

2C10

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

(原子力機構) 藤井健太郎, 横谷明德, 鹿園直哉

【序】我々のグループでは、電離放射線により DNA 分子に生じる主鎖切断や塩基損傷などの分子変化について、修復され難い分子変化とされ易い分子変化の分子構造の違いや、それぞれの生成過程を明らかにすることを目的として研究を行っている。これまでに、X線、 γ 線、電子線およびイオンビーム照射により DNA 中に生じる主鎖切断および塩基損傷についての研究[1]を行ってきた。一方損傷生成に到る物理化学的過程を解明するため、放射光軟 X 線を用いた分光学的な研究[2]も同時に進めている。本研究では高輝度放射光施設(SPring-8)原子力機構専用軟 X 線ビームライン (BL23SU) から得られる単色軟 X 線を線源とし、OH ラジカルを介さず光電効果及び低速 2 次電子の作用によりのみ直接生じる損傷の収率の光子エネルギー依存性を明らかにすることを目的とし、DNA 分子内の主鎖や塩基サイトに生じる選択的な分子変化を観測した。

【実験】試料となる DNA フィルムを作成するため、TE 緩衝液で希釈したプラスミド DNA(pUC18)試料溶液($\sim 1\text{mg/mL}$)をガラス基板上に $5\mu\text{L}$ 滴下し、溶液中の塩の析出を防ぐため窒素ガスをフローさせながら徐々に乾燥させた。この後さらに、真空乾燥機中に 30 分保持することで DNA 分子周囲の水和水を取り除いた。得られたフィルム状の試料($6.5 \times 10^{-5}\text{g/cm}^2$)を SPring-8・BL23SU に設置された真空チェンバに導入し、窒素および酸素 K 殻吸収端領域の単色軟 X 線(270, 380, 435, 560, および 760eV)を室温で照射した。照射後試料を TE 緩衝液で回収し、主鎖切断によるコンフォメーション変化をアガロース電気泳動法により調べた。また、塩基損傷の収率は Fpg 及び Nth の二種類の塩基除去修復酵素(グリコシレース)で処理(37 $^{\circ}\text{C}$ 、30min)し、酵素の持つ AP エンドヌクレース活性により塩基損傷部位を主鎖切断に変換することで定量した。

【結果と考察】図 1 に単色軟 X 線によって生成する DNA 主鎖切断(SSB)および Fpg あるいは Nth で認識される損傷サイト(Enzyme Sensitive Site(ESS_{Fpg} , ESS_{Nth}))の収率の比を示した。これまでに水溶液中のプラスミド DNA には、OH ラジカルにより Fpg 及び Nth の両グリコシレースにより認識される酸化的塩基損傷が誘発されることが報告されているが、その両者の収率はほぼ同じである[3]。本研究では拡散性の OH ラジカルを全く介さない軟 X 線照射の直接効果によっても酸化的塩基損傷が誘発することが確認され、Fpg と Nth 認識サイトの生成収率の比は光子エネルギーに依存して大きく変化した。Fpg の基質は 8-oxoguanine や FAPY-guanine などのプリン塩基損傷、Nth の基質は Dihydrothymine などのピリミジン塩基損傷である。一方、主鎖に含まれるデオキシリボースサイトと塩基のひとつであるグアニンが他の塩基サイトに比べると強い正孔トラップサイトであり、ピリミジン塩基サイト(シトシンとチミン)が他の塩基に比べて強い電子トラップサイトであると報告されている[4]。軟 X 線照射後の内殻電子のイオン化により、最終的にオージェ終状態として、内殻電子 1 電子のイオン化に対して、少なくとも二つの価電子帯の正孔と二つ

の2次電子(光電子とオージェ電子)が生成する。これらの正孔や電子が塩基と反応して上記のような塩基損傷を生成すると予想される。270-760eVの照射によって生成する2次電子の運動エネルギーが照射する光子エネルギーによって異なること[5]から、このような、2次電子の運動エネルギーの違いが、今回我々の実験でみられた、 ESS_{Fpg} と ESS_{Nth} の比が光子エネルギーによって異なる結果を引き起こした原因のひとつであると推測される。放射線トラック構造に依存したDNA損傷収率のモンテカルロシミュレーションによって、0.3keVおよび1.5keVの電子線によって得られる塩基損傷とSSBの比(塩基損傷/SSB)はおおよそ2.0および2.2であると推定され[6]、電子線のエネルギーにはこの比は大きくは依存しない。しかし、本研究で行った各照射エネルギーにおける ESS_{Fpg} 及び ESS_{Nth} の総和は0.4から2.4の値となり、エネルギーにより最大で6倍の差があった。特に380eVでは ESS/SSB が0.4と前述のシミュレーションと比較すると低値を示した。このことは、特に塩基損傷の生成に関わる物理過程が、各元素のK殻イオン化の有無による違いを強く反映していることを示唆している。これまでも我々は、100 keV/ μm を超える高LET放射線照射ではこの比が低い値を示した事例(148 keV/ μm のHeイオン照射の場合、比は約0.4)を報告している[7]。シミュレーションと比較して低値を示した理由として、高LETのHeイオン(148 keV/ μm)では塩基損傷が低LETのHeイオン(19 keV/ μm)と同程度生成しているにもかかわらず、各損傷が空間的に近接して存在(クラスター化)するため酵素認識の阻害が起こりESSが下がっていると推定される。つまり、酸化的塩基損傷の生成は放出された2次電子による作用だけではなく、内殻イオン化そのものにも起因していると推測される。

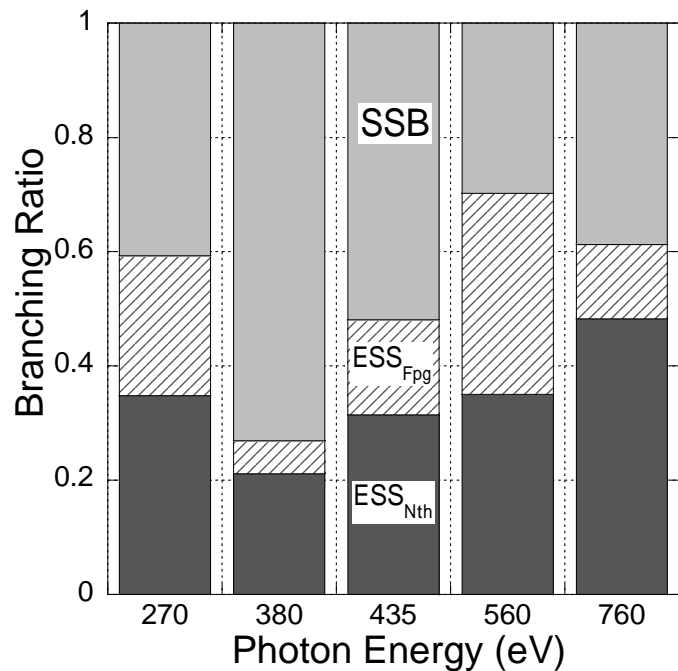


図1 DNA分子に生じる各種損傷収率比の光子エネルギー依存性

References

- [1] 横谷明德他, *放射線生物研究* **40** (2005) 164-184.
- [2] 藤井健太郎, *放射光* **16** (2003) 151-158.
- [3] A. Yokoya et al., *Radiat. Prot. Dosim.* **122** (2006) 86-88.
- [4] W.A. Bernhard and D.M. Close, in "Charged Particle and Photon Interactions with Matter", Y. Hatano and A. Mozmuder (eds), Marcel Dekker, New York, (2004), 431-470.
- [5] R. Watanabe et al., *Int. J. Radiat. Biol.* **11-12** (2004) 823-832.
- [6] H. Nikjoo et al., *Radiat. Environ. Biophys.* **38** (1999) 31-38.
- [7] A. Urushibara et al., *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 23-33.