総 説

インスリンの作用機序

—インスリン受容体後のシグナル伝達—

神戸大学医学部第二内科

春日 雅 人

Mechanism of Insulin Action

—Signal Transductions after Binding to Insulin Receptor—

Masato KASUGA

Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine.

Insulin binds to the α subunit of the insulin receptor which activates the tyrosine kinase in the β subunit and tyrosine-phosphorylates the insulin receptor substrates-1 (IRS-1). Insulin promotes the formation of a complex between tyrosine-phosphorylated IRS-1 and several proteins including phosphoinositide (PI) 3-kinase, a heterodimer consisting of regulatory 85-kDa (p85) and catalytic 110-kDa (p110) subunits, GRB2 and Syp via the Src homology region 2 (SH2) domains. Recently, it was suggested that GRB2-Sos complex binding to IRS-1 was linked to Ras activation and that PI 3-kinase binding to IRS-1 was linked to activation of glucose transport. Since the mechanism of insulin-stimulated glucose uptake is mainly due to translocation of glucose transporters from an intracellular vesicle pool to the plasma membrane, PI 3-kinase activity may be involved in vesicle transport in mammalian cells.

Keywords: GRB2(ASH)/IRS-1/PI 3-kinase/Ras/SHC

はじめに

インスリンがその作用を発現する第一歩は標的細胞のインスリン受容体に結合することである。インスリン受容体の構造と機能に関しては、多くの総説¹⁾²⁾によって紹介されている所であるので簡単にとどめ、受容体以降のシグナル伝達について本稿では紹介したい。インスリン受容体は、分子量135,000の α サブユニットと95,000の β サブユニットがS-S結合で結ばれた $\alpha_2\beta_2$ の形をとっており、 α サブユニットは細胞外に存在しインスリン分子と結合する。 β サブユニットは膜貫通蛋白であり、チロシンに特異的なキナーゼ活性をもつ磷酸化蛋白である。 α サブユニットにインスリン分子が結合すると β サブユニットに内在するチロシンキナーゼ活性が上昇し、 β サブユニットの自己磷酸化を生じ、さらにチロシンキナーゼ活性を活性化する(図1)。各種の実験からこのチロシンキナーゼ活性はインスリン作用の伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。

図1 インスリン受容体の構造と機能

IRS-1(Insulin Receptor Substrate-1)

インスリン³⁾⁴⁾, IGF-1刺激⁵⁾により非常に早期にチロシン磷酸化される SDS-PAGE により分子量185,000の部位に泳動される蛋白であり, 抗磷酸化抗体で検出される最も明らかな蛋白である。培養細胞のみならず, 個体のレベルにおいてもインスリン注入により同様の蛋白が検出されている⁶⁾。最近, この蛋白の cDNA がクローニングされ, その結果1235個のアミノ酸からなる蛋白であり, プロテインキナーゼ活性を持たないが多数のセリン, あるいはチロシン磷酸化されうる部位を持つことが明らかとなった⁷⁾。

インスリン受容体と同様にチロシンキナーゼ活性を内在する受容体としては, PDGF 受容体や EGF 受容体などが知られているが, それらの研究からこれらの受容体のチロシン磷酸化部位を SH2 ドメインと呼ばれる約100個のアミノ酸からなるドメインが特異的に認識して, SH2ドメインを持つ蛋白質が受容体に結合することが明らかになってきた。SH2ドメインを持つ代表的な蛋白を図2に示すが, チロシンキナーゼ活性, チロシンフォスファターゼ活性などの酵素活性を持つものあるいは酵素活性を持たず SH3ドメインと呼ばれる約50個のアミノ酸からなるドメインを持つものなど多種多様である。後者の SH3ドメインは proline-rich の配列を認識してその部分に結合することが知られている。従って, この蛋白は adaptor となり, チロシン磷酸化された蛋白と他の蛋白を連結する役割を果たすことになる。

インスリン受容体あるいは IGF-1受容体の場合は他のチロシンキナーゼ活性を内在する受容体と異なり, 受容体と結合する SH2を持った蛋白は検出されていないが, IRS-1にいくつかの SH2を持った蛋白が結合することが明らかになってきた。すなわち, IRS-1の Y608MPM, Y939MNM というアミノ酸配列を PI 3-キナーゼの 85K サブユニットが, Y895VNI というアミノ酸配列を G RB-2(ASH)が, Y1172IDL というアミノ酸配列を Syp(SH PTP-2)の SH2ドメインが認識し結合することが明らかになってきた。すなわち, IRS-1はインスリン受容体キナーゼあるいは IGF-1受容体キナーゼにより何カ所かがチロシン磷酸化され, それぞれの部位を SH2ドメインを持った蛋白が認識して結合すると考えられる。

PI 3-キナーゼ

PI 3-キナーゼは phosphatidylinositol のイノシトール環の D-3位を特異的にリン酸化する酵素であり、110K の catalytic subunit と85K の adaptor subunit の heterodimer であり、両 subunit の cDNA がとられ、その一次配列が決定された。85K の adaptor subunit は図2に示す如くひとつの SH3ドメインと2つの SH2ドメインを持つ。抗リン酸化チロシン抗体による免疫沈降物中の PI 3-キナーゼ活性がインスリンにより上昇することが報告され⁹⁾、これらは110K あるいは85K がチロシンリン酸化されているためではないかと推定されたが、その後両者のチロシンリン酸化は認められず、チロシンリン酸化された IRS-1に結合した PI 3-キナーゼの活性を測定していると推測された⁷⁾。その後、インスリン刺激により IRS-1の608あるいは939番目のチロシン残基がリン酸化され、その部位を特異的に認識して85K サブユニットが IRS-1に結合すると考えられるようになったのは、既に述べた通りである⁹⁾¹⁰⁾。最近、この結合により PI 3-キナーゼ活性が活性化されることが示された。すなわち、IRS-1蛋白あるいは YMXM を含むリン酸化ペプチドと85K が結合すると何らかの機序によりその立体構造に変化が起り、85K に結合している110K の酵素活性が上昇すると推測されている¹⁰⁾。110K の酵素活性の上昇に伴い、PI (3,4) P₂、PI (3,4,5) P₃などが産生されることが考えられるが、実際にインスリン刺激により細胞中のこれらの量が増加することが報告されている。

SH2 Family of Signaling Proteins

図 2

このインスリンによる IRS-1-85K-110K の complex 形成がどのようなインスリンの作用を伝達しているか明らかにするために、我々は IRS-1 と結合しうるが110K とは結合しえない85K を CHO 細胞に過剰発現させることを試みた¹¹⁾。85K における110K の結合部位は2つの SH2領域の間に存在し、N 端側の SH2領域に隣接する約50個程のアミノ酸よりなる部分であることが明らかとなったので、この部分を欠失した Δ p85蛋白を内在性の85K と比較し20~40倍 CHO 細胞に過剰発現させた。この Δ p85を発現した細胞 (CHO-IR Δ p85) では抗リン酸化チロシン抗体あるいは抗 IRS-1抗

体による免疫沈降物中の PI 3-キナーゼ活性はインスリンによってもほとんど上昇せず、また PI (3,4) P₂や PI (3,4,5) P₃の産生も半分以下であった。この CHO-IR Δp85細胞ではインスリンによる Ras 蛋白の活性化は正常に認められたが、糖輸送の活性化はほとんど認められなかった。インスリンによる糖輸送の活性化は各種の糖輸送担体を含む vesicle が細胞内から細胞表面へ translocation されるために生じると考えられているが、CHO-IR Δp85細胞でもその主な糖輸送担体である GLUT1の translocation が認められなかった。従って、この実験から PI 3-キナーゼの活性化は vesicular transport と関係している可能性が示唆されたと言える。PI 3-キナーゼの110K サブユニットの cDNA クローニングの結果は、VPS34と呼ばれる vesicular transport に関与していると推定されているイースト (*Saccharomyces cerevisia*) の蛋白と唯一ホモロジイが認められた。すなわち、PI 3-キナーゼの catalytic subunit は哺乳類においても vesicular transport に関与している可能性があると言える。また、この Δp85 蛋白や YMXM モチーフを持つ磷酸化ペプチドを microinjection するとインスリンや IGF-1による membrane ruffling が阻害される。従って、PI 3-キナーゼはインスリン受容体や IGF-1受容体から membrane ruffling までのシグナルトランスダクションに関与している可能性も高い¹²⁾。

GRB2(ASH)

図2に示すように GRB2(ASH)は2つの SH3領域と1つの SH2領域のみからなる蛋白で、adaptor の役割をしていると推定されていた。この GRB2/ASH の SH2領域がインスリンによりチロシン磷酸化された IRS-1の895番目のチロシンを含む部位を認識して結合することが明らかになったのは既に述べた通りである。この GRB2(ASH)の SH3領域は Sos と呼ばれる guanine nucleotide releasing factor と結合し、Sos は *ras* 蛋白に働いて GDP 型から GTP 型に活性化すると推定されている¹³⁾。(図3)

SHC

図2に示す通り SHC は SH2領域をもつ蛋白であり、EGF 受容体に結合してチロシン磷酸化されることが明らかにされていた。また、インスリン刺激によりチロシン磷酸化されることも明らかにされた¹⁴⁾。より詳しく検討してみると、この SHC は SH2領域を持つにもかかわらず、IRS-1やインスリン受容体とは直接結合していないこと、また、GRB2(ASH)-Sos にも結合することが明らかとなってきた。すなわち、インスリン受容体を介する *ras* の活性化には IRS-1→GRB2(ASH)→Sos と SHC→GRB2(ASH)→Sos という2つの系路が存在すると想定される。(図3)インスリン受容体の C 末端を82個欠失した変異インスリン受容体を発現した CHO 細胞では、キナーゼ活性が高度に低下しているが、IRS-1は正常にチロシン磷酸化される。この細胞では SHC のチロシン磷酸化は高度に低下しており、インスリンによる *ras* の活性化は認められるが正常よりは低く正常の70～80%を示す¹⁵⁾。IRS-1ならびに SHC の両者のチロシン磷酸化が高度に低下している場合は、*ras* の活性化はほとんど認められないので、IRS-1のチロシン磷酸化が *ras* の活性化に必要であることは明白である。また、*ras* の full activation には SHC のチロシン磷酸化も同時に必要である可能性が高く、上記の少なくとも2つの系路は存在すると思われる。

おわりに

現在のインスリンの作用機序の大略は図3の如くまとめられる。IRS-1には Syp(SH PTP-2)と呼ばれる SH2領域を持つチロシンフォスファターゼが結合することが知られている。このチロシンフォスファターゼ活性も IRS-1に結合することにより活性化する可能性が存在する。この蛋白

がどのような働きをしているか興味のある所である。また、最近、*ras* 蛋白と Raf 蛋白が結合することが報告され¹⁶⁾¹⁷⁾、これによりインスリン受容体から90KS6キナーゼまでの情報伝達の担い手はほぼ明らかになった可能性がある。もちろん、個々の情報伝達の機序やその制御に関しては不明の部分も多く、また、多くの cross-talk や側副路が存在すると思われる。インスリンはグリコーゲン合成酵素を脱リン酸化して活性化するが、それは主に ISPK (insulin-stimulated protein kinase) と呼ばれるキナーゼが PP1 (protein phosphatase-1) の G サブユニットの site-1 と呼ばれる部位をセリンリン酸化するために生じると考えられている¹⁸⁾。この ISPK が90K の S6キナーゼと類似していることが明らかになってきているので、インスリンのグリコーゲン合成酵素の活性化は、この *ras* 蛋白を介する系によって情報が伝達されている可能性が高い (図4)。

図 3

図 4

文 献

- 1) 春日雅人:「インスリン受容体を介する signal transduction model」日本内分泌学会雑誌 1987;63:1507-1514
- 2) 春日雅人:「インスリンレセプター」Annual Review 細胞生物学 1992; 222-231 (矢原一郎, 御子柴克彦, 月田承一郎編 中外医学社)
- 3) White MF, Maron R, Kahn CR: Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a M_r -185,000 protein in intact cells. *Nature* 1985; 318: 183-186
- 4) Kadowaki T, Kaoyasu S, Nishida E, Tobe K, Izumi T, Takaku F, Sakai H, Yahara I, Kasuga M: Tyrosine phosphorylation of common and specific sets of cellular proteins rapidly induced by insulin, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in an intact cell. *J Biol Chem* 1987; 262: 7342-7350
- 5) Izumi T, White MF, Kadowaki T, Takaku F, Akanuma Y, Kasuga M: Insulin-like growth factor-I rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a M_r -185,000 protein in intact cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 1282-1287
- 6) Tobe K, Koshio O, Tashiro-Hashimoto Y, Takaku F, Akanuma T, Kasuga M: Immunological detection of phosphotyrosine-containing proteins in rat liver after insulin injection. *Diabetes* 1990; 39: 528-533
- 7) Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF: Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991; 352: 73-77
- 8) Endemann G, Yonezawa K, Roth RA: Phosphatidylinositol kinase or an associated protein is a substrate for the insulin receptor kinase. *J Biol Chem* 1990; 265: 396-400
- 9) Yonezawa K, Ueda H, Hara K, Nishida K, Ando A, Chavanieu A, Matsuba H, Shii K, Yokono K, Fukui Y, Calas B, Grigorescu F, Dhand R, Gout I, Otsu M, Waterfield MD, Kasuga M: Insulin-dependent formation of a complex containing an 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine-phosphorylated insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 1992; 267: 25958-25966
- 10) Backer JM, Myers Jr MG, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik E, Schlessinger J, White MF: Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 1992; 9: 3469-3479
- 11) Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Ando A, Kotani K, Kitamura T, Ido Y, Ueda H, Stephens L, Jackson TR, Hawkins PT, Dhand R, Clark AE, Holman GD, Waterfield MD, Kasuga M: submitted for publication
- 12) Kotani K, Yonezawa K, Ueda H, Chavanieu A, Calas B, Grigorescu F, Waterfield MD, Kasuga M: submitted for publication
- 13) Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J: The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 1993; 260: 1953-1955
- 14) Pronk GJ, McGlade M, Pelicci G, Pawson T, Bos JL: Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins. *J Biol Chem* 1993; 268: 5748-5753
- 15) Yonezawa K, Ando A, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Kitamura T, Hara K, Nakafuku M, Okabayashi Y, Kadowaki T, Kaziro Y, Kasuga M: Signal transduction pathways from insulin receptors to Ras: Analysis by mutant insulin receptors. *J. Biol. chem* 1994; in press
- 16) Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A: Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *Science* 1993; 260: 1658-1661
- 17) Zhang X-F, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J: Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 1993; 364: 308-313
- 18) Dent P, Lavoie A, Nakielnny S, Caudwell FB, Watt P, Cohen P: The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. *Nature* 1990; 348: 302-308