

北嶋 省吾 阪大・医・精神  
 近藤 シゲ 慈恵医大・医化  
 武田薬工大阪工場製剤部  
 高島 雅映 労働科学研  
 竹内 敏文 神戸医大・小児科  
 楠 研二 阪大・医・眼科  
 香山満寿雄 科研販売 K.K.  
 岩波真佐夫 大津市水揚町 12  
 岩藤 嘉行 岡山大・医・生化  
 玉木 敬三 岡山大・医・生化

川口 力 京都市立医大・第二生理  
 岩部猪八郎 高松市松島町 334  
 佐伯富士雄 徳島県 半田町立病院  
 箕尾 務 金沢大・医・生化  
 伊藤 智夫 農林省蚕糸試  
 原 正巳 大阪市大・医・細菌  
 大住 義雄 大阪医大・微生物  
 浦上 芳達 京都市立医大・生理  
 琉球大図書 沖縄・那覇市  
 林業試験場熊本支場

〔死 亡〕

宮川 せん 弘前大・医・生化

〔住所変更〕

飯盛 幸子 福岡市塩原 純真女子短大  
 沢田藤一郎 福岡市大濠町 144  
 成田 耕三 阪大・理  
 伊藤 哲彦 名大・医・神経精神  
 野口 照久 鎌倉市大町佐助ヶ谷 523  
 小崎 吉久 明治製菓研  
 中津誠一郎 宮崎大・農・農化  
 真木 正博 秋田県森吉町 米内沢公種病院  
 永津 俊治 名大・医・精神  
 糠 沢 敦 都立アイソトープ総合研  
 稲葉 耕三 広島大・理・植物  
 田中 文彦 大阪武田薬工  
 正宗 一 仙台市荒巻山田 5

勝沼 信彦 阪大・蛋白質  
 岡 小天 都立大・理  
 後 藤 迪 名古屋市市瑞穂区市丘町 1~62  
 東海林純一 塩野義研  
 永田 幸雄 岐阜市岩戸隆城町 33  
 吾妻 信夫 山形県大石田町 吾妻病院  
 北村 光雄 立正学園女子短大  
 古 胡 司 広島市の場町 41  
 小 滝 祥 都立大・理・生物化  
 佐野 吉彦 日本ビタミン油業工研究部  
 黒田 吉男 九州電力病院研究室  
 児玉 光雄 名古屋市千種区城山町 2~21  
 下村 卓也 東京都中野区大和町 161

【編 集 だ よ り】

本学会総会も真近くなりました。今月号は本会総会抄録号として、本誌を会員の皆様にお送りいたします。総会会場では用意しておりませんから、総会に御出席の

方をお忘れなく本誌をお持ち下さるようお願いいたします。なお、会費未納の方は、会場での混雑をさけるため、本会宛大至急本年度会費をお納め下さい。

生 化 学 第 31 卷 第 7 号 定価 150 円 送料 12 円 1 ヵ年概算 1,000 円  
 昭和 34 年 10 月 20 日 印 刷 昭和 34 年 10 月 25 日 発 行  
 編集兼発行人 東京都文京区本富士町東京大学医学部生化学教室内 島 蘭 順 雄  
 印刷所 東京都新宿区神楽坂 1 の 2 研究社印刷株式会社  
 発行所 東京都文京区本富士町東京大学医学部生化学教室内 日 本 生 化 学 会  
 振替 (東京 71653)  
 発売所 東京都文京区春木町 3 の 32 株式会社南 立 江 一 堂  
 (会員以外の購読御申込は前金にて為替または振替 (振替口座東京 149) をもって発売所南江堂あて御送金ください)

〔綜 説〕

コ ラ ー ゲ ン

分子構造と線維の再生

野 田 春 彦\*

タンパク質、核酸などの生体にみられる高分子物質は、いろいろの意味での特異性を持っており、それが生命現象の重要なカギを握っていることは古くから考えられてきた。第二次大戦後に、われわれの研究手段は著しい進歩を遂げて、タンパク質のような巨大な分子の形についてもある程度の見当がつくようになり、アミノ酸の配列の順序などもくわしく知ることができるようになってみると、この特異性の重要さは、ますますはっきりしてきた。しかし、それでもこの特異性が構造的にいかんできていたかがはっきり捉えられた例はまだなく、なにがゆえに特異であり、いかなる働きを営んでいるかについては、まだごく大ざっぱな推測が行なわれるにすぎない。

このタンパク質の特異性を研究するにさいして、どこから出発すべきかについてはいろいろ議論があろう。はっきりした生理、生化学的現象を伴うようなものは、多くは現象そのものも興味深いものであり、関連した研究も多くて仕事を進めやすいが、それだけ複雑な因子を含むので現象論的な取扱いから出発せねばならず、物理学的または化学的取扱いを正しく行なうことがむづかしい場合が多い。それに反して比較的単純な因子から成り立つような現象は厳密な考え方で研究を進められる可能性が多いけれども、反面あまり生命の神秘に触れるような興味に乏しい。

われわれは、いろいろと考えた上で後者の道を選ぶことにして、研究の対象としてはコラーゲンと、その線維再生の問題を取り上げることにした。

コラーゲンは哺乳類から海綿動物にいたるまでの広い範囲<sup>1)</sup>に見出され、しかも、それぞれの動物体の形状を保つ役割をしているので、最も一般的にどこにもあるタンパク質である。しかし、単に形を保つ働きをするだけでは、生成流転を本質とする生命とはいささか縁遠いもの

であり、しかもほとんど溶けないうために、ゼラチンの原料としてわずかに研究の対象になったにすぎなかった。われわれは、Nageotte<sup>2)</sup> によって発見された若いネズミの腱のコラーゲンの溶液からコラーゲン線維の再生する現象を取り上げて、タンパク質の巨大な分子の相互作用の本質を探る緒としようと考えた。しかしこのように単一のタンパク質のみが関与しており<sup>3)</sup>、しかも *in vitro* の現象であるにもかかわらず、生物現象のはしきれとしてなかなか複雑であり、5年に余る時日を費してなお本質に到達したとはいえない状態である。しかし最近ようやく外国においても研究者を増し、研究結果も多く現われるようになり、すべての結果を総合するとコラーゲン線維の問題の解決の方向は少なくとも定まってきた。まだまだ難問題は多く残されているが、この段階で今までの研究をふり返ってみることは無意味ではないと思う。

コラーゲン分子の構造

1) 水溶液のコラーゲン分子

コラーゲンの溶液から線維の再生する機構を探るためには、まず溶液中で分子がどんな状態にあるかを知ることが先決問題である。

ネズミの腱からえられるコラーゲンの溶液を乾して電子顕微鏡で見ると、何も粒のようなものは見えない<sup>4)</sup>し、超遠心では単一の界面を示し、分析の結果はほとんどタンパク質のみである。だからこの溶液に分散しているものは線維の切れはしではなく、何か均一な大きさと組成を持ったものであるらしい。それでこれを仮にコラーゲンの分子と考えて、大きさ、形などを研究してみた。

ネズミの腱のコラーゲン溶液の測定結果は、沈降定数  $3.5 \times 10^{-13}$  cm/sec-dyne, 拡散定数  $0.3 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sec, 容積分率極限粘度数  $1.5 \times 10^3$  となった<sup>5)</sup>。この3種の測定値のうち2個を組み合わせると分子量がえられる。その組合せとそのときの仮定のおき方とで、多少分子量の計算値が変るが平均として  $1 \times 10^6$  となる。分子の形をこの測定値から定めるには、分子が水和しているか否かを知らなければならない。しかしタンパク質分子の水和

\* 東京大学理学部生物化学科

Collagen. Molecular structure and the mechanism of fiber reconstitution.

By Haruhiko Noda (Department of Biophysics and Biochemistry, Tokyo University, Tokyo).

量を確実に知る方法がないので、長さが 3,000~5,000 Å 位の細長いものだけしかいえない。そこで流動複屈折の測定を行なうと、コラーゲン分子の回転拡散定数を知ることができる。分子の回転拡散定数はその長さの3乗に反比例し、しかもほとんど長さだけで定まるので、細長い形の分子の長さを定めるには一番良い方法である。コラーゲンの回転拡散定数は  $250 \text{ sec}^{-1}$  となって、分子の長さは 4,500 Å と算出された。

Orekhovich たちは、ウサギの皮をクエン酸緩衝液で抽出して得るいわゆるプロコラーゲン (procollagen) で分子量  $7 \times 10^5$  をえた<sup>9)</sup>。

Boedtker と Doty<sup>7)</sup> はコイのうきぶくろからクエン酸緩衝液によって抽出したコラーゲン (ichthyocol) の溶液について、光散乱、滲透圧、沈降定数と粘度の組合せ、流動複屈折の諸方法で分子量と分子形を求めた。いずれの方法でも大体一致して分子量  $3.5 \times 10^5$ 、分子の長さ 3,000 Å をえた。

また、Doty と Nishihara<sup>8)</sup> はコウシの皮からクエン酸緩衝液で抽出したコラーゲン (むしろプロコラーゲンと呼ぶべきかも知れない) で分子量  $3.6 \times 10^5$ 、分子の長さ 3,100 Å をえた。

ネズミの腱の酢酸抽出液の分子量の決定では拡散定数の測定に相当大きな誤差の可能性があったし、また、流動複屈折の測定では分子の長さに相当の分布のあることが見られ、4,500 Å の長さより短いものも混っていることが認められているので、単位の大きさの分子の二量体などが存在していたかも知れない。また、抽出に酢酸を使うかクエン酸を使うかも分子量に影響があるらしく、ネズミの腱からクエン酸緩衝液で抽出を行なうと流動複屈折の測定では長さの短い分子がえられる。しかし、クエン酸抽出の場合には 3,000 Å より短い分子も相当混入しており、また、少なくとも流動複屈折に関する限りずっと低い濃度にいたるまで分子の長さが測定溶液濃度で著しく異なるように見えるという点から見ると、クエン酸緩衝液はコラーゲン分子をよくひとつひとつにほぐす作用と共に、もっと短い相互作用は大きい分子を作るような傾向があるらしい。これらすべてを考慮してみるとネズミの腱の酢酸抽出でえられるコラーゲンの分子量は少し大きくなりすぎている傾向があるので、コラーゲン一般としては Doty たちのえている分子量  $3.5 \times 10^5$ 、分子の長さ 3,000 Å という値が妥当であろう。

ところで分子量が  $3.5 \times 10^5$  であって長さが 3,000 Å にもおよぶことになると、太さはわずかに 15 Å ならずである。こんなに細長いものが水の中で果してまっすぐ

な状態を保つことができるかと思われる。しかし電子顕微鏡の結果<sup>9)</sup>からも、溶媒の粘度を変えた流動複屈折の結果<sup>10)</sup>からも、この細長い分子は相当の剛性を持ってびんとしていることが明らかにされている。

## 2) コラーゲンのペプチド鎖の立体構造

上述のように細長い形で、しかも剛いためには内部構造は相当に規則正しいことが予想されるが、事実コラーゲンは昔から特有の X 線回折<sup>11)</sup>を示すことが知られていて、ある程度結晶のような規則正しさを持っているのである。

X 線の回折点は結晶中に原子が配列しているときにのみ生ずるものであるから、X 線回折図形から逆に原子の配列、つまり原子構造を推定することができる。しかし回折 X 線の強度は測定できるが、その波動の位相は知ることができないので推定によってきめなければならないことと、X 線の回折を起こすのは個々の原子であるから、原子間の結合がどうなっているかも推定によらなければならない。このために X 線回折図形の解釈には相当試行錯誤の方法に頼らなければならない面があって、タンパク質のような複雑な構造を X 線回折のみから決定することはよほど多くの回折点がはっきり現われないと困難なことである。

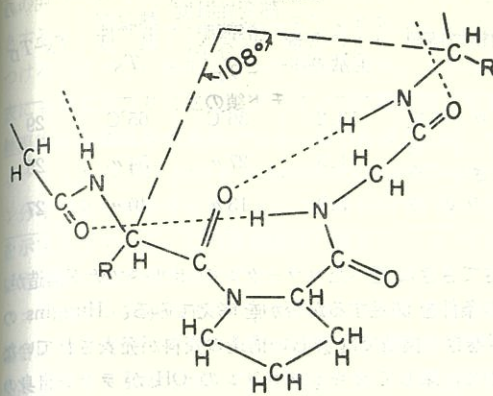
コラーゲンの場合にも特有な X 線回折図はえられるにしても、コラーゲンの構造を推論するにはその回折点の数が少ない。それでも Astbury<sup>12)</sup> 以来 10 指に余るほどのコラーゲンの原子模型<sup>13)</sup>が提出されたが、いずれもなにかの欠点があって満足のものとはいえなかった。

最近になって英国の King's College の人達がネズミの腱を少し引き伸ばした状態のものから、特に見事な X 線回折図<sup>14)</sup>をうるのに成功し、また、アミノ酸組成に関しても詳しい結果<sup>15)</sup>がえられるようになったので、新しくラセン対称を含んだポリペプチド構造の研究が始まった。まず Pauling たち<sup>16)</sup>と Huggins<sup>17)</sup>によって1本のポリペプチドから成り立つラセン状の模型が考えられた。次にインドの Ramachandran たち<sup>18)</sup>によって3本のポリペプチド鎖がそれぞれラセンの形で、それが3本1組となって、全体としてねじれる形の模型が提出された。これらの模型ではいずれもコラーゲンのアミノ酸配列は G-P-R という型式であると考えている\*。これはグリシンおよびプロリン+オキシプロリンが、それぞれアミノ酸残基総数の約 1/3 を占めることが理由になっているのである。

第1の1本のポリペプチド鎖の模型は、Huggins<sup>17)</sup>に

\* G はグリシン、P はプロリン、R は他のアミノ酸を示す。

第1図 Huggins<sup>17)</sup>の提出したコラーゲンのペプチド構造

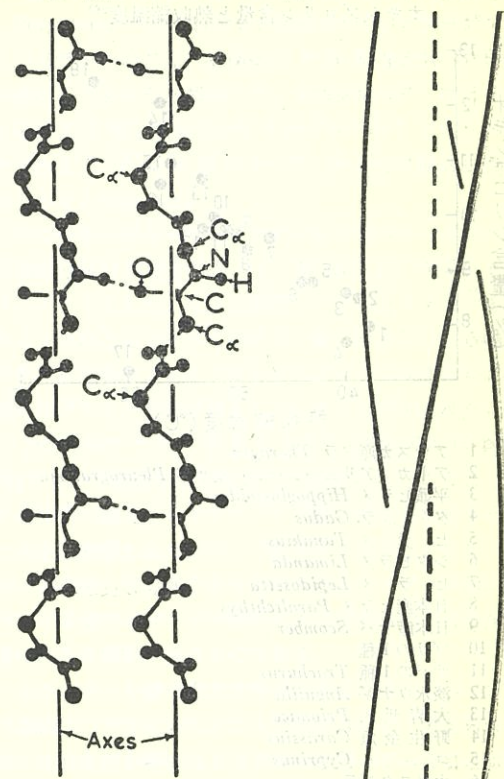


よって更に改善されて大体すべての条件を満足する形になっている (第1図)。しかし Pauling<sup>20)</sup>によると原子間隔と原子価角を厳密に保つには、この形は少々無理があるという。

第2の3本のポリペプチドの組の模型はその後 Ramachandran たち<sup>21)</sup>、Crick たち<sup>22)</sup>、Cowan たち<sup>23)</sup>、Bear たち<sup>24)</sup>によって細かく検討されると共に修正が加えられ、結局立体構造としては2種類のものだけに可能性があることに皆の意見が一致した。この2種は3本のポリペプチド鎖のラセンが組合わせられている点では全く同じ構造であるが (第2図参照)、これをペプチドのC端の方から軸に沿って眺めたときに、一方ではポリペプチド結合のイミノ基のHが時計回りの側につきだして次のポリペプチド鎖のCOと水素結合を作る (collagen-I) が、他の形ではNH基が反時計側に向いている (collagen-II) のである。この両者のうちでは後者の方が、すべての結合の距離と角の点で無理なく構成されているので、多くの人々はこの形がコラーゲンの構造であると考えたいらしい。しかし G-P-R の R にオキシプロリンが入った場合には、その OH 基の位置が collagen-I と -II では著しく異なる。collagen-I の場合にはオキシプロリンは隣のポリペプチド鎖の方に寄り添うような向にあって、その OH 基は隣の鎖の CO 基との間に水素結合を作ることができる。しかし collagen-II の形の場合には、オキシプロリンもまたその OH 基も完全に3本のペプチド鎖の組から離れた方向に突き出していて、もし水素結合を作るならば自分の属する3本の組以外の他の組のペプチド鎖と水素結合を作るより仕方がない。

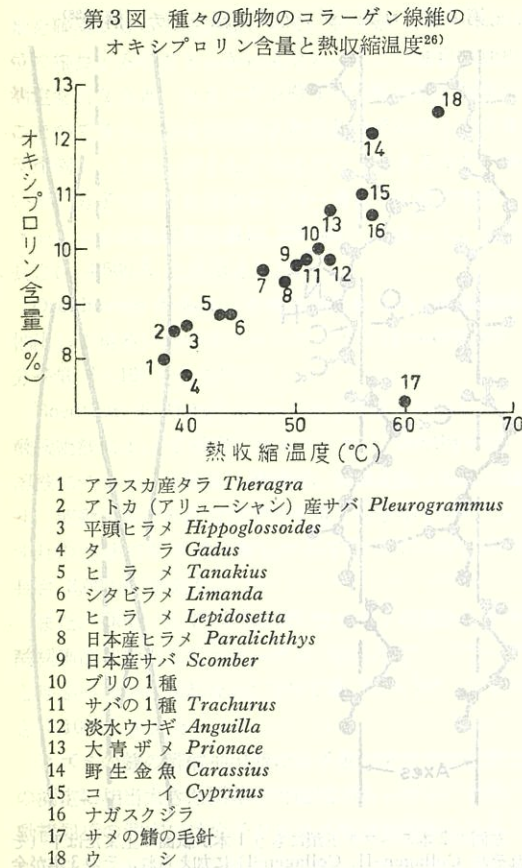
ところが、すでに Takahashi<sup>25)</sup> や Gustavson<sup>26)</sup> によっていろいろの動物のコラーゲンの構造の安定性がオ

第2図 コラーゲンの3本組ペプチド構造<sup>28)</sup>



左側の2本のペプチド鎖にもう1本が紙面上または下 (それぞれ Collagen-II, Collagen-I) に加えられ、その3本が全体として右側の図のようにねじれる。

キシプロリンの含量と密接な関係にあることが指摘されている。コラーゲンを含む組織や皮革などを熱湯に浸したりすると、甚だしく収縮して X 線回折で見ても無定形に近いものになってしまうことは古くから知られていることであって、これは規則正しく配列していたポリペプチド鎖が激しい熱運動の結果、結晶構造のきづなを振り切って自由な形になり、多くのポリペプチド鎖が互にからみ合うようになる結果と考えられている。これを超収縮の現象と呼ぶのであるが、コラーゲンを徐々に熱して行くと、ある温度をすぎるときにこれが急に起こる。そしてこの収縮温度はいろいろな種類のコラーゲンについて種類ごとに大体一定している。たとえばウシの皮ならば  $65^\circ\text{C}$ 、タラの皮では  $40^\circ\text{C}$  である。この収縮温度とオキシプロリン含量を図に表わしてみると、見事に直線上に点がなる<sup>26)</sup>ことから、コラーゲン線維の中でポリペプチド鎖の規則構造を作らせている原因のうちにはオキシプロリンの OH 基の水素結合によるところが多く、この水素結合が切れるとその構造も崩れるのである。



と考えられる(第3図参照)。

更にその上に面白いことには、溶液中のコラーゲン分子についても同じようなことがみつけられた<sup>7,8)</sup>のである。コラーゲンの溶液をある温度まで熱すると急に粘度が下り、旋光度が減り、流動複屈折を示さなくなってしまう。このような変化を起こしたときには分子の形の変化が最も著しい。すなわち前にも述べたように細長いけれどもしっかりした棒状の分子が、急にぐにゃぐにゃしたみみずのようなものになってしまうと考えれば、いろいろの性質の変化がよく説明できる。このいわゆる熱変性の起こる温度がやはりオキシプロリン含量と直線的な関係にある(第1表)。すなわちオキシプロリンのOHが作る水素結合は、コラーゲン分子相互を規則正しく結合すると同時に、1本のコラーゲン分子の中でもその構造をラセン型に保つ役割を果しているにちがいない\*。

\* このオキシプロリンのOHはコラーゲンの構造決定に重要な因子になっているが、Gustavsonの提唱した法則も無脊椎動物にはあてはまらない<sup>27)</sup>し、皮のコラーゲンの場合にもOHは分子内水素結合は作っていない<sup>28)</sup>という説もあるので少し注意する必要がある。

第1表 コラーゲンの熱変性温度と熱収縮温度<sup>26)</sup>

| 動物の種類    | オキシプロリン含量 (重量%) | 熱変性温度 (溶液中の分子) $T_D$ | 熱収縮温度 $T_S$ | $T_S - T_D$ |
|----------|-----------------|----------------------|-------------|-------------|
| コウシの皮    | 13.2            | 36°C                 | 65°C        | 29          |
| コイのうきぶくろ | 11.3            | 27 "                 | 54 "        | 25          |
| タラの皮     | 7.0             | 13 "                 | 40 "        | 27          |

さてさきに述べたコラーゲンのポリペプチド構造が、この条件を満足するか否かを考えてみる。Hugginsの1本巻きの模型では詳しい構造の資料が発表されていないので、果してオキシプロリンのOHがラセン自身の内部で水素結合を作ることができるか否かは不明である。最終的に改良される前の *cis*-構造を含んだ模型では、明らかにこの水素結合の可能性が考えられていたので、最終の模型でも考慮に入れてある可能性はある。Crick たちの模型ならば collagen-I といわれる方の模型でなくてはオキシプロリンのOHは分子内水素結合を作らない。

以上のように1本ラセンと3本ラセンの2種類の模型がコラーゲンのペプチド構造に対して提出されているのだが、多くの研究者がすべての可能性をしらべた上で意見の一致を見ている3本ラセンの模型の方が少なくとも collagen-I と collagen-II のいずれが真実に近いかにについては意見がわかる。原子間隔や原子価角を重視すれば collagen-II の型の方がよさそうだし<sup>29,28)</sup>、オキシプロリンの分子内水素結合を重要視すれば collagen-I 型がよい。実際のコラーゲンの中ではIとIIの両型が共存して熱力学的平衡にあっても差支えないのであるが、この点に関してはもっと別の実験の結果を待たなければならぬ。

コラーゲンが3本のポリペプチドから成るとする考えを支持するものに KCNS や、アルカリの影響の実験結果<sup>7,8)</sup>がある。コイのうきぶくろのコラーゲン (ichthyocol) は 2M の KCNS やアルカリで約 1/3 の分子量のものに分裂するし、コウシの皮から取ったプロコラーゲンは KCNS で 2/3 と 1/3 の2種類の粒子になり、更にアルカリで全部が 1/3 のものになってしまう。これらの事実は3本のポリペプチド鎖をつなぐ水素結合が切れて、それぞれの鎖が分離したためだと説明すれば、3本組の説とうまく合うのである。熱変性のときにも大体同様のことがおこる。

オキシプロリンのOHの作る水素結合が全部それぞれのコラーゲン内子内での安定化にのみ用いられているとすると、コラーゲン線維を作るときに分子を互に結びつける力はどこに由来するかが問題になる。しかし第1表にも見るとおりにオキシプロリンの含量が変わっても変性温度と収縮温度の差がいつも一定であることは、オキシプロリンのOHの作る水素結合は線維内でコラーゲン分子相互を結合させる力としては使われていないことを示すようである。この線維形成の結合力については後にもう少し論ずることとする。

コラーゲン分子のポリペプチド鎖がラセン構造を作る場合にも、また、そのラセンが集って線維を作る場合にも、水の分子が媒となって水素結合を作って構造の規則化と安定化に寄与している可能性がある。このことはコラーゲン線維のX線回折図形が水の含量によって示す変化が単に原子間またはペプチド鎖間の距離のみの変化でなく、質的な変化を含んでいるところが相当あることから、かなり確かにいえる。しかし、まだコラーゲンのポリペプチド鎖の構造を水を含めて解析することはほとんど行われていない。ただ最近赤外線吸収と重水素置換の方法を用いて、分子内水素結合を作らないCO基には相当しっかりと水の分子が結合<sup>29)</sup>していることが推定されている。コラーゲン線維の膨潤、コラーゲンまたはゼラチンのゲル化の問題なども関連して、水分子との間に作られる結合についてももっと研究することが必要である。

### 3) コラーゲンのアミノ酸組成とその配列

コラーゲン、またはその加水分解産物が主成分であるゼラチンのアミノ酸組成は、材料となる動物とその組織のちがいが、また精製の方法の差によって少しずつ異なるけれども、いつでも共通していえることは非常に多量のグリシンの存在すること、それよりわずかに少ないがやはり相当量のプロリンとオキシプロリンが存在することである。ことにオキシプロリンはほとんど他のタンパク質には見られないので、コラーゲンの定量をオキシプロリンの定量でおきかえられることも多い。少量のオキシリジンの存在もコラーゲンに特異的である。

グリシンはほとんどあらゆる場合に全残基数の約 1/3 を占める。プロリンとオキシプロリンを加えても多くの場合には全残基数の 1/3 よりはずかしく少ないが、アスパラギン酸、グルタミン酸の二塩基アミノ酸を加えると大体 1/3 に達することは Huggins<sup>30)</sup> によって指摘されている。これらの二塩基アミノ酸が自身で環状となつて、プロリンの代りにペプチド鎖中に位置する可能性を

Huggins は提唱したがあまり受け入れられていない。

Bergmann<sup>30)</sup> はこのアミノ酸組成から、コラーゲンおよびゼラチンのアミノ酸構造は P-G-R または G-P-R の繰返しであろうと推論した。Grassmann<sup>31)</sup> はゼラチンを加水分解したものから Lys-Pro-Gly\* というペプチドをえて、P-G-R がコラーゲン分子内の繰返しの単位であると結論した。

その後多くの人々<sup>32)</sup> がゼラチンおよびコラーゲンの部分加水分解の実験を行なって、40種以上にのぼるオリゴペプチドをえた。それを整理してみるとグリシンとアラニンはほとんどすべてのアミノ酸と結合している場合が見られたが、プロリンとオキシプロリンはほとんどの場合にグリシンとだけ結合していることが知られた。特に Schroeder たちの結果によると -Gly-Pro-Hydro-Gly- という結合が存在することがわかり、このことはX線回折の結果からポリペプチド鎖の構造を推定するのに大きな影響をあたえた。つまりプロリンとオキシプロリンが連続して存在することになると、ペプチド鎖につづいて2個のピロリジン環が入るので立体的に可能な構造は大きな制約を受けるのである。

コラーゲンを酸で加水分解する場合には、そのペプチド連鎖は、でたらめなところで切断されると考えられるが、これを何か特別なところでだけ切ってみることは誰もが考えつくところである。Grassmann<sup>33)</sup> たちはコラーゲンを変性させた後にトリプシンで分解を行ない、その分解物をクロマトグラフィーと電気泳動によって分別して数多くのペプチドをえた。トリプシンはアルギニン、リジンなどの塩基性アミノ酸のC端でペプチド鎖を切ることが知られている。えられたオリゴペプチドを分析した結果は複雑で、なかなか簡単な結論で解釈できないものであった。ただコラーゲン全体が G-P-R または P-G-R という3単位の繰返しだけでないことがはっきりと結論された。

ガス壊疽を起こす細菌の菌体外毒素の中には、タンパク質の中でコラーゲンまたはゼラチンだけを分解するコラゲナーゼ (collagenase) と呼ばれるものが含まれることはよく知られている。このコラゲナーゼを用いてコラーゲンを分解する試みが数カ所<sup>34-36)</sup> で行なわれた。われわれのえた結果をまとめてみると次のようになる。コラゲナーゼで切断されたペプチドのN端は95%以上がグリシンであり、C端は70%オキシプロリン、20%ア

\* アミノ酸の略号として次のものを用いる。

グリシン: Gly または G, プロリン: Pro または P, オキシプロリン: Hypro, アラニン: Ala, リジン: Lys.

ラニンであった<sup>35)</sup>。また、コラゲナーゼでコラーゲンを加水分解した生成物の中には Gly-Pro-Hypro と Gly-Pro-Ala が多量に存在し、両方でもとのタンパク質の約 1/4 にも達する量であった<sup>35,36)</sup>。コラーゲンの中には G-P-R という構造が相当あり、主としてこの部分がコラゲナーゼによって加水分解を受けるとことは確かになった。

しかし同時にコラゲナーゼを十分作用させてもそれ以上分解されない、相当に大きなオリゴペプチドが取れることも明らかになったので、前に述べた Grassmann のトリプシンによる分解実験の結果と共に G-P-R 以外の構造の部分が存在することも確かになった。G-P-R の配列をしている部分は前に X 線によるペプチド鎖の構造決定に関してのべたことから明らかなように、X 線回折を示すような結晶構造を持つと思われるけれども、それ以外のところには G-P-R の繰返しのような構造はなく、むしろ比較的乱雑な構造を取っているのではないかと思われる。実際 Bear<sup>1)</sup> は電子顕微鏡および X 線小角散乱によってコラーゲン線維に認められる 650 Å の回折は、結晶部分と非結晶部分がこの週期で交代しているのに起因すると考えているのである。しかしコラーゲン分子の中に結晶性部分と非結晶部分が 650 Å またはその何分の一かの週期で規則正しく繰返ししているとすれば、そのような構造の内容とそれを作り出す機構はなんであろうか。このように長い距離にわたって存在する週期性に関しては、まだわれわれはあまりに無知である。

G-P-R の繰返しの構造を持つ結晶部分で、R はほとんどアラニンとオキシプロリンである。更に P の 1 部はオキシプロリンでもあるらしい。それはコラゲナーゼで 10<sup>5</sup> g あたりのコラーゲンから約 150 残基のグリシン N-末端が作られるが、プロリンは 10<sup>5</sup> g のコラーゲンの中に 110~120 残基しか存在しない。そこで全部のグリシンが -Gly-Pro- から由来していただしたのではプロリン残基が足りないのである。しかもコラゲナーゼは -P-R-R'-P- というペプチド結合の存在するところだけを加水分解することが、合成基質の研究<sup>37)</sup>から明らかにされており、左側の P はオキシプロリンでもよいこと<sup>38)</sup>も確かめられているからである。このオキシプロリンがどのような分布を実際に示し、その OH 基の作る水素結合がどのような位置にあるかは今後の研究問題である。

更に組成アミノ酸の中には、コラーゲン分子の長さ当りで計算すると 650 Å またはその 1/3 の 220 Å あたり

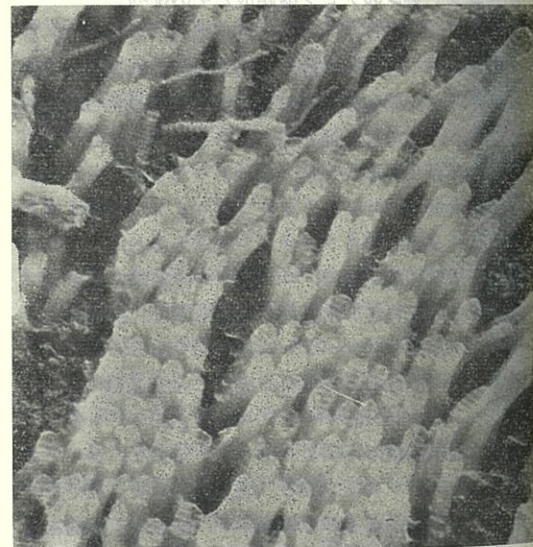
に 1 個存在するものもある<sup>39)</sup>。このように数の少ないものはチロジン、メチオニン、フェニルアラニンなどであるが、いずれもすべての種類のコラーゲンにほとんど同じ位の割合で含まれるので、なにかコラーゲンの特殊な横紋構造に関係があるかも知れない。ところが、一方ではアルコール沈殿でコラーゲンを精製すると、チロジンの含有量はずっと減る<sup>40)</sup>という結果もある。

#### コラーゲン線維の再生

##### 1) 3 種類の再生線維

コラーゲン線維は肉眼で見ると絹のような光沢があり、光学顕微鏡で見ると複屈折を示すが、電子顕微鏡で強拡大してみると、線維は更に細い線維から成り、その細い線維は 650 Å の間隔で繰返す規則正しい構造を持っている(第4図参照)。このコラーゲン線維を一度溶解してから、再び沈殿させるときに条件をよく選べば、規則正しい形の線維を再生させることができることは Nageotte<sup>2)</sup> 以来知られている(第5図参照)。この再生コラーゲン線維は電子顕微鏡で見たときに薄くて紡錘形の、いわば麦の葉のような形である点で、もとのコラーゲン線維が円柱状であったのとは異なる以外は全くもとのコラーゲン線維と同じ性質を示す。X 線回折の実験の結果<sup>41)</sup>によるとポリペプチド構造も同じである。しかしこれはコラーゲン分子のポリペプチド構造が溶解によって変化しないならば、その分子が再び寄り集って線維にな

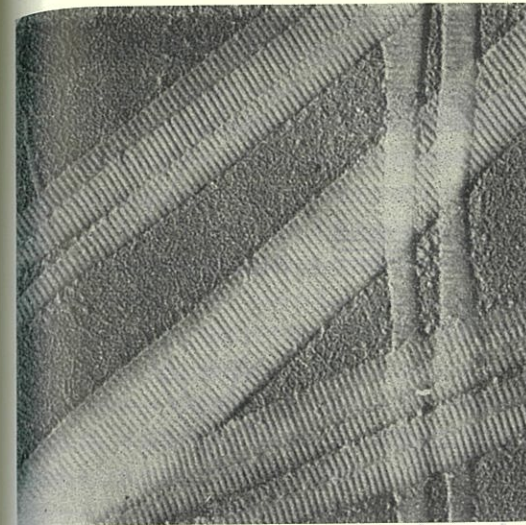
第4図 コラーゲン線維



ニワトリの翼の腱、ななめの切断面が見えている。(12,000×)

(6)

第5図 再生コラーゲン線維



ネズミの腱の抽出液より pH 5 でえたもの。(18,000×)

った場合にポリペプチド構造がもとのままなのは当然かも知れない。

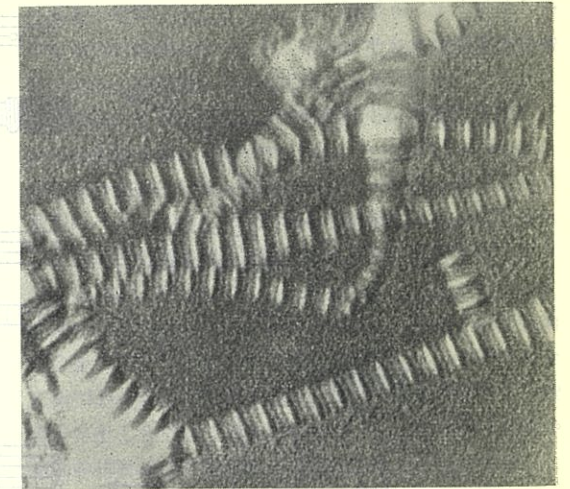
最近になって、コラーゲンの溶液に加えるものによっては、動物の組織内では見られたことのない構造の線維が作られることが発見された。これが第6, 7図に示すもので発見者たちの命名<sup>42,43)</sup>に従ってそれぞれ FLS 線維 (fibrous long spacing), SLS 線維 (segment long spacing) と呼ぶことにする。

FLS 線維はコラーゲン溶液に血清の糖タンパク質を加えると最もよくできるもので、構造の周期が 1,800~3,000 Å である。太い1本または2本の横縞のあるのが特徴で、その間の部分は非常にうすくて電子顕微鏡でみると下がすけて見えるほどである。血清の糖タンパク質以外に多くの高分子物質でも FLS 線維を作れることも報告されている<sup>44)</sup>。

SLS 線維は図に見られるとおりに非常に変わった形をしている。長さ 1,500~3,000 Å の枕のような形をしたもので、数多くの横縞が入っている。コラーゲンをうすい酸に溶したものにアデノシン三リン酸(ATP)を加えると沈殿するのがこの線維である。他の2種類の線維はどれも長さ制限のないものであるが、これはきまった長さでぷつと切れた形であるのが特徴である。

コラーゲンの溶液から再生する3種類の線維はいずれも再び酸で溶解することができるので、それからコラーゲンを取り出して別の形の線維に変えるこ

第6図 FLS 線維



ウシの血清糖タンパク質とネズミの腱の抽出液から作ったもの。

(15,000×)

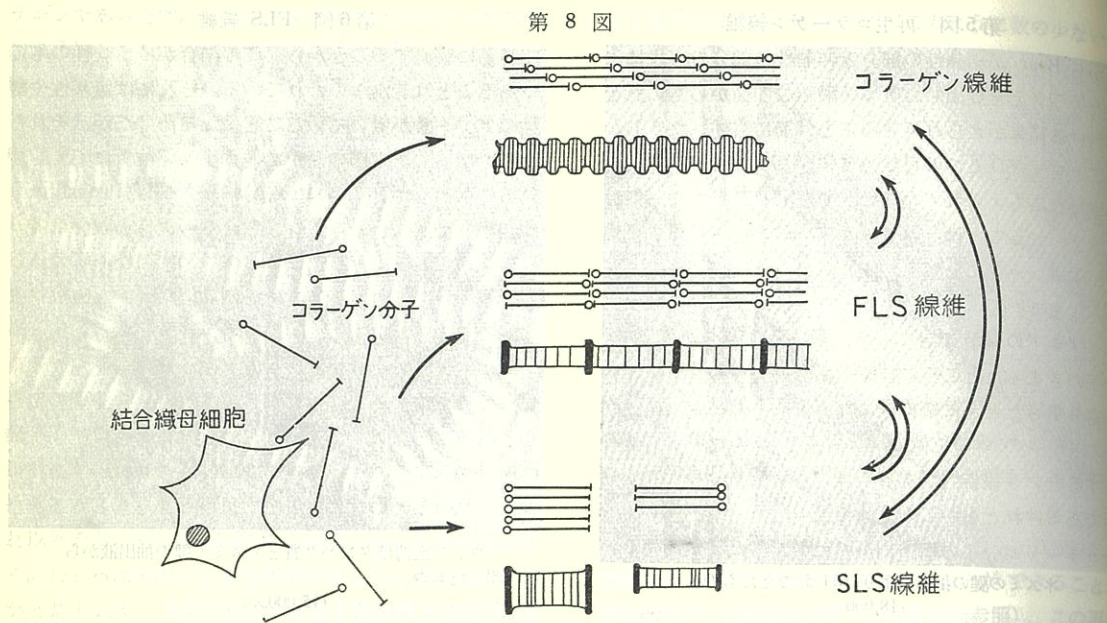
とができる<sup>45)</sup>。すなわち3種類の線維は同じコラーゲンを材料として再生するので、はじめのコラーゲンの中に3種類の別のものが含まれていて、それが別々に形を現わしたのではない。この3種類の線維を作る単位を Schmitt たちは "tropocollagen" と呼んでいるが、これはいままでもこの文の中ではコラーゲン分子と呼んできたものにほかならない。

第7図 SLS 線維



ウシの血清糖タンパク質とネズミの腱の抽出液から作ったもの。(18,000×)

(7)



同じコラーゲン分子の集合である線維に、このように異なった3種類の形が現われることはまことに不思議である。Doty たちが数種のコラーゲン分子の長さを大体  $3,000 \text{ \AA}$  と推定していることから、Schmitt たちはこれを tropocollagen の長さと考えて、第8図に模式図で示すような機構<sup>46)</sup>でコラーゲン分子から線維の生成を説明している。この機構を考えた根拠は、3種類の線維の横紋構造の対称性である。FLS 線維では特に目立った2本の太い縞のほかに多くの細い縞がある(第6図ではシャドウを施してあるので見にくい。線維を乾したままのほうがよく見える)が、それらの配列の仕方は線維のどちらの方向からたどっても同じである。ところが SLS 線維では第7図からも明らかなように、線維の横紋をくわしく見ると線維の一方の端を他端と区別することができる。つまり横紋構造が非対称である。通常のコラーゲン線維も第4, 5図のように線維の外形だけに注目してみると、横紋構造は対称であるけれども、線維をリタングステン酸などで染めて細かい構造<sup>47)</sup>を出してみると非対称である。そこでコラーゲン分子自身は長さの方向に頭と尾を区別できる構造を持っていて、横紋構造を作る化学構造の分布が非対称であるとすると、その分子が全部方向を揃えてならば非対称な横紋構造を作り、頭と尾が入り混ってならば対称な横紋構造を作る。つまり通常のコラーゲン線維と SLS 線維は前者で、FLS 線維は後者の場合にあたるわけである。同じ非対称構造の

場合にコラーゲン線維と SLS 線維が区別してできる点は、同じ平行な分子配列でも分子相互の位相が揃ったものと揃わないものの区別によるのである。SLS 線維は長さが分子の長さと同じなのだからコラーゲン分子が横にすっきり揃ってならんでいるにちがいない。そして分子の持っている模様がすっきり線維の横紋に見えるわけである。通常のコラーゲン線維では分子の縦の方向にお互にいくらか位相のずれた位置のものが生じるために、SLS 線維とは異ってもっと簡単な横紋になり、しかもその週期が  $650 \text{ \AA}$  と短くなっている。重金属で電子染色をしても通常のコラーゲン線維に観察される横紋はせいぜい10本で、SLS 線維に見られる横紋の数よりずっと少ないこと、再生コラーゲン線維は紡錘形になることなどはこの考え方を支持する事実である。(葉の束の例を考えても両端をそろえなければ紡錘形になる)更に最近、腱や骨などの組織の圧電効果の測定から、構成タンパク質線維は線維方向に異方性を持ち、しかもそれが向きを揃えて平行にならんでいるという結果<sup>48)</sup>がえられていることは、やはり第8図の考え方を支持する。

## 2) 横紋構造

以上はコラーゲン線維の横紋と、コラーゲン分子の化学的構造の間の関係をつける考え方のひとつであるが、コラーゲン分子自身の持つ模様が一体化学的にどんな構造であるのかわからない今の段階では、この考え方をこれ以上深く検討することができない。

コラーゲン線維の横紋に関しては、小角 X 線回折の結果から Bear が結晶性の部分と非晶性の部分の交代によるという考えを提出し、アミノ酸組成の面からもこれを裏付ける結果がえられていることは前にも述べた。しかしこれもまだひとつの可能性にすぎないので、具体的な証拠はなにもえられていない。更にもうひとつの可能性と考えられることは、コラーゲン分子のポリペプチド構造が1本ラセンにしても、また3本ラセンにしても、頭から尾まで同じ太さではなく、ところどころに分枝またはペプチドの環ができていられるかも知れないことである。分子のきまったところに枝や環が付着していれば、これが寄り集ったときに縞模様になるはずである。コラーゲンのリジンの  $\epsilon$  の位置のアミノ基にペプチド結合が存在するという報告<sup>49)</sup>があるのは、まだ実験的な検討が必要であるけれども、この意味で面白い。

コラーゲン分子の構造の分布に関しては、音波で分子を切ってみる Nishihara, Doty<sup>50)</sup>の実験で面白いことが見つけられている。音波が作用するとコラーゲン溶液の粘度はどんどん下がるが、旋光度はあまり変らない。すなわちコラーゲン分子は他の変化を起こさず、ただ長さだけが短く切れるのである。しかしやがて音波の作用ではなんの変化もなくなってしまふ。このときに分子の長さは最初の  $1/4$  になっているという。つまりコラーゲン分子は  $1/2$  と  $1/4$  のところに切れやすい個所を持っているらしい。更に音波で切れたコラーゲン分子から線維の再生を試みる<sup>51)</sup>と、わずかに音波を作用させただけでほとんど分子が短くならないとき、すでにコラーゲン線維を作る作用は失われてしまふ。しかしそのときにも ATP によって SLS 線維を作る働きは残っている。ただ分子の両端がなにか変化しているらしく、できる SLS 線維は枕のように太いものでなく平たいものになり、しかも SLS 線維がいくつも長さの方向につながったものができる。音波の作用が進んで分子が短くなるにつれて、ATP で作られる SLS 線維も短くなる。SLS 線維は特有の縞模様があるから、残っている部分がもとの分子のどの部分であるかを知ることができるが、不思議なことにもとの分子の端の部分が残っていないと SLS 線維にならないのである。このコラーゲン分子の両端の性質および音波で切れやすい  $1/4$  の位置が、どのような化学構造によってその性質を獲得しているのかについて多少の研究もある<sup>52)</sup>けれども、ここには省略する。

コラーゲン分子の構造と線維の横紋構造を考える上で最も大切だと思われることで、しかも今まであまり研究されていない問題は、コラーゲン分子を相互に結合させ

る力のことである。コラーゲン線維が弱い酸やアルカリで容易に膨潤することから、この結合がイオン性のものであることは昔からいわれている。それには塩基性や酸性のアミノ酸が働いていることになるわけだが、それらのものはペプチド鎖のなかで規則正しい位置に配置しているのだろうか。-Gly-Pro-Ala- と -Gly-Pro-Hydro- が相当の範囲にわたって存在し、この構造の部分は隣り同志のペプチドでもお互に揃って結晶状になっているらしいが、この結晶部分で極性のある原子団はオキシプロリンの OH である。

前にも述べたように、オキシプロリンは分子内で水素結合を作っている可能性が多いとすれば、分子間の結合にあづかるのは何であろうか。酸性や塩基性のアミノ酸の分布をしらべることで、G-P-R という形のペプチドの結晶の研究がこの問題をとくのに必要だと思われる。

組織の中に存在するコラーゲンの抽出されやすさにはいろいろと段階がある。一般的にいって若い組織からはコラーゲンを抽出しやすい。このことは代謝率を測定すると可溶性のコラーゲンの方が不溶性部分よりずっと大きいこととも関連して、可溶性のコラーゲンまたはプロコラーゲンはコラーゲンの前駆体だとされる根拠になっている。つまりまず可溶性の状態に作られたコラーゲンが、やがて不溶性のものになって行く。そして年令の進むにしたがって可溶性の部分は少なくなるのである。この場合不溶化に伴う変化は、コラーゲンなりコラーゲン線維の構造としてわれわれの考えているものに更に付加されるものかも知れないが、生理的な面、特に老衰の現象などと関連して興味がある。最近コウシの皮をクエン酸緩衝液で抽出した残りの部分、すなわち不溶性の部分をペプシンで消化すると、再びコラーゲンを抽出できるようになり、そのときえられるコラーゲンはさきに抽出されたものと全く同じ性質を持っていることがみつけれられた<sup>53)</sup>のは、これに関連して面白い。

## 生体高分子の働きと構造

生物体内にはあっても、生命現象からはやや縁遠いコラーゲンの研究であるから、単に手馴らしのように考えていたのであるけれども、段々と進むうちに案外生物化学上の重要な問題と密接に関連したところもいくつか現われてきた。

第1はコラーゲンのペプチド鎖構造の研究に利用しているコラゲナーゼに関して、その基質特異性とペプチドの立体構造の関係の問題である。前にも少しふれたようにコラゲナーゼは基質として、P-R-R'-P という長いペ

プチド構造の存在を必要とする。しかも N 端は塞がれていなければならない。もし酵素と基質間の特異的な結合が、抗原と抗体の場合のようにいわゆる「カギとカギ穴」として表現される空間的な形を基礎にしたものであるならば、4 個のペプチドにまたがる大きな構造に対して細かい要求をしているコラーゲナーゼは、基質の立体構造および基質との結合の立体関係についても当然特異的な要求をするだろうと予想される。

この観点から、コラーゲンに対して提出されているペプチド鎖模型や、コラーゲナーゼの基質となりうる合成ペプチドの立体構造を調査してみたが、立体構造や立体関係を限定できる場合を発見できなかった。この問題に結論を与えるためには立体障害によって特殊な立体構造しか取れないようなペプチドを合成してみるより方法がなさそうである。ただ熱変性したコラーゲンまたはゼラチンは未変性コラーゲンよりずっと早く、コラーゲナーゼの加水分解を受けるという事実<sup>53)</sup>は、この基質の立体構造に対する特異的要求に関係があると思われる。しかし、これもコラーゲンのペプチド鎖構造がもっとはっきりして、特に水素結合の位置と方向などもきちんと定められてみないと、実験と理論を結びつけることができない。

今までに多くのプロテアーゼまたはペプチダーゼの基質特異性が決定されてはいるが、基質の立体構造を考慮に入れる場合はまだない。ここでコラーゲナーゼの基質の立体構造に対する要求と更にコラーゲナーゼの活性部分の構造とが知れるならば、酵素反応の機構、特に反応の中間段階などの解析には一番よい材料のひとつになりそうである。

第2はコラーゲン分子とコラーゲン線維の関係を、核タンパク質と染色体の係に類推的におしひろめることである。この考えは Schmitt<sup>54)</sup> がいだしたもので、染色体の縞模様とコラーゲン線維の縞模様とが似ているというのである。一見唐突で無意味な類推のように見えるけれども、細長い分子の持っている構造がその分子の集合の上に少し次元の異なった構造として現われる問題という点では密接に関連している。また、この染色体が核のなかで他のタンパク質などと相互作用をする場合も、コラーゲンの線維生成に似通ったことが起こっている可能性もある。

コラーゲン線維の生体内での生成に関して、近頃しきりに研究されていることは、オキシプロリンやオキシリジンの生合成の問題<sup>55)</sup>である。たとえばオキシプロリンを組織に与えても、そのままの形では取り入れられないで、むしろプロリンとして取り入れられたものがどこか

の段階で、オキシプロリンに変えられるのである。またどの段階で OH 基が入れられるかはっきりしないけれども、もしポリペプチド鎖ができる時、またはでき上ってから適当な位置で、プロリンに OH 基が入れられるとすれば、この反応に与かる酵素はコラーゲナーゼに似た立体的な特異性を持っていることが予想される。まずコラーゲンにおけるオキシプロリンの分布をもっとはっきり定めなくてはならないことだけでも、そのような立体的な特異性を持った生合成は、非常に興味のある問題である。

コラーゲンの研究もようやく順調な動きに乗った感じである。少なくともいろいろな問題点と、それらをいかなる方向に追求するべきかがはっきりしてきた。そうすると加速度的に急な進歩をするのが近頃の常である。コラーゲン線維の再生機構の解明の夢はまもなく実現するかもしれない。

#### 文 献

- 1) Bear, R. S.: *Advances in Protein Chem.*, Academic Press, New York, 7, 69 (1952)
- 2) Nageotte, J.: *Compt. rend. acad. sci.* Paris, 184, 115 (1927)
- 3) 野田春彦: 日化誌, 76, 981 (1955)
- 4) Noda, H., Wyckoff, R. W. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 494 (1951)
- 5) 野田春彦: 日化誌, 76, 978 (1955)
- 6) Orekhovich, V. N., Shpikiter, V. O.: *Reports, Academy U. S. S. R.*, 101, 529 (1955)
- 7) Boedtker, H., Doty, P.: *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 248 (1955)
- 8) Doty, P., Nishihara, T.: "Recent Advances in Gelatin and Glue Research," Pergamon Press, London, p. 92 (1957)
- 9) Hall, C. E., Doty, P.: *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1269 (1958)
- 10) 野田春彦: 日化誌, 79, 767 (1958)
- 11) Herzog, R. O., Gonnell, H. W.: *Naturwissenschaften*, 12, 1153 (1924)
- 12) Astbury, W. T.: *J. Intern. Soc. Leather Trades Chemists*, 24, 69 (1940)
- 13) たとえば野田春彦: 「コラーゲン」, 「タンパク質化学」4巻, 共立出版 (1956) を参照
- 14) Cowan, P. M., North, A. C. T., Randall, J. T.: *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, 9, 115 (1955)

- 15) Bowes, J. H., Elliott, R. G., Moss, J. A.: "Nature & Structure of Collagen," Ed. by J. T. Randall, Butterworth, London, p. 199 (1953)
- 16) Pauling, L.: Presented at the Meeting of the American Leather Chemists' Assoc. (1953)
- 17) Huggins, M. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4054 (1954)
- 18) Ramachandran, G. N., Kartha, G.: *Nature*, 174, 269 (1954)
- 19) Huggins, M. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 43, 209 (1957)
- 20) Pauling, L.: "Recent Advances in Gelatin and Glue Research", Pergamon Press, London, p. 11 (1957)
- 21) Ramachandran, G. N.: *Nature*, 177, 710 (1956)
- 22) Rich, A., Crick, F. H. C.: *Nature*, 176, 915 (1955)
- 23) Cowan, P. M., McGavin, S., North, A. C. T.: *Nature*, 176, 1062 (1955)
- 24) Bear, R. S.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 363 (1956)
- 25) Takahashi, T., Tanaka, T.: *Bull. Jap. Soc. Fish.*, 19, 603 (1953)
- 26) Gustavson, K. H.: "The Chemistry and Reactivity of Collagen," Academic Press, New York, p. 44 (1956)
- 27) Ward, A. G.: "Gelatin and Glue Research," Ed. by G. Stainsby, Pergamon Press, London, p. 197 (1958)
- 28) Rich, A., Crick, F. H. C.: "Gelatin and Glue Research," Ed. by G. Stainsby, Pergamon Press, London, p. 20 (1958)
- 29) Fraser, P. D. B., Marae, T. P.: *Nature*, 183, 179 (1959)
- 30) Bergmann, M.: *J. Biol. Chem.*, 110, 471 (1935)
- 31) Grassmann, W., Riederle, K.: *Biochem. Z.*, 284, 177 (1936)
- 32) Heyns, K., Anders, G., Becker, E.: *Z. physiol. Chem.*, 287, 120 (1951); Kroner, T. D., Tabroff, W., McCarr, J. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4884 (1953); Schroeder, W. A., Kay, L. M., Le Gette, J., Honnen, L., Green, F. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 3556 (1954); Kroner, T. D., Tabroff, W., Carr, J. J. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3356 (1955)
- 33) Grassmann, W., Hoffmann, U., Kühn, K., Hörmann, H., Endres, H., Wolf, K.: "Connective Tissue", C. C. Thomas, Publ., Springfield, p. 157 (1957)
- 34) Seifter, S., Gallop, P. M., Klein, L., Meilman, E.: *J. Biol. Chem.*, 234, 285 (1959); Mandl, I., Zipper, H., Ferguson, L. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 74, 1465 (1958); Kazakova, V. O., Orekhovich, V. N., Shpikiter, V. O.: *Doklady Akad. Nauk., S.S.S.R.*, 122, 657 (1958)
- 35) 野田, 永井: コラーゲン研究会, 第1回会合 (1959) に発表
- 36) Schrohenloher, R. E., Ogle, J. D., Logan, M. A.: *J. Biol. Chem.*, 234, 58 (1959)
- 37) Nagai, Y., Noda, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 298 (1959)
- 38) Grassmann, W., Hörmann, H., Nordwig, A., Wünsch, E.: in preparation.
- 39) Burge, R. E., Cowan, P. M., McGavin, S.: "Gelatin and Glue Research," Pergamon Press, London, p. 25 (1957)
- 40) Eastoe, J. E.: *Biochem. J.*, 61, 589 (1955)
- 41) Wyckoff, G. R. W., Corey, R. B.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 34, 285 (1936)
- 42) Highberger, J. H., Gross, J., Schmitt, F. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 37, 286 (1951)
- 43) Schmitt, F. O., Gross, J., Highberger, J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 39, 459 (1953)
- 44) Fitton-Jackson, S., Randall, J. T.: "Nature and Structure of Collagen," Edited by J. T. Randall, Butterworth, London, p. 181 (1953)
- 45) Schmitt, F. O., Gross, J., Highberger, J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 39, 459 (1953)
- 46) Schmitt, F. O., Gross, J., Highberger, J. H.: *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, No. 9, p. 148 (1955)
- 47) Schmitt, F. O., Gross, J.: *J. Am. Leather Chemists' Assoc.*, 43, 658 (1948); Wolpers, C.: *Makromol. Chem.*, 2, 37 (1948); Grassmann, W., Hofmann, U., Nemetschek, Th.: *Naturwissenschaften*, 39, 215 (1952)
- 48) 深田栄一: コラーゲン研究会, 第1回会合に発表 (1959)
- 49) Solomons, C. C.: *S. African J. Med. Sci.*, 22, 160 (1957); Mechanic, G. L., Levy, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 1889 (1959)

50) Nishihara, T., Doty, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, 411 (1958)  
 51) Hodge, A. J., Schmitt, F. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, 418 (1958)  
 52) 西原富雄, 宮田暉夫: タンパク質構造討論会(1959)  
 53) 永井裕, 野田春彦: 未発表  
 54) Schmitt, F. O.: *Nature*, **177**, 503 (1956); *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **42**, 789 (1956)  
 55) Fitton-Jackson, S., Smith, R. H.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 897 (1957); Gould, B. S.: *J. Biol. Chem.*, **232**, 637 (1958); Van Slyke, D. D., Sinex, F. M.: *J. Biol. Chem.*, **232**, 797 (1958)  
 (受付 1959. 9. 30)

〔原 著〕 酵素水解に伴う血漿タンパク質の物理化学的、  
 免疫学的性質の変化\*

唐 沢 直 人\*\*

タンパク質水解酵素は種類によってその基質に働く作用点を異にする<sup>1)</sup>。血漿タンパク質が水解を受けるさいもその崩壊状況は作用酵素により当然差異があると思われる。タンパクの巨大分子が酵素水解を受けてある程度の大きさの中間分子を生じ、次いでそれが更に小さい断片に分解され、遂にアミノ酸まで分解されていくか、またはタンパク質より直ちにアミノ酸にかわるかはタンパク質の構造研究の上からも重要であるのみならず、生物学的見地からも重要である。

Tiselius は卵アルブミンのペプシン水解については水解を受けたタンパク分子は中間分子を生ずることなしに直ちに分子量数千のものとなるといっており<sup>2)</sup>、血清アルブミンにペプシンまたはトリプシンを作用させても同様な水解過程をとるとする人もいる<sup>3,4)</sup>。また抗体  $\gamma$ -グロブリンのペプシンまたはトリプシンによる水解はジフテリア抗毒素の精製に 응용されており、水解初期に分子はほぼ同じ大きさの2つの部分にわかれるが、なお、ジフテリア毒素との反応性を維持している。しかし、さらに消化を進め分子が1/4の大きさに切られると、もはや反応しなくなると報ぜられている<sup>5)</sup>。なお、精製物の抗体価に関しては、ペプシンを用いる Pope の方法<sup>6)</sup>がトリプシンを用いる Northrop の方法<sup>7)</sup>にまさっている。百日咳抗毒素の酵素水解に関する沖本の実験<sup>8)</sup>も、抗体価はペプシン水解によってほとんど減じないが、トリプシン水解によっては低下する。

一方、Landsteiner ら<sup>9)</sup>はウマ血清をペプシンで短時間消化した物につき、酵素水解を受けた抗原もとの抗体との反応性は弱くなるが、なお沈降物生成能力が保持されていることを確かめている。最近では Lapresle<sup>10)</sup>は人血清アルブミンをウサギの脾臓の粗抽出液で消化すると、抗人アルブミン-ウサギ血清と沈降物を作る3成分

を生ずると報じている。これらの成分は pH 8.6 において電気泳動による易動度は未消化アルブミンに非常に近く、恐らくアルブミンが少々崩壊したため生じたものであると推論している。それゆえ、タンパク質の酵素水解に伴う物理化学的諸性質の変化と分子の崩壊と合わせて抗原性の減退を追及するのは興味深い。

著者はすでにウマ血清アルブミン、 $\gamma$ -グロブリンをペプシン水解し、残余窒素(NPN)増加にかかわらず粘度低下が急におそくなる点があり、その前後で水解物は均一系から不均一系へ移行することを報告した<sup>11)</sup>。このことからアルブミン、 $\gamma$ -グロブリンには酵素水解を受けやすい部分と、受けにくい部分とがあると推測された。さらに今回はウマ血清アルブミン、 $\gamma$ -グロブリンをペプシンおよびトリプシンで水解し、そのさいの残余窒素の増加、電気泳動図、抗原性の変化、免疫電気泳動図、沈降定数および分子量について比較検討した。

実験材料ならびに実験方法

1) 基 質

ウマ血清より Cohn のエタノール法<sup>12,13)</sup>により分離した Tiselius の電気泳動法により 95%の純度を有するアルブミンおよび  $\gamma$ -グロブリンを用いた。エタノール法によってえられたアルブミンは容易にトリプシン水解を受ける。

2) 酵 素

結晶性ペプシン\*および結晶性トリプシン<sup>†</sup>を用いた。

3) 水 解 方 法

ペプシン水解は基質を N/10 塩酸で pH 4.2 となし、pH 4.2, 0.2 M 酢酸緩衝液を等量加え、これに N/10 塩酸に溶解したペプシンを基質量の 1% になるように加え、37°C で作用せしめた。pH 4.2 としたのはタンパク質の酸変性をきらって、ペプシンの至適 pH をさけたのである。時間を追って試料をとり出し、N/10 水酸化ナトリウムで中性に戻し、氷冷して以後の検査に供した。トリプシン分解は基質の pH を N/10 水酸化ナト

\* Cutter 研究所製

† 持田製薬製トリプシン

\* 本論文の要は第9回電気泳動学会総会(昭和33年10月)において発表した。

\*\* 東京大学医学部生化学教室(主任 島嶺順雄教授)

Change of physico-chemical and immunological properties of serum protein by enzymatic digestion.

By Naoto Karasawa (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tokyo University, Tokyo).