

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21241017

研究課題名（和文） 液体マイクロビーム分光法による生体分子系放射線誘起状態の時間発展観測法の開発

研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF A TIME-DEPENDENT LIQUID MICRO-JET SPECTROSCOPY FOR RADIATION-INDUCED ANOMALY IN MIMETIC BIO-CELL MOLECULES.

研究代表者

鵜飼 正敏 (UKAI MASATOSHI)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80192508

研究成果の概要（和文）：

DNAの放射線損傷と損傷を回避するための細胞系の自発的修復とを熱力学的緩和過程の観点から統一的に研究するための分光法の開拓を目的として、既存の液体分子線・シンクロトロン放射光電子分光法を発展させるとともに、新規に、光励起とは相補的な高速電子線エネルギー損失分光システムを開発した。また、光励起と電子エネルギー損失に後続して誘起される分子の非定常状態とその反応を時間発展的に観測するための分光学的研究法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the radiation-induced damage on DNA and its self-assembled repair both as the alternative thermo-dynamical restoration processes of bio-cells, we have developed a novel spectroscopic method for damage in bio-molecules under mimetic cell condition by combining a liquid-micro-jet synchrotron-radiation photoelectron spectroscopy and a newly built high energy electron energy loss spectroscopy. To observed time-dependent appearance of anomalous molecular species following irradiation, a high resolution mass spectrometry has also been developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2010年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
2011年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	34,700,000	10,410,000	45,110,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA放射線損傷・化学的損傷修復・シンクロトロン放射光電子分光・

電子エネルギー損失分光・時間相関分光・液体分子線・

超励起分子のダイナミクス・水素結合ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

・電離放射線による生体分子、特にDNAの分子損傷の修復過程には、修復酵素タンパク質による“酵素修復”とともに、より迅速に“化学修復”が起ることが知られている。

・放射線により局所的にエネルギーの付与された物質系（DNAを含む）の異常な非平衡状態は最初期的な損傷というべきものであるが、種々の化学反応とそれともなうエネルギーの拡散を介して熱力学的に緩和する。その結果、これらの多くは難修

復性損傷として定着することが回避され照射前の安定状態へ戻る。

- このような熱力学的プロセスが化学修復の本質であり、放射線照射前の安定状態への回帰（化学修復）と、異なる安定状態への遷移（化学的に安定な難修復性 DNA 損傷の発生：これに対して“酵素的修復”が行われる）は択一的である。
- したがって化学修復の時間発展的理解は、いまだ不十分な DNA 損傷のメカニズムの解明につながる。しかしこれらについては上記のような概念にとどまっている。
- 放射線損傷は、局所的に付与されたエネルギーという物質系の非平衡状態の緩和過程において行われる。超励起による放射線エネルギー付与の強調の効果が現れるため、化学修復の時間発展的研究法の出発点として有効に利用できる。
- 代表者と分担者はシンクロトロン放射光励起・液体分子線分光法を確立し、液相試料に対する X 線分光測定を世界に先駆けて成功させてきたが、これを放射線作用の観点から総合的に発展させる必要がある。

2. 研究の目的

- 本研究は、以上のような「化学修復は放射線照射前の安定状態への回帰であり、DNA 損傷の定着とは択一的な熱力学的緩和過程である」という着眼点から、放射線照射直後の DNA 分子の異常な非平衡状態（構造変化）の発生と、その熱力学的緩和過程を明らかにするための分光学的研究方法の開発を行うことを目的とした。
- 申請者と分担者の、「原子・分子分光学」と「湿潤生体系」の相異なるアプローチを総合し、かつ、シンクロトロン放射光による選択的な超励起を用いる液体分子線・光電子分光法を格段に発展させるとともに、新たに高速電子線エネルギー損失分光法を開発することにより、超励起に開始される生体分子の放射線損傷の新側面を開拓する。

3. 研究の方法

- 上記の目的に基づき、生体分子への溶媒和により規定された構造に特有な放射線誘起構造変化をサイト選択的に特定して観測する。これは時間発展的な観測の始点の特定である。
- そのために、本研究の前駆課題にて開発した液体分子線とシンクロトロン放射光による光電子分光法を発展的に用いる。

- また、あらたに高速電子線エネルギー損失分光法を開発し、両者により水和により規定された分子構造に特有な放射線誘起構造変化を、超励起によりサイト選択して特定して観測する。

- 後続して誘起される反応が溶液反応場とともに、時間発展する状況を観測するために、照射後の時間領域に特徴的な生成物の発生を、質量分析等の種々の分光学的方法により特定する方法を開発する。

- 試料調製については、比較的安価な市販 DNA 等から試料調製を行う方法を整備する。

- 以上により、生体分子内の元素・結合サイト等に選択的に与えられたエネルギーを有する最初期の放射線誘起構造変化を観測するための時間発展分光法を開発する。

4. 研究成果

高速電子線エネルギー損失分光法

- 高速電子線エネルギー損失分光装置の仕様を電子光学シミュレーションを行い決定した。本装置は静電半球型の電子エネルギー選別器と二段の静電レンズ系からなる、ほぼ対称形の一对の単色化電子エネルギー電子銃と電子エネルギー分光器によって構成された高速電子線エネルギー損失分光器である。衝撃電子エネルギーは 3 keV - 10 keV であり、理論分解能は 0.1eV である。
- 以上に基づき、電子分光装置、磁気シールド、差動排気超高真空排気装置を設計・製作した。また、高安定度加速電源系と散乱電子単一粒子計測用信号計測システムを整備し、試運転と調整、ならびに改造によりシステムを完成した（図 1）。

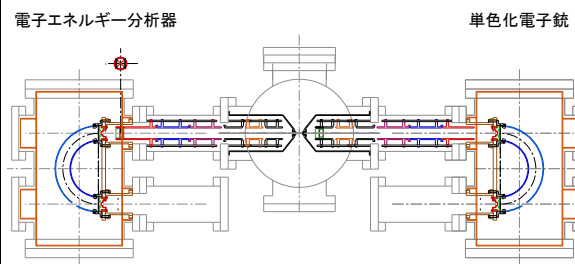


図 1 高速電子線エネルギー損失分光装置

液体分子線シンクロトロン放射光電子分光法

- 電子分光器製作に並行して西播磨 SPring-8 放射光施設に現有の液体分子線光・電子分光装置を用いた光電子分光実験の効率化のために、電子分光装置本体、信号計測系の整備、真空維持のための装置移動機構の設

計・製作と差動排気系の整備を行い、また、放射光光源系の高輝度・高収束化を行った。

- ・ヌクレオチドやATPなどDNA構成分子やその誘導体を含む水溶液試料に対する実験技術を継続的に蓄積し、高速電子線衝撃と軟X線照射を相補的に用いた液体分子線分光法を発展させた。典型的な成果の一つとして、溶液のpHによりヌクレオチドの構造変化を観測できたX線吸収スペクトル上を図2に示す。

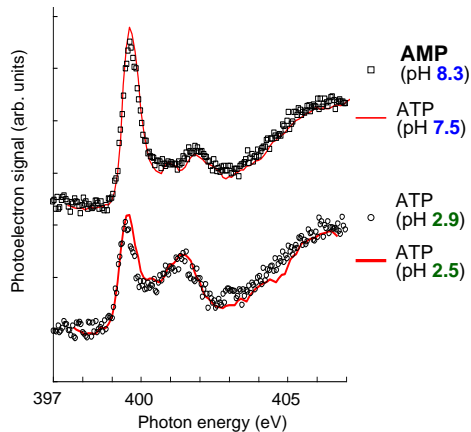


図2 水溶液のAMPとATPの窒素K吸収端近傍吸収スペクトル

高分解能質量分析法

- ・シンクロトロン放射光励起、あるいは高速電子線衝撃励起によって元素・サイト選択的に発生した初期状態から時間発展的に誘起される反応を分光学的に観測するための高分解能質量分析器を開発した。
- ・本装置はイオンの電界反射により高分解能を達成する往復飛行時間型質量分析器であり、超高真空槽に格納された分析器と飛行時間計測のための電源系と信号計測系からなる。
- ・本装置を用いてDNA塩基とほぼ同様の質量を持つSF₆に対する質量スペクトルを測定して検量線を作成した。また、質量分解能は約m/Δm=150程度と評価した(図3)。

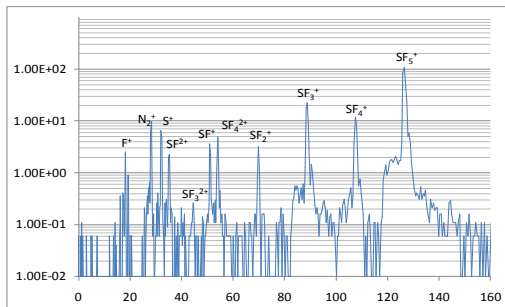


図3 電子線衝撃・分解されたSF₆の質量スペクトル

以上、計画調書記載の開発研究をほぼ遅滞なく遂行した。

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 16 件)

1. T.Oka, A.Yokoya, and K.Fujii, Lifetime of the unpaired electron species in calf thymus DNA thin films induced by nitrogen and oxygen K-shell photoabsorption, *Int. J. Radiat. Biol.* (2012) *in press*. **査読有**
2. T.Ushigome, N.Shikazono, K.Fujii, R. Watanabe, M.Suzuki, C.Tsuruoka, H.Tauchi, and A.Yokoya, Yield of single-, double-strand breaks and nucleobase lesions in fully hydrated plasmid DNA films irradiated with high-LET charged particles, *Radiat. Res.* (2012) *in press*. **査読有**
3. M.Noguchi, A.Urushibara, A.Yokoya, P. O'Neill, and N.Shikazono, The mutagenic potential of 8-oxoG/single strand break-containing clusters depends on their relative positions, *Mutat. Res.* **732**, 34-42 (2012). **査読有**
4. T.Oka, A.Yokoya, and K.Fujii, Electron paramagnetic resonance study of unpaired electron species in thin films of pyrimidine bases induced by nitrogen and oxygen K-shell photoabsorption, *Appl. Phys. Lett.* **98**, 103701_1-3 (2011). **査読有**
5. A.Yokoya, N.Shikazono, K.Fujii, M.Noguchi, and A.Urushibara, A novel technique using DNA denaturation to detect multiply induced single-strand breaks in a hydrated plasmid DNA molecule by X-ray and ⁴He²⁺ ion irradiation, *Radiat. Protect. Dosim.* **143**, 219-225 (2011). **査読有**
6. N.Shikazono, A.Yokoya, A.Urushibara, M. Noguchi, and K.Fujii, A model for analysis of the yield and the level of clustering of radiation-induced DNA strand breaks in hydrated plasmids, *Radiat. Protect. Dosim.* **143**, 181-185 (2011). **査読有**
7. H.Fu, M.Lin, Y.Muroya, Y.Katsumura, A.Yokoya, K.Hata, K.Fujii, and N.Shikazono, Protective effect of silybin and analogues against X-ray radiation-induced damage, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **42**, 489-495 (2010). **査**

読有

8. M.Ukai, A.Yokoya, K.Fujii, and Y.Saitoh, X-ray absorption spectra for nucleotides (AMP, GMP, and CMP) in liquid water solutions near the nitrogen K-edge, *Chem. Phys. Let.* **495**, 90-95 (2010). 査読有
 9. K.Fujii, N.Shikazono, and A.Yokoya, Nucleo-base lesions and strand breaks in dry DNA thin film selectively induced by monochromatic soft X-rays, *J. Phys. Chem. B.* **113**, 16007-16015 (2009). 査読有
 10. H.Fu, M.Lin, Y.Muroya, K.Hata, Y. Katsumura, A. Yokoya, N.Shikazono, and Y.Hatano, Free radical scavenging reactions and antioxidant activities of silybin: mechanistic aspects and pulse radiolytic studies. *Free Radic. Res.* **43**, 887-897 (2009). 査読有
 11. H.Fu, Y.Katsumura, M.Lin, Y.Muroya, K.Hata, K.Fujii, A.Yokoya, and Y.Hatano, Free radical scavenging and radioprotective effects of carnosine and anserine, *Radiat. Phys. Chem.* **78**, 1192-1197 (2009). 査読有
 12. A.Yokoya, S.M.T.Cunniffe, R.Watanabe, K. Kobayashi, and P.O'Neill, Induction of DNA strand breaks, base lesions and clustered damage sites in hydrated plasmid DNA films by ultrasoft X-rays around the phosphorus K-edge, *Radiat. Res.* **172**, 296-365 (2009). 査読有
 13. K.Fujii and A.Yokoya, Spectral change in X-ray absorption near edge structure of DNA thin films irradiated with monochromatic soft X-rays, *Radiat. Phys. Chem.* **78**, 1188-1191 (2009). 査読有
 14. M.Ukai, A.Yokoya, Y.Nonaka, K.Fujii, and Y.Saitoh, Synchrotron radiation photoelectron studies for primary radiation effects using a liquid water jet in vacuum: total and partial photoelectron yields for liquid water near the oxygen K-edge, *Radiat. Phys. Chem.* **78**, 1202-1206 (2009). 査読有
 15. A.Yokoya, K.Fujii, Y.Fukuda, and M.Ukai, EPR study of radiation damage to DNA irradiated with synchrotron soft X-rays around nitrogen and oxygen K-edge, *Radiat. Phys. Chem.* **78**, 1211-1215 (2009). 査読有
 16. N.Shikazono, M.Noguchi, K.Fujii, A. Urushibara, and A.Yokoya, The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA, *J. Radiat. Res.* **50**, 27-36 (2009). *invited review*. 査読有
- [学会発表] (計 29 件)
1. H.Shimada, T.Fukao, H.Minami, M.Ukai, A.Yokoya, K.Fujii, Y.Fukuda, and Y.Saitoh, Soft X-ray absorption spectra of AMP and ATP in solutions, *XII International Workshop on Radiation Damage to DNA*, 2-7 June, 2012, Prague, Czech Republic. *selected oral presentation*.
 2. T.Oka, A.Yokoya, K.Fujii, Y.Fukuda, and M.Ukai, Unpaired electron species induced in DNA thin films during monochromatic soft X-ray irradiation, *XII International Workshop on Radiation Damage to DNA*, 2-7 June, 2012, Prague, Czech Republic.
 3. T.Shiina, Y.Sugaya, I.Shiraishi, R.Watanabe, M. Suzuki, and A.Yokoya, Dependence of the yields of AP sites and AP clustered produced in plasmid DNA on scavenging capacity and LET, *XII International Workshop on Radiation Damage to DNA*, 2-7 June, 2012, Prague, Czech Republic.
 4. Y.Sugaya, T.Shiina, I.Shiraishi, and A.Yokoya, Variation in DNA damage induced by monochromatic soft X-rays in the energy region of oxygen K-edge, *XII International Workshop on Radiation Damage to DNA*, 2-7 June, 2012, Prague, Czech Republic.
 5. I.Shiraishi, T.Shiina, Y.Sugaya, N.Shikazono, and A.Yokoya, Order effects of base excision processes to repair clustered DNA damage, *XII International Workshop on Radiation Damage to DNA*, 2-7 June, 2012, Prague, Czech Republic.
 6. A.Urushibara, S.Kodama, and A.Yokoya, DNA damage caused by UV-A irradiation induces genetic instability, *XII International Workshop on Radiation Damage to DNA*, 2-7 June, 2012, Prague, Czech Republic.
 7. R.Watanabe, T.Shiina, and A.Yokoya, Simulation study of microdosimetry and distribution of DNA damage inducing base damage, *XII International Workshop on Radiation Damage to DNA*, 2-7 June, 2012, Prague, Czech Republic.
 8. 横谷明德, 放射線によるゲノム DNA 損傷の初期過程と生体修復, 日本物理学会第

67回年次大会, 2012年3/24-27, 関西学院大,
兵庫県. **招待講演**

9. A.Yokoya, Introduction to synchrotron radiation and radiobiological studies, *Surface, Electro, Radiation, and Photo Chemistry International Master Course (SERP-Chem), EU Education & Training "ERASUMUS MUNDUS"*, 11-26, Oct., 2011, Université Paris-Sud (11), Orsay, France. **invited.**
10. A.Yokoya, I.Shiraishi, and N.Shikazono, Order effect of base excision processes to repair clustered DNA damage, *14th International Congress of Radiation Research*, 28 Aug.-1 Sept., 2011, Warszawa, Poland.
11. K.Fujii and A.Yokoya, Near Edge X-ray Absorption spectroscopy of DNA damage induced by soft X-rays, *14th International Congress of Radiation Research*, 28 Aug.-1 Sept., 2011, Warszawa, Poland.
12. T.Oka, A.Yokoya, and K.Fujii, EPR study of unpaired electron species in DNA film induced by nitrogen and oxygen K-shell photoabsorption, *14th International Congress of Radiation Research*, 28 Aug.-1 Sept., 2011, Warszawa, Poland.
13. N.Shikazono, M.Noguchi, A.Urishibara, P. O'Neill, and A.Yokoya, Significance of the repair synthesis in determining the biological consequences of clustered DNA damage, *14th International Congress of Radiation Research*, 28 Aug.-1 Sept., 2011, Warszawa, Poland.
14. A.Yokoya, Y.Sugaya, K.Fujii, T.Oka, R. Watanabe, T.Kai, AP sites in plasmid DNA caused by Auger effect of oxygen, *7th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular, and Medical Aspects of Auger Processes*, 24-26 Aug., 2011 Jülich, Germany.
15. K.Fujii and A.Yokoya, X-ray absorption spectroscopic analysis of DNA damage induced by soft X-rays, *7th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular, and Medical Aspects of Auger Processes*, 24-26 Aug., 2011 Jülich, Germany.
16. T.Oka, A.Yokoya, and K.Fujii, Study of unpaired electron species in DNA film induced by nitrogen and oxygen K-shell photoabsorption, *7th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular, and Medical Aspects of Auger Processes*, 24-26 Aug., 2011 Jülich, Germany.
17. T.Oka, A.Yokoya, K.Fujii, Y.Fukuda, and M.Ukai, Measurement of unpaired electron species in dry DNA thin films irradiated with synchrotron soft X-rays around oxygen and nitrogen K-edge studied by EPR, *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)*, 15-20 Dec., 2010, Honolulu, USA.
18. 横谷明德, 放射線の直接作用による様々な DNA 損傷生成モード, 大阪大学産業科学研究所 平成 22 年度-第 2 回 量子ビーム科学研究施設研究会, 2010 年 11 月 30 日, 大阪大学, 大阪. **招待講演**
19. A.Yokoya, Various modes of DNA damage formation by the direct effect of radiation, *56th Annual Meeting of Radiation Research Society*, 25-29, Sept., 2010, Hawaii, USA. **invited.**
20. 横谷明德, 難修復性の DNA 損傷に関する物理学的及び生物学的アプローチによる研究, 東北大学加齢研究所研究員会セミナー, 2010年8月11日, 東北大学, 仙台. **招待講演**
21. 横谷明德, シンクロトロン放射を用いた DNA 損傷の分光研究, H22 年度第 1 回東京 RBC (放射線生物談話会) セミナー, 2010 年 7 月 17 日, 東京大学, 東京. **招待講演**
22. K.Fujii and A.Yokoya, Near Edge X-ray absorption fine structure of DNA thin film irradiated with soft X-rays, *37th International Conference on Vacuum Ultraviolet and X-ray Physics*, 11-16 June, 2010, Vancouver, Canada.
23. A.Yokoya, N.Shikazono, and K.Fujii, A novel technique using DNA denaturation-annealing to detect multiply induced base lesions in plasmid DNA molecules by X-ray irradiation, *11th International Workshop on Radiation Damage to DNA*, 15-19 May, 2010, Atlanta, USA.
24. M.Ukai, Y.Nonaka, R.Sumiya, S.Yasuhiro, A.Yokoya, K.Fujii, and Y.Saitoh, Synchrotron radiation photoelectron studies for primary radiation effects in bio-solutions: two dimensional electron spectra for liquid water in the soft X-ray region, *11th International Conference on Electronic Spectroscopy and Structure*, 6-10 Oct., 2009, Nara, Japan.

25. K. Fujii and A. Yokoya, Near Edge X-ray absorption fine structure of DNA thin film irradiated with soft X-rays, *11th International Conference on Electronic Spectroscopy and Structure*, 6-10 Oct., 2009, Nara, Japan.
26. M. Noguchi, A. Urushibara, A. Yokoya, P. O'Neill, and N. Shikazono, Mutagenic potential of clustered DNA damage containing single strand break and 8-oxoGs, *15th International Symposium on Microdosimetry: An International Meeting on Ionizing Radiation Quality, Molecular Mechanisms, Cellular Effects, and Their Consequences for Low Level Risk Assessment and Radiation Therapy*, 25-30 Oct., 2009, Verona, Italy.
27. N. Shikazono, A. Yokoya, A. Urushibara, M. Noguchi, and K. Fujii, Analysis on the yield and the level of clustering of radiation-induced DNA strand breaks in hydrated plasmids, *15th International Symposium on Microdosimetry: An International Meeting on Ionizing Radiation Quality, Molecular Mechanisms, Cellular Effects, and Their Consequences for Low Level Risk Assessment and Radiation Therapy*, 25-30 Oct., 2009, Verona, Italy.
28. A. Yokoya, N. Shikazono, A. Urushibara, M. Noguchi, and K. Fujii, A novel technique using DNA denaturation to detect multiply induced single-strand breaks in a hydrated plasmid DNA molecule by X-ray and He²⁺ ion irradiation, *15th International Symposium on Microdosimetry: An International Meeting on Ionizing Radiation Quality, Molecular Mechanisms, Cellular Effects, and Their Consequences for Low Level Risk Assessment and Radiation Therapy*, 25-30 Oct., 2009, Verona, Italy.
29. 住谷亮輔, 安廣哲, 野中裕介, 鵜飼正敏, 横谷明德, 藤井健太郎, 生体溶液試料に対する二次イオン質量分析法の開発, 原子衝突研究協会第 34 回年会, 2009 年 8 月 28-30 日, 首都大学東京, 東京.
- [図書] (計 3 件)
1. A. Yokoya, K. Fujii, N. Shikazono, and M. Ukai, Chap. 20. Spectroscopic study of radiation-induced DNA lesions and their susceptibility to enzymatic repair, in *“Charged particle and photon interactions with matter-recent advances, applications and interfaces”*, eds., Y. Hatano, Y. Katsumura, and A. Mozumder, CRC/Taylor & Francis Group, USA, pp543-574. (2011).

2. 鵜飼正敏, 5-3 節, 放射線作用の基礎過程, 市川行和, 大谷俊介編, 「原子分子物理学ハンドブック」朝倉書店, pp455-474 (2011).
3. 鵜飼正敏, 3 章, ペニングイオン化, 平岡賢三編, 「質量分析の源流」, 国際文献印刷社, pp41-59 (2011).
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
鵜飼 正敏 (UKAI MASATOSHI)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 80192508
- (2) 研究分担者
横谷 明德 (YOKOYA AKINARI)
日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主幹
研究者番号: 10354987
- (3) 連携研究者 なし
- (4) 研究協力者
藤井 健太郎 (FUJII KENTARO)
日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究副主幹
齊藤 祐児 (SAITOH YUJI)
日本原子力研究開発機構・放射光科学研究ユニット・研究副主幹
福田 義博 (FUKUDA YOSHIHIRO)
日本原子力研究開発機構・放射光科学研究ユニット・技術職員
島田 紘行 (SHIMADA HIROYUKI)
東京農工大学・大学院工学研究院・助教(2011 に参画)
住谷 亮介 (SUMIYA RYOSUKE)
東京農工大学・大学院工学府・博士前期課程(2009-2010 に参画)
安廣 哲 (YASUHIRO SATOSHI)
東京農工大学・大学院工学府・博士前期課程(2009-2010 に参画)
深尾 太志 (FUKAO TAISHI)
東京農工大学・大学院工学府・博士前期課程(2010-2011 に参画)
南 寛威 (MINAMI HIROTAKE)
東京農工大学・大学院工学府・博士前期課程(2011 に参画)