

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24561039

研究課題名(和文) マイクロ波誘電吸収法によるDNAの劣化評価と線量評価への応用

研究課題名(英文) Evaluation of DNA degradation Using Microwave dielectric Absorption Spectroscopy and Its Application to Dosimetry

研究代表者

泉 佳伸 (IZUMI, Yoshinobu)

福井大学・附属国際原子力工学研究所・教授

研究者番号：60252582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ波技術を使ってこれまで困難だと考えられてきた水溶液系のDNAの評価を可能にした。具体的には、プラスミドDNAの鎖切断に伴う大きな構造変化とそれによる誘電率変化を、空洞共振器の共振周波数変化等で検出し、精度や再現性の向上のために環境の影響を低減させた。酵素で2本鎖切断させたDNAと切断前のDNAで測定値に違いが得られた。

この技術を用いて、放射線被曝線量評価手法に応用できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：By using microwave technique, we have been succeeded in detect a change in conformation of aqueous solution containing DNA. The main chain scission of plasmid DNA could be recognized by analysing characteristic absorption of microwave. Moreover, accuracy was improved by controlling temperature, humidity etc.

研究分野：線量評価

キーワード：線量評価 被曝線量 マイクロ波 DNA

1. 研究開始当初の背景

DNA の構造が変化した場合、検出・評価手法としてはゲル電気泳動やコメットアッセイ法が普及している。また、PCR やシーケンス解析を用いた一連の遺伝子塩基配列解析等が一般的である。しかし、いずれの手法においても作業が複雑であったり薬品の使用が不可欠で経済的ではない。また、ゲル電気泳動では感度が低く、DNA に起こったわずかな変化を検出することは困難である。

一方、マイクロ波を使った測定では ESR でラジカル検出の試みが長年行われてきた。但し、広く普及している X-band ESR では水による吸収が大きく、水溶液系での分析には適さない。そこで、L-band ESR での分析が提案された。しかし、感度が低く実用的でないと考えられている。また、ESR では不対電子を持たない安定分子（放射線化学最終生成物）に対して感度を持たないため、適用できない。

マイクロ波を利用した生体関連物質の分析でも、誘電吸収のように双極子モーメント変化に基づいた検出を行えば、水系の DNA の様な試料も測定可能であると考えたが、適用例はなかった。そこで、水溶液中に存在する各種 DNA の濃度とマイクロ波吸収周波数シフトとの関係や、放射線の線量とマイクロ波吸収周波数シフトとの関係についてデータを収集し、特許出願を行った。（特願 2010-272436、『生体由来分子その他の含水性有機高分子を含む試料の変化評価方法』）

したがって以上より、DNA の切断等に伴って起こるコンフォーメーション変化をはじめとする構造変化を、マイクロ波誘電吸収に基づいて高感度に評価する手法はこれまでのところ、申請者らのグループによる測定以外には報告例がない。

2. 研究の目的

申請者が特許出願済の「マイクロ誘電吸収による生体分子等の構造評価技術」を被曝

線量評価に応用するための基礎的研究を推進する。実用化されている被曝線量計は、無機物での格子欠陥等の物理的計測が主流である。一方、人体の被ばくの場合、DNA をはじめ、生体分子の変化が健康影響を引き起こす。従って、被曝に伴う DNA の変化を高感度に実施できれば望ましい。しかし、ゲル電気泳動等の従来技術では感度不足であった。そこで、個人被曝線量計応用のために、マイクロ波誘電吸収法や従来法及びモデル計算から基礎的知見を取得し、マイクロ波誘電吸収法の応用・発展に資する事を目的とする。

3. 研究の方法

本課題では、(1)計算科学による DNA 構造変化・誘電率変化のシミュレーション、(2)DNA の構造変化の従来法及びマイクロ波誘電吸収法を用いた実測、及び(3)装置の改良・製作及び検証について検討した。

(1)計算科学による DNA 構造変化・誘電率変化のシミュレーションとモデル構築

DNA 構造変化・誘電率変化のシミュレーションとモデル構築のため、解析用ワークステーション、Fortran・C++コンパイラ等を購入し、解析に必要な放射線輸送計算コード PHITS、分子動力学プログラム AMBER をライセンス契約により整備した。

本研究で用いた環状プラスミドのモデリングを行った。切断箇所をユニークに決定できないので、複数の場合を与えてそれぞれの場合の DNA の分子動力学計算を AMBER コード等により計算した。

(2)DNA の構造変化の実測

コンピテントセル（大腸菌）内で増幅した後 DNA を抽出・精製した環状プラスミド DNA (pUC118) を、バッファーを含む水溶液内に分散させて試料とした。各種濃度の DNA 試料溶液に対して、鎖切断・構造変化を誘起した。なお、照射によって図 1 の様な反応（一本鎖切断又は二本鎖切断）及び構造変化が起こる

ことが定性的には分かっている。処理前後の変化を既設のマイクロ波誘電吸収測定システムを用いて吸収周波数のシフトとして測定するとともに、ゲル電気泳動によって、バンドの変化として観測した。なお、事前に行った予備検討では、ゲル電気泳動では感度が低く、低線量 (<50Gy) の照射では分解生成物のバンドを観測することができなかった。また別途、酵素反応によるプラスミド DNA の 2 本鎖切断生成物のみを調製した後、マイクロ波誘電吸収測定した。

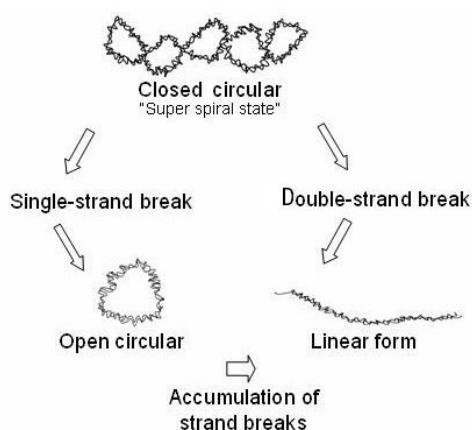


図1 プラスミド DNA に放射線照射した際に起こる反応と構造変化の模式図

(3)装置の改良・製作及び検証

上記の(2)で得られた知見から、現有装置の性能を上回る装置設計を行った。具体的には、小型コンパクト化の為に新たに S-band 空洞共振器システムを設計・製作した。さらには、測定プログラムを作成することにより測定精度及び感度を向上させるとともに、測定環境の影響を軽減させるための温度制御を検討した。

4. 研究成果

(1)計算科学による DNA 構造変化・誘電率変化のシミュレーションとモデル構築

本研究で用いた環状プラスミド DNA(pUC118)の分子構造モデリングにおいて、DNA の塩基配列 (3,162bp) を試料購入先 (TaKaRa バイオ) の情報を基に GenBank から

入手した。分子動力学計算に用いる pUC118 のトポロジー座標情報を文献等で調査したが、Protein Data Base(PDB)等のデータベースには存在せず、X 線や NMR による立体構造の解析情報も得られなかった。そのため、分子モデリング言語 Nucleic Acid Builder(NAB)を用いて pUC118 の分子構造を仮定してモデル化した。作成した分子構造モデルは 3 種類であり、linear、circle、nucleosome と名付け、それぞれ、DNA 二重鎖の 2 本切断、1 本切断、切断なしを模擬したプロトタイプモデルとした。これらの DNA のトポロジーモデルを図 2-4 に示す。

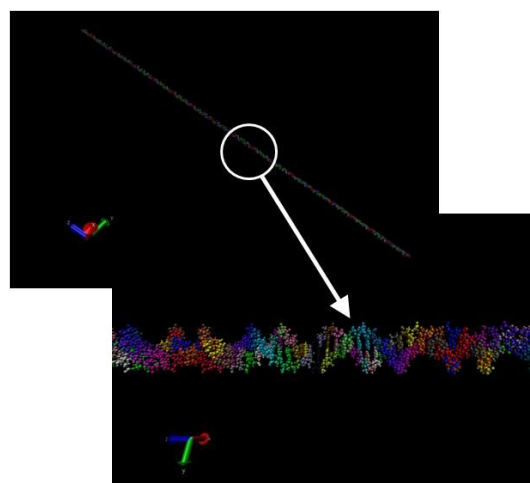


図2 NAB 言語による pUC118 の linear モデル

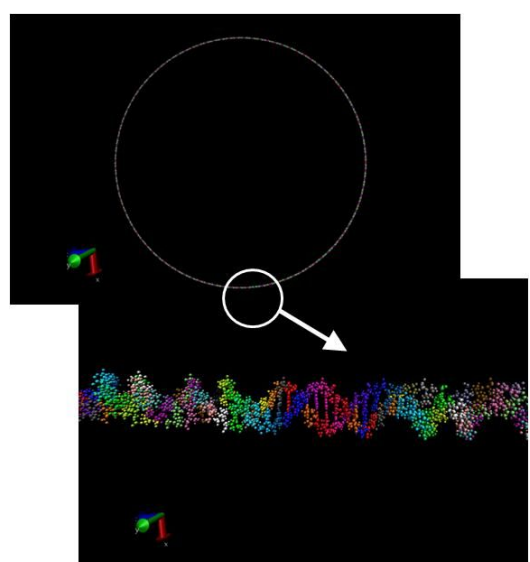


図3 NAB 言語による pUC118 の circular モデル

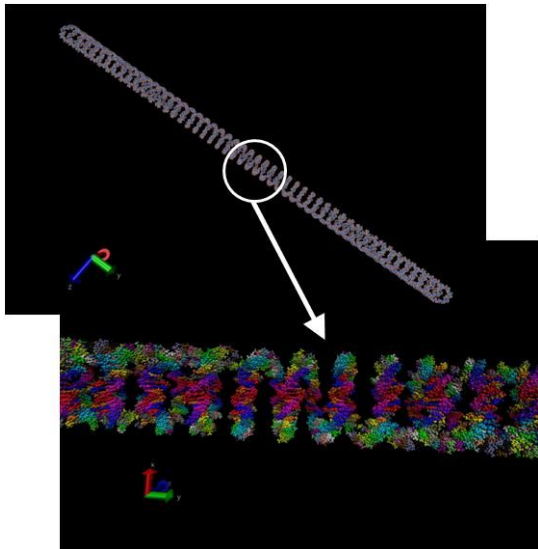


図 4 NAB 言語による pUC118 の nucleosome モデル

これらの DNA モデルから、AMBER によるエネルギー最小化計算、溶媒分子（水溶液）の付加を行い、定積過程で常温(300K)まで昇温し、その後定温過程の分子動力学シミュレーションによる緩和計算を実施した。計算は 1 ps 毎に約 1 ns まで実施したが、緩和過程が収束せず、平衡状態の詳細な分子構造が決定できなかった。この原因としては、採用した分子構造モデルが実際の pUC118 の分子構造とは異なっていることが挙げられる。実験で使用した pUC118 の各状態での実際の分子構造は不明であり、この分子構造情報が同定できなければ平衡状態のトポロジー座標情報が得られず、各状態の誘電率が正確に計算できない。

本研究では、DNA の切断を模擬した分子動力学計算により DNA 構造変化・誘電率変化のシミュレーションを実施するプロトタイプモデルを構築することができた。今後、実際に使用した DNA(pUC118)の各状態における実際の分子構造を X 線や NMR 解析手法を用いて同定する必要がある。また、本研究では解析する DNA 分子数が非常に多く、今回整備したワークステーションでは膨大な計算時間を要する。現実的な計算を行うためには多く

の GPU を搭載した高並列計算機クラスターが必須である。

(2)DNA の構造変化の従来法及びマイクロ波誘電吸収法を用いた実測 及び

(3)装置の改良・製作及び検証

注目すべき測定環境が及ぼす影響として、温度変化と湿度変化による影響を抽出した。本研究で用いる空洞共振器は真鍮でできている。室温変化に伴う線膨張によって空洞共振器の内側寸法が変化することが予想され、温度変化による配向分極によって実験試料の比誘電率が変化し、最終的に得られる結果に影響を及ぼすと考えられる。また、湿度変化は空洞共振器内部の水蒸気量の変化につながり、ひいては比誘電率が変化すると考えられる。

室温変化させた時の共振周波数を測定した結果を図 5 に示す。実線は最小二乗法を用いて得られた近似直線である。室温の上昇に伴い共振周波数が低周波数側にシフトすることが明らかになった。これは室温変化が、共振周波数に影響を与えることを示している。また、近似直線の傾きから、共振周波数への室温の影響は-46[kHz/]であると評価できた。また、室温を一定にして湿度を変化させたところ、湿度の上昇に伴って共振周波数が低周波数側にシフトしたがその影響はわずかであった。

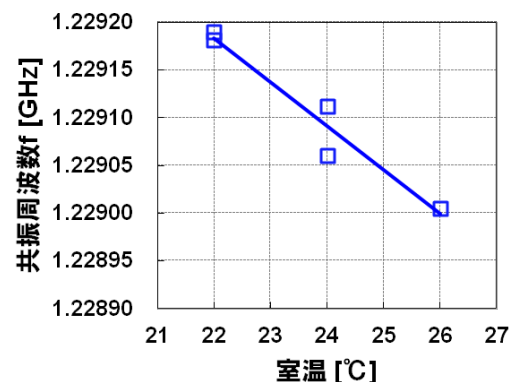


図 5 室温変化と共振周波数 f の関係

そこで、室温変動を軽減させるために、空

洞共振器を保温材容器 (IqL00 社の 156[L]クーラーボックス) 中に設置する改良を行った。空洞共振器の表面温度を計測するために、データロガーに接続された熱電対センサーを空洞共振器の表面に付着させ、USB を介してデータロガーと PC を接続させることで空洞共振器の表面温度を自動で計測できるようにした。また、日立産機システム社のコンプレッサーを用いて空洞共振器を入れた保温材容器中に乾燥空気を送り湿度の安定も図った。マイクロ波誘電吸収測定システムの改良の効果を確認するために、温度と共振周波数の長時間測定と湿度変化に伴う共振周波数を測定した。マイクロ波誘電吸収測定システムの改良前と改良後での温度の平均値と標準偏差を算出すると、改良前の平均値は 25.2[]、標準偏差は 0.6[]となり、改良後の平均値は 25.1[]、標準偏差は 0.1[]となった。このことから、温度のバラつきが抑制され、性能が向上したことを確認した。

以上のように、空洞共振器温度や内部の湿度、試料温度の影響が明らかになった。この結果を、影響を補正するプログラム開発に反映する計画である。

さらに、照射による鎖切断が生じた DNA のモデルとして、制限酵素 EcoR で二本鎖切断を生じたプラスミド DNA を作製した。EcoRI によって+926bp の位置に二本鎖切断が生じたサンプルを作製できる。この試料を二本鎖切断のプラスミド DNA 試料とした。

室温環境下 (25.0[]) で共振周波数と Q 値を測定した結果を図 6-7 に示す。プラスミド DNA に二本鎖切断が生じた場合、共振周波数 f と Q 値が変化することを確認した。この結果から、プラスミド DNA の誘電率・誘電損失の変化を、マイクロ波誘電吸収法により検出し、DNA 損傷を評価できる見通しを得た。また測定条件として、DNA 試料濃度は 40 ($\mu\text{g/ml}$) 以上、誘電損失変化を評価する際は 20 ($\mu\text{g/ml}$) 以上が望ましいことを確認した。

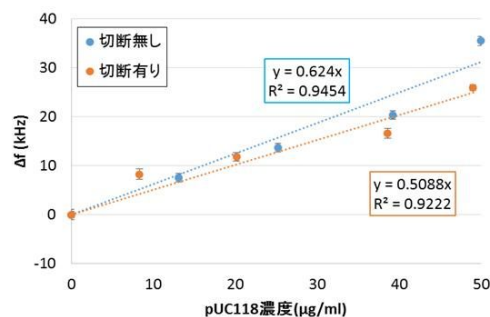


図 6 二本鎖切断の有無による共振周波数 f の変化量

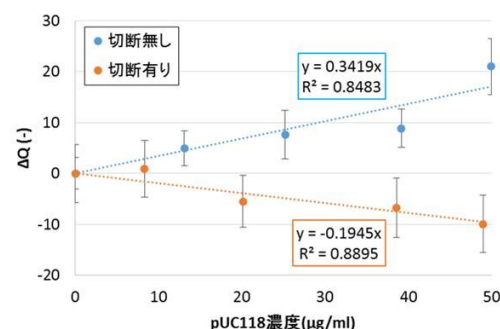


図 7 二本鎖切断の有無による Q 値の変化量

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 8 件)

- 1) マイクロ波誘電吸収法を用いた DNA 損傷評価 (2)、平山誠、松尾 陽一郎、砂川武義、泉佳伸、日本原子力学会 2015 年春の年会、茨城大学、茨城、平成 27 年 3 月 20 日～22 日。
- 2) 新たな線量計開発のためのマイクロ波誘電吸収システムの構築、平山誠、松尾陽一郎、砂川武義、泉佳伸、平成 26 年度応用物理学会 北陸・信越支部学術講演会、富山大学、富山、平成 26 年 11 月 7 日～8 日。
- 3) Y. IZUMI, Y. MATUO and T. SUNAGAWA, Development of Microwave Dielectric Absorption Spectroscopy for the Application to Dosimetry Using Plasmid DNA, the 4th Asian and Oceanic Congress on Radiation Protection (AOCRP-4),

Kuala Lumpur, Malaysia, May 12-16, 2014.

- 4) 岡田 翔太、松尾 陽一郎、砂川武義、小嶋 崇夫、泉 佳伸、マイクロ波誘電吸収法を用いた DNA の損傷評価、日本原子力学会 2013 年秋の年会、八戸工業大学、青森、平成 25 年 9 月 3 日。
- 5) Y. IZUMI, Y. MATUO, S. OKADA, T. KOJIMA and T. SUNAGAWA, An New Idea for dosimetry by using DNAs and Development of Microwave Dielectric Absorption Spectroscopy System, The 7th International Symposium on Radiation Safety and Detection Technology (ISORD-7), Sanya, China, Jul. 15-18, 2013.
- 6) 河田拓也、岡田翔太、砂川武義、小嶋崇夫、松尾陽一郎、泉 佳伸、生体物質を用いた線量計に関する研究、日本放射線安全管理学会 第 11 回学術大会、大阪大学、大阪、平成 24 年 12 月 4 日~6 日。
- 7) 岡田翔太、松尾陽一郎、河田拓也、砂川武義、小嶋崇夫、泉佳伸、マイクロ波誘電吸収法を用いた水溶液中における DNA の損傷評価に関する基礎的研究、放射線化学若手の会 2012 年度「夏の学校」、福井、平成 24 年 9 月 12 日。
- 8) Y. IZUMI, T. SUNAGAWA, Y. MATUO, T. KAWADA and Takao KOJIMA, The Detection of the DNA Structural Change Using the Microwave Dielectric Absorption Spectrometry and System Construction Aiming at Dosimetry, ICRS-12 & RPSD-2012, Nara Prefectural New Public Hall, Nara, Japan, Sep.2-7, 2012.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

泉 佳伸 (IZUMI, Yoshinobu)

福井大学・附属国際原子力工学研究所・教授

研究者番号 : 60252582

(2)研究分担者

松尾 陽一郎 (MATUO, Youichirou)

福井大学・附属国際原子力工学研究所・特命助教

研究者番号 : 90568883

山野 直樹 (YAMANO, Naoki)

福井大学・附属国際原子力工学研究所・特命教授

研究者番号 : 10397044

砂川 武義 (SUNAGAWA, Takeyoshi)

福井工業大学・工学部・教授

研究者番号 : 60329456

小嶋 崇夫 (KOJIMA, Takao)

大阪府立大学・地域連携研究

機構 放射線研究センター・助教

研究者番号 : 70360047