

— 原 著 —

# 人血清および牛歯肉抽出液による阻害からの コラゲナーゼ活性の回復

安 達 義 雄

新潟大学歯学部生化学教室（主任：野原広美教授）

（昭和58年11月15日受付）

Activation of Latent Collagenase Formed by Exposure to Human  
Serum or Bovine Gingival Extract

Yoshio ADACHI

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Niigata University  
(Director : Prof. Hiroyoshi Nohara)

省 略

- RSF コラゲナーゼ： リューマチ滑液コラゲナーゼ
- $\alpha_2$ -M：  $\alpha_2$ -Macroglobulin
- APMA： p-Aminophenylmercuric acetate

## 要 旨

動物組織のコラゲナーゼは大部分組織インヒビター、血清由来のインヒビター及びコラーゲン等との複合体あるいはプロ酵素として存在し、活性を示さないラテント型酵素として抽出される。従って、酵素活性測定のためには何らかの活性化処理を必要とする。そこで、精製容易で活性の強いRSF コラゲナーゼをマーカー酵素として用い、組織から酵素抽出の際混入し易くコラゲナーゼの強いインヒビターである血清、及び牛歯肉抽出液による不活性化後のコラゲナーゼの活性化について検討した。

血清又は  $\alpha_2$ -M による阻害からの回復には数種の処理を試みたが、 $\text{ClO}_4^-$  イオンが最も効果的であることを見出した。一方、歯肉抽出液による不活性化の場合には、 $\text{ClO}_4^-$  イオン、pH 5-10 % NaCl, トリプシン, APMA 等による単独処理と

それ等の組み合わせ処理を試み、トリプシン処理、pH 5-10 % NaCl 処理及び APMA 処理の組み合わせによって、ほぼ完全に酵素を活性化し得ることがわかった。従って、歯肉抽出液による不活性化は蛋白質分解酵素によるのではなく、いくつかのインヒビターによる不活性化であることが推察される。更に、歯肉抽出液のゲル・ロ過により、二つの阻害活性のピークの存在が示され、少なくとも二種類の阻害物質の存在が示唆された。

## 緒 論

コラーゲンは、動物の重要な構造タンパク質として結合組織の主成分をなし、骨、軟骨、腱、ヒフ、歯肉、魚鱗等に存在し、トリプシンの様な蛋白質分解酵素では分解されにくい硬タンパク質の一つである。

1962年、Gross と Lapierre<sup>1)</sup> により、オタマジャクシの尾ビレの酵素が、三重ラセン構造のコラ

ーゲンを分解することが示されて以来，哺乳動物の骨<sup>2)3)</sup>，ヒフ<sup>4)5)</sup>，子宮<sup>6)</sup>，滑膜組織<sup>7)~10)</sup>，白血球<sup>11)12)</sup>，マクロファージ<sup>13)</sup>，肝クッペル細胞<sup>14)</sup>，腫瘍細胞<sup>15)~18)</sup>，更に口腔の組織<sup>19)~27)</sup>からも，同様なコラーゲン繊維の分解酵素：コラゲナーゼ〔EC 3. 4. 24. 7〕が見い出された。

これらのコラゲナーゼは，一般に生体内で不活性の状態にあり，ラテント型として，即ちプロ・コラゲナーゼ<sup>28)~33)</sup>として，あるいは組織インヒビター<sup>34)~37)</sup>や  $\alpha_2$ -M<sup>38)~41)</sup>，それにコラーゲン<sup>42)~44)</sup>等と結合して存在しているものと考えられている。口腔組織でも，プロ・コラゲナーゼ<sup>45)46)</sup>として，あるいは  $\alpha_2$ -M，コラーゲン，組織インヒビター等との複合体としての存在<sup>25)~27)45)47)</sup>が示唆され，全コラゲナーゼ活性の定量の困難さを物語っている。又，これらの殆どの研究は，組織からの直接の抽出液についてではなく，組織や細胞の培養により得られた培養液を材料としているので，生体内での生理状態そのものを完全に反映しているものとは言い難い。

そこで著者は，牛歯肉組織から直接抽出した抽出液の全コラゲナーゼ活性の定量化を目的に，リウマチ患者の関節滑液コラゲナーゼをマーカー酵素として使用し，血清と  $\alpha_2$ -M あるいは歯肉抽出液の添加により生成されたラテント型マーカー酵素の活性化について検討したので報告します。

## 材 料 と 方 法

### (1) 試 薬

Hyaluronidase (bovine Testes), Trypsin (type III, bovine Pancreas), Trypsin Inhibitor (type I-S, Soybean), Serum Albumin (bovine) は，Sigma Chemical 社，p-Aminophenylmercuric acetate は，半井化学薬品 K. K., NaSCN と NaClO<sub>4</sub> は，関東化学 K. K., Sephadex G-150 は，Pharmacia fine Chemical 社，[1-<sup>14</sup>C] acetic anhydride は，The Radiochemical Center, Amersham から購入した。又，他の全ての化学薬品は，高純度のものを使用した。

### (2) 血清と $\alpha_2$ -マクログロブリンの調製

血清は，輸血検査用の人の正常血清を 0.2 M NaCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub> を含む 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) に透析して使用した (100% 血清標品の蛋白質濃度：44.8 mg/ml)。

$\alpha_2$ -M は，この人血清から Vater 等の方法<sup>43)</sup>により部分精製した (蛋白質濃度：35.3 mg/ml)。

### (3) リウマチ患者の関節滑液からのコラゲナーゼ酵素標品の調製

リウマチ患者から得た関節滑液は直ちに遠心 (9,000 × g, 30 min) し，生じた沈澱を除いた。次いで，粘性の強いこの遠心上清に，ヒアルロニダーゼ (11 mg/ml 上清)<sup>48)</sup>を 4°C で 18時間作用させた。生じた沈澱物は再度，遠心 (9,000 × g, 20 min) 除去した。その上清を Amicon 社製の Diaflo Membrane XM 100 A によって分子量 100,000 以上の物質を除いた口液として集めた。続いて，この口液は Diaflo Membrane PM 10 を使って濃縮された。濃縮液は更に，0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Brij, 0.03% toluene を含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液，pH 7.8 (RSF 緩衝液) に対して十分透析，遠心後，-20°C に保存された。以上の操作は全て，0~4°C で行なわれた。血清 ( $\alpha_2$ -M) と歯肉抽出液による不活性化に使われた酵素標品の蛋白質濃度は，それぞれ 4.9 mg/ml と 10.4 mg/ml であった。

### (4) 牛歯肉抽出液の調製

食肉衛生検査センターから材料を得ると，直ちに低温室内でメスを用いて歯肉を剔出し，冷・生理的食塩水でよく洗浄してから口紙で水分を除去し，湿重量を測定した。又，以下の操作も全て，0~4°C の下で行なった。

剔出した必要量の牛歯肉を，更に細かく切り刻み，2倍重量の海砂と共に乳鉢中で RSF 緩衝液を少量ずつ添加しながら，ペースト状になるまで十分に磨細した。これに RSF 緩衝液を歯肉重量の10倍容量添加し，十分攪拌してから三角コルベんに内容物を移し，振盪による低温抽出を22時間行なった<sup>49)</sup>。得られた抽出液を遠心 (105,000 × g, 60 min) し，その上清を Diaflo Membrane PM 10 を用いて濃縮した。濃縮液は，更に RSF 緩衝液に対して十分透析後，遠心 (105,000 × g, 60

min) され、その上清が牛歯肉抽出液標品として使用された。又、この標品は使用されるまで、 $-20^{\circ}\text{C}$  に保存された (蛋白質濃度  $22.0\text{ mg/ml}$ )。

#### (5) コラーゲンの抽出・精製と $^{14}\text{C}$ -標識 コラーゲンの調製

コラーゲンは、ラットのヒフから Gallop と Seifter の方法<sup>50)</sup>により抽出・精製された。このコラーゲン標品の純度は、Switzer と Summer の方法<sup>51)</sup>により定量されたヒドロキシ・プロリン含量から、 $96.0\%$ と検定された。

上記酸可溶性コラーゲンは、Cawston と Barrett の方法<sup>52)</sup>に従い、 $^{14}\text{C}$ -acetic anhydride を用いて標識された。比放射能は、 $3.92 \times 10^5\text{ cpm/mg}$ であった。

#### (6) コラゲナーゼ活性の測定

コラゲナーゼ活性は、酵素作用により、 $^{14}\text{C}$ -再構成コラーゲン・ゲルから反応液中に遊離してくるペプチドを測定する Cawston と Barrett 法<sup>52)</sup>の変法で行った。

##### (i) $^{14}\text{C}$ -再構成コラーゲン・ゲルの作成

酵素活性測定に先だち、先端の尖った卓上遠心管 (久保田商事 K. K.) に、蒸留水  $30\text{ }\mu\text{l}$ 、コラーゲン・ゲル緩衝液 ( $0.35\text{ M NaCl}$ ,  $0.005\text{ M CaCl}_2$  を含む  $0.25\text{ M Tris-HCl}$  緩衝液,  $\text{pH } 7.8$ )  $20\text{ }\mu\text{l}$ 、 $^{14}\text{C}$ -標識コラーゲン ( $4.7 \times 10^5\text{ cpm/1.2 mg/ml}$ )  $50\text{ }\mu\text{l}$  を各々採取し、均一になるように十分攪拌してから  $37^{\circ}\text{C}$  に30分間保温した。こうして作られた  $^{14}\text{C}$ -再構成コラーゲン・ゲルは、活性測定が行われるまで室温に保存された。

##### (ii) 標準酵素活性測定法

$^{14}\text{C}$ -再構成コラーゲン・ゲルの入っている遠心管に、コラゲナーゼ溶液と RSF 緩衝液、必要に応じてインヒビター溶液やアクティベーター溶液等を、容量  $0.1\text{ ml}$  になるように加え十分攪拌する。この際、加えた溶液が、 $^{14}\text{C}$ -再構成コラーゲン・ゲルを完全に取り囲むようにする。それから反応遠心管は、 $37^{\circ}\text{C}$  で18時間保温された。18時間後、直ちに反応管を遠心 ( $13,500\text{ rpm}$ ,  $10\text{ min}$ ,  $3^{\circ}\text{C}$ ) し、分解されなかった  $^{14}\text{C}$ -再構成コラーゲン・ゲルを沈澱として除き、 $^{14}\text{C}$ -ペプチドを含む上清を、大きさ「 $2 \times 4\text{ cm}$ 」の口紙に吸着させ

た。この口紙を Bray のシンチレーターの入っているバイアルに入れ、液体シンチレーション・カウンターで測定した。

#### (7) 試料の $\text{NaSCN}$ と $\text{NaClO}_4$ による 透析処理

カオトロピック・イオン処理は、Abe 等の方法<sup>39)</sup>に準じて行った。試料は、各指定濃度の  $\text{NaSCN}$  あるいは  $\text{NaClO}_4$  溶液 (両試薬とも Brij を除いた RSF 緩衝液に溶解した。)に、 $3^{\circ}\text{C}$  で16時間透析された。その後、直ちに RSF 緩衝液に対して逆透析を十分に行い、透析内液の必要量をコラゲナーゼ活性の測定に供した。

#### (8) 試料の $\text{pH } 5\text{--}10\%$ $\text{NaCl}$ 処理

コラーゲンに結合したコラゲナーゼは  $\text{pH } 5$  で遊離することが Nagai 等<sup>53)</sup>により報告されており、また大部分の可溶性コラーゲンは、酸性の下で  $10\%$   $\text{NaCl}$  により不溶性になることが知られている。そこで、 $\text{pH } 5\text{--}10\%$   $\text{NaCl}$  処理を行うことを考えた。

歯肉抽出液あるいは RSF コラゲナーゼを含む歯肉抽出液に  $0.1\text{ M NaCl}$  と  $0.01\text{ M CaCl}_2$  を含む  $1\text{ M}$  酢酸緩衝液 ( $\text{pH } 5.0$ ) を、処理溶液の  $1/10$  量加え、十分に攪拌してから  $0^{\circ}\text{C}$  に30分間放置した。放置後、 $\text{NaCl}$  濃度が  $10\%$  になるように、 $25\%$   $\text{NaCl}$  と  $0.01\text{ M CaCl}_2$  を含む  $0.1\text{ M}$  酢酸緩衝液 ( $\text{pH } 5.0$ ) を添加し、再び  $0^{\circ}\text{C}$  に60分間放置した。60分後、遠心 ( $59,310 \times g$ ,  $5\text{ min}$ ) して沈澱を除き、上清を RSF 緩衝液に対して十分透析をしてから、目的とする実験に使用した。

#### (9) 歯肉抽出液のゲル・口過による分画

あらかじめ、RSF 緩衝液で平衡化しておいたセファデックス G-150 カラム ( $1 \times 76\text{ cm}$ ) に牛歯肉抽出液 ( $1\text{ ml}$ ) を乗せ、同じ緩衝液で溶出した (流速:  $13.5\text{ ml/cm}^2/\text{h}$ ,  $1.06\text{ ml/fraction}$ )。得られた各フラクションについて、Spectrophotometer を使って波長  $280\text{ m}\mu$  での吸光度を測り、タンパク質の存在と濃度の目安とした。又、分画した物質の分子量を知るために、牛血清アルブミン、卵白アルブミン、大豆トリプシン・インヒビターをマーカーとして使った。

#### (10) タンパク質濃度測定

タンパク質濃度は、Lowry 等の方法<sup>54)</sup>により測定した。基準タンパク質としては、牛血清アルブミンを用いた。

## 結 果

### (I) 血清あるいは血清成分 $\alpha_2$ -M によって不活性化された RSF コラゲナーゼの活性化

血清存在下に培養された組織の培養あるいは組織から直接コラゲナーゼを抽出しようとするれば、コラゲナーゼの強いインヒビターとして知られている血清 ( $\alpha_2$ -M) が、当然酵素抽出液に混入し、延いては酵素精製に影響を与える。又、実際に  $\alpha_2$ -M とコラゲナーゼの複合体が抽出されてもいる<sup>40)</sup>。そこで、血清あるいは  $\alpha_2$ -M によって不活性化されたコラゲナーゼ活性の回復について検討した。

#### (1) コラゲナーゼ活性の血清あるいは $\alpha_2$ -M による不活性化

まず本実験の目的から RSF コラゲナーゼ酵素系に、種々の量の血清あるいは  $\alpha_2$ -M を添加し、活性を 100 % 不活性化する血清と  $\alpha_2$ -M の添加量を求めた (図1. A と B)。血清では 5 % (v/v) 以上、 $\alpha_2$ -M では 1.6 mg/ml 以上添加すると、コ

ラゲナーゼ活性は完全に不活性化されることが知られた。以下の実験では、それぞれこの値以上の血清あるいは  $\alpha_2$ -M が添加された。

#### (2) 血清あるいは $\alpha_2$ -M により不活性化されたコラゲナーゼの NaSCN と NaClO<sub>4</sub> による透析処理

これまでに、コラゲナーゼと  $\alpha_2$ -M の複合体が確認<sup>40)45)</sup>される一方、この複合体を 3 M NaSCN 溶液で低温透析処理すれば再び酵素活性を現わすことが報告されている<sup>39)</sup>。しかし、この処理による酵素活性の回復率は大変悪く 5 ~ 10 % であった。

そこで、これ以上のコラゲナーゼ活性の回復を期待し、カオトロピック・イオンの中でも SCN<sup>-</sup> イオンよりも弱い性質を持つ ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> イオンを試用することにした。

図2. A と B に図示したように、ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> イオンは SCN<sup>-</sup> イオンと同じく、血清による不活性化 (a)、あるいは  $\alpha_2$ -M による不活性化 (b) にも効果的であることがわかった。しかし、最高の回復率を現わす至適濃度が異なり、SCN<sup>-</sup> イオンでは 3 M であったのに対し、ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> イオンでは 5 M であった。しかも、その時の回復率は、SCN<sup>-</sup> イオンの約 38 % (a) と 40 % (b) に対し、ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> イオンで

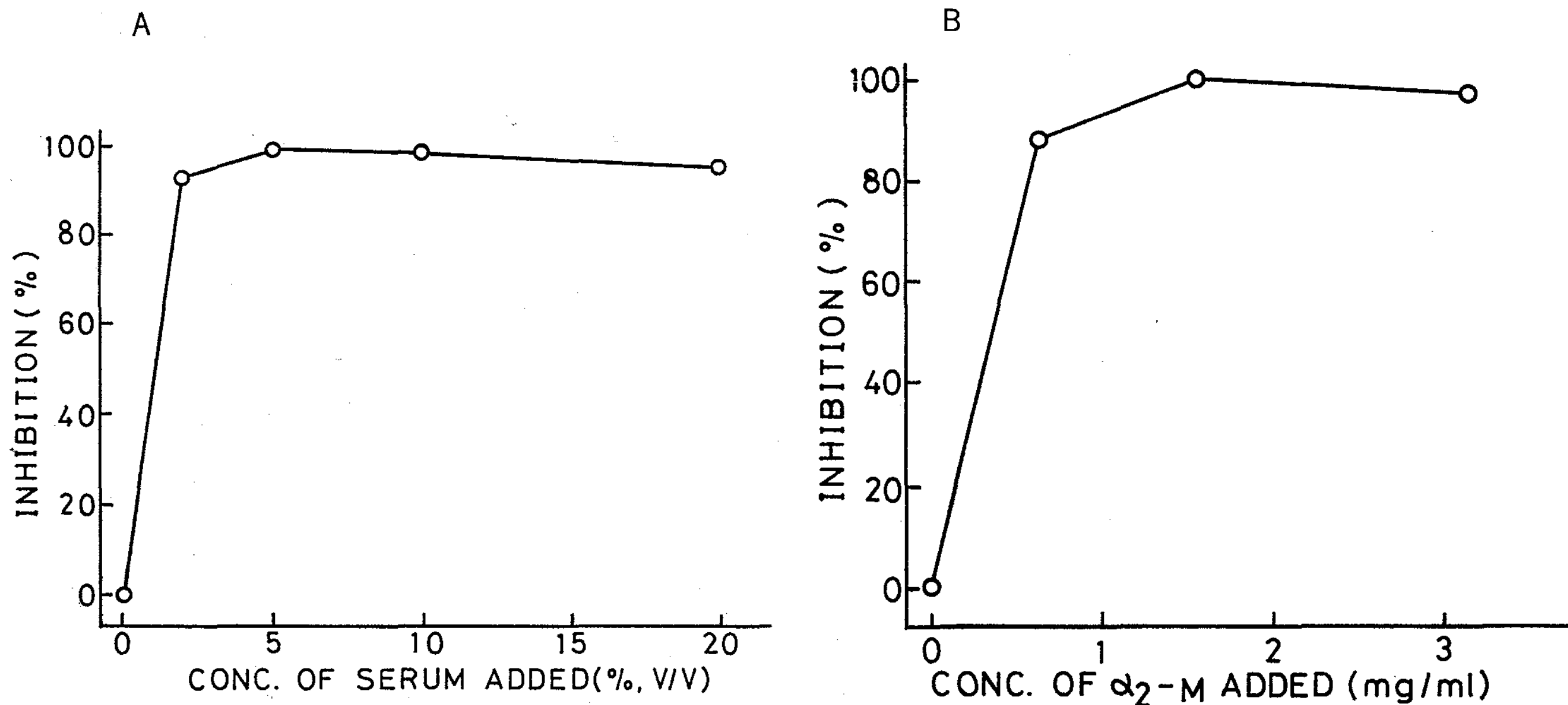


図1 人血清及び  $\alpha_2$ -M による RSF コラゲナーゼ活性の阻害

RSF コラゲナーゼ (10  $\mu$ l) に RSF 緩衝液 (10  $\mu$ l) と 11 mM APMA (2  $\mu$ l) を加え、37 °C で 3 時間保温し、酵素を活性化した。次いで、指定量の人血清あるいは  $\alpha_2$ -M と RSF 緩衝液を加えて 0.1 ml とし、十分攪拌してから“方法”で述べたように酵素活性を測定した。血清添加前の酵素活性 (6,280 cpm) を阻害率 0 % とした。A: 血清, B:  $\alpha_2$ -M。



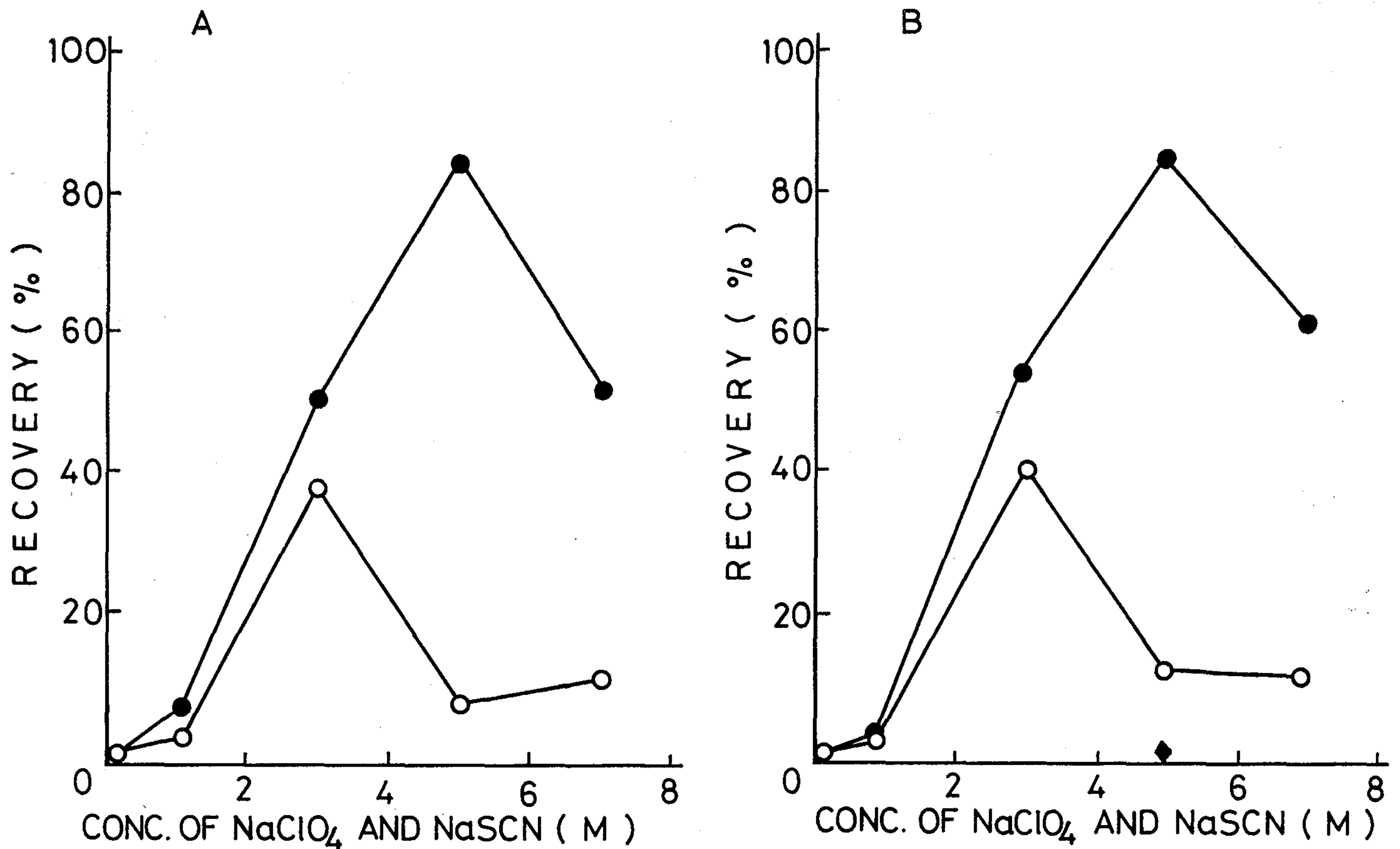


図2 血清及び α<sub>2</sub>-M により不活性化された RSF コラゲナーゼに対する SCN<sup>-</sup>イオン及び ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>イオン処理の効果

RSF コラゲナーゼ (30 μl) に RSF 緩衝液 (30 μl) と 11 mM APMA (6 μl) を加え, 37 °C で 3 時間保温後, 血清 (15 μl) あるいは α<sub>2</sub>-M (15 μl) と RSF 緩衝液 (15 μl) を添加し, 十分攪拌後, 再び 37 °C で 20 分保温した。それから, この反応溶液を透析膜に移し透析した ("方法" を参照)。酵素活性は透析後 RSF 緩衝液を加えて全量を 0.3 ml とし, その 0.1 ml ずつを取り 2 本分反応した。阻害物質添加前の酵素活性 (6,300 cpm) を回復率 100 % とした。A: 血清, B: α<sub>2</sub>-M。◆: 無処理の対照, ○—○: NaSCN 処理, ●—●: NaClO<sub>4</sub> 処理。

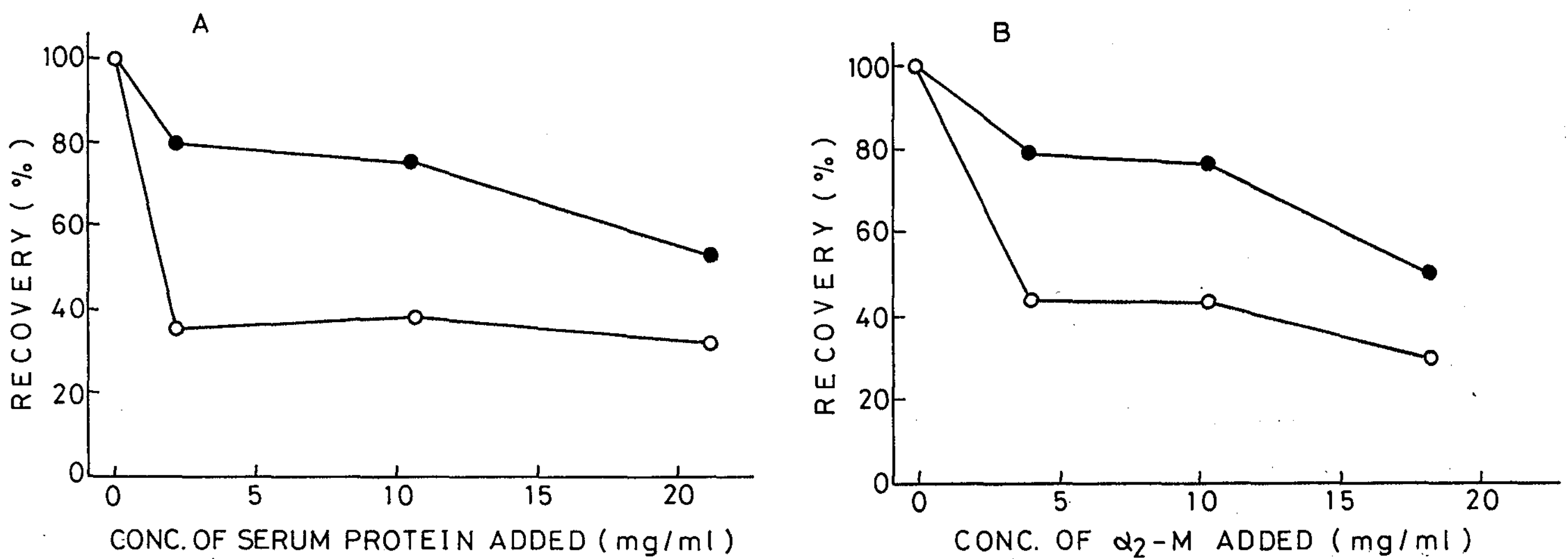


図3 NaSCN と NaClO<sub>4</sub> 処理に及ぼす血清量及び α<sub>2</sub>-M 量の影響

指定量の血清あるいは α<sub>2</sub>-M を RSF コラゲナーゼ酵素系に添加し, 3 M NaSCN と 5 M NaClO<sub>4</sub> 処理を各々行ない酵素活性の回復率を求めた。A: 血清, B: α<sub>2</sub>-M。○—○: 3M NaSCN 処理, ●—●: 5M NaClO<sub>4</sub> 処理。

は約85% (a), 86% (b) と,  $\text{ClO}_4^-$  イオン処理の方が  $\text{SCN}^-$  イオン処理よりも2倍以上も効果的であった。

次に, 3 M NaSCN 及び 5 M  $\text{NaClO}_4$  透析処理に対する血清及び  $\alpha_2\text{-M}$  量の影響について検討した。図3のAとBに示した様に, 血清及び  $\alpha_2\text{-M}$  いずれも 11 mg/ml までは, NaSCN 及び  $\text{NaClO}_4$  処理に影響を与えなかった。

### (3) 血清あるいは $\alpha_2\text{-M}$ により完全に不活性化されたコラゲナーゼ酵素系への有機水銀化合物とトリプシンの影響

カオトロピック・イオン透析処理の有効性が認められたが, より単純かつ短時間の操作としての APMA 及びトリプシン処理の影響について検討した。

APMA は 0.5 mM 濃度で, 十分組織インヒビターとコラゲナーゼの複合体からインヒビターを解離し, コラゲナーゼを活性化する試薬として知られている<sup>55)</sup>が,  $\alpha_2\text{-M}$  と RSF コラゲナーゼの複合体に対しては, 最大溶解度の 5.9 mM まで加えても, 効果が見られなかった (図4)。一方, トリプシンは, プロ・コラゲナーゼやコラゲナーゼと組織インヒビターあるいは  $\alpha_2\text{-M}$  との複合体

にも作用し, コラゲナーゼ活性の回復をもたらすと言われている<sup>45)54)56)56)</sup>。図5に, 血清を添加した RSF コラゲナーゼ系に, 種々の濃度のトリプシンを作用させた結果を示してあるが, 最高約20%のコラゲナーゼ活性の回復が見られたにとどまり, 5 M  $\text{NaClO}_4$  透析処理で認められたほど高い回復率は得られなかった。

### (II) 牛歯肉抽出液中のコラゲナーゼ阻害物質の除去

これまで数多くの組織から取り出されたコラゲナーゼは, 一般にラテント型酵素として見い出されており, 最近では, いろいろの組織からコラゲナーゼ・インヒビター<sup>57)~61)</sup>も発見抽出されるようになった。

いま一定量の RSF コラゲナーゼ酵素系に, 牛歯肉抽出液の添加量をふやしていき, その時のコラゲナーゼ活性を測ってみると, かなり強い酵素活性の阻害が認められた (図6)。歯肉抽出液 20  $\mu\text{l}$  で, ほぼ 100% RSF コラゲナーゼ活性が阻害された。尚, この場合 1 mM APMA 存在下に酵素活性を測定した結果, APMA は歯肉抽出液の低濃度領域では比較的良い活性回復効果を示したが, 高濃度領域では 27% 程度の回復効果であ

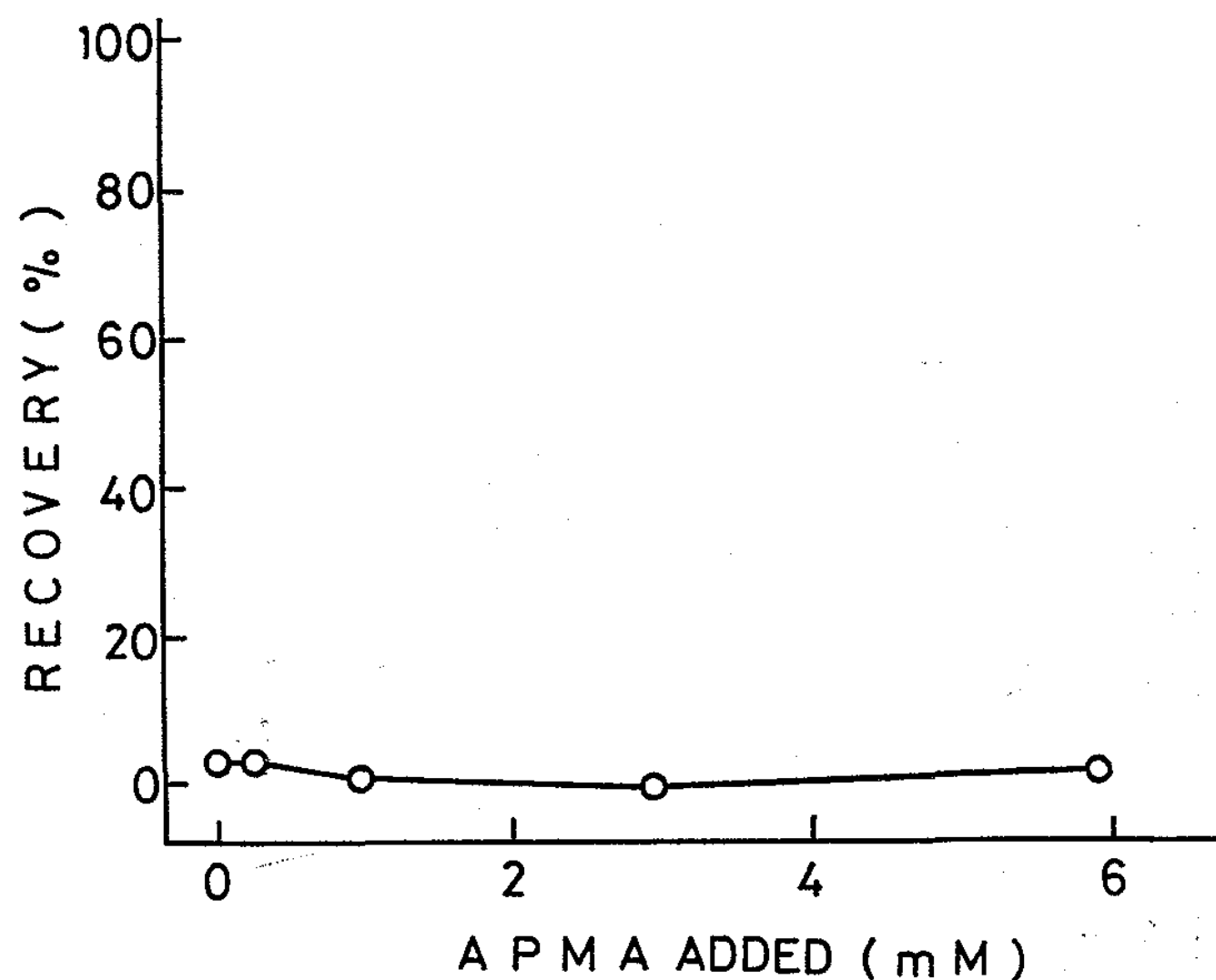


図4  $\alpha_2\text{-M}$  により不活性化された RSF コラゲナーゼの APMA 処理効果

図1同様に RSF コラゲナーゼを活性化後,  $\alpha_2\text{-M}$  (5  $\mu\text{l}$ ) 又は血清 (2  $\mu\text{l}$ ) を添加・攪拌し, 37°Cで20分間保温した。次いで, APMA を指定量加え酵素活性を測定し, 回復率を求めた。

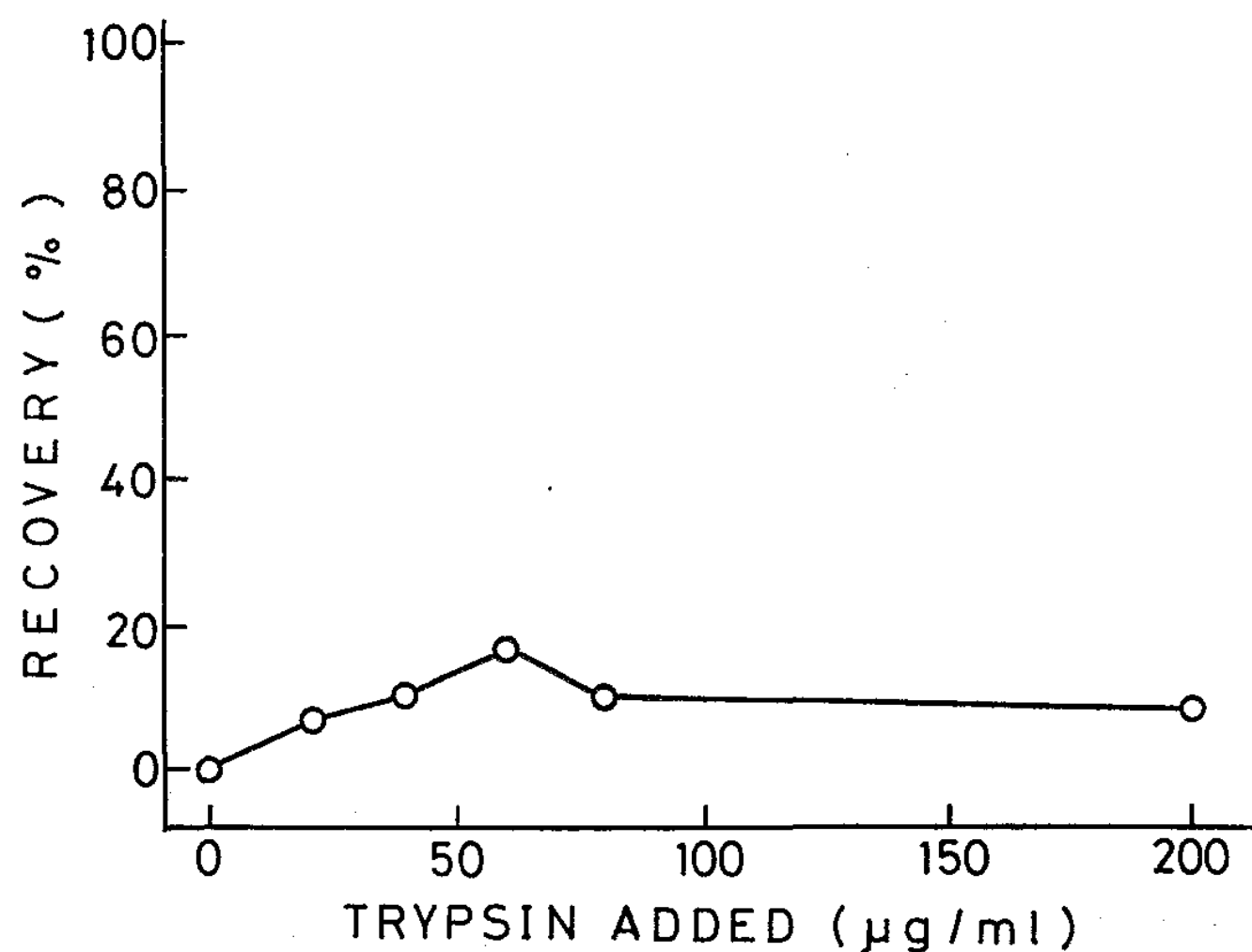


図5 血清により不活性化された RSF コラゲナーゼのトリプシン処理効果

トリプシン処理は, APMA の場合と同様に指定量を添加した後, 25°Cで20分間, 行われた。次いで, トリプシン・インヒビターをトリプシンの10倍量加え, 十分攪拌してから酵素活性を測定した。

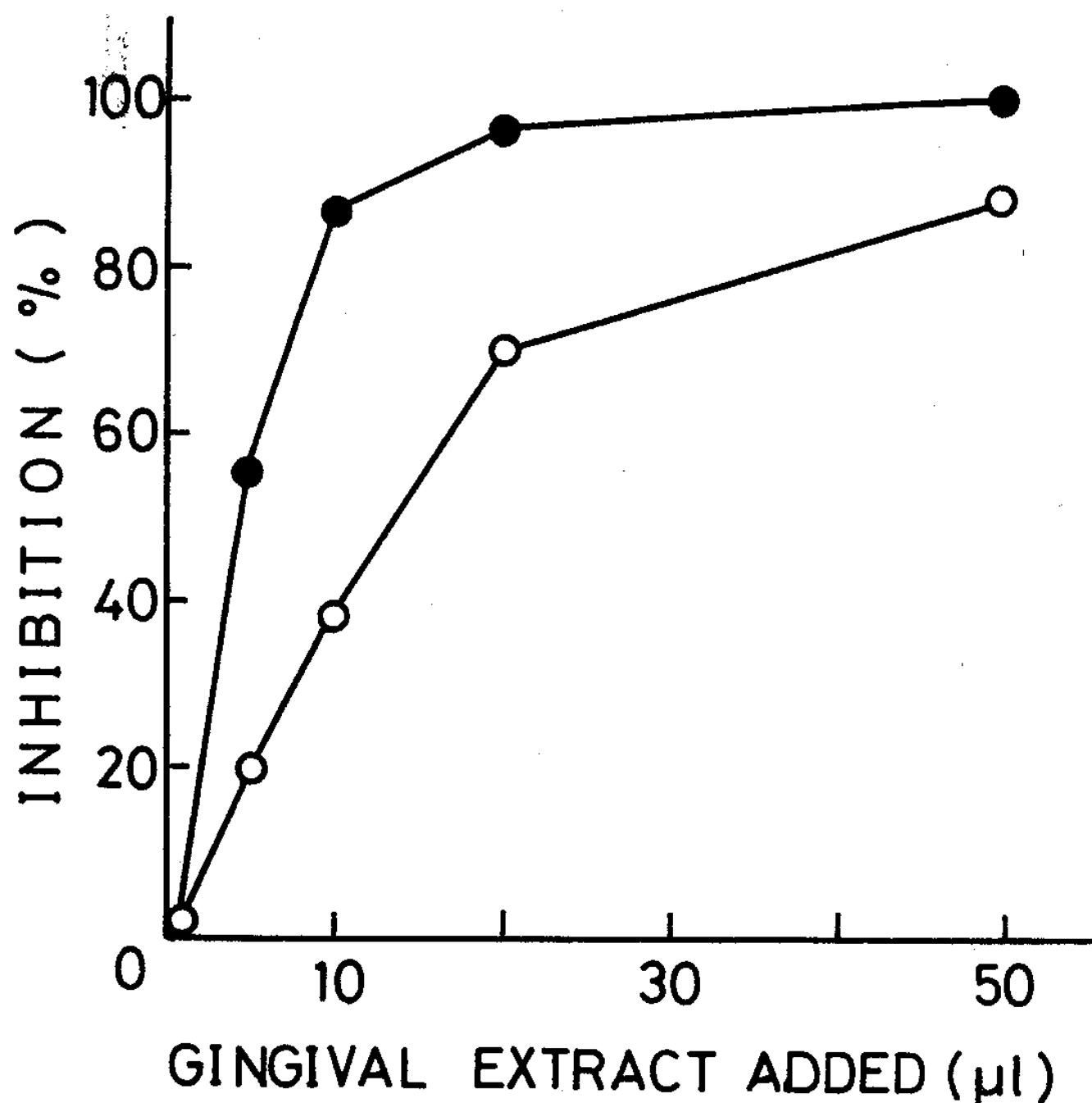


図6 歯肉抽出液のRSF コラゲナーゼ活性に及ぼす影響とAPMAの効果

RSF コラゲナーゼ溶液 (50 μl) に指定量の歯肉抽出液を添加し、RSF 緩衝液で全量を 0.1 ml に合わせ酵素活性を測定した (●—●)。あるいは、歯肉抽出液を添加・攪拌後、APMA を終濃度 1 mM になるように加えて全量を 0.1 ml とし、酵素活性を測定した (○—○)。歯肉抽出液添加前の酵素活性 (19,500 cpm) を阻害率 0% とした。

った。

### (1) NaClO<sub>4</sub> 及び pH 5-10 % NaCl 処理

歯肉抽出液に 5 M NaClO<sub>4</sub> 溶液による透析処理あるいは pH 5-10 % NaCl 処理を施した結果を、図7に示した。前者の処理によって歯肉抽出液中のタンパク質量は約 1/2 減少し、酵素活性は 30 % 近く回復した。即ち、阻害物質が 30 % 沈澱として除かれたと考えられる。一方、後者の方法での活性回復は 10 % にすぎなかった。

### (2) トリプシン処理

上記各方法で処理した歯肉抽出液を RSF コラゲナーゼ酵素系に添加し、これを更にトリプシン処理することを考えた。結果は図7に示すごとく NaClO<sub>4</sub> 前処理のものは酵素活性の回復率が 80 % を超え、pH 5-10 % NaCl 前処理のものでも 80 % と大幅なコラゲナーゼ活性の回復が見られた。これに対して、無処理歯肉抽出液の場合でも回復率約 60 % を示し、トリプシン処理の顕著な効果が認められた。又、NaClO<sub>4</sub> 前処理の場合には、他に

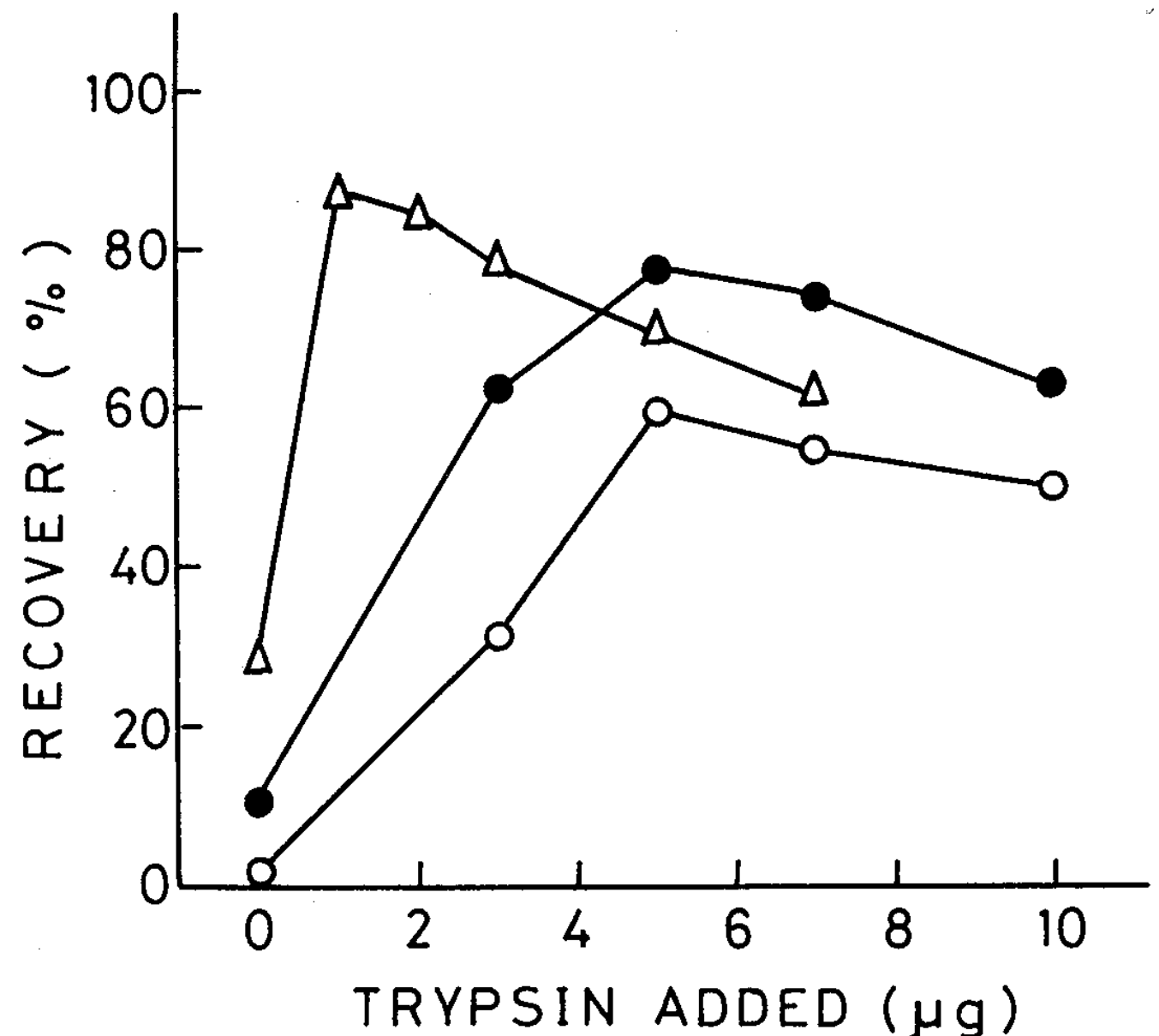


図7 NaClO<sub>4</sub> 処理あるいは pH 5-10 % NaCl 処理を行った歯肉抽出液の RSF コラゲナーゼ阻害作用に対するトリプシン処理の効果

歯肉抽出液を 5 M NaClO<sub>4</sub> 処理 (Δ—Δ) あるいは pH 5-10 % NaCl 処理 (●—●) し、それらの無処理歯肉抽出液 (○—○) 20 μl に相当する量を、それぞれ RSF コラゲナーゼ酵素液 (3 μl) に加え、十分攪拌した。次いで、指定量のトリプシンを加え 37 °C で 20 分間保温後、トリプシン・インヒビターと RSF 緩衝液を加え 0.1 ml とし、酵素活性を測定した。歯肉抽出液添加前の酵素活性 (21,600 cpm) を回復率 100 % とした。

比してより少ないトリプシン量で効果が認められたが、これは抽出液中のタンパク質量の減少によるものであろう。

### (3) APMA 処理

次に、APMA 処理の影響について実験した (図8)。歯肉抽出液により完全に活性を失った RSF コラゲナーゼは、この APMA 処理により約 40 % の活性を回復した。

NaClO<sub>4</sub> で前処理した歯肉抽出液を添加したコラゲナーゼ酵素系の場合、活性の最高回復は APMA 処理により殆ど影響を受けなかったが、pH 5-10 % NaCl 前処理を施した歯肉抽出液を添加したコラゲナーゼ酵素系の場合には、更に最高 90 % まで活性回復率が上った。

### (III) 歯肉抽出液により完全不活性化されたコラゲナーゼの活性化

以上の実験から、トリプシン、APMA、NaClO<sub>4</sub>、

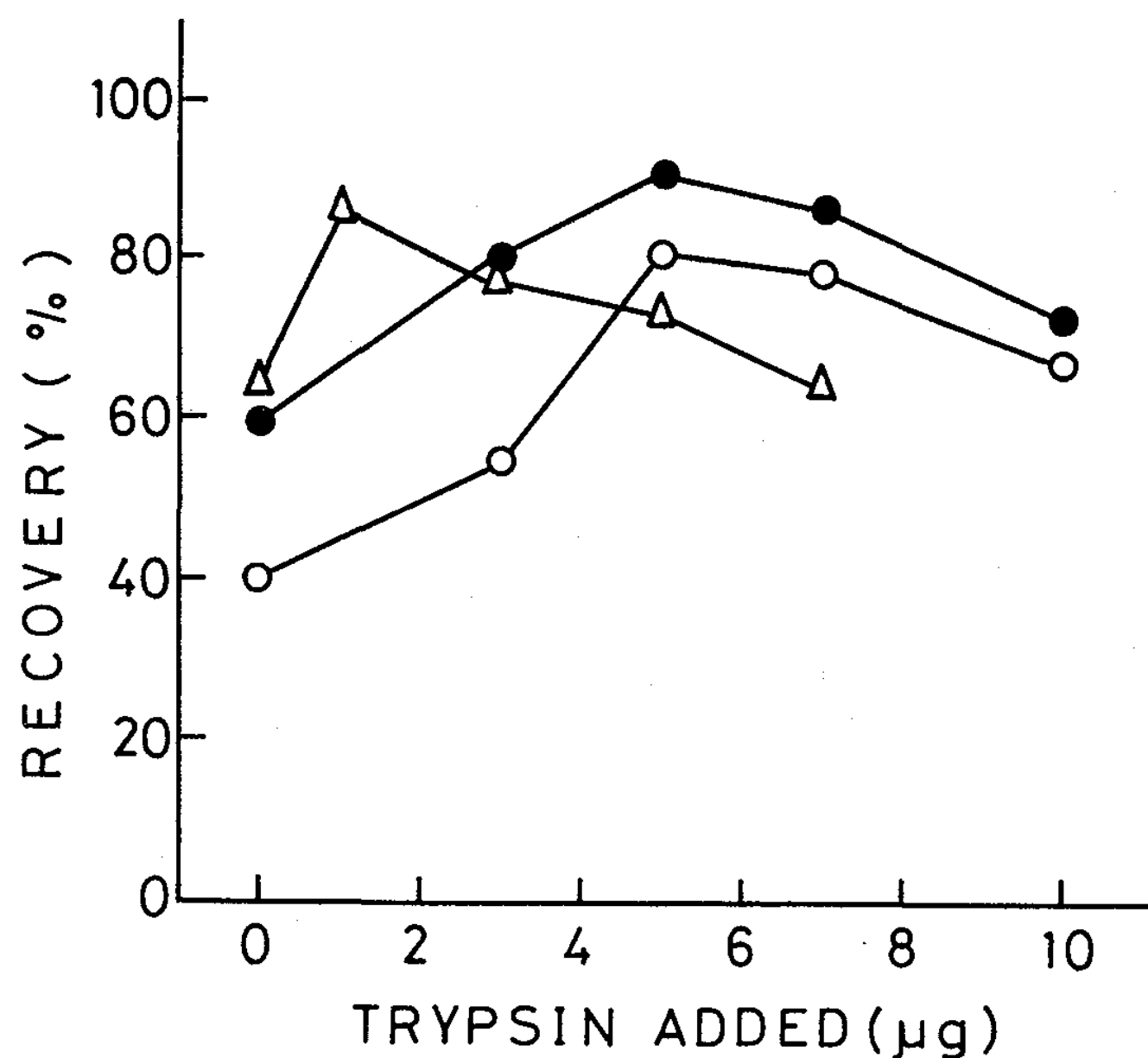


図 8  $\text{NaClO}_4$  処理あるいは pH 5-10 % NaCl 処理を行った歯肉抽出液の RSF コラゲナーゼ阻害作用に対するトリプシン処理及び APMA 処理の効果

APMA (終濃度 1 mM) 存在下でコラゲナーゼ活性を測定した以外の実験条件は図 7 と同じ。○—○: 無処理歯肉抽出液,  $\Delta$ — $\Delta$ : 5 M  $\text{NaClO}_4$  処理を行った歯肉抽出液, ●—●: pH 5-10 % NaCl 処理を行った歯肉抽出液。

pH 5-10 % NaCl 処理が, それぞれラテン・コラゲナーゼの活性化に有効であることが明らかになったので, これらの組み合わせにより, 歯肉抽出液で不活性化された RSF コラゲナーゼの完全活性化の可能性について検討した。

まず, 歯肉抽出液により完全に不活性化された RSF コラゲナーゼの活性化に要する至適トリプシン量を求めた (図 9)。5  $\mu\text{g}$  で最高の活性回復を示し, 過剰のトリプシンは回復率を低下させた。このことは, 過剰のトリプシンがインヒビターのみならずコラゲナーゼをも破壊することを示唆している。ところで,  $\text{NaClO}_4$  あるいは pH 5-10 % NaCl 処理に次ぐトリプシン, APMA 処理の組み合わせの結果は, 残念ながら 50 % にも満たない活性回復率であった。

そこで, 組み合わせ処理の順番を変えてみることにし, トリプシン処理を最初に行い, 続いて pH 5-10 % NaCl 処理あるいは 5 M  $\text{NaClO}_4$  処理, 更に APMA 処理を行った結果を表 1. に示した。コラゲナーゼ活性の回復率は, トリプシン

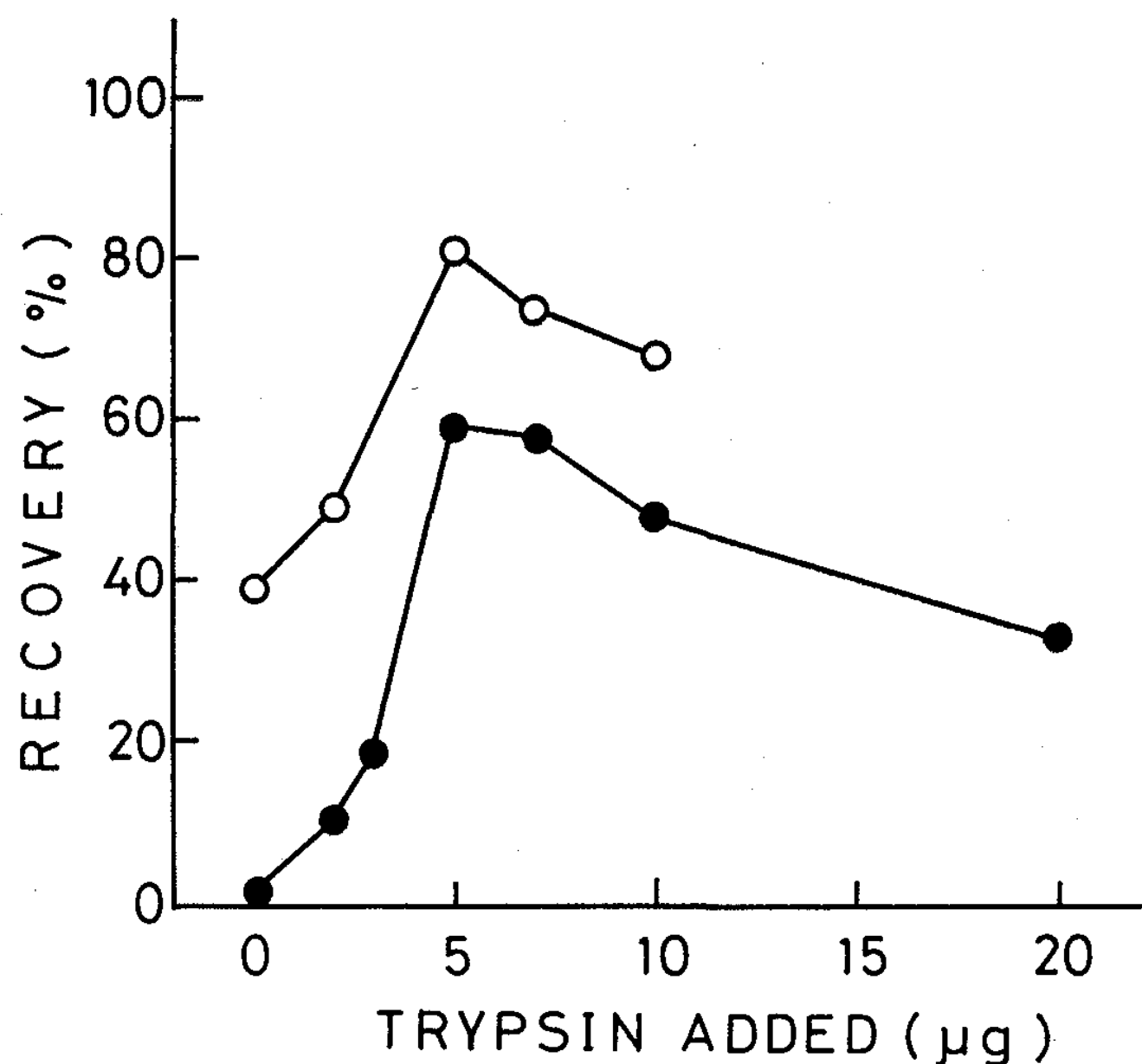


図 9 歯肉抽出液により不活性化された RSF コラゲナーゼの活性化に対するトリプシンの至適濃度

歯肉抽出液により不活性化された RSF コラゲナーゼ酵素系 (酵素溶液 20  $\mu\text{l}$  プラス抽出液 20  $\mu\text{l}$ ) に指定量のトリプシンと RSF 緩衝液を添加して 50  $\mu\text{l}$  とし, 37 °C で 20 分間保温した。以下, 図 7 と 8 参照のこと。

●—●: トリプシン処理, ○—○: トリプシン処理と APMA 処理。

表 1 歯肉抽出液により不活性化された RSF コラゲナーゼの活性化

Treatment	Recovery (%)
Trypsin	54.6
Trypsin and APMA	83.3
Trypsin and pH 5-10 % NaCl	70.4
Trypsin, pH 5-10 % NaCl and APMA	93.9
Trypsin and 5 M $\text{NaClO}_4$	34.2
Trypsin, 5 M $\text{NaClO}_4$ and APMA	47.6

図 9 と同様に RSF コラゲナーゼに歯肉抽出液を添加し, 完全に不活性化させた後, トリプシン 5  $\mu\text{g}$  を 37 °C で 20 分間作用させた。トリプシンインヒビターを加えトリプシンを失活させた後, pH 5-10 % NaCl 処理あるいは 5 M  $\text{NaClO}_4$  処理を行った。コラゲナーゼ活性は, APMA 添加又は無添加で測定した。

単独処理よりもトリプシン処理に次ぐ pH 5-10 % NaCl 処理の方が効果的であり, 更にトリプシン処理—APMA 処理よりトリプシン処理—pH 5-10 % NaCl 処理—APMA 処理の方がより効果的であり, これによりコラゲナーゼ活性を約 94 %



までとほぼ完全に回復させることができた。

#### (IV) 歯肉抽出液中のコラゲナーゼ・

##### インヒビター

以上の結果は、トリプシン処理及び APMA 処理の効果がほぼ相加であることを示し、このことは少なくとも二種類のインヒビターの存在を示唆する。そこで、歯肉抽出液をゲル・ロ過により分画し、各分画の阻害活性について検討した。その結果、二つのタンパク質による紫外線吸収のピークが得られた。又、これとほぼ一致した二つの阻害活性のピークが見い出された (図10)。このことは、牛歯肉抽出液に少なくとも大きさの異なる二種類のタンパク質性インヒビターの存在を示唆するものと思われる。

いとされている<sup>64)</sup>。代りに、血清インヒビターとして分子量 40,000 の  $\beta_1$ -アンチ・コラゲナーゼが見い出された<sup>65)66)</sup>。しかし、血清による動物コラゲナーゼ活性の阻害の 90% 以上は、 $\alpha_2$ -M によるものと言われている<sup>66)67)</sup>。著者の実験結果でも同じく、血清あるいは  $\alpha_2$ -M が強く RSF コラゲナーゼ活性を阻害した (図1, AとB)。

ところで、血清成分によるコラゲナーゼ活性の調節を生理的に見た場合、分子量の小さい  $\beta_1$ -アンチ・コラゲナーゼの方が膜透過性の点から考えて、高分子の  $\alpha_2$ -M (M. W. 725,000) よりも重要と考えられる。しかし、リウマチ患者の関節では、滑膜の透過性が高まることによるようで、 $\alpha_2$ -M がより多く見い出され<sup>68)</sup>、そこにはコラゲ

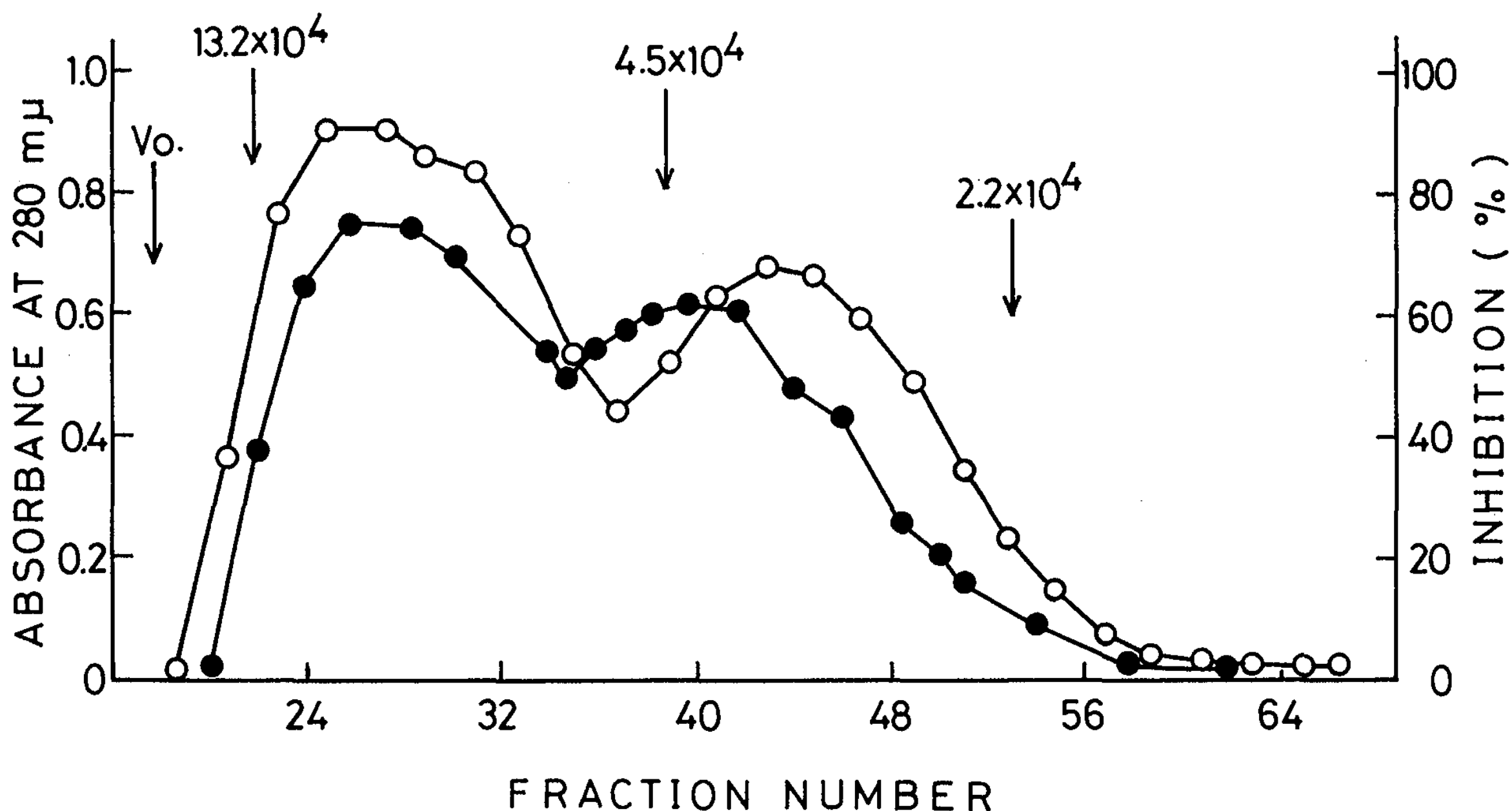


図10 歯肉抽出液のセファデックス G-150 によるゲル・ロ過のパターン

実験条件については“方法”参照。

○——○: 波長 280 mμ の吸光度, ●——●: 阻害活性 (%), 各分画 0.1 ml を RSF コラゲナーゼ 2 μl に添加し, 37°Cで18時間保温後, 酵素活性を測定した。

## 考 察

#### (I) 血清あるいは血清成分 $\alpha_2$ -M による阻害からの RSF コラゲナーゼ活性の回復

血清あるいは血清成分の  $\alpha_2$ -M や  $\alpha_1$ -プロテイナーゼ・インヒビター ( $\alpha_1$ -アンチ・トリプシン) が動物のコラゲナーゼ活性を阻害する<sup>62)63)</sup>と報告されていたが、現在では  $\alpha_1$ -アンチ・トリプシンは、動物コラゲナーゼに対して阻害作用を示さな

ナーゼと  $\alpha_2$ -M の複合体も発見された<sup>40)</sup>。尚、この実験に使った RSF コラゲナーゼ標品には、分子量 100,000 以上のものを除いたので、カオトロピック・イオンで活性化されるコラゲナーゼ活性は見られなかった (図2, B)。又、歯肉培養液からも NaSCN 処理によって活性化されるコラゲナーゼと  $\alpha_2$ -M との複合体が見い出されている<sup>45)</sup>。更に、歯肉組織から直接コラゲナーゼを抽出しようとするれば、 $\alpha_2$ -M も混在してくる<sup>23)</sup>可能

性があるので、 $\alpha_2$ -M とコラゲナーゼの複合体からコラゲナーゼを遊離させるテクニックを持つことは有意義なことであろう。

これまで Abe 等<sup>39)</sup>は、抗原・抗体の複合体を解離するために用いた 3 M NaSCN 溶液<sup>69)70)</sup> を使って  $\alpha_2$ -M とオタマジャクシのコラゲナーゼ複合体からコラゲナーゼの活性化を試みている。しかし、その回復率は 10 % 以下と悪かった。又、Birkedal-Hansen 等<sup>45)</sup>は歯肉の組織培養液をコラゲナーゼ酵素源として、 $\alpha_2$ -M との複合体を Abe 等と同様に 3 M NaSCN 透析処理を行ったが、活性回復率は 36 % と 50 % 以上にはあがらなかった。

そこで、著者は、より温和な処理条件を模索した。即ち、 $\text{SCN}^-$ イオンよりも弱いカオトロピック・イオンである  $\text{ClO}_4^-$ イオンを使用することを試みた。種々の濃度の  $\text{NaClO}_4$  処理を行ったところ、いずれの濃度でも NaSCN より効果的であり、5 M で最高の活性化を示し、ほぼ 90 % の活性を回復し得た。この場合、NaSCN はやはり 3 M が至適であり、その時の活性回復率は約 40 % であった (図 2)。尚、Shinkai 等<sup>34)71)</sup>や Sakamoto 等<sup>35)</sup>は 3 M NaI 処理により、 $\alpha_2$ -M 以外のインヒビターによるラテント・コラゲナーゼを活性化しているが、 $\text{I}^-$ イオンも同じカオトロピック・イオンであるので、用いる濃度を検討すれば  $\alpha_2$ -M・コラゲナーゼ複合体の活性化が可能であるかもしれない。逆に、 $\text{NaClO}_4$  処理によって、このラテント・コラゲナーゼの活性化が可能であるかもしれない。

APMA は、S-S 結合していると考えられている<sup>36)72)</sup>コラゲナーゼと組織インヒビターとの複合体からインヒビターを解離し、コラゲナーゼを活性化する試薬として知られている<sup>72)73)</sup>。トリプシンは蛋白質分解酵素として、プロ・コラゲナーゼ及び組織インヒビターとコラゲナーゼの複合体を限定分解することによって活性化すると考えられている<sup>9)29)32)46)48)</sup>。しかし、後者の場合には、トリプシノーゲンや TLCK・トリプシン処理によってもラテント・コラゲナーゼの活性化をもたらすことができるので、複合体とトリプシンの間の

SS 交換反応によりコラゲナーゼがインヒビターから解離され、酵素活性をもつに至ると考えられる<sup>36)</sup>。又、 $\alpha_2$ -M は 4 つの同じサブユニットからなり、分子量 181,000 のサブユニット 2 個づつが SS 結合で結ばれ、更にこれらが非共有結合で結ばれたものだという<sup>74)</sup>。そして、その一部をコラゲナーゼ等の蛋白質分解酵素により切られると、構造変化を来し酵素を内部に取り込むようになり、その結果、活性を阻害するとの仮説も考えられている<sup>45)74)75)</sup>。これによれば、 $\alpha_2$ -M・コラゲナーゼ複合体のコラゲナーゼとトリプシンの交換は起り難く、この様式による活性化は考えにくい<sup>45)</sup>。

著者の結果では、APMA は  $\alpha_2$ -M・コラゲナーゼ複合体に全く効果がなかったが、トリプシンは多少効果的であった (図 4, 5)。このことは、トリプシンによる活性化は SS 交換反応によるものではなく、Birkedal-Hansen 等も指摘しているように、トリプシンの  $\alpha_2$ -M 分解作用によるものと考えられる。

## (II) 牛歯肉抽出液による阻害からのコラゲナーゼ活性の回復

リウマチ滑膜から抽出されたコラゲナーゼ溶液を Ultrogel AcA 44 カラム・クロマトグラフィで分画し、得られた各フラクションについて、無処理あるいは活性化処理 (メルサリル使用) 後に測定した酵素活性パターンを見ると、フラクション全域にわたって酵素活性が現われている<sup>76)</sup>。このことは、コラゲナーゼがいろいろの大きさの阻害物質と結合していることを暗示し、コラゲナーゼを組織から直接抽出・精製すること及びその定量化の困難さを物語っている。

この実験に用いた牛歯肉抽出液も RSF コラゲナーゼ活性を強く阻害することが観察された (図 6)。又、この歯肉抽出液のセファデックスによるゲル・ロ過のパターンを見ても、分画されたタンパク質の殆んどが RSF コラゲナーゼ活性を阻害する様相を呈している (図 10)。それ故、何らかの活性化の方法を講じなければ、全く酵素活性は現われないであろう。そこで、次の様な活性化の方法を検討してみた。

### (1) APMA 処理

歯肉抽出液添加により完全に不活性化された RSF コラゲナーゼは, APMA 処理によりその活性を, ほぼ 30 ~ 40 % 回復させることが可能であった (図 6, 8, 9)。このことは, 歯肉組織にも SS 結合によってコラゲナーゼ活性を阻害するようなタンパク質性インヒビターが存在することを示唆する。これまでに, 口腔の組織から APMA によって活性化されるラテン・コラゲナーゼの存在が報告され<sup>24)25)27)47)</sup>, またインヒビターの存在も見い出されている<sup>59)77)78)</sup>。

#### (2) NaClO<sub>4</sub> 処理

歯肉抽出液を 5 M NaClO<sub>4</sub> で処理すると, そのタンパク質の約半分が沈澱除去されたが, 図 10 の結果から, この歯肉抽出液には分子量約 73 万という高分子の  $\alpha_2$ -M は存在しないと思われる。一方, この処理によってコラゲナーゼ活性の 25 ~ 30 % が回復される (図 7, 8)。従って, 用いた牛歯肉抽出液には 5 M NaClO<sub>4</sub> 処理によって沈澱除去されるような,  $\alpha_2$ -M とは別の阻害物質が存在するものと思われる。

#### (3) pH 5-10 % NaCl 処理

コラーゲンには中性塩で抽出されるものもあり, このコラーゲンはコラゲナーゼを抽出する際に混入し, 酵素活性の測定に影響を及ぼすと思われる。(事実, 牛歯肉抽出液中にコラーゲンを見出すことができた。) pH 5-10 % NaCl 処理を牛歯肉抽出液に施してみると, そのコラゲナーゼ阻害活性を 10 ~ 20 % 取り除くことができた (図 7, 8)。しかし, この場合コラーゲン以外のタンパク質も沈澱除去されることを示す結果が得られた。いずれにせよ, この処理をコラゲナーゼ抽出に利用することは, 意味があると考えられる。

#### (4) トリプシン処理

トリプシン処理は, 歯肉抽出液によって不活性化された RSF コラゲナーゼの活性化に, 回復率 50 ~ 60 % と強い効果を発揮した。しかし, それでもこの単独処理では未だ 40 ~ 50 % の活性が不活性化状態にあり, 阻害の多様化をうかがわせている。

#### (5) (1) ~ (4) の組み合わせ処理

そこで, (1) ~ (4) を組み合わせれば, より良い

酵素活性の回復が期待されるだろうと, 牛歯肉抽出液により完全不活性化された RSF コラゲナーゼ酵素系に組み合わせ処理を試みた。予想通り, トリプシン処理—pH 5-10 % NaCl 処理—APMA 処理によって, ほぼ完全に添加 RSF コラゲナーゼの活性を回復することができた (表 1)。しかし, pH 5-10 % NaCl 処理を先に行うと, コラーゲンその他のタンパク質の沈澱と共にコラゲナーゼも一部沈澱除去されることが認められた。従って, これらの組み合わせ処理の場合, その順序が重要である。又, 歯肉抽出液によるコラゲナーゼの阻害は, その 94 % が回復されることから蛋白質分解酵素によるコラゲナーゼの分解による結果ではなく, インヒビターとの複合体形成によるものであろう。更に, この三つの処理はそれぞれ別々の阻害物質に作用していると考えられる。即ち, pH 5-10 % NaCl 処理はコラーゲン及びその他のタンパク質の除去に, APMA はコラゲナーゼ・インヒビター間の S-S 結合の切断に, トリプシンは他のインヒビターの分解に作用すると考えられる。しかし, 一部同一物質に共通に作用する可能性は否定できない。いずれにしても, この牛歯肉抽出液にはセファデックスによるゲル・ロ過の結果が示すように, 少なくとも大きさの異なる二種類の阻害物質の存在することが推定される。

### 結 論

血清と  $\alpha_2$ -M, 更に牛歯肉抽出液によって不活性化された RSF コラゲナーゼ活性を回復させるため, 種々の活性化処理実験を行ない次の様な結論を得た。

(1) 血清あるいは  $\alpha_2$ -M によって阻害されるコラゲナーゼ活性は, 従来 3 M NaSCN を用いる透析処理によって活性を回復すると言われていたが, 著者は 5 M NaClO<sub>4</sub> 透析処理を行い, 80 % 以上の高い回復率をもってコラゲナーゼ活性を回復させることができた。

(2) 牛歯肉抽出液によって不活性化された RSF コラゲナーゼは, トリプシン処理, pH 5-10 % NaCl 処理及び APMA 処理を組み合わせ



ることによって、ほぼ完全にその活性を回復させることができた。この方法は、歯肉のみならず、種々の動物組織のコラゲナーゼ活性の測定に有用であろう。

(3) セファデックス G-150 を用いたゲル・ロ過により、牛歯肉抽出液には大きさの異なる2種のコラゲナーゼ阻害物質が存在することが示唆された。尚、このゲル・ロ過の結果は、歯肉抽出液中に  $\alpha_2$ -M が存在しないことを示した。

## 謝 辞

筆をおくに当り、手厚い指導と校閲の労をとられた野原広美教授に心から謝意を表します。又、実験に際し多大の便宜を与えられた口腔生化学教室員の皆様と実験材料獲得に援助を賜った蒲原宏、橋詰重平、東條猛諸氏に対し厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- Gross, J. and Lapiere, C. M.: Collagenolytic activity in amphibian tissue: A tissue culture assay, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **48**, 1014-1022, 1962.
- Fullmer, H. M. and Lazarus, G. S.: Collagenase in bone of man, *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 798, 1969.
- Shimizu, M., Glimcher, M. J., Travis, D. and Goldharber, P.: Mouse bone collagenase: Isolation, partial purification and mechanism of action, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **130**, 1175-1180, 1969.
- Eisen, A. Z., Jeffrey, J. J. and Gross, J.: Human skin collagenase: Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule, *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 637-645, 1968.
- Nagai, Y. and Hori, H.: Vertebrate collagenase: Direct extraction from animal skin and human synovial membrane, *J. Biochem.* **72**, 1147-1153, 1972.
- Jeffrey, J. J. and Gross, J.: A collagenase from rat uterus: Isolation and partial characterization, *Biochem.* **9**, 268-273, 1970.
- Evanson, J. M., Jeffrey, J. J. and Krane, S. M.: Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture, *J. Clin. Invest.* **47**, 2639-2651, 1968.
- Woolley, D. E., Glanville, R. W., Crossley, M. J. and Evanson, J. M.: Purification of rheumatoid synovial collagenase and its action on soluble and insoluble collagen, *Eur. J. Biochem.* **54**, 611-622, 1975.
- Vater, C. A., Mainardi, C. L. and Harris, E. D. Jr.: Activation in vitro of rheumatoid synovial collagenase from cell cultures, *J. Clin. Invest.* **62**, 987-992, 1978.
- Cawston, T. E. and Tyler, J. A.: Purification of pig synovial collagenase to high specific activity, *Biochem. J.* **183**, 647-656, 1979.
- Lazarus, G. S., Brown, R. S., Daniels, J. R. and Fullmer, H. M.: Human granulocyte collagenase, *Science*, **159**, 1483-1485, 1968.
- Lazarus, G. S.: Role of granulocyte collagenase in collagen degradation, *Am. J. Pathol.* **68**, 565-578, 1972.
- Wahl, L., Wahl, S., Mergenhagen, S. and Martin, G. E.: Collagenase production by endotoxin activated macrophage, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 3598-3601, 1974.
- Fujiwara, K., Sakai, T., Oda, T. and Igarashi, S.: The presence of collagenase in Kupffer cells of the rat liver, *Biophys. Res. Commun.* **54**, 531-537, 1973.
- Harris, E. D., Faulkner, C. S. and Wood, S. Jr.: Collagenase in carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 1247-1253, 1972.
- Yamanishi, Y., Maeyens, E., Dabous, M. K., Oyama, H. and Hashimoto, K.: Collagenolytic activity in malignant melanoma: Physicochemical studies: *Cancer Res.* **33**, 2507-2512, 1973.
- McCroskery, P. A., Richards, J. F. and Harris, E. D.: Purification and characterization of a collagenase extracted from rabbit tumours, *Biochem. J.* **152**, 131-142, 1975.



- 18) Wolf, W. and Wirl, G.: Collagenase in the Walker 256 carcinoma: A study of the latent and active enzyme in vivo and in vitro, *Eur. J. Biochem.* **121**, 623-629, 1982.
- 19) Gibson, W. and Fullmer, H. M.: Collagenolytic activity of gingival tissue in vitro, *J. Dent. Res.* **45**, 1225, 1966.
- 20) Beutner, E. H., Triftshauser, C. and Hazen, S. P.: Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal diseases, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**, 1082-1085, 1966.
- 21) Fullmer, H. M., Taylor, R. E. and Guthrie, R. W.: Human gingival collagenase: Purification, molecular weight and inhibitor studies, *J. Dent. Res.* **51**, 349-355, 1972.
- 22) Birkedal-Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: Bovine gingival collagenase: Demonstration and initial characterization, *J. Oral. Pathol.* **3**, 232-238, 1974.
- 23) Uitto, V., Turto, H. and Saxén, L.: Extraction of collagenase from human gingiva, *J. Periodont. Res.* **13**, 207-214, 1978.
- 24) Kishi, J., Iijima, K., and Hayakawa, T.: Dental pulp collagenase: Initial demonstration and characterization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**, 27-31, 1979.
- 25) Uitto, V. J., Appelgren, R. and Robinson, P. J.: Collagenase and neutral metalloproteinase activity in extracts of inflamed human gingiva, *J. Periodont. Res.* **16**, 417-424, 1981.
- 26) Iijima, K., Kishi, J., Fuyamada, H., Nagatsu, T. and Hayakawa, T.: Dental sac collagenase: Demonstration and initial characterization, *J. Dent. Res.* **57**, 724, 1978.
- 27) Hurum, S., Sodec, J. and Aubin, J. E.: Synthesis of collagen, collagenase and collagenase inhibitors by cloned human gingival fibroblasts and the effect of concanavalin A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 357-366, 1982.
- 28) Harper, E., Block, K. J. and Gross, J.: The zymogen of tadpole collagenase, *Biochemistry*, **10**, 3035-3041, 1971.
- 29) Vaes, G.: The release of collagenase as an inactive proenzyme by bone explants in culture, *Biochem. J.* **126**, 275-289, 1972.
- 30) Kruze, D. and Wojtecka, E.: Activation of leucocyte collagenase proenzyme by rheumatoid synovial fluid, *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 436-446, 1972.
- 31) Oronsky, A. L., Perper, R. J. and Schroder, H. C.: Phagocytic release and activation of human leucocyte procollagenase, *Nature*, **246**, 417-419, 1973.
- 32) Stricklin, G. P., Bauer, E. A., Jeffrey, J. J. and Eisen, A. Z.: Human skin collagenase: Isolation of precursor and active forms from both fibroblast and organ cultures, *Biochemistry*, **16**, 1607-1615, 1977.
- 33) Woessner, J. F. Jr.: A latent form of collagenase in the involuting rat uterus and its activation by a serine proteinase, *Biochem. J.* **161**, 535-542, 1977.
- 34) Shinkai, H. and Nagai, Y.: A latent collagenase from embryonic human skin explants, *J. Biochem.* **81**, 1261-1268, 1977.
- 35) Sakamoto, S., Sakamoto, M., Goldhaber, P. and Glimcher, M. J.: Latent collagenase from the culture medium of embryonic chick bones, *F E B S Lett.* **88**, 53-58, 1978.
- 36) Macartney, H. W. and Tschesche, H.: Latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes and activation to collagenase by removal of an inhibitor, *F E B S Lett.* **119**, 327-332, 1980.
- 37) Macartney, H. W. and Tschesche, H.: Latent and active human polymorphonuclear leucocyte collagenases: Isolation, purification and characterization, *Eur. J. Biochem.* **130**, 71-78, 1983.
- 38) Abe, S. and Nagai, Y.: Evidence for the presense of a latent form of collagenase in human rheumatoid synovial fluid, *J. Biochem.* **71**, 919-922, 1972.
- 39) Abe, S. and Nagai, Y.: Interaction bet-

- ween tadpole collagenase and human  $\alpha_2$ -macroglobulin, *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 125-132, 1972.
- 40) Abe, S. and Nagai, Y.: Evidence for the presence of a complex of collagenase with  $\alpha_2$ -macroglobulin in human rheumatoid synovial fluid: A possible regulatory mechanism of collagenase activity in vivo, *J. Biochem.* **73**, 897-900, 1973.
  - 41) Kitamura, K., Ito, A. and Mori, Y.: The existing forms of collagenase in the human uterine cervix, *J. Biochem.* **87**, 753-760, 1980.
  - 42) Pardo, A. and Pérez-Tamayo, R.: The presence of collagenase in collagen preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, **392**, 121-130, 1975.
  - 43) Vater, C. A., Mainardi, C. L. and Harris, E. Jr.: Binding of latent rheumatoid synovial collagenase to collagen fibrils, *Biochim. Biophys. Acta*, **539**, 238-247, 1978.
  - 44) Pardo, A., Soto, H., Montfort, I. and Pérez-Tamayo, R.: Collagen-bound collagenase, *Connect. Tiss. Res.* **7**, 253-261, 1980.
  - 45) Birkedal-Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fulmer, H. M.: Activation of latent bovine gingival collagenase, *Archs. Oral. Biol.* **20**, 681-685, 1975.
  - 46) Birkedal-Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblasts, *J. Biol. Chem.* **251**, 3162-3168, 1976.
  - 47) Iijima, K., Kishi, J. and Hayakawa, T.: Purification and characterization of bovine dental sac collagenase, *J. Biochem.* **89**, 1101-1106, 1981.
  - 48) Wize, J.: A latent collagenase from rheumatoid synovial fluid: Purification and partial characterization, *Biochem. Biophys. Acta*. **615**, 199-207, 1980.
  - 49) Yanagimura, M.: Collagenase activities in healthy and inflamed gingivae induced by plaque in dogs, *日歯周誌*. **22**, 575-591, 1980.
  - 50) Gallop, P. M. and Seifter, S.: Preparation and properties of soluble collagens, in *Methods in enzymology*, ed. Colorvick, S. P. and Kaplan, N. O. vol. **VI**, pp. 635-641, Academic Press, New York, 1963.
  - 51) Switzer, B. R. and Summer, G. K.: Improved method for hydroxyproline analysis in tissue hydrolyzates, *Anal. Biochem.* **39**, 487-491, 1971.
  - 52) Cawston, T. E. and Barrett, A. J.: A rapid and reproducible assay for collagenase using [ $^{14}\text{C}$ ] acetylated collagen, *Anal. Biochem.* **99**, 340-345, 1979.
  - 53) Nagai, Y. and Hori, H.: Entrapment of collagen in a polyacrylamide matrix and its application in the purification of animal collagenases, *Biochem. Biophys. Acta*, **263**, 564-573, 1972.
  - 54) 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.
  - 55) Sellers, A., Cartwright, E., Murphy, G. and Reynolds, J. J.: Evidence that latent collagenase are enzyme-inhibitor complexes, *Biochem. J.* **163**, 303-307, 1977.
  - 56) Stricklin, G. P., Jeffrey, J. J., Roswit, W. T. and Eisen, A. Z.: Human skin fibroblast procollagenase: Mechanism of activation by organomercurials and trypsin, *Biochem.* **22**, 61-68, 1983.
  - 57) Welgus, H. G., Stricklin, G. P., Eisen, A. Z., Bauer, E. A., Cooney, R. V. and Jeffrey, J. J.: A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts, *J. Biol. Chem.* **254**, 1938-1943, 1979.
  - 58) Vater, C. A., Mainardi, C. L. and Harris, E. D. Jr.: Inhibitor of human collagenase from cultures of human tendon, *J. Biol. Chem.* **254**, 3045-3053, 1979.
  - 59) Geiger, S. B. and Harper, E.: The inhibition of human gingival collagenase by an inhibitor extracted from human teeth, *J. Periodont. Res.* **16**, 8-12, 1981.

- 60) Cawston, T. E., Galloway, W. A., Mercer, E., Murphy, G. and Reynolds, J. J.: Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase, *Biochem. J.* **195**, 159-165, 1981.
- 61) Macartney, H. W. and Tschesche, H.: The collagenase inhibitor from human polymorphonuclear leucocytes: Isolation, purification and characterization, *Eur. J. Biochem.* **130**, 79-83, 1983.
- 62) Eisen, A. Z., Bloch, K. J. and Sakai, T.: Inhibition of human skin collagenase by human serum, *J. Lab. Clin. Med.* **75**, 258-263, 1970.
- 63) Eisen, A. Z., Bauer, E. A. and Jeffrey, J. J.: Human skin collagenase: The role of serum  $\alpha$ -globulin in the control of activity in vivo and in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 248-251, 1971.
- 64) Harris, E. D. Jr. and Cartwright, E. C.: Mammalian collagenases, in *Proteinases in mammalian cells and tissues*, ed. Barret, A. J., pp. 249-278, North-Holland Biomedical press, Amsterdam, 1977.
- 65) Woolley, D. E., Roberts, D. R. and Evanson, J. M.: Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 747-754, 1975.
- 66) Woolley, D. E., Roberts, D. R. and Evanson, J. M.: Small molecular weight  $\beta_1$  serum protein which specifically inhibits human collagenases, *Nature, (Lond.)* **261**, 325-327, 1976.
- 67) Werb, Z., Burleigh, M. C., Barrett, A. J. and Starkey, P. M.: Interaction of  $\alpha_2$ -macroglobulin with proteinases: Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases, *Biochem. J.* **139**, 359-368, 1974.
- 68) Abe, S., Shinmei, M. and Nagai, Y.: Synovial collagenase and joint diseases: The significance of latent collagenase with special reference to rheumatoid arthritis, *J. Biochem.* **73**, 1007-1011, 1973.
- 69) de Saussure, V. A. and Dandlicker, W. B.: Ultracentrifuge studies on the effects of thiocyanate ion on antigen-antibody systems, *Immunochem.* **6**, 77-83, 1969.
- 70) Carrel, S. and Barandun, S.: Protein-containing polyacrylamide gels: their use as immunoadsorbents of high capacity, *Immunochem.* **8**, 39-48, 1971.
- 71) Shinkai, H., Kawamoto, T., Hori, H. and Nagai, Y.: A complex of collagenase with low molecular weight inhibitors in the culture medium of embryonic chick skin explants, *J. Biochem.* **81**, 261-263, 1977.
- 72) Steven, F. S., Podrazyky, V. and Itzhaki, S.: The interaction of a trypsin-dependent neutral proteinase and its inhibitor found in tumour cells: Analysis of complex kinetic data involved in a thiol-disulphide exchange mechanism, *Biochim. Biophys. Acta* **524**, 170-182, 1978.
- 73) Uitto, V. J., Turto, H., Huttunen, A., Lindy, S. and Uitto, J.: Activation of human leukocyte collagenase by compounds reacting with sulfhydryl groups, *Biochem. Biophys. Acta*, **613**, 168-177, 1980.
- 74) Barret, A. J.:  $\alpha_2$ -Macroglobulin, in *Methods in enzymology*, ed. Lorand, L., vol. **80**, pp. 737-755, Academic Press, New York, 1981.
- 75) Barret, A. J. and Starkey, P. M.: The interaction of  $\alpha_2$ -macroglobulin with proteases: Characteristics and specificity of the reaction and a hypothesis concerning its molecular mechanism, *Biochem. J.* **133**, 709-724, 1973.
- 76) Weiss, J. B., Sedowofia, K. and Jones, C.: Collagen degradation: A defended multi-enzyme system, in *Biology of collagen*, ed. Viidik, A. and Vuust, J. pp. 113-134, Academic Press, London, 1980.
- 77) Simpson, J. W. and Mailman, M. L.: Synthesis of collagenase inhibitor by gingival fibroblast in culture, *Biochem. Biophys. Acta* **673**, 279-285, 1981.

- 78) Pettigrew, G. W., Wang, H. M., Sodek, J.  
and Brunette, D. M.: Synthesis of col-  
lagenolytic enzymes and their inhibitors

by gingival tissue in vitro: Effect of endo-  
toxin, J. Periodont. Res. **16**, 637-645, 1981.