OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	放射線間接作用の研究(第11報)蛋白質についての実験
Author(s)	沖舘, 純吉
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1959, 18(10), p. 1413-1418
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20254
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

放射射間接作用の研究(第11報)　蛋白質についての実験

北海道大学医学部放射線医学教室（主任　若林勝教授）
沖　舘　純　吉

（昭和33年10月6日受付）

緒　論

先に若林等[2)4)5)]は蛋白質の水溶液について照射による影響を検討し，照射により人血清蛋白は電気泳動的[1)]にも化学的にも明らかに変性し，更に照射による蛋白質の変化には稀釈効果[4)]があることを確めている．

著者は放射線化学の立場から更に詳細に検討するために比較的純粋な蛋白質について実験を行つた．即ち精製人血清γグロブリンを使用し，蛋白質水溶液における稀釈効果，酸素効果，更に保護効果について検索し蛋白質における間接作用機転，特に酸素の役割について考察を加えんとするものである．蛋白質の変性の指標としては活性チロヂン基の変化と濾紙電気泳動法によつた．

実験方法

実験材料としては精製人血清γグロブリン（日薬製）を使用した．保護精製剤の影響をさけるため透析後使用した．透析後，Kjeldahl 氏法により蛋白窒素を測定し，所要の濃度に稀釈して使用した．

放射線は主としてX線を用い時に Co^{60} よりのγ線を用いた．X線照射は 180Kv 4 mA 1.0mm Al 濾過，焦点被照射体距離10cm，線強度1,200r/minのものによつた．線量はX線の場合γ線の場合何れも 1.0×10^5r より 5.0×10^6rの種々なる量について実験を行つた．

実験成績

実験1　稀釈効果の検討

蛋白質溶液に対する放射線の作用には間接作用が可成の寄与をしていることは，人血清を材料とした実験[6)7)]から知られている．著者も亦γグロブリンについて先づ稀釈効果から検討した．

第1表　人血清γグロブリンの活性チロジン基

			活性チロジン（重量%）	活性チロジン全チロジン（%）
未処理			3.9	58%
X線照射	1.0×10^{-2}g/cc	3.0×10^6r	4.6	69%
		7.0×10^5r	5.4	80%
	1.0×10^{-4}g/cc	1.0×10^5r	4.9	73%
		2.0×10^5r	5.7	85%
		3.0×10^5r	6.1	90%
加熱（100℃10分）			6.2	92%
分析値（　　）			6.7	

尙この場合の変化の指標としては活性チロヂン基の消長によつた．活性チロヂン基の測定[2)8)]は，試料にM/6醋酸緩衝液を加え，更にM/200沃度カリの沃度液を加え20℃3時間放置し，チロヂン基と結合して残つた遊離沃度をM/200チオ硫酸ソーダにて測定した．

試料としてのγグロブリンの濃度は，10×10^{-2} g/cc及び 1.0×10^{-4} g/ccのものを用い．X線は，1x，2x，3x，7x10^5rを夫々照射した．

其の結果は第1表に示す如くであつた．

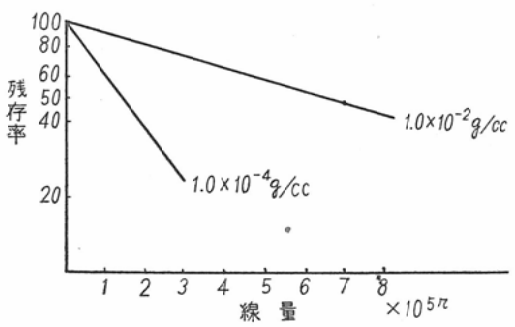
表には血清γグロブリンの分子量を 156.000[9)]とし1個のチロヂン基に2個の沃度分子が結合するものとして，蛋白中の幾重量%のチロヂン基が反応性であるかを示してある．即ち未処理のものでは3.9%であるに10^{-2} g/ccの濃度のもので 3.0×10^5r照射では 4.6%，7.0×10^5r 照射では 5.4%であつた．又10^{-4} g/ccの低濃度のもので 1.0×10^5r照射では 4.9%，2.0×10^5r 照射では 5.7% 3.0×10^5r照射では 6.1%であつた．即ち照射によりγグロブリンのチロヂン基の活性度は増加

する．そしてその増加の度は線量の増加に伴い大となる．

尙γグロブリン溶液を 100°C，5分加熱するときは活性チロヂン基量は 6.2%となる．又γグロブリンの全チロヂン基[9]は分析の結果 6.7%であつた．今全チロヂン基に対しての活性部分の割合を見るに未処理の生蛋白において58%が活性になつており又加熱により殆んど全てのチロヂン基が活性となつている．X線照射の場合は第1表第2柱に見る如くチロヂン基の活性度は増加する，その度は同一濃度では線量に対応し又同一線量では稀薄溶液ほど増加の度は大である．この結果は人血清アルブミンにおける実験とよく一致している[4]．

尙この実験結果について照射線量と変化量との関係を更に検討せん．今若林等[4]の云う如くX線照射により変化せる蛋白分子のチロヂン基は全て活性になるとして第1表より変化せる割合を算出すると第1図の如くである．横軸に照射線量，縦軸に変化を受けなかつた割合の対数を取ると，線量と変化量との間には指数函数的関係が成立する．これより半減量を求めると濃度 1.0×10^{-2} g/cc では 6.5×10^{5}r，濃度 1.0×10^{-4} g/cc では，1.4×10^{5}r となる．即ち稀薄水溶液に於いては同じ変化を起すに要する線量は小となる，即ち明らかに稀釈効果が認められた．

第1図　人血γグロブリンの稀釈効果



要するにγグロブリン溶液に於いても稀釈効果が認められ，この際の放射線作用に間接作用が重要な役割をもつものと考えられる．

そこで次に放射線間接作用に重要なる意味をもつと云われる酸素効果[6]について検討を加えた．

実験2　酸素効果の検討

酸素効果の検討には酸化により，容易に変化しうるチロヂン基測定による方法をさけ，濾紙電気泳動法[10][11]を用いた．

試料は前実験のものと同一の人血清γグロブリンで濃度は 6.8×10^{-2} g/cc でpH7.7の溶液のものを用いた．放射線はCo^{60}のγ線を用い線強度2,000 r/min で線量は 1.0×10^{5}r より 5.0×10^{6}r の各種を照射した．

酸素の除去はアンプレ中の試料より真空ポンプにて30分間空気を排除した後，アンプレの口を封じた．

濾紙電気泳動法は試料0.02cc，東洋濾紙 No.51 を使用し，ベロナール緩衝液（pH 6.8イオン強度 0.1）を用い，電圧 6～10 V/cmで15～20°Cの室温で10時間の泳動を行つた．泳動後速かに乾燥し，ブロムフェノールブルー溶液及び醋酸にて処理発色させた．これを光電比色計にて易動度及び面積を方眼紙に画き，この泳動図について所要の測定を行つた．

これによつて先づ酸素飽和溶液について照射の影響を観察次いで酸素除去のものについて実験，両者を比較した．尙酸素飽和溶液について照射前後の溶液中酸素の測定をも合せ行つた．

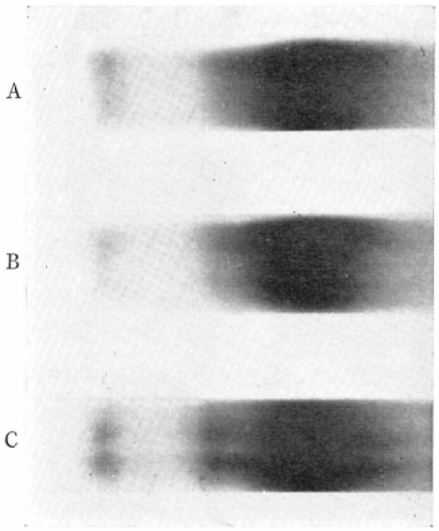
A：　酸素飽和溶液についての実験

先づ非照射の試料についての電気泳動図を見るに第2図A及び第3図Aに見る如くであつた．易動度から見る時は，γグロブリンが主なものであるが他に少量のアルブミン，α及びβグロブリンを含んでいる事が知られる．

従つて物理化学的に見て本試料は純粋γグロブリンとは云えないものであつた．これが照射による影響は第2図B，C及び第3図B,C,D，に見る如くγグロブリン分屑は著しく減少すると共に，βグロブリンの分屑に近く，一つの峯を形成する．照射量の増加により，この変化の傾向は大となる．5.0×10^{6}r照射例ではβ及びγグロブリンの頂点は消失して，両頂点の中間に一つの峯が作られる．（第4図，及び第3図D），

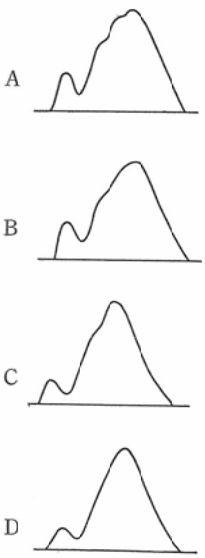
第2図　濾紙電気泳動図

A：非照射
B：5×10^6r 照射（酸素飽和）
C：5×10^6r 照射（酸素除去）



第3図　照射による変化

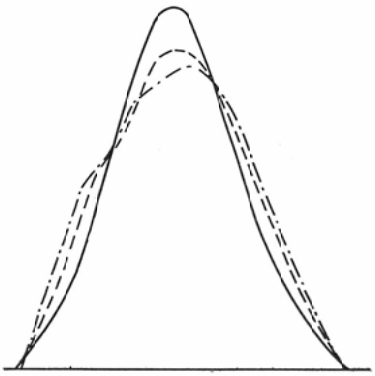
A：非照射　　B：1×10^5r 照射
C：1×10^6r 照射　　D：5×10^6r 照射



尙試料を照射後24時間放置しても，この変化が更に増強或は軽減する如きことはなかつた．DNA水溶液の粘度は照射中止後にも変化が増強することが知られている[21]がこの場合その様な所謂

第4図　グロブリン分層の電気泳動

鎖線：非照射
破線：1×10^6r 照射
実線：5×10^6r 照射



“After effecf,,は認められなかつた．

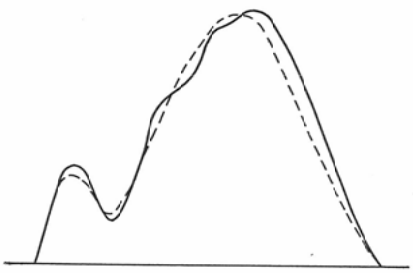
要するにγグロブリンは照射により変性しその易動度に変化を来す．そしてこの変化は照射中に惹起されるものである．この結果は若林等の人血清蛋白についての結果[1)5)]と全く一致している．

B：　酸素除去溶液についての実験

この照射による変化が溶媒中の酸素除去により如何なる影響を受けるかを次に検討した．空気中及び酸素除去した各々の試料にそれぞれ 5.0×10^6rの照射を行つた．

第5図　酸素の影響

実線：非照射
破線：5×10^6r 照射（酸素除去）



其の結果は第5図に見る如くであつた．即ち酸素を除去して照射した場合，非照射のものと殆んど全く一致する電気泳動図を示した．

要するにこの実験範囲に於いては溶媒中の酸素が欠如することにより，照射による蛋白質の変化

が現れない．前実験と対比してγグロブリン溶液に対する放射線の作用には明かに酸素効果が認められる．

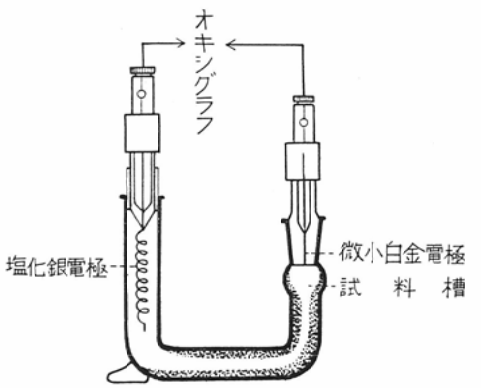
そこで著者はこの際酸素が如何なる割合をもつかを検討するために照射前後の溶液中の酸素量の測定を試みた．

C：　照射前後に於ける溶液酸素の消長

蛋白質溶液中の酸素濃度をオキシグラフ[12]を用いて，5×10^6rの照射前及び照射後の測定を行つた．

オキシグラフによる酸素測定の原理[23]は白金電極に電圧を加えると白金面上の酸素が還元されることを利用したものである．即ち酸素の還元によつて白金面を通して流れる電流は或電圧範囲で拡散限界電流を示す．この拡散限界電流が酸素濃度と比例することを利用するものである．この場合電流値から酸素濃度を求めるには使用各電極について化学分析によつて求めた濃度と比較校正して決定するのである．こゝでは酸素の化学分析が出

第6図　照射容器（オキシグラフ）



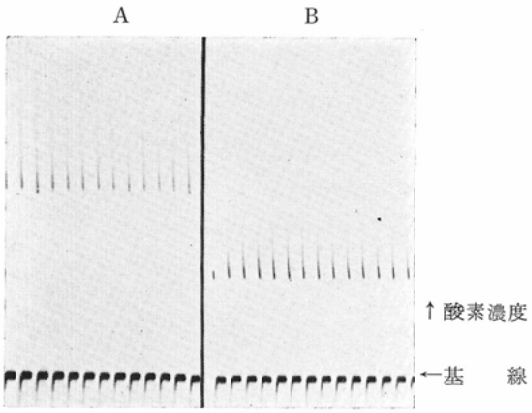
来なかつたので電流値の比較を求めるに止めた．

試料を測定容器（第6図）に盛り電極を気密に挿入し先づ拡散限界電流を求める．次いでこの測定容器を通して所要線量を照射し後再び拡散限界電流を測定した．

その結果は第7図に示す如くであつた．即ち照射により蛋白溶液中の酸素濃度は著明に減少する．恰も照射により酸素が蛋白質によつて消費せられる如くである．この現象は紫外線により蛋白

第7図　オキシグラム

A．照射前　　B．照射後（5×10^6r）



質は酸素との結合が著しく増強する現象，所謂“Photo-oxydation[13]”と類似した現象である．放射線エネルギーを与えられた蛋白質分子は，反応性が増加し，酸素と容易に結合し変性するものと考えられる．又もし照射の際，酸素等が存在しなければ励起された蛋白質分子は速かにもとの安定状態に戻り従つて変化が現れないものと考えられる．要するに照射による蛋白質変性に対する酸素の役割は Passive のものである．

これが蛋白質水溶液に於ける酸素効果の機構の一つであると考えられる．

実験3　保護効果の検討

蛋白質水溶液に於ける放射線間接作用の寄与は稀釈効果，或は酸素効果の存在により明かであるが，間接作用に対しては又保護効果[6][7][14]が広く認められている．

著者も亦本試料について保護物質がどの程度の役割をなすかを知らんとして本実験を行つた．

保護物質としてよく知られたチステイン，或は尿素[7][14]等は又蛋白変性剤[15]として強い作用をもつのでこれをさけ，著しい保護作用を有し又蛋白変性を起さない低濃度のエチールアルコールを用いた．

蛋白変性の指標としては実験1と同じく活性チロヂン基の消長[2][8]によつた．試料は 1.0×10^{-4} g/ccの濃度のものを用いた．この濃度では照射による変化は第1実験に見る如く殆んど間接作用に

第2表 エチルアルコールによる保護効果
(人γグロブリン濃度 1.0×10^{-4} g/cc)
(X線 3.0×10^{6}r 照射)

エチルアルコール濃度	0γ/cc (%)	1/10 γ/cc (%)	1γ/cc (%)	10γ/cc (%)	未照射
活性チロジン (重量%)	61	6.1	5.0	4.4	3.9
活性チロジン 全チロジン (%)	90	89	75	66	58
変化量	77	75	38	18	

よるものと考えられるものである.

保護剤としてのエチールアルコールは0.1γ/cc, 1γ/cc, 10γ/cc の濃度のものを用いた. これ等の濃度の保護物質を加えて照射したものと, 保護物質を加えないで照射したものとを比較した.

その結果は第2表に示す如く, 変化量はアルコールの加らぬものでは77%であるのに対し, 附加量 0.1γ/cc では75%, 1γ/cc では38%, 10γ/cc では18%であつた. 即ち加えるアルコール濃度が高くなるにつれて照射による蛋白質の変化は著しく軽減される.

即ち蛋白質の如き高分子に於いてもアルコールの著しい保護作用が見られる.

総括考按

以上を総括するに人血清γグロブリン水溶液に対する放射線の作用には, 明かに稀釈効果が認められ, 又γグロブリン水溶液中の酸素を除去して照射するに放射線の効果は殆んど現れない. 即ち明かに酸素効果が認められる. 蛋白水溶液中の酸素濃度は照射により著しく減少する. 又蛋白質稀薄水溶液にエチールアルコールの微量を加えることにより明かに保護効果が認められると云う結果である.

最近の放射線化学[6][7][14][17][18]の知見により, 放射線の水溶液中に於ける作用は, 照射によつて水に生じた種々なる活性基が溶質と反応して起る所謂活性水の作用が主役をなすと云われている. この根拠として, 稀釈効果, 酸素効果, 或は保護効果があげられている.

本報に於ける実験においても明かにこれ等の現象が見られ, γグロブリン水溶液における放射線作用は主として間接作用によることが考えられる. この間接作用の機転について検討して見よう.

若林等[4]は馬血清アルブミン水溶液における実験においてその間接作用機転を検討し, H_2O_2 乃至自由基が化学的に溶質に反応すると云う所謂化学反応説によつては照射による蛋白質の変化を説明しがたく, 照射によつて溶媒中に吸収された放射線エネルギーが直接に或は電離, 自由基等のエネルギー担体により間接に蛋白分子に移行することにより間接作用を説明している.

この際の酸素の役割を検討するに酸素の存在しない時は殆んど照射の効果が現れないこと, 及び照射により溶液中の酸素は著しく消費されることから照射による蛋白質の変性には "Radio oxydation[19]" なる現象が考えられる. これは自由基説[7][14][18]の云う如く, 酸素の存在によりOH基等の産生が増し, そのために間接作用が大となると考えるよりは照射により直接或は間接に放射線エネルギーが蛋白分子に与えられこの結果蛋白分子の反応性が増加し, 酸素等と結合し易くなる. この結合により変性が現れる. 然してその溶媒に酸素が存在しなければ励起された蛋白分子は速かに安定状態に戻り従つて変性は起らないと考えられる. 従つてこの際の酸素の役割は他動的なものと解される. 又溶液の酸素の存在は若林[19][20]の云う如く著者も亦放射線の二次的変化を強める要因の一つであると考える.

本実験においてエチールアルコールの如くそれ自身自由基乃至活性水と大なる反応性をもたず又SH基等をもたない物質がきわめて微量できわめて大なる保護効果を現わし1γ/cc の濃度で放射線間接作用は半減する.

この結果を低分子のパラアミノ安息香酸における高山[22], 中山[16]のデーターと比較して見るに間接作用を半減するに要するアルコール濃度はいづれもほぼ1γ/cc である. 今両者における放射線間接作用に対するアルコールの保護効果を検討す

るに，溶質分子1個に対し間接作用を半減するに要するアルコール分子数は，分子量 137のPABAでは3個，分子量 156.000の人γグロブリンでは34個と計算される．これによれば従来間接作用説で云われた自由基に対し，保護物質と溶質とが競合的に反応するとの考えだけからは本実験結果を説明しがたい．

以上論じたところより蛋白質水溶液における放射線作用の第一段階は放射線エネルギーが水に吸収され生じた遊離基がエネルギー担体となり蛋白分子にエネルギーを与え，これによつて該分子の物理化学的変化が起る．第二段階としてこの物理化学的状態変化を起した分子が不可逆的な状態（この場合化学的変性）に移行する，そしてこの段階の変化が存在する酸素により増強されるものと解するのが妥当であると考える．

結　論

人血清γグロブリン水溶液における放射線間接作用を検討し次の結果を得た．

1) γグロブリン水溶液においても明かに稀釈効果が認められる．

2) 照射によりγグロブリンの易動度は変化し，βグロブリン屑と，γグロブリン屑との間に一つの新しい峯を形成する．

3) この際酸素を除去して照射すれば変化は著しく減少する．

4) 酸素飽和の蛋白質溶液を照射するときは蛋白質の変性と共に溶液中の酸素は著しく減少する．

5) γグロブリン水溶液における間接作用にエチールアルコールは明かな保護効果を有する．

擱筆に臨み本研究に御指導を賜つた徳島大学河村教授並びに御校閲を賜つた札幌医科大学牟田教授に深甚の謝意を捧げる．

尚本研究の要旨は1955年第11回放射線医学会東北北海道地方会（仙台）及び第15回放射線医学会総会（東京）に於いて発表した．

本研究の一部は文部省科学研究費によつたことを附記し御礼申上げます．

文　献

1) 若林，河村：日医放誌，11，(9)，1 (1952). — 2) 河村：日医放誌，11，(10)，1 (1952). — 3) F. Dessauer: "Quantenbiologie" Berlin, Springer-Verlag, (1954). — 4) 若林，河村：日医放誌，13，(5)，329 (1953). — 5) M. Wakabayashi and F. Kawamura: Monogr. Res. Inst. Appl. Elec. 2, 11 (1951). — 6) J.J. Nickson: "Symposium on Radiology" New York: Wiley and Sons (1952). — 7) C.B. Allsopp: Brit. J. Radiol. 24, 413 (1951). — 8) C.H. Li: J. Am. Chem. Sci. 167, 1065 (1945). — 9) E. Brand: Ann. New York Acad. Sci. 57, 218 (1946). — 10) W. Grassmann and K. Hannig: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 290, 1 (1952). — 11) 小林：日本医事新報，No. 1562, 25 (1954). — 12) M. Mochizuki: Monogr. Res. Inst. Appl. Elec. 2, 39 (1951). — 13) L.E. Arnow: J. Biol. Chem. 120, 151(1937). — 14) D.E. Lea: "Actions of Radiations on Living Cells" 2nd. Ed. England, Cambridge University press (1955). — 15) H. Neurath: Chem. Rev. 34, 157 (1944). — 16) 中山：未発表．— 17) W.M. Dale: Biochem. J. 36, 80 (1942). — 18) E.S.G. Barron: Radiation Research, 1, 109 (1954). — 19) 若林：日本医事新報，No. 1579, 7 (1954). — 20) M. Wakabayashi and F. Kawamura: Monogr. Res. Inst. Appl. Elect. 5, 91 (1955). — 21) 渡辺：日医放誌，17，(11)，1275 (1957). — 22) 高山：日医放誌，16，(9)，936 (1955). — 23) 切替：北大応用電気研究所彙報，5，141 (1953).