各種結合組織のコラーゲンの研究

第2報 化学的諸性質の比較

久保木 芳徳

東京医科歯科大学歯学部生化学教室（指導 佐々木哲教授）

（昭和43年1月16日受付）

Collagen from Various Bovine Connective Tissues

II. Comparison of Chemical Properties

Yoshinori Kuboki

Department of Biochemistry (Director: Professor Satoshi Sasaki)

School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

I. 緒言

第1報¹⁾において、同一動物のコラーゲンでも、各組織のものにはそれぞれ形態的な特徴があり、コラーゲン線維の直径ならびにその分布状態をことにしていることが示された。しかし、それらの形態的特徴とその組織のコラーゲンの化学的性質との関連、あるいはまた、各組織コラーゲンの組成や化学的性質には実際どのような差があるのかについては現在のところ十分な解明がなされていない。本論文ではこれらの点を検討するために、各組織コラーゲンの化学的諸性質、すなわちアミノ酸組成とその他の微量成分、および溶解性の測定を行ない、各組織間で比較分析することにした。

従来、コラーゲンの化学的組成の比較研究は主として各種のことなつた動物間の比較に重点がおかれ、下等動物と高等動物の不溶性コラーゲンとではそのアミノ酸組成に多少の差があることが知られている。しかるに同一動物のコラーゲンの組織による差に関しては研究が進んでいず、ことに哺乳類については一部の報告^{2,3)}があるのみで、しかも各々抽出方法などをことにしているため、はつきりした結論を与えるに至っていない。

そこで著者らは、まず従来のコラーゲンの抽出方法に再検討を加え、ウシの各種結合組織から可溶性コラーゲンと不溶性コラーゲンとを収量よく抽出する方法を確立し⁴⁾、この同一の方法によって得たウシのアキレス腱、歯根膜、真皮、大腿骨のコラーゲンを比較研究の材料として用いることにした。

II. 研究方法

1. コラーゲンの抽出方法(図1)⁴⁾

屠殺直後の成牛の新鮮な各種組織、すなわち、真皮、アキレス腱、大腿骨および歯根膜をドライアイスで凍結し、切出しナイフでできるだけこまかく削り細切片を得る。ただし大腿骨は、その骨幹部を輪切にし骨髄を除いておく。これらの組織を鉄乳鉢内で、液体窒素に浸しガラス状になるまで凍結させてから粉碎し、同時に凍結融解の操作もくりかえしつつ粉末状の組織を得る。

組織粉末を最初、組織の10倍量の蒸留水で5回、ついで5倍量の0.2N第2磷酸ナトリウム溶液で5回洗い、その都度5°Cで、10,000 R.P.M., 30分間遠心し、残渣と洗液とに分離する。これらの洗液には組織に含まれている血清由来の蛋白質が抽出されてくるが、これらのものは第2磷酸

わち6時間水解し、グルコースを標準として測定した。ヘキソサミンの定量は Belcher ら⁸⁾の方法にしたがつて、不溶性コラーゲンを4 N 塩酸中で開管内、6時間水解しグルコサミンを標準として測定した。

3. 窒素および水分の測定

窒素の測定は Van Slyke ら⁹⁾の条件によるマイクロケルダール法を用いたが、その酸化条件は、川西、工藤、岩井ら¹⁰⁾にしたがい、融剤である硫酸カリの量を0.1 g にして行なつた。

試料中の水分の測定には Abderhalden の装置を用い、試料を真空下で110°C に1時間保つた後、減圧のまま室温にもどし恒量に至つた秤量値から水分量を求めた。

4. 燐の定量

不溶性コラーゲン中の燐含有量の定量は、20～30 mg の試料を Allen¹⁸⁾の方法にしたがい湿式灰化し、中村の方法¹⁹⁾で測定した。

5. ゼラチン化およびトリクロル酢酸処理

ゼラチン化の処理は100 mg の不溶性コラーゲンを冷却管のついた25 ml 試験管中で、10 ml の蒸留水と共に100°C で一定時間加熱して行なつた。反応終了後室温にもどし、12,000 R.P.M. で1時間遠心し上清と残渣に分ける。残渣は蒸留水で2回洗い遠心し、可溶性蛋白質を除き、真空デシケーター中で乾固し恒量に至つてから秤量した。

トリクロル酢酸 (TCA) 処理は Fitch ら²⁰⁾の方法を参考にし、100 mg の不溶性コラーゲンを10% TCA 溶液中で、90°C、10分間加熱して行ない、反応後は15°C まで急冷し、ゼラチンの場合と同様に遠心、水洗した後、残渣を乾燥し秤量した。

III. 結 果

1. 液体窒素を使用した抽出法と従来の抽出法との比較

各種の軟組織、すなわちアキレス腱、歯根膜、真皮を液体窒素によつてガラス状に硬化して粉碎した場合と、従来のようにドライアイスで硬化して細切した場合とを、組織から抽出され得る酸可

図2 歯根膜0.1 N HCl 抽出液の Biuret 反応

溶性コラーゲンの量によって比較した。図2は歯根膜についての結果であるが、横軸に0.1 N 塩酸での抽出(毎回250 ml)の回数と縦軸には抽出液の Biuret 反応の吸光度をとつてみると、液体窒素法のドライアイス法よりも抽出量が多いことがわかる。第1回抽出では1.6倍、その後の抽出回数でも多いが、5回の抽出を行なつた後の残渣をふたたび液体窒素で処理し抽出するとさらに酸可溶性コラーゲンが出てくることがわかる。コ

図3 アキレス腱0.1 N HCl 抽出液中の Hypro 量

図 4 真皮の 0.1 N HCl 抽出液中の Hypro 量

図 5 液体室素法，ドライアイス法での Hypro 抽出量の比較，各組織 25 gr (湿性) より 0.1 N HCl に対する抽出量

ラーゲンに特有なアミノ酸であるハイドロキシプロリン量を縦軸にとった場合も同様な結果が得られる。このような抽出量の増加はアキレス腱の場合にも認められる (図 3)。しかし真皮においては図 4 のように抽出量の増加を示さない。図 5 は

表 1 ウシ各組織の不溶性コラーゲンのアミノ酸組成 (Residue g/100 g protein)

	真 皮	大 腿 骨	歯 根 膜	アキレス腱	平均値(M)	標準偏差(ρ)	ρ/M×100
Hypro	16.66	11.37	15.00	11.10	13.53	2.71	20.0
Asp	10.09	5.49	9.54	6.22	7.84	2.22	28.4
Thr	1.52	1.73	1.61	1.91	1.69	0.19	11.2
Ser	2.51	2.71	2.51	3.02	2.69	0.20	7.4
Glu	9.08	10.06	9.12	10.59	9.71	0.32	3.3
Pro	10.10	12.15	10.51	12.21	11.26	1.15	10.2
Gly	15.84	18.57	15.22	13.32	15.73	2.31	14.7
Ala	6.94	7.64	7.16	8.05	7.45	0.58	7.8
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0			
Val	2.26	1.99	2.73	2.50	2.37	0.33	13.9
Met	0.21	0.31	0.44	0.55	0.38	0.15	39.4
Ileu	1.38	1.41	1.56	1.66	1.50	0.14	9.3
Leu	2.79	3.16	3.27	3.51	3.18	0.36	11.3
Tyr	0.56	0.57	1.19	0.72	0.76	0.30	39.5
Phe	1.99	1.79	2.33	2.20	2.08	0.24	11.5
Hylys	1.07	1.09	0.81	1.81	1.20	0.43	35.8
Lys	2.61	3.43	3.13	2.90	3.02	0.22	7.3
His	0.69	0.92	0.85	0.70	0.79	0.11	13.9
NH ₃	5.56	7.87	6.63	9.36	7.36	1.55	21.0
Arg	6.53	7.67	6.67	7.94	7.20	0.61	8.5

表 2 ウシ各組織の再生コラーゲンのアミノ酸組成 (Residue g/100 g protein)

	真 皮	大 腿 骨	歯 根 膜	アキレス腱	平均値(M)	標準偏差(σ)	$\sigma/M \times 100$
Hypro	10.36	12.79	11.61	9.26	11.00	1.63	14.8
Asp	5.88	5.70	5.84	6.53	5.99	0.36	6.0
Thr	1.69	1.87	1.90	2.12	1.90	0.17	8.9
Ser	3.06	2.83	2.98	3.12	2.99	0.05	1.7
Glu	9.72	11.23	9.82	9.86	10.16	0.73	7.2
Pro	11.90	13.04	12.00	10.95	11.97	1.00	8.4
Gly	19.31	20.78	17.88	17.05	18.76	1.52	8.1
Ala	6.86	6.18	7.51	7.51	7.02	0.66	9.4
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0			
Val	1.97	2.11	2.23	2.56	2.22	0.23	10.4
Met	0.0	0.19	trace	0.63	0.21	0.29	138
Ileu	1.49	1.49	1.51	1.79	1.57	0.13	8.3
Leu	3.50	3.46	3.32	3.72	3.50	0.16	4.6
Tyr	0.59	0.57	0.70	0.84	0.65	0.25	38.4
Phe	2.09	2.30	1.97	2.33	2.17	0.23	10.6
Hylys	0.83	0.69	1.05	0.89	0.87	0.14	16.1
Lys	3.72	4.81	3.66	3.60	3.95	0.63	16.0
His	0.84	0.65	0.74	0.84	0.77	0.07	9.1
NH ₃	9.17	0.70	7.63	9.02	6.63	4.04	61.0
Arg	7.18	8.80	7.65	7.26	7.72	0.78	10.1

図 6 ウシ各種組織の不溶性コラーゲンのアミノ酸組成

図 7 ウシ各種組織の再生コラーゲンのアミノ酸組成

全体として5回の0.1塩酸抽出によって得られる抽出液中のヒドロキシプロリン量を比較した結果である。これから明かなように、歯根膜、アキレス腱などのような、普通の処理方法では微細な小片になりにくい組織では、液体窒素処理によって約1.5~1.7倍、可溶性分画が増加し、一方真皮など比較的やわらかい組織では大差がないことが示された。

2. アミノ酸組成

各組織コラーゲンのアミノ酸組成の分析結果を100gの蛋白質あたりの各アミノ酸残基のg数で表現すると、表1および表2のごとくなる。さらにこの結果を比較しやすいように図6、および図7のようなヒストグラムに表わした。このグラフは横軸にカラムからの流出順にアミノ酸を配列し、縦軸に100gの蛋白質に対するアミノ酸残基のg数をとったものである。このような表現方法によって、アミノ酸組成を全体としてのパ

ターンで比較することが出来、また個々のアミノ酸の組織差を明瞭にすることが出来る。不溶性コラーゲンの各組織間の比較(図6)からは次の諸点が指摘され得る。すなわち全体のパターンとしてはどの組織のものでもかなり似ていることがわかるが、ヒドロキシプロリン、アスパラギン酸、グリシン等がかなり組織によつて異なっていることが認められる。この事は四組織間の値の平均値(M)と標準偏差(σ)を求め、その比をとつてみた場合にも明瞭であり(表1)、いずれも $\sigma/M \times 100$ の値は約15以上である。 $\sigma/M \times 100$ の値をみた場合にはメチオニン、チロジン、ヒドロキシリジンがいずれも35以上で、図6においては値が小さいため明瞭でないが、組織間の偏差が非常に大きいことがわかる。

これに対し図7および表2は再生線維どうしを比較した結果であるが、前記の偏差の大きいアミノ酸もメチオニンを除けば、いずれも不溶性コラーゲンに比較して $\sigma/M \times 100$ の値が小さいことが認められる。全アミノ酸を通じて比較しても、再生線維の方が不溶性コラーゲンよりも組織間偏差の大なるアミノ酸は、アラニン、メチオニン、グルタミン酸、リジンおよびアルギニンの5種にすぎないことがわかつた。

3. 窒素ならびにその他の微量成分の比較

アミノ酸組成に組織間の偏差の大きい不溶性コラーゲンについてさらにその組成の差を調べるため、各組織の不溶性コラーゲン中の燐、ヘキソース、ヘキソサミン、ケルダール窒素量および水分の含有量を測定して比較した結果が表3である。

燐は最近コラーゲン中に微量ではあるが混在物

表3 各組織不溶性コラーゲン中の燐、糖、窒素および水分の量(%)

成分 組織	燐	Hexose (glucose として)	Hexosamine (glucosamine として)	窒素	水分
歯根膜	0.021	0.64	0.323	17.7	12.9
アキレス腱	0.035	0.60	0.667	17.6	12.1
真皮	0.015	0.39	0.162	18.2	13.8
大腿骨	0.017	0.42	0.134	18.5	10.0

としてではなく存在することが示されているが¹¹⁾、今回測定した燐の含有量はアキレス腱のコラーゲンに多いが、他の各組織間では大差は認められない。大腿骨のコラーゲンも真皮、歯根膜のものにくらべて大差がなく、この点から骨ミネラルの脱灰は十分完了していることがうかがわれる。

グルコースに換算したヘキソースの値は、四組織の間で0.39~0.64%にとどまっているが、真皮と大腿骨では約0.4%であるのに対し歯根膜とアキレス腱とは約0.6%を示し1.5倍含有量が多い。ヘキソサミン含有量も、真皮と大腿骨の不溶性コラーゲンは約0.15%であるのに対し、歯根膜とアキレス腱の場合にはその倍以上の値を示し、とくにアキレス腱のものは多く、前二者の約4倍に達している。

水分の含有量は骨のコラーゲンにやや少ない他はほぼ一定とみなし得る。ケルダール窒素の値は、この水分を補正した値であるが、この値はアミノ酸自動分析の結果から算出した窒素含有量とよく一致した。

4. ゼラチン化による純度の検討

以上の結果から著者らの方法で抽出した不溶性コラーゲンは、組織によつてアミノ酸組成にかなりの偏差があり、また糖、燐酸などの微量成分の含有量にも違いがあることが示された。しかしこれらの差異が、各組織コラーゲンの本来の差によるものか、あるいは少量の混在物、たとえばエラスチンなどの不溶性蛋白質に由来するものかの疑問が残されている。この点を明らかにするために次のような実験を行なうことにした。すなわち、ゼラチン化法は、一般に、コラーゲンと他の不溶性蛋白質とを分離する手段として認められているが³⁾、この方法により今回抽出した不溶性コラーゲンを可溶化し、時間を追つてその溶解量を測定する。その結果最終的に不溶分画が残つたならば、その分画の組成を調べコラーゲンであるかの検討を行なうことにより、不純物の量を推定することが出来る。この結果を図8および表4にまとめた。

図8は、縦軸に各組織の不溶性コラーゲンの

図 8 各組織の不溶性コラーゲンのゼラチン化

表 4 ゼラチン化残渣の Hypro 含有量(%)

	アキレス腱	真 皮	歯根膜	大腿骨
1.5 時間残渣	10.0	11.6	10.0	11.6
12 時間残渣	3.74	3.20	7.92	7.8
エラスチン含有量(%) (計算値)	4.1	8.9	6.0	0.36

100°C の水に対する溶解率を百分率で示し、横軸には処理時間を示したものである。まず骨の場合をみると、6 時間位までに 93 % が溶け、12 時間には 98.5 % が溶解している。また、12 時間後の残渣のヒドロキシプロリン含有量は 7.8 % であり、コラーゲンのそれよりもかなり低い値であることがわかる。その他の組織の不溶性コラーゲンは、その溶解率の曲線からもわかるように骨のものより溶けにくく、12 時間後の溶解率はアキレス腱が 94 %、真皮が 88 %、歯根膜が 74 % となっている。また、12 時間後の残渣のヒドロキシプロリン含有量は、アキレス腱が 3.74 %、真皮が 3.20 %、歯根膜が 7.92 % となり、骨の場合を考え合せてみて、かならずしも一定の値でないことがわかる。

このようなゼラチン化を行なった後もなお、不溶分画として残り得る成分としてはコラーゲン以外にエラスチンとケラチンが挙げられよう。しかしケラチンは、今回抽出した不溶性コラーゲン中

にシステインが含まれていない点から一応度外視される。そこで残渣がエラスチンとコラーゲンの混合物であると仮定し、また、コラーゲン中のヒドロキシプロリンの含有量を 10 %、エラスチンのヒドロキシプロリン含有量を従来の文献値¹³⁾から 1 % と仮定して、各組織の不溶性コラーゲン中のエラスチン混在量を推定してみた。その結果は表 4 下段のようになり、エラスチンの混在量は最も多い真皮の場合でも約 9 % をこえず、骨の場合は 0.36 % できわめて少ない。したがってエラスチンの混在によるヒドロキシプロリン含有量の変動は 1 % をこえないことになる。

5. トリクロル酢酸 (TCA) 処理による純度の検討

TCA 処理はゼラチン化とならんでコラーゲン分画を溶解させる手段として広く用いられているが、この方法による各組織の不溶性コラーゲンの溶解率をさきのゼラチン化によるものと比較したのが表 6 である。TCA 処理による溶解率は、ゼラチン化によるものと比較し、骨の場合にやや低い値を示すが、他の組織ではいずれも非常に近い値を示している。

表 6 各組織不溶性コラーゲンのゼラチン化ならびに TCA 処理による溶解性 (溶解率%)

組織	処理 ゼラチン化 (12 hrs.)	TCA 処理
歯 根 膜	74.0	76.6
真 皮	88.2	88.6
アキレス腱	94.1	88.3
大 腿 骨	98.5	88.5

IV. 考 察

1. 抽出方法について

本実験に用いた液体窒素による組織前処理法の利点は、第 1 に従来のドライアイスなどによる凍結処理よりも、組織を一段と細かく粉碎できる点にあり、この結果、後に行なう各種溶媒での抽出において可溶性分画と不溶性分画との分離が容易

になることが挙げられる。第2には、凍結融解により組織破壊の効果が挙げられる。この作用は単に組織片を微細にするにとどまらず、不溶性コラーゲンの可溶化の効果が一部にはあるという¹⁴⁾。しかし同じように凍結融解を行なっているドライアイス処理法と比較して、図5にみられるように明らかな差があるため、液体窒素処理法での可溶性コラーゲンの収量増加は単なる凍結融解の効果のみで生じたとは考え難い。むしろ機械的な破碎の効果が強く組織の微細化が進んだため、組織内部への溶媒の浸透と可溶成分の溶出がより効果的になされた結果であると推測せられる。5回の0.1 N 塩酸抽出の後、ふたたび液体窒素処理をして抽出すると、さらに可溶性コラーゲンが出てくる(図2)ことは、組織の微細化の効果をよく示している。

このように抽出材料の物理的性状の差によつて可溶性コラーゲンの収量に差を生じることは、可溶性ならびに不溶性コラーゲンの定義にも関連し、定量的な抽出、たとえば各組織の可溶性コラーゲンの量を問題にする場合などには、重要な着眼点の一つであることがわかる。表5は、ドライアイス細切法、液体窒素法で抽出を行なつた際の

表5 各種組織中のコラーゲン量

組織	分画	新鮮組織中の含有量(%)		酸可溶性/不溶性(%)	
		不溶性	酸可溶性	ドライアイスで細切	液体窒素で粉砕
歯根膜		10.0	0.147	1.5	2.2
真皮		13.2	0.204	1.5	1.4
アキレス腱		28.2	0.056	0.19	0.39
大腿骨		18.5	0.77	—	4.2

各組織中の酸可溶性コラーゲンおよび不溶性コラーゲンの量を示したものであるが、歯根膜や、アキレス腱は、処理方法により両分画の比がことなっている²⁴⁾。

2. アミノ酸組成について

各組織コラーゲンのアミノ酸組成を全体のパターンとして比較してみると、図6および図7からわかるように、不溶性コラーゲンの場合の方が、可

溶性コラーゲン(再生線維)の場合よりも組織間の偏差が大きい。また個々のアミノ酸を比較した場合にも表1および表2のごとくアラニン、グルタミン酸、メチオニン、リジンおよびアルギニン以外はいずれも不溶性コラーゲンの方が組織間偏差が大であることがわかる。コラーゲンの特徴的なアミノ酸であるヒドロキシプロリンでは、各組織間の標準偏差(σ)は可溶性コラーゲンの1.6(g 残基/100 g 蛋白質)に対しコラーゲンは2.7(g 残基/100 g 蛋白質)で、かなり大きい。このような点からは、不溶性コラーゲンの方が組織間の変動が大きいとみなされるが、この値も、Snedecor のF表によつて有意差検定を行なつた結果ではむしろ同一母集団に属するとみなされる(分散比: $F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} = 2.76$, $P > 0.05$)。したがつて、組織間のアミノ酸組成の変動は不溶性、可溶性コラーゲンともいずれにしても大きなものではないが、全体のパターンとして相対的にみた場合、不溶性コラーゲンの方が可溶性コラーゲンよりも大であるということが出来よう。

個々のアミノ酸組成に着目した場合、表1および表2において顕著なことは、アキレス腱の不溶性コラーゲンのヒドロキシリジン含有量が、他の組織のものより約2倍多い点であろう。現在までに同一動物種の各組織コラーゲンのアミノ酸組成を調べた報告には、Piez ら²⁾、Eastoe³⁾ および Pine ら¹⁵⁾の報告があげられる。そのうち Piez らはウシの皮膚、腱、象牙質および骨の不溶性コラーゲンのアミノ酸組成を比較した結果、ヒドロキシリジンが組織によつてことなり、腱、象牙質では多い(各11.1, 13.5 残基/1000 残基)のに対し、骨や皮膚のものは少ない(5.4, 6.8 残基/1000 残基)と指摘している。この点に関しては今回の不溶性コラーゲンの分析結果とよく似ている。しかるに、今回の可溶性コラーゲンのヒドロキシリジン含有量は、どの組織のものでも大差はなく、アキレス腱にとくに多いとはいえない。この点に関し、従来の文献にはアキレス腱の可溶性コラーゲンのアミノ酸組成をあつかつたものはみあたらない。Eastoe は酸抽出したヒトの

アキレス腱と称してアミノ酸分析し、同じくヒトの骨のものよりもヒドロキシリジン含有量が高いことをみている³⁾が、このアキレス腱のサンプルは不溶性コラーゲンを0.1N塩酸中、100°Cで加熱し可溶化させたもので実質的には不溶性コラーゲンとみなし得るものである。Pineら¹⁵⁾はヒドロキシリジンの分析を行なっていない。

その意義は現在のところ明らかでないが、アキレス腱の不溶性コラーゲンのヒドロキシリジン含有量が他組織よりも顕著に多いこと、かつ、そのようなアキレス腱のアミノ酸組成の特徴も可溶性コラーゲンにはみとめられない事は、コラーゲンの組織差というものがあるが可溶性コラーゲンよりも不溶性コラーゲンにおいてあらわれる事を示唆していると考えられる。

3. 不純物の影響ならびに溶解性について

12時間のゼラチン化を行なった後の残渣もかなりの量のヒドロキシプロリンを含んでいる(表4)。このものが、一応エラスチンとコラーゲンとの混合物であると仮定してエラスチンの含有量を推定したが、コラーゲン分子が均一なものではなく、ヒドロキシプロリン含有量の少ないコラーゲンが残ったという可能性もあり、上記の仮定が必ずしも妥当な仮定であるという保証はない。しかしこの仮定を一応認めるとして推定した場合には、エラスチン量は最大限、真皮の場合の8.9%で、ヒドロキシプロリンの含有量に1%以上の変動はもたらさぬことになるが、実際のデータにはそれ以上の変動がある。また、エラスチンは、組成をみるとグリシン、プロリンなどコラーゲンの組成によく似ている。このような点から、各組織の不溶性コラーゲンのアミノ酸組成の偏差は、エラスチンの混在によるものがたとえあるにしても、その影響を上まわるコラーゲン本来の組織差を示すということが出来よう。

ヘキソースおよびヘキソサミンが、アキレス腱と歯根膜に多いが、これらが、コラーゲン本来のものか、基質の糖類の混入によるものか、現在のところ正確な意義は不明であり今後検討を要する問題である。しかしヘキソースは可溶性コラーゲ

ンにおいてはコラーゲンのペプチド鎖に結合している事が確められている²²⁾事や、同一条件で抽出してかつ、表3のような差が認められる事を考えると、これらの値も不溶性コラーゲンの組織差に関連があるものと予想される。なおヘキソースの成分については、Sweeley²¹⁾らの条件で、ガスクロマトグラフィーにより、その主なるものはグルコース、ガラクトースおよびマンノースである事を確認した¹²⁾がこれについては別に報告する予定である。

不溶性コラーゲンの組織差をさらに顕著に示す事実は、それらの溶解性の違いである。図8に示されたように、ゼラチン化による不溶性コラーゲンの溶解性は各組織のものによつて明らかにことなり、なかでも大腿骨のものは他の三組織のものよりもかなり高い。骨のコラーゲンがゼラチン化に対してこのように溶解性が高いことは、このコラーゲンが、他の組織のものとは質的にことなっているという印象を与える。現在までに骨のコラーゲンの溶解性を扱った報告として Glimcher¹⁶⁾らのものがあるが、彼らはニワトリの骨の不溶性コラーゲンを、各種の濃度の食塩、酢酸、尿素、ロダンカリ等で抽出し、その溶解性を調べている。彼らは、室温でこのような溶媒で骨コラーゲンを処理した場合、その80%位が溶解し、さらに0.1N食塩中で、100°Cに加熱すると4時間で98%まで溶解すると報告している。加熱によるゼラチン化という点では、今回のデータに非常に近い値といえよう。骨のような緻密な無機質に囲まれたコラーゲンの溶解性がとくに高いということは興味深い。すなわち、この組織のコラーゲンにはアイソトープを使つての実験から、他の組織のコラーゲンの場合より代謝の速度の早い分画があることが知られており、また骨組織が常時、吸収、再沈着の機転をくりかえしている事を考えると、骨コラーゲンの高い溶解性は、そのような組織の特徴にみあつた合目的性を示しているものと考えられる。

以上のような不溶性コラーゲンの組成ならびに溶解性が組織によつてことなるという点から推定

されることは、おそらくコラーゲンはその不溶化の過程において、組織によつてその機能に応じた修飾を受け、その結果組織によつて違つた組成、諸性質が形成され得るものであらうということである。各種の組織で機能に応じてどのような修飾をうけるかは将来の問題であり、また不溶化の機序自体にも現在不明な点が多いが、その解明の道の一つは、今回の知見からみて、不溶性コラーゲンの化学構造の研究にあると考えている。

V. 総 括

ウシ・コラーゲンの組織による化学的諸性質の差を知るため、試料の抽出方法を検討し、一定の方法で抽出したコラーゲンについて各種の化学分析および溶解性の測定を行ない次の結果を得た。

1. 組織を液体窒素によつて凍結、粉碎することにより、アキレス腱および歯根膜の可溶性コラーゲンの収量を、従来の方法よりも増加せしめることが出来た。また血清学的反応により、血清蛋白質などの混入がない事をたしかめた。

2. 各種組織のコラーゲンのアミノ酸組成をヒストグラムによつて比較すると、不溶性コラーゲンの方が、可溶性コラーゲン（再生線維）よりも各組織間の偏差が大であることが認められた。

3. 不溶性コラーゲンの個々のアミノ酸の組成は、ヒドロキシプロリン、アスパラギン酸、メチオニン、チロシン、およびヒドロキシリジンが、各組織間で大きく変動している ($\sigma/M \times 100 > 20$)。これに対しグルタミン酸、リジン、セリン、アルギニン、イソロイシン等は組織間の変動が小さい ($\sigma/M \times 100 < 10$)。

4. アキレス腱の不溶性コラーゲンは、ヒドロキシリジン含有量が、他の組織の不溶性コラーゲンよりも約2倍多いが、可溶性コラーゲンでは、他の組織のものと大差がなかった。

5. 歯根膜およびアキレス腱の不溶性コラーゲンの隣、ヘキソースおよびヘキソサミン含有量は、真皮および大腿骨の不溶性コラーゲンのそれに比較して高い値を示した。

6. 各組織の不溶性コラーゲンを 100°C でゼ

ラチン化した際の溶解性は、組織によつてことなり、とくに大腿骨のものは他の組織に比較して溶けやすく、6時間後に93%溶解するが、その他の組織のものは46~60%にとどまつた。この傾向はTCA処理の場合にも同様に認められた。

7. ゼラチン化の際の不溶性残渣がコラーゲンとエラスチンの混合物であると仮定し、またコラーゲンおよびエラスチンのヒドロキシプロリン含有量を各々10%、1%とするならば、不溶性コラーゲン中のエラスチン混在量は、最大限、真皮の場合の9%で他の組織の場合はそれより少ない。このことから各組織の不溶性コラーゲンのヒドロキシプロリンの値には、エラスチンなどの混在に由来する偏差があるにしても、それを上まわるコラーゲン本来の組織間の偏差があるものと推測される。

終りにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました荒谷真平教授（現、東北大学歯学部教授）、北里大学衛生学部化学科川西康博教授、ならびに本学佐々木哲教授に心から感謝致します。またアミノ酸分析でお世話になりました群馬大学岩井浩一教授、東京大学理学部生物化学科堀内、矢野両技官の各位、血清学的実験で御教示いただきました東京大学医学部血清学教室鈴木鑑教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 久保木芳徳：各種結合組織のコラーゲンの研究、第一報、口病誌、35、1968.
- 2) Piez, K. A., Likins, R. C.: Calcification in biological systems, (Ed. R. F. Sognes), Washington, 1960, Am. Assoc. Advancement Sci., p. 411.
- 3) Eastoe, J. E.: The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin, Biochem. J., 61, 589, 1955.
- 4) 久保木芳徳、荒谷真平、川西康博：コラーゲンの抽出諸条件の検討、生化学、35、32、1963. (抄録).
- 5) Araya, S., Saito, S., Kawanishi Y.: Soluble collagen in bone, Nature, 192, 758, 1961.
- 6) Spackman, D. H., Stein, W. H., Moore, S.: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, Anal. Chem., 30, 1190, 1958.
- 7) Scott, T. A., Melvin, E. H.: Determination

- of dextran with anthrone, *Anal. Chem.*, 25, 1656, 1953.
- 8) Belcher, R., Nutten, A. J., Sambook, C. M. : The determination of glucosamine, *Analyst*, 79, 201, 1954.
 - 9) Hiller, A., Plazin, J., Van Slyke, D. D. : A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins, *J. Biol. Chem.*, 176, 1401, 1948.
 - 10) 川西康博, 工藤陽子, 岩井浩一, 未発表.
 - 11) Glimcher M. J., Francois, C. J., Richards, L. Knone, S. M. : The presence of organic phosphorus in collagen and gelatins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 93, 585, 1964.
 - 12) 伊藤俊洋, 川西康博, 名雲照一, 久保木芳徳, 荒谷真平 : コラーゲンの糖組成の比較研究, *生化学*, 38, 152, 1966 (抄録).
 - 13) Sobel, A. E., Leibowitz, S., Eilberg R. G., Lamy, F. : Nucleation by elastin, *Nature*, 211, 45, 1966.
 - 14) Glimcher, M. J., Katz, E. P., Travis, D. F. : The solubilization and reconstitution of bone collagen, *J. Ultrastruct. Res.*, 13, 163, 1965.
 - 15) Pine, E. K., Holland, J. F. : Heterogeneity in the composition of human collagen, *Arch. Biochem. Biophys.*, 115, 95, 1966.
 - 16) Glimcher, M. J., Katz, E. P. : The organization of collagen in bone, *J. Ultrastruct. Res.*, 12, 705, 1965.
 - 17) Gerber, G., Gerber G., K. I. : Studies on the Metabolism of tissue proteins, I. Turnover of collagen labeled with proline U-C¹⁴ in young rats, *J. Biol. Chem* 135, 2653, 1960.
 - 18) Allen, R. J. L. : The estimation of phosphorus, *Biochem. J.*, 34, 858, 1940.
 - 19) 中村道徳 : 燐酸の比色定量法, *日農化誌*, 24, 1, 1950.
 - 20) Fitch, S. M., Harknes, M. L. R., Harknes, R. D. : Extraction of collagen from tissues, *Nature*, 176, 163, 1955.
 - 21) Sweeley, C. C. et al. : Gas-liquid chromatography of trimethyl silyl derivatives of sugars and related compounds, *J. A. C. S.*, 85, 2497, 1963.
 - 22) Butler, W. T., Cunningham, L. W. : Evidence for the linkage of a dissacharide to hydroxylysine in tropocollagen, *J. Biol. Chem.*, 241, 3882, 1966.
 - 23) Tristram, G. R., Smith, R. H. : The amino acid composition of some purified proteins, *Advan. Protein. Chem.*, 18, 227, 1963.
 - 24) 久保木芳徳, 川西康博, 荒谷真平 : ウシ各種組織コラーゲンの不均一性の検討, *生化学*, 37, 500, 1965 (抄録).