

## 順相分配クロマトグラフィーによるニワトリ I 型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖の分離精製

國井 沙織<sup>1</sup>, 森本 康一<sup>1,2</sup>

### 要旨

I 型コラーゲンは動物の結合組織を構成する主なタンパク質で、細胞の物理的保持や機能発現に関与する。その分子構造は二本の  $\alpha 1$  鎖と一本の  $\alpha 2$  鎖の計三本のポリペプチド鎖が 3 本鎖らせん構造を形成し、直鎖状分子の長さは 300 nm に達する。コラーゲンが誘導する細胞生物活性の分子機構には未だ不明な点が多く、 $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖の各々の性質を調べるのが重要である。しかし、それらのアミノ酸組成は類似し、分子量はおおよそ 11 万と 10 万であるため、分離することは容易ではなかった。本研究では、カルバモイル基をシリカゲルに結合させた順相 HPLC (TSKgel Amide-80) を用いて、ペプシン処理したニワトリ I 型コラーゲンの二種類の構成鎖を一段階で分離精製することに成功した。アセトニトリルの濃度勾配 (80-70%) で溶出させた  $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖は、5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で純度を確認した。本法により、単一の  $\alpha$  鎖のみを分離精製して各鎖の酵素分解ペプチドを調製することが容易になった。

### 1. 結論

I 型コラーゲンは動物の結合組織や骨組織などに豊富に存在し、幅広い細胞の機能を制御することが知られている<sup>(1-3)</sup>。例えば、コラーゲンの RGD 配列<sup>(4)</sup> は細胞接着に、KGHR 配列<sup>(5)</sup> はヘパリンとの結合に関与する。よって、その構造異常や代謝異常は生体の恒常性の維持に大きく影響する<sup>(6)</sup>。コラーゲン分子は、アミノ酸にして約 1,000 残基の  $\alpha$  鎖 3 本がそれぞれ左巻きにコイルを形成し、さらにそれらが右巻きに 3 本鎖らせん構造 (コイルドコイル) を形成する。最も研究されている I 型コラーゲンでさえ、その構成ポリペプチドである二種類の  $\alpha$  鎖の意義や 3 次構造は明らかではない<sup>(7)</sup>。さらに数百 nm にも及ぶ 3 本鎖らせん構造の形成機構、そしてコラーゲン分子がどのように自己会合して線維会合体を形成するかも詳細は不明である<sup>(8-10)</sup>。コラーゲンとその分解ペプチドの生体内での機能などについても未知の部分が多い。これまでにコラーゲンを構成する二つの  $\alpha$  鎖をタンパク質レベルで調べるため、分離精製することが試みられてきた<sup>(11-16)</sup>。コラーゲンを変性させると、各  $\alpha$  鎖はゼラチンと称する分子量 10 万程度のランダムコイル状の構造 (巨大ポリペプチド) となり、その溶解度は水分子との水素結合数が飛躍的に増大してコラーゲンより高くなる。 $\alpha$  鎖の混合物から  $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖を分離することは、分子量が大きく性質が類似していることから容易ではなかった。

I 型コラーゲンの  $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖のアミノ酸配列がともに UniProtKB/Swiss-Prot に登録されているのは、ヒト ( $\alpha 1$ : P02452,  $\alpha 2$ : P08123), マウス ( $\alpha 1$ : P11087,  $\alpha 2$ : Q01149), ラット ( $\alpha 1$ : P02454,  $\alpha 2$ : P02466), ウシ ( $\alpha 1$ : P02453,  $\alpha 2$ : P02465), イヌ ( $\alpha 1$ : Q9XSJ7,  $\alpha 2$ : O46392), ニワトリ ( $\alpha 1$ : P02457,  $\alpha 2$ : P02467) のみである<sup>(17-21)</sup> (括弧内の番号はそれぞれの accession number を示す)。その他に、 $\alpha 1$  鎖あるいは  $\alpha 2$  鎖のみのアミノ酸配列が報告されている動物も数種類登録されている<sup>(22, 23)</sup>。これら動物種の中で組織を容易に入手できるものはウシとニワトリであり、本研究ではニワトリ由来のコラーゲンをを用いることとした。

原稿受付 2008 年 6 月 17 日

本研究の一部は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.06-I-1, 2007 の助成を受けた。

1. 近畿大学大学院 生物理工学研究科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

遺伝子レベルの研究により、ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) の I 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖をコードする遺伝子, COL1A1 と COL1A2, は第 17 染色体と第 2 染色体に位置し, COL1A2 遺伝子は全長 50 kb に及び, 52 個のエキソンが存在することが報告された<sup>(24, 25)</sup>. さらに遺伝子の解読によりアミノ酸配列が決定され, それら構成鎖の違いが明らかとなった. 例えば,  $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖の各構成アミノ酸数 ( $\alpha 1$  鎖: 1,054 アミノ酸,  $\alpha 2$  鎖: 1,023 アミノ酸), Gly と Pro の組成比 ( $\alpha 1$  鎖: 32.6%と 22.6%,  $\alpha 2$  鎖: 32.4%と 20.7%) などである.

これまでに報告されているコラーゲン $\alpha$ 鎖の分離法は, 陽イオン交換クロマトグラフィー<sup>(11-15)</sup> と逆相クロマトグラフィー<sup>(16)</sup> である. 前者は移動相中で負電荷に解離するカルボキシメチル基やスルホプロリル基などが基材に結合した充填剤で, 溶液中での $\alpha$ 鎖のイオンの性質の違いを利用して塩濃度を増加させて分離する.  $\alpha 1$  鎖の理論等電点は 9.36 と計算され, 同様に $\alpha 2$  鎖も塩基性を示すと考えられる. よって陽イオン交換充填剤が吸着担体として使われている. ただし分画した溶液には塩が含まれるため, 実験によっては精製後に脱塩が必要となる. また,  $\alpha 2$  鎖の分離画分に $\beta$ 鎖が混在し, 単離しにくいことが知られる. 一方, 後者は極性をもつアセトニトリルと水との混合比を変えることにより,  $\alpha$ 鎖の溶媒に対する双極子親和力と水素結合の違いを利用して分離する. 一般には長鎖のアルキル基結合相である C8 (オクチル) や C18 (ODS) などの充填剤で, 移動相には TFA を 0.1%程度添加するが塩は含まない系が汎用される. 逆相 HPLC のペプチド分離に関しては多くの報告と成書<sup>(26)</sup> があり, また近年の LC-MS 解析には必須な手法でもある<sup>(27)</sup>. その他によく知られるカラム分離法として順相 HPLC があり, 一般には糖類などの分離手段として重用される<sup>(28-30)</sup>. しかし, ペプチド分離の応用例はほとんどなく, コラーゲン $\alpha$ 鎖の分離は報告されていない. なぜなら, 極性結合相に使われる  $\text{NH}_2$  (アミノ) 基はタンパク質とシッフ塩基を形成するため回収率が低下することなどが考えられるからである. そこで本研究では, そのような欠点を排除した順相系充填剤カラムを用いて, コラーゲンを構成する巨大ポリペプチド鎖の一段階分離を考えるに至った.

我々は, これまでにニワトリの皮から酸可溶性 I 型コラーゲンを抽出し, ブタ・ペプシンなどのプロテアーゼにて限定加水分解したコラーゲンを調製してその諸性質を明らかにしてきた<sup>(31-39)</sup>. 本研究では, それら酵素限定加水分解コラーゲンの $\alpha 1$  鎖と $\alpha 2$  鎖を順相 HPLC により分離精製した. 順相分配クロマトグラフィー用充填剤としてはアミノ基結合シリカゲルが一般的だが, 化学安定性が劣るなどの短所があるため, カルバモイル基結合シリカゲルである TSKgel Amide-80 (東ソー株式会社) を用いた. 移動相はアセトニトリルを直線濃度勾配で 80%から 70%まで減少させる単純な系を開発し,  $\alpha 1$  鎖と $\alpha 2$  鎖をそれぞれ単一に分離できる知見を得た.

## 2. 材料と方法

### 2.1 I 型コラーゲン限定加水分解物の調製

酸可溶性 I 型コラーゲンは森本ら<sup>(31)</sup> の方法に従い, ニワトリの皮部から抽出した. 抽出した I 型コラーゲンはブタ・ペプシン (シグマアルドリッチ, USA) により構成鎖すべての両末端にある非 3 本鎖らせん構造のテロペプチド領域を限定加水分解し, 2.5 M の塩化ナトリウムで 2 回塩析してペプシン処理コラーゲン (以後, P-Col と省略する) とした. 精製した P-Col は超純水にて透析後に凍結乾燥し, 純度を 5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で確認した. 電気泳動は非還元系の Laemmli<sup>(40)</sup> の方法に準じ, 泳動後のゲルはクマジープリリアントブルー-R-250 にて染色した. 分子量マーカーには, ミオシン (200 kDa),  $\beta$ -ガラクシダーゼ (116 kDa), ウシ血清アルブミン (66 kDa), アルドラーゼ (42 kDa), カルボニックアンヒドラーゼ (30 kDa), ミオグロビン (17 kDa) が含まれるタンパク質分子量マーカー「第一」・II (第一化学薬品株式会社) を使用した. また, コラーゲン以外のタンパク質が夾雑していないことを 280 nm の吸光度を測定して確認した. 精製した P-Col には Cys 残基がないので, 6 M 尿素を含む

15 mM 酢酸水溶液中で 5 mg/mL になるよう溶解し、室温にて 1 時間静置して変性させて実験用試料（ゼラチン）とした。

## 2.2 順相系クロマトグラフィーによる $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖の分離

順相系 HPLC 用カラムは東ソー株式会社製 TSKgel Amide-80 (5  $\mu$ m, 4.7 mm I.D.  $\times$  25 cm) を用いた。HPLC システムは、東ソー社製の DA-8020 ポンプ, CO-8020 カラムオープン, UV-8020 紫外可視検出器, LC-8020 Model-II (ver.3.20) ソフトウェアを使用した。カラム温度は 40°C, 検出波長は 210 nm, 流速は 1.0 mL/min, 注入量は 0.50 mL/回, 溶離条件は 0.1% TFA を含むアセトニトリル : H<sub>2</sub>O = 80 : 20 から 70 : 30 までの直線濃度勾配を 60 分間で完了するように設定した。尿素変性させた P-Col 溶液に, アセトニトリルを最終 80% になるよう添加して供した。試料注入後, 39 分から 48 分をピーク 1, 54 分から 62 分をピーク 2 として分画した。

## 2.3 ピーク 1 と 2 の SDS-PAGE 解析

順相 HPLC で分離したピークを調べるため, 5% SDS-PAGE にて分子サイズと純度を分析した。ピーク画分に含まれるアセトニトリルは遠心エバポレーターにて除去し, つぎに SDS-PAGE 用処理液 (8 M 尿素, 2% SDS, BPB) を少量添加した。SDS-PAGE は, 2.1 と同様の方法にて行った。

## 3. 結果と考察

ニワトリ I 型コラーゲンの各 $\alpha$ 鎖 (UniProtKB/Swiss-Prot,  $\alpha 1$  : P02457,  $\alpha 2$  : P02467 から計算) のアミノ酸組成を表 1 に示す。 $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖の (Gly+Pro) はともに 53% 以上を占め, それらの (Arg+Lys) と (Asp+Glu) はそれぞれ 8.5% と 7.6%, 8.0% と 6.6% である。表 1 より各 $\alpha$ 鎖のアミノ酸含量相対比 (%) は類似しており, 共通して Cys と Trp が全く含まれない。またアミノ酸配列より, 3 本鎖らせん構造を形成する Gly-Pro-HyPro の配列モチーフもよく保存されている。相違するアミノ酸含量は,  $\alpha 1$ 鎖の Asn, His, Ile と Val の相対比が小さく,  $\alpha 1$ 鎖の Gln と Met の相対比が大きい点である。両 $\alpha$ 鎖の等電点 (pI) は, ともに塩基性アミノ酸が相対的に多いので塩基性を示す。図 1 に各 $\alpha$ 鎖の疎水性を ProtScale の hydrophobicity at pH 7.5 by HPLC/Cowan にて計算した結果を示す。正值 (+) は疎水性が高く, 負値 (-) は親水性が高いことを表している。総じて両 $\alpha$ 鎖ともに若干の親水性を示すプロファイルで, 部分的にはスコアが -0.8 より負に大きい領域もある。全長にわたって疎水性あるいは親水性を示す領域が交互に存在し,  $\alpha$ 鎖間のパターンは必ずしも同じではない。このように性質が類似した巨大なポリペプチド分子を分離精製するため, 非常に緩やかな塩濃度勾配を用いたイオン交換クロマトグラフィーやアセトニトリル濃度勾配を用いた逆相クロマトグラフィーの系が開発されてきた。本法では, これまでに報告のない順相分配クロマトグラフィーによる $\alpha$ 鎖の分離を試みた。試料のニワトリ・コラーゲンは溶解度を上げるためとゲル化を防ぐため, 常法によりペプシンで N-と C-末端のテロペプチド領域を限定加水分解した。これは, これまでに報告されているコラーゲンの物性分析等で用いられる手法である<sup>(8-10, 41)</sup>。

図 2 に $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖の TSKgel Amide-80 を用いた分離の典型的なクロマトグラムを示す。検出波長は芳香族系のアミノ酸が少ないので 210 nm とした。試料に含まれる塩などが注入後 10 分までに素通りし,  $\alpha$ 鎖は充填剤に吸着した。移動相のアセトニトリル濃度を 60 分間 (5-65 分) に 80% から 70% まで減少させると, 2 つのピークが分離して溶出した。分離条件として,  $\alpha$ 鎖を分離するためには非常に緩やかなアセトニトリル濃度勾配が適した。39 分から 48 分までの画分をピーク 1, 54 分から 62 分まで画分をピーク 2 とした。ピーク 1 の面積はピーク 2 の面積の 1/2 程度であり, コラーゲンの構成鎖比率を考慮するとピーク 1 が $\alpha 2$ 鎖でピーク 2 が $\alpha 1$ 鎖と推察された。またデータでは示さないが,  $\alpha$ 鎖は強く熱変性させると

表1 ニワトリ I 型コラーゲンの $\alpha 1$  鎖と $\alpha 2$  鎖の  
アミノ酸組成

	$\alpha 1$ 鎖		$\alpha 2$ 鎖	
	個数	相対比 (%)	個数	相対比 (%)
Ala	133	12.6	99	9.7
Arg	52	4.9	53	5.2
Asn	13	1.2	26	2.5
Asp	31	2.9	22	2.2
Cys	0	0	0	0
Gln	31	2.9	19	1.9
Glu	50	4.7	45	4.4
Gly	344	32.6	331	32.4
His	3	0.3	8	0.8
Ile	7	0.7	19	1.9
Leu	22	2.1	32	3.1
Lys	38	3.6	29	2.8
Met	9	0.9	5	0.5
Phe	14	1.3	13	1.3
Pro	238	22.6	212	20.7
Ser	29	2.8	29	2.8
Thr	19	1.8	19	1.9
Trp	0	0	0	0
Tyr	4	0.4	1	0.1
Val	15	1.4	26	2.5
Z	2	0.2	0	0
X	0	0	35	3.4

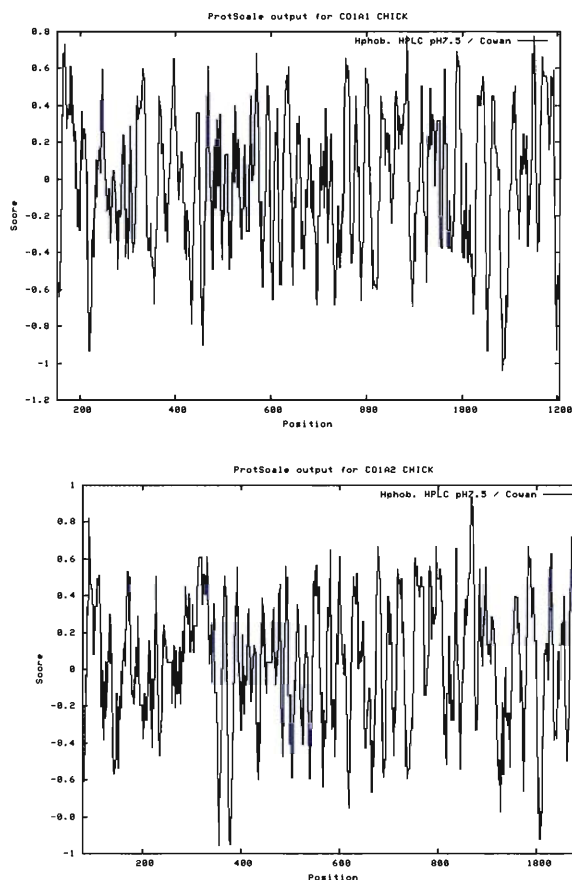


図1 ニワトリ I 型コラーゲンの $\alpha 1$  鎖と $\alpha 2$  鎖の  
疎水性 (ProtScale の Hydrophobicity at pH 7.5  
by HPLC/Cowan により, 各 $\alpha$ 鎖の疎水性度を  
図にした. 上図:  $\alpha 1$  鎖, 下図:  $\alpha 2$  鎖)

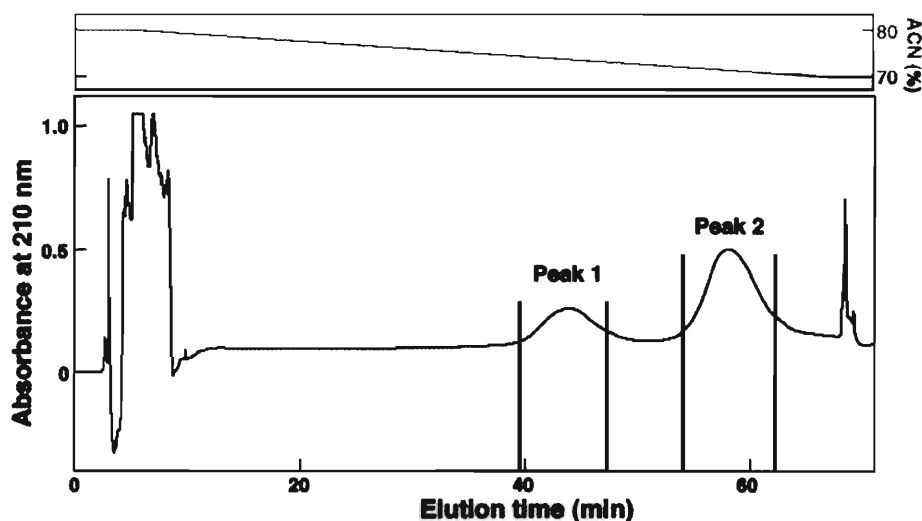


図2 ニワトリ I 型コラーゲン (尿素変性後) の順相 HPLC

カラム, TSKgel Amide-80 (4.7 mm ID  $\times$  25 cm)

流速, 1.0 mL/min; 検出波長, 210 nm

溶離液, アセトニトリル直線濃度勾配 80-70% (5-65 min)

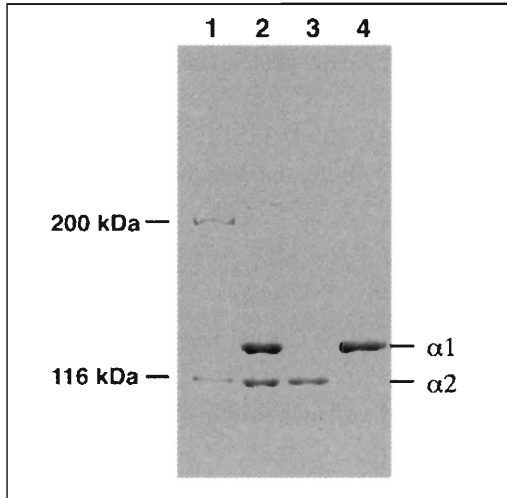


図3 順相 HPLC で分離した画分の 5% SDS-PAGE  
 レーン 1, 分子量マーカー  
 レーン 2, 分離精製前の I 型コラーゲン  
 レーン 3, TSKgel Amide-80 で分離したピーク 1 画分  
 レーン 4, TSKgel Amide-80 で分離したピーク 2 画分

ペプチド結合が切断されて小さなペプチド群が生じるので前処理法としては不向きであった。尿素あるいはグアニジン塩酸によるコラーゲンの変性剤が選択されるべきである。

ピーク 1 とピーク 2 を分画してアセトニトリルを除去した後、5% SDS-PAGE にてその移動度と純度を分析した (図 3)。その結果、ピーク 1 が  $\alpha 2$  鎖、ピーク 2 が  $\alpha 1$  鎖であることが確認された。また、図 3 より、純度は 95% 以上であり、レーン 3 とレーン 4 にそれぞれ異なる  $\alpha$  鎖の混在は認められなかった。本実験では、レーン 4 (ピーク 2) に微量の  $\beta 12$  鎖 ( $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖の二量体) が認められたが、分画時間をさらに細分することにより改善できると考えられた。これまでに報告されている ODS や CM-cellulose を用いた分離では、 $\alpha 1$  鎖、 $\alpha 2$  鎖の順序に溶出する<sup>(3,4)</sup>。本法との違いは試料と移動相、充填剤との親和性がそれぞれ異なるので簡単に説明できない。しかし原理の異なる順相系充填剤である TSKgel Amide-80 が  $\alpha$  鎖の分離に有効であり、巨大ポリペプチド分子の分離に応用できたことは新しい知見である。各鎖の分離再現性も良好であり、実用に適した手法であった。本実験系での 1 回の注入量はコラーゲンにして 0.5 mg であり、図 2 のピーク間の時間差などを考慮すると最大 1 mg 程度を一度に分離できる。ペプチド分析に使われる逆相系充填剤の特徴として、疎水性の強いポリペプチドは充填剤から解離しにくい、親水性ポリペプチドは素通ししやすいなどが挙げられる。しかし、順相 HPLC では試料を高濃度のアセトニトリルで調製するため、このようなポリペプチドの分離に向いていると考えられた。ただし、アミノ基などの他の順相系充填剤では、再現性や回収率に注意して条件を確立しなければならない。

以上の結果より、アミド基が充填剤の順相 HPLC により I 型コラーゲンの各  $\alpha$  鎖が分離精製できたことから、本法はポリペプチド分離法の選択として十分に試す価値があることが示された。今後、分離した  $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖、もしくは特定の各分解ペプチドを用いて I 型コラーゲンの線維形成阻害能や細胞の運動機能 (接着や浸潤など) の抑制・亢進を調べることにより、コラーゲンの機能発現に不可欠なペプチド配列を考察できると期待される。

#### 参考文献

- (1) P.D. Yurchenco, D.E. Birk, and R.P. Mecham, Eds. (1994) "Extracellular Matrix Assembly and Structure", Academic Press, San Diego, USA.
- (2) 林 利彦, 水野一乗, 中里浩一, 羽関典子, 西山敏夫 (2000) 4 コラーゲンスーパーファミリータンパク質 (「細胞外マトリックス-基礎と臨床-」小出 輝, 林 利彦編), p94-138, 愛智出版.

- (3) G.A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Körkkö, L. Ala-Kokko, and J.D. San Antonio (2002) Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J. Biol. Chem.* 277, 4223-4231.
- (4) K. M. Yamada (1991) Adhesive recognition sequences. *J. Biol. Chem.* 266, 12809-12812.
- (5) S. M. Sweeney, C. A. Guy, G. B. Fields, and J. D. San Antonio (1998) Defining the domains of type I collagen involved in heparin-binding and endothelial tube formation. *Biochemistry* 95, 7275-7280.
- (6) 中田 研, 妻木範行, 木村友厚 (2000) 14 細胞外マトリックスとトランスジェニックアニマル(「細胞外マトリックス-基礎と臨床-」小出 輝, 林 利彦編), p272-286, 愛智出版.
- (7) K. Okuyama, K. Okuyama, S. Arnnot, M. Takayanagi, and M. Kakudo (1981) Crystal and molecular structure of a collagen-like polypeptide (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>. *J. Mol. Biol.* 152, 427-443.
- (8) D.J. Prockop, and A. Fertala (1998) Inhibition of the self-assembly of collagen I into fibrils with synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 273, 15598-15604.
- (9) N. Kuzenetsova, and S. Leikin (1999) Does the triple helical domain of type I collagen encode molecular recognition and fiber assembly while telopeptides serve as catalytic domains? *J. Biol. Chem.* 274, 36083-36088.
- (10) U. Hansen, and P. Bruckner (2003) Macromolecular specificity of collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 37352-37359.
- (11) J. Worrall, and F. S. Steven (1966) The depolymerising action of pepsin on collagen. Column fractionation of the component polypeptide chains, *Biochim. Biophys. Acta*, 130, 184-189.
- (12) P. E. McClain, E. R. Wiley, P. R. Reynolds, and S. C. Morris (1977) Isolation and characterization of papain solubilized collagen from bovine spinous process cartilage, *J. Biochem.* 8, 381-387.
- (13) S. Kimura, Y. Miyauchi, and N. Uchida (1991) Scale and bone type I collagens of carp (*Cyprinus carpio*), *Comp. Biochem. Physiol.* 99B, 473-476.
- (14) S. Kimura, Y. Omura, M. Ishida, and H. Shirai (1993) Molecular characterization of fibrillar collagen from the body wall of starfish *Asterias amurensis*, *Comp. Biochem. Physiol.* 104B, 663-668.
- (15) A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan, and M. Tanaka (2005) Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin, *J. Sci. Food, Agric.* 85, 1203-1210.
- (16) M. Van der Rest, and P.P. Fietzek (1982) A comprehensive approach to the study of collagen primary structure based on high-performance liquid chromatography. *Eur. J. Biochem.* 125, 491-496.
- (17) M. H. Finer, H. Boedtger, and P. Doty (1987) Construction and characterization of cDNA clones encoding the 5' end of the chicken pro  $\alpha 1(I)$  collagen mRNA, *Gene*, 56, 71-78.
- (18) G. Tromp, H. Kuivaniemi, A. Stacey, H. Shikata, C. T. Baldwin, R. Jaenisch, and D. J. Prockop (1988) Structure of a full-length cDNA clone for the prepro  $\alpha 1(I)$  chain of human type I procollagen, *Biochem. J.* 253, 919-922.
- (19) B. Bätge, H. Notbohm, J. Diebold, H. Lehmann, M. Bodo, R. Deutzmann, and P. K. Müller (1990) A critical crosslink region in human-bone-derived collagen type I, *Eur. J. Biochem.* 192, 153-159.
- (20) K. Asahina, R. Utoh, M. Obara, and K. Yoshizato (1999) Cell-type specific and thyroid hormone-dependent expression of genes of  $\alpha 1(I)$  and  $\alpha 2(I)$  collagen in intestine during amphibian metamorphosis, *Matrix Biology*, 18, 89-103.
- (21) J. H. Highberger, C. Corbett, S. N. Dixit, W. Yu, J. M. Seyer, A. H. Kang, and J. Gross (1982) Amino acid sequence of chick skin collagen  $\alpha 1(I)$ -CB8 and the complete primary structure of the helical portion of the chick skin collagen  $\alpha 1(I)$  chain, *Biochem.* 21, 2048-2055.
- (22) K. Asahina, K. Oofusa, M. Obara, and K. Yoshizato (1997) Cloning and characterization of the full length cDNA encoding  $\alpha 2$  type I collagen of bullfrog *Rana catesbeiana*, *Gene*, 194, 283-289.
- (23) M. Saito, Y. Takenouchi, N. Kunisaki, and S. Kimura (2001) Complete primary structure of rainbow trout type I collagen consisting of  $\alpha 1(I)$   $\alpha 2(I)$   $\alpha 3(I)$  heterotrimers, *Eur. J. Biochem.* 268, 2817-2827.
- (24) H. Boedtger, M. Finer, S. Aho (1985) The structure of the chicken  $\alpha 2$  collagen gene. *Ann. NY. Acad. Sci.* 460, 85-116.

- 
- (25) L. A. Dickson, Y. Ninomiya, M. P. Bernard, D. M. Pesciotte, J. Parsons, G. Green, E. F. Eikenberry, B. de Cromburgghe, G. Vogeli, I. Pastan, P. P. Fietzek, and B. R. Olsen (1981) The exon/intron structure of the 3'-region of the pro  $\alpha 2(I)$  collagen gene. *J. Biol. Chem.* 256, 8407-8415.
- (26) 高橋 昭, 荒木 峻 訳 (1992) 「高速液体クロマトグラフィーの実際」 東京化学同人 (L. R. Snyder, J. L. Glajch, J. J. Kirkland (1988) "Practical HPLC Method Development" John Wiley & Sons., Inc.)
- (27) G. B. Smejkal, and A. Lazaren (2006) "Separation Methods in Proteomics" CRC Press, FL.
- (28) L. Culleré, M. Aznar, J. Cacho, and V. Ferreira (2003) Fast fractionation of complex organic extracts by normal-phase chromatography on a solid-phase extraction polymeric sorbent optimization of a method to fractionate wine flavor extracts. *J. Chromatogr. A*, 1017, 17-26.
- (29) R. Slimestad and I. M. Vågen (2006) Thermal stability of glucose and other sugar aldoses in normal phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1118, 281-284.
- (30) P. M. Hutchins, R. M. Barkley, and R. C. Murphy (2008) Separation of cellular nonpolar neutral lipids by normal-phase chromatography and analysis by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 49, 804-813.
- (31) K. Morimoto, S. Kunii, K. Hamano, B. Tonomura (2004) Preparation and structural analysis of actinidain-processed atelocollagen of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 861-867.
- (32) 森本康一, 吉川隆章, 外村辨一郎 (2004) システインプロテアーゼ処理コラーゲンの製造方法およびシステインプロテアーゼ処理コラーゲン, 特願 2004-532678.
- (33) 森本康一 (2004) 植物に含まれるシステイン・ペプチダーゼの利用 (「食品酵素化学の最新技術と応用」井上國世監修), シーエムシー出版, 134-140 頁.
- (34) 國井沙織, 森本康一 (2005) アクチニジン酵素処理にて生じた I 型コラーゲンの生化学的特性の変化, 近畿大学先端技術総合研究所紀要 10 号, 19-28 頁.
- (35) S. Kunii, M. Shibano, T. Saito, and K. Morimoto (2005) Difference of structural features between actinidain-hydrolyzed collagen matrices and pepsin-hydrolyzed collagen matrices. PACIFICHEM 2005, TECH-31, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA.
- (36) S. Kunii, M. Shibano, T. Saito, and K. Morimoto (2006) SEM observation of neutrophil motility in collagen matrix hydrolyzed by actinidain peptidase. The 16th International Microscopy Congress, Sapporo, Japan.
- (37) 森本康一, 國井沙織 (2007) Matrix metalloproteinase-1(MMP-1)分解による I 型コラーゲン会合体の構造解析, 近畿大学生物理工学部紀要 19 号, 57-65 頁.
- (38) S. Kunii, M. Shibano, T. Saito, and K. Morimoto (2007) Neutrophil distinguishes ultrastructure of enzyme-hydrolyzed collagen assemblies. 7th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium 2007 Cairns, Australia.
- (39) S. Kunii, M. Shibano, T. Saito, and K. Morimoto (2008) Difference in neutrophil dynamics induced by a novel superstructure of collagen. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference Athens, Greece.
- (40) U.K. Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- (41) K. Sato, T. Ebihara, E. Adachi, S. Kawashima, S. Hattori, and S. Irie (2000) Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with proteases. *J. Biol. Chem.* 275, 25870-25875.

英文抄録

## Separation of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ Chains from Chicken Type I Collagen by Normal Phase Chromatography

Saori Kunii<sup>1</sup> and Koichi Morimoto<sup>1,2</sup>

Type I collagen consists from two  $\alpha 1$  chains and one  $\alpha 2$  chain. Physiological functions of collagen depend on triple-helix structure and/or fibril structure. Separation of  $\alpha$  chains that form the triple-helix is most important to analyze biochemical features. In general, two basic modes of cation-exchange chromatography or reversed-phase chromatography have been utilized for peptide separation. However, it is not easy to separate  $\alpha$  chains, because each  $\alpha$  chain has high molecular weight ( $\sim 10^5$ ), similar isoelectric point and hydrophilicity. To separate the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chain with high efficiency, we used normal-phase HPLC with a TSKgel Amide-80 column. The  $\alpha$  chains were clearly separated to two peaks and investigated with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Our procedures described here provide a practical method for the separation and analysis of collagen polypeptides.

---

1. Graduate School of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan