

## 論文

らせん構造の変性 - 構造回復現象を利用した  
コラーゲングルマトリックス高強度化技術大藪 淑美<sup>\*1)</sup> 畑山 博哉<sup>\*1)</sup> 井田 昌孝<sup>\*2)</sup> 柚木 俊二<sup>\*1)</sup> 平岡 陽介<sup>\*2)</sup>Three-dimensional cell culture using fabrication of high-density collagen fibril matrix gels  
by renaturation of triple-helix collagen from gelatinYoshimi Ohyabu<sup>\*1)</sup>, Hirosuke Hatayama<sup>\*1)</sup>, Masataka Ida<sup>\*2)</sup>, Shunji Yunoki<sup>\*1)</sup>, Yosuke Hiraoka<sup>\*2)</sup>

Fibril formation of collagen is frequently used for encapsulating cells and 3D cell culture, but the weak mechanical properties of collagen fibrillar gel limits its use in regenerative medicine. To improve the mechanical properties by increasing the density of the collagen gel, we have developed a novel method for creating high-density collagen gels by renaturing denatured collagen. Pepsin-digestion collagen was denatured gently to avoid cleavage of the molecules to produce uncleaved gelatin (UCG). UCG having a denatured collagen triple-helix structure exhibited a more rapid and efficient renaturation of the triple-helix structure than cleaved gelatin (CG) over a broad range of temperature settings. The UCG solution formed an opaque gel having high-density reconstituted collagen fibrils at 28–32°C and a transparent gel similar to CG at <25°C. The unique gelation properties of UCG enabled the encapsulation of cultured cells by CFM with a high cell viability even at a high concentration (>5%) and high elasticity (1.28 ± 0.15 kPa at 5% and 4.82 ± 0.38 kPa at 8%). The elastic modulus was higher than that of conventional CFM containing 0.5% collagen. High-strength CFM may provide more durable hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine.

キーワード：コラーゲン，ゼラチン，3重螺旋再生，線維，3次元細胞培養

Keywords: Collagen, Gelatin, Renaturation of triple-helix, Fibril, Three-dimensional cell culture

## 1. はじめに

世界初の自家 iPS 細胞による細胞治療が 2014 年から開始され、2017 年には他家 iPS 細胞による細胞治療の臨床試験も予定されている。iPS 細胞は作製に長期間を要するため、高コスト化が産業化の課題となっていたが、iPS 細胞のバンク事業による解決が期待されている。

細胞の供給体制が整いつつある一方で、移植する培養組織の成形が課題として残されている。幹細胞治療の臨床研究で多用されている細胞シートは積層化および筒状に成形され、心筋組織および血管を模した成形体として利用される<sup>(1)~(3)</sup>。しかし、細胞シートは機械的強度を担うマトリクスを持たないため脆弱で、その成形には高度な技術や特殊な機械が必要である。

懸濁状態の細胞にも同様の問題があり、強度を担う生体材料と複合させた細胞/材料成形体が医療に用いられる。そのような生体材料の中でも、コラーゲンは生体親和性・吸収性・成形性に優れているためにこれまで多くの臨

床応用事例がある<sup>(4)</sup>。コラーゲン線維が形成するハイドロゲルで細胞を複合化すると、生体環境に類似した三次元環境での培養が増殖および分化を促進するため、すでに軟骨損傷の細胞治療では軟骨細胞とコラーゲンを複合化して利用されている<sup>(5),(6)</sup>。

しかし、コラーゲングルは強度が低く、細胞/材料成形体が大型化すると自重で変形してしまう。架橋剤の利用ができない細胞/材料成形体にとって、強度を上げるにはコラーゲンの緻密化しかない。しかし、ゲル作製の原料となるコラーゲン水溶液は 2%以上の濃度で流動性をほぼ喪失し、細胞との複合化が困難になる。そこで我々は、この課題を解決する新たなアプローチを模索し、“コラーゲンを変性させたゼラチンを経由してコラーゲングルを作製する”方法を着想した。

ゼラチンがコラーゲンの三重らせん構造を再生し線維形

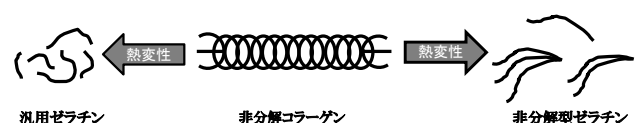


図 1. 汎用ゼラチンと非分解型ゼラチンの違い

事業名 平成 25 年度 共同研究, 平成 23-26 年度 日本学術振興会 科学研究費助成事業

<sup>\*1)</sup> バイオ応用技術グループ

<sup>\*2)</sup> 新田ゼラチン株式会社経営企画部ライフサイエンス室

成能させ回復し得ること<sup>(7-9)</sup>は希薄な溶液系で既に実証されているが、その構造回復現象を細胞包埋用の高密度コラーゲンマトリクス作製方法として利用した試みはない。本研究では、図 1 に示すように、コラーゲンをコラーゲン分子が分解しない条件で熱変性させて、非分解型ゼラチン (uncleaved gelatin, UCG) を作製して、高密度・高強度コラーゲン線維ハイドロゲルを開発し、そのハイドロゲルで細胞を包埋して高い生存率を維持できるという仮説を検証した。

## 2. 実験方法

**2.1 材料** UCG の調製と評価には、ブタ皮膚由来ペプシン可溶性コラーゲン水溶液 (新田ゼラチン株式会社製, pH3 希塩酸溶媒, 濃度 0.5%), ブタ皮膚由来 TypeA ゼラチン (MP Biomedicals LCC 製), リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 調製用タブレット (Sigma-Aldrich Co. 製), SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 0.1% 含有の 5% スラブゲル (PAGEL, Atto 製), 泳動バッファー (pH 8.5), 分子量マーカー (Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc. 製) および Quick-CBB (和光純薬株式会社製) を用いた。細胞培養にはヒト間葉系細胞株 UBE6T-7 (理化学研究所バイオリソースセンター提供, RCB2157), POWEREDBY10 (株式会社グライコテクニカ製), 細胞分散液 (Thermo Fisher Scientific Inc. 製, 0.25% トリプシン), コラーゲンゼ (和光純薬株式会社製), トリプシンインヒビター (Sigma-Aldrich Co. 製), 35 mm 細胞培養皿 (Corning Inc. 製), および 0.5% トリパンブルー染色液 (ナカライテスク株式会社製) を用いた。

**2.2 UCG の調製** コラーゲン水溶液の熱変性をできるだけ温和な条件で行い、UCG を調製した。500 ml のコラーゲン水溶液を 60°C の温浴に入れ、攪拌しながら液温を上昇させた。コラーゲン水溶液が 50°C に達した時点で、1 N 水酸化ナトリウムを滴下して pH を 7.0 に調製した。この熱変性コラーゲン水溶液を、エバポレータ (50°C) を用いて 10% に濃縮し、UCG 水溶液を得た。2 × PBS を等量加え、1 × PBS を溶媒とした 5% UCG 水溶液を得た。対照サンプルとして市販のブタ皮膚由来 Type A ゼラチン (CG) を用い、直接 1 × PBS に溶解して 5% 水溶液を調製した。

### 2.3 UCG の構造解析ならびに物性評価

(1) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 UCG ならびに CG の分子量分布を Laemmli<sup>(10)</sup> の方法に従って SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により確認した。定電流 (20 mA) で泳動した後のゲルを Quick-CBB で染色し、可視化されたバンドをデジタルカメラで撮影した。

(2) UCG のゲル化の温度特性 UCG 水溶液のゲル化の温度特性を HAAKE MARS III (Thermo Fisher Scientific Inc. 製) を用いた動的粘弾性測定により評価した。センサーには上フタ付きの DC60/1Ti (Diameter of 60 mm, cone angle of 1°) を用い、測定中のサンプル乾燥の影響を最

小化した。動的粘弾性測定は応力制御モード (せん断応力, 1 Pa) で実行し、貯蔵弾性率 ( $G'$ ) および損失弾性率 ( $G''$ ) を得た。50°C で融解した UCG 水溶液を 4°C へ冷却 (-1.2°C/min) し、2h 保持, その後 4°C から 50°C へ加温 (-1.2°C/min) した。DC60/1Ti センサーを用いて応力制御モード (1 Pa の一定せん断応力) で周波数 1 Hz の微小振動を与え、 $G'$  および  $G''$  を測定した。冷却中の  $G' = G''$  となる温度を  $T_g$  とした。次に、50°C から異なる温度 (4~37°C) へ冷却 (-6°C/min) して、12 h 保持し、 $G'$  の変化を追跡した。

(3) UCG ゲルの融解の温度特性 UCG ゲルの融解の温度特性を動的粘弾性測定装置により評価した。50°C で融解した UCG 水溶液を 4°C へ冷却 (-1.2°C/min) し、2 h 保持し、その後 4°C から 50°C へ一定速度 (-1.2°C/min) で加温した。DC60/1Ti センサーを用いて応力制御モード (1 Pa の一定せん断応力) で周波数 1 Hz の微小振動を与え、 $G'$  および  $G''$  を測定した。加温中の  $G' = G''$  となる温度を  $T_m$  とした。

(4) ゲルの弾性率 UCG ゲルの硬さを、動的粘弾性測定により計測される  $G'$  から評価した。50°C で融解した UCG 水溶液 2 ml を 35 mm 細胞培養皿に加えて、4°C で 1 h ゲル化させた後、23°C で 1 h 静置した。室温にて、内径 20 mm の平行平板センサーを用いて応力制御モード (1 Pa の一定せん断応力) で周波数 1 Hz の微小振動を与えたときの  $G'$  を測定した。センサーとゲルの滑りを防ぐため、上部センサーにはサンドペーパーを貼り付けて使用した。 $G'$  は線形粘性領域で測定された値を用いて、 $E = 3 \times G'$  より弾性率 ( $E$ ) を求めた。

**2.4 UCG ゲルの SEM 観察** UCG ゲル内部のナノスケール構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) 装置 Miniscope® TM3000 (日立製作所株式会社製) を用いて観察した。UCG ゲルをグルタルアルデヒドにより固定し、組織脱水溶液で脱水し、t-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥した。その後、ゲル内部を露出させ、Au 蒸着後、加速電圧 15 kV にて観察した。

**2.5 円偏光二色性測定** UCG のコラーゲンらせん回復挙動を、JASCO J-725 spectrometer (日本分光株式会社製) を用いた円偏光二色性測定により評価した。サンプルを 500  $\mu$ M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) により 0.0667% に希釈した後、50°C に加温して石英キュベットに添加し、保温された装置内に設置した。以下の温度プロファイルにより測定した。

(1) 冷却測定 37°C から 10°C に冷却速度-1.2°C/min で冷却し、221 nm のピーク高さ変化をモニターした。

(2) 定温測定 50°C から 30°C に冷却速度-10°C/min で冷却し、221 nm のピーク高さ変化を 120 min モニターした。

**2.6 細胞包埋試験** UCG ゲル包埋後の細胞生存率を計測し、UCG ゲル包埋操作の細胞侵襲性を評価した。対数増殖期の間葉系細胞株 UBE6T-7 を、細胞分散液により回収した後、培養液を溶媒とした UCG 水溶液に分散した。UCG

の濃度は 5% および 8% とし、細胞濃度は  $2.6 \times 10^6$  cells/ml とした。細胞と UCG の混合液を細胞培養皿に添加して、18 h, 30°C に静置して線維形成した後、37°C で 1 および 3 日間培養した。1% コラゲナーゼ - 0.2% トリプシンインヒビターによりゲルを消化して細胞を回収し、培養液に分散した。トリパンブルー染色液を細胞分散液に等量加えて、血球計算盤を用いて青く染色された死細胞と未染色の生細胞を計測し、細胞生存率を求めた。

### 3. 結果

**3.1 UCG の構造** UCG および CG の電気泳動パターンを図 2 に示す。コラーゲンの  $\alpha 1$ , 2 および  $\beta$  鎖の分子量である 140, 125 および 250 kDa のバンド<sup>(11)</sup>が、UCG の泳動パターンに確認できた。一方、CG ではコラーゲンに帰属されるバンドが不明瞭であり、140 kDa よりも分子量が小さいバンドが多数観察された。

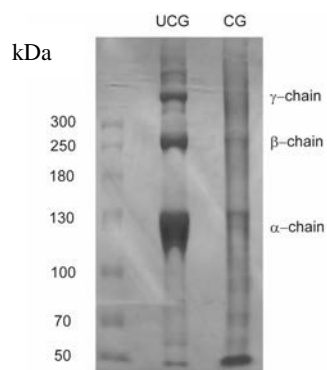


図 2. SDS-PAGE による UCG および CG の分子鎖<sup>(12)</sup>

**3.2 UCG のゲル化-融解の温度特性** UCG のゲル化曲線および融解曲線を図 3 に示す。50°C でゾル状態 ( $G' < G''$ ) であった UCG 水溶液は 35°C 付近で急激な  $G'$  の増加を示し、 $G'$  の値は  $G''$  を超えた。20°C 以下では  $G'$  が  $10^3$  Pa を超える硬いゲルを形成した。UCG の  $T_g$  は  $22.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 、 $T_m$  は  $34.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$  と計測された。一方、CG の  $T_g$  は  $18.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $T_m$  は  $31.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$  であり、UCG に比べていずれも約 4°C 低かった。

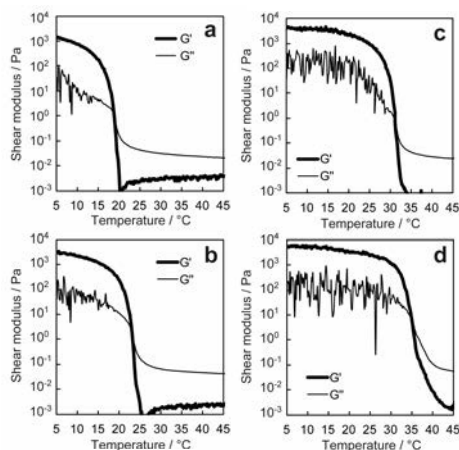


図 3. ゲル化曲線 (a および b) および融解曲線 (c および d) .  
CG は a および c, UCG は b および d. <sup>(12)</sup>

**3.3 ゲル化特性に及ぼす温度の影響** 温度によるゼラチン水溶液の  $G'$  の変化を図 4 に示す。UCG および CG のどちらにおいても  $G'$  の増加は 4°C で最も急速に生じ、温度が高くなるにともない  $G'$  の増加速度は減少した。CG の  $G'$  は 25°C 以上ではほとんど上昇せず、ゲル化に至らなかった。一方、UCG の  $G'$  の増加速度は 25°C でさえ、CG の 20°C における増加速度よりも高かった。UCG の  $G'$  は 28, 30 および 32°C で約 2 h 後から緩やかに上昇し続けてゲル化したが、37°C では全く上昇しなかった。このように、UCG は CG より高い温度でゲル化した。設定温度に応じて、UCG ゲルは透明または不透明な外観を示した (図 4c)。25°C 以下で急激にゲル化した UCG ゲルは CG ゲルと同様に透明であったが、28°C 以上ではコラーゲン線維ゲルに類似した白濁を呈した。

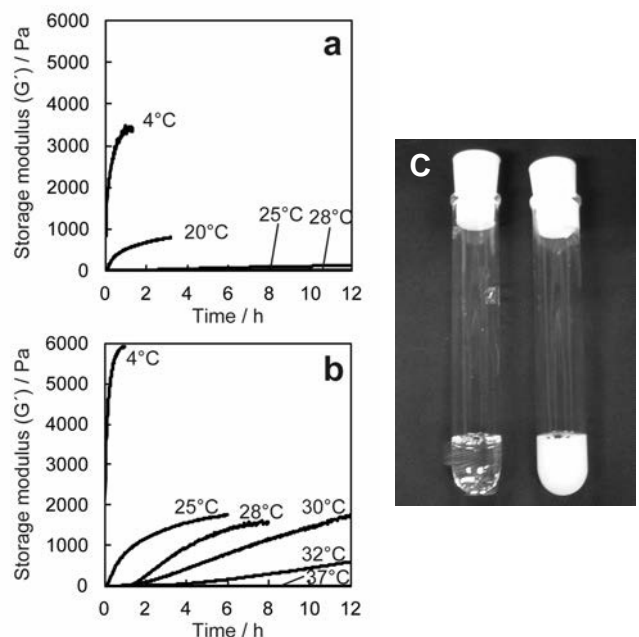


図 4. 各設定温度における CG (a) および UCG (b) のゲル化挙動とそのゲルの外観 (c 左:ゲル化温度 4°C, 右:30°C) <sup>(12)</sup>

**3.4 SEM による線維構造** 30°C で静置した不透明な UCG ゲル内部構造の SEM 観察結果を図 5a に示す。コラーゲン水溶液から調製した線維ゲル (図 5c) と同様な線維ネットワークが見られた。一方、4°C で静置した透明な UCG ゲル内部構造では、線維構造はまったく見られなかった (図 5b)。

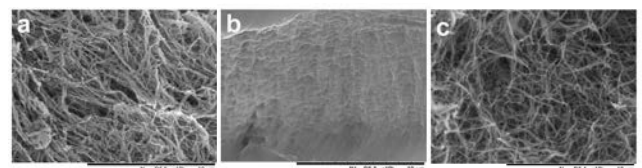


図 5. SEM 観察像: 30°C でゲル化した 5% UCG ゲル (a), 4°C でゲル化した 5% UCG ゲル (b) および 0.5% コラーゲン線維ゲル

**3.5 UCG の三重らせん構造の再生** 特定温度に 120 min 保持した場合のゼラチン水溶液の CD スペクトルを図 6 に示す。UCG および CG のいずれも設定温度が低いほど、コラーゲンの三重らせん構造に特有の 221 nm のピーク<sup>(13)</sup>は高くなったが、UCG のピーク高さは CG よりも高かった。30°C に保持した UCG および CG の CD スペクトルの時間変化を図 7 に示す。UCG では 60 min 後からピークが見られ、120 min 後にはさらに高くなった。対照的に、CG では時間が経過してもピークは見られなかった。

**3.6 UCG 包埋細胞の生存率** UCG ゲルに包埋された細胞の生存率を表 1 に示す。5% UCG に包埋された細胞にトリパンブルーで青く染色される死細胞は見られなかった。生存率のわずかな減少は 8% UCG ゲルに包埋された 1 日目の細胞に見られた。

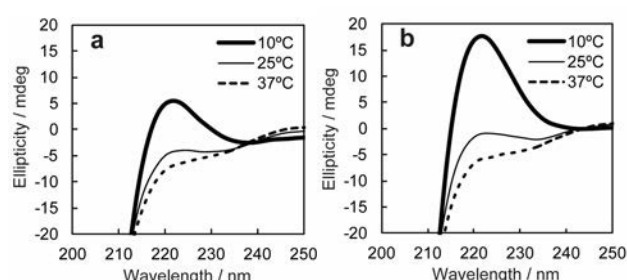


図 6. 冷却温度による CG (a) および UCG (b) の CD スペクトル<sup>(12)</sup>

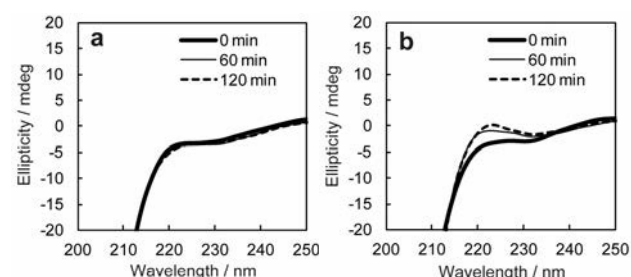


図 7. 30°C での時間経過による CG (a) および UCG (b) の CD スペクトル<sup>(12)</sup>

表 1. UCG ゲルに包埋された細胞の生存率とその弾性率<sup>(12)</sup>

ゲルの種類	基質濃度 (%)	細胞の生存 (%)		弾性率 (kPa)
		1日	3日	
UCG	8	92 ± 9	100	4.82 ± 0.32
UCG	5	100	100	1.28 ± 0.15
Collagen	0.5	-	-	0.38 ± 0.08

**3.7 細胞包埋された UCG ゲルの弾性率** 細胞を用いていないことを除き、細胞包埋実験と同一条件で調製したゲルの弾性率を表 1 に示す。対照として、従来の 0.5% コラーゲン線維ゲルの弾性率も測定した。UCG ゲルの弾性率は、コラーゲン線維ゲルよりも顕著に高かった。

#### 4. 考察

本研究では、三次元培養用ハイドロゲルとして生物学的に優れた特性を示すコラーゲンゲルの強度が低いという問題に取り組んだ。コラーゲン線維ゲルはコラーゲン水溶液

から作製される。コラーゲン水溶液の濃度を高められればゲルの強度を向上することが理論上は可能であるが、コラーゲン水溶液はわずか 2% 前後で流動性を消失し、市販されているコラーゲン水溶液の濃度は高くても 1% である。そこで、コラーゲン濃度を高める方法とは違ったアプローチが求められた。我々は、UCG の持つ 2 つの性質に着目した：ゼラチンと同様に UCG もコラーゲン水溶液に比べて大幅に低い粘度を示すこと、および UCG はコラーゲン線維様の構造体を再構築できること。これら二つの性質を組み合わせ、従来にないアプローチによるコラーゲン線維ゲルの高密度化・高強度化を実現した。

コラーゲンが変性してゼラチンになると、棒状構造がランダムコイルへと構造変化するため、粘度が大幅に低下する。室温における 0.5% コラーゲン水溶液の  $G'$  は  $10^0$  Pa であるが、融解状態の UCG 水溶液では、5% という高濃度でさえ  $G'$  は  $10^{-1}$  Pa を下回り、流動性に富む。したがって、細胞を 5% の UCG に包埋することが容易であり、そのまま UCG を線維化へと移行できれば、5% のコラーゲン線維マトリックスに細胞が包埋された状況を創り出すことができる。以上がコラーゲン高密度化への我々の新規なアプローチであるが、既存のゼラチンでは実現できない。既存のゼラチン（本研究における CG）には線維化へ移行する性質がほとんどないためである。

UCG と CG が線維化に移行する性質の違いは、その分子構造に原因がある。SDS-PAGE のパターンが示すように、UCG には  $\alpha$  鎖分解がないため、三重らせん構造の再生能が高く、コラーゲンが線維の再形成能を獲得した<sup>(8)</sup>。一方、低分子量化されたゼラチンである CG はコラーゲンの三重らせん構造を部分的には再生する<sup>(7)~(9)</sup>が、 $\alpha$  鎖分解により再生能が低く<sup>(13)</sup>線維形成にいたらないことが報告されている。

UCG の線維化には明確な温度依存性があり、28~32°C においてのみ線形ゲルを形成する一方、25°C 以下では通常のコラーゲンと同様な透明なゲルとなった。この相反する性質は、コラーゲンの線維化とゼラチンのらせん回復の温度依存性の違いで説明できる。高温域ではらせん回復が遅い反面、コラーゲンの線維化には有利であることが知られている。UCG は 2h のインターバルを経た後に徐々に線維化へと移行したと考えられた。一方、低温域ではゼラチンのらせん回復が活発に起こり速やかにゲル化する反面、コラーゲンの線維化は弱いことが知られている。今回の実験では UCG 濃度が 5% と高かったため、低温域では CG のゲル化と同様に線維化へと移行せずにそのままゲル化へと至ったと考えられた。

UCG 水溶液が線維化する温度域は細胞にとって温和な温度であり、我々は、UCG の線維化に細胞を共存させ、UCG 線維ゲルによる細胞包埋を行った。UCG 包埋の細胞侵襲性が低かったことには二つの理由があると考えている：①従来のコラーゲン水溶液では急激な線維形成を避けるために氷冷した水溶液に細胞を混合するが、UCG は 30°C で混合して線維形成に移行する。このため、UCG の包埋作業は温度

変化が小さく細胞への負担が少なかった。②37°Cにおける5% UCG 水溶液の粘性は2 mPa·sと極めて低く(0.3%コラーゲン溶液では64 mPa·s)、水溶液に細胞を分散する包埋作業において粘性の低いUCG水溶液が細胞への負担が少ない。これらの二つの理由から、3日間の包埋後の高い生存率が得られたと考えられた。

UCGゲルの課題として、培養温度(37°C)での安定性が十分でない点が判明した。UCG水溶液から再構築したコラーゲン線維様の構造体は培養温度(37°C)で見かけ上変化しないが、培養の継続により徐々に軟化することがわかった。UCGにはゼラチンに類似する分子も含まれており、ゼラチンに類似する分子を減少させて最適な分子で構成するために、UCGに含まれる分子 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -鎖およびオリゴマー構造の線維形成およびゲル化への影響を解析しなければならない。

## 5. まとめ

我々は、高濃度のUCG水溶液を用いた高密度・高強度コラーゲン線維様ハイドロゲルの作製技術を開発した。高強度で細胞生存率を高く維持するコラーゲン線維様ハイドロゲルは、三次元培養用ゲルとして生物学的に優れた特性を示すコラーゲンゲルの唯一の欠点である低強度を解決するための画期的なブレイクスルーとなる。本研究で開発された高強度コラーゲン線維様ゲルは、再生医療を始めとして多くの用途を展開できると期待される。なお、本論文の図は引用文献<sup>(12)</sup>から転載されたものであり、本研究の詳細も記述されている。

## 謝辞

本研究は、平成23-26年度JSPS科研費23791678の支援を受けて実施された。また、文部科学省による「ナノテクノロジープラットフォーム事業」を利用し、指導ならびに実施された。

(平成28年7月6日受付, 平成28年8月8日再受付)

## 文 献

- (1) C. Burillon, L. Huot, V. Justin, S. Nataf, F. Chapuis, E. Decullier, O. Damour, K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, K. Yamamoto, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano, T. Okano: "Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency", *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, Vol.53, pp.1325-1331 (2012)
- (2) Y. Sawa, S. Miyagawa, T. Sakaguchi, T. Fujita, A. Matsuyama, A. Saito, T. Shimizu, T. Okano, T. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, A. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, Y. Tano: "Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case", *Surg. Today*, Vol.42, 2, pp.181-184 (2012)
- (3) T. Ohki, M. Yamato, M. Ota, R. Takagi, D. Murakami, M. Kondo, R. Sasaki, H. Namiki, T. Okano, M. Yamamoto: "Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets", *Gastroenterology*, Vol.143, 3, pp.582-588 (2012)
- (4) C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee: "Biomedical applications of collagen", *Int. J. Pharm.* Vol.221, pp. 1-22 (2001)
- (5) M. Ochi, Y. Uchio, K. Kawasaki, S. Wakitani: "Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee", *J. Bone Joint Surg. Br.* Vol.84, pp.571-578 (2002)
- (6) H. Tohyama, K. Yasuda, A. Minami, T. Majima, N. Iwasaki, T. Muneta, I. Sekiya, K. Yagishita, S. Takahashi, K. Kurokouchi, Y. Uchio, J. Iwasa, M. Deie, N. Adachi, K. Sugawara, M. Ochi: "Atelocollagen-associated autologous chondrocyte implantation for the repair of chondral defects of the knee: a prospective multicenter clinical trial in Japan", *J. Orthop. Sci.* Vol.14, pp.579-588 (2009)
- (7) A. Veis, J. Anesey, J. Cohen: "The long range reorganization of gelatin to the collagen structure", *Arch. Biochem. Biophys.* Vol.94, pp. 20-31 (1961)
- (8) K. Kühn, J. Engel, B. Zimmermann, W. Grassmann: "Renaturation of Soluble Collagen. 3. Reorganization of Native Collagen Molecules from Completely Separated Units", *Arch. Biochem. Biophys.* Vol.105, pp. 387-403 (1965)
- (9) C. Tkocz, K. Kühn: "The formation of triple-helical collagen molecules from alpha-1 or alpha-2 polypeptide chains", *Eur. J. Biochem.* Vol.7, pp. 454-462 (1969)
- (10) U.K. Laemmli: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, Vol.227, pp.680-685 (1970)
- (11) S. Kaori, E. Tetsuya, A. Eijiro, K. Seiichi, H. Shunji: "Possible Involvement of Aminotelopeptide in Self-assembly and Thermal Stability of Collagen I as Revealed by Its Removal with Proteases", *J. Biol. Chem.* Vol.275, pp.25870-25875 (2000)
- (12) Y. Ohyabu, S. Yunoki, H. Hatayama, Y. Teranishi: "Fabrication of high-density collagen fibril matrix gels by renaturation of triple-helix collagen from gelatin", *Int J Biol Macromol.* Vol.62, pp.296-303 (2013)
- (13) T. Nishio, R. Hayashi: "Regeneration of a collagen-like circular dichroism spectrum from industrial gelatin", *Agric. Biol. Chem.* Vol.49, pp. 1675-1682 (1985)