

トピックス

DNA 及びそのサイト選択的励起による損傷の分光学的研究

藤井健太郎

日本原子力研究所 放射光科学研究センター*

Spectroscopic Study of Site Selective DNA Damage Induced by Intense Soft X-rays

Kentaro FUJII

Synchrotron Radiation Research Center, Japan Atomic Energy Research Institute

Abstract

To investigate the mechanisms of DNA damage induced by direct photon impact, we observed the near edge X-ray absorption fine structures (NEXAFS) of DNA nucleobases using monochromatic synchrotron soft X-rays around nitrogen and oxygen K-shell excitation regions. Each spectrum obtained has unique structure corresponding to π^* excitation of oxygen or nitrogen 1s electron. These aspects open a way of nucleobase-selective photo-excitation in a DNA molecule using high resolution monochromatized soft X-rays. From the analysis of polarization-dependent intensities of the π^* resonance peak, it is clarified that adenine, guanine and uracil form orientated surface structure. Furthermore from the direct measurement of positive ions desorbed from photon irradiated DNA components, it is revealed that the sugar moiety is a fragile site in a DNA molecule.

1. はじめに

放射光を用いた生物分野の研究というと、「構造生物」、「放射線治療」、「イメージング」、「放射線生物」や「生命の起源」を探る研究などが挙げられるが、我々は、生体分子の中で最も重要なプロセスの一つである「遺伝」を司る DNA を対象分子として、放射線による DNA 損傷と酵素タンパク質によるその修復機構に関する研究を通して、生物のもつ複雑でユニークな現象の機構解明を目指している。

一方ごく最近、ナノテクノロジーやバイオサイエンスの重点化により、DNA チップなどのマイクロアレイを始めとする、生体分子を用いた微細加工技術やこれらを使った物性測定により、生体分子の物性が明らかにされるようになった。生物のもつ特徴の一つである「増殖」は、遺伝によって生体の持つ情報を子孫へ伝達している。遺伝子の本体である DNA は自然環境下において、圧力・熱・放射線・ラジカルといった外的な環境因子によって様々な損傷を受けるが、そのままその損傷を放置しておくのではなく、これらのうちのいくつかについては酵素的な修復によって元通りに戻すことができる。このように、損傷によって修復されやすいものとされにくいものとが存在すると考えられるが、どのような DNA 損傷であれば修復されやすく、あるいはされにくいかについて調べることは、突然変異や発ガンの分子メカニズムを知る上でも重要なポイントとなる。そこで我々は、高輝度軟 X 線を用いて DNA 中の励起サイトを選択し、励起後に起こる光化学反応を分光学的な手法を用いて観測している。

2. DNA 構成分子の NEXAFS スペクトル

生体分子の電子状態を調べることは、電離放射線のトラ

ック中におけるフォトンあるいは荷電粒子と分子間の電子的衝突の相互作用を理解するうえで本質的である¹⁾。光吸収断面積を標的である生体分子に対して測定することは、放射線の生物に与える作用を理解するうえでとても重要である。本稿では放射線の標的分子として DNA を用い、DNA 薄膜や adenine, guanine, cytosine, thymine, および uracil といった DNA 構成塩基薄膜の NEXAFS スペクトルを測定した。これまでいくつかの光吸収スペクトル測定研究が、放射線のトラックエンドで生成する二次電子と同じエネルギー領域の放射光を用いて行われてきた。第一イオン化ポテンシャル近傍 100 eV 以下の真空紫外領域では、DNA 分子に対する吸収スペクトル測定が行われた。一方、100 eV 以上の領域は、より高いエネルギー領域に比べて、高いイオン化・励起密度を物質に与えるとして注目されている^{2,3)}。DNA 構成塩基の NEXAFS スペクトル測定については、吸収モードが DNA 中での炭素、窒素の周辺の化学的環境に大きく依存し、特徴ある微細構造を吸収スペクトルに与えることが明らかにされた⁴⁾。さらに最近我々のグループでは、酸素の K 殻吸収端では 2-deoxy-D-ribose の吸収微細構造が光照射による変化から、光分解後に、元々分子内に存在しなかった C=C や C=O が生成していることを明らかにした^{5,6)}。しかし、DNA および関連分子の吸収微細構造を与える電子状態を分子軌道法による計算から帰属した例は少ない。そこで、DNA 薄膜および DNA 構成塩基の NEXAFS スペクトルを測定し、電子状態についての帰属を試みた。

DNA 薄膜試料は Au 蒸着した Si(100) 基板上に水溶液をスピコートすることによって作成した。一方、核酸塩基薄膜 (~100 nm) は Au 蒸着した Si(100) 基板上に真空蒸着することによって作成した。実験は SPring-8 の日本

* 日本原子力研究所 放射光科学研究センター 〒679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都 1 丁目 1-1
TEL: 0791-58-2701 FAX: 0791-58-2740 E-mail: fujiken@spring8.or.jp

原子力研究所の軟 X 線ビームライン (BL23SU (VLS-PGM))^{7,8)}において行った。DNA 及びその構成塩基の窒素・酸素の NEXAFS スペクトルは、試料ドレインカレント測定による全電子収量法によって得られた。NEXAFS スペクトルの帰属は mochizuki らの HF-STEX による理論計算⁹⁾や、DV-X α 分子軌道法¹⁰⁾を用いた結果を元に行った。

得られた DNA 塩基薄膜の酸素 K 殻吸収端近傍の NEXAFS スペクトルは Fig. 1 のようになった。Adenine は分子内に酸素原子が存在しないため、スペクトルには構造が現れていない。DV-X α 法によって求めた、 π^* 軌道を傍線でスペクトル中に示した。一般的に π^* 共鳴励起ピークは σ^* よりも低エネルギー側に現れる。DV-X α 法による計算では多くの σ^* 励起軌道が見られたため、図中には水平のバーで示した。スペクトル中の π^* 共鳴励起構造は各々の塩基によって特徴のある構造を示している。この共鳴励起エネルギーは塩基分子内の置換基の化学的な特性に大きく影響を受ける。Cytosine と guanine はほとんど同じエネルギーのところに大きな一つの π^* 共鳴ピークを持つ。それに比べて thymine では π^* ピークは二つに分離しており、それらを π_1^* と π_2^* と呼ぶこととする。各々のカルボニル基の環境がそれぞれ、cytosine と guanine と似ているこ

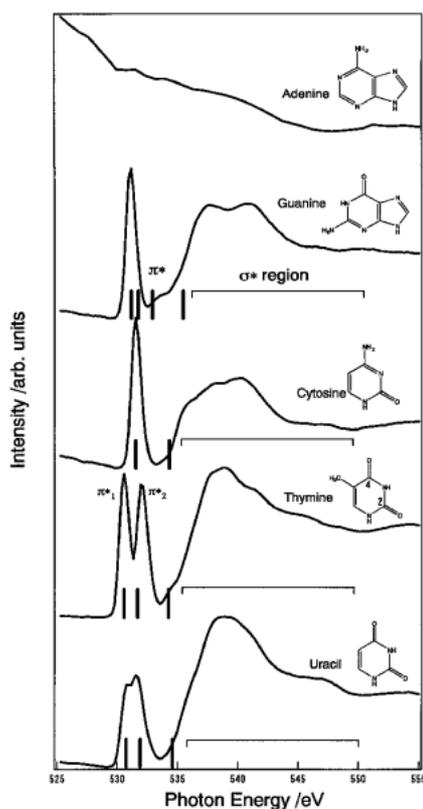


Figure 1. NEXAFS spectra of nucleobases thin films around oxygen K-edge region with the calculated π^* resonant excitations DV-X α method (solid bar) of each nucleobases. The region of the σ^* resonant excitation is shown by a horizontal bar.

とから、分子構造から判断して、 π_1^* ピークは $\pi^*(4C=O)$ 、 π_2^* は $\pi^*(2C=O)$ と帰属した。Uracil のスペクトルと比較すると、 π_2^* ピークは明らかに blue shift しており、これは thymine のメチル基の効果であると考えられる。

DNA 塩基薄膜の窒素 K 殻吸収端近傍の NEXAFS スペクトルは Fig. 2 のようになった。これらのスペクトルは、以前に Kirtley らによって報告されたもの⁴⁾と、ほぼ等しいが、本研究で使用した光学系の分解能が高いために、より微細な構造が現れている。Uracil と thymine は、どちらも類似した構造を示すことから、thymine のメチル基の効果はピリミジン環内に含まれる C-N 結合の π 軌道へはあまり影響しないことを示している。一方、adenine, guanine そして cytosine のプリン環やピリミジン環外のアミノ基によって大きく red shift しており、アミノ基の化学的特性は π 軌道に大きく影響することを示している。

DNA 薄膜の窒素と酸素 K 殻 NEXAFS スペクトルは Fig. 3 のようなものが得られた。窒素 K 殻 NEXAFS スペクトル (Fig. 3(a)) には、398~403 eV 付近の二つの鋭いピークと 403~415 eV 付近の一つのブロードなピークが見られた。これらのピークはすべて塩基に関係したピークであると解釈できる。一方、酸素 K 殻 NEXAFS スペ

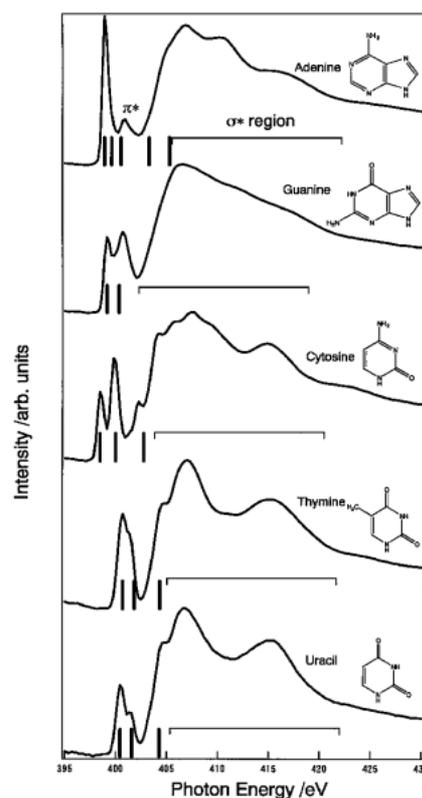


Figure 2. NEXAFS spectra of nucleobases thin films around nitrogen K-edge region with the calculated π^* resonant excitations with DV-X α method (solid bar) of each nucleobases. The region of the σ^* resonant excitation is shown by a horizontal bar.

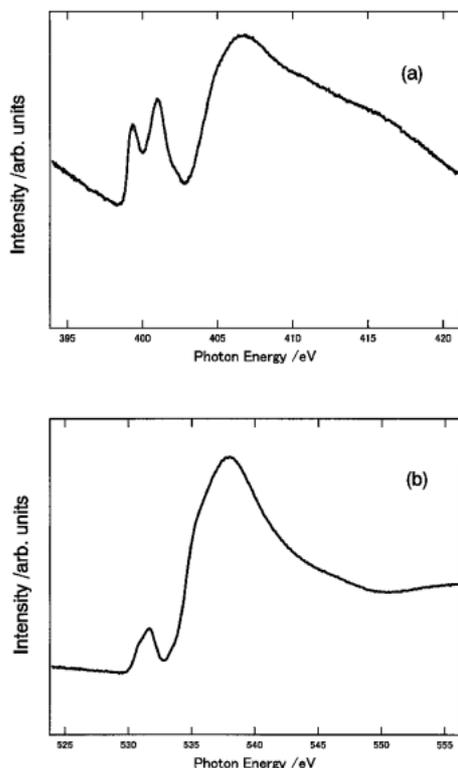


Figure 3. (a) NEXAFS spectrum of DNA thin films around nitrogen K-edge region and (b) oxygen K-edge region.

クトル (Fig. 3(b)) では、530~532 eV に一つの小さくシャープなピークと532~550 eV に一つのプロードなピークが見られる。2-deoxy-*D*-ribose⁵⁾とリン酸基¹¹⁾のNEXAFS スペクトルは538 eV 付近に強い、プロードなピークが現れると報告されており、このピークは σ^* (C-O) と帰属されている。低エネルギー側の小さなピークは、塩基の π^* 共鳴励起に由来している。

最近、DNA 分子内の電荷移動反応に関する研究が盛んに行われている^{12,13)}。それによると、DNA 内で起こったイオン化が、大きいときは八塩基対離れた所に移動して guanine へ局在化し、酸化的塩基損傷を引き起こすといわれている。O'Neill らによって193 nm のUVを用いて、酸化的塩基損傷が、他の塩基に比べてイオン化ポテンシャルの低い guanine に選択的に起こることが、塩基除去修復酵素を用いた実験および、理論的なアプローチによって調べられている¹⁴⁾。内殻励起を行いた「塩基選択的励起」を応用することにより、このようなDNA 分子内電荷移動に関して直接的な証拠を得ることが期待できる。たとえば、T-(A)_n-G のようなオリゴヌクレオチドに対して、530.5 eV (thymine の π^* ピークに相当) の光を照射すると、guanine の π^* 共鳴励起エネルギーが0.7 eV 程度高いために thymine の酸素を選択的に励起することができる。このような試料を用いて、thymine の選択的励起によって起こる、guanine サイトのような離れた位置での7,8-di-

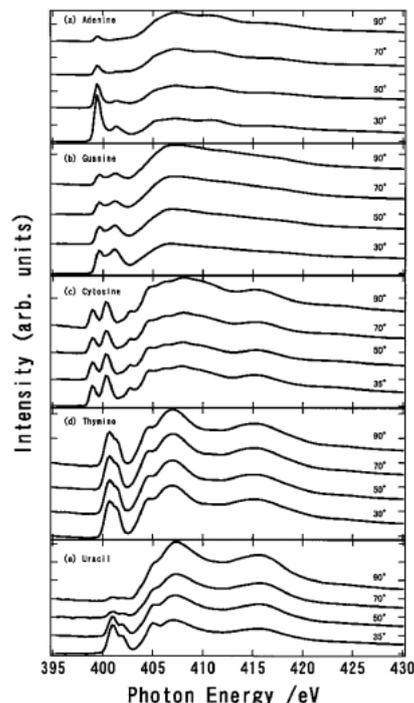


Figure 4. NEXAFS spectra of nucleobases thin films around nitrogen K-edge region of (a) adenine, (b) guanine, (c) cytosine, (d) thymine, and (e) uracil, respectively.

hydro-8-oxo-guanine のような酸化的塩基損傷をスペーサーである adenine の数を変化させることによって観測することができれば、内殻共鳴励起は、塩基選択的励起による光誘起のDNA 損傷のメカニズムを調べるための重要なツールとなることが期待できる¹⁵⁾。

3. NEXAFS スペクトル測定によるDNA 構成塩基薄膜の表面配向構造

核酸塩基はプリンあるいはピリミジンのように環構造をもち、DNA 中で核酸塩基は、隣り合う塩基はスタッキング構造をとる。また、対をなす塩基とは水素結合で結ばれている。NEXAFS スペクトル測定では単に電子状態についての情報が得られるだけでなく、 π^* や σ^* といった異方向性を持った分子軌道と放射光の持つ偏向特性を利用して、表面での分子の配向構造を観測することが可能である¹⁶⁾。そこで、本研究では各々の核酸塩基の多分子薄膜において、配向構造を決定することを試みた。実験に用いた塩基薄膜試料は前述の実験と同様、真空蒸着によって作成し、NEXAFS スペクトルは、全電子収量法によって測定した。また、放射光の電場ベクトルと薄膜表面の法線ベクトルとのなす角度 (θ) は30°から90°まで試料基板を放射光に対して回転させることによって変化させた。

Fig. 4(a)-(d)に adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil の窒素 K 殻 NEXAFS スペクトルの入射光偏光依存性を示した。Adenine, guanine, そして uracil の π^* ピーク

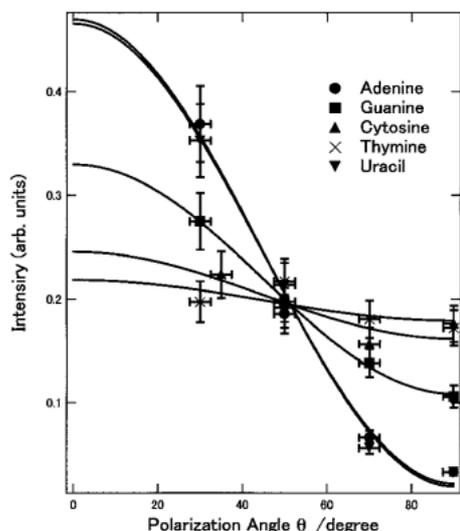


Figure 5. Polarization dependence of the intensities of the π^* resonances in the N 1s NEXAFS spectra of nucleobases. (● ■ ▲ × ▼) show the normalized peak area ratios of lowest π^* resonance of adenine, guanine, cytosine, thymine and uracil obtained from curve fitting procedure. Solid lines show the curve fitting results for adenine, guanine, cytosine, thymine and uracil respectively.

クの強度に注目すると、斜入射条件 (small θ) においては、 σ^* と同程度か大きい、 θ が大きくなると π^* ピークの強度が小さくなっている。同様のことが酸素 K 殻 NEXAFS スペクトルからもいえる。つまり、adenine, guanine, uracil 薄膜は何らかの配向構造を持っていることがわかった。一方、thymine と cytosine ではこのような π^* ピークの入射光の角度依存性は見られていない。つまり、thymine と cytosine は表面では特定の配向構造を持たないことがわかった。表面におけるプリンやピリミジン環の配向構造について詳しく調べるために、最も低エネルギー側の π^* ピーク強度の入射光偏光依存性についてプロットしたものが Fig. 5 である。実線は NEXAFS ピーク強度を入射光偏光依存性の関係式から求めたものであるが、それによると、adenine: 15°, guanine: 38°, uracil: 16° に配向した表面構造をもつことが分かった。また、thymine と uracil は同じピリミジン環を持つにもかかわらず、配向構造が異なることがわかった。その理由について詳しく調べるために、5-halouracil (X=F, Cl, Br, I) の NEXAFS スペクトルの測定を行い、 π^* ピークの入射光偏光依存性を調べたものが Fig. 6 である。それによるとすべての 5-halouracil が表面配向構造を持ち、角度は FUracil: 20°, ClUracil: 32°, BrUracil: 29°, IUracil: 32° であった。酸素の π^* (C=O) ピークについても同様の解析を行い、guanine: 38°, uracil: 16°, FUracil: 29°, ClUracil: 23°, BrUracil: 23°, IUracil: 33° と窒素 K 殻領域で得られた結果とほぼ同じ結果を示した。つまり、環外のカルボニル基もプリンあるいはピリミジン環と同一平面内に存在していることがわかった。

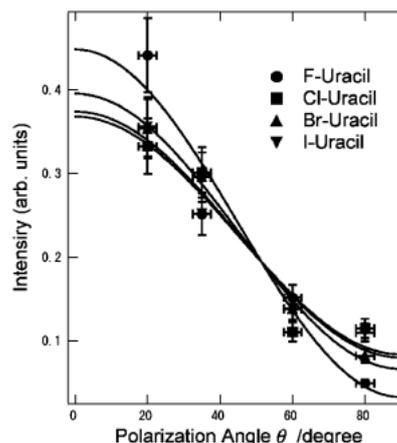


Figure 6. Polarization dependence of the intensities of the π^* resonances in the N 1s NEXAFS spectra of 5-halouracils. (● ■ ▲ ▼) show the normalized peak area ratios of lowest π^* resonance of FUracil, ClUracil, BrUracil and IUracil obtained from curve fitting procedure. Solid lines show the curve fitting results for FUracil, ClUracil, BrUracil and IUracil respectively.

Thymine と 5-halouracil の積層構造を比較すると、thymine では表面で無配向な構造を持つものに対して、5-halouracil は全て、配向構造を示している。Thymine と 5-halouracil の分子構造の違いは C5 位置の官能基の違いにあるが、thymine のメチル基のファンデルワールス半径は I 原子とほぼ等しい。しかしながら、IUracil と thymine の積層構造が異なるということは、分子の立体的配置だけの問題ではないと推測される。メチル基はピリミジン環内では、Halogen と比較すると大きな部分電荷密度を持つ。5-halouracil と thymine の積層構造の違いはこのような官能基の持つ物理化学的な特徴を反映しているものと考えられる。

4. 軟 X 線照射による DNA からの正イオン脱離反応

放射線が及ぼす DNA への影響は単鎖切断 (SSB) や二重鎖切断 (DSB) のような構造変化や DNA からの核酸塩基の脱離、塩基の構造変化を伴うような塩基損傷や、たんぱく質とのクロスリンクなどが挙げられるが、これらの損傷は致死や突然変異といった深刻な生物効果を引き起こすことが報告されている¹⁷⁾。これらの分子的な損傷は、DNA の直接的な励起やイオン化あるいは、水分子からのラジカル (OH \cdot など) による損傷を引き起こす (間接効果)。細胞内のような高濃度のラジカルスカベンジャーが存在する条件下では、直接励起やイオン化といった直接効果は比較的大きなウェイトを占めること (50%程度) が最近報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。これまでに、軟 X 線照射が引き起こす放射線損傷やその後に起こる突然変異といった細胞応答がいろいろと研究されている^{2,21)}。この領域の電子はバルク試料内で非弾性散乱によってそのエネルギーを失い、ついには数十 eV のエネルギーに落ち着く。これらの

低エネルギー電子は解離的電子付着 (dissociative electron attachment) によってDNAの鎖切断を引き起こすことが知られている²²⁾。一方、炭素、窒素、酸素およびリンの内殻励起・イオン化は放射線による直接的なインパクトによる分解と励起後に起こる、オージェ電子放出効果による分解が考えられ、興味ある現象が期待される。低エネルギー電子線の代わりに、放射光からの光を分光して用いる、単色軟X線を利用して、DNA鎖切断²³⁻²⁷⁾やヌクレオチドの光分解²⁸⁾などの研究がなされている。

我々はNEXAFSスペクトルの変化やFT-IRスペクトルの測定により、酸素のK殻励起によって起こる、2-deoxy-D-riboseの効率よい分解が起こることを報告している^{5,6)}。それに加えて、我々はthymineのSR照射による最終生成物の分析をHPLCを用いてすでに行っている²⁹⁾。しかしながらDNAから放出される、光照射による生成物を直接的に観測するような、物理的な初期過程の研究例は非常に少ない。生体分子で起こる放射線に対する応答は、長寿命ラジカルに代表されるような、比較的遅い時間で起こる過程 (マイクロ秒から数時間のオーダーまで) についてはさまざまな実験がなされているが、物理的な初期過程 (ピコ秒オーダー) でどのような反応が起こるのかについてはほとんどわかっていない。

照射試料からの正イオン脱離の検出は、残留ガス測定用の質量分析器と試料との間に適当なイオン引き込み電場を与えることによって容易に行うことができる。光刺激イオン脱離反応 (PSID) に関しては固体表面上の有機分子に対して多くの研究がなされており、その反応機構を示すいくつかのモデルが提唱されている³⁰⁻³³⁾。本研究ではDNA損傷、特にDNA中の酸素原子の直接励起・イオン化を通して起こる鎖切断や塩基損傷に注目して、その分子反応機

構を明らかにするために、軟X線ビームラインに設置した質量分析器 (Fig. 7) を用いてDNA構成分子からの正イオンの脱離を観測した。DNA構成分子を試料として用い、これらの分子からのイオン脱離を比較することにより、酸素の内殻励起によって起こる、様々なDNA構成分子の分子応答の違いについて調べた。

実験はSPring-8軟X線ビームラインBL23SUにおいて行った。thymine, thymidine 5'-monophosphate

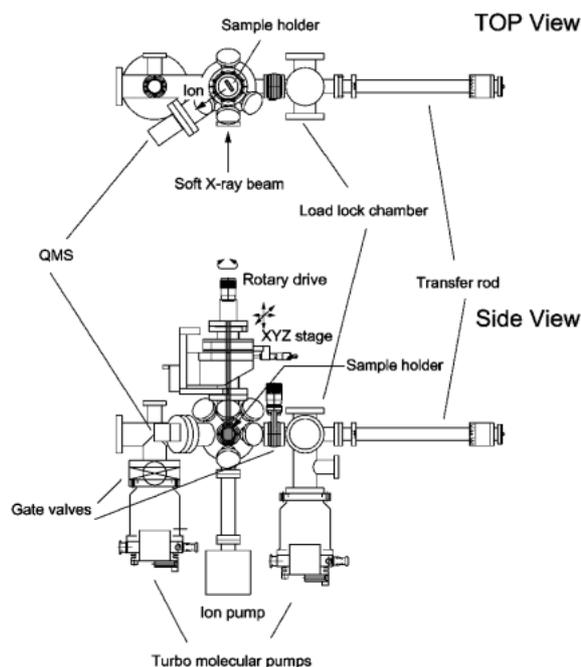


Figure 7. Illustration of photon-stimulated desorption chamber. The vacuum chamber is connected to the beamline vacuum pipe.

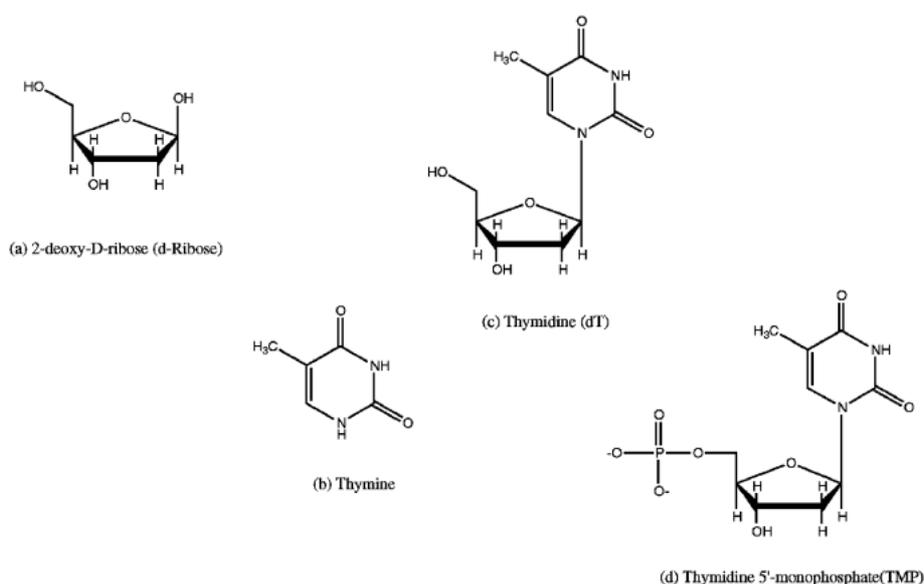


Figure 8. Molecular structure of each DNA components of (a) 2-deoxy-D-ribose, (b) thymine, (c) thymidine (dT) and (d) thymidine 5'-monophosphate (TMP).

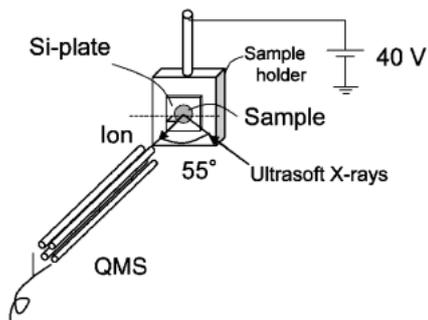


Figure 9. Schematic layout for desorbed positive ion measurement by irradiating the monochromatic soft X-rays.

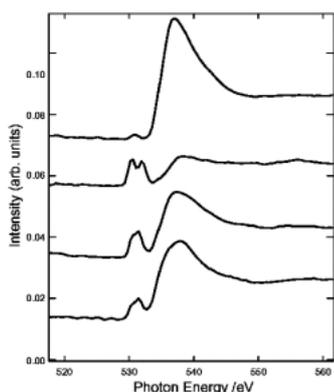


Figure 10. Obtained NEXAFS spectra for (a) 2-deoxy-*D*-ribose, (b) thymine, (c) dT, and (d) TMP thin films around the oxygen K-shell excitation region.

(TMP), thymidine (dT), 2-deoxy-*D*-ribose (d-Ribose) など DNA 構成分子の薄膜を試料として用いた (Fig. 8)。薄膜表面からの脱離イオンは入射軟 X 線から 55° 傾いた方向に、試料表面からおよそ 30 mm 離れた位置に設置された四重極質量分析器によって正イオンを観測した (Fig. 9)。イオンの検出感度を上げるために、試料には +40 V のバイアス電圧を印加している。

NEXAFS スペクトルを測定することで酸素の内殻励起領域での光吸収断面積を見積もり、各々の試料について Fig. 10 (a)–(d) のようなスペクトルを得た。すべての試料において吸収強度の比較的大きなエネルギー (538 eV) を選び、励起エネルギーを固定して、脱離イオンの質量分析を行った結果が Fig. 11 (a)–(d) である。これらのイオン強度は、照射のフルエンスと照射時間でノーマライズした。照射された DNA 構成分子からの分子フラグメントの直接観測は、DNA ダメージの化学的あるいは生物的過程の前に起こる、初期の物理的な過程に関する情報を与える。PSID に関するモデルは有機分子や無機分子系において、KF モデル³¹⁾、ASID モデル³²⁾、UFD モデル³³⁾ や XESD モデル³⁴⁾ といったいくつかのモデルが提唱されている。今回試料として用いた DNA 構成分子薄膜においては、凝縮系のために XESD のようなバックグラウンドの

上に ASID や UFD といった共鳴励起効果が加わっていると考えられる。

まず、d-Ribose の脱離イオンスペクトル (Fig. 11 (a)) に注目すると、 H^+ 、 CH_2^+ 、 CH_3^+ 、 $C_2H_2^+$ 、 $C_2H_3^+$ 、 CO^+ 、 CHO^+ 、 CH_3O^+ 、 $C_3H_3^+$ 、 C_2HO^+ 、 $C_2H_2O^+$ 、 $C_2H_3O^+$ 、 $C_3H_3O^+$ イオンが観測された。d-Ribose において、酸素の内殻準位を励起しているにもかかわらず、OH 基の脱離によって観測されるような、 O^+ や OH^+ のイオン信号は観測されていない。また、 CH_3^+ イオンは単純な分子分解ではなく、たとえば CH_2 と H^+ の再結合反応のような過程によって生成しているものと考えられる。今回観測されたさまざまなイオン種から判断すると、フラノース環の C–C と C–O あるいは C–C 結合が同時に切断して生成しているものと考えられ、どの部位の切断に由来するかは特定できないが、フラノース環がバラバラに壊れていると予想される。フラノース環は平面からゆがんだ構造を持つことが知られており³⁴⁾、thymine のような環状分子よりも比較的高い内部エネルギーを持つと考えられる。また、thymine のピリミジン環に存在するような二重結合がフラノース環には存在しないことから、酸素原子への光励起によって、d-Ribose は環構造を維持できないような分子分解を引き起こすと思われる。つまり、糖のサイトは DNA 中では脆弱部位となることが予想できる。また、d-Ribose で確認さ

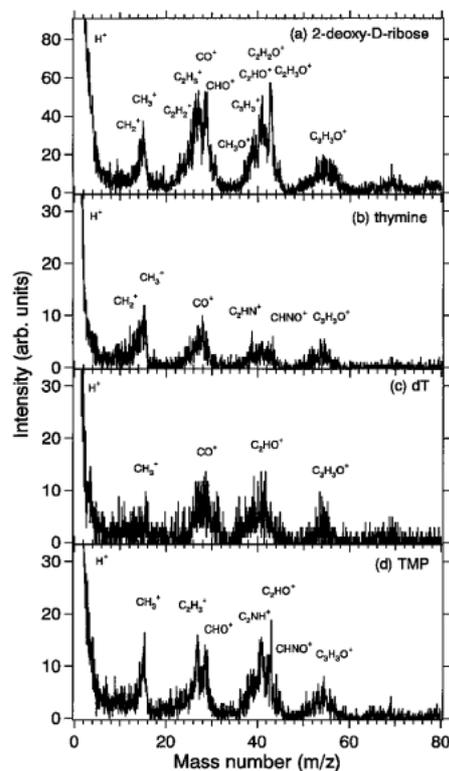


Figure 11. Obtained mass spectra of positive ions from (a) 2-deoxy-*D*-ribose, (b) thymine, (c) dT and (d) TMP thin films following oxygen core excitation (538 eV). Ion counts were normalized with photon-flux, irradiation time and X-ray absorption intensity.

れた $C_2H_3O^+$ イオンの生成は DNA 分子中では β - δ -SSB という d-Ribose が完全に抜けて 5', 3'リン酸基末端が現れるような鎖切断を引き起こす。この型の SSB と guanine の酸化的塩基損傷 (7,8-dihydro-8-oxo-guanine) が対になった cluster 損傷は塩基除去修復酵素のグリコシレース活性の強い阻害を引き起こすことが知られている³⁵⁾。つまり、このような損傷は修復できない致命的な損傷となる。Fig. 12 に d-Ribose からの脱離イオン収量の酸素の内殻励起領域での励起エネルギー依存性を示す。それによると、すべてのイオンが同じようなスペクトル構造を示し、538 eV 付近の $O1s \rightarrow \sigma^*$ (C-O) 共鳴励起エネルギーでイオン収量の増加が見られている。正孔-正孔反発力を考慮に入れた ASID のメカニズムは共有結合や化学結合系に適応されている。加えて、オージェ過程などによって生成した二次電子が引き起こす脱離は ASID とは区別して、XESD と呼ばれている。XESD によって生じたイオンは X 線吸収スペクトルに比例すると考えられるために、今回得られたスペクトルから判断して、d-Ribose からの脱離イオンはおもにこの XESD が支配的であると考えられる。

Thymine の薄膜からは、 H^+ , CH_2^+ , CH_3^+ , CO^+ , C_2HN^+ ,

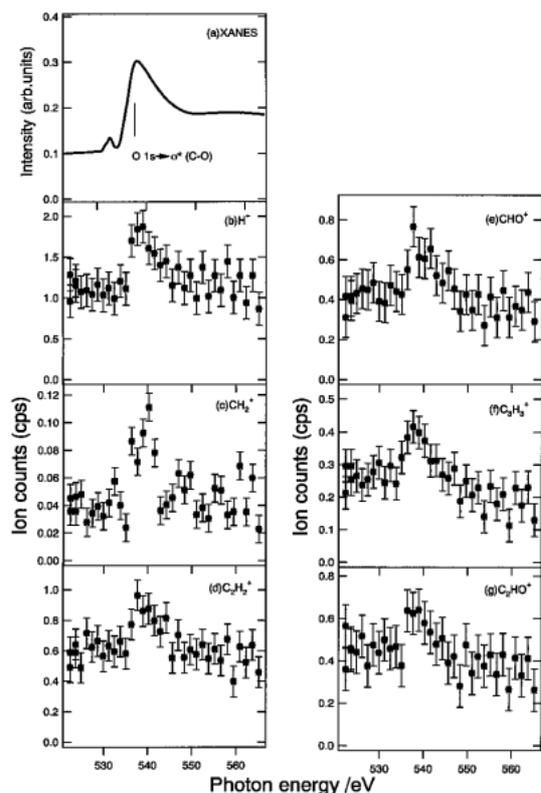


Figure 12. NEXAFS spectrum of 2-deoxy-D-ribose (a) and photon energy dependence of the yield of the desorbed (b) H^+ , (c) CH_2^+ , (d) $C_2H_2^+$, (e) CHO^+ , (f) $C_3H_3^+$ and (g) C_2HO^+ per constant photon flux (8.9×10^{10} photon/s) respectively around oxygen K-edge region. The error bars were determined by the fluctuation of the yield at the same photon energy.

$CHNO^+$, $C_3H_3O^+$ イオンが観測された (Fig. 11(b))。質量15のところに比較的高い収量を持つイオンが観測されている。このイオンの帰属としては NH^+ と CH_3^+ が考えられるが、カウンターイオンである、 $CHNO^+$ や CO^+ の収量が比較的小さいことから、このイオンは CH_3^+ であると帰属した。Thymine からの CH_3^+ の脱離は DNA 分子中で thymine から uracil のポイントミューテーションを引き起こすと思われる。一般に塩基損傷としての uracil は cytosine の脱アミノ反応によって生成することはよく知られているが¹⁸⁾、今回得られた結果は、直接効果によって thymine からの uracil の生成を示唆するものと思われる。直接効果による thymine から uracil の生成についてはすでに我々の HPLC を用いた照射最終生成物の分析においても確認されている²⁹⁾。水溶液系の実験では thymine から HMU や DHT, for Ura などの生成が確認されているが³⁶⁾、我々の結果では、これらの高い質量のイオンは観測されていない。観測された CO^+ , C_2NH^+ , $CNOH^+$ イオンはピリミジン環の分解に由来するものと考えられる。これらのイオン収量は CH_3^+ に比べると少ないため、ピリミジン環の分解は uracil の生成に比べると低いと考えられる。

dT 薄膜では、主なイオンとして H^+ , CH_3^+ , CO^+ , C_2HO^+ , $C_3H_3O^+$ イオンが観測された (Fig. 11(c))。他のスペクトルに比べて S/N 比が低いために、27や41といったイオンははっきりと分離されていないことがわかる。一方、TMP 薄膜では、 CH_3^+ イオンが dT よりも多く観測された。dT で見られたイオンに加えて、 $C_2H_3^+$, CHO^+ , C_2NH^+ , $CHNO^+$ イオンが観測された (Fig. 11(d))。thymine と dT, TMP のイオン強度は d-Ribose の強度の1/3程度であった。dT と TMP のマスパターンは d-Ribose と thymine のスペクトルの線形結合で表現可能であることから、分子フラグメントは糖と塩基の両方のサイトで生成しているものと考えられる。

今回のマスペクトルから得られた、d-Ribose を除いた thymine, dT, TMP 薄膜の全イオン強度は比較的同じような値を示しているが、Müller ら³⁷⁾ の thymine, dT, TMP におけるフリーラジカルの生成の G 値はそれぞれ、0.1, 0.4, 2.0 と大きく異なっている。水溶液系では水素が付加した中性ラジカルが主に検出されている。つまり、DNA 分解に関するすべての物理化学的な直接効果を明らかにするには、イオンの検出だけでなく中性脱離の観測が必要となる。

通常ひとまとめに鎖切断や塩基損傷と呼んでいる損傷にもさまざまな損傷過程が考えられ、その損傷によって生じた最終生成物もまた、さまざまな構造をもつ。軟 X 線によって引き起こされる直接効果によって生じたダメージは、高密度な励起によって、クラスター化した損傷が起こることが知られており、また、そのようなダメージが容易に修復されないような、致命的なダメージを生体を与えるとして、注目されている。また、それぞれの損傷がどのよ

うな励起によって特異的に生成するのかといった生成メカニズムを解明することも重要であり、今後の課題である。

5. まとめ

本研究では高輝度光源からの単色軟 X 線を用いて、まず、DNA 構成塩基の窒素および酸素の NEXAFS スペクトルの測定を行った。それによると、塩基種の違いによる電子状態の違いによって DNA 中で、塩基を選択的に励起する、「塩基選択的励起」の可能性を見出すことができた。また、NEXAFS スペクトルの入射光偏光角度依存性より、adenine, guanine, uracil 薄膜は分子が配向構造をもつことが明らかになった。さらに、軟 X 線による DNA 損傷のメカニズムについて探るために、光照射によって生じたイオンを検出するための、装置を立ち上げ、いくつかの DNA 構成分子について、酸素 K 殻励起領域での脱離イオン観測を行い、直接励起によって生じる DNA 損傷のメカニズムについての有力な知見を得ることができた。

謝 辞

DV-X α 分子軌道計算について助言をいただきました、理化学研究所の菊池昌裕博士、日本原子力研究所の村松康司博士、関口哲司博士、そして、質量分析装置の立ち上げに関して助言をいただきました、馬場祐治博士に感謝申し上げます。また、ビームラインの調整に関係された、日本原子力研究所のビームラインスタッフの皆様にも感謝申し上げます。最後に共同研究者である、日本原子力研究所の赤松憲博士、横谷明德博士に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) J. J. Nixon: in: Symposium on Radiobiology. The Basic Aspects of Radiation Effects on Living Systems. O Berlin College Jm. 14-18 1950 (Wiley, New York, 1952) p. 153.
- 2) J. F. Ward: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95 (1988).
- 3) D. T. Goodhead: in: Synchrotron Radiation in the Biosciences, Eds. B. Chance et al., (Clarendon Press, Oxford, 1994) p. 683.
- 4) S. M. Kirtley, O. C. Mullins, J. E. Chen, S. J. George, C. T. Chen, T. O'Halloran and S. P. Cramer: *Biochem. Biophys. Acta.* **1132**, 249 (1992).
- 5) K. Akamatsu and A. Yokoya: *Radiat. Res.* **155**, 449 (2001).
- 6) K. Akamatsu, K. Fujii and A. Yokoya: *Nucl. Inst. Meth. B199*, 328 (2003).
- 7) A. Yokoya, T. Sekiguchi, Y. Saitoh, T. Okane, T. Nakatani, T. Shimada, H. Kobayashi, M. Takao, Y. Teraoka Y. Hayashi, S. Sasaki, Y. Miyahara, T. Harami and T. A. Sasaki: *J. Synchrotron Radiat.* **5**, 10 (1998).
- 8) T. Nakatani, Y. Saitoh, Y. Teraoka, T. Okane and A. Yokoya: *J. Synchrotron Radiat.* **5**, 536 (1998).
- 9) Y. Mochizuki, H. Koide, T. Imamura and H. Takemiya: *J. Synchrotron Rad.* **8**, 1003 (2001).
- 10) H. Adachi, M. Tsukada and C. Satoko: *J. Phys. Soc. Jpn.* **45**, 875 (1978).
- 11) A. J. Nelson, T. van Buuren, Eric Miller, T. A. Land, C. Bostedt, N. Franco, P. K. Whitman, P. A. Baisden, L. J. Ter-

- minello and T. A. Callcott: *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **114-116**, 873 (2001).
- 12) A. Grasslund, A. Ehrenberg, A. Rupprecht and G. Ström: *Biochem. Biophys. Acta.* **254**, 172 (1971).
- 13) M. G. Debije, M. T. Milano and W. A. Bernhard: *Argew. Chem. Int. Ed. Engl.* **38**, 2752 (1999).
- 14) T. Melvin, S. M. T. Cunniffe, P. O'Neill, A. W. Parker and T. Roldan-Arjona: *Nucleic Acids Res.* **26**, 421 (1998).
- 15) K. Fujii, K. Akamatsu, Y. Muramatsu and A. Yokoya: *Nucl. Inst. Meth. B199*, 249 (2003).
- 16) J. Stöhr: NEXAFS Spectroscopy, Springer Ser. Surf. Sci., Vol. 25, Springer, Berlin, Heidelberg, 1992.
- 17) C. von Sonntag: 1987, The Chemical Basis of Radiation Biology, (London: Taylor & Francis).
- 18) P. O'Neill and E. M. Fielden: *Advances in Radiation Biology* **17**, 53 (1993).
- 19) D. Becker and M. D. Sevilla: *Advances in Radiation Biology* **17**, 121 (1993).
- 20) C. M. deLala, T. J. Jenner, K. M. S. Townsend, S. J. Marsden and P. O'Neill: *Radiat. Res.* **144**, 43 (1995).
- 21) D. T. Goodhead, R. J. Munson, J. Thacker and R. Cox: *Int. J. Radiat. Biol.* **37**, 135 (1980).
- 22) B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels and L. Sanche: *Science* **287**, 1658 (2000).
- 23) B. Fayard, A. Touati, F. Abel, M. A. Herve du Penhoat, I. Despiney-Bailly, F. Gobert, M. Ricoul, A. L'Hoir, M. F. Politis, M. A. Hill, D. L. Stevens, L. Sabatier, E. Sage, D. T. Goodhead and A. Chetoui: *Radiat. Res.* **157**, 128 (2002).
- 24) A. Yokoya, R. Watanabe and T. Hara: *Journal of Radiation Research* **40**, 145 (1999).
- 25) K. Takakura, H. Maezawa, K. Kobayashi and K. Hieda: 1994, Synchrotron Radiation in the Biosciences, Eds. B. Chance et al., (Clarendon Press, Oxford, 1994) p. 756.
- 26) K. Hieda, T. Hirono, A. Azami, M. Suzuki, Y. Furusawa, H. Maezawa, N. Usami, A. Yokoya and K. Kobayashi: *Int. J. Radiat. Biol.* **70**, 437 (1996).
- 27) C. le Sech, H. Frohlich, C. Saint-marc and M. Charlier: *Radiat. Res.* **145**, 632 (1996).
- 28) T. Ito, M. Saito and K. Kobayashi: *Int. J. Radiat. Biol.* **62**, 129 (1992).
- 29) K. Akamatsu, K. Fujii and A. Yokoya: *Radiat. Res.*, to be submitted.
- 30) P. J. Feibelman and M. L. Knotek: *Phys. Rev. B18*, 6531 (1978).
- 31) D. E. Ramaker: in: N. H. Tolk, M. M. Traum, J. C. Tully, T. E. madey (Eds.), Desorption Induced by Electronic Transitions, DIET-I, Springer Series in Chem. Phys, Vol. 24, Springer, Heidelberg, 1983, p. 70.
- 32) D. Menzel: in: A. R. Burns, E. B. Stechel, D. R. Jennison (Eds.), Desorption Induced by Electronic Transitions, DIET-I, Springer Series in Surf. Sci, Vol. 31, Springer, Berlin, 1993, p. 101.
- 33) D. E. Ramaker, T. E. Marday, R. L. Kurtz and H. Sambe: in: Desorption induced by electronic transitions, DIET III., Springer Series in Surf. Sci., Vol. 13, Eds. R. H. Stulen, M. L. Knotek, (Springer, Berlin, 1988) p. 182.
- 34) M. Daune: Molecular Biophysics Structures in Motion, (Oxford university press, Oxford, 1999) p. 38.
- 35) M.-H. David-Cordonnier, S. Boiteux and P. O'Neill: *Nucleic Acids Research.* **29**, 1107 (2001).
- 36) J. Cadet, M. Berger, T. Douki and J.-L. Ravanat: *Rev. Phys. Biochemical Pharmacology.* **131**, 1 (1997).
- 37) A. Mullar: *Int. J. Rad. Biol.* **8**, 131 (1964).