

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03891

研究課題名(和文)放射線によるDNA損傷形成における水和水の作用の解明

研究課題名(英文)Role of Hydration Water in Radiation Damage to DNA

研究代表者

山下 真一 (Yamashita, Shinichi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：20511489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA近傍には配向した水和水が存在し、十分離れた位置にある普通の水(自由水)とは性質が異なる。放射線によるDNA損傷誘発における水和水のはたらきを明らかにすること目的とした。時間分解測定(パルスラジオリシス)では吸収分光と共鳴ラマン分光を実施した。前者では、グアニンのヌクレオチドを用い、化学回復を直接観測した。後者は、設計から始め信号取得にまで漕ぎつけた。大腸菌プラスミドDNA(pUC18)に生じた安定なDNA変異はアガロースゲル電気泳動法で高感度に検出および定量した。透析による不純物除去の結果、薬剤の微量添加の影響を検討できるようにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線の生体影響は被ばく時のリスク評価やがん放射線治療の高度化といった観点から注目されているものの、水和水に着目した研究は少ない。放射線防護剤・増感剤の設計指針は自由水中で得られてきた知見に根差しているため、本研究の成果によりさらに高度化されることが期待できる。また、時間分解測定を単色の放射光やレーザー光ではなく放射線で行ったことも特徴である。淡色の光では“整った”始状態(初期損傷)が誘発されるのに対し、放射線では“ばらけた(多種多様な)”始状態がランダムに生じ、複数の始状態が複合的に作用する。

研究成果の概要(英文)：Oriented hydration water exists in the vicinity of DNA, and its properties are different from those of ordinary water (free water or bulk water) located far enough away. The purpose of this study was to clarify the function and role of hydration water in the induction of DNA damage by ionizing radiation. Time-resolved measurements (pulse radiolysis) were performed by absorption spectroscopy and resonance Raman spectroscopy. In the former, chemical repair was directly observed, in which initial and unstable damage on guanine nucleotides (dGMP) was repaired by a tiny amount of flavonoid. For the latter, we started from the design stage and worked up to signal acquisition. Stable DNA mutations in *E. coli* plasmid DNA (pUC18) were detected and quantified with high sensitivity by agarose gel electrophoresis. Impurities were removed by dialysis, allowing us to study the effect of trace addition of drugs.

研究分野：放射線化学

キーワード：放射線 DNA損傷 パルスラジオリシス 初期過程 界面 共鳴ラマン分光 吸収分光

1. 研究開始当初の背景

放射線が誘発する DNA 損傷は、エネルギーの受け取り手により直接作用と間接作用に分けられる。直接作用では放射線が直接 DNA 損傷を引き起こすのに対し、間接作用では放射線による水分解で生じる酸化性のラジカルが DNA 損傷を引き起こす。便宜的に、酸化性のラジカルの除去で抑制できる DNA 損傷が間接作用によるもの、それでも残る DNA 損傷が直接作用によるもの、と分類されている。

しかし、両者の明確な区別はない。DNA 近傍には配向した水と水が存在する(図1)。その性質は、DNA から十分離れた位置にある普通の水(自由水)とは異なる。放射線による DNA 損傷が水と水同士あるいは水と DNA の間のネットワーク構造の有無で異なることが現象論的には分かっている。これは、水と水が固くて動きにくく、電子移動度、拡散速度、誘電率、酸解離平衡(pH), なども影響を受けるためと考えられている。

一方、「では具体的に、水と水の存在が DNA への放射線作用にどう影響しているのか?」ということはまだよく分かっていない。水と水の存在により DNA のイオン化効率が上がるのか、イオン化で生じた余剰電子や正孔は DNA と水と水の間で移動して損傷収率を増加させるのか、抗酸化薬剤の放射線防護機能は自由水と水と水の中で同じか、といったことが本課題の学術的な「問い」となっている。

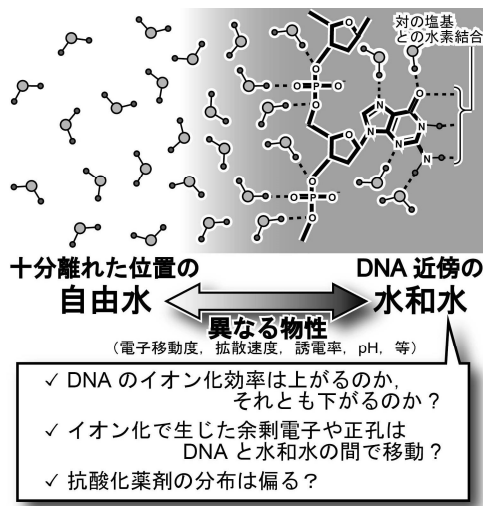


図1 水と水と自由水

2. 研究の目的

細胞の中では、DNA 近傍の配向した水と水は十分離れた位置にある自由水と比べて少ないとは言えず、DNA に対する放射線影響を考える上で無視できないことが現象論的には分かっている。本研究では DNA 損傷誘発における水と水のはたらきを明らかにすることを目指した。

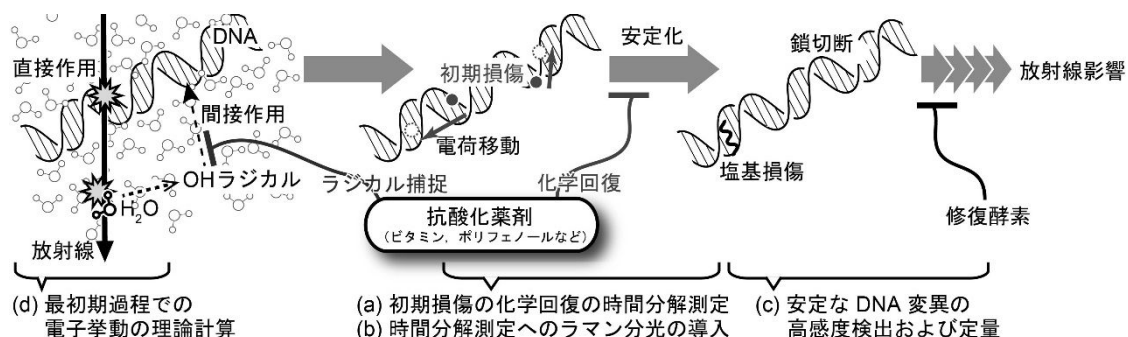


図2 放射線誘発 DNA 損傷の形成および安定化過程

DNA に対する放射線影響(図2)は、最初期のイオン化に始まり、まず、直接作用による DNA の初期損傷の形成と、間接作用につながる水分解が起こる。水分解で生じた酸化性のラジカル(不対電子を持つ化学種の総称)による初期損傷形成がこれに続くが、この際、DNA 以外の物質が酸化性のラジカルを除去すると間接作用による損傷形成は未然に防がれる。これをラジカル捕捉という。その後、初期損傷は鎖切断や塩基損傷といった DNA 変異へゆっくりと安定化していく。この安定化において、微量の抗酸化薬剤が初期の酸化損傷を還元して回復する可能性が報告されている [Hata K, et al. Biochem Biophys Res Commun 434: 341, 2013]。これをラジカル捕捉とは区別し、化学回復とよぶ。ラジカル捕捉や化学回復の結果、初期損傷から安定変異に至る割合は少なく、さらに本研究では対象としていない生体機能としての修復も起こるため、ほとんどの初期損傷は放射線影響に至らない。しかしなぜごく稀に放射線影響に至る初期損傷があるのかということが重要で、これは、未解明である低線量被ばくの影響を考える上でも必要不可欠である。本研究では、放射線による DNA 損傷形成のうち、直接作用による最初期のイオン化、抗酸化薬剤による化学回復、最終的に残る安定変異という三つの局面において、水と水の果たす役割を明らかにする。なお、ラジカル捕捉はこれまで多く研究されてきている上、これが有効な間接作用は自由水の中で起こる現象のため、本研究の対象とはしていない。

放射線の生体影響は被ばく時のリスク評価やがん放射線治療の高度化といった観点から注目されているものの、水と水に着目した研究は少ない。放射線防護剤・増感剤の設計指針は自由水中で得られてきた知見に根差しているため、本研究の成果によりさらに高度化されることが期待できる。また、時間分解測定を単色の放射光やレーザー光ではなく放射線で行うことも特徴で

ある。淡色の光では“整った”始状態（初期損傷）が誘発されるのに対し、放射線では“ばらけた（多種多様な）”始状態がランダムに生じ、複数の始状態が複合的に作用する。

3. 研究の方法

初期損傷の化学回復の時間分解測定（担当：山下真一，于嵩）では，DNA のモデル分子としてヌクレオチドを用い，最も酸化されやすい核酸塩基であるグアニンのヌクレオチド，デオキシグアノシンーリン酸（dGMP）を用い，化学回復を時間分解測定（パルスラジオリシス法）で直接観測した（図3）。抗酸化剤としてルチンおよびその糖転移体（モノグルコシルルチン）を微量添加し，dGMP ラジカルのゆっくりとした化学回復過程を数マイクロ秒から数十マイクロ秒にかけて光吸収の時間変化から観測した。

時間分解測定（パルスラジオリシス法）への共鳴ラマン分光の導入（担当：山下真一，翁汉钦，于嵩，室屋裕佐）では，体系の設計から始め，装置類の同期精度の改善により，信号取得に成功した。安定性が高いダイオード励起レーザーを励起光として用い，これを電子線パルスと同期させて試料である水溶液に照射し，ラマン散乱でストークスシフト（分子結合に対応した波長の変化）した光をポリクロメータで分光し，ゲート付き CCD カメラで検出した。試料としてはハロゲン化物イオン X^- （塩化物イオン Cl^- ，臭化物イオン Br^- ，ヨウ化物イオン I^- ，チオシアン酸イオン SCN^- ）の水溶液を用い，水の放射線分解で生じる $\cdot OH$ ラジカル（ $\cdot OH$ ）との反応で生成する二量体ラジカルアニオン $X_2^{\cdot -}$ の $X-X$ 結合に対応する信号を検出した。

安定な DNA 変異の高感度検出および定量（担当：于嵩，横谷明德，平山亮一，山下真一）では，大腸菌プラスミド DNA（pUC18）を用いた。pUC18 は大腸菌を培養することで大量に準備することができ，また，鎖切断（一本鎖切断および二本鎖切断）が生じることによって高次構造がドラスティックに変化することを利用してアガロースゲル電気泳動法で高感度に検出できる [Yokoya A, *et al.* J Phys Chem B 107: 832, 2003]。抽出後の pUC18 は透析により不純物を極力除去し，微量の抗酸化剤添加の影響を検討できるようにした。pUC18 を希薄水溶液およびフィルムの試料 [Yokoya A, *et al.* J Am Chem Soc 124: 8859, 2002] として調製し，X 線照射を行い，生じた安定変異をアガロースゲル電気泳動法で分離し，臭化エチジウムによって pUC18 を染色した後，紫外光励起で蛍光画像を撮影し，損傷収率を定量した。この際，塩基部位の損傷も塩基除去修復酵素を利用することで鎖切断に変換して検出，定量した。抗酸化剤としてアミノ酸を微量添加し，各損傷の収率の変化を調べた。

最初期過程での電子挙動の理論計算（担当：佐藤健，石川顕一）では，佐藤らが開発した時間依存多配置波動関数理論 [Sato T and Ishikawa K. Phys Rev A 94: 023405/1-14, 2016 / Phys Rev A 91: 023417/1-15, 2015 / Phys Rev A 88: 023402/1-15, 2013.] を利用した。

4. 研究成果

初期損傷の化学回復の時間分解測定により，化学回復に対応する吸収スペクトルの変化がこれまでにない明瞭さで観測できた [Yu H and Yamashita S, Free Radical Res 53: 1005, 2019.]。また，電子引抜反応を起こすアザイドラジカル ($N_3^{\cdot -}$) を利用することで，ルチンによる化学回復の素過程（メカニズム）についても検討し， $\cdot OH$ に酸化された dGMP ラジカルが，ルチンから水素原子を供与されることによって化学回復が起こっていることが示唆された（図4）。

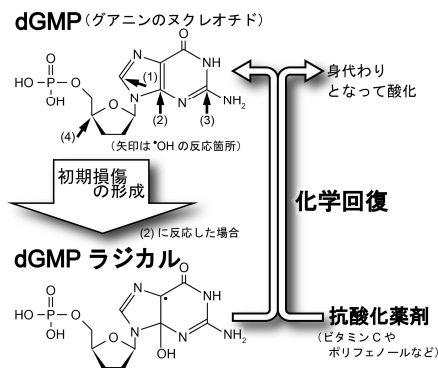


図3 dGMP の化学回復

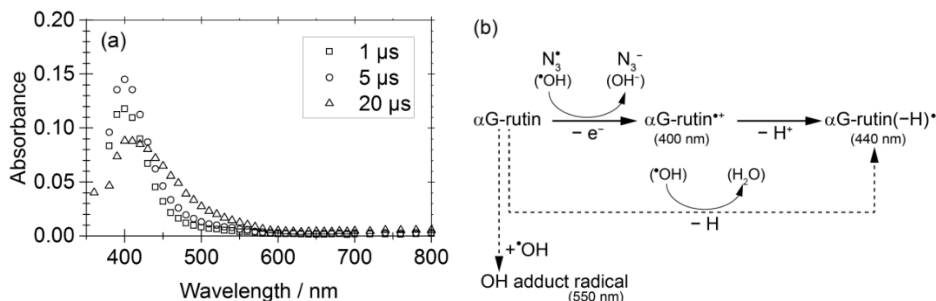


図4 ルチンによる化学回復の素過程（メカニズム）の検討結果 [Yu H and Yamashita S, Free Radical Res 53: 1005, 2019.]

時間分解測定(パルスラジオリシス法)への共鳴ラマン分光の導入では、電子線パルスと励起用レーザーパルスのタイミングと位置を精度よく合わせると同時に、検出系の位置と動作タイミングも精度よく合わせる必要がある(図5)。位置合わせは慎重なアライメントによって達成できたものの、タイミング合わせ(同期)は加速器特有のジッタの解消が必要であった。また、レーザー発振器にはプレトリガを入れる必要もあった。そこで論理回路を組み込み、遅延発生器を設置することで同期精度を向上した。最終的にはジッタを数ナノ秒に抑えることに成功した。検出器(ゲート付きCCDカメラ)のゲート幅(5 ns)と励起用レーザーのパルス幅(5 ns)も踏まえ、測定系全体の時間分解能は10 ns となった。ハロゲン化物イオンの水溶液を試料として用い、二量体ラジカルアニオンの信号取得にも成功した。ラマン活性によって中間活性種にも観測可能なものとそうでないものがあることも確認できた。

安定な DNA 変異の高感度検出および定量では、微量添加した抗酸化剤の放射線防護または放射線増感の作用を検討できるよう、捕捉剤フリーな pUC18 試料を調製する手法を確立した [Yu H, *et al.* Radiat Res (doi:10.1667/RADE-21-00057.1)]。フィルム試料では線量補正が必要となるため、この点も PHITS シミュレーションにより定量的に評価した(図6)。鎖切断および塩基損傷の収率は、pUC18 試料に含まれる水分量によって必ずしも同じ傾向を示さず、DNA 近傍の水は十分離れた位置に存在する自由水とは異なるはたらきを持つことが示された。

最初期過程での電子挙動の理論計算に向け、分子中の電子ダイナミクスを実時間・実空間で追跡するための計算手法を整備した。本研究開始以前に佐藤らが開発した時間依存多配置波動関数理論(図7)は、レーザーや放射線照射下の分子中の電子ダイナミクスを精度良く計算することができたが、(i) 厳密な計算では電子数に対して計算コストが指数関数的に増大する、(ii) 近似的な計算では電子数が増えるにつれて計算精度が劣化する、(iii) 有限のシミュレーション領域の境界に到達した電離電子が非物理的に反射されて分子の近くに戻ってきてしまう、等の問題があった。そこでまず、定常状態の量子化学計算で有名な結合クラスター法を時間依存量子力学に拡張し、時間依存結合クラスター法を定式化した [Sato T, *et al.* J Chem Phys 148, 051101 (2018)]。これにより(I) 計算コストは電子数に対して多項式スケールで済み、(II) 電子数が増えても計算精度が劣化しない「サイズ無矛盾」な時間依存理論を初めて確立した。また時間依存結合クラスター法に様々な近似を導入することにより、更に計算コストの低い一連の計算手法を開発した [Pathak H, *et al.* J Chem Phys 152: 124115, 2020; Pathak H, *et al.* J Chem Phys 153: 034110, 2020; Pathak H, *et al.* J Chem Phys 154: 23104, 2021.]。特に、時間依存最適化二次摂動法と呼ぶ手法では、グアニン分子や同程度の大きさの分子の全電子ダイナミクス計算を研究室レベルのワークステーションで実行可能である。次に、(III) 水素原子などの一電子系のみにも適用されていた無限範囲外部複素スケーリング法を多電子計算に拡張し、有限のシミュレーション領域でも「反射しない境界条件」を初めて実現した [Orimo Y, *et al.*

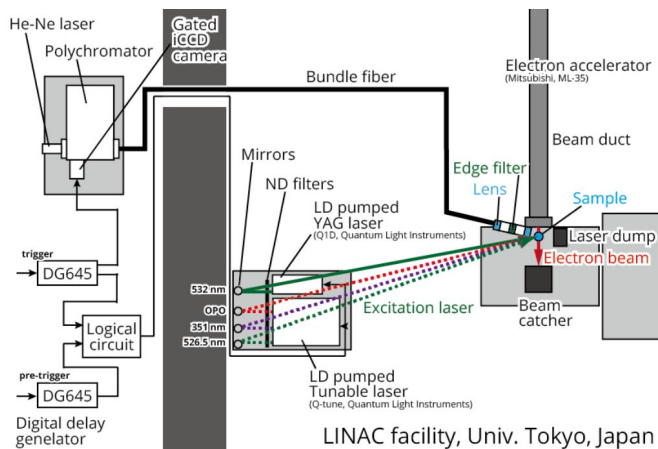


図5 時間分解共鳴ラマン分光体系

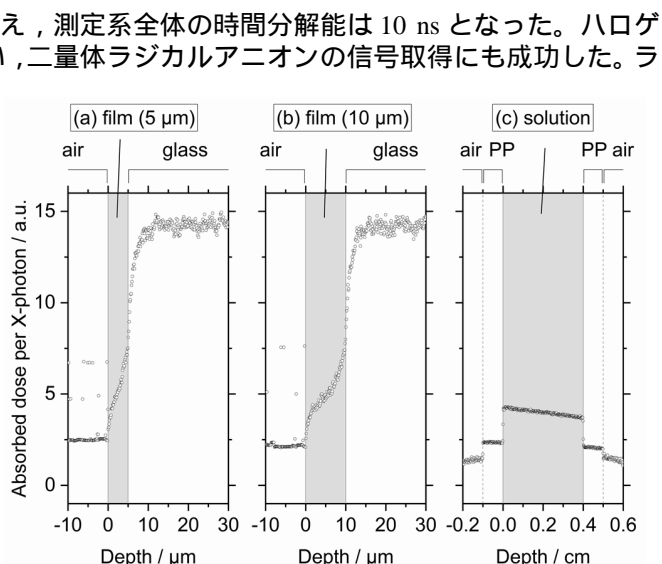


図6 PHITS シミュレーションで評価した吸収線量 [Yu H, *et al.* Radiat Res (doi:10.1667/RADE-21-00057.1)]

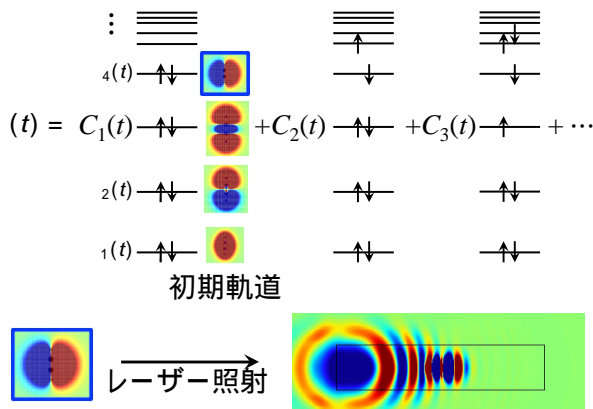


図7 時間依存波動関数理論の模式図

Phys Rev A 97: 023423, 2018.]. また, シミュレーション境界面を (反射せずに) 通過する電子波束を時間積分することで光電子スペクトルを直接抽出できる手法を開発した [Orimo Y, *et al.* Phys Rev A 100: 013419, 2019.]. これらの要素技術を統合した分散並列計算プログラムを開発し, レーザーや放射線下の原子や分子の様々な問題に応用した[Wahyutama IS, *et al.* Phys Rev A 99: 063420, 2019 ; You D *et al.* Phys Rev X 10: 031070, 2020 ; Li Y *et al.* Phys Rev A 104: 043104, 2021.]. 特に, シクロヘキサジエン分子における電離直後の電子ダイナミクスを実時間・実空間で精密に可視化できることを実証した (図 8). 以上より, 電子挙動を解明するための理論・計算手法が整備された。これを用い, 最初期過程でのイオン化, 直接作用による DNA 初期損傷の形成, 間接作用につながる水分解等の理論的解明のための研究を継続していく。

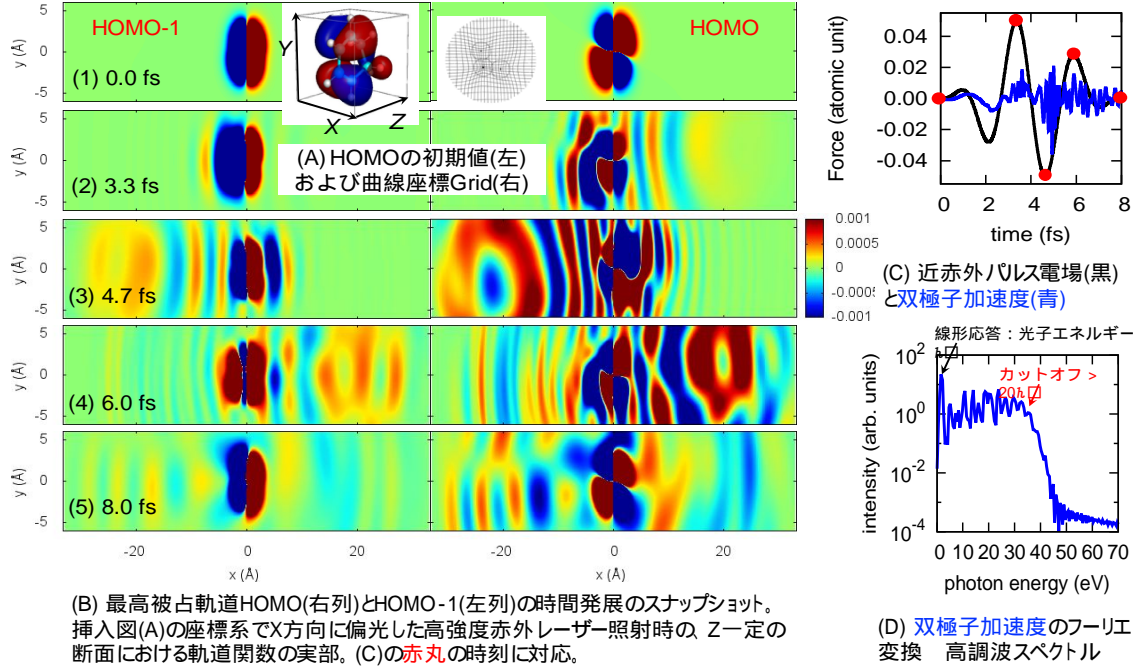


図 8 シクロヘキサジエン分子のシミュレーション結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Y. Hao, S. Yamashita	4. 巻 53
2. 論文標題 Radical Scavenging and Chemical Repair Reactions of Rutin Observed by Pulse Radiolysis: As a Basis for Radiation Protection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 1005-1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2019.1667991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiroki Nakae, Yui Obata, Kiichi Kaminaga, Nobuyoshi Akimitsu, Akinari Yokoya	4. 巻 NCY241
2. 論文標題 Visualization of the DNA repair process in mammalian cells transfected with EGFP-expressing plasmid DNA after exposure to X-rays in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rpd/ncy241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yang Li, Takeshi Sato, Kenichi L. Ishikawa	4. 巻 99
2. 論文標題 High-harmonic generation enhanced by laser-induced electron recollision	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physical Review A	6. 最初と最後の頁 43401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevA.99.043401	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ryoji Anzaki, Yasushi Shinohara, Takeshi Sato, Kenichi L. Ishikawa	4. 巻 98
2. 論文標題 Gauge Invariance beyond the Electric Dipole Approximation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Review A	6. 最初と最後の頁 63410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevA.98.063410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jun Ma, Anil Kumar, Yusa Muroya, Shinichi Yamashita, Tsuneaki Sakurai, Sergey A. Denisov, Michael D. Sevilla, Amitava Adhikary, Shu Seki, Mehran Mostafavi	4. 巻 10
2. 論文標題 Observation of dissociative quasi-free electron attachment to nucleoside via excited anion radical in solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-08005-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hanqin Weng, Zhihao Wu, Chi Zhao, Mozhen Wang, Xuewu Ge, Shinichi Yamashita, Jia Tang, Mingzhang Lin	4. 巻 10
2. 論文標題 Construction of polyporous polymer microspheres with a tailored mesoporous wall	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 1508-1518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8py01714j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 H. Yu, 永井菜月, 近藤勇佑, 藤井健太郎, 横谷明德, 山下真一
2. 発表標題 X線照射で誘発されるDNA安定変異収率への抗酸化剤添加の影響
3. 学会等名 第62回放射線化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下真一, 黒川彩音
2. 発表標題 ナノ複合体ゲル線量計で利用されるラポナイトと水分解ラジカルとの反応
3. 学会等名 第56回アイソトープ放射線研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Yu, 山下真一, 藤井健太郎, 横谷明德
2. 発表標題 放射線によるDNA 変異誘発における微量添加剤の影響: 高純度DNA 試料へのX線照射
3. 学会等名 第56回アイソトープ放射線研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井菜月, H. Yu, 山下真一, 藤井健太郎, 横谷明德, 平山亮一
2. 発表標題 防護剤フリーな条件での放射線の直接作用によるDNA損傷
3. 学会等名 第56回アイソトープ放射線研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Yu, K. Fujii, A. Yokoya, S. Yamashita
2. 発表標題 Effects of Additives on Radiation-induced DNA Damage: from the Viewpoints of Free Radical Scavenging and Chemical Repair
3. 学会等名 31st Miller Conference on Radiation Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Sato
2. 発表標題 Time-dependent wave function-based methods for intense laser-driven multielectron dynamics in atoms and molecules
3. 学会等名 International symposium on ultrafast electronic and structural dynamics, International center of educational reserch, Institute for Materials Research, Tohoku University, Sendai, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Sato
2. 発表標題 Time-dependent multiconfiguration and coupled-cluster methods for intense-laser driven multielectron dynamics
3. 学会等名 SILAP2018, Fields Institute, University of Toronto, Toronto, Canada (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Sato
2. 発表標題 Time-dependent wavefunction-based methods for intense laser-driven multielectron dynamics
3. 学会等名 AIEDS18, Epochal Tsukuba, Tsukuba, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Sato
2. 発表標題 Application of time-dependent multiconfiguration and coupled-cluster methods to intense-laser driven multielectron dynamics in atoms and molecules
3. 学会等名 9th AWCXR, Hokkaido University, Sapporo, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Sato
2. 発表標題 Time-dependent optimized coupled-cluster method for intense laser-driven multielectron dynamics
3. 学会等名 7th Japan-Czech-Slovak Symposium, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Praha, Czech Republic (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横谷 明德 (Yokoya Akinari) (10354987)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・統括グループリーダー (82502)	
研究分担者	佐藤 健 (Sato Takeshi) (30507091)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	室屋 裕佐 (Muroya Yusa) (40334320)	大阪大学・産業科学研究所・准教授 (14401)	
研究分担者	平山 亮一 (Hirayama Ryoichi) (90435701)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・主任研究員(定常) (82502)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	于 嵩 (Yu Hao)	東京大学・大学院工学系研究科原子力専攻	(現所属)量子科学技術応用研究開発機構, 高崎量子応用研究所
研究協力者	翁 漢欽 (Weng Hanqin)	中国科学技術大学	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石川 顕一 (Ishikawa Kenichi)	東京大学・大学院工学系研究科原子力国際専攻	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関