

蛋白激酶的相互作用促进 τ 的阿尔茨海默样磷酸化*

王建枝 GRUNDKE-IQBAL I SMITH A IQBAL K

(同济医科大学病理生理教研室, 武汉 430030)

摘要 cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA) 的预处理可显著增强糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 对 τ 蛋白的磷酸化作用. 将磷酸化的 τ 蛋白经胰蛋白酶消化, FeCl_3 亲和柱分离及 C18 反相高压液相层析纯化后, 再用高压电泳, 手工 Edman 降解及自动氨基酸序列分析等技术, 对其磷酸化位点进行鉴定. 结果发现: GSK-3 可使 PKA 预处理的 τ 至少在丝氨酸 (Ser) -195, Ser-198, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-262, Ser-356, Ser-404, 苏氨酸 (Thr) -205 和 Thr-231 等 10 个位点发生磷酸化. 其中 Ser-198, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-262, Ser-404, Thr-205 和 Thr-231 为 Alzheimer 病 (AD) τ 蛋白的异常磷酸化位点. 上述磷酸化作用高度抑制 τ 的生物学活性, 提示: AD τ 的生物学功能的抑制与 Ser-198, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-262, Thr-205 和 Thr-231 的磷酸化密切相关, PKA 和 GSK-3 的相互作用可能在 AD 神经原纤维变性中起重要作用.

关键词 蛋白激酶, τ 蛋白, 阿尔茨海默病, 异常磷酸化

学科分类号 R745.7, Q513

τ 蛋白是神经细胞内含量最高的微管相关蛋白, 其正常功能是促进微管组装和维持微管的稳定性. 在阿尔茨海默 (Alzheimer, AD) 病患者, τ 蛋白被异常过度磷酸化, 从而丧失上述生物学功能^[1,2]. AD 脑中 τ 的异常磷酸化与蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶调节失衡有关. 已知多种蛋白磷酸酯酶 (PP), 如 PP-2A, PP-1 和 PP-2B 在 τ 的 AD 样异常磷酸化中起重要作用^[3], 然而, 对蛋白激酶的有关影响却知之甚少. 根据丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的催化序列是否依赖脯氨酸, 可将其分为脯氨酸指导的蛋白激酶 (PDPK) 和非脯氨酸指导的蛋白激酶 (nonr-PDPK). 在 AD τ 蛋白已经发现的 21 个异常磷酸化位点中, 有 10 个 PDPK 和 11 个 nonr-PDPK 位点^[4]. 可见, PDPK 和 nonr-PDPK 可能均参与了 AD 的发病过程. 因此, 本研究分别选用 PKA (nonr-PDPK) 和 GSK-3 (PDPK), 探讨蛋白激酶的相互作用对 τ 蛋白磷酸化及其所致的生物学功能抑制的影响, 以期部分阐明蛋白激酶在 AD 神经原纤维退化中的作用.

1 材料与方法

1.1 蛋白质样品的制备

重组人类 τ (τ 3L) cDNA 由 Goedert 博士提供. τ 3L 的制备根据 Goedert 法^[5] 进行如下改良: 将在大肠杆菌中表达后收获的含重组 τ 3L 的细胞于 80 mmol/L Mes (pH 6.8) 含 5 mmol/L DTT 的溶液中进行超声破碎, 120 000 $\times g$ 离心后, 取上清

液用磷酸纤维素柱层析分离, 用免疫印迹法确定 τ 的洗脱峰, 收集富含 τ 的级分于沸水浴中煮沸 5 min 后用过氯酸进行抽提. 所纯化的 τ 蛋白达凝胶电泳蛋白质染色单点纯, 其得率平均为 5 mg/L. GSK-3 由 Singh 博士^[6] 提供. GSK-3 制剂含 α 和 β 同工异构体的比例为 1:3. 1 单位 GSK-3 定义为在 30 $^{\circ}\text{C}$ 每分钟催化 1 nmol ^{32}P 掺入鞘脂碱性蛋白 (1 g/L) 所需的酶量. PKA 催化亚基从 Sigma 公司购买. 蛋白质含量测定用改良 Lowry 法.

1.2 τ 蛋白的磷酸化

将 τ 3L (1 g/L) 与 PKA (6 $\mu\text{g/L}$) 和非标记 ATP 在磷酸化缓冲液 (7 mmol/L MgCl_2 , 12 mmol/L $\beta\text{-ME}$, 0.5 mmol/L ATP, 20 mmol/L Hepes pH 7.5) 中 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 和 10 000 $\times g$ 离心 10 min 后, 于上清液中加入 GSK-3 (350 mU/ml) 和 ^{32}P -ATP, 再继续保温 4 h. 用 Cerenkov 计数法测得 τ ^{32}P 的标记率约为每摩尔 τ 掺入 3.2 mol ^{32}P .

1.3 τ 蛋白的胰酶降解及 FeCl_3 亲和柱分离

将上述激酶处理的 τ 按 1:1 用胰蛋白酶在 50 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.0) 缓冲液中消化 36 h 后, 再用 FeCl_3 亲和柱层析法进行分离, 约 97% 的 ^{32}P 活性在 1% 醋酸铵 (pH 8.5) 缓冲液中洗脱, 收集该级分真空干燥后待用.

* 国家自然科学基金资助项目 (39770175).

收稿日期: 1998-08-19, 修回日期: 1998-12-29

1.4 磷酸化 τ 肽的反相高压液相层析 (RPLC)

将上述磷酸化 τ 肽重悬于 0.15 ml 双蒸水中, 用 Millipore 超滤膜 (截留相对分子质量 > 10 000) 过滤后, 再用 C₁₈ RPLC 柱 (0.46 cm × 25 cm, Vydac) 以 0%~35% 乙腈 (溶于含 0.1% 三氟乙酸的水溶液) 线性梯度 (0.5%/min) 进行层析纯化, 以 1 ml/min, 0.3 ml/管收集, 真空干燥后待用。

1.5 磷酸氨基酸分析

将 RPLC 纯化的磷酸化 τ 肽冲氮气后用 6 mol/L HCl 在 110 °C 消化 2 h, 消化液用硅胶薄层板进行高压电泳分离约 25 min. 电泳缓冲液为: 甲酸: 醋酸: 水 (50: 160: 1794, 体积比) pH 1.9, 电泳电压为 1.5 kV. 电泳后以磷酸氨基酸 (Sigma 公司) 的茚三酮染色图谱为标准, 对样品进行放射自显影, 检测磷肽所含磷酸氨基酸的类型。

1.6 手工 Edman 降解及自动氨基酸序列分析

将 RPLC 纯化的磷酸化 τ 重悬于 50% 乙腈水溶液, 取部分样品加于 SequelonTM AA Disk

(Millipore), 用异硫氰酸苯酯 (PITC) 和三氟乙酸 (TFA) 分别修饰和降解 N 端氨基酸, 收集每次循环降解液进行真空干燥后, 再用 Cerenkov 法测定放射活性, 从而确定磷酸化氨基酸所在位置; 同时, 将同一样品的另一部分籍氨基酸自动分析仪进行氨基酸序列分析. 通过匹配手工 Edman 降解及自动氨基酸序列分析结果可确定 τ 蛋白的磷酸化位点. τ 蛋白促微管组装和维持微管稳定性的测定参照文献 [2, 7].

2 结 果

2.1 磷酸化 τ 肽的 RPLC 纯化及其磷酸氨基酸的鉴定

GSK-3 磷酸化的 PKA 预处理 τ 蛋白经胰酶消化及 FeCl₃ 亲和柱分离后, 含磷 τ 肽经 RPLC 进一步纯化获得 8 个含 τ 序列的 ³²P 多肽片段, 根据其洗脱顺序分别命名为磷肽 I 至 VIII (图 1). 高压电泳分析结果显示: 磷肽 I 至 IV 含磷酸-Ser 和磷酸-Thr, 而磷肽 V 至 VIII 只含磷酸-Ser.

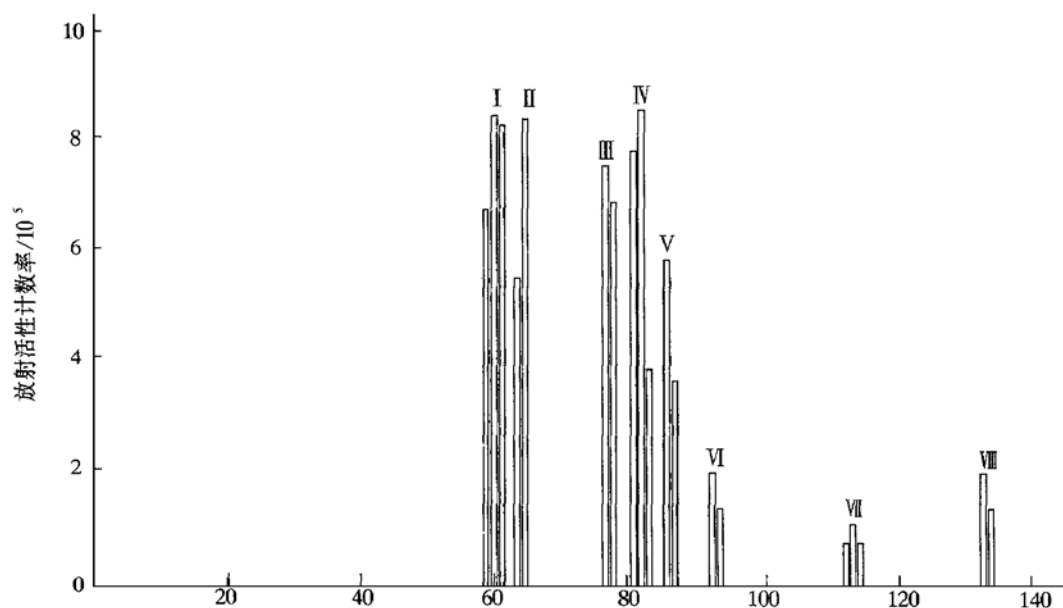
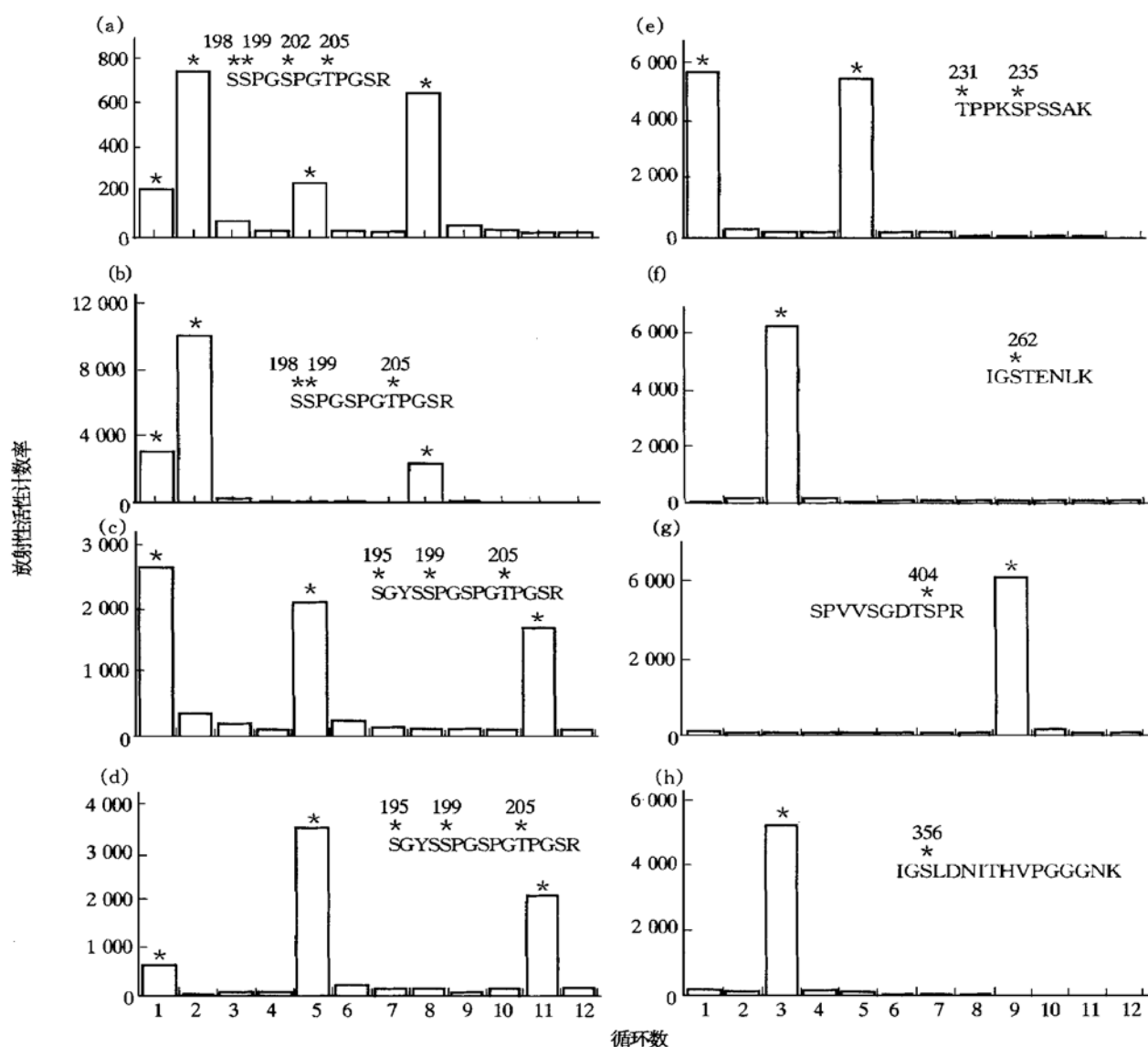


图 1 PKA 和 GSK-3 联合磷酸化的 ³²P τ 肽的 RPLC 分离

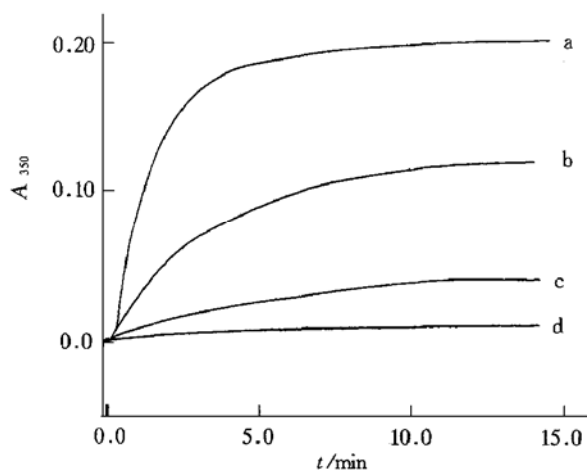
2.2 手工 Edman 降解及自动氨基酸序列分析

通过对手工 Edman 降解及自动氨基酸序列分析结果的综合分析表明: 经 PKA 预处理后, GSK-3 磷酸化 τ 的位点分别为: Ser-195, Ser-198, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-262, Ser-356, Ser-404, Thr-205 和 Thr-231, 其中 Ser-198, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-262, Ser-404, Thr-205 和

Thr-231 为 Alzheimer 病 (AD) τ 蛋白的异常磷酸化位点. 这些位点在 τ 蛋白分子中的母序列分别为: Ser-195 至精氨酸 (Arg) -209, Thr-231 至赖氨酸 (Lys) -240, 异亮氨酸 (Ile) -260 至 Lys-267, Ile-354 至 Lys-369 和 Ser-396 至 Arg-406 (图 2).

图2 经 RPLC 分离的 ^{32}P 肽磷酸化位点的鉴定

2.3 磷酸化对 τ 蛋白生物学活性的影响

图3 磷酸化对 τ 促微管组装活性的影响

a: 正常对照; b: 单纯 GSK-3 磷酸化; c: PKA + GSK-3 磷酸化的 τ ; d: 微管蛋白对照。

与正常 τ 蛋白相比, PKA 加 GSK-3 的磷酸化作用使 τ 几乎完全丧失其促微管组装功能 (图 3), 且其微管结合活性降低约 50% (图略)。

3 讨 论

3.1 作者最近的研究发现: 单纯 GSK-3 与重组 τ 保温 4 h 仅催化约 1.7 mol ^{32}P 掺入 1 mol τ , 其磷酸化的位点分别为的 Thr-181, Ser-184, Ser-262, Ser-356 和 Ser-400, 其中包括 Ser-262 和 Ser-400 两个 AD τ 异常磷酸化位点 (待发表资料)。本研究发现: PKA 的预处理使 GSK-3 催化的 τ ^{32}P 掺入量增加至每摩尔 τ 掺入 3.2 mol ^{32}P , 且 τ 的磷酸化位点增加至 10 个, 其中 8 个为 AD τ 的异常磷酸化位点, 异常磷酸化作用高度抑制 τ 的生物学功能。这些资料有力地说明: PKA 和 GSK 的相互作用在 τ

的AD样病理改变中起重要作用,因而可能是AD患者神经原纤维变性的潜在性责任酶系统.

3.2 AD双螺旋丝中的 τ 至少有21个异常磷酸化位点(Ser-46, Thr-123, Ser-198, Ser-199, Ser-202, Thr-205, Ser-208, Ser-210, Thr-212, Thr-217, Thr-231, Ser-235, Ser-262, Ser-396, Ser-400, Thr-403, Ser-404, Ser-409, Ser-412, Ser-413, Ser-422)^[8], AD异常磷酸化的 τ 完全丧失其生物学活性,从而导致微管破坏,神经原纤维变性.可见,从上述21个异常磷酸化位点中,找出影响其功能活性的关键性位点及其相关的蛋白激酶,对阐明AD的发病机制和开发有效防治新药无疑具有重要意义. Biernat等^[9]曾报道: τ 蛋白Ser-262位磷酸化使其微管结合活性完全丧失,从而提出Ser-262是 τ 生物学功能的决定部位,而能催化Ser-262磷酸化的蛋白激酶则为引起AD的责任酶.然而, Singh等^[7]选用含Ser-262的 τ 肽片段和特异性识别Ser-262磷酸化的抗体(12E8)的研究发现:钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CamK II)使 τ 的Ser-262磷酸化仅部分抑制其促微管组装和微管结合活性,从而对上述研究结果提出质疑.根据作者最近对 τ 的磷酸图谱和生物学活性的同步测定结果,发现单纯用GSK-3磷酸化的 τ 位点中含Ser-262,但仅轻度抑制 τ 生物学活性,而用PKA加GSK-3的磷酸化作用则高度抑制 τ 的功能,进一步确证:除Ser-262外,AD τ Ser-198, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-404, Thr-205和Thr-231的磷酸化与其生物学活性丧失密切相关.

参 考 文 献

- 1 Wang J Z, Gong C X, Zaidi T, *et al.* Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by PP-2A and PP-2B. *J Biol Chem*, 1995, **270** (9): 4854~4860
- 2 Wang J Z, Grundke Iqbal I, Iqbal K. Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatases-2A, -2B and -1. *Mol Brain Res*, 1996, **38** (2): 200~208
- 3 Iqbal K, Alonso A, Gong C X, *et al.* τ phosphatase. In: Kosik K, Avila J, eds. *Brain Microtubule Associated Proteins: Modifications and Diseases*. New York: Harwood Academic Publishers, 1997. 95~111
- 4 Singh T J, Zaidi T, Grundke Iqbal I, *et al.* Non-proline-dependent protein kinases phosphorylated several sites found in tau in Alzheimer disease brain. *Mol Cell Biochem*, 1996, **154** (1): 143~151
- 5 Goedert M, Jake R. Expression of separate isoforms of human tau proteins: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*, 1990, **9** (2): 4225~4230
- 6 Sengupta A, Wu Q L, Grundke Iqbal I, *et al.* Potentiation of

GSK-3-activated Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem*, 1997, **70** (4): 765~768

- 7 Singh T J, Wang J Z, Novak M, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett*, 1996, **387**: 145~148
- 8 Morishima Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, *et al.* Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 823~829
- 9 Biernat J, Gustke N, Drewes G, *et al.* Phosphorylation of Ser-262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, 1993, **11** (1): 153~163

Interaction of Protein Kinases Stimulates an Alzheimer-like Phosphorylation of τ . WANG Jian-Zhi, GRUNDKE-IQBAL I, SMITH A, IQBAL K (*Pathophysiology Department, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China*).

Abstract Prephosphorylation of τ by cAMP-dependent protein kinase (PKA) significantly stimulated its consecutive phosphorylation catalyzed by glycogen synthetase kinase-3 (GSK-3). After digestion of phosphorylated τ with trypsin, ³²P-labeled τ peptides were purified by a sequential FeCl₃ micro affinity column and a C₁₈ reverse phase high performance liquid chromatography. The results from a combined techniques of high voltage electrophoresis, manual Edman degradation and auto gas phase amino acid sequence analysis demonstrated that the phosphorylation sites of τ (pretreated with PKA) by GSK-3 were Ser (serine) -195, Ser-198, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-262, Ser-356, Ser-404, Thr (threonine) -205 and Thr-231. Among them, Ser-198, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-262, Ser-404, Thr-205 and Thr-231 are abnormal phosphorylation sites of τ found in Alzheimer disease. As the above phosphorylation potentially inhibited the biological activity of τ , it was concluded that the phosphorylation of τ at above mentioned Alzheimer sites is critical to the inhibition of its biofunction, and that the interaction of PKA and GSK-3 might be a potential system responsible for the neurofibrillary degeneration seen in Alzheimer disease.

Key words kinase, τ protein, Alzheimer disease, abnormal phosphorylation