卵白リゾチーム水溶液に対する γ 線照射の影響

久米民和*, 佐藤 泰, 梅本弥一郎

(名古屋大学農学部)

昭和 48 年 4 月 9 日 受理

Effect of γ -Irradiation on Egg White Lysozyme in Aqueous Solution

By Tamikazu KUME,* Yasushi SATO and Yaichiro UMEMOTO

Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya

The effect of γ -irradiation on 0.3% lysozyme solution at pH 8.0 was studied as the fundamentals of the radiation preservation of egg white.

The inactivation curve of lysozyme in aqueous solution was exponential and the value of D_{87} , the dose required to reduce the enzymatic activity to 37% of its initial value, was 0.35 Mrad. Enzymatic activity of lysozyme in egg white was slightly affected by irradiation. Thus it seemed that lysozyme might be protected from the influence of irradiation because of high concentration of protein in egg white.

Irradiated lysozyme was subjected to Sephadex G-75 column chromatography. Area of the earlier fraction was increased with the increase of irradiation doses. The fraction had no enzymatic activity and the molecular weight estimated from elution volume was about 70,000.

Ethanol had a protective effect which paralleled to their rates of reaction with OH radicals; this indicates that OH radical is primarily responsible for inactivation and aggregation of lysozyme.

(Received April 9, 1973)

* Present address: Japan Atomic Energy Research Institute, Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Takasaki

緒 言

鶏卵の殺菌を目的として卵白に γ 線を照射すると、種々の変化がおこることが知られており⁽¹⁾, これらの変化には卵白構成タンパク質の変化が関与しているものと考えられる。数種の卵白構成タンパク質のうち、リゾチームは卵白の粘調な性状に関係するなど、卵白の新鮮な状態に密接な関係をもつタンパク質であり、また立体構造や活性部位が解明されている酵素タンパク質である⁽²⁾。

リゾチームに対する放射線の影響に関する研究は、これまでに固体状態、水溶液状態で数多く行なわれている。固体状態で照射した場合、Stevens ら⁽³⁻⁵⁾ は約 30 Mrad の照射ではアミノ酸組成にほとんど変化なく、4~5 量体の重合物が形成され、失活分子の 10~20% は

* 現在、日本原子力研究所・高崎研究所。

主に S-S 結合の損傷によると考えられると報告しており、Friedberg⁽⁶⁾ も主鎖の開裂なく、重合がおこることを報告している。また White⁽⁷⁾ は、secondary-free-radical が N-末端、C-末端および活性に關与する疎水部分に多く認められると報告している。水溶液状態では、失活に關して Brustad⁽⁸⁾ は指数関数的、Gorin ら⁽⁹⁾ は直線的、Shalek ら⁽¹⁰⁾ は直線的でも指数関数的でもないと報告しており、さらに検討することが必要である。また、リゾチームの照射による失活は pH 中性付近で最小であり、主として OH ラジカルによると報告されている⁽¹¹⁾。以上のように、リゾチームに対する放射線の影響はかなり解明されているが、まだ完全に解明されるにはいたっていない。とくに水溶液中での変化については、酵素活性の変化以外の研究はあまり行なわれておらず、また卵白を照射したときのリゾチームの変化についても

検討されていない。

したがって本研究では、鶏卵への放射線利用を図るための基礎として、なるべく卵白中に近い条件でリゾチーム溶液に γ 線を照射したときの諸性質の変化を検討し、同時に卵白を照射したときの諸性質の変化についても検討を加えた。

実験方法

1. 照射用試料溶液の調製 結晶リゾチームは新鮮卵より直接晶化法⁽¹³⁾によって調製し、再結晶化を3回繰り返して精製し、透析を行なった後、凍結乾燥した。この乾燥物を濃度 0.3% となるように蒸留水に溶解し、希 NaOH で pH 8.0 に調整した溶液をリゾチーム溶液とし、照射実験に供した。

新鮮卵の卵白のみを均質化したものを卵白原液とし、蒸留水で希釈して生じた不溶物を濾別した溶液を希釈卵白溶液とし、照射実験に供した。

2. 照射条件 各試料溶液を大気中で封管し、氷水中にて⁶⁰Co- γ 線(線源 4000 Ci)を 0.1~1.0 Mrad 照射した。用いた線量率は 6.9×10^4 rad/hr であった。また必要に応じ、 N_2 置換あるいは空気を通じながら、同条件で照射を行なった。

3. 酵素活性測定 各試料溶液を照射後 30 分以内に蒸留水で希釈して、Shugar の方法⁽¹³⁾に準じて測定した。すなわち 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.2) に懸濁した *M. lysodeikticus* 基質懸濁液を 37°C に保持し、酵素溶液を加え、540 m μ における吸光度の変化より酵素活性を求めた。

4. でんぷんゲル電気泳動⁽¹⁴⁾ トリス-クエン酸緩衝液 (pH 8.65) にでんぷんを加熱溶解し、脱気してでんぷんゲルを作製し、ホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH 8.8) を用い、ゲル断面積 1 cm² あたり 3~5 mA の電流を通じて 8 時間泳動後、ニグロシンにて染色した。

5. 超遠心沈降分析 照射前または照射後のリゾチーム溶液について、スピスコ E 型超遠心機を用い、20°C, 59,780 rpm で沈降実験を行ない、得られた結果から $s_{20,w}$ を計算した。

6. ゲル濾過 Sephadex G-75 カラム (1.8 $\times$ 80 cm) に照射前または照射後のリゾチームを吸着させ、1% ギ酸溶液で溶出し、280 m μ の吸光度を測定した。溶出速度は 15 ml/hr とした。

7. 重合部分のアミノ酸分析 ゲル濾過により分離

した重合部分を 6N HCl に溶解し、封管して 105~110°C で 22 時間酸加水分解を行ない、Beckman Amino Acid Analyser Model 120 B を用いて分析した。

8. 非タンパク態窒素 (NPN) の定量 照射前あるいは照射後のリゾチーム溶液 5 ml に対し、4% トリクロル酢酸溶液 25 ml を加え、生じた沈殿を濾別して非タンパク質区分を得、そのなかの窒素量を微量定量法⁽¹⁵⁾で定量して、非タンパク態窒素量とした。

9. 重合部分の還元カルボキシメチル化 ゲル濾過により分離した 1 Mrad の重合部分を凍結乾燥し、Canfield らが用いた方法⁽¹⁶⁾で還元カルボキシメチル化して凍結乾燥した。

実験結果

1. 酵素活性の変化

0.3% 水溶液を照射したときの線量に対する残存酵素活性は Fig. 1 に示したとおりであり、ほぼ指数関数的に失活していた。また、このときの D_{37} 線量 (残存酵素活性を 37% にするのに必要な線量) は約 0.35 Mrad であった。また N_2 置換および通気しながら照射したときの失活曲線も、ほぼ同様の結果を示した。

リゾチーム濃度を 0.1% から 10% までかえて照射した場合の失活曲線を同時に Fig. 1 に示した。どの濃度でもほぼ指数関数的に失活しており、濃度が高い場合には失活しにくくなっていた。

また卵白原液および 10 倍、30 倍、50 倍希釈卵白溶液を照射したときのリゾチームの残存酵素活性を Fig. 2 に示した。原液を照射した場合のリゾチームの失活は非常にわずかであり、卵白濃度が低くなるにしたがってリ

Fig. 1. Inactivation of Lysozyme Irradiated at Various Concentrations.

△—△ 10%, ▲—▲ 1.0%,
○—○ 0.3%, ●—● 0.1%.

ゾチームの失活は著しくなった。また原液および希釈卵白溶液中においては、0.1Mrad 以上の線量領域でリゾチームは指数関数的に失活したが、0.1Mrad までの失活率は 0.1Mrad 以上のそれより大きく、リゾチーム単独の溶液の場合と比較すると、多少異なる失活曲線を示した。

2. 重合変化

0.3% リゾチーム溶液を照射したとき

のでんぷんゲル電気泳動図は Fig. 3 に示したとおりであり、線量が増加するにしたがって泳動しにくくなり、1.0Mrad ではすべて原点付近にとどまっていた。また、 N_2 置換および通気しながら照射した場合も、同様の結果を示した。

また、卵白原液を照射したときの泳動図を Fig. 4 に

Fig. 2. Inactivation of Lysozyme in Various Dilute Egg White with Irradiation.

○—○ $\times 1$, ●—● $\times 10$,
△—△ $\times 30$, ▲—▲ $\times 50$.

Fig. 3. Starch-gel Electrophoretic Patterns of Irradiated Lysozyme.

Electrophoresis was carried out for about 8 hr.

Fig. 4. Starch-gel Electrophoretic Patterns of Irradiated Egg White.

Electrophoresis was carried out for about 8 hr.

示した。この結果、1.0Mrad の照射で卵白中のすべてのタンパク質が変化していることが認められ、リゾチームもわずかではあるが泳動しにくくなる傾向を示した。

大気中で封管したリゾチーム溶液を 0.5 および 1.0 Mrad 照射して、超遠心沈降分析を行なったときの沈降定数は Table I に示したとおりであり、照射により沈降定数が増大する傾向が認められた。

また Sephadex G-75 を用いてゲル濾過を行なった結

Table I. Sedimentation Constant of Irradiated Lysozyme

	$S_{20,W}$
Control	2.1
0.5Mrad	3.3
1.0Mrad	5.2

59,780rpm, 20°C.

Fig. 5. Chromatography of Irradiated Lysozyme.

Samples were applied to a 1.8×80 cm column of Sephadex G-75 in 1% formic acid. Flow rate 15ml/hr.

○—○ control, ●—● 0.5Mrad,
△—△ 1.0Mrad.

Table II. The Amino Acid Composition of Irradiated Lysozyme Aggregates and Non-protein Nitrogen Contents in Irradiated Lysozyme Solution

Amino acid	Content*		
	Control	0.5Mrad	1.0Mrad
Lysine	6.3	6.6	6.8
Histidine	0.8	0.8	0.8
Arginine	12.7	11.1	10.8
Aspartic acid	21.5	—	21.5
Threonine	7.5	7.5	9.5
Serine	9.5	9.8	9.5
Glutamic acid	4.7	4.5	4.8
Glycine	12.4	12.1	12.3
Alanine	11.9	11.6	12.1
Methionine	1.9	1.9	1.6
Isoleucine	6.3	6.3	6.2
Leucine	8.6	8.4	7.9
Tyrosine	3.0	3.0	2.6
Phenylalanine	3.0	3.0	2.6
Non-protein nitrogen**	0.07	0.22	0.41

* Values were shown as residues/molecule.

** Non-protein nitrogen were shown as mg/100 mg protein.

Fig. 6. Chromatography of Carboxymethylated Aggregates of Irradiated Lysozyme.

Chromatographic conditions were described in Fig. 5. Carboxymethylation was performed according to the method of Canfield.

果を Fig. 5 に示した。線量が増すにしたがって早く溶出する部分, すなわち分子量が増大していると考えられる部分が多くなった。また遅く溶出する部分のみが活性を有し, 早く溶出する部分は失活していた。この早く溶出する部分の分子量を, Sephadex G-75 および G-200

Fig. 7. Ultraviolet Absorption Spectra of Irradiated Lysozyme.

— control, ---- 0.5Mrad,
- · - 1.0Mrad.

を用いた溶出速度より求めたところ, 約 70,000 であった。

また, この重合部分の amino 酸分析を行なった結果を Table II に示した。同時に, 照射溶液中の非タンパク態窒素量も示した。この結果, 重合部分の amino 酸組成は非照射のものとは比べて, ほとんど変化が認められなかった。また照射溶液中の非タンパク態窒素量は, 非照射のものと比較して増大する傾向を示したが, これはタンパク質量に対してわずかな量であった。

ゲル濾過により分離した重合部分を還元カルボキシメチル化して, 再度同様に Sephadex G-75 を用いてゲル濾過を行なった結果, Fig. 6 に示したように重合部分が還元カルボキシメチル化することによって, わずかではあるがテーリングをおこすことが認められた。

3. 紫外部吸収変化

リゾチーム溶液を照射すると紫外部吸収スペクトルに変化が認められ (Fig. 7), 照射により紫外部全域で吸光度が増加すること, および 275, 290 mμ の肩の部分がはっきりしなくなる傾向が認められた。また, このときの非照射溶液に対する照射溶液の紫外部における差スペクトルを測定した結果を Fig. 8 に示した。この場合も

Fig. 8. Ultraviolet Difference Spectra of Irradiated Lysozyme.

Unirradiated lysozyme was used as the reference.

— 0.5 Mrad, --- 1.0 Mrad.

Fig. 9. Effect of Radical Scavengers on the Inactivation of Irradiated Lysozyme.

○—○ 1M EtOH, ●—● 10^{-2} M EtOH,
△—△ 10^{-3} M EtOH, ▲—▲ N_2O saturated.

紫外部全域で吸光度の増大が認められ、また 296, 287, 250 mμ のピークが照射線量の増大とともに大きくなる傾向が認められた。

4. ラジカル種の検討

水溶液中でのリゾチームの変化は、主として水の放射線分解により生じたラジカルの間接作用によるものと考えられる。一般に中性付近の pH では、OH ラジカル、 e_{aq}^- および H_2O_2 が主に生成しており、 H_2O_2 は酵素の失活には関与していないであろうと考えられている。したがって、ここでは OH ラジカルおよび e_{aq}^- の関与の検討を行なった。OH ラジカルの捕捉剤 (scavenger) であるエタノールの濃度を 1, 10^{-2} , 10^{-3} M としたリゾチーム溶液を照射したときの活性変化を Fig. 9 に示した。また、 e_{aq}^- の捕捉剤である N_2O 置換して照射したときの活性変化も同時に示した。この結果、エタノール濃度が高くなるにしたがってリゾチームの失活が減少し、エタノールによる保護効果が認められた。しかし N_2O 置換して照射した場合には、失活が促進される傾向が認めら

Fig. 10. Chromatography of Irradiated Lysozyme in the Presence of Various Radical Scavengers.

Chromatographic conditions were described in Fig. 5.

○—○ 1M EtOH, ●—● 10^{-2} M EtOH,
△—△ 10^{-3} M EtOH, ▲—▲ N_2O saturated.

れた。またこれらの溶液を用いて Sephadex G-75 によるゲル濾過を行なった結果を Fig. 10 に示した。活性変化の場合と同様に、エタノール濃度が高くなるにしたがって早く溶出する部分が減少し、エタノール添加により重合も抑制される傾向が認められたが、 N_2O 置換して照射した場合には、早く溶出する部分がさらに多くなっており、重合も促進される傾向を示した。

考 察

リゾチームの失活に関しては、異なる結果がこれまでに報告されているが、本実験で用いた濃度 0.3%, pH 8.0 という条件下では、ほぼ指数関数的に失活した。また照射中に酸素が存在すると、リゾチームの失活は多少保護されると報告されている^(11,17) が、本実験では N_2 置換および通気しながら照射した場合も空气中で封管して照射した場合と同様の結果を示し、酸素効果は認められなかった。Aldrich ら⁽¹⁸⁾ の報告によると pH 8 付近では N_2 中、 O_2 中の照射効果がほとんど同じになる結果が示されており、本実験では pH 8.0 という条件を用いたため、酸素効果が認められなかったものと考えられる。

卵白中でのリゾチームの失活は、単独溶液に比べて非

常にわずかであったが、卵白の希釈度とともに失活が増大したこと (Fig. 2) や、高濃度のリゾチーム溶液を照射した場合には失活しにくくなったこと (Fig. 1) などから、卵白中では主としてタンパク質濃度が高い (約 10%) ため、リゾチームが保護されていたものと考えられる。また卵白中での失活曲線が異なることや、卵白中の糖タンパク質が特に影響を受けやすいこと⁽¹⁹⁾ などから、他のタンパク質による特別の保護効果もあり得るであろう。

ゲル濾過をかねた電気泳動法であるでんぶんゲル電気泳動で泳動しにくくなったこと (Fig. 3)、超遠心沈降定数が増大したこと (Table II)、ゲル濾過により早く溶出する部分が増大したこと (Fig. 5) より、リゾチームは照射により重合することは明らかであろう。また溶出速度より求めた分子量は約 70,000 であり、5 量体程度の重合物が生成したと考えられる。

タンパク質の重合の原因としては、i) タンパク質分子間の S-S 結合形成、ii) 巨大分子遊離基が結合する結果 C-C 結合形成による架橋、iii) 分子崩壊による分子断片間に新しい水素結合が形成される、などが考えられている⁽²⁰⁾。しかし、重合部分のアミノ酸組成にはほとんど変化が認められなかったことや、ゲル濾過で分子量の減少した成分は認められなかったことなどから、主鎖の開裂は 1.0 Mrad までの照射ではおこっていないと考えられるので、iii) の可能性は少ない。また、還元カルボキシメチル化が完全にできたかどうかの確認は行っていないが、Fig. 6 に示したように重合部分を還元カルボキシメチル化してゲル濾過を行なうと、多少テーリングを示したことより、重合部分の分子量が一部減少したことも考えられるが、非常にわずかな量であり、i) の可能性はあるが主たる反応ではないと考えられる。Henriksen⁽²¹⁾ は乾燥状態でリゾチームを照射すると、 α 炭素およびイオウ原子にラジカルが生成すると報告しており、また水溶液中でペプタイドを照射すると α 炭素にラジカルができ、分子間に C-C 結合が形成され 2 量体を作りやすいという報告⁽²²⁾ もあり、ii) による反応は十分考えられる。Aldrich ら⁽¹⁸⁾ は、希薄溶液で重合がおこり 2~3 量体ができると報告しているが、本実験ではかれらの実験より高濃度の 0.3% 溶液を用いたため、重合がさらに促進されたものと考えられる。また Stevens ら⁽⁸⁻⁶⁾ は、乾燥状態で照射した場合 4~5 量体の重合物が生じ、この重合の 10~20% は S-S 結合の損傷によると報告して

おり、乾燥状態と水溶液状態での重合は異なっていることも考えられ、今後さらに検討することが必要である。

照射したリゾチーム溶液が、Fig. 7 に示したように紫外部全域で増大した原因は、主として重合によるものと考えられるが、紫外吸収スペクトルおよび差スペクトルが変化したことより、リゾチームの芳香族アミノ酸が変化していることが考えられる。リゾチームの活性基であるトリプトファン残基が、溶媒に接していた状態から接し得ない状態に変化したときのスペクトルは 293, 285, 270 m μ にピークを持ち⁽²³⁾、Fig. 8 に示した差スペクトル (296, 287 m μ にピーク) と非常に類似していることや、 β -oxindoxylalanine が最大吸収を示す 250 m μ の吸収が増大したことなどから、リゾチーム中のトリプトファン残基が変化していることが推測される。トリプトファンの状態識別試薬⁽²⁴⁾ である過酸化水素-ジオキサンを、照射したリゾチーム溶液に加えると沈殿が生じるために、トリプトファンが変化しているかどうかの確認はできなかったが、照射によるリゾチームの失活は、トリプトファンが変化することによるという報告⁽²⁵⁾ もあり、照射リゾチームの失活にトリプトファンの変化が関与しているのは確かであろう。

OH ラジカル捕捉剤であるエタノール中で照射すると、失活および重合が減少したこと (Fig. 9, Fig. 10)、および他の OH ラジカル捕捉剤である臭化カリウム、パラアミノ安息香酸を用いた場合にも同様の結果が得られたことから、リゾチームの水溶液中での失活および重合は、主として OH ラジカルによるものと考えられる。また、 e_{aq}^- 捕捉剤である N_2O ガス置換して照射した場合の失活および重合はむしろ促進されたが、これは N_2O は e_{aq}^- との反応速度が速く、次のように反応した結果 OH ラジカルが生成し⁽²⁶⁾、この OH ラジカルによりリゾチームの変化が促進されたものと考えられ、これは Aldrich らの結果と一致した。

したがってリゾチームは濃度 0.3%, pH 8.0 の水溶液の状態では 1.0 Mrad まで照射すると、主として OH ラジカルにより失活および 5 量体程度の重合がおこる。失活と重合のどちらが優先するか、あるいは同時におこるかは明らかでなく、今後検討することが必要である。また卵白中ではリゾチームは照射の影響から保護されていることが認められたが、多少の変化はあり、この変化が他の卵白構成物質の変化同様、卵白の放射線による品質

劣化に関与していると考えられる。

要 約

濃度 0.3%, pH 8.0 の卵白リゾチーム水溶液に γ 線を照射したときの諸性質の変化について実験を行ない、次の結果を得た。

(1) リゾチーム活性はほぼ指数関数的に減少し、 D_{87} 線量は約 0.35 Mrad であった。

(2) 1.0 Mrad までの線量では、主鎖の開裂はなく重合していることが認められ、重合物は失活していた。またゲル濾過による溶出速度より求めた重合物の分子量は約 70,000 であり、5 量体程度に重合していると考えられた。

(3) 紫外部における吸収の変化より、芳香族アミノ酸の変化が推測された。

(4) エタノールを添加して照射すると失活および重合が保護されたことより、主として OH ラジカルにより失活・重合するものと考えられた。

(5) 卵白中でのリゾチームの照射による変化は保護されており、これは主として卵白のタンパク濃度が高いことによると考えられた。

本研究の大要は、第 6 回日本食品照射研究協議会大会 (1970 年 11 月) において口頭で発表した。

- (1) わが国における食品照射の現状と問題点, 科学技術庁, 1966, p. 96.
- (2) 浜口浩三: 蛋白質 核酸 酵素, **13**, 98 (1968).
- (3) C. O. Stevens, B. M. Tolbert and F. E. Reese: *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 423 (1963).
- (4) C. O. Stevens, L. E. Henderson and B. M. Tolbert: *ibid.*, **107**, 367 (1964).

- (5) C. O. Stevens, H. E. Sauberich and G. R. Bergstrom: *J. Biol. Chem.*, **242**, 1821 (1967).
- (6) F. Friedberg: *Radiation Res.*, **38**, 34 (1969).
- (7) F. H. White, Jr.: *ibid.*, **36**, 470 (1968).
- (8) T. Brustad: *ibid.*, **22**, 421 (1964).
- (9) G. Gorin, L. Papapavlou and L. W. Tai: *Int. J. Radiat. Biol.*, **15**, 33 (1969).
- (10) R. J. Shalek and C. E. Smith: *ibid.*, **14**, 9 (1968).
- (11) T. Brustad: *Radiation Res.*, **27**, 456 (1966).
- (12) 赤堀四郎, 水島三一郎: 蛋白質化学, 第 2 巻, 共立出版, 1964, p. 86.
- (13) D. Shugar: *Biochem. Biophys. Acta*, **8**, 302 (1952).
- (14) 本間運隆: 家畜繁殖誌, **9**, 139 (1964).
- (15) "Manometric Techniques," ed. by W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer, Burgess Publishing Company, U. S. A., 1957, p. 238.
- (16) R. E. Canfield and C. B. Anfinsen: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2684 (1963).
- (17) J. V. Davies, M. Ebert and R. J. Shalek: *Int. J. Radiat. Biol.*, **14**, 19 (1968).
- (18) J. E. Aldrich and R. B. Cundall: *ibid.*, **16**, 343 (1969).
- (19) 佐藤 泰, 梅本弥一郎, 久米民和: 食品照射, **4**, 42 (1969).
- (20) 本城市次郎, 崔 英哲: 基礎放射線生物学, 南江堂, 1966, p. 73.
- (21) T. Henriksen: *Radiation Res. Supple.*, **7**, 87 (1967).
- (22) W. M. Garrison: *ibid.*, **4**, 158 (1964).
- (23) 船津 勝: 蛋白質 核酸 酵素, **13**, 105 (1968).
- (24) 栗原堅三, 堀西宥夫, 柴田和雄: 蛋白質 核酸 酵素, **10**, 483 (1965).
- (25) G. E. Adams *et al.*: *Int. J. Radiat. Biol.*, **16**, 333 (1969).
- (26) J. H. Baxendale: *Radiation Res. Supple.*, **4**, 114 (1964).