

GOVP1200507285

과제번호: M10106000023-01A200000600

**레프-원과 베타-카테닌에 의한 대장암, 피부암 발생  
기전연구**

전남대학교

과 학 기 술 부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 레프-원과 베타-카테닌에 의한 대장암, 피부암 발생 기전 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2004 . 7 . 27

주관연구기관명 : 전남대학교

주관연구책임자 : 김권섭

## 보고서 초록

과제관리번호	M10106000023-01A200000600	해당단계 연구기간	2001.8.1 ~ 2004.5.31	단계 구분	(1 / 3)
연구사업명	중 사업명	국책연구개발사업			
	세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업(분자의과학사업 이관)			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	레프-원과 베타-카테닌에 의한 대장암, 피부암 발생 기전연구			
연구책임자	김권섭	해당단계 참여연구원수	총 : 15 명 내부 : 1 명 외부 : 14 명	해당단계 연구비	정부: 145,000 천원 기업: 천원 계: 145,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	전남대학교 약학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	29
<ul style="list-style-type: none"> <li>● TOPFLASH reporter system을 이용한 preliminary experiments에서 N-terminal 86 아미노산들을 제거한 beta-catenin mutant에 비해 C-terminal 123 아미노산을 제거시킨 beta-catenin mutant는 그 transactivation 기능이 현저하게 저하됨을 관찰.</li> <li>● C-terminal 부분을 각기 다르게 절단시킨 7종의 deletion mutants를 현재 합성완료하였으며 추가로 3종의 deletion mutants를 합성. 모든 deletion mutants를 합성한 후 TOPFLASH reporter assay를 통해 정확한 transactivation domain을 C-말단의 50 아미노산으로 파악.</li> <li>● LEF-1을 발현시키는 adenovirus를 성공적으로 생산시켰으며 그 발현을 RT-PCR, anti-LEF-1 antibody를 이용한 Immunostaining을 통해 확인하였음. 또한 정상상피세포와 암세포를 이용 100% transfection 효율과 beta-catenin을 핵으로 이동시키는 기능적인 면을 관찰.</li> <li>● beta-catenin과 CRM1과의 직접적인 결합을 GST pull down assay를 통해 확인하였으며, beta-catenin의 Arm repeat domain이 결합 부위로 파악되었음. 또한 녹색형광 또는 적색형광 단백질을 tagging한 CRM1 또는 beta-catenin을 이용하여 세포내에서 이들 단백질이 핵내에서 함께 위치함을 관찰하였으며, CRM1에 의한 beta-catenin의 핵외배출 사실을 검증하였음.</li> <li>● 현재 DNA chip 분석을 통해 정상상피세포에서 발현증가된 유전자 1종, 감소된 유전자 5종, DLD1 대장암세포주에서 발현증가된 유전자 2종, 감소된 유전자 3종 파악.</li> <li>● MYCBP를 beta-catenin/LEF-1의 주요 타겟으로 밝혀내었으며, Promoter/Enhancer 부분의 deletion을 통하여 LEF-1 responsive 부위를 파악.</li> </ul>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	암, 카테닌, 유전자, 핵외배출, 프로모터, 바이러스			
	영 어	cancer, catenin, gene, nuclear export, promoter, virus			

## 요 약 문

### I. 제 목

레프-윈과 베타-카테닌에 의한 대장암, 피부암 발생 기전 연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

연구개발의 목적:

1. LEF-1과 beta-catenin에 의한 발암 기전의 이해.
2. beta-catenin의 기능에 대한 분자구조학적 분석
3. beta-catenin의 핵내이동과 배출에 관한 기전 이해
4. 대장암, 피부암에서 beta-catenin과 LEF-1의 발암 가능성 조사
5. beta-catenin과 LEF-1의 영향을 받는 유전자군 파악, 발암기전과 연계 연구

연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성/필요성:

beta-catenin은 피부암(모발암 Pilomatrixomas)에서 75%, 간암 20%, 대장암, 자궁암, 전립선암, 자궁경부암에서 4-13%에서 베타카테닌의 돌연변이가 존재함이 밝혀졌고, 그 세포질내 조절인자인 APC와 더불어 대장암, 피부암등의 형성과정에서 제일 먼저 변이되는 유전체로 보고되고 있다. 이 베타카테닌은 정상 상피세포의 경우 가쪽면 구조인 Adherens Junction에서 E-cadherin과 결합하는 주 구성 단백질이지만, 특정 암에서는 핵으로 이동해 전사인자인 LEF-1이나 TCF-4와 함께 암유발에 영향을 끼치는 유전자들의 발현에 영향을 끼치는 것으로 그 모델이 제시되고 있다. 따라서,이처럼 암의 초기 발생에 중요한 영향을 끼치는 beta-catenin과 LEF-1 유전자의 기능에 대한 분석은 암의 유발, 전이 기전을 이해하기 위한 분자수준의 자료를 제공해 줄 것이다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

1차년도

beta-catenin의 transactivation 기능을 파악하기위해 14종의 변이형 유전자 개발  
beta-catenin 핵외배출기전 연구를 위한 4종의 CRM1 constructs 확보  
beta-catenin과 LEF-1을 발현시키는 2종의 adenovirus 생산

## 2차년도

LEF-1을 과발현하는 adenovirus를 세포에 감염후, 쥐에 injection, in vivo 발암유무 data 확보

beta-catenin과 CRM1의 deletion constructs를 이용, GST pull down assay를 통해 결합 domain 파악

LEF-1 adenovirus를 이용, beta-catenin의 핵내 발현을 최적화한 후 RNA 추출, DNA chip analysis를 통해 downstream target 파악

## 3차년도

DNA chip 분석과 RT-PCR을 통해 얻어진 potential beta-catenin/LEF-1의 target 유전자들을 reporter assay를 통해 promoter/enhancer 부분을 검토하여 beta-catenin에 의해 발현조절이 가능한 부위를 파악.

최종 3개 이상의 확실한 타겟 유전자를 확보한 후 그 유전자의 과발현시 세포에 대한 영향을 분석

## IV. 연구개발결과

- TOPFLASH reporter system을 이용한 preliminary experiments에서 N-terminal 86 아미노산들을 제거한 beta-catenin mutant에 비해 C-terminal 123 아미노산을 제거시킨 beta-catenin mutant는 그 transactivation 기능이 현저하게 저하됨을 관찰.
- C-terminal 부분을 각기 다르게 절단시킨 7종의 deletion mutants를 현재 합성완료하였으며 추가로 3종의 deletion mutants를 합성. 모든 deletion mutants를 합성한 후 TOPFLASH reporter assay를 통해 정확한 transactivation domain을 C-말단의 50 아미노산으로 파악.
- LEF-1을 발현시키는 adenovirus를 성공적으로 생산시켰으며 그 발현을 RT-PCR, anti-LEF-1 antibody를 이용한 Immunostaining을 통해 확인하였음. 또한 정상상피세포와 암세포를 이용 100% transfection 효율과 beta-catenin을 핵으로 이동시키는 기능적인 면을 관찰.
- beta-catenin과 CRM1과의 직접적인 결합을 GST pull down assay를 통해 확인하였으며, beta-catenin의 Arm repeat domain이 결합 부위로 파악되었음. 또한 녹색형광 또는 적색형광 단백질을 tagging한 CRM1 또는 beta-catenin을 이용하여 세포내에서 이들 단백질이 핵내에서 함께 위치함을 관찰하였으며, CRM1에 의한 beta-catenin의 핵외배출 사실을 검증하였음.
- 현재 DNA chip 분석을 통해 정상상피세포에서 발현증가된 유전자 1종, 감소된 유전자 5종, DLD1 대장암세포주에서 발현증가된 유전자 2종, 감소된 유전자 3종 파악.
- MYCBP를 beta-catenin/LEF-1의 주요 타겟으로 밝혀내었으며, Promoter/Enhancer 부분의 deletion을 통하여 LEF-1 responsive 부위를 파악.

## V. 연구개발결과의 활용계획

첫번째, 본 연구에서 얻어지는 연구 결과들은 직접적으로 항암제 개발의 중요한 target으로 이용될 수 있을 것이다. beta-catenin의 최소 transactivation domain, 핵내 이동과 배출에 관여되는 최소의 motif, beta-catenin과 LEF-1의 downstream target중 발암 기전에

가장 영향을 끼치는 유전자군들 모두 항암제 개발의 재료로 사용될 수 있다.

두번째, beta-catenin이 알짜이며 치매의 발생 기전에 중요한 Presenilin-1과도 결합함으로써 본 연구에서 얻어지는 여러 실험 재료들과 핵내 이동, 배출 기전에 대한 명확한 분석은 알짜이며 치매 연구에도 이용 가능하다.

세번째, beta-catenin의 결합 전사인자인 LEF-1의 유전자 발현이 저해될 경우 발생과정에서 치아와 모발 형성이 완전히 되지 않는다. 따라서, 본 연구에서 얻어지는 beta-catenin과 LEF-1을 발현하는 adenovirus system은 조직 공학을 이용한 치아, 모발 제조의 연구에 이용될 수도 있을 것이다.

특히 두 번째 활용계획이었던 알짜이며 치매 연구에의 활용은 학진신진사업의 지원결과로 Presenilin-1의 새로운 기질로 delta-catenin이 밝혀지고, 본 연구의 테마였던 beta-catenin이 또 Presenilin-1과 결합함으로써 그 생물학적 의의에 대해 추후 연구를 통해 좀더 면밀하게 연구해 볼 필요가 있으며 본 연구를 통해 습득한 각종 construct와 LEF-1 adenovirus는 유용하게 쓰여질 전망이다.

## S U M M A R Y

The Main purpose of this research was to investigate the effects of LEF-1 and beta-catenin on the tumorigenesis of colon and hair matrix cells. Using beta-catenin and CRM1 deleted constructs and adenovirus expressing LEF-1, we have identified the major domains of beta-catenin for transactivation and nuclear export. The major transactivation of beta-catenin locates at the C-terminus, especially 1-50 residues from the C-terminus, whereas the major nuclear export signal of beta-catenin at its ARM repeats (N257-265 residues). We have shown that CRM1, the nuclear export receptor, could bind beta-catenin directly, which affects the LEF-1/beta-catenin-dependent transactivation function. We have also developed the adenovirus overexpressing LEF-1 and assayed the LEF-1 dependent gene profiling by DNA chip analyses. We have identified noticeable changes of gene expression at least in 10 genes whose changes were confirmed by RT-PCR. Among these, we have investigated MYCBP as the most important target of LEF-1/beta-catenin and identified the LEF-1-response element in its 5' promoter region using deleted MYCBP promoters and TOPFLASH reporter systems. Our results suggest that LEF-1/beta-catenin could play a pivotal role in the tumorigenesis of colon, and that MYCBP could affect the cell cycle together with cyclin D1 and c-Myc, known targets of TCF/beta-catenin.

## C O N T E N T S

Chapter 1. Brief summary of proposed research.....	p9
Chapter 2. Development circumstances of domestic and foreign research groups....	p10
Chapter 3. Major contents of proposed research and main results.....	p13
Chapter 4. Goal achievements and contribution to the same area.....	p16
Chapter 5. Schedule for applying the results.....	p18
Chapter 6. Foreign scientific information acquired during researches.....	p19
Chapter 7. References.....	p19



## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	p9
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	p10
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	p13
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	p16
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	p18
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	p19
제 7 장 참고문헌.....	p19

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절. 연구개발의 목적

- LEF-1과 beta-catenin에 의한 발암 기전의 이해.
- beta-catenin의 기능에 대한 분자구조학적 분석
- beta-catenin의 핵내이동과 배출에 관한 기전 이해
- 대장암, 피부암에서 beta-catenin과 LEF-1의 발암 가능성 조사
- beta-catenin과 LEF-1의 영향을 받는 유전자군 파악, 발암기전과 연계 연구

## 제 2절. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성/필요성

beta-catenin은 피부암(모발암 Pilomatrixomas)에서 75%, 간암 20%, 대장암, 자궁암, 전립선암, 자궁경부암에서 4-13%에서 베타카테닌의 돌연변이가 존재함이 밝혀졌고, 그 세포질내 조절인자인 APC와 더불어 대장암, 피부암등의 형성과정에서 제일 먼저 변이되는 유전체로 보고되고 있다. 이 베타카테닌은 정상 상피세포의 경우 가쪽면 구조인 Adherens Junction에서 E-cadherin과 결합하는 주 구성 단백질이지만, 특정 암에서는 핵으로 이동해 전사인자인 LEF-1이나 TCF-4와 함께 암유발에 영향을 끼치는 유전자들의 발현에 영향을 끼치는 것으로 그 모델이 제시되고 있다. 따라서,이처럼 암의 초기 발생에 중요한 영향을 끼치는 beta-catenin과 LEF-1 유전자의 기능에 대한 분석은 암의 유발, 전이 기전을 이해하기 위한 분자수준의 자료를 제공해 줄 것이다.

## 제 2 장. 국내외 기술개발 현황

### 제 1절. 연구개발내용의 세계적 수준

현재 beta-catenin의 경우 그 세포내 작용기전에 대한 연구가 개념정립단계에 있으며 많은 부분이 논란의 대상이 되고 있다. 특히 암모델에서 많이 연구되고 암의 발전과정에서 그 역할의 중요성이 부각됨에도 아직 항암제 개발에 대한 시도가 아직 초기 단계에 불과하다.

### 제 2절. 지금까지의 연구개발 실적

현재 국내외의 연구기관에 의해 진행되어 보고되고 있는 beta-catenin의 연구는 몇가지 측면에서 요약해 볼 수 있다.

※ 먼저 다양한 암환자에서 채취된 암조직에 beta-catenin 유전자의 돌연변이가 존재하는지를 살피는 병리학적 연구들이 있다. 1999년 Chan et al.에 의해 Nature Genetics에 보고된 내용은 아래와 같다.

	No. b-catenin mutations found	Starting sample size	% of tumors with b-catenin mutations
Pilomatrixomas	12	16	75
Colon tumors	16	377	4
Hepatocellular CA	20	101	20
Medulloblastoma	3	67	4
Ovarian carcinoma	3	40	8
Prostate carcinoma	5	104	5
Endometrial carcinoma	10	76	13

이처럼 다양한 암조직에서 beta-catenin의 세포내 농도를 증가시키는 돌연변이가 보고되고 있고, 대장암의 발암모델의 초기인 early adenoma의 조직에서도 beta-catenin의 돌연변이가 보고되고 있다 (Korinek et al., 1997). 이러한 유전체의 돌연변이는 beta-catenin의 조절인자인 APC의 돌연변이와 함께 발암단계에서 가장 초기에 발견되는 돌연변이 유전체이며, 이러한 사실은 beta-catenin에 관련한 신호전달계가 얼마나 발암과정에서 중요하게 작용할 수 있는지를 시사한다.

※ 두 번째 그룹의 연구는 어떻게 정상상피세포에서 Adherens Junction에 존재하는 beta-catenin이 어떻게 해서 세포질내로 이동할 수 있나를 살펴보는 것이다. 발표된 내용을 정리해 보면 다음과 같다.

♣ EGFR와 같은 growth factor receptor나 c-Src같은 kinase에 의한 beta-catenin의

tyrosine phosphorylation

♣ E-cadherin의 down-regulation

♣ beta-catenin이나 APC의 돌연변이

※ 세 번째 그룹의 연구는 세포질내에서 beta-catenin의 농도를 조절하는 메카니즘에 관한 내용이다. 현재 결합하는 것으로 알려져 있는 단백질로는 APC, Axin, GSK-3b, b-TrCP, PP2A 등이 알려져 있고, 이중 GSK-3b에 의해 beta-catenin이 Serine residue에 phosphorylation이 되면, ubiquitination이 되고 proteosome complex에 의해 beta-catenin이 분해되는 것으로 알려져 있다. 이러한 분해 과정은 신호전달계에 의해 조절을 받으며, 발생과 유방암 모델에서 Wnt pathway에 의해 이 과정이 저해를 받음이 보고되고 있다 (Hsu et al., 1998; von Kries et al., 2000).

※ 마지막 그룹의 연구는 beta-catenin의 핵내 이동과 배출, 그리고 핵 안에서 유전자 발현에 미치는 연구에 관한 내용이다. 핵내 이동은 TCFs/LEF-1에 의한 정상적 핵내 이동. 즉 Importin a/b에 의한 이동의 모델이 하나 제시되어 있고, TCFs/LEF-1에 관련이 없는 Importin a/b-independent model이 또한 제시되어 있다. 핵의 배출 역시 Crm1에 의한 정상 배출, 반대로 Crm1-independent nuclear export의 두가지 이상 모델이 제시되어 있는 바 아직 이점이 충분한 영역이라 할 수 있다. 현재 핵내에서 beta-catenin는 전사인자인 LEF-1과 TCF-4와 결합할 수 있으며, 이 중 TCF-4가 결합하면 cyclin D1, c-myc, PPAR-d, TCF-1 등의 유전자 발현이 증가되는 것으로 보고되고 있다 (Tetsu et al., 1999; Kim et al., 2000; Henderson et al., 2002; Rosin-Arbesfeld et al., 2003).

### 제 3절. 현기술상태의 취약성

#### 가. 명확하지 못한 beta-catenin의 핵내이동, 배출과정

위에서 기술한 바와 같이 beta-catenin이 핵내로 이동하고 핵외로 배출되는 과정은 여러 모델이 제시되어 있고 현재 이 모델중 세포에서 실제로 일어나는 타당성있는 것을 규명하기 위한 노력이 필요하며, 이 것은 정상세포와 암세포의 세포내 beta-catenin 조절 기전의 차이를 이해하는 측면에서도 반드시 필요하다.

#### 나. LEF-1과 beta-catenin에 의한 유전자 발현 연구 전무

베타카테닌은 자체가 DNA에 결합할 수 있는 능력이 없기 때문에 다른 유전자 발현에 영향을 미치기 위해서는 두가지 전제 조건을 먼저 충족시켜야 한다. 먼저, 베타카테닌이 핵내로 이동해야 하고 두 번째, 그 결합전사인자인 TCF-4나 LEF-1과 결합하여야 한다. 베타카테닌의 경우 그 결합 전사인자인 TCF-4에 의한 유전자 발현이 보고되었으나 다른 결합 전사인자인 LEF-1에 의한 유전자 발현은 보고가 된 바 없다. TCF-4와 LEF-1의 단백질 구조적 특성과, beta-catenin과 결합하는 능력이 매우 유사하나, 그들 유전자의

결합이 있는 mouse model에서 phenotype이 다르기 때문에 TCF-4와 LEF-1이 각각 beta-catenin과 결합했을 경우 영향을 받는 유전자들 그룹이 다를 가능성이 크다.

#### 다. 기존 transfection방법의 한계성

대장암, 피부암 모델의 경우 정상 상피세포에서 암으로의 발전과정에서 이 베타카테닌의 영향을 살피기 위해 베타카테닌의 다량 생산이나 그 결합인자인 TCFs/LEF-1의 다량생산이 필요한데 기존의 transfection 방법으로는 정상상피세포에서 유의성을 갖는 다량생산이 거의 불가능하다. 따라서, 이러한 기술적 한계를 뛰어 넘을 수 있는 고효율의 새로운 transfection 방법을 사용하여 이들 유전자들의 영향을 분석하는 기술이 필요하다.

#### 라. beta-catenin과 LEF-1에 의한 직접 발암 가능성과 기전에 대한 in vivo data 없다.

현재 각종 암조직에서 beta-catenin의 돌연변이가 보고되고 있고, LEF-1과 TCFs의 발현이 대장암, 유방암에서 증가되며, beta-catenin과 TCF-4의 핵내 target molecule이 Cyclin D1과 c-myc 등 세포주기에 관계되어 이들 유전자가 핵내에서 활성화 될 경우 세포의 분열이 증가되고, 정상 세포가 암세포화 될 것으로 예측되나 아직 직접적으로 이러한 발암 과정을 증명해 준 in vivo data는 없다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1차년도 (2001.8.1-2002.5.31)

연구 내용	연구 결과
<p>beta-catenin의 transactivation 기능을 파악하기위해 14종의 변이형 유전자 개발</p>	<p>TOPFLASH reporter system을 이용한 preliminary experiments에서 N-terminal 86 아미노산들을 제거한 beta-catenin mutant에 비해 C-terminal 123 아미노산을 제거시킨 beta-catenin mutant는 그 transactivation 기능이 현저하게 저하됨을 관찰. 이에 C-terminal 부분을 각기 다르게 절단시킨 7종의 deletion mutants를 현재 합성완료하였으며 추가로 3종의 deletion mutants를 합성중. 모든 deletion mutants를 합성한 후 TOPFLASH reporter assay를 통해 정확한 transactivation domain을 파악할 것임.</p>
<p>beta-catenin 핵외배출기전 연구를 위한 4종의 CRM1 constructs 확보</p>	<p>현재 Full length hCRM1과 N-terminal deleted hCRM1 constructs 2종류가 확보되었으며, GST Pull Down assay를 통해 beta-catenin과 hCRM1과의 직접 결합을 확인. 또한 beta-catenin의 핵외배출기전이 정상상피세포와 APC 돌연변이체를 지닌 대장암세포주와 다름을 관찰하였다. 정상상피세포의 경우 LEF-1과발현으로 유도된 beta-catenin의 핵내이동은 12-48 시간내 신속하고 효율높은 핵외배출이 뒤따른다. 암세포의 경우 LEF-1과발현에 의한 beta-catenin의 핵이동은 세포형태변환을 수반하며 정상상피세포에서 관찰된 핵외배출이 관찰되지 않았다. Immunostaining을 통해 APC와 beta-catenin의 colocalization을 확인하였으며 현재 hCRM1과의 colocalization을 확인중.</p>
<p>beta-catenin과 LEF-1을 발현시키는 2종의 adenovirus 생산</p>	<p>현재 LEF-1을 발현시키는 adenovirus를 성공적으로 생산시켰으며 그 발현을 RT-PCR, anti-LEF-1 antibody를 이용한 Immunostaining을 통해 확인하였음. 또한 정상상피세포와 암세포를 이용 100% transfection 효율과 beta-catenin을 핵으로 이동시키는 기능적인 면을 관찰. 하지만 beta-catenin의 경우 과발현이 핵내에서 독특한 nuclear body를 형성시키며 apoptosis를 유도. 따라서 beta-catenin을 과발현시키는 adenovirus system 구축은 그 기능적의미가 없어 중단하였음.</p>

2차년도(2002.6.1-2003.5.31)

연구 내용	연구 결과
LEF-1을 과발현하는 adenovirus를 세포에 감염후, 쥐에 injection, in vivo 발암유무 data 확보	beta-catenin의 과발현시 apoptosis를 유도하는 본인의 실험결과와 LEF-1과발현시 philomatricoma 발생하는 Dr.E.Fuch의 논문 발표로 in vivo 실험의 의의가 없어져 실험 중단.
beta-catenin과 CRM1의 deletion constructs를 이용, GST pull down assay를 통해 결합 domain 파악	beta-catenin과 CRM1과의 직접적인 결합을 GST pull down assay를 통해 확인하였으며, beta-catenin의 Arm repeat domain이 결합 부위로 파악되었음. 또한 녹색형광 또는 적색형광단백질을 tagging한 CRM1 또는 beta-catenin을 이용하여 세포내에서 이들 단백질이 핵내에서 함께 위치함을 관찰하였으며, CRM1에 의한 beta-catenin의 핵외배출 사실을 검증하였음.
LEF-1 adenovirus를 이용, beta-catenin의 핵내 발현을 최적화한 후 RNA 추출, DNA chip analysis를 통해 downstream target 파악	현재 DNA chip 분석을 통해 정상상피세포에서 발현증가된 유전자 1종, 감소된 유전자 5종, DLD1 대장암세포주에서 발현증가된 유전자 2종, 감소된 유전자 3종 파악. 이중 RT-PCR 분석을 통해 정상상피세포에서 변화하는 유전자 2종, 대장암 세포주에서 발현이 변화하는 유전자 2종을 확인. Promoter/Enhancer 의 DNA sequence 분석을 통해 이들 유전자의 5' 부분에 LEF-1 putative binding motif 확인. 현재 이들의 beta-catenin/LEF-1에 대한 반응여부를 Luciferase reporter assay를 통해 확인하기 위해 cloning 작업중이며 preliminary reporter 결과를 분석하는 작업중임.

3차년도(2003.6.1-2004.5.31)

연구 내용	연구 결과
<p>DNA chip 분석과 RT-PCR을 통해 얻어진 potential beta-catenin/LEF-1의 target 유전자들을 reporter assay를 통해 promoter/enhancer 부분을 검토하여 beta-catenin에 의해 발현조절이 가능한 부위를 파악.                      최종 3개 이상의 확실한 타겟 유전자를 확보한 후 그 유전자의 과발현시 세포에 대한 영향을 분석</p>	<p>MYCBP를 beta-catenin/LEF-1의 주요 타겟으로 밝혀내었으며, Promoter/Enhancer 부분의 deletion을 통하여 LEF-1 responsive 부위를 파악.                      CASP4와 Pinin의 확실한 타겟확보.</p>



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1차년도(2001.8.1-2002.5.31)

목 표	달 성 도(%)	내 용
beta-catenin transactivation 기능을 파악하기 위해 단위아미노산을 제거한 14종의 beta-catenin 변이형 유전자 합성	72%	총 10종의 beta-catenin 변이형 유전자 합성.
beta-catenin 핵외배출 기전 연구를 위한 4종의 CRM1 construct 확보	50%	현재 Full length와 N-terminal deleted CRM1 construct 확보
beta-catenin과 LEF-1을 발현시키는 2종의 adenovirus system 구축	100%	LEF-1 adenovirus high titer 확보. beta-catenin의 경우 과발현시 apoptosis유도로 adenovirus system의 개발이 의미가 없어짐.
SCI급 저널에 논문 1편이상 게재 또는 제출	0	미제출

### 2차년도(2002.6.1-2003.5.31)

목 표	달 성 도(%)	내 용
beta-catenin과 LEF-1에 의한 in vivo 발암증거확보	0	beta-catenin의 과발현시 apoptosis를 유도하는 본인의 실험결과와 LEF-1과발현시 philomatricoma 발생하는 Dr.E.Fuch의 논문 발표로 in vivo 실험의 의의가 없어져 실험 중단.
beta-catenin의 명확한 핵외배출기전 분석	70%	beta-catenin과 CRM1과의 직접적인 결합을 GST pull down assay를 통해 확인하였으며, beta-catenin의 Arm repeat domain이 결합 부위로 파악되었음.
beta-catenin/LEF-1에 의한 target 유전자 규명	100%	현재 정상상피세포에서 발현증가된 유전자 1종, 감소된 유전자 5종, DLD1 대장암세포주에서 발현증가된 유전자 2종, 감소된 유전자 3종 파악.
SCI급 저널에 논문 1편 이상 게재 또는 제출	0	1편 논문 제출- Reject

3차년도(2003.6.1-2004.5.31)

목 표	달 성 도(%)	내 용
beta-catein/LEF-1의 최종 타겟 3종 확인, 의존 부위 확인	33%	MYCBP를 beta-catenin/LEF-1의 주요 타겟으로 밝혀내었으며, Promoter/Enhancer 부분의 deletion을 통하여 LEF-1 responsive 부위를 파악. CASP4와 Pinin의 타겟확보하였으나 의존부위 파악 실험 진행 미진.
SCI급 저널에 논문 2편 이상 게재 또는 제출	100%	현재 2편 논문 제출, 1편은 JBC에 게재완료, 1편은 결과를 기다리고 있음.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

첫번째, 본 연구에서 얻어지는 연구 결과들은 직접적으로 항암제 개발의 중요한 target으로 이용될 수 있을 것이다. beta-catenin의 최소 transactivation domain, 핵내 이동과 배출에 관여되는 최소의 motif, beta-catenin과 LEF-1의 downstream target중 발암 기전에 가장 영향을 끼치는 유전자군들 모두 항암제 개발의 재료로 사용될 수 있다.

두번째, beta-catenin이 알짜이며 치매의 발생 기전에 중요한 Presenilin-1과도 결합함으로써 본 연구에서 얻어지는 여러 실험 재료들과 핵내 이동, 배출 기전에 대한 명확한 분석은 알짜이며 치매 연구에도 이용 가능하다.

세번째, beta-catenin의 결합 전사인자인 LEF-1의 유전자 발현이 저해될 경우 발생과정에서 치아와 모발 형성이 완전히 되지 않는다. 따라서, 본 연구에서 얻어지는 beta-catenin과 LEF-1을 발현하는 adenovirus system은 조직 공학을 이용한 치아, 모발 제조의 연구에 이용될 수도 있을 것이다.

특히 두 번째 활용계획이었던 알짜이며치매 연구에의 활용은 학진신진사업의 지원결과로 Presenilin-1의 새로운 기질로 delta-catenin이 밝혀지고, 본 연구의 테마였던 beta-catenin이 또 Presenilin-1과 결합함으로써 그 생물학적 의의에 대해 추후 연구를 통해 좀더 면밀하게 연구해 볼 필요가 있으며 본 연구를 통해 습득한 각종 construct와 LEF-1 adenovirus는 유용하게 쓰여질 전망이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

LEF-1의 과발현이 발모작용을 함과 동시에 발암효과 - 따라서, 발암과 발모현상의 특징적 유전자 타겟에 대한 연구를 수행할 필요 제시됨.

b-catenin 의 신호전달과 메카니즘에 대한 주요 연구보고서가 Cell, Nature, Science 등 주요 연구저널에 지속적으로 발표됨. - 따라서 이에 대한 항암제 연구에 대한 제약회사와 연구소의 투자가 예상됨.

## 제 7 장 참고문헌

Henderson, BR. et al. Lymphoid enhancer factor-1 blocks adenomatous polyposis coli-mediated nuclear export and degradation of beta-catenin. Regulation by histone deacetylase 1. J Biol Chem 277(27):24258-64, 2002.

Hsu, S. et al. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. Mol. Cell. Biol. 18:4807-4818, 1998.

Kim, K. et al. Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 of the involvement of major G1 cell cycle regulators. Mol. Biol. Cell. 11:3509-3523, 2000.

Korinek, V. et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-TCF complex in APC-/- colon carcinoma. Science. 275:1784-1787, 1997.

Rosin-Arbesfeld, R. Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. EMBO J 22(5):1101-13, 2003.

Tetsu, O. and McCormick, F. beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature. 398:422-426, 1999.

von Kries, et al. Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. Nature structural Biol. 7:800-806, 2000.

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	국책연구개발사업			
	세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업			
과제명		레프-원과 베타-카데닌에 의한 대장암,피부암 발생기전연구			
연구기관		전남대학교	연구책임자	김권섭	
총연구기간		2001년. 8월. 1일. ~ 2004 년. 5월. 31일. (2년 10개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계	
		145,000		145,000	
기술분야		생명과학분야			
참여기업					
공동연구기관					
위탁연구기관					
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ( )	2. 기술이전 ( )	3. 후속연구추진( )	4.타사업에 활 용( )
		5. 선행 및 기 초연구(√ )	6. 기타목적활용 (교육,연구)( )	7. 활용중단(미활용)( )	

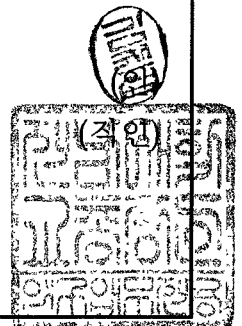
특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거  
연구결과 활용계획서를 제출합니다.

- 첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.  
2. 기술요약서 1부

2004    년    7    월    27    일

연구책임자 :                    김권섭  
연구기관장 :                 정석중

과학기술부장관 귀하



# 연구결과 활용계획서

## 1. 연구목표 및 내용

연구개발의 최종목표

- LEF-1과 beta-catenin에 의한 발암 기전의 이해.
- beta-catenin의 기능에 대한 분자구조학적 분석
- beta-catenin의 핵내이동과 배출에 관한 기전 이해
- 대장암, 피부암에서 beta-catenin과 LEF-1의 발암 가능성 조사
- beta-catenin과 LEF-1의 영향을 받는 유전자군 파악, 발암기전과 연계 연구

연구개발의 내용:

1차년도

beta-catenin의 transactivation 기능을 파악하기위해 14종의 변이형 유전자 개발

beta-catenin 핵외배출기전 연구를 위한 4종의 CRM1 constructs 확보

beta-catenin과 LEF-1을 발현시키는 2종의 adenovirus 생산

2차년도

LEF-1을 과발현하는 adenovirus를 세포에 감염후, 쥐에 injection, in vivo 발암유무 data 확보

beta-catenin과 CRM1의 deletion constructs를 이용, GST pull down assay를 통해 결합 domain 파악

LEF-1 adenovirus를 이용, beta-catenin의 핵내 발현을 최적화한 후 RNA 추출, DNA chip analysis를 통해 downstream target 파악

3차년도

DNA chip 분석과 RT-PCR을 통해 얻어진 potential beta-catenin/LEF-1의 target 유전자들을 reporter assay를 통해 promoter/enhancer 부분을 검토하여 beta-catenin에 의해 발현조절이 가능한 부위를 파악.

최종 3개 이상의 확실한 타겟 유전자를 확보한 후 그 유전자의 과발현시 세포에 대한 영향을 분석

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록: 해당사항없음

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고

나. 프로그램 등록목록: 해당사항없음

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역: 해당사항없음

라. 발생품 및 시작품 내역: 해당사항없음

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
The Journal of Biological Chemistry	Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanism	2004년 6월 18일	279(25)	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.	미국	O
계: 1건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
한국분자세포생물학회	DNA microarray analysis of LEF-1-induced gene expression profiles in normal epithelia versus tumor cells	2003년 10월 9일	포스터	한국분자세포생물학회	한국
한국분자세포생물학회	Nuclear $\beta$ -catenin induced by LEF-1 is rapidly exported into the cytoplasm of epithelial cells through adirect interaction with CR	2003년 10월 9일	포스터	한국분자세포생물학회	한국
계: 2건수					

3. 연구성과: 해당사항없음

※ 기술이전이나 기업화 완료(추진중 포함) 실적

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

첫번째, 본 연구에서 얻어지는 연구 결과들은 직접적으로 항암제 개발의 중요한 target으로 이용될 수 있을 것이다. beta-catenin의 최소 transactivation domain, 핵내 이동과 배출에 관여되는 최소의 motif, beta-catenin과 LEF-1의 downstream target중 발암 기전에 가장 영향을 끼치는 유전자군들 모두 항암제 개발의 재료로 사용될 수 있다.

두번째, beta-catenin이 알짜이며 치매의 발생 기전에 중요한 Presenilin-1과도 결합함으로써 본 연구에서 얻어지는 여러 실험 재료들과 핵내 이동, 배출 기전에 대한 명확한 분석은 알짜이며 치매 연구에도 이용 가능하다.



세번째, beta-catenin의 결합 전사인자인 LEF-1의 유전자 발현이 저해될 경우 발생과정에서 치아와 모발 형성이 완전히 되지 않는다. 따라서, 본 연구에서 얻어지는 beta-catenin과 LEF-1을 발현하는 adenovirus system은 조직 공학을 이용한 치아, 모발 제조의 연구에 이용될 수도 있을 것이다.

#### 나. 활용방법

beta-catenin의 최소 transactivation domain, 핵내 이동과 배출에 관여되는 최소의 motif, beta-catenin과 LEF-1의 downstream target중 발암 기전에 가장 영향을 끼치는 유전자 군들 모두 항암제 개발의 재료로 사용될 수 있다.

LEF-1을 발현하는 adenovirus system은 조직 공학을 이용한 치아, 모발제조의 연구에 이용될 수도 있을 것

#### 다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

알짜이머치매 연구에의 활용은 학진신진사업의 지원결과로 Presenilin-1의 새로운 기질로 delta-catenin이 밝혀지고, 본 연구의 테마였던 beta-catenin이 또 Presenilin-1과 결합함으로써 그 생물학적 의의에 대해 추후 연구를 통해 좀더 면밀하게 연구해 볼 필요가 있으며 본 연구를 통해 습득한 각종 construct와 LEF-1 adenovirus는 유용하게 쓰여질 전망이다.

beta-catenin은 그 transactivation domain이 mapping 되어서 대기업 연구소나 제약회사에 Targeting 가능성 여부를 타진, 향후 항암제개발의 초석으로 본 연구의 결과를 이용할 수 있게되기를 희망.

#### 5. 기대효과

본 연구의 차년도 이후 활용계획이 적절하게 진행될 경우 초기 발암과정에 결정적 역할을 하는 beta-catenin 신호전달계에 대한 항암제는 효과적이면서도 막대한 경제적 효과를 가져올 것으로 기대됨.

#### 6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

연구비 지급이 제 때 이루어졌으면 하는 바램이고, 연구성과에 대한 자체평가의견서제출과 판단을 연구종료일로부터 2년정도의 시간을 주었으면 하는 바램입니다.

[첨부2]

## 기술 요약서

■ 기술의 명칭: 연구의 특성상 기초연구로 해당사항 없음

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	정부(        )천원	민간(        )천원	합계(        )천원
연구책임자 1	성명		주민번호
	근무기관 부서		E-mail
	직위/직급		전화번호
연구책임자 2	성명		주민번호
	근무기관 부서		E-mail
	직위/직급		전화번호
실무연락책임자	성명		소속/부서
	직위/직급		E-mail
	전화번호		FAX
	주소	(        -        )	

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

<기술적 특징>

(1)

(2)

(3)

[용도 · 이용분야]

(1)

(2)

(3)

■ 기술의 분류

[기술코드] 400 (3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

- 정보산업     기계설비     소재     정밀화학·공정     생명과학  
 원자력     자원     에너지     항공·우주     해양  
 교통     보건·의료     환경     기초·원천     기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

- 신제품개발     신공정개발     기존제품개선     기존공정개선  
 기 타 ( 분자세포공학기술 )

[기술의 용도] (복수 선택(✓로 표시)가능합니다)

- 기계설비     부품소자     원료재료     소프트웨어  
 가공처리기술     자동화기술     불량률 감소 등 현장애로기술  
 제품설계기술     공정설계기술     기 타 ( 기초 )

■ 산업재산권 보유현황(기술과 관련한): 해당사항 없음

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호

\* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재

\* '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재



■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술: 해당사항없음

[ 기술개요 ]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[ 기술을 도출한 과제현황 ]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : (            )백만원 - 정부 : (            )백만원    민간 : (            )백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			