

放射線照射による卵白リゾチームの変化

田中 正仁・原 慎一郎  
(九州農業試験場)

Masahito TANAKA and Shinichiro HARA :  
Effect of Gamma Ray Radiation on Some Properties of Egg White Lysozyme

畜産物由来の動物性タンパク質に $\gamma$ 線を照射して、新たな構造や機能を有する新素材を開発し、畜産物の新規需要を開拓する試みはほとんどなされていない。そこで、タンパク質分子の構造および機能改変に要する $\gamma$ 線の強度や実際の照射による具体的な変化について調べる目的で、卵白リゾチームに $\gamma$ 線を照射したときの分子量、分光特性やタンパク質分解酵素感受性などの変化について検討した。

1. 材料および方法

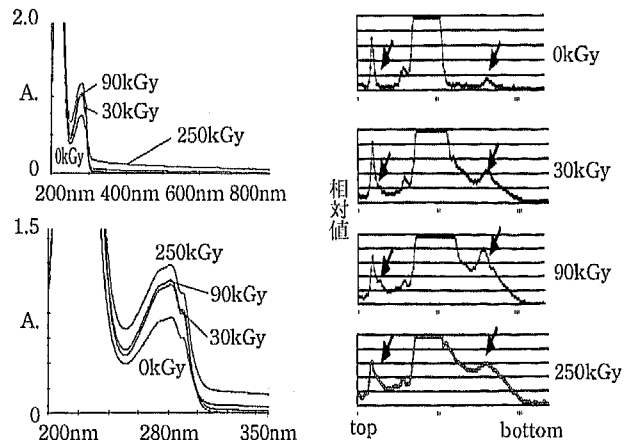
卵白リゾチームの粉末にそれぞれ0, 30, 90, 250kGyの強度で $\gamma$ 線を照射した。おのおのの照射済みサンプルを150mMのリン酸緩衝液pH7.0に2.0mg/mlとなるように混合・攪拌し200-800nmの吸光スペクトルを観察した。また、SDS-PAGEを行い、照射前後の分子量変化を調べた。さらに、各 $\gamma$ 線照射リゾチームのV8プロテアーゼおよびProteinase Kに対する感受性の違いを検討した。すなわち、一定量の各 $\gamma$ 線照射リゾチーム溶液にV8プロテアーゼあるいはProteinase Kを単独で一定時間作用させた後、各タンパク質分解酵素を失活させSDS-PAGEを行い、分解・消化による分子量の変化を調べた。

2. 結果および考察

卵白リゾチームは白色の粉末結晶であるが、 $\gamma$ 線の照射によってわずかに褐変した。その褐変の程度は $\gamma$ 線の照射強度が高くなるにつれて大きくなった。しかし、照射終了直後の各リゾチームの温度は通常環境下においてタンパク質が褐変するほど上昇はしていなかったため、この褐変は過度の温度上昇によるものではないと思われる。各照射サンプルを150mMのリン酸緩衝液pH7.0に2.0mg/mlとなるように混合したときの溶解性にも変化がみられ、未照射のリゾチームが完全に溶解したのに対して30kGy照射のリゾチームでは不溶性の微粉末が溶液中に確認され、90kGy照射リゾチームでは溶液全体が白濁した。さらに、250kGyの照射サンプルでは白濁に加えて繊維状の不溶物が観察された。これらの各リゾチーム溶液に対して波長200-800nmの吸光スペクトルをとったところ、320-800nmに顕著な吸収帯は観察されなかった(第1図)。また、芳香族アミノ酸の吸収波長である280nm付近では不溶性物質によるわずかな吸光度差がみられたが、全体の波形には変化がみられなかった(第1図)。溶解性低下の原因として、 $\gamma$ 線照射によるリゾチーム分子表面の親水性側鎖が変性するようなランダムな構造変化が起こっている可能性が考えられるが、今回はその変化を分光学的にとらえることはできなかった。各リゾチームのSDS-PAGE像では $\gamma$ 線照射によってリゾチーム固有の分子量である14.3kDaよりも高分子の領域のバンド強度が増加するとともに低分

子領域のバンド強度も増加した。そして、その程度は照射した $\gamma$ 線の強度によく対応していた(第2図)。また、不溶性の画分は主要なリゾチームのバンド以外の低分子および高分子成分で主に構成されていた。グルタミン酸およびアスパラギン酸のC端側を選択的に切断するStaphylococcus aureus V8由来のタンパク質分解酵素V8プロテアーゼを22℃、2時間作用させ、それぞれの $\gamma$ 線照射リゾチームのV8感受性を検討したところ、リゾチーム本体のバンドがややブロードになり低分子領域に新たなスミア状のバンドが確認されたが、各照射リゾチームと未照射リゾチームとの間に顕著な差はみられなかった。さらに、N置換型、疎水性アミノ酸のC端を切断するTritirachium album由来のタンパク質分解酵素であるProteinase Kを22℃、2時間反応させて、各 $\gamma$ 線照射リゾチームの感受性を比較した。未照射リゾチームはリゾチーム本体のバンドが消失し、5kDa以下のところに明確なバンドが出現した。このバンドは $\gamma$ 線の照射強度が増加するにつれて微弱化していった。すなわち、 $\gamma$ 線照射によってProteinase Kによるペプチドの切断が進行したことを示している。未照射のリゾチームはV8プロテアーゼよりもProteinase Kへの感受性が高かった。また、Proteinase K感受性の変化から、 $\gamma$ 線の照射によって疎水性アミノ酸近傍の構造のゆるみ、あるいは露出が増大している可能性が考えられ、V8プロテアーゼに対しては感受性に変化がみられなかったことからグルタミン酸やアスパラギン酸近傍では大きな構造の変化がなかったと考えられる。

今回の結果は物質としての卵白リゾチームに強度の $\gamma$ 線を照射することによって性質が変化することを示しており、今後 $\gamma$ 線照射産物について有用な生物活性等を検索することで、これまでになかった新たな畜産物素材を開発できる可能性を示唆している。



第1図  $\gamma$ 線照射した卵白リゾチームの分光特性 第2図  $\gamma$ 線照射した卵白リゾチームのSDS-PAGE像