

## Insulin Receptor Substrate 1의 세린731 인산화 억제를 통한 살리실산의 인슐린저항성 개선효과 기전

이 용 희<sup>#</sup>

충북대학교 의과대학 생화학교실  
(Received March 4, 2008; Revised May 8, 2008)

### Salicylate Enhances Insulin Signaling by Preventing Ser731 Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1

Yong Hee Lee<sup>#</sup>

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

**Abstract** — Salicylate (SA) was shown to alleviate insulin resistance. Here, we showed that SA inhibited Ser731 phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS1) and S6 kinase activation, and enhanced tyrosine phosphorylation of IRS1 in response to insulin or amino acid. Experiments using a cJun N-terminal kinase (JNK)-deficient cell and an IRS1 JNK-binding mutant showed that JNK is not required for Ser731 phosphorylation. A two-week treatment of obese mice with SA resulted in decreased Ser731 phosphorylation and enhanced insulin signaling. These results suggest that SA enhances insulin signaling by inhibiting Ser731 phosphorylation of IRS1.

**Keywords** □ IRS1, insulin, salicylate, phosphorylation

인슐린 저항성(insulin resistance)은 말초의 간, 지방 및 근육 조직이 정상적인 농도의 인슐린에 대해서 제대로 반응하지 않아 인슐린에 의한 포도당 및 영양분 대사조절에 이상이 나타나는 상태를 의미한다. 인슐린 저항성은 비만, 심혈관질환, 감염 및 상해 등과 관련되어 있으며, 특히 췌장 랑게르한스섬의 베타세포가 더 많은 인슐린 분비를 통한 보상을 하지 못하게 될 경우 당뇨병을 유발하게 된다.<sup>1)</sup> 인슐린 저항성은 이와 같이 많은 합병증을 수반하는 심각한 질환으로 최근 "대사증후군(metabolic syndrome)"이라 지칭되며, 특히 선진국에서 기하급수적으로 환자 수가 증가하고 있으며, 우리나라도 서구화되어 가는 식단으로 인한 영양과잉과 운동부족 및 스트레스 등으로 인해 그 수가 폭발적으로 증가하고 있다. 따라서 인슐린 저항성 발생의 분자생물학적 기전을 밝힐 수 있다면, 치료법 및 예방법의 개발에 큰 도움이 될 것이다.

인슐린 저항성의 발병원인으로 인슐린 신호전달과정의 비정상

적인 저해가 제시되고 있다. 인슐린 신호전달은, 타이로신 kinase 활성을 갖는 인슐린수용체(insulin receptor, IR)가 insulin receptor substrate(IRS) 단백질의 타이로신 잔기들을 인산화하여 활성화시킴으로써 시작된다. 인산화된 IRS에 결합해 활성화된 phosphoinositide 3-kinase(PI3K)가 Akt, S6 kinase(S6K) 등 여러 단백질 kinase들을 순차적으로 활성화시켜 포도당흡수, 글리코겐합성, 단백질 합성, 세포성장 등의 다양한 세포활동을 촉진하게 된다.<sup>2)</sup> 또한 IRS 단백질은 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로를 활성화 시켜 세포성장을 촉진하기도 한다. 조직에 따라 IRS1과 IRS2가 서로 다른 기능을 수행하며, 포도당 대사조절에는 주로 IRS1이 관여하고, 췌장 베타세포의 성장과 뇌 시상하부의 식욕조절중추의 조절에는 주로 IRS2가 관여하는 것으로 생각되고 있다.<sup>3)</sup>

현재까지 알려진 사실들을 종합해보면 IRS 단백질이 인슐린 신호전달의 가장 중요한 매개체로서 세린 잔기 인산화와 단백질 분해를 통한 IRS의 비활성화가 인슐린 신호전달의 저해, 즉 인슐린 저항성의 주요 원인일 것으로 생각되고 있다.<sup>3)</sup> 이러한 견해의 근거로는 첫째, 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 알려진 유리지방산, diacylglycerol, 지방산 CoA, 세라마이드, 고농도의

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-261-3385 (팩스) 043-274-9710  
(E-mail) yh-lee@cnu.ac.kr

포도당 등이 IRS 단백질의 세린 인산화를 유도한다.<sup>4)</sup> 둘째, 감염, 상해, 비만 시에 증가되는 인터페론 감마, 인터루킨-1 $\beta$ , Tumor necrosis factor  $\alpha$  등의 염증성 사이토카인들이 IRS1의 세린 인산화와 인슐린 저항성을 유도한다.<sup>4)</sup> 또한 인슐린 저항성 상태에 보상적으로 인슐린 분비가 증가되어 나타나는 고인슐린혈증(hyperinsulinemia) 자체에 의해서도 IRS1의 세린 인산화가 유도되어 상황을 더 악화시키는 것으로 보고되었다.<sup>5)</sup> IRS1에는 약 70여개의 잠재적인 세린/쓰레오닌 인산화잔기가 존재하며, cJun N-terminal kinase(JNK), protein kinase C $\zeta$ , I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ), mammalian target of rapamycin(mTOR), MAPK, AMP-activated kinase 등 많은 kinase 들이 IRS1을 인산화하기 때문에,<sup>4)</sup> 실제 인체 내에서 인슐린 저항성의 유도에 중요한 인산화잔기와 kinase를 밝히는데 어려움이 있다. 비만, 스트레스 및 여러 대사이상에 의해 다양한 kinase 들이 만성적으로 활성화되게 되면 이들이 IRS1/2의 세린/쓰레오닌 잔기들을 인산화하여 IRS1/2의 신호전달 활성을 직접 억제할 뿐 아니라, ubiquitin-proteasome에 의한 IRS 단백질의 분해도 촉진하여 장기적인 인슐린 신호전달의 저해현상, 즉 인슐린 저항성이 나타나는 것으로 생각되고 있다.<sup>4)</sup>

최근의 보고에 의하면, 비만인 사람의 혈중에 많이 존재하는 유리지방산, 여러 염증성 사이토카인 등이 인슐린 저항성을 일으키는 과정에서 세포내의 JNK와 IKK $\beta$ 를 활성화하여 IRS1의 307번째 세린을 인산화함으로써 인슐린 신호전달 기능을 저해한다고 알려지고 있다.<sup>5)</sup> 비만으로 인해 대사에 이상이 생긴 경우, 비정상적인 지질대사와 단백질 합성으로 인해 ER에 과다한 stress가 가해지고, 이를 IRE1 kinase가 인지해 JNK를 활성화시킨다.<sup>6)</sup> 이러한 경우에 JNK 저해제의 처리에 의해 인슐린 저항성이 개선될 수 있음이 본 연구자와 다른 그룹에 의해 보고되었다.<sup>5,7)</sup>

따라서, 인슐린 저항성과 관련이 있는 IRS1의 세린 인산화잔기와 이를 유도하는 kinase를 규명하는 연구를 통해 인슐린 저항성을 치료할 수 있는 새로운 기반지식을 제공할 수 있을 것이다. 이러한 목적을 달성하기 위해 살리실산(salicylate)에 주목하게 되었는데, 살리실산은 잘 알려진 cyclooxygenase 저해효과와 무관하게, 고농도에서 인슐린 저항성을 개선한다는 사실이 오래 전부터 동물실험과 인체실험을 통해 알려졌다.<sup>8)</sup> 최근의 보고에서 이러한 살리실산의 효과가 IKK $\beta$  또는 JNK 등의 단백질 kinase 활성억제를 통한 IRS-1의 세린인산화 저해에 기인하리라는 가능성이 제시되었으나<sup>9)</sup> 아직은 정확한 작용기전이 밝혀지지 않은 상태이다. 현재 살리실산을 당뇨병 치료제로 개발하기 위하여 임상시험이 진행 중인 단계로 그 작용기전에 대한 연구가 시급한 상태이다.<sup>10)</sup>

본 연구자는 이전의 연구에서 살리실산의 표적 인산화잔기로 세린731을 밝혔고, 이에 대한 인산화 특이적 항체를 제조하여 세포배양 실험에서 세린731 인산화의 기능에 대한 연구결과를 보

고한 바 있다.<sup>11)</sup> 본 연구에서는 인슐린 저항성 개선효과가 입증된 살리실산의 세린731 인산화 저해를 통한 인슐린 저항성 개선 효과를 마우스를 이용한 동물 시험에서 규명하고자 하였다.

## 실험 방법

### 실험재료

IRS1의 인산화 특이적 항체는 인산화된 세린과 주변 아미노산을 포함하는 합성 peptide를 토끼에 주사하여 제조하였다(Covance, Denver, PA, USA). Anti-phosphotyrosine(PY-20) antibody는 Transduction Laboratories사(Lexington, KY, USA)에서 구입하였고, phospho-Akt, phospho-p70S6K, phospho-4EBP-1와 hemagglutinin(HA) antibody 들은 모두 Cell Signaling Technology사(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 인슐린은 Roche사(Indianapolis, IN, USA), 살리실산과 rapamycin 등의 약품은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 세포배양 및 처리

본 실험에는 IR과 IRS1을 과발현하는 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포주 CHO<sup>IR/IRS1</sup>을 사용하였다. CHO 세포주는 10% FBS를 함유하는 Ham's F-12 배지에 배양하였다. 마우스 배아유래 fibroblast는 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에 배양하였다. 플라스미드의 transfection에는 Lipofectamine Plus(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. CHO 세포는 최소 16시간 이상 무혈청 배지에서 배양한 후 약물을 처리하였다. 5 mM 살리실산은 인슐린을 처리하기 2시간 전에 처리하였다.

### Mutagenesis

IRS1의 세린731 잔기를 알라닌으로 교체하여 세포내에 집어 넣어 wildtype과 인슐린 신호전달 활성을 비교분석하였다. JNK 결합부위를 제거한 IRS1 mutant는 856과 858번 류신을 글라이신으로 교체하여 제조하였다.<sup>5)</sup> 이때 Stratagene사(La Jolla, CA, USA)의 Quickchange site-directed mutagenesis kit을 사용하였다.

### Western blot 및 immunoprecipitation

세포 및 조직을 lysis buffer(20 mM Tris(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 100  $\mu$ M NaVO<sub>4</sub>, 1 mM PMSE, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml aprotinin)에서 용해한 후, 여러 항체를 사용해 immunoprecipitation 하거나, 또는 바로 lysate를 SDS-PAGE로 분리하고, western blot하여 인산화잔기를 분석하거나 인슐린 신호전달과정을 분석하였다.

### 마우스에 대한 살리실산의 투여

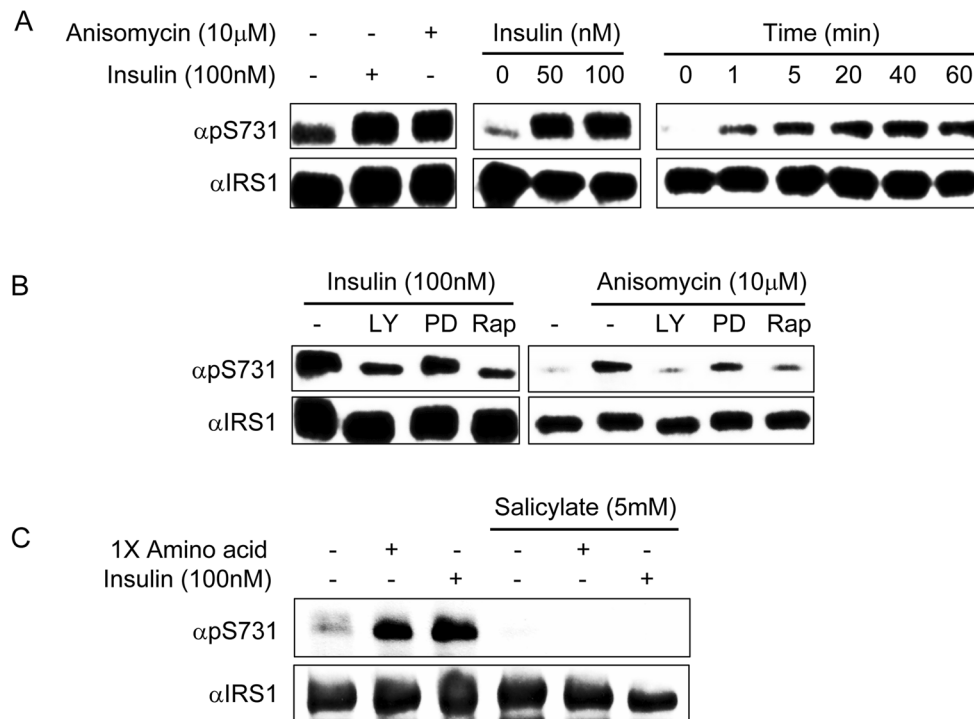
생후 10주된 C57BL/6 마우스를 고지방식이(총칼로리 4.73 kcal/g 중 45%가 지질유래, 20%는 단백질 유래, 35%는 탄수화물 유래임, Rodent Diet D12451[Research Diets, New Brunswick, NJ, USA])을 먹이며 8주간 키위 비만상태를 유도하였다. ALZET 28-day release osmotic pump(Durect, Cupertino, CA, USA)에 식염수 또는 살리실산을 넣고, 이를 각 군별로 5마리씩의 C57BL/6 마우스의 등쪽 피하에 수술로 집어넣었다. 수술후 회복이 확인된 마우스들을 고지방식을 먹이면서 14일간 더 키웠다. 14일째에 인슐린을 투여하고 5분이 지난 후 간조직을 얻어 액체질소에 급속 냉각하여 보관하였다. 이후 간조직을 분쇄하여 조직 추출물을 얻은 후 실험에 사용하였다. 본 연구의 마우스실험은 충북대학교 의과대학 동물실험실의 허가를 받아 실험동물윤리 가이드라인에 따라 실시하였다.

### 실험 결과

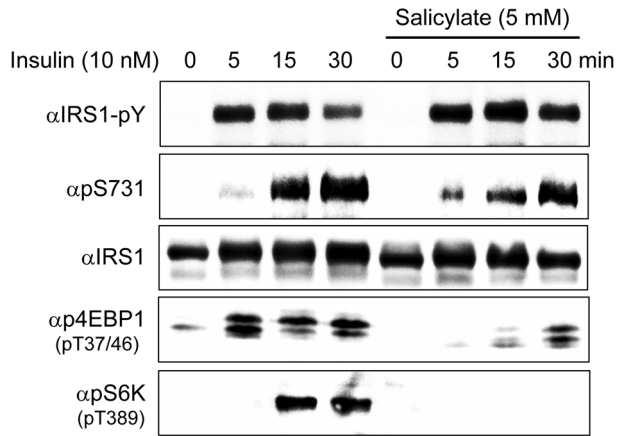
#### 살리실산과 rapamycin에 의해 억제되는 IRS1의 세린 731 인산화

IRS1 단백질의 세린/쓰레오닌 인산화는 TNF $\alpha$ , 인슐린, phorbol

myristate acetate(PMA) 등의 여러 가지 물질들에 의해 증가되는데, 살리실산을 함께 처리하면 인산화가 억제된다고 알려져 있다.<sup>8)</sup> 그러나, 살리실산에 의해 저해되는 인산화단기와 이를 인산화하는 단백질 kinase가 무엇인지에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구자는 이전의 연구에서 살리실산의 표적 인산화단기로 세린 731을 밝혔고, 이에 대한 인산화 특이적 항체를 제조한 바 있다.<sup>11)</sup> CHO<sup>IR/IRS1</sup> 세포주에 5 mM 살리실산과 인슐린을 처리한 후, 제조한 인산화 특이적 항체(anti-pS731 항체)를 사용하여 IRS1의 인산화를 분석하였다. Fig. 1A에 보인 바와 같이, 인슐린 저항성을 유도하는 anisomycin과 고농도의 인슐린 자체에 의해서 IRS1의 세린731에 인산화가 강력하게 유도되었다. 이는 인슐린의 농도에 의존적으로 증가되었으며, 인슐린 처리 후 40분경에 최대치에 도달하였다. 인슐린과 anisomycin에 의해 유도된 세린 731 인산화는 모두 PI3K 저해제와 mTOR-S6K 저해제 처리에 의해 감소되었고, MAPK kinase 저해제에 의해서는 변화되지 않았다(Fig. 1B). 인슐린뿐 아니라 아미노산의 처리에 의해서도 세린731 인산화가 증가되었는데(Fig. 1C) 이는 아미노산 증가가 mTOR-S6K를 활성화시킨다는 보고와 종합해 볼 때, 앞서 rapamycin에 의한 인산화 저해와 잘 부합되는 결과이다. 살리실산을 처리하는 경우 이와 같이 인슐린 및 아미노산에 의해 유도



**Fig. 1** – Modulation of serine 731 phosphorylation of IRS1. (A) CHO<sup>IR/IRS1</sup> cells were treated with insulin or anisomycin for 30 min or indicated times. Immunoprecipitates of IRS1 were analyzed by immunoblotting with antibodies against phospho-serine731 or total IRS1. (B) CHO<sup>IR/IRS1</sup> cells were pre-treated with LY294002, PD98059 or rapamycin for 30 min prior to stimulation of cells with insulin or anisomycin for 30 min and then phosphorylation was analyzed as above. (C) CHO<sup>IR/IRS1</sup> cells were serum-starved for 24 h, placed in DPBS with or without 5 mM SA for 2 h, and stimulated with 1X amino acid or 100 nM insulin for 15 min. Immunoprecipitates of IRS1 were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.



**Fig. 2** – Salicylate increases the insulin-induced tyrosine phosphorylation of IRS1. CHO<sup>IR/IRS1</sup> cells were treated with 5 mM SA for 2 h prior to stimulation with 10 nM insulin for the indicated times. Immunoprecipitates of IRS1 or total cell lysates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

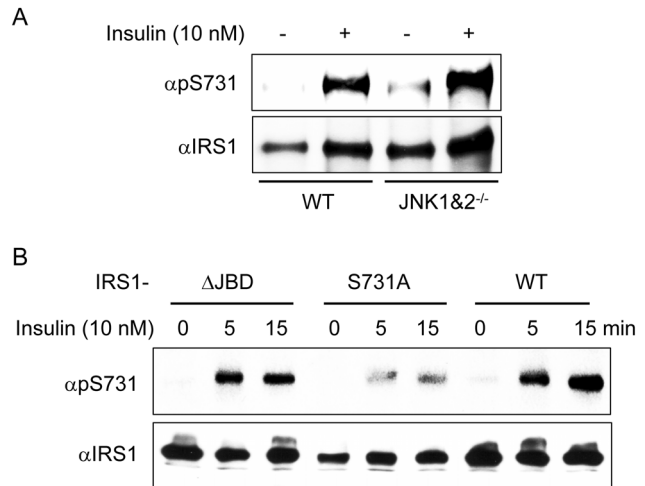
된 세린731 인산화가 완전히 억제되었다(Fig. 1C).

**살리실산에 의한 IRS1의 타이로신 인산화 증가**

CHO<sup>IR/IRS1</sup> 세포주에 살리실산을 사전 처리하고, 인슐린을 처리한 후 시간에 따른 변화를 관찰하였다. 앞서 보여준 결과와 마찬가지로 살리실산의 처리에 의해 인슐린에 의해 유도된 IRS1의 세린731 인산화가 저해되었고, 동시에 IRS1의 활성을 대변하는 타이로신 인산화는 살리실산 처리에 의해 더욱 강해지고, 연장되었다. 이때, 살리실산은 S6K의 인산화와 그 기질인 4E-binding protein(4E-BP)의 인산화를 억제하였으며 이는 S6K의 활성화가 저해되었음을 보여준다(Fig. 2). 이 결과는 살리실산이 인슐린의 IRS1을 통한 작용을 강화시키는 효과가 mTOR-S6K pathway를 저해하고 따라서 IRS1의 세린731 인산화를 저해함으로써 이뤄진다는 것을 의미하는 것이다.

**JNK는 세린731 인산화와 무관함**

IRS1의 세린731을 인산화하는 효소가 무엇인지 알고자, 이전의 보고들에서 IRS1의 세린307을 인산화하여 그 신호전달을 차단하며, 살리실산에 의해 그 활성이 저해된다고 알려진 JNK의 관련성을 알아 보았다.<sup>11)</sup> JNK1과 JNK2가 모두 제거된 마우스에서 얻은 배아유래 fibroblast를 사용한 결과, JNK의 유무는 세린731 인산화에 아무 영향을 주지 않았다(Fig. 3A). 또한 IRS1의 JNK 결합 부위를 변형시키면 JNK가 결합하지 못하는 IRS1 ΔJBD mutant를 만들 수 있는데,<sup>5)</sup> 이 mutant에서도 wildtype과 유사한 정도로 강한 세린731 인산화가 관찰되었다(Fig. 3B). 인슐린 처리 후 15분에서는 ΔJBD mutant에서 wildtype보다 다소 약한 인산화가 관찰되었는데 이는 JNK가 세린731 인산화에 일

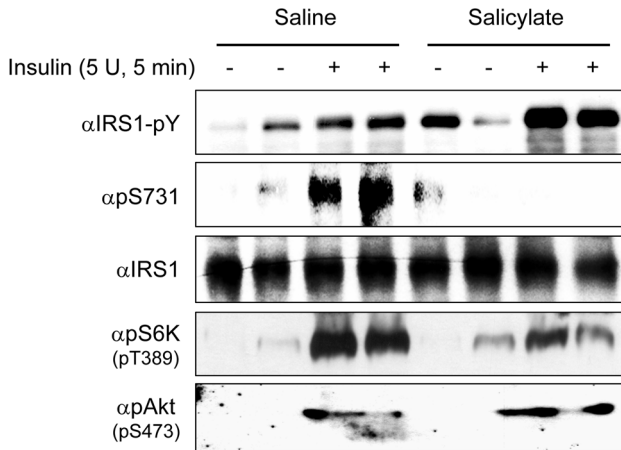


**Fig. 3** – JNK is not required for Ser731 phosphorylation of IRS1. (A) wildtype (WT) or JNK1 and JNK2 double knockout (JNK1&2<sup>-/-</sup>) mouse embryonic fibroblast cells were incubated in serum-free media for 4 h before 15 min stimulation with 10 nM insulin. Immunoprecipitates of IRS1 were analyzed by immunoblotting with anti-phospho-Ser731 (pS307) or anti-IRS1 (IRS1) antibodies. (B) CHO<sup>IR</sup> cells were transfected with plasmids expressing a HA-tagged wildtype IRS1, a mutant IRS1 with Ser731 changed to Ala (S731A), or a mutant IRS1 with leucines at positions 856 and 858 changed to glycines (ΔJBD). Cells were stimulated with 10 nM insulin for the indicated times and immunoprecipitates of IRS1 using HA tag antibody were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

부 관여할 가능성을 제시한다. 그러나 JNK가 제거된 배아유래 fibroblast의 실험 결과와 종합해 보면 JNK의 역할은 미미한 수준일 것으로 생각할 수 있다. 세린731을 알라닌으로 바꾸어 인산화가 일어나지 못하게 만든 IRS1 S731A mutant에서는 세린731 인산화 특이 항체에 의한 반응이 아주 약한 것으로 보아, 이 항체가 주로 세린731 인산화에만 반응하는 것임을 알려준다. 다만 IRS1 S731A mutant에 약한 반응이 보인 것은 이 항체가 IRS1에 포함된 약 70여 개의 인산화 잔기 중 일부와 아주 미약한 교차반응이 있음을 의미하며, 이는 인산화 특이 항체에 일반적인 특성으로 허용할 만한 수준 이하이다. 이 결과는 JNK가 IRS1의 세린731 인산화에는 관련이 없음을 의미하며, 따라서 앞서 보인 결과와 종합해 볼 때, S6K가 이 잔기의 인산화 효소일 가능성이 높음을 시사하는 것이다.

**마우스 모델에서 살리실산 투여에 의한 세린731 인산화 감소와 인슐린 감수성 증가**

살리실산의 작용기전을 세포배양뿐 아니라, 동물모델에서도 밝히기 위하여, 생후 10주부터 고지방식을 8주간 먹여 비만 및 인슐린저항 상태가 유도된 마우스를 사용하여 실험하였다. 고지방식을 먹인 마우스는 체중 40±3 g, 공복시 혈당이 136±10



**Fig. 4** – Salicylate improves insulin signaling by inhibiting Ser731 phosphorylation of IRS1 in mice. C57BL/6 mice were fed with high fat diets for 8 weeks, treated with saline or salicylate at the concentration of 120 mg/kg/day using osmotic pumps and fed with high fat diets for 14 days. Liver tissues were removed following 5 min stimulation with 5 U insulin or saline. Immunoprecipitates of IRS1 or total tissue lysates were analyzed with the indicated antibodies.

mg/d로서 정상식을 먹인 마우스들의 체중  $33 \pm 4$  g, 공복시 혈당  $82 \pm 7$  mg/d에 비해 훨씬 높게 나타나 비만으로 인한 인슐린 저항성 상태인 것을 확인하였다. 이 마우스들을 대상으로 식염수 또는 살리실산을 삼투압펌프를 이용하여 2주 간 투여한 후 인슐린 반응성을 시험한 결과, 살리실산 투여 마우스의 공복시 혈당은  $105 \pm 8$  mg/d로서 식염수처리 대조군의  $145 \pm 12$  mg/d에 비해 인슐린 저항성이 크게 개선되었음을 알 수 있었고 이는 이전의 보고와 잘 부합되었다.<sup>8,9)</sup> 살리실산의 인슐린 저항성 개선효과의 표적 단백질을 밝히기 위해, 이 마우스들을 인슐린으로 5분 간 자극한 후 얻은 간조직 단백질 추출물내의 인슐린 신호전달을 분석하였다. Fig. 4에 보인 바와 같이 인슐린 투여에 의해 증가된 IRS1의 타이로신 인산화와 Akt 인산화는, 대조군에 비해 살리실산 투여군에서 훨씬 강한 양상을 보여 주어, 살리실산이 인슐린 신호전달을 강화시켜주는 효과가 있음을 밝혀내었다. 특히 이때, IRS1의 세린731 인산화는 살리실산 투여군에서 거의 관찰할 수가 없었는데 이는 살리실산의 인슐린 신호전달 개선효과가 세린731 인산화의 저해를 통한 것임을 의미하는 것이다. 세포배양에서와 마찬가지로 살리실산은 S6K의 활성을 강력하게 저해하였으며, 이는 마우스에서도 S6K가 IRS1 세린731 인산화를 통해 인슐린 신호전달을 조절하는 역할을 가진다는 것을 시사하는 것이다. 이상의 결과는 세포배양 실험의 결과와 마찬가지로 동물 모델에서도 살리실산이 S6K를 저해하여 IRS1의 세린731 인산화를 막음으로써 인슐린 신호전달을 개선함을 확인해 주는 것이다.

## 고 찰

최근 살리실산의 인슐린 저항성에 대한 개선효과가 세포배양 뿐 아니라 동물시험과 인체를 대상으로 한 시험에서도 밝혀진 후, 많은 관심을 받고 있다. 이러한 살리실산의 약효에 대한 분자수준에서의 작용기전에 대한 연구가 몇몇 그룹에 의해 보고되었으며, 이들은 살리실산이 IKK $\beta$ 와 JNK 등의 단백질 kinase들을 저해하여, IRS1의 세린 307 인산화를 억제하여 작용할 가능성을 제시하였다.<sup>8,9,12,13)</sup> 본 연구에서는 살리실산이 mTOR-S6K 경로를 저해하여 IRS1의 작용에 억제적으로 작용하는 세린731의 인산화를 감소시킴으로써, 인슐린 작용 개선효과를 나타낸다는 사실을 세포배양 뿐 아니라 마우스 동물 모델에서 밝혔다.

이전의 보고들에서 살리실산이 비특이적으로 작용하여 여러 종류의 단백질 kinase 활성을 저해한다고 알려졌다.<sup>12,13)</sup> 본 연구를 통해 살리실산이 mTOR와 S6K에는 저해작용을 보이지만, Akt 활성은 오히려 증가시키며, 인슐린 저항성이 발병하는데 가장 중요한 kinase로 지목되고 있는 JNK의 경우<sup>13)</sup>는 무관함을 밝혔다. JNK를 제거한 마우스 세포와 JNK에 결합하지 못하는 IRS1 mutant 발현 세포주를 이용한 실험에서 모두 IRS1의 세린731 인산화가 정상적으로 유도되는 것으로 보아 JNK가 IRS1의 세린731 인산화와 무관한 것으로 결론을 내렸다.

본 연구의 결과로 볼 때 살리실산에 의해 저해되며, 세린731의 인산화에 중요한 kinase는 mTOR 또는 S6K인 것을 보인다. 그러나 아직 세린731 잔기가 이들에 의해 직접 인산화될지 아니면 간접적으로 일어날지에 대해서는 추가적인 실험이 요구된다. mTOR의 억제제인 rapamycin 처리에 의해 세린731 이외에도 여러 세린 잔기의 인산화가 억제되고, 또한 JNK, IKK $\beta$  등의 kinase도 억제된다고 보고된 바 있다.<sup>14)</sup> 따라서, mTOR-S6K 경로는 다른 하위 kinase들을 조절하는 상위 조절자일 가능성이 높다. 추가적인 실험을 통하여 세린731을 직접 인산화하는 하위 kinase를 밝히고, 이들이 mTOR-S6K에 의해 어떤 방식으로 활성화되는지, 그리고 mTOR-S6K는 인슐린 저항성을 일으키는 여러 가지 물질들이나 스트레스에 의해 어떤 양식으로 조절되는지를 밝힐 필요성이 있다.

장기적인 고농도의 인슐린 처리에 의해 proteasome을 통한 IRS1 단백질의 분해가 증가된다는 사실이 보고되었고, 이것이 인슐린 저항성 발병의 한가지 방식으로 제시된 바 있다.<sup>15)</sup> 이러한 IRS1의 분해는 rapamycin에 의한 세린 인산화 억제와 깊은 연관성이 있다는 보고가 있다.<sup>16)</sup> 특히 IRS1의 세린307 인산화가 IRS1의 분해를 촉진한다고 보고되었다.<sup>17)</sup> 본 연구에서 찾아낸 세린731 인산화도 rapamycin에 의해 저해되므로 IRS1의 단백질 분해와 관련이 있을 가능성이 높다고 할 수 있다. 또한 비록 본 연구에 사용한 CHO 세포에서는 살리실산이 IRS-1의 단백질 분해에 효과가 없는 것처럼 보이는 결과를 얻었으나, 장기적으로

고농도의 인슐린을 처리하여 IRS1 분해를 유도한 상황에서 살리실산이 어떤 효과를 갖는지에 대한 연구도 매우 흥미로운 주제가 될 것이다.

본 연구에서는 인슐린 저항성 개선효과를 가지며, 현재 치료제로 개발되는 중에 있는 살리실산의 작용기전을 밝히기 위하여, 살리실산에 반응하는 IRS1의 세린731의 인산화가 mTOR와 S6K 경로에 의해 직접 또는 간접적으로 조절된다는 사실을 세포배양뿐 아니라 마우스 동물 모델에서 밝혔다. 본 연구결과는 인슐린 및 insulin-like growth factor-1 신호전달이 IRS1 단백질의 세린 인산화를 통해 어떠한 방식으로 조절되는지에 대한 새로운 설명을 제시함으로써, 인슐린의 작용기전에 대한 한 가지 해답을 제시하는 것이다. 또한, 전세계적으로 급속도로 증가하고 있는 당뇨병과 대사증후군의 공통 증상인 인슐린 저항성의 발병기전을 이해하고, 그에 대한 치료제 개발의 기초지식을 제공할 것이다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

### 문헌

- 1) Saltiel, A. R. : New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* **104**, 517 (2001).
- 2) White, M. F. : Insulin signaling in health and disease. *Science* **302**, 1710 (2003).
- 3) Lee, Y. H. and White, M. F. : Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 361 (2004).
- 4) Zick, Y. : Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell. Biol.* **11**, 437(2001).
- 5) Lee, Y. H., Giraud, J., Davis, R. J. and White, M. F. : c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **278**, 2896 (2003).
- 6) Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H. and Hotamisligil, G. S. : Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457 (2004).
- 7) Kaneto, H., Nakatani, Y., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M., Kajimoto, Y., Ichijo, H., Yamasaki, Y. and Hori, M. : Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat. Med.* **10**, 1128 (2004).
- 8) Kim, J. K., Kim, Y. J., Fillmore, J. J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., Yuan, M., Li, Z. W., Karin, M., Perret, P., Shoelson, S. E. and Shulman, G. I. : Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J. Clin. Invest.* **108**, 437 (2001)
- 9) Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M. and Shoelson, S. E. : Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293**, 1673 (2001).
- 10) Powell, K. : The two faces of fat. *Nature* **447**, 525 (2007).
- 11) Lee, Y. H. : Induction of insulin resistance by serine phosphorylation of IRS-1. *Chungbuk Med. J.* **16**, 459 (2006).
- 12) Jiang, G., Dallas-Yang, Q., Liu, F., Moller, D. E. and Zhang, B. B. : Salicylic acid reverses phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)- and tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced insulin receptor substrate 1 (IRS1) serine 307 phosphorylation and insulin resistance in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 180 (2003).
- 13) Gao, Z., Zuberi, A., Quon, M. J., Dong, Z. and Ye, J. : Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 24944 (2003).
- 14) Zick, Y. : Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci. STKE* **268**, pe4 (2005).
- 15) Zhande, R., Mitchell, J. J., Wu, J. and Sun, X. J. : Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1016 (2002).
- 16) Pederson, T. M., Kramer, D. L. and Rondinone, C. M. : Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes* **50**, 24 (2001).
- 17) Greene, M. W., Sakaue, H., Wang, L., Alessi, D. R. and Roth, R. A. : Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 8199 (2003).