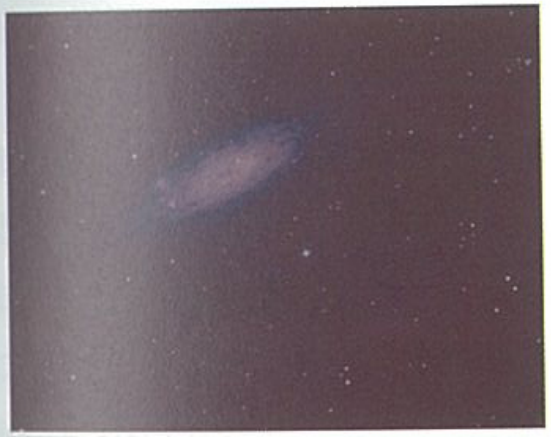
放射線照射による蛋白質への影響

藤井　紀子

京都大学原子炉実験所
放射線生命科学研究部門

*自然界の放射線



宇宙からの放射線
0.38ミリシーベルト／年

大地からの放射線
0.46ミリシーベルト／年

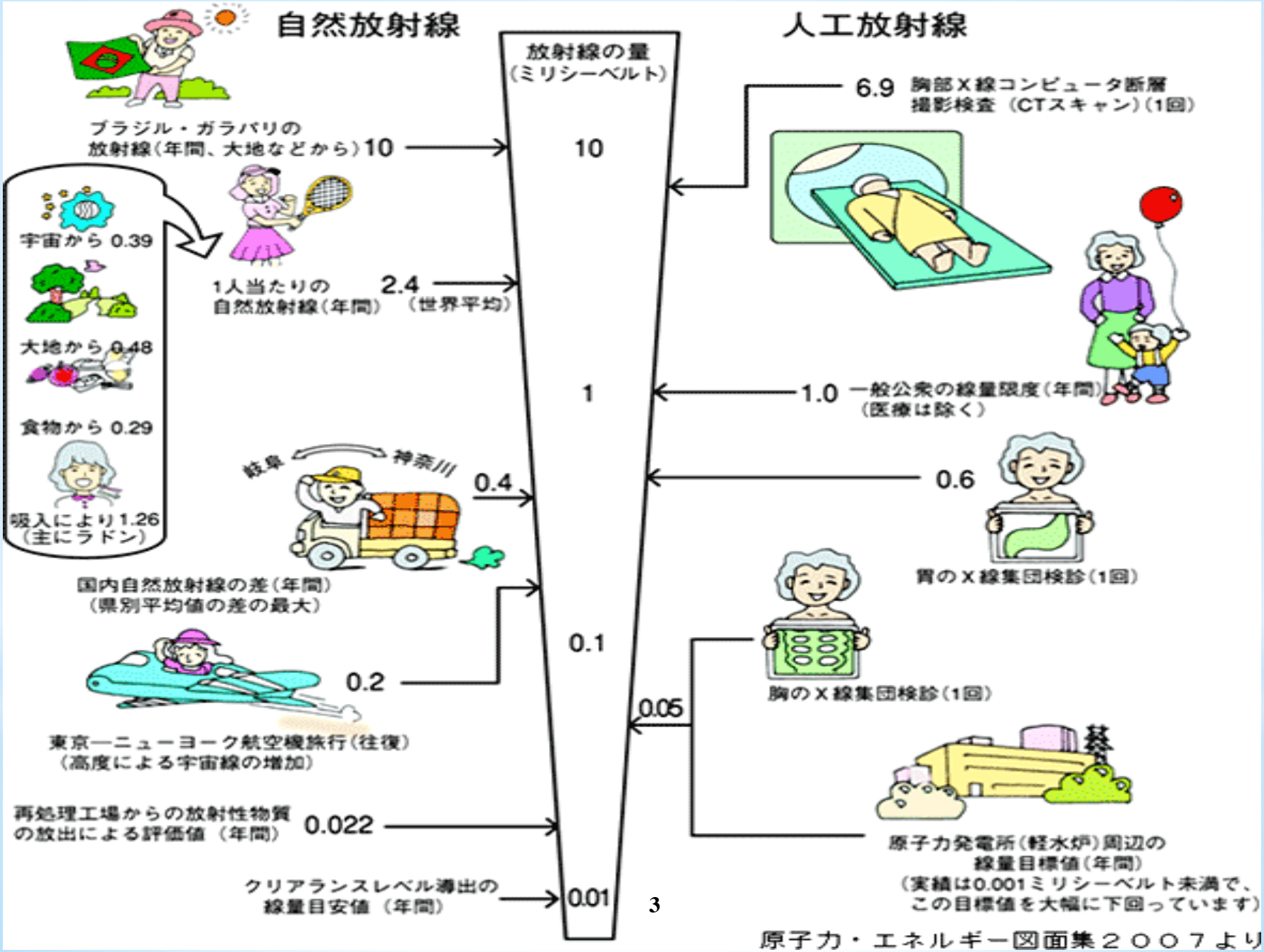
科学技術庁が決めた
年間許容量は50mSv

自然界の放射線合計
年間約2.4ミリシーベルト

空気中のラドンなどからの
放射線
1.3ミリシーベルト／年

食物からの放射線
0.24ミリシーベルト／年

（「放射線化学のすすめ」学会出版センターより）


自然放射線
人工放射線
放射線の量
（ミリシーベルト）
ブラジル・ガラパリの
放射線（年間、大地などから）10
10
宇宙から 0.39
大地から 0.48
食物から 0.29
吸入により1.26
（主にラドン）
1人当たりの
自然放射線（年間）
2.4
（世界平均）
6.9 胸部X線コンピュータ断層
撮影検査（CTスキャン）（1回）
1
1.0 一般公衆の線量限度（年間）
（医療は除く）
岐阜
神奈川
0.4
0.6
胃のX線集団検診（1回）
国内自然放射線の差（年間）
（県別平均値の差の最大）
0.1
0.2
東京―ニューヨーク航空機旅行（往復）
（高度による宇宙線の増加）
0.05
胸のX線集団検診（1回）
再処理工場からの放射性物質
の放出による評価値（年間）
0.022
原子力発電所（軽水炉）周辺の
線量目標値（年間）
（実績は0.001ミリシーベルト未満で、
この目標値を大幅に下回っています）
クリアランスレベル導出の
線量目安値（年間）
0.01
原子力・エネルギー図面集２００７より

放射線による生物影響

身体的影響

急性症状　：　皮膚の紅斑、脱毛など

晩発症状：　白血病、ガン、白内障など

遺伝的影響
代謝異常　軟骨異常など。

急性症状は 0.25Sv 以下では臨床上現れないが、3Sv 以上になると皮膚の紅斑、脱毛が起こり、 7Sv を越すと大多数の人が死亡する。

放射線量別の人体への影響

高線量放射線

致　死　的 100 Sv　即死

～100 Sv　がんの放射線治療を行うときの局所的な照射

50 Sv　（局部照射）壊死

10 Sv　（全身照射）1～2週間でほとんど死亡、（局部照射）紅斑

重　　症 5 Sv　白内障

4 Sv　吐き気、半数が死亡する

軽　　症 3 Sv　発熱・感染・出血・脱毛・子宮が不妊になる

2 Sv　倦怠・疲労感、白血球数低下、睾丸が不妊になる

1 Sv(1,000mSv)　吐き気などの「放射線病」（死亡率は低い）低線量放射線

250 mSv　胎児の奇形発生（妊娠 14 日～18 日）

～ 200 mSv　（これ以下の被ばくでは放射線障害の臨床的知見、無）

50 mSv　原子力施設で働く人たちへの基準（年間）

10 mSv　ガラバリ（ブラジル）の人が年間に受ける自然の放射線量

0.6 mSv　1 回の胃の X 線診断で受ける量

自 然 放 射 線

4.4 mSv（医療機関も含めて）日本人が 1 年間に受ける平均の放射線量

2.4 mSv　1 年間に自然から受ける平均の放射線量

1.0 mSv　原子力施設の公衆への基準（年間）

0.2 mSv　成田・ニューヨーク間の国際線航空機片道飛行で宇宙線からあびる量

（1Sv = 1,000mSv）

（出典：https://www.atomin.go.jp/reference/radiation/body/index05.html#introduction

宇宙ステーションでの被曝予想

宇宙放射線の量は、地表からの高度とともに大気層が無くなること、荷電粒子を散乱させる地磁気が弱くなるため、急激に増加する。

国際宇宙ステーションは、高度約400km、軌道傾斜角51.6度で飛行：

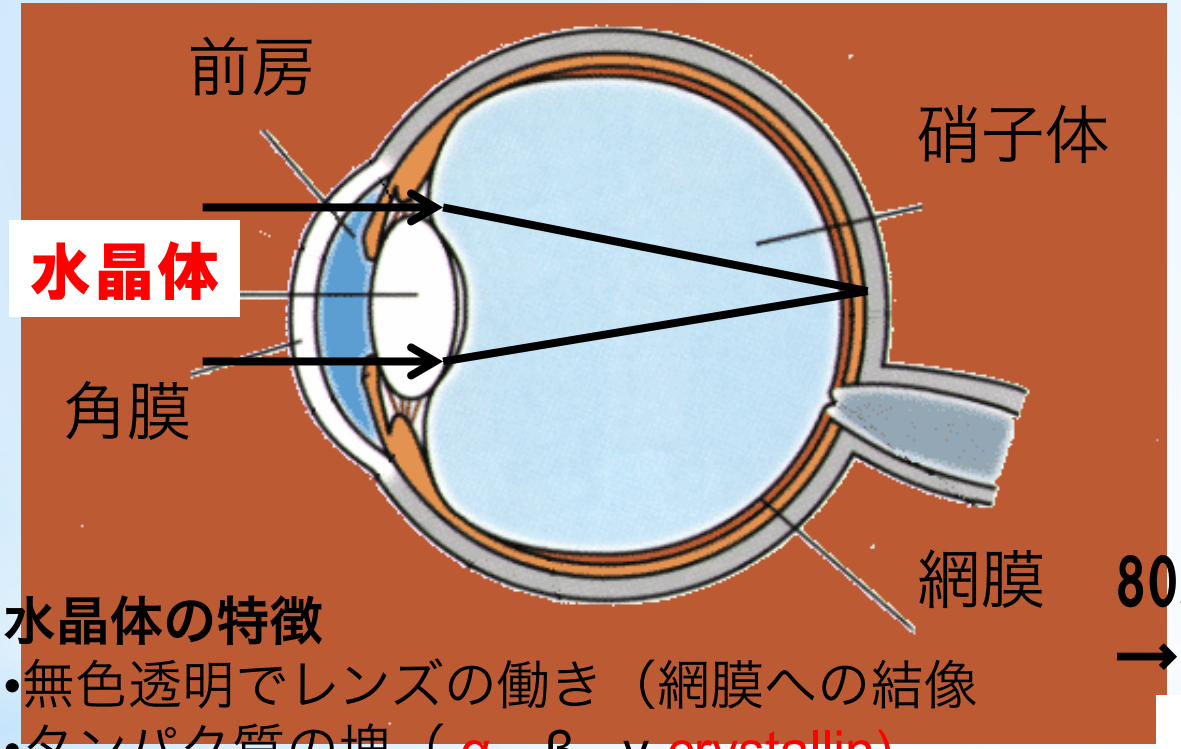
被曝：低LET放射線（γ線や高エネルギー陽子など）
　　高LET放射線（α線、重粒子線、中性子線など）

国際宇宙ステーションの内部の被曝量は、1日
　　あたり約1mSvと概算されている（地表の約1,000倍）
（放射線作業従事者の被曝限度：年間50mSv以下）

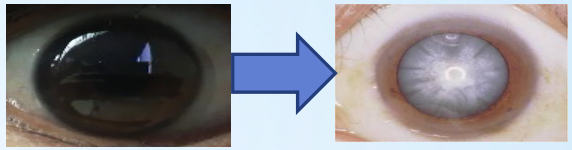
眼の水晶体は、放射線感受性が最も高い組織の一つで、検出可能な水晶体変化は、0.2～0.5Gyで認められる。

調査対象	白内障のタイプ	しきい線量	信頼区間
原爆被ばく者（急性被ばく）	皮質白内障	0.6Sv	90%:0～1.2Sv
	後嚢下白内障	0.7Sv	90%:0～2.8Sv
チェルノブイリ（急性被ばく）	病期Ⅰ－Ⅴ	0.50Gy	95%:0.17～0.65Gy
事故処理作業員（分割照射/放射線誘発以外長期被ばく）	病期Ⅰ	0.34Gy	95%:0.19～0.68Gy
	の病期Ⅰの白内障	0.50Gy	95%:0.17～0.69Gy
	病期Ⅰ表面皮質白内障	0.34Gy	95%:0.18～0.51Gy
	病期Ⅰの後嚢下白内障	0.35Gy	95%:0.19～0.66Gy

*白内障とは？水晶体が濁る疾患

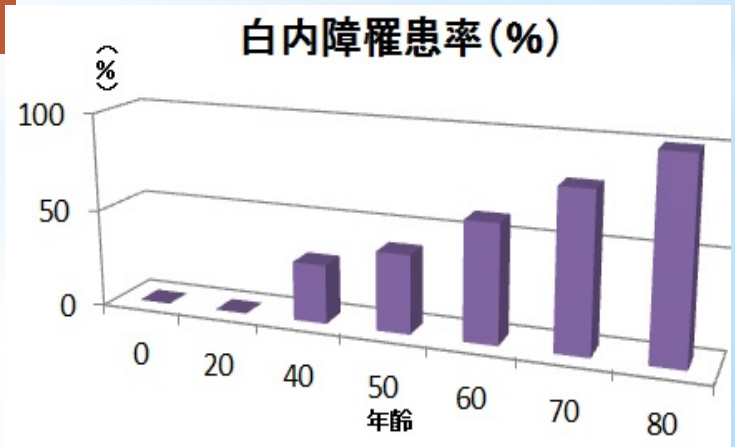


白内障



リスクファクター
加齢、放射線、
紫外線、薬物

80歳の罹患率ほぼ100％
→　失明



水晶体の特徴
- 無色透明でレンズの働き（網膜への結像
- タンパク質の塊（ α、β-, γ-crystallin)
- 代謝されずに核部（中心）に集積する

水晶体混濁の増加の原因
水晶体内の蛋白質の変性に伴う不溶性蛋白質の増加

From: **Cosmic Radiation Increases the Risk of Nuclear Cataract in Airline Pilots: A Population-Based Case-Control Study**

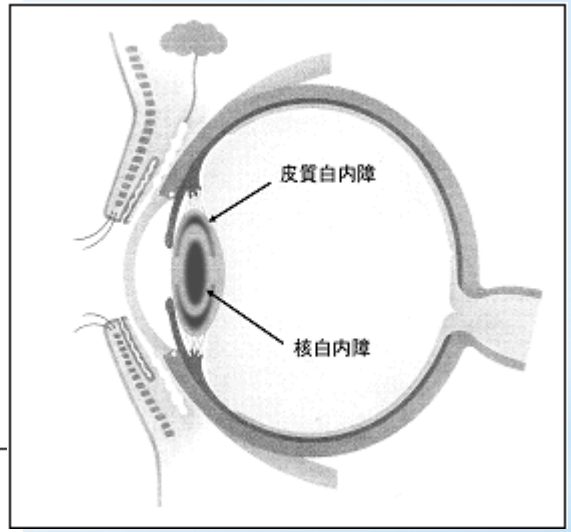
Arch Ophthalmol. 2005;123(8):1102-1105. doi:10.1001/archopht.123.8.1102

パイロット（71名）は一般人(374名）よりも3倍以上、核白内障を発生しやすい。

Table 1. Data From Logistic Regression of Nuclear Cataract Risk Among Cases and Controls According to Employment as a Commercial Airline Pilot, Age, Smoking Status, and Sunbathing Habits

Variable	Controls (n = 374)*	Cases (n = 71)*	Adjusted Odds Ratio (95% Confidence Interval)†
Age, mean, y	66.1	74.6	1.17 (1.12-1.22)
Employment			
Never a pilot‡	310	56	1.00
Ever a pilot	64	15	3.02 (1.44-6.35)
Smoking status			
Never smoked‡	250	12	1.00
Ever smoked	124	59	1.92 (0.92-3.99)
Sunbathing habit			
Not a regular sunbather‡	327	63	1.00
Regular sunbather	47	8	0.91 (0.38-2.20)

*Data are given as number in each group.
†Data have been calculated in a unique multivariate analysis, taking into account simultaneously all the variables.
‡Reference group.



Data From Logistic Regression of Nuclear Cataract Risk Among Cases and Controls According to Employment as a Commercial Airline Pilot, Age, Smoking Status, and Sunbathing Habits

Date of download: 2/1/2014

Copyright © 2014 American Medical Association.
All rights reserved.

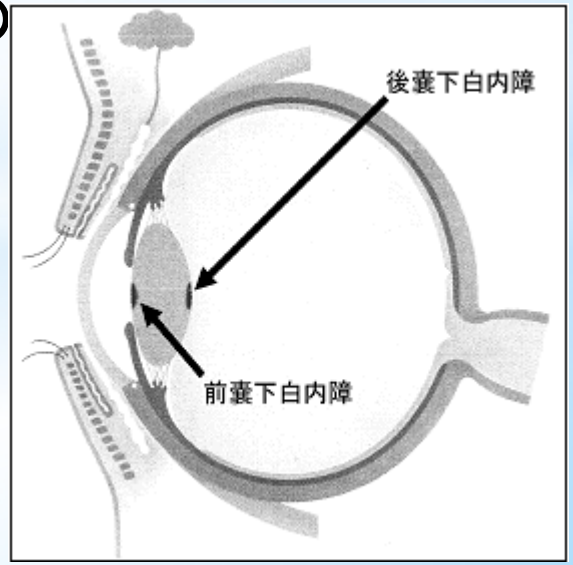
宇宙飛行士と白内障

1） 21 人の宇宙飛行士の眼の混濁度を 395 人の一般者と比較したところ、不透明度の値がわずかに強く、後部皮質（posterior cortex）や水晶体後嚢（posterior capsule）で増加する。

Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 240, 543–547, 2002

2）247名の宇宙飛行士または軍飛行士の対照群との水晶体皮質部白内障の変動性及び中央値が、対照群と比較して有意に高い（p=0.015）とした。また、ベースラインの所見で、宇宙放射線と、後嚢下領域（p=0.015）及び病巣中心（p=0.056）の増加とに正の相関が見られるとして、後嚢下白内障の大きさと被ばく線量の相関が宇宙飛行士の集団で認められるとした。一方で、核性白内障は被ばくと関連していないとし、皮質及び後嚢下混濁に対する白内障のリスクは低線量で増加する。

Radiat. Res. 172, 10–20, 2009



*白内障の危険因子

- 加齢
- 性別（女性）
- 喫煙
- 放射線
- 紫外線
- 近視
- 薬物
  - ステロイド
- 全身疾患
  - 糖尿病
  - アトピー性皮膚炎

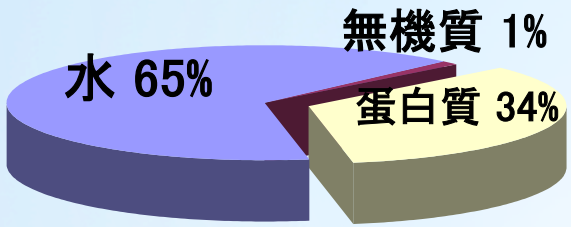
*白内障__
何を指標に測定するか？

水晶体混濁の増加の原因

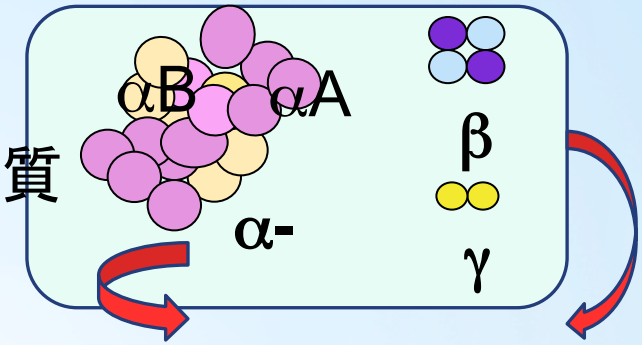
水晶体内の蛋白質の変性に伴う不溶性蛋白質の増加

水晶体蛋白質の化学変化

* 水晶体の成分



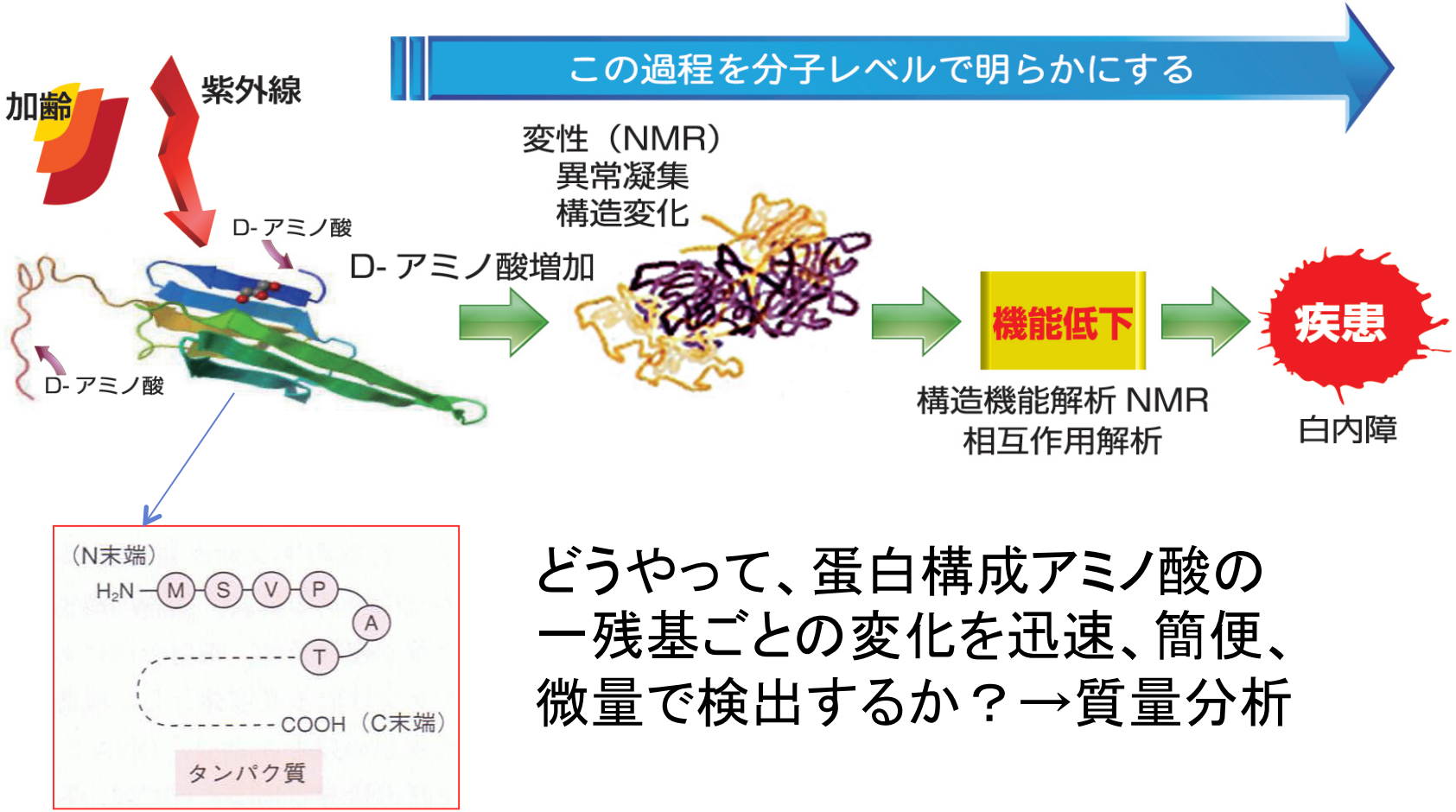
Crystallin
細胞骨格蛋白質



安定な会合体形成、透明性維持

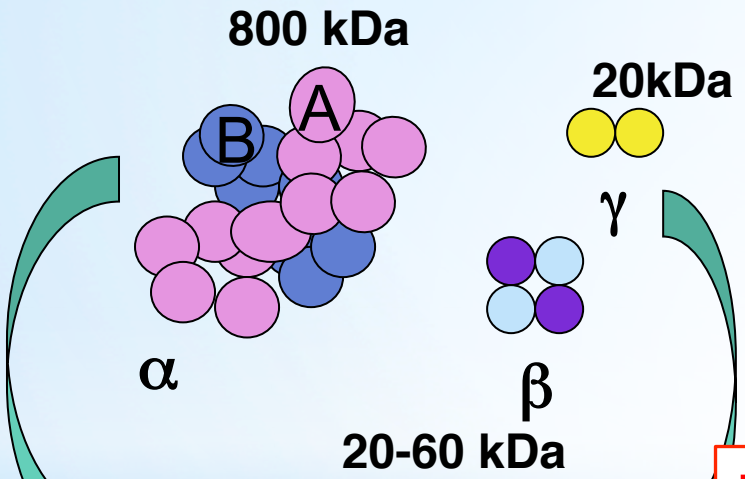
	α-crystallin	β-crystallin	γ−crystallin
Subunit	αA , αB	βA1-βA4 βB1-βB3	γA-γF γS
	20 kDa	23−35 kDa	20 kDa
会合状態	30～40量体	二量体/複合体	単量体
主要2次構造	β-sheet	β-sheet	β-sheet
生体内局在	多分布	水晶体固有	水晶体固有

放射線、紫外線、加齢による水晶体内蛋白質の変化



どうやって、蛋白構成アミノ酸の一残基ごとの変化を迅速、簡便、微量で検出するか？→質量分析

*蛋白質化学からみる白内障発症のメカニズム



水晶体を構成している蛋白質の約90%がクリスタリン
（α-, β-, γ-クリスタリン）

アスパラギン酸（Asp）の異性化

酸化
糖化
リン酸化
脱アミド化
異性化

安定な会合体

異常な会合体

水晶体の透明性を維持

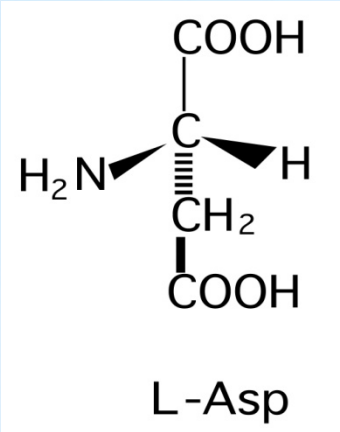
白内障

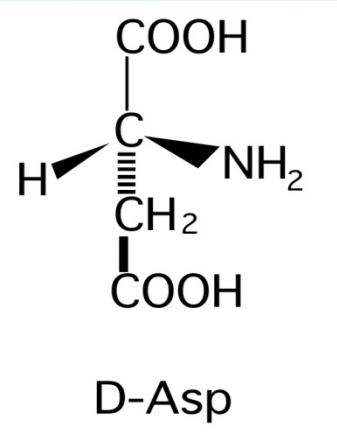
生体内のアミノ酸、ペプチド、蛋白質はすべてL-アミノ酸で構成されている。

体内ではD-アミノ酸変化しないと信じられていた。

加齢、放射線によってアスパラギン酸が生体内でD-体に変化する

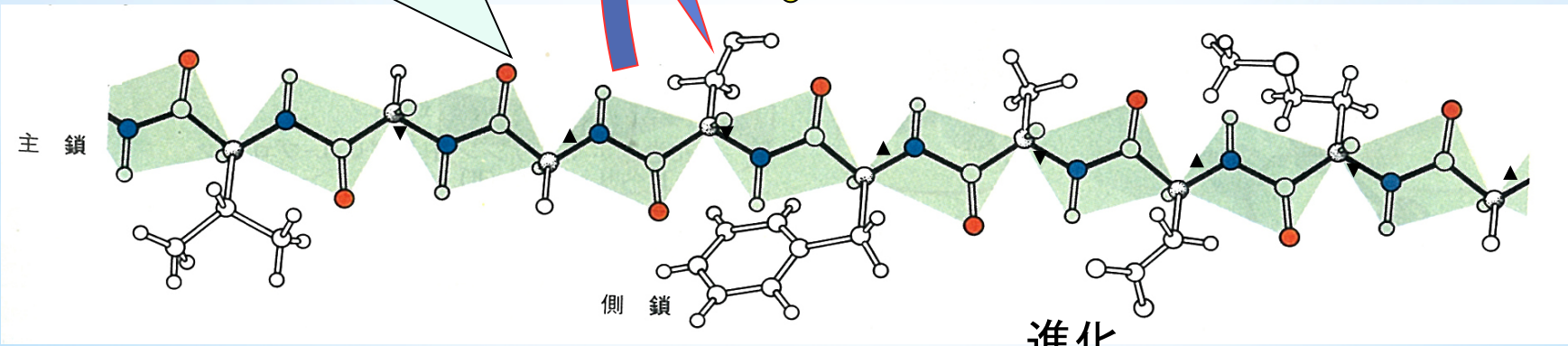
蛋白質中にD−アスパラギン酸が生成されると？





隣接残基の側鎖が
同じ向きに配置
される。

ポリペプチド鎖が乱れる



進化

片手構造の維持

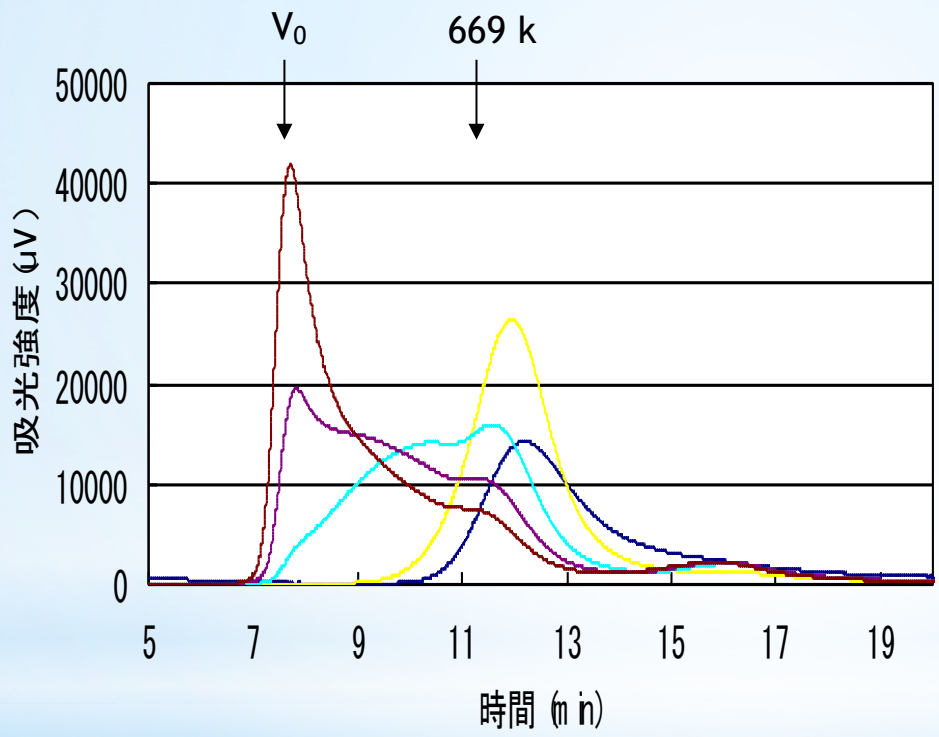
正常な生命活動

老化

放射線照射による蛋白質への影響

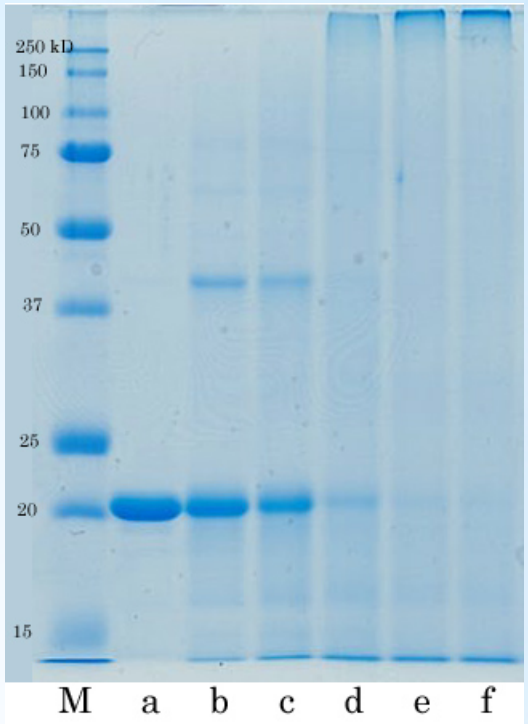
凝集、ラセミ化、酸化

γ線照射によるαB-crystallinの凝集



—0 Gy, —0.5 kGy, —1.0 kGy, —1.5 kGy, —2.0 kGy

αB-crystallin



M: M.W. marker
a: 0 Gy
b: 0.25 kGy
c: 0.5 kGy
d: 1.0 kGy
e: 1.5 kGy
f: 2.0 kGy

* Risk factors, cataract and racemization of Asp in lens proteins

Risk factors	Cataract	D/L ratio of Asp in lens proteins	Growth Rate
60 days after 15 Gy (mouse)[1)]	+++	0.04 →0.06	50%
18 months after 5 Gy 18 months (0Gy) (mouse) [1)]	+++ +	0.05 →0.09 0.05 →0.06	44% 20%

1) Fujii N. et al. J Rad. Res. 27, 183-190 (1986)

* Risk factors, cataract and racemization of Asp in lens proteins

Risk factors	Cataract	D/L ratio of Asp in lens proteins	Growth Rate
60 days after 15 Gy (mouse)[1)]	+++	0.04 →0.06	50%
18 months after 5 Gy 18 months (0Gy) (mouse) [1)]	+++ +	0.05 →0.09 0.05 →0.06	44% 20%
UVB (5J/cm^2) after 72 hours (6 week-old rat) [2)]	+++	0.02 →0.20 (Asp 151 of αA)	900%

1) Fujii N. et al. J Rad. Res. 27, 183-190 (1986), 2) Fujii N. etal. Exp. Eye Res. 65, 99-104 (1997)

Risk factors, cataract and racemization of Asp in lens proteins

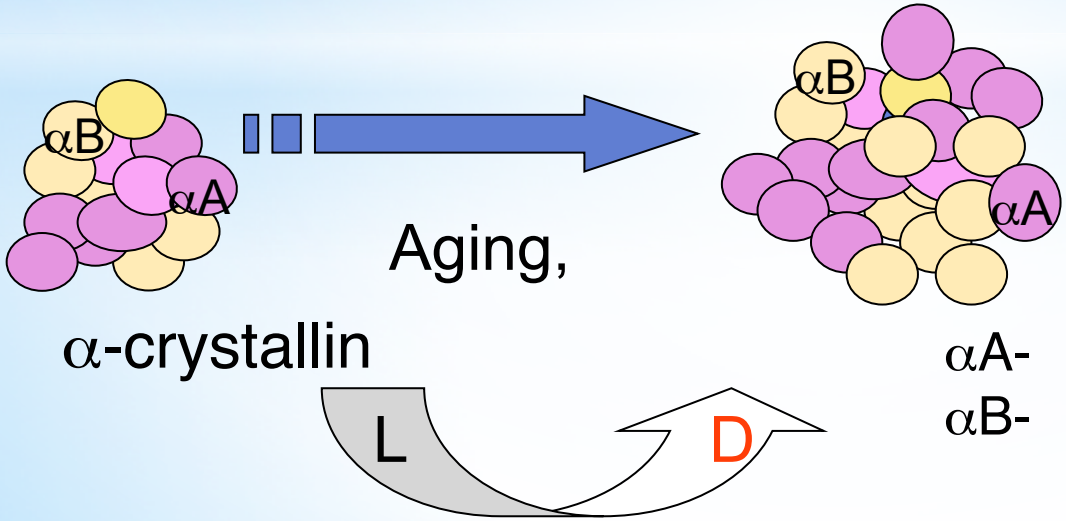
Risk factors	Cataract	D/L ratio of Asp in lens proteins	Growth Rate
60 days after 15 Gy (mouse)[1)]	+++	0.04 →0.06	50%
18 months after 5 Gy 18 months (0Gy) (mouse) [1)]	+++ +	0.05 →0.09 0.05 →0.06	44% 20%
UVB (5J/cm^2) after 72 hours (6 week-old rat) [2)]	+++	0.02 →0.20 (Asp 151 of αA)	900%
80 Y human αA-crystallin[3)] 80 Y human αB-crystallin[3)]	+++	0.02 →0.20 0.02 →0.10	900% 400%

1) Fujii N. et al. J Rad. Res. 27, 183-190 (1986), 2) Fujii N. etal. Exp. Eye Res. 65, 99-104 (1997)
3) Fujii N. et al. Biochim. Biophys. Acta 999, 239-242 (1989)

放射線白内障と加齢性白内障に共通していること

1.　水晶体蛋白質の凝集促進と機能低下

	1 Year	80 Year
＊　$S_{20,W}$	17S	30-80S
＊＊R_g(Å) (37℃)	60	70-80
＊Chaperon Act.	100％	40％



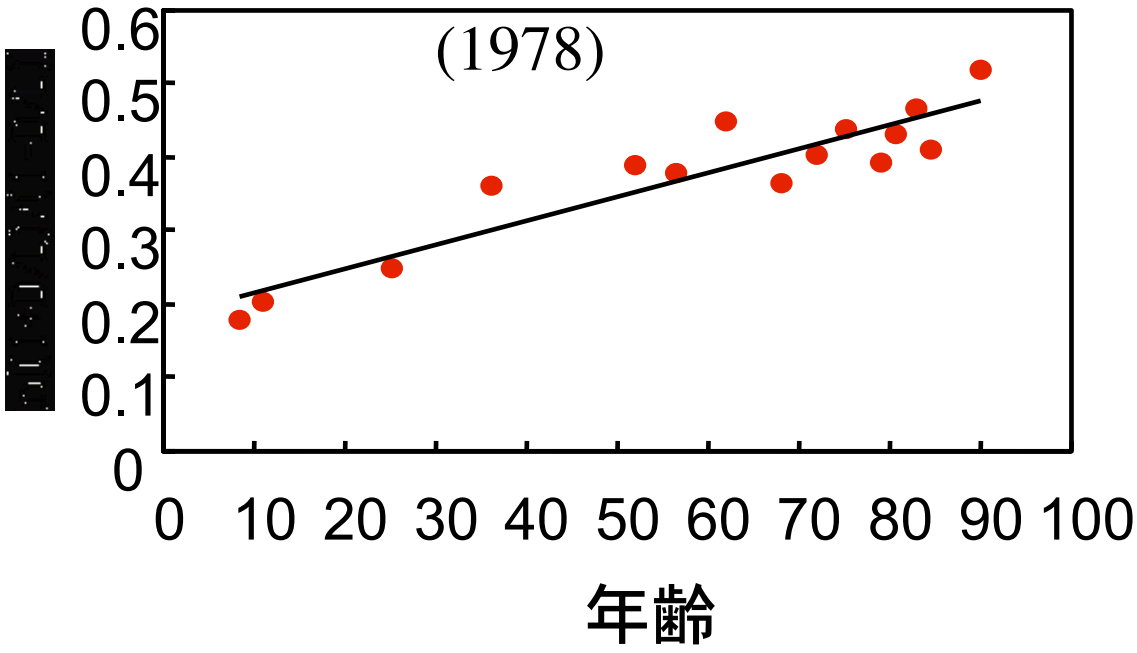
αA-　D- β −Asp：Asp58, Asp151
αB-　D- β Asp：　Asp36, Asp62

白内障のクリスタリンは会合の度合いが大きく、シャペロン機能も低下

放射線白内障と加齢性白内障に共通していること

2.　水晶体蛋白質のラセミ化が促進

Masters et al. Proc.Natl. Acad.Sci . 1204 (1978)



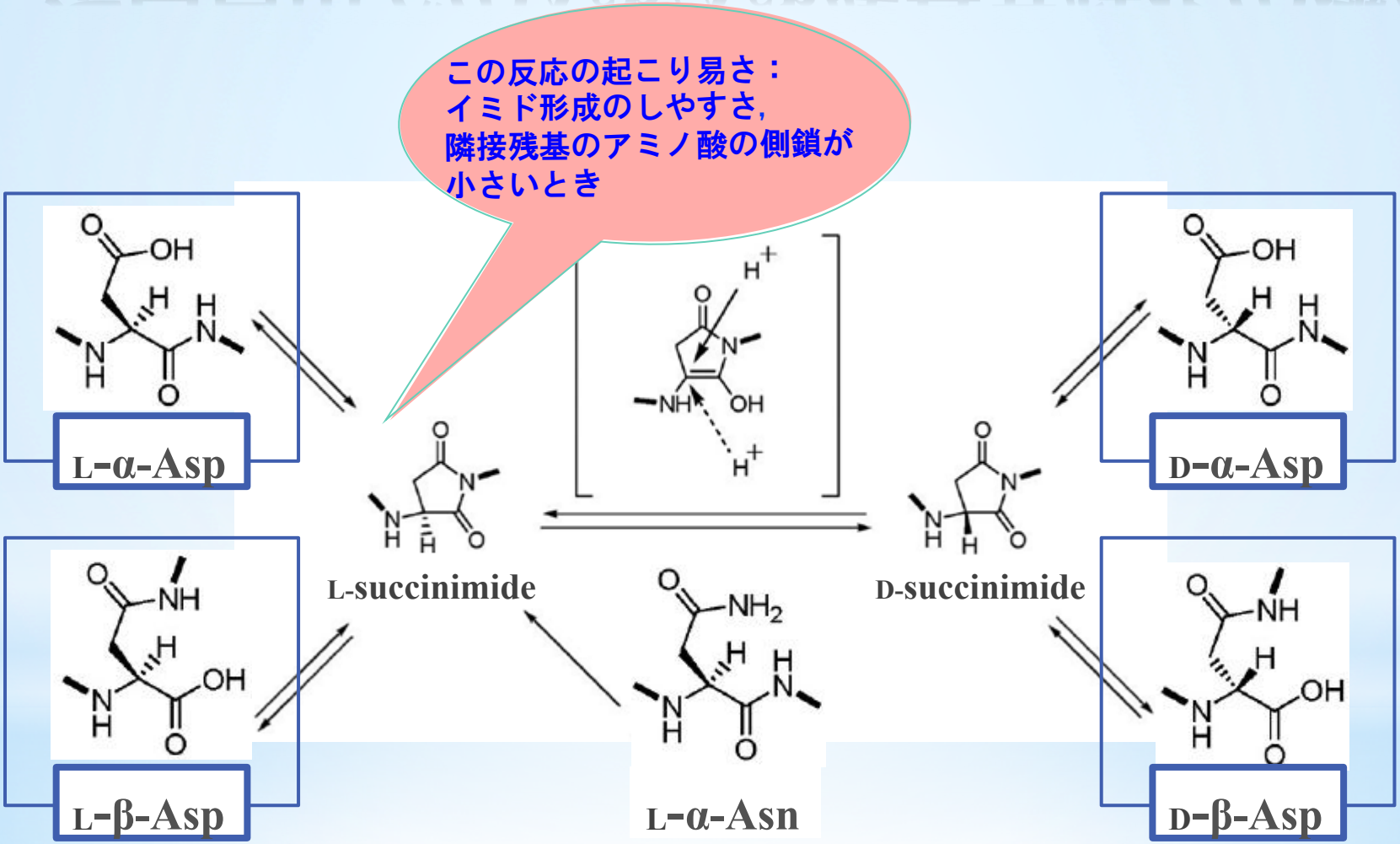
水晶体蛋白質のうちの、どの蛋白質のどのアミノ酸がラセミ化しているのか？

これを化学的に、定量的に簡便に決定する。

微量D-アミノ酸の迅速、精度の良い
分析法を確立

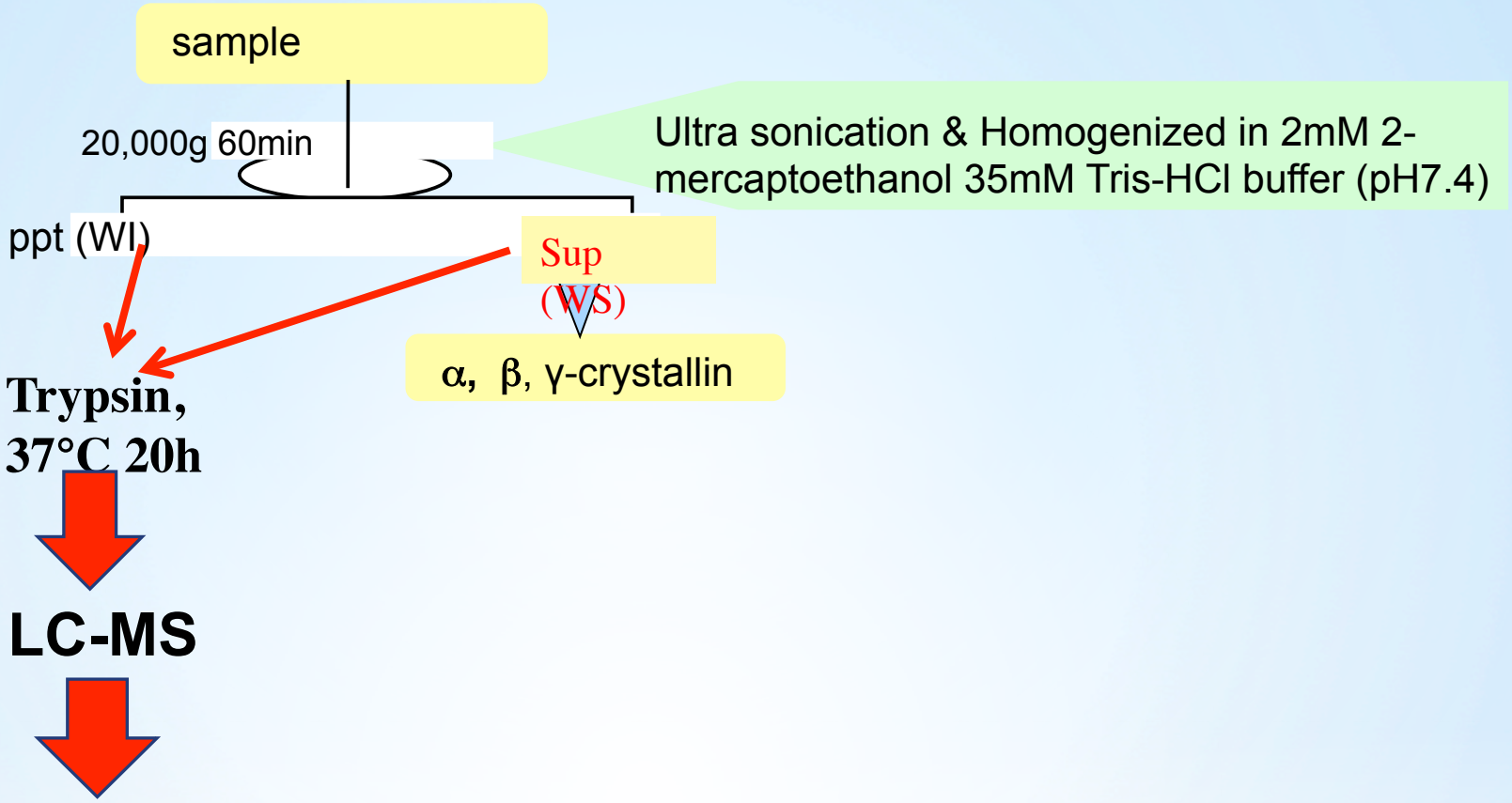
タンパク中のD−アミノ酸の検出は
藁の中に落ちている針を見つけるようなもの

*蛋白質中でのAsp/Asn残基異性化の機構



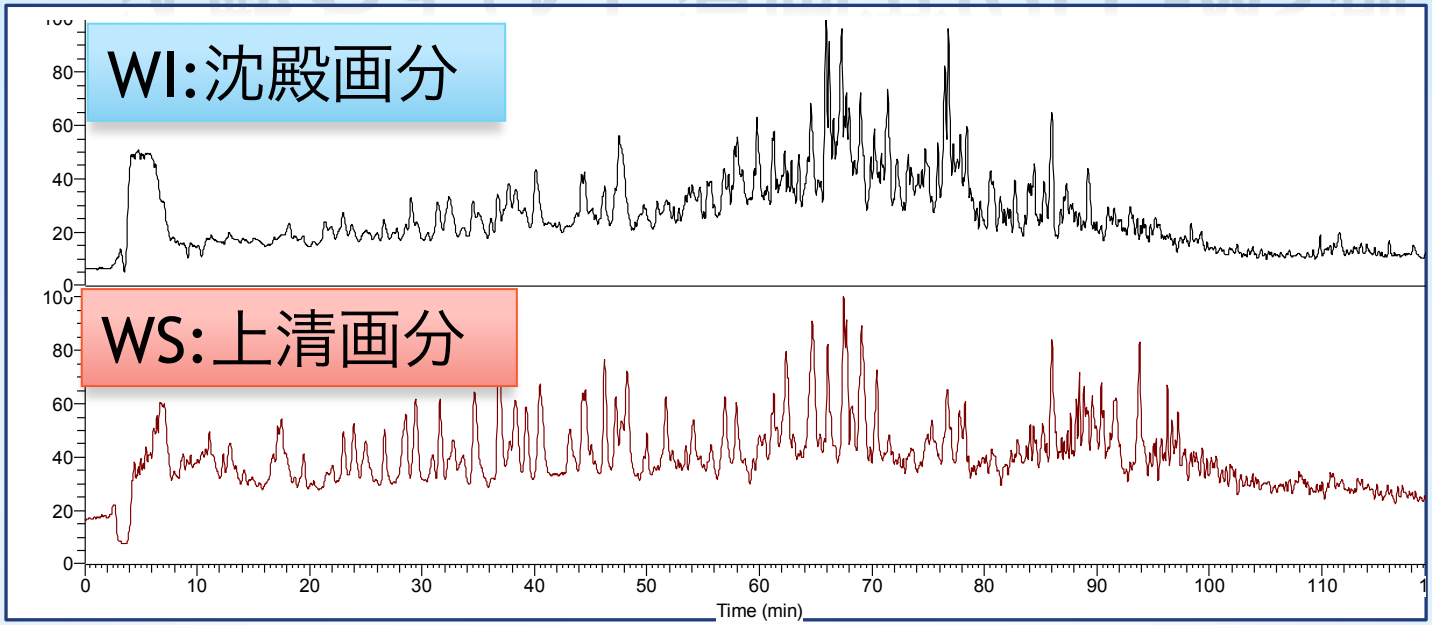
Asp残基は4つの異性体を有する

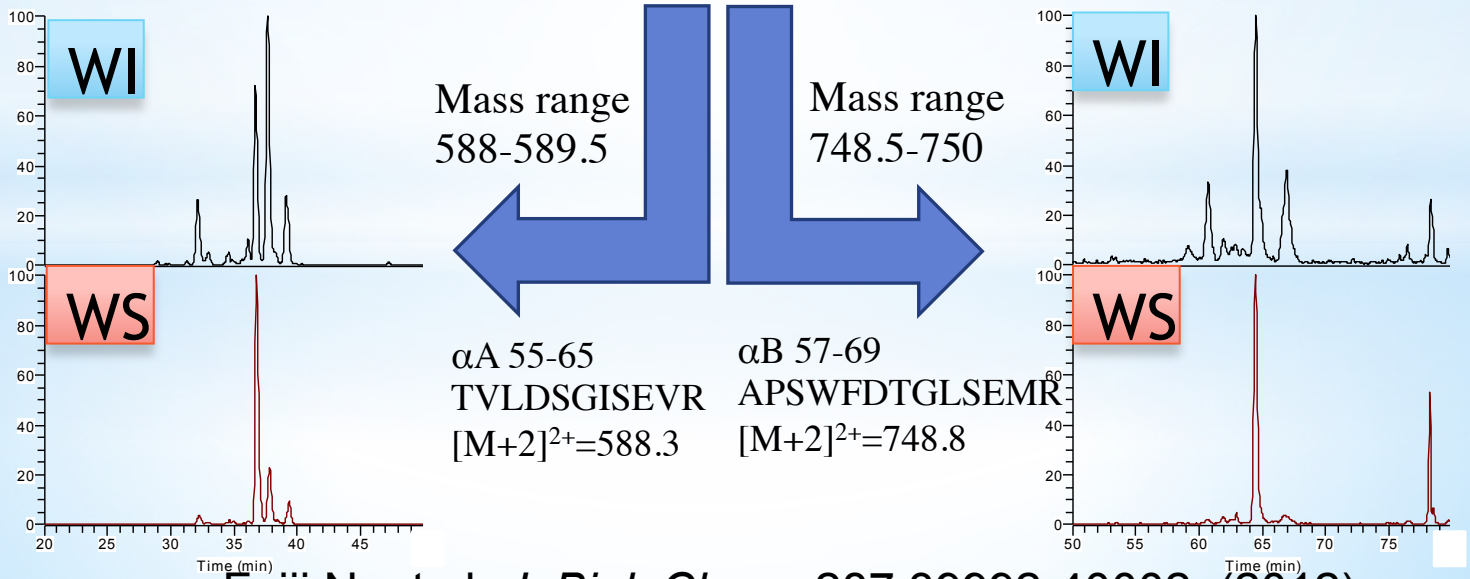
方法



1) Identify the tryptic peptides .
2) Analyze D/L ratio and β/α ratios of individual Asp residues in all crystallins

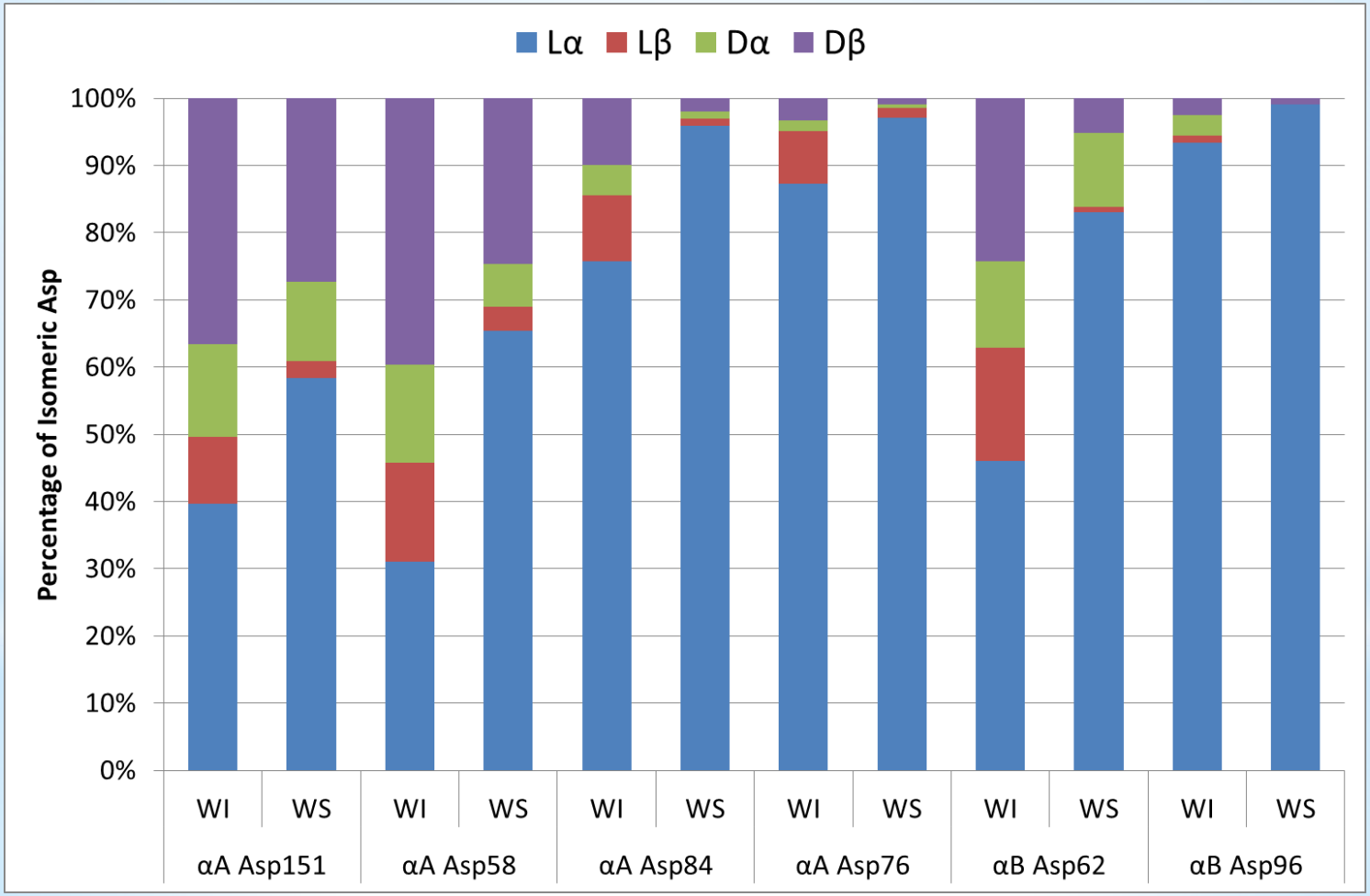
*沈殿および上清画分のLC-MS測定





Fujii N. et al. *J. Biol. Chem.* 287,39992-40002, (2012)

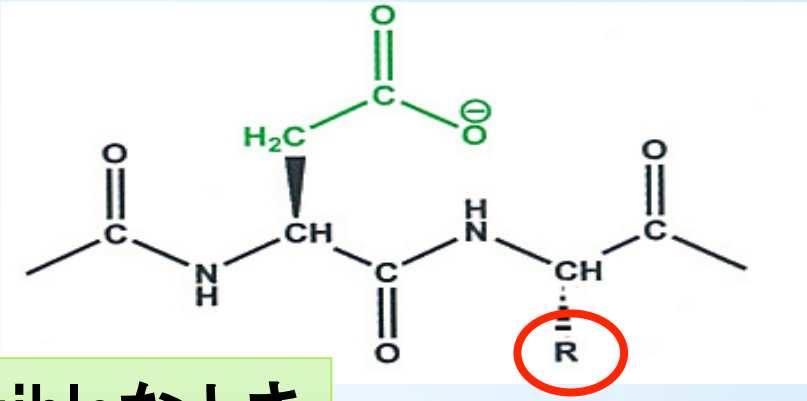
αA-, αB-クリスタリン中の Asp残基の異性体含有率



Fujii N. et al. *J. Biol. Chem.* 287,39992-40002, (2012)

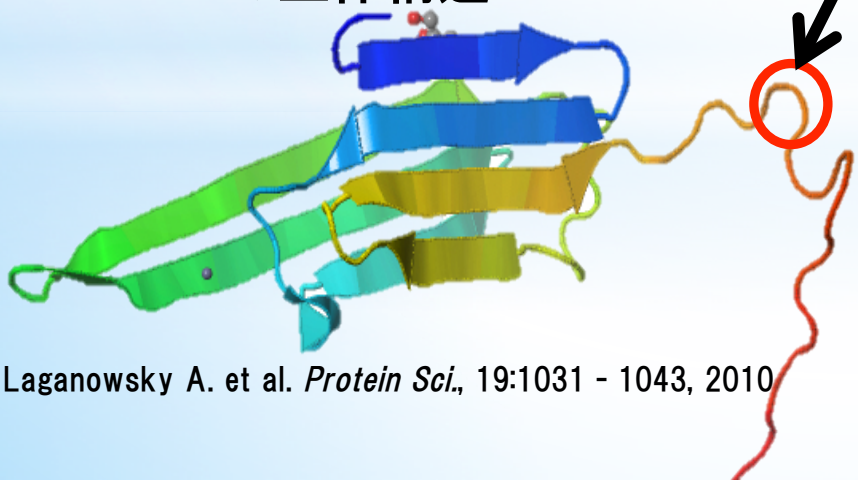
異性化しやすいAsp残基の特徴

1. 隣のアミノ酸残基が Gly, Ala, Serのような小さいアミノ酸のとき



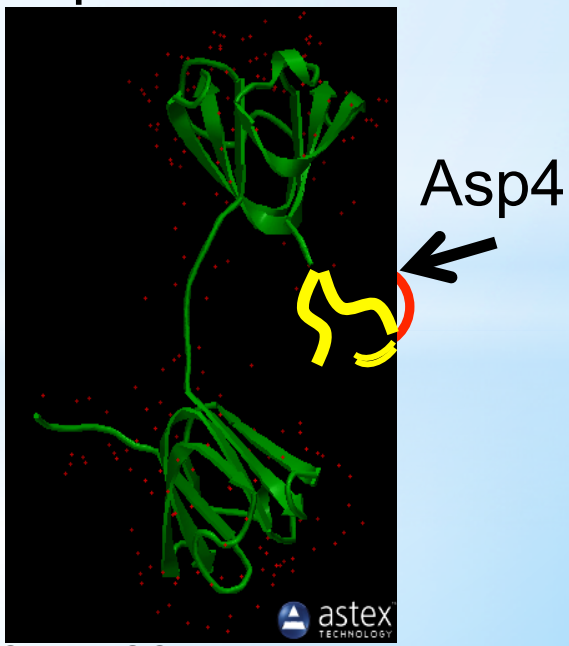
2. Asp残基周辺の構造がflexibleなとき

ウシαA-クリスタリンの立体構造



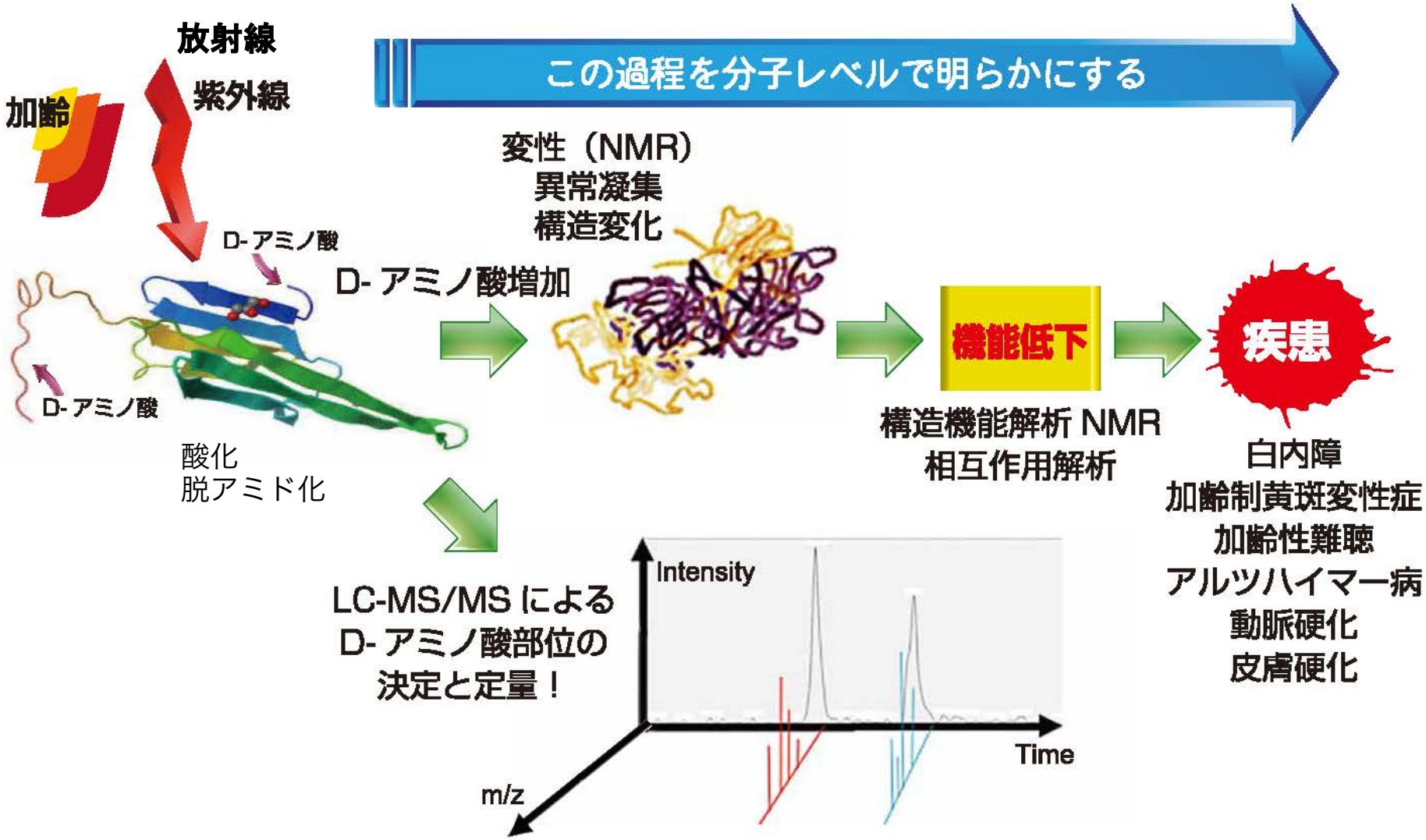
Laganowsky A. et al. *Protein Sci.*, 19:1031 - 1043, 2010

βB2-クリスタリン



Smith MA et al. *PROTEIN SCI. 16,* 615-625, **2007**,

放射線、紫外線、加齢による蛋白質の変化



Fujii N. et al. J. Biol. Chem. 287, 39992-40002 (2012).

*まとめ

1. 白内障(蛋白質の異常凝集)はAsp 残基の異性化によって惹起する。Asp 残基の異性化すべての残基に生じるのではなく、部位特異的に生じることが明らかとなった。
2. LC-MSを用いて蛋白質の同定と異性体部位の同時決定する方法を確立した。多種多様の異性体一斉分析が可能となった。

- 白内障の防御の一助となりえる。

*謝辞

慶応大：　竹鼻　真
筑波大：　加治優一
旭テクノグラス：下岡正志
阪大：　後藤祐児
金沢医大：　佐々木　洋
藤田保健衛生大：山本直樹
防衛医大皮膚科：多島新吾
京大：三木邦夫、喜田昭子

京大原子炉：藤井智彦、高田匠、久下勝規、新名芳有、
中村徹、倉林咲枝、石田匠、清水健一、森雄平、
安岐健三、川口剛広、元家亮太、坂上弘明、
貴田将司、美濃岡智洋, 蔡 思敏、金仁求、
前田裕貴、木野内忠稔、齊藤毅、杉山正明

Oregon Health Science Univ.　: Kirsten　Lampi

Welcome to D-amino acid world

*ご清聴ありがとうございました

鏡の国のアリス