

DOI: 10.13376/j.cblls/2022128

文章编号: 1004-0374(2022)09-1155-13

# 哺乳动物细胞氨基酸转运体及胞内感受机制研究进展

陆心月<sup>1</sup>, 郑旭<sup>1,2</sup>, 王志钢<sup>1</sup>, 吴晓彤<sup>1\*</sup>

(1 内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010070; 2 呼伦贝尔市人民医院, 海拉尔 021008)

**摘要:** 氨基酸作为生物体的关键营养素和代谢物, 除了直接参与蛋白质等大分子物质的合成, 还能通过激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 以及一般性调控阻遏蛋白激酶 2 (general control nonderepressible 2, GCN2) 等信号通路, 参与细胞生长、分化和代谢调控。外源氨基酸在氨基酸转运体的介导下进入细胞, 通过胞内氨基酸感受器发挥信号分子的作用。近年来, 随着胞内感受器的不断发现, 不同氨基酸的感受机制也逐渐被认识。本文综述了哺乳动物细胞的氨基酸跨膜转运体以及胞内氨基酸信号感受机制的最新研究进展, 为进一步优化氨基酸营养配比、提高氨基酸在体内利用效率提供参考。

**关键词:** 氨基酸; 氨基酸转运体; 氨基酸胞内感受器

中图分类号: Q257 文献标志码: A

## Progress on amino acid transporters and intracellular sensing mechanisms in mammalian cells

LU Xin-Yue<sup>1</sup>, ZHENG Xu<sup>1,2</sup>, WANG Zhi-Gang<sup>1</sup>, WU Xiao-Tong<sup>1\*</sup>

(1 School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China;

2 Clinical Laboratory, Hulunbuir People's Hospital, Hailar 021008, China)

**Abstract:** Amino acids are key nutrients and metabolites in various organisms. In addition to serving as the building blocks for protein synthesis, amino acids are involved in the regulation of cell growth, differentiation, and metabolism by activating mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) and GCN2 (general control nonderepressible 2) signaling pathways. The cellular uptakes of exogenous amino acids are mediated by amino acid transporters, and then amino acids serve as signaling molecules through intracellular sensors. In recent years, the sensing mechanisms of amino acids have been revealed with the discovery of many more intracellular amino acid sensors. The article reviews the transmembrane amino acid transporters and the sensing mechanisms of intracellular amino acids in mammalian cells to provide references for further optimizing animal nutrition and improving the utilization efficiency of amino acids *in vivo*.

**Key words:** amino acid; amino acid transporter; intracellular amino acid sensor

氨基酸 (amino acid, AA) 是生物体内必不可少的营养素, 目前已经发现的氨基酸及其衍生物共有 300 多种, 参与蛋白质合成的有 20 余种, 其中赖氨酸 (Lys)、甲硫氨酸 (Met)、苏氨酸 (Thr)、色氨酸 (Trp) 等是动物的限制性氨基酸。蛋白质合成所需氨基酸来源有三个: 其一是从外界摄入, 如饲料中蛋白质或肽经分解代谢后产生的氨基酸, 这一方式是动物细胞获取氨基酸的主要方式; 其二是机体内自身组

织蛋白质分解产生的氨基酸再利用, 如胞外基质蛋白降解形成的氨基酸; 其三是机体内通过氨基酸转换作用形成的氨基酸。由于氨基酸是极性分子, 不能自由通过细胞膜发挥作用, 因此需要细胞膜上蛋白质转运体的协助才能进出细胞完成转运。

收稿日期: 2022-03-10; 修回日期: 2022-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960669, 32160836)

\*通信作者: E-mail: wxt67@126.com

胞内氨基酸不仅作为蛋白质及其他含氮化合物合成的基本原料,参与机体多种营养物质代谢,还能够作为重要的信号分子,激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 以及一般性调控阻遏蛋白激酶 2 (general control nonderepressible 2, GCN2) 信号通路来调控蛋白质的合成。本文综述了哺乳动物细胞氨基酸转运体以及信号感受机制的最新进展,为氨基酸营养研究提供参考。

## 1 氨基酸转运体

哺乳动物细胞氨基酸转运体 (amino acid transporter, AAT) 是介导氨基酸跨膜转运蛋白的统称,不仅参与氨基酸的跨膜转运,还可以作为营养信号受体,偶联相关信号通路,调控细胞的各种生理代谢活动<sup>[1]</sup>,在营养吸收、细胞氧化还原平衡和信号转导等方面发挥重要作用。

### 1.1 AAT的类型

哺乳动物细胞具有多种类型的 AAT。AAT 主要由溶质载体 (solute carriers, SLCs) 基因编码<sup>[2]</sup>,目前发现并鉴定出 458 个 SLC 转运蛋白基因,归为 SLC1、SLC2、SLC3 等 65 个基因家族<sup>[3]</sup>,其中 11 个 SLC 基因家族含有能够编码氨基酸转运蛋白的成员,分别为 SLC1、SLC6、SLC7、SLC15、SLC16、SLC17、SLC25、SLC32、SLC36、SLC38 和 SLC43。在 SLC3 基因家族成员中,SLC3A1 编码的 rBAT 和 SLC3A2 编码的 4F2hc 可以通过二硫键与 SLC7 家族中部分成员杂聚,共同形成异二聚体转运蛋白<sup>[4]</sup>。同一 SLC 基因家族编码的 AAT 可以共享转运底物和 (或) 运输机制,如 SLC1 基因家族中 SLC1A3、SLC1A2、SLC1A1、SLC1A6、SLC1A7 编码的 EAAT1-5 转运蛋白均可以转运 L 型谷氨酸 (L-Glu) 和 D/L 型天冬氨酸 (D/L-Asp)<sup>[5]</sup>;同一氨基酸也可以由不同 SLC 基因家族编码的 AAT 转运进出细胞,如 SLC17 家族中的 SLC17A8 和 SLC25 家族中的 SLC25A12 均可编码转运谷氨酸的转运蛋白,区别之一是 SLC17A8 编码的 VGLUT3 在肝脏中表达,而 SLC25A12 编码的 AGC1 不在肝脏中表达<sup>[6-7]</sup>。

AAT 几乎在所有哺乳动物细胞中存在,通常定位于细胞膜<sup>[8]</sup>、线粒体<sup>[9]</sup>、溶酶体<sup>[10]</sup>、囊泡<sup>[11]</sup>和其他细胞内膜上<sup>[12]</sup>,且不同 AAT 选择性地不同的组织细胞中表达。目前普遍认为 AAT 有 3 种分类方法:第一种是根据转运氨基酸底物的性质不同,可分为中性、碱性和酸性氨基酸转运体;第二

种是根据转运是否依赖  $\text{Na}^+$ ,可分为  $\text{Na}^+$  依赖氨基酸转运体和非  $\text{Na}^+$  依赖氨基酸转运体;第三种是根据氨基酸底物的亲和特异性,可分为不同的转运系统。目前受到广泛认可的哺乳动物细胞氨基酸转运系统有 20 多种,其中  $\text{Na}^+$  依赖中性氨基酸转运体系统有 A、ASC、 $\text{B}^0$  等 10 种,非  $\text{Na}^+$  依赖中性氨基酸转运体系统有 asc、imino、L 和 T,  $\text{Na}^+$  依赖碱性氨基酸转运体系统有  $\text{B}^{0+}$  和  $\text{y}^+\text{L}$ ,非  $\text{Na}^+$  依赖碱性氨基酸转运体系有  $\text{b}^{0+}$  和  $\text{y}^+$ ,  $\text{Na}^+$  依赖酸性氨基酸转运体系有  $\text{X}_{\text{AG}}^-$ ,非  $\text{Na}^+$  依赖酸性氨基酸转运体系有  $\text{X}_c^-$ <sup>[13]</sup>。表 1 总结了哺乳动物细胞中的 AAT 系统、蛋白质名称、对应的编码基因以及转运的氨基酸底物 (主要参考基因组转运蛋白数据库 SLC 系列,网址 <http://slc.bioparadigms.org/>,部分根据最新研究成果补充)<sup>[11,14-33]</sup>。

### 1.2 AAT的转运机制

一般来说,细胞外液中氨基酸浓度低于或等于细胞内液中的浓度,因此需要通过主动运输的方式转运氨基酸进入细胞。根据目前对 AAT 转运机制的研究,一般可归为单向协同转运和反向交换转运两类。单向协同转运即通过电化学梯度形式储存的自由能实现氨基酸转运,例如 EAAT1-5 协同钠钾泵,偶联  $\text{H}^+$  转运 L-Glu 和 D/L-Asp 进入细胞,维持细胞内外  $\text{Na}^+$  浓度平衡<sup>[34]</sup>;有些氨基酸转运过程也可依赖  $\text{Cl}^-$  或偶联  $\text{OH}^-$  等其他离子,例如 VGLUT1~3 主要是以  $\text{Cl}^-$  依赖的转运模式以及  $\text{K}^+/\text{H}^+$  逆向运输的转运模式进行囊泡内 Glu 转运<sup>[35]</sup>。另外,氨基酸本身也可能是其转运的又一驱动力,例如 ASCT1/2、AGC1/2 等可以依赖其氨基酸底物提供的动能完成转运过程<sup>[18,36]</sup>。反向交换转运 (或称双向转运机制),即 AAT 在转运某种氨基酸进入细胞的同时,按照等比例反向交换另一氨基酸转出细胞,从而实现细胞膜两侧氨基酸净转运量为零,例如 xCT/4F2hc 异源二聚体转运蛋白 1:1 将 Cys-Cys 的阴离子形式转入细胞内来换取 Glu 的转出<sup>[37]</sup>。值得注意的是,有些异源二聚体转运蛋白可以通过不同的转运机制转运不同性质的氨基酸底物,例如  $\text{y}^+\text{LAT}1/2$  转运蛋白能够以非  $\text{Na}^+$  依赖的形式转运细胞内阳离子氨基酸,以  $\text{Na}^+$  依赖的形式转运细胞外中性 L 型氨基酸,且以前者为先<sup>[38]</sup>。目前人们对 AAT 的转运机制了解并不充分,部分 AAT 的转运机制尚未得到确定,因此可能存在其他机制,或者已知一种转运机制的 AAT 可能兼并其他多种转运机制共同完成氨基酸转运。另外,全面了解 AAT 的转运机制对于选择性控

表1 哺乳动物细胞氨基酸转运系统及底物

氨基酸转运体系统	氨基酸转运蛋白	编码基因	转运底物		
中性氨基酸转运体	Na <sup>+</sup> 依赖型	A	SNAT1	SLC38A1	Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met, Thr, Pro, Tyr, Val
			SNAT2	SLC38A2	Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met
			SNAT4	SLC38A4	Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Asn, Met, His, Lys, Arg, Gln
			SNAT8	SLC38A8	Ala, Ser, Gln, Arg, His, Asp
			SNAT10	SLC38A10	Glu, Gln, Asp, Ala, Ser
			—	SLC38A9	Arg, Gln, Asn, Leu
			ASC	SLC1A4	Ala, Ser, Cys, Thr
				SLC1A5	Ala, Ser, Cys, Thr, L-Gln, L-Asn
			B <sup>0</sup>	B <sup>0</sup> AT1	Phe, Leu, Gln, Ala
				B <sup>0</sup> AT2	Leu, Ile, Val, Pro, Met
GLY	—	BETA	NTT4/B <sup>0</sup> AT3	Pro, Gly, Leu, Ala	
			GAT1	SLC6A17	GABA, β-AA
			GAT2	SLC6A1	GABA, β-AA
			GAT3	SLC6A13	GABA, β-AA, hypotaurine
			BGT1	SLC6A12	GABA, β-AA, taurine
			TAUT	SLC6A6	GABA, taurine, hypotaurine, β-AA
			GLYT1	SLC6A9	Gly
			GLYT2	SLC6A5	Gly
				XT2/B <sup>0</sup> AT3	Gly
				SIT1	Pro
IMINO	N	SNAT3	SLC6A20	Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Met, His, Lys, Arg, Asn	
		SNAT5	SLC38A5	Gln, Asn, His, Ala, Ser, Gly	
		SNAT7	SLC38A7	Gln, Asn, His, Ser	
			—	—	Gln, Asn, His
			—	—	Gln, Asn, His
			PROT	SLC6A7	Pro
			Asc-1	SLC7A10	Gly, Ala, Ser, Cys, Thr
			Asc-2	SLC7A12	Gly, Ala, Ser, Cys, Thr
				PAT1/LYAAT1	Pro, Gly, Ala, GABA
				PAT2/LYAAT2	Pro, Gly, Ala, GABA
非Na <sup>+</sup> 依赖型	—	L	PAT4	Pro, Try, Ala	
			VIAAT	Gly, GABA	
			LAT1	His, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp	
			LAT2	Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp	

表1 (续)

氨基酸转运体系统	氨基酸转运蛋白	编码基因	转运底物
	LAT3	<i>SLC43A1</i>	Leu, Ile, Met, Phe, Val
	LAT4	<i>SLC43A2</i>	Leu, Ile, Met, Phe, Val
	TAT1	<i>SLC16A10</i>	Phe, Tyr, Trp
碱性氨基酸转运体	ATB(0,+)	<i>SLC6A14</i>	除Glu的AA, Asp
	$\gamma^+$ LAT1	<i>SLC7A7</i>	Cationic AA, Neutral AA
	$\gamma^+$ LAT2	<i>SLC7A6</i>	
	B(0,+)/AT	<i>SLC7A9</i>	Lys, Arg, Orn, Cys
	Cat-1	<i>SLC7A1</i>	Arg, Lys, His, Orn
	Cat-2	<i>SLC7A2</i>	Arg, Lys, His, Orn
	Cat-3	<i>SLC7A3</i>	Arg, Lys, Orn
	Cat-4	<i>SLC7A4</i>	Cationic AA
	PHT2	<i>SLC15A3</i>	His
	PHT1	<i>SLC15A4</i>	His
酸性氨基酸转运体	EAAT1	<i>SLC1A3</i>	Glu, Asp
	EAAT2	<i>SLC1A2</i>	Glu, Asp
	EAAT3	<i>SLC1A1</i>	Glu, Asp, Cys
	EAAT4	<i>SLC1A6</i>	Glu, Asp
	EAAT5	<i>SLC1A7</i>	Glu, Asp
	xCT	<i>SLC7A11</i>	Glu, Asp, Cys, Cit
	AGT1	<i>SLC7A13</i>	Glu, Asp
	VGLUT2	<i>SLC17A6</i>	Glu
	VGLUT1	<i>SLC17A7</i>	Glu
	VGLUT3	<i>SLC17A8</i>	Glu

制某些底物的摄入也同样具有重要意义。

### 1.3 内膜系统转运体

外源氨基酸跨膜进入哺乳动物细胞后, 无论用于蛋白质合成还是作为信号分子发挥作用, 都会涉及溶酶体、线粒体、高尔基体、囊泡等内膜系统, 因此在细胞内膜上也存在 AAT<sup>[39]</sup>。目前普遍认为, 外源氨基酸是 mTORC1 激活的强烈刺激因子, 溶酶体是 mTORC1 激活的主要细胞内场所<sup>[40-41]</sup>; 同时, 溶酶体内氨基酸也是 mTORC1 激活的关键, 其作为一种重要的信号分子将 mTORC1 招募到溶酶体表面<sup>[42]</sup>。因此, 在溶酶体膜上同样存在多种 AAT, 它们不仅可以发挥转运功能, 本身也可以直接作为氨基酸的受体传递信号。SLC38A9 是一种定位于溶酶体膜上的氨基酸转运体, 同时它也是精氨酸 (Arg) 感受器, 还可以介导以亮氨酸 (Leu)、酪氨酸 (Tyr) 为主的许多必需氨基酸 (essential amino acid, EAA) 输出溶酶体至胞质以激活 mTORC1, 相比于 Arg, SLC38A9 对 Lys 敏感度较低<sup>[43]</sup>。SLC38A9 转运氨基酸是由其 N 末端结构域 (N-plug) 所介导的<sup>[44]</sup>, 但精细的转运机制仍不清楚。PAT1 定位于细胞膜和溶酶体, 可以将溶酶体内氨基酸运出, 但其在介导氨基酸信号调节 mTORC1 活性中的作用尚有争议, 目前存在正调控和负调控两种说法<sup>[45-47]</sup>, 可能与氨基酸营养状态和 PAT1 在溶酶体的丰度有关<sup>[47]</sup>。除溶酶体外, 有研究发现定位于高尔基体的 PAT4 也与 mTORC1 活性相关, 且 PAT4 对丝氨酸 (Ser) 和谷氨酰胺 (Gln) 有明显的转运偏好<sup>[24]</sup>, 对 mTORC1 的下游效应器翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (4E-binding protein 1, 4E-BP1) 的调控作用要强于另一个下游效应器 S6 激酶 (S6 kinase, S6K)<sup>[23-24]</sup>。线粒体转运蛋白 ORC1/2 (分别由 *SLC25A15*、*SLC25A2* 编码) 主要定位于线粒体膜上, 并为氨基酸参与代谢途径提供重要的转运基础<sup>[48]</sup>。此外, 囊泡转运蛋白 VGLUT1/2/3 能够独立并灵活地结合  $K^+$  将 Glu 转运至囊泡内<sup>[35]</sup>。总之, 对内膜系统转运体的种类及相应转运机制仍知之甚少, 目前已知的内膜系统转运体是否偶联其他相关功能蛋白参与细胞内代谢活动等问题尚未得到全面探究。

## 2 氨基酸信号的感受机制

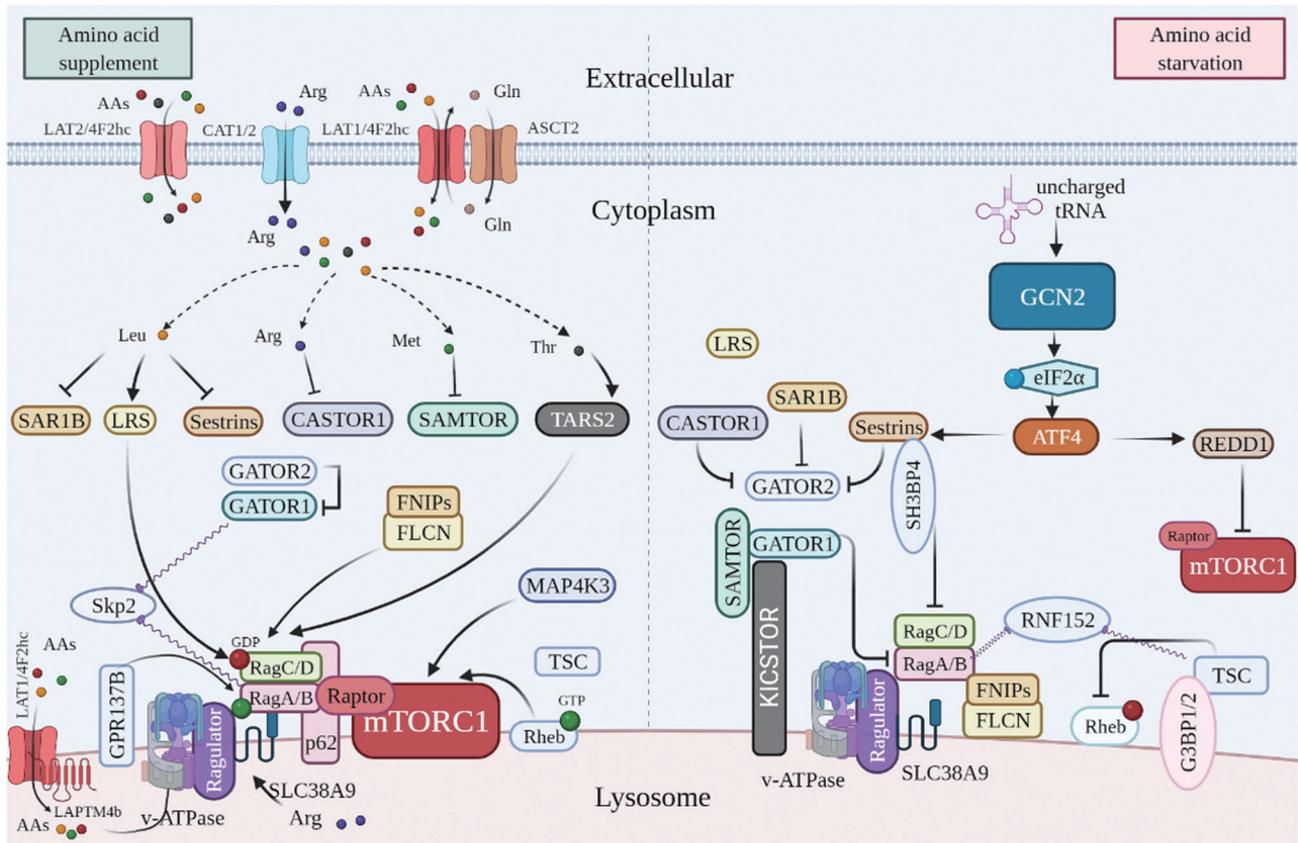
作为信号分子发挥作用是氨基酸的另一个重要功能。对胞内氨基酸水平变化的准确感知是维持哺乳动物体内氨基酸稳态的关键。大量关于 mTORC1 和 GCN2 对氨基酸水平感受机制的研究证实, mTORC1

和 GCN2 在氨基酸调控蛋白质合成过程中具有重要作用。对氨基酸信号的高度敏感性是 mTORC1 途径的一个显著属性, 当氨基酸不足时, mTORC1 分散游离在整个细胞质中; 但补入足量氨基酸后, mTORC1 迅速移位至溶酶体表面并被 Rheb 激活, 促进蛋白质的合成<sup>[49]</sup>。GCN2 则感受氨基酸匮乏信号, 通过抑制蛋白质的合成、增加与氨基酸合成和转运有关的蛋白质的翻译来响应氨基酸水平变化<sup>[50]</sup>。mTORC1 和 GCN2 对氨基酸信号的感知在维持蛋白质和氨基酸稳态中发挥关键作用 (图 1)。

### 2.1 AAT对mTORC1和GCN2信号通路的影响

AAT 能感知并传递氨基酸信号, 偶联 mTORC1 和 GCN2 信号通路, 从而引发下游效应因子发挥作用, 调节细胞生长和代谢。mTORC1 是细胞生长和代谢的中心调节器, 它可以整合生长因子、氨基酸、能量状态和环境胁迫等信号来调控细胞的生理过程, 是细胞应对内外营养物质刺激信号的关键作用因子<sup>[51]</sup>。早期研究已知, L-Gln 可通过 ASCT2 转运进入细胞, 同时作为 LAT1/4F2hc 的外排底物参与调节 EAA 的摄取, 激活 mTORC1<sup>[52]</sup>。抑制 LAT1 不仅可以下调 mTORC1 活性, 还会激活 GCN2 通路, 从而全面影响蛋白质翻译过程<sup>[53]</sup>。除了定位于细胞膜上, LAT1/4F2hc 还能够与溶酶体相关跨膜蛋白 4b (lysosomal-associated transmembrane protein 4b, LAPTM4b) 结合, 定位于溶酶体膜上, 转运胞内氨基酸进入溶酶体, 由内而外激活 mTORC1<sup>[54]</sup>。这两种不同的亚细胞定位, 在很大程度上说明了 LAT1 在控制 EAA 摄入水平并参与调控 mTORC1 和 GCN2 信号通路活性过程中具有至关重要的作用。值得注意的是, 越来越多的证据表明哺乳动物中的部分 AAT, 如 SLC38A9<sup>[17]</sup>、PAT1<sup>[17,55]</sup>、PAT4<sup>[55]</sup> 和 SNAT2<sup>[56]</sup> 等可以发挥转运蛋白和信号感受器的双重功能, 除了转运氨基酸底物穿过膜结构, 还可以充当受体来感知氨基酸水平, 参与调节 mTORC1 等信号通路活性。

GCN2 信号通路能及时感知氨基酸的不足, 通过下游效应器下调蛋白质合成水平、诱导 AAT 表达、上调氨基酸生物合成相关基因表达等方式维持稳态, 这一过程也称为“适应性调节”。其中, 氨基酸反应元件 (amino acid response element, AARE) 在 GCN2 调节 AAT 表达的过程中发挥重要作用。经鉴定发现 Cat-1<sup>[57]</sup>、SNAT2<sup>[58]</sup> 及 SLC38A9<sup>[59]</sup> 中均含有一个或两个 AARE, 并可能具有相同的 AAT 表达调节机制: 氨基酸不足时, GCN2 通过引起真核翻



在氨基酸充足时, Leu、Arg、Met及Thr主要通过细胞膜上LAT1/4F2hc、LAT2/4F2hc、CAT1/2、ASCT2等氨基酸转运体转运进入细胞,胞内AAS感受相应氨基酸信号水平,促进Rags活性,招募mTORC1定位于溶酶体表面并被Rheb激活,众多正、负调控因子参与其中发挥重要功能。在溶酶体上,同样存在LAT1/4F2hc、SLC38A9等氨基酸转运体,它们能够促进胞质氨基酸进入溶酶体,介导氨基酸由内而外发挥对mTORC1信号通路的调节功能。当氨基酸被剥夺时,GCN2被激活,而mTORC1处于失活状态游离在细胞质中,GCN2通过上调ATF4表达,参与调控mTORC1信号网络,GASTOR1、Sestrins和SAR1B等氨基酸感受器与GATOR2结合,释放GATOR1从而抑制Rags活性,无法招募mTORC1定位于溶酶体表面,同时Rheb活性受TSC抑制,胞内其他相关调控因子均全面响应氨基酸不足并进行适应性调节。

图1 氨基酸信号感受机制及胞内氨基酸感受器与已知信号通路的关系

译起始因子 2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ ) 磷酸化,促进激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 与 AARE 结合,从而上调 AAT 编码基因的转录水平。

综上,AAT作为介导氨基酸信号分子发挥其调控作用的参与者,在氨基酸介导mTORC1和GCN2信号通路并影响下游大分子物质翻译的过程中发挥不可替代的作用。一方面,AAT不同的亚细胞定位决定了其转运功能的执行范围和参与调控信号通路活性的形式;另一方面,AAT双重角色扮演也足以说明其在信号通路调控网络中的功能多样性与复杂性。但就目前研究成果来看,仅有少部分AAT被发现兼具转运和信号感受功能,因此对于该领域仍具有较大的研究空间。总的来说,在众多AAT中哪些是通过转运功能间接参与信号调控,哪些能作

为受体直接发挥信号传递作用,是发挥正调控还是负调控作用,参与调控的形式与其转运底物类型或转运机制又有何种联系等,这些关键问题仍有待进一步确定并归类。

## 2.2 氨基酸信号招募mTORC1定位于溶酶体并激活

溶酶体不仅可以充当细胞内的“清理回收站”,释放水解酶消化大分子物质、清除病理性细胞、回收其组分代谢物等,同时它还能作为mTORC1的主要激活平台,承载并连接许多蛋白因子响应上游信号,参与调控mTORC1通路<sup>[60]</sup>。一些氨基酸,如Leu、Arg、Gln等对mTORC1的作用机制研究已取得一些成果。目前形成共识的机制包括外源氨基酸通过细胞膜上AAT的转运进入细胞,经一系列级联反应驱动Rag GTPases与mTORC1的重要组分Raptor相互作用<sup>[61]</sup>,使游离的mTORC1募集

到溶酶体膜上, 同时 Rheb 结合于 mTORC1 并促进其磷酸化以增加激酶活性<sup>[62]</sup>, 接着呈活化状态的 mTORC1 通过磷酸化下游靶点(如 S6K、4E-BP1), 调节蛋白质翻译<sup>[63]</sup>等过程。目前很多研究均围绕氨基酸信号调控 mTORC1 这一途径展开, 包括氨基酸如何通过不完全相同的机制调控 mTORC1 通路<sup>[49, 64-65]</sup>, 溶酶体是否是细胞内唯一的 mTORC1 激活场所<sup>[66]</sup>, 众多已知的蛋白因子如何在 mTORC1 响应氨基酸信号过程中发挥作用以及不同水平氨基酸如何影响 mTORC1 定位、激活、调控下游蛋白合成的过程等等。总之, mTORC1 响应氨基酸信号的调控网络是非常复杂且精密的, 涉及众多蛋白因子以及其他信号通路, 在这一系列调控机制的支持下, 细胞才得以迅速感应环境变化做出反应, 启动不同“程序”来维持机体营养及生理状态, 一旦失衡将引发多种疾病, 包括胰岛素抵抗<sup>[67]</sup>、糖尿病<sup>[68]</sup>和各种癌症<sup>[69]</sup>等。

在氨基酸信号促进 mTORC1 定位于溶酶体表面并被激活的过程中, 多种蛋白因子参与其中, 根据作用性质可归为三类: 第一类蛋白因子主要发挥正向调控作用, 能够直接或间接介导氨基酸信号, 调控 mTORC1 的活性, 或作为促进 GDP 解离的鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)影响相关蛋白的功能活性, 进而传递氨基酸信号; 第二类蛋白主要作为负调控因子参与其中, 具有刺激 GTP 水解的 GTP 酶活化蛋白(GTPase-activating protein, GAP)活性或防止 GDP 解离的鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂(guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDI)活性, 使得与 mTORC1 直接或间接结合的关键蛋白活性被抑制, 进而影响 mTORC1 的激活; 第三类蛋白则同时兼具正、负双调节功能, 具有更为复杂的功能活性, 能够响应不同氨基酸水平进而影响 mTORC1 活性。以上三类调节单元协同互动, 共同介导氨基酸信号转导至 mTORC1。

### 2.2.1 正调控因子

Rheb 作为 mTORC1 直接正调控因子之一, 主要定位于溶酶体表面, 其 GTP 形式对 mTORC1 起激活作用<sup>[70]</sup>。Rag GTPases (Rags) 是连接 mTORC1 和氨基酸信号的关键分子, 由 RagA/B 与 RagC/D 构成, RagA/B-GTP 能够直接与 Raptor 结合并招募 mTORC1 在溶酶体膜上定位, RagC/D-GDP 则与 RagA/B-GTP 直接结合形成异二聚体。此外, Rags 使用“锁定”机制来稳定其活性(RagA<sup>GTP</sup>-RagC<sup>GDP</sup>)或非活性(RagA<sup>GDP</sup>-RagC<sup>GTP</sup>)状态<sup>[71]</sup>。MAP4K3 是

一种高度保守的生发中心激酶, 通过激活片段中 Ser170 反式自磷酸化位点参与氨基酸诱导的 mTORC1 激活过程<sup>[72]</sup>。在原代早产大鼠骨骼肌卫星细胞中, 敲低 MAP4K3 导致 Leu 诱导的 mTORC1 信号明显减弱, 但并非完全减弱, 这表明 MAP4K3 可能在 mTORC1 响应 Leu 并被完全激活的过程中发挥正向调控作用<sup>[73]</sup>。

以下正调控因子均与 Rags 相关或以 Rags 依赖的方式发挥作用。早期研究发现, Ragulator 复合体介导 RagA/B 的溶酶体定位, 能够作为 RagA/B 的 GEF, 使其变为 RagA/B-GTP 活性形式从而响应氨基酸信号<sup>[74]</sup>。研究还发现亮氨酸-tRNA 合成酶(LRS)参与 mTOR 通路并对 RagD 有 GAP 活性, 它能够敏锐地感知 Leu 信号从而激活 mTORC1<sup>[75]</sup>。随着蛋白质组学的广泛应用, 发现 SLC38A9 不仅能够跨溶酶体膜转运多种氨基酸, 同时可以通过特定位点感受 Arg 水平, 参与 Ragulator-Rags-mTORC1 复合物响应氨基酸信号水平的过程<sup>[76-77]</sup>。Shen 等<sup>[78]</sup>发现 SLC38A9 在 Arg 信号的激活下能够作为 RagA 的 GEF, 与 Ragulator 一起激活 Rags, 但与先前研究不同的是, Ragulator 对 RagC 的 GEF 作用显著大于 RagA。v-ATPase 作为溶酶体质子泵, 负责酸化溶酶体和维持溶酶体功能, 与 Ragulator 协作向 Rags 发出信号, 从而正向调节 mTORC1 活性<sup>[79-80]</sup>, 同时 v-ATPase 还参与溶酶体内氨基酸流出的调控活动<sup>[81]</sup>。p62 (由 SQSTM1 基因编码)作为一种支架蛋白, 在氨基酸激活 mTORC1 过程中发挥重要作用。在早期研究中, p62 能够在溶酶体表面与 Raptor 和 RagC 结合, 调控活性 RagB<sup>GTP</sup>-RagC<sup>GDP</sup> 异二聚体形成, 促进 mTORC1 移位至溶酶体<sup>[82]</sup>。之后的研究发现, 该蛋白还能以 MEKK3 依赖性的机制(该机制不涉及 Rags)被 p38 $\delta$  磷酸化, 磷酸化 p62 通过 TB 结构域招募 TRAF6 介导 mTORC1 多泛素化激活<sup>[83]</sup>。此外, GPR137B 被发现是一种溶酶体定位的 G 蛋白偶联受体样蛋白, 通过与 RagA/B 结合并加强 RagA-GTP 活性, 调节 mTORC1 的溶酶体移位及活性<sup>[84]</sup>。

### 2.2.2 正负双调控因子

GATOR1/2 对 Rags 具有正、负调节活性, 进而对 mTORC1 活性具有相反的调控作用, 其中 GATOR1 对于 RagA/B 有 GAP 活性, 负调控 mTORC1; 而 GATOR2 能够抑制 GATOR1 活性<sup>[80]</sup>, 因此可视为正向调节因子。FLCN 作为一种肿瘤抑制因子, 通常与 FLCN 相互作用蛋白 1/2 (FNIPs) 共同参与

mTORC1 细胞信号转导途径。FLCN-FNIPs 同样具有正、负双调节活性,一方面可以作为 RagC/D 的 GAP 激活 Rags,并游离于细胞质中,在 mTORC1 信号通路中发挥正向调控作用;另一方面,FLCN-FNIPs 可以与 RagA/B-GDP 结合,从而被招募至溶酶体并与 RagA<sup>GDP</sup>-RagC<sup>GTP</sup> 和 Ragulator 形成稳定复合物,这一过程依赖于上游 GATOR1 对 RagA/B 的 GAP 活性,且发生于低营养状态下,此时 FLCN-FNIP2 的 GAP 活性受到抑制<sup>[85-86]</sup>。

### 2.2.3 负调控因子

结节性硬化症蛋白复合物 (tuberous sclerosis complex, TSC)(TSC1/TBC1D7/TSC2) 作为 Rheb 的 GAP 促进 Rheb-GDP 非活性形式的形成,对 mTORC1 起抑制作用<sup>[87]</sup>;同时, TSC 还能够介导 Rheb 泛素化负调节 mTORC1 活性<sup>[88]</sup>。G3BP1/2 作为应激颗粒 (SGs) 的核心成分,通常定位于溶酶体表面,以非冗余方式将 TSC 锚定在溶酶体上,并抑制氨基酸对 mTORC1 的激活;与 TSC 表现一致的是, G3BP1 的缺失会导致 mTORC1 的过度激活<sup>[89]</sup>。同年,另有研究显示 TSC1 通过其 N 端结构域与溶酶体膜磷脂酰肌醇磷酸盐 (PIPs) 结合实现 TSC 的溶酶体定位以及 mTORC1 的活性调节<sup>[90]</sup>。RNF152 是一种 E3 连接酶,能够与 RagA 结合并促进 RagA 与 GATOR1 相互作用,同时招募 TSC2 溶酶体定位负调控氨基酸依赖的 mTORC1 活性<sup>[91]</sup>。Skp2 作为另一种 E3 连接酶,与 RNF152 具有功能相似性,重要区别之一是 RNF152 在氨基酸缺乏状态下激活,而 Skp2 在氨基酸饱和情况下发挥作用以防止 mTORC1 的过度激活<sup>[92]</sup>。

Sestrin1/2/3 作为一种应激反应蛋白,通过与 GATOR2 相互作用或作为 Rags 的 GDI 来调节 mTORC1 信号转导,从而负调节氨基酸传感途径<sup>[93-94]</sup>。SH3BP4 是一种结合蛋白,也称为转铁蛋白受体转运蛋白。SH3BP4 在氨基酸耗尽时通过 SH3 结构域与 Rags 结合并抑制其活性,作为负调控因子下调氨基酸诱导的 mTORC1 活性<sup>[95]</sup>。Luo 等<sup>[96]</sup>发现,游离氨基酸通过负调控 ATF4 的表达与核定位,从而负调控 Sestrin2 的表达, Sestrin2 通过与 SH3BP4 结合传递上游信号,抑制 mTORC1 活性。KICSTOR (KPTN/ITFG2/C12orf66/SZT2) 作为一种蛋白质复合物,定位于溶酶体,通过其亚基 SZT2 与 GATOR1 结合并招募至溶酶体表面,进而与 GATOR2 间接结合,在 GATOR2-RagA/B-mTORC1 信号途径中发挥负调控作用<sup>[97]</sup>。SAGA 复合物是一

种染色体修饰蛋白,该复合物是氨基酸诱导 mTORC1 活性的抑制因子,其组分 CCDC101 的缺失能够激活 mTORC1 并在氨基酸补入后继续上调 mTORC1 活性,因此 SAGA 复合物主要通过下调 *SLC16A10* 与 *SLC43A1* 基因表达(分别编码 TAT1 和 LAT3 转运蛋白)以及下游 GATOR2-RagA/B 的信号强度来抑制 mTORC1 通路<sup>[98]</sup>。

### 2.3 氨基酸缺乏激活 GCN2 通路抑制蛋白质合成

在哺乳动物细胞中,与氨基酸富集激活 mTORC1 信号通路不同的是,氨基酸不足能够激活 GCN2 途径。GCN2 是 eIF2 $\alpha$  激酶,氨基酸饥饿时,游离的空载 tRNA 富集,结合并激活 GCN2,导致 eIF2 $\alpha$  在第 51 位的 Ser (mRNA 翻译的关键控制点) 发生磷酸化,蛋白质合成被普遍抑制<sup>[99]</sup>;而 eIF2 $\alpha$  磷酸化水平上升会促进 ATF4 的选择性翻译<sup>[100]</sup>, ATF4 表达上调诱导许多与氨基酸代谢相关的基因表达,例如氨基酸转运蛋白编码基因 *SLC7A1* 和 *SLC38A2*<sup>[101]</sup>,天冬酰胺合成酶 (asparagine synthetase, ASNS)<sup>[102]</sup> 和氨酰基-tRNA 合成酶 (aminoacyl-tRNA synthetases, ARSs) 基因<sup>[103]</sup>,以及自噬调节基因 *p62*、*NBR1* 和 *ATG7* 等<sup>[104]</sup>。这些 ATF4 下游靶标与 GCN2 引起的 eIF2 $\alpha$  磷酸化共同促进细胞适应氨基酸匮乏,从而恢复细胞稳态。

在以往的多项研究中,发现氨基酸耗尽后 GCN2 激活可抑制 mTORC1 活性<sup>[105]</sup>, GCN2 和 mTORC1 两条通路之间可能存在“串扰”的分子机制,协作产生营养饥饿适应性行为,但机制仍不完全清楚。在 Leu 等单一氨基酸戒断期间,活化的 GCN2 上调 ATF4 以诱导应激反应蛋白 Sestrin2 的表达,从而抑制 mTORC1 的定位及活性<sup>[106]</sup>; Xu 等<sup>[107]</sup>发现, Leu 剥夺以 ATF4 依赖的方式上调应激反应蛋白 REDD1 和 Sestrin2 的表达,并且这两种蛋白质都参与了长时间 Leu 剥夺期间 mTORC1 的抑制; REDD1 是 GCN2/ATF4 信号转导的关键下游效应器,能够在氨基酸剥夺期间诱导 mTORC1 的活性抑制<sup>[108]</sup>。但另一项研究发现, GCN2 及磷酸化 eIF2 $\alpha$  参与了 Leu 或 Arg 饥饿对 mTORC1 活性的抑制作用,在单一氨基酸饥饿早期,并未发现 ATF4 参与 mTORC1 抑制过程<sup>[109]</sup>。这在此后的一项研究中也得到了印证<sup>[110]</sup>。以上观点看似矛盾,但这可能是由于 GCN2 和 mTORC1 感应氨基酸饥饿信号具有时间性或阶段性, ATF4 可能在长期缺乏氨基酸时维持 mTORC1 活性抑制。此外,不同氨基酸的缺乏对这一过程的差异性影响也值得关注并进一步探究。

### 3 胞内氨基酸感受器与已知信号通路的关系

氨基酸感受器 (amino acid sensor, AAS) 的基本特性是必须直接与浓度范围内的氨基酸结合, 并将氨基酸结合状态的信息传递给 mTORC1, 使其激活。目前, 研究者们已经在细胞质中发现部分蛋白质因子可以作为 AAS 发挥作用, 但鉴定出所有的 AAS 并了解其亚细胞定位仍是一项待完成的艰巨任务。近几年, 作为参与 mTORC1 途径的 AAS, Sestrin1/2、SAR1A/B、LRS、SLC38A9、CASTOR1、SAMTOR 和 TARS2 等功能蛋白的不断发现是该领域的一个重要进展。

研究发现, 哺乳动物细胞内多种蛋白因子可以感受 Leu 并传递信号参与调控 mTORC1 活性。细胞质 Sestrin2 能够感受并结合 Leu<sup>[111]</sup>, 在 Leu 饥饿条件下, Sestrin2 结合并抑制 GATOR2, 间接解除 GATOR2 对 GATOR1 的抑制作用, GATOR1 进一步抑制 mTORC1 的活性; 当 Leu 存在时, Sestrin2 与 Leu 结合并破坏 Sestrin-GATOR2 的相互作用, 允许 GATOR2 抑制 GATOR1, 解除 GATOR1 对 mTORC1 的抑制, 激活 mTORC1, 可以说 Leu 的存在能够解除 Sestrin2 对 mTORC1 的负调控作用<sup>[112]</sup>。同时, Sestrin1 也具有类似于 Sestrin2 的 Leu 敏感性。有趣的是, Sestrin2 与 LRS 虽然在感受 Leu 信号介导 mTORC1 激活方面具有相同效果, 但两者在介导 Rags 的 GTP/GDP 负载循环上发挥的作用是不同的<sup>[113]</sup>, Sestrin2 与 LRS 的协作关系有待进一步确定。此外, SAR1B 同样能够感受 Leu, 调节 mTORC1 活性。Leu 饥饿时, SAR1B 能够与 GATOR2 的亚基 MISO 结合, 并通过 SAR1B-GATOR2-Rag 途径抑制 mTORC1 活性。SAR1B 的类似物 SAR1A 也表现出同样的 Leu 感受功能, 特别的是, Sestrin2 结合 GATOR2 的另一个亚基 SEH1L, 与 SAR1B 协同感知不同水平的 Leu, 且二者在识别 Leu 的位点上也有不同, SAR1B 识别 Leu 的氨基和侧链, 而 Sestrin2 识别氨基和羧基<sup>[114]</sup>。

除 Leu 外, Arg、Met 和 Thr 等也能够依托各自的感受器以 Rags 依赖方式对 mTORC1 起调控作用。胞内 SLC38A9 能够作为 Arg 感受器参与溶酶体氨基酸外流和 mTORC1 途径调控<sup>[115]</sup>。CASTOR1 目前也被认为是 Arg 感受器<sup>[116]</sup>。与 Sestrins 相似, CASTOR1 在 Arg 缺乏的条件下优先与 GATOR2 结合, 而 Arg 添加解除了 CASTOR1 对 GATOR2 的抑制, 从而导致 Rags 依赖型的 mTORC1 信号增强<sup>[117]</sup>。

SAMTOR 作为 Met 的感受器, 能够通过 GATOR1 相互作用来抑制 mTORC1 信号<sup>[118]</sup>。TARS2 是一种线粒体氨酰基 tRNA 合成酶, 它能够优先与 RagC-GTP 结合, 提高 RagA 的 GTP 负荷和 mTORC1 活性, 并可能作为 Thr 的感受器参与其中<sup>[119]</sup>。

总的来说, 不同氨基酸可能存在不唯一的感受器, 不同感受器之间可能协同互作感受不同的氨基酸水平, 并可能在氨基酸浓度到达某个阈值后发生竞争性结合。虽然 Sestrin1/2、SAR1B 与 CASTOR1 都涉及到与 GATOR2 的相互作用, 但 GATOR2 的分子功能以及其中的相关调节机制尚不清楚, 它可能是特定氨基酸向 mTORC1 转导信号的中心节点。同一氨基酸的不同感受器与 GATOR2 结合的位点可能不一样, 这导致 AAS 之间会存在平行发挥功能的现象。值得注意的是, AAS 可能部分归类于氨酰基-tRNA 合成酶家族, 这类蛋白不仅在蛋白质生物合成过程中催化氨基酸与同源 tRNA 的连接, 同时还可能作为 AAS 在 mTORC1 信号通路中发挥信号转导及调控等功能。

### 4 展望

距离最初发现 mTOR 已经有 30 余年了, 许多实验室及研究人员对氨基酸转运体及胞内感受器的鉴定成果极大地加深了人们对于氨基酸如何通过 mTORC1 等信号通路调控蛋白质合成的理解。尽管取得了巨大进展, 但仍有许多问题需要解决, 如细胞内存在的大量氨基酸转运体及感受器还没有被完全识别出来, mTORC1 在氨基酸饥饿状态下的细胞内定位尚不完全清楚, 对氨基酸感受机制的综合认识尚有缺乏, mTORC1 在除溶酶体外的细胞器表面的定位、活化, 溶酶体在氨基酸信号感知中的具体职能, 以及不同氨基酸感受机制之间潜在的交叉调节也尚未完全了解。同时, mTORC1 与 GCN2 的关系也需要进一步确认。mTORC1 信号通路将氨基酸等营养因子与各类细胞生理病理过程相结合的能力仍然是该领域研究热点之一。基于目前研究现状, 营养信号对 mTORC1 发挥的调控机制仍不完全清晰, 氨基酸信号通路网络模型有待完善。由于存在这些尚未解决的问题, 未来的研究方向将更加清晰并聚焦, 并进一步促进我们对于基础营养生理学的全面理解。

#### [参 考 文 献]

- [1] Barthelemy C, André B. Ubiquitylation and endocytosis

- of the human LAT1/SLC7A5 amino acid transporter. *Sci Rep*, 2019, 9: 16760
- [2] Yahyaoui R, Perez-Frias J. Amino acid transport defects in human inherited metabolic disorders. *Int J Mol Sci*, 2019, 21: 119
- [3] Bai X, Moraes TF, Reithmeier RAF. Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. *Mol Membr Biol*, 2017, 34: 1-32
- [4] Wu D, Grund TN, Welsch S, et al. Structural basis for amino acid exchange by a human heteromeric amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 21281-7
- [5] Kanai Y, Cl emen on B, Simonin A, et al. The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med*, 2013, 34: 108-20
- [6] Reimer RJ. SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol Aspects Med*, 2013, 34: 350-9
- [7] Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med*, 2013, 34: 465-84
- [8] Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch*, 2004, 447: 784-95
- [9] Ruprecht JJ, Kunji ERS. The SLC25 mitochondrial carrier family: structure and mechanism. *Trends Biochem Sci*, 2020, 45: 244-58
- [10] Chantranupong L, Wolfson RL, Sabatini DM. Nutrient-sensing mechanisms across evolution. *Cell*, 2015, 161: 67-83
- [11] Preobraschenski J, Cheret C, Ganzella M, et al. Dual and direction-selective mechanisms of phosphate transport by the vesicular glutamate transporter. *Cell Rep*, 2018, 23: 535-45
- [12] Jung JW, Kim JE, Kim E, et al. Amino acid transporters as tetraspanin TM4SF5 binding partners. *Exp Mol Med*, 2020, 52: 7-14
- [13] Br er S, Br er A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem J*, 2017, 474: 1935-63
- [14] H gglund MGA, Hellsten SV, Bagchi S, et al. Transport of L-glutamine, L-alanine, L-arginine and L-histidine by the neuron-specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. *J Mol Biol*, 2015, 427: 1495-512
- [15] Hellsten SV, H gglund MG, Eriksson MM, et al. The neuronal and astrocytic protein SLC38A10 transports glutamine, glutamate, and aspartate, suggesting a role in neurotransmission. *FEBS Open Bio*, 2017, 7: 730-46
- [16] Hellsten SV, Eriksson MM, Lekholm E, et al. The gene expression of the neuronal protein, SLC38A9, changes in mouse brain after *in vivo* starvation and high-fat diet. *PLoS One*, 2017, 12: e0172917
- [17] Wang D, Wan X, Du X, et al. Insights into the interaction of lysosomal amino acid transporters SLC38A9 and SLC36A1 involved in mTORC1 signaling in C2C12 cells. *Biomolecules*, 2021, 11: 1314
- [18] Freidman N, Chen I, Wu Q, et al. Amino acid transporters and exchangers from the SLC1A family: structure, mechanism and roles in physiology and cancer. *Neurochem Res*, 2020, 45: 1268-86
- [19] Nishimura T, Higuchi K, Yoshida Y, et al. Hypotaurine is a substrate of GABA transporter family members GAT2/Slc6a13 and TAUT/Slc6a6. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41: 1523-9
- [20] Romei C, Raiteri L. Advances in understanding the functions of native GlyT1 and GlyT2 neuronal glycine transporters. *Neurochem Int*, 2016, 99: 169-77
- [21] Ehmsen JT, Liu Y, Wang Y, et al. The astrocytic transporter SLC7A10 (Asc-1) mediates glycinergic inhibition of spinal cord motor neurons. *Sci Rep*, 2016, 6: 35592
- [22] Mesuret G, Khabbazzadeh S, Bischoff AM, et al. A neuronal role of the alanine-serine-cysteine-1 transporter (SLC7A10, Asc-1) for glycine inhibitory transmission and respiratory pattern. *Sci Rep*, 2018, 8: 8536
- [23] Fan SJ, Goberdhan DCI. PATs and SNATs: amino acid sensors in disguise. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 640
- [24] Fan SJ, Snell C, Turley H, et al. PAT4 levels control amino-acid sensitivity of rapamycin-resistant mTORC1 from the golgi and affect clinical outcome in colorectal cancer. *Oncogene*, 2016, 35: 3004-15
- [25] Sakaew W, Tachow A, Thoungseabyoun W, et al. Expression and localization of VIAAT in distal uriniferous tubular epithelium of mouse. *Ann Anat*, 2019, 222: 21-7
- [26] Wang Q, Holst J. L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am J Cancer Res*, 2015, 5: 1281-94
- [27] Na ecz KA. Amino acid transporter SLC6A14 (ATB<sup>0+</sup>) - a target in combined anti-cancer therapy. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 594464
- [28] Rotoli BM, Barilli A, Visigalli R, et al. y+LAT1 and y+LAT2 contribution to arginine uptake in different human cell models: implications in the pathophysiology of lysinuric protein intolerance. *J Cell Mol Med*, 2020, 24: 921-929
- [29] Ellingsen S, Narawane S, Fjose A, et al. The zebrafish cationic amino acid transporter/glycoprotein-associated family: sequence and spatiotemporal distribution during development of the transport system b<sup>0+</sup> (*slc3a1/slc7a9*). *Fish Physiol Biochem*, 2021, 47: 1507-25
- [30] Jungnickel KEJ, Parker JL, Newstead S. Structural basis for amino acid transport by the CAT family of slc7 transporters. *Nat Commun*, 2018, 9: 550
- [31] Wang XX, Li YB, Feng MR, et al. Semi-mechanistic population pharmacokinetic modeling of L-histidine disposition and brain uptake in wildtype and pht1 null mice. *Pharm Res*, 2018, 35: 19
- [32] Wang Y, Li P, Song F, et al. Substrate transport properties of the human peptide/histidine transporter PHT2 in transfected MDCK cells. *J Pharm Sci*. 2019, 108: 3416-24
- [33] Ma Z, Zhang H, Lian M, et al. SLC7A11, a component of cysteine/glutamate transporter, is a novel biomarker for the diagnosis and prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2017, 38: 3019-29
- [34] Gegelashvili G, Schousboe A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull*, 1998, 45: 233-8

- [35] Prebraschenski J, Zander JF, Suzuki T, et al. Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter. *Neuron*, 2014, 84: 1287-301
- [36] Amoedo ND, Punzi G, Obre E, et al. AGC1/2, the mitochondrial aspartate-glutamate carriers. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863: 2394-412
- [37] Lim JC, Donaldson PJ. Focus on molecules: the cystine/glutamate exchanger (system x<sub>c</sub><sup>-</sup>). *Exp Eye Res*, 2011, 92: 162-3
- [38] Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med*, 2013, 34: 139-58
- [39] Scalise M, Pochini L, Console L, et al. The human SLC1A5 (ASCT2) amino acid transporter: from function to structure and role in cell biology. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 96
- [40] Shibutani S, Okazaki H, Iwata H. Dynamin-dependent amino acid endocytosis activates mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*, 2017, 292: 18052-61
- [41] Meng D, Yang Q, Wang H, et al. Glutamine and asparagine activate mTORC1 independently of Rag GTPases. *J Biol Chem*, 2020, 295: 2890-9
- [42] Wu X, Zhao L, Chen Z, et al. FLCN maintains the leucine level in lysosome to stimulate mTORC1. *PLoS One*, 2016, 11: e0157100
- [43] Wyant GA, Abu-Remaileh M, Wolfson RL, et al. mTORC1 activator SLC38A9 is required to efflux essential amino acids from lysosomes and use protein as a nutrient. *Cell*, 2017, 171: 642-54
- [44] Lei HT, Mu X, Hattne J, et al. A conformational change in the N terminus of SLC38A9 signals mTORC1 activation. *Structure*, 2021, 29: 426-32
- [45] Luo H, Zhao L, Ji X, et al. Glycosylation affects the stability and subcellular distribution of human PAT1 protein. *FEBS Lett*, 2017, 591: 613-23
- [46] Ögmundsdóttir MH, Heublein S, Kazi S, et al. Proton-assisted amino acid transporter PAT1 complexes with rag GTPases and activates TORC1 on late endosomal and lysosomal membranes. *PLoS One*, 2012, 7: e36616
- [47] Zhao L, Zhang X, Ji X, et al. The amino acid transporter PAT1 regulates mTORC1 in a nutrient-sensitive manner that requires its transport activity. *Cell Signal*, 2019, 53: 59-67
- [48] Fiermonte G, Dolce V, David L, et al. The mitochondrial ornithine transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem*, 2003, 278: 32778-83
- [49] Carroll B, Maetzel D, Maddocks OD, et al. Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *Elife*, 2016, 5: e11058
- [50] Edick AM, Audette J, Burgos SA. CRISPR-Cas9-mediated knockout of GCN2 reveals a critical role in sensing amino acid deprivation in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*, 2021, 104: 1123-35
- [51] Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 72-82
- [52] Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, 2009, 136: 521-34
- [53] Quan L, Ohgaki R, Hara S, et al. Amino acid transporter LAT1 in tumor-associated vascular endothelium promotes angiogenesis by regulating cell proliferation and VEGF-A-dependent mTORC1 activation. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 266
- [54] Milkereit R, Persaud A, Vanoaica L, et al. LAPT4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation. *Nat Commun*, 2015, 6: 7250
- [55] Heublein S, Kazi S, Ögmundsdóttir MH, et al. Proton-assisted amino-acid transporters are conserved regulators of proliferation and amino-acid-dependent mTORC1 activation. *Oncogene*, 2010, 29: 4068-79
- [56] Pinilla J, Aledo JC, Cwiklinski E, et al. SNAT2 transceptor signalling via mTOR: a role in cell growth and proliferation? *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 1289-99
- [57] Lopez AB, Wang C, Huang CC, et al. A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochemical J*, 2007, 402: 163-73
- [58] Palii SS, Thiaville MM, Pan YX, et al. Characterization of the amino acid response element within the human sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) System A transporter gene. *Biochem J*, 2006, 395: 517-27
- [59] Wang D, Guo C, Wan X, et al. Identification of amino acid response element of SLC38A9 as an ATF4-binding site in porcine skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 569: 167-73
- [60] Lawrence RE, Zoncu R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 133-42
- [61] Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, et al. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 2010, 141: 290-303
- [62] Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 2008, 320: 1496-501
- [63] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 2017, 169: 361-71
- [64] Jewell JL, Kim YC, Russell RC, et al. Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*, 2015, 347: 194-8
- [65] Dyachok J, Earnest S, Iturraran EN, et al. Amino acids regulate mTORC1 by an obligate two-step mechanism. *J Biol Chem*, 2016, 291: 22414-26
- [66] Averous J, Lambert-Langlais S, Carraro V, et al. Requirement for lysosomal localization of mTOR for its activation differs between leucine and other amino acids. *Cell Signal*, 2014, 26: 1918-27
- [67] Yoon MS, Choi CS. The role of amino acid-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)

- signaling in insulin resistance. *Exp Mol Med*, 2016, 48: e201
- [68] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 21-35
- [69] Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 2007, 12: 9-22
- [70] Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, et al. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 566-71
- [71] Shen K, Choe A, Sabatini DM. Intersubunit crosstalk in the Rag GTPase heterodimer enables mTORC1 to respond rapidly to amino acid availability. *Mol Cell*, 2017, 68: 552-65
- [72] Yan L, Mieulet V, Burgess D, et al. PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR. *Mol Cell*, 2010, 37: 633-42
- [73] Guo CY, Yu MX, Dai JM, et al. Roles of mitogen-activating protein kinase kinase kinase kinase-3 (MAP4K3) in preterm skeletal muscle satellite cell myogenesis and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation regulation. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3562-70
- [74] Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, et al. Ragulator is a GEF for the Rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell*, 2012, 150: 1196-208
- [75] Han JM, Jeong SJ, Park MC, et al. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell*, 2012, 149: 410-24
- [76] Wang S, Tsun ZY, Wolfson RL, et al. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*, 2015, 347: 188-94
- [77] Lei HT, Ma J, Sanchez Martinez S, et al. Crystal structure of arginine-bound lysosomal transporter SLC38A9 in the cytosol-open state. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 522-7
- [78] Shen K, Sabatini DM. Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: 9545-50
- [79] Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Science*, 2011, 334: 678-83
- [80] Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, et al. A tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*, 2013, 340: 1100-6
- [81] Abu-Remaileh M, Wyant GA, Kim C, et al. Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase- and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes. *Science*, 2017, 358: 807-13
- [82] Duran A, Amanchy R, Linares JF, et al. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell*, 2011, 44: 134-46
- [83] Linares JF, Duran A, Reina-Campos M, et al. Amino acid activation of mTORC1 by a PBI-domain-driven kinase complex cascade. *Cell Rep*, 2015, 12: 1339-52
- [84] Gan L, Seki A, Shen K, et al. The lysosomal GPCR-like protein GPR137B regulates Rag and mTORC1 localization and activity. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 614-26
- [85] Meng J, Ferguson SM. GATOR1-dependent recruitment of FLCN-FNIP to lysosomes coordinates Rag GTPase heterodimer nucleotide status in response to amino acids. *J Cell Biol*, 2018, 217: 2765-76
- [86] Lawrence RE, Fromm SA, Fu Y, et al. Structural mechanism of a Rag GTPase activation checkpoint by the lysosomal folliculin complex. *Science*, 2019, 366: 971-7
- [87] Menon S, Dibble CC, Talbott G, et al. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*, 2014, 156: 771-85
- [88] Deng L, Chen L, Zhao L, et al. Ubiquitination of Rheb governs growth factor-induced mTORC1 activation. *Cell Res*, 2019, 29: 136-50
- [89] Prentzell MT, Rehbein U, Cadena Sandoval M, et al. G3BPs tether the TSC complex to lysosomes and suppress mTORC1 signaling. *Cell*, 2021, 184: 655-74
- [90] Fitzian K, Brückner A, Brohée L, et al. TSC1 binding to lysosomal PIPs is required for TSC complex translocation and mTORC1 regulation. *Mol Cell*, 2021, 81: 2705-21
- [91] Deng L, Jiang C, Chen L, et al. The ubiquitination of Rag A GTPase by RNF152 negatively regulates mTORC1 activation. *Mol Cell*, 2015, 58: 804-18
- [92] Fingar DC. Rag ubiquitination recruits a GATOR1: attenuation of amino acid-induced mTORC1 signaling. *Mol Cell*, 2015, 58: 713-5
- [93] Chantranupong L, Wolfson RL, Orozco JM, et al. The sestrins interact with GATOR2 to negatively regulate the amino-acid-sensing pathway upstream of mTORC1. *Cell Rep*, 2014, 9: 1-8
- [94] Peng M, Yin N, Li MO. Sestrins function as guanine nucleotide dissociation inhibitors for Rag GTPases to control mTORC1 signaling. *Cell*, 2014, 159: 122-33
- [95] Kim YM, Stone M, Hwang TH, et al. SH3BP4 is a negative regulator of amino acid-Rag GTPase-mTORC1 signaling. *Mol Cell*, 2012, 46: 833-46
- [96] Luo C, Zheng N, Zhao S, et al. Sestrin 2 negatively regulates casein synthesis through the SH3BP4-mTORC1 pathway in response to AA depletion or supplementation in cow mammary epithelial cells. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 4849-59
- [97] Wolfson RL, Chantranupong L, Wyant GA, et al. KICSTOR recruits GATOR1 to the lysosome and is necessary for nutrients to regulate mTORC1. *Nature*, 2017, 543: 438-42
- [98] Long L, Wei J, Lim SA, et al. CRISPR screens unveil signal hubs for nutrient licensing of T cell immunity. *Nature*, 2021, 600: 308-13
- [99] Berlanga JJ, Santoyo J, De Haro C. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase. *Eur J Biochem*, 1999, 265: 754-62
- [100] Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 11269-74
- [101] Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-dependent transcription

- mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20: 436-43
- [102] Gwinn DM, Lee AG, Briones-Martin-Del-Campo M, et al. Oncogenic KRAS regulates amino acid homeostasis and asparagine biosynthesis via ATF4 and alters sensitivity to L-asparaginase. *Cancer Cell*, 2018, 33: 91-107
- [103] Shan J, Zhang F, Sharkey J, et al. The C/ebp-Atf response element (CARE) location reveals two distinct Atf4-dependent, elongation-mediated mechanisms for transcriptional induction of aminoacyl-tRNA synthetase genes in response to amino acid limitation. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 9719-32
- [104] B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, et al. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 7683-99
- [105] Anthony TG, McDaniel BJ, Byerley RL, et al. Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. *J Biol Chem*, 2004, 279: 36553-61
- [106] Ye J, Palm W, Peng M, et al. GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing sestrin2. *Genes Dev*, 2015, 29: 2331-6
- [107] Xu D, Dai W, Kutzler L, et al. ATF4-mediated upregulation of REDD1 and sestrin2 suppresses mTORC1 activity during prolonged leucine deprivation. *J Nutr*, 2020, 150: 1022-30
- [108] Jin HO, Hong SE, Kim JY, et al. Amino acid deprivation induces AKT activation by inducing GCN2/ATF4/REDD1 axis. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 1127
- [109] Averous J, Lambert-Langlais S, Mesclon F, et al. GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Sci Rep*, 2016, 6: 27698
- [110] Nikonorova IA, Mirek ET, Signore CC, et al. Time-resolved analysis of amino acid stress identifies eIF2 phosphorylation as necessary to inhibit mTORC1 activity in liver. *J Biol Chem*, 2018, 293: 5005-15
- [111] Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, 2016, 351: 43-8
- [112] Saxton RA, Knockenhauer KE, Wolfson RL, et al. Structural basis for leucine sensing by the sestrin2-mTORC1 pathway. *Science*, 2016, 351: 53-8
- [113] Lee M, Kim JH, Yoon I, et al. Coordination of the leucine-sensing Rag GTPase cycle by leucyl-tRNA synthetase in the mTORC1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E5279-88
- [114] Chen J, Ou Y, Luo R, et al. SAR1B senses leucine levels to regulate mTORC1 signalling. *Nature*, 2021, 596: 281-4
- [115] Fromm SA, Lawrence RE, Hurley JH. Structural mechanism for amino acid-dependent Rag GTPase nucleotide state switching by SLC38A9. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27: 1017-23
- [116] Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, et al. The CASTOR proteins are arginine sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell*, 2016, 165: 153-64
- [117] Saxton RA, Chantranupong L, Knockenhauer KE, et al. Mechanism of arginine sensing by CASTOR1 upstream of mTORC1. *Nature*, 2016, 536: 229-33
- [118] Gu X, Orozco JM, Saxton RA, et al. SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, 2017, 358: 813-8
- [119] Kim SH, Choi JH, Wang P, et al. Mitochondrial threonyl-tRNA synthetase TARS2 is required for threonine-sensitive mTORC1 activation. *Mol Cell*, 2021, 81: 398-407