

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12489

研究課題名(和文) クラスタライオンに特異的な突然変異誘発と産業応用に関する基盤研究

研究課題名(英文) Studies on the cluster-ion-specific mutagenesis and industrial application

研究代表者

長谷 純宏 (Hase, Yoshihiro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員

研究者番号：70354959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで生物照射に利用されたことのないクラスタライオンビームの照射効果を枯草菌の胞子をモデルとして評価した。シリコンウェハ上にほぼ単層に配置した胞子を真空チャンバー内で照射し、生存率を調査した。2 MeV H₂⁺と340 keV H⁺は線エネルギー付与は同等であるが、致死効果は2 MeV H₂⁺の方が低かった。2 MeV H₂⁺の2つの水素原子の核間距離及び動径線量を評価した結果、同等のエネルギー量であっても数nm程度離れた2ヶ所に付与されることで致死効果は大きく低減されること、また、軌道中心から半径1 nm程度の範囲のエネルギー密度が致死効果に大きく寄与することが実験的に示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、クラスタライオン特有のエネルギー付与を利用することによって、軌道中心のエネルギー密度が致死効果に大きく寄与することを初めて実験的に示唆する結果を得た。高LET放射線の生物効果を理解するツールの1つとして、クラスタライオンの活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the biological effects of cluster ion beams, which has never been used for the irradiation of biological samples, by using the spores of *Bacillus subtilis* as a model organism. Mono-layered spore samples prepared on silicon wafer were irradiated in a vacuum chamber and the survival rate was determined. The 2 MeV H₂⁺ showed a lower lethality than 340 keV H⁺, although both have a comparable linear energy transfer. The estimated internuclear distance of two protons of 2 MeV H₂⁺ and the radial dose distribution suggest that the spread of deposited total energy over two areas separated by just several nm greatly diminishes the lethality and that the energy density in the very center of the trajectory, possibility within a 1 nm radius, has a great impact on the lethality.

研究分野：量子ビーム科学

キーワード：クラスタライオン 枯草菌 致死効果 突然変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クラスターイオンビームは、複数の原子や分子からなるクラスターをイオン化して加速したものであり、MeV エネルギー級にまで加速できるようになった 90 年代以降、特に、高密度のエネルギー付与に起因する非線形効果が注目された。MeV 級の高速クラスターイオンが利用可能な施設は世界でも数えるほどしかない。研究代表者が所属する量研高崎研は、クラスターイオンを利用した材料表面の分析や加工に関する研究で世界をリードする研究施設の 1 つであり、近年では、C₆₀ フラーレンイオン生成に関する技術革新にも成功している。研究代表者らは、クラスターイオンが生物試料に対しても特異的な照射効果をもたらす可能性が高いと考え、従来全く行われていなかったクラスターイオンの生物影響に関する研究を 2016 年度から開始した。量研高崎研の静電加速器で利用可能なクラスターイオンの飛程は数 μm ~ 十数 μm であり、また、ターゲットに入射すると同時に結合電子を失って単原子に解離する特性を持つため、照射効果を精緻に評価するためには、細胞を単層に配置する必要がある。そこで、真空中での照射にも耐え得る枯草菌胞子 (厚み約 0.5 μm) を生物試料のモデルとし、シリコン基板上にほぼ単層に配置する試料調整方法を確立するとともに、炭素イオンの致死効果について検討した。しかしながら、炭素イオンのクラスターでは線エネルギー付与 (LET) が極めて高く、致死に必要な量以上のエネルギーがイオンの飛跡近傍に付与されるため照射効果の解釈が困難であり、“クラスター効果”を評価するには LET が 150 keV/ μm 以下の条件が好ましいことが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究は、炭素イオンよりも LET が低い水素イオンを用い、LET 及びクラスター数が異なる条件で微生物の胞子に照射し、致死効果及び突然変異の分子的特徴に関する“クラスター効果”を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

枯草菌 (*Bacillus subtilis* M168 株) の胞子の水溶液を、約 10 mm 角にカットしたシリコンウェハ上に 3 μl (2×10^5 個の胞子を含む) 滴下し、凍結乾燥の後、結露処理を行うことにより、ほぼ単層に配置された試料を作製した。量研高崎研イオン照射研究施設 (TIARA) の 3MV タンデム加速器、3MV シングルエンド加速器またはイオン注入装置を用いて、真空チャンバー内で LET の異なる 3 種類の単原子イオン (340keV H⁺ (LET 75.0 keV/ μm)、500keV H⁺ (58.9) 及び 1MeV H⁺ (37.7)) 及び 1 MeV H⁺ と原子あたりの入射エネルギーが等しいクラスターイオン (2MeV H₂⁺ (37.7 \times 2=75.4)) を照射した (表 1)。照射翌日にウェハー上から胞子を回収し、希釈平板法により致死効果を評価した。また、突然変異の分子的特徴を評価するため、菌体から抽出した DNA を用いて全ゲノムシーケンスを行った。得られた配列データを枯草菌のリファレンス配列にマッピングし、GATK、Pindel 及び BreakDancer アルゴリズムを用いて変異を検出した。複数の検体に共通する変異は擬陽性として除外した後、全ての変異箇所を Integrative Genomics Viewer で確認した。

表 1 本研究で用いた水素の単原子及びクラスターイオンビームの特性

Beam	Surface LET (keV/ μm)	Penetration Range (μm)
1 MeV H ⁺	37.7	16.7
2 MeV H ₂ ⁺	37.7 \times 2 (75.4) *	16.7 *
500 keV H ⁺	58.9	5.8
340 keV H ⁺	75.0	3.4

The LET values and penetration ranges were calculated assuming dried bacteria. * Values assuming no interaction between the two protons of the H₂⁺ ion.

4. 研究成果

2 MeV H₂⁺ は、340 keV H⁺ と同等の LET を有するにもかかわらず、致死効果は 340 keV H⁺ に比べて低く、この違いは空間的な線量分布によるものと考えられた (図 1)。2 MeV H₂⁺ は試料表面で結合電子を失い、2 つの 1 MeV H⁺ に解離する。2 つの 1 MeV H⁺ の核間距離は胞子を通過する間に徐々に広がるが、クーロン斥力及び胞子中での多重散乱を考慮すると概ね数 nm 以内であると考えられた (図 2)。さらに、1 MeV H⁺ 及び 340 keV H⁺ の水中での動径線量を評価した結果、いずれのイオンも軌道中心から半径 1 nm の領域に大きな線量を付与し、さらにこの領域における線量は 340 keV H⁺ の方が 1 MeV H⁺ に比べて 3 倍以上高いと考えられた (図 3)。これらの結果から、同等のエネルギー量が数 nm 程度離れた 2 ヶ所に付与されることで致死効果は大きく低減されること、また、軌道中心から半径 1 nm 程度の範囲のエネルギー密度が致死効果に大きく寄与することが実験的に示唆された。

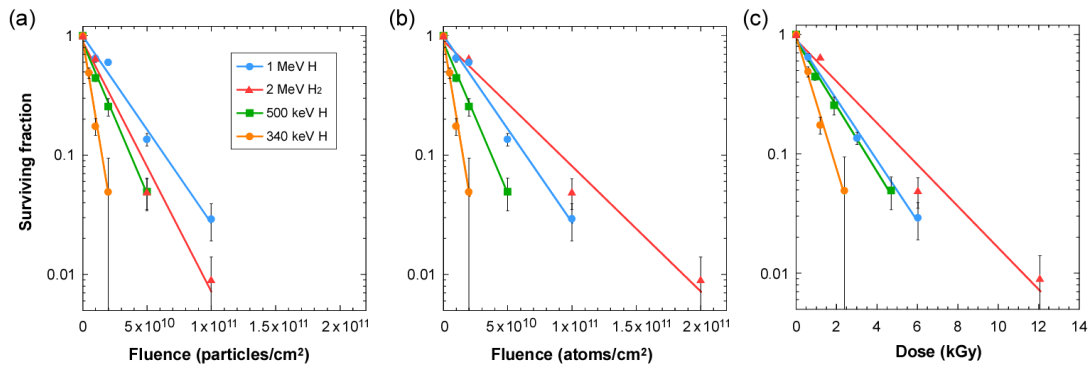


図1 照射した枯草菌胞子の生存率。(a)粒子あたり、(b)原子あたり、(c)線量あたりの結果。

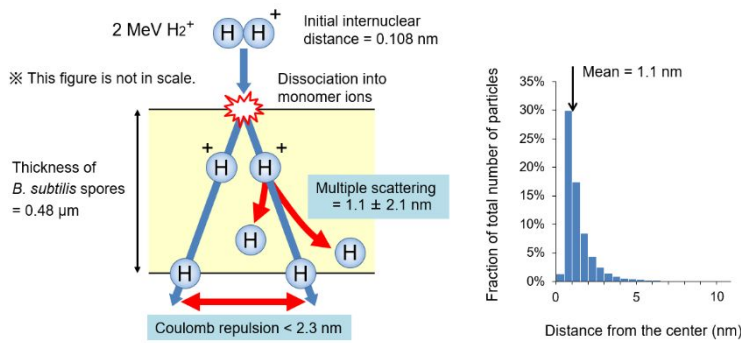


図2 枯草菌胞子を通る 2 MeV H_2^+ の核間距離の推定。2つの水素原子は試料表面で解離し、厚み $0.48 \mu m$ の胞子を通る間に、クーロン斥力及び多重散乱の影響を重ね合わせると、最大数 nm 程度まで核間距離が拡大すると推定される。

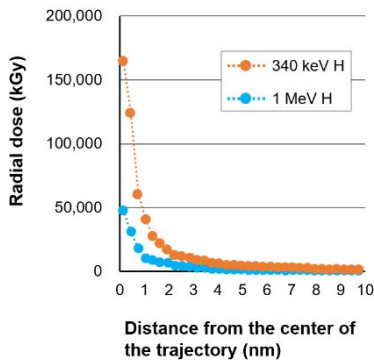


図3 340 keV H^+ と 1 MeV H^+ の動径線量の評価。

クラスターイオンと単原子イオンで生じる突然変異の特徴を比較するため、生存率が 0.1 から 0.01 になる線量で 2 MeV H_2^+ 、1 MeV H^+ 及び 340 keV H^+ を照射して得られた生存コロニーから DNA を抽出し、全ゲノム解析を実施した。非照射区に比べて照射区での変異率は 13 倍から 23 倍に増加した。変異率と生存率には負の相関関係がみられた。非照射区では塩基置換のみが検出されたのに対し、照射区では塩基置換に加えて、欠失、挿入及び染色体構造変化が検出された。照射区で検出された塩基置換では、GC AT、AT TA 及び GC TA の頻度が比較的高く、GC CG の頻度は低かった。欠失では 1 塩基の欠失が最も高頻度であり、欠失のサイズが大きくなるに従って頻度は低下した。構造変化は変異全体の 1.5 から 8.0% を占めていた。計 21 件の構造変化を検出し、20 件の全体構造を推定できた(図4)。20 件の構造変化のうち 7 件は主要な再結合点が 2ヶ所のシンプルな逆位で、主要な再結合点が 3ヶ所、4ヶ所及び 5ヶ所より複雑な構造変化がそれぞれ 9 件、3 件及び 1 件確認された。理由は不明だが、2 MeV H_2^+ 及び 340 keV H^+ に比べて 1 MeV H^+ での構造変化の発生頻度は 2 倍以上高かった。しかしながら、これらの実験を通じて、クラスターイオンと単原子イオンの間で変異の特徴に関する明確な差は認められなかった。

クラスターイオン特有の照射効果を見出すため、DNA を試料として真空チャンバー内で照射し、切断された DNA 鎖長の分布の評価を試みた。予備試験として pUC19 プラスミド DNA を水溶液または乾燥状態でガンマ線に暴露し、アガロースゲル電気泳動で DNA 鎖長の分布を評価した結果、水溶液に比べて乾燥状態ではやや切断効率が低下するが、少なくとも 1kGy で DNA の断片化が確認された。そこで、シリコンウェハ上に滴下して乾燥させた DNA に対して、真空チャンバー内で 2 MeV H₂⁺及び 1 MeV H⁺を照射した。線量 6 kGy に相当する 1x10¹¹ (particles/cm²) では明らかな切断は確認できなかった。一方、1x10¹³ または 1x10¹⁴ (p/cm²) では低分子化した DNA が確認できた。1x10¹³ (p/cm²) では、1 MeV H⁺では未切断のプラスミド DNA のバンドが確認されたのに対し、2 MeV H₂⁺では確認できなかった。更なる検討の結果、この違いは 1 MeV H⁺に比べて 2 MeV H₂⁺の方が弾き出し効果が高いことによるものと考えられた。DNA の低分子化が確認できる照射量ではスパッタリングが避けられないため、DNA 鎖切断の定量的な評価は困難であり、調査した範囲内ではクラスターイオンと単原子イオンの間で明確な差を見出すことはできなかった。










		No. of SV events (Sample name)		
		2 MeV H ₂	1 MeV H	340 keV H
SV with two major junctions				
Simple inversion		3 (B52823, B52923, H2_4-7)	3 (H121, H142, H1_1-6)	1 (B51434)
SV with three major junctions				
Inversion with deletion		2 (B521032, H2_1-5)		
Tandem inversion		1 (H252)		
Inversion & translocation		1 (H2_3-8)	4 (H142, H1_1-2, H1_2-2, H1_3-2)	
Inversion & translocation			1 (H1_1-8)	
SV with four major junctions				
Inversion & translocation			1 (H1_2-5)	
Inversion & Translocation with deletion			1 (H1_4-5)	
Inversion & translocation				1 (B51435)
SV with five major junctions				
Inversion & translocation			1 (H144)	
Total no. of SV events / Total no. of colonies examined		7 / 85 (8.2%)	11 / 55 (20.0%)	2 / 30 (6.6%)

図4 照射した胞子の全ゲノム解析で確認された構造変化(SV)の模式図。主要な再結合点の数によって分類した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hase Yoshihiro, Satoh Katsuya, Chiba Atsuya, Hirano Yoshimi, Moribayashi Kengo, Narumi Kazumasa	4. 巻 5
2. 論文標題 Proton-Cluster-Beam Lethality and Mutagenicity in Bacillus subtilis Spores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Quantum Beam Science	6. 最初と最後の頁 25 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/qubs5030025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hase Yoshihiro, Satoh Katsuya, Chiba Atsuya, Hirano Yoshimi, Moribayashi Kengo, Narumi Kazumasa	4. 巻 QST-M-33
2. 論文標題 Lethality and energy deposition profile of proton cluster beams in Bacillus subtilis spores	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2020	6. 最初と最後の頁 98 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 土田秀次、長谷純宏、佐藤勝也、他22名	4. 巻 -
2. 論文標題 高速クラスタービームによる生命科学・表面界面工学への応用研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 連携重点研究 2019年度成果報告書	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 長谷純宏、佐藤勝也、千葉敦也、平野貴美、鳴海一雅	4. 巻 QST-M-29
2. 論文標題 A Comparative Study on Lethal Effect of Monomer and Cluster Proton Ion Beams in Bacterial Spores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2019	6. 最初と最後の頁 94-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷純宏、佐藤勝也、森林健悟、千葉敦也、平野貴美、鳴海一雅
2. 発表標題 枯草菌胞子におけるクラスターイオンの致死効果及び変異誘発効果
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	森林 健悟 (Moribayashi Kengo) (70354975)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学 領域・上席研究員（定常） (82502)	

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0件

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