

学位論文
Doctor's Thesis

インスリンによる PI 3-キナーゼ/Akt 経路を介した
IRS-2 発現抑制機序の解析

(Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression
through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.)

平島 義彰
Yoshiaki Hirashima

指導教官
熊本大学大学院医学研究科代謝内科学

荒木 栄一 教授

七里 元亮 前教授

2003年度

学位論文

Doctor's Thesis

論文題名：インスリンによる PI-3 キナーゼ/Akt 経路を介した
IRS-2 発現抑制機序の解析

(Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression
through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.)

著者名： 平島 義彰
Yoshiaki Hirashima

指導教官名： 代謝内科学担当教授

荒木栄一 教授

七里元亮(前教授)

審査委員名：	分子遺伝学担当教授	森 正敬	教授
	循環器病態学担当教授	小川 久雄	教授
	消化器内科学担当教授	佐々木 裕	教授
	神経発生分野担当教授	大久保 博晶	教授

2003 年度

目次

1. 要旨.....	1
2. 発表論文リスト.....	3
3. 謝辞.....	4
4. 略語一覧.....	5
5. 研究の背景と目的.....	7
5-(1) 2型糖尿病の成因と病態.....	8
5-(2) インスリン作用伝達機構.....	9
(A) インスリン受容体	
(B) インスリン受容体の基質	
(C) PI-3 キナーゼ	
(D) Akt およびそれ以降のシグナル	
5-(3) IRSの構造と発現調節.....	15
(A) IRSの構造、発現	
(B) IRSの転写調節	
(C) IRSの代謝	
5-(4) インスリンレスポンスエレメント(IRE: insulin response element)...	21
5-(5) 本研究の目的.....	23
6. 実験方法.....	26
6-(1) 細胞培養	26
6-(2) ウェスタンブロット法	26
6-(3) ノザンブロット法	27
6-(4) IRS-1 および IRS-2 の mRNA の半減期の解析	28
6-(5) DN-Akt (dominant nes ative Akt)を導入した アデノウィルス(recombinant adenovirus)の構造.....	28
6-(6) アデノウィルスを介した遺伝子導入	29
6-(7) 核蛋白の抽出	29
6-(8) EMSA(electrophoretic mobility shift assay).....	30
6-(9) ラット IRS-2 遺伝子プロモーターの一部の配列の決定.....	30
6-(10) ルシフェラーゼアッセイ	31
6-(11) 統計処理.....	31
7. 実験結果.....	32

7-(1) インスリンは IRS-1 と IRS-2 の mRNA および蛋白を制御していた...	31
7-(2) インスリンによる IRS-2 の蛋白および mRNA の減少は PI-3 キナーゼの阻害剤によって回復した.....	33
7-(3) インスリンによる IRS-2 蛋白および mRNA の減少は Akt と密接に関係していた.....	35
7-(4) インスリンによる IRS-2 の mRNA の減少は 他の蛋白の合成に関係がある.....	36
7-(5) インスリンは IRS-2 mRNA の半減期に影響を与えなかった.....	37
7-(6) IRS-2 のインスリンレスポンスエレメント(IRE)様の配列に 結合する核蛋白は PI3 キナーゼ依存性であった.....	38
7-(7) インスリンによる IRS-2 遺伝子のプロモーター活性は PI-3 キナーゼ依存性であった.....	39
8. 考察.....	44
8-(1) インスリンの IRS-1 と IRS-2 蛋白量の調節.....	44
8-(2) インスリンの IRS-1 と IRS-2 蛋白量の調節機序.....	44
8-(3) PI-3 キナーゼ/Akt を介する経路の関与.....	45
8-(4) mRNA の安定性.....	46
8-(5) IRS-2 遺伝子の転写調節.....	46
8-(6) ラット IRS-2 プロモーターのインスリンレスポンスエレメント.....	47
8-(7) 新たに合成される蛋白.....	48
9. 結語.....	49
10. 参考文献.....	50

1. 要旨

IRS (insulin receptor substrate)-1 および IRS-2 はインスリン受容体の主要基質であり、インスリン作用を分岐伝達する。IRS 蛋白の発現量はインスリン自身によっても制御されている。インスリンは、プロテアソームによる分解を介して IRS-1 蛋白の発現を調節することが報告されたが、IRS-2 蛋白の発現制御に関しては報告が少なく、不明な点が多い。本研究ではラット肝腫瘍由来の Fao 細胞を用いて、インスリンが IRS-2 蛋白の発現を抑制することを明らかにし、さらに IRS-2 蛋白の発現抑制の機序につき解析した。

インスリンによる IRS-1 蛋白の発現調節は、既報の様にプロテアソームによる分解を介して行われ、IRS-1 の mRNA 量を変化させることはなかった。これに対し、インスリンによる IRS-2 蛋白の発現抑制は mRNA 量の減少と平行して起こったが、これは IRS-2 mRNA 半減期の変化を伴っていなかった。インスリンによる IRS-2 蛋白と mRNA の減少は、PI-3 キナーゼ (phosphatidylinositol 3 kinase) の阻害剤 LY294002 によって阻害されたが、ERK (extracellular signal regulated kinase) の阻害剤 PD98059 では影響を受けなかった。ドミナントネガティブ型 Akt を過剰発現した細胞では、インスリンによる IRS-2 蛋白量の減少は完全に阻害され、IRS-2 mRNA の減少も一部阻害されていた。

in vitro の系では、IRS-2 遺伝子のプロモーター領域に存在する IRE (インスリンレスポンスエレメント: insulin response element) に、ある種の核蛋白がインスリン依存性に結合することを確認した。またその結合は PI-3 キナーゼ阻害剤である LY294002 によって阻害されたが、MEK 阻害剤である PD98059 では阻害されなかった。レポータープラスミドを用いたプロモーター解析により、ヒトおよびラットの IRS-2 遺伝子プロモーターの活性はインスリン依存性に低下し、またこの反応は PI-3 キナーゼ依存性であった。

以上のことから、IRS-2 のインスリンによる発現は PI-3 キナーゼ、Akt を介する経路を通して制御されていること、IRS-1 と IRS-2 蛋白の発現量はインスリンによって負に制御されているが、その制御機構は 2 種の IRS で異なっていること、また IRS-2 蛋白の発現減少は IRS-2 遺伝子の転写レベルでの制御であること、さらにその制御には IRE へ結合するある種の核蛋白が関与することが示された。

Summary

Insulin receptor substrate (IRS) -1 and IRS-2 are the major substrates that mediate insulin action. Insulin itself regulates the expression of the IRS protein in the liver, but the underlying mechanisms of IRS-1 and IRS-2 regulation are not fully understood. Here we report that insulin suppressed the expression of both IRS-1 and IRS-2 proteins in Fao hepatoma cells. The decrease of IRS-1 protein occurred via proteasomal degradation without any change in IRS-1 mRNA, whereas insulin-induced suppression of IRS-2 protein was associated with a parallel decrease in IRS-2 mRNA without changing IRS-2 mRNA half-life. Insulin-induced suppression of IRS-2 mRNA and protein was blocked by PI-3kinase inhibitor, LY294002, but not by MEK inhibitor, PD98059. Inhibition of Akt by overexpression of dominant-negative Akt also caused complete attenuation of insulin-induced decrease of IRS-2 protein and partial attenuation of its mRNA down-regulation. Some nuclear proteins bound to the insulin response element (IRE) sequence on IRS-2 gene in an insulin-dependent manner *in vitro*, and the binding was also blocked by PI-3 kinase inhibitor. Reporter gene assay showed that insulin suppressed the activity of both human and rat IRS-2 gene promoters through IRE in a PI-3 kinase-dependent manner. Our results indicate that insulin regulates IRS-1 and IRS-2 through different mechanisms and that insulin represses IRS-2 gene expression via a PI-3 kinase/Akt pathway.

2. 発表論文リスト

1. Hirashima Y, Tsuruzoe K, Kodama S, Isata M, Toyonasa T, Ueki K, Kahn CR, Araki E.
Insulin down regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.
J. Endocrinol. *In press*.
2. Motoshima, H., Araki, E., Nishiyama, T., Tasuchi, T., Kaneko, K., Hirashima, Y., Yoshizato, K., Shirakami, A., Sakai, K., Kawashima, J., Shirotani, T., Kishikawa, H., and Shichiri, M
Bradykinin enhances insulin receptor tyrosine kinase in 32D cells reconstituted with bradykinin and insulin signaling pathways.
Diab. Res. Clin. Pract.48 (3): 155-70.2000.
3. Yoshizato K, Shirotani T, Furukawa N, Tasuchi T, Motoshima H, Toyonasa T, Hirashima Y, Kawashima J, Ebina Y, Shichiri M, Araki E
Identification of a *cis*-Actins Element and a Novel *trans*-Actins Factor of the Human Insulin Receptor Gene in HepG2 and Rat Liver Cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001 Jan. 19; 280(2): 428-34.
4. Shirakami, A., Toyonasa, T., Tsuruzoe, K., Shirotani, T., Matsumoto, K., Yoshizato, K., Kawashima, J., Hirashima, Y., Miyamura, N., Kahn, CR., and Araki, E.
Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance. Possible model for the development of type 2 diabetes.
J. Endocrinol. 2002 Aug.; 174(2): 309-19.
5. 荒木栄一, 河島淳司, 白神敦久, 平島義彰, 七里元亮.
2型糖尿病の分子病態とその発生工学的アプローチ
組織培養工学 25:567-571,1999.
6. 荒木栄一, 平島義彰.
PKB とインスリン作用における役割
医学のあゆみ vol.192 No.5 410-415, 2000.

3. 謝辞

本研究は熊本大学大学院医学研究部代謝内科学講座で、荒木栄一 教授，七里元亮 元教授による御指導の下に行いました。研究について多面にわたり御指導を頂き，深く感謝致します。

熊本大学大学院医学研究部代謝内科学講座助手 豊永哲至博士には，論文作成および日頃の研究の中で貴重な御指導，御助言を頂きました。

本研究の施行にあたり，熊本大学大学院医学研究部代謝内科学講座医員 水流添覚博士，白神敦久博士に実験の細部に至るまでの御指導，御助言を頂きました。

さらに熊本大学大学院医学研究部代謝内科学講座技官 一ノ瀬賢司氏にも，御助言を頂きました。

最後に，熊本大学大学院医学研究部代謝内科学講座研究室の皆様には日頃から御助言，御協力を頂きました。

皆様に心より感謝致します。

4. 略語一覽

4E-BP1	4E-binding protein 1
4PS	IL-4 induced phospho-tyrosine substrate
AP-1	activator protein 1
Apo	apolipoprotein
APS	adapter protein with a PH domain and an SH2 domain
BAD	Bcl-2 associated death protein
bFGF	basic fibroblast growth factor
CAT assay	chloramphenicol acetyltransferase assay
Cbl	Casitas B lineage lymphoma
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
EGF	Epidermal growth factor
eIF4E	eukaryotic initiation factor 4E
ERK	extracellular signal regulated kinase
FAS	fatty acid synthase
FKHRL1	forkhead drosophia homolog of rhabdomyosarcoma like 1
Gab-1	Grb2 associated binder 1
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase,
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GRE	glucocorticoid response element
GSK3	glycogen synthase kinase 3
IGF	insulin like growth factor
IRE	insulin response element
IRS	insulin receptor substrate
JNK	Jun N-terminal kinase
KRLB domain	kinase regulatory loop binding domain

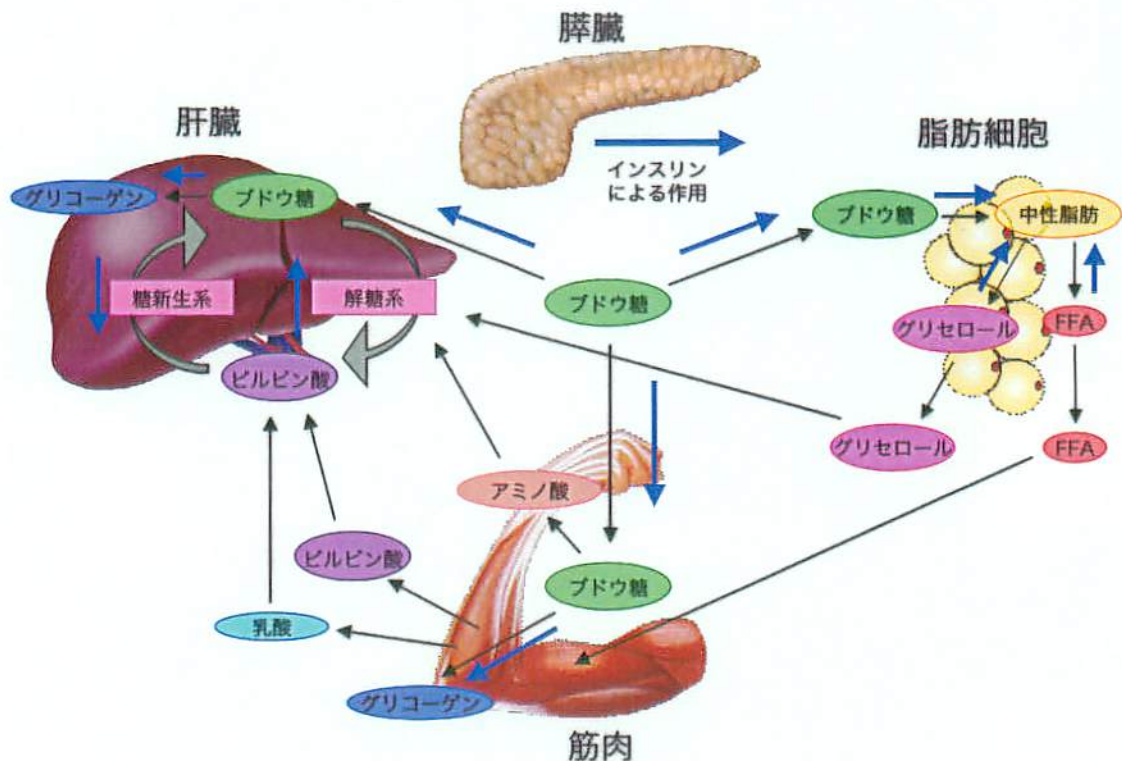
LAR	leukocyte common antigen-related protein –tyrosine phosphatase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK-2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2
MEF	mouse embryonic fibroblasts
MEK	MAP kinase ERK kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
PDE3B	cAMP phosphodiesterase 3B
PDGF	platelet derived growth factor
PDK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PFK2	6-phosphofructose 2-kinase
PH	pleckstrin homology
PHAS-I	PH- and acid-stable I
PI-3 K	phosphatidylinositol 3 kinase
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PRE	progesterone response element
PTB	phosphotyrosine binding
PTP	protein-tyrosine phosphatase
SAIN domain	SHC and IRS-1 NPXY-binding domain
SH2	src homology 2
Shc	src homology and collagen
SHP2	src homology phosphotyrosine phosphatase 2
SREBP	sterol-response-element-binding protein
TAT	tyrosine aminotransferase
TTF-2	thyroid transcription factor

5. 研究の背景と目的

本章では本研究の背景と目的について述べる。まず、5-(1)では 2 型糖尿病の成因と病態を、5-(2)ではインスリン作用伝達機構を、5-(3)では IRS の構造と発現調節を、5-(4)ではインスリンレスポンスエレメント(IRE)について、当研究室においてこれまで明らかにしてきた事項と共に述べる。最後に、5-(5)で本研究の目的について述べる。

5-(1) 2 型糖尿病の成因と病態

糖尿病は、インスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である。血糖値は主として①肝臓での糖産生、②骨格筋、脂肪組織での糖取り込み、③肝臓での糖取り込み、により通常は 70~130mg/dl と非常に厳格に制御されている。

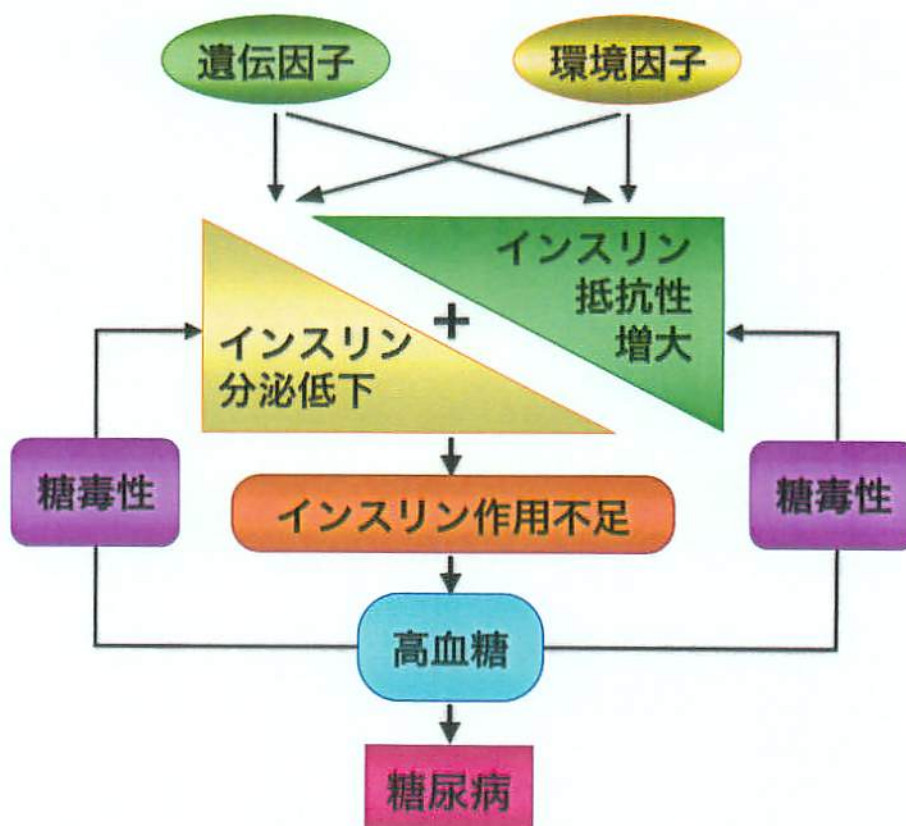


[図1]インスリン作用の模式図

インスリンの主要標的臓器への作用を模式的に示す。インスリンは筋肉、脂肪組織への糖の取り込みを促進し、肝臓でのグリコーゲン分解や糖新生を抑制する。また脂肪組織において中性脂肪の合成を亢進する。

食物摂取後、腸管より吸収されたブドウ糖は膵β細胞からのインスリン分泌を促し、肝臓ではグリコーゲン合成の促進、糖新生の抑制を、筋肉では糖輸送の亢進、グリコーゲン合成の亢進を、脂肪組織では糖輸送の亢進、脂肪分解の抑制を起こす。これにより、消化管より吸収された過剰なブドウ糖は肝臓、筋肉、脂肪組織に取り込まれ、正常の血糖値が保たれる。一方、絶食時には膵β細胞からのインスリン分泌が基礎値に戻り、肝臓におけるグリコーゲンの分解と、乳酸、アミノ酸、グリセロールなどからの糖新生によりブドウ糖が血中に放出され、脳へのブドウ糖供給を維持している（図1）。

このような血糖値の制御は中枢神経系や内分泌系によって厳格に制御されており、中でも生体内で唯一の血糖低下作用を持つホルモンであるインスリンがその中心的な役割を果たしている。環境因子や遺伝因子によってインスリン分泌の低下やインスリン作用の障害、



〔図2〕 2型糖尿病の成因と病態

2型糖尿病発症には遺伝因子と環境因子が共に背景にあると考えられる。個体のインスリン抵抗性の増大とインスリン分泌の低下が起こり、インスリンの作用不足状態となったときある程度は代償性のインスリン分泌により補われるが、補いきれなくなったとき高血糖を呈する。この高血糖はそれ自体がインスリン分泌や

インスリン抵抗性を増悪させる。このような悪循環を繰り返して2型糖尿病が発症、進展すると考えられる。すなわちインスリン抵抗性が起こると、インスリン作用の不足が生じ血糖値の一過性上昇を示す。血糖値を正常範囲内に維持するため、より過剰なインスリンの分泌が必要となり高インスリン血症を呈する。この代償性のインスリン分泌が膵β細胞の機能を越えた場合に高血糖が引き起こされる。高血糖はそれ自体がインスリンの分泌低下や、インスリン抵抗性の増悪を引き起こし(糖毒性)、高血糖が増悪する。このような悪循環の結果、持続的な高血糖が顕著になり糖尿病が発症すると考えられている(図2)。

このようにインスリン抵抗性はインスリン分泌障害と並んで糖尿病発症に重要な因子であり、遺伝的素因と後天的な環境因子の両者が関与すると考えられる。遺伝的な要素には未解明の部分が多く残されているが、インスリン受容体から最終的な糖代謝の発現にいたる間での作用伝達に携わる様々な蛋白の発現量の変化や構造の異常が、インスリン抵抗性の原因となるものと予想される。単一の遺伝子異常で著明なインスリン抵抗性をきたし糖尿病を発症するものに、インスリン受容体異常症がある。これはインスリン受容体遺伝子の変異によりインスリン受容体蛋白の質的、量的な異常が生じ、著明な高インスリン血症を伴うインスリン抵抗性の糖尿病と、黒色表皮腫や色素沈着、多嚢包性卵巣などの病態を呈する疾患である。このような単一の遺伝子異常で高度なインスリン作用障害を来とし、糖尿病をもたらすものも存在するが、2型糖尿病の大半は複数の遺伝子が発症に関与すると予想されている。一方、近年の糖尿病患者数の増加は、このような遺伝的背景が急速に変化したのではなく、環境因子によるインスリン抵抗性の増大によって導かれたものである。すなわち、文明の発達に伴う運動量の減少や食生活の欧米化、ストレスの増加や高齢化などが引き金となって、インスリン抵抗性の要素が増大していると考えられている。

5-(2) インスリン作用の伝達機構

(A) インスリン受容体

インスリンは糖、脂質、蛋白質の代謝調節作用のほか、細胞増殖、筋肉や脂肪の分化、転写調節、アポトーシスの抑制等、非常に多岐にわたる生理作用を有するホルモンである

(図 3)。このような多彩なインスリン作用は、インスリンが細胞膜上に存在するインスリン受容体に結合し、受容体チロシンキナーゼが活性化されることにより発現される(Ebina et al., 1985; White and Kahn, 1994)。インスリン受容体は IGF-I(Insulin like growth factor-I)受容体や EGF(epidermal growth factor)受容体と同じく、受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する。インスリン受容体は、肝・筋・脂肪といったインスリンの主な標的組織だけでなく、循環血液細胞・脳・生殖細胞などの細胞表面にも存在することが知られている。インスリン受容体は、分子量 135 kDa の 2 つの α サブユニットと、95 kDa の 2 つの β サブユニットが S-S 結合で結ばれた $\alpha 2 \beta 2$ の四量体を形成している。 α サブユニットにはインスリン結合部位が存在し、一方、 β サブユニットは膜貫通蛋白で、細胞内に存在する C 端側にインスリンにより調節を受けるチロシンキナーゼ活性部位を持つ。インスリンが α サブユニットに結合するとそれまで α サブユニットにより抑制されていた β サブユニットのチロシンキナーゼが活性化される。この活性化したチロシンキナーゼによりインスリン受容体の自己リン酸化が起こり、更に細胞内のインスリン受容体の基質をチロシンリン酸化し、インスリンの情報を下流に伝達している。

(B) インスリン受容体の基質

現在のところ少なくとも 9 つのインスリン、IGF-I 受容体の細胞内基質が同定されている。このうちの 4 つは IRS(insulin receptor substrate)ファミリーに属するものである。IRS 蛋白には、最初にクローニングされた分子量約 180 kDa の IRS-1 (Sun et al., 1991) のほか、分子量約 190 kDa の IRS-2 (Araki et al., 1994; Sun et al., 1995)、約 60 kDa の IRS-3 (Lavan et al., 1997a)、さらに約 160 kDa の IRS-4 (Lavan et al., 1997b) の 4 種のアイソフォームが現在同定されている。その他は Gab-1 (Grb2-associated binder-1), Cbl (Casitas B-lineage lymphoma), APS (adapter protein with a PH domain and an SH2 domain), Shc (src homology and collagen) protein などである。

インスリン受容体によりリン酸化を受けたこれら基質のチロシン残基は、SH2 (Src-homology-2) 部位をもつ蛋白の認識部位となる。この SH2 蛋白には PI-3 キナーゼの調

節領域である p85 や Grb2(growth factor receptor-bound protein 2), CrkII の様にアダプター蛋白として働くものと, SHP2(src homology phosphotyrosine phosphatase 2) や Fyn などのようにそれ自体が酵素として作用を発現するものがある。このような SH2 蛋白を介してインスリンのシグナルは下流に伝達されていく(Goldstein et al., 1998; Takada et al., 1998)。

IRS 蛋白のうち IRS-1 と IRS-2 はチロシンリン酸化だけでなくセリンリン酸化も受け、インスリンシグナル伝達を負に調節することが知られている(Paz et al., 1997)。IRS-1 にはリン酸化可能なセリン残基が多数存在するが、このうち PTB (phosphotyrosine bindins)領域の近くに存在する 307 番目のセリン(Ser³⁰⁷)のリン酸化はインスリンシグナル伝達の抑制に関与すると考えられている。Asuirre らはイーストリハイブリッドアッセイ(yeast tri-hybrid assay)で Ser³⁰⁷ のリン酸化によりインスリン受容体と IRS-1 の PTB 領域の結合が阻害されることを示し、また培養細胞を用いた実験で Ser³⁰⁷ のリン酸化により PI-3 キナーゼや MAP(mitogen activated protein)キナーゼの活性が低下することを示した(Asuirre et al., 2002)。Ser³⁰⁷ はインスリン刺激により活性化されるキナーゼや、JNK(Jun N-terminal kinase)などのストレスにより活性化されるキナーゼなどによりリン酸化を受け、インスリン作用伝達に対するネガティブフィードバック(negative feedback)や、他のインスリン抵抗性因子によるシグナルの標的部位として働いていると考えられる。

また、インスリン受容体や IRS 蛋白は PTPase(protein tyrosine phosphatase)により脱リン酸化を受け、このことによりインスリン作用は減弱をされる。PTPase は 70 数種類のアイソザイムが報告されているが、インスリンのシグナル伝達機構との関連があると思われるのは LAR(leukocyte common antigen related protein-tyrosine phosphatase), PTP(protein-tyrosine phosphatase) α , PTP1B, SHP-2 等である。特に PTP1B と LAR は直接インスリン受容体に結合することが見出され、この 2 つがインスリンシグナル制御に特異的に働く可能性がある。PTP1B のノックアウトマウスではインスリン感受性が増強し、高脂肪食にしても肥満にならない肥満抵抗性となると報告されている(Elchebly et

al., 1999)。また LAR ノックアウトマウスでは空腹時血糖値やインスリン値の低下、肝臓での糖新生の低下が見られるなど、インスリン感受性の亢進を示唆する所見が認められる (Ren et al., 1998)。

(C) PI-3 キナーゼ

ワートマニンなどの PI-3 キナーゼの特異的阻害剤や (Hayashi et al., 1992), ドミナントネガティブ型 PI-3 キナーゼを用いた研究の結果 (Hara et al., 1995), インスリンによる代謝調節作用は主に PI-3 キナーゼを介していることが明らかとなっている。PI-3 キナーゼは PI (phosphatidylinositol) のイノシトール環の D3 位をリン酸化することにより、細胞内で PI 3, 4 P₂ や PI 3, 4, 5 P₃ を生成する脂質リン酸化酵素である。PI 3, 4, 5 P₃ は様々なシグナル伝達蛋白が持つ PH (pleckstrin homology) 領域に結合し、その活性や細胞内分布を変化させることによりシグナル伝達を調節していると考えられている (Lietzke et al., 2000)。PI-3 キナーゼは分子量 110 kDa の触媒サブユニット p110 と、より小さな分子量の調節サブユニットとの 2 量体からなる。調節サブユニットには p85 α , p85 β , P55^{PIK} の 3 種類のアイソフォームがあり (Pons et al., 1995), 更に p85 α の alternative splicing form AS53/p55 α (Antonetti et al., 1996) と p50 α (Fruman et al., 1996) が存在することも知られている。この中で p85 α は主要な蛋白であり、インスリンシグナル伝達も p85 α が中心的な役割を果たしていると考えられている。p110 には p110 α , p110 β , p110 δ の 3 種のアイソフォームが存在し、いずれもその N 末端部分で調節サブユニットと結合する (Funaki et al., 1999)。

インスリンの代謝調節作用の多くは PI-3 キナーゼを介していることが明らかとなったが、その下流については十分な検討はされていなかった。近年、PI-3 キナーゼの下流のエフェクター分子として、2 つのタイプのセリン/スレオニンキナーゼが同定された。その一つは、Akt とよばれる N 末端側に PH ドメインを有する蛋白リン酸化酵素であり (Staal, 1987), もう 1 つは、PKC (protein kinase C) ファミリーのなかの atypical PKC とよばれるタイプの PKC である (Akimoto et al., 1998)。atypical PKC は、インスリン作用のう

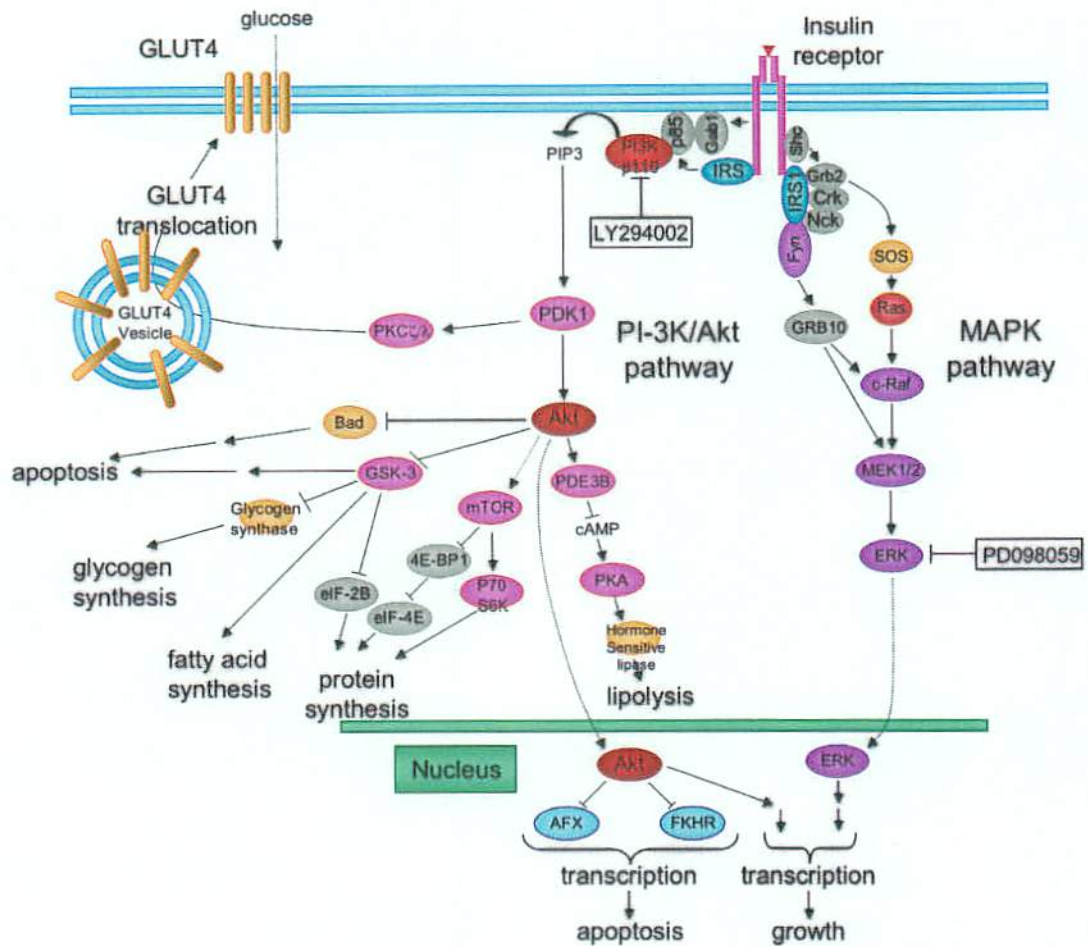
ち、蛋白合成や糖の取り込み、アポトーシス抑制に関与していることが報告されている (Standaert et al., 1997)。

(D) Akt およびそれ以降のシグナル

Akt はそのキナーゼドメインが PKA や PKC と相同性を呈することから、PKB (protein kinase B) とよばれる。Akt はインスリンを始め、PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) など各種の増殖因子の刺激により活性化されることが報告された (Franke et al., 1997)。PI-3 キナーゼの特異的阻害剤であるワートマニンによって Akt の活性化が阻害されること (Kohn et al., 1996b), ドミナントネガティブ型の PI-3 キナーゼは Akt の活性を抑制すること (Alessi et al., 1996) (Kitamura et al., 1998), Akt はインスリンによっても活性化され、ワートマニンで阻害されること (Kohn et al., 1996a), 恒常的活性型 PI-3 キナーゼにより Akt は活性化されること (Klippel et al., 1996), などから Akt は PI-3 キナーゼの下流に位置するセリン/スレオニンキナーゼであると考えられている。Akt には Akt1 と Akt2 の 2 つのアイソフォームが存在するが、Akt2 のノックアウトマウスでは肝臓でのインスリン抵抗性を有することが示された (Cho et al., 2001)。

PI-3 キナーゼを介する刺激に際して、Akt の 2 つのリン酸化部位、スレオニン 308 およびセリン 473 が自己リン酸化されるが、Thr³⁰⁸ は 67kDa の PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1) に、Ser³⁰⁸ は PDK2 とよばれるキナーゼによって特異的にリン酸化され、これらの 2 つのリン酸化部位は独立して調節されている (Alessi et al., 1997b)。PDK1 の過剰発現は Akt を部分的に活性化し、PDK1 或いは Akt の PH ドメインの変異体は Akt の活性を減少させる (Alessi et al., 1997a)。PDK1 の活性やリン酸化の状態は、PI-3 キナーゼのリガンド刺激によっても変化せず、常に活性化されているという報告があり、PDK1 の機能は細胞内の極在によって調節されていると考えられている (Pullen et al., 1998)。PDK2 は MAPK によって調節される MAPKAPK-2 (mitos-en-activated protein kinase-activated protein kinase-2) によってリン酸化されるが

(Kohn et al., 1996b), インスリン, IGF-I, PDGF などは MAPK/Akt-2 を活性化しない。
 PDK2 によってリン酸化されるセリン 473 は Akt 活性化を増強する役割を果たすようである(Coffer et al., 1998)。



[図 3]インスリン作用伝達機構のモデル

インスリンのシグナルは、①インスリン結合により生じるインスリン受容体の自己リン酸化とチロシンキナーゼ活性化、②活性化されたインスリン受容体チロシンキナーゼにより直接チロシンリン酸化を受ける IRS ファミリー、Shc などインスリン受容体の基質のリン酸化、③チロシンリン酸化を受けたこれらの基質と SH2 部位を有する蛋白の結合、④SH2 蛋白によるシグナルの分岐・伝達、⑤さらにその下流のシグナル伝達系の活性化、など多段階の反応により下流へと伝達される。

Gab-1: Grb2-associated binder-1, Grb2: growth factor receptor-bound protein 2

PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, mTOR: mammalian target of rapamycin,

PDE3B: cAMP phosphodiesterase 3B, GSK3: glycogen synthase kinase, 4E-BP1: 4E-binding protein 1,

eIF4E: eukaryotic initiation factor 4E, BAD: Bcl-2-associated death protein,

FKHR: forkhead drosophila homolog of rhabdomyosarcoma, PKA: protein kinase A,

PKC: protein kinase A, PKC: protein kinase C, ERK: extracellular signal-regulated kinase,

MEK: MAP kinase-ERK kinase, GLUT4: Glucose transporter 4

Akt の活性化は以下のように考えられている。リガンドの刺激下でない細胞では、PI-3 キナーゼと Akt は細胞質内にあり活性化されていない。インスリン等の刺激により PI-3 キナーゼが活性化され、PI-3,4-P2 や PI-3,4,5-P3 が産生される。すると PH ドメインを持つ Akt や PDK は膜近傍で集合し、PDK により Akt の 2 つのリン酸化部位がリン酸化されて、Akt は活性化される。

現在までに、Akt を介するインスリン作用として、①GSK3(s lycos en synthase kinase) の活性抑制によるグリコーゲン合成(Cross et al., 1995), ②リボソームのリン酸化と翻訳の増加を来す p70S6K を活性化し、あわせて mRNA の翻訳を導く 4E-BP1 (4E-bindins protein 1) または PHAS-I (PH and acid stable I) と呼ばれる蛋白のリン酸化と eIF4E(eukaryotic initiation factor 4E)からの解離することによる、直接的あるいは間接的な蛋白合成の増加(Franke et al., 1997; Datta et al., 1997; Gins ras et al., 1998; Takata et al., 1999), ③Bcl-2 ファミリーの蛋白の一つである BAD(Bcl-2 associated death protein), カスパーゼ 9(caspase-9)や FKHRL1 forkhead drosophia homolos of rhabdomyosarcoma like 1)のリン酸化から 14-3-3 蛋白を介したアポトーシス抑制作用 (Datta et al., 1997; Brunet et al., 1999), ④PDE3B (cAMP phosphodiesterase)のリン酸化を介する脂肪分解抑制(Kitamura et al., 1999), ⑤PFK2 (6-phosphofructose 2-kinase) のリン酸化を介する解糖の調節(Deprez et al., 1997)などが考えられている。

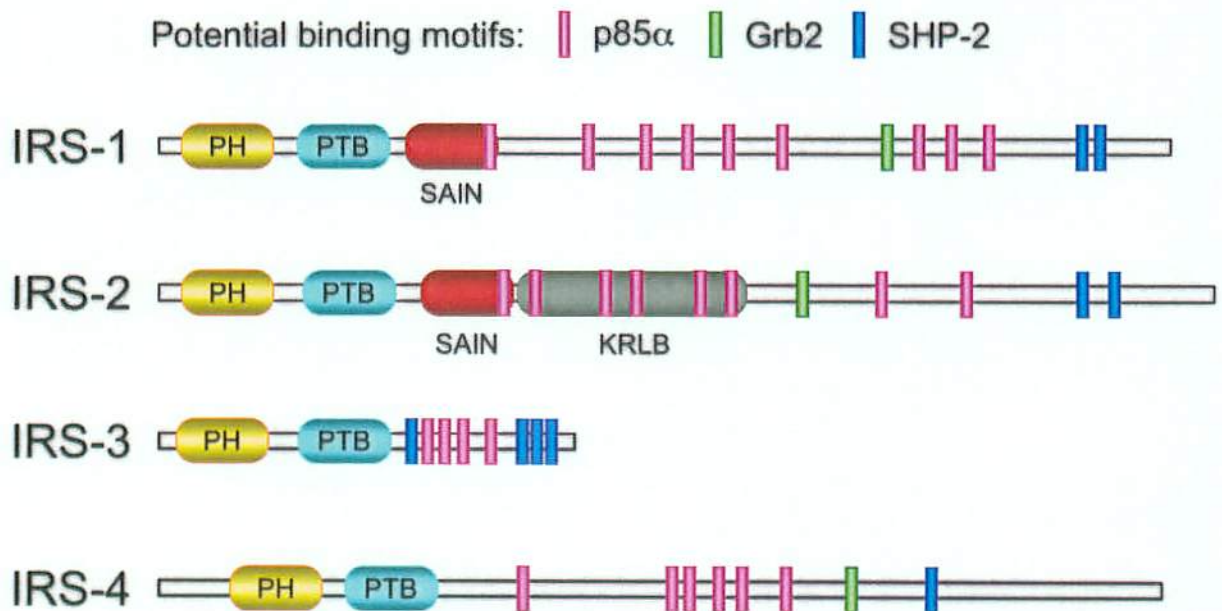
5-(3) IRS の構造と発現調節

(A) IRS の構造, 発現

IRS-1 はインスリン受容体チロシンキナーゼの基質として最初に同定され、その構造が決定された(Sun et al., 1991)。また、IRS-2 は IRS-1 ノックアウトマウスの解析中に Araki らにより同定された蛋白である(Araki et al., 1994)。これは Sun らによってクローニングされた 4PS (IL-4 induced phospho-tyrosine substrate)と呼ばれる、IL-4 により IL-4 受容体を介してチロシンリン酸化を受ける蛋白と同じ蛋白であった(Sun et al., 1995)。IRS-3(Lavan et al., 1997a), IRS-4 (Lavan et al., 1997b)はそれぞれ齧歯類脂肪細胞、

ヒト腎由来(embryonic kidney)細胞において同定されたインスリン受容体の基質で、IRS-3 は脂肪細胞において IRS-1 と同様、インスリン作用を伝達していると考えられているが、ヒトではまだ同定されていない。IRS-4 の機能は不明な点が多いが、他の IRS に対して抑制的に調節することが示されている(Tsuruzoe et al., 2001)。

IRS-1~4 までの IRS ファミリーはいずれも N 端に PH (pleckstrin homology)部位と PTB (phosphotyrosine binding)部位と呼ばれる機能部位を有しており、前者は細胞膜との結合に、後者は自己リン酸化されたインスリン受容体膜貫通部位直下の NPXY (Asn-Pro-X-Tyr)モチーフとの結合に重要であると考えられている(図 4)。また IRS-1, IRS-2 には PTB ドメインの直後に SAIN (SHC and IRS-1 NPXY binding)ドメインを持つ。この領域はインスリン刺激後の NPXY モチーフと IRS の結合に、PTB ドメインと協調して



PH; pleckstrin homology, PTB; phosphotyrosin binding domain,

SAIN; SHC and IRS-1 NPXY-binding, KRLB; kinase regulatory loop binding,

Grb2; growth factor receptor-bound protein 2, SHP-2; src homology phosphotyrosine phosphatase 2

[図 4] IRS の構造

IRSはN端側にPH 領域とPTB領域を持ち、C端側にSH2蛋白と結合可能なチロシン残基を多数有する。IRS-1とIRS-2はリン酸化を受けたインスリン受容体と結合するSAIN領域を、IRS-2はまた同様にインスリン受容体と結合するSAIN領域およびKRLB領域を有する。

働いている(Gustafson et al., 1995; He et al., 1996)。また IRS-2 にのみ KRLB (kinase regulatory loop binds)ドメインと呼ばれる領域が存在する(Sawka-Verhelle et al., 1996)。

KRLB 領域はアミノ酸 591 番から 786 番の間に存在し、インスリン受容体との結合には、インスリン受容体のチロシンキナーゼ部位のループ制御領域(regulatory loop)の 1146, 1150, 1151 番のチロシン残基のリン酸化が必要であり、PTB 部位とは異なり、NPXY モチーフは結合に必要としない。すべての IRS 蛋白には、PTB ドメインの直後から C 末端側にかけて 8~18 個の特徴的なチロシンリン酸化モチーフが存在する。インスリン受容体によりこれらのチロシン残基がリン酸化されると、特定のリン酸化チロシン残基はPI-3 キナーゼの調節サブユニットである p85 等の SH2 蛋白と結合することが示されている(Sun et al., 1993; Eck et al., 1996)。

臓器・細胞		IRS-1	IRS-2
Liver	Fresh homogenates (mouse)	+	+
Skeletal muscle	Fresh homogenates (mouse)	+	+
Brain	Mouse	++	++
Adipocyte	Epididymal (rat)	+	+
Testis	Mouse	+	±
Fao	Hepatoma (rat)	++	++
βTC-3	Pancreatic beta cell (mouse)	±	++
PC12	Rat pheochromocytoma	±	++
CHO	Ovarian carcinoma (hamster)	+	+
NH-3T3	Fibroblast (mouse)	+	+
3T3-L1	Fibroblast (mouse)	+	±
3T3-L1	Adipocyte (mouse)	+++	±
B cell	Freshly isolated murine	±	++
T cell	Freshly isolated murine	±	++

[表 1c IRS-1 と IRS-2 蛋白の各種臓器, 細胞における発現
各細胞, 組織より IRS-1, IRS-2 の抗体を用いウェスタンブロット法にて検討した。

IRS-1 と IRS-2 はほとんど全ての臓器で発現している。Sun らは IRS-1 と IRS-2 蛋白の発現量をウェスタンブロット法によって各組織や培養細胞で比較した(Sun et al., 1997) (表 1)。

これらの組織、細胞の中で、特に IRS-1 に比べて IRS-2 蛋白が多く発現しているのは、血球系の細胞と、膵β細胞、ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞であった。これらの細胞では、主に IRS-2 がインスリンや IGF-1 などの作用を伝達しているのかもしれない。一方、IRS-3 は脂肪細胞以外に肝臓、肺、心臓、腎臓で発現していることが mRNA レベルで確認されている。IRS-4 はヒトでは下垂体、甲状腺に高発現を認め、脳、脊髄、気管支、リンパ節に軽度の発現をしていることがノザンブロット法で示されており(Uchida et al., 2000), 脳組織を用いた in situ hybridization では視床下部で最も強く発現し、そのほかの部位はむしろ他の IRS に比べて低値であった(Numan and Russell, 1999)。

(B) IRS の転写調節

前章で示したように IRS は組織間での発現の違いが認められる。この発現調節について、IRS 遺伝子プロモーターの解析が行われた。

① IRS-1 遺伝子プロモーター

マウス IRS-1 遺伝子プロモーターは Araki らによりをクローニングされ、解析された(Araki et al., 1995)。マウス IRS-1 プロモーターは典型的な CAAT box や TATA box を欠き、9 箇所の Sp1 結合領域を持ち、その他に 5 箇所の AP-2 結合配列、1 箇所の C/EBP(CCAAT/enhancer-binding protein)結合配列、GRE (glucocorticoid response element), PRE (pro-estrogen response element)と相同性のある領域を持つ。欠失変異させた IRS-1 プロモーターを CHI , HepG2 細胞に導入し行った CAT (chloramphenicol acetyltransferase)アッセイでは、-1645 から-1605bp の欠失で HepG2 細胞ではプロモーター活性が上昇し、-1605 から-1585bp の欠失で CHI 細胞でのプロモーター活性が低下することから、これらの部位が組織特異的発現調節に関与する

と考えられた(Matsuda et al., 1997)。また Araki らは 3T3-F442A 脂肪細胞をインスリン刺激し、IRS-1 蛋白発現量、mRNA レベル、プロモーター活性を検討している(Araki et al., 1995)。長時間のインスリン刺激にて IRS-1 蛋白発現量は約 60%に低下したが、IRS-1 mRNA レベルや IRS-1 プロモーター活性には変化を認めなかった。また同細胞をデキサメサゾンで刺激した時は IRS-1 蛋白発現量、IRS-1 mRNA レベルは著明に低下したが、IRS-1 プロモーター活性には変化が無く、IRS-1 mRNA の半減期の減少が原因であった。このようにインスリン、デキサメサゾンは IRS-1 プロモーターの活性には直接影響を与えないことが明らかとなった。

② IRS-2 遺伝子プロモーター

Vassen らはヒト IRS-2 遺伝子プロモーターをクローニングし、解析を行った(Vassen et al., 1999)。IRS-2 プロモーターは典型的な Sp1, AP2, CCAAT-box 結合領域を多数持つものの、TATA box は認めなかった。また、GRE も認められなかった。Zhans らはヒト IRS-2 プロモーターの-574 から-568bp、およびマウス IRS-2 プロモーターの-1571 から-1565bp に IRE (insulin response element)を見出し、解析を行っている(Zhans et al., 2001)。IRE に変異を加えた IRS-2 プロモーターを持つレポーター遺伝子の発現は、初代培養肝細胞においてインスリンによる抑制が消失していた。この結果より IRS-2 はインスリンにより転写レベルで負に調節を受けていることが明らかとなった。

(C) IRS の代謝

現在のところ蛋白の分解には、リソソームによる分解、カルシウム依存性の分解、ATP 依存性の分解、カルシウム ATP 非依存性の分解、プロテアソームによる分解等の経路が関与することが知られている。以下に現在までに報告されている IRS の代謝調節について各 IRS ごとに概略する。

①IRS-1

Araki らの 3T3-F442A 脂肪細胞での検討では長時間のインスリン刺激で IRS-1 蛋白発現量は著明に低下を認めたが, IRS-1 mRNA レベルや IRS-1 プロモーター活性には低下を認めなかった(Araki et al., 1995)。このことより慢性的な高インスリン状態では IRS-1 蛋白の半減期が短縮することが示唆された。また 3T3-L1 adipocyte での検討では慢性的な高インスリン状態で IRS-1 の蛋白発現量は低下していた。蛋白の分解速度は正常の約 10 倍に増加し, これはクロロキニンにより阻害されなかったため, リソソームによる分解によるものでは無いと考えられた(Rice et al., 1993)。また IRS-1 蛋白分解は細胞透過性カルシウムキレート剤, 細胞透過性 thiol 蛋白分解酵素阻害剤, 選択的細胞透過性 calpain 抑制剤により抑制され, IRS-1 はカルシウム依存性 thiol 蛋白分解酵素である m-calpain により分解されることが示唆されている(Smith et al., 1996)。しかしながら, *in vivo* ではインスリン刺激により calpain 活性は上昇せず疑問点も多い(Smith et al., 1993)。ほ乳類細胞での主要な蛋白分解経路はプロテアゾームによる経路である。CHI 細胞にインスリン受容体と IRS-1 を過剰発現した CHI /IR/IRS-1 細胞では慢性的な高インスリン刺激にて IRS-1 の蛋白量低下を示すが, これはプロテアゾームに特異的な阻害剤である lactacystin により抑制された(Sun et al., 1999)。この分解亢進は PI-3 キナーゼの阻害剤であるワートマニンにより抑制された。これらのことよりインスリンによる刺激が PI-3 キナーゼを介し, プロテアゾーム蛋白分解経路を活性化し, IRS-1 の分解が亢進することが示唆された。また Lee らも長時間の IGF-I 刺激により IRS-1 の分解が亢進することを示し, これが PI-3 キナーゼを介しユビキチン, プロテアゾーム経路により起こることを示した(Lee et al., 2000)。

②IRS-2

Rui らはユビキチン, プロテアゾーム系による IRS-2 の蛋白分解経路について報告している。3T3-L1 細胞, Fao 細胞, 野生型, および IRS-1^{-/-}マウスの MEF (mouse embryonic fibroblasts)細胞で長時間のインスリン刺激により IRS-2 蛋白発現の低下を確認している

(Rui et al., 2001)。これはプロテアゾームに特異的な阻害剤である lactacystin により消失し、免疫沈降法にてユビキチンと IRS-2 の結合を認めたため、ユビキチン、プロテアゾーム系による IRS-2 蛋白の分解と考えられる。

5-(4)インスリンレスポンスエレメント(IRE: insulin response element)

インスリンは 150 以上の遺伝子の発現を制御している。インスリンは目的物質のタンパク量を変化させ、あるいは既存の酵素の活性や細胞内局在を変化させることによって代謝を制御する。インスリンのその下流に対する効果は様々な分野で長年研究されてきた (Denton and Tavaré, 1995; Shepherd and Kahn, 1999; Virkamaki et al., 1999)。最近 10 年間の研究の成果はめざましく、インスリンが制御する遺伝子の発現調節機序に関していくつかの新しい知見が明らかにされた (I 'Brien and Granner, 1991; I 'Brien and Granner, 1996)。

IRE type	Genes	Consensus sequence	Effect of insulin
GAPDH IRE-A-like motif	GAPDH; Apo A-1	CCCGCCTC	positive
Serum response element	c-Fos; b-Actin	CC(AT) ₆ GG	positive
AP-1 motif	Collagenase-I; malic enzyme	TGA(G/C)TCA	positive
Ets motif	Prolactin; somatostatin	(C/A)GGA(A/T)	positive
E-box motif	Pyruvate kinase; FAS	CANNTG	positive
SREBP motif	Glucokinase?	ATCACCCAC	positive
TTF-2 motif	Thyroglobulin; thyroperoxidase	C(T/A)(A/G)A(A/G)(C/A)AAACA	positive
Inverted TCAAT box motif	Glucagon; somatostatin	(A/T)GATTGA(A/T)	negative
PEPCK-like motif	PEPCK; IGFBP; TAT; G6Pase; Apo CIII; IRS-2	T(G/A)TTT(T/G)(G/T)	negative

[表 2c インスリンレスポンスエレメントのコンセンサス配列の比較

Apo; apolipoprotein, AP-1; activator protein 1, FAS; fatty acid synthase, GAPDH; glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, SREBP; sterol-response-element-binding protein, TAT; tyrosine aminotransferase, TTF-2; thyroid transcription factor

インスリンは、転写や mRNA の安定性や mRNA の翻訳に影響を与えることにより、特定の遺伝子の発現を制御している(I 'Brien and Granner, 1991; I 'Brien and Granner, 1996)。インスリンが蛋白合成や遺伝子の転写を制御することはいくつかの総説に記述されているが(I 'Brien and Granner, 1996; Proud and Denton, 1997), インスリンが mRNA の安定性を制御することはほとんど報告がない。インスリンの遺伝子発現に対する効果は多岐にわたり、多くの生物学的現象を司る種々の蛋白の遺伝子に関与している。さらに、この効果は肝や筋や脂肪細胞など直接インスリン感受性がある組織だけでなく、通常はインスリンに直接関係しない脳や消化管など組織にも及んでいる(I 'Brien and Granner, 1991; I 'Brien and Granner, 1996)。

インスリンの効果を遺伝子の転写に反映する、プロモーター上の領域は IRE(insulin response element)あるいは IRS(insulin response sequence)と呼ばれている。インスリンが制御する種々の遺伝子の研究から、コンセンサス配列はいくつかのグループに分かれる(I 'Brien R et al., 2001) (表 2)。表 2 に示す 8 つの配列のうち 7 つの配列はインスリンの効果を正に調節する。この 7 つには含まれないが IRE の可能性がある配列が、ここに挙げた遺伝子以外の遺伝子を調節しているという報告もいくつかある(I 'Brien and Granner, 1996)。これに対し、2 つの IRE 配列はインスリンの効果を負に調節する(I 'Brien R et al., 2001)。そのうち一つはグルカゴン遺伝子の転写を負に調節するインスリンの効果を仲介するものであった(Philippe et al., 1995)。もう一つは表 2 に示すようにいくつかの遺伝子の転写でインスリンの負の効果を仲介するコンセンサス配列であった(表 2) (I 'Brien and Granner, 1996)。この IRE 配列による作用機序は、フォルボールエステルが多く異なるコンセンサス配列を介して遺伝子の転写を調節する機構に類似している(Rahmsdorf and Herrlich, 1990)。

これに対し、代謝や遺伝子転写においてインスリンとは拮抗する作用を持つグルカゴンの転写における効果は、CRE(cAMP-response element)という唯一のコンセンサス配列によって仲介されているようである(Pilkis and Granner, 1992; Daniel et al., 1998)。

5-(5)本研究の目的

食生活の高脂肪食化、車の普及などによる運動不足などのライフスタイルの変化に伴い、個々のインスリン抵抗性は増大し、糖尿病のみならず、肥満、高血圧、脂質代謝異常などの動脈硬化の危険因子を複数有することとなる。その結果、虚血性心疾患などの動脈硬化性疾患の発症率は増加の一途をたどっている。いずれも遺伝的素因を有する者にライフスタイル変化が加わることによるインスリン抵抗性の増大が、その発症の第一歩と考えられる。

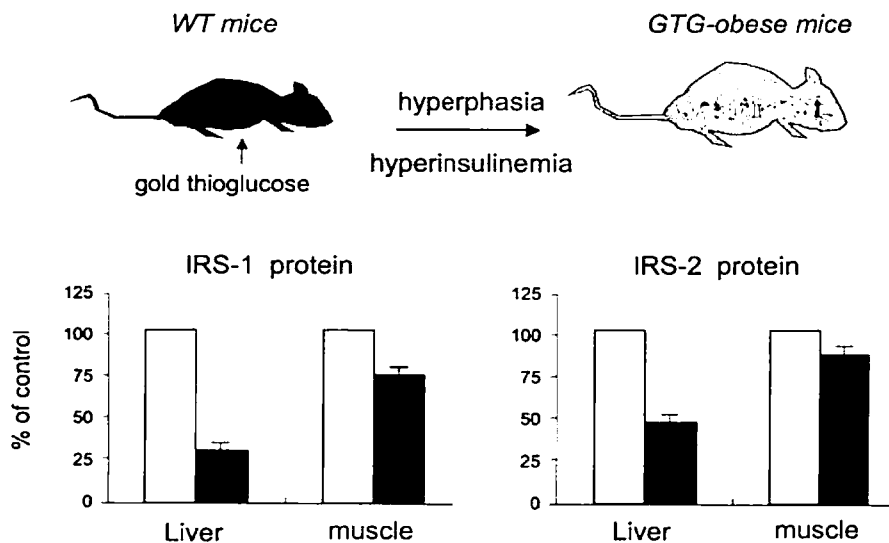
インスリンは、インスリン受容体に結合し、内在するチロシンキナーゼを活性化し (Hendricks et al., 1984), IRS-1, IRS-2 などの内因性の基質をチロシンリン酸化して、下流にインスリン作用を伝える。IRS-1 と IRS-2 は多くの細胞において、インスリン受容体の主要な基質である (Sun et al., 1991; Sun et al., 1995)。

IRS-1 または IRS-2 欠損マウスが末梢組織においてインスリン抵抗性を呈することは、IRS-1 と IRS-2 が通常のインスリン作用に不可欠であることを示している (Waterfield and Greenfield, 1991; Araki et al., 1994; Withers et al., 1998)。さらに、インスリン受容体 (IR) と IRS-1 あるいは IRS-2 のダブルヘテロノックアウト ((IR^{+/-}/IRS-1^{+/-}) または (IR^{+/-}/IRS-2^{+/-})) マウスでは、各々50%は正常のタンパクを有するにもかかわらず、高い割合で糖尿病になっている (Brunins et al., 1997; Kido et al., 2000)。また、最近我々は肥満を導入した IRS-1 ヘテロノックアウトマウスにおいて、IR, IRS-1 および IRS-2 が著明に減少していることを報告した (Shirakami et al., 2002)。これらの結果は IRS-1 または IRS-2 の減少が、糖尿病の成因となり、また糖尿病を進行させることを示唆している。

肝は空腹時の血糖の恒常性を制御するための、インスリンの主たる標的臓器である (DeFronzo, 1997)。PI-3 キナーゼは、インスリン作用を仲介する主要な物質である (Kanai et al., 1993; Cheatham et al., 1994; Dorrestijn et al., 1996)。肝において、インスリン刺激後の IRS-1 および IRS-2 が結合した PI-3 キナーゼの活性が上昇するが、IRS-1 欠損マウスの肝において PI-3 キナーゼの活性はほぼ正常であることから、IRS-2 を介する作

用伝達系がより重要と考えられる(Araki et al., 1994; Yamauchi et al., 1996; Withers et al., 1998)。

インスリン抵抗性を有する肥満や2型糖尿病患者において、筋肉や肝での IRS-1 および IRS-2 蛋白の減少が認められ(Goodyear et al., 1995; Rondinone et al., 1997; Friedman et al., 1999)。インスリン抵抗性モデルマウスにおいても肝を含む様々なインスリン感受性組織において IRS-1 および IRS-2 蛋白の減少が認められている(Saad et al., 1992; Kerouz et al., 1997; Anai et al., 1998; Jians et al., 1999; Shimomura et al., 2000; Shirakami et al., 2002) (図 5)。肝においては、IRS-2 がインスリン作用伝達に主要な役割を担うと考えられていることから、主に IRS-2 蛋白の発現の減少が血糖の恒常性に異常を来した可能性が考えられる。IRS-1 の制御機序に関しては、現在まで多くの報告があるが(Araki et al., 1995; Saad et al., 1995; Matsuda et al., 1997; Sun et al., 1999; Haruta et al., 2000; Lee et al., 2000)、正常あるいはインスリン抵抗性や糖尿病状態のような異常な状態における IRS-2 蛋白量の制御に関してはほとんど報告がない。



[図 5c 肥満導入マウスにおける IRS 蛋白の減少(Shirakami et al., 2002)

ゴールドチオグルコースにより肥満を導入したマウスは、肝および筋において IRS-1 および IRS-2 蛋白の減少が認められた。

高インスリン血症のモデルである ob/ob マウスや Zucker fatty ラットの肝において IRS-1 および IRS-2 蛋白の減少が報告された(Saad et al., 1992; Gerfen et al., 1995; Anai et al., 1998; Shimomura et al., 2000)。これに対し、肝においてインスリン作用が選択的に阻害されている肝特異的 IR ノックアウト(LIRKI)マウスでは、肝における IRS-2 蛋白の著明な増加が認められた(Michael et al., 2000)。これらのことは、IRS-1 と同様、肝においてはインスリン自体が IRS-2 の蛋白量を制御していると考えられる。

以上のことをふまえ、本研究ではラット肝腫瘍由来の Fao 細胞を用いて、インスリンが IRS-2 蛋白の発現を抑制することを明らかにし、さらに IRS-2 蛋白の発現抑制の機序について解析を行い、2 型糖尿病発症のメカニズムの一端を解明することを試みた。

6. 実験方法

6-(1) 細胞培養

Fao 細胞は RPMI 培養液 (Gibco BRL 社) に、最終濃度が 10% となるようにウシ胎児血清 (Fetal Serum: FBS, INTERGEN 社) を加えた培地 (RPMI+10%FBS) にて、60mm プレート (IWAKI 社) で、5% CO_2 を含む培養器 (CO_2 培養器) で行った。

6-(2) ウェスタンブロット法

すべての実験において、細胞は血清を含まない 0.1 % BSA (bovine serum albumin) を含む培養液に交換して一晩 (16 時間) 培養した後、100 nM インスリン存在下、非存在下にて下記の時間で刺激した。MG132 (50 μ M), PD098059 (50 μ M), LY294002 (50 μ M) の阻害剤を使用する場合にはインスリン刺激前 30 分に加えた。

細胞内蛋白の抽出には以下のバッファーを用いた。

50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 ,
20 mM $Na_4P_2O_7$, 100 mM NaF, 1 % NP-40,
2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 20 μ g of aprotinin per ml,
10 μ g of leupeptin per ml

上記バッファー中で、4 °C, 30 分間ゆっくり回転し、その後 4 °C, 15,000 rpm, 30 分間遠心し、上清を蛋白抽出液とした。

蛋白量はブラッドフォード (Bradford) 法による蛋白アッセイにて決定した。

精製した各蛋白を 50 μ g ずつ分注し、ルミネ SDS サンプルバッファー (Laemmli SDS sample buffer) を加えて 95 °C 5 分間煮沸し、SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) を行った。SDS-PAGE 終了後、セミドライ・プロッターを用いてニトロセルロース膜に電氣的に転写した。目的とする蛋白の検出方法は Chemiluminescence Western Blotting キット (Roche, Indianapolis, IN, USA) に付属のプロトコールに従った。まず、ブロッキング液中でニトロセルロース膜をブロッキング。次に一次抗体反応 (2 時間, 室温), 二次抗体反応 (ペルオキシダーゼ標識抗マウス, ウサギ IgG 抗体, 30 分,

室温)を行ったあと、発光基質を加え、発光を X 線フィルムに感光した。定量はフィルムをスキャナーで画像として取り込み NIH イメージアナライザー (NIH MA USA)にて解析を行った。以下に一次抗体反応で用いた抗体を示す。

抗 IRS-1 抗体(Upstate biotechnolology, NY, USA)

抗 IRS-2 抗体(Upstate biotechnolology, NY, USA)

抗 Akt 抗体(New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA)

抗リン酸化 Akt 抗体(New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA)

抗 ERK1/2 抗体(New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA)

抗リン酸化 ERK1/2 抗体(New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA)

6-(3) ノザンプロット法

すべての実験において、細胞は血清を含まない BSA(0.1 % bovine serum albumin)を含む培養液に交換して一晩(16 時間)培養した後、100 nM インスリン存在下、非存在下にて下記の時間で刺激した。サイクロヘキサマイド(CHX: cycloheximide) (5 μ s/ml), PD098059 (50 μ M), LY294002 (50 μ M)の阻害剤を使用する場合にはインスリン刺激前 30 分に加えた。

IRS-1, IRS-2 および 36B4 (対照)の mRNA を以下に述べるノザンプロット法を用いて解析した。総 RNA は TRIzol reagent (GIBCO -BRL, Gaithersburgs, MD,USA)を用いて抽出した。各々 20 μ s の RNA を、ホルムアルデヒドを含む 1%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。RNA 量の統一性を確認した後、ゲルに含まれる RNA を Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech 社)にトランスファーし、NaI H を用いてアルカリ固定を行った。Mesaprine DNA Labelling System キット (Amersham Pharmacia Biotech 社)を用いて[α -³²P]dCTP でラベルしたプローブを ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech Laboratories 社)の中でハイブリダイゼーションを行った。

Tsuruzoe らの方法を参考にしたプライマーの配列を以下に示す(Tsuruzoe et al., 2001)。

Fao 細胞から抽出した RNA を鋳型として用い RT-PCR を行った。

IRS-1: 5'-AGCGAGCTCGAGCATGGCGAGCCCTC-3'

5'-ATCGTCGACTCGAGATCTCCGAGTCA-3'

IRS-2: 5'-CTCTGACTATATGAACCTG-3'

5'-ACCTTCTGG CTTTGGAGGTG-3'

68°C で2時間ハイブリダイゼーションを行った後、メンブレンを室温で10分間、1次洗浄液 [2×SSC buffer (300 mmol/l NaCl + 30 mmol/l クエン酸ナトリウム)に最終濃度が0.05%となるような SDS を加えたもの] で2回洗浄し、続いて50°C で10分間、2次洗浄液 (0.1×SSC buffer に最終濃度が0.1%となるように SDS を加えたもの) で洗浄した。メンブレンを X 線フィルムに感光した。定量はフィルムをスキャナーで画像として取り込み NIH イメージアナライザー (NIH MA USA)にて解析を行った。

6-(4) IRS-1 および IRS-2 の mRNA の半減期の解析

細胞は血清を含まない BSA(0.1 % bovine serum albumin)を含む培養液に交換して一晩(16時間)培養した。15分間アクチノマイシン D(Actinomycin D)(5 μs/ml) で前処置した後、100 nM インスリン存在下、非存在下にて0~90分間刺激した。IRS-1, IRS-2 および 36B4 (対照)の mRNA をノザンプロット法を用い解析した。

6-(5) DN-Akt (dominant nesative Akt)を導入し遺伝子操作をしたアデノウィルス (recombinant adenovirus)の構造

共同実験者の植木らによって作成された、Akt の Thr-308 を Ala に、Ser-473 を Ala に置換した、DN-Akt(dominant nesative Akt)をアデノウィルスの発現コスミド (cosmid)に導入し、遺伝子操作をしたアデノウィルスを作成した(Jones and Persaud, 1998; Kitamura et al., 1998)。また対照群として LacZ 遺伝子を導入したアデノウィルスを使用した。

6-(6) アデノウィルスを紹介した遺伝子導入

60mm プレートで培養したコンフルエント(confluent)の状態の Fao 細胞に、300 μ l の培養液に含まれたアデノウィルスを加え、1 時間、37 $^{\circ}$ C にて培養する。1 時間後、10 % FBS を含む RPMI 培養液を 4ml 加え、24 時間培養した。その後、血清を含まない培養液に交換し一晩培養し、以下の実験に使用した。

加えたアデノウィルスの濃度は 3×10^8 PFU(plaque-forming units/cm²)であり、その発現はウエスタンブロット法にて確認した。

6-(7) 核蛋白の抽出

核蛋白の抽出方法は Gorski らによって報告された方法を改良し以下のように行った (Gorski et al., 1986)。

核蛋白抽出に用いたバッファー

バッファーA 10 mM HEPES-KI H, pH 7.8, 10 mM KCl,
0.1 mM EDTA, pH 8.0, 0.1% NP-40

バッファーC 50 mM HEPES-KI H, pH 7.8, 420 mM KCl,
0.1 mM EDTA pH 8.0, 5 mM $MgCl_2$, 20% Glycerol

バッファーA,C 共に使用直前に以下の試薬を添加した。(濃度は全て終濃度)

1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 μ g/ml Aprotinin, 2 μ g/ml Pepstatin, 2 μ g/ml Leupeptin

細胞を 60mm プレートから PBS 1ml で回収して、4 $^{\circ}$ C, 5,000 rpm, 1 分間遠心し、ペレットを PBS 1ml で洗浄して、4 $^{\circ}$ C, 5,000 rpm, 1 分間遠心した。ペレットを界面活性剤を含む buffer A 400 μ l に懸濁し、十分ボルテックスをした後、4 $^{\circ}$ C, 5,000 rpm, 1 分間遠心した。ペレット(核分画)を buffer C 400 μ l に懸濁して、4 $^{\circ}$ C, 30 分間ゆっくり回転させ、核蛋白を抽出した。4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 15 分間遠心して、上清を核蛋白抽出液として-80 $^{\circ}$ C にて保存した。

6-(8) EMSA(electrophoretic mobility shift assay)

ヒト IRS-2 遺伝子プロモーター領域の IRE(nt -585 ~-557)を含むフラグメントを以下の方法で標識しプローブとして用いた(Iwamoto et al., 2002)。

5'-GAGTCACATGTTGTTTTGCTCTTCTTAGT-3' (forward)

5'-ACTAAGAAGAGCAAAACAACATGTGACTC-3' (reverse)

の合成オリゴヌクレオチド(50 pmol)を 80 °C, 15 分間加温した後, 徐々に室温まで冷却することでアニールさせ, T4 polynucleotide kinase(ニッポンジーン社)を用い, [γ - 32 P]ATP (New England Nuclear Inc. Woburn, MA, USA)で 5'末端を標識した。約 1.0×10^4 cpm の 32 P で標識されたプローブに, Fao 細胞から抽出した核蛋白 3μ s, poly(dI-dC) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MI, USA) 1μ s, binding buffer [50 mM KCl, 20 mM K_3 PI₄ (pH 7.4), 6 mM Ms Cl₂, 1 mM β -mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.5 mM DTT, および 0.05 mM PMSFc を加え, 一方, 競合阻害実験 (competition assay) 時は 500 倍量の阻害物質 (competitor) を核蛋白を加える前に添加し, 室温で 30 分間静置後, dye を加えて, 4% ポリアクリルアミドゲル, 0.5x TBE バッファーにて電気泳動を行った(Furukawa et al., 1999)。

6-(9) ラット IRS-2 遺伝子プロモーターの一部の配列の決定

ラットの IRS-2 遺伝子プロモーターの一部の配列を決定するために, Fao 細胞および Wistar ラットのゲノム DNA を鋳型にして PCR を行い, シークエンス解析を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer にて行った。PCR プライマーはマウス IRS-2 遺伝子の配列を元に以下のように設計した(White, 1998)。

A-1 5'-ACAGTTTACACAAAGGGTAAAGCATCTAT-3' (forward)

A-2 5'-AACTGCTGCTTTGAATTTCTCTATCTAC-3' (reverse)

B-1 5'-TAAGATAAACTCTGGTCCTGAATTGTTTCA-3' (forward)

B-2 5'-TGCTGGCGTAGGAAAATGCGGTTTCCATAG-3' (reverse)

また, PCR の条件は以下の通りである。

Denature; 96 °C, 2 分, Annealins; 55 °C, 2 分, Extension ; 72 °C, 分。

6-(10) ルシフェラーゼアッセイ

以下の種々の長さのプロモーターを組み込んだルシフェラーゼ(Luciferase)レポータープラスミドを神戸大学柱本博士より提供いただいた(Iwamoto et al., 2002)。

pGL3-IRS2 (-834)	-834 ~ -124
pGL3-IRS2 (-1824)	-1824 ~ -124
pGL3-IRS2 (-2116)	-2116 ~ -124

PicaGene コントロールベクター PGV-C2 (Toyo Ink , Tokyo, Japan)の Sma I サイトに, 上記PCR プライマー A-1 とA-2によって得られたラット IRS-2 プロモーターの IRE 相同部位を含む 398 bp の PCR 産物を組み込み PGV-C2-RatIRS2 を作成した。コントロールベクターとして PGV-C2 を使用した。

トランスフェクションの前日に, Fao 細胞を 12 ウェルプレートに 70~80% コンフルエントになるように(2×10^5 cells/well)準備し, 500 ns の luciferase reporter construct DNA と 50 ns の internal control plasmid pRL-TK (Promes a, Madison, WI USA)を FUGENE 6 (Roche, Indianapolis, IN. USA)トランスフェクションキットを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション後, 細胞は 8 時間培養液中から血清を除去した後, 100 nM インスリン存在下, 非存在下において 16 時間培養した。LY294002 はインスリン刺激の 30 分前に前処置した。

その後, Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promes a, Madison, WI USA) を用いて, Firefly と Renilla のルシフェラーゼ活性を測定した。

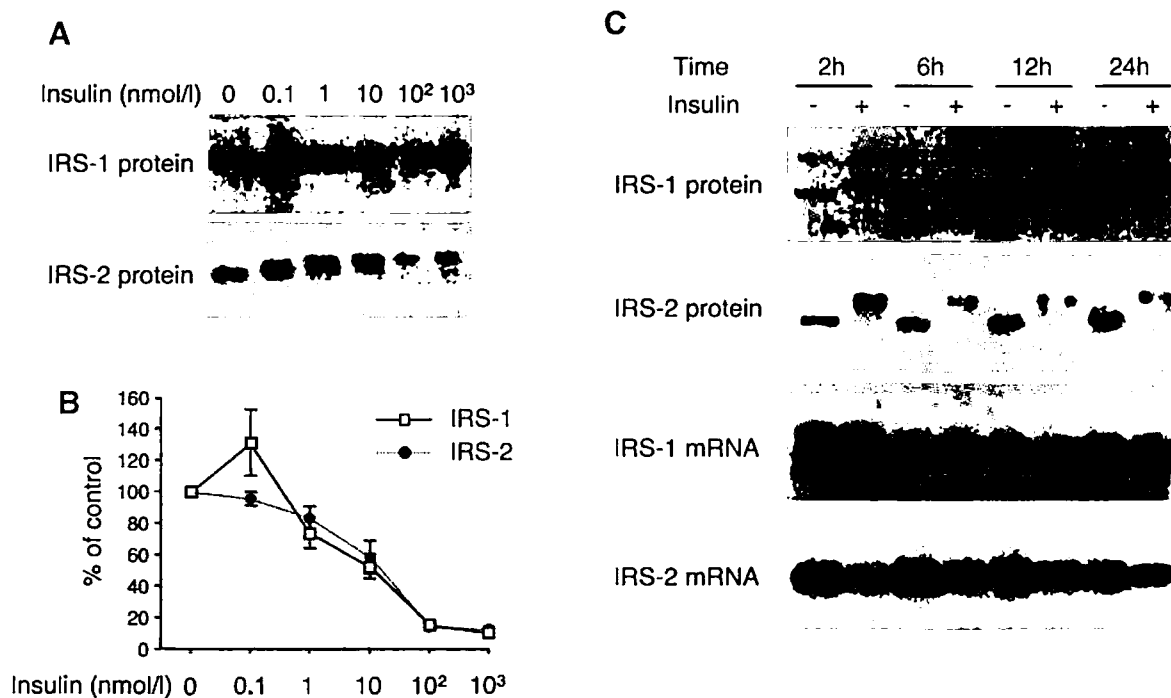
6-(11) 統計処理

数値は平均値±標準偏差(SEM)で表記した。数群間の有意差は, ANI VAにて検定した。また2群間の検定に関してはstudent's *t*-testにて有意差を検定した。いずれも $P < 0.05$ の際に, 統計学的に有意と判断した。

7. 実験結果

7-(1) インスリンは IRS-1 と IRS-2 の mRNA および蛋白を制御していた。

Fao 細胞における、インスリンの IRS-1 と IRS-2 蛋白に対する影響を調べるため、一晚 FBS を含まないメEDIUMで培養した Fao 細胞を、種々のインスリン濃度で 24 時間刺激し、抽出した蛋白(50 μ s/lane)を抗 IRS-1 抗体、抗 IRS-2 抗体を用いウェスタンブロット法で解析した。IRS-1 と IRS-2 の蛋白は両方ともインスリン濃度依存性に減少し、半減する濃度はそれぞれ 8.8 nM と 13.1 nM であった(図 6A, B)。



[図 6d IRS-1 および IRS-2 蛋白の発現に対するインスリンの影響

(A) 一晚 FBS を含まないメEDIUMで培養した Fao 細胞を、種々のインスリン濃度で 24 時間刺激し、抽出した蛋白(50 μ g/lane)を抗 IRS-1 抗体、抗 IRS-2 抗体を用いウェスタンブロット法で解析した。(B) インスリン非存在下の蛋白レベルを 100%として、(A)の結果をグラフ化し、インスリン濃度依存性に IRS-1 と IRS-2 蛋白の発現量減少を表した。結果は独立した 3 回の実験の典型例を示している。(C) 一晚 FBS を含まないメEDIUMで培養した Fao 細胞を、上記の時間 100nM インスリンで刺激し、抽出した蛋白(50 μ g/lane)を抗 IRS-1 抗体、抗 IRS-2 抗体を用いウェスタンブロット法で解析した。また、抽出した RNA (20 μ g/lane)をノザンブロット法で解析した。結果は独立した 3 回の実験の典型例を示している。

IRS-1 と IRS-2 とともにインスリンの濃度依存性に electromobility shift を認めたが、これは IRS-2 でより顕著であった(図 6A)。次に 2~24 時間、100 nM インスリン刺激による IRS-1 と IRS-2 の蛋白の変化を経時的にウェスタンブロット法で検討した。インスリン刺激後 6 時間で IRS-1 と IRS-2 の蛋白はそれぞれ 93%および 76%の減少を認め、この減少は 24 時間持続した(図 6C)。IRS-1 と IRS-2 の両方で electromobility shift を認めたが、electromobility shift は 2 時間で出現し 24 時間持続したが、ここでも IRS-2 でより顕著であった。

IRS 蛋白の減少の機序を明らかにするために、2~24 時間、100 nM インスリン刺激による IRS-1 と IRS-2 の mRNA の変化を経時的にノザンブロット法で検討した。過去の報告によれば、インスリンによる IRS-1 蛋白の減少はその分解によると考えられているが(Araki et al., 1995; Sun et al., 1999; Haruta et al., 2000)、本研究においても IRS-1 mRNA はインスリンの存在下、非存在下に関わらず変化しなかった。一方、IRS-2 mRNA はインスリン刺激後 2 時間で 92%減少し、この減少は少なくとも 24 時間持続した。

7-(2) インスリンによる IRS-2 の蛋白および mRNA の減少は PI-3 キナーゼの阻害剤によって回復した。

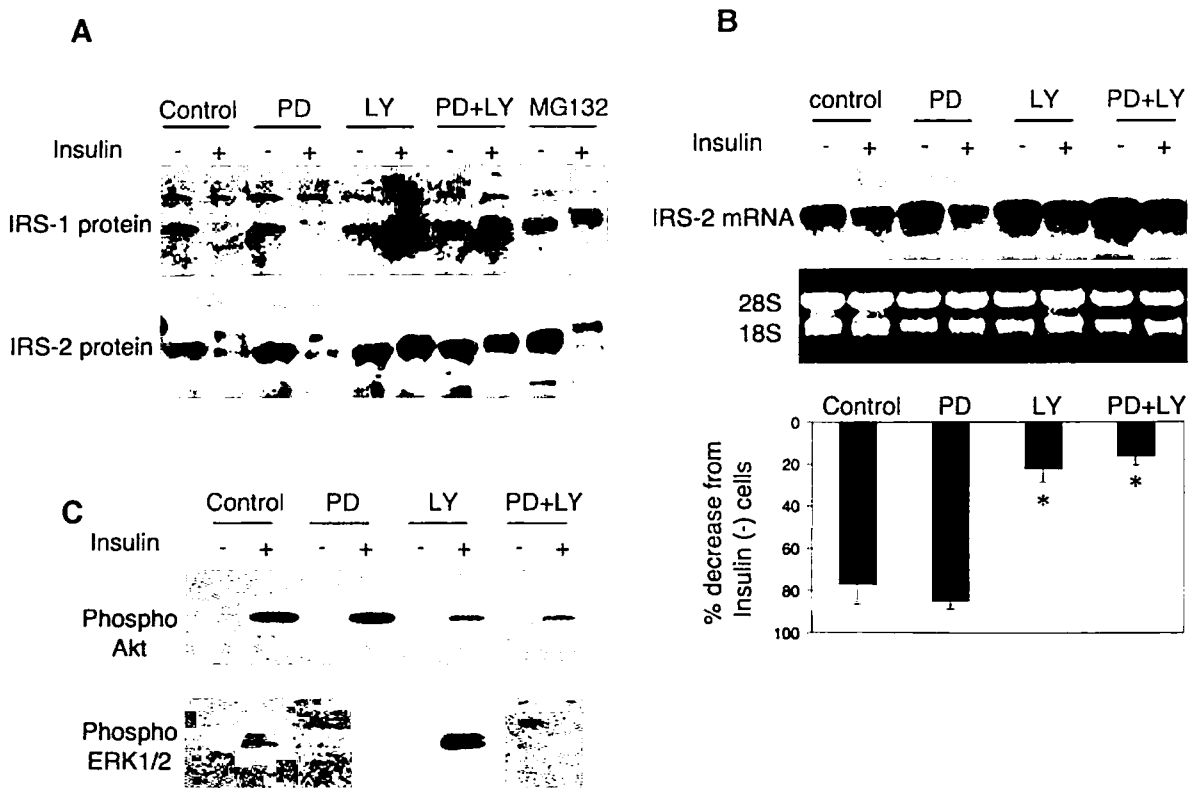
インスリンによる IRS-1 と IRS-2 の蛋白減少を司るシグナル経路を解明するために、MAP キナーゼの活性を阻害する MEK 阻害剤 PD098059 (50 μ M)と PI-3 キナーゼの特異的阻害剤である LY294002 (50 μ M)を使用した。細胞をインスリン刺激前 30 分にこれらの阻害剤で前処置し、100 nM インスリンで 12 時間刺激した。

PD098059 の前処置は、インスリンによる IRS-1 と IRS-2 の蛋白の減少に対しなんら影響を与えなかった(図 7A)。これに対し LY294002 よる前処置は、これらの蛋白の electromobility shift を完全にではないが、一部阻害した(図 7A)。PD098059 と LY294002 の両方で前処置しても、LY294002 で前処置したときと同様の結果だった。

過去の報告によれば、インスリンによる IRS-1 の減少はプロテアソーム-ユビキチンの経路を介していることが示唆されている(Sun et al., 1999; Haruta et al., 2000; Lee et al.,

2000)。Fao 細胞において、プロテアゾーム阻害剤である MG132 はほぼ完全にインスリンによる IRS-1 蛋白の減少を阻害していた。これに反して、インスリンによる IRS-2 蛋白の減少はプロテアゾーム阻害剤である MG132 によってもわずかに変化しただけだった (図 7A)。

2 時間のインスリン刺激による IRS-1 と IRS-2 の mRNA の減少をノザンプロット法にて検討した。



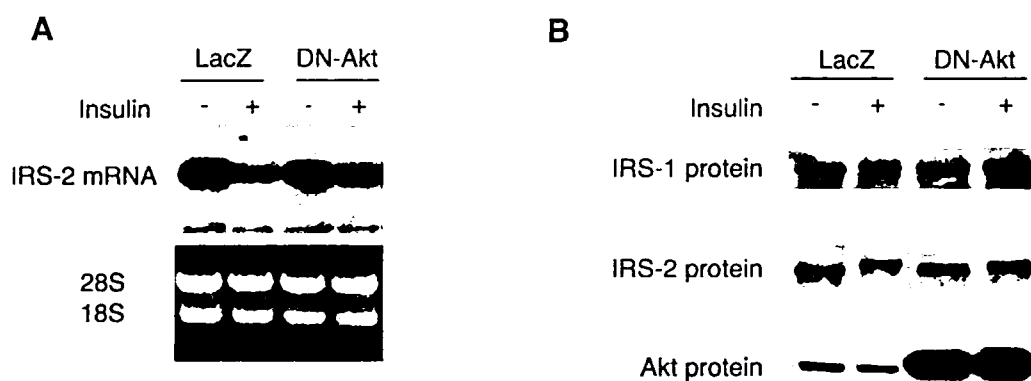
[図 7cインスリンによる IRS-1 および IRS-2 の減少に対する化学的阻害剤の影響

(A)Fao 細胞を PD098059 (PD) (50 μ M), LY294002 (LY) (50 μ M) の単独または両方および MG132 (50 μ M)で 30 分間前処置した後, 100 nM インスリンでさらに 12 時間刺激した。抽出した蛋白を抗 IRS-1 抗体および抗 IRS-2 抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。結果は独立した 3 回の実験の典型例を示している。(B) Fao 細胞を PD098059 (PD) (50 μ M), LY294002 (LY) (50 μ M) の単独または両方で 30 分間前処置した後, 100 nM インスリンでさらに 12 時間刺激した。抽出した RNA をノザンプロット法にて解析した。さらに, それぞれの阻害剤のインスリン非存在下における IRS-2 の mRNA 量に対する減少率をグラフ化した。結果は独立した 3 回の実験の平均と標準偏差を示した。(C) Fao 細胞を PD098059 (PD) (50 μ M), LY294002 (LY) (50 μ M) の単独または両方で 30 分間前処置した後, 100 nM インスリンでさらに 12 時間刺激した。抽出した蛋白を抗リン酸化 Akt 抗体および抗リン酸化 ERK 抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。結果は独立した 3 回の実験の典型例を示している。

PD098059 の前処置はインスリンによる IRS-2 の mRNA の減少に対し影響を与えなかった(図 7B)。これに対して、LY294002 で前処置すると、インスリンによる IRS-2 の mRNA の減少は有意に阻害された(図 7B)。

これらの化学的阻害剤の効果を、インスリンシグナリングにおいて IRS 蛋白の下流に位置する ERK と Akt のリン酸化にて確認した(図 7C)。ERK1/2(p44/p42 MAP キナーゼ)のインスリンによるリン酸化は PD098059 によって完全に阻害された。Akt は PI-3 キナーゼの下流に位置するが、そのリン酸化は PI-3 キナーゼの特異的阻害剤である LY294002 によって完全ではないが有意に阻害された。興味深いことに、LY294002 で前処置した際の ERK1/2 のリン酸化は前処置しない対照群と比べ有意に増加していた。しかしながら、PD098059 と LY294002 の両方で前処置した際には、ERK1/2 のリン酸化は増加していなかった。

7-(3) インスリンによる IRS-2 蛋白および mRNA の減少は Akt と密接に関係していた。

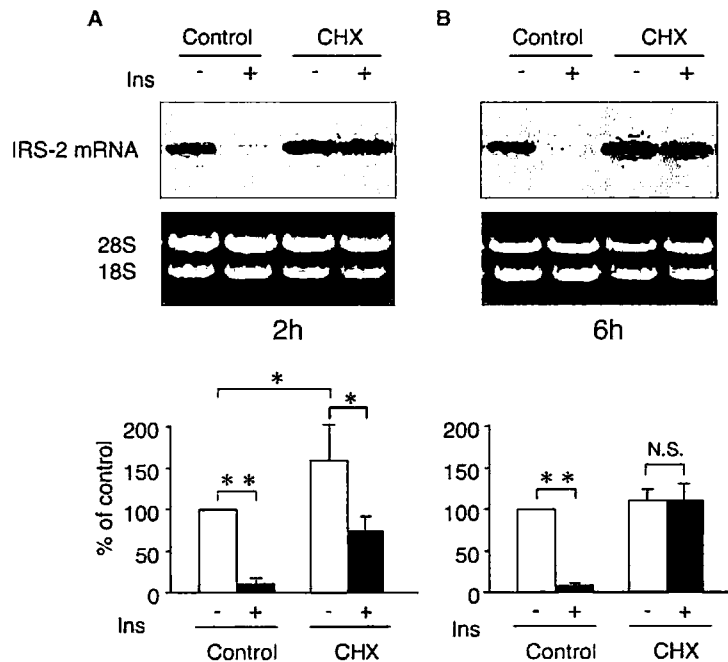


[図 8c インスリンによる IRS-1 および IRS-2 の減少に対するドミナントネガティブ Akt(DN-Akt)の効果 (A) 60mm プレートで培養した confluent の Fao 細胞に、DN-Akt または LacZ を含むアデノウィルス を 3×10^8 plaque-forming units (PFU) の濃度で感染させた。感染後 24 時間に、16 時間培養液から FBS を除去し、その後 2 時間 100 nM インスリンで細胞を刺激した後、抽出した RNA を用いてノザンプロット法で解析した。結果は独立した 3 回の実験の典型例を示している。(B) 上記と同様に、DN-Akt または LacZ を含むアデノウィルスを感染させ、100 nM インスリンで細胞を刺激した後、抽出した蛋白をウェスタンプロット法で解析した。結果は独立した 3 回の実験の典型例を示している。

Akt はインスリンによる様々な遺伝子の発現制御と深い関係がある(Ayala et al., 1999)。PI-3 キナーゼから Akt を介する経路が IRS-2 遺伝子の発現と関係があるかどうかを確かめるために、アデノウィルスを用いて Akt のドミナントネガティブフォーム(DN-Akt)を過剰発現して、PI-3 キナーゼから Akt を介する経路を阻害する実験を行った。DN-Akt を過剰発現した細胞では、インスリンによる IRS-2 の mRNA の減少が部分的に阻害された。インスリン非存在下においては IRS-2 の mRNA 量には影響を与えなかった(図 8A)。

DN-Akt の過剰発現は、インスリンによる IRS-2 蛋白の減少を完全に阻害したが、IRS-1 蛋白に関してはわずかに影響しただけだった(図 8B)。これらのことから、インスリンは、少なくとも部分的には、PI-3 キナーゼから Akt を介する経路を通じて IRS-2 蛋白および mRNA の制御を行っている可能性がある。

7-(4) インスリンによる IRS-2 の mRNA の減少は他の蛋白の合成に関係がある。

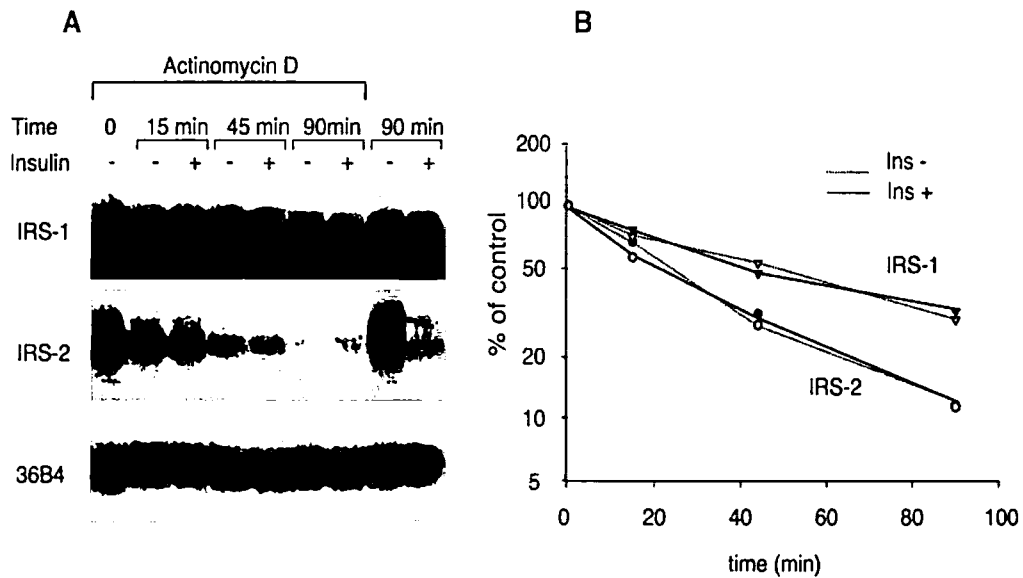


[図 9c インスリンによる IRS-2 mRNA の減少に対する蛋白合成阻害剤、サイクロヘキサマイドの効果 16時間FBSを除去したFao細胞を5μg/mlのサイクロヘキサマイド(CHX)で30分間前処置した後、100nMインスリンで2時間(A)ないし6時間(B)刺激した。その後、抽出したRNAをノザンプロット法で解析した。下段は対照群のインスリン非存在下のIRS-2 mRNA量に対する量的比較を示している。結果は独立した3回の実験の平均と標準偏差を示した。

インスリンによる IRS-2 の mRNA の減少が、他の蛋白の合成に関係しているかどうか確認するために、細胞を蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイド(CHX: cycloheximide)で 30 分間前処置した後、2~6 時間 100 nM インスリンで刺激した。

2.5 時間のサイクロヘキサマイド処理は、インスリン非存在下において有意な IRS-2 mRNA 量の増加を来した(図 9A)。2 時間のインスリン刺激は、サイクロヘキサマイド存在下で IRS-2 mRNA を 40%減少させた。この減少の割合は対照群のインスリン刺激による減少に比べ有意に小さかった。6 時間のサイクロヘキサマイド処理は、インスリン非存在下においては IRS-2 mRNA に影響を与えなかった(図 9B)。しかしながら、6 時間のインスリン刺激による IRS-2 mRNA の減少は、サイクロヘキサマイド処理によって完全に消失した。

7-(5) インスリンは IRS-2 mRNA の半減期に影響を与えなかった。



[図 10c インスリンによる IRS-1 および IRS-2 mRNA の減少に対する RNA 合成阻害剤、アクチノマイシン D の効果 (A) 16 時間 FBS を除去した Fao 細胞を 5 μg/ml のアクチノマイシン D で 15 分間前処置した後、100 nM インスリンで 0~90 分間刺激した。抽出した RNA をノザンプロット法で解析した。(B)IRS-1(Δ)と IRS-2(○)の mRNA の経時的変化を示した。破線はインスリン非存在下、実線はインスリン存在下を示す。結果は時間 0 のアクチノマイシン D 存在下、インスリン非刺激状態を 100 として対数表示した。

インスリンは、遺伝子の転写を調節することにより、あるいは mRNA の安定性を変えることにより mRNA を調節することができる(I'Brien and Granner, 1996)。近年, Zhans らによって、インスリンが IRS-2 遺伝子の転写を抑制していることが報告された(Zhans et al., 2001)。

インスリンによる mRNA の半減期に対する影響を検討するため、Fao 細胞を RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D ($5 \mu\text{s/ml}$) で 15 分間前処置し、アクチノマイシン D の存在下で 0~90 分間インスリン刺激をした(図 10A, B)。アクチノマイシン D の存在下で、対照の 36B4 mRNA は 90 分間では有意な変化を認めなかったが、IRS-1 および IRS-2 mRNA は両方とも時間とともに減少した。アクチノマイシン D 非存在下では、90 分間のインスリン刺激は IRS-2 mRNA の 87% の減少を来たすが、IRS-1 mRNA には影響を与えなかった(図 12A の右側 2 レーン)。アクチノマイシン D 存在下では IRS-1 と IRS-2 の mRNA の半減期は各々 26 ± 5.2 分と 59 ± 6.3 分であった。ここでもっとも重要なことは、インスリンはアクチノマイシン存在下で IRS-1 と IRS-2 の両方の mRNA に影響を与えなかったということである。過去の報告と併せると、インスリンは IRS-2 遺伝子の転写速度を減少させることで IRS-2 mRNA を調節している可能性が示唆された。

7-(6) IRS-2 のインスリンレスポンスエレメント(IRE)様の配列に結合する核蛋白は PI-3 キナーゼ依存性であった。

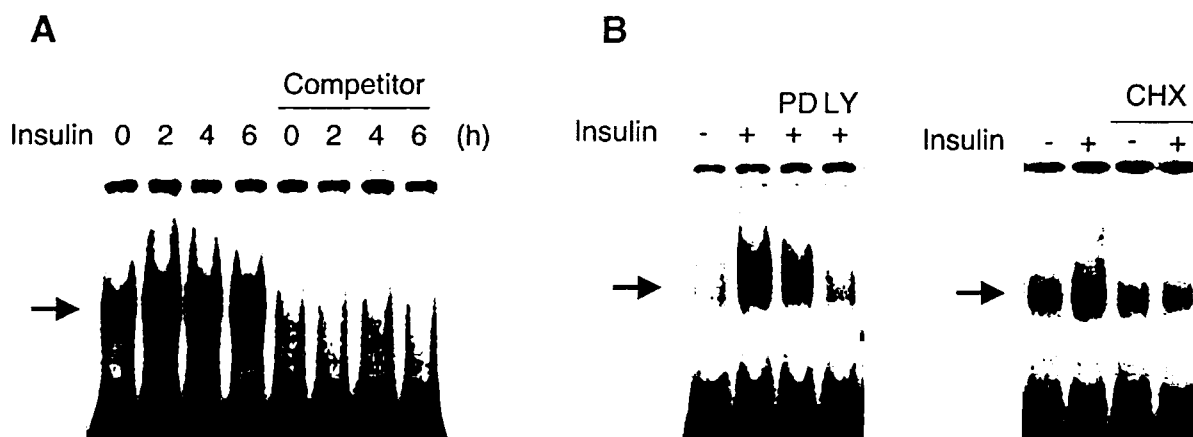
インスリンレスポンスエレメント(IRE)様の配列は、ヒト(TGTTTTG -574 to -568) とマウス(TGTTTTG -1571 to -1565) の両方の IRS-2 遺伝子のプロモーター領域で報告されており、ヒトの IRS-2 遺伝子のプロモーター領域に存在する IRE はインスリンにより転写の調節を受ける(White, 1998; Iwamoto et al., 2002)。

インスリンによる IRS-2 mRNA の抑制が PI-3 キナーゼ依存性かどうかを確認するために、ヒト IRS-2 プロモーター領域の IRE 周辺の配列(nt -585 to -557)をプローブとして、インスリンで刺激した Fao 細胞から抽出した核蛋白とともに EMSA を行った。IRE と核蛋白の結合はインスリン刺激後 2 時間で増加し、IRE と核蛋白の複合体の増加は少な

くとも6時間持続した(図 11A)。[γ - 32 PcATP で標識していないプローブを過剰に加えた競合阻害実験においては、IRE と核蛋白複合体は効果的に阻害された。PI-3 キナーゼ阻害剤の LY294002 は IRE と核蛋白の結合を阻害したが、MEK 阻害剤の PD98059 は阻害しなかった(図 11B)。さらに蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイドは部分的に IRE と核蛋白の結合を阻害した(図 11B)。これらのことから、インスリンによる PI-3 キナーゼの活性化は IRS-2 遺伝子の IRE に核蛋白が結合することに起因していることが示唆された。さらに、少なくとも一部は何らかの蛋白の合成が IRE と核蛋白の結合に関与している可能性がある。

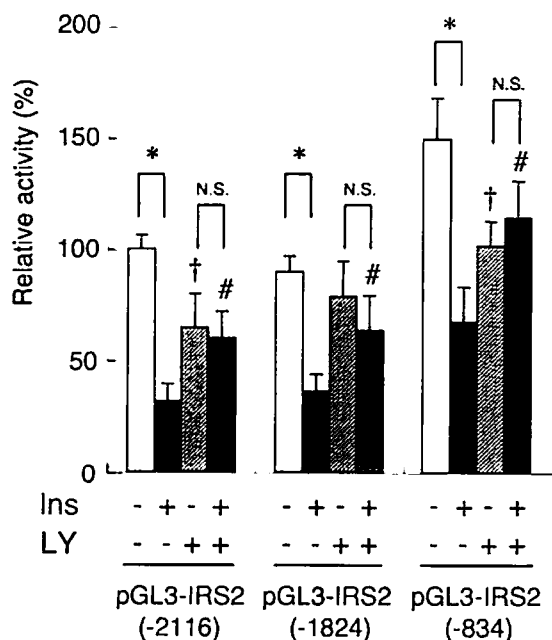
7-(7) インスリンによる IRS-2 遺伝子のプロモーター活性は PI-3 キナーゼ依存性であった。

インスリンによる IRS-2 遺伝子の転写抑制が PI-3 キナーゼを介していることを確認するために、種々の長さのヒト IRS-2 遺伝子プロモーターを含むルシフェラーゼレポータープラスミド[pGL3-IRS2 (-834), pGL3-IRS2 (-1824), pGL3-IRS2 (-2116)cを一過性



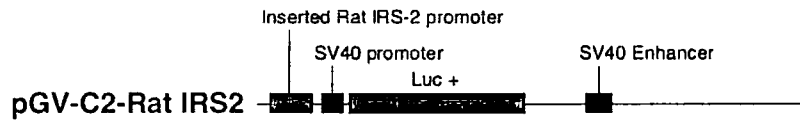
[図 11c IRS-2 遺伝子プロモーターの IRE に対する EMSA。(A)16 時間 FBS を除去した Fao 細胞を 100 nM インスリンで上記の時間刺激した。抽出した核蛋白を、競合阻害物質の存在下、非存在下において、 32 P で標識したヒト IRS-2 遺伝子プロモーター領域の IRE 周囲の配列 (nt -585 to -557) とともに、実験方法に記載した方法で静置した後、泳動し解析した。矢印は IRE と核蛋白の複合体を示している。(B)16 時間 FBS を除去した Fao 細胞を LY294002 (50 μ M) あるいは サイクロヘキサマイド (5 μ g/ml) で 30 分間前処置した後、100 nM インスリンで 6 時間刺激した。その後、上記と同様に EMSA を行い解析した。

に Fao 細胞に導入した。インスリンは pGL3-IRS2 (-834)のルシフェラーゼ活性をインスリン刺激していない細胞に比べ 55% ($p<0.05$)抑制した(図 14)。pGL3-IRS2 (-1824) , pGL3-IRS2 (-2116) を導入した細胞においても、インスリンはそれぞれのルシフェラーゼ活性を 59% ($p<0.05$) , 68% ($p<0.05$)抑制した。しかしながら、PI-3 キナーゼ阻害剤 LY294002 で前処置した細胞においては、インスリンによる抑制は効果的に阻害されていた(図 12)。 ヒト IRS-2 遺伝子の IRE(TGTTTTG)は -574 ~ -568 に位置するが、その周辺の配列はマウスの-1571 to -1565 に位置する IRE (TGTTTTG)の周辺の配列と相同性が低い(Zhans et al., 2001)。この配列に相同する配列の有無をラット IRS-2 遺伝子プロモーターで確認するために、マウスの DNA 配列をもとに作成したプライマーを使ってラットのゲノム DNA に対し PCR を施行した。ラットのゲノム DNA は Fao 細胞とウイスターラットから別々に単離した。PCR で得られたラットの IRS-2 プロモーターの配列とヒトおよびマウスの IRS-2 プロモーターの配列の相同性を検討した(図 13A)。

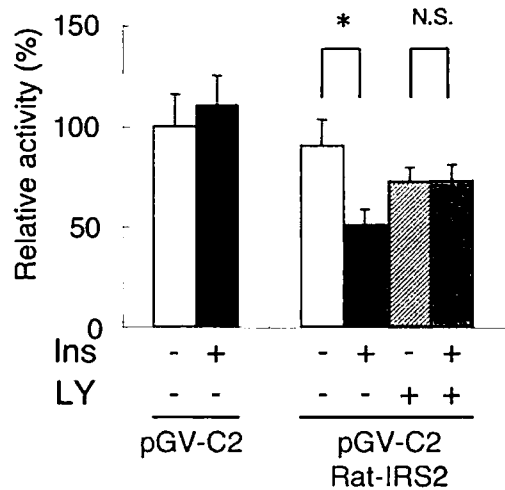


[図12cヒトIRS-2遺伝子プロモーター活性に対するインスリンの効果 pGL3-BasicプラスミドにヒトIRS-2遺伝子プロモーター種々の長さのフラグメント(-2116~-124, -1824~-124, -834~-124)を組み込み、一過性にFao細胞に導入した。6時間培養液からFBSを除去したのち、LY294002 (50 μ M)で30分間前処置し、100 nMインスリンで12時間刺激した。その後、実験方法に記述したようにルシフェラーゼ活性を測定し、インスリン非存在下のpGL3-IRS2 (-834)のルシフェラーゼ活性と比較して、結果を示した。結果は独立した6回の実験の平均と標準偏差を示した。* $P<0.05$

B



C



[図13cラットIRS-2遺伝子プロモーター活性に対するインスリンの効果 (A)ラット, マウス, ヒトのIRS-2遺伝子のプロモーター領域の相同性を示した。黄色で網かけした文字は2種間で配列が保存されているもの, 緑で網かけした文字は3種間で配列が保存されているものを表している。図中のA-1, A-2, B-1 は実験方法で示したPCRプライマーの位置を示す。B-2はここに描いた配列の約60bp下流に位置する。囲み線内のTGTTTTG, GGTTTTG, CAAAATAはインスリンレスポンスエレメント様の配列である。(B) pGV-C2-Rat IRS2の構造を示した。A-1とA-2をプライマーとして得られた396 bpのフラグメントをpGV-C2に組み込みpGV-C2-Rat IRS2とした。(C) pGV-C2とpGV-C2-Rat IRS2をFao細胞に導入し, インスリンで刺激後ルシフェラーゼ活性を上記の方法で測定, 解析した。結果は独立した6回の実験の平均と標準偏差を示した。* $P < 0.05$

この領域の塩基配列はラットで一塩基の違いが認められるものの(GGTTTTG), ラット, マウス, ヒトの間で高い相同性があり, (T/G)GTTTTG配列(マウスでは-1571 to-1565に位置する)は3種間で保存されていた。ラットではTGTTTTGの約80bp上流にもう一つのインスリンレスポンスエレメント様の配列が存在した(図15A)。

CAAAATAおよびGGTTTTGを含む塩基配列にインスリン反応性があるかどうかを確認するために, SV40のプロモーターの直前に組み込んだpGV-C2-Rat IRS2プラスミドを作成した(図15B)。pGV-C2-Rat IRS2とpGV-C2プラスミド(対照)をFao細胞に導入し, ルシフェラーゼ活性を測定してプロモーター活性の解析を行った。pGV-C2-Rat IRS2はインスリンに反応し, そのプロモーター活性はインスリン刺激によって44%抑制された($p < 0.05$)。さらにLY29004で前処置すると, インスリンによるプロモーター活性の抑制効果は阻害されていた(図15C)。

8. 考察

8-(1) インスリンの IRS-1 と IRS-2 蛋白質の調節

IRS ファミリーはインスリン受容体や IGF-I 受容体など受容体チロシンキナーゼの重要な基質である(White, 1998)。IRS ファミリーの中で IRS-1 と IRS-2 は血糖の恒常性と成長に重要な役割を担うと考えられている(Araki et al., 1994; Tamemoto et al., 1994; Withers et al., 1998)。IRS-1 と IRS-2 はほとんどの臓器に発現しており(Araki et al., 1993; Sun et al., 1995), これらの蛋白はインスリン抵抗性や糖尿病などの病的な状態ではその発現量が増加する(Goodyear et al., 1995; Rondinone et al., 1997; Friedman et al., 1999)。肝におけるインスリンシグナリングにおいて, IRS-2 は IRS-1 より重要な役割を担っている。筋においては, 逆に IRS-1 がより重要な役割を担う(Araki et al., 1994; Yamauchi et al., 1996)。

高インスリン血症の動物モデルである ob/ob マウス或いは Zucker fatty ラットの肝臓において, IRS-1 および IRS-2 蛋白は減少していた(Saad et al., 1992; Kerouz et al., 1997; Anai et al., 1998; Shimomura et al., 2000)。これに対し, 低インスリン血症をきたす STZ (streptozotosin)糖尿病ラットでは, 肝臓において IRS-1 および IRS-2 蛋白は増加を来たした(Kerouz et al., 1997; Shimomura et al., 2000)。また, 肝特異的インスリン受容体ノックアウト(LIRKI)マウスでは, 肝における IRS-2 蛋白の著名な増加が報告された(Michael et al., 2000)。これらのことは, インスリンが肝臓において, IRS-1 と IRS-2 の蛋白レベルの調節を行っていることを示唆している。

8-(2)インスリンの IRS-1 と IRS-2 蛋白質の調節機序

3T3-F442A 細胞および 3T3-L1 脂肪細胞において, インスリンは IRS-1 の mRNA を変化させることなく蛋白量を減少させる(Rice et al., 1993; Araki et al., 1995)。これらの細胞において, インスリンは IRS-1 蛋白の半減期を有意に短縮した。最近の研究では, インスリンと IGF-1 はプロテアゾームによる分解を介する経路を介して IRS-1 蛋白を分解するとされている(Sun et al., 1999; Haruta et al., 2000; Lee et al., 2000)。このイン

スリンによる IRS-1 蛋白分解の促進は PI-3 キナーゼの経路を阻害することによって抑制される。この知見は肝においても同様で、インスリンによる IRS-1 蛋白の減少はプロテアソームによる分解を介する経路を介し、PI-3 キナーゼによって調節されている。

IRS-1 蛋白の調節機構については過去にいくつかの報告があるが、IRS-2 蛋白の発現抑制の機序に関してはほとんど報告がない。本研究において、Fao 細胞をインスリンで刺激すると、IRS-1 とは対照的に IRS-2 の mRNA と蛋白の有意な減少を来たした。IRS-2 mRNA に対するインスリンの効果は 2 時間以内という早い時間から起こり、6 時間後に蛋白の減少を認めた。本研究では、プロテアソーム阻害剤である MG132 は、インスリンによる IRS-2 蛋白の減少に対してわずかな影響を与えたのみであった。しかし Rui らは繊維芽細胞および Fao 細胞において、インスリンによる IRS-2 蛋白の減少は、別のプロテアソーム阻害剤(lactacystin)を使って、一部阻害されることを報告している(Rui et al., 2001)。このことは、インスリンが IRS-2 蛋白を IRS-2 mRNA 発現の抑制と、IRS-2 蛋白分解の促進という 2 つの機序で調節していることを示唆している。

8-(3) PI-3 キナーゼ/Akt を介する経路の関与

MEK 阻害剤 PD098059 はインスリンによる IRS-2 蛋白と mRNA の減少を抑制できなかったが、PI-3 キナーゼ阻害剤 LY294002 はインスリンによる IRS-2 蛋白の減少をほぼ完全に抑制した。一方で IRS-2 mRNA の減少の抑制は有意ではあったが完全ではなかった。このことは前述のようにインスリンが IRS-2 の発現を蛋白レベルと mRNA レベルの両方で調節していることを支持している。インスリンによる IRS-2 mRNA の減少が LY294002 によって完全に阻害されないのは、LY294002 が PI-3 キナーゼ経路を完全に阻害できない可能性も考えられる。

もちろん、PI-3 キナーゼ以外の経路が、このインスリンによる IRS-2 蛋白と mRNA の抑制に関与していることも否定はできない。本研究において LY294002 は、ERK1/2 のリン酸化の増加を来たした。このことはこの細胞系における PI-3 キナーゼと MAP キナーゼの相互作用の存在を示唆している(Rommel et al., 1999; Zimmermann and

Moellins, 1999)。しかし、PI-3 キナーゼ阻害剤と MEK 阻害剤の両方を使用すると、インスリンによる IRS-2 mRNA の減少を LY294002 単独で使用したときと同様に阻害することから、LY294002 が IRS-2 mRNA に作用して、MAP キナーゼを活性化すると考えることには多少無理があるかもしれない。

Akt は PI-3 キナーゼのすぐ下流に位置し、糖取り込み(Kohn et al., 1996a; Kohn et al., 1996b), グリコーゲン合成(Ueki et al., 1998), 脂肪分解(Des erman et al., 1997; Kitamura et al., 1999; Takata et al., 1999), 遺伝子発現(Cichy et al., 1998)など様々なインスリン作用を仲介する。本研究における、DN-Akt を組み込んだアデノウィルスを使った実験では、インスリンによる IRS-2 mRNA の減少の抑制は部分的であったが、Akt が IRS-2 mRNA の発現調節に関与していること示し得た。従ってインスリンにより活性化された Akt は、後述するように IRE と核蛋白との結合を新たな蛋白の合成を介して制御している可能性がある。

8-(4) mRNA の安定性

アクチノマイシン D は RNA 合成阻害剤であるため、これを使用してすでに合成された RNA の安定性を検討することができる。本研究におけるアクチノマイシン D を使用した実験では、インスリンはアクチノマイシン D 存在下で IRS-1 と IRS-2 の両方の mRNA に影響を与えなかった。しかしながら、IRS-2 mRNA の半減期は 24 ± 5.2 分であり IRS-1 mRNA の半減期の 59 ± 6.3 分に比べ著明に短かかった。先の報告では、3T3-F442A 細胞において IRS-1 mRNA の半減期は 190 ± 28 分であった(Araki et al., 1995)。この Fao 細胞と 3T3-F442A 細胞における IRS-1 mRNA の半減期の違いは、肝細胞と脂肪細胞という細胞の由来の違いに起因するものであろう。

8-(5) IRS-2 遺伝子の転写調節

インスリンは種々の遺伝子の発現を、遺伝子の転写あるいは mRNA の安定性を調節することによって制御している(I 'Brien and Granner, 1996)。Fao 細胞においてインスリ

ンはアクチノマイシン D 存在下で IRS-2 mRNA に影響を与えなかったことから、インスリンは IRS-2 遺伝子の転写を調節していることが強く示唆される。実際、Zhans らはレポーター遺伝子解析によってインスリンが IRS-2 遺伝子の転写を抑制していることを示した(Zhans et al., 2001)。また、インスリンはインスリンレスポンスエレメント(IRE)を介して、種々の遺伝子発現を調節することも明らかにされている(I 'Brien and Granner, 1996)。この IRE の基本的な配列は T(G/A)TTT(T/G)(G/T)である(Hall et al., 2000)。ヒトおよびマウスの IRS-2 遺伝子の 5'端非翻訳領域は一部発表されているが(Sun et al., 1997; Vassen et al., 1999), ラットに関しては未知であった。IRE 配列はヒト(TGTTTTG ; -574~-568)およびマウス(TGTTTTG;-1571~-1565)の IRS-2 遺伝子プロモーター領域に存在し(Zhans et al., 2001), ヒト IRS-2 遺伝子プロモーター領域の IRE に関しては、インスリンによる負の転写調節が報告されている(Zhans et al., 2001)。本研究において、Fao 細胞の核蛋白がヒト IRS-2 遺伝子の IRE に *in vitro* で結合し、この結合がインスリンによって増強されることが確認できた。さらにレポータープラスミドを使ったプロモーター解析において、インスリンは明らかにヒト IRS-2 遺伝子プロモーターの転写活性を抑制した。LY294002 はインスリンによる IRS-2 mRNA の減少を抑制し、さらにインスリンによる核蛋白と IRE との結合を阻害するとともに、IRS-2 遺伝子の転写も抑制した。Zhans らの報告と本研究の結果を統合すると、インスリンは転写因子と IRE の結合を増加させることによって IRS-2 遺伝子の転写を抑制する可能性がある。

8-(6) ラット IRS-2 プロモーターのインスリンレスポンスエレメント

Fao 細胞はラット細胞株であるので、さらにラットの IRS-2 遺伝子プロモーターのインスリン反応性を確認した。このために、まずラット IRS-2 遺伝子プロモーターの一部を単離し、マウス IRS-2 遺伝子プロモーターの IRE に相同性を有する IRE 様の配列を同定した。この同定した IRE 周辺の配列はマウスおよびヒトに高い相同性を示した。さらに、この TGTTTTG 配列の約 80bp 上流にもう一つの IRE 様配列(CAAAATA)を同定した。この両方の IRE 様配列を含む領域は、レポータープラスミドを用いたプロモーター活性

の解析において、インスリン依存性に活性を低下させた。このことは、ラット IRS-2 遺伝子においても、インスリンは IRE 配列を含んだこの領域を介して転写調節を行っていることを示唆する。

IRS-2 遺伝子の IRE に結合する核蛋白は現在のところ明らかではない。forkhead rhabdomyosarcoma transcription factor (FKHR) はインスリン反応性遺伝子である IGF-1 の IRE に結合し、その発現を PI-3 キナーゼの経路を介して調節することが報告されている(Guo et al., 1999)。。 IRS-2 遺伝子の転写制御において、FKHR を含む IRE に結合する核蛋白の役割に関してはさらなる研究解析が必要である。

8-(7) 新たに合成される蛋白

蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイドは、インスリンによる IRS-2 mRNA の抑制を 6 時間にわたって阻害した。このことは、インスリンによる IRS-2mRNA の抑制は、新たに合成された蛋白を介していることを強く示唆している。さらに本研究において、サイクロヘキサマイドが核蛋白と IRE の複合体の増加を阻害することを EMSA にて確認した。一般的には、転写因子とプロモーター配列のシスアクティングエレメントとの結合は、転写因子の量的増加、転写因子の核への移行、あるいは結合能力の増加などによって制御される(I rphanides et al., 1996; Roeder, 1996)。本研究の結果から、インスリンが IRE に結合する核蛋白の合成を助長するとは確認していないが、少なくともインスリンによって新たに合成された蛋白が、IRE と IRE に結合する核蛋白との相互作用に関与することは確実と考えられる。しかしながら、2 時間ではサイクロヘキサマイドはインスリンの IRS-2 mRNA に対する効果を阻害できなかった。このことは、2 時間以内の初期には、インスリンが IRS-2 mRNA 減少の抑制を蛋白因子の合成とは別の経路を介して制御している可能性がある。

9. 結語

糖尿病はインスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、発症の背景には遺伝的素因と後天的な環境因子の両者が関与すると考えられる。IRS-2 はインスリン受容体の基質の一つであり、空腹時血糖値の恒常性を制御するために重要な、肝におけるインスリンシグナル伝達に主要な役割を果たす。インスリン抵抗性を有する肥満や2型糖尿病患者では、インスリン感受性組織における IRS-1 および IRS-2 蛋白の減少が認められ、特に肝においては主に IRS-2 蛋白の発現の減少が血糖値の恒常性に異常を来している可能性がある。

本研究では、ラット肝腫瘍由来の Fa0 細胞を用いて、インスリンが IRS-2 蛋白の発現を抑制することを明らかにし、さらに IRS-2 蛋白の発現抑制の機序を解析することにより、2型糖尿病発症のメカニズムの一端を解明することを目的とした。

Fa0 細胞において、インスリンは IRS-1 と IRS-2 の蛋白を減少させたが、インスリンによる IRS-1 蛋白の発現調節は IRS-1 mRNA 量の変化を伴わず、プロテアソームによる分解を介して行われたのに対し、IRS-2 蛋白の発現抑制は mRNA 量の減少と平行して起こることがわかった。このインスリンによる IRS-2 蛋白と mRNA の減少は、PI 3-キナーゼ/Akt の経路を介していた。さらにインスリンは核内蛋白と IRE の結合を増加させ IRS-2 遺伝子の転写を抑制することにより IRS-2 mRNA を調節しており、この IRS-2 遺伝子の転写抑制は、インスリンにより新たに合成された蛋白と IRE との相互作用によって行われていることが示唆された。

本研究の結果より、インスリンは IRS-2 の発現を IRS-1 とは異なる機序で調節することが明らかとなり、新たに合成される蛋白と IRE の相互作用の関与が明らかとなったが、IRE に結合する蛋白の同定や新たに合成される蛋白との同一性は確認できなかった。今後、IRS-2 遺伝子プロモーターのさらなる解析や、プロモーター上のシスアクティングエレメントと結合する転写調節因子の同定などを行うことにより、2型糖尿病発症のメカニズムのなおいっそうの解明が期待できる。

10. 参考文献

- Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., and White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277, 1531-1537.
- Akimoto, K., Nakaya, M., Yamanaka, T., Tanaka, J., Matsuda, S., Weng, Q. P., Avruch, J., and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C binds and regulates p70 S6 kinase. *Biochem J* 335 (Pt 2), 417-424.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 15, 6541-6551.
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., et al. (1997a). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7, 776-789.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., and Cohen, P. (1997b). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 7, 261-269.
- Anai, M., Funaki, M., Ogihara, T., Terasaki, J., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., and Asano, T. (1998). Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes* 47, 13-23.
- Antonetti, D. A., Algenstaedt, P., and Kahn, C. R. (1996). Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol Cell Biol* 16, 2195-2203.
- Araki, E., Haag, B. L., 3rd, Matsuda, K., Shichiri, M., and Kahn, C. R. (1995). Characterization and regulation of the mouse insulin receptor substrate gene promoter. *Mol Endocrinol* 9, 1367-1379.
- Araki, E., Lipes, M. A., Patti, M. E., Bruning, J. C., Haag, B., 3rd, Johnson, R. S., and Kahn, C. R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*

372. 186–190.

Araki, E., Sun, X. J., Haag, B. L., 3rd, Chuang, L. M., Zhang, Y., Yang-Feng, T. L., White, M. F., and Kahn, C. R. (1993).

Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1. Characterization of the cDNA, gene, and chromosomal localization. *Diabetes* 42, 1041–1054.

Ayala, J. E., Streeper, R. S., Desgrosellier, J. S., Durham, S. K., Suwanichkul, A., Svitek, C. A., Goldman, J. K., Barr, F. G., Powell, D. R., and O'Brien, R. M. (1999).

Conservation of an insulin response unit between mouse and human glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoters: transcription factor FKHR binds the insulin response sequence. *Diabetes* 48, 1885–1889.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999).

Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.

Bruning, J. C., Winnay, J., Bonner-Weir, S., Taylor, S. I., Accili, D., and Kahn, C. R. (1997).

Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88, 561–572.

Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., and Kahn, C. R. (1994).

Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14, 4902–4911.

Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., 3rd, Kaestner, K. H., Bartolomei, M. S., Shulman, G. I., and Birnbaum, M. J. (2001).

Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728–1731.

Cichy, S. B., Uddin, S., Danilkovich, A., Guo, S., Klippel, A., and Unterman, T. G. (1998).

Protein kinase B/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* 273, 6482–6487.

Coffer, P. J., Jin, J., and Woodgett, J. R. (1998).

Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 335 (Pt 1), 1–13.

- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. (1995).
Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Daniel, P. B., Walker, W. H., and Habener, J. F. (1998).
Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr* 18, 353-383.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997).
Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- DeFronzo, R. A. (1997).
Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth J Med* 50, 191-197.
- Degerman, E., Belfrage, P., and Manganiello, V. C. (1997).
Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272, 6823-6826.
- Denton, R. M., and Tavaré, J. M. (1995).
Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *Eur J Biochem* 227, 597-611.
- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D. R., Hue, L., and Rider, M. H. (1997).
Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem* 272, 17269-17275.
- Dorrestijn, J., Ouwens, D. M., Van den Berghe, N., Bos, J. L., and Maassen, J. A. (1996).
Expression of a dominant-negative Ras mutant does not affect stimulation of glucose uptake and glycogen synthesis by insulin. *Diabetologia* 39, 558-563.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J. H., Masiarz, F., Kan, Y. W., Goldfine, I. D., and et al. (1985).
The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40, 747-758.
- Eck, M. J., Dhe-Paganon, S., Trub, T., Nolte, R. T., and Shoelson, S. E. (1996).
Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell*

85, 695–705.

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. C., et al. (1999).

Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544–1548.

Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C., and Toker, A. (1997).

Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665–668.

Friedman, J. E., Ishizuka, T., Shao, J., Huston, L., Highman, T., and Catalano, P. (1999).

Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* 48, 1807–1814.

Fruman, D. A., Cantley, L. C., and Carpenter, C. L. (1996).

Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* 37, 113–121.

Funaki, M., Katagiri, H., Kanda, A., Anai, M., Nawano, M., Ogihara, T., Inukai, K., Fukushima, Y., Ono, H., Yazaki, Y., et al. (1999).

p85/p110-type phosphatidylinositol kinase phosphorylates not only the D-3, but also the D-4 position of the inositol ring. *J Biol Chem* 274, 22019–22024.

Furukawa, N., Shirotani, T., Araki, E., Kaneko, K., Todaka, M., Matsumoto, K., Tsuruzoe, K., Motoshima, H., Yoshizato, K., Kishikawa, H., and Shichiri, M. (1999).

Possible involvement of atypical protein kinase C (PKC) in glucose-sensitive expression of the human insulin gene: DNA-binding activity and transcriptional activity of pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1) are enhanced via calphostin C-sensitive but phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and Go 6976-insensitive pathway. *Endocr J* 46, 43–58.

Gerfen, C. R., Keefe, K. A., and Gauda, E. B. (1995).

D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci* 15, 8167–8176.

Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N., and Hay, N. (1998).

4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 12, 502–513.

- Goldstein, B. J., Ahmad, F., Ding, W., Li, P. M., and Zhang, W. R. (1998). Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem* 182, 91-99.
- Goodyear, L. J., Giorgino, F., Sherman, L. A., Carey, J., Smith, R. J., and Dohm, G. L. (1995). Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 95, 2195-2204.
- Gorski, K., Carneiro, M., and Schibler, U. (1986). Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 47, 767-776.
- Guo, S., Rena, G., Cichy, S., He, X., Cohen, P., and Unterman, T. (1999). Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* 274, 17184-17192.
- Gustafson, T. A., He, W., Craparo, A., Schaub, C. D., and O'Neill, T. J. (1995). Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* 15, 2500-2508.
- Hall, R. K., Yamasaki, T., Kucera, T., Waltner-Law, M., O'Brien, R., and Granner, D. K. (2000). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *J Biol Chem* 275, 30169-30175.
- Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Kotani, K., Kojima, A., Waterfield, M. D., and Kasuga, M. (1995). Normal activation of p70 S6 kinase by insulin in cells overexpressing dominant negative 85kD subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 208, 735-741.
- Haruta, T., Uno, T., Kawahara, J., Takano, A., Egawa, K., Sharma, P. M., Olefsky, J. M., and Kobayashi, M. (2000). A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* 14, 783-794.

Hayashi, H., Kamohara, S., Nishioka, Y., Kanai, F., Miyake, N., Fukui, Y., Shibasaki, F., Takenawa, T., and Ebina, Y. (1992).

Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the alpha-type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in vivo. *J Biol Chem* 267, 22575-22580.

He, W., Craparo, A., Zhu, Y., O'Neill, T. J., Wang, L. M., Pierce, J. H., and Gustafson, T. A. (1996). Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for two distinct phosphotyrosine-dependent interaction domains within IRS-2. *J Biol Chem* 271, 11641-11645.

Hendricks, S. A., Agardh, C. D., Taylor, S. I., and Roth, J. (1984).

Unique features of the insulin receptor in rat brain. *J Neurochem* 43, 1302-1309.

Iwamoto, K., Mori, H., Okazawa, H., Hashiramoto, M., and Kasuga, M. (2002).

Identification of a single nucleotide polymorphism showing no insulin-mediated suppression of the promoter activity in the human insulin receptor substrate 2 gene. *Diabetologia* 45, 1182-1195.

Jiang, Z. Y., Lin, Y. W., Clemont, A., Feener, E. P., Hein, K. D., Igarashi, M., Yamauchi, T., White, M. F., and King, G. L. (1999).

Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 104, 447-457.

Jones, P. M., and Persaud, S. J. (1998).

Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocr Rev* 19, 429-461.

Kanai, F., Ito, K., Todaka, M., Hayashi, H., Kamohara, S., Ishii, K., Okada, T., Hazeki, O., Ui, M., and Ebina, Y. (1993).

Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 762-768.

Kerouz, N. J., Horsch, D., Pons, S., and Kahn, C. R. (1997).

Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest* 100, 3164-3172.

Kido, Y., Burks, D. J., Withers, D., Bruning, J. C., Kahn, C. R., White, M. F., and Accili, D. (2000).

Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J*

Clin Invest 105, 199–205.

Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W., and Kasuga, M. (1999).

Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol* 19, 6286–6296.

Kitamura, T., Ogawa, W., Sakaue, H., Hino, Y., Kuroda, S., Takata, M., Matsumoto, M., Maeda, T., Konishi, H., Kikkawa, U., and Kasuga, M. (1998).

Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol Cell Biol* 18, 3708–3717.

Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W. M., Apell, G., Escobedo, M. A., and Williams, L. T. (1996). Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol Cell Biol* 16, 4117–4127.

Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J., and Roth, R. A. (1996a).

Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271, 31372–31378.

Kohn, A. D., Takeuchi, F., and Roth, R. A. (1996b).

Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem* 271, 21920–21926.

Lavan, B. E., Fantin, V. R., Chang, E. T., Lane, W. S., Keller, S. R., and Lienhard, G. E. (1997a).

A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 21403–21407.

Lavan, B. E., Lane, W. S., and Lienhard, G. E. (1997b).

The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 11439–11443.

Lee, A. V., Gooch, J. L., Oesterreich, S., Guler, R. L., and Yee, D. (2000).

Insulin-like growth factor I-induced degradation of insulin receptor substrate 1 is mediated by the 26S proteasome and blocked by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibition. *Mol Cell Biol* 20, 1489–1496.

Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M. P., and Lambright, D. G. (2000).

Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 6,

385-394.

Matsuda, K., Araki, E., Yoshimura, R., Tsuruzoe, K., Furukawa, N., Kaneko, K., Motoshima, H., Yoshizato, K., Kishikawa, H., and Shichiri, M. (1997).

Cell-specific regulation of IRS-1 gene expression: role of E box and C/EBP binding site in HepG2 cells and CHO cells. *Diabetes* 46, 354-362.

Michael, M. D., Kulkarni, R. N., Postic, C., Previs, S. F., Shulman, G. I., Magnuson, M. A., and Kahn, C. R. (2000).

Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6, 87-97.

Numan, S., and Russell, D. S. (1999).

Discrete expression of insulin receptor substrate-4 mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 72, 97-102.

O'Brien R. M., Streeper, R. S., Ayala, J. E., Stadelmaier, B. T., and Hornbuckle, L. A. (2001).

Insulin-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans* 29, 552-558.

O'Brien, R. M., and Granner, D. K. (1991).

Regulation of gene expression by insulin. *Biochem J* 278 (Pt 3), 609-619.

O'Brien, R. M., and Granner, D. K. (1996).

Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev* 76, 1109-1161.

Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996).

The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10, 2657-2683.

Paz, K., Hemi, R., LeRoith, D., Karasik, A., Elhanany, E., Kanety, H., and Zick, Y. (1997).

A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 29911-29918.

Philippe, J., Morel, C., and Cordier-Bussat, M. (1995).

Islet-specific proteins interact with the insulin-response element of the glucagon gene. *J Biol Chem* 270, 3039-3045.

Pilkis, S. J., and Granner, D. K. (1992).

Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54, 885-909.

Pons, S., Asano, T., Glasheen, E., Miralpeix, M., Zhang, Y., Fisher, T. L., Myers, M. G., Jr., Sun, X. J., and White, M. F. (1995).

The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 15, 4453-4465.

Proud, C. G., and Denton, R. M. (1997).

Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem J* 328 (Pt 2). 329-341.

Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B. A., and Thomas, G. (1998).

Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279, 707-710.

Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1990).

Regulation of gene expression by tumor promoters. *Pharmacol Ther* 48. 157-188.

Ren, J. M., Li, P. M., Zhang, W. R., Sweet, L. J., Cline, G., Shulman, G. I., Livingston, J. N., and Goldstein, B. J. (1998).

Transgenic mice deficient in the LAR protein-tyrosine phosphatase exhibit profound defects in glucose homeostasis. *Diabetes* 47. 493-497.

Rice, K. M., Turnbow, M. A., and Garner, C. W. (1993).

Insulin stimulates the degradation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 190, 961-967.

Roeder, R. G. (1996).

The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-335.

Rommel, C., Clarke, B. A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. (1999).

Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286. 1738-1741.

Rondinone, C. M., Wang, L. M., Lonroth, P., Wesslau, C., Pierce, J. H., and Smith, U. (1997).

Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94. 4171-4175.

- Rui, L., Fisher, T. L., Thomas, J., and White, M. F. (2001). Regulation of insulin/insulin-like growth factor-1 signaling by proteasome-mediated degradation of insulin receptor substrate-2. *J Biol Chem* 276, 40362-40367.
- Saad, M. J., Araki, E., Miralpeix, M., Rothenberg, P. L., White, M. F., and Kahn, C. R. (1992). Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 90, 1839-1849.
- Saad, M. J., Folli, F., and Kahn, C. R. (1995). Insulin and dexamethasone regulate insulin receptors, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in Fao hepatoma cells. *Endocrinology* 136, 1579-1588.
- Sawka-Verhelle, D., Tartare-Deckert, S., White, M. F., and Van Obberghen, E. (1996). Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J Biol Chem* 271, 5980-5983.
- Shepherd, P. R., and Kahn, B. B. (1999). Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341, 248-257.
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 6, 77-86.
- Shirakami, A., Toyonaga, T., Tsuruzoe, K., Shirotani, T., Matsumoto, K., Yoshizato, K., Kawashima, J., Hirashima, Y., Miyamura, N., Kahn, C. R., and Araki, E. (2002). Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 174, 309-319.
- Smith, L. K., Bradshaw, M., Croall, D. E., and Garner, C. W. (1993). The insulin receptor substrate (IRS-1) is a PEST protein that is susceptible to calpain degradation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 767-772.
- Smith, L. K., Rice, K. M., and Garner, C. W. (1996). The insulin-induced down-regulation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes is mediated by a calcium-dependent thiol protease. *Mol Cell Endocrinol* 122, 81-92.

Staal, S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5034–5037.

Standaert, M. L., Galloway, L., Karnam, P., Bandyopadhyay, G., Moscat, J., and Farese, R. V. (1997). Protein kinase C- ζ as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* 272, 30075–30082.

Sun, X. J., Crimmins, D. L., Myers, M. G., Jr., Miralpeix, M., and White, M. F. (1993). Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13, 7418–7428.

Sun, X. J., Goldberg, J. L., Qiao, L. Y., and Mitchell, J. J. (1999). Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes* 48, 1359–1364.

Sun, X. J., Pons, S., Wang, L. M., Zhang, Y., Yenush, L., Burks, D., Myers, M. G., Jr., Glasheen, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., et al. (1997). The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. *Mol Endocrinol* 11, 251–262.

Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J., and White, M. F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73–77.

Sun, X. J., Wang, L. M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M. G., Jr., Glasheen, E., Lane, W. S., Pierce, J. H., and White, M. F. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173–177.

Takada, T., Matozaki, T., Takeda, H., Fukunaga, K., Noguchi, T., Fujioka, Y., Okazaki, I., Tsuda, M., Yamao, T., Ochi, F., and Kasuga, M. (1998). Roles of the complex formation of SHPS-1 with SHP-2 in insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 273, 9234–9242.

Takata, M., Ogawa, W., Kitamura, T., Hino, Y., Kuroda, S., Kotani, K., Klip, A., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Kasuga, M. (1999). Requirement for Akt (protein kinase B) in insulin-induced activation of glycogen synthase and

phosphorylation of 4E-BP1 (PHAS-1). *J Biol Chem* 274, 20611–20618.

Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., and et al. (1994).

Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182–186.

Tsuruzoe, K., Emkey, R., Kriauciunas, K. M., Ueki, K., and Kahn, C. R. (2001).

Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21, 26–38.

Uchida, T., Myers, M. G., Jr., and White, M. F. (2000).

IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 126–138.

Ueki, K., Yamamoto-Honda, R., Kaburagi, Y., Yamauchi, T., Tobe, K., Burgering, B. M., Coffey, P. J., Komuro, I., Akanuma, Y., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. (1998).

Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J Biol Chem* 273, 5315–5322.

Vassen, L., Wegrzyn, W., and Klein-Hitpass, L. (1999).

Human insulin receptor substrate-2: gene organization and promoter characterization. *Diabetes* 48, 1877–1880.

Virkamaki, A., Ueki, K., and Kahn, C. R. (1999).

Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103, 931–943.

Waterfield, M. D., and Greenfield, C. (1991).

Expression and properties of epidermal growth factor receptor expressed from baculovirus vectors. *Methods Enzymol* 200, 627–645.

White, M. F. (1998).

The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 182, 3–11.

White, M. F., and Kahn, C. R. (1994).

The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269, 1–4.

Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., et al. (1998).

Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904.

Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., et al. (1996).

Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 16, 3074-3084.

Zhang, J., Ou, J., Bashmakov, Y., Horton, J. D., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2001).

Insulin inhibits transcription of IRS-2 gene in rat liver through an insulin response element (IRE) that resembles IREs of other insulin-repressed genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3756-3761.

Zimmermann, S., and Moelling, K. (1999).

Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286, 1741-1744.