

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12211

研究課題名(和文)放射線DNA損傷を増感させるアンテナ分子の探索

研究課題名(英文)Explore of molecular aeriels sensitizing radiobiological effects

研究代表者

横谷 明德 (Yokoya, Akinari)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員(定常)

研究者番号：10354987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線増感作用のあるアンテナ分子を探索することである。放射光ビームラインに接続したEPR装置を用いたDNA塩基分子のラジカル測定から、Br原子の持つ電子吸引効果がラジカル生成過程に大きく関与すること、また比熱測定からBrの存在により微視的な状態数が増加することを明らかにした。さらにプラスミドDNAにBrウラシルを導入すると、X線照射によるDNAの2本鎖切断修復が20%増した。モンテカルロシミュレーションを用いた計算により、このような2本鎖切断はDNA上の電荷移動により生じると推測された。これらの結果は、Br近傍の特異な電子状態がアンテナの性質に深く関与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to explore molecular aeriels which sensitize radiobiological effects. Radical measurement experiments using an EPR apparatus revealed that the electron attraction to bromine atom would play an important role in the radical process in DNA. It was inferred that the number of microscopic states increases with existence of a bromine atom. Furthermore, DNA damage of double strand breaks (DSBs) in Br-incorporated plasmid were also enhanced by 20 % when exposed to X-rays. Monte Carlo track simulation indicates that the enhancement of DSBs could be induced by charge migration along a DNA molecule. These evidences show that the electronic state around bromine atom is characteristic to specify its molecular aerial nature.

研究分野：放射線生物物理学

キーワード：Brウラシル DNA損傷 ハロゲンによる放射線増感 電子状態 熱容量測定 単結晶 プラスミドDNA

1. 研究開始当初の背景

生体中のゲノム DNA に取り込まれたハロゲン原子は、放射線照射に対して強い増感効果を示すことが知られている。このため、放射線によるがん治療への応用の期待から世界で多くの研究が培養細胞を用いて行われている。一方、ハロゲンを取り込んだ DNA の損傷生成メカニズムを、分子レベルで研究した例は多くない。申請者らはシンクロトン放射 (以下、放射光) から得られる単色軟 X 線を利用した電子常磁性共鳴 (EPR) 装置を開発し、DNA 損傷の前駆体となる不安定・短寿命の DNA ラジカル (不対電子を持つ DNA 分子) を研究してきた [1]。その結果、プラスミド DNA 薄膜を試料とし、光電効果に特有の新しい DNA ラジカルの生成過程を見出すとともに [2]、ウラシル (U) では、EPR 強度は X 線吸収による光電効果断面積の変化に良く対応するのに対し、ハロゲンの一つである Br 原子を持つプロモウラシル (BrU) では、予想とは逆に EPR 強度の変化がほとんど消失することを見出した。一見矛盾するこの二つの現象の背後に、新奇なメカニズムとして “分子アンテナ” の存在を予測した。これらの結果は、X 線のエネルギー吸収後の BrU の励起状態の緩和経路が U とは異なり、EPR で検出され得る安定な不対電子生成以外の経路であることを示している。

2. 研究の目的

ハロゲン原子近傍の DNA 鎖が、ラジカルや 2 次電子を捕集し、電荷やスピンをハロゲン原子近傍に集めるための “アンテナ” として機能し、放射線の効果を増大させていると予測した。これを実証するため、異なる置換基を持つピリミジン塩基 (Br を含まないウラシル (U)、メチル基を持つチミン (T) 及びアミノ基を持つシトシン (C) の各塩基についても EPR 測定を試みることを目的とした。ハロゲン < 水素 < メチル基 < アミノ基の順で、ピリミジン環への電子供与性の共鳴効果が大きくなることが知られている。一方電子物性の観点から、比熱測定を実施する。さらに、実際に Br を含むプラスミド DNA を作成し、放射線損傷の収率を生化学的に定量評価し、Br を含む DNA の “アンテナ” 効果を追求した。

3. 研究の方法

まず BrU 及び U、T 及び C の各塩基を無酸素銅のロッドに蒸着した。これを真空中チャンバ内に置かれたマイクロ波キャビティに挿入し、単色の放射光軟 X 線を照射しながら生成したラジカル収量を EPR 観測を行った。放射光のエネルギーを掃引しながら EPR 信号強度を測定した。また、ハロゲン化塩基が持つ特異的な電子物性を明らかにするため、半導体や超電導などを扱う固体電子物性の研究手法であるカロリメトリー法により、BrU などの塩基の単結晶試料に対す

る比熱測定を低温熱容量測定装置を用い微視的な電子状態数の推定を行った。

一方、実際に BrU をモデル DNA 分子 (プラスミド) に導入し、どのように放射線損傷が生じるのかを生化学的な分析を試みた。まず、大腸菌 (JM109 株) を BrU 入りの培地で培養した後、菌から pUC18 プラスミド DNA を抽出精製した。このプラスミド DNA (スーパーコイル形状) に対して X 線を照射し、DNA 鎖切断損傷を電気泳動法により定量した。さらに、モンテカルロ法によるハロゲン DNA の損傷生成モデルを検討した。

4. 研究成果

各塩基の蒸着試料に対して、窒素及び酸素の内殻イオン化領域の軟 X 線を照射しながら EPR 測定を行った結果を図 1 に示す。

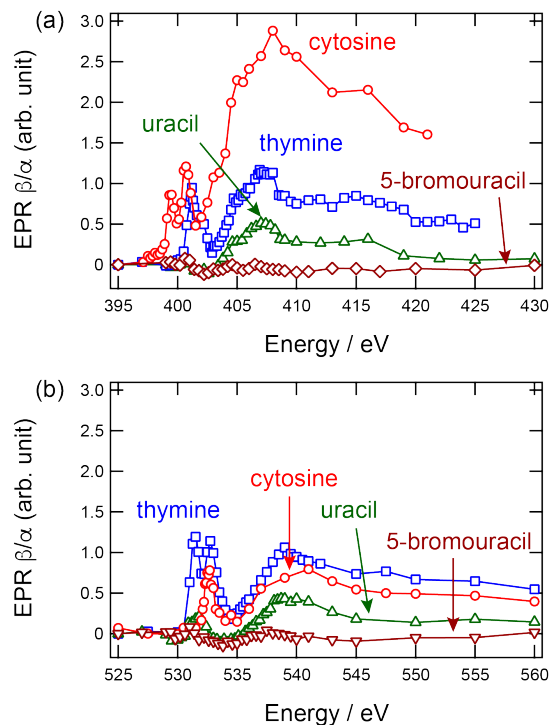


図 1 EPR 強度の窒素 (a) 及び酸素 (b) 吸収端近傍における軟 X 線エネルギー依存性。茶：Br ウラシル、緑：ウラシル、赤：シトシン、青：チミン。β/αは、395eV 及び 525eV で EPR 強度を 0 に規格化するための補正係数。

BrU では既報の通りそれぞれの K 吸収端領域における EPR 強度変化はほとんど見られなかったのに対し、本研究により他の塩基では K 殻吸収に対応する構造がスペクトル上に観察された。またその構造の大きさは、窒素の K 吸収端領域では C > T > U > BrU となり、また酸素の K 吸収端領域では、T > C > U > BrU となった。各塩基が含む窒素及び酸素の原子数を考慮に入れると、このラジカル収率の大きさの傾向は、各官能基の電子供与性の傾向と一致した。Br 原子は強い電子吸引効果を持つため、ピリミジン環状の電子密度が減少し、ラジカルとして観測されていない可能

性が示された。また逆に、この Br の性質が DNA の分子アンテナとして不可欠な要素と考えられる。内殻イオン化に伴う不対電子生成とピリミジン環上における電子の局在化・非局在化について議論した論文[3]を投稿準備中である。

一方、BrU とチミンの単結晶を作成し、原子力機構の低温熱容量測定装置を用いた比熱測定を実施し(図2)、微視的な電子状態数の推定を行った。得られた結果は、予想通り Br の存在により比熱が高くなり微視的な電子状態数が増加することが示された。DNA 分子中の Br 原子の電子励起状態がアンテナ分子としての性質に深く関与する可能性を示すものであり、今後第一原理計算による分子軌道計算も併せ、アンテナ分子としての特性を左右する電子状態の特性を探っていく予定である。

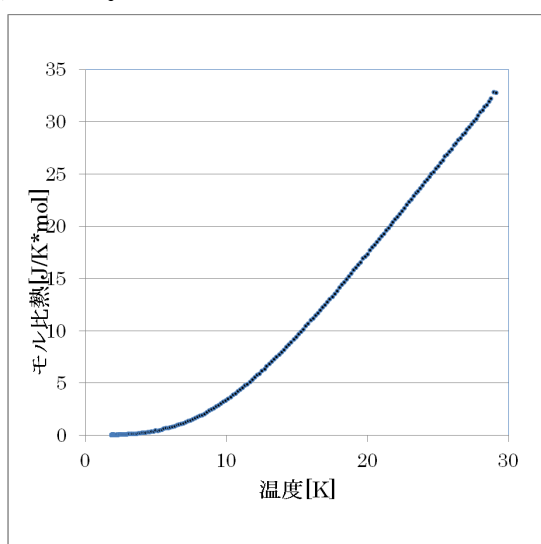


図2 BrU単結晶の温度に対するモル比熱の測定結果

さらに Br を取り込ませたプラスミド DNA 及び取り込ませていないプラスミド DNA を大腸菌から抽出・精製し、これらに対する X 線照射を実施した。照射により誘発した DNA の鎖切断型の損傷を電気泳動法により定量したところ、1 本鎖切断 (SSB) については Br を取り込ませたことによる増感はほとんどなかったが、2 本鎖切断 (DSB) については約 20% の増感が観測された。このことから、Br が DNA 損傷の中でも特に細胞致死の主要な要因とされる DSB を増感させる、アンテナ分子の構成要素として有望であることが示された。ハロゲン塩基への電荷移動モデルを導入した DNA 損傷分布を計算するモンテカルロシミュレーションコードを用いて、放射線照射による損傷分布を評価を行い、電荷移動が生じた場合の局所的な損傷密度の増加が確認された。損傷密度の増加と細胞致死の相関関係を仮定すると、細胞致死の増感へのハロゲン塩基の関与が示唆される。

< 引用文献 >

- [1] Yokoya, A., Fujii, K., Shikazono, N. and Ukai, M. Chapter 20. Spectroscopic study of radiation-induced DNA lesions and their susceptibility to enzymatic repair. In: Charged particle and photon interactions with matter-recent advances, applications and interfaces, Eds., Y. Hatano, Y. Katsumura, and A. Mozumder, CRC/Taylor & Francis Group, USA, pp543-574. (2011).
- [2] Oka, T., Yokoya, A., Fujii, K., Fukuda, Y. and Ukai, M. Unpaired electron species in calf thymus DNA thin films induced by nitrogen and oxygen K-shell photoabsorption. Phys. Rev. Lett. 109, 213001 (2012).
- [3] Oka, T., Yokoya, A. and Fujii, K. Substituent effect on the yield of unpaired electrons in DNA-bases studied by electron paramagnetic resonance. To be submitted.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計10件)

Kentaro Fujii, Spectroscopic Study for Physical Process of DNA Strand Breakage by Ionizing Radiations using Soft X-rays, Hiroshima International Workshop on Circular Dichroism Spectroscopy 2017, Hiroshima University, 2017/2/28, Invited talk

鬼澤 美智, 芳賀芳範, 横谷明德, プロモウラシル (BrU) の電子状態計算. 量研機構・未来ラボセミナー, 量研機構・東京事務所 (東京), 2017/2/7,

Kentaro Fujii, Roles of Oxygen for Inducing DNA Strand Breakages by Ionizing Radiation, Oxygenalia 2016, Jagiellonian University (Poland), 2016/11/19, Invited talk.

渡辺 立子, DNA 損傷・飛跡構造解析に関する研究. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 広島, 2016/10/26-28

横谷 明德, 神長 輝一, 渡辺 立子, 服部 佑哉, 福永 久典, 鈴木 啓司, 泉 雄大, 藤井 健太郎, 放射線生体影響のメカニズム解明に向けた放射光利用研究. PF 研究会・福島環境回復を目指した放射光研究の現状と今後の課題, 高エネルギー加速器研究機構・フォトンファクトリー, 2016/10/14

鬼澤 美智, 芳賀芳範, 横谷明德, 放射線増感剤としてのプロモウラシル (BrU) の電子物性の研究. 若手放射線生物専門研究会・DNA 損傷応答機構の破綻と疾患, 2016/9/3-4, 東京工業大学

Toshitaka Oka, Akinari Yokoya, Kentaro

Fujii, Yasushi Kino, Tsutomu Sekine, Substituent effect on the yield of the unpaired electrons of pyrimidine DNA-base induced by soft X-ray irradiation, 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2016/3/20-24, Melbourne, Australia (Poster)

岡 壽崇, 「K 殻イオン化で生じる不対電子による DNA 損傷形成機構」, 「プラズマ科学における分光計測の高度化と原子分子過程研究の新展開」・「原子分子データ応用フォーラムセミナー」合同研究会, 2016/1/27-29, 核融合科学研究所 (依頼講演)

Toshitaka Oka, Akinari Yokoya, Kentaro Fujii, Yasushi Kino, Tsutomu Sekine, Unpaired electrons of DNA and DNA-base thin films studied by electron spin resonance, XXIX International Conference on Photonic, Electronic and Atomic Collisions, 2015/7/22-28, Toledo, Spain (Poster)

Toshitaka Oka, Akinari Yokoya, Kentaro Fujii, Yasushi Kino, Tsutomu Sekine, Unpaired electrons in pyrimidine DNA-bases induced by core-excitation and substituent effect, 8th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular, and Medical Aspects of Auger Processes (Auger Symposium 2015), 2015/5/20-22, Kyoto, Japan (Poster)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者

横谷 明德 (YOKOYA AKINARI)
量子科学技術研究開発機構・東海量子ビーム
応用研究センター・上席研究員
研究者番号 : 10354987

(2)研究分担者

岡 壽崇 (OKA TOSHITAKA)
東北大学・高度教養教育・学生支援機構・
助教

研究者番号 : 70339745

鵜飼 正敏 (UKAI MASATOSHI)
東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・
教授

研究者番号 : 80192508

渡辺 立子 (WATANABE RITSUKO)
量子科学技術研究開発機構・東海量子ビーム
応用研究センター・上席研究員

研究者番号 : 10360439

芳賀 芳範 (HAGA YOSHINORI)
日本原子力研究開発機構・先端基礎研究セ
ンター・研究主幹

研究者番号 : 90354901

(3)連携研究者

藤井 健太郎 (FUJII KENTARO)
量子科学技術研究開発機構・東海量子ビーム
応用研究センター・上席研究員

研究者番号 : 00360404

(4)研究協力者

()