HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ホタテガイ外套膜コラーゲンのα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	http://hdl.handle.net/2115/22012
Type	bulletin (article)
File Information	56(3)_P67-74.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
56(3), 67-74, 2005.

ホタテガイ外套膜コラーゲンの α 鎖の分離

申　鉉日[1)]・栗原　秀幸[1)]・高橋是太郎[1)]

(2005年8月31日受付，2005年9月21日受理)

Separation of the α Chains of Scallop Mantle Collagen

Xuan Ri SHEN[1)], Hideyuki KURIHARA[1)] and Koretaro TAKAHASHI[1)]

Abstract

Collagen was extracted from scallop mantle through pepsin-mediated partial degradation, and subjected to subunit characterization. Two α-chains were separated through anion exchange, and gel filteration chromatographies. In contrast, it was impossible to separate those two α-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, α 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 α 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 α 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 α 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°Cの冷凍庫に凍結して保存したものを用いた。

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×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を加えて一晩抽出し，10,000×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回繰り返し，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，撹拌しながら24 h抽出を行った。その後，10,000×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になるように撹拌しながら添加し

1) 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℃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℃で24 h加水分解した。アミノ酸分析は分解液100 μl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℃, 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，1.5φ×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℃, 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℃, 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α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α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α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β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α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α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）からも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α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α鎖が分解される可能性がある。そ

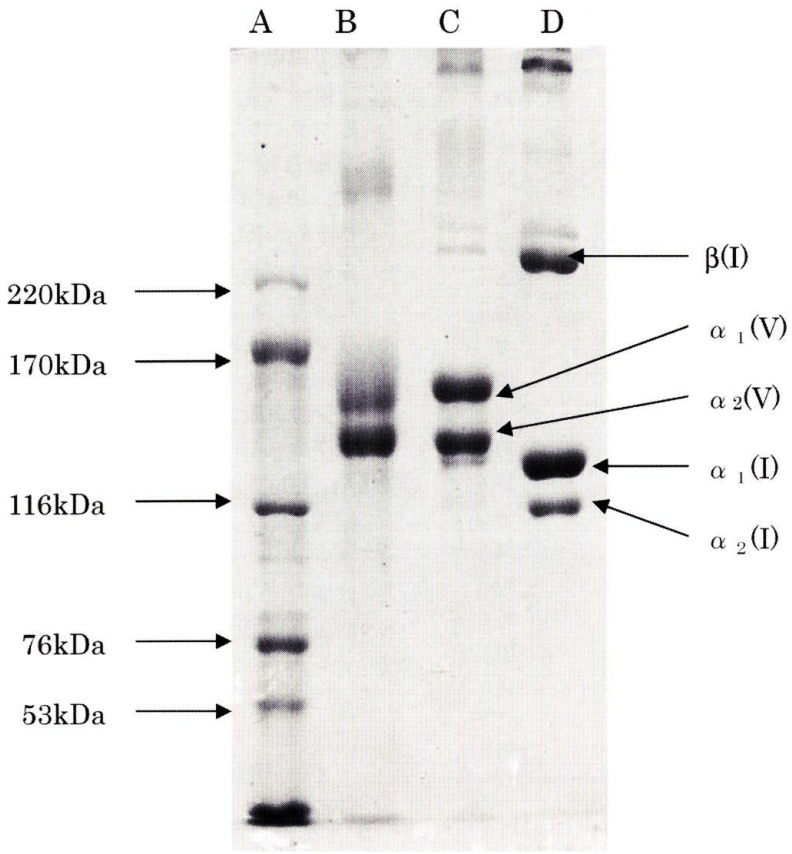

Fig. 1. SDS-PAGE (5% gel) patterns of the pepsin-solubilized collagen with respect to α chain comparison.
A, Molecular weight standards ; B, Scallop mantle pepsin-solubilized collagen (SMPC) ; C, Bovine placental type V collagen ; D, Bovine skin type I collagen.

こで，コラーゲン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), α 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 α 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 α_2 の位置とほぼ等しく，もう一方のバンドは α_2 のやや下の位置に出現した。このことは α_1 鎖が α_2 鎖よりも切断されやすいことが原因で，α_1 鎖が切断されて α_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 α_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 α 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 α 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 α 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 α 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 α_1 鎖と α_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 α_2 鎖が溶出し，次に α_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 α 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 α 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 α 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[a)]	CWPC[b)]
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 α 鎖を分離するときに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 α_1 鎖フラクションに β 鎖が混入していたことから，次に β 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 β 鎖と分離された α 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 α_1 と α_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 α_1 と α_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 α_1 及び α_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，α 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。

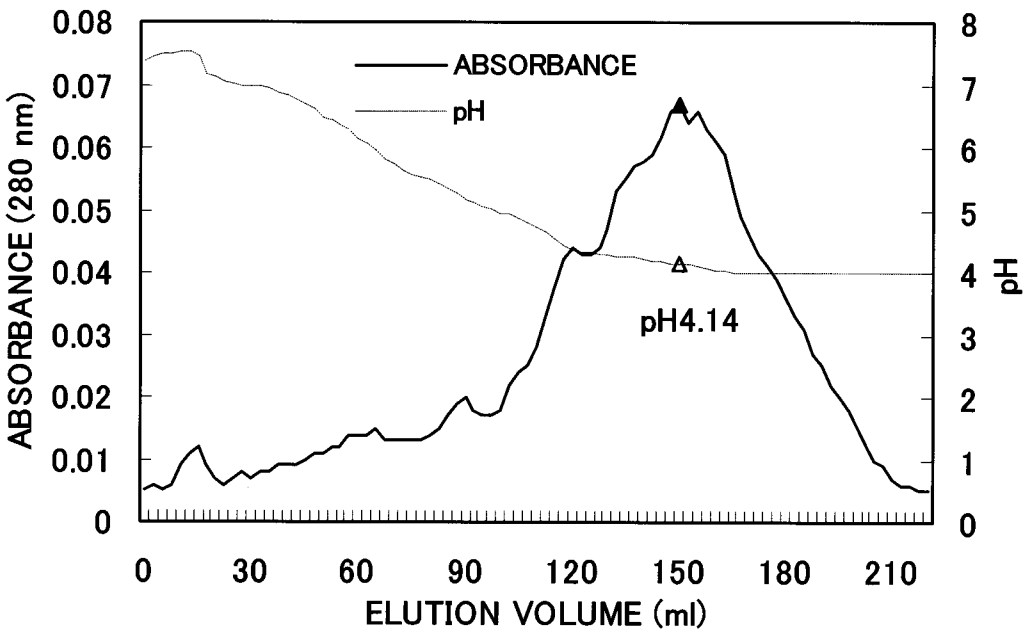

Fig. 2. Isoelectric point chromatography of denatured scallop mantle collagen.
Scallop mantle collagen of 25 mg was dissolved in 5 ml 0.025 M imidazole-HCl buffer (pH 7.4), and heated at 40°C for 30 min, then applied to a PBE 94 chromatography. chromatography was operated at a flow rate of 45 ml/h, and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

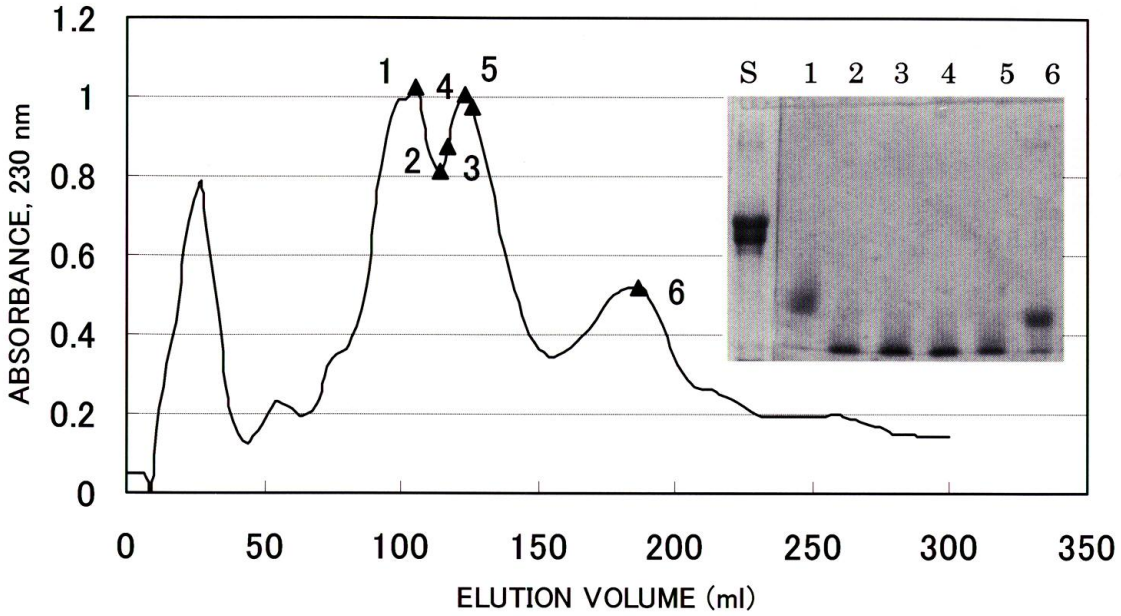

Fig. 3. Elution profile of denatured scallop mantle collagen on CM52 cellulose column chromatography, along with the SDS-PAGE pattens of the fractions medicated by fraction numbers.
Heat-denatured scallop mantle collagen (50 mg) was loaded on a CM52 cellulose column (15ϕ × 100 mm) and eluted at a flow 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

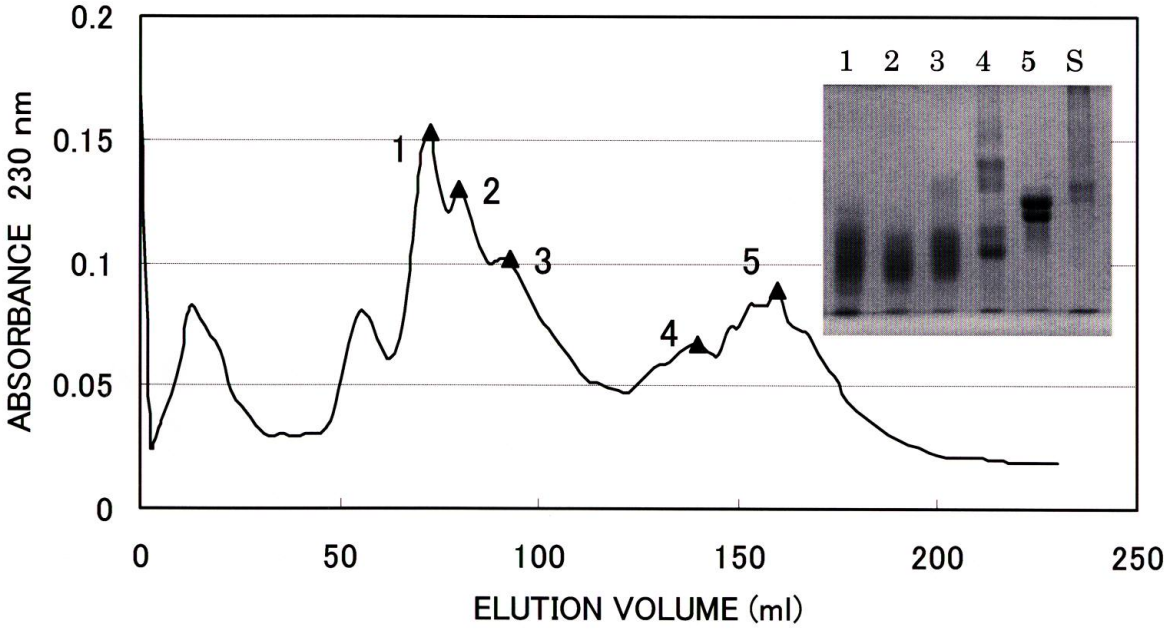

Fig. 4. Elution profile of heat and 6 M urea-denatured scallop mantle collagen on CM52 cellulose column chromatography, along with the SDS-PAGE pattens of the fractions medicated by fraction numbers.
Heat denatured scallop mantle collagen (50 mg) was loaded on a CM52 cellulose column (15ϕ × 100 mm) and 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

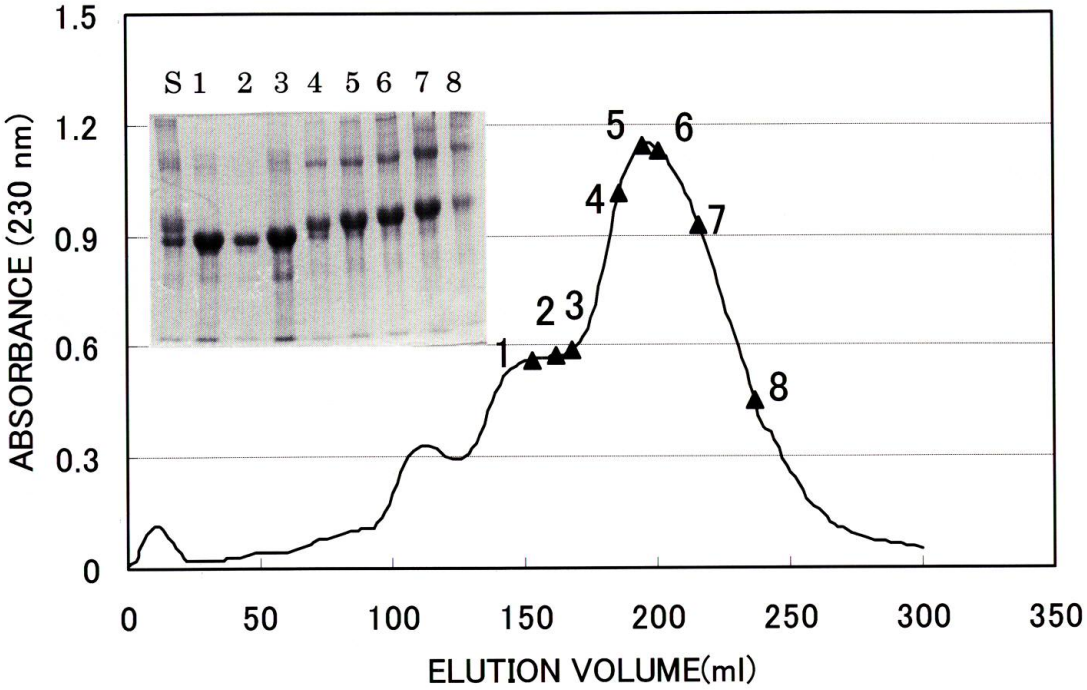

Fig. 5. Elution profile of scallop mantle collagen on DEAE cellulose column chromatography.
Heat denatured scallop mantle collagen (50 mg) was loaded on a DEAE cellulose column (15ϕ × 100 mm), then eluted at a flow rate of 30 ml/h with 0.02 M Tris buffer (pH 8.3), and a NaCl linear gradient from 0 to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

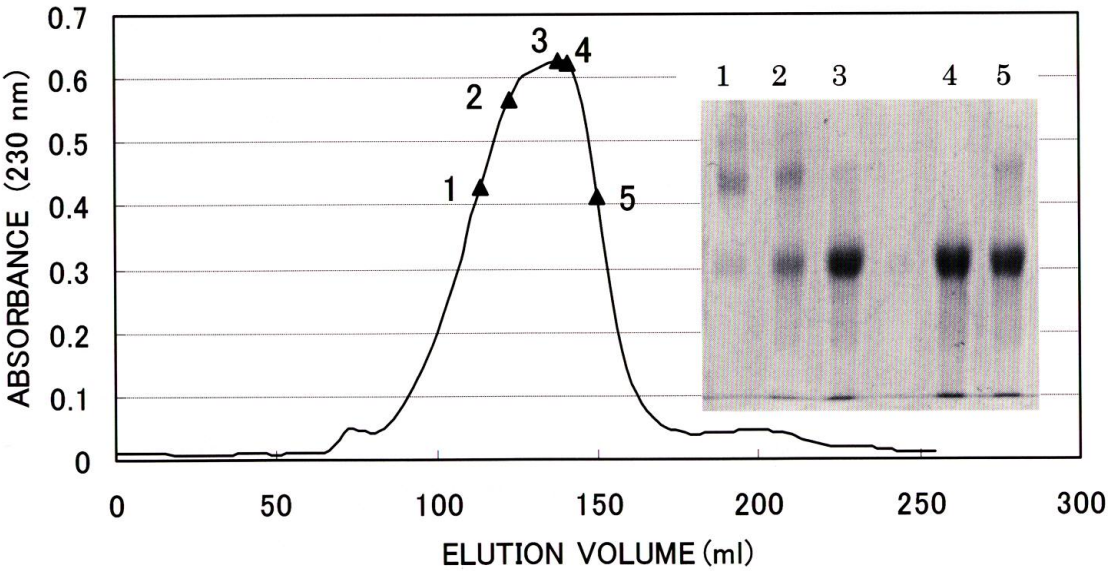

Fig. 6. Elution profile of the fractions 5-7 shown in Fig. 5 on sepharose CL4B column chromatography.
Nine mg sample was dissolved in 0.02 M Tris-HCl, (pH 8.0) buffer and chromato-graphed at 27°C on a Sepharose CL4B column (1.5ϕ × 90 cm) at a flow rate of 20 ml/h. Fractions indicated by numbers were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

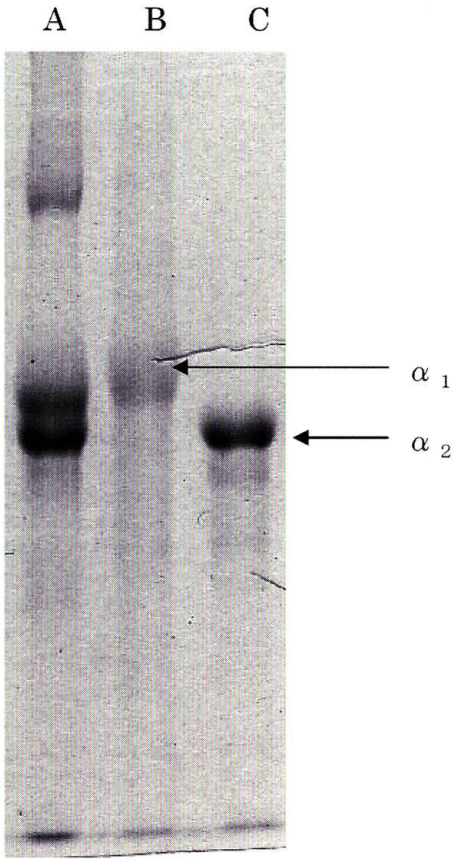

Fig. 7. SDS-5% PAGE of isolated α chains from scallop mantle collagen.
A : Scallop mantle collagen, B : α_1 chain of scallop mantle collagen, C : α_2 chain of scallop mantle collagen.

Table 2 Amino acid composition of α_1 and α_2 chains of various collagens

Amino acid	α_1				α_2			
	S. mantle	*A. ijimai*[a]	*Porcine(I)*[b]	*Porcine(V)*[c]	*S. mantle*	*A. ijimai*[a]	*Porcine(I)*[b]	*Porcine(V)*[c]
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 ad-ductor 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 α_1 chains erom shark skin collagen type I. *J. Food Sci.*, **60**, 1233-1236.

Omura, Y., Urano, N. and Kimura, S. (1996) Occurrence of fibrillar collagen with struc-ture 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. Toxi.*, **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 鉉日・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.