

鯨コラーゲンの組織の違いによる比較研究

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
巻/号	3612
掲載ページ	p. 1242-1245
発行年月	1970年12月

鯨コラーゲンの組織の違いによる比較研究

久保田 穰・内田直行・木村 茂

(1970年7月8日受理)

Comparison of Collagens from Different Tissues of Sperm Whale

Minoru KUBOTA*, Naoyuki UCHIDA*, and Shigeru KIMURA*

In a previous paper, it was reported that pepsin-treated neutral salt soluble collagen, obtained from the nose cartilage of sperm whale, exhibits some unusual properties, particularly the high contents of hydroxylysine and amide nitrogen and the existence of glucuronic acid. In order to investigate whether its unusual properties are characteristic of sperm whale collagen or not, some collagens were isolated from other tissues of the sperm whale, such as hide, brain-oil bag, and intermuscular connective tissue (tendinous septa) and characterized with respects to chemical composition and some physical properties. As the major parts of these collagens are insoluble in neutral salt and dilute acid, soluble collagen was obtained by pepsin treatment.

The intrinsic viscosity of these collagens lies in the range of 18 and 20 dl/g and the specific optical rotation in the range of -390° and -434° . Furthermore, the values of denaturation temperature lie in the range of 31.7 and 33.8°C, which are comparable to that of warm-water fish. The amino acid composition and content of carbohydrates in these collagens are very similar to each other and are also comparable to those of vertebrate collagen. These results suggest that there is no substantial difference among collagens obtained from these three different tissues. However, the contents of hydroxylysine, amide nitrogen, and carbohydrates from these collagens were considerably lower than those of nose cartilage collagen and glucuronic acid could not be found in any of the collagens reported here. The difference in the chemical composition of the collagens obtained from different tissues of a single species is considered due to the particular function of each tissue.

コラーゲンは動物体内に幅広く分布している主要な硬タンパクで、一般に動物の種類によつてコラーゲンの性質、特に耐熱性はかなり異なるが、その原因は主にその動物の生活環境に由来すると考えられている¹⁾。他方、同一の動物体内においても、コラーゲンの形態と機能は組織によつてかなり異なっている。FITTON等²⁾は人間のコラーゲンについて、また PIEZ³⁾は成牛のコラーゲンについて組織によるアミノ酸組成の比較を行なっている。最近になつて、牛腎臓の基底膜のコラーゲン^{4,5)}や回虫のクチクラと筋肉中のコラーゲン^{5,6)}等が研究され、組織によつてはかなり異なつたアミノ酸組成を有していることが明らかになつて来た。著者等はすでにマッコウ鯨鼻軟骨の中性塩可溶性コラーゲンの性質について報告し⁷⁾、2, 3の点でいわゆる哺乳動物や魚類の皮コラーゲンと明白な差異が認められた。そこで本報では同じマッコウ鯨の皮、肉中の筋隔膜および脳油の袋(千筋)からコラーゲンを単離し、軟骨コラーゲンと比較検討を行なつた。

実験方法

試料 前報⁷⁾で使用したマッコウ鯨から皮、筋隔膜および千筋を次のごとく調整した。表皮や附着している肉を十分に除去して得られる真皮と表面の膜を除去した脳油の袋(千筋)を細切し、エーテルで十分脱脂して試料とした。筋隔膜は鯨肉中から膜を取り出し、附着している肉を除去し、細切して試料とした。

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

コラーゲンの調製 各試料を冷却した中性塩溶液 (0.45 M NaCl-0.02 M Na_2HPO_4) と 0.1 M 酢酸で繰返し洗浄して可溶性物質を除去する。次に不溶性物質に対して 1% の結晶ペプシン (Sigma 社製, 3 X) を加え, 0.1 M 酢酸中で, 23°C, 72 時間攪拌しながら, 不溶性コラーゲンを溶解した。この酵素処理後にも残存する不溶物はナイロンストッキングでろ過した後, ろ液を 40,000×g, 2 時間遠心分離を行なう。上清液は冷蔵庫中で 10 倍量の 0.02 M Na_2HPO_4 に対して 24 時間ずつ 3 回透析し, ペプシンを失活させると共にコラーゲンを繊維状に沈殿させる。こうして得られるコラーゲン (Pepsin solubilized collagen: PSC) を 0.1 M 酢酸による溶解と 0.02 N Na_2HPO_4 による繊維再生を 2 回繰返して精製を行なつた。

化学的および物理的分析法 アミノ酸全分析は日立アミノ酸分析計 (KLA-2) により通常の方法で行なつたが, ヒドロキシプロリン (Hypro) は別に鬼塚の変法⁹⁾ により定量した。チロシン (Tyr), ヘキサースおよびヘキサミン等の化学分析と固有粘度 $[\eta]$, 比旋光度 $[\alpha]_D$ および変性温度 (T_D) 等の測定は前報⁷⁾ のとおりである。

電気泳動 NAGAI 等⁹⁾ の方法に従い, 7.5% アクリルアミドゲルを使用し, ディスク電気泳動を行なつた。泳動は pH 4.2 のゲル 1 本当たり 4 mA の条件で 100 分間行なつた。

実験結果

化学組成 真皮, 筋隔膜および千筋からペプシンによつて可溶化して得られるコラーゲン (PSC) の特徴的な成分の含有量は Table 1 にしめすとおりである。なお前報⁷⁾ に報告した鼻軟骨のペプシン処理コラーゲンの値も比較のために Table 1 にしめた。真皮, 筋隔膜および千筋のコラーゲンはいずれも良く似た組成をしめしており, コラーゲンに特有の Hypro 約 11%, 不純タンパクの目安ともなる Tyr 1% 以下およびヘキサース, ヘキサミンは共に 1% 以下で, 従来知られている脊椎動物コラーゲンと良く類似しており, コラーゲンとしてかなり純粋であることがわかる。しかし軟骨コラーゲンの糖含有量はかなり高く, 軟骨と他組織では糖含有量の点で明らかな差が認められた。

Table 1. Contents of hydroxyproline, tyrosine, and carbohydrates in whale collagens solubilized by pepsin.

Source	Hydroxyproline (%)	Tyrosine (%)	Hexose (%)	Hexosamine (%)
Nose cartilage*	10.9	0.6	3.0	1.3
Hide	11.0	0.7	0.8	0.3
Brain-oil bag	11.3	0.9	0.3	0.1
Tendinous septa	11.0	0.6	0.3	0.2

* Ref. 7.

あり, TRISTRAM¹⁰⁾ によつて報告されている鯨皮コラーゲンと大差ない値であつた。しかし軟骨コラーゲンは他組織のコラーゲンといくつかの点で明らかに異なつており, 人骨コラーゲン²⁾, 成牛の硬骨コラーゲン³⁾ とも異なつていた。すなわち Ser, Met および Lys が少なく, Glu やアミド態 N がかなり多く含まれていた。Lys に対する Hylys の比 (Hylys/Lys) は皮 0.36, 筋隔膜 0.50, 千筋 0.44, 軟骨 1.30 であり, 軟骨の値は他に比較して数倍大きかつた。この性質は軟体動物^{11,12)}, 甲殻類¹²⁾, ナマコ¹³⁾ 等のほか, 牛の水晶体⁹⁾ や腎臓の基底膜等のコラーゲン^{4,5)} にも認められているが, 一般に無脊椎動物コラーゲンに多く認められる特徴である。Hylys は Lys が水酸化酵素によつて水酸化されて生じることが証明されてお¹⁴⁾、このように同一体内においても組織によつて水酸化の程度に差のあることは非常に興味がある。なお Pro に対する Hypro の比 (Hypro/Pro) はいずれも 0.5~0.65 にあつて大差なかつた。

アミノ酸組成 Hypro および Tyr の値からは各組織のコラーゲン間に顕著な差は認められなかつたが, Table 2 にしめたごとく, アミノ酸全分析の結果, 2, 3 の特徴的な差異が認められた。アミノ酸組成は各組織のコラーゲンともいわずゆるコラーゲンの特徴をしめしており, Gly が全体の約 1/3, Pro と Hypro の和が約 1/5 をしめしている。真皮, 筋隔膜および千筋のコラーゲンの個々のアミノ酸含量はほとんど同じで

Table 2. Amino acid composition of whale collagens solubilized by pepsin.

Amino acid	Nose cartilage*	Hide	Brain-oil bag	Tendinous septa
Source	(residues/1,000 total residues)			
Hypro	86.5	77.1	81.9	84.0
Asp	40.6	47.8	48.6	45.8
Thr	19.7	17.4	23.8	21.9
Ser	7.7	40.9	39.8	38.4
Glu	91.0	70.3	73.0	68.6
Pro	136	149	132	130
Gly	332	312	313	309
Ala	102	123	121	140
Cys/2	0	0	0	0
Val	22.4	19.0	21.5	19.4
Met	0.2	5.0	3.9	3.7
Ileu	10.4	12.0	12.7	11.1
Leu	35.5	24.4	25.4	24.0
Tyr	1.2	2.5	2.8	2.1
Phe	15.7	11.6	10.5	12.0
Lys	19.2	25.6	24.9	24.8
Hylys	25.3	9.1	11.0	12.4
His	4.6	4.5	5.0	5.0
Arg	50.5	48.7	50.8	48.3
(-NH ₂)	(102)	(48.0)	(50.8)	(56.7)

* Ref. 7.

く、 β (2量体, M.W.=20万) および γ 成分 (3量体, M.W.=30万) またはそれ以上の成分はごくわずかであった。他の組織のコラーゲンは γ 成分またはそれ以上の成分がほとんどであり、これらコラーゲンには数分子が結合した重合体の存在が推定される。軟骨以外のコラーゲンは元来不溶性で架橋結合に富んだコラーゲンをペプシンで可溶化しているため、このように α および β 成分が少ないのであろう。

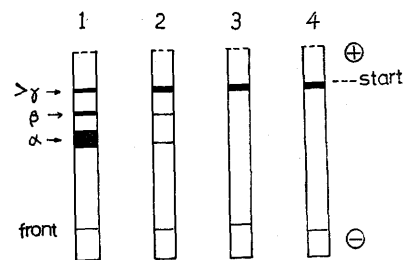
Table 3. Some physical properties of whale collagens solubilized by pepsin.

Source	$[\eta]$ (dl/g)	T_D (°C)	$[\alpha]_D$
Nose cartilage*	13.3	30.2	-439°
Hide	19.6	31.7	-434°
Brain-oil bag	18.0	33.4	-420°
Tendinous septa	20.0	33.8	-390°

* Ref. 7.

物理的性質 各組織から得たコラーゲンの固有粘度, 比旋光度および変性温度を Table 3 にしめた。軟骨コラーゲンの固有粘度 $[\eta]$ は 13.3 dl/g で同じ海獣類のイルカ皮コラーゲン¹⁵⁾ やふつうのコラーゲンと良く一致していた。他の組織のコラーゲンは 18~20 dl/g とかなり高い値をしめしている。このように固有粘度の高い理由は皮, 筋隔膜および千筋からペプシン処理によつて抽出したコラーゲンが完全に単分子状に溶解しておらず, 2分子あるいは3分子等の重合体が存在しているためであろう。比旋光度の値は -390~-440° というコラーゲン特有の大きな負の旋光度をしめしており, これらの試料が変性していないことを表わしている。変性温度は組織によつて多少バラツキが認められるが, ほぼ 30~34°C の間にあり大差なく, 暖海性魚類コラーゲンの変性温度に相当していた¹⁾。

電気泳動 各組織のコラーゲンを 0.1M 酢酸に溶解し, 40°C で 30 分間熱変性した後, 電気泳動を行なつた。Fig. 1 にしめすごとく, 軟骨コラーゲンは α 成分 (単量体, M.W.=10万) が多

**Fig. 1.** Disc electrophoresis of denatured whale collagens solubilized by pepsin.

- 1: Nose cartilage.
- 2: Hide.
- 3: Brain-oil bag.
- 4: Tendinous septa.

Denatured collagen (40°C, 30 min.) was separated by 7.5% polyacrylamide gel at pH 4.2. A current of 4 mA per tube was applied for 100 min.

考 察

以上のごとく、各組織のコラーゲンの間に物理的性質に大きな差がないことから、これらコラーゲン分子の間に基本的な構造(分子量, 形, 大きさ)には本質的な差はないと思われる。しかし、化学組成においては軟骨と他の組織との間にはいくつかの明白な相異が認められた。このことはさらに十分な検討を必要とするが、中性塩可溶性コラーゲンおよびペプシン可溶性コラーゲンの間に化学組成, 分子量, 分子形にほとんど差の認められないという事実^{16~18)}から考えると、ここで認められた差は軟骨と他の組織の構造や機能の違いによるものと思われる。皮, 筋隔膜および干筋はどれもほとんど純粋なコラーゲン繊維から出来ているが、軟骨はコラーゲン繊維以外に多量多糖類および粘質多糖類や非コラーゲン性タンパク, それに少量の無機物を含み, それらが互いに関連し合つて一つの軟骨組織を作っている。組織つまり機能が異なると, コラーゲン繊維の状態(例えば繊維の太さ, 長さ, 絡み合いの程度等)に差が生じるとともに, コラーゲン分子自体にも微妙な差が生じることは十分考えられる。すなわち, コラーゲン自体の分子構造は大きく変えることは出来ないが, 他成分との相互作用を行ない易いようにアミノ酸組成に変化を生じたり, また糖類と結合することにより他成分との相互作用を円滑にしたりして, その組織の機能を満足すべくコラーゲン分子に微妙な変化が生じるのであろう。コラーゲンに含まれているヘキソースは Hylys と結合しているものがあるといわれている¹⁹⁾が, 軟骨コラーゲン中には他に比較してかなり多量の糖と Hylys を含んでいることから, このような結合の可能性が考えられる。また前報⁷⁾でも述べたごとく, 軟骨コラーゲンには精製しても除去出来ない多くの非コラーゲン性タンパクを含んでおり, コラーゲン分子と何らかの結合をしているものと思われる。このようにコラーゲンもまた, 組織の機能に適應するように各組織においては特異的化学構造を保持していると考えられる。そして軟骨コラーゲンには皮等ほかの組織のコラーゲンと異なつた性質を持つことが確認された。

本研究を行なうにあたりアミノ酸分析に際し御援助いただいた本学の須山三千三助教授に感謝いたします。

文 献

- 1) A. J. BAILEY: in "Comprehensive Biochemistry" (M. FLORKIN and E. H. STOTZ, eds.) Vol. 26, part B, 332~335, Elsevier Publishing Co. (1968).
- 2) S. FITTON-JACKSON: in "The Cell" (T. BRACKET and A. E. MIRSKY, eds.) Vol. 4, 387, Academic Press, N. Y. (1960).
- 3) K. A. PIEZ and R. C. LIKINS: in "Calcification in Biological Systems" (R. F. SOGNAES, ed.) 411~420, Publ. No. 64, Am. Assoc. Advancement Sci., Washington, D. C. (1960).
- 4) N. A. KEFALIDES and R. J. WINZLER: *Biochemistry*, 5, 702~710 (1966).
- 5) D. FUJIMOTO: *Biochim. Biophys. Acta*, 168, 537~543 (1968).
- 6) D. FUJIMOTO, T. IKEUCHI, and S. NOZAWA: *ibid.* 188, 295~301 (1969).
- 7) 久保田 穰・内田直行・木村 茂: 本誌, 35, 1006~1011 (1969).
- 8) 鬼塚卓弥: 生化学, 32, 13~19 (1960).
- 9) Y. NAGAI, J. GROSS, and K. A. PIEZ: *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 494~500 (1964).
- 10) G. R. TRISTRAM: in "The Proteins" Vol. 1 A, 181, Academic Press, New York (1953).
- 11) 木村 茂・久保田 穰: 本誌, 34, 925~929 (1968).
- 12) S. KIMURA, Y. NAGAOKA, and M. KUBOTA: *This Bull.*, 35, 743~748 (1969).
- 13) K. A. PIEZ and J. GROSS: *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 24~39 (1959).
- 14) F. M. SIVEX, D. D. VAN SLYKE, and D. R. CHRISTMAN: *J. Biol. Chem.*, 234, 918~921 (1959).
- 15) 久保田 穰・木村 茂・田島英男: 本誌, 33, 217~223 (1967).
- 16) 西原富雄: 研究報告第6号(日本皮革研究所) 1~48 (1961).
- 17) A. L. RUBIN, M. P. DRAKE, D. PFAHL, P. T. SPEAKMAN, and F. O. SCHMITT: *Biochemistry*, 4, 181~190 (1965).
- 18) S. KAWAI, S. KIMURA, T. MIYATA, and T. NISHIHARA: *Collagen Symposium*, VI, 93~94 (1965).
- 19) W. T. BATHER and L. W. CUNNINGHAM: *J. Biol. Chem.*, 241, 3882~3888 (1966).