

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07631

研究課題名(和文)放射線照射による生体分子の損傷解析と放射線治療効果モデルへの応用

研究課題名(英文) Analysis of bio-molecule damaged by radiation and its application to model of radiation effects

研究代表者

平野 祥之 (Hirano, Yoshiyuki)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授

研究者番号：00423129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は放射線の種類における生体分子、特にDNAの損傷の仕方について、ラマン分光法により特定し、その影響を生物効果モデルに反映させることが目的であったが、残念ながらモデルに組み込むまでは至らなかった。また様々な定量評価のための測定手法を試したが、なかなか安定した結果が得られなかった。最終的には、液体セルと解析手法を開発することでラマン分光法によるDNA損傷の観測手法を確立することができた。この手法を用いて塩基や同線量の紫外線(UVBとUVC)とガンマ線(Co-60)を照射し、それぞれの損傷の特徴を観測できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線影響のメカニズムを明らかにすることは、放射線被ばくや放射線治療の効果予測において非常に重要である。放射線影響は生体分子と放射線との相互作用である物理化学過程からはじまり、細胞、組織臓器、個体レベルへと伝搬する。本研究は初期段階である放射線によってDNAがどのように損傷するかを調べることを目的としている。損傷構造によっては、修復酵素の認識やDNA複製に影響を与えられ、そのためには、まずどのような損傷構造になるかを知ることが極めて重要であり、本研究はラマン分光を用いて放射線の種類による損傷の違いを示すことができ、放射線影響のメカニズム解明の一助になったと考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify radiation damage to DNA by using of Raman spectroscopy, and the results were used for a biological effect model. Unfortunately, I did not apply to the model. But I eventually established a stable measurement of DNA damage by Raman spectroscopy by developing a liquid cell and analysis methods after several tries and errors. Using this method, DNA damage by equivalent doses of ultraviolet rays (UVB and UVC) and gamma-rays (Co-60) was observed. For example, ring modes of adenine and cytosine were observed for UV irradiation but not observed for gamma-ray irradiation. In the future, I will identify structures of DNA damage using quantum chemistry calculation to reproduce the experimental results.

研究分野：放射線影響

キーワード：ラマン分光 DNA損傷 紫外線損傷 ガンマ線損傷 放射線治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線影響は、放射線と生体分子の反応である物理化学過程から、細胞レベル、臓器・組織レベル、個体レベルへと進展し、その総体として人体に影響を与える。放射線影響学においても物理化学過程である放射線と生体分子との相互作用については、細胞、臓器・組織あるいは個体レベルをターゲットにした研究に比べると少ない。また特に DNA がどのような構造で損傷するかを特定することは非常に重要である。損傷構造によっては修復酵素が認識しないや結合できない等の事が起きるためである。また放射線の種類によっても LET の高い粒子線と低いガンマ線では同じ線量であったとしても損傷構造が異なる可能性がある。放射線影響のメカニズムを明らかにすることは、放射線被ばくの影響や放射線治療効果の予測には必至である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、粒子種（炭素線、陽子線、X 線）を変えて、放射線による DNA 損傷（フラグメント化）の定量とフラグメントの構造を分析化学的手法およびシミュレーションによって予測することである。この損傷の特徴が粒子種によって異なるかを調べる。さらにその結果と細胞生存率との比較により細胞死につながる損傷の特徴を調べることである。この結果を基に既存の生物効果モデルの改良や新しいモデルの構築を行い、より正確な生物線量計算の実現を目指す。

### 3. 研究の方法

一般に生体分子の構造を知るには、X 線や中性子を用いた構造解析が利用されているが、これらは分子の結晶を用意する必要があり、損傷した分子からなる結晶は用意できないため、利用できない。他に構造を知る方法として、電子顕微鏡、質量分析や NMR および分光学的な方法が挙げられるが、本研究では比較的測定が容易でかつサンプル調整の必要がないラマン分光を用いることにした。ラマン分光を採用したもう一つの理由として、将来は Tip 増強ラマン分光を用いることで、原子間力顕微鏡と当程度の分解能でラマン分光測定ができるためである。そのために、まずバルクとして測定することにした。

放射線を照射した生体分子を、ラマン分光器（RENISHAW inVia Reflex）を用いてラマンスペクトルを測定し、ラマン強度あるいはラマンシフトに変動があるピークを特定する。ラマン分光器の回折格子は 3,000 1/mm、対物レンズは 50 倍、励起波長は 532nm を用いた。まず粉末の塩基（アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル）を購入して Co-60 ガンマ線で 1 kGy、2 kGy 照射し、非照射とラマンスペクトルを比較した。その後、市販されている牛の胸腺 DNA に対して、4kGy 相当の紫外線（UVC: 250nm と UVB: 310nm）とガンマ線を照射し、DNA のラマンスペクトルを測定した。事前に DNA 溶液に紫外線を照射し、その透過線量を紫外線線量計で計測することで吸収線量を見積もった。DNA の定量ラマン測定については、先行研究等で示されている方法を試したが、照射と非照射の比較において、再現性のある測定結果が得られなかった。以下は研究の成果の一部であるが、最終的には使用しなかったため、ここでその一部を挙げる。はじめはよりピークが見えやすい乾燥 DNA の測定を試みていたが、一様に乾燥させるのが難しくラマンスペクトルの場所依存性がみられた。強度の定量測定のために目印として NaSO<sub>3</sub> 結晶を混ぜる方法もあったが、これも同様にスペクトルの測定箇所の依存性がみられた。マッピングにより広範囲のスペクトルを取り平均スペクトルを評価することも試したが再現性が得られる測定ができなかった。また先行研究の多くは、本研

究のように数 kGy しているが、数 Gy でも変動が見られるという結果もあり、先行研究の中でも結果が異なっている。以上の理由で乾燥 DNA をラマン観測するのをやめにし、水溶液で比較することにした。水溶液にするとピークの数が減ってしまうが、ラマンシフトの解析には十分であると判断した。またステンレス板に直径 2mm の穴を空け、そこにサンプルを入れて石英ガラスでカバーする液体セルによるサンプルホルダーを作成することで、効率よく安定した測定が可能となった。

モデルへの応用については、残念ながらラマン分光の定量解析の確立に苦勞し、モデル開発までには至らなかった。また粒子線等他の放射線については、測定はできなかったが、今後も継続していきたいと考えている。

#### 4. 研究成果

表 1 にガンマ線照射による変動した塩基のラマンシフトのピーク波長を示す。いくつかのピークにおいて変動が観測された。また量子化学計算によりそれぞれのラマンピークを計算したのでその結果も示す。PubChem で得られる塩基の 3D 構造をなるべく高レベルな計算精度 (B3LYP/6-311G(dp)) で計算したが、おおよそ実験を再現しているが、 $10\text{ cm}^{-1}$  以上一致しない場合もあった。しかし全体のスペクトルとしてはおおむねあっているため、どのように構造変化したらラマンシフトが実験値のように変動するかの予想等には利用できるのではないかと考えている。これについては新たな研究テーマとして取り組みたい。

表 1 塩基のラマンピークと計算値。灰色は変動があったピーク。  
単位は  $\text{cm}^{-1}$

Peak No		1	2	3	4	5	6	7	8
シトシン	実験値	444	537	599	792	991	1275	1362	
	計算値	441	540	595	795	993	1309	1371	
チミン	実験値	479	561	617	740	804	984	1369	1671
	計算値	460	556	608	732	803	965	1370	1696
グアニン	実験値	496	650	711	937	1187	1266	1391	1550
	計算値	499	642	718	958	1184	1280	1399	1545
ウラシル	実験値	537	556	790	984	1235	1394	1418	1504
	計算値	542	561	810	990	1228	1405	1420	1504

図 1 に、4kGy 相当の紫外線とガンマ線を吸収させた DNA 水溶液の

ラマンスペクトルを示す。これまでも紫外線照射やガンマ線照射の DNA のラマンスペクトルの先行研究はあったが、すでに述べたように先行研究間でも一致しないところが見られ、線量も含め同一条件で測定することに意義があると考えている。また表 2 にラマンシフトの変動があった波長と文献から得られた帰属を示す。UVB、UVC 照射にて共通にみられる損傷が比較的多く、そのほとんどがアデニンもしくはシトシンに関係している。DNA に紫外線を照射するとピリミジン二量体ができることがよく知られているがシトシンについてはその影響かもしれない。このような損傷が生じると、DNA の複製や転写を妨げる。本研究では UVB、UVC 照射でみられたグアニンの損傷が Co-60 ガンマ線照射では見られなかった。またガンマ線のほうが変動したピークの数も少ない。これらについては今後の課題にはなるが、線種による損所の違いが見られた可能性が高い。また計算科学と実験結果を比較しながら、どのような損傷構造が得られるかを推測する計算手法を確立したいと考えている。

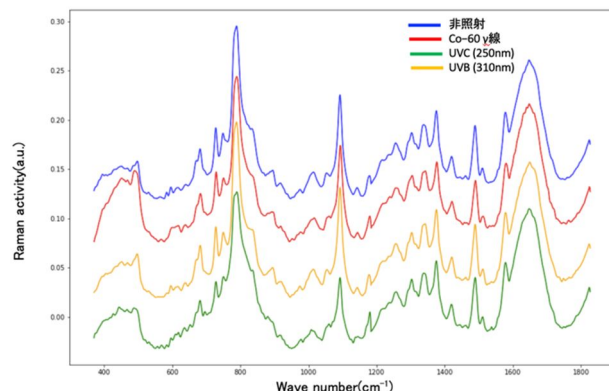


図 1 DNA 水溶液のガンマ線照射、UVB、UVC 照射後のラマンスペクトル

表 2. ガンマ線、紫外線照射によるラマンシフトとその帰属

Radiation type	Wave number (cm <sup>-1</sup> )	Raman shift (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
<sup>60</sup> Co $\gamma$ -ray	11187.5	-3	dT,dC
	1447	4.5	d( $\delta$ CH <sub>2</sub> )
	1511	-2.5	C, A (ring breathing)
	1659.5	3	T,C( $\nu$ C=O)
	1666.5	-4.5	dT
UVB (310nm)	804	4	$\nu$ OPO,A-DNA
	811.5	-3.5	vas(OPO)Z-DNA
	877.5	2.5	d
	1027.5	4	weak band
	1254	-2	dA,dC
	1301	3	A,C(ring mode)
	1525.5	-4	A
	1525.5	3.5	dC
	1630	-3.5	C
	1630	3	C
1680	-3	G	
UVC (254nm)	972.5	-3	d
	1027.5	-4.5	weak band
	1027.5	2.5	weak band
	1153.5	2	d-p
	1254	-3.5	dA,dC
	1292	-3	dC
	1301	2.5	A,C(ring mode)
	1306	-2.5	A,C(ring mode)
	1377.5	-2.5	T,A,G
	1445.5	-2.5	d( $\delta$ CH <sub>2</sub> )

d : vibration localized in the deoxyribose moiety, d-p : vibration of the deoxyribose-phosphate moiety.  
dA, dC, dG, and dT: vibrations of the deoxynucleosides, including modes either localized in the purine or pyrimidine base or delocalized (base plus furanose moieties).

A : adenine, C : cytosine, G : guanine, T : thymine.

ring mode : ring structure change,  $\nu$ : stretching vas : asymmetric stretching,  $\delta$  : bending, ring breathing : Breathing vibration of cyclic compounds.

A-DNA: A-form of DNA, Z-DNA: Z form of DNA.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤成美、平野祥之
2. 発表標題 Analysis of DNA damage by UVC and gamma rays using Raman spectroscopy
3. 学会等名 放射線影響学会65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野祥之
2. 発表標題 Angular dependency of visible light imaging of water by radiations using a photon propagation simulation
3. 学会等名 The 117th Scientific Meeting of the Japan Society of Medical Physics
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀井良守哉
2. 発表標題 Verification of the Oxygen in the heavy-ion track hypothesis in carbon-ion irradiation using Geant4-DNA
3. 学会等名 放射線影響学会65回大会
4. 発表年 2022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	余語 克紀  (Yogo Katunori)  (30424823)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・助教    (13901)	

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
---------	---------