

Collagen 분자 중의 lysine 산화반응에 미치는 비타민 C의 영향

김 미 향*

신라대학교 식품영양학과 및 해양신약소재 융합기술연구소

Received February 27, 2004 / Accepted May 18, 2004

The effect of L-Ascorbic Acid on the Oxidative Reaction of Lysine in Collagen. Mihyang Kim*. Dept. of Food Science and Nutrition, Silla university, and Fusion Technology Research Institute for Marine Pharmaceutical Materials, Busan 617-736, Korea – In a model reaction using lysyl oxidase purified partially from bovine aorta, effect of L-ascorbic acid AsA on the oxidative reaction of lysine in collagen was investigated. Addition of AsA to the reaction mixture under aerobic conditions resulted in the decrease of enzymatic activity. In order to examine the specificity of AsA in the oxidative reaction of lysine, other reductants including AsA derivatives instead of AsA were added to the reaction mixture. Thiol such as glutathione had no effect on the activities of lysyl oxidase. on the other hand, it was observed that erythorbic acid, which was a stereoisomer of AsA, had the same inhibitory effect on this oxidative reaction as AsA. Moreover, by the addition of 3,4-dihydroxybenzoate, which was structural analog of AsA, the activities decreased in a similar manner to that of AsA. These results indicate that the regulatory effect of AsA on lysyl oxidase is attributed to characteristics of the structure. From the determination of AsA remained in the reaction mixture, it is shown that AsA concentration remarkably decreased by lysyl oxidase of the reaction mixture. It is hypothesized that endiol groups reduces the enzyme-bound Cu^{2+} required for further progress of the reaction, and suggests that AsA regulates specifically the reduction of Cu^{2+} required to oxidize lysyl oxidase. This findings support that AsA has an important regulatory role on the oxidative reaction of lysine and on changes of collagen cross-links with aging.

Key words – AsA, lysine, lysyl oxidase, oxidative reaction

Collagen은 분자 내 또는 분자 간에 다수의 가교를 형성하여 collagen 섬유가 된다. Collagen중의 가교형성은 주로 성장과정에서 이루어지며, 특히 collagen 가교변화는 불용화, 물리적·화학적 안정성의 증가를 초래한다고 알려져 있다 [1-9]. 따라서 가교증가에 의한 collagen 불용화는 조직경화를 일으킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다. Pyridinoline은 collagen의 성숙가교물질로서 hydroxylysine (Hyl) 1분자와 생체 내에서 효소적 반응에 의해 생성되어진 hydroxyallysine 2분자가 결합하는 비효소적 반응에 의해 생성되며 [10-13], hydroxylysine의 생성에는 환원형 비타민 C (L-ascorbic acid; AsA)를 필요로 한다 [14-15]. Siegel은 pyridinoline을 포함하지 않는 태내 병아리 연골 중의 염가용성 collagen에 lysyl oxidase를 첨가하여 37°C에서 10일간 가온하였을 때 pyridinoline 생성을 확인하였고, 5주제의 pyridinoline 생성량은 0.144 mmol/mol Hyp로서 lysyl oxidase 무 첨가에 비해 확실히 증가되었음을 보고하였다 [16]. 즉, 반응초기에 Hyl은 lysyl oxidase에 의하여 hydroxyallysine으로 변화하고, 장시간의 가온에 의해 비효소적으로 pyridinoline이 생성됨을 나타내고 있다.

Lysyl oxidase는 구리 의존성의 amine oxidase이며, col-

lagen 분자내의 Hyl 및 Lys (lysine) 잔기를 산화적으로 탈아미노화하여 hydroxyallysine 잔기 또는 allysine 잔기 및 NH_3 와 H_2O_2 형성을 촉매하는 효소이다. 또한 유리의 Hyl과 Lys에는 활성을 가지지 않으나, 세포외에서 fibril을 형성한 collagen 분자중의 Lys 또는 Hyl에만 작용하며, 이 반응에 대한 특이한 저해인자로서 β -aminopropionitrile (BAPN)이 알려져 있다 [17-22]. Lysyl oxidase는 여러 동물조직으로부터 분리할 수 있고, 정제되어진 효소의 분자량은 약 28-34KDa로 알려져 있으며, 이 효소의 cofactor 중의 하나인 구리는 lysyl oxidase 32KDa에 대하여 1 g-atom 내재하고 있다 [23]. Lysyl oxidase 활성에 구리가 어떠한 역할을 하는지 확실한 규명은 없으나 식사 중의 구리 결핍에 의해 결합조직에 이상을 일으킨다고 보고 되고 있다 [24]. 또한, 이 효소를 metal-free enzyme으로 하였을 경우 활성을 잃고, 실험한 효소에 구리를 첨가하였을 때 효소활성이 회복되며, AsA는 구리 이온을 1가로 환원시켜 자신은 산화하는 것으로 알려져 있다 [25].

전보에서 저자는 AsA가 collagen 성숙가교인 pyridinoline 생성에 미치는 영향을 조사하였다 [26]. 그 결과, AsA는 효소적 반응에서 반응 초기에 일부 환원형 비타민 C (AsA)로서 작용하나 산화형 비타민 C (dehydroascorbic acid; DHA)로서 pyridinoline 생성을 더욱 억제하는 것으로 나타났다. Collagen 분자의 생합성을 촉진하는 AsA가 collagen 분자중의 pyridinoline 생성을 억제하는 실험 결과만으로는 AsA가 hydroxyallysine 생성을 위한 lysine 산화 반응에 어떠한

*Corresponding author

Tel : +82-51-309-5620, Fax : +82-51-309-5620

E-mail : mihkim@silla.ac.kr

영향을 미치는지 확실하지 않다. AsA가 lysine 산화 반응을 억제한다면 성장기에 과도한 pyridinoline 생성을 막을 수 있고, 노화와 나타나는 collagen 불용화에 의한 조직 경화를 억제하는 수단이 될 것으로 기대할 수 있다.

이와 관련하여 본 연구에서는 정제한 lysyl oxidase에 환원형 및 산화형 비타민 C (dehydroascorbic acid ; DHA)와 그 이성질체인 erythorbic acid (ErA) 환원제 glutathione (GSH) 및 3,4-dihydroxybenzoate를 첨가하여 lysine 산화반응에 미치는 비타민 C의 영향을 조사하여 그 반응 기구를 확실히 하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

Dehydroascorbic acid (DHA)는 Sigma Chemical Company (U.S.A.)로부터 ascorbate (AsA), erythorbate (ErA), 3,4-dihydroxybenzoate 및 glutathione (GSH)은 (주)和光純藥工業(Japan)에서, dimethylaminoethyl cellulose (DE52)는 Whatman으로부터, 소혈청알부민은 (주)생화학공업(Japan)으로부터 각각 구입하였다.

DE52 이온 교환체의 조제

DE52 이온 교환수지 20 g에 500 mL의 증류수를 첨가하여 잘 저은 후 30~40분 정지 후 상등액을 폐기하는 과정을 여러 번 반복하여 불순물인 미립자를 제거한 후 0.5 N NaOH-물-0.5N HCl-물-0.5 N NaOH-물의 순서로 세정하였다. 알칼리와 산으로 세정한 교환체는 glass wool로 선단을 채운 glass column (3.0×20 cm)에 충전하여 완충액(6 M Urea / 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.6)으로 평형화하여 조효소 정제에 사용하였다.

Lysyl oxidase의 정제

Lysyl oxidase는 다음과 같이 조제하였다. 지방을 제거한 소의 대동맥 200 g에서 추출정제한 조효소를 완충액 PBU (6 M Urea/10 mM Na₂HPO₄ buffer, pH 7.8)에 용해하여 원심분리에 의하여 얻어진 상등액을 10 mM Na₂HPO₄ buffer (pH 7.8, PB)로 평형화한 Sephacril S-200 column에 부하하여 용리하였다. 용출액은 fraction collector를 이용하여 9 mL 씩 분획하여 자외선 280 nm에서 흡광도 0.2 이상을 나타내는 용출획분을 모아, PB로 2일간 투석하였다. 이상의 조작에 의해 얻어진 투석 내액을 효소액으로 하여 동결건조 후 -80°C에서 동결보존 하였다. 효소단백질은 Lowry법에 의해 측정하였다(27).

효소활성의 측정

효소액을 첨가하여 37°C에서 0~1시간 동안의 효소반응을 관찰하였다. 본 효소반응에 의해 생성된 과산화수소는 산소

전극을 사용하여 과산화수소계(Olivedector-Model 5, Oriental 전기주식회사, Japan)로 측정하였다.

반응조건

반응혼합액을 조제하여 효소액 첨가와 동시에 37°C에서 0~1시간 반응시켰다. 각 실험 군에는 장시간 반응에 의한 세균번식을 막기 위해 2~3방울의 toluene을 표층에 가하였다. 효소 활성에 미치는 AsA의 농도별 영향을 측정하기 위하여 모델 반응계에 lysyl oxidase 2 µg과 AsA를 2, 0.2, 0.02 µM 되도록 첨가하여 37°C에서 60분 incubation 하여 H₂O₂ 발생량을 경시적으로 관찰하였다. AsA 및 GSH, ErA, 3,4-dihydroxybenzoate를 최종농도 0.2 µM 되도록 첨가하여 효소활성을 측정하였다. 대조군은 모델 반응계에 효소만을 첨가하여 측정하였다.

과산화수소의 측정

과산화수소에 catalase를 첨가하여(H₂O₂ → ½O₂ + H₂O) 생성되는 용존 산소의 함량을 산소전극으로 검출하였다(ORITECTOR MODEL III, Oriental Electric Co. Japan).

측정방법은 셀에 시료 2 mL을 넣고 stirrer로 각반하면서 질소 gas를 가하여 시료용액 중의 용존산소를 제거하여, 산소전극의 출력의 변화를 기록계 상에서 읽은 후 안정한 시점에서 0점으로 조정하여 catalase 용액 20 µL를 첨가한 다음, 과산화수소의 분해에 의해 발생한 산소를 산소전극 출력에 의해 나타난 peak의 높이를 측정하여 과산화수소의 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

Model 반응계에서의 lysine 산화반응에 미치는 비타민 C의 농도별 효과

In vitro model 계에서 각 농도의 AsA를 첨가하였을 때 효소활성의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. AsA의 첨가에 의해 lysyl oxidase 활성의 지표인 과산화수소의 생성량은 대조군에 비하여 감소하였다. 2 µM의 AsA의 첨가에 의해 효소활성은 완전히 억제되었고, 0.2 µM 농도에서 억제효과가 나타났으나 40분 경과 후 다시 활성이 상승하는 경향이 나타났다. 또한 0.02 µM 에서는 효소활성의 변화는 대조군과 비슷한 경향을 나타내었다. AsA를 과잉으로 첨가하였을 때 lysyl oxidase의 활성은 저해제인 BAPN을 첨가 하였을 때와 같은 결과를 나타내었다(Table 1). Lysyl oxidase 활성이 완전히 억제될 경우 pyridinoline 생성량은 감소될 것이고, 성숙가교인 pyridinoline 생성이 저하하면 분자 간 가교에 영향을 주어 collagen은 정상적인 기능이 유지되기 어려울 것으로 예상된다. 성장이상이나 lathylism의 증상이 나타날 가능성도 배제하기 어려울 것이다. 노화와 함께 결합조직의 변화는 적당한 AsA가 필요한 것으로 사료된다. 이상의 결과에서 AsA는

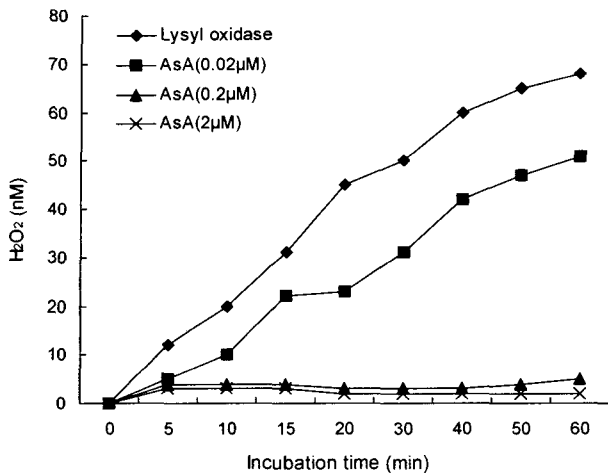


Fig. 1. Effect of various AsA concentration on the reaction mixture of lysyl oxidase. Reaction mixture was incubated at 37°C. AsA: ascorbic acid.

Table 1. Inhibition of lysyl oxidase activity by BAPN

min	H ₂ O ₂ (nM)	
	lysyl oxidase	BAPN
30	10.68	0
60	32.85	0

2 µM 이상의 농도에서 lysyl oxidase의 활성을 완전히 억제하여 pyridinoline 생성을 조절할 수 있는 농도는 그 이하가 적절한 것으로 나타났다.

Lysine 산화반응에 미치는 환원형 비타민 C 및 관련 물질의 영향

효소반응에서 초기의 과산화수소 생성량에 미치는 AsA, DHA, ErA, glutathione 및 3,4-dihydroxybenzoate의 영향을 Table 2에 나타내었다. 정제효소만을 첨가한 대조군은 0.941 nM/min으로 높은 수치를 나타내었으나, AsA 첨가에 의해 79% 억제되었다(Table 2). ErA 첨가에 의해서도 과산화수소 생성은 현저하게 억제되어 AsA와 ErA는 효소반응의 초기단계에 있어서도 현저하게 그 반응을 억제함을 알 수 있었다.

Lysine 산화반응에 미치는 산화형 비타민 C 및 Glutathione의 영향

Lysine 산화반응에 산화형 비타민 C (DHA)와 환원제인 glutathione (GSH)의 영향을 검토하였다(Fig. 2). 전보에서 저자는 염가용성 collagen과 부분정제 lysyl oxidase를 사용한 반응계에서 비타민 C의 영향을 조사한 결과[28], AsA는 효소 반응을 현저하게 억제하며 DHA에 의해서도 억제하는 경향이 나타났다. 본 실험에서는 정제 효소 중에 DHA를 첨가하여도 그 영향은 대조군과 비슷하게 나타나, 조효소를 사

Table 2. Effect of various agents on the reaction mixture of lysyl oxidase

Compound	Initial rate of H ₂ O ₂ (nM/min)
Lysyl oxidase	0.941
Ascorbic acid	0.198
Erthorbic acid	0.197
Dehydroascorbic acid	0.963
Glutathione	0.827
3,4-Dihydroxybenzoate	0.387

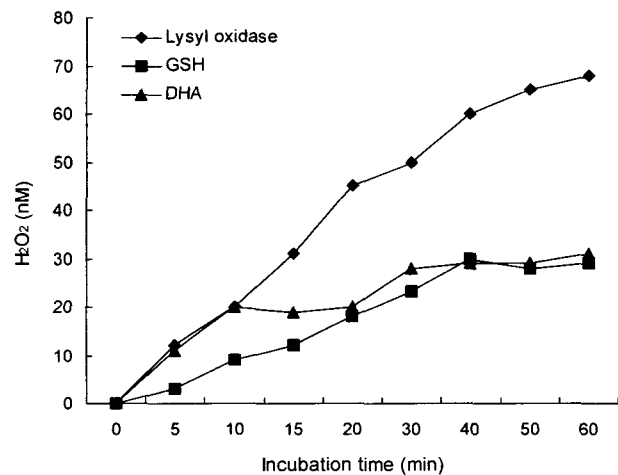


Fig. 2. Effect of DHA and GSH on the reaction mixture of lysyl oxidase. Reaction mixture was incubated at 37°C. GSH: glutathione, DHA : dehydroascorbic acid.

용한 반응계와 다른 양상을 띠고 있음을 추정할 수 있었다. Lysine과 hydroxylysine은 δ-amino기를 가지고 있으며 collagen 분자 중에서 DHA와 maillard 반응에 의해 carboxymethyl lysine (CML) 또는 carboxymethyl hydroxylysine (CMhL)을 생성한다[29]. Hyl이 이러한 산화반응에 의해 CML 또는 CNhL로 변화한다면 pyridinoline 생성은 억제될 것으로 추측된다. Shimamura는 동물실험에서 꿀 및 연골 collagen 중의 DHA 농도는 AsA와 비교해 높은 경향을 나타냄을 확인하였고, 이러한 것은 pyridinoline 생성에 의해 AsA가 산화되어 DHA와 Lys 또는 Hyl이 Maillard 반응을 일으켰을 것으로 추정하고 있다(30). CML이나 CMhL은 연골 또는 골 collagen에서의 존재 여부는 확인되지 않았으나 당뇨병환자의 안구 중의 collagen은 CML 반응 경로를 거치므로(31) 같은 변물질인 Maillard 반응생성물의 생성을 억제할 것이라고 추측할 수 있다. In vitro에서 collagen을 glucose 용액 중 37°C에서 수주간 방치할 경우 노화한 사람의 collagen과 비슷한 Maillard 반응 생성물을 생성한다고 한다[30]. 환원제인 GSH를 첨가한 경우 과산화수소의 생성량은 대조군과 비교하여 변화는 나타나지 않았으며 DHA와 비슷한 패턴을 나타냈다

(Fig. 2). Lysyl oxidase 증에는 cysteine이 아미노산 1000잔기에 대하여 약 30잔기 존재하며 이러한 disulfide 결합에 의해 효소가 안정화 된다고 알려져 있다[23]. GSH와 같은 thiol 화합물은 cysteine 측쇄개열 시약으로 사용되며 lysyl oxidase의 disulfide를 절단하는 것에 의해 효소 활성을 억제할 가능성도 예상되지만 본 반응계에서는 그 효과는 나타나지 않았다. 같은 환원제로 기능을 하는 AsA에서는 그 영향이 나타났으므로 AsA의 구조가 이러한 반응에 관여하는 것을 예측할 수 있다.

이상의 결과로부터 환원형의 비타민 C는 효소활성에 저해제로서 그 효과가 높은 것이 밝혀졌다. 황화합물인 GSH는 lysyl oxidase의 disulfide 결합을 절단하는 것에 의해 효소의 활성을 저해 할 것으로 예상되었으나 그 영향은 나타나지 않았다.

Lysine 산화반응에 미치는 입체이성체 erythorbic acid의 영향

반응계에 erythorbic acid (ErA)를 첨가하였을 때의 경시적 변화를 Fig. 3에 나타내었다. ErA는 AsA의 5번째 탄소원자에 결합하는 수산기가 다른 입체이성체이며 AsA와 거의 동등한 화학적 성질을 가지며 강한 환원성을 나타내는 것으로 알려져 있다[32]. Guinea pig를 이용한 실험에서는 대량의 ErA의 투여는 장기 중의 AsA 함량을 감소시키나 AsA의 효과는 저하시키지 않는 점, AsA 결핍 시에는 AsA로서 효력을 나타내는 것이 밝혀졌다(32). ErA를 첨가하였을 때 과산화수소 생성량은 대조군과 비교해서 19% 감소를 나타내었고(Table 2) AsA와 동등한 억제효과를 나타내었다. 또한 경시적 변화를 관찰해도 AsA와 같은 결과가 얻어졌다.

이상의 결과로부터 AsA의 입체이성체인 ErA는 AsA와 같이 lysine 산화반응에서 억제적으로 작용하고 환원제인 GSH

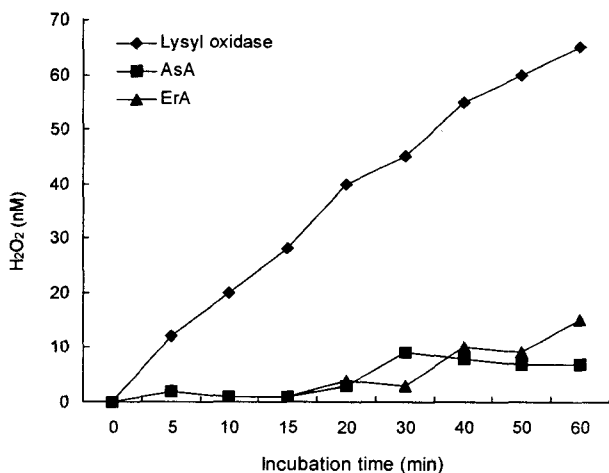


Fig. 3. Effect of AsA and ErA on the reaction mixture of lysyl oxidase. Reaction mixture was incubated at 37°C. AsA: ascorbic acid, ErA : erythorbic acid.

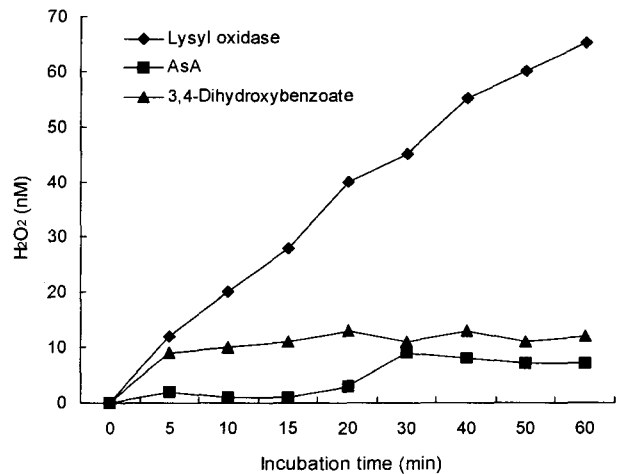


Fig. 4. Effect of AsA analogue on the reaction mixture of lysyl oxidase. Reaction mixture was incubated at 37°C.

보다도 lysyl oxidase에 미치는 영향은 큰 것으로 나타났다. 즉, lysine 산화반응에 미치는 억제 효과는 환원제로서는 AsA와 ErA에서만 나타났으므로, 그 구조가 lysyl oxidase에 관여할 가능성이 시사되어졌다.

Lysine 산화반응에 미치는 3,4-dihydroxybenzoate의 영향

이상의 결과에서 AsA의 구조가 lysine의 산화반응을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 추측되므로, AsA의 analogue인 3,4-dihydroxybenzoate를 이용하여 lysyl oxidase의 효소활성에 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 4). 효소반응계에 3,4-dihydroxybenzoate를 첨가한 결과 lysyl oxidase의 효소활성은 억제되었다. AsA의 analogue가 AsA와 같은 효과를 나타내었으므로 AsA의 endiol기의 작용 가능성을 추측할 수 있다. 정제한 prolyl hydroxylase를 사용한 proline 수산화반응에서 acylreductone과 같은 환원제가 필수이며, 이러한 환원제는 단순히 반응계에서 유리 철을 환원시키는 것뿐만 아니라 효소 내부의 활성중심 부근에 근접하여 효소복합체를 환원시킬 때 AsA의 구조적 특징인 endiol을 가지는 5원환 lactone을 필요로 하는 것으로 알려져 있다(33). 따라서 구리 의존성 lysyl oxidase가 구조적으로 prolyl hydroxylase의 반응과 비슷한 점으로부터 효소 내부의 활성부위 근방에 효소 복합체를 환원시키기 위해 AsA의 endiol기가 필요한 것으로 사료된다.

이상의 결과로부터 AsA의 lysine 산화반응에 미치는 억제 효과는 구조적인 부분에서 AsA의 특징인 endiol기에 의한 것으로 추측되고 이러한 endiol기가 효소-구리 복합체를 환원할 때 효소의 활성부위에 근접하는 것으로 생각되어진다.

요 약

AsA 및 그 관련화합물, 각종 환원제 등을 첨가하여 lysine

의 산화반응에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. AsA의 첨가에 의해 lysyl oxidase 활성의 지표인 과산화수소의 생성량은 대조군에 비하여 감소하였다. 2 μ M의 AsA의 첨가에 의해 효소활성은 완전히 억제되었고, 0.2 μ M 농도에서 억제효과가 나타났으나 40분 경과 후 다시 활성이 상승하는 경향이 나타났다. 또한 0.02 μ M 에서는 효소활성의 변화는 대조군과 비슷한 경향을 나타내었다. 효소활성은 환원형 AsA에서 저해 효과가 높았으나 산화형 비타민 C (dehydroascorbic acid: DHA)와 환원제인 glutathione (GSH)에서는 억제효과가 크게 나타나지 않았다. AsA의 입체이성체인 ErA는 AsA와 같이 lysine 산화반응에서 억제적으로 작용하고 환원제인 GSH보다도 lysyl oxidase에 미치는 영향은 큰 것으로 나타났다. 즉, lysine 산화반응에 미치는 억제 효과는 환원제로서는 AsA와 ErA에서만 나타났으므로, 그 구조가 lysyl oxidase에 관여할 가능성이 보여졌으므로, AsA의 analogue인 3,4-dihydroxybenzoate를 이용하여 lysyl oxidase의 효소활성에 미치는 영향을 검토하였다. AsA의 analogue인 3,4-dihydroxybenzoate를 첨가하였을 때에도 lysyl oxidase 활성은 억제되어, AsA의 analogue가 AsA와 같은 효과를 나타내었으므로 AsA의 endiol기의 작용 가능성을 추측할 수 있다.

이러한 결과로부터 lysine의 산화반응은 AsA에 의해 억제되고, 그 억제 효과는 AsA의 endiol기가 효소-구리이온 복합체를 환원할 때 효소의 활성부위에 접근하여 나타나는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 신라대학교 교내연구비에 의해 수행된 연구결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 藤本大三郎. 1982. 콜라겐分子的變化とエシグ-老化をくいとめる方法はみつかるか. *現代化學*, **8**, 10-15.
2. Fujimoto, D. 1982. Aging and cross-linking in human aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1264-1269.
3. Robins, S. P. and A. J. Baily. 1997. The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem. J.*, **163**, 339-346.
4. Robins, S. P. 1982. Turnover and cross-linking of collagen. *Collagen in Health and Disease*, 160-178.
5. Yamauchi, M., D. T. Woodley and G. L. Mechanic 1988. Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 898-903.
6. Kuboki, Y and G. L. Mechanic. 1982. Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. *Calcif. Tissue Int.*, **34**, 306-308.
7. Siegel, R. C. 1977. Collagen cross-linking effect of D-penicillamine on cross-linking *in vitro*. *J. Biologic. chem.*, **252**, 254-259.
8. Eyre, D. R., I. R. Dickson and K. V. Ness. 1988. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem. J.*, **252**, 49-500.
9. Kim, M., M. Otsuka and N. Arakawa. 1994. Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 95-103.
10. Fujimoto, D. and T. Moriguchi. 1978. Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. *J. Biochem.*, **83**, 863-867.
11. Fujimoto, D., T. Moriguchi and H. Hayashi. 1978. The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 52-57.
12. Barber, M., R. Bordoli, G. J. Elliott, D. Fujimoto, S. E. Scott. 1982. The structures of pyridinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1041-1046.
13. Tsuda, M., T. Ono, T. Ogawa and Y. Kawamishi. 1982. Pyridinoline is a real moiety of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1407-1412.
14. Nurad, S., A. Sivarajah and S. R. Pinnel. 1981. Regulation of propyl and lysyl hydroxylase activities in cultured human skin fibroblasts by ascorbic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 868-875.
15. Chan, D., S. R. Lamande, W. C. Cole, J. F. Bateman. 1990. Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation *in vitro*. *Biochem. J.*, **269**, 175-181.
16. Siegel, R. C., J. C. C. Fu, N. Uto, K. Horiuchi and D. Fujimoto. 1982. Collagen cross-linking: Lysyl oxidase dependent synthesis of pyridinoline *in vitro*: confirmation that pyridinoline is derived from collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1546-1550.
17. Pinnell, S. R. and G. R. Martin. 1968. The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to α -amino adipic- δ -semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 708-716.
18. Layman, D. L., A. S. Narayanan and G. R. Martin. 1972. The production of lysyloxidase by human fibroblasts in culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**, 97-101.
19. Narayanan, A. S., R. C. Siegel and G. R. martin. 1974. Stability and purification of lysyl oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 231-237.
20. Hayakawa, T., M. Hino, H. Fuyamada, T. Nagatsu, H. Aoyama and Y. zawa. 1976. Lysyl oxidase activity in human normal skins and postburn scars. *Cinica. Chimica. Acta.*, **71**, 245-250.
21. Siegel, R. C. and J. C. C. Fu. 1976. Collagen cross-linking. *J. Biol. Chem.*, **251**, 5779-5785.
22. Kagan, H. M., K. A. Sullivan, T. A. Olsson and A. L. Cronlund 1979. Puridication and properties of four species of lysyl oxidase from bovine aorta. *Biochem. J.*, **177**, 203-214.
23. Siegel, R. C. 1979. Lysyl oxidase. *Inter. Rew. Connec. Tissue Res.*, **8**, 73-118.
24. Bird, T. A. and C. I. Levene. 1982. Lysyl oxidase: evience that pyridoxal phosphate is a cofactor. *Biocnem. Biophys.*

- Res. Commun.*, **108**, 1172-1180.
25. Shieh, J. J. and K. T. Yasunobu. 1974. Purification and properties of lung lysyloxidase, a copper-enzyme. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **48**, 267-273.
 26. Kim, M. 1998. The effect ascorbic acid on the enzyme reaction in pyridinoline formation during soluble collagen maturation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 305-312.
 27. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-269.
 28. Kim, M. 1999. The effect of L-ascorbic acid on the formation of immature crosslink in bone collagen in vitro. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 1332-1338.
 29. Nagar, R. H., D. R. Sell, M. Prabhakaram, B. J. Ortwerth and V. M. Monnier. 1991. High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 10257-10261.
 30. Shimamura, E. 1994. The effect of L-ascorbic acid on the formation of collagen cross-links in the connective tissues. *Doctor Degree Paper*, Ochanomizu University, Tokyo.
 31. Nagaraj, R. H. and V. M. Monnier. 1992. Isolation and characterization of a blue fluorophore from human eye lens crystallins : *In vitro* formation from maillard reaction with ascorbate and ribose. *Biochimica. Biophysica. Acta.* **1116**, 34-42.
 32. 村田晃. 1990. ビタミンCの多様な作用と作用機作. *日本農芸化学會誌*, **64**, 1843-1845.
 33. Tuderman, L., R. Myllyla and K. I. Kivirikko. 1977. Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. *Eur. J. Biochem.*, **80**, 341-348.