ウシ口腔組織の非活性型コラゲナーゼについて

安 炳 善

大阪歯科大学 生化学教室* (主任: 榊 鉄也教授)

[受付: 昭和54年2月10日]

抄録: 生体内におけるコラーゲン代謝に関して、非活性型コラゲナーゼがどのような役割を果たしているのかを解明するには、まず、生体内における非活性型コラゲナーゼの分布と存在形式、および個体の成長に伴う動態を知ることが必要である。そこで、本実験では、混合歯列期のウシの歯肉、萌出前後期の歯の歯髄および歯根膜の KCl homogenate から非活性型コラゲナーゼを抽出し、NaSCN, trypsin およびその両者で活性化させたのち、各種組織における本酵素活性の量的分布と存在形式について検討した。その結果、本実験に用いた各組織には、NaSCN によっても、trypsin によっても活性化される非活性型コラゲナーゼと、NaSCN では活性化されないが、trypsin で活性化される形式のものが混在し、各組織および成長時期におけるこれらの構成比率はそれぞれ異なっていた。また、例外も認められたが、各組織における DNA 量と非活性型コラゲナーゼ量との間に、相関性が認められた。

結 言

結合組織の成分は、細胞、線維および液状基質に大別される。細胞の分化とともに合成される線維成分のコラーゲンは、細胞間マトリックスを構成する主要な高分子で、液状基質である酸性ムコ多糖とともに、張力や弾力に耐える物理的な働きだけではなく、構造蛋白質としての重要な機能をもっている。したがって、正常な成長発育や各種疾患に伴って結合組織の合成や分解には多彩な変化がみられるようになる。

生体内におけるコラーゲンは、ほとんどが線維を形成しており、物理的抵抗性が比較的強く、化学的にもコラーゲンが未変性であるかぎり、一般的な中性蛋白分解酵素によって分解をうけない。したがって、コラーゲン代謝研究の初期においては、コラーゲンの分解経過を直接観察することができず、コラーゲンの量的変動からコラーゲンの分解を予測するにすぎなかった¹⁾。しかし、Gross

et al. (1962)²⁾がオタマジャクシの尾の培養液からコラゲナーゼの存在をはじめて証明して以来、コラゲナーゼの精製法の進歩とともに、コラゲナーゼの生化学的諸性状が明らかにされるにつれて、コラーゲンとコラゲナーゼの関係がしだいに明確にされるようになってきた。さらに、Dresden (1971)³⁾, Nagai (1973)⁴⁾, Kuboki et al. (1973)⁵⁾は、生理的にコラーゲン分解が行われている組織から、コラゲナーゼの作用によって生ずるコラーゲン分解産物を分離し、生体内でのコラゲナーゼの存在や本酵素の生理的な機能を実証した。

一方、生体組織内でのコラゲナーゼの存在形式については、生理的な条件下でコラーゲンを分解する活性型と、コラゲナーゼの前駆体である pro-collagenase⁶⁻¹¹⁾, α_2 -macroglobulin とコラゲナーゼの複合体^{4,7,10,12-18)}, および低分子のコラゲナーゼ抑制因子^{19,20)}とコラゲナーゼの複合体などの非活性型が知られている。一般に、組織 homoge-

A Study of Inactive Collagenase in Bovine Oral Tissue

Byung Sun AHN (Department of Biochemistry, Osaka Dental University) (Director: Prof. T. SAKAKI)

* 大阪市東区京橋 1 丁目 47 (〒540)

Jap. J. oral Biol., 21: 317-326, 1979.

nate から直接活性型コラゲナーゼを観察することはできず^{2,21)}, 組織培養法に頼るしかない。このことは、コラゲナーゼが組織内には微量しか存在しないか、あるいはほとんどが非活性型として存在するためであろうと考えられている。

しかし、生体内におけるコラーゲン代謝において、このような非活性型コラゲナーゼがどのような役割を果たしているのかは、まだ知られていない。そこで、これを解明するには、まず、生体内における非活性型コラゲナーゼの分布と存在形式、および個体の成長と平行する組織反応に伴う動態を知ることが必要であろうと思われる。このような観点から、本実験では、混合歯列期のウシを対象として、その口腔組織の homogenate から非活性型コラゲナーゼを直接抽出し、歯の萌出前後期における非活性型コラゲナーゼの分布を、核酸、コラーゲンおよび非コラーゲン性蛋白質の量と比較することにより、各組織における非活性型コラゲナーゼの動態の検討を試みた。

実験材料および方法

1. 実験動物および材料

屠殺場から得た混合歯列期のウシ、5頭(♀: 2頭, ♂: 3頭)分の下顎骨を実験に用いた。歯髄と歯根膜は、未萌出歯と、未咬合の萌出歯からそれぞれ採取した。歯肉は、前歯部では唇側の、臼歯部では頬舌側の遊離歯肉と附着歯肉を用いた。

各組織は、氷冷生理食塩水で3回洗浄後、適量の蒸留水を加えて冷下、Polytronでhomogenizeし、homogenateの一部は核酸、非コラーゲン性蛋白質およびコラーゲンの定量ならびに乾燥重量の測定に用い、残りは非活性型コラゲナーゼの抽出に供した。

2. 非活性型コラゲナーゼの抽出および活性化

非活性型コラゲナーゼはSteven et al. (1977)²²⁾の方法に準じて抽出し、3M NaSCN^{11,23)}, trypsin¹¹⁾およびその両者による活性化を行った。

a) 抽出

各組織のhomogenateを遠心し、回収した沈渣は0.5M KClを含むpH 7.4の0.1M Tris-HCl緩衝液(5mM CaCl₂を含有)でrehomogenize

し、20,000 ×gで遠心した。上清を分離後、沈渣を再び同一緩衝液でrehomogenizeした。同じ操作を3回繰り返して上清を集め、硫酸塩析し、その20~60%飽和画分を非活性型コラゲナーゼ画分とした。得られた画分は蒸留水に溶解し、蒸留水に対して48時間透析後、凍結乾燥した。なお、以上の操作は、すべて氷冷下で行った。

b) 活性化

NaSCNによる活性化は、乾燥した非活性型コラゲナーゼを5mM CaCl₂と0.2M NaClを含むpH 7.5の0.1M Tris-HCl緩衝液(Tris-NaCl-CaCl₂緩衝液)に溶解し、3M NaSCNを含むTris-NaCl-CaCl₂緩衝液に対して20時間透析した。ついで、Tris-NaCl-CaCl₂緩衝液に対して、FeCl₃で[CN⁻]が検出されなくなるまで透析した。

Trypsinによる活性化は、乾燥した非活性型コラゲナーゼをTris-NaCl-CaCl₂緩衝液に溶解後、溶液1ml当たり30μgのTPCK-trypsin (Worthington)を加え、室温で10分間放置したのち、trypsinの5倍量のsoybean trypsin inhibitor (Sigma)を加え、trypsin作用を停止させた。

NaSCNとtrypsinの両者による活性化は、まず乾燥した非活性型コラゲナーゼを、前記と同一方法で透析したのち、さらに前記と同一の方法でtrypsinを作用させた。

3. コラゲナーゼの活性の測定

コラゲナーゼの活性は、再生コラーゲン線維に抽出した非活性型酵素液、活性化した酵素液をそれぞれ加え、一定時間incubateしたのち、得られた反応生成物の水解によって得られるhydroxyproline量から求めた。

使用したコラーゲンは、Worthingtonから購入したcalf skin soluble collagenをTris-NaCl-CaCl₂緩衝液で0.3%に希釈し、同緩衝液に対してじゅうぶん透析したものである。上記コラーゲン液0.5mlを小遠心管に入れ、37°Cで3時間incubateしてコラーゲンを再生させたのち、上記の酵素液0.9mlと0.2mlのTris-NaCl-CaCl₂緩衝液を加え反応混合液とした。また、対照には酵素液の代わりにTris-NaCl-CaCl₂緩衝液に30μgのtrypsinを加えたもの(a)、およびtrypsin

を含まない Tris-NaCl-CaCl₂ 緩衝液だけを加えたもの(b)の両者を用いた。また、同時にこの緩衝液の代わりに、6%のEDTAを含むTris-NaCl-CaCl₂ 緩衝液を酵素液に加え、EDTAによるコラゲナーゼ活性阻害効果を検討した。

各反応混合液は、37°C で24時間 incubate し、30,000×g, 30分間遠心したのち、その上清に1.5mlの濃HClを加え、封管中で120°C, 20時間加水分解した。水解産物は、ロータリーエバポレーターで減圧乾固してHClを除去したのち、30mlの蒸留水に溶解し、Woessner法(1)(1961)²⁴⁾に準じてhydroxyproline量を測定した。

各組織における非活性型コラゲナーゼの量的比較は、trypsinで活性化したコラゲナーゼの活性値で行った。

4. 核酸の抽出および定量

核酸の抽出は、Schmidt-Thannhauser-Schneiderの方法(1946)²⁵⁾に準じて行い、定量は、Chargaff et al. (1955)²⁶⁾の方法に準じて行った。

すなわち、各組織のhomogenate 1mlを遠心し、その沈渣を冷10% TCA溶液に懸濁させたのち、rehomogenizeした。その沈渣を、冷10% TCA溶液で3回洗浄したのち、ethanol-ether (3:1, V/V)で脱脂した。脱脂した沈渣は、5mlの1N KOHに懸濁させて37°Cで20時間 incubate したのち、さらに1mlの6N HClと過塩素酸を6%になるように加え、その遠心上清をRNA画分とした。

RNAを抽出した残りの沈渣は5mlの6%過塩素酸に懸濁させ、90°C, 15分間加熱後、冷却し、その遠心上清をDNA画分とした。

以上の抽出操作は、それぞれ3回ずつ行った。

核酸の標準には、酵母由来のRNA (type XI, Sigma)と、仔ウシ胸腺由来のDNA (type I, Sigma)を用い、定量は日立分光光度計(124型)で、260nmにおける紫外外部吸光によって測定した。

5. 非コラーゲン性蛋白質の定量

非コラーゲン性蛋白質は、核酸抽出後の残りの沈渣から抽出し、Lowry et al. (1951)²⁷⁾の方法に準じて定量した。

すなわち、核酸を抽出した残りの沈渣を、1.0N NaOHに懸濁させ、90°C, 20分間加熱したのち、その遠心上清を蛋白画分とした。

以上の蛋白質抽出操作は3回繰り返した。蛋白質の標準には、ウシ血清albumin (Sigma)を用いた。

6. 組織乾燥重量の測定

各組織のhomogenate 1mlを凍結乾燥させたのち、室温でその重量を測定した。

7. コラーゲンの定量

乾燥組織の一部は秤量後、6N HClを加え、封管中で120°C, 20時間加水分解した。水解産物はロータリーエバポレーターで減圧乾固してHClを除去したのち、Woessner法(1)²⁴⁾に準じてhydroxyproline量を測定した。

実験結果

1. 核酸量

組織乾燥重量(100mg)当たりのDNA量(μg)は、歯の萌出、未萌出に関係なく、歯髄より歯根膜が高く、歯肉は最も低い値を示した(Table 1)。歯の萌出前後の変化をみると、歯髄でも歯根膜の場合でも未萌出期のほうが含量が高く、萌出に伴って両者とも同じ程度の減少傾向を示した。

Table 1 The amounts of DNA, RNA, uncollagenous protein and collagen in 100 mg of dry tissue

		DNA (μg)	RNA (μg)	Uncollagenous protein(mg)	Collagen (OH-pro. mg)
Gingiva		53.19	171.85	28.79	6.66
Unerupted	Pulp	75.23	161.15	13.91	2.03
	PDM	80.11	169.00	14.08	5.09
Erupted	Pulp	54.29	106.21	13.56	5.63
	PDM	63.94	143.78	15.07	7.30

PDM: abbreviation of periodontal membrane

RNA 量は、歯肉、未萌出期の歯髄と歯根膜とも同程度の含量を示していたが、歯髄と歯根膜の場合には、歯の萌出に伴って減少する傾向がみられ、その傾向は、歯根膜より歯髄で著明であった (Table 1)。また、DNA 量に対する RNA 量の比率は、歯肉で最も高く、未萌出期の歯髄と歯根膜ではともに歯肉の約 $\frac{2}{3}$ の値を示したが、萌出に伴って前者は低下、後者は上昇する傾向を示した。

2. 非コラーゲン性蛋白質量

非コラーゲン性蛋白質量は、歯肉においては組織乾燥重量の約30%を占めていたが、歯髄と歯根膜の場合には、両者とも著しく低下して約15%を占めるにすぎず、しかも、歯の萌出前後で変化を示さなかった (Table 1)。

3. コラーゲン含量

各組織のコラーゲン含量は、組織乾燥重量 (100 mg) 当たりの hydroxyproline 量 (mg) として求め、Table 1 に併記した。未萌出期の歯では、歯髄は歯肉の約 $\frac{1}{3}$ 、歯根膜は歯肉の約 $\frac{3}{4}$ の値を示した。歯の萌出に伴って歯髄および歯根膜のコラーゲン量は著しく増加し、前者では未萌出期の

Fig. 1 Effects of several methods in activation of inactive collagenase from each tissue

G: abbreviation of gingiva

PDM: abbreviation of periodontal membrane

約2.3倍、後者では約1.4倍に増加し、歯根膜では歯肉より高い値を示した。 (Table 1)。

Table 2 Distribution of inactive collagenase compared to various factors in each tissue, and comparison of effects of several methods in activating inactive collagenase from each tissue

			Activity (OH-pro. μg)	Activity (OH-pro. μg)	Activity (OH-pro. μg)	Activity (OH-pro. μg)	Activity (OH-pro. μg)
			Dry tissue (100mg)	DNA (100 μg)	RNA (100 μg)	Uncollagenous protein (10mg)	Collagen (OH-pro. 10mg)
Trypsin	Gingiva		83.11	156.25	48.36	28.69	124.81
		Pulp	119.97	159.47	74.44	86.25	591.86
		PDM	112.79	140.79	66.74	80.11	221.55
	Erupted	Pulp	85.70	157.86	80.67	63.20	152.36
		PDM	151.76	237.66	105.69	100.84	208.08
NaSCN	Gingiva		24.28	45.65	14.13	8.38	36.47
		Pulp	42.24	56.17	26.21	30.37	208.39
		PDM	38.29	47.80	22.66	27.20	75.22
	Erupted	Pulp	30.00	55.25	28.24	22.12	53.33
		PDM	64.73	100.03	45.02	42.95	88.63
NaSCN+ Trypsin	Gingiva		77.57	145.84	45.14	26.78	116.49
		Pulp	104.75	139.25	65.01	75.31	516.77
		PDM	90.05	112.40	53.28	63.96	176.88
	Erupted	Pulp	69.11	127.30	65.07	50.97	122.86
		PDM	131.43	205.54	91.41	87.21	179.97

PDM: abbreviation of periodontal membrane

Fig. 2 Distribution of inactive collagenase in each tissue (Distribution of inactive collagenase was expressed as activity of collagenase activated with trypsin)

UE: abbreviation of unerupted teeth

E: abbreviation of erupted teeth

PDM: abbreviation of periodontal membrane

4. コラゲナーゼ活性の検討

各組織由来の非活性型酵素液を基質 コラーゲンに反応させた場合の反応生成物中には、微量の hydroxyproline が検出された。また、酵素液の代わりに trypsin を加えたり(対照 a),あるいは緩衝液だけを加えたもの(対照 b)でも、非活性型酵素を作用させたととき同様の微量の hydroxyproline が得られ、しかもその値は trypsin で活性化させた酵素液を作用させた場合の約 $1/10$ にすぎなかった (Fig. 1)。したがって、これらの結果は、反応生成物中にみられた hydroxyproline がコラゲナーゼの分解作用によって生成されたも

のではなく、基質コラーゲンの contamination によるものであることを示すとともに、各組織由来の非活性型 コラゲナーゼ画分には活性型コラゲナーゼが含まれていないことを示唆している。

5. 非活性型コラゲナーゼの組織内分布

組織乾燥重量, DNA 量, RNA 量, 非コラーゲン性蛋白質量およびコラーゲン量当たりの各組織における非活性型コラゲナーゼ由来の活性は, trypsin, NaSCN およびその両方で活性化したものについて検討し, 分解生成物中の hydroxyproline 量で示した (Table 2)。3種の活性化操作のうち、非活性型コラゲナーゼは、いずれの組

織においても trypsin によって最大の活性発現を示したので、各組織における非活性型コラゲナーゼ由来の活性比較は、この trypsin 処理群で行った (Table 2, Fig. 2)。

組織乾燥重量当たりの非活性型コラゲナーゼ由来の活性は、未萌出期の歯の歯髄と歯根膜では、ともに歯肉の約1.4倍であったが、萌出後の歯髄では減少してほぼ歯肉と同じ値になり、歯根膜では増加して歯肉の約2倍の値を示した。

DNA 量を基準にした場合には、未萌出期の歯の歯髄、歯根膜および萌出後の歯髄とも活性は歯肉と同じ程度であったが、萌出後の歯根膜では増加して萌出前の約1.7倍であった。

RNA 量を基準にした場合には、未萌出および萌出後の歯髄の活性は、ともに歯肉の約1.5倍で変動を示さなかったが、歯根膜では未萌出期で歯肉の約1.4倍、萌出後では未萌出期の約1.6倍にも増加していた。

非コラーゲン性蛋白質量を基準にした場合の活性をみると、未萌出期の歯の歯髄と歯根膜では、ともに歯肉の約3倍の値を示していたが、萌出後の歯髄では未萌出期より減少を示し、逆に歯根膜では未萌出期の約1.6倍に増加していた。

コラーゲン量を基準にした場合の非活性型コラゲナーゼ由来の活性は、未萌出期の歯の歯髄および歯根膜では歯肉より著しく高く、前者では歯肉の約5倍、後者では約2倍に達していた。これに対し、萌出後の歯髄では萌出前の約 $\frac{1}{4}$ に減少したが、歯根膜では変化がみられなかった。

6. EDTA による活性阻害

活性化させた酵素液とともに EDTA を添加した緩衝液を作用させた場合には、いずれの組織においても対照群と同程度の hydroxyproline 量しか検出されなかった。このことから、非活性型コラゲナーゼ由来の活性は、EDTA によって阻害されることが判明した。

7. 非活性型コラゲナーゼの活性化効果

NaSCN, trypsin およびこの両者による各組織由来の非活性型コラゲナーゼの活性化効果は、Table 2に一括して示した。また、各組織とも trypsin 処理を施した場合に最大活性を発現したので、その活性を100にしたときの NaSCN 処理

Table 3 Comparison of effects of trypsin(100%) with other methods in activating inactive collagenase from each tissue

		Trypsin	NaSCN	NaSCN+Trypsin
Gingiva		100	29.2	93.3
	Pulp	100	35.2	87.3
	PDM	100	34.0	79.8
Erupted	Pulp	100	35.0	80.6
	PDM	100	42.6	86.5

PDM: abbreviation of periodontal membrane

群, NaSCN+trypsin 処理群の活性効果を比較した (Table 3)。その結果、NaSCN で処理したものが最も活性が低く、trypsin の約30~40%にすぎなかった。また、NaSCN+trypsin 処理の場合の活性は、trypsin 単独による場合の約80~90%を示していた。しかし、それぞれの方法による活性化効果には、各組織および歯の萌出前後の時期によって、若干の差がみられた。

考 察

一般にコラーゲンは、未変性であるかぎり中性蛋白分解酵素によって分解されず、コラゲナーゼによってのみ N-末端から $\frac{3}{4}$ と $\frac{1}{4}$ の分子長に特異的に分解されるが^{14,28-31)}、その作用は、EDTA あるいは cystein によって抑制されることが知られている^{32,33)}。本実験においても、trypsin によって分解されなかった再生コラーゲン線維が、各組織由来の活性化酵素によって分解されたことや、この酵素活性が EDTA 添加によって抑制されたことを考え合わせると、基質コラーゲンの分解は、コラゲナーゼの作用によるものと推測できる。

1966年、Nagai et al.¹²⁾によって、血清にはコラゲナーゼに対して強力な抑制作用を示す働きのあることが初めて報告されて以来、コラゲナーゼの存在形式についての関心が高まり、つづいて血清中にはコラゲナーゼ抑制因子が存在し、このものは α_2 -macroglobulin であることが明らかにされた^{7,10,12-17)}。さらに、Bauer et al. (1975)¹⁹⁾は血清未添加の培養液から、McCroskery et al. (1975)²⁰⁾はウサギの癌組織から、それぞれ低分子のコラゲナーゼ抑制因子をみだし、その存在を

確認した。また、コラゲナーゼは前駆体である非活性の procollagenase として存在することも報告されている^{4,6-11)}。

一方、生体中では、このような非活性型コラゲナーゼの代謝機構において、生理的条件下でコラゲナーゼが α_2 -macroglobulin と複合体を形成して非活性となるが、この過程は irreversible で、この活性化は観察されておらず、ただ procollagenase の活性化因子の存在が確認されているにすぎない^{4,7,11)}。したがって、最近では生体中でのコラゲナーゼ活性の調節は、procollagenase が活性化されることと⁹⁾、活性型コラゲナーゼが血清中の α_2 -macroglobulin と複合体を形成して活性を失うことによって^{4,7)}行われるのであろうと考えられている¹¹⁾。

一方、in vitro においては、コラゲナーゼと α_2 -macroglobulin の複合体は 3 M NaSCN あるいは高濃度の trypsin で活性化されるが、低分子の抑制因子とコラゲナーゼとの複合体や procollagenase は、NaSCN では活性化されず、trypsin で活性化されることが示されている¹¹⁾。さらに、Birkedal-Hansen et al. (1975)¹¹⁾は、コラゲナーゼと α_2 -macroglobulin の複合体の活性化について検討し、trypsin では全体の約60%を、NaSCN + trypsin でも同じく約60%を活性化させるだけであったが、3 M NaSCN に透析するだけでは活性化はさらに低く、わずか30%にすぎないと報告している。

本実験でも、NaSCN と trypsin を用いて活性化を試み、その効果を比較した結果、NaSCN による場合は trypsin による効果の約30~40%であり、NaSCN + trypsin で活性化させた場合は trypsin の約80~90%を示していた。また、各種の活性化法による効果は、各組織や歯の萌出前後の時期によって、それぞれ多少の変動を伴っていた。このような結果は、本実験に用いた各組織中の非活性型コラゲナーゼには、コラゲナーゼが α_2 -macroglobulin と複合体を形成している形式のものと、NaSCN では活性化されないが、trypsin で活性化される低分子の抑制因子結合型のコラゲナーゼあるいは procollagenase の両者か、あるいはそのいずれかが存在し、しかもこれらの非活

性型コラゲナーゼの構成比率が、各組織や各組織の成長時期によって異なっていることを示唆している。

各組織における非活性型コラゲナーゼの量的分布と、これを算出するための基準として用いた組織乾燥重量、RNA 量、非コラーゲン性蛋白質量およびコラーゲン量との関連性については、Fig. 2 に示すように、いずれの場合においても一定した関連性は認められなかった。しかし、DNA 量を基準にした場合には、歯肉、未萌出期の歯の歯髄、歯根膜および萌出後の歯髄で同じ分布を示し、各組織の cellularity と非活性型コラゲナーゼの量的分布との間には相関性のあることが認められた。しかし、萌出後の歯の歯根膜の場合には、これらの約1.7倍の値を示した。

Rippin (1978)³⁴⁾は、歯根膜のコラーゲンの turnover rate が、コラーゲンを含む組織のなかで最も速く、歯根膜のなかでも成長期のものがさらに速いと報告している。また、この turnover rate が速いことは、生理的な歯の移動と下顎関節頭の発育に適応するための歯の移動および歯の萌出などに起因するものであろうと説明している。この所見と、本実験において、歯根膜での非活性型コラゲナーゼ由来の活性が他の歯肉あるいは歯髄より高かったこと、歯の萌出前後の歯髄では活性に変化がないか、あるいは減少したのに対し、歯根膜では増加したことを考え合わせると、生体中でのコラーゲンの turnover rate と非活性型コラゲナーゼの量的分布との間には相関性のある可能性が考えられる。したがって、DNA 量を基準にして非活性型コラゲナーゼの活性発現を比較した場合に、萌出後の歯の歯根膜で示された高い活性は歯の萌出に起因したものと考えられる。

以上、本実験においては、歯肉および歯の萌出前後の歯髄と歯根膜における非活性型コラゲナーゼの量的分布およびこれらの量的変動に関して検討したが、これらの組織由来の非活性型コラゲナーゼは、単一型のものではなく、これらの組織にはコラゲナーゼが α_2 -macroglobulin と複合体を形成するもの、およびコラゲナーゼが低分子の抑制因子と複合体の形式をとるもの、あるいは前駆体である procollagenase の形式をとるもの

の両者か、あるいはそのいずれかが存在した。今後、これらの非活性型 コラゲナーゼと活性型コラゲナーゼの量的分布や量的変動について対比しながら検討すると同時に、組織環境との関連性を追求することによって、生体中でのコラゲナーゼ活性の調節機構は徐々に明確にされるであろう。

結 論

混合歯列期のウシの歯肉、萌出前後期の歯の歯髄および歯根膜から非活性型 コラゲナーゼを抽出し、NaSCN, trypsin およびその両者で活性化させたのち、各種組織における本酵素活性の量的分布と存在形式について検討し、次の所見を得た。

1. 混合歯列期のウシの 歯肉や萌出前後期の歯の歯髄および歯根膜に存在する 非活性型コラゲナーゼには、 α_2 -macroglobulin とコラゲナーゼとの複合体としての形式をとるものと、NaSCN では活性化されないが、trypsin で活性化される形式のものとが混在していた。

2. 各組織における非活性型 コラゲナーゼの存在形式からみた構成比率は、組織によって異なっ

ていた。

3. 各組織における非活性型 コラゲナーゼの量的分布と組織乾燥重量、RNA 量、非コラーゲン性蛋白質量およびコラーゲン量との間には、それぞれ一定の関連性は認められなかった。

4. 歯肉、歯髄および未萌出期の歯根膜では、DNA 量と非活性型 コラゲナーゼの量との間に、相関性が認められた。しかし、萌出後の歯の歯根膜では相関性は認められなかった。

5. 歯の萌出に伴って歯髄の非活性型 コラゲナーゼ量はほとんど変動を示さないか、あるいは減少していたのに、歯根膜では増加を示していた。

これらの所見は、組織コラゲナーゼの代謝に一つの指針を与えるもので、歯周疾患などの病態解明に基礎的資料となるであろう。

稿を終るにあたり、ご指導とご校閲を賜った榊鉄也教授ならびに城西歯科大学学長・多和敏一先生に深甚の謝意を表します。また、ご援助いただいた本多忠敬講師をはじめ教室員各位に深謝いたします。

Summary: A study was made of the distribution and type of inactive collagenase in the bovine gingiva, pulp and periodontal membrane of teeth in the stage of mixed dentition. Inactive collagenase was directly extracted with KCl from tissue, activated with NaSCN, trypsin and both of them, and from the activity of activated collagenase the content of inactive collagenase was calculated.

The results obtained were as follows:

1. There were two types of inactive collagenase in the bovine gingiva, the pulp and periodontal membrane of unerupted and erupted teeth. One was a complex of collagenase and α_2 -macroglobulin, and the other was activated by trypsin but not by NaSCN.

2. Distribution of the two types of inactive collagenase in tissue was individually different.

3. No relationship was found between the distribution of inactive collagenase and dry tissue weight, the content of RNA, uncollagenous protein and collagen in each tissue.

4. A relationship was found between the distribution of inactive collagenase and the content of DNA in the bovine gingiva, the pulp of unerupted and erupted teeth and the periodontal membrane of unerupted teeth, but not in the periodontal membrane of erupted teeth.

5. In tooth eruption, the pulp showed no difference or decrease in the content of inactive collagenase, while the periodontal membrane was increased.

文 献

1) GERSH, I. and CATCHPOLE, H. R.: The

organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. *Amer. J. Anat.*, 85 : 457-519, 1949.

- 2) GROSS, J. and LAPIERE, C. M. : Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proc. US Nat. Acad. Sci.*, **48** : 1014-1022, 1962.
- 3) DRESDEN, M. H. : Evidence for the role of collagenase in collagen metabolism. *Nature (London)*, *New Biol.*, **231** : 55-57, 1971.
- 4) NAGAI, Y. : Vertebrate collagenase: Further characterization and the significance of its latent form in vivo. *Mol. Cell. Biochem.*, **1** : 137-145, 1973.
- 5) KUBOKI, Y., SHIMOKAWA, H., ONO, T. and SASAKI, S. : Detection of collagen degradation products in bone. *Calcif. Tissue Res.*, **12** : 303-312, 1973.
- 6) HARRIS, E. D., JR., DIBONA, D. R. and KRANE, S. M. : Collagenases in human synovial fluid. *J. Clin. Invest.*, **48** : 2104-2113, 1969.
- 7) EISEN, A. Z., BAUER, E. A. and JEFFREY, J. J. : Human skin collagenase: The role of serum alpha-globulins in the control of activity in vivo and in vitro. *Proc. US Nat. Acad. Sci.*, **68** : 248-251, 1971.
- 8) HARPER, E., BLOCH, K. J. and GROSS, J. : The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry*, **10** : 3035-3041, 1971.
- 9) HARPER, E. and GROSS, J. : Collagenase, procollagenase and activator relationships in tadpole tissue cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48** : 1147-1152, 1972.
- 10) SAKAMOTO, S., GOLDBERGER, P. and GLIMCHER, M. J. : Maintenance of mouse bone collagenase activity in the presence of serum protein by addition of trypsin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139** : 1038-1041, 1972.
- 11) BIRKEDAL-HANSEN, H., COBB, C. M., TAYLOR, R. E. and FULLMER, H. M. : Activation of latent bovine gingival collagenase. *Arch. Oral Biol.*, **20** : 681-685, 1975.
- 12) NAGAI, Y., LAPIERE, C. M. and GROSS, J. : Tadpole collagenase: Preparation and purification. *Biochemistry*, **5** : 3123-3130, 1966.
- 13) EISEN, A. Z., JEFFREY, J. J. and GROSS, J. : Human skin collagenase: Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, **151** : 637-645, 1968.
- 14) EVANSON, J. M., JEFFREY, J. J. and KRANE, S. M. : Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture. *J. Clin. Invest.*, **47** : 2639-2651, 1968.
- 15) SAKAMOTO, S., GOLDBERGER, P. and GLIMCHER, M. J. : Further studies on the nature of the components in serum which inhibit mouse bone collagenase. *Calcif. Tissue Res.*, **10** : 280-288, 1972.
- 16) ABE, S. and NAGAI, Y. : Interaction between tadpole collagenase and human α_2 -macroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **278** : 125-132, 1972.
- 17) BERMAN, M. B., BARBER, J. C., TALAMO, R. C. and LANGLEY, C. E. : Corneal ulceration and the serum antiproteases: I. α_1 -Antitrypsin. *Invest. Ophthalmol.*, **12** : 759-770, 1973.
- 18) WOOLLEY, D. E., ROBERTS, D. R. and EVANSON, J. M. : Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66** : 747-754, 1975.
- 19) BAUER, E. A., STRICKLIN, G. P., JEFFREY, J. J. and EISEN, A. Z. : Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64** : 232-240, 1975.
- 20) McCROSKERY, P. A., RICHARDS, J. F. and HARRIS, E. D., JR. : Purification and characterization of a collagenase extracted from rabbit tumours. *Biochem. J.*, **152** : 131-142, 1975.
- 21) NAGAI, Y. and HORI, H. : Vertebrate collagenase: Direct extraction from animal skin and human synovial membrane. *J. Biochem.*, **72** : 1147-1153, 1972.
- 22) STEVEN, F. S. and ITZHAKI, S. : Evidence for a latent form of collagenase extracted from rabbit tumour cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **496** : 241-246, 1977.
- 23) ABE, S. and NAGAI, Y. : Evidence for the presence of a complex of collagenase with α_2 -macroglobulin in human rheumatoid synovial fluid: A possible regulatory mechanism of collagenase activity in vivo. *J. Biochem.*, **73** : 897-900, 1973.
- 24) WOESSNER, J. F., JR. : The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93** : 440-447, 1961.
- 25) SCHNEIDER, W. C. : Phosphorus compounds in animal tissues: III. A comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, **164** : 747-751, 1946.
- 26) CHARGAFF, E. and DAVIDSON, N. J. : The nucleic acids. 1. *Academic Press*, New York, 1955.
- 27) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275, 1951.

- 28) GROSS, J. and NAGAI, Y. : Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. US Nat. Acad. Sci.*, **54** : 1197-1204, 1965.
- 29) KANG, A. H., NAGAI, Y., PIEZ, K. A. and GROSS, J. : Studies on the structure of collagen utilizing a collagenolytic enzyme from tadpole. *Biochemistry*, **5** : 509-515, 1966.
- 30) SAKAI, T. and GROSS, J. : Some properties of the products of reaction of tadpole collagenase with collagen. *Biochemistry*, **6** : 518-528, 1967.
- 31) JEFFREY, J. J. and GROSS, J. : Collagenase from rat uterus: Isolation and partial characterization. *Biochemistry*, **9** : 268-273, 1970.
- 32) DONOFF, R. B., McLENNAN, J. E. and GRILLO, H. C. : Preparation and properties of collagenases from epithelium and mesenchyme of healing mammalian wounds. *Biochim. Biophys. Acta*, **227** : 639-653, 1971.
- 33) BIRKEDAL- HANSEN, H., COBB, C. M., TAYLOR, R. E. and FULLMER, H. M. : Procollagenase from bovine gingiva. *Biochim. Biophys. Acta*, **429** : 229-238, 1976.
- 34) RIPPIN, J. W. : Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces : II. Adult rat molars. *J. Periodontal Res.*, **13** : 149-154, 1978.