

鯨コラーゲンのSubunitsについて

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	3612
掲載ページ	p. 1246-1249
発行年月	1970年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



鯨コラーゲンの Subunits について

久保田 穰・内田直行・木村 茂

(1970年7月8日受理)

On the Subunits of Whale Collagens

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

The subunits of neutral salt soluble collagen from nose cartilage and pepsin-solubilized collagen from skin of sperm whale were separated by CM-cellulose column chromatography of the denatured proteins and each fraction obtained was examined by disc electrophoresis. For comparison, acid soluble collagen of the great blue shark skin was also studied. The shark collagen consists of α_1 , α_2 , β_{11} , β_{22} , and γ components and the whale skin collagen consists of α_1 , α_2 , α_3 , β_{22} , γ , and unidentified β (perhaps β_{11} , β_{13} , or β_{33}). As a whole, the chromatograms of these two collagens are similar to those of other reported collagens. However, the chromatogram of collagen from whale nose cartilage was quite different from that of ordinary collagen. When this collagen was chromatographed under similar conditions used for shark and whale skin collagens, protein peaks were very fast in appearing in the effluent, and major parts of the collagen were found to be not adsorbed by CM-cellulose. At a lower ionic strength, four kinds of α and one of β were isolated. The fast peak (α -component) accounted for about 1/3 of the total protein contained 9% hydroxyproline and 2.3% glucuronic acid. This unusual pattern is probably due to the non-collagenous material, such as glucuronic acid, combined to the cartilage collagen molecule.

マッコウ鯨の鼻軟骨中性塩可溶性コラーゲンは同じ鯨の他の部位のコラーゲンや一般の脊椎動物コラーゲンに比べていくつかの異なる性質を有している^{1,2)}。そこで本報ではこの鼻軟骨コラーゲンの Subunits を調べる目的で、CM-セルロースカラムにより熱変性コラーゲンを分画し、ディスク電気泳動による α および β 鎖の同定を行なった。そして軟骨コラーゲンの特徴を知るため、マッコウ鯨の真皮コラーゲンとヨシキリサメ皮のコラーゲンについて同様にCM-セルロースにより分画し、軟骨コラーゲンとの比較検討を行なった。

実験方法

試料 マッコウ鯨の鼻軟骨コラーゲンと真皮コラーゲンは前報の方法²⁾によつて調製した。ヨシキリサメ皮の酸可溶性コラーゲンは前報の方法³⁾によつた。

クロマトグラフィー 熱変性コラーゲンのCM-セルロースカラムクロマトグラフィーはPIEZらの方法⁴⁾に準じて行なった。CM-セルロースはBrown社製の標品を通常の方法で充分洗浄し、Na一型としてジャケット付2.2×30cmカラムに高さ20cmまで充填し、使用前にStarting bufferで充分緩衝化を行なつて使用した。Starting bufferは68gの酢酸ナトリウムと19mlの水酢酸を蒸留水に溶解して1lとしたものを保存緩衝液($\mu = 0.5$, pH 4.8)とし、任意のイオン強度に希釈してStarting bufferとして使用した。変性コラーゲンの溶出は800mlの緩衝液を使用し、塩化ナトリウムによるlinear gradientを行なった。試料は30~100mgのコラーゲンを10~20mlのStarting bufferに5°Cで一晩溶解し、サメ皮コラーゲンでは40°C、鯨コラーゲンは45°Cで各々30分間加熱変性させた。カラム温度はサメ皮コラーゲンで35°C、鯨コラーゲンで40°Cの温水をジャケットに流して調整した。溶出速度は1時間当たり150mlと

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

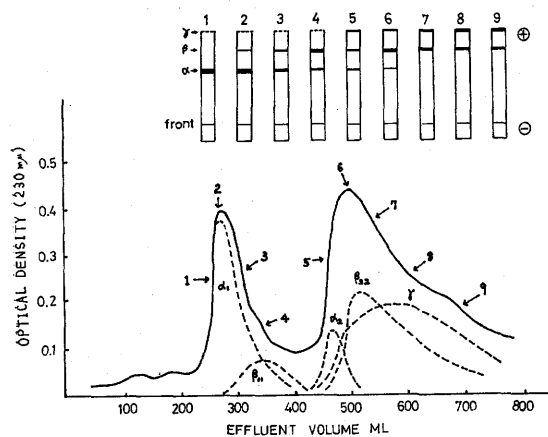


Fig. 1. Chromatogram of denatured acid soluble collagen from great blue shark on CM-cellulose column at 35°C and disc electrophoretic patterns of each fraction.

A linear gradient between 0.06 and 0.18 ionic strength acetate buffers (pH 4.8) was employed. The effluent was collected in 5 ml fraction with flow rate of 150 ml/h. Each fraction marked with arrows was separated by 7.5% polyacrylamide gel at pH 4.2.

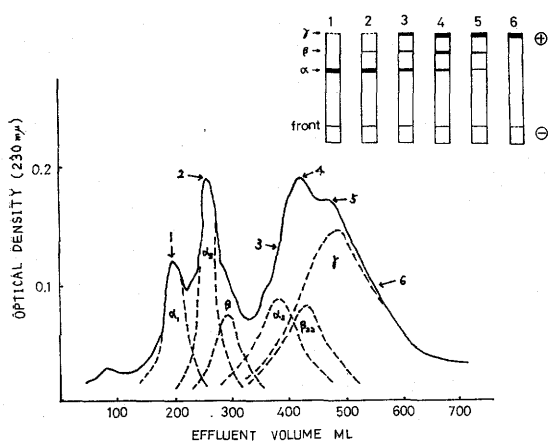


Fig. 2. Chromatogram of denatured pepsin-solubilized collagen from sperm whale skin on CM-cellulose column at 40°C and disc electrophoretic patterns of each fraction.

A linear gradient between 0.05 and 0.16 ionic strength acetate buffers (pH 4.8) was employed.

し、5 ml ずつ分取後、230 m μ の吸光度を測定して溶出コラーゲン量を求めた。

化学分析 アミノ酸および糖の含有量は前報¹⁾に記したとおりである。

ディスク電気泳動 7.5% polyacrylamide ゲルを用い前報¹⁾と同様に pH 4.2 で行つた。

結果および考察

ヨシキリサメ皮コラーゲン イオン強度 $\mu = 0.06 \sim 0.18$ の間で linear gradient 溶出を行なつた時の溶出図は Fig. 1 にしめすとおりである。吸着させた試料 90 mg の約 90% が回収された。一般にコラーゲンは3本のポリペプチド鎖からなる剛体棒状の分子であるが、熱変性によつて3本鎖はバラバラになり糸まり状分子となる。この時生じる subunits の内、3本鎖の1本を α 鎖 (M.W. 10 万)、2本が何らかの形で結合したものを β 鎖 (α の2量体, M.W. 20 万)、3本とも結合したものを γ 鎖 (α の3量体, M.W. 30 万) とよんでいる。結局コラーゲン分子は3本の α 鎖からなるが、多少溶出位置に相異が認められ、 α_1 , α_2 , α_3 等の名称がつけられている。同様に β 鎖も構成する α 鎖の種類によつて、 β_{11} , β_{12} , β_{22} 等の区別がなされている。本実験の場合、溶出液を9区分に分けて、各区分について α , β , γ の同定はディスク電気泳動から、 α_1 , α_2 , β_{11} , β_{12} 等の同定は溶出位置とアミノ酸組成との関係から定めた PIEZらの命名法^{4,5)}によつて行なつた。各区分の電気泳動の結果は Fig. 1 の上部にしめたごとくなり、この結果から個々の成分を点線のごとく推定した。Fig. 1 から明らかなように、サメ皮コラーゲンは α および β 鎖と同様にかかなりの γ 鎖が存在していた。タラ皮のコラーゲンでは3種類の α 鎖が分離されている⁵⁾が、一般に α_1 と α_3 は非常にアミノ酸組成が類似して分離し難く、サメ皮コラーゲンの場合にも2種の α 鎖 (α_1 と α_2) しか認められなかつた。

鯨皮コラーゲン 前報²⁾に記したごとく、鯨皮コラーゲンは非常に不溶化しており、そ

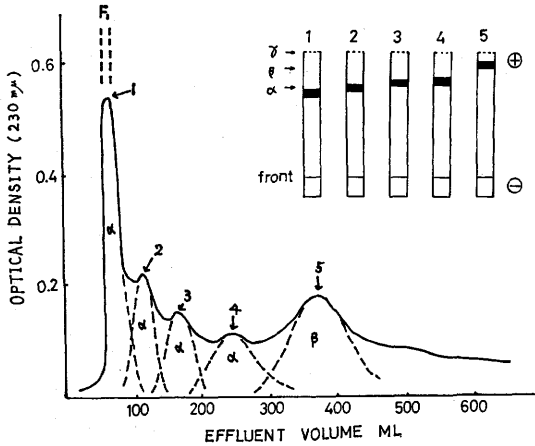


Fig. 3. Chromatogram of denatured neutral salt soluble collagen from sperm whale nose cartilage on CM-cellulose column at 40°C and disc electrophoretic patterns of each fraction.

A linear gradient between 0.01 and 0.11 ionic strength acetate buffers (pH 4.8) was employed.

鯨鼻軟骨コラーゲン 軟骨コラーゲンの溶出図形はサメ皮や鯨皮のコラーゲンとはかなり異なっており、イオン強度 $\mu = 0.01 \sim 0.11$ で溶出した時の結果は Fig. 3 のごとくで、吸着させた試料 50 mg の約 60% が回収された。軟骨コラーゲンの場合、starting buffer のイオン強度を鯨皮コラーゲンと同じ $\mu = 0.05$ から始めてもほとんどセルロースに吸着されずに素通りしてしまい、出来るだけイオン強度を低くして $\mu = 0.01$ にしても第 1 のピーク (F₁) はほとんど吸着されていないと思われる。熱変性コラーゲンの溶出に用いるイオン強度はそのコラーゲンの histidine 含有量に依存し、histidine 含有量の高い程、高イオン強度を必要とするといわれている⁴⁾。鯨皮コラーゲンと鯨鼻軟骨コラーゲンの histidine 含有量は前報²⁾に報告したごとく、各々 1000 残基中 4.6 および 5.0 残基でほとんど等しいにもかかわらず、軟骨コラーゲンは非常に低いイオン強度でも容易に溶出されてしまう。溶出量全体の約 1/3 をしめる最初のピーク (F₁) はセルロースにほとんど吸着しておらず、cationic というよりむしろ anionic な性質をしめしている。この区分の化学分析の結果は Table 1 にしめすごとく、明らかにコラーゲンとしての性質をしめしているが、ヒドロキシプロリンは未処理のコラーゲンよりかなり高く、逆にチロシン、ヘキソース、ヘキソサミン等は減少している。しかしグルクロン酸の量はほとんど変化なく、多少増加していると思われ、このグルクロン酸が結合しているためにふつうのコラーゲンより負の荷電が多くなり、樹脂に吸着されにくくなるのであろう。

各区分の電気泳動の結果は Fig. 3 の上部にしめたごとく、ピーク 1 と 2 はともに α 鎖といえるが、溶

のためペプシンによる可溶化コラーゲンを試料として用いた。イオン強度 $\mu = 0.05 \sim 0.16$ で linear gradient 溶出を行なった時の溶出図形は Fig. 2 のごとくなり、試料の回収率は約 80% であった。サメ皮コラーゲンの時と同様に各区分のディスク電気泳動の結果から、各々のピークを点線のごとく分割した。この結果、鯨皮コラーゲンはかなり多量の α および γ 鎖を含んでおり、 α 鎖には 3 つのピークが認められた。PIEZ のタラ皮コラーゲンでの結果に準じて第 1 のピークを α_1 、第 2 のピークを α_3 とした。 α_3 と α_2 間の β 鎖は β_{11} , β_{13} , β_{33} 等が考えられるが、本実験の結果だけでは明らかでない。NISHIHARA 等⁶⁾ は仔牛皮コラーゲンをペプシン処理によつて分子の末端部分 (Telopeptide) を切断することにより、3 種の α 鎖を分離している。この鯨皮コラーゲンの場合もペプシン処理によつて末端部分が消化され、 α_1 と α_3 が分離し易くなつたものと考えられる。

Table 1. Contents of hydroxyproline, tyrosine, and carbohydrates in fraction 1 (F₁).

	Hydroxyproline (%)	Tyrosine (%)	Hexosamine (%)	Hexose (%)	Glucuronic acid (%)
NSC*	7.3	1.2	1.2	2.9	2.1
F ₁	9.0	0.6	0.6	1.6	2.3

* Neutral salt soluble collagen (unfractionated), Reference 1.

出位置の遅くなるにつれて泳動距離も短くなっている。最後のピーク5は β 鎖であるが、ピーク3と4は α か β かの判定に多少困難はあるにしても、泳動距離から考えてまず α 鎖といえよう。前報¹⁾に記したごとく軟骨コラーゲン中にかなり多量に存在するムコ多糖類や非コラーゲン性タンパクが α 鎖に結合して分子量や荷電に変化を起し、その結合量の程度により多少電気泳動速度のことなつた4種もの α 鎖とみなされる成分が分離されたと考えられよう。また軟骨コラーゲンのカラムからの回収率は60%とかなり低く、40%がこの条件下では溶出しておらず、かなり樹脂に吸着されている部分が存在していた。これら軟骨コラーゲンのクロマト図形の異常性について、その詳細は明らかでないが、軟骨コラーゲンに含まれるコラーゲン以外の物質がコラーゲンと何らかの形で結合し、溶出図に大きな変化をもたらしているのであろう。それゆえ、今後はこの非コラーゲン性成分の研究が重要な問題となるであろう。

文 献

- 1) 久保田 穰・内田直行・木村 茂：本誌，**35**，1006~1011 (1969).
- 2) 久保田 穰・内田直行・木村 茂：本誌，**36**，1242~1245 (1970).
- 3) M. KUBOTA and S. KIMURA: *This Bull.*, **33**, 338~342 (1967).
- 4) K. A. PIEZ, E. A. EIGNER, and M. S. LEWIS: *Biochemistry*, **2**, 58~66 (1963).
- 5) K. A. PIEZ: *J. Biol. Chem.*, **239**, PC 4315~4316 (1964).
- 6) T. NISHIHARA, T. MIYATA, S. KIMURA, and S. HASHIMOTO: *Collagen Symposium (Japan)* VI, 146~147 (1965).