

放射線による新しい DNA 損傷過程の提案

東北大学 高度教養教育・学生支援機構/東北大学大学院 理学研究科
岡 壽崇*

This article depicts a proposal of a novel DNA modification mechanism induced by irradiation, and is written as an award work from Japanese Society of Radiation Chemistry. The mechanism of DNA modification induced by K-shell photoabsorption of nitrogen and oxygen atoms was investigated by electron paramagnetic resonance and x-ray absorption near edge structure measurements of calf thymus DNA film. The EPR intensities for DNA film were twofold times larger than those estimated based on the photoabsorption cross section. This suggests that the DNA film itself forms unpaired electron species through the excitation of enhanced electron recapturing, known as the postcollision interaction process.

Keywords: soft x-ray, DNA, electron paramagnetic resonance (EPR), electron spin resonance (ESR), postcollision interaction (PCI)

1 はじめに

2015年9月に「放射線による新しい DNA 損傷過程の提案」というタイトルで、日本放射線化学会より放射線化学賞を受賞した。

本稿では、本受賞の対象論文となった「T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, Unpaired Electron Species in Thin Films of Calf-Thymus DNA Molecules Induced by Nitrogen and Oxygen K-Shell Photoabsorption, *Physical Review Letters*, 109 (2012) 213001¹⁾」の解説と、分量制限のために論文に執筆できなかった内容について

での説明を行う。

2 軟 X 線を用いた DNA 損傷の研究

重粒子線をはじめとする各種放射線が DNA に照射されると、直接あるいは間接的な効果によって DNA 変異や鎖切断などの DNA 損傷が形成されるが、形成される損傷の種類や収量は放射線の線質やエネルギーによって大きく異なる。一方で、軟 X 線は、その照射エネルギーを選ぶと（単色化すると）、DNA 構成元素である炭素、窒素、酸素、リンなどを選択的に励起・イオン化できるという利点があるため、DNA や DNA 関連分子に対する照射効果の研究が広く行われてきた。最近では、Fujii らが DNA 塩基損傷や DNA 鎖切断などの収量が軟 X 線のエネルギーによって変化することを報告するなど、軟 X 線による選択的な DNA 損傷導入は、放射線 DNA 損傷の修復の研究や DNA のナノデバイスへの応用など、幅広い分野への応用が期待される。

一般的な放射線の照射によって形成された DNA 損傷は電気泳動法などで調べることでできる、いわば「最終生成物」である。我々のグループでは、この最終生成物を調べるだけでなく、照射から最終生成物にいたる過程における中間生成物である「DNA ラジカル」にも注目し、細胞致死や突然変異などの放射線生物影響の原因の1つである DNA 損傷の物理化学的なメカニズムを明らかにしたいと考えている。より具体的にいえば、軟 X 線を DNA に照射し、DNA を構成する元素に生じた内殻イオン化と、これに引き続いて起きる Auger 過程によって、どのように DNA 損傷が形成されるのかを明らかにしたい、ということである。

DNA ラジカルの研究は、通常は放射線を低温で照射し、低温に保持したまま電子常磁性共鳴 (electron paramagnetic resonance, EPR, 電子スピン共鳴 (electron spin resonance, ESR) とも) 装置まで輸送し、低温で安定なラジカルを対象とすることがほとんどである³⁻⁵⁾。しかし、このような多段階の手法では、内殻イオン化

A proposal of a novel DNA modification mechanism induced by irradiation

Toshitaka Oka* (*Institute for Excellence in Higher Education / Graduate School of Science, Tohoku University*),

〒980-8576 宮城県仙台市青葉区川内 41

TEL: 022-795-6597, FAX: 022-795-6597,

E-mail: kotobuki@m.tohoku.ac.jp

と Auger 過程のようなごく初期に形成されるラジカルを測定することは不可能である。そこで、横谷らは、SPring-8 の BL23SU のビームラインに EPR 装置を直接接続し、*in situ* で EPR 測定可能な装置を開発した⁶⁾。EPR のキャビティが真空ラインの中にあり、 10^{-7} Pa の高真空内で軟 X 線を照射しながら EPR 測定が可能である。なお、本論文では DNA ラジカルではなく「不對電子」という表現を用いるが、これは通常の低温で安定な DNA ラジカルと区別するためである。

3 実験

仔牛胸腺 DNA を蒸留水に溶かして清浄な基板に滴下し、大気中・室温で乾燥させた。基板上から DNA 薄膜を剥離し、短冊状に切り出し、金を蒸着した無酸素銅のロッドの上に固定し⁷⁾、銅のロッドを直線導入器に取り付け、ロードロック室 (10^{-5} Pa) を経由して高真空チャンバー (10^{-7} Pa) に導入した。軟 X 線が試料を透過してロッドに照射されるとロッド由来のラジカルが生成されてしまう。仔牛胸腺 DNA と X 線との断面積^{8,9)} から、軟 X 線は 1 枚の試料でも十分に吸収されロッドに到達しないことを確かめたが、DNA は鎖状分子のために軟 X 線が薄膜を通り抜ける可能性があるため、これを極力減らすよう試料は 3 枚重ねにした。また、ロッドのシグナルがどのエネルギーにおいても検出されなかったことから、薄膜を透過してロッドに照射された軟 X 線は無視できるレベルであり、観測されたシグナルのほとんどは DNA 試料由来のものであると判断された。

高真空チャンバー導入後、窒素 (370 eV–425 eV) および酸素 (525 eV–600 eV) の K 殻吸収端を含むエネルギー領域で EPR 測定を行った。エネルギーを変化させながら EPR 測定を行い、得られたシグナルの 2 回積分の値を、集光ミラーのドレインカレント (\propto 光子量) で割って EPR の強度とした。EPR の測定条件は掃引時間 1 分、掃引幅 ± 1 mT、マイクロ波出力 250 μ W である。

さらに、DNA 薄膜の X 線吸収スペクトルも取得した。軟 X 線の透過力は弱いいため、いわゆる x-ray absorption fine structure (XAFS) 測定では Si 基板上に形成した薄膜に軟 X 線を照射し、試料のドレインカレントを測定して X 線の吸収を見積もることが多いが、今回は文字通り「X 線吸収測定」を行うこととした。DNA の自立薄膜を作製し穴あきのホルダに取り付け、フォトダイオードで透過光の強度 (I) を、さらに薄膜を光軸から完全に外して入射光の強度 (I_0) を測定し、

Beer-Lambert の法則 ($A = -\log(I/I_0)$) で吸光度 A を計算し、エネルギーを掃引することで「真の X 線吸収測定」による XAFS を得た。

4 結果と考察

Figure 1 に DNA 薄膜の窒素および酸素の K 殻吸収端近傍における EPR スペクトルの例を示す。チミンやシトシンなどと同じような 1 本線で、ビームを止めるとすぐに消失する短寿命のラジカル^{10,11)} が 370 eV から 700 eV のエネルギー範囲で得られた。 g 値は Mn マーカーから 2.000 と見積もられ、自由電子 (g 値 2.0023) とは異なるラジカルであることがわかった。

EPR 強度とマイクロ波出力の平方根 (\sqrt{P}) の関係を Fig. 2 に示す。通常、EPR 強度と \sqrt{P} の間には直線関係があり、 \sqrt{P} が大きくなると飽和するのだが、軟 X 線のエネルギーにかかわらず \sqrt{P} が小さいところでは EPR 強度は \sqrt{P} の増加とともにゆるやかに増加し、 \sqrt{P} が大きくなると発散するという関係が得られた。そこで、原点に外挿すると曲線関係を示す領域 ($13 \mu\text{W}^{1/2}$ – $18 \mu\text{W}^{1/2}$) のちょうど真ん中あたりの 250 μ W で実験を行うこととした。また、軟 X 線のスリットを広げて線量 (光子量) を増やすと EPR 強度が線量に比例して大きくなることも確かめた。

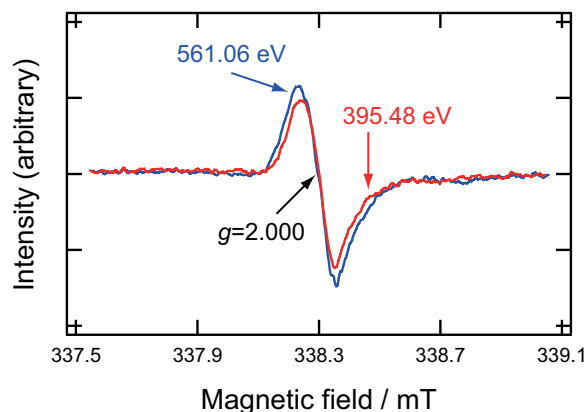


Figure 1. EPR spectra for calf thymus DNA during soft x-ray irradiation around the nitrogen and the oxygen K edge at room temperature. The EPR spectra were obtained at energies of 395.48 and 561.06 eV. (Reprinted figure with permission from T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, *Physical Review Letters*, **109**, 213001, 2012. Copyright (2011) by the American Physical Society.)

このような条件で測定した EPR 強度の軟 X 線エネルギー依存性を Fig. 3 に示す。右軸は X 線吸収測定か

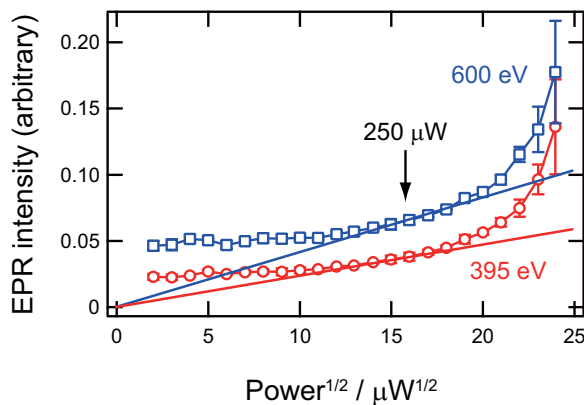


Figure 2. Plot of the DNA film EPR intensity vs the square root of microwave power. The soft x-ray energies were 395 and 600 eV, and the solid lines are visual guides. Hereafter, a microwave power of 250 μ W was used for all EPR measurement. (Reprinted figure with permission from T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, *Physical Review Letters*, **109**, 213001, 2012. Copyright (2011) by the American Physical Society.)

ら求めた x-ray absorption near edge structure (XANES) スペクトルである。2つのスペクトルは K 殻吸収端よりも低いエネルギー (プレッジ) で規格化した。EPR のエネルギー依存性は窒素・酸素の両方の領域において XANES と似たような微細構造を示すが、図を見てもわかるように K 殻吸収端近傍で XANES スペクトルよりも高くなっており、仔牛胸腺 DNA 上に誘起された不対電子 (DNA ラジカル) が窒素や酸素の K 殻吸収端において増感していることを示唆している。横谷らは仔牛胸腺 DNA の EPR 強度と 1 本鎖切断の収量が酸素の K 殻吸収端近傍において多くなった原因を DNA の水和水の酸素による効果ではないかと報告している⁷⁾が、本研究では窒素の K 殻吸収端近傍でも EPR 強度の増感も観測できたことから、水和水以外の原因があることが示唆された。

Figure 4 に、Fig. 3 の (a) 窒素と (b) 酸素のエネルギー領域それぞれを拡大したものを示す。破線は仔牛胸腺 DNA の吸収断面積を、DNA を構成する元素の断面積から見積もったもの (ベースライン) である⁸⁾。 α は K 殻吸収端のプレッジの強度、 β は破線のベースラインよりも大きな値、すなわち α の影響を除いた強度と定義すると、たとえば α_{EPR} は水素の K 殻、炭素の K 殻、窒素の L 殻と酸素の K 殻の和、 β_{EPR} は窒素 K 殻のイオン化のみによって得られる EPR 強度となる。この指標を利用して、EPR と XANES のそれ

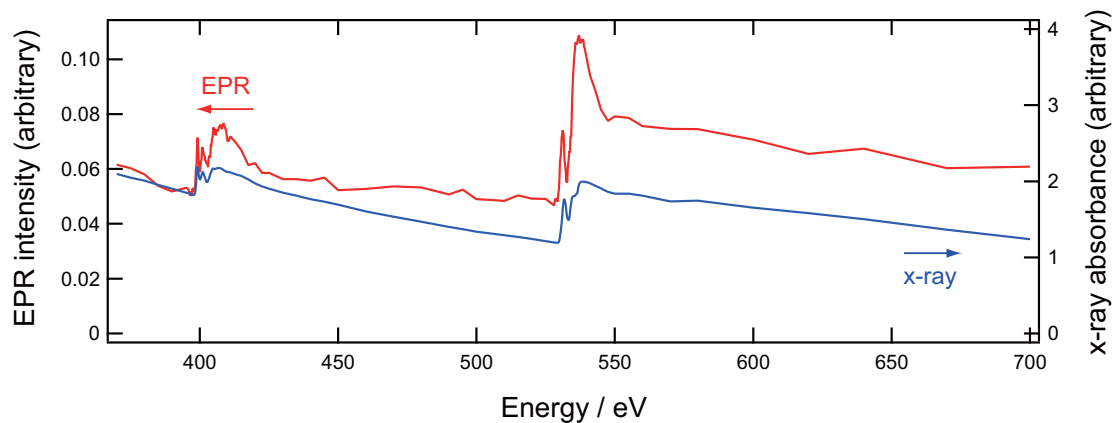


Figure 3. The dependence of the double-integrated EPR intensity of the calf thymus DNA film on the soft x-ray energy, from 370 to 700 eV including the nitrogen and the oxygen K edges. The right-hand axis shows the XANES spectrum of the calf thymus DNA film. The yields of the unpaired electron species produced in the calf thymus DNA film were significantly enhanced by the nitrogen and the oxygen photoabsorption. (Reprinted figure with permission from T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, *Physical Review Letters*, **109**, 213001, 2012. Copyright (2011) by the American Physical Society.)

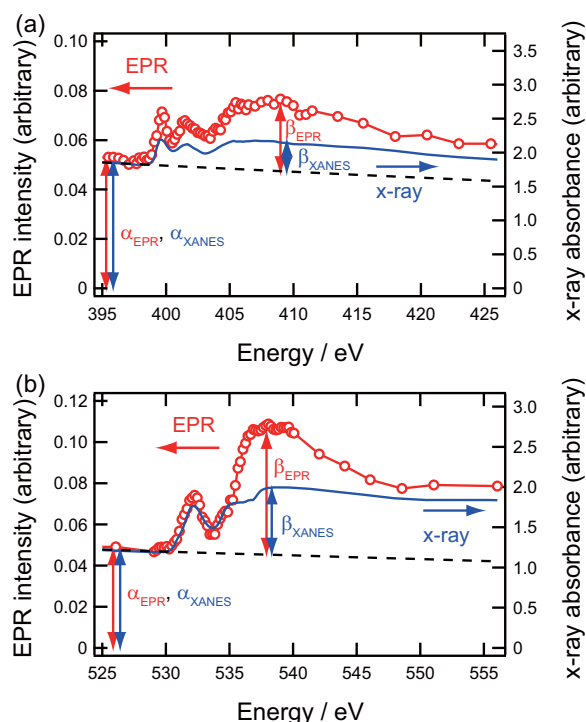


Figure 4. The soft x-ray energy dependence of the double-integrated EPR intensity of the calf thymus DNA film around (a) the nitrogen K edge, and (b) the oxygen K edge. The right-hand axes show the x-ray absorption spectra of the calf thymus DNA film. The dotted curves represent the baseline of the spectra. (Reprinted figure with permission from T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, *Physical Review Letters*, **109**, 213001, 2012. Copyright (2011) by the American Physical Society.)

それぞれについての α と β の比および EPR と XANES の比 (EPR:XANES) を Table 1 にまとめた。ここで、 α はプレエッジのエネルギーを、 β のエネルギーは π^* , σ^* そしてイオン化閾値よりも十分高いところを選択した。EPR の強度は全てのエネルギー領域において XANES のそれよりも高かった。特に σ^* で顕著であり、EPR:XANES が 2 倍程度と最も高くなったことから、EPR 強度は $1s \rightarrow \sigma^*$ で著しく増感されることがわかった。

DNA ラジカルは軟 X 線照射に起因する光電子放出とそれにとまう Auger 電子の放出によって形成されると考えられるが、これだけでは K 殻イオン化閾値より上のエネルギーにおける著しいラジカル増感を十分に説明することはできない。となると、最初に放出さ

Table 1. Ratios of β to α for EPR and XANES spectra at the nitrogen K-edge (α : 395.48 eV, β : 399.68 eV (π^*), 408.98 eV (σ^*), 420.48 eV and 450.48 eV) and the oxygen K-edge (α : 526.06 eV, β : 532.26 eV (π^*), 538.06 eV (σ^*), 561.06 eV and 621.06 eV), for the calf thymus DNA film. (Reprinted table with permission from T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, *Physical Review Letters*, **109**, 213001, 2012. Copyright (2011) by the American Physical Society.)

	EPR β/α	XANES β/α	EPR:XANES
Nitrogen K-edge			
399.68 eV	0.39	0.20	1.93
408.98 eV	0.55	0.23	2.39
420.98 eV	0.33	0.19	1.77
450.48 eV	0.29	0.16	1.75
Oxygen K-edge			
532.26 eV	0.56	0.48	1.17
538.06 eV	1.29	0.69	1.88
561.06 eV	0.71	0.62	1.15
621.06 eV	0.82	0.68	1.20

れた光電子の電子付着や再結合をこの原因と考えるのが自然である。

K 殻から放出された遅い光電子の電子付着^{12,13)}が、まず思い浮かぶ。もしこのような電子付着が起きると閾値よりも 1 eV や 2 eV 高いエネルギーにおいて鋭いピークを見せるはずであるが¹³⁾、窒素・酸素のどちらの閾値以上においても電子付着に起因する共鳴構造のピークが観測されなかった。我々がチミンやシトシンで同様の測定をした際も¹¹⁾ 鋭いピーク^{14,15)}は得られなかったし、チミンではラジカルの増感もなかった。また、我々が測定しているラジカルは数 10 μs –数 100 μs と短寿命であり¹⁶⁾、文献 [12,13] で報告されている鎖切断のような安定な生成物とは異なる。これらのことから、我々は解離性電子付着はこの DNA ラジカルや塩基ラジカル増感の原因ではないと考えた。もう 1 つの可能性は電子とイオンの再結合であるが、本論文の照射条件では体積再結合は考えにくい。このように消去法で検討したところ、Auger 電子放出前の 1 価イオンによる再結合、特にイオン化閾値付近で強調される親イオンへの再結合 (ジェミネート再結合) が起きているのだろうと予想されたが、通常のジェミネート再結合では電子が周囲との多段階の非弾性衝突によって減速される必要があるので、クーロンポテン

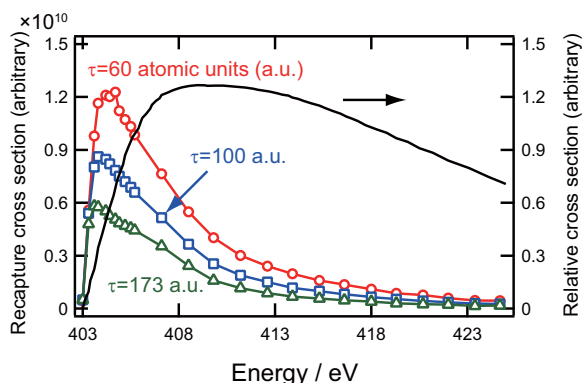


Figure 5. Recapture cross section of the calf thymus DNA film vs the photon energy above ionization potential of nitrogen. The units for τ in the figure are atomic units (a.u.). The right-hand axis shows the relative cross section of DNA. The threshold peak of the recapture cross section above the ionization potential is similar to the enhancement of the EPR intensities shown in Figs. 3 and 4. (Reprinted figure with permission from T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, *Physical Review Letters*, **109**, 213001, 2012. Copyright (2011) by the American Physical Society.)

シャル内に再捕獲される可能性は低い。しかし、Auger 電子放出によるポテンシャルの急激な変化による減速ならば再捕獲可能である。この過程は気相の原子・分子を扱う研究領域では衝突後相互作用 (postcollision interaction, PCI) として知られている¹⁷⁾。これは、入射光子のエネルギーがイオン化閾値に十分近い場合、イオン化する光電子が遅く、後続の Auger 電子がこれを追い越すことで 2 価になるはずの原子のポテンシャルが変化し、光電子が減速され、親イオン原子へ再捕獲されて 1 価になる現象である¹⁸⁻²⁰⁾。これらのことから、我々は PCI によって再捕獲された光電子が EPR によって検出されているのではないかと考えた。

本当にこのような再捕獲が σ^* 付近のエネルギーで行われるかは半古典的¹⁸⁾な計算で推定した (計算方法は文献 [21] で解説したので割愛する)。Figure 5 に窒素イオン化閾値以上のエネルギー領域における再捕獲断面積のエネルギー依存性を示す。図の右軸は相対吸収断面積のエネルギー依存性である。窒素の K ホール寿命 τ を 173 a.u. (原子単位) とした結果とあわせ、比較のために 100 a.u. と 60 a.u. の場合も示した。再

捕獲断面積のイオン化閾値以上での挙動が EPR 強度のイオン化閾値以上の挙動とほぼ同様の形となったことで、PCI 過程が DNA 薄膜のイオン化閾値近傍での EPR 強度増感の有力な原因であることが示された。このように再捕獲された DNA は 1 価のイオンであり、通常の内殻イオン化によって生じる 2 価のイオンとは異なる。そのため、通常の 2 価のイオンを出発点とした DNA 損傷とは異なる新しい DNA 損傷過程を示す可能性があり、価数の違いでどのような DNA 損傷を形成するかは非常に興味深く、引き続き研究を進めていく必要がある。

5 まとめ

軟 X 線照射した自立仔牛胸腺 DNA 薄膜の EPR 強度の窒素および酸素の K 殻吸収端近傍のエネルギー依存性および XANES スペクトルを初めて測定した。照射中のみ観測される短寿命の DNA ラジカルの g 値は 2.000 と見積もられ、EPR 強度の \sqrt{P} 依存性はよく知られている飽和する挙動とは異なり発散した。EPR 強度は窒素および酸素のイオン化閾値以上のエネルギーで PCI によって増感することがわかり、通常の 2 価のイオンではなく 1 価のイオンを出発点とする新しい DNA 損傷過程を提案することができた。

〈謝 辞〉

放射線化学賞受賞においては、本賞選考委員の先生方、推薦していただいた小林慶規博士 (産業技術総合研究所)、平出哲也博士 (日本原子力研究開発機構、受賞時: 事務局)、鷲尾方一先生 (早稲田大学、受賞時: 会長)、もっぱら有機高分子材料の分析を行っていた筆者に放射線化学の立場から放射線化学と放射線生物影響の境界領域の研究を始めるきっかけを下さった勝村庸介先生 (アイソトープ協会) にお礼申し上げます。本受賞対象論文の成果は、共同研究者の横谷明德博士 (量子科学技術研究開発機構 (QST))、藤井健太郎博士 (QST)、鶴飼正敏先生 (東京農工大学)、福田義博氏 (スプリングエイトサービス) のお力無くしては得られません。深く感謝いたします。また、応募から受賞にいたる間、いろいろとサポートいただいた木野康志准教授および関根勉教授 (東北大学) にもお礼申し上げます。(所属は全て現所属)

本研究の軟 X 線照射は公益財団法人 高輝度光科学研究センター (JASRI) の課題番号 2010B3811, 2011A3815 および 2011B3815 によるものです。また、本研究の

一部は JSPS 科研費 21310041 の助成を受けたものです。

〈参 考 文 献〉

- 1) T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, *Phys. Rev. Lett.* 109 (2012) 213001.
- 2) K. Fujii, N. Shikazono, A. Yokoya, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 16007.
- 3) W. A. Bernhard, D. M. Close in *Charged Particle and Photon Interactions with Matter: Chemical, Physico-chemical, and Biological Consequences with Applications*, edited by A. Mozumder, Y. Hatano (Marcel Dekker, Inc., New York, 2004), Chap. 15, pp. 431–470.
- 4) S. Purkayastha, J. R. Milligan, W. A. Bernhard, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 26286.
- 5) D. Becker, A. Adhikary, M. D. Sevilla in *Charged Particle and Photon Interactions with Matter: Recent Advances, Applications, and Interfaces*, edited by Y. Hatano, Y. Katsumura, A. Mozumder (CRC Press, Boca Raton, 2011), Chap. 19, pp. 503–541.
- 6) A. Yokoya, K. Akamatsu, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A-Accel. Spectrom. Dect. Assoc. Equip.* 467–468 (2001) 1333.
- 7) A. Yokoya, K. Fujii, N. Shikazono, K. Akamatsu, A. Urushibara, R. Watanabe, *Int. J. Radiat. Biol.* 84 (2008) 1069.
- 8) B. L. Henke, E. M. Gullikson, J. C. Davis, *Atom. Data Nucl. Data Tables* 54 (1993) 181.
- 9) The Center for X-Ray Optics, <http://www.cxro.lbl.gov>.
- 10) A. Yokoya, K. Fujii, Y. Fukuda, M. Ukai, *Radiat. Phys. Chem.* 78 (2009) 1211.
- 11) T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, *Appl. Phys. Lett.* 98 (2011) 103701.
- 12) B. Boudaïffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, L. Sanche, *Science* 287 (2000) 1658.
- 13) F. Martin, P. D. Burrow, Z. L. Cai, P. Cloutier, D. Hunting, L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.* 93 (2004) 068101.
- 14) M. A. Huels, I. Hahndorf, E. Illenberger, L. Sanche, *J. Chem. Phys.* 108 (1998) 1309.
- 15) S. Ptasíńska, S. Denifl, V. Grill, T. D. Märk, E. Illenberger, P. Scheier, *Phys. Rev. Lett.* 95 (2005) 093201.
- 16) T. Oka, A. Yokoya, K. Fujii, *Int. J. Radiat. Biol.* 88 (2012) 884.
- 17) A. Lindblad, R. F. Fink, H. Bergersen, M. Lundwall, T. Rander, R. Feifel, G. Ohrwall, M. Tchapyguine, U. Hergenhausen, S. Svensson, O. Bjorneholm, *J. Chem. Phys.* 123 (2005) 211101.
- 18) A. Niehaus, *J. Phys. B-At. Mol. Opt. Phys.* 10 (1977) 1845.
- 19) J. Tulkki, T. Åberg, S. B. Whitfield, B. Crasemann, *Phys. Rev. A* 41 (1990) 181.
- 20) W. Eberhardt, S. Bernstorff, H. W. Jochims, S. B. Whitfield, B. Crasemann, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3808.
- 21) 横谷明德, 鷗飼正敏, 岡 壽崇, 甲斐健師, 渡邊立子, 藤井健太郎, *しょうとつ*, 11 (2014) 33.

〈著 者 略 歴〉

岡 壽崇：2003年 早稲田大学大学院理工学研究科単位取得退学，博士（理学）。早稲田大学，産業技術総合研究所，千葉大学，日本原子力研究開発機構，早稲田大学，大阪大学を経て，現在，東北大学高度教養教育・学生支援機構/東北大学大学院理学研究科助教，専門：材料分析，放射線生物影響，陽電子科学。趣味：ウインタースポーツ，ラグビー観戦ほか。