

Title	放射線間接作用の検討(蛋白質變性について)
Author(s)	若林, 勝; 河村, 文夫
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1953, 13(5), p. 329-333
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/14912
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

放射線間接作用の検討(蛋白質變性について)

(古賀教授に答えて)

北海道大學醫學部放射線醫學教室(主任 若林勝教授)

若林 勝・河村 文夫

(昭和28年3月24日受付)

§ 1. 緒 言

近時の放射線化學の進歩¹⁾²⁾により稀薄溶液における放射線の作用機序が明かにされるに到つた。之れによれば稀薄溶液においては、溶質に對する「直接作用」と共に、溶媒に吸収された放射線エネルギーの溶質への移行或は溶媒におこされた化學變化が溶質に作用する「間接作用」があると云う。事實多くの化學物質、酵素、ウイルス等においてこの間接作用の存在が明かにされ、その間接作用の寄與についても詳細なる検討が加えられている。

我々³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾はすでに、X線照射による蛋白質の變化を検討し、更にこの變化につき的彈説を適用し理論的にその作用機序の解明を試みた。

本報においては馬血清アルブミンについて、チロジン基の活性度を示標として種々なる蛋白濃度におけるX線照射のさいの變化を検討し、更に既知濃度の過酸化水素水を作用させ、之れとX線照射による影響を比較し、放射線間接作用機序の解明を試みんとするものである。

(本實驗は又第7回日本放射線學會東北海地方會演說に對しての東北大古賀教授の御質問に對する解答でもある)。

§ 2. 實驗方法

實驗材料としては馬血清アルブミンを用いた。試料は馬血清より Mc Meekin の方法⁷⁾により精製し、透析後 Kjeldahl 氏法により蛋白窒素を測定し、所要の濃度に稀釋して使用した。

X線照射はスタビリボルト装置により、140KVP, 3mA, 1.0耗アルミ濾過, 焦點被照射體距離10種,

線強度は 600r/min で 10⁵r より 10⁶r の間の線量を用いた。試料はパラフィン中に密封し、室温(10°~15°C)にて照射した。H₂O₂ は pH 7.0 の磷酸緩衝液を加えた蛋白窒素量 1.2 × 10⁻³ mol の蛋白溶液 2 容に、1 容の 3% 過酸化水素水を加え 1 時間放置し反應せしめた。其の後にセロハン袋に入れ流水にて 2 日間透析し後測定した。

遊離チロジン基の測定は前報の方法⁴⁾によつた。即ち試料に pH 5.70 の M/5 醋酸緩衝液に少しく過剰の M/200 沃度カリ加沃度液を加え、チロジン基と結合して残つた沃度量を M/200 規定チオ硫酸ソーダにて逆滴定し、消費沃度量より活性化しているチロジン基を算出した。

§ 3. 實驗成績

試料としては蛋白濃度 2.7% より 0.02% の水溶液を用いた。

X線照射により試料の帶黄色は淡くなり、稀薄溶液では乳濁を來した。H₂O₂ 處理のものでは對照と全く差異を認めなかつた。

實驗結果は第 1, 2 表に示す如くであつた。即ち馬血清アルブミンの分子量を 70,000⁸⁾ とし、一分子中の窒素原子数を 800⁹⁾ とし、1 個のチロジン殘基に 2 個の沃度が結合する⁴⁾ ものとして、チロジンにして全蛋白の幾重量% が活性化しているか

第 1 表 各處理による活性チロジン基量

	未處理	加 熱	紫外線過酸化 大量照射	酸化水素處理
活性チロジン	2.2%	4.7%	5.2%	2.8%
活性チロジン 全チロジン	42.7%	90.2%	100%	54.6%

第2表 X線照射例の活性チロジン基量(重量%)

蛋白濃度	照射 X 線 量			
	2.85 ×10 ⁵ r	3.0 ×10 ⁵ r	4.0 ×10 ⁵ r	1.0 ×10 ⁶ r
2.7 ×10 ⁻³	活性チロジン		2.4%	2.8%
	(活性チロジン/全チロジン)%		(46.1)	(54.2)
1.0 ×10 ⁻²	活性チロジン		2.5%	3.0%
	(活性チロジン/全チロジン)%		(48.4)	(57.2)
2.7 ×10 ⁻³	活性チロジン		2.6%	2.8%
	(活性チロジン/全チロジン)%		(50.0)	(53.9)
1.0 ×10 ⁻³	活性チロジン	3.2%		3.5%
	(活性チロジン/全チロジン)%	(61.5)		(65.9)
5.0 ×10 ⁻⁴	活性チロジン	4.5%		5.0%
	(活性チロジン/全チロジン)%	(86.2)		(97.2)
2.0 ×10 ⁻⁴	活性チロジン	4.5%		5.0%
	(活性チロジン/全チロジン)%	(87.0)		(96.7)

を算出すると、未処理の生蛋白では2.2%、加熱では4.7%、紫外線大量照射では5.2%が活性化し、過酸化水素処理例は2.8%であった。

X線照射例について見るに2.7%の濃度のものにおいては、3.0×10⁵rでは2.4%、1.0×10⁶rでは2.8%で、1.0%の濃度においては3.0×10⁵rでは2.5%、1.0×10⁶rでは3.0%であった。0.27%の蛋白濃度において照射せる場合は3.0×10⁵rでは2.6%、4.0×10⁵rでは2.8%、1.0×10⁶rでは3.2%であった。0.10%の濃度においては2.85×10⁵rでは3.2%、4.0×10⁵rでは3.5%、0.05%の蛋白濃度においては2.85×10⁵rでは4.5%、4.0×10⁵rでは5.0%で、0.02%の蛋白濃度のものでは2.85×10⁵rでは4.5%、4.0×10⁵rでは5.0%のチロジン基が活性となつている。

今紫外線大量照射によりすべてのチロジン基が活性となるものとして⁵⁾、各處理により全チロジン基の幾%が活性化しているかを見るに、未處理のものでもすでに43%が活性で、加熱例では90%、H₂O₂處理のものでは54.6%となり明かに活性化チロジン基は増加する。

X線照射例について見るに、照射により明かに活性化チロジン基は増加し、その増加の度は線量と共に大となつている。又照射せる試料の蛋白濃度と變化量とについて見るに同一の線量においても稀釋が大となるにつれ、活性となるチロジン基は増加して來ると云う結果であつた。

§ 4. 理論的考察

今上述の實驗結果につき理論的に検討しよう。

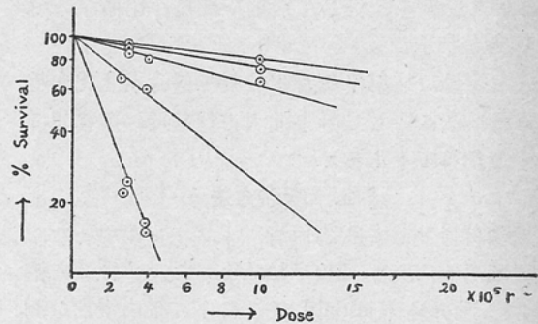
a. 照射線量と變化量との關係

照射線量と變化量との關係を見るに、各濃度において照射線量にともない活性化チロジン基は増加している。今前報における如くX線照射により變化せる蛋白分子のすべてのチロジン基は活性となると假定し、第2表より變化せる蛋白分子の割合を算出すると第3表の如くなる。この關係を横軸に照射線量を縦軸に變化をうけなかつた蛋白分子の割合の對數をとるときは、第1圖に示す如く、何れの濃度においても、照射線量と變化量との間には指數函數的關係が成立する。

第3表 X線量と變化量との關係

蛋白濃度	照射 X 線 量			
	2.85×10 ⁵ r	3.0×10 ⁵ r	4.0×10 ⁵ r	1.0×10 ⁶ r
2.7×10 ⁻²		6.0%		20.2%
1.0×10 ⁻²		10.0%		25.3%
2.7×10 ⁻³		12.7%	17.8%	33.2%
1.0×10 ⁻³	32.8%		40.5%	
5.0×10 ⁻⁴	76.0%		95.0%	
2.0×10 ⁻⁴	77.5%		94.0%	

Fig. 1



これより各濃度において變化せざる蛋白分子の割合を50%にするX線量即ち半減量を求めると第

第4表 各蛋白濃度における半減量

蛋白濃度	2.7×10^{-2}	1.0×10^{-2}	2.7×10^{-3}	1.0×10^{-3}	5.0×10^{-4}	2.0×10^{-4}
半減量 $\times 10^6 r$	34	24	15	5	1.4	1.4

4表の如くなる。即ち被照射蛋白濃度が稀薄となるに従つて同じ変化をおこすに要する線量は小となる結果で、この場合にも明かに稀薄効果¹⁾が認められる。

b. 間接作用の検討

上述の如く蛋白質においても酵素、ウイルス等と同じく稀薄効果が認められ、稀薄溶液における蛋白質の變化には直接作用と共に間接作用がその一端をになつてることがうかがえる。この間接作用の寄與は次の如き形で表わされる¹⁰⁾。

$$\frac{\text{直接作用のみを考える場合に要する線量}}{\text{溶液中において実際に要する線量}} = 1 + \frac{r}{\Gamma} \left(\frac{\text{溶媒濃度}}{\text{溶質濃度}} \right)$$

ここに r は間接作用のイオン收量即ち

$$\frac{\text{溶質分子と反応した數}}{\text{溶媒中に生じた電離數}}$$

Γ は直接作用のみのイオン收量即ち

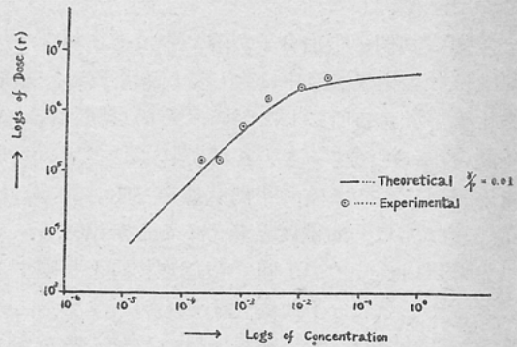
$$\frac{\text{溶質分子と反応した數}}{\text{溶質中に生じた電離數}}$$

である。

即ち r/Γ は間接作用と直接作用とのイオン收量の比を表わすもので物質について一定の値を示すもので、この r/Γ の値をもつて間接作用の寄與を表わしているものである。例えばウイルス、酵素の不活性化について見るに、Tabacco mosaic virus においては $r/\Gamma = 2.6 \times 10^{-4}$ 、Rabbit papilloma virus においては 4.0×10^{-4} 、Ribonuclease では 3×10^{-2} の値を示している¹⁰⁾。

今余の實驗結果(第4表)より r/Γ の値を求めよう。今各濃度における半減量の對数を縦軸に、横軸に濃度の對数をとれば第2圖の如くなる。この實驗値は r/Γ の値0.01で、直接作用のみの半減量が $4.7 \times 10^6 r$ として求めた曲線によく一致している。即ち蛋白濃度が 10^{-2} より大なるときはほとんど直接作用が主となるものであり、之より小なる濃度になるにしたがつて、急激に間接作用の寄與

Fig. 2



が大となる。この値は Ribonuclease の不活性化における値の $0.03^{10)}$ 、又 Dale のデータより D.E. Lea が計算により求めた “Specific protein” の $0.02 <^{10)}$ の値と比較しても妥當なものと考えられる。

さて直接作用のみの半減量は $4.7 \times 10^6 r$ であるから、的彈説より前報⁹⁾における如き計算によつて的彈域の大きさを求めると的彈域の大きさ v は $\frac{0.693}{4.7 \times 10^6 \times 1.6 \times 10^{12}} = 9.7 \times 10^{-20} \text{cm}^3$ となる。

この値はX線回折より求められた馬血清アルブミンの濕つた状態における體積⁸⁾の $11 \times 10^{-20} \text{cm}^3$ の値とよく一致する。このことは水中においても血清アルブミンの粒子全體が的彈域となつてゐることを明かにうかがうことが出来る。

しかしてX線の蛋白質に対する作用には直接作用の外に間接作用がある。この間接作用は如何なる機序によるものであろうか。之について検討を加えよう。

c. 質量作用の法則による検討(化學反應説)

放射線の生體物質に対する作用機轉の一つの説明として、質量作用の法則の上に立つ化學反應説¹¹⁾(O. Rahn)がある。之は加熱或は種々の藥品による傷害曲線が、質量作用の法則に基く理論によつて充分な説明を與える事實によるもので、放射線の生物作用機轉に對しても、化學反應説の立場に立つて説明を與えようとしている。之の説によつても的彈説と同じく放射線による傷害曲線を説明することが出来、的彈説に對する有力な反駁の一つとなつてゐるものである。

今この説の立場に立つて放射線の蛋白質に對する作用を検討して見よう。

最初に a_0 個の蛋白分子が溶液中にある場合、放射線吸収の結果溶液中に生じる反應物質は、放射線化學の教える所にしたがひ、その反應物質は短時間の中に消滅するものと考えれば、一定の線強度の照射によつては、平衡状態をとると考えられるから、常に一定濃度と考えることが出来る。

先ず蛋白質分子が1個でも反應物質と反應することによりその分子は變化するものとする。この場合ある時間をへて反應しなかつた分子数を a とすれば、きわめて短時間 dt における減少 da は a に比例するから

$$-da = pa dt \dots (1) \text{となる。}$$

ここに P は單位時間に反應する確率である。

$$(1) \text{より } \ln a = -pt + c \dots (2)$$

(2) に初期条件を入れれば

$$a = a_0 e^{-pt} \text{ 又は } \frac{a}{a_0} = e^{-pt} \dots (3) \text{となる。}$$

即ち傷害をうけずに残つた割合と、照射時間との間には指數函數的關係が成立する。したがつて反應物質を短時間に消滅するものと考え¹²⁾ 且つ單分子反應と考えれば的彈説における $n=1$ の場合¹⁰⁾ によく一致する。

このことは河村の蛋白變性に關する實驗結果は形式の上では的彈説にも、或は化學反應説の何れにも従うることになる。

この點について考察して見よう。質量作用の法則は、化學反應がおこるためには反應する分子間の衝突が前提となつていて、その衝突のおこり方は確率的現象であるから、この點において放射線エネルギーの吸収が確率的に行われるとの假定の上に立つ的彈説とは同じ基礎の上に立つものと云える。只化學反應説はその作用機構を化學反應に限定した點において的彈説とことなるものである。

即ち實驗より求められた傷害曲線は、的彈説の $n=1$ の場合、或は化學反應説の一定の条件下における單分子反應の何れによつても説明しうるのである。しかれば、化學反應説によつて説明するとせば、實際の反應は如何に行われるかについ

て検討しよう。

d. 活性水或は H_2O_2 の作用

この反應にあづかるものとしては、Radiation Chemistry¹³⁾ の教える所によれば、溶媒の水より生ずる自由 OH 基或は H 基をもつ所謂活性水或は H_2O_2 があげられる。 H_2O_2 の產生は溶液中の O_2 量、溫度、pH、線強度によつてことなつてくる¹⁾。余の照射條件において、 $10^6 r$ の照射によつて生ずる H_2O_2 の量は $2.5r/cc$ ¹⁾ である。

この實驗において加えた H_2O_2 の量は $10,000r/cc$ であるがそのさいの蛋白質の變化量は僅かに 20% にすぎず、この變化量は X 線の $10^6 r$ 照射に相當する。もし X 線作用の本態が H_2O_2 であるとすればその變化量ははるかに大でなければならぬ。之より見ても H_2O_2 の作用によつて X 線の作用機轉を説明しつくすことは出来ない。

X 線照射によつて溶媒たる水より生じた自由 OH 基が放射線間接作用機轉に對し重要な役割をもつことが明かにされ¹²⁾¹⁴⁾、又自由 H 基も或る種の反應¹⁴⁾ に對し重要な作用をもつものと考えられている。

この自由 OH 基は電子受容體として反應性にとみ、又自由 H 基は酸化劑があれば容易に之と反應するものである。之等自由基の產生は1個の電離當り1個といわれている¹⁰⁾。

この活性水を反應の實體と考えて見るに、余の實驗より求められた傷害曲線は單分子反應であるから、1個の活性基と蛋白分子の反應によつて蛋白に觀察される如き變化³⁾⁴⁾⁵⁾ をおこすことになる。しかしながら放射線照射によつておこされた蛋白質分子の變化は、分子内の1個の酸化或は還元反應によつておこされると考えられる變化に比しきわめて大きく、之等活性基による化學反應によつてかかる變化⁵⁾ をおこしうる可能性は考えられない。このことは又 pH の變化による蛋白質の變化¹²⁾ より考えても1個の OH 基或は H 基との單なる化學反應によるものでないことは明かである。

即ち X 線照射による蛋白質の變化は化學反應説の立場よりは説明することは困難である。しかればその作用機構は如何に考えられるであろうか。

e. エネルギー移行による説明

前報においてX線による蛋白質の變化は、蛋白質分子内の何かの部分に遊離された電離エネルギーは1分子當り數百 Kcal/molにおよび之が蛋白質分子内の種々なる結合に活性化エネルギーを與え、之を變化せしめることによることを論述した。又自由 OH 基が或る種の放射線間接作用に重要な役割をもつことが明かにされているが^{12,14)}、之の自由 OH 基のもつエネルギーは數 eV (3.7eV)に相當し、このエネルギーがOH基の反應によつて遊離され、この遊離された光子量程度のエネルギーが種々なる作用を呈することが考えられ、蛋白質分子のある種の變性¹²⁾にも可能であると考えられる。

このことは蛋白質の加熱變性¹²⁾の活性化エネルギー ΔH はラクトグロブリンにおいては數十 Kcal/mol¹²⁾、タバコモザイクウイルスの如き巨大分子においてもその不活性化の ΔH は150Kcal/mol¹³⁾にすぎないことより見てもエネルギー論的に充分可能である。

即ち溶液中における蛋白質のX線照射による變化は蛋白質分子中に與えられた放射線エネルギー或は溶媒中に吸収された放射線エネルギーによつて生じた電離又は活性基が蛋白質分子内で反應するときに遊離する所謂間接に與えられた放射線エネルギーによつておこされると云うことが出来る。

換言すればX線照射による蛋白質變化における間接作用は、溶媒中に吸収された放射線エネルギーの蛋白質分子への移行によつておこるものである。

§ 5. 總括結論

蛋白チロジン残基の活性度を示標として、X線照射による馬血清アルブミンの變化に對する間接作用を検討し次の如き結果を得た。

1) 種々なる濃度(2.7%~0.02%)において、X線照射による馬血清アルブミンの變化量と線量と

の間には指數函數的關係が成立する。

2) その半減量は濃度の減少にともない小となる。之より馬血清アルブミンに對するX線照射の影響には明かに稀薄効果が認められる。

3) 馬血清アルブミンの間接作用のイオン收量(r)と直接作用のイオン收量(Γ)との比 r/Γ の値は0.01である。

4) 溶液中の馬血清アルブミンの直接作用のみの半減量は $4.7 \times 10^9 r$ で、之より求めた的弾域の大きさは $9.7 \times 10^{-20} \text{cm}^2$ で之は濕つた分子の大きさとよく一致する。

5) 過酸化水素水を作用せしめることにより軽度のチロジン基の活性度の増加を見る。

6) 實驗より求めた傷害曲線は形式的には化學反應説と一致するが、放射線による蛋白質變性に對しては化學反應説により説明しつくすことは出来ない。

7) X線照射による蛋白質變性に對する間接作用は溶媒に吸収された放射線エネルギーの蛋白質分子への移行によるものである。

文 獻

- 1) C.B. Allsopp: Brit. J. Radiol. 24, (1951). 413-435. —2) F.G. Spear: Brit. J. Radiol. Suppl. 1, (1947). —3) 若林, 河村: 日醫放誌, 11卷, 9號, (昭27). —4) 河村: 日醫放誌, 11卷, 10號, (昭27). —5) 河村: 日醫放誌, 12卷, 6號, (昭27). —6) 若林, 河村: Monograph. Series of the Reseach Inst. of Applied Electricity. No. 2, (1951). 1. —7) Mc Meekin: J.A.C.S. 61, (1939). 2884. —8) I. Fankuchen: Advances in Protein Chemistry II (1945). 387. —9) J. T. Edsall: Advances in Protein Chemistry II. (1945). 465. —10) D.E. Lea: Action of Radiations on Living Cells. Cambridge Press. (1947). —11) O. Rahn: Biochem. Zeits. 284, (1936). 40. —12) H. Neurath etc: Chem. Rev. 34, (1944). 157. —13) 江上編: 核酸及び核蛋白質, (昭26), 299, 共立出版. —14) J. Weiβ etc: Exp. Cell Research Suppl. 2, (1952). 279.