

ジペプチドの γ 線照射について

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

Radiolysis of Dipeptide

Isao OGURA, Katsuhiko TAKAHASHI,
Katsuichi NAKAMURA, Hiroshi TANAKA,
Shohsaku KINOSHITA*, Masao YAMAGUCHI**

(Received November 11, 1980)

As a preliminary experiment, DL-Ala-DL-Ileu was irradiated with ^{60}Co γ -ray at 10^{-3} and 10^{-5} mole solution adjusted in pH 3, distilled water (ca. 5.1) and 11 to 10^5 , 10^6 and 10^7 R. The irradiated pH 3 solution had a few peaks and it, excepted a solid material produced by the irradiation, immediately could be examined with amino acid analyser. Since the peaks obtained by the irradiation of 10^{-3} mole solution came out to a pretty small shape on the analyser, 10^{-5} mole solutions were used for the coming irradiation. Decreasing ratio of used amino acid and increasing ratio of generated ammonia by γ -irradiation of glycine and alanine were observed almost the same. Urea, produced by the irradiation of Gly-dipeptide, found out on the 10^7 R irradiated samples, in Ala-dipeptide it was recognized even to low dose irradiated samples.

KEYWORDS

DL-Ala-DL-Ileu, γ -Ray, Amino acid analyser, Ammonia, Gly-dipeptide, Ala-dipeptide

アミノ酸、ペプチドあるいはタンパク質の放射線分解については、多数の論文が発表されている。古くは X線によるグリシンおよびアラニンの照射がよく研究されている。Dale ら¹⁾あるいは Sein ら²⁾はグリシンの水溶液を X線で照射し、その生成物より変化の中間過程を論じているが、式化するまでには至らなかった。その後 Weeks ら³⁾あるいは Maxwell ら⁴⁾はグリシンの希薄水溶液を X線で照射して、水素、過酸化水素、アンモニア、二酸化炭素、ホルムアルデヒド、ギ酸、メチルアミン、酢酸、グリオキサル酸、アスパラギン酸および α 、 β -ジアミノコハク酸の生成を確認し、空気溶存水溶液と空気を除いた水溶液では若干相違するが、それらの変化の過程を式化している。Hochanadel ら⁵⁾は放射線の照射実験を 10^4 MeV の

範囲まで試み、X線、 γ 線および電子線による照射では、被照射物質は本質的には同じ変化をし、それらの性質およびその濃度によって相違が生ずるに過ぎないと報告している。Draganic⁶⁾は pH の相違でグリシン水溶液では異なった結果を得ており、Ikeda⁷⁾はグリシン-銅化合物の生成から、 γ 線による脱アミノ反応を調べている。その後 ESR スペクトルを利用して、アミノ酸、アミノ酸誘導体あるいはタンパク質の放射線照射による変化の検討⁸⁾がかなり多くなされて

いる。
アミノ酸分子に含まれる各種結合の結合エネルギーは $10^0 \sim 10^4$ eV 程度で、 ^{60}Co の γ 線の一つの量子のもつエネルギー (2×10^6 eV) では特定の結合のみが切断されるとは考えられず、生成混合物がかなり複雑になるとは予想されたが、筆者らはアミノ酸分析計を利用して、 γ 線の照射で巨大なエネルギーをジペプチドに与え、その結果どの程度、どのような分解をし、高

* 大阪府放射線中央研究所

** 和歌山県立医科大学

等動物の体内存在は危険視されるアンモニアがどの程度生成するかなどの検討の目的をもって、グリシルおよびアラニルジペプチドの各数種について γ 線照射実験を行なった。予備試験として Gly-DL-Ileu の 10^{-2} および 10^{-3} モル pH 3, 蒸留水および pH 11 の水溶液の照射を行なったが、 10^{-3} モル溶液ではピークが小さく且少なかつたので、以後はすべて 10^{-2} モル溶液にし、ピークが比較的少なく、そのまま分析計にかけられる pH 3 の水溶液で照射を行なった。さらに比較のため、グリシンおよび DL-アラニンの pH 3 水溶液の γ 線照射も行なった。

実験の部

1 ジペプチド グリシルジペプチドとして Gly-DL-norVal, Gly-DL-Ileu, Gly-DL-nor Leu, Gly-DL-Phe および Gly-DL-Met, アラニルジペプチドとして DL-Ala-Gly, DL-Ala-DL-Met, DL-Ala-DL-norVol, DL-Ala-DL-Ser および DL-Ala-DL-Asp の入手可能な市販品を使用した。グリシンおよびアラニンも市販品を使用した。

2 試料の調整 予備試験用の Gly-DL-Ileu は HCl で pH 3, NaOH で pH 11 に調整した水および蒸留水の溶液を用いた。その他の試料には HCl で pH 3 に調整した水を使用した。

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, 予備試験の Gly-DL-Ileu では 8.4×10^6 R/hr の線量率, その他の試料については 7.2×10^6 R/hr の線量率で, ^{60}Co の γ 線で 10^6 , 10^6 および 10^7 R 照射した。Gly-DL-Met, Gly-DL-Phe および DL-Ala-DL-Met では絮状沈殿が生じたが, 照射試料はすべて遠心分離器(4000 r/min \times 5 min)にかけて分析用試料とした。

4 アミノ酸分析計 835型日立高速アミノ酸分析計 カラム 2.6×150 mm(2.6×250), 樹脂 日立 No. 2619, 分析サイクル156min(240), Buffer 流速0.225 ml/min (0.275), ニンヒドリン 流速 0.25ml/min (0.3), カラム圧力 80~130 kg/cm 2 (130~220), Buffer 切替4段(5段), カラム温度35~70 $^{\circ}$ C 4段(36~68, 5段)

結果と考察

γ 線照射によって種々の化合物の生成が予想されるが, アミノ酸分析計による検討では, アミノ酸以外の

物質は, その保持時間に相当するアミノ酸のピークとして検知された。なお, 分析結果より市販の数種の試料には, アミノ酸以外の物質がかなりの種類また数量存在した。予備的に照射した Gly-DL-Ileu の pH 3, 蒸留水 (pH 約 5.1) および pH 11 の水溶液での分析結果を Table I に示した。 10^{-3} モル溶液ではピークが小さく, また数も少なかつたので, 以後の照射にはすべて 10^{-2} モル水溶液で照射した。pH 11 の溶液には多数のピークが存在し, その中には試料中に存在しない管の S あるいは P を含むアミノ酸に相当する保持時間のピークも多数認められた。ただし, Table には分析計にセットされた化合物名をそのまま記入した。なお, 2600以上の値を示したピークはすべてスケールオーバーしたものである。pH 3 の水溶液はピークの数比較的少なく, 且つ固型物などを除けばそのままアミノ酸分析計で検討することが可能なため, 以後の試料はすべて pH 3 の水溶液で照射した。

本実験においてはグリシンおよびアラニンのジペプチドを使用したので, グリシンおよびアラニンの両アミノ酸についても, 全く同じ条件で γ 線照射を行なった。その結果を Table II に示した。この場合, 10^6 R の照射で変化した量を基準にすると, グリシンもアラニンも略同じ程度, すなわちグリシンでは $1(10^6): 4.47(10^6): 12.54(10^7\text{R})$, アラニンにおいては $1(10^6): 4.36(10^6): 12.24(10^7\text{R})$ の割合でアミノ酸が減少した。また, アンモニアの検出量も, 前者は $1(10^6): 5.53(10^6): 19.26(10^7\text{R})$, 後者は $1(10^6): 5.39(10^6): 19.89(10^7\text{R})$ と略同じ増加を示した。アラニンにおいては, メチル基の解離で生ずるグリシンがいずれの照射試料にも存在し, 生じたグリシンは, グリシン自身の水溶液を照射した時と略同じ傾向で減少した。偶然の一致かも知れないが, 面白い結果が得られた。

Table III にグリシルジペプチド, Table IV にアラニルジペプチドの照射した試料の分析結果を示した。この中の2600以上の値は, 前述のようにスケールオーバーした場合の値であり, 定性的な意味しかもたない。一般的には, ジペプチドは水溶液での γ 線照射により一部はその成分アミノ酸に分解し, その分解の程度, すなわちグリシンおよびアラニンの生成量は, 個々のアミノ酸の γ 線照射による分解量の補正を行えば, 線量にしたがって増加していった。また, 生体の有害物質であるアンモニアの生成も, かなりの量が測定された。

Table III の試料 Gly-DL-Ala では, ジペプチドと

Table I γ -Irradiation of Gly-DL-Ileu in Various pH Solution (in ng/0.5 μ l, 10⁻²M Soln.)

Name		tR (min)	pH 3				distil.H ₂ O(ca.pH5.1)				pH 11			
Abb	Full		O	⁵ 10	⁶ 10	⁷ 10R	O	⁵ 10	⁶ 10	⁷ 10R	O	⁵ 10	⁶ 10	⁷ 10R
P-Ser	Phosphoserine	5.18	54.08	61.62	67.20	58.35	53.96	60.88	594.45	205.66	34.25	43.88	533.63	203.29
Tau	Taurine	6.85												
PEA	Phosphoethanolamine	7.44						156.64	49.45		21.59	41.25	17.25	
Urea	Urea	10.58				33.23		25.47	36.67			79.60	35.97	
Asp	Aspartic acid	18.65										14.65	13.41	
Thr	Threonine	25.72												
Ser	Serine	27.66	21.28	23.95	27.12		16.01			14.64	11.15	9.76	16.43	
Glu	Glutamic acid	32.97												
Sar	Sarcoine	40.30												
α AAA	α -Amino adipic acid	44.88												
Gly	Glycine	54.98	9.79	55.78	142.01	151.28	12.38	22.39	42.99	48.71	19.28	29.59	16.00	10.09
Ala	Alanine	61.16												
Cit	Citrulline	64.37												
α ABA	α -Amino-n-butyric acid	70.90												
Val	Valine	80.84												
Cys	Cystine	88.70					199.94							
Met	Methionine	90.77					95.94				187.62			
Cysthi	Cystathionine	92.41		42.93								36.26		
Ileu	Isoleucine	95.66		38.47			18.79				21.85			
Leu	Leucine	98.04								15.15	23.09	19.29		
Tyr	Tyrosine	100.98												
Phe	Phenylalanine	109.97												
β Ala	β -Alanine	116.58		70.19	45.90								37.95	
β AIBA	β -Aminoisobutyric acid	121.69												
γ ABA	γ -Amino-n-butyric acid	132.69												
EtOHNH	Ethanolamine	137.50		24.25	119.47	13.42		269.13			65.23	40.90		
NH ₃	Ammonia	143.14	88.78	23.79	133.86	390.86	121.29	70.38	287.39	413.98	48.53	67.54	301.13	407.27
Hyls	Hydroxylisine	148.32		181.48	418.67			57.63						
Orn	Ornithine	158.48	69.97	42.89	55.47	70.81	57.92	43.37	11.89	62.63	78.71	116.10	83.93	93.49
Lys	Lysine	165.98											18.83	
1-MeHis	1-Methylhistidine	168.54		33.69				181.56						
His	Histidine	170.93					50.49				25.79			
3-MeHis	3-Methylhistidine	179.49												
Ans	Anserine	181.78	2621.43	1854.38	1911.35	2621.43	2044.79	1694.56	1804.18	2269.56	2621.43	1342.85	1724.16	2621.43
Car	Carnosine	183.72						320.77					377.60	
Arg	Arginine	198.86												

小倉他：ジペプチドの γ 線照射について

Table II γ -Irradiation of Glycine and Alanine in pH 3 Solution (in nMol/50 μ l)

Name	Gly				Ala			
	0	5 10	6 10	7 10R	0	5 10	6 10	7 10R
P-Ser								
Tau								
PEA								
Urea								
Asp		0.258					1.656	
Thr		0.252	0.161			0.554	0.401	0.131
Ser								
Glu		0.167						
Sar								
α -AAA								
Gly	210.985	206.740	192.020	157.740		3.105	1.650	1.426
Ala					284.155	273.670	238.467	155.705
Cit								
α -ABA								
Val		0.339	0.360					
Cys	0.158					0.785	4.664	0.149
Met							0.066	
Cysthi								
Ileu								
Leu		0.182						
Tyr								
Phe								
β -Ala								
β -AIBA								
γ -ABA								
EtOHNH								
NH ₃	4.442	11.022	40.798	131.195	3.149	10.014	40.171	139.698
Hyls								
Orn								
Lys						0.071		
1-Mehis								
His	0.067					0.071		
3-Mehis								
Ans								
Car								
Arg								

Table III γ -Irradiation of Gly-dipeptide in pH 3 Solution (in Table III and IV, Solid line shown the place of tR of each dipeptide. t : noncounted peak)

Name	Gly-DL-norVal				Gly-DL-Ileu				Gly-DL-norLeu				Gly-DL-Phe				Gly-DL-Met			
	O	5 10	6 10	7 10R	O	5 10	6 10	7 10R	O	5 10	6 10	7 10R	O	5 10	6 10	7 10R	O	5 10	6 10	7 10R
P-Ser	20.79	24.70	25.13	2621.43	59.66	30.35	24.81	2621.48	16.81	14.69	40.47	2621.43	t	11.54	33.14	542.50	945.99	1160.58	1175.05	1083.43
Tau															59.74				102.43	
PEA													t	8.80	47.74		94.55		66.38	86.28
Urea				2621.43				2620.25				2621.43			t	681.87			t	1187.77
Asp																				
Thr																				
Ser	10.00				48.23	14.09	13.96		7.50	12.96					t			8.97	9.07	
Glu						t														
Sar																				
α -AAA															9.89		45.30	108.35	248.17	
Gly	12.91	14.04	28.39	78.67	22.52	27.52	38.96	126.87	16.44	41.84	56.22	129.29	119.70	139.14	126.52	242.19	59.98	59.61	71.92	77.49
Alu																	532.23	1004.84	1732.29	904.69
Cit			263.72						t											
α -ABA							69.19			t								40.47	179.90	301.94
Val																		83.65	90.22	157.55
Cys	5.36			t	16.06	453.59	648.53		251.43	180.45				t	t		211.93	739.97	484.90	
Met		37.26	124.24	141.97	4.48	180.80	166.10		342.43	198.23	62.61		111.64	89.39			208.86	199.86	115.79	158.37
Cysthi	t	t	10.12		12.19	944.13	75.40	71.94		t	t	t	415.83	339.78	636.48		121.82	110.92	171.65	93.22
Ileu			77.06		18.84	59.30	104.83	130.85	t	29.29	89.18	t		t	98.81					15.97
Leu						71.52	204.62				11.81				9.73				112.22	t
Tyr		151.17	602.55			684.07	164.57		234.73	2025.21			t	t	15.01	t	27.64	831.57	2621.35	2621.35
Phe						1754.05	361.71		17.71	12.80			731.38	594.83	500.81					
β -Ala	————— (t R 114.0)				32.08	441.49	212.50	42.74	t	130.61	331.15	t		t	t		————— (t R 112.3)			
β -AIBA			599.78					307.09				t		t	t					92.02
γ -ABA					————— (t R 119.5)				————— (t R 131.7)											
EtOHNH																				
NH ₃	33.09	24.91	216.53	1123.06	54.76	90.69	663.22	1117.72	173.89	230.71	683.41	967.02	163.01	254.41	448.67	2299.57	36.50	74.85	236.11	783.26
Hlys													————— (t R 142.5)							
Orn	37.18	126.00	1050.28	144.32	79.32	22.46	665.60	95.07	37.04	54.64	315.59	711.81	28.71	t	2329.78	t	61.99	142.37	486.72	767.65
Lys		121.93	540.12				360.42				563.61			t					271.37	353.14
1-MeHis															t					
His							327.33				t	20.44								
3-MeHis																				
Ans																				
Car																				
Arg																				

小倉他：ジペプチドの γ 線照射について

Table IV γ -Irradiation of Ala-dipeptide in pH 3 Solution

Name	DL-Ala-Gly				DL-Ala-DL-Met				DL-Ala-DL-norVal				DL-Ala-DL-Ser				DL-Ala-DL-Asp				
	O	5 10	6 10	7 10 R	O	5 10	6 10	7 10 R	O	5 10	6 10	7 10 R	O	5 10	6 10	7 10 R	O	5 10	6 10	7 10 R	
P-Ser	8.74	42.22	103.19	2621. ₄₃	7.59	44.39	64.21	621.99	17.28	55.06	26.50	2621. ₁₆	6.14	47.57	47.10	1041. ₀₁	t	158.37	335.21	2621. ₂₇	
Tau	3.94		114.67	189.51		19.89	43.43	65.16							65.84	338.63		54.91	404.74	755.07	
PEA	14.80	161.53	205.29	375.81	2.89	3.09	91.19	228.10	t	14.51	50.36	725.55	10.76	54.56	134.81	123.01		50.44	205.53		
Urea		123.37	284.50	2621. ₄₀			t	367.60				2621. ₄₃	139.08	334.03	1072. ₄₃			465.88	2621. ₄₈	1628. ₄₅	
Asp	t	27.92	40.51	41.60											122.74		239.80	14.80	4.89	137.70	
Thr																					
Ser	23.76	41.95	213.45	13.08	12.04	10.76							402.57	320.63	717.64	48.93	31.92		199.83	24.47	
Glu		22.30	52.28														223.52	31.46	221.29		
Sar		104.55	215.51								t	12.29									
α AAA						537.12	1174. ₁₈	1019. ₇₅										9.54	201.13	363.76	29.56
Gly	55.10	62.23	121.99	161.76									12.25				1.48	t	t	1212. ₁₇	
Ala	547.19	497.83	496.68	239.19	16.42	15.97	16.42	51.85	7.93	151.19	117.24	8.91					49.93	103.21	206.79	100.16	
Cit													2621. ₂₆	2578. ₉₂	2621. ₄₃	53.83	28.40		585.70		
α ABA						16.50	73.78	t					t	(t R 63.6)				(t R 65.8)			
Val						t	118.10	114.26													
Cys		(t R 87.8)		470.72	t	15.80	52.09	140.56	112.14	68.07	275.20	t	22.06	69.05	585.66	256.93				65.65	
Met	2621. ₄₃	2621. ₄₃	2621. ₄₃	320.48	50.26	56.69	102.39	120.96	t	45.05	172.67	70.87	38.01	53.73	277.85	371.93	66.76	23.18	214.16	115.79	
Cysthi					54.75	53.60	48.35	216.72	248.99	402.88	904.85	t	t	23.49	198.76	147.21		158.49	54.89	27.84	
Ileu	55.07	48.21	22.97					129.33			170.06	t		22.85	534.54	63.40			493.43	24.45	
Leu						241.59	2621. ₄₃	2621. ₄₃			734.59	t			138.27	33.97	26.83		10.64		
Tyr		144.65	1006. ₅₈	138.04				260.69						109.34	863.33	t					
Phe					2621. ₄₃	2621. ₁₀	2616. ₄₄	1000. ₅₁						99.68	272.60	t					
β Ala					(t R 109.51)	t	98.51	59.83	2621. ₄₃	2621. ₄₃	1422. ₇₅	945.51		11.52	252.66	112.88	t	25.41			
β AIBA									214.21	t	(t R 111.0)			18.52	471.91	293.13			56.40		
γ ABA					189.36	113.10	42.47	384.18							14.73				t	42.00	
EtOHNH			42.58	56.78		26.79	52.90	115.16			122.46	11.86		26.13	156.96	198.05		45.74	168.25	71.03	
NH ₃	45.74	65.76	184.70	2621. ₄₃	63.18	35.78	89.85	571.30	11.36	49.27	101.04	1132. ₉₁	150.30	15.93	186.47	2621. ₄₃	t	517.55	1416. ₇₅	2621. ₄₃	
HLys																					
Orn	222.00	46.30	30.61	7.77	52.80	263.80	701.07	1058. ₇₁	75.10	299.60	2067. ₂₉	48.62	82.30	57.92	20.07	602.36	334.91	50.12	60.29	55.02	
Lys			19.22														60.61				
1-MeHis																					
His																					
3-MeHis																					
Ans																					
Car																					
Arg																					

アンモニアのピークが略同じ位置に現われたので、アンモニアの定量的計測は不可能であった。これらの検出量の間には、グリシンおよびアラニンの照射で見られたような一定の変化の関係は見出せなかった。これはジペプチドおよび解離したアミノ酸の分解の度合の差もある程度関与するものと推測される。ジペプチドの照射線量とアンモニアの生成量の関係を Fig. 1 に示した。

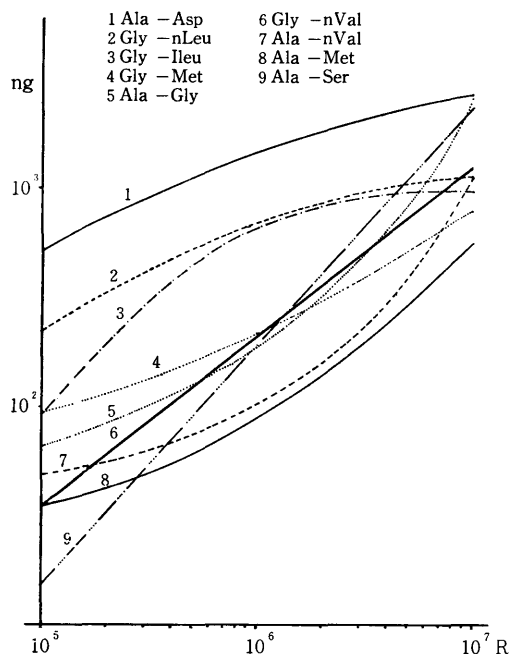


Fig. 1 Quantity of NH_3 generated by γ -Irradiation

また、試料の水溶液は γ 線の照射でかなり温度が上昇するので、測定されたアンモニアの量も実際に生成した量と相違すると思われる。それで、この量よりG値を計算して10~75の値を得たが、表示するのは控えた。

グリシンジペプチドでは照射線量の増加とともにグリシンの量は増加しているが、Table IV に示された結果では、構成アミノ酸のアラニンの量は逐次減少している。これも前述の推測と同様と考えられるが、DL-Ala-DL-nor Valにおいても解離したアラニンの量は減少している。試験した試料の数が少ないので決定的なことは云えないが、メチン基（不斉炭素原子）に直結する原子あるいは原子団の結合が、 γ 線による巨大エネルギーで解離され易くなるためではなかろうか。尿素の生成はグリシンジペプチドでは 10^7R を照

射してはじめて認められたが、アラニンジペプチドでは、勿論線量が多くなる程その量は多いが、低線量の照射でもその生成が認められた。尿素の生成はペプチド結合が切れずにその他の部分が分解することを意味し、その部分がアラニンのメチン炭素-カルボニル炭素結合と考えれば、上記の実験結果と合致する。

以上のほかに、グリシンジペプチドでは Gly-DL-Phe が他の試料よりピークの数が少なく、尿素の生成量も他に較べてかなり低い値を示した。メチオン含有ジペプチドは照射でその溶液が微黄色を示し、開栓の際かなり強い硫化水素臭を呈した。DL-Ala-Gly および DL-Ala-DL-nor Val の結果が示すように、解離したアラニンの量は照射線量の増加とともに減少するが、DL-Ala-Gly ではグリシンの量が照射線量とともに増加している。このことから、上記と同じようにメチン基をもつアラニンが、グリシンよりかなり放射線分解され易い傾向にあるものと推測される。

謝辞 多数の試料のアミノ酸分析を引受けていただいた本学農学部大西俊夫助教授に深謝する。

参考文献

- 1) W. M. Dale, J. D. Davies, C. W. Gilbert, *Biochem. J.*, **45**, 93 (1949)
- 2) G. Stein, J. Weiss, *J. Chem. Soc.*, **1949**, 3256
- 3) B. M. Weeks, W. M. Garrison, *Radiation Res.*, **9**, 291 (1958)
- 4) C. D. Maxwell, D. C. Peterson, W. C. White, *Radiation Res.*, **2**, 431 (1955)
- 5) C. J. Hohanadel, S. C. Lind, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **7**, 83 (1956)
- 6) I. Draganic, *J. Chem. Phys.*, **56**, 9 (1959), *Nucleonics*, **21**, 33 (1963)
- 7) T. Ikeda, *Rep. Fac. Sci. Shizuoka Univ.*, **1**, 13 (1965)
- 8) P. R. Crippa, R. A. Tederchi, A. Vedi, *Int. J. Radiat. Biol.*, **25**, 497 (1974)