

胶原蛋白结构基础上的设计与合成

Structure-based Design and Biosynthesis of Collagen Proteins

杜春玲, 姚菊明*

DU Chun-Ling and YAO Ju-Ming*

浙江理工大学材料与纺织学院, 教育部先进纺织材料与制备技术重点实验室 杭州 310018

The Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology of Ministry of Education, College of Materials and Textile, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

摘 要 胶原蛋白在人体组织中的含量十分丰富,它是具有绕轴周期性螺旋(即三重螺旋)结构的纤维状蛋白,它为细胞粘附和大分子的沉积等提供支架结构。随着基因工程技术和生物材料科学的不断发展,以及对如何获得具有特殊功能胶原蛋白研究的不断深入,使其成为第三代生物材料中倍受瞩目的成员之一。基于胶原蛋白结构的分子设计以及合成途径值得探讨。

关键词 胶原蛋白,生物合成,基因工程,羟化酶,分子设计

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0189-06

Abstract Collagen is the most abundant protein in human body and a periodic helix, *i. e.*, triple helix, fibrous protein, which provides the scaffold structures for the cell adhesion and macromolecule aggregation, *etc.* With the development of gene engineering and biomaterial technologies, and the incessant studies on the technique to obtain the proteins with special functions, the collagen protein has been one of the third generation biomaterials that attract more attention than others. In this paper, we reviewed the recent structure-based design and biosynthesis of collagen.

Key words collagen, biosynthesis, gene engineering, hydroxylases, molecular design

胶原蛋白在哺乳动物机体中含量丰富,它以胶原纤维形式存在,对动物和人体皮肤、血管、筋腱和软骨的形成都十分重要,为这些结缔组织提供一定的结构和机械力学性质^[1]。另一方面,胶原蛋白具有良好的细胞粘附性能,与细胞结合对细胞迁移、胶原分解代谢以及血小板凝聚等也具有一定的作用^[2-4]。鉴于胶原蛋白固有的生物兼容性、生物降解性和吸收性以及促进细胞形成等诸多功能,在生物医用材料、组织工程、化妆品和食品等领域具有广泛

的应用价值。目前确认的胶原蛋白已有 20 多种,其中以 I 型胶原蛋白的含量最多,约占全部胶原蛋白的 90% 以上。胶原蛋白多半从牛筋和牛皮等动物组织中萃取,但随着禽流感、疯牛病及其人类变种——“克雅氏症”(Creutzfeldt-jakob disease)等的出现,人们开始担心动物来源的胶原蛋白及其衍生物可能会受到病毒污染,并且伴随潜在的免疫排异反应^[5]。为了降低胶原蛋白的免疫排异反应,科学家设想从人胎盘中获取胶原蛋白,但是该研究受到世界人权

Received: September 21, 2006; Accepted: October 31, 2006.

This work was supported by the grants from NSF(No. 20404011, 10672145) and ZJNSF(No. R404066).

* Corresponding author. Tel.: +86-571-86843618; Fax: +86-571-86843619; E-mail: yaoj@zstu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20404011, 10672145)和浙江省自然科学基金(No. R404066)资助编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

组织及 FDA 的阻止。然而 现代生物技术的发展为利用 DNA 重组技术生产类人胶原蛋白提供了可能,一方面可以提高蛋白的纯度、降低从动物体内萃取时受到病毒感染的风险,同时,通过严密的分子设计可选择性地保留胶原蛋白的优点,提高其活性和力学性能。这就要求研究者知道胶原蛋白的结构特征,以及结构和性能之间的关系,从而进一步应用于材料科学的设计与制备。

1 胶原蛋白的结构

在分子结构上,胶原蛋白是由平行线型链组成,每一线型链由三条扭曲左旋的 α -肽链通过链间相互作用紧密结合而形成一极强的右旋三重螺旋(triple helix)结构(如图 1a 所示)。每条 α -肽链由多达 300 个以上的 Gly-X-Y 三联体重复构成,两端连接具有不同结构的其它小片段。组成胶原蛋白的氨基酸残基均为 α -氨基酸,其中 X、Y 是 Gly 之外的任何氨基酸残基,但 X 通常是 Pro, Y 通常是不由 DNA 碱基密码子编码的羟基脯氨酸(Hyp),它是在蛋白质一级结构序列形成之后由特定的酶——脯氨酸-4-羟化酶(prolyl-4-hydroxylase, P4H)作用于序列中的 Pro 形成的, Hyp 羟基通过分子间氢键对稳定胶原螺旋结构起着非常重要的作用^[6,7];另外,还含有一定量的羟赖氨酸(Hyl),它具有与 Hyp 相类似的作用。由于 Pro 和 Hyp 的侧链是环形的,它们的 α -碳和酰胺氮之间的键不能旋转(ϕ 角一般固定在 -60° 左右),因此高含量的这些氨基酸残基促进了 α -肽链螺旋结构的形成和稳定。在三重螺旋结构中, Gly 残基位于螺旋形的中心,而其它具有侧链的氨基酸残基位于螺旋的外侧(如图 1b 所示)。右旋三重螺旋的螺距为 8.55 nm,半径为 1.5 nm,每圈每条肽链上包含 30 个残基,而每条左旋肽链的螺旋为 0.952 nm,每圈约含 3.3 个残基,其轴向相邻氨基酸残基间的距离大约为 0.286 nm^[8]。由于三重螺旋结构是一种错位的结构,来自三条肽链的 Gly 残基沿着螺旋的中心轴堆积。在三维空间上,一条链上的 Gly 处于和其它两条链的 X 和 Y 残基相邻的位置,如图 1b 中, A 链上的 Gly 与 C 链上的 X 和 B 链上的 Y 距离较近。因此,每个 Gly 残基的 N-H 就与相邻的 X 残基上的 C=O 形成氢键。由于 Hyp 残基的羟基也参与链间氢键的形成,三重螺旋结构得到了稳定和增强。有研究表明,二价铁离子存在于胶原多肽的 N 末端时可以提高三重螺旋结构的稳定性^[9]。另外,圆二色光谱分析显示,多羟基的化合物如糖醇类的物质可

以与胶原蛋白发生聚合,分子力学计算进一步显示,这种聚合通常发生在胶原蛋白三联体的 X 为 Ser 的位置上,但是胶原蛋白的稳定性会随着该类化合物碳原子的增加而减弱^[10]。

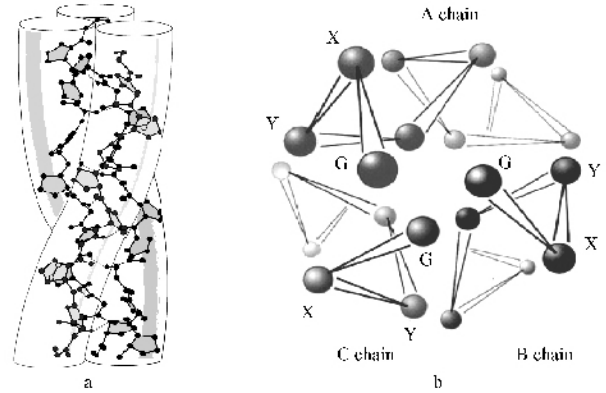


图 1 胶原蛋白结构特征示意图

Fig. 1 Structural features of collagen protein with triple helix structure

a: side view of the triple helix; b: cross-section of the triple helix.

对于胶原蛋白而言,真正可发挥其生物功能和力学性能的必须是由三条缠绕的直链组成,成为三重螺旋结构,若三条螺旋链的立体结构遭到加工或受高热而破坏,则成为一般俗称的明胶。

2 胶原蛋白在生物体内的合成与纤维的形成

胶原蛋白在生物体内的合成如图 2 所示^[11]。各个肽链所对应的遗传基因信息,由信使 RNA(mRNA)将编码蛋白所需的遗传信息转录到核糖体,在核糖体上合成多肽链。多肽链经侧链羟基化,即形成羟脯氨酸、羟赖氨酸残基,再经糖基化作用等一系列修饰作用后形成原胶原分子,并分泌到细胞外。在胞外经羧基肽酶和氨基肽酶的作用下,将 C-端和 N-端的球状蛋白水解下来,从而形成胶原分子。胶原分子首尾相随,平行排列而成纤维束,通过共价交联,形成具有抗张强度的胶原原纤,进一步通过分子内或分子间的相互作用聚集成束,成为稳定的水不溶性胶原纤维。由于胶原蛋白中缺乏 Cys,因此一般不存在二硫键的交联,而是通过赖氨酸残基的 ϵ 氨基在赖氨酰氧化酶的催化下,氧化成醛基,该醛基与邻近的赖氨酸氨基或羟赖氨酸的羟基缩合,形成共价交联稳定原纤维的结构。由于羟化反应是以维生素 C 为辅助因子的,故 V_C 缺乏时,此稳定结构的共价键就不能形成,以致发生牙龈出血、创伤不易愈合等病变。最近,有研究人员通过对照酶

催化的和非酶催化交联的胶原蛋白生物力学方面的测试发现, 胶原蛋白的后转录修饰对骨骼的脆弱性有很大的影响^[12]。另外, 有些有机物质会对胶原蛋白的纤维化有重要的影响。例如, 胶原蛋白的甘油化会减弱 I 型胶原蛋白和蛋白聚糖之间的静电作用, 影响胶原蛋白的核心部分与蛋白多糖之间的相互作用, 因此, 在体内以甘油为最终产物的都可能会破坏蛋白多糖和胶原蛋白之间的联系, 从而影响细胞外基质的完整性以及细胞之间的相互作用和细胞的粘附性^[13]。

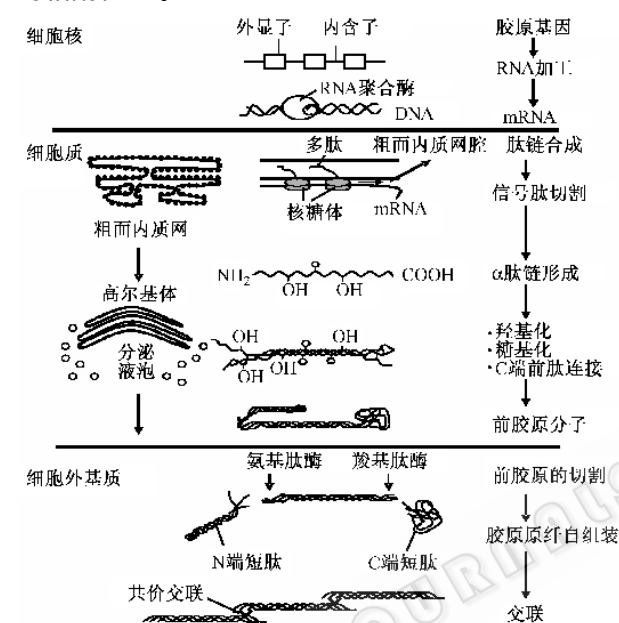


图 2 胶原蛋白的体内合成过程

Fig. 2 Progress on *in vivo* synthesis of collagen proteins

3 类胶原蛋白的设计与合成

随着现代生物技术的发展, 国内外陆续有公司或研究单位开始开发重组类胶原蛋白的生产技术。例如, 美国 FibroGen 公司已成功表达包括 I 型胶原在内的 9 种不同类型的重组胶原蛋白^[14]; Cohesion Technologies, Inc. 也利用转基因的方法, 培育出含类人胶原蛋白的小白鼠^[15]; 美国胶原公司将特定的乳腺表达系统微量注射到受精卵母细胞后, 移植到哺乳动物母体, 使其怀胎足月, 得到含有重组类人胶原蛋白的哺乳动物^[16]。但通过哺乳类或昆虫细胞株生产的成本极高、生产周期长, 而且昆虫细胞和部分哺乳动物中没有足够水平的 P4H^[17,18]。研究人员也尝试利用微生物(如大肠杆菌 *E. coli*)来生产类胶原蛋白^[19], 因为该方法的生产成本相对较低。但在大多数的大肠杆菌和酵母中其自身根本不能合成 P4H, 因而不能形成 Hyp 残基^[7,20]。为了得到稳定的

三重螺旋结构, 并具有良好生物活性的胶原蛋白, 国内外研究者主要从下面几个方面来开展研究。

3.1 含有 Hyp 残基的类胶原蛋白

如前所述, Hyp 和 Hyl 是在蛋白质一级结构序列形成之后由羟基化酶作用于序列中的 Pro 和 Lys 形成的, 这种翻译后的修饰对胶原蛋白三重螺旋结构的稳定起着非常重要的作用^[21]。虽然大多数的大肠杆菌或酵母其自身不能合成 P4H, 但在合适的培养条件下, 大肠杆菌可以直接利用编码脯氨酸的密码子来转录翻译得到羟脯氨酸^[22]。一般情况下, 大肠杆菌的蛋白质合成机制所合成的羟脯氨酸不足以支持含羟脯氨酸残基蛋白质的合成, 但在培养过程中, 培养基中高浓度的 NaCl 可以提高细胞内羟脯氨酸的浓度, 从而弥补其低水平的缺陷^[22,23]。该方法所合成的胶原蛋白与来自于组织中的天然胶原有一定程度的差异, Pro 在 Gly-X-Y 三联体中的 X 和 Y 位置均有可能出现。结果表明, 利用大肠杆菌合成的胶原分子具有显著的柔韧性, 可以更广泛地将稀有氨基酸残基合成到重组蛋白中^[22]。

修饰用的 P4H 存在于内质网腔中, 脊椎动物的 P4H 是由 $\alpha_2(\beta_2)$ 构成的四聚体, 每一个 α 亚基包含一个将 Pro 羟化的催化位点^[24]。所有尝试将一个来自于各个亚基, 有活性的 P4H 四聚体在体外非细胞系统中的表达都没有成功, 但通过将两个亚基一起表达而产生的重组酶在许多类型细胞中都能得以实现^[25,26]。例如, 采用一种铁氧还原蛋白酶和谷胱甘肽还原酶突变体的大肠杆菌菌株, 并进行逐步控制该酶亚基在细胞质中的表达, 结果获得了大量的类人胶原 I 型的 P4H 四聚体^[27]。在细胞质中表达纯化后得到的 P4H 四聚体的活性值在一定的允许范围内, 该范围是以人胶原 I 型的 P4H 单独作为非重组酶或者在昆虫细胞中内质网腔中产生酶活性为标准的, 但其表达水平在发酵罐发酵表达时的收率大约为 25 mg/L, 几乎是昆虫细胞中的 5~10 倍^[28]。并且, 这种在大肠杆菌中表达得到的酶与生物体内或源于其它宿主的酶是不一样的, 因为它缺少了 N 末端的糖基化和 α 亚基, 这对于结晶试验是非常有效的^[29]。因此, 如果将这种在大肠杆菌中高效表达的羟化酶与胶原蛋白的基因一起转化, 并在大肠杆菌中表达, 可以使胶原蛋白中的 Pro 残基发生羟基化, 从而得到具有稳定三重螺旋结构的胶原蛋白。另外, 将重组 III 型胶原蛋白和哺乳动物的 P4H 在酵母中共同表达, 从而得到具有三重螺旋的胶原蛋白^[30]。Pratt 等^[31]则利用酿酒酵母使四个基因共同

表达,其中两个基因是用来编码类人 I 型胶原蛋白的肽链,另外两个基因编码 P4H 的亚基,结果获得了具有稳定三重螺旋结构的胶原蛋白。最近有研究人员利用转基因的方法,在家蚕的后部丝腺细胞中同时合成了高活性的 P4H 四聚体和分子量较小的胶原蛋白,该酶活性是天然 P4H 活性的 13 倍,最终可以从蚕茧中得到充分羟基化的胶原蛋白多肽^[32]。

3.2 不含 Hyp 的类胶原蛋白

虽然 Hyp 对胶原蛋白三重螺旋结构的稳定起着非常重要的作用,但在许多情况下, Hyp 还是非常难以获得的。因此,研究者开始寻找在 Hyp 缺失的情况下,如何促进类胶原蛋白三重螺旋结构的形成与稳定。在蛋白质材料中,分子基团间的静电相互作用也是稳定其结构的重要因素。而天然胶原蛋白中 40% 的 Gly-X-Y 三联体含有至少一个带电荷氨基酸残基,这些氨基酸残基,如正电荷的谷氨酸 (Glu) 和天冬氨酸 (Asp) 一般在三联体的 X 位置上,而负电荷的赖氨酸 (Lys) 和精氨酸 (Arg) 则在 Y 位置上^[33, 34]。另外,把一些具有交联能力的序列,如源于 III 型胶原蛋白的 GPPGPCCGGG 连接到类胶原蛋白的 C-末端,由于链间二硫键的形成从而促进其三重

螺旋结构的形成和稳定^[33, 35]。

另一方面, GER 三联体在 I 型胶原蛋白中含量较多,出现的频率排列第五^[36]。而且有研究表明,胶原蛋白中的 GER 序列不仅能够促进细胞的粘附,同时也是血小板的凝聚以及血管修复和生长所必需的^[36, 37]。Grab 等^[38]研究了 I 型胶原蛋白中可能的细胞粘附识别位点后发现, GPQGIAGQGRGVVLP * (P *, Hyp) 序列在三重螺旋结构条件下,除了能提高细胞信号识别和产生基质金属蛋白酶外,还具有高度的纤维细胞粘合的功能。因此,本文作者^[39, 40]曾经设计以及利用基因重组技术合成了两种类胶原蛋白, ColI (氨基酸序列为 [GERGDLGPQGIAGQGRGVV (GER)₃GAS]₃) 和 Coll-Fusion (氨基酸序列为 [GERGDLGPQGIAGQGRGVV (GER)₃GAS]₃GPPGPCCGGG)₃。不同条件下的圆二色谱 (图 3) 分析结果显示,含有较多 Glu 和 Asp 残基,并且 C-末端连接 GPPGPCCGGG 序列的类胶原蛋白在酸性条件下具有最为稳定的三重螺旋结构。而且,这两种类胶原蛋白对 BALB3T3 纤维细胞的粘附性能比天然胶原还要好,并且,末端序列 GPPGPCCGGG 不对细胞相容性产生任何影响^[33]。

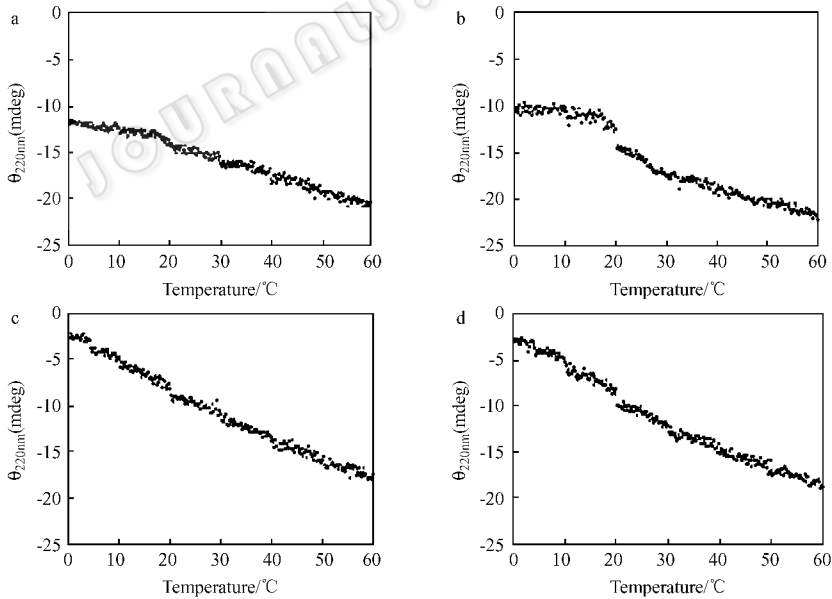


图 3 类胶原蛋白 ColI 和 Coll-Fusion 在不同条件下的圆二色谱

Fig. 3 Thermal stability of collagen-like proteins in PBS buffer

a : ColI (8), pH 5.8 ; b : ColI (8)-Fusion, pH 5.8 ; c : ColI (8), pH 8.0 ; d : ColI (8)-Fusion, pH 8.0.

4 展望

胶原蛋白特有的三重螺旋结构赋予其很多有用的功能特性,包括力学性能和生物相容性等。因此,胶原蛋白可以广泛应用于生物、化工、食品等许多领

域,这就促使人们对胶原蛋白相关领域的研究不断深入。近年来,对胶原蛋白的研究主要集中在新型胶原的发现,结构与性能研究,蛋白质的化学修饰、交联,以及复合胶原蛋白材料的开发利用等。例如 John 等^[41]将牛脱钙骨粉、重建牛皮胶原复合材料

料作为骨形态蛋白生长因子的载体,用于硬组织和软组织的创伤修复。Ma 等人为了缓解组织工程用胶原蛋白孔支架的降解速度,用氨基酸作为交联桥,增加了生物支架的稳定性^[42]。M. Rafiuddin 等人使用胶原蛋白制成的交联管状神经导管成功实现了神经再生^[43]。研究人员发现,通过中等浓度交联剂 EDC 的作用不仅可以增加胶原海绵的稳定性和力学性能,还可以为细胞的粘附、生长、分化及皮肤细胞再生等营造良好的环境^[44]。Ito 等^[45]设计合成了一种重组的新型类人胶原蛋白,这种蛋白已被用作软骨细胞生长的骨架,并且显示出其优越性。这些应用研究都是以胶原蛋白分子结构为基础的,随着胶原蛋白这种功能高分子材料的广泛应用,要求我们在它的结构基础上设计和合成出功能各异的胶原蛋白,越来越多地满足人们的不同需要,特别是在生物医用领域应用的胶原蛋白以及含胶原蛋白制品的不断涌现,将会更广泛地造福人类。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*, 2001, **221**: 1–22.
- [2] Perris R, Syfrig J, Paulsson M, *et al.* Molecular mechanisms of neural crest cell attachment and migration on types I and IV collagen. *J Cell Sci*, 1993, **106**: 1357–1368.
- [3] van der Zee E, Everts V, Hoebe K, *et al.* Cytokines modulate phagocytosis and intracellular digestion of collagen fibrils by fibroblasts in rabbit periosteal explants. Inverse effects on procollagenase production and collagen phagocytosis. *J Cell Sci*, 1995, **108**: 3307–3315.
- [4] Staatz WD, Walsh JJ, Pexton T, *et al.* The alpha 2 beta 1 integrin cell surface collagen receptor binds to the alpha 1(I)-CB3 peptide of collagen. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 4778–4781.
- [5] Takaki K, Daisuke LH, Shinichi A, *et al.* Self-complementary peptides for the formation of collagen-like triple helical supramolecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 2005, **15**: 5230–5233.
- [6] Saito M, Takenouchi Y, Kunisaki N, *et al.* Complete primary structure of rainbow trout type I collagen of 1(I)2(I)3(I) heterotrimers. *Eur J Biochem*, 2001, **268**: 2817–2827.
- [7] Vuorela A, Myllyharju J, Nissi R, *et al.* Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type III collagen in the yeast *Pichia pastoris*: formation of a stable enzyme tetramer requires coexpression with collagen and assembly of a stable collagen requires coexpression with prolyl 4-hydroxylase. *EMBO J*, 1997, **16**: 6702–6712.
- [8] Eyre DR, Wu JJ, Woods P. Cartilage-specific collagens: structural studies. In: Kuettner KE, Schleyrenbach R, Peyron JG, *et al.* *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York: Raven Press, 1992, pp. 119–131.
- [9] Dey SK, Kraatz HB. Ferrocene-assisted stabilization of collagen mimetic triple helices: solid-phase synthesis and structure. *Bioconjug Chem*, 2006, **17**(1): 84–89.
- [10] Usha R, Sundar Raman S, Subramanian V. Role of polyols (erythritol, xylitol and sorbitol) on the structural stabilization of collagen. *Chemical Physics Letters*, 2006, **430**: 391–396.
- [11] Ottani V, Martini D, Frachi M, *et al.* Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron*, 2002, **33**: 587–596.
- [12] Vignat-Carrin S, Roux JP, Arlot ME, *et al.* Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae. *Bone*, 2006, **39**: 1073–1079.
- [13] DiLullo G, Reigle KL, Turner KR, *et al.* Type I collagen glycation reduces proteoglycan binding. *Matrix Biology*, 2006, **25**(Suppl. 1): S38.
- [14] Prockop D, Ala-Kokko L, Fertala A, *et al.* Synthesis of human procollagens and collagens in recombinant DNA systems. US Patent 5593859, January 14, 1997.
- [15] Berg RA. Production of human recombinant collagen in the milk of transgenic animals. US Patent 5895833, April 20, 1999.
- [16] Liu YH(刘庆慧), Ji BS(季勃生). Research advances on collagen. *Marine Fisheries Research(海洋水产研究)*, 2003, **23**(1): 76–78.
- [17] John DC, Watson R, Kind AJ, *et al.* Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. *Nature Biotechnol*, 1999, **17**: 385–389.
- [18] Lamberg A, Helaakoski T, Myllyharju J, *et al.* Characterization of human type III collagen expressed in a baculovirus system. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 11988–11995.
- [19] Fan DD(范代娣). One kind of collagen-like and a method to produce it. China Patent 01106757.8, 2001-02–21.
- [20] Frank S, Kammerer RA, Mechling D, *et al.* Stabilization of short collagen-like triple helices by protein engineering. *J Mol Biol*, 2001, **308**: 1081–1089.
- [21] Antje N, Peter N, Johanna M. High-level production of human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Matrix Biology*, 2005, **24**: 59–68.
- [22] Douglas DB, David NP, Bridget SL, *et al.* Co-translational incorporation of trans-4-hydroxyproline into recombinant proteins in Bacteria. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 645–650.
- [23] Meng JF, Wang XH, Rong ZY. Preparation of human soluble collagen. *China J Biologicals(中国生物制品学杂志)*, 2000, **13**(3): 161–162.
- [24] Lamberg A, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Site-directed mutagenesis of the α subunit of human prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 9926–9931.
- [25] Toman PD, Chisholm G, McMullin H, *et al.* Production of recombinant human type I procollagen trimers using a four-gene expression system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 23303–23309.
- [26] Merle C, Perret S, Lacour T, *et al.* Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. *FEBS Lett*, 2002, **515**: 117–121.

- [27] John MM. Utility of collagen-based vehicles in delivery of growth factors for hard and soft tissue wound repair. *Clin Mater*, 1992, **9**: 225 – 234.
- [28] Bulleid NJ, John DC, Kadler KE. Recombinant expression systems for the production of collagen. *Biochemical Society Transactions*, 2000 **28**: 350 – 353.
- [29] Elizabeth AK, Joshua JH, Ronald TR. Production of human prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2004, **38**: 279 – 291.
- [30] David P, Toman, George C, *et al.* Production of recombinant human type I procollagen trimers using a four-gene expression system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 23303 – 23309.
- [31] Pfaff M, Aumailley M, Specks U, *et al.* Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagentype VI. *Exp Cell Res*, 1993, **206**: 167 – 176.
- [32] Takahiro A, Masahiro T, Katsuhiko S, *et al.* Generation of hybrid transgenic silkworms that express *Bombyx mori* prolyl-hydroxylase - subunits and human collagens in posterior silk glands: Production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues. *J Biotech*, 2006, **126**: 205 – 219.
- [33] Mechling DE, Bächinger HP. The collagen-like peptide (GER)₅ GPCCG forms pH-dependent covalently linked triple helical trimers. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 14532 – 14536.
- [34] Ala-Kokko L, Kontusaari S, Baldwin C, *et al.* Structure of cDNA clones coding for the entire prepro alpha 1 (III) chain of human type III procollagen. Differences in protein structure from type I procollagen and conservation of codon preferences. *Biochem J*, 1989, **260**: 509 – 516.
- [35] Boudko S, Frank S, Kammerer RA, *et al.* Nucleation and propagation of the collagen triple helix in single-chain and trimerized peptides: Transition from third to first order kinetics. *J Mol Biol*, 2002, **317**: 459 – 470.
- [36] Knight CG, Morton LF, Onley DJ, *et al.* Identification in collagen type I of an integrin alpha2 beta1-binding site containing an essential GER sequence. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 33287 – 33294.
- [37] Sweeney SM, DiLullo G, Slater SJ. Angiogenesis in collagen I requires $\alpha 2(\text{I})$ ligation of a GFP* GER sequence and possibly p38 MAPK activation and focal adhesion disassembly. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 30516 – 30524.
- [38] Grab B, Miles AJ, Furcht LT, *et al.* Promotion of fibroblast adhesion by triple-helical peptide models of type I collagen-derived sequences. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 12234 – 12240.
- [39] Yao JM, Yanagisawa S, Asakura T. Design, Expression and characterization of collagen-like proteins based on the cell adhesive and crosslinking sequences derived from native collagens. *J Biochem*, 2004, **136**: 643 – 649.
- [40] Yao JM (姚菊明). A method for the synthesis, expression and purification of recombinant collagen proteins. China Patent 200610048946.0, 2006-01-09.
- [41] John MM. Utility of collagen-based vehicles in delivery of growth factors for hard and soft tissue wound repair. *Clin Mater*, 1992, **9**: 225 – 234.
- [42] Ma L, Gao CY, Mao ZW, *et al.* Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. *Biomaterial*, 2004, **25**: 2997 – 3004.
- [43] Ahmed MR, Venkateshwarlu U, Jayakumar R. Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair. *Biomaterials*, 2004, **25**: 2585 – 2594.
- [44] Heather MP, Steven TB. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials*, 2006, **27**: 5821 – 5827.
- [45] Ito H, Steplewski A, Alabveva T, *et al.* Testing the utility of rationally engineered recombinant collagen-like proteins for applications in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2006, **76** (3): 551 – 560.