

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

森本 康一¹, 國井 沙織²

要旨

Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) はコラーゲンの 3 重螺旋構造を切断できる酵素の一つであり, 細胞外マトリックスを分解することで組織細胞周辺の環境を一新する. MMP-1 の機能はコラーゲン代謝のみならず, 細胞の浸潤や転移にも関わる重要な酵素である. 一方, 同じコラーゲンでも魚類と鳥類では熱安定性も異なり, MMP-1 の特異性も異なることが予想される. また, コラーゲンのテロペプチド領域を除いたペプシン処理コラーゲンとアクチニダイン処理コラーゲンの構造変化が MMP-1 の反応特性に変化を及ぼす可能性が考えられる. 本研究では, *Clostridium* 菌と *Streptomyces* 菌由来の MMP-1 を用いて, キハダマグロとニワトリから調製したペプシン処理コラーゲンとアクチニダイン処理コラーゲンに対する反応速度や特異性などの酵素特性をポリアクリルアミドゲル電気泳動と逆相 HPLC にて調べた. MMP-1 の分解速度はキハダマグロとニワトリの各コラーゲンで大きく異なることが示された. さらに, 2 種類の菌由来 MMP-1 のニワトリ・コラーゲンに対する特異性に相違がみつかった. また, ニワトリのアクチニダイン処理コラーゲンの MMP-1 分解物にはペプシン処理コラーゲンの分解物にないペプチド断片が認められた. 異なる MMP-1 とコラーゲンとの酵素反応を調べることにより, コラーゲンの構造とその安定性に関する知見を得た.

1. 緒論

動物の組織細胞間に存在する細胞外基質であるコラーゲンなどのタンパク質は量的にも豊富でかつ幅広い細胞の機能を制御しており, その構造異常や代謝異常は動物の健康に大きく影響する^{(1), (2)}. 現在, コラーゲンは約 20 種類に分類されているが, 生体内での機能などについては未知の部分が多い. 一番研究されている含量比の多い I 型コラーゲンでさえ, その線維化機構などについては完全に理解されていない⁽³⁾⁻⁽⁵⁾. また, すべてのコラーゲンは安定な 3 重螺旋構造をもつため, セリンプロテアーゼなどの内在性酵素で分解されにくく, コラーゲンに特異的な酵素であるコラゲナーゼにより代謝される. 細胞外基質の主な成分であるコラーゲンを特異的に分解する細胞由来のコラゲナーゼの活性挙動は, 器官形成, 傷害修復, 血管新生のような生物学的現象にきわめて重要である.

コラゲナーゼはその名が示すとおりコラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解するので, そのような酵素を総じてマトリックス・メタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase ; MMP) と命名された. 現在までに約 20 種類の MMP が報告され, それらはファミリーと呼ばれる酵素群に分類され, 基質特異性などの酵素化学的研究のみならず遺伝子レベルでの解析も盛んに行われてきた^{(6), (7)}. 1989 年にはフロリダで開催された国際 MMP 会議で MMP ファミリーの分類などが提案され, 1) プロ体として生合成され, プロセッシングにより成熟体に変換される, 2) 酵素活性が金属イオンに依存し, EDTA や *o*-フェナンスロリンな

原稿受付 2006 年 11 月 21 日

本研究の一部は, 独立行政法人日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C 2 16500307) と近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.04-I-2, 2005 の助成を受けた.

1. 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
2. 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

どで阻害される, 3) 組織メタロプロテアーゼ・インヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) で阻害されるなどの特徴が挙げられた. また, MMP の酵素活性には Ca^{2+} と Zn^{2+} が必須で, pH 7.5-8.0 で最大活性を示すことが知られる. これまでに癌組織での浸潤・転移などの stage 依存的な MMP-2 の発現なども報告され, 阻害因子である TIMP とともに研究が蓄積されている. 1994 年には, 膜結合型 MMP (MT1-MMP) の活性亢進が生体内での癌細胞浸潤で見いだされ, 広く注目されている.

線維芽細胞や骨芽細胞などから分泌される間質コラーゲナーゼである MMP-1 (EC 3.4.24.7) は I, II, III, VII, VIII と X 型の各コラーゲンに作用し, いくつかは最初の切断点が同定されている. I 型コラーゲンでは, $\alpha 1$ 鎖の Gly⁷⁷⁵-Ile⁷⁷⁶ 間と $\alpha 2$ 鎖の Gly⁷⁷⁵-Leu⁷⁷⁶ 間のペプチド結合が切断されることが明らかとなった. この切断により, コラーゲンは 3/4 と 1/4 の断片に分かれる⁽⁸⁾. 一カ所が切断されて 3 重螺旋構造が部分的に解れたコラーゲンは熱安定性が低下し, さらに酵素分解が進み, 多くのポリペプチド断片が生じる. 特に MMP-1 とコラーゲンの作用機序は X 線結晶構造解析から決定された立体構造からも研究され, 多くの知見が報告されている⁽⁹⁾⁻⁽¹²⁾. MMP-1 以外には, 多形核白血球である好中球が分泌する MMP-8 がよく研究されている. 例えば, MMP-1 の分解速度は I 型と III 型コラーゲンで同等であるが, MMP-8 は III 型コラーゲンより I 型コラーゲンを 15 倍も早く分解することが知られる. このような違いは, 主に体細胞が分泌する MMP-1 と免疫細胞が分泌する MMP-8 の生体内での機能が異なることを示唆している. 動物種間の異なるコラーゲンに対する MMP-1 の反応性にも未だ不明な点が多く, 詳細な解析が必要である. 例えば魚類と鳥類の I 型コラーゲンの相同性は比較的高く, また両者とも 3 重螺旋構造を保持する. しかし, 鳥類由来コラーゲンのプロリンとヒドロキシプロリン含量は魚類より多く, 変性温度は比例して鳥類で高いことが知られる. よって, MMP-1 の分解挙動に差が生じる可能性も考えられる. また, 市販で入手可能な細菌由来の MMP-1 の特異性や反応速度の差異を調べることも酵素化学的に重要である. 基質であるコラーゲンと MMP-1 との反応機序を解析するためには, 分解したコラーゲンペプチドの量的変化と質的变化を明らかにしなければならない.

本研究では, キハダマグロとニワトリの皮部から調製した酸可溶性 I 型コラーゲンをペプシンとアクチニダインで処理し, *Clostridium histolyticum* (*C. histolyticum*) 菌と放線菌の一種である *Streptomyces* sp. C-51 菌由来の MMP-1 の分解活性を経時的に追跡した. 通常, MMP の酵素化学実験ではコラーゲン分解活性を正確に評価するため, N 末端と C 末端のテロペプチド領域をあらかじめ限定分解した産物を用いる. 当研究室でブタ・ペプシンとキウイフルーツ由来アクチニダインによりテロペプチドを限定加水分解したものを調製し^{(13),(14)}, これらコラーゲン試料に対する MMP-1 の分解活性の差を調べた. アクチニダインで限定加水分解した I 型コラーゲンは, これまでに報告されていない性質が現れることから, 立体構造が変化している可能性が高い⁽¹⁵⁾⁻⁽¹⁸⁾. よって, MMP-1 による分解物を調べることで基質の構造変化を検証できうると考えた. その結果, I 型コラーゲンの分解物と分解速度, 細菌由来 MMP-1 の基質特異性で興味深い知見を得たので報告する.

2. 材料と方法

2. 1 I 型コラーゲンの抽出・調製とテロペプチドの限定加水分解

I 型コラーゲンは森本らの方法に従い, キハダマグロ (*Thunnus albacares*) とニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) の皮部からそれぞれ抽出した⁽¹⁴⁾. 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) とキウイフルーツ果実から精製したアクチニダイン (研究室で精製) で限定加水分解し, テロペプチド領域をほとんど含まない 3 重螺旋領域のコラーゲンとした. これらは, 以後 P-Col (ペプシン処理 I 型コラーゲン) と NM-Col (アクチニダイン処理 I 型コラーゲン) と省略する. P-Col と NM-Col は硫酸アンモニウム (20%飽和) による塩析を繰り返し, 続いて陰イオン交換ゲルである TOYOPEARL

DEAE-650C (東ソー株式会社) を用いたバッチ法により精製した。精製した P-Col と NM-Col は超純水にて透析後に凍結乾燥し、各純度を 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⁽¹⁹⁾ の方法に準じ、泳動ゲルはクマジープリリアントブルーR-250 にて染色した。電気泳動には、ミオシン (200 kDa), β -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。精製したキハダマグロ・コラーゲンとニワトリ・コラーゲンは、それぞれ 20 mM リン酸水溶液と 15 mM 酢酸水溶液中で 4°C にて数日間静置して溶解し、MMP-1 実験用試料とした。

2. 2 MMP-1 による酵素反応

MMP-1 は、*Clostridium histolyticum* (150 unit/mg) 菌由来をナカライテスク株式会社から、*Streptomyces* sp. C-51 (500 unit/mg) 菌由来をヤクルト薬品工業株式会社から入手した。*Streptomyces* sp. C-51 由来 MMP-1 は「ヤクルト」と「ヤクルトS」の二つのグレードを用いた。10 mg/mL のキハダマグロ由来の P-Col と NM-Col を 20 mM リン酸水溶液で調製した後、20 mM 塩化カルシウムを含む 100 mM HEPES (pH 7.5) 溶液で最終 2 mg/mL に希釈して基質溶液とした。キハダマグロの P-Col と NM-Col 溶液には、最終濃度 10 unit/mL になるように *Streptomyces* 菌由来と *C. histolyticum* 菌由来の MMP-1 を添加した。また、10 mg/mL のニワトリの P-Col と NM-Col 溶液には、*Streptomyces* 菌由来と *C. histolyticum* 菌由来の MMP-1 をそれぞれ最終濃度 10 unit/mL と 2 unit/mL になるように基質溶液に添加した。混合時を反応 0 時間とし、1, 2, 3, 4, 5, 10, 24 時間後の酵素反応溶液を適量採取し、SDS, 尿素, EDTA 等を含む溶液を添加して反応を停止させた。酵素反応温度は、キハダマグロとニワトリともに 30°C に設定した。また、MMP-1 の酵素反応の初期過程を詳細に解析するため、混合後の早期に反応を停止させる方法も併用した。

2. 3 MMP-1 分解物の SDS-PAGE と逆相 HPLC による解析

各 MMP-1 で酵素分解した P-Col と NM-Col の各反応時間の溶液は、それぞれ SDS-PAGE で解析した。SDS-PAGE は分解ペプチド断片を詳細に解析するため、7.5% アクリルアミド濃度で行った。*Streptomyces* sp. C-51 菌ヤクルト S の MMP-1 によるニワトリの P-Col と NM-Col の 5 時間反応溶液を逆相 HPLC にて解析した。逆相 HPLC は東ソー社製のシステム機器を用いた。逆相 HPLC で使用したカラムは TSKgel ODS-100V (4.6 mm ID×15 cm, 東ソー株式会社) で、流速 0.5 mL/min, 検出波長 210 nm, 移動相 0.1% TFA を含む水-アセトニトリル系 (0-40% アセトニトリル濃度勾配; 10-40 分) の条件で溶出させた。アセトニトリルと TFA は HPLC グレードの特級品 (ナカライテスク株式会社) を使用した。カラム温度は 40°C に設定し、各注用量はオートサンプラーにより 100 μ L とした。

3. 結果

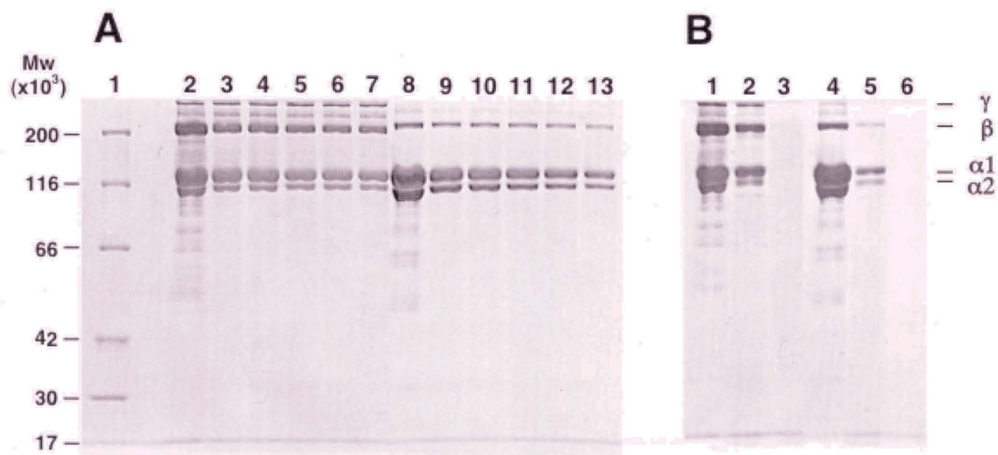
3. 1 酸可溶性 I 型コラーゲンの抽出・調製とテロペプチド領域の限定加水分解

キハダマグロとニワトリから抽出・調製した I 型コラーゲンをペプシンとアクチニジンにて限定加水分解した。これら酵素により、コラーゲンのテロペプチド領域は分解されて 3 重螺旋領域のみが残っていると考えられる⁽¹⁴⁾。分解されたペプチドと酵素は以後の実験結果に影響するので、硫酸塩析と DEAE ゲルにて除去した。精製した P-Col と NM-Col の UV スペクトルを測定した結果、芳香族アミノ酸に起因する 280 nm 付近の吸光度はほとんど検出されず、コラーゲン以外の夾雑タンパク質は無視できると判断した (データ未発表)。また、P-Col の SDS-PAGE ではコラーゲンの構成成分である α 1 鎖, α 2 鎖, β 鎖と γ 鎖

をそれぞれ確認した (Fig. 1A レーン2 と Fig. 2A レーン1). 一方, NM-Col では β 鎖含量が相対的に減少し, $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖含量が逆に増大することが示された (Fig. 1A レーン8 と Fig. 2A レーン6).

3. 2 MMP-1によるキハダマグロ由来コラーゲン分解物のSDS-PAGE解析

キハダマグロ皮部から精製した P-Col と NM-Col の分解挙動は, *C. histolyticum* 菌と *Streptomyces* 菌「ヤクルトS」の MMP-1 で大きく異なった. *C. histolyticum* 菌 MMP-1 (10 unit/mL) の分解速度は遅く, 反応24時間後でも未分解物が残っていた (Fig. 1A). 一方, *Streptomyces* 菌 MMP-1 (10 unit/mL) の分解は速く, 5時間以内でほとんどのコラーゲンを分解することが示された (Fig. 1B). また α 鎖, β 鎖, γ 鎖ともに同様に分解するのが分かった. NM-Col も同様に数時間で分解することが示された. すべての MMP-1 反応試料の SDS-PAGE で, 分子量 17 kDa 以上の分解断片はまったく確認できなかった. この結果は, MMP-1 がキハダマグロ・コラーゲンの3重螺旋構造を低分子ペプチドまで速やかに分解することを示している. また本条件では分解断片が認められないため, P-Col と NM-Col の分解物に差を見つけることができなかった.



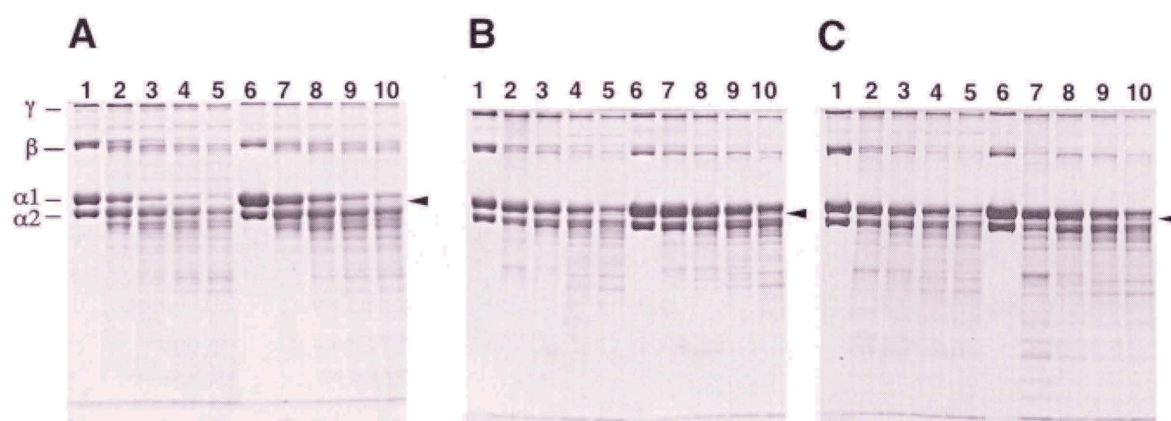
A. *C. histolyticum*菌由来 MMP-1.
 レーン1: 分子量マーカー, レーン2: P-Col 反応0時間, レーン3: P-Col 反応1時間,
 レーン4: P-Col 反応2時間, レーン5: P-Col 反応5時間, レーン6: P-Col 反応10時間,
 レーン7: P-Col 反応24時間, レーン8: NM-Col 反応0時間, レーン9: NM-Col 反応1時間,
 レーン10: NM-Col 反応2時間, レーン11: NM-Col 反応5時間, レーン12: NM-Col 反応10時間,
 レーン13: NM-Col 反応24時間
 B. *Streptomyces*菌由来MMP-1「ヤクルトS」.
 レーン1: P-Col 反応0時間, レーン2: P-Col 反応1時間, レーン3: P-Col 反応5時間,
 レーン4: NM-Col 反応0時間, レーン5: NM-Col 反応1時間, レーン6: NM-Col 反応5時間.

Fig.1 キハダマグロ・コラーゲンに対する MMP-1 の分解活性

3. 3 MMP-1によるニワトリ由来コラーゲン分解物の SDS-PAGE 解析

ニワトリ由来のP-ColとNM-Colに対する*C. histolyticum* 菌由来MMP-1の分解速度は, *Streptomyces* 菌の MMP-1 と若干異なることが示された (Fig. 2). Figure 2Aでは, NM-Colの $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖間に新たな分解断片が見られた (図中, 矢尻). またP-Colの分解速度はNM-Colより少し早く, $\alpha 2$ 鎖の低分子側の分解断片には染色度の異なるバンドが認められた. また, P-ColとNM-Colの β 鎖の分解にも差があり, P-Colでは $\alpha 1$ 鎖と β 鎖間に分解物が見られた. 10 unit/mLのヤクルトとヤクルトSのMMP-1間では, コラーゲン分解速度に

大きな差がなかった (Fig. 2Bと2C) . しかし, 1/5濃度 (2 unit/mL) の *C. histolyticum* 菌MMP-1と分解速度は同等であり, 相対的に *Streptomyces* 菌MMP-1の分解速度は遅かった. Figure 2Bと2Cでは, $\alpha 1$ 鎖と β 鎖間に分解断片はほとんどなかったが, $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖間にはP-ColとNM-Colの双方で新たなバンドが現れた. 総じてMMP-1のコラーゲン分解物は42~94 kDaに多数見られ, α 鎖が徐々に末端部分から分解することが示された. *C. histolyticum* 菌由来MMP-1では $\alpha 2$ 鎖より $\alpha 1$ 鎖の分解速度が早く, *Streptomyces* 菌のMMP-1の分解速度は $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖で大きな差がなかった.

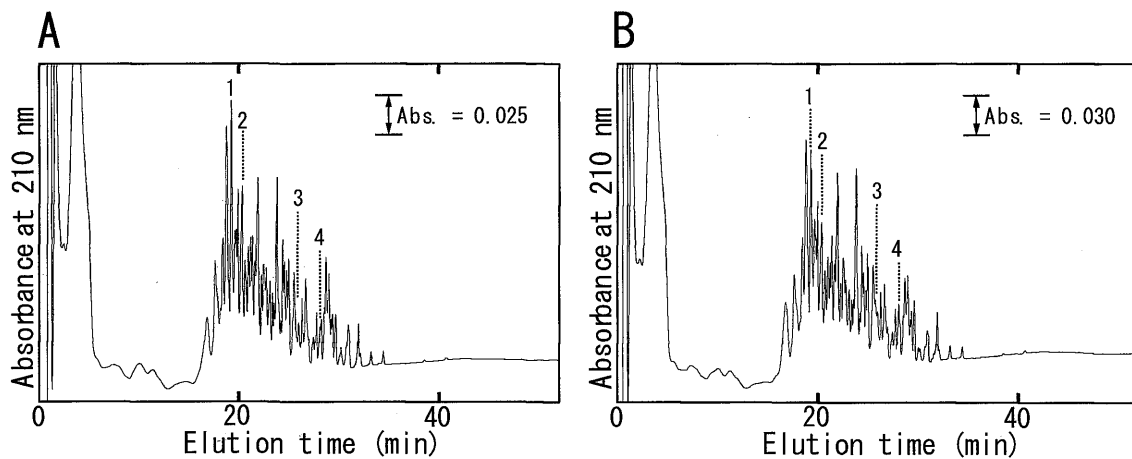


A. *C. histolyticum*菌由来MMP-1,
 レーン1: P-Col 反応 0 時間, レーン2: P-Col 反応 1 時間, レーン3: P-Col 反応 2 時間,
 レーン4: P-Col 反応 3 時間, レーン5: P-Col 反応 4時間, レーン6: NM-Col 反応 0時間,
 レーン7: NM-Col 反応1時間, レーン8: NM-Col 反応2時間, レーン9: NM-Col 反応3時間,
 レーン10: NM-Col 反応4時間,
 B. *Streptomyces*菌由来MMP-1「ヤクルト」,
 レーン1: P-Col 反応 0 時間, レーン2: P-Col 反応 1 時間, レーン3: P-Col 反応 2 時間,
 レーン4: P-Col 反応 3 時間, レーン5: P-Col 反応 4時間, レーン6: NM-Col 反応 0時間,
 レーン7: NM-Col 反応1時間, レーン8: NM-Col 反応2時間, レーン9: NM-Col 反応3時間,
 レーン10: NM-Col 反応4時間,
 C. *Streptomyces*菌由来MMP-1「ヤクルトS」,
 レーン1: P-Col 反応 0 時間, レーン2: P-Col 反応 1 時間, レーン3: P-Col 反応 2 時間,
 レーン4: P-Col 反応 3 時間, レーン5: P-Col 反応 4時間, レーン6: NM-Col 反応 0時間,
 レーン7: NM-Col 反応1時間, レーン8: NM-Col 反応2時間, レーン9: NM-Col 反応3時間,
 レーン10: NM-Col 反応4時間,

Fig.2 ニワトリ・コラーゲンに対する MMP-1 の分解活性

3. 4 MMP-1によるニワトリ由来コラーゲン分解物の逆相HPLC解析

ニワトリ由来 P-Col と NM-Col では MMP-1 による多数の分解物が SDS-PAGE で認められたので, ヤクルト S の MMP-1 による分解物を逆相 HPLC にて分析した (Fig. 3). 本実験で使用した ODS-100V ゲルは細孔径 100 Å のシリカゲルに C18 がモノレイヤーで導入された充てん剤で, 親水性と疎水性のペプチドを高分解能に分離できる. P-Col と NM-Col には芳香族アミノ酸がほとんどないので, 検出波長は 210 nm とした. NM-Col と P-Col の分解物の溶出結果をそれぞれ Fig. 3A と 3B に示す. どちらの結果とも ODS ゲルに未吸着の成分が多量に存在することが示された. 未吸着画分のピーク形状は, NM-Col と P-Col でよく似ていた. このように溶出曲線の全体像は Fig. 3A と 3B で相似であるが, いくつかのピークはその強度が異なった. Figure 3 のピーク 1 と 2 では吸光度の増減が認められ, ピーク 3 と 4 は形状にも変化が確認された.



A: NM-Col の MMP-1 分解ペプチド, B: P-Col の MMP-1 分解ペプチド.

吸光度の増減が見られるおもなピークを各 1~4 に示す. 逆相 HPLC 用カラムは TSKgel ODS-100V, 流速 0.5 mL/min, アセトニトリル濃度勾配 0-40% (10-40 分), 検出波長 210 nm にて分析した.

Fig.3 各コラーゲンの MMP-1 分解ペプチドの逆相 HPLC による分析

4. 考察

キハダマグロとニワトリの皮部から酸可溶性 I 型コラーゲンを抽出し, ペプシンとアクチニダインを用いてテロペプチド領域を限定加水分解した P-Col と NM-Col を調製した. 調製した P-Col と NM-Col は硫酸塩析と陰イオン交換ゲルにより高純度に精製した. ペプシンとアクチニダインの pI は酸性であり, pH 4.0 の酢酸緩衝液ではどちらも負の表面電荷となる. 一方, コラーゲンの pI は中性から弱アルカリ性であり, 同緩衝液では正の表面電荷を示す. そのため, 陰イオン交換ゲルである DEAE-650C は酢酸緩衝液 (pH 4.0) でプタ・ペプシンとアクチニダインを選択的に吸着してコラーゲンをほとんど吸着しない. よって, バッチ法は MMP-1 の酵素反応解析に必要な前工程である. 精製した P-Col には, $\alpha 1$ 鎖, $\alpha 2$ 鎖, β 鎖と γ 鎖が認められ, β 鎖と γ 鎖の量比が高かった. NM-Col では β 鎖と γ 鎖の比率が著しく低く, $\alpha 1$ 鎖が高い量比を占めた. これはアクチニダインが P-Col の分子内架橋結合の内側を切断することにより, β 鎖と γ 鎖の比率が低下したと推察される. P-Col と NM-Col の SDS-PAGE の結果は, これまでの報告とよく一致した^{(14),(16)}.

キハダマグロとニワトリから精製した各コラーゲンに対する MMP-1 の反応特性は大きく異なることが示された. 興味深いことに, キハダマグロでは MMP-1 の分解物 (17-116 kDa) を SDS-PAGE でまったく確認できなかった (Fig. 1). *C. histolyticum* 菌の MMP-1 (10 unit/mL) では, 酵素反応はゆっくりと進行し, 24 時間後でも未分解物が認められた. 一方, *Streptomyces* 菌の MMP-1 (10 unit/mL) では反応開始 5 時間以内にすべてのコラーゲン構成鎖がほぼ分解された. つまり, MMP-1 の反応活性は *Streptomyces* 菌の方が *C. histolyticum* 菌より高く, 菌種による特性が明らかになった. しかし, どちらの SDS-PAGE でも分解物を検出できなかったため, MMP-1 の P-Col と NM-Col に対する特異性を証明することはできなかった. 分解断片が検出できない理由は, 一カ所切断されたキハダマグロ・コラーゲンの立体構造が非常に不安定になることで速やかに 17 kDa 以下にまで分解されるのかもしれない. なぜなら, 魚類のコラーゲンは他の動物のものと比べると, イミノ酸 (プロリン+ヒドロキシプロリン) 含量が相対的に少なく熱安定性が低い. よって, 一カ所が切断されたコラーゲンは瞬時にランダムコイル状の構造に転移すると考えられる.

これは魚類の肉質軟化（コラーゲンの分解に起因する）が死後早期に起こることと関係しているのかもしれない。

MMP-1 のニワトリ・コラーゲンへの反応特異性は菌種により相違のあることが Fig. 2 に示された。*Streptomyces* 菌由来のヤクルトとヤクルト S の分解物の移動度は非常に似ていたが (Fig. 2B と 2C) , *C. histolyticum* 菌 MMP-1 の分解物は, *Streptomyces* 菌 MMP-1 と比較していくつか異なった (Fig. 2A) . *C. histolyticum* 菌 MMP-1 による β 鎖の分解断片は 4 本認められたが, *Streptomyces* 菌 MMP-1 では 2 本少なかった. 興味深いことに, *Streptomyces* 菌 MMP-1 の $\alpha 2$ 鎖と $\alpha 1$ 鎖に対する反応性は同等であったが, *C. histolyticum* 菌 MMP-1 は $\alpha 1$ 鎖への反応性が著しく高いことが示された. この結果は P-Col と NM-Col で同様であった (Fig. 3A). また, α 鎖の分解物の移動度に少差があることと染色度が異なることから, *Streptomyces* 菌と *C. histolyticum* 菌の MMP-1 の特異性はそれぞれ異なると考えられた. キハダマグロ・コラーゲンに比べて分解速度が遅いのは, コラーゲン自体の熱安定性が高く, 容易に 3 重螺旋構造が崩れないことが理由と考えられる. *C. histolyticum* 菌の NM-Col と P-Col に対する反応を比べてみると, $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖間に分解物の有無と染色度の相違が認められた (Fig. 2A の矢尻) . 分解物のバンドは NM-Col にあったが, P-Col には見られなかったので, *C. histolyticum* 菌の MMP-1 が P-Col と NM-Col の立体構造の微小な違いを認識していることを示唆した. これまでに報告された NM-Col と P-Col の生化学的性質の変化⁽¹⁶⁾が, MMP-1 の分解特性とも関係しているのかもしれない. つまり, 分解特性に差が生じる理由は, NM-Col 会合体と P-Col 会合体の構造変化に起因すると推察した.

次にヤクルト S の MMP-1 によるコラーゲン分解物を詳細に調べるため, 逆相 HPLC の測定系を確立した. Fig. 3A と 3B のピーク 1-4 に示すように, P-Col と NM-Col での相違はおもにピーク強度の増減であった. 本実験で用いた方法では, 明らかに異なるピークを検出することができなかった. コラーゲンの各構成鎖は約 1,000 アミノ酸残基から成る. P-Col と NM-Col の差を MMP-1 による分解ペプチドから明らかにするためには, 20-30 アミノ酸残基のポリペプチド断片を得ることが重要である. なぜなら, 長いペプチド断片では数残基の違いを検出するのが難しいと考えられる. また一方, 短すぎると分解物の母集団が多くなり, 目的とするペプチド断片を分離することが困難となる. 20-30 アミノ酸残基であれば, 分取して質量分析計でアミノ酸配列を決定することも可能である. 今後, 最適な分解物を得るためには, MMP-1 の反応温度, 反応濃度, 反応時間などをさらに検討する必要がある.

本研究により, *C. histolyticum* 菌と *Streptomyces* 菌の各 MMP-1 のコラーゲン会合体に対する基質特異性の違いと反応速度の変化が明らかになった. また, *C. histolyticum* 菌 MMP-1 による P-Col と NM-Col 分解断片に差が認められ, P-Col 会合体と NM-Col 会合体の違いが示唆された.

謝辞

本研究を遂行するにあたり, 有益なご助言をいただきました京都大学名誉教授 外村辨一郎先生に深く感謝いたします. また, 本研究のコラーゲン原材料として用いたキハダマグロの皮をご提供いただきました (有) 大井水産と, *Streptomyces* 菌由来の MMP-1 をご提供いただきましたヤクルト薬品工業株式会社に感謝いたします. なお本研究の一部は, 独立行政法人 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C 2 16500307, KM) と近畿大学生物理工学部戦略的研究 No. 04-I-2 の助成を受けています.

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) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) U. Hansen, and P. Bruckner (2003) Macromolecular specificity of collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 37352-37359.
- (6) 来住準一, 早川太郎 (1993) メタロプロテアーゼ (「蛋白質酵素分解 I」生物化学実験法 30, 鶴 大典, 船津 勝編), 130-169 頁, 学会出版センター.
- (7) 岡田保典 (2000) 細胞外マトリックス物質の分解調節 (「細胞外マトリックス-基礎と臨床-」小出 輝, 林 利彦編), 215-230 頁, 愛智出版.
- (8) T. Hayashi, T. Nakamura, H. Hori, and Y. Nagai (1980) The degradation rates of type I, II, and III collagens by tadpole collagenase, *J. Biochem.* **87**, 809-815.
- (9) T. Sasaki, W. Göhring, K. Mann, P. Maurer, E. Hohenester, V. Knäuper, G. Murphy, and R. Timpl (1997) Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J. Biol. Chem.* **272**, 9237-9243.
- (10) B. Lovejoy, A.R. Welch, S. Carr, C. Luong, C. Broka, R. T. Hendricks, J. A. Campbell, K.A.M. Walker, R. Martin, H. Van War, and M.F. Browner (1999) Crystal structures of MMP-1 and -13 reveal the structural basis for selectivity of collagenase inhibitors, *Nature Structural Biology* **6**, 217-221.
- (11) L. Chung, D. Dinakarpanian, N. Yoshida, J.L. Lauer-Fields, G.B. Fields, R. Visse, and H. Nagase (2004) Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO* **23**, 3020-3030.
- (12) M. Sano, I. Nishino, K. Ueno, and H. Kamimori (2004) Assay of collagenase activity for native triple-helical collagen using capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* **809**, 251-256.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 國井沙織, 森本康一 (2005) アクチニダイ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.
- (17) S. Kunii, M. Shibano, T. Saito, 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.
- (18) S. Kunii, M. Shibano, T. Saito, K. Morimoto (2006) SEM observation of neutrophil motility in collagen matrix hydrolyzed by actinidain peptidase, The 16th International Microscopy Congress, Sapporo, Japan.
- (19) U.K. Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

英文抄録

Structural analysis of type I collagen self-assemblies using matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)

Koichi Morimoto¹ and Saori Kuni²

The degradation of type I collagen fibril *in vivo* is most important event in cell invasion, tissue repair, and organ morphogenesis. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) is one of enzyme, which hydrolyzes triple-helical structure of the native collagen. The collagen fragments cleaved by MMP-1 are readily digested to small polypeptides. The enzyme specificity of bacterial MMP-1 would be different among the species. It also depends on molecular structure of the collagen self-assemblies. The digested fragments were investigated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and reverse phase HPLC. Here we report that the structural difference between pepsin-treated collagen and actinidain-treated collagen had influence on the enzymatic activity of MMP-1. The study also shows that the degradation rate of tuna collagen was much faster than that of chicken collagen and MMP-1s produced from *Clostridium histolyticum* and *Streptomyces* were a minimal difference in specificity.

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

2. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

