



# 磷酸化与泛素化修饰对雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (TORC1) 信号通路的调控\*

姚怡辰\*\* 徐鹏飞\*\* 许国强\*\*\* 滕昕辰\*\*\*

(苏州大学药学院, 苏州 215123)

**摘要** TORC1 是一个在真核生物中高度保守的激酶复合物, 能通过感应营养物质、生长因子、能量水平等信号调节细胞代谢水平和生长。TORC1 信号通路的失调与代谢紊乱、神经病变、癌症和衰老密切相关。本文比较了酵母细胞及哺乳动物细胞中 TORC1 的结构与功能, 并着重综述了磷酸化和泛素化修饰在 TORC1 信号通路中的作用。由于磷酸化和泛素化在传导外界信号至 TORC1 以及调节 TORC1 下游通路中均发挥重要作用, 因此深入研究磷酸化和泛素化对 TORC1 信号通路的影响, 将为药物靶点的发现提供新思路。

**关键词** 酵母 Tor1, mTOR, 酵母 TORC1 信号通路, mTORC1 信号通路, 磷酸化, 泛素化

**中图分类号** Q2, Q25, Q291

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0219

雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (TORC1) 能感知多种信号, 包括营养物质、生长因子、能量水平等, 也是调节细胞生长和代谢的关键复合物。在营养、生长因子和能量水平高时, TORC1 被激活, 提高合成代谢并抑制分解代谢以促进细胞生长; 而在营养、生长因子和能量缺乏时, TORC1 活性被抑制, 使细胞生长停止以避免耗尽所有供给<sup>[1]</sup>。TORC1 的活性对维持细胞稳态至关重要, TORC1 失调会导致外界信号与细胞生长脱节, 从而导致多种疾病。了解 TORC1 信号通路有助于更好地理解相关疾病的病理机制<sup>[1]</sup>。

蛋白质翻译后修饰是 TORC1 接收和传导信号的途径之一, 其中磷酸化和泛素化修饰在 TORC1 信号通路中发挥主要作用。磷酸化指由蛋白激酶催化磷酸基团转移到底物蛋白氨基酸 (如丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸等) 残基上的过程。当受到上游信号刺激时, 蛋白激酶可以被激活并磷酸化下游底物从而调节底物的定位、结构或活性, 以此传递信号<sup>[2]</sup>。泛素化则是指泛素的 C 端在 E1 泛素活化酶、E2 泛素缀合酶和 E3 泛素连接酶的多酶级联催化下共价结合到底物蛋白上的过程。泛素的 N 端甲硫氨酸和 7 个赖氨酸均可被另一个泛素分子的羧基端修饰, 从而形成多聚泛素链, 其中泛素连接方式主要分为 8 种 (M1、K6、K11、K27、K29、K33、

K48、K63), 可以调控底物蛋白的不同功能。如 K48 多聚泛素化主要发挥泛素-蛋白酶体系统降解底物蛋白的作用, 而 K63 多聚泛素化主要起调节内吞、蛋白质相互作用和信号转导等作用<sup>[3]</sup>。

本论文通过总结酵母 TORC1 和哺乳动物 mTORC1 信号通路中蛋白质的磷酸化和泛素化修饰, 及其在 TORC1 信号通路中所发挥的作用, 以期对相关疾病药物靶点的发现提供新思路。

## 1 TORC1 复合物的结构与功能

### 1.1 TORC1 复合物的组成

雷帕霉素靶蛋白 (TOR) 是一种磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 同源的蛋白激酶, 在调控细胞内外各种刺激下的多种细胞过程中起关键作用<sup>[4]</sup>, 最初是在对雷帕霉素有抗性的酵母突变体中发现的, 随后 TOR 的同源蛋白在所有真核生物中被鉴定出来<sup>[5]</sup>。研究表明, TOR 蛋白在真核生物中高度保

\* 苏州大学“大学生创新创业训练计划”(202010285048Z) 和国家自然科学基金 (31970550) 资助项目。

\*\* 并列第一作者。

\*\*\* 通讯联系人。

许国强 Tel: 0512-65882723, E-mail: gux2002@suda.edu.cn

滕昕辰 Tel: 0512-65882089, E-mail: xcteng@suda.edu.cn

收稿日期: 2022-05-12, 接受日期: 2022-08-12

守,不同物种的TOR蛋白在结构和功能上具有高度同源性<sup>[6]</sup>。低等真核生物(如酵母)通常存在两种TOR基因,它们在蛋白质合成和细胞周期调节中具有共同的功能,而高等真核生物仅存在1种TOR基因<sup>[7]</sup>。TOR蛋白能够形成两种功能和结构上不同的蛋白质复合物TOR复合物1(TORC1)和2(TORC2),其中只有TORC1对雷帕霉素敏感<sup>[7]</sup>。TORC1在真核生物中普遍存在,而TORC2在除植物外的多种真核生物中存在<sup>[8]</sup>。TORC1通过调节蛋白质合成和自噬来调控细胞生长<sup>[1]</sup>。营养物质、能量水平和生长因子等多种信号都能调控

TORC1活性,其中氨基酸是激活TORC1的必要条件<sup>[9]</sup>。

酵母TORC1主要由Tor1/Tor2、Kog1、Lst8和Tco89组成<sup>[6]</sup>(图1)。哺乳动物mTORC1则主要由mTOR(与酵母Tor1/2同源)、RAPTOR(mTOR的调节相关蛋白,与酵母Kog1同源)、mLST8(哺乳动物致死SEC13蛋白8,也称为GβL,与酵母Lst8同源)、抑制亚基PRAS40(40 ku的富脯氨酸AKT底物)和DEPTOR(包含DEP结构域的mTOR相互作用蛋白)构成<sup>[6]</sup>(图1)。

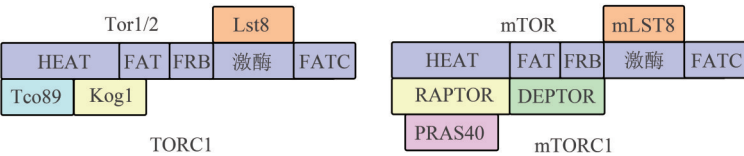


Fig. 1 Illustration of the yeast TORC1 and mTORC1 complexes  
图1 酵母TORC1和mTORC1复合物示意图

酵母TORC1主要由Tor1/Tor2、Kog1、Lst8和Tco89组成。哺乳动物mTORC1主要由mTOR、RAPTOR、mLST8、PRAS40和DEPTOR组成。其中,Tor1/2和mTOR同源,Kog1和RAPTOR同源,Lst8和mLST8同源。

1.2 TOR蛋白的结构与功能

TOR蛋白属于PI3K相关激酶(PIKK)家族,这个家族除了TOR蛋白,还包括哺乳动物ATM、ATR、DNA依赖蛋白激酶、果蝇Mei-41、酵母Mec1、Rad53和Tel1蛋白等<sup>[10]</sup>。尽管TOR蛋白与PI3K同源,但有研究表明TOR蛋白具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性而不具有酯酶活性<sup>[11]</sup>。TOR在酵母中有两个旁系同源蛋白Tor1和Tor2,两者序列高度保守,且在雷帕霉素敏感信号通路中存在功能冗余<sup>[6]</sup>。高等真核生物只有一个TOR蛋白(如哺乳动物中的mTOR),与酵母Tor1和Tor2高度同源(40%~60%的序列相同)<sup>[12]</sup>。

酵母Tor1是一种包含多种结构域的大型蛋白激酶,有2470个氨基酸(图2)。所有TOR蛋白的

一个共同特征是在C端具有与PI3K和PI4K相关催化域高度同源的激酶结构域<sup>[13]</sup>。蛋白质序列分析表明,TOR蛋白激酶结构域的完整性对其功能至关重要<sup>[11]</sup>。Tor1的N端包含一个HEAT(Huntington、EF3、PR65/A、TOR)结构域,HEAT基序是一个介导蛋白质-蛋白质相互作用的α螺旋结构,在N端串联重复多达11次<sup>[14]</sup>。Tor1的中间部分包含FAT(FRAP-ATM-TRRAP)结构域,该结构域在PIKK家族的所有成员中都存在,可介导与其他蛋白质的相互作用<sup>[11, 15]</sup>。在FAT和激酶结构域之间的是FKBP12-雷帕霉素复合物的结合位点(FKBP12-rapamycin binding, FRB)结构域,是FKBP12-雷帕霉素复合物的结合区域<sup>[16]</sup>。Tor1的C端约30个残基形成FATC(FAT羧基末端)结

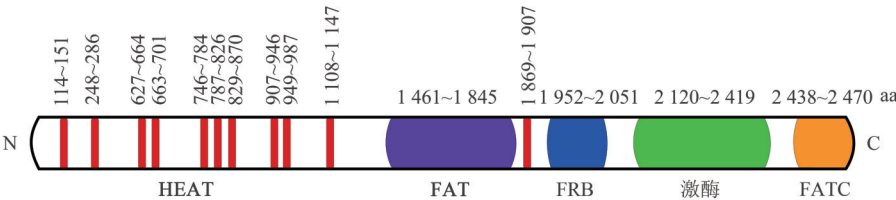


Fig. 2 Illustration of the domain structure of the yeast Tor1  
图2 酵母Tor1结构示意图

酵母Tor1是由2470个氨基酸组成的包含多种结构域的蛋白激酶,从N端到C端依次包括HEAT、FAT、FRB、激酶和FATC结构域。各结构域的具体特点及功能见正文。

构域,由1个 $\alpha$ 螺旋和1个二硫键组成,可受胞质氧化还原电位调控,该结构域对激酶活性很重要<sup>[15]</sup>。

哺乳动物 mTOR 和酵母 Tor1 类似,也是一种包含多种结构域的大型蛋白激酶,有 2 549 个氨基酸。在结构上, mTOR 也由 N 端 HEAT 重复序列、中间 FAT 结构域、与 FKBP12-雷帕霉素复合物结合的 FRB 结构域、C 端激酶结构域和末端 FATC 结构域组成,且各个结构域功能也与酵母 Tor1 类似<sup>[17]</sup>。激酶结构域调控 mTORC1 的催化活性。HEAT 重复序列和 FAT 结构域参与了 mTOR 与其他蛋白质的相互作用<sup>[18]</sup>。

### 1.3 TORC1复合物中与TOR相互作用的蛋白质

TOR 蛋白与 Kog1/RAPTOR、Lst8/mLST8 等结合形成 TORC1 复合物。Kog1 及其在哺乳动物中的同源蛋白 RAPTOR 在 TOR 信号传导中发挥积极的作用<sup>[12]</sup>。这两个蛋白质结构相似,在 N 端含有一个保守的 RAPTOR 氨基末端保守结构域 (RNC),3 个 HEAT 重复序列和 C 端的 7 个 WD40 (40 个氨基酸的色氨酸-天冬氨酸重复序列) 结构域<sup>[7]</sup>。有研究表明,雷帕霉素可破坏 mTOR-RAPTOR 的相互作用,但是不会使 Kog1 与酵母的 Tor1 分离。Kog1/RAPTOR 能作为一个支架将 S6K1 和 4E-BP1 底物募集到 TORC1<sup>[19]</sup>。S6K1 和 4E-BP1 的 TOR 信号 (TOR signaling, TOS) 基序被 Kog1/RAPTOR 的 N 端 RNC 结构域识别,大大提高了被 TOR 磷酸化的效率<sup>[19]</sup>。此外, Kog1/RAPTOR 还起到稳定 TOR 的作用,并赋予其响应上游信号的能力<sup>[12]</sup>。由于 Kog1/RAPTOR 的 C 端 WD40 重复序列与 TOR 的 N 端 HEAT 重复序列结合,而 Kog1/RAPTOR 的 N 端 RNC 结构域靠近 TOR 激酶结构域,因此 RNC 结构域很可能发挥着将底物引入催化区域附近的作用<sup>[17]</sup>。Lst8 和其在哺乳动物中的同源蛋白 mLST8 主要与 TOR 蛋白的激酶结构域结合,可稳定 TOR 蛋白的激酶活性。但是其似乎并不是 TOR 和 Kog1/RAPTOR 结合所必需的,因此可能在 TORC1 功能中不起关键作用<sup>[17]</sup>。

## 2 TORC1信号通路

### 2.1 TORC1上游信号

TORC1 能响应上游能量状态、生长因子、营养条件等信号,以此调控细胞的生长、自噬、代谢等生理活动<sup>[1]</sup>。

在酵母中, TORC1 可对氨基酸和葡萄糖信号

作出反应。氨基酸信号可以分别由 RAG GTP 酶和 Whi2 介导的两条信号通路转导至 TORC1。在氮源充足的情况下, Ego1-Ego2-Ego3 三元复合物能发挥骨架蛋白的功能,募集 RAG GTP 酶 Gtr1-Gtr2 形成 EGO 复合物,使 Gtr1 与 GTP 结合, Gtr2 与 GDP 结合,形成有活性的 RAG GTP 酶复合物,从而招募并激活 TORC1<sup>[20]</sup>。而 Whi2 可感知低浓度氨基酸环境,并在此条件下抑制 TORC1 活性。此通路独立于 RAG GTP 酶通路,且需要磷酸酶 Psl1/2 的参与<sup>[21]</sup>。AMP 活化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Snf1 主要参与葡萄糖缺乏条件下对 TORC1 的抑制作用<sup>[22]</sup>。当葡萄糖缺乏时, Snf1 被磷酸化而激活,并进一步磷酸化 Kog1 的 Ser722 和 Ser792 位点。Kog1 的磷酸化会导致其与 TORC1 解离,使 TORC1 失活<sup>[23]</sup>。

在哺乳动物中, mTORC1 能感应氨基酸、生长因子、葡萄糖等多种信号。氨基酸充足时, RAG GTP 酶形成的异二聚体中的 RAGA/B 与 GTP 结合,而 RAGC/D 与 GDP 结合,从而形成有活性的 RAG GTP 酶复合物并与 Ragulator 复合物结合,以此招募和激活 mTORC1<sup>[24]</sup>。生长因子可以抑制结节性硬化症复合物 TSC (tuberous sclerosis complex),而 TSC 可以抑制 Ras 相关小 GTP 酶 Rheb,所以抑制 TSC 可以使 Rheb 激活从而激活 mTORC1<sup>[25]</sup>。当葡萄糖缺乏时,细胞内 AMP/ATP 比值变大,从而磷酸化并激活能量响应调节子 AMPK,而 AMPK 可以通过磷酸化 RAPTOR 或者激活 TSC 抑制 mTORC1 活性<sup>[25]</sup>。

### 2.2 TORC1下游信号通路

在酵母中, TORC1 主要通过 AGC (环磷酸腺苷 (cAMP) 依赖的蛋白激酶 A, 环磷酸鸟苷 (cGMP) 依赖的蛋白激酶 G 以及  $\text{Ca}^{2+}$  和磷脂依赖的蛋白激酶 C 家族) 激酶 Sch9 (与哺乳动物细胞的核糖体蛋白 S6 激酶 S6K 同源) 和 Tap42-PP2A (蛋白磷酸酶 2A 调节亚单位 Tap42-蛋白磷酸酶 2A) 调控细胞的生长和代谢<sup>[26]</sup>。在营养充足的情况下, TORC1 能激活 Sch9 以及几个转录因子 (包括 Sfp1、Dot6/Tod6、Fhl1、Maf1 和 Stb3 等),以促进蛋白质和核糖体的合成。同时,被激活的 TORC1 能结合并抑制 Tap42-PP2A<sup>[26]</sup>。而 Tap42-PP2A 主要有 3 个作用,一是能激活 Npr1、Gln3、Rtg1/Rtg3 等因子介导的氨基酸合成和氮同化途径,二是能激活 Msn2/Msn4 介导的对外界刺激的响应,三是激活 Atg1 和其他因子介导的细胞自噬<sup>[26]</sup>。所



以 TORC1 能通过结合并抑制 Tap42-PP2A 来抑制应激、自噬等生理效应。

在哺乳动物中, mTORC1 信号通过刺激生物合成途径促进细胞生长, 包括蛋白质、脂质和核苷酸的合成, 并抑制自噬<sup>[1]</sup>。mTORC1 磷酸化真核起始因子 4E 结合蛋白 (4E-BPs), 促进 4E-BPs 释放真核翻译起始因子 4E (eIF4E), 增强 mRNA 的翻译, 从而促进蛋白质的合成<sup>[27]</sup>。mTORC1 主要通过两个途径促进脂质的合成: 一个途径是 mTORC1 磷酸化甾醇调控元件结合蛋白 (SREBP) 的抑制因子 LIPIN1, 促进 SREBPs 从内质网膜易位到细胞核<sup>[28]</sup>, 上调细胞核中相关基因来促进脂质和胆固醇的合成<sup>[29]</sup>; 另一个途径是 mTORC1 活化过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), 控制参与脂肪生成的脂质稳态基因的表达, 从而促进脂肪生成<sup>[1]</sup>。此外, mTORC1 还能通过调节核苷酸生物合成的一碳单位的供应来调控增殖细胞中的 DNA 复制和 rRNA 合成。mTORC1 能激活转录因子 ATF4 及其下游靶蛋白亚甲基四氢叶酸还原酶 2 以驱动嘌呤的从头合成<sup>[30]</sup>。mTORC1 还能通过 S6K1 促进氨基甲酰磷酸合成酶 2、天冬氨酸转氨甲酰酶、二氢乳清酸酶的磷酸化和活化, 从而驱动嘧啶的合成<sup>[1]</sup>。mTORC1 还能通过上调转录因子缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 增加糖酵解酶的表达, 促进糖酵解<sup>[31]</sup>。并且 mTORC1 激活的 SREBPs 也能促进磷酸戊糖途径, 为脂质和核苷酸合成提供 NADPH 和含碳前体<sup>[31]</sup>。同时 mTORC1 还能通过磷酸化 UNC-51 样自噬激活激酶 (ULK1) 来抑制分解代谢程序, 从而抑制自噬<sup>[32]</sup>。

### 2.3 TORC1对生命活动的重要性

TORC1 作为细胞生长的中心控制因子, 能够整合能量、生长因子和营养物质的信号, 调控细胞的生长<sup>[1]</sup>。在许多人类疾病 (如癌症、糖尿病、神经退行性疾病等<sup>[1]</sup>) 中已经发现了 TORC1 失调, 因此, TORC1 是临床疾病如癌症<sup>[33]</sup>、神经退行性疾病<sup>[34-35]</sup> 治疗中的一个重要靶点。

对于大多数真核细胞, 雷帕霉素对 TORC1 的抑制会导致其生长停滞。受药物影响的细胞退出细胞周期, 变得对生长因子和营养刺激无反应。但是, 不同细胞对雷帕霉素的敏感性各不相同。淋巴细胞和某些癌细胞比如乳腺癌、前列腺癌、肺癌细胞等属于雷帕霉素高敏感细胞。这种差异化的敏感性允许使用雷帕霉素及其衍生物选择性地阻断癌细胞的生长和增殖, 而不影响人体中正常细胞的增

殖, 使雷帕霉素成为潜在抗癌药<sup>[36-37]</sup>。

## 3 翻译后修饰对TORC1信号通路的影响

蛋白质是生命活动的主要承担者, 其不仅是机体组织、器官的重要组成部分, 更是机体内各种功能的执行者, 如机体的免疫、物质的运输、催化和调节生化反应、调控细胞的生长和凋亡等。蛋白质功能的正常发挥决定了正常的生命活动。蛋白质一级结构和空间结构决定了蛋白质的功能, 而翻译后修饰在蛋白质成熟过程中发挥着重要的作用。翻译后修饰使蛋白质结构更加复杂, 功能更加完善, 并且细胞内的许多生理功能均依赖于动态的蛋白质翻译后修饰来调控。同时, 蛋白质的翻译后修饰也使相同的编码基因产生功能不同的蛋白质, 赋予生命活动更多的复杂性。

对于 TORC1 信号通路中的蛋白质, 最主要的翻译后修饰是磷酸化和泛素化。磷酸化和泛素化在动态调节 TORC1 信号通路中发挥关键作用, 这些修饰的缺陷会引起一系列细胞功能失调乃至疾病。通过了解 TORC1 信号通路中的磷酸化和泛素化位点可为探索药物治疗靶标提供新思路。

### 3.1 酵母TORC1通路中的蛋白质翻译后修饰

#### 3.1.1 磷酸化对酵母TORC1通路的影响

酵母 TORC1 的下游效应器主要有 Sch9、Ypk3、PP2A、Atg13 和 Npr1 (图 3)。TORC1 能磷酸化 Sch9 的 Thr737, 活化的 Sch9 能磷酸化核糖体蛋白 Rps6, 这样 TORC1 和 Sch9 就能发挥激酶级联作用, 调节酵母生长<sup>[38]</sup>。TORC1 介导酵母 Rps6 中 Ser232 和 Ser233 位点的磷酸化。这两个磷酸化位点高度保守, 分别对应于高等真核生物 Rps6 蛋白的 Ser235 和 Ser236。也有研究认为 Ypk3 是酵母中的 Rps6 激酶<sup>[39]</sup>, TORC1 会导致 Ypk3 羧基末端的 Ser505、Ser513、Ser517、Ser519 磷酸化, 活化的 Ypk3 进一步磷酸化 Rps6<sup>[40]</sup>, 从而促进蛋白质翻译, 调节生长。

酵母 TORC1 活性状态还能由蛋白磷酸酶 PP2A 传递。在营养充足时, 活化的 TORC1 先磷酸化 Tap42, 磷酸化的 Tap42 和 PP2A 的催化亚基 Pph21/22 及 Sit4 形成复合物, 使 PP2A 的磷酸酶活性受到抑制。在营养缺乏或雷帕霉素处理后, PP2A 的磷酸酶活性被激活, 进而使下游蛋白质去磷酸化。PP2A 自身去磷酸化可导致 TAP42-PP2A-Sit4 复合物解离和 Tap42 的去磷酸化, 使 TORC1 失活后产生一个自我抑制信号<sup>[38]</sup>。通过 PP2A 途径可

以调节应激反应和氮代谢。

在营养充足的条件下, 酵母 TORC1 能磷酸化自噬相关蛋白 Atg13 的 Ser348、Ser496、Ser535 和 Ser541 位点<sup>[41]</sup>, 从而阻止 Atg1-Atg13-Atg17 复合物的形成并阻断自噬; 在营养匮乏的时候 TORC1 会失活, 并通过 Atg13 的去磷酸化促进复合物的形成, 诱导自噬<sup>[42]</sup>。

酵母 TORC1 还能磷酸化质膜氨基酸转运体内吞作用的负调节因子 Npr1 激酶, 抑制其活性, 促进氨基酸转运体的内吞和降解。在氮源缺乏的时候, 活化的 Npr1 能使铵转运蛋白 Mep2 羧基端的自抑制结构域 Ser457 磷酸化从而激活 Mep2, 促进氨基酸的吸收<sup>[43-44]</sup>。

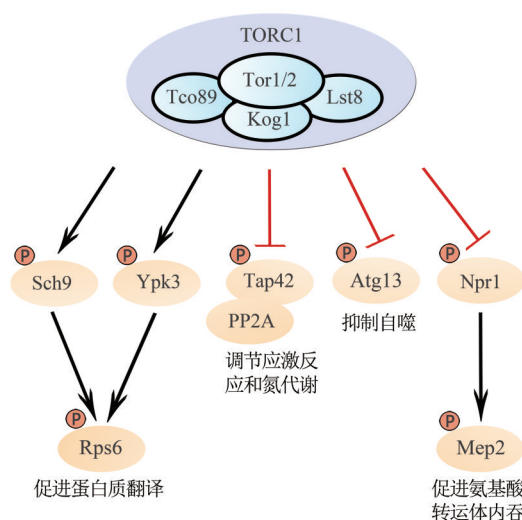


Fig. 3 Illustration of the phosphorylation of each protein in the yeast TORC1 pathway

图3 酵母TORC1通路中各蛋白质磷酸化示意图

TORC1 的下游效应器主要有 Sch9、Ypk3、PP2A、Atg13 和 Npr1。TORC1 通过磷酸化 Sch9 和 Ypk3 来增强它们的活性, 从而促进蛋白质翻译; 也能通过磷酸化并抑制 Tap42、Atg13 和 Npr1 的活性, 调节应激反应和氮代谢, 以及抑制自噬。黑色箭头表示活性激活, 红色 T 型箭头表示活性抑制, P 表示磷酸化。

### 3.1.2 泛素化对酵母 TORC1 通路的影响

目前对于酵母 TORC1 信号通路中蛋白质泛素化的研究较少, 数据库中预测的 Tor1 泛素化位点为 K1186 和 K1196, Tor2 的泛素化位点为 K1237, Kog1 的泛素化位点是 K475, 而 Tco89 的 K276 和 K279 也是可能的泛素化位点<sup>[45]</sup>。这说明酵母 TORC1 信号传导有可能受到泛素化影响, 需要进一步实验证明酵母 TORC1 通路中各蛋白质的泛素化修饰对这条信号通路及其功能的影响。

## 3.2 mTORC1 通路中的蛋白质翻译后修饰

### 3.2.1 磷酸化对 mTORC1 通路的影响

mTORC1 上游的 AMPK 在营养缺乏时介导 RAPTOR 的 Ser792 磷酸化并诱导其与 14-3-3 结合从而抑制 mTORC1<sup>[46]</sup>。而 AKT 在生长因子存在时介导 PRAS40 磷酸化并诱导其与 14-3-3 结合从而激活 mTORC1<sup>[47]</sup> (图4)。

mTOR 能在 Ser2448、Ser2481、Thr2446 和 Ser1261 等位点磷酸化<sup>[48]</sup>。Ser2448 位点的磷酸化是由 S6K 介导的<sup>[49]</sup>, 主要发生在 mTORC1 中的 mTOR<sup>[48]</sup>。Ser2481 是一个雷帕霉素不敏感的自磷酸化位点<sup>[50]</sup>, 该位点的磷酸化主要发生在 mTORC2 中的 mTOR<sup>[48]</sup>。Thr2446 可能被 AMPK 磷酸化, 并且磷酸化水平在营养缺乏时升高, 在胰岛素刺激时降低<sup>[51]</sup>。Rheb 磷酸化 mTOR 的 Ser1261 位点促进 mTORC1 介导的底物磷酸化和细胞生长, 并且该位点的磷酸化是 mTOR Ser2481 自磷酸化和 S6K1 磷酸化所必需的<sup>[52]</sup>。

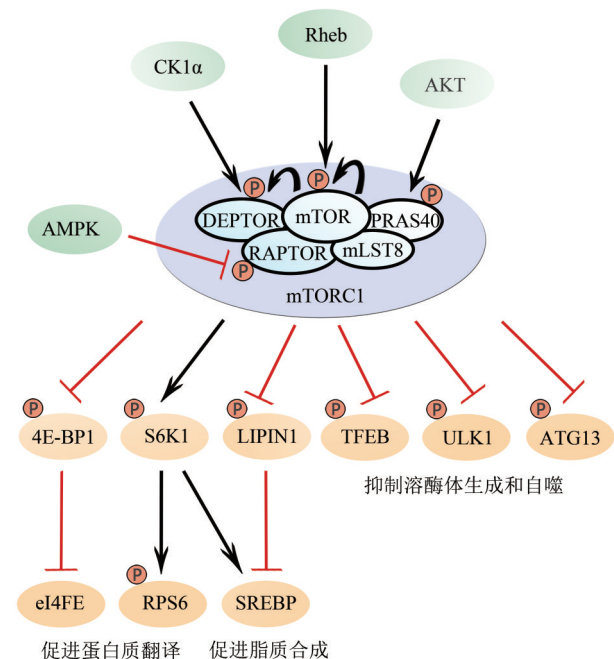
DEPTOR 主要与 mTOR 相互作用来调控 mTORC1 活性。DEPTOR 由 3 个不同的高度保守的区域组成, 从 N 端到 C 端分别为两个串联 DEP 结构域 (DEPt), 长连接子和 PDZ 结构域<sup>[53]</sup>。在饥饿条件下, DEPTOR 的长连接子和 PDZ 结构域分别与 mTOR 的 FRB 和 FAT 结构域相互作用, 并抑制 mTOR 的激酶活性<sup>[54]</sup>; 而在营养丰富的条件下, mTOR 在 Ser293 和 Ser299 上磷酸化 DEPTOR, 促进 CK1 $\alpha$  在 Ser286、Ser287 和 Ser291 上磷酸化 DEPTOR<sup>[55]</sup>。mTOR 和 CK1 $\alpha$  对 DEPTOR 的磷酸化促进泛素连接酶  $\beta$ -TrCP 与 DEPTOR 结合, 从而介导 DEPTOR 的多聚泛素化和降解。而 DEPTOR Tyr289 位点的磷酸化破坏了其与 mTOR 的相互作用, 导致 mTOR 活性增加<sup>[56]</sup>。

mTORC1 下游的效应器主要包括 S6K1、4E-BP1、LIPIN1、TFEB、ULK1 和 ATG13 (图4)。mTORC1 对 S6K1 和 4E-BP1 的磷酸化能调节蛋白质翻译。mTORC1 能直接磷酸化 S6K1 的 Thr389 位点, 以激活 S6K1, 随后磷酸化 RPS6, 促进蛋白质翻译, 以此来调控细胞生长<sup>[57]</sup>。除此之外, mTORC1 还能直接磷酸化 4E-BP1 的两个磷酸化位点 Thr37 和 Thr46, 随后引起 Thr70 和 Ser65 的磷酸化。因为低磷酸化的 4E-BP1 与 eIF4E 具有高亲和力, 而多磷酸化的 4E-BP1 则导致 4E-BP1 从 eIF4E 释放, 从而激活 eIF4E 并增强核糖体募集, 启动翻译<sup>[57]</sup>。mTORC1 还能通过磷酸化活化 S6K1 或多位



点磷酸化抑制LIPIN1导致胆固醇调节元件结合蛋白SREBP去磷酸化,以促进脂质合成<sup>[28, 31]</sup>。

mTORC1抑制自噬也是通过磷酸化下游蛋白质实现的。mTORC1通过磷酸化转录因子TFEB的Ser142和Ser211位点抑制TFEB核易位,来抑制溶酶体生成和自噬<sup>[58]</sup>。ULK1是哺乳动物中酵母Atg1的同源物,激活的ULK1可和ATG13、FIP200以及ATG101组成复合物,促进自噬小体的生成,引发自噬。mTORC1可以磷酸化ULK1的Ser638和Ser758<sup>[59]</sup>,其中mTORC1磷酸化ULK1的Ser758,可以破坏ULK1和AMPK之间的相互作用,从而阻止了AMPK激活ULK1,抑制自噬<sup>[60]</sup>。mTORC1还可磷酸化ATG13的Ser258,从而对ULK1的自噬功能产生抑制作用,但此抑制作用不是通过改变ATG13和ULK1、FIP200的结合产生的,而是通过抑制ULK1的激活活性产生的<sup>[61]</sup>。



**Fig. 4 Illustration of the phosphorylation of each protein in the mTORC1 pathway**

**图4 mTORC1通路中各蛋白质磷酸化示意图**

mTORC1上游的AMPK在营养缺乏时介导RAPTOR磷酸化并诱导其与14-3-3结合从而抑制mTORC1。而AKT在生长因子存在时介导PRAS40磷酸化并诱导其与14-3-3结合从而激活mTORC1。Rheb可以磷酸化mTOR从而激活mTORC1,活化的mTORC1可自磷酸化以及磷酸化DEPTOR,DEPTOR还可被CK1α磷酸化。mTORC1下游的效应器主要包括S6K1、4E-BP1、ULK1、LIPIN1、TFEB、GRB10。mTORC1通过对下游效应蛋白的磷酸化调控,从而调节蛋白质和脂质的代谢,以及调控自噬。黑色箭头表示活性激活,红色T型箭头表示活性抑制,P表示磷酸化。

### 3.2.2 泛素化对mTORC1通路的影响

泛素介导的mTOR调控作为一种重要的调控手段,可以通过多种方式调控mTOR信号功能,如通过降解mTOR信号靶点终止mTOR信号,调节蛋白质在细胞的定位,或调节蛋白质与其结合伴侣的相互作用,而改变其生物学功能(图5)。

GATOR1通过抑制RAG GTP酶从而抑制mTORC1的活性,而GATOR2则通过抑制GATOR1的活性来激活mTORC1<sup>[62]</sup>。E3泛素连接酶RNF186的C10-20区域与亮氨酸传感器Sestrin2的C100-173区域结合,介导Sestrin2的Lys13位点泛素化及蛋白酶体途径降解,从而抑制Sestrin2和GATOR2的相互作用,并降低GATOR1对RAG GTP酶的抑制作用,以此增强mTORC1活性<sup>[63]</sup>;E3泛素连接酶RNF167可对Sestrin2进行K63多聚泛素化,增强其与GATOR2的相互作用,从而抑制mTORC1活性<sup>[64]</sup>。E3泛素连接酶RNF167还能介导mTORC1的胞质精氨酸传感器CASTOR1蛋白的K29多聚泛素化,从而导致CASTOR1的降解,减少CASTOR1与GATOR2的相互作用,从而增强mTORC1活性<sup>[65]</sup>。E3泛素连接酶RNF152和SCF(SKP1-Cullin1-F-box)<sup>SKP2</sup>可对RAGA进行K63多聚泛素化,以此招募RAGA的抑制剂GATOR1,从而抑制mTORC1活性<sup>[66-67]</sup>。RNF152还可诱导Rheb的Lys8位点泛素化,导致Rheb与TSC复合物结合,抑制mTORC1和Rheb的相互作用,从而使mTORC1失活<sup>[68]</sup>。E3泛素连接酶MAGE-A3/6-TRIM28可对AMPKα进行K48多聚泛素化并促进其降解,从而增加mTORC1活性<sup>[68]</sup>。

在氨基酸的诱导下,p62-TRAF6复合物可对mTOR进行K63多聚泛素化,从而招募mTOR到溶酶体并随后激活mTORC1,促进蛋白质合成和细胞生长。mTOR的泛素化修饰位点主要是Lys777、Lys782和Lys784。在氨基酸激活的细胞中,mTOR三重突变体Lys777/782/784A的表达能明显抑制S6K和4E-BP1的磷酸化。此外,mTOR的多聚泛素化选择性影响mTORC1的活性,而不影响mTORC2的活性<sup>[69]</sup>。mTOR的多聚泛素化是通过与E3泛素连接酶SCF<sup>FBXW7</sup>直接结合介导的,而SCF<sup>FBXW7</sup>主要结合在mTOR上保守的CDC磷酸化降解结构域(CPD)区<sup>[70]</sup>。

E3泛素连接酶TRAF2可对mLST8进行K63多聚泛素化,促进RAPTOR结合以维持mTORC1复合物稳态<sup>[67]</sup>。E3泛素连接酶DDB1-Cullin4泛素化

RAPTOR能通过非降解途径维持mTORC1的稳定,并且也是激活mTORC1所必需的<sup>[71]</sup>。mTOR、CKI、RSK和p38可以磷酸化DEPTOR,进一步引发E3泛素连接酶SCF<sup>β-TrCP</sup>泛素化并降解DEPTOR,进而激活mTORC1<sup>[55, 72-73]</sup>。

mTORC1下游信号也可以通过泛素化被调控。LIPIN1抑制SREBP活性,当mTORC1磷酸化LIPIN1后,E3泛素连接酶SCF<sup>β-TrCP</sup>介导LIPIN1 Lys804位点的泛素化并降解LIPIN1,从而激活

SREBP,促进脂肪生成<sup>[74]</sup>。活化的mTORC1可通过磷酸化TFEB抑制自噬,而E3泛素连接酶STUB1能泛素化并降解磷酸化的TFEB(无活性),促进非磷酸化的TFEB(有活性)二聚并入核,从而参与调节自噬和溶酶体功能<sup>[75]</sup>。ULK1的磷酸化增强了E3泛素连接酶NEDD4L对ULK1 Lys925和Lys933位点的泛素化,以此对ULK1进行K27和K29多聚泛素化,从而促进ULK1降解并抑制自噬<sup>[76]</sup>。

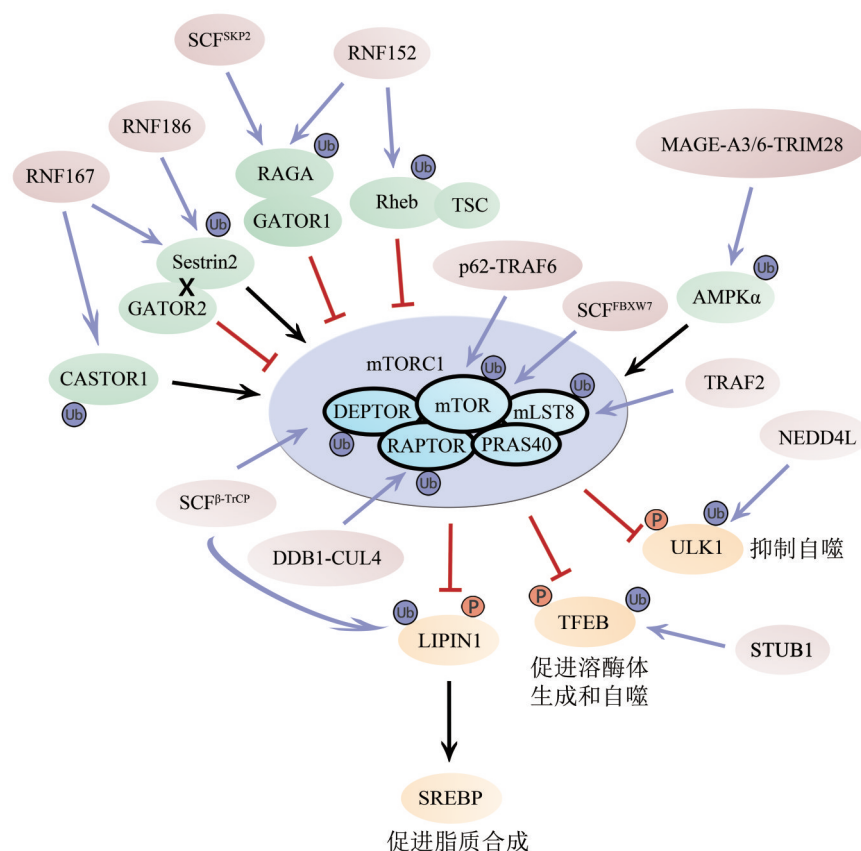


Fig. 5 Illustration of the ubiquitination of each protein in the mTORC1 pathway

图5 mTORC1通路中各蛋白质泛素化示意图

E3泛素连接酶有多种亚型,不仅可以通过泛素化mTORC1上游信号通路蛋白调控mTORC1活性,还可以通过泛素化mTORC1下游蛋白实现对细胞自噬、脂质合成等的调控。紫色箭头表示泛素化,黑色箭头表示活性激活,红色T型箭头表示活性抑制,P表示磷酸化,Ub表示泛素化。

## 4 问题与前景

蛋白质的磷酸化是动态可逆的过程,磷酸化和去磷酸化之间的平衡决定了底物蛋白的功能和命运,因此蛋白质的去磷酸化和磷酸化在细胞信号传导过程中发挥着同等重要的作用。底物蛋白的去磷酸化过程由磷酸酶催化,然而,在TORC1信号通

路中,只鉴定出一小部分磷酸酶,大部分蛋白质的去磷酸化途径及其功能仍不明确,还需进一步研究。从TORC1信号通路相互作用蛋白中筛选磷酸酶,或通过磷酸酶基因敲低、敲除筛选是鉴定TORC1信号通路磷酸酶的两个可行策略。

在TORC1信号通路中,某些蛋白质具有多个磷酸化位点,并且不同位点的磷酸化影响不同的蛋

白质功能。比如mTOR Ser2448和Thr2446位点的差异磷酸化可以作为一种开关机制,整合来自营养状态和生长因子的信号以控制蛋白质翻译的调节<sup>[51]</sup>;ULK1 Ser638和Ser758位点的磷酸化由mTOR介导且会抑制自噬而Ser555和Ser777位点的磷酸化由AMPK介导且会激活自噬<sup>[59]</sup>。但其他蛋白质是否存在多个磷酸化位点仍有待发现。磷酸化修饰蛋白质组学可以鉴定这些蛋白质在不同信号通路下发生的磷酸化修饰位点。

TORC1信号通路的磷酸化过程从酵母到哺乳动物的进化过程中相对保守,但泛素化过程在低等真核生物中不保守,大多数E3泛素连接酶和去泛素化酶只在小鼠和人类中保守。因此mTORC1信号通路中蛋白质的泛素化修饰可能是一个晚期进化事件,通过在高等真核生物中提供新的调节途径以适应更复杂的细胞环境,所以泛素化失调可能与人类疾病特异性相关<sup>[77]</sup>。

mTORC1信号通路的泛素化修饰中同一个E3泛素连接酶可能介导不同底物蛋白的泛素化。比如E3泛素连接酶SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>可以泛素化和降解DEPTOR从而激活mTORC1活性<sup>[72]</sup>,还可以泛素化和降解LIPIN1以此激活SREBP促进脂肪生成<sup>[74]</sup>;E3泛素连接酶RNF167可对Sestrin2进行K63多聚泛素化以此抑制mTORC1活性<sup>[64]</sup>,还可通过K29多聚泛素化并降解CASTOR1以此激活TORC1活性<sup>[65]</sup>。并且同一个底物蛋白可能被不同E3泛素连接酶通过不同泛素化方式修饰,以此行使不同功能,比如Sestrin2既可能被RNF186通过K48多聚泛素化降解来激活mTORC1活性<sup>[63]</sup>,又可被RNF167进行K63多聚泛素化来抑制mTORC1活性<sup>[64]</sup>。E3泛素连接酶如何整合外界信号和下游泛素化底物及泛素化方式还有待进一步研究<sup>[77]</sup>。

在哺乳动物TORC1信号通路中磷酸化和泛素化之间存在紧密的协同作用。有些底物蛋白需要先被磷酸化再被泛素化,磷酸化可以影响底物蛋白泛素化途径,比如DEPTOR、LIPIN1、TFEB、ULK1的泛素化修饰都需要在磷酸化的基础上进行<sup>[74-76]</sup>。磷酸化还可以直接作用于E3泛素连接酶调节其活性,比如mTORC1-S6K途径通过磷酸化E3泛素连接酶RNF168的Ser60位点并通过降解抑制其E3连接酶活性,从而导致DNA损伤<sup>[78]</sup>。这种磷酸化和泛素化之间的交叉调控表明对细胞生物过程的调节并非以单一形式进行,而涉及复杂的调控网络,这有助于拓展底物蛋白的生理功能,并对

特定生物过程开展精准调控。目前,定量蛋白质组学和磷酸化修饰蛋白质组学已被用来研究特定信号通路中底物蛋白磷酸化和泛素化的交互应答<sup>[79]</sup>,对TORC1信号通路中蛋白质磷酸化和泛素化之间的交互应答形式和机制还有待进一步探索。

综上所述,磷酸化和泛素化对TORC1信号通路的调控研究仍有大量空白,但其对TORC1信号通路的重要影响有目共睹,具有广阔的研究前景和重大的研究意义。

## 5 结 语

TORC1信号通路是细胞内响应环境营养信号和调节生长代谢过程的一个重要的信号通路。该通路与诸多疾病的发生有关,如糖尿病、肿瘤、肥胖等,同时也是治疗肿瘤和癌症的一个可以成药的靶点。mTOR信号通路的过度激活会促进肿瘤细胞生长和增殖,其中mTORC1下游蛋白4E-BP1和eIF4E的失调在肿瘤形成中起关键作用。目前已经研发了多种雷帕霉素类似物作为mTOR的抑制剂来治疗癌症,例如替西罗莫司用于治疗晚期肾癌,依维莫司用于治疗复合型结节性硬化症<sup>[80]</sup>。有研究表明mTOR的过度激活还与癫痫发作有关,目前已有作为抗癫痫药物的mTOR抑制剂在进行临床试验<sup>[1]</sup>。因此研究该通路中主要的TOR蛋白对阐明该通路的分子机制有着重要的作用。

TOR蛋白序列在进化上高度保守,并且其调节细胞生长代谢的功能也是保守的。TOR蛋白与其他蛋白质结合,构成了TORC1复合物。TORC1复合物能响应环境信号,调控细胞的蛋白质合成和自噬等过程。

蛋白质的组成和空间结构决定了其生理功能,在各种应激反应中,调节蛋白质修饰位点和修饰水平等非常重要。因此蛋白质的翻译后修饰在细胞生长及应激反应过程中起着关键性的作用。TORC1信号通路的很多生理作用受到了蛋白质翻译后修饰的调控,因此研究TORC1上下游的翻译后修饰对阐明TORC1信号通路的生理作用有很重要的意义。但是当前对于该信号通路的翻译后修饰研究仍然不足,仅仅鉴别出其部分磷酸化和泛素化修饰位点,对于其他翻译后修饰(如甲基化、乙酰化、类泛素化等)的作用还未知,仍然需要更细致的研究。

正因为TORC1信号通路调控细胞的生长代谢,与诸多疾病尤其是癌症密切相关,所以阐明TORC1信号通路的分子机制有助于更好地理解疾



病的发病机制, 从而确定合理的疾病诊断指标, 并发现新的药物靶点用于药物研发。

### 参 考 文 献

- [1] Liu G Y, Sabatini D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, **21**(4): 183-203
- [2] Watanabe N, Osada H. Phosphorylation-dependent protein-protein interaction modules as potential molecular targets for cancer therapy. *Curr Drug Targets*, 2012, **13**(13): 1654-1658
- [3] Tracz M, Bialek W. Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, **26**(1): 1
- [4] Simcox J, Lamming D W. The central mTOR of metabolism. *Dev Cell*, 2022, **57**(6): 691-706
- [5] Heitman J, Movva N R, Hall M N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 1991, **253**(5022): 905-909
- [6] Morozumi Y, Shiozaki K. Conserved and divergent mechanisms that control TORC1 in yeasts and mammals. *Genes*, 2021, **12**(1): 88
- [7] Szwed A, Kim E, Jacinto E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiol Rev*, 2021, **101**(3): 1371-1426
- [8] Ingargiola C, Turqueto Duarte G, Robaglia C, *et al.* The plant target of rapamycin: a conductor TOR of nutrition and metabolism in photosynthetic organisms. *Genes*, 2020, **11**(11): 1285
- [9] Takahara T, Amemiya Y, Sugiyama R, *et al.* Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *J Biomed Sci*, 2020, **27**(1): 87
- [10] Abraham R T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 2001, **15**(17): 2177-2196
- [11] Alarcon C M, Heitman J, Cardenas M E. Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Mol Biol Cell*, 1999, **10**(8): 2531-2546
- [12] Adami A, Garcia-Alvarez B, Arias-Palomo E, *et al.* Structure of TOR and its complex with KOG1. *Mol Cell*, 2007, **27**(3): 509-516
- [13] Wullschleger S, Loewith R, Hall M N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006, **124**(3): 471-484
- [14] Consortium T U. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*, 2020, **49**(D1): D480-D489
- [15] Bosotti R, Isacchi A, Sonhammer E L. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25**(5): 225-227
- [16] Crespo J L, Hall M N. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(4): 579-591
- [17] Choi J, Chen J, Schreiber S L, *et al.* Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*, 1996, **273**(5272): 239-242
- [18] Bai X, Jiang Y. Key factors in mTOR regulation. *Cell Mol Life Sci*, 2010, **67**(2): 239-253
- [19] Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, *et al.* The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*, 2003, **278**(18): 15461-15464
- [20] Powis K, Zhang T, Panchaud N, *et al.* Crystal structure of the Ego1-Ego2-Ego3 complex and its role in promoting Rag GTPase-dependent TORC1 signaling. *Cell Res*, 2015, **25**(9): 1043-1059
- [21] Teng X, Hardwick J M. Whi2: a new player in amino acid sensing. *Curr Genet*, 2019, **65**(3): 701-709
- [22] Hughes Hallett J E, Luo X, Capaldi A P. State transitions in the TORC1 signaling pathway and information processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2014, **198**(2): 773-786
- [23] Hughes Hallett J E, Luo X, Capaldi A P. Snf1/AMPK promotes the formation of Kog1/Raptor-bodies to increase the activation threshold of TORC1 in budding yeast. *eLife*, 2015, **4**: e09181
- [24] Rogala K B, Gu X, Kadir J F, *et al.* Structural basis for the docking of mTORC1 on the lysosomal surface. *Science*, 2019, **366**(6464): 468-475
- [25] Zhang S, Lin X, Hou Q, *et al.* Regulation of mTORC1 by amino acids in mammalian cells: a general picture of recent advances. *Anim Nutr*, 2021, **7**(4): 1009-1023
- [26] Loewith R, Hall M N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, 2011, **189**(4): 1177-1201
- [27] Gingras A C, Gygi S P, Raught B, *et al.* Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 1999, **13**(11): 1422-1437
- [28] Peterson T R, Sengupta S S, Harris T E, *et al.* mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 2011, **146**(3): 408-420
- [29] Horton J D, Goldstein J L, Brown M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002, **109**(9): 1125-1131
- [30] Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult S J H, *et al.* mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*, 2016, **351**(6274): 728-733
- [31] Düvel K, Yecies J L, Menon S, *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 2010, **39**(2): 171-183
- [32] Carosi J M, Fourrier C, Bensalem J, *et al.* The mTOR-lysosome axis at the centre of ageing. *FEBS Open Bio*, 2022, **12**(4): 739-757
- [33] Popova N V, Jücker M. The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(4): 1743
- [34] Karalis V, Bateup H S. Current approaches and future directions for the treatment of mTORopathies. *Dev Neurosci*, 2021, **43**(3-4): 143-158
- [35] Moloney P B, Cavalleri G L, Delanty N. Epilepsy in the mTORopathies: opportunities for precision medicine. *Brain Commun*, 2021, **3**(4): fcab222
- [36] Kaur K, Anant A, Asati V. Structural aspects of mTOR inhibitors: search for potential compounds. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, **22**(6): 1037-1055
- [37] Qiu H Y, Wang P F, Zhang M. A patent review of mTOR inhibitors for cancer therapy (2011-2020). *Expert Opin Ther Pat*, 2021, **31**(11): 965-975

- [38] Broach J R. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 2012, **192**(1): 73-105
- [39] González A, Shimobayashi M, Eisenberg T, *et al.* TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 2015, **10**(3): e0120250
- [40] Yerlikaya S, Meusburger M, Kumari R, *et al.* TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2016, **27**(2): 397-409
- [41] Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, *et al.* Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol*, 2010, **30**(4): 1049-1058
- [42] Mugume Y, Kazibwe Z, Bassham D C. Target of rapamycin in control of autophagy: puppet master and signal integrator. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(21): 8259
- [43] Macgurn J A, Hsu P C, Smolka M B, *et al.* TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell*, 2011, **147**(5): 1104-1117
- [44] Boeckstaens M, Llinares E, Van Vooren P, *et al.* The TORC1 effector kinase Npr1 fine tunes the inherent activity of the Mep2 ammonium transport protein. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3101
- [45] Xu H, Zhou J, Lin S, *et al.* PLMD: an updated data resource of protein lysine modifications. *J Genet Genomics*, 2017, **44**(5): 243-250
- [46] Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 2008, **30**(2): 214-226
- [47] Vander Haar E, Lee S I, Bandhakavi S, *et al.* Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(3): 316-323
- [48] Copp J, Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res*, 2009, **69**(5): 1821-1827
- [49] Holz M K, Blenis J. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem*, 2005, **280**(28): 26089-26093
- [50] Peterson R T, Beal P A, Comb M J, *et al.* FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem*, 2000, **275**(10): 7416-7423
- [51] Cheng S W, Fryer L G, Carling D, *et al.* Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem*, 2004, **279**(16): 15719-15722
- [52] Acosta-Jaquez H A, Keller J A, Foster K G, *et al.* Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Mol Cell Biol*, 2009, **29**(15): 4308-4324
- [53] Peterson T R, Laplante M, Thoreen C C, *et al.* DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 2009, **137**(5): 873-886
- [54] Heimhalt M, Berndt A, Wagstaff J, *et al.* Bipartite binding and partial inhibition links DEPTOR and mTOR in a mutually antagonistic embrace. *eLife*, 2021, **10**: e68799
- [55] Duan S, Skaar J R, Kuchay S, *et al.* mTOR generates an auto-amplification loop by triggering the  $\beta$ TrCP- and CK1 $\alpha$ -dependent degradation of DEPTOR. *Mol Cell*, 2011, **44**(2): 317-324
- [56] L M G, Morin N, Lavoie N, *et al.* Tyrosine phosphorylation of DEPTOR functions as a molecular switch to activate mTOR signaling. *J Biol Chem*, 2021, **297**(5): 101291
- [57] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 2004, **18**(16): 1926-1945
- [58] Settembre C, Zoncu R, Medina D L, *et al.* A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J*, 2012, **31**(5): 1095-1108
- [59] Holczer M, Hajdú B, Lőrincz T, *et al.* Fine-tuning of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 17803
- [60] Kim J, Kundu M, Viollet B, *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 2011, **13**(2): 132-141
- [61] Puente C, Hendrickson R C, Jiang X. Nutrient-regulated phosphorylation of ATG13 inhibits starvation-induced autophagy. *J Biol Chem*, 2016, **291**(11): 6026-6035
- [62] Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, *et al.* Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, 2016, **351**(6268): 43-48
- [63] Lear T B, Lockwood K C, Ouyang Y, *et al.* The RING-type E3 ligase RNF186 ubiquitinates Sestrin-2 and thereby controls nutrient sensing. *J Biol Chem*, 2019, **294**(45): 16527-16534
- [64] Wang D, Xu C, Yang W, *et al.* E3 ligase RNF167 and deubiquitinase STAMBPL1 modulate mTOR and cancer progression. *Mol Cell*, 2022, **82**(4): 770-784.e779
- [65] Li T, Wang X, Ju E, *et al.* RNF167 activates mTORC1 and promotes tumorigenesis by targeting CASTOR1 for ubiquitination and degradation. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1055
- [66] Deng L, Jiang C, Chen L, *et al.* The ubiquitination of rag A GTPase by RNF152 negatively regulates mTORC1 activation. *Mol Cell*, 2015, **58**(5): 804-818
- [67] Jin G, Lee S W, Zhang X, *et al.* Skp2-mediated RagA ubiquitination elicits a negative feedback to prevent amino-acid-dependent mTORC1 hyperactivation by recruiting GATOR1. *Mol Cell*, 2015, **58**(6): 989-1000
- [68] Deng L, Meng T, Chen L, *et al.* The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, **5**(1): 11
- [69] Hardt M, Chantaravisoont N, Tamanoi F. Activating mutations of TOR (target of rapamycin). *Genes Cells*, 2011, **16**(2): 141-151
- [70] Mao J H, Kim I J, Wu D, *et al.* FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science*, 2008, **321**(5895): 1499-1502
- [71] Hussain S, Feldman A L, Das C, *et al.* Ubiquitin hydrolase UCH-L1 destabilizes mTOR complex 1 by antagonizing DDB1-CUL4-mediated ubiquitination of raptor. *Mol Cell Biol*, 2013, **33**(6):

- 1188-1197
- [72] Zhao Y, Xiong X, Sun Y. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF<sup>βTrCP</sup> E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol Cell*, 2011, **44**(2): 304-316
- [73] González-Terán B, López J A, Rodríguez E, *et al.* p38γ and δ promote heart hypertrophy by targeting the mTOR-inhibitory protein DEPTOR for degradation. *Nat Commun*, 2016, **7**: 10477
- [74] Shimizu K, Fukushima H, Ogura K, *et al.* The SCF<sup>β-TRCP</sup> E3 ubiquitin ligase complex targets Lipin1 for ubiquitination and degradation to promote hepatic lipogenesis. *Sci Signal*, 2017, **10**(460): eaah4117
- [75] Rao L, Sha Y, Eissa N T. The E3 ubiquitin ligase STUB1 regulates autophagy and mitochondrial biogenesis by modulating TFEB activity. *Mol Cell Oncol*, 2017, **4**(6): e1372867
- [76] Nazio F, Carinci M, Cecconi F. ULK1 ubiquitylation is regulated by phosphorylation on its carboxy terminus. *Cell Cycle*, 2017, **16**(19): 1744-1747
- [77] Jiang Y, Su S, Zhang Y, *et al.* Control of mTOR signaling by ubiquitin. *Oncogene*, 2019, **38**(21): 3989-4001
- [78] Xie X, Hu H, Tong X, *et al.* The mTOR-S6K pathway links growth signalling to DNA damage response by targeting RNF168. *Nat Cell Biol*, 2018, **20**(3): 320-331
- [79] Liu P, Cong X, Liao S, *et al.* Global identification of phospho-dependent SCF substrates reveals a FBXO22 phosphodegron and an ERK-FBXO22-BAG3 axis in tumorigenesis. *Cell Death Differ*, 2022, **29**(1): 1-13
- [80] Laplante M, Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 2012, **149**(2): 274-293



## Regulatory Function of Phosphorylation and Ubiquitination on The TORC1 Signaling Pathway\*

YAO Yi-Chen\*\*, XU Peng-Fei\*\*, XU Guo-Qiang\*\*\*, TENG Xin-Chen\*\*\*

(College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract** TORC1 is a highly conserved kinase complex in eukaryotes that regulates cellular metabolism and growth by sensing signals such as nutrients, growth factors, and energy levels. Dysregulation of the TORC1 signaling pathway has been associated with metabolic disorders, neurodegenerative diseases, cancer, and aging. In this review, we compare the structure and function of TORC1 in yeast and mammalian cells. TORC1 in yeast consists of Tor1/Tor2, Kog1, Lst8, and Tco89, while mTORC1 in mammalian consists of mTOR (homolog of yeast TOR1/2), RAPTOR (homolog of yeast Kog1), mLST8 (homolog of yeast Lst8), PRAS40 and DEPTOR. We then review the critical roles of phosphorylation and ubiquitination in transducing external signals to TORC1 and regulating the downstream signaling pathways. Yeast TORC1 phosphorylates and activates Sch9 and Ypk3 to promote protein translation. Yeast TORC1 also regulates stress response, nitrogen metabolism, and autophagy by phosphorylating and inhibiting Tap42, Atg13, and Npr1. Mammalian AMPK, CK1 $\alpha$ , Rheb, and AKT can phosphorylate mTORC1, thereby regulating the activity of mTORC1. mTORC1 regulates protein and lipid metabolism by phosphorylating downstream effector proteins, including S6K1, 4E-BP1, and LIPIN1. mTORC1 also inhibits autophagy by phosphorylating ULK1, TFEB, and ATG13. In addition, E3 ubiquitin ligases, including RNF167, RNF186, SCF, *etc.*, either cause protein degradation or promote protein interactions through different forms of polyubiquitination, thus precisely modulating the mTORC1 signaling pathways. The crosstalk between phosphorylation and ubiquitination involved in the mTORC1 signaling pathway is also summarized. An in-depth understanding of the effects of phosphorylation and ubiquitination on the TORC1 signaling pathway can provide new insights for drug target discovery.

**Key words** yeast Tor1, mTOR, yeast TORC1 signaling pathway, mTORC1 signaling pathway, phosphorylation, ubiquitination

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0219

\* This work was supported by grants from Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship, Soochow University (202010285048Z) and The National Natural Science Foundation of China (31970550).

\*\* These authors contributed equally to this work.

\*\*\* Corresponding author.

XU Guo-Qiang. Tel: 86-512-65882723, E-mail: gux2002@suda.edu.cn

TENG Xin-Chen. Tel: 86-512-65882089, E-mail: xcteng@suda.edu.cn

Received: May 12, 2022 Accepted: August 12, 2022