

水溶液生体分子構造に対する放射光励起・  
液体分子線分光研究（前編）

東京農工大学大学院 工学研究院

鷓飼 正敏\*, 島田 紘行

A new spectroscopic research of radiation induced damage on DNA and its constituent molecules is proposed, which is made possible using a liquid micro-jet technique for bio-solution under vacuum in combination with synchrotron-radiation aided site-selective excitation. We emphasize a view point of time-evolutional production and destruction of irregular chemical species characteristic of time domains after irradiation, which finally result in the alternative processes to give rise to a irreparable damage or to avoid it by a thermodynamical restration. Up to now a method of spectroscopy to identify the initial molecular site of radition interaction is almost completed.

The former part of the proposal article is presented in this volume. We describe the objectives of the new spectroscopy for observing the early processes of direct radiation effect on DNA leading to damage induction using a site-selective synchrotron-radiation excitaion to identify the initial site of radiation interaction. The present status of development is described by presenting the new results of the spectra of X-ray absorption near edge structure and ejected electron energy spectra for liquid water as examples. The forthcoming latter part of this article will discuss the conformational and electronic structure of nucleotides in water solution prior to time evolution.

**Keywords:** liquid micro jet, thermodynamical repair, DNA, nucleotide, site-selective synchrotron-radiation irradiation

Liquid-Microjet Synchrotron-Radiation Spectroscopy for Biomolecules in Water Solution I

Masatoshi UKAI\* and Hiroyuki SHIMADA (*Department of Applied Physics, Tokyo University of Agriculture and Technology*),

〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16,

TEL: 042-388-7222, FAX: 042-385-6255,

E-mail: ukai3@cc.tuat.ac.jp

## 1 はじめに

放射線を用いた技術が様々な分野で用いられている。物質の改質（加工，構造鎖の切断・架橋，不純物の打ち込みなど），あるいは，除害，殺菌といった工学技術だけでなく，がん治療や診断などの医学応用にも用いられている。これにともない，放射線による壊質・損傷や修復などについても知識の拡充が望まれている。

物質への放射線効果は，一次放射線，および，二次電子によって誘起された様々な不安定化学種（励起原子・分子，ラジカル，イオン，低エネルギー電子など）と物質のつくる非定常状態が定常状態に回帰する際の時間発展的な緩和現象において現れる。放射線によって与えられたエネルギーは粒子の運動エネルギーとしてだけでなく，不安定化学種の内部エネルギーに様態を変えて時間軸上を輸送され，拡散する。したがって，放射線エネルギーの拡散は時間とともに生成・消滅する不安定化学種として追跡される。このため，放射線化学では緩和現象の追跡を研究の柱の一つにすえ，パルスラジオリシスのような方法を開発してきた。

生体への放射線効果である被曝は細胞液相中における非孤立分子の反応が主となるため，要素還元的に理解することは難しい。また，単純な緩和現象で終了するのではなく，遺伝子への放射線損傷に特徴的であるが，生命活動によって損傷が増殖あるいは消滅するという点が一般の物質に対する放射線効果とは大きく異なる。しかし，放射線相互作用から損傷の定着までの初期過程においては，通常物質と同様の基盤から捉えることができると考えられ，そのようなアプローチが試みられている<sup>1,2)</sup>。現在，もっとも有効な追跡方法の一つとされているモンテ・カルロ・シミュレーションは<sup>3)</sup>，緩和現象の観点に立った計算機実験であると言えるだろう。しかし，様々な物理的・化学的相互作用

用の集合であるために、放射線エネルギーがどこに付与され、そのうち、どのようなプロセスをたどって DNA に鎖切断や酸化的塩基損傷が発生するかということは、理論的にも実験的にも十分に理解されていないようである。本誌 81 号で紹介された、二次電子の減速過程の最終段階における DNA への解離性電子付着も損傷発生についての仮説の一つである<sup>4)</sup>。

私たちは原子力機構との共同研究により、生体分子、特に DNA の損傷に関する時間発展的な分光実験の開発を進めているところであり、最初期過程の分光方法の開発をほぼ終了したところある。本記事ではその現状報告を行う。前編では、主として、目的、原理と方法の開発について、水についての成果を示すことにより述べ<sup>5,6)</sup>、後半では、新規開発された方法を用いて得られた、DNA 構成要素であるヌクレオチドの結果について述べる<sup>7,8)</sup>。

## 2 本研究のねらい

本記事では、DNA、RNA といった遺伝情報物質の放射線損傷における直接効果を観察対象とし、試料として注目するのはこれらの物質の構成単位であるヌクレオチドである。ヌクレオチドは核酸塩基、デオキシリボース (RNA ではリボース)、およびリン酸からなる分子であり、リン酸と糖のエステル結合により DNA の鎖状構造がつくられている。試料分子を含む水溶液分子線に対する軟 X 線領域のシンクロトロン放射光励起による分光実験が本解説の概要である (図 1)。

以下に、本研究に関する若干の知識の整理を行い、そのねらいとするところを示したい。

### 2.1 初期過程における損傷の定着と修復・回避

被曝を原因とする放射線障害は、線量しきい値をもつ細胞死と、線量しきい値をもたない確率的現象である DNA 損傷とに大別されている<sup>9)</sup>。放射線治療の効果の評価、そして二次被曝の見積りといった観点からは前者・後者ともに重要な意味を持つが、原子炉の管理や有人宇宙衛星などで必要とされている低線量リスク防護の観点からは、後者の評価が重要であるとされている。紫外線のような低エネルギー放射線の照射でも DNA 上の近接するチミン、シトシンが共有結合した二量体を作ることが知られており、これが一方の DNA 鎖内で起こると複製が行えなくなり、二重鎖間の架橋として起こると鎖の分離ができなくなる<sup>9,10)</sup>。前述のように、放射線によるリスク防護に対してはモンテ・カルロ・シミュレーションが有効な再現方法と考

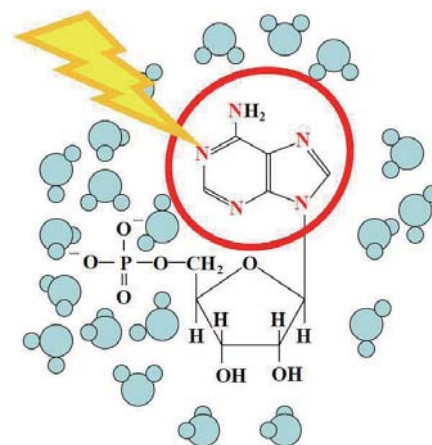


図 1 本研究のねらい：シンクロトロン放射光励起によるヌクレオチドの選択励起。

えられ<sup>3,11)</sup>、その基礎となる素過程データの重要性が叫ばれている<sup>12)</sup>。つまり、このような遺伝情報物質に対する放射線相互作用素過程の洗い出しとその断面積の収集・集積が重要である。

放射線のエネルギーが細胞に付与されてもそのすべてが損傷として定着するわけではない。環境放射線程度の線量で発生する異常分子種(損傷)に対しては、細胞が自己修復作用を発現する。DNA 損傷が発生すると、Fpg、Nth など、修復酵素といわれるタンパク質が発現して DNA 上の構造異常を検出して修復を行うため、損傷の発生を修復酵素の作用により誘発された鎖切断として検出する方法が従来から行われている<sup>13)</sup>。DNA の二重鎖のうち一本鎖切断と二本鎖切断とは、それぞれに対して特異的に機能する修復機構が存在する<sup>14)</sup>。リン酸と糖とからなる二重鎖の親水性により、DNA の周囲には水素結合のネットワークが鞘のように結合しているが、このような二重に規定された DNA の安定構造には自己修復をうながす形状記憶の役割があるかもしれない。また、修復酵素による修復(酵素修復)以外にも、抗酸化作用のある物質や酸化的ラジカルの捕捉剤となるような物質を投入することにより DNA 損傷が低減することが知られており、酵素修復に対して化学修復、あるいは速い修復などと呼ばれている<sup>15-17)</sup>。つまり修復酵素による修復以前に、細胞が自発的に損傷を修復するメカニズムがあると考えられ、これらの現象はそのメカニズムを強調して見せたものと考えられる。

放射線の与えるエネルギーは熱エネルギーと比較す

ればはるかに大きいですが、一個の細胞全体の温度を検出できるほどに上げるものではない。自発的な損傷修復は、放射線によって誘起された非定常状態が定常状態へと緩和する際に、放射線照射前の定常状態に回帰する可能性があるということであり、照射前とは異なる定常状態が生成したときに、それが損傷として定着したということになるのではないだろうか。このように考えると、放射線による損傷の発生とその回避は、熱力学的な緩和過程における択一的な反応であると推測することができ、上記に述べた放射線照射後の緩和現象における不安定化学種の生成・消滅を時間発展的に追跡することを通じて択一的な反応経路を明らかにすることができると思われる。

## 2.2 放射線損傷における直接効果

一次放射線、もしくは、二次電子による生体分子へのエネルギー付与によって誘起される放射線効果を直接効果と呼ぶ。これに対して、生体が溶液系であるため、細胞液などへのエネルギー付与を経て生じた粒子種が拡散し細胞内の様々な部位の生体分子との反応がおこる。これを間接効果という<sup>18)</sup>。放射線のトラックが必ずしも細胞中の特定の分子上を通るとは限らないために、これまでは細胞液へのエネルギー付与によって生じた二次粒子による間接効果が主要な寄与を占めると考えられてきた。間接効果をになう粒子種としては、細胞液中に発生したOHラジカル、一重項酸素分子 $O_2(a^1\Delta_g)$ 、負イオン $O_2^-(X^2\Pi_g)$ 、水和電子などが知られており、特にOHラジカルの反応が重要な寄与を果たすものと理解されている<sup>18)</sup>。OHとDNAとの反応を考える。OHラジカルは不飽和環状分子である核酸塩基の不飽和結合へのOとHの挿入反応（酸化的損傷）の反応性が高く、たとえば、核酸塩基の一つであるグアニンから8-オキソ-7,8-ジヒドログアニン（8-オキソグアニン）（図2）が生じると、通常のグアニンがシトシンとG-C対を作るのに対して、8-オキソグアニンではアデニンとのG-A対を作るため、遺伝情報の書き換えがおこる。

また、核酸塩基以外の部分とOHラジカルの反応では、リン酸とデオキシリボースの結合部位P-O-CH<sub>2</sub>-からのH原子の引き抜きにより、C原子の部分でラジカル化する。これによりO-C結合が弱まり、加水分解により切断される（鎖切断）。しかし、放射線誘起反応の追跡という観点からは、反応の起点となるOHラジカルなどの発生の由来が特定しにくいという困難さがあると考えられる。また、DNAだけでなく生体分子は

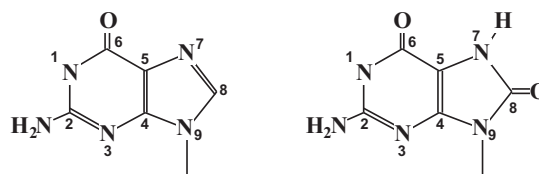


図2 グアニン（左）とその酸化的損傷生成物（8-オキソグアニン；右）。

親水相互作用、および、分子を取り囲む水素結合ネットワークを介して水和外圏のバルクの細胞液に連続するため、直接効果と間接効果の範囲が明確ではないことも注意すべきことである。

ところで、本研究では放射線損傷における直接効果が主題であると述べた。上記に見たようなOHラジカル等の間接効果に関わる二次粒子は、細胞液中を拡散してDNAに到達することになるが、細胞液は純水ではないため、拡散の途中でラジカル捕捉剤としてはたらくような数多くの不純物分子と出会って消滅する。前節で紹介した化学修復の研究は、このような細胞液の性質を促進させて検出したものと言えるだろう。このため、近年の研究では、直接効果の寄与は間接効果の寄与に比して決して少なくなく、実は同程度であるとする報告がなされている<sup>2)</sup>。したがって、DNAへの放射線エネルギー付与を反応の始点としてその後の緩和過程における生成物を時間発展的に追跡することは一つの研究上のアプローチとしてだけでなく、リスク防護の観点からも有意な成果が期待できる。ここで、単色化されたシンクロトロン放射光によるエネルギー選択的励起が有効な方法となると考えられる。

## 2.3 放射光による放射線初期相互作用のサイト選別

放射線荷電粒子や二次電子との相互作用はパルス電場との相互作用であるため、近似的に白色光照射と同様にとらえられることが、長年、井口らによって提唱されてきた<sup>19)</sup>。また、それを逆転して利用し、シンクロトロン放射光の利用が普及する前には、高速電子線エネルギー損失分光が真空紫外から軟X線領域における吸収スペクトルを測定するほとんど唯一の手段であった<sup>20,21)</sup>。

本研究では軟X線シンクロトロン放射光を用いる。籾野の解説にあるように<sup>22)</sup>、分子の最低イオン化エネルギーは10 eV付近に集中しており、それよりもエネ

ルギーの大きな外殻吸収の領域, すなわち, 真空紫外領域の光に対して, もっとも大きな光吸収断面積をもつ. その際の分子は主として一個の外殻電子のイオン化を起こす. 外殻電子は分子の結合に大きく関与するが, エネルギー的に近接した外殻軌道間には強い相互作用を生じており, どのような結合に関与する電子が放出されたかということが明確になりにくい. たとえば, 有機分子における炭素の  $sp^3$  軌道混成を考えればそれは明らかであろう. 同様に, 異なる元素の組み合わせでできた分子から放出された光電子の由来となる原子を特定することは困難である.

これに対して内殻軌道電子は特定の原子内の原子核近傍に集中して存在し, 周囲の原子の内殻電子の波動関数とは重なりがほとんどないため, 一個の原子内に局在するという見方が成立する. 内殻電子の束縛エネルギーは原子核電荷の引力を直接反映するために元素によって大きく異なり, 放出電子のエネルギー分析を行うことにより元素分析ができる. これが X 線光電子分光法であるが, Siegbahn の提唱した ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis, 電子分光化学分析) という方法は, X 線による特定の原子に局在する内殻電子という観点をさらに進めて, 化学結合や表面吸着などの周囲環境の静電場が局在する内殻軌道電子のエネルギー状態を変化させる (ケミカルシフト) と考え, 放出電子のエネルギーを分析することにより, このような化学的環境の与えるケミカルシフトを明らかにし, またそのような化学環境にある原子を定量分析する方法である<sup>23)</sup>. ESCA の登場により, 分子内の特定の “結合サイトを選別” して電子放出を行わせるという, 分子制御の概念がもたらされた. また, X 線に対する内殻吸収において内殻電子が外殻の非占有軌道に励起される際の遷移エネルギーにも類似のケミカルシフトが発生する. 分子の非占有軌道は分子全体に広がって存在しており, 異なるサイトの内殻電子が同一の非占有軌道に励起されるとき, 異なる結合サイトに含まれる原子の有する内殻電子のエネルギーにケミカルシフトが発生するならば, その内殻電子が励起される際の遷移エネルギーにもケミカルシフトは反映する. この特性は X 線領域の単色化シンクロトロン放射光の波長選択性と組み合わせられて “サイト選択的励起” としてクローズアップされており<sup>24)</sup>, このような観点から X 線吸収スペクトルを見る際には単に XAS (X-ray Absorption Spectrum) とはいわず, XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure, 内殻吸収端近傍 X 線吸収スペクトル) と呼ばれることが多いようである<sup>25)</sup>.

一例を示すと, 次回に詳しく説明するが, 本研究では窒素の K 吸収端付近におけるヌクレオチドの XANES スペクトルが得られた. 窒素原子はヌクレオチド内の核酸塩基部位にのみ存在することから, この XANES は核酸塩基サイトの選択励起に対応するものであり, また, 塩基内の異なる結合サイトに含まれた窒素原子に対するサイト選択励起が見られている<sup>5,7)</sup>. さらに, DNA の周囲につくられる水素結合ネットワークによる水和構造もまたケミカルシフトの重要な要因となり, 放射線吸収サイトの特定に用いることができると期待される.

本研究では以上のように放射光の波長選択性を駆使したサイト選択励起の観点から, 放射光エネルギーの付与される分子内部位を特定する.

内殻励起を用いる他の理由は, 第一に軟 X 線の物質内への浸透力の強さを利用することである. 上述のように, 分子は真空紫外光に対して大きな光吸収断面積をもつため, この領域の光は, 物質内部, 細胞内部, あるいは, 実験試料の内部にまで浸透せず, 表面付近で吸収されてしまう. 固体表面上に乾燥試料を配置するような実験では, 細胞内の “生きた” 試料に対する研究とはなりにくい. 次節で述べるが, バルクの水中に対象とする分子があるような実験の場合, 小さな相互作用しか示さない X 線の利用は逆にメリットである.

第二には, 物質内に浸透した軟 X 線を内殻電子が吸収すると, 内殻イオン化や内殻励起だけでなく, オージェ効果により, 軟 X 線とほぼ同程度の大きさのエネルギーを持つオージェ電子が放出されることである. このような放射線としては低エネルギーの電子を外側から物質に注入して放射線効果を観測することはオージェ電子放出体の同位元素を用いる方法しかない. 内殻吸収を用いることは選択した原子を随意にオージェ電子放出体に変えてしまう制御技術でもあり, サイト選択された原子の周辺に限定して, いわば  $\delta$  線というべき二次電子による放射線効果を誘起する方法は他に存在しない.

内殻電子の放出とともにオージェ電子が放出されると, 分子内に生じた二個の正孔の間に強いクーロン反発力のために, ほとんどの場合, 分子の分解が起こる. このように, 放射線エネルギー付与の時点で, 被照射サイトそのものが天然には存在しない異常構造をもった不安定化学種に変化することも本研究における緩和過程の追跡においてメリットであると考えている.

図 3 には本研究で最終的にねらいとする研究概要の模式図を示した. 放射光, および, 光電子分光によるサイト選択励起は, DNA を構成する元素, 結合サイ

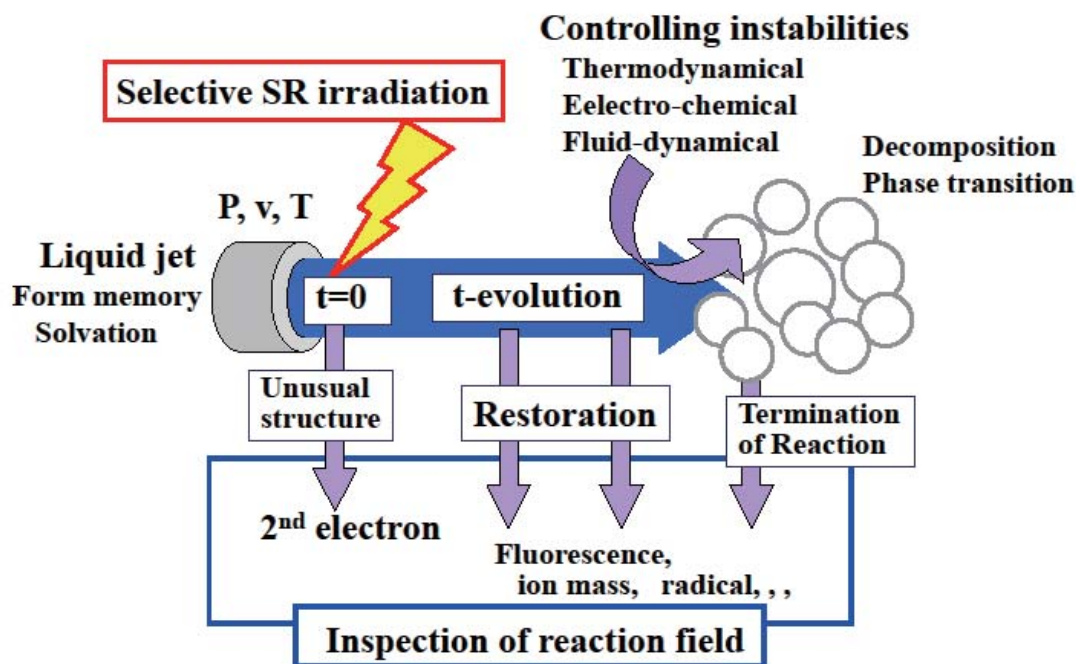


図3 反応時間発展の時間相関分光の模式図。

ト、そして、結合サイトへの水和状態を選別して初期放射線損傷を特定できると考えられる。このようにして特定された分子内サイト上に発生した異常構造（不安定化学種）が時間とともに構造変化する様子を分解断片種からの発光や質量分析、あるいはESRのような方法を用いて追跡する。そのための方法も開発中である。この方法により最終的にDNA上に損傷が定着するか回避されるかまでを追跡することは難しいかもしれない。しかし、上記のような時間領域に特徴的な不安定化学種を時間相関させていくことにより、放射線照射後の緩和過程の詳細についての途中経過を明らかにすることができるものと期待している。また、後述のように、液体試料は真空中では種々の不安定性のため、やがて分解して氷の微粒子となる。これは実験的には液体試料が消滅するという問題であるが、このような相転移を有効に用いることにより時間発展的な不安定化学種の変容を強制的に終始させて固定するという、中間状態の生成物分析に利用できると考えられる。

序に述べたとおり、本記事では以上の基点となる放射光によるDNA構成単位であるヌクレオチドの選択

励起について解説するが、その前に、水溶液下にある細胞環境を模擬的に再現するための試料技術について述べる。

## 2.4 液体分子線

軟X線に対する光吸収断面積は真空紫外光に比べれば小さいが、その輸送光路は真空である必要がある。光電子分光実験では、主要な情報である光電子のエネルギーの正確な観測のために、高真空中で実験を行う必要がある。しかし、水のような蒸気圧の高い液体を真空中に導入すると、蒸発により装置内の真空が悪化し、さらに、気化熱の放出により試料温度が低下し、固相に相転移してしまう。このような実験上の困難さから、液体についての光電子分光研究はほとんど進んでいない。

液体試料に対する分光試料技術として、近年、液体分子線技術が用いられるようになった。これはもともと、宇宙船内の除湿のために宇宙空間へ排水を行う技術として開発されたものであるが<sup>26)</sup>、Faubelらが分光

試料の発生技術として基礎的な性質を研究することにより<sup>27-29)</sup>, 物理化学研究の試料として普及した<sup>30-35)</sup>. なお, 噴射直後の液体分子線表面は滑らかな層流となることが知られており, 液体分子線が大強度のレーザー光を通すための光ファイバーとして用いたレーザー微細加工装置も市販されている<sup>36)</sup>.

液体分子線技術では液体試料を細孔から真空中に噴出することにより, 液体表面積を小さくして蒸発を軽減し, 真空槽内の真空度の悪化を防ぐとともに, 液相から固相への相転移も遅延させることができる.

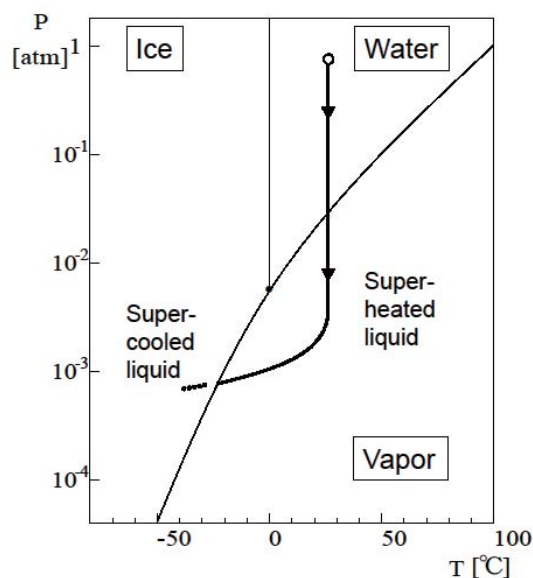


図4 真空中に放出された水の相図上の状態変化.

液体分子線が真空中に放出されてから相図上でたどるであろう経路を図4に示す. 真空中に液体分子線を噴出すると, 外界の急激な圧力低下により, 相図上では断熱的に気相に転移する. 分子線表面から蒸発がおこるが, 液体分子線中にはすべての分子を気化させるに十分な内部エネルギーはないため過熱液体の状態となる. 続いて蒸発熱の放出により分子線は徐々に冷却され, 熱力学的には気相から固相へ相転移するはずである. しかし, 真空中では熱伝導や体積膨張による外界への仕事などによる有効な凝固熱の放出が困難なため, 分子線は過冷却状態になる. さらに真空中での飛行を続けると, 液体分子線は流体力学的な不安定性を生じ, 液滴への分解を契機として氷の微粒子として飛散する. 液体分子線は液体表面からの蒸発により冷却される. 真空中への液体分子線試料の単位時間当たり

の噴出量と分子線表面からの蒸発量を比較すれば分子線温度を推測することができる.

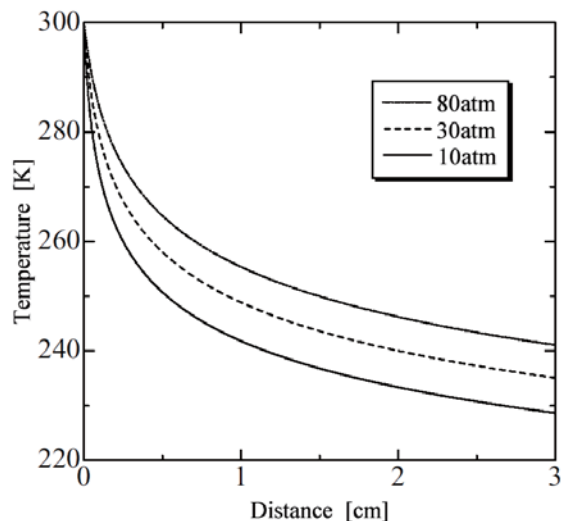


図5 真空中の液体分子線の飛行距離と温度の関係.

図5は, 初期温度 300 K の水試料を, 押し出し圧 10 atm, 30 atm, 80 atm で直径 10  $\mu\text{m}$  の液体分子線ノズルから液体分子線を噴射したときの真空中の飛行距離に対する温度を計算したものである. このような温度の見積もりを行うことにより照射位置を決定するが, より詳細には後述のように実験結果との突合せが必要になる.

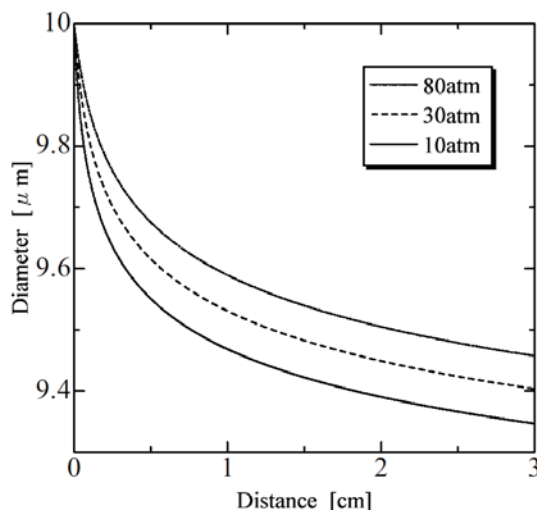


図6 液体分子線の飛行距離と分子線直径の関係.

また、液体試料は蒸発により失われ分子線径が減少する。分子線直径の変化についての計算による見積もりを図6に示す。これは分子線温度の違いによる水の飽和蒸気圧変化を反映し、分子線への照射位置の付近における雰囲気圧力を推定するために用いた。条件は上記の温度変化の場合と同一である。

なお、液体分子線は以上のような熱力学的な変化だけでなく、境界をもたない真空中の局所に高密度の流体を輸送するものであるため、流体力学的な不安定性によって、表面振動や揺らぎが発散的に拡大して分裂する。また、自己電離した水のイオンや電解質溶質に対して、ノズルやそれ以前の輸送経路が電極としてはたらくために発生する電気化学的な不安定性が存在するといわれている。それらの詳細はまだ十分に解明されているとはいいがたいが、分光試料としてはこのような不安定性を制御して防ぐ技術を開発させる必要がある。また前節で述べた反応の時間発展の強制停止の観点からは、不安定性を自在に発生させる技術もまた重要になるだろう。

### 3 実験方法

実験は西播磨科学公園都市にある SPring-8 大型放射光施設内の日本原子力研究開発機構ビームライン BL23SU の生物分光ステーションにおいて行った<sup>37,38)</sup>。

アンジュレーターから出射された放射光ビームを不等刻線間隔平面回折格子分光器により単色化し、二段階の再集光光学系により 50  $\mu\text{m}$  以下のスポットサイズにまで集光して液体分子線に照射した。放射光のエネルギーの較正は、同一のエネルギーにおける気体の酸素分子、および、窒素分子の光吸収スペクトルを測定して既報のものと比較して行った<sup>39-41)</sup>。

液体分子線の光電子分光実験の装置の全体図を図7に示す。本装置は、液体分子線ノズルへの放射光照射を行うための主真空槽(左側)と、静電レンズシステムと静電半球型エネルギー選別器を備えた光電子分光器真空槽(右側)からなる。二つの真空槽は大容量のターボ分子ポンプにより差動排気するとともに、主真空槽には液体窒素クライオパネルを設置した。また、照射後の試料は進行方向下流(主真空槽の下側。図に表示されてはいない。)の液体窒素冷却した廃試料トラップにより真空装置内に固定した。なお、地球磁場等の残留磁場により電子の運動を乱されることを防ぐために、主真空槽、光電子分光器真空槽の内壁に二重の  $\mu$ -メタルによる磁気シールドを施した<sup>6)</sup>。

液体試料には、Milli-Q システムを用いて精製された純水を用い、液体クロマトグラフ用の送液ポンプにより加圧し、直径 10  $\mu\text{m}$ 、および、20  $\mu\text{m}$  の白金製の電子顕微鏡の絞りをノズルとして用いて液体分子線を発生させた<sup>5-7)</sup>。このノズルは主真空槽の XYZ 三軸マニピュレーター上に設置し、出射ノズルからの照射位置を変化させて蒸発による液体分子線試料の温度を実効的に制御した。

放射光照射により液体分子線試料から放出された光電子を静電レンズシステムに通過させ、静電型電子分光器にてエネルギー分析を行い検出した。また、X 線吸収スペクトル(XANES)は、レンズ通過後の電子を、エネルギー分析器を動作させずに通過させて計測する全放出電子収量測定の方法により求めた。

なお、蒸発した水蒸気は電子分光器上に付着して氷の絶縁膜をつくり、電子透過率の低下や電極電位のシフト・揺らぎの発生などの問題を起こすため、静電レンズ系と電子エネルギー分析器の数箇所にヒーターを設置して氷の絶縁膜の発生を防いだ<sup>6)</sup>。また、有機分子などの絶縁体試料に対する光電子分光の際には、試料のイオン化による帯電が測定上の問題の一つであり、純水の実験の場合にそれが見られた。そこで、放射光の照射量に対する帯電の程度を、光電子放出量と電子エネルギースペクトルのシフト量から見積もり補正した。

### 4 測定結果

#### 4.1 水の酸素 K 殻吸収端付近の XANES スペクトル

図8は純水の液体分子線に 530 eV–550 eV の単色化 X 線を照射し、全電子収量を X 線エネルギーの関数として表したものであり、酸素の K 殻軌道電子の励起、イオン化に対応した XANES スペクトルである<sup>5)</sup>。この測定には 10  $\mu\text{m}$  のノズルを用いており、押し出し圧は 3.0 MPa である。図8右側の XANES は液体分子線に対する放射光照射位置を 1 mm – 17 mm の範囲で変化させて測定したものであり、一番下側の XANES は液体分子線付近の水蒸気に対するものであり、既報の気体の水のスペクトルにはほぼ一致する<sup>42,43)</sup>。

気体の XANES には、534 eV、536 eV、537 eV の三つのピークを確認することができるが、これらは、 $1s \rightarrow 4a_1$ 、 $1s \rightarrow 2b_2$ 、 $1s \rightarrow \text{Rydberg } 3p$  の遷移に対応する<sup>44)</sup>。一方、液体の XANES では、534.5 eV 付近のピークと、536 eV から立ち上がる幅広いピークが見られた。前者の鋭いピークは気体の 534 eV のピークに対応した内殻励起状態の生成(K 殻吸収共鳴)であり、後者の

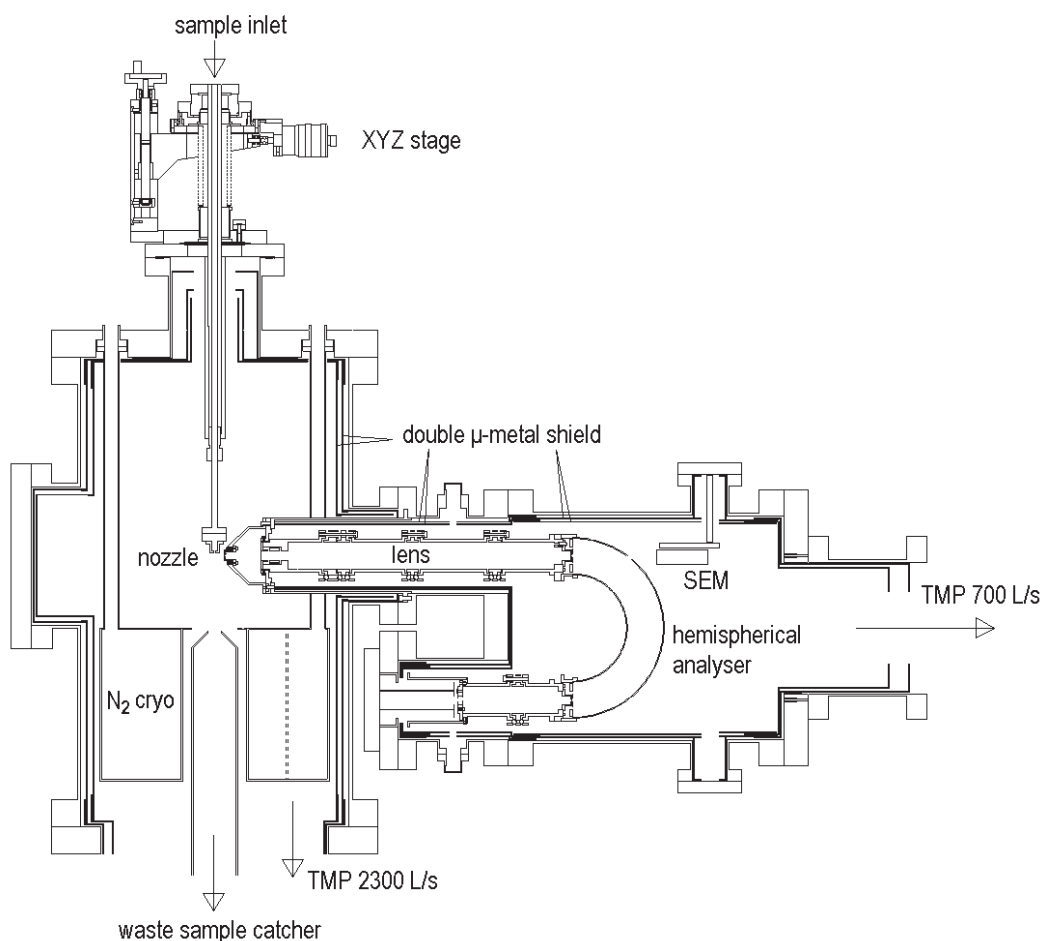


図7 実験装置全体図<sup>6)</sup> .

幅の広いピークはO原子のK殻電子の光イオン化に対応するK殻イオン化断面積のピーク(K殻イオン化ピーク)であり,水分子中のO原子のK殻イオン化閾値はこの二つのピークの間にあると考えられる.量子化学計算によると,液体と気体のXANESの違いは,水素結合による水分子クラスターの外殻電子の非局在的な振る舞いによるものとされている<sup>45)</sup>.

#### 4.2 分子線温度と相

図8右側のXANESは液体分子線に対する放射光照射位置を1mm-17mmの範囲で変化させて測定したものであることを述べた.すなわち,この図は液体分子線試料の温度を実質的に変化させて測定したXANESに相当する.温度の見積りのため,図8の左側には前節で示した真空中の水の液体分子線の飛行距離と温

度の関係を示した<sup>5)</sup>.

ノズルから1mmおよび2mm下流で測定した液体分子線に対するXANESでは,536eVと537eV付近に気体の水分子の寄与と考えられるピークが重畳していることを確認することができ,この領域では分子線表面からの蒸発が活発に起こっていると考えられる.K殻吸収共鳴ピークにも気体のスペクトルの重畳による低エネルギー側へのシフトが見られている.このときの分子線温度は図8左より270K以上である.また,ノズルから12mmと17mm下流で測定したXANESには,541eV付近に新たなピークが出現するようになる.このようなピークは固体の水に対するXANESに特徴的に見られる強調構造である.このとき,分子線温度は図8左によれば250K以下であり,液体分子線は凝固しつつあるものと考えられる.

以上のXANESの実効的な温度依存性の結果から



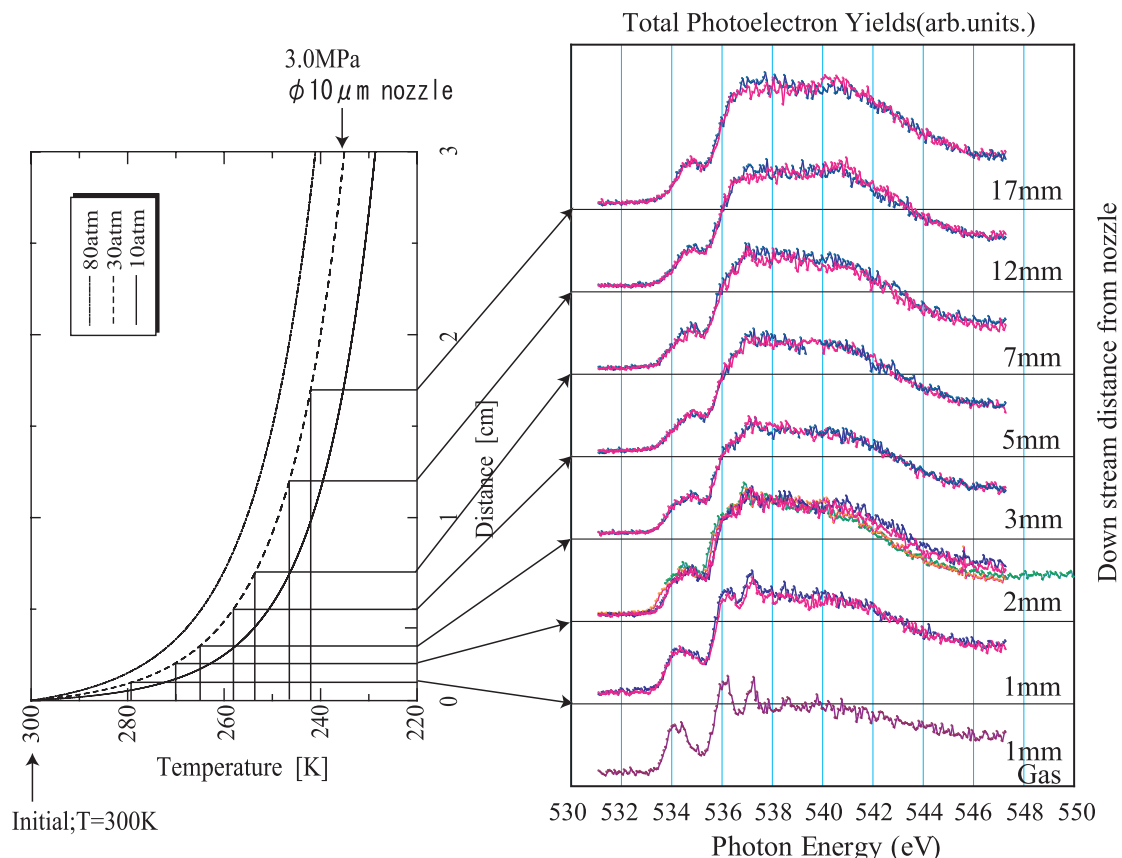


図8 液体分子線のノズルからの飛行距離および温度と XANES の関係<sup>5)</sup>。

10 μm 径のノズルを用いて 3.0 MPa の押し出し圧において発生させた液体分子線の場合、ノズルから 3 mm–7 mm 下流では液体状態が保たれ、かつ蒸発分子の寄与も無視できる液体試料が実現できていると判断できる。以下においても、同様な方法により、液体状態が保持されていると判断される液体分子線試料に対して実験を行った<sup>6)</sup>。

#### 4.3 水液体分子線からの放出電子スペクトル

水の液体分子線からの放出電子スペクトルを図9に示す<sup>6)</sup>。エネルギー 532 eV–549 eV の軟 X 線放射光の照射によって放出された電子の運動エネルギーを 450 eV–530 eV の範囲において分散させ、相対収量を測定したものである。縦軸は、一つのスペクトルだけでなく、異なる X 線エネルギーで測定したスペクトルの間での相対収量をも表す。

これら液体の水からの放出電子スペクトルは、金属表面上に凝結させた氷に対するスペクトルとよく一致

しており<sup>46)</sup>、凝縮系の特徴を共有するものと思われる。

また、気体に対する放出電子スペクトルとも類似が見られるが<sup>23,47)</sup>、気体のスペクトルに比べて、液体の電子スペクトルの全体がわずかに高エネルギー側にシフトしており、電子スペクトルの幅も広い。図9には電子収量の強調構造（ピーク）が電子エネルギー 460 eV, 480 eV, 500 eV の付近に見られるが、これらのピークは X 線のエネルギーを変化させても中心エネルギーに大きな変化は見られない。このことからこれらの電子収量のピークはオージェ遷移によるものと考えられる。これらのオージェ遷移は上記の気体のスペクトルにおける同定結果<sup>23,47)</sup>を参考にすると、主として、500 eV 付近： $K^{-1}1b_11b_1$ 、480 eV 付近： $K^{-1}2a_1V$ 、460 eV 付近： $K^{-1}2a_12a_1$  であると考えられる<sup>6)</sup>。ここで、 $K^{-1}$  空孔の右に書いた二つの軌道はオージェ遷移に関与して空孔の生じる外殻軌道であり、酸素原子の 2s 軌道に由来する  $2a_1$  軌道のほか、O-H 結合に関与する  $1b_1$ 、孤立電子対をつくる  $3a_1$  と  $1b_2$  の三つの外殻価電子軌道 (V) が相当する。これに対して 500 eV 付近

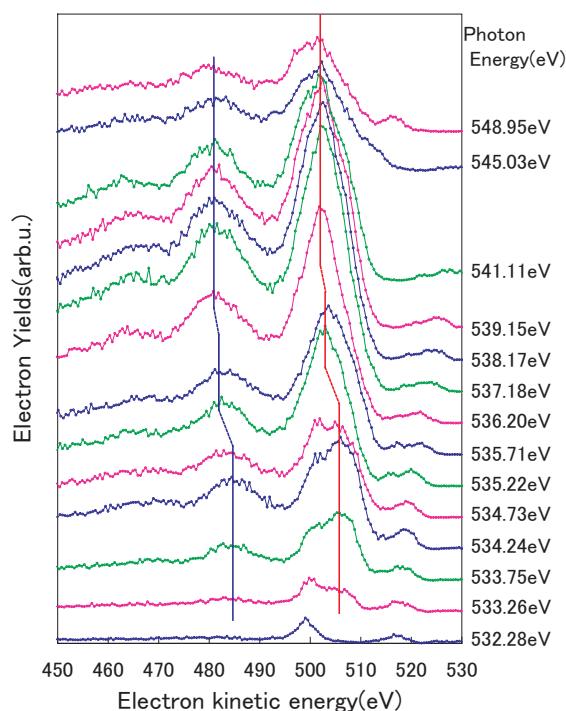


図9 水液体分子線からの放出電子スペクトルの軟 X 線エネルギー依存性<sup>6)</sup>。

の  $K^{-1}1b_11b_1$  オージェ電子ピークよりも高エネルギー側にも電子収量のピークが見られているが、これらは X 線エネルギーを変化させると、その変化分だけのエネルギーシフトが現われ、外殻光電子放出に対応することがわかる。

図9の放出電子スペクトルの変化について概説する。図8右の XANES では  $h\nu=533$  eV 付近から酸素 K 殻軌道電子の X 線吸収に対応する全電子収量の強調が始まる。図9のいちばん下側のスペクトルを測定した  $h\nu=532.28$  eV の X 線エネルギーでは酸素 K 殻電子の励起に満たず、電子エネルギー 499 eV、および、516 eV 付近に見られる電子収量ピークは外殻軌道からの光電子放出に対応する。外殻光電子の小さな収量は、この X 線エネルギーでのきわめて小さな外殻軌道のイオン化断面積を反映したものである<sup>48)</sup>。

$h\nu=533.26$  eV では酸素 K 殻電子の吸収が起こりはじめており(図8)、図9においても電子エネルギー 485 eV、506 eV 付近にはオージェ電子放出に対応する新たなピークが現われる。 $h\nu=536.20$  eV よりも高エネルギー側ではこれらのピークの中心エネルギーはほぼ一定であるのに対して、 $h\nu=534.73$  eV (K 殻吸

収共鳴) から  $h\nu=536.20$  eV (K 殻イオン化ピークの極大値) の領域では、図中の赤と青の縦線で示したようにオージェ電子ピークの中心エネルギーの二段階にわたるシフトがみられた。エネルギーシフト量は全体で 3 eV-4 eV 程度である(表1)。このような内殻吸収領域の低エネルギー末端におけるオージェ電子のエネルギーシフトは、気体や固体でも観測されている内殻励起に特有な現象であり、共鳴オージェシフトと呼ばれている<sup>49)</sup>。外殻空孔軌道に励起された電子が分子内にとどまるため内殻イオン化状態とは分子内電場が異なり、電子のエネルギー準位が変化し、それがオージェ電子エネルギーに反映したものである。

なお、液体の水に対するオージェ電子スペクトルは本研究と相前後してドイツのグループによっても測定されており、本研究の結果とよく一致する<sup>50)</sup>。

#### 4.4 二次元放出電子スペクトル

X 線エネルギーによる電子スペクトルの変化をより視覚的に分かりやすくあらわすために図10の二次元スペクトルを作成した。この図は、横軸に X 線照射により放出された電子の運動エネルギー、縦軸に入射 X 線エネルギーをとり、電子の収量を色調の等高線変化により表したものである。X 線エネルギー軸の測定点が少ないため、スムージング処理により補間した。比較のため全電子収量測定による XANES も図10左に示した。図10右中に青線で示したように共鳴オージェピークシフトを連続して見ることができる。また、赤線で示したように、電子エネルギー 430 eV-530 eV の範囲における三種類のオージェピークの電子収量 K 殻吸収共鳴や K 殻イオン化ピークにおける電子収量の強調が明瞭である。

図11は図8の液体および気体の XANES に加えて、図8あるいは図9の電子エネルギー 450 eV から 520 eV の範囲における電子収量を積算した部分電子収量と、もっとも収量の大きな  $K^{-1}1b_11b_1$  オージェ遷移に対する電子収量を、K 殻吸収共鳴ピークの極大値付近で規格化して示したものである<sup>6)</sup>。

部分電子収量および  $K^{-1}1b_11b_1$  オージェ電子収量はほぼ一致しているが、これらと全電子収量との間には、K 殻イオン化ピークの立ち上がり領域の差異が生じており、個々のオージェ遷移過程の部分断面積の違いが見えているかのようである。より詳細な測定により明らかにされると期待される。

表 1 オージェ電子ピークの中心エネルギーの軟 X 線エネルギーによる変化。

軟 X 線エネルギー	$K^{-1}1b_11b_1$ (赤線) (eV)	$K^{-1}2s_1V$ (青線) (eV)
536.20 eV ~ 548.95 eV	502.3	481.6
535.22 eV ~ 535.71 eV	503.2	482.8
533.26 eV ~ 534.73 eV	506.0	484.5

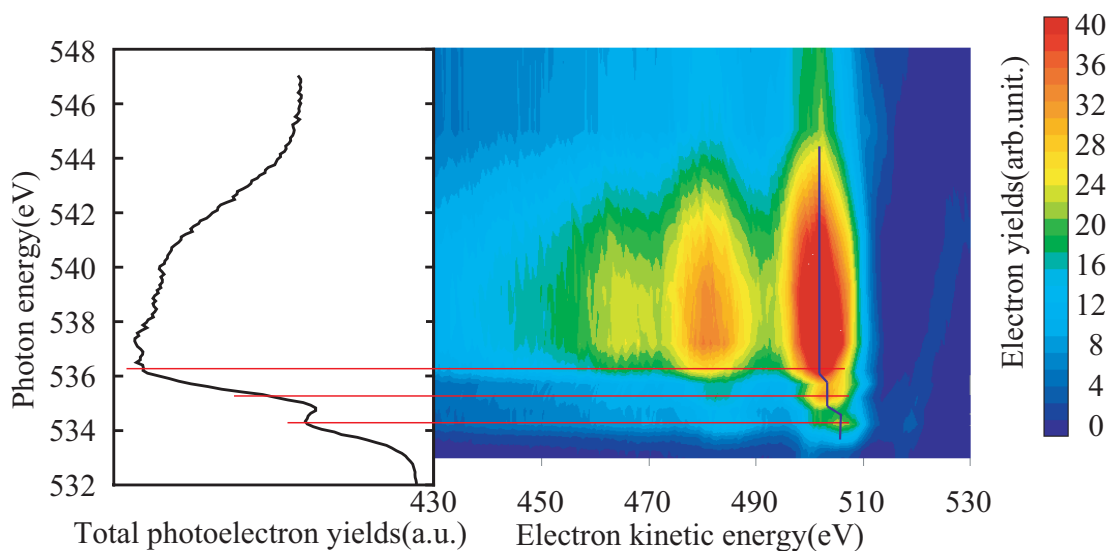


図 10 酸素 K 殻吸収端付近における水の二次元光電子スペクトル。

## 5 終わりに

以上に述べた結果は DNA やヌクレオチドに対する直接効果の初期過程の研究のための方法論の開発として行ってきたものであるが、水の放射線分解における OH ラジカルの生成のような間接効果の初期過程の研究として、あるいは、モンテ・カルロ・シミュレーションにおける素過程データとしてこれまで用いられてきた気体の水からの放出電子スペクトルや X 線ラマンスペクトルに比較して、より現実的な液体の水についての XANES や放出電子スペクトルの詳細を明らかにしたものとして、意義を認めることもできると考えられる。

以上のように、液体分子線を用いた放射光選択励起の方法はほぼ確立した。後編では DNA の構成単位であるヌクレオチドの X 線吸収スペクトルならびにその構造変化について述べる。

## 6 謝辞

本研究は科学研究費補助金（課題番号 13304033, 17204035, 21241017），ならびに，原子力機構先端基礎研究センター黎明研究（H20, H21）の援助を受けて行われてきました。また，原子力機構先端基礎研究センターの横谷明德博士，藤井健太郎博士，同機構放射光研究ユニットの斎藤祐児博士らとの共同研究により行われてきたものです（原子力機構専用ビームライン課題：2005B3805, 2006A3804, 2006B3833, 2007A3820, 2007B3810, 2008A3810, 2008B3810, 2009A3810, 2009B3810, 2010A3810, 2010B3810, 2011A3810, 2011B3810/BL23SU）。同ユニットの福田義博氏には実験・保守の上で重要な協力をいただいています。また，農工大の多くの修士課程修了者や，卒業生，在籍者とともに進められて来ました。以上，記して感謝いたします。

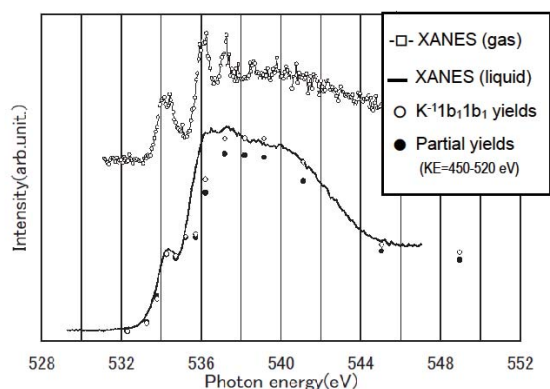


図 11 電子収量の比較<sup>6)</sup>。実線：全電子収量 (XANES), ○:  $K^{-1}b_11b_1$  オージェメインピーク電子収量, ●: 部分電子収量。上側は気体の水に対する XANES。

参考文献

- 1) 山下真一, 放射線化学, 89 (2010) 2; および 89 号特集記事に現状分析が示されている。
- 2) A. Yokoya, K. Fujii, N. Shikazono, M. Ukai, Spectroscopic study of radiation-induced DNA lesions and their susceptibility to enzymatic repair, in Y. Hatano, Y. Katsumura, A. Mozumder (Eds.), Charged particle and photon interactions with matter-recent advances, applications and interfaces, CRC/Taylor & Francis Group, USA, 2011, pp. 543-574.
- 3) 日本放射線化学会 (Ed), 放射線化学のすすめ, 学会出版センター, 2006.
- 4) 田中大, 星野正光, C. Makochekanawa, 放射線化学, 81 (2006) 40.
- 5) M. Ukai, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Saitoh, Radiat. Phys. Chem., 77 (2008) 1265.
- 6) M. Ukai, A. Yokoya, Y. Nonaka, K. Fujii, Y. Saitoh, Radiat. Phys. Chem., 78 (2009) 1202.
- 7) M. Ukai, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Saitoh, Chem. Phys. Lett., 495 (2010) 90.
- 8) H. Shimada, T. Fikao, T. Minami, I. Sakuma, N. Okuizumi, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, Y. Saitoh, M. Ukai, to be published.
- 9) 近藤宗平, 分子放射線生物学, 学会出版センター, 1972.
- 10) 松原謙一ほか訳, 第 4 版 ワトソン 遺伝子の分子生

- 物学, トッパン, 2006.
- 11) A. Kling, F. Barãno, M. Nakagawa, L. Távora, P. Vaz (eds.), Advanced Monte Carlo for Radiation Physics, Particle Transport Simulation and Applications, Proceedings of the Monte Carlo Conference, Lisbon, 2000, Springer, Berlin, 2001.
- 12) M. Fuss, A. Muñoz, J.C. Oller, F. Blanco, P. Limão-Vieira, C. Huerga, M. Téllez, M.J. Hubin-Franskin, K. Nixon, M. Brunger, G. García, J. Phys; Conf. Ser. 194 (2009) 012028.
- 13) B. Sutherland, P. Bennett, O. Sidorkina, J. Laval, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97 (2000) 103.
- 14) E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, T. Ellenberger (eds.), DNA Repair and Mutagenesis, ASM, Washington D.C., 2006.
- 15) P. O'Neill, P.W. Chapman, Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med., 47 (1985) 71.
- 16) C. Zhao, Y. Shi, W. Wang, W. Lin, B. Fan, Z. Jia, S. Yao, R. Zheng, Radiat. Phys. Chem., 63 (2002) 137.
- 17) Y. Shi, W. Wang, C. Huang, Z. Jia, S. Yao, R. Zheng, Mutagenesis, 23 (2008) 19.
- 18) 山本修 (Ed), 放射線障害の機構, 学会出版センター, 1982.
- 19) 井口道生, 放射線化学, 85 (2008) 45.
- 20) J.W. Gallagher, C.E. Brion, J.A.R. Samson, P.W. Langhoff, J. Phys. Chem. Ref. Data, 17 (1988) 9.
- 21) C.E. Brion, Comment Atom. Molec. Phys., 16 (1985) 249.
- 22) Y. Hatano, Phys. Rep., 313 (1999) 109.
- 23) K. Siegbahn, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom., 5 (1974) 3.
- 24) W. Eberhardt, T.K. Sham, R. Carr, S. Krummacher, M. Strongin, S.L. Weng, D. Wesner, Phys. Rev. Lett., 50 (1983) 1038.
- 25) 市村禎二郎, 旗野嘉彦, 井口洋夫 (eds.), 日本分光学会測定法シリーズ 24, シンクロトロン放射光 - 化学への基礎的応用 -, 学会出版センター, 1991.
- 26) H. Fuchs, H. Legge, Acta Astronautica, 6, (1979) 1213.
- 27) M. Faubel, S. Shlemmer, J.P. Toennies, Z. Phys., D, 10 (1988) 269.
- 28) M. Faubel, B. Steiner, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 96 (1992) 1167.
- 29) M. Faubel, T. Kisters, Nature, 339 (1989) 527.
- 30) M. Faubel, B. Steiner, J.P. Toennies, J. Chem. Phys., 106 (1997) 9013.

- 31) M. Faubel, B. Steiner, J.P. Toennies, J. Electron Spectrosc. Rel. Phenom., 95 (1999) 159.
- 32) R. Moberg, F. Bökman, O. Bohman, H. Siegbahn, J. Phys. Chem., 94 (1991) 5226.
- 33) H. Morgner, Surface Investigation, 13 (1998) 463.
- 34) F. Sobott, A. Wattenberg, H.-D. Barth, B. Brutschy, Int. J. Mass Spectrom., 185/186/187 (1999) 271.
- 35) N. Horimoto, J. Kohno, F. Mafuné, T. Kondow, Chem. Phys. Lett., 318 (2000) 536.
- 36) たとえば, <http://www.synova.ch>
- 37) A. Yokoya, T. Sekiguchi, Y. Saitoh, T. Okane, T. Nakatani, T. Shimada, H. Kobayashi, M. Takao, Y. Hayashi, S. Sasaki, Y. Miyahara, T. Harami, T.A. Sasaki. J. Synchrotron Rad., 5 (1998) 10.
- 38) Y. Saitoh, T. Nakatani, T. Matsushita, A. Agui, A. Yoshigoe, Y. Teraoka, A. Yokoya, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A, 474 (2001) 253.
- 39) C.T. Chen, F. Sette, Rev. Sci. Instrum., 60 (1989) 1616.
- 40) R.N.S. Sodhi, C.E. Brion, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom., 34 (1984) 363.
- 41) M. Coreno, M. de Simone, K.C. Prince, R. Richter, M. Vondráček, L. Avaldi, R. Camilloni, Chem. Phys. Lett., 306 (1999) 269.
- 42) K.R. Wilson, B.S. Rude, J. Smith, C. Cappa, D.T. Co, R.D. Schaller, M. Larsson, Rev. Sci. Instrum., 75 (2004) 725.
- 43) S. Kashtanov, A. Augustsson, Y. Luo, J.-H. Guo, C. Sâthe, J.-E. Rubensson, H. Siegbahn, J. Nordgren, H. Ågren, Phys. Rev. B, 69 (2004) 024201.
- 44) J. Schirmer, A.B. Trofimov, K.J. Randall, J. Feldhaus, A.M. Bradshaw, Y. Ma, C.T. Chen, F. Sette, Phys. Rev. A, 47 (1993) 1136.
- 45) Ph. Wernet, D. Nordlund, U. Bergmann, M. Cavalleri, M. Odelius, H. Ogasawara, L.Å. Näslund, T.K. Hirsch, I. Ojamäe, L.G.M. Pettersson, A. Nissen, Science, 304 (2004) 995.
- 46) D. Coulman, A. Puschnann, U. Höfer, H.-P. Steinrück, W. Wurth, P. Feulner, D. Menzel, J. Chem. Phys., 93 (1990) 58.
- 47) W.E. Moddeman, T.A. Carlson, M.O. Krause, B.P. Pullen, W.E. Bull, G.K. Schweitzer, J. Chem. Phys., 55 (1971) 2317.
- 48) J. Berkowitz, Atomic and Molecular Photoabsorption: Absolute Total Cross Sections, Academic, London and San Diego, 2002.
- 49) I. Hjelte, M.N. Piancastelli, R.F. Fink, O. Björneholm, M. Bässler, R. Feifel, A. Giertz, H. Wang, K. Wiesner, A. Ausmees, C. Miron, S.L. Sorensen, S. Svensson, Chem. Phys. Lett., 334 (2001) 151.
- 50) B. Winter, U. Hergenhahn, M. Faubel, O. Björneholm, I.V. Hertel, J. Chem. Phys., 127 (2007) 094501.

## 著者略歴

鶴飼 正敏：1988年東京工業大学大学院理工学研究科博士後期課程修了。日本学術振興会特別研究員を経て、1988年東京工業大学理学部助手。1995年東京農工大学工学部助教授。2010年より同大学院工学研究院教授(現職)。理学博士。専門：放射線化学・原子分子物理学。趣味：雑学。

島田 紘行：2006年東京大学大学院総合文化研究科博士後期課程修了。2006年分子科学研究所CREST研究員。2008年東京農工大学工学部特任助教。2011年同大学院工学研究院助教(現職)。学術博士。専門：原子分子物理学・量子エレクトロニクス。趣味等：読書・楽器演奏