水産動物のコラーゲンに関する研究—II.

イルカ皮不溶性コラーゲンの可溶化について

久保田 穰・田島 英男*

1966 年 9 月 13 日受理

Studies on Collagen in Aquatic Animals—II.

On the Solubilization of the Dolphin Insoluble Hide Collagen

Minoru KUBOTA and Hideo TAJIMA*

For the purification of the dolphin collagen the fiber formation processing after the solubilization of pretreated dolphin hide was applied. First, the effect of the pretreatment on the component of the dolphin hide and some methods of the solubilization were examined.

The dolphin hide was pretreated with acetone and ethyl ether, then 0.5 M sodium acetate and 0.1% acetic acid. From the analyses of amino acids (Hypro, Pro, Tyr, Try), sugars (hexose and pentose) and amino sugar (hexosamine), the dolphin hide seemed to be considerably purified by the pretreatment (Table 1).

The amount of acid soluble collagen extracted by citrate buffer (pH 3.6) was as low as 0.1%.

It was confirmed to be better to solubilize the dolphin hide with the treatment of pepsin (crystallized twice-PU 366,000) than with that of the Hirotake enzyme product (PU 16,600) after pretreating under the following condition as a method of the solubilization; Preheating treatment was done at 70°C, for 10 min. After preheating, the dolphin hide was cooled slowly to room temperature for 2~3 hr. Pepsin treatment was done with 1% pepsin on dried hide weight at pH 1.5 (HCl-CH₃COONa buffer), and 25°C.

コラーゲンを化学的に純粋状態に単離することは非常に難しいので、コラーゲンの分離精製については十分吟味する必要があることがこれまで多くの研究者らにより強調されてきた¹⁾。本報においては、前報²⁾に引続き、皮を酸活性酵素により可溶化しコラーゲン分子の溶液を得、その後透析により繊維を再生させることにより精製する方法³⁾⁴⁾を採用し、前処理により調製された不溶性コラーゲンの可溶化について各種の方法を検討したので報告する。

実験方法

試料 江ノ島マリンランドで飼育中、1965 年 6 月死亡したバンドウイルカ（体長 257 cm ♀）から死亡直後剥皮し、撒塩処理し、冷蔵庫に保存した皮を試料とした。

前処理—不溶性コラーゲンの調製 試料皮を水洗して表面に付着している汚物、食塩などをとり除き表皮の黒皮および肉面付着物をナイフで機械的に除去し真皮部分だけを 5 mm 角に細切してから、アセトンで脱水後ソックスレー脂肪抽出器によりエチルエーテルで脱脂した。さらに 1 mm 角に細切してから 0.5 M 酢酸ナトリウムで回転振とうし可溶性物質を除去した。酢酸ナトリウムを 1 日 2 回とりかえて 3 日間処理したのち、水を 1 日 2 回とりかえて 3 日間洗浄し、酢酸ナトリウムを除去した。ついで 0.1% 酢酸を 1 日 2 回とりかえながら 3 日間回転振とう処理し、水で十分洗浄してから 0.02 M 第二磷酸ナトリウムを 1 日 2

* 東京水産大学 (Tokyo Univ. of Fisheries, Minato-ku, Tokyo, Japan)

回とりかえて3日間処理し中和した。この酢酸と第二リン酸ナトリウムの交互処理を3回繰返し最後に水で十分洗浄してからアセトンで脱水し真空デシケーターで乾燥して保存した。これらの処理は冷室(5~10°C)で行なわれた。

酸可溶性コラーゲンの定量 窪田の方法⁴⁾に基いてアセトンおよびエチルエーテルで脱水・脱脂後 0.5 M 酢酸ナトリウムで可溶性蛋白を除去した試料を用いて pH 3.6 の 0.15 M クエン酸緩衝液 (0.05 M クエン酸ナトリウム-0.1 M クエン酸) で 90 時間、4°C で攪拌抽出しこの溶液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離し固形物を取り除き、さらに 40,000×g で 120 分遠心分離して、その上澄液のヒドロキシプロリンを測定し (上澄液のヒドロキシプロリン量供÷試料のヒドロキシプロリン量)×100 から酸可溶性コラーゲン量を求めた。

不溶性コラーゲンの可溶化法

酵素処理による可溶化法 供試酵素は SIGMA 製ペプシン (2 回再結晶) とヒイロタケ産生酵素標品³⁾を用いた。試料が完全に溶解したとき 0.3% のコラーゲン溶液を得るように皮片を採取し、緩衝溶液 (0.1 M HCl-0.1 M CH₃COONa) に浸漬し、十分に膨潤させる。酵素処理は回転振とう機で攪拌する方法を用いた。また腐敗を防止するためにトルエンを添加した。処理後溶液の一部を取り No. 3 のグラスフィルターで濾過し、その濾液の全窒素を測定して可溶化量を求め、(溶液の全窒素÷供試試料の全窒素)×100 で可溶化率を表わした (以下同様に可溶化率を求めた)。

熱変性後酵素処理による可溶化法 加熱処理によるイルカ皮の熱変性条件を検討し、その結果に基いて熱変性させた後前項の方法と同様な酵素処理を行なう。

熱変性後トリプシンおよびペプシン処理による可溶化法 前項と同じ条件で熱変性させた後 pH 8.0 の硼酸緩衝溶液中で不溶性コラーゲンに対し 1% のトリプシン (東京化成工業株式会社製) を加え 25°C で 3 日間処理する。上澄液を傾捨しコラーゲン小片を水でくりかえしゆるやかに攪拌しながら洗浄したのち 3°C で pH 2 の塩酸中に分散させると均一な白濁粘稠溶液となる。この溶液を 0.02 M 第二リン酸ナトリウム溶液に対して透析し生じた繊維状の沈殿を水で十分洗浄する。得られた繊維をふたたび pH 2 の塩酸に 0.3% の濃度になるよう溶解し基質に対して 1% のペプシンを加え 20°C で 3 日間作用させると透明になり一層粘稠性を増す。ついで 40,000×g, 120 分遠心分離し上澄液の全窒素を測定し、可溶化率を算出した。

蛋白変性剤処理後ペプシン処理による可溶化法 蛋白変性剤 (水素結合破壊剤) 溶液⁵⁾⁶⁾ として KSCN (100% w/v), CaCl₂ (100% w/v), ヒドロキシルアミン (1 M), Ni (NO₃)₂ (100% w/v) および尿素 (8 M) を用いて 20°C で 5 日間、回転振とう処理したのち十分水洗する。その後基質に対して 1% のペプシンを添加し pH 1.5 の緩衝溶液中で回転振とう処理し可溶化する。溶液を 40,000×g, 120 分遠心分離し、上澄液の全窒素量を測定し、可溶化率を算出した。

アルカリ処理による可溶化法 Hey ら⁷⁾の方法により皮片を 8% NaOH (乾燥試料 1 g 当り 120 ml) で 6 日間、3°C で膨潤させる。前もつて冷却した pH 3.1 のクエン酸緩衝液を pH 3.1 になるまで加える (乾燥試料 1 g 当り 200 ml 必要)。攪拌してから 20°C まで温度を上げ 24 時間後混合液を激しく攪拌して 48 時間抽出したのち 40,000×g で 120 分遠心分離する。上澄液の全窒素量を測定し、可溶化率を算出した。超遠心分離操作は全実験を通じ 5°C で行なわれた。

酵素力価測定 萩原-Anson 法⁹⁾により測定した。

全窒素の測定 ミクロケルダール法によつた。

アミノ酸および糖類の定量 ヒドロキシプロリンおよびプロリンは試料を 6N 塩酸で封管中 110°C において 24 時間加水分解し蒸発乾固後定量に希釈したものについて²⁾ チロシンおよびトリプトファン⁹⁾ は前項の加水分解蒸発乾固物を 0.1N NaOH に溶解し紫外部吸収測定法により⁹⁾、ヘキソサミンは試料を 4N 塩酸で封管中 100°C において 10 時間加水分解し蒸発乾固後水酸化ナトリウム溶液で中和し、BLECKER らの方法¹⁰⁾により、またヘキソースおよびペントースは試料を 1N 塩酸で封管中 100°C において 5 時間加水分

解し蒸発乾固したのち ANTHRON 法および ORCIN 法⁸⁾によりそれぞれ定量した。

結果および考察

前処理による組成変化 前処理の各段階を追ってアミノ酸および糖類の分析を行なった結果は Table 1 に示すとおりである。0.5M 酢酸ナトリウムで繰返し処理するとヒドロキシプロリンが約 1.5 倍に、プロリンが約 2.5 倍に増加した。チロシンは変らないが、トリプトファンは約 20% 減少した。コラーゲンに

Table 1. Amounts of nitrogen, amino acids and saccharides in pretreated dolphin hide

Pretreatment	Nitrogen (%)	Amino acids (%)				Saccharides (%)		
		Tyr	Try	Hyp	Pro	Hexo-samine	Hexose	Pentose
Acetone and ether	15.8	1.05	0.57	5.65	6.0	0.32	0.70	0.45
0.5 M-Sodium acetate	16.0	1.05	0.44	8.58	15.4	0.23	0.48	0.15
0.1%-Acetic acid	16.5	1.03	0.37	8.75	15.5	0.18	0.46	0.06

After the treatment with acetone and ether, the dolphin hide was treated with 0.5 M sodium acetate, then with 0.1% acetic acid at 5~10°C.

特有なアミノ酸であるヒドロキシプロリンや多量に含有されているプロリンの占める割合が急激増加するが、その反面コラーゲンにはほとんど含有されないので夾雑蛋白の指標に用いられるトリプトファンが減少していることから可溶性蛋白が相当除去されたことがわかる。同時に糖類も、ヘキサミンもともにかなり除去された。つぎに 0.1% 酢酸で処理し酸可溶性夾雑物と酸可溶性コラーゲンを除去したが、酢酸ナトリウム処理と同様にヒドロキシプロリンの占める割合が増加した。ヘキサミンやヘキソースも酢酸ナトリウム処理ほどではないが減少しており酸処理でもかなり精製されるようである。

酸可溶性コラーゲンの含有量 本実験では pH 3.6 のクエン酸緩衝溶液に可溶なものを西原³⁾、窪田⁴⁾の所論にしたがい酸可溶性コラーゲンとし、その含有量を測定したところ僅か 0.1% しか得られなかつた。それゆえ供試イルカ皮はほとんど不溶性エラゲンから構成されていると考えられる。一般に若い動物のコラーゲンは酸可溶性コラーゲンが多く（小牛皮の場合 1~5%）、成長した動物ではほとんど 0 になるといわれているから¹¹⁾、本実験に供したイルカは相当成長したイルカであると推定される。

Fig. 1. Effect of pH on the solubilization of the dolphin hide in the treatment with pepsin or the Hirotake enzyme product. The solubilization with the enzymes was performed at Temp. 25°C and time 3 days, the mixture solution being stirred vigorously not so as to make bubble.
 —○—: Treatment with pepsin
 —●—: Treatment with the Hirotake enzyme product

不溶性コラーゲンの可溶化方法の検討 各種の可溶化実験を行なったが、それらの結果について述べる。

酵素処理条件の検討 供試した酵素の力価 PU はペプシン 366,000, ヒイロタケ酵素標品は 16,400 であった。至適 pH は温度 25°C において不溶性コラーゲンを基質として可溶化率から測定すると Fig. 1 示すような結果が得られ、ペプシンは pH 1.5, ヒイロタケ酵素は pH 3.0 に至適値がある。また可溶化に及ぼす濃度効果は Fig. 2 に示すとおりであり、ペプシンは基質に対し 1% で可溶化平衡となるが、ヒイロタケ酵素は供試濃度範囲では可溶化平衡を示さない。そこで今後の実験ではペプシンを温度 25°C で、pH 1.5 において、基質に対して 1%, ヒイロタケ酵素標品は pH 3.0 において、基質に対し 3% 使用することにした。

酵素処理による可溶化状況 両酵素による不溶性コラーゲンの可溶化状況は Fig. 3 に示すとおりである。この結果によれば 25°C で 1 週間処理した場合、可溶化率はペプシン処理で 37%, ヒイロタケ酵素処理で 8% あった。ヒイロタケ酵素は酵素濃度を高めても Fig. 2 より考えてそれほど可溶化は期待できないし、濃度を過度に高めることは溶液中に不溶解物が増すので可溶化方法として好適ではない。ペプシン処理は一週間位経過すると活性を減ずるように思われるので、不溶解物を再び新しく調製した酵素溶液で処理するとほとんど可溶化することが可能であった。

熱変性後酵素処理による可溶化 本法は成牛皮の不溶性コラーゲンの可溶化に通常用いられる方法であるが、イルカ皮の不溶性コラーゲンの可溶化に応用し、変性温度、冷却方法および変性時間などの条件を実験的に決定した。

変性温度 不溶性コラーゲンを 60°, 70° および 80°C の水中で 10 分熱処理し（この際各温度における可溶化率はそれぞれ 2.4%, 2.6% および 3.3% であった）その後水冷により室温まで冷却してからペプシン処理したときの可溶化率は酵素処理 3 日では、変性温度が 60°, 70° および 80°C の場合それぞれ 16.4%, 19.8% および 21.8% であったが、酵素処理 5 日ではそ

Fig. 2. Effect of enzyme concentration on the solubilization of the dolphin hide in the treatment with pepsin or the Hirotake enzyme product.

—○—: Solubilization curve with pepsin at a pH value of 1.5

—●—: Solubilization curve with the Hirotake enzyme product at a pH of 3.0

Condition: Temp. 25°C, Time 3 days

The percentage of concentration was estimated on dry weight of the hide.

Fig. 3. Rate of solubilization course of the dolphin hide by the treatment with pepsin or the Hirotake enzyme product.

—○—: Treatment with pepsin at Temp. 25°C, pH 1.5, and with enzyme conc. 1.0% on dried hide weight.

—●—: Treatment with the Hirotake enzyme product at Temp. 25°C, pH 3.0, and with enzyme conc. 3.0% on dried hide weight.

れぞれの変性温度において 20.8%, 28.0% および 29.8% であった。

冷却方法 不溶性コラーゲンを 20°C で 10 分熱変性させた後 1) 氷水中に浸漬して急冷する, 2) 水中に浸漬して冷却する, 3) 変性時の温水に浸漬したままゆつくり冷却する, などの方法により室温まで冷却しその後ペプシン処理による可溶化状況をしらべた。その結果可溶化率は酵素処理が 3 日の場合 1) 18.4%, 2) 20.8% および 3) 36.0% であったが, 5 日の場合 1) 26.0%, 2) 29.0% および 3) 50.8% であった。

変性時間 不溶性コラーゲンを 70°C の水中で 10 分, 30 分および 60 分加熱した後そのまま放冷し, さらにペプシン処理をして可溶化状況をしらべた結果, 可溶化率は変性時間が 10 分, 30 分および 60 分の場合酵素処理 5 日の可溶化率はそれぞれ 50.0%, 50.5% および 51.5% であり, 変性時間による可溶化率の差はほとんど認められなかった。しかし 70°C の水中で不溶性コラーゲンを 10 分, 30 分および 60 分加熱しただけの場合の可溶化率はそれぞれ 2.6%, 4.2% および 6.0% であった。

上記の結果から熱変性温度については 70°C と 80°C では可溶化にたいして差は見られなかったが, 熱変性時の溶解損失量は 80°C の方が大であった。また別に Ts 59°C の結果を得ているので, 60°C 以上の温度ならば熱変性の目的は達せられるはずであるが, 今後の実験では 70°C を採ることとした。冷却方法としては熱変性時の温水につけたまま室温まで 2~3 時間かけて冷却する方法が良好であった。おそらく水素結合が温和な条件下でかなり破壊される結果と思われる。また変性時間については酵素処理 5 日ではほとんど差が認められなかった。結局熱変性条件としては 70°C で 10 分熱変性させたのち, その温度の水中で緩慢に 2~3 時間かけて冷却する方法が良好な結果を得た。

そこでこのような条件下で熱変性させた不溶性コラーゲンをペプシンおよびヒイロタケ酵素標品で処理した場合の可溶化過程は Fig. 4 に示すとおりである。

結果は明らかにヒイロタケ酵素標品処理よりもペプシン処理の方が優つていることを示し, 不溶性コラーゲンを熱変性させた場合でも本標品は可溶化に不適當と思われる。また熱変性処理の効果をペプシン処理による可溶化について比較すると熱変性させた方が優つており, 熱変性の場合の 3 日間の可溶化量と未変性の場合の 7 日間のそれとが同程度であった。しかし熱変性コラーゲンの酵素による可溶化が 4 日後に緩慢になるのは酵素が活性を減じてくるためと考えられる。残渣を取り出し新しい酵素溶液で処理を行なえばほとんど可溶化できたので, 本法により可溶化する場合 5 日酵素処理したならば新しく調製した酵素溶液にかえて処理すれば一層効果的に可溶化ができると思われる。

熱変性後トリプシンおよびペプシンによる可溶化 本法もまた成牛皮不溶性コラーゲンの可溶化に用いられる方法³⁾であるが, イルカ皮不溶性コラーゲンに応用したところトリプシン (PU 19,800) 処理中に 50.4% も可溶化されてしまい, コラーゲン分子としての可溶化量も 13.5% と低く, かつ熱変性時に 2.6%

Fig. 4. Solubilization course of the preheated dolphin hide by the treatment with pepsin or the Hirotake enzyme product.

After preheating for 10 min. at 70°C in water, the hide was cooled till room temperature slowly.

—○—: Treatment with pepsin

—●—: Treatment with the Hirotake enzyme product

Both conditions of the solubilization were same as in case of Fig. 3.

の溶解損失があることなど考え合わせるとイルカ皮の溶解には不適當であると思われる。成牛皮はトリプシン処理により約 20 % 可溶化される程度である⁴⁾が魚皮やサメ皮はトリプシンに極めて可溶化され易いことが知られている¹²⁾。したがってイルカ皮はトリプシンによる可溶化という点では魚皮に近いようである。

蛋白変性剤処理後ペプシンによる可溶化 水素結合破壊剤と呼ばれる蛋白変性剤により予め水素結合を切つておいて酵素処理を行ないその可溶化状況を調べた結果 Table 2 を得た。

Table 2. Solubilization of the dolphin hide treated with the denaturants by the successive treatment with pepsin

Day	KCNS 100% (W/V)	CaCl ₂ 100% (W/V)	Hydroxylamine 1 M	Ni(NO ₃) ₂ 100% (W/V)	Urea 8 M	Control*
3	96.2	81.1	75.1	79.5	45.4	22.7
5	97.8	85.4	79.1	89.7	90.2	51.8

* Control is the native dolphin hide.

Figures are expressed as %.

Both treatments were performed being stirred in the revolving agitator at 20°C.

Concentration of pepsin: 1% for the hide weight.

タラ皮では本実験に供した蛋白変性剤の処理 (20°, 14 日間) だけで 90~100 % 溶解することを確めたが、イルカ皮不溶性コラーゲンでは 20°C で 5 日処理しても溶解現象は全く認められなかつた。Table 2 に示めされるように、KCNS が特に有効であつた。しかしこの種の変性剤が存在すると可溶化コラーゲン分子は変性することがられている¹¹⁾ので、処理後十分に変性剤を除去しないと酵素処理により生成されたコラーゲン分子が変性する可能性があるし、また酵素蛋白に対する影響も考慮しなければならない。

アルカリ処理による可溶化 本法による可溶化率は 23.7%であつた。可溶化法としては有効ではないが、酵素処理以外の可溶化方法として興味深い。本法で得られる精製コラーゲンの化学組成については後に検討するが、本法を開発した HEY ら⁸⁾はアルカリと硫酸塩による方法よりも収率のよいことや比旋光度と粘度測定から酸可溶性コラーゲンと比較してコラーゲン分子構造を損うことなく可溶化できると述べている。

要 約

イルカ皮コラーゲンを単離するため、その可溶化を中心にして検討した。すなわち精製の前段階としてまず皮を細切し、アセトンおよびエーテルで脱水および脱脂し、その後 0.5 M 酢酸酢ソーダおよび 0.1% 酢酸ソーダーによる夾雑物除去の前処理を行なつた。前処理の各段階を追い、アミノ酸および糖類の分析を行なつた結果、コラーゲン特有のアミノ酸であるハイドロキシプロリンの占める割合が増加すること、また夾雑蛋白の指標とされるトリプトファンが減少することから可溶性蛋白がかなり除去されることが知られた。糖類含有量もまた著しく低下した。前処理後不溶性コラーゲンを可溶化するための諸条件を検討した結果 70°C で 10 分水中で加熱し熱変性させた後 pH 1.5 の緩衝液中で基質に対して 1 % の結晶ペプシンで処理する方法が確実な方法であることが判明した。酸可溶性コラーゲンはわずか 0.1%しか含まれていなかった。

終わりにバンドウイルの皮を供提して下さつた江ノ島マリンランド中島将行博士に深謝する次第である。また本研究費の一部は昭和 40 年科学研究費 (各個) の補助に仰いだことを付記する。

文 献

- 1) 土屋靖彦: 蛋白質・核酸・酵素, **5** (12), 643~652 (1960).
- 2) 久保田稔・田島英男: 本誌, **30**, 1038~1042 (1964).

- 3) 西原富雄: 研究報告 (日本皮革研究所), 第 6 輯, 1~48, 昭和 38 年.
- 4) 窪田あき: 研究報告 (日本皮革研究所), 第 9 輯, 1~11, 昭和 38 年.
- 5) K. H. GUSTAVSON: "Collagen", 285. *Interscience Publishers, New York*, (1960).
- 6) G. N. RAMACHANDRAN: "Recent Advances in Gelatin and Glue Research", 32, *Pergamon Press, London*, (1958).
- 7) C. D. HEY and G. STAINSBY: *Biochem. Biophys. Acta*, **97**, 364~366 (1965).
- 8) 赤堀四郎: 酵素研究法, 第 2 卷, 237~246, 朝倉書店 (1963).
- 9) G. H. BEAVEN and E. R. HOLIDAY: "Advances in protein Chemistry", Vol., 323~326, *Academic Press, New York* (1952).
- 10) R. BERCHER, A. J. NUTTEN, and C. M. SAMBRÖOK: *Analyst*, **79**, 201~208 (1954).
- 11) 西原富雄: 蛋白質・核酸・酵素, **5** (7), 387~401 (1960).