

미생물에서 돼지 150-kDa Insulin-Like Growth Factor Complex의 Acid-Labile Subunit 발현

이철영 · 강혜경 · 문양수

진주산업대학교 동물생명산업센터

Prokaryotic Expression of Porcine Acid-Labile Subunit of the 150-kDa Insulin-like Growth Factor Complex

C. Young Lee, Hye-Kyeong Kang and Yang Soo Moon

Regional Animal Industry Research Center, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT

Acid-labile subunit (ALS) is a 85-kDa glycosylated plasma protein which forms a 150-kDa ternary complex with 7.5-kDa insulin-like growth factor (IGF) and 40~45-kDa IGF-binding protein-3. In a previous study, the present authors prepared a porcine ALS (pALS) expression construct by inserting a pALS coding sequence into a plasmid vector following synthesis of the sequence by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression construct, however, was subsequently found to have a mis-sense mutation at two bases of the pALS coding sequence which is presumed to have occurred through a PCR error. In the present study, the correct coding sequence was synthesized by the site-directed mutagenesis and inserted into the pET-28a(+) plasmid expression vector containing the His-tag sequence flanking the last codon of the insert DNA. After induction of the expression construct in *E. coli* BL21 (DE3) cells, the resulting presumptive recombinant peptide was purified by the Ni-affinity chromatography. Upon SDS-PAGE, the affinity-purified peptide was resolved as a single band at a 66-kDa position which is consistent with the expected molecular mass of the presumptive recombinant pALS. Collectively, results indicate that a recombinant pALS peptide was successfully expressed and purified in the present study.

(Key words : IGF, ALS, Mutagenesis, Prokaryotic Expression, Pig)

I. 서 론

Insulin-like growth factors (IGFs)는 내분비(endocrine) 형태는 물론 국소적인 분비(autocrine/paracrine) 형태로도 작용하는 7.5-kDa의 크기를 가진 peptide로서 대부분의 혈중 IGF는 간으로

부터 분비되어 (Yakar 등, 1999) 혈관 내에서 ~45-kDa의 IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) 및 ~85-kDa의 당단백질인 acid-labile subunit (ALS) 와 결합하여 150-kDa ternary complex를 형성한다 (Baxter 등, 1989; Lee와 Rechler, 1995b). IGF 특히 IGF-I은 생후 성장호르몬 (growth hormone;

Corresponding author : C. Young Lee, Regional Animal Industry Center, Jinju National University, Jinju 660-758, Republic of Korea
Tel: +82 55-751-3285 FAX: +82 55-753-4422, E-mail: cylee@jinju.ac.kr

GH)의 성장 촉진 작용의 대부분을 매개하는 GH의 ‘2차호르몬’으로 잘 알려져 있으나, IGFBP-3 및 ALS의 발현도 일차적으로 GH에 의해 제어되기 때문에 후자들 또한 IGF-I와 유사한 GH의 2차호르몬이라 칭할 수도 있다(이, 2000; Butler 등, 2002). 생리학적으로 ALS는 혈중에서 150-kDa ternary complex에 결합된 IGF ligand가 서서히 방출되게 함으로써(Lee와 Rechler, 1995a, 1996; Ueki 등, 2000) 혈관을 쉽게 통과하는 ‘free’ IGF 혹은 IGF : IGFBP binary complex의 과다한 포도당 흡수 촉진 작용(insulin-like action)에 의해 야기될 수 있는 저혈당의 위협으로부터 생체를 보호해주는 역할(Zapf, 1993)과 IGF를 혈중에 저장하는 역할을 한다(Baxter와 Martin, 1989; Rechler와 Clemons, 1998). 근년의 연구결과에 의하면 IGFBP-3 : IGF complex 뿐만 아니라 35~40-kDa의 IGFBP-5 : IGF complex도 ALS와 결합하여 ternary complex를 형성할 수 있다(Twigg와 Baxter, 1998). 그러나 혈중 IGFBP-5의 농도는 IGFBP-3의 농도의 10% 미만일 뿐만 아니라 혈중에서 후자는 거의 100% ternary complex를 형성하는 반면 전자는 약 50%만이 ternary complex를 형성하기 때문에(Baxter 등, 2002) 혈중 대부분의 IGFs는 IGFBP-3 : IGF : ALS ternary complex 상태로 존재하고 일부만이 IGFBP-5 : IGF : ALS ternary complex, non-IGFBP-3 : IGF binary complex 및 free IGF 상태로 존재한다.

‘Natural’ ALS peptide는 몇몇 연구팀에 의해 단지 인간과 쥐의 혈청으로부터 정제되었을 뿐(Baxter 등, 1989; Baxter와 Dai, 1994; Lee와 Rechler, 1995b) 타 종에서의 정제는 보고되지 않고 있다. ALS 항혈청 역시 natural peptide(Baxter, 1990; Baxter와 Dai, 1994; Lee와 Rechler, 1995b) 혹은 ‘synthetic’ peptide(Liu 등, 1994; Kim 등, 2006)를 항원으로 하여 소수의 연구팀에 의해서만 생산되었다. 더욱이 이들 ALS peptide 및 그 항혈청은 한정된 연구팀 내에서

만 사용되고 있을 뿐만 아니라 후자의 경우는 타 종의 ALS peptide와의 교차반응성(cross-reactivity)이 매우 낮거나(Baxter와 Dai, 1994; Lee와 Rechler, 1995b) 그에 대한 정보조차 없기 때문에 가축에서의 ALS peptide 연구는 극히 제한적일 수밖에 없다. 본 연구진은 선행연구(강 등, 2006)에서 돼지(porcine) ALS(pALS) peptide를 ‘expression’ 하기 위해 1818-base pair ‘full-length’ pALS coding sequence를 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법으로 합성하여 pEF6/V5-His TOPO plasmid expression vector에 삽입시킨 바 있다. 그러나 선행연구가 종료된 후 pALS expression vector에 삽입된 pALS coding sequence를 조사한 결과 6 개의 bases에서 ‘error’가 발생하였고 이중 2개의 codons에서 mis-sense errors가 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 ‘site-directed mutagenesis’ 방법으로 이들 2개의 mis-sense codons를 바로 잡아 full-length pALS cDNA를 합성하여 pET-28a(+) plasmid expression vector에 삽입시키고 *E. coli* cell에서 발현시켜 pALS peptide를 생산하고 정제하였다.

II. 재료 및 방법

본 연구에 앞서 선행연구(강 등, 2006)에서 제작된 pALS plasmid expression construct의 ‘insert DNA’를 sequencing해 본 결과 당초 본 연구진이 보고한 pALS coding sequence(Lee 등, 2001)와 6개의 bases에서 PCR 과정중 발생했던 것으로 추정되는 errors가 발견되었고 이중 2개의 bases에서 ‘non-conservative’ errors가 확인되었다(Fig. 1). 이들 2개의 non-conservative errors를 교정하기 위해 아래와 같은 2 sets의 DNA primers를 이용하여 전술(Choi 등, 2004)한 바와 같이 site-directed mutagenesis 방법으로 coding sequence를 교정하였다.

이때 *NH₂*-terminal coding sequence와 *COOH*-

Query	1	ATGGCCCTGAGGAAGGAGGCCGCGCCCTGGCGCGCTGCTGGTCTCCTGGCGGCCGCTG	60
Sbjct	66	ATGGCCCTGAGGAAGGAGGCCGCGCCCTGGCGCGCTGCTGGTCTCCTGGCGGCCGCTG	125
Query	121	TGCCCGCTGCCTGCCTGCCACGACTACACGGACGAGCTCAGCGTCTCTGC	180
Sbjct	186	TGCCCGCTGCCTGCCTGCCACGACTACACGGACGAGCTCAGCGTCTCTGC	245
Query	241	CTGGACAGCAACAACTTCTCCTCCGTCCCCGGGGCTTCCGCAACCTCTCCAGCTG	300
Sbjct	306	CTGGACAGCAACAACTTCTCCTCCGTCCCCGGGGCTTCCGCAACCTCTCCAGCTG	365
Query	541	AGCCTGGCCGTGCTGCCTGACACTGCGTCCACGGCTGGCCAACCTGCGGGAGCTGGTG	600
Sbjct	606	AGCCTGGCCGTGCTGCCTGACACTGCGTCCATGGCTGGCCAACCTGCGGGAGCTGGTG	665
Query	901	GCCCTGCCAGCCTGCCGCCGCCACCTTCAGGACCTGCACTTCTGGAGGAGCTGCAG	960
Sbjct	1	GCCCTGCCAGCCTGCAAGCCGCCACCTTCAGGACCTGCACTTCTGGAGGAGCTGCAG	60
Query	1141	GTCTTCCGGGGCTGGCAAGCTGCAAGCCTGCACTGGAGCAGCTGCCCTGGGCC	1200
Sbjct	241	GTCTTCCGGGGCTGGCAAGCTGCAAGCCTGCACTGGAAACAGCTGCCCTGGGCC	300
Query	1381	GAGTACCTGCTCCTCCGCACCGGCTGTCGGCGTGCCAGCGGACGCCGCTGGGCC	1440
Sbjct	448	GAGTACCTGCTCCTCCGCACCGGCTGTCGGCGTGCCAGCGGACGCCGCTGGGCC	389

Fig. 1. Alignment of the original pALS coding sequence [upper; Lee et al., 2001] with that which was inserted into the pEF6/V5-His TOPO expression vector [lower; Kang et al. (강 등, 2006)]. One-letter bases at which presumptive ‘conservative’ and ‘non-conservative’ PCR errors occurred are underlined and shaded, respectively. For brevity, only those regions where the presumptive RT-PCR error occurred are shown in this figure.

280m Sense 5' CCCGCGGGGCTTCCGCAACCTCT 3'
 280m Antisense 5' AGAGGTTGCGGAAGCCCCCGCGGG 3'

917m Sense 5' CTCGCCAGCCTGC~~G~~CCCCGACCTTC 3'
 917m Antisense 5' GAAGGTGCGGGG~~C~~CGCAGGCTGGCGAG 3'

Sense (*Bam*H I) 5' GAT AGG ATC CAC GGA GCC CGG GGC GCC AT 3'

Antisense (*Hind* III) 5' GAG CAA GCT TTC AGC AGG GAG CAA AGT GTG 3'

STOP

terminal coding sequence에는 위와 같이 *Bam*H I & *Hind* III restriction sites를 부착하여 COOH-terminal 부위에 ‘6x-His-tagged’ 된 pET-28a (+) plasmid expression vector (Novagen, La Jolla,

CA, USA)의 해당 sites에 삽입하고 insert DNA sequence를 확인하였다.

제작된 expression construct는 전술(Lee 등, 2005)한 바와 같이 *E. coli* BL21 (DE3) cell에

'transformation' 시켜 37°C 혹은 16°C에서 'induction' 하여 유전자재조합(recombinant) pALS를 발현시킨 후 세포를 'sonication' 방법으로 용해시켰다. 'Cell lysate'는 원심분리하여 상등액은 'non-denaturing' condition 하에서 Ni-NTN column에 제조자(Biorad, Hercules, CA, USA)의 지시에 따라 'loading'한 후 imidazole를 함유하는 buffer로 'elution' 시켰다. Inclusion body가 들어있는 cell lysate pellet은 denaturing binding buffer [50 mM sodium phosphate (pH 8.0)/300 mM NaCl/8M urea]에 용해시킨 후 원심 분리하여 상등액을 Ni-NTN column에 loading 하여 wash buffer [denaturing binding buffer + 20mM imidazole]로 세척하고 elution buffer [denaturing binding buffer + 100 or 250mM imidazole]로 Ni-resin에 결합되었던 peptides를 분리시켰다. Recombinant pALS 정제의 각 단계에서 얻어진 시료는 SDS-PAGE한 후 Coomassie staining으로 용해·정제의 여부와 순도를 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

pALS expression plasmid를 transformation시킨 *E. coli* BL21 (DE3) cell을 37°C 혹은 16°C에서 배양한 후 non-denaturing condition에서 세포를 용해시키고 원심분리하여 상등액을 Ni-NTN affinity chromatography 한 결과 pALS가 Ni-NTN column에 결합(binding)하지 않았다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 발현된 pALS peptide가 불용성의 inclusion body를 형성하여 Ni column에 결합하지 않았음을 의미하므로 다음 실험에서는 induction된 *E. coli* cell을 denaturing condition 하에서 cell lysate pellet 용해, Ni column에 loading, washing & elution하였다.

Fig. 3는 8M urea 농도의 denaturing condition 하에서 *E. coli* cell을 용해시키고 Ni-NTN affinity chromatography 한 다음 수행한 SDS-PAGE & Coomassie staining 결과이다. 앞에서

예상했던 대로 denaturing condition 하에서는 약 66kDa의 'presumptive' pALS peptide가 Ni-NTN resin에 결합하였고 elution buffer와 함께 resin으로부터 분리되었다. 즉 이와 같은 결과는 *E. coli* cell에서 발현된 pALS peptide가 세포 내에서 inclusion body를 형성하여 non-denaturing condition 하에서는 불용이기 때문에 Ni column에 결합하지 않은 반면, denaturing condition 하에서는 용해되어 Histidine(imidazole) 잔기를 통하여 Ni column에 결합된 다음 imidazole을 함유하는 elution buffer를 가하자 resin에 결합되었던 pALS peptide가 elution buffer 속으로 떨어져 나왔음을 의미한다.

인간(human) ALS (hALS)는 67kDa의 peptide core에 약 18-kDa의 'N-linked' 당쇄가 결합한 85-kDa의 당단백질이다(Baxter 등, 1989). 본 연구에서 *E. coli*에서 발현된 당쇄가 없는 peptide는 예상대로 Ni-NTN column에 결합하는 특성을 보였고, SDS-PAGE & Coomassie staining 결과 약 66kDa의 크기를 보임으로써 hALS peptide core와 크기가 거의 일치하였다. 이상의 결과는 본 실험에서 발현·정제된 peptide가 당초 의도된 pALS peptide임이 거의 확실함을 시사한다.

Glycosylated recombinant ALS peptide는 실험 실 수준에서 수차례 expression되어 약간의 생화학적 특성이 조사되었으나(Leong 등, 1992; Choi 등, 2004; Lee 등, 2005), non-glycosylated prokaryotic ALS의 생화학적 특성에 대해서는 알려진 바가 없다. 이와 관련하여 natural ALS peptide의 당쇄를 glycanase로 제거하거나 CHO cell에서 'N-linked' 당쇄가 결합되지 않도록 고안된 'mutagenic' expression construct를 transfection 시켜 발현된 mutant hALS peptide는 IGFBP-3를 결합하는 능력이 상실되는 것으로 보고되었다(Janosi 등, 1999). 따라서 본 연구에서 expression된 presumptive pALS peptide가 deglycosylated 혹은 non-glycosylated hALS mutant

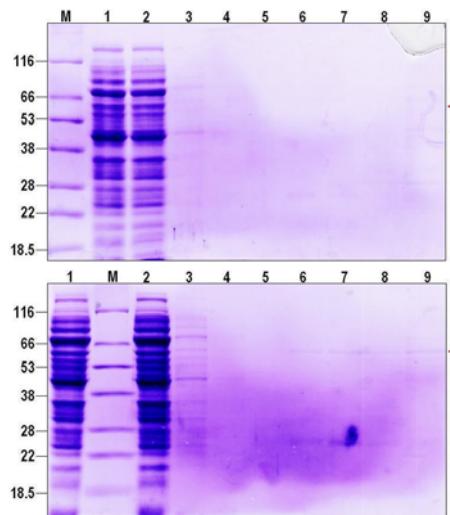


Fig. 2. SDS-PAGE and Coomassie staining of the lysate of *E. coli* BL21 (DE3) cells following expression of the recombinant pALS peptide. The *E. coli* cells were transformed with a pALS pET-28a (+) plasmid expression vector and 'induced' at 37°C (upper) or 16°C (lower). Following lysis of the cells and centrifugation, the supernatant of the lysate was subjected to Ni-NTN affinity chromatography under non-denaturing conditions. M, protein size marker; lane 1, supernatant of the cell lysate after centrifugation; lane 2, flow-through of the Ni-NTN column; lanes 3, 4 & 5, washes of the column with a buffer containing 100 mM (lane 3) or 250 mM (lanes 4 & 5) imidazole; lanes 6-8, eluates with a buffer containing 100 mM (lane 6) or 250 mM (lanes 7 & 8) imidazole; lane 9, supernatant of the Ni-NTN resin after boiling and centrifugation.

와 같이 ternary IGF complex의 subunit로서의 ALS 활성이 상실되었는지의 여부를 판명하기 위해서는 추가의 연구가 요망된다. 한편 일반적으로 당단백질의 당쇄는 단백질간의 상호작용시 상대편 단백질의 인지 'marker'로서의 역

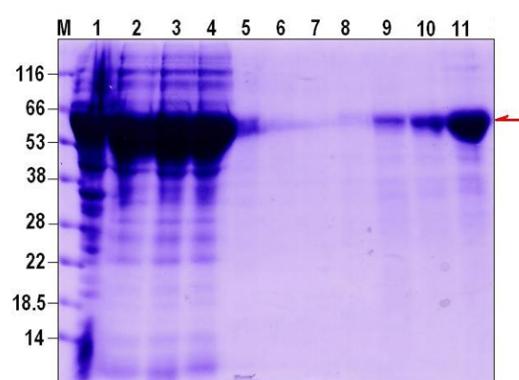


Fig. 3. Purification of a presumptive recombinant pALS peptide following expression in *E. coli* cells and Ni-NTN affinity chromatograph under denaturing conditions. Following expression of a pALS plasmid expression construct in *E. coli* BL21 (DE3) cells at 37°C and lysis of the cells under a non-denaturing condition, the insoluble fraction of the lysate was solubilized using a denaturing binding buffer containing 8M urea followed by Ni-NTN affinity chromatography under the denaturing condition. The Ni-NTN column eluate was subjected to SDS-PAGE followed by Coomassie staining. M, protein size marker; lane 1, whole cell lysate; lane 2, insoluble fraction (pellet) of the cell lysate; lane 3, supernatant of lane 2 following solubilization of lane 2 in the denaturing binding buffer and centrifugation; lane 4, Ni-column flow-through of lane 3; lanes 5-7, sequential washes of the column with an elution buffer containing 20mM imidazole; lanes 8-10, eluate from the Ni column with a buffer containing 100 mM (lane 8) or 250 mM (lanes 9 & 10) imidazole; lane 11, supernatant of the Ni-NTN resin after the affinity chromatography, boiling and centrifugation.

할과 peptide의 안정성 즉 반감기(half-life)를 증가시키는 효과가 있으나 면역 유발 작용(immunogenicity)에는 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구로부터 도출된 presumptive pALS peptide는 항혈청을 만들기 위한 항원과 방사면역측정법[radioimmunoassay (RIA)] 혹은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)의 비표지항원 [unlabeled antigen (standard)]으로 쓰일 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 요 약

Acid-labile subunit (ALS)는 85-kDa 크기의 당단백질로서 7.5-kDa의 insulin-like growth factor (IGF) 및 40~45-kDa IGF-binding protein-3와 결합하여 150-kDa ternary complex를 형성하는 혈장단백질이다. 선행연구에서 본 연구진은 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 돼지(porcine) ALS(pALS)의 coding sequence를 합성하여 plasmid vector에 삽입시켜 'expression construct'를 제작한 바 있다. 그러나 본 expression construct의 pALS coding sequence에는 PCR error로 추정되는 원인으로 말미암아 2개의 bases에서 mis-sense mutation이 일어난 것이 발견되었다. 본 연구에서는 'site-directed mutagenesis' 방법으로 pALS의 올바른 coding sequence를 합성하여 'insert DNA'의 마지막 codon 다음에 'His-tag' sequence가 위치한 pET-28a(+) plasmid expression vector에 삽입하였다. 본 expression construct는 *E. coli* BL21 (DE3) 세포에서 'induction' 시켰고, 발현된 유전자재조합(recombinant) peptide는 Ni-affinity chromatography로 정제하였다. 이렇게 affinity chromatography로 정제된 peptide는 SDS-PAGE에서 66kDa 위치에 single band를 나타냄으로써 recombinant pALS의 예상된 질량과 일치하였다. 이상의 결과는 본 연구에서 recombinant pALS

peptide가 성공적으로 발현·정제되었음을 시사한다.

V. 사 사

본 논문은 산업자원부와 한국산업기술평가원이 지원하는 진주산업대학교 동물생명산업센터의 사업비 및 2007학년도 진주산업대학교 기성회연구비 지원을 받아 수행되었습니다.

VI. 인 용 문 현

- Baxter, R. C. 1990. Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (α) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70:1347-1353.
- Baxter, R. C. and Dai, J. 1994. Purification and characterization of the acid-labile subunit of rat serum insulin-like growth factor binding protein complex. *Endocrinology* 134:848-852.
- Baxter, R. C. and Martin, J. L. 1989. Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function. *Prog. Growth Factor Res.* 1:49-68.
- 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.
- Baxter, R. C., Meca, S. and Firth, S. M. 2002. Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:271-276.
- Butler, A. A., Yakar, S. and LeRoith, D. 2002. Insulin-like growth factor-I: compartmentalization within the somatotropic axis. *News Physiol. Sci.* 17:82-85.
- Choi, K.-Y., Kyung, Y.-J., Lee, C. Y. and Lee,

- D.-H. 2004. Characterization of insulin-like growth factor-free interaction between insulin-like growth factor binding protein 3 and acid labile subunit expressed from *Xenopus* oocytes. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37:153-158.
8. Janosi, J. B. M., Firth, S. M., Bond, J. J., Baxter, R. C. and Delhanty, P. J. D. 1999. N-linked glycosylation and sialylation of the acid-labile subunit. Role in complex formation with insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3. *J. Biol. Chem.* 274:5292-5298.
9. Kim, J. W., Rhoads, R. P., Segoale, N., Kristensen, N. B., Bauman D. E. and Boisclair, Y. R. 2006. Isolation of the cDNA encoding the acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex in cattle and ALS regulation during lactation from pregnancy and lactation. *J. Endocrinol.* 189:583-593.
10. 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.
11. Lee, C. Y. and Rechler, M. M. 1995a. A major portion of the 150-kilodalton insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) complex in adult rat serum contains unoccupied, proteolytically nicked IGFBP-3 that binds IGF-II preferentially. *Endocrinology* 136:668-678.
12. Lee, C. Y. and Rechler, M. M. 1995b. Purified rat acid-labile subunit and recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 can form a 150-kilodalton binary complex *in vitro* in the absence of IGFs. *Endocrinology* 136: 4982-4989.
13. Lee, C. Y. and Rechler, M. M. 1996. Proteolysis of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in 150-kilodalton IGFBP complexes by a cation-dependent protease activity in adult rat serum promotes the release of bound IGF-I. *Endocrinology* 137:2051-2058.
14. Lee, D.-H., Chun, C., Kim, S.-H. and Lee, C. Y. 2005. Expression of porcine acid-labile subunit (pALS) of the 150-kilodalton ternary insulin-like growth factor complex and initial characterization of recombinant pALS protein. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38:225-231.
15. 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.
16. Liu, F., Hintz, R. L., Khare, A., Diaugustine, R. P., Powell, D. R. and Lee, P. D. K. 1994. Immunoblot studies of the IGF-related acid-labile subunit. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:1883-1886.
17. Rechler, M. M. and Clemmons, D. R. 1998. Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins. *Tren. Endocrinol. Metab.* 9:176-183.
18. Twigg, S. M. and Baxter, R. C. 1998. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J. Biol. Chem.* 272:6074-6079.
19. 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 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.
20. Yakar, S., Liu, J. L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer B. and LeRoith, D. 1999 Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7324-7329.
21. Zapf, J. 1993. Role of insulin-like growth factor (IGF) II and IGF binding proteins in extra-

- pancreatic tumour hypoglycaemia. J. Intern. Med. 234:543-552.
22. 강혜경, 하미숙, 문양수, 이철영. 2006. 돼지 150-kDa insulin-like growth factor complex의 acid-labile subunit expression construct 제작. 진주산업 대학교 농업기술연구소보 19:213-219.
23. 이철영. 2000. Insulin-like growth factor system과 성장, 대사 및 영양과의 관계. 동물자원지 42: 795-816.
- (접수일자 : 2008. 1. 21. / 채택일자 : 2008. 4. 21.)