



Title	放射線間接作用の研究(第12報)DNA結合水についての 実験
Author(s)	赤津, 修二
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1958, 18(3), p. 318-323
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16009
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

放射線間接作用の研究(第12報)

DNA 結合水についての實驗

北海道大学医学部放射線医学教室 (主任 若林勝教授)

赤 津 修 二

(昭和32年12月19日受付)

緒 言

放射線照射による物質の變化は、放射線エネルギー吸収の結果として起るものであるが、このエネルギーの吸収につづく過程は未だ明らかにされていない¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

若林⁵⁾⁶⁾によれば、放射線の作用は、直接溶質に吸収されるか、或は間接に溶媒に吸収されたエネルギーが、溶質に移行してその溶質を勵起状態にし、このエネルギーによつて種々なる化學結合を勵起し、或は切斷するのが一次的な作用であり、それに續いて種々なる二次的化學反應或いは生物作用が現われるという。

この考えによれば、放射線の作用の第一機轉は物理的な分子の勵起、或は切斷が見られる筈で、特に低い結合エネルギーによつて重合されている高分子化合物においてはこの現象が認めやすい筈である。

高分子化合物としては、生体物質の中、蛋白質、核酸等が知られている。そのうち、これまでに放射線の作用のよく知られているものにDNAがある。

DNAの水溶液に対する放射線の作用については、種々なる化學的變化⁷⁾⁸⁾、物理的變化、特に粘度の著しい低下⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾が種々の研究者により報告されている。

特に稀薄水溶液においては、いわゆる稀釋効果が著しく、又照射後も更に數日に亘つて粘度の著しい低下¹¹⁾¹²⁾¹³⁾を見るなど、その作用の機序は極めて複雑である。

このDNA溶液の著しい粘性は、DNAの高分子化合物としての構造粘性に基くものと考えられ

るが、その水との結合の状態は、未だ明らかにされていない。

そこで本報に於ては、DNA水溶液に於ける水とDNA分子との結合の状態を明らかにする爲に蒸氣壓法による結合水の測定¹⁴⁾¹⁵⁾を行い、更にX線照射時の結合水の状態の變化を追及した。而してこの結果よりDNA水溶液に於ける粘度の低下と結合水の變化との關係をうかがつてみた。

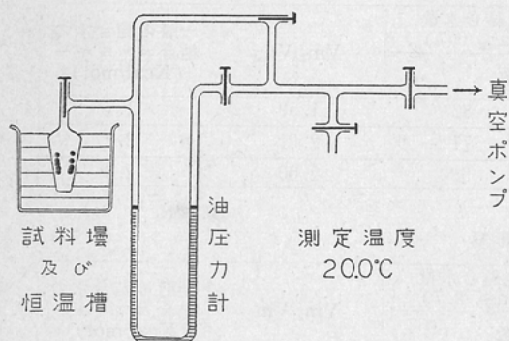
實驗方法

試料として鯨の白子より精製せる Desoxyribonucleic Acid (以下DNAと略す)のNa鹽(ミノファーゲン製, No. 31)を用いた。このDNA 0.1gに對し、蒸溜水 0.5ccの割合に加え、膨潤せしめ使用した。

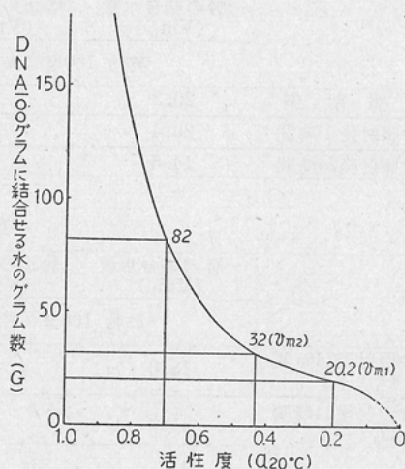
X線照射條件は、60kVp, 10mA, 濾過板なし、半價層 1.9mmAl, 焦點試料間距離 5 cm, 線強度 1350r/min で、照射線量は、 10^5 r である。試料は小試料皿に入れ、室温(20°C)にて照射した。

結合水の測定は、第1圖に示す如く、河村、廣田による蒸氣壓法¹⁴⁾¹⁵⁾により行つた。即ち眞空ポンプで一定時間排氣し水を蒸發除去し、1時間以上20.0°Cにおき、試料の水とその蒸氣壓とを充分飽和せしめ試料の20.0°Cにおける水蒸氣壓とその重量を測定した。試料の水蒸氣壓と、之と同温度の純水蒸氣壓との比、即ち活性度(a 20.0°C)が0.1前後になる迄、之を繰り返した。最後に試料を110°Cにて5時間、乾燥せしめ秤量し之をDNA乾物重量と見做した。乾燥試料の重量はこの乾燥條件により充分一定する。勿論X線照射によりアンモニアの如き氣體が発生し、消失することも豫想せられるが⁷⁾⁸⁾、その量は 10^5 r 照射によつて

第1図 測定装置



第2図 等温蒸気圧曲線 X線非照射例



は、きわめて微量であるから、減圧排気による重量の減少は全て H₂O によると見做してよい。

この乾物重量と各活性度の試料の重量の差より試料中に含まれる水分量を求め、DNA 乾物 100g 中に含まれる水の量を算出した。

之より 20.0°C における試料中の水の活性度 *a* と、その際の DNA 乾物 100g 中に含まれる水分の割合 (%) との関係をもとめ、20.0°C における等温蒸気圧曲線を求めた。

実験結果

A. 対照実験

X線非照射例として DNA 0.1g に對し蒸留水 0.5cc を加え、24時間冷蔵庫に放置し充分膨潤せしめたものを使用した。試料は無色透明、ゲル状の物質である。

活性度 *a* (20.0°C) を横軸に、DNA 乾物 100g 中に含まれる水の量 (*G*) を縦軸に取り 20.0°C における等温蒸気圧曲線をとると第2圖の如くなる。

Brunauer, Emmett, Teller の理論¹⁶⁾

この等温蒸気圧曲線を (B.E.T. の理論¹⁶⁾) に従つて分析してみた。B.E.T. 理論は無機物質に對するガスの多層吸着における吸着量と吸着面積及び吸着エネルギーの關係を示す理論である。又 L. Pauling¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾ 等は蛋白質とその結合水との關係について水が蛋白質分子の表面に一層に吸着され更にその上に多くの層をなして吸着されていると假定して B.E.T. 理論を適用し、かなり広い範圍にわたつて B.E.T. の理論が適用し得ることを證明している。

この際一層の水の吸着面積は蛋白質のもつ水と水素結合をつくり得る分子の數に關係し、吸着エネルギーは水素結合のエネルギーにほぼ等しいと云われている。

そこで上記の等温蒸気圧曲線を B.E.T. 理論により整理し、試料の第一層に吸着せる水の量及びその結合エネルギー並びに結合面積を求めてみた。今第一層に吸着されている水が第二層以上の水よりも強固に結合していると假定¹⁵⁾¹⁹⁾すれば、活性度 *a* と水の量 *G* との間には B.E.T. 理論により次の様な關係を導くことが出来る。

$$\frac{a}{G(1-a)} = \frac{1}{V_{m1}C} + \frac{c-1}{V_{m1}C} \cdot a \dots\dots (1)$$

V_{m1} は DNA 分子の表面第一層に結合せる水の量

$$C = e^{\frac{E_1-E_0}{QT}} \dots\dots (2)$$

Q : Gas 常數

T : 絶対温度

E₁ : 水と DNA との結合エネルギー

E₀ : 水と水との結合エネルギー

E₁-E₀ は 1 mol 當りの第一層の吸着のエネルギーである。

今横軸に *a*、縦軸に $\frac{a}{G(1-a)}$ をとると B.E.T. 理論のあてはまる範圍に於ては直線關係が成立する (第5圖)。

第1表 X線照射の影響

	一層の結合水量 (V_{m1})	二層迄の結合水量 (V_{m2})	全結合水量 ($a \leq 0.7$)	V_{m2}/V_{m1}	一層の結合水の 結合エネルギー (Kcal/mol)
	乾物 100g に結合せる水のg数				
非照射例	20.2	32	82	1.59	1.7
10^5r 照射後1時間	20.4	41	71	2.01	2.2
10^5r 照射後24時間	14.5	29	68	2.00	2.0

第2表 酸素の影響

	一層の結合水量 (V_{m1})	二層迄の結合水量 (V_{m2})	全結合水量 ($a \leq 0.7$)	V_{m2}/V_{m1}	一層の結合水の 結合エネルギー (Kcal/mol)
	乾物 100g に結合せる水のg数				
10^5r 照射後24時間 O_2 (+)	18.0	35	60	2.0	2.1
10^5r 照射後24時間 O_2 (-)	18.8	35	58	1.9	2.3

そしてこの直線から V_{m1} と C を算出する事が出来る。 C の値が求められると (2) 式より水が一層の表面に吸着されている場合のエネルギー即ち結合エネルギーの値 $(E_1 - E_0)$ を求めることが出来る。

この分析を第2圖の非照射例について適用してみると第1表にみる如く一層の結合水量 V_{m1} は乾物 100g 當り 20.2g, 一層の結合水の結合エネルギーは, 1.7Kcal/mol となる。更に第2圖の等温蒸気圧曲線より a に對する G/a の關係を, Bull¹⁷⁾ に従つて分析すれば第二層迄についている水の量 V_{m2} を算出する事が出来る。

この値は乾物 100g 當り 32g である (第1表)。又活性度 0.7 以下の水は所謂自由水と異り, ある程度の結合エネルギー (0.5Kcal/mol) をもつて結合している水と考えられ, 電氣的測定による結合水の測定では, $a = 0.7$ 以下が所謂結合水と考えられるという。

これに従つて 0.7 以下の活性度を示す水の量を全結合水としてとれば, 乾物 100g 當り 82g となる (第1表)。

この値は Bull¹⁷⁾¹⁸⁾ 等のゼラチンにおける値 $V_{m1} = 8.7g$, 及び結合エネルギー 1.6Kcal/mol, 或いは蛋白質における, Pauling 等の値, $V_{m1} = 0.3g$, 及び結合エネルギー 2Kcal/mol と比較すれば一層の吸着量は非常に多く, 又吸着エネ

ギーは, 水素結合のエネルギーに等しい。この事は DNA の非常に強い膨潤力, 或いは高粘度を示すことよりみて非常に多くの水を吸着し得る可能性が考えられる。

又この DNA の水との結合は水素結合によるものであることも明らかである。

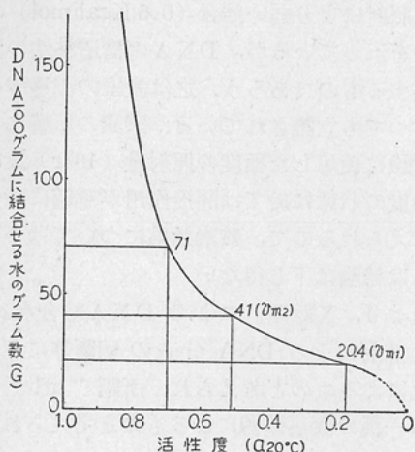
B. 照射實驗

X線 10^5r 照射の場合についてみると照射後 DNA 粘度の急激に減少する 1 時間後¹²⁾¹³⁾ 及び, 所謂 "after effect" のみられる 24 時間¹²⁾¹³⁾ の場合についてみるに第3圖, 第4圖, 第5圖, 及び第1表, に示す如くなる。即ち全結合水量は照射前の 82g に對し 1 時間後は 71g 及び 24 時間後は 68g となり照射により直後より明らかに減少を來す。

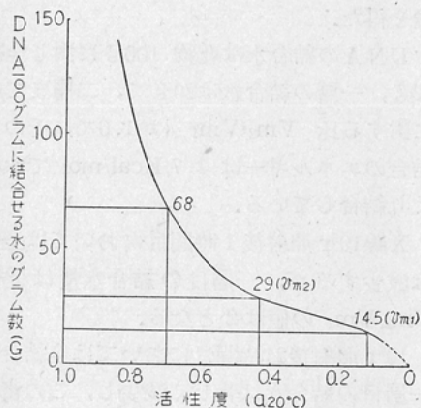
一層の結合水量についてみるに非照射例では 20.2g で X 線照射後, 1 時間では 20.4g, 24 時間後では 14.5g となつている。即ち X 線照射によつて著しく粘度の減少している照射後 1 時間後における一層の結合水量が變らず, "after effect" がみられる 24 時間後に於て著しく減少していることは, DNA における "after effect" の一つの原因が結合水のつき得る遊離基同志の結合即ち凝集などの機轉に存することを示している。

その一層の結合水の結合エネルギーは, 照射前は, 1.7Kcal/mol で, 照射後は 2.2 及び 2.0 Kcal/mol となつていて, 何れも水素結合の結合

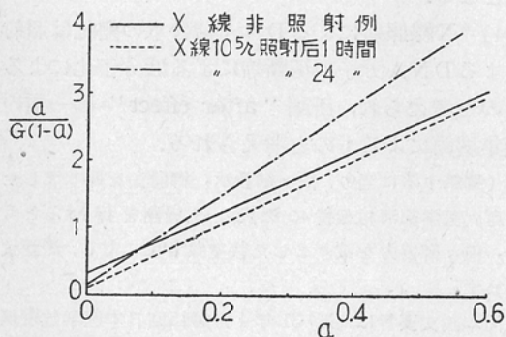
第3図 等温蒸気圧曲線 X線 10^5 r照射後1時間



第4図 等温蒸気圧曲線 X線 10^5 r照射後24時間



第5図



エネルギーに相当している。

次に二層の結合水量についてみるに非照射例では、32g、X線照射後1時間では41gと増加し、

24時間後では、29gと又減少している。そして二層の吸着水に対する一層の吸着水の比 V_{m2}/V_{m1} の値は非照射例では1.59でゼラチン等親水性のゲル状物質の値¹⁷⁾に近く、X線照射後1時間の2.01及び24時間の2.00はいわゆる球状蛋白質等の単分子物質の値¹⁷⁾に近くなっている。このことは一定の構造をもっているDNA分子が照射により分離され、いわゆる低重合化が起り、このため二層の結合水量は増加しその形も単分子物質に近くなるものと考えられ、照射による著しい粘度低下の一因も之によるものと考えられる。

24時間後における一層及び二層の結合水量の減少は、いわゆる“after effect”による凝集等の機轉による事が考えられ、全結合水の減少はいわゆる構造粘性の破壊によるものと考えられる。

C. 酸素効果についての実験

次に照射によるDNAの粘度の減少には、いわゆる酸素効果が重要な役割を示し特に“after effect”に著しいと云われている¹²⁾¹³⁾。そこで結合水の變化に對していかなる影響を示すかを一方は酸素を入れたまゝ、他方は酸素を除去して照射し、24時間放置した場合について比較した。その結果は第2表に示す如く、兩者の間には特別の差はみられなかつた。即ち粘度に對する酸素効果は別の機轉によるものかもしれない。

總括並びに考按

以上の結果を要約すると、DNAの結合水は乾物100g當り82g、一層に吸着している結合水の量は、20gで非常に多くの水を結合水としてもっている。その結合は水素結合によるものである。

X線照射により全結合水は減少し、一層についている結合水の量はX線 10^5 r照射後24時間に於て著しく減少している。これらの點について検討を加えてみる。

結合水とはいわゆる“bound water¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾と云われるもので、普通の溶媒となつている水と異り、溶質分子との間にある程度の結合エネルギーをもつて結合している水である。

Pauling¹⁸⁾ 或は Sponsler¹⁹⁾ 等による蛋白質、或はゼラチン等の分子のうちの所謂水素結合を

造り得る極性基(—OH, —COOH, =O, —NH₂, =NH, —N)だけが水分子と結合し得るものである。従つて結合水の量を測定することによつてこれ等、極性基の數及び状態を知ることが出来る。DNAは、現在では、Purin 体或は、Pyrimidin 体よりなる四鹽基酸と Ribose 及び磷酸より成るものを單位としてそれらが多數一定の構造をもつて配列重合したものである⁸⁾。従つて、水素結合をつくり得る極性基は、鹽基の部分の—NH₂, =NH, Ribose の部の—OH, 磷酸の部の—OH, =O等であると考えられる。

今DNAの結合水の状態についてみるに二層に吸着している水と一層に吸着している水との比は ≈ 1.6 で、之はゼラチン等、一定の配列をもち、その間に水分子をはさんで重合していると考えられているものと同じ値¹⁹⁾をとつていることはDNA分子の重合の状態がこれらと類似のものであることを示している。X線照射によつてDNAのうける、化學的變化は鹽基の部分と Ribose の部分が勵起状態となり、二次的に重合部の加水分解を來し、又鹽基の部分から離環してアンモニアを遊離することを立證されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

X線照射によりDNAの全結合水は減少しているが之はいわゆる構造粘性の減少に對應するものであろう。一層の結合水量は照射後1時間では著變のないことは 10^5 r 程度の照射によつては極性基の著しい變化を來さないことを示し、24時間後では照射前の70%の一層の結合水量となつてゐることは、即ち極性基同志の反應による凝集機轉を示すもので、所謂“after effect”の機轉が照射直後にみられる機轉と異なることを物語るものであろう。二層の結合水は普通の球狀蛋白質等においては一層の吸着水とほぼ等しく V_{m2}/V_{m1} の値は従つて2になつてゐる¹⁹⁾。

X線照射により、 V_{m2}/V_{m1} の値が照射直後及び24時間目に於て球狀蛋白質に於けると同じく2の値を示していることは照射によるDNAの分子の切斷を示すものと考えられる。全結合水より二層目までの水の量を引くと照射前では50g、照射後1時間では30g及び24時間では39gとなつてい

る。

之は照射により弱い結合(0.5 Kcal/mol)の水の減少を示しているが、DNAの構造粘性の減少に對應するものであろう。之は教室の渡邊¹²⁾の實驗によつても立證されている。酸素の影響については實驗に使用した程度の照射量(10^5 r)及び斯る高濃度の状態に於ては間接作用が著明に現れないと考えられるので、酸素効果についてはこの實驗からは結論は下し得ない。

以上より、X線照射によるDNA結合水の變化は、照射によるDNA分子の切斷等による低分子化によるものと考えられ、所謂“after effect”は一種の凝集機轉によるものと考えられる。

結 論

X線照射による結合水の變化を追及し、次の如き結論を得た。

1) DNAの結合水は乾物100gに對し全結合水は82g、一層の結合水は20gで、二層までの結合水に對する比 V_{m2}/V_{m1} は1.6で、その一層目の結合のエネルギーは1.7 Kcal/mol で水素結合により結合している。

2) X線 10^5 r 照射後1時間目においては全結合水量は減少するが、一層目の結合水量は變化せず、 V_{m2}/V_{m1} の値は2となる。

3) 10^5 r 照射後24時間目においては全結合水量及び一層目の結合水は著しく減少し、この實驗に於ても“after effect”を認める。 V_{m2}/V_{m1} は2となる。

4) X線照射によるDNA結合水の變化は照射によるDNA分子の切斷等による低分子化によるものと考えられ、所謂“after effect”は一種の凝集機轉によるものと考えられる。

(擧筆するに當り、種々御教示、御討論を賜りました徳島大医学部河村教授に深甚なる感謝を捧げると共に、種々御協力を戴きました教室員各位に對し、深謝致します。

尚本論文要旨は昭和31年4月第15回日本医学放射線学会總會及び昭和31年10月、日本医学放射線学会第13回東北、北海道、新潟地方会に於て發表した。)

文 献

- 1) D.E. Lea: “Actions of Radiations on Living

Cells", 2nd ed., Cambridge University Press, London (1955). — 2) J. Weiss: Nature 153, 748 (1944). — 3) J. Weiss: Brit. J. Radiol. Suppl., 1, 56 (1947). — 4) M. Wakabayashi, and F. Kawamura: Monogr. Res. Inst. Appl. Elec., 5, 91 (1955). — 5) 若林: 日本医事新報, 1579号, (昭29). — 6) M. Wakabayashi, F. Kawamura, and J. Okidate: Jap. Jour. Physiol., 5, Suppl., Feb., 382 (1956). — 7) G. Scholes, G. Stein, and J. Weiss: Nature 164, 709 (1949). — 8) G. Scholes, and J. Weiss: Exp. Cell Res. Suppl., 2, 219 (1952). — 9) A.H. Sparrow, and F.M. Rosenfeld: Science, 104, 245 (1946). — 10) B. Taylor, J.P. Greenstein, and A. Hollaender: Arch. Biochem.,

16, 19 (1948). — 11) G. Limperos, and W.A. Mosher: Am. J. Roentg. Ra. Therap., 63, 681 (1950). — 12) 渡辺: 日医放誌投稿中. — 13) G. Scholes, and J. Weiss: Brit. J. Radiol., 27, 47 (1954). — 14) 河村, 広田: 科学, 21, 469 (1951). — 15) H. Hirota, and F. Kawamura: Monogr. Res. Inst. Appl. Elec., 2, 11 (1951). — 16) S. Brunauer, P.H. Emmett and E. Teller: J. Am. Chem. Soc., 60, 309 (1938). — 17) H.B. Bull: J. Am. Chem. Soc., 66, 1499 (1944). — 18) L. Pauling: J. Am. Chem. Soc., 67, 555 (1945). — 19) O.L. Sponsler, J.D. Bath and J.W. Ellis: J. Phys. Chem. 44, 996 (1940).

Studies on Indirect Action of Radiation

(12th Report)

Experiments on Bound Water of Desoxyribonucleic Acid (DNA)

By

Shuki Akatsu

From the Department of Radiology, Faculty of Medicine, Hokkaido University

(Director: Prof. M. Wakabayashi)

The bound water of DNA solutions was measured by the vapor pressure method in three different cases, i. e. before X-ray irradiation, 1 hour and 24 hours after X-ray irradiation of 10^5 r. The experimental data were analysed by means of Brunauer, Emmett et Teller and Bull's theory. The results obtained are summarized as follows.

1) By X-ray irradiation the whole bound water was decreased, and it may be considered that this phenomenon is caused by decrease of structural viscosity.

2) The quantity of bound water in first layer of DNA molecule is not changed so much by irradiation at the time of 1 hour, but at the time of 24 hours it changed markedly (7% of quantity) as compared with that before irradiation.

This phenomenon may be considered as the aggregation of molecules due to the mutual reactions of polar radical and show that mechanism of the "after effect" is different from that directly after irradiation.

3) It may be considered that the radiolysis of DNA molecule was occurred because the ratio

$$\left(\frac{\text{the quantity of bound water to second layer}}{\text{the quantity of bound water in first layer}} \right)$$

is 2 same as that of spherical protein.