



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	申, 鉉日; 小野, 世吾; 栗原, 秀幸 他
Citation	日本食品科学工学会誌, 52(9), 398-405 https://doi.org/10.3136/nskkk.52.398
Issue Date	2005
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42699
Type	journal article
File Information	takahashi_JJSFST52_398.pdf



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

申 鉉日, 小野世吾, 栗原秀幸, 高橋是太郎[§]

北海道大学大学院水産科学研究院

Characterization of Pepsin-solubilized Collagen from Scallop Mantle

Xuan Ri Shen, Seigo Ono, Hideyuki Kurihara and Koretaro Takahashi[§]

Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University,
3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, 041-8611

Pepsin-solubilized collagen was prepared from scallop mantle. The scallop mantle pepsin solubilized collagen (SMPC) was subjected to analyses of amino acid composition, digestive pattern by protease, electron microscopic view of collagen fibers, and moisture absorption to evaluate its characteristics in comparison with bovine skin type I and bovine placental type V collagens. The amino acid composition of SMPC coincided with that of bovine type V collagen. The SDS-PAGE analysis showed that two α -chains were similar in molecular weight to those of bovine placental type V collagen. However, SMPC was more susceptible than bovine placental type V collagen to *Staphylococcus aureus* V8 protease digestion. The diameter of the SMPC gel fibril was about half of the bovine type I collagen gel fibril. Gel formation ability of the bovine type I collagen was higher than that of SMPC. SMPC showed a higher moisture absorption isotherm under high humidity than bovine skin type I collagen. Electron microscopic view of SMPC showed in part a sponge-like structure.
(Received Dec. 16, 2004 ; Accepted Jun. 8, 2005)

コラーゲンは生体の結合組織の主要なタンパク質の一種で、皮膚に最も多く、血管、腱、骨等にも豊富に分布している。コラーゲン分子は、アミノ酸約1000個が連結した長いポリペプチド鎖3本が、らせん状に組み合わさり、分子本体を構成している¹⁾。これまで、コラーゲンとゼラチンは牛骨、牛皮、豚皮などを原料にして生産されてきた。近年、牛海綿状脳症(BSE)、口蹄疫などの問題で家畜系コラーゲンが敬遠されるようになり、水産系コラーゲンへの転換が試みられている。北海道では、ホタテガイ(*Patinopecten yessoensis*)が天然貝及び養殖貝とも盛んに生産されている。しかし、ホタテガイの加工においては、貝柱のみを利用することが多く、外套膜や内臓の多くは廃棄され、外套膜だけでも年間30000トンにも及ぶ。蛸谷ら²⁾の研究から北海道のホタテガイ外套膜中のコラーゲン含量は6~10月にかけて1.3~2.0%の間に分布している事がわかり、コラーゲンの供給源として安定的だと言うことが実証された。しかし、今まで無脊椎動物コラーゲンに関する研究は哺乳類動物コラーゲンに比べてかなり少なく、コラーゲンの有効利用を目的にその特性を分析した例はさらに少ない。そこで、本研究では北海道で大量かつ安定的に原料を確保できるホタテガイ外套膜由来のペプシン可溶

化コラーゲン(SMPC)を調製し、アミノ酸組成、分子量、及び繊維の形状、ゲル形成能、吸水性などについて牛コラーゲンと比較してその特性を検討した。

実験方法

1. ホタテガイ外套膜由来のペプシン可溶化コラーゲンの調製

SMPCの調製は吉中らの方法³⁾に準じて行った。すなわち、水洗したホタテガイ外套膜100gを細切後、蒸留水500mlを加えてホモジナイズした。10000×gで10min遠心分離した後の沈殿に0.1M水酸化ナトリウム溶液2000mlを加えて一晚抽出した。次いで、10000×gで10min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0.5M酢酸溶液1000mlとペプシン(豚由来EC3.4.23.1; シグマ)を基質に対して2%になるよう加え、攪拌しながら24h抽出を行った。その後、10000×gで10min遠心分離し、上清に塩化ナトリウムを終濃度2.0Mになるように攪拌しながら添加してコラーゲンを沈殿させた。沈殿したコラーゲンを再び0.5M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479mg得た。酸可溶性コラーゲンの場合はRS-ALに0.5M酢酸溶液1000mlを入

〒041-8611 北海道函館市港町3-1-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), kore@fish.hokudai.ac.jp

れて 24 h 抽出した後、 $10\,000\times g$ で 10 min 遠心分離を行い、上清を求めて SMPC と同じ方法で凍結乾燥品を得た。供試するときは、凍結乾燥物を再び 0.5 M 酢酸に溶かした後に、 $30\,000\times g$ 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。

2. コラーゲン含量及び全タンパク質含量の測定

ホタテガイ外套膜中コラーゲンの含量はアルカリ残渣 (RS-AL) を用いて Bergman ら⁴⁾ の方法に準じてヒドロキシプロリンの含量を測定した後、係数 10.2²⁾ をかけてコラーゲン量とした。ホタテガイ外套膜中のタンパク質の含量はケルダール法に準じて窒素量を測定した後、6.25 を乗じてタンパク質量とした。

3. ペプシン可溶性コラーゲンの分画

SMPC を 200 mg ずつとり、0.5 M 酢酸及び 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5, 1.0 M 塩化ナトリウム含有) 100 ml に溶解した。酢酸で溶解させた SMPC 溶液には終濃度 0.2 M, 0.3 M, 及び 0.45 M になるように塩化ナトリウムを加えた。

トリス塩酸緩衝溶液には終濃度 2.8 M, 3.5 M, 4.0 M になるように、塩化ナトリウムを加えた^{5)~7)}。静置により生成した沈殿は $10\,000\times g$, 30 min の遠心分離で集め、0.5 M 酢酸に溶解してから蒸留水に対して透析を行った。

4. 電気泳動

酸抽出コラーゲン、SMPC、牛皮タイプ I コラーゲン (高研)、および牛胎盤タイプ V コラーゲン (高研) 溶液 (濃度 2 mg/ml) それぞれ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、Laemmli 法⁸⁾ 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。

5. アミノ酸分析

SMPC 502 μg を 6N 塩酸 1 500 μl 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。

6. 電子顕微鏡観察

0.05 M 酢酸溶液に SMPC および牛皮タイプ I コラーゲンを濃度が 1 mg/ml になるように溶解してコラーゲングルと繊維を形成させた。ゲルはコラーゲン溶液を 20 mM トリス塩酸溶液 (pH 7.4, 150 mM NaCl 含有) の中で 48 h 透析して形成させた。繊維はコラーゲン溶液 0.5 ml とアデノシン三リン酸 (ATP) 溶液 3.5 ml を混合し、4℃ にて 1 週間静置することによって形成させた⁹⁾。生成したゲルの方はそのまま、また繊維の方は ATP 溶液で 10 倍に希釈してからコロジオン膜グリット (200-A メッシュ、応研商事) に 1 滴のせた。コラーゲングルと繊維をそれぞれグリッドに 2% グルタルアルデヒドで固定させた後、1% 酢酸ウランと 1% タングステン酸を用いてポジティブ染色¹⁰⁾ を行った。

7. V8 プロテアーゼ酵素分解

V8 プロテアーゼ酵素分解は Minamisako ら⁶⁾ の方法に準じて行った。牛皮タイプ I コラーゲン、牛胎盤タイプ V コラーゲン、及び SMPC を 200 μg ずつ取り、それぞれを 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.2, 0.01 M SDS 含有) 100 μl に溶解した。100℃, 1 min 熱変性させたあと、室温に戻した。*Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼ (EC3.4.21.19) (和光純薬工業) を 5 μg 含んだリン酸緩衝液 10 μl をコラーゲン溶液に入れて攪拌した後、37℃ で 25 min インキュベートした。次いで、沸騰水に 3 分間静置して反応を止めた後、10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

8. コラーゲンのゲル形成能の比較

SMPC と牛皮タイプ I コラーゲンをそれぞれ pH 3 の塩酸溶液で濃度が 3 mg/ml になるように溶解させた後、1.5 ml ずつ取って、各種 pH のリン酸緩衝液を同じ量入れ、ゆっくり混合した。この混合した溶液を 4℃ の条件下で 30 min 静置した後、分光光度計で 310 nm の吸光度を測定した。

9. 吸湿性試験

コラーゲンを 2 mg/ml になるように 0.5 M 酢酸溶液に溶かした後、0.01 M 酢酸溶液に対して透析し、15 ml ずつ分注して凍結乾燥を行った。コラーゲン試料は乾燥後ただちに重量を測定した。その後、飽和溶液で湿度を調整したデシケーター内で 24 h 吸水させ、重量変化から吸湿率を算出した。湿度の調整は $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $(NH_4)_2 SO_4$, NaCl, NaBr, CH_3COOK の各飽和溶液をデシケーターの中に置くことにより、デシケーター内の相対湿度がそれぞれ 20%, 58%, 75%, 80%, 95% に達するようにした。

実験結果および考察

1. コラーゲンの抽出率

ホタテガイ外套膜中蛋白質含量は 9.90%, コラーゲン含量は 1.81% だった。上述した方法でコラーゲンを抽出した結果、酸抽出コラーゲンの量はかなり少なく、100 g ホタテガイ外套膜中 16.0 mg (総コラーゲン量の 0.88%) しか抽出できなかった。しかし、SMPC の抽出率は酸抽出コラーゲンに比べてかなり高く、総コラーゲン量の 26.5% であった。二枚貝類コラーゲンの抽出率 10~30%¹¹⁾ と比べてみると 30% までには至らなかった。これは用いたペプシンの量が少なかった事と、ペプシン処理前に解繊処理を行っていなかったためと考えられる。

2. ホタテガイ外套膜由来ペプシン可溶性コラーゲンの SDS-PAGE パターンとアミノ酸組成

ペプシン限定分解によるコラーゲンの性状変化を調べるためにホタテガイ外套膜の酸抽出コラーゲンと SMPC を用いて SDS-PAGE 電気泳動を行った。Fig. 1 に示したように、酸抽出コラーゲンと SMPC の間に大きな性状変化はなかった。但し、酸抽出コラーゲンの α 鎖の方が SMPC の α 鎖よりわずかに上の方に現れ、分子量が若干大きいこ

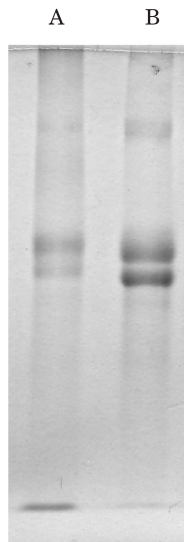


Fig. 1 SDS-PAGE (5% gel) patterns of pepsin solubilized collagen and acid extracted collagen

A, Scallop mantle acid extracted collagen ; B, Scallop mantle pepsin-solubilized collagen (SMPC).

とが示唆された。これは酸抽出コラーゲンの場合、分子両端にテロペプチドとコラーゲン以外のマトリックス成分が付いていて、分子量がわずかに大きくなったためと考えられる。他にも SMPC の α_1 鎖の上の部分が分解された事が観察された。これはすでに水田ら¹²⁾¹³⁾が報告したように α_1 鎖はペプシンの作用を良く受け、切られる可能性があるという事と良く一致した。次いで、SMPC、牛皮タイプ I コラーゲン、牛胎盤タイプ V コラーゲンをを用いて純度検定とサブユニットの分子量を推定するために SDS-PAGE 分析を行った (Fig. 2)。SMPC では α 鎖由来のバンドが検出され、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。泳動パターンを見ると牛胎盤タイプ V コラーゲンの分子量と同じぐらいの分子量を示し、133 kDa と 153 kDa に α_2 と α_1 サブユニットに相当する α 鎖が検出された。SMPC のアミノ酸組成を文献値^{14)~16)}と比較したところ (Table 1)、SMPC 由来のアミノ酸組成はコイ白筋ペプシン可溶化タイプ V 及び Pearl oyster mantle コラーゲンと類似していた。海洋性無脊椎動物のコラーゲンは脊椎動物のタイプ V コラーゲンと良く類似性を示している^{17)~20)}。甲殻類、軟体動物、腔腸動物など下等動物の major コラーゲンが脊椎動物の major コラーゲンであるタイプ I コラーゲンと異なることは、動物の進化過程中タイプ V に類似したコラーゲンがタイプ I に進化した可能性があると言う事も報告されている²¹⁾²²⁾。又、SMPC のアミノ酸組成を 6 種類の無脊椎動物のコラーゲンと比較した場合、おおよそ同じ特徴を示した。すなわち、Gly + Ala の 1000 残基中の残基数は約 373 で脊椎動物コラーゲンの 430~440¹⁶⁾と比較してかなり少なく、酸性アミノ酸の数が多く 172 残基

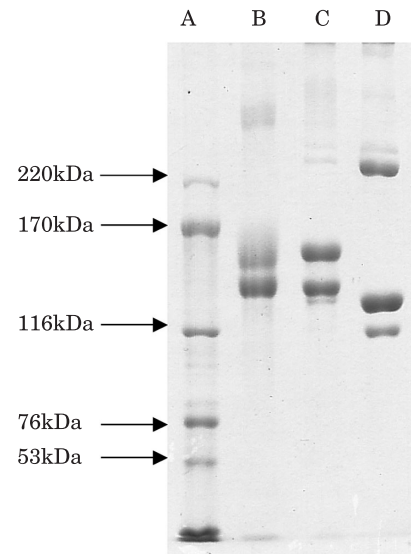


Fig. 2 SDS-PAGE (5% gel) patterns of pepsin-solubilized collagen with respect to α chain comparison

A, Molecular weight standards ; B, Scallop mantle pepsin-solubilized collagen (SMPC) ; C, Bovine placental type V collagen ; D, Bovine skin type I collagen.

を占めていた。その他、Hyl/Lys, Hypo/Pro, アミドなどの数値も良く一致した (Table. 2) プロリンとヒドロキシプロリン残基数の合計はコラーゲンの変性温度と関係があると言われている²³⁾。SMPC の場合、イミノ酸が 1000 残基あたり 172 個あって、牛皮コラーゲン中のイミノ酸の数 (214 個/1000 残基アミノ酸) と比べてかなり少なく、真珠貝外套膜、イカ胴肉などのコラーゲンとおおよそ一致した。このことから、SMPC の変性温度は牛皮コラーゲンより低く、無脊椎動物であるカキ、イカなどと近いことが推測された。他にカキ外套膜のコラーゲンのアミノ酸組成と比べて見ると Oyester (*Crassostrea gigas*) の外套膜コラーゲン¹¹⁾より Pearl oyster (*Pinctada martensii*) の外套膜コラーゲン¹⁶⁾にもっと近かった。

3. ホタテガイ外套膜由来ペプシン可溶化コラーゲンの分画

SMPC はトリス緩衝液 (pH 7.5) 中で牛タイプ I コラーゲンと同様に 4.0 M 塩化ナトリウム添加まではすべてのコラーゲンが沈殿になった。一方、0.5 M 酢酸溶液中では 0.45 M 塩化ナトリウム添加までですべてのコラーゲンが沈殿になった。無脊椎動物の間質コラーゲンには、脊椎動物同様、複数の型の間質コラーゲンを持つことがある²⁴⁾。SMPC を塩化ナトリウムで分別沈殿した結果 (Fig. 3)、H 画分 (酢酸中 0.2~0.3 M NaCl に沈殿した部分) 及び I 画分 (酢酸中 0.3~0.45 M NaCl に沈殿した部分) が他の 5 画分とは異なるパターンを示した。Fig. 3 で示したように、H、I ともに α_1 鎖のバンドが他の 5 画分の α_1 鎖より狭いバンドを示した。この原因は不明だが、アミノ酸組成 (Table 1) を見ると Cys をわずかに含んでおり、ユニークな分子種

が微量存在する可能性もある。

4. タンパク質分解酵素による消化

SMPC の V8 プロテアーゼ消化物の SDS-PAGE パターン (Fig. 4) は牛皮タイプ I コラーゲン, 牛胎盤タイプ V コラーゲンの各消化物とは異っていた。分解パターンを見ると SMPC の方が他の二種類のコラーゲンよりも良く分解されていた。これは V8 プロテアーゼが Asp 残基と Glu 残基のカルボキシル基側のペプチド結合を切断する酵素であり, SMPC に Asp 及び Glu 残基が多いためと考えられる。V8 プロテアーゼの分解の受けやすさは分解され易い方より SMPC, 牛胎盤タイプ V, 牛皮タイプ I コラーゲンの順であった。このことから, SMPC は脊椎動物タイプ V コラーゲンと分子量及びアミノ酸組成の面では類似性を示したが, 同じ一次構造は持っていないことが分かった。

5. 電子顕微鏡下におけるコラーゲン繊維の特徴

再構成したコラーゲン繊維を電子顕微鏡を用いて観察した結果 (Fig. 5), SMPC は牛皮タイプ I コラーゲンに比べて繊維の太さのばらつきが少なく, その平均直径は牛皮タイプ I コラーゲンの約 1/2 であった。SMPC は丈夫なネットワークを持たず, 細かくて均一な繊維を形成していた。このことがゲル形成能の低い (Fig. 6) 一因であると推察される。牛皮タイプ I コラーゲンのように温度を高めることで疎水結合による白濁した強固なゲルを形成することはなかった。SMPC ゲルの透明度は高く, 修飾によりゲル形成能を高める工夫を加えることで医療, 食品, 化粧品分野に利用できる可能性があると考えられる。

6. 吸湿性

SMPC と牛皮タイプ I コラーゲンの吸湿性を比較した結果, 相対湿度が高い時に SMPC がより高い吸湿性を示

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

Amino acid	SMPC	BSC ⁽¹⁴⁾	SSC ⁽¹⁴⁾	CWPC ⁽¹⁵⁾	POMC ⁽¹⁶⁾	OCMC ⁽¹¹⁾
Asp	60	48	45	41	62.5	55.6±0.4
Thr	30	17	24	32	22.2	31.1±0.5
Ser	50	34	42	41	39.4	35.5±0.1
Glu	112	74	76	93	112.0	113.2±
Gly	317	318	311	326	325.0	329.6±1.4
Ala	56	115	119	62	65.4	47.8±0.2
Cys/2	2	0	2	0	2.6	0
Val	20	25	28	19	23.1	19.2±1.6
Met	25	6	15	2	13.5	19.6±1.8
Ile	19	11	20	20	20.0	14.6±0.7
Leu	34	25	29	34	36.8	23.2±0.5
Tyr	7	5	6	6	6.3	9.5±0.1
Phe	11	14	16	14	11.5	6.7±0.2
HyLys	19	9	12	30	15.7	13.0±0.2
Lys	10	27	25	26	10.0	5.8±0.0
His	5	8	10	10	1.3	1.4±0.1
Arg	50	50	52	48	53.9	48.4±0.6
Hypro	71	88	67	87	83.8	105.9±1.2
Pro	101	126	100	110	97.0	119.9±1.2

*Residues per 1000 residues.

SMPC, scallop mantle pepsin-solubilized collagen ; BSC, bovine skin collagen ; SSC, shark skin collagen ; CWPC, carp white muscle pepsin-solubilized type V collagen ; POMC, Pearl oyster (*Pinctada martensii*) mantle pepsin-solubilized collagen ; OCMC, Oyster (*Crassostrea gigas*) mantle pepsin-solubilized major collagen.

Table 2 Degrees of hydroxylation of lysine and proline and amide nitrogen in scallop mantle collagen (Comparison among six invertebrate species⁽¹⁶⁾)

Ratio	Lobster subcuticular tissue	Blue crab	Octopus	Squid body wall	Abalone	Pearl oyster mantle	Scallop mantle
Hylys/Lys	1.28	2.27	1.39	1.05	1.7	1.56	1.9
Hypro/Pro	0.62	0.78	0.99	0.94	0.93	0.86	0.70
Amide nitrogen	92.7	65.8	76.0	77.4	70.4	70.8	68.1

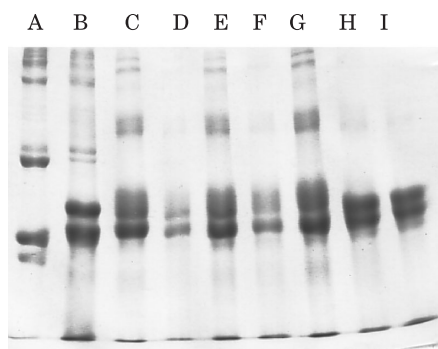


Fig. 3 SDS-PAGE (5% gel) patterns of precipitated fractions of the scallop mantle pepsin-solubilized collagen treated with different concentrations of NaCl in 0.5 M acetic acid and 1.0 M Tris buffer (pH 7.5).

A, Bovine skin type I collagen ; B, Bovine placental type V collagen ; C, Scallop mantle pepsin-solubilized collagen ; D, Precipitate in 2.5–2.8 M NaCl/Tris buffer ; E, Precipitate in 2.8–3.5 M NaCl/Tris buffer ; F, Precipitate in 3.5–4.0 M NaCl /Tris buffer ; G, Precipitate in 0.2 M NaCl/acetic acid ; H, Precipitate in 0.2–0.3 M NaCl/acetic acid ; I, Precipitate in 0.3–0.45 M NaCl/acetic acid.

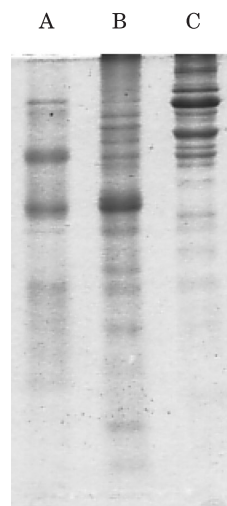


Fig. 4 SDS-PAGE (10% gel) patterns of digested scallop mantle pepsin-solubilized collagen (A), Bovine placental type V collagen (B), and Bovine skin type I collagen (C), with *S. aureus* V8 protease.

した (Fig. 7). これは Fig. 8 の電子顕微鏡観察からも認められるように, SMPC には海綿状構造を形成している部分があって, 水分と接触する表面積が大きいためだと考えられる. その他, SMPC の方が Glu, Tyr, Ser 等親水性の側鎖を持つアミノ酸をより多く含むことも一因と考えられる. よって吸湿性を生かした SMPC の応用が今後期待される.

要 約

ホタテ外套膜からペプシン可溶化コラーゲン (SMPC) を抽出した. 得られたコラーゲンは牛タイプ I コラーゲン, 牛タイプ V コラーゲンと比較して以下の特徴があった.

- (1) SMPC は牛胎盤タイプ V コラーゲンとよく類似したアミノ酸組成と SDS-PAGE 泳動パターンを示した.
- (2) V8 プロテアーゼを用いて酵素分解を行った結果, SMPC は牛胎盤タイプ V コラーゲンや牛皮タイプ I コラーゲンよりも分解を受けやすく, 両者とは異なる一次構造を持っていることが分かった.
- (3) SMPC 繊維を再構成して電子顕微鏡で観察した結果, 繊維の太さは牛皮タイプ I コラーゲン繊維の約半分, ほぼ均一な繊維を形成していた.
- (4) 牛皮タイプ I コラーゲンとゲル形成能を比較した結果, SMPC のゲル形成能は牛タイプ I コラーゲンよりも低いことを認めた.
- (5) 牛皮タイプ I コラーゲンと吸湿性を比較した結果, SMPC の方が高湿度下において, より高い吸水性を示

した.

以上のように, ホタテガイ外套膜ペプシン可溶化コラーゲンは動物筋肉の主要な結合組織であるタイプ I 型コラーゲンとは異なる特徴を示した. その一方で, 他の無脊椎動物のコラーゲンと類似の特徴を示し, 牛胎盤タイプ V コラーゲンにもよく類似していた. しかし, アミノ酸組成中 HyLys の量がタイプ V コラーゲンに比べてやや少なく²⁵⁾²⁶⁾, V8 プロテアーゼの分解パターンが異なっていた. 生物学的に分子種を確認するには遺伝子解析が必要であるが, ここでは食品や, 生体に応用することを目的として SMPC の部分特性を調べた. ホタテガイ外套膜コラーゲンは牛に対しては BSE 問題にかかる優位性があり, 豚には BSE の問題はないものの, 牛と同じ「畜産」ということで多少イメージダウンになっている. 鶏は鶏インフルエンザでイメージが低下しており, 魚皮コラーゲンには悪臭の問題がある. ウロコや骨は脱灰が大変である. 以上の点からホタテガイ外套膜コラーゲンの特性を把握した上で, 抽出率や処理コスト低減を図ることにより従来品に対して, 少しずつ代替が今後可能になっていくものと考えられる. ホタテガイ外套膜ペプシン可溶化コラーゲンのように安価かつ安定的に大量入手できる原料からタイプ V 型に類似したコラーゲンを抽出することができた事は, 今後, さらに分子特性と化学, 物理的な性質を詳しく解析して機能性材料として利用していくための基礎的知見を得る上で意義深い.

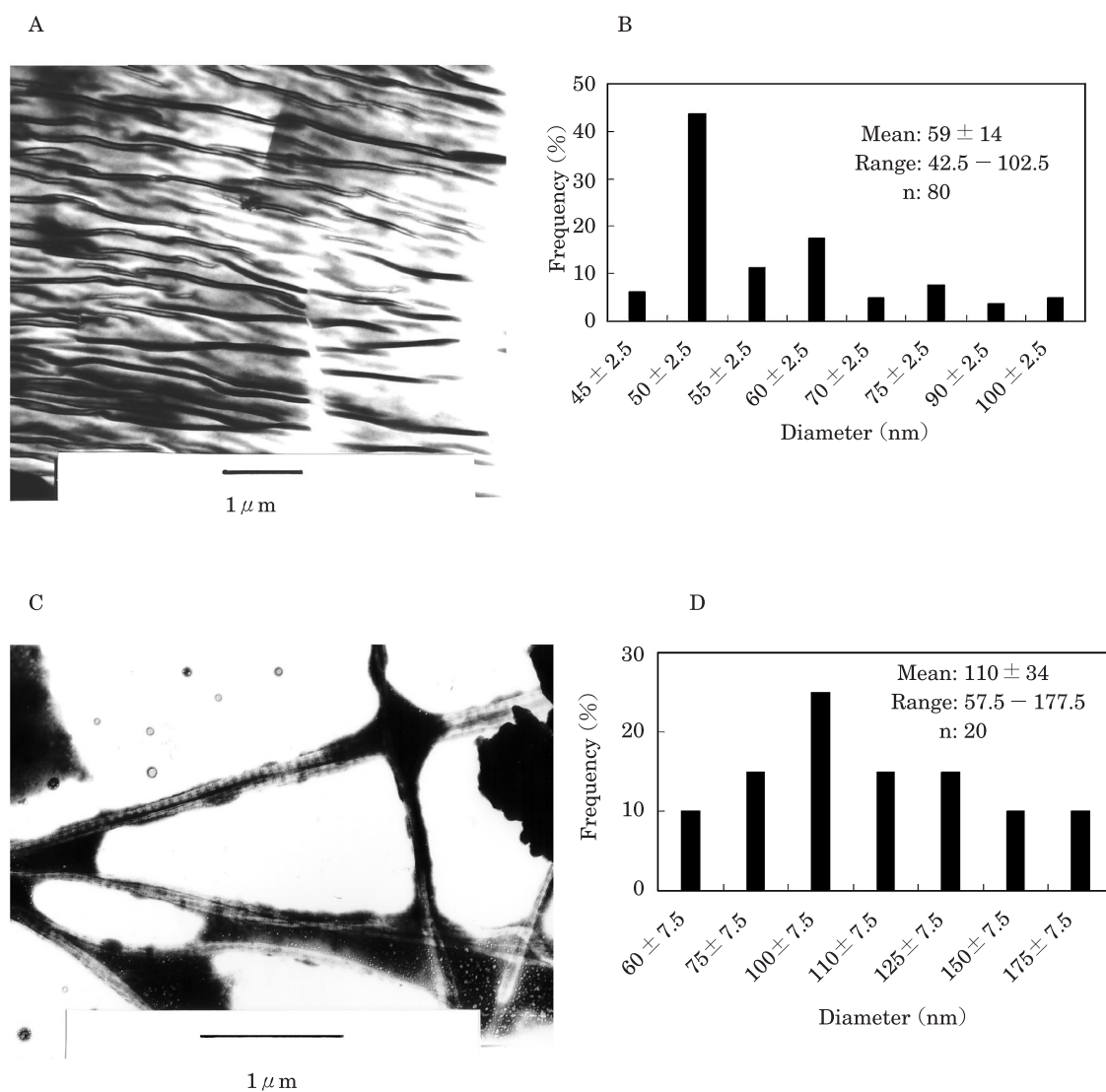


Fig. 5. Transmission electron micrographs of collagen gels. The fibril diameters were measured under positively stained transmission electron micrographs (magnification, $\times 10\text{ k}$).

A, Gel of scallop mantle pepsin-solubilized collagen ; B, Diameter distribution of scallop mantle pepsin-solubilized collagen gel ; C, Gel of bovine skin type I collagen ; D, Diameter distribution of bovine skin type I collagen gel.

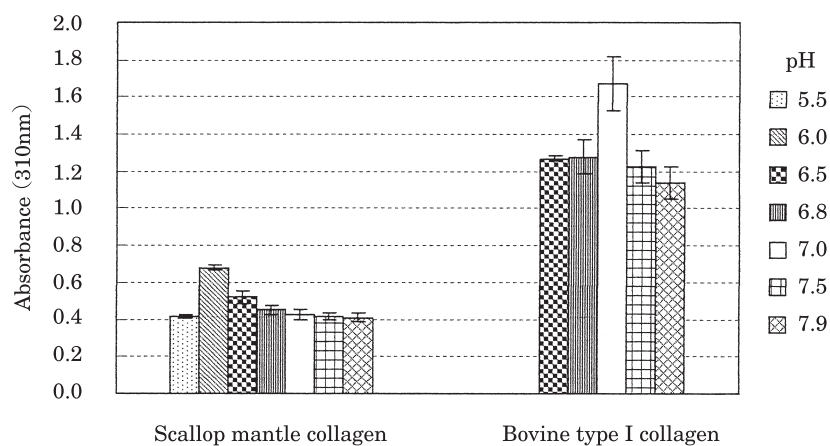


Fig. 6 Comparison of reconstructed collagen gels between those of scallop mantle and bovine at different pH.

Gel formation was evaluated by measuring turbidity increase at 310 nm under 4°C . Error bars designate mean $\pm$ standard deviation (n=3).

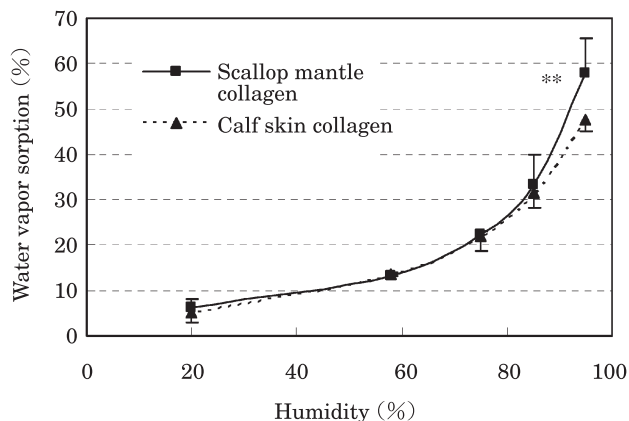


Fig. 7 Water vapor sorption curves of lyophilized collagen.

Vertical bars indicate standard deviation (n=3) of means. (**)p<0.01.

謝 辞

ご協力を賜った北海道立水産試験場の今村琢磨氏、蛭谷幸司氏、辻 浩司氏、宮崎亜希子氏、北海道立工業試験場の蓑嶋裕典氏、(独)水産総合研究センターの大村裕治氏、岡崎恵美子氏に深謝する。

文 献

- Elijah, Adams., Invertebrate collagens. *Science*, **202** (10), 591-598 (1978).
- 蛭谷幸司, 成田正直ら, ホタテガイ外套膜に含まれるコラーゲンの利用に向けての基礎調査, 網走水産試験場平成14年度事業報告書, pp. 93-96 (2003).
- 吉中禮二, 佐藤 守, 魚類の筋肉からのコラーゲンの分画定量, 「水産化学実験法」, (恒星社厚生閣, 東京), pp. 57-60 (1989).
- Bergman, I. and Loxley, R., Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline, *Anal. chem.*, **35**, 1961-1965 (1963).
- Kimura, S., Kamimura, T., Takema, Y. and Kubota, M., Lower vertebrate collagen evidence for Type I-like collagen in the skin of lamprey and shark, *Biochimica et Biophysica. Acta.*, **669**, 251-257 (1981).
- Minamisako, K. and Kimura, S., Characterization of muscle collagen from fleshy prawn *penaeus chinensis*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**, 349-353 (1989).
- Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K. and Kawabata, M., Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle, *J. Agric. Food chem.*, **39**, 1222-1225 (1991).
- 高木俊夫, Laemmli 法, 「ポリアクリルアミドゲル電気泳動法」, (廣川書店, 東京), pp. 53-61 (1990).
- 永井 裕, 藤本大三郎, 「コラーゲン実験法」, (講談社, 東京), pp. 256-257 (1985).
- Yoshihiro, N., Koji, T., Kunio, S. and Keizo, W., Features of collagen matrix reconstructed with proteodermatan sulfate from pigskin insoluble collagen, *Agric. Boil. Chem.*, **53** (4), 939-948 (1989).
- Mizuta, S., Miyagi, T. and Yoshinaka, R., Characterization of the quantitatively major collagen in the mantle of oyster *crassostrea gigas*, *Fisheries Science.*, **71**, 229-235 (2005).
- Mizuta, S., Miyagi, T., Nishimiya, T. and Yoshinaka, R., Partial characterization of collagen in mantle and adductor of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Food Chem.*, **79**, 319-325 (2002).
- Mizuta, S., Miyagi, T., Nishimiya, T. and Yoshinaka, R., Partial characterization of collagen in several bivalve species. *Food Chem.* **87**, 83-88 (2004).
- Yoshimura, K., Hozan, D., Chonan, Y. and Shirai, K., Comparison of the physico-chemical properties of shark skin collagen and of pig and bovin skins., *Anim. Sci. Technol. Jpn.*, **67**, 445-454 (1996).
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Itoh, Y. and Shimizu, Y., Isolation of Type I and V collagens from carp muscle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 155-158 (1988).
- Kimura, S., Nagaoka, Y. and Kubota, M., Studies on marine invertebrate collagens-I. Some collagens from crustaceans and mollusks, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 743-748 (1969).
- Sivakumar, P., Suguna, L. and Chandrakasan, G., Purification and partial characterization of a type V like collagen from the muscle of marine prawn, *Penaeus indicus*, *J. Biosci.* **22**, 131-141 (1997).
- Sivakumar, P. and Chandrakasan, G., Occurrence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid, *Sepia officinalis*: comparison with shark cartilage collagen. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1381**, 161-169 (1998).
- Sivakumar, P. and Suguna, L., Chandrakasan, G., Similarity between the major collagens of cuttlefish cranial cartilage and cornea, *Comp. Biochem. Physiol. Part B.*, **134**, 171-180 (2003).
- Tillet, E., Franc, J.M., Franc, S. and Garrone, R., The evolution of fibrillar collagens: A sea-pen collagen shares common features with vertebrate type V collagen, *Comp. Biochem. Physiol. Part B.*, **113**, 239-246 (1996).
- Sivakumar, P., Suguna, L. and Chandrakasan, G., Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissues of the marine crab, *Scylla serrata*. *Comp.*



Fig. 8 Transmission electron micrograph of positively stained reconstituted fibril of scallop mantle pepsin-solubilized collagen (magnification, ×20 k).

- Biochem. Physiol. Part B.*, **125**, 555-562 (2000).
- 22) Mizuno, K., Adachi, E., Imamura, Y., Katsumata, O. and Hayashi, T., The fibril structure of type V collagen triple-helical domain, *Micron.*, **32**, 317-323 (2001).
- 23) Arnold Nordwig., Ursula Hayduk. Invertebrate collagens : Isolation, characterization and phylogenetic aspects, *J. Mol. Biol.* **44**, 161-172 (1969).
- 24) 蛭原哲也, 入江伸吉, 魚類及び無脊椎動物コラーゲン, 畑隆一郎, 服部俊治, 新井克彦編, 細胞外マトリックス研究法第 I 部, コラーゲン技術研修会, pp. 52-57 (1998).
- 25) Sato, K., Sakuma, A., Ohtsuki, K. and Kawabata, M., Subunit composition of eel (*Anguilla japonica*) type V collagen : Evidence for existence of a novel fourth α_4 (V) chain, *J. Agric. Food chem.*, **42**, 675-678 (1994).
- 26) Sato, K., Shiina, T.T., Jun, F., Kawamura, W., Ichinomiya, M., Minegishi, Y., Tsukamasa, Y., Nakamura, Y., Kawabata, M. and Ohtsuki, K., 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., B* **790**, 277-283 (2003).
- (平成 16 年 12 月 16 日受付, 平成 17 年 6 月 8 日受理)
-