

ポリペプチドの γ 線照射について

小倉 勲, 中村 勝一, 田中 浩史,
高橋 克彦, 小寄 誠, 木下 商策*,
山口 正雄**

Radiolysis of Polypeptide

Isao OGURA, Katsuichi NAKAMURA, Hiroshi TANAKA,
Katsuhiko TAKAHASHI, Makoto OZAKI, Shohsaku KINOSHITA
and Masao YAMAGUCHI

(Received September 18, 1981)

Almost the same results were obtained from the additional dipeptide, Gly-DL-Ala and DL-Ala-DL-Phe, by the γ -irradiation as previous report. Tri and tetrapeptide consisted of the same amino acid signified good stability than the others. Every polypeptide composed from sulfur contained amino acid exhaled the smell of hydrogen sulfide by the irradiation. It seemed that the stability by the difference of position of amino group in amino acid increased in order α , β , γ amino acid and that by the existence of hydroxyl group became smaller.

KEYWORDS

Di-, Tri-, Tetrapeptide, Aminobutyric acid, Hydroxyaminobutyric acid, Protein.

前報¹⁾においてグリシン, アラニンおよびそれらのジペプチドの数種について, pH³ の10² モル水溶液を⁶⁰Coの γ 線で10⁵, 10⁶ および10⁷ R 照射し, アミノ酸分析計でその変化の状況を観察した結果を報告した。グリシルジペプチドは照射線量が増加するとともにグリシンの検出量が増加したが, アラニルジペプチドにおいてはアラニンの検出量は線量の増加とともに減少した。放射線の照射によりアミノ酸の α 位の炭素に不対電子が局在するようになるため²⁾, この位置に結合する原子団が比較的容易に脱離するためと考えられる。

前回はかなり数の化合物が検出可能であるようにアミノ酸分析計が設定されていたが, 該当しない化合物

もかなり多くあったので, 今回は16種類のアミノ酸のみを設定し, 比較のため前報で報告した Gly-DL-Pheを含め, ジペプチドとして Gly-DL-Ala, Gly-DL-Met および DL-Ala-DL-Phe の4種を, トリペプチドとして Gly-Gly-Gly, DL-Leu-Gly-Gly, L-Ala-Gly-Gly およびグルタチオンを, さらにテトラペプチドとして Gly-Gly-Gly-Gly の pH₃, 10⁻² モル水溶液を前回同様 γ 線で照射した。これらのほかカゼイン, フィブロイン, α , β , γ -グロブリン, 血漿, 牛乳アルブミンのタンパク質と, アミノ基の結合位置の差による放射線分解の状況観察のため DL- α -アミノ-DL- β -アミノ- および DL- γ -アミノ-n-酪酸, さらにアミノ基が ϵ 位にあると ϵ -アミノ-n-カプロン酸の同様な水溶液の照射を行うとともに, アミノ酸分子中に存在するヒドロキシル基の影響をみるため, DL- α -アミノ- γ -, および γ -アミノ- β -ヒドロキシ酪酸の照射を行い, アミノ酸分析計でその変化の状況を観察した。

* 大阪府放射線中央研究所

** 和歌山県立医科大学

実験の部

1 試料 いずれも市販品を使用した。

Gly-DL-Phe, Gly-DL-Ala, DL-Ala-DL-Phe, Gly-Gly-Gly, DL-Leu-Gly-Gly, L-Ala-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, Glutathione, Casein, Fibrinogen, α , β , γ -Globulin, Serumalbumin, Lactalbumin, DL- α -Amino- γ -hydroxybutyric acid, γ -Amino- β -hydroxybutyric acid, DL- α -Amino-n-butyric acid, DL- β -Amino-n-butyric acid, DL- γ -Amino-n-butyric acid, ϵ -Amino-n-capric acid.

2 試料の調整 HCl で pH3 に調整した水に各試料を 10^{-2} モル濃度になるように溶解した。ただし、カゼインのみは完全に溶解せず、濁濁の状態にあったので濾過してそのまま照射用試料とした。

3 γ 線照射 試料を照射用共栓試験管（外径15、

長さ 150mm）に約80%入れ、 7.2×10^6 R/hr の線量率で ^{60}Co の γ 線を 10^5 , 10^6 および 10^7 R 照射した。タンパク質溶液はほとんど絮状沈殿を生じたが、照射試料はすべて遠心分離機（ $4,000 \text{ r/min} \times 5 \text{ min}$ ）にかけて分析用試料とした。

4 アミノ酸分析計 前報と同じ。

結果と考察

16種のアミノ酸の保持時間を分析計に設定したため、相当するアミノ酸の存在や生成が考えられないものも、保持時間が一致する物質については設定されたアミノ酸として取扱った。Table I に試料の入手が遅れて前報で報告できなかったジペプチド2種と、前報でも報告したが比較のため今回あらたに照射した Gly-DL-Phe の分析結果を示した。照射による変化の状況は前報とほぼ同様で、グリシルジペプチドで検出され

Table I γ -Irradiation of Some Dipeptide in pH 3 Solution

Name		tR	Gly-DL-Phe				Gly-DL-Ala				DL-Ala-DL-Phe			
Abb	Full	(min)	0	10^5	10^6	10^7	0	10^5	10^6	10^7	0	10^5	10^6	10^7 R
Asp	Aspartic acid	13.16						18.89	61.84					
Thr	Threonine	17.65		68.33	13.29						18.92		24.42	
Ser	Serine	19.05	19.00				30.48				11.70			
Glu	Glutamic acid	21.65	10.72							365.61	12.43			19.97
Gly	Glycine	37.25	88.83	145.16	146.00	160.87	12.39	12.21	54.79	153.34	17.39			7.97
Ala	Alanine	41.10	13.66	10.96				125.06	106.76	41.53	116.41	163.75	140.22	41.32
Val	Valine	54.44												
Cys	Cystine	61.80	52.01	23.38	85.86		39.54	37.79	46.51		39.20	65.77	124.59	166.04
Met	Methionine	64.14	208.94	120.11	169.75	483.72	2621.42	2621.42	2620.86	45.14	82.79	17.07	31.96	21.31
Ileu	Isoleucine	67.14						281.36	1212.89					
Leu	Leucine	69.58												
Tyr	Tyrosine	73.14		18.82					1907.26	70.09	24.84			
Phe	Phenylalanine	80.13	459.99	1411.70	193.40						307.63	235.07	327.41	
NH ₃	Ammonia	92.36	2621.43	2621.43	743.24	1750.71	18.90	134.43	572.89	2428.94	1551.47	2621.43	1321.73	824.98
Lys	Lysine	103.09	42.42	33.66	36.42	32.29	42.54	44.34	46.53	47.46	33.16	36.17	36.18	44.98
His	Histidine	108.29	127.36	199.74	475.06		148.03	102.37	49.98	104.25	110.27	129.86	433.10	
Arg	Arginine	125.58	40.09						38.65					

Table II 7- Irradiation of Tri and Tetrapeptide in pH 3 Solution

Name	Gly-Gly-Gly				DL-Leu-Gly-Gly				A _L -Ala-Gly-Gly				Gly-Gly-Gly-Gly				Glutathione				
	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷ R	
Asp					13.31			16.76		114.44	1274.29		2621.43				2621.43	2621.43	2621.43	2621.43	
Thr		143.01	129.37		10.88								2215.33	41.51	218.68	23.33	84.40	125.73			
Ser			34.61		35.94	12.15	38.41	39.20	33.25	25.71	113.95							2561.03	41.56		
Glu	22.11	18.12					92.61		12.94	57.21	375.31		150.61		190.64						
Gly	128.99	233.55	259.86	662.78	600.87	658.82	1096.11	2621.43	28.10	122.91	348.67	683.97		75.62	263.95	704.56		100.44			
Ala					10.04			22.17	1320.55	1224.33	629.99	79.57	23.03	130.29							
Val					6.85	37.85		11.09					121.58	2621.19	107.70	873.31				39.06	
Cys	136.11	147.77	936.00		48.95	26.95	206.33		2621.43	2621.43	2621.43	130.68	2394.99	2621.43	2621.43	2621.43		2621.43			
Met	2562.38	2621.43	2621.43		96.96	187.17	337.38	121.89					47.16		2564.61		22.89	375.07		123.47	
Ileu					26.50					507.12	2621.43			21.08		310.38	414.14		47.10	16.39	14.86
Leu					2621.43	2619.94	2621.43	17.99								222.51		40.36	16.47	22.26	
Tyr								27.68					70.29	55.71							50.31
Phe										22.32	122.48	93.35	22.35	251.15	1424.89	217.68					
NH ₂	27.49	182.73	1690.50	2621.43	56.56	97.18	520.90	1763.91	38.10	101.96	540.43	1882.91	972.56	58.87	170.94	2092.13	33.38	107.14	242.36	850.68	
Lys	46.32	39.56	53.37	62.22	9.70	12.17			10.90				21.52		9.88			9.88			
His	85.43	90.61	83.07	559.51	33.32	45.36	39.04	118.89	110.75	74.28	100.16	122.37	232.60	29.63	11.16	564.30	219.55	172.52	126.26	302.90	
Arg			87.02			16.26	57.30		20.97												

Table III γ-Irradiation of Some Aminobutyric and Some hydroxyaminobutyric Acids

Name	DL-α-Amino-n-butyric acid				DL-β-Amino-n-butyric acid				DL-γ-Amino-n-butyric acid				ε-Amino-n-capric acid				DL-α-Amino-γ-hydroxybutyric acid				γ-Amino-β-hydroxybutyric acid				
	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷ R	
Asp	18.63	83.56	310.96	287.64		39.84											262.39	1571.83	2621.43				19.70	25.30	
Thr		131.90	333.30	64.17													592.67	1102.19	20.61						
Ser		11.65					15.87			8.32	14.36	7.86	12.95		20.82		23.70	34.73	20.23	27.01	9.22	22.23	7.92	9.01	
Glu			180.24	573.71							96.35	178.72			19.82						11.39				
Gly	7.27			155.67			9.52			7.63		9.25	8.24			5.57	30.60	15.73			68.56	13.61	101.67	32.46	31.99
Ala	237.94	234.24	234.04	119.22		78.59	27.52	16.58						10.18			23.32	15.11	94.31	270.62					
Val	618.10			11.82																		26.43	14.13		
Cys	189.82	121.10	769.32	470.56	30.37	70.67	45.47	56.40		101.58	258.40	694.72	22.80	32.11	25.57	34.58	45.06	222.90	2621.43	137.22	307.13	215.34	125.33		
Met		52.55	702.55	12.26			16.18	25.47				11.94			33.77	16.82									
Ileu		123.24	923.44				112.28				47.67	58.74				17.62					2621.43	2621.43	49.31		
Leu										166.50	559.98	302.92									2621.43	2621.43	2621.43	592.33	
Tyr					32.66	284.36	69.45																44.74		
Phe	37.25									217.97	16.23	20.28		111.64	664.58	398.49		28.69							
NH ₂		2.86	209.13	1234.07	32.78	107.43	393.08	1512.83		6.89	90.63	1272.29	47.37	17.55	126.33	659.52	27.46	57.11	146.29	951.59	15.39	35.19	854.16	1867.12	
Lys							12.91				16.11			42.71		13.99					18.98	18.02	11.43		
His		12.79			16.34	132.32	146.39	40.69	79.93	161.78	102.78		2052.24	2621.43	2621.43	2619.68	86.96		147.73	703.64	18.25	193.27	75.15	25.57	
Arg							14.31																		

グリシンの量は線量の増加とともに増加し、アラニンペプチドで検出されたアラニンは線量の増加とともに減少した。

Table II にトリおよびテトラペプチドの結果を示した。トリおよびテトラペプチドにおいても、γ線の照射により解離生成するグリシンの量はジペプチドで観察したと同様、照射線量の増加とともに増加したが、他の構成アミノ酸の検出量はこれと逆の結果を示した。これは Gordy's⁹ や Drew's¹⁰ が示しているように、α位の炭素が容易にラジカルになる結果と考え

られ、前報の実験結果とも一致する。同種のアミノ酸を構成成分とするペプチド、Gly-Gly-Gly および Gly-Gly-Gly-Gly においては、解離したグリシンの量は異種のアミノ酸を含むものより少く、放射線照射に対して安定であるように見受けられる。アラニンあるいはロイシンを含むトリペプチドでは、ロイシンを構成成分とするトリペプチドの方がグリシンの生成量が多く、この結果からは複雑なアミノ酸分子が構成成分になっているペプチドが、より放射線の影響を受けるように思われる。含硫アミノ酸を含むグルタミンでは

Table IV b γ -Irradiation of Some Protein

Name	α -Globulin				β -Globulin				γ -Globulin			
	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷ R
Asp				9.32			9.45	9.45				39.26
Thr										6.91		12.63
Ser	10.09			12.93	204.95	18.92	29.74			8.83		15.24
Glu		60.61	45.45					20.47			15.74	30.89
Gly					10.81	17.04						
Ala	66.02				20.13					13.45	12.74	22.09
Val										12.54		
Cys	204.22			36.89	24.87	21.83	96.61	192.04	257.69	42.81	110.83	71.23
Met			83.40							6.86		19.25
Ileu								18.63				27.68
Leu	29.39		24.80					43.03		38.17	27.81	30.70
Tyr	88.43		68.49									40.95
Phe												
NH ₃				261.89			631.27	48.26	49.01	53.37	172.50	605.30
Lys	399.42	362.28	325.73		10.38			13.16	6.29	15.06	9.21	30.70
His	480.50	38.18	30.11	342.53	666.58	505.33	331.97	265.08	336.78	14.43	566.17	194.00
Arg												38.67

Table IV a γ -Irradiation of Some Protein

Name	Casein				Fibrinogen				Serumalbumin				Lactalbumin			
	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷ R
Asp						111.01	25.02	29.42			9.05			10.65	10.38	12.11
Thr					8.22	103.97	101.83			8.21						
Ser	6.41		11.77			61.48	164.25	40.25	8.51	12.93	9.04	14.71				5.89
Glu					8.97	185.20	151.81	27.36	17.80	11.47			29.86	26.04	8.09	
Gly						642.22	106.00	84.34	10.59	7.28	5.48	7.28				
Ala	15.32	9.00				72.97	227.98	116.44	14.70	21.83			8.46	6.95	8.64	
Val						35.98	50.87									
Cys	226.73	165.31	257.35	45.51	72.76	40.45	40.78	95.60	58.04	17.43	20.30	26.06	109.30	111.84	156.51	260.91
Met				12.38		36.26	8.06	8.06								
Ileu						14.83	22.83									
Leu	48.68	9.45				74.26	110.34			8.53						
Tyr						127.93	42.40									
Phe						962.95										
NH ₃		86.70	107.10	365.10	201.77	968.72	226.47	388.51		107.02	347.89	45.86	211.05	215.04	222.50	279.50
Lys	320.03	291.67	277.49	227.78	10.08	1036.56	254.53	13.89		10.38			6.87	7.31		
His	25.92	47.80	782.21	201.76	58.25	229.23	241.46	397.47	72.79	12.88	694.05	68.29	345.48	309.31	272.53	12.57
Arg						184.30	32.40									

10^5 R の照射で構成成分のシステインを多量に検出したが、 10^6 および 10^7 R では検出されなかった。照射用試験管の栓をあけるといずれも硫化水素臭が感じられたが、照射線量の大きいものほど強い臭を呈した。放射線の照射でポリペプチド鎖の α 炭素が最もラジカルになりやすいが、硫黄原子も不対電子が局在しやすく⁵⁾、一般に最も安定とされている。低線量でまず加水分解的にアミノ酸が解離し、さらに照射により不対電子の局在した硫黄に水素ラジカルが結合し、分解して硫化水素を生成するものと考えられる。

Table III にアミノ基の結合位置の相違および水酸基の存在による影響を知る目的で、種々のアミノ酪酸およびヒドロキシアミノ酸の照射結果を示した。Name の欄にアミノ酸名が書かれているが、これは分析計にアミノ酸の保持時間を設定しているためで、アンモニアの生成量で変化の程度を検討した。不対電子の局在位置の点からアミノ基が α 、 β 、 γ ……と遠ざけるにしたがって安定になり、水酸基の存在はある程度アミノ基の解離を抑えるように見受けられた。

Table IV a および b に試料としたタンパク質の照射結果を示した。カゼインは 10^5 では僅かに、 10^6 および 10^7 R でかなり強いニンニク様の臭気が、 α -グロブリンは 10^7 R 照射試料に僅かの刺激臭が、 γ -グロブリンは 10^6 および 10^7 R 照射で硫化水素臭が、血清アルブミンでは 10^6 および 10^7 R の照射試料に若干の刺激臭が認められた。血清および牛乳アルブミ

ンは絮状沈殿の生成が少なかったが、その他の試料は照射によりかなりの沈殿を生じ、とくに γ -グロブリンが多量で、黄白色を呈した。一般に分子の大きいタンパク質は β 、 γ トリあるいはテトラペプチドなどよりは安定で、分解生成物の量も少なかった。これは照射によって試験管内の温度がかなり上昇するため、タンパク質の凝固がさき起きて分解が困難になるのが一つの原因であるかも知れない。

謝辞 多数の試料の分析をしていただいた本学農学部の大西俊夫助教授に深謝する。

参考文献

- 1) 小倉 勲, 高橋克彦, 中村勝一, 田中浩史, 木下商策, 山口正雄, 近畿大学原子力研究所年報 **17**, 13 (1980).
- 2) J. Schmidt, D. C. Borg, Radiat. Res., **46**, 361 (1971).
- 3) W. Gordy, H. Shields, Radiat. Res., **9**, 611 (1958).
- 4) R. C. Drew, W. Gordy, Radiat. Res., **18**, 552 (1963).
- 5) F. Patten, W. Gordy, Radiat. Res., **14**, 573 (1961).