

## — 綜 説 —

## コラーゲンの酵素的分解について

野 原 広 美

新潟大学歯学部口腔生化学教室 (主任: 野原広美教授)

(昭和54年10月31日受付)

## Enzymatic Degradation of collagen

Hiroyoshi NOHARA

*Department of Oral Biochemistry, Niigata University School of Dentistry**(Director: Prof. H. Nohara, M. D.)*

コラーゲンはプロテオ・グリカンと共に結合組織の主成分であり、口腔領域では歯肉、歯のゾーゲ質及び骨に多い。このコラーゲンの研究の歴史は古く、今世紀の始にさかのぼるが、それ等は主として構造研究の歴史である<sup>1)</sup>。コラーゲンの合成及び分解についての研究は比較的最近のことである。

生体でのコラーゲンの酵素的分解の研究は1962年のGross及びLapierre<sup>2)</sup>のコラーゲナーゼの発見に始る。彼等は両棲類のおたまじゃくしの尾ひれ (tadpole tail fin) の培養液にこの酵素を発見したが、その後多くの人の努力により高等動物の骨、皮フ、子宮、関節液、歯肉等に見出されている<sup>3)</sup>。これ等の酵素は現在のところ構造的には多様であるが、その作用様式、特異性等については大きな違いは見出されていない。尚最近、この酵素に潜在性酵素 (latent enzyme) が見出され、それはプロ酵素 (proenzyme) 又は酵素・阻害蛋白複合体 (enzyme-inhibitor complex) であることが知られている。こうして、組織のコラーゲンの分解の調節はコラーゲナーゼの合成の増加と蛋白性阻害物質の減少或はその逆というように、酵素とその阻害物質の相対量の変化によると考えられている。

コラーゲン分解に関しては、Woessner (1973)

<sup>3)</sup>, Harris and Krane (1974)<sup>4)</sup>, Weiss (1976)<sup>5)</sup>, Gross (1976)<sup>6)</sup> 等のすぐれた綜説がある。

## I 基質としてのコラーゲン

コラーゲンという名称は“にかわのもと”という意味に由来して古く名づけられたものであるが、その構造の複雑な為更に細分化された定義を必要とする。生のコラーゲン (native collagen) の最小単位はコラーゲン・モノマー (collagen monomer) 又はトロポコラーゲン (tropo collagen, TC) といわれ、分子量約10万、約1000個のアミノ酸からなるペプチド ( $\alpha$ ) が3本集ってラセン構造 (right handed super helix) をとったものである<sup>1,5)</sup>。このコラーゲン・モノマーが並列及び縦列に会合してセン維状になったものが組織にあるコラーゲンの自然の状態で、不溶性コラーゲン (insoluble collagen) といわれる<sup>5)</sup>。不溶性コラーゲンに対して、中性塩溶液及び弱酸溶液に可溶性のコラーゲンを中性塩及び酸可溶性コラーゲン (soluble collagen) という。これは主としてコラーゲン・モノマーからなる。このモノマーのアミノ及びカルボキシ末端部分にはラセン構造をとっていない部分があり、telopeptide<sup>7)</sup> 或は non-helical terminal peptide と呼ばれる。

昔から知られていたゼラチン (gelatin) はコラーゲン・モノマーが熱処理によって三重鎖構造がこわれ、3本のペプタイド ( $\alpha$ ) がばらばらになったものである。このように、二次、三次構造がこわれることは変性 (denaturation) と呼ばれている。変性は一般に、熱、酸、アルカリ処理の外、尿素、SDS 等のいわゆる変性剤によってもおこなわれる。変性が温和におこなわれると、2~3の異なる変性産物を生ずる。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  凝集体 (aggregates) と呼ばれ、 $\beta$  は2本の $\alpha$ 鎖、 $\gamma$  は3本の $\alpha$ 鎖の凝集体である。これはラセン構造がこわれる前に telopeptide により分子間に架橋が形成される為と考えられている<sup>5)</sup>。変性を受ける温度はプロリン及びヒドロキシプロリンの含量と相関があり、一般にその生物の体温にほぼ等しい<sup>8)</sup>。モノマーは変性すると粘度の低下及び旋光性の変化等の物理化学的性質に変化をもたらす。

最近、コラーゲンにはI, II, III, IV型 (type I, II, III, IV) があることが見出された。I型コラーゲンは2本の $\alpha 1(I)$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖からなり、 $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ と書かれ、皮フ、骨、腱、ゾーグ質、歯肉等に存在する<sup>9-12)</sup>。II型コラーゲンは3本の $\alpha 1(II)$ 鎖からなり、 $[\alpha 1(II)]_3$ と書かれ、軟骨にある<sup>13)</sup>。III型コラーゲンはシステインを含む $\alpha 1(III)$ 鎖3本からなり、胎児組織に多いが、成人の皮フ及び動脈にも見出されている<sup>14,15)</sup>。IV型コラーゲン、 $[\alpha 1(IV)]_3$ は基底膜に見出されている<sup>16)</sup>。このように、コラーゲンには一次構造の異なる4種類があり、それ等はコラーゲナーゼによる分解のされやすさが異なる。

## II コラーゲンを分解する酵素

Gross<sup>17)</sup> 及び Evanson<sup>18)</sup> は“真のコラーゲナーゼ” (true collagenase) とは未変性コラーゲンを生理的なPH及び温度で分解出来る酵素であると定義している。このように、コラーゲナーゼは、従来基質の二次、三次構造について余り考慮せずに分類されて来た蛋白分解酵素 (プロテアーゼ) に対して、新しいカテゴリーに属させるべきものである。

コラーゲナーゼのようにコラーゲンのラセン構

造部分を分解出来る酵素が外にあるだろうか? パパイン、プロナーゼ、高濃度のトリプシン、カテプシン B<sub>1</sub> 及びバクテリアのコラーゲナーゼ (Clostridium histolyticum, Clostridiopeptidase A) 等がこれに属する<sup>6,19)</sup>。しかし、パパイン及びプロナーゼはコラーゲンにゆっくり作用し、又動物組織由来の酵素でない為に余り研究されていない。又トリプシンは非生理的高濃度でのみ作用するのであり、カテプシン B<sub>1</sub> はPH 5.5以下で作用するという事で、何れも生理的意義は少ない。clostridiopeptidase Aはバクテリア由来でやはり生理的意義は少ないが、酵素学的に利用価値は高くよく研究されている<sup>19)</sup>。

未変性コラーゲンは以上の酵素の外に、多くの非特異的蛋白分解酵素により分解されることが知られているが、それはコラーゲンの一部即ち非ラセン構造部分、telopeptide、が分解されるのである<sup>5)</sup>。したがって、コラーゲン分子の1~2%が分解されるのみである。

一方、変性コラーゲン即ちゼラチンは他の球状蛋白と同じようにすべての細胞内の蛋白分解酵素によって分解される筈である。しかしながら、コラーゲンはプロリン、ヒドロキシプロリン及びグリシンが極端に多いという特異なアミノ酸配列を持つ為に、多くのエクソ・ペプチダーゼ (exo-peptidase) によって余り分解されない。又多くのエンド・ペプチダーゼによって分解を受けるが、大きなペプタイド断片を残す。

以上のような非特異的蛋白分解酵素に対して、中性即ち生理的PHでゼラチンをよく分解する酵素が多く動物組織から見出され、ゼラチナーゼ (animal gelatinase, PZ Peptidase) と呼ばれている<sup>5)</sup>。これ等の酵素は 4-phenylazobenzyl-carbonyl-L-proline-L-leucylglycine-L-proline-D-arginine という人工ペプタイドを基質として検出される。この基質はPZ-ペプタイドとも呼ばれ、もともとバクテリアのコラーゲナーゼの基質として合成されたものである。このPZ-ペプタイドは動物のゼラチナーゼ及びバクテリアのコラーゲナーゼによって、leucyl-glycineの所で切断され、PZ-prolyl-leucine と glycylyl-

D-arginine になる。この PZ-ペプチドは D-アルギニンを持つ為、カルボキシ・ペプチダーゼ及び非特異的中性蛋白分解酵素によって分解されない。尚、このペプチドは Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Y 即ちゼラチンのアミノ酸配列に似ている。この PZ-ペプチドを分解する PZ-ペプチダーゼ(ゼラチナーゼ)は未変性のコラーゲンを分解出来ない。この酵素はリウマチ性滑膜組織、角膜、ネズミの子宮、肺、肝、腫瘍等に見出されているが、生理的意義は明らかでない<sup>5)</sup>。

尚、ゼラチンを特異的に分解するエクソ・ペプチダーゼも知られている。

### III コラーゲナーゼの分析法<sup>6)</sup>

未変性のコラーゲンを分解するコラーゲナーゼの検出、定量法としては、可溶性コラーゲンをゲル化して、いわゆる再構成コラーゲン・センキ(reconstituted collagen fibril)として酵素と反応させる方法とコラーゲンを溶液状のまま酵素と反応させる2つの方法がある。

#### (1) 再構成コラーゲン・ゲルを用いる方法

未知の組織のコラーゲナーゼ活性を検出する方法として、可溶性コラーゲンの塩溶液を 37°C で 1~24 時間インキュベートすることにより生ずるコラーゲン・ゲル<sup>20)</sup>上で培養を行い、組織によるゲルの分解を見る方法がある。一般に広く用いられている定量的方法としては、放射性アミノ酸で標識した塩可溶性又は酸可溶性コラーゲンを上述の如くゲル化し、これに酵素液を加えて反応させて後、遠心により生ずる上清の放射能を測定するものがある<sup>20,21)</sup>。尚、比放射活性の高いコラーゲンを得る方法として、 $\beta$ -aminopropionitrile の存在下で chick embryo clavaria の組織培養を用いる技術が開発されている<sup>22)</sup>。

#### (2) コラーゲン溶液を用いる方法

溶液状のコラーゲンを酵素と反応させて、その産物を分析する方法である。反応産物の粘度の低下を測定する方法が古くからある<sup>23)</sup>。最近、放射性コラーゲンを用いて分解産物を 50%デオキサン

液<sup>24)</sup>又はアクリルアミド電気泳動<sup>25)</sup>で分離し、その放射能を測定する方法が開発され、感度が著しく向上している。

### IV コラーゲナーゼの分布及び性質

コラーゲナーゼ (true collagenase) は、現在までに、皮<sup>26,27)</sup>、骨<sup>28,29)</sup>、子宮<sup>30)</sup>、歯肉<sup>25,31-34)</sup>、滑膜組織<sup>35)</sup>、白血球<sup>36)</sup>、マクロファージ<sup>37)</sup>、肝クッペル細胞<sup>38)</sup>、腫瘍細胞<sup>39,40)</sup>等にその存在が認められている。しかし、これ等の組織のコラーゲナーゼ含量は低く、大量の酵素を得ることは困難である。したがって、精製酵素を用いての研究は少ない。

Harper 等<sup>41)</sup>が初めて、SDS ポリアクリルアミド電気泳動でほぼ単一であり、他の非特異的プロテアーゼを含まない酵素を、おたまじゃくしの尾ひれの培養液から得た。その後、高等動物の組織からも、即ち人のリウマチ性滑膜組織の培養液<sup>42)</sup>、ウサギの腫瘍細胞<sup>43)</sup>、及び人の皮フのセンキ芽細胞の培養液<sup>44)</sup>等から比活性 300~3570 単位\*のコラーゲナーゼが精製されている。

このように高度に精製された酵素又は部分的に精製された酵素により、その性質が検討されている。至適 PH は一般に広範囲にわたっているが、PH 7.5—8.0 が中心になっている<sup>3,42)</sup>。尚、賦活剤 (Cofactor) としてカルシウム ( $\text{Ca}^{++}$ ) を必要とする<sup>3)</sup>。したがって、EDTA のようなキレート剤によって阻害される。又、システイン、メルカプト・エタノール等の SH 化合物によって阻害される。したがって、S-S 結合が酵素の活性維持に重要な役割を果していることが想像される。イオン交換セルローズ及び電気泳動の研究の結果、この酵素は塩基性に荷電していると推定される<sup>42)</sup>。この酵素の大きさについてみると、ウサギ角膜からの酵素の 158,000 ダルトンからリウマチ性関節炎組織からの 25,000 ダルトンにわたっている<sup>3)</sup>。しかし、多くは 60,000~30,000<sup>3,34,42,44)</sup> ダルトンである。このような分子量の大きなばらつきの原因として、特に部分精製の酵素の場合、酵素

\* 1 単位 = 35~37°C で 1 分間に 1  $\mu\text{g}$  のコラーゲン・ゲルを分解する酵素活性

に非特異蛋白が結合している可能性或は活性を持つ酵素断片の可能性が考えられる。しかし、高度に精製した動物酵素でも 33,000~50,000 ダルトン<sup>42,44)</sup> と一様でないことは、各組織に特有な酵素が存在することを暗示している。

## V コラーゲナーゼによる分解産物

Gross 及び Lapierre<sup>2)</sup> は両棲類からコラーゲナーゼを最初に発見した時から、この酵素が未変性コラーゲン・モノマーに作用して、アミノ末端から  $\frac{3}{4}$  の所で切断して、モノマーの  $\frac{3}{4}$  と  $\frac{1}{4}$  の断片 (TC<sub>3/4</sub>, TC<sub>A</sub> と TC<sub>1/4</sub>, TC<sub>B</sub>) を生ずることを見出している。しかし、この外に小さなペプチドが生ずる可能性は否定しなかった。その後、多くの研究者により動物組織の酵素を用いての研究が行われたが、酵素の精製が不完全な為か、切断の場所は一定でなかった<sup>5)</sup>。例えば、ウサギの角膜の酵素ではカルボキシ末端から 23.5% の部分<sup>45)</sup>、ネズミの皮フの酵素ではアミノ末端から 62 及び 67% の部分<sup>46)</sup> が切断点であった。おたまじゃくしからの部分精製酵素は変性コラーゲンを Gly-Leu, Gly-Ile, Gly-Val, Gly-Ala, Gly-Phe 部分で切断した<sup>47)</sup>。Harris 等<sup>5)</sup> は精製酵素を用いて、変性コラーゲンも未変性コラーゲンと同様に唯一カ所で切断されることを示した。しかし、変性コラーゲンの分解速度は未変性コラーゲンに比して遙かに遅かった<sup>5)</sup>。

変性及び未変性コラーゲンの唯一の切断場所はプロモシアン分解ペプチド  $\alpha 1$ -CB7 及び  $\alpha 2$ -CB5 にあり、それぞれ Gly-Ile 及び Gly-Leu の間であることが明らかにされた<sup>48)</sup>。 $\alpha 1$ (I) コラーゲンでは 788—789 番目のアミノ酸に相当する。尚 I, II, III 型コラーゲンはアミノ酸配列が異なる為か、分解速度が一様でなく、III>I>II の順である<sup>49)</sup>。

コラーゲナーゼによって生ずる 2 個の分解産物、TC<sub>3/4</sub> 及び TC<sub>1/4</sub> 断片の変性温度 (T<sub>M</sub>) はコラーゲンモノマーに比して低いことが知られている<sup>50)</sup>。したがって、これ等のペプチド断片は 37°C に置くと更に非特異的プロテアーゼの作用を受けると考えられる。

## VI コラーゲナーゼ活性の調節

コラーゲナーゼの合成及び活性化を制御する生物学的信号は何であろうか？ 血清及び細胞成分が如何に細胞外のコラーゲナーゼ活性を調節するのであるか？ これ等の問題の解答は摸索状態にあり、研究は始ったばかりである。

### (1) コラーゲナーゼ活性の阻害

コラーゲナーゼが EDTA, システイン及び血清によって阻害されることは、その発見の当初から知られていた<sup>20)</sup>。血清による阻害は  $\alpha 2$ -マクログロブリン ( $\alpha 2$ M) 及び  $\alpha 1$ -抗トリプシン因子 ( $\alpha 1$ -at) によることが示された<sup>51)</sup>が、後者については疑問がもたれている<sup>52)</sup>。尚、 $\alpha 2$ -M は、殆んどすべての中性プロテアーゼ同様、酵素と固く結合して阻害することが認められている。 $\alpha 2$ -M 及び  $\alpha 1$ -at の外に、分子量約 40,000 ダルトンの血清由来のインヒビターが見出された<sup>53)</sup>。

血清成分以外の阻害物質 (インヒビター) として、ヒストン及びプロタミン等の塩基性蛋白及びプロテオグリカンが知られている。この外、組織に蛋白性のインヒビターが存在することが報告されている<sup>43,54-56)</sup>。このインヒビターは分子量 30,000 ダルトン位であり、コラーゲナーゼとの結合はそう固くなく、種々のクロマトグラフィーで酵素から分離される<sup>56)</sup>。

### (2) コラーゲナーゼ活性の促進

培養組織に添加することにより、コラーゲナーゼ活性を増加させる物質としてコルヒチンがある<sup>57)</sup>。このコルヒチンの作用はリンパ球に働いて活性物質を放出させることにより、コラーゲナーゼの合成を刺戟すると想像されている。同様の作用を示すものにヘパリンがある<sup>58)</sup>。尚、ヘパリンは酵素反応そのものを促進する。これに関連して、粒子性物質の貪食がコラーゲナーゼ及び中性プロテアーゼの分泌を促進することが培養細胞で示された<sup>59)</sup>。更に詳細な研究により、抗原及びコンカナバリン A の刺戟により活性化されたリンパ球がリンフォカイン (lymphokine) を産生し、これがマクロファージ (macrophage) を刺戟して、コラーゲナーゼの合成を促進させる図式が示され

た<sup>60)</sup>。尚、創傷がコラーゲナーゼ産生を引き起す事実は知られているが、そのメカニズムは明らかでない。

### (3) コラーゲナーゼ活性のホルモンによる調節

コラーゲン代謝に関係するホルモンとして、骨吸収に於けるパラ・サイロイド・ホルモン (PTH)、子宮の強度維持に関係しているプロゲステロン (progesteron) 及び外傷角膜の潰瘍化 (ulceration) 過程に逆作用を示すコルチゾン (cortisone) 等がある<sup>6)</sup>。しかし、培養骨に於ける PTH のコラーゲナーゼ活性の促進、破碎子宮でのコラーゲン吸収のプロゲステロンによる阻害のメカニズムは不明である。尚、cAMP もプロゲステロンと同様の作用を示すことが認められている。ヒドロ・コルチゾンも又 cAMP と共に、コラーゲナーゼを直接障害することなく、培養液のコラーゲナーゼ活性を完全に抑制することが人の皮フの培養実験で認められている。しかし、そのメカニズムの解明は今後に残されている。

### (4) ラテント・コラーゲナーゼとその活性化

コラーゲナーゼはその発見の当初から、酵素の前駆物質即ちザイモヂェン (zymogen) 又はプロ酵素 (proenzyme) の存在が考えられていた。もう一つのラテント酵素として、コラーゲナーゼ・蛋白性インヒビター複合体の可能も考えられて来た。これ等は何れも蛋白分解酵素により活性化される。

プロ酵素は Harper<sup>41)</sup> 等により初めて、おたまじゃくしから単離された。彼等は、おたまじゃくしの酵素 (分子量 100,000) の抗体と反応するがコラーゲと結合せず、したがってコラーゲナーゼ活性を持たない分子量 110,000 の蛋白を分離した。これは培養液と孵置すると酵素活性を示すようになるので、プロ酵素と同定された。同様なプロ酵素が人の皮フの培養液からも分離されている<sup>44)</sup>。尚、Birkedal-Hansen 等<sup>61)</sup> は牛歯肉の培養実験で、第2日目の培養液はコラーゲナーゼ活性を示さないが、セファデックス G-150 のゲル・クロマトグラフィーを行うと二つの活性化される分割が現われることを見出した。最初の分割は  $\alpha_2$ -

M と結合したコラーゲナーゼであり、後の分割は牛歯肉のコラーゲナーゼ (分子量 63,000) より少し大きく、トリプシンによってのみ活性化された。したがって、プロ酵素と推定される。こうして、歯肉組織では血清インヒビターと結合した酵素及びプロ酵素の存在が認められた。この外、コラーゲンに結合しており、37°C で長く孵置すること或は 60°C で4分孵置することにより遊離する酵素の存在が知られている。更に前述の如く、組織由来のインヒビターの存在<sup>43,54-56)</sup> の為に活性を示さないラテント酵素もある。

こうして、コラーゲナーゼの存在様式として、遊離の状態のものとコラーゲンに結合したものの外に、ラテント酵素即ち血清又は組織由来のインヒビターと結合したものとプロ酵素が考えられる。したがって、血清又は組織由来のインヒビターの増減及びプロ酵素の活性化の機構も又コラーゲン分解活性の調節に重要な役割を果していると考えられる。

## 文 献

- 1) Eastoe, J. E.: Composition of collagen and allied protein, in Treatise on collagen, ed. G. N. Ramachandran, vol. 1, P. 1-67, Academic Press, New York and London, 1967.
- 2) Gross, J. and Lapiere, C. M.: Collagenolytic activity in amphibian tissue: A tissue culture assay, Proc. Natl. Acad. Sci. **48**, 1014-1022, 1962.
- 3) Woessner, F. J.: Mammalian collagenase, Clin. Orthop. **96**, 310-326, 1973.
- 4) Harris, E. D., Jr. and Krane, S. M.: Medical Progress: Collagenase, Part I, II, III, New Engl. J. Med. **291**, 557-563, 605-609, 652-661, 1974.
- 5) Weiss, J. B.: Enzymic degradation of collagen, in International review of connective tissue research, ed. D. A. Hall and D. S. Jackson, vol. 7, 102-149, Academic Press, New York and London, 1976.
- 6) Gross, J.: Aspects of the collagenases, in

- Biochemistry of collagen, ed. G. N. Ramachandran and A. H. Reddi, P. 275-318, Plenum Press, New York and London, 1976.
- 7) Rubin, A. L., Pfahl, D., Speakman, P. T., Davison, P. F. and Schmitt, F.: Tropocollagen: Significance of protease-induced alterations, *Science*. **139**, 37-38, 1963.
  - 8) Von Hippel, R. H. and Wong, K.: The collagen  $\rightleftharpoons$  gelatin phase transition. I. Further studies of the effects of solvent environment and polypeptide chain composition, *Biochem.* **2**, 1387-1398, 1963.
  - 9) Butler, W. T., Piez, K. A. and Bornstein, P.: Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptide from the  $\alpha 1$  chain of rat skin collagen, *Biochem.* **6**, 3771-3780, 1967.
  - 10) Kang, A. H., Piez, K. A. and Gross, J.: Characterization of the  $\alpha$ -chain skin collagen and the nature of the  $\text{NH}_2$ -terminal cross-link region, *Biochem.* **8**, 3648-3655, 1969.
  - 11) Clik, E. M. and Bornstein, P.: Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains of human skin collagen, *Biochem.* **9**, 4699-4706, 1970.
  - 12) Traub, W. and Piez, K. A.: The chemistry and structure of collagen, in *Advan. Protein chem.*, **25**, 243-352, 1971.
  - 13) Trelstad, R. L.: The developmental biology of vertebrate collagens, *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 521-528, 1973.
  - 14) Chung, E. and Miller, E. J.: Collagen polymorphism: Characterization of molecules with the chain composition  $[\alpha 1(\text{III})]_3$  in human tissues, *Science* **183**, 1200-1201, 1974.
  - 15) Epstein, E. H.:  $[\alpha 1(\text{III})]_3$  human skin collagen: Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life, *J. Biol. Chem.* **249**, 3225-3231, 1974.
  - 16) Kefalides, N. A.: Structure and biosynthesis of basement membranes, in *International review of connective tissue Research*, ed. D. A. Hall and D. S. Jackson, Vol. **6**, P. 63-104, Academic Press, New York and London, 1973.
  - 17) Gross, J.: The animal collagenase, in *Chemistry and molecular biology of the inter cellular matrix*, ed. E. A. Balazs, Vol. **3**, P. 1623-1636, Academic Press, New York, 1970.
  - 18) Evanson, J. M.: In *Tissue proteinase*, ed. A. J. Barret and J. T. Dingle, P. 327-346, North-Holland Publ., Amsterdam, 1971.
  - 19) Seifter, S. and Harper, E.: The collagenase, in *The enzymes*, ed. P. D. Boyer, Vol. **III**, P. 649-693, Academic Press, New York and London, 1971..
  - 20) Nagai, Y., Lapiere, C. M. and Gross, J.: Tadopole collagenase: preparation and purification, *Biochem.* **5**, 3123-3130, 1966.
  - 21) Lazarus, G. S., Brown, R. S., Daniels, J. and Fullmer, H. M.: Human granulocyte collagenase, *Science* **159**, 1483-1485, 1968.
  - 22) Robertson, P. B., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: A reproducible quantitative collagenase radiofibril assay, *Clin. Chim. Acta*, **42**, 43-45, 1972.
  - 23) Kang, A. H., Nagai, Y., Piez, K. A. and Gross, J.: Studies on the structure of collagen utilizing a collagenolytic enzyme from tadopole, *Biochem.* **5**, 509-515, 1966.
  - 24) Terato, K., Nagai, Y., Kawanishi, K. and Yamoto, S.: A rapid assay method of collagenase activity using  $^{14}\text{C}$ -labeled soluble collagen as substrate, *Biochim. Biophys. Acta*. **445**, 753-762, 1976.
  - 25) Urtto, V., Turto, H. and Saxén, L.: Extraction of collagenase from human gingiva, *J. Periodontal Res.* **13**, 207-214, 1978.
  - 26) 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.
  - 27) Nagai, Y. and Hori, H.: Vertebrate col-

- lagenase: Direct extraction from animal skin and human synovial membrane, *J. Biochem.* **72**, 1147-1153, 1972.
- 28) Fullmer, H. M. and Lazarus, G. S.: Collagenase in bone of man, *J. Histochem. cytochem.* **17**, 793-798, 1969.
- 29) 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.
- 30) Jeffrey, J. J. and Gross, J.: A collagenase from rat uterus: Isolation and partial characterization, *Biochem.* **9**, 268-273, 1970.
- 31) Gibson, W. and Fullmer, H.: Collagenolytic activity of gingival tissue in vitro, *J. Dent. Res.* **45**, 1225, 1966.
- 32) Fullmer, H. M. and Gibson, W.: Collagenolytic activity in gingiva of man, *Nature*, 728-729, 1966.
- 33) Beutner, E. H., Triftshauser and Hazen, S. P.: Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal diseases, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**, 1082-1085, 1966.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) Lazarus, G. S.: Role of granulocyte collagenase in collagen degradation, *Am. J. Pathol.* **68**, 565-578, 1972.
- 37) Wahl, L., Wahl, S., Mergenhagen, S. and Martin, G. E.: Collagenase production by endotoxin activated macrophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 3598-3601, 1974.
- 38) Fujiwara, K., Sakai, T., Oda, T. and Igarashi, S.: The presence of collagenase in Kupffer cells of the rat liver, *Biochem. Biophys. Res. commun.* **54**, 531-537, 1973.
- 39) Yamanishi, Y., Maeyens, E., Dabous, M. K., Ohyama, H. and Hashimoto, K.: Collagenolytic activity in malignant melanoma: Physicochemical studies, *Cancer Res.* **33**, 2507-2512, 1973.
- 40) Harris, E. D., Faulkner, C. S. and Wood, S. Jr.: Collagenase in carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 1247-1253, 1972.
- 41) Harper, E., Block, K. J. and Gross, J.: The zymogen of tadpole collagenase, *Biochem.* **10**, 3035-3041, 1971.
- 42) Wooley, 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.
- 43) McCroskery, P. A., Richard, J. F. and Harris, E. D.: Purification and characterization of a collagenase extracted from rabbit tumors, *Biochem. J.* **152**, 131-142, 1975.
- 44) 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, *Biochem.* **16**, 1607-1615, 1977.
- 45) Davison, P. F. and Berman, M.: Connective tissue Res. **2**, 57-64, 1973.
- 46) Tokoro, Y., Eisen, A. Z. and Jeffrey, J. J.: Characterization of a collagenase from rat skin, *Biochim. Biophys. Acta* **258**, 289-302, 1972.
- 47) Nagai, Y., Lapiere, C. and Gross, J.: Tadpole collagenase: Preparation and purification, *Biochem.* **5**, 3123-3130, 1966.
- 48) Gross, J., Harper, E., Harris, E. D. Jr., McCroskery, P., Highberger, J. H., Corbett, C., and Kang, A. H.: Animal collagenase: Specificity of action and structure of the substrate cleavage site, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 605-612, 1974.
- 49) Harris, E. D., Faulkner, C. S. and Brown, F. E.: Collagenolytic system in rheuma-

- toid arthritis, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **110**, 303-316, 1975.
- 50) Sakai, T. and Gross, J.: Some properties of the products of reaction of tadpole collagenase with collagen, *Biochem.* **6**, 518-528, 1967.
- 51) 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. U. S. A.* **68**, 248-251, 1971.
- 52) Nagai, Y.: Vertebrate collagenase: Further characterization and significance of its latent form in vivo, *Mol. cell Biochem.* **1**, 137, 1973.
- 53) Woolley, D. E., Robert, 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.
- 54) Bauer, E. A., Stricklin, G. P., Jeffrey, J. J. and Eisen, A. Z.: Collagenase production by human skin fibroblast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 232-240, 1975.
- 55) Sellers, A. and Reynolds, J. J.: Identification and Partial Characterization of an inhibitor of collagenase from rabbit bone, *Biochem. J.* **167**, 353-360, 1977.
- 56) Welgus, H. G., Stricklin, G. P., Eizen, A. Z., Bauer, E. A., Cooney, R. B., and Jeffrey, J. J.: A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **254**, 1938-1943, 1979.
- 57) Harris, E. D. and Krane, S. M.: Effects of colchicine on collagenase in culture of rheumatoid synovium, *Arthritis Rheum.* **14**, 669, 1971.
- 58) Sakamoto, S., Goldhaber, P. and Glimcher, M. J.: Mouse bone collagenase: The effect of heparin on the amount of enzyme released in tissue culture and on the activity of the enzyme, *Calcif. tissue Res.* **12**, 247-258, 1973.
- 59) Werb, Z. and Reynolds, J.: Stimulation by endocytosis of the secretion of collagenase and neutral proteinase from rabbit synovial fibroblasts, *J. Exp. Med.* **140**, 1482-1497, 1974.
- 60) Wahl, L. M., Wahl, S. M., Mergenhagen, S. and Martin, G. E.: Collagenase production by lymphokine-activated macrophage, *Science* **187**, 261-263, 1975.
- 61) Birkedal-Hansen, H., Cobb, C. M., Taylor, R. E. and Fullmer, H. M.: Activation of latent bovine gingival collagenase, *Arch. Oral Biol.* **20**, 681-685, 1975.