

糖元合成酶激酶 3 β 对微管 相关蛋白 tau 的磷酸化作用 *

刘 飞^{1,2)**} 施建华^{1,2)} 丁绍红¹⁾ 尹晓敏¹⁾

(¹⁾南通大学江苏省神经再生重点实验室, 南通 226001)

(²⁾南通大学医学院生化教研室, 南通 226001)

摘要 tau 蛋白是中枢神经系统中重要的微管相关蛋白, 其功能受磷酸化调节. 异常过度磷酸化的 tau 蛋白是阿尔茨海默病患者脑中神经纤维缠结的主要组成部分. 糖元合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 是重要的 tau 蛋白激酶之一, 它虽可催化 tau 蛋白多个位点的磷酸化, 但对不同位点, 其催化效率不同. 通过位点特异性、磷酸化依赖的 tau 蛋白抗体, 用免疫印迹技术, 检测 GSK-3 β 对 tau 蛋白位点特异性的磷酸化作用及动力学. 用双倒数作图, 计算 GSK-3 β 催化 tau 磷酸化以及各个位点磷酸化的 K_m 值, 并结合培养细胞中的实验, 研究 GSK-3 β 对 tau 蛋白磷酸化作用的位点特异性. 结果显示, GSK-3 β 催化 tau 蛋白多个位点的磷酸化, 其中包括 Thr181、Ser199、Ser202、Thr205、Thr212、Thr217、Thr231、Ser396 和 Ser404, 对不同的位点磷酸化作用, 其 K_m 值不同, GSK-3 β 对 Ser396 的 K_m 值最低, 即对 Ser396 位点的亲和性最高, 催化其磷酸化的能力最强. 在培养的细胞中, 也显示了 GSK-3 β 的表达引起 Ser396 位点的磷酸化最明显.

关键词 tau, 糖元合成酶激酶 3 β (GSK-3 β), 磷酸化

学科分类号 R745.7, Q513

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的成年人痴呆, 它以细胞外 β -淀粉样蛋白(β -amyloid peptide)聚集形成的老年斑(senile plaque)和细胞内异常过度磷酸化的 tau 蛋白聚集形成的神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)为主要病理特征. 并且, 其痴呆症状的严重程度与神经纤维缠结的多少有关^[1].

tau 蛋白是存在于神经元中主要的微管相关蛋白, 其生物学功能是促进微管的聚合和稳定微管的结构. 在正常成年人脑中, 有 6 种 tau 蛋白变异体, 这 6 种变异体是由同一基因编码, 经过不同剪接的结果. tau 蛋白受磷酸化、糖基化、糖化、泛素化、硝基化等翻译后修饰. 在正常人脑中, 每个分子 tau 蛋白修饰有 2~3 个分子的磷酸基团, 但在 AD 患者的脑中, 每个分子 tau 蛋白可连接有 9~10 个磷酸基团^[2]. 这种过度的磷酸化使得 tau 蛋白失去其生物学功能, 易于聚集成双螺旋丝(paired helical filament, PHF), 并变成毒性分子, 可猎获神经元中正常的微管相关蛋白, 使微管结构崩解, 神经元退变^[3,4]. 因此, tau 蛋白的异常过度磷酸化被认为

是 AD 致病的关键因素.

蛋白质的磷酸化受蛋白激酶催化. 糖元合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 是最重要的催化 tau 蛋白磷酸化的蛋白激酶之一, 它可催化 tau 蛋白上多个丝氨酸或苏氨酸位点的磷酸化^[5]. 越来越多的研究已显示了 GSK-3 β 在 tau 蛋白磷酸化及其在 AD 致病过程的作用及 GSK-3 β 抑制剂在 AD 防治方面的潜在作用. 虽然 GSK-3 β 催化 tau 蛋白多个位点的磷酸化, 但它对各个位点磷酸化作用的效果不同. 我们曾报道, GSK-3 β 催化 tau 蛋白微管结合域下游位点磷酸化的能力较细胞周期依赖性激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5) 强, 但对微管结合域上游位点的磷酸化则不如 CDK5^[6]. GSK-3 β 对 tau 位点特异性磷酸化, 特别是对各个位点磷酸化的动力学(如 K_m)还未见报道. 在这里, 我们通过用位点特异性、磷酸化依赖的抗

*国家自然科学基金(30572076), 江苏省自然科学基金(BK2004047)和江苏省六大人才高峰资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 0513-85051813, E-mail: feiliu63@hotmail.com

收稿日期: 2007-02-15, 接受日期: 2007-04-02

tau 蛋白抗体, 用免疫点印迹技术, 检测 GSK-3 β 对 tau 蛋白各个位点磷酸化作用的动力学, 用林贝氏双倒数法作图, 计算其催化各个位点磷酸化的 K_m 值, 并结合在培养细胞中的实验, 研究了 GSK-3 β 对 tau 蛋白磷酸化作用的位点特异性.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒. CHO 细胞购自美国 ATCC 公司. pCI/tau₄₄₁ 由日本理化研究所的 Takashima 馈赠, pCDNA₃/GSK-3 β 由西班牙马德里的 Avila 惠赠.

1.1.2 抗体. 抗 tau [pT181]、tau [pS199]、tau [pS202]、tau [pT205]、tau [pT212]、tau [pS214]、tau [pT217]、tau [pS262]、tau [pS396] 和 tau [pS404] (多克隆抗体, 识别特异位点磷酸化的 tau 蛋白) 为美国 Biosource International 公司产品; 92e 和 R134d (多克隆抗体, 识别磷酸化和非磷酸化的 tau 蛋白) 及 tau [pS422] 为美国纽约州立基础研究所神经化学系自行研制; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为美国 JacksonImmunoResearch Laboratories 产品.

1.1.3 其他试剂和材料. GSK-3 β 为 CalBiochem 公司产品; Tau₄₄₁ 为本室自制; ECL 化学发光试剂盒为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; Immobilon™-P PVDF 膜、硝酸纤维素膜为 Millipore 公司产品; Lipofactamin2000 为 Invitrogen 公司产品; [γ -³²P]ATP 为美国 ICN Biomedicals 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 GSK-3 β 对 tau₄₄₁ 的磷酸化. 在反应缓冲液中 (50 mmol/L HEPES, pH 7.4, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 0.2 mmol/L ATP), 磷酸化反应通过保温 (30℃) 0.2 g/L tau₄₄₁ 与 2.2 mg/L GSK-3 β 150 min 而进行. 反应通过加入 4 倍的 SDS-PAGE 上样缓冲液并煮沸 5 min 而终止. 磷酸化产物用蛋白质印迹分析, 检测 tau 蛋白在各个位点上的磷酸化.

1.2.2 GSK-3 β 催化 tau 蛋白磷酸化反应的 K_m 测定. 对于 GSK-3 β 催化 tau 蛋白总磷酸化反应的 K_m 值, 在上述的磷酸化反应缓冲液中, 以 [γ -³²P]ATP 代替 ATP, 通过在 30℃ 保温 GSK-3 β 与不同浓度的 tau₄₄₁ 10 min 后, 以纸层析分离游离的 ATP 和掺入到 tau 蛋白上的磷酸基团, 通过液闪仪计算 tau 蛋白的磷酸化程度. 并通过林贝氏双倒数法计算其 K_m 值. 对于催化 tau 蛋白各个位点磷酸化反应的 K_m

值, 通过保温 (30℃) 不同浓度的 tau 蛋白与 GSK-3 β 在上述的反应缓冲液中 10 min 后, 加入 5% 乙酸终止反应. 然后, 将系列稀释的反应产物通过点印迹的方法, 用位点特异的、磷酸化依赖的抗 tau 蛋白抗体, 检测各个位点磷酸化的水平. 通过林贝氏双倒数作图, 计算出 GSK-3 β 对各个位点磷酸化反应的 K_m 值.

1.2.3 细胞培养和转染. CHO 细胞培养在含 10% 小牛血清的常规 DMEM 培养基中, 每 2 天换液一次. 在转染的前一天, 将 CHO 细胞培养于 6 孔板上, 用 Lipofactamin2000, 按说明书的方法, 转染 pCI/tau₄₄₁ 或共转染 pCI/tau₄₄₁ 与 pCDNA₃/GSK-3 β . 2 天后, 用含 100 nmol/L Okadaic acid 的 SDS-PAGE 上样缓冲液裂解细胞, 煮沸 5 min 后, 用蛋白质印迹分析, 检测 tau 蛋白在各个位点上的磷酸化.

1.2.4 蛋白质印迹分析按已发表的方法完成^[7]. 蛋白质经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 通过电印迹致 PVDF 膜上. 然后用 5% 脱脂奶粉封闭 30 min, 一抗室温孵育过夜. 经含 0.5% Tween 20 的 TBS (TBST) 洗涤后, 与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h. 再经 TBST 洗涤后, 用 ECL 化学发光试剂盒按说明书描述的方法检测.

2 结 果

2.1 GSK-3 β 催化 tau 蛋白多个位点的磷酸化

GSK-3 β 是重要的 tau 蛋白激酶之一, 它可催化 tau 蛋白多个位点的磷酸化. 我们以人 tau 蛋白最长的变异体 tau₄₄₁ 作为底物, 用重组的 GSK-3 β 催化 tau 蛋白的磷酸化反应, 然后通过蛋白质印迹技术, 用位点特异的、磷酸化依赖的抗 tau 蛋白抗体检测 GSK-3 β 磷酸化 tau 的位点. 如图 1 所示, GSK-3 β 催化 tau 蛋白多个位点的磷酸化, 其中包括 Thr181、Ser199、Ser202、Thr205、Thr212、Thr217, Thr231、Ser396 和 Ser404 (图 1a~j). 而且, tau 蛋白的磷酸化使得 tau 蛋白的迁移变慢 (图 1k).

2.2 GSK-3 β 催化 tau 蛋白磷酸化反应的动力学

为了更好地了解 GSK-3 β 催化 tau 蛋白的磷酸化作用, 我们研究了其磷酸化反应的动力学. 图 2 显示 GSK-3 β 催化 tau 蛋白磷酸化反应呈现典型的米-曼氏曲线. 为了计算其催化反应的 K_m 值, 我们采用林贝氏双倒数作图法, 通过在 x 轴的截矩, 计算出其 K_m 值为 42 μ mol/L (图 2).

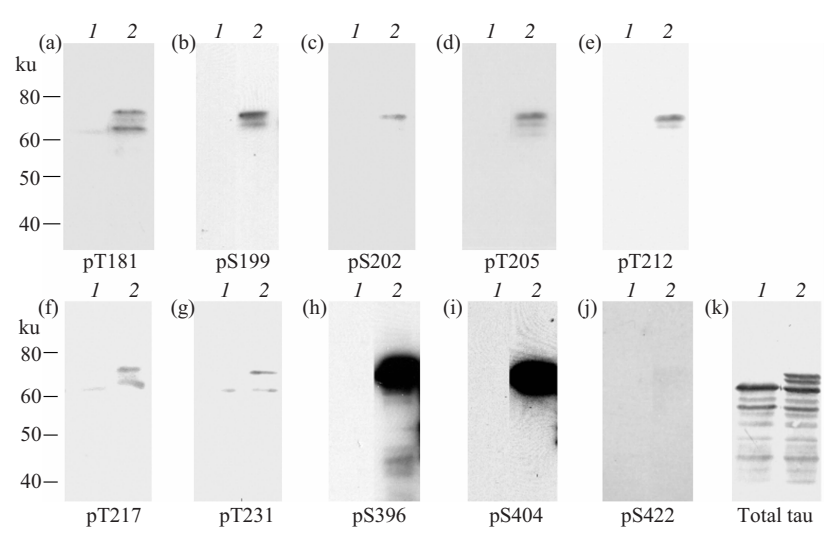


Fig. 1 Site-specific phosphorylation of tau by GSK-3β *in vitro*
tau₄₄₁ (0.2 g/L) was phosphorylated by GSK-3β for 150 min in reaction buffers described in **Materials and methods**. After incubation, the reaction was terminated by adding 4×SDS-PAGE sample buffer and boiling for 5 min. The phosphorylation of tau at each site was determined by using Western blot analyses employing site-specific and phosphorylation-dependent anti-tau antibodies indicated under each blot. The total tau level was detected by R134d, a phosphorylation-independent anti-tau antibody. 1: Control; 2: GSK-3β.

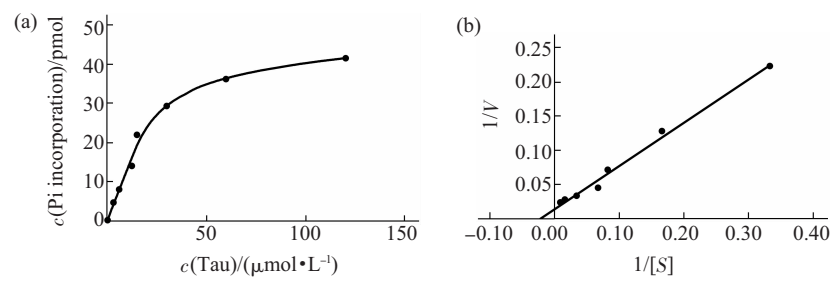


Fig. 2 Kinetic study of tau₄₄₁ phosphorylation catalyzed by GSK-3β
Various concentrations of tau were phosphorylated by GSK-3β. The ³²P incorporated to tau was plotted against substrate (tau) concentration (a) or data were plotted by using the Lineweaver-Burk double-reciprocal method (b).

2.3 GSK-3β 对各个位点磷酸化反应的 K_m 值

由于 GSK-3β 催化 tau 蛋白多个位点的磷酸化, 并且对每个位点磷酸化的催化效率不同. 因此, 我们用位点特异性、磷酸化依赖的抗 tau 蛋白抗体, 通过 Dot-blot 检测此磷酸化反应中, tau 蛋白在各个位点的磷酸化程度. 从图 3a~d 显示几个最容易被 GSK-3β 催化发生磷酸化位点的 Dot-blot 结果. 通过对各个点进行密度扫描, 计算出其磷酸化的相对强度. 如图 3e 所示, GSK-3β 对 tau 蛋白 Ser199 位点的磷酸化反应随着底物浓度的增加而增加, 并在 50 μmol/L tau 蛋白时, 磷酸化反应增

加减缓, 呈现典型的米 - 曼氏曲线. 通过对其双倒数作图, 我们计算出了 GSK-3β 催化 tau 蛋白在 Ser199 位点磷酸化反应的 K_m 值为 64 μmol/L.

对于 Thr212 位点的磷酸化, 从图 3b 和 3g 我们可以看到, 随着 tau 蛋白浓度的增加, GSK-3β 催化 Thr212 位点的磷酸化也增加, 但在 tau 蛋白浓度达到 100 μmol/L 时, Thr212 位点的磷酸化并没有减缓而达到平台, 也就是说, 若继续增加 tau 蛋白的浓度, 在此位点的磷酸化还会相应增加. 因此, 在此底物浓度范围内, 我们未能获得 GSK-3β 催化 tau 在 Thr212 位点磷酸化的 K_m 值.

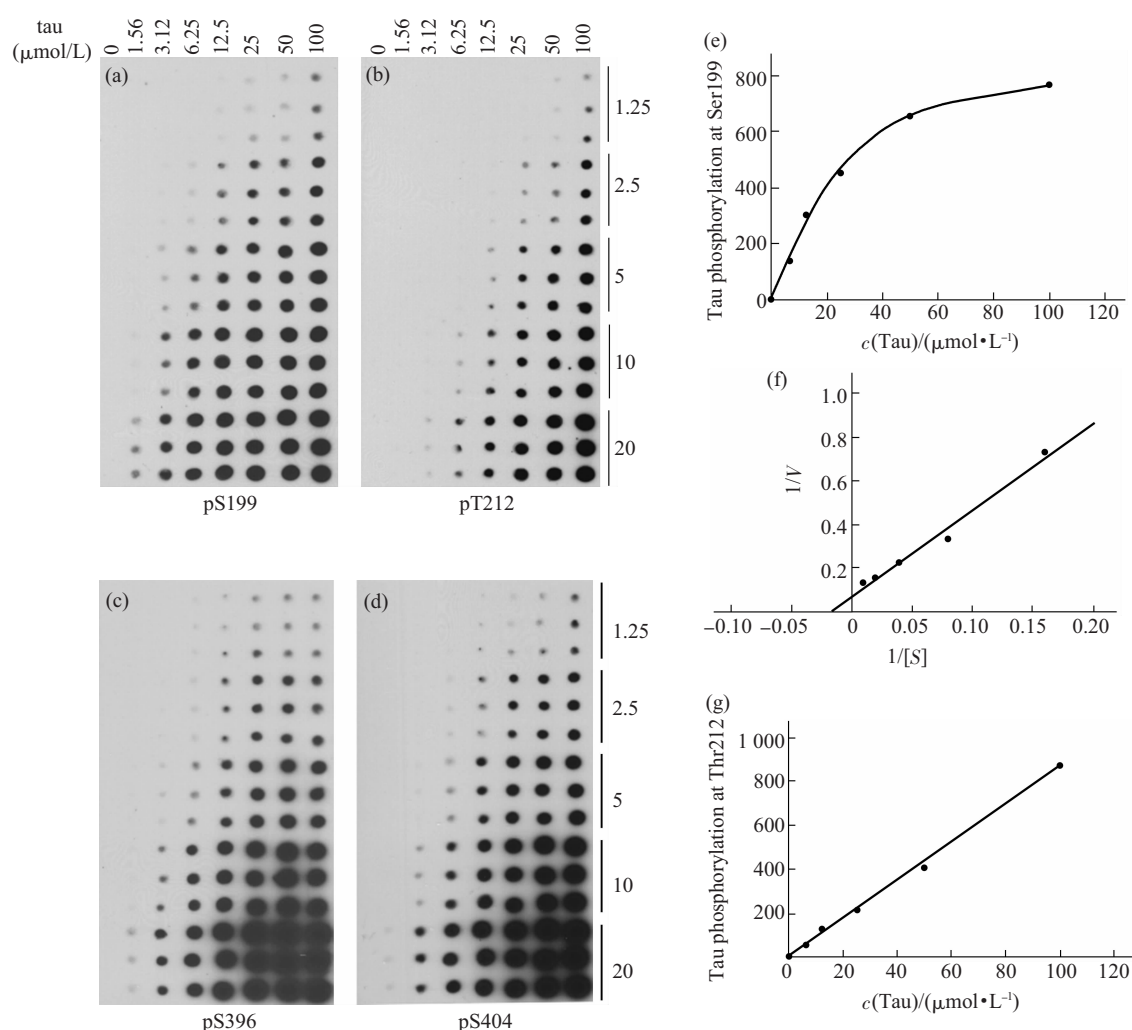


Fig. 3 Kinetics of tau₄₄₁ phosphorylation at individual site catalyzed by GSK-3β

(a), (b) Tau phosphorylation at individual site was measured by immuno-dot-blot by using site-specific and phosphorylation dependent tau antibodies indicated under each blot. The phosphorylation level (arbitrary units) of tau at each site was plotted against substrate (tau) concentration (e), (g) or data were plotted by using the Lineweaver-Burk double-reciprocal method (f).

同样，我们计算了 GSK-3β 对 Ser396 和 Ser404 位点磷酸化反应的 K_m 值分别为 16 $\mu\text{mol/L}$ 和 45 $\mu\text{mol/L}$ 。由于在其他位点的磷酸化程度较 Thr212 更弱，它们的 K_m 值在此实验条件下也无法被测得。

2.4 GSK-3β 在培养细胞中对 tau 的磷酸化作用

为了研究 GSK-3β 是否在培养的细胞中磷酸化 tau 也呈现位点特异性。我们共转染 tau₄₄₁ 和 GSK-3β 致 CHO 细胞，然后用蛋白质印迹法检测 tau 蛋白在各个位点的磷酸化。如图 4 所示，GSK-3β 的共转染使得 tau 蛋白分子迁移变慢，并在多个位点的磷酸化增加，其中，以 Ser396 的磷酸化增加最多，其次是 Ser199 和 Ser404。因此，与体外实验相似，在培养的细胞内，GSK-3β 对 tau

蛋白的磷酸化也呈现位点特异性，其中，Ser396 是它的最合适的磷酸化位点。

3 讨论

tau 蛋白的异常过度磷酸化是 AD 致病过程中的关键事件。GSK-3β 作为催化 tau 蛋白磷酸化的重要蛋白激酶，它在 tau 蛋白磷酸化中的作用显得越来越重要。GSK-3β 是脯氨酸指导的蛋白激酶，它只催化在 C 端联有脯氨酸的丝氨酸或苏氨酸残基的磷酸化，因此，它不能催化 tau 蛋白在 Ser214, Ser262, 和 Ser409 等的磷酸化^[6]。由于 tau 蛋白有多个位点可以被磷酸化，而各个位点的磷酸化对 tau 蛋白的功能及特性的影响也各不相同。比如，由于 Ser262 和 Thr356 位于微管结合域，因此此位点的

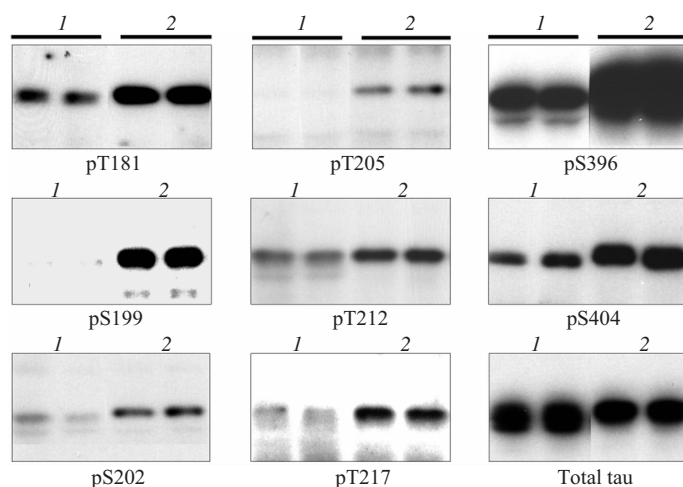


Fig. 4 Site-specific phosphorylation of tau by GSK-3 β in cultured CHO cells

CHO cells were co-transfected with pCI/tau₄₄₁ and pcDNA3/GSK-3 β for 48 h. The cell lysates were analyzed by Western blots developed with phosphorylation-dependent and site-specific tau antibodies, as indicated under each blot, to determine tau phosphorylation levels at the specific phosphorylation sites and 92e to determine the levels of total tau₄₄₁, respectively. 1: Control; 2: GSK-3 β .

磷酸化将影响 tau 蛋白的微管结合能力^[8,9]. 另外, 对于 tau 蛋白的成纤维作用, 不同的位点也有不同的影响. C 端的磷酸化也更有利于 tau 蛋白聚集形成纤维状结构^[10,11]. 因此, 系统地研究 GSK-3 β 对 tau 蛋白各个位点的磷酸化, 有助于我们更好地了解 GSK-3 β 在 tau 蛋白磷酸化及在 AD 致病过程中的作用.

我们的结果证明, GSK-3 β 催化 tau 蛋白磷酸化反应的 K_m 值大约为 40 $\mu\text{mol/L}$. 此数值大于已报道的 12 $\mu\text{mol/L}$ ^[12]. 这可能是由于在此实验中, 我们反应的时间更短, 更接近反应的初速度. 通过对各个位点磷酸化反应 K_m 值的测定显示, GSK-3 β 对不同的位点拥有不同的 K_m 值, 也即它对不同的位点有不同的亲和性. GSK-3 β 对 Ser396 的 K_m 值最低, 即对 Ser396 位点的亲和性最高, 催化其磷酸化的能力最有效. 在培养的细胞中, 也显示了 GSK-3 β 的表达引起 Ser396 位点的磷酸化最明显 (图 4). 因此, Ser396 是 GSK-3 β 催化 tau 蛋白磷酸化的最好位点.

在体外, GSK-3 β 对 Ser404 位点的 K_m 值低于 Ser199, 但在培养的细胞中, GSK-3 β 的过表达使得其磷酸化的增加低于 Ser199 磷酸化的增加. 这可能是许多蛋白激酶催化 tau 蛋白的磷酸化, 使得 tau 蛋白变得更容易被 GSK-3 β 磷酸化, 但不同的位点, 呈现不同的作用. 例如, 蛋白激酶 A(PKA)

的预磷酸化使得 tau 变成更好的底物, 预磷酸化的 tau 更容易被 GSK-3 β 磷酸化, 但不是每一个 GSK-3 β 位点都这样, 如 Ser404 的磷酸化则被降低^[13].

虽然我们测定到的 GSK-3 β 对 tau 蛋白的 K_m 值大于其生理浓度. 由于多个位点的磷酸化使得 tau 蛋白对 GSK-3 β 的亲和性增加而更容易被 GSK-3 β 磷酸化^[14]. 在正常人脑中每分子的 tau 蛋白含有 2~3 个磷酸基团, 因此, 细胞内部分磷酸化的 tau 蛋白可能使 GSK-3 β 对其 K_m 降低, GSK-3 β 能更有效地使得 tau 蛋白在多个位点磷酸化. 此假设有待于进一步的实验验证.

由于 GSK-3 β 催化 tau 蛋白 Ser396 位点的磷酸化能力最强, 而 Ser396 的磷酸化可能与 tau 蛋白的成纤维作用有关^[15], 因此, GSK-3 β 可能在 AD 致病过程中神经纤维缠结的形成有密切关系. 此推测有待进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 Arriagada P V, Growdon J H, Hedley-Whyte E T, *et al.* Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 1992, **42** (3pt1): 631~639
- 2 Kopke E, Tung Y C, Shaikh S, *et al.* Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 1993, **268** (32): 24374~24384

- 3 Alonso A del C, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, *et al.* Role of abnormally phosphorylated τ in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (12): 5562~5566
- 4 Iqbal K, Alonso A Del C, Chen S, *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1739** (2~3): 198~210
- 5 Gong C X, Liu F, Grundke-Iqbal I, *et al.* Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 2005, **112** (6): 813~838
- 6 丁绍红, 施建华, 尹晓敏, 等. PKA、GSK-3 β 和 CDK5 对微管相关蛋白 tau 的位点特异性磷酸化. 南通大学学报, 2006, **26** (4): 235~238
Ding S H, Shi J H, Yin X M, *et al.* *Journal of Nantong University*, 2006, **26** (4): 235~238
- 7 Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, *et al.* Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*, 2005, **22** (8): 1942~1950
- 8 Biernat J, Gustke N, Drewes G, *et al.* Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, 1993, **11** (1): 153~163
- 9 Sengupta A, Kabat J, Novak M, *et al.* Phosphorylation of tau at both Thr231 and Ser262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **357** (2): 299~309
- 10 Abraha A, Ghoshal N, Gamblin T C, *et al.* C-terminal inhibition of tau assembly *in vitro* and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci*, 2000, **113** (21): 3737~3745
- 11 Haase C, Stieler J T, Arendt T, *et al.* Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J Neurochem*, 2004, **88** (6): 1509~1520
- 12 Godemann R, Biernat J, Mandelkow E, *et al.* Phosphorylation of tau protein by recombinant GSK-3 β : pronounced phosphorylation at select Ser/Thr-Pro motifs but no phosphorylation at Ser262 in the repeat domain. *FEBS Lett*, 1999, **454** (1~2): 157~164
- 13 Liu F, Liang Z H, Shi J H, *et al.* PKA modulates GSK-3 β - and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. *FEBS Letter*, 2006, **580** (26): 6269~6274
- 14 Liu S J, Zhang j Y, Li H L, *et al.* Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem*, 2004, **279** (48): 50078~50088
- 15 Haase C, Stieler J T, Arendt T, *et al.* Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J Neurochem*, 2004, **88** (6): 1509~1520

Site-specific Phosphorylation of Tau by GSK-3 β *

LIU Fei^{1,2)**}, SHI Jian-Hua^{1,2)}, DING Shao-Hong¹⁾, YIN Xiao-Min¹⁾

¹⁾Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China;

²⁾Department of Biochemistry, Medical College, Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract Tau is a microtubule associated protein in neuron. The biological functions of tau are to stimulate microtubule assembly and to stabilize microtubule structure. These functions are regulated by its phosphorylation status. Abnormally phosphorylated tau is a major component of neurofibrillary tangles. As one of the major tau kinases, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) can phosphorylate tau at several sites. Site-specific phosphorylation of tau by GSK-3 β and the kinetics of GSK-3 β on tau phosphorylation was investigated. Tau₄₄₁ was phosphorylated by recombinant GSK-3 β *in vitro*, and the site-specific phosphorylation was detected by Western blots using site-specific and phosphorylation-dependent tau antibodies. The kinetics of phosphorylation by GSK-3 β to total tau and to individual site was studied by incubating GSK-3 β with various concentration of tau at 30°C for 10 min. These velocities of phosphorylation reaction were determined at various concentrations of tau by measuring ³²P incorporation to tau and phosphorylation level at individual site detected with immuno-dot blots using site-specific and phosphorylation dependent anti-tau antibodies, respectively. The K_m values of GSK-3 β toward total tau and toward individual site were calculated by using Lineweaver-Burk double-reciprocal method. The site-specific phosphorylation of tau by GSK-3 β was further confirmed in cultured CHO cells by co-transfection of tau₄₄₁ with GSK-3 β . It was found that GSK-3 β phosphorylated tau at several sites, including Thr181, Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Thr 217, Thr231, Ser396, and Ser404. The K_m value of GSK-3 β toward total tau was 42 μ mol/L, but the K_m value of GSK-3 β to every site was different. Among all the phosphorylation sites detected here, Ser396 phosphorylation catalyzed by GSK-3 β showed the lowest K_m , only 16 μ mol/L. In cultured CHO cells, GSK-3 β over-expression also induced tau phosphorylation at Ser396 the most dramatically. These results suggested that GSK-3 β catalyzed tau phosphorylation at several sites with different efficiency, and Ser396 was the most efficient site for phosphorylation by GSK-3 β .

Key words tau, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), phosphorylation

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30572076), The Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2004047) and Six Talented-man Peak of Jiangsu Province.

**Corresponding author . Tel: 86-513-85051813, E-mail: feiliu63@hotmail.com

Received: February 15, 2007 Accepted: April 2, 2007