

酵母 TOR 信号转导途径

蒋伶活* 闫智慧

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要 TOR (target of rapamycin)是真核细胞中一种高度保守的与磷脂酰肌醇激酶相关的蛋白激酶(PIKK),它是免疫抑制剂/抗癌药物雷帕霉素(rapamycin)的靶物质。TOR 是细胞生长的中枢控制因子,外界营养因素通过 TOR 的作用控制酵母、果蝇和哺乳动物细胞的生长。TOR 根据细胞环境的营养条件做出相应的应答,参与调控蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的活性,从而控制与蛋白质合成和基因转录相关基因的表达。现对酵母细胞中 TOR 信号转导途径的研究进行简明的阐述。

关键词 酵母; 信号转导; TOR; 雷帕霉素; 蛋白激酶

雷帕霉素(rapamycin或sirolimus)是从*Streptomyces hygroscopicus*中分离到的大环内酯类次级代谢产物,最初是以抗真菌白念珠菌(*Candida albicans*)的药物被筛选出来,随后的研究发现它还具有免疫抑制活性——能抑制T淋巴细胞的生长和繁殖^[1,2]。TOR (target of rapamycin)是雷帕霉素进入细胞后的靶物质,是最早从酿酒酵母细胞中发现和鉴定的蛋白激酶,它在真核细胞中高度保守。在酿酒酵母中,由*FPR1*基因编码的胞质蛋白FKBP12(FK506-binding protein of 12 kDa)是雷帕霉素的直接受体,它与雷帕霉素形成一个复合物,这个复合物然后结合TOR并抑制TOR的活性。胞质蛋白FKBP12是一种脯氨酸异构酶,缺少FKBP12的酿酒酵母表现出对雷帕霉素的抗性^[3]。在酿酒酵母细胞中存在两个TOR的同源基因*TOR1*和*TOR2*^[4],而拟南芥植物(*Arabidopsis thaliana*)和哺乳动物细胞中只存在一个TOR^[5,6]。在哺乳动物细胞内,雷帕霉素也是先结合胞质蛋白FKBP12后再去结合抑制mTOR(mammalian TOR),所以雷帕霉素的作用方式在酵母和高等真核细胞中是高度保守的^[6,7]。

1 酵母TOR的结构和组成

TOR 激酶是分子量约为 280 kDa 的蛋白质,酿酒酵母的TOR1和TOR2分子量分别为281 kDa和282 kDa。TOR 的一级结构由 5 个功能区域组成(图 1)^[8],从 TOR 激酶的氨基端开始依次为: 大约 20 个串联的 HEAT 重复序列、位于中心的 FAT 域、靠近羧基端的 FRB 域(FKBP12-rapamycin binding domain)、激酶域(或催化域)和 FATC 域。HEAT 重复序列参与蛋白质的转运,而位于激酶域氨基末端的FAT区域和位

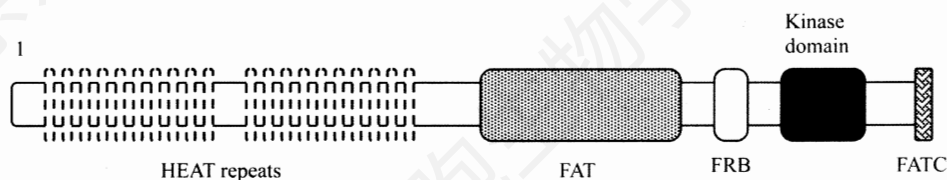
于激酶域羧基末端的FATC域联合后在蛋白质-蛋白质相互作用中发挥功能^[8,9]。大约有 100 个氨基酸的FRB域是能FKBP12-雷帕霉素复合物结合的最小蛋白功能域。当位于该区域的丝氨酸残基(TOR1 的 Ser¹⁹⁷² 和 TOR2 的 Ser¹⁹⁷⁵)发生突变时,突变菌株表现出雷帕霉素抗性,说明此处的丝氨酸残基对FKBP12-雷帕霉素复合物和TOR激酶的结合起着重要作用^[10]。随后的研究还发现,TOR2色氨酸和苯丙氨酸残基(Trp²⁰⁴²和Phe²⁰⁴⁹)的突变同样影响FKBP12-雷帕霉素复合物和TOR激酶的结合。在哺乳动物的mTOR中同样含有保守的丝氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基^[11]。TOR 是相关磷脂酰肌醇激酶家族中的一员。虽然TOR的羧基端与磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)和磷脂酰肌醇-4激酶(PI4K)的催化域有很高的同源性,但是TOR并没有脂类激酶的活性,研究表明TOR具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性^[12]。

最新研究发现在酵母细胞中,TOR以两种不同的复合物形式存在——TORC1(TOR complex 1)和TORC2(TOR complex 2)^[13]。如图2^[14]所示,TORC1包括TOR1或TOR2、保守的生长控制因子1(KOG1)和LST8。KOG1含有4个内在的HEAT重复序列和7个WD40重复,它可能是作为支架蛋白(scaffold protein)促进TOR与靶点的结合。LST8有7个WD40重复,负责控制营养敏感型通道蛋白(permease)的分选(sorting)和调控信号蛋白RTG1-RTG3转录因子^[14,15]。TORC2包括TOR2、AVO1、AVO2、AVO3

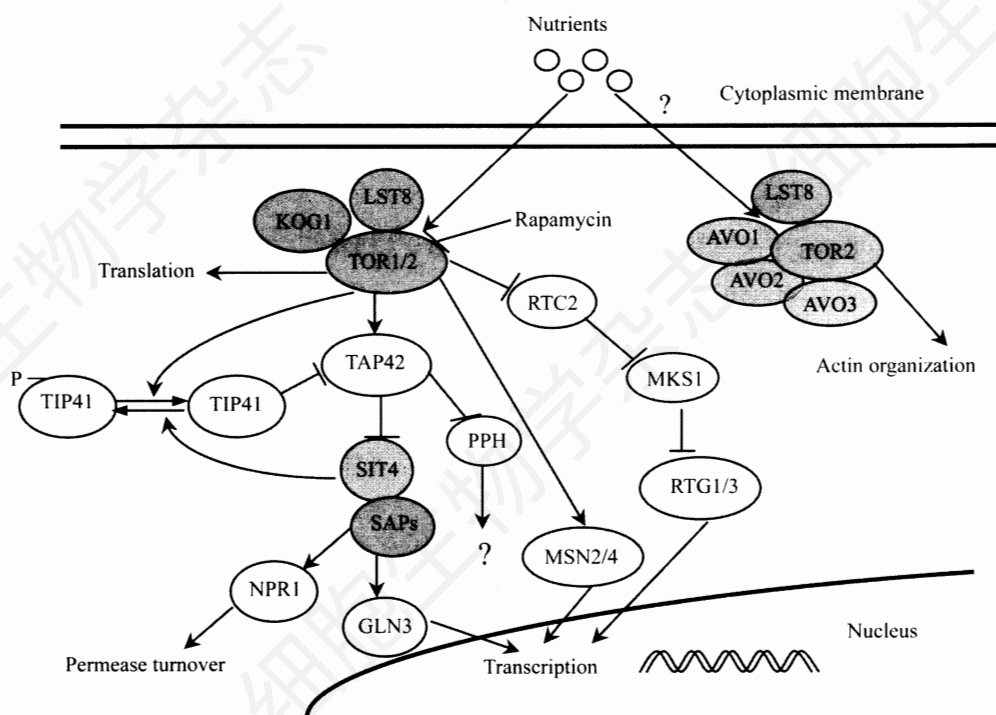
收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-03-20

国家自然科学基金资助项目(No.30571047)

* 通讯作者。Tel: 022-27402527, E-mail: linghuojiang@yahoo.com.cn

图1 TOR 的一级结构和功能区域^[8]

TOR 由 HEAT 重复域、FAT 域、FRB 域(FKB12-rapamycin binding domain)、激酶催化域(kinase domain)和 FATC 域 5 个功能区域组成。

图2 TOR 信号转导途径示意图^[14]

TORC1 和 TORC2 应答胞外营养等环境因子的变化, 将信号最后传送到细胞核内, 最终影响基因的转录和转译以及蛋白质的稳定和组装, 导致细胞为适应环境变化的生长和代谢的改变。⊥表示抑制; →表示激活。

和 LST8^[16]。AVO1 含有一个和 Ras 结合域 RBD 类似的结构域。AVO2 包括 5 个锚蛋白(ankyrin)重复序列, 而且 AVO2 是 TORC1 和 TORC2 中唯一的非必需蛋白质组分。AVO3 包括一个鸟苷酸交换因子(RasGEFN)域, 这个域常见于交换因子和类 Ras 鸟苷三磷酸酶的激活蛋白(activating proteins for Ras-like small GTPases)结构中。

2 TOR对细胞生长的调控

外界营养条件如碳源和氮源能刺激细胞的生长。研究显示, 酵母 TOR 信号转导途径可以对这些外界营养条件产生应答。同时缺失 TOR1 和 TOR2 的突变株或雷帕霉素处理过的细胞, 都表现出营养缺乏或停止在 G₀ 期的细胞特征。这些细胞特征包括蛋

白质和核糖体合成水平的下降、细胞自噬(autophagy)的增加和依赖泛素的蛋白质降解活性的增加、转译引发的 mRNA 降解等^[17]。同时缺失 TOR1 和 TOR2 的酵母细胞与雷帕霉素处理后的细胞表型相似, 这表明 TORC1 参与雷帕霉素敏感的信号转导途径, 负责与生长相关的营养应答^[13]。

雷帕霉素-FKBP12 复合物在细胞里能够结合 TORC1, 但是不能结合 TORC2, 所以 TORC1 对雷帕霉素敏感而 TORC2 对雷帕霉素不敏感^[13]。TORC2 具有不同的细胞功能, 如果单独剔除 TOR2(既失去 TORC2 但保留 TORC1), 会造成细胞周期肌动蛋白骨架的极化缺陷^[18,19]。形成极化的肌动蛋白细胞骨架可以引导细胞的分泌系统, 使新合成的蛋白质和脂类输送到特定的生长位点, 或者输送到酵母细胞表面的

芽体。TORC2能调节肌动蛋白构成的细胞骨架的极化过程,因此对细胞生长进行空间调控。综上所述,TORC2与TORC1这两种构成组分和功能都不同的TOR复合物,为酵母中TOR信号转导功能的多样性、特殊性和对雷帕霉素的敏感性提供了分子基础。

3 TOR对蛋白质合成和稳定性的调控

经过雷帕霉素处理后的酵母细胞,可以观察到依赖帽子结构的转译起始活性水平的下降,细胞停止于细胞周期的G₁期^[17]。酵母TORC1通过激活蛋白激酶S6K1和转译起始因子eIF4E(也称为帽子结合蛋白)来控制蛋白质的合成^[17,18]。激活的S6K1磷酸化40S核糖体蛋白S6,从而导致含有5'端寡聚嘌呤mRNA的转译增加。TORC1直接磷酸化eIF4E-结合蛋白1(4E-BP1),从而让4E-BP1释放eIF4E,游离的eIF4E可以结合eIF4G一起促进蛋白的转译起始^[20]。

TOR可以控制蛋白质的稳定性。当营养物质存在时,TOR通过抑制自噬和依赖蛋白的蛋白质降解来维持蛋白质的稳定性。在营养缺乏时,自噬激酶复合物APG1-APG13发生去磷酸化并激活自噬作用,随后形成自噬小液泡,降解细胞内的物质。TOR通过保持APG1的磷酸化状态来抑制自噬。相似的,TOR能保持丝氨酸/苏氨酸激酶NPR1的磷酸化状态——即无活性状态来阻止蛋白质泛素化、自噬液泡的形成和色氨酸转运子TAT2的降解,从而阻止自噬的发生^[21,22]。其中的原因是,NPR1可能磷酸化TAT2从而直接引发蛋白质泛素化和自噬的发生。

4 TOR对转录的调控

在酵母中,TOR通过控制多种营养应答转录因子的核内定位来负向调控特定饥饿基因的转录。TOR保持GATA型转录因子GLN3处于磷酸化状态并结合于胞质蛋白URE2,在依赖TOR调控的过程中URE2呈磷酸化的状态。当TOR因为缺乏营养或经雷帕霉素处理而处于非活化状态时,GLN3处于非磷酸化状态并从URE2上释放下来并移位到核内,引导二次氮源利用所必须的基因的转录^[23,24]。

TOR通过把普遍胁迫转录因子MSN2和MSN4隔离于细胞质中从而负向控制胁迫应答基因的转录^[24]。TOR可能通过促进MSN2和MSN4与细胞质14-3-3蛋白BMH1和BMH2的联合达到将MSN2和MSN4隔离于细胞质中。TOR负向调控RTG1和

RTG3组成的异二聚体转录因子,但是TOR抑制RTG1-RTG3的机制还不清楚,异位显性分析显示这种抑制可能通过RTG2和MKS1的共同作用而造成的^[25,26]。TOR可能负向调控RTG2,而RTG2继而负向调控MKS1,而MKS1抑制RTG1-RTG3。所以,TOR抑制RTG1-RTG3的作用方式是通过3个负向调控步骤的级联。当缺乏谷氨酰胺时RTG1-RTG3进入核区,引导编码三羧酸(TCA)循环酶的基因转录。当GLN3和RTG1-RTG3对细胞内的谷氨酰胺产生应答时,TOR途径能感知谷氨酰胺的浓度^[27]。所以TOR通过把多种转录因子隔离于细胞质中,来控制与生长相关的代谢。

5 TOR作为蛋白磷酸酯酶调控因子

TOR信号转导的一个重要机制是对2A型蛋白磷酸酯酶(PP2As)的调控。TOR的许多下游效应物,例如酵母中磷酸化的NPR1和GLN3,在经过雷帕霉素处理后会迅速去磷酸化。TOR对蛋白磷酸酯酶和蛋白激酶的调控保证了TOR能迅速合理地对营养缺乏作出应答。在酵母和哺乳动物中,蛋白磷酸酯酶PP2A的催化亚基(C)是非常活跃的,而且它的结合靶点是由调节亚基(A或B)决定的。蛋白磷酸酯酶的调节亚基种类较多,具有能控制底物的专一性和确定蛋白磷酸酯酶复合物亚细胞定位的特性。酵母中有两种PP2A,PPH21和PPH22。它们的催化亚基能与调节亚基A、TPD3、两个调节亚基B中的一个、CDC22或RTS1相联合^[28]。SIT4是酵母中与PP2A相关的蛋白磷酸酯酶,能与4种SAPs(SIT4 associated proteins)——SAP4, SAP155, SAP185和SAP190中的一种相联合。剔除其中3种SAP基因(SAP155, SAP185, SAP190)的表型相当于SIT4缺失的表型,这表明SAP正向调控SIT4的活性^[29]。

在酵母中,SIT4和PP2A与必需蛋白质TAP42(type 2A associated protein-42kDa)相互作用。在雷帕霉素存在的条件下,TAP42会与PP2A和SIT4的催化亚基相结合,表现出营养依赖的雷帕霉素敏感性,这表明TAP42是TOR途径的一个组成部分。TAP42和其他调控亚基同时竞争与蛋白磷酸酯酶催化亚基的结合机会,而TOR能促进TAP42与蛋白磷酸酯酶催化亚基的结合并且阻止其他调控亚基与蛋白磷酸酯酶催化亚基的结合,从而达到对SIT4和PP2A活性的抑制(图2)。在经过雷帕霉素处理后,TOR活性受到抑制,使得TAP42不能与PP2A和SIT4催化亚基

结合, 游离的 SIT4 因此可以让 NPR1 和 GLN3 迅速去磷酸化(图 2)。有趣的是, TAP42 只结合大量的催化亚基中的一小部分, 这暗示 TAP42 可能只抑制特定区域的 PP2A 或 SIT4。TAP42 也可能引导 PP2A 或 SIT4 去结合目前未知的特定靶点^[30]。

TOR 可以直接或者间接地调控 TAP42, TOR 能通过 TAP42 的相互作用蛋白 TIP41 来控制 TAP42 与 SIT4 的结合^[31,32]。TOR 通过保持 TIP41 的磷酸化状态促进 TAP42 与 SIT4 的结合。在 TOR 失活后, TIP41 去磷酸化并与 TAP42 结合, 进而导致 SIT4 的释放和活化。SIT4 反过来使更多的 TIP41 去磷酸化, 造成 SIT4 的进一步释放和活化。所以, TIP41 是这个反馈循环的一部分, 这个循环的目的是对 TOR 失活应答的放大, 从而迅速提高蛋白磷酸酯酶的活性^[32]。

酵母细胞中存在 7 种 2C 类蛋白磷酸酯酶(PP2C)^[33~36]。我们最近发现^[36], 缺失了 PP2C 基因 *PTC1* 或 *PTC6* 的酵母细胞表现对雷帕霉素的敏感, 高表达 *PTC6* 基因则导致酵母细胞对雷帕霉素的抗性增加, 这表明它们和酵母细胞抗雷帕霉素有关。这些 PP2C 磷酸酯酶与酵母 TOR 信号转导的关系正在研究之中。

6 小结和展望

TOR 的主要作用机制是通过激活蛋白激酶的活性和抑制蛋白磷酸酯酶的活性, 从而导致下游与蛋白质合成有关的效应物的磷酸化, 达到对细胞生长所需的蛋白质合成过程的控制^[37,38]。外界营养因素通过 TOR 的作用控制酵母、果蝇和哺乳动物细胞的生长, 但是 TOR 是如何感知外界营养条件的, 目前还不清楚。对与 TOR 相关的调控蛋白的进一步研究, 将为了解 TOR 是如何实现控制细胞生长的多种功能提供线索。免疫抑制剂/抗癌药物雷帕霉素除了直接阻止肿瘤细胞的生长, 它还可以阻止向肿瘤细胞供氧的新生血管的生成。因此, TOR 作用机制的研究对于临床药物雷帕霉素的应用以及新型抗肿瘤药物的研发具有重要意义。此外, 最近的研究表明 TOR 除了控制处于快速生长期的酵母、果蝇和哺乳动物细胞的生长外, 也控制生长极为缓慢的神经元和肌肉细胞的分化和生长^[39]。关于哺乳动物细胞 TOR(mTOR) 的研究进展, 请阅读潘智等^[40]的综述。在人体病原

真菌白念珠菌(*Candida albicans*)中也只存在一个 TOR 基因, TOR 信号途径中的其他一些组件已相继被鉴定^[7,41,42]。因此, 对 TOR 信号转导途径的进一步研究, 将有利于人们对神经衰退性和肌肉萎缩性疾病的深入了解以及新型抗真菌药物的研发。

参考文献(References)

- [1] Vezina C et al. *J. Antibiot (Tokyo)*, 1975, **28**: 721
- [2] Sigal NH et al. *Annu Rev Immunol*, 1992, **10**: 519
- [3] Heitman J et al. *New Biol*, 1992, **4**: 448
- [4] Heitman J et al. *Science*, 1991, **253**: 905
- [5] Menand B et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 6422
- [6] Chiu MI et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 12574
- [7] Cruz MC et al. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 4101
- [8] Dames SA et al. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 20558
- [9] Bosotti R et al. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25**: 225
- [10] Stan R et al. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 32027
- [11] Lorenz MC et al. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 27531
- [12] Isotani S et al. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 34493
- [13] Loewith R et al. *Mol Cell*, 2002, **10**: 457
- [14] Chen EJ et al. *J Cell Biol*, 2003, **161**: 333
- [15] Liu Z et al. *EMBO J*, 2001, **20**: 7209
- [16] Wullschlegel S et al. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 30697
- [17] Barbet NC et al. *Mol Biol Cell*, 1996, **7**: 25
- [18] Wullschlegel S et al. *Cell*, 2006, **124**: 471.
- [19] Kamada Y et al. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 7239
- [20] Danaie P et al. *Biochem J*, 1999, **340**: 135
- [21] Schmidt A et al. *EMBO J*, 1998, **17**: 6924
- [22] Kamada Y et al. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, **279**: 73
- [23] Cardenas ME et al. *Genes Dev*, 1999, **13**: 3271
- [24] Beck T et al. *Nature*, 1999, **402**: 689
- [25] Dilova I et al. *Curr Biol*, 2002, **12**: 389
- [26] Sekito T et al. *Mol Biol Cell*, 2002, **13**: 795
- [27] Crespo JL et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 6784
- [28] Goldberg Y et al. *Biochem Pharmacol*, 1999, **57**: 321
- [29] Luke MM. et al. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**: 2744
- [30] Di Como CJ et al. *Genes Dev*, 1996, **10**: 1904
- [31] Santhanam A et al. *Eukaryot Cell*, 2004, **3**: 1261
- [32] Jacinto E et al. *Mol Cell*, 2001, **8**: 1017
- [33] Jiang L et al. *FEBS Lett*, 2001, **509**: 142
- [34] Jiang L et al. *FEBS Lett*, 2002, **527**: 323
- [35] Cheng A et al. *Genes Dev*, 1999, **13**: 2946
- [36] Ruan H et al. *FEMS Yeast Res*, 2007, **7**: 209
- [37] Neufeld TP. *Cell Metab*, 2007, **5**: 3
- [38] Martin DE et al. *Cell Metab*, 2006, **4**: 259
- [39] Jacinto E et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**: 117
- [40] 潘智等. *细胞生物学杂志*, 2006, **28**: 395
- [41] Ferrara A et al. *Gene*, 1992, **113**: 125
- [42] Zheng C et al. *FEMS Yeast Res*, 2007, in press

TOR Signaling Pathway in Yeast

Ling-Huo Jiang*, Zhi-Hui Yan

(College of Pharmaceuticals and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Target of rapamycin (TOR), a member of the phosphatidylinositol kinase-related protein kinase (PIKK) family, is highly conserved in eukaryotes and regulates growth and proliferation of yeast, fly and mammalian cells. TOR promotes the phosphorylation of its downstream targets, leading to increased protein synthesis and decreased protein turnover, and therefore controls transcription and translation of nutrient-regulated genes in response to environmental changes of nitrogen or carbon sources. This review summarizes recent advances in studies on the TOR signaling in budding yeast.

Key words yeast; signaling pathway; TOR; rapamycin; protein kinase

Received: January 15, 2007 Accepted: March 20, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30571047)

*Corresponding author. Tel: 86-22-27402527, E-mail: linghuojiang@yahoo.com.cn