

인슐린의 신호전달 기전 : Transcription Factor AP-1 의 역할

김 성진, 경희 대학교 치과대학 약리학 교실

초 록 :

대부분의 인슐린의 작용들은 인슐린 수용체를 통하여 이루어 진다. 인슐린이 수용체에 결합하면, 수용체 고유의 tyrosine kinase 효소활성의 증가를 유발 시키며, 결과적으로 세포내에 존재하는 기질 단백질, IRS-1, 의 tyrosine 잔기의 인산화를 증가 시키게 된다. 이후, 여러 형태의 serine / threonine protein kinase 의 연속적인 활성화가 일어난다. 이들에 부가해서, 인슐린의 효과는 세포핵 내에 까지 전달되어 유전자 발현의 조절과 같은 세포핵 고유의 활동에도 관여한다. 현재, 세포막에서 시작된 인슐린의 신호들이 세포핵까지 전달되는 정확한 기전에 대해서는 알려진 바 없지만, 최근의 연구에 의하면 MAP Kinase 와 S6 Kinase 그리고 Transcription Factor AP-1의 중요성이 제시되고 있다. 특히 유전자 조절 기전 에는 핵단백질인 transcription factor 의 인산화 반응이 큰 역할을 한다고 보고되고 있는바, 본 연구에서 AP-1, transcription factor 의 인산화 반응이 인슐린의 신호전달계에 미치는 역할에 대하여 고찰 하였다. 요약하면, AP-1 transcription factor의 구성원인 c-Jun, c-Fos 그리고 Fos 관련 단백질들의 인산화가 인슐린에 의해 증가되며, 동시에 그들의 DNA-binding activity 와 유전자 발현의 활성이 증가됨을 밝힘으로써, AP-1 transcription factor의 인산화 반응이 인슐린의 핵 내에서의 작용기전에 중요한 역할을 함이 제시되고 있다. 또한 AP-1 의 인산화 반응에 관여하는 세포핵 protein kinase 로서 Casein Kinase II 의 중요성이 밝혀졌다.

본 문 :

Insulin은 인체의 혈당조절을 포함한 다양한 대사효과 이외에도 세포의 성장및 분화에도 영향을 미친다. Insulin의 약리작용은 Insulin 수용체를 통하여 이루어 진다. Insulin이 세포막에 존재하고있는 수용체에 결합 하게되면 수용체 고유의 tyrosine kinase 활성을 증가 시키게 되며, 따라서 수용체 자체의 베타subunit 뿐만아니라 세포내에 존재하는 target protein (IRS-1)들의 tyrosine phosphorylation을 증가 시키게 된다. 이같은 현상들은 세포질내에 존재하는 일련의 protein serine/threonine kinase들 (MAP Kinase, S6 Kinase, Casein Kinase II 그리고 PI3-Kinase) 과 연계되어 있다. Insulin의 효과는 세포핵 내

부까지 전달되어서 Insulin에 반응하는 다양한 유전자들의 transcription을 조절하게 된다. 하지만 세포핵내로 Insulin의 신호전달이 매개되는 분자적 기전에 대해서는 아직 알려지지 않은 상태이다. 최근의 보고에 의하면 Insulin에 의해 수개의 DNA 결합 단백질들의 phosphorylation 상태가 증가한다고 제시되고 있다. 그 예로써 lamin, numatrin, nucleolin, CREB (cAMP response element-binding protein), c-Jun, c-Fos 그리고 Fos-related protein 등을 들 수 있다. DNA 결합 단백질 그리고 Transcription factor 들의 조절, 기전으로서 protein phosphorylation (단백질의 인산화) 반응이 가장 중요한 기전으로 제시되고 있다. 이는 유전자 발현에 영향을 미치는 많은 수의 호르몬 또는 세포성장 인자들이 protein kinase의 활성을 증가시키는 사실과 잘 부합하고 있다. Glycogen synthase kinase 3, casein kinase II, protein kinase C 그리고 MAP kinase 들은 c-Jun의 특별 부위에 serine phosphorylation을 증가시키며, 결과적으로 c-Jun의 DNA 결합과 transcription의 활성을 조절한다. c-Fos 또한 transcription 활성에 중요하다고 제시되는 여러 부위가 protein kinase A, protein kinase C, Fos kinase, 그리고 cdc2 kinase에 의해 인산화된다. 흥미롭게도 Insulin 유사인자인 IGF-1은 c-Jun을 포함한 세포핵에 존재하는 여러 단백질의 tyrosine phosphorylation을 증가시킨다는 사실이 밝혀졌다. 또한 Insulin은 Insulin 수용체의 세포핵내로의 이동을 유발시키며 동시에 세포핵내의 tyrosine kinase의 활성을 증가시킨다고 보고되고 있다. 이들 결과들은 Insulin의 세포핵 내로의 신호전달에 serine kinase, tyrosine kinase 그리고 Insulin 수용체등이 관여될 수 있다는 가능성을 강력히 제시하고 있다.

따라서, 본 연구에서는 insulin에 의해 조절되는 유전자 발현에 있어서, transcription factor AP-1의 역할에 대한 직접적인 증거들이 제시되고 있다.

1. Phosphorylation of AP-1 by insulin

AP-1 transcription factor의 주요 구성원인 c-Jun과 c-Fos는 생체내에 존재하는 다수의 serine/threonine protein kinase들에 의해 in vitro에서 인산화되는 부위를 함유하고 있다. 과연 insulin이 AP-1 transcription factor의 인산화 반응을 조절하는지의 여부를 cell culture system을 이용하여 탐색하였다.

3T3-F442A adipocytes를 ^{32}P -orthophosphate로 label한 후,

insulin 을 처치 하고, 세포핵을 분리 하였다. 그후, c-Jun 과 c-Fos antibody 를 이용하여 immunoprecipitation 을 실시하고, 인산화된 transcription factor 들을 autoradiography 를 통하여 동정 하였다. c-Jun 은 insulin 처치후 1분 후에 최대의 인산화 정도를 보였으며, 곧 insulin 처치 전 수준으로 감소 하였다. 반면, insulin 은 c-Fos 는 물론, 수개의 Fos 관련 단백질들 (pp39, pp45 그리고 pp72) 의 인산화 반응을 시간 의존적으로 증가 시켰다. 또한, phosphotyrosine antibody를 이용한 Western blot analysis 를 시행한 결과 이들 단백질의 인산화 반응은 serine 또는 threonine 잔기에 국한된 것으로 사료된다. 이에 부가하여, 분자량이 큰 새로운 Fos 관련 단백질인 pp82 의 tyrosine phosphorylation 이 insulin 에 의해 증가됨이 발견 되었다. pp82 는 최근 연구되어 흥미를 끌고 있는 단백질인 ISGF-3 (interferon stimulated gene factor 3) 와는 다른 물질인 것으로 판명 되었다.

이같은 결과로써, 세포막 에서의 insulin의 작용이, 세포핵 까지 전달 되어서, 세포핵 내에 존재 하는 serine / threonine kinases 뿐만 아니라, tyrosine kinase의 활성을 증가 시키고, 결과적으로 이들 AP-1 및 관련 단백질들의 인산화 반응을 증가 시키는 것으로 추측 된다.

2. Insulin-sensitive nuclear serine / threonin kinases

AP-1 factor들은 MAP Kinase 와 Casein Kinase II (CK II) 에 의한 인산화 반응 부위를 함유 하고 있고 MEK (MAP Kinase Kinase) 가 MAP Kinase 를 인산화 시킴으로써 그 활성을 조절 한다는 사실에 착안하여, 이들 protein kinase 들의 1) 세포핵 내의 존재 여부, 2) insulin 에 의해 이들 kinase 들이 세포핵으로의 translocation 이 유도되는지의 여부, 3) 그리고 이들 kinase 의 활성이 insulin 에 의해 조절되는지의 여부를 각 protein kinase 에 특이한 항체들을 이용한 Western blot analysis 와 In-situ gel kinase assay 를 이용하여 관찰 하였다.

본 연구에서는 인간의 insulin 수용체 cDNA 를 함유하는 expression vector를 chinese hamster ovary (CHO) cell에 stable transfection 방법으로 도입 함으로써, 인간 insulin 수용체를 인공적으로 발현시킨 model system 을 이용 하였다. 상당량의 MAP Kinase 와 CK II 가 insulin을 처치 하기 전 상태에서 이미 존재 하고 있으며,

insulin 처치 후에도 이들 단백질의 세포내 각 기관별 분포에는 영향을 미치지 않았다. 반면에, insulin 처치후 세포질에 존재 하는 MEK이 세포핵으로 translocation 됨이 밝혀 짐으로써, 이와같이 세포핵으로 이동한 MEK에 의하여 세포핵내에 이미 존재하고 있던 MAP Kinase 의 활성이 조절될수 있다는 가능성을 강력히 시사 하고 있다. 그리고 MEK 단백질의 amino acid sequence 에 양전하를 가지는 nuclear localization signal sequence 가 존재함은, 이 kinase 가 insulin 에 의해 세포핵 으로 이동한다는 사실을 뒷받침 해주고 있다. 최근 연구에 의하면, 어떤 특정 세포 에서 MEK 단백질은 serum 이나 TPA 처치에 의하여 세포핵으로 이동되지 않는 반면, MAP Kinase 는 이들 처치에 의하여 세포핵으로 이동된다는 사실을 고려 한다면, MEK 과 MAP Kinase 의 세포핵으로의 이동 현상은 세포나 ligand의 종류에 의존 하는 현상일 가능성을 시사 하고 있다.

In-situ MBP 그리고 Casein-containing gel kinase assay 를 시행한 결과, insulin 에 의해 MAP Kinase 와 Casein Kinase II 모두 신속히 활성화 됨을 관찰 하였다. 이로써, 이들 insulin-sensitive nuclear kinase들 (MAP Kinase 와 Casein Kinase II) 이 AP-1 transcription factor 들의 인산화 반응에 중요한 역할을 할수 있다는 가능성을 제시 하고 있다.

3. AP-1 의 유전자 발현 과정에서의 역할

최근 연구에 의하면 transcription factor 들의 DNA 결합 반응, 전사 활성 및 nuclear translocation process 등과 같은 다양한 생화학적 기능의 조절 기전 으로서 인산화 반응의 중요성이 제시되고 있다. 따라서, AP-1 transcription factor 가 insulin 에 의해 조절되는 유전자의 발현에 있어서 중요한 매개체 로서 역할을 하는지의 여부를 탐색 하기 위해, AP-1 의 결합 부위 로써 기능을 담당 하고 있는 TRE (TPA-responsive element) 를 함유하고 있는 CAT(chloramphenicol acetyl transferase)-reporter gene 을 3T3-F442A adipocyte 에 transfection 시키고, insulin 처치후 CAT 의 효소 활성을 측정 함으로써, 유전자 발현의 활성을 평가 하였다.

Insulin 처치후 CAT 활성은 비교군에 비하여 5배 이상 증가됨으로써, insulin에 의한 유전자 발현의 조절에 AP-1 transcription factor 가 중요한 역할을 하고 있음이 판명 되었다. 이와 같은 맥락 에서, AP-1 의 insulin 에 의한 DNA-binding activity 의 조절여부를

EMSA (electromobility shift assay) 를 실시함으로써 탐색 하였다. 또한 AP-1 과 DNA 가 상호 작용 하는데 인산화가 중요한 역할을 하는 바, 특이한 protein kinase inhibitor인 MEKI (MEK inhibitor) 와 DRB (CK II inhibitor) 를 전 처치 한후 EMSA 를 시행 함으로써, MEK 과 CKII 의 관련성에 관 해서도 고찰 하였다.

Insulin 처치로 인하여 대조군에서 AP-1 의 DNA-binding activity 가 시간 의존적으로 증가 (3 배) 하였으며, AP-1 과 DNA 의 복합체 에는 c-Jun 과 c-Fos 가 포함 되어 있음이 확인 되었다. MEKI 를 전처치 한 경우, insulin 에 의한 AP-1 의 DNA binding activity 의 증가에는 변화가 없었으나, DRB 전 처치군 의 경우에는, insulin 에 의한 DNA-binding activity 의 증가가 대조군에 비해 현저히 감소함을 보임으로써, CKII 가 insulin 에 의한 AP-1 의 DNA-binding activity 증가에 중요한 역할을 담당 하고 있음이 제시 되고 있다.

이들 결과로써, 세포막으로 부터의 insulin의 신호가 세포막으로 전달되어 세포핵 내에 존재하고 있는 CKII의 활성을 증가 시키게 되고, 그로 인하여 AP-1 의 인산화 반응이 자극되며, 따라서 AP-1 의 DNA-binding activity 가 증가될 수 있다는 하나의 가능한 모델이 제안 되고 있다.

이 모델은 insulin에 의해 영향을 받고 있는 유전자들의 발현 조절 기전을 설명 하는데 중요한 역할을 하리라 사료 된다.