水産動物のコラーゲンに関する研究—III.

ペプシンで可溶化されたイルカ皮コラーゲンの 2, 3 の
物理化学的性質について

久保田 穰・木村 茂・田島英男*

(1966 年 9 月 27 日受理)

Studies on Collagen in Aquatic Animals—III.

On Some Physicochemical Properties of the Pepsin Solubilized
Collagen of the Dolphin Hide

Minoru KUBOTA, Shigeru KIMURA, and Hideo TAJIMA*

The study was carried out to elucidate the chemical composition and physicochemical properties of the hide collagen of the dolphin (*Tursiops truncatus*). By the electron micrograph, the macrostructure of the fiber was found to be constructed of the net work resembling to that of the cattle hide.

The hide was solubilized by pepsin treatment at 25°C in the buffer of pH 1.5 after the pretreatment such as degreasing (ether and acetone), extracting (0.5 M Na-acetate and 0.1% acetic acid) and heat denaturation (at 70°C, 10 min. in water). The pepsin solubilized collagen (PSC) was reconstituted by dialysing against 0.02 M Na₂HPO₄. The PSC purified thrice by such method as solubilization and reconstitution was analyzed regarding amino acids, sugars, and amino sugar (Table 1 and 2).

By the viscometry, the intrinsic viscosity and thermal denaturation of the PSC were measured (Fig. 1 and 2) and following results were obtained; $[\eta]$: 15.2 dl/g, T_D : 31°C, whereas T_S was 59°C.

By the sedimentation analysis of the PSC, the molecular weight was proved to be 350,000 in native state, and 130,000 (α -component) and 200,000 (β -component), respectively in denatured state.

By the starch gel electrophoresis method of Kulson *et al.* (1964), the PSC was separated to the sub-units of α_1 , α_2 , β_{11} , β_{12} and γ components.

イルカ皮コラーゲンは前報¹⁾で述べたように不溶性コラーゲンが大部分を占め可溶化が容易でないことは成牛皮のそれに似ている。そこでまずイルカ皮の繊維構造を電子顕微鏡にて観察し、そして前報において検討した可溶化法に基づき可溶化し、中性溶液中に透析し、繊維を再生させて得られるペプシン可溶化コラーゲン (Pepsin-solubilized collagen: PSC) についてアミノ酸組成および二、三の物理化学的性質を調べた結果について報告する。

実験方法

イルカ皮試料 バンドウイルカ (前報において記したものと同一である。)

電子顕微鏡写真 脱脂皮の真皮組織を針の先ですできるだけほぐし、無水アルコール中で激しく振とうして微細繊維のけんだく液を作る。この一部をデシケター中で乾燥し電子顕微鏡写真の試料とした。電子顕微

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

鏡は日立 HS-7 型を使用し、直接倍率 5000 倍であつた。試料は staining および shadowing とともに行なわなかつた。

ペプシン可溶性コラーゲン (PSC) の調製法 前報に述べた前処理 (エーテル, アセトン, 0.5 M 酢酸ソーダーおよび 0.1% 酢酸処理後) し、皮を 70°C で 10 分間水中で熱変性させ、皮基質に対して 1% の結晶ペプシンを pH 1.5 の緩衝液 (0.1 M-HCl-0.1 M-CH₃COONa) 中で温度 25°C において 4 日間作用させた。ただし皮試料は約 1 mm 角に細切し、コラーゲンが溶解した場合に溶液のコラーゲン濃度は 0.3% 以下となるようにした。可溶化後、溶液中の薄片をグラスフィルターで除いてから、40,000×g で 120 分間遠心分離する。得られた上澄液を 0.02 M Na₂HPO₄ に対して Visking 透析膜で 48 時間透析する。透析膜は使用に先だち 1% 炭酸ナトリウムで 10 分間煮沸し、希塩酸に一夜漬けて中和後よく水洗した。膜内液中にコラーゲン繊維を再生するが、外液の Na₂HPO₄ は 4 回とりかえて透析を完全に行なつた。繊維再生後、3000 r.p.m. で 15 分間遠心分離し、繊維を集めた。さらに繊維は蒸留水で十分洗い第 2 リン酸ソーダーを洗い落した。これを 1/100 N-HCl にコラーゲン濃度が 0.3% になるように攪拌溶解 (3°C で 2 時間) させた後、前と同じように第 2 リン酸ソーダー溶液中で繊維を再生させ遠心分離後水洗する。このように繊維再生と酸溶解操作を 3 回繰返した。得られた精製コラーゲンは凍結乾燥して保存した。

アミノ酸分析法 試料を 6N HCl により 110°C で 24 時間加水分解した後蒸発乾固して過剰の塩酸を除去した。アミノ酸全分析は自動アミノ酸分析機 (日立 KLA-2 型) により行なつた。ヒドロキシプロリン (HyPro) は鬼塚法²⁾、プロリン (Pro) は TROLL 法³⁾、チロシン (Tyr) およびトリプトファン (Tyr) は加水分解物を 0.1N NaOH に溶解し紫外吸収測定法⁴⁾により定量した。

糖類の分析法 試料を封管中で 1N HCl により 100°C、5 時間加水分解した後蒸発乾固して過剰の塩酸を除去し、orcin 法および anthrone 法⁵⁾により定量した。

アミノ糖の分析法 試料を封管中で 4N HCl により 100°C、10 時間加水分解し、蒸発乾固後 1% NaOH で中和してヘキソサミンとして BELCHER 法⁶⁾により定量した。

固有粘度 PSC 溶液の粘度測定は Ostwald-Fenske 粘度計を用い、温度 20±0.02°C において行なつた。 η_{sp} を測定し η_{sp}/c (c : 濃度%) を求め $c \rightarrow 0$ に外そうして固有粘度 $[\eta]$ を求めた。この際溶媒としては 0.15 M クエン酸緩衝液 (pH 3.6) を用いた。

熱収縮温度 (T_s) および 変性温度 (T_D) T_s は PSC 繊維を水にけんだくさせた状態で、融点測定器を用い繊維の熱収縮する温度を測定して求めた。 T_D は PSC の濃度 0.02% の 0.01 M 酢酸溶液 (pH 3.6) について各種温度における粘度を測定し、 η_{sp}/c の値が半減する温度をもつて表わした。

デンブengel電気泳動 KULONEN⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ らの方法にしたがい、水解デンブengel (第一化学薬品工業株式会社製) のゲルを調製した。この際ゲル濃度は 14.7% で、用いた緩衝液は 0.01 M 酢酸塩 (pH 4.7, $\mu = 0.017$) であつた。PSC を 0.01 M 酢酸緩衝液に 0.1% になるように 1 昼夜攪拌溶解した後、40°C で 15 分間加熱して熱変性コラーゲンとし、38°C に調整した恒温室内で泳動させた。泳動装置は小林式汙紙電気泳動装置を用いた。泳動は電圧勾配 9V/cm で 4 時間行ない、その後ゲルを 0.1% ニグロシン-グリセリン水溶液で 90°C、15 分間染色してから 50% (V/V) グリセリン水溶液で脱色した。

Plate 1. Electron micrograph of dolphin hide 5000× (without staining and shadowing).

超遠心分析 沈降図は日立分析用超遠心機を用い、59870 r.p.m., 温度約 15°C におい

て測定した。供試 PSC 溶液の濃度は未変性状態の時 0.13%, 変性状態の時 0.8% である。溶媒は未変性状態の時 0.15 M クエン酸緩衝液 (pH 3.6), 変性状態の時 0.15 M クエン酸緩衝液+1.2 M KSCN (pH 3.6) を用いた。

物理化学的実験に供した PSC 試料はすべて溶解, 繊維再生操作を 3 回行なつた精製試料であることを特記する。

結果および考察

皮繊維の電子顕微鏡写真 直接倍率 5000 倍で撮影したイルカ皮繊維の電子顕微鏡写真は Plate I に示す。この繊維構造はサメ, マグロなどの魚類の皮コラーゲン繊維とは異り, 牛皮のそれと類似している¹²⁾¹³⁾。すなわち繊維は随所に結び目のある網状構造を形成している点に大きな特徴がある。単繊維内の周期構造の見えないのは Staining を行なっていないことによると思われる。

PSC の精製過程におけるアミノ酸, 糖類およびアミノ糖の組成変化 前報に述べた前処理を終えた皮をペプシン処理により可溶化し, 0.02 M Na_2HPO_4 に対して透析して得たコラーゲン繊維を再生させる操作を 3 回繰返した場合, 各過程において得られた再生繊維の分析結果は Table 1 に示すとおりである。

Table 1. Changes of the components of the pepsin solubilized collagen during the process of purification.

Collagen fiber	Total N (%)	Amino acids (%)				Sugars (%)		Amino sugar (%)
		Tyr	Try	Pro	Hypro	Hexose	Pentose	Hexosamine
Renatured once	17.7	0.33	0.12	12.1	9.83	0.11	0.05	0.32
Renatured twice	17.9	0.30	0.10	12.3	9.82	0.09	0.03	0.20
Renatured thrice	17.9	0.28	0.11	12.3	9.83	0.06	trace	0.18
Original*	16.5	1.03	0.37	15.5	8.75	0.18	0.06	0.46

* Original means the dolphin hide pretreated with acetone-ether, 0.5 M Na-acetate, followed by 0.1% acetic acid.

前処理しただけの試料の組成と再生 1 回の繊維の組成を比較すると後者は全 N が 17.7% に達した。通常コラーゲンの全 N は約 18% であるから相当夾雑物が除去されたことがわかる。ペプシン処理によりコラーゲン分子が 250 Å 程度消化され, しかもその部分は比較的チロシンを多量に含むことが知られている¹⁴⁾が, 本実験でもペプシン処理によりチロシンが約 1/3 に減少し, 精製により得られるコラーゲンのチロシン含有量が 0.23% という値が得られた。しかし除去されたチロシンがすべて皮コラーゲンに由来するとはいえない。またチロシンが 1/3 程度に減少し, ヒドロキシプロリンが増加することからペプシン処理により夾雑蛋白がかなり除去されたことは間違いない。3 回精製した繊維は 1 回再生のものに比較してアミノ酸よりも糖類およびアミノ糖の含有量の減少が著しく, ペントースはほとんど認められないが, ヘキソースは 0.18%, ヘキソサミンは 0.06% となつている。相当に精製したコラーゲンでもヘキソサミンは測定困難な程度まで減少するが, ヘキソースは 0.3~0.5% 以下には減少しないという説¹²⁾もあり, また SCHMITT らは¹⁵⁾コラーゲンを完全に精製した時コラーゲン中のヘキソサミンが 0.05% にまで減少したと報告しているから本法で得られたコラーゲンは糖に関しては相当に精製されたと考えられる。少量の糖類はコラーゲンに単に混在するのではなく, 結合して分子の安定に何らかの役割を果している可能性も考えられよう。コラーゲン分子に末端基が存在しないという従来の知見¹⁶⁾から考えても首肯できよう。

PSC のアミノ酸組成 3 回精製 PSC のアミノ酸組成は Table 2 に示すとおりである。

アミノ酸分析値は脊椎動物のコラーゲンの典型的アミノ酸組成¹²⁾を示している。すなわちヒドロキシプロリン (HyPro) が 9.8% に達し他の蛋白質に見られない特性的含量であるし, またシスチン (Cys) は痕

Table 2. Amino acid composition of purified PSC from the dolphin hide.

Amino acid	PSC		Whale skin*
	Percent	residues 1000 residues	residues 1000 residues
Hydroxyproline	9.8	85.5	89.1
Aspartic acid	5.2	44.3	46.3
Threonine	2.8	26.4	24.0
Serine	3.8	41.5	41.0
Glutamic acid	9.8	75.8	69.6
Proline	12.3	126	128
Glycine	24.6	323	326
Alanine	9.1	116	110
Cys (half)	trace	trace	0.0
Valine	2.0	19.3	20.6
Methionine	trace	trace	4.7
Isoleucine	1.7	14.5	11.0
Leucine	3.0	25.9	24.8
Tyrosine	0.3	1.7	3.6
Phenylalanine	1.5	10.1	13.0
Tryptophan	trace	trace	0.0
Hydroxylysine	1.1	7.2	5.8
Lysine	2.5	29.9	25.9
Histidine	0.8	* 5.0	5.7
Arginine	7.2	42.7	50.1

* Tristram (1953)

The specimen were hydrolyzed in 6N HCl in a sealed tube at 110°C for 24 hours.

Fig. 1. Intrinsic viscosity of pepsin solubilized collagen from the dolphin hide.

Temperature: 20°C

Solvent: 0.5 M citrate buffer (pH 3.6)

Fig. 2. Thermal denaturation of pepsin solubilized collagen (Dolphin hide) as shown by the viscometry. The measurement was carried out with a protein concentration of 0.02% in 0.01 M acetic acid (pH 3.6). $T_D \cdots 31^\circ\text{C}$ $T_S \cdots 59^\circ\text{C}$

跡しか認められなく、チロシンおよびトリプトファンが少なく、ヒドロキシリジンが存在している。ヒドロキシプロリンとプロリンが陸上動物のコラーゲンと比較して少ないが、他のヒドロキシアミノ酸、すなわちセリンおよびスレオニンの多いことは鯨および魚類のコラーゲンと良く似ている。おおむね全アミノ酸組成が鯨のそれと近似していることを示す意味で Table 2 に Tristram¹⁷⁾ による鯨皮コラーゲンの分析値を併記した。

固有粘度、熱収縮温度 (T_S) および変性温度 (T_D) 温度 20°C において PSC の 0.15 M クエン酸緩衝溶液の各種濃度と η_{sp}/c の関係は Fig. 1 に示すとおりである。この関係から濃度 0 における極限値すなわち固有粘度を求めれば $[\eta] = 15.2 \text{ dl/g}$ を得る。

さらに PSC の濃度 0.02% の 0.01 M 酢酸溶液 (pH 3.6) の各種温度における粘度測定から η_{sp}/c の変化を調べた結果は Fig. 2 に示すとおりである。

η_{sp}/c の曲線は 25°C まではほぼ一定であるが、次第に低下し、再び 35°C 以上で平衡値になる。そこで

η_{sp}/c の変化の半減する温度すなわち T_D は 31°C となる。ここで各温度における粘度の値はその温度での粘度変化がほとんど認められなくなるまで (2~3 時間) 放置した時の値である。

PSC 繊維自体の T_S は 59°C であった。 T_D および T_S はコラーゲンの熱変性特性であるが、 $T_S - T_D = 28^\circ\text{C}$ となり、西原の $T_S - T_D = 25 \sim 30^\circ\text{C}$ の説⁴⁾に合致する。イルカ皮の PSC は魚皮の可溶性コラーゲン (Soluble Collagen: SC) よりも牛皮の SC に近い値であるが、それらの中間値となつている。 $(T_S - T_D)$ の値はコラーゲン繊維の結晶エネルギーの尺度となろう。

ゲル電気泳動 精製された PSC 分子のデンプンゲル電気泳動図は Fig. 3 に示すとおりである。この場合 PSC は熱変性されており、その結果として PSC 分子は 5 成分に分かれていることを表わしている。

未変性 PSC 分子は後に示す超遠心沈降図からわかるように単一分子であつたものが、熱変性の結果として α , β および γ の 3 成分に分かれ、さらに α は α_1 と α_2 , β は $\beta_{12}(\alpha_1 + \alpha_2)$ と $\beta_{11}(\alpha_1 + \alpha_1)$ に細分されていると考えられる。これらの Sub-units の定量関係は染色ゲルの脱色がうまくゆかなかつたため求めることはできなかつた。Sub-units の量的関係は熱変性方法により変わるであろうが、Fig. 3 は PSC の構成を示す典型的な図形であるといえよう。本図から PSC は α_1 および α_2 が非常に多く、次に β_{12} と β_{11} となり、 γ は最も少なかつた。

超遠心分析 未変性 PSC および変性 PSC の超遠心沈降図は Plate 2 および 3 に示すとおりである。

Fig. 3. Starch gel electrophoretic pattern of the denatured pepsin solubilized collagen from the dolphin hide.

Plate 2. Sedimentation velocity pattern of the native pepsin solubilized collagen from dolphin hide. The photograph was taken 101 minutes after the speed of 59870 r.p.m. was reached. The measurement was carried out with a protein concentration of 0.13% in 0.15M citrate buffer (pH 3.6), at 21°C and phase plate angle 65° .

Plate 3. Sedimentation velocity pattern of the denatured pepsin solubilized collagen from dolphin hide. The photograph was taken 96 minutes after the speed of 59870 r.p.m. was reached. The measurement was carried out with a protein concentration of 0.8% in 0.15M citrate buffer plus 1.2M KCNS (pH 3.6), at 19°C and phase plate angle 65° . The boundaries, in order of increasing sedimentation rate (left to right), are designated α and β ; representing monomers and covalently linked dimers, respectively.

$$\alpha : \beta = 80 : 20$$

Table 3. Physicochemical properties of pepsin solubilized collagen from the dolphin hide.

	Native	Denatured
$S_{20,w}^0$	3.2	3.9 (α) 5.2 (β)
$[\eta]$	15.2 dl/g	
M_w	350,000	130,000 (α) 200,000 (β)

未変性状態では PSC 溶液は単一の鋭いピーク ($S_{20,w}^0 = 3.2$) を表わすが、変性状態では 2 つのピーク (α 成分 $S_{20,w}^0 = 3.9$ および β 成分 $S_{20,w}^0 = 5.2$) が認められた。しかし電気泳動で認められた γ 成分はその量が非常に少ないため超遠心図では認められなかった。そこで未変性の時は Scheraga-Mandelkern の式、また変性状態の時はゼラチンに対して求められている沈降定数 ($S_{20,w}^0$) と分子量との関係より各々について分子量を求めた結果は Table 3 に示す。

未変性の PSC の分子量は 350,000 であったものが、変性すると分子量 130,000 (α 成分) と 200,000 (β 成分) に分れたことになり、また未変性分子は γ 成分 (α 成分 + β 成分) に対応する分子量であることがわかる。

子牛皮の酸可溶性コラーゲンに対するペプシンの作用はコラーゲン分子の約 8% を切断するという知見から考えて、イルカ皮不溶性コラーゲンは約 380,000 の分子量を有する単位の集合体であろうと推定される。

要 約

イルカ皮真皮組織の繊維構造は牛皮のそれと同様な網状構造をなすことが電子顕微鏡写真より観察された。イルカ皮コラーゲンは大部分が不溶性であり、これを分子構造を破壊することなく精製した単離することは不可能に近いので、酸性でペプシンによりコラーゲン分子の末端を消化することにより可溶化し、さらに中性塩溶液に対して透析することによりコラーゲン繊維を再生させる操作を繰返して精製する方法をとった。この精製を 3 回繰返すことにより非常に純度の高いコラーゲン (PSC) を得た (Table 1)。この PSC のアミノ酸組成を分析し (Table 2)、鯨皮コラーゲンに類似した組成を持つが、ヒドロキシプロリン以外のヒドロキシアミノ酸の多い点で魚類の皮コラーゲンに近いことがわかる。PSC の粘度測定より、未変性 PSC の酸性溶液は高い粘度を有し、 $[\eta]$ は 15.2 dl/g であるが、25°C から 35°C の間で急激に粘度の低下することが認められた (Fig. 2)。 T_D は 31°C を示し、一方 T_S は 59°C であるから $T_S - T_D = 28$ (°C) の値を得た。

PSC の変性状態におけるデンプンゲル電気泳動実験から、PSC は α_1 , α_2 , β_{11} , β_{12} および γ の 5 成分の Sub-units に分かれることが認められた (Fig. 3)。

超遠心沈降分析より (Plate 2 および 3)、PSC の沈降定数 $S_{20,w}^0$ を測定し、分子量を算出したところ、未変性状態では $S_{20,w}^0 = 3.2$ 、分子量 = 350,000、変性状態では α 成分 $S_{20,w}^0 = 3.9$ 、分子量 = 130,000、 β 成分 $S_{20,w}^0 = 5.2$ 、分子量 200,000 であった。

本研究を行なうに当り電子顕微鏡写真の撮影に対しては東京工業大学教授木好右衛門博士に、超遠心分析に対しては東海区水産研究所技官神名孝一氏に多大のご高配を賜った。ここに深甚の謝意を表する次第である。また本研究費の一部は昭和 40 年度科学研究費 (各個) に仰いだことを付記する。

文 献

- 1) 久保田 稔・田島英男: 本誌 **33**, 217~222 (1967).
- 2) 鬼塚卓弥: 生化学, **32**, 13~19 (1960).
- 3) W. TROLL and J. LINDSLEY: *J. Biol. Chem.*, **215**, 655~660 (1955).
- 4) 西原富雄: 研究報告 (日本皮革株式会社研究所) 第 6 輯, 1~48, 昭和 36 年.
- 5) 久保田 稔・田島英男: 本誌, **30**, 1038~1042 (1964).
- 6) R. BELCHER, A.J. NUTTEN, and C.M. SAMBROOK: *Analyst.*, **79**, 201~208 (1954).
- 7) J. HOLLMER and E. KULONEN: *Acta. Chem. Scan.*, **18**, 1027~1028 (1964).

- 8) J. PIKKARAINEN and E. KULONEN: **ibid.** **18**, 2011~2012 (1964).
- 9) V. NÄNTÖ, J. MAATELA, and E. KULONEN: **ibid.** **17**, 1604~1608 (1963).
- 10) J. KOHN: *Clin. Chem. Acta*, **2**, 297~303 (1957).
- 11) E.W. BAUR: *J. Lab. Clin. Med.*, **61**, 166~173 (1963).
- 12) FLORKIN and H. S. MASON: in "Comparative Biochemistry", Vol. 5, 307~346, Academic Press, New York (1963).
- 13) 久保田 穰: 東京水産大学特別研究報告, **2**, 95 (1958).
- 14) T. NISHIHARA and T. MIYATA: Collagen Symposium (Japan), **3**, 66, 84 (1962).
- 15) F.O. SCHMITT, J. GROSS, and J.H. HIGHBERGER: "Symposium of the Society for Experimental Biology" Fibrous Proteins and their Biological Significance, 148 pp., University Press, Cambridge (1955).
- 16) J.H. BOWES and J.A. MOSS: *Biochem. J.*, **55**, 735~741 (1953).
- 17) G.R. TRISTRAM: in "The Proteins", Vol. 1A, 181, Academic Press, New York (1953).