



Title	ホタテガイ外套膜コラーゲンの鎖の分離
Author(s)	申, 鉉日; 栗原, 秀幸; 高橋, 是太郎
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 56(3), 67-74
Issue Date	2005-12
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/22012">http://hdl.handle.net/2115/22012</a>
Type	bulletin (article)
File Information	56(3)_P67-74.pdf



[Instructions for use](#)

## ホタテガイ外套膜コラーゲンの $\alpha$ 鎖の分離

申 鉉日<sup>1)</sup>・栗原 秀幸<sup>1)</sup>・高橋是太郎<sup>1)</sup>

(2005年8月31日受付, 2005年9月21日受理)

### Separation of the $\alpha$ Chains of Scallop Mantle Collagen

Xuan Ri SHEN<sup>1)</sup>, Hideyuki KURIHARA<sup>1)</sup> and Koretaro TAKAHASHI<sup>1)</sup>

#### Abstract

Collagen was extracted from scallop mantle through pepsin-mediated partial degradation, and subjected to subunit characterization. Two  $\alpha$ -chains were separated through anion exchange, and gel filtration chromatographies. In contrast, it was impossible to separate those two  $\alpha$ -chains with the conventional cation exchange chromatography. To probe out the reason, isoelectric point chromatography was carried out after heat denaturation of the scallop mantle collagen at 40°C. The result showed that isoelectric point of the scallop mantle collagen (pI 4.14) is lower than the ones of major vertebrate collagens.

**Key words:** Scallop mantle collagen,  $\alpha$  chain, Anion exchange chromatography, Isoelectric point

#### はじめに

コラーゲンは生体内結合組織の重要なタンパク質として、骨、腱、皮膚などの組織に幅広く分布しており、生体の支持と器官の保護などの作用をする他に、細胞外マトリクスの主要成分として細胞の接着、増殖、分化、転移などに大きな影響を与えている (Karl et al., 1996)。コラーゲンには遺伝的に異なる 19 種類以上の分子種がこれまでに知られている。そのうち、I型コラーゲンはせき椎動物の生体に広く分布し、主要な分子種として盛んに研究されている。I型コラーゲン分子は、アミノ酸 1,000 個が左巻きのポリペプチド鎖 (サブユニット) を成し、それら 3 本が右巻きになった棒状構造をとっている (Mizuno et al., 2001)。I型コラーゲンの分子には $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$  及び  $\alpha_1(I) \alpha_2(I) \alpha_3(I)$  の 2 種類の分子形が存在する。その中で、 $\alpha_3(I)$  鎖は硬骨魚類以外のせき椎動物には存在しない極めてユニークな  $\alpha$  鎖である (水田, 2005)。しかし、哺乳動物 V型コラーゲンには $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$  以外に  $\alpha_1(V) \alpha_2(V) \alpha_3(V)$  の分子形も存在する。コラーゲン分子形の違いと機能の関係の例として  $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$  分子形が  $\alpha_1(V) \alpha_2(V) \alpha_3(V)$  分子形よりもヒト血管内皮細胞に対する増殖阻害作用が強いと報告されている (Sato et al., 1995)。一方、イカ (*Sepia officinalis*) などの主要なコラーゲンはせき椎動物コラーゲンの主要なコラーゲンである I型コラーゲンとは異なり、V型コラーゲンに近い特性を持っている (Sivakumar et al., 2000; Sivakumar et al., 2003)。このように、動物コラーゲンは進

化の過程と生存環境に応じて多様な分子構造と機能を示している。そこで、本研究ではホタテガイ外套膜コラーゲンのサブユニットの分離方法を検討し、分離した  $\alpha$  鎖の化学的特徴を I型コラーゲン及び V型コラーゲンの  $\alpha$  鎖と比較した。

#### 実験方法

##### 材料

ホタテガイは 2004 年 5 月に紋別で採集し、直ちに  $-20^\circ\text{C}$  の冷凍庫に凍結して保存したものをを用いた。

##### ホタテガイ外套膜コラーゲンの抽出

ペプシンで可溶化したホタテガイ外套膜コラーゲン (SMPC) の抽出はペプシン限定分解抽出法 (吉中・佐藤, 1989) で行った。すなわち、水洗したホタテガイ外套膜 100 g を細切後、蒸留水 500 ml を加えてホモジナイズし、 $10,000\times g$  で 10 min 遠心分離した。次いで沈殿に 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液 2,000 ml を加えて一晚抽出し、 $10,000\times g$  で 10 min 遠心分離を行い、アルカリ可溶タンパク質を除いた。このアルカリ抽出操作をさらに 2 回繰り返す。得られた沈殿 (RS-AL) に 0.5 M 酢酸溶液 1,000 ml とペプシン (豚由来 EC3.4.23.1; シグマ) を基質に対して 2% (W/W) になるよう加え、攪拌しながら 24 h 抽出を行った。その後、 $10,000\times g$  で 10 min 遠心分離し、上清に塩化ナトリウムを終濃度 2.0 M になるように攪拌しながら添加し

<sup>1)</sup> 北海道大学大学院水産科学研究院生物資源利用分野  
(Laboratory of Marine Products and Food Science, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

てコラーゲンを沈殿させた。沈殿したコラーゲンを再び 0.5 M の酢酸に溶解させた後、蒸留水に対して 3 日間透析を行った。内液を凍結乾燥 (東京理科器械, FD-5N 型) して、SMPC を 479 mg 得た。供試するときは、凍結乾燥物を再び 0.5 M 酢酸に溶解した後に、30,000×g で 30 min 遠心分離した上清を用いた。なお、コラーゲンの抽出と精製は 4°C 下で行った。

#### アミノ酸分析

SMPC を 6 N 塩酸に溶かして減圧下で封管し、110°C で 24 h 加水分解した。アミノ酸分析は分解液 100  $\mu$ l を用いて、全自動アミノ酸分析機 JLC-500/V (日本電子) で行った。

#### SDS-PAGE 分析

SMPC 溶液 (濃度 2 mg/ml) をドデシル硫酸ナトリウム (SDS 終濃度 2%) 含有 0.06 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解し、沸騰水で 3 min 変性させた後、高木の方法 (高木俊夫, 1990) に準じて電気泳動を行った。タンパク質の検出はクマシーブリリアントブルー 250R 染色で行った。クロマトグラフィーで分画したフラクションを蒸留水に対して透析した後凍結乾燥を行い、凍結乾燥品を蒸留水に溶解させて電気泳動分析に供した。

#### 陽イオン交換クロマトグラフィー

SMPC 50 mg を 0.02 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0), 10 ml に溶解させ、40°C, 30 min 変性させた後、同じ緩衝液で平衡させた陽イオン交換セルロース CM52 (ワットマン, 1.5 $\phi$ ×10 cm) に供した。溶出には NaCl の濃度が 0–0.12 M のリニアグラジエント法を用いて、30 ml/h 速度で分離を行った。

#### 陰イオン交換クロマトグラフィー

SMPC 50 mg を 0.02 M トリス緩衝液 (pH 8.3) 10 ml に溶解し、40°C, 30 min 変性させた後、同じ緩衝液で平衡させた DEAE-セルロースカラム (和光純薬工業, 1.5×10 cm) に供した。溶出には NaCl の濃度が 0–0.13 M のリニアグラジエント法を用いて、30 ml/h 速度で分離を行った。

#### 等電点クロマトグラフィー

SMPC 25 mg を 5 ml の 0.025 M イミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解させて、40°C, 30 min 変性させた後、PBE 94 担体 (アマシャムバイオサイエンス) に供した。溶出は pH 4.0 のポリバッファー 74 緩衝液で担体に pH 勾配を形成させることによって行った。

#### ゲルろ過クロマトグラフィー

陰イオン交換クロマトグラフィーのフラクション 9 mg を 0.02 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解させ、セファロース CL4B カラム (アマシャムバイオサイエンス, 1.5×

90 cm) に供して、20 ml/h の速度で分離を行った。

## 結果及び考察

### コラーゲンの SDS-PAGE

SMPC をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 分析した結果、Fig. 1 に示したように、抽出した SMPC に  $\alpha$  鎖のバンドが 2 本検出され、非コラーゲン性タンパク質のバンドは認められなかった。2 本の  $\alpha$  鎖は 153 KDa と 133 KDa の位置に現れ、両者ともにせき椎動物 I 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖とは異なり、せき椎動物 V 型コラーゲンと類似していた。薄いバンドではあるが  $\beta$  鎖のバンドも観察された。SMPC のアミノ酸組成分析 (Table 1) の結果から、SMPC には Gly が 1,000 残基あたり 331 残基含まれており、全アミノ酸中の約 1/3 を占めていることから、抽出したコラーゲンの純度が高いことを認めた。SMPC のアミノ酸組成は脊椎動物 I 型コラーゲンより V 型コラーゲンのアミノ酸組成に類似していた (申ら, 2005)。

### コラーゲン $\alpha$ 鎖の分離

ほ乳動物 I 型コラーゲンと魚類 I 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖の分離には陽イオン交換クロマトグラフィーを用いた方法が報告されている (Nomura et al., 1995; Omura et al., 1996)。それに従い pH 4.8 の酢酸ナトリウム緩衝液を用いてホタテガイ外套膜コラーゲンを変性させ、陽イオン交換クロマトグラフィー (CM 52 セルロース) を行った。しかし、変性させた SMPC は陽イオン交換体に吸着しなかった。陽イオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質の分離では、タンパク質の等電点よりも低い pH でタンパク質をプラスに荷電させ、担体に吸着させる。陽イオン交換クロマトグラフィーに SMPC が吸着しなかった原因として、SMPC の等電点が溶出液である酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) よりも低いことが予想される。そこで、SMPC を等電点クロマトグラフィーに供した。Fig. 2 に示すように変性させた SMPC 溶液の溶出パターンは pH 4.14 に極大ピークを示した。ほ乳動物 I 型コラーゲンの場合、酸性条件下及びアルカリ条件下で変性させた場合、等電点がそれぞれ pI 5 と pI 6–9 になる (古川, 2003)。よって哺乳動物の I 型コラーゲンでは溶出液の pH が 4.8 であっても吸着と分離が出来たと推定される。しかし、本研究のホタテガイ外套膜コラーゲンの場合は等電点が pH 4.8 以下であるため、カラムに吸着しなかったと考えられる。これは SMPC 中の酸性アミノ酸含量が牛皮 I 型コラーゲン及び魚皮 I 型コラーゲンよりも多いこと (Table 1) から説明することができる。コラーゲンを溶解する緩衝液の pH を 4.0 に下げ、塩化ナトリウムのリニアグラジエント法を用いて分離を再度行った結果 (Fig. 3), 分離は出来たが  $\alpha$  鎖が分解した状態で分離された。酸性溶液中で SMPC を変性させた場合、共存酵素の作用で  $\alpha$  鎖が分解される可能性がある。そ

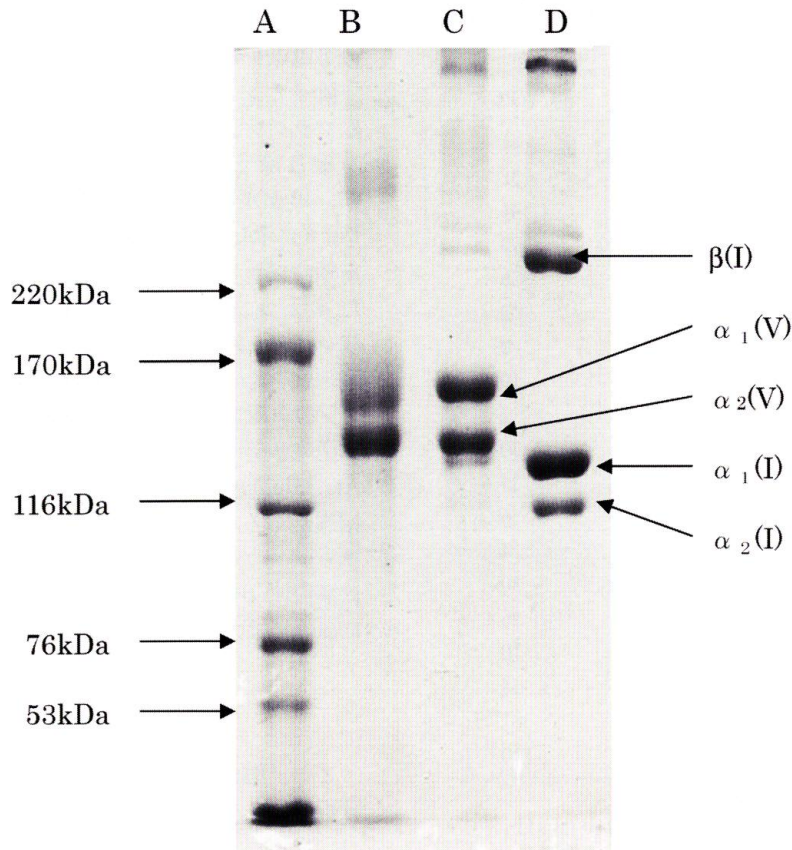


Fig. 1. SDS-PAGE (5% gel) patterns of the pepsin-solubilized collagen with respect to  $\alpha$  chain comparison. A, Molecular weight standards; B, Scallop mantle pepsin-solubilized collagen (SMPC); C, Bovine placental type V collagen; D, Bovine skin type I collagen.

ここで、コラーゲタンパク質の変性を促すことと酵素活性を阻害するために、pH 4.0 酢酸ナトリウム緩衝液に 6 M 尿素を加えて SMPC を 40°C, 30 min 変性させた。6 M 尿素を含んだ緩衝液を用いて CM52 セルロースカラムを平衡させた後、塩化ナトリウムのリニアグラジエント溶離を行った。その結果 (Fig. 4),  $\alpha$  鎖の分解を防ぐことはできなかったが、フラクション 5 に 2 本の  $\alpha$  鎖と類似したバンドが検出された。この 2 本のバンドのうち一つは泳動距離が  $\alpha_2$  の位置とほぼ等しく、もう一方のバンドは  $\alpha_2$  のやや下の位置に出現した。このことは  $\alpha_1$  鎖が  $\alpha_2$  鎖よりも切断されやすいことが原因で、 $\alpha_1$  鎖が切断されて  $\alpha_2$  鎖よりも短くなったことが理由として考えられる。これは水田ら (Mizuta et al., 2002; Mizuta et al., 2004) のカキ外套膜コラーゲン中  $\alpha_1$  鎖ドメインにペプシン感受性が高い区域がある結果とも一致した。なお、酸性条件下で SMPC の  $\alpha$  鎖を分解する酵素について検討するため、ペプシン阻害剤であるペプスタチン A (和光純薬工業) とコラゲナーゼの阻害剤である EDTA (和光純薬工業) をそれぞれ 0.5%, 150 mM になるように SMPC 溶液に入れ、40°C で 30 min 変性させた後電気泳動を行った。しかし、両方とも  $\alpha$  鎖の分解を防ぐことはできなかった (結果未掲載)。このことから  $\alpha$  鎖を分解する共存酵素はペプシンおよびコラゲナーゼ以外

の酵素であることが分かった。しかし、酸性条件下で SMPC を分解する原因となる酵素を特定するまでには至らなかった。

分解を抑えながら SMPC の  $\alpha$  鎖を分離するために DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにした。陰イオン交換クロマトグラフィーでは  $\alpha_1$  鎖と  $\alpha_2$  鎖を分離することが出来た (Fig. 5)。溶出パターンを見ると、陽イオン交換クロマトグラフィーの結果 (Omura, 1996) とは異なり、最初に分子量の小さい  $\alpha_2$  鎖が溶出し、次に  $\alpha_1$  鎖が溶出した。これまでの報告ではせき椎動物と無脊椎動物にかかわらず、酸性アミノ酸含量の少ないコラーゲンの場合には陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて  $\alpha$  鎖を分離できたことが報告されている (Mizuta et al., 1994; Omura, 1996)。酸性アミノ酸含量の多いカキ外套膜主要コラーゲンの  $\alpha$  鎖分離に P11 陽イオン交換クロマトグラフィーを用いた報告 (Mizuta, 2005) もあるが、分離パターンを見ると、分離が不明瞭な単一ピークしか出現していなかった。分離が良くない原因として、カキ外套膜主要コラーゲンの等電点が I 型コラーゲンと比べて低いことが考えられる。酸性アミノ酸の多い V 型コラーゲンの  $\alpha$  鎖を分離する際に、陰イオン交換カラム HPLC を用いて分離した例がある (Sato et al., 2003)。以上の知見はクロマトグラ

Table 1 Amino acid composition\* of scallop mantle pepsin-solubilized collagen

Amino acid	SMPC	BSC <sup>a)</sup>	CWPC <sup>b)</sup>
Asp	58	48	41
Thr	29	17	32
Ser	50	34	41
Glu	111	74	93
Gly	331	318	326
Ala	54	115	62
Cys/2	0	0	0
Val	19	25	19
Met	24	6	2
Ile	18	11	20
Leu	31	25	34
Tyr	6	5	6
Phe	10	14	14
HyLys	16	9	30
Lys	7	27	26
His	5	8	10
Arg	50	50	48
Hypro	84	88	87
Pro	97	126	110

\*Residues /1000 residues

SMPC: Scallop mantle collagen; BSC: Bovine skin collagen; CWPC: Carp white muscle type V collagen

a: Omura, Y. et al., 1996; b: Yahya, A. et al., 1997

フィーでコラーゲンの  $\alpha$  鎖を分離するときコラーゲンの等電点を考慮しなければならないことを意味している。

陰イオン交換クロマトグラフィーを行って分離した  $\alpha_1$  鎖フラクションに  $\beta$  鎖が混入していたことから、次に  $\beta$  鎖を取り除くためにフラクション 5-7 (Fig. 5) を用いて CL-4B ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。その結果、Fig. 6 に示したようにフラクション 4 に  $\beta$  鎖と分離された  $\alpha$  鎖サブユニットのみの画分を得ることができた。分離した  $\alpha_1$  と  $\alpha_2$  鎖の電気泳動を Fig. 7 に、それらのアミノ酸組成を Table 2 に示す。I 型コラーゲンの  $\alpha_1$  と  $\alpha_2$  鎖のアミノ酸組成を比べてみると、HyPro, Pro, Val, Iso, Lys などのアミノ酸含量に大きな差異がある (Omura et al., 1996)。一方、豚由来 V 型 コラーゲンの  $\alpha_1$  及び  $\alpha_2$  鎖と比較した場合は Ala, Glu, HyLys, Hypro, Pro などのアミノ酸組成に大きな相違がある。以上の結果から、SMPC は脊椎動物 V 型コラーゲンと分子量、アミノ酸組成、繊維の太さなどの点では類似性 (申ら, 2005) を示すが、 $\alpha$  鎖ごとのアミノ酸組成においては大きな違いがあることが明らかになった。

謝 辞

アミノ酸分析の測定をしていただいた北海道大学機器分析センター広瀬知広氏に感謝いたします。

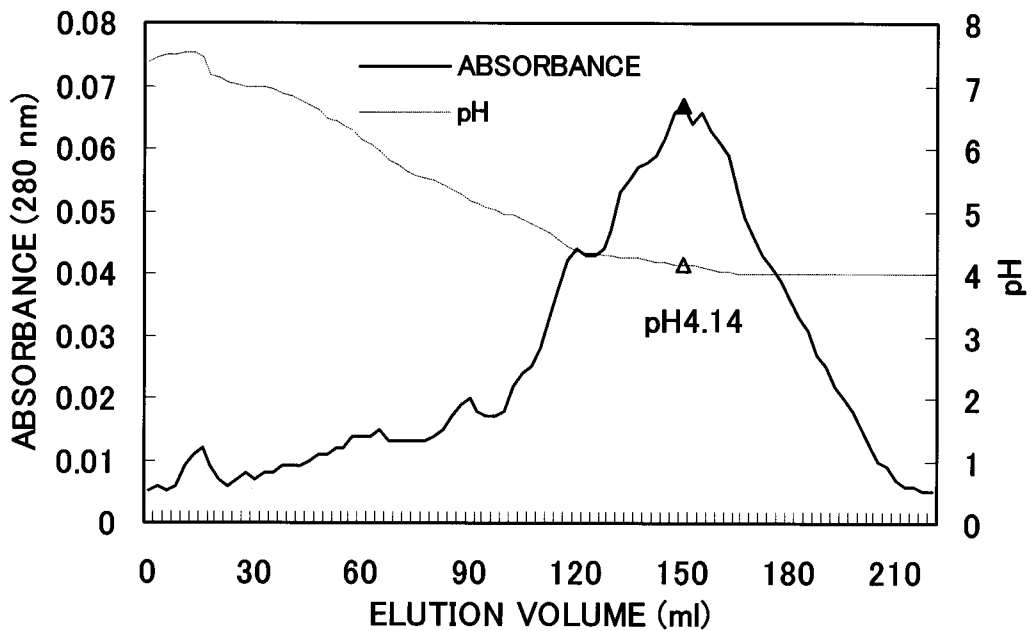


Fig. 2. Isoelectric point chromatography of denatured scallop mantle collagen. Scallop mantle collagen of 25 mg was dissolved in 5 ml 0.025 M imidazole-HCl buffer (pH 7.4), and heated at 40°C for 30 min, then applied to a PBE 94 chromatography. chromatography was operated at a flow rate of 45 ml/h, and elution was achieved at 27°C with polybuffer 74-HCl. pH gradient elution was conducted.

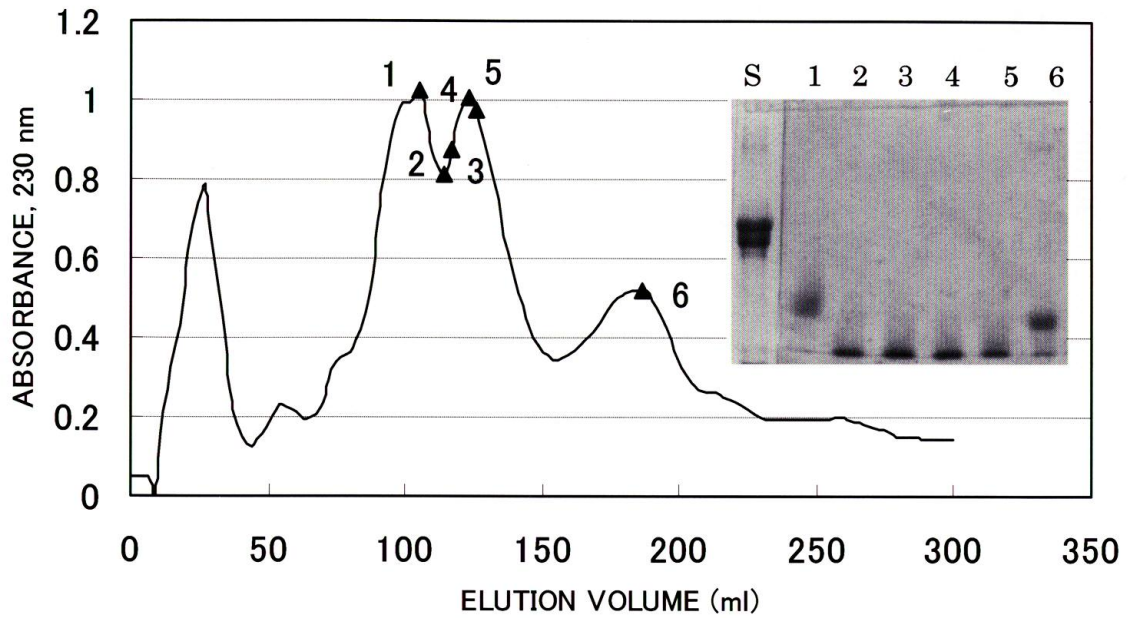


Fig. 3. Elution profile of denatured scallop mantle collagen on CM52 cellulose column chromatography, along with the SDS-PAGE patterns of the fractions medicated by fraction numbers.  
Heat-denatured scallop mantle collagen (50 mg) was loaded on a CM52 cellulose column (15 $\phi$ ×100 mm) and eluted at a flow rate of 30 ml/h with 0.02 M sodium acetate, pH 4.0, and NaCl linear gradient from 0 to 0.12 M. The appropriate fractions were collected and analyzed by SDS-5% PAGE.  
S: SMPC

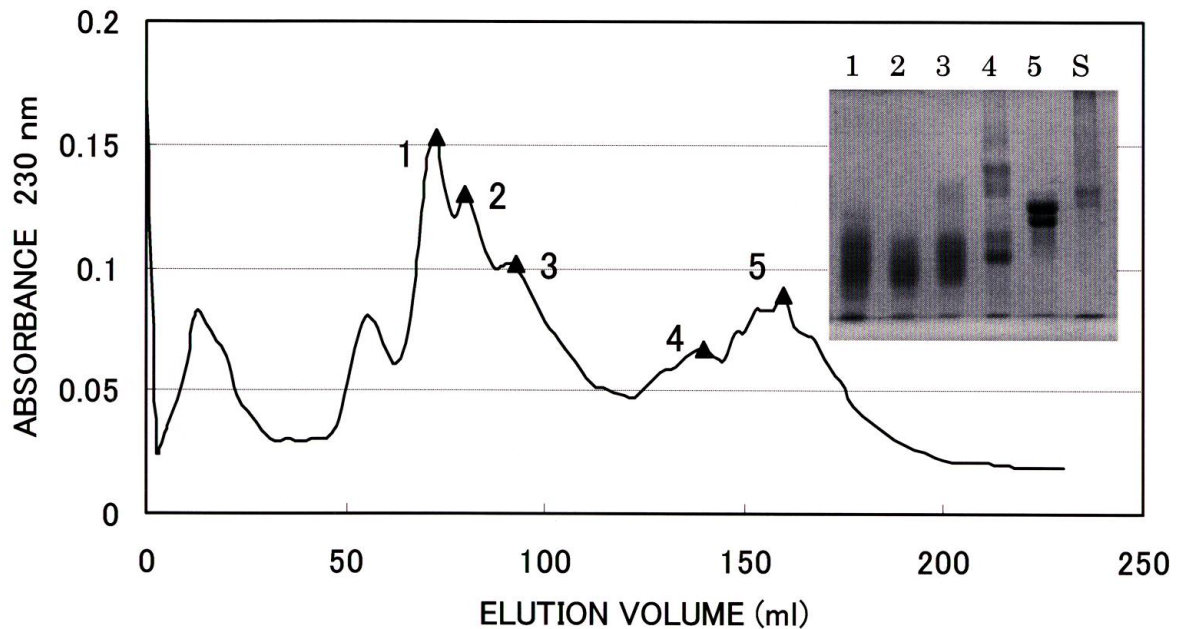


Fig. 4. Elution profile of heat and 6 M urea-denatured scallop mantle collagen on CM52 cellulose column chromatography, along with the SDS-PAGE patterns of the fractions medicated by fraction numbers.  
Heat denatured scallop mantle collagen (50 mg) was loaded on a CM52 cellulose column (15 $\phi$ ×100 mm) and eluted at a flow rate of 30 ml/h with 0.02 M sodium acetate, pH 4.0, and NaCl linear gradient from 0 to 0.12 M. The appropriate fractions were collected and analyzed by SDS-5% PAGE.  
S: SMPC

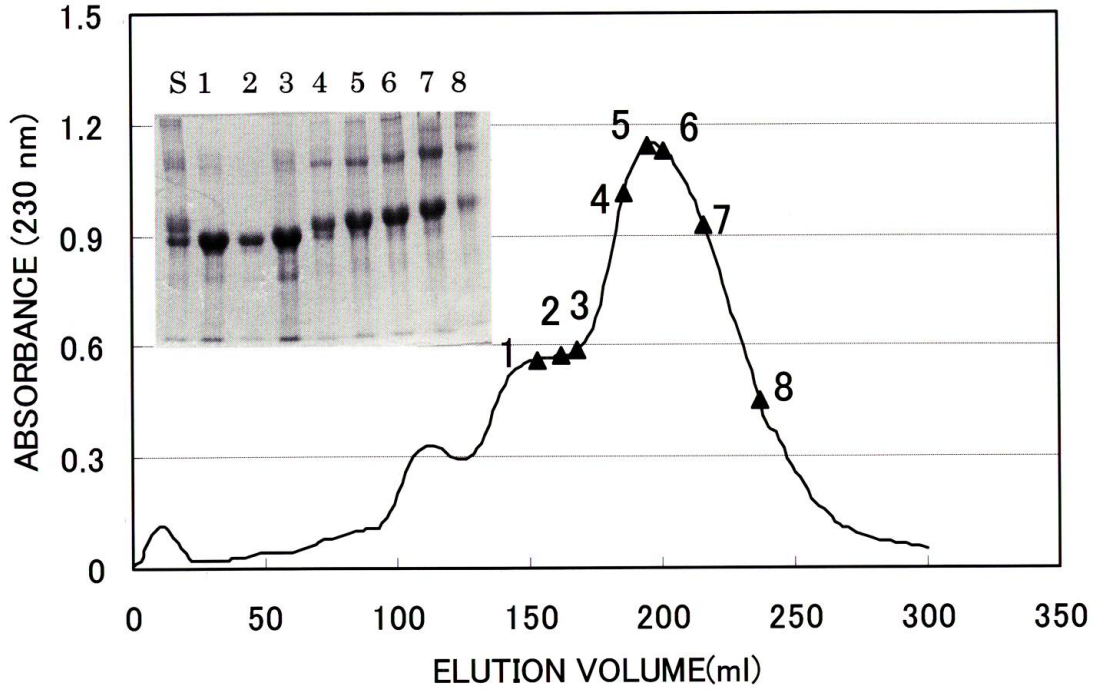


Fig. 5. Elution profile of scallop mantle collagen on DEAE cellulose column chromatography. Heat denatured scallop mantle collagen (50 mg) was loaded on a DEAE cellulose column ( $15\phi \times 100$  mm), then eluted at a flow rate of 30 ml/h with 0.02 M Tris buffer (pH 8.3), and a NaCl linear gradient from 0 to 0.13 M. The appropriate fractions were collected and analyzed by SDS-5% PAGE. S: SMPC

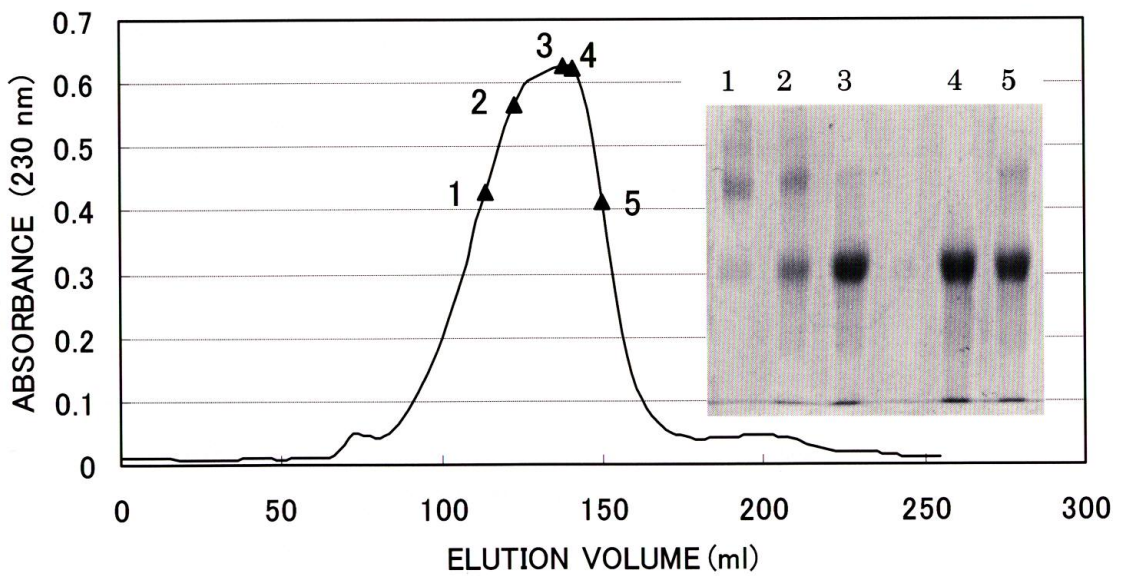


Fig. 6. Elution profile of the fractions 5-7 shown in Fig. 5 on Sepharose CL4B column chromatography. Nine mg sample was dissolved in 0.02 M Tris-HCl, (pH 8.0) buffer and chromatographed at 27°C on a Sepharose CL4B column ( $1.5\phi \times 90$  cm) at a flow rate of 20 ml/h. Fractions indicated by numbers were applied on SDS-5% PAGE.

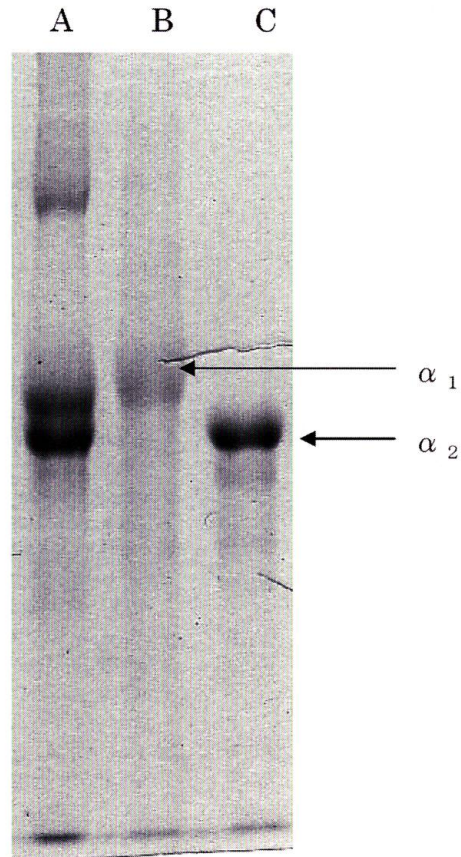


Fig. 7. SDS-5% PAGE of isolated  $\alpha$  chains from scallop mantle collagen.

A : Scallop mantle collagen, B :  $\alpha_1$  chain of scallop mantle collagen, C :  $\alpha_2$  chain of scallop mantle collagen.

Table 2 Amino acid composition of  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  chains of various collagens

Amino acid	$\alpha_1$				$\alpha_2$			
	<i>S. mantle</i>	<i>A. ijimai</i> <sup>a</sup>	<i>Porcine(I)</i> <sup>b</sup>	<i>Porcine(V)</i> <sup>c</sup>	<i>S. mantle</i>	<i>A. ijimai</i> <sup>a</sup>	<i>Porcine(I)</i> <sup>b</sup>	<i>Porcine(V)</i> <sup>c</sup>
Asp	55	60	46	40	63	62	45	42
Thr	33	39	17	21	25	45	21	27
Ser	55	60	34	27	49	48	30	36
Glu	116	95	72	131	114	89	72	109
Gly	338	324	337	353	334	326	340	354
Ala	62	87	114	31	52	62	112	39
Val	16	15	20	15	19	37	30	23
Met	24	9	6	8	23	14	7	13
Ile	15	6	7	15	18	20	9	9
Leu	29	24	21	27	28	36	31	25
Tyr	6	3	2	2	7	6	2	2
Phe	10	3	13	10	9	3	11	9
HyLys	11	10	8	29	15	8	13	17
Lys	5	4	26	8	7	9	20	8
His	3	5	4	5	5	7	7	9
Arg	44	54	44	40	57	66	41	52
Hypro	86	96	99	103	80	74	91	107
Pro	92	106	130	136	95	88	118	121

a : Omura, Y. et al., 1996. b : Yahya, A. et al., 1997. c : Kenji, S. et al., 2003



## 参考文献

- Acil, Y., Brinckmann, J., Behrens, P., Muller, P.K. and Batge, B. (1997) Semipreparative isolation of collagen types I, II, III and V by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electroelution. *J. Chromatogr.*, **758A**, 313-318.
- 古川 徹 (2003) 惣菜へのゼラチンの応用. フードケミカル, **10**, 32-34.
- Karl E.K., David F.H., John A.T. and John A.C. (1996) Collagen fibril formation. *J. Biochem.*, **316**, 1-11.
- Mizuno, K., Adachi, E., Imamura, Y., Katsumata, O. and Hayashi, T. (2001) The fibril structure of type V collagen triple-helical domain. *Micron*, **32**, 317-323.
- Mizuta, S., Yoshinaka, R., Sato, M., Itoh, Y. and Sakaguchi, M. (1994) Subunit composition of two distinct types of collagen in the muscle of the squid *Todarodes pacificus*. *Fisheries Sci.*, **60**, 597-602.
- Mizuta, S., Miyagi, T., Nishimiya, T. and Yoshinaka, R. (2002) Partial characterization of collagen in mantle and adductor of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Food Chem.*, **79**, 319-325.
- Mizuta, S., Miyagi, T., Nishimiya, T. and Yoshinaka, R. (2004) Partial characterization of collagen in several bivalve species. *Food Chem.*, **87**, 83-88.
- Mizuta, S., Miyagi, T. and Yoshinaka, R. (2005) Characterization of the quantitatively major collagen in the mantle of oyster *crassostrea gigas*. *Fisheries Sci.*, **71**, 229-235.
- 水田尚志 (2005) マリンコラーゲン. 日本水産学会誌, **71**, 667-670.
- Nomura, Y., Yamano, M. and Shirai, K. (1995) Renaturation of  $\alpha_1$  chains from shark skin collagen type I. *J. Food Sci.*, **60**, 1233-1236.
- Omura, Y., Urano, N. and Kimura, S. (1996) Occurrence of fibrillar collagen with structure of  $(\alpha_1)_2\alpha_2$  in the of sea Urchin *Asthenosoma ijimai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **115B(1)**, 63-68.
- Saito, M., Kunisaki, N., Urano, N. and Kimura, S. (2002) Collagen as the major edible component of sea cucumber (*stichopus japonicus*). *J. Food Chem. Toxicol.*, **67**, 1319-1322.
- Sato, K., Yosinaka, R., Sato, M., Itoh, Y. and Shimizu, Y. (1988) Isolation of Type I and V collagens from carp muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 155-158.
- Sato, K., Taira, T., Takayama, R., Ohtsuki, K. and Kawabata, M. (1995) Improved chromatographic purification of human and bovine type V collagen submolecular species and their subunit chains from conventional crude preparations, application to cell-substratum adhesion assay for human umbilical vein endothelial cell. *J. Chromatogr.*, **663(B)**, 25-33.
- Sato, K., Shiina, T.T., Jun, F., Kawamura, W., Ichinomiya, M., Minegishi, Y., Tsukamasa, Y., Nakamura, Y., Kawabata, M. and Ohtsuki, K. (2003) Simple and rapid chromatographic purification of Type V collagen from a pepsin digest of porcine intestinal connective tissue, an unmanageable starting material for conventional column chromatography. *J. Chromatogr.*, **790B**, 277-283.
- 申 鉦日・小野世吾・栗原秀幸・高橋是太郎 (2005) ペプシンで可溶化したホタテガイ外套膜由来コラーゲンの特性. 日本食品科学工学会誌, **52**, 398-405.
- Sivakumar, P., Suguna, L. and Chandrakasan, G. (2000) Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissues of the marine crab, *Scylla serrata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **125B**, 555-562.
- Sivakumar, P., Suguna, L. and Chandrakasan, G. (2003) Similarity between the major collagens of cuttlefish cranial cartilage and cornea. *Comp. Biochem. Physiol.*, **134B**, 171-180.
- 高木俊夫 (1990) Laemmli 法. p. 53-61, ポリアクリルアミドゲル 電気泳動法, 廣川書店, 東京.
- Yoshimura, K., Hozan, D., Chonan, Y., and Shirai, K. (1996) Comparison of the physico-chemical properties of shark skin collagen and of pig and bovin skins. *Anim. Sci. Technol. Jpn.*, **67**, 445-454.
- 吉中禮二・佐藤 守 (1989) 魚類の筋肉からのコラーゲンの分画定量. pp. 57-60, 水産化学実験法, 恒星社厚生閣, 東京.