

原 著

加齢に伴う牛皮膚組織コラーゲンの抽出性の変化と得られた標品の生化学的特性

蛸原哲也¹, 飯島克昌¹, 佐藤かおり¹, 染木衣応里¹, 桑葉くみ子¹, 服部俊治^{1,2}, 入江伸吉^{1,2}
株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所¹, 財団法人日本皮革研究所²

Changes in the Extractability of Bovine Skin Collagen through the Course of Aging and Biochemical Properties of the Collagen Extracted

Tetsuya EBIHARA¹, Katsumasa IJIMA¹, Kaori SATO¹, Iori SOMEKI¹, Kumiko KUWABA¹,
Shunji HATTORI^{1,2} and Shinkichi IRIE^{1,2}

¹Nippi Research Institute of Biomatrix, ²Japan Institute of Leather Research

Received, 31 October 1998; accepted, 25 January 1999.

Abstract: We examined four ways for collagen extraction from bovine skin tissue at different ages. From fetus and new born bovine skins, 50% collagen was extracted by 0.5 M acetic acid treatment. From the 3-month and 18-month old bovine, collagen was able to be extracted by pepsin or proctase digestion. Collagen was hardly extractable from 8-years old skin, unless alkaline extraction was applied. Such different profiles of extractability may reflect change of collagen crosslinks during aging. Acid labile, reducible crosslinks were found in fetus and new born bovine skin. Pyridinoline was detected in the bovine skin, elder than 3 month, and other crosslink, pentosidine, was exclusively detected in the 8 years-old bovine skin. We could not find any difference in amino acid compositions and denaturation temperature among the collagen specimens prepared from differently aged bovine tissues. However, the features of fibril formation were characteristically different from each other.

Key words: collagen, aging, crosslink, extractability, fibril formation

はじめに

線維形成性コラーゲンは動物の体内に最も多く含まれるタンパク質群であり、組織の細胞外マトリックスを構成している。皮膚真皮層には線維形成性コラーゲンとしてはI, III, V型コラーゲンが含まれる。皮膚は、生体を外界からの物理的、化学的な刺激から防御する組織であり、線維性コラーゲンは皮膚組織の弾力性、強度の維持に重要な役割を担っていると考えられている^{1,2}。皮膚は加齢とともに外見が変化し、免疫学的、機械的な防御機能が低下する。特に弾力性の低下の原因として、線維性コラーゲン、エラスチンの変化が考えられる。これらのタンパク質は生体中での代謝が非常に遅く、特に細胞外へ分泌された後の経時的変化がその機能に影響する

と考えられる。コラーゲン分子の翻訳後の修飾には水酸化、糖付加が知られているが、月、年のオーダーで起こる変化としては架橋があげられる。架橋はコラーゲン線維の安定化に関わると考えられるが、一方、皮膚の老化に関わる変化にも影響すると考えられる。

コラーゲンには現在、以下にあげる3種の架橋構造が知られている³。①リジンもしくはヒドロキシリジン残基がリジルオキシダーゼによりアリジンが形成され、これがリジンもしくはヒドロキシリジン残基と反応して形成されるシッフ塩基を持つ還元性架橋。②還元性架橋を経て非酵素的に形成されるピリジノリンやヒスチジノヒドロキシリジノルロイシンなどの成熟架橋。③生体内メイラード反応や生体内で生じるラジカルにより形成されると考えられる架橋。還元性架橋は、コラーゲン分子内、特にテロペプチド間で形成されるものと、テロペプチドと隣接するコラーゲン分子の三重らせん領域との分子間で形成されるものが知られている。成熟架橋であるピリジノリンやヒスチジノヒドロキシリジノルロイシンは、分子間にすでに形成された還元性架橋と異なるコラーゲン分子との間に形成される架橋である。

別刷請求先：蛸原哲也 〒120-8601 東京都足立区千住緑町 1-1 株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所

Reprint requests to: Tetsuya Ebihara, Nippi, Research Institute of Biomatrix, 1-1, Senju-midoricho, Adachi-ku, Tokyo 120-8601, Japan. Tel: +81-3-3888-5111, Fax: +81-3-3870-9631

生体内メイラード反応や、活性酸素及び各種ラジカルによる架橋の形成の多くは、*in vitro* の系でも形成されることが確認されている⁴⁻⁶⁾。メイラード反応による架橋成分としてはペントシジン⁷⁾が知られているが、その形成には長時間を要し、生体の老化との関連性が示唆されている。また同定されていない架橋成分も多数存在すると考えられる。

本報告では、異なる年齢の牛皮から、酸、2種のタンパク質分解酵素、アルカリを用いた4種の方法によりコラーゲンを抽出し、その抽出率と、皮膚中の架橋成分との相関について検討した。さらに得られたコラーゲンの生化学的特性を調べ、加齢に伴うコラーゲンの変化を考察した。

材料と方法

試料および試薬

牛皮膚組織は、北海道道東地区で生産された牛から屠殺時に採取した。ペプシンは和光純薬、プロクターゼは明治製菓製を使用した。ピリジノリンはウシ脱灰骨からYoshimuraらの方法にしたがって精製した⁸⁾。ペントシジンはGrandhee and Monnierの方法⁹⁾にしたがって合成した。

コラーゲンの抽出と精製¹⁰⁾

採取した皮膚から毛及び脂肪層を除去後、0.1 mM N-エチレンマレイミド-0.01 mM フェニルメタンスルホンフルオリド-1 mM エチレンジアミン四酢酸-0.01 M リン酸水素二ナトリウム溶液（組織洗浄液）中でミンズ、ホモジナイズした。組織洗浄液で十分に洗浄後、10倍量のジエチルエーテル-エタノール（1:1）で3回脱脂後冷暗所にて風乾した。

牛皮湿重量あたり50倍量の各抽出液を用いてコラーゲンの抽出を行なった。

抽出液は以下4種類を用いた。①0.05 M 酢酸（酸抽出）②0.1 mg/mL ペプシン-0.5 M 酢酸（ペプシン抽出）③0.1 mg/mL プロクターゼ-0.1 N 酒石酸-酒石酸ナトリウム緩衝液（pH 2.8）（プロクターゼ抽出）④0.125 M モノメチルアミン-0.75 M 水酸化ナトリウム（アルカリ抽出）

抽出温度は酸抽出及びペプシン抽出は4°Cで、プロクターゼ抽出及びアルカリ抽出は20°Cで行なった。

プロクターゼ抽出液からは次の方法でコラーゲンの精製を行なった。

プロクターゼ抽出液に終濃度2 M となるよう NaCl を加え、遠心分離（10,000 g×30 min）により沈殿を回収した。沈殿を0.05 M 酢酸溶液に溶解して遠心分離（10,000 g×30 min）により不溶性成分を除去後、再度

終濃度1 M の NaCl を加え、遠心分離（10,000 g×30 min）により沈殿を回収してこれを0.05 M 酢酸溶液に再溶解した。pH 7.5 の緩衝液に対して透析を行ない（等電点沈殿）、得られた沈殿を0.05 M 酢酸溶液に再溶解後0.005 M 酢酸に対して透析し実験に供した。

アミノ酸分析及びコラーゲン量測定

真皮および抽出したコラーゲンを6 N 塩酸で110°C、24時間、加水分解後、アミノ酸分析機（Hitachi L-8500）を用いてアミノ酸を測定した。アミノ酸分析で得られたヒドロキシプロリン量を比較して、真皮から抽出されたコラーゲン量を算定した。

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）

Laemmliの方法¹¹⁾に準じ3%濃縮ゲル及び5%分離ゲルを調製した。試料は試料緩衝液中で加熱溶解後に泳動し、クマシーブリリアントブルー R-250 で染色した。

ピリジノリン及びペントシジンの測定

牛皮を6 N 塩酸で加水分解後、塩酸を除去し蒸留水に溶解した成分を試料とした。試料を4.6 mm×150 mm の C-18 逆相カラム（Shodex C 18-5 A）に30 mM のヘプタフルオロ酪酸（HFBA）を含む20%アセトニトリルを1 mL/min の流速で溶出分離を行ない、ピリジノリン及びペントシジンを蛍光検出器（Waters 474 scanning fluorescence detector）で検出した（励起波長307 nm、蛍光波長390 nm）¹²⁾。

円偏光二色性（circular dichroism）によるコラーゲン変性温度の測定

コラーゲン溶液（0.1 mg/mL 5 mM 酢酸）を0.25°C/min の速度で20°Cから50°Cに昇温したときの220 nm における円偏光二色性の分子楕円率の変化をPolarimeter（日本分光、JASCO J-600）を用いて測定した。20°Cと50°Cにおける分子楕円率の中間の値を示す温度を変性温度とした。

再生線維形成

等量のコラーゲン溶液（1 mg/mL-5 mM 酢酸）と2倍濃度リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline）を4°Cで混合後、37°Cに加温して、530 nm の濁度の変化を分光光度計（Miltonroy Spectronic 601）を用いて測定した。

濁度の経時変化を示す曲線（線維形成曲線）の傾きが最大になる点での接線と時間軸の切片を核形成時間（ t_0 ）とした。また、最終的な濁度の比較は測定後1時間の値を用いた。

結 果

種々の方法によるコラーゲンの抽出挙動

胎児, 新生児, 3カ月齢, 18カ月齢及び8年齢の牛真皮

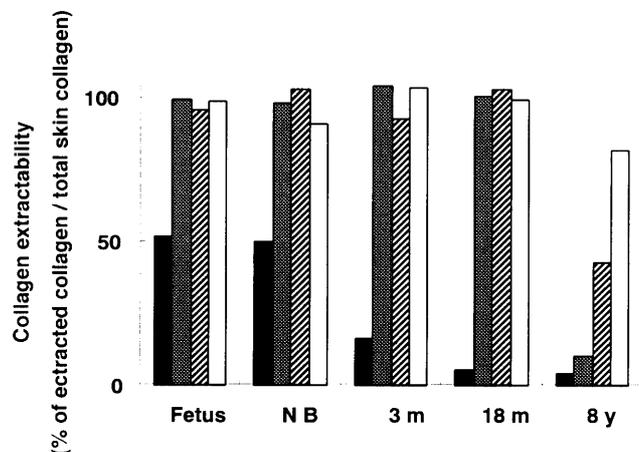


Fig. 1. Extractability of bovine skin collagens from fetus, new born (NB), 3-months old (3m), 18-months old (18m) and 8 years-old (8y) animal.

Solid column, 0.05 M Acetic acid extraction at 4°C; gray column, pepsin (0.2%) in 0.5 M acetic acid solution at 4°C; hatched column, proctase (0.2%) in 0.1 M tartarate buffer (pH 2.8) at 20°C; open column, 3% NaOH(w/v)-1.9% monomethylamine (v/v) solution at 20°C. The content of skin collagen or extracted collagen was estimated by comparing hydroxyproline content after hydrolysis of samples.

皮から, 4種の方法でのコラーゲン抽出率を Fig. 1 に示した. ここでは, 酸, ペプシン, およびプロクターゼ処理では 24 時間抽出を 3 回繰り返して得られたコラーゲン量, アルカリ処理では 14 日間の抽出によって得られたコラーゲン量から, 牛真皮全コラーゲン量に対する抽出率を求めた. 抽出率はそれぞれの試料中のヒドロキシプロリン量からコラーゲン量を算出し比較して求めた.

酸抽出法では, 胎児及び新生児真皮全コラーゲン中約 50% のコラーゲンが可溶化されてきたが, 3 カ月齢以上の牛真皮では, 抽出量が減少し 3 カ月齢では 16%, 18 カ月齢及び 8 年齢では 5% 以下であった. ペプシン及びプロクターゼ処理では, 18 カ月齢以下の牛真皮においてはいずれも組織中のほぼ全コラーゲンが可溶化されてきたが, 8 年齢牛真皮においては, ペプシンで 10%, プロクターゼで 42% のコラーゲンが可溶化され, 加齢の進んだ組織からはプロクターゼがペプシンより高い抽出能を示した. アルカリ抽出においてはいずれの 18 カ月齢以下の牛真皮においてもほぼ全量のコラーゲンが可溶化され, 酸, プロテアーゼ処理ではほとんど抽出されない 8 年齢牛真皮においても 82% のコラーゲンが可溶化された. アルカリ処理ではコラーゲンのテロペプチド領域が分解され, アスパラギン, グルタミン残基がアスパラギン酸, グルタミン酸残基に変化して, 等電点が酸性になることが知られている¹³⁾.

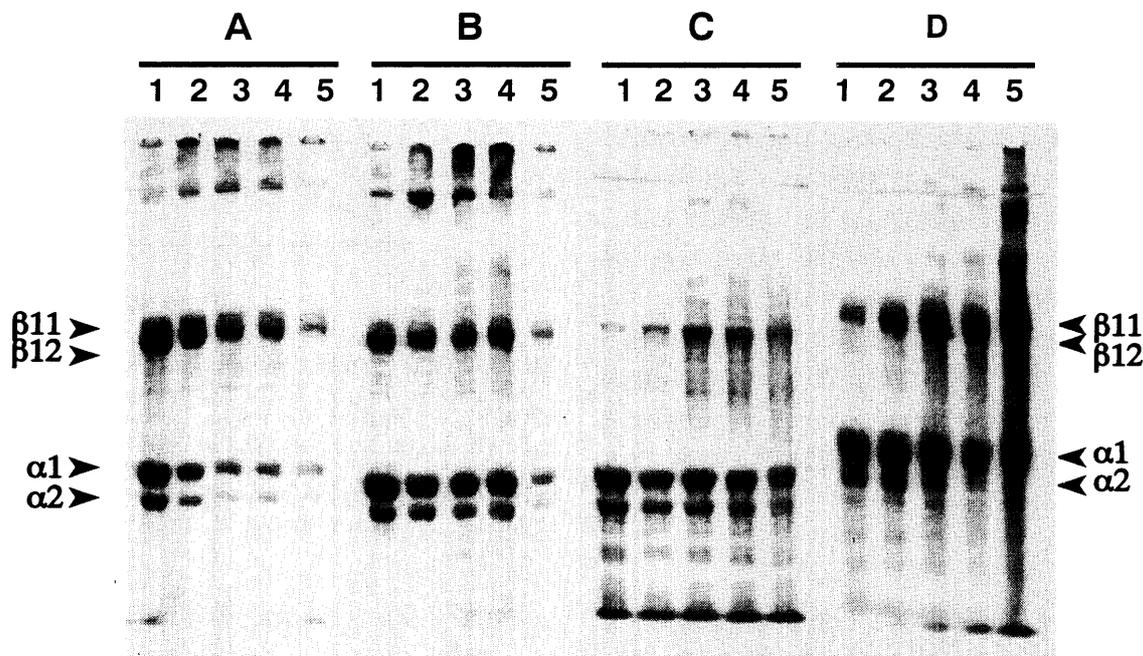


Fig. 2. SDS-PAGE of bovine skin collagen from fetus, new born, 3 months-old, 18 months old and 8 years-old animal.

Extracted collagen was analyzed by SDS-PAGE (5% gel). (A), 0.05 M Acetic acid; (B), pepsin; (C), proctase; (D), 3% NaOH(w/v)-1.9% monomethylamine (v/v). Extraction condition was the same as in Fig. 1. Lane 1, fetus; lane 2, new born; lane 3, 3 months old; lane 4, 18 months old; lane 5, 8 years old.

可溶化されたコラーゲンの架橋度および分子種を確かめるため、上記の各方法で調製したコラーゲン抽出液を0.8 μm のメンブレンフィルターでろ過した後、SDS-PAGEによって分析した。ウェル当たりのコラーゲン量は一定に調製した (Fig. 2)。いずれの抽出法においてもウシ年齢が高くなるに従い、 α 鎖成分に対する β 鎖以上の高分子成分の割合が増加していく傾向が見られた。特に、8年牛真皮では、泳動において濃縮ゲルに入らない高分子が多く存在したため、酸抽出及びペプシン抽出では、 α 鎖、 β 鎖の検出量が低くなった。アルカリおよびプロクターゼ可溶性コラーゲンは酸、ペプシンで可溶化されたコラーゲンに比較して、 β 鎖 γ 鎖成分以上の架橋された鎖が少ない傾向が見られた。アルカリ抽出においては、アミノ酸側鎖の修飾により各コラーゲン鎖の移動度が、酸及びプロテアーゼによる抽出と異なり見掛け上高分子の位置に検出される。抽出されたコラーゲンの分子種は、クマシーブリリアントブルー R-250による染色感度の範囲では95%以上I, III型コラーゲンであると考えられる。

次に、新生児、18カ月齢及び8年牛真皮を用いて抽出の経時変化を検討した (Fig. 3)。酸抽出における新生児牛皮では、初めの3時間で約15%のコラーゲンが抽出されその後、徐々に増加し、7日以降ほぼ一定(50%)の値となった。ペプシン、プロクターゼでは、抽出はほぼ一日以内に完了し、それ以上処理を続けても、抽出効率は変化しない。アルカリ抽出では新生児および18カ月齢牛皮では3日で全コラーゲンが抽出された。8年牛真皮においては抽出過程はより緩慢で、14日以上に渡って徐々にコラーゲンが可溶化される。

以上、各抽出法によるコラーゲンの抽出率の変化から、真皮組織中のコラーゲンは加齢によって以下の3段階の存在様式があることが推定される。①酸処理によって組織中の50%のコラーゲンが可溶化される状態 (胎児と新生児)、②酸処理では可溶化されにくい、プロテアーゼ処理で組織中のほぼ全量のコラーゲンが抽出される状態 (3カ月齢及び18カ月齢)。③プロテアーゼ処理によっても組織の60%のコラーゲンが不溶の状態にあり、アルカリ抽出において80%が抽出される状態 (8年牛年齢)である。

架橋成分の変化

牛皮膚を NaBH_4 で処理することで還元性架橋を酸に対して安定化させた後、酸による抽出性を調べた。 NaBH_4 未処理の場合には約50%のコラーゲンが抽出された胎児及び新生児牛真皮からは NaBH_4 処理することで、コラーゲンは抽出されなくなった。この結果は、還元性架橋が若い組織においても形成されていることを示す。成熟架橋については、牛真皮に含まれるピリジノリ

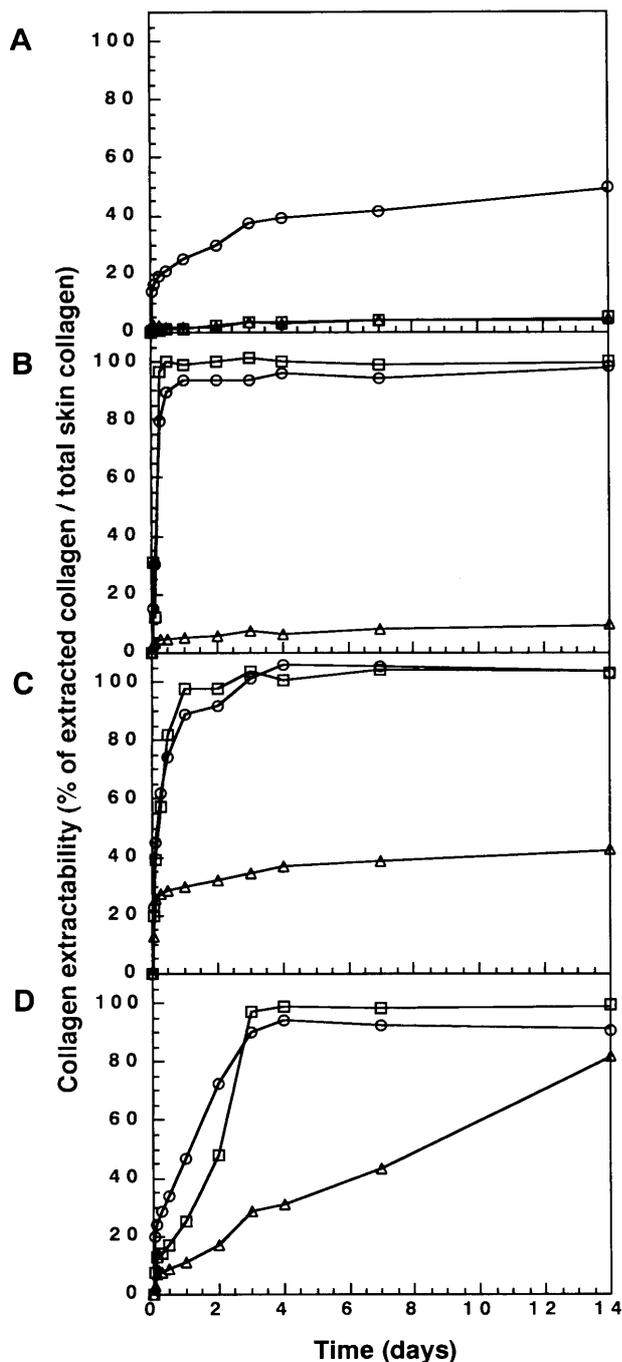


Fig. 3. Time course for collagen extraction.

(A), 0.05 M Acetic acid; (B), pepsin; (C), proctase; (D), 3% NaOH(w/v)-1.9% monomethylamine (v/v). Extraction condition was the same as in Fig. 1. At indicated time, the aliquot of extraction mixture was centrifuged, and the supernatant was measured for collagen content. Symbols: (O), new born; (□), 18 months old; (△), 8 years old.

ンとピリジノリンの加齢に伴う変化を測定した (Table 1)。ピリジノリンは3カ月齢以上の真皮で検出された。ピリジノリンは胎児および新生児では形成されておらず、3カ月齢以降の真皮で検出された。生体内メイラード反応により形成されるピリジノリンは18カ月齢以上の真皮で検出され特に8年牛の真皮で多く検出された。この結果は、架橋成分の出現には順序があり、還元性架

Table 1 Pyridinoline and pentosidine contents of different aged bovine skins

	pyridinoline (mmol/mol collagen)	pentosidine
Fetus	* n.d.	* n.d.
New born	* n.d.	* n.d.
3 months-old	4.86	* n.d.
18 months-old	6.52	0.14
8 years-old	25.72	6.85

* n.d., not detected

橋, ピリジノリン, ペントシジンの順で生成されることを示す。

コラーゲンの生化学的性状

側鎖のアミノ酸が化学修飾されることなく抽出される方法のうち, 最も抽出率の高かったプロクターゼによって可溶化された各年齢ウシコラーゲンを塩分別によって精製し, その性状解析を行なった。アミノ酸組成はいずれの年齢の真皮コラーゲンにおいても顕著な差は見られず, I型コラーゲンの組成とほぼ一致した。円偏光二色性の測定によって得られた変性温度も, 年齢間での差は見い出せず, いずれのコラーゲンも 37°Cであった。

一方, コラーゲンの線維形成能を比較したところ, 由来組織の年齢によるコラーゲンの顕著な差が見られた (Fig. 4 A)。線維形成反応における核形成時間 (t_0) は, 胎児コラーゲンでは 14 分, 新生児コラーゲンでは 11 分, 3 カ月齢が 8 分, 18 カ月齢が 5 分, そして 8 年齢では 3 分とウシの加齢に伴い核形成時間が短くなる傾向が見られた。また, 線維形成により生じる濁度は, ウシの加齢に伴い減少し, 8 年齢コラーゲンでは形成された線維は肉眼観察ではほとんど透明であった。線維に取り込まれたコラーゲン量は, 線維を遠心分離 (10,000 g×30 min, 37°C) により分離し, 上清と沈殿のコラーゲン量を測定することで算定した (Fig. 4 B)。胎児, 新生児, 3 カ月齢及び 18 カ月齢では, 線維を形成したコラーゲン量は, 70-75%と一定であるのに対し, 線維形成によって生じる濁度は胎児が 0.853, 新生児が 0.513, 3 カ月齢は 0.353, 18 カ月齢が 0.149 と大きく異なった。8 年齢では他と比べると線維を形成するコラーゲン量は約 55%と多少少ないが, 濁度が胎児に比べ 1/10 以下の 0.051 と大きく異なった。

考 察

コラーゲンの三重らせん構造を維持した状態での抽出法として古くから酸及びプロテアーゼ処理が一般に知られている。一方, 工業的な手法としてアルカリ条件下での抽出が開発されてきた¹⁴⁾。酸抽出ではテロペプチド領域を保持したいわゆるトロポコラーゲン状態で, またプ

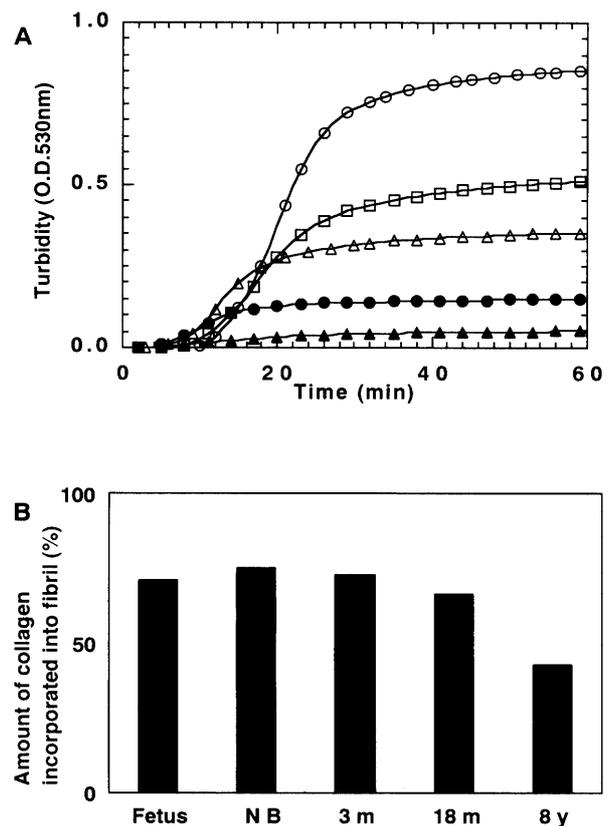


Fig. 4. Fibril formation (37°C) of differently aged bovine skin collagens.

A. Turbidity curve. Symbols: (○), fetus; (□), new born (NB); (△), 3 months-old (3 m); (●), 18 months-old (18 m); (▲), 8 years-old (8 y). B. Amount of collagen incorporated into fibril.

ロテアーゼによる抽出では, 架橋に関わるリジン残基を含むテロペプチドが除かれた三重らせん領域だけの状態であるアテロコラーゲンの状態でコラーゲンが得られる。アルカリ条件下では, テロペプチドの除去と側鎖のアミノ酸の修飾を伴った状態で抽出されてくる^{13),14)}。アルカリ条件下での抽出では同時に架橋成分の分解も起こる。実際, 我々はピリジノリンやペントシジン架橋がアルカリ条件下で分解されることを確かめている。以上の各抽出法における反応を考慮することで, 異なった年齢のウシ真皮組織中でのコラーゲン分子の架橋の状態を推察できる。

胎児, 新生児牛真皮からは酸処理では約 50%のコラーゲンが抽出されるが, NaBH₄による還元処理で不溶化したことから, 新生児期以前から還元性架橋が形成されていると考えられる。リジン残基の酸化を阻害すると線維形成は起こすが, 線維としての十分な強度を保つことができなくなるという Yamauchi らの報告¹⁶⁾と考えあわせると, 還元性架橋は生体にとって体を維持するために必要な架橋であると考えられる。新生児牛真皮からの酸抽出は 7 日という比較的長い時間が必要であるのは, 酸によって還元性架橋が分解され, コラーゲンが徐々に抽出されてくるためと考えられる。

ペプシン、プロクターゼ処理は、1日以内で完了した (Fig. 3)。これらの抽出法は、テロペプチド部分で架橋しているコラーゲンを可溶化していると考えられる。注目すべきは、8年齢の皮膚からはペプシン処理では10%の抽出にすぎなかったにもかかわらずプロクターゼでは約40%のコラーゲンが抽出されてきたことである。この差は、ペプシンとプロクターゼのテロペプチドの切断位置が異なるためであると考えている。我々は、ペプシン処理では架橋に関わる α_2 鎖のリジン残基が分解されず残るのに対し、プロクターゼはN末端から三重らせん領域の数残基内側を切断することを確認している (未発表: Sato et al.)。したがって、ペプシン処理では分解されにくい α_2 鎖を介した架橋を持つコラーゲンが、プロクターゼで可溶化してきたと考えられる。

成熟架橋は、テロペプチド領域の還元性架橋のシッフ塩基と他のアミノ酸に因り非酵素的に形成されていく。成熟架橋は主にピリジノリンとヒスチジノヒドロキシリジノノルロイシンが知られており、個体の成長に伴って経時的に増加していく。ヒスチジノヒドロキシリジノノルロイシンは、牛皮膚において4-5年齢まで徐々に増加していくことが報告されている¹⁶⁾。今回、牛皮膚のピリジノリンは、ヒスチジノヒドロキシリジノノルロイシンと同様に加齢に伴い増加していく傾向が見られた (Table 1)。生体内での分布はヒスチジノヒドロキシリジノノルロイシンは主に皮膚に多く存在し、一方、ピリジノリンは皮膚以外の骨、腱、靭帯といった組織に存在している¹⁵⁾。ピリジノリンはI型コラーゲンの α_1 鎖C末側のテロペプチドのリジン残基 (α_{1-16} Lys) 2個と α_1 鎖87番のヒドロキシリジン残基 (α_{1-87} Hyl) 間を架橋しており、ヒスチジノヒドロキシリジノノルロイシンは α_{1-16} Lys, α_{1-87} His と α_2 鎖の92番目のヒスチジン残基間を架橋していると考えられている¹⁷⁾。この架橋部位の違いが、各組織に特有なコラーゲン分子の配列を規定していると考えられている^{16), 17)}。今回、皮膚由来コラーゲンからピリジノリンが検出され、さらにその含有量が加齢に伴って増加する傾向が見られたことは、加齢によって皮膚のコラーゲン分子のパッキングが骨型に変化している可能性を示している。

プロテアーゼで可溶化されなかったコラーゲンは三重らせん領域で架橋した分子と考えられる。三重らせん領域間の架橋としてはペントシジンが知られる。ペントシジンの出現はピリジノリンよりさらに遅れて、18ヵ月齢以降、特に8年齢の牛皮膚に多く検出された。しかし、8年齢でもペントシジン含量はコラーゲン1000分子あたり6分子にすぎないことから考慮すると、プロクターゼで抽出されてこない約60%のコラーゲン量はペントシジンだけでは説明できない。もっとも、ペントシジンの存在は、8年齢牛皮膚中で生体内メイラード反応が

起きたことを示しており、他にも未同定の生体内メイラード反応生成物による架橋成分が存在すると考えられる。細胞外マトリックス成分には線維性コラーゲンに対して親和性を持つものが多く存在する。これらの成分とコラーゲン分子との直接の架橋や、生体内メイラード反応を介しての架橋によりコラーゲンが不溶化している可能性も否定できない。

アルカリ処理では、アルカリ条件下で起きる抽出に伴う化学反応であるテロペプチドの分解、側鎖の修飾による等電点の低下は酵素反応に比較して遅い反応で2-5日を要する¹⁸⁾。3日より早い時点で、アルカリ処理の抽出が酵素による抽出より遅い傾向が見られたのはこのような理由であると考えられる。しかし、最終的には、アルカリ処理は、他の3種類の方法で抽出できなかったコラーゲンをほぼすべて可溶化する強力な方法であることが確かめられた。

次に、プロクターゼで抽出された各年齢の牛皮のコラーゲンの性質の比較では、アミノ酸組成、プロリンの翻訳後修飾 (ヒドロキシプロリン量)、及び、変性温度の加齢による変化は見られなかったが、*in vitro* 線維形成に顕著な差が見られた。形成した線維の透明度、核形成時間は年齢によって大きく異なっていた。各年齢のコラーゲンをSDS-PAGEによって分析すると、抽出されたコラーゲンはすべて単量体としてのみ存在しているのではなく、架橋による多量体を形成したままの分子形状のものが含まれていた。この多量体は、年齢の高い牛皮膚コラーゲンにより多く含まれていた。このような多量体コラーゲンは線維形成反応で核となることが考えられ、多量体が多い加齢したコラーゲン試料では線維形成反応での核形成時間 (t_0) が短縮され、更に、この核の数量が線維の形態に大きく影響していると推測される。

一方、8年齢コラーゲンでは、線維に取り込まれたコラーゲン量が他の年齢に比べ低い値を示した。8年齢牛真皮では、他の年齢にはほとんど含まれていないと考えられる組織において形成された三重らせん領域間の架橋が存在する。抽出されてきたコラーゲン中にこの三重らせん領域間で架橋した状態の多量体が含まれていることが推測され、このことが形成された線維の構造を異なったものにしていく可能性がある。実際、電子顕微鏡観察では、8年齢コラーゲンは再生線維の直径が若いウシのコラーゲンより細くなっていた (未発表: Sato et al.)。今回の実験では10,000 g×30 min という遠心条件で沈殿したものを線維としてとりあつかっているが、年齢の高いウシコラーゲンでは、微小なコラーゲンがこの条件では沈殿せず、線維に取り込まれたコラーゲン量を過小に見積もっている可能性がある。

以上、異なる4種類の方法でコラーゲンを抽出し、その性質を検討した。その可溶化度の違いから、コラーゲ

ンの加齢に伴う存在様式の変化が認められた。胎児, 新生児期は, コラーゲンは主に還元性の架橋で結合している。年齢が進むにつれ, プロテアーゼによって可溶化する成熟架橋が増加してゆき, 老化した個体ではアルカリ処理で初めて可溶化する三重らせん領域での架橋が優勢となる。また老化とともに通常, 皮膚では検出されないピリジノリンが増加し, 線維中のコラーゲン分子のパッキングにも変化が生ずることが推察される。

謝辞

牛皮膚を供していただきました三菱化学中標津製造所の阿部力丸氏, 向峯弥紀氏に深謝致します。

文 献

- 1) Nimni, M. E., and Harkness, R. D. (1988) Molecular structures and function of collagen. In: Nimni, M. E. (eds) Collagen, vol. 1, CRC Press, Florida, p. 1-77
- 2) Piez, K. A. (1984) Molecular and aggregate structures of the collagens. In: Piez, K. A. and Reddi, A. H. (eds) Extracellular Matrix Biochemistry, Elsevier, New York, p. 1-39
- 3) Yamauchi, M., and Mechanic, G. L. (1988) Crosslinking of collagen. In: Nimni, M. E. (eds) Collagen, vol. 1, CRC Press, Florida, p. 157-172
- 4) Reser, K. M., Amigable, M., and Last, J. A. (1992) Nonenzymatic glycation of type I collagen. The effects of aging on preferential glycation sites. *J. Biol. Chem.* **267**, 24207-24216
- 5) Tanaka, S., Avigad, G., Eikenberry, E. F., and Brodsky, B. (1988) Isolation and partial characterization of collagen chains dimerized by sugar-derived cross-links. *J. Biol. Chem.* **263**, 17650-17657
- 6) Ohshima, M., Jung, S.-K., Yasuda, T., Sakano, Y., and Fujimoto, D. (1993) Active oxygen-induced modification alters properties of collagen as a substrate for fibroblast. *Matrix* **13**, 187-194
- 7) Sell, D. H., and Monnier, V. M. (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentose in the aging process. *J. Biol. Chem.* **264**, 21597-21602
- 8) Yoshimura, Y., Ohnishi, K., Hamamura, M., Oda, T., and Sohda, T. (1993) Automated high-performance liquid chromatographic determination of hydroxylysylpyridinoline and lysylpyridinoline in urine using a column-switching method. *J. Chromatogr.* **613**, 43-49
- 9) Grandhee, S. K., and Monnier, V. M. (1991) Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J. Biol. Chem.* **266**, 11649-11653
- 10) 蛭原哲也, 服部俊治 (1998) 型別コラーゲンの精製・同定法 I, III型コラーゲン. 細胞外マトリックス研究法 I (畑隆一郎, 服部俊治, 新井克彦編) コラーゲン技術研修会, 東京, p. 14-20
- 11) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**, 680-685
- 12) Takahashi, M., Hoshino, H., Kushida, K., and Inoue, T. (1995) Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **232**, 158-162
- 13) 桑葉くみ子, 蛭原哲也, 染木衣応里, 入江伸吉 (1997) 石灰法ゼラチンの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. *日本写真学会誌* **60**, 13-16
- 14) Fujii, T. (1969) The effect of amines added to an alkali pretreatment on solubilisation of collagen and on the properties of gelatin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1257-1265
- 15) Tanzer, M. L. (1976) Cross-linking. In: Ramachandran, G. N., and Reddi, A. H. (eds) Biochemistry of Collagen, Plenum Press, New York, p. 137-162
- 16) Yamauchi, M., Woodley, D. T., and Mechanic, G. L. (1988) Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **152**, 898-903
- 17) Mechanic, G. L., Katz, E. P., Henmi, M., Noyes, C., and Yamauchi, M. (1987) Locus of a histidine-based, stable trifunctional, helix to helix collagen cross-link: stereospecific collagen structure of type I skin fibrils. *Biochemistry* **26**, 3500-3509
- 18) Hattori, S., Adachi, E., Ebihara, T., Shirai, T., Someki, I., and Irie, S. (1999) Alkali-treated collagen retained the triple helical conformation and ligand activity for the cell adhesion via $\alpha_2\beta_1$ integrin. *J. Biochem* (in press)