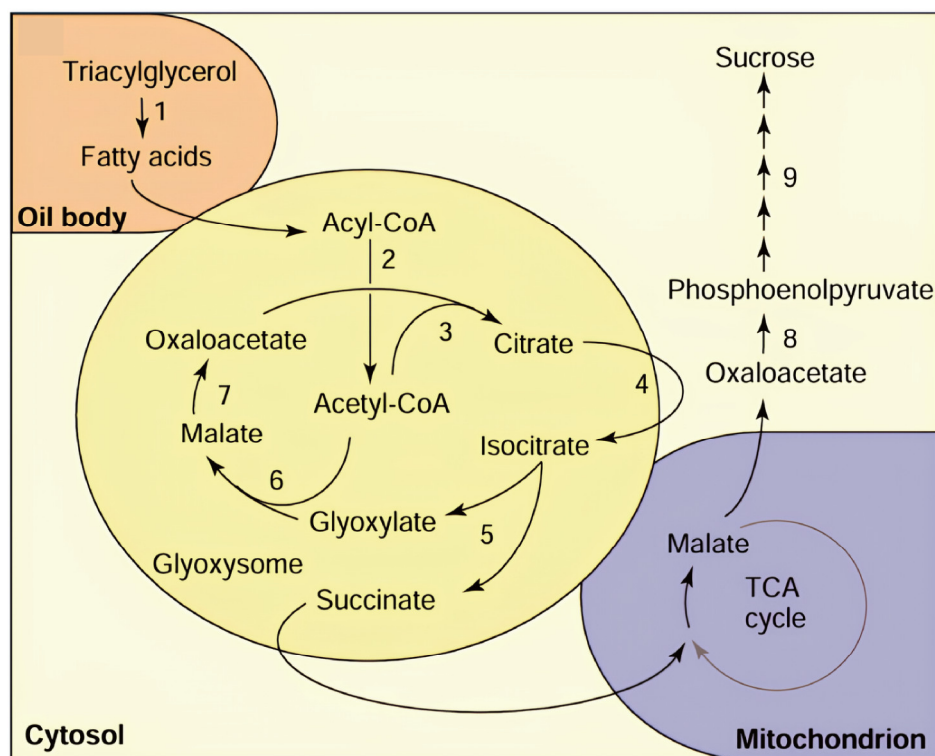


图 1.14 油料种子萌发后异养生长的代谢过程^[106]

图注：数字表示酶或酶催化的反应。1，三酰甘油脂肪酶（triacylglycerol lipase）；2，脂肪酸 β 氧化；3，柠檬酸合成酶（citrate synthase）；4，顺乌头酸酶（aconitase）；5，异柠檬酸裂解酶（isocitrate lyase）；6，苹果酸合成酶（malate synthase）；7，苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase）；8，磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶（phosphoenolpyruvate carboxykinase）；9，糖异生（gluconeogenesis）。

1.3.5 CTS 转运脂肪酸进入过氧化物酶体进行 β 氧化

CTS 最早鉴定与过氧化物酶体中脂肪酸 β 氧化过程有关^[48]，其突变体幼苗在添加蔗糖后才能正常生长。野生型种子在萌发后迅速降解储备的脂质，而 *cts* 突变体种子中仍保留大量的脂质^[47,50]。此外，免疫印迹实验表明拟南芥子叶中 CTS 的表达量在萌发后上升，而随着幼苗生长子叶留在土中即持续黑暗的条件下，表达量逐渐下降。然而，*cts* 突变体的过氧化物酶体形态上是正常的，呈现为圆形或椭圆形，与野生型无差别^[50]。

为了进一步探究 *cts* 突变体中脂质分解阻滞的原因以及 CTS 蛋白的功能，Steven Footitt 等人测量了 *cts* 突变体和相应野生型 WT 中三酰基甘油(TAG)和酰

基辅酶 A 的水平^[47] (图 1.15)。

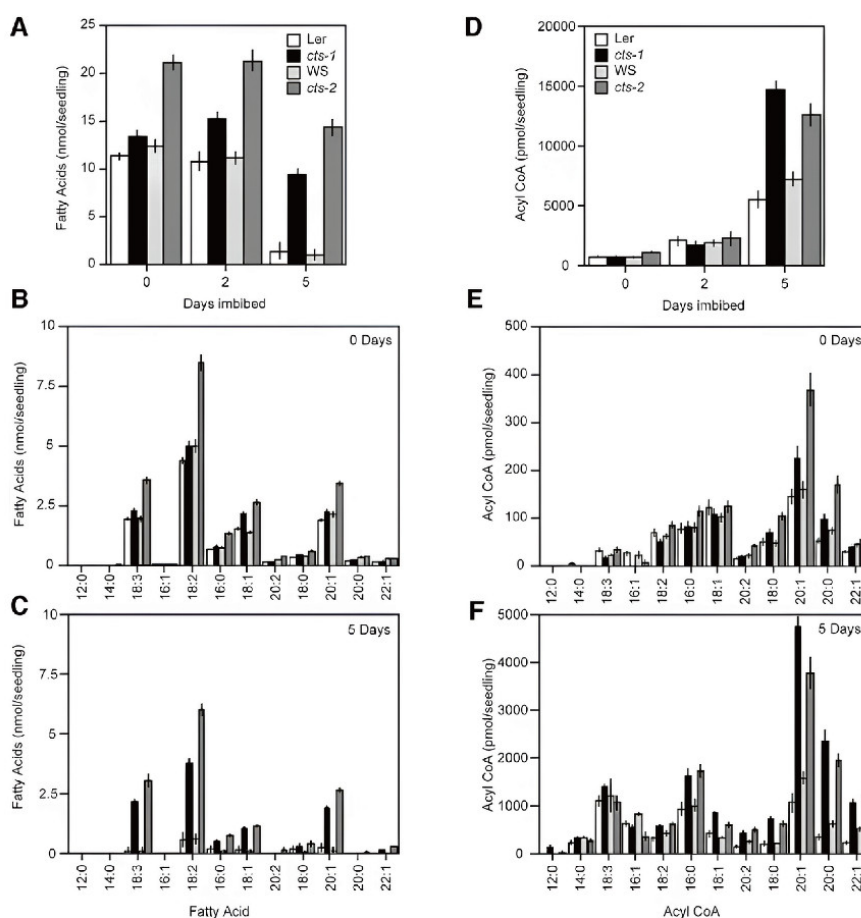


图 1.15 野生型与 *cts* 突变体中 TAG 衍生的脂肪酸以及脂酰辅酶 A 水平的变化^[47]

图注: A 与 D. 野生型 Ler、WS 和突变体 *cts-1*、*cts-2* 的种子和幼苗中 TAG 衍生的脂肪酸(A)以及酰基辅酶 A(D)含量对比。B 与 C. 野生型和突变体种子(B)以及 5 日龄幼苗(C)中 TAG 衍生的不同链长脂肪酸的含量。E 与 F. 野生型和突变体种子(E)以及 5 日龄幼苗(F)中不同链长酰基辅酶 A 的含量。所有种子播种在含有 1%蔗糖的培养基上,在 4°C 下保存 4 天,然后转移到萌发条件。*cts* 突变体的种皮被破坏以允许发芽。幼苗处于相似的形态发育阶段。

发芽后,野生型幼苗中脂肪酸含量显著减少,而在突变体中脂肪酸含量下降程度较小(图 1.15A)。在萌发 5 天后,野生型 Ler 与 WS 中所有 TAG 衍生的不同长度脂肪酸均被动员降解,而突变体 *cts-1*、*cts-2* 仍保留高水平的脂肪酸(图 1.15B、C)。此外,在发芽 5 天内,所有植株的酰基辅酶 A 总量都有所增加,在突变体 *cts-1*、*cts-2* 中更显著(图 1.15D)。在第 5 天,突变体相较于野生型积累了大量的酰基辅酶 A,其中最显著的是 C20:1-CoA、C20:0-CoA 以及 C22:1-CoA(图 1.15E、F),C20 脂肪酸在拟南芥非储存脂质中含量很少,因此突变体中这些积累的 C20-CoA 来源于储存的 TAG。这些数据表明,*cts* 突变体中脂肪酸 β 氧化缺陷导致 TAG 来源的长链酰基辅酶 A 积累。短链脂肪酸可以扩散穿过过氧化

物酶体膜，因此作者在培养基中添加短链脂肪酸丙酸和丁酸，大大提高了 *cts-1* 种子的萌发率，这表明 *cts-1* 突变体中过氧化物酶体的 β 氧化具有正常功能。因此在 *cts-1* 突变体中 TAG 衍生的长链脂肪酸与酰基辅酶 A 的积累以及代谢失败是由于跨膜转运到过氧化物酶体这一过程缺陷导致，这表明 CTS 介导脂肪酸转运到过氧化物酶体。

为了探究 CTS 的转运底物，Yvonne Nyathi 等人建立了生化表征系统^[51]，将 CTS 异源表达在其同源蛋白 PXA1/PXA2 敲除的酿酒酵母（记为 *pxa1 pxa2* Δ ）中。通过提取过氧化物酶体进行 ATPase 活性实验，作者发现 CTS 的表达使得活性增加，且活性被金属氟化物 AlF_x 抑制。随后作者测定了表达 CTS 的酵母细胞代谢不同链长和饱和度的脂肪酸的能力，结果显示，CTS 的表达提高了酵母细胞对棕榈酸（C16:0）以及更长碳链的脂肪酸，包括硬脂酸（C18:0）、油酸（C18:1）、亚油酸（C18:2）、白石酸（C22:0）、二十二碳六烯酸（C22:6）以及木脂酸（C24:0）的 β 氧化能力，接近于 WT 水平。与对照组空载相比，Walker A 基序突变体 CTS K487A 没有恢复 β 氧化能力。这些结果表明，CTS 可以转运不同链长以及不同饱和度的脂肪酸进入过氧化物酶体进行 β 氧化。然而，这些细胞水平的活性测量受到酵母代谢不同脂肪酸的能力的限制，只能为底物特异性提供间接证据。

许多 ABC 转运蛋白的 ATPase 活性在底物结合后提高^[107-109]。基于此结论，Yvonne Nyathi 等人纯化了表达 CTS 的酵母细胞过氧化物酶体，测试脂肪酸和脂肪酰基辅酶 A 对 CTS 的 ATPase 活性影响^[51]。CTS 具有 ATP 酶活性，当加入酰基辅酶 A 时，CTS 的 ATP 酶活性明显增加，而加入脂肪酸时变化不明显（图 1.16A）。游离的辅酶 A（CoASH）对 CTS 的 ATP 酶活性没有影响，但由不可水解的醚键连接的 C14 辅酶 A 醚（CoAether）增加了 CTS 的 ATP 酶活性，这表明脂酰辅酶 A 刺激的 ATP 酶活性不是由于水解释放 FA 产生的。IBA 和 2,4-DB 都被认为是 CTS 的底物^[46,50]，作者测试了两者对 CTS 的 ATP 酶活性影响，发现这些化合物不会刺激 ATP 酶活性，然而由于没有相应的 CoA 酯售卖，无法进行 ATP 酶活性实验。为了更直观精确地评估不同化合物的刺激效果，作者计算了每个潜在底物的刺激倍数（图 1.16B）。脂酰辅酶 A 对 CTS 的 ATP 酶活性刺激更高，而脂肪酸刺激较弱。这些结果表明，脂酰辅酶 A 是 CTS 的底物。然而，并非所有 ABC 转运蛋白的底物都刺激 ATP 水解，并非所有刺激 ATP 酶活性的化合物都是底物^[107,110-114]，不能排除脂肪酸作为潜在底物的可能性。因此使用重组表达以及纯化的 CTS 蛋白进行转运试验对于明确其底物至关重要。

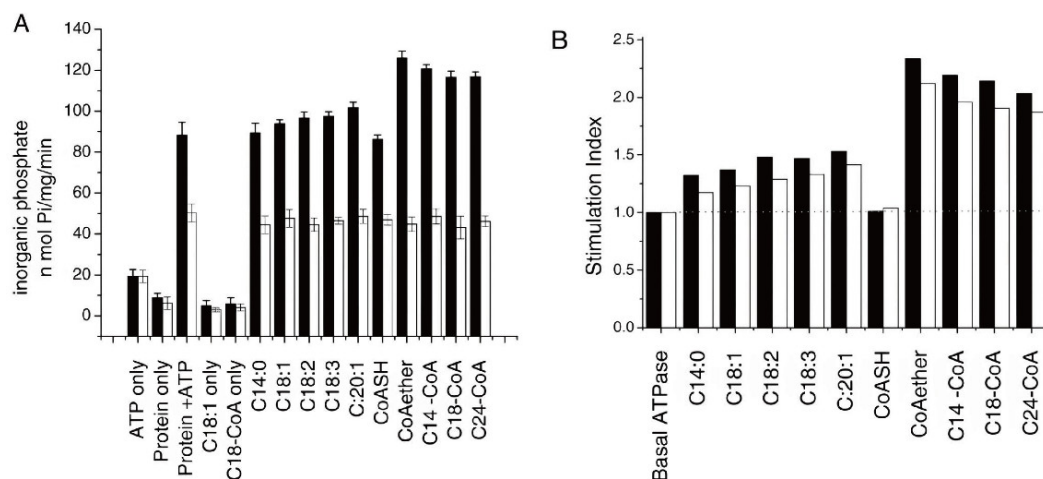


图 1.16 脂肪酸和脂肪酰基辅酶 A 对 CTS 的 ATP 酶活性的影响^[51]

图注：在 10 μ M、100 μ M 脂肪酸或者脂酰辅酶 A 存在下测量从转化了 CTS 质粒或者空载质粒酵母细胞分离的过氧化物酶体的 ATPase 活性。A. 存在或不存在 10 μ M 脂肪酸或者脂肪酰基辅酶 A 时测量的 ATP 酶活性，其中黑色代表 CTS 质粒，白色代表空载质粒。B. 从 A 中获得的 ATP 酶活性数据或者使用底物浓度为 100 μ M 进行相同实验获得的 ATP 酶活性数据，用于计算相对于基础酶活性的 ATP 酶活性刺激倍数。其中黑色代表 100 μ M 底物，白色代表 10 μ M 底物。

除了长链脂肪酸，CTS 蛋白还参与短链脂肪酸的转运。在种子萌发与幼苗生长期间，乙醛酸循环可将脂肪酸 β 氧化生成的乙酰辅酶 A 转化为琥珀酸，最终通过糖异生途径转化成蔗糖作为能量来源^[106]。氟乙酸（fluoroacetic acid, FAc）常被用作鼠药以及农药，其毒性作用在于抑制了顺乌头酸酶（aconitase, ACO）的活性^[115]，即 FAc 可与辅酶 A 结合生成氟乙酰辅酶 A^[116]，接着与草酰乙酸反应转化为氟柠檬酸盐，不可逆地与 ACO 结合，使得底物柠檬酸不能与 ACO 结合，从而中断了乙醛酸循环，抑制植物根系生长。因此，阻止 FAc 进入乙醛酸循环将导致植物对 FAc 的耐受性增强。2007 年，Hooks MA 等人发现 *cts* 突变体对 FAc 的抗性增加^[117]。与野生型相比，*cts* 突变体（*acn2/pxa1/cts1*）的子叶正常扩张，根系正常生长（图 1.17A），表现出 FAc 抗性；当 *cts* 突变体被回补时，FAc 抗性消失，根系生长被抑制，与野生型类似。这些结果表明 CTS 在介导 FAc 敏感性中发挥作用。此外，作者通过 ¹⁴C 标记乙酸盐的喂养实验发现，*cts* 突变体（*acn2/cts-1*）中可溶性碳水化合物（CHO）的放射性 ¹⁴C 含量与野生型相比显著减少，说明 *cts* 突变体中乙酸转化为碳水化合物的能力降低。这些结果表明，CTS 可能参与转运乙酸盐进入过氧化物酶体。

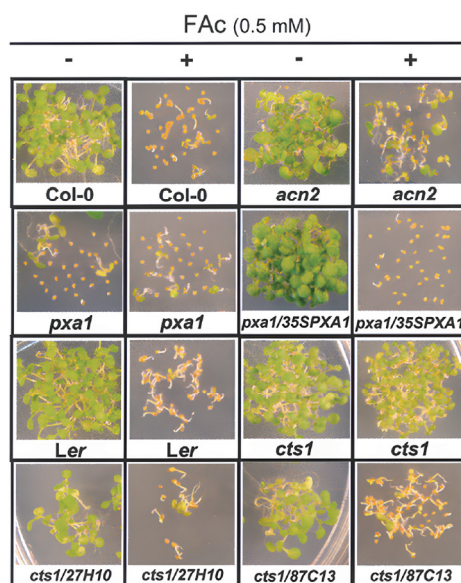


图 1.17 野生型与 *cts* 突变体的 FAc 抗性以及对外源 ^{14}C 乙酸盐利用率的比较^[117]

图注: *cts* 突变体 (*acn2/pxa1/cts1*) 均进行破坏种皮处理; 野生型 (Col-0/Ler) 以及突变型回补植株均未处理。所有种子接种到含有 20 mM 蔗糖以及相应浓度 FAc 的培养基上, 生长 8 日后进行拍照。

CTS 介导的脂肪酸 β 氧化也在长时间黑暗下的叶片代谢中发挥作用^[118]。黑暗诱导 CTS 表达上调^[119]。在长时间黑暗条件下, 叶片细胞中的淀粉消耗殆尽, 叶绿体膜被水解并释放游离脂肪酸, 这些脂肪酸被 CTS 蛋白转运至过氧化物酶体进行 β 氧化产生能量, 多余的则转化为 TAG 被储存起来 (图 1.18A)。当 CTS 功能缺陷时, 游离脂肪酸积累过多, 使得类囊体与包膜解体, 叶片薄壁细胞塌陷且细胞区室消失; 叶绿素分解, 细胞中积累高浓度的脱镁叶绿酸 a (pheophorbide a, PhA), 叶片坏死, 呈蓝绿色且出现斑点, 即使恢复光照也无法恢复表型^[118]。此外, CTS 介导的脂肪酸 β 氧化也为叶片气孔开放提供能量来源^[120]。在光诱导的气孔开放过程中, 储存于保卫细胞脂滴 (lipid droplet, LD) 中的三酰甘油 TAG 被脂肪酶 SDP1 水解从而提供脂肪酸, 随后脂肪酸通过 CTS 蛋白转运进入过氧化物酶体进行 β 氧化最终产生气孔开放所需的 ATP (图 1.18B)。当 CTS 发生突变时, 气孔开放程度显著降低, 脂肪酸利用率降低, 脂滴体积几乎没有变化^[120]。

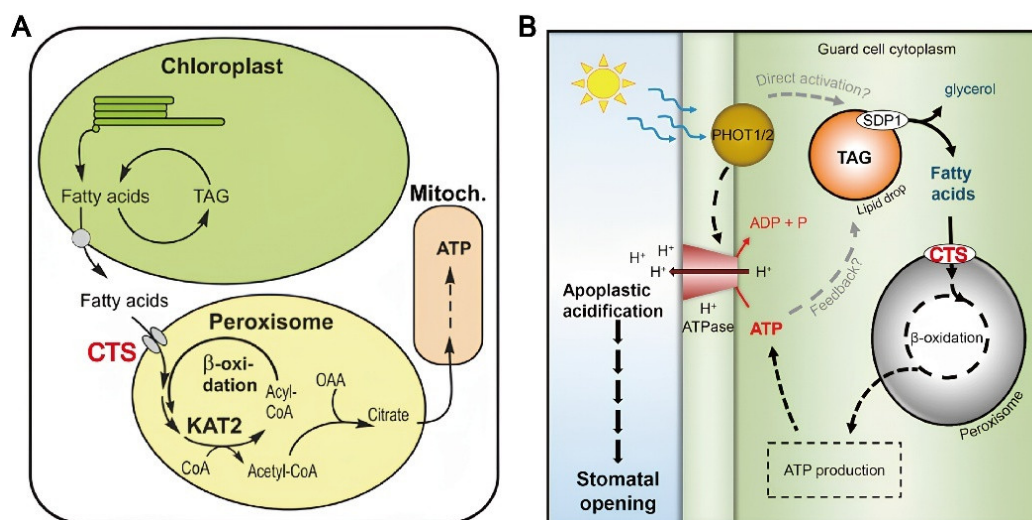


图 1.18 CTS 介导脂肪酸 β 氧化在叶片组织中的作用^[118,120]

图注：A. 长时间黑暗下 CTS 转运叶绿体膜脂来源的脂肪酸进入过氧化物酶体进行 β 氧化提供能量。B. 光诱导的气孔开放过程中 CTS 转运 TAG 来源的脂肪酸进入过氧化物酶体进行 β 氧化提供能量。

除了营养器官, CTS 介导的脂肪酸 β 氧化在生殖器官中也发挥重要功能^[121]。开花植物的受精是一个多步骤过程, 需要将花粉精子细胞运输到位于花朵底部的胚珠^[122]。随着花药开裂, 花粉落在柱头, 接着发芽长出花粉管并穿过柱头的细胞壁形成精子传播管道。由于花粉通常过多, 花粉管必须争夺胚珠, 因此快速生长是雄性生殖成功的关键^[123]。成熟花粉会积累脂质并以 TAG 的形式储存, 为花粉管生长提供能量来源。在 *cts* 纯合突变体中, 脂肪酸无法进入过氧化物酶体通过 β 氧化提供能量, 花粉管生长受损, 使得花粉粒中的精子以及其他内容物无法进入胚珠, 导致 *cts* 突变体出现生育缺陷, 胚珠受精减少以及胚胎流产, 生成的角果变短。

1.4 CTS 参与生长素 IAA 合成

生长素 (auxin) 是一类含有一个双杂环和一个羧基侧链的植物内源激素, 参与调节植物生长和形态发生。生长素生物学的主要假设之一认为生长素是一种形态发生素, 生长素梯度决定了发育结果^[124-127]。外源生长素处理对植物生长发育的影响与浓度有关: 低浓度的生长素通常会促进生长, 高浓度的外源生长素会抑制生长^[128,129]。最常见的生长素包括吲哚乙酸 (3-indoleacetic acid, IAA)、吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid, IBA)、4-氯吲哚-3-乙酸 (4-chloroindole-3-acetic acid, 4-Cl-IAA) 以及苯基乙酸 (phenylacetic acid, PAA) (图 1.19), 其中 IAA 是植物中最丰富的生长素。生长素作为一种植物激素, 即使在低浓度条件下也可以调控特定的基因表达从而对环境做出应答, 因此将细胞中活性生长素维持在适当的浓

度对于调节植物生长发育十分重要。细胞生长素水平可以通过从头生物合成、运输以及前体和修饰的生长素相互转化来改变。

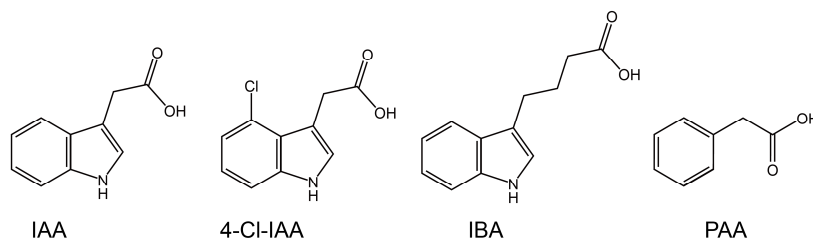
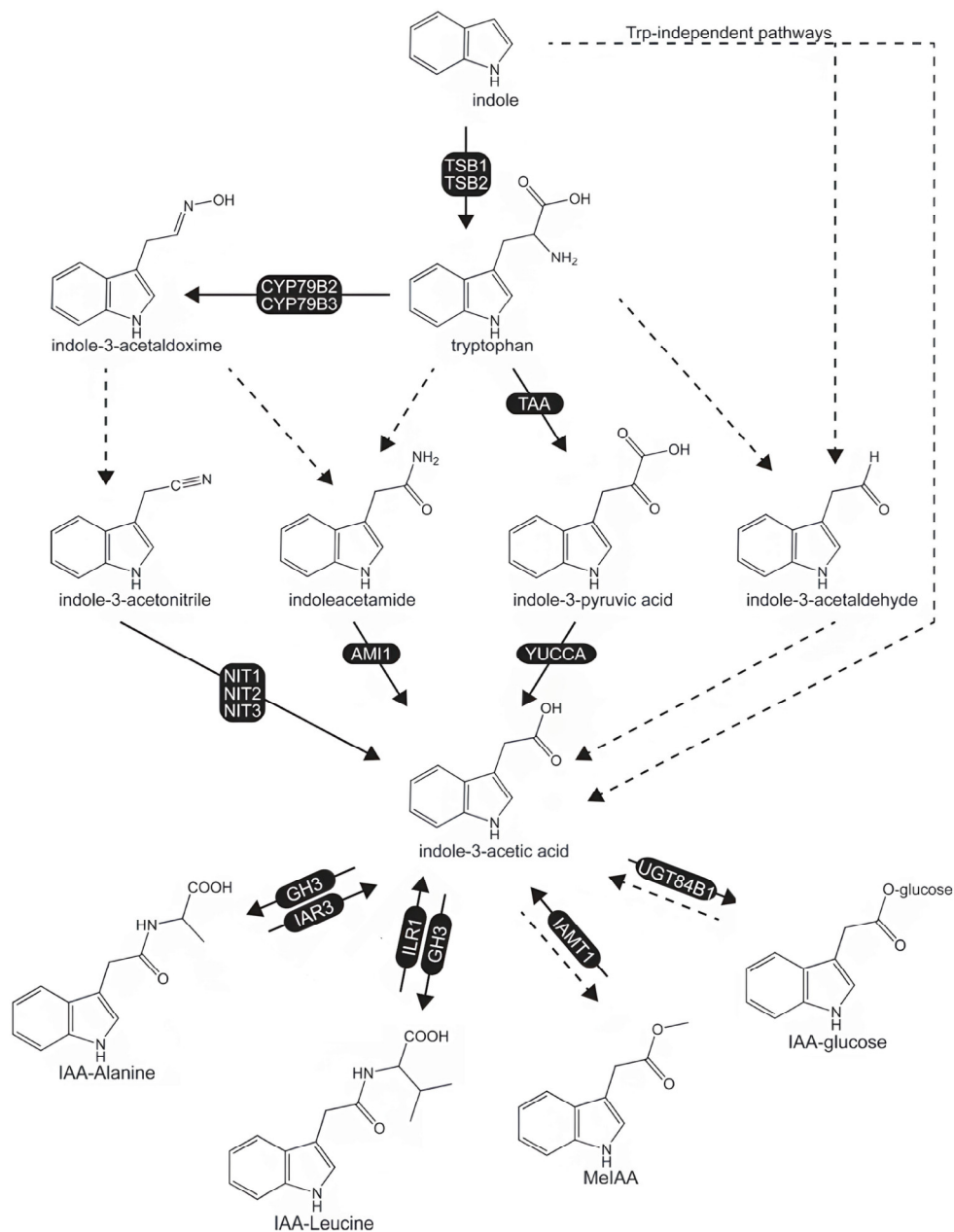


图 1.19 植物中天然生长素的化学结构

1.4.1 生长素 IAA 的生物合成

IAA 是研究最广泛的天然活性生长素，主要合成部位在幼嫩的芽、叶、根尖以及发育的种子中^[130]。在拟南芥中，IAA 的生物合成主要通过两种方式：色氨酸 (Trp) 依赖方式以及非色氨酸依赖方式^[131]，其中色氨酸依赖方式包括吲哚-3-乙醛肟(indole-3-acetaldoxime, IAOx)途径、吲哚-3-丙酮酸(indole-3-pyruvic acid, IPyA)途径、吲哚乙酰胺(indoleacetamide, IAM)途径(图 1.20)。其中，IPyA 途径是 IAA 的主要合成途径，也是研究最透彻的一种途径，在整个植物界中高度保守，包括拟南芥^[132,133]、水稻^[134,135]、玉米^[136,137]、牵牛花^[138]以及地钱^[139]等。该途径包含两步酶催化的反应^[133]。首先，色氨酸在拟南芥色氨酸氨基转移酶(Trp aminotransferase of *Arabidopsis*, TAA)作用下将氨基转移至丙酮酸或 α -酮戊二酸从而生成 IPyA^[140]；随后在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)以及氧分子存在下，黄素单加氧酶 YUCCA 将 IPyA 氧化脱羧转化为 IAA^[132,141]，这一步也是 IPyA 途径的限速步骤。IAA 生物合成受到严格监管，当 IPyA 水平升高时，另一种氨基转移酶 VAS1 则会将 IPyA 转化为 Trp^[142]。生成的 IAA 可以在 IAA-氨基酸合成酶(Indole-3-acetic acid-amido synthetase) GH3 作用下与氨基酸(如丙氨酸 Ala、亮氨酸 Leu 等)偶联，也可以在 UDP 糖基转移酶(UDP glucosyltransferase) UGT84B1 作用下与葡萄糖偶联，还可以在 IAA 羧甲基转移酶(IAA carboxymethyl transferase) IAMT1 作用下被甲基修饰形成 IAA 甲酯(MeIAA)^[143]。通过这些偶联修饰，IAA 可以转化成非活性形式(图 1.20)，后续在酰胺水解酶(IAA amidohydrolase, IAH)的作用下，这些偶联修饰的 IAA 可以重新转化为具有活性的游离 IAA。值得注意的是，当 IAA 在 GH3 作用下与天冬氨酸 Asp 以及谷氨酸 Glu 偶联后，IAA-Asp 以及 IAA-Glu 将不可水解为游离 IAA，并且可以转化为氧化 IAA-Asp(oxIAA-Asp)最终进入分解代谢途径。此外，IAA 也可以转化为非活性的前体 IBA^[144]储存。这些以非活性形式存在的生长素在特定条件下可以通过水解或者 β 氧化转化为 IAA，从而调节生长素稳态，将生长素维持在适当的浓度。

图 1.20 IAA 及其衍生物的生物合成通路示意图^[143]

图注：合成通路中各反应用箭头表示。实线代表参与该反应的酶被鉴定，虚线代表参与该反应的酶未被鉴定。IAR3、ILR1 均为 IAA-氨基酸水解酶。TSB，色氨酸合成酶 B 亚基（tryptophan synthase subunit B）；CYP79B，细胞色素 P450 单加氧酶 79B（cytochrome P450 monooxygenase 79B）；IAMT1，酰胺酶（amidase 1）；NIT，腈酶（nitrilase）。

1.4.2 IAA 信号通路

生长素是植物生长发育的核心调节因子。IAA 是天然存在的主要生长素，可以通过调控细胞分裂与伸长从而调节多种发育事件，如胚胎极化、维管束分化、向光性生长以及顶端优势等^[131]。生长素之所以可以调控这些发育事件的原因在

于其能够调控成百上千个基因的表达,这种转录调控的核心是生长素可以增强泛素介导的转录抑制蛋白 Aux/IAA 的降解^[131] (图 1.21)。

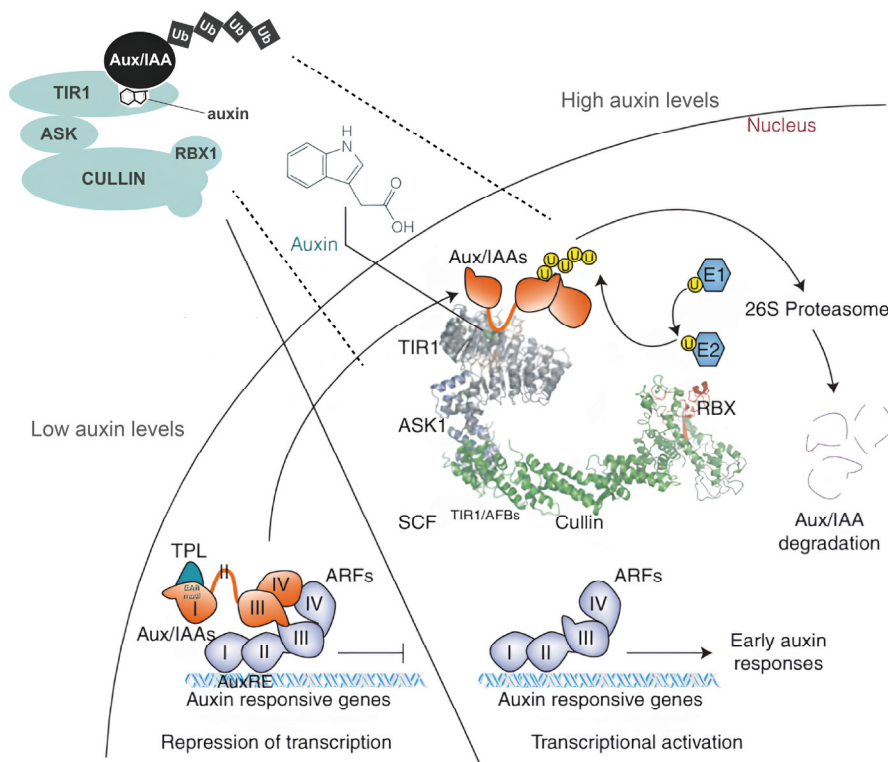


图 1.21 生长素信号传导模型^[145,146]

图注:IAA 通过增强转录抑制蛋白 Aux/IAA 与受体 TIR1 的相互作用,促进 Aux/IAA 蛋白降解,从而恢复生长素响应因子 ARF 的活性,促进早期生长素反应基因转录。TIR1, IAA 受体 (Transport inhibitor response 1); ASK, 拟南芥 SKP 亚基 (Suppressor of kinetochore protein); RBX1, E3 泛素连接酶复合物 SCF 的组成亚基 (RING box1); FBP, F-box 蛋白 (F-box protein); ARF, 生长素响应因子 (Auxin response factor)。

研究表明, TIR1 (Transport inhibitor response 1) 与 AFB (Additional F box protein) 蛋白是生长素受体^[147-149], 均以生长素依赖性方式与 Aux/IAA 蛋白相互作用。TIR1 是一种 F-box 蛋白, 作为 E3 泛素连接酶复合物 SCF^{TIR1} 的一个组分。E3 泛素连接酶负责催化靶蛋白的泛素化, 从而导致 26S 蛋白酶体中靶蛋白的快速降解。SCF 型 E3 泛素连接酶由四个组分组成 (图 1.21), 包括 SKP 亚基 (Suppressor of kinetochore protein, 拟南芥中称为 ASK 蛋白)、Cullin 亚基、RBX1 亚基 (RING box1) 以及 FBP (F-box 蛋白) 亚基^[146], 其中 Cullin 亚基与 RBX1 亚基构成 SCF 复合物的核心, 可与不同的 SKP-FBP 亚复合物结合并募集 E2 泛素偶联酶^[145]。在拟南芥中, 生长素受体 TIR1 通过富含亮氨酸重复序列结构域 LRR (Leucine-rich repeat) 与靶蛋白 Aux/IAA 结构域 II 内一个短的“degron”基序相互作用^[150]。生长素在这个过程中充当“分子胶”的功能, 当生长素与受体 TIR1

结合时可以增强 TIR1 与靶蛋白 Aux/IAA 的相互作用, 使得 SCF^{TIR1}-生长素-Aux/IAA 复合物成为调控基因表达去抑制的枢纽, 即当生长素水平较低时, 转录抑制蛋白 Aux/IAA 稳定存在, 与生长素响应因子 ARF (Auxin response factor) 结合形成非活化的异源二聚体, 抑制早期基因的转录; 随着生长素水平升高, 生长素介导 Aux/IAA 与 E3 泛素连接酶 SCF^{TIR1} 相互作用, 促进 Aux/IAA 蛋白被降解, 使得 ARF 恢复活性, 促进了早期生长素反应基因的转录 (图 1.21)。

1.4.3 IBA 通过 β 氧化转化为 IAA

除了通过 IPyA 途径从头合成 IAA 之外, 活性生长素的水平还可以通过储存的前体 IBA 转化而来。研究表明拟南芥以及玉米等植物可以利用 ATP 作为能量来源, 将 IAA 与乙酰辅酶 A 转化为 IBA^[151]。IBA 最早作为一种合成化合物被发现, 外源施加 IBA 可以促进植物根生成、茎弯曲以及叶伸长等类似的生长素反应^[152], 因此常用于诱导茎插条繁殖中不定根的生成。后续的实验结果证明, IBA 是一种内源性生长素, 存在于多种植物中, 包括拟南芥^[153]、玉米^[154]、胡萝卜^[155]、烟草^[156]、豌豆^[157]、马铃薯^[158]、金莲花^[159]等, 这也表明 IBA 在生长素稳态中具有保守作用。

在拟南芥中, IBA 的浓度低于 IAA^[153]。与 IAA 类似, IBA 也可以被氨基酸以及葡萄糖偶联^[143] (图 1.22), 且大多数被偶联修饰的 IBA 作为非活性形式储存, 只有少部分以游离形式存在^[153]。IBA 的化学结构与 IAA 相似, 不同之处在于 IAA 羧基侧链只有两个碳原子, 而 IBA 羧基侧链有四个碳原子 (图 1.19)。正是由于这种延长的侧链, 使得 IBA 无法和 IAA 一样结合生长素受体 TIR1^[160], 需要转化为 IAA 才能发挥生长素的功能。除此之外, IBA 与 IAA 羧基侧链长度的差异也使得二者通过不同的载体蛋白进行转运。具体而言, AUX/LAX 蛋白家族向细胞内转运 IAA^[161], PIN 家族以及 ABCB 家族蛋白介导 IAA 的细胞外排^[162,163]; 然而, IBA 外排主要由 ABCG36 以及 ABCG37 蛋白介导^[164,165], 向细胞内转运 IBA 的载体蛋白研究较少, 目前还未被鉴定。

遗传学证据表明, 拟南芥 IBA 的生长素活性很可能依赖类似于过氧化物酶体中脂肪酸 β 氧化过程转化为 IAA^[166,167] (图 1.22)。与脂肪酸 β 氧化不同, 一些特异性的酶参与 IBA 转化为 IAA 的 β 氧化过程, 包括短链脱氢酶/还原酶 IBR1 (Indole-3-butyric acid response 1)^[168]、酰基辅酶 A 脱氢酶 IBR3^[169]、烯酰基辅酶 A 水合酶 IBR10^[168]以及 ECH2 (Enoyl-CoA hydratase 2)^[170]。当编码这些酶的基因发生突变时, 拟南芥的脂肪酸 β 氧化过程不受影响, 但根尖中 IAA 水平降低, 子叶面积减小, 子叶维管的形态发育异常, 表皮细胞变小且形状异常, 叶脉分叉变少^[170]。此外, 突变体的根毛发育出现缺陷, 其根毛比野生型植株更短

[167]; 幼苗顶端钩弯曲也存在缺陷, 弯曲率降低, 存在时间变短[170]; 高温下诱导下胚轴伸长的能力也降低[170]。不仅如此, 与野生型相比, 突变体的侧根数量减少, 即使外源添加 IBA, 其侧根数量也远少于野生型[170]; 突变体的根尖分生组织与野生型相比也变短, 根的宽度也减小, 整个根尖分生组织变小[170]。这些现象表明, IBA 衍生而来的 IAA 对拟南芥的生长发育过程十分重要。

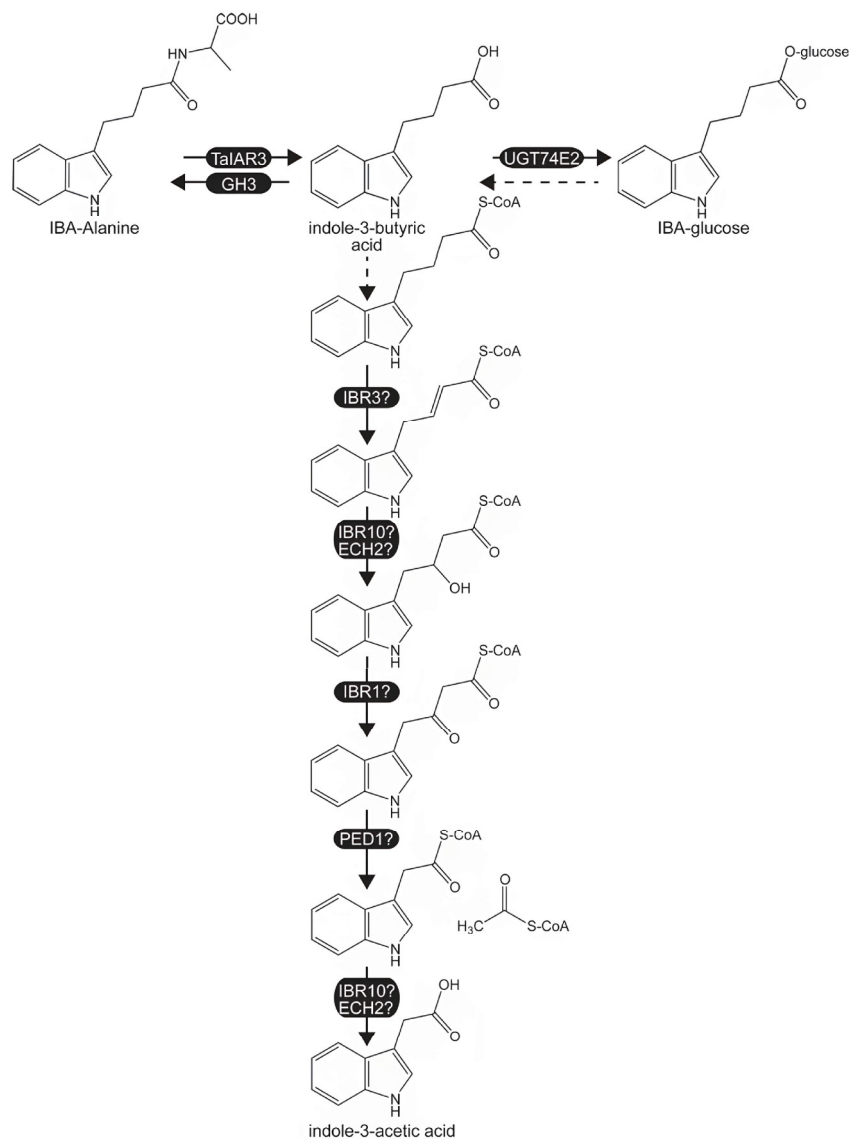


图 1.22 IBA 通过 β 氧化生成 IAA 的潜在通路示意图^[143]

图注: 合成通路中各反应用箭头表示。实线表示参与该反应的酶被鉴定, 虚线表示参与该反应的酶未被鉴定。问号表示该通路已通过遗传性手段鉴定但尚未通过生化方法证实。TaLAR3, 小麦 IBA-氨基酸水解酶; UGT74E2, UDP 糖基转移酶; PED1, 3-酮酰基辅酶 A 硫醇酶 2。

1.4.4 除草剂 2,4-DB 的作用机制

2,4-二氯苯氧丁酸 (2,4-dichlorophenoxy butyric acid, 2,4-DB) 是一种合成的

生长素类激素，于 1947 年被发现，随后在农业生产中作为一种选择性除草剂被广泛用^[171]。将 2,4-DB 喷洒于植物叶面可控制许多一年生以及多年生阔叶双子叶杂草，可以用于花生、大豆、紫花苜蓿以及春大麦（播种前使用）的种植。施用后，2,4-DB 很容易被叶子与根吸收，并在植物体内转运。

2,4-DB 的选择性在于敏感的阔叶植物可以将其转运并迅速通过 β 氧化转化为活性成分 2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)^[60]。2,4-D 与天然生长素 IAA 结构相像（图 1.23），且具有相似的作用模式，可与生长素受体 TIR1 结合从而引发生长素反应^[150]。然而，天然生长素通常在 IAA-氨基酸偶联酶 GH3 的作用下转化为 IAA-Ala、IAA-Leu 等非活性形式，或者转化为 IAA-Asp、IAA-Glu 进入降解途径^[172]。GH3 催化 Asp 以及 Glu 偶联 2,4-D 的活性远低于 IAA，且合成的 2,4-D-Asp 以及 2,4-D-Glu 可以再水解为游离的 2,4-D，这使得 2,4-D 在植物体内具有很高的稳定性，从而导致生长素反应不受控制，引起敏感植物不规则生长^[173]、气孔关闭、活性氧积累等现象，最终导致植物组织坏死^[174]。此外，过量积累的 2,4-D 通过诱导生长素反应基因的表达，从而诱导乙烯的生物合成以及脱落酸 ABA 的产生，乙烯与 ABA 均抑制细胞分裂并刺激叶片衰老，从而抑制生长并伴随组织损伤，最终导致植物死亡^[175]（图 1.23）。值得注意的是，豆科植物由于氧化速率缓慢，产生的代谢物 2,4-D 未达到有毒剂量因而不被影响。

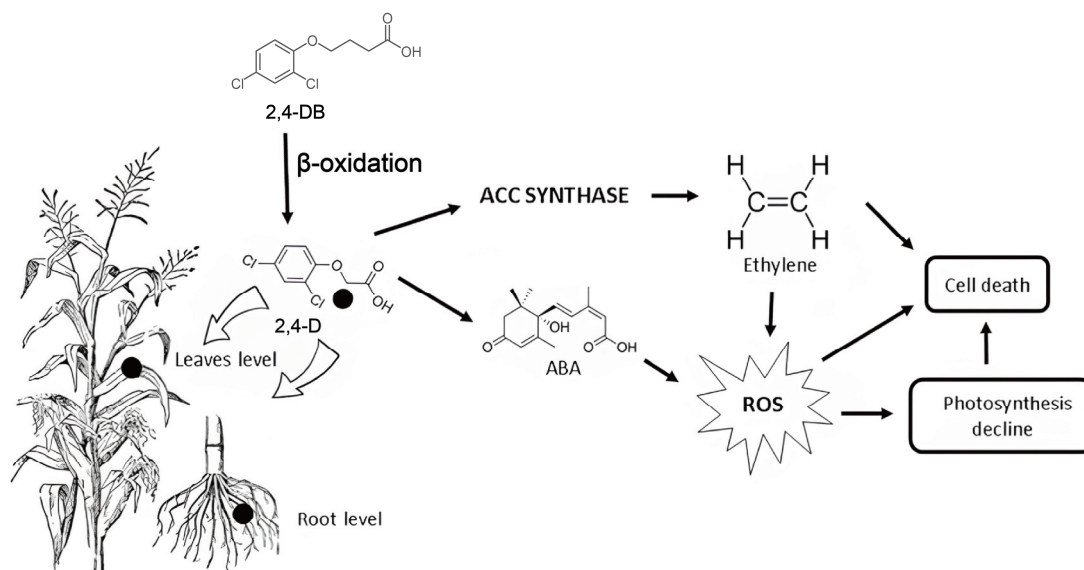


图 1.23 除草剂 2,4-DB 对目标杂草的作用机制^[175]

图注：ACC，1-氨基环丙烷-1-羧酸（1-aminoacyclopentane-1-carboxylate）；ABA，脱落酸（abscisic acid）；ROS，活性氧（reactive oxygen species）。

1.4.5 CTS 转运 IBA 进入过氧化物酶体生成 IAA

生长素影响植物的生长发育，包括根伸长、侧根生长、器官发育^[176]。IBA 被

证明与 IAA 一样，都是植物中天然存在的生长素^[153,154]。用同位素标记生长素进行的实验表明，许多植物可以将 IBA 转化为 IAA，包括苹果^[177]、橄榄^[178]、葡萄^[178]、梨^[179]、豌豆^[180]、豆类^[181]和玉米^[182]。由于 IAA 侧链比 IBA 少两个碳，人们认为 IBA 到 IAA 的转化类似于脂肪酸 β 氧化过程。

IBA 具有诱导生根的作用，在农业中应用广泛。高水平的外源生长素抑制主根伸长。为了探究这种内源性生长素在植物体内的作用，2000 年 Bethany K. Zolman 等人在研究 IBA 功能时发现 CTS 突变后不再响应 IBA，即突变体植株在添加 IBA 时对根伸长的抑制作用具有抗性^[46,166]。野生型 Col-0 在高浓度 IBA 以及 IAA 作用下主根伸长受到抑制，*cts* 突变体在一定浓度范围内都能抵抗 IBA 对主根伸长的抑制（图 1.24A），但 IAA 仍然能抑制主根伸长（图 1.24B），这表明在 *cts* 突变体中 IBA 转化为 IAA 过程出现缺陷。此外，*cts* 突变体在侧根形成方面也存在缺陷。在未添加生长素的培养基上，野生型 Col-0 形成的侧根很少，*cts* 突变体无侧根生成。当培养基中加入 IBA 以及 IAA 时，野生型 Col-0 的侧根变多，*cts* 突变体仍然没有侧根生成，对 IBA 具有抗性；然而在培养基中添加 IAA 时，*cts* 突变体会生成与野生型类似数目的侧根（图 1.24C）。即使将生长期延长，添加 IBA 能强烈地刺激野生型生成侧根，而 *cts* 突变体在 IBA 处理下没有产生额外的侧根（图 1.24C）。

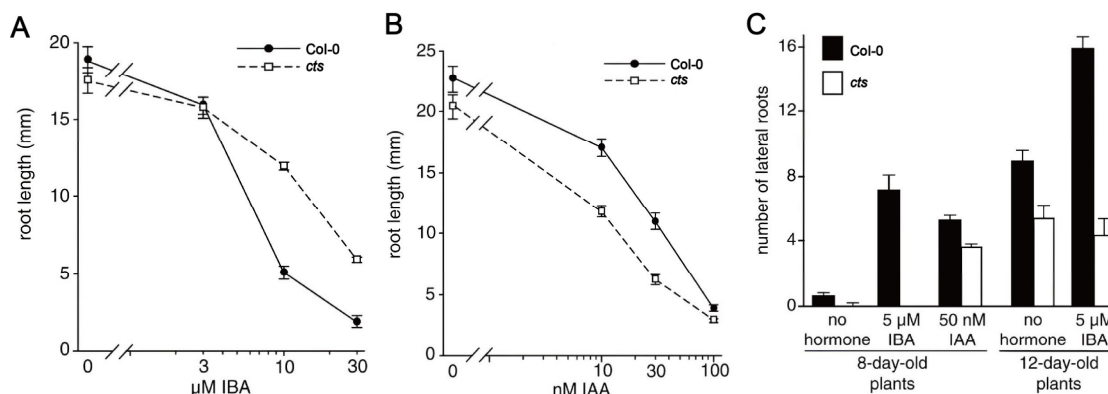


图 1.24 *cts* 突变体对 IBA 具有抗性^[46]

图注：A. IBA 对主根伸长的影响。测量在添加指定浓度 IBA 的培养基上生长的 8 日龄野生型 Col-0 和 *cts* 突变体幼苗主根的长度。B. IAA 对主根伸长的影响。测定方法于 A 相同。C. *cts* 突变体在侧根形成方面缺陷。野生型和 *cts* 突变体幼苗在无激素培养基中生长 4 或 6 天，然后转移到无激素、5 μ M IBA 以及 50 nM IAA 培养基中。8 或 12 天后计算侧根的数量。

为了证实这种表型是由 *cts* 的突变导致，作者将野生型 *cts* 构建到 p35S 载体，随后转化到突变体植株中。回补后的植株在没有添加蔗糖的培养基上正常发育，恢复了脂肪酸 β 氧化的能力。此外，回补后的植株在添加 IBA 时主根伸长

受到抑制，并且恢复了形成侧根的能力。这些结果表明，CTS 参与 IBA 至 IAA 的转化，即转运 IBA 进入过氧化物酶体进行 β 氧化。类比脂肪酸以辅酶 A 修饰的形式被 CTS 转运进入过氧化物酶体，IBA 可能也以辅酶 A 修饰的形式被 CTS 转运。

除了根系发育，CTS 介导 IBA 至 IAA 的转化也参与雄蕊发育。在 *cts* 突变体中，花的形态正常，但花丝伸展与野生型相比较为延迟^[121]。在第 13 阶段花期时，*cts* 突变体的长雄蕊与雌蕊长度之比低于野生型（图 1.25A），将野生型 *cts* 基因回补可以恢复该比例。外源喷洒茉莉酸 JA 并不能改善花丝延迟伸展的表型，但合成生长素类似物 1-萘乙酸（NAA）以及 IAA 可恢复花丝的延伸，与野生型类似（图 1.25B）。这些结果表明，*cts* 突变体中花丝延伸延迟是由于缺少 IAA 导致。

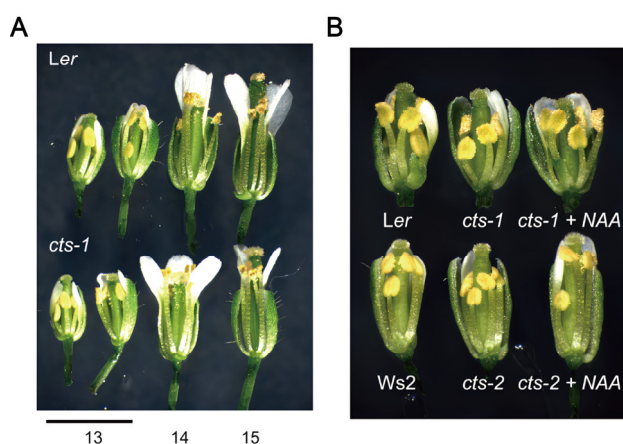


图 1.25 *cts* 突变体的花丝表型^[121]

图注：A. 拟南芥野生型 *Ler* 以及突变体 *cts-1* 初级花序的花蕊照片。B. 野生型 *Ler*/*Ws*、突变体 *cts-1/2* 以及 10 μ M NAA 处理的突变体的花蕊照片。

1.5 CTS 参与茉莉酸的生物合成

植物生长在千变万化的自然环境中，面临着很多不利于生长以及生存的挑战^[183]，如致病性细菌、昆虫、食草动物等生物压力因素，以及干旱、盐碱、极端温度等非生物压力因素^[184,185]。作为无法移动的生物体，植物进化出了复杂的反应机制来抵抗、减轻这些挑战带来的影响^[186]。植物激素作为一种重要的调节因子，参与对各种环境信号的感知、传递以及随后的防御反应。到目前为止，人们已经发现九大类天然植物激素，分别是生长素（auxin）、细胞分裂素（cytokinin, CTK）、赤霉素（gibberellin, GA）、脱落酸（abscisic acid, ABA）、乙烯（ethylene, ET）、油菜素内酯（brassinosteroid, BR）、茉莉酸（jasmonic acid, JA）、水杨酸（salicylic acid, SA）以及独角金内酯（strigolactone, SL）^[187]。在这些激素中，茉莉酸广

泛存在于高等植物中，在响应逆境与防御机制领域受到了广泛关注。

1.5.1 茉莉酸的生物合成

茉莉酸 JA 属于化学结构多样化的氧合脂肪酸家族，氧合脂肪酸也称为氧脂素 (oxylipins)，由多不饱和脂肪酸自氧化或者酶催化氧化产生。茉莉酸及衍生物茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)、异亮氨酸缀合物 (JA-Ile) 等，统称为茉莉酸盐 (jasmonates, JAs) [188]。1962 年，Demole E 等人首次在大花茉莉精油中分离出 MeJA [189]，随后在 1971 年，Aldridge D.C 等人在甘蔗的培养液中检测到游离 JA，并且首次报道了 JA 具有抑制植物生长的作用 [190]。JAs 在高等植物中普遍存在，其中生殖组织以及花中 JA 含量较高，成熟的叶以及根中含量非常低 [191,192]。JAs 在植物生长发育过程中发挥着多种调控作用，例如调控胚胎发生过程中的轴伸长、花发育、叶片衰老、根生成以及气孔开放等 [193]。此外，许多研究表明在不利的环境条件下，JAs 通过一系列信号通路来提高植物的抗逆性。

茉莉酸的生物合成是通过十八烷 (来源于 C18:3) 或者十六烷 (来源于 C16:3) 途径进行的，拟南芥存在这两种途径 [194,195]，而马铃薯以及许多其他植物不含 C16:3，因此只利用十八烷途径进行茉莉酸生物合成 [75]。在拟南芥中，茉莉酸的从头合成发生叶绿体和过氧化物酶体 (图 1.26)。当拟南芥受到机械损伤或病原体感染时，一种多肽信号分子前体蛋白 PROPEP1 (由 92 个氨基酸组成) 将被水解为具有活性的小肽 PEP1 (由 23 个氨基酸组成) [196]。随后 PEP1 与质膜上的受体 PEPR1 以及 PEPR2 结合 [197,198]，最终激活叶绿体膜上的磷脂酶 A1 (phospholipase A1, PLA1) 水解叶绿体类囊体膜上的半乳糖苷脂并释放 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, α -LeA) [199] (图 1.26)。在叶绿体中， α -LeA 在 13-脂氧合酶 (13-lipoxygenase, 13-LOX) 作用下生成 13-羟基十八碳三烯酸 (13-hydroperoxyoctadecatrienoic, 13-HPOT)。接着，13-HPOT 在氧化丙烯合成酶 (allene oxide synthase, AOS) 催化下转化为 12,13-环氧十八碳三烯酸 (12,13-epoxyoctadecatrienoic acid, 12,13-EOT)，然后在环氧丙烷环化酶 (allene oxide cyclase, AOC) 作用下生成茉莉酸前体 12-氧代植物二烯酸 (12-oxophytodienoic acid, OPDA)。随后，OPDA 被叶绿体内膜转运蛋白 OPDAT1 [200] 以及外膜蛋白 JASSY [201] 转运出叶绿体。大部分 OPDA 通过过氧化物酶体膜上的 CTS 蛋白转运进入过氧化物酶体，部分 OPDA 可能以游离酸形式渗透进入过氧化物酶体 [202]。在进入过氧化物酶体后，OPDA 在 OPDA 还原酶 3 (OPDA reductase 3, OPR3) 作用下转化为 3-氧代-2 (顺式-2'-戊烯基)-环戊烷-1-辛酸 [3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid, OPC-8]。随后 OPC-8 经过三轮 β 氧化反应，在酰基辅酶 A 氧化酶 (acyl-CoA oxidase, ACX)、多功能蛋白 (multifunctional

protein, MFP) 以及 3-酮酰基辅酶 A 硫解酶 (3-ketoacyl-CoA thiolase, KAT) 催化下转化为 JA。接下来, JA 被输出到细胞质中, 在 JA-Ile 合成酶 (JA-amino acid synthetase, JAR1) 催化下与 Ile 结合生成具有生物活性的 JA-Ile, 最后被 JA-Ile 转运蛋白 1 (JA-Ile transporter 1, JAT1) 转运进入细胞核并激活下游信号通路^[203]。

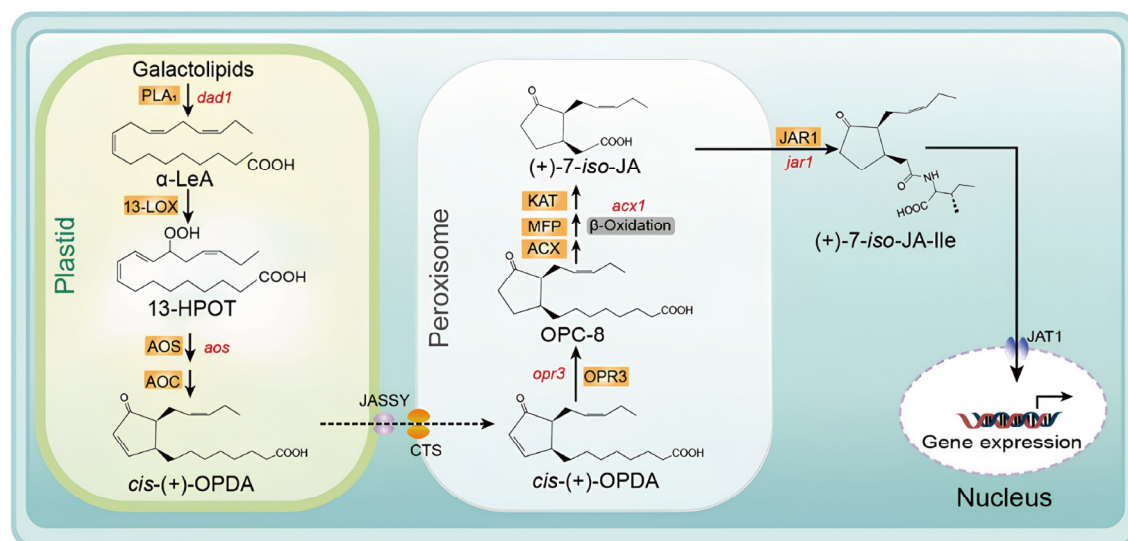
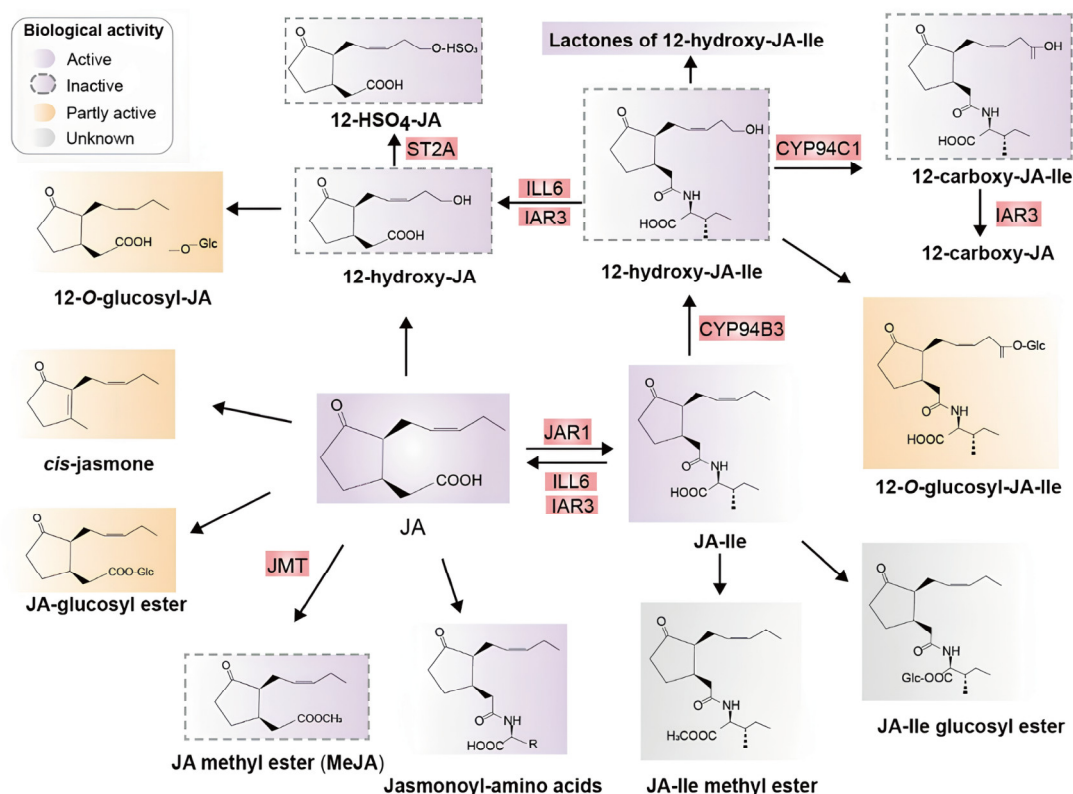


图 1.26 茉莉酸 JA 及 JA-Ile 的生物合成过程^[204]

图注: 参与 JA 生物合成的酶用橙色突出显示, 对应的基因用红色字体表示。 α -LeA, α -亚麻酸 (α -linolenic acid); PLA1, 磷脂酶 A1 (phospholipase A1); 3-HPOT, 13-羟基十八碳三烯酸 [(13S)-hydroperoxyoctadecatrienoic acid]; 13-LOX, 13-脂氧合酶 (13-lipoxygenase); AOS, 氧化丙烯合成酶 (allene oxide synthase); AOC, 环氧丙烷环化酶 (allene oxide cyclase); *cis*-(+)-OPDA, 顺式-(+)-12-氧-植物二烯酸 [*cis*-(+)-12-oxo-phytodienoic acid]; OPR3, OPDA 还原酶 3 (OPDA reductase 3); OPC-8, 3-氧-2-(顺-2-戊烯基)-环戊烷-1-辛酸 [3-oxo-2-(*cis*-2-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid]; ACX, 酰基辅酶 A 氧化酶 (acyl-CoA oxidase); MFP, 多功能蛋白 (multifunctional protein); KAT, 3-酮酰基辅酶 A 硫解酶 (3-ketoacyl-CoA thiolase); JAR1, JA-Ile 合成酶 (JA-amino acid synthetase); JAT1, JA-Ile 转运蛋白 1 (JA-Ile transporter 1, JAT1)。

1.5.2 茉莉酸代谢

JA 与 JA-Ile 合成后可以通过至少 12 种代谢途径, 包括氨基酸偶联、脱羧、磺化、羟基化、羧化、O-糖基化、甲基化、酯化以及内酯化生成多种衍生物 (图 1.27)。具体而言, JA 可以甲基化形成 MeJA, 糖基化生成 JA 糖基酯, 脱羧生成 12-OH-JA。此外, JA 也可以与氨基酸偶联, 如与 Ile 形成 JA-Ile。JAs 失活可以通过羟基化完成, 即 JA 与 JA-Ile 分别羟基化生成无活性的 12-OH-JA 与 12-OH-JA-Ile, 这些产物可以继续被磺化以及羧化为其他形式的非活性 JAs。

图 1.27 JA 代谢生成的茉莉酸盐^[204]

图注：参与这些转化过程的酶用红色突出显示。具有生物活性的化合物用紫色背景表示；无活性的化合物用虚线框表示；部分活性的化合物用橙色背景表示；未知的化合物用灰色背景表示。CYP94B3，JA-Ile-12 羟化酶；CYP94C1，12-OH-JA-Ile 羧化酶；IAR3 与 ILL6 均为酰胺水解酶。JAR1，JA-Ile 合成酶（jasmonyl isoleucine synthetase）；JMT，JA 甲基转移酶（JA methyltransferase）；ST2A，12-OH-JA 磺基转移酶（12-OH-JA sulfotransferase）。

1.5.3 茉莉酸信号通路

JA 信号通路存在两种模式：正常条件下处于抑制状态以及压力条件下处于激活状态（图 1.28）。当胞质中 JA-Ile 浓度非常低时，JA 信号通路处于抑制状态，参与 JA 生物合成的基因处于失活状态^[205]。在这种状态下，与基因启动子结合的各种转录因子（transcription factor, TF）被一系列转录抑制因子 JAZ（jasmonate zinc-finger inflorescence domain）蛋白抑制。JAZ 招募 topless (TPL) 蛋白以及 JAZ 新型相互作用因子（novel interactor of JAZ, NINJA），形成 JAZ 转录抑制因子封闭复合物（JAZ-NINJA-TPL 复合物）^[206]，该复合物进一步募集组蛋白去乙酰化酶 6（histone deacetylase 6, HDA6）以及组蛋白去乙酰化酶 19（HDA19），从而阻止 JA 反应基因的激活^[205,207-209]（图 1.28）。当处于压力条件下时，胞质中 JA-Ile 高浓度积累，随后通过核膜上 JA 转运蛋白 JAT1（也称为 ABCG16）转入细胞核^[205]。在细胞核中，SCF 复合物（COI1-ASK1-CUL1-RBX1）作为 E3 泛素连

接酶介导 JA 反应。首先,进入细胞核的 JA-Ile 被 SCF 复合物中的 F-box 蛋白 COI1 识别,随后共受体 JAZ 识别 JA-Ile,促进 JAZ 与 COI1 之间的相互作用^[210,211]。接着 JAZ 被泛素化,最终被 26S 蛋白酶体降解。随着 JAZ 降解,转录因子被激活,此时可与 G-box 元件结合并招募中介体蛋白 25(mediator 25, MED25),最终激活 JA 反应基因表达^[208]。

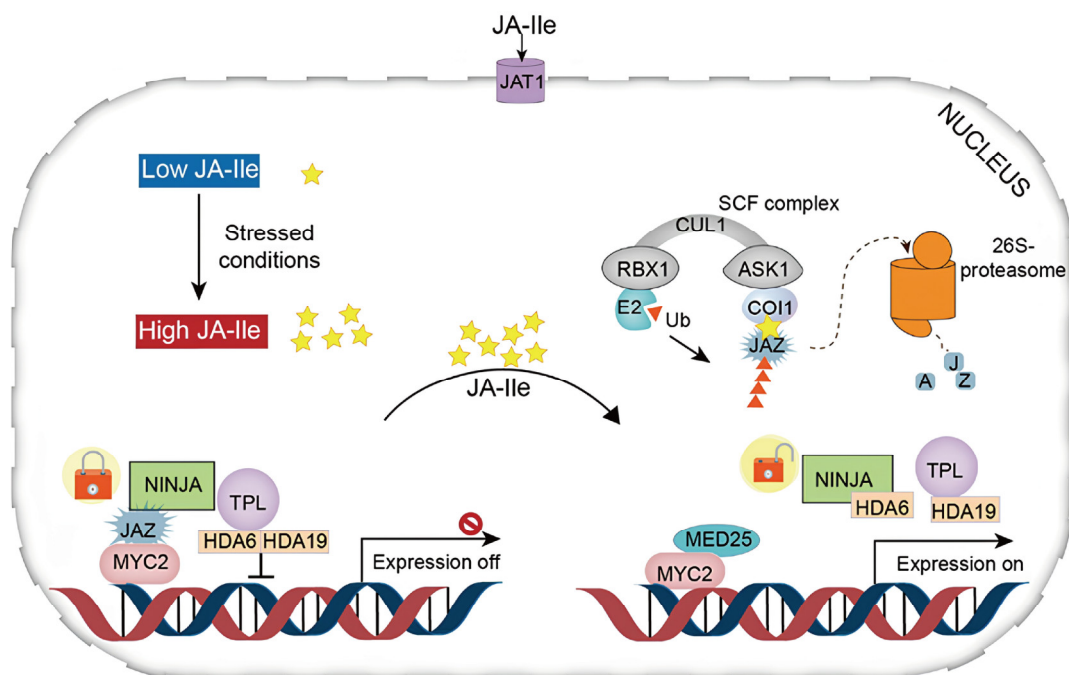


图 1.28 茉莉酸信号转导示意图^[204]

图注:在压力条件下,JA-Ile 促进 JAZ 与 SCF 复合物中的 COI1 相互作用,使得 JAZ 被蛋白酶体降解,转录因子被激活,促进 JA 反应基因表达。JAZ,茉莉酸锌指花序结构域[jasmonate zinc-finger inflorescence(ZIM) domain];NINJA, JAZ 新型相互作用因子(novel interactor of JAZ);HDA6 与 HDA19,组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase);Ub,泛素(ubiquitin);E2,泛素-结合酶(ubiquitin-conjugating enzymes);CUL1,支架蛋白 1(cullin 1);ASK1,拟南芥动粒蛋白 1(Arabidopsis kinetochore protein 1);COI1,冠菌素不敏感蛋白(coronatine insensitive 1);MED25,中介体蛋白 25(mediator 25);TPL,转录辅抑制因子(topless);RBX1, CUL1 调节蛋白(ring box 1)。

1.5.4 CTS 转运 OPDA 进入过氧化物酶体生成 JA

茉莉酸 JA 及其甲酯 JA-Me 是具有生物活性的脂质衍生物,在植物防御、代谢和发育中起着重要作用^[193]。JA 生物合成发生在叶绿体和过氧化物酶体中。在叶绿体中,亚麻酸在脂加氧酶 13-LOX、氧化烯合酶 AOS、氧化烯环化酶 AOC 作用下转化为前体 OPDA;随后,OPDA 进入过氧化物酶体被还原为 OPC:8,经过三轮 β 氧化反应生成 JA。由于 OPDA 与脂肪酸的结构相似,通常认为 OPDA

通过膜渗透自由进入过氧化物酶体，但由于 OPDA 本身就是一种重要的信号分子^[212,213]，在亚细胞区室之间运输可能受到高度调节^[214]，因此 OPDA 从叶绿体到过氧化物酶体的过程可能涉及膜上的转运蛋白。

早期的研究表明 CTS 介导脂肪酸以及 IAA 前体 IBA 转运到过氧化物酶体进行 β 氧化^[46,47]，Theodoulou Frederica.L 等人猜测 CTS 可能也转运 OPDA 进入过氧化物酶体，从而参与 JA 的生物合成^[202]。作者通过液相色谱-质谱法测定了两个 *cts* 突变体及其各自的野生型中 JA 和氧化脂质中间体的含量（图 1.29）。突变体 *cts1* 和 *cts2* 中 JA 含量明显低于野生型。*cts1* 突变体中 OPDA 含量与野生型 Ler 含量相似，但 *cts2* 中 OPDA 的含量与野生型 Ws 相比显著增加，这表明 JA 通路的调控可能存在与 CTS 无关的生态特异性差异。值得注意的是，在 *cts2* 突变体中，13-羟基-12-氧-十八烯二烯酸（ α -酮醇）和 9-羟基-12-氧-十八烯二烯酸（ γ -酮醇）的含量相对于野生型 Ws 显著升高，这些化合物是由不稳定的烯氧化物非酶水解形成^[215]。此外，拟南芥在 dnOPDA（十六烷酸 C16:3 的 JA 合成途径）处理后 α -酮醇含量增加^[195]。因此，*cts2* 突变体中酮醇含量增加可能反映了该突变体中 OPDA 含量的升高。

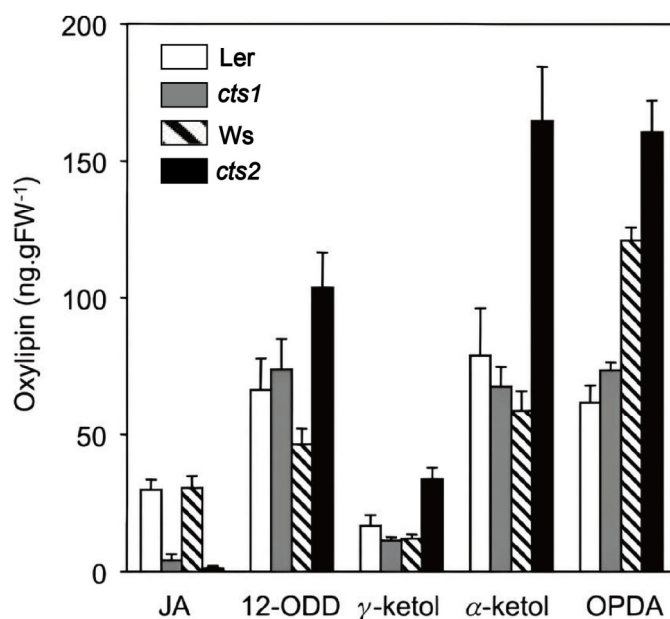


图 1.29 野生型以及 *cts* 突变体中 JA 以及氧化脂质中间体的含量测定^[202]

图注：野生型以及突变体植株在 22°C 下生长 13 天后，分别取 200 mg 莲座叶测定 JA 以及氧化脂质中间体的含量。数值为 8 个独立样本的平均值，且每个样本都进行了重复分析。

Theodoulou Frederica.L 等人还研究了 CTS 在伤口诱导 JA 形成中的作用^[202]。野生型 Ws 和突变体 *cts2* 的基础 JA 含量相差不多，然而两者在叶片受到损伤后出现了明显的差异：在野生型叶片中，伤口诱导 JA 含量增加；*cts2* 突变体叶片

损伤后 JA 含量虽然有所增加，但反应较慢，且明显低于野生型。这些结果表明 CTS 转运 JA 前体 OPDA 进入过氧化物酶体。值得注意的是，*cts* 突变体中仍存在低水平 JA，这可能是因为 OPDA 作为一种弱酸，可以以阴离子的形式被动扩散到过氧化物酶体从而产生少量 JA。

CTS 功能缺陷引起的 OPDA 积累不仅降低了 JA 的产生，还抑制了种子萌发。2000 年，Russell L 等人发现 *cts* 突变会使得拟南芥种子一直处于“休眠（comatose）”状态，种子发芽被严重抑制，发芽率很低（图 1.30A），即使添加促进萌发的赤霉素也不能改善突变体的休眠状态^[216]。然而，破坏种皮可以促进 *cts* 突变体种子的萌发^[217]，这表明 *cts* 基因突变可能影响种子萌发过程中种皮的水解。研究表明，*cts* 突变体种子中含有高水平 OPDA 积累，使得转录因子 ABI5 的表达上升^[218]。作为一种转录因子，ABI5 进一步诱导多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白（polygalacturonase inhibiting protein, PGIP）的表达，从而抑制种皮中果胶的降解（图 1.30B），最终导致胚根无法从种皮破出，抑制萌发^[219]。

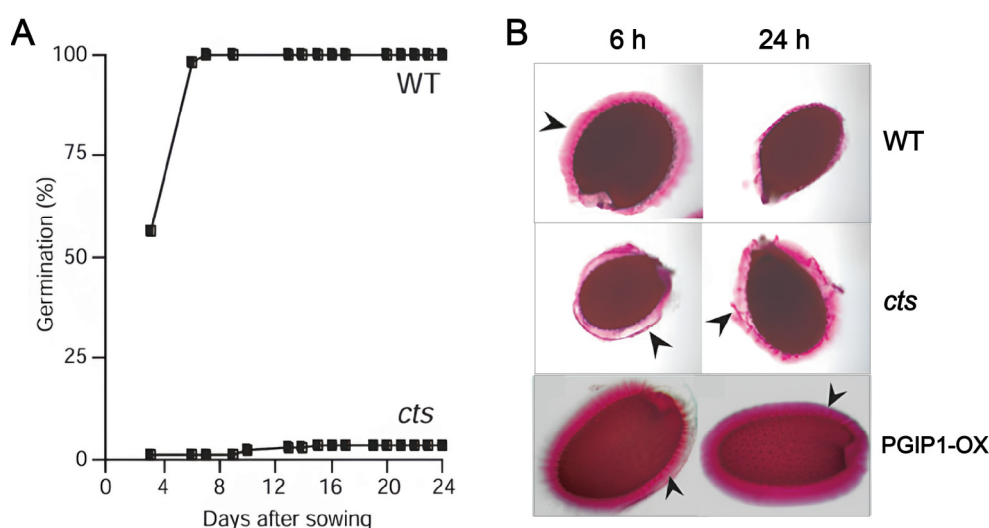


图 1.30 CTS 突变导致种子萌发被抑制^[216,219]

图注：A. 野生型与 *cts* 突变体种子储存一个月后的萌发率。B. 使用钉红染液对吸胀种子的种皮粘液进行染色观察，其中 PGIP1-OX 为 PGIP1 过表达植株。

1.6 研究目的与意义

自从 1998 年 Makoto Hayashi 等人鉴定拟南芥 CTS 蛋白与脂肪酸 β 氧化过程有关以来，科学家们对 CTS 亚细胞定位、组织表达、生理功能以及底物转运机制的研究越来越多。CTS 定位于过氧化物酶体膜，脂肪酸、生长素 IAA 前体 IBA 及茉莉酸 JA 前体 OPDA 转运到过氧化物酶体进行 β 氧化，参与脂质代谢与激素稳态的维持。当 CTS 功能缺陷时，植物将出现种子休眠、发芽受损、侧根减少、花丝伸长延迟、花粉管发育受损以及黑暗条件下叶片坏死等多种生长发育

缺陷表型。

尽管同源蛋白人类 ABCD1 的结构以及底物结合复合物结构已被解析^[54-58], 但 CTS 与人类 ABCD1 在结构组成与功能上存在差异。首先, 人类 ABCD1 是半转运蛋白, 需要形成同源二聚体才能发挥功能; 拟南芥 CTS 不需要同源二聚化, 单独的 CTS 蛋白即可完成转运底物的功能, 因此 CTS 识别结合底物的方式可能与人类 ABCD1 不同, 转运底物的分子机制也不同。其次, CTS 与人类 ABCD1 的底物偏好性不同, 人类 ABCD1 转运饱和以及单不饱和的超长直链脂肪酸, 而 CTS 可以转运不同长度、不同饱和度的脂肪酸以及芳香族羧酸。拟南芥回补实验也表明, 即使将人类 ABCD1 回补到 *cts* 突变体植株中也无法挽救脂肪酸 β 氧化功能的缺陷^[220], 这表明 CTS 在蛋白结构上具有特殊性, 使得其相比于人类 ABCD1 具有更广谱的底物特异性。因此, 人类 ABCD1 的结构对于 CTS 结构与功能研究的参考意义十分有限。然而, 目前 CTS 蛋白的结构并未被解析, 其识别广谱底物的分子基础以及转运机制仍未被揭示。

本研究将对 CTS 蛋白进行表达与纯化, 利用 ATPase 活性实验及蛋白脂质体转运实验探索 CTS 的底物。此外, 本研究将利用冷冻电镜单颗粒技术解析转运循环中各个阶段的 CTS 结构及不同底物结合 CTS 的复合物结构, 结合 ATPase 活性实验、蛋白脂质体转运实验以及拟南芥生理实验, 探究底物转运过程的关键残基, 阐明 CTS 广谱底物特异性的分子基础以及底物转运机制。

植物 CTS 蛋白的结构与功能研究具有多种科学意义。首先, 通过解析 CTS 与生理底物结合的复合物结构, 并结合突变体的生化实验有助于了解 CTS 识别底物的分子机制。其次, CTS 可以转运不同形状的底物, 通过解析 CTS 与多种不同底物的复合物结构, 有助于揭示 CTS 广谱底物特异性的分子基础。此外, 解析不同构象下的 CTS 结构可以为阐明 CTS 转运底物的分子机制提供结构基础。另外, 基于 CTS 的结构还可以进行植物生长调节剂的筛选, 在提高农业生产方面具有重要的应用前景。

第2章 实验材料、仪器设备与方法

2.1 实验材料

2.1.1 质粒、菌株和细胞系

质粒：哺乳动物细胞表达系统的质粒为 pCAG 与 pcDNA，其中 pCAG 空载质粒由中国科学技术大学孙林峰教授惠赠。昆虫杆状病毒表达系统的质粒为 pFastBac。

菌株：大肠杆菌 TOP10，用来构建 pCAG 质粒和扩增。大肠杆菌 DH10Bac，用来构建昆虫表达系统转染所需的杆状病毒。大肠杆菌 DH5 α ，用于构建植物生理实验质粒 pDONR 与 PENTR。

细胞系：人胚胎肾细胞 HEK293F（Human Embryonic Kidney 293F）以及昆虫卵巢细胞 sf9（*Spodoptera frugiperda* cell）。

2.1.2 实验仪器设备

本研究所使用的仪器如表 2.1 所示。

表 2.1 主要仪器设备

仪器设备	型号	厂家
PCR 仪	S1000	BIO-RAD
Superose 6 Increase 层析柱	29091596	Cytiva
蛋白纯化仪	29383015	AKTA
振荡培养箱	ZCZY-CS8V	知楚
冷冻制样机 Vitrobot	Mark IV	赛默飞
200 kV 冷冻透射电镜	Glacios 2	赛默飞
300 kV 冷冻透射电镜	Titan Krios G3i	赛默飞
落地式超速离心机	XPN-100	贝克曼
多功能酶标仪	SpectraMax iD5	Molecular Devices
高速冷冻离心机	CR22G	日立
台式离心机	5417R	艾本德

2.1.3 实验试剂与耗材

本研究所使用的试剂与耗材如表 2.2 所示。

表 2.2 主要试剂与耗材

名称	货号	品牌
限制性核酸内切酶 KpnI	1068S	Takara
限制性核酸内切酶 XhoI	1094S	Takara
限制性内切酶 DpnI	FD1704	赛默飞
DNA 聚合酶 Phanta	P515-01	诺唯赞
DNA 聚合酶 Taq	P112-01	诺唯赞
双片段同源重组酶 Exnase II	C112-02-AB	诺唯赞
多片段同源重组酶 Exnase MultiS	C113-02	诺唯赞
PEI (MW 40,000)	40816ES03	翌圣
DNA marker	MD104	Biomed
三色预染蛋白 marker	20350ES72	翌圣
彩虹 245 广谱蛋白 marker	PR1920	索莱宝
HEK293F 细胞培养基	M293TII	义翘
Luria-Bertani	244620	美国 BD 公司
蛋白酶抑制剂	C0001	陶术
LMNG	NG310	Antrance
DDM	D310A	Antrance
CHS	CH210	Antrance
GDN	GDN101	Antrance
Digitonin	BID3301	APOLLO scientific
抗 FLAG M2 凝胶	A2220	默克
FLAG 肽	499312	吉尔生化
浓缩管 (50kD 截留)	UFC9050	默克
DNA 纯化回收试剂盒	DP214	天根
质粒小提试剂盒	DP103	天根
质粒大提试剂盒	CW2104M	康为世纪
铜网 Cu 1.2/1.3	N1-C14nCu30-01	Quantifoil

2.2 实验方法

为了探究 CTS 转运多种脂肪酸以及激素前体的分子机制，本研究将合成拟南芥 CTS 基因并在体外异源表达 CTS 蛋白，利用冷冻电镜单颗粒技术解析不同状态下 CTS 的结构（图 2.1），结合生化以及生理实验，探究 CTS 转运底物的分子基础。

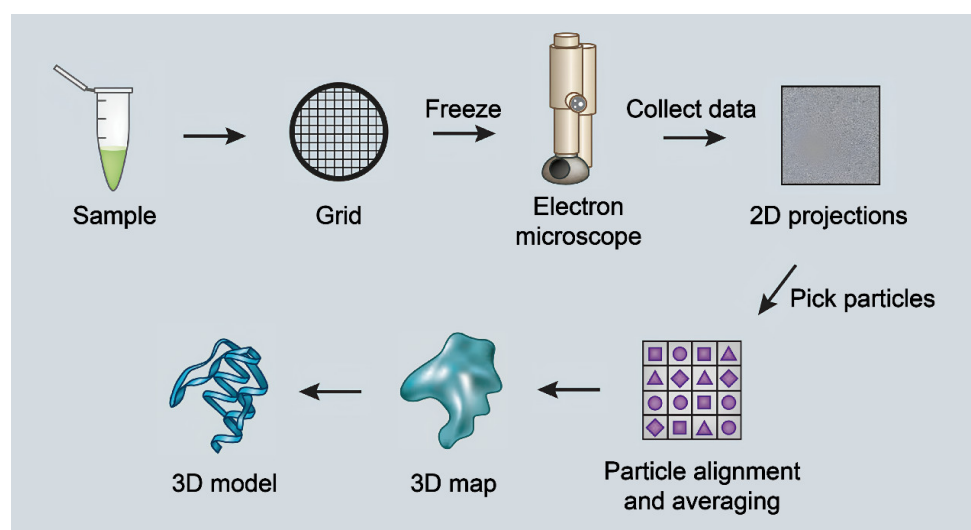


图 2.1 冷冻电镜单颗粒技术解析蛋白结构流程简图^[221]

2.2.1 重组质粒构建

2.2.1.1 拟南芥 CTS 重组质粒的构建

HEK293F 细胞表达系统中常用的表达载体有 pCAG 以及 pcDNA，本研究中使用的这两种载体均分别有两种纯化标签，包括氨基（N）端 Flag 标签（记为 pCAG-NF、pcDNA-NF）以及羧基（C）端 Flag 标签（记为 pCAG-CF、pcDNA-CF）。使用同源重组法，将拟南芥 *cts* 基因构建于这四种载体上，得到的重组质粒记为 pCAG-NF-CTS、pCAG-CF-CTS、pcDNA-NF-CTS 以及 pcDNA-CF-CTS。具体步骤如下：

（1）在数据库 Uniprot 中搜索拟南芥 CTS（Uniprot entry: Q94FB9）的蛋白质序列（见附录 A），全长蛋白由 1337 个氨基酸组成。对拟南芥 *cts* 基因进行哺乳动物细胞及昆虫细胞表达体系的密码子优化，随后由上海生工公司合成并构建在 pUC 载体上。

（2）pCAG 载体线性化：由于 pCAG 载体具有二级结构，无法通过聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）线性化，因此选择通过限制性核酸内切酶进行线性化。载体 pCAG-NF/CF 均有 KpnI 和 XhoI 酶切位点，使用限制

性核酸内切酶 KpnI 和 XhoI 对载体在 37°C 过夜酶切，随后切胶回收线性化的载体。酶切体系如表 2.3 所示。

表 2.3 双酶切体系 (100 μ L)

组分名称	体积 (μ L)
KpnI	5
XhoI	5
10 $\times$ M buffer	80
载体 pCAG	80

(3) *cts* 基因线性化：通过 PCR 从 pUC 载体扩增线性化的带有载体同源臂的 *cts* 基因，随后通过切胶回收获得目的片段。PCR 体系如表 2.4 所示。

表 2.4 PCR 体系 (50 μ L)

反应组分	体积 (μ L)
上游引物	2
下游引物	2
基因模板	1
Phanta 酶	1
2 $\times$ buffer	25
dNTP	2
ddH ₂ O	17

(4) 同源重组：使用诺唯赞同源重组酶 Exnase II 对载体和基因进行同源重组，37°C 水浴 30 min。双片段同源重组体系如表 2.5 所示。其原理是通过在载体与基因片段两端加上同源臂序列，在同源重组酶 Exnase II 的作用下，将两个线性化片段转化为环形质粒（图 2.2）。

表 2.5 双片段同源重组体系 (20 μ L)

组分名称	体系
载体	(0.02 $\times$ 载体 bp 数) ng
基因	(0.04 $\times$ 基因 bp 数) ng
Exnase II	2 μ L
5 $\times$ CE II buffer	4 μ L
ddH ₂ O	补至 20 μ L

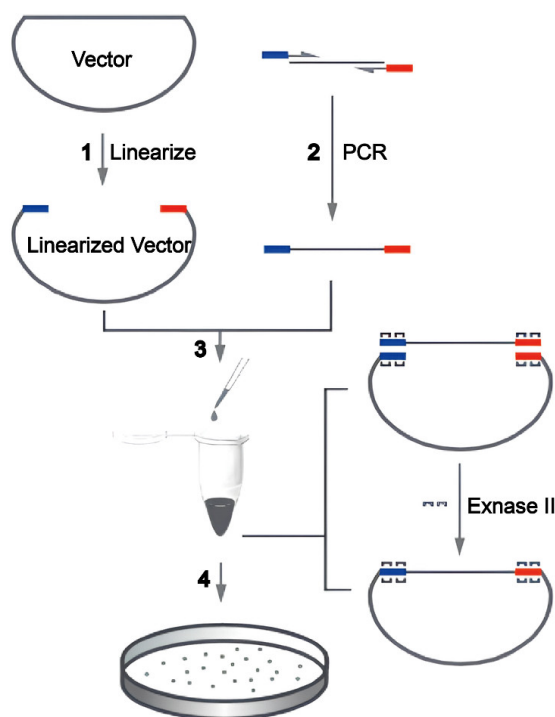


图 2.2 同源重组流程图

图注：图片来自于诺唯赞官网 (<https://bio.vazyme.com/product/81.html>)。数字表示不同的实验步骤。1，通过酶切将载体线性化；2，通过 PCR 将目的基因线性化并加入载体的同源臂序列；3，将线性化的载体及目的基因同源重组，将重组的质粒转化到感受态细胞中；4，将转化后的菌液涂板与培养，生成的菌落包含阳性菌落。

(5) 转化涂板：将重组产物转化到感受态 TOP10 中，加入 600 μl 无抗性的液体 LB (Luria-Bertani) 培养基，放置于 37°C 摇床培养 50 min，随后接种到含有氨苄青霉素 Ampicillin (Amp, 浓度为 30 $\mu\text{g/ml}$) 的固体平涂板并 37°C 过夜培养。次日挑选单克隆菌落于液体 LB 培养基 (Amp) 中 37°C 培养 6 h，再进行菌液 PCR 挑选有阳性条带的单克隆进行测序验证。测序验证重组质粒构建成功后使用试剂盒进行质粒小提。

表 2.6 菌液 PCR 体系 (10 μL)

组分名称	体积 (10 μL)
上游引物	1
下游引物	1
菌液	1
2×Taq Master Mix	5
ddH ₂ O	2

类似地,通过同源重组法构建 pcDNA-NF/CF-CTS 重组质粒以及昆虫杆状病毒表达系统的重组质粒 pFastBac-NF/CF-CTS。

单点突变的 pCAG 重组质粒通过多片段同源重组法构建。首先,在点突变处将 *cts* 基因分为两部分进行 PCR 扩增,片段 1 为 *cts* 的 N 端至突变位点(记为 *cts*-N),在下游引物中引入点突变;片段 2 为突变位点至 *cts* 的 C 端(记为 *cts*-C),在上游引物中引入点突变。接着将 *cts*-N、*cts*-C 以及载体片段通过多片段同源重组构建突变体质粒。多片段同源重组体系如表 2.7 所示。

表 2.7 多片段同源重组体系 (20 μ L)

组分名称	体系
<i>cts</i> -N	(0.04 $\times$ 载体 bp 数) ng
<i>cts</i> -C	(0.04 $\times$ 基因 bp 数) ng
载体 pCAG-NF	(0.02 $\times$ 基因 bp 数) ng
Exnase MultiS	2 μ L
5 $\times$ CE MultiS buffer	4 μ L
ddH ₂ O	补至 20 μ L

2.2.1.2 拟南芥-线虫 CTS 嵌合体重组质粒的构建

研究表明,拟南芥 CTS 蛋白在哺乳动物细胞 CHO(中国仓鼠卵巢细胞)中的表达量较低,秀丽隐杆线虫 PMP-1、PMP-2、PMP-4 均可在 CHO 细胞中表达并且可以正确定位^[44]。此外,将秀丽隐杆线虫 PMP-4、PMP-2 的 N 端 H0 基序分别嵌合到人类 ABCD1 与 ABCD3 的 N 端可以明显提高 ABCD1 以及 ABCD3 的表达量^[54,59],因此本研究尝试将 CTS 蛋白的 N 端 H0 基序替换为线虫 PMP2 以及 PMP-4 的 H0 基序,观察是否能提高 CTS 蛋白在 HEK293F 细胞中的表达量。秀丽隐杆线虫 cePMP-2(Uniprot entry: Q18598)由 661 个氨基酸组成,cePMP4(Uniprot entry: O45730)由 734 个氨基酸组成(见附录 B)。本研究尝试了三种嵌合体重组质粒,即将 cePMP-2 的 N 端 49 个氨基酸(记为 cePMP-2-49)替换 CTS 的 N 端 70 个氨基酸,cePMP-2 的 N 端 58 个氨基酸(记为 cePMP-2-58)、cePMP-4 的 N 端 64 个氨基酸(记为 cePMP-4-64)替换 CTS 的 N 端 79 个氨基酸,并构建于 pCAG-NF 载体,重组质粒分别记为 pCAG-2-49-CTS、pCAG-2-58-CTS、pCAG-4-64-CTS。步骤如下:

(1) cePMP-2 以及 cePMP-4 的基因由上海生工公司合成。

(2) 通过 PCR 将重组片段扩增:首先设计引物将 cePMP-2-49、cePMP-2-58、cePMP-4-64 片段,以及 CTS 去除 N 端 70 个氨基酸、79 个氨基酸(记为 CTS Δ 70、CTS Δ 79)的片段扩增。扩增 cePMP-2-49、cePMP-2-58、cePMP-4-64 片

段的引物 N 端带有载体 pCAG-NF 的 N 端序列, C 端带有 CTS Δ 70/79 的 N 端序列; 扩增 CTS Δ 70/79 片段的引物 C 端带有载体 pCAG-NF 的 C 端序列。随后通过 PCR 扩增上述片段并且切胶回收。

(4) 使用多片段重组酶进行三片段重组(体系如表 2.7 所示), 随后 37°C 水浴 30 min。

后续转化、涂板、测序步骤与构建拟南芥 CTS 重组质粒的类似。测序验证嵌合体重组质粒构建成功后使用试剂盒进行质粒小提。

2.2.1.3 重组杆状病毒的制备

首先通过同源重组法将密码子优化后的 *cts* 基因连接到 pFastBac 载体上, 构建质粒 pFastBac-NF-CTS (N 末端 FLAG 标签) 以及 pFastBac-NF-CTS (C 末端 FLAG 标签)。随后将重组质粒转化到感受态 DH10Bac 中, 加入 700 μ L 无抗 LB 培养基, 然后放置于 37°C 摇床 200 rpm 培养 5 h。接着取 70 μ L 菌液接种于三抗性平板(卡那霉素 50 μ g/mL, 四环素 10 μ g/mL, 庆大霉素 7 μ g/mL), 需要注意的是在菌液接种前需将 40 μ L IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷, 浓度为 0.6 M) 以及 100 μ L X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷, 浓度为 20 mg/mL) 均匀涂在三抗性平板表面。随后用锡纸包裹接种的平板并放置于 37°C 恒温箱培养 48 h, 挑选白色菌落, 放于 5 mL 三抗性 LB 培养基中 37°C 培养 14-16 h, 3,200 g 离心 20 min 以便收集细菌沉淀。

使用天根质粒小提试剂盒抽提 bacmid。具体步骤如下: 取 300 μ L P1 将细菌沉淀重悬, 加入 300 μ L E2 进行裂解并温和混匀, 再加入 300 μ L E3 并温和混匀沉淀, 随后 13,680 g 离心 10 min, 将上清转移到新的 EP 管并向其中加入 550 μ L 异丙醇混匀, 于 -20°C 放置 3.5 h, 接着将该混合液在 18,630 g 转速下离心 15 min, 去除上清。然后加入 800 μ L 预冷的 70% 乙醇, 18,630 g 离心 5 min, 去除上清, 重复此步骤。加入 1 mL 预冷的 100% 乙醇后 18,630 g 离心 5 min, 去除上清后将 EP 管放在超净台晾干, 最后加入 50 μ L 灭菌的 ddH₂O 溶解 bacmid 并分装。由于 bacmid 较长, 操作不当时容易断裂, 通常需要通过 PCR 验证 bacmid 的完整性。

在提取 bacmid 后将其转染到昆虫细胞 sf9 中即可获得杆状病毒。具体步骤如下: 取 2×10^6 个 sf9 细胞放置于直径 60 mm 的平板中, 静置 30 min 使 sf9 细胞贴壁。此时可以利用这 30 min 时间配制转染液。取干净的 EP 管 1, 加入 100 μ L 培养基以及 10 μ L bacmid 并混匀; 取干净的 EP 管 2, 加入 100 μ L 培养基及 6 μ L cellfectin 并混匀。随后将 EP 管 2 中的液体加入 EP 管 1, 混匀后静置 30 min, 然后加入 800 μ L 培养基混匀即得到转染液。在细胞贴壁结束后, 将平板中的培养基吸出, 加入 2 mL 新鲜的培养基洗去未贴壁的细胞并吸出, 接着加入转染液,

将平板置于 28℃ 培养箱中静置培养 6 h。随后将培养基吸出，加入 3 mL 双抗性（青霉素及链霉素）的培养基，继续在 28℃ 培养箱中培养 6 天。6 天后，观察平板中是否出现悬浮的细胞，若出现则说明有病毒产生，随后吸取培养基，200 g 离心 10 min，收集上清即可得到 P0 代病毒。通常 P0 代病毒滴度较低，不适用于大量细胞转染，因此需要将病毒扩增 2 至 3 代。取 50 mL 双抗性培养基于 10 cm 直径的平板中，加入 10×10^6 个 sf9 细胞，静置 30 min 使细胞贴壁，接着加入 2 mL P0 代病毒，28℃ 培养 6 天，离心取上清即可获得 P1 代病毒。类似地，重复以上步骤即可得到 P2、P3 代病毒。当 sf9 细胞的密度达到 2×10^6 个细胞/mL 时进行转染，每升细胞加入 25 mL P3 代病毒，28℃ 培养箱 200 rpm 转速下培养 48 h 后进行细胞收集。

2.2.2 重组质粒的大量提取、转染以及表达

HEK293F 悬浮细胞是一种常见的表达系统，通过将重组质粒在细胞中瞬时转染，可以快速获得高产量的目的蛋白。每 800 mL 细胞转染所需的质粒用量为 1.5~2 mg，因此需要准备大量的重组质粒。本研究使用康为的质粒大提试剂盒进行重组质粒的大量提取。步骤如下：

（1）将重组质粒转化到感受态 TOP10 中，加入 600 μ L 无抗性的液体 LB 培养基，放置于 37℃ 摇床培养 50 min，随后接种到 4 mL 含有 Amp 抗性的液体 LB 培养基并 37℃ 培养 6~8 h 至菌液浑浊。接着将菌液接种到 400 mL 液体 LB 培养基中过夜培养。次日待菌液 OD600 至 1.8 时收菌，8000 g 离心 3 min，去除上清保留细菌沉淀。

（2）取 12 mL 已加入 RNase A 的 buffer P1 重悬细菌沉淀，并转移到干净的 50 mL 离心管中。随后加入 12 mL buffer E2，立即温和地上下混匀，放置 5 min 直至细菌完全裂解，液体变得澄清。接着加入 12 mL buffer E3，温和地上下混匀，此时液体变得透明且出现白色不溶物。使用落地冷冻离心机 14000 g 离心 10 min，将上清液转移至干净的 50 mL 离心管中，加入 12 mL 异丙醇，随后于 -20℃ 放置 2 h。

（3）取新的吸附柱，加入 2 mL buffer PS，室温放置 2 min 后使用台式离心机 3130 g 离心 2 min。随后将加入了异丙醇的混合液体于吸附柱中，3130 g 离心 5 min，去除下槽液。向吸附柱中加入 10 mL 加入了 200 mL 乙醇的 buffer PW 进行洗杂，3130 g 离心 2 min 去除下槽液，随后重复此步骤一次。接着加入 10 mL endo-free PW 去除内毒素，3130 g 离心 2 min 后去除下槽液。然后 3130 g 空柱离心 10 min，取吸附柱于超净台吹风放置 5 min 以去除乙醇。最后加入 3 mL 65℃ 水浴过的 buffer EB 进行洗脱，孵育 5 min 使得质粒充分溶解，随后 14,000 g 离

心 3 min 得到下槽液，将其转移到无菌的 15 mL 离心管中，测量浓度后于 -20℃ 冰箱保存。通常 400 mL 菌液大提质粒所得的量可达 6 mg。

HEK293F 细胞在 37℃、5% CO₂、130 rpm 转速的恒温培养箱中进行培养。当细胞密度达到 $2.0\sim 3.0\times 10^6$ 个细胞/mL 时进行转染。本研究使用的转染试剂是水溶性较高的聚乙烯亚胺 (Poly ethylene imine, PEI)，这是一种带有正电荷的阳离子聚合物，丰富的氨基使得 PEI 可以与带负电的核酸分子结合,形成整体带正电荷的复合物，随后与细胞膜表面带负电荷的蛋白多糖结合，通过胞吞作用进入细胞^[222] (图 2.3)。

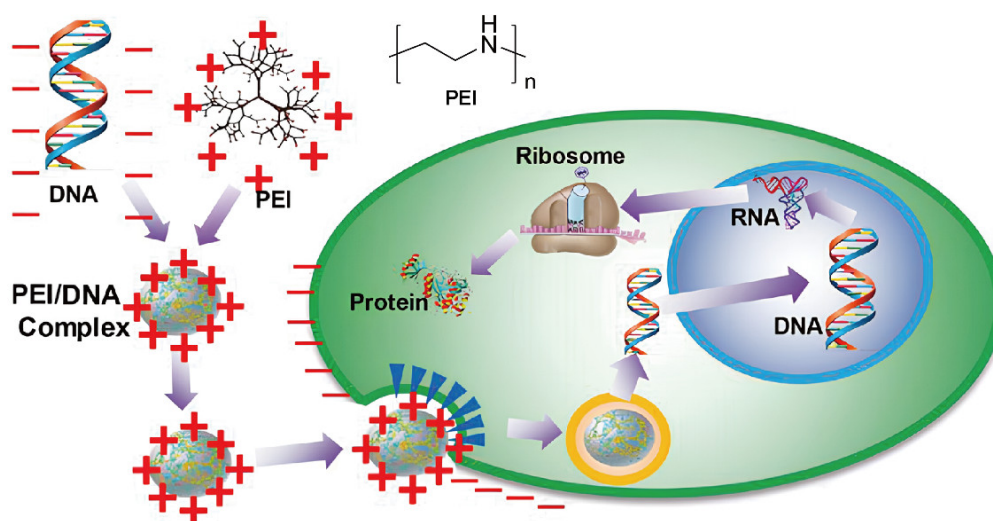


图 2.3 PEI 转染原理图^[222]

图注：PEI 是一种带正电荷的阳离子聚合物，与 DNA 分子结合后形成整体带正电的复合物，可通过胞吞作用进入细胞。PEI，聚乙烯亚胺 (Poly ethylene imine)。

正确的 DNA 浓度、PEI/DNA 的比例以及 PEI/DNA 复合物的形成是成功转染的关键。过量的 PEI 会引起细胞毒性。本研究中重组质粒与 PEI 的质量比为 1:2 至 1:3，每 800 mL 细胞加入 4 mg PEI 与 2 mg 重组质粒进行转染。具体步骤如下：首先取 45 mL 培养基于无菌的 50 mL 离心管中，加入 2 mg 重组质粒后混匀，随后加入 4 mg PEI，充分混匀后静置 15 min；将上述混合物加入细胞液中，并补加 50 mL 培养基，充分混匀后静置 15 min。转染后的细胞可以在 37℃ 摇床培养 2 天后收集；也可以在 37℃ 摇床培养 8~12 h 后加入丁酸钠（每 800 mL 细胞加入 2.5 mL 2M 丁酸钠），随后继续在 30℃ 摇床培养 2 天后收集。

表达了目的蛋白的 HEK293F 细胞使用日立落地离心机进行收集，5000 g 离心 6 min 后去除上清，每 800 mL 细胞加入 15 mL buffer A [150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20% (v/v) 甘油] 将细胞沉淀重悬，并转移到干净的 50 mL 离心管中，补加 buffer A 至总体积为 35 mL，随后使用液氮进行速冻，将细胞冻存

于-80℃冰箱。

对于昆虫 sf9 细胞而言，当细胞密度达到 2×10^6 个细胞/mL 时，可以进行转染，每升细胞加入 25 mL P3 代病毒，于 28℃ 摇床培养 2 天后进行细胞收集，收集步骤与 HEK293F 细胞完全相同。

2.2.3 重组蛋白的纯化

膜蛋白存在于细胞或细胞器膜中，是细胞功能的核心组成部分，广泛参与细胞信号转导、物质跨膜转运以及能量转化等至关重要的生物学过程，因此也成为主要的药物研究靶点。为了了解膜蛋白的工作原理，纯化膜蛋白用于结构研究以及生化表征非常重要。

与可溶蛋白相比，膜蛋白的纯化十分困难。一方面是因为膜蛋白内源表达量相对较低，通常可以外源表达目的蛋白来提高表达量，但翻译后修饰的差异会影响蛋白的活性，因此需要尝试不同的表达系统或者点突变修饰位点。另一方面是膜蛋白具有较强的疏水性，需要高浓度的去垢剂从天然膜中溶解并保持其结构与功能的完整性^[223]。与磷脂类似，去垢剂是一种两亲性小分子，具有亲水性头部以及疏水性尾巴^[224]（图 2.4）。

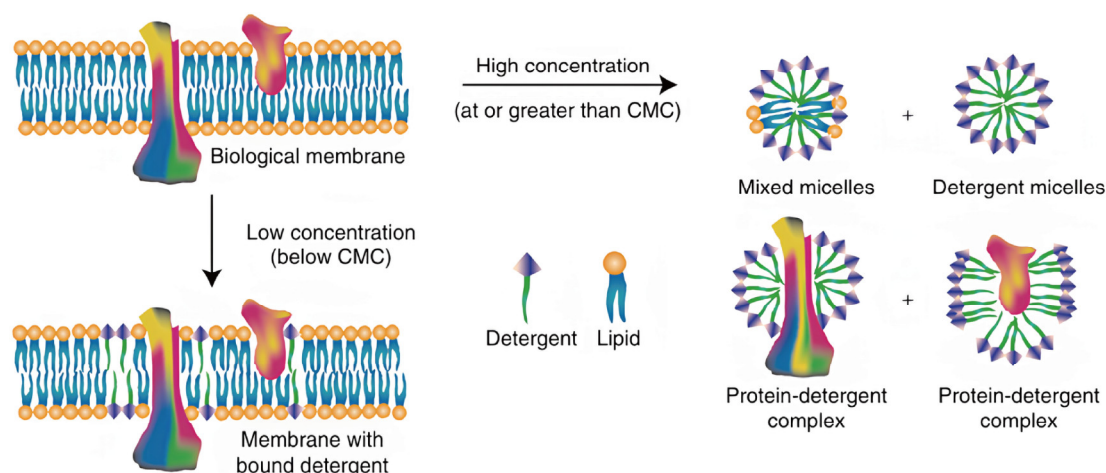


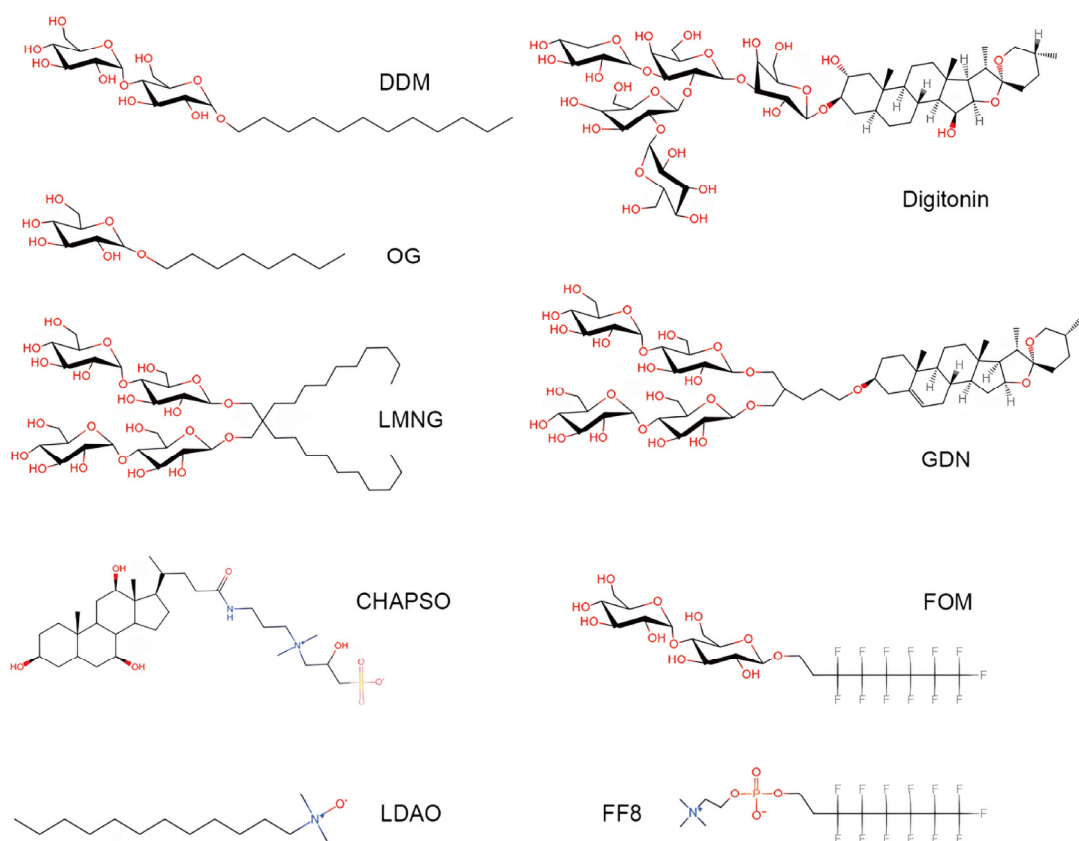
图 2.4 去垢剂溶解膜蛋白的示意图^[224]

图注：CMC，临界胶束浓度（critical micelle concentration）。

在低浓度时，去垢剂插入脂质双分子层并破坏膜的稳定性；当浓度达到临界胶束浓度（critical micelle concentration, CMC）时，膜脂质双分子层被破坏，形成脂质-去垢剂以及蛋白-去垢剂的混合胶束，去垢剂的疏水链包裹在蛋白质的疏水区域^[225]。为了有效地将膜蛋白从膜中溶解，去垢剂的使用浓度通常是几倍 CMC,但太高浓度的去垢剂会使得蛋白质变性^[226]。当蛋白浓度为 1~5 mg/ml 时，有效提取的去垢剂浓度通常为蛋白浓度的 0.5%~2%；当蛋白浓度更高或者样品

体积较小时，去垢剂与蛋白的浓度比例需要进行调整。对于层析分离过程，去垢剂的浓度应该降低至两到三倍 CMC，从而可以避免与蛋白紧密结合的脂质被剥离^[226]。此外，在溶解膜蛋白时可以加入高浓度的甘油，如 10%~20% (v/v)。甘油作为一种渗透调节剂，可以帮助维持蛋白的活跃构象、提高蛋白活性，在蛋白重构为蛋白脂质体过程中也至关重要^[227]。

使用去垢剂时通常需要考虑其物理化学性质。头部基团通常对去垢剂与蛋白质的相互作用有很大的影响，烷基链的长度决定了 CMC 和聚集数。根据极性头部基团的性质，去垢剂可分为离子型、非离子型和两性离子型（图 2.5）。非离子型去垢剂是一类温和的去垢剂，可以溶解膜蛋白而不改变重要的结构特征^[225,228]，常见的有葡萄糖苷系列、麦芽糖苷系列以及洋地黄皂苷（digitonin）。两性离子去垢剂的溶解效果比非离子型去垢剂更强，但更可能使蛋白质失活^[229]，如十二烷基二甲胺氧化物（lauryldimethylamine oxide, LDAO）和 CHAPSO。LDAO 常用于晶体学，CHAPSO 可以用来改善冷冻电镜样品的取向优势问题。离子型去垢剂是一种有效的溶解剂，容易使蛋白变性，常见的有十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS），通常被用于聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE）。目前，大多数用于膜蛋白纯化和结构测定的去垢剂是非离子型去垢剂以及新戊二醇类去垢剂，如月桂基麦芽糖新戊二醇（lauryl maltose neopentyl glycol, LMNG）^[226,230,231]，其中 LMNG 比烷基糖苷类去垢剂具有更低的 CMC 值^[232,233]。此外，在真核膜蛋白纯化时添加胆固醇半琥珀酸酯（cholesteryl hemisuccinate, CHS）可以增加膜蛋白的稳定性^[234]。值得注意的是，糖薯蓣皂苷元（glyco-diosgenin, GDN）也常被用于冷冻电镜单颗粒结构解析^[235]。GDN 于 2012 年首次表征，疏水性的类固醇基团与亲水性的二麦芽糖头部基团相连^[236]，由于成本以及质量可变性的原因，GDN 作为 digitonin 的替代品而被广泛使用。

图 2.5 膜蛋白结构测定中常用去垢剂^[237]

图注：DDM，N-十二烷基 β -D-麦芽糖苷 (N-dodecyl β -D-maltoside)；OG，辛基葡萄糖苷 (octyl glucoside)；LMNG，月桂基麦芽糖新戊二醇 (lauryl maltose neopentyl glycol)；LDAO，月桂基二甲胺-N-氧化物 (lauryldimethylamine oxide)；digitonin，洋地黄皂苷；GDN，糖薯蓣皂苷元 (glyco-diosgenin)；FOM，氟化辛基麦芽糖苷 (fluorinated octyl-maltoside)；FF8，氟化 fos-胆碱-8 (fluorinated fos-choline-8)。

对于膜蛋白而言，从膜中溶解提取的最佳条件可能不是结构解析与生化表征的最佳条件，通常在溶解后的纯化过程中需要更换去垢剂。高 CMC 的去垢剂有利于结晶；低 CMC 去垢剂纯化的蛋白更适用于冷冻电镜，如 GDN 和 LMNG，可以在降低冷冻电镜成像中背景噪音的同时又能减少蛋白变性，更有利于数据处理中颗粒的提取、分类以及对齐^[237]。在本研究中，从膜中溶解蛋白的去垢剂包括 DDM 与 LMNG，CMC 分别为 0.0087% (w/v) 与 0.001% (w/v)，使用的终浓度均为 1% (w/v)；亲和层析以及尺寸排阻层析使用的去垢剂包括 GDN 与 digitonin，CMC 分别为 0.0021% (w/v) 与 0.06% (w/v)，使用的终浓度分别为 0.02% (w/v) 以及 0.06% (w/v)。目的蛋白的纯化过程如下：

(1) 配制去垢剂母液：溶解膜的去垢剂母液为 10% (w/v) LMNG-1% (w/v) CHS。首先使用 pH7.5 的 200 mM Tris-HCl 溶解 LMNG 粉末，待 LMNG 完全溶

解后加入 CHS 粉末,这样可以促进 CHS 更快溶解。类似的步骤配制 10% (w/v) DDM-1% (w/v) CHS 母液。GDN 与 digitonin 均用抽滤过的 ddH₂O 配制,母液浓度分别为 10% (w/v) 与 5% (w/v),其中 digitonin 在配制时需将 ddH₂O 加热,促进粉末溶解。

(2) 溶解膜:将冻存的细胞解冻并震荡至无明显块状沉淀,随后加入去垢剂母液、蛋白酶抑制剂 Cocktail、ATP/Mg²⁺,至终浓度为 1% (w/v) LMNG, 0.1% (w/v) CHS, 5 mM ATP/Mg²⁺以及 1×Cocktail, 总体积为 40 mL。将该体系放置于旋转混合仪,转速为 25 rpm, 6°C 孵育 2 小时。

(3) 超速离心:将膜溶解后的体系进行超速离心, 4°C 下 200,000 g 离心 45 min 去除不溶物质以及细胞碎片。

(4) 亲和层析:本研究使用抗 FLAG M2 亲和凝胶重力柱对重组目的蛋白进行亲和纯化(图 2.6)。抗 FLAG M2 亲和凝胶与小鼠单克隆抗体共价连接,可与融合在目的蛋白 N 末端以及 C 末端的 FLAG 肽结合。首先使用 25 mL buffer B (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) 预处理抗 FLAG M2 亲和凝胶重力柱,接着将超速离心后的上清与抗 FLAG M2 亲和凝胶孵育 1 小时,随后将液体流穿。加入 25 mL buffer C [150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5% (v/v) 甘油, 0.02% (w/v) GDN, 0.5 mM ATP/Mg²⁺]进行洗杂。随后加入 6 mL buffer D [150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.02% (w/v) GDN, 0.5 mM ATP/Mg²⁺, 5% (v/v) 甘油, 200 µg/mL FLAG 肽]孵育 15 min, 然后收集流穿的洗脱液。

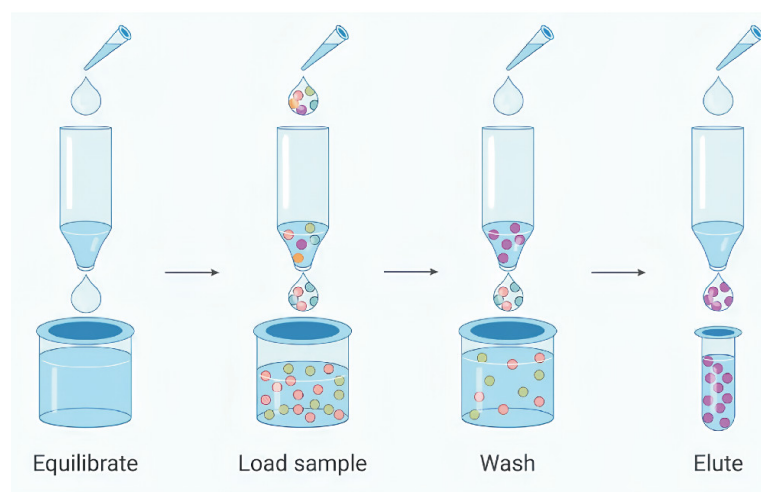


图 2.6 抗 FLAG M2 凝胶亲和层析过程

图注:目的蛋白融合的 Flag 标签与凝胶表面的抗体结合,通过流穿可以将目的蛋白富集;FLAG 肽与凝胶表面的抗体竞争性结合,使得目的蛋白与凝胶解离。

(5) 尺寸排阻层析:本研究使用 Superose 6 increase 10/300(下文简称为 S6)色谱柱对目的蛋白进行纯化。尺寸排阻层析色谱柱由多孔琼脂糖微珠填充,使用

生物流体作为多孔固定相的流动相，以与分子大小成反比的速度对分子进行差异洗脱^[238]。当混合物样品进入色谱柱时，大尺寸的分子无法进入微珠，直接通过微珠间隙最先被洗脱下来；小尺寸的分子可以进入多孔微珠，洗脱时间更长（图 2.7）。使用 buffer E [150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.02% (w/v) GDN] 平衡 S6 色谱柱，流速为 0.4 mL/min。对于进行尺寸排阻层析的蛋白样品而言，体积小于或者等于色谱柱体积 5% 时分离效果最佳，因此需要将亲和层析的洗脱液进行浓缩。使用截流 50 kD 分子量的浓缩管进行浓缩，4℃ 下 800 g 离心 10 min，吹吸上槽液体，防止局部的蛋白以及去垢剂浓度过高而导致蛋白聚集沉淀，重复此步骤，使得上槽液体体积小于或者等于 1 mL。随后取出上槽液体，在 4℃ 条件下 15,300 g 离心 15 min 以去除沉淀的蛋白。使用针头注射器吸取离心后的蛋白样品注射到蛋白纯化仪的样品环中，以 0.4 mL/min 的流速对样品中的目的蛋白进行分离纯化。通常结果峰图中会出现核酸、目的蛋白以及 FLAG 肽的峰。随后取目的蛋白峰对应的样品进行 SDS-PAGE，判断目的蛋白的纯度，取纯度较高的样品浓缩以进行后续的冷冻电镜样品制备以及 ATPase 活性实验。

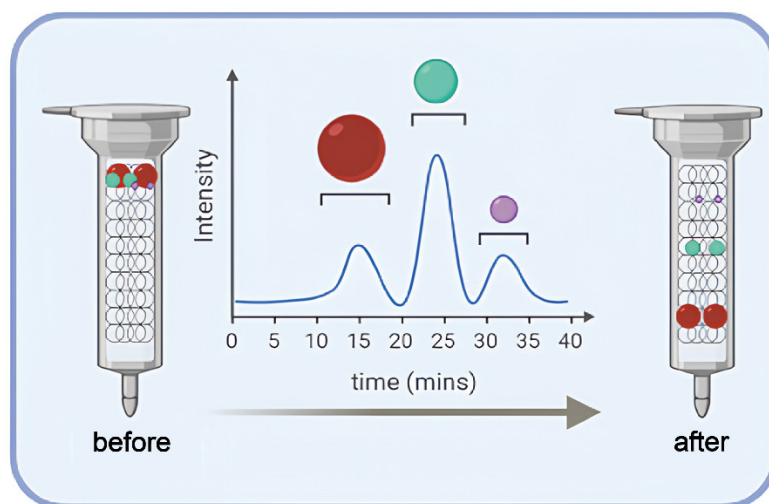


图 2.7 尺寸排阻层析原理^[238]

图注：尺寸排阻层析色谱柱由多孔琼脂糖微珠填充，当混合物样品进入色谱柱时，大尺寸的分子无法进入微珠，最先被洗脱下来；小尺寸的分子可以进入多孔微珠，洗脱时间更长。

2.2.4 常温负染样品的制备

负染色 (Negative staining, NS) 是指使用重金属盐染料对载网上的样品进行染色，整个载网涂上一层薄薄的重金属盐染色层，在样品颗粒处无染料堆积（图 2.8）。在电镜下观察时，由于样品与染料周围重金属原子之间存在电子密度差，电子束可以穿过电子密度低的样品而无法穿过重金属原子，最终呈现样品颗粒明

亮而背景黑暗的负对比度状态，从而允许对样品形态进行观察^[239,240]。负染色对背景进行染色，与普通染色（正染色，对样品染色）的方法不同，因此又称阴性染色。常用的负染色染料包括醋酸铀和磷酸钨^[240]。本研究在前期的实验中通过制备目的蛋白的负染样品来观察蛋白的形态以及聚集状态。实验步骤如下：

（1）由于铜网表面的碳膜疏水，不利于蛋白样品吸附，因此需要先使用 Gatan 等离子清洗机对铜网进行亲水化处理 10 s。亲水化原理是通过将氢气与氧气辉光放电产生等离子体，使得铜网表面亲水化。

（2）取纯化后的峰尖蛋白样品，将样品进行稀释至浓度 0.1 mg/mL，随后在 15,300 g 转速下离心 10 min。取 3.5 μL 蛋白滴于铜网上，孵育 1 min，随后用滤纸吸取多余液体。

（3）接着取 3.5 μL 醋酸铀滴于铜网上，目的是洗去蛋白样品中的缓冲液成分，随后用滤纸吸去醋酸铀染液。重复一次清洗。

（4）最后取 3.5 μL 醋酸铀滴于铜网上，孵育 1 min，随后吸去染液，风干至染液完全蒸发，将负染样品保存于样品盒中，在 120 kV 透射电镜下观察蛋白状态。

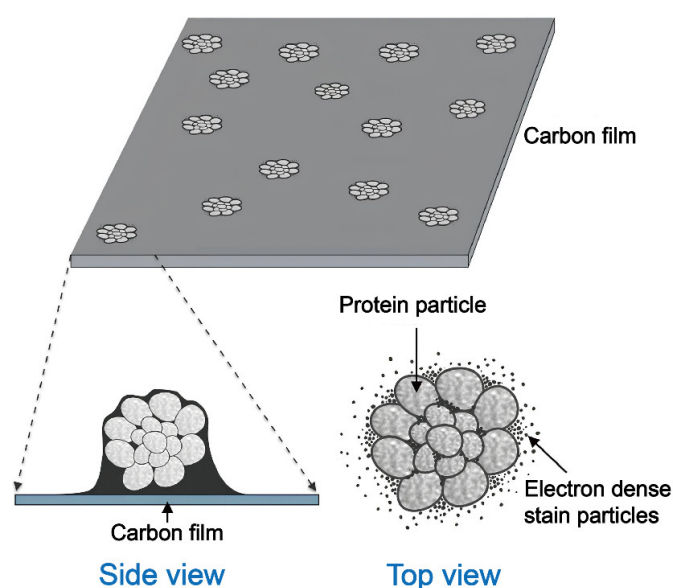


图 2.8 负染色原理

图注：图片来自网站 <https://myscope.training>，展示了负染色的原理，样品颗粒在重金属染料的深色背景下呈现为浅色。

2.2.5 冷冻电镜样品制备

为了使获得的冷冻电镜照片中蛋白颗粒数最大化，通常将纯化的膜蛋白样品浓缩至 5 mg/mL 以上，使得有更多的蛋白进入铜网的样品孔。随后将浓缩的蛋

白以 15,300 g 转速离心 10 min 去除浓缩过程中产生的蛋白沉淀，取上清进行冷冻制样。在三种底物结合以及 ATP/Mg²⁺结合的 chCTS 冷冻电镜样品制备时，浓缩后的蛋白先与底物或者 ATP/Mg²⁺孵育 30 min，再进行离心与冷冻制样。使用 Vitrobot 冷冻制样机进行冷冻制样（图 2.9）。本研究使用圆形多孔碳膜铜网，规格为 1.2/1.3，其中孔径大小为 1.2 μm，孔间距 1.3 μm。首先将铜网进行亲水化 10 s，冷冻制样温度设置为 8°C，湿度设置为 100%。取 3.5 μL 蛋白样品放置于铜网上，等待 5 秒以便蛋白吸附在铜网上，接着用滤纸吸去多余的液体并快速地将铜网投放于液态乙烷（-188°C）中，以免形成冰晶而破坏样品的完整性。最后将铜网从液态乙烷快速转移到液氮中，小心地将其放置于载网样品盒（grid box）中保存。

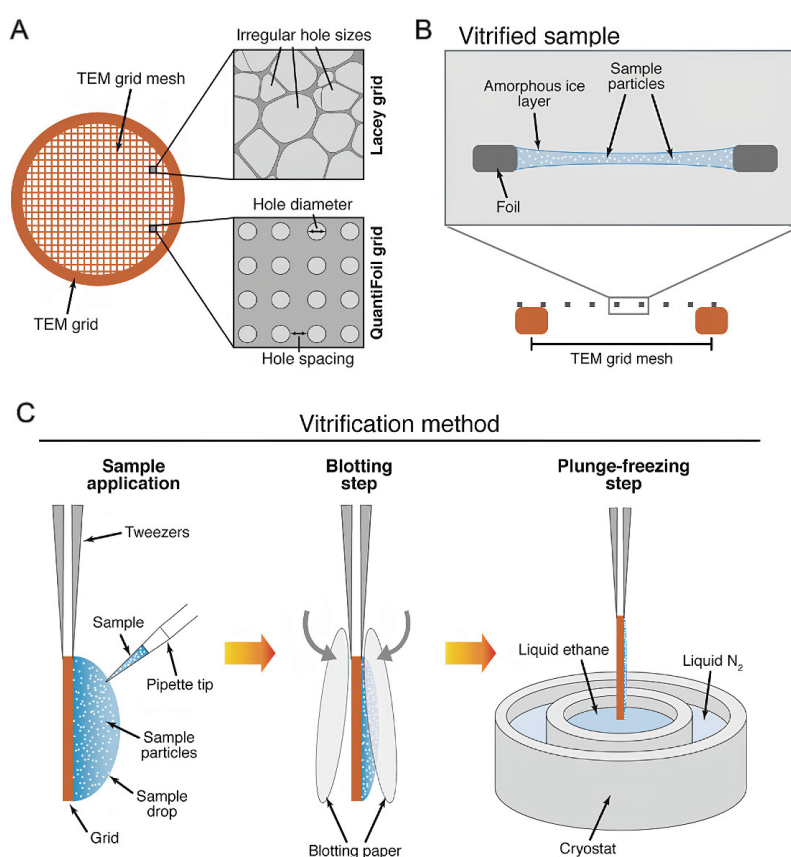


图 2.9 冷冻电镜样品制备流程^[241]

图注：A. 具有不规则孔径以及具有确定孔径和间距的电镜载网示例。B. 蛋白样品冷冻在玻璃冰中。C. 自动切入式冷冻机器将样品玻璃化的过程。

2.2.6 冷冻电镜样品观察

在进行大量数据收集之前使用 200 kV Glacios 冷冻透射电镜对冷冻样品进行检查，观察蛋白颗粒分布是否均一无聚集、冰层厚度是否合适。使用 EPU 软件检查样品以及收集数据。

(1) 首先, 打开分子泵, 关闭镜筒阀, 点击需要检查的样品编号, autoloader 机械手自动将样品放进镜筒中。为了减少震动, 检查样品时可将分子泵关闭。

(2) 选择“Atlas”放大倍数下检查整个铜网的透光情况。打开镜筒阀, 插入荧光屏, 选择一个透光的 square 将其移动到屏幕中心, 接着撤出荧光屏, 选择“Preview”拍摄一张低倍的局部铜网照片。

(3) 选择“Square”放大倍数, 将鼠标置于 square 中心, 点击“Preview”拍摄一张整个 square 的照片, 观察 square 中大致可收数据的孔数以及碳膜是否破裂。

(4) 选择“Hole/Eucentric Height”放大倍数, 在此倍数下调节 z 轴高度。将鼠标置于 square 中心的碳膜上, 点击 square 中心的碳膜, 点击“Preview”拍摄一张照片, 此时可粗略观察孔中的蛋白状态。在“Auto Function”中选择“Auto-eucentric by beam tilt”自动调节 z 轴高度。接着选择“Autofocus”自动调节焦距, 此时可点击“Preview”拍摄一张调节过 z 轴高度和焦距的照片, 观察冰层的厚度, 一般选择像水滴般立体的孔。冰层太薄则表明孔中央无蛋白, 冰层太厚则会出现蛋白颗粒叠加重合的状况。

(5) 将鼠标置于孔中心, 在“Data Acquisition”倍数下拍摄一张照片, 观察孔中的蛋白颗粒是否分布均匀无聚集, 此外还需注意孔中蛋白颗粒数目以调整下次制样时的蛋白浓度。若蛋白状态良好, 可继续拍摄 Atlas 大地图, 观察整个铜网中可用来收集数据的 square 是否足够。若足够, 可将此样品进行回收冻存于液氮中, 用于 300 kV 冷冻透射电镜数据收集。

2.2.7 冷冻电镜数据收集与处理

使用 Titan Krios G3i 300 kV 冷冻透射电镜进行数据收集 (图 2.10)。首先在 EPU 中拍摄 Atlas 地图, 结束后会对每个 square 的冰层厚度进行评估, 冰层厚度相似的 square 会被相同的颜色标记。随后建立 EPU 数据收集任务, 选择照片格式为无损压 Tiff 形式。接着挑选冰层合适的 square, 通常邻近的 square 冰层厚度类似, 尽量选取冰层较薄、面积较大的 square 进行数据收集, 可以减少相机移动的时间且避免出现颗粒叠加的情况。随后进行选孔, 在确定选择前最好在 Data Acquisition 倍数下观察孔中是否有蛋白颗粒, 避免收集空白照片。在选好孔后, 调节光斑大小与孔相同, 同时将相机的成像范围定位于孔中央, Autofocus 范围定位于碳膜中央, 将漂移区域与 Autofocus 范围重合, 设置每个拍摄位置的 Autofocus 值为-2.3, -2.2, -2.1, -2.0, -1.9, -1.8, -1.7, -1.6, -1.5。接着, 试运行设置的收集数据模板是否能正常运行。最后进行调光以及测定电子剂量, 在超分辨率 (Superresolution) 模式下进行数据收集的任务。在本研究中, 数据收集时

的放大倍数为 81K, 像素大小为 $1.07 \text{ \AA}$, 球差系数为 2.7 mm , 无配体状态、C12:0-CoA 结合以及 ATP/Mg²⁺结合的 chCTS 结构总电子剂量为 $55 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$, IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 结合的 chCTS 结构的总电子剂量为 $50 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ 。

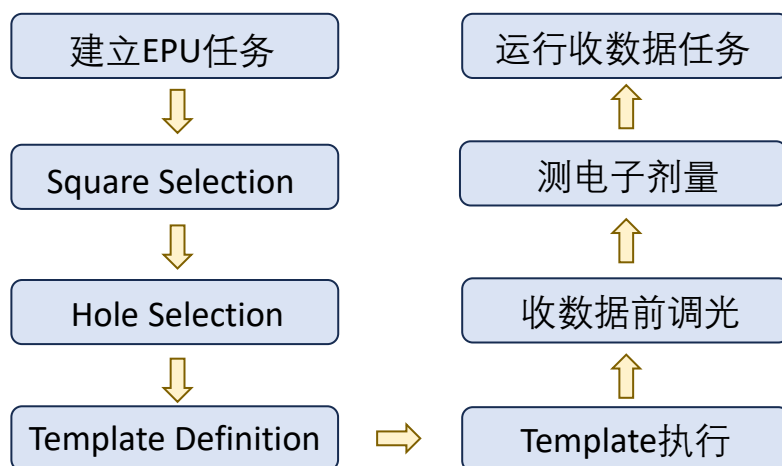


图 2.10 EPU 数据收集流程图

在数据收集完成后, 将数据拷贝至机械硬盘中, 在实验室的服务器中利用 cryoSPARC 进行数据处理 (图 2.11)。首先将 fractions.tiff 与 gain.tiff 文件导入, 随后进行漂移校正 (Motion Correction) 以及衬度传递函数 (Contrast Transfer Function, CTF) 估计与校正。接着进行颗粒挑选, 通过斑点挑选 (Blob picker) 自动选取直径范围在 $150 \text{ \AA}$ 至 $220 \text{ \AA}$ 之间的颗粒, 然后以 400 像素将这些颗粒提取, 设置提取后的颗粒尺寸为 200 像素。随后进行二维分类 (2D Classification), 将提取的这些颗粒分成 100 个类别, 一共进行 40 次迭代, 每个类别每次迭代使用 200 个颗粒, 最终选择具有明显结构特征 (如有两个 NBD 等) 的类别。通常重复 2~3 次二维分类, 将明显不是蛋白颗粒的类别去除, 保留目的蛋白颗粒的类别。接着以二维分类的结果为模板进行颗粒挑选, 选取直径为 $180 \text{ \AA}$ 的颗粒, 以 256 像素将这些颗粒提取, 设置提取后的颗粒尺寸为 128 像素, 进行两轮二维分类, 随后去除非蛋白颗粒的类别。在剩下类别的颗粒中取 200,000 颗粒进行三维模型重构 (Ab-Initio Reconstruction), 设置生成四类密度图模型, 接着将选取的二维分类的所有颗粒对这些密度图异质修正 (Heterogenous Refinement), 取分辨率高的密度图的颗粒继续进行三维模型重构, 设置生成三类密度图模型然后再异质修正。随后将分辨率较高的密度图颗粒以 280 像素进行提取, 重新进行三维模型重构与异质修正, 此时可以下载各类别的密度图, 在 Chimera 中观察这些密度图的构象是否相同, 将相似的密度图进行同质修正 (Homogeneous Refinement)。接着进一步对密度图进行细化, 包括非均匀修正 (Non-uniform Refinement)、全局 CTF 修正 (Global CTF Refinement) 以及局部修正 (Local Refinement), 最终

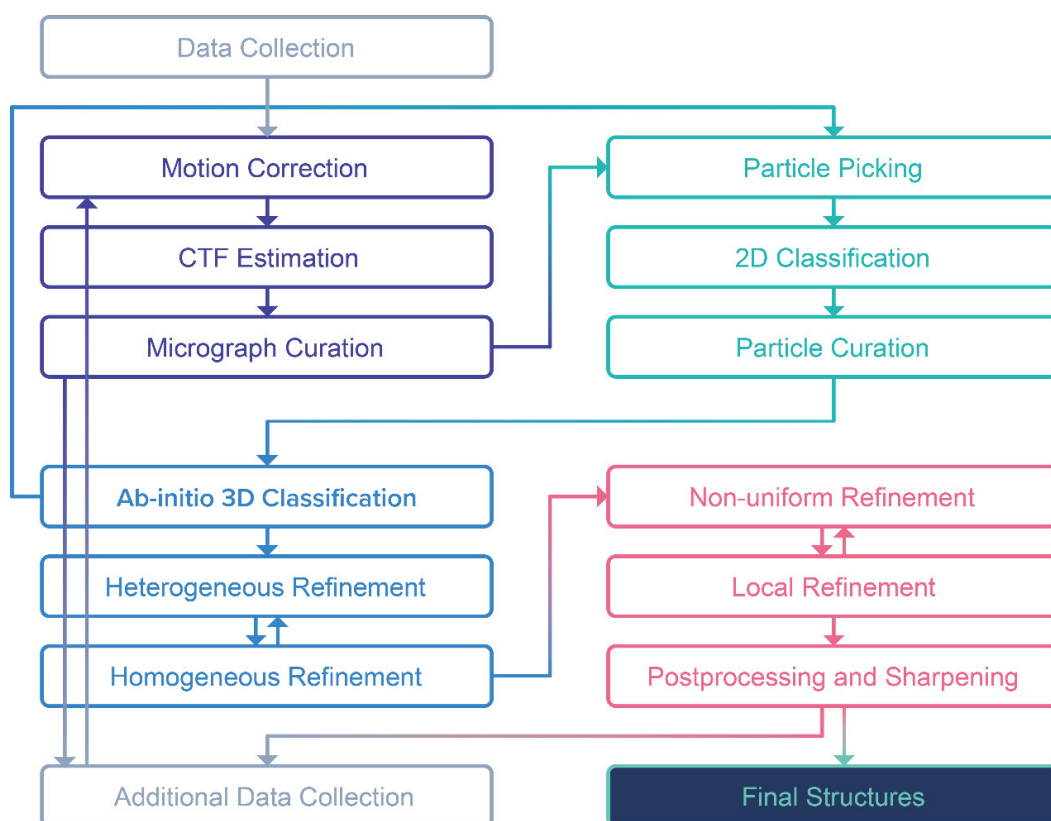


图 2.11 cryoSPARC 数据处理流程图

图注：图片来自于网站 <https://www.exxactcorp.com/category/CryoSPARC-Optimized-GPU-Solutions>。

2.2.8 蛋白质结构模型搭建

通过 cryoSPARC 对不同状态下 chCTS 的照片数据进行处理，分别得到了无配体、C12:0-CoA 结合、IBA-CoA 结合、2,4-DB-CoA 结合以及 ATP/Mg²⁺结合的 chCTS 较高分辨率的电镜密度图，随后对这些密度图进行原子模型搭建。

(1) 初始模型构建: Alphafold2 是一种用于预测蛋白质结构的机器学习算法, 目前已获得数十万个蛋白质结构模型^[242]。首先在 Alphafold 数据库中搜索拟南芥 CTS 的预测结构模型 (标识符为 AF-Q94FB9-F1-v4, 记为 CTS_{AF})。由于预测的 CTS_{AF} 结构模型构象与无配体 chCTS 密度图构象差异较大, 因此选择分开截取 CTS_{AF} 的 TMDs 以及 NBDs, 并在 UCSF Chimera 1.15 软件中将其分别安置于无配体 chCTS 的密度图中, 从而得到无配体 chCTS 密度图的初始结构模型。对于三种底物结合的 chCTS 密度图而言, 初始结构模型为 CTS_{AF}; 对于 ATP/Mg²⁺ 结合的 chCTS 密度图而言, 初始结构模型为已解析的无配体 chCTS 结构。

(2) 结构修正与细化：首先将密度图与初始模型在 Phenix 1.20.1 软件中进行初步的实空间修正 (Real-space refinement)，随后在 WinCoot 软件中检查每个

残基位置与键角是否正确，若不正确的话可手动进行实空间修正（Real Space Refine Zone）与旋转异构修正（Rotamers Select），确保每个氨基酸残基的二面角 ψ 和 ϕ 在拉式图（Ramachandran Plot）中处于合理区域。对于小分子的结构模型而言，若收录于 PDB 数据库中，如 C12:0-CoA 分子，通过复制其 SMILES 号在 Phenix 1.20.1 中利用 eLBOW 功能生成 pdb 文件以及 cif 文件；若未收录于 PDB 数据库，如本研究中化学合成的 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 分子，则首先在 COOT 软件中绘制其结构式并生成 SMILES 号，再通过 Phenix 1.20.1 生成 pdb 文件以及 cif 文件。

（3）结构模型评估：在 Phenix 1.20.1 软件中对搭建的结构原子模型进行全面验证（Comprehensive validation），观察冲突数值（Clash score）、旋转异构异常值（Rotamer outliers）是否处于相对合理的范围内。对于 Clash score 较高的模型，则需要在 WinCoot 中继续对产生冲突的残基进行修正与调节。本论文中的结构图均通过 UCSF Chimera 1.15 以及 PYMOL 2.5.5 进行绘制。

2.2.9 ATPase 活性实验

ABC 转运蛋白在将底物进行跨膜转运时会伴随着 ATP 的结合、水解以及磷酸根的释放^[1]，这意味着底物可以刺激 ABC 转运蛋白的 ATPase 活性，ATPase 活性可以侧面反映蛋白转运底物的能力。本研究使用孔雀石绿-磷钼酸分光光度法测定 CTS 水解 ATP 时所释放的游离磷酸根^[243,244]，其原理是在酸性条件下，磷酸根与钼酸铵反应生成磷钼酸，磷钼酸进一步转化为杂多酸阴离子，随后与孔雀石绿阳离子发生离子缔合反应生成离子缔合物，这种缔合物在酸性条件下十分稳定，呈现蓝绿色且颜色的深浅与磷酸盐的含量成正比，可在 630 nm 波长处测定吸收值。在此方法中，首先需要测定磷酸根的标准曲线，接着将反应后测定的 630 nm 吸收值代入标准曲线即可获得反应体系中磷酸根的含量。

本研究中 ATPase 活性实验的反应总体积为 90 μL ，蛋白终浓度为 0.05 μM ，反应 buffer 为 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM MgCl_2 , 0.02% (w/v) GDN。每组实验进行三次重复。在进行反应前准备以下试剂：

- （1）纯化后的蛋白进行浓缩至 3.33 μM （即 0.5 mg/mL）。
- （2）500 mM ATP：使用抽滤过的 ddH₂O 溶解 ATP 粉末，使用 NaOH 调至中性 pH。不同浓度 ATP 母液使用 buffer B 进行稀释。
- （3）底物分子母液：短链、中长链以及长链脂肪酰基辅酶 A、IBA-CoA、2,4-DB-CoA 均使用 buffer B 溶解，超长链脂肪酰基辅酶 A 使用 5% (w/v) β 环糊精溶解，均使用 NaOH 调节至中性 pH。
- （4）显色液 Mix：由孔雀石绿母液、钼酸铵母液以及 Tween-20 按 100: 25:

2 的体积比配制而成。孔雀石绿母液由 0.44 g 孔雀石绿粉末溶于 360 mL 1.5M H_2SO_4 配制而成；钼酸铵母液由 0.1 g 四水合钼酸铵粉末在 90°C 下溶于 1.25 mL ddH₂O 配制而成，现配现用。

在进行 ATP 浓度依赖的 ATPase 活性实验时，向每个体系中依次加入 1.5×反应 buffer、ddH₂O、蛋白以及对应浓度的 ATP，混匀后 37°C 水浴反应 20 min，随后将整个反应体系在 4°C 下 15,300 g 离心 5 min，混匀后取 75 μL 加到 25 μL 显色液中，显色 2 min 后加入 10 μL 5% (w/v) 草酸终止反应，室温避光放置 1 h 后测量 630 nm 处的吸收值。在进行底物浓度依赖的 ATPase 活性实验时，ATP 的终浓度为 2 mM，加入反应 buffer、ddH₂O、蛋白以及底物后混匀，冰上孵育 10 min，再加入 ATP 进行后续的反应。

使用多功能酶标仪 ID5 测量 630 nm 处的吸收值，根据标准曲线将这些吸收值换算为每个反应体系中磷酸根含量。通过减去 ATP 自水解产生的磷酸根，可以得到由 CTS 蛋白水解 ATP 产生的磷酸根含量，再除以时间与蛋白含量则得到 CTS 水解 ATP 的速率。将加入底物实验组水解 ATP 的速率除以 CTS 水解 ATP 基础速率（不加底物）即可得到底物刺激的相对 ATPase 活性。使用 GraphPad Prism 软件进行 ATPase 活性曲线以及柱状图的绘制。

表 2.8 CTS 的 ATPase 活性实验体系

分组	自水解 (μL)	基础水解 (μL)	底物刺激 (μL)
1.5×反应 buffer	60	60	60
3.3 μM 蛋白	0	1.3	1.3
100×底物	0	0	0.9
100×ATP	0.9	0.9	0.9
ddH ₂ O	29.1	27.8	26.9

表注：100×底物是指体系中底物终浓度的 100 倍；100×ATP 是指体系中 ATP 终浓度的 100 倍。

2.2.10 拟南芥生理实验

为了深入理解 CTS 转运底物的分子机制，本研究构建了野生型以及单点突变的 *cts* 基因回补质粒，并将这些质粒回补 *cts* 突变体植株（本研究使用的是 *pxa1-2* 突变体^[245]，SALK_019334，下文简称 *cts* 突变体），进而检测 CTS 单个氨基酸残基的突变是否影响种子的萌发以及对脂肪酸、IBA 与 2,4-DB 的转运能力（图 2.12）。

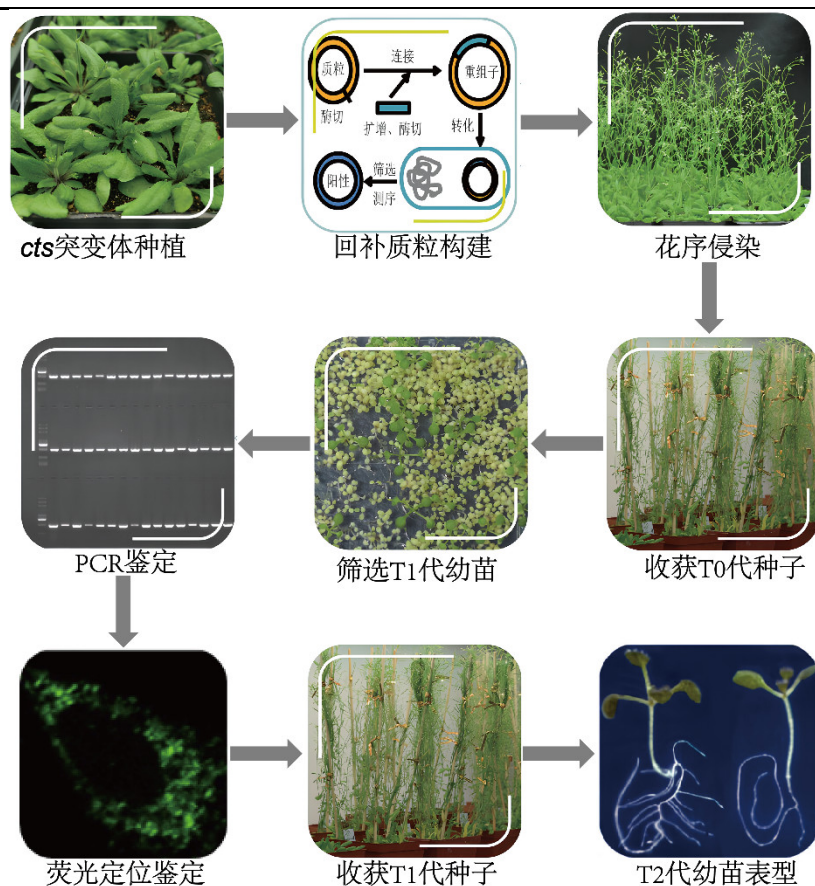


图 2.12 拟南芥回补实验流程

首先构建野生型以及单点突变的 *cts* 基因回补质粒。以拟南芥幼苗提取的 cDNA 及基因组为模板,通过 PCR 分别扩增 *cts* 基因编码区及启动子(promoter)片段。利用同源重组的方法,将 *cts* 基因及 promoter 片段分别构建于 pENTR 以及 pDONR 载体,重组质粒分别记为 pENTR-CTS、pDONR-promoter。为了鉴定回补的 CTS 蛋白是否正确定位,在其 C 端融合荧光蛋白 Venus。利用 LR 克隆酶,将中间载体 pDONR-promoter、pENTR-CTS、pDONR-Venus 与目的载体 p35S 进行重组,构建终载回补质粒 p35S-promoter-CTS-Venus(下文简称为 p35S-CTS)。终载质粒 p35S 具有草铵膦(Basta)抗性基因,用于后续筛选回补成功的植株。

接下来利用农杆菌侵染花序法对 *cts* 突变体进行遗传操作。将回补质粒 p35S-CTS 电转化到农杆菌中,制备侵染的农杆菌悬浮液,使用移液枪将农杆菌悬浮液滴在拟南芥的花序上,待植株成熟后得到的种子即为 T0 代种子。接着将 T0 代种子播种到抗性平板上,挑选正常生长的幼苗转移到土壤中继续生长。待幼苗长大后采集叶片并提取基因组,通过 PCR 验证目的基因是否成功转化到 *cts* 突变体中。对于点突变的植株,还需将 PCR 产物进行测序验证。待植株成熟后收获种子,即为 T1 代种子。对于种子萌发实验,将 T1 代种子灭菌后播种于植物琼脂平板(Basta)上,冷处理 2 天后转移至 16 h 光照/8 h 黑暗光周期的 22°C 温室生

长7天，观察各基因型种子是否萌发。在测定拟南芥植株转运脂肪酸能力的实验中，将T1代种子灭菌后播种于添加蔗糖及不加蔗糖的平板（均添加Basta）上，观察7天后幼苗的生长情况。在测定拟南芥植株转运2,4-DB能力的实验中，将T1代种子灭菌后播种于加蔗糖的平板（Basta）平板上，生长4天后将幼苗转移到1 μM 2,4-DB平板上，继续生长7天后观察幼苗根系的生长情况。类似地，在测定拟南芥植株转运IBA能力的实验中，将生长7天后的幼苗转移到5 μM IBA平板上，7天后观察幼苗侧根的数量。对于不萌发的种子，需用针头破坏种皮后才能正常生长幼苗。此部分实验与彭亚坤博士一起完成。

2.2.11 分子动力学模拟实验

本研究采用显式溶剂模型进行全原子分子动力学模拟，以探究OPDA-CoA分子与chCTS蛋白的结合稳定性。此部分实验由李勃锐博士完成。

首先，将OPDA-CoA分子的结构对接(docking)在chCTS与C12:0-CoA复合物电镜密度图C12:0-CoA对应的密度中。使用CHARMM-GUI网站进行蛋白质包埋、溶剂化、力场生成等操作。小分子力场使用CGenFF生成。chCTS蛋白包埋在双层磷脂POPC中，并使用TIP3P水模型及50 mM KCl进行溶剂化，box尺寸为107 Å×107 Å×195 Å。使用GROMACS 2024.3在温度300K下进行模拟。首先进行能量最小化消除不合理结构，进行短暂的125 ps的NVT平衡模拟。接下来进行3次100 ns的NPT production模拟，监测chCTS蛋白与OPDA-CoA分子随时间变化的RMSD来验证平衡。使用GROMACS软件对OPDA-CoA分子相对于chCTS蛋白C α 原子的RMSD进行计算，每0.1 ns统计一次RMSD，使用Matplotlib绘制RMSD的统计图。通过GROMACS软件的cluster功能对模拟轨迹进行聚类，设定RMSD截止距离设为3 Å，统计一共出现的聚类数（簇）。选取最大簇的代表构象作为蛋白-小分子复合物的结合模式。

第3章 实验结果

3.1 拟南芥 CTS 蛋白的表达与纯化

在对蛋白进行结构解析与生化表征前需要获取足够表达量的高纯度目的蛋白，从拟南芥内源提取 CTS 蛋白耗时长且蛋白量低，因此首先尝试在人胚胎肾细胞 HEK293F 中重组表达 CTS 蛋白。

3.1.1 表达载体的筛选

常见的哺乳细胞表达载体有 pcDNA 与 pCAG，其中 pcDNA 载体使用巨细胞病毒（Cytomegalovirus, CMV）强启动子，pCAG 载体则是在 pcDNA3.1 载体的基础上将 CMV 启动子换成 CAG 强启动子。CAG 启动子是一种人工启动子，由 CMV 的增强子序列、鸡 β -肌动蛋白（chicken β -actin）启动子以及兔 β -珠蛋白（rabbit β -globin）组成，其转录能力与 CMV 类似，但表达谱更广，且能在多种细胞中促进基因表达而不被沉默。

首先通过同源重组将 *cts* 基因构建到 pcDNA-NF、pcDNA-CF、pCAG-NF 以及 pCAG-CF 载体，随后大提质粒并转染到 400 mL HEK293F 细胞中，37°C 表达两天后收集细胞进行表达检测。使用去垢剂 1% DDM-0.1% CHS 溶解 CTS 蛋白，使用 0.02% GDN 进行 FLAG 凝胶亲和层析，将洗脱的蛋白样品进行浓缩并通过 SDS-PAGE 检测蛋白是否表达（图 3.1）。

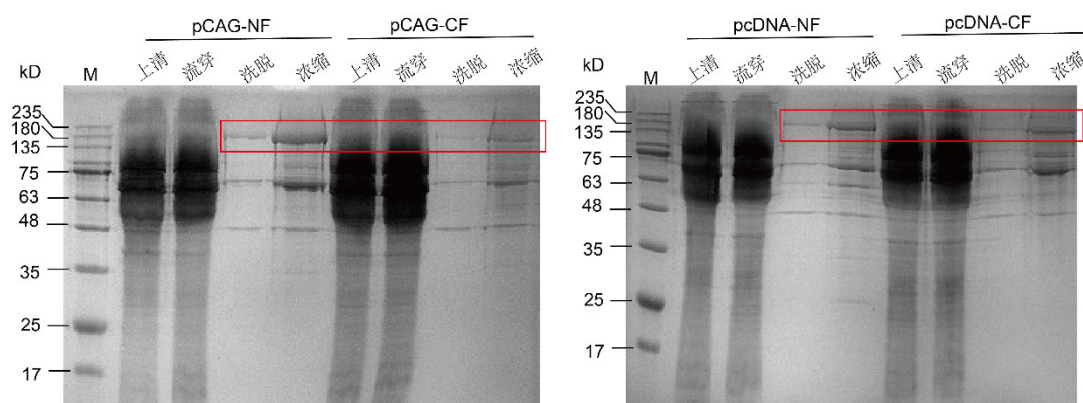


图 3.1 不同载体表达拟南芥 CTS 蛋白的 SDS-PAGE 结果

图注：上清泳道指超速离心后的上清取样；流穿泳道指上清在 FLAG 凝胶中孵育 1 h 后流穿的样品；洗脱泳道指 FLAG 凝胶亲和层析的洗脱液；浓缩泳道指浓缩后的洗脱液样品。M 指蛋白 marker。红色方框内是拟南芥 CTS 的条带。

结果显示，四种重组质粒表达后的蛋白纯化样品中均有 CTS 的条带（149 kD）（图 3.1），表明 CTS 蛋白可以在 HEK293F 细胞中表达；然而 CTS 的蛋白条带

太浅，蛋白表达量低，若需要冷冻制样，则需转染更多的细胞来表达蛋白，对于去垢剂与培养基的需求较高。此外，在 70 kD 处有明显的杂蛋白条带，猜测可能是热激蛋白，这表明 CTS 的表达状态不好，蛋白可能未完全折叠。

从 SDS-PAGE 结果初步判断 pCAG-NF 表达的蛋白量最高，条带最粗，因此将浓缩后的样品进行尺寸排阻层析，使用 Superose 200 increase 10/300 层析柱（下文简称 S200）对洗脱液进行分离纯化，评估 CTS 的表达量。从尺寸排阻层析的结果看（图 3.2A），主要在 10 mL 以及 19 mL 出现了两个样品峰。根据标定分子量计算公式（ $y=0.2109 \cdot x+4.9531$ ，其中 x 为出峰位置/mL， y 为分子量大小/kD），19 mL 的样品为洗脱液中 FLAG 肽，10 mL 的样品可能是 CTS，因此选取出峰位置为 10 mL 的样品进行 SDS-PAGE。SDS-PAGE 显示有 CTS 的条带（图 3.2B），表明该峰为目的蛋白 CTS 的峰，但样品中除了目的蛋白还有 75 kD 大小的杂蛋白未能分离。

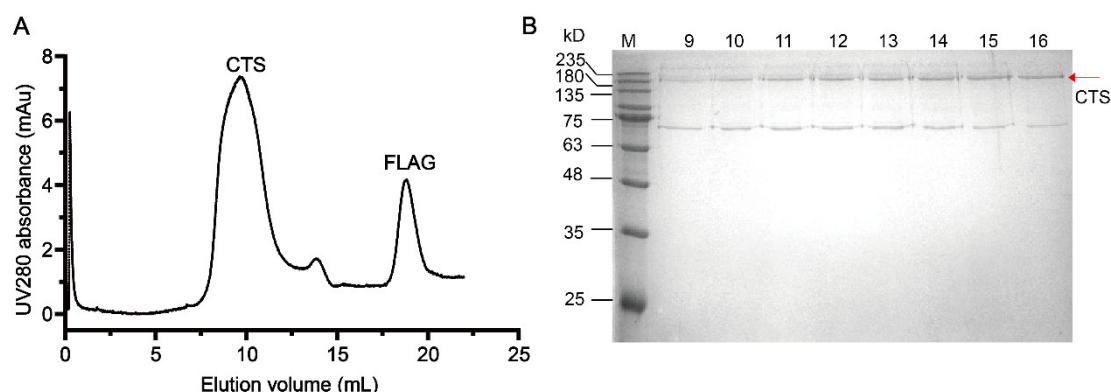


图 3.2 pCAG-NF-CTS 纯化结果

图注：A. 尺寸排阻层析结果。CTS 蛋白在 10 mL 出峰。B. CTS 蛋白峰样品的 SDS-PAGE 结果。红色箭头处为 CTS 的条带。M 指蛋白 marker。9-16 表示峰尖对应的样品管序号。

综上，CTS 在 pCAG-NF 载体中的表达量最高，但得到的蛋白远不足用于冷冻电镜制样，且蛋白峰形不够对称尖锐，纯化效果不好。

3.1.2 表达条件以及纯化去垢剂筛选

去垢剂的选择对于膜蛋白的纯化十分重要，不同的去垢剂纯化效率可能不同，因此需筛选不同的去垢剂组合，溶解膜去垢剂为 DDM 或者 LMNG，纯化去垢剂为 GDN 或者 digitonin，观察对蛋白纯化得率是否有所提高。此外，由于 37°C 表达条件下蛋白样品中杂蛋白较多，因此尝试在转染后加丁酸钠 30°C 表达两天，并且在纯化过程中加入 ATP 以去除热激蛋白。结果显示（图 3.3A），30°C 表达以及纯化时加入 ATP 可有效地去除大部分杂蛋白，目的蛋白的纯度大大提高。此外，从 SDS-PAGE 结果看，不同去垢剂组合纯化的蛋白量无明显区别。后续使用

S6 层析柱对浓缩后的洗脱液进行分离纯化。结果显示（图 3.3B），30℃表达的蛋白峰更对称，且 LMNG-GDN 组合纯化的蛋白量最高。

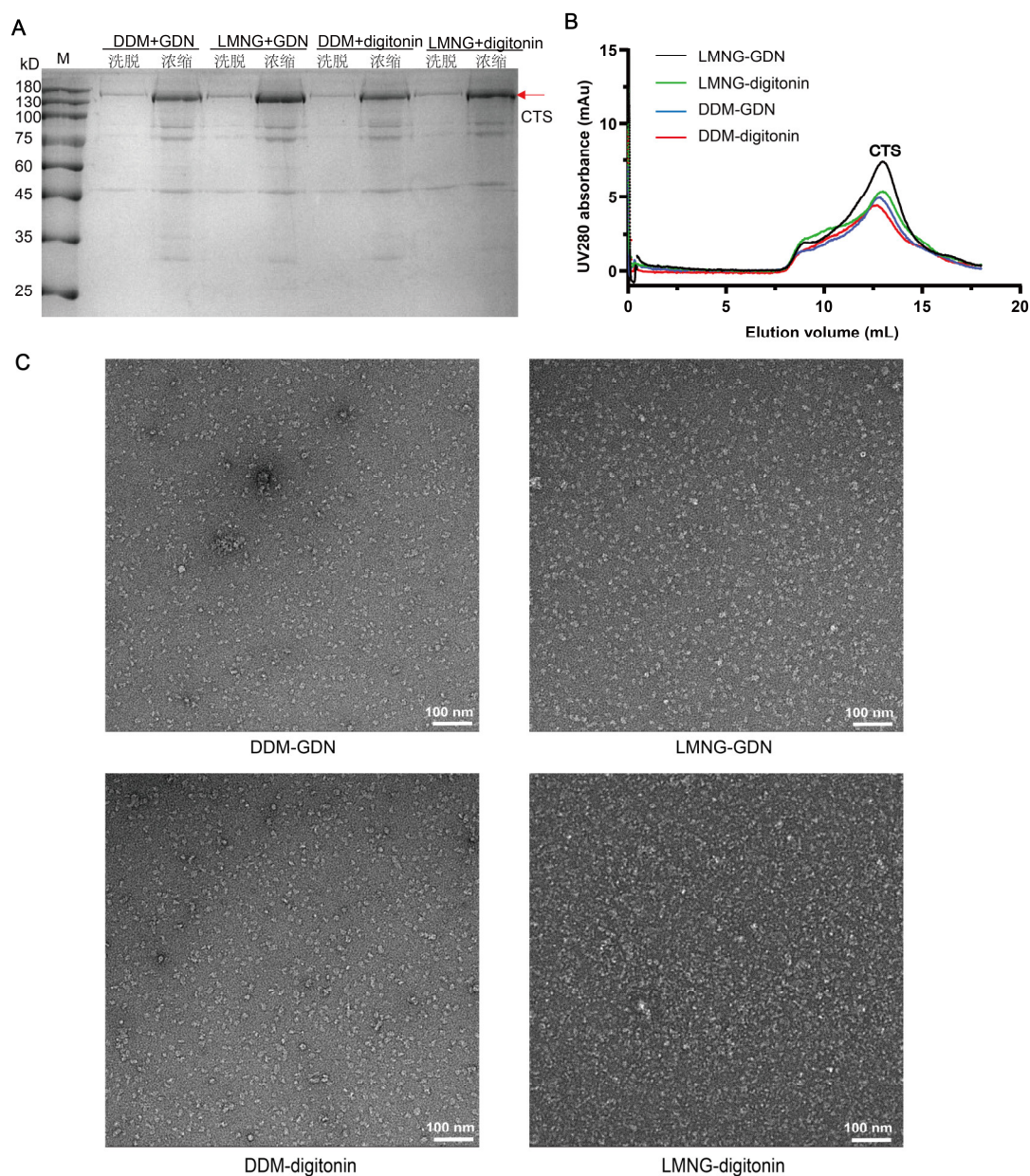


图 3.3 不同去垢剂组合纯化 pCAG-NF-CTS 的结果

图注：A. 不同去垢剂组合纯化 CTS 蛋白的 SDS-PAGE 结果。红色箭头处为 CTS 的条带。M 指蛋白 marker。B. 尺寸排阻层析结果。C. 使用 120 kV 透射电镜在 45,000×放大倍数下拍摄不同去垢剂组合纯化 CTS 蛋白负染样品的电镜照片。

此外，为了观察不同去垢剂纯化 CTS 蛋白的聚集状态，取峰尖的蛋白样品进行负染制样，使用 120 kV 透射电子显微镜观察负染样品。结果显示，DDM-GDN、DDM-digitonin 以及 LMNG-GDN 纯化的蛋白负染样品中目的蛋白均分散均匀，呈现单颗粒状态（图 3.3C）；而 LMNG-digitonin 纯化的蛋白负染样品中颗

粒不均一，表明此条件去垢剂不适合纯化目的蛋白。此外，使用 LMNG-GDN 纯化的蛋白负染样品，蛋白颗粒大小均一性更高，蛋白的状态更好。

综合纯化以及负染的结果，后续蛋白均在 30℃ 表达且使用 LMNG-GDN 去垢剂纯化。

3.1.3 表达体系的筛选

真核蛋白常用的表达体系包括酵母细胞、昆虫细胞以及哺乳动物细胞^[246]。昆虫细胞膜的成分与哺乳动物细胞不同，其胆固醇含量较低，细胞膜的流动性高，有助于膜蛋白插入与定位，因此多用于动植物膜蛋白的异源表达。本研究也尝试在昆虫细胞中表达 CTS 蛋白，使用 400 mL sf9 细胞进行表达检测，观察蛋白表达量。使用 1% LMNG-0.1% CHS 溶解 CTS 蛋白，0.02% GDN 进行后续纯化，实验条件及操作与纯化在 HEK293F 细胞中表达的 CTS 蛋白完全相同。结果显示，CTS 在昆虫细胞体系中表达，且 N 端 FLAG 的 CTS 条带比 C 端 FLAG 的更深，说明表达量更高（图 3.4A），这与在哺乳动物 HEK293F 中表达结果类似；取 NF-CTS 样品进行尺寸排阻层析，结果显示（图 3.4B），在昆虫细胞中 CTS 的表达量比在 HEK293F 中表达的更高，但对于冷冻电镜样品制备而言蛋白表达量仍然不够。此外 CTS 的峰形不对称，说明蛋白出现聚集，状态较差。

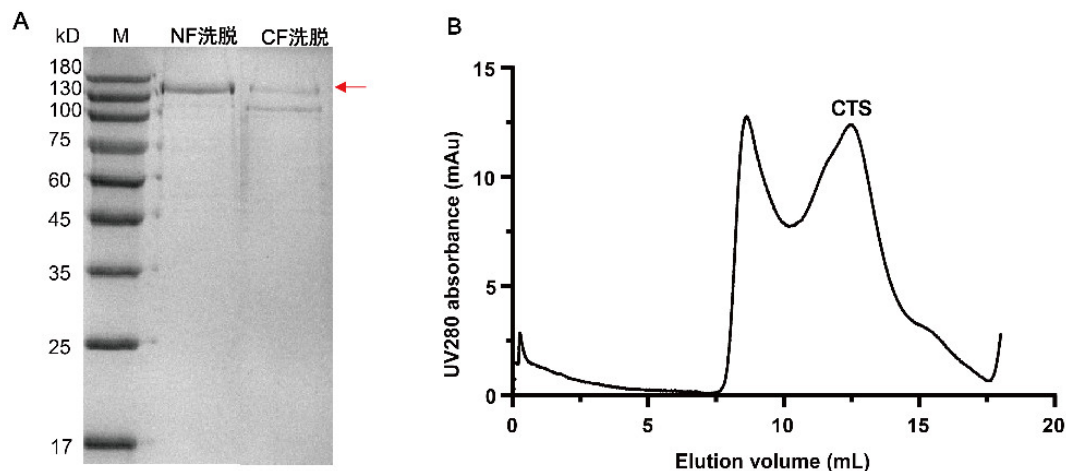


图 3.4 昆虫细胞中 NF-CTS 的纯化结果

图注：A. CTS 在昆虫细胞体系中表达的 SDS-PAGE 结果。红色箭头处为 CTS 的条带。M 指蛋白 marker。B. NF-CTS 的尺寸排阻层析结果。

综合以上表达载体、纯化条件以及表达体系优化的结果，最终选择在 30℃ 条件下于 HEK293F 细胞中表达全长拟南芥 CTS 蛋白（pCAG-NF-CTS），纯化蛋白时使用去垢剂 LMNG-CHS 进行膜溶解以及 GDN 进行层析分离，所得的蛋白用于后续 ATPase 活性实验。

3.2 拟南芥-线虫 CTS 嵌合体蛋白的表达与纯化

前期的实验结果表明纯化的 CTS 蛋白量不足以用于制备冷冻电镜样品，且将秀丽隐杆线虫 PMP-4、PMP-2 的 N 端 H0 基序分别嵌合到人类 ABCD1 与 ABCD3 的 N 端可以明显提高 ABCD1 以及 ABCD3 的表达量^[54,59]，因此本研究尝试将 CTS 蛋白的 N 端 H0 基序替换为线虫 PMP2 以及 PMP-4 的 H0 基序，观察是否能提高 CTS 蛋白在 HEK293F 细胞中的表达量。将纯化标签 FLAG 融合在 CTS 的 N 末端以及使用 pCAG 载体时蛋白的表达量更高，因此构建拟南芥-线虫嵌合 CTS 蛋白时也将 FLAG 标签融合在 N 端，一同构建于 pCAG 载体。将三种重组质粒 pCAG-NF-2-49-CTS、pCAG-NF-2-58-CTS、pCAG-NF-4-64-CTS 转染于 400 mL HEK293F 细胞中，30℃表达两天，随后收集细胞进行表达检测。使用 1%LMNG-0.1%CHS 溶解蛋白，0.02%GDN 进行后续纯化，实验条件及操作与纯化拟南芥全长 CTS 蛋白完全相同。SDS-PAGE 结果显示，拟南芥-线虫嵌合的 CTS 蛋白均有表达，其中 NF-4-64-CTS 以及 NF-2-58-CTS 的条带更粗，蛋白表达量更高（图 3.5）。

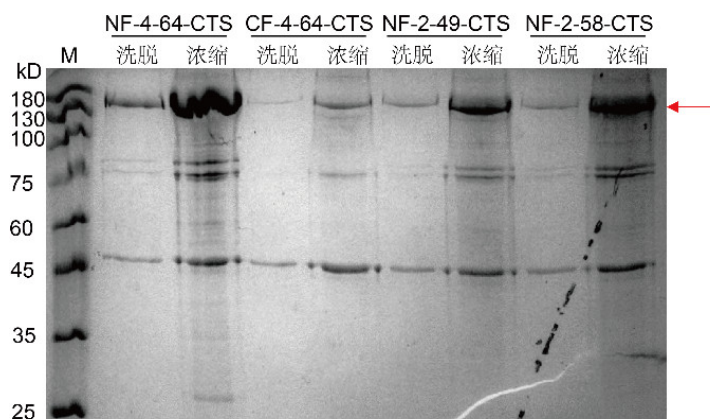


图 3.5 拟南芥-线虫嵌合 CTS 蛋白的纯化结果

图注：四种拟南芥-线虫嵌合 CTS 蛋白在 HEK293F 细胞中表达的 SDS-PAGE 结果。

红色箭头处为嵌合 CTS 的条带。M 指蛋白 marker。NF 表示 FLAG 融合于 N 端；CF 表示 FLAG 融合于 C 端。

为了进一步评估蛋白表达量，将浓缩后的蛋白样品进行尺寸排阻层析。结果显示，线虫 PMP-4 与 CTS 的嵌合体 NF-4-64-CTS 的表达量最高（图 3.6），峰高约为拟南芥全长 CTS 峰高的 2 倍，而线虫 PMP-2 与 CTS 的两种嵌合体 NF-2-49-CTS、NF-2-58-CTS 峰高与拟南芥全长 CTS 峰高无明显区别。此外，嵌合体 NF-4-64-CTS 的峰形比全长 CTS 更加尖锐更加对称，表明嵌合体的蛋白状态更好。

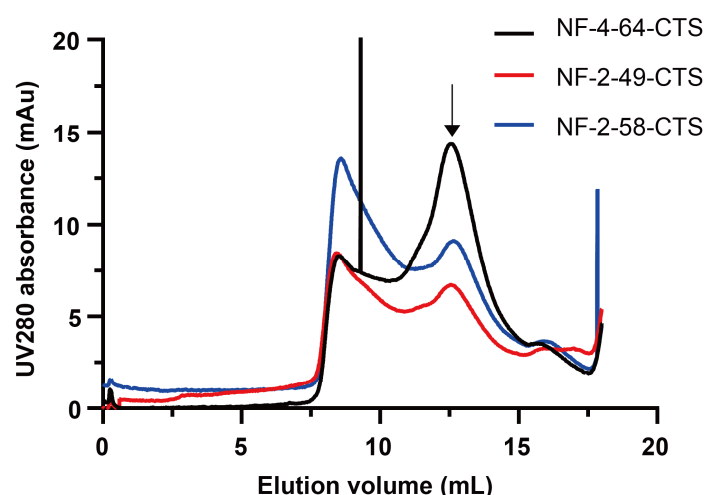


图 3.6 三种拟南芥-线虫嵌合 CTS 蛋白的尺寸排阻层析结果

图注：横坐标表示蛋白的出峰位置，纵坐标表示 280 nm 处的 UV 吸收峰。

为了观察不同版本拟南芥-线虫嵌合体 CTS 蛋白的状态，分别取峰尖的蛋白样品进行负染制样，使用 120 kV 透射电子显微镜观察负染样品。结果显示，三种嵌合体蛋白均分散均匀且呈现单颗粒状态（图 3.7）。然而综合纯化获得的蛋白量考虑，后续主要对嵌合体 NF-4-64-CTS（下文将 NF-4-64-CTS 称为 chimeric CTS，简称 chCTS）进行生化表征，观察其与拟南芥全长 CTS 生化活性的差别。

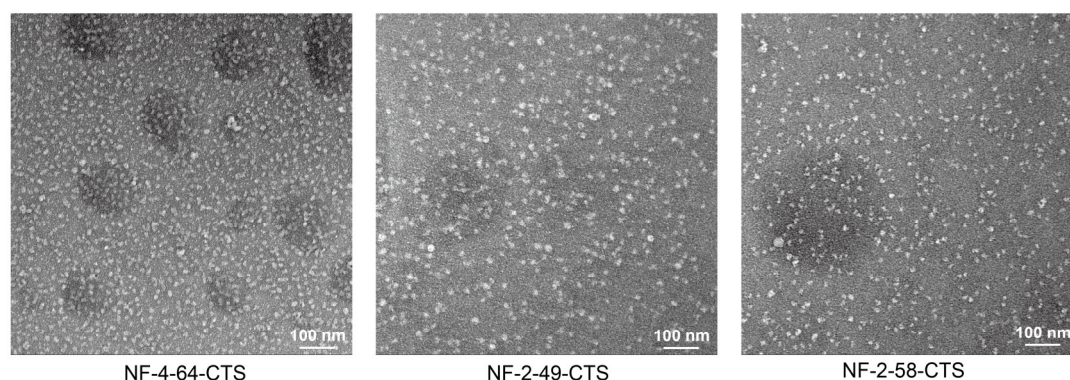


图 3.7 不同版本拟南芥-线虫嵌合体 CTS 蛋白的负染样品结果

图注：使用 120 kV 透射电镜在 45,000×放大倍数下拍摄的蛋白负染样品的电镜照片。

3.3 拟南芥 CTS 的 ATPase 活性检测

ABC 转运蛋白通过 NBD 结合、水解 ATP 以及释放磷酸根，驱动 TMD 发生构象变化从而使得底物分子进行跨膜易位^[2]。因此底物可以刺激 ABC 转运蛋白的 ATPase 活性，ATPase 活性可以侧面反映蛋白转运底物的能力。

为了检验纯化所得的拟南芥全长 CTS 蛋白是否具有活性, 首先对全长 CTS 蛋白进行 ATPase 活性检测, 观察其是否具有水解 ATP 的能力。结果显示, 全长 CTS 蛋白可以水解 ATP, 具有 ATPase 活性且活性随 ATP 浓度的增加而增加, 在 ATP 浓度达到 4 mM 时反应达到最大速率 (图 3.8A)。使用米氏方程对全长 CTS 蛋白水解 ATP 的活性曲线进行拟合, 计算得出 K_m 值为 2.26 mM, 最大速率 V_{max} 为 $35.96 \text{ mol Pi min}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ 。ABC 转运蛋白 NBD 结构域 H 开关中的组氨酸负责稳定催化过度状态^[1]。对 CTS 蛋白的 NBD 进行多序列比对 (图 3.8B), 发现 NBD2 结构域中 H 开关的组氨酸退化为谷氨酰胺 (Q1305), 这表明 CTS 蛋白只存在一个 ATPase 活性位点。因此, 将 CTS 蛋白 NBD1 中负责极化水分子的谷氨酸突变成谷氨酰胺 (记为 E607Q 突变) 后, CTS 蛋白的 ATPase 活性几乎完全丧失 (图 3.8A)。

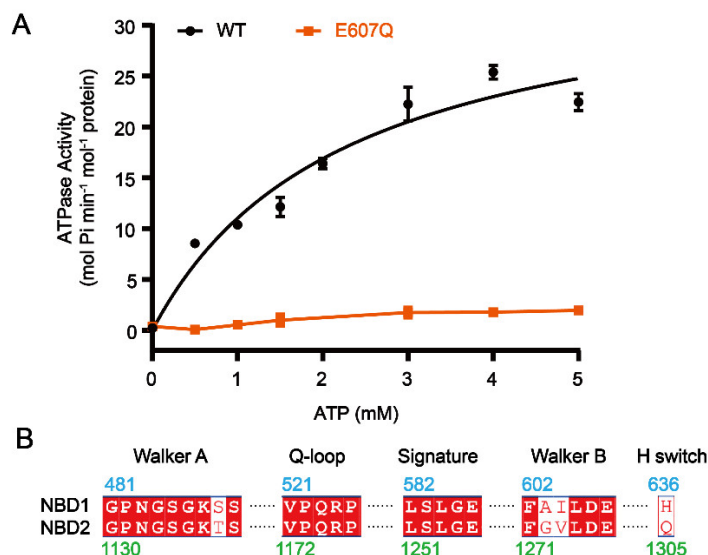


图 3.8 拟南芥 CTS 蛋白的 ATPase 活性

图注: A. 拟南芥 CTS 蛋白野生型 (WT) 以及 E607Q 突变体的 ATPase 活性测定, 其中 WT 的 ATPase 活性曲线使用米氏方程进行拟合。B. 拟南芥 CTS 蛋白 NBDs 中结合以及水解 ATP 基序的序列比对结果。

遗传学生理实验表明, CTS 蛋白功能缺陷将导致幼苗中积累脂肪酸以及脂酰辅酶 A^[47]。体外生化实验表明, 脂酰辅酶 A 而非脂肪酸可以明显刺激 CTS 蛋白的 ATPase 活性^[51]。为了探究使用去垢剂纯化在 HEK293F 细胞中表达的 CTS 蛋白的 ATPase 活性是否响应底物的刺激, 将不同长度脂肪酸以及脂酰辅酶 A (图 3.9A) 加入 ATPase 活性体系, 观察 CTS 水解 ATP 的速率是否增加。结果表明, 加入游离脂肪酸 C8:0、C12:0 的 ATPase 活性与基础 ATPase 活性 (不加底物) 没有明显差异, 表明 C8:0 与 C12:0 不刺激 CTS 蛋白的 ATPase 活性 (图 3.9B)。类似地, 生长素 IBA 以及除草剂 2,4-DB 也不刺激 CTS 蛋白的 ATPase 活性。相反, C8:0-CoA 以及 C12:0-CoA 可以明显刺激 CTS 的 ATPase 活性, 约为基础 ATPase

活性的 7 倍 (图 3.9B)。这些结果表明, 辅酶 A 修饰的脂肪酸才是 CTS 的底物。此外, 长链 (C16)、超长链 (C22、C24、C26) 以及支链 (4ME C16, phytanic acid) 脂酰辅酶 A 均能明显刺激全长 CTS 蛋白的 ATPase 活性, 分别为基础 ATPase 活性的 6.4 倍、4.6 倍、4.8 倍、3.7 倍以及 4.7 倍 (图 3.9B)。本研究还测试了短链脂酰辅酶 A (C2:0-CoA) 对 CTS 蛋白 ATPase 活性的影响, 结果显示, C2:0-CoA 也能刺激 CTS 的 ATPase 活性, 约为基础 ATPase 活性的 1.8 倍 (图 3.9B)。这些结果表明, 不同长度的脂酰辅酶 A, 从短链 C2 至超长链 C26, 均能刺激 CTS 的 ATPase 活性, 其中 C8:0-CoA、C12:0-CoA 以及 C16:0-CoA 对 CTS 的 ATPase 活性刺激效果更显著。

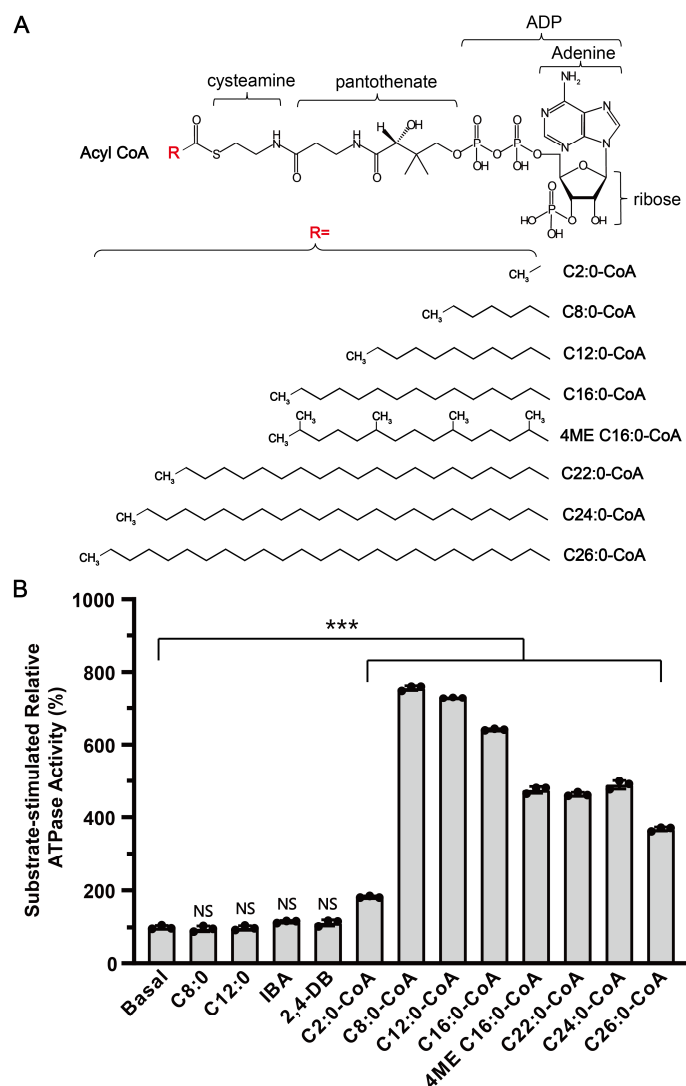


图 3.9 拟南芥 CTS 蛋白在底物刺激下的 ATPase 活性

图注: A. 不同长度脂肪酰基辅酶 A 的结构式。B. 拟南芥 CTS 蛋白在不同长度脂肪酸以及脂酰辅酶 A 刺激下的 ATPase 活性测定, 蛋白浓度均为 0.05 μ M, ATP 浓度为 2 mM, 各底物的浓度均为 5 μ M。使用 one-way ANOVA 进行显著性分析, ***表示 P 值小于 0.0001, NS 表示无显著性差异。

3.4 拟南芥-线虫 CTS 嵌合体的 ATPase 活性检测

为了探究嵌合体 chCTS 蛋白与全长 CTS 蛋白的生化活性是否有差异, 首先对嵌合体 chCTS 蛋白进行基础 ATPase 活性测定。结果显示, ATP 浓度为 2 mM 的条件下, CTS 蛋白水解 ATP 的速率为 $18.45 \text{ mol Pi min}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, chCTS 蛋白水解 ATP 的速率为 $67.19 \text{ mol Pi min}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, chCTS 蛋白的基础 ATPase 活性为 CTS 蛋白的 3.6 倍 (图 3.10A)。

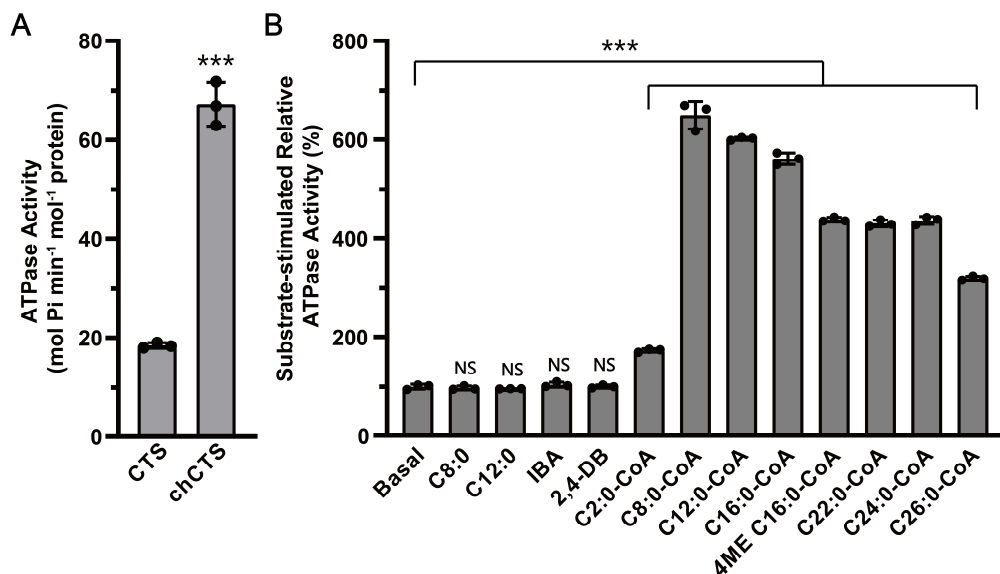


图 3.10 拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 蛋白的 ATPase 活性

图注: A. 拟南芥全长 CTS 与拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 蛋白的基础 ATPase 活性测定。B. 拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 蛋白在不同长度脂肪酸以及脂酰辅酶 A 刺激下的 ATPase 活性测定, 蛋白浓度均为 $0.05 \mu\text{M}$, ATP 浓度为 2 mM, 各底物的浓度均为 $5 \mu\text{M}$ 。使用 one-way ANOVA 进行显著性分析, ***表示 P 值小于 0.0001。

此外, 将不同长度脂肪酸以及脂酰辅酶 A 加入 ATPase 活性体系, 观察这些底物对 chCTS 蛋白 ATPase 活性的刺激效果。结果显示, 与拟南芥 CTS 类似, C8:0、C12:0、IBA 以及 2,4-DB 均不刺激嵌合体 chCTS 的 ATPase 活性; 脂酰辅酶 A 均能明显刺激嵌合体 chCTS 蛋白的 ATPase 活性 (图 3.10B)。其中, C2:0-CoA、C8:0-CoA、C12:0-CoA、C16:0-CoA、4ME C16:0-CoA、C22:0-CoA、C24:0-CoA 以及 C26:0-CoA 存在下的 ATPase 活性分别为 chCTS 基础 (不加底物) ATPase 活性的 1.7 倍、6.4 倍、6 倍、5.5 倍、5.4 倍、4.3 倍、4.3 倍以及 3.2 倍 (图 3.10B)。通过比较, 不同长度脂酰辅酶 A 对拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 蛋白与全长 CTS 蛋白 ATPase 活性的刺激效果相差不多。因此, 尽管嵌合体 chCTS 蛋白的基础 ATPase 活性为全长 CTS 的 3.6 倍, 但两者响应底物刺激时水解 ATP 的能力相似, 生化活性也相似。

除了生化活性，本研究还比较了全长 CTS 蛋白与嵌合体 chCTS 蛋白的冷冻电镜样品状态。为了观察冷冻电镜样品中拟南芥全长 CTS 蛋白以及拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 蛋白的状态，分别纯化 2 L 表达了目的蛋白的 HEK293F 细胞，取峰尖样品进行浓缩，其中全长 CTS 蛋白浓缩至 2.5 mg/mL、嵌合体 chCTS 蛋白浓缩至 5 mg/mL，随后进行冷冻制样。结果显示（图 3.11），尽管拟南芥全长 CTS 蛋白浓度较低，但蛋白颗粒分散不均一，出现聚集状态；拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 蛋白颗粒分散均匀，呈现单颗粒状态。因此推测嵌合体 chCTS 蛋白比全长 CTS 蛋白的基础 ATPase 活性更高可能是因为纯化的嵌合体 chCTS 蛋白状态更好。

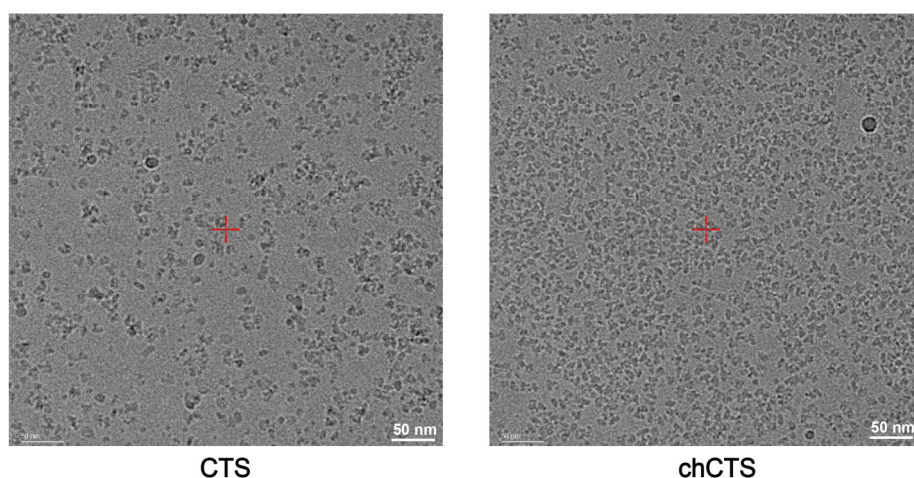


图 3.11 全长 CTS 蛋白及嵌合体 chCTS 蛋白的冷冻电镜样品状态

图注：使用 200 kV Glacios 透射电镜在 120,000×放大倍数下拍摄的蛋白冷冻电镜照片。其中 CTS 蛋白浓度为 2.5 mg/mL，chCTS 蛋白浓度为 5 mg/mL。

综上，拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 与拟南芥全长 CTS 的生化活性相似，底物对两者的 ATPase 活性刺激程度相似，但 chCTS 蛋白表达量更高且冷冻电镜样品中蛋白颗粒分布更均匀。在人类 ABCD1 以及 ABCD3 的解析结构过程中，尽管作者将蛋白 N 端 H0 基序替换为线虫同源蛋白的 H0 基序，但在解析的结构中，替代的线虫同源蛋白 H0 基序因柔性摆动使得该部分结构未被解析，整体解析的结构为 ABCD1 以及 ABCD3 的核心结构^[54,59]。因此推测在拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 中 H0 基序可能也会摆动，使得该部分结构不可解析。基于以上实验，本研究后续使用拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 蛋白进行冷冻电镜结构解析，同时使用拟南芥全长 CTS 蛋白进行生化实验（特别说明除外）。

3.5 拟南芥 CTS 底物浓度依赖的 ATPase 活性

前期的研究结果表明，脂酰辅酶 A 均能明显刺激全长 CTS 蛋白的 ATPase 活

性, 其中 C8:0-CoA 以及 C12:0-CoA 的刺激倍数最高 (图 3.9B)。因此选择 C12:0-CoA 与嵌合体蛋白 chCTS 孵育并制备复合物的冷冻电镜样品, 通过解析 chCTS 与 C12:0-CoA 复合物结构并结合生化实验探究底物识别的分子机制。为了评估冷冻电镜制样时添加 C12:0-CoA 的浓度, 首先测定拟南芥 CTS 蛋白在不同 C12:0-CoA 浓度下水解 ATP 的速率。在 GraphPad Prism 软件中使用 S 型变构调节曲线 (Allosteric sigmoidal) 对数据进行拟合。结果表明, CTS 水解 ATP 的速率随着底物 C12:0-CoA 浓度的增加而增加, 并且在底物 C12:0-CoA 浓度为 $2\text{ }\mu\text{M}$ 时达到最大反应速率, 为 $124.6\text{ mol Pi min}^{-1}\text{ mol}^{-1}$, 底物 C12:0-CoA 的 EC_{50} 为 $0.26\text{ }\mu\text{M}$, 表明底物 C12:0-CoA 与蛋白的亲和力较高 (图 3.12)。

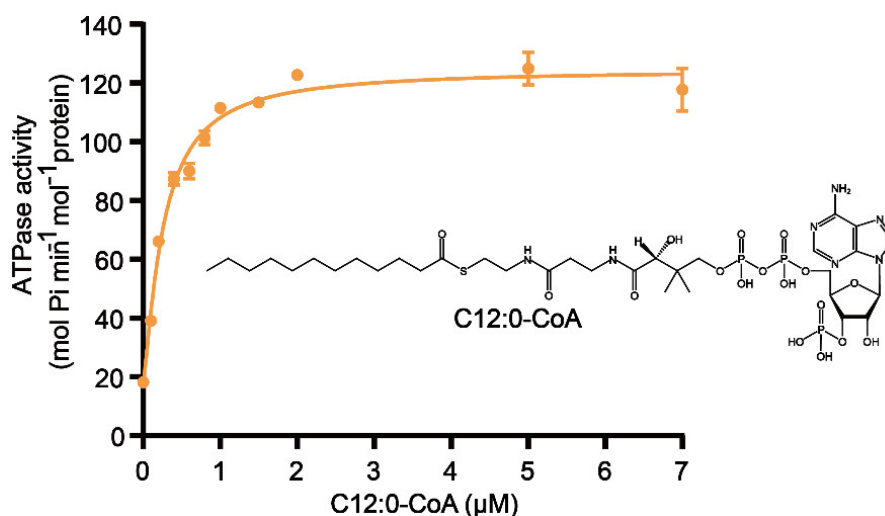


图 3.12 C12:0-CoA 浓度依赖性的 ATPase 活性曲线

图注: 拟南芥 CTS 蛋白对 C12:0-CoA 浓度依赖的 ATPase 活性曲线。反应体系加入的是拟南芥全长 CTS 蛋白, 每个底物浓度均进行 3 组重复实验。图片使用 GraphPad Prism 软件进行绘制, 并使用 S 型变构调节曲线 (Allosteric sigmoidal) 对数据进行拟合, R 方为 0.9815。

为了获得 chCTS 蛋白与 C12:0-CoA 复合物的冷冻样品, 首先尝试在制备冷冻电镜样品前将嵌合体蛋白 chCTS 与 $500\text{ }\mu\text{M}$ C12:0-CoA 孵育 30 min 。使用 200 kV Glacios 透射电镜观察样品中蛋白状态 (图 3.13), 发现蛋白出现部分聚集, 且进孔较少, 与单独 chCTS 蛋白冷冻样品中单颗粒的状态不同 (图 3.11), 这可能是加入的 C12:0-CoA 浓度太高导致, 样品状态不适合大量的数据收集。因此后续将 C12:0-CoA 的浓度降低至 $300\text{ }\mu\text{M}$ 并进行冷冻制样, 复合物样品状态明显改善, 蛋白分散均匀, 呈现单颗粒状态 (图 3.13), 表明该浓度下的样品适合大量数据收集。

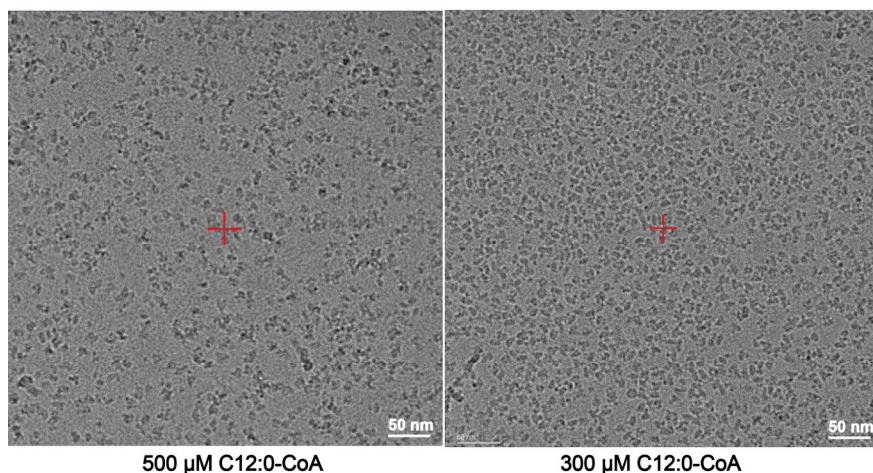


图 3.13 chCTS 蛋白与 C12:0-CoA 复合物的冷冻样品照片

图注：嵌合体 chCTS 蛋白与不同浓度 C12:0-CoA 孵育后的冷冻电镜样品照片。比例尺表示 50 nm。

IBA 是一种内源性生长素前体，可以通过 β 氧化转化为 IAA 从而调节植物生长发育。2,4-DB 是一种合成的生长素类似物，被广泛用作一些敏感植物的除草剂，可以作为“选择性”除草剂用于控制许多一年生和多年生阔叶双子叶杂草。遗传学生理实验结果显示，CTS 参与转运 IBA 以及 2,4-DB 进入过氧化物酶体的过程^[46]。前期的生化实验表明（图 3.9B），IBA 与 2,4-DB 均不能刺激 CTS 的 ATPase 活性，表明两者并不是 CTS 的底物。鉴于脂酰辅酶 A 是 CTS 的转运底物，可以明显刺激 CTS 的 ATPase 活性，因此推测 CTS 可能转运辅酶 A 修饰的 IBA（IBA-CoA）以及 2,4-DB（2,4-DB-CoA）。然而目前市场上没有 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 出售，因此在中国科学技术大学郑基深老师的帮助下通过化学合成获得了 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 分子（图 3.14），合成前体为 IBA/2,4-DB 以及 CoA-SH。

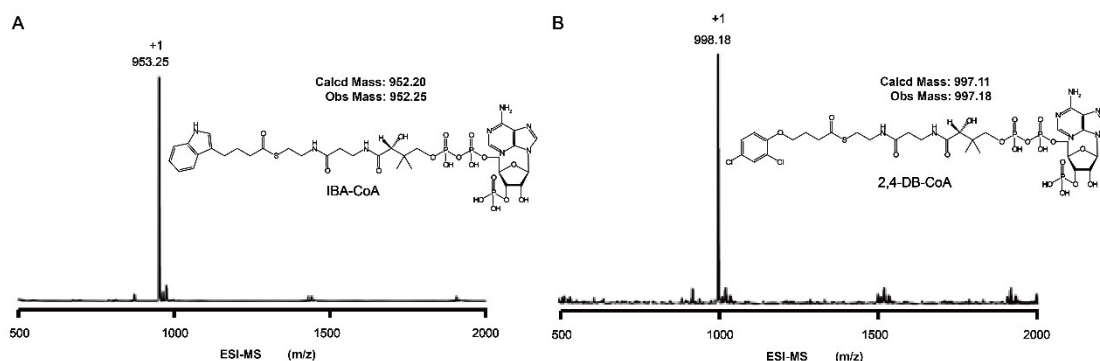


图 3.14 化学合成 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 分子的质谱结果

图注：使用电喷雾正离子质谱（ESI-MS）对合成的 IBA-CoA（A）与 2,4-DB-CoA（B）进行结构鉴定。理论计算质量与实测质量均在图中标注。

在获得 IBA-CoA 分子后进行底物刺激的 ATPase 活性预实验。结果显示, IBA-CoA 分子可以显著刺激 CTS 蛋白的 ATPase 活性, 约为基础 ATPase 活性的 2.5 倍 (图 3.15A), 这表明 IBA-CoA 才是转运底物, 即 CTS 转运辅酶 A 修饰的 IBA。后续测定 CTS 蛋白在不同 IBA-CoA 浓度下水解 ATP 的速率, 在 GraphPad Prism 软件中使用 S 型变构调节曲线对数据进行拟合。结果表明, CTS 水解 ATP 的速率随着 IBA-CoA 浓度的增加而增加, IBA-CoA 的 EC_{50} 为 $0.24\ \mu\text{M}$, 最大反应速率为 $69.2\ \text{mol Pi min}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$ (图 3.15B)。类似地, 本研究也合测定了 CTS 蛋白对于 2,4-DB-CoA 浓度依赖的 ATPase 活性曲线, 计算得出 2,4-DB-CoA 的 EC_{50} 为 $0.64\ \mu\text{M}$, 最大反应速率为 $115.4\ \text{mol Pi min}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$ (图 3.15B)。

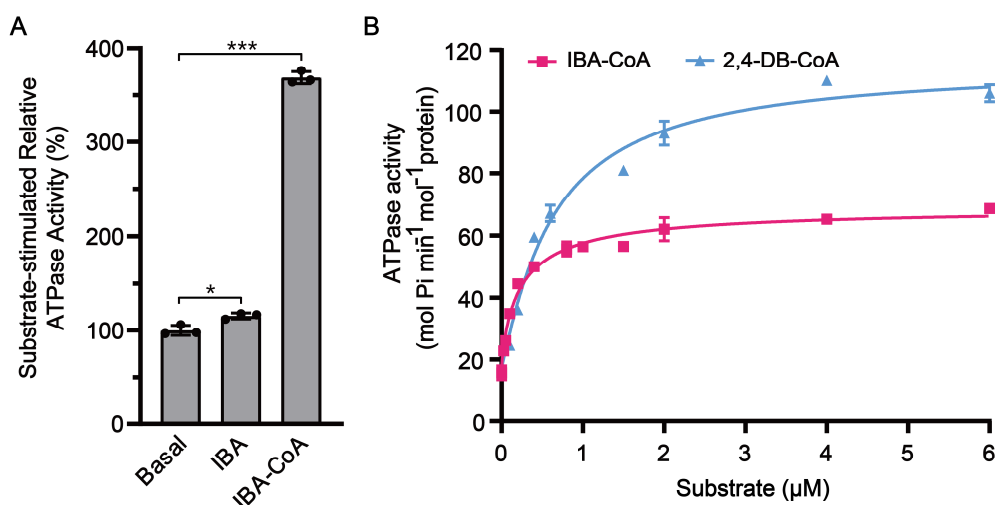


图 3.15 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 浓度依赖性的 ATPase 活性

图注: A. 拟南芥 CTS 蛋白在不同小分子刺激下的 ATPase 活性。各反应体系中 CTS 蛋白浓度均为 $0.05\ \mu\text{M}$, ATP 浓度为 $2\ \text{mM}$, 小分子终浓度均为 $5\ \mu\text{M}$ 。使用 one-way ANOVA 进行显著性分析, IBA 组的 P 值为 0.0192 , IBA-CoA 组的 P 值小于 0.0001 。***表示 P 值小于 0.001 , *表示 P 值小于 0.05 , 每组实验均重复 3 次。B. 拟南芥 CTS 蛋白对 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 浓度依赖的 ATPase 活性曲线。各反应体系中 CTS 蛋白浓度均为 $0.05\ \mu\text{M}$, ATP 浓度为 $2\ \text{mM}$, 每组实验均重复 3 次。使用 S 型变构调节曲线对数据进行拟合, R 方分别为 0.9814 (IBA-CoA) 与 0.9816 (2,4-DB-CoA)。

由于 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 的 EC_{50} 与 C12:0-CoA 的 EC_{50} ($0.26\ \mu\text{M}$) 相近, 因此参考冷冻电镜制样时添加 C12:0-CoA 的浓度, 将嵌合体蛋白 chCTS 分别与 $300\ \mu\text{M}$ IBA-CoA 以及 $300\ \mu\text{M}$ 2,4-DB-CoA 孵育 $30\ \text{min}$ 后再制备冷冻电镜样品。在 $200\ \text{kV}$ Glacios 透射电镜下观察样品中蛋白状态 (图 3.16), 发现蛋白分散均匀, 呈现单颗粒状态, 表明该浓度下的样品适合大量收集数据。

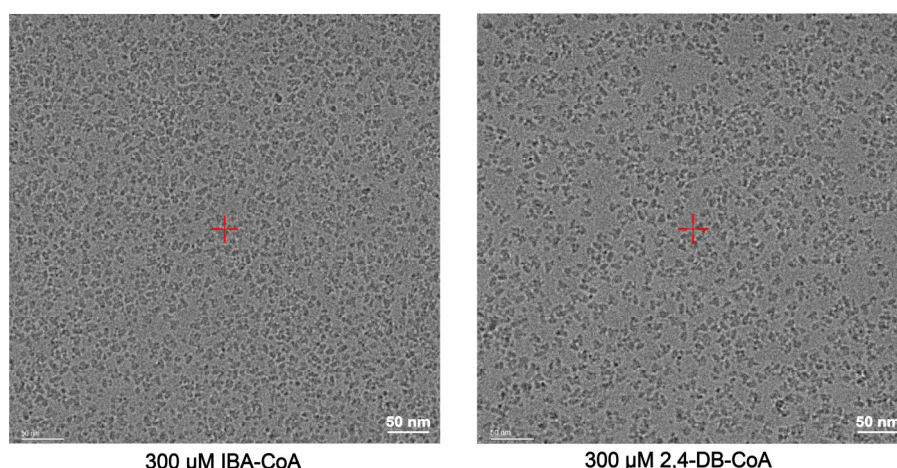


图 3.16 嵌合体 chCTS 与 IBA-CoA、2,4-DB-CoA 复合物的冷冻电镜样品照片

图注：嵌合体 chCTS 蛋白与 IBA-CoA 或者 2,4-DB-CoA 孵育后的冷冻电镜样品照片。底物终浓度均为 300 μM 。比例尺表示 50 nm。

3.6 CTS 蛋白的冷冻电镜结构解析与整体结构分析

随着透射电子显微镜、探测器以及自动化程序技术的发展，结合对用户友好的图像处理软件和不断增长的计算能力，单颗粒冷冻电子显微镜（single-particle cryo-electron microscopy）已经成为解析生物大分子三维结构的强大方法，尤其是可以解析无法结晶的大分子复合物结构^[247]。CTS 具有广谱的底物特异性，能够转运不同长度、不同饱和度的脂肪酸以及芳香族羧酸的酰基辅酶 A 进入过氧化物酶体进行 β -氧化，调控植物生长发育。由于缺少高分辨率的蛋白质结构，目前其底物识别和转运的分子机制尚未被阐明。本研究利用单颗粒冷冻电镜技术，解析表达量提高版的嵌合体 chCTS 在底物转运循环中的各个阶段不同构象的蛋白质结构以及不同底物结合的复合物结构，鉴定底物结合位点和转运通道，比较底物结合和转运过程中的蛋白质构象变化，从而探究 CTS 的广谱底物特异性的分子基础以及底物转运机制。

3.6.1 CTS 蛋白的冷冻电镜结构解析

通过前期的实验摸索了拟南芥-线虫嵌合体 chCTS 蛋白表达纯化以及制备冷冻电镜样品的条件，因此重新纯化新鲜的蛋白并制备冷冻电镜样品。在 200 kV Glacios 冷冻透射电镜下观察样品，选取透光区域大、冰层厚度合适且蛋白状态良好的冷冻电镜样品（图 3.17B）进行回收，随后在 Titan Krios G3i 300 kV 冷冻透射电镜下，使用 EPU 软件在超分辨率（Superresolution）模式下收集了 2,786 张照片（图 3.17A）。数据收集时的放大倍数为 81K，像素大小为 1.07 $\text{\AA}$ ，球差系数为 2.7 mm，总电子剂量为 55 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$ 。

本研究使用 cryoSPARC 软件对收集的电镜照片进行处理。首先将 2,786 张电镜照片导入 cryoSPARC，随后进行漂移校正 (Motion Correction) 以及衬度传递函数 (Contrast Transfer Function, CTF) 估计与校正，使用斑点挑选 (Blob picker) 自动选取 1,547,372 个颗粒，直径范围在 150 Å 至 220 Å 之间。接着以 400 像素将这些颗粒提取，设置提取后的颗粒尺寸为 200 像素，共提取 1,271,848 个颗粒。随后将这些颗粒进行二维分类 (2D Classification)，设置分成 100 个类别，手动去除非蛋白颗粒的类别，剩下的颗粒再进行二维分类，保留具有明显结构特征 (如有两个 NBD 等) 的类别。随后以二维分类的结果为模板 (Template picker) 重新挑选 4,060,769 个颗粒。选取直径在 150 Å 以内的颗粒，以 256 像素将这些颗粒提取，设置提取后的颗粒尺寸为 128 像素，一共提取 3,692,980 个颗粒。接着将这些颗粒进行两轮二维分类，此时可以在一些类别中观察到跨膜螺旋的骨架 (图 3.17C)，选取不同视角以及具有结构特征的类别，共 2,122,456 个颗粒。随后从这些颗粒中选取 100,000 个进行三维模型重构 (Ab-Initio Reconstruction)，设置生成四类密度图模型，接着将选取的二维分类所有颗粒对这些密度图异质修正 (Heterogenous Refinement)。结果显示，第一类密度图呈长条形 (灰色密度图)，没有 NBD 结构域，可能是去垢剂胶束 (图 3.17A)；第二类 (绿色密度图) 与第三类 (紫色密度图) 仅出现一个 NBD，另一个 NBD 可能因为柔性摆动而无法对齐颗粒；第四类密度图 (黄色密度图) 具有两个完整的 NBD，且该密度图分辨率最高，因此取该密度图的颗粒继续进行三维模型重构，设置生成三类密度图模型然后再异质修正。随后以 256 像素提取分辨率最高的密度图颗粒 (共 702,696 个颗粒)，重新进行三维模型重构与异质修正，选取分辨率最高的密度图 (439,713 个颗粒) 进行同质修正 (Homogeneous Refinement)。接着进一步对密度图进行细化，包括非均匀修正 (Non-uniform Refinement)、全局 CTF 修正 (Global CTF Refinement) 以及局部修正 (Local Refinement)，最终得到整体分辨率为 3.2 Å 的电镜密度图 (图 3.17)，其中 TMDs 以及 NBDs 大部分区域分辨率达到 3 Å，达到搭建结构模型的条件。

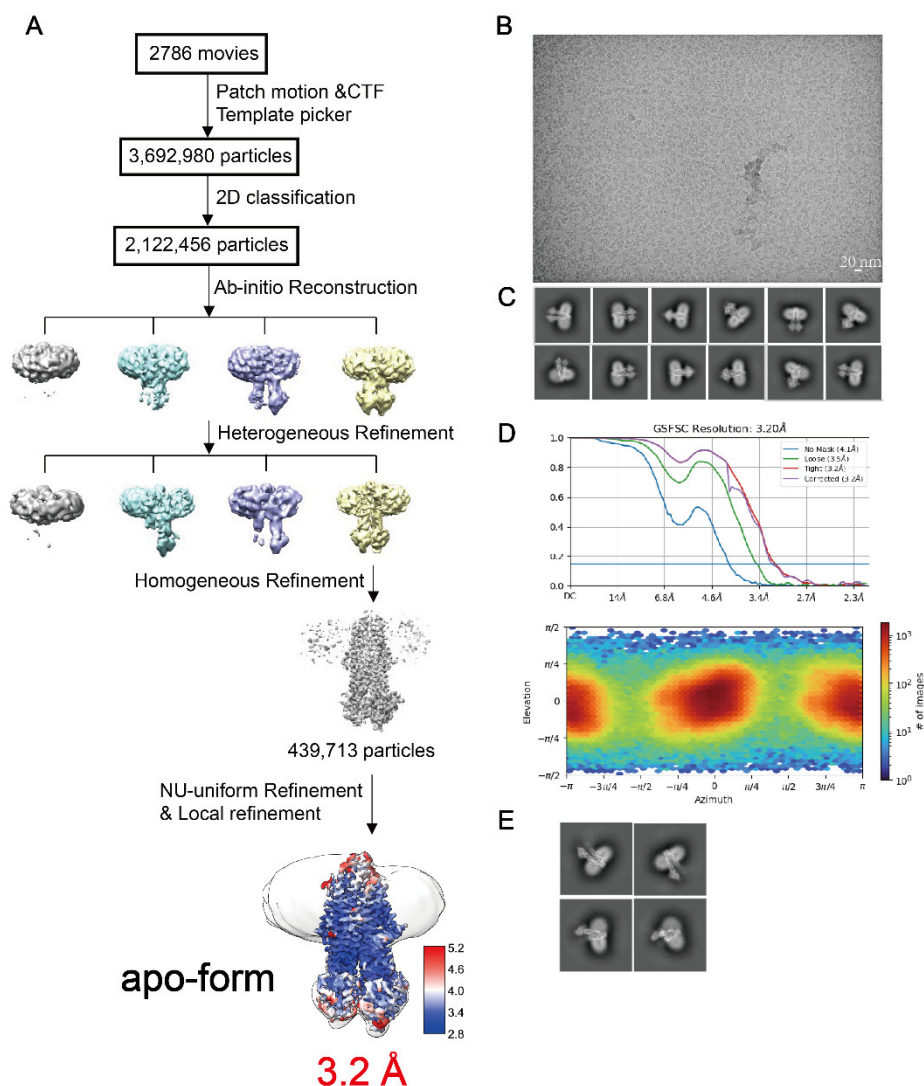


图 3.17 CTS 蛋白无配体状态下的冷冻电镜结构解析过程

图注：A. 使用 cryoSPARC 软件对收集的冷冻电镜数据照片处理的流程图。在 cryoSPARC 中对最终的电镜密度图进行局部分辨率计算，随后在 ChimeraX 中进行染色。数字为对应的颜色代表的分辨率 (Å)。B. 来自本数据集的冷冻电镜照片，比例尺为 20 nm。C. 计算本数据集的二维分类结果。D. 本数据集蛋白颗粒的 FSC 曲线以及欧拉角分布图。E. 部分二维分类结果，这些类别中缺失一个 NBD。

3.6.2 CTS 蛋白的结构模型搭建

在通过 cryoSPARC 计算得到最终密度图后对该密度图进行蛋白结构模型搭建。首先在 AlphaFold 数据库中搜索拟南芥 CTS 的预测结构模型 CTS_{AF} (标识符为 AF-Q94FB9-F1-v4)，在 Chimera 软件中通过 “fit in map” 功能将 CTS_{AF} 模型放置于密度图中，发现 CTS_{AF} 模型 TMD 之间开口更大，无法很好地与密度图匹配。因此选择将两个 TMD 以及两个 NBD 截断，分别放置于密度图中，最后在 COOT 软件中使用 “Merge molecules” 功能再将 TMDs 以及 NBDs 连接起来，从

而得到嵌合体 chCTS 密度图的初始结构模型。通过多次使用 COOT 软件手动修正以及 Phenix 软件自动修正最终得到高度匹配的 chCTS 结构模型（表 3.1），最终 1,178 个氨基酸残基可以搭建在电镜密度图中，包括 Gly85-Gly427、Glu444-Asp664、Gln711-Gly1081 以及 Asp1092-Gln1334。

值得注意的是，在搭建结构模型过程中，N 末端 84 个氨基酸残基的电镜密度缺失，可能是由于该部分出现柔性摆动从而无法对齐，类似于通过嵌合线虫同源蛋白 H0 基序的方法解析的人类 ABCD1 以及 ABCD3 结构^[54,59]。由于嵌合体 chCTS 蛋白是将拟南芥 CTS 蛋白 N 末端 79 个残基替换成线虫 PMP-4 的 N 末端 64 个残基，因此本研究搭建的 chCTS 结构模型实际上是拟南芥 CTS 的核心区域结构模型，在后续结构分析中，该蛋白及结构直接称为 CTS 蛋白及结构。图 3.18 展示了跨膜螺旋以及 NBDs 的电镜密度。此外，在蛋白结构模型搭建完成后，在 TMDs 以及 NBDs 中均没有额外的电镜密度，因此认为本数据集解析的 CTS 蛋白处于无配体（apo-form）状态。

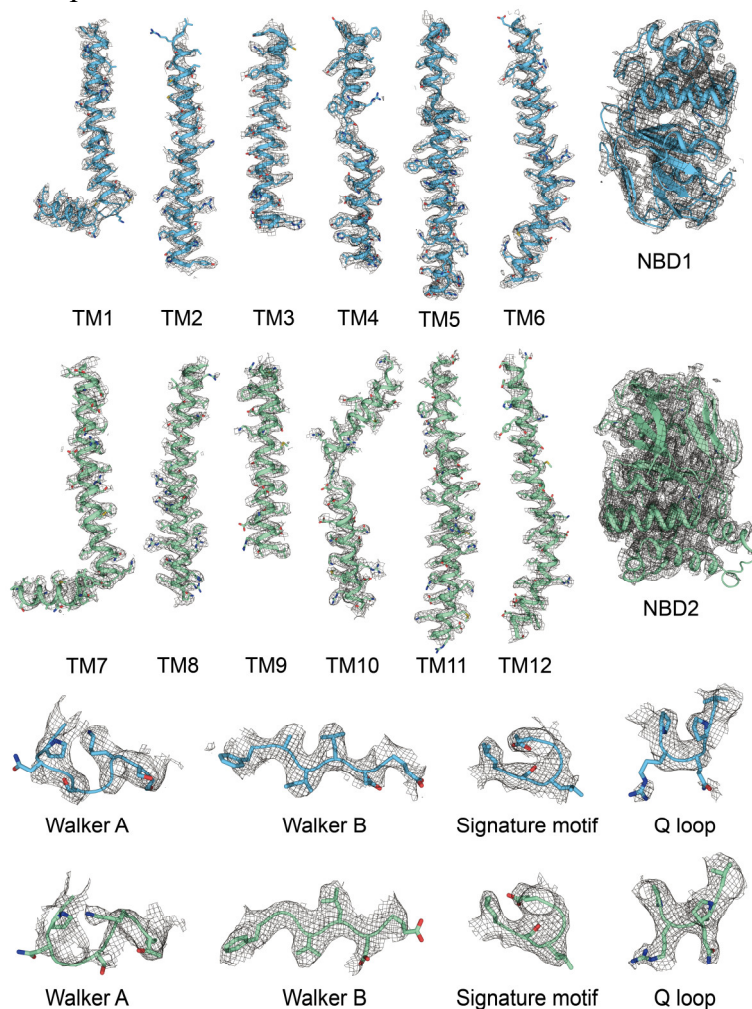


图 3.18 无配体状态下 CTS 跨膜螺旋以及 NBDs 的电镜密度

图注：TM10 的等高线（contour level）为 3σ ，NBD1 中 Walker A 的等高线为 4σ ，其余跨膜螺旋 TM1-9、TM11-TM12 以及 NBDs 的等高线为 5σ 。

表 3.1 无配体状态 CTS 蛋白冷冻电镜数据处理与结构模型的参数

	Apo-form
Data collection and processing	
Voltage (kV)	300
Electron exposure ($e^-/\text{\AA}^2$)	55
Magnification	81,000
Pixel size ($\text{\AA}$)	1.07
Defocus range (μm)	-2.0 to -1.2
Initial particles images (no.)	2,122,456
Final particles images (no.)	439,713
Map resolution ($\text{\AA}$)	3.2
Map resolution range ($\text{\AA}$)	2.8-5.2
FSC threshold	0.143
Refinement	
Model resolution	3.2
Map sharpening B factor ($\text{\AA}$)	-118.2
Protein residues	1178
Non-hydrogen atoms	9319
B factors ($\text{\AA}^2$)	
Protein	45.45
R.m.s.deviation	
Bond lengths ($\text{\AA}$)	0.003
Bond angles ($^\circ$)	0.782
Validation	
Molprobity score	1.98
Clashscore	10.75
Poor rotamers (%)	0.89
Ramachandran plot	
Favored (%)	93.42
Allowed (%)	6.58
Disallowed (%)	0

3.6.3 CTS 蛋白的整体结构分析

CTS 蛋白是全转运体 ABC 转运蛋白，两个跨膜结构域 TMDs 以及两个核酸结合结构域 NBDs 位于一条肽链上，形成“TMD1-NBD1-TMD2-NBD2”形式的

拓扑结构(图 3.19A)。CTS 由 12 个跨膜螺旋(transmembrane helix, TM)组成, TMD1 由 TM1 至 TM6 组成, TMD2 由 TM7-TM12 组成, 其中 TM4 以及 TM10 均发生部分解旋, 分成 a、b 两部分(图 3.19A)。每个 TMD 前面均有一个短的轴螺旋(Elbow helix, EH), 位于过氧化物酶体膜的外小叶。值得注意的是, CTS 是一种典型的 IV 型 ABC 转运蛋白^[1], 来自 TMD1 的 TM4、TM5 与来自 TMD2 的 TM10、TM11 发生了结构域交换(图 3.19C)。CTS 含有 4 个耦合螺旋(Coupling helix, CH), TM2 与 TM3 之间的 CH1 以及 TM8 与 TM9 之间的 CH3 均嵌入同侧 NBD 的凹槽中, TM4 与 TM5 之间的 CH2 以及 TM10 与 TM11 之间的 CH4 均由于发生结构域交换而嵌入对侧 NBD 的凹槽中(图 3.19B), 这四个 CH 一起传递 TMDs 与 NBDs 之间的构象变化。此外, CTS 还具有典型的 IV 型 ABC 转运蛋白的特点, 即除了 TM1 以及 TM7, 其它 TM 较长, 均延伸至细胞质, 使得 NBDs 远离过氧化物酶体膜。

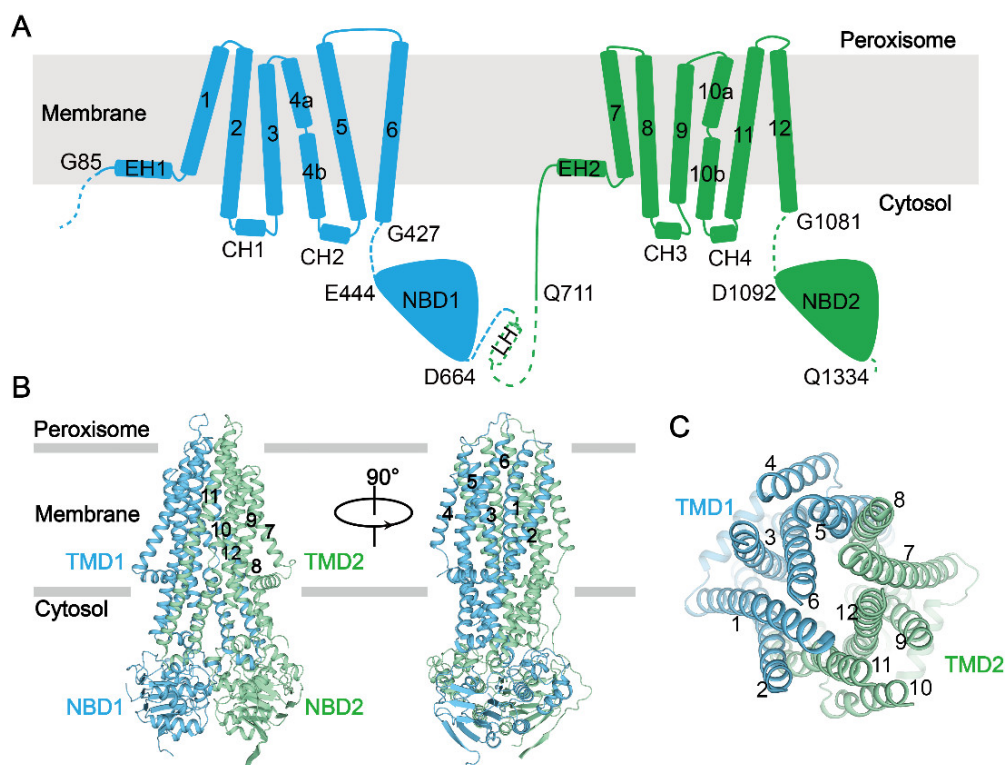


图 3.19 无配体状态 CTS 蛋白的整体结构

图注: A. CTS 的拓扑结构图, TMD1 以及 NBD1 用蓝色(lanthanum)表示, TMD2 以及 NBD2 用绿色(promethium)表示, 过氧化物酶体膜平面用灰色矩形表示。未解析的结构用虚线表示。B. 无配体状态 CTS 蛋白的卡通模式结构图。灰色线条表示过氧化物酶体膜。C. 无配体状态 CTS 中 TMD 从过氧化物酶体膜内小叶视角的俯视图(Top view)。

无配体状态 CTS 处于向内封闭(inward-occluded)构象, 类似于之前报道过的 McjD 无配体状态结构^[248]。McjD 也是一种典型的 IV 型 ABC 转运蛋白, 在大

肠杆菌中负责外排抗菌肽 MccJ25^[248]。在 CTS 这种向内封闭的构象中，来自 TMD1 的 TM3-5 与来自 TMD2 的 TM9-11 相互靠近，使得底物的易位腔（Translocation cavity）闭合（图 3.19B），NBDs 也相互靠近然而却并未发生二聚化（图 3.20A）。人类 ABCD1 在无配体状态（PDB: 7RRA）处于向内开口（inward-facing）的构象^[56]，其 TMD 之间的开口与 CTS 相比更大，且 NBDs 之间的距离也更远（图 3.20B）。将无配体状态的 CTS 与 ABCD1 进行三维结构比对，1,034 个 α 碳原子产生 9.9 Å 的均方根偏差（root-mean-square-deviation, RMSD），这表明无配体状态下 CTS 与 ABCD1 的三维结构之间存在巨大的构象差异。尽管本研究中解析的 CTS 无配体状态处于向内封闭构象，TMD 闭合，开口较小，但在数据处理过程中有一些类别的颗粒缺失一个 NBD（图 3.17E），猜测该 NBD 处于柔性摆动中，这种 NBD 摆动使得底物从细胞质一侧进入底物结合口袋从而完成跨膜转运。因此本研究认为解析所得的这种构象是 CTS 蛋白处于能量最低的稳定状态。

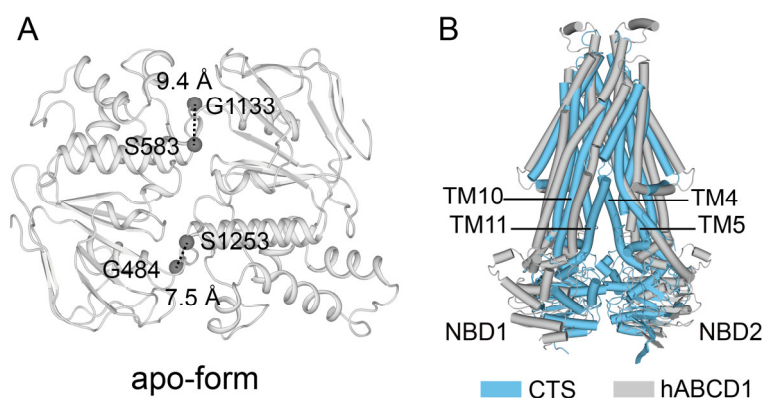


图 3.20 拟南芥 CTS 与人类 ABCD1 在无配体状态下的结构比对

图注：A. 无配体状态 CTS 蛋白 NBDs 之间的距离，通常指一个 NBD 中 Walk A 基序第一个 Gly 与另一个 NBD 特征基序中 Ser 的 α 碳原子的距离。B. 无配体状态的 CTS 与人类 ABCD1（PDB: 7RRA）的三维结构比对结果，1,034 个 α 碳原子产生的 RMSD 为 9.9 Å。

3.7 CTS 与底物复合物的冷冻电镜结构解析与整体结构分析

为了探究 CTS 蛋白识别以及转运底物的分子机制，本研究解析了多个不同底物（C12:0-CoA、IBA-CoA、2,4-DB-CoA）结合的 CTS 复合物结构，通过结构比对以及底物结合位点的鉴定，提出了 CTS 的广谱底物特异性的分子基础以及底物转运机制。

3.7.1 CTS 与 C12:0-CoA 复合物冷冻电镜结构解析与结构模型搭建

将 chCTS 蛋白与 300 μ M C12:0-CoA 孵育 30 min 后进行冷冻样品制备。在

收集了 2,931 张电镜照片后将其导入 cryoSPARC 进行处理, 计算的步骤与解析无配体 CTS 结果类似, 最终通过 353,872 个颗粒解析得到整体分辨率为 3.4 Å 的电镜密度图 (图 3.21A)。其中 TMDs 的分辨率达到 3 Å, 允许搭建结构模型; 而 NBD1 分辨率较低, 可能是由于柔性摆动导致。

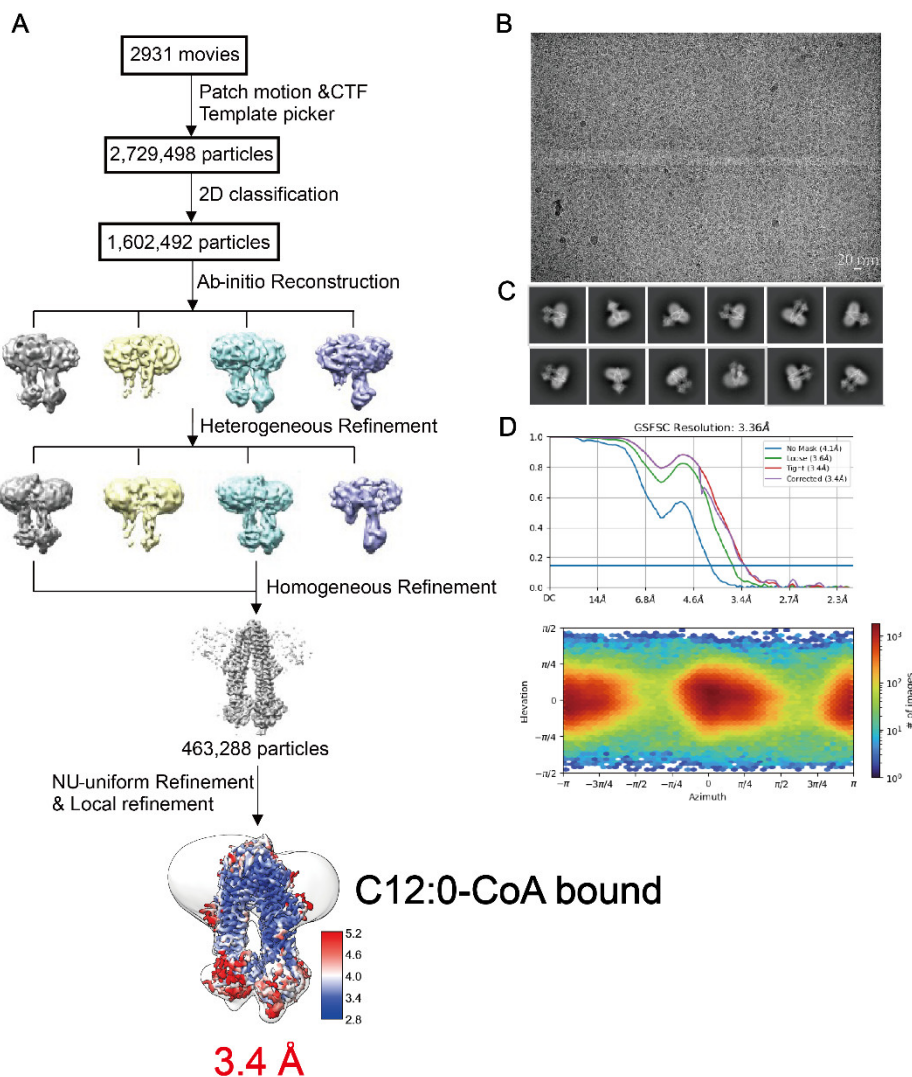


图 3.21 CTS 蛋白与 C12:0-CoA 复合物的冷冻电镜结构解析过程

图注: A. 使用 cryoSPARC 软件对收集的冷冻电镜数据照片处理的流程图。在 cryoSPARC 中对最终的电镜密度图进行局部分辨率计算, 随后在 ChimeraX 中进行染色。数字为对应的颜色代表的分辨率 (Å)。B. 来自本数据集的冷冻电镜照片, 比例尺为 20 nm。C. 计算本数据集的二维分类结果。D. 本数据集蛋白颗粒的 FSC 曲线以及欧拉角分布图。

将无配体状态 CTS 的密度图与本数据集解析所得的密度图进行比对, 发现此次的密度图 TMD 开口更大, 蛋白处于一种新的构象, 这暗示着底物 C12:0-CoA 可能与 CTS 蛋白结合。因此将无配体状态 CTS 的结构分成 N 端 (TMD1 以及 NBD1) 与 C 端 (TMD2 以及 NBD2) 两部分, 分别放置于密度图中, 最后在 COOT

软件中使用“Merge molecules”功能再将 N 端与 C 端合并，从而得到 CTS 与 C12:0-CoA 复合物密度图的初始结构模型。类似地，多次使用 COOT 软件手动修正以及 Phenix 软件自动修正最终得到高度匹配的 CTS 蛋白结构模型（表 3.2），最终 1,190 个氨基酸氨基可以搭建在电镜密度图中（图 3.22），包括 Gly86-Gly427、Glu444-Asp664 以及 Gln711-Gln1337。

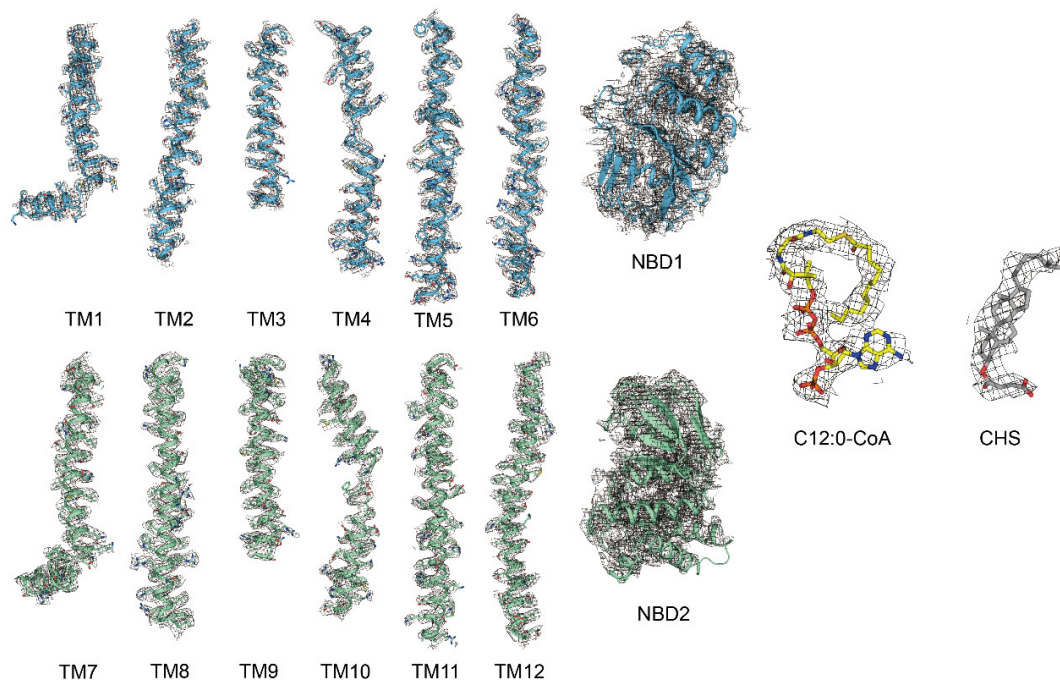


图 3.22 C12:0-CoA 结合的 CTS 结构中跨膜螺旋、NBDs 以及底物分子的电镜密度

图注：NBD1 的等高线（contour level）为 3σ ，其余跨膜螺旋、NBD2、C12:0-CoA 以及 CHS 的等高线为 5σ 。

在整体蛋白结构模型搭建完成后，在 TMD 区域存在额外的环形电镜密度。由于 chCTS 蛋白的纯化条件相同，此次只额外添加了底物 C12:0-CoA，因此推测该密度可能是 C12:0-CoA 的密度。从 PDB 数据库中下载 C12:0-CoA 的 SMILES 号（三字母化学 ID 为 DCC），利用 Phenix 软件生成 PDB 文件以及 cif 文件，随后将 C12:0-CoA 的结构放置于该密度中，发现 C12:0-CoA 分子可以很好地匹配该密度（图 3.22），因此本数据集解析的结构为 C12:0-CoA 结合（C12:0-CoA bound）的 CTS 结构。此外，在脂肪酰基的烃链末端还发现了一个长条形状的电镜密度。由于在溶解膜蛋白时加入了 CHS，因此首先将 CHS 分子放置于该密度中，CHS 分子也可以很好地匹配该密度（图 3.22）。

表 3.2 CTS 与 C12:0-CoA 复合物冷冻电镜数据处理与结构模型的各项参数

	C12:0-CoA bound
Data collection and processing	
Voltage (kV)	300
Electron exposure ($e^-/\text{\AA}^2$)	55
Magnification	81,000
Pixel size ($\text{\AA}$)	1.07
Defocus range (μm)	-2.0 to -1.2
Initial particles images (no.)	1,602,492
Final particles images (no.)	463,288
Map resolution ($\text{\AA}$)	3.4
Map resolution range ($\text{\AA}$)	2.8-5.2
FSC threshold	0.143
Refinement	
Model resolution	3.4
Map sharpening B factor ($\text{\AA}$)	-142.2
Protein residues	1190
Non-hydrogen atoms	9512
Ligand	A C12:0-CoA molecule
B factors ($\text{\AA}^2$)	
Protein	66.01
Ligand	48.68
R.m.s.deviation	
Bond lengths ($\text{\AA}$)	0.004
Bond angles ($^\circ$)	0.732
Validation	
Molprobit score	1.94
Clashscore	11.26
Poor rotamers (%)	0.68
Ramachandran plot	
Favored (%)	94.51
Allowed (%)	5.49
Disallowed (%)	0

3.7.2 CTS 与 C12:0-CoA 复合物的整体结构分析

C12:0-CoA 结合的 CTS 蛋白呈现向内开口(inward-facing)的构象(图 3.23A), 其中 C12:0-CoA 分子结合在 TMD1 和 TMD2 之间的两亲性空腔中(图 3.23C), 位于过氧化物酶体基质侧膜小叶且更靠近 TMD2(图 3.23B)。在脂肪酸 C12 末端, 一个 CHS 分子紧接着结合在疏水口袋(图 3.23C), 可能为 C12:0-CoA 提供另外的疏水作用界面。

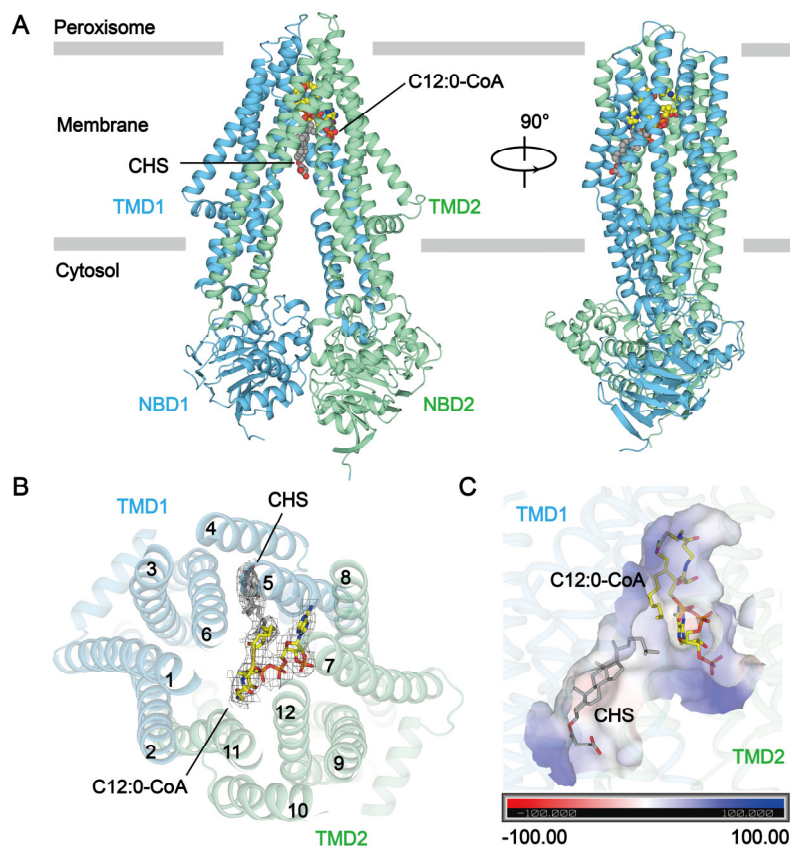


图 3.23 C12:0-CoA 结合的 CTS 蛋白整体结构

图注: A. CTS 与 C12:0-CoA 复合物的卡通模式结构图。C12:0-CoA 分子与 CHS 分子分别以黄色、灰色球体(sphere)显示。B. CTS 与 C12:0-CoA 复合物 TMD 的俯视图(从过氧化物酶体膜内小叶)。C12:0-CoA 分子与 CHS 分子分别以黄色、灰色棒状显示, 电镜密度以黑色网格显示。C. C12:0-CoA 结合口袋表面电势, 设置的电势范围为-100 Kt/e(红色)至 100 Kt/e(蓝色)。

将 C12:0-CoA 结合的 CTS 与无配体状态 CTS 进行三维结构比对, 1,077 个 α 碳原子产生的 RMSD 为 4.96 Å, 这表明在 C12:0-CoA 分子结合后蛋白发生了明显的构象变化。具体而言, C12:0-CoA 结合的 CTS 蛋白 TMD 开口更大(图 3.24A), 其中 TM1-2、TM4-5、TM7、TM9、TM11-12 均向两侧移动 4-5 Å(图 3.24B), TM3、TM6、TM8 及 TM10 向两侧移动距离更大, 约 6-8 Å(图 3.24B), 为底物 C12:0-CoA 的结合提供足够的空间。此外, NBD1 也发生了明显的构象变

化，向后移动约 11 Å (图 3.24C)，NBD2 整体摆动很小，因此猜测 NBD1 的相对摆动为底物进入 TMD 提供了入口。

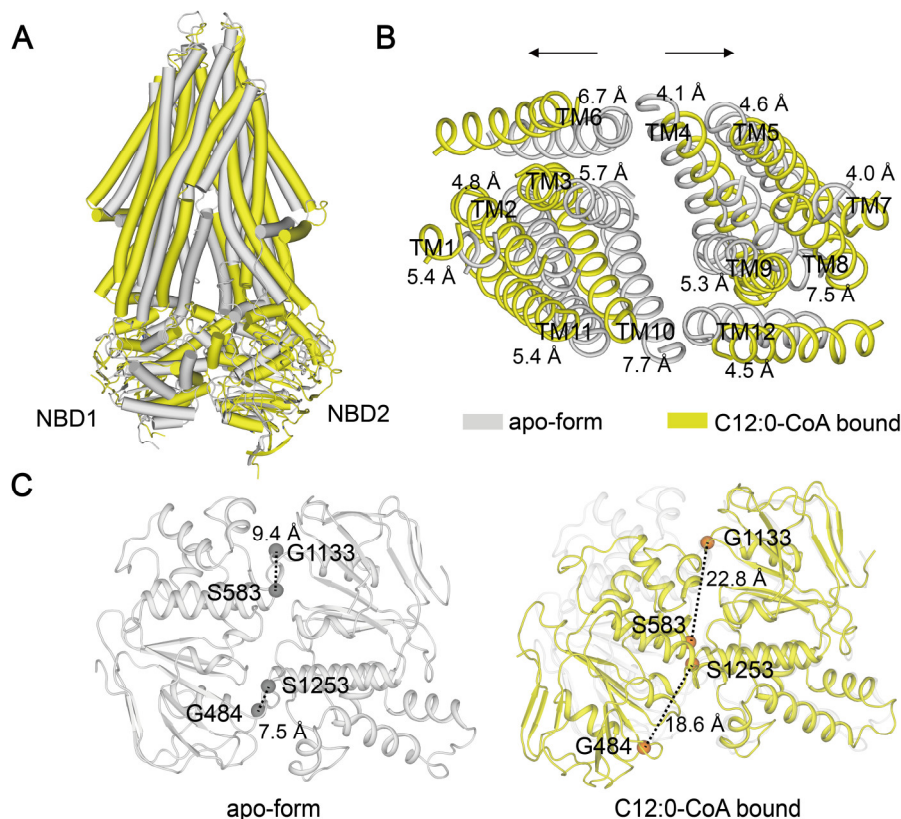


图 3.24 C12:0-CoA 结合的 CTS 与无配体状态 CTS 的结构比对

图注: A. 无配体状态 CTS 与 C12:0-CoA 结合的 chCTS 整体结构比对结果。B. TMDs 在 C12:0-CoA 结合后发生的构象变化。C. C12:0-CoA 结合的 CTS 结构中 NBDs 之间的距离。

对底物结合口袋进行分析，CoA 的 3'-磷酸 ADP 部分被包埋在主要由极性残基形成的亲水口袋中。具体而言 (图 3.25)，嘌呤环与 TM5 的 Thr350、TM7 的 Asn784、TM8 的 Ser806 以及 TM5 的 Tyr346 主链形成氢键而被稳定；核糖的 3'-磷酸与 TM5 的 Lys345 和 TM7 的 Arg773 形成盐桥，此外还与 TM5 的 Tyr346、TM7 的 Ser777 及 TM12 的 Gln1043 形成氢键；二磷酸基团除了与 TM12 的 Arg1035 形成盐桥，还与 Ser1039 及 Ser1042 形成氢键相互作用；酰基链与 Thr385 形成氢键。此外，连接 3'-磷酸 ADP 和脂肪酰基链的泛酸和半胱胺在由 TM1 的 Phe134 与 TM11 的 Trp1007 形成的弓形疏水腔处向后弯曲，整个分子折叠成“U”型，使得脂肪酰基的烃链指向细胞质并结合在一个由异亮氨酸簇 (I356、I381 以及 I389) 形成的疏水腔中 (图 3.25A)。

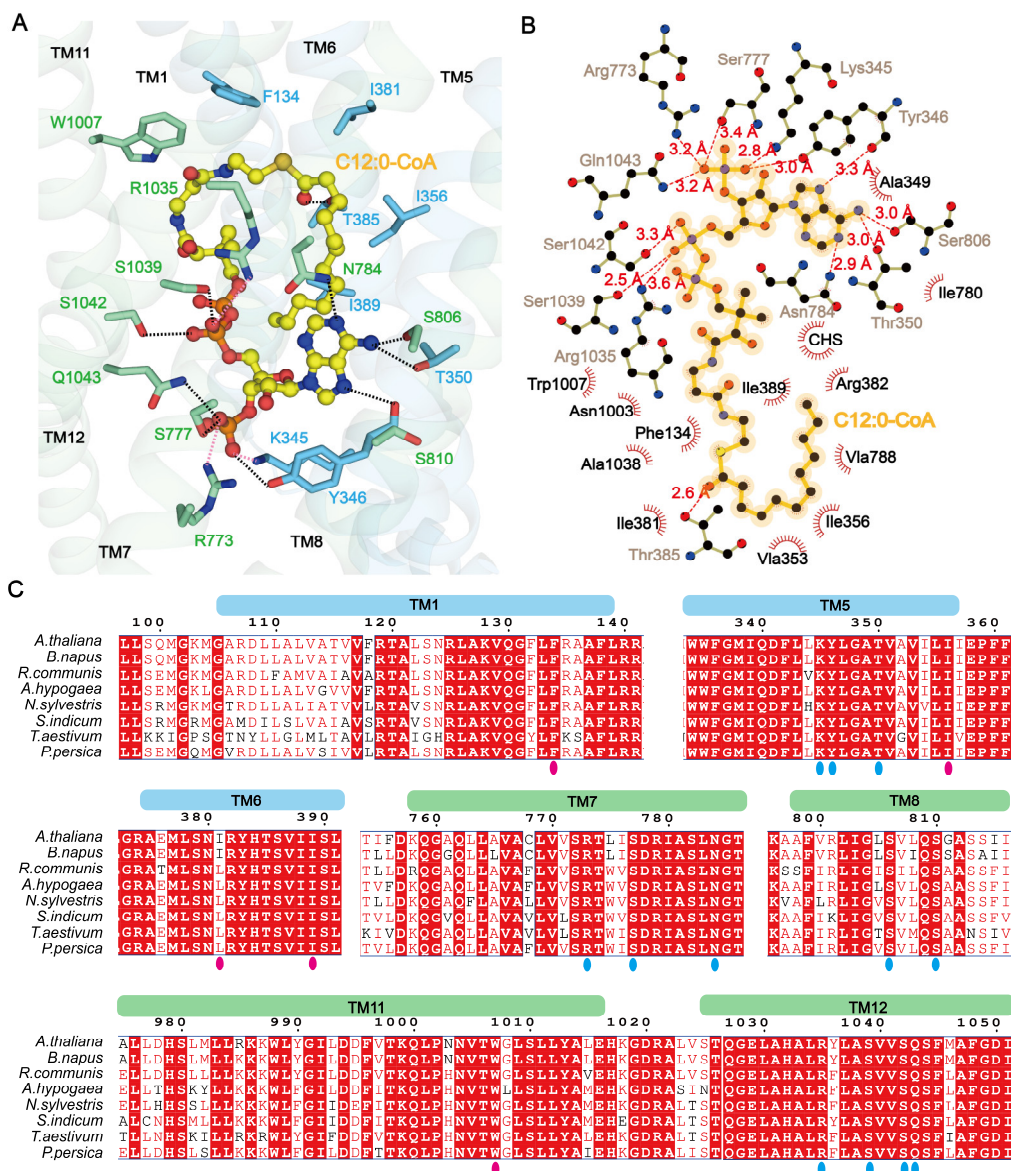


图 3.25 底物 C12:0-CoA 结合口袋分析

图注: A. 底物 C12:0-CoA 分子的结合口袋。C12:0-CoA 以黄色球体棒状形式展示, 与底物相互作用的残基以棒状展示。氢键以黑色虚线展示, 盐桥以粉色虚线展示。 B. 使用 LigPlot⁺软件分析得出 C12:0-CoA 与 chCTS 蛋白相互作用网络。 C. 油料种子植物 CTS 同源蛋白的 TMDs 序列比对结果。各物种 CTS 蛋白的 Uniprot 编号: *Arabidopsis thaliana* (拟南芥), Q94FB9; *Brassica napus* (油菜), A0A816N9V8; *Ricinus communis* (蓖麻), B9RQ07; *Arachis hypogaea* (花生), A0A444X104; *Nicotiana sylvestris* (烟草), A0A1U7VWC1; *Sesamum indicum* (芝麻), A0A6I9US45; *Triticum aestivum* (小麦), A0A3B6EV19; *Prunus persica* (桃树), A0A251QD25。与 C12:0-CoA 分子相互作用的残基用椭圆标记, 其中极性残基为蓝色, 疏水残基为洋红色。

此外, 多序列比对结果显示, 所有与 3'-磷酸 ADP 部分形成极性相互作用的残基在这些油料种子植物中均高度保守(图 3.25C), 如 K345、Y346、T350、R773、N784 以及 R1035; 在泛酸部分提供疏水作用的 F134 以及 W1007 也是高度保守

的；为脂肪酰基链提供疏水环境的 I356 以及 I389 高度保守，I381 虽然不是保守的，但其它植物中的 L381 提供的疏水性与 I381 类似，因此异亮氨酸簇的疏水性是保守的。总体而言，与 C12:0-CoA 分子相互作用残基保守，暗示着这些油料种子植物的 CTS 蛋白将脂肪酰基辅酶 A 从细胞质转运进入过氧化物酶体的方式可能也是保守的。

为了进一步探究底物 C12:0-CoA 结合的关键残基，将与 C12:0-CoA 相互作用的氨基酸残基进行突变并测定底物刺激下的 ATPase 活性。结果表明，与野生型 WT 相比，与 3'-磷酸 ADP 部分形成极性相互作用的氨基酸残基发生突变（如 K345A、Y346A、T350A、R773A、N784A、S806A 以及 R1035A）均会降低底物刺激的 ATPase 活性（图 3.26），其中，K345A、R773A 以及 N784A 的 ATPase 活性降低最为明显，分别为 WT 的 31.2%、38.7% 以及 38.4%，说明 K345、R773 以及 N784 对于底物 C12:0-CoA 的结合至关重要。值得注意的是，当残基 R1035 以及 S810 发生突变时，植物降解种子储存脂质的功能存在缺陷，幼苗无法正常生长^[50]。突变体的 ATPase 活性实验显示，R1035A 突变体的 ATPase 活性降低为 WT 的 55%，S810N 突变体的 ATPase 活性更是降为 WT 的 33.4%（图 3.26）。对底物结合的 CTS 结构进行分析，R1035 突变的植株功能缺陷可能是其影响了底物的识别与结合，使得底物刺激的 ATPase 活性降低；S810 虽然与 C12:0-CoA 没有直接的相互作用，但其位于 C12:0-CoA 分子附近，推测在底物转运过程的其它构象状态中，S810 可能对底物分子的结合发挥关键作用。此外，突变体 F134A 以及 W1007A 底物刺激的 ATPase 活性也降低至 WT 的 50%（图 3.26），表明该残基与泛酸之间的相互作用对于 C12:0-CoA 的结合也十分重要。

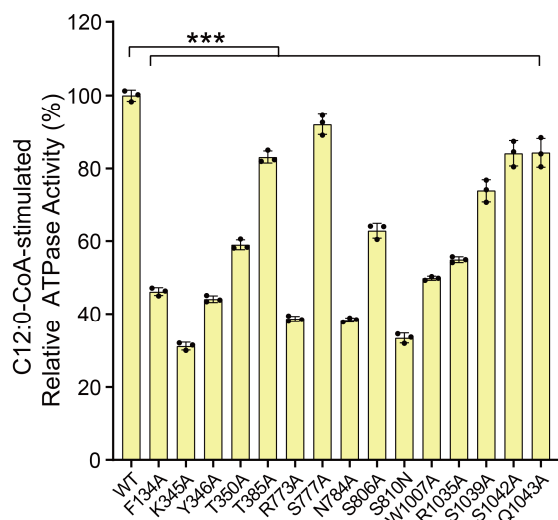


图 3.26 C12:0-CoA 相互作用残基突变体的 ATPase 活性

图注：底物结合口袋相互作用残基突变体在底物刺激下的 ATPase 活性，每组实验重复 3 次，误差条表示平均值±标准差。使用 One-way ANOVA 进行显著性分析，***表示 P 值<0.001。

3.7.3 CTS 与 IBA-CoA 复合物的冷冻电镜结构解析与结构模型搭建

将收集的 2,524 张电镜照片导入 cryoSPARC 进行计算，数据处理过程与前文解析 C12:0-CoA 结合的 CTS 复合物结构类似，最终 353,872 个颗粒计算得到整体分辨率为 3.2 Å 的电镜密度图（图 3.27）。对密度图进行局部分辨率计算，TMDs 的分辨率达到 3 Å，允许搭建结构模型，而 NBD1 由于柔性摆动所以分辨率较低。

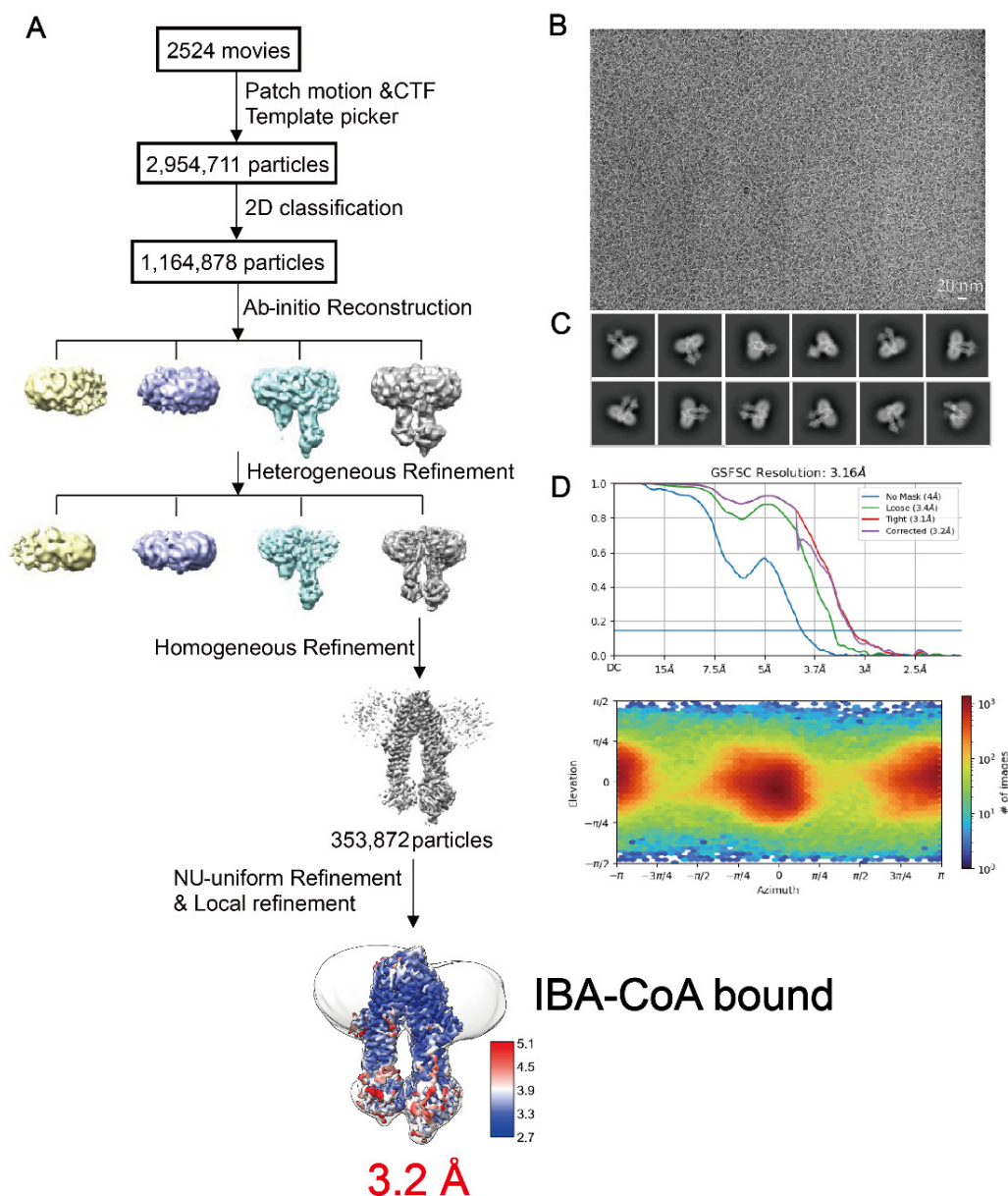


图 3.27 CTS 蛋白与 IBA-CoA 复合物的冷冻电镜结构解析过程

图注：A. 使用 cryoSPARC 软件对收集的冷冻电镜数据照片处理的流程图。在 cryoSPARC 中对最终的电镜密度图进行局部分辨率计算，随后在 ChimeraX 中进行染色。数字为对应的颜色代表的分辨率（Å）。B. 来自本数据集的冷冻电镜照片，比例尺为 20 nm。C. 计算本数据集的二维分类结果。D. 本数据集蛋白颗粒的 FSC 曲线以及欧拉角分布图。

将此次计算得到的密度图与无配体状态 CTS 的密度图进行比较，发现两者的构象不同，此次获得的密度图开口更大，因此猜测 IBA-CoA 分子可能与蛋白结合。随后将此次的密度图与 C12:0-CoA 结合 chCTS 的密度图进行比对，发现两者构象大致相同，TMD 开口大小类似，这也暗示 IBA-CoA 可能与蛋白结合。因此，取 C12:0-CoA 结合的 CTS 结构为初始结构模型，通过多次手动修正以及自动修正得到高度匹配的 chCTS 蛋白结构模型（表 3.3），最终 1190 个氨基酸氨基可以搭建在电镜密度图中（图 3.28），包括 Gly86-Gly427、Glu444-Asp664 以及 Gln711-Gln1337。

与解析 C12:0-CoA 结合的 CTS 结构类似，TMD 区域也存在额外的环形电镜密度，因此推测可能是 IBA-CoA 的密度。首先，利用 COOT 生成 IBA-CoA 的 SMILES 号，再通过 Phenix 生成 pdb 文件以及 cif 文件。随后将 IBA-CoA 的结构放置于该密度中，发现 IBA-CoA 分子可以很好地匹配该密度（图 3.28），因此本数据集解析的结构为 IBA-CoA 结合（IBA-CoA bound）的 CTS 结构。此外，在 IBA 部分的腺苷头部也发现了一个长条形状的电镜密度，基于前面解析 CTS 与 C12:0-CoA 复合物结构的经验，认为该密度是 CHS 的密度。随后将 CHS 分子放置于该密度中，CHS 分子可以很好地匹配该密度（图 3.28）。

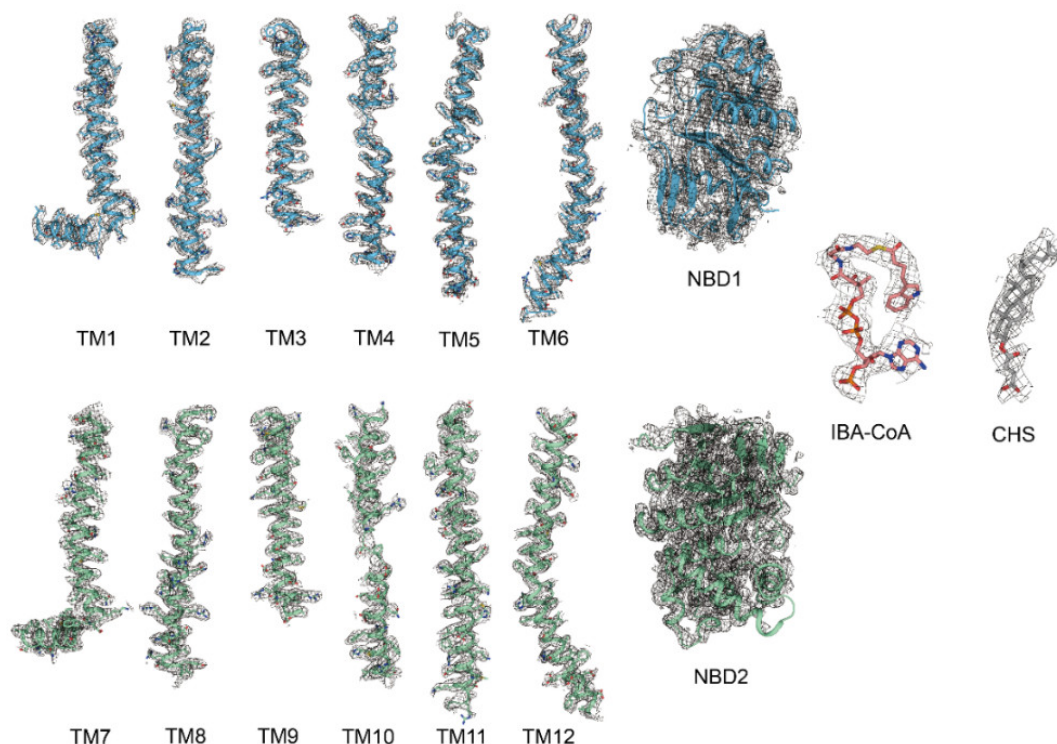


图 3.28 CTS 与 IBA-CoA 复合物结构中跨膜螺旋、NBDs 以及底物分子的电镜密度

图注：NBD1 的等高线（contour level）为 3σ ，其余跨膜螺旋、NBD2、IBA-CoA 以及 CHS 的等高线为 5σ 。

表 3.3 CTS 与 IBA-CoA 复合物冷冻电镜数据处理与结构模型的各项参数

	IBA-CoA bound
Data collection and processing	
Voltage (kV)	300
Electron exposure ($e^-/\text{\AA}^2$)	55
Magnification	81,000
Pixel size ($\text{\AA}$)	1.07
Defocus range (μm)	-2.0 to -1.2
Initial particles images (no.)	1,164,878
Final particles images (no.)	353,872
Map resolution ($\text{\AA}$)	3.2
Map resolution range ($\text{\AA}$)	2.8-5.2
FSC threshold	0.143
Refinement	
Model resolution	3.2
Map sharpening B factor ($\text{\AA}$)	-109.3
Protein residues	1190
Non-hydrogen atoms	9515
Ligands	An IBA-CoA molecule
B factors ($\text{\AA}^2$)	
Protein	40.2
Ligand	16.29
R.m.s. deviations	
Bond lengths ($\text{\AA}$)	0.003
Bond angles ($^\circ$)	0.691
Validation	
Molprobity score	1.97
Clashscore	10.77
Poor rotamers (%)	0.58
Ramachandran plot	
Favored (%)	93.58
Allowed (%)	6.42
Disallowed (%)	0

3.7.4 CTS 与 2,4-DB-CoA 复合物的冷冻电镜结构解析与结构模型搭建

将收集的 3,981 张电镜照片导入 cryoSPARC 进行计算，数据处理过程与前文解析 C12:0-CoA 结合的 CTS 复合物结构类似，最终 572,683 个颗粒计算得到整体分辨率为 3.5 Å 的电镜密度图（图 3.29）。对密度图进行局部分辨率计算，TMDs 的分辨率达到 3 Å，允许搭建结构模型，而 NBD1 由于柔性摆动所以分辨率较低。

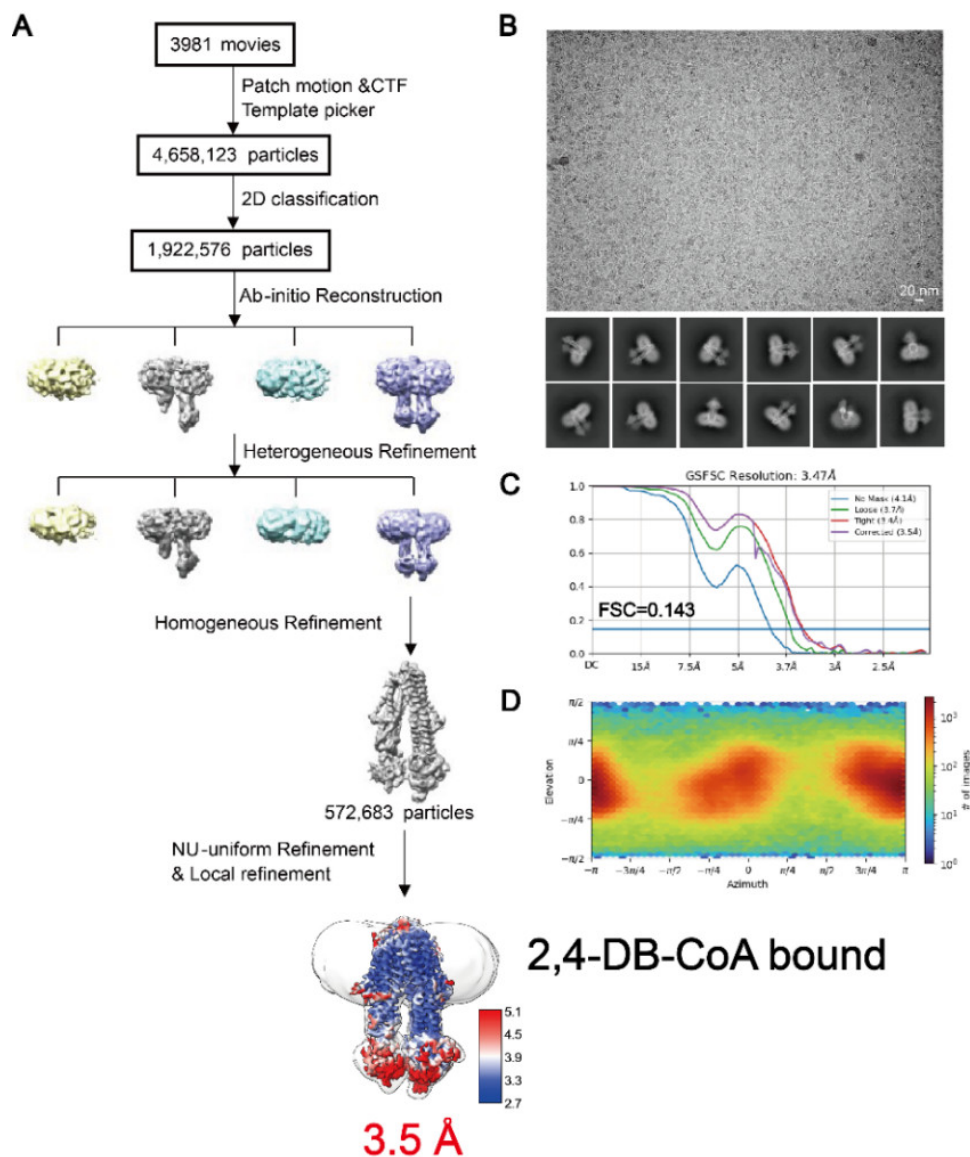


图 3.29 CTS 蛋白与 2,4-DB-CoA 复合物的冷冻电镜结构解析过程

图注：A. 使用 cryoSPARC 软件对收集的冷冻电镜数据照片处理的流程图。在 cryoSPARC 中对最终的电镜密度图进行局部分辨率计算，随后在 ChimeraX 中进行染色。数字为对应的颜色代表的分辨率（Å）。B. 来自本数据集的冷冻电镜照片，比例尺为 20 nm。C. 计算本数据集的二维分类结果。D. 本数据集蛋白颗粒的 FSC 曲线以及欧拉角分布图。

通过比较发现，此次计算得到的密度图与无配体状态 CTS 的密度图相比开口更大；与 C12:0-CoA 结合、IBA-CoA 结合的 CTS 密度图进行比对，三者构象大致相同，TMD 开口大小相同，因此推测 2,4-DB-CoA 分子可能与蛋白结合。类似地，将 C12:0-CoA 结合的 CTS 结构作为初始结构模型，通过多次手动修正以及自动修正得到高度匹配的 CTS 蛋白结构模型（表 3.4）。最终 1,191 个氨基酸可以搭建在电镜密度图中，包括 Gly86-Asp428、Glu444-Asp664 以及 Gln711-Gln1337（图 3.30）。此外，在 TMD 也发现了额外的密度，推测为 2,4-DB-CoA，利用 COOT 生成 2,4-DB-CoA 的 SMILES 号，再通过 Phenix 生成 pdb 文件以及 cif 文件。将 2,4-DB-CoA 分子搭建到该密度中，发现可以很好地匹配（图 3.30）。类似地，在 2,4-DB 头部也发现了 CHS 的密度（图 3.30）。

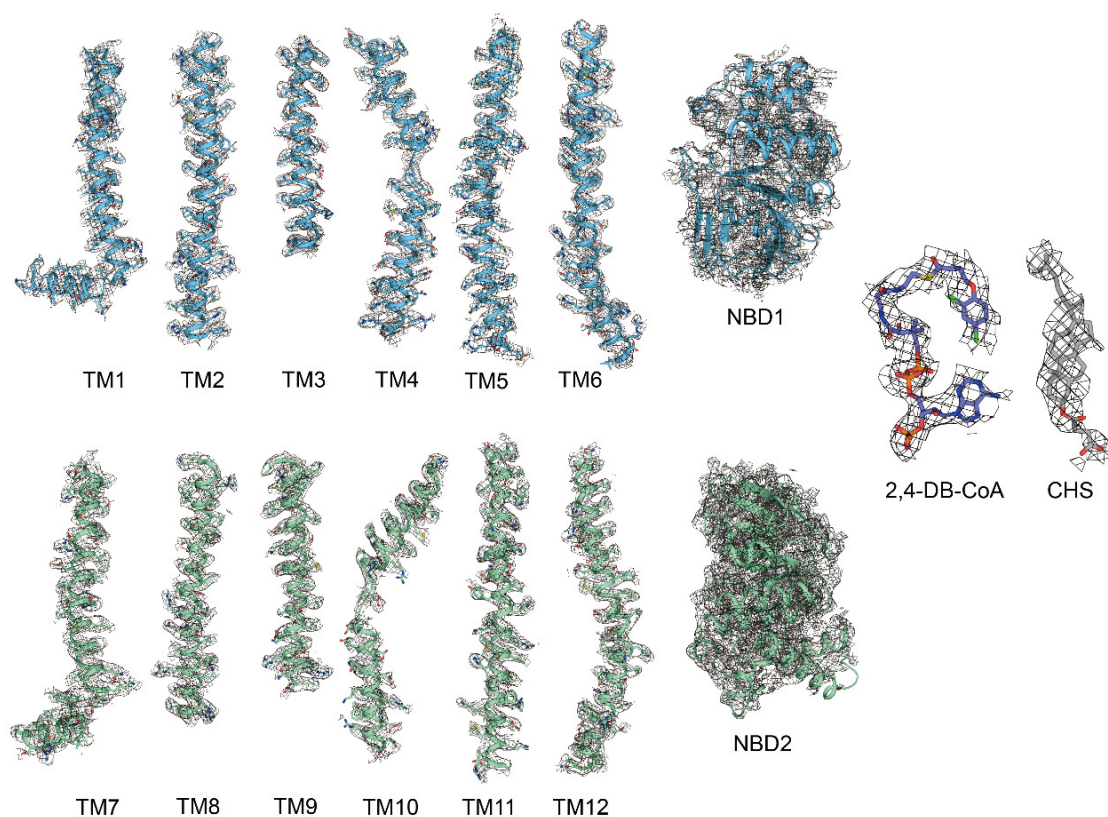


图 3.30 CTS 与 2,4-DB-CoA 复合物结构跨膜螺旋、NBDs 以及底物分子的电镜密度

图注：NBD1 以及 CHS 的等高线（contour level）为 3σ ，其余跨膜螺旋、NBD2 的等高线为 5σ 。

表 3.4 CTS 与 2,4-DB-CoA 复合物冷冻电镜数据处理与结构模型的各项参数

	2,4-DB-CoA bound
Data collection and processing	
Voltage (kV)	300
Electron exposure ($e^-/\text{\AA}^2$)	55
Magnification	81,000
Pixel size ($\text{\AA}$)	1.07
Defocus range (μm)	-2.0 to -1.2
Initial particles images (no.)	1,922,576
Final particles images (no.)	572,683
Map resolution ($\text{\AA}$)	3.5
Map resolution range ($\text{\AA}$)	2.8-5.2
FSC threshold	0.143
Refinement	
Model resolution	3.5
Map sharpening B factor ($\text{\AA}^2$)	-121.2
Non-hydrogen atoms	9523
Protein residues	1191
Ligands	A 2,4-DB-CoA molecule
B factors ($\text{\AA}^2$)	
Protein	49.78
Ligand	28.05
R.m.s.deviation	
Bond lengths ($\text{\AA}$)	0.003
Bond angles ($^\circ$)	0.876
Validation	
Molprobity score	2.04
Clashscore	11.39
Poor rotamers (%)	0.19
Ramachandran plot	
Favored (%)	92.49
Allowed (%)	7.51
Disallowed (%)	0

3.7.5 CTS 与 IBA-CoA 复合物、2,4-DB-CoA 复合物的整体结构分析

IBA-CoA 结合的 CTS 蛋白与 2,4-DB-CoA 结合的蛋白均为向内开口的构象（图 3.31A、C），与 C12:0-CoA 结合的 CTS 类似，且开口比无配体状态 CTS 大。IBA-CoA 分子与 2,4-DB-CoA 分子均结合在 TMD1 与 TMD2 之间的空腔，且更靠近 TMD2 一侧（图 3.31B、D）。此外，与 CTS 与 C12:0-CoA 复合物结构类似，IBA-CoA 结合的 CTS 以及 2,4-DB-CoA 结合的 CTS 结构中酰基链末端均发现一个 CHS 分子，CHS 位于过氧化物酶体膜内外小叶之间，而底物 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 更靠近内小叶（图 3.31A、C）。

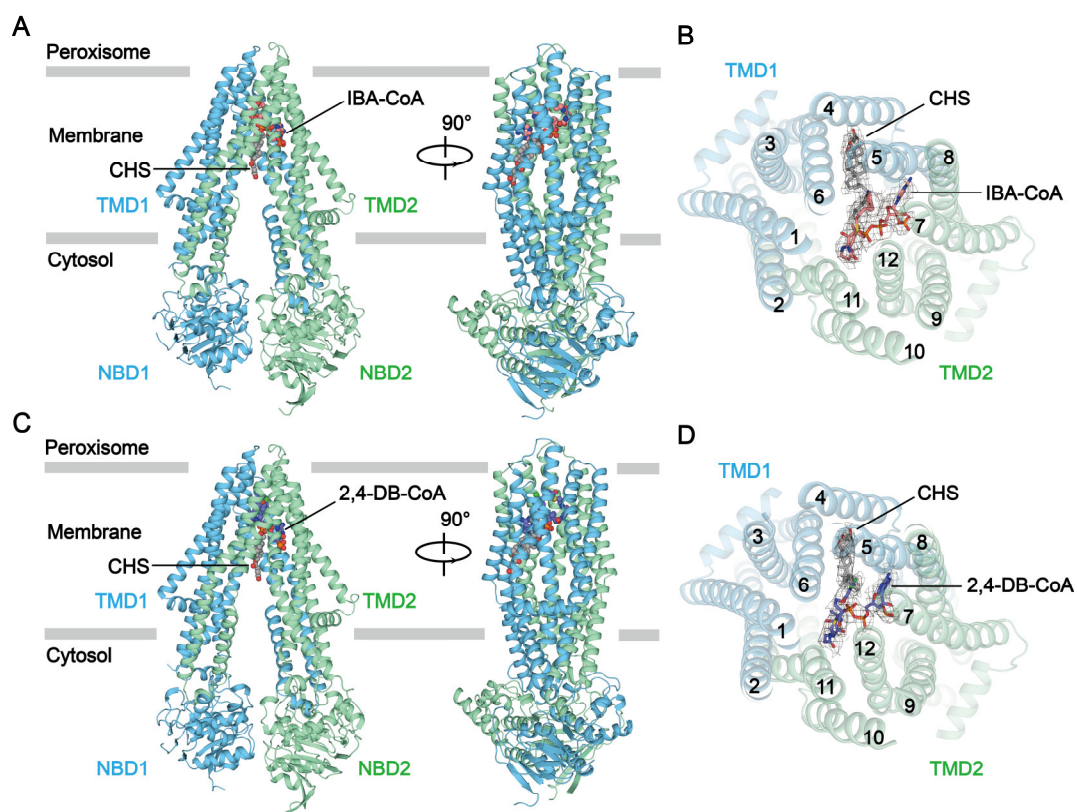


图 3.31 IBA-CoA 结合以及 2,4-DB-CoA 结合的 CTS 蛋白整体结构

图注：A 与 C 分别为 CTS 与 IBA-CoA 复合物（A）、与 2,4-DB-CoA 复合物（C）的卡通模式结构图。IBA-CoA 分子、2,4-DB-CoA 分子以及 CHS 分子分别以粉红色（salmon）、蓝灰色（slate）以及灰色球体显示。B 与 D 分别为 CTS 与 IBA-CoA 复合物以及 2,4-DB-CoA 复合物中 TMD 的俯视图。IBA-CoA 分子、2,4-DB-CoA 分子以及 CHS 分子分别以粉红色、蓝灰色以及灰色棒状显示，电镜密度以黑色网格显示。

与 C12:0-CoA 类似，IBA-CoA 及 2,4-DB-CoA 结合后，CTS 发生了明显的构象变化，TMD 开口变大（图 3.32A、D），其中 TM1-2、TM4-5、TM7、TM9、TM11-12 均向两侧移动 4-5 Å（图 3.32B、E），TM3、TM6、TM8 及 TM10 向两侧移动距离更大，约 6-8 Å（图 3.32B、E），为底物分子的结合提供足够的空间。

此外, NBD1 也发生了明显的构象变化, 向后移动约 10 Å (图 3.32C、F), NBD2 整体摆动很小。

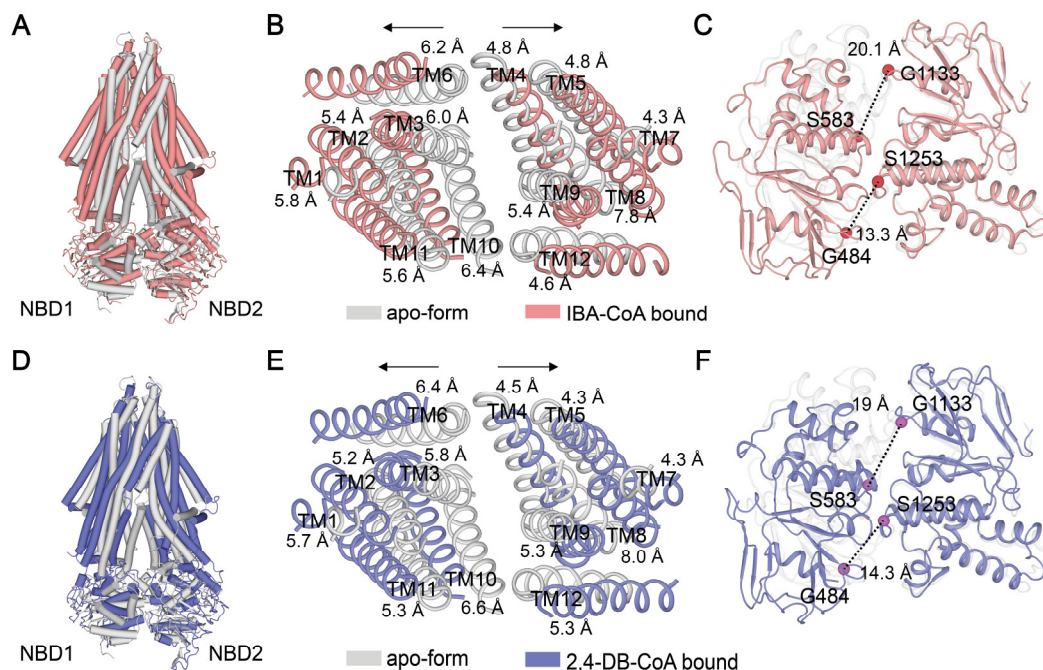


图 3.32 IBA-CoA 及 2,4-DB-CoA 结合的 CTS 与无配体状态 CTS 的结构比对

图注: A 与 D. IBA-CoA (A) 及 2,4-DB-CoA (D) 结合的 CTS 分别与无配体状态 CTS 进行三维结构比对, 产生的 RMSD 分别为 5.28 Å (1,174 个 α 碳原子) 及 5.21 Å (1,159 个 α 碳原子)。B 与 E. TMDs 在 IBA-CoA (B) 及 2,4-DB-CoA (E) 结合后发生的构象变化。C 与 F. IBA-CoA (C) 及 2,4-DB-CoA (F) 结合的 CTS 结构中 NBDs 之间的距离。

IBA-CoA 分子与 2,4-DB-CoA 分子均结合在 TMDs 之间的两亲性空腔 (图 3.33), 其中, 辅酶 A 头部与 IBA、2,4-DB 均结合在疏水口袋, 核糖 3'-磷酸以及 ADP 二磷酸结合在碱性表面, 与 C12:0-CoA 分子类似。此外, CHS 分子结合在酰基链末端, 可能为底物的稳定结合提供疏水作用界面 (图 3.33)。

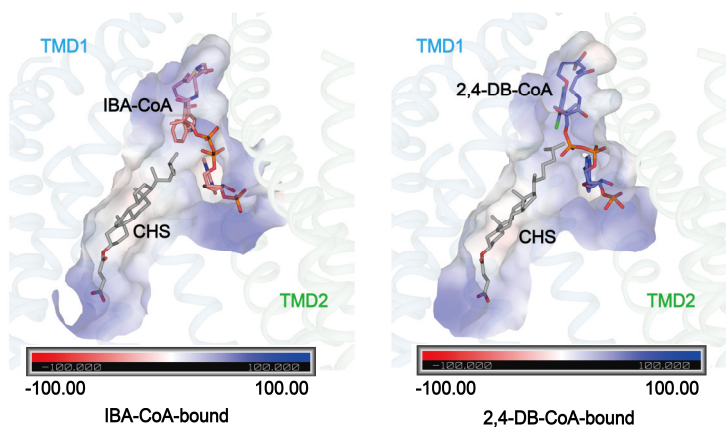


图 3.33 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 结合口袋电势

图注: 设置的电势范围为-100 Kt/e (红色) 至 100 Kt/e (蓝色)。

对底物 IBA-CoA、2,4-DB-CoA 相互作用残基进行分析 (图 3.34), 辅酶 A 头部的腺苷环与 Thr350、Asn784 以及 Ser806 形成氢键从而嵌入一个疏水口袋; 核糖 3'-磷酸除了与 Lys345、Arg773 形成盐桥, 还与 Tyr346、Ser777 以及 Gln1043 形成氢键; ADP 的二磷酸部分与 Arg1035 形成盐桥, 与 Ser1039、Ser1042 形成氢键。此外, IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 的泛酸部分均与来自 TM6 的 Arg382 形成氢键, 且 2,4-DB-CoA 的泛酸部分还与来自 TM11 的 T1006 形成氢键, 这在 C12:0-CoA 结合口袋中并没有观察到。IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 分子的半胱胺部分也在 F134、W1007 形成的弓形疏水腔出向后弯曲。末尾的酰基链与 C12 类似, 被周围疏水的的异亮氨酸簇包围, 整个分子呈现一个未闭合的环状结构。多序列比对结果表明, R382 以及 T1006 在油料种子植物中也是高度保守 (图 3.25), 表明这些植物中转运 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 的方式可能也是保守的。

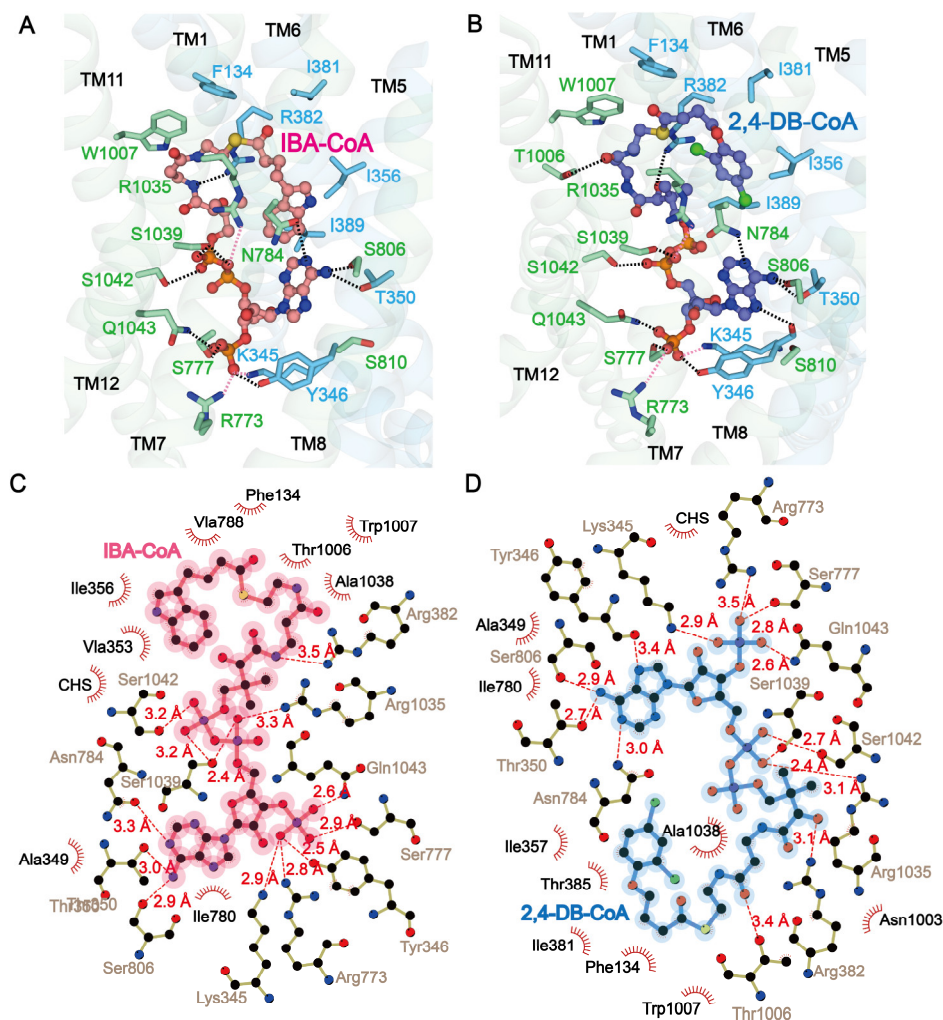


图 3.34 物 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 的结合口袋分析

图注: A 与 B. 底物 IBA-CoA (A) 以及 2,4-DB-CoA (B) 的结合口袋。IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 分别以粉色与蓝灰色球体棒状形式展示, 与底物相互作用的残基以棒状展示。氢键以及盐桥以黑色虚线展示。C 与 D. 使用 LigPlot⁺软件分析得出 IBA-CoA (C)、2,4-DB-CoA (D) 与 CTS 蛋白相互作用网络。

此外, 突变体的 ATPase 活性实验结果显示, 与野生型 WT 相比, 与辅酶 A 部分形成极性相互作用的氨基酸残基发生突变均会降低底物 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 刺激的 ATPase 活性(图 3.35), 如 K345A、Y346A、T350A、R382A、R773A、N784A 以及 R1035A; 突变体 F134A 以及 W1007A 底物刺激的 ATPase 活性也严重降低, 表明该残基提供的疏水界面对于 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 的结合也十分重要。

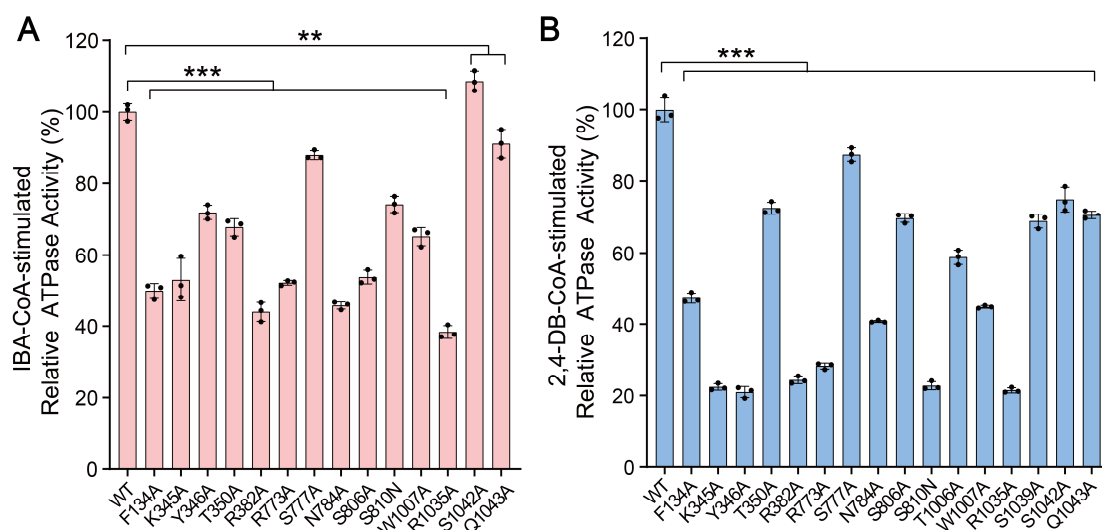


图 3.35 底物相互作用残基突变体的 ATPase 活性

图注: 对 IBA-CoA (A) 与 2,4-DB-CoA (B) 底物结合口袋相互作用残基突变体在底物刺激下的 ATPase 活性, 每组实验重复 3 次, 误差条表示平均值±标准差。使用 One-way ANOVA 进行显著性分析, ***表示 P 值<0.001, **表示 P 值<0.01。

3.7.6 CTS 与不同酰基辅酶 A 结合复合物的整体比对

对本研究解析的三种底物结合的 CTS 复合物结构进行三维结构比对, 结果显示(图 3.36A), 这三种底物结合的 CTS 处于相同的向内开口构象, 且 TMDs 之间的开口大小相同, NBD2 也处于相同位置, NBD1 存在小幅度摆动(图 3.36A)。底物分子 C12:0-CoA、IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 结合在同一个口袋(图 3.36B), 辅酶 A 的腺苷以及二磷酸部分几乎完全重合, 来自 TM5/7/12 的极性残基负责固定 CoA 头部, TM5/6/11 的疏水残基负责结合酰基链。值得注意的是, 酰基链在 TM1/11 的疏水界面折叠, 使得整个底物分子呈现“U”形结合在两亲性口袋。此外, 在底物分子酰基链末端均有一个 CHS 分子结合, 并且随着酰基链长度变化, CHS 的相对位置也不同(图 3.36C), 对于短链酰基辅酶 A, CHS 会进入部分底物结合口袋的疏水腔; 对于长链酰基辅酶 A, CHS 则会退出该疏水腔将空间留给酰基链。

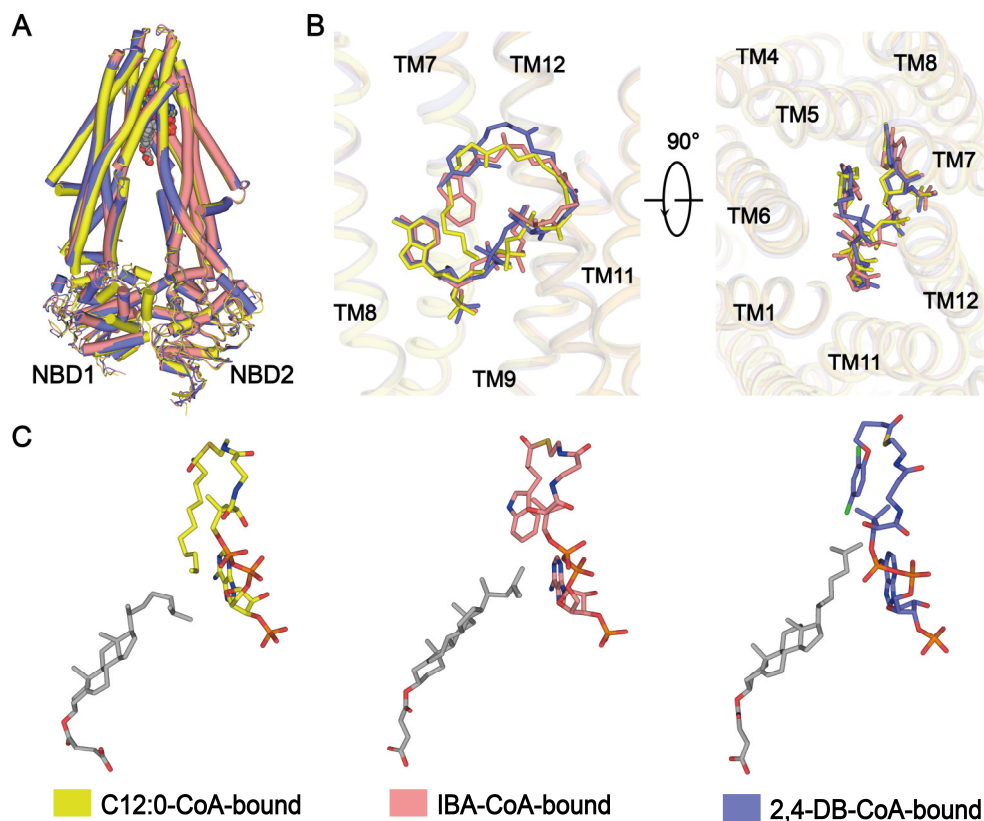


图 3.36 不同底物结合的 CTS 复合物结构比对

图注: A. CTS 与 C12:0-CoA 复合物 (黄色)、IBA-CoA 复合物 (粉色) 以及 2,4-DB-CoA 复合物 (灰蓝色) 的整体结构比对, 底物 C12:0-CoA、IBA-CoA、2,4-DB-CoA 以及 CHS 均以球体展示。B. 底物结合口袋处三种底物分子的位置比对。C12:0-CoA (黄色)、IBA-CoA (粉色) 以及 2,4-DB-CoA (灰蓝色) 以棒状形式展示。C. 底物分子与 CHS 相对位置比对。其中, C12:0-CoA、IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 分别展示为黄色、粉色以及蓝灰色棒状, CHS 展示为灰色棒状。

3.8 CTS 与核苷酸复合物的冷冻电镜结构解析与整体结构分析

3.8.1 CTS 与核苷酸复合物的冷冻电镜结构解析与结构模型搭建

ABC 转运蛋白通过 NBD 结合、水解 ATP 以及释放磷酸根, 驱动 TMD 发生构象变化从而使得底物分子进行跨膜易位^[2]。为了更好地理解 CTS 转运底物的过程, 本研究尝试解析转运循环中不同阶段的构象结构。

多序列比对结果显示, CTS 蛋白 NBD2 结构域中 H 开关的组氨酸退化为谷氨酰胺 (Q1305) (图 3.8B), 这表明 CTS 蛋白只存在一个 ATPase 活性位点。当 NBD1 中负责极化水分子的谷氨酸突变成谷氨酰胺 (记为 E607Q 突变) 后, CTS 的 ATPase 活性几乎完全丧失 (图 3.8A), 推测此时 ATP 可以结合在 NBD 二聚化界面但无法被水解为 ADP 与 Pi。因此, 本研究在制备冷冻电镜样品时加入 300 μM C12:0-CoA 以及 10 mM ATP/Mg²⁺ 与 chCTS 突变体 E607Q (记为 chCTS^{E607Q})

孵育，期望得到底物转运后的构象结构。后续收集了 2,577 张电镜照片，通过 cryoSPARC 软件进行数据处理，最终通过 298,382 个颗粒重构得到整体分辨率为 3.2 Å 的电镜密度图（图 3.37）。

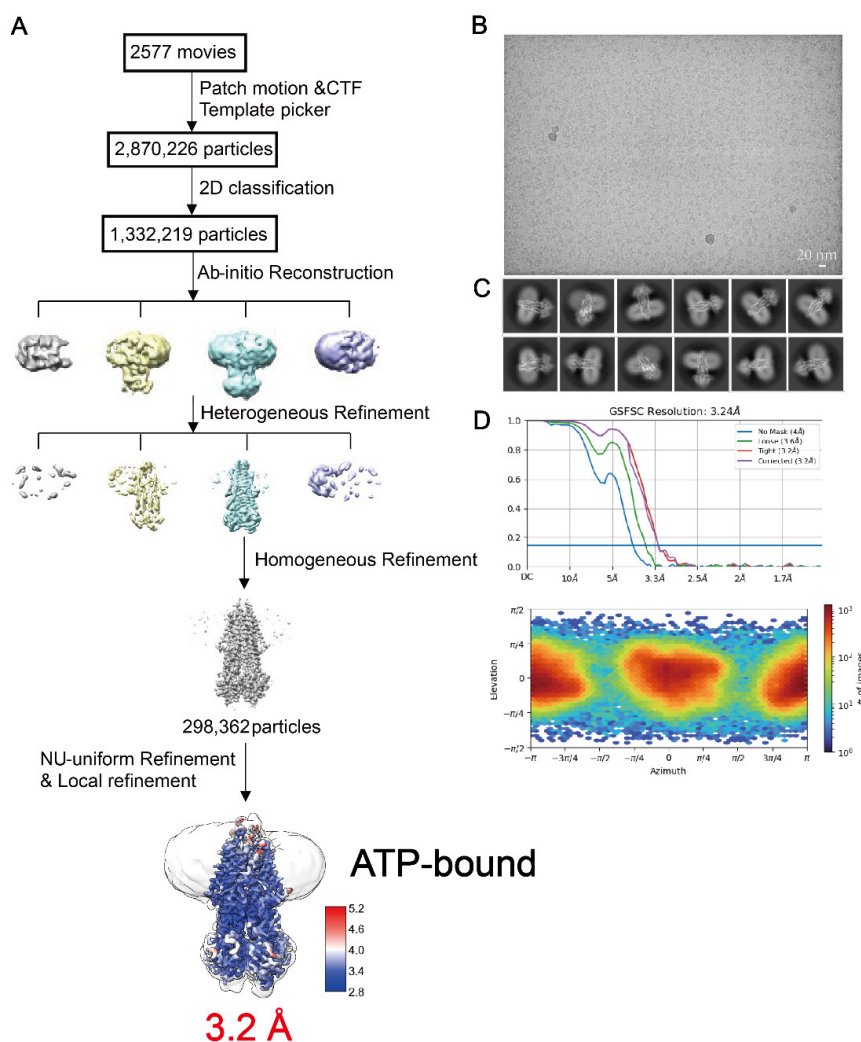


图 3.37 嵌合体 chCTS 蛋白与 ATP 复合物的冷冻电镜结构解析过程

图注：A. 使用 cryoSPARC 软件对收集的冷冻电镜数据照片处理的流程图。在 cryoSPARC 中对最终的电镜密度图进行局部分辨率计算，随后在 ChimeraX 中进行染色。数字为对应的颜色代表的分辨率（Å）。B. 来自本数据集的冷冻电镜照片，比例尺为 20 nm。C. 计算本数据集的二维分类结果。D. 本数据集蛋白颗粒的 FSC 曲线以及欧拉角分布图。

观察本次计算得到的电镜密度图，发现其 TMD 开口较小，与底物结合的构象明显不同；随后将其与无配体状态 CTS 的电镜密度图进行比对，发现两者开口大致相似，因此取无配体状态 CTS 结构作为初始模型，利用 COOT 以及 phenix 软件进行修正，最终 1,210 个氨基酸氨基可以搭建在电镜密度图中，包括 Gly85-Asp428、Ser443-Asp663、Asp680-Gly1081 以及 Asp1092-Gln1334（图 3.38）。在搭建完蛋白的结构后，发现在 NBD 二聚化界面有额外的电镜密度，考虑到在制

备冷冻电镜样品时加入 ATP/Mg^{2+} ，尝试将 ATP/Mg^{2+} 放置于该密度中，发现能很好地匹配，因此此次数据解析的为 CTS 与 ATP 结合复合物的结构。

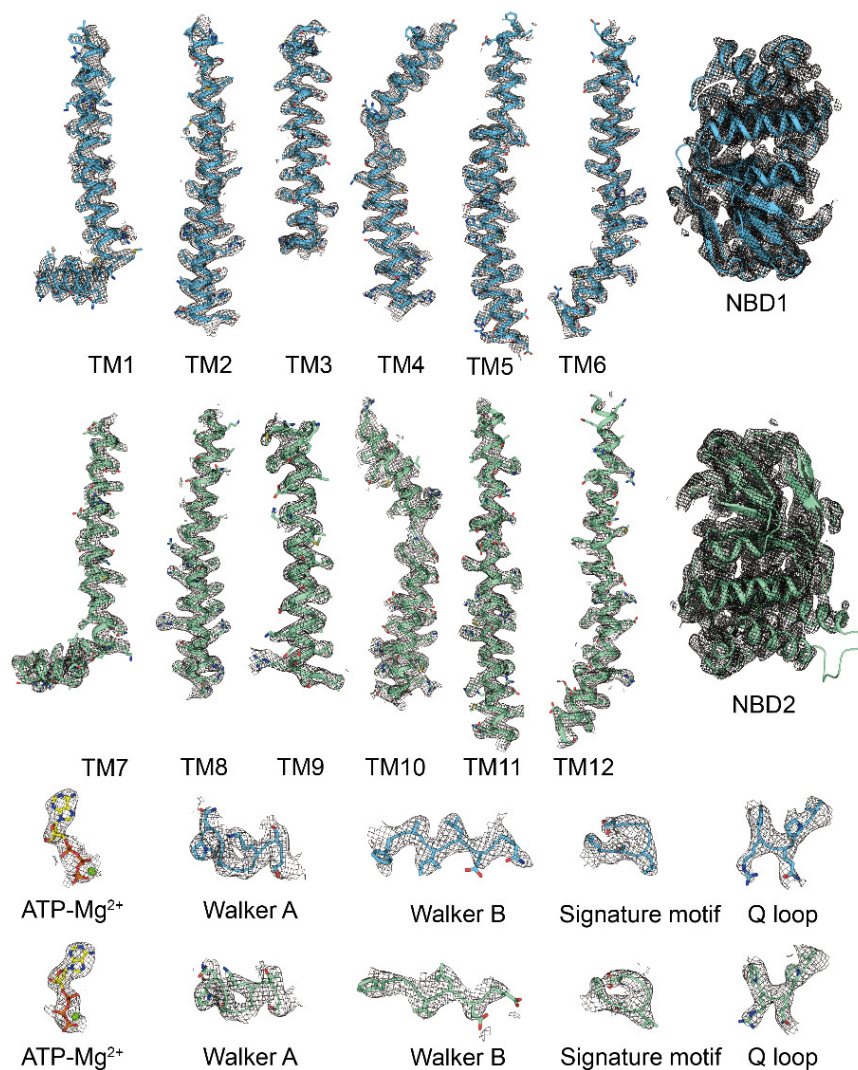


图 3.38 CTS 与 ATP 复合物结构中跨膜螺旋、NBDs 以及 ATP/Mg^{2+} 的电镜密度

图注：TM10 的等高线 (contour level) 为 3σ ，其余跨膜螺旋、NBDs 以及 ATP/Mg^{2+} 的等高线为 5σ 。

表 3.5 CTS 与 ATP 复合物冷冻电镜数据处理与结构模型的各项参数

	ATP-bound
Data collection and processing	
Voltage (kV)	300
Electron exposure ($e^-/\text{\AA}^2$)	55
Magnification	81,000
Pixel size ($\text{\AA}$)	1.07
Defocus range (μm)	-2.0 to -1.2
Initial particles images (no.)	1,602,492
Final particles images (no.)	463,288
Map resolution ($\text{\AA}$)	3.2
Map resolution range ($\text{\AA}$)	2.8-5.2
FSC threshold	0.143
Refinement	
Initial mode used	
Model resolution	3.2
Map sharpening B factor ($\text{\AA}^2$)	-125.7
Non-hydrogen atoms	9628
Protein residues	1210
Ligands	Two ATP molecules and two Mg^{2+}
B factors ($\text{\AA}^2$)	
Protein	82.53
Ligand	83.42
R.m.s. deviations	
Bond lengths ($\text{\AA}$)	0.003
Bond angles ($^\circ$)	0.602
Validation	
Molprobity score	1.87
Clashscore	10.18
Poor rotamers (%)	0.1
Ramachandran plot	
Favored (%)	95.01
Allowed (%)	4.99
Disallowed (%)	0

3.8.2 CTS 与核苷酸复合物的整体结构分析

在 ATP 结合的 CTS 蛋白结构中, ATP 结合在 NBDs 二聚化界面, 耦合螺旋将 NBDs 的构象变化传递给 TMDs 使得 TMDs 相互靠近, 底物的结合口袋被挤压使得底物被释放进入过氧化物酶体, 朝向过氧化物酶体基质的底物易位通道阀门部分关闭 (图 3.39A), 整体结构呈现为向外闭合 (outward-occluded) 的瞬时中间构象, 类似于以前报道的 McjD 与 AMP-PMP 复合物结构^[248]以及 TmrAB 与 ATP 复合物结构^[249]。由于两个 ATP 水解位点发生突变, 因此两个 ATP 分子尚未发生水解, 只对称结合在核酸结合位点 (nucleotide-binding site, NBS) (图 3.39C)。将 ATP 结合的 CTS 与 ATP 结合的 hABCD1 (PDB: 7VX8) 进行三维结构比对, 777 个 α 碳原子产生的 RMSD 为 1.08 Å, 表明两者具有明显的构象差异。这种构象差异主要是由位于过氧化物酶体内小叶侧的 TMD 开口大小不同引起的, 其中 hABCD1 的 TMD 向过氧化物酶体开放, 底物被释放进入过氧化物酶体; CTS 的 TMD 在底物释放后 TMD 闭合, 蛋白即将恢复向细胞质侧开口的中间状态。

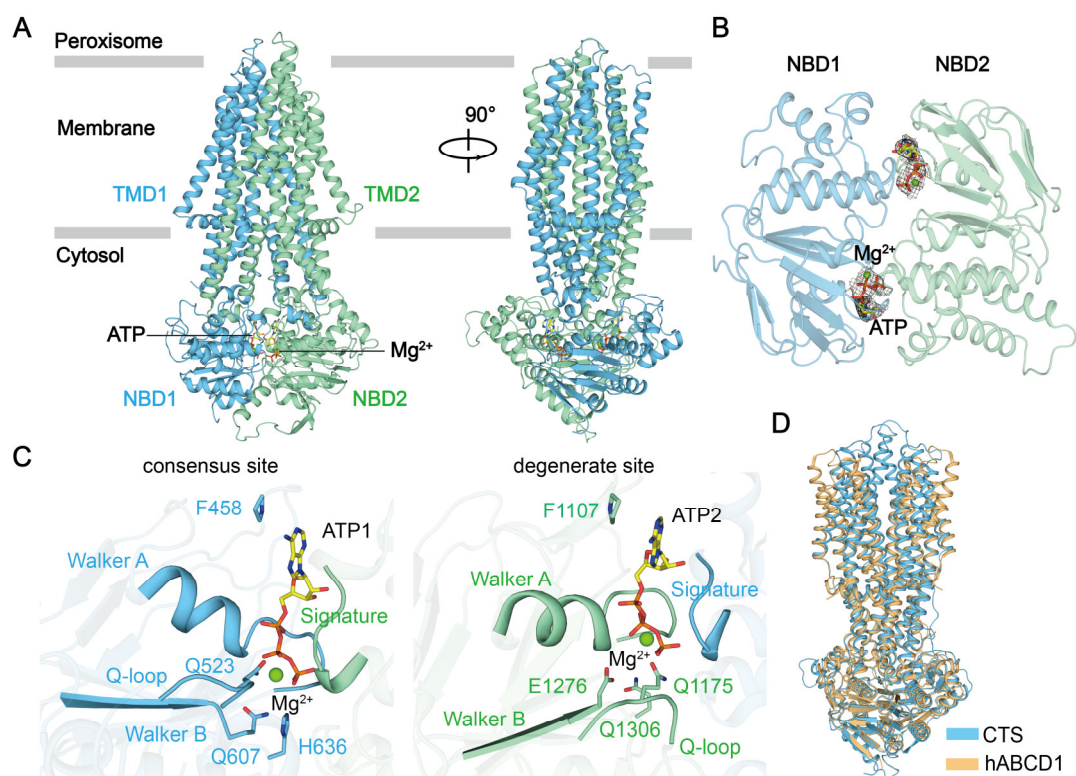


图 3.39 CTS 与 ATP 复合物的整体结构

图注: A. CTS 与 ATP 复合物的卡通模式结构图, ATP 分子以黄色棒状显示, 镁离子以绿色球体显示。B. CTS 与 ATP 复合物二聚化界面。ATP 与镁离子的电镜密度以黑色网格显示。C. 每个核酸结合位点处 ATP 的结合口袋。与 ATP 相互作用的保守基序已在图中标注。D. ATP 结合的 CTS 及 hABCD1 (PDB: 7VX8) 结构比对结果, 777 个 α 碳原子产生的 RMSD 为 1.08 Å。

将 ATP 结合的 CTS 结构与无配体状态 CTS 结构进行比对, 912 个 α 碳原子产生的 RMSD 为 0.69 Å, 这表明两个结构的构象差异较小 (图 3.40A)。通过结构比对发现, 在 CTS 与 ATP 复合物结构中, 连接 NBD1 与 TMD2 的连接螺旋 (linker helix, LH) 结构可以被搭建 (图 3.40B、C), 而在无配体状态 CTS 结构中 LH 结构由于柔性摆动使得电镜密度不可见。序列比对结果显示 (图 3.40D), LH 与 hABCD1 的 C 端交叉螺旋 (crossover) 具有序列相似性, hABCD1 交叉螺旋对 NBDs 二聚化具有重要功能, 缺失时会显著降低 ATPase 活性^[54], 因此猜测拟南芥 CTS 的连接螺旋 LH 可能具有类似的调节 NBDs 二聚化功能。此外通过结构分析, 尽管无配体 CTS 与 ATP 结合的 CTS 构象差异小, 但 ATP 结合的 CTS 结构中 NBDs 之间的距离与无配体 CTS 相比明显缩短, 约为 6 Å (图 3.40E)。在 NBD1 中的核酸结合位点处, A 环中的 F458、Q 环中的 Q523 以及 Walker B 基序明显向外移动, 为 ATP 的结合提供足够空间, 类似的残基移动在 NBD2 中也存在 (图 3.40F)。

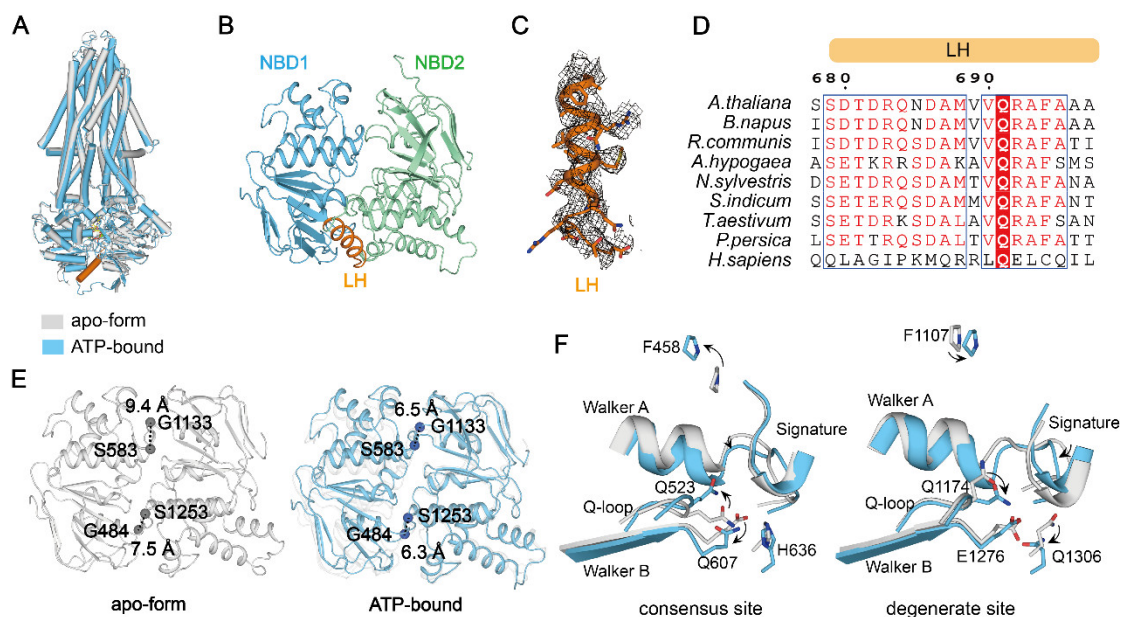


图 3.40 ATP 结合的 CTS 与无配体 CTS 的结构比对

图注: A. ATP 结合的 CTS 与无配体 CTS 的整体结构比对, 连接螺旋 LH 以橙色表示。B. ATP 结合的 CTS 复合物中 LH 从细胞质侧内小叶视角的仰视图。LH 结合在 NBD1 与 NBD2 之间。C. ATP 结合的 CTS 结构中 LH 的电镜密度, 等高线为 2.5σ 。D. LH 的多序列比对结果, 各物种缩写与图 3.25 相同。E. 无配体状态 chCTS 与 ATP 结合的 CTS 结构中 NBDs 之间的距离。F. ATP 结合的 CTS 与无配体 CTS 结构中 ATP 的结合口袋变化。灰色为无配体 CTS 结构, 蓝色为 ATP 结合的 CTS。

将 ATP 结合的 CTS 分别与 C12:0-CoA 结合、IBA-CoA 结合以及 2,4-DB-CoA 结合的 CTS 进行三维结构比对, 产生的 RMSD 分别为 5.35 Å (1075 个 α 碳原子)、5.6 Å (1161 个 α 碳原子)、5.66 Å (1174 个 α 碳原子), 表明 ATP 结合后

CTS 结构发生明显的构象变化。与底物结合的 CTS 结构相比, ATP 结合的 CTS 结构中跨膜螺旋均相互靠近, 其中两个肘螺旋、TM1-3、TM6、TM8-10 发生明显的移动 (图 3.41A); 此外, NBDs 也相互靠近, S583 与 G1133 之间的距离缩短了约 14 Å, G484 与 S1254 之间的距离缩短了约 8 Å (图 3.41B)。

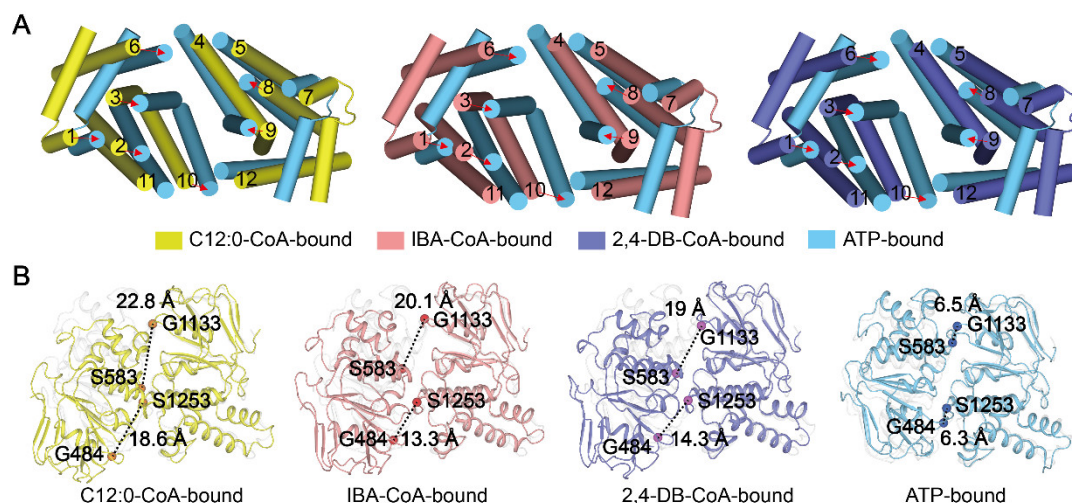


图 3.41 ATP 结合的 CTS 与底物结合的 CTS 结构比对

图注: A. ATP 结合的 CTS 与底物结合的 CTS 结构中 TMD 的构象变化。B. ATP 结合的 CTS 与底物结合的 CTS 结构中 NBDs 之间距离的变化。

3.9 分子动力学模拟预测 OPDA-CoA 结合模式

除了将活性生长素的前体 IBA 转运进入过氧化物酶体进行 β 氧化生成 IAA, 拟南芥 CTS 还参与转运茉莉酸 JA 前体 OPDA 进入过氧化物酶体进行 β 氧化。前期的生化实验表明底物 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 可以明显提高 CTS 的 ATPase 活性, 因此本研究推测辅酶 A 修饰的 OPDA 即 OPDA-CoA 才是 CTS 的生理底物。由于市场并无 OPDA-CoA 在售, 本研究期望利用前体 OPDA 与 CoASH, 通过化学合成获得 OPDA-CoA。然而由于 OPDA 分子的甲基端含有活性基团碳碳双键, 在化学合成时产生大量的副产物, 因此本研究未能得到 OPDA-CoA 分子, 也未能通过生化证明 OPDA-CoA 是 CTS 的底物。

基于对三种底物结合 CTS 复合物结构的分析, 本研究推测 OPDA-CoA 也将结合在相同的底物口袋。由于 OPDA 比 C12 更长, 猜测 OPDA 酰基链将占据 CHS 所在的疏水口袋。因此将 OPDA-CoA 分子的结构对接 (docking) 在 CTS 与 C12:0-CoA 复合物电镜密度图 C12:0-CoA 对应的密度中 (图 3.42A)。为了验证这个猜想, 本研究使用显式溶剂模型中的全原子分子动力学模拟来预测 OPDA-CoA 分子是否能稳定结合在该口袋。此部分分子动力学模拟由李勃锐博士完成。在模拟过程中, OPDA-CoA 与 CTS 的结合出现了 8 种可能的构象 (簇), 按照

出现频率从高到低将这些构象命名为 1 至 8，其中构象 1 至 3 出现的频率较高（图 3.42C、D），分别为 32.79%、29.16%以及 22.83%。RMSD 通常用来评估模拟过程中 OPDA-CoA 分子相对于 CTS 结构的偏差。RMSD 小提琴图显示（图 3.42B），整体 OPDA-CoA 分子相对于 CTS 的移动较小（小于 10 Å），然而其结合形式并不单一，出现多个峰，说明存在不同的结合构象。

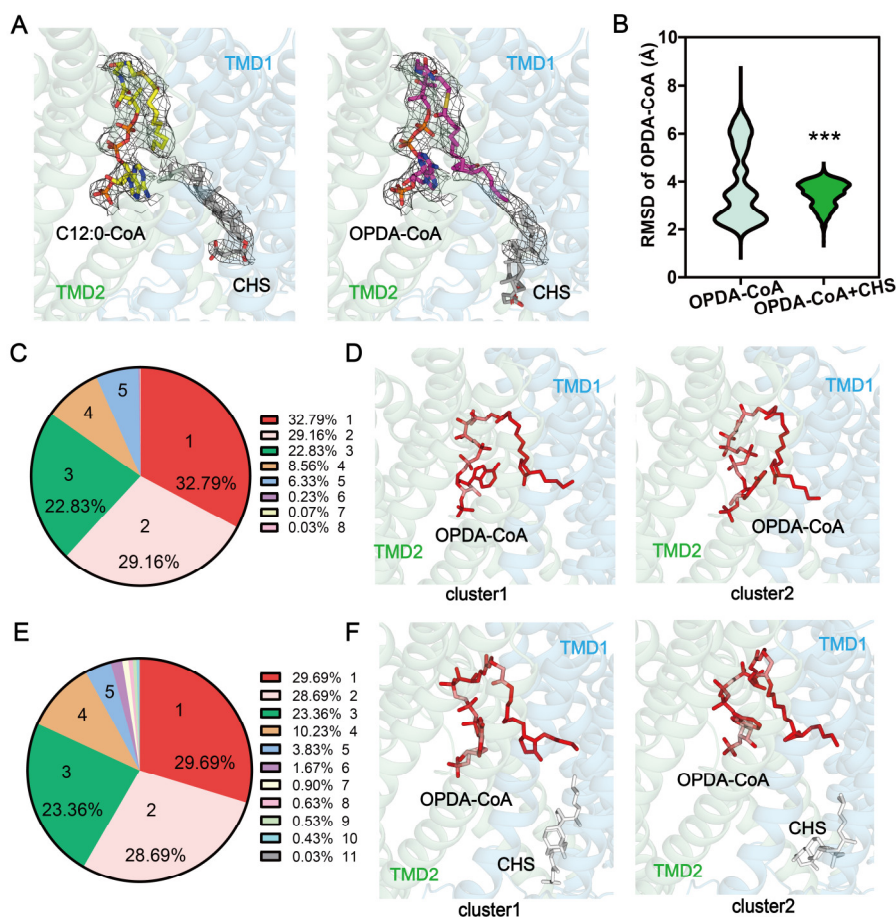


图 3.42 CTS 与 OPDA-CoA 的分子动力学模拟结果

图注：A. OPDA-CoA 对接于 C12:0-CoA 电镜密度的结果。左图为 C12:0-CoA 与 CHS 的电镜密度。电镜密度以黑色网格显示。B. 只添加 OPDA-CoA 与添加 OPDA-CoA 及 CHS 进行分子动力学模拟的 RMSD 结果。使用 t 检验进行显著性分析，***表示 P 值<0.001。C 与 E. 只添加 OPDA-CoA (C) 与添加 OPDA-CoA 及 CHS (E) 分子动力学模拟过程中各构象出现的频率扇形图。D 与 F. 只添加 OPDA-CoA (D) 与添加 OPDA-CoA 及 CHS (F) 模拟过程中出现频率较高的两个构象中 OPDA-CoA 的结合模式。Cluster1 代表构象 1，cluster2 代表构象 2。OPDA-CoA 分子按照局部波动性染色，红色表示波动最大，白色表示波动最小。

考虑到在底物结合口袋中，酰基链末端均结合了一个 CHS 分子，猜测 OPDA-CoA 结合不稳定的原因可能是在模拟计算时未添加 CHS 分子，因此重新将 CHS 分子放置于 OPDA 烃链末端，重新进行分子动力学模拟计算。添加 CHS 分子之

后的分子动力学模拟过程出现了 11 种可能的构象，其中构象 1 至 3 出现的频率较高（图 3.42E、F），分别为 29.69%、28.69%以及 23.36%。此次结果的 RMSD 均比未加 CHS 的更小（图 3.42B），几乎在 4 Å 以内，说明 OPDA-CoA 分子相对于 CTS 偏移程度更小，OPDA-CoA 分子可以稳定地结合在该口袋。这也侧面说明，CHS 的加入可以稳定底物分子的结合。然而，分子动力学模拟及生理实验只能大致预测 OPDA-CoA 分子可以结合在该口袋，是否具有其它的结合口袋以及真正的结合模式还需要通过结构生物学手段来确定。

3.10 拟南芥生理实验揭示底物转运的关键残基

为了进一步探究 CTS 转运底物酰基辅酶 A 的关键残基，本研究通过农杆菌花序侵染法，将野生型及单点突变的 *cts* 基因转化到 *cts* 突变体中，观察单点突变对拟南芥种子萌发、幼苗生长、IBA 存在下侧根生成以及 2,4-DB 存在下主根生长等过程的影响，从而评估 CTS 对脂肪酸、IBA、2,4-DB 及 OPDA 的转运能力。

荧光定位结果显示，野生型及单点突变的 CTS 蛋白均成功靶向过氧化物酶体（见附录 C）。*cts* 突变体种子无法萌发。当在培养基中添加蔗糖时，*cts* 种子不萌发，幼苗仍然无法生长，没有绿色的子叶及伸长的主根出现（图 3.43A）。当野生型 CTS 回补时，种子可以正常萌发，幼苗正常生长，与 *Col-0* 类似。当残基 F134、T350、N784、S806、T1006 及 W1007 发生突变时，拟南芥种子萌发及幼苗生长不受影响，与 *Col-0* 表型类似（图 3.43A）。然而，当 S810 突变时，拟南芥种子能正常萌发，胚根突破种皮，但子叶和主根的发育生长受损；外源补充蔗糖时，S810N 幼苗可以正常生长，与 *Col-0* 类似（图 3.43B），这些结果表明这两个突变体的种子将脂质转化为蔗糖的功能受损，S810 突变影响 CTS 对脂肪酸的转运能力。值得注意的是，K345A、Y346、R382A、R773A 以及 R1035A 突变对 CTS 功能影响最大，这些残基突变后 CTS 蛋白失去功能，单点突变体种子与 *cts* 突变体类似，种子无法正常萌发，胚根无法突破种皮（图 3.43A），即使外源添加蔗糖也无法改善这种表型（图 3.43B）。研究显示，在种子发育过程中，CTS 功能缺陷会导致种子积累高水平的 OPDA，最终抑制种子萌发^[218]。因此，K345A、R382A、R773A 及 R1035A 突变体的表型是 CTS 转运 OPDA 功能缺陷导致的，细胞质中积累 OPDA，抑制了突变体的种子萌发。当人工去除 K345A、R382A、R773A 及 R1035A 突变体种子的种皮时，胚根可以生长发育，但子叶与主根不能正常生长发育，与 *cts* 突变体类似（图 3.43C）；当外源补充蔗糖时，K345A、R382A、R773A 及 R1035A 突变体幼苗可以正常生长，出现绿色的子叶及伸长的主根（图 3.43D），这表明当 K345、R382、R773 及 R1035 突变时，CTS 转运脂酰辅

酶 A 的能力降低, 种子无法将脂质代谢转化为蔗糖用于幼苗生长发育。以上结果表明, K345、Y346、R382、R773、S810 及 R1035 对 CTS 转运脂肪酸的功能至关重要。

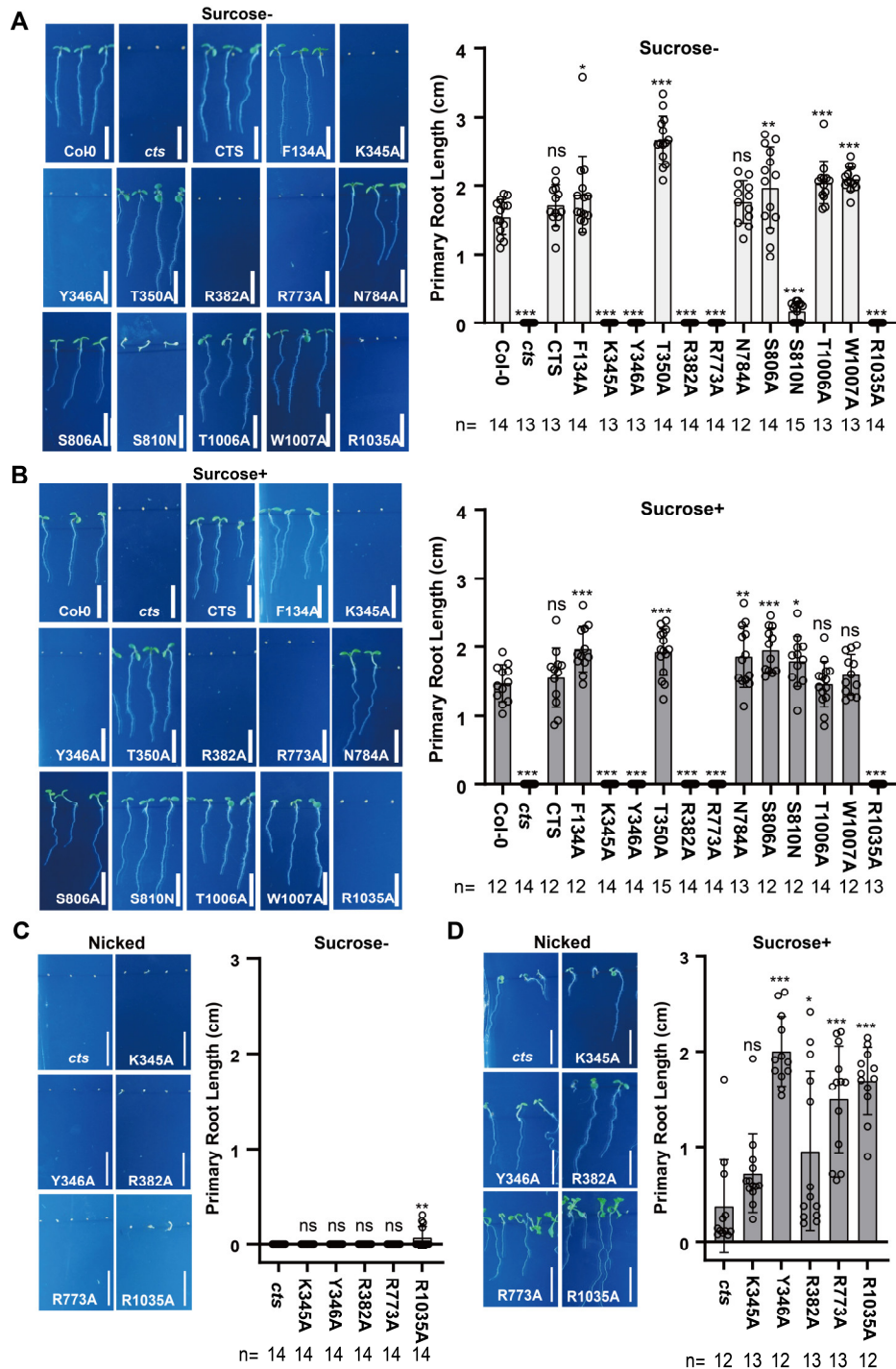


图 3.43 野生型及单点突变 CTS 回补植株种子萌发以及幼苗生长的结果

图注: A 与 B. 各基因型植株种子在不添加 (A) 及添加 (B) 蔗糖时的萌发结果。C 与 D. 各基因型植株种子破坏种皮后在不添加 (C) 及添加 (D) 蔗糖时的生长结果。所有种子在 MS 培养基上生长 7 天。比例尺表示 1 cm。n 表示幼苗数。误差条表示平均值±标准差。使用 One-way ANOVA 进行显著性分析, *** 表示 P 值<0.001, ns 表示无显著性差异。

外源施加 IBA 促进侧根生成^[152]。为了鉴定 CTS 转运 IBA 的关键残基，本研究在培养基中添加 IBA，观察 CTS 不同点突变回补植株幼苗的侧根发育情况。结果显示，外源施加 IBA 促进 Col-0 侧根生成（图 3.44A），平均侧根数为 18；*cts* 突变体不响应 IBA，侧根数目很少，平均侧根数为 3；野生型 CTS 回补 *cts* 突变体后，侧根数目明显增加，平均侧根数为 15（图 3.44B）。当残基 F134、T350、S806 及 W1007 发生突变，植株生成的侧根数与野生型 CTS 回补的植株类似（图 3.44B），表明这些突变体将 IBA 转化为 IAA 的功能不受影响，CTS 仍具备转运 IBA 的能力。然而，当 K345、Y346、R382、R773、S810 及 R1035 发生突变时，植株生成的侧根数明显减少，平均侧根数分别为 11、5、7、6、4、3（图 3.44B），这些结果表明突变体植株中 CTS 转运 IBA 的能力明显降低，K345、Y346、R382、R773、S810 及 R1035 对 CTS 转运 IBA 十分重要。

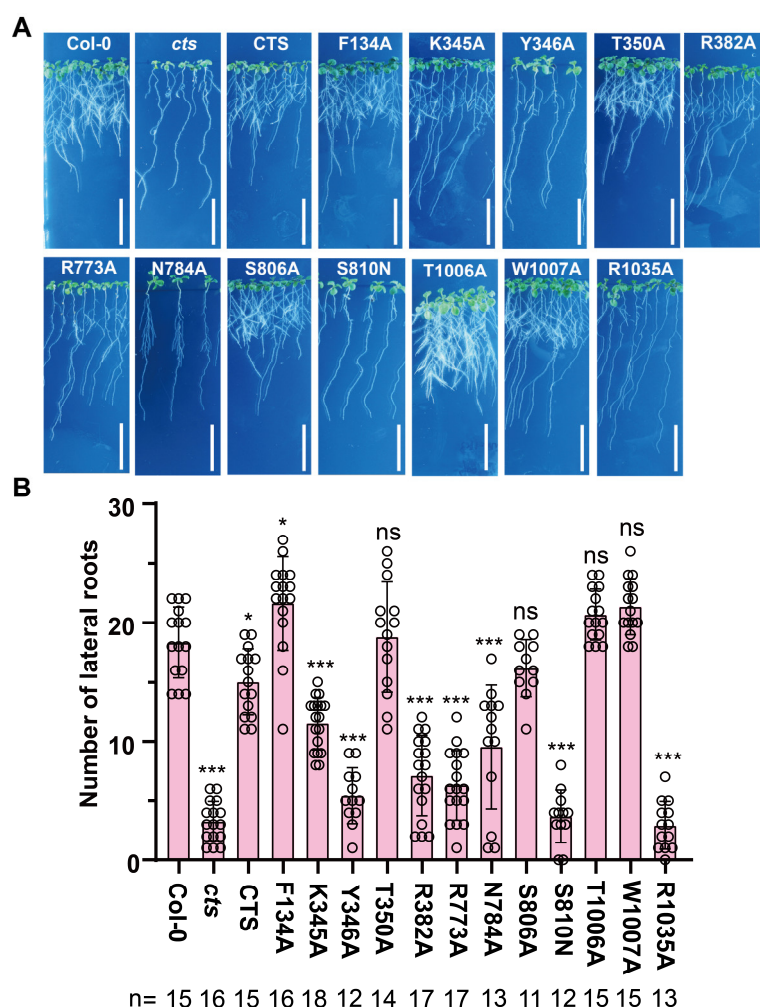


图 3.44 野生型及单点突变 CTS 回补植株在 IBA 存在下的侧根发育结果

图注：A. 各基因型植株响应 IBA 的侧根发育照片。所有幼苗在含有 5 μ M IBA 的培养基上生长 10 天。比例尺表示 1 cm。B. 对应于 A 图各植株的侧根数目。n 表示幼苗数。误差条表示平均值 $\pm$ 标准差。使用 One-way ANOVA 进行显著性分析，***表示 P 值 < 0.001，ns 表示无显著性差异。

类似地，为了鉴定 CTS 转运除草剂 2,4-DB 的关键残基，本研究在培养基中添加 2,4-DB，观察 CTS 不同点突变回补植株幼苗的主根生长情况。2,4-DB 抑制 Col-0 幼苗主根生长；*cts* 突变体失去转运 2,4-DB 的能力，使得 2,4-DB 无法通过 β 氧化转化为 2,4-D，因此对 2,4-DB 具有抗性，幼苗的主根正常生长；当野生型 CTS 回补 *cts* 突变体时，幼苗恢复了转运 2,4-DB 的功能，主根生长被抑制（图 3.45A）。当 K345、Y346、R773、N784、S810 以及 R1035 发生突变时，拟南芥幼苗也对 2,4-DB 表现出抗性，幼苗的主根正常生长（图 3.45），与 *cts* 突变体表型类似；然而，其他残基如 F134、T350、S806、T1006 及 W1007 等发生突变时，幼苗的主根生长被明显抑制（图 3.45B），类似于 Col-0。这些结果表明，K345、Y346、R773、N784、S810 以及 R1035 对于转运 2,4-DB 十分重要，当这些残基位点发生突变，CTS 丧失了转运 2,4-DB-CoA 的能力。

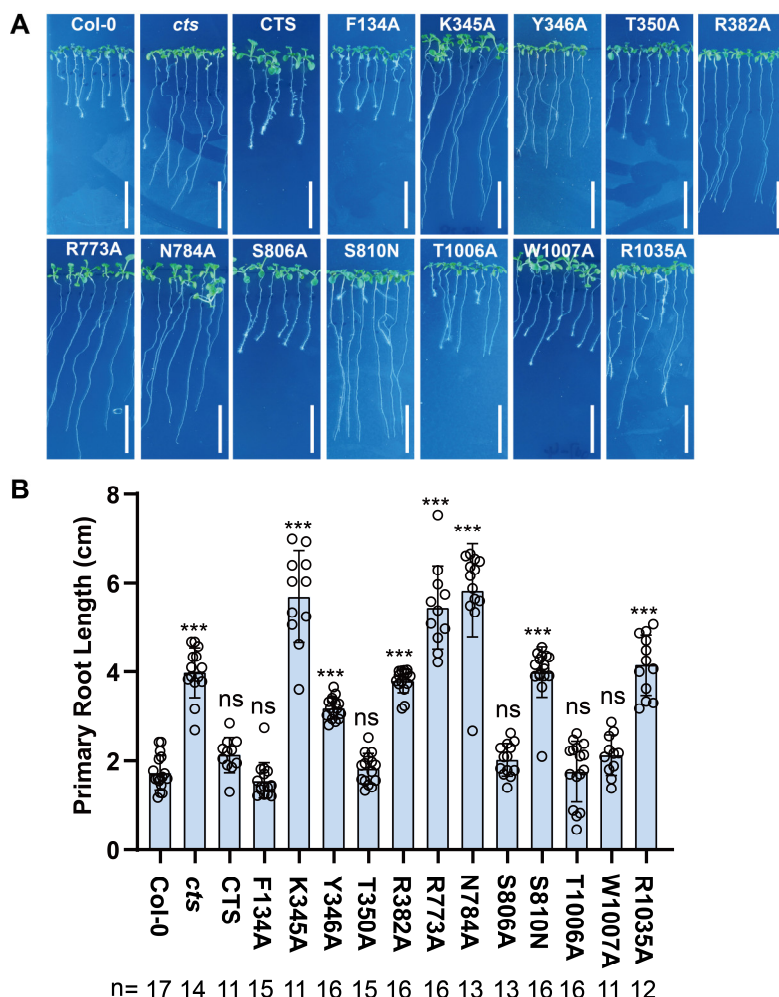


图 3.45 野生型及单点突变 CTS 回补植株在 2,4-DB 存在下的主根生长结果

图注：A. Col-0、*cts* 突变体、野生型 CTS 及单点突变体植株在 2,4-DB 存在下的主根生长照片。所有幼苗在含有 1 μ M 2,4-DB 的培养基上生长 10 天。比例尺表示 2 cm。B. 对应于 A 图各植株的主根长度。n 表示幼苗数。误差条表示平均值 $\pm$ 标准差。使用 One-way ANOVA 进行显著性分析，***表示 P 值 < 0.001，ns 表示无显著性差异。

3.11 拟南芥 CTS 与人类 ABCD1/3 不同的底物结合模式

人类 ABCD 家族有三个成员, 分别为 ABCD1、ABCD2 及 ABCD3, 其中 ABCD1 与 ABCD2 转运长链及超长链脂酰辅酶 A, ABCD2 还转运多不饱和超长链脂酰辅酶 A; ABCD3 转运支链脂酰辅酶 A 与胆汁酸中间体胆甾酰辅酶 A。这三个蛋白均是半转运蛋白 (half transporter), 需要形成同源二聚体来发挥转运底物的功能, 每条肽链由一个 TMD 与一个 NBD 组成^[45]。在过去几年的研究中, 人类 ABCD1 以及 ABCD3 的冷冻电镜结构陆续被报道^[54-59]。结构显示, 人类 ABCD1 及 ABCD3 同源二聚体具有对称的底物结合模式, TMD 存在一对重复的结合口袋, 均结合两个底物分子 (图 3.46A)。这种结合模式要求每个 TMD 同时协调辅酶 A 和酰基链的结合。在人类 ABCD1 结合超长链脂肪酸 C22:0-CoA 的结构中, 每个 TMD 必须在两个不同的位置提供两个结合位点, 一个用于结合一个底物的 CoA 部分, 另一个用于结合另一个底物的酰基链。此外, 每个 C22:0-CoA 分子都必须穿过两个 TMD, 这样长链才能被易位腔很好地容纳。相比之下, 在本研究所解析的底物结合 CTS 复合物结构中, CTS 蛋白采用不同于人类 ABCD1/3 的底物结合模式。CTS 的 TMD 只结合一个底物, 其中 CoA 主要通过氢键和盐桥被特异性识别, 而酰基链主要通过疏水相互作用以较不特异的方式结合。

将 C12:0-CoA 结合的 CTS 与 C22:0-CoA 结合的 hABCD1 (PDB: 7VZB)、oleoyl-CoA 结合的 hABCD1 (PDB: 7SHN) 以及 4ME C16:0-CoA 结合的 hABCD3 (PDB: 8Z9X) 进行三维结构比对 (图 3.46), 结果显示底物结合的 CTS 结构与人类 ABCD1、ABCD3 底物复合物结构具有明显的构象差异。首先, 这四个脂酰辅酶 A 与蛋白的复合物均呈现向内开口的构象, C22:0-CoA 结合的 hABCD1 与 CTS 的 TMD 开口大小相似, 而 oleoyl-CoA 结合的 hABCD1 以及 4ME C16:0-CoA 结合的 hABCD3 的 TMD 开口更大。其次, 结合的底物分子个数不同: hABCD1 以及 hABCD3 为同源二聚体, 具有两个底物结合位点, 因此结合了两个脂酰辅酶 A 分子, 而 CTS 作为全长转运蛋白, 只结合一个 C12:0-CoA 分子。此外, 底物分子的结合方式不同: 在脂酰辅酶 A 结合的 hABCD1 以及 hABCD3 结构中, 脂酰辅酶 A 分子对称地交叉结合在 TM 之间, 脂肪酰基的烃链均指向过氧化物酶体基质; 在 C12:0-CoA 结合的 CTS 结构中, C12:0-CoA 分子结合在 TMD1 与 TMD2 之间的空腔, 辅酶 A 部分靠近 TMD2, 脂肪酰基的烃链在过氧化物酶体膜内小叶处弯曲回折并指向细胞质。

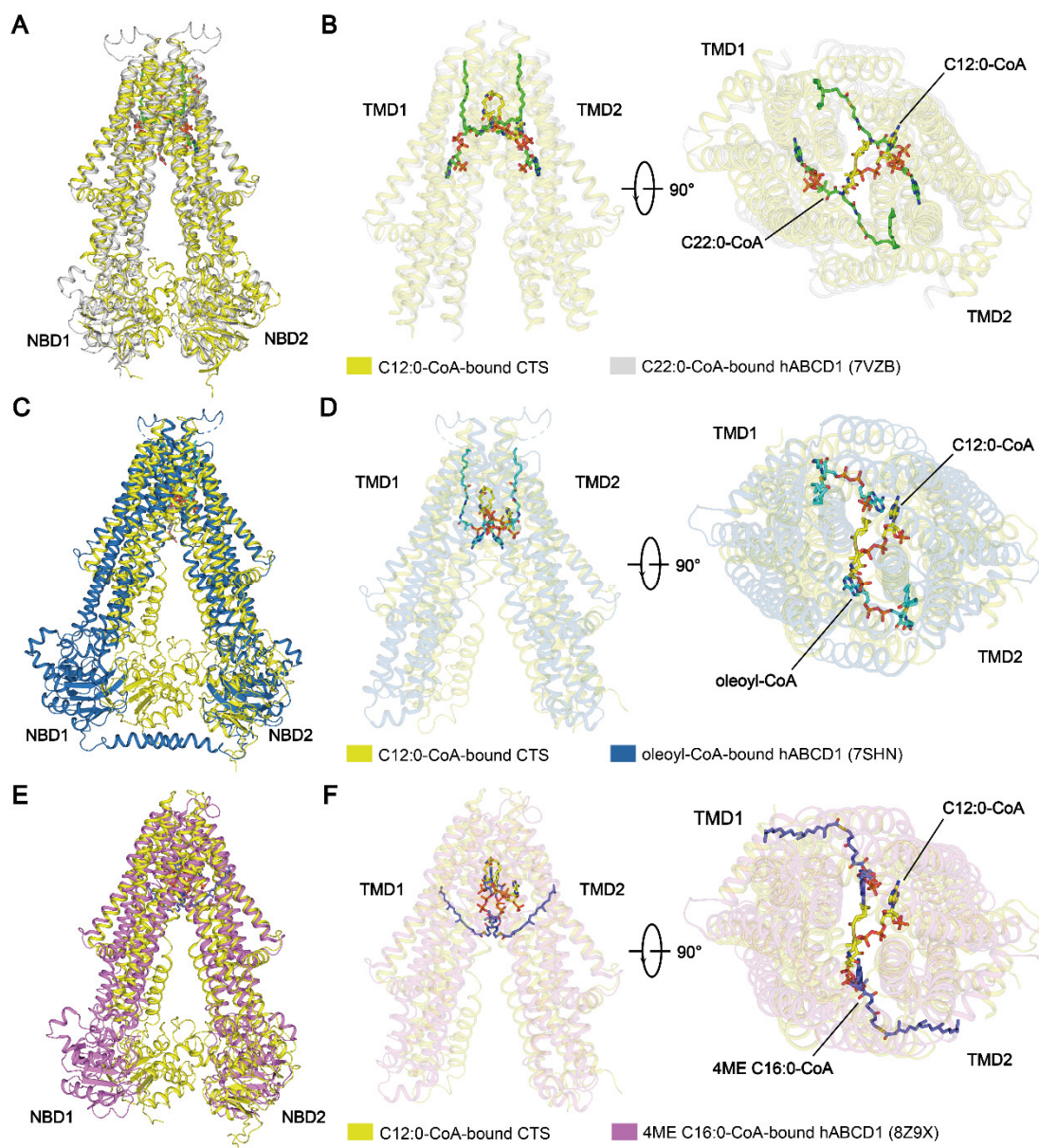


图 3.46 脂酰辅酶 A 结合的 CTS 与 hABCD1/3 复合物结构的比对

图注: A. C12:0-CoA 结合的 CTS 与 C22:0-CoA 结合的 hABCD1 (PDB: 7VZB) 结构比对, 814 个 α 碳原子的 RMSD 为 3.96 Å。B. 左图为 A 图 TMD 放大视角, 右图为左图的俯视图视角。C. C12:0-CoA 结合的 CTS 与 oleoyl-CoA 结合的 hABCD1 (PDB: 7SHN) 结构比对, 846 个 α 碳原子的 RMSD 为 8.08 Å。D. 左图为 C 图 TMD 放大视角, 右图为左图的俯视图视角。E. C12:0-CoA 结合的 CTS 与 4ME C16:0-CoA 结合的 hABCD3 (PDB: 8Z9X) 结构比对, 871 个 α 碳原子的 RMSD 为 5.48 Å。F. 左图为 E 图 TMD 放大视角, 右图为左图的俯视图视角。

此外, hABCD1 及 CTS 与底物相互作用的氨基酸残基在序列以及位置上也并不完全保守 (图 3.47)。C22:0-CoA 的腺苷头部除了与极性残基 S213 相互作用, 还和带电的 K217 形成氢键; 而 C12:0-CoA 的腺苷头部主要与不带电的极性残基形成氢键作用 (T350、N784 以及 S806)。C22:0-CoA 与 C12:0-CoA 的 3'-磷

酸部分均与正电残基 R 以及 K 形成盐桥, C12:0-CoA 的 3'-磷酸还与 Y346、S777、Q1043 形成氢键。C22:0-CoA 的双磷酸部分与多个正电残基相互作用, 包括 R104、K336'以及 R337'; C12:0-CoA 的双磷酸不仅与正电残基 R1035 形成盐桥, 还与极性残基 S1039、S1042 形成氢键。此外, C22:0-CoA 的酰基链部分与多种疏水残基相互作用, 包括亮氨酸以及缬氨酸; 而 C12:0-CoA 的酰基链部分主要与异亮氨酸残基 (I356、I381 以及 I389) 产生疏水相互作用。

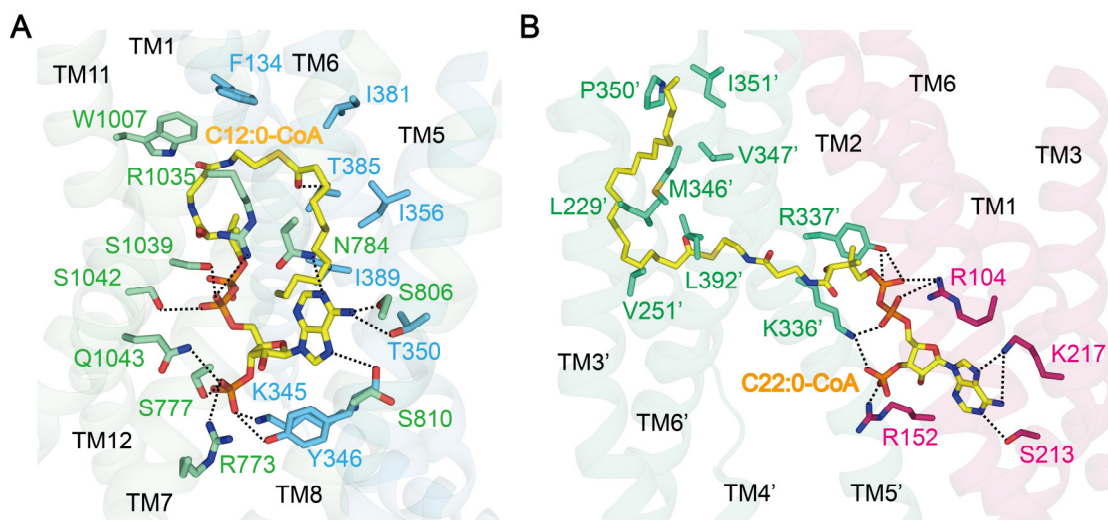


图 3.47 拟南芥 CTS 与人类 ABCD1 底物结合模式^[54]

图注: A 与 B 分别为底物 C12:0-CoA (C) 与 C22:0-CoA (D) 的结合口袋。C12:0-CoA 与 C22:0-CoA 以黄色球体棒状形式展示, 与底物相互作用的残基以棒状展示。氢键以及盐桥以黑色虚线展示。

第4章 讨论与展望

4.1 拟南芥 CTS 蛋白的研究总结与讨论

拟南芥 CTS 蛋白是一种 ATP 结合盒式 (ABC) 转运蛋白, 属于 ABCD 亚家族的成员。CTS 定位于过氧化物酶体膜上, 可以将一系列不同的底物从细胞质基质转运到过氧化物酶体中进行 β 氧化, 包括脂肪酸与某些激素前体, 如生长素前体 IBA 以及茉莉酸前体 OPDA 等。当 CTS 功能缺陷时, 植物将出现种子休眠、发芽受损、侧根减少以及黑暗条件下叶片坏死等多种生长发育缺陷表型。

本研究首先在哺乳细胞 HEK293F 中表达拟南芥 CTS 蛋白, 通过优化表达及纯化条件, 本研究获得了纯度较高的 CTS 蛋白。ATPase 活性实验显示, 纯化的 CTS 蛋白具有活性, 且生理底物脂酰辅酶 A (Fatty acyl-CoA, FA-CoA) 可以显著提高 CTS 的 ATPase 活性。然而, 游离的 IBA 与 2,4-DB 不能提高 CTS 的 ATPase 活性, 这说明二者不是 CTS 的底物。随后, 本研究化学合成了辅酶 A 修饰的 IBA (IBA-CoA) 以及 2,4-DB (2,4-DB-CoA), 二者可以显著增强 CTS 的 ATPase 活性, 且该增强效果呈现底物浓度依赖性。

为了探究 CTS 转运多种底物的分子机制, 本研究期望通过冷冻电镜技术解析 CTS 及其与不同底物复合物的结构。然而, CTS 蛋白的表达量远不足以用于冷冻电镜结构解析。为了获得足够表达量的蛋白, 本研究构建了线虫-拟南芥嵌合蛋白 chCTS, 其表达量约为 CTS 的 2 倍。ATPase 活性实验显示, chCTS 蛋白同样具有活性, 脂酰辅酶 A 对 chCTS 蛋白 ATPase 活性的刺激程度与 CTS 相似, 表明嵌合体 chCTS 识别及转运底物的功能与 CTS 相似。

通过优化制样条件, 本研究获得了状态良好的冷冻电镜样品。利用冷冻电镜单颗粒技术, 本研究解析了无配体状态、ATP 结合的 chCTS 结构, 分辨率均为 3.2 Å, 以及三种底物包括 C12:0-CoA、IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 结合的 chCTS 结构, 分辨率分别为 3.4 Å、3.2 Å 以及 3.5 Å。由于在解析的所有结构中嵌合部分的结构因柔性摆动而缺失, 因此本研究解析的结构是拟南芥 CTS 蛋白的核心结构。

CTS 蛋白是全转运体 ABC 转运蛋白, 由 12 个跨膜螺旋 (TM) 组成, TMD1 由 TM1 至 TM6 组成, TMD2 由 TM7-TM12 组成, 两个跨膜结构域 TMDs 以及两个核酸结合结构域 NBDs 位于一条肽链上。无配体状态下, CTS 处于向细胞质侧封闭 (inward-occluded) 构象, 来自 TMD1 的 TM3-5 与来自 TMD2 的 TM9-11 相互靠近, 使得底物的易位腔闭合, NBDs 也相互靠近然而却并未发生二聚化。本研究解析的无配体 CTS 结构处于能量最低状态, 部分 CTS 蛋白颗粒的 NBD1

及连接螺旋 LH 处于柔性摆动状态,从而为底物的结合打开通道。在 ATP 结合时,连接螺旋 LH 结合在 NBD 二聚化界面,底物进入通道关闭,使得底物分子被有序地转运进入过氧化物酶体。

底物 C12:0-CoA、IBA-CoA 及 2,4-DB-CoA 结合的 CTS 均处于向细胞质侧开放(inward-facing)构象,三种底物分子均折叠成“U”形结合在 TMDs 之间的两亲性空腔中,与 CTS 蛋白形成广泛的极性相互作用。三维结构比对显示,C12:0-CoA、IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 分子 CoA 的腺苷以及二磷酸部分几乎完全重合,酰基链结合在同一个大的疏水腔。具体而言,腺苷头部嵌入疏水口袋,与来自 TM5 的 Thr350、来自 TM7 的 Asn784 以及来自 TM8 的 Ser806 形成氢键;ADP 的 3'磷酸结合在碱性表面,不仅与来自 TM5 的 Lys345、来自 TM7 的 Arg773 形成盐桥,还与来自 TM5 的 Tyr346、来自 TM7 的 Ser777 形成氢键;ADP 的双磷酸与来自 TM12 的 Arg1035 形成盐桥,与 Ser1039 形成氢键;泛酸以及半胱胺在由 TM1 的 Phe134 及 TM11 的 Trp1007 形成的弓形疏水腔处向后弯曲,使得酰基链指向细胞质,脂肪酸 C12:0、IBA 及 2,4-DB 结合在由异亮氨酸 Ile356、Ile381、Ile389 形成的疏水口袋。此外,在 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 结合的 CTS 结构中,半胱胺还与来自 TM6 的 Arg382 形成氢键。值得注意的是,当氨基酸残基 Lys345、Arg382、Arg773 以及 Arg1035 发生突变,拟南芥种子萌发被抑制,幼苗无法正常生长,植株对 IBA 与 2,4-DB 的敏感性降低。这些形成底物结合口袋的氨基酸残基在油料植物中高度保守,暗示着 CTS 转运底物分子的方式也是保守的。由于无法通过化学合成获得 OPDA-CoA 分子,本研究将 OPDA-CoA 分子对接(docking)于底物结合口袋。分子动力学模拟的结果显示,OPDA-CoA 分子可以稳定地结合在该口袋,较长的 OPDA 酰基链占据了部分 CHS 的位置。通过广泛的极性以及疏水相互作用,底物结合口袋可以高特异性地识别 CoA 基团,并且同时容纳一系列酰基链,包括不同长度及饱和度的脂肪酸以及激素前体。

拟南芥 CTS 蛋白具有独特的底物结合模式。人类 ABCD1/2/3 具有不同的底物偏好性,共同负责转运不同的脂肪酸进入过氧化物酶体^[36]。在已解析的人类 ABCD1 结构中,两分子超长链脂酰辅酶 A (C22:0-CoA) 对称地结合在转运易位腔^[54]。每个 C22:0-CoA 与两个 TMD 均产生相互作用,CoA 基团与一个 TMD 形成极性相互作用,末端酰基链 C22:0 结合于另一个 TMD。然而,拟南芥 CTS 的底物转运口袋只结合一分子底物,底物分子呈“U”形构象。CTS 的底物结合口袋可以分成两部分:亲水部分负责识别及稳定 CoA 基团,疏水部分负责稳定酰基链。这种相对较大的底物结合口袋使得 CTS 容纳多种具有较短或较长酰基链的底物,包括不同的脂肪酸以及衍生的激素,从而使得 CTS 在植物生长发育的多个阶段发挥关键作用(图 4.1)。在种子萌发阶段,OPDA 通过 CTS 转运进入过

氧化物酶体，当 CTS 功能缺陷，种子积累高水平 OPDA，抑制种子的萌发；随后，在幼苗生长阶段，脂肪酸通过 CTS 转运进入过氧化物酶体进行 β 氧化生成乙酰辅酶 A，用于提供能量以及碳骨架；在营养生长阶段，CTS 将 IBA 转运到过氧化物酶体中，促进 IBA 转为为活性 IAA，调控生长素的稳态平衡并促进侧根发育；在花粉发育阶段以及响应外界压迫过程中，CTS 将 OPDA 转运进入过氧化物酶体以便生成 JA。此外，广泛应用于农业的选择性除草剂 2,4-DB 也通过 CTS 转运进入过氧化物酶体代谢为活性 2,4-D，从而抑制主根生长。

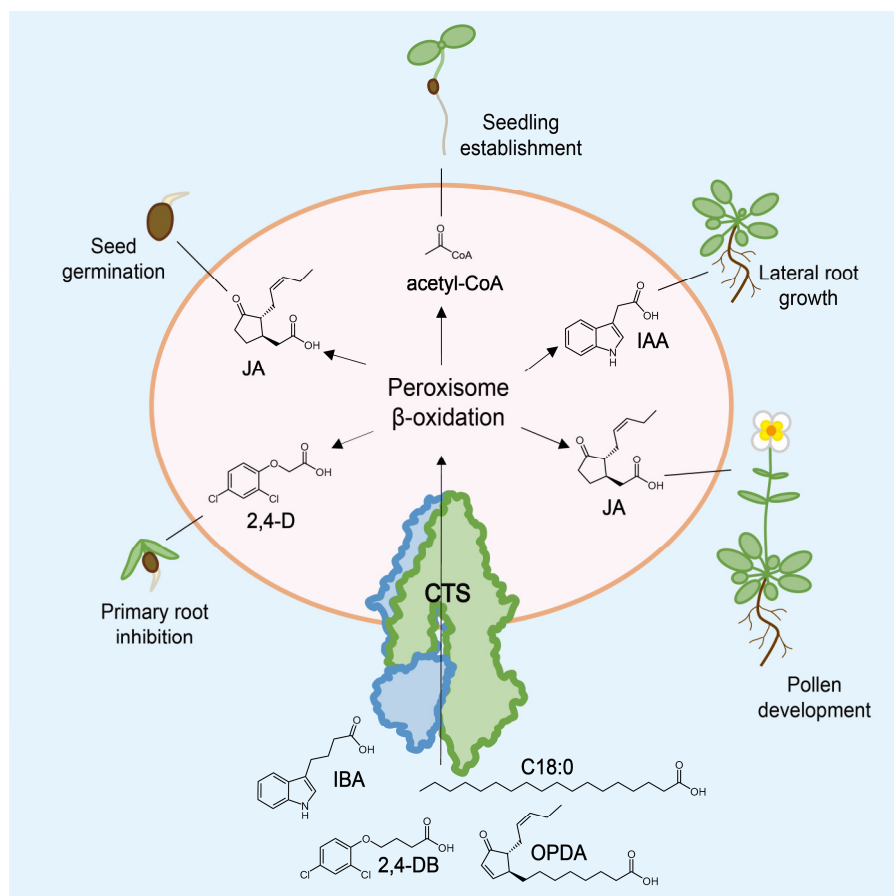


图 4.1 CTS 在植物生长发育过程的作用

图注：CTS 通过运输不同底物在多个植物生长发育阶段的协调作用的示意图。CTS 介导多种辅酶 A 修饰的脂肪酸及衍生物进入过氧化物酶体，包括 OPDA、脂肪酸 FA、IBA 以及 2,4-DB，随后通过 β 氧化代谢为茉莉酸 JA、乙酰辅酶 A、IAA 以及活性除草剂成分 2,4-D。这些代谢产物调节关键的发育过程，包括种子发芽、幼苗建立、侧根生长和花粉发育。

本研究从结构、生化以及生理水平阐释了 CTS 转运广谱性底物酰基辅酶 A 的分子机制，并提出了 CTS 独特的底物结合模式。CTS 作为过氧化物酶体代谢的“门户”蛋白，调控植物脂质代谢与激素稳态，参与植物根系发育及外源环境响应等关键生命过程。

4.2 CTS 转运酰基辅酶 A 的分子机制

基于对 CTS 蛋白结构与功能的研究,本研究提出 CTS 蛋白转运底物酰基辅酶 A 的潜在分子机制(图 4.2)。

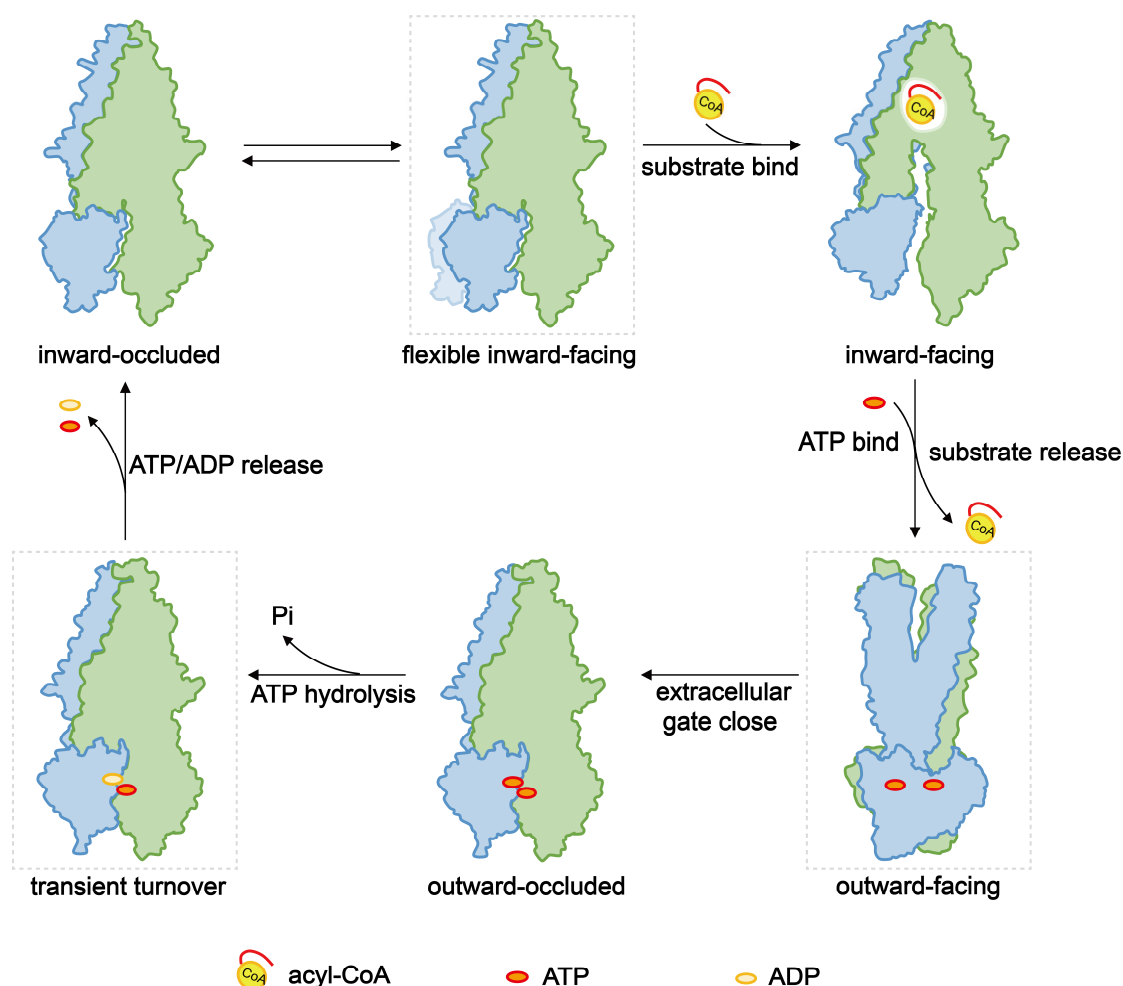


图 4.2 CTS 转运底物的分子机制

图注: 潜在的 CTS 转运循环示意图。本研究未解析的构象用灰色虚线边框标注。

其中 TMD1 与 NBD1 结构域用蓝色展示, TMD2 与 NBD2 结构域用绿色展示。

静息状态下, CTS 处于向细胞质侧封闭(inward-occluded)构象, 此时蛋白处于能量最低状态; 伴随着 NBD1 的柔性摆动, 细胞质侧的底物进入通道暴露, 使得底物分子有机会进入结合口袋。当 CTS 识别底物分子时, 蛋白整体呈现向细胞质侧开放(inward-facing)构象, TMD 打开, 底物分子呈“U”形结合在两亲性口袋。随着 ATP 结合, NBDs 二聚化, 耦合螺旋将 NBDs 的构象变化传递到 TMDs, 细胞质侧底物进入通道关闭, 过氧化物酶体侧底物通道打开, 使得整个蛋白呈现向过氧化物酶体基质侧开放(outward-facing)构象, 这种构象改变使得底物结合口袋被破坏, 底物分子被释放到过氧化物酶体中; 随着底物释放, 过氧

化物酶体侧底物通道关闭, CTS 蛋白呈现向细胞质侧闭合 (outward-occluded) 构象。接着, ATP 在水分子的攻击下被水解为 ADP 及磷酸根 P_i , P_i 被释放; 由于 CTS 只具有一个活性 ATP 水解位点, 因此此时将出现结合一个 ADP 以及一个 ATP 的瞬时周转 (transient turnover) 构象。最后, 随着 ADP 与 ATP 分子的释放, NBDs 解二聚化并相互分离, 蛋白回到向细胞质侧闭合 (inward-occluded) 构象, 进入下一个转运循环。

4.3 未来展望

尽管本研究解析了 CTS 蛋白在无配体状态下、与 ATP 结合以及与不同底物结合的复合物结构, 但是关于拟南芥 CTS 的结构与功能仍有很多问题等待解决。

首先, 本研究中用于测定生化活性的蛋白是表达于 HEK293F 细胞中的拟南芥全长 CTS 蛋白, 具有水解 ATP 的活性。然而人类 HEK293F 细胞的膜组成与植物拟南芥细胞的膜组成存在差异, 这种差异或许会影响蛋白的组装与活性。为了消除这种差异带来的影响, 后续研究可以构建携带纯化标签的 CTS 过表达拟南芥植株, 尝试原位纯化拟南芥的 CTS 蛋白来进行生化活性测定, 或者使用拟南芥 T87 悬浮细胞系表达全长 CTS 蛋白, 其结果会更接近于真实情况。此外, 本研究用于结构解析的蛋白是表达于 HEK293F 细胞中的线虫-拟南芥嵌合蛋白 chCTS, 虽然解析的结构中被线虫替代的 N 端 H0 基序结构不可见, 所获得的结构为拟南芥 CTS 的核心结构, 但 H0 基序对于蛋白正确定位于过氧化物酶体膜具有重要功能, 因此为了观察细胞内部完整的 CTS 蛋白结构, 后续可以考虑使用冷冻电镜断层成像技术 (cryo-electron tomography, cryo-ET) 来解析不同生理状态下 CTS 的原位结构, 或者使用拟南芥 T87 悬浮细胞系表达的全长 CTS 蛋白以及原位纯化拟南芥的 CTS 蛋白用于结构解析。

第二, 尽管本研究解析了 C12/IBA/2,4-DB-CoA 结合的 CTS 结构, 但这三种底物属于中长链脂肪酸及芳香族羧酸, 对于超长链脂肪酸辅酶 A 及茉莉酸前体 OPDA-CoA 的结合方式仍需要实验验证。对于超长链脂酰辅酶 A, 后续可以使用原位纯化的 CTS 蛋白与其孵育以获得复合物样品从而进行结构解析; 对于 OPDA-CoA, 可以外源给予拟南芥植株一些环境压力, 如昆虫及机械损伤, 使得植株产生 JA, 则有可能获得 OPDA 结合的 CTS 蛋白。

第三, 在本研究解析的底物结合复合物结构中, 酰基链末端均有一分子 CHS 结合。CHS 是一种胆固醇类似物, 常用于膜蛋白的纯化。在分子动力学模拟中, CHS 可以提供额外的疏水界面, 以便 OPDA-CoA 的稳定结合。那么, 在植物体内, CTS 转运底物酰基辅酶 A 是否也需要甾醇的参与? 后续研究或许可以在纯化 CTS 蛋白时不添加 CHS 或者组装纳米盘以去除 CHS, 观察底物刺激的 ATPase

活性是否改变；也可以在植物细胞水平进行底物转运实验，通过使用 β 环糊精去除植物细胞中的甾醇，比较 CTS 转运底物的能力是否改变。此外，ATP 结合的 CTS 结构中，连接螺旋 LH 结合在 NBD 二聚化界面，使得底物进入通道关闭；在无配体状态以及底物结合的结构中，LH 却处于柔性摆动中。那么 LH 在转运循环中的功能是什么？多序列比对结果显示 LH 含有较多保守的带电残基，无配体状态下 LH 是否具有识别底物的功能？解决这些问题将有助于理解 CTS 的转运循环机制。后续实验可以截短 LH 或者将这些残基突变，观察底物的结合与转运过程是否受影响。

第四，早期遗传学方法证明 CTS 介导脂肪酸转运进入过氧化物酶体，本研究通过 ATPase 活性实验以及结构解析证明脂酰辅酶 A 是 CTS 的底物，但后续还需要通过转运实验更加直接地证明 CTS 蛋白转运脂酰辅酶 A。本研究早期尝试将 CTS 蛋白组装到脂质体中，测量其对荧光基团硝基苯-2-氧杂-1,3 二唑（Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole, NBD）标记的 C16:0-CoA 的转运实验。然而，由于这种长链脂酰辅酶 A 可以通过自由扩散穿过脂质双层，CTS 蛋白脂质体并未展现明显的转运效率。因此，后续实验或许可以尝试提取过氧化物酶体进行荧光基团或同位素标记的脂酰辅酶 A 的转运实验。类似的，早期的生理实验证明 CTS 负责将 IBA 以及 2,4-DB 转运进入过氧化物酶体，本研究的 ATPase 活性实验也证明 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA 可以刺激 CTS 的 ATPase 活性，但后续仍需进行转运实验更加直接地证明 CTS 转运 IBA-CoA 以及 2,4-DB-CoA。由于放射性 ^3H 标记的 IBA 价格昂贵，无法购买足够量的放射性 IBA 来合成 IBA-CoA，后续若存在荧光基团 NBD 标记的 IBA-CoA 与 2,4-DB-CoA 或许可以尝试进行转运实验。此外，在细胞水平，也可以尝试在培养基中添加放射性 ^3H 标记的脂肪酸（如 C18）、IBA 及 2,4-DB，测量幼苗中 ^3H 标记的糖类、IAA 及 2,4-D 的含量，从而计算 CTS 的转运效率。

第五，在底物结合 CTS 的复合物结构中，Ser810 位于底物结合口袋附近。尽管 Ser810 未与底物分子直接产生相互作用，但 Ser810 突变会显著降低底物对 CTS 蛋白 ATPase 活性的刺激，并且降低 CTS 转运脂肪酸、IBA 以及 2,4-DB 的能力，使得拟南芥幼苗无法正常生长，对 IBA、2,4-DB 的敏感性降低。这可能是在底物转运的其他过程中，底物与 Ser810 可能产生相互作用，Ser810 参与底物的转运。值得注意的是，Carine De Marcos Lousa 等人使用表达了 CTS 蛋白的昆虫细胞膜囊泡进行实验发现 CTS 具有硫酯酶活性，在转运酰基辅酶 A 进入过氧化物酶体过程中 CTS 将其水解为游离脂肪酸以及辅酶 A^[250]。此外，作者还鉴定了硫酯酶活性位点 S810，当 S810 突变为 N，CTS 的硫酯酶活性降为野生型的 40%。人类 ABCD1 也被报道具有硫酯酶活性^[251]。在本研究所解析的结构中，未

能捕捉到 CTS 水解酰基辅酶 A 的中间状态，并且在底物结合的复合物结构中，S810 位于酰基辅酶 A 的腺苷头部附近，与硫酯键的距离较远。若 S810 参与水解酰基辅酶 A，那么在 ATP 结合后底物发生翻转的中间状态中可能与硫酯键靠近。因此获取这种中间状态构象的结构对理解 CTS 硫酯酶催化机制至关重要。后续的研究也可尝试使用纯化的 CTS 蛋白进行硫酯酶活性实验，结合结构探究 CTS 水解脂酰辅酶 A 的分子机制。

第六，尽管本研究通过解析结构以及生化生理实验探究了 CTS 识别及转运底物分子的分子机制，但 CTS 转运底物的调控机制仍是未知的。比较基因鉴定蛋白 58 (Comparative Gene Identification-58, CGI58) 是一种 α/β 水解酶型蛋白，参与调节哺乳动物及植物的三酰甘油稳态^[252,253]。CGI-58 是一种可溶蛋白，在一定条件下可以与脂滴表面的周脂素 (Perilipin) 相互作用^[254]，在肾上腺素刺激下，周脂素被磷酸化并释放 CGI-58^[255]，随后 CGI-58 与脂肪组织甘油三酯脂肪酶 (Adipose triglyceride lipase, ATGL) 相互作用，促进 ATGL 降解 TAG 以产生脂肪酸^[256]。在拟南芥中，CGI-58 通过与 CTS 蛋白 NBD2 的 Walker B 基序相互作用可定位于过氧化物酶体表面^[257]。在此基础上，CGI-58 通过调节 CTS 的转运活性，进而参与调控 JA 与 IAA 的生成。此外，CGI-58 突变将导致 CTS 活性降低，使得叶肉细胞中 TAG 含量增加^[257]。为了探究 CGI-58 调控 CTS 的分子机制，后续可以将 CGI-58 与 CTS 共表达与纯化或者纯化后共孵育，以获得复合物进行结构解析。值得注意的是，CTS 底物口袋有多个 Ser/Thr，后续也可以通过质谱鉴定这些位点是否会磷酸化，并且通过点突变判断磷酸化位点是否会影响 CTS 的活性。此外，后续还可以通过免疫共沉淀筛选其它的 CTS 互作蛋白，观察互作蛋白突变体的表型以探究其对 CTS 活性的具体调控作用。

第七，CTS 将底物转运进入过氧化物酶体是一个连续动态的过程，尽管本研究解析了三种构象下较为稳定的 chCTS 结构，包括无配体状态、底物结合状态以及底物释放后 ATP 未发生水解状态，但转运循环中其它高能中间态构象还未被揭示。后续研究可以利用 cryo-ET 技术捕获在无配体状态下 TMD 开口打开、NBD 不同程度摆动的中间态构象，这将有助于进一步理解底物如何被识别、是否具有其它蛋白参与调控的动态过程。在本研究解析的底物结合 CTS 复合物结构中，底物几乎位于过氧化物酶体膜内小叶，这或许有助于 ATP 结合后底物的快速释放。然而，底物在被 CTS 蛋白识别后如何进入结合口袋、ATP 结合如何调控 TMD 的构象变化、底物如何被释放出去以及 ATP 水解后 CTS 如何恢复静息状态等问题还未被解决。这些过程通常在毫秒级的时间内发生，将蛋白与底物分子孵育后再制样等传统的制样方法对于捕捉这些中间构象而言十分困难。因此后续研究或许可以尝试时间分辨率冷冻电镜技术 (Time-resolved cryo-EM,

TRCEM)^[258], 在蛋白与底物混合后的某个时间点将其放入乙烷进行快速冷冻, 再通过常规的制样方法进行制样, 或许可以在体外获得转运循环的各种中间态构象。不仅如此, 后续也可以利用 cryo-ET 技术原位捕捉各种中间构象, 观察在酰基辅酶 A 转运过程中, 是否有其他蛋白参与调节 CTS 的活性。

拟南芥 CTS 以辅酶 A 修饰的形式将各种不同形状和大小的底物从细胞质转运进入过氧化物酶体进行 β 氧化, 包括脂肪酸以及植物激素前体, 这使得 CTS 蛋白成为植物从生长到繁殖整个生命周期的重要门户蛋白。早前的研究表明, 农药单氟乙酸 FAc 可通过 CTS 转运进入过氧化物酶体, 通过抑制乙醛酸循环中的顺乌头酸酶 Aco 的活性, 从而抑制幼苗生长, 达到除草的效果^[117]。基于此, 后续可以针对在过氧化物酶体中发挥功能的蛋白靶点进行药物设计, 如添加羧基侧链, 利用 CTS 将其运送至过氧化物酶体中, 通过 β 氧化转化为活性形式, 从而作用于靶点蛋白。此外, 类似于除草剂 2,4-DB, 后续研究还可以将现有的除草剂小分子添加羧基侧链, 制备无活性的除草剂前体, 基于 CTS 蛋白的保守性, 使得不同物种 CTS 蛋白对除草剂前体的转运效率不同而具有选择性, 具有保守 CTS 的杂草将前体转运进入过氧化物酶体并生成活性除草剂, 从而实现选择性抑制杂草生长的目的。未来还可以筛选 CTS 的激动剂加速转运脂肪酸的速率, 使得农作物生长速度加快, 降低时间成本。

参考文献

- [1] THOMAS C, TAMPÉ R. Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters [J]. Annual Review of Biochemistry, 2020, 89(Volume 89, 2020): 605-636.
- [2] LOCHER K P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2016, 23(6): 487-493.
- [3] MAQBOOL A, HORLER RICHARD S P, MULLER A, et al. The substrate-binding protein in bacterial ABC transporters: dissecting roles in the evolution of substrate specificity [J]. Biochemical Society Transactions, 2015, 43(5): 1011-1017.
- [4] BERNTSSON R P A, SMITS S H J, SCHMITT L, et al. A structural classification of substrate-binding proteins [J]. FEBS Letters, 2010, 584(12): 2606-2617.
- [5] HUNG L-W, WANG I X, NIKAIDO K, et al. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter [J]. Nature, 1998, 396(6712): 703-707.
- [6] HOPFNER K-P, KARCHER A, SHIN D S, et al. Structural Biology of Rad50 ATPase: ATP-Driven Conformational Control in DNA Double-Strand Break Repair and the ABC-ATPase Superfamily [J]. Cell, 2000, 101(7): 789-800.
- [7] SMITH P C, KARPOWICH N, MILLEN L, et al. ATP Binding to the Motor Domain from an ABC Transporter Drives Formation of a Nucleotide Sandwich Dimer [J]. Molecular Cell, 2002, 10(1): 139-149.
- [8] WALKER J E, SARASTE M, RUNSWICK M J, GAY N J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold [J]. The EMBO Journal, 1982, 1(8): 945-951.
- [9] VETTER I R, WITTINGHOFFER A. Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer [J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 1999, 32(1): 1-56.
- [10] SEYFFER F, TAMPÉ R. ABC transporters in adaptive immunity [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2015, 1850(3): 449-460.
- [11] OLDHAM M L, CHEN J. Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(37): 15152-15156.
- [12] COTTEN J F, OSTEDGAARD L S, CARSON M R, WELSH M J. Effect of Cystic Fibrosis-associated Mutations in the Fourth Intracellular Loop of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(35): 21279-21284.
- [13] LOO T W, BARTLETT M C, CLARKE D M. Human P-glycoprotein Contains a Greasy Ball-and-Socket Joint at the Second Transmission Interface* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013,

- 288(28): 20326-20333.
- [14] LEE J-Y, KINCH L N, BOREK D M, et al. Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8 [J]. *Nature*, 2016, 533(7604): 561-564.
- [15] LUO Q, YANG X, YU S, et al. Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB2FG [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(5): 469-474.
- [16] FITZPATRICK A W P, LLABRÉS S, NEUBERGER A, et al. Structure of the MacAB–TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(7): 17070.
- [17] QIAN H, ZHAO X, CAO P, et al. Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1 [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1228-1239.e1210.
- [18] TAYLOR N M I, MANOLARIDIS I, JACKSON S M, et al. Structure of the human multidrug transporter ABCG2 [J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 504-509.
- [19] BI Y, MANN E, WHITFIELD C, ZIMMER J. Architecture of a channel-forming O-antigen polysaccharide ABC transporter [J]. *Nature*, 2018, 553(7688): 361-365.
- [20] CHEN L, HOU W-T, FAN T, et al. Cryo-electron Microscopy Structure and Transport Mechanism of a Wall Teichoic Acid ABC Transporter [J]. *mBio*, 2020, 11(2): 10.1128/mbio.02749-02719.
- [21] THOMAS C, ALLER S G, BEIS K, et al. Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters [J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(23): 3767-3775.
- [22] HIGGINS C F, AMES G F. Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981, 78(10): 6038-6042.
- [23] RUSSELL R R, ADUSE-OPOKU J, SUTCLIFFE I C, et al. A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(7): 4631-4637.
- [24] REMPEL S, STANEK W K, SLOTBOOM D J. ECF-Type ATP-Binding Cassette Transporters [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88(Volume 88, 2019): 551-576.
- [25] XU K, ZHANG M, ZHAO Q, et al. Crystal structure of a folate energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis* [J]. *Nature*, 2013, 497(7448): 268-271.
- [26] CROW A, GREENE N P, KAPLAN E, KORONAKIS V. Structure and mechanotransmission mechanism of the MacB ABC transporter superfamily [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(47): 12572-12577.
- [27] VERRIER P J, BIRD D, BURLA B, et al. Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory [J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(4): 151-159.
- [28] JOOHYUN K, JIYOUNG P, HYUNJU C, et al. Plant ABC Transporters [J]. *The Arabidopsis Book*, 2011, 2011(9).

-
- [29] DEAN M, ANNILO T. EVOLUTION OF THE ATP-BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTER SUPERFAMILY IN VERTEBRATES* [J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2005, 6(Volume 6, 2005): 123-142.
- [30] GEROVAC M, TAMPÉ R. Control of mRNA Translation by Versatile ATP-Driven Machines [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2019, 44(2): 167-180.
- [31] HWANG J-U, SONG W-Y, HONG D, et al. Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle [J]. Molecular Plant, 2016, 9(3): 338-355.
- [32] MOSSER J, DOUAR A-M, SARDE C-O, et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters [J]. Nature, 1993, 361(6414): 726-730.
- [33] LOMBARD-PLATET G, SAVARY S, SARDE C O, et al. A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(3): 1265-1269.
- [34] KAMIJO K, TAKETANI S, YOKOTA S, et al. The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(8): 4534-4540.
- [35] SHANI N, JIMENEZ-SANCHEZ G, STEEL G, et al. Identification of a Fourth Half ABC Transporter in the Human Peroxisomal Membrane [J]. Human Molecular Genetics, 1997, 6(11): 1925-1931.
- [36] KAWAGUCHI K, MORITA M. ABC Transporter Subfamily D: Distinct Differences in Behavior between ABCD1–3 and ABCD4 in Subcellular Localization, Function, and Human Disease [J]. BioMed Research International, 2016, 2016(1): 6786245.
- [37] VAN ROERMUND C W T, VISSER W F, IJLST L, et al. The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl–CoA esters [J]. The FASEB Journal, 2008, 22(12): 4201-4208.
- [38] VAN ROERMUND C W T, VISSER W F, IJLST L, et al. Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid β -oxidation [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2011, 1811(3): 148-152.
- [39] VAN ROERMUND C W T, IJLST L, WAGEMANS T, et al. A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014, 1841(4): 563-568.
- [40] COELHO D, KIM J C, MIOUSSE I R, et al. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism [J]. Nature Genetics, 2012, 44(10): 1152-1155.
- [41] KAWAGUCHI K, OKAMOTO T, MORITA M, IMANAKA T. Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein

- LMBD1 [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 30183.
- [42] SHANI N, VALLE D. A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(21): 11901-11906.
- [43] HETTEMA E H, VAN ROERMUND C W, DISTEL B, et al. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The EMBO Journal, 1996, 15(15): 3813-3822-3822.
- [44] LEE A, ASAHINA K, OKAMOTO T, et al. Role of NH₂-terminal hydrophobic motif in the subcellular localization of ATP-binding cassette protein subfamily D: Common features in eukaryotic organisms [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 453(3): 612-618.
- [45] THEODOULOU FREDERICA L, CARRIER DAVID J, SCHAEGLER THERESIA A, et al. How to move an amphipathic molecule across a lipid bilayer: different mechanisms for different ABC transporters? [J]. Biochemical Society Transactions, 2016, 44(3): 774-782.
- [46] ZOLMAN B K, SILVA I D, BARTEL B. The Arabidopsis *pxa1* Mutant Is Defective in an ATP-Binding Cassette Transporter-Like Protein Required for Peroxisomal Fatty Acid β -Oxidation [J]. Plant Physiology, 2001, 127(3): 1266-1278.
- [47] FOOTITT S, SLOCOMBE S P, LARNER V, et al. Control of germination and lipid mobilization by *COMATOSE*, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP [J]. The EMBO Journal, 2002, 21(12): 2912-2922-2922.
- [48] HAYASHI M, TORIYAMA K, KONDO M, NISHIMURA M. 2,4-Dichlorophenoxybutyric Acid-Resistant Mutants of Arabidopsis Have Defects in Glyoxysomal Fatty Acid β -Oxidation [J]. The Plant Cell, 1998, 10(2): 183-195.
- [49] TYRA H M, LINKA M, WEBER A P M, BHATTACHARYA D. Host origin of plastid solute transporters in the first photosynthetic eukaryotes [J]. Genome Biology, 2007, 8(10): R212.
- [50] HAYASHI M, NITO K, TAKEI-HOSHI R, et al. Ped3p is a Peroxisomal ATP-Binding Cassette Transporter that might Supply Substrates for Fatty Acid β -Oxidation [J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(1): 1-11.
- [51] NYATHI Y, DE MARCOS LOUSA C, VAN ROERMUND C W, et al. The Arabidopsis Peroxisomal ABC Transporter, Comatose, Complements the *Saccharomyces cerevisiae* *pxa1 pxa2 Δ* Mutant for Metabolism of Long-chain Fatty Acids and Exhibits Fatty Acyl-CoA-stimulated ATPase Activity* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(39): 29892-29902.
- [52] HU J, BAKER A, BARTEL B, et al. Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function [J]. The Plant Cell, 2012, 24(6): 2279-2303.

- [53] THEODOULOU F L, BALDWIN S A, BALDWIN J M, BAKER A. Plant Peroxisomal ABC Transporters: Flexible and Unusual [M]//GEISLER M. Plant ABC Transporters. Cham; Springer International Publishing. 2014: 77-101.
- [54] CHEN Z-P, XU D, WANG L, et al. Structural basis of substrate recognition and translocation by human very long-chain fatty acid transporter ABCD1 [J]. Nature Communications, 2022, 13(1).
- [55] JIA Y, ZHANG Y, WANG W, et al. Structural and functional insights of the human peroxisomal ABC transporter ALDP [J]. eLife, 2022, 11: e75039.
- [56] LE L T M, THOMPSON J R, DANG P X, et al. Structures of the human peroxisomal fatty acid transporter ABCD1 in a lipid environment [J]. Communications Biology, 2022, 5(1): 7.
- [57] WANG R, QIN Y, LI X. Structural basis of acyl-CoA transport across the peroxisomal membrane by human ABCD1 [J]. Cell Research, 2022, 32(2): 214-217.
- [58] XIONG C, JIA L-N, XIONG W-X, et al. Structural insights into substrate recognition and translocation of human peroxisomal ABC transporter ALDP [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8(1): 74.
- [59] LI Y, CHEN Z-P, XU D, et al. Structural insights into human ABCD3-mediated peroxisomal acyl-CoA translocation [J]. Cell Discovery, 2024, 10(1): 92.
- [60] WAIN R L, WIGHTMAN F, RUSSELL E J. The growth-regulating activity of certain ω -substituted alkyl carboxylic acids in relation to their β -oxidation within the plant [J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences, 1997, 142(909): 525-536.
- [61] BEEVERS H. GLYOXYSOMES IN HIGHER PLANTS [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1982, 386(1): 243-253.
- [62] MA C, AGRAWAL G, SUBRAMANI S. Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis [J]. Journal of Cell Biology, 2011, 193(1): 7-16.
- [63] KASHIWAYAMA Y, ASAHINA K, MORITA M, IMANAKA T. Hydrophobic Regions Adjacent to Transmembrane Domains 1 and 5 Are Important for the Targeting of the 70-kDa Peroxisomal Membrane Protein* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(46): 33831-33844.
- [64] LODHI IRFAN J, SEMENKOVICH CLAY F. Peroxisomes: A Nexus for Lipid Metabolism and Cellular Signaling [J]. Cell Metabolism, 2014, 19(3): 380-392.
- [65] MATTHÄUS B. The new database Seed Oil Fatty Acids (SOFA) [J]. Lipid Technology, 2012, 24(10): 230-234.
- [66] RESZCZYŃSKA E, HANAKA A. Lipids Composition in Plant Membranes [J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2020, 78(4): 401-414.
- [67] SASAKI Y, NAGANO Y. Plant Acetyl-CoA Carboxylase: Structure, Biosynthesis, Regulation, and Gene Manipulation for Plant Breeding [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004,

- 68(6): 1175-1184.
- [68] GUCHHAIT R B, POLAKIS S E, DIMROTH P, et al. Acetyl Coenzyme A Carboxylase System of *Escherichia coli*: PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE BIOTIN CARBOXYLASE, CARBOXYLTRANSFERASE, AND CARBOXYL CARRIER PROTEIN COMPONENTS [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(20): 6633-6645.
- [69] HUERLIMANN R, HEIMANN K. Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, 33(1): 49-65.
- [70] KONISHI T, SHINOHARA K, YAMADA K, SASAKI Y. Acetyl-CoA Carboxylase in Higher Plants: Most Plants Other Than Gramineae Have Both the Prokaryotic and the Eukaryotic Forms of This Enzyme [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1996, 37(2): 117-122.
- [71] FATLAND B L, NIKOLAU B J, WURTELE E S. Reverse Genetic Characterization of Cytosolic Acetyl-CoA Generation by ATP-Citrate Lyase in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(1): 182-203.
- [72] WAITE M, WAKIL S J. Studies on the Mechanism of Fatty Acid Synthesis: XII. ACETYL COENZYME A CARBOXYLASE [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237(9): 2750-2757.
- [73] ALBERTS A W, VAGELOS P R. Acetyl CoA carboxylase. I. Requirement for two protein fractions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1968, 59(2): 561-568.
- [74] CRONAN J E, WALDROP G L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases [J]. *Progress in Lipid Research*, 2002, 41(5): 407-435.
- [75] LIM G-H, SINGHAL R, KACHROO A, KACHROO P. Fatty Acid- and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2017, 55(Volume 55, 2017): 505-536.
- [76] HARWOOD J L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1996, 1301(1): 7-56.
- [77] WHITE S W, ZHENG J, ZHANG Y-M, ROCK C O. THE STRUCTURAL BIOLOGY OF TYPE II FATTY ACID BIOSYNTHESIS [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2005, 74(Volume 74, 2005): 791-831.
- [78] SALAS J N J, OHLROGGE J B. Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 403(1): 25-34.
- [79] THELEN J J, OHLROGGE J B. Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants [J]. *Metabolic Engineering*, 2002, 4(1): 12-21.
- [80] SHANKLIN J, CAHOON E B. DESATURATION AND RELATED MODIFICATIONS OF FATTY ACIDS I [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1998, 49(Volume 49, 1998): 611-641.
- [81] ONGENA M, DUBY F, ROSSIGNOL F, et al. Stimulation of the Lipoxygenase Pathway Is Associated with Systemic Resistance Induced in Bean by a Nonpathogenic *Pseudomonas* Strain

- [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 2004, 17(9): 1009-1018.
- [82] KACHROO A, SHANKLIN J, WHITTLE E, et al. The Arabidopsis stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(2): 257-271.
- [83] KACHROO P, SHANKLIN J, SHAH J, et al. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(16): 9448-9453.
- [84] GRAHAM I A. Seed Storage Oil Mobilization [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(Volume 59, 2008): 115-142.
- [85] THEODOULOU F L, EASTMOND P J. Seed storage oil catabolism: a story of give and take [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2012, 15(3): 322-328.
- [86] BATES P D, STYMNE S, OHLROGGE J. Biochemical pathways in seed oil synthesis [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2013, 16(3): 358-364.
- [87] FAN J, YAN C, ROSTON R, et al. Arabidopsis Lipins, PDAT1 Acyltransferase, and SDP1 Triacylglycerol Lipase Synergistically Direct Fatty Acids toward β -Oxidation, Thereby Maintaining Membrane Lipid Homeostasis [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(10): 4119-4134.
- [88] CHAPMAN K D, OHLROGGE J B. Compartmentation of Triacylglycerol Accumulation in Plants* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(4): 2288-2294.
- [89] HENRY S A, KOHLWEIN S D, CARMAN G M. Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2012, 190(2): 317-349.
- [90] XU C, SHANKLIN J. Triacylglycerol Metabolism, Function, and Accumulation in Plant Vegetative Tissues* [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2016, 67(Volume 67, 2016): 179-206.
- [91] MURPHY D J, VANCE J. Mechanisms of lipid-body formation [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(3): 109-115.
- [92] CHAPMAN K D, DYER J M, MULLEN R T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man [J]. *Journal of Lipid Research*, 2012, 53(2): 215-226.
- [93] SHIMADA T L, SHIMADA T, TAKAHASHI H, et al. A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2008, 55(5): 798-809.
- [94] SILOTO R M P, FINDLAY K, LOPEZ-VILLALOBOS A, et al. The Accumulation of Oleosins Determines the Size of Seed Oilbodies in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(8): 1961-1974.
- [95] SHIMADA T L, TAKANO Y, SHIMADA T, et al. Leaf Oil Body Functions as a Subcellular Factory for the Production of a Phytoalexin in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(1): 105-118.

- [96] LI F, ASAMI T, WU X, et al. A Putative Hydroxysteroid Dehydrogenase Involved in Regulating Plant Growth and Development [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(1): 87-97.
- [97] KNOTTNERUS S J G, BLEEKER J C, WÜST R C I, et al. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation and the carnitine shuttle [J]. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2018, 19(1): 93-106.
- [98] BEEVERS H. Microbodies in higher plants [J]. 1979.
- [99] NISHIMURA M, HAYASHI M, KATO A, et al. Functional Transformation of Microbodies in Higher Plant Cells [J]. *Cell Structure and Function*, 1996, 21(5): 387-393.
- [100] NELSON D L, COX M M. *Lehninger Principles of Biochemistry* [M]. W. H. Freeman, 2017.
- [101] KHAN B R, ADHAM A R, ZOLMAN B K. Peroxisomal Acyl-CoA oxidase 4 activity differs between Arabidopsis accessions [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78(1): 45-58.
- [102] KORNBERG H L, KREBS H A. Synthesis of Cell Constituents from C2-Units by a Modified Tricarboxylic Acid Cycle [J]. *Nature*, 1957, 179(4568): 988-991.
- [103] KORNBERG H L, BEEVERS H. A Mechanism of Conversion of Fat to Carbohydrate in Castor Beans [J]. *Nature*, 1957, 180(4575): 35-36.
- [104] YANG P, LIU W, CHEN Y, GONG A-D. Engineering the glyoxylate cycle for chemical bioproduction [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10.
- [105] EASTMOND P J. SUGAR-DEPENDENT1 Encodes a Patatin Domain Triacylglycerol Lipase That Initiates Storage Oil Breakdown in Germinating Arabidopsis Seeds [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(3): 665-675.
- [106] EASTMOND P J, GRAHAM I A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds [J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 72-78.
- [107] KERR K M, SAUNA Z E, AMBUDKAR S V. Correlation between Steady-state ATP Hydrolysis and Vanadate-induced ADP Trapping in Human P-glycoprotein: EVIDENCE FOR ADP RELEASE AS THE RATE-LIMITING STEP IN THE CATALYTIC CYCLE AND ITS MODULATION BY SUBSTRATES* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(12): 8657-8664.
- [108] ROMSICKI Y, SHAROM F J. The Membrane Lipid Environment Modulates Drug Interactions with the P-Glycoprotein Multidrug Transporter [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(21): 6887-6896.
- [109] KIMURA Y, KIOKA N, KATO H, et al. Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol [J]. *Biochemical Journal*, 2006, 401(2): 597-605.
- [110] SAUNA Z E, NANDIGAMA K, AMBUDKAR S V. Multidrug Resistance Protein 4 (ABCC4)-mediated ATP Hydrolysis: EFFECT OF TRANSPORT SUBSTRATES AND CHARACTERIZATION OF THE POST-HYDROLYSIS TRANSITION STATE* [J]. *Journal of*

- Biological Chemistry, 2004, 279(47): 48855-48864.
- [111] TAKAHASHI K, KIMURA Y, KIOKA N, et al. Purification and ATPase Activity of Human ABCA1* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(16): 10760-10768.
- [112] WANG J, SUN F, ZHANG D-W, et al. Sterol Transfer by ABCG5 and ABCG8: IN VITRO ASSAY AND RECONSTITUTION* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(38): 27894-27904.
- [113] TELBISZ Á, MÜLLER M, ÖZVEGY-LACZKA C, et al. Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2007, 1768(11): 2698-2713.
- [114] VELAMAKANNI S, JANVILISRI T, SHAHI S, VAN VEEN H W. A Functional Steroid-Binding Element in an ATP-Binding Cassette Multidrug Transporter [J]. Molecular Pharmacology, 2008, 73(1): 12.
- [115] QUASTEL J. Inhibitions in the citric acid cycle [M]. Metabolic inhibitors. Elsevier. 1963: 473-502.
- [116] TURNER J E, GREVILLE K, MURPHY E C, HOOKS M A. Characterization of Arabidopsis Fluoroacetate-resistant Mutants Reveals the Principal Mechanism of Acetate Activation for Entry into the Glyoxylate Cycle* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(4): 2780-2787.
- [117] HOOKS MARK A, TURNER JAMES E, MURPHY ELAINE C, et al. The Arabidopsis ALDP protein homologue COMATOSE is instrumental in peroxisomal acetate metabolism [J]. Biochemical Journal, 2007, 406(3): 399-406.
- [118] KUNZ H-H, SCHARNEWSKI M, FEUSSNER K, et al. The ABC Transporter PXA1 and Peroxisomal β -Oxidation Are Vital for Metabolism in Mature Leaves of Arabidopsis during Extended Darkness [J]. The Plant Cell, 2009, 21(9): 2733-2749.
- [119] BUCHANAN-WOLLASTON V, PAGE T, HARRISON E, et al. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis [J]. The Plant Journal, 2005, 42(4): 567-585.
- [120] MCLACHLAN DEIRDRE H, LAN J, GEILFUS C-M, et al. The Breakdown of Stored Triacylglycerols Is Required during Light-Induced Stomatal Opening [J]. Current Biology, 2016, 26(5): 707-712.
- [121] FOOTITT S, DIETRICH D, FAIT A, et al. The COMATOSE ATP-Binding Cassette Transporter Is Required for Full Fertility in Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2007, 144(3): 1467-1480.
- [122] JOHNSON M A, PREUSS D. Plotting a Course: Multiple Signals Guide Pollen Tubes to Their Targets [J]. Developmental Cell, 2002, 2(3): 273-281.
- [123] HOWDEN R, PARK S K, MOORE J M, et al. Selection of T-DNA-Tagged Male and Female

- Gametophytic Mutants by Segregation Distortion in Arabidopsis [J]. *Genetics*, 1998, 149(2): 621-631.
- [124] VERNA C, SAWCHUK M G, LINH N M, SCARPELLA E. Control of vein network topology by auxin transport [J]. *BMC Biology*, 2015, 13(1): 94.
- [125] BHALERAO R P, BENNETT M J. The case for morphogens in plants [J]. *Nature Cell Biology*, 2003, 5(11): 939-943.
- [126] FRIML J. Auxin transport — shaping the plant [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(1): 7-12.
- [127] LEYSER O. Auxin Distribution and Plant Pattern Formation: How Many Angels Can Dance on the Point of PIN? [J]. *Cell*, 2005, 121(6): 819-822.
- [128] COLLETT C E, HARBERD N P, LEYSER O. Hormonal Interactions in the Control of Arabidopsis Hypocotyl Elongation1 [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(2): 553-562.
- [129] LINCOLN C, BRITTON J H, ESTELLE M. Growth and development of the *axr1* mutants of Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 1990, 2(11): 1071-1080.
- [130] LJUNG K, BHALERAO R P, SANDBERG G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth [J]. *The Plant Journal*, 2001, 28(4): 465-474.
- [131] WOODWARD A W, BARTEL B. Auxin: Regulation, Action, and Interaction [J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(5): 707-735.
- [132] DAI X, MASHIGUCHI K, CHEN Q, et al. The Biochemical Mechanism of Auxin Biosynthesis by an Arabidopsis YUCCA Flavin-containing Monooxygenase* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(3): 1448-1457.
- [133] MASHIGUCHI K, TANAKA K, SAKAI T, et al. The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(45): 18512-18517.
- [134] KAKEI Y, NAKAMURAA, YAMAMOTO M, et al. Biochemical and Chemical Biology Study of Rice OsTAR1 Revealed that Tryptophan Aminotransferase is Involved in Auxin Biosynthesis: Identification of a Potent OsTAR1 Inhibitor, Pyruvamine2031 [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2017, 58(3): 598-606.
- [135] WOO Y-M, PARK H-J, SU'UDI M, et al. Constitutively wilted 1, a member of the rice YUCCA gene family, is required for maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(1): 125-136.
- [136] GALLAVOTTI A, BARAZESH S, MALCOMBER S, et al. *sparse inflorescence1* encodes a monocot-specific YUCCA-like gene required for vegetative and reproductive development in maize [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(39): 15196-15201.
- [137] PHILLIPS K A, SKIRPAN A L, LIU X, et al. *vanishing tassel2* Encodes a Grass-Specific

- Tryptophan Aminotransferase Required for Vegetative and Reproductive Development in Maize [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(2): 550-566.
- [138] TOBEÑA-SANTAMARIA R, BLIEK M, LJUNG K, et al. FLOOZY of petunia is a flavin monooxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture [J]. *Genes & development*, 2002, 16(6): 753-763.
- [139] EKLUND D M, ISHIZAKI K, FLORES-SANDOVAL E, et al. Auxin Produced by the Indole-3-Pyruvic Acid Pathway Regulates Development and Gemmae Dormancy in the Liverwort *Marchantia polymorpha* [J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(6): 1650-1669.
- [140] TAO Y, FERRER J-L, LJUNG K, et al. Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants [J]. *Cell*, 2008, 133(1): 164-176.
- [141] STEPANOVA A N, YUN J, ROBLES L M, et al. The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase Functions in the Indole-3-Pyruvic Acid Branch of Auxin Biosynthesis [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(11): 3961-3973.
- [142] ZHAO Y. Essential Roles of Local Auxin Biosynthesis in Plant Development and in Adaptation to Environmental Changes [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2018, 69(Volume 69, 2018): 417-435.
- [143] KORASICK D A, ENDERS T A, STRADER L C. Auxin biosynthesis and storage forms [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(9): 2541-2555.
- [144] LUDWIG-MÜLLER J, EPSTEIN E. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana* III. In vivo biosynthesis [J]. *Plant Growth Regulation*, 1994, 14(1): 7-14.
- [145] CALDERON-VILLALOBOS L I, TAN X, ZHENG N, ESTELLE M. Auxin perception—structural insights [J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2010, 2(7): a005546.
- [146] KEPINSKI S. The anatomy of auxin perception [J]. *Bioessays*, 2007, 29(10): 953-956.
- [147] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor [J]. *Nature*, 2005, 435(7041): 441-445.
- [148] KEPINSKI S, LEYSER O. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor [J]. *Nature*, 2005, 435(7041): 446-451.
- [149] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, WEIJERS D, et al. Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F Box Proteins [J]. *Developmental Cell*, 2005, 9(1): 109-119.
- [150] TAN X, CALDERON-VILLALOBOS L I A, SHARON M, et al. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase [J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 640-645.
- [151] LUDWIG-MÜLLER J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development [J]. *Plant Growth Regulation*, 2000, 32(2): 219-230.
- [152] ZIMMERMAN P W, WILCOXON F. Several chemical growth substances which cause initiation

- of roots and other responses in plants [J]. 1935.
- [153] LUDWIG-MÜLLER J, SASS S, SUTTER E G, et al. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*: I. Identification and quantification [J]. *Plant Growth Regulation*, 1993, 13: 179-187.
- [154] EPSTEIN E, CHEN K-H, COHEN J D. Identification of indole-3-butyric acid as an endogenous constituent of maize kernels and leaves [J]. *Plant Growth Regulation*, 1989, 8(3): 215-223.
- [155] EPSTEIN E, NISSEN S J, SUTTER E G. Indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in tissues of carrot inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1991, 10(1): 97-100.
- [156] SUTTER E G, COHEN J D. Measurement of Indolebutyric Acid in Plant Tissues by Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis 1 [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99(4): 1719-1722.
- [157] SCHNEIDER E A, KAZAKOFF C W, WIGHTMAN F. Gas chromatography-mass spectrometry evidence for several endogenous auxins in pea seedling organs [J]. *Planta*, 1985, 165(2): 232-241.
- [158] BLOMMAERT K L J. Growth- and Inhibiting-Substances in Relation to the Rest Period of the Potato Tuber [J]. *Nature*, 1954, 174(4438): 970-972.
- [159] LUDWIG-MÜLLER J, COHEN J D. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115(2): 320-329.
- [160] UZUNOVA V V, QUARESHY M, DEL GENIO C I, NAPIER R M. Tomographic docking suggests the mechanism of auxin receptor TIR1 selectivity [J]. *Open Biology*, 2016, 6(10): 160139.
- [161] SWARUP R, PÉRET B. AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, Volume 3 - 2012.
- [162] UNG K L, SCHULZ L, STOKES D L, et al. Substrate recognition and transport mechanism of the PIN-FORMED auxin exporters [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2023, 48(11): 937-948.
- [163] MELLOR N L, VOß U, WARE A, et al. Systems approaches reveal that ABCB and PIN proteins mediate co-dependent auxin efflux [J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(6): 2309-2327.
- [164] RŮŽIČKA K, STRADER L C, BAILLY A, et al. *Arabidopsis* PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(23): 10749-10753.
- [165] STRADER L C, BARTEL B. The *Arabidopsis* PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP Binding Cassette Transporter Modulates Sensitivity to the Auxin Precursor Indole-3-Butyric Acid [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(7): 1992-2007.
- [166] ZOLMAN B K, YODER A, BARTEL B. Genetic Analysis of Indole-3-butyric Acid Responses in *Arabidopsis thaliana* Reveals Four Mutant Classes [J]. *Genetics*, 2000, 156(3): 1323-1337.
- [167] STRADER L C, CULLER A H, COHEN J D, BARTEL B. Conversion of Endogenous Indole-3-

- Butyric Acid to Indole-3-Acetic Acid Drives Cell Expansion in Arabidopsis Seedlings [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1577-1586.
- [168] ZOLMAN B K, MARTINEZ N, MILLIUS A, et al. Identification and Characterization of Arabidopsis Indole-3-Butyric Acid Response Mutants Defective in Novel Peroxisomal Enzymes [J]. *Genetics*, 2008, 180(1): 237-251.
- [169] ZOLMAN B K, NYBERG M, BARTEL B. IBR3, a novel peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase-like protein required for indole-3-butyric acid response [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(1): 59-72.
- [170] STRADER L C, WHEELER D L, CHRISTENSEN S E, et al. Multiple Facets of Arabidopsis Seedling Development Require ^[L]_{SEP} Indole-3-Butyric Acid-Derived Auxin [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(3): 984-999.
- [171] CHARLES J M, CIFONE M A, LAWLOR T, et al. Evaluation of the in vitro genetic toxicity of 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2000, 472(1): 75-83.
- [172] LJUNG K, HULL A K, KOWALCZYK M, et al. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(2): 309-332.
- [173] KELLEY K B, RIECHERS D E. Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 89(1): 1-11.
- [174] GROSSMANN K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action [J]. *Pest Management Science*, 2010, 66(2): 113-120.
- [175] MAGNOLI K, CARRANZA C S, ALUFFI M E, et al. Herbicides based on 2,4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(31): 38501-38512.
- [176] DAVIES P J. The Plant Hormone Concept: Concentration, Sensitivity and Transport [M]//DAVIES P J. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht; Springer Netherlands. 1995: 13-38.
- [177] VAN DER KRIEKEN W M, BRETELER H, VISSER M H M. The Effect of the Conversion of Indolebutyric Acid into Indoleacetic Acid on Root Formation on Microcuttings of Malus [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1992, 33(6): 709-713.
- [178] EPSTEIN, E., LAVEE, S. Conversion of Indole-3-butyric Acid to Indole-3-acetic Acid by Cuttings of Grapevine (*Vitis vinifera*) and Olive (*Olea europea*) [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1984, 25(5): 697-703.
- [179] BARALDI R, BERTAZZA G, PREDIERI S, et al. Uptake and metabolism of indole-3-butyric acid

- during the in vitro rooting phase in pear cultivars (*Pyrus communis*); proceedings of the VII International Symposium on Plant Growth Regulators in Fruit Production 329, F, 1992 [C].
- [180] NORDSTRÖM A-C, JACOBS F A, ELIASSON L. Effect of Exogenous Indole-3-Acetic Acid and Indole-3-Butyric Acid on Internal Levels of the Respective Auxins and Their Conjugation with Aspartic Acid during Adventitious Root Formation in Pea Cuttings [J]. *Plant Physiology*, 1991, 96(3): 856-861.
- [181] WIESMAN Z, RIOV J, EPSTEIN E. Comparison of movement and metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean cuttings [J]. *Physiologia Plantarum*, 1988, 74(3): 556-560.
- [182] LUDWIG-MÜLLER J, EPSTEIN E. Occurrence and in Vivo Biosynthesis of Indole-3-Butyric Acid in Corn (*Zea mays* L.) 1 [J]. *Plant Physiology*, 1991, 97(2): 765-770.
- [183] VANWALLENDAEL A, SOLTANI A, EMERY N C, et al. A Molecular View of Plant Local Adaptation: Incorporating Stress-Response Networks [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70(Volume 70, 2019): 559-583.
- [184] BASHIR K, MATSUI A, RASHEED S, SEKI M. Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in response to drought, salinity, heat, and cold stress [version 1; peer review: 2 approved] [J]. *F1000Research*, 2019, 8(658).
- [185] ALONSO C, RAMOS-CRUZ D, BECKER C. The role of plant epigenetics in biotic interactions [J]. *New Phytologist*, 2019, 221(2): 731-737.
- [186] KU Y-S, SINTAHA M, CHEUNG M-Y, LAM H-M. Plant Hormone Signaling Crosstalks between Biotic and Abiotic Stress Responses [J/OL] 2018, 19(10):10.3390/ijms19103206
- [187] KAMIYA Y. Plant hormones: versatile regulators of plant growth and development [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61(1).
- [188] RUAN J, ZHOU Y, ZHOU M, et al. Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants [J/OL] 2019, 20(10):10.3390/ijms20102479
- [189] DEMOLE E, LEDERER E, MERCIER D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 1962, 45: 675-685.
- [190] ALDRIDGE D C, GALT S, GILES D, TURNER W B. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae* [J]. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1971, (0): 1623-1627.
- [191] DAR T A, UDDIN M, KHAN M M A, et al. Jasmonates counter plant stress: A Review [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, 115: 49-57.
- [192] WASTERNAK C, HAUSE B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals*

- of Botany [J]. *Annals of Botany*, 2013, 111(6): 1021-1058.
- [193] HUANG H, LIU B, LIU L, SONG S. Jasmonate action in plant growth and development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(6): 1349-1359.
- [194] VICK B A, ZIMMERMAN D C. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1983, 111(2): 470-477.
- [195] WEBER H, VICK B A, FARMER E E. Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(19): 10473-10478.
- [196] HUFFAKER A, PEARCE G, RYAN C A. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(26): 10098-10103.
- [197] YAMAGUCHI Y, PEARCE G, RYAN C A. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(26): 10104-10109.
- [198] YAMAGUCHI Y, HUFFAKER A, BRYAN A C, et al. PEPR2 Is a Second Receptor for the Pep1 and Pep2 Peptides and Contributes to Defense Responses in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(2): 508-522.
- [199] ISHIGURO S, KAWAI-ODA A, UEDA J, et al. The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(10): 2191-2209.
- [200] ZHAO X, LI N, SONG Q, et al. OPDAT1, a plastid envelope protein involved in 12-oxo-phytodienoic acid export for jasmonic acid biosynthesis in Populus [J]. *Tree Physiology*, 2021, 41(9): 1714-1728.
- [201] GUAN L, DENKERT N, EISA A, et al. JASSY, a chloroplast outer membrane protein required for jasmonate biosynthesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(21): 10568-10575.
- [202] THEODOULOU F L, JOB K, SLOCOMBE S P, et al. Jasmonic Acid Levels Are Reduced in COMATOSE ATP-Binding Cassette Transporter Mutants. Implications for Transport of Jasmonate Precursors into Peroxisomes [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(3): 835-840.
- [203] LI Q, ZHENG J, LI S, et al. Transporter-Mediated Nuclear Entry of Jasmonoyl-Isoleucine Is Essential for Jasmonate Signaling [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(5): 695-708.
- [204] WANG Y, MOSTAFA S, ZENG W, JIN B. Function and Mechanism of Jasmonic Acid in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stresses [J/OL] 2021, 22(16):10.3390/ijms22168568

-
- [205] ALI M S, BAEK K-H. Jasmonic Acid Signaling Pathway in Response to Abiotic Stresses in Plants [J/OL] 2020, 21(2):10.3390/ijms21020621
- [206] KE J, MA H, GU X, et al. Structural basis for recognition of diverse transcriptional repressors by the TOPLESS family of corepressors [J]. *Science Advances*, 1(6): e1500107.
- [207] CHINI A, GIMENEZ-IBANEZ S, GOOSSENS A, SOLANO R. Redundancy and specificity in jasmonate signalling [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 33: 147-156.
- [208] WASTERNAK C, SONG S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(6): 1303-1321.
- [209] PAUWELS L, BARBERO G F, GEERINCK J, et al. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling [J]. *Nature*, 2010, 464(7289): 788-791.
- [210] ZHAI Q, ZHANG X, WU F, et al. Transcriptional Mechanism of Jasmonate Receptor COI1-Mediated Delay of Flowering Time in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(10): 2814-2828.
- [211] MOSBLECH A, THUROW C, GATZ C, et al. Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in Arabidopsis thaliana [J]. *The Plant Journal*, 2011, 65(6): 949-957.
- [212] BLECHERT S, BOCKELMANN C, FÜßLEIN M, et al. Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of Bryonia dioica Jacq [J]. *Planta*, 1999, 207(3): 470-479.
- [213] STINTZI A, WEBER H, REYMOND P, et al. Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(22): 12837-12842.
- [214] STENZEL I, HAUSE B, MIERSCH O, et al. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of Arabidopsis thaliana [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(6): 895-911.
- [215] GRECHKIN A N, KURAMSHIN R A, SAFONOVA E Y, et al. Formation of ketols from linolenic acid 13-hydroperoxide via allene oxide. Evidence for two distinct mechanisms of allene oxide hydrolysis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1991, 1086(3): 317-325.
- [216] RUSSELL L, LARNER V, KURUP S, et al. The Arabidopsis COMATOSE locus regulates germination potential [J]. *Development*, 2000, 127(17): 3759-3767.
- [217] PINFIELD-WELLS H, RYLOTT E L, GILDAY A D, et al. Sucrose rescues seedling establishment but not germination of Arabidopsis mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism [J]. *The Plant Journal*, 2005, 43(6): 861-872.
- [218] DAVE A, HERNÁNDEZ M L, HE Z, et al. 12-Oxo-Phytodienoic Acid Accumulation during Seed Development Represses Seed Germination in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(2):

- 583-599.
- [219] KANAI M, NISHIMURA M, HAYASHI M. A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5 [J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(6): 936-947.
- [220] ZHANG X, DE MARCOS LOUSA C, SCHUTTE-LENSINK N, et al. Conservation of targeting but divergence in function and quality control of peroxisomal ABC transporters: an analysis using cross-kingdom expression [J]. *Biochemical Journal*, 2011, 436(3): 547-557.
- [221] DOERR A. Single-particle cryo-electron microscopy [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(1): 23-23.
- [222] YANG S, ZHOU X, LI R, et al. Optimized PEI-based transfection method for transient transfection and lentiviral production [J]. *Current protocols in chemical biology*, 2017, 9(3): 147-157.
- [223] SMITH S M. Strategies for the Purification of Membrane Proteins [M]//WALLS D, LOUGHRAN S T. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. New York, NY; Springer New York. 2017: 389-400.
- [224] KIELKOPF C L, BAUER W, URBATSCH I L. Considerations for membrane protein purification [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021, 2021(1): pdb. top102285.
- [225] LE MAIRE M, CHAMPEIL P, MØLLER J V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000, 1508(1): 86-111.
- [226] WIENER M C. A pedestrian guide to membrane protein crystallization [J]. *Methods*, 2004, 34(3): 364-372.
- [227] MALONEY P C, AMBUDKAR S V. Functional reconstitution of prokaryote and eukaryote membrane proteins [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 269(1): 1-10.
- [228] SEDDON A M, CURNOW P, BOOTH P J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2004, 1666(1): 105-117.
- [229] WHITE M A, CLARK K M, GRAYHACK E J, DUMONT M E. Characteristics Affecting Expression and Solubilization of Yeast Membrane Proteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 365(3): 621-636.
- [230] RAMAN P, CHEREZOV V, CAFFREY M. The Membrane Protein Data Bank [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(1): 36-51.
- [231] LYONS J A, SHAHSAVAR A, PAULSEN P A, et al. Expression strategies for structural studies of eukaryotic membrane proteins [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 38: 137-144.
- [232] CHAE P S, RASMUSSEN S G F, RANAR R, et al. Maltose–neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(12): 1003-1008.

- [233] CHAE P S, RANA R R, GOTFRYD K, et al. Glucose-neopentyl glycol (GNG) amphiphiles for membrane protein study [J]. *Chemical communications*, 2013, 49(23): 2287-2289.
- [234] DING W-X, QI X-R, LI P, et al. Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 300(1): 38-47.
- [235] CHOY B C, CATER R J, MANCIA F, PRYOR E E. A 10-year meta-analysis of membrane protein structural biology: Detergents, membrane mimetics, and structure determination techniques [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2021, 1863(3): 183533.
- [236] CHAE P S, RASMUSSEN S G F, RANA R R, et al. A New Class of Amphiphiles Bearing Rigid Hydrophobic Groups for Solubilization and Stabilization of Membrane Proteins [J]. *Chemistry – A European Journal*, 2012, 18(31): 9485-9490.
- [237] LI S. Detergents and alternatives in cryo-EM studies of membrane proteins [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2022, 54(8): 1049-1056.
- [238] SIDHOM K, OBI P O, SALEEM A. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? [J/OL] 2020, 21(18):10.3390/ijms21186466
- [239] DE TITO S, TURACCHIO G, VALENTE C. Negative Staining Electron Microscopy for Morpho-Functional Characterization of Purified Golgi Membranes from Mammalian Cells [M]//WANG Y, LUPASHIN V V, GRAHAM T R. *Golgi: Methods and Protocols*. New York, NY; Springer US. 2023: 225-234.
- [240] ZHANG L, TONG H, GAREWAL M, REN G. Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2013, 1830(1): 2150-2159.
- [241] SGRO G G, COSTA T R D. Cryo-EM Grid Preparation of Membrane Protein Samples for Single Particle Analysis [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2018, 5.
- [242] CRAMER P. AlphaFold2 and the future of structural biology [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2021, 28(9): 704-705.
- [243] BAYKOV A A, EVTUSHENKO O A, AVAEVA S M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay [J]. *Analytical Biochemistry*, 1988, 171(2): 266-270.
- [244] VARDAKOU M, SALMON M, FARALDOS J A, O'MAILLE P E. Comparative analysis and validation of the malachite green assay for the high throughput biochemical characterization of terpene synthases [J]. *MethodsX*, 2014, 1: 187-196.
- [245] FAN J, YU L, XU C. A Central Role for Triacylglycerol in Membrane Lipid Breakdown, Fatty Acid β -Oxidation, and Plant Survival under Extended Darkness [J]. *Plant Physiology*, 2017,

- 174(3): 1517-1530.
- [246] SCHÜTZ A, BERNHARD F, BERROW N, et al. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production [J]. STAR Protocols, 2023, 4(4): 102572.
- [247] YIP K M, FISCHER N, PAKNIA E, et al. Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM [J]. Nature, 2020, 587(7832): 157-161.
- [248] BOUNTRA K, HAGELUEKEN G, CHOUDHURY H G, et al. Structural basis for antibacterial peptide self-immunity by the bacterial ABC transporter McjD [J]. The EMBO Journal, 2017, 36(20): 3062-3079-3079.
- [249] HOFMANN S, JANULIENE D, MEHDIPOUR A R, et al. Conformation space of a heterodimeric ABC exporter under turnover conditions [J]. Nature, 2019, 571(7766): 580-583.
- [250] DE MARCOS LOUSA C, VAN ROERMUND C W T, POSTIS V L G, et al. Intrinsic acyl-CoA thioesterase activity of a peroxisomal ATP binding cassette transporter is required for transport and metabolism of fatty acids [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(4): 1279-1284.
- [251] KAWAGUCHI K, MUKAI E, WATANABE S, et al. Acyl-CoA thioesterase activity of peroxisomal ABC protein ABCD1 is required for the transport of very long-chain acyl-CoA into peroxisomes [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 2192.
- [252] JAMES C N, HORN P J, CASE C R, et al. Disruption of the Arabidopsis CGI-58 homologue produces Chanarin–Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(41): 17833-17838.
- [253] RADNER F P W, GROND S, LASS A, ZECHNER R. Fat in the skin: Triacylglycerol metabolism in keratinocytes and its role in the development of neutral lipid storage disease [J]. Dermato-endocrinology, 2011, 3(2): 77-83.
- [254] YAMAGUCHI T, OMATSU N, MATSUSHITA S, OSUMI T. CGI-58 Interacts with Perilipin and Is Localized to Lipid Droplets: POSSIBLE INVOLVEMENT OF CGI-58 MISLOCALIZATION IN CHANARIN-DORFMAN SYNDROME* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(29): 30490-30497.
- [255] SUBRAMANIAN V, ROTHENBERG A, GOMEZ C, et al. Perilipin A Mediates the Reversible Binding of CGI-58 to Lipid Droplets in 3T3-L1 Adipocytes* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(40): 42062-42071.
- [256] LASS A, ZIMMERMANN R, HAEMMERLE G, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome [J]. Cell Metabolism, 2006, 3(5): 309-319.
- [257] PARK S, GIDDA S K, JAMES C N, et al. The α/β Hydrolase CGI-58 and Peroxisomal Transport

- Protein PXA1 Coregulate Lipid Homeostasis and Signaling in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(5): 1726-1739.
- [258] BHATTACHARJEE S, FENG X, MAJI S, et al. Time resolution in cryo-EM using a PDMS-based microfluidic chip assembly and its application to the study of HflX-mediated ribosome recycling [J]. *Cell*, 2024, 187(3): 782-796.e723.

附录 A 拟南芥 CTS 蛋白的氨基酸序列

>CTS

MPSLQLLQLTERGRGLVASRRKSILLAAGIVAAGGTAVYLKSRVASRRPDSSRL
CNGQSDDDETLEKLTATDQNAKITTCKKKGGGLKSLQVLTAILLSQMGMGA
RDLLALVATVVFRITALSNRLAKVQGFLFRAAFLRRAPLFLRLISENIMLCFMLS
TLHSTSKYITGALSRLFRKILTKIIHSHYFENMVYYKISHVDGRITHPEQRIASD
VPRFSSELSDLILDDLTAVTDGILYAWRLCSYASPKYIFWILAYVLGAGTAIRNF
SPSFGKLMSKEQQLEGEYRQLHSRLRTHSESAFYGGETREESHIQQKFKNLVS
HMSHVLHDHWWFGMIQDFLLKYL GATVAVILIIEPFFSGHLRPDDSTLGRAEM
LSNIRYHTSVIISLFQALGTLSISSRRLNRLSGYADRIHELMASVRELSGDDKSSF
QRNRSRNYLSEANYVEFSDVKVVTPTGNVLVEDLTLRVEQGSNLLITGPNGSG
KSSLFRVLGGLWPLVSGHIVKPGVGSDLNKEIFYVPQRPYMAVGTLRDQLIYP
LTSGQESELLTEIGMVELLKNVDLEYLLDRYQPEKEVNWGDELSLGEQQRLG
MARLFYHKPKFAILDECTSAVTTDMEERFAAKVRAMGTSCITISHRPALVAFH
DVVLSLDGEGGWSVHYKRDDSALLTDAEIDSVKSSDTDRQNDAMVVQRAFA
AARKESATNSKAQSYQTQLIARSPVVDKSVVLPRFPQPQTSQRALPSRVAAML
NVLPTIFDKQGAQLLAVACLVSRTLISDRIASLNGTTVKYVLEQDKAAAFVRL
IGLSVLQSGASSIIAPSLRHILTQRLALGWRIRLTQHLLRNYLRNNAFYKVFHMS
GNSIDADQRLTRDLEKLTADLSGLLTGMVKPSVDILWFTWRMKLLTGQRGVAI
LYTYMLLGLGFLRRVAPDFGDLAGEEQQLEGKFRFMHERLNTHAESIAFFGG
GAREKAMVDKKFRALLDHSLMLLRKKWLYGILDDFVTKQLPNNVTWGLSLL
YALEHKGDRALVSTQGELAHALRYLASVVSQSFMAGDILELHKKFLELSGGI
NRIFELDEFDASQSGVTSENQTSRLDSQDLSFSEVDIITPAQKLMASKLSCEI
VSGKSLLVTGPNGSGKTSVFRVLRDIWPTVCGRLTKPSLDIKELGSGNGMFFV
PQRPYTCLGTLRDQIIYPLSKEEAEKRAAKLYTSGESSTEAGSILDSHLKTILEN
VRLVYLLERDVGGWDATTNWEDILSLGEQQRLGMARLFFHRPKFGVLDECT
NATSVDVEEQLYRVARDMGVTFITSSQRPALIPFHSLELRLIDGEGNWELRSIEQ
TTE

附录 B 秀丽隐杆线虫 PMP-2/4 蛋白的氨基酸序列

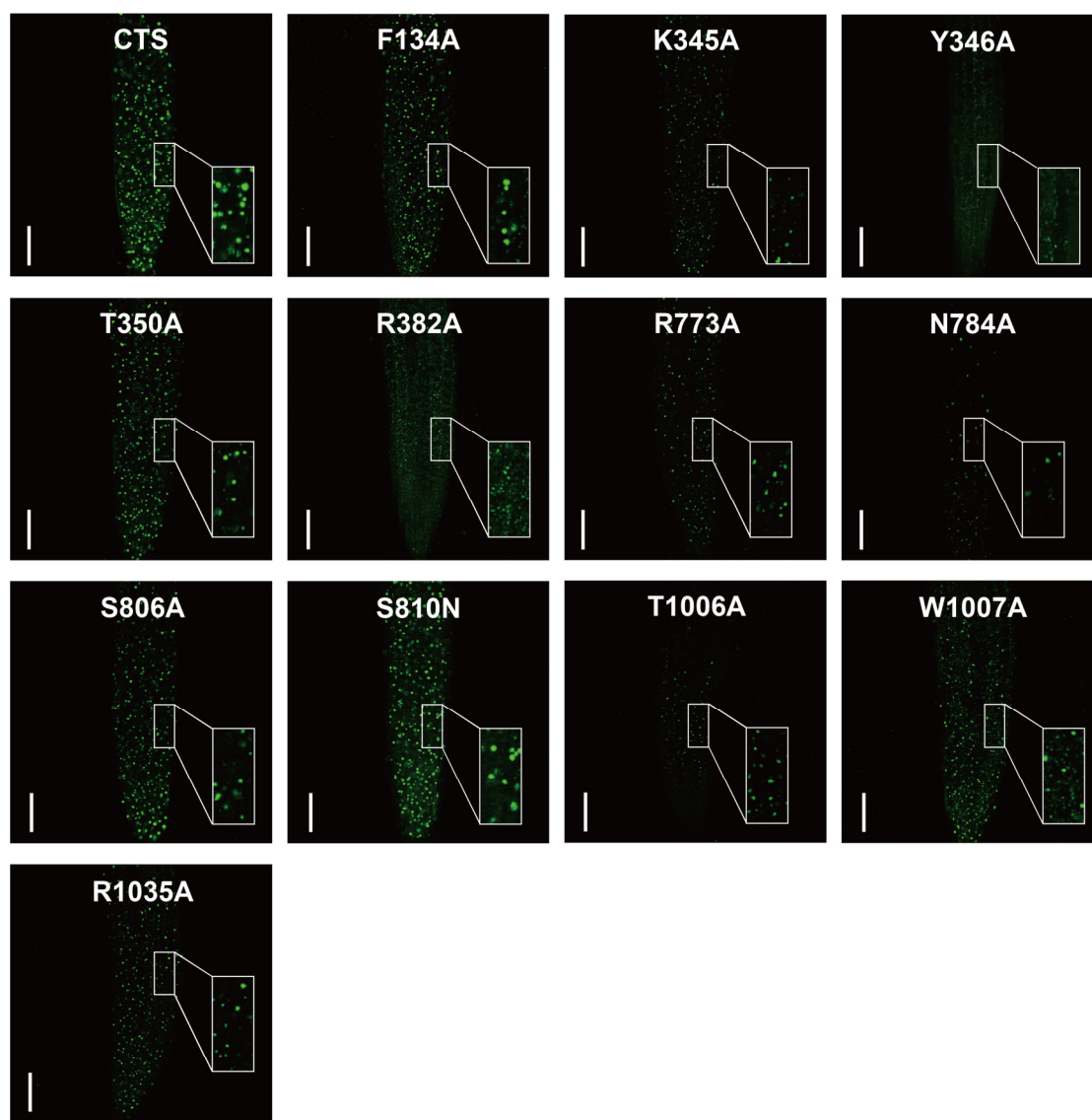
>PMP-2

MAVFSKLQLLGQAIPPKQYAPGVVGM LAVFALIKLYKQDIRGTKHLVAKTKKD
GSKGQKAHVDGVFLGKLARILKILIPGFFSKESFYLLILIAVSLLCRTYADVYMI
TSTKIEASIIDRNPLLFALEAFKYVLNLP AISVTNAILKFGIAELKLRFRERLSTH
LYSQYLKGFTFYKMSNLDTRIQNADQLLTQDVDRFCDGIVELYSNLSKPILDV
FLYLFRLGTSLGFSSPSILFSYLLFTGVGLTYLRRPIGRLTVEEQALEGEYRYVN
SRLIMNSEEIAFYQGNQSEKETIMSTFASLVQH LRKIILFRFSIGFVDNIVAKYLA
TVVGWYAVGSSFFDKQHKPFIGMSRNQLMQEYYNSGRMMYKMAEALGRLA
LAGRDMTRL SGFTSRVDTLNVLDDVNSGNYKRTMVGEKEESSALIKSELVA
GSGNLRVQDNVIRFDNVPLVTPNGDVLIERLNFEVPSGTNVLCGPNGCGKSS
LFRVLGELWPLFGGTLTKPAKGKLFYVPQRPYMTLGTLRDQIIYPDRPLDMIR
KGVSDSDLEQMLENVQLTHILEREGGWSAVQDWMDVLSGGEKQRIAMARLF
YHKPQFAILDECTSAVSVDVEGAMYRLCREKNITLFTVSHRKS LWKYHEYSLY
MDGRGSYRFEQIDDQSDQFGS

>PMP-4

MSVQSKFLETGIDPEKRKKALLVGAAGVA AVAVAHWVSLRKSQKSHHKMEK
EDSVASDGT PKKNKKKAFDPQFLKQLKELLKIMIPGVFSKEAGIIGMHSIILICR
TFLTIFVAQLEGSMVQAIVEKNVLQFVLHLVKWILVALPATFVN SMIRFFESYL
GLAFRTRLTKHAYKQYFSDQYYAVSNLDTRLQNADQCLTEDITMFSQSVAHLY
SHLT KPVLDVALITFTLIK LAIQRG TGRSTFLPSCMAIMAVSLTAKILRAVSPRFG
HMVAEEARRKGHLRYLHSRIITNSEEIAFYGGHQA EYKQLDGAFNSLYQQMM
LIFKKRIPYIMIEQFLMKYVWSGTGMVMIALPILATEYADDEKSTKLEDLPDRG
VSERTRGYATAKTLLFNSADAVERLMTSYKEVTELAGYTGRVHEMFQVFDDA
KKGIYQRQTVSAGAEQQQRGERFDTSKIEGIITDSEADEIILNSVPIVTPNGDVV
VKNMTLTISPGMHVLITGPNGCGKSSLFRILGGLWPVYRGHLEKPTSDRMYYI
PQRPYMTLGTLRDQVIYPDTTIQMRRQGITDQDLMTMLRIVHLEHIVEREGG
WDAQNDWMDVLSGGEKQRMGMARVFYHRPKYALLDECTSAVSIDVEGSIY
QAIKDSGITLLTVTHRPSLWKFH THLLQYDGEGGYKVSSLNEKTIGERM SYSE
EKQQLEKQLAEVPRWKERLEEVCQLLGGNEDHLNMTIDTDDSE

附录 C 拟南芥各突变体 CTS 蛋白的荧光定位结果



图注：使用激光扫描共聚焦显微镜（CLSM）对 7 日龄野生型及点突变 CTS-Venus 转基因系的拟南芥幼苗进行荧光定位检测。野生型及点突变的 CTS-Venus 蛋白均能正确定位于过氧化物酶体（呈点状分布）。比例尺表示 50 μm 。

致谢

光阴似箭，日月如梭。不知不觉已在科大度过七年的研究生时光，在这七年里，有欢乐也有泪水，我学会了许多也收获了许多。在即将结束的研究生生涯，我想对指导过我的导师，一起生活学习的实验室小伙伴说一声感谢！

首先感谢我的导师陈宇星教授和周丛照教授。感谢两位老师给了我宝贵的读研机会，让我有机会在 CZlab 学习与实验。两位老师深厚的学术功底，敏锐的科学洞察力，独到的科研见解使我受益良多，深刻影响我以后的工作与生活。在此，我想特别感谢陈老师。在科研上，陈老师对我的实验进行细心的指导，尽心尽力为我的课题提供实验条件；在生活上，陈老师一直鼓励我，在我沮丧的时候耐心开解我，在此由衷地感谢陈老师！

感谢江永亮老师，侯文韬老师以及李琼老师对我实验上的指导与帮助。感谢李卫芳老师，李旭老师以及任艳敏老师在生活上的关心和帮助，为大家提供了一个良好的实验室环境。感谢中科大冷冻电镜平台高永翔老师，唐培萍老师，王冬梅老师以及裘振宇老师在我使用冷冻电镜观察样品以及收集数据时的帮助。感谢郑基深老师、谭树堂老师及黄栋梁老师对我实验上的帮助。

感谢王亮师兄、徐达师兄、陈志鹏师兄以及陈宇师兄，四位师兄无私地教会我实验技能，让我有了独立实验的能力。感谢陈志鹏师兄对我实验的耐心指导，师兄细致严谨的科研态度，认真负责的品质，为我树立了榜样。感谢陈宇师兄为我实验上遇到的困难解惑，师兄丰富的科研知识和耐心的指导让我受益匪浅。感谢韩书婧、程梦婷、杨丰、孔文文、王潇倩、李阳及方舒城等师兄师姐对我实验上的指导与帮助。感谢孙彩荣、毛耀许、余荣成、朱洁、李波及杜康等师兄师姐在实验与生活上的热情帮助，与师兄师姐共同探讨学术问题、交流研究心得的经历，使我的科研生活充满动力与乐趣，你们的专业素养与乐观态度，让我在遇到困难时总能获得启发与支持。祝愿师兄师姐们今后工作顺利，生活愉快！

特别感谢我的同级，美丽善良的李竞，认真勤奋的王洁，帅气儒雅的侯普，大家在实验和生活上互相帮助互相鼓励，一起度过了难忘的科研生涯。感谢白雨以及已毕业的魏紫露与计欣烨，大家初入科大一起上课的时光仍历历在目。感谢你们让我的研究生生活丰富多彩！希望大家今后的生活顺风顺水，心想事成！

感谢褚晨阳、许康、李琴瑶、张红艳、程文斌、杨濛、安寅收、王震洲、李勃锐等师弟师妹对我实验与生活上的帮助。特别感谢彭亚坤师妹对我实验上的帮助，你的认真稳重是我坚实的科研后盾。感谢申培珍、王方方、孙元昕、杨祥瑞、张书琪、陈国婷、王博等师弟师妹，实验室因为你们的存在变得欢声笑语。感谢王雅美、张凌宇、邓家鑫、董得沁、陈超艺、臧瑞劫、赵恒睿等师弟师妹，谢谢

致谢

你们对实验室做出的贡献。祝愿大家今后科研一切顺利！

感谢我的家人，尤其是我的父母。感谢父母一直以来对我生活上的支持与鼓励，让我可以安心无忧地完成学业。感谢我的男朋友张镇潮先生，谢谢你一直以来对我的鼓励与陪伴。

感谢祖国的繁荣昌盛，让我们可以拥有和平稳定的生活。

再次对大家的支持与鼓励表示衷心的感谢。祝愿我们都有美好的未来！

2025 年 10 月

在读期间取得的科研成果

发表论文:

[1]. **Zhi-Hui Zha**[#], Yakun Peng[#], Dong-Liang Huang[#], Zhi-Peng Chen, Fang-Fang Wang, Bo-Rui Li, Bo Wang, Linfeng Sun, Ji-Shen Zheng^{*}, Shutang Tan^{*}, Cong-Zhao Zhou^{*}, Wen-Tao Hou^{*} & Yuxing Chen^{*}. Structural insights into Arabidopsis thaliana CTS-mediated fatty acid and hormone metabolism. (*Nature Communications*, accepted)

[2]. Chen Y, Wang L, Hou WT, **Zhi-Hui Zha**, Xu K, Zhou CZ, Li Q, Chen Y. Structural insights into human ABCC4-mediated transport of platelet agonist and antagonist. *Nat Cardiovasc Res*. 2023 Jul;2(7):693-701.

研究生期间参加的学术会议:

第二十次中国暨国际生物物理大会, 2023 年, 长沙

第八届中国晶体学会, 2021 年, 南昌