目　　次

ご　挨　拶 …… 1

ポ ス タ ー …… 3

サイエンスセミナー
「体のなかのコラーゲンの役割
～コラーゲン研究からわかること（マンモスを例にとって）～」
株式会社ニッピバイオマトリックス研究所長　　服部　俊治　氏

第一部 …… 4

第二部 …… 16

資　　料 …… 24

ご挨拶

国立大学法人秋田大学　男女共同参画推進室長
渡　部　育　子

女性研究者支援モデル育成事業では、次世代の研究者育成が重要な課題のひとつとなります。秋田大学では、株式会社ニッピバイオマトリックス研究所・所長の服部俊治氏を講師にお招きし、2010年12月23日に小中学生･高校生と保護者の方を対象に、「不思議体験『親子でサイエンス～ようこそ！コラーゲンの世界へ～』」を開催しました。翌24日には大学院生・研究者を対象に「サイエンスセミナー『体のなかのコラーゲンの役割～コラーゲン研究からわかること（マンモスを例にとって）～』を開催しました。

小中学生・高校生のみなさまには、サイエンスをもっとよく知りたい、研究したいと思っていただきたい、保護者のみなさまにはサイエンスへの入り口は日常生活のなかにあるということを理解していただきたいという思いから選んだテーマです。

今、「コラーゲン」という文字を目にしない日はないほど、メディアはこの語をとりあげています。老若男女を問わず、何となく気になるコラーゲン！。23日のイベントでは保護者の方々からも多くの質問が寄せられました。実は、今から約1300年前の養老元年（717)、元正女帝は美濃（岐阜県）多度山にある泉の水で手や顔を洗ったところ肌が滑らかになり、痛いところを洗ったところ痛みが無くなったと言って、たいへん喜んだと伝えられます。美と健康を求めるこころは、昔も今も変わらないようです。

本冊子は24日のイベントの内容を編集したものです。是非、ご一読ください。

平成21年度採択　文部科学省科学技術振興調整費「女性研究者支援モデル育成事業」
秋田大学「大学間連携と女性研究者支援in秋田」

サイエンスセミナー

体のなかのコラーゲンの役割

～コラーゲン研究からわかること（マンモスを例にとって）～

日時
- 平成22年**12月24日**（金）
- 10：00～12：00

場所
- 秋田大学医学部
  細胞生物学講座セミナー室
  （基礎医学研究棟3階）
- 学外の方は事前申込みにご協力ください

講師
- 株式会社ニッピ
  バイオマトリックス研究所
  所長　**服部　俊治**　氏

対象
大学院生
研究者

服部俊治所長のご紹介

職歴

1985年6月　東京医科歯科大学難治疾患研究所　助手

1989年9月　(株)ニッピバイオマトリックス研究所　プロジェクトリーダー

1995年4月　(株)日本皮革研究所　主任研究員

2009年4月　(株)ニッピバイオマトリックス研究所　所長

なお、2007年4月～　東京農工大学　客員准教授

【お問い合せ】男女共同参画推進室coloconi　tel:018-889-2260
E-mail:sankaku@jimu.akita-u.ac.jp

サイエンスセミナー

「体のなかのコラーゲンの役割

～コラーゲン研究からわかること（マンモスを例にとって）～」

株式会社ニッピバイオマトリックス研究所長　服部　俊治　氏

◎プロフィール

最終学歴　東京医科歯科大学　医学研究科　医学博士（1985）
主な職歴　東京医科歯科大学難治疾患研究所　助手（1985-1989）
株式会社ニッピ・バイオマトリックス研究所（1989-現在）
フレッドハッチンソン癌研究所（米国シアトル）客員研究員　（1990-1993）

［司会］　秋田大学大学院医学系研究科　教授　妹尾　春樹

第一部

妹尾） これより、サイエンスセミナー「体のなかのコラーゲンの役割～コラーゲン研究からわかること（マンモスを例にとって）～」と題して、株式会社ニッピバイオマトリックス研究所の服部俊治所長をお迎えし、ご講演いただきます。これは秋田大学の男女共同参画推進室と医学部細胞生物学講座の共催ということで、今日やらせていただくことになっています。

服部先生はここの職歴に書いてありますように、東京医科歯科大学の助手を務められてからニッピバイオマトリックスの方に移られて、非常に様々な研究を展開されていらっしゃいます。特に最近の一つのトピックスはマンモスですね。それがフローズンのマンモスとか、それから化石になったマンモスからコラーゲンを取り出して、それの解析をして非常におもしろいデータを今蓄積されつつあるというところで、今日もそういうことを中心に話していただきます。

宜しくお願いします。

服部） 宜しくお願いします。

前半はコラーゲンの一般的な話と、コラーゲンの変性温度について、ちょっとだけお話させていただきます。

後半を秋田大学の妹尾先生と一緒にやっているマンモスの話の今わかっているデータまでを話させていただきます。お願いします。

一般的にコラーゲン、広辞苑的にはコラーゲンのことがいっぱい書いてありますが、ゼラチンの方がずっと詳しいです。一般的にはゼラチンがあって、コラーゲンというのはゼラチンになる元の物という程度の認識で言っています。

一方、生物学的視点でいくと、コラーゲンが非常にメインにでてきまして、いろいろ構造のことも書いてあって、ゼラチンは変性したものがゼラチンということだけで、基本的には元が同じです。

昨日の「親子でサイエンス」イベントの中で、チャップリンが革の靴を食べているところがありました。「これでコラーゲンを食べているということになりますが、わかります？」というところで、ゼラチン、靴を煮てゼラチンにして食べているということで、コラーゲンそのものではないんですけれども、コラーゲンが変性、熱にかけて変性したものを食べているということで、コラーゲンを食べているという話になっていました。

一般的にはゼラチンというものが元にあって、そのゼラチンの、ニッピにある本の知識だと、これがCだったり、Kだったりしますけど、ギリシャ語とか、古い言葉ではゼラチンのことが、コルで、コルのもとであるということで、造語ですね、コラーゲンの方が造語でゼラチンが元。ジェル状の物がゼラチン。

ですが生物学的にはこのコラーゲンの方が意味があるので、コラーゲンというものが主な説明ということになっています。

今までのコラーゲンの歴史というものはちょっと復習させていただきますと、コラーゲンというのは昔は皮、皮革としてはまず使って、これはタンニン、昔は木の渋ですね、皮に木の渋を擦り込むとコラーゲンが非常に溶けにくくなって、これも実験をすればすぐわかるんですけれども、ゼラチンとかコラーゲンはタンニンを入れるとすぐ沈殿します。すごく溶けにくくなるということで、タンニンを入れて丈夫にする。これはあとで1800年代くらいになるとクロムの方がもっといいなめし材だということがわかってきて、これが一般的には靴とか、鞄にはこれが使われています。

が、また自然回帰でタンニンも出ていますが、こういうもので皮を腐りにくくする方法として皮が革になるということがやられています。

それから中国では昔からこの字を使っていまして、“膠・こう”とか、“きょう”とか“にべ”とか、“にべ”は日本語かな。呼んでおります。

だからコラーゲンの“コロ”とこの“膠”は言葉は似ているし、シルクロードに繋がったところでは同じ言葉を使っていたのかもしれないですけれども、歴史的には相当古くから使っています。

昨日はゼラチンをみんなに触ってもらって熱で溶かして、だんだん冷やすと固まるというのを見てもらい、そのあと手で触ってもらって実際とてもねちゃねちゃする、ねちょねちょするということで、糊としてすごく使えます。昔から糊として使っていまして、墨を集めて固める時にも膠を使っていますし、あと日本絵画は自然の顔料を使いますけど、紙に塗りつける時には糊としてはゼラチン、膠を使って書くということがありますので、そういう使い方が昔からあった。

さらに日本ではこれのことを“にかわ”と言いますけども、これはもともとゼラチン、さっき言ったように皮を、皮のコラーゲンを煮だしたものがゼラチンですので、皮を煮たものとして“にかわ”という名前で、和語としてはこういう言葉を昔から使っています。

その接着剤の流れとしては、このマッチの頭の所の火薬を固めるとか、いろんな使い方をしています。

それから詳しいことは僕もよく知らないんですが、“阿膠（あきょう）”という名前で、漢方薬としても使われているそうです。これは一応阿膠としてはロバの膠を使っているそうです。なんか婦人科系の出血傾向を止めるとか、そのような効果があるということは漢方のインターネット、本を見ると書いてありますので、なんらかの薬効を中国人は認めてきたということはあるようです。

そのあとヨーロッパの方ではゼラチン、これはただ煮ただけなので相当不純物も入っていて、色も茶色かったり、黒っぽかったりします。それをもっときれいなゼラチンそのもので純粋になるとすごく透明ですので、それをきれいに取ってくる方法をいろいろ開発して、食用としてイギリスで特許が最初に出たのがこの頃、150年ぐらい前らしいですけれども、ババロアを作ったというのがあります。

もうちょっと経つと写真用の看板の感光材をくっつけるために、やっぱり糊として、ゼラチンが使われています。この伝統はとても長くて、今はデジタルに変わっちゃいましたけど、現在のフィルムに至るまで、このゼラチンが感光材を塗り付ける時に使われていて、感光材が光にあたって変化した時の粒子の保持とか、安定性とかが一番いいということで、これが使われているそうです。

うちのニッピという会社も、実際の工場はコラーゲンを作ったり、ゼラチンを作ったりする工場は富士宮にありますが、もともとある富士フィルムにゼラチンを供給するために、富士に工場を作りました。水をたくさん使いますので、富士山の湧水を使って、作っています。

うちの会社がゼラチン作ったのはもっとずっとあとですけども、写真用のゼラチンを作ったのは1940年ころ、第２次大戦ぐらいから作っています。

それからゼラチン用のカプセルを今でも、薬の

ゼラチンとして使われています。ゼラチンのカプセルとか、感圧式複写機だから、墨をゼラチンに封入して、押し付けると墨が出るという形の複写機とか使われています。

現代ではもともとコラーゲン、ゼラチンが生体物資だということを利用して、注射の安定剤とか、それから化粧品に使うとか、健康飲料に使うとか、さらには今は再生医療の細胞の基材に使うとかいうような使い方が今段々増えてきています。うちでもこういうのをやりたいなというところで話が進んでいます。

コラーゲンの研究の歴史において、先ほど言いましたようにコラーゲンというのはあとで作られた造語でもともと存在しているのはゼラチン、皆さん知っていたのは膠とか、ゼラチンという形で知っていたので、コラーゲンというものがあるか、ないか、これはどういうものか、ゼラチンのもとになるものは体にあるということはわかっていたけれども、それがどういうものかというのはそれほどわかっていませんでした。

古い歴史、古い論文などを見るとSchmittとか、Grossらは相当有名で、コラーゲン研究者では我々の上の永井先生の時代では有名ですけれども、こういう人達が電子顕微鏡を使ってコラーゲンを見ると、なんか体の中のコラーゲン見ると、線維状でしかも縞模様のあるものが見えて、こういうものが「コラーゲンとして見えるよ」というようなことが、この40年代に随分と論文として出ています。

この周期構造とかの研究で、X線回折という方法を使って、周期構造の分析や、それからコラーゲンの分子というのが、これはコラーゲンの一個一個の分子が横に200か300並んだ形でやっとこの太さになっていまして、全体では数千個の分子が束になっている様子が見えるようになっています。

この線維自身にも一定の周期が見えるし、それからもっとさらに細かく見ると一個一個の分子についても、周期構造があるということで、これはコラーゲンというのがペプチドという、タンパク質のペプチド、繋がったものがさらに3本集まった、三重螺旋構造をしているのではないかというようなことが研究されたのはこの頃です。

ちょうどこの頃は1952年とか、53年、54年の頃はワトソンとクリックらによって、DNAの螺旋構造がわかってきた頃で、たぶん世界的にもこういう微細構造に興味がみんな移った頃だと思います。コラーゲンについてもそういう螺旋構造がX線回折でわかるということで、こういう研究が進んでいます。

結構有名な論文は二つ、『Nature（ネイチャー)』に出ていて、コラーゲン構造の研究、ClickとRich、この2名はどっちも有名なんです。これ、ClickはWatson・ClickのClickですけれども、RamachandranとKarthaというこの2人が結構有名です。

西洋的にはClickの方が有名なんですけれども、実際のモデルとしてはRamachandranとKartha、こっちの方が近いらしいです。この2名はインド人でして、ゼラチンって、今でもインドから輸入しているんですけれども、ゼラチンコラーゲンの研究で、わりと最近までですけど、結構インド人の研究者というのはたくさんいます。

構造研究ではかなりインド人が出てきますし、あと今日の話にはないですけど、コラーゲン関連では酵素の研究だと、フィンランド人が結構出てきて、意外と地域性のある研究があちこちにあります。

ただ並んでいて、お砂糖と同じ、糖鎖と同じでそんなに長さとかの制御がされているのかどうかというのもはっきりわかっていない状態で、適当に長いタンパク質をアミノ酸をくっつけていけば、こういう構造になるのだろうというふうに考えている人もいました。そして一定の構造があると言いだしたのはこのGrossという人間で、このユニットのことをTropocollagen、ユニットとして存在するというような話をこの頃論文に書いています。

研究としては溶かさないとそれ以上の研究が進まないということで、ちゃんとした一定単位を

きちっと溶かして、それが一定の単位の物であるということを証明するというのはなかなか難しいと思われていましたが、西原という人がもともとSchmittの所と、もう一ヶ所に留学をしてコラーゲンの研究をして、日本に帰ってきてからこのコラーゲンというのを溶かすことができるということを見つけたのは60年です。

ちょうど今年がコラーゲンの溶かし方の発見50周年で、なにかイベントをしようと話していましたが、間に合わず来年何かなんかやろうと思っています。

溶かせるということを調べて、しかもタンパク質なので、蛋白分解酵素を使ったらタンパク質は壊れますが、なぜかコラーゲンだけは3本鎖のきちっとした構造をとっていると壊れなくて、蛋白分解酵素を使ってタンパクを溶かして精製するというのは、すごい突飛な発想ですが、こういうことで溶かすことに成功してます。

しかも溶けてきたものが一定の単位の約30万の分子であって、ただ単に繋がったものではなくて、一定の分子であるということをここで証明したというのは結構大きい仕事に、立派な仕事だと思っています。

我々が昔コラーゲンでいろいろお世話になった林先生がという方がおりまして、先生ももったいないと言っていたのは、今のマトリックス研究会という、今年（H22年）秋田で開催したこの研究会の発表しか文献が残っておりません。大きい論文には書いておりません。

ただし特許は日本、アメリカ、ヨーロッパ相当いろいろとっていますので、そういう意味では権利は確保したけれども、論文的にはあまり有名にならなくて、惜しいことをしたなというふうに思っております。

そのあと、コラーゲンというのはタンパク質、酵素で溶かせないということもありますけれども、溶かす特別な酵素があるということを見つけてきたのがこの頃です。

これはGross&Nagaiの仕事です。この永井は妹尾先生と私、山口先生がいた部屋の教授でありまして、アメリカで見つけております。

そのあとコラーゲンというのはもっとほんとは大きい形でとれてきて、最終的に体で沈着する時には30万の分子であるということで、生合成系を見つけてきたというのはこのKivirikko and Prockopのグループです。Kivirikkoがフィンランドで、Prockopがもともとノルウェーでしたっけ。ともかく北欧です。今アメリカにいます。

コラーゲン研究者には北欧の人間が多くて、山口さんが行っていたオールセンという人もノルウェーです。

さらにコラーゲンにも遺伝子があると、ちゃんとした遺伝子があるとわかってきたのがこの頃で、今ではコラーゲンは細胞接着としても非常に重要とか、いろんなことがわかってきております。

85年の当時では調べていた遺伝子の中ではコラーゲン遺伝子が一番大きい遺伝子だったと思います。その後70年ごろまでにはコラーゲンのタイプがいろいろ見つかっていましたが、コラーゲンの遺伝子がわかったあとはだんだんコラーゲンにもいろんなタイプがある上に、とってくるよりも遺伝子を調べた方が早いということでいろんな遺伝子をどんどん解明していって、山口先生も8型を見つけるとか、どんどん増えてきて今29型までコラーゲンがあります。ともかく重要で、なくなると病気になったりするのが結構あるので、相当それぞれマイナーコラーゲンでも重要なことをしているということはわかりつつあります。

昨日の話したことは、コラーゲンはゼラチンのもとになって、接着剤のような働きをするということです。

体にはいろんな組織があって、そのうちで骨とか、皮膚、それからアキレス腱、こういうところにはコラーゲンがいっぱいありますという話をして、骨の例を取り出して、見て触ってもらって、実感していただきました。

（骨の写真）

３種類の骨があります。これ（左）が普通の骨です。触れるかなっていうと、みんな小学生はちゃんと触りましたね。

すごく丈夫な骨があります。普通骨と言うと、何からできているか。

カルシウムと言います。カルシウム、見てみようということで、骨をカルシウムだけにしてみたのがこれ（右）です。逆にコラーゲンだけにしたらというのがこれ（中央）です。
やわらかいです。

そうするとコラーゲンとカルシウムでできているけど、それぞれ何をしているかというのは想像できるかなということであります。

これ（右）硬いけど、こするとボロボロ落ちてくる。無機質ですから、やっぱり硬いけどすごくもろい。

これ（中央）はソフト、しなやかな感じになっていまして、この硬いのをこいつで埋めることでしなやか、しかもなかなか折れない構造ができていて、しかもさっきのゼラチンも糊として使っていましたけど、生体内でも骨のものをちゃんとくっつける、糊的な役割。実際にはこの中に細胞がいっぱい生きています。細胞が生きていくための細胞と細胞をくっつけるための糊になっている。

コラーゲンがあって、細胞がくっつかないとバラバラになってしまう。体ができているというのはそういう糊の役割が大事だということが言いたくて出しております。

カルシウムだけだと硬くて、でも折れやすい。コラーゲンだけだとしなやかです。これが両方とも混ざって重要な役割をしていますという話を一つはしました。

非常に骨がしっかりするのに重要なので、実際に骨がダメになるといろんな病気が出きて、この辺は医学部の人の方が詳しいと思います。このコラーゲンがちゃんとできないと骨がバキバキに折れてしまうような、骨がもろくなる病気とか。それから関節が異常に曲がる病気とか。

昨日あった顔の皮がビヨーンとなる妹尾先生のスライド。あれ自体では病気とは言えないでしょうけど、他の組織のコラーゲンも弱いので、血管が弱かったり、心臓にダメージがあったり、そういうことで病気になるということがありまして、当然コラーゲンがちゃんとしてないと病気になります。

そういうビヨーンとしたようなのはEhlers－Danlos syndrome、これはいろんなタイプがあります。コラーゲンそのものがダメだったり、コラーゲンを作る酵素がダメだったり、コラーゲンをちゃんと丈夫にするためのちょっとした最後の一工夫がうまくいかなかったりとか。

骨が弱くなるのはOsteogenesis Imperfecta。こっちの皮膚とかそっちの方に出るのをEhlers－Danlos syndromeと言います。

同じコラーゲンがダメでも、骨に出たり、皮に出たりするのはなぜダメかというのはわかっているのかどうか、よく知りません。

それからコラーゲン、逆にたくさん作っちゃうような病気で線維症とか、肺線維症とか、肝臓の線維症とか、強皮症とか、こういう病気もあります。

これはコラーゲンが多いので、強皮症とか、膠原病とか、という名前付けられていますが、コラーゲンが悪者というよりもたぶん正常に働ける細胞がダメになって、そこにしょうがないからコラーゲンが増えてきて、結果的にコラーゲンがいっぱいになっちゃった症状が見えるので、線維症と呼んでいるのであって、コラーゲンが悪者というよりは、仕方なく埋めているような気もします。この辺もお医者さん的にはどういうふうに考

えているかは、いろんな人がいると思います。

コラーゲンを減らせば治るかどうか、そこも微妙で、減らした上でちゃんとした肝臓なら肝臓の細胞、腎臓なら腎臓の細胞を増やすことが大事ではないかなとは思います。いろんな病気があります。

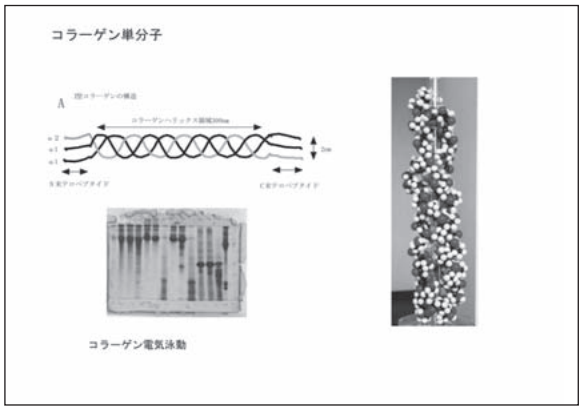
それから関節のコラーゲンを壊しちゃうという病気もあって、これはリウマチといいます。ここの関節のツルツルしている所はコラーゲンで、骨の硬い所とは別のタイプのⅡ型というコラーゲンでできている。これで関節がスムーズに動くのですが、これがどんどん壊れちゃって関節の摩擦が非常に強くて痛いとか、癒着しちゃったりするのがリウマチです。

それから癌の転移にも関係しています。腎臓、これ、おしっこを作る所ですけれども、ここではⅣ型のコラーゲンというのが線維上でもすごい網目状の構造を作って、そこがろ過する構造を作っているんですけど、こいつがダメになると腎臓の病気、アルポートシンドロームとか、いろんな病気がある。

それから皮膚にもコラーゲンがいっぱいあります。表皮と真皮という所があります。その間に基底膜というコラーゲンがありますけれども、その表皮と真皮を繋ぎとめているコラーゲンというのもあります。

皮膚は表皮と真皮と別の、張り合わされた組織です。そこを繋ぎ合わせているいろんな組織、ボタンみたいにとめている所もあって、そういうのにXⅦ型のコラーゲンというのが働いている。これがダメになるとひどい水泡症になる。水ぶくれだらけで大変な病気になったり、その他いろんな病気に関係する。ないと病気になることがあります。

実際のコラーゲンの構造は、先程の人体にあるコラーゲンを見ると、こういう線維構造が見えます。この線維構造の中のここにコラーゲンの分子というのがたくさん並んでいる模式図です。ですが、これ自体もすごく細長い分子からできていまして、長さが3メートルだとすると幅は2センチぐらいの、すごく細長くて、3本鎖螺旋に巻いている。そういう分子がいっぱい集まってできています。これが分子模型です。



出典：化粧品とコラーゲン　コラーゲンの製造と応用
展開シーエムシー出版　2009年　服部

この一本一本はタンパク質でアミノ酸の繋がりです。そのアミノ酸の繋がりを調べると、アミノ酸が1,014個並んでいます。特徴的にはこの1,014個の所は絶対間違えずに、三つ目にグリシンがある。グリシンというタンパク質、アミノ酸があるのが一つの特徴。

出典：*Matrix Biol.* 17, 85-88 (1998) shirai et al

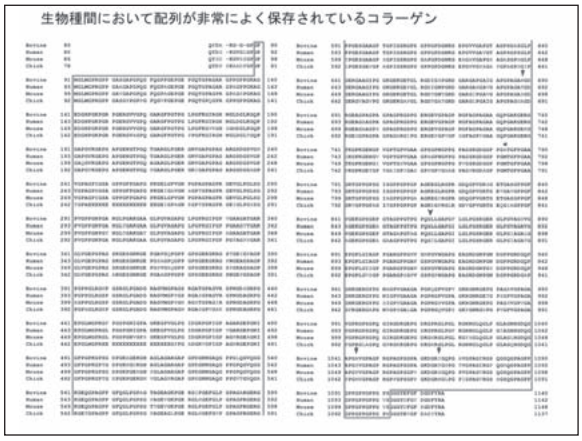
また、このPというのが非常に目立ちますが、プロリンというのが非常にたくさんあります。しかもこのプロリンの中でも、グリシンから二つ目のこのプロリン、このプロリンはこの三つ目のプロリンというのは、ハイドロキシプロリンという、これは他のタンパク質にはほとんどないアミノ酸になっています。

このハイドロキシプロリン、これは遺伝子にはハイドロキシプロリンというコードはなく、決められていなくて、一旦プロリンとしてできたタン

パク質がコラーゲンの場合にはあとでここの3番目のところだけ場所を見つけて、プロリンというアミノ酸にOH、水酸基をくっつけるということをするという酵素があって、ハイドロキシプロリンを作っていきます。

ハイドロキシプロリンの量がたくさんあることで、さっきの3本鎖コードというのがうまく安定になっているというのは結構昔から知られている話です。

それから普通、動物が違うとタンパク質が配列とか、アミノ酸の入れ替えが随分多いです。例えばこのコラーゲンというのは非常に種が違ってもかなり似ていて、これはウシとヒトとマウスとニワトリでデータベースから調べたものです。赤い所だけ違っていて、あとは黒い所は全部一緒で、しかも数もまったく一緒の1,014個の所になっています。

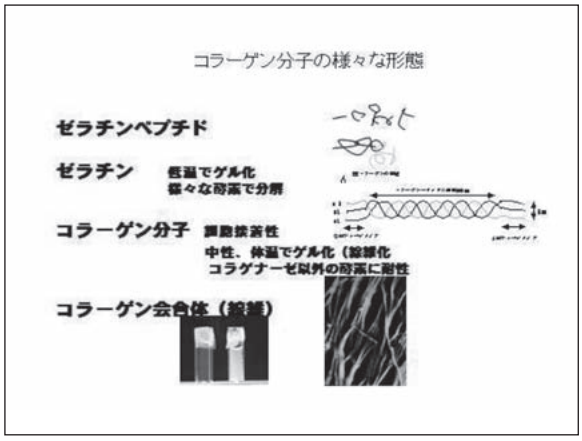


出典：Fragrance J. 11月号　52-58　(2001) 服部ら

95％ぐらいのものが一緒で、要するにちゃんとした3本鎖構造を保つためには非常に規制が多くて、ちょっとでも外れると進化的にうまくいかないということがあるのだと思います。非常によく配列が保存されています。

医療用に使う時にも普通は、他の動物の物を打ったりすると、免疫反応でアレルギーを起こしたりしますが、コラーゲンの場合非常に近くて、人に牛のコラーゲン使ったとしても、ほとんど免疫拒絶などはないということが知られていますので、医療用にも本当は人の使った方がいいんでしょうけど、それが簡単に手に入らない時には、牛とか豚の使ってもほとんどそういう影響がないということは知られています。

コラーゲンというのはさっきの一個一個分子としてはこういう形をしています。温度を上げていくとバラバラ、3本鎖構造がこうやってゼラチンというものになります。さらに壊していくとゼラチンのペプチド、これもコラーゲンペプチドと言っても間違いではないので、コラーゲンペプチドという名前で呼んでいます。



こういうふうにすると非常に水によく溶けて、飲む時もすぐ溶けるし、よく溶けるので飲料に随分使われています。コラーゲン飲料というものはこれが入っています。

コラーゲン分子ではほとんど溶けないのですが、これを溶かしてニッピではこの状態で化粧品として使っています。

細胞、これが生体内になるとコラーゲン、この分子がずっと並んで線維上のものを作るということになります。この分子が、たくさん並んでいて束になっているという状態です。

次に一般的な話ですが、いろいろな動物からコラーゲンをとってみるというのを昔やっていまして、これとマンモスの話にも関係するので、ここだけちょっと詳しくやります。I型のコラーゲン、海産動物から哺乳類までいろいろ取ってきたコラーゲンを比較したことがあります。

Hagfish、ヌタウナギという相当下等なもの。それから軟骨魚類のサメ、シャケ、カエル、ニワトリ、ウシ。他にもいろいろあります。電気泳動という方法で分子を分離して調べますが、ヒト

やウシ、ブタはほとんど同じこういう形で見えまして、これが1,000個集まったα鎖というものになります。これが2個くっついちゃったβ鎖、これは3本くっついたもので、分子量が10万、20万、30万なんですけどもこういう形で見えまして、少しずつ移動度、動き方は違いますが、Ⅰ型のコラーゲンは似たような挙動を示します。

それでアミノ酸分析をすると、これはアミノ酸で、このグリシンというのはさっきの1,000個中に何個アミノ酸が入っているかというもので、グリシンは3個目に必ずくるのでだいたい300前後であっています。あと非常に目立つのがこのプロリンというのは他のタンパク質にはあまりないのですが、コラーゲンには結構たくさんあります。

Table. 1 Amino acid Compositions of Collagen from Various Sort of Animal S.kins

Amino Acid	hagfish	shark	salmon	frog	chick	bovine
Hypro	62.6	66.0	54.3	74.5	104.9	82.7
Asp	46.5	43.2	53.5	48.8	48.1	46.3
Thr	31.3	25.4	23.3	20.7	19.1	17.1
Ser	59.3	42.4	49.2	51.8	28.6	32.2
Glu	59.1	73.4	75.3	75.4	74.1	73.8
Pro	100.7	107.9	103.8	124.5	123.1	122.6
Gly	357.1	337.4	361.2	343.3	331.0	339.8
Ala	115.7	114.5	108.4	110.0	114.6	115.2
Cys	trace	trace	2.3	0.4	trace	1.5
Val	28.0	23.7	15.6	13.4	19.8	20.9
Met	14.9	12.4	18.3	5.8	6.2	7.9
Ile	13.6	19.9	10.6	8.5	10.9	12.0
Leu	16.6	25.2	20.3	19.7	23.8	25.5
Tyr	3.7	2.3	0.0	1.3	3.4	2.6
Phe	9.4	12.3	12.7	11.6	14.3	12.4
Hylys	4.0	5.2	4.3	5.5	9.6	5.7
Lys	18.6	26.6	26.1	27.6	19.0	26.6
His	6.9	8.1	9.1	5.9	4.5	4.2
Arg	52.2	53.5	51.7	51.3	44.8	51.0
						(mol/1000 residues)
Hypro+Pro	163.3	174.5	158.1	199.0	228.0	205.3
Hypro%	38.3	38.2	34.3	37.4	46.0	40.3
Hylys+Lys	22.6	31.8	30.4	33.1	28.6	32.3
Hylys%	17.7	16.4	14.1	16.6	33.6	17.6
Hydrophobic*	302.6	318.2	289.7	294.8	316.1	319.1
Hydrophilic**	340.5	344.4	349.1	361.9	352.7	339.6

*Hydrophobic; Pro+Ala+Val+Met+Ile+Leu+Tyr+Phe
**Hydrophilic; Hypro+Asp+Thr+Ser+Glu+Cys+Lys+Hylys+Arg

ヒドロキシプロリン含量に注目

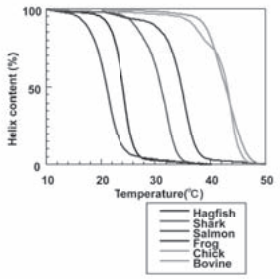
出典：Fragrance J. 11月号　52-58　(2001)　服部ら　一部改変

それからこれがハイドロキシプロリンという、先ほどのプロリンに水酸基OHがくっついたものであります。これがコラーゲンに特徴的です。

特にこのハイドロキシプロリンがどのくらいあるかによって、コラーゲンの性質がすごく変わってきます。先ほどの3本鎖がほどけてしまう温度というのは、円偏光二色性という一定の測定法があって、温度溶液を上げていくと、こっちが3本鎖のヘリックスの巻き具合ですが、巻いてるのが温度を上げるとだんだんなくなっていきます。こういう温度を上げながら光をあてて、3本鎖構造を調べるという方法があります。

様々な動物のコラーゲンの変性温度

Fig.2 Thermal Denaturation Curve of Collagens from Various Sort of Animals.



出典※1

これで調べてやりますと、一番低いのがシャケですね。20度ぐらいでほどけちゃいます。それからヌタウナギというのは25度ぐらい。サメが30度前後、カエルが35度ぐらい、ウシが42度。ニワトリがウシとほぼ同じかちょっと高いくらいです。

ほどける温度は、ハイドロキシプロリンの量と相関しています。これが少ないと変性温度が低い。ニワトリが一番変性温度が高くて、哺乳類は37度位の体温ですけども、体温よりちょっと上あたりに変性温度があります。

人が熱出して、42.3度が限界というのはコラーゲンの限界でもあって、関係あるのかもしれません。

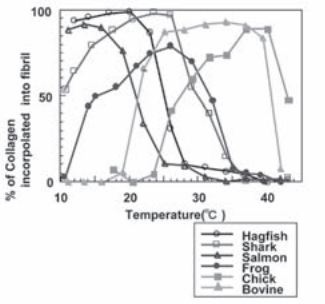
シャケとか、寒い所にいるものは低い温度で変性します。だから普通に食卓に上がる頃にはコラーゲンは変性しているのかな。カエルとかは変性動物ですけど、たぶん生きていくための限界の温度というのはこの辺にあるのではないかなというふうに思われます。

一般的に海の物だと生きている温度に近い所に変性温度があります。

それから淡水魚はわりと高めです。生きている環境で、海の物は温度によって北へ南へ逃げられるけれども、淡水魚は逃げられないから高い方に順化していると思います。生活環境を遺伝子だけで決めると生活環境に対応できないので、遺伝子移行の酵素活性で変性温度が決まるので、その辺を調節してコラーゲンの安定性を決めているように思われます。

また、コラーゲンというのは３本鎖構造を中性において温度を上げていくと、だんだん透明になった溶液が白く濁ってきます。白く濁ってくるというのはこの分子がどんどん並んで、線維を作るということが知られていまして、体の中ではコラーゲンの線維として存在するわけなので、中性である温度で線維になったものが皮膚とか、骨になっていることがあります。

様々な動物種のコラーゲンの線維形成能温度



出典※２

この線維化する温度というのもちょっと興味があって、やりました。例えばウシだと37.8度から25.6度の所で線維化がおきました。ニワトリだともうちょっと高い所から線維化が起こります。もっと高くなるとこれは分子が変性してしまうので、線維化おきませんが、分子が変性する寸前位の所で一番線維化がおきます。

一方シャケとかは変性温度よりも低い所で起きるということで、やはり微妙にサメはこの辺で変性温度ありますが、それより低い所。逆に今度高い所で線維化するのは低い温度では変性化しにくい、ちょうどこの体温あたりで一番線維化をするということで、その辺も非常によく制御されているなというふうに思われます。

次にこれが遺伝的に決まっているかどうか、というので一つ興味があって、コイを20度と30度で何カ月か飼って順化させたというコイをいただいたことがあります。これは東大のワタベ先生がやっていたのをいただいて、コラーゲンの分析をしたものです。

温度順化したコイコラーゲン

Table. 2 Amino Acid Compositions of Collagen from Carp Skin Acclimated to Different Temperature.

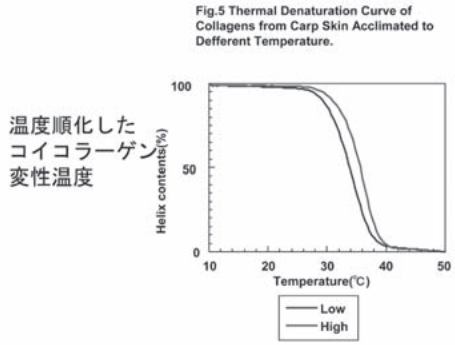
Amino Acid	Low	High
Hypro	69.4	81.0
Asp	48.5	47.5
Thr	29.6	30.1
Ser	47.8	47.9
Glu	75.8	75.6
Pro	107.6	96.4
Gly	339.4	335.6
Ala	124.7	126.3
Val	17.0	17.4
Cys	n.d.	n.d.
Met	3.7	2.5
Ile	11.4	12.2
Leu	21.3	21.8
Tyr	3.1	3.4
Phe	13.1	13.8
Hylys	3.3	3.5
Lys	29.0	29.2
His	4.8	5.1
Arg	50.5	50.7
	(mol/1000 residues)	
Pro+Hypro	177.0	177.4
Hypro %	39.2	45.7
Lys+Hylys	32.3	32.7
Hylys %	10.2	10.7
Hydrophobic*	284.9	276.4
Hydrophilic**	358.7	370.6

**Hydrophilic; Hypro+Asp+Thr+Ser+Glu+Cys+Lys+Hylys+Arg
*Hydrophobic; Pro+Ala+Val+Met+Ile+Leu+Tyr+Phe

出典※３

そうすると同じコラーゲンでも低い温度で飼っていたコイはハイドロキシプロリンが70個ぐらいで、高い温度だと80個ぐらいあります。

遺伝的に決まらずに環境で決まっているように思われます。



出典※４

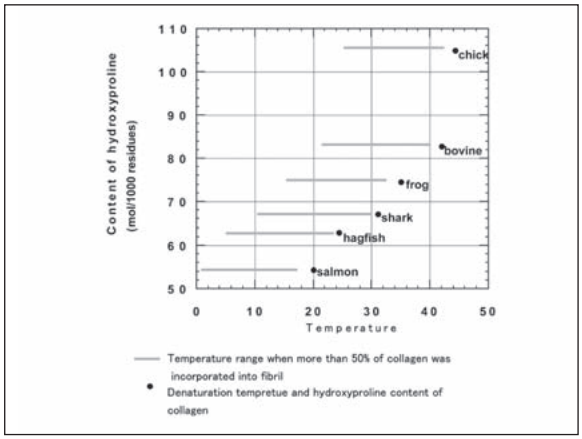
実際に変性温度調べてもこの差がどの程度反映されているかわかりませんが、34度と36度、２度ぐらい変性温度が違って、低い温度の所のものは、ちょっと低くなります。

さらに変性だけじゃなくて、線維化の温度というものも微妙に違ってきて、低い温度の方が低い所で線維化することがあって、この辺も体の中でいろんな調節をしていて、特にこういう変性温度、哺乳類についてはだいたい温度が決まってきています。変温動物とかについてはコラーゲンの変性温度を調べることで、生活環境などがわかるということで、コラーゲンだけしかなかったとすると、その動物がどのくらいの温度で生きていた

かとか、体温がどのくらいだったかというのが想像できるのではないかなと思います。その辺の生きていた環境までわかるのではないかということが非常に興味深いと思います。

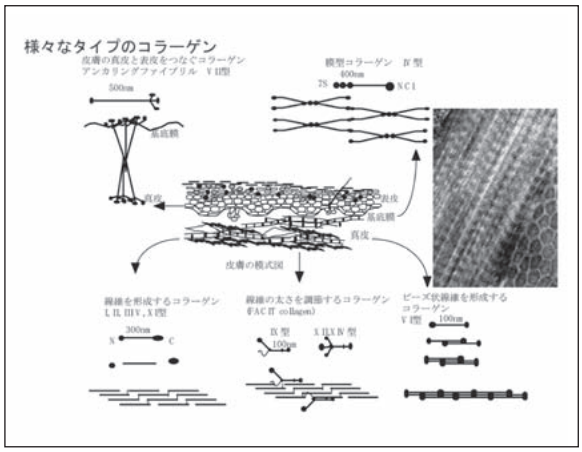
いろんな温度で変性温度を調べて、ハイドロキシプロリンの量との比較をしました。

それから線維形成する温度についても調べてみました。



だいたいここが変性温度になります。この灰色の所が50％以上線維化した温度になりますが、線維性のちょっと下から15度くらいの所で線維化しました。寒すぎると線維化できないのも、こういう変温動物では何か、これ以上下がったら冬眠するなどのシグナルになるかもしれませんが、ともかくわりときれいに線維化と変性温度の関係がしっかりあることがわかりました。

次に、様々なタイプのコラーゲンがあります。この皮膚の様式図ですが、真皮にはきっちりと線維を作って体を丈夫にする、体の組織を丈夫にする、こういう線維形成をするコラーゲンがあります。表皮にはコラーゲンはほとんどありませんが、この表皮と真皮をつなぐ所には基底膜というものがあって、ここにはⅣ型のコラーゲンがたくさんあります。このⅣ型のコラーゲンが二次元状にメッシュワークを作って、この人間の体の外側と内側を分けているということがわかっています。



出典：化粧品とコラーゲン　コラーゲンの製造と応用
展開シーエムシー出版　2009年　服部

この単位は非常に細かい線維構造なので、なかなか見にくいのですが、ここの教室の今井先生がいろいろ工夫して下さって、やっとこのメッシュワークの中が見れそうだというデータをもらって、大変うれしく思っています。

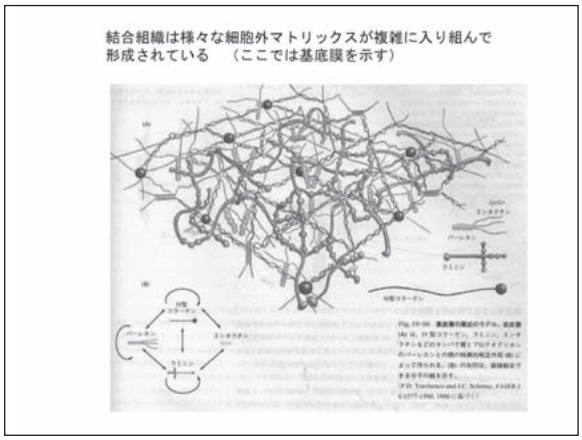
なぜかコラーゲンはⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型と、ローマ数字で示すのが習慣になっていまして、今ＸＸⅨ型まであります。名前の付いたいきさつもいろいろありますが、40年代、50年代ではコラーゲンといえばⅠ型しかありませんでした。1962年にミラーという人が軟骨から違うコラーゲンを見つけてⅡ型というのにしました。Ⅱ型があるのなら、今までのはⅠ型にしようかということでⅠ型にして、そのあと皮膚から違うコラーゲンがあるということでⅢ型を見つけ、今度基底膜でⅣ型見つけて、Ⅴ型見つけ、というような順番で発見した順番に名前が付いていきていました。Ⅵ型、Ⅶ型ぐらいまではコラーゲンとして、タンパク質として見つかってきています。

ちょうど私が大学にいた頃はたぶんⅤ型か、Ⅵ型かぐらいまでしかわかっていなかったのですが、そのあと爆発的に増えてきて、Ⅷ型以降はたぶん遺伝子が先に見つかって、そのあとからⅨ型はものが見つかりましがたが、少なくともＸⅡ型以降は全部遺伝子が見つかって、そのあとに今はノックアウト動物とか、いろんなものができてその遺伝子がないとどういう病気ができるかを見たりして、その機能を調べるというようなことが

進んでいます。

今ゲノムが全部わかったのでＸＸIX型以上出てこないかなと思いますけど、わかりません。

これは、先ほどの２次元構造を取る基底膜コラーゲンの模式図です。教科書からとってきたものです。



出典：The cell fifth edition 2008

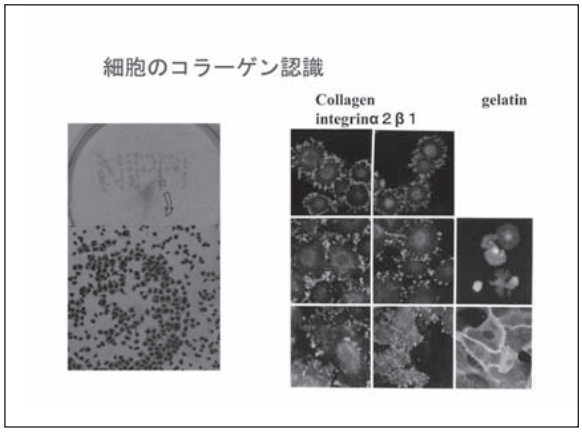
コラーゲンが二次元構造をとって、その間にいろんなラミニン、エンタクチンなどのタンパク質がくっついて、体をちゃんと作っているということがわかります。

先程の研究の歴史では1970年代位の所まできましたが、そのあとコラーゲンとしてはいろいろとわかってきたことは、細胞接着基質、体の中でも糊の役割をします。ただ単に糊のようにくっつけるのではなく、細胞がコラーゲンならコラーゲンを見つけて、そこにきちんとコラーゲンだということを細胞がわかっていて、細胞の方がコラーゲンにくっついていく構造の仕組みがわかってきたというのが80年代以降のことになります。

例えばコラーゲンの上で、皮膚の細胞をとってきてまいてあげると、皮膚の表皮細胞というのがコラーゲンの上にビタッとくっついて、だいたいこれ一晩12時間ぐらいですがくっついて動いて、もっと経つと細胞がどんどん増えてきて細胞がきっちりくっつくということがわかります。

お皿の上に細胞をまいて、様子を見たのがこういう感じになります。この時にはお皿の上に先にコラーゲンを塗ってあります。コラーゲンを塗っていないとずっと丸い形のままでいて、最後死んでしまうものがかなりあって、コラーゲンがないとうまく細胞がくっつけないということがわかってきました。

一定の装置があるというのがだんだんわかってきて、これはお皿の上にコラーゲンでNIPPIと書いて細胞をまいてやると、ちゃんとコラーゲンが塗ったところだけ細胞が集まってきています。くっついてくれます。



出典：*J. Biochem.* 125, 676-684 (1999) Hattori et al

そこにはちゃんとした装置があって、細胞にはインテグリンという、これが1980年代に見つかったもので、細胞の表面にあるコラーゲンを察知するアンテナがあるんですが、そのアンテナがありますよと。くっついた時にはこのアンテナでくっついていますよということがわかります。

このコラーゲンを、変性してしまったゼラチンにしますと、このアンテナが出てこなくて、特に３時間、４時間、24時間の写真ですが、すごく、くっつきが悪くなります。しかもアンテナもほとんど出てこなくて、自分自身でくっつけるものを何とか絞り出して、出して、それを表面にくっつけてから自分がなんとか生きてくっついてくるという状態です。初めからコラーゲンがあると、そこに細胞がくっついて広がるということになります。

一般的にコラーゲンとか、そういうものがあるとインテグリンから、今更に細胞の中に細胞内の骨格というのがありまして、これはアクチンというファイバー、骨格が繋がっていて、細胞がきっちりと伸びて広がるということが出来ます。

人間の体というのは、なにかにくっついていないと生きていけないというのが宿命で、くっつかずに生きていけるのは血液の中に入っている血球とか、それぐらいで他の物は何かにくっついていないと生きていけないし、増えれないというのがあるので、くっつくというのはすごく大事な体の細胞の性質、性であるということになります。

くっつく相手としてはいろんなものが知られていて、このコラーゲンもありますけど、その他にもラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、いろんなタンパク質、細胞外マトリックスと一般的に呼ばれているのがあって、コラーゲンもその仲間です。アンテナになる分子というのもいろんな分子があって、いろんな組み合わせがあって、この組み合わせで何にくっつくかというのが決まってきて、細胞の環境でどれにくっつきましょうというのを決めてきたりするということになっています。

コラーゲンの接着と変性の話をまずここまでにさせていただいて、あとはマンモスの方で何をやっていたかという話にしたいと思います。

出典※１～４
4th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium 1999
Ebihara ら

第二部

それでは妹尾先生達と一緒にやっているマンモスコラーゲンのことについてお話させていただきます。

2006年に京都の学会で妹尾先生からマンモスのサンプルで共同研究のお話をいただきました。昔から古いものには興味があって、論文などもよく見ています。恐竜などの化石からDNA抽出します。それからネアンデルタール人からもDNA抽出して、ホモサピエンスと性的関係があったかとか、ネアンデルタール人は白人だったか、黒人だったかというような話もあって、黒くなる遺伝子がないから白人だったろうとか、いろんな情報があります。

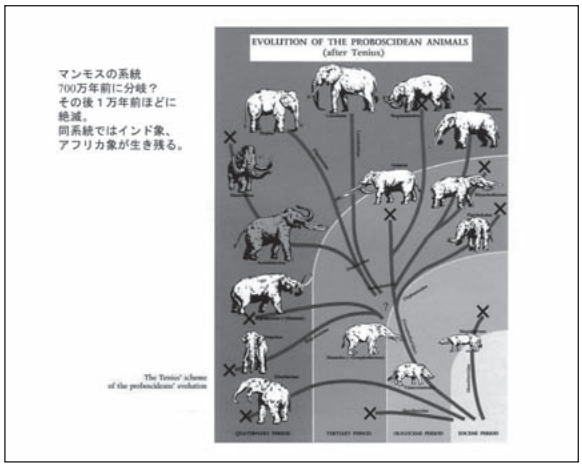
マンモスのDNAについても、『Nature』に随分出ていたりして、相当カバーする遺伝子がとられています。これは遺伝子がPCRという方法で増幅できて分析し易いし、結構安定だということで研究が進んできました。

一方タンパク質は生体内のほとんどを占めるにもかかわらず、すごく重要なのにもかかわらず他の細菌や動物のえさになって腐ってしまう。それからタンパク質は増幅する方法がないとか、いろいろな理由があって、タンパク質からそういう古い化石とか、古いサンプルにアプローチすることはあまりなかったというのが現実だと思います。

でも今回妹尾先生からもらったもの、冷凍マンモスはある意味新鮮ということで、タンパク質の研究が行われるのではないかということで、研究を始めております。

組織化学的な分析は秋田大学で、生化学的な分析をニッピで行いました。

マンモスはこのように系統が分岐して、今残っているのはインド象とアフリカ象だけです。



出典：The Yakut Phenomenon：The World Of Mammoths

本には数千年前まで生き残っていたマンモスもいたかもしれないと書いてありますが、人類がちょうどシベリアにいた３，４万年前ぐらい前から急に減ってきて、一万年ぐらい前には絶滅してしまったというふうに言われています。

シベリアではいろんなマンモスが見つかっていまして、特に冷凍、永久凍土にそのまま埋もれたものが結構あって、そのまま腐ってしまったものがほとんどなんでしょう。これは、もともと掘りだした骨だけ残したんですよね。マンモスは相当化石としても保存状態がいいですし、溶けだした所がマンモスがたまに人の目に触れれば見つかるということなので。

出典：The Yakut Phenomenon：The World Of Mammoths

この写真は、マンモスの本には必ず出てくる人で、チコノフさんと妹尾先生が一緒にサンクトペテルブルクに行ったもので、ジーマ君とマーシャ君の皮は剥製みたいな感じになっています。内臓

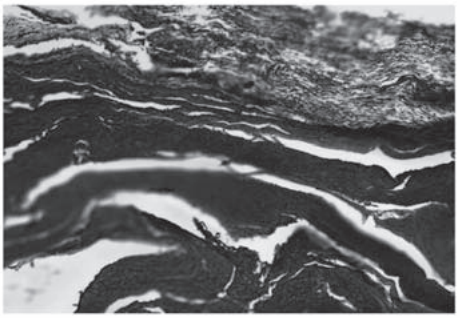
はアルコールにつけてとっていて、この組織の一部を妹尾先生がもらってきて分析するということになっております。

秋田大の分析ではこの肝臓は鍍銀で染まる方法ですか。

マンモス肝臓

妹尾）どちらも鍍銀で染まっています。線維が細いと上のように黒く染まって、線維が太いと茶色く染まっています。

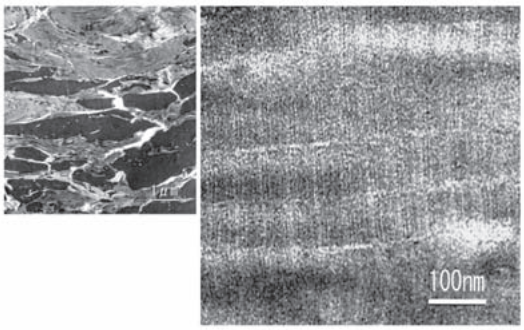
ジーマ 肝臓（石井式鍍銀法）



服部）組織学的にもコラーゲンが結構残っているということがわかっています。

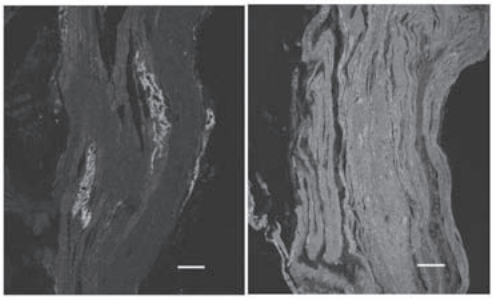
肺の組織も肺胞の組織が残っていて、中の細胞質性の物はありませんけど、細胞外マトリックス的なものは残っていて、ここを電子顕微鏡で見るとコラーゲン特有の、コラーゲンが線維になると一定の間隔が見える縞構造がコラーゲン特有で、コラーゲンが壊れると見えないので、コラーゲンがきちんと残っているということがわかっています。組織学的にもわかりました。

ジーマ 肺 TEM



免疫染色もしていただいて、これⅣ型とⅠ型で染められて、Ⅰ型でも非常によく染まるし、Ⅳ型でも染まることができるということで、コラーゲン的には相当よく残っていて、組織的、形もよく残っているというのがわかってきました。

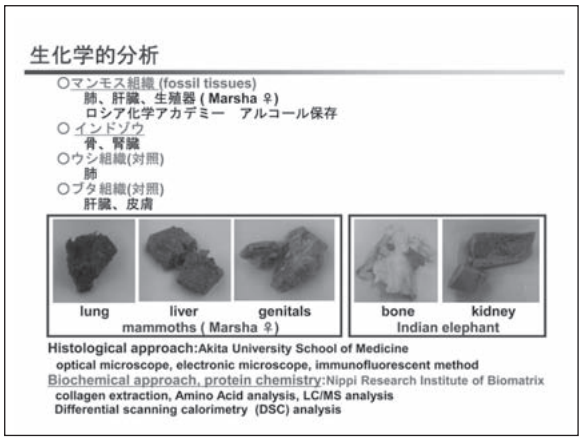
マーシャ 肺 免疫染色



ニッピではそれの生化学的な分析をしました。

このマンモス組織は肺組織、肝臓それから生殖器と書いていましたが、この組織はよくわかりませんでした。これは、アルコールに保存してあったものを一部こちらにもいただきました。

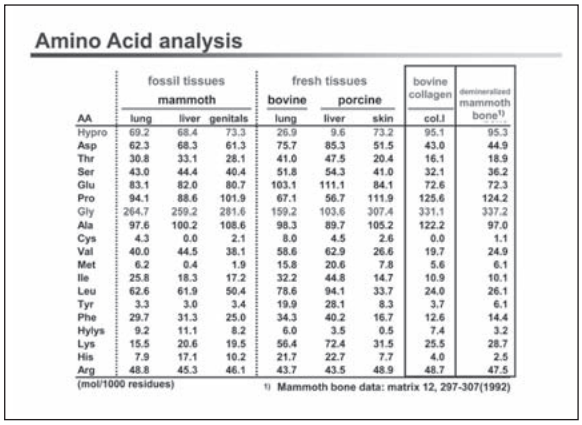
それから象の組織で、これもアルコールに溶かして保存してあった腎臓と骨です。



出典※１

それから古くない組織として、新しい組織で象の物は手に入らないので、これに対応する肺とか、肝臓、それからコラーゲンのある皮膚などは対象品として我々が用意したものを使って、分析をしてみました。

まず先程言ったようにアミノ酸分析というのをしてみました。組織丸ごとアミノ酸分析というのをしております。そうするとマンモス組織では、どの組織でもコラーゲン特有のハイドロキシプロリンというのが非常にたくさんあります。グリシンも300に近い、コラーゲンは精製していませんが、そうとうコラーゲンに近いタンパク質がたくさんあることがわかりました。



Amino Acid analysis

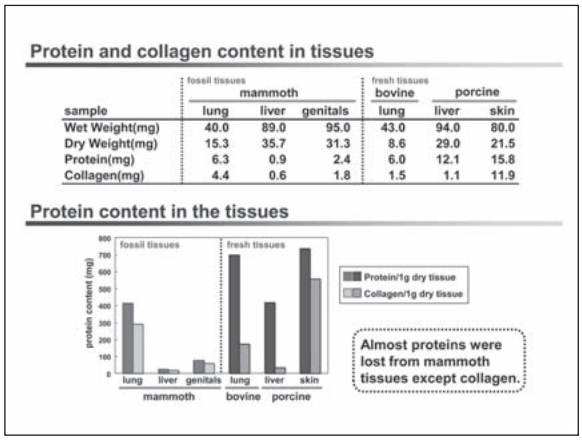
	fossil tissues			fresh tissues			bovine collagen	demineralized mammoth bone[1)]
	mammoth			bovine		porcine		
AA	lung	liver	genitals	lung	liver	skin	col.I	
Hypro	69.2	68.4	73.3	26.9	9.6	73.2	95.1	95.3
Asp	62.3	68.3	61.3	75.7	85.3	51.5	43.0	44.9
Thr	30.8	33.1	28.1	41.0	47.5	20.4	16.1	18.9
Ser	43.0	44.4	40.4	51.8	54.3	41.0	32.1	36.2
Glu	83.1	82.0	80.7	103.1	111.1	84.1	72.6	72.3
Pro	94.1	88.6	101.9	67.1	56.7	111.9	125.6	124.2
Gly	264.7	259.2	281.6	159.2	103.6	307.4	331.1	337.2
Ala	97.6	100.2	108.6	98.3	89.7	105.2	122.2	97.0
Cys	4.3	0.0	2.1	8.0	4.5	2.6	0.0	1.1
Val	40.0	44.5	38.1	58.6	62.9	26.6	19.7	24.9
Met	6.2	0.4	1.9	15.8	20.6	7.8	5.6	6.1
Ile	25.8	18.3	17.2	32.2	44.8	14.7	10.9	10.1
Leu	62.6	61.9	50.4	78.6	94.1	33.7	24.0	26.1
Tyr	3.3	3.0	3.4	19.9	28.1	8.3	3.7	6.1
Phe	29.7	31.3	25.0	34.3	40.2	16.7	12.6	14.4
Hylys	9.2	11.1	8.2	6.0	3.5	0.5	7.4	3.2
Lys	15.5	20.6	19.5	56.4	72.4	31.5	25.5	28.7
His	7.9	17.1	10.2	21.7	22.7	7.7	4.0	2.5
Arg	48.8	45.3	46.1	43.7	43.5	48.9	48.7	47.5

(mol/1000 residues)

1) Mammoth bone data: matrix 12, 297-307(1992)

出典※２

一方、これはマンモスではないから絶対同じではありませんが、一般的な組織で、とくに肝臓とかは、普通にはコラーゲン特有のハイドロキシピロリンが非常に少ないです。コラーゲンは10％以下しか入っていないはずで、長く化石サンプルでは非常にこの率が上がっているということで、これはここのマンモスの肝臓が非常にコラーゲン多かったというよりは、保存中にコラーゲン以外のタンパク質がほとんどなくなってしまって、要するにコラーゲンはすごく安定なので残っていたのではないかと思われます。



Protein and collagen content in tissues

	fossil tissues			fresh tissues		
	mammoth			bovine		porcine
sample	lung	liver	genitals	lung	liver	skin
Wet Weight(mg)	40.0	89.0	95.0	43.0	94.0	80.0
Dry Weight(mg)	15.3	35.7	31.3	8.6	29.0	21.5
Protein(mg)	6.3	0.9	2.4	6.0	12.1	15.8
Collagen(mg)	4.4	0.6	1.8	1.5	1.1	11.9

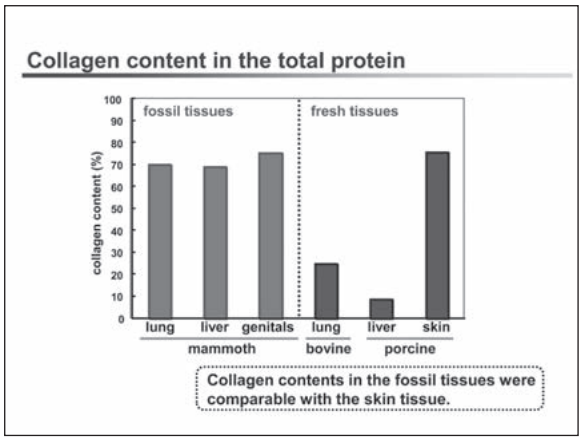
Protein content in the tissues

出典※３

肺についても、肝臓よりは多いのですが、コラーゲンは非常に少ないですが、マンモスでは多いと。

でも皮膚とかは90％ぐらいのタンパク質がコラーゲンなんですけど、皮膚の組織と匹敵するぐらい肝臓やどこだろうが皮膚と匹敵するぐらい、たぶん90％近くはコラーゲンだけになったようなものとして残っている。他のタンパク質はやはり分析するのは非常に難しいのですが、コラーゲンならかなり残っているのではないかと思います。

次に実際にこの割合として、コラーゲンの割合が全体のタンパク質に対するコラーゲンの割合というのを出してみました。新鮮な組織では肝臓で10％以下、肺では20％ぐらい、皮膚だと80％以上。マンモス組織だとどの部分をとっても全体に残ったタンパク質でのコラーゲンの割合が非常に高いことがわかります。



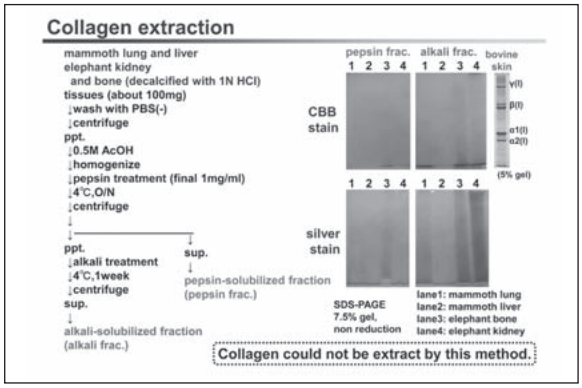
出典※４

これだけコラーゲン残っているんだから、コラーゲンそのものを取り出してコラーゲンの分析ができるのではないかと思い、いろいろなことをやってみました。

一つはそのまま酸に溶かすという方法。それからペプシンというもので溶かして、コラーゲンだけを残すという方法をやっています。

さらにこれはニッピだけしかほとんどやっていない方法ですが､アルカリ（水酸化ナトリウム）で無理矢理溶かすということもやっていまして、これですとだいたい生きているコラーゲンで溶けてこないものはないというぐらい強力な方法です。

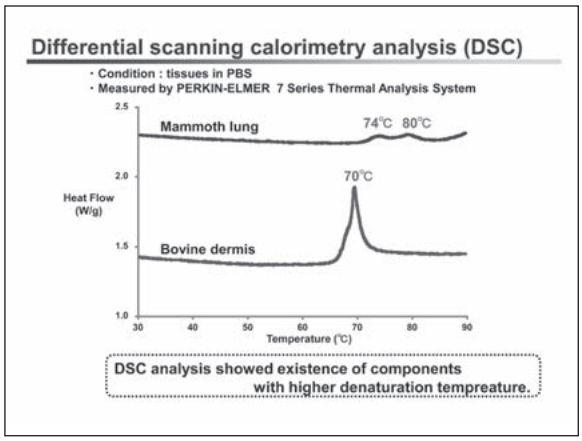
普通の新生児のウシだとか胎児のウシだと、この酸だけでほとんど溶けてきます。若いウシはこのペプシンで、数カ月のウシだとペプシンでほとんど溶けてきます。ですが、２才、３才、８才とかの牛になるとほとんど溶けず、このアルカリという方法を使うとどのウシのサンプルでも全部溶けてきます。



出典※５

ということでこの方法でやって調べました。これがコラーゲンで溶けてきたものを電気泳動したのですが、全然溶けてこない。ということで非常にアルカリの方法でも溶けてこないということで、相当溶かすのは厳しいということがわかってきまして、コラーゲンとしてどの程度完全なものが残っているかどうか、このサンプルではわかりませんでした。

変性温度の調べ方はいくつかありますが、これは熱示唆計というので、温度を上げていくと一定の所でタンパク質の構造変化をする所で熱の吸収が変わる、水が凍る時に潜熱があるとか、蒸発する時に熱を奪うとか、同じような方法で熱の変化があるので、そこのところで、熱の変化するところを見るという方法で調べています。



出典※６

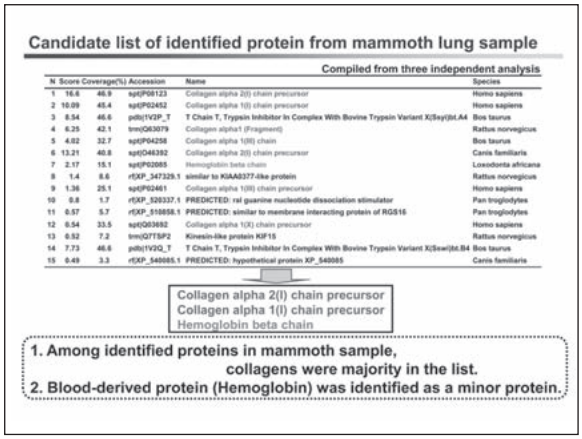
コラーゲン自身の変性温度というのは42.3度ですが、皮そのものを調べると、ヒトでもウシでも70度ぐらいでコラーゲンの線維がキュッと縮む点がありまして、ここがコラーゲン分子というよりもコラーゲンの線維が変化する温度としてわかっています。

この組織でもこの辺で若干の変化が見られたので、なんかやっぱりあるんだろうなと思いますが、とにかく溶かし出してくるということはできないけど、何かあるということはわかりました。

コラーゲンそのものの分析というのはちょっと難しいということになり、断片でもとれればいいやということで、先ほどのコラーゲンの３本鎖構造とかそういうことは一旦忘れて、熱を加えてト

リプシンで消化してしまうという方法で蛋白質の断片を片っ端から拾ってきて、それを質量分析計というので分析するという方法をとってみました。

質量分析計では、タンパク質の断片になったものを片っ端から調べて、信頼度は相当低い所もありますが、その配列を調べてそれをデータベースと照らし合わせて、出してくれるという方法。それで調べてみたらかなりいろんなタンパク質から由来する断片が出てきました。



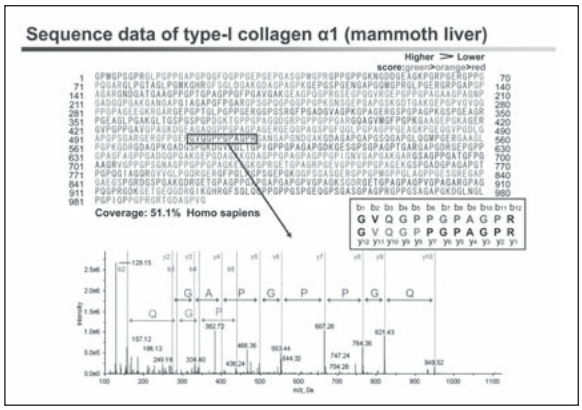
出典※７

この配列サンプルでは、いろんなタンパク質が見えてきたということがわかります。定量性というのは相当低いけれども、上の方に出てくるものがたくさんあるということがわかっています。

これで見てもやはり出てくるのは基本的にコラーゲンで、他の物はほとんどない。１個出てきたのはこれですね。ヘモグロビンのβチェーンというのは出てきましたので、血液成分はやっぱりもともとたくさんあるせいか、若干残っている可能性はあります。

全体の配列の中の何パーセントぐらいこれに一致したものがあるかというと、全体のコラーゲンのうちの半分ぐらいは読めそうな状態。これだと15％。基本的にコラーゲンのⅠ、Ⅲ、Ｘもありますけど、これになると信頼度相当低いんですけども、コラーゲンとしてはやっぱり一般的にあるということがあって、片っ端からまずこれでわかることは何だろうと片っ端から調べてみました。

見つかってきた、表としては、Ⅰ、Ⅲ、Ｘ、ＸⅠ型。

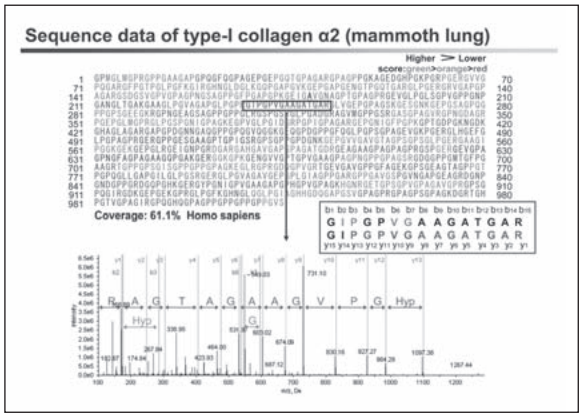


出典※８

実際に調べる方法は、データとしてはこういうピークが出てきて、ピークとピークの間の分子量を、ここが分子量になって、このピークとピークの間が分子量の差で、それぞれの分子量からアミノ酸を調べるという方法で、読めます。Ｃ末から読むのと、Ｎ末から読むのがあり、Ｎから読んでいくとQGQGPPG、こういう形で読んで、わかっているデータベースのうちのどれにどの場所に一致するかというので、どんどん調べていきました。

これはウシ、ヒトのコラーゲンとの比較ですけれども、半分ぐらいの所がヒトのコラーゲンとどこと相同する場所かというのがわかって、読めた場所に色を付けてあります。

信頼度は、これは質量分析の難しい計算をしているので私にはよくわかりませんが、この信頼度として高いものは緑で示し、低い方は赤で示してあります。こういう配列が出てきました。ここの灰色の所は読めなかった所になります。



出典※９

これはα１鎖、α２鎖でも同じように60％ぐ

らいが見えてきまして、読んでみましたというのがあります。

結局、アミノ酸の質量分析、これはうまくできましたが、コラーゲンの分析がうまくいかなかった。

私らの感触では、たぶんコラーゲンの分子は保存中でもすごく安定していても、抽出は自然界での状態ではなくて、発掘後アルコールにずっと保存してあった、こちらの固定方法のせいで抽出できないのではないかと思い、特に固定処理していないもののサンプルをやりたいということがありました。

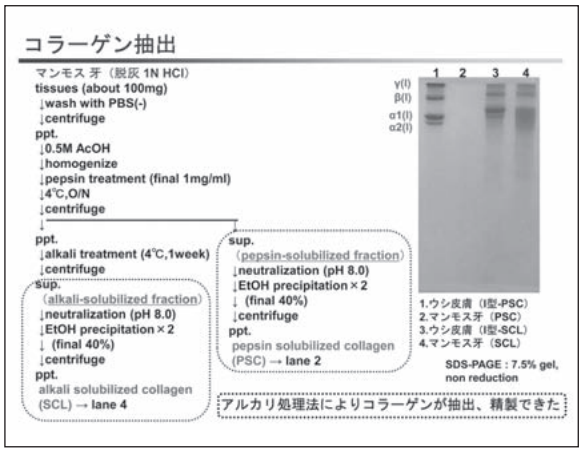
そのマンモスの牙のサンプルというのは別に固定処理していなくても手に入れることができます。この度、妹尾先生よりサンクトペテルブルグのお土産物屋で買ったマンモスの牙で作られた親子のマンモスの彫り物と、県内の中学校に寄贈されたマンモスの牙の一部を切り出していただいたものを提供してもらいました。

（マンモスの牙で作られた彫り物）

この２種類のサンプルを使って、年代測定をやってみました。放射性炭素年代測定に依頼出しました。結果、お土産が１万2770年前のもので、中学校の牙が２万9000年前。±140年、150年。

実験は、マンモスの臓器の形態、コラーゲン、アミノ酸、質量分析を行って、アミノ酸の比較をし、報告したけれども、エタノールで保存されたためだと思いますが、コラーゲン分子としては抽出はうまくいかなかったので、マンモスの牙を使ってみたということをやってみました。

ここにはお土産の牙の結果を書いてありますけれども、同じ事を中学校の牙でもやりました。



出典※10

方法としては一番確実に取れてくると思われる、アルカリ抽出法を使って、100mgのサンプル使って、100％残っていれば半分近くコラーゲンだと思いますが、1/100ぐらいですが、この0.7mgのコラーゲンがとれました。

マンモスの牙を１回、脱灰して、ペプシンもやってみた。ペプシン処理とアルカリ処理をやって、それぞれ抽出したものを電気泳動でとってみました。

ペプシン処理という方法では何も取れてこなかったけれども、アルカリ処理では、コラーゲンらしい、ちょっとバンドがこれほどくっきり、ウシの皮膚ほどはくっきり見えないんですけども、バンドが見えてきて、これがα鎖、β鎖、γ鎖というのが見えてきて、コラーゲンがとれたということになりました。

中学校の牙も始めはもったいないので、のこぎりで切り取った際の屑の粉と、それから中心のところがあって。はじめ粉でやって、その方が抽出の効率がいいだろうと思って、この粉でやりましたがこれは全然うまくいかなくてダメかと思いました。なるべく芯の方、中の方を割り出して、そこを100mgとってやったら同じものがとれたので、１万年前だろうが３万年前だろうがとれるということがわかりました。

アミノ酸分析

コラーゲン（SCL）

AA	マンモス牙	ウシ(I型)
Hypro	87.5	88.9
Asp	49.3	45.7
Thr	21.0	17.5
Ser	37.9	31.9
Glu	79.8	74.0
Pro	115.1	116.0
Gly	322.4	336.5
Ala	120.6	120.6
Cys	0.5	0.7
Val	24.9	21.6
Met	0.0	0.0
Ile	10.7	12.7
Leu	26.9	25.3
Tyr	3.8	0.9
Phe	15.2	13.1
Hylys	3.2	9.7
Orn	6.3	8.6
Lys	32.4	27.9
His	-	5.2
Arg	42.2	43.1

(mol/1000 residues)

マンモス組織

AA	肺	肝臓	骨
Hypro	69.2	68.4	95.3
Asp	62.3	68.3	44.9
Thr	30.8	33.1	18.9
Ser	43.0	44.4	36.2
Glu	83.1	82.0	72.3
Pro	94.1	88.6	124.2
Gly	264.7	259.2	337.2
Ala	97.6	100.2	97.0
Cys	4.3	0.0	1.1
Val	40.0	44.5	24.9
Met	6.2	0.4	6.1
Ile	25.8	18.3	10.1
Leu	62.6	61.9	26.1
Tyr	3.3	3.0	6.1
Phe	29.7	31.3	14.4
Hylys	9.2	11.1	3.2
Lys	15.5	20.6	28.7
His	7.9	17.1	2.5
Arg	48.8	45.3	47.5

(mol/1000 residues)

マンモス骨データ: matrix 12, 297-307(1992)

出典※11

アミノ酸分析をしてみました。マンモスの牙、だいたいウシと同じくらいのハイドロキシプロリンの量があって、グリシンの量もほぼ1/3なので、組織に比べてもきれいにコラーゲンがとれたということがわかりました。

次に、変性温度を調べてみました。アルカリ処理すると全体に変性温度が下がるので、さっきのウシは42度でしたが、ウシで同じ方法でとると35度であります。

マンモスの方でも、まず３本鎖構造がきちんと保たれているかどうか、CDという値で見て、ここが227m、波長が円偏光二色性でプラスに出ると、これは三重螺旋ということで、ほぼきれいな３本螺旋をまいていることがわかりました。

３本螺旋が何度で崩れるかというのをここで見ますと、ウシよりも少し低いことがわかりました。

要するにハイドロキシプロリンというのは遺伝子からではわからないから、タンパク質でしかわからない情報で、しかもこういう変性温度を測れるようなものがとれたというのがまず一つ大きい。

さらに変性温度とさっき話しましたように、体温とか、環境の温度というのは非常に密接な関係があるので、うまくすればマンモスの体温の推定か、環境の推定というのが可能ではないかということで、遺伝子の方をいくらやってもわからないことがコラーゲンを見ることでわかるんじゃないかというのが、大きい知見だと思っています。

この少し低い変性温度というのはいろいろ可能性が考えられて、面白いです。ここの電気泳動のものを質量分析、MALDI-TOFというので分子量を測るものでとってみました。

一般的にウシでとったものは非常にきれいに分子量、91000というバンドが出てきました。

マンモスのものは、ちょっとブロードになっています。これは全体にブロードになるかと思ったら、きちっとこういうのが一つ出て、もう１個、10000くらいバンドが出ていることがわかりまして、一部切れた分子もあるのかもしれないと思います。

なので少し低い解釈というのがちょっと難しいけれども、一つの可能性としてはマンモスの体温が低かったせいか、ちょっと経年変化で一部切れたことが影響しているのではないかという二つが考えられます。

それからコラーゲンというのは細胞をくっつける能力がありますので、この１～３万年たったコラーゲンにも残っているかどうかということについても調べました。要するに生きたコラーゲンかどうか、いわゆる生の状態かどうかということを、細胞の接着実験というのをしています。これはヒトの線維芽細胞にコラーゲンをガラスの上に塗って、くっつけるという方法です。コラーゲンがあればコラーゲンにくっつく接着装置のインテグリンとか、パキシリンというのもある。こういうものが出てくるはずです。

ウシのコラーゲン、マンモスのコラーゲン、これは対象として血清蛋白質ですけれども、細胞がまずマンモスのコラーゲンにもよくくっつくということで、ちゃんと生きています。

しかも接着装置に特有のパキシリンが、細胞のふちに点状に見えるのがパキシリンなんですけども、マンモスの場合もちゃんときっちり見えています。

細胞がマンモスのコラーゲンだろうが、コラーゲンだよと認めてくっついたということになります。BSAだとくっつかない。

さらに細胞の中の細胞内の骨格というのが発達しているかどうかのアクチンというのはちゃ

んとコラーゲンの上では伸びていますし、マンモスでもきれいに細胞内骨格においてはっている状態があります。要するにコラーゲン、機能的にも生きているコラーゲンがこのサンプルからとれたということがわかりました。

マンモスより、たぶん初めてだと思いますが、未変性のコラーゲンの抽出に成功して、変性温度も測れました。さらに、生理的にも生きているコラーゲンをとれました。今、お土産品を使ってここまでわかりました。

中学校でいただいた牙でも同じことを試みています。うまくいけば世界中のサンプルを色々使うことでもっといろんなことができる可能性があって、それは我々がやらなくてもみんながやってくれればいいのですが、こういうサンプルを使って、当時の生きている状態を少しでも想像か、再現できるような情報がここから得られてくることを期待して、今日の話を終わりにします。

以上です。

出典※１～９：Yokosuka science festa 2009 桐山ら
出典※10・11：第51回結合組織学会2010 桐山ら

資料 ～第一部～

秋田大学にて　2010. 12. 24

ニッピバイオマトリックス研究所
Research Institute of BIOMATRIX
服部俊治

コラーゲンって何

コラーゲンの歴史？

構造蛋白質としてのコラーゲン（体を支える）

コラーゲンとゼラチン

コラーゲンの様々な形態

細胞外マトリックスと細胞接着

広辞苑（ 1998）
コラーゲン (英 collagen かぁりぃじぇん、独 Kollagen こらーげん)
動物の皮革、腱、軟骨などを構成する硬蛋白質の一種。温水で処理すると溶けて、ゼラチンとなる。　膠原質。
ゼラチン (英じぇらてぃん)
誘導蛋白質の一種。こらーげんを含む物質（動物の皮、骨、結合組織など）を長時間石灰液中に浸すか、酸で処理したものを温水で抽出して製する。その粗製品を膠という。熱湯には速やかに溶解し、冷却すれば凝固する。食用のほか、接着剤、培養基、写真感光材料などに用いる。ゲラチン

細胞生物学辞典 (共立出版、 1998)
コラーゲン
細胞外マトリックスの主要構造タンパク質。 285kD。アミノ酸組成は、グリシン、ヒドロキシプロリン、リシン、ヒドロキシリシン、も多いが、チロシン、トリプトファンは含まれていない。構造 は 95kD のトロポコラーゲン分子が 3 本鎖ら旋構造をとり、 300nmx0.5nm の大きさになる。またプロテアーゼに耐性を 示すなど特異的なタンパク質である。殆どの型が分子間で特異的 な 1/4 ずつずれた重なりをつくって繊維を形成し、張力に耐性のある優れた構造になっている。IV 型は基底層に特徴的で、繊維を形成しない。現在ではいくつもの違った型が見つかっている。ヒドロキシリシンにグルコース -ガラクトース二量体のついたものもあり 、ほぼすべての型にコラーゲンは、リシン側鎖が架橋されている。
ゼラチン
熱変性コラーゲン

コラーゲン関連研究の歴史（1）

コラーゲン以前（ゼラチン、皮革）
　皮革として（タンニン、クロムで鞣す）
　膠　にかわ、こう（漢音）、きょう（呉音）、にべ
　日本書紀（618）　高句麗王より紙、墨の製法が伝わる。
　にかわ（煮皮）という和語はそれ以前からの利用を示す？
　用途　接着剤　墨　絵の具の展色　漢方薬（阿膠）弓の竹の接合
（にべ、ウラル系の語源）マッチ（明治以降）

ゼラチン（コラーゲン熱変性物）
　食用
　減圧脱水、人工乾燥による衛生的な製法　（1800年代ヨーロッパ）
　1845年食用ゼラチン特許Cooper　イギリス
　1846年パパロア
　写真用等
　18 71年写真用感光乳剤発明　Madox
　1876年ゼラチン乾板発売　イギリス
　1850年ゼラチン用カプセルMothesフランス　1932年 Scherer イギリス
　1955年感圧複写機
　医療用等
　1965年低分子ゼラチンの開発　注射薬安定剤（ウロキナーゼ）日本
　　化粧品等への添加　健康飲料など

コラーゲン関連研究の歴史（2）：コラーゲン分子の概念の確立

1948年　コラーゲン線維の規則的な縞模様の観察（電子顕微鏡観察）
　　Gross and Schmitt J.Exp. Med . 88,555-）その他多数
　　コラーゲン構造のX線散乱による研究
1954年　コラーゲン３本螺旋構造の提出　Ramachandran and Kartha
　　Nature 174,269-
1955年　コラーゲン螺旋構造の研究　Crick and Rich　Natue 176,780-
1955年　コラーゲン線維が一定のユニット分子からなるという概念の提出
　　この概念上のユニットをTropocollagenと命名（GrossらPNAS,41,1-）
1960年　コラーゲ分子のペプシン等酵素による可溶化成功　西原他（ニッピ）
　　International Collagen symposium
1964年　動物由来コラーゲン分解酵素をオタマジャクシより発見　Gross & Nagai
　　PNAS 54,1197
1965年　プロコラーゲンの単離　Kivirikko and Prockop　Biochem J 102,432-
1985年　コラーゲン遺伝子配列（α２　type I）の決定
　　Boedtker, Finer and Aho, NY Acad Sci. 460,85

コラーゲン

・ゼラチンのもとになるもの

・体の中で接着剤のような働き

・動物の体の中にたくさんある。

体は色々な器官からできている

頭
髪の毛
歯
目
鼻
足
手
胴体
おしり

骨
筋肉
皮膚
血管
アキレス腱
内臓
（肺、胃、腸、
肝臓、腎臓）
精巣、卵巣

骨、皮膚、腱には、コラーゲンがたくさんあります。

骨、皮膚、腱には、コラーゲンがたくさんあります。

骨のコラーゲンを見てみよう！

骨は何からできている？

コラーゲン　カルシウム

その他　からできています

観察

・動物の骨と皮を見てみよう

・コラーゲンだけの骨

・カルシウムだけの骨

骨は、

カルシウムだけ（かたい）でも
コラーゲンだけ（しなやか）でも
折れやすい

↓

両方とても大切な
わたしたちの体を作る材料

コラーゲンと疾患

Genetic Disorders of ECM protein

1. Ehlers-Danlos Syndrome

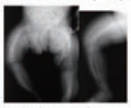
Joint hypermobility, skin hyperextensibility, skin splitting, easy bruising

possible genetic deficiencies

reduced hydroxylase activity, reduced lysine hydroxylation, lack of alpha 2 chain of type I collagen

2. Osteogenesis Imperfecta

Bone to fracture (lethal), Progressively deforming bone



Mutation of type I or III collagen

3. Marfan syndrome

Abnormalities of eye and blood vessels and skeleton (long limbs)

疾患との関わり

I 型コラーゲン関連

genetic

Ehlers-Danlos Syndrome 関節の過可動、皮膚の脆弱

その他 III 型コラーゲンの異常、架橋酵素異常

Osteogenesis Inperfecta 骨異常 生後直後の死亡が多い

コラーゲン本体の突然変異、プロコラーゲン異常など

Marfan Syndrome 手足が長く体躯が比較的短い

acquired

Scleroderma 強皮症 I 型コラーゲン合成過多

その他の繊維症もこれに入る（結果としてコラーゲンの過多）

その他コラーゲンの関わる疾患

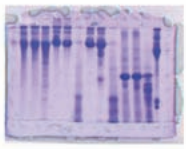
リウマチ（RI）関節 II 型コラーゲンの分解（免疫異常）

癌転移（IV 型コラーゲン分解、MMP の働き）

腎疾患（IV 型コラーゲンの遺伝疾患、および異常分解）

表皮水疱症 17 型コラーゲン遺伝疾患 ラミニン欠損など

コラーゲン単分子



コラーゲン電気泳動

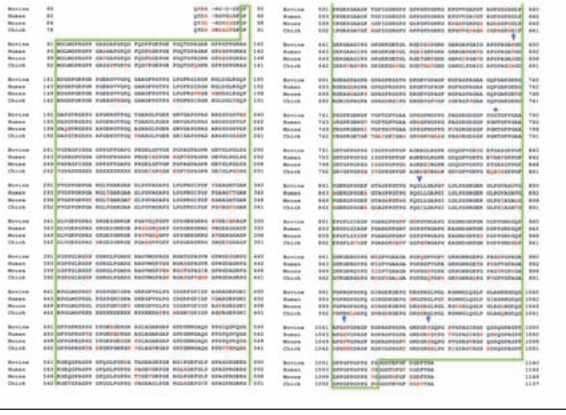
コラーゲンアミノ酸配列

ウシコラーゲンα２鎖全配列

```
Bovine Type I alpah2
                 10        20        30        40        50        60
1    GPMGLMGPRGPPGASGAPGPQGFQGPPGEPGEPGQTGPAGARGPPGPPGKAGEDGHPGKI
61   GRPGERGVVGPQGARGFPGTPGLPGFKGIRGHNGLDGLKGQPGAPGVKGEPGAPGENGTI
121  GQTGARGLPGERGRVGAPGPAGARGSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFPGAPGPKGELGPV
181  GNPGPAGPAGPRGEVGLPGLSGPVGPPGNPGANGLPGAKGAAGLPGVAGAPGLPGPRGII
241  GPVGAAGATGARGLVGEPGPAGSKGESGNKGEPGAVGQPGPPGPSGEEGKRGSTGEIGPA
301  GPPGPPGLRGNPGSRGLPGADGRAGVMGFPAGSRGATGPAGVRGPNGDSGRPGEPGLMGPF
361  GFPGSPGNIGPAGKEGPVGLPGIDGRPGPIGPAGARGEPGNIGFPGPKGPSGDPGKAGEK
421  GHAGLAGARGAPGPDGNNGAQGPPGLQGVQGGKGEQGPAGPPGFQGLQGMPAGTAGEAGKP
481  GERGIPGEPGLPGPAGARGERGPPGESGAAGPTGPIGSRGPSGPPGPDGNKGEPGVVGAI
541  GTAGPSGPSGLPGERGAAGIPGGKGEKGETGLRGDIGSPGRDGARGAPGAIGAPGPAGAA
601  GDRGEAGPAGPAGPRGSPGERGEVGPAGPNGFAGPAGAAGQPGAKGERGTKGPKGEP
661  GPVGPTGPVGAAGPSGPNGPPGPAGSRGDGGPPGATGFPGAAGRTGPPGPSGISGPPGPI
721  GPAGKEGLRGPRGDQGPVGRSGETGASGPPGFVGEKGPSGEPGTAGPPGTPGPQGLLGAI
781  GFLGLPGSRGERGLPGVAGSVGEPGPLGIAGPPGARGPPGNVGNPGVNGAPGEAGRDGNI
841  GNDGPPGRDGQPGHKGERGYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVGKHGNRGEPGPAGAVGPA
901  GAVGPRGPSGPQGIRGDKGEPGDKGPRGLPGLKGHNGLQGLPGLAGHHGDQGAPGAVGPA
961  GPRGPAGPSGPAGKDGRIGQPGAVGPAGIRGSQGSGQPAGPPGPPGPGPPGPS
```

コラーゲン特有のアミノ酸としてハイドロキシプロリンとハイドロキシリジンが存在。それぞれコラーゲンの熱安定性および線維の安定性に関与。（栄養学的には？）グリシンが１/３を占める。

生物種間において配列が非常によく保存されているコラーゲン



様々な動物のＩ型コラーゲンの比較

Fig.1 SDS-PAGE of Collagens from Various Sort of Animals.

コラーゲン分子の様々な形態

ゼラチンペプチド

ゼラチン 低温でゲル化
様々な酵素で分解

コラーゲン分子 酵素抵抗性
中性、体温でゲル化（線維化）
コラゲナーゼ以外の酵素に耐性

コラーゲン会合体（線維）

Table. 1 Amino acid Compositions of Collagen from Various Sort of Animal S.kins

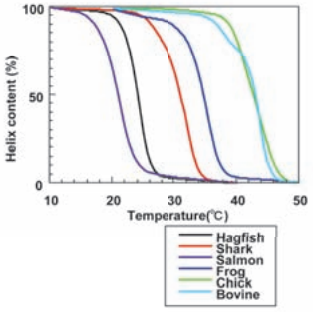
Amino Acid	hagfish	shark	salmon	frog	chick	bovine
Hypro	62.6	66.6	54.3	74.5	104.9	82.7
Asp	46.5	43.2	53.5	48.8	48.1	46.3
Thr	31.3	25.4	23.3	20.7	19.1	17.1
Ser	59.3	42.4	49.2	51.8	28.6	32.2
Glu	59.1	73.4	75.3	75.4	74.1	73.8
Pro	100.7	107.9	103.8	124.5	123.1	122.6
Gly	357.1	337.4	361.2	343.3	331.0	339.8
Ala	115.7	114.5	108.4	110.0	114.6	115.2
Cys	trace	trace	2.3	0.4	trace	1.5
Val	28.0	23.7	15.6	13.4	19.8	20.9
Met	14.9	12.4	18.3	5.8	6.2	7.9
Ile	13.6	19.9	10.6	8.5	10.9	12.0
Leu	16.6	25.2	20.3	19.7	23.8	25.5
Tyr	3.7	2.3	0.0	1.3	3.4	2.6
Phe	9.4	12.3	12.7	11.6	14.3	12.4
Hylys	4.0	5.2	4.3	5.5	9.6	5.7
Lys	18.6	26.6	26.1	27.6	19.0	26.6
His	6.9	8.1	9.1	5.9	4.5	4.2
Arg	52.2	53.5	51.7	51.3	44.8	51.0
						(mol/1000 residues)
Hypro+Pro	163.3	174.5	158.1	199.0	228.0	205.3
Hypro%	38.3	38.2	34.3	37.4	46.0	40.3
Hylys+Lys	22.6	31.8	30.4	33.1	28.6	32.3
Hylys%	17.7	16.4	14.1	16.6	33.6	17.6
Hydrophobic*	302.6	318.2	289.7	294.8	316.1	319.1
Hydrophilic**	340.5	344.4	349.1	361.9	352.7	339.6

*Hydrophobic; Pro+Ala+Val+Met+Ile+Leu+Tyr+Phe
**Hydrophilic; Hypro+Asp+Thr+Ser+Glu+Cys+Lys+Hylys+Arg

ヒドロキシプロリン含量に注目

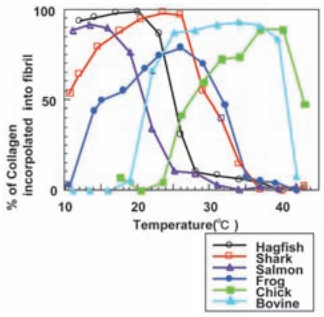
様々な動物のコラーゲンの変性温度

Fig.2 Thermal Denaturation Curve of Collagens from Various Sort of Animals.



様々な動物種のコラーゲンの線維形成能温度

Fig.3 *in Vitro* Collagen Fibril Formation at Different Temperature. Collagens from Various Sort of Animals.



温度順化した
コイコラーゲン

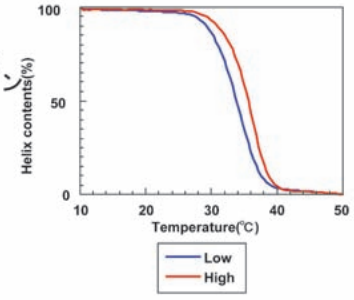
Table. 2 Amino Acid Compositions of Collagen from Carp Skin Acclimated to Different Temperature.

Amino Acid	Low	High
Hypro	69.4	81.0
Asp	48.5	47.5
Thr	29.6	30.1
Ser	47.8	47.9
Glu	75.8	75.6
Pro	107.6	96.4
Gly	339.4	335.6
Ala	124.7	126.3
Val	17.0	17.4
Cys	n.d.	n.d.
Met	3.7	2.5
Ile	11.4	12.2
Leu	21.3	21.8
Tyr	3.1	3.4
Phe	13.1	13.8
Hylys	3.3	3.5
Lys	29.0	29.2
His	4.8	5.1
Arg	50.5	50.7
	(mol/1000 residues)	
Pro+Hypro	177.0	177.4
Hypro %	39.2	45.7
Lys+Hylys	32.3	32.7
Hylys %	10.2	10.7
Hydrophobic*	284.9	276.4
Hydrophilic**	358.7	370.6

**Hydrophilic; Hypro+Asp+Thr+Ser+Glu+Cys+Lys+Hylys+Arg
*Hydrophobic; Pro+Ala+Val+Met+Ile+Leu+Tyr+Phe

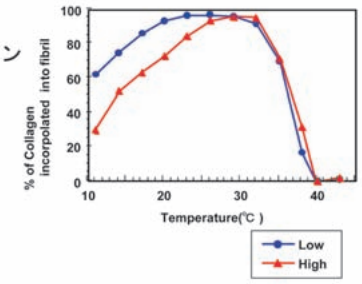
温度順化した
コイコラーゲン
変性温度

Fig.5 Thermal Denaturation Curve of Collagens from Carp Skin Acclimated to Defferent Temperature.



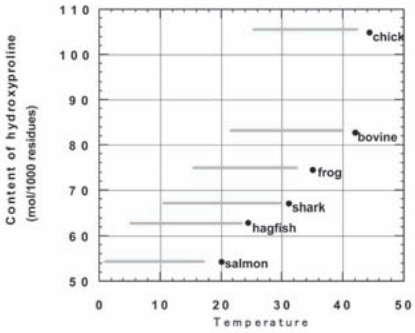
コイコラーゲン
線維形成
温度

Fig.6 *in Vitro* Collagen Fibril Formation at Different Temperature.
Collagens from Carp Skin Acclimated to Different Temperature.



Summary

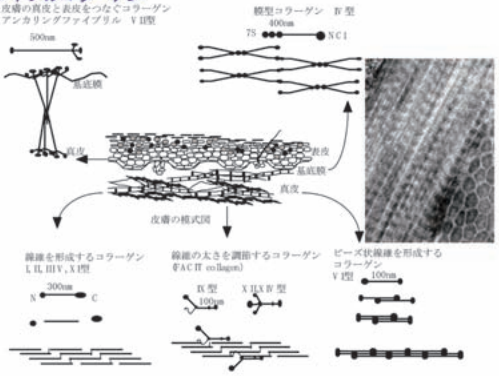
Component of α chain		Tm (℃)	Hypro content (mol/1000 residues)	Temperature range of fibril formation (℃)	Fibril formed collagen at 10 ℃ (%)
Bovine	$(\alpha_1)_2\alpha_2$	37.0 & 42.0	82.7	20 - 40	-
Chick	$(\alpha_1)_2\alpha_2$	42.0 & 44.0	104.9	20 - 42	-
Frog	$(\alpha_1)_2\alpha_2$	33.0	74.5	12 - 32	-
Salmon	$(\alpha_1)_2\alpha_2$	21.0	54.3	< 21	87.8
Shark	$(\alpha_1)_2\alpha_2$	30.5	66.6	< 30	58.5
Hagfish	$(\alpha_1)_2\alpha_2$	23.5	62.6	< 26	90.0
Carp(Low)	$(\alpha_1)_2\alpha_2$	33.0	69.4	< 35	58.2
Carp(High)	$(\alpha_1)_2\alpha_2$	36.0	81.0	< 35	25.0



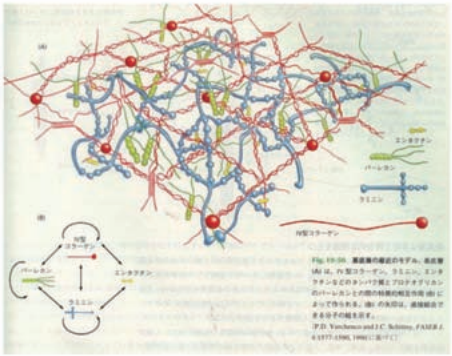
Temperature range when more than 50% of collagen was incorporated into fibril

● Denaturation tempretue and hydroxyproline content of collagen

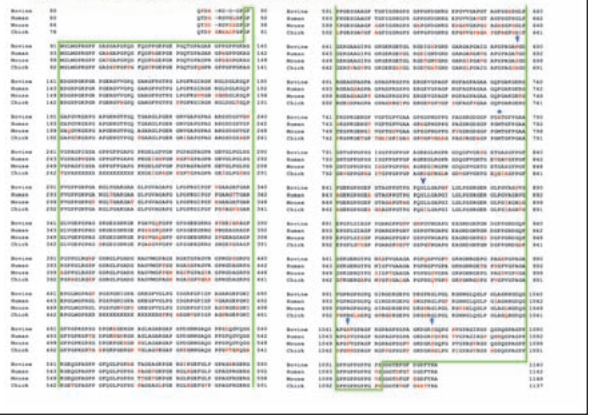
様々なタイプのコラーゲン



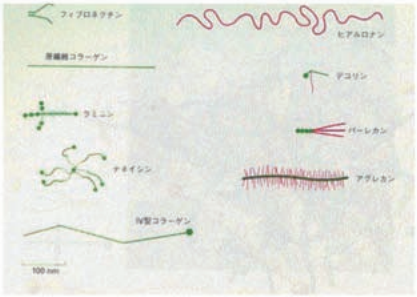
結合組織は様々な細胞外マトリックスが複雑に入り組んで形成されている　（ここでは基底膜を示す）



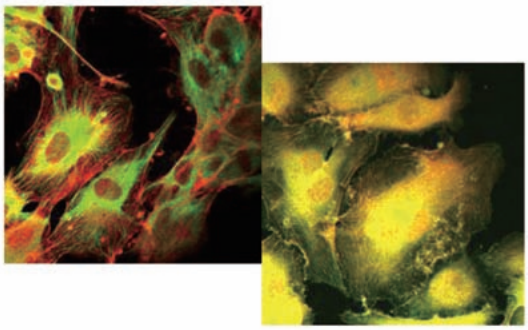
生物種間において配列が非常によく保存されているコラーゲン



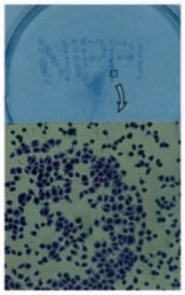
マトリックスの形状と大きさ



細胞接着基質としてのコラーゲン

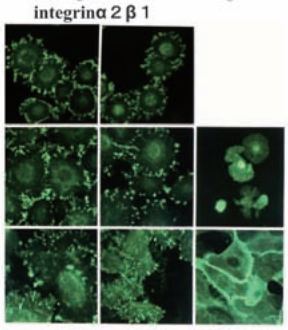


細胞のコラーゲン認識

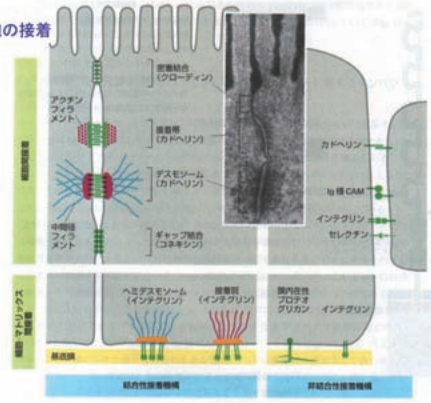


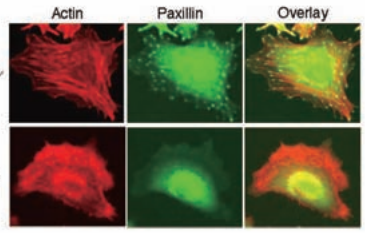
Collagen　　gelatin

integrinα２β１



細胞の接着

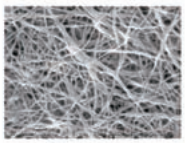




蛍光顕微鏡、　共焦点レーザー顕微鏡

integrinα2β1の反応は未変性コラーゲンに限る

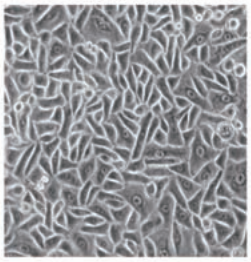
再構成コラーゲンゲルとコラーゲン分子



コラーゲン分子の3本鎖らせん構造のモデル図　　再形成させたⅠ型コラーゲン線維

☼On coated collagen I

I型コラーゲンコート上での皮膚上皮細胞の挙動

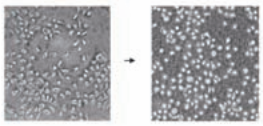


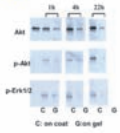
integrinα2β1

On coated collagen I :
1.HFKs can adhere and spread via integrin
2. Keratinocytes proliferate well
3. Activation of Akt and Erk

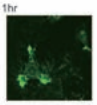
☼On 3-D collagen I

I型コラーゲンゲル上での皮膚上皮細胞の挙動





1hr

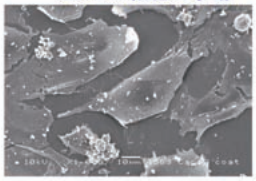


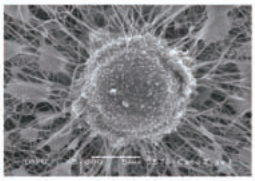
1day

integrinα2β1

On collagen I gel :
1. HFKs can not spread
2. Apoptosis of keratinocyte was induced within 1day
3. No activation of Akt and Erk
4. Differentiation is not observed

コラーゲンコート上及び線維上における Caco-2 細胞の挙動

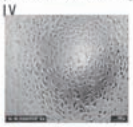




コラーゲンコート　5 μm　　コラーゲン線維　5 μm

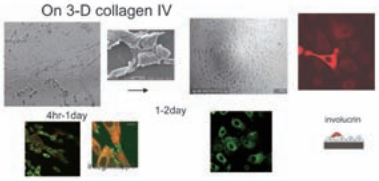
IV型コラーゲンゲル上での皮膚上皮細胞の挙動

☼On coated collagen IV



integrinα2β1

On 3-D collagen IV



4hr-1day

1-2day

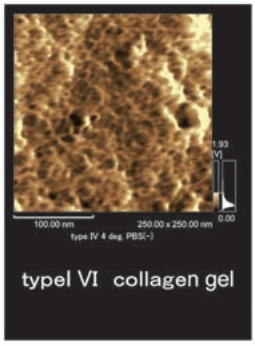
involucrin

On coated collagen IV :
Behavior of HFK is indistinguishable from HFKs on collagen I.

On collagen IV gel :
1. Keratinocyte adhere with tube like form (4hr).
2. Apoptosis of keratinocyte was induced but very slowly
3. No activation of Akt but Erk is activated.
4. Differentiation of HFKs is observed

I型コラーゲンとIV型コラーゲンの違い

typel I　collagen gel



typel VI　collagen gel

コラーゲンの応用　革として

コラーゲンの応用（ゼラチンまたは低分子ペプチドとして）

コラーゲンの応用（溶液コラーゲンを再整形する）

コラーゲン紡糸

コラーゲン糸をもちいた人工毛髪

ブラシ

コラーゲンシート（フェイスパック用）

コラーゲンの応用（医用）

透析膜

透析チューブ

被覆剤

人工血管

手術用止血剤

sausage casing

Collagen gel as cosmetic use

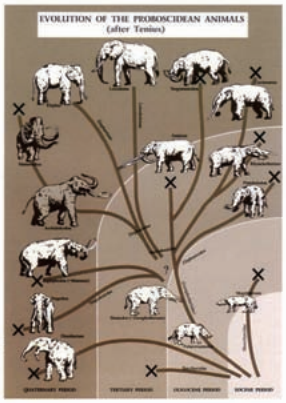
資料 ～第二部～

マンモスのコラーゲンが教えてくれること

秋田大学妹尾先生より 2006 年の生化学会で共同研究のお誘いをいただきました。
かねてから化石サンプルには興味を持っていました。
これまで恐竜をはじめとした様々な化石からDNAが抽出され分析されています。ネアンデルタール人からの DNAから現世ホモサピエンスとの関係が推察されたり、マンモスDNAからマンモス再現計画が取りざたされたり。これはPCR等の増幅技術の発達や、DNAの安定性のおかげで研究が進んできました
　一方蛋白質は生物機能を実際執り行っている物質であるにもかかわらず、その増幅方法がないことや、その不安定性によって化石サンプルからの情報は非常に限られています。しかし冷凍マンモスは古代サンプルに関わらず新鮮な組織が入手可能であることから蛋白質の研究が行えるのではないかという期待から研究を始めた。

組織学的分析を秋田大学、
生化学的分析をニッピで分担して行いました

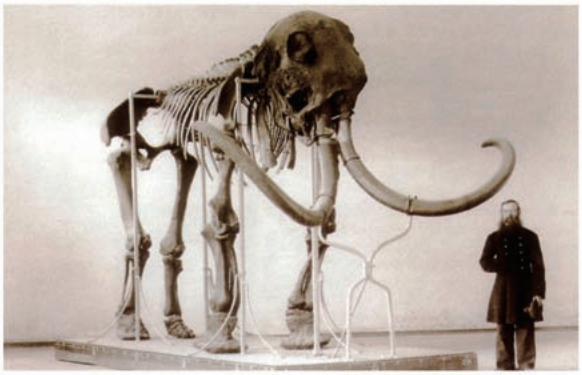
マンモスの系統
700万年前に分岐？
その後１万年前ほどに
絶滅。
同系統ではインド象、
アフリカ象が生き残る。



The Tenius' scheme of the proboscideans' evolution

シベリアでのマンモスの分布

Yakutian mammoth fauna site map



Adams Mammoth skeleton found in 1799 in the Lena River delta - on the Tumus Peninsula (Bykovskiy).
Taken to Saint Petersburg in 1806

永久凍土地帯から溶け出した層でマンモスが希に見つかる

マンモス発掘

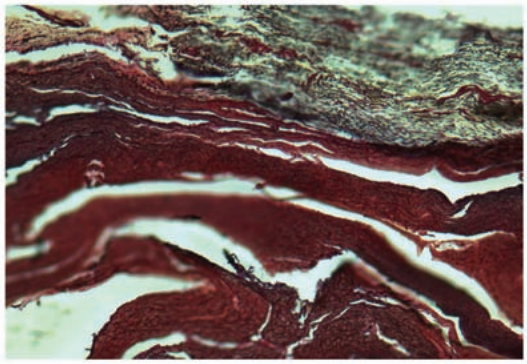
Excavation of the Yukagir Mammoth in process. The upper layers of the ground are washed away with a water pump

ジーマ　（♂）　8ヶ月

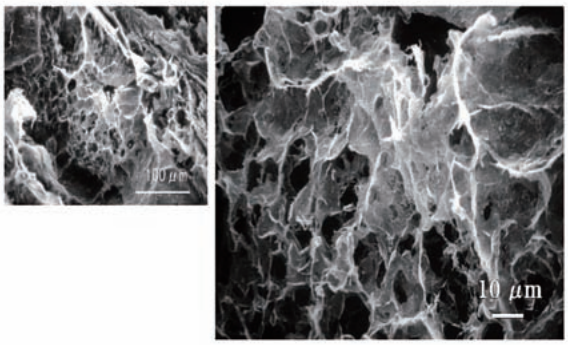
マーシャ（♀）3〜4ヶ月

マンモス肝臓

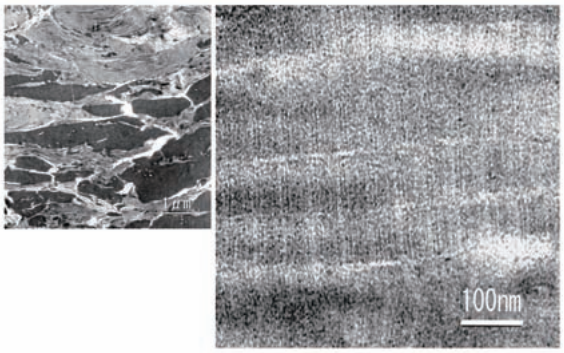
ジーマ　肝臓（石井式鍍銀法）



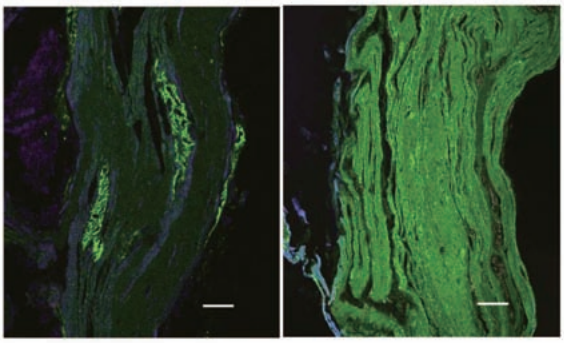
マーシャ 肺 SEM



ジーマ 肺 TEM



マーシャ 肺 免疫染色



生化学的分析

○マンモス組織 (fossil tissues)
肺、肝臓、生殖器 (Marsha ♀)
ロシア化学アカデミー　アルコール保存
○ インドゾウ
骨、腎臓
○ウシ組織(対照)
肺
○ブタ組織(対照)
肝臓、皮膚

Histological approach: Akita University School of Medicine
optical microscope, electronic microscope, immunofluorescent method
Biochemical approach, protein chemistry: Nippi Research Institute of Biomatrix
collagen extraction, Amino Acid analysis, LC/MS analysis
Differential scanning calorimetry (DSC) analysis

Amino acid analysis method

tissues 40-100mg wet weight
fossil tissues: mammoth lung, liver, genitals
fresh tissues: bovine lung, porcine liver, skin
↓6N HCl
↓110℃, 24h
Amino acid analysis
(Hitachi L-8800 Amino Acid Analyzer)

★amino acid composition
★estimation of protein content
★calculation of collagen content from hydroxyproline concentration
★estimation of water content of tissue by lyophilization

Amino Acid analysis

	fossil tissues			fresh tissues			bovine collagen	demineralized mammoth bone[1)]
	mammoth			bovine	porcine			
AA	lung	liver	genitals	lung	liver	skin	col.I	
Hypro	69.2	68.4	73.3	26.9	9.6	73.2	95.1	95.3
Asp	62.3	68.3	61.3	75.7	85.3	51.5	43.0	44.9
Thr	30.8	33.1	28.1	41.0	47.5	20.4	16.1	18.9
Ser	43.0	44.4	40.4	51.8	54.3	41.0	32.1	36.2
Glu	83.1	82.0	80.7	103.1	111.1	84.1	72.6	72.3
Pro	94.1	88.6	101.9	67.1	56.7	111.9	125.6	124.2
Gly	264.7	259.2	281.6	159.2	103.6	307.4	331.1	337.2
Ala	97.6	100.2	108.6	98.3	89.7	105.2	122.2	97.0
Cys	4.3	0.0	2.1	8.0	4.5	2.6	0.0	1.1
Val	40.0	44.5	38.1	58.6	62.9	26.6	19.7	24.9
Met	6.2	0.4	1.9	15.8	20.6	7.8	5.6	6.1
Ile	25.8	18.3	17.2	32.2	44.8	14.7	10.9	10.1
Leu	62.6	61.9	50.4	78.6	94.1	33.7	24.0	26.1
Tyr	3.3	3.0	3.4	19.9	28.1	8.3	3.7	6.1
Phe	29.7	31.3	25.0	34.3	40.2	16.7	12.6	14.4
Hylys	9.2	11.1	8.2	6.0	3.5	0.5	7.4	3.2
Lys	15.5	20.6	19.5	56.4	72.4	31.5	25.5	28.7
His	7.9	17.1	10.2	21.7	22.7	7.7	4.0	2.5
Arg	48.8	45.3	46.1	43.7	43.5	48.9	48.7	47.5

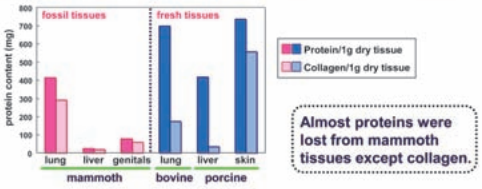
(mol/1000 residues)

1) Mammoth bone data: matrix 12, 297-307(1992)

Protein and collagen content in tissues

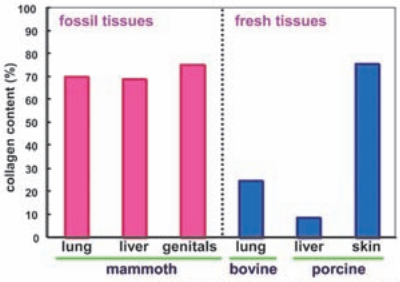
sample	fossil tissues: mammoth lung	mammoth liver	mammoth genitals	fresh tissues: bovine lung	porcine liver	porcine skin
Wet Weight(mg)	40.0	89.0	95.0	43.0	94.0	80.0
Dry Weight(mg)	15.3	35.7	31.3	8.6	29.0	21.5
Protein(mg)	6.3	0.9	2.4	6.0	12.1	15.8
Collagen(mg)	4.4	0.6	1.8	1.5	1.1	11.9

Protein content in the tissues



Almost proteins were lost from mammoth tissues except collagen.

Collagen content in the total protein

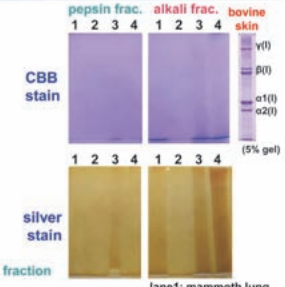


Collagen contents in the fossil tissues were comparable with the skin tissue.

Collagen extraction

mammoth lung and liver
elephant kidney
and bone (decalcified with 1N HCl)
tissues (about 100mg)
↓wash with PBS(-)
↓centrifuge
ppt.
↓0.5M AcOH
↓homogenize
↓pepsin treatment (final 1mg/ml)
↓4℃,O/N
↓centrifuge
↓
ppt.
↓alkali treatment
↓4℃,1week
↓centrifuge
sup.
↓
alkali-solubilized fraction
(alkali frac.)

sup.
↓
pepsin-solubilized fraction
(pepsin frac.)



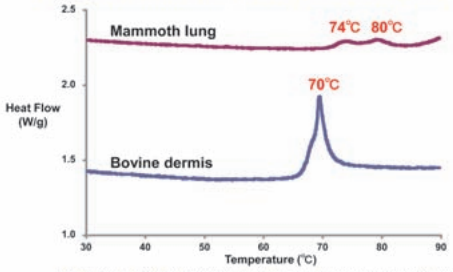
SDS-PAGE
7.5% gel,
non reduction

lane1: mammoth lung
lane2: mammoth liver
lane3: elephant bone
lane4: elephant kidney

Collagen could not be extract by this method.

Differential scanning calorimetry analysis (DSC)

- Condition : tissues in PBS
- Measured by PERKIN-ELMER 7 Series Thermal Analysis System



DSC analysis showed existence of components with higher denaturation tempreature.

LC/MS analysis method

mammoth lung and liver
elephant kidney
and bone (decalcified with 1N HCl)
tissues (45-50mg)
↓wash with NH_4HCO_3
↓centrifuge
ppt.
↓homogenize for Bio Masher ®
↓0.5ml NH_4HCO_3
↓80℃, 5min
↓1mg/ml trypsin treatment 20μl
↓4℃, O/N
↓1mg/ml trypsin treatment 5μl
↓37℃, 6-7h
↓centrifuge
sup.
↓Sep-Pak
↓concentration
↓filter
LC/MS analysis

- apparatus
  High performance liquid chromatograph (HPLC)
  :1200 Series (Agilent Technologies)
  Mass spectrometer (MS)
  :3200QTRAP (Applied Biosystems)
- HPLC condition
  Analytical column
  :XBridge C18 3.5 μm,
  2.1 mm i.d.×150 mm (Waters)
- Data analysis soft
  :ProteinPilot Software 1.0
  (Applied Biosystems)

Candidate list of identified protein from mammoth lung sample

Compiled from three independent analysis

N	Score	Coverage(%)	Accession	Name	Species
1	16.6	46.9	sp|P08123	Collagen alpha 2(I) chain precursor	Homo sapiens
2	10.09	45.4	sp|P02452	Collagen alpha 1(I) chain precursor	Homo sapiens
3	8.54	46.6	pdb|1V2P_T	T Chain T, Trypsin Inhibitor In Complex With Bovine Trypsin Variant X(Sey)(bt.A4	Bos taurus
4	6.25	42.1	trn|Q63079	Collagen alpha1 (Fragment)	Rattus norvegicus
5	4.02	32.7	sp|P04258	Collagen alpha 1(III) chain	Bos taurus
6	13.21	40.8	sp|Q46392	Collagen alpha 2(I) chain precursor	Canis familiaris
7	2.17	15.1	sp|P02085	Hemoglobin beta chain	Loxodonta africana
8	1.4	8.6	rf|XP_347329.1	similar to KIAA0377-like protein	Rattus norvegicus
9	1.36	25.1	sp|P02461	Collagen alpha 1(III) chain precursor	Homo sapiens
10	0.8	1.7	rf|XP_520337.1	PREDICTED: ral guanine nucleotide dissociation stimulator	Pan troglodytes
11	0.57	5.7	rf|XP_510858.1	PREDICTED: similar to membrane interacting protein of RGS16	Pan troglodytes
12	0.54	33.5	sp|Q03692	Collagen alpha 1(X) chain precursor	Homo sapiens
13	0.52	7.2	trn|Q77SP2	Kinesin-like protein KIF15	Rattus norvegicus
14	7.73	46.6	pdb|1V2Q_T	T Chain T, Trypsin Inhibitor In Complex With Bovine Trypsin Variant X(Saw)(bt.B4	Bos taurus
15	0.49	3.3	rf|XP_540085.1	PREDICTED: hypothetical protein XP_540085	Canis familiaris

Collagen alpha 2(I) chain precursor
Collagen alpha 1(I) chain precursor
Hemoglobin beta chain

1. Among identified proteins in mammoth sample, collagens were majority in the list.
2. Blood-derived protein (Hemoglobin) was identified as a minor protein.

Candidates of collagen types exist in tissues by LC/MS analysis

Mammoth (Marsha)

Lung
- collagen alpha 2(I) chain precursor
- collagen alpha 1(I) chain precursor
- collagen alpha 1(III) chain precursor
- collagen alpha 1(X) chain precursor

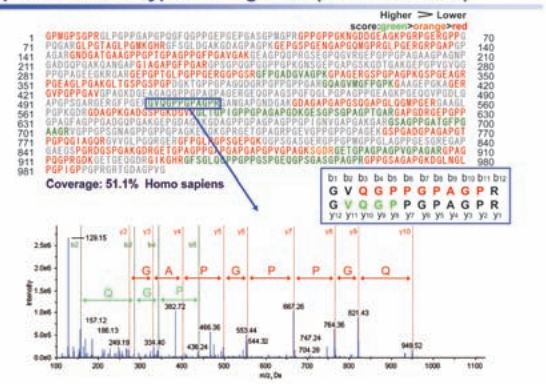
Liver
- collagen alpha 1(I) chain precursor
- collagen alpha 2(I) chain precursor
- procollagen, type III, alpha 1
- collagen alpha 1(XI) chain precursor

Indian elephant

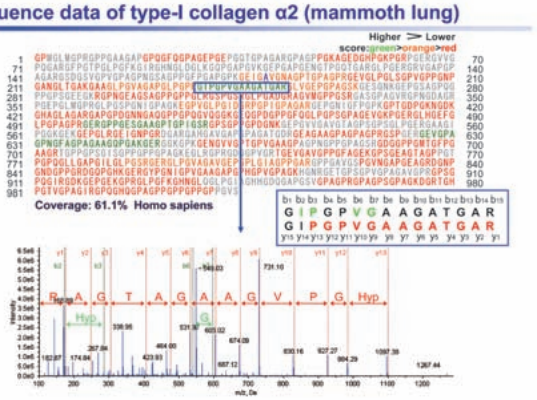
Bone
- collagen alpha 2(I) chain precursor
- collagen alpha 1(I) chain precursor
- collagen alpha 1 type II
- alpha-1 (III) collagen
- type IV alpha 6 collagen isoform
- type II collagen alpha1 (Fragment)

Kidney
- collagen alpha 1(I) chain precursor

Sequence data of type-I collagen α1 (mammoth liver)



Sequence data of type-I collagen α2 (mammoth lung)



アミノ酸分析、質量分析による部分アミノ酸シークエンスの分析は可能であったがコラーゲン分子の抽出は成功しなかった

コラーゲン分子の安定性は示されたが、抽出できなかったのは、自然界での冷凍のためでなく発掘後の保存法（アルコール固定）にあったのではないか？

特に保存処理を行っていない、
マンモス牙サンプルでの分析に挑戦した

背景・目的

昨年度、本学会において、冷凍状態で発見されたマンモスの臓器（肺、肝臓）の微細形態学及び、組織に残存するコラーゲンのアミノ酸分析、質量分析による解析を行い、現生ほ乳類 I 型コラーゲンとのアミノ酸配列の比較を報告した。

しかし、本サンプルは、冷凍状態で発見されたものの、その後エタノール中で保存されていた為、コラーゲン分子としての抽出は成功しなかった。

本年度は固定処理をしていないマンモスの牙を用いて、コラーゲンの抽出を試みた。

方法

サンクトペテルブルグで購入したマンモスの牙を用い、ペプシン処理法及び、アルカリ処理法によるコラーゲンの抽出を試みた。また、抽出したコラーゲンを用い、アミノ酸分析、SDSポリアクリルアミド電気泳動、MALDI-TOF 質量分析、円偏光二色性（CD）測定及び、細胞接着実験を行った。またサンプルの年代は放射性炭素年代測定によって確定した。

結果

アルカリ処理法によって、約 100mgのサンプルより、約 0.7mgのコラーゲンを得た。アミノ酸分析では、ウシ I 型コラーゲンと類似した値を示した。質量分析では、分子量82Kと92Kのα鎖が検出された。CD測定では、コラーゲン特有の三重らせん構造の存在が確認され、変性温度は31.5℃であった。また、このコラーゲンを基質として線維芽細胞培養を行うと、ウシ I 型コラーゲンと同様の接着性を示した。

以上の結果、化石サンプル（マンモス牙）より、生理活性を保ったままコラーゲンタンパク質を抽出することに成功した。

材料

○ サンクトペテルブルグで購入したマンモス牙（妹尾先生）

マンモス牙

12770±50年前

○ 河辺中学校で保管されていたマンモス牙

29040±140年前

コラーゲン抽出

マンモス 牙（脱灰 1N HCl）
tissues (about 100mg)
↓wash with PBS(-)
↓centrifuge
ppt.
↓0.5M AcOH
↓homogenize
↓pepsin treatment (final 1mg/ml)
↓4℃,O/N
↓centrifuge
↓
ppt.
↓alkali treatment (4℃,1week)
↓centrifuge
sup.
（alkali-solubilized fraction）
↓neutralization (pH 8.0)
↓EtOH precipitation×2
↓ (final 40%)
↓centrifuge
ppt.
alkali solubilized collagen (SCL) → lane 4

sup.
（pepsin-solubilized fraction）
↓neutralization (pH 8.0)
↓EtOH precipitation×2
↓ (final 40%)
↓centrifuge
ppt.
pepsin solubilized collagen (PSC) → lane 2

1.ウシ皮膚（I型-PSC）
2.マンモス牙（PSC）
3.ウシ皮膚（I型-SCL）
4.マンモス牙（SCL）

SDS-PAGE : 7.5% gel, non reduction

アルカリ処理法によりコラーゲンが抽出、精製できた

アミノ酸分析

コラーゲン（SCL）

AA	マンモス牙	ウシ(I型)
Hypro	87.5	88.9
Asp	49.3	45.7
Thr	21.0	17.5
Ser	37.9	31.9
Glu	79.8	74.0
Pro	115.1	116.0
Gly	322.4	336.5
Ala	120.6	120.6
Cys	0.5	0.7
Val	24.9	21.6
Met	0.0	0.0
Ile	10.7	12.7
Leu	26.9	25.3
Tyr	3.8	0.9
Phe	15.2	13.1
Hylys	3.2	9.7
Orn	6.3	8.6
Lys	32.4	27.9
His	-	5.2
Arg	42.2	43.1

(mol/1000 residues)

マンモス組織

AA	肺	肝臓	骨
Hypro	69.2	68.4	95.3
Asp	62.3	68.3	44.9
Thr	30.8	33.1	18.9
Ser	43.0	44.4	36.2
Glu	83.1	82.0	72.3
Pro	94.1	88.6	124.2
Gly	264.7	259.2	337.2
Ala	97.6	100.2	97.0
Cys	4.3	0.0	1.1
Val	40.0	44.5	24.9
Met	6.2	0.4	6.1
Ile	25.8	18.3	10.1
Leu	62.6	61.9	26.1
Tyr	3.3	3.0	6.1
Phe	29.7	31.3	14.4
Hylys	9.2	11.1	3.2
Lys	15.5	20.6	28.7
His	7.9	17.1	2.5
Arg	48.8	45.3	47.5

(mol/1000 residues)

マンモス骨データ：matrix 12, 297-307(1992)

まとめ・考察

1. マンモス牙より初めて未変性コラーゲンの抽出、精製に成功した。
2. マンモスコラーゲンの変性温度が測定可能で、ウシより3℃ほど低かった。
3. マンモスコラーゲンのHypro含量はウシとマンモスでほぼ同程度であった。
4. マンモスコラーゲンは細胞接着活性を残していた。

今回、アルカリ処理法にて抽出したマンモスコラーゲンは、ウシとほぼ同程度のHypro含量であったが、変性温度が3℃低かった。
その理由として、コラーゲンの経年変化によるものか、あるいは、マンモス由来コラーゲンの特徴であることが考えられた。

サイエンスセミナー

『体のなかのコラーゲンの役割
コラーゲン研究からわかること（マンモスを例にとって）』

発　行　2011年３月
編　集　国立大学法人秋田大学　男女共同参画推進室
連絡先　〒010-8502 秋田県秋田市手形学園町１番１号
TEL 018-889-2260
URL http://www.akita-u.ac.jp/coloconi/
E-mail sankaku@jimu.akita-u.ac.jp