

## 우유로부터 Osteopontin의 분리·정제 및 특성에 관한 연구

최기원\*·김동운\*\*·이수원\*

성균관대학교 식품·생명자원학과\*, 축산기술연구소\*\*

## Purification and Properties of Osteopontin from Bovine Milk

K. W. Choi\*, D. W. Kim\*\* and S. W. Lee\*

Department of Food and Life Science, Sungkyunkwan University\*

National Livestock Research Institute, RDA\*\*

### ABSTRACT

The purpose of this study is to observe purification and properties of osteopontin(OPN) from bovine milk. The purification of osteopontin from bovine milk was performed by using ion-exchange and hydrophobic chromatography. SDS-PAGE analysis revealed that the protein migrated at Mw. 60,000. NH<sub>2</sub>-terminal sequence analysis of the first seven amino acids revealed the protein to be identical to that previously reported for bovine OPN. 35-wk-old chickens, including 3 Single Comb White Leghorn (SCWL), were used to produce egg yolk antibody(IgY) against OPN as an antigen. However, the anti-OPN antibody activities determined by ELISA. Immunological assay of OPN in milk was performed using radial immunodiffusion test based on the standard curve of pure OPN. The radial precipitation lines of four different milk samples indicated that the concentrations of OPN in the milk samples were within the range of 31.7 to 39.7 μg/ml. On inhibition with OPN on precipitation of calcium phosphate, OPN was slightly higher than casein phosphopeptide(CPP) and poly-glutamic acid.

(**Key words** : Osteopontin, Anti-OPN, Radial immunodiffusion, CPP, Calcium phosphate)

### I. 서 론

우유는 칼슘공급원으로써 많은 식품 중에서도 으뜸가는 식품이다. 우유 및 유제품 중의 칼슘은 이용률이 매우 높아 가장 우수한 칼슘 공급식품으로 주목받고 있다(Bergeim 1926; Kline 등, 1932). 이것은 우유 내에 존재하는 칼슘 결합단백질 및 우유단백질인 casein 자체가 칼슘 흡수에 영향을 주기 때문으로 보고 되어있다(Bronner, 1987).

현재 알려진 우유 중의 칼슘흡수 촉진물질인 casein phosphopeptide(CPP)는 칼슘과 화학적으로 결합할 수 있는 negative charge를 띤 phosphoserine(Ser-P)을 함유하고 있다(Abd El-salam 등, 1996). CPP는 칼슘과 인(P)의 결합을 저지하기 때문에 칼슘은 가용성의 상태로 흡수된다(Bronner, 1987; Naito 등, 1972; Reeves 등, 1958; 内藤, 1986). CPP의 이 같은 작용은 CPP의 펩타이드 분자 내에 존재하는 Ser-P에 칼슘이 결합됨으로써 칼슘의 가용성이 유지 된다

---

Corresponding author : S. W. Lee, Department of Food and life Science, Sungkyunkwan University, 300, Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do, Korea. Tel: 82-031-290-7805 Fax: 82-031-290-7815 E-mail: leesw@skku.edu

(Kitts와 Yuan, 1992).

우유 중에는 CPP 이외에 칼슘흡수촉진물질로 예상되는 물질 중 하나가 osteopontin(OPN)이다. OPN의 분자량은 약 60kDa이고, 아미노산분석으로 27개의 phosphoserine, 1개의 phosphothreonine과 3개의 O-glycosylation을 가지고 있는 것으로 확인되었다(Sorensen과 Petersen, 1995). OPN은 무기물화된 소의 뼈에서 처음으로 발견되었고(Franzen과 Heinegard, 1985), 그 후 rat(Oldberg 등, 1986), human(Fisher 등, 1987), mouse, pig, chicken 등에서 분리되었으며 우유에서도 발견되었고(Sorensen과 Petersen, 1993), 최근 콩팥을 비롯하여 소화관상피, 자궁, 난소, 피부 등 매우 다양한 조직에 분포하고 있음이 알려졌다(Brown 등, 1992). 처음에는 OPN이 뼈에만 특이적으로 존재하는 물질이며 그 기능도 RGD의 아미노산 서열을 통해 단순히 뼈세포를 기질에 붙여주는 것으로만 생각하였으나(Reinholt 등, 1990), Ca의 조절, 무기물화된 조직의 형성과 형태를 고쳐주고 격자구조의 결정으로 발달된 분열을 통하여 산화칼슘염의 결정의 성장을 억제 및 세포 손상시의 방어기전을 돕고, 질소를 포함하는 산화물 생산에 영향을 주는 등 매우 다양하다는 사실이 발표되었다(Denhardt와 Guo, 1993). 이러한 기능들 중 많은 부분이 칼슘에 의해 매개되거나 칼슘의존성인 여러 가지 과정과 밀접한 관련을 가지고 있다(Zimolo 등, 1994; Shirga 등, 1992). 그러나 아직도 우유에 존재하는 OPN의 생리적 기능에 대해서는 분명히 밝혀져 있지 않다. 한편 OPN의 분자구조에는 특이하게도 phosphoserine이 27개나 존재하며 이것은 CPP와 같이 칼슘과 반응성을 생각할 수 있으며, 소장 내에서 칼슘을 수용성으로 존재시킬 가능성이 크다.

본 실험은 우리가 섭취하고 있는 우유 중 칼슘흡수에 기여되는 예상 물질인 osteopontin을 우유에서 분리하고 그 특성을 조사해서 식품소재로서의 응용을 목적으로하는 기초 자료로 사용하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Osteopontin의 분리·정제

OPN의 분리·정제는 Bayless 등(1997)의 방법에 준하여 사용하였다. 1ℓ의 원유를 12,000×g로 15분간 원심분리한 후 지방층을 제거하여 탈지유를 제조하였으며, ion-exchange chromatography인 DEAE-Sephacel과 hydrophobic chromatography인 Phenyl-Sepharose 2개를 사용하여 OPN을 분리·정제하였다. 분리한 분획은 280nm에서 흡광도를 측정 후 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리 정도를 확인하였다. 확인된 분획은 Mw. 25,000(Spectra/pr, USA)의 dialysis membrane을 이용하여 생리식염수에 48시간 동안 투석한 후 동결건조하여 -20℃에서 보관하였다.

### 2. Protein assay

단백질정량은 표준물질로 BSA를 사용하여 protein assay kit(Bio-rad, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 3. NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence 확인

분리된 OPN 단백질의 NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence는 Applied Biosystem Model 491 protein sequencer(한국기초과학지원 연구원)를 이용하여 분석하였다.

### 4. 산란계 면역

OPN에 대한 항혈청을 제조하기 위하여 산란계의 면역은 35주령 된 Single Comb White Leghorn(SCWL) 3수를 이용하여, Sunwoo 등(1996)의 방법을 이용하였다. 항원으로서 OPN 1mg을 0.01M PBS buffer(pH 8.2)로 1ml로 용해시킨 후 동량의 Freund's complete adjuvant

(Difco, USA)와 혼합한 후 산란계의 가슴근육 4부위에 주사하였다. 2주 후에 다시 booster injection을 하기 위하여 항원은 1차면역과 동일 양을 Freund's incomplete adjuvant(Difco, USA)와 혼합하여 같은 방법으로 재주사 하고, 계란은 매일 수집하여 4°C에 보관하여 사용하였다.

## 5. IgY 항체의 분리

계란으로부터 anti-OPN IgY는 Akita와 Nakai (1992)의 방법에 따라 water soluble fraction (WSF)에서 얻었다. 즉 계란의 난황을 증류수로 4~5배로 희석한 후 pH를 5.0으로 조정하여 4°C에서 6시간 동안 처리한 후 원심분리(10,000 ×g, 4°C, 25min)하였다. 상등액을 Whatman No. 1 여과지로 여과한 후 동결건조하여 사용하였다.

## 6. 항체 역가 측정

난황항체의 활성은 Mine(1997)과 Li 등(1998)의 ELISA 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 96 well의 microplate에 OPN 항원을 부착하기 위하여 각 well에 OPN 항원 2 $\mu$ g/ml의 농도로 0.05M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 용해하여 well당 200 $\mu$ l씩 주입하였다. 이것을 4°C에서 24시간동안 정지시킨 후 plate를 PBS-T buffer(Phosphate buffer saline, 0.05% Tween 20, pH7.4)로 3회 세척하였다. 여기에 WSF를 증류수로 1,000배로 희석하여 plate에 주입한 후 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 PBS-T buffer로 3회 세척하였다. 그런 다음 Alkaine phosphatase(AP)가 결합된 이차 항체인 rabbit anti-chicken IgG(Sigma, USA) 용액을 1,000배로 희석하여 100 $\mu$ l씩 well에 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 PBS-T buffer로 3회 세척하였다. 다음으로 Alkaine phosphatase의 기질인 p-nitrophenyl phosphate(Sigma, USA)을 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 3N NaOH를 50 $\mu$ l씩

사용하여 반응을 정지시킨 다음 405nm의 파장에서 ELISA microplate reader(ELISA:ELx808: Bio-tec, USA)로 각 well의 흡광도를 측정하였다.

## 7. 우유 중의 OPN 함량 측정

Radial immunodiffusion(RID)은 Sunwoo 등(1996)의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. 1.7ml PBS buffer와 0.3ml anti-OPN IgY를 혼합하여 56°C에서 가운하고, agarose 70mg는 4.67 ml PBS buffer와 0.35% sodium azide 0.4ml를 혼합하여 완전히 녹을 때까지 증탕하고, 그 후 두 용액을 완전히 섞어 준비된 RID plate에 부어 gel이 될 때까지 기다린다. RID plate에서 gel 상태로 굳으면 직경이 2.5mm가 되게 구멍을 뚫어 분리한 OPN을 10, 20, 40, 80 $\mu$ g의 농도로 각각 6 $\mu$ l씩 주입하여 3일간 상온에서 배양한다. 배양이 완료되면 RID plate에 주입한 액이 확산에 의해 만들어진 침강선의 직경을 측정하여 OPN 표준정량곡선을 작성하였다. 또한 같은 방법으로 우유 중의 OPN 함량을 표준정량곡선으로부터 계산하였다.

## 8. OPN의 가용화 능력 검정

内藤(1986)의 방법에 준하여 20mM CaCl<sub>2</sub> 0.25ml에 CPP(明治製菓株式會社, Japan), polyglutamicacid(Sigma, USA), OPN을 각각 1mg을 첨가한 후, 20mM Na-phosphate buffer(pH 7.0) 1ml를 첨가하였다. 소장하부의 조건(pH 7.0, 37°C)을 유지시켜 주면서 0, 2, 4, 6, 8, 24시간에 시료를 채취하여 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 ICP Emission Spectro Analyzer(JY 38 Plus. ISA, Jobin Yvon, France)로 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 우유로부터 OPN의 분리·정제

우유에서 OPN 단백질을 분리·정제하기 위하여 ion-exchange chromatography인 DEAE-Sephacel과 hydrophobic chromatography인 Phenyl-Sephacel을 이용하였으며, 각 단계별 정제도는 SDS-PAGE에 의하여 확인하였다(Fig. 1).

Lane 1은 DEAE-Sephacel column을 이용하여 정제한 protein의 band를 나타낸 것으로 분자량 60,000dalton 정도인 OPN이라고 추측되는 물질이 있는 것을 확인 할 수 있었으나 다른 protein band가 많았다. 다시 순도를 높이기 위하여 Phenyl-Sephacel column 2개를 거쳐 정제한 결과 Lane 3에서 보는 것과 같이 OPN 이외의 다른 protein band 없이 순수한 단백질을 얻을 수 있었다.

또한 정제단계별 단백질 정량은 Table 1에서 보는 것과 같다. 우유 1ℓ에서 최종 5.7mg의 순수한 OPN을 얻었다. 정제과정에서 OPN의 확인은 분자량만을 기준으로 하였기 때문에 OPN의 정량은 최종 단계에서만 하였다. 한편 Bayless 등(1977)에 의하면 우유 1ℓ에서 약 8mg의 순수한 OPN을 얻었으며, Senger 등(1989)도 모유에서 3~10mg/ℓ를 분리하였다. 따라서 우유나 모유 속에는 정제된 양보다는 많겠지만, 미량 존재하는 단백질을 알 수 있다.

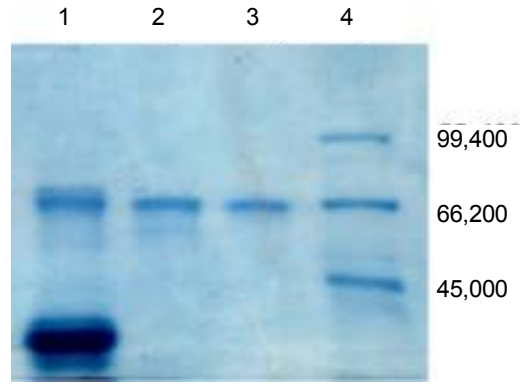


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of purification from bovine milk.

- 1 : Purification by DEAE-Sephacel from bovine milk
- 2 : Purification by Phenyl-Sephacel I from bovine milk
- 3 : Purification by Phenyl-Sephacel II from bovine milk
- 4 : Low molecular weight marker(Bio-rad, USA).

#### 2. N-terminal sequence 확인

분자량을 기준으로 하여 우유에서 분리·정제한 protein이 OPN인지를 더욱 정확히 확인하기 위해서 N-terminal amino acid sequence를 확인한 결과 Leu-Pro-Val-Lys-Pro-Thr-Ser으로 판명되었다. 이것은 Kerr(1991) 등에 의해 알려진 OPN의 N-terminal amino acid sequence와 대조한 결과 OPN의 N-terminal amino acid sequence 7개의 순서가 일치하였다. 따라서 본 실험에서 분리·정제한 단백질이 Kerr(1991) 등에 의해 알려진 OPN과 동일 물질임을 확인하였다.

Table 1. Purification of Osteopontin from Bovine milk

	volume (ml)	Protein (mg)	OPN (mg)
Starting material	1000	20300	-
DEAE-Sephacel	112	251	-
Phenyl-Sephacel I	70	16.7	-
Phenyl-Sephacel II	15	5.7	5.7

### 3. 난황내의 Anti-OPN IgY 항체의 확인

항원인 OPN으로 면역된 산란계에서 생산된 계란의 anti-OPN IgY 항체의 역가를 ELISA로 측정하였다(Fig. 2). OPN을 주사 후 항체가 조금씩 높아지다가 1차 면역 후 14일째에 2차 추가면역(boosting)을 함으로써 다시 역가가 상승하여 42일째에 가장 높은 항체 역가를 보였다. 이것은 Shimizu 등(1998)이 *E. coli* O142: K86: H6의 사균을 주사한 후 계란의 anti-*E. coli* O142: K86: H6의 항체역가를 ELISA를 이용하여 측정한 결과 면역 주사 후에는 계속 증가하는 경향을 보이다 40일 경에 최고치를 나타내다가 차츰 감소하는 경향을 나타냈다는 보고와 비슷한 결과를 보였다.

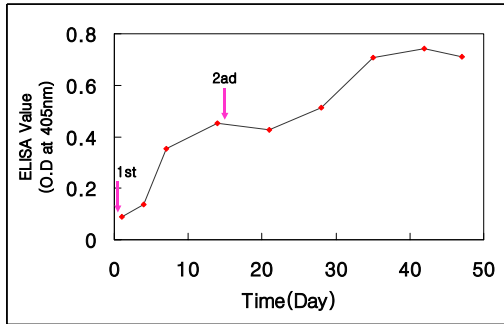


Fig. 2. Changes of antibody activity in egg yolk during the immunization period. Anti-OPN antibody activity in egg yolk were measured by ELISA. The arrows indicate 0, 14 days when injected with OPN.

### 4. 우유의 OPN 함량 측정

우유에 존재하는 OPN의 함량은 RID 방법을 사용하여 측정하였다(Fig. 3). 이것은 anti-OPN IgY와 OPN의 화학적 반응에 의한 radial 형태로 침강선이 형성되는 것을 이용하였다. Anti-OPN IgY 항체를 agarose gel에 혼합한 후 분리·정제된 OPN을 각 well에 10~80 $\mu$ g을 주입 후 나타나는 침강선의 직경으로부터 Fig. 4에서

보는 것과 같이 OPN의 정량곡선을 작성하고 이 곡선에 의해 우유 중의 OPN 함량을 정량하였다. 그 결과 원유, 탈지유, 시유에서 각각 39.78, 31.74, 37.48 $\mu$ g/ml을 함유하고 있는 것으로 나타났다(Table 2). 탈지유에서 약간 낮은 OPN 함량은 탈지과정에서 단백질의 일부가 소실됨을 의미한다. 한편 OPN으로 면역된 계란에서 분리한 anti-OPN IgY를 이용한 우유 중 OPN의 함량 분석기법으로 활용할 수 있을 것으로 생각되어진다.

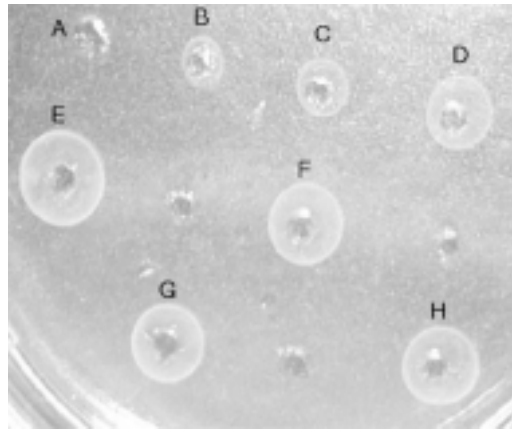


Fig. 3. Single radial immunodiffusion patterns of anti-OPN IgY against OPN dilution.

- A : OPN
- B : OPN 10 $\mu$ g
- C : OPN 20 $\mu$ g
- D : OPN 40 $\mu$ g
- E : OPN 80 $\mu$ g
- F : Raw milk
- G : Skim milk
- H : Market milk.

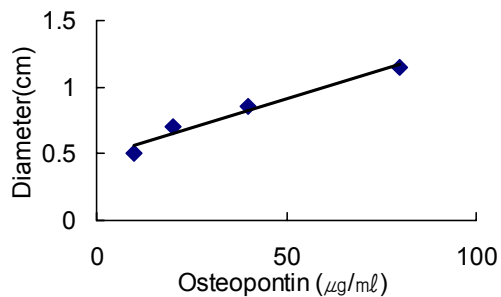


Fig. 4. Standard curve of OPN in single radial immunodiffusion.

Table 2. OPN concentration in bovine milk by radial immunodiffusion

	Raw milk	Skim milk	Market milk
OPN	39.78	31.74	37.48

( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

## 5. OPN의 가용화 능력 검정

*In vitro* 실험을 통해 OPN이 Ca-P의 결합에 의한 침전을 저지하는 능력, 즉 칼슘가용화 정도를 측정하였다(Fig. 5). 분자구조상으로 칼슘가용화 능력을 나타낼 수 있는 negative charge를 가진 펩타이드인 poly-glutamic acid와 CPP의 Ca 가용화 능력을 OPN과 비교하였다.

시간별로 Ca 가용화 능력 정도를 살펴볼 때 시간이 지남에 따라 Ca 가용화 능력은 점차 감소하는 경향이 나타났으며, 6시간 이후로는 OPN을 제외한 물질들의 Ca 가용화 능력은 현저히 떨어져 대조구와 비슷하였다. 이와 같은 결과는 OPN이 기존에 Ca 가용화 능력이 좋다고 알려진 poly-glutamic acid나 CPP보다 더욱 우수한 것이며 이는 OPN의 화학적구조가 Ca 가용화에 더욱 적합한 것으로 사료되었다.

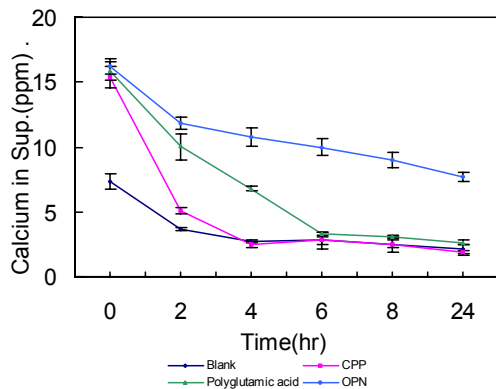


Fig. 5. Inhibition with OPN on the precipitation of calcium *in vitro* at physiological pH.

## IV. 요약

본 연구는 우유로부터 OPN을 분리·정제하여 그 특성을 규명하기 위해서 수행되었다. 먼저 ion-exchange와 hydrophobic chromatography를 이용하여 우유로부터 OPN을 분리·정제하였다. OPN의 분자량은 SDS-전기영동 상에서 약 60,000dalton이었고, NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence를 확인한 결과 Leu-Pro-Val-Lys-Pro-Thr-Ser 순이었다. OPN을 35주령된 SCWL를 이용하여 산란계를 면역 시키고, 형성된 anti-OPN IgY 항체를 분리·정제한 후 ELISA test로 항체를 측정하였다. 또한 RID test을 이용하여 OPN 함량에 따른 정량곡선을 작성하고, 이 곡선에 의해 우유 중 OPN 함량을 정량하였다. 그 결과 원유, 탈지유, 시유에서 각각 39.78, 31.74, 37.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 또한 OPN의 Ca 가용화 능력을 검정한 결과 OPN이 CPP와 poly-glutamic acid 보다 더 우수한 것으로 나타났다.

## V. 인용 문헌

1. Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S. and Buchheim, W. 1996. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *Int. Dairy J.* 6: 327-341.
2. Akita, E. M. and Nakai, S. 1992 Immunoglobulins from egg yolk : isolation and purification *J. Food Sci.* 57:629-634.
3. Bayless, K. J., Davis, G. E. and Meininger, G. A.

1997. Isolation and biological properties of osteopontin from bovine milk. *Protein Expr. and Puri.* 9:309-314.
4. Bergeim O. V. 1926. Carbohydrates and calcium and phosphorus. *J. Biol. Chem.* 70:35-45.
  5. Bronner, F. 1987. Intestinal calcium absorption : Mechanisms and applications. *J. Nutr.* 117(8): 1347-1352.
  6. Brown, L. F., Berse, B., Van de Water, L., Papadolos-Sergiou, A., Perruzzi, C. A., Manseau, E. J., Dvorak, H. F. and Senger, D. R. 1992. Expression and distribution of osteopontin in human tissues; widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol. Biol. Cell.* 3: 1169-1180.
  7. Denhardt, D. T. and Guo, X. 1993. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB. J.* 7 : 1475-1482.
  8. Fisher, L. W., Hawkins, G. R., Tuross, N. and Termine, J. D. 1987. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.* 262:9702-9708.
  9. Franzen, A. and Heinegard, D. 1985. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochim. J.* 232:715-724.
  10. Kerr, J. M., Fisher, L. W., Termine, J. D. and Young, M. F. 1991. The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin. *Gene* 108 : 237-243.
  11. Kitts, D. D. and Yuan, Y. V. 1992. Casein phosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends in Food Sci. Technol.* 3:31-36.
  12. Kline, O. L., Keenan, J. A., Elevehjem, C. A. and Hart, E. B. 1932. Lactose in nutrition. *J. Biol. Chem.* 98:121-131.
  13. Li, X., Nakano, T., Sunwoo, H. H. and Sim, J. S. 1998. Effects of egg yolk weights on yolk antibody(IgY) production in laying chickens. *Poult. Sci.* 77:226-270.
  14. Mine, Y. 1997. Separation of Salmonella enteritidis from experimentally contaminated liquid eggs using a hen IgY immobilized immunogenetic esparation system. *J. Agric. Food Chem.* 45:3723-3727.
  15. Naito, H., Kawakami, A. and Imamura, T. 1972. *In vivo* formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agr. Biol. Chem.* 36:409-415.
  16. Oldberg, A., Franzen, A. and Heinegard, D. 1986. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein(osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:8819-8823.
  17. Reeves, R. E. and Latour, N. G. 1958. Calcium phosphate sequestering phosphopeptide form casein. *Science.* 128:472-472.
  18. Reinholt, F. P., Hulthenby, K., Oldberg, Å. and Heinegard, D. 1990. Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. *Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4473-4475.
  19. Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Papadopoulos, A. and Tenen, D. G. 1998. Purification of a human milk protein closely similar to rumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim. Biophys. Acta* 996:43-48.
  20. Shimizu, M., Fitzsimmons, R. C. and Nakai, S. 1988. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a prtential food ingredient. *J. Food Sci.* 53:1360-1366.
  21. Shiraga, H., Min, W., WanDuse, W. J., Clayman, M. D., Miner, D., Terrell, C. H., Sherbotie, J. R., Foreman, J. W., Przysiecki, C, Neilson, E. G. and Hoyer, J. R. 1992. Inhibition of calcium oxalate crystal growth *in vitro* by uropontin, an new member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:426-430.
  22. Sorensen, E. S. and Petersen, T. E. 1993. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Res.* 60:189-197.
  23. Sorensen, E. S. and Petersen, T. E. 1995. Phosphorylation, glycosylation, and trans-glutaminase sites in bovine osteopontin<sup>n</sup>. *The New York Academy of Sciences.* 760:363-366.

24. Sunwoo, H. H., Nakano, T., Dixon, W. T. and Sim, J. S. 1996. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *escherichia coli* and *salmonella tryphimurium*. *Poult. Sci.* 75:342-345.
  25. Zimolo, Z., Wesolowski, G., Tanaka, H., Hyman, J., Hoyer J. R. and Rodan, G. A. 1994. Soluble  $\alpha_v\beta_3$  integrin ligands increase intracellular ( $Ca^{++}$ ) in rat osteoclasts and mouse derived osteoclast-like cells. *Am. J. Physiol.* 266:376-381.
  26. 内藤. 1986. カゼインの 消化時生成するホスホペプチドのカルシウム 吸収促進機構. *日本營養食糧學會紙.* 39(6):433-439.
- (접수일자 : 2003. 1. 20 / 채택일자 : 2003. 4. 15)