The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	臓器核酸代謝に及ぼす放射線の影響 第4報 酸可溶性又クレオチッドの代謝について
Author(s)	田中, 敬正
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1960, 20(6), p. 1295-1300
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19745
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

臓器核酸代謝に及ぼす放射線の影響
(第4報) 酸可溶性又クレオチッドの代謝について

京都大学医学部放射線医学教室(主任 福田正教授)
助手 田 中 敬 正

(昭和35年6月6日受付)

緒 言

我々は第1,2報に於て,酸可溶性分画全体として,燐量や^{32}P交替率が放射線に如何に影響されるかを見たが,現在の所,酸可溶性燐酸化合物は今迄知られたものでも既に100種をはるかに突破しているといわれている[1]. 故に之等全体としての放射線の影響はいわば雑然とした意味しかもたない. 故にもう少し,詳しく分離定量を行い,主なヌクレオチッドの代謝が放射線により如何に影響をうけるかを見る事は興味深いと思われる.

酸可溶性ヌクレオチッドの研究は,比較的短い歴史しか持たない. しかしこの分画にグアノシン,ウリヂン,シチジンの燐酸塩がアデノシンの場合と同じく存在する事が知られてより[2)3)4)5)],之等の化合物の代謝について数多くの実験が行われて来た.

とくに1952年,Hurlbert, Potter[6)]が^{14}C-オロチン酸を使用した実験で,この酸可溶性分画に含まれたヌクレオチッドプールが核酸のPrecursorである可能性を認めて以来,核酸生合成の研究上興味が持たれた. かくの如く,ヌクレオチッド分画が一面では核酸生合成のPrecursorとして,生長代謝に関与すると共に,他方では燐酸化反応や,Coenzymeの合成に動き,エネルギー代謝を支配する鍵を握るものである事が明かにされた.

この酸可溶性ヌクレオチッドの分離を手掛けたのはCohn等[7)8)]であり,陰イオン交換クロマトグラフィーによつて分離を行つた. その後gradient elution法による装置が考案され[9)],蟻酸に種々に蟻酸安門を加える事により,分離は一層改良された. 我々はPotter[10)],高木[11)]等の方法を使用し分離定量を行つた.

実験方法

1. カラムの製法

Dowex I (Chloride)$_{X-6}$ 200〜400メッシュを用いた. 後沈澱法で荒い粒子と細い粒子を除いてから,2NHCl, 2NNaOH, アセトンを通過して紫外線吸収物質を全部洗い出す. 後3M蟻酸ソーダにてclイオンが全く出なくなる迄洗滌して蟻酸型とする. カラムは内径0.7cm,長さ20cmを使用した.

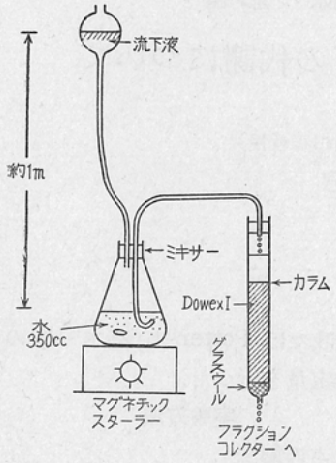
2. 酸可溶分画の分離

実験動物は120g前後の雄白鼠(Wister系)を使用した. ^{32}Pの中性にした溶液を1g体重あたり0.5μcを腹腔内に注射し,注射後1時間,2時間半後の肝,脾を分離して(肝は1回量4g,脾は2g)酸可溶性ヌクレオチッドを分離定量した. 即ち組織を2倍量の0.2N冷過塩素酸と共に,Potter-Elvejem型ガラスホモジナイザーで磨砕し,遠沈して得た沈澱を再び0.2N過塩素酸で再抽出を2回くりかえし,上清を集める. 之を冷却しながら,KOHでpH 7.0とし,生じた$KClO_4$を遠心し,上清をカラムに加え吸着させる.

3. 溶出[11)12)13)]

装置は図1の如く,カラム500ccのミキサー,マグネチックスターラー,フラクションコレクター,ゴム連結管とから成つている. 図1の如く,ミキサーには350ccの水(時には増減す)を満し,流下液を1mの水圧で流下速度が8〜10秒に

第1図



1滴とした．ミキサー中の液をマグネチックスターラーにより攪拌する．流下液は，4N蟻酸，4N蟻酸＋0.2N蟻酸アンモニウム，4N蟻酸＋0.4N蟻酸アンモニウム，4N蟻酸アンモニウムを順次流下した．流下液は，ミキサーの水と混合して順次連続的に蟻酸の濃度を上げつゝ運ばれる．之が連続稀釈法（gradient elution system）である．

4.　分析方法

各分画の吸光度は Beckman DU 型 Spectropohtometer で波長260，275mμ に於て測定した．この2つの波長での吸光度の比（$E_{275}:E_{260}$）は，各塩基に特有で[11)12)13)]分析が容易である．

又各分画の一定量（1cc）をアルミ皿にとり之を乾燥して後そのカウント値を測定した．

なお同時に血清を分離し，之のカウントをも測定し各実験の場合に比較訂正した．

5.　X線照射

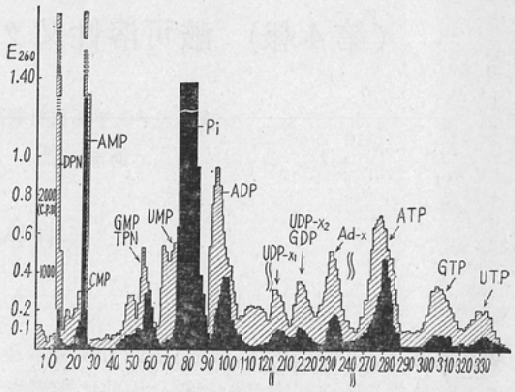
X線照射は，160KVp，3mA，0.4mmCu＋1.0mmAl の Filter で，皮膚焦点間距離30cmで，1,000 r 全身照射を行つた．

実験結果

1）　正常肝

白鼠正常肝で ^{32}P 0.5μc/g を腹腔内に注射後2.5時間の酸溶性分画は，図2の如くになる．各ヌクレオチッドは斜線で現わしてある．

第2図　正常肝白鼠P^{32} 0.5μc/g 注射後 2.5時間（ミキサー 400cc）



即ち4N蟻酸を reservoir に入れてより，順次DPN，CMP，AMP，GMP，TPN，UMP，ADPが出，ADPが出終つてより，蟻酸アンモン＋4N蟻酸に換えると次にUDP$_{X1}$，UDP$_{X2}$ADx，ATP，GTP，UTP等の Peak が出てくる．我々の用いたフラクション，コレクターの試験管1本に5ccづつ流下液を集めたが，この1ccをとり，ガイガー計数器で測定した値を元の注射した時の活性度に換算して現わしたのが図2の黒色の部分である．

図に示す如く各ヌクレオチッドの Peakに一致して放射活性を見た．なお，無機燐の^{32}PのPeakはADPの Peak の直前に大きく出現した．mixer volum を 350～400 ccとし分離を巧く行えばADPと別々に重らずに行い得た．

Brumm[15)] 等も行つて居る様に Optical Densityによる分析の外に，^{32}P を併用する時は一層明確な結果が得られるわけで，E_{260} の Peak と^{32}P放射活性の Peak が比例的に一致すれば之等のPeakは，それ自身純であると考えて差支えない．各種ヌクレオチッドは夫々特有の紫外線吸收曲線を描く．之によりアデニン系，グアニン系ウラシル系，シトシン系の化合物であると云う見当がつく．シトシン系（Emax＝ 280mμ 前後）を除き他の3つの系は Emax は 260mμ にあるので，各ヌクレオチッドの量は，各分画の E_{260} 値の総和で表わせば，相互のヌクレオチッドの量を比較し得

表1 ^{32}P 0.5μc/g 注射後 2.5時間

	正常肝			1,000r全身照射(6h後)			1,000r 全身照射(2日後)		
	E_{260} (総量)	^{32}P CPm.	$\frac{^{32}P\ CPm}{E_{260}}$	E_{260}	^{23}P C,P. m	$\frac{^{32}P\ CPm}{E_{260}}$	E_{260}	^{32}P C.P. m	$\frac{^{32}P\ CPm}{E_{260}}$
AMP	10.2	5040	494	11.0	2850	259	9.5	3340	352
GMP等	1.97	4552	2310	2.23	5537	2480	2.29	7537	3160
UMP+IMP	5.19			4.62			3.04		
ADP	7.90	7172	910	5.10	3220	632	6.77	2881	426
UDP-x_1	1.07	1047	980	2.25	1085	482	2.39	1648	690
UDP-x_2	1.85	1706	922	1.95	1320	677		1736	
AD-x	3.43	2248	655	2.79	1600	574		1441	
ATP	6.31	7065	1120	4.51	4340	964	4.85	4490	931
GTP	1.73	2078	1200				0.65	569	875
inorg P		74883			35400			44678	

表2 ^{32}P 注射後1, 2.5h の $^{32}PC.P.m$ の比較

	正常肝		1000r照射(6h後)	
注射後の時間	1.0h	2.5h	1.0h	2.5h
AMP	4020	5040	2650	2850
GMP		4552		5537
ADP	5170	7172	3580	3220
UDP-x_1	712	1047	825	1085
ADx		2248		1600
ATP	5570	7065	4450	4340
inorg P	58032	74883	39530	35400

る．只蟻酸系では，相等高濃度にある蟻酸そのものが，紫外部吸收を持つためいつも E_{260} 総値を出す場合 Blank を差引いた．田中[14]等によれば，4NHCOOH+1MNH$_4$-formate で E_{260}=0.131 の値を出しているが我々も E_{260}=0.145 前後の値を得た．表1にE_{260}総値と，^{32}P のカウント総値を現わしている．

2. 肝臓（照射群）

a) ^{32}P 0.5μc/g (body weight) 注射後 2.5時間

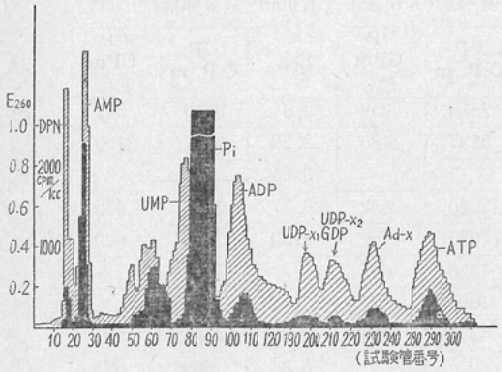
表1に1,000 r 全長照射後，6時間，2日後に ^{32}P 0.5μc/g 注射後 2.5時間を観察した値を出している．（3例平均値）なおUMP+IMPの ^{32}P Count 値は無機燐の Count の Peak と重り，求め得なかつた．この表の中で ^{32}P Specific Activity と E^{260} 総値の比を求めたが，之は各ヌクレオチッドの一定量に転入する ^{32}P の割合を示し，云わば交替率に相当する．正常肝に於ては，この S.A/E_{260} を見るとAMPがやゝ少いがその他に於て略ゝ等しい値を示しており，之は ^{32}P 注射後 2.5時間にて各ヌクレオチッドに略ゝ平等に ^{32}P 転入があつた事を暗示する．

X線照射により，ヌクレオチッドの量そのものは，UMP (+IMP), ADP, ADx, ATPの

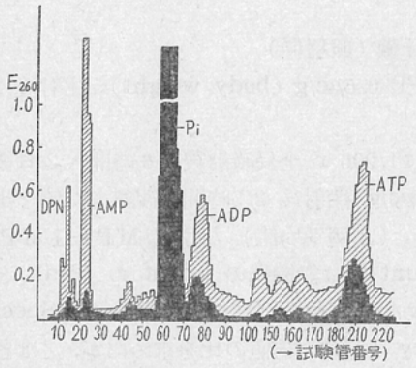
表3 脾臓（^{32}P 注射後 2.5時間）（0.5μc/g）

	正常肝			1,000r 全身照射（2日後）		
	E_{260}（総値）	$^{32}PCPm$	$\frac{^{32}PCPm}{E_{260}}$	E_{260}	$^{32}PCPm$	$\frac{^{32}PCPm}{E_{260}}$
AMP	7.30	1530	220	8.20	980	119
ADP	6.32	2980	471	4.20	1990	474
ATP	8.82	7130	810	3.9	3100	795
inorg P		23890			9830	

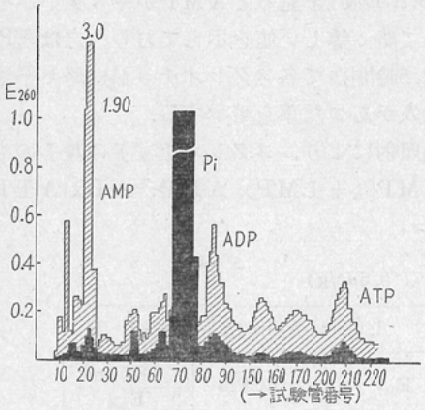
第3図　全身照射1000r白鼠照射後2日^{32}P 0.5 μc/g 注射後 2.5時間



第4図　脾臓正常^{32}P 0.5μc 注射後 2.5時間



第5図　脾臓1000r 全身照射後2日 0.5μc 注射後 2.5時間



量の多少の減少，UDP−X2，UDP−X1，の多少の増加を見るが総じてそう大きな変化は見られない．しかし^{32}P incorporation に対しては，比較的著明な変化を見た．即ちまず著明な変化は，無機燐の^{32}P活性の減少である．之は島薗，関口等も同様の事を報告している．我々は1,000 r 照射後6時間で52%，2日後で40%の^{32}P活性の減少を見た．AMP，ADP，ATP等への^{32}P転入も比較的著明に抑制された．GMPへの^{23}P転入は多少増加している．1,000 r 照射2日後にも6時間後と略ゝ同じ動きを見せた．

b) ^{32}P 0.5μc/g 注射後1時間（表2）

1,000 r 全身照射後6時間，^{32}P 0.5μc/g 注射後1時間の^{32}P活性度を表2に示した．この場合も，2.5時間の場合と同じくAMP，ADP，ATPの^{32}P転入に減少を（対照値に比し）見たが，前回よりも程度は軽度であつた．

3）脾臓の場合（表3の如くなる）

1,000 r 照射後2日を調べた．表3に示す如くAMP量には著変はないが，ADP量は33%減少，ATP量は56%の減少を見た．^{32}P の incorporation は，肝に見る如く無機燐への^{32}P転入が著明に抑えられ，59%減少した．減少の程度は，肝の場合よりも程度が大であつた．

ATPも57%，ADPも33%減を見た．

脾臓の各ヌクレオチッドの分離の模様は図4，5に示した．

考　按

体内に入れられた^{32}Pは比較的速かに諸臓器に分布する．^{32}P を白鼠に経口的投与の場合，各臓器内濃度及び排泄の模様を時期的に観察すると，投与後1時間目に肝臓内総燐量の1.13%に放射能が認められ，酸可溶性分屑内の放射能も1.10%で両者の間に殆んど差がない[16]．投与後3時間前後で酸可溶性分画は最高値をとり後徐々に減少する．その後酸可溶性分画より^{32}Pが複雑な燐化合物，恐らくはリポイド燐等へ転化される．

かゝる酸可溶性分画への^{32}P転入がX線照射により如何に影響されるかという報告は少く，又その結果も一様でない．特に陰イオン交換樹脂クロマトグラフイーによる分離により之を調べた例は極めて少い．

上記の実験結果で1,000 r 照射により，無機燐の Phosphorilation が著明に抑制される事をし

つたが，之とは逆に Euler や Hevesy[17] は，白鼠X線照射（335～2,000 r）を行つて，肝に於ける ^{32}P の比放射能が対照に比し著明に増加する事を見た．Sherman 及び Forssberg[18] は，マウスで 800r 照射後 ^{32}P を注射後5分後の変化を見ているが，筋肉への ^{32}P の incorporation は低下するが，肝に於ては Orth P, Acid labile P 共に著明（40%）に増加しており，Total acid soluble P には著変がなかつたと報じ，之は肝の毛細管壁のみならず，肝細胞の膜を ^{32}P の透過性がX線照射により増加するためであると報じている．之は当実験と反対の結果になつているが，上記の実験は ^{32}P 注射後5分後を見，我々は，1, 2.5時間後を見ており，この時間的のずれにより，血管透過性の Peak が見逃され，かえつて低値をとつたのかもしれない．しかし，van Bekkum[19] は，800～1,100 r 照射により脾より分離したミトコンドリヤの Oxidative Phosphorilation が著明に抑制された事を報じ，又Ashwell & Hickman[20] は，照射マウスからの脾のホモジネードに於て，高エネルギー燐化物の合成の能力の減少を見ている．

又 Thomson 等[21]は白鼠に X線全身照射後胸腺のホモジネートに，同じく無機燐の摂取の減少を見ている．又関口等も，我々と同じ実験方法にて，無機燐への ^{32}P 転入の著明な減少を見ている．又我々は之と併行して各々ヌクレオチッドへの（勿論各ヌクレオチッドの運命なり代謝経過は解つていないが）^{32}P 転入が抑制された．かゝるヌクレオチッドより更に高次のポリヌクレオチッドへの合成を想定する時，核酸燐プールへの ^{32}P 転入が抑制される事も又容易に説明しうると考えられる．なお肝臓では核酸とくに DNA-P の ^{32}P 交替率は，X線の影響は少く，脾臓は著明に抑制される事を第2報に於て観察したが，肝臓のヌクレオチッドは照射により量的変化こそ少いが，^{32}P 転入は比較的著明に抑制される事を知つた．

脾臓では ^{32}P のみならず各ヌクレオチッドの量自身も著明に減少した．又肝のGMP等の多少の増加に対する意味づけに関しては，不明であるが，之も代謝過程の一切の阻害と考えてよいであろう．

総　括

正常雄白鼠にX線1,000 r 全身照射を行い，肝臓，脾臓の酸可溶性分画の主なヌクレオチッドの量的変化及び，^{32}P 転入への影響を調べた結果は次の如くである．

1）肝臓，脾臓共に無機燐への ^{32}P incorporation が照射により著明に抑制された．

2）肝臓に於ては，各ヌクレオチッドの多少の増減はあつたが，量的には著明な変化はなかつた．しかし，^{32}P 転入は比較的著明に抑制され，特に，ADP，AMP，ATPへは同程度に減少した．GMP等へは逆に多少増加を見た．

3）脾臓では，各ヌクレオチッド，特に，ADP，ATPが量的にも著減し，^{32}P 転入も著明に抑制された．

（本論文の要旨は，第18回日本医学放射線学会総会に於て発表す）

擱筆に臨み，御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師福田教授に対し深謝す．

文　献

1）高木：分析化学，7巻，5号（昭33）．—2）Caputto, Re., et al,: J. Biol. Chem., 184, 333, (1950). —3) Paladini, A.C.: Biochemical J., 51, 426 (1952). —4) Cabib, E.: J. Biol. Chem, 203, 1055 (1953). —5) Park, J.T.: Biol. Chem., 194, 877, 897 (1952). —6) Hurlbert, R.B, and Potter. V.R.: J. Biol. Chem., 195, 257 (1952) 209, 1 (1954). —7) Cohn, W.E.: J. Am. Chem. Soc., 72, 1471 (1950). —8) Cohn, W. E.: J. Biol. Chem, 203, 319 (1953). —9) Busch, H.: J. Biol. Chem. 196, 717 (1952). —10) Hurlbert, R.B.: J. Biol. Chem. 209, 23 (1954). —11）高木：第1回燐酸代謝シンポジウム（1957）．—12）中尾：蛋白質，核酸，酵素，3，203（1958）．—13）古川，高橋：燐酸代謝実験法〔I〕広川書店．—14）田中伸一：未発表．—15) Brumm, A.F.: Potter, V.R.: J. Biol. Chem. 220, 713 (1956). —16）加藤：慶応医学，32，21（1955）．—17) Euler, H.v. & Hevesy G.: Arkiv Kewi, Mineral. Geol 17 A, No. 30 (1944). —18) Sherman, F. G & Forssberg. A.: Arch. Biochem 48, 293 (1954). —19) van Bekkum, D.W., et al.: Brit. J. Radiol. 27, 127 (1954). —20) Ashwell, J &Hickman, v. J.: Proc. Soc. exp. Biol. Med 1952, 31 (407). —21) Thomson, J. F., Fourtelotte, W. W.: Proc. Soc. exp. Biol. Med 1952, 31(268).

Effect of Radiations on the Nucleic Acid Metabolism
4. Study on tne nucleotides of acid soluble phosphate.

By

Yoshimasa Tanaka

Department of Radiology, Faculty of Medicine. Kyoto University.
(Director: Prof. Masashi Fukuda)

Normal White rats were totally irradiated with 1000 r, and the quantitative change of the chief nucleotides and incorporation of ^{32}P into nucleotides after irradiation were examined by using a method of ion exchange chromatography(gradient elution system) and the results were as follows.

1) The incorporation of ^{32}P into in organic phosphate was markedly inhibited owing to irradiation on the liver and spleens.

2) As for the quantitative change of the nucleotides of the liver, remarkable change was not seen, but incorporation of ^{32}P into nucreotides was inhibited relative markedly, especially incorporation into ADP, AMP and ATP conspicuously decreased. But into GMP etc increase was seen to some extent after irradiation.

3) On the spleen, nucleotides besonders ADP and ATP was quantitably decreased and incorporation of ^{32}P also was inhibited remarkably.