

# 골대사에서 Wnts, LRP5 및 sFRPs의 역할

아주대학교 의과대학 내분비대사내과학교실

정 윤 석

## Role of Wnts, LRP5, and sFRPs in Bone

Yoon-Sok Chung

Department of Endocrinology and Metabolism, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

### LRP5 수용체의 발견

최근 골다공증 분야의 breakthrough라 할 수 있는 low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene mutation이 보고된 것은 불과 수년전의 일이다. LRP5 gene의 발견은 대표적인 환자의 질병으로부터 기초연구의 연결을 통한 의학의 발전이라고 할 수 있는 예이다. Osteoporosis pseudoglioma syndrome (OPPG)라고 하는 질환은 소아연령부터의 심각한 골다공증과 안구의 망막혈관이 잔재하여 종양과 유사하게 보인다고 하여 명명된 질병이다. 이러한 환자들을 연구하여 LRP5 유전자에 loss of function 돌연변이가 있음을 보고하였다[1]. 돌연변이는 LRP5 유전자의 여러부위에 non-sense, mis-sense 및 frameshift 등의 다양한 돌연변이임을 확인하였다. 한편 비슷한 시기에 골밀도와 골량이 증가한 돌연변이도 보고되었는데, 이 역시 LRP5 유전자의 171번째 아미노산이 glycine에서 valine으로 치환된 돌연변이였으나 OPPG와는 달리 골량이 매우 증가한 양상을 보인 gain of function 돌연변이였다[2,3]. 따라서 LRP5 유전자는 골량을 감소시키기도 하고, 골량을 증가시킬수도 있는 골대사에서 매우 중요한 유전자임이 밝혀졌다. Katof[4] 등은 LRP5 유전자의 knockout mouse를 만들어 실험한 결

과 조골세포의 수가 정상에 비하여 감소하고 골형성속도(bone formation rate)가 감소하며 석회결절(mineral nodule)이 감소한 골형성 장애가 있음을 보고하였다. 또한 이들은 Wnt1을 처리하였을때 leukocyte enhancer factor 1(Lef1) 전사인자의 발현증가가 LRP5 knockout model에서는 나타나지 않는 것을 보고하여 LRP5가 Wnt1의 신호를 세포내로 전달하는데 중요함을 증명하였다. 이외의 다른 실험연구에서도 LRP5는 Wnt의 co-receptor로 연결된다는 것이 알려졌는데, frizzled receptor와 더불어 Wnt의 신호전달을 하는 것으로 보고되었다.

척추동물에서의 LRP와 초파리에서의 Arrow는 기다란 단회통과(single pass) transmembrane 수용체 단백질이다. Wnts가 LRP의 세포외 domain에 직접 결합하여 작용을 나타낸다는 것이 밝혀져 있는데, LRP와 Wnts 그리고 frizzled receptor가 ternary complex를 형성하는 것이 보고되었다. LRP의 cytoplasmic domain이 Axin과 작용을 한다고 보고되었다. LRP는 또한 Wnt inhibitor인 Dickkopf (Dkk)와 결합할 수 있는데 결합부위는 Wnt 결합부위와는 다른 것으로 밝혀져 있다[5]. LRP는 LRP5와 LRP6의 2종류가 존재하는 것으로 밝혀져 있다. LRP5의 돌연변이는 흥미있게도 뼈의 발달과 눈의 발달에 관여하는 것으로 알려져

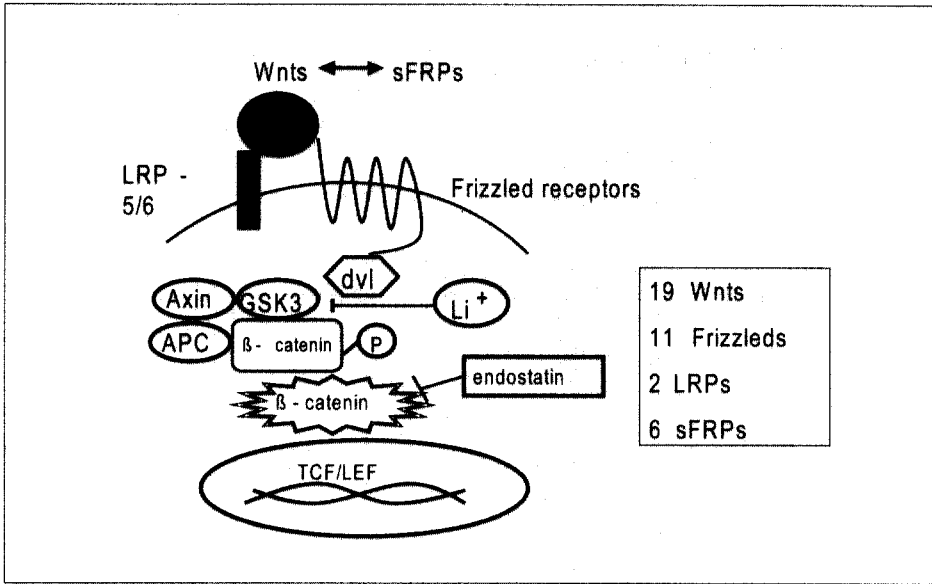


Fig. 1. Wnt signaling pathway.

다. Dkk1은 kremen2 (Krm2) 및 LRP6와 결합하여 ternary complex를 형성하고 endocytosis되어 degradation됨으로서 Wnt 신호전달을 억제하는 것으로 보고되었다. 한편, Dkk2가 LRP6에 결합하여 Wnt 신호전달 체계를 활성화하는 것으로 알려져 있다. LRP6의 epidermal growth factor (EGF) repeat 1~4을 deletion 시키면 지속적으로 LRP6가 활성화 되는 것으로 보아 LRP6는 antoinhibitory로 작용하다가 Dkk2가 결합하면 이러한 억제신호가 차단되어 활성화 되는 것으로 보고 있다. 한편 Krm2가 Dkk2 및 LRP6와 결합하여 ternary complex를 형성하면 LRP6를 통한 신호전달이 다시 억제되는 것을 human 293 fibroblast에 Dkk2와 Krm2를 transfection 시킨 실험과 Xenopus embryo 실험을 통해 증명하였다[6].

### Wnt 신호전달

Wnt 신호전달에 대한 연구는 처음에는 암의 형성에 관련되는 proto-oncogene으로서 연구되어지다가, 그 homolog가 Drosophila에서 초기 발생 단계에서 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀짐으로써 많은 연구가

이루어 이루어져왔다. Mammary gland tumor virus의 삽입에 의해서 유발되어지는 암의 병인 유전자가 proto-oncogene인 int-1이고, Drosophila의 발생과정에서 중요한 wingless (wg) 유전자가 그 ortholog라는 사실로부터 Wnt (wg+int)라고 명명되어졌다. Wnt 신호전달은 포유동물뿐만 아니라 Xenopus, Zebra fish, Drosophila 및 C.elegans와 여러 모델 동물에서 공통적으로 적용되는 체계로서, 각각의 시스템으로부터 얻어진 정보가 천체의 신호전달 과정을 이해하는 상호보완 관계를 유지하면서 연구가 발전되어왔다[7].

휴먼 지놈 프로젝트의 결과와 지금까지 염기 서열이 밝혀진 바에 의하면 적어도 19개의 휴먼/마우스 Wnts 유전자가 있고 각각의 Wnt들은 초기 발생단계의 특정부위와 시간에 특이적으로 발현하는 양상을 나타내며 다양한 역할을 한다.

Wnt 신호전달은 cytoplasmic β-catenin의 level을 변화시킴에 의해서 유도되는 target 유전자의 발현을 조절하는 'canonical pathway'와 G 단백질을 통하여 Ca<sup>++</sup>fluxes와 phosphatidyl inositide metabolism을 조절하는 'non-canonical pathway'로 나눌 수 있다. 따라서 canonical pathway를 활성화시키는 지 유무에 따

라서 다양한 Wnt들이 분류가 되기도 한다. 가령  $\beta$ -catenin level을 증가시키는 Wnt 1, 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 review에서는 그동안 주로 연구되어 왔던 canonical pathway에 초점을 맞추어서 기술하고자 한다.

Wnt signaling이 없는 상태에서는 Axin, glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )와 Adenomatous Polyposis Coli tumor suppressor protein (APC)가 ternary complex를 형성하고 이중 주로 GSK3 $\beta$ 가  $\beta$ -catenin을 인산화시켜, E3 ubiquitin ligase인  $\beta$ -TrCP가 인산화되어진  $\beta$ -catenin과 결합하여  $\beta$ -catenin의 ubiquitination-mediated proteasome degradation을 유발하게 된다. 이때, 핵내에서는 T cell factor (TCF) /Leukocyte enhancer factor (LEF) 전사인자와 전사억제자인 Groucho라는 단백질이 결합하여 Wnt 신호전달에 의해 조절되는 유전자의 발현을 억제하게 된다. Wnt 단백질이 수용체인 Frizzled에 결합하게 되면 Dishevelled (Dvl)을 활성화 시켜서 직접 또는 간접적으로 GSK3 $\beta$ 의 활성을 억제시킨다. 이때 Axin의 단백질 level도 감소하게 되어 cytoplasm내에 있는  $\beta$ -catenin의 분해가 억제된다. 따라서 cytoplasm내에  $\beta$ -catenin이 축적되어지고, 축적된  $\beta$ -catenin은 핵 내로 이동하여, Groucho와 결합하여 전사가 억제되어있던 TCF/LEF를 활성화시켜 여러 표적유전자(target gene)들의 발현을 촉진시킨다. 한편, Wnt가 LRP5 수용체에 결합하게 되면 주로 Axin이 LRP5수용체에 결합되면서 ternary complex가 해체되어 역시 free  $\beta$ -catenin이 증가하게 된다. 또한 lithium 이온은 GSK3 $\beta$ 를 억제하여  $\beta$ -catenin을 증가시키고, endostatin은  $\beta$ -catenin을 직접 분해시키는 작용을 하는 것으로 보고되었다. 한편 secreted form인 secreted frizzled related protein (sFRP)는 frizzled 수용체의 extracellular domain만 존재하고 transmembrane domain과 cytosolic domain이 없는 truncated form으로서 세포외로 분비되어 존재하다가 Wnt와 결합하여 Wnt가 frizzled 또는 LRP5 수용체에 결합하는 것을 억제함으로써 Wnt 신호전달을 방해하는 물질로 알려져 있다 (Fig. 1). 현재까지 Wnt

신호전달에 의하여 조절되는 약 50여 가지의 유전자가 밝혀져 있는데, 그 중 세포 주기를 조절하는 c-myc, cyclin D1과 초기 발생을 조절하는 전사 인자인 siamois나 brachyury 등이 대표적이라고 할 수 있다. 이들 유전자의 발견으로 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. Siamois나 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. 따라서 최근에는 제노믹스나 프로티오믹스 등의 방법을 이용하여 Wnt 신호전달에 의해 조절되는 유전자의 발굴에 상당한 연구가 집중이 되어지고 있다.

### 조골세포에서 sFRP-3 처리 실험

저자는 미국 연수기간동안 조골세포배양 실험에서 Wnt antagonist로 알려진 sFRP-3를 세포배양액내에 처리하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 실험전 세웠던 가설은 sFRP-3는 기존에 sFRPs가 알려져 왔던 것처럼 Wnt signal을 억제하여 조골세포의 증식과 분화를 억제할 것으로 생각하였다. 세포는 MC3T3-E1세포와 mouse bone marrow stromal cell을 사용하였다. 세포의 증식은 alamarBlue assay와 bromodeoxyuridine uptake 검사를 통해 가설처럼 sFRP-3를 처리할 경우 용량의존적(dose-dependent)으로 세포의 증식을 억제함을 알 수 있었다. 이 경우 세포의 고사(apoptosis)에 의한 것임이 아님을 확인하기 위해 caspase-3/7 assay를 시행하였고, positive control인 thapsigargin은 고사를 증가시켰으나 sFRP-3는 고사에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 조골세포의 분화에 관한 실험은

alkaline phosphatase activity와 배양액내 osteocalcin 농도, 그리고 석회결절 (mineral nodule)을 통해 확인한 결과, 가설과는 반대로 분화가 촉진됨을 발견하였다. 이러한 결과의 기전을 설명하기 위해  $\beta$ -catenin이 세포내에서 어떠한 변화를 보이는지 western blot을 통해 확인한 결과 sFRP-3가  $\beta$ -catenin을 감소시킴을 알 수 있었다. 따라서 sFRP-3는 세포내  $\beta$ -catenin을 감소시키고 이에 의해 세포의 증식은 억제함을 설명할 수 있었으나, 세포의 분화가 촉진된다는 것은 일반적으로  $\beta$ -catenin이 세포분화를 촉진한다고 알려져 있어 상이한 결과를 얻어서 차후 추가적인 연구가 필요하다고 할 수 있다.

### 참 고 문 헌

1. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Breigton P, Black GCM, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, Paepe AD, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam C, Hirose T, Jans A, Jppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard M-J, Hul WV, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML: *LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell* 107:513-523, 2001
2. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP: *High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. N Engl J Med* 346:1513-1521, 2002
3. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao S-C, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nagues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Eerdewegh PV, Recker RR, Johnson ML: *A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. Am J Hum Genet* 70:11-19, 2002
4. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BHJ, GlassII DA, Hartmann C, Li L, Hwang T-H, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L: *Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J Cell Biol* 157:303-314, 2002
5. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stanek P, Glinka A, Niehrs C: *LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. Nature* 411:321-325, 2001
6. Mao B and Niehrs C: *Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. Gene* 302:179-183, 2003
7. 조익훈: 신경발생 및 분화에서의 Wnt 신호전달의 역할. 분자세포생물학뉴스 14(3):30-34, 2002