

mTOR 的研究进展

潘 智^{1,2} 张令强^{1*} 蒋继志² 贺福初^{1*}

(¹军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850; ²河北大学生命科学学院, 保定 071002)

摘要 mTOR(mammalian target of rapamycin)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在感受营养信号、调节细胞生长与增殖中起着关键性的作用。mTOR 可磷酸化 p70^{S6K} 和 4E-BP1, 促进蛋白质合成。mTOR 的活性受氨基酸尤其是亮氨酸浓度的调节, 生长因子及能量水平也能通过 AMPK 调节 mTOR 活性。PI3K/Akt 和 Akt/TSC1-TSC2 两条信号通路都可调控 mTOR 活性, 进而调节细胞的生长与增殖。mTOR 信号通路的异常会导致肿瘤的发生, 可以针对 mTOR 研制出治疗肿瘤的靶向药物。

关键词 雷帕霉素; mTOR; 信号通路; 肿瘤

mTOR(mammalian target of rapamycin)是雷帕霉素(rapamycin)的靶分子, 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在感受营养信号、调节细胞生长与增殖中起着关键性的作用。雷帕霉素是一种抗真菌、抗肿瘤的大环内酯药物^[1], 不仅具有较强的免疫抑制作用, 还能预防血管形成术(angioplasty)后的冠状动脉再狭窄。mTOR 在细胞生长中处于核心地位, 可在多种因素的活化下参与基因转录、蛋白质翻译起始、核糖体生物合成、细胞凋亡等多种生物学功能。另外, mTOR 信号通路调控异常与肿瘤发生密切相关, 是肿瘤治疗的一个重要靶点。

1 mTOR 的分子结构

TOR 最初是在啤酒酵母的突变株 TOR1 和 TOR2 中发现的, TOR1 和 TOR2 基因编码两个大的(280 kDa)高度同源的(70%)TOR1 和 TOR2^[2]。而在哺乳动物中也发现了结构和功能保守的 TOR, 称为 mTOR(又称 FRAP、RAFT1、RAPT)。人 mTOR 基因定位于 1p36.2, 编码的蛋白质由 2 549 个氨基酸组成, 分子量是 280 kDa, 分别与酵母 TOR1 和 TOR2 有 42% 和 45% 的同源性^[2]。mTOR 被认为是磷脂酰肌醇 3- 激酶相关激酶(phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-related kinase, PIKK)蛋白质家族成员, 因为在 mTOR 的 C 末端有一个激酶结构域(kinase domain), 约 234 个氨基酸。PIKK 家族还包括 ATM、ATR/FRP、DNA-PKc、TRRAP 等, 它们广泛参与调控细胞生长、细胞周期和 DNA 损伤修复等过程。在 mTOR 激酶结构域的 N 端是 FAT 结构域(约 568 个氨

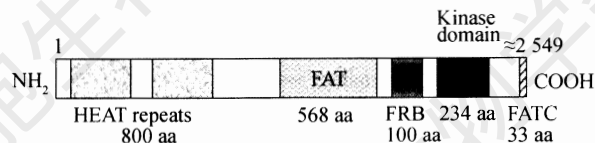


Fig.1 A schematic structure of mTOR (partially refer to [5])

基酸)、FRB 结构域(约 100 个氨基酸), C 端是 FATC 结构域(约 33 个氨基酸), FATC/FAT 以相互结合的形式在分子内协同作用调节 mTOR 激酶活性^[3]。FAT 的 N 末端有近 20 个重复的 HEAT 模体, 每个模体由大约 40 个氨基酸组成, 这些 HEAT 模体排列形成超螺旋结构, 介导了蛋白质间的相互作用(图 1)。FRB 是 FKBP-rapamycin 复合物结合区, 在雷帕霉素特异抑制 mTOR 的过程中起着连接作用^[3]。雷帕霉素与其细胞内 12 kDa 的受体 FKBP12(FK506 结合蛋白)结合, 形成 FKBP-rapamycin 复合物, 再与 mTOR 的 FRB 相结合, 从而抑制 mTOR 的激酶活性^[4]。

2 mTOR 的生物学功能

2.1 调控蛋白质合成

在所有细胞中, TOR 最主要的功能是调控蛋白质合成。哺乳动物细胞中的真核翻译起始因子 4E

收稿日期: 2005-11-10 接受日期: 2005-12-28

国家自然科学基金(No.30321003)和国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2004AA221100, No.2002BA71A02-5)资助项目

* 通讯作者。贺福初: Tel/Fax: 010-68177417, E-mail: hefuc@nic.bmi.ac.cn; 张令强: Tel/Fax: 010-68177417, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

(eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF-4E)结合蛋白 4E-BP1 是翻译的负调控因子, 4E-BP1 通过与 eIF-4E 的 mRNA 帽结合亚单位的结合抑制翻译的起始。当受到外界刺激时, mTOR 磷酸化 4E-BP1 而使其失活, 引起与 eIF-4E 的解离。游离的 eIF-4E 能与 eIF-4G、eIF-4B、eIF-4A 结合形成 eIF-4F 起始复合物, 结合到 mRNAs 5' 末端的帽结构上, 促进帽结构依赖性翻译起始^[6]。雷帕霉素通过抑制 mTOR 的活性, 进而阻断 4E-BP1 的磷酸化和蛋白质翻译。mTOR 可直接磷酸化 4E-BP1 的第 37 和 46 位苏氨酸, 同时第 65 位丝氨酸和第 70 位苏氨酸的磷酸化也与 mTOR 密切相关, 与前者不同的是, 后者间接依赖于 mTOR, 可能是由于某种 mTOR 依赖型蛋白激酶或 mTOR 抑制性磷酸酶活性改变所引起的^[7]。mTOR 还可以直接磷酸化 PDK1, 并与其共同活化 p70^{S6K}。p70^{S6K} 是核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白激酶, 它通过磷酸化 S6 蛋白, 进而调控 5'TOP(5' terminal oligopyrimidine tract)mRNA 翻译蛋白的起始。5'TOP mRNA 占细胞总 mRNA 的 20%, 它的主要翻译产物包括许多翻译元件成分如核糖体蛋白、延伸因子 EF1 α 、EF2 和 poly(A)结合蛋白等^[8]。mTOR 被磷酸化激活后, 通过调控 4E-BP1 和 p70S6K 两条不同的下游通路, 分别控制特定亚组 mRNA 的翻译(图 2)。因此, mTOR 调控着翻译元件的生物合成, 是蛋白质生物合成的基础。

除 S6K、4E-BP1 外, eIF-4G、eIF-4B、STAT3

也是 mTOR 的磷酸化底物, eIF-4B 同时又可被 S6K 磷酸化。eIF-4G、eIF-4B 和 eIF-4E 也都参与了蛋白质翻译。STAT3 是一种转录激活因子, mTOR 磷酸化 STAT3 Ser727 位点, 使 STAT3 达到最大转录活化状态, 促进 STAT3 对靶基因的转录^[9]。此外, mTOR 可通过 cyclin D 和 p27^{Kip1} 来影响 pRb 活性, 进而调控 PolII、PolIII, 参与基因表达的转录水平调控^[10]。Majumder 等^[11]还证实 mTOR 调控抗凋亡基因 Bcl-2 和转录因子 HIF-1 α 的表达与功能。

2.2 调控细胞生长和增殖

mTOR 能够加快细胞周期 G₁-S 期的转换, 促进细胞增殖。在酵母中, 雷帕霉素处理或 TOR1、TOR2 基因的失活都可导致细胞停滞在 G₁ 期, 因为 TOR 失活引起部分细胞周期蛋白合成的不足, 如起关键作用的 G₁ 期周期蛋白 CLN3^[4]。mRNA 的翻译产物中有与细胞周期 G₁-S 相转换有关的蛋白质成分, TOR 的失活将会减少蛋白质翻译, 抑制细胞的增殖。

mTOR 主要通过两种信号通路调控细胞的生长和增殖: ① PI3K/Akt/mTOR 通路。Akt 可直接磷酸化 mTOR 的 Ser2448 位点, 激活 mTOR 和它的下游途径, 控制着细胞增殖和转化所需特殊蛋白质的翻译。研究证实, 在卵巢癌、前列腺癌细胞中, PI3K 传递有丝分裂原信号经 Akt、mTOR 到 p70^{S6K}, 加快 cyclin D1、CDK4、CDC25A、Rb 的磷酸化, 促进 G₁ 期的发展; 雷帕霉素对细胞周期则有抑制作用^[12]。mTOR 磷酸化 eIF4G C 端的 Ser1108、Ser1148

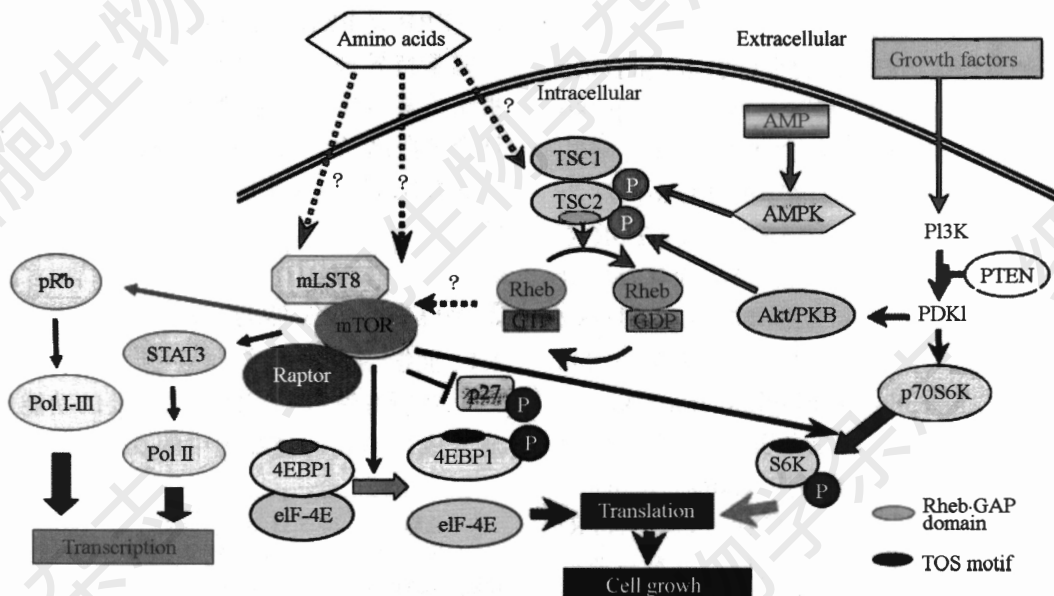


Fig.2 A model describing the mTOR signalling pathway (partially refer to [5])

和 Ser1192 位点, 促进蛋白质翻译的起始; 磷酸化 nPKC δ 、nPKC ϵ 的丝氨酸残基, 使 nPKC 活性增加。近年来还证实 nPKC δ 能介导 mTOR 对 4E-BP1 的磷酸化^[13]。通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路, Akt 直接作用于 mTOR, 调控细胞生长与增殖。② Akt/TSC1-TSC2/mTOR/S6K 通路。TSC 是肿瘤抑制因子, TSC 基因发生突变或缺失时会引起细胞黏附、生长和迁移, 导致大脑及肾脏结节性硬化损坏。哺乳动物细胞中 TSC1-TSC2 复合物是 mTOR 的抑制因子, 因此在 TSC1-TSC2 异常的细胞中, mTOR 和它下游的效应分子被激活, 使得细胞可以不断生长^[14]。当胰岛素启动 IGFR 受体酪氨酸的磷酸化后, PI3K 的合成增加, 促使 Akt 富集在细胞膜上并被激活, 促进了 4E-BP1 和 p70^{S6K} 的高度磷酸化, 从而使 TSC2 磷酸化, 加速了 TSC1 与 TSC2 的降解^[14]。这个过程引起 mTOR 在 TSC1-TSC2 复合物抑制的状态下释放, 不受抑制的 mTOR 具有磷酸化 S6K 和调节下游蛋白质的活性, 导致细胞内蛋白质合成增加。

最近发现 Rheb 作为 TSC1-TSC2 复合体和 mTOR 之间的“桥梁蛋白”可以促进 mTOR 的磷酸化。TSC2 具有 GTP 酶活化蛋白(GAP)活性, GAP 是指能够将 GTP 酶从 GTP 结合的活化状态转化为 GDP 结合的非活化状态的一类酶^[15]。TSC2 通过调控 Rheb 与 GTP 结合(激活)或与 GDP 结合(失活)来控制 mTOR 的活性^[16](图 2)。

Insulin/Akt/mTOR 通路和 Akt/TSC1-TSC2/mTOR 通路是并行的, 但相互有影响。如在 Akt1 和 Akt2 双剔除的小鼠胚胎成纤维母细胞中发现有 4E-BP1 磷酸化的下降, 但没有 TSC2 磷酸化的下降^[17]。这说明 Akt 通过不依赖于 TSC2 的途径直接影响 mTOR 的活性。更重要的是, 在 PI3K 或 Akt 突变的果蝇中 S6K 的活性并不受影响^[18]; TSC1 和 PTEN 双突变的果蝇也有细胞体积增大的现象^[19]。

不论 Akt 是直接还是间接调控 mTOR, TSC1-TSC2 复合体都是 mTOR 活性调节中的关键抑制因子。TSC1 或 TSC2 基因发生突变都会干扰有活性 TSC1-TSC2 复合体的组装, 引起 mTOR 的激活和不受调控, 最终导致细胞异常生长。

mTOR 的下游底物有调节性相关蛋白(raptor)、G β L 和 mLST8 等。Raptor 是一种桥梁分子, 它将 mTOR 与下游底物 S6K、eIF-4E 连接起来, S6K N 端和 eIF-4E C 端的 TOS 模体是这种连接中必不可少的结构, TOS 模体的突变可以使体外 mTOR 催化的

p70^{S6K} 磷酸化减少 75%^[20]。G β L 结合于 mTOR 的激酶结构域, 稳定 raptor 与 mTOR 的结合, 增强 mTOR 的激酶活性。mTOR 对底物尤其是 4E-BP1 和 p70^{S6K} 的磷酸化很大程度上依赖于 raptor。当体内 raptor 缺乏时, mTOR 不能磷酸化 4E-BP1^[21]。mLST8 是一个 36 kDa 的多肽, 预测其结构是由 7 个 WD 重复排列形成的“ β 螺旋”^[22]。mTOR 与 mLST8、mAVO3 形成复合物, 在 Rho GTP 酶的上游调节肌动蛋白骨架, 控制细胞的生长与增殖(图 2)。

mTOR 还可以整合氨基酸、ATP 所激发的信号通路, 借以调控细胞生长增殖和细胞周期^[23]。这些调控采用的是 PI3K/Akt 非依赖性途径, TSC1-TSC2、Rheb(一种与 Ras 相关的小 G 蛋白)或 mTOR 对氨基酸、糖、氮等营养成分的浓度改变很敏感。对其感受机制的假设认为, 氨基酸代谢、第二信使的产生、胞内电荷的变化在感受过程中起到了一定的作用^[7]。虽同为 PI3K/Akt 非依赖性途径, 但 ATP 对 mTOR 的调控方式又有所不同, 有研究指出 mTOR 不能直接感受 ATP 的变化, 而是通过 AMP/ATP 比例来调节 AMPK。当 AMP/ATP 处于高比值状态时, AMPK 被活化, 活化的 AMPK 作用于 TSC1-TSC2, 磷酸化 TSC2 增强了其活性, 进一步抑制了 mTOR, 促使 S6K 和 4EBP1 的去磷酸化, 从而抑制因葡萄糖缺乏引起的细胞凋亡, 增强了细胞的生存能力^[24,25]。

3 mTOR 与肿瘤

现已发现, 许多肿瘤都伴有 mTOR 信号通路的调控异常。与肿瘤发生密切相关的多种生理过程如细胞生长增殖、细胞周期调控、细胞迁移等都受到 mTOR 的调控; cyclin D、c-myc 等多种癌基因的表达在翻译水平上也受到 mTOR 调控。在肿瘤发生中, mTOR 通路相关受体组成性激活、PI3K 的催化亚基 P110 扩增、Akt 扩增、PTEN 功能缺失、TSC1-TSC2 突变缺失、eIF-4E 和 S6K 扩增或过表达等现象频频出现^[26]。

由于 mTOR 是肿瘤发生过程中的一个关键因子, 因此成为了肿瘤治疗中的一个重要靶点。雷帕霉素是早期研究出的 mTOR 特异抑制剂, 现在已相继开发了一系列雷帕霉素类似物: CCI779、RAD001、AP23573 等。这些药物与 FKBP12 形成复合物后可与 mTOR 结合起到抑制作用。PTEN 突变肿瘤、Akt 组成性活化肿瘤、TSC1-TSC2 突变肿瘤及其他伴有 mTOR 信号通路组分异常的肿瘤都具有良好的药物

敏感性^[27]。

4 小结与展望

目前对 mTOR 的研究已经相当广泛, 无论从生理学、生物化学、组织遗传学还是临床医学等方面都有了深入研究, 但仍然还有一些问题亟待解决, 例如 mTOR 如何感受氨基酸的变化, 其激酶活性怎样受氨基酸调节; 作为能量调节因子, mTOR 在信号转导途径中的作用是什么; “桥梁蛋白” Rheb 调控 mTOR 的具体机制是什么, 等等。长期以来, mTOR 的相关研究都依赖于雷帕霉素, 这在一定程度上限制了对 mTOR 的全面认识。有文献报道 mTOR 的作用方式不仅仅局限于雷帕霉素依赖性途径, 还同时存在雷帕霉素的非依赖性途径^[28], 若运用基因剔除和 RNAi 方法对此途径进行研究将会有很大帮助。随着对 mTOR 更深入的研究, 透彻地了解其作用机制, 不仅能进一步完善细胞信号转导通路, 而且对肿瘤靶治疗将有更好的指导意义。

参考文献 (References)

- [1] Raught B *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 7037
- [2] Helliwell SB *et al. Mol Biol Cell*, 1994, **5**: 105
- [3] Asnaghi L *et al. Pharmacol Res*, 2004, **50**: 545
- [4] Jacinto E *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**: 117
- [5] Kazuyoshi Y. *Hepatol Res*, 2004, **30S**: S9
- [6] Gingras AC *et al. Genes Dev*, 2001, **15**: 807
- [7] Fingar DC *et al. Oncogene*, 2004, **23**: 3151
- [8] Jefferies HB *et al. EMBO J*, 1997, **16**: 3693
- [9] Yokogami K *et al. Curr Biol*, 2000, **10**: 47
- [10] Hashemolhosseini S *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 14424
- [11] Majumder PK *et al. Nat Med*, 2004, **10**: 594
- [12] Shigemitsu K *et al. FEBS Lett*, 1999, **447**: 303
- [13] Gao N *et al. Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, **287**: C281
- [14] Potter CJ *et al. Nat Cell Biol*, 2002, **4**: 658
- [15] Zhang Y *et al. Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 578
- [16] Inoki K *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 1829
- [17] Peng XD *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 1352
- [18] Radimerski T *et al. Nat Cell Biol*, 2002, **4**: 251
- [19] Gao X *et al. Genes Dev*, 2001, **15**: 1383
- [20] Hara K *et al. Cell*, 2002, **110**: 177
- [21] Schalm SS *et al. Curr Biol*, 2002, **12**: 632
- [22] Liu Z *et al. EMBO J*, 2001, **20**: 7209
- [23] Shamji AF, *et al. Mol Cell*, 2003, **12**: 271
- [24] Dennis PB *et al. Science*, 2001, **294**: 1102
- [25] Inoki K *et al. Cell*, 2003, **115**: 577
- [26] Tolcher AW *et al. J Urol*, 2004, **171**: S41
- [27] Bjornsti MA *et al. Nat Rev Cancer*, 2004, **4**: 335
- [28] Fingar DC *et al. Mol Biol Cell*, 2004, **24**: 200

Progress in mTOR study

Zhi Pan^{1,2}, Ling-Qiang Zhang^{1*}, Ji-Zhi Jiang², Fu-Chu He^{1*}

(¹Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China; ²College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract The mammalian target of rapamycin, mTOR, is a serine/threonine protein kinase that plays a crucial role in the nutrient-sensitive signalling pathway and the regulation of cell growth and proliferation. mTOR phosphorylates p70^{S6K} and eIF4E binding protein-1 to promote mRNA translation. The activity of mTOR is regulated by the concentration of amino acids, especially leucine, as well as the growth factors and the overall energy supply by which the AMP-activated protein kinase is required. Two signalling pathways, i.e. PI3K/Akt and Akt/TSC1-TSC2 pathways, have been demonstrated to be critical in the regulation of mTOR activity. Abnormalities in the mTOR signalling pathway contributes to tumorigenesis; thus, therapeutic drugs might be designed which targets mTOR kinase.

Key words rapamycin; mTOR; signalling pathway; tumor

Received: November 11, 2005 Accepted: December 28, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30321003) and the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2004AA221100, No. 2002BA71A02-5)

*Corresponding authors. Fu-Chu He: Tel/Fax: 86-10-68177417, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

Ling-Qiang Zhang: Tel/Fax: 86-10-68177417, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn