

## 綜 説

## インスリン作用の細胞内伝達機構

山内 恵 史

信州大学医学部老年医学教室

## Mechanism of Intracellular Signaling of Insulin

Keishi YAMAUCHI

Department of Endocrinology, Metabolism and Geriatrics,  
Shinshu University School of Medicine

---

**Key words:** insulin receptor, intracellular signal transduction, growth factor  
インスリン受容体, 細胞内情報伝達, 増殖因子

---

## はじめに

糖尿病はインスリンの絶対的あるいは相対的不足をきたしている疾患であるが, 相対的不足つまりインスリン非依存性糖尿病の発症にインスリンに対する抵抗性が関与しているとされている。抵抗性の成因には不明の点が多く, インスリンの作用機構の解明が必要である。今回の綜説では私および私の所属していた研究室のデータを含めてインスリン作用の細胞内伝達機構をまとめてみた。

I インスリン受容体およびその分子内  
信号伝達

インスリンは血糖を下げる唯一のホルモンとして知られていたが, 糖代謝・脂質代謝ばかりでなく細胞増殖因子の作用も有する。インスリン分子はポリペプチドであり脂溶性でないため細胞膜を通過できない。したがってその分子と特異的に結合してその作用を細胞内に伝播するインスリン受容体は細胞表面に存在する。

1982年 Kasuga<sup>ら</sup>はインスリン受容体がチロシン残基をリン酸化するチロシンキナーゼであり, インスリン受容体自身もリン酸化される自己リン酸化がおき

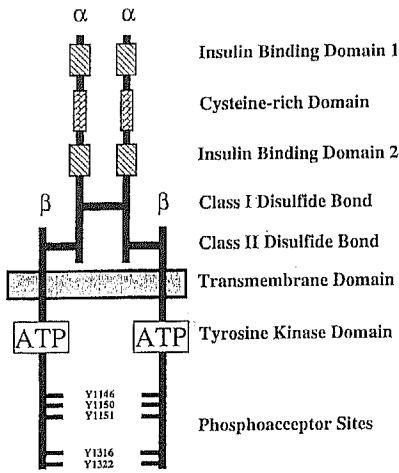
ることを見いだした。

インスリン受容体は1985年に2つのグループによってクローニングされた<sup>2)3)</sup>。その構造はすでに予想されていたように, 細胞外にある135kDaの $\alpha$ サブユニットおよび膜貫通ドメインを持つ95kDaの $\beta$ サブユニットからなる糖タンパク質である。2つのサブユニットがS-S結合(ジサルフィド結合)し $\alpha\beta$ の型をしている。この $\alpha\beta$ がやはりS-S結合して $\alpha_2\beta_2$ の四量体を形成している(図1)。インスリン受容体の $\alpha$ サブユニットにインスリンが結合し, そのシグナルにより $\beta$ サブユニットに存在するチロシンキナーゼが活性化される。インスリン受容体はIGF-1 (insulin-like growth factor-1) 受容体<sup>4)</sup>, IRR (insulin receptor related receptor)<sup>5)</sup>と相同性が高くファミリーをなしている。

インスリン受容体の分子内信号伝達についてのべる。インスリン受容体にリン酸化活性がありそれ自身もリン酸化されることはすでに述べたが, 図2aのようにその伝達方法はシスの伝達, トランスの伝達とに分かれる。私の所属していた研究室のFrattali<sup>ら</sup><sup>6)7)</sup>はインスリン受容体内信号伝達機構をインスリン受容体のハイブリッドをつくることで*in vitro*で検討した。その結果インスリン受容体の分子内リン酸化はトランスの伝達が主である。また片方の受容体へのインスリン

---

別刷請求先: 山内 恵史  
〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部老年科



Insulin Receptor

図1 インスリン受容体の構造

結合が他方の受容体のキナーゼを活性化する。基質のリン酸化には両方のキナーゼ活性が必要であることが判った(図2b)。言い換えればβサブユニットの片方だけでも異常があれば基質リン酸化活性は無くドミナント・ネガティブ (dominant negative) であることを示している。我々は未発表であるが、受容体の自己リン酸化の必要性について自己リン酸化部位の変異が共優性 (co-dominant) であることを見いだしている。

これらの結果は、インスリン受容体の変異を持つ患者の臨床所見において、αサブユニットのインスリン結合部位に変異を持つヘテロの患者はインスリン抵抗性が無いか軽く、βサブユニットのキナーゼ活性に影響を与える変異はヘテロ患者においてもインスリン抵抗性が存在することと矛盾しない<sup>8)</sup>。

最近インスリン受容体のβサブユニットの結晶化がなされその構造からもインスリンの自己リン酸化がトランスの伝達によっておこっていると証明された<sup>9)</sup>。

## II インスリン受容体以降の細胞内信号伝達

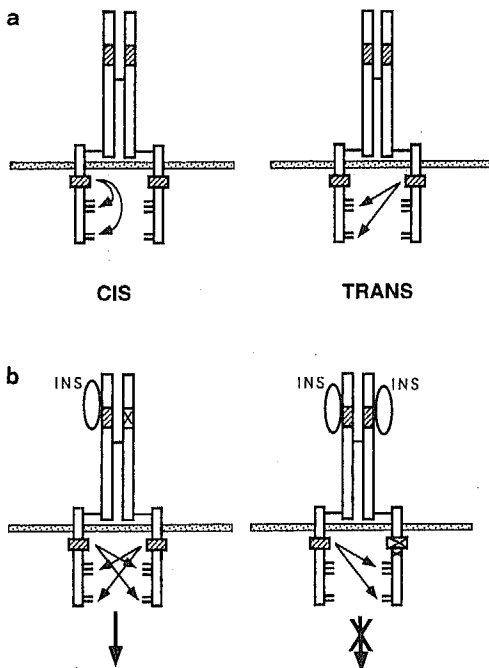


図2 インスリン受容体分子内信号伝達  
 a シスの伝達(左) トランスの伝達(右)  
 b αサブユニットに変異があっても分子外基質をリン酸化できる(左) βサブユニットに変異があると基質をリン酸化できない。

インスリン刺激によりチロシンリン酸化される細胞内物質はSDS-PAGEにより解析すると(図3)、インスリン刺激後直ちにリン酸化される95kDaのインスリン受容体βサブユニット、185kDaのタンパク質(pp185)およびしばらく遅れてリン酸化がみられる42kDaのタンパク質が知られていた。

インスリン刺激後遅れてリン酸化のみられた42kDaのタンパク質はMitogen-activated protein kinase (MAPK) であることがわかった。MAPK自身はセリンスレオニンキナーゼでMAPKのチロシン残基がリン酸化された後キナーゼの活性化がおこるためリン酸化カスケードにおけるスイッチ・キナーゼと考えられていた。この酵素は酵母からヒトまで多様なシグナル伝達系で活性化していることが明らかになった<sup>10)</sup>。この酵素はBoultonら<sup>11)</sup>によってクローニングされERK (extracellular receptor kinase) と名づけられた。MAPKとERKの使い分けはMAPK全体を示すときはMAPKと呼び、個々のタンパク質を示すときERK1, ERK2のように呼ぶ。MAPKはこれをリン酸化する上流の酵素はMEK (MAPK / ERK kinase)<sup>12)</sup>、その上の酵素はMEKK (MEK kinase) と呼ばれる。MEKはセリンスレオニン・チロシンキナーゼでMAPKのスレオニン・チロシン残基をリン酸化し活性化する。MEKKの1つがプロトオンコジーンであ

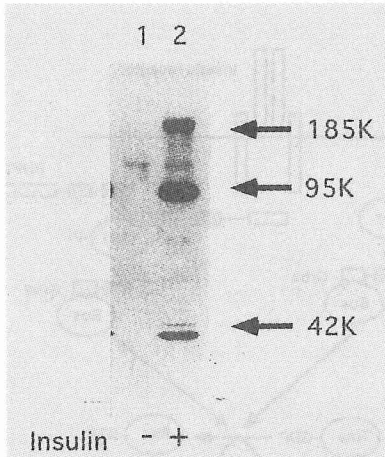


図3 インスリン刺激細胞内チロシンリン酸化物質  
 インスリン受容体を発現した細胞を刺激前(1), インスリン刺激後5分(2)で細胞をSDS化し, DTT還元下で電気泳動(SDS-PAGE)した。

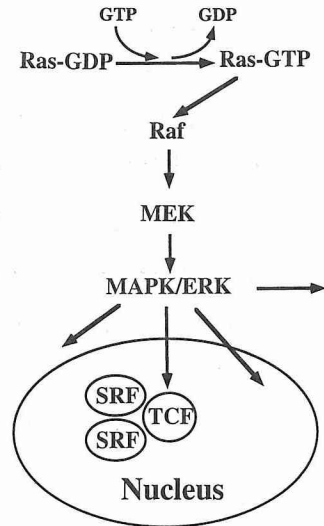


図4 RasからMAPK / ERKに至るシーム

る c-raf の生産物 Raf であることが判明した<sup>13)</sup>。Raf はセリンスレオニンキナーゼである。その Raf の上流に低分子 GTP 結合タンパク質の 1 つ Ras があり, Raf は Ras の活性型 (Ras-GTP) と直接結合することで活性化される<sup>14)</sup> (図 4)。この Ras とインスリン受容体とを結ぶ系について以下に述べる。

**A インスリン受容体細胞内基質と信号伝達**

インスリン刺激によりインスリン受容体自身もリン酸化されるが, インスリン受容体自己リン酸化部位に結合するタンパク質は存在しないか, あっても細胞内信号伝達に大きな役割をなしていない。インスリン受容体の細胞内リン酸化基質としていくつかのタンパク質が知られており, これにいくつかの重要な細胞内信号伝達物質が結合することが判っている。インスリンの細胞内信号伝達に関わっているとされているインスリン受容体リン酸化基質で良く検討されているのが IRS-1 (insulin receptor substrate-1) と Shc (Src homologous and collagen) である。

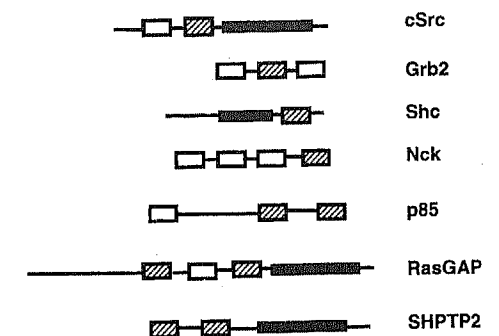
**1 IRS-1**

前述した pp185 はインスリン刺激後速やかにリン酸化されるためインスリン受容体リン酸化基質として早くから注目されてきた<sup>15)</sup>。1991年 Sun ら<sup>16)</sup> によってクローニングされ IRS-1 と名づけられた。インスリンを含む細胞増殖因子の信号伝達はリン酸化カスケードによって行われていると考えられてきた。このためインスリン受容体のリン酸化基質もリン酸化酵素活性あ

るいはなんらかの酵素活性を持つと考えられてきたが, IRS-1 は多数のチロシンリン酸化部位を持つが IRS-1 自身には酵素活性はないことが判明した。しかし IRS-1 の抗体による免疫沈降によって PI-3 キナーゼ (Phosphatidylinositol-3 kinase) 活性が共沈した。IRS-1 と PI-3 キナーゼの結合はチロシンリン酸化部位と SH2 ドメインと呼ばれるアミノ酸配列との関係である。ここで SH2 ドメイン, SH3 ドメインについて解説しておく (図 5)。

SH2 ドメイン, SH3 ドメインは非受容体型チロシンキナーゼ Src ファミリーに存在する相同性の高い領域で, その後多くの細胞内信号伝達分子にその配列が存在することが判った<sup>17)</sup>。SH2 ドメインは約 100 アミノ酸からなる配列でリン酸化チロシンを含むアミノ酸配列を認識しこれに高い親和性を示す。結合にはチロシン残基のリン酸化が必須である。SH3 ドメインは約 50 アミノ酸からなる配列でプロリンに富んだ約 7 つのアミノ酸配列 (プロリンリッチ配列) に結合する。

これまでに IRS-1 は PI-3 キナーゼの 85kDa サブユニット<sup>18)</sup>, SH-PTP2 (SH2 ドメイン含有チロシン脱リン酸化酵素)<sup>19)</sup>, Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)<sup>20)</sup> が SH2 ドメインを介して結合していることが判明しており結合部位も同定されている<sup>20)</sup>。また Nck<sup>21)</sup>, Crk<sup>22)</sup> というタンパク質も結合することが報告されているが結合部位は不明である。なお IRS-1 のリン酸化はインスリン受容体あるいは IGF-1 受容



SH2 領域  
Src Homology 領域の1つで約100個のアミノ酸からなる。  
チロシンリン酸化部位を含む配列を認識し結合する。

SH3 領域  
Src Homology 領域の1つで約50個のアミノ酸からなる。  
プロリンを多く含む配列を認識し結合する。

図5 SH2, SH3ドメイン

体に特異的にリン酸化されると考えられてきたが、インターロイキン4受容体<sup>23)</sup>、成長ホルモン受容体<sup>24)</sup>等によってもリン酸化されることが報告されたが生理的意義は不明である。

2 Shc

1992年 Pelicci ら<sup>25)</sup>はSH2ドメインをプローブにしてcDNAライブラリーを検索しShcをクローニングした。このタンパク質はPDGF (platelet-derived growth factor) 受容体などのリセプター型チロシンキナーゼによってリン酸化され、Grb2に結合することがわかった。後にShcはインスリン受容体によってもリン酸化されることが判明した<sup>26)</sup>。

a) Grb2は2つのSH3ドメイン、1つのSH2ドメインのみからできている酵素活性領域を持たないいわゆるアダプター分子である<sup>27)</sup>。Grb2はShcとIRS-1のどちらにも結合する<sup>28)</sup>。Grb2はまたSon of sevenless (Sos) とよばれるグアニンヌクレオチド交換因子と結合している<sup>29)</sup>。グアニンヌクレオチド交換因子は非活性型 Ras (Ras-GDP) を活性型 Ras (Ras-GTP) にする作用を持っている。これでインスリン受容体と Ras を活性化する系につながったことになる (図6)。

Grb2はShcとIRS-1のどちらにも結合するがどちらも Ras への信号伝達に主体であるかは議論の分かれるところである。我々を含めいくつかのグループのデータはShc-Grb2系が Ras への信号伝達のメイン・

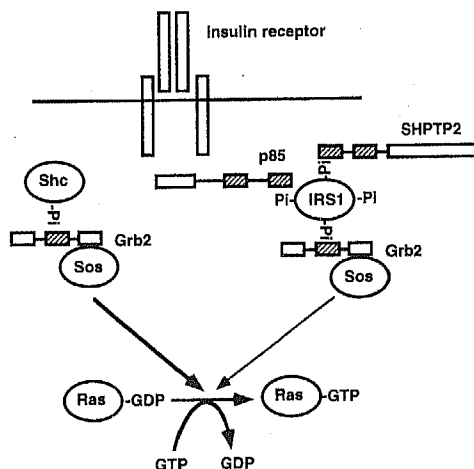


図6 インスリン受容体から Ras への信号伝達

ルートであるとしている<sup>30)-32)</sup>。またGrb2とSosの結合はSH3ドメインとプロリンリッチ配列の結合で恒常的なものであると考えられていたが、我々はMAPKによりSosのセリンスレオニン残基がリン酸化され、この結合を解離させることを見いだした<sup>33)</sup>。いわゆるネガティブ・フィードバックの一端をなしていると考えられる。

b) SH-PTP2はSH2ドメインを2個持つチロシン残基特異脱リン酸化酵素である<sup>34)</sup>。インスリンを含めた多くの細胞増殖因子受容体信号伝達の第一歩がチロシンリン酸化であるため、脱リン酸化酵素は信号伝達の抑制あるいは刺激前の状態への復帰に働くと考えられていた。しかしインスリン刺激後SH-PTP2はRasの活性化つまり細胞増殖作用において正の信号伝達を行うことが我々を含むいくつかのグループから報告された<sup>35)-37)</sup>。我々のとった方法はSH2ドメインは保存されているが遺伝子の点変異によりチロシン脱リン酸化酵素活性を持たないSH-PTP2 (PTP2C/S) あるいはSH2ドメインのみ (PTP2SH2) を過剰発現することにより、Ras-MAPK 刺激の下流にある serum response element (SRE) 活性への影響を見た (図7)。SREの反応はインスリン刺激によって増加するが、酵素活性陰性のPTP2C/SおよびPTP2SH2の発現で強く押さえられる。この抑制は常時活性型Rasの発現で回復することよりRas-MAPK系の上流にSH-PTP2が位置していることが推察された。

c) PI-3キナーゼはイノシトールリン脂質であるPI, PIP, PIP<sub>2</sub>のイノシトール環の3位を特異的にリ

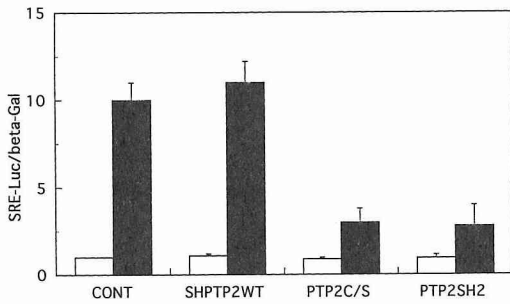


図7 不活性型 SHPTP2 によるインスリン作用の抑制

SRE-Luc 活性はインスリンにより増加するが PTP2C/S, PTP2SH2 を発現すると抑制される。(WT=wild type)

ン酸化する酵素である。110kDa の酵素活性サブユニットと 85kDa の調節サブユニットから構成されている。85K 調節サブユニットは 1991 年に 3 つのグループによって同時にクローニングされた<sup>38)-40)</sup>。続いて 110 K 活性サブユニットも Hiles ら<sup>41)</sup> によってクローニングされた。私の所属していた研究室の Holt ら<sup>42)</sup> は two-hybrid system を用い 85K 調節サブユニットと 110K 酵素活性サブユニットは、85K の 2 つの SH2 ドメインの間のアミノ酸配列と 110K の N 末端のアミノ酸配列を介して結合すること、酵素活性は 85K との結合で低下するが、リン酸化チロシンを含むアミノ酸配列が SH2 ドメインに結合することで再び活性化することを報告した。

我々は PI-3キナーゼの 85K 調節サブユニットを過剰発現することによりインスリンによる SRE の活性化が押さえられたため、PI-3キナーゼが Ras 活性化に関わっていると報告した<sup>43)</sup>。肯定的な追試<sup>44)</sup>と否定的なもの<sup>45)</sup>があり意見の一致を見ないが、現在の所 PI-3キナーゼの主たる作用とは考えられていない。逆に Ras が PI-3キナーゼを活性化するという報告もある<sup>46)</sup>。現在の所、増殖因子受容体による PI-3キナーゼの活性化の作用はリボゾーム S6 をリン酸化する pp70S6 キナーゼを刺激しトランスクリプションの調節を行うことが主であると考えられている<sup>47)</sup>。後述するが、この PI-3キナーゼがインスリン依存性糖輸送に強く関わっているという説が有力である。

### 3 その他のインスリン受容体リン酸化基質

#### a) IRS-2 (insulin receptor substrate-2)

IRS-1 遺伝子ノックアウトマウスが Tamemoto ら<sup>48)</sup> および Araki ら<sup>49)</sup> によって作製されたが、これ

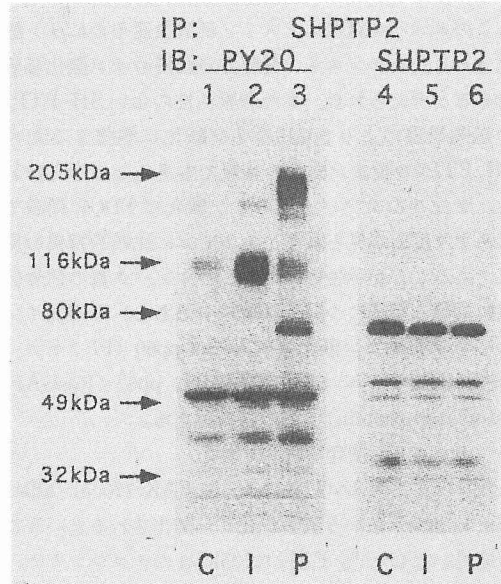


図8 新しいインスリン受容体リン酸化基質 pp115

SHPTP2 抗体にて免疫沈降後リン酸化チロシン抗体を用いて Western blotting した。(左) C : コントロール, I : インスリン刺激, P : PDGF 刺激, インスリン刺激後 115kDa のタンパク質のリン酸化がみられる。リン酸化チロシンのかわりに SHPTP2 抗体で blotting した。(右)

68kDa の SHPTP2 の量に 3 者とも変化はない。

らのマウスは予想に反して軽い成長障害と耐糖能異常を有するのみであった。このノックアウトマウスより 185-190kDa のチロシンリン酸化タンパク質が認められインスリン受容体の新たな基質と考えられた。最近このタンパク質はクローニングされ IRS-2 と名付けられ構造も明らかになった<sup>50)</sup>。IRS-1 に相似のタンパク質で Grb2, PI-3キナーゼとの結合が確認されておりインターロイキン 4 受容体によってリン酸化される 4 PS と呼ばれるタンパク質と同様であると考えられている。しかしこのタンパク質の健常動物における生理的意義については不明である。

#### b) 新しいインスリン受容体基質 pp115

前述したように IRS-1 はインスリン刺激によりリン酸化され、SH-PTP2 は SH2 ドメインを介してこの IRS-1 と結合し活性化されるとされてきた。我々は SH-PTP2 の抗体を用いて免疫沈降したところ、共沈するリン酸化タンパク質は IRS-1 が主たるタンパク質でなく、115kDa のリン酸化タンパク質 (pp115) であった<sup>51)</sup> (図 8)。

このタンパク質はインスリン刺激後速やかにリン酸化されるためインスリン受容体の直接のリン酸化基質であると考えられた。また酵素活性のないSH-PTP2の過剰発現により pp115のリン酸化は増強するためSH-PTP2の脱リン酸化の基質でもあるとも考えられた。またこのタンパク質のリン酸化はPDGF刺激ではあまり反応が見られずインスリンに比較的特異的の反応であることが示唆された。このタンパク質の信号伝達における意義については検討中である。その他インスリン受容体リン酸化基質として pp60 (PI-3キナーゼ85K 調節サブユニット様物質)<sup>52)</sup>, pp62 (RasGAP-associated protein)<sup>53)</sup>等の報告がある。

#### 4 インスリン依存性脱リン酸化

我々はインスリン刺激によってFAK (focal adhesion kinase) という物質が脱リン酸化されるということを見いだした<sup>54)</sup>。FAKは125kDaのチロシンキナーゼ活性を持つタンパク質で細胞骨格を形成するアクチンと結合する。細胞外物質 (ECM; extracellular matrix) がインテグリンを介してFAKを活性化することが判っているため<sup>55)</sup>、動脈硬化等、高インスリン血症が引き起こす合併症病変に関連したインスリンの新たな信号伝達機序として注目される。また未発表であるが我々はFAK以外にSH2ドメインに結合する90 kDaのタンパク質がインスリンによって脱リン酸化されることを見いだしている。

### III インスリン刺激と糖輸送

インスリン作用として固有のものと考えられてきた作用に血糖降下作用がある。この血糖降下作用に大きく関わっているのは、筋肉・脂肪細胞における糖輸送および肝臓・筋肉でのグリコーゲン合成と考えられている。インスリン依存性糖輸送の促進はGlut4と呼ばれる糖輸送体がインスリン刺激により細胞膜での数が増えることによる<sup>60)</sup>。インスリンの増殖因子としての作用はこれまでおもに述べてきたRasを介する系であった。この系が果たして糖輸送に関わっているかについてKozmaら<sup>57)</sup>は常時活性化型Rasの発現が糖輸送

を促進すると報告した。しかしこの作用はインスリンの糖輸送促進作用と独立しているという報告<sup>58)</sup>があり結論が出ていない。

一方いくつかのグループがPI-3キナーゼの特異的阻害剤を添加することによりインスリン依存性糖輸送が著しく抑制されることからPI-3キナーゼが糖輸送に強く関わっていると報告した<sup>59)60)</sup>。この作用はpp70S6キナーゼを抑制してもみられることから、pp70S6キナーゼ活性化とは異なった系を介していると考えられる<sup>61)</sup>。PI-3キナーゼはグリコーゲン合成も活性化するという報告がある<sup>62)</sup>。しかしインスリンばかりでなく様々な細胞増殖因子がPI-3キナーゼを活性化するのにも関わらず、なぜインスリンのみが糖輸送を促進するのか。ことにIGF-1受容体はインスリン受容体と相同性が高いが細胞増殖因子としての作用が強いと考えられる。しかし実験的にはインスリン受容体と信号伝達の機序・反応の面での違いは見いだせない<sup>63)</sup>。なぜ生理作用が生体内では大きく異なるのか。これについては筋肉・脂肪細胞にインスリン受容体がGlut4とともに多く発現しているため特異的な作用でないとする考えもある。またインスリンの半減期が短いことも関係しているかも知れない。

#### おわりに

ここで述べてきたインスリン作用の説明の多くが糖代謝作用でなく増殖因子作用の説明になってしまった。これはインスリン受容体と糖輸送体Glut4を結ぶ系がいまだにミッシング・リングであるためである。この未発見の輪に対する検索ももちろん多くの研究室で多くの研究者が精力的に進めている。私もこのなかの一人としてインスリン作用の解明の一端を担えるよう努力していきたいと思う。

この総説を書く機会を下さった橋爪潔志教授と3年半の間様々な助言をしてくださった偉大なボス、アイオワ大学生理学教室 Jeffrey E Pessin 教授に深謝します。

#### 文 献

- 1) Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR: Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* 298: 667-669, 1982
- 2) Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID, Roth RA, Rutter WJ: The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40: 747-758, 1985

- 3) Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, Pawson T: Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313: 756-761, 1985
- 4) Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang FT, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le BT, Kathuria S, Chen E, Pawson T: Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5: 2503-2512, 1986
- 5) Shier P, Watt, VM: Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J Biol Chem* 264: 14605-14608, 1989
- 6) Frattali AL, Treadway JL, Pessin JE: Insulin/IGF-1 hybrid receptors: implications for the dominant-negative phenotype in syndromes of insulin resistance. *J Cell Biochem* 48: 43-50, 1992
- 7) Frattali AL, Pessin JE: Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin / insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J Biol Chem* 268: 7393-7400, 1993
- 8) Taylor SI: Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* 41: 1473-1490, 1992
- 9) Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA: Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372: 746-754, 1994
- 10) Kyriakis JM, Force TL, Rapp UR, Bonventre, JV, Avruch J: Mitogen regulation of c-Raf-1 protein kinase activity toward mitogen-activated protein kinase-kinase. *J Biol Chem* 268: 16009-16019, 1993
- 11) Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD: ERKs: a family of protein-serine / threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65: 663-675, 1991
- 12) Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL: The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258: 478-480, 1992
- 13) Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigam DL, Rapp UR, Avruch J: Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358: 417-421, 1992
- 14) Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi SE, 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* 364: 308-313, 1993
- 15) White MF, Maron R, Kahn CR: Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 318: 183-186, 1985
- 16) 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* 352: 73-77, 1991
- 17) Koch, CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T: SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252: 668-674, 1991
- 18) Backer JM, Myers MJ, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, Goldstein BJ, White MF: Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 11: 3469-3479, 1992
- 19) Kuhne MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng, GS: The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem* 268: 11479-11481, 1993
- 20) Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers MJ, Backer JM, Ullrich A, White MF: The SH2 / SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J* 12: 1929-1936, 1993

- 21) Lee CH, Li W, Nishimura R, Zhou M, Batzer AG, Myers MJ, White MF, Schlessinger J, Skolnik EY : Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin-stimulated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 11713-11717, 1993
- 22) White MF, Kahn CR : The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269 : 1-4, 1994
- 23) Wang LM, Myers MJ, Sun XJ, Aaronson SA, White MF, Pierce JH : IRS-1 : essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. *Science* 261 : 1591-1594, 1993
- 24) Souza SC, Frick GP, Yip R, Lobo RB, Tai LR, Goodman HM : Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 269 : 30085-30088, 1994
- 25) Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T, Pelicci PG : A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70 : 93-104, 1992
- 26) Pronk GJ, McGlade J, Pelicci G, Pawson T, Bos JL : Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins. *J Biol Chem* 268 : 5748-5753, 1993
- 27) Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar SD, Schlessinger J : The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70 : 431-442, 1992
- 28) Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee, CH, Lowenstein EJ, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J : The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260 : 1953-1955, 1993
- 29) Buday L, Downward J : Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73 : 611-620, 1993
- 30) Yamauchi K, Pessin JE : Enhancement or inhibition of insulin signaling by insulin receptor substrate 1 is cell context dependent. *Mol Cell Biol* 14 : 4427-4434, 1994
- 31) Sasaoka T, Langlois WJ, Leitner JW, Draznin B, Olefsky JM : The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J Biol Chem* 269 : 32621-32625, 1994
- 32) Pruett W, Yuan Y, Rose E, Batzer AG, Harada N, Skolnik EY : Association between GRB2 / Sos and insulin receptor substrate 1 is not sufficient for activation of extracellular signal-regulated kinases by interleukin-4 : implications for Ras activation by insulin. *Mol Cell Biol* 15 : 1778-1785, 1995
- 33) Waters SB, Yamauchi K, Pessin JE : Insulin-stimulated disassociation of the SOS-Grb2 complex. *Mol Cell Biol* 15 : 2791-2799, 1995
- 34) Freeman RJ, Plutzky J, Neel BG : Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase : a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 11239-11243, 1992
- 35) Noguchi T, Matozaki T, Horita K, Fujioka Y, Kasuga M : Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Mol Cell Biol* 14 : 6674-6682, 1994
- 36) Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR, Pessin JE : Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 664-668, 1995
- 37) Milarski KL, Saltiel AR : Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. *J Biol Chem* 269 : 21239-21243, 1994
- 38) Otsu M, Hiles ID, Gout I, Fry MJ, Ruiz LF, Panayotou G, Thompson A, Dhand R, Hsuan J, Totty NF, Gout I, Waterfield MD : Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T / pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell* 65 : 91-104, 1991
- 39) Escobedo JA, Navankasattusas S, Kavanaugh WM, Milfay D, Fried VA, Williams LT : cDNA cloning



- of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF beta-receptor. *Cell* 65: 75-82, 1991
- 40) Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, Schlessinger J: Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression / cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell* 65: 83-90, 1991
  - 41) Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz LF, Thompson A, Totty NF, Waterfield MD: Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 70: 419-429, 1992
  - 42) Holt KH, Olson AL, Moye RW, Pessin JE: Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high-affinity interactions between distinct domains within the p110 and p85 subunits. *Mol Cell Biol* 14: 42-49, 1994
  - 43) Yamauchi K, Holt K, Pessin JE: Phosphatidylinositol 3-kinase functions upstream of Ras and Raf in mediating insulin stimulation of c-fos transcription. *J Biol Chem* 268: 14597-14600, 1993
  - 44) Jhun BH, Rose DW, Seely BL, Rameh L, Cantley L, Saltiel AR, Olefsky J M: Microinjection of the SH2 domain of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits insulin-induced DNA synthesis and c-fos expression. *Mol Cell Biol* 14: 7466-7475, 1994
  - 45) Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Ando A, Kotani K, Kitamura T, Kitamura Y, Ueda H, Stephens L, Jackson TR, Otsu M, Waterfield MD, Kasuga M: 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7415-7419, 1994
  - 46) Rodriguez VP, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J: Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370: 527-532, 1994
  - 47) Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J: PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370: 71-75, 1994
  - 48) Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, Kasuga M, Yazaki Y: Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 182-186, 1994
  - 49) Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag BIII, Johnson RS, Kahn CR: Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372: 186-190, 1994
  - 50) Sun XJ, Wang LM, Zang Y, Myer MG, Lane WS, Pierce JH, White MF: Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* 377: 173-177, 1995
  - 51) Yamauchi K, Ribon V, Saltiel AR, Pessin JE: Identification of the major SHPTP2-binding protein that is tyrosine -phosphorylation in response to insulin. *J Biol Chem* 270: 17716-17722, 1995
  - 52) Lavan BE, Lienhard GE: The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 268: 5921-5928, 1993
  - 53) Hosomi Y, Shii K, Ogawa W, Matsuba H, Yoshida M, Okada Y, Yokono K, Kasuga M, Baba S, Roth RA: Characterization of a 60-kilodalton substrate of the insulin receptor kinase. *J Biol Chem* 269: 11498-11502, 1994
  - 54) Knight JB, Yamauchi K, Pessin JE: Divergent insulin and platelet-derived growth factor regulation of focal adhesion kinase (pp125FAK) tyrosine phosphorylation, and rearrangement of actin stress fibers. *J Biol Chem* 270: 10199-11203, 1995
  - 55) Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS: Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol* 119: 905-912, 1992

- 56) James DE, Strube M, Mueckler M: Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338: 83-87, 1989
- 57) Kozma L, Baltensperger K, Klarlund J, Porras A, Santos E, Czech MP: The ras signaling pathway mimics insulin action on glucose transporter translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4460-4464, 1993
- 58) Hausdorff SF, Frangioni JV, Birnbaum MJ: Role of p21ras in insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 269: 21391-21394, 1994
- 59) Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M, Holman GD: Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem J* 300: 631-635, 1994
- 60) Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Kotani K, Kojima A, Waterfield MD, Kasuga M: 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, 1995
- 61) Fingar DC, Hausdorff SF, Blenis J, Birnbaum MJ: Dissociation of pp70 ribosomal protein S6 kinase from insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 268: 3005-3008, 1993
- 62) Shepherd PR, Nave BT, Siddle K: Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthetase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J* 305: 25-28, 1995
- 63) Steele PG, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA: Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 263: 11486-11492, 1988

(7. 10. 12 受稿)