

## 叶绿体ATP合酶生物发生的研究进展

张琳, 彭连伟\*

上海市植物分子科学重点实验室, 上海师范大学生命科学学院, 上海200234

**摘要:** 叶绿体ATP合酶属于F-型ATP合酶, 它利用光合电子传递过程中产生的跨膜质子动力势催化ADP与无机磷合成ATP, 实现光能向化学能的转化。叶绿体ATP合酶由9种亚基共26个蛋白组成, 它的生物发生不但需要叶绿体基因的正常表达, 还需要各亚基以特定的组装步骤进行高效的装配, 在此过程中有多种蛋白作为辅助因子参与生物发生的调控。本文就叶绿体ATP合酶的生物发生调控过程以及相关调控因子的生物学功能进行了分析和总结。

**关键词:** 光合作用; 叶绿体ATP合酶; 生物发生; 组装; 基因表达

叶绿体ATP合酶(CF<sub>1</sub>-CF<sub>0</sub> ATP synthase)位于叶绿体类囊体膜上, 属于F型ATP合酶(F-ATPase), 这是一类世界上最小、最精密的“纳米分子马达”。叶绿体ATP合酶的主要功能是通过光合磷酸化作用合成ATP。光合生物在进行光合作用过程中, 光系统II和光系统I吸收光能、引起电荷分离, 从水中摄取电子、释放氧气并进一步推动电子在光合膜上依次传递, 最终生成NAD(P)H。与此同时, 光合电子传递耦联着质子在光合膜囊腔中累积, 形成质子动力势, 用于驱动叶绿体ATP合酶将ADP合成为ATP。这个光合生物利用光能耦联光合电子传递与磷酸化作用催化ADP与Pi形成ATP的反应称为光合磷酸化(photophosphorylation), 它可以为光合生物提供能量来源, 是地球上最重要的化学反应之一。所以叶绿体ATP合酶是光合磷酸化的关键酶, 它最终使光合生物实现了光能向化学能的转化。

### 1 叶绿体ATP合酶的结构和功能

叶绿体ATP合酶和其他F-型的ATP合酶类似, 包括突出于膜外的CF<sub>1</sub>和镶嵌于膜内的CF<sub>0</sub> 2个亚复合物(图1) (Hahn等2018)。CF<sub>1</sub>为亲水亚复合物, 由 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$  5种亚基组成, 其化学计量比为3:3:1:1:1, 主要负责催化ATP的合成或水解。CF<sub>0</sub>为疏水亚复合物, 由I、II、III和IV 4种亚基以化学计量比1:1:14:1组成, 主要负责形成跨膜质子通道和固定CF<sub>1</sub>的支架(Mellwig和Böttcher 2003; von Ballmoos等2009; Allen等2011)。

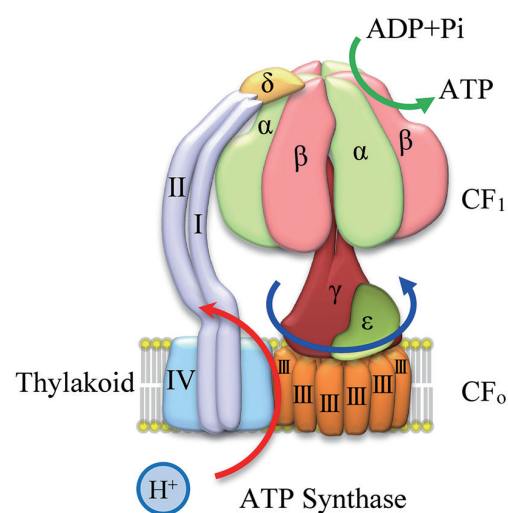


图1 叶绿体ATP合酶结构与工作模式图

Fig.1 The structural representation and working model for chloroplast ATP synthase

叶绿体ATP合酶由突出于膜外的亲水亚复合物CF<sub>1</sub>和镶嵌于膜内的疏水亚复合物CF<sub>0</sub>组成, CF<sub>1</sub>主要负责催化ATP的合成和水解, CF<sub>0</sub>负责形成跨膜质子通道。在光合作用过程中, 类囊体囊腔积累的质子通过CF<sub>0</sub>的IV亚基形成的跨膜质子通道流入基质将驱动III亚基形成的c-环高速旋转, 进而带动结合在c-环上的中央茎 $\gamma\epsilon$ 的旋转。由于 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基形成的 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体被 $\delta$ 与I/II/IV亚基形成的外周柄固定在类囊体膜上, 因此插入 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体内的 $\gamma$ 亚基的N端和C端会在 $\alpha_3\beta_3$ 空腔内转动从而引起 $\alpha_3\beta_3$ 的构象发生变化, 催化合成ATP (Mellwig和Böttcher 2003; Weber 2007)。

收稿 2019-03-20 修定 2019-05-30

资助 国家自然科学基金青年科学基金(31700202)、中国博士后科学基金(2017M621511)、上海植物种质资源工程技术研究中心(17DZ2252700)和上海市科学技术委员会(18DZ2260500)。

\* 通讯作者(penglianwei@shnu.edu.cn)。

在CF<sub>1</sub>亚复合物中, 3个 $\alpha$ 亚基和3个 $\beta$ 亚基交替排列形成 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体, 形成一个上部封闭、下部开口、中间有空腔的蛋白球体。 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体具有6个核苷酸结合位点, 即3个催化位点(catalytic site, CS)和3个非催化调节位点(NCS), 它们分别位于 $\alpha/\beta$ 亚基的交界面处, 负责催化ATP的合成或水解。 $\gamma$ 和 $\epsilon$ 亚基形成中央茎(central stalk), 并与14个III亚基紧密排列形成的疏水性跨膜圆柱体结构(c-环, c-ring)结合, 共同形成“转子”。与此同时,  $\gamma$ 亚基的N端和C端形成的 $\alpha$ 螺旋螺旋结构插入 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体的空腔内。另一个CF<sub>1</sub>亚基 $\delta$ 则与I/II/IV亚基结合形成外周的“定子”部分, 同时IV亚基紧靠在c-环上形成质子跨膜转运通道。光合作用过程中, 质子通过跨膜通道由类囊体膜囊腔向基质跨膜转移时会驱动c-环在类囊体膜上高速转动, 进而带动中央茎 $\gamma\epsilon$ 的高速旋转。由于 $\alpha_3\beta_3$ 被 $\delta$ 和I、II亚基固定, 所以 $\gamma$ 亚基的N和C末端会在 $\alpha_3\beta_3$ 空腔内转动并引起 $\alpha_3\beta_3$ 的构象发生变化, 从而催化ATP的合成(Mellwig和Böttcher 2003; Weber 2007)。

## 2 叶绿体ATP合酶基因表达的调控

虽然人们对叶绿体ATP合酶的结构和工作机理有比较深入的了解, 但对它生物发生机理的认识却不是很清楚。研究表明, 对于光合膜上的大分子蛋白复合物, 光合生物在进化过程中获得了一系列高效、复杂的生物发生策略来确保其快速累积和修复。这个策略一般可分为基因表达调控和组装调控两个层面。首先, 在通常情况下, 光合膜复合物的蛋白亚基是由核基因组和叶绿体基因组共同编码的, 其基因的表达不但需要两套遗传系统的相互协调, 还需要一些特异性的调控因子对叶绿体编码基因从转录到翻译等多个水平进行调控。其次, 类囊体膜大分子蛋白复合物的组装是一个非常复杂的多步骤有序过程, 其间需要大量的组装因子作为分子伴侣特异性地作用于每一个步骤。此外, 还有很多研究表明, 叶绿体基因表达和组装过程是紧密耦联、相互调节的, 这样的相互调控过程既可以避免蛋白亚基的过多合成, 又可以促进复合物的组装和修复。和其他光合膜复合物一样, 叶绿体ATP合酶的生物发生过程也主

要包括亚基的基因表达和组装调控两个方面。

由于高等植物缺少ATP合酶常常无法光合自养, 这种致死的表型使得在早期对高等植物ATP合酶生物发生的研究变得异常困难。然而由于衣藻可以进行光合异养, 因此在培养体系中加入一些无机物后, 衣藻ATP合酶的突变体则可以正常生长, 这极大方便了突变株的保存和实验研究的需求。归功于这些优点, 早期筛选到了一批不能光合自养的衣藻ATP合酶突变体并进行了分类。其中一类是核基因发生突变的突变体, 通过分析后发现这些突变基因并不编码叶绿体ATP合酶的亚基, 而是编码一些未知的调控因子分别在调节叶绿体基因的转录、转录本稳定性以及翻译等环节起作用。由于当时克隆基因的技术不成熟, 并未克隆到相关突变基因, 直到2011年才克隆得到衣藻*TDA1*基因。衣藻*TDA1*基因编码的蛋白含有8个OPR结构域(octotrico peptide repeat, 由38个简并氨基酸组成), 它可以结合*atpA*的5'非翻译区并将其募集到核糖体上从而激活*atpA* mRNA的翻译(Eberhard等2011)。

随着分子生物学技术的发展, 基因克隆已经成为实验室的常规技术, 越来越多的高等植物叶绿体ATP合酶基因表达调控基因被克隆出来, 它们作用于叶绿体ATP合酶基因表达的多个阶段。编码高等植物叶绿体ATP合酶亚基的9个基因中有3个(*atpC*、*atpD*和*atpG*)为核基因, 其余6个为叶绿体基因, 后者分布于2个多顺反子*atpB-atpE*和*atpI-atpH-atpF-atpA*上(Malik Ghulam等2012)。PPR10是在玉米中发现的一个含有PPR结构域(pentatricopeptide repeats)的叶绿体蛋白, 缺少此蛋白的玉米叶片呈白化表型(Pfalz等2009)。研究表明PPR10可以结合在*atpI* mRNA的3'端和*atpH* mRNA的5'端(两者有一定程度的重合), 同时与*psaJ* mRNA(编码光系统I复合物的PsaJ亚基)的3'端也有弱的相互作用。PPR10通过结合在mRNA的特定序列, 形成类似帽子的结构可以阻止核酸外切酶从3'端或5'端对mRNA的降解(Pfalz等2009)。进一步研究表明, PPR10通过结合*atpH* mRNA的5'端特异性序列还释放了核糖体的结合区域, 从而促进了*atpH*的翻译起始过程(Prikryl等2011)。

研究人员通过高通量突变体筛选体系获得了一个叶绿体ATP合酶含量特异性降低的突变体 *bfa2*, 通过图位克隆发现 *BFA2* 基因也编码一个PPR蛋白, 属于P-class类型, 缺少BFA2蛋白会导致 *atpH/F* 转录本的缺失, 进一步造成了叶绿体ATP合酶的含量特异性降低(Zhang等2019)。进一步研究表明BFA2蛋白特异性地结合在 *atpF-atpA* 基因间序列, 通过形成类似帽子的结构阻止核酸外切酶从3'端对 *atpH/F* mRNA的降解。由此可见, 高等植物叶绿体中 *atpH/F* mRNA的稳定性需要2个PPR蛋白——PPR10和BFA2的调控, 它们分别结合在 *atpH/F* 转录本的5'和3'端起到保护mRNA防止核酸外切酶降解的作用(Pfalz等2009; Zhang等2019)。虽然BFA2也可以结合在 *atpA* 的5'端, 但是蛋白质标记实验和多聚核糖体分析实验表明 *atpA* 的翻译起始并没有受到影响, 所以BFA2与PPR10不同, 可能不参与调控蛋白质的翻译起始过程(Zhang等2019)。

在玉米中发现的ATP4蛋白同样是一个含有PPR结构域的叶绿体基质蛋白。除了PPR结构域, 在ATP4的C端还含有一个SMR (small MutS-related) 结构域。最近这个结构域被证明可能具有潜在的DNA核酸酶活性(Zhou等2017)。进一步研究表明, ATP4蛋白可能结合在 *atpB/E* mRNA的5'非翻译区, 从而促进了核糖体与mRNA的结合或底物蛋白的翻译(Zoschke等2012)。拟南芥中的SVR7蛋白是玉米ATP4的同源蛋白, *svr7* 突变体中ATP合酶含量为野生型的25%左右。研究发现, 拟南芥 *svr7* 突变体中 *atpB/E* mRNA结合多聚核糖体的能力也下降, 说明这两个同源蛋白在功能上可能是一致的(Zoschke等2013)。

由于编码叶绿体ATP合酶CF<sub>1</sub>I亚基的 *atpF* 基因含有一个内含子, *atpF* 基因在转录后需要进行剪接反应。 *atpF* 内含子属于II型内含子家族, 它的剪接需要几种蛋白质因子, 例如CRS1、RNC1、WHY1、WTF1、MatK和AEF1/MPR25的参与(Till等2001; Watkins等2007; Prikryl等2008; Kroeger等2009; Zoschke等2010; Yap等2015)。其中AEF1/MPR25蛋白也是一个PPR蛋白, 但是它不但定位于叶绿体, 还定位于线粒体。在叶绿体中, 缺失AEF1/MPR25蛋白导致 *atpF* 内含子的剪接受到抑制, 同

时 *atpF* 基因编辑位点的编辑也受到影响(Yap等2015)。在拟南芥和水稻线粒体中, AEF1/MPR25蛋白还参与了 *nad5* 基因的编辑。所以AEF1/MPR25蛋白是一个定位于两个细胞器的基因编辑和剪接因子。

### 3 叶绿体ATP合酶的组装及组装因子

F-型ATP合酶作为精巧精密的分子马达, 它是如何装配成有功能复合物的是一个具有挑战性的课题。叶绿体ATP合酶的9种亚基由2个基因组共同编码, 其多个亚基的化学计量比也不尽相同。如何确保各个亚基以特定的比例生成并快速组装是光合作用功能发挥的前提条件。类比于线粒体ATP合酶的组装过程, 科学家推测叶绿体ATP合酶的组装也是一个多步骤分步组装的过程, 在此过程中会在叶绿体的不同部位瞬时形成多个独立的组装中间体(图2)。首先, I、II和IV亚基在叶绿体内合成后在光合膜上组装成I/II/IV“定子”部分, III亚基组装成含有14个亚基的c-环亚复合物, 后者准备招募CF<sub>1</sub>亚复合物。同时, CF<sub>1</sub>亚复合物的主要部分 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 可能在叶绿体基质或类囊体膜上合成。随后, CF<sub>1</sub>亚复合物结合在c-环亚复合物上, 并和I/II/IV亚复合物以及 $\delta$ 亚基整合在一起形成有功能的ATP合酶复合物(图2)。

叶绿体ATP合酶在组装过程中也需要大量特异性的分子伴侣蛋白在特定的过程进行协助组装(Rühle和Leister 2015)。详细研究这些组装因子的生物学功能会极大地促进人们对叶绿体ATP合酶组装的认识。迄今为止, 通过生物化学以及遗传学等多种策略, 人们发现了6个组装因子(Alb4、CGL160、YL1、PAB、BFA3/CGLD11和BFA1), 它们分别参与叶绿体ATP合酶复合物组装的各个调控过程(Benz等2009; Rühle等2014; Firstedt等2015; Mao等2015; Chen等2016; Grahl等2016; Zhang等2016, 2018)。

拟南芥Alb4蛋白属于YidC/Oxa1/Alb3家族成员, 它们在叶绿体、线粒体以及细菌中主要用来辅助底物蛋白插入到细胞膜上或组装到细胞膜上的复合物中(Kuhn等2003; Yi等2005)。在高等植物和绿藻叶绿体的类囊体膜上发现了2个YidC/Oxa1/



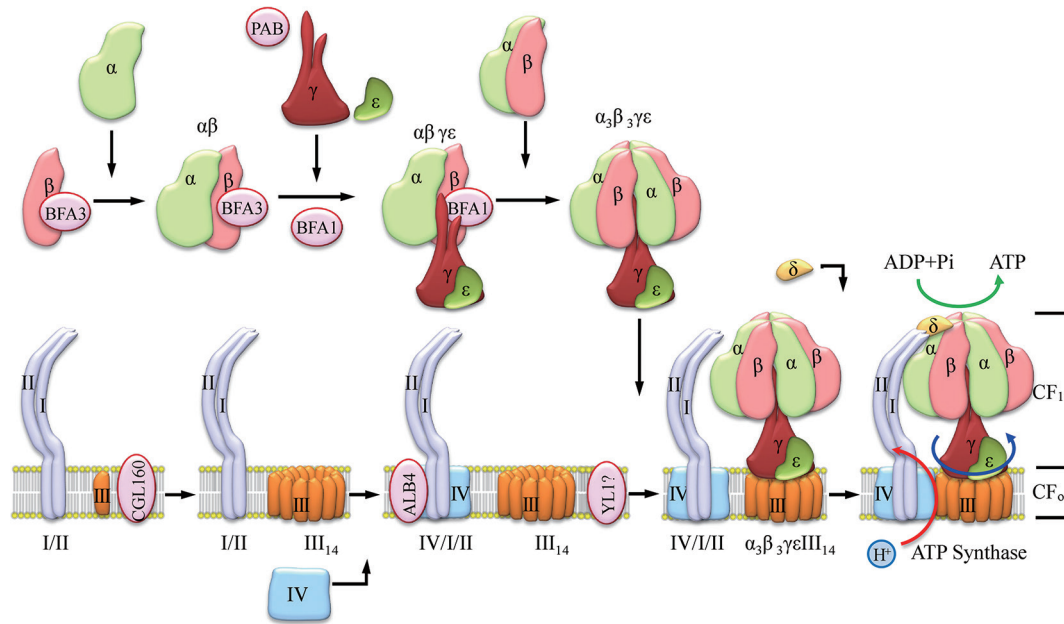


图2 叶绿体ATP合酶组装过程模式图

Fig.2 Schematic representation of assembly process of chloroplast ATP synthase complex

类似于线粒体ATP合酶的组装过程,叶绿体ATP合酶的组装也是一个多步骤分步组装的过程,其间会在叶绿体的不同部位瞬时形成多个独立的组装中间体,这一过程需要多个蛋白因子(红色椭圆)参与调控。首先, I、II和IV亚基在叶绿体内合成后在光合膜上组装成I/II/IV“定子”部分, CGL160蛋白促进14个III亚基组装成c-环复合物, 后者准备招募CF<sub>1</sub>亚复合物。同时,  $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基通过BFA3/CGLD11蛋白的辅助形成二聚体,  $\alpha\beta$ 二聚体与 $\gamma$ 亚基在PAB和BFA1蛋白的协助下在叶绿体基质或类囊体膜上组装形成CF<sub>1</sub>亚复合物的主要部分 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 复合物。随后, CF<sub>1</sub>亚复合物在Alb4蛋白的促进下结合在c-环复合物上, 进而和I/II/IV亚复合物以及 $\delta$ 亚基整合在一起形成有功能的ATP合酶复合物。目前YL1参与组装调控的具体过程还不清楚(问号表示)。

Alb3家族成员Alb3和Alb4。缺失Alb3蛋白的拟南芥突变体叶片色素缺失, 类囊体膜发育受阻, 植物无法光合自养(Sundberg等1997)。研究表明, Alb3直接结合着cpSecY转位酶而促进了捕光天线蛋白的跨类囊体插入过程(Klostermann等2002)。相反, 虽然缺失Alb4蛋白突变体的生长也受到严重的抑制, 但是可以光合自养。免疫印迹分析表明, *alb4*突变体中叶绿体ATP合酶的含量大大降低, 进一步利用Co-IP、BiFC等技术证明了Alb4蛋白可以和CF<sub>1</sub> $\beta$ 、CF<sub>0</sub>II直接相互作用(Benz等2009), 表明Alb4蛋白可能稳定或促进了CF<sub>1</sub>亚复合物与CF<sub>0</sub>亚复合物的整合(Benz等2009)。

拟南芥CGL160蛋白也定位于叶绿体类囊体膜上, 其C端部分和原核生物的ATP SYNTHASE PROTEIN1 (Atp1/Unc1)蛋白具有一定的相似性。这个Atp1/Unc1结构域包含4个跨膜 $\alpha$ 螺旋, 在多种细菌中被证明可以促进ATP合酶c-环的形成(Ozaki

等2008)。在拟南芥中, 缺失CGL160的突变体叶绿体ATP合酶的含量降低到野生型的10%~30%, 而其他光合膜复合物含量仅稍微下降(Rühle等2014; Fristedt等2015)。进一步利用分裂泛素化酵母双杂交证明CGL160和CF<sub>0</sub>III亚基具有强的相互作用, 与CF<sub>0</sub>II也有微弱的相互作用。这些数据证明了拟南芥CGL160蛋白也促进了叶绿体ATP合酶c-环的形成(Rühle等2014), 这类蛋白在功能上具有一定的相似性。

叶绿体蛋白YL1是从水稻突变体中鉴定到的蛋白, 缺失此蛋白的突变体叶绿体ATP的含量同样也大大降低(Chen等2016)。YL1含有一个跨膜区并且在高等植物中高度保守, 说明它可能是一个类囊体膜蛋白。酵母双杂交和BiFC实验证明YL1蛋白可以和CF<sub>1</sub> $\beta$ 亚基相互作用, 表明它可能通过和CF<sub>1</sub> $\beta$ 亚基的直接互作而促进了叶绿体ATP合酶的组装(Chen等2016)。

与上述三个组装因子不同的是, 拟南芥PAB是一个叶绿体基质蛋白。PAB蛋白虽然没有已知功能的结构域, 但可以和CF<sub>1</sub>γ特异性相互作用。除此之外, 体外重组实验表明, CF<sub>1</sub>γ亚基经Cpn60复合物帮助下折叠成正确构象后, 与PAB蛋白相互作用, 形成具有组装活性的PAB-CF<sub>1</sub>γ中间复合物, 当这个复合物与CF<sub>1</sub>α/β异源二聚体相互作用时, 可能通过竞争作用替换PAB蛋白, 而与CF<sub>1</sub>γ亚基形成CF<sub>1</sub>活性中心复合物α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ (Mao等2015)。这些研究结果表明PAB作用于Cpn60复合物之后, 它们协同促进了CF<sub>1</sub>γ亚基的正确折叠和后续组装中间体的行成, 从而辅助了CF<sub>1</sub>亚复合物的高效组装(Mao等2015)。

拟南芥BFA3/CGLD11蛋白也是一个叶绿体基质蛋白, 缺失此蛋白后叶绿体ATP合酶的含量降低至野生型的25%左右(Grahl等2016; Zhang等2016)。同位素蛋白标记、酵母双杂交和免疫共沉淀等实验结果表明, BFA3特异性地与CF<sub>1</sub>β亚基催化结构域相互作用而促进了叶绿体ATP合酶的CF<sub>1</sub>亚复合物的组装。进一步研究发现, BFA3与β亚基的催化位点在进化上具有一致性, 这种协同进化关系可能有助于高等植物叶绿体ATP合酶获得更高的催化活性或组装效率, 从而使高等植物以及叶绿体能够更好地响应环境变化(Zhang等2016)。虽然也有证明表明BFA3/CGLD11可能定位于线粒体, 但线粒体ATP合酶的含量没有受到影响, 说明BFA3/CGLD11在线粒体中可能不参与ATP合酶的组装或者其在线粒体ATP合酶组装过程中的功能不像在叶绿体中那么重要(Grahl等2016)。

拟南芥BFA1也是一个叶绿体基质蛋白, 缺失BFA1蛋白导致叶绿体ATP合酶的含量降低到野生型的10%左右。研究表明, BFA1蛋白通过与叶绿体ATP合酶的β、γ和ε亚基相互作用, 而介导了叶绿体ATP合酶CF<sub>1</sub>亚复合物的组装过程。为了准确解析BFA1蛋白是如何促进叶绿体ATP合酶的组装过程, 研究人员解析了拟南芥BFA1蛋白2.8 Å的晶体结构, 结果显示BFA1由2个相互几乎垂直连接的β桶组成(Zhang等2018)。Zhang等(2018)虽然没有解析BFA1-CF<sub>1</sub>β/γ/ε组装中间体的结构, 但通过酵母双杂交以及分子对接等实验得到了BFA1与

CF<sub>1</sub>β/γ相互作用的准确位置, 发现BFA1蛋白也结合在CF<sub>1</sub>β的催化结构域部分, 但与BFA3蛋白的位置相比要更靠近CF<sub>1</sub>α/β六聚体的囊腔位置。同时, BFA1蛋白和CF<sub>1</sub>γ亚基的N-和C-端2个短小的α螺旋相互作用。通过模拟BFA1与CF<sub>1</sub>β/γ相互作用位置表明, BFA1可以很巧妙地把CF<sub>1</sub>β/γ亚基固定在一个特定的位置, 并且这个位置和组装完毕的CF<sub>1</sub>亚复合物中CF<sub>1</sub>β/γ亚基的位置相似。据此提出, BFA1作为一个分子支架首先促进α/β异源二聚体与γ亚基的结合, 后续α/β亚基的结合将导致γ亚基进行9–28 Å以及15°的旋转等一系列位置微调, 最终完成CF<sub>1</sub>亚复合物的组装过程(Zhang等2018)。

由于CF<sub>1</sub>亚复合物的α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ是ATP合酶催化生成ATP的关键模块, 人们对它的组装过程进行了大量的研究。前期研究中, 通过表达ATP合酶亚基以及一系列的分子伴侣蛋白并进行体外重组分析, 人们提出CF<sub>1</sub>α、β亚基可能首先形成二聚体, 继而组装成α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>蛋白球体。之后γ亚基的N/C端的α螺旋再插入到腔体内形成CF<sub>1</sub>亚复合物(Gao等1995; Strotmann等1998; Rühle和Leister 2015)。也有科学家提出了另一种组装模型: CF<sub>1</sub>α、β亚基可能围绕着由γ亚基N和C末端形成的支柱进行依次、环周组装, 最终形成α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ亚复合物(Wollman等1999; Choquet和Vallon 2000; Hippler等2002; Mao等2015)。由于α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ亚复合物结构及组装过程的复杂性, 两种模型都没有很好的实验结果支持。BFA1晶体结构以及分子对接分析结果更符合后一种组装模型的过程(Zhang等2018) (图2)。

除了上述多个核基因编码的分子伴侣蛋白参与了叶绿体ATP合酶的组装过程, 3个核基因(*atpC1*、*atpD*和*atpG*)编码的亚基也在这一组装过程中发挥着重要作用。*atpC1*基因编码叶绿体ATP合酶γ亚基, 缺失γ亚基的拟南芥突变体*dpa1*不能进行光合自养, *dpa1*中ATP合酶亚基的含量低于野生型的5%。体内蛋白质标记分析表明, 虽然*dpa1*中ATP合酶α和β亚基能够正常合成并组装至类囊体膜上, 但γ亚基的缺失仍然会导致ATP合成酶复合物的组装受阻(Dal Bosco等2004)。*atpD*基因编码叶绿体ATP合酶δ亚基, 缺失δ的拟南芥*atpd-1*突变体呈现苗期致死表型。δ亚基的缺失不仅影响CF<sub>1</sub>

的积累,还影响CF<sub>0</sub>亚基的积累(Maiwald等2003)。*atpG*基因编码叶绿体ATP合酶II亚基,缺失*atpG*基因的拟南芥突变体*atpg*呈白化致死表型,II亚基的缺失虽然不影响CF<sub>1</sub>亚复合物的累积,但影响了CF<sub>1</sub>-CF<sub>0</sub>复合物的累积(Kong等2013)。因此,3个核基因编码的亚基( $\gamma$ 、 $\delta$ 和II)对于叶绿体ATP合酶的累积和功能也至关重要。

#### 4 叶绿体ATP合酶基因表达与组装的相互调控关系

叶绿体ATP合酶的亚基分属于细胞核和叶绿体基因组两套遗传系统,并且亚基的化学计量比不均一,因此叶绿体ATP合酶的生物发生需要两套遗传系统基因表达的紧密协调。为了确保叶绿体ATP合酶亚基以正确的化学计量比合成与积累,叶绿体不仅进化出一系列特异性的调节因子,而且衣藻叶绿体中还存在着一种称为CES (control epistasy of synthesis)的调控机制(Drapier等2007)。在CES调控过程中,叶绿体ATP合酶复合物的组装与其亚基的合成是紧密耦合的。首先,核基因编码的 $\gamma$ 亚基的累积是叶绿体编码的 $\beta$ 亚基的翻译所必需的,即从细胞质中转运进叶绿体的 $\gamma$ 亚基是 $\beta$ 亚基合成的前提条件。之后, $\beta$ 亚基的翻译又会进一步激活叶绿体编码的 $\alpha$ 亚基的翻译,合成的 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基在一系列组装伴侣的协助下形成 $\alpha/\beta$ 异源二聚体。 $\alpha/\beta$ 异源二聚体除了可以进一步组装成完整的ATP合酶外,过剩的 $\alpha/\beta$ 异源二聚体还可以与*atpB* mRNA的5' UTR结合并抑制*atpB*的翻译,进而抑制了 $\alpha$ 亚基的翻译。当 $\gamma$ 亚基与 $\alpha/\beta$ 异聚体结合形成 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 复合物, $\alpha/\beta$ 异聚体对亚基翻译的抑制作用就会减弱(Drapier等2007)。这一机制能够防止 $\alpha/\beta$ 亚基的过度累积。

CES是否存在于陆地植物中目前尚存在争议(Rühle和Leister 2015),陆地植物是如何在叶绿体ATP合酶生物发生过程中实现以正确的化学计量比合成亚基的还不清楚。然而,根据最近对叶绿体ATP合酶突变体刻画的深入,发现高等植物叶绿体ATP合酶的基因表达和组装过程也是紧密耦合的。例如,在突变体*cgl160*、*bfa1*以及*bfa2*中,*atpB/E*

转录本含量大大降低;而在*bfa3*突变体中,*atpB/E*转录本含量则升高(Zhang等2018, 2019)。同样,在突变体*cgl160*和*bfa1*中,*atpH/F*的含量升高,而在*bfa3*突变体中,*atpH/F*的含量则降低,与*atpB/E*的含量呈相反的调节趋势。由于以上突变体中叶绿体ATP合酶的组装缺陷发生于不同的过程,所以可以推测是不同的组装中间体对*atpB/E*和*atpH/F*转录本含量进行着精密的调节。叶绿体除了对*atpB/E*和*atpH/F*转录本含量进行调节外,对它们结合多聚核糖体的能力也进行着调节。例如在突变体*cgl160*、*bfa1*以及*bfa2*中,初级*atpB/E*双顺反子结合多聚核糖体的能力下降,但其他*atpB/E*转录本结合多聚核糖体的能力则没有受到影响(Zhang等2018, 2019),这说明 $\beta$ 亚基翻译的起始可能也受到组装中间体的调节,虽然这其中的分子机制尚不清楚。

#### 5 展望

在合成生物学研究中,F-型的ATP合酶有望被改造成理想的分子尺度下微小精密的纳米马达系统,用于纳米医药研究(Ahmad和Cox 2014)。详细研究叶绿体ATP合酶的生物发生过程将为其合成生物学研究中F-型的ATP合酶的分子改造与分子组装过程提供灵感(Bertoni 2018),筛选并详细分析其他生物发生因子将有助于人们对这个过程的深入理解。然而,由于叶绿体ATP合酶的活性具有极大的可调节性,甚至ATP合酶含量下降到野生型的1/2也不会导致植物具有明显的生长和叶绿素荧光表型(Rott等2011)。所以筛选叶绿体ATP合酶含量轻微减弱的突变体将是一个新的挑战。建立新的叶绿体ATP合酶突变体筛选体系筛选新型组装因子并进行深入分析其生物学功能将是下一步研究的重点。

#### 参考文献(References)

- Ahmad Z, Cox JL (2014). ATP synthase: the right size base model for nanomotors in nanomedicine. *Sci World J*, 2014: 567398
- Allen JF, de Paula WB, Puthiyaveetil S, et al (2011). A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci*, 16: 645–655



- Benz M, Bals T, Gügel IL, et al (2009). Alb4 of *Arabidopsis* promotes assembly and stabilization of a none chlorophyll-binding photosynthetic complex, the CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub>-ATP synthase. *Mol Plant*, 2: 1410–1424
- Bertoni G (2018). Assembling a nanomolecular power station. *Plant Cell*, 30: 1665
- Chen F, Dong G, Wu L, et al (2016). A nucleus-encoded chloroplast protein YL1 is involved in chloroplast development and efficient biogenesis of chloroplast ATP synthase in rice. *Sci Rep*, 6: 32295
- Choquet Y, Vallon O (2000). Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie*, 82: 615–634
- Dal Bosco C, Lezhneva L, Biehl A, et al (2004). Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 279: 1060–1069
- Drapier D, Rimbault B, Vallon O, et al (2007). Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits. *EMBO J*, 26: 3581–3591
- Eberhard S, Loiselay C, Drapier D, et al (2011). Dual functions of the nucleus-encoded factor TDA1 in trapping and translation activation of *atpA* transcripts in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Plant J*, 67: 1055–1066
- Fristedt R, Martins NF, Strenkert D, et al (2015). The thylakoid membrane protein CGL160 supports CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub> ATP synthase accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 10: e0121658
- Gao F, Lipscomb B, Wu I, et al (1995). *In vitro* assembly of the core catalytic complex of the chloroplast ATP synthase. *J Biol Chem*, 270: 9763–9769
- Grahl S, Reiter B, Gügel IL, et al (2016). The *Arabidopsis* protein CGLD11 is required for chloroplast ATP synthase accumulation. *Mol Plant*, 9: 885–899
- Hahn A, Vonck J, Mills DJ, et al (2018). Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science*, 360: eaat4318
- Hippler M, Rimbault B, Takahashi Y (2002). Photosynthetic complex assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplast*, 153: 197–220
- Klostermann E, Droste Gen Helling I, Carde JP, et al (2002). The thylakoid membrane protein ALB3 associates with the cpSecY-translocase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, 368: 777–781
- Kong M, Wang F, Yang Z, et al (2013). ATPG is required for the accumulation and function of chloroplast ATP synthase in *Arabidopsis*. *Chinese Sci Bull*, 58: 3224–3232
- Kroeger TS, Watkins KP, Friso G, et al (2009). A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 4537–4542
- Kuhn A, Stuart R, Henry R, et al (2003). The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol*, 13: 510–516
- Maiwald D, Dietzmann A, Jahns P, et al (2003). Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase delta-subunit of *Arabidopsis*. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression. *Plant Physiol*, 133: 191–202
- Malik Ghulam M, Zghidi-Abouzid O, Lambert E, et al (2012). Transcriptional organization of the large and the small ATP synthase operons, *atp1/H/F/A* and *atpB/E*, in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 79: 259–272
- Mao J, Chi W, Ouyang M, et al (2015). PAB is an assembly chaperone that functions downstream of chaperonin 60 in the assembly of chloroplast ATP synthase coupling factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112: 4152–4157
- Mellwig C, Böttcher B (2003). A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts. *J Biol Chem*, 278: 18544–18549
- Ozaki Y, Suzuki T, Kuruma Y, et al (2008). UncI protein can mediate ring-assembly of c-subunits of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 367: 663–666
- Pfalz J, Bayraktar OA, Prikryl J, et al (2009). Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J*, 28: 2042–2052
- Prikryl J, Rojas M, Schuster G, et al (2011). Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 415–420
- Prikryl J, Watkins KP, Friso G, et al (2008). A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res*, 36: 5152–5165
- Rott M, Martins NF, Thiele W, et al (2011). ATP synthase repression in tobacco restricts photosynthetic electron transport, CO<sub>2</sub> assimilation, and plant growth by overacidification of the thylakoid lumen. *Plant Cell*, 23: 304–321
- Rühle T, Leister D (2015). Assembly of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1847: 849–860
- Rühle T, Razeghi JA, Vamvaka E, et al (2014). The *Arabidopsis* protein CONSERVED ONLY IN THE GREEN LINEAGE160 promotes the assembly of the membranous part of the chloroplast ATP synthase. *Plant Physiol*, 165: 207–226
- Strotmann H, Shavit N, Leu S (1998). Assembly and Function of the Chloroplast ATP Synthase. In: Rochaix JD, Gold-

- schmidt-Clermont M, Merchant S (eds). The Molecular Biology of Chloroplast and Mitochondria in *Chlamydomonas*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 477–500
- Sundberg E, Slagter JG, Firdborg I, et al (1997). *ALBINO3*, and Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell*, 9: 717–730
- Till B, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, et al (2001). CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA*, 7: 1227–1238
- von Ballmoos C, Wiedenmann A, Dimroth P (2009). Essentials for ATP synthesis by  $F_1F_0$  ATP synthases. *Annu Rev Biochem*, 78: 649–672
- Watkins KP, Kroeger TS, Cooke AM, et al (2007). A ribonuclease III domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts. *Plant Cell*, 19: 2606–2623
- Weber J (2007). ATP synthase—the structure of the stator stalk. *Trends Biochem Sci*, 32: 53–56
- Wollman FA, Minai L, Nechushtai R (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1411: 21–85
- Yap A, Kindgren P, Colas des Francs-Small C, et al (2015). AEF1/MPR25 is implicated in RNA editing of plastid *atpF* and mitochondrial *nad5*, and also promotes *atpF* splicing in Arabidopsis and rice. *Plant J*, 81: 661–669
- Yi L, Dalbey RE (2005). Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria. *Mol Membr Biol*, 22: 101–111
- Zhang L, Duan ZK, Zhang J, et al (2016). BIOGENESIS FACTOR REQUIRED FOR ATP SYNTHASE 3 facilitates assembly of the chloroplast ATP synthase complex. *Plant Physiol*, 171: 1291–1306
- Zhang L, Pu H, Duan Z, et al (2018). Nucleus-encoded protein BFA1 promotes efficient assembly of the chloroplast ATP synthase coupling factor 1. *Plant Cell*, 30: 1770–1788
- Zhang L, Zhou W, Che L, et al (2019). PPR protein BFA2 is essential for the accumulation of the *atpH/F* transcript in chloroplasts. *Front Plant Sci*, 10: 446
- Zhou W, Lu Q, Li Q, et al (2017). PPR-SMR protein SOT1 has RNA endonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: E1554–E1563
- Zoschke R, Kroeger T, Belcher S, et al (2012). The pentatricopeptide repeat-SMR protein ATP4 promotes translation of the chloroplast *atpB/E* mRNA. *Plant J*, 72: 547–558
- Zoschke R, Nakamura M, Liere K, et al (2010). An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 3245–3250
- Zoschke R, Qu Y, Zubo YO, et al (2013). Mutation of the pentatricopeptide repeat-SMR protein SVR7 impairs accumulation and translation of chloroplast ATP synthase subunits in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res*, 126: 403–414

## Research progress on regulation mechanisms of biogenesis of chloroplast ATP synthase

ZHANG Lin, PENG Lian-Wei\*

Shanghai Key Laboratory of Plant Molecular Sciences, College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

**Abstract:** Chloroplast ATP synthase belongs to F-type ATP synthases. Utilizing the proton motive force generated by photosynthetic electron transport, this enzyme produces ATP to convert the energy of sunlight into chemical energy. Chloroplast ATP synthase is composed of 26 peptides from nine different subunits with a stoichiometry of  $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1I_1II_1III_{14}IV_1$ . Biogenesis of ATP synthase requires expression of plastid-encoded ATP synthase genes as well as efficient assembly which is assisted by several nucleus-encoded factors. In this review, we described and summarized the biogenesis regulation of chloroplast ATP synthase and the biological functions of the biogenesis factors involved in this process.

**Key words:** photosynthesis; chloroplast atp synthase; biogenesis; assembly; gene expression

Received 2019-03-20 Accepted 2019-05-30

This work was supported by the National Science Foundation for Young Scientists of China (31700202), the China Postdoctoral Science Foundation (2017M621511), the funds from the Shanghai Engineering Research Center of Plant Germplasm Resources (17DZ2252700) and the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (18DZ2260500).

\*Corresponding author (penglianwei@shnu.edu.cn).