

Title	X線の蛋白質に及ぼす影響(第2報)化学的變化について
Author(s)	河村, 文夫
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1952, 11(10), p. 12-16
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17140
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

X線の蛋白質に及ぼす影響(第2報)

化学的變化について

北海道大學醫學部放射線醫學教室(主任 若林勝教授)

河村 文夫

(昭和26年10月25日受付)

緒言

著者は先に若林と共にX線照射による血清蛋白質の電気泳動的變化¹⁾について報告したが、本篇においては、X線照射による蛋白質の變化を化学的に検討した結果を報告する。

蛋白質は變性²⁾にさいし、蛋白分子中の種々の原子團の反應性が變化することはよく知られている。しかるにX線照射による蛋白質の變化について種々検討されているが³⁾⁴⁾⁵⁾、明かなる化学的變化は認められていない。

本実験においてはX線大量照射による蛋白質の化学的變化を、SH基、NH₂基、チロジン基の反應性を尺度として検索し、更に加熱變性、紫外線照射のさいの變化と比較検討した。

実験第一 SH基について

実験方法 実験材料として人血清アルブミンを用いた。試料は人血清より Mc Meekin⁶⁾の方法により精製し透析後使用した。

X線照射は前報¹⁾の條件に 2.5×10^5 r及び 3.0×10^5 rの線量を用いた。

紫外線照射はアクメ人工太陽燈を用い、100V、7Aの人力にて、30種の照射距離にて1時間照射した。このさい試料は、外側を冷却し、温度上昇を防止した。

加熱は試料を試験管に入れ、沸騰水中で10分間作用せしめた。

活性SH基の測定は赤血鹽法⁷⁾によつた。即ち被検蛋白液中にpH6.8の磷酸緩衝液及び少しく過剰のFerricyanideを加え、37°Cにて10分間反應せしめた後、2Nの三鹽化醋酸を加え蛋白を沈澱せしめ濾別する。この濾液にアラビヤゴムを加えた硫酸鐵溶液⁷⁾を加え試料中の活性SH基により

還元されて生じたFerrocyanideをベルリン青として、20分後に定量する。ベルリン青の定量は赤色フィルターを用いた比色計により実施し、比色の基準としては濃度既知のFerrocyanide溶液を對照蛋白液中に加え被検液と同様の處理を加えたものを用いた。

実験成績

試料としては1cc中の蛋白窒素量 9.60×10^{-5} モルの水溶液を用いた。

X線照射により試料には變化を認めない。紫外線照射により帶黄色の沈澱形成を見、加熱によつて白色沈澱を生じた。

実験結果について見るに第1表に示す如くであつた。即ち人血清アルブミンの組成⁸⁾より1分子

第1表 人血清アルブミンにおけるSH基 (Ferricyanid法⁷⁾による)

	形成された Ferrocyanide (mM)	システインに換算 した-SH基 (per cent)
未處理	0	0
X線 2.5×10^5 r照射	0.00002	0.03
X線 3.0×10^5 r照射	0.00002 ₅	0.03 ₅
紫外線大量照射	0.00027	0.35
加熱(100°C 10')	0	0

中の窒素原子数を750個とし、2個のシステインを酸化するに2分子のFerricyanideを要するものとして⁷⁾、SH基をシステインに換算して、重量にして全蛋白の幾パーセントに當るかを算出すると、未處理の生蛋白では0.0%で、X線 2.5×10^5 r照射例では0.03%、 3.0×10^5 r照射例では0.03₅%が活性となつている。紫外線大量照射では0.35%が活性で、加熱例では0.0%であつた。

即ち未處理の生蛋白及び加熱變性せるものでは、活性のSH基は全く無く、紫外線大量照射に

よつて、すべてのSH基²⁾が活性化してくる。

X線照射によつても明かにSH基が活性化してくる。即ち 2.5×10^5 rでは、紫外線大量照射のさいの8.5%、 3.0×10^5 rでは10%が活性化している。

この結果を先人の業績と比較するに、Heeren等⁷⁾はポーログラフにより、X線照射のさいのNH₂基、SH基、S-S基の變化を、血清蛋白質について検索したが、 3×10^5 rより 10^6 rの間では殆んど變化を認めず、紫外線照射の如きSH基、S-S基の遊離をおこさないと云う。したがつて私の結果とは異つてゐるがその使用X線量及び實驗精度より、變化を認め得なかつたものと考えられる。

とにかく人血清アルブミンにおいては、X線照射により明かにSH基は活性化され、その變化の度は線量と共に大となつてゐる。加熱變性においては、SH基は全く活性化せず、この點においてX線照射による蛋白質の變化は加熱變性とは異つたものである。紫外線照射とは定性的に相似たる結果であつた。

成績第二 NH₂基について

實驗方法 試料としては前實驗における人血清アルブミンを用いた。X線は前報¹⁾の條件にて 2.5×10^5 rを照射した。

NH₂イオンの測定はネスレルの試薬を用い、試料中のNH₂イオンの量は濃度既知の硫酸アンモニウム液を基準として、比色計により定量した。

實驗成績 試料として1cc中の蛋白窒素量 9.6×10^{-5} モルの水溶液を用いた。X線照射により試料には肉眼的變化を認めない。

實驗結果について見るに、對照例においては、 4.9×10^{-7} モルで、X線 2.5×10^5 r照射においては 6.4×10^{-7} モルであつた。即ちX線 2.5×10^5 r照射によつて 1.5×10^{-7} モルの遊離NH₂イオンを増加している。

即ちX線照射によつて遊離アンモニウムイオンは明かに増加すると云う結果であつた。

實驗第三 チロジン基について

實驗方法 實驗材料として牛血清アルブミン、牛血清γグロブリン及び卵白アルブミンを用いた。牛血清アルブミンはMcMeekin⁸⁾の方法により得た試料を透析後、Cohn⁹⁾の方法により精製した。牛血清γグロブリンはMcMeekinの方法により得られたオイグロブリンを透析後Deutsch等¹⁰⁾の方法により精製した。卵白アルブミンはHopkins, Pinkus¹¹⁾の方法により精製し透析後使用した。之等の試料はKjeldahl氏法により蛋白窒素量を測定し所要の濃度に稀釋して使用した。

X線照射、紫外線照射、加熱の各處理は、實驗第一と同じ條件にて實施した。

遊離チロジン基の測定はLi¹²⁾の方法に従つた。即ち被檢蛋白溶液中にpH 5.70のM/6醋酸緩衝液を加え、之れに少しく過剰の沃度加里沃度液を加え、チロジン基と結合して残つた遊離沃度は規定チオ硫酸ソーダにて逆滴定し、消費された沃度量より遊離チロジン量を算出した。

實驗成績

a) 牛血清アルブミン、試料として1cc中の窒素量 5.00×10^{-5} モルの水溶液を用いた。X線照射

第2表 蛋白質の活性チロジン基

		未處理	X線照射 3×10^5 r	X線照射 8×10^5 r	紫外線 大量照射	加熱	分析による チロジン含量
牛血清 アルブミン	活性チロジン (重量%)	2.1	2.5	2.8	5.3	4.6	5.5% ⁸⁾
	活性チロジン 全チロジン	39%	45%	51%	98%	84%	
牛血清 γグロブリン	活性チロジン (重量%)	3.4	4.4		6.5	6.5	6.7% ⁸⁾
	活性チロジン 全チロジン	50%	65%		97%	96%	
卵白 アルブミン	活性チロジン (重量%)	2.0	2.2		3.3	3.3	3.4% ¹³⁾
	活性チロジン 全チロジン	58%	64%		97%	97%	

により試料の帯黄色は淡くなるが濁濁、沈澱形成は認められない。紫外線照射によつて帯色は淡くなり、かなりの濁濁を見た。加熱によつては白色沈澱を生じた。

實驗結果について見るに第2表に示す如くであつた。即ち牛血清アルブミンのアミノ酸組成より1分子中の窒素原子数を750個とし、1個のチロジン残基に2個の沃度が結合するものとして、チロジンの重量に換算して全蛋白の幾%のチロジン残基が活性化しているかを算出すると、未處理の生蛋白では2.1%、加熱例では4.6%でLi¹²⁾等の成績とよく一致している。紫外線照射例では5.3%が活性化している。

X線3×10⁵r照射例では2.5%、8×10⁵rを照射せるものでは2.8%となつている。

この値をアミノ酸分析によるチロジン含量と比較すると、生の蛋白ではすでにその39%が活性の状態にあり、熱變性、紫外線大量照射によつて大部分のチロジン残基が反應性となつている。

X線照射においては3×10⁵rでは45%、8×10⁵rでは51%で明かに生蛋白の39%より増加している。

即ち牛血清アルブミンはX線照射により活性化せるチロジン残基が増加し、その度は線量の増加にともない大となる。

b) 牛血清γグロブリン、試料として1cc中の蛋白窒素量4.10×10⁻⁵モルのpH7.8のM/100磷酸緩衝液溶液を用いた。X線照射によつては試料には肉眼的に變化を認めず、紫外線照射により、僅かに濁濁し、加熱により白色沈澱を生じた。

實驗結果について見るに第2表に示す如くであつた。即ちチロジンの重量に換算して、全蛋白の幾%のチロジン残基が反應性であるかを見るに、未處理の生蛋白では3.4%、熱變性及び紫外線照射例では6.5%、X線3×10⁵r照射例では4.4%であつた。

即ちこの成績を人血清γグロブリンのチロジン含量⁹⁾と比較しても、未處理の生蛋白においても50%がすでに反應性であり、加熱及び紫外線大量照射により殆んどすべてのチロジン残基が反應して

いる。

X線8×10⁵r照射例では65%であり、生の蛋白より更に15%が増加している。

c) 卵白アルブミン 試料として1cc中の蛋白窒素量1.48×10⁻⁴モルの微紅色の水溶液を用いた。X線照射により僅かに濁濁をみとめ、紫外線照射によりかなりの濁濁を來し、加熱により白色沈澱を生じた。

實驗結果について見るに第2表に示す如くであつた。即ち卵白アルブミンの窒素量より計算するに、未處理の生蛋白では2.0%、加熱及び紫外線照射例では3.3%で、X線3×10⁵r照射例では2.2%のチロジン残基が活性化している。

之をアミノ酸分析によるチロジン含量¹³⁾と比較すると、未變性の生蛋白ではすでに58%、加熱及び紫外線照射例では殆んどすべてのチロジン残基が反應する。

X線3×10⁵r照射例では64%が活性化しており、生の蛋白より更に6%のチロジン残基が活性化されている。

以上の實驗より牛血清アルブミン、牛血清γグロブリン及び卵白アルブミンにおいては、未處理の生蛋白においてもすでにその含有チロジン残基の一部が反應性であり、加熱及び紫外線大量照射によつて殆んどすべてのチロジン残基が反應する様になる。

X線照射によつても、之等の蛋白質は活性なチロジン残基を増加し、その増加の度は線量の増加にともない大となつている。

總括考案

以上の成績を總括するに、各種蛋白質においてX線照射により、蛋白分子中のSH基、NH₂基、チロジン残基の反應性が、生の蛋白より明かに増加する。紫外線照射によつては殆んどすべてのSH基、チロジン残基が活性化する。又加熱處理によつては、チロジン残基は殆んどすべて反應性となるが、活性なSH基は證明し得ないと云う結果であつた。

近時の蛋白質研究の進歩により、蛋白質は變性¹⁴⁾にさいし、その分子構造は變化し、種々の原子團

の反応性を變化することが知られている。之によつて見ても、X線照射により、SH基、NH₄基、チロジン基の反応性の増加していることは、X線照射により蛋白分子が、化學的乃至分子構造的に明かに變性していることをうかがうことが出来る。このことはX線照射による血清蛋白質の電気泳動的變化¹⁾、粘度の増加²⁾⁵⁾等より裏づけられる。

さてこのX線照射による變化を、紫外線照射及び加熱による影響と比較するに、何れの場合においてもチロジン基の活性化が認められるが、加熱變性においては、活性なSH基は證明されないが、紫外線照射及びX線照射においては明かにSH基は反応性となつてゐる。又血清蛋白質の電気泳動圖上の變化¹⁾、又 Spiegel-Adorf の紫外線吸収スペクトルによる研究¹⁴⁾によつて見ても、X線或は紫外線照射による量子エネルギー吸収による蛋白質の變化と、加熱による分子運動エネルギー増加による蛋白質變化とは明かに異なるものである¹⁵⁾¹⁶⁾。

次にX線照射による蛋白質の化學的變化の度と線量との關係を見るに、何れも線量の増加と共に變化の度も大となつてゐる。

今この結果をX線照射の血清蛋白質の電気泳動圖に及ぼす影響¹⁾と比較して見る。たとえばγグロブリン分解の減少をとつて見ると、γ分層より消失せる蛋白質のすべてのチロジン基が活性となつたとすると、 3×10^5 r では電気泳動圖上のγグロブリンの減少は30%であるから、之れより計算すると65%のチロジン基が活性であるはずで、實驗値は65%でよく一致する。この點に關しては後報において理論的に検討する。

結論

各種蛋白質にX線照射、紫外線照射及び加熱の各處理を加へ、各々のSH基、NH₄基、チロジン基の反応性の變化を化學的に検討し次の如き結果を得た。

1) 人血清アルブミンにおいては未處理の生蛋

白においてはSH基は反應しないが、X線照射によりSH基は明かに活性化して來る。紫外線大量照射においてはすべてのSH基は反應性となり、加熱變性ではSH基は活性化しない。

2) 人血清アルブミンにおいてX線照射により遊離のNH₄基は明かに増加する。

3) 牛血清アルブミン、牛血清γグロブリン及び卵白アルブミンにおいて、チロジン基の反応性を見るに、未處理の生蛋白では既にその一部が活性の状態にあり、X線照射によつて活性なチロジン基は明かに増射する。加熱及び紫外線大量照射により殆んどすべてのチロジン基は線應性となる。

4) X線照射により蛋白質はSH基、NH₄基、チロジン基などの反応性を増加し、化學的、分子構造的に明かに變性する。

(本實驗に當り、研究の便宜を與えられ、且つ御教示いただいた、本學應用電氣研究所東健一教授、廣田鋼藏教授に感謝する。)

尙本論文の一部は第10回日本醫學放射線學會總會(昭和26年4月)において發表した。

文獻

- 1) 若林, 河村: 日醫放誌に掲載豫定
- 2) Neurath, H. etc: Chem. Rev. 34 (1944) 157.
- 3) Dugger, B.M.: "Biological Effects of Radiation" New York (1936).
- 4) Heeren, J.G. etc: Strahlenther. 67 (1940) 130.
- 5) Clark, J.H.: Am. J. Roent. 40 (1938) 501.
- 6) Mc Meekin: J. Am. Chem. Soc. 61 (1939) 2884.
- 7) Anson, M.L.: J. Gen. Physiol. 23 (1940) 247.
- 8) Band, E.: Ann. New York Acad. Sci. 57 (1946) 218.
- 9) Cohn, E.J. etc: J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 459.
- 10) Deutsch. etc: J. Biol. Chem. 146 (1946) 93 & 106.
- 11) Hopkins. etc: J. Physiol. 25 (1900) 306.
- 12) Li, C.H.: J. Am. Chem. Soc. 67 (1945) 1065.
- 13) Boyd. etc: J. Biol. Chem. 174 (1948) 1027.
- 14) Spiegel-Adorf, M.: Arch. Path. 12 (1931) 553.
- 15) Dessauer, F.: Zeit. Physik. 12 (1923) 38.
- 16) Nakashima: Strahlenther. 24 (1926) 1.
- 17) 河村: 日醫放誌に掲載豫定。

On the Effect of X-ray on the Proteins.

2. Experiments on Chemical Changes.

Fumio Kawamura

from

The Department of Radiology, Faculty of Medicine, Hokkaido University, Sapporo Japan.

The changes of reactivity of SH group, NH_4 group and tyrosine group so forth of proteins by X-ray irradiation were studied and compared with the changes of heat denaturation and those caused by ultraviolet irradiation.

The results of the experiments were as follows.

1) Active sulfhydryl group of human serum albumin was not observed in the case of native. By X-ray irradiation sulfhydryl groups obviously became active and the degree of changes became large according to the increase of doses. By ultraviolet irradiation in large quantity practically all sulfhydryl groups became active and by heating no active SH group was observed.

2) By X-ray irradiation NH_4 groups of human serum albumin were obviously liberated.

3) In bovine serum albumin, bovine serum γ -globulin and egg albumin we know that some part of tyrosine groups contained each protein in untreated is already reactive and by ultraviolet irradiation and by heating practically all tyrosine groups became active. By X-ray irradiation liberated tyrosine groups obviously increased. The degree of increase corresponds to the increase of doses used.