

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K03769

研究課題名(和文) 液体内生体分子の放射線損傷における分子周辺で起こる素反応の解明

研究課題名(英文) Elucidation of elementary reactions in radiation damage of biomolecules in liquid

研究代表者

土田 秀次 (Tsuchida, Hidetsugu)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50304150

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)：放射線の生体影響は人類の長年の関心事であるが、その根本的なメカニズムは未だ解明されていない。最近の研究では、原子レベルでの生体分子への放射線損傷の分析が行われ、損傷における液体の水の役割の解明が課題になっている。本研究では、この課題を解決するために、イオンビームによる水中の生体分子損傷に関する実験的研究を行った。この研究は、粒子線がん治療の基礎物理に関連している。この研究を通じて、我々は、次の2つの知見を得た。一つ目は、生体分子の損傷過程において分子周辺の水分子の配位が損傷に影響を及ぼしていること、二つ目は生体分子の損傷に関与する二次電子のエネルギーを特定したことである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子の放射線損傷に関するこれまでの研究では、細胞の主成分である水分子の影響が考慮されていない問題点があった。本研究では、液体の水環境下における生体分子の放射線損傷を、生体分子の分解生成物を質量分析により直接測定し、生体分子の損傷箇所(結合が切れた箇所)を原子レベルで特定するもので、このような研究は未だ行われていない。従って、放射線によるDNA損傷の新たなメカニズムの解明に繋がる可能性がある。生体分子損傷における水の影響の解明は全く進んでおらず、本研究により、人体への放射線影響の科学的理解がさらに進展するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The biological effects of radiation have long been a concern of humankind, but the underlying mechanism has not yet been elucidated. Recent studies have analyzed radiation damage to biomolecules at the atomic level, and the challenge is to elucidate the role of liquid water in damage. To solve this problem, we conducted an experimental study on biomolecular damage in water caused by ion beams. This study is related to the fundamental physics of particle beam cancer treatment. Through this research, we have obtained the following two findings. The first is that the coordination of water molecules around the molecule affects biomolecular damage. The second is identifying the energy of secondary electrons involved in the damage of the biomolecule.

研究分野：放射線物理学

キーワード：イオンビーム 紫外線 生体分子損傷 液相水 ヌクレオチド分子

1. 研究開始当初の背景

近年、放射線によるがん治療において、がん組織への線量集中性が極めて高い粒子線がん治療が国内外において進められている。世界における治療施設の数、現在約 80 箇所あり、2020 年までに新たに 45 箇所の施設が開設する予定である。その中で日本は、世界の最先進国であり、米国に続き第 2 位の施設数を有し、特に、炭素線を用いる重粒子線がん治療の開発において世界をリードしている [1]。一方で、原子物理学のアプローチにより、生体分子の放射線損傷を原子レベルで解明する研究が盛んに行われ、解離性電子付着 (dissociative electron attachment: DEA) による DNA 損傷や、分子間クーロン崩壊 (intermolecular coulombic decay: ICD) に伴う分子損傷など、新たな DNA 損傷過程が提唱されている [2]。この研究に用いた生体試料は気相や凍結状態の生体分子で、これは実際の生体環境とは異なる。そのため、水和した生体試料を用いた研究が最近始まり、水中における生体分子の放射線損傷の素反応の解明が今後の大きな課題となっている。

参考文献

- [1] Particle therapy co-operative group; <https://www.ptcog.ch/index.php/>
 [2] M. Rezaee et al., Radiation Research **188**, 123-143 (2017).

2. 研究の目的

水中における生体分子の放射線損傷について、水分子に囲まれた生体分子がどのような反応を経て損傷に至るかを実験的に明らかにすることである。本研究の目的は、水中における生体分子の周辺で起こる素反応について、特に、生体分子損傷における液体の水分子の役割を明らかにすることである。本研究の実験では、真空内液体分子線法により作製した生体分子水溶液に、MeV エネルギーのイオンビームを衝突させ、液体から放出する生体分子の分解イオンを質量分析することで、分子の切断箇所を原子レベルで特定することができる。本研究では、生体分子に水が配位することで、放射線による直接作用がどう影響されるかに注目する。具体的には、放射線が生体分子に直接あたり分解が起こる際、周辺の水分子によりその分解が抑制されるか、二次電子が生体分子にあたり分解が起こる際、周辺の水分子によりその分解がどのような機構になっているかを明らかにする。このような素反応の解明により、放射線の人体へ影響について、その原因を原子レベルで理解することに繋がる。

3. 研究の方法

液体分子線法により生体分子含有の水溶液を真空中に導入し、その標的にイオンビームを照射し、液体から放出した生体分子の分解イオンを飛行時間型二次イオン質量分析することで、生体分子の損傷箇所を特定した。ここで液体分子線法は、独 Max Planck Institute の Manfred Faubel 博士によって開発されたもので、この方法は、液体クロマトグラフ用の送水ポンプで高圧をかけた液体を、数十ミクロン径のノズルから真空中へジェット状に噴出させることで、液体状態を保持した過冷却の液体を真空中に導入できる方法である。図 1 に実験装置の概略を示す。ノズルから噴出した後の液体を液体窒素トラップで凝固させることで真空度の悪化を防ぐことができる。生体分子には、DNA 損傷を模擬するために、DNA の基本単位であるヌクレオチド分子 (ウリジンリン酸、uridine monophosphate: UMP) を用いた。

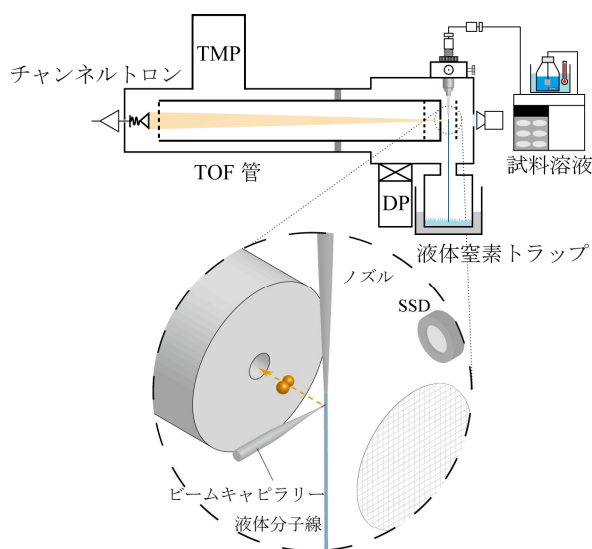


図 1: 実験装置の概略図

た。UMP 水溶液の濃度は、0.226 mol/L である。本研究では、生体分子の損傷における水の役割を調べるために、生体分子水溶液と、生体分子水溶液を Si 基板上に滴下し自然乾燥させた標的 (水分子が無い状態) を用いている。イオンビームの発生には、京都大学工学研究科附属量子理工学教育研究センターの 2 MV タンデム型ペレットロン加速器を用いた。この加速器から得られる MeV 領域のイオンビームは、粒子線がん治療の特徴である「ブラッグピーク領域」に相当する。これらの方法により、以下の研究テーマを実施した。

(1) 水分子の配位による生体分子損傷への影響

次に、水溶液と結晶標的の両者から放出される主要な二次イオンについて、二次イオン収量のレーザー強度依存性を調べると、図3に示す結果を得た。ここで、二次イオン生成における吸収した紫外線光子数を示す。つまり、 H_3O^+ に対する α の値は 1.8 であるので、これは、266 nm 光子を 2 つ吸収して生成したと考えられる。266 nm 光子を 2 つ分のエネルギーは 9.32 eV に相当し、このエネルギーは水のイオン化エネルギー (10.2 eV) より低い。この原因は、水分子の周辺に別の水分子が水素結合していることで、触媒効果によるものと考えられる。UMP 分子の分解に注目すると、 $[U+H]^+$ および $[U+C_2H_3O]^+$ の α の値が、水溶液と結晶標的の場合とで異なる点である。水溶液における $[U+H]^+$ は、2 光子吸収で生成されるのに対し、結晶標的では、3 光子吸収で生成されている。また、 $[U+C_2H_3O]^+$ の場合は、水溶液では 3 光子吸収で、結晶標的では 5 光子吸収で生成されている。これらの結果は、水溶液標的の方が、少ない光子吸収で分解が起こることを示唆している。この原因は、現段階では、UMP 分子に配位した水分子の影響であると考えている。つまり、UMP 周辺の水分子に紫外線の 2 光子吸収が起こると、 H_3O^+ が生成され、これに伴って放出された低エネルギー電子や OH ラジカルと UMP が相互作用して、 $[U+H]^+$ を生じる損傷が起こると考えられる。このように、水が紫外線を吸収することによる間接作用で UMP 分子の損傷が引き起こされた可能性がある。

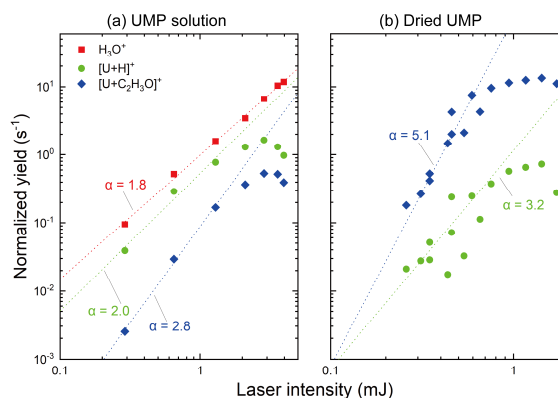


図3: UMP 水溶液と結晶標的から放出された二次イオン (H_3O^+ , $[U+H]^+$, $[U+C_2H_3O]^+$, U はウラシル分子) の紫外線レーザー強度依存性。

(2) イオンビームによるヌクレオチド分子の損傷過程における水環境の影響

(1)と同様の標的を用いて、ブラッグピーク領域のエネルギーを持つイオンビームを照射し、標的分子の原子レベルでの損傷箇所を二次イオン質量分析で特定した。まず、イオンビームの直接作用による分子損傷を解明するため、水を含まない UMP の固体標的に、異なる線エネルギー付与 (LET) のイオンビームを照射し、UMP の分解過程における LET 依存性を調べた。二次イオン質量スペクトルの測定データから、UMP のリン酸、リボース、核酸塩基の各部位が分解したイオン強度を求め、各部位の分解度を求めた。

図4は、一例として、2.5 MeV O^{2+} ビームを UMP 水溶液と結晶標的に照射した場合に放出した正に帯電したイオンの質量スペクトルを示す。両者の標的から、 $[PO+CH_3]^+$ と $[PO+R]^+$ (R はリボース分子) が生成されており、これらはリン酸の損傷を伴うイオンである。この結果は、DNA

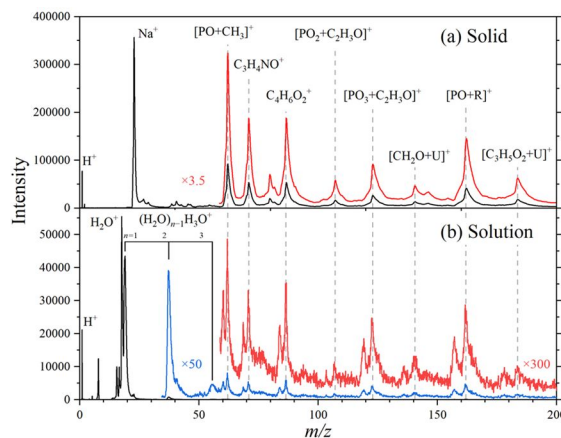


図4: 2.5 MeV O^{2+} ビーム照射による UMP 水溶液と結晶標的から放出した正に帯電したイオンの質量スペクトルの比較。

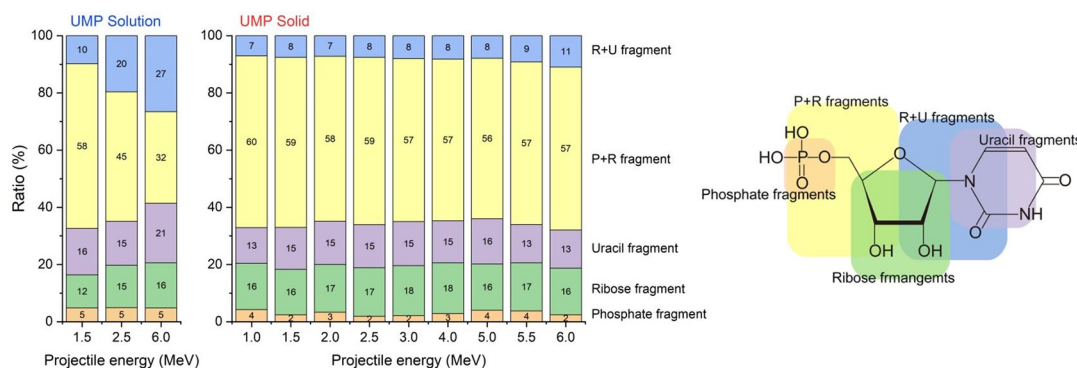


図5: UMP 水溶液と結晶標的から放出した UMP の部分構造毎の分解イオンの割合に対する酸素イオンビームのエネルギー依存性。

損傷において、水の有無にかかわらず、直接作用により鎖切断が生じることを示している。次に、UMP 水溶液のみから生じたイオンに注目すると、リボースの損傷を受けた二次イオン ($C_2H_4O^+$ と $C_4H_2O_2^+$) の収量が、ウラシルやリン酸の損傷を受けたイオンの収量に比べて高くなっている。この結果は、間接作用は塩基損傷より鎖切断を引き起こしやすいことを示唆している。

次に、UMP のリン酸、リボース、塩基部分の損傷における酸素イオンビームのエネルギー依存性について調べた結果を図 5 に示す。まず、UMP の結晶標的の場合は、図の右に示す UMP の部分構造の分解イオンの割合は、入射エネルギーに殆ど依存しないことが分かった。これは、水分子が無い場合直接作用が起こるため、UMP 分子の分解の直接作用において、入射エネルギー、すなわち LET 依存性が無いと結論できる。一方、UMP 水溶液の場合は、顕著な入射エネルギー依存性が見られる。この結果は、入射エネルギーが高い、すなわち LET が高くなるにつれてリン酸の相対的な分解度が高くなることを示している。つまり、DNA 損傷で考えると、DNA 構造の鎖切断が相対的に増えることを示唆している。

以上の結果をまとめると、イオンビームによる UMP の分解過程における液体の水の影響は、LET が高くなると核酸塩基の部位の分解が増える。核酸塩基の損傷は、水の放射線分解に伴う間接作用によって起こる。一方、水の有無にかかわらず、リン酸とリボースの部位が分解したイオンが生成され、直接作用によって起こることを示している。以上の結果から、放射線による DNA 損傷は水の影響を受けることが原子レベルでの実験から明らかにすることができた。

(3)イオンビームによるアミノ酸分子の損傷に関する二次電子エネルギーの解析

水中において水の放射線分解で生じた二次電子のエネルギーと生体分子損傷との関係を、実験とシミュレーション解析から調べた。実験は、グリシン水溶液の液滴標的に 0.4-8.0 MeV の炭素イオンを照射し、正および負に帯電したグリシンの分解イオンを質量分析した。主な分解イオンは、正イオンではグリシン分子の C-C 結合が切断して生じる $CH_2NH_2^+$ やグリシン分子に水素が付着した $GlyH^+$ 、負イオンではグリシン分子から水素脱離した $[Gly-H]^-$ 、 CN^- 、 HCO_2^- などである。これらの分解イオン収量は、炭素イオンのエネルギーによって変化すること、また、そのエネルギー依存性は分解イオンの極性、すなわち、正および負イオンによって異なることが明らかになった。この要因を調べるため、日本原子力機構が開発した放射線輸送計算コード PHITS (Particle and Heavy Ion Transport code System) を用いて、イオンビームを液相水に照射した際に、ナノメートルスケールのトラックから発生した二次電子が水中で衝突相互作用する過程を解析し、グリシンが解離した正および負に帯電したイオンの生成メカニズムを考察した。

図 6 に解析結果を示す。イオン照射により発生した二次電子が関与する電離・励起、および解離性電子付着 (DEA) の誘発量は、生成されたグリシンの正及び負イオンの生成収量と相関があることを見出した。具体的には、電離・励起を誘発する二次電子はグリシンが分解した正イオン生成と相関し、その際の二次電子エネルギーは 13-100 eV の領域であるのに対し (図 6(a))、解離性電子付着を誘発する二次電子はグリシンが分解した負イオン生成と相関し、その二次電子エネルギーは 13 eV 以下であることが分かった (図 6(b))。今後の研究において、DNA ベースの生体分子について同様の実験と PHITS による解析を行い、DNA 損傷を誘発する二次電子エネルギーを特定する研究に発展させる予定である。

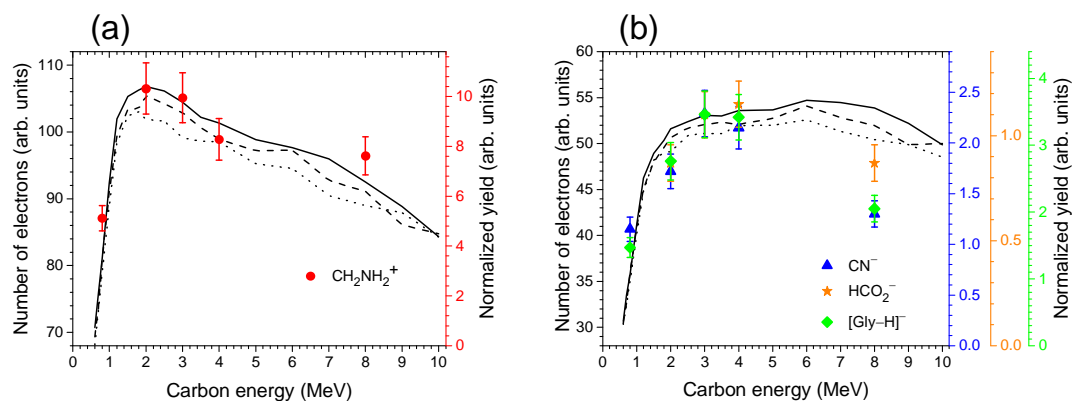


図 6 : グリシン液滴から放出された分解イオンの収量に対する炭素イオンの入射エネルギー依存性。(a) 正に帯電した分解イオン ($CH_2NH_2^+$) (b) 負に帯電した分解イオン (CN^- 、 HCO_2^- 、 $[Gly-H]^-$)。線は、PHITS 計算から得られた二次電子の衝突スペクトルにおいて、衝突前に (a) 13-100 eV のエネルギー領域の二次電子数、(b) 13 eV 未満のエネルギーの二次電子数に対する炭素イオンの入射エネルギー依存性。二次イオン収量とあるエネルギーを持つ二次電子数に相関が見られる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuchida Hidetsugu, Kai Takeshi, Kitajima Kensei, Matsuya Yusuke, Majima Takuya, Saito Manabu	4. 巻 74
2. 論文標題 Relation between biomolecular dissociation and energy of secondary electrons generated in liquid water by fast heavy ions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The European Physical Journal D	6. 最初と最後の頁 212 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1140/epjd/e2020-10172-x	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 Majima T., Mizutani S., Mizunami Y., Kitajima K., Tsuchida H., Saito M.	4. 巻 153
2. 論文標題 Fast-ion-induced secondary ion emission from submicron droplet surfaces studied using a new coincidence technique with forward-scattered projectiles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 224201 ~ 224201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0032301	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hidetsugu Tsuchida
2. 発表標題 Ion irradiation of liquid targets under vacuum using the capillary microbeam technique
3. 学会等名 The 17th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications (ICNMTA2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤隆哉, 本郷瑞起, 手塚智哉, 今井誠, 間嶋拓也, 斉藤学, 土田秀次
2. 発表標題 高速重イオン照射による水溶液環境下での生体分子損傷
3. 学会等名 原子衝突学会第45回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手塚智哉, 本郷瑞起, 佐藤隆哉, 甲斐健師, 今井 誠, 間嶋拓也, 斉藤学, 土田秀次
2. 発表標題 紫外線レーザー照射による水中における生体分子損傷
3. 学会等名 原子衝突学会第45回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手塚智哉, 本郷瑞起, 佐藤隆哉, 甲斐健師, 今井誠, 間嶋拓也, 斉藤学, 土田秀次
2. 発表標題 UV多光子吸収による水溶液環境下でのヌクレオチド損傷
3. 学会等名 日本物理学会第76回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Tsuchida, K. Kitajima, T. Majima, M. Saito, and T. Kai
2. 発表標題 Influence of secondary electrons on biomolecular damage in water by fast heavy-ion irradiation
3. 学会等名 The ninth International Symposium "Atomic Cluster Collisions" (ISACC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Tsuchida, S. Nomura, T. Majima, and M. Saito
2. 発表標題 Fast ion interactions with liquid jet targets under vacuum using the capillary microbeam method
3. 学会等名 23rd International Workshop on Inelastic Ion-Surface Collisions (IISC-23) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土田秀次
2. 発表標題 液体物質の二次イオン質量分析法を用いた水中における生体分子の重粒子線損傷 に関する基礎研究
3. 学会等名 第16回日本中性子捕捉療法学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土田秀次、甲斐健師、佐藤隆哉、本郷瑞起、北島謙生、間嶋拓也、斉藤学
2. 発表標題 液体への高速イオン照射における二次イオン放出と二次電子との関係
3. 学会等名 日本物理学会第75回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土田秀次
2. 発表標題 イオンビームによる液体物質の二次イオン質量分析法を用いた水中における生体分子の放射線損傷に関する研究
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手塚智哉、本郷瑞起、中川創平、今井誠、間嶋拓也、斉藤学、土田秀次
2. 発表標題 高速重イオン照射によるヌクレオチド損傷における水環境の影響
3. 学会等名 日本物理学会2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手塚智哉、本郷瑞起、今井誠、間嶋拓也、斉藤学、土田秀次
2. 発表標題 紫外線およびイオンビームによる液体内ヌクレオチド分子の損傷過程
3. 学会等名 第46回原子衝突学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土田秀次
2. 発表標題 イオンビームによる質量分析法を用いた水中における生体分子放射線損傷の研究
3. 学会等名 応用物理学会薄膜表面物理分科会 第22回「イオンビームによる表面・界面の解析と改質」特別研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手塚智哉、本郷瑞起、秀嶋雄登、今井誠、間嶋拓也、斉藤学、土田秀次
2. 発表標題 UVレーザーによる生体分子水溶液からの二次イオン放出
3. 学会等名 第77回日本物理学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土田秀次、手塚智哉、甲斐健師、松谷悠佑、間嶋拓也、斉藤学
2. 発表標題 水中におけるイオントラック内の二次電子と二次イオン生成の関係
3. 学会等名 第77回日本物理学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本郷瑞起、土田秀次、手塚智哉、間嶋拓也、斉藤学
2. 発表標題 SIMS分析を用いた重イオンビームによる生体分子損傷の入射粒子依存性
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 土田秀次、間嶋拓也、甲斐健師	4. 発行年 2022年
2. 出版社 応用物理学会	5. 総ページ数 未定
3. 書名 応用物理「研究紹介：イオンビームによるナノスケールで起こる 水中での生体分子損傷の機構解明」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

EurekaAlert!に掲載。 NEWS RELEASE 29-OCT-2020 Identifying biomolecule fragments in ionising radiation https://www.eurekaalert.org/news-releases/501846
--

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

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2件

国際研究集会 The ninth International Symposium "Atomic Cluster Collisions" (ISACC 2019)	開催年 2019年～2019年
国際研究集会 23rd International Workshop on Inelastic Ion-Surface Collisions (IISC-23)	開催年 2019年～2019年

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