

解説

## 軟 X 線を用いた生物分光研究

横谷 明德

日本原子力研究所・SPring-8\*

### Spectroscopy on Biological Systems Using Synchrotron Soft X-rays

Akinari YOKOYA

*Japan Atomic Energy Research Institute, JAERI-RIKEN SPring-8 Project Team*

Some molecular changes on DNA could not be repaired even by powerful enzymatic systems in a living cell. In order to elucidate the inactivation mechanism of the repair system, site-selective innershell photoabsorption has been used as the probe inducing the severe damages on the DNA. In this article, spectroscopy studies on living cells and DNA related molecules are reviewed focusing on phosphorus K-photoabsorption. The effect by the secondary electrons ejected from the phosphorus is discussed in terms of their range. An attempt to extend the studies to a lower energy region including nitrogen and oxygen K-edge is also presented.

#### 1. はじめに

生物学的研究の道具として、シンクロトロン放射は欠かせないものになりつつあることは誰もが認めるところであろう。例えばタンパク質の立体構造を解くことでその機能を探ろうとする構造生物学は、その代表的な例である。しかし本稿ではこれらの研究とは異なる視点に立つもう一つの生物研究として、環境からの影響による遺伝子(DNA)の分子変化とその修復機構の関連を調べるためのプローブとして単色軟 X 線を用いる「生物分光研究」について紹介する。

#### 2. 遺伝子を守れ!

地球に原始生命が誕生したのは30億年以上も

前と言われている。このような長い時間の経過にもかかわらず、生物は自分自身の形質を多少の変異をうけつつも遺伝情報という形で子孫に確実に伝えてきた。Schrödinger は一般向けの著書<sup>1)</sup>の中でヨーロッパのある貴族の顔の特徴が子孫代々に受け継がれることを例に挙げ、「情報を担うであろう生体内の物質(遺伝子)は絶えず熱的な揺動にさらされているにもかかわらず、なぜ正確に情報がコピーされてゆくのか?」という疑問を投げかけた。若い頃この本を読まれた方も多いと思う。この本の出版の約10年後に、Watson と Crick がその秘密が DNA の二重らせん構造そのものにあることを提唱したことはあまりに有名な話である。

\* 日本原子力研究所・SPring-8 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町 SPring-8 リング棟  
TEL 07915-8-0839 FAX 07915-8-0830 e-mail yokoya@spring8.or.jp

さて生物が受けてきた揺動は、熱だけではない。環境に存在する放射性核種の崩壊により放射される $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 線や、銀河からの高エネルギーの粒子などにも絶えずさらされている。これら（放射線と慣用的にひとくくりに呼ばれてきた）は、生体を構成する分子の化学結合よりはるかに高いエネルギーを持つため生体中に励起・電離を生じさせ、結果として不可逆的な化学変化を引き起こしてしまう。このような条件にもかかわらず、ではなぜ子孫への安定した情報のコピーを生物は行うことができるのか？ それを可能にしている一番重要な生体の機構は、生体分子の中でも特に遺伝子本体であるDNAの不可逆変化を元に戻す「修復」と呼ばれる防御システムである。これまで独立したいくつかの修復系が存在することが知られており、これは何種類かの酵素タンパク質の働きによるものであることもある程度わかりつつある。生物が受けるDNAの不可逆的な分子変化は、ほとんどこのシステムで修復されてしまうらしい。

よく知られている大腸菌における修復系の一例として、紫外線照射により生成するピリミジン・ダイマーの除去修復の様子を模式的に図1に示した。この修復は、UvrABC エンドヌクレアーゼなどいくつかの酵素が分子変化した部位（この場合はピリミジン・ダイマー）に作用しながら、最終的には正常なDNAに戻すというものである<sup>2,3</sup>。UvrABC 酵素は特定の分子変化を直接検出するのではなくDNAの立体構造のひずみを識別するといわれており、ピリミジン・ダイマー以外の重大なDNAの分子変化に対しても活性を持つと考えられている。この修復系の研究が進んだ理由のひとつは、修復対象をピリミジン・ダイマーと特定できたため、原因と結果を1対1に対応づけることができたからであると思われる。生物にはさらに高度な「組換え」と呼ばれるシステムがあり、DNA上に受けた変化を相同染色体上のもう一組の変化を受けていないDNAとそっく

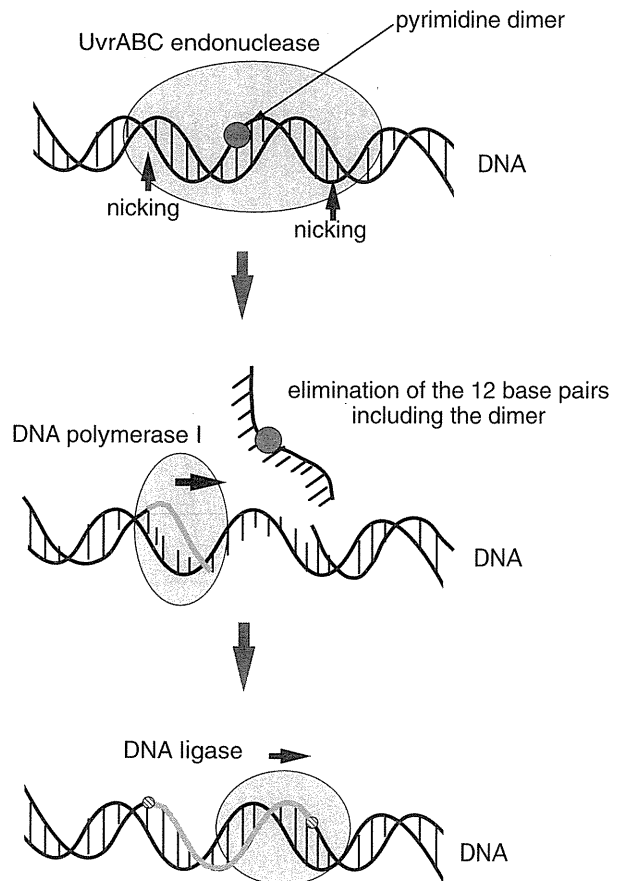


Figure 1. Schematic illustration of the excision repair system. UvrABC binding to the pyrimidine-dimer nicks on the single strand in the DNA and removes a 12-base-pair fragment including the dimer. DNA polymerase I inserts nucleotides to make the correct sequence at the place. DNA ligase seals the strand again.

り取り替えることで失った配列を回復させるしくみを持つ。組換えは2つのDNA分子がつながったホリデー構造 (Holliday structure) を持つ中間体を経由することがわかっており<sup>4</sup>、RecA と呼ばれる1本鎖DNA結合活性を有するタンパク質の働きにより相互的な分子鎖の交換が行われると考えられている<sup>5</sup>。組換えに関してここでは詳しく述べることはしないが、専門外の人にもわかりやすく書かれた解説書がいくつもあるのでそちらを参照して頂きたい<sup>6</sup>。

さてほとんどの不可逆的な分子変化は、修復の対象となると上に述べた。これは逆に、わずかではあるがその対象とならない分子変化も存在することを意味している。しかし生物にとっては、わ

ずかとはいえこのような修復されない分子変化があることは重大である。なぜならこれが原因で、突然変異など自らの存続を揺るがす遺伝的な影響を被ってしまうからである。修復の機能を明らかにするためのまず第一歩は、どのような分子変化であれば修復され、あるいはされないかを突き止めることであると考えられる。これまで手を変え（放射線の種類を変え）品を変え（対象となる生物試料の種類を変え）、分子変化と最終的な突然変異などの生物応答の因果関係を探る研究が行われてきた。しかし決定的な答えが得られたという話は、いまだに聞かない。問題はどこにあるのだろうか？「手を変え」の部分にあるのではないかというのが、筆者らの考えである。おおよそ電離放射線と呼ばれるものは、生体中に比較的ランダムに励起や電離といったイベントを起こしてしまう。また生体の側にも多くの非常に多くの種類の分子が存在するため、どの分子に生じたどのようなイベントが生物応答に関連するのかを突き止めるのは、非常に困難な仕事である。

### 3. 「生物分光」研究

もし生体中の特定部位に放射線のエネルギーを吸収させることができれば、上に述べたようなイベントの位置に関するあいまいさは排除できる。入射フォトンエネルギーを特定の準位間のエネルギー差、例えば内殻準位に合わせることで、その部位への高効率のエネルギー吸収を起こすことが可能となる。深い内殻の電子がフォトン吸収すると、その原子近傍に光電子やオージェ電子といった二次電子が放出され、これらがまた近傍の分子の励起・電離といったイベントを引き起こすと考えられる。また電子を放出した原子は高い電荷を帯びるため、この原子を含む原子団に特異的な化学変化が起こる可能性がある。蛍光 X 線放出による緩和過程も考慮されなければならないが、生体を構成する比較的軽い元素の場合この確率は低い。二次電子の生体内での平均的な飛程は

おおよそ数 nm 程度である。ここで内殻光吸収を起こした原子が DNA 中内にあると仮定すると、この原子から数 nm の領域に励起・電離イベントが生じることになる。この領域は原子のサイズから見ると非常に大きい、DNA のような巨大分子のサイズ（例えば100アミノ酸残基のタンパク質がコードされている部分であれば約100 nm）に比べると小さい。このため巨大分子中のある領域だけについて、その部位の構造を化学的に変えることができると考えられる。

これを実現するためには、入射フォトンバンド幅を可能な限り目的の準位間のエネルギー差に一致させ、目的部位以外の部分でのフォトン吸収を極力抑えることが不可欠である。任意のエネルギーについて単色のフォトンを供給できるシンクロトロン放射は、現在この研究に利用できる唯一の光源であろう。研究の手法としては、シンクロトロン放射を分光して得られる単色フォトンエネルギーを変えながら励起する内殻準位を変えて行き、この時の生物の応答を測定するということになる。標題にある「生物分光」と言うことばは、あまり馴染みがないかもしれない。一般に分光学という研究手法は、対象に光などをあててそこから放出される光子や電子あるいはイオン等の強度、エネルギー分布を観測することで対象に関する情報を得ようとするものである。ここで対象を生体物質あるいは細胞とし、観測する量を生体物質の生理的活性あるいは生物の遺伝的変化まで拡張して考え、これを「生物分光」と呼ぶことにする。

### 4. エネルギー吸収部位を指定したときの生物応答

#### 4.1 内殻吸収を用いた細胞応答の研究

これまで特性 X 線とフィルターの組合せにより、特定元素の内殻電離が生体に及ぼす効果を調べる試みがいくつかなされたが、明確な生物応答の特異性を明らかにするまでにはいたらなかつ

た<sup>7)</sup>。シンクロトロン放射が実用化されてから今日までの10年間、生体を構成する元素の内殻吸収端付近で充分バンド幅が狭いフォトンが、実用強度で得られるようになった。この単色フォトンを用いて、DNAを構成する元素(リン, 臭素, カルシウム等)の内殻にフォトン吸収させた時の生物応答の研究が、高エネルギー物理学研究所のフォトンファクトリーで行われてきた。これまでに、内殻吸収が起きた場合細胞致死率や突然変異誘発率が増大すること等が明らかにされ、いくつかの興味深いトピクスについては本誌の解説で過去に取りあげられている<sup>8-10)</sup>。残念ながら国外ではごく最近までシンクロトロン放射を用いる研究はほとんどなかった。理由はわからないが、この分野の生物研究者が容易にビームタイムが得られなかったか、あるいはシンクロトロン放射を使うこと自体に敷居の高さを感じたのかもしれない。

これまでの研究では、観測量として得られる生のデータを試料中のDNAを含む標的部位に吸収されたフォトン数あるいは質量あたりに吸収されたエネルギーで規格化することで、生物応答のエネルギー依存性が評価された。しかし吸収フォトン数の見積もりを行う際、どうしても標的の大きさに関する仮定(例えば標的をDNA単体にするかあるいは染色体レベルにするか等)が入らざるを得なかった。このため増感された生物応答の原因が、化学的に異なる分子変化が生じたためなのかあるいは単にフォトン吸収の確率が増したための効果なのか議論されなければならなかった。内殻光吸収により化学的に特異な変化が生じているか否かは、生体中で修復されるかどうかで明確に判定できると考えられる。どのような種類の修復されない(あるいはされる)分子変化がDNA上に生じるのかという観点に立ち、DNA分子骨格に含まれるリン原子のK殻光吸収による生物応答を調べた最近の研究成果を紹介する。

#### 4.2 リン K 殻光吸収に対する哺乳動物培養細胞の応答

Watanabe 等により、ゴールデンハムスターの胎児細胞(SHE)の細胞致死効率、クロマチン(染色体)切断効率、突然変異率及び形質転換(トランスフォーメーション)誘発頻度の各生物応答が、リンのK殻光吸収端付近で調べられた<sup>11)</sup>。リン原子は phosphodiester bond により形成されるDNAの骨格にのみ存在するため、分子骨格に与える内殻光吸収の効果を調べることが可能となる。これまでDNAの分子鎖切断は、放射線照射による細胞致死(細胞分裂能の不活性化を指す)などの生物応答を導く最も重要なDNA上の化学変化のひとつとされてきた。リンを標的とすることで、高い効率で生物応答が観測されることが予測される。突然変異は、修復後もDNA上にいくつかのヌクレオチドの欠損/付加あるいは塩基置換等の分子変化が残された結果、特定の遺伝子が不活性化/活性化されることを指す。これに対し形質転換は、細胞の無限増殖能の獲得により、培養シャーレ上に特徴的なフォーカスが形成されることで判定される。形質転換は発ガンに至る一連のプロセスの初期の過程と考えられ、突然変異とは異なるメカニズムを持つ細胞応答とされている。

PFのInSb二結晶分光器を備えるBL-11Bにおいて、生体試料用照射装置を用いて空気中に軟X線ビームを取り出すことにより、細胞に対して軟X線照射が行われた。細胞に対して低温処理などはせず、修復系の働く条件下で実験は行われた。照射に用いたエネルギーは、リンのK殻吸収端を挟む2147 eV, 2159 eVと吸収端上に現れる大きな共鳴ピークである2153 eVの3種類である<sup>12)</sup>。2153 eVの共鳴ピークは、無機リン酸で得られたデータ<sup>13)</sup>との比較からリン原子の $1s \rightarrow 2p_{1/2}^*$ への遷移に由来すると考えられる<sup>14)</sup>。

細胞生存率を、試料の単位質量あたりに吸収されたフォトンエネルギー(Gy=J/kg)に対して

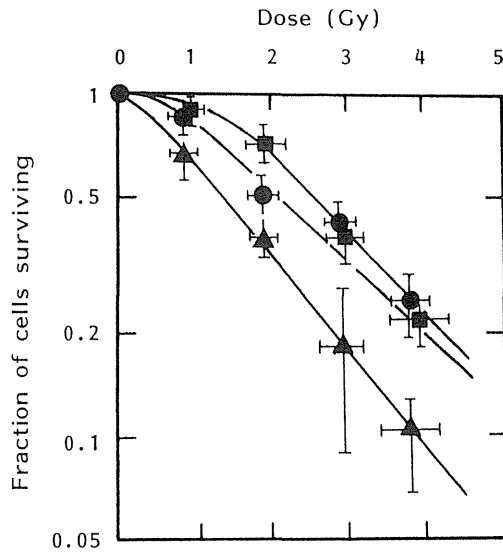


Figure 2. Survival curves of SHE cells irradiated with soft X-rays around the energy of phosphorus K-edge. Results are presented as the means  $\pm$  standard deviation of four independent experiments. Symbols;  $\bullet$ , 2.159 keV (middle line);  $\blacktriangle$ , 2.153 keV (lower line);  $\blacksquare$ , 2.147 keV (upper line) (Ref. 11).

プロットした結果を図2に示す。共鳴ピークで得られた細胞致死効率は、10%生存率を与えるdose ( $D_{10}$ ) が他の2種類のエネルギーのそれと比べ約30%程小さいため、このエネルギーでは効率良く細胞の致死が起こることがわかった。クロマチン(染色体)切断頻度と突然変異についても、共鳴ピークでの効率が他のエネルギーに比べてやはり30%程高いことが、それぞれの直線の傾きの比からわかった(図3(a), (b))。これらの結果は、リンによるK殻光吸収により予想通り生物応答が enhance されたことを意味する。しかし、50%生存率を与えるdoseを3種類のエネルギーについて比較すると、DNAの吸収スペクトル上の吸収の大きさの順、すなわち2153 $\rightarrow$ 2159 $\rightarrow$ 2147 eVの順に大きくなる(不活性化しにくくなる)のに対して、染色体切断および突然変異の頻度では、完全に連続状態への励起が起こるはずの2159 eVでの応答がリンによるK殻光吸収がおこらない2147 eVと同程度であるのはなぜか? この理由は、まだ明らかでな

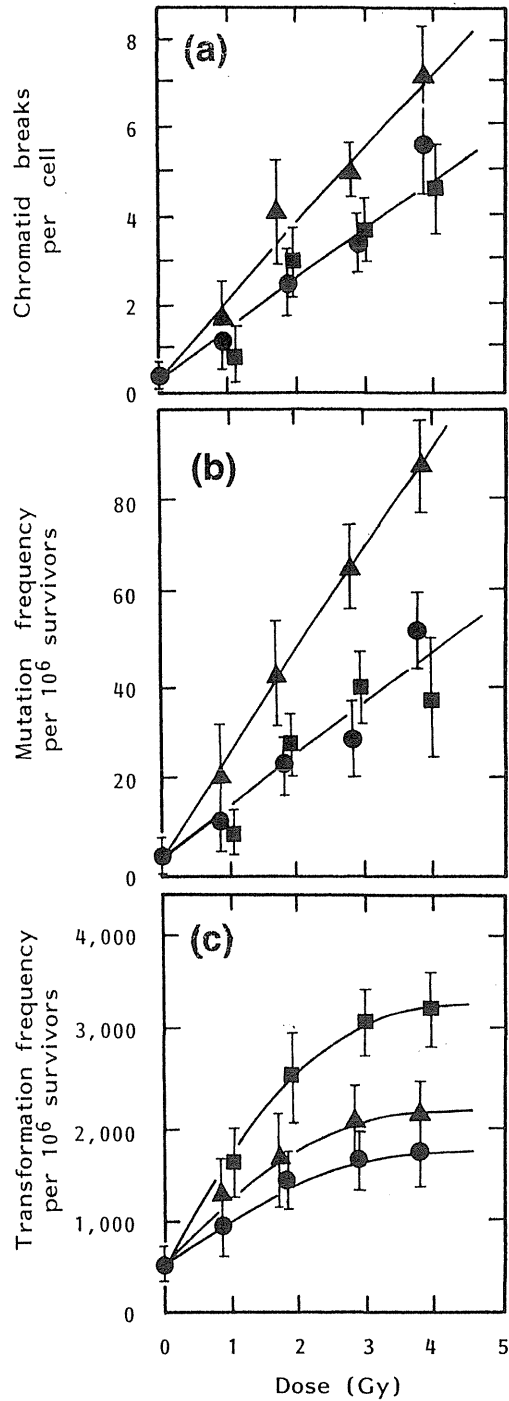


Figure 3. The frequencies of chromatid breaks (top), mutation (middle) and morphological transformations (bottom) in SHE cells irradiated with soft X-ray around phosphorus K-edge. Results are presented as the means  $\pm$  standard deviation of four independent experiments. Symbols;  $\bullet$ , 2.159 keV (middle line);  $\blacktriangle$ , 2.153 keV (lower line);  $\blacksquare$ , 2.147 keV (upper line) (Ref. 11).

い。

またトランスフォーメーションの頻度は、致死や突然変異と明らかに異なるエネルギー依存性を

示していることがわかる (図3(c))。リンのK殻を励起できない2146 eVのエネルギーが最もトランスフォーメーション頻度が高く、リンの共鳴がある場合は一番低い頻度である。観測する生物応答を変えると、細胞内で生じている化学変化は同じであるにもかかわらず、異なるエネルギー依存性が見られたことになる。トランスフォーメーションを引き起こす標的がDNAの分子骨格のリンではないため、リンによるフォトン吸収の多くはトランスフォーメーションに関しては「むだ弾」になっているのかもしれない。非常に興味深い現象が見られた事になるが、ともかくリンの内殻光励起が細胞内の修復系にとって化学的に特異な分子変化を与えることが示された。

#### 4.3 染色体切断の修復

リンのK殻光吸収端を含む軟X線領域での酵母菌の液体保持回復については Usami 等<sup>15)</sup>の、また動物培養細胞の染色体異常の誘発頻度については Saigusa 等による系統的な研究がある<sup>16)</sup>。さらに最近 Maezawa 等は、細胞の修復過程に与えるリンのK殻光吸収の効果をより直接的に観測することに成功した<sup>17)</sup>。用いた細胞は哺乳動物培養細胞であるV79細胞で、軟X線の照射はBL-27Aの生物照射ステーションで行われた。V79に対するリンK殻光吸収により引き起こされる染色体(クロマチン)の切断効率を、未成熟染色体凝集法(PCC法)により酵素的な修復効率として直接調べた。照射に用いたエネルギーは、Watanabe 等と同様にリンのK殻吸収端を挟む2146 eV, 2160 eVと、共鳴ピークの2153 eVの3種類である。共鳴ピークでは、D<sub>10</sub>が他のふたつのエネルギーに比べて約34%減少することがあらかじめ測定された(図4)。これはリンの共鳴が効率よく細胞致死を引き起こしていることを示しており、上に述べたWatanabe等の結果と一致する。

照射直後に生ずる細胞内のクロマチン断片の数

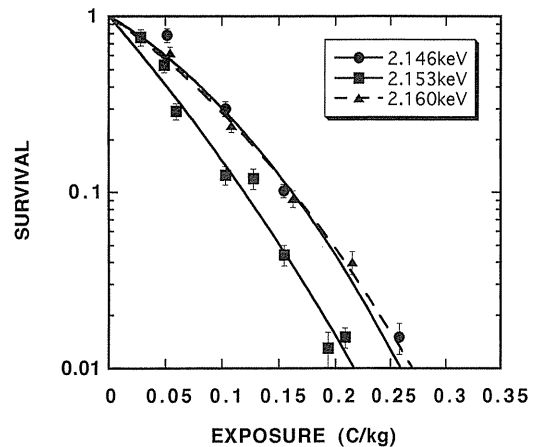


Figure 4. Survival curves of V79 cells irradiated with soft X-rays around the energy of phosphorus K-edge. Symbols; ●, 2.146 keV (upper solid line); ■, 2.153 keV (lower solid line); ▲, 2.160 keV (dotted line) (Ref. 17).

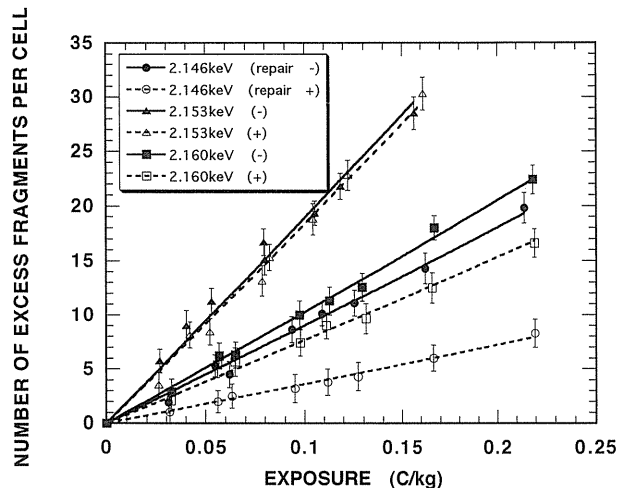


Figure 5. Exposure dependency of the production of chromatin breaks in V79 cells with (open symbols) or without (closed symbols) repair after irradiation with 2.146, 2.153 and 2.160 keV soft X-rays (Ref. 17).

は、図5中の●、▲、■に示される。横軸は照射されたフォトン数を示す。照射直後の修復が起こらない状況下では、リンの内殻吸収が起こらない2146 eVでの照射に比べて、リンのK殻光吸収端を超える2160 eVでのクロマチン切断頻度は1.14倍とあまり変わらない。これに対して共鳴ピーク(2153 eV)では、2.09倍に増えた。しかしこれらの値だけからは、リンのK殻光吸収に特異的な化学変化が起こっているか否かの判定は難しい。なぜならクロマチンの切断頻度は、単純に

リン K 殻光吸収端付近で変化する細胞のフォトン吸収の割合に単純に比例しているだけの可能性もあるからである。

次に、生体中の酵素的な修復過程を経た後のクロマチン切断頻度が調べられた。その結果は、図 5 中の○, △, □で示される。修復の割合は、各エネルギーについて 2 本の直線の傾きの違いとして現れる。リンの K 殻光吸収が起こらない 2146 eV では生じた切断のうち 60% が修復されるのに対して、吸収端を超えるとこれが 25% に減少した。さらにリンの共鳴ピークでは、わずかに 3% であった。これらの結果は、吸収端を超えリンの K 殻に光吸収が起こると修復を受けにくい、より「重大な」分子変化が DNA を含むクロマチン上に生じたことを示している。リンの共鳴励起と連続状態への励起による生物応答の違いは、両者で異なる化学変化が起こることでも説明できるが、同じ種類の「重大な変化」であってもそれが生成される効率の違いでも説明できよう。

以上の研究から、リンの K 殻共鳴励起より細胞の持つ修復反応が大きく制限されることが明らかになった。修復が起こりにくい現象は、これまで高 LET 放射線に分類されるイオンビームなどで顕著に現れることが知られている。この性質を利用し、イオンビームを用いたガンの治療等が行われている。試料中でイオンが通過するトラック沿いに高密度の励起・電離のイベントが起こるため、まばらなイベントしか生じない  $\gamma$  線や比較的高いエネルギーの X 線の場合に比べて、生体にとってより重大な化学変化が引き起こされることが、この修復能力低下の原因であると考えられている。しかしイオンビームであってもトラック内には様々な分子変化が生じるため、最終的な生物応答に結びつくイベントを特定することは難しい。言い換えると、イオンビームにより生じたイベントのうちには、生物応答には結びつかない「むだ弾」がかなり含まれている可能性があるということである。これに対して内殻光吸収を利用

する研究では、標的分子とその近傍に生じるイベントの数は試料の光吸収断面積がわかれば比較的簡単に評価することが可能である。この場合参照光として吸収端よりわずかに低エネルギー側のフォトンを用いた結果との比較が重要である。標的以外の部分に生じるフォトン吸収による効果（バックグラウンドとみなされる）を差し引いたものが標的分子の内殻光吸収のみによる効果と考えられる。この点でこれまでに紹介した研究は非常にユニークであると同時に、フォトン吸収に開始される化学変化と生物応答との関連というこれまで得ることのできなかった重要な情報を我々に提供してくれる。いずれにせよ、2.1 keV 付近でフォトンのエネルギーを 6 eV (わずか 0.3%) 変えるだけで、このようなドラスティックな生物応答の変化が現れた事それ自体が非常に興味深い。

## 5. フォトン吸収後の化学的過程

さて DNA の骨格に含まれるリン原子の K 殻光吸収に対して、これに特異的な生物応答が起こり得ることを見いだすことができた。本稿中でこれまで分子変化あるいは不可逆的变化といった抽象的な言葉で述べてきた標的分子上の化学変化についても、細胞の応答と平行して調べる必要がある。さまざまな分子変化が生じる可能性があるが、これらのうちのどれが生物応答を引き起こすのかを突き止めなくてはならない。この問いに対する最もシンプルなアプローチは、標的分子である DNA を生体中から抽出し分子単体に対する効果を調べるというものである。もしリンの K 殻光吸収に特有な DNA の化学的な変化が見つければ、それが生物応答の最有力候補となり得よう。これらの研究が、細胞レベルの研究と同時進行で開始された。

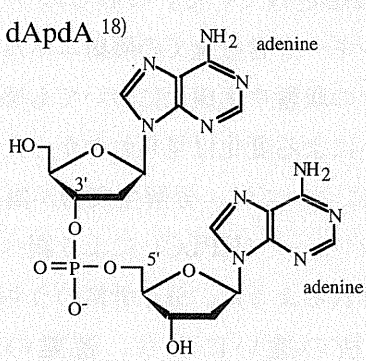
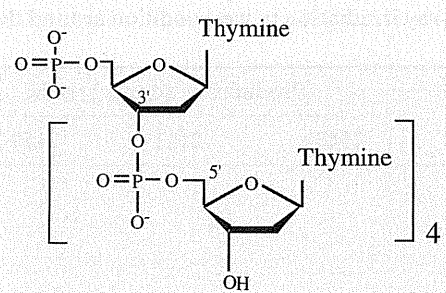
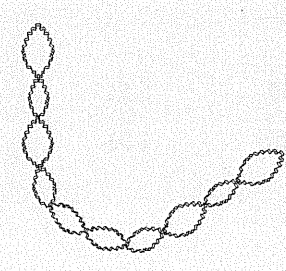
一般に電離放射線が照射された細胞中では DNA 分子の切断が生じることが知られており、これがさまざまな放射線作用を引き起こすとされている。DNA 分子の切断は、二重らせんのうち

の片側のみの切断 (single strand break, 以後 ssb と略記) と両側の鎖の切断 (double strand break, 以後 dsb と略記) に大別される。ssb は、そのほとんどが修復されてしまうことが知られている。残った鎖が鋳型として使えるため、修復の効率が高くなるのであろう。これに対して dsb

は完全に分子が分離してしまうため、修復されにくい分子変化とされている。リンの K 殻光吸収により生じるこのふたつのタイプの鎖切断の頻度が、まず調べられてきた。

DNA はその構成単位であるヌクレオチドが直線的に連結された鎖状分子である。実験的に得ら

Table 1. Compiled data on the molecular dissociation with the soft X-ray irradiation around the phosphorus K-absorption edge.

Materials (dry condition)	Products or strand breaks		
	2147	2153	2159 (eV)
dApdA <sup>18)</sup> 	adenine 5'-dAMP	adenine 5'-dAMP	adenine 5'-dAMP
d(pT) <sub>5</sub> <sup>19)</sup> 	G value of thymine		
	d(pTp)	0.300	0.276
	5'-dTMP	0.038	0.042
	d(pT)2	0.055	0.054
	d(pT)3	0.068	0.064
	d(pT)4	0.063	0.061
	d(pT)4	0.069	0.063
pBR322 plasmid DNA <sup>14)</sup> (super coil) 	dose (keV) per ssb:	0.362	0.342
	dose (keV) per dsb:	9.36	7.93
			8.52



れる情報は、試料として選ばれた分子中にいくつのユニットが含まれているかで異なってくる。表1にこれまでに行われた実験とその結果をまとめて示した。ここに示されたいくつかのデータについては、すでに本誌に檜枝による解説で詳しく取り上げられているのでそちらも参照されたい<sup>10)</sup>。もう一つの重要な試料条件は、試料が水の雰囲気下にあるか否かである。いうまでもなく生体を構成する割合が最も大きな物質は水であり、機能高分子の状態あるいは分子同士の反応の様子も水の有無で大きく異なる。表2に水溶液状態での試料に対するリンK殻光吸収による分子変化を調べた研究をまとめた。

### 5.1 乾燥系

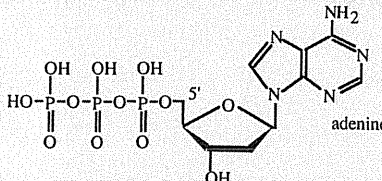
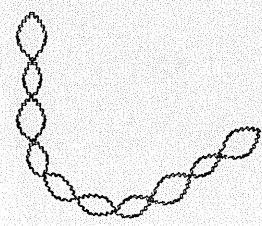
水のない乾燥系で実験に用いられたのは、ふたつのDNA構成ユニットがリン酸基で結合したオリゴヌクレオチドであるdApdA<sup>18)</sup>、5つの構成ユニットからなるdTpdTpdTpdTpdT (d(pT)<sub>5</sub>と略記)<sup>19)</sup>である。また環状二重らせんのDNAで

あるプラスミドpBR322を用いて、ssbとdsbの両者が調べられた<sup>14)</sup>(表1)。

dApdAとd(pT)<sub>5</sub>は、主としてssbの生成を調べる時のモデル分子として用いられた。dApdAの照射生成物として、adenineと5'-dAMPのふたつが薄層クロマトグラフィー(TLC)による生成物分析により観測された。前者は5'末端側のdeoxyriboseが壊れて遊離するadenineと考えられる。後者はやはり5'末端側のdeoxyriboseの3'炭素とリン酸基の酸素の間の結合が切断されてできる産物であり、ssbの起こるひとつの経路と推定されている。これらはリンK共鳴吸収エネルギーを含む全ての照射エネルギーで観測され、その収量や生成比についても照射エネルギーの違いによる変化は見られなかった。

d(pT)<sub>5</sub>については、分解生成物が高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により調べられた。表1に示されるように、分子骨格のうちの切断を受ける箇所の違いにより、遊離のthymine、d(pTp)、5'-dTMP、d(pT)<sub>2</sub>、d(pT)<sub>3</sub>、d(pT)<sub>4</sub>が生

Table 2. Compiled data on the molecular dissociation with the soft X-ray irradiation in wet condition around the phosphorus K-absorption edge.

Materials (Wet condition)	Products or strand breaks		
	2147	2153	2159(eV)
ATP <sup>26)</sup>			
	G-value of Adenine		
	150 mg/ml:	1.1±0.1	1.6±0.2
530 mg/ml:	1.4±0.2	2.5±0.3	
Col E1 plasmid DNA <sup>27)</sup> (super coil)			
	G-value for ssb (×10 <sup>-3</sup> ):		
	4.59	5.51	6.43
G value for ssb (×10 <sup>-3</sup> ):			
1.38	1.93	1.56	

じていることがわかる。しかしこれらのいずれも100 eVのエネルギー吸収あたりの収率 (G value) で評価した場合、顕著な照射エネルギー依存性は見られなかった。

さらに二重らせんのDNAであるpBR322に対するssb, dsbも調べられた。表1に、それぞれの鎖切断をひとつ生成させるのに必要な総エネルギー (keV) を示した。この値が小さいほど、フォトンあたりの鎖切断の効率が高いことを示している。ssbについては、リンのK殻光吸収が起こらない2147 eVに比べて他のエネルギーでのそれは幾分小さいが、顕著な違いは見られなかった。dsbに関しては、共鳴ピーク (2153 eV) の値は2147 eVのそれに比べて約85%程度に小さくなった。表1には示されていないが、より高エネルギー側の2168, 2199 eVのエネルギーについても実験が行われており、ssbについては明確なエネルギー依存性が見られなかったこと、dsbについては吸収端を超えると1.2倍弱の生成効率の増加があることが明らかになった。

ここに取りあげた試料についての結果は、ssbのフォトンエネルギー依存性がほとんどないことを示している。dApdAの分子分解効率は、7 eV (第1イオン化ポテンシャル) 以上のVUV領域でも測定されている<sup>20-23</sup>)。これらの結果と比較すると、分解生成物のadenineと5'-dAMPのふたつはVUV領域でも2.1 keV程度の軟X線領域でも変わらない。Ito等の解釈は次のようなものである。現在広く受け入れられているように電離放射線と物質との相互作用において、入射フォトンあるいは二次電子のエネルギーがイオン化ポテンシャルよりはるかに高くても、40 eV以下のエネルギー領域での光学的な様式の吸収が分子に起こることにより電氣的に中性の励起状態 (超励起状態) が形成され得る<sup>23</sup>)。またこの中性励起状態は、分子の分解過程で重要な役割を果たしていることが示されている<sup>24</sup>)。二次電子により近接したDNAに励起が起こり、その結果最も切断を

受けやすい3'側のphosphoester結合の切断が生じたとすれば、今回の場合のように最初に励起される原子によらず同じ生成物が観測されるであろう。リンのK殻光吸収によるssbの収率に関しては特別のことは起こらないため、ssbは我々の探している分子変化の候補からどうやら落として良さそうである。

pBR322の結果ではわずかにdsbの収率がリンのK殻光吸収により増加しているようであるが、これを積極的にリンK殻光吸収に特異的な分子変化とするにはまだデータが不十分であろう。これまでDNAの二本鎖切断は、そのうちの一部分が生体の修復過程で修復されずに最終的な生物応答を導くと考えられてきた。残念ながら本稿で紹介した研究では、切断端の化学的な構造などの情報を含めてどのようなdsbが生物応答に結びつく可能性があるのかについてはまだわからない。この議論はひとまず置き、もうひとつの重要なファクターである水のあるなしで修復を受けにくいDNAの分子変化が生じるか否かについて以下に述べる。

## 5.2 水溶液系

我々生物を構成する最も多い分子は水であり、例えば哺乳動物の培養細胞であればその70%近くが水である。一般に電離放射線が照射された水溶液中では、水の励起とこれに続く反応性の高い活性分子種の生成が知られている。リンのK殻光吸収が起きた後でも同様の事が生じるはずであり、これらがさらに標的のDNAと反応し修復不可能な分子変化を引き起こす可能性がある。実際の実験では、乾燥状態 (固相系) の試料の場合と同じ照射方法は使えない。なぜなら固相系の場合のように、水溶液状態の試料は真空チャンバー内にセットすることが非常に困難であるからである。また2 keV付近ではX線の物質に対する透過性は低く、厚みのある試料のごく表面にしかフォトンが照射されない可能性がある。Takakura

等は有機高分子薄膜 (マイラー) の窓を持つ小さなチャンバーに試料を入れ, ごく小さな攪拌子で攪拌しながら大気中で水溶液試料に均一にフォトン照射するシステムを考えた<sup>25)</sup>。また研究の数そのものは多くないが, 重要な結果が得られ始めている。表 2 には, DNA のモデル分子である ATP (adenosine triphosphate)<sup>25)</sup> と環状 DNA (Col E1 plasmid DNA)<sup>26)</sup> の分子変化を調べた結果をまとめた。

ATP を照射する際の実験条件として 100 mg/ml 以上の極端な高濃度の水溶液状態が選ばれた。これは生体中での機能分子の総濃度に近い条件を想定したためである。最初に照射エネルギーを決定するため, 水溶液試料専用開発された吸収測定装置を用いて試料の吸収スペクトルが測定され, DNA 薄膜のスペクトルと共鳴ピークエネルギーが変わらない事が確かめられた<sup>27)</sup>。照射試料は高速液体クロマトグラフィーにより分離・定量された。観測された主な生成物は, 塩基部分のみがはずれたアデニンであった。表 2 に示されるように, 乾燥系での dApdA 等の結果とは異なりリンの共鳴によりアデニンの遊離が増感する結果が得られ, ATP の濃度が高いほどその傾向は強かった。環状 DNA (Col E1) でもこの傾向は見られ, リンの K 殻光吸収により ssb に関する収率が明らかに増加している。しかも連続状態への励起が起こると考えられる 2159 eV の方が高い収率を示した。Takakura は吸収端近傍でその他のエネルギーについても系統的に ssb, dsb を調べ, 図 6 に示されるような作用スペクトルを得た。まず第一に気がつく点は, ふたつのスペクトル上に現れるピークの位置が 6 eV 程ずれている点である。このような例はこれまで知られていないが, 共鳴状態からの緩和が ssb 以外のなんらかの経路に行く確率が大きくなったため, ssb の収率が小さくなったのと考えられる。しかし, それがどのような経路なのかはまだわからない。

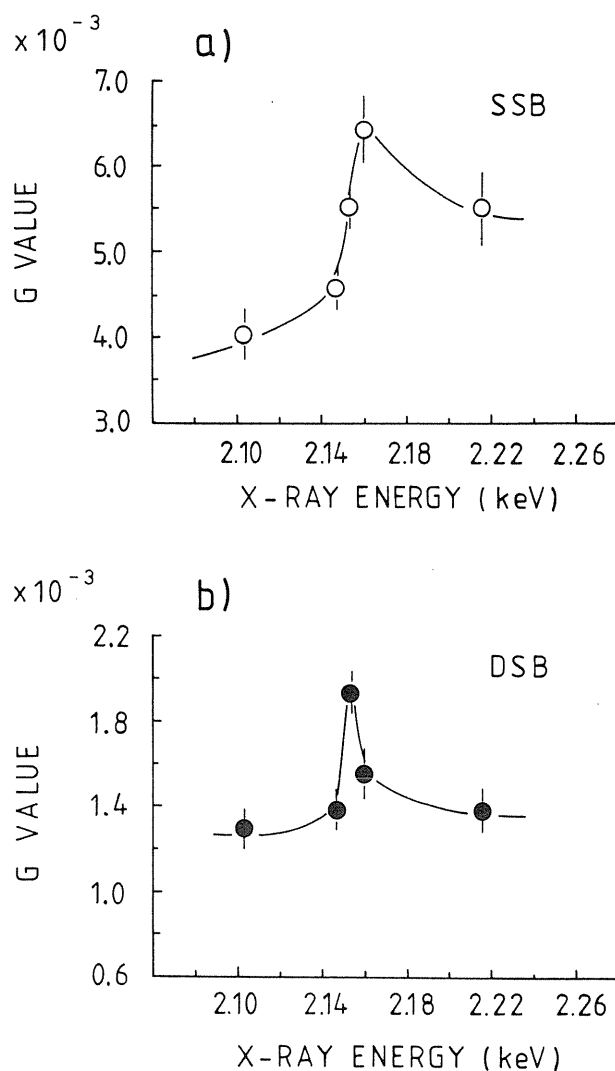


Figure 6. The dependence of the G-value of (a) ssb and (b) dsb on Col E1 plasmid DNA irradiated with the soft X-rays around the phosphorus K-edge (Ref. 26).

## 6. 生体中で高密度の励起・電離が生じると?

### 6.1 凝縮相内で 2 次電子が果たす役割

乾燥系での結果のまとめとして, ssb は修復されにくい DNA 分子の変化の候補から除くことができそうだと述べたが, 水溶液系の結果を見る限りまだ確定したことは言えないようである。単純に DNA の片側の鎖が切断されたか否かということだけでは, 生物応答に結びつく分子変化としての議論は十分ではなく, 切断が生じた部分の化学構造と修復タンパク質の反応の様子を調べる必要があると思われる。これは二本鎖切断に関しても

同様なことが言えよう。また同時に、リンのK殻光吸収によって生じる切断端の化学構造についても調べる必要がある。

ここで注意しなければならないことは、内殻吸収後の生体中での分子の分解のプロセスについては、必ずしも原子・分子科学の分野で扱う気相分子あるいは表面吸着分子に対する内殻光吸収の効果と同じ考え方をしてはならないということであろう。最近、清浄表面上の有機分子に対する炭素のK殻励起により特定の化学結合の切断が起こり得る事が示され、いわゆる「分子のメス」として注目を集めている<sup>28,29)</sup>。また気相を対象にした研究では、Eberhardt等によりアセトン中の2種類の炭素についての1sからの励起による分解パターンの違いが報告されている<sup>30)</sup>。しかし隣の分子との間で電荷のやりとりが比較的自由に行える生体のような凝縮相系では、このような励起原子を含む特定の化学結合の切断が効率よく生じる理論的な裏付けはない。むしろ励起からの緩和過程で生じる光電子やオージェ電子あるいはイオンなどにより、周囲の分子がさらに変化を受ける確率の方が大きいので、特定の化学結合の切断が生じたとしても数の上では決して多数を占める反応とはなり得ないであろう。ただし少数であってもこれが最後まで修復されずに残る、我々の探している「修復されない」分子変化である可能性も捨て切れない。

筆者等はイオウを含む一連のアミノ酸(図7)をモデル分子として選び、固相中試料に対するイオウのK殻光励起の分子分解パターンに与える効果を調べた<sup>31,32)</sup>。これらのアミノ酸は、分子骨格の切断により生じると予想される分子断片もまたアミノ酸の形態をとるため、通常のアミノ酸分析法で容易に親分子から分離・定量できる。またこれらの分子断片から、切断された結合の位置が特定できるという利点がある。得られた結果から、ひとつのフォトン吸収により種類・数ともかなり多くの分解生成物が観測され、光吸収した

分子以外の周囲の分子も分解していることがわかった。しかしこれらの二次的な効果があるにもかかわらず、イオウK殻励起の有無により生成物分布は大きく異なった(図8)。2次電子を介した反応が数多くあるような条件下でも、内殻光吸収に特有の化学変化が生じる可能性があるのだろうか? 生体試料という凝縮相中で内殻光吸収によりどのような事が起こるのかを再度原点に戻って調べてみる必要がある。

## 6.2 狭い空間内に生じる複数の分子変化

生体を構成する比較的軽い原子から放出される2次電子は、通常数十eVから数keV程度である。1MeV以下のエネルギー領域で、水の電子に対するmass stopping powerが一番大きくなるのはこの領域である<sup>33)</sup>。例えばリンから放出されるLMMオージェ電子のエネルギー117eVは約5nmの飛程の飛跡にそって媒質中に付与されるため、励起リン原子のごく近傍の水分子に励起・電離が数多く生じることになる。この結果水の励起あるいは分解生成物であるイオンやラジカルが高密度で形成され、これらがさらに元のDNAと反応すると考えられる。直径2.4nmのDNAのらせんの1ピッチは3.4nmであり、1ピッチには10塩基対が含まれることを考えると、DNA上のリンが内殻光吸収を起こした場合にその箇所から15塩基対程度の領域内に複数の分子変化が生じる可能性がある。DNAの二本鎖の両側に約10-20塩基対の範囲にssbが生じるとこれがdsbになるとともいわれており、リンのK殻光吸収により効率よくdsbが生じる可能性がある。またこのような高密度の分子変化(クラスター・ダメージ)こそが、生物応答に直接関連する分子変化ではないかという考えがある<sup>34,35)</sup>。

2次電子により水中で形成されるラジカルの収量を調べるため、Watanabe等はフリッケ化学線量計を用いて10keVから1.8keVまでの軟X線領域での硫酸第一鉄の酸化反応のG value (100

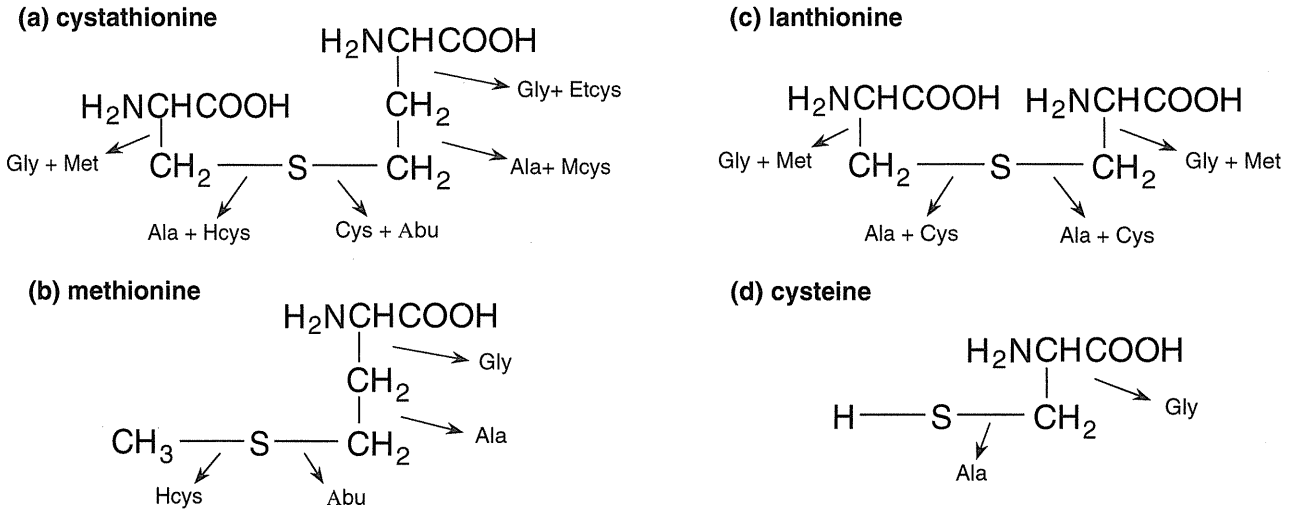
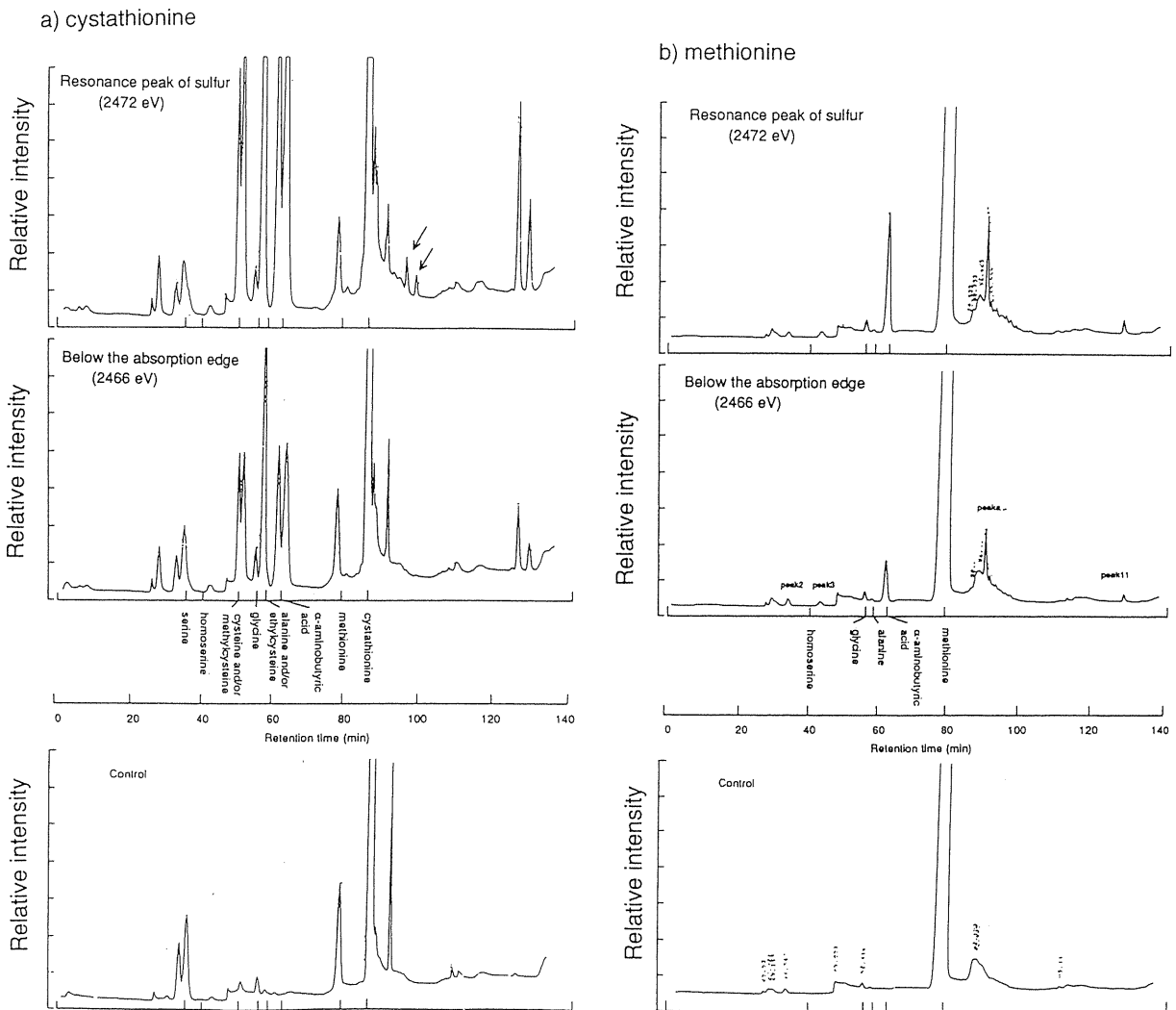


Figure 7. Molecular formula of sulfur-containing amino acids; (a) cystathionine; (b) methionine; (c) lanthionine; (d) cysteine. The relation of each cleavage site to the expected products is shown by arrows. Ala; alanine, Gly; glycine, Met methionine, Cys; cysteine, Mcys; methylcysteine, Ecys; ethylcysteine, Hcys; homocysteine, Abu;  $\alpha$ -aminobutyric acid.



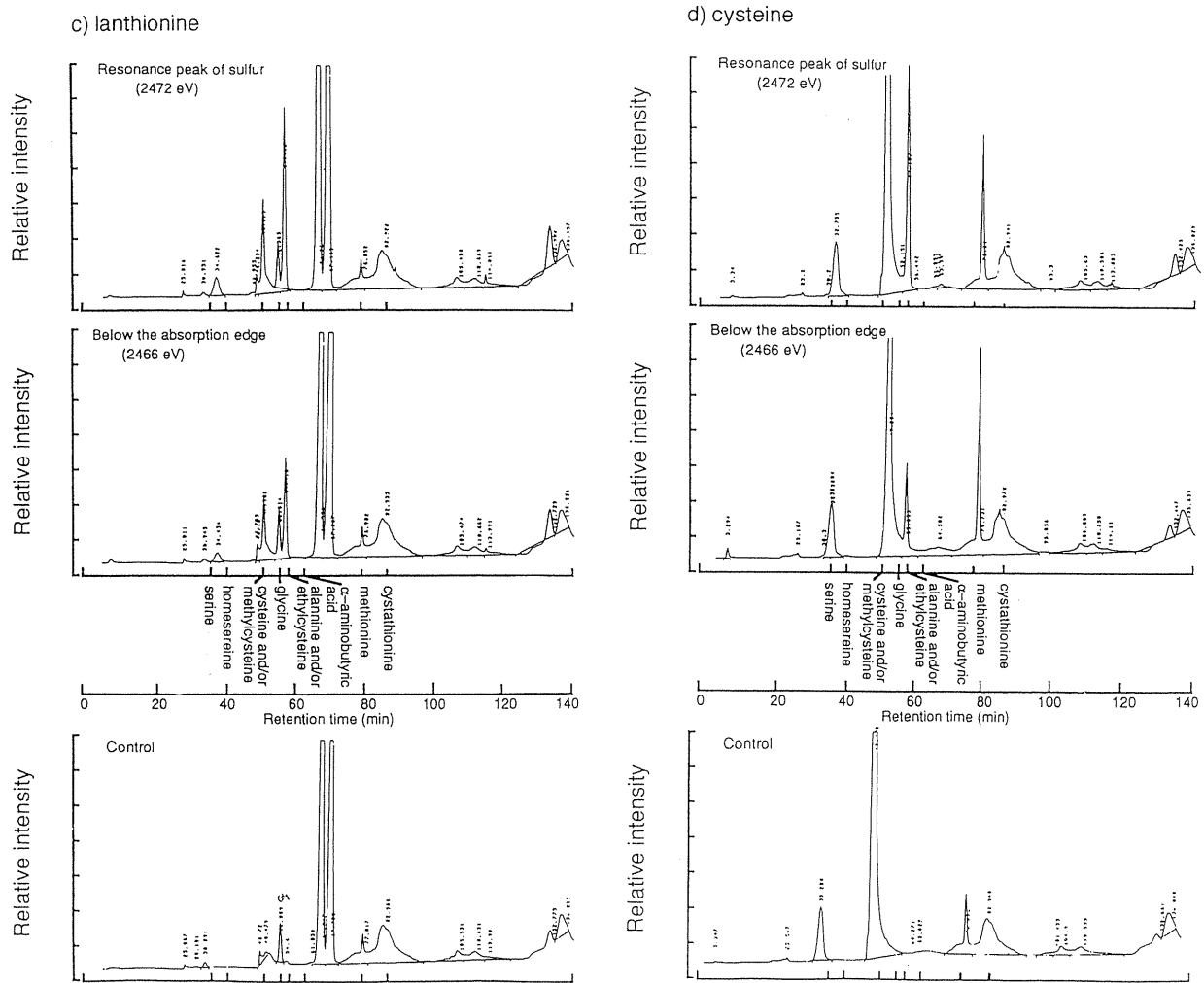


Figure 8. HPLC chromatograms of (a) cystathionine, (b) methionine, (c) lanthionine and (d) cysteine irradiated with soft X-rays around sulfur K-edge. The photon energies used were 2472 eV (upper panels) and 2466 eV (middle panels). The lower panels were control samples.

eV のエネルギー吸収あたりの分子変化量) を測定した<sup>36)</sup>。得られたスペクトルを、図 9 に示す。ここで G value は、軟 X 線照射により生じた水ラジカルの収率に対応すると考えられる。このエネルギー領域で、水の分解により生じるラジカル収率を系統的に調べた初めての実験データである。ラジカル収率は低エネルギー側に向けて減少し、Magee and Chatterjee<sup>37)</sup> あるいは Yamaguchi<sup>38)</sup> の計算で得られた結果と定性的に一致した。この結果は、電子の飛跡に沿ってラジカルの recombination が起こっていることを示していると考えられる。

このラジカルの recombination より、先の水溶

液系で得られた ATP 及びプラスミド DNA のふたつのデータがうまく説明がつくのであろうか？高密度に水ラジカルが生じる領域に十分な量の ATP 分子が存在すれば、ラジカルはお互い同士が recombination する前に ATP と反応するため、結果として adenine の収率が増加したと考えられる<sup>27)</sup>。一方プラスミド DNA の水溶液の濃度は、ATP 水溶液のそれよりもかなり薄い 1 mg/ml である。得られたデータを見ると、G value にしてせいぜい  $6 \times 10^{-3}$  程度であり、2.1 keV フォトンがひとつだけ試料に吸収された時の分子変化の総量はたかだか 0.1 個である。Col E1 は約  $6 \times 10^3$  塩基対 (分子量約  $3.6 \times 10^6$ ) であるから

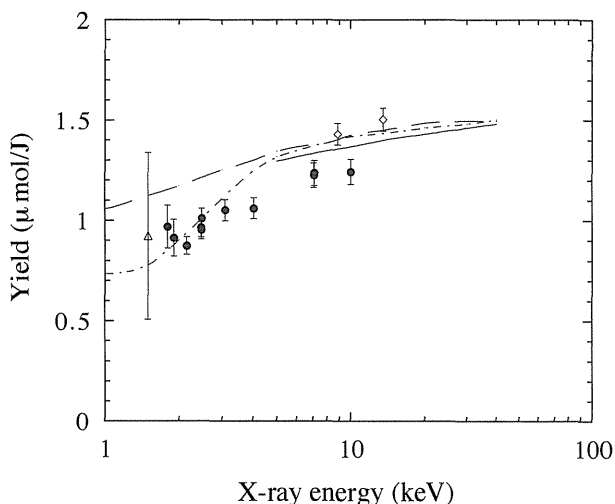


Figure 9. Yield of the ferric ion as a function of the incident X-ray energy. The values reported based on other studies are also plotted for a comparison. Present study, ●; Hoshi et al. (1992), ◇; Freyer et al. (1989), △; Yamaguchi (1989), ∙, Magee and Chatterjee, (1987), ---; and recommended values of ICRU (1970), — (Ref. 36).

試料中の濃度は約 $1.7 \times 10^{14}$  分子/ml となり、試料内に均一に分子が分散していると仮定したときの平均分子間距離は180 nm となる。ある Col E1 DNA 上のリン原子が内殻光吸収した結果生じる2次電子のうち、最もエネルギーの高い KLL オージェ電子 (1850 eV) でさえ水中での飛程はようやく100 nm である。このため、ある分子内で生じたリン K 殻光吸収とその緩和により生成した2次電子による化学変化はそのDNAのごく近傍で完結し、結果的に ssb, dsb とともにその収率が増加したとのだと考えることができる。

実際の試料中で発生する2次電子の分布を調べると、リンの LMM オージェ電子 (約120 eV) が最も多い。この電子の飛程 (5 nm) を半径とする球内に与えられるエネルギー密度は約 $0.35 \text{ eV/nm}^3$  で、リンの励起が起こらない2146 eV の場合の $0.04 \text{ eV/nm}^3$  の実に9倍である<sup>27)</sup>。この高密度励起・電離の仮想的な球とDNAの大きさを比較してみた (図10)。DNAの2ターン分 (約20塩基対) ほどがこの球の中にすっぽり入る事がわかる。タンパク質をコードする300塩基対

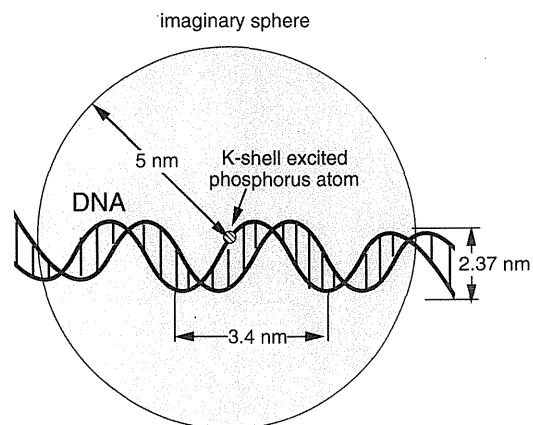


Figure 10. Schematic illustration showing the relation between the DNA size and the range of the LMM Auger electrons from a K-shell excited phosphorus in the DNA's backbone. The gray circle with the 5 nm radius is an imaginary sphere indicating a range of the Auger electrons.

程度の DNA 領域に比べるとかなり小さいが、上に述べた修復タンパク質 (UvrABC) のエンドヌクレアーゼ活性によって切り取られる領域 (12塩基対) の倍である。飛躍を恐れずに想像すると、修復タンパク質の守備範囲を越えた広い領域にわたるDNAの変化が、紹介してきたようなリンのK殻光吸収による生物応答を引き起こしているのではないだろうか。

## 7. 1 keV 以下の軟 X 線領域へ

内殻光吸収の緩和過程で生じる比較的低速の2次電子が、修復されないDNAの分子変化に何らかの役割を果たしている可能性についてこれまで述べてきた。それではリンのK殻光吸収端よりも低い1 keV 以下の軟 X 線領域では、修復されにくい分子変化 (例えば dsb?) の収率はさらに上がるのであろうか? この領域には炭素、窒素及び酸素のK殻光吸収端があるため、フォトンのエネルギーを選択することでそれぞれの元素のKLL オージェ電子 (それぞれ約250, 380, 500 eV) を選択して発生させることができると考えられる。これらのオージェ電子は、リンのLMM オージェ電子に比べるとそのエネルギーが高いため長い飛程を持つ。しかし入射光子の

エネルギーは小さく従って光電子のエネルギーも小さいため、2 keV 領域に比べて2次電子のスペクトルは全体的にさらに低エネルギー側にある。よって高密度励起・電離領域が、照射された試料中のほとんどを占めると思われる。1 keV 以下の軟 X 線領域で筆者等が最近行ったいくつかの実験を、以下に紹介する。

### 7.1 DNA 薄膜の絶対吸収測定

1 keV 以下の軟 X 線は、生体試料中では  $\mu\text{m}$  程度の距離を進む間に急激に減衰する。このため試料の光吸収断面積の絶対測定はこれまで非常に困難であった。光吸収断面積は、照射効果を評価する際に必要となる試料に吸収されたフォトン数の見積もりに不可欠な光学データである。全電子収量によるスペクトル測定はスペクトルの形状の観察には利用できるが、試料のチャージアップ等の問題があるために吸収断面積の絶対値を得ることは難しい。これまでは、理論的に計算された光吸収断面積<sup>40)</sup>に試料の元素組成を乗じて、試料全体の吸収断面積を見積もっていた。しかし実際の分子試料の吸収スペクトル上には、計算値では考慮されない吸収端近傍の XANES 構造が現れることが予想される。我々はまず、実際の DNA 試料の絶対吸収測定をまず試みた。何種類かの厚みの異なる DNA の薄膜を用意し、窒素、酸素の K 殻光吸収端を含むエネルギー領域で透過法による吸収スペクトル測定を行った<sup>39)</sup>。

試料には子牛胸腺 DNA を用い、機械的強度を稼ぐため Ni メッシュで試料薄膜を裏打ちした。あらかじめ UV260 nm で紫外光吸収測定を行い、面密度を求めておいた。乾燥 DNA 膜の260 nm での吸収係数は、湿度を変えた時の DNA の吸収測定結果<sup>40)</sup>から、 $4.0 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{g}$  とした。軟 X 線の吸収測定は、KEK・PF の BL-12A で行った。本ビームラインのエネルギー分解能 ( $E/\Delta E$ ) は、入射・出射スリットが100  $\mu\text{m}$  時には約300, 20  $\mu\text{m}$  時には1000程度である。用いた測

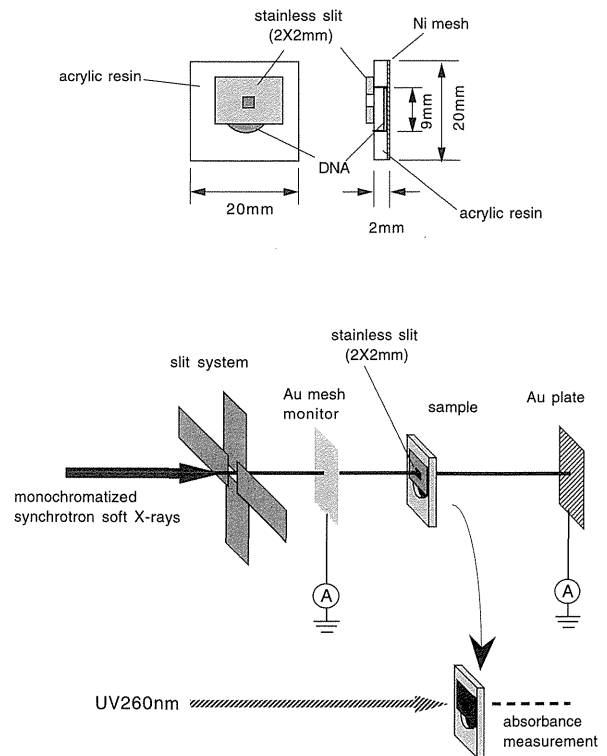


Figure 11. The schematic layout of the measurement system for the absorption at BL-12A at the Photon Factory. UV absorption measured at the same sample area.

定系は、図11に示したように比較的簡単なものである。試料を透過してきた光を金の板で受光し、光電子電流を測定しこれを透過光強度とした。また DNA 試料を乗せていない Ni メッシュを透過してきたビーム強度を、試料への入射光強度とした。リング電流の継時変化に伴うビーム強度変化は、試料上流に設置された金のメッシュでモニターした。

得られた DNA の吸収スペクトルを図12に示す。スリット幅100  $\mu\text{m}$  の場合、得られた吸収スペクトル上には、それぞれの元素の K 殻光吸収端付近に反結合軌道への励起に起因すると考えられる大きな共鳴構造が観測された。さらにスリット幅を20  $\mu\text{m}$  に狭めると、窒素の場合ピークは二つに分裂し、また酸素の場合545 eV 付近の小さなピークと550 eV 付近の大きなピークの二つが観測された (図13)。共鳴ピークエネルギーで正確に吸収を求めるためには、フォトンのバンド幅をスペクトル上のピークの自然幅より充分狭く



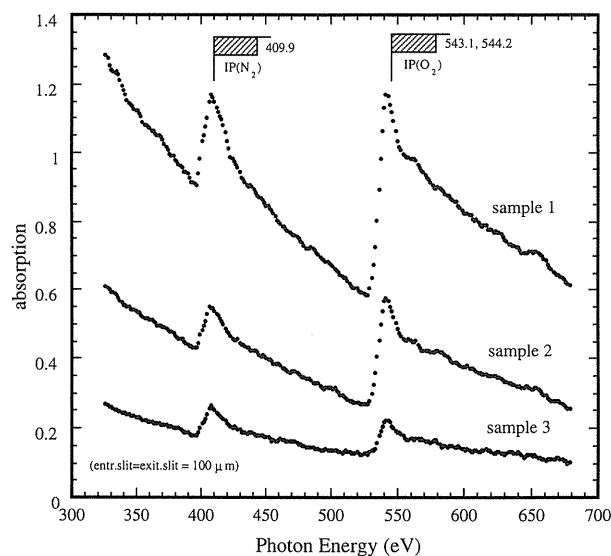
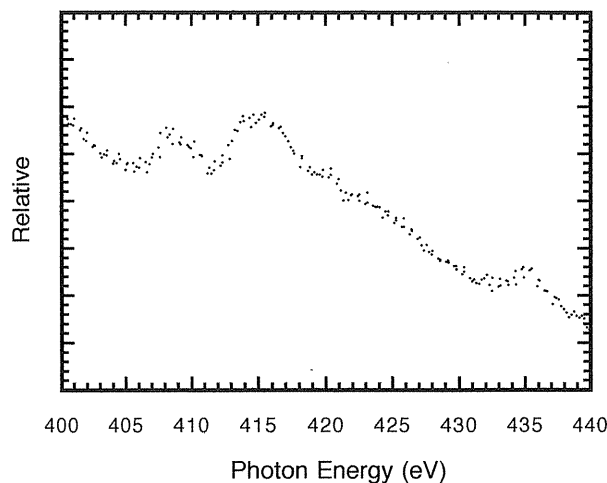


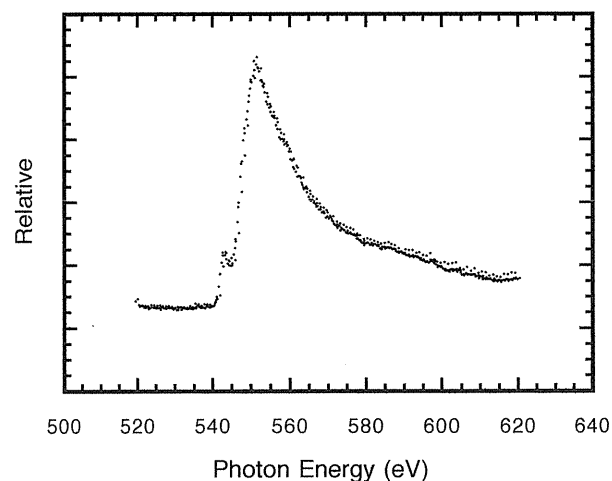
Figure 12. Photoabsorption spectrum of the DNA. The full widths at half maximum of the resonance peak were 20 eV at the N K-edge and 10 eV at the O K-edge.

することが必要である。今回の測定条件では、分光器の入射スリットを狭めると正確な測定を行うための十分なフォトン数が得られないため、共鳴ピーク以外のエネルギーについての吸収断面積を求めた。

各エネルギーでの吸収を面密度に対してプロットすると比例関係にあることが確認されたため(図14), 測定は Beer-Lambert の法則が成り立つ条件下で行われた事が確認された。この時の直線の傾きから得た光吸収断面積を, Henke による光吸収断面積<sup>40)</sup>を用いて計算して得た値とともに表 3 に示した。計算に用いた試料の元素組成は, 子牛胸腺 DNA ナトリウム塩の塩基組成: adenine+thymine: guanine+cytosine=1:1.35<sup>41)</sup>を基に, 元素組成を H; 22.57, C; 19.57, N; 7.42, O; 13.42, P; ; 2.00, Na; 2.00とした。また真空状態に保持した場合でも排除できない水分子が, DNA 中の 1 ヌクレオチドあたりに 2.5 分子あることが示されている<sup>42)</sup>。そこでこれらの配位水分子 (2.5 分子/ヌクレオチド) を仮定した場合についても, 同様の計算を行った。これらの計算値は, 表 3 中の括弧内に示した。



(a)



(b)

Figure 13. Photoabsorption spectrum of the DNA around (a) nitrogen K-edge and (b) oxygen K-edge. Both of the entrance and the exist slit width of the monochromator were adjusted to 20  $\mu\text{m}$ .

350, 450, 500, 600, 650 eV の各エネルギーで得た DNA の光吸収断面積は, 計算値とよく一致した。特に 1 ヌクレオチドあたり 2.5 分子の水分子が DNA に配意していると仮定した場合には, 500 eV 以下のエネルギー領域で実験誤差の範囲内で両者は一致した。しかし, 600 eV では実験値の方が 2 割ほど大きかった。これは K 殻光吸収端付近の巨大な共鳴ピークの影響が, まだこの領域でも残っているためであると考えられる。今後よりエネルギー分解能の良い単色光を用いて, 各共鳴状態を分離した上でそれぞれの吸収断面積

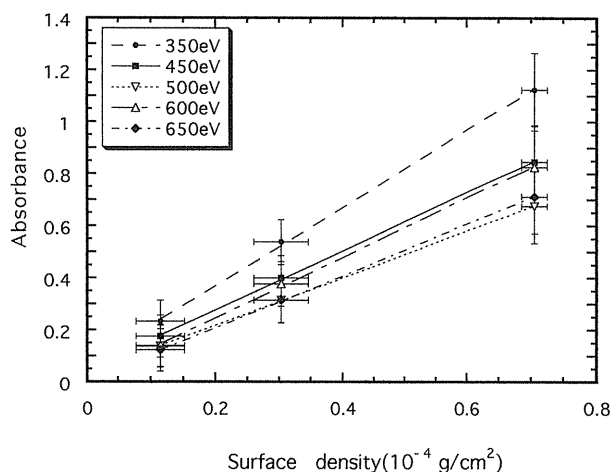


Figure 14. Absorbance at the energies of 350, 450, 500, 600 and 650 eV plotted against the surface density. The lines were fitted using a least-square method. The error bars indicate the standard deviations of the surface density of each sample obtained from the data of the photoabsorption at the energy of 900 eV.

Table 3. Photoabsorption cross sections of the DNA film compared with those calculated using Henke's data

photon energy (eV)	Experimental data ( $\times 10^4 \text{ cm}^2/\text{g}$ )	calculated value ( $\times 10^4 \text{ cm}^2/\text{g}$ )	ratio
350	1.50	1.62 (1.54)	0.93(0.97)
450	1.13	1.20 (1.13)	0.94(1.00)
500	0.908	0.981(0.89)	0.93(1.02)
600	1.16	0.890(0.98)	1.30(1.19)
650	1.00	0.898(0.94)	1.11(1.06)

を求める必要がある。すでに炭素及び窒素の K 殻光吸収端付近で DNA の XANES 構造が、米国のグループにより高分解能軟 X 線分光器を備えたビームラインを使って得られている<sup>43,44</sup>。しかし DNA の光吸収断面積の絶対値がこの領域で実験的に求められたのは初めてである。これらの光学データは、酸素、窒素の吸収端付近での DNA をはじめとする生体試料に対する照射効果を解析する際に有用となろう。

## 7.2 窒素及び酸素の K 殻光吸収端付近での DNA の鎖切断

さらに得られた吸収スペクトルを基に、フォト

ンの透過率が等しくなるように選んだ窒素、酸素の吸収端を挟む三つのエネルギー (388, 435及び 585 eV) の単色軟 X 線を、乾燥状態のプラスミド DNA (pBR322) に照射し ssb 及び dsb の量を測定した<sup>46</sup>。照射光子数は、フォトダイオード (IRD 社) の量子効率から推定した。照射及び照射後の試料の分析は、Hieda 等の方法による<sup>14</sup>。光子のエネルギーを試料の透過率が等しくなるように設定することで、試料内への光子の進入距離を等しくしたまま光吸収部位を変えて生物応答を調べるというアイデアは、Gould が細胞試料について提案している<sup>47</sup>。

アガロースゲル上に現れた DNA の形態に応じたバンドの蛍光強度の結果から、照射した光子数あたりの ssb 及び dsb の数を求めた。得られた結果を表 4 に示す。ssb と dsb の比 (dsb/ssb) は、0.07~0.08 に分布し、照射エネルギー依存性はそれほど顕著ではなかった。しかしこれら値は、リン K 殻光吸収端付近 (2.15 keV) で得られた値 (表 1) から計算される比 (約 0.04) の 2 倍程の大きさであった。予想したとおり、2 keV 付近よりも低エネルギーの 2 次電子が数多く生じるため高密度の励起・電離領域が増し、狭い空間内の複数の ssb から生じる dsb が高い割合になったためであると考えられる。またイオン化ポテンシャルを超えた真空紫外線領域の光子 (20 eV) の場合に得られた ssb と dsb の作用断面積の比 (約 0.013)<sup>48</sup> の約 6 倍であった。さらに低 LET 放射線である <sup>60</sup>Co $\gamma$  線の場合のそれ (0.056)<sup>49</sup> と比較しても、今回得られた値の方が

Table 4. Comparison between dsb and ssb at the soft X-ray region under 1 keV

photon energy (eV)	n(ssb)/sec	n(dsb)/sec	ratio (dsb/ssb)
388	$5.57 \times 10^{-4}$	$4.3 \times 10^{-5}$	0.077
435	$7.53 \times 10^{-4}$	$5.5 \times 10^{-5}$	0.074
573	$1.03 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-5}$	0.078

大きかった。どうやら数100 eV のエネルギー領域が、最も効率よく dsb を生成するらしい。

このように単純に ssb あるいは dsb を比較するだけでも、2次電子のエネルギー分布と DNA の分子変化についての情報がある程度得られる。今後酸素、窒素の各共鳴ピーク波長近傍の狭いエネルギー領域で、励起状態を変えたときの照射効果を調べてゆくことも必要であろう。

## 8. 今後の展開

6章の最後で、リンの K 殻光吸収により DNA 近傍に生じる高密度励起・電離が発生する仮想球を考えた。この球内で DNA 上に生じる分子変化の種類・数を、手計算で求めることは難しい。ワークステーションを用いたモンテカルロシミュレーションコードによる計算により推定できると考えられる。現在筆者等は、Tomita 等が  $\gamma$  線照射された DNA 上の分子変化数を計算するために開発した、DNA の立体構造まで考慮に入れたモンテカルロシミュレーションコード(DBREAK)<sup>50)</sup> を、軟 X 線領域での研究に拡張することを検討中である。

今回紹介した DNA 分子レベルの研究のほとんどは、軟 X 線照射による安定な最終生成物である ssb と dsb の検出に終始していた。しかし高密度励起・電離の仮想球の中では、当然これ以外の分子変化も生じるはずであり、塩基の化学的な修飾やあるいは遊離などはその有力候補である。むしろこれらの中から、内殻光吸収に特有の分子変化が見つかる可能性も高い。これらを調べるためには、最終生成物から入る方法と反応中間体として数多く生成すると思われる遊離基(フリーラジカル)の検出から入る方法がある。二つの方法は、相補的な関係にあると思われる。後者のフリーラジカルを測定するためには、電子常磁性共鳴装置(EPR)を用いるのが普通である。しかしこの装置は、少なくとも国内の放射光施設内にはこれまで設置されていなかったため、この分野の

研究は立ち後れている。リン K 殻光吸収の効果に関しては、uridine5'-monophosphateなどを試料として、軟 X 線照射直後にスピントラップ剤と混合しフリーラジカルを補足する試みが Kuwbara 等によって行われた例があるだけである<sup>51)</sup>。彼等はまた、Br-Uracil に対する Br の K 殻光吸収に対する効果を、全フリーラジカル収量を調べることで行った<sup>52)</sup>。筆者等は、液体窒素温度に保持したまま生体分子結晶試料に対して軟 X 線照射が行え、かつそのまま EPR 装置のキャビティに挿入できる専用のデュワーを開発した<sup>53)</sup>。試験的な運用の結果、集光していない変更電磁石ビームラインではフォトンの絶対数が少ないため、測定にかかる程度のスピン数を得るためには20時間もの照射時間が必要であることがわかった。このような測定には、挿入光源ビームラインでの実験が不可欠である。将来高輝度リング(SPring-8)のビームラインに EPR 装置を直接設置し、この研究をさらに展開してゆく予定である<sup>54)</sup>。

## 9. まとめ

DNA などの生体分子レベルから生きた細胞レベルに至るまで、特定元素の内殻光吸収による生物応答を調べる「生物分光研究」について紹介した。生体の防御システムでは「修復されない」DNA の分子変化は、光吸収した原子より放出される比較的低エネルギーの2次電子による高密度励起・電離により生成することが示された。この修復されない分子の化学変化・構造変化、試料内での空間分布を明らかにして行くことが、今後の研究に期待されている。

## 謝辞

本稿には KEK・PF での、Radiation Biology Group による共同利用実験の成果を数多く引用させて頂いた。これらの共同利用研究者、伊藤隆、檜枝光太郎、小林克己、高倉かほる、宇佐美

徳子, 渡辺正己, 桑原幹典の諸氏に感謝いたします。細胞を扱う実験の詳細に関しては東海大学・医学部の前沢博氏に, また二次電子の効果に関しては原研・環境物理の渡邊立子氏に数多くの助言を頂き, また議論をさせて頂きました。お二人に深く感謝いたします。

## 文献

- 1) E. Schrödinger: *What is life?—The Physical Aspect of the Living Cell* (Cambridge Univ. Press, 1944).
- 2) G. B. Sancar and W. D. Rupp: *Cell*, **33**, 249–260 (1983).
- 3) A. T. Yeung, W. B. Mattes, E. Y. Oh and L. Grossman: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **80**, 6157 (1983).
- 4) R. Holliday: *Genet. Res.*, **5**, 282 (1972).
- 5) N. Sigal and B. Alberts: *J. Mol. Biol.*, **71**, 789 (1972).
- 6) 例えば, J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz and A. M. Weiner: *Molecular Biology of the Gene* (The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1987) Chapter. 11.
- 7) W. R. Guild: *Archives of Biochem. Biophys.*, **40**, 402 (1952).
- 8) 前沢 博: 日本放射光学会誌, **1**, 15 (1988).
- 9) 宗像信生: 日本放射光学会誌, **5**, 143 (1992).
- 10) 檜枝光太郎: 日本放射光学会誌, **6**, 49 (1993).
- 11) M. Watanabe, M. Suzuki, K. Watanabe, K. Suzuki, N. Usami, A. Yokoya and K. Kobayashi: *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 161 (1992).
- 12) K. Kobayashi, K. Hieda, H. Maezawa, Y. Furusawa, M. Suzuki and T. Ito: *Int. J. Radiat. Biol.*, **59**, 643 (1991).
- 13) H. Sekiyama, Y. Kitajima, N. Kosugi, H. Kuroda and T. Ohta: *Photon Factory Activity Report 1984/1985*, p. 198.
- 14) K. Hieda, T. Hirono, A. Azami, M. Suzuki, Y. Furusawa, H. Maezawa, N. Usami, A. Yokoya and K. Kobayashi: *Int. J. Radiat. Biol.*, **70**, 437–445 (1996).
- 15) N. Usami, K. Kobayashi, A. Yokoya and S. Ishizaka: *Photon Factory Activity Report 1989*, p. 94.
- 16) S. Saigusa, Y. Ejima, K. Kobayashi and M. S. Sasaki: *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 785 (1992).
- 17) H. Maezawa, M. Suzuki, A. Yokoya, N. Usami and K. Kobayashi: *Photon Factory Activity Report*, in press.
- 18) T. Ito, M. Saito and K. Kobayashi: *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 129 (1992).
- 19) H. Yamada, K. Kobayashi and K. Hieda: *Int. J. Radiat. Biol.*, **63**, 151 (1993).
- 20) T. Ito, M. Saito and T. Taniguchi: *Photochem. Photobiol.*, **46**, 979 (1987).
- 21) T. Ito and M. Saito: *Photochem. Photobiol.*, **48**, 567 (1988).
- 22) T. Ito and M. Saito: *Radiat. Phys. Chem.*, **37**, 681 (1991).
- 23) R. L. Platzman: *Radiation Research*, edited by G. Silini (North-Holland, Amsterdam, 1967) pp. 20–42.
- 24) H. Koizumi, K. Shinsaka and Y. Hatano: *Radiat. Phys. Chem.*, **34**, 87 (1989).
- 25) R. Watanabe, M. Ishikawa, K. Kobayashi and K. Takakura: *Biophysical Aspects of Auger Processes, AAPM Symposium Series 8*, edited by R. W. Howell, V. R. Narra, K. S. R. Sastry and D. V. Rao (American Institute of Physics, New York, 1992) pp. 24–36.
- 26) K. Takakura, H. Maezawa, K. Kobayashi and K. Hieda: *Synchrotron Radiation in Life Science*, edited by T. Sasaki et al (Oxford Univ. Press, Oxford, 1994) pp. 756–764.
- 27) R. Watanabe, Ph.D. thesis (Graduate Univ. for Advanced Studies, 1994).
- 28) M. C. K. Tinone, K. Tanaka, J. Maruyama, N. Ueno, M. Imamura and N. Matsubayashi: *J. Chem. Phys.*, **100**, 5988 (1994).
- 29) M. C. K. Tinone, T. Sekitani, K. Tanaka, J. Maruyama and N. Ueno: *Appl. Surf. Sci.*, **79/80**, 89 (1994).
- 30) W. Eberhardt, T. K. Sham, R. Carr, S. Krummacher, M. Strongin, S. L. Weng and D. Wesner: *Phys. Rev. Lett.*, **50**, 1038 (1983).
- 31) A. Yokoya, K. Kobayashi, N. Usami and S. Ishizaka: *J. Radiat. Res.*, **32**, 215–223 (1991).
- 32) K. Kobayashi, A. Yokoya, N. Usami and S. Ishizaka: *Biophysical Aspects of Auger Processes, APM Symposium Series 8*, Edited by R. W. Howell, V. R. Narra, K. S. R. Sastry, D. V. Rao (American Institute of Physics, New York, 1992) pp. 14–23.
- 33) International Commission of Radiation Units and Measurements Report No. 16 (1970).
- 34) D. T. Goodhead: *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**, 7 (1989).
- 35) J. F. Word: *Radiat. Res.*, **104**, S–103–S–111 (1985).
- 36) R. Watanabe, N. Usami and K. Kobayashi: *Int. J. Radiat. Biol.*, **68**, 77 (1989).
- 37) J. L. Magee and A. Chatterjee: *Radiat. Phys. Chem.*, **15**, 125 (1978).
- 38) H. Yamaguchi: *Radiat. Phys. Chem.*, **34**, 801 (1989).
- 39) A. Yokoya, R. Watanabe, T. Hara, K. Kobayashi and K. Hieda: *Photon Factory Activity Report*, Submitted.
- 40) B. L. Henke, E. M. Gullikson and J. C. Davis: *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, **54**, 181 (1993).
- 41) M. Falk, K. A. Hartman Jr. and R. C. Lord: *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 391 (1963).
- 42) A. Kornberg: *Science*, **131**, 1503 (1960).
- 43) N. J. Tao, S. M. Lindsay and A. Rupprecht: *Biopolymers*, **28**, 1019 (1989).
- 44) S. M. Kirtley, O. C. Mullins, J. Chen, J. van Elp,

- S.J. George, C. T. Chen, T. O'Halloran and S. P. Cramer: *Biochim. Biophys. Acta*, **1132**, 249 (1992).
- 45) H. Ade, X. Zhang, S. Cameron, C. Costello, J. Kirz and S. Williams: *Science*, **258**, 972 (1992).
- 46) R. Watanabe, A. Yokoya, K. Kobayashi and K. Hieda: *Photon Factory Activity Report*, Submitted.
- 47) M. N. Gould, J. MacKay, D. W. Pearson, W. S. Kennan, S. Muller, P. Shulman, T. R. Mackie, J. F. Fowler, C. Hill and P. DeLuca Jr.: *Synchrotron Radiation in Life Science*, edited by T. Sasaki et al (Oxford Univ. Press, Oxford, 1994) pp. 706-713.
- 48) K. Hieda, K. Suzuki, T. Hirono, M. Suzuki and Y. Furusawa: *J. Radiation Research*, **35**, 104, (1994).
- 49) T. Ito, S. C. Baker, C. D. Stickley, J. G. Peak and M. J. Peak: *Int. J. Radiation Biology*, **63**, 289 (1993).
- 50) Tomita et al.: *Int. J. Radiation Biology* (1996) In press.
- 51) M. Kuwabara, W. Hiraoka, A. Yokoya, K. Hieda and K. Kobayashi: *Photon Factory Activity Report*, **8** (1990) p. 256.
- 52) M. Kuwabara, S. Sawamura, O. Inanami and K. Kobayashi: *Radiation Damage in DNA: Structure/Function Relationships at Early Times*, pp. 241-249 (1995).
- 53) 横谷明德, 渡邊立子, 高倉かほる, 恵 恒雄, 伊藤 隆: 第39回放射線化学討論会講演要旨 (1996).
- 54) A. Yokoya, T. Sekiguchi, Y. Saito, 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.* In press.

## きいワード

### UvrABC

大腸菌の突然変異株の研究から, 紫外線照射による致死損傷修復機能に関わる遺伝子には, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* の3つがあることが1960年代に明らかにされた。現在これらの遺伝子産物であるポリペプチドは, UvrABC という酵素タンパク質のサブユニットを構成することがわかっている。UvrABC は, ピリミジン・ダイマーの場所に結合しDNA の片側の鎖に切れ込みを入れ, その部位を12塩基対だけ切り取るエンドヌクレアーゼ活性を持つ。

### 未成熟染色体凝集 (Premature Chromosome Condensation (PCC)) 法

放射線や薬剤による哺乳類細胞 (分裂中期以外の間期細胞) の遺伝子損傷を, 染色体切断として検出する方法である。調べたい標的細胞を分裂中期細胞 (分裂誘導因子提供細胞) と融合すると, 標的細胞内で紡錘糸の凝縮が起こり, 未成熟染色体 (PCC) 構造が現れる。未処理の標的細胞では細胞染色体数と等しい数の PCC 凝縮像が顕微鏡下で観察されるが, 被処理細胞では凝縮片に切断が起こり PCC 断片数が増加する。被処理と未処理の PCC 断片数の差が, 処理により誘導された PCC 切断数であり, これを遺伝子損傷の程度を示す量として用いる。