

コラーゲンの電顕的観察を一筋に

伊東多加志

部局系技術支援室 医学技術系第一医学系

概要

私は昭和45年4月に北大歯学部にて技術職員として入職し、口腔解剖学第二講座に所属しました。北大歯学部は新設されたばかりで、学生実習に必要な組織標本の整備等、実習の準備にかなりの時間を割いておりました。一方で、研究の技術的支援業務もあり、電子顕微鏡用試料の作製や観察にも従事しておりました。数年後、教室の教官が週に1回開催していたセミナー（論文の抄読会や実験データの報告など）に加わるようになり、その後コラーゲンの研究との関わりを持つことになりました。コラーゲンは線維性蛋白質で生体の全蛋白質の約1/3を占め、結合組織の主要成分ですが、電子顕微鏡で観察すると、線維に67nmの周期構造（縞模様）が観察されます。この美しさと線維内コラーゲン分子の配列に興味を持ち、様々な実験を通して線維形成過程を電子顕微鏡で観察しました。昭和56年4月に主任の星野教授が名古屋大学医学部に転任したのに伴い、私も同行して解剖学第二講座の所属となりました。名古屋大学に転任してからは、コラーゲン分子間の会合状態を電顕的に観察する手段として、グルターアルデヒドによる分子間の架橋固定を行い、次いでコラーゲンの分子地図となるSLS（segment-long spacing）を形成させる方法を導入しました。以来、主任教授が平成8年に定年退官するまでコラーゲンの研究を支援して来ましたので、その一端を紹介したいと思います。

In vitro コラーゲン線維形成の分子機序についての電顕的証明

伊東多加志 名古屋大学医学系研究科機能組織学分野

我々は以前、コラーゲン線維形成過程の電顕的観察を行っていたが、その中から今回はコラーゲン線維形成の分子機序を探る電顕的な仕事についてお話をしたい。随分古い話になりますが、ご容赦ください。

はじめに

結合組織から抽出されたコラーゲン分子が *in vitro* の生理的条件下で native - type 線維を再生することがよく知られている。native - type 線維は生体の天然線維と同じく 67nm 周期の横紋構造を示し、線維内で個々の分子が互いに 67nm (D) あるいはその倍数 (nD) だけ軸上にずれるように配列されている。線維構造の維持はもちろん、線維形成でさえ最も重要な結合は D ずれ結合であり、4D ずれ (=0.4D end - overlap) 結合は線維形成のもっと後の段階でのみ起こると長い間考えられてきた。最近、Silver はレーザ光散乱の研究から、*in vitro* 線維形成の初期段階に線状ポリマーが存在すると主張している。そして、コラーゲン線維形成において、4D ずれ結合の線状ダイマーやトリマーの形成が 1D ずれ結合の形成に先立って起こるといふ仮説が提出されている。しかしながら、観察された線状ポリマーが 4D ずれ結合のものであるという確認はされておらず、またポリマーの各々分子の方向も決定されていない。最初に形成された分子集合体を電顕で観察することにも成功していない。我々は、コラーゲン線維形成の最も初期の段階に形成される分子集合体を電

子顕微鏡下で直接観察することによってこの仮説を検証した。

方法

1) *In vitro* でのコラーゲン分子の 4D ずれ線状ポリマーの形成

架橋阻害剤であるラチロゲンを生前投与したラットの皮膚から 0.5M 酢酸でコラーゲンを抽出し、分別沈殿法により I 型コラーゲンを分離、精製し、凍結乾燥して -20°C で保存した。Interrupted SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動での同定により、試料はほとんど I 型コラーゲンであった。

0.5 M 酢酸に溶解したコラーゲン液 (0.1 mg/ml) を $100,000\times g$ で 3 時間超遠心し、コラーゲンポリマーを除去した後、それぞれ pH 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 の 5–10 mM 酢酸緩衝液に 4°C で 3–4 日間透析した。一定の pH で分子間の結合が起こっても、pH を下げるとモノマー分子に分離されたので、さらに 2 日間、0.3% グルターアルデヒドを含む同酢酸緩衝液に透析した。酸に不安定な結合を分離させるために 0.5M 酢酸に少なくとも 2 日間透析し、さらに 0.2% ATP \cdot Na₂/0.1M 酢酸に透析した。1 滴のサンプルをコロジオン膜でコートしたグリッドに載せ、2% モリブデン酸アンモニウムでネガティブ染色、または 2% リンタングステン酸と 1% 酢酸ウランでポジティブ染色し、日立 H800 で電顕観察した。

2) 4D ずれ線状ポリマーの native-type 線維への取り込み

1) では、コラーゲン溶液を pH 4.0–4.5 の酢酸緩衝液に透析したサンプルで 4D ずれ結合を示す Fibrous SLS が形成されたので、これを 0.14 M NaCl/30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に透析し、 37°C でインキュベーションした。経時的にサンプルを採取し、ネガティブ染色を施した後、電顕で観察した。

結果および考察

コラーゲン溶液を pH 3.0–5.5 の酢酸緩衝液に透析して線維を形成しても、一旦 0.5M 酢酸 (pH 約 2.3) に透析すると、その後 ATP/0.1M 酢酸に透析してもモノマー分子が横方向に揃って集合した普通の SLS しか観察されなかった。このことから、一定の pH で分子会合体が形成されても、その結合はより低い pH で分離する酸不安定性のものであることが予想された。そこで我々は各々 pH の酢酸緩衝液に透析後、さらにグルターアルデヒドを含む同緩衝液に透析して分子間の結合を架橋固定させることを試みた。その結果、pH 4.0–4.5 の酢酸緩衝液に透析したサンプルから、SLS の両端が head-to-tail の関係で 0.4D end-overlap した Fibrous SLS が観察された。このことは、0.5 M 酢酸でモノマーに分散したコラーゲン分子が、pH 4.0–4.5 で同じ方向に 4D ずれ結合した線状ダイマーやポリマーを形成したことを示している。

さらに、この架橋固定した 4D ずれ線状ポリマーが native-type 線維へと取り込まれるかを確かめるため、Fibrous SLS を 37°C で 0.14 M NaCl/30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に透析し、経時的にサンプルを採取した。電顕の観察では、4D ずれ (周期) の SLS が緩められた後、透析の 4 時間以内に D 周期の細い線維構造が現れていた。さらに 37°C でインキュベーションを続けると、4D 周期は完全に消失し、バックグラウンドに細いフィラメントと共に、D 周期で極性を持つ線維が形成されていた。*in vitro* の生理的条件下で形成された 4D ずれ線状ポリマーが、定型的な D 周期横紋パターンを示すコラーゲン線維へと取り込まれることが確かめられた。これらの結果は、4D ずれ線状ポリマーが *in vitro* 線維形成の最初に形成される分子集合体であるという仮説を実証するものである。

研究・技術支援業績リスト（伊東関係分）

1975. 10. 31 星野 洸, 伊東多加志

口演：走査電子顕微鏡によるエナメル質の低石灰化部位の観察

抄録：歯科基礎学会誌 17 卷 (4 号), p. 507

1979. 8. 28 伊東多加志, 星野 洸

口演：Native type 再生コラーゲン線維形成における経時的超微形態変化

第 21 回歯科基礎学会総会

抄録：歯科基礎学会誌 21：補冊, p. 264, 1979

1981. 2. 7 伊東多加志, 星野 洸

口演：In vitro 再生コラーゲン線維にみられた D P S- 型線維について

日本電子顕微鏡学会北海道支部学術講演会（札幌、武藤歯科器材）

1982. 7. 23 伊東多加志, 星野 洸

示説：In vitro におけるコラーゲン線維形成過程にみられる D P S- 型線維について第 14 回日本結合組織学会総会（札幌）

結合組織 14, suppl., p. 66, 1982

抄録：結合組織 14 (3, 4), pp. 266-267, 1983

1983. 6. 2 星野 洸, 伊東多加志, 小林邦彦

口演：コラーゲン線維形成初期における 4D-staggered linear polymers の出現について

日本電子顕微鏡学会（総会） 第 39 回学術講演会（名古屋）

抄録：J. E. M. 32 (3), p. 268, 1983

The formation of 4D-staggered linear polymers in the initial phase of collagen fibrillogenesis.

1983. 7. 7 星野 洸, 伊東多加志, 小林邦彦

口演：コラーゲン線維形成初期過程の分子機構

第 15 回 日本結合組織学会総会（神戸）

抄録：結合組織 15 (3, 4 号), p. 114-115, 1984

The 4D-staggered intermolecular association in type 1. collagen fibrillogenesis

1984. 3. 17 星野 洸, 伊東多加志, 小林邦彦

口演：コラーゲン線維形成における 4 D ずれ分子間結合について—電子顕微鏡的研究—

昭和 58 年度（第 31 回）コラーゲン研究会（浜松市，サンビーチ浜松）

抄録：pp. 57-58 (59-60), 1984

4D-staggered intermolecular association in collagen fibrillogenesis

--Electron microscopic study--

1984. 4. 3 星野 洸, 伊東多加志, 小林邦彦

口演: *in vitro* におけるコラーゲン線維形成初期過程の電顕的観察

抄録: 解剖誌 59(4), p. 460

Early stages of *in vitro* collagen fibrillogenesis studied by electron microscopy

1984. 10. 6 小林邦彦, 星野 洸, 伊東多加志

口演: pH 4 付近におけるコラーゲン分子集合状態 日本生化学会総会 (東大教養部) 抄録: 生化学 56(8), p. 635

1985. 7 Kobayashi, K., Ito, T., Hoshino, T.

論文: Electron microscopic demonstration of acid-labile, 4D-staggered intermolecular association of collagen formed *in vitro*.

Collagen and Related Reserch 5(3):253-260, 1985.

1985. 3 小林邦彦, 伊東多加志, 星野 洸

口演: *In vitro* におけるコラーゲンの 4 D ずれ分子間結合の形成

昭和 59 年度 (32 回) コラーゲン研究会 (阿蘇) 抄録: p. 17 (64-65), 1985

In vitro formation of 4D-staggered intermolecular association of collagen.

1985. 4. 3 小林邦彦, 伊東多加志, 星野 洸

口演: コラーゲン分子間相互作用の電子顕微鏡的研究

第 90 回日本解剖学会総会 福岡 (九大)

抄録: 解剖誌 60: p. 456

1985. 7. 5 小林邦彦, 伊東多加志, 星野 洸

示説: コラーゲンの *In vitro* 線維形成における 4 D ずれ線状ポリマーの役割

第 17 回 日本結合組織学会総会 (京都)

抄録: 結合組織 17(4); suppl., p. 74 (予稿集) pp. 380-381

1985. 5. 25 小林邦彦, 伊東多加志, 星野 洸

口演: コラーゲン分子間相互作用の電子顕微鏡的解析

日本生化学会中部支部例会 (津), 要旨集 (抄録) 生化学 57(7) p. 658

1986. 9 Kobayashi, K., Ito, T., Hoshino, T.

論文: Incorporation of *in vitro* formed 4D-staggered linear polymers of collagen into D-periodic fibrils.

Collagen Rel. Res. 6:195-201, 1986. 9/26 reprint

1986. 4. 2 小林邦彦, 伊東多加志, 星野 洸

口演: コラーゲン分子間相互作用の電子顕微鏡的研究 2, 線維形成初期段階

第 91 回 日本解剖学会総会 (東京, 昭和大)

抄録：解剖誌 61(4), p. 454

1986. 5. 24 小林邦彦, 伊東多加志, 星野 洸

口演：コラーゲン S L S 分子束のネガティブ染色像と一次構造の相関

第 46 回 日本生化学会中部支部例会 (名古屋)

抄録：プログラム 生化学 58(9) :1241-1242

1986 Kobayashi, K., Ito, T., Hoshino, T.

論文：Correlation between negative staining pattern and hydrophobic residues of collagen

J. Electron Microsc. 35 (3) :272-275, 1986

1986. 9. 1-2 Kobayashi, K., Ito, T., Hoshino, T.

ポスター：In vitro formation of 4D-staggered linear polymers of collagen and their incorporation into D-periodic fibrils

抄録：11th ICEM (abstract) Electron Microscopy, Kyoto, (vol. 3.) pp. 2395-2396

1986. 9. 3-4 Kobayashi, K., Ito, T., Hoshino, T.,

ポスター：Molecular basis of negative staining - - -

Direct correlation between negative stained bands and hydrophobic clusters along segment -long-spacing crystallite of collagen

抄録：11th ICEM(abstract) Electron Microscopy 1986. Proc. 11th Int. Cong. on Electron Microscopy (vol. 4.) pp. 2703-2704

1987. 3. 13 伊東多加志, 星野 洸

口演：コラーゲン分子間 4D-staggered interaction におけるテロペプチド除去後の反応性
61 年度 (第 34 回) コラーゲン研究会 (名古屋、愛知会館)

抄録：p. 6 (57-58) The effect of removal of telopeptides on the formation of 4D-staggered interaction of collagen molecules

1988. 9. 23-25 伊東多加志, 藤田芳和, 星野 洸

口演：コラーゲン線維形成初期過程におけるテロペプチドの役割

医学・生物学電子顕微鏡技術研究会 第 4 回学術講演会 (聖マリアンナ医科大学)

研究報告：医学・生物学電子顕微鏡技術研究会会誌 vol. 3, No1, p. 5, 1989

1989. 2. 17-18 伊東多加志, 藤田芳和, 星野 洸

口演：電顕によるコラーゲン分子会合体観察のための S L S 結晶体の応用

第 11 回 生理学技術研究会 (岡崎生理研)

研究報告：生理学技術研究会報告 第 11 号, pp. 58-60 (1989)

1989. 7. 20-22 伊東多加志, 藤田芳和, 星野 洸

示説：In vitroにおけるコラーゲン線維形成過程の電顕的観察

医学・生物学電子顕微鏡技術研究会 第5回学術講演会（名古屋市立大学 医学部）

研究報告：医学・生物学電子顕微鏡技術研究会会誌 vol. 4, No. 1, pp. 13-15, 1990

1990. 3. 9 伊東多加志

技術研修会の講演と実技指導：（岡崎生理研技術課）

生理学技術研究会第3回専門部会の技術研修に講師として招かれた。第三専門部会の研修テーマは「生体分子のための顕微鏡技術」で、私は「ネガティブ染色法の原理と実際」について講演し、コラーゲンを材料として実技指導を行った。最後に電子顕微鏡で実際にネガティブ染色像を観察した。

生理学研究所技術課報告 No. 5, p. 63, 66, 1990

1990. 7. 11-13 伊東多加志, 藤田芳和, 星野 洸

口演：ペプシン限定消化コラーゲンによる線維形成能とテロペプチドの役割

医学・生物学電子顕微鏡技術研究会 第6回学術講演会（京大会館）

研究報告：医学・生物学電子顕微鏡技術研究会会誌 vol. 5, No. 2, pp. 43-44, 1991

1991. 2. 22-23 伊東多加志

口演：1. 型コラーゲンの調製法（及び interrupted SDS-PAGE による同定法）

第13回 生理学技術研究会（岡崎生理研）

研究報告：生理学技術研究会報告 第13号 pp. 34-37 (1991)

1991. 3. 1 星野 洸, 伊東多加志, 小林邦彦

総説：コラーゲン分子の解剖学

電子顕微鏡（日本電子顕微鏡学会誌） Vol. 26, No. 1, pp. 2-9, 1991

1991. 7. 24 伊東多加志

口演：コラーゲン線維形成の分子機構に関する電顕的研究

平成3年度名古屋大学技術職員研修 生物コース「技術発表」

1995. 7. 27 伊東多加志

口演：金コロイドマーカを用いた包埋後免疫電顕法（免疫凍結超薄切片法を主体として）平成7年度名古屋大学技術職員研修 生物コース「技術発表」

発表報告：平成7年度名古屋大学技術職員研修「技術発表報告集」, pp. 116-123 (1995)

1996. 2. 15 伊東多加志, 田中 稔, 早坂 静

口演及びパネル展示：凍結超薄切片法の技術修得をめざして

第18回 生理学技術研究会（岡崎生理研）

研究報告：生理学技術研究会報告 第18号, pp. 19-22 (1996)

2007.3.26 伊東多加志

口演：*In vitro* コラーゲン線維形成の分子機構についての電顕的証明

第 8 回解剖技術研究・研修会（大阪大学中之島センター）

抄録：第 8 回解剖技術研究・研修会予稿集， pp. 7-8（2007）

その他の業績

写真データ提供：（伊東多加志）

コラーゲン線維のポジティブ、ネガティブ染色像（電子顕微鏡写真）

「口腔生化学」 p. 19, 21 早川太郎、須田立雄 著、医歯薬出版、1987

1988. 9. 23-25

写真データ展示：（伊東多加志）

細菌産生コラーゲナーゼ消化後のコラーゲン S L S 電顕像（写真コンテスト）

医学・生物学電子顕微鏡技術研究会， 第 4 回学術講演会（聖マリアンナ医科大学）

写真データ提供：（伊東多加志）

草刈古墳 3 号（千葉県）の人骨化石中のコラーゲン線維（電顕像）

NHK 総合テレビ、特集番組「サイエンス Q」“日本人のルーツを科学でさぐる”

（藤ノ木古墳からの出土品、人骨化石中のコラーゲンの解析）

1989. 2. 7（火） 22:20～ 放映（国立科学博物館人類研究部長 山口敏、千田アナウンサー）

投稿：（伊東多加志）

「技術研究会専門部会に参加して」

岡崎生理研技術課回覧 113 号掲載，1990 年 6 月．

1990. 6. 18 伊東多加志

講義：「有機溶剤の分類名並びに、性質と組成」

第 3 回医学部技術職員セミナー [第 4 回医学部技術職員研修のためのプレセミナー]

報告集原稿：医学部技術職員セミナー報告集（創刊号） pp. 12-22, 1992

1991. 11/12, 11/29, 1992. 1/22, 2/5 伊東多加志

講義：「免疫の基礎」 合計 4 回

第 10、11、13、14 回医学部技術職員セミナー（第 5 回医学部技術職員研修のためのプレセミナー） 報告集原

稿：医学部技術職員セミナー報告集（第 2 号） pp. 23-38, 1993

2003. 1. 20 写真データ提供：（伊東多加志）

コラーゲン線維のネガティブ染色像（電子顕微鏡写真）

「スタディ 口腔生化学・分子生物学」大井田新一郎著（鶴見大学口腔生化学講座助教授）永末書店、2003.