

酿酒酵母TORC1通路上游调控元件以及在核糖体合成中的作用

张文哲² 李万杰^{1,2*}

(¹细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875; ²北京师范大学生命科学院, 北京 100875)

摘要 酿酒酵母的TORC1(target of rapamycin complex 1)复合体是由Kog1、Lst8、Tco89以及Tor1或者Tor2组成, 其中, Tor1和Tor2最初是作为雷帕霉素作用靶点而在1991年被发现的。近年来的一些研究表明, TORC1以及另一个相似的复合体TORC2参与营养代谢、核糖体合成、细胞周期、自噬衰老等细胞进程。近几年来对TORC1上游调控元件EGO(escape from rapamycin-induced growth arrest)复合体的深入研究, 很大程度上解释了TORC1对氨基酸的感知途径。核糖体的生物合成是高度耗能的过程, 而TORC1在rRNA转录及核糖体蛋白合成的过程中起到重要的控制作用。该文以酿酒酵母TORC1为例, 回顾它的发现过程, 并综述近几年在TORC1上游调控元件以及核糖体合成中作用的研究进展。

关键词 雷帕霉素; TORC1; EGO复合体; 核糖体合成

Advances on TORC1 Pathway Upstream Regular Elements and Ribosome Biosynthesis Function in *Saccharomyces cerevisiae*

Zhang Wenzhe², Li Wanjie^{1,2*}

(¹Key Lab of Cell Proliferation and Regulation Biology, Ministry of Education, Beijing 100875, China;

²College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract TORC1 (target of rapamycin complex 1) is composed from Kog1, Lst8, Tco89 and either Tor1 or Tor2 in *Saccharomyces cerevisiae*. As the target of rapamycin, Tor1 and Tor2 were discovered in 1991. Some recent researches show that TORC1 and another similar complex, TORC2, play roles in many cell processes, such as nutrition metabolism, ribosome biosynthesis, cell cycle, autophagy, aging and etc. Recent discoveries in EGO complex, which is an important upstream element of TORC1, interpret how TORC1 sensed surrounding amino acid to a large extent if not all. Ribosome biosynthesis is a highly energy-consumed process, while TORC1 plays an important role in controlling synthesis of rRNA and ribosomal proteins (RP). This review not only looked back on the discovery of TORC1 in *S. cerevisiae*, but also summarized recent research on TORC1 upstream regular elements and its roles in ribosome biosynthesis.

Keywords rapamycin; TORC1; EGO complex; ribosome biosynthesis

在酿酒酵母中, 由Tor蛋白质(包括Tor1、Tor2)作为中心的TORC1(target of rapamycin complex 1)复合体在细胞生长代谢的控制中起到至关重要的作

用, 尽管Tor和TORC的发现分别已有二十多年和十多年, 这两条TORC复合体的通路仍然存在很多未知。研究者已经了解到它的很多功能, 但很少理解

收稿日期: 2017-05-17 接受日期: 2017-08-02

*通讯作者。Tel: 010-58809729, E-mail: lwj@bnu.edu.cn

Received: May 17, 2017 Accepted: August 2, 2017

*Corresponding author. Tel: +86-10-58809729, E-mail: lwj@bnu.edu.cn

网络出版时间: 2017-10-25 17:31:55 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1731.012.html>

具体的相互作用分子。TORC1作为从时间上控制细胞生长的关键节点,其上游调控元件是研究的重点之一。在TORC1的各种调控功能中,控制核糖体的生物合成是一支少有的成果显著的通路。因此,本文将这两个内容作为重点,并通过回顾Tor及TORC1的发现历程来帮助理解它们的功能。

1 Tor及TORC1的发现历程

酿酒酵母中的Tor1最初是作为雷帕霉素(rapamycin)的靶分子而被发现的^[1],其中的雷帕霉素是一种由吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)产生的亲脂性大环内酯类药物。雷帕霉素在上世纪七十年代早期被纯化出来并用作抗真菌药物,之后由于其具有免疫抑制的副作用而被停用,随后又因为这一特性而作为T细胞抑制剂被用于器官移植。雷帕霉素在1999年被正式用于肾脏移植中的抗排斥反应,而雷帕霉素的衍生物CCI-779和RAD001则在后来被用于治疗癌症。此外,雷帕霉素还被用于心脏支架手术中防止血管发生再狭窄。这三个方面的作用说明雷帕霉素的效应物具有阻止或抑制细胞生长的功能,提示了雷帕霉素的作用靶点是一个控制细胞生长的中心分子^[2]。

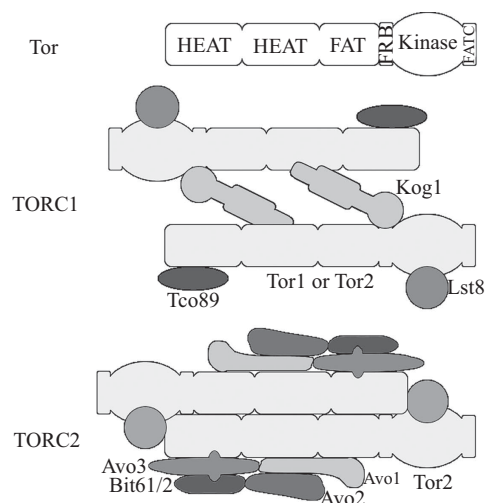
八十年代末期,研究者开始在酵母和哺乳动物细胞中寻找雷帕霉素的靶分子。当时的研究发现,雷帕霉素可能通过与具有脯氨酰异构酶活性的蛋白质FKBP12(FK506-binding protein 12)结合从而抑制其活性^[3]。研究者发现,破坏了酵母的FKBP的基因(*FPR*)之后,对生长没有重要影响^[4]。这就说明,FKBP与雷帕霉素有关,但不是最终效应物。另外,研究人员还发现,某些药物的类似物能够结合并抑制FKBP12,但不具有免疫抑制作用^[5],而且破坏*FPR1*基因会使细胞产生对雷帕霉素的抗性^[4-5],说明雷帕霉素可能与FKBP会形成“免疫亲和素(immunophilin)-药物复合物”,而该复合物具有药物作用,并作用于另一个靶点,即FKBP是雷帕霉素作用的辅助因子。

为了确定FKBP-雷帕霉素复合体的作用靶点,研究者利用具有雷帕霉素抗性的突变酵母菌株筛选得到了*TOR1*和*TOR2*两个基因。*TOR1*和*TOR2*编码的蛋白质是磷脂酰肌醇相关激酶(phosphatidylinositol-3-kinase-related kinase, PIKK)家族的成员,大小都是282 kDa,分别含有2 470和2 474个氨基酸残基,具有67%的同源性^[6-8]。破坏Tor1和Tor2会导致类似雷帕

霉素处理的生长停滞,提示Tor1和Tor2是FKBP-雷帕霉素的靶点^[7]。随后,有直接证据表明,Tor1和Tor2能够与FKBP-雷帕霉素复合体直接结合^[9],并且Tor在结构上和作为FKBP-雷帕霉素靶点上都是相当保守的。有趣的是,酿酒酵母中含有两个*TOR*的基因,而几乎所有其他的真核生物都只有一个*TOR*基因,这个情况使得酿酒酵母成为分析两条Tor通路功能的绝佳生物。

所有的Tor蛋白质都含有相似的结构域(图1),从N-端到C-端包括HEAT(huntingtin, elongation factor 3, the A subunit of PP2A, and Tor1)重复序列、FAT(FRAP-ATM-TRRAP)结构域、FRB(FKBP12-rapamycin-binding)结构域、激酶结构域和FATC(C-terminal to the FAT domain)结构域^[2]。HEAT重复序列包括两个区域的约20个HEAT模体(motif),每个模体包括由约40个氨基酸残基组成的一对相互作用的反平行的 α 螺旋。HEAT重复序列占据了Tor N-端的一半,是Tor复合体的底物结合区域。位于中央的FAT结构域约为500个氨基酸残基,位于C-端的FATC结构域约为35个残基,而用来结合FKBP-雷帕霉素的FRB结构域紧贴着FAT结构域,约为100个残基。通过对所有的雷帕霉素抗性突变体中的*TOR*测序,发现它们都含有FRB结构域的突变^[2],并且都包括一个关键丝氨酸残基的点突变,即Tor1的Ser1972突变成Arg或Asn,或Tor2的Ser1975突变成Ile^[6,8]。激酶结构域是Tor的催化结构域,其结构类似于PI3K和PI4K的激酶结构域。

上世纪九十年代对Tor功能的研究发现,Tor2具有两个重要功能:一个是与Tor1相同的功能即Tor-shared功能,另一个是Tor2单独的功能即Tor2-unique功能^[10]。2002年,Tor的研究有了突破性进展,Tor在细胞中会形成TORC1和TORC2复合体(图1)^[11]。它们在酵母中被发现并纯化出来,随后被证明它们即是Tor两条通路的核心分子。TORC1复合体含有Tor1或Tor2,对雷帕霉素敏感,介导Tor-shared通路,控制多种有关于决定细胞质量的末端产出,包括蛋白质合成与降解、mRNA合成与降解、核糖体合成、营养物运输以及自噬^[12];TORC2复合体只含有Tor2,对雷帕霉素不敏感,介导Tor2-unique通路,功能是组织细胞骨架、内吞作用和鞘磷脂的合成。在其他真核生物包括植物、线虫、果蝇和哺乳动物中也发现了高度同源的两个TORC,证明Tor通路的调节方式也是非常保守的^[2],因此,TORC的发现具有里程碑式的意义。



Tor1或Tor2包含: HEAT重复序列、FAT结构域、FRB结构域、激酶结构域以及FATC结构域。TORC1包含Kog1、Lst8、Tco89以及Tor1或者Tor2, 而TORC2包含Tor2、Avo1、Avo2、Avo3、Bit61或Bit2。

Structures of Tor1 and Tor2: the HEAT repeats, the FAT domain, the FRB domain, the kinase domain, and the FATC domain. Composition of TORC1 includes Kog1, Lst8, Tco89, and Tor1 or Tor2. And TORC2 includes Tor2, Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 or Bit2.

图1 Tor及TORCs示意图(根据参考文献[2]修改)

Fig.1 Schematic representation of Tor and TORCs (modified from reference [2])

酿酒酵母TORC1主要由Kog1、Lst8、Tco89以及Tor1或者Tor2组成^[11,13]。分子筛数据显示, 该复合体的分子量约为2 000 kDa, 所以该复合体可能是以二聚体形式存在的。通过给TORC1组分带上GFP标签以及免疫金电镜等手段, 发现TORC1定位在酵母的液泡膜上^[13-14]。近几年的研究发现, TORC1不只对胞外的营养物作出反应, 还对包括翻译、核糖体合成、自噬等自身的过程的很多末端产物作出反应, 即含有负反馈调节^[15]。

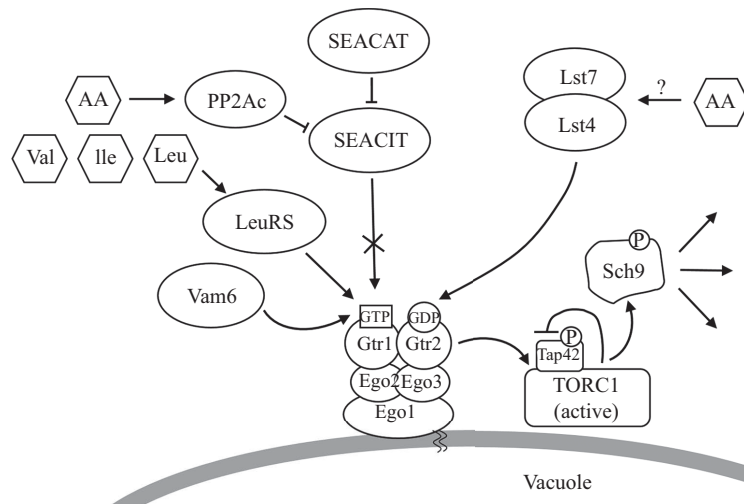
2 酿酒酵母TORC1的上游调控

TORC1主要受到生长因子、能量状态、环境压力以及氨基酸浓度等细胞信号的调节^[16]。其中, 氨基酸作为重要的营养物质对酵母细胞以及TORC1的调控最为基础, 而EGO复合体起主要调控作用。EGO复合体最早得名于不能脱离雷帕霉素介导的生长阻滞(escape from rapamycin-induced growth arrest, EGO)突变体^[17], 后来被证实该复合体是TORC1的重要调节因子^[14]。

EGO复合体由5个蛋白质组成: Ego1、Ego2、Ego3、Gtr1和Gtr2(图2)。其中, Gtr1和Gtr2属于Ras家族GTP酶^[18], 在高等真核生物中的同源物为Rag家族的RagA、RagB、RagC和RagD^[19]。Ego1、Ego2和Ego3的功能类似于脊椎动物的p18和p14+MP1, 后两者的作用是一起形成调节子复合体(ragulator

complex)^[20]。Ego2最近才被鉴定出来, 被认为与Ego1相互作用并起到稳定作用^[19]。EGO复合体通过Ego1的共价连接和Ego3的跨膜而定位在酵母的液泡膜上, 朝向胞质一侧, 通过感受氨基酸浓度来调节TORC1的磷酸化状态。Gtr1和Gtr2形成异源二聚体, 其核苷酸的装载状态决定了EGO复合体的活性。经研究表明, 只有当Gtr1(RagA/B)装载GTP且Gtr2(RagC/D)装载GDP, EGO复合体才具有完整活性。此时, Gtr1-Gtr2会直接结合TORC1的Kog1, 从而激活TORC1^[14,18]。

研究发现, 在通过感受氨基酸浓度来改变Gtr1和Gtr2的核苷酸装载状态的过程中, 鸟苷酸交换因子(guanine-nucleotide exchange factor, GEF)Vam6/Vps39起到了一定的作用^[14]。Vam6是C类Vps/HOPS复合体的一个成员^[21], 酵母细胞的Vam6可以在体外实验中对Gtr1起到核苷酸交换的作用^[14], 缺失Vam6会导致Gtr1-Ego1无法发生相互作用^[19]。在后来的研究中, 经由EGO复合体感受到的亮氨酸浓度被认为是TORC1的主要影响因素, EGO复合体是被亮氨酸-tRNA合成酶(leucyl-tRNA synthetase, LeuRS)和液泡ATP酶正向调控的^[22]。LeuRS通过感受亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸等支链氨基酸的浓度, 来对Gtr1的核苷酸装载状态起到正向的调控作用^[23]。由Seh1组织的复合体SEAC(Seh1-associated complex)则通过Gtr1对TORC1起到负调控作用^[22,24]。SEAC可以



TORC1通过EGO复合体感受液泡和胞质中的氨基酸浓度, 从而进一步对下游的Sch9和Tap42进行磷酸化调控。EGO复合体包括Ego1、Ego2、Ego3、Gtr1和Gtr2等5个蛋白质, 而该复合体通过Ego1锚定在液泡膜上。Gtr1和Gtr2的核苷酸装载状态控制TORC1的活性, 而它们则受到多个上游的调控。Vam6和LeuRS对Gtr1以及Lst4-Lst7对Gtr2的核苷酸交换活性促使Gtr1^{GTP}-Gtr2^{GDP}状态的形成, 而SEACAT(Seh1-associated complex activating TORC1)与PP2Ac(PP2A catalytic subunit)则会妨碍SEACIT(Seh1-associated complex inhibiting TORC1)对Gtr1的抑制作用。

TORC1 senses amino acid concentration in vacuole and cytoplasm via EGO complex, and then phosphorylates and activates downstream effectors, Sch9 and Tap42. EGO complex is composed of Ego1, Ego2, Ego3, Gtr1, and Gtr2, and it anchored in vacuole membrane through Ego1. Nucleotide-loading status of Gtr1 and Gtr2, regulated by multiple upstream, controls TORC1 activation directly. The activities of Vam6, LeuRS on Gtr1 and Lst4-Lst7 on Gtr2 promote Gtr1^{GTP}-Gtr2^{GDP} formation, while SEACAT and PP2Ac interfere with the inhibitory effect of SEACIT on Gtr1.

图2 TORC1上游调控途径(根据参考文献[19]修改)

Fig.2 Upstream regulation pathway of TORC1 (modified from reference [19])

分为两部分, Iml1/Sea1、Npr2和Npr3形成TORC1的负调控子, 被称为SEACIT(SEAC inhibiting TORC1), 而Sch1、Sec13、Sea2、Sea3和Sea4则形成TORC1的正调控子, 被称做SEACAT(SEAC activating TORC1)。氨基酸缺乏的情况下, SEACAT与PP2Ac对SEACIT的抑制作用会解除, 而后者会将Gtr1的GTP交换成GDP, 从而失活EGO复合体。Gtr2的核苷酸装载状态则由Lst4-Lst7复合体来调控^[25]。Lst4-Lst7复合体会在氨基酸存在的状态下结合装载了GTP的Gtr2并激活它的GTP酶活性, 从而使Gtr2将GTP水解成GDP, 激活EGO复合体的完整活性。

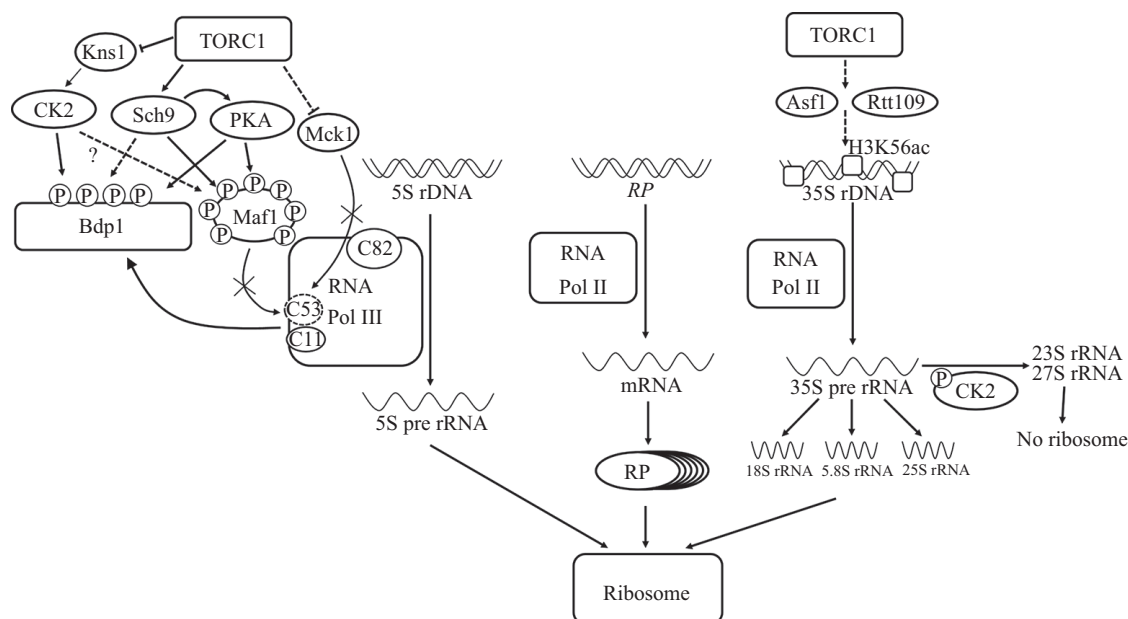
Kingsbury等^[26]发现, 无论是否通过EGO复合体、亮氨酸以及其代谢物 α -酮异己酸都能激活TORC1, 而将亮氨酸转化成 α -酮异己酸的支链转氨酶在其中起到重要作用。因此, 除了EGO复合体之外, 可能还存在其他的上游调控元件通过TORC1传递信号, 不过具体过程尚不清楚。

3 酿酒酵母TORC1在核糖体合成中的作用

酵母通过上游调控元件感受外界信号, 并通过信号级联传导调控细胞内的生物进程, 其中, TORC1几乎参与了所有与生长相关的信号通路。在细胞

生长过程中, 蛋白质的生物合成显得尤为基础和重要。核糖体是蛋白质合成的重要场所, 而TORC1也参与了核糖体生物合成的调控过程。最初的研究发现, 雷帕霉素处理酵母细胞会导致5S rRNA、35S rRNA和tRNA迅速显著地降低^[27]。随后的研究证实, TORC1在核糖体合成中起到了重要的作用。酵母细胞在最适生长条件下大约每100分钟分裂一次, 每个细胞含有大约200 000个核糖体, 因此, 平均一个酵母细胞每分钟要合成和装配2 000个核糖体。每个核糖体包含78个蛋白分子和4条rRNA, 装配过程还需要大量核糖体生物合成(ribosome biogenesis, RiBi)因子的参与, 因此, 核糖体的合成是一个重要的生命活动。

首先, TORC1会通过以下几个层次来调控RNA聚合酶I转录35S rRNA(图3)。35S前体rRNA与核糖体蛋白(RP)的mRNA会共转录, 当用雷帕霉素处理之后会导致RP的翻译减少(如上文所述)^[28], 从而使得35S rRNA无法与足够的RP结合并被迅速降解。雷帕霉素处理稍长时间后, RNA聚合酶I会不再结合rDNA, 从而转录会停止, 这个原因可能与关键的转录因子Rrm3的降解有关^[28-29]。此外, TORC1可以影响组蛋白的修饰, 从而对rRNA的合成起到调控作



活化状态的TORC1通过磷酸化而激活Sch9, 后者又进一步激活PKA, 并与PKA分别磷酸化Maf1, 从而抑制其与RNA聚合酶III的Rpc53和Rpc11两个亚基结合, 并进一步影响5S rRNA的转录。CK2对Maf1的磷酸化作用还不确定。激活的TORC1还会通过抑制类Cdc激酶Kns1对CK2的磷酸化, 来调控CK2的底物特异性。Sch9、PKA和CK2共同磷酸化TFIIB的Bdp1亚基, 使RNA聚合酶III能够与之结合并转录5S rRNA。TORC1还会间接抑制Mck1以防止其磷酸化RNA聚合酶Rpc53亚基。Asf1和Rtt109会协助TORC1使组蛋白H3K56乙酰化, 促进rRNA的转录。磷酸化的CK2能够使35S前体rRNA剪切成无法组装成核糖体的23S rRNA和27S rRNA, 从而降低核糖体的生物合成。

Activated TORC1 inhibits RNA Pol III subunits Rpc53 and Rpc11 direct binding by Maf1, phosphorylated by Sch9 and PKA. CK2 has a controversial phosphorylating effect on Maf1. TORC1 also regulates substrate-specificity of CK2 by inhibiting Cdc-like kinase, Kns1. Sch9, PKA and CK2 can phosphorylate TFIIB subunit, Bdp1, and then phosphorylated Bdp1 binds to RNA Pol III to promote 5S rRNA transcription. TORC1 also prevents RNA Pol subunit, Rpc53, from phosphorylation by indirectly inhibiting Mck1. Asf1 and Rtt109 help TORC1 to acetylate H3K56 and promote rRNA transcription. Phosphorylated CK2 can alternate 35S pre-rRNA processing and produce invalid 23S rRNA and 27S rRNA to reduce ribosome biogenesis in post-transcriptional level.

图3 TORC1通过调控RNA聚合酶来调控核糖体的组成

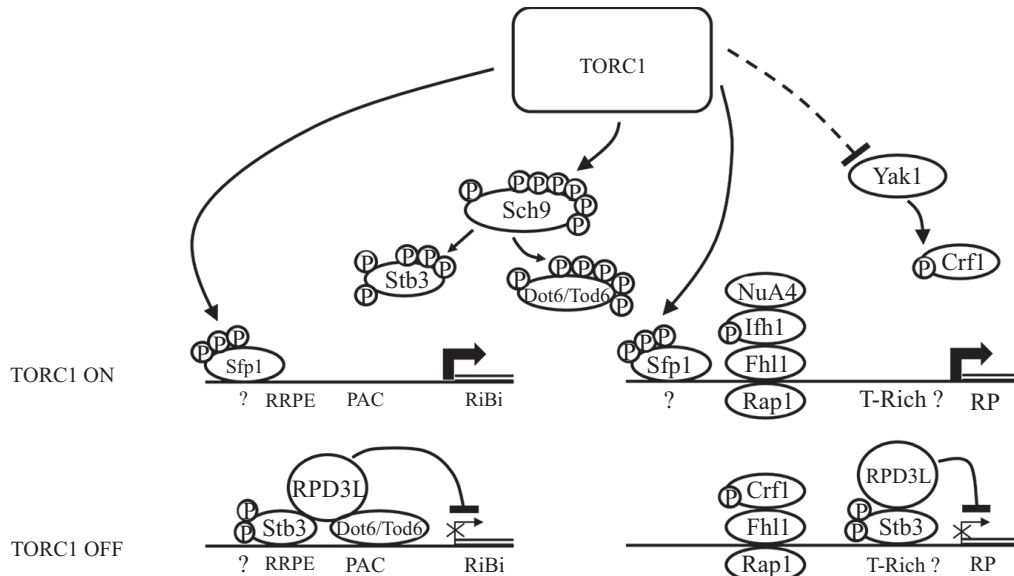
Fig.3 TORC1 regulates ribosome biogenesis through RNA Pols

用。组蛋白H3的56位赖氨酸乙酰化(H3K56ac)会有利于RNA聚合酶I对rRNA的转录以及Hmo1对rRNA前体的处理, TORC1会通过组蛋白分子伴侣Asf1和乙酰转移酶Rtt109来对其进行调控^[30]。TORC1在失活状态下会解除对Cdc样激酶Kns1的抑制, 进而导致CK2被磷酸化并改变其与底物的亲和性^[31]。CK2的调节亚基Ckb1被磷酸化则会使35S前体rRNA的剪接发生改变, 产生不能发挥作用的23S rRNA和27S rRNA, 减少核糖体的形成^[32]。

其次, TORC1还会通过Sch9以及PKA(protein kinase A)对Maf1和RNA聚合酶III的亚基Rpc53的作用, 来调节RNA聚合酶III对5S rRNA的转录(图3)^[33-35]。Maf1是一个保守的RNA聚合酶III的转录调节因子, PKA和Sch9直接磷酸化Maf1的7个位点, 阻止后者对RNA聚合酶III的结合和抑制^[36]。Graczyk等^[37]认为, 蛋白激酶CK2在Maf1与RNA聚合酶III的结合中起到作用, 而Moir等^[38]则认为, CK2与其无关。Rpc53

则具有3个磷酸化位点, 在雷帕霉素抑制了TORC1之后, 它会被GSK-3家族的成员Mck1磷酸化, 并与另一个亚基Rpc11一起结合Maf1并抑制RNA聚合酶III的活性^[35]。

一项对RNA聚合酶III的17个亚基和转录起始因子TFIIB的3个亚基的研究发现, 聚合酶的亚基Rpc82和TFIIB的亚基Bdp1的磷酸化水平受到TORC1活性的调控(图3)^[39]。Bdp1在对数期生长时有4个位点被磷酸化, 此时, Bdp1似乎会拮抗Maf1的抑制作用, 而PKA、Sch9和CK2都参与了Bdp1的调节。TORC1还会参与控制Rpc53和Rpc82的SUMO(small ubiquitin-like modifier)化, 使RNA聚合酶III具有更高的转录tRNA的能力^[40]。此外, 最近研究发现, 环境压力对酿酒酵母核糖体前rRNA的合成存在选择作用^[32], 营养物的去除、热激和雷帕霉素处理等会导致TORC1和CK2介导不同的两个翻译后修饰通路。然而, 这两个通路与Sch9或Tap42都无关,



TORC1激活: TORC1通过磷酸化Sch9使Stb3和Dot6/Tod6被磷酸化失活,阻止其结合*RiBi*的调控元件。TORC1对Sfp1的磷酸化使其能够结合*RiBi*和*RP*上游的未知元件,以激活它们的转录。同时,TORC1会通过抑制Yak1使其不能磷酸化Crf1,阻止后者与Fhl1的结合。磷酸化的Ifh1则结合组成性结合*RP*启动子的Fhl1和Rap1,可能通过招募组蛋白乙酰基转移酶NuA4来激活*RP*的转录。TORC1失活: Stb3和Dot6/Tod6去磷酸化并结合*RiBi*上游的RRPE和PAC,招募组蛋白脱乙酰基酶复合体RPD3L以抑制转录。Yak1会磷酸化Crf1,后者会结合到Fhl1上替换掉Ifh1,并且Stb3似乎还会结合*RP*上游的富含T区域并招募RPD3L抑制转录。

TORC1 on: Sch9 phosphorylates and inactivates Stb3 and Dot6/Tod6, which is phosphorylated by TORC1. And the phosphorylation prevents them from binding to the regulating elements of *RiBi*. Phosphorylation of Sfp1 enhances it binding to unknown upstream elements of *RiBi* and *RP*, activating their transcription respectively. TORC1 inhibits Yak1, which is likely to phosphorylate Crf1, preventing from binding to Fhl1. Phosphorylated Ifh1 binds to Fhl1 and Rap1, which constitutively binding to *RP* promoters, and possibly recruits NuA4, histone acetyltransferase, and activates transcription. **TORC1 off:** dephosphorylated Stb3 and Dot6/Tod6 bind to RRPE and PAC upstream of *RiBi*, respectively, and recruit RPD3L, histone deacetylase complex, to repress transcription. Yak1-phosphorylated Crf1 binds to Fhl1 and replaces Ifh1. Stb3 is likely to bind to T-Rich element upstream of *RP* and recruit RPD3L to repress transcription.

图4 TORC1控制*RiBi*和*RP*转录途径(根据参考文献[2]修改)

Fig.4 TORC1 regulates transcription of *RiBi* and *RP* (modified from reference [2])

说明TORC1下游可能存在新的效应物分支。

酵母的78个核糖体蛋白由137个基因编码,而TORC1会通过几个通路调控这些基因的表达(图3)。这其中的关键蛋白质是Fhl1^[41-43]。Fhl1具有一个叉状的DNA结合域,会组成性地结合到核糖体蛋白(ribosomal protein, *RP*)基因的启动子上,并被DNA结合蛋白Rap1与高速涌动蛋白Hmo1所辅助^[44]。TORC1调节*RP*转录的方式是控制Fhl1与两个含有FHB(four-helix bundle)结构域的蛋白Ifh1和Crf1之一结合。细胞正常生长时TORC1处于激活状态,Ifh1被磷酸化并结合Fhl1以激活*RP*转录。相反地,失活的TORC1会解除对激酶Yak1的抑制作用而导致Crf1被磷酸化,后者会替换Ifh1并抑制*RP*的转录(图4)。

除了Fhl1/Ifh1/Crf1系统以外,TORC1还存在其他方式控制*RP*的转录,其中之一是锌指蛋白Sfp1(图4)^[45-47]。TORC1能够与Sfp1直接结合并将其磷酸化,磷酸化状态的Sfp1能够结合到*RP*的启动子上。作

为Rab的护送蛋白(escort protein),Mrs6不仅在膜蛋白分选中发挥作用,也能够与Sfp1结合,并帮助后者进入细胞核,调控转录^[46-47]。此外,虽然并没有发现Sfp1能够与*RiBi*的启动子直接相互作用,但是过表达Sfp1会导致大多数*RiBi*基因的表达上调^[45]。

另一种方式是Sch9依赖的转录调控。*RiBi*的启动子往往具有PAC(polymerase A and C)和/或核糖体RNA处理元件(ribosomal RNA processing element, RRPE),前者能被myb家族转录因子Dot6和Tod6结合,后者能被Stb3结合^[48-50]。此外,Stb3似乎还会结合到*RP*的启动子的一个富含T的元件上^[51]。这三个转录因子都可以被Sch9磷酸化,因此受到TORC1的调控^[50-51]。当TORC1失活时,它们就会被去磷酸化并结合到相应的启动子上,并招募RPD3L组蛋白乙酰基转移酶复合体从而起始转录。

另一个与哺乳动物S6K同源的AGC激酶Ypk3被发现会在TORC1的调控下对核糖体蛋白Rps6进

行磷酸化^[52]。Rps6是核糖体40S亚基的成分, 具体作用还在研究之中, 有研究认为, 它与细胞大小、细胞增殖和葡萄糖稳态有关^[53]。营养物的存在会迅速导致Rps6被磷酸化, 而实现这个过程的是Ypk3而不是Sch9。调节亚基磷酸化缺陷的Ypk3无法磷酸化Rps6, 而将S6K导入细胞则能回补Ypk3敲除的细胞。Yerlikaya等^[54]则发现, 不只是TORC1通过Ypk3磷酸化Rps6, TORC2也通过Ypk1来对Rps6的N-端进行磷酸化。Rps6磷酸化受到抑制会导致核糖体40S亚基的缺陷和生长速率的减慢。Rps6在哺乳动物中也是非常重要的核糖体蛋白, Rps6敲除的小鼠是胚胎致死的^[55]。

TORC1在调节核糖体生物合成中扮演了关键角色, 尤其是在转录水平。在其他方面, TORC1也或多或少起到了一定作用。在核糖体的翻译后修饰中, TORC1有可能调节核糖体装配的催化步骤^[34,56]。TORC1还有可能对mRNA的稳定性起到正向作用, 并且可能间接参与mRNA的剪接^[32,34,54-55,57-58]。TORC1对核糖体合成的调节具体有着多大贡献, 还有待进一步研究。

4 结语与展望

对酵母TORC1的深入研究可以为哺乳动物中的同源物mTORC1(mammalian TORC1)提供重要的借鉴。mTORC1具有很多相似的功能, 主要也是在对生长的控制方面。此外, 在上游的调控方面, mTORC1除了感受氨基酸以外, 还在很大程度上受到自身激素的调节; 下游元件也具有很大的保守性。最近几年尽管在TORC1上游调控元件的研究有了很大的突破, 但是在EGO复合体之外, 其他调控元件是否存在仍然不得而知; 而在下游的核糖体合成的通路中, 尽管已经发现了对rRNA、RP、RiBi多方面的调控, 但是在作用机制上反而存在更多的未知。细胞生长的主动控制在TORC1的通路中表现得淋漓尽致, 深入研究酿酒酵母TORC1的信号通路在增进人们对细胞生长的理解上具有重要意义。

参考文献 (References)

- 1 Abraham RT, Wiederrrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 483-510.
- 2 Loewith R, Hall MN. Target of Rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 2011; 189(4): 1177-201.
- 3 Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991; 251(4991): 283-7.
- 4 Heitman J, Movva NR, Hiestand PC, Hall MN. FK 506-binding protein prolinerotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(5): 1948-52.
- 5 Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991; 253(5022): 905-9.
- 6 Cafferkey R, Young PR, McLaughlin MM, Bergsma DJ, Koltin Y, Sathe GM, *et al*. Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 1993; 13(10): 6012-23.
- 7 Kunz J, Hall MN. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci* 1993; 18(9): 334-8.
- 8 Helliwell SB, Wagner P, Kunz J, Deuter-Reinhard M, Henriquez R, Hall MN. TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* 1994; 5(1): 105-18.
- 9 Stan R, McLaughlin MM, Cafferkey R, Johnson RK, Rosenberg M, Livi GP. Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J Biol Chem* 1994; 269(51): 32027-30.
- 10 Helliwell SB, Howald I, Barbet N, Hall MN. TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1998; 148(1): 99-112.
- 11 Loewith R, Jacinto E, Wulschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, *et al*. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002; 10(3): 457-68.
- 12 Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103(2): 253-62.
- 13 Reinke A, Anderson S, McCaffery JM, Yates J 3rd, Aronova S, Chu S, *et al*. TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2004; 279(15): 14752-62.
- 14 Binda M, Péli-Gulli MP, Bonfils G, Panchaud N, Urban J, Sturgill TW, *et al*. The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Mol Cell* 2009; 35(5): 563-73.
- 15 Eltschinger S, Loewith R. TOR complexes and the maintenance of cellular homeostasis. *Trends in Cell Biol* 2016; 26(2): 148-59.
- 16 Yang H, Gong R, Xu Y. Control of cell growth: Rag GTPases in activation of TORC1. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(16): 2873-85.
- 17 Dubouloz F, Deloche O, Wanke V, Cameroni E, de Virgilio C. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol Cell* 2005; 19(1): 15-26.
- 18 Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 2008; 10(8): 935-45.
- 19 Powis K, De Virgilio C. Conserved regulators of Rag GTPases orchestrate amino acid-dependent TORC1 signaling. *Cell Discov* 2016; 2: 15049.
- 20 Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal

- surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010; 141(2): 290-303.
- 21 Starai VJ, Hickey CM, Wickner W. HOPS proofreads the trans-SNARE complex for yeast vacuole fusion. *Mol Biol Cell* 2008; 19(6): 2500-8.
 - 22 Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, *et al.* A tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* 2013; 340(6136): 1100-6.
 - 23 Bonfils G, Jaquenoud M, Bontron S, Ostrowicz C, Ungermann C, De Virgilio C. Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol Cell* 2012; 46(1): 105-10.
 - 24 Panchaud N, Péli-Gulli MP, De Virgilio C. SEACing the GAP that nEGOCiates TORC1 activation: evolutionary conservation of Rag GTPase regulation. *Cell Cycle* 2013; 12(18): 2948-52.
 - 25 Péli-Gulli MP, Sardu A, Panchaud N, Raucchi S, De Virgilio C. Amino acids stimulate TORC1 through Lst4-Lst7, a GTPase-activating protein complex for the Rag family GTPase Gtr2. *Cell Rep* 2015; 13(1): 1-7.
 - 26 Kingsbury JM, Sen ND, Cardenas ME. Branched-chain aminotransferases control TORC1 signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 2015; 11(12): e1005714.
 - 27 Zaragoza D, Ghavidel A, Heitman J, Schultz MC. Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1998; 18(8): 4463-70.
 - 28 Reiter A, Steinbauer R, Philippi A, Gerber J, Tschochner H, Milkereit P, *et al.* Reduction in ribosomal protein synthesis is sufficient to explain major effects on ribosome production after short-term TOR inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2011; 31(4): 803-17.
 - 29 Claypool JA, French SL, Johzuka K, Eliason K, Vu L, Dodd JA, *et al.* Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol Biol Cell* 2004; 15(2): 946-56.
 - 30 Chen H, Fan M, Pfeffer LM, Larabee RN. The histone H3 lysine 56 acetylation pathway is regulated by target of rapamycin (TOR) signaling and functions directly in ribosomal RNA biogenesis. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(14): 6534-46.
 - 31 Sanchez-Casalogue ME, Lee J, Diamond A, Shuldiner S, Moir RD, Willis IM. Differential phosphorylation of a regulatory subunit of protein kinase CK2 by target of rapamycin complex 1 signaling and the Cdc-like kinase Kns1. *J Biol Chem* 2015; 290(11): 7221-33.
 - 32 Kos-Braun IC, Jung I, Kosl M. Tor1 and CK2 kinases control a switch between alternative ribosome biogenesis pathways in a growth-dependent manner. *PLoS Biol* 2017; 15(3): e2000245.
 - 33 Reina JH, Azzouz TN, Hernandez N. Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription. *PLoS One* 2006; 1: e134.
 - 34 Huber A, Bodenmiller B, Uotila A, Stahl M, Wanka S, Gerrits B, *et al.* Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev* 2009; 23(16): 1929-43.
 - 35 Lee J, Moir RD, McIntosh KB, Willis IM. TOR signaling regulates ribosome and tRNA synthesis via LAMMER/Clk and GSK-3 family kinases. *Mol Cell* 2012; 45(6): 836-43.
 - 36 Vannini A, Ringel R, Kusser AG, Berninghausen O, Kassavetis GA, Cramer P. Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell* 2010; 143(1): 59-70.
 - 37 Graczyk D, Debski J, Muszyńska G, Bretner M, Lefebvre O, Boguta M. Casein kinase II-mediated phosphorylation of general repressor Maf1 triggers RNA polymerase III activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(12): 4926-31.
 - 38 Moir RD, Lee J, Willis IM. Recovery of RNA polymerase III transcription from the glycerol-repressed state: revisiting the role of protein kinase CK2 in Maf1 phosphoregulation. *J Biol Chem* 2012; 287(36): 30833-41.
 - 39 Lee J, Moir RD, Willis IM. Differential phosphorylation of RNA polymerase III and the initiation factor TFIIB in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 2015; 10(5): e0127225.
 - 40 Chymkowitz P, Nguéa PA, Aanes H, Robertson J, Klungland A, Enserink JM. TORC1-dependent sumoylation of Rpc82 promotes RNA polymerase III assembly and activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(5): 1039-44.
 - 41 Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, *et al.* Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2002; 298(5594): 799-804.
 - 42 Martin DE, Souillard A, Hall MN. TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 2004; 119(7): 969-79.
 - 43 Schawalder SB, Kabani M, Howald I, Choudhury U, Werner M, Shore D. Growth-regulated recruitment of the essential yeast ribosomal protein gene activator Ifh1. *Nature* 2004; 432(7020): 1058-61.
 - 44 Berger AB, Decourty L, Badis G, Nehrbass U, Jacquier A, Gadal O. Hmo1 is required for TOR-dependent regulation of ribosomal protein gene transcription. *Mol Cell Biol* 2007; 27(22): 8015-26.
 - 45 Jorgensen P, Rupes I, Sharom JR, Schnepfer L, Broach JR, Tyers M. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* 2004; 18(20): 2491-505.
 - 46 Lempiäinen H, Uotila A, Urban J, Dohnal I, Ammerer G, Loewith R, *et al.* Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling. *Mol Cell* 2009; 33(6): 704-16.
 - 47 Singh J, Tyers M. A Rab escort protein integrates the secretion system with TOR signaling and ribosome biogenesis. *Genes Dev* 2009; 23(16): 1944-58.
 - 48 Freckleton G, Lippman SI, Broach JR, Tavazoie S. Microarray profiling of phage-display selections for rapid mapping of transcription factor-DNA interactions. *PLoS Genet* 2009; 5(4): e1000449.
 - 49 Zhu C, Byers KJ, McCord RP, Shi Z, Berger MF, Newburger DE, *et al.* High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res* 2009; 19(4): 556-66.
 - 50 Liko D, Slattery MG, Heideman W. Stb3 binds to ribosomal RNA processing element motifs that control transcriptional responses to growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2007; 282(36): 26623-8.
 - 51 Huber A, French SL, Tekotte H, Yerlikaya S, Stahl M, Perepelkina MP, *et al.* Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex

- RPD3L. EMBO J 2011; 30(15): 3052-64.
- 52 González A, Shimobayashi M, Eisenberg T, Merle DA, Pendl T, Hall MN, *et al.* TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One 2015; 10(3): e0120250.
- 53 Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. Biochem J 2012; 441(1): 1-21.
- 54 Yerlikaya S, Meusburger M, Kumari R, Huber A, Anrather D, Costanzo M, *et al.* TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 2016; 27(2): 397-409.
- 55 Panić L, Tamarut S, Sticker-Jantschkeff M, Barkić M, Solter D, Uzelac M, *et al.* Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation. Mol Cell Biol 2006; 26(23): 8880-91.
- 56 Honma Y, Kitamura A, Shioda R, Maruyama H, Ozaki K, Oda Y, *et al.* TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients. EMBO J 2006; 25(16): 3832-42.
- 57 Breitreutz A, Choi H, Sharom JR, Boucher L, Neduva V, Larsen B, *et al.* A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. Science 2010; 328(5981): 1043-6.
- 58 Soulard A, Cremonesi A, Moes S, Schütz F, Jenö P, Hall MN. The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. Mol Biol Cell 2010; 21(19): 3475-86.