

文章编号:1004-0374(2005)01-0045-04

## 多功能的蛋白：糖原合成酶激酶-3

毛伟峰<sup>1,2</sup>, 李佳<sup>2\*</sup>, 袁崇刚<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; <sup>2</sup>中国科学院上海生命科学研究院  
上海药物研究所, 国家新药筛选中心, 上海 201203)

**摘要:** 糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 是一个多功能的丝氨酸/苏氨酸类激酶, 在真核生物中普遍存在。在哺乳动物中包括两个亚型, 即 GSK-3 $\alpha$  和 GSK-3 $\beta$ 。GSK-3 至少在三条细胞通路上有作用: Wnt/wingless, PI3-kinase 以及 Hedgehog 信号通路, 该酶的作用主要包括调节糖原的合成代谢, 参与细胞的分化与增殖等。研究发现, GSK-3 在某些疾病, 如阿尔茨海默病和非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM) 中, 其活性会异常升高。现已发现了几种针对该酶的抑制剂, 如 aloisine, paullones 和马来酰胺类化合物等。这些抑制剂的确在分子水平特异性地抑制 GSK-3 的活性, 而对其他激酶几乎没有作用。关于这些抑制剂的研究工作也已经在细胞水平和动物模型上开展起来, 为开发以 GSK-3 为靶点的新的治疗药物创造了良好的基础。

**关键词:** GSK-3; 磷酸化; Wnt; 抑制剂

中图分类号: Q55 文献标识码: A

## Multi-function kinase: glycogen synthase kinase-3

MAO Wei-Feng<sup>1,2</sup>, Li Jia<sup>2\*</sup>, YUAN Chong-Gang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China; <sup>2</sup> National Center for Drug Screening, Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201213, China)

**Abstract:** Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is a serine/threonine kinase, highly conserved and has been identified in every eukaryote investigated to date. It is encoded by two isoforms in mammals, termed GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ . GSK-3 plays an important role in at least three signal transducing systems, namely, the Wnt/wingless, Hedgehog and PI3-kinase pathways, which influence proliferation and cell survival, respectively, highlighted by the wide array of substrates controlled by this enzyme that includes cytoplasmic proteins and nuclear transcription factors. Several diseases such as in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), Alzheimer's disease, neurological disorders, and cancer have been related to GSK-3, as a potential therapeutic target. Several new GSK-3 inhibitors, such as the aloisines, the paullones and the maleimides, have been developed. Although they are just starting to be characterized in cell culture and animal model experiments, these new inhibitors hold promise as therapeutic agents.

**Key words:** GSK-3; phosphorylation; Wnt; inhibitor

### 1 简介

GSK-3 是一种丝氨酸/苏氨酸类激酶<sup>[1-2]</sup>, 最初认为该酶的功能仅仅是磷酸化肝糖原合成酶(GS)并使之失活。后来研究表明, 它在蛋白合成、细胞

增殖、细胞分化和细胞运动诸多方面, 都扮演了相当重要的角色<sup>[3-6]</sup>。GSK-3 与许多疾病的发生有关, 可以作为一个潜在的药物靶点。事实已证明, GSK-3 的一些抑制剂能在 2 型糖尿病以及阿尔茨海默病的

收稿日期: 2004-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170805, 39970641)

作者简介: 毛伟峰 (1978—), 男, 硕士研究生; 李佳 (1970—), 男, 博士, 副研究员, \* 通讯作者; 袁崇刚 (1954—), 男, 博士, 教授。

细胞、动物模型中起到有效的治疗作用；另一方面，由于它在多条细胞信号通路中的作用，也引起了一些争论和疑问：怎样才能够选择性地作用于一个过程而使得其他功能不受影响。因此，这需要进一步了解 GSK-3 的更多功能。

## 2 变种(variant)

GSK-3 在所有真核生物中都有分布。在哺乳动物体内发现有两种亚型存在，即 GSK-3 $\alpha$  和 GSK-3 $\beta$ ，分子量分别为 51 kD 和 47 kD。这两个亚型的氨基酸序列在催化区有高达 98% 的同源性；但是在蛋白的两端差异较大，仅有约 36% 的同源性，其中在 GSK-3 $\alpha$  的 N 端有一个富含甘氨酸的序列。果蝇中的 Shaggy (GSK-3 同源物) 与哺乳动物中的 GSK-3 $\beta$  更接近，而与 GSK-3 $\alpha$  的差别较大。以果蝇为对象的研究证明，哺乳动物的 GSK-3 $\beta$  可以代替 Shaggy 行使部分功能。因此，早期的观点认为只有  $\beta$  亚型才在哺乳动物细胞的 Wnt 信号通路中起作用。然而，小鼠的 GSK-3 $\beta$  基因敲除实验<sup>[7]</sup>证明，早期胚胎发育一切正常，也就是 GSK-3 $\alpha$  在发育中同样起到非常重要的作用，至少可以功能性地代偿 GSK-3 $\beta$  的缺失。这些小鼠会在出生后 13.5~14.5 日由于肝退化而死亡，说明这两种亚型的功能存在某些差异。

## 3 底物作用方式

GSK-3 的底物比较特殊，需要先经过另一个酶的预磷酸化，才可以被 GSK-3 所作用。大多数 GSK-3 底物共有的序列为：Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr-P<sup>[8]</sup>，其中第一个 Ser/Thr 是磷酸化的目标残基，X 表示任何氨基酸，最后的 Ser-P/Thr-P 则表示预磷酸化位点。例如，肝糖原合成酶 (GS) 需要被酪蛋白激酶 II (CK2) 预先磷酸化，然后再由 GSK-3 对其多个位点依次磷酸化。

## 4 GSK-3 的 T-loop 结构

GSK-3 及与之类似的激酶，如 CDK2、p38- $\gamma$  和 ERK2，活性中心均是 T-loop 结构。与这三个激酶相比，GSK-3 的 T-loop 结构缺少了一个磷酸化的苏氨酸，这正好由底物预磷酸化的苏氨酸/丝氨酸来代替。由 Arg96、Arg180 和 Lys205 三个带正电的氨基酸组成的口袋结构 (底物结合位点)，恰好与苏氨酸/丝氨酸相结合。这三个残基在所有的 GSK-3 同源物中是高度保守的。并非所有的 GSK-3 底物都具有预磷酸化位点，通常这些蛋白底物的磷酸化位点周围是一些带负电的氨基酸残基，模拟一个磷酸化的 Ser/Thr 残基。

GSK-3 的 T-loop 的关键位点分别是  $\alpha$  的 Tyr279 和  $\beta$  的 Tyr216。Tyr279/Tyr216 的磷酸化修饰在 GSK-3 $\alpha$  和 GSK-3 $\beta$  打开底物结合位点时起到相当重要的作用；但未磷酸化的 GSK-3 本身并不形成阻碍底物进入的构象。因此，T-loop 的酪氨酸磷酸化仅是辅助底物的磷酸化，而不是蛋白具有激酶活性的先决条件。

## 5 GSK-3 的丝氨酸磷酸化抑制

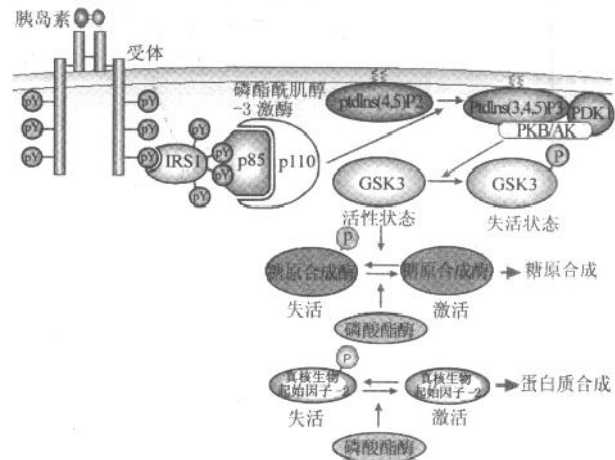


图 1 PI3-kinase 信号通路

胰岛素受体与胰岛素结合后被激活，在几个位点自身磷酸化，其磷酸化的酪氨酸残基与 IRS 的 PTB 区域相互作用，使 IRS 聚集在细胞膜处并受到胰岛素受体的磷酸化。然后，IRS 与 PI3K 中 p85 亚基的 SH2 区域作用，让 PI3K 聚集于细胞膜，使得 p110 亚基催化 PtdIns(3,4,5)P<sub>2</sub> 成为 PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>。PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 与 PDK 和 PKB/AKT 的 PH 区域结合后，不仅使两者定于细胞膜，而且促使 PDK1 活化 PKB/AKT。活化后的 PKB/AKT 磷酸化并抑制 GSK-3。在磷酸酯酶的作用下，GS 与 eIF2B 去磷酸化，糖原与蛋白质的合成可正常进行。

胰岛素作用于靶细胞，激活下游的磷酸酯酰肌醇 3-激酶 (PI3-kinase, PI3K)。PI3K 活化 AKT/PKB，后者磷酸化 GSK-3 $\alpha$  第 21 位的丝氨酸和 GSK-3 $\beta$  第 9 位的丝氨酸，从而抑制 GSK-3 的活性<sup>[9]</sup>。许多其他刺激同样也能使 S9/S21 磷酸化，从而导致 GSK-3 失活，包括 EGF 和 PDGF 等。

磷酸化的 S9/S21 形成一个预磷酸化的假底物，结合在前面提到过的带正电口袋中。由于催化区被占据，蛋白的这种折叠方式将底物排除在外。这种机制是竞争性的抑制作用，因此，如果预磷酸化的底物浓度足够高，它依然会被磷酸化。

## 6 GSK-3 是 Wnt 信号通路中的关键环节

Wnts 是一个分泌型，半胱氨酸丰富，具有糖基化配体的蛋白家族，在细胞生长发育分化和迁移

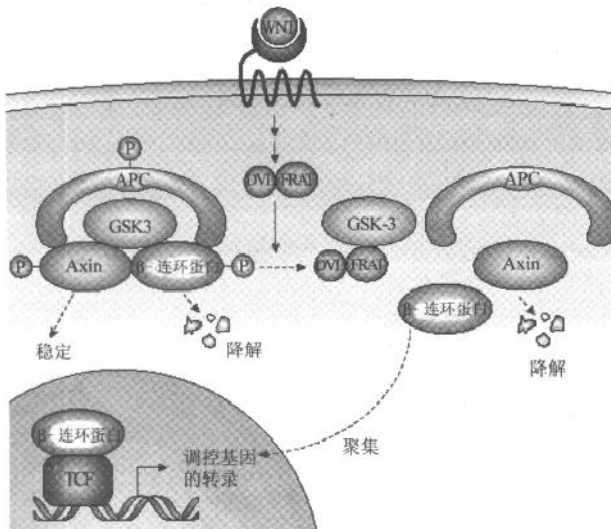


图2 Wnt 信号通路

当没有上游的Wnt信号时,活化的GSK-3与其底物形成一个复杂的多蛋白复合物,从而降解 $\beta$ -连环蛋白。 $\beta$ -连环蛋白N端丝氨酸残基的磷酸化能被Axin所增强,Axin折叠并结合在上述的蛋白复合物上,这个蛋白复合物包括GSK-3, $\beta$ -连环蛋白以及APC基因产物。Axin和APC本身也是GSK-3的底物。Axin被GSK-3磷酸化后,其稳定性有所提高,而APC被GSK-3磷酸化后,有利于 $\beta$ -连环蛋白和APC之间的相互作用,并使得 $\beta$ -连环蛋白被GSK-3磷酸化。通过这一过程, $\beta$ -连环蛋白由蛋白酶识别并降解;而Wnt信号通路依然处于关闭状态。当细胞接收到Wnt信号后,GSK-3即会失活,这个机制尚不清楚。目前只研究到这一过程需要磷酸化的Dishevelled(DVL)。因此, $\beta$ -连环蛋白得以去磷酸化,避免被蛋白酶所降解。去磷酸化的 $\beta$ -连环蛋白在胞质中聚集并运输到细胞核内,从而引起T细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEFs)调控的下游蛋白转录表达。

凋亡等过程中起到重要作用,从水螅到哺乳动物都有分布<sup>[10]</sup>。Wnt信号通路最终导致由T细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)家族引起的基因转录。

GSK-3在Wnt信号通路中的功能并不与其别的功能相干扰。譬如说,胰岛素信号引起GSK-3的S9/S21磷酸化失活并不会使得 $\beta$ -连环蛋白在胞质中聚集。同样,Wnt通路激活后也不会产生胰岛素类似的作用。目前这种隔离的机制还不清楚,有人猜测这与Axin与GSK-3的特异性结合有关。

## 7 Hedgehog 信号通路

2002年,发现了在果蝇中还存在着Hedgehog(Hh)信号通路<sup>[11]</sup>,这也可能是GSK-3最新发现的功能之一。Hh与Wnt信号通路有些类似,它们都是胚胎发育中分泌型的信号蛋白。在Hh信号通路中,上游信号传递至细胞核的尺骨中断蛋白Cubitus in-

terruptus(Ci)在哺乳动物细胞中则传递至Gli。当没有上游的Hh信号时,Ci将被水解。与Wnt信号通路不同,它不会被完全降解,而是由155个氨基酸残基(Ci-155)降解成75个氨基酸残基(Ci-75),而Ci-75具有抑制转录的功能。GSK-3在此过程中与CKI以及PKA相结合,以磷酸化Ci-155,从而使其易于被水解切割。而当Hh接收到上游信号时,全长的Ci-155则会将信号传递到核内,使某些基因转录表达,其具体机制正在进一步探索过程中。

## 8 GSK-3的小分子抑制剂

在众多人类疾病中发现GSK-3的活性异常升高。实验证明,GSK-3的过量表达能够导致一些病理学症状,如糖尿病以及某些神经退行性疾病。因此,GSK-3成为一个潜在的治疗靶点。

GSK-3在诸多细胞信号通路中都有作用,这使找到一个专一性的抑制剂变得困难。同时,模拟GSK-3N端的11肽能够抑制GSK-3的预磷酸化或非预磷酸化底物,另一个较短的8肽则仅仅能够抑制预磷酸化的底物<sup>[3]</sup>。这样小分子的抑制剂就有进入带正电的口袋,只选择性地抑制GSK-3对预磷酸化底物作用的可能性。

目前最明确的抑制剂是lithium ions(Li<sup>+</sup>)<sup>[12-13]</sup>。Li<sup>+</sup>是一个相对专一的抑制剂,而且需要一个相对较高的剂量(抑制常数K<sub>i</sub>为mM级)来抑制GSK-3在细胞中的活性,其作用方式与Mg<sup>2+</sup>竞争。最近的研究发现,Zn<sup>2+</sup>也能够在细胞水平抑制GSK-3的活性(IC<sub>50</sub>为15 $\mu$ M)。在体外实验中,Be也能够抑制GSK-3的活性。

Coghlan等<sup>[14]</sup>找到了两种分子为马来酰胺类的抑制剂:SB-216763和SB-41528629,其抑制常数(K<sub>i</sub>)分别为9nM和31nM。它们在分子水平上比较特异,进一步研究其在细胞上发现有与胰岛素类似的作用,并能够抑制神经元凋亡。

现在找到的大多数GSK-3的小分子抑制剂是ATP竞争型的,这些抑制剂的具体情况见表1。

表1中的抑制剂都有可能作为针对GSK-3的治疗药物。然而问题在于GSK-3的广泛作用,完全抑制酶的活性有可能造成 $\beta$ -连环蛋白的积聚,而这是一个已知的原癌基因的转录产物。为了减少这种复杂性,找到具有高度选择性的GSK-3的抑制剂是令人向往的。尤其是对于某些慢性病症来说,如糖尿病。从积极的一面来说,研究表明,Li<sup>+</sup>虽然抑制了GSK-3的活性,却并未导致任何癌症的发病率升高。

表 1 GSK-3抑制剂

| 药物类型           | 举例                      | 作用模式                 | 细胞或临床诊断效果                    | 参考文献    |
|----------------|-------------------------|----------------------|------------------------------|---------|
| Aloisines      | AloisineA               | ATP 竞争型              | 抑制细胞增殖                       | [15]    |
| Hymenialdisine | 溴-Hymenialdisine        | ATP 竞争型              | 抗炎; 抑制TAU磷酸化                 | [16]    |
| 靛(玉)红          | 5, 5'-二溴-靛红             | ATP 竞争型              | 抗肿瘤; 抑制TAU磷酸化                | [17]    |
| 马来酰胺类          | SB-216763,<br>SB-415286 | ATP 竞争型              | 胰岛素类似的作用; 抑制神经元凋亡            | [14]    |
| 离子             | Li <sup>+</sup>         | Mg <sup>2+</sup> 竞争型 | 稳定情绪; 防治亨廷式病症<br>产生过多聚谷氨酸的毒性 | [12-13] |
| 毒蝇蕈碱拮抗剂        | AF102B, AF150           | 未检测                  | 抑制 TAU 磷酸化                   | [18]    |

## 9 总 结

GSK-3 是一个多功能的蛋白激酶, 在蛋白合成、细胞增殖、细胞分化和细胞运动等诸多方面, 都有重要作用。对它的研究, 为我们进一步了解细胞信号通路提供了重要依据。它是治疗糖尿病和神经退行性疾病的治疗靶点。现在找到的大多数 GSK-3 的小分子抑制剂大多是 ATP 竞争型的, 并已在细胞以及动物实验中得到了验证。以此为基础, 必然能够开发研制成新的治疗糖尿病和其他重大疾病的药物。

### [参 考 文 献]

- [1] Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, 1980, 107: 519-527
- [2] Woodgett JR, Cohen P. Multisite phosphorylation of glycogen synthase: molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim Biophys Acta*, 1984, 788: 339-347
- [3] Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*, 2001, 359: 1-16
- [4] Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, 2001, 65: 391-426
- [5] Woodgett JR. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE*, 2001, 100: RE12
- [6] Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J*, 1990, 9: 2431-2438
- [7] Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, et al. Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation. *Nature*, 2000, 406: 86-90
- [8] Fiol C J, Mahrenholz AM, Wang YH, et al. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem*, 1987, 262: 14042-14048
- [9] Cross DAE, Alessi DR, Cohen P. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 1995, 378: 785-789
- [10] Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*, 2001, 3(1): reviews3001. 1-3001. 15
- [11] Jia JH, Amanai K, Wang GL, et al. Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signaling by regulating Cubitus interruptus. *Nature*, 2002, 416: 548-552
- [12] Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 8455-8459
- [13] Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics Wingless signaling in intact cells. *Curr Biol*, 1996, 6: 1664-1668
- [14] Coghlan MP, Culbert AA, Cross DAE, et al. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol*, 2000, 7: 793-803
- [15] Mettey Y, Gompel M, Thomas V, et al. Aloisines, a new family of CDK/GSK-3 inhibitors. SAR study, crystal structure in complex with CDK2, enzyme selectivity, and cellular effects. *J Med Chem*, 2003, 46(2): 222-236
- [16] Meijer L, Thunnissen AMWH, White AW, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 $\beta$  and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem Biol*, 2000, 7: 51-63
- [17] Damiens E, Baratte B, Marie D, et al. Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene*, 2001, 20: 3786-3797
- [18] Forlenza OV, Spink JM, Dayanandan R, et al. Muscarinic agonists reduce tau phosphorylation in non-neuronal cells via GSK-3 $\beta$  inhibition and in neurons. *J Neural Transm*, 2000, 107, 1201-1212
- [19] Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 769-776