

機関番号：82110

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20710048

研究課題名（和文） イオン飛行時間分析法を用いたクラスターDNA損傷の直接観測

研究課題名（英文） Direct observation of clustered DNA damage using time-of-flight ion mass spectrometer

研究代表者

藤井 健太郎 (FUJII KENTARO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・副主任研究員

研究者番号：00360404

研究成果の概要（和文）：本研究では、クラスターDNA損傷の生成過程についての知見を得るために単一の光によってDNA分子中に同時に二個以上生成するイオンの生成時間とイオン種の相関について調べるための、飛行時間型イオン質量分析器を開発した。さらに、軟X線によって生成するクラスターDNA損傷を酵素を用いた方法により定量した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the production mechanism of clustered DNA damage, I developed the time-of-flight ion mass spectrometer. If the two ions were produced by a single photon, the coincidence signal can be detected on the ion mass spectrum. Moreover, I measured the clustered DNA lesions induced by monochromatic soft X-rays by an enzymatic method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：放射線・化学物質影響科学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：クラスターDNA損傷、軟X線、イオン、質量分析

1. 研究開始当初の背景

放射線によって物質は分子変化を生じる。これまで、DNAに対する軟X線照射により得られるイオン脱離の実験から、DNA主鎖を構成する糖部位から顕著なイオン脱離が観測されており、DNA主鎖切断に関わって

いることが報告されている。内殻電子励起が起こるとその後のオージェ過程によって価電子帯に二個以上の正孔を生じる。その正孔同士のクーロン反発により、分子結合の切断が起こり、正イオンが生成する。気相孤立分子において、二個以上の正イオンの同時生成

が報告されているが、このような過程が生体内の遺伝情報を司るDNA分子に対して起こるとすると、近接した部位に多数の分子変化を生じることが予測される。このような分子変化は、多重損傷部位あるいは「クラスターDNA損傷」と呼ばれ、突然変異や細胞致死を引き起こす重篤な損傷のひとつである。これまでクラスターDNA損傷は、空間的に密な電離や励起を与える放射線トラック上に生成する可能性が高いことが、モンテカルロシミュレーションを用いた研究によって示唆されているが、物理化学的な生成過程については未知である。

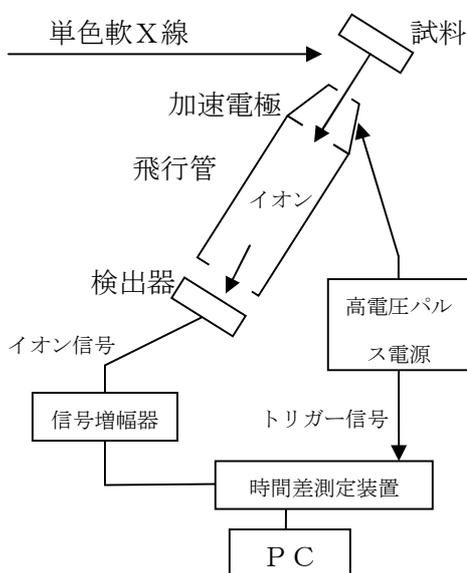


図1. イオン-イオン同時計測の概略

試料に単色軟X線が照射された後に生成したイオンは、飛行管を経由して検出器で検出される。そこまでの到達時間を時間差測定装置により測定する。単一の光によって同時に二個以上生成したイオンが生成した場合、特定のコインシデンスシグナルとして、時間差測定装置で検出される。

2. 研究の目的

本研究では放射線によるクラスターDNA損傷の物理化学的生成過程について、内殻電子励起後の多重イオン生成がどのように起こるかを明らかにするため、単一光子によって同時発生したイオンをイオン-イオン同時



図2. 作成した質量分析器の写真

図左端の加速電極に高電圧を印加し、図中の飛行管内にイオンを引き込む。図右端フランジに取り付けたイオン検出器に到達するまでの飛行時間を測定することによりイオンの質量を選別する。

計測によって、その相関を計測し、クラスターDNA損傷との関係を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

高電圧パルス電源により生じた電場によってイオン飛行管内に引き込まれたイオンの飛行時間を時間差測定装置によって計測する。図1にイオン-イオン同時計測の概略および図2に本予算で開発したイオン質量分析器の写真を示した。本実験により特定の飛行時間差を持つイオン種のみが相関ピークとして観測されるため、複数光子によりランダムに発生したイオン種とは区別して、単一光子により同時に生成したイオン種のみ的情報を得ることが可能となる。

4. 研究成果

装置設計のためのシミュレーションによって質量数100程度のイオンが、分解能1 amu以上で検出することができる条件を最適化した。軟X線照射実験は原子力機構・関西研播磨の放射光軟X線ビームラインBL23SUにおいて行った。試料には超ねじれ構造を持つプラスミドDNA (pUC18)を用い、照射試料をアガロース電気泳動法によってコンフォメーションごとに分離し、二本鎖切断量および、塩基損傷を含んだ non-DSB タイプのクラスターDNA損傷の誘発量を求めた (図

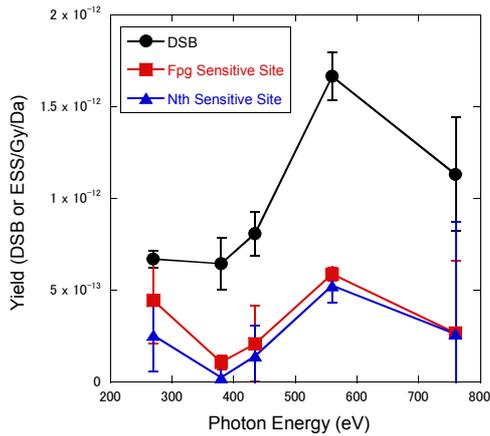


図 3. 単色軟 X 線によって誘発される各種クラスターDNA 損傷

軟 X 線照射により誘発される二本鎖切断 (DSB (●)) と Fpg (■) および Nth (▲) により認識された non-DSB タイプのクラスターDNA 損傷。

3)。その結果、DNA 構成元素である炭素・窒素および酸素の内殻電子励起領域で二本鎖切断量に大きな変化があること、が明らかになった。DNA 二本鎖切断は、細胞死に直接関係する DNA 分子変化のひとつであるが、内殻電子励起領域 (270-760eV) の数十 eV という γ 線などの高エネルギー放射線と比較すると極端に低いエネルギーで、このような大きな分子変化の差が現れた。すなわち、生体に対する放射線の効果は、放射線トラックによるエネルギー付与だけでなく、放射線によって起こる、内殻電子励起等の物理作用によっても大きく左右されることが明らかになった。本研究により、生体に対する放射線の効果について、細胞死に関わる DNA 二本鎖切断量が内殻電子励起領域の数十 eV という比較的低いエネルギー領域で大きく異なるという新規な結果が得られた。今後は、放射光ビームタイムを利用して、イオン-イオン同時計測を行い、求めたクラスターDNA 損傷との関係を調べる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

(1) 藤井健太郎、軟 X 線照射による DNA 損傷の光子エネルギーによる選択的な依存性 (放射線化学会奨励賞受賞記事)、査読有、放射線化学 90、17-22 (2010)。

(2) K. Fujii, and A. Yokoya, Spectral Change of X-ray Absorption Near Edge Structure of DNA Thin Films Irradiated with Monochromatic Soft X-rays. (査読付原著論文) Radiation Physics and Chemistry 78 (2009) 1188-1191.

(3) K. Fujii, N. Shikazono, and A. Yokoya, Nucleobase Lesions and Strand Breaks in Dry DNA Thin Films Selectively Induced by Monochromatic Soft X-rays. (査読付原著論文) Journal of Physical Chemistry B 113 (2009) 16007-16015.

(4) K. Fujii, A. Yokoya, and N. Shikazono, Induction of Single Strand Breaks, and Base Lesions in Plasmid DNA Films Induced by Carbon, Nitrogen, and Oxygen KLL Auger Process. (査読付原著論文) International Journal of Radiation Biology 84 (2008) 1104-1111.

[学会発表] (計 28 件)

(1) 藤井健太郎、横谷明德、軟 X 線照射した DNA 薄膜の XANES スペクトル変化 第 24 回日本放射光学学会年会 2011 年 1 月 9 日 つくば市

(2) 藤井健太郎、軟 X 線照射による DNA 損傷の光子エネルギーによる選択的な依存性 (学会奨励賞受賞講演) 第 53 回放射線化学討論会 2010 年 9 月 22 日 名古屋市

(3) 藤井健太郎、鹿園直哉、横谷明德、単色軟 X 線による乾燥 DNA 中に生じる分子変化の照射エネルギー依存性 第 23 回日本放射光学学会年会 2010 年 1 月 6 日 姫路

(4) 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. 2010年7月12日バンクーバー(カナダ)

(5) K. Fujii, and A. Yokoya, Near Edge X-ray Absorption Fine Structure of DNA Thin Films Irradiated with soft X-rays. 11th International Conference on Electronic Spectroscopy & Structure 2009年10月6日 奈良市

(6) 藤井健太郎、鹿園直哉、横谷明德、単色軟X線によるDNA鎖切断および塩基損傷の選択的誘発 日本放射線影響学会第52回大会 2009年11月11日 広島市

(7) K. Fujii, A. Yokoya, and N. Shikazono, DNA Damage Spectra in Ultrasoft X-ray Region: Effect of Inner-shell Ionization of Carbon, Nitrogen and Oxygen Atoms on the Damage Induction. 10th International Workshop Radiation Damage to DNA 2008年6月9日 裏磐梯

(8) K. Fujii, and A. Yokoya, Spectral Change of X-ray Absorption Near Edge Structure of DNA Thin Films Irradiated with Monochromatic Soft X-rays. 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry 2008年8月31日 東京都

(9) 藤井健太郎、横谷明德、鹿園直哉、軟X線照射によって乾燥プラスミドDNAに生じる分子損傷の収率 第51回放射線化学討論会 2008年10月16日 つくば市

(10) 藤井健太郎、横谷明德、鹿園直哉、軟X線によってDNA分子内に生じるサイト選択的分子変化 分子科学討論会 2008年9月25日 福岡市

[図書] (計1件)

(1) A. Yokoya, K. Fujii, N. Shikazono, and

M. Ukai, Chap. 20: R 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 -, ed. by Y. Hatano, Y. Katsumura, and A. Mozumder, CRC/Taylor & Francis Group, USA, pp543-574.

[その他]

ホームページ等

http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGL_OBAL_ID=200901099565273528&t=1&d=1&q=%28205%29%3D5000101360

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 健太郎 (FUJII KENTARO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・副主任研究員

研究者番号：00360404