

신경 발생 및 분화에서의 Wnt 신호전달의 역할

Wnt 신호전달의 개요

Wnt 신호전달에 대한 연구는 처음에는 암의 형성에 관련되는 proto-oncogene으로서 연구되어지다가, 그 homolog가 *Drosophila*에서 초기 발생 단계에서 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀짐으로써 많은 연구가 이루어져 왔다 (Polakis, 2000; Cadigan and Nusse, 1997). Mammary gland tumor virus의 삽입에 의해서 유발되어지는 암의 병인 유전자가 proto-oncogene인 *int-1* 이고, *Drosophila*의 발생과정에서 중요한 *wingless (wg)* 유전자가 그 ortholog라는 사실로부터 Wnt (*wg+int*)라고 명명되어졌다. Wnt 신호전달은 포유동물뿐만 아니라 *Xenopus*, *Zebra fish*, *Drosophila* 및 *C.elegans*와 여러 모델 동물에서 공통적으로 적용되는 체계로서, 각각의 시스템으로부터 얻어진 정보가 전체의 신호전달 과정을 이해하는 상호보완 관계를 유지하면서 연구가 발전되어왔다 (1).

휴먼 지놈 프로젝트의 결과와 지금까지 염기 서열이 밝혀진 바에 의하면 적어도 19 개의 휴먼/마우스 Wnt 유전자가 있고, 각각의 Wnts들은 초기 발생단계의 특정 부위와 시간에 특이적으로 발현하는 양상을 나타내며 다양한 역할을 한다. Gene targeting 등의 방법을 이용하여 밝혀진

바에 의하면 Wnt1은 mid-brain의 형성, Wnt3는 초기 발생단계에서의 embryonic axis의 결정, Wnt7a는 cerebellum에서 synapses의 성숙에 필수적이며, Wnt10b는 adipogenesis를 억제하고 또한 여러 다양한 stem cell의 분화에도 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다. 이와 같이 초기 발생 및 stem cell의 분화에서의 다양한 기능 및 암을 형성하는 기전을 밝히기 위하여 Wnt 신호전달의 경로 및 조절에 관여하는 많은 유전자들이 발굴이 이 분야의 연구에 중심이 되어져왔다.

Wnt 신호전달은 cytoplasmic β -catenin의 level을 변화시킴에 의해서 유도되는 target 유전자의 발현을 조절하는 'canonical pathway'와 G 단백질을 통하여 Ca^{++} fluxes와 phosphatidyl inositide metabolism을 조절하는 'non-canonical pathway'로 나눌 수 있다. 따라서 canonical pathway를 활성화시키는지 유무에 따라서 다양한 Wnt들이 분류가 되기도 한다. 가령 β -catenin level을 증가시키는 Wnt1, 3a, 8, 8b와 그렇지 않은 Wnt 4, 5a, 11 등으로 분류되어 진다. 최근에 non-canonical pathway의 여러 사례들이 밝혀지고 그 중요성이 인식되어지기 시작하고 있지만, 본 논문에서는 그동안 주로 연구되어 왔던 canonical pathway에 초점을 맞추어서 기술하고자 한다.



조익훈 / 조교수

서울시립대학교

Tel. 02-2210-2681
Fax. 02-2210-2888
E-mail. ej70@uos.ac.kr

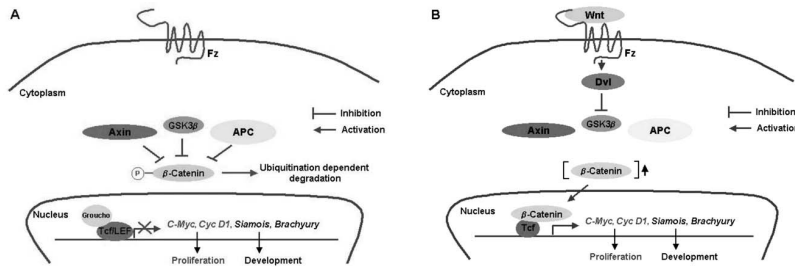


그림 1. Wnt 신호 전달 경로

Table 1. 신경 발생과 분화에 관련된 Wnt Knockouts 마우스의 표현형

Gene	Phenotype	Reference
Wnt-1	Loss of midbrain, loss of cerebellum	13
	Deficiency in neural crest derivatives	8
Wnt-3a	Reduction of neural crest and CNS progenitors	14
	Loss of hippocampus	12
Wnt-7a	Delay of synaptic maturation	6
β -cat*	Brain malformation and failure of craniofacial development	4

* Wnt1 promoter와 Cre-LoxP system을 이용하여 β catenin을 Wnt1이 발현되는 곳에서 특이적으로 제거된 마우스

Wnt signaling이 없는 상태에서는 β -catenin, Axin, GSK3 β 와 Adenomatous Polyposis Coli tumor suppressor protein (APC)의 complex 내에서 GSK3 β 가 β -catenin을 인산화 시키고, E3 ubiquitin ligase인 β -TrCP가 인산화되어진 β -catenin과 결합하여 β -catenin의 ubiquitination-mediated proteasome degradation을 유발하게 된다(그림 1A). 이때, 핵 내에서는 TCF/LEF 전사인자와 전사 억제자인 Groucho라는 단백질이 결합하여 Wnt 신호전달에 의해 조절되는 유전자의 발현을 억제하게 된다. Wnt 단백질이 수용체인 Frizzled에 결합하게 되면 Dvl을 활성화시켜서 직접 또는 간접적으로 GSK3 β 의 활성을 억제시킨다(그림 1B). 이때 Axin의 단백질 level도 감소하게 되어 cytoplasm내에 있는 β -catenin의 분해가

억제된다. 따라서 cytoplasm내에 β -catenin이 축적되어지고, 축적된 β -catenin은 핵 내로 이동하여, Groucho와 결합하여 전사를 억제하고 있는 TCF/LEF와 활성화시켜 여러 target 유전자들의 발현을 촉진시킨다. 현재까지 Wnt 신호전달에 의하여 조절되는 약 50여 가지의 유전자가 밝혀져 있는데, 그 중 세포 주기를 조절하는 *c-myc*, *cyclin D1*과 초기 발생을 조절하는 전사 인자인 *siamois*나 *brachyury* 등이 대표적이라고 할 수 있다. 이들 유전자의 발현으로 인해서 Wnt 유전자가 많이 발현되거나, Wnt 신호전달을 억제하는 Axin 또는 APC에 돌연변이가 일어나게 되면 암이 유발되는 경우나 정상적이지 않은 Wnt 신호전달에 의하여 유도되는 기형적인 발생과정의 메커니즘을 이해할 수 있게 되었다. 가령 *c-myc*,

cyclin D1 등의 발현이 Wnt 신호전달에 의해서 정상적으로 조절이 되지 않으면 세포의 성장 및 분열이 촉진되어 암이 형성되어지게 된다. *siamois*나 *brachyury* 등과 같은 유전자는 embryo의 dorsal fate를 결정하는 유전자의 발현을 촉진시키는데, 이런 유전자들이 ventral fate로 결정되어져 있는 부분에 과량의 Wnt 신호전달에 의해서 발현되어지게 되면 두 개의 dorsal fate를 갖게되어 embryonic axis가 duplication된다고 밝혀져 왔다 (Bienz and Clevers, 2000). 따라서 최근에는 제노믹스나 프로티오믹스 등의 방법을 이용하여 Wnt 신호전달에 의해 조절되는 유전자의 발현에 상당한 연구가 집중이 되어지고 있다 (Kolligs *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002).

신경 발생 및 분화에서의 Wnt 신호전달의 역할

Wnt 신호전달이 발생과정에서 뇌의 형성에 중요하다는 사실은 다양한 Wnts 들이 발생 과정에서 특이적으로 신경 조직에서 발현이 되어지고, Harvard 대학의 McMahon lab에서 Wnt1이 마우스에서 Knockout 되어졌을 때 midbrain과 cerebellum의 발생이 결여되어진다는 사실로부터 밝혀지기 시작하였다 (McMahon and Bradley, 1990; Table 1). 마우스를 이용한 실험이외에도 여러 모델 시스템에서도 동일한 결과가 여러 연구자에 의해 밝혀져 왔다. *Xenopus*의 embryo는 상대적으로 다루기가 쉽고 표현형을 쉽게 선별 할 수 있다는 장점 때문에 특정 유전자의 발생 과정에서의 역할을 조사하기 위하여 오래 전부터 이용되어져왔다. 그림 2에서는 *Xenopus embryo*에서 Wnt

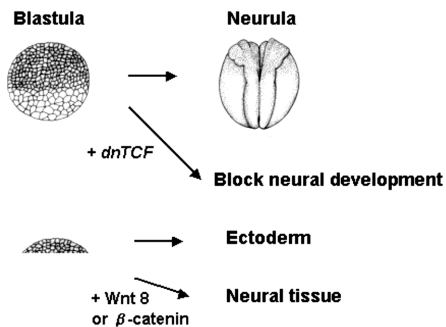


그림 2. Wnt 신호전달의 뇌의 발생에서의 역할

신호전달이 neural tissue의 발생에 중요하다는 사실을 보여주고 있다. *Xenopus embryo*는 수정이 일어난 후 1000여 개의 세포로 이루어진 blastula를 형성하고 gastrulation 단계를 거쳐서 neural tissue를 갖는 neurula 상태에 도달하게 된다. 수정 후 분열이 일어나기 시작하기 직전에 Wnt 신호전달을 억제할 수 있는 dominant negative TCF (dnTCF)를 주사하면 neural tissue의 형성이 억제되었다. Blastula의 윗 부분 (animal cap)을 잘라내어 in vitro에서 키우게 되면 ectoderm을 형성한다고 알려져 있다. 하지만 수정 후 분열이 일어나기 시작하기 직전에 Wnt 신호전달을 촉진하는 Wnt8 이나 β-catenin을 주사하여 blastula를 형성한 후, 그 blastula의 animal cap을 in vitro에서 키우게 되면 neural tissue를 형성한다는 사실로부터 Wnt 신호전달이 neural tissue의 발생에서 중요하다는 결론을 얻을 수 있었다 (Baker et al., 1999).

최근에 독일의 Dr. Kemler 그룹에 의해 발표된 바에 의하면 Wnt1이 마우스에서 Knockout 되어졌을 때 나타나는 발생의 결함들이 β-catenin 신호 전달에 의한 것임을 밝혀주고 있다 (Brault et al., 2001). 이 논문은 많은 연구자들이 생각

은 경우에 있어서 Wnt의 Knockout은 embryonic lethality를 나타내므로 원하는 시기에서 Wnt 신호전달의 역할을 연구하기가 어려웠다. Dr. Kemler 그룹은 Wnt1의 endogenous 발현과 동일하게 리포터 유전자를 발현시킬 수 있는 Wnt1 promoter/enhancer construct를 Cre 효소를 발현시키는 vector로 사용하였다. 이와 동시에 β-catenin의 유전자 주위에 LoxP 서열을 삽입한 마우스를 제작하고, 두 마우스를 교배하여 Wnt1이 발현되는 곳에서 특이적으로 β-catenin을 제거시킬 수 있었다. 그 결과로 나온 마우스의 표현형은 Wnt1의 Knockout 마우스의 표현형과 비슷하다는 사실로 미루어 Wnt/β-catenin 신호 전달이 뇌의 발생에 중요하다고 보고하였다.

마우스에서 Wnt gene이 Knockout 되었을 때 위에서 기술한 바와 같은 전체적인 뇌의 형성에서의 문제를 나타내는 경우가 생길 수 있다고 밝혀졌다 (Muroyama et al., 2002). Spinal cord가 발생할 때 등 부위의 roof plate로부터 신호 전달 물질이 나와서 세가지의 dorsal interneuron (D1, D2, D3)의 형성을 조절한다고 알려져 왔다. Wnt1 과 Wnt3a

가 이 부위에서 발현되는 점으로 미루어 Wnt가 후보 물질로 생각되었지만 확실치는 않은 상태였다. 일본의 Takada 그룹에서는 Wnt1과 Wnt3a가 동시에 Knockout 되어진 마우스에서 D1 과 D2 interneuron의 발생이 감소되어지고, Wnt3a를 과 발현 시켰을 때 D1 과 D2 interneuron의 형성이 촉진되었다는 발견으로부터 Wnt 신호전달이 dorsal interneuron의 cell type을 specification 하는데 필수적이라는 결론을 내릴 수 있었다.

위에서 기술한 모델 생물 시스템을 사용하는 연구 이외에도 세포 수준에서도 Wnt 신호전달의 역할을 알아보기 위한 많은 연구가 진행되어져왔다. P19 embryonic carcinoma cell은 미분화된 상태로 있다가 retinoic acid에 의해서 신경세포로 분화되는 특징이 있다 (Jones-Villeneuve et al., 1982). 신경세포로의 분화 과정에서 여러 가지 Wnt 들은 발현이 차등적으로 조절되어진다는 사실이 밝혀져 왔다 (그림 3; Smolich and Papkoff, 1994 ;Ryu et al. submitted).

본 연구자의 미발표된 자료에 의하면 Wnt 신호전달을 억제하는 유전자의 발현

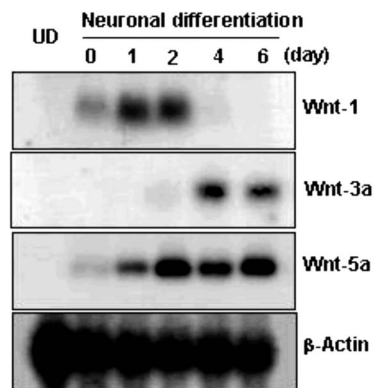


그림 3. 신경세포로의 분화과정에서의 Wnt mRNA들의 발현 양상

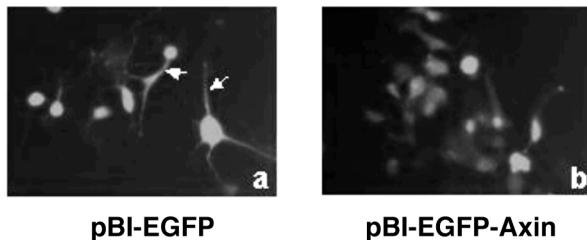


그림 4. Wnt 신호의 억제에 의한 neurite 형성의 억제

이 신경세포로의 분화 과정에서 감소되어 지는 반면에 촉진하는 β -catenin의 level은 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Ryu *et al.*, submitted). Tet-On inducible 시스템을 이용하여 Axin을 신경세포로의 분화 과정에서 계속해서 발현 시켰을 때, neurite의 형성이 억제되어지는 사실과 Wnt3a conditioned media에 의한 신경세포 분화 인자의 발현이 증대되는 점으로 미루어 Wnt 신호전달이 neuron의 성숙에 중요하다는 사실을 보여주고 있다 (그림 4).

앞으로의 Wnt 신호전달 연구의 전망

위에서 기술한 바와 같이 Wnt 신호전달은 뇌의 형성 및 신경세포의 분화에서 결정적인 역할을 담당하고 있다. 본 논문에서는 Wnt 신호전달의 역할을 신경의 분화 및 발생에 국한 지어서 설명했지만, 실제로는 훨씬 다양한 분야에서 연구가 진행되어지고 있다. 암의 형성 기전, 여러 stem cell의 분화를 촉진하거나 억제하는 기전, adipogenesis에서의 역할, 세포의 변형에 관계되는 TGF- β 신호전달과의 연계성, Alzheimer's 치매의 병인 기전으로

서 Wnt 신호전달에 관한 연구가 활발하게 진행되어지고 있다. 따라서 최근의 연구 경향은 *in vivo* 내에서 Wnt 신호전달을 조절하는 여러 물질의 발굴과, 발견되어진 유전자의 기능을 밝히는 연구가 중점을 이룬다고 할 수 있다. 앞서서도 기술한 바와 같이 특정 유전자를 Cre-LoxP 시스템을 사용하여 원하는 시간과 장소에서 제거하거나 Tet 시스템을 이용하여 inducible 하게 발현시킬 수 있는 방법 등을 사용하여 Wnt 신호전달의 역할과 정교한 조절 메커니즘을 이해하려는 시도가 더욱더 많이 이용되어질 것이다. Wnt 신호전달의 조절 메커니즘의 완벽한 이해는 부적절한 Wnt 신호전달에 의해 야기되는 여러 가지 질병의 원인 유전자를 제공하는데 결정적인 역할을 하게 될 것이다.

참고 문헌

1. <http://www.stanford.edu/~musse/wntwindow.html>
2. Baker JC, Beddington RS and Harland RM. (1999) Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits *bmp4* expression and activates neural development. *Genes Dev.* **13**, 3149-59.
3. Bienz M and Clevers H. (2000)

Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**, 311-20.

4. Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O. and Kemler R. (2001) Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* **128**, 1253-64.
5. Cadigan KM and Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Dev.* **11**, 3286-3305.
6. Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, and Kalnins VI. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol.* **94**, 253-62.
7. Kolligs FT, Nieman MT, Winer I, Hu G, Van Mater D, Feng Y, Smith IM, Wu R, Zhai Y, Cho KR, and Fearon ER. (2002) ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell* **1**, 145-55.
8. Lee MS, D'Amour KA, and Papkoff J. (2002) A yeast model system for functional analysis of beta-catenin signaling. *J Cell Biol.* **158**, 1067-78.
9. McMahon AP and Bradley A. (1990) The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **162**, 1073-85.
10. Muroyama Y, Fujihara M, Ikeya M, Kondoh H, and Takada S. (2002) Wnt signaling plays an

essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* **16**, 548-53.

11. Smolich BD and Papkoff J. (1994) Regulated expression of Wnt family members during neuroectodermal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells: overexpression of Wnt-1 perturbs normal differentiation-specific properties. *Dev Biol.* **166**, 300-10.

저자약력

1986. 2	서울대학교 농화학과, 학사
1989. 9	한양대학교 유전공학과, 석사
1995.10	Michigan State University Ph.D.
1995.11-1997. 2	SUNY at Stony Brook, 연구원
1997. 3-2000.12	Columbia University, 연구원
2001. 1-2001. 8	가톨릭 의과대학, Brain Pool
2001. 9-현재	서울시립대학교 생명과학과, 조교수

