

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25740020

研究課題名(和文)自己組織化分子膜に配置したDNA分子の放射線損傷の物理化学素過程の研究

研究課題名(英文) Study on physicochemical process of radiation damage for DNA adsorbed on self-assembled monolayer

研究代表者

成田 あゆみ(Narita, Ayumi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・省エネルギー研究部門・産総研特別研究員

研究者番号：50633898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer: SAM)を利用して固体表面上に生体内に近い状態のDNA試料を作製し、放射光軟X線を用いた照射を行い照射影響を明らかにすることを目的とした。DNA-SAM二重膜の試料を作製し、膜厚とDNAとSAMの界面の化学結合状態を明らかにした。また作製した試料に対して放射光軟X線を用いた照射を行い、照射前後の吸収端近傍X線吸収微細構造(Near-edge X-ray fine structure: NEXAFS)スペクトルの比較から照射影響による電子構造の変化が確認された。

研究成果の概要(英文)：A novel two-layer sample composed of a deoxyribonucleic acid (DNA) film and self-assembled monolayer (SAM) was prepared on an inorganic surface. A SAM was formed on a sapphire surface, then oligonucleotide (OGN) molecules were adsorbed on the MPTS-SAM. The thicknesses and chemical states of the layers were determined. The sample was irradiated with synchrotron soft X-rays. The chemical state of the OGN molecules before and after irradiation was examined by Near-edge X-ray fine structure (NEXAFS). The peak shape of the N K-edge NEXAFS spectra of the MPTS-OGN layers clearly changed following irradiation. The MPTS-OGN layer formed on the sapphire surface. The chemical states and the structure of the interface were elucidated using synchrotron soft X-rays. The OGN molecules adsorbed on the MPTS films decomposed upon exposure to soft X-ray irradiation.

研究分野：表面化学、放射光科学

キーワード：DNA 自己組織化単分子膜 放射光軟X線 X線光電子分光 吸収端近傍X線吸収微細構造

### 1. 研究開始当初の背景

電離放射線によって引き起こされる DNA 損傷の初期過程では、構成元素の励起・イオン化が起きる。これらの現象が DNA 損傷過程にどのような影響を及ぼすかを調べるために、10 eV 以下の低エネルギー電子の入射や放射光軟 X 線(200 eV~5 keV)を用いて、DNA 損傷過程に関する研究が行われている。例えば DNA 構成元素は、イオン化する元素の違いによって鎖切断や塩基損傷の誘発量が顕著に変化することが明らかになっている。しかしながら、これらの実験はすべて金属や半導体基板上に多層の DNA 膜を作製した状態での実験結果であり、生体内での DNA をとは異なる環境下に置かれた DNA 試料を用いた結果である。そこで、固体表面に生体内 DNA に近い状態を再現するために、機能性膜材料の一つである自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer: SAM)に着目した。SAM は固体表面において分子が自発的に形成する膜であり、生体分子により近い有機分子でも作製できる。本研究では、有機 SAM 表面に DNA 分子を固定化することで、より生体内での状態に近い DNA を固体表面に配置した試料を提案した。さらに構成元素を選択的に励起・イオン化させることで現れる照射影響を検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、励起・イオン化による DNA 損傷過程を明らかにするために、固体表面に SAM を介して作製した DNA 試料の膜評価と、放射光による照射影響の解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 酸化物表面への SAM 作製

DNA を固定化するための SAM を作製する分子にはメルカプトプロピルトリメトキシシラン(Me rcaptopropyl-trimethoxy-silane: MPTS)分子を選択した。MPTS は三つの炭素の鎖の両端が SH 基と Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 基で終端された分子である(図 1)。MPTS の SAM 膜を作製する基板には、DNA を損傷させる二次電子放出効率の低い、アルミニウム酸化物であるサファイア基板を選択した。10 mM の MPTS-エタノール溶液を作製し、サファイアを 1 時間浸したのち、エタノール中で 10 分間の超音波洗浄を行うことで MPTS 膜を作製した。

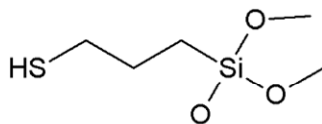


図 1. MPTS の化学構造

#### (2) SAM への DNA の固定化

固定化に用いる DNA は、5'末端が SH 基で

修飾された一本鎖 DNA であるオリゴヌクレオチド(Oligonucleotide: OGN)を選択した。(1)で作製した MPTS 膜に 10 mM Tris- HCl バッファーで 1 μM に濃度調整した OGN を 100 μl 滴下し、湿度 90%以上の環境に 24 時間静置した。その後、純水で 10 分間の超音波洗浄を行い、大気中で乾燥し、OGN-MPTS 二重膜を作製した。

#### (3) 作製した二重膜の評価

作製した試料は放射光 X 線を用いた光子分光法(X-ray photoelectron spectroscopy: XPS)と吸収端近傍 X 線吸収微細構造法(Near-edge X-ray absorption fine structure: NEXAFS)で測定した。XPS で得られた試料由来の光電子強度より膜厚を算出した。また、XPS および NEXAFS のピークエネルギーより SAM と OGN 界面の化学結合状態を考察した。

#### (4) 二重膜の照射影響の観察

放射光軟 X 線を用いて、作製した試料の照射影響を観察した。照射エネルギーは N 原子のイオン化領域である 430 eV を選択し、30 分間照射を行い、照射前後の OGN の化学状態変化を N K-edge NEXAFS にて観測した。

### 4. 研究成果

作製した MPTS-SAM の膜厚は、図 2 の XPS スペクトルに見られるサファイア基板由来の Al 1s ピークと MPTS 由来の Si 1s ピークの強度比より、3.1 nm と算出された。また、MPTS 膜上に作製した OGN 膜は、4.6 nm であった。よって二重膜の厚みは 7.7 nm であった。

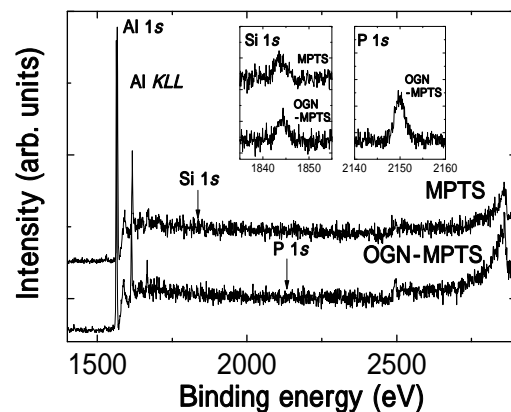


図 2. サファイア表面に作製した MPTS の SAM 膜および OGN-MPTS 二重膜のワイドスキャン XPS スペクトル。インセットは Si 1s および P 1s のナローキャンスペク

図 3 には、MPTS 膜と OGN-MPTS 二重膜の S 1s XPS スペクトルと、S K-edge NEXAFS スペクトルを示す。MPTS 膜の XPS スペクトルでは、2979.4 eV に一本のピークが確認され、これは MPTS の単層(モノレイヤー)由来のピークであると同定した。また過去に行った研究から、MPTS 分子の持つ Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 基は酸

化物表面に対して結合するという結果を得ている。これらより、サファイア表面の MPTS 分子は、 $\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$  基がサファイア表面に結合し、反対側の SH 基が再表面に露出していると予測される。OGN-MPTS 膜の場合は、OGN が S を含んでいるのにも関わらず、ピークは確認できなかった。一方で S K-edge NEXAFS の結果からは、MPTS 膜では 2472.3 eV と 2480.2 eV にピークが現れ、それぞれ S-C および S-O 結合に局在化した S 1s から  $\sigma^*$  軌道への遷移である。OGN-MPTS 膜の場合には S-C 結合由来のピークが減少した。これらの結果を XPS および NEXAFS の測定深度を考慮して解析した結果、OGN 分子中の SH 基は、MPTS 膜と OGN 分子膜の界面に存在し、MPTS 分子の SH 基と S-S 結合を形成している可能性を示唆した。

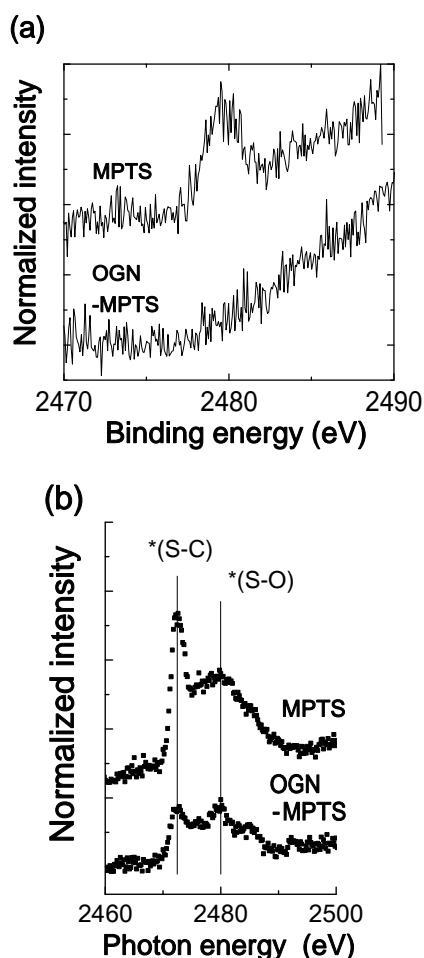


図 3. サファイア表面に作製した MPTS の SAM と OGN-MPTS 二重膜の (a) S 1s XPS スペクトルと (b) S K-edge NEXAFS スペクトル

図 4 は、OGN-MPTS 二重膜試料に N のイオン化領域エネルギーである 430 eV の放射光軟 X 線照射前後の N K-edge スペクトルである。照射前のスペクトルでは 395 eV から 403 eV にかけて現れる 2 本の明瞭なピークと、

403 eV から 410 eV のブロードなピークは、それぞれ N 1s から  $\pi^*$  および  $\sigma^*$  軌道への遷移であり、DNA に特徴的なピークである。照射後のスペクトルでは  $\pi^*$  ピークは確認できず、 $\sigma^*$  のピークもブロードになっている。これは OGN 分子中の N を含む塩基部位の構造が変化していることを示している。過去の研究より、この構造変化は塩基の分解を示していることが明らかとなっている。

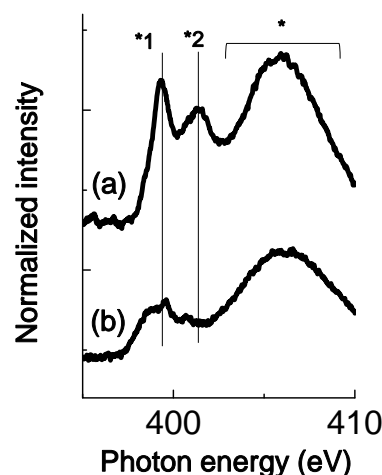


図 4. OGN-MPTS 二重膜試料の (a) 照射前および (b) 430 eV で照射後の N K-edge NEXAFS スペクトル

以上の結果は、本研究で作製した SAM に固定化した DNA 試料は、新しい照射影響研究のための試料として有用であることを示した。

#### 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 1 件)

A. Narita, K. Fujii, Y. Baba and I. Shimoyama, Use of a DNA film on a self-assembled monolayer for investigating the physical process of DNA damage induced by core electron ionization, Int. J. Radiat. Biol. 査読有, Article in press, 2016.

DOI: 10.1080/09553002.2016.1179812

[学会発表](計 5 件)

A. Narita, K. Fujii, Y. Baba and I. Shimoyama, Novel technique to investigate physical process of DNA damage induction by core electron ionization of constituent atoms in chromatin structure, Auger2015(Kyoto, Japan) 2015/5/21

成田あゆみ, 藤井健太郎, 横谷明德, 馬場祐治, 下山巖, 自己組織化単分子膜を介した無機表面へのオリゴヌクレオチドの固定化, 日本化学会第 95 春季年会 (船橋, 千葉) 2015/3/27

成田あゆみ, 藤井健太郎, 横谷明德, 馬場

祐治、下山巖、有機自己組織化膜をアンカーとした透明酸化物表面へのオリゴヌクレオチドの固定化、第 32 回 PF シンポジウム (つくば、茨城) 2015/3/17

A. Narita, K. Fujii, Y. Baba and I. Shimoyama, Immobilization of oligonucleotide on oxide surface through organic layer as anchor, ISSS7 (Shimane, Japan) 2014/11/3

成田あゆみ、藤井健太郎、横谷明德、馬場祐治、下山巖、酸化物表面に作製した有機自己組織化膜へのオリゴヌクレオチド固定化、第 31 回 PF シンポジウム(つくば、茨城) 2013/3/18

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

成田あゆみ (NARITA, Ayumi )

産業技術総合研究所 省エネルギー研究

部門・産総研特別研究員

研究者番号：5 0 6 3 3 8 9 8