

제2형 당뇨병 (OLETF rat)에서 라미프릴의 장기투여가 $G_{i\alpha 2}$ 단백질과 Protein Tyrosine Phosphatase 1B에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학 교실, 가톨릭의과학연구소¹

이정민·홍옥기¹·권혁상·문성대·장상아·손현식·윤건호·차봉연·강성구

The Long-Term Effect of Ramipril on $G_{i\alpha 2}$ -Protein and Protein Tyrosine Phosphatase 1B in an Animal Model of Type 2 Diabetes (OLETF rat)

Jung Min Lee, Ok Ki Hong¹, Hyuk Sang Kwon, Sung Dae Moon, Sang Ah Chang, Hyun Shik Son, Kun Ho Yoon, Bong Yun Cha, Sung Koo Kang

Division of Endocrinology & Metabolism, Department of Internal medicine, Catholic Research Institutes of medical Science¹, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

- Abstract -

Background: The regulation of tyrosine phosphorylation/dephosphorylation is an important mechanism in various intracellular metabolism. Also impaired insulin signal transduction is important in pathogenesis of type 2 diabetes. It has been reported that PTP1B is a negative regulator of insulin action, and $G_{i\alpha 2}$ -protein is related to the regulation of PTP1B. Herein we investigated the long-term effects of ramipril on PTP1B/insulin signal protein interaction and the relation between $G_{i\alpha 2}$ and PTP1B in animal model of type 2 diabetes (OLETF rat).

Methods: OLETF rats and age-matched LETO rats were divided into two groups. One group of rats received ramipril (10 mg/kg body weight) for 12 weeks, and another group did not. Finally, each group was divided into 2 subgroups, with or without insulin injection intravenously, before sacrifice. After sacrifice, tissues extracts of liver, hind limb muscle, and epididymal fat were obtained for quantification of PTP1B, $G_{i\alpha 2}$, and several insulin signal proteins by western blotting.

Results: In liver and muscle, the levels of basal PTP1B and activated PTP1B of OLETF rats treated with ramipril and insulin were significantly decreased. The levels of $G_{i\alpha 2}$, activated IRS-2, and activated p-85 α were significantly increased in OLETF rats treated with ramipril and insulin. In adipose tissue, the levels of $G_{i\alpha 2}$ and activated p-85 α of OLETF rats treated with ramipril and insulin were slightly increased as in liver and muscle. But, the levels of basal PTP1B and activated PTP1B were significantly increased. And, the levels of activated IRS-1 and activated IRS-2 were decreased.

Conclusion: These results suggest that the improvement of insulin sensitivity by treatment with ramipril was related to the decreased level of activated PTP1B. Also, we could suggest that the changes of activated PTP1B level was related with the changes of $G_{i\alpha 2}$ -protein. However, the results of adipose tissue were different from those of liver and muscle. So it seemed likely that there would be various major modulators for regulation of insulin signal pathway according to tissue (**J Kor Diabetes Assoc 30:25~38, 2006**).

Key Words: OLETF rat, PTP1B, $G_{i\alpha 2}$ -protein, Insulin signal proteins

서 론

제2형 당뇨병은 간, 지방, 근육 등과 같은 인슐린의 표적 장기의 인슐린저항성에 의하여 발생하는 질환이다¹⁾. 정상적인 인슐린의 작용은 복잡한 세포내 신호전달계를 경유하여 글리코겐의 합성, 포도당 수송, 지방형성 등을 증가시키고 포도당생성, 지방분해, 글리코겐분해 등을 감소시키는 작용을 한다^{2,3)}. 제2형 당뇨병의 원인인 인슐린저항성의 발생기전을 알아보기 위하여 인슐린수용체의 분자구조 및 기능과 다양한 인슐린의 세포내 신호전달 물질의 작용기전에 대한 연구가 이미 수십 년 동안 진행되어 왔다. 그 결과 인슐린에 의하여 유도되는 세포내 여러 가지 작용과 관련된 다양한 신호전달계가 규명되었다. 그러나 이런 신호전달계를 사이에 복잡한 연관성이 관찰되고 조직이나 실험 방법에 따라 상이한 결과를 나타내고 있어 정확하게 어떤 과정에 의하여 인슐린저항성이 발생되는지는 향후 해결해야할 중요한 과제로 남아있다. 인슐린수용체는 인슐린과 결합하면 인슐린 수용체의 β -subunit에서 자가인산화 (autophosphorylation)가 진행되어 tyrosine kinase 활성도를 가지게 된다. 인슐린 수용체 tyrosine kinase는 인슐린수용체기질 (IRS-1, IRS-2)들을 활성화 시키면서 하부 신호전달계의 이차적인 인산화와 탈인산화 연쇄작용을 유도한다고 알려져 있다⁴⁾. 활성화된 IRS-1과 IRS-2에 의하여 phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase)가 활성화 되고 이 PI-3 kinase에 의하여 serine/threonine kinase인 Akt/PKB (protein kinase B)가 활성화 되면 인슐린의 표적세포에서 인슐린의 세포내 작용이 일어나게 되는 것이다. 인슐린수용체는 인슐린의 작용과 밀접하게 연결되어 있지만 이 수용체가 갖는 tyrosine kinase 작용만으로는 다양한 세포내 인슐린 작용을 모두 설명할 수는 없다. 그러나 인슐린수용체는 인슐린 자극에 의하여 나타나는 각종 세포내 대사들을 연결시켜줄 수 있는 독특한 신호전달 물질을 규제 또는 조절할 것으로 믿어지고 있다.

인슐린 표적세포에 널리 발현되는⁵⁾ protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)는 과발현 세포를 이용한 실험에서 인슐린의 신호 전달계가 억제되며⁶⁻⁹⁾, PTP1B를 억제하는 경우 인슐린의 작용이 증강된다고 보고되었다^{10,11)}. 그러므로 PTP1B는 인슐린수용체 kinase의 활성화에 의한 신호전달이 시작된 후에 신호전달이 더 이상 과다하게 진행하지 못하게 하고 불충분한 신호전달을 방지할 수 있는 생리적인 조절작용을 한다고 알려져 있다. PTP1B 이외에 SHP2도 활성화된 수용체 kinase의 탈인산화에 영향을 주는 phosphatase라고 알려졌지만 현재까지는 PTP1B가 가장 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다. 한편 PTP1B의 활성도는 G 단백질에 의하여 조절된다고 보고 된 바 있다¹²⁾. G 단백질은 많은 수용체들의 세포내 작용기전에서 신호전달의 조절 및 증폭 기능을 수행한다. 또한 G 단백질의 몇몇 subunit들은 인슐린

작용에 관여하며 인슐린의 작용에 매우 다양한 물질이 관여할 것이라는 점을 감안하면 G_i 단백질이 PTP1B의 활성도를 조절하여 인슐린의 세포내 작용에 관여할 가능성을 생각할 수 있다.

최근 대사성증후군의 요소들인 고혈압, 비만, 고지질혈증도 인슐린저항성과 관련되어 발생한다는 사실이 밝혀졌고 항고혈압제인 안지오텐신전환효소억제제를 이용한 임상연구들 중 이 약제에 의해 제2형 당뇨병의 발생 위험도 감소가 관찰되어¹³⁻¹⁵⁾ 이 약제가 인슐린저항성을 개선시키는 작용에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 안지오텐신-II는 인슐린 작용과 반대하여 간에서의 당생성을 증가시키고 glycogen synthase를 억제하여 혈당을 증가시킨다고 보고되기도 하였고¹⁶⁾ 초기 인슐린 신호 전달계에 대한 영향을 주기보다는 oxidative stress를 증가시켜 PI-3 kinase 이후의 전달계에 영향을 주어 인슐린저항성을 증가시킨다고 보고하기도 하였다¹⁷⁾. 그러나 안지오텐신-II가 인슐린저항성을 일으키는 기전이 다양하게 제시되고 있고 안지오텐신전환효소억제제를 이용한 연구에서 안지오텐신전환효소억제제가 안지오텐신을 감소시키는 한 가지 작용이 아니라 bradykinin의 증가와 같은 부가적인 작용이 모두 인슐린저항성을 감소시키는 기전과 연관이 있을 것으로 보고하는 등 다양한 결과를 보이고 있다. 이에 인슐린저항성에 의한 제2형 당뇨병의 자연 발생 동물모델에서 안지오텐신전환효소억제제인 ramipril의 장기 투여가 G_i 단백질과 PTP1B와 인슐린 신호전달계에 미치는 효과를 관찰하여 ramipril이 인슐린저항성 개선에 영향을 주는 기전으로 인슐린의 포도당대사 신호전달계와 G_i-단백과 PTP1B의 관계를 알아보고자 이 연구를 계획하였다.

방 법

1. 실험동물

실험동물로는 제2형 당뇨병의 유전적 자연 발생 모델인 Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty (OLETF) 수컷 쥐와 대조군인 Long-Evans-Tokushima Otsuka (LETO) 수컷 쥐를 Otsuka Pharmaceutical Tokushima Research Institute (Tokushima, Japan)에서 출생 후 4주가 지난 상태로 공급받았다. 이 실험동물을 가톨릭대학교 의학연구소 실험동물실에서 실험실 조건 하 (23 ± 1°C, 12L:12D)에서 표준 쥐 사료 (Samyangsa, Seoul, Korea)와 물로 출생 후 20주까지 키웠다. 출생 후 20주된 총 27마리의 OLETF 쥐와 LETO 쥐는 4그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 무작위로 추출된 OLETF 쥐는 ramipril (Aventis Pharmaceutical, Frankfurt, Germany) 처리군 (10 mg/kg, n=8)과 비처리군 (n=8)으로 나누어 실험을 실시하였다. Ramipril은 물에 녹여 공

급하였으며 먹이는 일정량만을 공급하였다. LETO 쥐도 동일한 조건하에서 ramipril 처리군 (n=6)과 비처리군 (n=5)으로 나누어 실시하였다. 매일 먹이와 물의 양을 기록하였고, 일주일 간격으로 체중과 혈당을 측정하였다. Ramipril 처리 12주 후 각각의 실험동물들은 마취를 하고 인슐린의 주요 표적세포인 간, 근육 (hindlimb muscle), 부고환 지방을 분리하였다. 이때 각 실험군마다 희생 전에 다시 무작위로 인슐린 처리군과 비처리군으로 나누어 인슐린 처리군은 인슐린 (10U/kg)을 정맥 주사한 뒤 90초 후에 조직을 분리하였다. 적출한 조직은 -80°C 에 저장한 후에 용해질 침전과 단백질 정량에 사용하였다.

2. 경구당부하검사 (Oral glucose tolerance test)

Ramipril 처리 전과 처리 시작 후 12주에 경구당부하검사를 실시하였다. 12시간을 먹이를 주지 않고 물만 공급한 뒤에 25% 포도당 용액을 (2 g/kg) 투여한 후에 혈당의 변화를 측정하였다. 꼬리에서 얻은 혈액 시료는 휴대용 혈당 측정기 (Precision glucose meter, Abbott Laboratories, North Chicago, IL)를 이용하여 혈당을 측정하였다.

3. 용해질 침전과 단백질 정량 (Lysate precipitation and protein assays)

얻린 각 조직들은 조직 부피보다 10배 많은 차가운 용해 완충액 [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 1% NP-40, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM PMSF, 10 mg/mL aprotinin, 10 mg/mL leupeptin, and 0.1 mg/mL soybean Inhibitor]을 넣고 Polytron homogenizer (Brinkmann Instrument, Westbury, NY)를 사용하여 파쇄 하였다. 파쇄된 시료는 4°C 냉장고에서 1시간 동안 용해시킨 후에 4°C 에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 지방과 침전물을 제거한 후에 상층액만을 모았다. BSA (Bovine serum albumin)를 표준시료로 사용하여 각각의 단백질을 Bradford 법¹⁹⁾으로 정량하였다.

4. 면역침전 (Immunoprecipitation)

면역침전을 위하여 500 μg /50 μL 의 시료를 Tris-완충액 (20 mM Tris, pH 7.4, 5 mM EDTA, 10 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 100 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 1% NP-40, 1 mM PMSF, 10 mg/mL aprotinin, 10 mg/mL leupeptin)에 넣어 녹인 다음, 시료와 30 μL sephadex protein A (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) 또는 protein G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)와 2~4 mg/mL anti-PY99 monoclonal antibody, anti-IR- β polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 잘 섞은 다음 4°C 에서 밤새 배양하였다. 배양 후 4°C 에서 15,000 rpm으로 1

분간 원심분리를 하여 상층액은 제거하고 침전물만 모았다. 단백질소 억제제 (PMSF, aprotinin, leupeptin)가 포함되어지 않은 Tris-용해 완충액 1 μL 로 2번, 2 mM Na_3VO_4 을 포함하는 PBS 완충액 1 μL 로 2번 세척하고 원심분리를 병행하였다. 마지막 원심분리 후 상층액은 버리고 남은 침전물에 20 μL 4 X Lammlie sample 완충액 (0.625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol)을 넣어 100°C 에서 5분간 끓였다. 15,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액만 모아 전기영동 시료로 사용하였다.

5. Western blotting

면역침전을 실시한 후 얻은 시료 외에 단백질 정량을 한 시료는 Lammlie sample 완충액으로 녹여 100°C 에서 5분간 끓인 후 상층액만 전기영동에 사용하였다. 전기영동은 10% SDS-PAGE 또는 8% SDS-PAGE로 실시하였고, 전기 영동한 젤을 0.45 μm nitrocellulose 막에 전이시켰다. Nitrocellulose 막은 5% 탈지분유를 함유한 Tris-완충 식염수 (TBS; 20 mM Tris/HCl, 137mM NaCl, pH 7.5)로 1시간 동안 차단시킨 다음, 각각의 일차 항체 용액: anti-IRS-1 polyclonal antibody, anti-phospho-IRS-1 polyclonal antibody, anti-PT P1B polyclonal antibody (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), anti-IRS-2 polyclonal antibody, anti-p-85 α polyclonal antibody, anti-PY99 monoclonal antibody, anti-IR- β polyclonal antibody, anti- $G_{i\alpha 2}$ polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에 넣어 4°C 에서 밤새 배양한 후 TBST (TBS + 0.1% Tween 20)로 3회 세척하였다. 그 이후 HRP-conjugated anti-rabbit or mouse 이차 항체 용액 (1:1,000 희석)으로 1시간 동안 상온에서 배양하였으며, 상기와 동일하게 다시 세척한 후 enhanced chemiluminescence (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)를 사용하여 X선-필름으로 발색시켰다. 단백질 밴드 강도는 densitometer VSD (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)를 사용하여 측정하였다.

6. 통계적 검정

각 실험은 3회 이상 반복하였고 실험결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm S.E.)로 표시하였다. 통계적인 유의성 검정은 one way ANOVA 및 unpaired Student's *t* test를 이용하였으며 유의성은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. Ramipril 처리에 의한 실험동물의 체중 변화와 당 대사

체중은 대조군인 LETO 쥐와 비교하여 OLETF 쥐에서

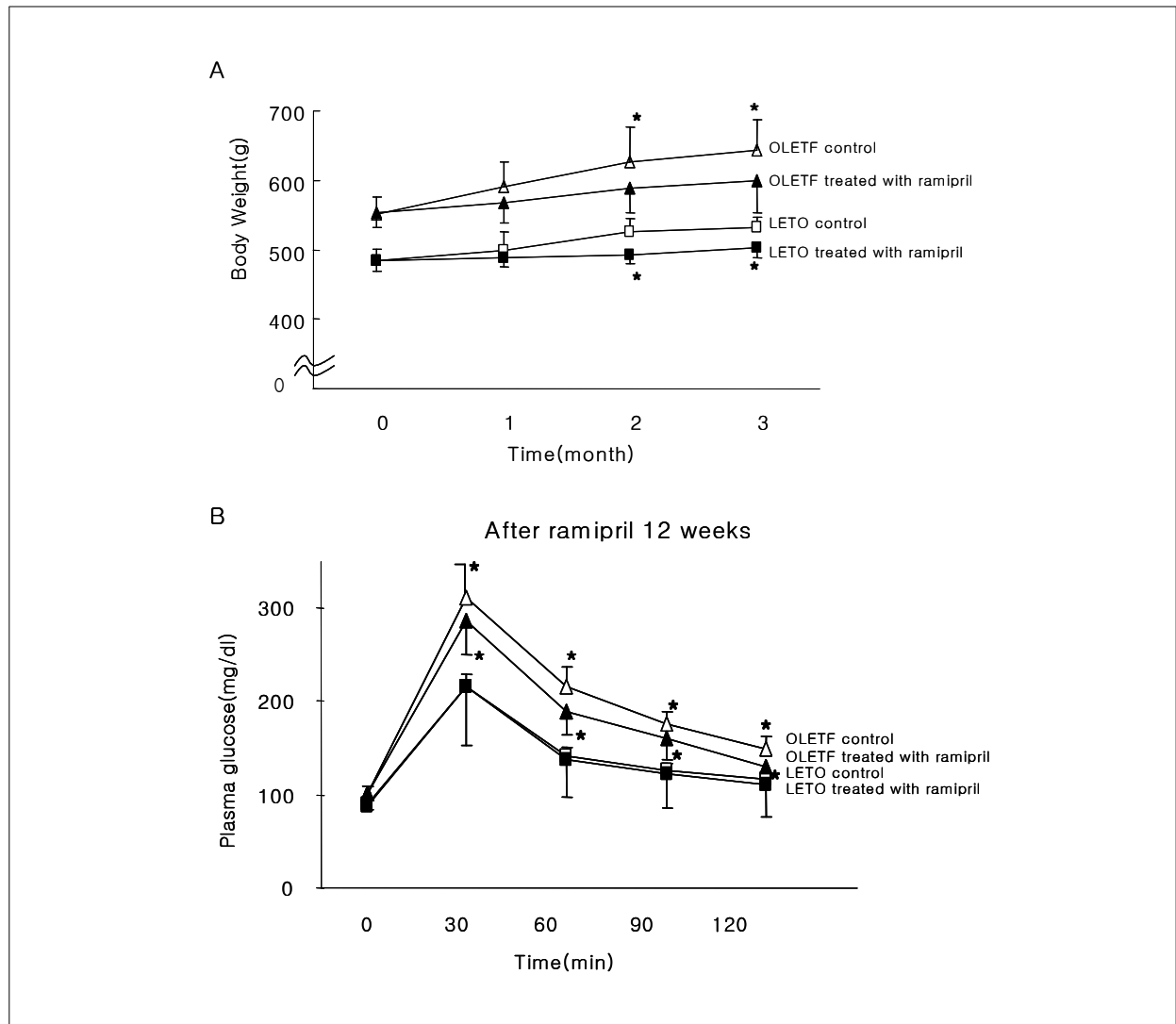


Fig. 1. The changes of body weight (A), and the differences of oral glucose tolerance test (B) of LETO and OLETF rats with or without ramipril treatment. Oral glucose tolerance tests were done at 12 weeks after ramipril treatment. Data were expressed as mean \pm SE. * $P < 0.05$

시간이 경과함에 따라 유의하게 증가하였다. Ramipril 처리군과 비처리군의 체중은 LETO 쥐와 (502.3 ± 14.0 vs. 532.1 ± 15.8 g, $P < 0.05$) OLETF 쥐에서 (598.8 ± 46.1 g vs. 643.5 ± 43.2 g, $P < 0.05$) 모두 ramipril 처리군의 체중이 비처리군에 비하여 적었다 (Fig. 1A). Ramipril 처리 12주 후 희생 전에 시행한 당 부하 검사 결과에서 LETO 쥐에서는 ramipril 처리군과 비처리군 간의 유의한 차이를 보이지 않았지만 OLETF 쥐에서 당 부하 후 30분, 60분, 90분, 120분의 혈당치 모두가 ramipril 처리군이 비처리군에 비해 낮았다 (Fig. 1B).

2. Ramipril 처리가 PTP1B의 발현에 미치는 효과

(1) 간

희생 전 인슐린을 주사하지 않은 OLETF 쥐에서 ramipril

처리군과 비처리군의 기저 상태의 PTP1B의 양은 비슷하였다. 그러나 인슐린을 주사한 OLETF 쥐에서 기저 상태 PTP1B의 양은 ramipril 처리군에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 2A, left panel). 마찬가지로 활성화된 PTP1B의 양을 비교한 결과에서도 인슐린을 주사하지 않은 OLETF 쥐에서 ramipril 처리에 따른 차이는 보이지 않았지만 인슐린 주사한 OLETF 쥐에서는 ramipril 처리군에서 활성화된 PTP1B의 양이 유의하게 낮았다 (Fig. 2A, right panel).

(2) 근육

희생 전에 인슐린을 주사하지 않은 OLETF 쥐의 후지근 (hind limb)에서는 기저 상태 PTP1B와 활성화된 PTP1B의 양은 모두 오히려 ramipril을 처리한 OLETF 쥐에서 약간 증가되는 경향을 보였지만 통계적인 의의는 없었다. 그러나

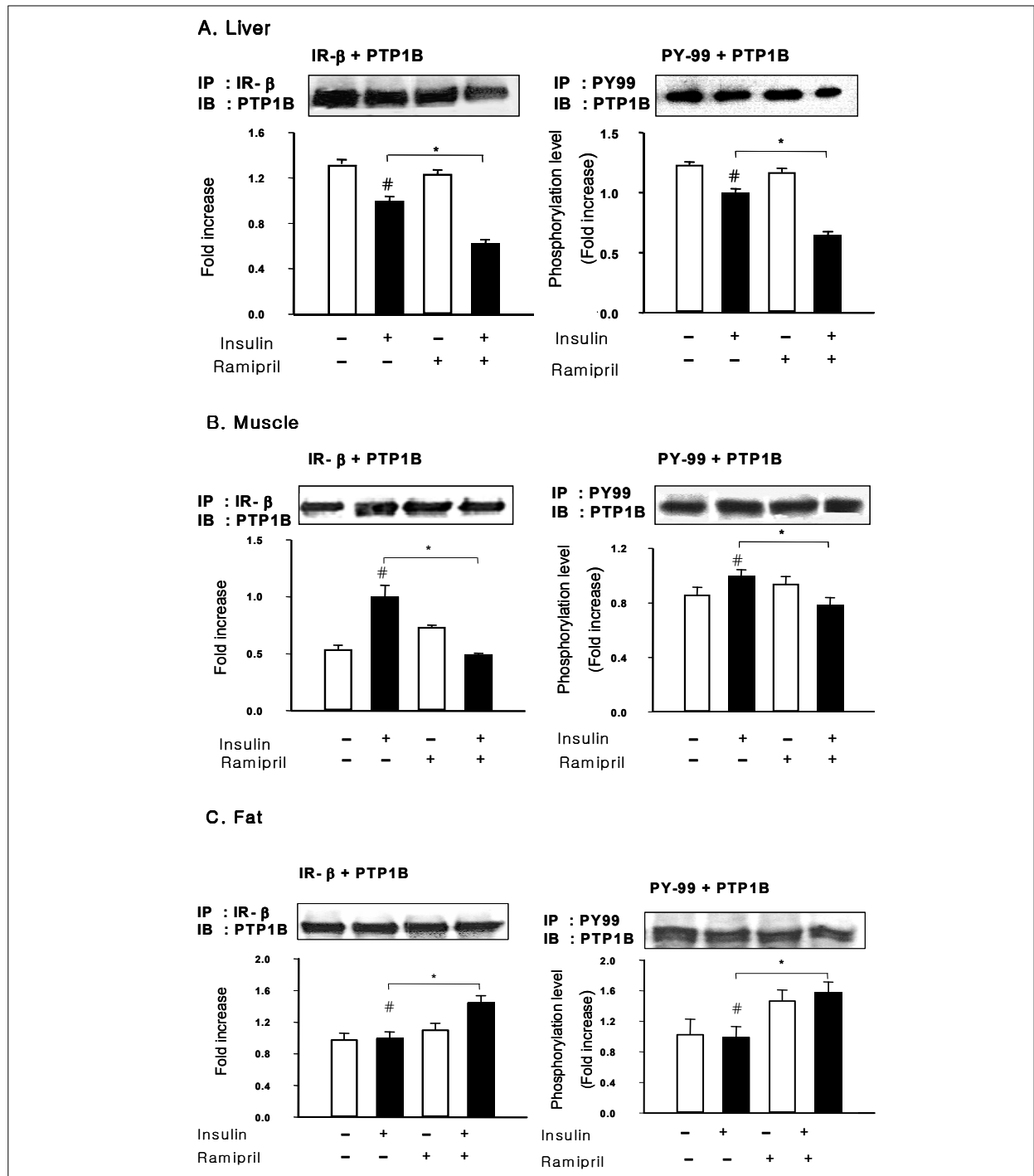


Fig. 2. Effects of ramipril on tyrosine phosphorylation of PTP1B in liver (A), muscle (B), and fat tissue (C) of OLETF rats with or without ramipril treatment. The proteins were isolated with extraction buffer as described in methods and kept on ice. After centrifugation, aliquots of the supernatant were immunoprecipitated (IP) with anti-IR- and immunoblotted (IB) with anti-PTP1B antibodies (left panel of A, B, C), IP with anti-phosphotyrosine antibodies and IB with anti-PTP1B antibodies (right panel of A, B, C). Data were expressed as mean \pm SE and represented by fold increase comparing with the control protein (#) that were normalized to 1. * $P < 0.05$

인슐린을 주사한 OLETF 쥐에서는 기저 상태 PTP1B와 활성화된 PTP1B의 양은 모두 ramipril을 처리한 OLETF 쥐에서 낮았다 (Fig. 2B).

(3) 지방

인슐린 처리와 상관없이 ramipril을 처리한 OLETF 쥐에서 기저 상태의 PTP1B와 활성화된 PTP1B 양이 모두 인슐

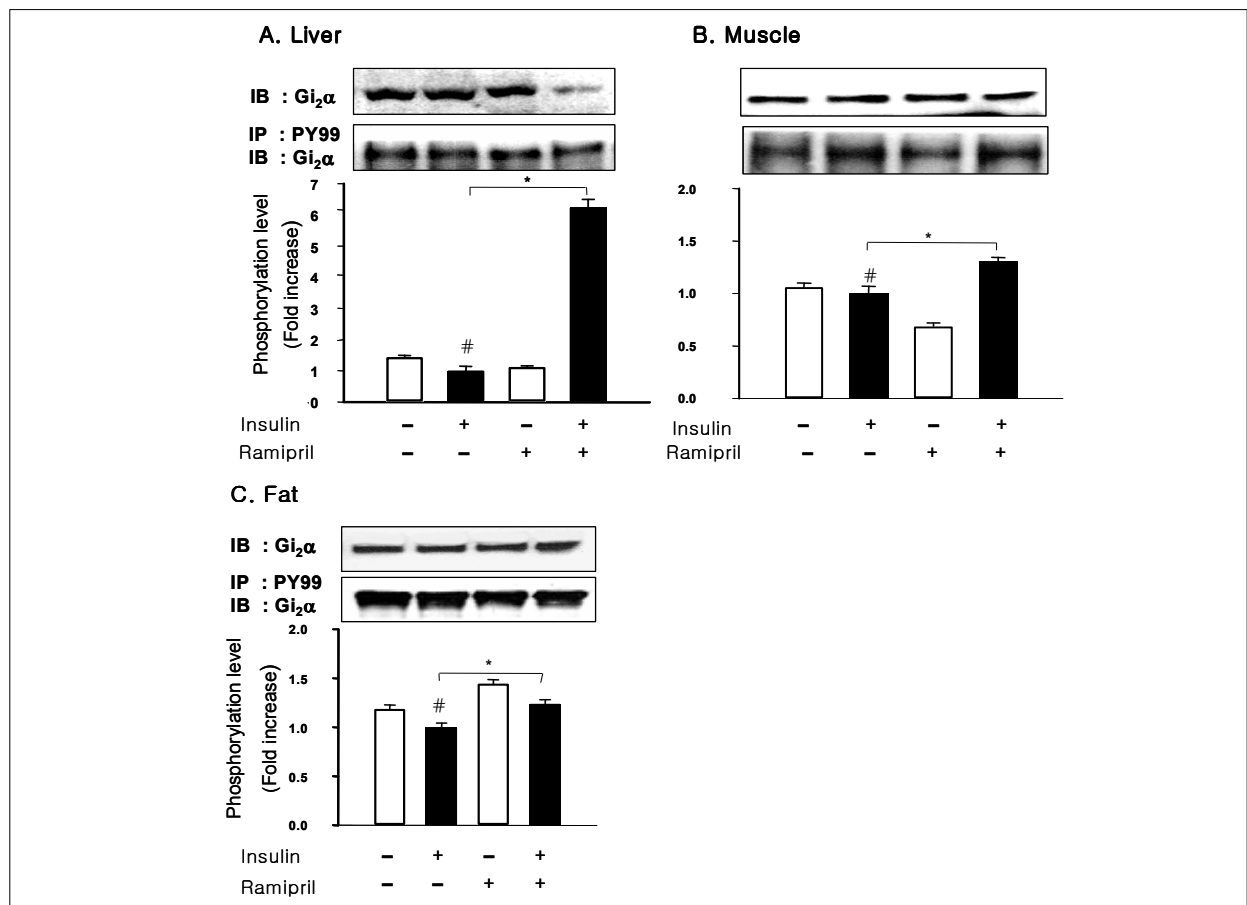


Fig. 3. Effects of ramipril on $Gi_2\alpha$ -protein in liver (A), muscle (B), and adipose tissue (C) of OLETF rats with or without ramipril treatment. The proteins were isolated with extraction buffer as described in methods and kept on ice. After centrifugation, aliquots of the supernatant were immunoblotted (IB) with anti- $Gi_2\alpha$ antibodies (upper blot), and were immunoprecipitated (IP) with anti-phosphotyrosine antibodies and immunoblotted with anti- $Gi_2\alpha$ antibodies (lower blot). Data were expressed as mean \pm SE and represented by fold increase comparing with the control protein (#) that were normalized to 1. * $P < 0.05$

린 자극에 의하여 유의하게 증가하였다 (Fig. 2C).

3. Ramipril 처리가 $Gi_2\alpha$ 단백질의 발현에 미치는 효과

인슐린을 주사하지 않은 OLETF 쥐의 간과 근육에서는 ramipril 처리에 의한 $Gi_2\alpha$ 단백질의 양적인 현저한 차이는 없었으나 지방조직에서는 $Gi_2\alpha$ 단백질이 증가된 경향을 보였다. 그러나 인슐린을 주사한 OLETF 쥐에서는 ramipril 처리에 의하여 간과 근육과 지방조직 모두에서 인산화된 $Gi_2\alpha$ 단백질의 양이 유의하게 증가되었다 (Fig. 3A-C).

4. Ramipril 처리에 의한 $IR-\beta$, IRS-1, IRS-2, p-85a (PI-3 kinase) 활성도의 변화

(1) 간

인슐린 신호 전달계를 자극하기 위하여 인슐린을 주사한 OLETF 쥐에서 활성화된 $IR-\beta$ 와 IRS-1의 양은 오히려

ramipril 처리군에서 낮았다 (Fig. 4A & B) 그러나 활성화된 IRS-2와 p-85a의 양은 ramipril 처리군에서 증가되었다 (Fig. 4C & D).

(2) 근육

회생 전에 인슐린을 주사한 OLETF 쥐에서 활성화된 $IR-\beta$ 의 양은 유의하게 감소하였지만 ($P < 0.05$) 활성화된 IRS-1과 p-85a의 양은 ramipril을 처리한 OLETF 쥐에서 증가되었다 (Fig. 5A-C).

(3) 지방

인슐린 주사한 경우 활성화된 $IR-\beta$ 와 IRS-1이 모두 ramipril을 처리한 OLETF 쥐에서 낮았다 (Fig. 6A-C). 그러나 활성화된 p-85a의 양은 ramipril을 처리한 OLETF 쥐에서 증가되었다 (Fig. 6D).

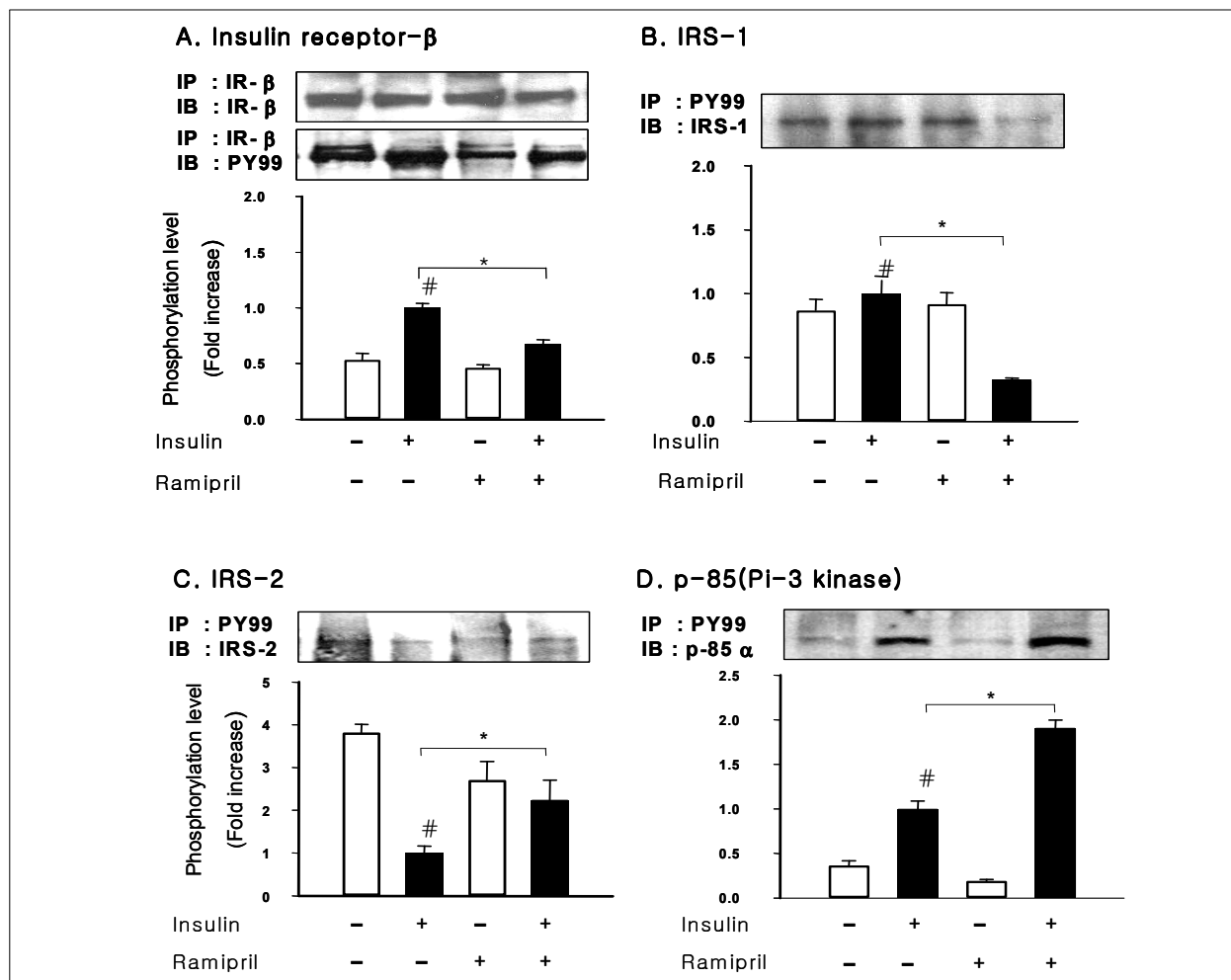


Fig. 4. Effects of ramipril on insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR-, IRS-1, IRS-2, and p-85 in liver of OLETF rats with or without ramipril treatment. The proteins were isolated with extraction buffer as described in methods and kept on ice. After centrifugation, aliquots of the supernatant were immunoprecipitated (IP) with anti-IR- and immunoblotted (IB) with anti-IR-antibodies (A, upper blot), IP with anti-IR- and IB with anti-phosphotyrosine antibodies (A, lower blot), IP with anti-phosphotyrosine and IB with anti-IRS1 antibodies (B), IP with anti-phosphotyrosine and IB with IRS-2 antibodies (C), IP with anti-phosphotyrosine and IB with anti-p-85 antibodies (D). Data were expressed as mean \pm SE and represented by fold increase comparing with the control protein (#) that were normalized to 1. * $P < 0.05$

고 찰

Protein tyrosine phosphorylation은 세포내 대사를 조절 하는데 필수적인 기전으로 많은 다양한 질환에서 tyrosine phosphorylation을 포함하는 신호 전달계의 증가 또는 감소가 특징적으로 관찰된다. 제2형 당뇨병의 원인인 인슐린 저항성은 인슐린 수용체로부터의 하부 전달계로 진행되는 신호 전달에 장애가 발생되어 나타난다. 인슐린 신호 전달계는 인슐린의 자극이 종료되면 인산화에 의해 활성화되었던 인슐린 수용체나 수용체 하부 신호 전달계의 물질들은 다시 탈인산화되어 기저 상태로 돌아가게 되는데 이때 작용하는 것이 PTP (protein tyrosine phosphatase)들이다. 그러므로 인슐린 신호 전달계의 음성적인 조절인자 (negative regu-

lator)로 알려진⁷⁾ PTP1B의 인슐린 신호 전달계에 대한 조절 기능에 이상이 오는 경우에도 인슐린 저항성이 발생할 가능성이 있다. 3개의 subunit (α , β and γ)로 구성된 G 단백질은 세포내 신호 전달의 조절 및 증폭기능을 수행하는 물질로 PTP1B의 조절 작용도 가지고 있다고 알려져 있다¹²⁾. Adenylate cyclase를 활성화시키는 여부에 따라 G_s (stimulatory) 단백질과 G_i (inhibitory) 단백질로 분류되며 특히 G_i 단백질은 인슐린 작용과 밀접한 연관성이 있다고 알려졌다²⁰⁾. 그러므로 G_i 단백질이 인슐린 작용에 관여하며 PTP1B의 조절 작용도 가지고 있다는 점에서 인슐린 저항성의 발생과도 관계가 있을 것이다. 안지오텐신 전환효소 억제제가 제2형 당뇨병의 원인인 인슐린 저항성을 개선시켜 제2형 당뇨병의 발생 위험도를 감소시킨다고 보고되면서¹³⁻¹⁵⁾

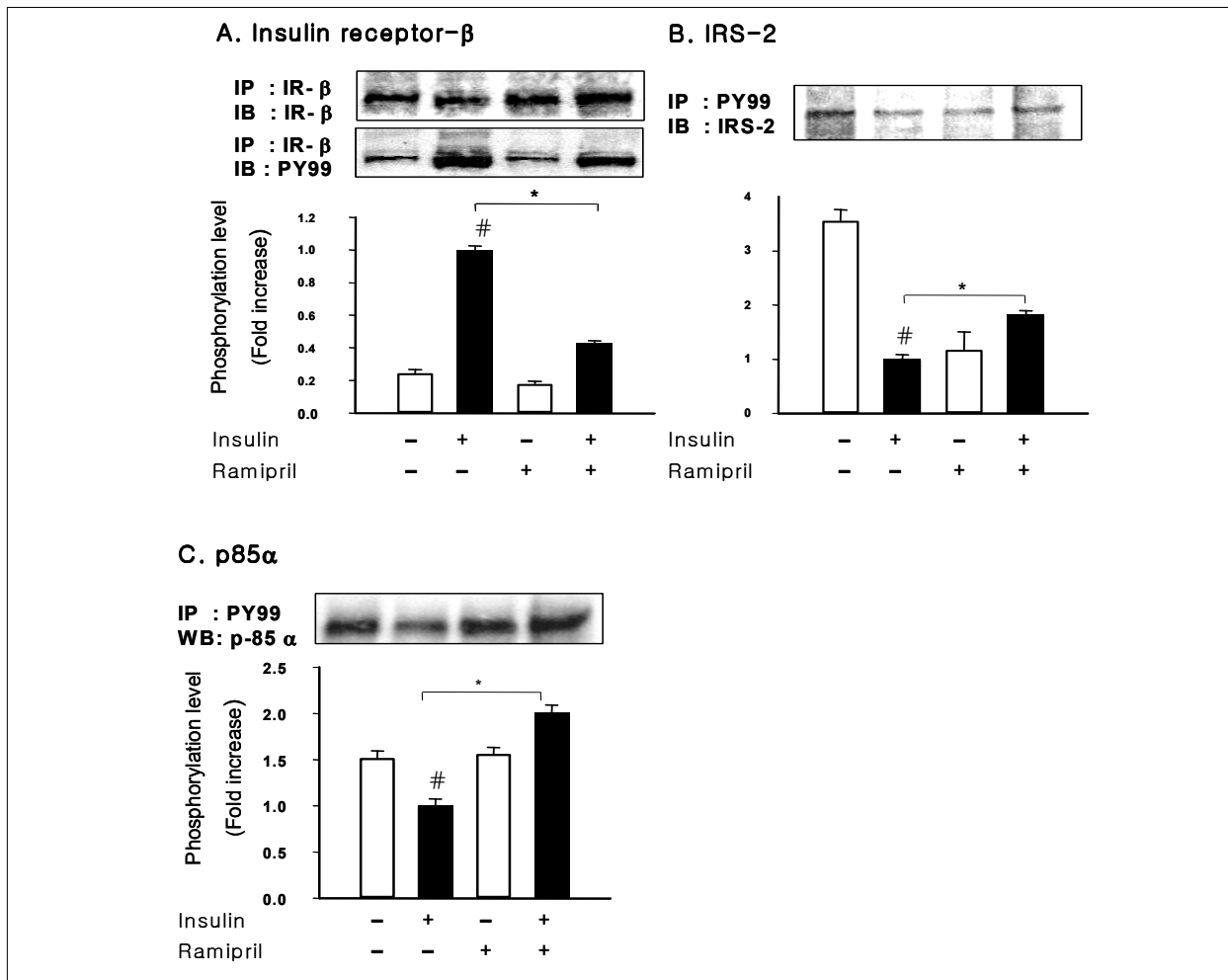


Fig. 5. Effects of ramipril on insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR-, IRS-2, and p-85 in muscle of OLETF rats with or without ramipril treatment. Other procedures were similar in figure 4. Data were expressed as mean \pm SE and represented by fold increase comparing with the control protein(#) that were normalized to 1. * $P < 0.05$

인슐린 감수성이 회복되는 기전에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 안지오텐신 전환효소 억제제에 의한 PTP1B의 활성도와 IRS-1 인산화의 변화¹⁸⁾, 혈관 저항성의 감소²¹⁾, 여러 가지 kinin들의 축적²²⁾ 등 다양한 기전들을 보고하고 있으나 Ludvik 등에 의한 연구에서는 단기간의 ramipril 처리와 인슐린 감수성 증가와는 관련이 없다는 연구 결과를 발표한 바도 있어²³⁾ 아직 정확한 기전은 밝혀지지 않았다. 이에 본 연구에서는 제2형 당뇨병에서 장기간의 ramipril 처리가 인슐린 신호 전달체계에 미치는 효과를 관찰하였다.

OLETF 쥐는 유전적으로 제2형 당뇨병이 자연 발생하는 동물모델로 비만하고 고인슐린혈증을 보이며 인슐린저항성이 증가하여 당뇨가 발생한다. 대조군인 LETO 쥐와 비교했을 때 OLETF 쥐는 체중 증가가 현저했고 혈당도 공복 시 혈당 보다는 당 부하 후의 혈당이 높게 나와 (Fig. 1A, B) 인슐린저항성이 증가된 것으로 생각되었다. 또한 ramipril을 처리한 OLETF 쥐에서 ramipril을 처리하지 않은 OLETF

쥐에 비하여 당 부하 후 30분, 60분, 90분, 120분의 혈당이 낮게 측정된 것으로 보아 (Fig. 1B) ramipril에 의해 인슐린 저항성이 개선되었다고 생각할 수 있었다. 다만 ramipril 처리를 한 OLETF 쥐의 체중 증가가 둔화되어 비만 정도가 낮아 체중 조절 효과에 의해 혈당 수준이 낮아졌을 것이라는 가능성을 완전히 배제할 수는 없었다. 그렇지만 PTP1B의 활성도 변화가 제2형 당뇨병뿐만 아니라 비만에도 영향을 준다는 보고도 있고²⁴⁾ 비만이 포함되어 있는 대사성 증후군의 근본적인 원인이 인슐린저항성이기 때문에 체중 증가량이 적은 것으로도 인슐린저항성이 개선된 것을 기대할 수 있었다. 본 실험에서 혈당과 더불어 혈중 인슐린 농도를 같이 측정하고 HOMA-IR 과 같은 인슐린저항성 지수를 측정하였다면 인슐린저항성의 증가 및 개선을 더 정확하게 확인할 수 있었을 것이지만 OLETF 쥐가 인슐린저항성의 증가에 의해 제2형 당뇨병이 발생하는 것으로 알려진 동물 모델이라는 점을 고려해 인슐린저항성을 혈당의 변화만으로

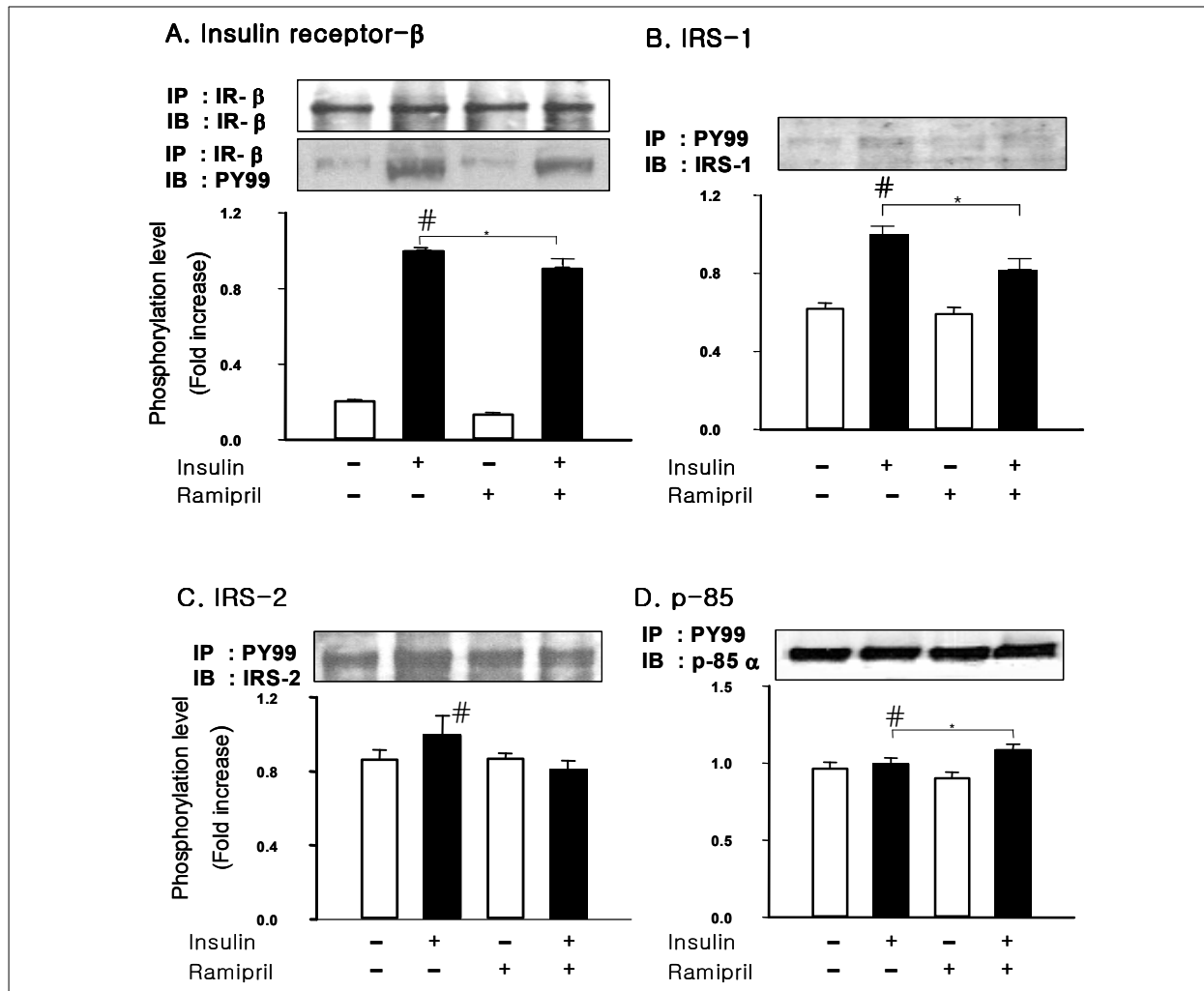


Fig. 6. Effects of ramipril on insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR-, IRS-1, IRS-2, and p-85 in adipose tissue of OLETF rats with or without ramipril treatment. Other procedures were similar in figure 4. Data were expressed as mean \pm SE and represented by fold increase comparing with the control protein (#) that were normalized to 1. * $P < 0.05$

로 관찰한 것은 제한점으로 생각되었다.

당 대사에 관련된 인슐린의 세포내 신호 전달계는 거의 비슷하지만 조직마다 다양한 경로들의 복합적인 상호 작용에 의하여 당 대사 작용이 나타나기 때문에 이번 연구에서는 인슐린의 대표적인 표적 기관인 간, 근육, 지방에 인슐린 자극을 주어 실험에 사용하였다.

간과 근육에서는 희생 전에 인슐린 자극을 한 OLETF 쥐에서 ramipril 처리군의 기저 PTP1B와 활성화된 PTP1B의 수준이 ramipril 비처리군보다 현저하게 감소되어 ramipril 장기 처리에 의하여 PTP1B의 인슐린 신호 전달에 대한 음성적인 조절 기능이 저하된 것을 알 수 있었다 (Fig. 2A, B). 또한 Tao 등에 의한 연구 보고에 따르면 인슐린은 tyrosine 인산화를 촉진시키고 PTP1B를 불활성화 시킨다고 하였는데²⁵⁾ 우리의 결과에서도 활성화된 PTP1B의 수준이 현저히 낮아진 것으로 미루어 ramipril 처리를 한 OLETF

쥐에서는 인슐린의 PTP1B에 대한 불활성화 작용이 증가되어 인슐린저항성이 개선되었을 것으로 생각되었다. 그러나 지방조직에서는 간이나 근육과는 달리 인슐린 자극을 한 OLETF 쥐에서 ramipril 처리군의 기저 PTP1B와 활성화된 PTP1B의 수준이 ramipril 비처리군보다 오히려 증가되는 것이 관찰되었다 (Fig. 2C). 이는 인슐린저항성의 개선이 간과 근육에서의 PTP1B의 변화와는 관련이 있으나 지방에서는 PTP1B와 관계가 없다는 사실을 나타내는 결과로 Elchebly 등이 PTP1B 유전자 결손 쥐를 이용한 실험에서도 조직 특이성 인슐린 감수성으로 인하여 PTP1B의 결손이 간과 근육에서만 인슐린 감수성을 증가시키고 지방조직에서는 변화가 없었다는²⁶⁾ 결과와도 일치하였다.

Ramipril을 처리 후 인슐린저항성의 개선에 PTP1B가 관여되어 있다는 결과로 미루어 PTP1B의 조절 기능을 가진 G_{i2} 단백질도 인슐린의 저항성의 개선되는 기전에 작용할 것

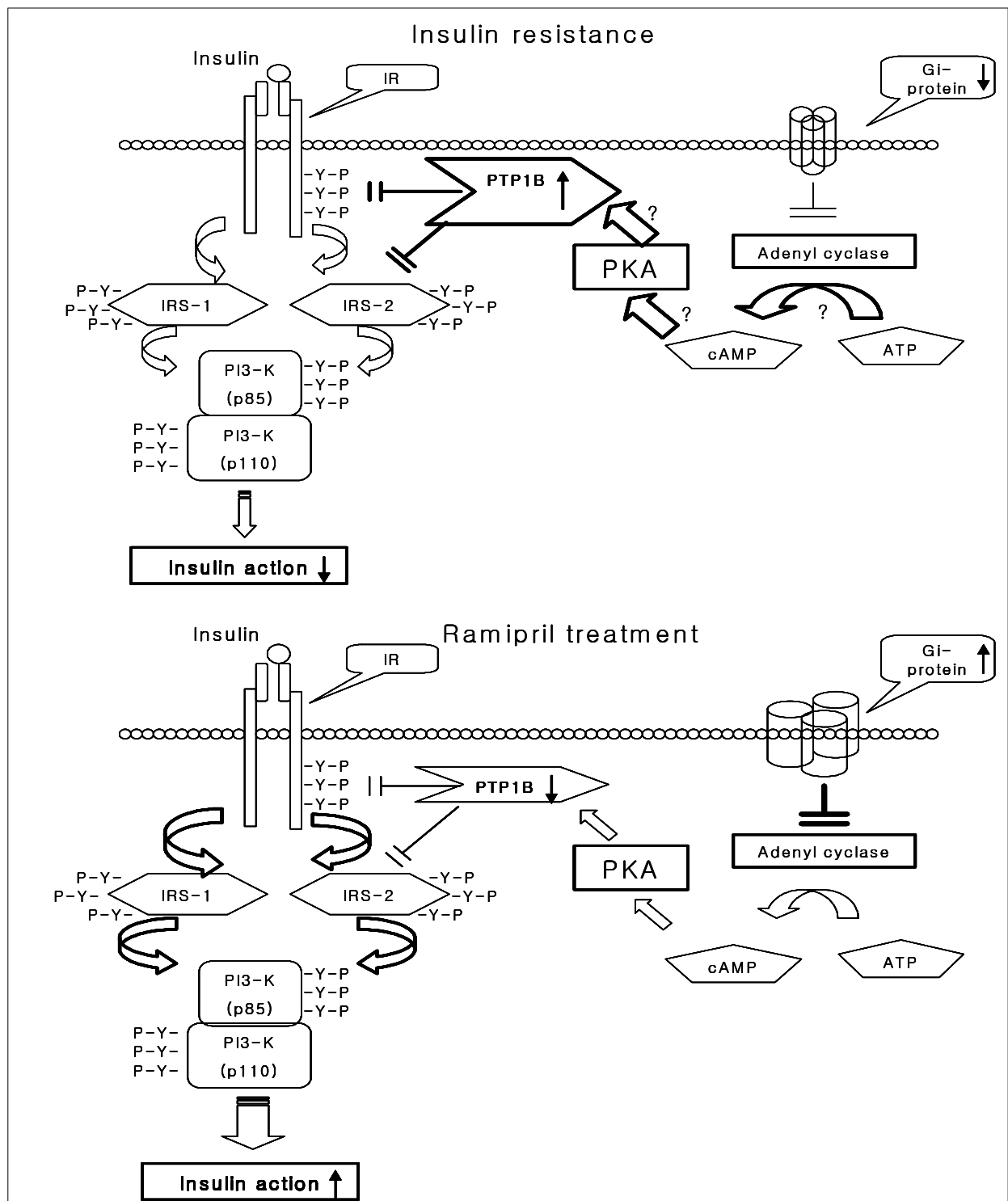


Fig. 7. Schematic representation of molecular mechanisms for insulin resistance (A) and improvement of insulin sensitivity by ramipril treatment (B). IR: insulin receptor, PI3-K: phosphatidylinositol-3 kinase, PTP1B: protein tyrosine phosphatase, IRS-1/-2: insulin receptor substrate-1/-2, PKA: protein kinase A.

으로 생각되었다. 과거 여러 연구에서 G 단백질은 인슐린 수용체의 신호 전달에 관여하며^{27,28)}, ras²⁹⁾, RhoGEF³⁰⁾, MAP (mitogen-activated protein) kinase 신호 전달계³¹⁾, Akt/protein kinase B³²⁾ 등의 신호 전달 기전에도 초기 조절 인

자로 작용한다고 보고되었다. 특히 G_{i2} 단백질과 인슐린 작용이나 인슐린 신호 전달계와의 밀접한 관련성을 보여준 많은 연구 결과가 있었으나^{20),32,33)} 실험에 사용한 조직이나 방법에 따라 다양한 결과를 보여 주었다. 아직까지 G_{i2} 단백질이

인슐린 신호 전달계와 연결된 정확한 기전에 대해서는 밝혀지지 않았지만 $G_{i\alpha 2}$ 단백질에 의한 PTP1B의 조절 기능이 인슐린 신호 전달계와의 연결 고리로 알려지고 있기에¹²⁾ 이번 연구에서도 $G_{i\alpha 2}$ 단백질과 PTP1B의 연관성을 알아보았다. 회생 전 인슐린을 준 OLETF 쥐에서는 ramipril 처리군에서 비처리군보다 활성화된 $G_{i\alpha 2}$ 단백질 양이 현저하게 증가하였다 (Fig. 3). 이 결과로 Ramipril 처리에 의해 간과 근육에서 활성화된 $G_{i\alpha 2}$ 단백질이 현저히 증가하게 되고 $G_{i\alpha 2}$ 단백질의 증가로 PTP1B에 대한 억제 작용이 강화되어 인슐린저항성이 개선되었다고 생각할 수 있으나 지방조직에서는 $G_{i\alpha 2}$ 단백질과 PTP1B간의 관련성을 볼 수 없었다. 한편 Pandey 등이 고혈압의 심장 근육과 captopril을 이용한 실험에서는 안지오텐신 전환효소 억제제인 captopril이 증가된 G_i 단백질을 정상으로 감소시켜 adenylyl cyclase 활성도에 영향을 준다고 보고한 바 있어³⁴⁾ 안지오텐신 전환효소 억제제가 G_i 단백질의 발현에 미치는 영향에 대해서는 좀 더 연구해보아야 할 문제이다.

활성화된 $G_{i\alpha 2}$ 단백질이 증가와 활성화된 PTP1B의 감소가 인슐린 신호 전달계에 영향을 주었는지 확인하기 위하여 활성화된 인슐린 수용체, IRS-1, IRS-2, p-85a (PI-3 kinase) 등의 변화를 관찰하였다. 간과 근육에서는 활성화된 인슐린 수용체와 IRS-1의 양은 오히려 ramipril 처리군에서 낮았지만 활성화된 IRS-2와 p-85a의 양은 높았다 (Fig. 4A-D, 5A-C). 인슐린 신호전달에서 가장 중요한 역할을 하는 활성화된 p-85a가 증가되었다는 결과로 인슐린저항성이 개선되었음을 알 수가 있었다. 지방조직에서도 ramipril 처리군에서 활성화된 p-85a가 높아 인슐린저항성의 개선을 확인할 수 있었지만 (Fig. 6D) 간이나 근육과는 다르게 인슐린 수용체와 IRS-1, IRS-2의 양이 모두 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 6A-C). 이 결과는 쥐의 지방조직을 사용한 이전의 연구에서 PTP1B가 지방조직에서 인슐린 수용체 kinase와 IRS-1과 같은 인슐린 수용체 하부 전달계의 전달자들을 불활성화시켜 인슐린 신호를 조절한다고 보고한 것과는³⁵⁾ 일치하지 않았다. PTP1B의 결과와 같이 보면 간과 근육에서는 PTP1B의 음성적인 조절 역할이 감소되어 인슐린의 신호 전달 연쇄 반응이 강화되는 것을 보여주지만 지방조직에서는 PTP1B의 음성적인 조절 역할이 증가했음에도 불구하고 활성화된 p-85a만 증가되어 PTP1B 이외에 다른 조절 인자의 존재 가능성을 보여주었다.

이번 실험에서 ramipril 처리에 의해 조직에 따라 IRS-1과 IRS-2가 차이가 있음을 알 수 있었다. IRS-1과 IRS-2는 두 가지 모두 인슐린 수용체와 결합할 수 있는 NPXY motif를 가지고 있지만 IRS-2는 부가적인 domain을 더 가지고 있고^{36,37)} IRS-1 보다 빠르게 탈인산화되며 PI-3 kinase를 활성화시키는 작용도 IRS-1보다 더 일시적이라고 알려져 있다³⁸⁾. 그러므로 IRS-1과 IRS-2의 탈인산화기전에는

PTP1B 한 가지가 작용하는 것이 아니라 서로 다른 tyrosine phosphatase가 작용할 가능성이 있다. 여러 인슐린 표적 장기에서 IRS-1이 인슐린 신호 전달계에서 더 주도적인 역할을 할 것으로 기대되고 있지만 간에서의 인슐린 신호 전달 역할에는 IRS-2가 IRS-1 보다 더 주도적인 역할을 담당하여 PI-3 kinase를 활성화 시킨다는 연구 보고도 있었고^{39,40)} 이는 우리의 실험에서도 일치하였다.

이상의 결과를 종합해 보면 ramipril이 간과 근육에서는 PTP1B의 활성도를 조절하는 $G_{i\alpha 2}$ 단백질을 증가시키고 신호 전달자들의 인산화/탈인산화를 조절하는 PTP1B를 감소시킴으로써 인슐린 신호 전달의 증강 효과를 보이는 것으로 생각된다 (Fig. 7A,B). 그러므로 향후 제2형 당뇨병의 치료에 있어서 또한 대사성 증후군의 치료적인 면에 있어서도 PTP1B를 억제하거나 감소시키는 방향으로의 접근이 가능할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 제2형 당뇨병은 간, 지방, 근육 등과 같은 인슐린의 표적 장기의 인슐린저항성에 의하여 발생하는 질환이다. 인슐린저항성의 원인을 규명하기 위한 인슐린 신호 전달계에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으나 현재까지 정확한 기전에 대해서는 확실하게 밝혀지지 않고 있다. 다양한 세포내 작용을 조절하는 tyrosine phosphorylation은 포도당대사와 관련된 인슐린의 신호전달에도 역시 중요한 역할을 담당하고 있어 tyrosine 인산화/탈인산화를 조절하는 역할을 담당하는 PTP1B의 변화가 인슐린저항성의 발생과 연관이 있을 것으로 생각된다. 한편 다양한 세포내 신호 전달의 매개 역할을 하는 G_i 단백질은 인슐린의 작용과도 연관성을 보이고 있고 PTP1B의 조절 역할도 가지고 있는 것으로 알려져 있어 G_i 단백질의 변화와 이에 따른 PTP1B의 변화가 인슐린저항성의 발생 기전에 연관되어 있을 것으로 생각되어 제2형 당뇨병의 자연 발생 동물 모델인 OLETF 쥐에서 안지오텐신 전환 효소 억제제인 ramipril을 장기 투여하여 인슐린저항성이 개선되는 과정에서 G_i 단백질과 인슐린 신호 전달계의 변화를 관찰하였다.

대상 및 방법: OLETF 쥐와 대조군인 LETO 쥐를 출생 후 20주까지 키워, 무작위로 ramipril 처리군 (10 mg/kg)과 비처리군으로 나누어 12주간 유지시킨 후 회생 전 인슐린을 정주하고 간, 근육, 지방조직을 적출하여 각각의 조직의 분획을 얻었다. 각 조직의 분획을 전기영동 후 PTP1B, G_i 단백질, IR- β , IRS-1/2, p-85a (PI-3 kinase)에 대한 면역침전과 Western blotting을 시행 후 protein densitometry 측정을 하여 비교하였다.

결과: 경구당부하검사에서 ramipril을 처리한 OLETF 쥐가 ramipril을 처리하지 않은 OLETF 쥐보다 혈당이 낮았

다. 희생 전에 인슐린을 주사한 OLETF 쥐의 간과 근육에서 기저 PTP1B의 양은 ramipril 처리군과 비처리군 간의 유의한 차이는 관찰되지는 않았지만 활성화된 PTP1B의 양은 ramipril 처리군에서 유의하게 낮았고 $G_{i\alpha 2}$ 단백질은 증가되어 있었다. 인슐린 신호전달계에서는 활성화된 IRS-2와 p-85a가 증가되어 있었다. 반면, 지방조직에서는 ramipril을 처리하고 희생 전 인슐린을 주사한 OLETF 쥐에서 기저 PTP1B와 활성화된 PTP1B와 $G_{i\alpha 2}$ 단백질이 모두 증가되어 있었고, 인슐린 신호 전달계에서는 활성화된 IRS-1/2는 감소하였으나 활성화된 p-85a는 약간 증가하는 결과를 보였다.

결론: 이 실험에서 ramipril을 처리하고 희생 전 인슐린을 준 쥐의 간과 근육에서는 $G_{i\alpha 2}$ 단백질의 증가와 활성화된 PTP1B의 감소와 인슐린 신호 전달계 활성화도의 증가가 관찰되어 인슐린저항성이 개선되는 기전과 관련되어 있을 것으로 생각되었다. 그러나 지방조직은 간이나 근육에서의 결과와는 다른 양상을 보여 인슐린 신호 전달계의 조절 기전에는 조직마다 주된 작용을 하는 다양한 신호 전달계가 있을 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Reaven GM: *Role of insulin resistance in human disease. Diabetes* 37:1595-607, 1988
2. Kahn BB, Flier JS: *Obesity and insulin resistance. J Clin Inv* 106:473-81, 2000
3. Saltiel AR: *New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. Cell* 104: 517-29, 2001
4. White MF, Kahn CR: *The insulin signaling system. J Biol Chem* 269 (1):1-4, 1994
5. Goldstein BJ: *Regulation of insulin receptor signaling by protein-tyrosine dephosphorylation. Receptor* 3:1-15, 1993
6. Kenner KA, Anyanwu E, Olefsky JM, Kusari J: *Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. J Biol Chem* 271:19810-6, 1996
7. Egawa K, Maegawa H, Shimizu S, Morino K, Nishio Y, Bryer-Ash M, Cheung AT, Kolls JK, Kikkawa R, Kashiwagi A: *Protein-tyrosine phosphatase 1B negatively regulates insulin signaling in L6 myocytes and Fao hepatoma cells. J Biol Chem* 276:10207-11, 2001
8. Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampit JE, Zinker BA, Trevillyan JM, Ulrich RG, Jirousek MR, Rondinon CM: *Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increase insulin-dependent signaling in ob/ob mice. Diabetes* 52:21-9, 2003
9. Zabolotny JM, Haj FG, Kim HJ, Shulman GI, Kim JK, Neel BG, Kahn BB: *Transgenic overexpression of PTP1B in muscle causes insulin resistance but overexpression with LAR does not additively impair insulin action. J Biol Chem* 279:24844-51, 2004
10. Ahmad F, Li PM, Meyerovitch J, Goldstein BJ: *Osmotic loading of neutralizing antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative regulation of the insulin action pathway. J Biol Chem* 270:20503-8, 1995
11. Kushner JA, Haj FG, Klamann LD, Dow MA, Kahn BB, Neel BG, White MF: *Islet-sparing effects of protein tyrosine phosphatase-1b deficiency delays onset of diabetes in IRS2 knockout mice. Diabetes* 53:61-6, 2004
12. Tao J, Malbon CC, Wang HY: *$G_{i\alpha 2}$ enhances insulin signaling via suppression of protein-tyrosine phosphatase 1B. J Biol Chem* 276:39705-12, 2001
13. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmaki K, Dahlof B, de Faire U, Morlin C, Karlberg BE, Wester PO, Bjorck JE: *Effects of angiotensin-converting-enzyme inhibition compare with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPP) randomized trial. Lancet* 353:611-6, 1999
14. Yusuf S, Gerstein H, Hoogwerf B, Pogue J, Bosch J, Wolfenbuttel BH, Zinman B: *Ramipril and the development of diabetes. JAMA* 286:1882-5, 2001
15. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H: *Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention for endpoint reduction in hypertensive study (LIFE): a randomized trial against atenolol. Lancet* 359:995-1003, 2002
16. RAO RH: *Pressor doses of angiotensin II increase hepatic glucose output and decrease insulin sensitivity in rats. J Endocrinol.* 148 (2):311-8, 1996
17. Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Katagiri H, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Komuro I, and Fujita T: *Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with en-*

- hanced insulin signaling. Hypertension 40:872-9, 2002*
18. Krutzfeldt J, Raasch W, Klein HH: *Ramipril increases the protein level of skeletal muscle IRS-1 and alters protein tyrosine phosphatase activity in spontaneously hypertensive rats. Arch Pharmacol 362:1-6, 2000*
19. Bradford MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-56, 1976*
20. Moxham CM, Malbon CC: *Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit $G_{i\alpha 2}$. Nature 379:840-4, 1996*
21. Nawano M, Anai M, Funaki M, Kobayashi H, Kanda A, Fukushima Y, Inukai K, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, Asano T: *Imidapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, improves insulin sensitivity by enhancing signal transduction via insulin receptor substrate proteins and improving vascular resistance in the Zucker Fatty rat. Metabolism 48:1248-55, 1999*
22. Sechi LA, Griffin CA, Zingaro L, Valentin JP, Bartoli E, Schambelan M: *Effects of angiotensin II on insulin receptor binding and mRNA levels in normal and diabetic rats. Diabetologia 40:770-7, 1997*
23. Ludvik B, Kueenbourg E, Brunnbauer M, Schemthaner G, Prager R: *The effects of ramipril on glucose tolerance, insulin secretion, and insulin sensitivity in patients with hypertension. J Cardiovasc Pharmacol 18 (Suppl 2):S157-9, 1991*
24. Ukkola O. and Santaniemi M: *Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities. Int Med 251:467-75, 2002*
25. Tao J, Malbon CC, Wang HY: *Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo. J Biol Chem 276:29520-5, 2001*
26. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramchandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP: *Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase 1B gene. Science 283:1544-8, 1999*
27. Heyworth CM, Houslay MD: *Insulin exerts action through a distinct species of guanine nucleotide regulatory protein: inhibition of adenylate cyclase. Biochem J 214:547-52, 1983*
28. Gawler D, Milligan G, Spiegel AM, Unson CG, Houslay MD: *Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G_i activity in diabetes. Nature 327:229-32, 1987*
29. Crespo P, de Mora JF, Aaronson DS, Santos E, Gutkind JS: *Transforming G protein-coupled receptors block insulin and ras-induced adipocytic differentiation in 3T3-L1 cells: evidence for a PKC and MAP kinase independent pathway. Biochem Biophys Res Commun 245:554-61, 1998*
30. Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, Bollag G: *Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by $G_{\alpha 13}$. Science 280:2112-4, 1998*
31. Lefkowitz RJ: *G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. J Biol Chem 273:18677-80, 1998*
32. Wang L, Hayashi H, Kishi K, Huang L, Hagi A, Tamaoka K, Hawkins PT, Ebina Y: *G_i -mediated translocation of GLUT4 is independent of $p85/p110\alpha$ and $p110\gamma$ phosphoinositide 3-kinases but might involve the activation of Akt kinase. Biochem J 345:543-55, 2000*
33. Zheng XL, Guo J, Wang H, Malbon CC. *Expression of constitutively activated $G_{i\alpha 2}$ in vivo ameliorates streptozotocin-induced diabetes. J Biol Chem 273:23649-51, 1998*
34. Pandey SK and Anand-Srivastava MB. *Modulation of G-protein expression by the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril in heart from spontaneously hypertensive rats. AJH 9:833-7, 1996*
35. Calera MR, Vallega G, Pilch PF: *Dynamics of protein-tyrosine phosphatase in rat adipocytes. J Biol Chem 275:6308-12, 2000*
36. He W, Craparo A, Zhu Y, O'Neill TJ, Wang LM, Pierce JH, Gustafson TA: *Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor I receptor. Evidence for two distinct phosphotyrosine-dependent interaction domains within IRS-2. J Biol Chem 271:11641-8, 1996*
37. Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van

- Obberghen E: *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* 271:5983-9, 1996
38. Ogihara T, Shin BC, Anai M, Katagiri H, Inukai K, Funaki M, Fukushima Y, Ishihara H, Takata K, Kikuchi M, Yazak Y, Oka Y, Asano T: *Insulin receptor substrate (IRS)-2 is dephosphorylated more rapidly than IRS-1 via its association with phosphatidylinositol 3-kinase in skeletal muscle cells. J Biol Chem* 272:12868-73, 1997
39. Rother KI, Imai Y, Caruso M, Beguinot F, Formisano P. *Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes J Biol Chem* 273:17491-7, 1988
40. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T: *Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. Diabetes* 49:1880-9, 2000