

## 自己評価報告書

平成 23 年 5 月 10 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20580223

研究課題名(和文) プロテアーゼによる二枚貝類コラーゲンの特異な分解挙動の解析と機構解明

研究課題名(英文) Analysis and mechanism of the unique degradation behavior of collagen in bivalve molluscs by protease digestion

## 研究代表者

水田 尚志 (MIZUTA SHOSHI)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：30254246

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：コラーゲン、二枚貝、ホタテガイ、サブユニット、塩酸グアニジン、ペプシン

## 1. 研究計画の概要

無脊椎動物のコラーゲンには難溶性であるものが多いため、コラーゲンの可溶性を増すためにペプシンに代表されるプロテアーゼを用いた限定分解を行う。しかし、多くの二枚貝類についてコラーゲンをペプシン消化に供すると、 $\alpha$ 鎖の相対的減少が起こるなど、顕著な電気泳動パターンの変化を生じる。つまり、二枚貝類コラーゲンには三重らせん領域においてプロテアーゼ感受性部位が存在するなど、他動物にはほとんど見られない興味深い特性を有することが推測される。本研究では、これに関わる基礎的知見を集積することを目的として、まずプロテアーゼ消化に供していない生来の構造をもつコラーゲン(インタクトコラーゲン)ならびにペプシン可溶性コラーゲンを構成する各コラーゲン分子種および $\alpha$ 成分を単離し、さらに免疫化学的手法を用いて分解されるコラーゲン分子種および構成 $\alpha$ 鎖の同定を行う。

## 2. 研究の進捗状況

(1)ホタテガイ外套膜より生来の一次構造を保持したインタクトなコラーゲン(塩酸グアニジン可溶性コラーゲン、GSC)を得た。電気泳動分析により GSC を構成する $\alpha$ 成分として少なくとも4種類(a、b、c、およびd鎖)が存在することが明らかとなった。複数のpH条件下におけるホスホセルロースカラムクロマトグラフィーを行うことにより、a鎖およびb鎖の精製に初めて成功した。また、c鎖およびd鎖については同カラムクロマトグラフィーにおける溶出挙動が極めて類似していたため相互分離には至らず、両者を含む混合物として回収された。これらの単離 $\alpha$ 成分または混合物(c鎖およびd鎖)につい

てアミノ酸組成分析を行った結果、いずれもコラーゲンに特徴的な組成を示し、またa鎖およびb鎖は互いに遺伝的に異なる $\alpha$ 成分であることが示唆された。

(2)ホタテガイ外套膜より既報の方法に従って、ペプシン可溶性コラーゲン(PSC)を得た。比較対照として用いたソデイカ皮膚PSCでは、pH5～10の範囲でほとんど溶解しなかったのに対し、ホタテガイPSCではpH8～10の範囲で高い溶解度を示した。ホタテガイPSCは酸性領域(pH2-3付近)ではソデイカ皮膚PSCと同様高い溶解度を示した。これらの結果は、ホタテガイPSCが他種コラーゲンの多くで溶解性が低い弱塩基性領域において、良好な溶解性を持つことを示している。未変性条件下のクロマトグラフィーで通常添加される尿素(濃度2M)の存在下においてpH6.8およびpH8.8にて溶解性の検討を行ったところ、いずれの条件でもほぼ完全に溶解することが分かった。ホタテガイPSCに含まれる主要コラーゲン分子種については、これまでクロマトグラフィーによる精製が困難であったが、今後2M尿素存在下におけるpH6.8～8.8の条件を適用することにより完全精製を目指す。

## 3. 現在までの達成度

## ③やや遅れている

(理由)コラーゲンまたは構成 $\alpha$ 成分のクロマトグラフィー精製(特にGSCを構成する $\alpha$ 成分の精製)について、その条件検討に想定よりも多くの時間を要したため、現在達成度としてはやや遅れている。

## 4. 今後の研究の推進方策

本研究の過程において、上にも述べたとお

りホタテガイのペプシン可溶化コラーゲンが弱塩基性 pH 領域にて特異的に高い溶解性を有することが明らかとなった。この性質は他の水産動物種由来のコラーゲンにはほとんど見られない性質である。今後、他種二枚貝類においてもこのような性質が見られるかどうかを検証すると同時に、二枚貝類の未変性コラーゲンの精製にこの性質を大いに活用していく。さらに、ペプシン可溶化コラーゲンを構成する $\alpha$ 成分を単離して、GSCの構成 $\alpha$ 成分との対応関係を明らかにする。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計1件)

水田尚志、二枚貝類のコラーゲンの特性－ホタテガイ外套膜の塩酸グアニジン可溶性コラーゲンを構成するインタクトな $\alpha$ 鎖の単離－、平成 22 年度日本水産学会秋季大会、2010 年 9 月 22 日、京都大学吉田キャンパス