

# 돼지 150-kDa Insulin-like Growth Factor Complex의 Acid-labile Subunit(ALS) 유전자의 Intron 및 ALS Complementary DNA의 3' 비해독 부위 Cloning과 생체조직에서의 ALS 유전자 발현 확인

진은정 · 김인애 · 이철영

진주산업대학교 동물소재공학과 · 동물생명산업 지역협력연구센터

## Cloning of An Intron of the Gene Coding for Porcine Acid-Labile Subunit(pALS) of the 150-kDa Insulin-like Growth Factor Complex and the 3' Untranslated Region of pALS Complementary DNA and Confirmation of pALS Gene Expression in Multiple Tissues

E. J. Jin, I. A. Kim and C. Y. Lee

Department of Animal Resources Technology, Regional Animal Industry Research Center, Jinju National University

### ABSTRACT

The aims of this study were as follows: 1) identification and cloning of an intron of the gene coding for porcine acid-labile subunit(pALS), a component of the 150-kDa ternary insulin-like growth factor(IGF) complex, and amplification and cloning of 3' untranslated region(3' UT) of pALS complementary DNA, 2) identification of pALS gene expression in porcine tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction using an intron-spanning primer pair and 3) identification of ALS gene expression in porcine hepatocytes. Following nucleotide sequencing after amplification of pALS gene by PCR using genomic DNA as template with a primer pair spanning the expected intron region and insertion of the PCR product into a plasmid vector, a 1,371-base pair(bp) intron of pALS gene has been identified at a site of pALS gene identical to those of other ALS genes of known species. Also identified and sequenced in the present study was a 147-bp 3' UT following 3' rapid amplification of cDNA end(3' RACE) using RNA isolated from the liver as starting template. Results of the RT-PCR have exhibited that pALS gene is expressed not only in the liver but in other internal organs(kidney, lung, spleen), female reproductive organs(ovary, oviduct, uterus) and skeletal muscle. Moreover, in the liver, the ALS gene was found to be expressed in hepatocytes by *in-situ* hybridization. These results suggest a possibility that in addition to the known major role as plasma IGF reservoir/regulator, ALS may also have unknown role(s) in the extra-vascular space.

(Key words : Pig, IGF, ALS, Gene, cDNA)

### I 서 론

호르몬의 성장 촉진 작용의 대부분을 매개하고 IGF-II는 태아의 성장을 촉진하는 7.5-kDa의 크 Insulin-like growth factor(IGF)-I은 주로 성장 기를 가진 peptide 생리조절물질이다(Jones와

Corresponding author : C. Y. Lee, Regional Animal Industry Research Center, Jinju National University, Jinju 660-758, Republic of Korea, Tel : 055-751-3258, Fax : 055-753-4422, E-mail : cylee@jinju.ac.kr

Clemmons, 1995; 이, 1996, 2000). 혈중 IGF는 대부분 간에서 분비된 후 40~45-kDa의 IGF-binding protein-3(IGFBP-3)와 85-kDa의 acid-labile subunit(ALS)와 결합되어 150-kDa ternary complex 형태로 존재한다(Furlanetto, 1980; Baxter 등, 1989). 따라서 ALS는 IGFBP-3의 BP로서 혈중 IGF의 반감기(plasma half-life)를 연장시켜 혈중에 IGF를 저장하여 생체의 IGF 이용률을 극대화하는 역할을 한다.

ALS 유전자는 두 개의 exons와 종에 따라 1-kb 내외 크기의 intron으로 구성되어있는데, exons 1과 2에는 각각 signal peptide의 전부분을 coding하는 sequence와 그 이하 모든 coding sequence가 존재하고 exon-intron junction은 종간에 잘 보존된 것으로 알려져 있다(Boisclair 등, 1996; Delhanty와 Baxter, 1997; Rhoads 등, 2000; Suwanichikul 등, 2000). ALS는 혈장단백질이기 때문에 간 이외의 조직에서는 ALS 유전자의 발현이 거의 검출되지 않았고(Dai와 Baxter, 1994; Delhanty와 Baxter, 1996; Rhoads 등, 2000), 간에서의 ALS 유전자 발현은 주로 성장호르몬에 의해 제어(Ooi 등, 1997)되는 것으로 알려져 있다.

선행연구에서 본 연구진은 돼지 ALS 유전자의 exon 2 내에서 signal peptide의 후반부로부터 mature ALS protein의 COOH-말단까지의 coding sequence를 cloning하고, 간은 물론 몇몇 간 이외의 조직에서도 ALS 유전자가 발현됨을 확인하였고(Lee 등, 2001), 이어지는 연구(정 등, 2002)에서는 ALS 유전자의 5' 비해독 부위(untranslated region; UT)를 cloning 하였다. 그러나 이들 선행연구에서는 ALS 유전자 intron의 존재 여부가 확인되지 않았기 때문에 intron-spanning primer pair를 이용하여 낮은 수준의 유전자 발현의 여부까지 판명할 수 있는 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법으로 간 이외의 조직에서 ALS 유전자 발현을 확인하지 못하였다. 따라서 본 연구는 돼지 ALS 유전자의 intron과 ALS cDNA의 3' UT를 cloning한 다음 RT-PCR로 간 이외의 조직에서의 ALS 유전자 발현의 여부를 확인하고, 마지막으로 간 조직 중 hepatocyte

에서의 ALS 유전자 발현을 확인하고자 착수되었다.

## II 재료 및 방법

### 1. Intron 증폭과 cloning

돼지 genomic DNA는 교잡종 백색계 돼지 혈액으로부터 DNA extraction kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 제조자의 지시대로 추출하였다. 돼지 ALS(porcine ALS; pALS)의 intron 부위는 ALSF2(5'-ATGGCCCTGAGGAAA-3') forward primer와 ALSR2(5'-GAGGTTCCGGAGCTGCAGAA-3') reverse primer를 이용하여 PCR로 증폭하였다. PCR 반응물은 DNA template 0.2 $\mu$ g, forward & reverse primers 각각 25pmoles, 각각의 deoxy nucleoside-5'-triphosphate 10nmoles, *Taq* polymerase(TaKaRa Shuzo Co., Otsu, Japan) 2.5U와 DMSO 10%(최종 농도)를 첨가하고 10 $\times$ PCR buffer[1 $\times$ =10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5 mM Mg<sup>2+</sup>]와 H<sub>2</sub>O를 넣어 최종 PCR buffer 농도와 반응물의 부피가 각각 1 $\times$  및 50 $\mu$ l 되게 하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C 3분(denaturation)  $\rightarrow$  [denaturation(94 $^{\circ}$ C 1분)  $\rightarrow$  annealing {58 $^{\circ}$ C 15초  $\rightarrow$  55 $^{\circ}$ C 15초  $\rightarrow$  53 $^{\circ}$ C 15초  $\rightarrow$  50 $^{\circ}$ C 15초}  $\rightarrow$  extension(74 $^{\circ}$ C 3분)]  $\times$  35cycles  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 10분  $\rightarrow$  4 $^{\circ}$ C 조건 하에서 수행하였다. PCR product는 전술(Lee 등, 2001)한 바와 같이 전기영동법으로 정제하여 TA-cloning vector(Invitrogen, San Diego, CA, USA)에 삽입하여 automated dideoxynucleotide chain-termination 방법으로 DNA insert의 염기서열을 결정하였다.

### 2. 3' rapid amplification of 3' cDNA end(3' RACE)

pALS cDNA의 3' untranslated region(3' UT)는 3' RACE kit(Invitrogen)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 개괄적으로, 돼지의 간에서 추출한 total cellular RNA를 주형으로 하고 3' 부위에 adaptor primer가 연결된 oligo(dT) primer를 이용한 역전사 반응으로 first-

strand cDNA를 합성한 다음 RNase H를 첨가하여 RNA 주형을 제거하였다. pALS cDNA의 3' UT는 first-strand cDNA를 template로 하여 pALS cDNA의 termination codon과 인접한 부위에 위치한 ALS1F forward primer(5'-CTCAGCGAGGCACACTTTGCTCCC-3')와 first-strand 합성시 이용했던 oligo(dT)-adaptor primer의 adaptor 부위와 보충되는(reverse) universal amplification primer를 이용하여 PCR로 합성하여 TA-cloning vector에 삽입하고 염기서열을 결정하였다.

### 3. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

생체중 약 110kg의 암돼지를 도축장에서 도축한 직후 내장 기관 및 조직을 채취하여 액체 질소에 급속냉동시켜 실험실로 운반한 다음 Trizol을 이용하여 total cellular RNA를 추출하였다. RT-PCR은 전술(Lee 등, 2001)한 바와 같이 cDNA Cycle kit(Invitrogen)를 이용하여 10 $\mu$ g total RNA를 template로 하여 first-strand cDNA를 합성하고, ALSF1(forward)-R1(reverse) intron-spanning primer pair를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이들 forward & reverse primers의 cDNA 상에서의 위치와 염기서열은 각각 #32~51 & #278~298이고, 염기서열은 각각(5'-GAGGGATGGCCC TGAGGAAA-3') 및 5'-AGGAGAAGTTGTTGCTG TCCA-3') 이었다.

### 4. ALS fluorescence *in-situ* hybridization (FISH)

돼지 간 조직에 대한 FISH는 간조직의 slide 표본을 *in vitro* transcription으로 digoxigenin (DIG)-labeling시킨 pALS riboprobe와 반응시킨 다음 alkaline phosphatase(AP)가 conjugation된 anti-digoxigenin 항체와 반응시킨 후 형광을 발하는(fluorescent) AP 기질(substrate)과 반응시키는 detection system을 이용하였다(Kim 등, 2001; Sohn 등, 2002). 본 실험을 위하여 먼저 ALSF1-R1 primer pair를 이용하여 합성한 liver RT-

PCR product를 pGem-T Easy plasmid vector (Promega)에 삽입한 후 염기서열을 결정하여 267-bp pALS cDNA fragment insert의 orientation을 확인하였다. pALS plasmid 1 $\mu$ g을 각각 Sph I 과 Pst I 제한효소를 써서 절단(linearization)하여 SP6 & T7 promoter 및 DIG-UTP를 이용한 DIG-labeling kit(Roche, Penzberg, Germany)로 *in vitro* transcription하여 anti-sense & sense(negative control) riboprobes를 DIG-labeling하고 phenol-chloroform extraction & ethanol precipitation 방법으로 정제하였다. 간 조직 표본은 65 $^{\circ}$ C에서 1시간 prehybridization한 다음 위에서 준비한 DIG-labeled riboprobe를 함유한 50ml hybridization solution(2 $\times$ SSC, 50% formamide, 1% SDS)에 넣어 65 $^{\circ}$ C에서 overnight incubation시켰다. Slide 표본은 Tris-buffered saline[TBS; 10mM Tris-HCl(pH 7.4) & 150mM NaCl]으로 세척하고 5% mouse serum으로 blocking한 다음 1:2,000 AP-conjugated anti-DIG Fab fragment(항체) 50 $\mu$ l와 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 반응시키고 세척한 후 상온에서 2시간 동안 1ml detection solution [15.68ml AP buffer{0.1M Tris-HCl(pH 9.5) & 0.1M NaCl} + 0.16ml 2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylamide phosphate(HNPP; AP substrate) + 0.16ml 4-chloro-2-methylbenzenediazonium hemizinc chloride salt(Fast Red TR; 보조시약)]과 반응시키고 TBS로 세척하였다. 완성된 FISH 표본은 500~540-nm 파장대의 필터(WIG 필터; Olympus, Tokyo, Japan)를 장착한 형광현미경(Model AX-70, Olympus) 하에서 관찰하고, 형광영상은 PM-30 photomicroscope(Olympus)와 ASA 400 color film(Kodak, Rochester, NY, USA)을 이용하여 촬영하였다.

## III 결 과

### 1. ALS 유전자의 intron과 ALS cDNA의 3' UT 염기서열

돼지 genomic DNA를 template로 하여 intron-spanning primer pair를 이용한 PCR로 돼지 ALS(porcine ALS; pALS) 유전자의 intron을 증

```

AGGCATCCGCCTGTGCGTCCAGGCTCTGCACGAGGGATGGCCCTGAGGAAAGcgattatggc 52
cccaagcacaacaatcagactgggttaaagtagcataggctagtgctcctgatggaagaaca (72)
ttcgaattttgcacaaaagttcaaggtgtcaggaaaacattataaccatcgtggtgtcagc (134)
aggtccagcatcctgggcagctatgtactccttatgtcattggcttctcgtccctgggtgtca (196)
ttttcctcatgtgagcatgggttttctgtgcagtcctctctatagacccagacccccagctct (258)
cttctaactaagccagccgcgatacttagtcatccgtttatagctgaagttgactagtcgc (320)
ctgcgatcgcccctgggaactacccgatggaatttcagagatgtttcccagattggctttgt (382)
tttcccttagtgcagaaaactaggcctaggctcgacccctctgtcaagatctttccctaggcta (444)
ccgtcagatggaattaaacactcacacacaactgaaagcaaaatcagaatcctcgccata (506)
cagaaggcagccacagatcccagatgggcttcctagtccacacgggtgccttatagacaggac (568)
cttccaaaggaaaatccccaaccgggaaccagagttcccccagacggacaaggtccaagggg (630)
cctcagcatgcatgcctgggaacttacccagatgcccggcgagggtgtcaggagtcccggat (692)
gctacttggctccttccccaagaaggttcttgcagtgggacgtctgggtcagcaggagcaga (754)
gggaaagaaaggagtcccccagagaccagcggaccccccagaggtgctggggtggtgcttgc (816)
cttccgaacacctccccacccagagttccagcctctgagatgaccagtgggtctgctcag (878)
ggcctggccctgtggcaggaaactctcagcgatctggcctctgaaagagtccctcaacctc (940)
tgtcccccaaggggagactgggctggagagaagcctcagagcctctggtccagccgagagc (1002)
cgctgcccacgcttgttgcgaaatttggctctgtctgccggtgccaaatacaaacgcag (1064)
cgacagagtttggggtgaaggagagaaagatcgcttgattgctctgccaggcaaagggggcac (1126)
ctcagcaggctagtgccctaaagactgtgcccccatggaaagcatttcgaggagtgtag (1188)
agtgaaaagggagaaaaaagaggtttcagatacgaatctggattgggacaaacatgcattct (1250)
tcttgtttgggggcattttagccacaaagctgggtgtccaaagatctcggcatgacagtggt (1312)
tggtggctttttgggttattgcctgggataacagccctggaaacagggcatatagatcGAG (1371)
GCCGCGCCCTGGCGGCCTGCTGGTCTCTCTGGGTGGCACTGGGCCCTGCACCCTGGCAGGC 117
ACGGAGCCCGGGGCGCATCGGACGCCGAGGGCCTGCCGTGCCCGGCTGCCTGCTCCTGCCG 179
CCACGACGACTACAGGACGAGATCAGCGTCTTCTGCAGCTCCCGAACCTC----- 231
-----1,596 bases-----
CTCAGCGAGGCACACTTTGCTCCCTGCTGACCCGCGTGCTCAGGAGACCTGCTGGGTCCCGC 1889
CCCCAGCGGACCCCGGCCTGGGTCCGGACCCGGGCCCTGTGGTTTGGCCCCACCCGGGTCC 1951
CAGAGGGCCAGCCCTCCCCACCCATCCCCGATTAAAAGCAACCTGATGTACGC 2004

```

Fig. 1. Nucleotide sequences of the pALS intron and the 3' untranslated region of pALS cDNA. The pALS intron and 3' untranslated region(3' UT) were amplified by PCR using an intron-spanning primer pair and 3' rapid amplification of cDNA end(3' RACE), respectively. The intron and 3' UT sequences are shown with flanking sequences which have been cloned in previous studies. Nucleotide numbers of the cDNA(*uppercase letters*) and intron (*lowercase letters*) are indicated in bold and italic letters in parentheses, respectively, at the right margin, with each first nucleotide assigned #1. Sites of the forward and reverse PCR primers flanking the intron as well as of the ALS gene-specific forward primer for 3' RACE are underlined. *Shaded* are codons for the initiation of translation, the first amino acid of mature pALS protein and termination.

폭하고 plasmid vector에 삽입하여 염기서열을 결정하였다. 또한 폐지의 간에서 추출한 RNA를 역전사하여 얻은 first-strand pALS cDNA를 template로 하여 termination codon 부위의

forward primer와 (reverse) adaptor primer를 이용한 PCR로 pALS cDNA의 3' UT 부위를 합성·증폭(3' RACE)하고 염기서열을 결정하였다. Fig. 1은 이들 두 부위의 염기서열이다. pALS

intron은 타 종의 ALS 유전자(Boisclair 등, 1996; Delhanty와 Baxter, 1997; Rhoads 등, 2000; Suwanichikul 등, 2000)에서와 같이 6번째 codon의 첫 번째와 두 번째 nucleotides 사이에 위치하였다. 또한 1,371-base pair(bp) pALS intron의 염기서열은 타 종의 ALS intron 염기서열이 잘 보존되지 않았듯이 어느 종의 ALS intron 염기서열과도 상동성을 보이지 않았다. 타 종의 3' UT 염기서열이 잘 보존되지 않았듯이 본 연구에서 sequencing한 147-bp 3' UT 또한 타 종의 ALS cDNA의 3' UT 염기서열과 상동성을 나타내지 않았다.

## 2. 돼지 조직에서의 ALS 유전자 발현

전술한 실험의 결과 pALS 유전자의 intron의 존재와 그 염기서열이 확인되었으므로 intron-spanning primer pair를 합성·이용하여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법으로 생체조직에서의 ALS 유전자 발현의 여부를 조사할 수 있게 되었다. 본 실험에서는 먼저 간에서 추출한 RNA로부터 예상된 267-bp 크기의 RT-PCR product를 확인(Fig. 2, left panel)한 다음 간 이외의 조직에서의 ALS 유전자 발현의 여부를 검사하였다. 놀랍게도 조사된 모든 내장기관과 근육(배최장근) 및 자성 생식기관에서 추출한 RNA의 RT-PCR 결과 예상된 크기의 DNA product가 나타났(Fig. 2, right panel). 더욱이 간을 포함한 여러 조직의 RT-PCR products를 plasmid vector에 삽입하여 염기서열을 결정된 결과 ALS cDNA fragment sequence임이 확인되어 본 연구에서 조사된 모든 조직에서 ALS 유전자가 발현된다는 사실이 밝혀졌다. 한편 본 RT-PCR의 목적이 각 조직에서의 ALS 유전자 발현의 여부 검정이었기 때문에 PCR cycle 수가 의도적으로 quantitative PCR이 될 수 있는 cycle 수를 벗어나고, 따라서 agarose gel 상에 나타난 각 조직에 대한 RT-PCR product band의 intensity는 선행 연구(Lee 등, 2001)로부터 유추할 수 있는 조직별 ALS mRNA의 상대적인 수준과는 무관하였다.



Fig. 2. ALS reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR).

The RT-PCR was performed using total cellular RNA with a primer pair spanning 267-base pair(bp) nucleotides encompassing a mRNA splicing site, followed by 1% agarose gel electrophoresis and visualization by ethidium bromide staining. *Left*, a RT-PCR product for the liver(right lane) was loaded along with a 100-bp DNA ladder(left lane). *Right*, RT-PCR products for the indicated organs/tissues were loaded. Only the 267-bp PCR product of expected size is shown in this figure.

## 3. 간에서의 ALS 유전자 발현: fluorescence *in-situ* hybridization(FISH)

쥐의 간에서 ALS 유전자는 parenchymal cell (hepatocyte)에서 발현되는 것으로 알려져 있다 (Chin et al., 1994). 돼지에서도 ALS 유전자가 hepatocyte에서 발현되는지의 여부를 확인하기 위해 digoxigenin-labeled pALS riboprobe를 합성하여 간 조직 표본과 hybridization 시킨 다음 형광을 발하는 detection system을 이용하는 FISH를 수행하였다. 예상대로 anti-sense pALS riboprobe를 이용한 간 표본 FISH는 형광을 발하였으나(Fig. 3, upper left panel), sense pALS riboprobe(negative control)를 썼을 때는 형광을 발하지 않았다(Fig. 3, upper right panel). 또한 anti-sense pALS riboprobe는 간 조직 특유의 sinusoid 구조(Fig. 3, lower left panel)의 hepatocytes에 결합함을 보임으로써(Fig. 3, lower right panel) 돼지 간에서도 ALS 유전자가 hepatocyte에서 발현됨이 확인되었다.

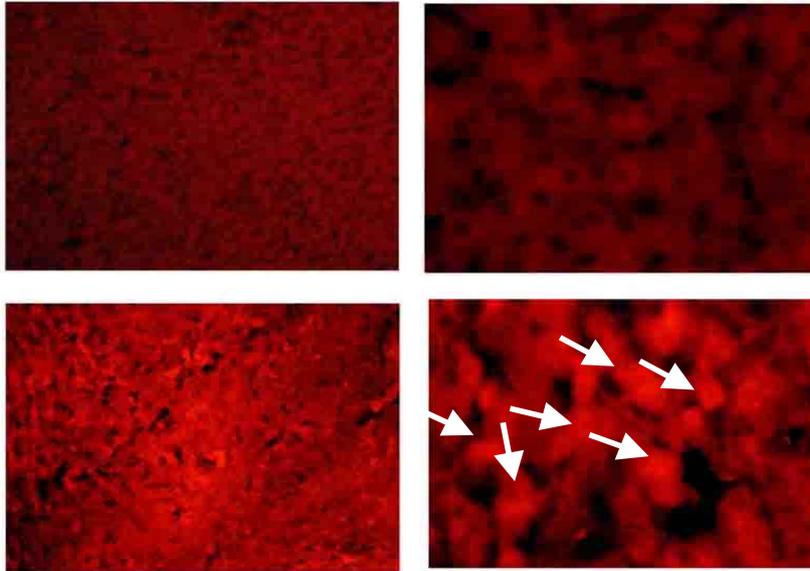


Fig. 3. ALS fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) on the pig liver slice. The ALS FISH was performed on the pig liver specimen using a 267-nucleotide pALS anti-sense riboprobe(*upper left and lower panels*) or sense riboprobe(*upper right panel*; negative control). Note the sinusoidal structure in *lower left panel* and hybridization signals on hepatocytes(*lower right panel, arrows*) in the magnified microscopic field of the lower left panel.

#### IV 고 찰

ALS가 혈중 대부분의 IGF를 운반하는 IGFBP-3를 결합하여 ALS:IGFBP-3:IGF ternary complex를 형성함으로써 혈중 IGF의 저장체 역할을 한다는 사실은 오랫동안 잘 알려져 왔다 (Rechler와 Clemmons, 1998; Boisclair 등, 2001). 또한 ALS는 혈중 대부분의 IGF를 ternary complex 형태로 혈관 내에 국한시킴으로써 혈관으로부터 쉽게 조직으로 확산되는 free IGF 혹은 IGF:IGFBP binary complexes의 과도한 포도당 운반 자극 작용에 의해 야기될 수 있는 저혈당(hypoglycemia)의 위험으로부터 생체를 보호해 주고(Zapf, 1993), 혈중 IGF의 이용률을 극대화시킴으로써 정상적인 성장을 가능하게 하는 역할을 하기도 한다(Ueki 등, 2000).

본 연구에서는 선행연구(Lee 등, 2001)의 연장으로서 돼지 ALS(pALS) 유전자 상에서 타 종의 ALS 유전자에서와 동일한 위치에서 intron의 존재를 확인-cloning 함으로써 RT-PCR 방법으로 조직에서의 ALS 유전자 발현을 조사

하는데 이용할 수 있는 intron-spanning primer pair를 합성할 수 있게 되었다. 또한 pALS cDNA의 3' UT 부위에서 147-bp sequence를 cloning함으로써 선행 연구(Lee 등, 2001; 정 등, 2002) 결과와 합하여 총 2,004-bp pALS cDNA 염기서열을 확보하게 되었다. 그러나 본 연구에서는 3' UT 부위에서 poly(A)-tail 서열이 확인되지 않았고, 편집된 pALS의 총 cDNA의 길이가 약 2.2-kb의 pALS mRNA보다 짧기 때문에 3' RACE product의 cloning 혹은 sequencing 도중 tail 부위의 일부가 소실된 것으로 추측된다. 인간(Leong 등, 1992), 양(Rhoads 등, 2000) 및 쥐(Dai와 Baxter, 1992)의 ALS cDNA에서 termination codon에서 poly(A)-tail의 개시부까지의 길이는 각각 약 180-, 150- 및 270-bp에 이르는 것으로 산정된다.

pALS RT-PCR을 수행한 결과 놀랍게도 간을 포함한 조사된 모든 돼지 조직 특히 선행연구(Lee 등, 2001)에서 RNase protection assay(RPA) 방법으로 ALS 유전자 발현이 확인되지 않았던 신장, 폐 및 난관에서까지 ALS 유전자 발현이

확인되었다. 현재까지 연구발표된 모든 종에서 Northern blotting에 의해서는 ALS mRNA가 간에서만 검출되었다(Dai와 Baxter, 1994; Delhanty와 Baxter, 1996; Rhoads 등, 2000; Lee 등, 2001). 그러나 *in-situ* hybridization 방법을 이용하여 Chin 등(1994)과 Wandji 등(2000)은 각각 쥐의 신장 피질과 돼지의 난소에서 낮은 수준의 ALS mRNA가 존재함을 밝혔고, 본 연구진(Lee 등, 2001)은 RPA 방법으로 돼지의 근육, 비장 및 자궁에서도 역시 낮은 수준이지만 ALS 유전자가 발현됨을 밝힌 바 있다. 또한 쥐에서 ALS 유전자는 간 조직 중 hepatocyte에서 발현·분비되는 것으로 알려져 있는데(Chin 등, 1994; Scharf 등, 1996) 본 연구의 *in-situ* hybridization 결과 돼지에서도 역시 hepatocyte에서 ALS 유전자가 발현됨이 확인되었다. 따라서 기 발표된 연구결과와 본 RT-PCR 결과를 종합하면, ALS protein이 혈중 IGF의 저장/조절체로서의 주기능 외에 말초 조직의 모세혈관 밖에서도 미지의 기능이 있을 가능성 또한 배제할 수 없다.

## V 요약

본 연구의 목적은 다음과 같다: 1) 돼지에서 150-kDa ternary insulin-like growth factor(IGF) complex의 한 구성 요소인 acid-labile subunit (ALS) 유전자 intron의 존재 확인-cloning 및 돼지 ALS(porcine ALS; pALS) complementary DNA(cDNA)의 3' 비해독(untranslated) 부위(3' UT) 증폭 · ning, 2) intron-spanning primer pair를 이용한 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법에 의한 돼지 조직에서의 ALS 유전자 발현 분포 확인 및 3) 돼지 hepatocyte에서의 ALS 유전자 발현 여부 확인. 돼지 genomic DNA를 template로 하여 PCR 방법으로 예상되는 intron 부위를 증폭하고 plasmid vector에 삽입하여 염기서열을 결정된 결과 타 종의 ALS 유전자에서와 같은 위치에 1,371-base pair(bp)의 pALS intron이 존재함을 확인하였다. 역시 본 연구에서 간에서 추출한 RNA를 주형으로 시작하여 3' rapid amplification

of cDNA end(3' RACE) 방법으로 147-bp의 3' UT를 합성하고 그 염기서열을 결정하였다. RT-PCR 결과 간은 물론 조사된 모든 돼지의 내장 기관(신장, 폐, 비장)과 자성 생식기관(난소, 난관, 자궁) 및 골격근육에서 ALS 유전자가 발현됨이 밝혀졌다. 또한 돼지 간 조직에 대한 *in-situ* hybridization 결과 hepatocyte에서 ALS 유전자가 발현됨이 확인되었다. 이상의 결과는 ALS가 혈중 IGF의 저장/조절체로서의 주기능 외에 모세혈관 밖에서도 미지의 기능이 있을 가능성을 시사한다.

## VI 사 사

본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업 지역협력연구센터의 연구비 지원에 의한 것입니다.

## VII 인용 문헌

1. Baxter, R. C., Martin, J. L. and Beniac, V. A. 1989. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. *J. Biol. Chem.* 264: 11843-11848.
2. Boisclair, Y. R., Rhoads, R. P., Ueki, I., Wang, J. and Ooi, G. T. 2001. The acid-labile subunit(ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J. Endocrinol.* 170:63-70.
3. Boisclair, Y. R., Seto, D., Hsieh, S., Hurst, K. R. and Ooi, G. T. 1996. Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10028-10033.
4. Chin, E., Zhou, J., Dai, J., Baxter, R. C. and Bondy, C. A. 1994. Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex. *Endocrinology* 134:2498-2504.
5. Dai, J. and Baxter, R. C. 1992. Molecular cloning of the acid-labile subunit of the rat insulin-like growth factor binding protein complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188:304-309.
6. Dai, J. and Baxter, R. C. 1994. Regulation *in vivo*

- of the acid-labile subunit of the rat serum insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 135:2335-2341.
7. Delhanty, P. and Baxter, R. C. 1996. The cloning and expression of the baboon acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227:897-902.
  8. Delhanty, P. and Baxter, R. C. 1997. Cloning and characterization of the rat gene for the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. *J. Mol. Endocrinol.* 19:267-277.
  9. Furlanetto, R. W. 1980. The somatomedin C binding protein: evidence for a heterologous subunit structure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:12-19.
  10. Jones, J. I. and Clemmons, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16:3-34.
  11. Kim, H. J., Koh, P. O., Kang, S. S., Paik, W. Y. and Choi, W. S. 2001. The localization of dopamine D2 receptor mRNA in the human placenta and the anti-angiogenic effect of apomorphine in the chorioallantoic membrane. *Life Sci.* 68:1031-1040.
  12. Lee C. Y., Kwak, I., Chung, C. S., Choi, W. S., Simmen, R. C. M. and Simmen, F. A. 2001. Molecular cloning of the porcine acid-labile subunit (ALS) of the insulin-like growth factor-binding protein complex and detection of ALS gene expression in hepatic and non-hepatic tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 26:135-144.
  13. Leong, S. R., Baxter, R. C., Camerato, T., Dai, J. and Wood, W. I. 1992. Structure and functional expression of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Mol. Endocrinol.* 6:870-876.
  14. Ooi, G. T., Cohen, F. J., Tseng, LY-H., Rechler, M. M. and Boisclair, Y. R. 1997. Growth hormone stimulates transcription of the gene encoding the acid-labile subunit(ALS) of the circulating insulin-like growth factor binding protein complex and ALS promoter activity in rat liver. *Mol. Endocrinol.* 11:997-1007.
  15. Rechler, M. M. and Clemmons, D. R. 1998. Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins. *Tren. Endocrinol. Metab.* 9:176-183.
  16. Rhoads, R. P., Greenwood, P. L., Bell, A. W. and Boisclair, Y. R. 2000. Organization and regulation of the gene encoding the sheep acid-labile subunit of the 150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 141:1425-1433.
  17. Scharf, J., Ramadori, G., Braulke, T. and Hartmann, H. 1996. Synthesis of insulinlike growth factor binding proteins and of the acid-labile subunit in primary cultures of rat hepatocytes, of Kupffer cells, and in cocultures: regulation by insulin, insulinlike growth factor, and growth hormone. *Hepatology* 23:818-827.
  18. Sohn, S. H., Lee, C. Y., Ryu, E. K., Han, J. Y., Multani, A. S. and Pathak, S. 2002. Rapid sex identification of chicken by fluorescence *in situ* hybridization using a W chromosome-specific DNA probe. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 11:1531-1535.
  19. Suwanichikul, A., Boisclair, Y. R., Olney, R. C., Durham, S. K. and Powell, D. R. 2000. Conservation of a growth hormone-responsive promoter element in the human and mouse acid-labile subunit genes. *Endocrinology* 141:833-828.
  20. Ueki, I., Ooi, G. T., Tremblay, M. L., Hurst, K. R., Bach, L. A. and Boisclair, Y. R. 2000. Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6868-6873.
  21. Wandji, S. A., Gadsby, J. E., Simmen, F. A., Barber, J. A. and Hammond, J. M. 2000. Porcine ovarian cells express messenger ribonucleic acids for the acid-labile subunit and insulin-like growth factor binding protein-3 during follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Endocrinology* 141:2638-2647.
  22. Zapf, J. 1993. Role of insulin-like growth factor (IGF) II and IGF binding proteins in extrapancreatic tumour hypoglycaemia. *J. Intern. Med.* 234:543-552.
  23. 이철영. 1996. Insulin-like growth factor system의 생식기능에서의 역할: 자궁편. *대한불임학회지* 23: 247-268.
  24. 이철영. 2000. Insulin-like growth factor system과 성장, 대사 및 영양과의 관계. *동물자원지* 42:795-816.
  25. 정진희, 김진현, 백규흠, 이철영. 2002. 돼지 150-kilodalton insulin-like growth factor complex의 acid-labile subunit에 대한 complementary deoxyribonucleic acid의 5' end cloning. *진주산업대학교 농업기술 연구소보* 15:187-192.
- (접수일자 : 2004. 5. 21. / 채택일자 : 2004. 8. 10.)