

线粒体代谢物转运及其在微生物细胞工厂应用中的研究进展

李昌凡, 林铭鑫, 卢雪瑶, 柳隐芳, 顾 洋, 黄 和*

(南京师范大学 食品与制药工程学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 线粒体是柠檬酸循环、乙醛酸循环和呼吸链反应发生的重要场所,是真核生物不可缺少的细胞器之一。线粒体与细胞质间的物质交换直接影响着细胞的分解和合成代谢,然而线粒体内膜具有高度选择性和不可透性,因此物质交换需要通过线粒体膜上的底物通道或者载体蛋白协助。作者归纳了在线粒体与细胞质和其他细胞器之间的代谢物交换中的线粒体载体蛋白和代谢物底物通道,包括碳代谢物线粒体载体蛋白、NAD(P)H 和 NAD(P)⁺代谢物线粒体底物通道、辅因子载体蛋白、氨基酸载体蛋白和其他一些已鉴定的线粒体载体和底物通道,同时总结了目前线粒体膜载体蛋白工程在微生物代谢改造中的应用,阐明代谢物跨细胞器膜转运机制,将为线粒体载体蛋白工程在设计新的代谢途径、重塑细胞内代谢网络中铺平道路,加深对细胞内代谢的理解,有利于更好地设计微生物细胞工厂。

关键词: 线粒体载体;代谢物转运;酿酒酵母;微生物细胞工厂

中图分类号:Q 731 文章编号:1673-1689(2022)07-0032-12 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.07.004

Research Progress in Mitochondrial Metabolite Transport and Its Application in Microbial Cell Factories

LI Changfan, LIN Mingxin, LU Xueyao, LIU Yinfang, GU Yang, HUANG He*

(School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Mitochondria are important places where citric acid cycle, glyoxylate cycle and respiratory chain reactions occur, and they also the indispensable organelles of eukaryotes. The exchange of substances between mitochondria and cytoplasm directly affects the catabolism and anabolism of cells, while the inner mitochondrial membrane is highly selective and impermeable. Therefore, the exchange of substances needs to be assisted by substrate channels or carrier proteins on the mitochondrial membrane. This review summarizes the mitochondrial carrier and metabolic substrate channels in the exchange of metabolites between mitochondria and cytoplasm and other organelles, including carbon metabolites mitochondrial carrier proteins, NAD(P)H and NAD(P)⁺ metabolites mitochondrial substrates channel, cofactor carrier protein, amino acid carrier protein, and several other mitochondrial carrier and substrate channels that have been identified. At the same

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 江苏省自然科学基金前沿引领技术基础研究专项(BK20202002);国家自然科学基金项目(22108126)。

* 通信作者: 黄 和(1974—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物代谢工程及合成生物学研究。

E-mail: huangh@njtech.edu.cn

time, the application of mitochondrial membrane carrier protein engineering in microbial metabolic transformation is summarized as well. In addition, the elucidation of metabolite transport mechanisms across organelle membranes in this review will pave the way for mitochondrial carrier protein engineering in designing new metabolic pathways and remodeling intracellular metabolic networks, which deepens our understanding of intracellular metabolism and makes us better design the microbial cell factories.

Keywords: mitochondrial carrier, metabolite transport, *Saccharomyces cerevisiae*, microbial cell factories

真核微生物拥有多个细胞器,如线粒体、细胞核、高尔基体等,各细胞器将细胞质空间区域化并执行特定的代谢功能^[1]。其中,线粒体是真核微生物细胞内三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环、氧化磷酸化反应、支链氨基酸及许多辅因子(如硫辛酸)合成的场所,对于几乎所有真核微生物来说都是必不可少的^[2]。此外,线粒体内环境具有氧化还原电位强、氧浓度低、pH 高、代谢物丰富等特征,与细胞质环境有显著差异^[3]。同时,线粒体空间相对较小,有利于底物的浓缩,促进酶促反应的正向进行。因此,微生物细胞工厂构建工作已尝试将产物合成途径固定于线粒体内^[3-5],例如支链醇、类异戊二烯、单萜等代谢产物的合成,通过将产物合成途径固定于线粒体有利于利用线粒体内的优势资源,也可以避免中间代谢物在细胞质或细胞核中积累对细胞造成的毒性作用,防止副产物途径的竞争。

线粒体具有双膜结构,由线粒体外膜(outer mitochondrial membrane, OMM)和线粒体内膜(inner mitochondrial membrane, IMM)构成^[6]。然而,IMM 具有高度的选择性和不可透性,仅允许一些小的不带电分子扩散通过(O_2 和 CO_2 等),导致线粒体与细胞质和其他细胞器间的物质交换只能由线粒体膜载体蛋白(mitochondrial carriers, MCs)或代谢物穿梭通道实现,极大限制了线粒体工程在代谢工程和微生物细胞工厂的应用。线粒体生物学研究表明,MCs 主要参与了线粒体内代谢物的输出和线粒体外代谢物的输入,调控着线粒体内物质的稳态^[7]。MCs 氨基酸序列高度保守,通常由 100 个氨基酸的 3 个重复残基结构域组成,每个残基结构域包含两个保守的特征序列 $PX[D/E]XX[K/R]X[K/R]$ 和 $[D/E]GXXX[X[W/Y/F][K/R]G$,两个保守的序列由 20~30 个氨基酸隔开,该特征序列已被用于识别和预测生物体中 MCs^[8]。目前大部分工业微生物的 MCs 及其生理功

能已被鉴定和表征,并且研究者还发现了几种负责转运乙酰基(CH_3CO^-)和稳定氧化还原力的线粒体/细胞质代谢物穿梭通道^[9]。为此,作者将主要对工业微生物酵母中已鉴定的 MCs 和线粒体/细胞质代谢物穿梭通道进行分类和归纳,总结目前线粒体膜载体蛋白工程在微生物代谢改造中的应用,同时对其未来发展进行展望。

1 碳代谢物线粒体膜载体

线粒体是真核微生物 TCA 循环的发生场所,而 TCA 循环是糖、脂肪和蛋白质代谢与转化的枢纽,其中间代谢产物(柠檬酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸等)直接参与了糖、氨基酸、脂肪的合成代谢。因此,线粒体内 TCA 循环中间代谢产物的转运对于真核微生物的生理代谢至关重要,碳代谢物 MCs 是实现 TCA 循环中间代谢产物转运的主要途径(见图 1)。

1.1 丙酮酸载体

细胞质丙酮酸是糖酵解途径的最终代谢物,同时也是 TCA 循环的起始代谢物,因此需要将细胞质的丙酮酸转运至线粒体。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,已鉴定的丙酮酸 MCs 包括亚基 Mpc1p、Mpc2p 和 Mpc3p^[10]。其中,亚基 Mpc1p 和 Mpc2p 复合物在有氧条件下具有丙酮酸转运活性,而 Mpc1p 和 Mpc3p 复合物在厌氧条件下表现出转运活性。为了使丙酮酸代谢通量转向目标化学品生产,Morita 等对 *S. cerevisiae* 的线粒体丙酮酸转运基因(*MPC1*)进行敲除以抑制线粒体代谢,减少不必要的丙酮酸消耗,结果显示敲除 *MPC1* 后乙醇产量增加 14.3 倍,达到 (336.4 ± 113.5) mg/L,表明基于线粒体转运控制线粒体代谢能提高酵母化学物质的生产力^[11]。

1.2 琥珀酸/富马酸载体

基因 *ACR1* 编码的 Sfc1p 是 *S. cerevisiae* 的琥

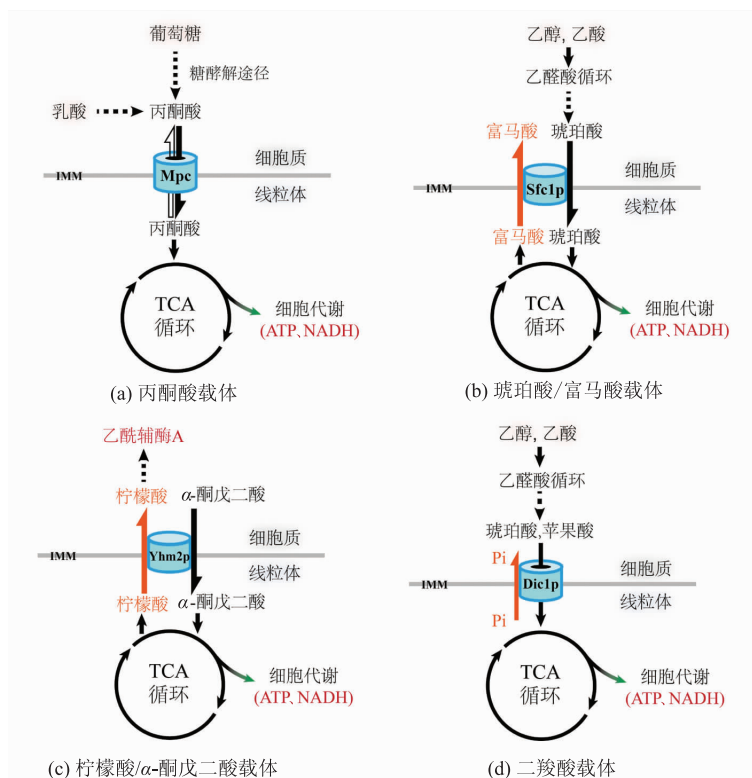


图1 碳代谢物线粒体膜载体

Fig. 1 Carbon metabolites mitochondrial carriers

琥珀酸/富马酸线粒体载体^[12],其将线粒体内的富马酸转运至细胞质的同时会将等量的细胞质琥珀酸转运至线粒体内。有研究表明,Sfc1p参与了*S. cerevisiae*的乙醇代谢,Sfc1p的缺失会导致*S. cerevisiae*无法在以乙酸或乙醇为唯一碳源的培养基中生长^[13]。Yuzbasheva等报道了*Y. lipolytica*的线粒体琥珀酸/富马酸载体 YISfc1,其控制着线粒体的异柠檬酸外流^[14]。对 YISfc1 纯化后载体功能进行分析发现除异柠檬酸外,其还可以转运琥珀酸、富马酸、草酰乙酸、异柠檬酸和 α -酮戊二酸。

1.3 柠檬酸/ α -酮戊二酸载体

S. cerevisiae 的柠檬酸/ α -酮戊二酸载体 Yhm2p 由基因 *YMR241w* 编码,其对柠檬酸盐和 α -酮戊二酸的 K_m 值分别为 0.2 mmol/L 和 1.2 mmol/L^[15]。柠檬酸/ α -酮戊二酸载体在将乙酰辅酶 A 以柠檬酸的形式从线粒体输出到细胞质中起着核心作用,进而连接碳水化合物分解代谢和脂肪生成。Yuzbasheva 等对 *Y. lipolytica* 中编码柠檬酸/ α -酮戊二酸载体的基因 *YlCTP1* 和 *YlYHM2* 进行敲除,发现 $\Delta Ylctp1$ 菌株在生长速度、有机酸和脂质产量方面与野生型菌

株无显著差异,但 $\Delta Ylyhm2$ 菌株不能在含有少量柠檬酸盐的液体培养基中生长。此外,在含糖、脂肪生长培养基中,*YlYHM2* 突变株不产生柠檬酸,且异柠檬酸和脂质的产量也显著下降,但将基因 *YlYHM2* 重新引入 $\Delta Ylyhm2$ 菌株能恢复在柠檬酸培养基中的生长。载体功能分析发现, $\Delta Ylyhm2$ 菌株的柠檬酸/柠檬酸和 α -酮戊二酸/ α -酮戊二酸同交换活性分别降低了 87% 和 40%,而柠檬酸(进)/ α -酮戊二酸(出)和 α -酮戊二酸(进)/柠檬酸(出)的异质交换活性分别降低了 87% 和 95%^[16]。

1.4 二羧酸载体

Oac1p 和 Dic1p 是 *S. cerevisiae* 的二羧酸线粒体载体,其中 Oac1p 是草酰乙酸/硫酸盐载体^[17],而 Dic1p 负责转运琥珀酸和苹果酸^[10]。Oac1p 存在于线粒体膜内,能运输丙二酸、草酰乙酸、硫酸盐和硫代硫酸盐,其基因的缺失会大大减少草酰乙酸、硫代硫酸盐和丙二酸的转运。此外,Oac1p 缺失的突变体可以在全合成培养基(CSM)和复合培养基(YPD)上生长,但 Oac1p 和 Dic1p 的双重缺失的突变体在 CSM 和 YPD 上无法生长^[18]。研究表明细胞质苹果酸

脱氢酶可以催化草酰乙酸生成苹果酸,然后通过 Dic1p 转运到线粒体中,从而维持细胞对草酰乙酸的需求^[17]。

2 NAD(P)H 的线粒体/细胞质转运通道和转运机制

NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺不仅是细胞分解代谢和合成代谢中必不可少的电子供体和受体,而且还作为还原力来维持细胞内氧化还原稳态^[19]。NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺分别存在于 740 个和 887 个生物代谢反应中^[20],其生理功能包括驱动生化过程、控制代谢通量、调节能量代谢、影响线粒体功能和细胞寿命^[21-22]。然而,细胞内的 NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺具有高度区域化分布的特点,这在很大程度上归因于 NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺特定的亚细胞器代谢途径^[23],比如线粒体中就含有大量的 NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺,据报道细胞中约有 50% 的 NADH/NAD⁺和 NADPH/

NADP⁺存在于线粒体中^[24]。然而,由于 IMM 具有 NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺不可渗透的特性,所以线粒体和细胞质之间的 NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺的交换只能通过线粒体载体或代谢物穿梭通道实现^[25]。迄今为止,酵母中鉴定的 NAD⁺载体包括 Ndt1p 和 Ndt2p^[26],但其主要生理功能是通过单向交换的方式转运 NAD⁺^[18]。因此,维持线粒体和细胞质的氧化还原稳态主要依赖于线粒体代谢物穿梭通道^[27],包括 3-磷酸甘油穿梭通道、乙醇/乙醛穿梭通道、苹果酸/草酰乙酸穿梭通道、苹果酸/天冬氨酸穿梭通道、苹果酸/丙酮酸穿梭通道、异柠檬酸/ α -酮戊二酸穿梭通道、丙酮酸/草酰乙酸/苹果酸(POM)穿梭通道、苹果酸/柠檬酸穿梭通道、一碳代谢穿梭通道和脂肪酸穿梭通道等(见图 2)^[17,23,27-28]。苹果酸/柠檬酸穿梭通道、一碳代谢穿梭通道和脂肪酸穿梭通道主要存在于哺乳动物细胞中,在酵母中不起作用,因此不详细讨论。

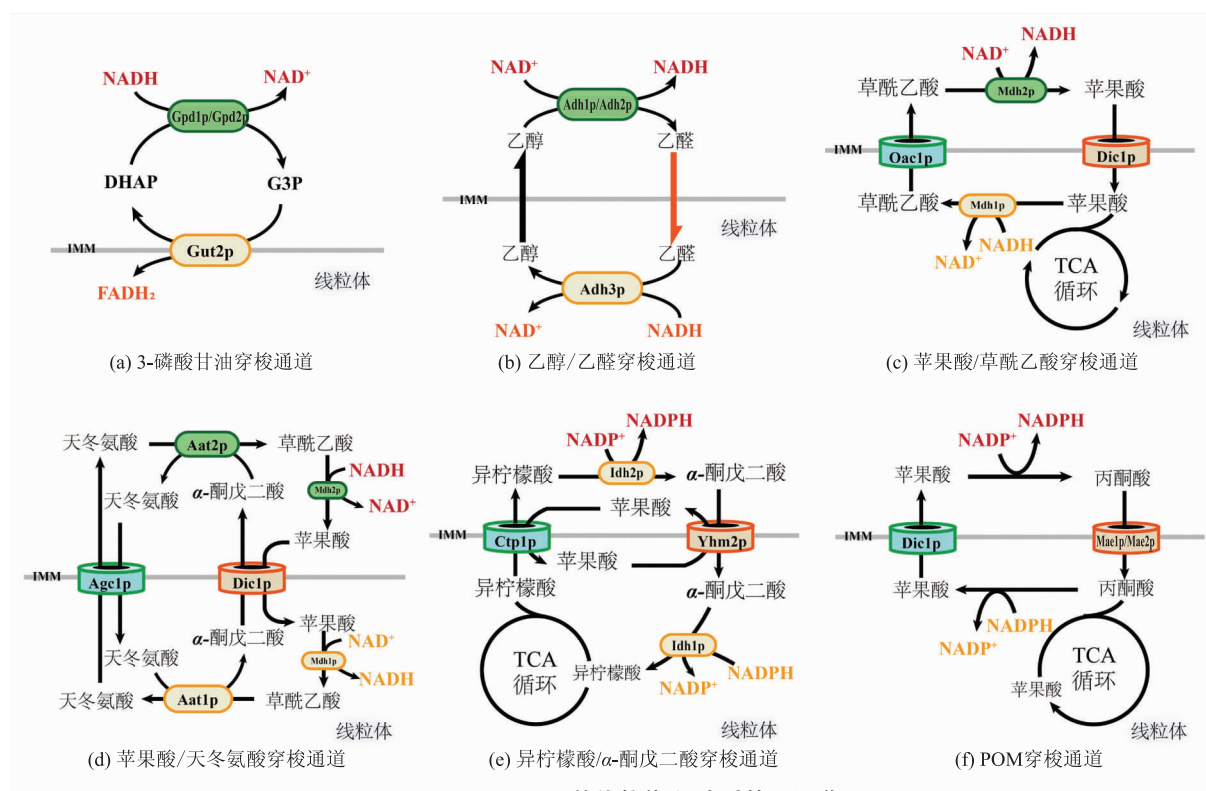


图 2 NAD(P)H 的线粒体/细胞质转运通道
Fig. 2 NAD(P)H mitochondrial/cytoplasmic shuttles

2.1 3-磷酸甘油穿梭通道

以葡萄糖或其他还原性高的底物进行发酵合成还原性低的产物时,微生物会在生长和产物合成

阶段产生大量的 NADH,如微生物合成 1 mol 的 N-乙酰氨基葡萄糖会产生 2 mol 的 NADH,因此 N-乙酰氨基葡萄糖合成时极易导致重组工程菌细胞内

积累 NADH, 造成细胞内还原力失衡, 进而合成 NADH 依赖型副产物或消耗 O_2 氧化过剩的 NADH^[29]。不论哪种方式都会消耗额外的碳源, 降低底物经济性, 所以维持细胞氧化还原稳态和平衡对于分解代谢和合成代谢至关重要^[30]。其中, 3-磷酸甘油穿梭通道是一种在有氧条件下处理细胞内多余 NADH 的途径, 其通过线粒体电子呼吸链间接氧化细胞质 NADH 再生 NAD^{+} ^[31], 由位于线粒体内膜上的 3-磷酸甘油脱氢酶 Gut2p 和细胞质 NAD^{+} 依赖性 3-磷酸甘油脱氢酶 Gpd1p/Gpd2p 组成^[32]。具体而言, 3-磷酸甘油穿梭通道的作用如下: 1) Gpd1p/Gpd2p 将细胞质脱羟基丙酮磷酸 (DHAP) 转化为 3-磷酸甘油 (G3P), 并将细胞质 NADH 氧化为 NAD^{+} ; 2) 产生的 G3P 通过 OMM (OMM 包含膜孔, 可以允许相对分子质量小于 5 000 的物质自由扩散) 扩散至线粒体 IMM 和 OMM 之间的空间; 3) Gut2p 催化 G3P 氧化, 重新生成 DHAP, 并产生 $FADH_2$ 进入线粒体呼吸链参与氧化磷酸化产生 ATP (腺嘌呤核苷三磷酸); 4) 最后, 生成的 DHAP 通过自由扩散返回细胞质^[27]。值得说明的是, 3-磷酸甘油穿梭通道催化过程是不可逆的^[9], 敲除 Gut2p 编码基因 *GUT2* 可以阻断 3-磷酸甘油的转运, 提高甘油产量, 且对 *S. cerevisiae* 的细胞生长没有影响^[31, 33]。此外, *Y. lipolytica* 中基因 *GUT2* 的缺失能导致脂质产量增加 3 倍^[34], 表明 3-磷酸甘油穿梭通道的破坏有利于合成还原性代谢物。

2.2 乙醇/乙醛穿梭通道

乙醇/乙醛穿梭通道由线粒体乙醇脱氢酶 Adh3p 和细胞质乙醇脱氢酶 Adh1p/Adh2p 组成, 其可以输出线粒体内还原力将细胞质 NAD^{+} 还原为 NADH^[27]。由于乙醇和乙醛具有磷脂膜可透的特点, 因此乙醇/乙醛穿梭通道中没有转运载体。有研究推测乙醇/乙醛穿梭通道在好氧条件下没有生理功能, 但在厌氧条件下对细胞代谢起重要作用^[27, 35], 因为在厌氧条件下细胞 NADH 主要由线粒体中丙酮酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶合成谷氨酸产生^[36]。据报道, 编码线粒体乙醇脱氢酶 Adh3p 基因缺失后, 在厌氧条件下 *S. cerevisiae* 生长速率显著降低^[35], 表明乙醇/乙醛穿梭通道参与了细胞代谢。

2.3 苹果酸/草酰乙酸穿梭通道

苹果酸/草酰乙酸穿梭通道由线粒体/细胞质 NAD^{+} 特异性苹果酸脱氢酶 Mdh1p 和 Mdh2p、苹果酸线粒体载体 Dic1p 和草酰乙酸线粒体载体 Oac1p

组成, 可将细胞质 NADH 转运至线粒体进行氧化^[27]。此外, 苹果酸/草酰乙酸穿梭通道在过氧化物酶体 β -氧化循环中也发挥着重要作用, 它可以将过氧化物酶体 NADH 转运到线粒体, 将 NADH 重新氧化为 NAD^{+} , 从而平衡过氧化物酶体还原当量^[37], Mdh1p 缺失的 *S. cerevisiae* 突变体无法代谢脂肪酸^[38]。

2.4 苹果酸/天冬氨酸穿梭通道

苹果酸/天冬氨酸穿梭通道是哺乳动物和微生物中细胞质 NADH 氧化的主要途径^[39]: 1) 细胞质草酰乙酸被细胞质 NAD^{+} 特异性苹果酸脱氢酶 Mdh2p 还原为苹果酸, 同时消耗 1 分子细胞质 NADH, 产生 1 分子 NAD^{+} ; 2) 产生的细胞质苹果酸在二羧酸载体 Dic1p 的作用下转运至线粒体内, 同时运出等量的 α -酮戊二酸; 3) 线粒体 NAD^{+} 特异性苹果酸脱氢酶 Mdh1p 将苹果酸氧化为草酰乙酸, 并产生 1 分子 NADH; 4) 草酰乙酸通过线粒体转氨酶 Aat1p 以谷氨酸作为氨供体转氨生成天冬氨酸; 5) 线粒体天冬氨酸通过天冬氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白 Agc1p 运出到细胞质; 6) 最后, 天冬氨酸通过细胞质转氨酶 Aat2p 重新转化为草酰乙酸。Agc1p 将天冬氨酸从线粒体转出到细胞质取决于线粒体呼吸链产生的质子动力, 转运 1 分子天冬氨酸需要消耗 1 分子谷氨酸分子和 1 个质子^[39-41], 因此基于这个特征苹果酸/天冬氨酸穿梭通道在呼吸条件下进行细胞质 NADH 向线粒体的单向转运, 从而导致线粒体中的 NADH 与 NAD^{+} 比值远高于细胞质^[39]。

2.5 异柠檬酸/ α -酮戊二酸穿梭通道

异柠檬酸/ α -酮戊二酸穿梭通道由线粒体 $NADP^{+}$ 特异性异柠檬酸脱氢酶 Idh1p、细胞质 $NADP^{+}$ 特异性异柠檬酸脱氢酶 Idp2p、柠檬酸/苹果酸逆向转运蛋白 Ctp1p 和 α -酮戊二酸/柠檬酸逆向转运蛋白 Yhm2p 组成。NADPH 是微生物细胞重要的辅因子和能源物质, 其以氢和电子供体/载体的形式直接参与了细胞内 586 个酶催化的 1 058 个生化反应, 这些反应通过 NADPH 的再生与竞争性利用影响着微生物物质的代谢、信号转导和底物转运^[30, 42]。NADPH 则专一用于还原性物质的合成, 比如在以葡萄糖或乙酸为底物合成脂肪酸和固醇类物质时, 需要消耗 NADPH 作为氢原子或电子供体将酮基还原为亚甲基^[43-45]。因此, NADPH 的供给被认为是影响微生物合成还原性物质 (脂肪酸和固醇类物质等) 的关键因素之一。微生物细胞内 NADPH

主要来源于磷酸戊糖途径,然而磷酸戊糖途径作为糖酵解的支路代谢受到多层次、多时空的调控,通过代谢工程手段很难迫使代谢流向磷酸戊糖途径增加 NADPH 的供应^[44]。理论上讲,异柠檬酸/ α -酮戊二酸穿梭通道可以解决上述问题,该穿梭通道可以将线粒体内 NADPH 外排至细胞质中,具体过程包括:1)线粒体 NADP⁺特异性异柠檬酸脱氢酶 Idh1p 催化 α -酮戊二酸转化为异柠檬酸,同时将 NADPH 氧化为 NADP⁺;2)线粒体异柠檬酸在柠檬酸/苹果酸逆向转运蛋白 Ctp1p 的作用下转运至细胞质,同时转入等量的苹果酸;3)异柠檬酸在细胞质 NADP⁺特异性异柠檬酸脱氢酶 Idh2p 催化下转化为 α -酮戊二酸,并产生细胞质 NADPH;4)最后,细胞质 α -酮戊二酸通过 α -酮戊二酸/柠檬酸逆向转运蛋白 Yhm2p 转运到线粒体中^[28]。然而到目前为止,异柠檬酸/ α -酮戊二酸穿梭通道在代谢工程中还没有得到实际应用。

2.6 丙酮酸/草酰乙酸/苹果酸(POM)穿梭通道

丙酮酸/草酰乙酸/苹果酸穿梭通道由线粒体 NADP⁺特异性苹果酸酶 Mae2p、细胞质 NADP⁺特异性苹果酸酶 Mae1p 和二羧酸转运蛋白 Dic1p 组成,该穿梭通道已被用于将线粒体内的 NADPH 转运至细胞质^[46]。在代谢工程改造 *Y. lipolytica* 合成脂质的研究中,Qiao 等发现细胞质 NADP⁺依赖的苹果酸酶增强 POM 循环,从毛霉中克隆并表达 MCE2,使得工程菌株的脂质产量从 0.17 g/g 增加到 0.21 g/g,同时生物量也略有增加^[44]。

3 辅因子线粒体载体

辅因子(ADP、ATP、GDP、GTP、FAD 等)被广泛用作代谢反应的底物、抑制剂和激活剂^[47],影响细胞许多生理和生化功能,如信号转导、主动运输、细胞形态、应激反应以及蛋白质定位和磷酸化^[48]。在线粒体中,辅因子还参与许多合成代谢和分解代谢^[49],然而线粒体缺乏一些参与辅因子合成和再生途径的关键酶,且 IMM 对大多数辅因子(包括 ATP、GTP、FAD、硫辛酸等)是不可透的。因此,辅因子线粒体载体对维持细胞生理代谢和生理功能是必不可少的。

3.1 ADP/ATP 载体

细胞内产生 ATP 有两种合成途径,即氧化磷酸化和底物水平磷酸化。与底物水平磷酸化相比,氧化磷酸化在调节细胞内 ADP/ATP 水平方面更为重

要,因为此途径是再生 ATP 的主要途径^[48]。具体来说,真核微生物的氧化磷酸化发生在线粒体中,其中 ATP 合酶以 ADP 和磷酸盐为前体,催化 ATP 的再生。线粒体内的 ADP 通常由 ADP/ATP 载体由细胞质转入,同时向细胞质输出等量的线粒体 ATP^[50],因此 ADP/ATP 载体在有氧条件下对细胞能量代谢发挥着重要作用。目前,已确定的酿酒酵母 ADP/ATP 载体包括 Aac1p、Aac2p 和 Aac3p,但进一步研究发现,在有氧条件下仅需要 Aac2p^[51],而在厌氧条件下 Aac3p 发挥作用^[52]。在厌氧条件下细胞内 ATP 主要是由底物水平的磷酸化产生,Aac3p 可以将细胞质中合成的 ATP 导入线粒体以维持线粒体蛋白质稳态^[52]。

3.2 GDP/GTP 载体

5'-三磷酸鸟苷(GTP)对线粒体功能至关重要,是 RNA 合成、蛋白质合成及糖异生反应的必需前体,同时也是细胞内重要的能量物质^[53]。一般而言,细胞内合成 GTP 的生物反应包括:1)琥珀酰辅酶 A 合成酶将琥珀酰辅酶 A 转化为琥珀酸,同时生成 GTP;2)通过核苷二磷酸激酶将磷酸基团从 ATP 转移到 5'-二磷酸鸟苷(GDP)。然而,*S. cerevisiae* 线粒体内的琥珀酰辅酶 A 合成酶底物偏好性为 ADP,而不是 GDP,且线粒体中不存在核苷二磷酸激酶,其定位在线粒体膜间隙中^[54],因此需要将细胞质 GTP 导入线粒体。基因 YDL198c 编码的 Ggc1p 已被鉴定为 *S. cerevisiae* 的 GDP/GTP 线粒体载体,其可以介导 GTP、GDP、脱氧鸟苷-5'-三磷酸(dGTP)、脱氧鸟苷-5'-二磷酸(dGDP)、三磷酸肌苷(ITP)和二磷酸肌苷(IDP)的转运,其中 Ggc1p 对 GDP/GTP 的亲和力比 dGDP/dGTP 高 10 倍左右,是 IDP/ITP 的 100 倍^[55]。此外,Ggc1p 的缺失会导致 *S. cerevisiae* 线粒体中 GDP 水平升高,GTP 水平降低,证明了 Ggc1p 的主要生理功能是介导细胞质 GTP 的转入^[55]。

3.3 黄素腺嘌呤二核苷酸载体

黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)是黄素辅酶不可缺少的辅因子,在氧化还原稳态、蛋白质折叠、DNA 修复、脂肪酸 β -氧化、氨基酸氧化和胆碱代谢等方面发挥重要作用^[56-58]。*S. cerevisiae* 中的 FAD 由线粒体 FAD 合成酶(EC 2.7.7.2)在线粒体内合成,并通过一种不同于核黄素的吸收系统被输出到细胞质中。为了解 *S. cerevisiae* 的线粒体 FAD 载体 Flx1p 的作用,Bafunno 等构建了一个 Flx1p 基因敲除突变株,

对突变株与原始株线粒体就吸收核黄素、合成 FAD 以及 FAD 输出到细胞质的能力进行了比较,发现突变株的线粒体特异性地失去了输出 FAD 的能力,但没有失去吸收核黄素、黄素单核苷酸以及合成 FAD 的能力,表明 Flx1p 是线粒体 FAD 外排载体^[59]。此外,基因 *FLX1* 的缺失导致线粒体硫辛酰胺脱氢酶和琥珀酸脱氢酶活性的特异性降低。

3.4 辅酶 A 载体

辅酶 A (CoA) 是一种普遍分布的细胞内辅因子,据估计 CoA 及其衍生物酰基辅酶 A 参与 4% 的已知生化反应,涉及碳代谢、氨基酸代谢、脂肪酸合成和乙酰胆碱合成^[60]。在 *S. cerevisiae* 中,已鉴定的 CoA 载体 Leu5p 由基因 *YHR002w* 编码,基因 *YHR002w* 缺失会导致线粒体 CoA 浓度降低至 1/15,但不影响细胞质 CoA 水平^[61]。

3.5 硫胺素焦磷酸载体

硫胺素焦磷酸盐(ThPP)是细胞质转酮酶、线粒体乙酰乳酸合酶、细胞质丙酮酸脱羧酶、线粒体 α -酮戊二酸脱氢酶和线粒体丙酮酸脱氢酶 E1 组分的必需辅酶^[62]。基因 *YGR096w* 编码的 *S. cerevisiae* 的 ThPP 线粒体载体 Tpc1p 生理功能是将细胞质 ThPP 输入线粒体并将生成的硫胺素磷酸盐(ThMP)输出到细胞质,缺失 Tpc1p 的突变菌株在不添加硫胺素或支链氨基酸的情况下无法生长^[62]。

4 氨基酸线粒体载体

线粒体在细胞氮代谢中也起着关键作用,包括:1)部分氨基酸直接在线粒体中合成,同时氨基酸的碳骨架来源于线粒体 TCA 循环;2)细胞内 NH_4^+ 去除的关键反应发生在线粒体中^[63]。在线粒体中直接合成的氨基酸包括丙氨酸和支链氨基酸缬氨酸和异亮氨酸,其中丙氨酸由线粒体转氨酶 Alt1p 合成,消耗前体丙酮酸和谷氨酸^[64],而缬氨酸和异亮氨酸由丙酮酸在乙酰乳酸合酶 Ilv2p、乙酰乳酸变位酶 Ilv5p、二羧酸脱水酶 Ilv3p 和支链氨基酸氨基转移酶 Bat1p 催化下合成^[6]。此外,利用线粒体 TCA 循环中代谢物作为碳骨架的氨基酸包括谷氨酸、亮氨酸、赖氨酸和精氨酸^[25]。然而,迄今为止仅鉴定和表征了 5 种氨基酸的线粒体载体^[63],包括谷氨酸、天冬氨酸/谷氨酸、鸟氨酸、甘氨酸、S-腺苷甲硫氨酸。

4.1 谷氨酸载体

在 *S. cerevisiae* 中,已鉴定的线粒体谷氨酸载体是 Ymc2p,由基因 *YBR104wp* 编码^[63],Ymc2p 对谷氨酸的 K_m 值约为 15 $\mu\text{mol/L}$,Ymc2p 催化的谷氨酸单向转运蛋白 $V_{\max}$ 达到 4 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ ^[65]。然而,与已鉴定的人类谷氨酸载体不同,Ymc2p 缺乏与谷氨酸结合的功能域。并且,在某些特定条件下,Ymc2p 可以反向输出谷氨酸,目前 Ymc2p 的机制尚不清晰。此外,Ymc1p 与 Ymc2p 具有 65% 的序列同源性,也被认为是线粒体谷氨酸载体^[66]。

4.2 天冬氨酸/谷氨酸载体

Agc1p 已被确定为 *S. cerevisiae* 中天冬氨酸/谷氨酸线粒体载体,其能将细胞质谷氨酸输入线粒体从而合成鸟氨酸,并将线粒体中天冬氨酸、半胱氨酸亚磺酸输出到细胞质^[63]。Agc1p 是线粒体苹果酸/天冬氨酸线粒体穿梭通道的重要组成部分,可以平衡细胞内氧化还原稳态,并维持细胞在乙酸盐和脂肪酸上的生长,Agc1p 缺失突变体不能在以醋酸盐和油酸为碳源的合成培养基上生长^[8]。

4.3 鸟氨酸载体

鸟氨酸线粒体载体 Ort1p 转运鸟氨酸出线粒体的同时可能伴有瓜氨酸、精氨酸和赖氨酸的交换^[67],当细胞质精氨酸或赖氨酸浓度较高时,Ort1p 可以催化赖氨酸或精氨酸进入线粒体,同时转出鸟氨酸^[18]。Ort1p 的转运活性可被甲基汞、5'-磷酸吡哆醛、对氯汞苯磺酸盐、对羟基汞苯甲酸盐和 N-乙基马来酰亚胺抑制^[63]。此外,人来源的 Ort1p 可以运输一些碱性氨基酸,如组氨酸、赖氨酸、精氨酸、单甲基精氨酸、高精氨酸和不对称二甲基精氨酸^[63],且在尿素代谢中发挥重要作用,从线粒体转出瓜氨酸参与细胞质尿素循环,将瓜氨酸转化为无毒的鸟氨酸和尿素^[68]。

4.4 甘氨酸载体

基因 *YDL119cp* 编码的甘氨酸线粒体载体 Hem25p,其缺陷突变体中的线粒体对细胞质甘氨酸的吸收减少,同时呼吸效率降低,表明 Hem25p 负责将细胞质甘氨酸输入线粒体^[69]。此外,有研究者发现 Hem25p 不是唯一的线粒体甘氨酸载体,SLC25 家族成员 Ymc1 也是甘氨酸线粒体载体^[70]。

4.5 S-腺苷甲硫氨酸载体

S-腺苷甲硫氨酸载体为 Sam5p,可以将细胞质的 S-腺苷甲硫氨酸转运到线粒体中,参与 DNA、

RNA、蛋白质和甾醇甲基化反应,同时作为生物素和硫辛酸合成的辅助因子^[71]。研究表明,Sam5p也参与线粒体与细胞质之间S-腺苷高半胱氨酸的交换^[18]。

5 其他线粒体载体和穿梭通道

5.1 乙酰基穿梭通道

乙酰辅酶A是一种重要的中心碳代谢物,是线粒体TCA循环的前体,同时也是各种合成代谢反应的底物,对于细胞生长和能量代谢至关重要^[72]。真核微生物以葡萄糖为碳源生长时,不需要线粒体膜载体转运乙酰辅酶A,因为乙酰辅酶A直接由线粒体内丙酮酸脱氢酶(PDH)催化丙酮酸合成。然而,在醋酸盐、乙醇和脂肪酸等其他碳源上生长时,就需要线粒体载体来运输乙酰基,因为生成的乙酰辅酶A来源于细胞质或过氧化物酶体,而不是线粒体^[73]。目前,在*S. cerevisiae*中已经确定了乙酰基线粒体穿梭通道为肉碱穿梭通道:1)肉碱乙酰转移酶将乙酰基从乙酰辅酶A转移到肉碱,产生乙酰肉碱;2)乙酰肉碱通过由基因YOR100cp编码的肉碱转运蛋白Crc1p转运到线粒体中;3)乙酰基在线粒体肉碱乙酰转移酶的催化下从乙酰肉碱中释放出来^[74-75]。基因组注释显示*S. cerevisiae*具有3种肉碱乙酰转移酶,包括Cat2、Yat1和Yat2。其中,Cat2定位于过氧化物酶体和线粒体^[76],而Yat1定位于线粒体外膜^[77],Yat2定位于细胞质^[78]。另外,以葡萄糖为底物时乙酰辅酶A需转出线粒体,因为细胞质诸多代谢反应也需要乙酰辅酶A的参与(如脂质合成),所以有必要将线粒体乙酰辅酶A转运至细胞质。其中,柠檬酸穿梭通道是线粒体乙酰辅酶A外排至细胞质的主要途径:1)线粒体柠檬酸合酶催化乙酰辅酶A与草酰乙酸缩合,生成线粒体柠檬酸;2)线粒体柠檬酸通过柠檬酸盐载体Dic1p转运到细胞质中;3)细胞质柠檬酸被外源表达的细胞质柠檬酸裂解酶ACL裂解为草酰乙酸和乙酰辅酶A,进而参与细胞质的其他反应。目前,已经证实肉碱穿梭通道和柠檬酸穿梭通道都是*S. cerevisiae*中乙酰基转运的途径^[72]。

5.2 嘧啶核苷酸载体

在线粒体中,嘧啶核苷三磷酸(PyNTPs)是合成线粒体DNA和各种类型的RNA所必需的^[79-80]。然

而,PyNTPs两种合成方式(即从头合成和补救途径合成)都发生在线粒体外^[81],因此必须将细胞质PyNTPs导入线粒体。Rim2p已被鉴定为*S. cerevisiae*中的嘧啶核苷酸线粒体载体,其通过交换线粒体嘧啶核苷单磷酸来转运PyNTPs^[81]。一般来说,Rim2p的主要生理功能是输入细胞质PyNTPs用于线粒体DNA、RNA合成,同时输出线粒体嘧啶(脱氧)核苷单磷酸^[81]。

5.3 磷脂酸载体

Ups1被鉴定为脂质转运蛋白,可将磷脂酸转运通过线粒体膜^[82]。磷脂酸的转运需要Ups1与Mdm35(保证Ups1不被降解)动态组装,并在线粒体内膜中将磷脂酸转化为心磷脂^[82]。

除了上述线粒体载体和穿梭通道,还有其他一些已被报道的载体及通道,如由基因YMR166c编码的Mme1p被发现能够转运Mg²⁺,敲除Mme1p基因的突变体会导致线粒体中Mg²⁺水平升高^[83];基因YNL083w编码的Sal1p在Ca²⁺刺激下转运ADP、ATP和Pi^[84];基因YJR077c和YER053c编码的Mir1p和Pic2p被认为是转运Pi的线粒体载体^[85-86];基因YJL133w和YKR052c编码的Mrs3p和Mrs4p对线粒体中的铁转运起重要作用^[87]。

6 展望

作者讨论了MCs和代谢物穿梭通道在线粒体与细胞质和其他细胞器之间的代谢物交换,包括碳代谢物MCs、NAD(P)H和NAD(P)⁺代谢物线粒体穿梭通道、辅因子MCs、氨基酸MCs和其他一些已鉴定的其他线粒体载体和穿梭通道。尽管在过去的20年中已经开展了大量工作来识别和表征微生物MCs,但仍有许多转运机制尚不清晰。此外,在早期研究中MCs的一些特征性可能会被忽视,因此未来的工作应侧重于挖掘潜在的MCs及其转运机制,如氨基酸和谷胱甘肽线粒体输入。此外,研究MCs的活性与生理功能之间的相关性可有助于设计新的代谢途径,重塑细胞内代谢网络。更重要的是,阐明跨细胞器膜代谢物转运机制能够加深对细胞内代谢的理解,为MCs设计应用于微生物细胞工厂奠定基础。

参考文献:

- [1] NAVARRO-ESPÍ N R, SUASTE-OLMOS F, PERAZA-REYES L. Dynamic regulation of peroxisomes and mitochondria during fungal development[J]. **Journal of Fungi**, 2020, 6(4): 1-30.
- [2] SMITH C P, THORSNESS P E. The molecular basis for relative physiological functionality of the ADP/ATP carrier isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Genetics**, 2008, 179(3): 1285-1299.
- [3] AVALOS J L, FINK G R, STEPHANOPOULOS G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols[J]. **Nature Biotechnology**, 2013, 31(4): 335-341.
- [4] CAO X, YANG S, CAO C, et al. Harnessing sub-organelle metabolism for biosynthesis of isoprenoids in yeast[J]. **Synthetic and Systems Biotechnology**, 2020, 5(3): 179-186.
- [5] YEE D A, DENICOLA A B, BILLINGSLEY J M, et al. Engineered mitochondrial production of monoterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Metabolic Engineering**, 2019, 55: 76-84.
- [6] MALINA C, LARSSON C, NIELSEN J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology[J]. **FEMS Yeast Research**, 2018, 18(5): 1-17.
- [7] TAYLOR E B. Functional properties of the mitochondrial carrier system[J]. **Trends in Cell Biology**, 2017, 27(9): 633-644.
- [8] BIANCHI F, VAN'T-KLOOSTER J S, RUIZ S J, et al. Regulation of amino acid transport in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**; MMBR, 2019, 83(4): 1-38.
- [9] PÅHLMAN I L, LARSSON C, AVERÉT N, et al. Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002, 277(31): 27991-27995.
- [10] PALMIERI L, AGRIMI G, RUNSWICK M J, et al. Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276(3): 1916-1922.
- [11] MORITA K, MATSUDA F, OKAMOTO K, et al. Repression of mitochondrial metabolism for cytosolic pyruvate-derived chemical production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbial Cell Factories**, 2019, 18(1): 1-11.
- [12] PALMIERI L, LASORSA F M, DE PALMA A, et al. Identification of the yeast *ACR1* gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate[J]. **FEBS Letters**, 1997, 417(1): 114-118.
- [13] FERNÁNDEZ M, FERNÁNDEZ E, RODICIO R. *ACR1*, a gene encoding a protein related to mitochondrial carriers, is essential for acetyl-CoA synthetase activity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Molecular & General Genetics**, 1994, 242(6): 727-735.
- [14] YUZBASHEVA E Y, SCARCIA P, YUZBASHEV T V, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for the selective and high-level production of isocitric acid through manipulation of mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carriers[J]. **Metabolic Engineering**, 2021, 65: 156-166.
- [15] CASTEGNA A, SCARCIA P, AGRIMI G, et al. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2010, 285(23): 17359-17370.
- [16] YUZBASHEVA E Y, AGRIMI G, YUZBASHEV T V, et al. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid[J]. **Metabolic Engineering**, 2019, 54: 264-274.
- [17] PALMIERI L, VOZZA A, AGRIMI G, et al. Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1999, 274(32): 22184-22190.
- [18] PALMIERI F, MONNÉ M. Discoveries, metabolic roles and diseases of mitochondrial carriers: a review [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2016, 1863(10): 2362-2378.
- [19] LIU J, LI H, ZHAO G, et al. Redox cofactor engineering in industrial microorganisms: strategies, recent applications and future directions[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2018, 45(5): 313-327.
- [20] CHEN X, LI S, LIU L. Engineering redox balance through cofactor systems[J]. **Trends in Biotechnology**, 2014, 32(6): 337-343.
- [21] ORLANDI I, STAMERRA G, VAI M. Altered expression of mitochondrial NAD⁺ carriers influences yeast chronological lifespan by modulating cytosolic and mitochondrial metabolism[J]. **Frontiers in Genetics**, 2018, 9: 1-13.
- [22] ZHAO C, ZHAO Q, LI Y, et al. Engineering redox homeostasis to develop efficient alcohol-producing microbial cell factories[J].

- Microbial Cell Factories**, 2017, 16(1): 1-11.
- [23] KORY N, DE BOS J U, VAN DER RIJ T S, et al. MCART1/SLC25A51 is required for mitochondrial NAD transport[J]. **Science Advances**, 2020, 6(43): 1-14.
- [24] TISCHLER M E, FRIEDRICHS D, COLL K, et al. Pyridine nucleotide distributions and enzyme mass action ratios in hepatocytes from fed and starved rats[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1977, 184(1): 222-236.
- [25] SPINELLI J B, HAIGIS M C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism[J]. **Nature Cell Biology**, 2018, 20(7): 745-754.
- [26] TODISCO S, AGRIMI G, CASTEGNA A, et al. Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2006, 281(3): 1524-1531.
- [27] BAKKER B M, OVERKAMP K M, VAN MARIS A J, et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **FEMS Microbiol Reviews**, 2001, 25(1): 15-37.
- [28] XIAO W, WANG R S, HANDY D E, et al. NAD(H) and NADP(H) redox couples and cellular energy metabolism[J]. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2018, 28(3): 251-272.
- [29] GU Y, LYV X, LIU Y, et al. Synthetic redesign of central carbon and redox metabolism for high yield production of N-acetylglucosamine in *Bacillus subtilis* [J]. **Metabolic Engineering**, 2019, 51: 59-69.
- [30] WANG M, CHEN B, FANG Y, et al. Cofactor engineering for more efficient production of chemicals and biofuels [J]. **Biotechnology Advances**, 2017, 35(8): 1032-1039.
- [31] LARSSON C, PÅHLMAN I L, ANSELL R, et al. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Yeast**, 1998, 14(4): 347-357.
- [32] RIGOLET M, AGUILANI H, AVÉRET N, et al. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2004, 256: 73-81.
- [33] OVERKAMP K M, BAKKER B M, KÖTTER P, et al. Metabolic engineering of glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68(6): 2814-2821.
- [34] BEOPOULOS A, MROZOVA Z, THEVENIEAU F, et al. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008, 74(24): 7779-7789.
- [35] BAKKER B M, BRO C, KÖTTER P, et al. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Journal of Bacteriology**, 2000, 182(17): 4730-4737.
- [36] NISSEN T L, SCHULZE U, NIELSEN J, et al. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Microbiology**, 1997, 143(1): 203-218.
- [37] AL-SARYI N A, AL-HEJJAJ M Y, VAN ROERMUND C W T, et al. Two NAD-linked redox shuttles maintain the peroxisomal redox balance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Scientific Reports**, 2017, 7(1): 1-9.
- [38] VAN ROERMUND C W, ELGERSMA Y, SINGH N, et al. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under *in vivo* conditions [J]. **The EMBO Journal**, 1995, 14(14): 3480-3486.
- [39] BORST P. The malate-aspartate shuttle (Borst cycle): how it started and developed into a major metabolic pathway [J]. **IUBMB Life**, 2020, 72(11): 2241-2259.
- [40] CAVERO S, VOZZA A, DEL-ARCO A, et al. Identification and metabolic role of the mitochondrial aspartate-glutamate transporter in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Molecular Microbiology**, 2003, 50(4): 1257-1269.
- [41] AMOEDO N D, PUNZI G, OBRE E, et al. AGC1/2, the mitochondrial aspartate-glutamate carriers [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2016, 1863(10): 2394-2412.
- [42] XU J Z, YANG H K, ZHANG W G. NADPH metabolism: a survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis [J]. **Critical Reviews In Biotechnology**, 2018, 38(7): 1061-1076.
- [43] JIANG H W, CHEN Q, PAN J, et al. Rational engineering of formate dehydrogenase substrate/cofactor affinity for better performance in NADPH regeneration [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2020, 192(2): 530-543.
- [44] QIAO K, WASYLENKO T M, ZHOU K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism [J]. **Nature Biotechnology**, 2017, 35(2): 173-177.
- [45] WANG Y, SAN K Y, BENNETT G N. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology [J]. **Current Opinion in**

- Biotechnology**, 2013, 24(6):994-999.
- [46] MOREIRA D S M, RAGHEVENDRAN V, KÖTTER P, et al. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments[J]. **Metabolic Engineering**, 2004, 6(4): 352-363.
- [47] MAN Z, GUO J, ZHANG Y, et al. Regulation of intracellular ATP supply and its application in industrial biotechnology[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2020, 40(8): 1151-1162.
- [48] ZHOU J, LIU L, SHI Z, et al. ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives[J]. **Biotechnology Advances**, 2009, 27(1): 94-101.
- [49] LILL R, MÜHLENHOFF U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases[J]. **Annual Review of Biochemistry**, 2008, 77: 669-700.
- [50] BABOT M, BLANCARD C, ZEMAN I, et al. Mitochondrial ADP/ATP carrier: preventing conformational changes by point mutations inactivates nucleotide transport activity[J]. **Biochemistry**, 2012, 51(37): 7348-7356.
- [51] RUPRECHT J J, HELLAWEEL A M, HARDING M, et al. Structures of yeast mitochondrial ADP/ATP carriers support a domain-based alternating-access transport mechanism[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2014, 111(4): 426-434.
- [52] PEREIRA C, CAMOUGRAND N, MANON S, et al. ADP/ATP carrier is required for mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release in yeast apoptosis[J]. **Molecular Microbiology**, 2007, 66(3): 571-582.
- [53] MONNÉ M, PALMIERI F. Antiporters of the mitochondrial carrier family[J]. **Current Topics in Membranes**, 2014, 73: 289-320.
- [54] AMUTHA B, PAIN D. Nucleoside diphosphate kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, Ynk1p: localization to the mitochondrial intermembrane space[J]. **The Biochemical Journal**, 2003, 370(3): 805-815.
- [55] VOZZA A, BLANCO E, PALMIERI L, et al. Identification of the mitochondrial GTP/GDP transporter in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279(20): 20850-20857.
- [56] ABBAS C A, SIBIRNY A A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2011, 75(2): 321-360.
- [57] LIU S, HU W, WANG Z, et al. Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes[J]. **Microbial Cell Factories**, 2020, 19(1): 1-16.
- [58] GIANCASPERO T A, LOCATO V, BARILE M. A regulatory role of NAD redox status on flavin cofactor homeostasis in *S. cerevisiae* mitochondria[J]. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013, 2013: 1-17.
- [59] BAFUNNO V, GIANCASPERO T A, BRIZIO C, et al. Riboflavin uptake and FAD synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: involvement of the Flx1p carrier in FAD export[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279(1): 95-102.
- [60] NAQUET P, KERR E W, VICKERS S D, et al. Regulation of coenzyme A levels by degradation: the 'Ins and Outs' [J]. **Progress in Lipid Research**, 2020, 78: 1-44.
- [61] PROHL C, PELZER W, DIEKERT K, et al. The yeast mitochondrial carrier Leu5p and its human homologue Graves' disease protein are required for accumulation of coenzyme A in the matrix[J]. **Molecular and Cellular Biology**, 2001, 21(4): 1089-1097.
- [62] MAROBBO C M, VOZZA A, HARDING M, et al. Identification and reconstitution of the yeast mitochondrial transporter for thiamine pyrophosphate[J]. **The EMBD Journal**, 2002, 21(21): 5653-5661.
- [63] MONNÉ M, VOZZA A, LASORSA F M, et al. Mitochondrial carriers for aspartate, glutamate and other amino acids: a review[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019, 20(18): 1-24.
- [64] GARCÍA-CAMPUSANO F, ANAYA V H, ROBLEDO-ARRATIA L, et al. *ALT1*-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 2009, 55(4): 368-374.
- [65] PORCELLI V, VOZZA A, CALCAGNILE V, et al. Molecular identification and functional characterization of a novel glutamate transporter in yeast and plant mitochondria[J]. **Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics**, 2018, 1859(11): 1249-1258.
- [66] TROTTER P J, ADAMSON A L, GHRIST A C, et al. Mitochondrial transporters involved in oleic acid utilization and glutamate metabolism in yeast[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2005, 442(1): 21-32.

- [67] PALMIERI L, DE MARCO V, IACOBazzi V, et al. Identification of the yeast ARG-11 gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis[J]. **FEBS Letters**, 1997, 410(2/3): 447-451.
- [68] MORRIS S M, KEPKA-LENHART D. Hormonal induction of hepatic mitochondrial ornithine/citrulline transporter mRNA[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2002, 294(4): 749-752.
- [69] LUNETTI P, DAMIANO F, DE BENEDETTO G, et al. Characterization of human and yeast mitochondrial glycine carriers with implications for heme biosynthesis and anemia[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2016, 291(38): 19746-19759.
- [70] FERNÁNDEZ-MURRAY J P, PRYKHOZHII S V, DUFAY J N, et al. Glycine and folate ameliorate models of congenital sideroblastic anemia[J]. **PLoS Genetics**, 2016, 12(1): 1-19.
- [71] MAROBIO C M, AGRIMI G, LASORSA F M, et al. Identification and functional reconstitution of yeast mitochondrial carrier for S-adenosylmethionine[J]. **The EMBO Journal**, 2003, 22(22): 5975-5982.
- [72] STRIJBIS K, DISTEL B. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism[J]. **Eukaryotic Cell**, 2010, 9(12): 1809-1815.
- [73] ZHOU H, LORENZ M C. Carnitine acetyltransferases are required for growth on non-fermentable carbon sources but not for pathogenesis in *Candida albicans*[J]. **Microbiology**, 2008, 154(2): 500-509.
- [74] VAN ROERMUND C W, HETTEM A E H, VAN DEN BERG M, et al. Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Acp2p[J]. **The EMBO Journal**, 1999, 18(21): 5843-5852.
- [75] HYNES M J, MURRAY S L, ANDRIANOPOULOS A, et al. Role of carnitine acetyltransferases in acetyl coenzyme A metabolism in *Aspergillus nidulans*[J]. **Eukaryotic Cell**, 2011, 10(4): 547-555.
- [76] ELGERSMA Y, VAN ROERMUND C W, WANDERS R J, et al. Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene[J]. **The EMBO Journal**, 1995, 14(14): 3472-3479.
- [77] SCHMALIX W, BANDLOW W. The ethanol-inducible *YAT1* gene from yeast encodes a presumptive mitochondrial outer carnitine acetyltransferase[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1993, 268(36): 27428-27439.
- [78] FRANKEN J, KROPENSTEDT S, SWIEGERS J H, et al. Carnitine and carnitine acetyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a role for carnitine in stress protection[J]. **Current Genetics**, 2008, 53(6): 347-360.
- [79] MAROBIO C M, DI NOIA M A, PALMIERI F. Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: bacterial expression, reconstitution and functional characterization [J]. **The Biochemical Journal**, 2006, 393(2): 441-446.
- [80] FROSCHAUER E M, RIETZSCHEL N, HASSLER M R, et al. The mitochondrial carrier Rim2 co-imports pyrimidine nucleotides and iron[J]. **The Biochemical Journal**, 2013, 455(1): 57-65.
- [81] YOON H, ZHANG Y, PAIN J, et al. Rim2, a pyrimidine nucleotide exchanger, is needed for iron utilization in mitochondria[J]. **The Biochemical Journal**, 2011, 440(1): 137-146.
- [82] CONNERTH M, TATSUTA T, HAAG M, et al. Intramitochondrial transport of phosphatidic acid in yeast by a lipid transfer protein[J]. **Science**, 2012, 338(6108): 815-818.
- [83] CUI Y, ZHAO S, WANG J, et al. A novel mitochondrial carrier protein Mme1 acts as a yeast mitochondrial magnesium exporter [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2015, 1853(3): 724-732.
- [84] CAVERO S, TRABA J, DEL ARCO A, et al. The calcium-dependent ATP-Mg/Pi mitochondrial carrier is a target of glucose-induced calcium signalling in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **The Biochemical Journal**, 2005, 392(3): 537-544.
- [85] MÜHLENHOFF U, STADLER J A, RICHHARDT N, et al. A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003, 278(42): 40612-40620.
- [86] ZHANG Y, LYVER E R, KNIGHT S A, et al. Mrs3p, Mrs4p, and frataxin provide iron for Fe-S cluster synthesis in mitochondria [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2006, 281(32): 22493-22502.
- [87] HAMEL P, SAINT-GEORGES Y, DE PINTO B, et al. Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*[J]. **Molecular Microbiology**, 2004, 51(2): 307-317.