

β -アミノプロピオニトリル投与によるコイ各組織低分子内架橋コラーゲンの可溶化

誌名	日本大学農獣医学部学術研究報告
ISSN	00780839
著者	内田, 直行 江波戸, 辰夫 安斎, 寛
巻/号	45号
掲載ページ	p. 74-79
発行年月	1988年3月

Solubilization of low Intramolecular Cross-linking Collagen from the Several Tissues of Carp by Administration of β -aminopropionitrile

Naoyuki UCHIDA, Tatsuo EBATO, Hiroshi ANZAI, Eiichi NISHIDE and Shigeru KIMURA*

Lab. Marine Biochemistry, Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.

* Lab. Biochemistry, Tokyo University of Fisheries

(Accepted Oct. 1, 1987)

ABSTRACT. Solubilization of low intramolecular cross-linking collagen from the skin, the air bladder, the scale, the vertebral column and the skull of carp *Cyprinus carpio* was attempted by continuous exposure to 1 ppm of β -aminopropionitrile (β -APN) solution and by oral administration of 0.3% β -APN in diet.

Ratio of acid-soluble collagen (ASC) to the total collagen in all tissues investigated and α chain content in ASC estimated by SDS-PAGE were clearly increased by the oral administration. In the continuous exposure, slight increases in the ratio of ASC and in the α chain content in ASC were shown in all tissues investigated.

These results suggested that the oral administration of β -APN was more effectively inhibited inter- and intramolecular cross-linking of collagen than the continuous exposure and very useful for the study of collagen from the fish tissues having difficulty in getting soluble collagen.

Key words: Solubilization, Acid soluble-collagen, Carp, β -APN, Oral administration

β -アミノプロピオニトリル投与によるコイ各組織低分子内架橋 コラーゲンの可溶化

内田 直行・江波戸辰夫・安 齊 寛
西 出 英 一・木 村 茂*

日本大学農獣医学部 水産生物化学研究室
* 東京水産大学 生物化学研究室

(昭和62年10月1日受理)

コラーゲンは生体中の全タンパク質の約 1/3 を占める主要タンパク質であり、骨、軟骨、皮膚及び腱などの結合組織に多く含まれる。また、心臓、筋肉及び肺臓など全身のあらゆる器官に存在している、哺乳動物のコラーゲンについてはこれまで詳細な研究がなされており、現在のところ遺伝的に異なる10種のコラーゲンの存在が確認されている。これらのそれぞれはその機能に応じた種々な分子形を持ち、細胞間マトリックスとして各組織特

有の環境を作り、細胞の分化に重要な役割を担っていると考えられている[1]。

魚類のコラーゲンについては可溶性コラーゲンが比較的容易に得られる真皮、鰓及び筋肉に関する研究が多く、特に真皮コラーゲンについては魚種により構成ポリペプチド鎖が異なることが報告されている[2]。しかし、さらに詳細な分子レベルでの研究のために、より架橋結合の少ないコラーゲンがより多く可溶化できることが望まれ

ている。また、骨、鱗及びその他の組織に関しては不溶性コラーゲンが多く、分子状コラーゲンを得ることが困難であるため、その性質はほとんど知られていない。これら組織のコラーゲンの研究を進めるためにはこの不溶性コラーゲンの可溶化が要求される。

哺乳動物などにおいてはラチローゲンである β -アミノプロピオニトリル (β -APN) を投与し、コラーゲン分子の不溶化の原因である架橋結合形成を阻害し、いわゆるラチリズムを惹起させ、不溶性の強い組織より可溶性コラーゲンを得ることを常法としている[3]。魚類に関するこの方面の研究は少なく、コイに β -APN 及び D-ベニシルアミンを投与しラチリズムを惹起している報告が見られるだけである[4, 5]。これによるとコイは両者のラチローゲン投与により結合組織の軟弱化あるいは脊椎骨及び真皮の中性塩可溶性コラーゲンの増加を引き起こしている。しかし、その他の組織あるいは可溶化されたコラーゲンの性状については不明である。そこで、本研究ではラチローゲンとして β -APN を選び、継続的な投与が期待できる流水式飼育装置による β -APN の連続暴露及び経口投与を行い、コイにおけるラチリズム惹起効果の比較を真皮、鰓、脊椎骨及び鱗における酸可溶性コラーゲン量の増加及び得られたコラーゲンの分子内架橋度を追跡することにより行った。

実験材料及び方法

1. 試料

コイ *Cyprinus carpio* は日本観賞魚貿易株式会社（東京都）より購入し、0.5%塩化ナトリウム水溶液の止水中、25°Cで1週間薬浴した後に、23°Cの脱塩素水にて市販のコイ用餌料ペレットを与え流水飼育した。このうち魚体重 40.9~131.0 g（平均 104.3 g）の健康なコイ20尾を選び、それぞれ10尾ずつを59×28×36 cm のガラス水槽にて同様に1週間予備飼育を行い実験に供した。

2 試薬

β -APN は東京化成工業株式会社製のフマル酸 β -APN を、セルロースは東洋澁紙株式会社製のCellulose powder D を、その他の試薬は和光純薬工業株式会社製の得られる最高純度のものを使用した。

3. 合成餌料の調製

合成餌料の組成は Table 1 に示す通りである。ここで用いたミネラル混合物は萩野[6]による調製法に従った。また、ビタミン混合物は高松[7]のコイ用餌料の配合比及び Halver[8]の使用量を参考にし、コラーゲン合成を促進させるためビタミンC含量を多くした Table 2 の組成のものを使用した。

Table 1 Composition of the experimental diet

Casein	45	g
Potato starch*1	48	
Soybean oil	5	
Mineral mixture*2	2	
Vitamin mixture*3	1.8	
β -APN	0.3	

*1: Potato starch was mixed with other ingredients after heating with water in a boiling water.

*2: The formula of the mineral mixture by Ogino [6].

*3: Described in Table 2.

Table 2 Composition of the vitamin mixture

Vitamin supplement	Amount (mg/100g of diet)
B ₁ (thiamin HCl)	3.0
B ₂ (riboflavin)	9.0
B ₆ (pyridoxine)	2.7
Nicotinic acid	30
Calcium pantothenate	15
Inositol	120
Biotin	0.048
Folic acid	0.6
B ₁₂ (cyanocobalamin)	0.0045
Choline chloride	105
C(ascorbic acid)	1500
A(palmitate)	3000 IU
D ₃	600 IU
E(DL- α -tocopherol)	30
K ₃ (menadione)	3
p-aminobenzoic acid	15

4. β -APN の投与法

β -APN を連続的に暴露するために用いた流水式飼育装置の概略は Fig. 1 に示す通りである。薬物供給装置（マリオートビン）より 250 ppm の β -APN 水溶液を 0.8 ml/min の流速で混合装置に送る。これを活性炭により脱塩素した水道水を希釈水供給装置より、200 ml/min で供給し、終濃度 1 ppm にし、飼育水槽に流入した。餌料は市販コイ用餌料ペレットを与え、人工照明（12時間/日）により、23±1°Cで飼育した。排水はアンパライト XAD-2（ローム・アンド・ハース社製）及び活性炭カラムを通し、残留する β -APN を除去した後には排水した。

経口投与には薬物供給装置を除いた Fig. 1 と同様な飼育装置を用い、0.3% β -APN を含む合成餌料を魚体重の 1.5% ずつ1日2回与え、前述と同様に飼育した。一定期間投与したコイは取り上げ後、直ちに-35°Cで凍結保存し、適宜実験に供した。

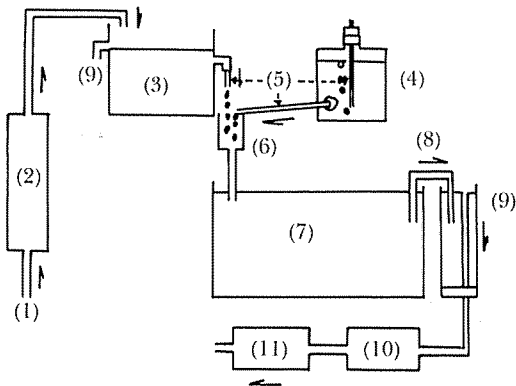


Fig. 1 Flow-through aquarium system for the exposure of β -APN to carp.

Two hundred fifty ppm β -APN solution was stocked in toxicant supply. The β -APN solution was supplied to diluter at the flow rate of 0.8 ml/min through capillary tube. This toxicant was diluted with two hundred fifty times volume of tap water dechlorinated with activated charcoal. The diluted β -APN solution was supplied to test tank (59×28×36 cm) including 10 fishes and maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Waste solution was discharged after elimination of remaining β -APN through Amberlite-XAD-2 and activated charcoal column.

(1): tap water, (2): activated charcoal, (3): water supply, (4): toxicant supply, (5): capillary tube, (6): diluter, (7): test tank, (8): siphon tube, (9): overflow, (10): Amberlite-XAD-2 column, (11): activated charcoal column

5. 酸可溶性コラーゲン量の測定法

凍結保存したコイを水道水 (20°C 以下) で半融解状態にし、真皮、鱗、脊椎骨及び鰾を分離した。各組織より他組織をできる限り取り除き、細切後、洗浄液が透明になるまで冷水で繰返し搅拌洗浄した。洗浄後の各組織はガーゼ及び濾紙により充分水切をし、その 0.2 g を採取した。これに、0.5M 酢酸 20 ml を加え、48時間、マグネチックスターラを用いて搅拌し、30,000 xg, 60分間の遠心分離を行い、上澄液と沈殿を分離した。沈殿物はさらに、10 ml の 0.5M 酢酸を加え、搅拌後、20,000 xg, 15分間の遠心分離を行う操作を2回繰返し、洗浄した。この沈殿物全量を、また、上澄液の一定量を 6N 塩酸、 110°C 、24時間の加水分解に付し、それぞれに含まれるヒドロキシプロリン (Hyp) 量を Bergman and Coxley の方法[9]により測定した。コラーゲンの可溶化率は両画分の全 Hyp 量の合計に対する上澄液中の Hyp

量の百分率で表わした。なお、以上の操作は特記しない限りすべて $4 \sim 6^\circ\text{C}$ に行った。

6. 分子内架橋度の測定

前述の操作で得られた上澄液の一定量を凍結乾燥した後、Laemmli の方法[10]によるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に付し、酸可溶性コラーゲンの構成ポリペプチド鎖を分離した。得られた泳動図より、単量体 (α_1 , α_2 鎖)、二量体 (β 鎖) 及び多量体 (γ 鎖以上) の量比より定性的に分子内架橋の程度を判断した。

7. 硬骨組織の脱灰

細切した硬骨組織に50~100倍容量の 20 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)-1 mM フッ化フェニルメ

実験結果及び考察

1. 酸可溶性コラーゲン量の変化

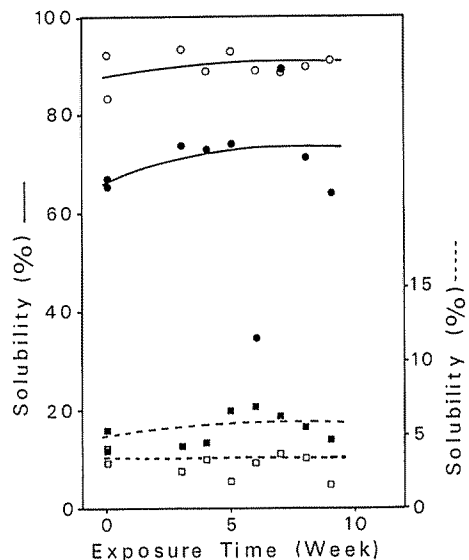


Fig. 2 Ratio of acid-soluble collagen to the total collagen in several tissues of carp exposed continuously to β -APN.

Two hundred mg of each tissue washed with water was solubilized in 20 ml of 0.5 M acetic acid at 4°C for 48 h and then separated into supernatant and precipitation by centrifugation at 30,000 xg for 60 min. Solubility was calculated as percentage of hydroxyproline content in the supernatant to the sum of that in both fraction. Hydroxyproline content in hydrolysate with 6N HCl at 110°C for 24 h was determined by the method of Bergman and Loxley [9]

○: Skin, ●: Air bladder, ■: Scale, □: Vertebral column.

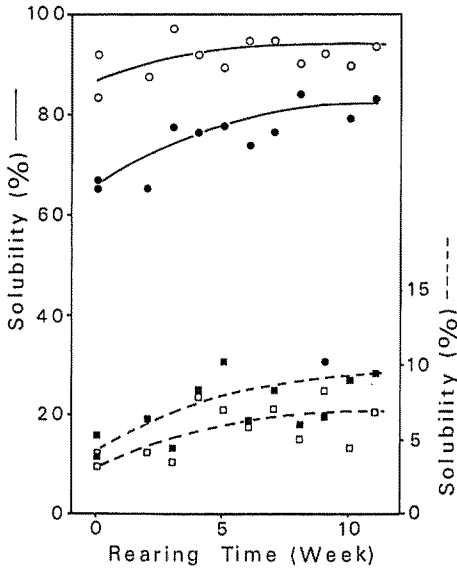


Fig. 3 Ratio of acid-soluble collagen to the total collagen in several tissues of carp administered orally with β -APN. Experimental conditions are the same as described in the legend to Fig. 2.
 ○ : Skin, ● : Air bladder, ■ : Scale, □ : Vertebral column.

チルスルホニル (PMSF)—2 mM N-エチルマレイミド (NEM), pH 7.5 を加え, 攪拌する。1 日 1 回溶液を交換し, 8 日間処理した。脱灰組織からの酸可溶性コラーゲンの抽出は前述と同様に行った。

1 ppm の β -APN 水溶液に連続的に暴露した場合, 9 週間の実験期間中, 奇形, 鱗の剝脱など外観的なラチリズムは観察されなかった。また, コラーゲンの可溶化

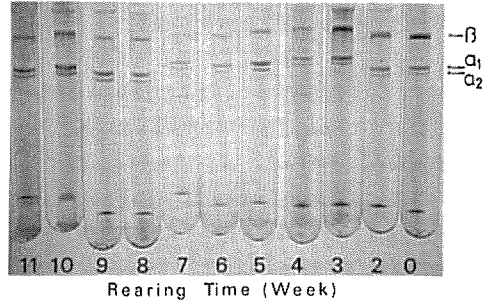


Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of acid-soluble collagen from the skin of carp administered orally with β -APN. Electrophoresis was performed by the method of Laemmli [10] on 7.5% polyacrylamide gel at 8 mA/gel.

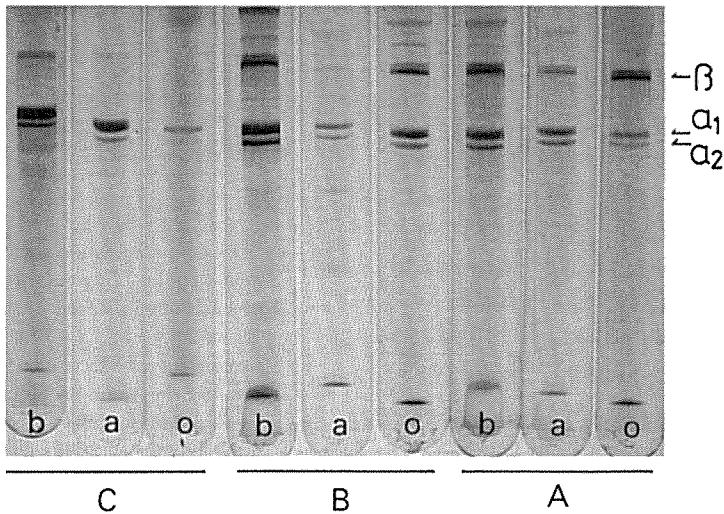


Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of acid-soluble collagen from several tissues of carp administered with β -APN for 5 weeks. Electrophoresis conditions are as described in the legend to Fig. 4.
 o : Original, a : Oral administration, b : Continuous exposure, A : Skin, B : Air bladder, C : Scale.

率について見ても、真皮、鰓及び鱗において僅かに増加傾向が認められる程度であり、脊椎骨においてはほとんど変化を示さなかった (Fig. 2)。

このことから、 β -APN の水溶液による連続的な暴露により本研究で検討した各組織コラーゲンの分子間架橋結合は阻害されなかったと考えられる。この原因としては β -APN がコイの上皮組織より取り込み難いためと考えられる。

一方、経口投与した場合、実験期間中に鱗の剝脱、脊椎骨の彎曲及び魚体の異常な軟化が観察され、外観的に明らかにラチリズムが進行していることが認められた。

コラーゲンの可溶化率についても実験期間に伴い増加し、真皮において83~92% (平均88%) から約94%に、鰓では65~67% (平均66%) から約82%に、鱗で4~5%から約7%に、それぞれ増加した (Fig. 3)。このことは β -APN は経口投与により明らかに各組織の分子間架橋結合を阻害していることを示し、その効果は連続的な上皮組織經由取り込みよりも高いことが判明した。

脊椎骨において β -APN 投与によるコラーゲンの可溶化が観察されたことから、さらに硬骨組織における可溶化効果を確認するため、未処理及び経口投与11週目のコイより脊椎骨及び頭骸骨 (鰓蓋を含む) を採取し、脱灰処理を施した後の可溶化率を検討した。その結果、Table 3 に示すように1尾ずつの実験であるが明らかに可溶化率は増加し、それは頭骸骨において顕著であった。このことから、本法により硬骨の酸可溶性コラーゲンが得られることを確認した。

2. 分子内架橋結合の変化

可溶化率の増加が明確であった経口投与したコイから得られた酸可溶性コラーゲンを SDS-PAGE に付したところ、脊椎骨以外の組織より得たコラーゲンは実験期間の経過に伴い、分子内架橋により生成する β 及びそれ以上の重合体が少なくなり、単量体である α 鎖の増加が明らかに認められた。Fig. 4 にその代表的な真皮コラーゲンの泳動図を示す。また、経口投与による可溶化率の効果が著明となる5週目における両処理したコイの真皮、鰓及び鱗から得た酸可溶性コラーゲンと未処理コイから得たそれらと比較した電気泳動図を Fig. 5 に示す。鱗では未処理の場合ほとんど酸可溶性コラーゲンが得られないが、暴露投与に比べ経口投与したものが α 鎖比が明らかに高くなっている。また他の2組織については未処理、暴露投与、経口投与の順に α 鎖の比率が高くなっている。なお、脊椎骨については実験期間のいずれにおいても明確なコラーゲンバンドは確認できなかったが、脱灰処理後に得た酸可溶性コラーゲンの泳動図から、経口投与により明らかに α 鎖比が高くなっていることが判

Table 3 Ratio of acid-soluble collagen in the decalcified bone of carp administered orally with β -APN

tissue	Solubility(%)	
	Original	Administration
Vertebral column	2.3	6.8
Skull	8.1	19.5

Both tissues were decalcified with stirring in fifty to one hundred times volume of decalcifying solution (20mM EDTA-1mM PMSF-2mM NEM, pH 7.5) for 8 days. The solution was exchanged daily.

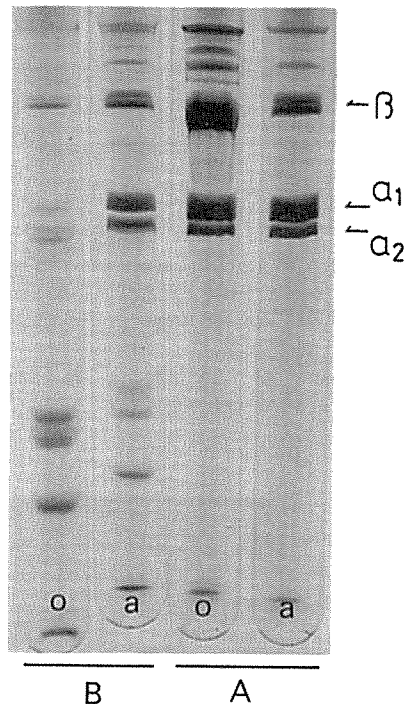


Fig. 6 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of acid-soluble collagen from the decalcified bone of carp administered orally with β -APN for 11 weeks.

Conditions of electrophoresis and decalcification are the same as described in the legend to Fig. 4 and Table 3, respectively.

o : Original, a : Oral administration, A : Skull, B : Vertebral column.

る (Fig. 6)。

別に、 β -APN 含量が1%及び3%の合成飼料による実験も試みたが、外観的なラチリズム症状を示す時期が多少速くなる程度であった。

以上の結果より、 β -APN の経口投与はコイ各組織コラーゲンの分子間及び分子内架橋結合を効果的に阻害し

分子内の架橋の少ない可溶性コラーゲンの抽出を可能とし、現在のところ不明な点が多い魚類の不溶化の強い各組織コラーゲンの研究のために非常に有効な手段であることが確認できた。

文 献

- 1 畑 隆一郎 1986: コラーゲン—その機能と代謝—, 蛋白質核酸酵素, 31, 29-52.
- 2 S. Kimura, Y. Ohno, Y. Miyauchi and N. Uchida 1987: Fish skin type I collagen: Wide distribution of an α 3 subunit in teleosts. *Comp. Bioch. Physiol.*, 88B, 27-34.
- 3 砂田泰伸, 永井 裕 1985: 型別コラーゲンの調製, 「コラーゲン実験法, 永井 裕, 藤本大三四郎編」(講談社, 東京), 31-40.
- 4 M. Sato, R. Yoshinaka and S. Ikeda 1977: Latyrpic changes in carp caused by β -aminopropionitrile and D-penicillamine. *Nipon Suisan Gakkaishi*, 43, 349-355.
- 5 R. Yoshinaka, M. Sato and S. Ikeda 1977: Changes in the mechanical strength of the bone and in the collagen solubility of the bone and the skin of carp caused by β -aminopropionitrile and D-penicillamine. *Nipon Suisan Gakkaishi*, 43, 429-435.
- 6 葬野珍吉 1980: 無機質, 「魚類の栄養と飼料, 葬野珍吉編」(恒星社厚生閣, 東京), 232-246.
- 7 高松千秋 1980: 魚用飼料, 「配合飼料講座, 上巻, 設計篇」, (チクサン出版社, 東京), 579-599.
- 8 J. E. Halver 1957: Nutrition of salmonoid fishes III. Water-soluble vitamin requirements of chinook salmon. *J. Nutrition*, 62, 225-243.
- 9 I. Bergman and R. Loxley 1963: Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.*, 35, 1961-1965.
- 10 U. K. Laemmli 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.