鯨軟骨の中性塩可溶性コラーゲン

久保田 稔・内田直行・木村 茂

(1969 年 7 月 17 日受理)

Studies on Neutral Salt Soluble Collagen from Whale Nose Cartilage

Minoru KUBOTA, Naoyuki UCHIDA, and Shigeru KIMURA*

Neutral salt soluble collagen (NSC) was extracted from nose cartilage of sperm whale, *Physeter catodon*. The chemical composition and some of its physical properties were studied. Only 5% of total collagen was NSC. Acid soluble collagen (ASC) was not present in significant amounts. Purified NSC consisted approximately of 70% collagen, 25% non-collagenous protein, and 5% mucopolysaccharide, although the sedimentation pattern showed one sharp peak only ($S=2.4$, $\text{Conc.}=0.09\%$). The physical properties of NSC were similar to those of the ordinary collagens. The non-collagenous protein moiety of NSC was removed by pepsin treatment, but the mucopolysaccharide moiety was not. The thermal stability of pepsin-treated NSC (PT-NSC) was similar to that of the skin collagens from warm-water fishes, but distinct differences were found in chemical composition; particularly high contents of hydroxylysine (25.3 residues/1000), hexose (3.0% by weight), and glucuronic acid (2.2%) were found in PT-NSC. The heat-denatured NSC was separated into three components corresponding to α , β , and γ by acrylamide gel electrophoresis. The electrophoretic patterns of NSC and PT-NSC were very similar to each other and showed the presence of large amounts of α -components. From these results, it is inferred that the non-collagenous protein and mucopolysaccharide in NSC are linked to the collagen molecule.

近年、軟骨におけるコラーゲンはムコ多糖類やムコタンパクとなんらかの相互作用を持ち、軟骨組織の形成に重要な役割を演じているといわれている。そしてそれらの相互作用を明らかにするという観点からかなり多くの研究が行なわれている¹⁻⁴⁾。このように軟骨にとって重要な成分であるコラーゲンは軟骨組織から未変性状態で抽出することが困難なため、軟骨コラーゲン自体の研究はほとんど行なわれていない。著者らは水産動物コラーゲンの比較生化学的研究の一環として、哺乳動物である鯨のコラーゲンを検討中、その鼻軟骨中に中性塩可溶性コラーゲンの存在を認めたので、その精製を行なった。その結果、このコラーゲンはムコタンパクと結合していると思われる結論を得たので、ここに報告する。

実験方法

試料 -25°C の凍結室に保存した マッコウクジラ, *Physeter catodon* (体長 14.5 m, ♂) の鼻軟骨を室温にて解凍し、軟骨以外の夾雑物を除去した後、細切し十分に水洗した。

化学的分析法 タンパク量はマイクロケルダール法により窒素を定量して求めたが、ムコ多糖類を含む場合はヘキササミン由来の窒素を差し引いた窒素量を元に計算した。ヒドロキシプロリン (Hypro) およびチロシン (Tyr) は各々鬼塚の変法⁵⁾および Anson-萩原法⁶⁾で定量した。アミノ酸全分析は日立アミノ酸分析計 (KLA-3 B) により通常の方法で行なつた。グルクロン酸はカルバゾール硫酸法⁷⁾により定量したが、コラーゲン中のグルクロン酸量はコラーゲンによる阻害率 32.4% を補正して算出した。ヘキササミン、ヘキソースおよびペントースは各々 Belcher 法⁸⁾, Anthrone 法⁹⁾, および Orcine 法¹⁰⁾により定量した。ま

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

Fig. 1. Fractionation scheme of neutral soluble collagen (NSC), acid soluble collagen (ASC), and insoluble material (ISM) of whale nose cartilage. All operation was performed at 5°C.

ラーゲン (Acid soluble collagen: ASC), および残渣 (Insoluble matter: ISM) に含まれる不溶性コラーゲン (Insoluble collagen: ISC) の3区分に分画した。まず軟骨を庖丁で細断し, 5°C に冷却したブレンダーで 3~5 分間粉碎する。これに試料の2倍量の中性塩溶液 (0.45 M NaCl-0.02 M Na₂HPO₄) を加え, 5°C で7日間スターラーで攪拌抽出を行なうと, コンドロイチン硫酸が多量に溶出し, 粥状のどろどろした液となる。この粘稠な溶液を 40,000×g で2時間遠心分離し, その上清を粗 NSC とした。残渣は 0.5 M 酢酸で3日間抽出して同様に遠心分離し, 上清を粗 ASC, 沈澱物を ISM とした。

中性塩可溶性コラーゲンの精製 5°C に冷却した粗 NSC 溶液に終濃度 16% になるように NaCl を加えると, ムコ多糖類は沈澱しないが, コラーゲンは白い綿のような繊維状沈澱物となる。この状態で 12 時間冷蔵庫に入れ放置後, 40,000×g で2時間遠心し, コラーゲン繊維を集めた。この繊維を再び 0.45 M NaCl-0.02 M Na₂HPO₄ に完全に溶解させ, 40,000×g で2時間遠心分離後, 再び 16% NaCl でコラーゲンを沈澱させ, 3,000×g で 15 分間遠心し沈澱物を集めた。この沈澱と溶解の操作を5回繰返し, コラーゲンの精製を行なつた。

Table 1. Chemical composition of whale nose cartilage.

Component	% of defatted dry weight
Protein	(58.1)
Collagen	39.6
Non-collagenous protein	18.5
Carbohydrate	(38.7)
Hexosamine	16.5
Glucuronic acid	18.0
Hexose	2.8
Pentose	1.4
Ash	(2.1)
Calcinm	1.0
Other materials	1.1

たカルシウムと全灰分は重量法により求めた。

物理的分析法 コラーゲン溶液の比旋光度 $[\alpha]_D$ は Lippich 旋光計により, また固有粘度 $[\eta]$ は Ostward-Fenske 粘度計により測定した。変性温度 (T_D) は各温度に 30 分間放置後の比粘度を求め, その値が半減した時の温度として求めた。電気泳動はミツミ科学製のディスク電気泳動装置を用い, 7.5% ポリアクリルアミドゲルにより永井らの方法⁽¹⁾に従って行なつた。これらの測定に用いた溶媒はいずれも 0.1 M 酢酸である。超遠心分析は 0.45 M NaCl-0.02 M Na₂HPO₄ を溶媒に用い, 日立分析用超遠心機 (UCA-1) で回転数 60,000 r. p. m., 温度 17°C で行なつた。

軟骨コラーゲンの分画 軟骨中のコラーゲンを Fig. 1 に示すごとく, 中性塩可溶性コラーゲン (Neutral salt soluble collagen: NSC), 酸可溶性コ

実験結果

鯨鼻軟骨の化学組成 エーテルおよびアセトンで脱脂脱水した軟骨粉末の化学組成は Table 1 に示すごとく, 硬骨とはかなり異なりその主成分はコラーゲンとムコ多糖類である。タンパクは全体の約 60% をしめ, 残りの 40% は先に報告したようにほとんどコンドロイチン硫酸 A⁽²⁾ を主成分とするムコ多糖類である。コラーゲン含有量は全体の約 40% 近く, 全タンパクの 70% をしめている。しかし灰分は約 2% 程度で硬骨に比較して非常に少なかった。

溶解性による軟骨の分画とその化学組成 一般に軟骨コラーゲンは高度に不溶化しており, 温和な条件下で溶解するコラーゲン量は僅かである。Fig.

Table 2. Distribution of total N, hydroxyproline, tyrosine, and hexosamine in each fraction of defatted whole cartilage.

Fraction	Total N (%)	Hydroxy- proline (%)	Tyrosine (%)	Hexosamine (%)
Defatted whole cartilage	100	100	100	100
Crude NSC	15.3	4.6	26.0	18.8
Crude ASC	0.5	0.02	1.0	0.5
ISM	84.0	95.4	73.0	80.7

1のごとく軟骨コラーゲンを粗 NSC, 粗 ASC および ISM に大別した時の各区分について, 特徴的な 2, 3 の成分の収量を Table 2 に示した。各区分中のコラーゲン量はコラーゲンに特有のアミノ酸である Hypro の含有量から, またコラーゲン以外のタンパク質量は純粋なコラーゲンに僅か 1% 以下しか含まれていない Tyr の含有量から推定した。さらに軟骨中にかなり多量に含まれる多糖類はヘキシサミンの含有量から推定した。この表から明らかなごとく, 軟骨コラーゲンの約 95% は不溶性であり, 可溶性のものは少なく, 特に酸可溶性のものはほとんど存在しなかつた。全コラーゲンの約 5% をしめる粗 NSC 区分は Hypro に比べて全窒素, Tyr およびヘキシサミンが多く, このことはコラーゲンよりも非コラーゲン性タンパク質やムコ多糖類に富んでいることを表している。粗 ASC 区分はいずれの成分も含有量が低く, 鼻軟骨中の弱酸可溶性物質は非常に少ないといえる。残渣の ISM は軟骨の約 80% をしめ, また組成的にも未処理の軟骨と大差ないが, 溶出による非コラーゲン性タンパク質含量の低下が認められた。

不溶性コラーゲンのペプシンによる溶解 以上のごとく, 鼻軟骨中のコラーゲンはほとんどが不溶性であるので, 次の 3 つの方法でペプシンによる可溶化を試みたが, いずれの場合にもほとんど溶解しなかつた。すなわち基質としての軟骨(乾量)に対し i) 1% ペプシンを用い, 0.1 M 酢酸中で 23°C, 3 日間処理, ii) 0.5 M 酢酸で 1 カ月間脱灰後, i) と同じ方法で処理, iii) 水中で 85°C, 5 日間熱変性後, i) と同じ方法で処理を行なつた。なお軟骨を水中で 100°C, 30 分間加熱しても微量のゼラチンしか得られなかつた。

中性塩可溶性コラーゲンの精製と化学組成 粗 NSC を 16% NaCl による沈澱と 0.45 M NaCl-0.02 M Na_2HPO_4 による溶解を 5 回繰返して得た精製 NSC の Hypro, Tyr および糖類の含有量を Table 3 に示した。この精製過程で遊離のムコ多糖類は完全に除去され, 精製 NSC は粗 NSC に比較して Hypro に富み, Tyr およびヘキシサミンは非常に減少し, コラーゲンとして高度に精製されたことがわかる。しかし一般の脊椎動物コラーゲンより Hypro 含有量は低く, Tyr および糖類の含有量が高い傾向が認められた。このことは精製 NSC にも少量の非コラーゲン性タンパクやムコ多糖類の含まれている可能性を示している。そこでさらに非コラーゲン性物質を除去するためにペプシン処理を行なつた。ペプシン処理によるコラーゲン分子の変化については詳細な報告があり, ペプシン処理により分子の末端部分(分子全体の数%)が消化されるが, アミノ酸組成および分子形にほとんど変化のないことが知られている^{13,14)}。ペプシン処理 NSC (PT-NSC) は Table 3 に示したごとく, Hypro 含有量が 10.9% に増加し, 逆に Tyr が 0.6% に減少

Table 3. Contents of hydroxyproline, tyrosine, hexosamine, hexose and glucuronic acid in neutral salt soluble collagen (NSC) and pepsin-treated NSC (PT-NSC).

Fraction	Hydroxy- proline (%)	Tyrosine (%)	Hexosamine (%)	Hexose (%)	Glucuronic acid (%)
Crude NSC	2.0	6.3	30.4	—	—
NSC	7.3	1.2	1.2	2.9	2.1
PT-NSC	10.9	0.6	1.3	3.0	2.2

Table 4. Amino acid composition of PT-NSC.

Amino acid	Residues/100
3-Hydroxyproline	0
4-Hydroxyproline	86.5
Aspartic acid	40.6
Threonine	19.7
Serine	7.7
Glutamic acid	91.0
Proline	136
Glycine	332
Alanine	102
Cystine/2	0
Valine	22.4
Methionine	0.2
Isoleucine	10.4
Leucine	35.5
Tyrosine	1.2
Phenylalanine	15.7
Lysine	19.2
Hydroxylysine	25.3
Histidine	4.6
Arginine	50.5
Amide N	(102)

Table 5. Some physical properties of NSC and PT-NSC.

Property	NSC	PT-NSC
$[\eta]$ (dl/g)	12.0	13.3
$[\alpha]_D$	-406	-439
T_d (°C)	29.0	30.2

し、非コラーゲン性タンパク質が除去され、いわゆる典型的なコラーゲン分子の性質を示している。しかしこのペプシン処理によっても糖類の量は変化なく、コラーゲン分子と結合していることが考えられる。PT-NSC の Hypro の分析値から推定できる NSC 中のコラーゲン量は約 70% である。さらにグルクロン酸は軟骨中に多量に含まれるコンドロイチン硫酸由来のものと考えられるので、NSC 中のムコ多糖類は約 5% となる。それゆえ残りの約 25% は非コラーゲン性タンパクから成っているといえる。

このように精製された PT-NSC のアミノ酸組成を Table 4 に示した。全体的にはいわゆるコラーゲンのアミノ酸組成の特徴をそなえているが、2, 3 の点で脊椎動物の皮コラーゲンと異なっていた。最も顕著な点はヒドロキシリジン (Hyls) およびアミド態窒素の含有量が 3 倍程度高いことである。特に

Lys に対する Hyls の比は 1.3 で脊椎動物の 0.23¹⁵⁾ に比較して非常に大きく、Lys の水酸化が著しく進んでいることが認められた。これらの特徴は無脊椎動物コラーゲン^{16,17)}や脊椎動物でも皮以外の水晶体や歯のコラーゲン¹⁵⁾と良く類似している。

中性塩可溶性コラーゲンの物理的性質 NSC および PT-NSC の物理的性質は Table 5 に示した。

Fig. 2. Sedimentation pattern of NSC from whale nose cartilage in 0.45 M NaCl-0.02 M Na₂HPO₄.

The protein concentration was 0.09%.

The photograph was taken at 96 min. after the speed of 60,000 r. p. m. was reached.

Fig. 3. Disc electrophoretic patterns of NSC and PT-NSC in denatured state.

Denatured collagen (40°C, 15 min.) was separated by 7.5% polyacrylamide gel at pH 4.0.

A current of 4 m. Amp. per tube was applied for 100 min.

[η] や [α]_D はともに他のコラーゲンと大差なく、 T_D は 29~30°C で陸上の哺乳動物の皮コラーゲンよりもやや低く、暖海性魚類¹⁸⁾の皮コラーゲンに相当している。NSC には約 30% の非コラーゲン性物質が含まれているが、Fig. に示すごとく超遠心図形は単一の sharp peak ($S = 2.4$, Conc = 0.09%) を示し、濃度 0.14% でも他成分は認められず、NSC は超遠心的に単一であるといえる。この点からも NSC 中のコラーゲン、非コラーゲン性タンパク、およびムコ多糖類は何らかの結合をしているものと思われる。

次に NSC の Subunits を調べる目的で、変性した後 (40°C, 30 分加熱) の NSC を Acrylamide gel 電気泳動により分画した。その結果は Fig. 3 に示すごとく、主成分は α 成分で、 β および γ 成分も多少存在していた。PT-NSC の電気泳動図も NSC¹¹⁾ の場合と大差なく、主成分は α 成分であり、他の動物の NSC とも良く一致していた。

考 察

鯨鼻軟骨 NSC はコラーゲン以外に非コラーゲン性タンパク (約 25%) とムコ多糖類 (約 5%) を含んでいる。粗 NSC の精製過程でこれらの非コラーゲン性成分が除去できなかつたとも考えられるので、予備実験として市販のコンドロイチン硫酸や鯨鼻軟骨から調製したコンドロムコタンパクの 1% 中性塩溶液について、同じ方法で溶解と沈澱を繰返すと、これら 2 つの成分はほとんど除かれてしまった。さらに超遠心的に単一であること、および NSC のペプシン処理により非コラーゲン性タンパク消化されて除去されるが、ムコ多糖類はほとんど変化がないということからも、これら非コラーゲン性成分は夾雑物として存在しているのではなく、相互に結合して存在しているものと思われる。

これら非コラーゲン性成分がどのような様式または順序で結合しているかは明らかでない。しかし i) コラーゲン分子中のヘキシースは Hylys の水酸基と O-グリコシド結合により結合している¹⁹⁾。ii) 鯨鼻軟骨コラーゲンにはかなり多量の Hylys とヘキシースを含む。iii) 鯨鼻軟骨コラーゲン (NSC) はペプシン処理により非コラーゲン性タンパクは消化されるが、糖類含有量にはほとんど変化がない。iv) 軟骨中にはムコ多糖類と非コラーゲン性タンパクの複合体が存在している²⁰⁾。等々の事実を考え合せると、「コラーゲン分子中の Hylys—ヘキシース—ムコ多糖類—非コラーゲン性タンパク」の結合様式の存在する可能性がある。鯨鼻軟骨中のコラーゲンのすくなくとも一部はこのような形で存在し、軟骨特有な組織の形成に重要な役割をしているものと思える。

本研究を行なうにあたり、超遠心分析に際し御援助いただいた東海区水産研究所の神名孝一氏、ならびにアミノ酸分析に御援助いただいた東京工業試験所第七部の豊田春和博士ならびに二見明氏に感謝いたします。

文 献

- 1) B. R. GERBER, E. C. FRANKLIN, and M. SCHBERT: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2870~2875 (1960).
- 2) R. D. CAMPO and D. O. DZIEMIATKOWSKI: *J. Biol. Chem.*, **237**, 2729~2735 (1962).
- 3) J. H. FESSLER: *Biochem. J.*, **76**, 124~132 (1960).
- 4) M. B. MATHEWS: *Biochem. J.*, **96**, 710~716 (1965).
- 5) 鬼塚卓弥: 生化学, **32**, 13~19 (1960).
- 6) 赤堀四郎編: 酵素研究法第 2 巻, 238 (1936). 朝倉書店.
- 7) T. BITTER and H. M. MUIR: *Anal. Biochem.*, **4**, 330~334 (1962).
- 8) R. BELCHER, A. J. NUTTEN, and C. M. SAMBROOK: *Analyst.*, **79**, 201~208 (1954).
- 9) R. JOHANSON: *Anal. Chem.*, **26**, 1331~1333 (1954).
- 10) W. Z. MEJBAUM: *Physiol. Chem.*, **258**, 117~121 (1939).
- 11) Y. NAGAI, J. GROSS, and K. A. PIEZ: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 494~500 (1964).
- 12) 久保田 稯・丸茂 高: 東京水産大学研究報告, **54**, 11~20 (1967).
- 13) T. NISHIHARA and T. MIYATA: *Collagen Symposium (Japan)*, **3**, 84~93 (1962).
- 14) A. L. RUBIN, M. P. DRAKE, P. F. DAVISON, P. T. SPEAKMAN, and F. O. SCHMITT: *Biochemistry*, **4**, 181~190 (1965).

- 15) J. GROSS: in "Comparative Biochemistry" (M. Florkin and H. S. Mason, ed.) Vol. 5, 307~346, Academic Press, New York (1963).
- 16) K. A. PIEZ and J. GROSS: *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 24~39 (1959).
- 17) S. KIMURA, Y. NAGAOKA, and M. KUBOTA: This Bull., **35**, 743~748 (1969).
- 18) A. J. BAILEY: in "Comprehensive Biochemistry" (M. Florkin and E. H. Stotz, ed.) Vol. 26, part B, 333, Elsevier Publishing Co. (1968).
- 19) W. T. BATLER and L. W. CUNNINGHAM: *J. Biol. Chem.*, **241**, 3882~3888 (1966).
- 20) J. SHATTON and M. SCHUBERT: *J. Biol. Chem.*, **211**, 565~573 (1954).