カツオの筋肉および真皮 I 型コラーゲンの熱安定性とサブユニット組成

朱 曉 萍, 木 村 茂

(1990 年 10 月 12 日受付)

Thermal Stability and Subunit Composition of Muscle and Skin Type I Collagens from Skipjack

Xiao-Ping Zhu* and Shigeru Kimura*

Skipjack *Euthynnus pelamis* is one of the species of warm-blooded fishes and its true dark muscle is often 10°C warmer than the surrounding water. In this study, we have isolated soluble Type I collagens from the true dark muscle, ordinary muscle, and skin of skipjack in order to make a comparison on their thermal stability and subunit composition.

The denaturation temperature of dark muscle collagen, 33.0°C, was found to be higher than those of ordinary muscle and skin collagens by 0.2°C and 2.0°C, respectively. This was explained by the high degree of proline hydroxylation, that is, the high content of hydroxyproline in the dark muscle collagen, when compared to the other two collagens. On the other hand, the chromatographic and electrophoretic analyses of these collagens showed a tissue-specific existence of two molecular forms; an $(\alpha 1)_2\alpha 2$ heterotrimer for dark and ordinary muscles and an $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ heterotrimer for skin.

魚類は一般に、体温が生息水温とほぼ等しい変温動物である。しかし、高速で泳ぐマグロ、カツオ、アオザメなどにとって、体温を比較的高く保つことは筋力を増大し維持するのに極めて重要である。このため、これらの魚は奇網 (*rete mirabile*) と呼ばれる巧妙な血液循環機構をもち、代謝熱の損失を防いで体温を保持している。カツオなどの場合、真正血合肉の筋温は遊泳層の水温より、10°C 以上も高い例が知られている。^{1,2)}

ところで、魚類 I 型コラーゲンの熱安定性は魚の生息可能な上限温度と密接に関係し、³⁾ 暖海性の魚は寒海性の魚に比べ、コラーゲンの熱安定性とヒドロキシプロリン含量が明らかに高い。⁴⁾ 著者らは最近、5 種の魚について、普通肉の筋隔膜からコラーゲンを単離して諸性状を調べた。その結果、普通肉 I 型コラーゲンは同一魚体の真皮 I 型コラーゲンより、熱変性温度が 1°C ほど高く、ヒドロキシプロリン含量も高いことを認めた。⁵⁾ すなわち、魚体内部に分布する筋肉は体表を被う真皮に比べ、若干高い体温を維持しており、それゆえ、コラーゲンも熱安定性に富むのであろう。さらに、サケは他の魚種と相違し、筋肉と真皮の I 型コラーゲンが異なるサブユニット組成をもつことも判明した。

本研究では奇網によって筋温をかなり高く保っているカツオ *Euthynnus pelamis* を試料とし、真正血合肉および普通肉の I 型コラーゲンを単離して熱安定性とサブユニット組成を調べ、真皮 I 型コラーゲンとの比較を行った。その結果、真正血合肉のコラーゲンが最も熱安定性に富むこと、および筋肉と真皮のコラーゲンは互にサブユニット組成を異にすることが明らかになった。

実験方法

I 型コラーゲンの調製 カツオの真正血合肉と普通肉 (各 200 g) を細切し、10 倍量の冷 0.6 M KCl 中でホモジナイズした後、主に筋隔膜からなる I 型コラーゲン線維をピンセットあるいはガラス棒で直ちに集めた。このコラーゲン線維をカミソリでしごいて付着する筋肉タンパク質、色素などをていねいに除去し、新たな 0.6 M KCl で十分に洗浄した。次に既報の方法⁶⁾に準じて、コラーゲン線維から 0.5 M 酢酸で抽出される可溶性コラーゲンを NaCl による分別沈殿に付し、I 型コラーゲンを単離した。同時に、真皮の I 型コラーゲンも常法に準じて調製した。⁶⁾ 以下では、可溶性 I 型コラーゲンを単にコラーゲンと呼ぶ。

* 東京水産大学食品生産学科食品生化学研究室 (Laboratory of Food Biochemistry, Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan).

略語: CM-, carboxymethyl-; SDS, sodium dodecyl sulfate.

コラーゲン溶液の熱変性曲線の測定 凍結乾燥したコラーゲン標品を 4~6°C の低温室内で、濃度 0.03% となるように 0.1 M 酢酸に溶解した。その 5 ml を Cannon-Fenske 型毛細管粘度計に入れ、恒温水槽で温度を制御しながら粘度を測定し、コラーゲン分子の熱変性過程を調べた。熱変性曲線は次の 2 つの方法で測定した。

1. 8~45°C の間で 10 点の測定温度を設定し、試料の入った粘度計を低温側から各設定温度に 30 分間保持した後、粘度測定を行った。こうして得られる熱変性曲線の変曲点の温度を、コラーゲンの熱変性温度とした。
2. 最初に 20°C で試料の粘度を測定した後、瞬時に水温を 33.0°C にあげてコラーゲンを部分的に熱変性させ、その後は経時的に粘度測定を行った。

ペプチドマップの作成 コラーゲン 200 μ g を 100 μ l の 0.5% SDS-0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、60°C で 10 分間の熱変性を行った。これに *Achromobacter lyticus* の産生するリシルエンドペプチダーゼ (和光純薬製, E.C. 3.4.21.50) 5 μ g を含む同緩衝液 10 μ l を加え、30°C で 10 分間の限定分解に付した。反応終了後、分解液に 2% の SDS を加えて 3 分間煮沸し、酵素を失活させた。こうして得たコラーゲンのペプ

チド断片を SDS-10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、ペプチドマップを作成した。

その他の分析法 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動, CM-セルロースカラムクロマトグラフィー及びアミノ酸組成分析は既報の方法に準じて行った。⁶⁾

実験結果

コラーゲンの電気泳動的性質とアミノ酸組成 カツオの真正血合肉、普通肉および真皮から調製したコラーゲン標品を純度検定のため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析を行った。Fig. 1 に示すごとく、各組織のコラーゲンは互に極めてよく類似した泳動図を示し、基本のサブユニットである $\alpha 1$ と $\alpha 2$ に相当する 2 種の α 鎖の存在が認められた。さらに、これらのコラーゲンは α 鎖の二量体である β 鎖などの架橋成分に富み、メタクロマジーを示さない非コラーゲン性タンパク質は全く検出されなかった。

すでに報告したように、^{7,8)} 多くの硬骨魚類コラーゲンに存在するユニークな $\alpha 3$ は本泳動条件下で $\alpha 1$ と同じ移動度を有し、その存在を泳動図から確認することは出来ない。そこで、リシルエンドペプチダーゼでコラーゲンを限定分解し、得られるペプチド断片を SDS-ポリ

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of skipjack Type I collagens and their peptide fragments obtained by digestion with lysyl endopeptidase. Collagens were resolved by 3.5% gel electrophoresis in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.1% SDS and 3.5 M urea. Lysyl endopeptidase digests of collagens were resolved by 10% gel electrophoresis in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.1% SDS. True dark muscle collagen is characterized by the occurrence of a peptide fragment (▲) having an electrophoretic mobility different from that of the counterpart in skin collagen. 1: True dark muscle, 2: Ordinary muscle, 3: Skin, 4: Skin, 5: True dark muscle.

Table 1. Amino acid composition and denaturation temperature of skipjack Type I collagens

	True dark muscle	Ordinary muscle	Skin
	(residues/1000)		
Hydroxyproline	82	80	76
Aspartic acid	42	43	43
Threonine	31	31	29
Serine	34	33	35
Glutamic acid	75	75	74
Proline	100	102	107
Glycine	339	337	338
Alanine	128	126	122
Valine	17	18	21
Methionine	14	15	15
Isoleucine	10	11	11
Leucine	24	23	23
Tyrosine	3	3	3
Phenylalanine	13	14	13
Hydroxylysine	9	7	6
Lysine	23	26	27
Histidine	5	6	5
(NH ₂)	(60)	(67)	(48)
Arginine	51	52	52
Totals	1000	1000	1000
Degree of hydroxylation (%)			
Proline	45.1	44.0	41.5
Lysine	28.1	21.2	18.2
Denaturation temperature (°C)	33.0	32.8	31.0

アクリルアミドゲル電気泳動で分離してペプチドマップを作成した。Fig. 1の右側の写真は血合肉と真皮を比較したもので、◀印付近のペプチドの移動度に若干の相違が認められ、サブユニットの一次構造は必ずしも同一でないことが推定された。なお、結果は図示しないが、血合肉と普通肉のコラーゲンは同一のペプチドマップを示し、共通のサブユニットをもつことが判明した。

そこで次に、各コラーゲン標品のアミノ酸組成分析を行った。全体的にみると、筋肉と真皮のコラーゲンはよく類似し、全プロリン（プロリン+ヒドロキシプロリン）及び全リシン（リシン+ヒドロキシリシン）の含量もほぼ等しい（Table 1）。殊に、血合肉と普通肉ではプロリンとリシンの水酸化率にみられる若干の差異を除けば、両筋肉コラーゲンはほぼ同一の組成値をもつといえよう。一方、真皮コラーゲンは筋肉コラーゲンに比べて、プロリンとリシンの水酸化率がわずかに低いばかりでなく、アラニンとバリンの含量にも差異が認められた。前述したペプチドマップの結果と考え合わせると、筋肉と真皮のコラーゲンはサブユニットの一次構造に微妙な相違のあることが判明した。

Fig. 2. Thermal denaturation curves of skipjack Type I collagens as measured by viscosity in 0.1 M acetic acid. The 0.03% solution of collagen was first incubated at 8°C for 30 min and its viscosity was measured by a Cannon-Fenske type viscometer. Then, the viscosity of collagen solution was measured at each temperature shown in this figure and finally at 45°C. The incubation time at each temperature was 30 min. ○: True dark muscle, □: Skin,

Fractional change:

$$\frac{(\eta_{sp}/C)_{t=8^{\circ}\text{C}} - (\eta_{sp}/C)_{t=45^{\circ}\text{C}}}{(\eta_{sp}/C)_{t=8^{\circ}\text{C}} - (\eta_{sp}/C)_{t=45^{\circ}\text{C}}}$$

Fig. 3. Thermal denaturation curves of skipjack Type I collagens as measured by viscosity in 0.1 M acetic acid. The 0.03% solution of collagen was first incubated at 20°C for 30 min and its viscosity was measured. Then, the temperature was raised to 33.0°C as soon as possible and the viscosity of the collagen solution was measured as a function of time elapsed. ○: True dark muscle, △: Ordinary muscle, □: Skin, Fractional change: $(\eta_{sp}/C)_{t=33^{\circ}\text{C}}/(\eta_{sp}/C)_{t=20^{\circ}\text{C}}$.

Fig. 4. CM-cellulose chromatography of Type I collagen from the true dark muscle of skipjack. Fifty mg of the collagen was dissolved in 12 ml of 0.06 M sodium acetate buffer (pH 4.8), denatured at 40°C for 10 min, and then applied to a column (1.5×10 cm) of CM-cellulose. Elution was achieved at 37°C with a linear gradient of 0–0.1 M NaCl over a total volume of 200 ml at a flow rate of 200 ml/h. Several fractions, as indicated by the numbers, were examined by SDS-3.5% polyacrylamide gel electrophoresis.

コラーゲンの熱安定性 Fig. 2 は血合肉と真皮のコラーゲン溶液を低温側から徐々に加熱し、ヘリックス構造の崩壊を粘度変化から追ったものである。血合肉コラーゲンは真皮コラーゲンに比べ、明らかに熱安定性に富んでいる。すなわち、血合肉コラーゲンの粘度が半減する時の温度（熱変性温度）は 33.0°C であり、この温度で、真皮コラーゲンの粘度低下はほぼ完了している。真皮コラーゲンの熱変性温度は 31.0°C で、血合肉コラーゲンの値より 2°C も低いことが特徴的であった。

ところで、普通肉コラーゲンは血合肉コラーゲンとよく似た熱変性曲線を示すが、その熱変性温度はわずかに 0.2°C ほど低かった（結果は複雑になるので、Fig. 2 には示さない）。この事実を確認するため、20°C に保った粘度計にコラーゲン溶液を入れて平衡化した後、血合肉コラーゲンの熱変性温度である 33.0°C に水温を瞬時にあげ、直ちに粘度低下を経時的に測定した。Fig. 3 に示すごとく、コラーゲンの粘度低下は血合肉が最も遅く、

真皮が最も速い。問題の普通肉コラーゲンは血合肉コラーゲンと似た粘度低下を示すが、その速度は普通肉コラーゲンの方が明らかに速い。すなわち、普通肉コラーゲンは血合肉コラーゲンに比べ、わずかに熱安定性の劣ることが確認された。

コラーゲンのサブユニット組成 コラーゲン溶液を 40°C で 10 分ほど熱変性させた後、37°C で CM-セルロースカラムクロマトグラフィーに付すと、サブユニットを分離することが出来る。^{5,7)} Fig. 4 は血合肉コラーゲンの溶出図で、図中の数字で示した各フラクションを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果も併せて示してある。溶出位置から推定すると、フラクション 1 と 9 の α 鎖は各々 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 、そしてフラクション 3 と 7 の β 鎖は各々 β_{11} ($\alpha 1$ の二量体) と β_{12} ($\alpha 1$ と $\alpha 2$ の二量体) であった。それゆえ、血合肉コラーゲンは 2 本の $\alpha 1$ と 1 本の $\alpha 2$ からなる $(\alpha 1)_2\alpha 2$ ヘテロ分子であることが判明した。なお、結果は図示しないが、

Fig. 5. CM-cellulose chromatography of Type I collagen from the skin of skipjack. Chromatographic conditions were the same as described in the legend to Fig. 4. Several fractions, as indicated by the numbers, were examined by SDS-3.5% polyacrylamide gel electrophoresis.

普通肉コラーゲンも血合肉コラーゲンと極めてよく似た溶出図を示し、 $(\alpha 1)_2\alpha 2$ ヘテロ分子として存在していた。

一方、真皮コラーゲンは筋肉コラーゲンと異なり、 $\alpha 1$ の直後に第3の α 鎖の存在することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析によって明らかになった。この $\alpha 3$ はFig. 5に示すごとく、フラクション3を中心に溶出している。 $\alpha 3$ と同時に溶出する β 鎖は溶出位置から推定すると、 β_{13} ($\alpha 1$ と $\alpha 3$ の二量体)といえよう。また、フラクション7と8の β 鎖は β_{12} と β_{23} が重なって溶出したと考えられる。これらの結果、真皮コラーゲンは3本の異種 α 鎖からなる $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ ヘテロ分子と推定された。

考 察

魚類のI型コラーゲンは魚種のみならず組織によっても、熱安定性やサブユニット組成を異にする例が報告されている。^{5,7-10)} 筋肉コラーゲンの熱安定性についてみると、コイ、マサバ、サケ、ウナギおよびサンマの普通肉は同一魚種の真皮に比べ、コラーゲンの熱変性温度がい

ずれも 1°C ほど高い。本研究で調べたカツオの場合、普通肉と真皮のコラーゲンを比べると、熱変性温度の差は 1.8°C もあり、上記の 1°C に比べてかなり大きい。さらに、魚体中央部に分布し、筋温の最も高い真正血合肉は真皮に比べ、コラーゲンの熱変性温度が 2.0°C も高いことが判明した。そこで、コラーゲンの熱安定性に寄与するヒドロキシプロリンの含量をプロリン水酸化率の面からみると、熱変性温度の高いコラーゲンはプロリン水酸化率も高い (Table 1)。すなわち、奇網によって筋温を高く維持しているカツオの筋肉コラーゲンはプロリンの水酸化率を高めてヒドロキシプロリンを増し、高い筋温に耐えうる熱安定性を獲得したといえよう。

筋肉コラーゲンのサブユニット組成は魚種によって異なるが、 $(\alpha 1)_2\alpha 2$ または $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ のいずれかである。^{5,8)} カツオの場合、血合肉と普通肉のコラーゲンは共に $\alpha 3$ を欠き、 $(\alpha 1)_2\alpha 2$ ヘテロ分子として存在していた。この結果は、同じサバ科に属するマサバの普通肉コラーゲンが $\alpha 3$ を含む $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ ヘテロ分子と考えられているのとは対照的である。⁵⁾ ところで、ある種の魚ではコラーゲン

のサブユニット組成が組織特異性を示すことも知られている。コイ, マサバ, ウナギ, サンマおよびアユは筋肉と真皮のコラーゲンが同じサブユニット組成を有する。^{5,8)}これに反して, サケのコラーゲンは筋肉の $(\alpha 1)_2\alpha 2$ に対し, 真皮では $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ であった。⁶⁾ カツオはサブユニット組成の組織特異性からみるとサケと一致し, 真皮コラーゲンのみに $\alpha 3$ を含む。現在のところ, カツオ真皮コラーゲンは $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ ヘテロ分子と推定されるが, その詳細は不明である。今後, 各 α 鎖を単離し, サブユニット組成を確認したい。

魚類血合肉のコラーゲンに関しては, これまでにほとんど研究例をみない。本研究の結果, カツオの血合肉コラーゲンは普通肉コラーゲンと同一の $(\alpha 1)_2\alpha 2$ ヘテロ分子からなるが, 両者の間にはプロリンとリシンの水酸化率に若干の相違が認められた。前述したごとく, 血合肉コラーゲンの熱安定性の向上にプロリン水酸化, すなわち, ヒドロキシプロリンの増加が寄与していることは, コラーゲンヘリックスの熱安定性とヒドロキシプロリンの関係を論じた多くの研究^{11,12)}から想像に難くない。一方, リシンの水酸化, すなわち, ヒドロキシリシンの増加がコラーゲン分子にどのような影響を与えているのかは不明である。しかし, プロリン水酸化率と同じく, 熱安定性の高いコラーゲンはどリシン水酸化率も高いことは確かである (Table 1)。ヒドロキシリシンの水酸基もサブユニット間に水素結合を形成し, ヘリックス構造の安定化に関与しているのかも知れない。ユニークなアミノ酸であるヒドロキシリシンの役割に関しては今後の検討が必要である。

文 献

- 1) F. G. Carey, J. M. Teal, J. W. Kanwisher, K. D. Lawson, and J. S. Beckett: *Amer. Zool.*, **11**, 137-145 (1971).
- 2) A. E. Dizon and R. W. Brill: *Amer. Zool.*, **19**, 249-265 (1979).
- 3) B. J. Rigby: *Nature*, **219**, 166-167 (1968).
- 4) 高橋豊雄, 横山和吉: 日水誌, **20**, 525-529 (1954).
- 5) S. Kimura, X.-P. Zhu, R. Matsui, M. Shijoh, and S. Takamizawa: *J. Food Sci.*, **53**, 1315-1318 (1988).
- 6) S. Kimura, Y. Takema, and M. Kubota: *J. Biol. Chem.*, **256**, 13230-13234 (1981).
- 7) S. Kimura, Y. Ohno, Y. Miyauchi, and N. Uchida: *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B**, 27-34 (1987).
- 8) 松井理佐子, 山内 肇, 菅沼宏重, 石田真巳, 木村 茂: 日水誌, **55**, 1421-1426 (1989).
- 9) S. Kimura and Y. Ohno: *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B**, 409-413 (1987).
- 10) 宮内芳朗, 木村 茂: 日水誌, **56**, 1509-1514 (1990).
- 11) S. Jimenez, M. Harsch, and J. Rosenbloom: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 106-114 (1973).
- 12) R. A. Berg and D. J. Prockop: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 115-120 (1973).