

抗ヒラメ V 型コラーゲン抗体の作製

木宮 隆¹・久保田 賢¹・河野 礼也¹・豊原 治彦²・森岡 克司¹・伊藤 慶明¹

(¹農学部栽培漁業学科水産利用学研究室・²京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋生物機能学研究室)

Preparation of Polyclonal Antibody against Japanese Flounder Type V Collagen

Takashi KIMIYA¹, Satoshi KUBOTA¹, Michiya KOHNO¹, Haruhiko TOYOHARA²,
Katsuji MORIOKA¹, and Yoshiaki ITOH¹

¹ *Laboratory of Aquatic Product Utilization, Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture;*

² *Laboratory of Marine Biological Function, Division of Applied Biosciences, Graduate School of Kyoto University*

Abstract : We prepared a polyclonal antibody against Japanese flounder type V collagen to clarify the contribution of degradation of type V collagen to the post-mortem softening of fish muscle during chilled storage. Intact type V collagen was isolated from acid-soluble collagen preparation of Japanese flounder muscle by two steps of ion-exchange chromatographies and immunized to a rabbit. Reactivity of the antiserum with type V collagen increased with immunizations. However, the antiserum also recognized type I collagen, a quantitatively major constituent of connective tissue. To remove the cross-reactivity with type I collagen, anti-type V collagen antibody was purified from the antiserum by using affinity columns coupled with type I and V collagens. The purified antibody recognized only type V collagen but not type I collagen. This result suggests that the antibody is able to detect the type V collagen degradation, causing post-mortem softening of fish muscle.

Keywords : fish muscle, Japanese flounder, polyclonal antibody, type V collagen

緒 言

わが国では、刺し身やすしなどに代表されるように、魚介肉がしばしば生で食べられてきた。生の魚肉は、加熱した魚肉に比べて咀嚼したときに組織から液汁が分離しにくいことから、風味が比較的弱いと考えられている¹⁾。そのため、テクスチャーが重要視され、特にマダイやヒラメのような白身の魚肉の食感は、プリプリしたものが好まれる傾向にある²⁾。この食感は、活け造りのように魚をメた直後に最も顕著である。一般に、魚は品質保持のため低温で流通される。しかし、多くの魚種では冷蔵している場合ですら、筋肉が死後速やかに軟化することが知られている³⁾。したがって、生食用魚肉の食感を維持するためには、この軟化現象の解明が不可欠であり、それに関する研究が数多く行われてきた。

ANDO ら^{4,5)}は、冷蔵中の魚肉組織のどの部分の変化が軟化に寄与するかを知る目的で、咀嚼を模して魚肉に一定の荷重を加えた後、光学顕微鏡により構造の変化を観察した。その結果、即殺直後の魚肉では顕著な構造の崩壊は観察されなかったが、冷蔵後のそれでは筋線維間に間隙が生じることを見出している。この部分には結合組織が存在しており、その主要な構成タンパク質はコラーゲンである。それらは線維を形成して筋肉の物理的強度を保持していると考えられている。SATO

ら⁶⁾は、冷蔵魚肉の透過型電子顕微鏡観察により、筋線維間の微細な結合組織である筋内膜中のコラーゲン細線維は崩壊するが、より大きな結合組織である筋隔膜中のそれは顕著な変化を示さないことを明らかにした。また、顕著な軟化を示さないトラフグでは、筋内膜中のコラーゲン細線維でさえ目立った構造変化は観察されていない⁶⁾。これらの結果から、魚肉の冷蔵中に筋内膜中のコラーゲン細線維が崩壊して同組織の脆弱化をもたらし、軟化が生じると推察された。

現在、脊椎動物では20以上のコラーゲン分子種が確認されており、そのうちI、IIIおよびV型コラーゲンが筋肉内の線維性コラーゲンとして分類されている⁷⁾。一方、魚類の筋肉内結合組織では、III型コラーゲンに関する報告は無いが、I型およびV型コラーゲンの存在が確認されている⁸⁾。一般に線維性コラーゲン分子は、中央部の3重らせん領域とその両端に位置する非らせん領域（テロペプチド）から構成されており、分子同士が側方で結合して線維構造を形成している⁷⁾。魚肉の免疫組織化学的研究により、I型コラーゲンは筋隔膜、V型コラーゲンは筋内膜に局在することが示されている³⁾。

SATO ら^{6,9,10)}は、冷蔵により魚肉中のV型コラーゲンの溶解性が特異的に上昇することを複数の魚種で見出している。また、V型コラーゲンのテロペプチドが冷蔵中に分解されることも報告している¹⁰⁾。さらに最近、筋肉内V型コラーゲン含量が高い魚種の方が、軟化の速度が速いことも示された¹¹⁾。以上のことから、冷蔵中に筋内膜中のV型コラーゲンが特異的な変化を受け、コラーゲン細線維の崩壊を引き起こすことにより軟化が生じると結論付けられている。

V型コラーゲンは量的にマイナーな成分であることから、これまではV型コラーゲンの部分精製もしくはクロマトグラフィーを用いた精製が行われ、その含量や電気泳動像の死後変化が調べられてきた^{6,9-12)}。しかしながら、冷蔵中に何らかの構造変化を受けた場合、性質が変化し精製過程で廃棄される画分へ移行してしまう可能性がある。そのため、冷蔵中に生じるV型コラーゲンの変化を網羅的に検討するには、筋肉の粗抽出液中のV型コラーゲン分子あるいはその分解断片を直接検出することが不可欠となる。そこで本研究では、冷蔵中の軟化が観察されていること^{5,13)}、白身魚であることや商業的価値が高いこと等の理由からヒラメを対象魚とし、そのV型コラーゲンを特異的に認識するポリクローナル抗体の作製を試みた。

実験方法

供試魚 市販の養殖ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*, 体長 32-42cm, 体重 412-880g) を供試した。ヒラメは即殺後、氷蔵して実験室に持ち帰った。直ちにフィレーに加工した後、ミンサーを2回通してミンチにした。

試薬 生化学用のペプシン(ブタ胃製)、5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate *p*-toluidine salt (BCIP), nitroblue tetrazolium (NBT), 化学用の polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20), 電気泳動用の ammonium peroxodisulfate, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, *N,N'*-methylene-bis(acrylamide) および一級の 6-aminohexanoic acid は、Wako (Japan) 製のものを用いた。また、特級の Bromophenol Blue (BPB), 等電点電気泳動用特製試薬の acrylamide (monomer) および難溶性タンパク質研究用特製試薬の sodium dodecyl sulfate (SDS) は Nacalai Tesque (Japan) より購入した。このほか、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250, Fluka, Switzerland) および skim milk (DIFCO, USA) を使用した。一般試薬は特級のものを用いた。

コラーゲンの精製 酸可溶性コラーゲン (acid-soluble collagen, ASC) およびペプシン可溶化コラー

ゲン (pepsin-solubilized collagen, PSC) を, SATO ら¹⁴⁾の方法に準じて調製した. 操作はすべて4℃で行った. まず, 即殺ヒラメ筋肉の0.1M NaOH 抽出残渣を0.5M 酢酸で抽出し, 得られた上清をASC 標品とした. 一方, 沈殿は0.5M 酢酸に懸濁した状態で, 酵素/基質比1/200 (w/w) のペプシンで消化し, 得られた上清をPSC 標品とした. ASC は, 5M 尿素の存在下でDEAE-CELLULOSE (生化学工業株式会社, Japan) および SP-Toyopearl 650M (TOSOH, Japan) クロマトグラフィーにより, 酸可溶性I 型およびV 型コラーゲン (ASC-I および ASC-V) 画分に分離した¹⁵⁾. ASC-I 画分は, さらに DEAE-Toyopearl 650M (TOSOH, Japan) クロマトグラフィーに供し, 素通り画分を精製 ASC-I (P-ASC-I) 画分とした. 一方, PSC は塩分画法によりペプシン可溶性I 型およびV 型コラーゲン (PSC-I および PSC-V) 画分に分離した¹⁴⁾. このうち PSC-I 画分は, 2M 尿素の存在下での SP-Toyopearl クロマトグラフィーにより, 微量に混在するV 型コラーゲンを除去した.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) SDS-PAGE は, LAEMMLI¹⁶⁾の方法を改変して行った. 試料液を SDS-PAGE 用の6×試料緩衝液 (60% glycerol, 0.6% SDS, 0.06% BPB, 600mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8)) と混合した後, 100℃で5分間加熱した. 7.5% ミニスラブゲルを使用し, 1枚あたり定電流25mA で泳動を行った (泳動緩衝液: 50mM Tris, 373mM glycine, 0.1% SDS). 泳動後のゲルは, CBB R-250 染色液 (0.04% CBB R-250, 40% methanol, 10% 酢酸) で染色後, 10% 酢酸で脱色した.

コラーゲンの定量 コラーゲンは, Lowry 法や Bradford 法などの発色法による検出感度が低いことが知られていることから¹⁷⁾, SDS-PAGE で分離後に CBB R-250 で染色されたバンドの染色強度 (staining intensity) をもとに定量を行った. 一般的なコラーゲンの泳動像は重合体も同時に検出されるため, 単量体である α 鎖より高分子に検出されたバンドすべてを定量し, その合計をコラーゲン量とした. まず, 濃度既知のI 型コラーゲン (3 mg/ml, Wako, Japan) を標準として検量線を作成し, それをもとにコラーゲン試料の濃度を算出した. 染色強度は, ゲル解析ソフト (EDAS290 version 3.5, KODAK, USA) を用いて算出した.

ASC-V のペプシン消化 ペプシン処理によりテロペプチドを除去した SP-Toyopearl 吸着画分を, PSC-V と比較することにより, この画分に ASC-V が分画されたかどうかを確認した. 吸着画分の一部を10mM HCl に透析後, 酵素/基質比1/200 (w/w) でペプシンを加え, 4℃で2時間消化させた. 反応は, 1/50 量 (v/v) の1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を添加して停止させた. この SDS-PAGE パターンを PSC-V のそれと比較した.

抗ヒラメ ASC-V 抗血清の調製 ASC-V 画分を抗原として, ウサギに免疫した. 初回は完全フロイントアジュバント, 2回目以降は不完全フロイントアジュバントを用いた. 1回につき約500 μ g の抗原を, 2週間に1回の間隔で計6回, 背部皮下20箇所以上に注射した. 免疫開始から0 (免疫前), 4, 6 および7週間後に試験採血した. また, 8週間後および最終免疫の11日後 (全血) に採血し, それぞれ約21ml および約72ml の抗血清を回収した.

アフィニティークロマトグラフィーによる抗ヒラメ ASC-V 抗体の精製 ヒラメ筋肉 P-ASC-I および ASC-V を固定化したアフィニティークラムを用いて, 抗血清から抗ヒラメ ASC-V 抗体を精製した. 熱変性させた P-ASC-I 約1mg および約9mg を, それぞれ1ml および5ml の HiTrap NHS-activated HP (Amersham Biosciences, USA) に固定化した (1ml P-ASC-I カラムおよび5ml P-ASC-I

カラム). ASC-V は約 2mg を熱変性させた後, 1ml の同カラムに固定化した(ASC-V カラム). 4 回および 6 回免疫後の抗血清それぞれ約 21ml および約 36ml に, 等量の飽和硫酸アンモニウム溶液を加え, 生じた沈殿を遠心分離により回収した. 沈殿をそれぞれ約 15ml および約 35ml のリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, PBS: 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 8.10mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄)に溶解した. 4 回免疫後の抗血清からの精製の場合は, PBS で平衡化した 1ml P-ASC-I カラムを 4 回素通りさせた. 6 回免疫抗血清の場合は, 5ml P-ASC-I カラムを 4 回素通りさせた後, さらに ASC-V カラムに添加した. 吸着した抗体を 750 μ l の 0.1M glycine-HCl 緩衝液(pH 2.5)で溶出した後, 直ちに 250 μ l の 1M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を加えて中和した.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ASC-V 画分を 5 μ g/ml の濃度に PBS または炭酸緩衝液で希釈した後, 50 μ l ずつ 96 穴プレートに分注した. 4℃で 1 晩静置して抗原を固相化した後, 1%ウシ血清アルブミンを含む PBS (BSA/PBS)を 300 μ l ずつ分注し, 室温で 1-2 時間静置してブロッキングした. 1% BSA/PBS で 1000, 5000, 25000 および 125000 倍希釈した抗血清をそれぞれ 50 μ l ずつ加え, 25℃で 1 時間静置して 1 次抗体反応を行った. 0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T)で 5 回洗浄した後, 1% BSA/PBS で 5000 倍に希釈した Anti-Rabbit IgG (H+L) POD conjugate を 50 μ l ずつ添加した. 25℃で 1 時間静置して 2 次抗体反応を行った後, PBS-T で 5 回洗浄した. 発色基質液(0.1% *o*-phenylenediamine, 0.015% H₂O₂, クエン酸リン酸緩衝液(pH 5.0))を 100 μ l ずつ分注し, 室温で 5-15 分間発色させた. 6N 硫酸 30 μ l で反応を停止した後, 492nm の吸光値を測定して抗体価とした.

ウェスタンブロット分析 ブロッキングは平野¹⁸⁾の方法に準じて, セミドライ型装置(AE-6677, ATTO, Japan)を用いて行った. ミニスラブゲルを用いた SDS-PAGE で分離したタンパク質を, polyvinylidene fluoride 膜(Pall Corporation, USA)に定電流 0.85mA/cm² で 1 時間転写した. 膜を 2.5% skim milk/PBS-T に浸してブロッキングした後, 0.5% skim milk/PBS-T で希釈した抗血清または精製抗体溶液中で, 1 時間常温で反応させた. PBS-T で 3 回洗浄した後, 0.5% skim milk/PBS-T で 2000 倍に希釈した Goat F(ab')₂ Anti Rabbit IgG(H&L)-Alkaline Phosphatase (Leinco Technologies, Inc., USA)溶液に浸漬し, 常温で 1 時間反応させた. 再び PBS-T で 3 回洗浄した後, さらに PBS で 1 回洗浄した. 膜を発色液(0.002% NBT, 0.015% BCIP, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl 緩衝液(pH 9.5))に浸し, 適度な発色が観察されたところで蒸留水により反応を停止した.

結 果

V 型コラーゲンの精製 ヒラメ筋肉より調製した ASC を, DEAE-CELLULOSE クロマトグラフィーにより分画した. 素通り画分では典型的な脊椎動物 I 型コラーゲンと類似したバンドパターンが認められたのに対して(Fig.1), 吸着画分ではそれとは異なるバンドが検出された(データは示していない). この吸着画分を, さらに SP-Toyopearl クロマトグラフィーで分画した(Fig.1). 画分 11 までは I 型コラーゲンと近い分子量の濃いバンドが観察され, それ以降は α (I) 鎖と β (I) 鎖の間に複数のバンドが認められた. ニジマスでは, この後半の画分に ASC-V が溶出されることが, ペプシン処理により明らかにされている¹⁵⁾. 本研究でも, それと類似したバンドが画分 11-18 で検出されたことから, これを ASC-V 画分とした.

ペプシン処理および免疫に用いるため, この画分のタンパク質量を定量した. 標準コラーゲン量

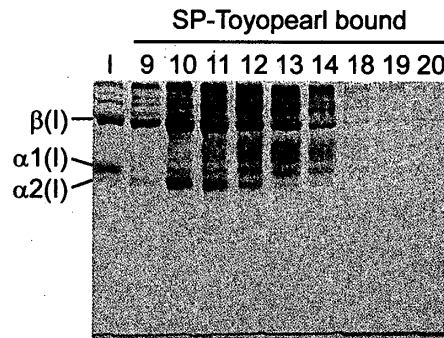


Fig.1 Fractionation of Japanese flounder DEAE-CELLULOSE bound fraction from ASC by SP-Toyopearl 650M chromatography.

I: type I collagen (DEAE-CELLULOSE unbound fraction).

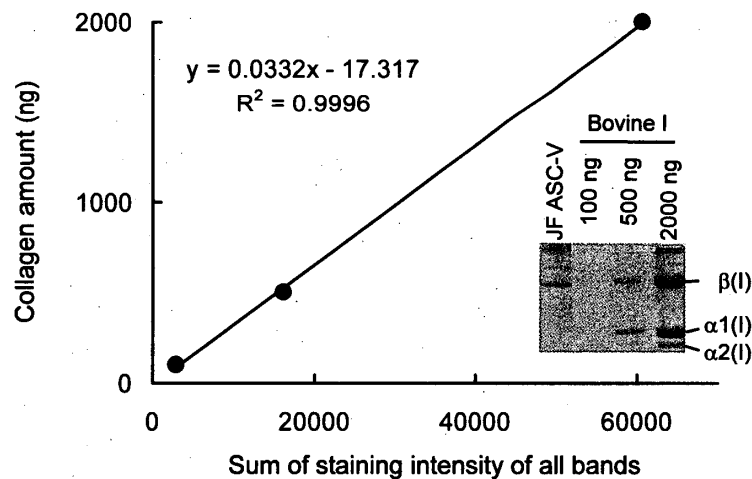


Fig.2 Standard curve of collagen amount versus the staining intensity.

JF: Japanese flounder, Bovine I: bovine type I collagen.

の検量線および定量に用いた SDS-PAGE 像を Fig.2 に示す。染色強度とコラーゲン量との間に、 $R^2 = 0.9996$ という高い相関が認められた。この検量線を用いて、ASC-V 画分のタンパク質濃度を算出したところ、約 $210 \mu\text{g/ml}$ であった。同画分をペプシン処理した結果、PSC-V と同じ α 鎖のパターンを示した (Fig.3)。

ASC-V の免疫による抗血清の反応性の変化 ASC-V を免疫した抗血清の抗体価を ELISA により測定した。3 回の免疫によって抗体価は直線的に上昇したが、4 回目の免疫後の値は横ばいとなった (データは示していない)。Fig.4 に、同抗血清の I 型および V 型コラーゲンに対する反応性を、ウェスタンブロット分析により調べた結果を示す。免疫前の血清には、ASC-V への弱い反応性が見られたものの、PSC-V への反応性は認められなかった。これに対して、2 回免疫後の抗血清は ASC-V を強く認識すると同時に、弱いながらも PSC-V も検出した。それらに対する反応性は、いずれも免疫を重ねるにつれて上昇した。4 回免疫後の抗血清は、PSC-V に対して $\alpha 2$, $\alpha 1$, $\alpha 3$ 鎖の順に強い反応性を示した。一方で、ASC-I への反応性も免疫によって顕著に上昇した。

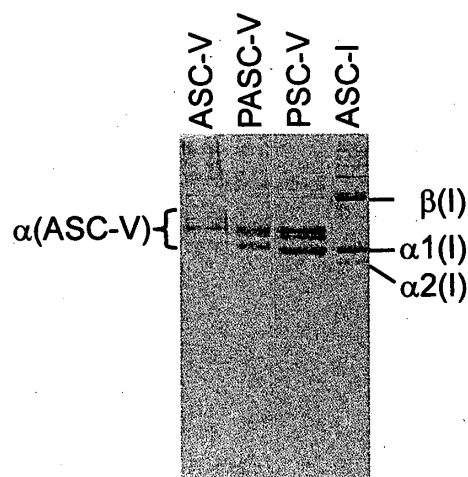


Fig.3 SDS-PAGE patterns of intact and pepsinized type V collagens from Japanese flounder muscle. ASC-V: intact type V collagen from ASC (Fractions 11-18 of Fig.1), PASC-V: pepsinized ASC-V.

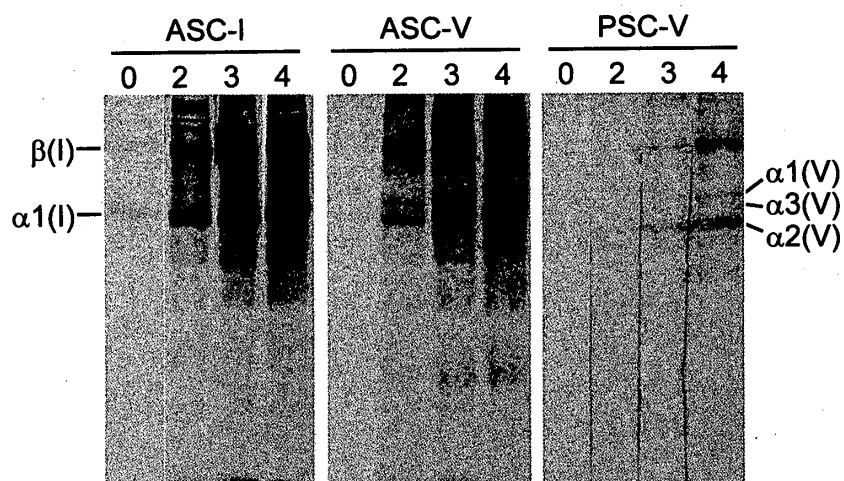


Fig.4 Increases in reactivities of antisera with type I and V collagens.

0: pre-immunized serum, 2, 3, 4: 2, 3 and 4 times-immunized antisera. The sera were used at a 1/3000 dilution.

抗ヒラメ ASC-V 抗体の精製 抗血清の ASC-I に対する反応性を, P-ASC-I カラムを繰り返し素通りさせることにより吸収させた. Fig.5 に, その吸着および素通り画分の I 型および V 型コラーゲンに対する反応性を示す. 1 回目に素通りさせた時に吸着した画分は, ASC-I および ASC-V への非常に強い反応性を示した (Fig.5a). ASC-I への交差性は, 2 回の素通りにより減少したものの, $\alpha 1(I)$ および $\beta(I)$ に相当する位置に比較的強いシグナルが検出された (Fig.5b). しかし, 3 回素通り画分では ASC-I への交差性はほとんど観察されなくなった. 一方, V 型コラーゲンに対する反応性は 3 回の素通りにより減少したが, 1 次抗体の希釈倍率を 200 倍にしたところ, V 型コラーゲンに対する強い反応性を示した. ASC-V への反応性は, 3 回目と 4 回目の素通り画分間に顕著な差は見られず, 4 回素通りさせた後も残存していた. 一方, PSC-V については, 4 回素通り後も $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 3$ 鎖と思われる位置にシグナルが検出されたが, $\alpha 2$ 鎖への反応性は 3 回目までにほとんど消失した. 200 倍希釈で用いた場合にも I 型コラーゲンに対する交差性は見られなかつ

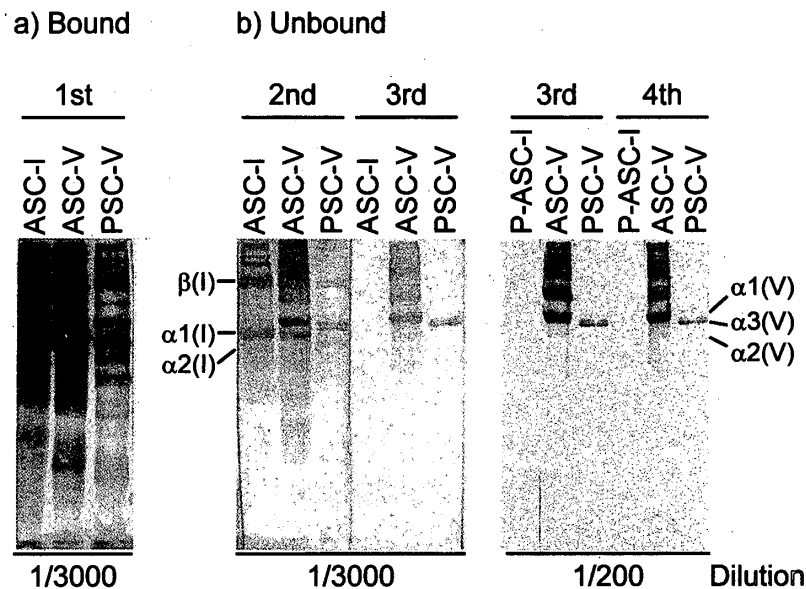


Fig.5 Specificities of affinity chromatographic fractions to type I and V collagens.

1st, 2nd, 3rd, 4th: 1st, 2nd, 3rd and 4th P-ASC-I column chromatographic fractions.

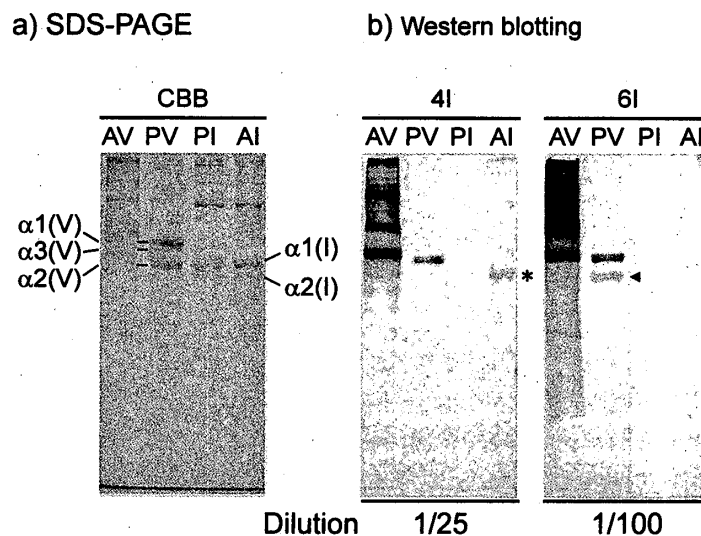


Fig.6 Reactivities of anti-type V collagen antibodies with type I and V collagens.

a) SDS-PAGE analysis of collagens, b) Western blot analysis of ones with anti-type V collagen antibodies. A: ASC, P: PSC, 4I: 4 times-immunized, 6I: 6 times-immunized. Asterisk: $\alpha 1(I)$ chain, Arrowhead: $\alpha 2(V)$ chain.

たことから、この4回素通り画分を4I (4 times-immunized)抗体とした。

この4I抗体を用いて、予備実験的にヒラメ筋肉粗抽出液のウェスタンブロット分析を行ったところ、強い非特異的発色が認められた(データは示していない)。そこで、6回免疫後の抗血清から、より特異性の高い抗V型コラーゲン抗体の精製を試みた。4I抗体精製で行ったP-ASC-Iカラムへの吸収に加えて、ASC-Vカラムへの吸着により抗体を精製した。この吸着画分を6I (6 times-immunized)抗体とし、I型およびV型コラーゲンに対する反応性を4I抗体と比較した。

(Fig.6). I型コラーゲンへの交差性の有無をより厳しい条件で確認するため, 4I抗体は25倍, 6I抗体は100倍希釈で用いて検出を試みた. PSC-Vの $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 3$ 鎖のシグナル強度が両抗体間で同程度になるまで発色させた. 4I抗体では, Fig.5では認められなかったI型コラーゲンのシグナルが弱いながらも検出された($\alpha 1$ (I)鎖, Fig.6b アスタリスク). これに対して6I抗体は, Fig.6aに示したCBB染色レベルで検出される量のI型コラーゲンさえ全く認識しなかった. また, V型コラーゲンへの反応性を比較すると, 6I抗体はASC-Vを4I抗体よりも強く認識すると共に, 4I抗体では検出されなかった $\alpha 2$ 鎖(Fig.6b 矢じり)を含む全 α (PSC-V)鎖に反応性を示した. この6I抗体で筋肉粗抽出液の免疫染色を行った結果, 非特異的発色が4I抗体と比べて大幅に低減された(データは示していない).

考 察

本研究では, I型コラーゲンと交差せずヒラメV型コラーゲンを特異的に認識するポリクローナル抗体を得ることができた. 一般的にV型コラーゲンは, PSC溶液から塩分画法により調製されてきた¹⁹⁾. 魚類のV型コラーゲンの分画法もコイを用いてすでに確立されており¹⁴⁾, 他の魚種でもこの方法でV型コラーゲンが分画されている^{8,9)}. 一方, 一部の魚類コラーゲンは, ペプシン処理を行わず酸のみで多量に可溶化されることも知られている^{8,20)}. このコラーゲン(ASC)は分子間架橋が多く存在するテロペプチドを含んでいることから, 塩分画法によるI型コラーゲンとV型コラーゲンの分画は難しいとされてきた⁸⁾. SATOら¹⁵⁾はニジマス筋肉から, 尿素存在下でイオン交換クロマトグラフィー法を組み合わせることで, ASC-Vを分画できることを明らかにした. 本研究でも, この方法を適用することにより2種類の異なったバンドパターンを示す画分に分けることができた(Fig.1). この結果がニジマスのものと類似していたことから, ここで分画されたコラーゲンは魚種間で近い電気的性質を有することが推察された. この後半の画分のペプシン処理により, α 鎖のバンドパターンがPSC-Vのそれと一致したため, 同画分の大部分がV型コラーゲンであることが明らかとなった(Fig.3).

コラーゲンは, Lowry法やBradford法などの発色法による検出感度が低いことが知られていることから¹⁷⁾, SDS-PAGEで分離後CBB染色されたバンドの染色強度を基に定量を試みた(Fig.2). 作成した検量線が極めて高い直線性を示したことから, この方法がコラーゲンの定量に有用であることが示された. さらに, この方法はタンパク質をあらかじめゲルで分離しているため, 目的のバンドに絞って定量可能である点でも有利である.

免疫前の血清は精製コラーゲンをほとんど認識しなかったが, ASC-V免疫後のそれはI型とV型コラーゲンの両方を強く認識した(Fig.4). 両コラーゲンに対する反応性が免疫を重ねるたびに強くなったことから, 抗原として用いたASC-V画分がI型コラーゲンを認識する抗体の産生も刺激していることが示唆された. ASCはペプシン処理を行っていないことから, 分子間架橋が多く残されたまま可溶化されている. また, 結合組織内ではI型コラーゲンとV型コラーゲンの間も架橋されていることが知られている²¹⁾. さらに, ASC-V画分のペプシン処理の結果, 重合体でPSC-Vと若干パターンの相違が認められた(Fig.3). これらのことから, ASC-V画分中の重合体にI型コラーゲンとV型コラーゲンが架橋したものが少なからず含まれており, これに対する抗体も多量に産生された可能性がある. また, 線維性コラーゲンである両コラーゲンの構造が類似しているため⁷⁾, この両方を認識する抗体が産生された可能性も考えられる. もし仮に, このような抗体分子が存在する場合は, V型コラーゲンへの吸着精製だけでは除去することができない. そこで, I型コラーゲンを固定化したカラムを素通りさせたところ, その吸着画分がI型コラーゲンだけで

はなくV型コラーゲンも認識した(Fig.5a). このことから、両コラーゲンを認識する抗体が存在し、それらをこの手法で吸収できることが示された. 1回の素通りで吸収し切れなかった抗体も、P-ASC-Iカラムを繰り返し素通りさせることにより段階的に除去できることが明らかになった(Fig.5b). これらのことは、コラーゲンのように構造の類似した分子種をもつタンパク質に対するポリクローナル抗体を調製する場合には、交差することが予想される抗原以外の分子種に対して、交差性を吸収させることが重要であることを示している. 今回、1ml P-ASC-Iカラムを4回素通りさせた4I抗体を25倍希釈という高濃度で用いた場合に、I型コラーゲンの弱いシグナルが検出されたが、5ml ASC-Iカラムを4回素通りさせた6I抗体は、PSC-Vを4I抗体の場合と同程度発色させてもI型コラーゲンをまったく認識しなかった(Fig.6b). 以上のことから、カラムに固定化するタンパク質量や素通りさせる回数が重要であることも示唆された. 一方、本研究ではI型コラーゲンへの交差性を吸収させる過程で、 $\alpha 2(V)$ 鎖に対する反応性が減少した(Fig.5b). これはI型コラーゲン鎖と $\alpha 2(V)$ 鎖の間で架橋された重合体がカラムに固定化したP-ASC-I中に含まれ、 $\alpha 2(V)$ 鎖を認識する抗体を吸収したために生じた可能性や、両鎖間に類似した構造が存在することにより、この共通した構造を認識する抗体が抗血清中に産生され、これが吸収されたために生じた可能性などが考えられる. このようなことが想定されるため、抗体によっては精製過程で生じる反応性の減少も考慮する必要がある. 本研究ではこれを補う目的で、V型コラーゲンへの反応性の上昇を期待して2回の追加免疫を行った.

4I抗体を用いて、予備実験的にヒラメ筋肉の粗抽出液を免疫染色したところ、強い非特異的発色が認められた(データは示していない). これは、ウサギの血清に元々含まれていた種々の抗体により生じたものと考えられた. このことから、量的にマイナーなV型コラーゲンおよびその断片を、多量の夾雑タンパク質の存在する筋肉の粗抽出液中で特異的に検出するには、それらの抗体も除く必要があることが示された. そこで、2回の追加免疫を行った抗血清のASC-Iカラム素通り画分を、ASC-Vカラムに吸着させることにより6I抗体を精製した. この抗体は、4I抗体と比較してASC-Vをより強く認識するとともに、PSC-Vの $\alpha 2$ 鎖のシグナルも検出したことから、2回の追加免疫によるV型コラーゲンに対する反応性の上昇が確認された(Fig.6b). また、この6I抗体で筋肉の粗抽出液を免疫染色した場合に非特異的発色が大幅に低減されたことから、ASC-Vカラムへの吸着により抗V型コラーゲン抗体以外の分子が効果的に除去されたことが示唆された(データは示していない).

本研究で抗体の反応性を調べるために泳動したASC-VとPSC-VをCBB染色した場合、PSC-Vの α 鎖の方が濃く検出されたが(Fig.6a)、抗V型コラーゲン抗体を用いた免疫染色ではASC-Vの方がそのシグナル強度は強かった(Fig.6b). これはASC-Vを免疫した抗血清が、V型コラーゲンの3重らせん領域よりも、テロペプチドを認識する抗体を多く含んでいたためと考えられる. この結果は、テロペプチドの方が3重らせん領域よりも抗原性が高いというこれまでの知見と一致しており^{22,23)}、コラーゲンに対するポリクローナル抗体の調製には、テロペプチドを保持したASCが抗原として有効であることが示された.

冷蔵初期に生じる魚肉の軟化には、V型コラーゲンの特異的な可溶化が関与することが報告されている^{6,9,10)}. また、その可溶化にはテロペプチドの分解が寄与することが精製したコラーゲンを用いて明らかにされている¹⁰⁾. 他方、筋肉から調製したコラーゲン画分中のV型コラーゲン含量が、冷蔵後に減少していることがマイワシで見出されている⁶⁾. このことは、冷蔵によりV型コラーゲンの一部がコラーゲン画分に回収されなくなってしまうことを示唆している. そのため、V型コラーゲンの冷蔵中の変化を網羅的に検討するには、筋肉の粗抽出液中のV型コラーゲンあるいはその断片を直接検出することが必要である. 今回、テロペプチドを含むV型コラーゲンに特

異的な抗体が得られたことにより、それが可能となった。これまでの報告では精製過程で失われていた可能性のある、未知の V 型コラーゲン断片の検出が期待される。現在、この抗体を用いて冷蔵魚肉中の V 型コラーゲン断片の検出を試みている。

謝 辞

なお、本研究の一部は、農林水産省委託事業である「形態・生理機構の改変による新農林水産生物の創出に関する総合研究」により行われた。

要 約

冷蔵中の魚肉軟化への V 型コラーゲン分解の寄与を解明するため、ヒラメ筋肉 V 型コラーゲンに対する特異的なポリクローナル抗体を作製した。ヒラメ筋肉の酸可溶性コラーゲンからイオン交換クロマトグラフィーにより V 型コラーゲンを調製し、ウサギに免疫した。抗血清の抗原に対する反応性は、免疫に伴い上昇したが、結合組織で最も豊富に含まれる I 型コラーゲンに対しても強い交差性を示した。この交差性を除去するため、I 型および V 型コラーゲンをそれぞれ固定化したアフィニティーカラムを用いて、抗血清から抗ヒラメ V 型コラーゲン抗体を精製した。精製した抗体は、I 型コラーゲンは認識せず、V 型コラーゲンのみを認識した。この抗体は、魚肉の死後変化を引き起こす V 型コラーゲン分解の検出に有用であると考えられた。

キーワード：V 型コラーゲン，魚肉，ヒラメ，ポリクローナル抗体

文 献

- 1) 畑江敬子：魚の調理・加工の科学，魚の科学(鴻巣章二監修，阿部宏喜・福家眞也編)，p.133-146，朝倉書店，東京(1994)。
- 2) 豊原治彦：魚介類のテクスチャー，魚の科学(鴻巣章二監修，阿部宏喜・福家眞也編)，p.79-86，朝倉書店，東京(1994)。
- 3) 安藤正史：魚肉の軟化機構，魚介類の細胞外マトリックス 水産学シリーズ [114] (木村茂編)，p.73-82，恒星社厚生閣，東京(1997)。
- 4) ANDO, M., TOYOHARA, H., SHIMIZU, Y. and SAKAGUCHI, M.: Post-mortem tenderization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle caused by gradual disintegration of the extracellular matrix structure. *J. Sci. Food Agric.*, 55, 589-597 (1991)。
- 5) ANDO, M., TOYOHARA, H., SHIMIZU, Y. and SAKAGUCHI, M.: Post-mortem tenderization of fish muscle due to weakening of pericellular connective tissue. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1073-1076 (1993)。
- 6) SATO, K., ANDO, M., KUBOTA, S., ORIGASA, K., KAWASE, H., TOYOHARA, H., SAKAGUCHI, M., NAKAGAWA, T., MAKINODAN, Y., OHTSUKI, K. and KAWABATA, M.: Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 343-348 (1997)。
- 7) VAN DER REST, M. and GARRONE, R.: Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 5, 2814-2823 (1991)。

- 8) SATO, K.: Comparative biochemistry of molecular species of fish and mammalian collagens. *Trends in Comparat. Biochem. Physiol.*, 1, 557-567 (1993).
- 9) SATO, K., OHASHI, C., OHTSUKI, K. and KAWABATA, M.: Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1222-1225 (1991).
- 10) SATO, K., URATSUJI, S., SATO, M., MOCHIZUKI, S., SHIGEMURA, Y., ANDO, M., NAKAMURA, Y. and OHTSUKI, K.: Effect of slaughter method on degradation of intramuscular type V collagen during short-term chilled storage of chub mackerel *Scomber japonicus*. *J. Food Biochemistry*, 26, 415-429 (2002).
- 11) SHIGEMURA, Y., ANDO, M., TSUKAMASA, Y., MAKINODAN, Y. and KAWAI, T.: Correlation of type V collagen content with post-mortem softening of fish meat during chilled storage. *Fish. Sci.*, 69, 842-848 (2003).
- 12) AIDOS, I., LIE, Ø. and ESPE, M.: Collagen content in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1440-1444 (1999).
- 13) ANDO, M., TOYOHARA, H., SHIMIZU, Y. and SAKAGUCHI, M.: Post-mortem tenderization of fish muscle proceeds independently of resolution of rigor mortis. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1165-1169 (1991).
- 14) SATO, K., YOSHINAKA, R., SATO, M., ITOH, Y. and SHIMIZU, Y.: Isolation of types I and V collagens from carp muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B, 155-158 (1988).
- 15) SATO, K., OHASHI, C., MURAKI, M., ITSUDA, H., YOKOYAMA, Y., KANAMORI, M., OHTSUKI, K. and KAWABATA, M.: Isolation of intact type V collagen from fish intramuscular connective tissue. *J. Food Biochemistry*, 22, 213-225 (1998).
- 16) LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 17) LÓPEZ, J.M., IMPERIAL, S., VALDERRAMA, R. and NAVARRO, S.: An improved Bradford protein assay for collagen proteins. *Clin. Chim. Acta*, 220, 91-100 (1993).
- 18) 平野久: 遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析—プロッティングとシークエンシング—, 232 pp., 東京化学同人, 東京(1993).
- 19) NIYIBIZI, C., FIETZEK, P.P. and VAN DER REST, M.: Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an $\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$ collagen molecule. *J. Biol. Chem.*, 259, 14170-14174 (1984).
- 20) SATO, K., YOSHINAKA, R., SATO, M. and SHIMIZU, Y.: Isolation of native acid-soluble collagen from fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1431-1436 (1987).
- 21) BIRK, D.E., FITCH, J.M., BABIARZ, J.P. and LINSSEN, T.F.: Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J. Cell Biol.*, 106, 999-1008 (1988).
- 22) SCHMITT, F.O., LEVINE, L., DRAKE, M.P., RUBIN, A.L., PFAHL, D. and DAVISON, P.F.: The antigenicity of tropocollagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51, 493-497 (1964).
- 23) PONTZ, B., MEIGEL, W., RAUTERBERG, J. and KUHN, K.: Localization of two specific antigenic determinants on the peptide chains of calf skin collagen. *Eur. J. Biochem.*, 16, 50-54 (1970).

平成15年 (2003) 10月1日受理

平成15年 (2003) 12月25日発行