

# コラゲナーゼ活性の新しい迅速測定法の 検討とその応用

## 第 1 編

### <sup>14</sup>C 標識可溶性コラーゲンを基質とした コラゲナーゼの迅速測定法の検討

岡山大学医学部第 3 内科教室 (主任: 大藤真教授)

寺 戸 国 昭

(昭和51年11月10日受稿)

#### I 緒 言

コラーゲンは生体全蛋白のうちほぼ25%をしめる線維性の蛋白であり、関節、血管、皮膚をはじめ全身の細胞間 matrix の主成分をなしている。この代謝回転は一般に非常におそく、その半減期はラット尾の腱や皮膚では数百日も云われているが、一方、オタマジャクシの変態時の尾ヒレや分娩後の子宮にみられるように数日間で急激に分解吸収が起ることもある<sup>1)</sup>。このコラーゲンの代謝に関与する酵素がコラゲナーゼである。コラゲナーゼは生理的条件下で3本鎖ラセン構造をとるコラーゲン分子をN末端より $\frac{3}{4}$ の位置で2つに分解する非常に特異性の高い protease である<sup>2)</sup>。

コラゲナーゼは1962年、Gross ら<sup>3)</sup>によりオタマジャクシの皮膚培養液中にみいだされて以来、種々の動物のあらゆる組織に存在することが明らかにされてきた<sup>4,5)</sup>が、それに伴い、各種の結合組織疾患との関係も急速に注目されるようになった。現在、コラゲナーゼ活性が異常に上昇する疾患として、先天性表皮水疱症、歯周困炎、角膜混濁、悪性腫瘍、胃潰瘍、肝硬変症および慢性関節リウマチなどが知られているが<sup>6)</sup>、コラゲナーゼ活性発現やその抑制の機構は十分に明らかにされていない。これらの疾患におけるコラゲナーゼの産生およびその活性の制御機構を解明することは、これらの結合組織疾患の発生機構の理解につながり、ひいてはその治療法の確立にもつながるものと思われる。

このためには、まずコラゲナーゼ活性を容易にし、

かも正確に測定する方法が必要である。現在、もっとも広く用いられているコラゲナーゼ活性測定法は、<sup>14</sup>C標識コラーゲンの再生線維を基質とし、酵素作用により溶出される放射活性を測定する方法<sup>9)</sup>である(以下ゲル法と略す)。この方法は感度がよく、しかもコラゲナーゼに特異的であり、同時に多数の試料を測定することができる点ですぐれている。しかしながら、このゲル法は、1) 酵素活性測定前に基質として用いるコラーゲンの再生線維形成に2時間以上かかること、2) 用いた<sup>14</sup>C標識コラーゲンの15~20%が可溶性として残り、background が高く、しかも pH、イオン強度、温度および試料中の夾雑物によって影響をうけること、3) 酵素活性と酵素量の間で直線関係を示す範囲が狭いこと、などの欠点を有している。

このため、可溶性コラーゲンを基質として溶液中で酵素と反応させ、阻害剤を加えて反応を停止した後、温度を37℃に上げてコラーゲンの線維を形成させ、酵素作用に伴う線維形成の減少度より酵素活性を測定する溶液反応による測定法が考案されている<sup>6,7)</sup>。しかし、反応後のコラーゲン再生線維の形成は、試料中に含まれる夾雑物や塩濃度に大きく左右されるため、この方法の適用はごく限られた試料のみに限定され、一般的ではない。

一方、コラーゲンの線維化機構の研究よりコラーゲンは高濃度の glucose 存在下では、中性 pH 領域でも37~40℃で線維化せず、安定に溶存状態を保つことが林ら<sup>8,9)</sup>により明らかにされた。したがって、コラーゲンの線維化を阻害するため、glucose を添

加した緩衝液中でコラーゲンとコラーゲナーゼを反応させた後、その分解産物を選択的に抽出することが可能であれば、溶液反応により高感度にコラーゲナーゼ活性を測定できるはずである。

本報告は、溶液反応を用いたコラーゲナーゼ活性測定法を開発するため、まずモデル実験として、未変性および変性コラーゲンの各種濃度の dioxane に対する溶解度を調べ、次にその溶解度の差を利用し、オタマジャクシコラーゲナーゼによるコラーゲンの分解産物を選択的かつ定量的に抽出することを検討したものである。

## II 実験材料

### <sup>14</sup>C-glycine 標識コラーゲン

コラーゲナーゼの基質として用いた <sup>14</sup>C-glycine 標識モルモット皮膚コラーゲン (比活性 1200 cpm/mg) は永井らの方法<sup>10)</sup>により <sup>14</sup>C-glycine を投与したモルモット皮膚より抽出精製し、最終濃度 0.4% (W/V) となるように 0.005 M 酢酸に溶解し、4℃で実験に供するまで保存した。

従来のゲル法によるコラーゲナーゼ活性測定<sup>6)</sup>には、0.2mlの0.4% <sup>14</sup>C標識コラーゲン溶液に0.4 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>を含む0.1 M Tris-HCl緩衝液 pH 7.8 (以下0.1 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>と略す)を0.2ml加え、よく混合したのち35℃で一昼夜 incubation し、線維形成を行なったものを基質として用いた。

また、溶液反応によるコラーゲナーゼ活性測定には、0.1mlの0.4% <sup>14</sup>C標識コラーゲン溶液に対し、35℃、中性 pH 領域におけるコラーゲンの線維形成を防ぐため、1 M glucose を加えた上記 0.1 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>緩衝液 (以下 0.1 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>-glucose と略す) 0.1 ml を加え混合したものを基質とした。

さらに、コラーゲンの dioxane への溶解度を測定するためには、上記 0.2% コラーゲン溶液 0.2 ml に、0.2 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.8 (以下 0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> と略す) 0.2 ml を加え、計 0.4 ml/管として用いた。

### オタマジャクシコラーゲナーゼ

永井らの方法<sup>10)</sup>に従い、オタマジャクシ皮膚を Tyrode 培養液中で 3 日間培養し、その培養液を Diaflow で約 10 倍に濃縮後、0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> に一昼夜透析したものを粗酵素として用いた。

また、精製コラーゲナーゼは、粗酵素を acrylamide gel 中に固定したコラーゲンを支持体とした affinity

chromatography により分離したのち、Sephadex G-75 surperfine column chromatography により作製した<sup>10)</sup>

### o-phenanthroline 溶液

コラーゲナーゼ活性を阻害し、反応を停止するため、o-phenanthroline<sup>11)</sup> を 80 mM となるように 50% dioxane/water に溶解したものをを用いた。

## III 方 法

### 原 理

溶液法によるコラーゲナーゼ活性測定の原理は、1) コラーゲンの線維化を防止し溶液状態に保つために、glucose を添加した緩衝液中で、コラーゲンの変性温度以下でしかも TC<sup>A</sup> (コラーゲンのコラーゲナーゼによる分解産物の 3/4 fragment) の変性温度以上の温度で、<sup>14</sup>C標識コラーゲンとコラーゲナーゼを反応させ、2) コラーゲナーゼの阻害剤を添加して反応を停止後、分解産物のみを選択的に変性し、3) 変性した分解産物を室温にて有機溶媒 (dioxane) により選択的に抽出し、抽出された放射活性よりコラーゲナーゼ活性を測定するものである。

### <sup>14</sup>C標識可溶性コラーゲンを基質としたコラーゲナーゼ活性の測定 (溶液法)

glucose を含む <sup>14</sup>C標識コラーゲン溶液 (実験材料の項参照) 0.2 ml に任意の酵素量を含む 0.2 ml の 0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> を加え、35℃で一定時間反応後、20 μl の 80 mM o-phenanthroline 溶液を加え反応を停止した。反応停止後、さらに 35℃で 60 分間 incubation し、分解産物を変性後、室温に冷却し、0.4 ml の dioxane を加え激しく攪拌したのち、6000 rpm で 10 分間遠沈し、残った未分解コラーゲンを沈澱せしめた。その上清 0.5 ml を 10 ml の Bray 溶液<sup>12)</sup> に加え、放射活性を測定した。

### <sup>14</sup>C標識コラーゲンの再生線維を基質としたコラーゲナーゼ活性の測定 (ゲル法)

永井らの方法<sup>6, 10)</sup>に従い、<sup>14</sup>C標識コラーゲンの再生線維から溶出される放射活性より、コラーゲナーゼ活性を測定した。すなわち、0.4 ml のコラーゲンゲル (実験材料の項参照) に 0.2 ml の酵素を含む 0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> を加え、35℃または 37℃で一定時間反応後、6000 rpm で 10 分間遠沈し、その上清中の放射活性を測定した。

### disk 電気泳動

コラーゲン分解産物の disk 電気泳動は永井らの方法<sup>11)</sup>に従って行なった。

蛋白の定量

Lowry らの方法<sup>14</sup>に従い、ウシ血清アルブミンを標準物質として行なった。

IV 結 果

(1) 未変性コラーゲンと変性コラーゲンの dioxane による分別抽出

dioxane は放射活性を測定する際の scintillator の溶媒として、Bray 溶液に使用されており、放射活性測定の際、quenching を起さない有機溶媒である。そこで、dioxane を用い、未変性コラーゲンと変性コラーゲンの分別を試みた。0.1%の<sup>14</sup>C標識未変性および熱変性コラーゲン溶液 0.4ml に dioxane を順次加えていき、その上清中の放射活性を測定することにより、未変性と変性コラーゲンの各濃度の dioxane 溶液中への両者の溶解度を測定し、比較した(図1)。

pH7.8では、未変性コラーゲンは最終 dioxane 濃度 33%で完全に沈澱するのに対し、変性コラーゲン(45℃, 10分間)は dioxane 濃度 50%まで可溶性であり、それ以上の dioxane 濃度で一部沈澱した(図1-a)。

一方、酸性 pH下では、両者共 dioxane 濃度 60%まで可溶性であり、両者を分別する条件は得られなかった(図1-b)。

以上の結果から、未変性コラーゲンと変性コラーゲンは pH7.8 で 33~50% dioxane 溶液への溶解度の差を利用し、分別可能であることが推察されたので、次に pH7.8 で両者の 50% dioxane への溶解度を測定した。結果は図2-a に示したごとく、未変性コラーゲンは 10~400 μg までまったく 50% dioxane に溶解しないのに対し、変性コラーゲンは 10~400 μg まで定量的に溶解した。

同様に、未変性と変性コラーゲンの混合溶液に等量の dioxane を加え、変性コラーゲンを抽出したところ、50% dioxane 中では変性コラーゲンは未変性コラーゲンと共沈することなく、上清中に定量的に回収された(図2-b)。

さらに、50% dioxane による変性コラーゲンの抽出に対するコラーゲン以外の蛋白の影響をみた。オタマジャクシ皮膚培養液より得た 1.7 mg の蛋白を加えた<sup>14</sup>C標識変性コラーゲン溶液からの 50% dioxane により抽出された放射活性の回収率は 99%であり、多量の粗蛋白の存在下でも、定量的に<sup>14</sup>C標識変性コラーゲンは 50% dioxane により抽出されることが明らかとなった。

(2) 未変性コラーゲンの 50% dioxane への溶解度に対する温度の影響

室温下では、pH7.8 の<sup>14</sup>C標識コラーゲン溶液に等量の dioxane を加えても、その上清中にはほとん

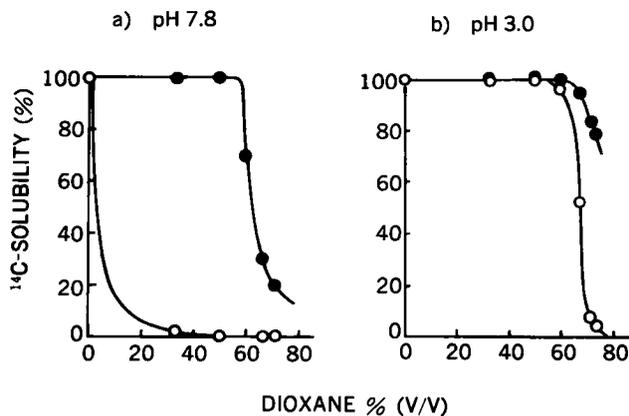


図1 中性および酸性下での未変性コラーゲンと変性コラーゲンの種々濃度の dioxane への溶解度の比較

0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>-glucose (a) および 0.05 M 酢酸 (b) に溶解した 0.1 %, <sup>14</sup>C 標識コラーゲン (2400 cpm/mg) 溶液 0.4ml に室温にて、図に示した濃度となるよう dioxane を加え、激しく攪拌後、6000 rpm で 10 分間遠沈し、上清に抽出された放射活性を測定した。

○：未変性コラーゲン

●：熱変性コラーゲン (45℃ 10分)

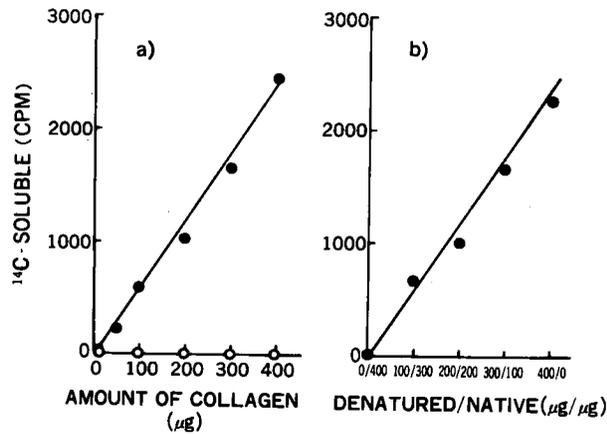


図2 pH7.8における50% dioxane への変性コラーゲンの溶解度

10~400  $\mu\text{g}$  の  $^{14}\text{C}$  標識未変性(○)または変性コラーゲン(●)を含む0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>-glucose 溶液(a), および未変性コラーゲンと変性コラーゲンの混合溶液(b)それぞれ0.4 ml に等量の dioxane を加え, 図1に示した方法により上清中に抽出される放射活性を測定した。

ど放射活性は抽出されない。しかし, 酵素活性は一般に25~37℃で行なわれるため, 反応終了後, dioxane を加え分解産物を抽出する際, 残存する未反応のコラーゲンが抽出されない条件を選択する必要がある。

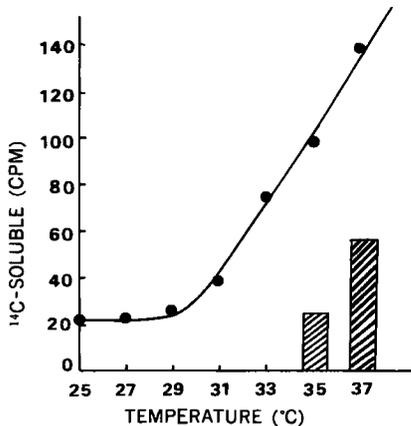


図3 pH7.8における未変性コラーゲンの50% dioxane への溶解度に対する温度の影響

0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>-glucose に溶解した0.1%  $^{14}\text{C}$  標識コラーゲン(480 cpm/400  $\mu\text{g}$ ) 溶液0.4 ml をそれぞれ図に示した温度で2時間 incubation 後, 同じ温度にあらかじめあたためた dioxane を0.4 ml 加え, 上清中の放射活性を測定した。また35°Cおよび37°Cで2時間 incubation 後, 25°Cに冷却し, 25°Cの dioxane を加え抽出された放射活性は bar で示した。

未変性コラーゲンの50% dioxane への溶解度に対する温度の影響を調べた。その結果は図3に示したごとく, 未変性コラーゲンは25~29℃ではまったく50% dioxane には不溶(480 cpmのうち20 cpm)であったが, 29℃以上では温度が高くなるに従って溶解度が増し, 35℃では約20%, 37℃では約29%が溶解した。このため, 変性コラーゲン(酵素による分解産物)の抽出は29℃以下で行なう必要があることが明らかとなった。

一方, 未変性コラーゲン溶液を35℃で2時間 incubation した後, 25℃に冷却後, 等量の dioxane を加え抽出すると, 可溶性放射活性は約5%であり(図中 bar で示した), 25℃で直接抽出される値と変化なかった。しかし, 37℃では冷却後も約14%が可溶化され, コラーゲンの一部が変性している可能性が推察された。

### (3) コラーゲン分解産物の変性と50% dioxane による抽出

以上述べてきたごとく, 50% dioxane は変性コラーゲンの選択的抽出に適した溶媒であり, この system をコラーゲナーゼ活性の測定に応用するため, (i) o-phenanthroline によるコラーゲナーゼの反応停止, (ii) コラーゲナーゼによるコラーゲン分解産物の選択的変性条件とその抽出につき検討した。

(i) o-phenanthroline によるコラーゲナーゼの阻害

一般にコラゲナーゼの反応停止には  $\text{Ca}^{++}$  のキレート剤である EDTA<sup>9)</sup> が使用されているが、EDTA は Bray 溶液に不溶性であるため、白濁し放射活性測定効率を著しく低下させる。このため、Bray 溶液に可溶性の o-phenanthroline<sup>10)</sup> を用い検討した。

すなわち、400  $\mu\text{g}$  の <sup>14</sup>C 標識コラーゲンとオタマジャクシコラゲナーゼの反応液に o-phenanthroline を 0 ~ 4 mM となるように加え、35°C で 2 時間反応後、ただちに室温に冷却し、等量の dioxane を加え、その上清に抽出された放射活性を測定した。その結果は図 4 に示したごとく、o-phenanthroline は 1 mM ではほぼ完全にコラゲナーゼを阻害することが明らかとなったので、安全度をみて、反応停止には 0.4 ml の反応液に対し、80 mM o-phenanthroline 溶液 20  $\mu\text{l}$  (最終濃度 4 mM) を加えることとした。

(c) コラゲナーゼによるコラーゲン分解産物の 35°C における変性時間と 50% dioxane による抽出

コラーゲンの分解産物の変性が起らない 25°C で精製オタマジャクシコラゲナーゼと <sup>14</sup>C 標識コラーゲンを反応し、o-phenanthroline を加え反応を停止後、35°C で 0 ~ 120 分 incubation し、室温に冷却後、等量の dioxane を加え、変性して 50% dioxane 可溶性となる分解産物の増加を時間を追って測定した。

その結果、酵素反応停止直後では、分解産物は未変性であるため、まったく放射活性は 50% dioxane

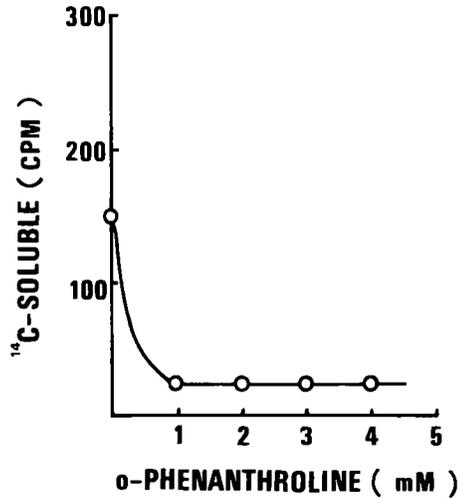


図 4 o-phenanthroline によるコラゲナーゼ阻害

10  $\mu\text{l}$  のオタマジャクシ粗コラゲナーゼと 400  $\mu\text{g}$  の <sup>14</sup>C 標識コラーゲンを、最終濃度 0 ~ 4 mM となるよう o-phenanthroline を添加した 0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>-glucose 緩衝液 (pH 7.8) 中で 35°C、2 時間反応後、室温にて等量の dioxane を加え、図 1 に示した方法により上清中に抽出された放射活性を測定した。

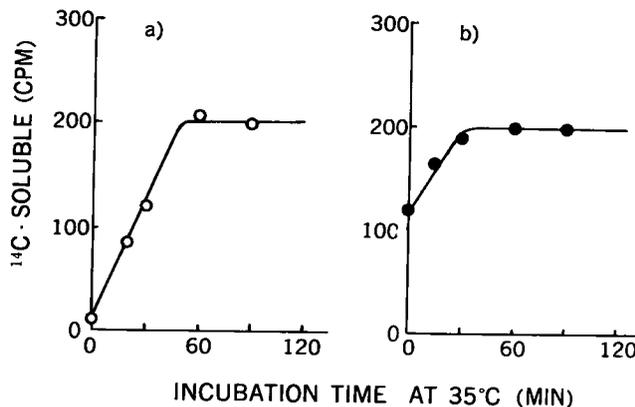


図 5 コラゲナーゼによるコラーゲン分解産物の 35°C における変性

<sup>14</sup>C 標識コラーゲン (480 cpm/400  $\mu\text{g}$ ) を精製 (○) および粗コラゲナーゼ (●) とそれぞれ 25°C で 22 時間 (a)、および 35°C で 1 時間 (b) 反応させ、20  $\mu\text{l}$  の 80 mM o-phenanthroline 溶液を加え反応を停止後、35°C で 0 ~ 120 分 incubation し、室温 (22 ~ 28°C) にもどした後、等量の dioxane を加え、変性し上清に可溶化された放射活性を測定した。

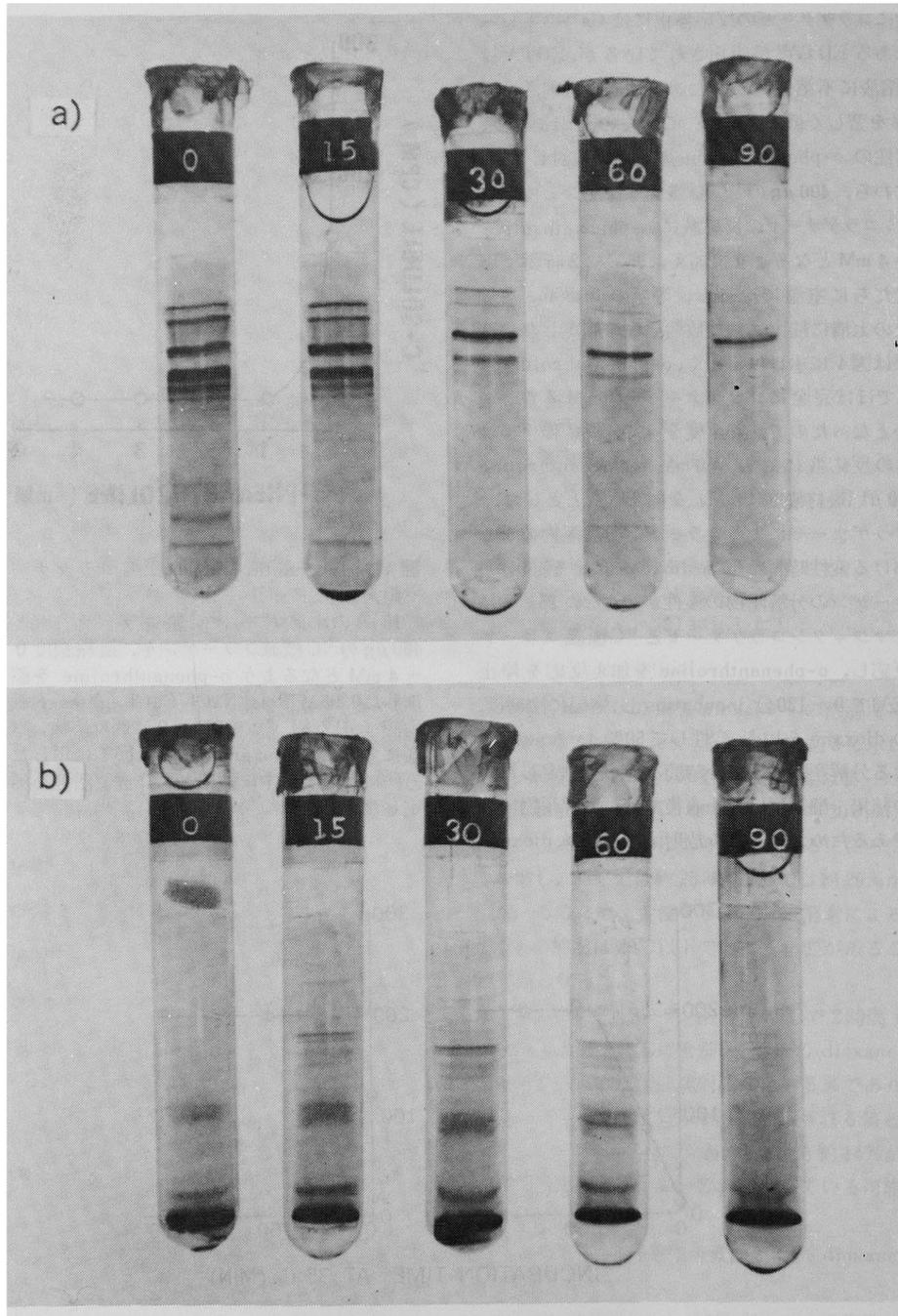


図6 50% dioxane 抽出および沈澱画分の disk 電気泳動 pattern

図5—bの(●)に対応する50% dioxane 抽出沈澱画分(a)と上清画分(b)をそれぞれ7.5% acrylamide gel を用い、pH 2.3 disk 電気泳動を行なった。沈澱画分は0.4ml の glycine-酢酸緩衝液 pH 4.0 に溶解後、45℃で10分間あたため、コラーゲンを変性後、泳動を行なった。また上清画分は dioxane を除去せず、そのまま泳動にかけた。

により抽出されなかった (図5-a, 0時間). しかし, 反応停止後, 35°Cで incubation すると, コラーゲンの分解産物は変性して50% dioxane に抽出されるようになり, 抽出される放射活性は60分 で plateau となった (図5-a).

これに対し, 酵素反応を35°Cで行なった時, 反応停止直後でもかなりの放射活性が50% dioxane 可溶性であった (図5-b, 0時間). しかし, 分解産物の一部はまだ未変性で残存するので, 分解産物を完全に変性させるために, 反応停止後さらに30~60分, 35°Cで incubation する必要があることが, 図

5-bより明らかとなった.

上述した結果をさらに確認するため, 図5-b (オタマジャクシ粗酵素反応物) に示した50% dioxane 可溶性画分と沈澱画分をそれぞれpH2.3の disk 電気泳動により分析した. その結果は図6に示したごとく, コラーゲン分解産物は, 35°Cで変性が進むに従って, 沈澱画分より上清画分に移行するのに対し, 未分解のコラーゲンは $\alpha$ および $\beta$  bandとも, 35°Cで60~90分 incubation しても変性せず, 50% dioxane の沈澱画分に残ることが明らかとなった.

(4) 溶液法とゲル法によるオタマジャクシコラーゲナ

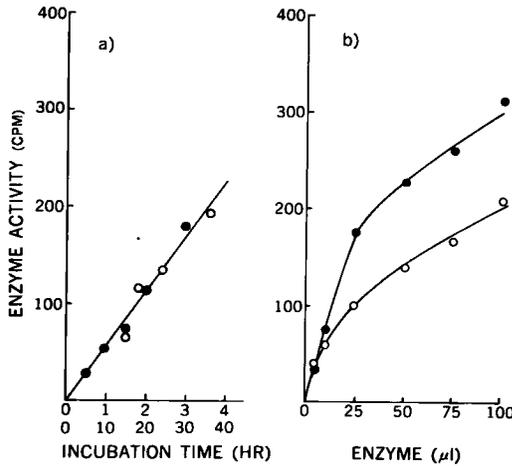


図7 ゲル法と溶液法によるオタマジャクシ精製コラーゲナーゼ活性の比較

(a) 10 $\mu$ lの酵素溶液を用い, 35°Cで溶液法(●)は1~4時間, ゲル法(○)は10~40時間それぞれ反応した.

(b) 10~100 $\mu$ lの酵素溶液を用い, 35°Cで溶液法(●)は2時間, ゲル法(○)は20時間それぞれ反応した.

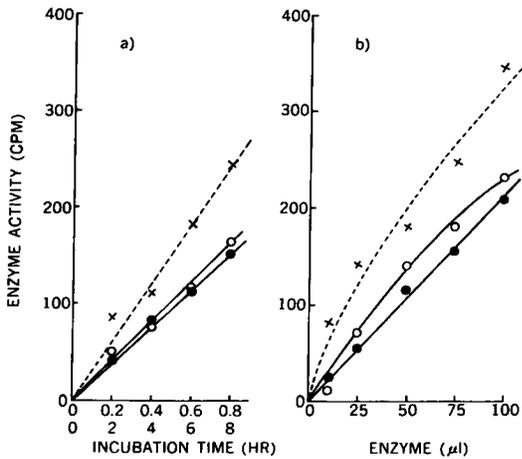


図8 ゲル法と溶液法によるオタマジャクシ粗コラーゲナーゼ活性の比較

オタマジャクシ皮膚培養液を粗酵素として用いた. (a) 25 $\mu$ lの酵素溶液を用い, 35°Cで溶液法(●)は0.2~0.8時間, ゲル法(○)は2~8時間反応した. (b) 10~100 $\mu$ lの酵素溶液を用い, 溶液法(●)は0.4時間, ゲル法(○)では4時間それぞれ反応した. また同じ酵素溶液を用い, ゲル法により37°Cで反応したものを(×)で示した.

### ーゼ活性測定と比較

以上述べてきたごとく、可溶性<sup>14</sup>C標識コラーゲンを基質とし、その分解産物を50% dioxaneにより選択的に抽出し、抽出された放射活性よりコラーゲナーゼ活性を測定することが可能となった(実験方法の項参照)。そこで400 μg/管の<sup>14</sup>C標識コラーゲンを基質としたこの溶液法と、従来の<sup>14</sup>C標識コラーゲンの再生線維(800 μg/管)を基質とするゲル法を、オタマジャクシの精製および粗コラーゲナーゼの両方を用いて、35℃でそれぞれ比較した。

その結果、図7—aおよび8—aに示したごとく、酵素の純度に関係なく、反応時間と酵素活性の間には、両方法ともよい直線性が得られた。しかし、溶液法では、その反応時間はゲル法の10分の1で、同じレベルの活性が測定された。

また、酵素量と酵素活性の間にも、溶液法は使用する基質量がゲル法の半分量であるにもかかわらず、ゲル法より広い範囲で直線性が得られた(図7—bおよび8—b)。

一般に、ゲル法においては、酵素活性は37℃で測定が行なわれており、オタマジャクシ粗コラーゲナーゼ活性をゲル法により37℃で測定した時の値を35℃と比較した。その結果は図8—a, bに点線で示したごとく、反応速度は35℃に比較して約40%高くなったが、反応時間および酵素量と酵素活性の間の直線性に関しては、35℃のそれとかわりはなかった。

## V 考 察

ここに述べた溶液反応を用いたコラーゲナーゼ活性測定法は、従来の固一液相反応を用いたゲル法に比し、backgroundが低く、反応速度が約10倍大きいだけでなく、反応系が均一であるため、酵素量と酵素活性の間により広い直線性が得られた。さらにゲル法では、温度、pHおよび種々の夾雑物により、コラーゲンの再生線維の溶解が起り、ある一定の条件以外では正しいコラーゲナーゼ活性を測定することが困難であるが、溶液法では、コラーゲンの変性の起らない35℃以下の任意の温度、さらに分解産物のdioxane抽出時に反応液を中性に合せる操作さえ行なえば、中性以外のpHでもコラーゲナーゼ活性を正しく測定することが可能である。

また、ゲル法では、酵素活性を測定しようとする試料中に含まれる夾雑物のすべてが、放射活性測定時にBray溶液に加えられるが、溶液法では、酵素による分解産物を最終濃度50%のdioxaneにより

抽出するため、試料中の夾雑物の多くが除去され、放射活性は低quenching、高効率で測定することができる。

一方、コラーゲンの再生線維形成防止のため、glucoseを加えたpH7.8のコラーゲン溶液を25℃および35℃で16時間incubationしても、コラーゲンの変性は起らず、50% dioxaneに抽出される放射活性は480 cpm/管中、約20~25 cpmである。しかし、37℃で2時間incubationしたものは約70 cpmが50% dioxaneに抽出されるようになり、このため、コラーゲナーゼ活性測定のための反応温度は35℃がもっとも適していると考えられる。

一方、可溶性コラーゲンは線維性コラーゲンに比し、コラーゲナーゼ以外の他のproteaseに対する抵抗性は弱いものと推定される。しかし、ここで述べた実験条件下では、400 μgの<sup>14</sup>C標識可溶性コラーゲンに対し、0.002~0.2 μgの精製ウシtrypsinを35℃、4時間反応させた時、50% dioxaneに抽出される放射活性は約20~50 cpmで、これはコラーゲン分子そのものが分解されることよりも、コラーゲン分子のN末端に存在するtelopeptideが切断され、抽出されてくるものと考えられる。そこで試料中に含まれるコラーゲナーゼ以外のproteaseによる影響を少なくするためには、あらかじめ、trypsin処理によりtelopeptideを除いた<sup>14</sup>C標識コラーゲンを基質として用いた方がよいと考えられる。しかしながら、コラーゲナーゼ以外の中性proteaseを含むオタマジャクシの皮膚培養液(粗コラーゲナーゼ)およびそれよりaffinity chromatographyにより単離した精製コラーゲナーゼを用い、ゲル法と溶液法を比較した場合、図7および図8に示したように、その反応速度はコラーゲナーゼの精製度に関係なく、1:10であり、粗酵素液に含まれるコラーゲナーゼ以外のproteaseの影響は無視しえるものと考えられた。

以上のことから、ここに新しく開発した溶液法は、従来のゲル法と比較して反応時間を短縮することができ、しかもbackgroundが小さく、また、酵素量と酵素活性の直線性も明確でかつ広く、さらに試料中に含まれる夾雑物の影響もより少ないと考えられ、ゲル法の代りに、または補足的にコラーゲナーゼ活性測定に利用されうるものと考えられる。

## VI 結 語

1) <sup>14</sup>C標識未変性および熱変性コラーゲンを用い、種々の濃度のdioxane溶液へのそれぞれの溶解度を

測定した。その結果、pH7.8では未変性コラーゲンは33~50% dioxane にはまったく不溶性であるのに対し、変性コラーゲンは可溶性であり、両者を分別抽出することができた。これを利用し、溶液反応によるコラゲナーゼ活性の新しい迅速測定法を考案した。

2) この溶液法の原理は、基質である<sup>14</sup>C 標識コラーゲン(400 μg/管)の線維化を防止するため、0.25 M の glucose を含む緩衝液中で酵素反応を行ない、o-phenanthroline で反応を停止後、35℃でその分解産物のみを選択的に変性し、等量の dioxane を加え、その上清中に抽出される放射活性を測定するものである。

3) オタマジャクシの皮膚培養液およびそれより精製純化したオタマジャクシコラゲナーゼを用い、従来の<sup>14</sup>C 標識コラーゲンの再生線維(800 μg/管)を

基質とするゲル法と35℃で比較したところ、溶液法は酵素の精製度に関係なく、反応速度はゲル法の約10倍であり、酵素量と酵素活性の直線性の得られる範囲も2倍以上広がった。

#### 謝 辞

本研究の遂行に当り、御指導ならびに御校閲を賜りました恩師大藤真教授ならびに山本伸郎博士に深謝致します。また、直接御指導下さいました河西浩一講師はじめ、教室員各位に感謝致します。

また、長年に亘り御教示下さり、研究の機会を与えて下さいました東京医科歯科大学・難治疾患研究所、永井裕教授ならびに<sup>14</sup>C 標識コラーゲンおよび精製オタマジャクシコラゲナーゼを恵与下さいました掘久枝氏に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Woessner, J. F. Jr. : Biological Mechanism of Collagen Resorption. In Treatise of Collagen ed. by Gould, B. S. Vol 2, Part B, Academic Press London and New York. p. 253, 1968.
- 2) Kang, A. H., Nagai, Y., Piez, K. A. and Gross, J. : Studies on the Structure of Collagen Utilizing a Collagenolytic Enzyme from Tadpole. *Biochemistry*, **5**, 509-515, 1966.
- 3) Gross, J. and Lapiere, C. M. : Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues : A Tissue Culture Assay. *Proc. N. A. S.*, **48**, 1014-1022, 1962.
- 4) Harris, E. D. Jr. and Krane, S. M. : Collagenase. *New Eng. J. Med.*, **291**, 557-563, 1974.  
       ibid            **291**, 605-609, 1974.  
       ibid            **291**, 652-661, 1974.
- 5) Montfort, I. and Pérez-Tamayo, R. : The Distribution of Collagenase in Normal Rat Tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 910-920, 1975.
- 6) Nagai, Y., Lapiere, C. M. and Gross, J. : Tadpole Collagenase. Preparation and Purification. *Biochemistry*, **5**, 3123-3130, 1966.
- 7) Sakamoto, S., Goldhaber, P. and Glimcher, M. J. : A New Method for the Assay of Tissue Collagenase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**, 1057-1059, 1972.
- 8) Hayashi, T. and Nagai, Y. : Increased Amount of Soluble Collagen by New Extraction Methods and Its Relation to the Nature of Associating Forces Among Collagen Molecules. *Conn. Tiss. Res.*, **1**, 39-46, 1972.
- 9) Hayashi, T. and Nagai, Y. : Effect of pH on the Stability of Collagen Molecules in Solution. *J. Biochem. (Tokyo)*, **73**, 999-1006, 1973.
- 10) Nagai, Y. and Hori, H. : Entrapment of Collagen in a Polyacrilamide Matrix and Its Application in the Purification of Animal Collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 564-573, 1972.
- 11) Werb, Z. and Burleigh, M. C. : A Specific Collagenase from Rabbit Fibroblasts in Monolayer

- Culture. *Biochem. J.*, **137**, 373-385, 1974.
- 12) Bray, G. A. : A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting Aqueous Solutions in a Liquid Scintillation Counter. *Anal. Biochem.*, **1**, 279-285, 1960.
- 13) Nagai, Y., Gross, J. and Piez, K. A. : Disk Electrophoresis of Collagen Components. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121** (Art. 2), 494-500, 1964.
- 14) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.

**A new rapid assay method of collagenase activity  
and its clinical applications**

**Part 1. A rapid assay method of collagenase activity  
using  $^{14}\text{C}$ -labeled soluble collagen as substrate**

**Kuniaki TERATO**

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Tadashi Ofuji)

A rapid assay method of collagenase activity has been developed using  $^{14}\text{C}$ -labeled soluble collagen as substrate. This method is based on following three parts; first, carrying out the enzyme reaction with  $^{14}\text{C}$ -labeled collagen in solution containing 0.25M glucose to prevent collagen fibril formation at 35° C under neutral condition, second, denaturation of the enzyme digestion products at 35° C for 1hr after stopping the reaction by adding o-phenanthroline and third, selective extraction of the denatured  $^{14}\text{C}$ -products into dioxane at a final concentration of 50% and counting  $^{14}\text{C}$ -activity in the supernatant. The rate of the reaction was about 10 times higher than that obtained by the conventional method using reconstituted collagen fibrils as substrate and relationship between enzyme activity and enzyme concentration was linear over a wider range regardless of the purity of collagenase.