

氏 名	坂 戸 邦 昭 さか と くに あき
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	論 工 博 第 684 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 49 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Formation of Triple-Helical Structure of Collagen (コラーゲンの三重らせん構造の形成について)
論文調査委員	(主 査) 教 授 倉 田 道 夫 教 授 福 井 三 郎 教 授 伊 勢 典 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本論文はコラーゲンの3重らせん構造の変性および構造回復の過程を速度論的に研究し、特に構造回復過程には、コラーゲン分子間の架橋の影響がいちじるしいことを明らかにしたもので、6章から成っている。

第1章は序論で、コラーゲンの生物学的意義と物理学的性質の説明に加えて、現在までに判明しているコラーゲンの生合成経路と本研究の目的であるコラーゲンの3重ヘリックス形成の機構との関係が述べてある。

第2章にはコラーゲンとその構成ポリペプチドの調製法が述べてある。ねずみ (*Sprague-Dowley*) の背皮とみみず (*Pheretima communissima*) の表皮よりコラーゲンを抽出、精製する。特に著者はねずみ背皮より分子内および分子間架橋を含まないコラーゲンを得るために、Lathyrogen として D-penicillamine を経口投与した後、0.15 M NaCl で抽出するという独自の方法を開発している。ねずみ背皮のコラーゲンの各構成成分 (α_1 , α_2 , β_{11} , β_{12}) を単離するために、CM-cellulose を使用したイオン交換クロマトグラフを利用し、良好な分離結果を得ている。また第5章で用いる γ -collagen の調製に使うためのアクリルアミドのゲルカラムを作製した。さらに普通の架橋を含む試料と Lathyrogen で処理したねずみ背皮のコラーゲンのアミノ酸組成に変化のないことも確かめている。

第3章はトロポコラーゲンの希薄溶液中の性質をしらべたものである。トロポコラーゲンの溶液中での大きさと形状は、従来より多くの研究者により、分子量は 3.45×10^5 、直径は $14\text{\AA}$ 、長さは $3000\text{\AA}$ の固い棒状分子であると報告されている。著者の用いたみみず表皮のコラーゲンは分子量がきわめて高く 1.69×10^6 にも達する。この試料を利用して沈降係数と極限粘度より、コラーゲン分子鎖の屈曲性を定めることに成功した。得られた一方向の平均持続長は約 $1300\text{\AA}$ であった。これはコラーゲンの3重らせん構造がかなりの屈曲性をもっていることを示す。

第4章ではコラーゲンの変性過程と3重らせん構造の再成過程について研究を行なっている。Lathyrim

を利用した分子内、分子間の架橋を含まないコラーゲンを基準試料として用い、これらの過程に対する架橋の影響を定量的に検討した。その結果架橋の存在は、変性過程にはまったく影響を与えないことを明らかにした。しかし架橋の存在は、3重らせん構造の形成には大きな影響を与える。たとえば架橋の存在は、初速度と構造回復値を増加させる。構造回復過程の反応次数は、架橋が存在しないと3次であるが、架橋をふくむ β 成分が入ると2次へ低下する。さらに3本鎖が連結した γ 成分が多くなると、反応次数は1次まで低下する。従来コラーゲンの構造回復過程の反応次数は、1次ないし2次であるという報告が多かったが、これらはいずれも架橋のある試料を用いたための結果にすぎないことが明らかにされた。

第5章では分子内架橋度を制御した γ -コラーゲンの調製法についてのべている。コラーゲンの原試料として *Lathyrism* を利用した無架橋コラーゲンをを用い、また架橋剤としてはホルムアルデヒドを用い、反応温度、反応時間、反応液中のコラーゲン濃度、ホルムアルデヒド濃度等の反応条件を詳細に検討している。最適条件は架橋反応液中の組成が、コラーゲン 0.377 mg/ml, ホルムアルデヒド 7%, 酢酸緩衝液 (PH 4.80) 0.06 M 中で、反応時間は 25°C で2-8時間であった。この条件下で導入した架橋の数は、14C-標識ホルムアルデヒドを用いて定量したところ、トロポコラーゲンあたり9個/時間であった。架橋は 40°C において、少なくとも5時間は安定であった。この条件で調製した γ -collagen の分子量は、変性しても変化せずこの分子が架橋によって連結した3量体であることを示している。

第6章では第5章において調製した種々の分子内架橋度を有する γ -コラーゲンをを用い、3重らせん構造の回復過程の動力学に対する架橋度、温度、ゼラチン濃度の影響および構造の最終回復率などを検討している。架橋度が増加するにつれて、構造回復の過程は1次反応となり、構造の回復率、初速度は増加する。また温度が変性温度に近くなるにつれて回復率は増加する。架橋数29の γ -ゼラチンを用いた場合、20°C, 0.339-0.068 mg/ml のゼラチン濃度の条件下で最終回復率96-99%を得ている。この再構成した γ -コラーゲンについて、沈降係数、変性温度、施光分散を測定し、未変性コラーゲンに対するものと一致する結果を得た。特に熱変性曲線は、完全に未変性のものと重なる。すなわち分子内架橋によって3本のコラーゲン鎖の相対位置を規制することにより、完全なコラーゲン構造の再構成の実現に成功したわけである。これらの結果は、トロポコラーゲンの3本の α 鎖の相互作用が、かなり特異的であることを示している。Speakman, Bellamy & Bornstein⁷らはコラーゲンの生合成の過程で、プロトコラーゲンの末端に、3重ヘリックスの生成を可能にする架橋構造を持つ特殊なペプチド鎖が存在することを仮定している。これは3本の α 鎖から3重ヘリックスへの完全な巻き戻りには架橋構造の導入がきわめて有効であるという本実験の結果と対応するものである。

論文審査の結果の要旨

コラーゲンは生体の皮、骨、軟骨、結締組織に広く分布する蛋白質で、個々の分子は特異な3重らせん構造をとっている。成熟した生体組織中では、分子内および分子間架橋が存在し、構造の安定性に寄与しているが、逆にこの架橋の存在が、本来の3重らせん構造の変性、再構成などの分子的機構を複雑にし、たとえば再構成の反応速度の次数についても1次反応とする説、2次反応とする説など従来の研究結果には著しい不一致が見られる。この不一致の原因を解明するためには、架橋の存在しないコラーゲン試料に

ついて研究を行ない、ついで架橋度を制御した試料について比較研究を行なうことが必要である。本論文はこのような観点から行なったコラーゲンの変性およびコラーゲン構造の再構成についての一連の研究結果をまとめたものである。得られた主な成果は次の通りである。

(1) みみずの表皮、および D-penicillamine を経口投与したねずみの表皮よりそれぞれトロポコラーゲンを抽出し、分子量、沈降定数および固有粘度の測定を行ない溶液中の分子形状を確定した。これらは直径 $15 \text{ \AA}$ 、定方向持続長約 $1300 \text{ \AA}$ の半屈曲性円筒状の構造をもつ。変性によって分子量が正確に $1/3$ の分子に開裂することを確かめ、これらが架橋を含まないコラーゲンであることを明らかにした。

(2) 無架橋コラーゲンを 0.14% のホルムアルデヒドで処理すると、分子内架橋を定量的に導入することができる。カルボキシメチルセルローズを用いたイオン交換クロマトグラフにより、これらのコラーゲンの変性後の成分分別を行ない、ホルムアルデヒド処理コラーゲンには 1 本鎖の α 成分以外に、2 本鎖の β 成分が生成してくることを認めた。さらに高濃度 7% のホルムアルデヒド処理を行なうと、3 本鎖が一体となった γ 成分が得られる。

(3) これら架橋程度の異なるコラーゲンについて実験を行ない、変性の速度過程は架橋の影響を受けないことを確認した。しかし逆過程であるコラーゲン構造の再構成過程は架橋の影響を大きく受ける。無架橋の α 成分のみよりなるコラーゲンでは、この過程は 3 次反応（厳密には約 2.8 次）の形式で進行する。 α 成分と β 成分を含むコラーゲンでは 2 次反応、また γ 成分のみよりなるコラーゲンでは 1 次反応式が適用できる。この結果は従来の諸研究の結果の不一致が、もっぱら使用された試料の架橋度の相違にもとづくものであることを明らかにしたもので、高く評価される。

(4) 1 分子あたり約 30 個の架橋を導入した γ -ゼラチンからコラーゲンへの再構成過程は完全な 1 次反応形式で速やかに進行し、低濃度で実験を行なう時は、最終回復率は $96-99\%$ に達する。この再生コラーゲンの熱変性曲線は未変性のものと完全に一致する。以上の結果より、コラーゲンの 3 重らせん構造の生成には、3 本の分子が相互に正しい位置で固定されていることが重要であると結論される。架橋導入コラーゲンでは、未変性状態で生成する架橋がこの相互位置固定の役割を果たし、また細胞内のコラーゲン合成時には、末端の制御ペプチドがこの役割を果たすのであろうと著者は結論している。

以上要するに、本論文は架橋度を制御したコラーゲン試料を用いて 3 重らせん構造の変性と再構成の速度過程の実験的研究を行ない、これらの過程におよぼす架橋度の影響を明らかにしたものである。また完全な再構成が行なわれるための架橋および濃度の条件を明らかにしている。学術上、工業上寄与するところが少なくない。

よって、本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。