



内殻励起による DNA 塩基ラジカル生成機構

横谷明徳 日本原子力研究所・先端基礎研究センター・放射線 DNA 損傷機構研究グループ
〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2-4

要旨

放射線により DNA 分子中に生じる塩基の酸化的損傷の前駆体を明らかにするため、我々は SPring-8 の軟 X 線ビームライン (BL23SU) に設置された電子常磁性共鳴 (EPR) 装置を用いて、酸素及び窒素 K 吸収端領域における DNA 塩基ラジカルの生成機構について調べている。DNA 塩基のひとつであるグアニン塩基に対する EPR の“その場”測定から、ビーム照射時のみ現れる短寿命のラジカルが生成することが見出された。このラジカルはグアニン中にただひとつしかない酸素 (カルボニル酸素) の $1s \rightarrow \sigma^*$ 共鳴によりその収率が顕著に増えた。一方ビーム照射を停止しても残存する安定なラジカルも生成し、これは γ 線照射などで既に報告されているグアニンカチオンラジカルと推定された。このカチオンラジカルは短寿命ラジカルとは異なり、酸素の $1s \rightarrow \sigma^*$ 共鳴により逆に収率が減少した。以上の結果から、オージェ終状態からさらに競争的にこれ二つのラジカル過程を経て化学的に安定なグアニン損傷に至ることが示された。

1. はじめに

私たち生体は、宇宙線や地上の放射性同位元素の崩壊による放射線など、環境から絶えず微量の放射線を浴びている。このため、細胞内の遺伝子 (DNA 分子) に不可逆的な化学変化 (損傷, Fig. 1) が生じるが、生命が進化の過程で獲得した DNA 損傷の修復機能という防御システムによりこれら損傷が極めて効率よく無害化されることが知られている。修復は DNA 修復酵素と呼ばれる、一群のタンパク質によって行われている。しかしごくまれに、この生体の防御システムでも除去できない DNA 損傷があり、これが原因で突然変異や発ガンといった重大な遺伝的影響が起ると推測される。遺伝的影響の度合いを正確に予測することは、前述した環境からの低線量放射線の影響、あるいは放射線医療の最適化という観点から、最近その重要性が特に指摘されている。

正確に放射線影響の度合いを知るためには、どのような DNA 損傷が酵素的に修復され、あるいは修復を受け難いかをまず明らかにする必要がある。これまでの研究では、DNA の鎖が完全に切れてしまう、いわゆる DNA 1 本鎖と 2 本鎖切断 (SSB; Singl strand Break と DSB; Double strand break) が最も重要な損傷とされ、細胞致死作用との因果関係などについて一定の知見が得られてきた。しかし致死に至った細胞はそこで寿命が尽きるため、我々のような多細胞生物の場合、失われた細胞があっても生き残っている細胞が細胞分裂してその数を回復すれば、個体そのものに対するその後の影響はほとんどないと考えられる。また最近の研究から、DSB が生じて DNA の切断端を効率よく再結合させる修復経路 (非相同的末端結合や相同的組換え等) があることが急速に明らかになりつつある。突然変異や細胞のガン化は、むしろ生き残った細胞の遺伝的な性質の変化が問題となるのである。突然変異や細胞のガン化のメカニズムを解明するための第一歩としては、

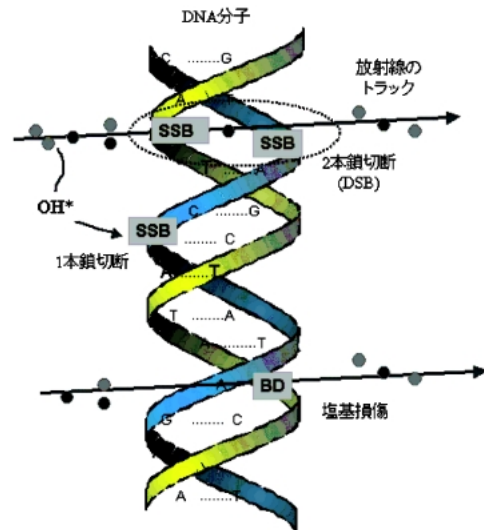


Figure 1. DNA damages induced by ionizing radiation.

“修復され得るか? され難いか?” の境界を決める DNA 損傷の化学構造及び安定な損傷に至るまでの反応を明らかにすることが重要である。

1980年代以降、DNA 分子上に近接して (数 nm 以内) 複数の損傷がクラスター化して生じるた不可逆的な化学変化 (以下クラスター DNA 損傷) が修復されにくい損傷として提案されてきた^{1,2)}。しかし、その化学構造などの実体はほとんど明らかにされてこなかった。我々の最近の研究により、DNA を取り囲む水和水を制御しながら OH ラジカルなどの間接効果を抑制した条件下で DNA に α 線や γ 線などの放射線照射すると、8-oxo-グアニンなどの酸化的塩基損傷とこれを含むクラスター DNA 損傷が高い収率で生じることが、グリコシレースと呼ばれる酸化的塩基損傷の修復酵素タンパク質 (Fpg, EndoIII) をプローブとし

て用いる研究によって突き止められた^{3,4)}。これまで塩基損傷は、DNAの鎖切断(SSBやDSB)に比べて注目の度合いが少なかったが、実際には放射線の直接作用によりSSBの3倍もの量が生じていることも明らかになった。現在、人工的に合成した塩基損傷を含むオリゴヌクレオチドに対する修復度合いを調べるための生化学的な研究が盛んに行われているが⁵⁻⁷⁾、損傷生成に至る物理化学的なプロセスに関しては、OHラジカルなど一部の活性酸素による反応⁸⁾を除けばほとんど明らかにされていない。我々のグループではDNA損傷の生成メカニズムを解明するため、軟X線領域の放射光を用いてDNA関連分子のラジカルやイオンを測定する分光学的な研究を行っている。DNAからの脱離イオンの測定及び鎖切断機構については、共同研究者の藤井が本誌ですでに紹介しているの⁹⁾、興味のある方はそちらを参照されたい。本稿では、SPring-8の軟X線ビームライン(BL23SU)に設置された電子常磁性共鳴(EPR)装置を用いて我々が最近行ってきた、DNA塩基ラジカルの“その場”測定により得られた知見について紹介する。

2. 放射光軟X線を利用したDNA損傷過程の研究

一般に我々が日常浴びる可能性がある放射線は、環境や医療(診断・治療)に用いられるα線などの高エネルギーの粒子線や硬X線であり、数keV以下の軟X線を浴びる可能性はほとんどない。我々がなぜDNA損傷の研究に軟X線領域の単色放射光を用いているのかについて、まず簡単に説明する。

荷電粒子などのイオン化放射線と分子の相互作用は、電磁気的な現象である。DNAなどの分子のごく近傍を、ガンの放射線治療などで用いるような高いエネルギーのイオンが通過(衝突)すると、そのエネルギーは分子内の電子励起や振動、回転励起に使われる。実際の分子の励起はとても複雑である。そこでこれを数学的に取り扱えるようにするため、Platzmanは特定の励起を考える代わりに振動子 s (振動数 ν_s に対してそのエネルギーは $E=h\nu_s$)の励起を考え、各振動子の励起確率の総和が分子内の全電子数に等しくなるように規格化された振動子強度 f_s という概念を導入した¹⁰⁾。一方荷電粒子の通過に伴う電場の時間変化には主に粒子の進行方向に対する垂直成分が寄与し、この振動数分布は最大振動数(荷電粒子の運動エネルギー)に至るまで、全ての区間でほとんど一定となる。これは振動数区間内のエネルギーの総和が等しくなるように、荷電粒子と分子の間で「仮想光子(virtual photon)」がやりとりされると考えることができ、その光子数 n_s は $1/h\nu$ に比例する。言い換えるとDNA近傍を通過する荷電粒子の作用は、振動数分布が $1/h\nu_s=1/E_s$ に比例する「白色光」の照射と近似的に見なせることを意味する。粒子の通過に伴い状態 s に励起される分子の数 N_s は、振動子強度分布が連続分布の場合、

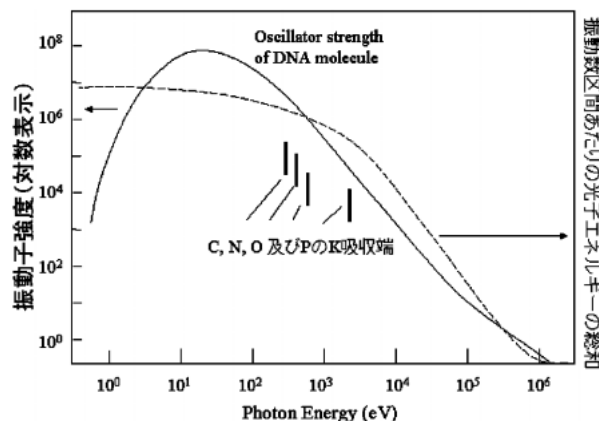


Figure 2. Schematic diagram of oscillator strength distribution of DNA molecule and virtual photon spectrum by irradiating with 3.3 MeV α -particles.

$$N(E) \propto \frac{df/dE}{E} \quad (4)$$

となり、これらの考え方は光学近似(optical approximation)と呼ばれる¹⁰⁾。このような光学近似に基づき、DNAの振動子強度分布と3.3 MeVのα線が衝突した場合の仮想光子のスペクトルを概念的に表したのがFig. 2である。振動子強度分布は主にVUV領域に極大を持ち、この領域では主に分子の価電子励起・電離が生じる。DNA鎖切断の量子効率の測定¹¹⁾など多くのVUV領域でのDNA損傷研究が、第1、第2世代の放射光を利用し数多くなされて来た。

しかし、100 eV以上の軟X線領域での研究は極めて少ない。この領域ではVUVに比べ、DNAの振動子強度もだいぶ小さくその結果励起分子数、 $N(E)$ も少ないと考えられるが、DNAを構成する主要な元素である炭素、窒素、酸素及びリンの内殻レベルの吸収帯(K吸収端)が存在することが大きな特徴である。この励起に伴う内殻正孔はAuger緩和するが、分子の解離と競合して起こる場合もある。さらには、放出されたAuger電子やイオンなどによる隣接官能基の損傷といった複雑な過程を経るため、VUV領域での価電子励起とは異なる、クラスターDNA損傷(=修復され難い損傷)が生じると予想される。

3. アンジュレータ軟X線ビームラインに設置されたEPR装置

一般に放射線が照射されたDNA分子は、不対電子を持つ非常に化学的に活性の強いDNAラジカルを経て安定な損傷に至ることが知られている⁸⁾。このようなラジカルは、電子常磁性共鳴(EPR)装置を用いることで観測できる。EPR装置はラジカルが持つ常磁性を利用するもので、外部磁場により生じたエネルギー準位の差(Zeeman

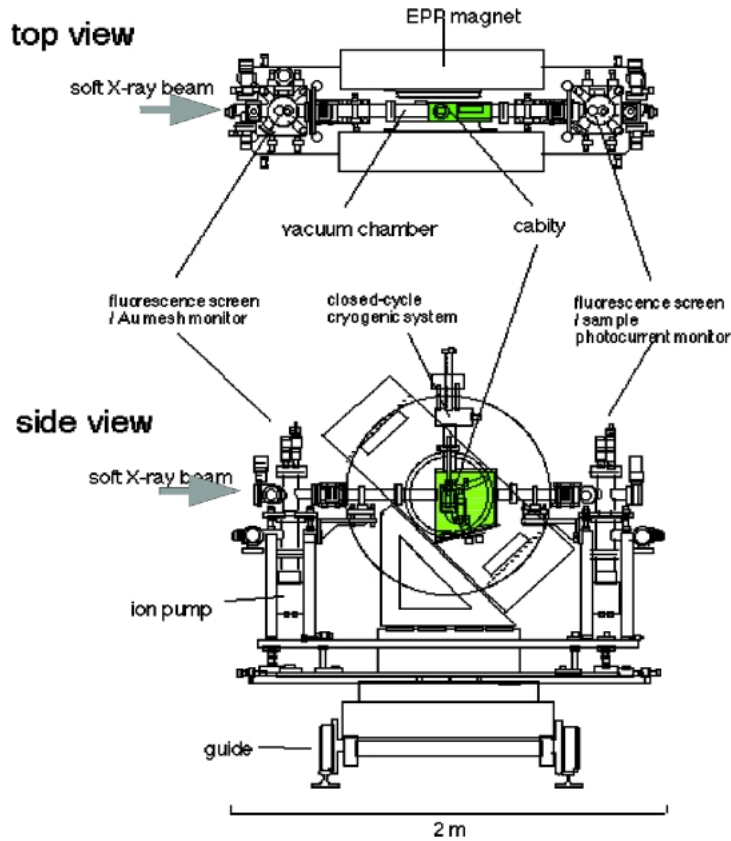


Figure 3. Illustration of the EPR apparatus installed in BL23SU in SPring-8. The vacuum chamber, in which the microwave cavity is installed, is mounted at the center of the magnet gap (see top view). The chamber is connected to the beam-line vacuum pipe at both the front and the rear.

分裂)に相当するマイクロ波の吸収スペクトルを測定する。試料は通常、マイクロ波空洞共振器の内部に設置されるため、試料に放射線を照射しようとする照射用の窓を空洞共振器に設ける必要がある。マイクロ波の損失を抑えるためには、共振器にあける窓はなるべく小さくすることが望ましいが、一般の X 線源のような発散が大きいビームでは技術的に非常に困難である。これまでの EPR を使う研究では、液体窒素・ヘリウム温度で試料に放射線を試料に照射し、その後低温に保ちながら EPR 室まで運搬し測定を行うのが通常の方法であった。しかしこの方法では、低温でも寿命の短いラジカルは、運搬の途中で消滅してしまい、検出にかからない可能性がある。

我々は、窒素及び酸素 K 吸収端付近の軟 X 線放射光を仮想光子を供給するためのモデル光源として用い、世界でも初めての試みとして、放射光ビームラインに直接接続した EPR 装置を開発した (Fig. 3)¹²⁾。これは SPring-8 のような第 3 世代の放射光光源により、極めて小さい光源サイズ及びビームサイズ特性が実現されたことで初めて可能になったものである。本装置では、その心臓部であるマイクロ波キャビティの側面に設けるビーム導入のための窓や磁場にモジュレーションをかけるためのコイルの間隙を十分に小さくすることができるため (一番狭い場所で 7

Table 1. Parameters of BL23SU and the EPR apparatus

Light source	Variably polarizing undulator
Monochromator	Varied-line-spacing plane gratings (600 and 1000 lines/mm) $\alpha + \beta = 176$ and 174°
Photon flux	$\sim 10^{11}$ photon/sec at 0.5 keV
Photon energy	0.4~1.8 keV
E/ ΔE	$\sim 10^4$ at 0.5 keV
Microwave	X-band, 8.8~9.6 GHz
Maximum magnetic field	1.4 T
Temperature control	10~300 K by a closed-circular cryogenic system
Pressure in vacuum chamber	$\sim 10^{-6}$ Pa

mm), 測定中のマイクロ波の損失を極力抑えることができた。軟 X 線は空気中で極めて早く減衰してしまうため、マイクロ波共振器全体が真空チャンバーに挿入され、ビームラインの真空と接続されている。1 mm (v) × 2 mm (h) に細く絞られたビームは、共振器に開けられた直径 10 mm の窓を通して真空中で試料に照射される。He 循環による温度制御装置で、試料の温度は 10 K まで低温にすることができる。

EPR 装置は、日本原子力研究所の専用軟 X 線ビームラ

イン (BL23SU) に挿入された。このビームラインは、偏光可変のアンジュレータを挿入光源とし、不等折線間隔平面回折格子を分光器として備え、極めて高いエネルギー分解能と明るさを両立させたビームラインである¹³⁾。このEPR装置及び試料位置でのビームの基本的な特性をTable 1に示した。

4. 酸素及び窒素のK殻励起による短寿命のグアニン塩基ラジカル

この装置を使って、DNA塩基のうちの1つであるグアニンのラジカルの“その場観測”を行った。グアニンは、A, T, G及びCの4塩基の中で最もイオン化エネルギーが低い。このためDNA分子中で酸化を受けやすく、

DNA分子内の他の部位で正孔が生じた場合でもグアニンまで移動し、最終的にグアニン損傷を形成することが最近報告され、注目を集めている¹⁴⁾。我々はまず、直接放射線のエネルギーがグアニン分子内にただ1つあるカルボニル酸素に付与された場合のラジカル過程に着目した。軟X線照射により初めて観測された、グアニンのペレットを試料としたときのEPRスペクトルをFig. 4に示す。真空中及び77 Kの条件で軟X線を照射した場合、照射時のみ観測される極めて短寿命のラジカルが現われた (Fig. 4中の矢印)。この短寿命のラジカルのスペクトルを拡大すると (Fig. 5), EPRのマイクロ波飽和特性が異なる2つのコンポーネントからなり (Fig. 5中のa及びb), ビー

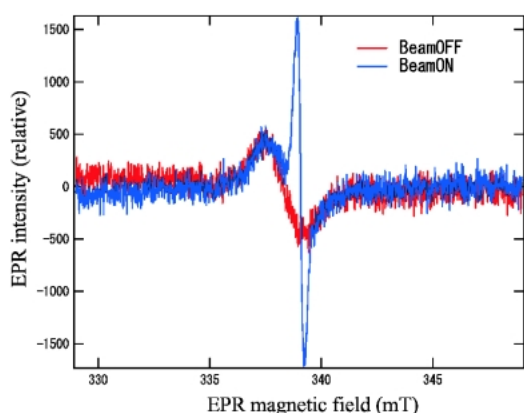


Figure 4. EPR spectra of guanine during irradiation with ultrasoft X-rays (539 eV) at 77 K (a), and just after exposure (b). The microwave power was 200 μ W and the width of the magnetic field modulation of 100 kHz was 0.5 mT.

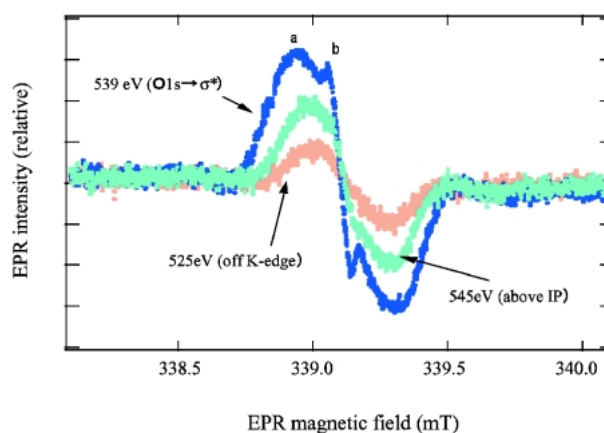


Figure 5. EPR spectra of guanine obtained during irradiation with ultrasoft X-rays around the oxygen K-edge (525, 539 and 550 eV) at 77 K. The microwave power was 200 μ W and the width of the magnetic field modulation of 100 kHz was 0.07 mT.

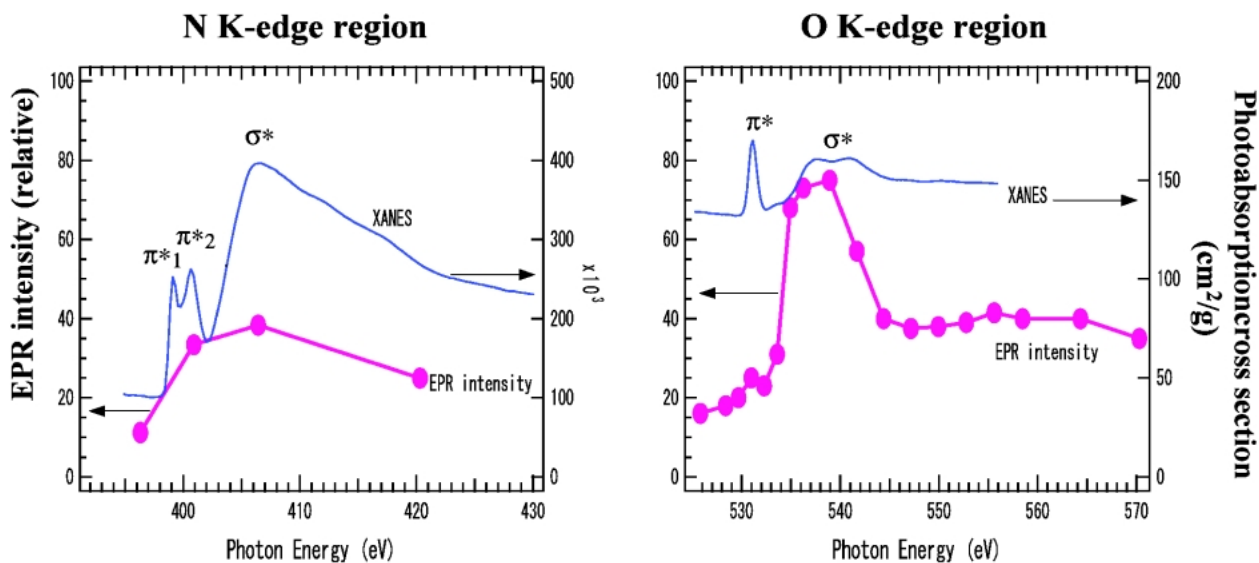


Figure 6. Ultrasoft X-ray energy dependence of the yield of the short-lived guanine radical. The intensity of peak a (see Figure 5) is plotted against the photon energy around (a) the oxygen and (b) the nitrogen K-edge region (solid line). The intensity was normalized by the incident photon flux. The X-ray absorption near edge structure (XANES) shown by a dot line is reproduced from Fujii et al.

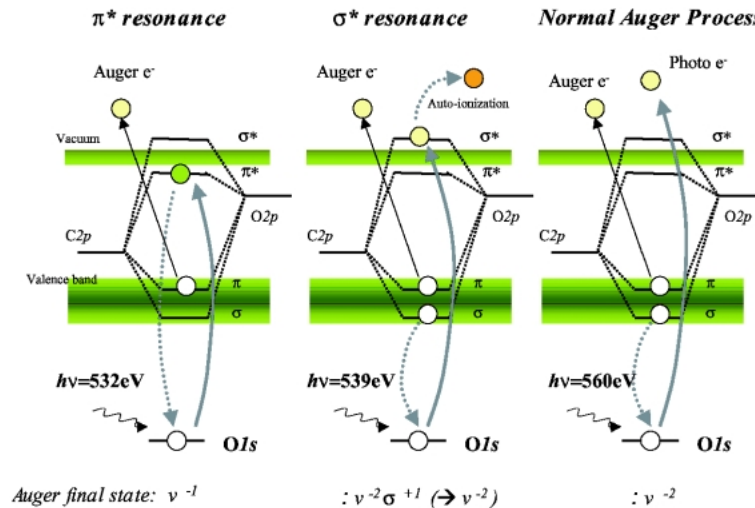


Figure 7. Schematic illustration of the participant, spectator and normal Auger processes in the guanine carbonyl oxygen.

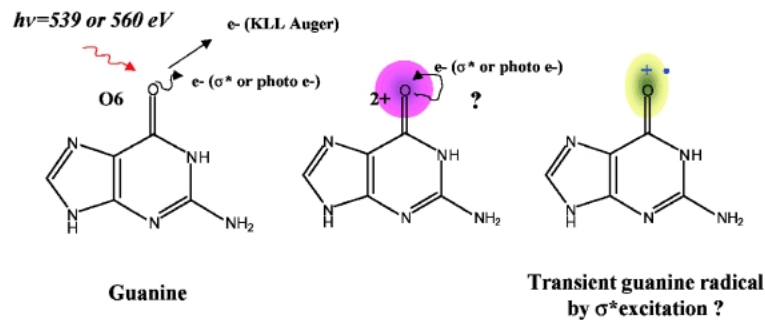


Figure 8. Schematic illustration of the short-lived guanine radical formation after resonant Auger process.

ムを切っても残る安定なラジカルのそれ (Fig. 4, b) とは明らかに区別された。

次に軟 X 線のエネルギーを少しずつ変えながら、短寿命のラジカルの強度を測定した。酸素の K 殻を励起する 539 eV の照射により短寿命ラジカルの信号強度は大幅に増感し、K 吸収端低エネルギー側 (524 eV) の場合のその 5 倍以上であった (Fig. 6, a)¹⁵⁾。539 eV の軟 X 線照射では分子中にただ 1 つあるカルボニル酸素の 1s 電子の O=C 結合を構成する σ^* 反結合軌道への励起と、これに続く Auger 緩和が起きることが予想される¹⁶⁾。一方 π^* への励起が起きると考えられる 531 eV では、大変に興味深い事に EPR シグナルの増感はほとんど起こらなかった。さらに、窒素原子はグアニン分子環中に 5 つあるのにも関わらず、窒素の K 吸収端 (401 eV) の近傍では短寿命ラジカルの EPR 信号強度は酸素 σ^* 励起した場合のそれに比べ全体に小さいことも明らかになった (吸収断面積で規格化すると $\sim 1/10$ 以下である) (Fig. 6, b)。

以上の結果から、グアニン損傷のラジカル過程にカルボニル酸素の K 殻共鳴励起が大きな役割を果たしている可能性が示された。酸素 1s 電子が O=C 結合を形成する分

子軌道へ共鳴励起する様子を Fig. 7 に模式的に示す。軟 X 線のエネルギーを変えると、励起先及び Auger 緩和による終状態も変わる。 π^* 、 σ^* 及びイオン化閾値以上のエネルギーで、それぞれ Participant, Spectator 及び Normal と呼ばれる Auger 緩和が起こると考えられる。 σ^* 電子は時間の経過とともに自動電離すると予想される。しかし不対電子として EPR で観測されるためには、価数は 1 価でなければならない。今回観測されたグアニンの短寿命ラジカルは、自動電離したほとんど運動エネルギーがゼロに近いような電子が、元の分子イオンに再捕獲された結果生じたラジカルであると推測される (Fig. 8)。

5. 安定なグアニンカチオンラジカル

ビーム照射を停止しても観測される安定なラジカルに由来するスペクトル (Fig. 4, b) は、既に報告されている γ 線を照射した時に観測されるスペクトル¹⁷⁾ と似ていることから、グアニンカチオンラジカル (Fig. 9) と推測された。このラジカルについて、酸素の 1s $\rightarrow \sigma^*$ 励起 (539 eV) 及び K 吸収端低エネルギー側 (524 eV) の二つのエネルギーを照射した際の、照射時間に対する収量の増加を調べ

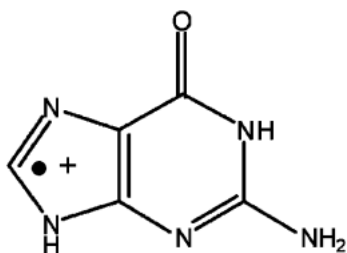


Figure 9. Schematic illustration of the long-lived guanine cation radical.

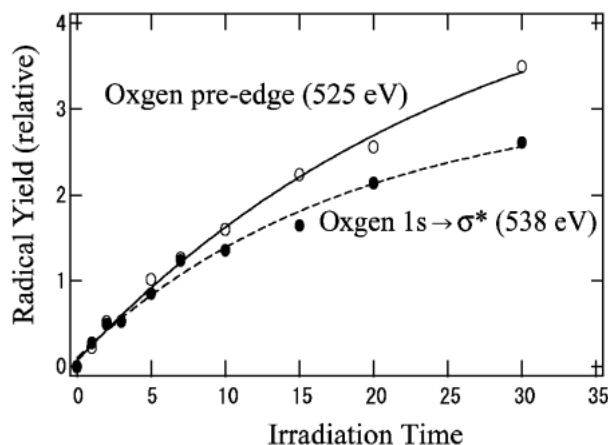


Figure 10. Dose response curves of the long-lived guanine cation radical.

た。得られた結果を、Fig. 10に示した。どちらのエネルギーを照射した場合でも、ラジカル収量は照射時間（照射線量）に比例せずに次第に飽和して行く様子が観測された。これは試料表面近くで生成したカチオンラジカルが、照射により二次的に壊れてしまうためであると推測される。また興味深いことに、上述した短寿命ラジカル収量は酸素の $1s \rightarrow \sigma^*$ 励起で顕著な増大を示したのに対して、カチオンラジカルは逆に酸素の $1s \rightarrow \sigma^*$ 励起で K 吸収端低エネルギー側に比べて30%ほど減少してしまう。これらの結果から、短寿命及び長寿命の二つのラジカル過程は、お互いに競争関係にある別経路で生成していることを示していると考えられる。現在、窒素 K 吸収端近傍での収量の測定実験も進めている。

分析化学的な手法以外にも、酸化的塩基損傷を認識し切り出す修復酵素（Fpg などのグリコシラーゼ）をプローブとして利用し、実際の DNA 試料中ではどちらのラジカル経路が最終的な 8-oxo-G などの最終的なグアニン損傷に結びつくかを今後明らかにして行く予定である。

6. まとめ

DNA の放射線損傷のメカニズムを解明する目的で、高輝度軟 X 線ビームラインに直接接続した EPR 装置の開発を行って来た。この装置を用いて、DNA 塩基のひとつで

あるグアニンの軟 X 線照射により生成するラジカルを“その場”測定により調べた。その結果、これまで観測されたことのないビーム照射中のみ現れる短寿命のラジカルが生成することを見出した。さらにこのラジカルは、グアニン分子中のカルボニル酸素の $1s \rightarrow \sigma^*$ 励起によりその収量が増大することもわかった。一方、ビーム照射により次第に蓄積して行くカチオンラジカルは、逆に酸素の $1s \rightarrow \sigma^*$ 励起により収率が減少した。これらの知見の集積により、DNA の酸化的塩基損傷生成メカニズム解明の端緒が拓かれると期待される。

謝辞

SPring-8, BL23SU 担当の原研の吉越章隆博士、藤森伸一博士、光学系の調整では斎藤祐児博士にお世話になりました。また、東京農工大学の鶴飼正敏博士及び原研の馬場祐治博士には、内殻励起分子とその Auger 緩和過程に関する助言・議論をして頂きました。最後に、本研究は原研の赤松憲博士、藤井健太郎博士と共に行ったものです。以上の方々に、心より感謝いたします。

参考文献

- 1) D. T. Goodhead: *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 7 (1994).
- 2) J. F. Ward: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95 (1980).
- 3) A. Yokoya, S. M. T. Cunniffe and P. O'Neill: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8859 (2002).
- 4) A. Yokoya, S. M. T. Cunniffe, D. Stevens and P. O'Neill: *J. Phys. Chem B* **107**, 832 (2003).
- 5) M. A. Chaudhry and M. J. Weinfeld: *J. Mol. Biol.* **249**, 914 (1995).
- 6) M. H. David-Cordonnier, J. Laval and P. O'Neill: *J. Biol. Chem.* **275**, 11865 (2000).
- 7) L. Harrison, Z. Hatahet, A. A. Purmal and S. S. Wallace: *Nucleic Acid Res.* **26**, 932 (1998).
- 8) C. von Sonntag: *Chemical basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, London. (1987).
- 9) 藤井健太郎: 放射光 **16**, 151 (2003).
- 10) R. L. Platzman: *Vortex* **23**, 372 (1962).
- 11) K. Hieda, Y. Hayakawa, A. Ito, K. Kobayashi and T. Ito: *Photochem. Photobiol.* **44**, 379 (1986).
- 12) A. Yokoya and K. Akamatsu: *Nucl. Instr. Meth. A* **467-468**, 1333 (2001).
- 13) Y. Saito, T. Nakatani, T. Matsushita, A. Agui, A. Yoshigoe, Y. Teraoka and A. Yokoya: *Nucl. Instr. Meth. A* **474**, 253 (2001).
- 14) T. Melvin, S. M. T. Cunniffe, P. O'Neill, A. W. Parker and T. Roldan-Arjona: *Nucleic Acid Res.* **26**, 4935 (1998).
- 15) A. Yokoya, K. Akamatsu and K. Fujii: *Int. J. Radiat. Biol.* to be published.
- 16) K. Fujii, K. Akamatsu and A. Yokoya: *Nucl. Instr. Meth. B* **199**, 249 (2003).
- 17) D. M. Close, E. Sagstuen and W. Nelson: *J. Chem. Phys.* **32**, 4386 (1955).

著者紹介



横谷明德

日本原子力研究所・先端基礎研究センター・放射線 DNA 損傷機構研究グループ(放射光科学研究センター兼務)主任研究員

E-mail: yokoya@popsvr.tokai.jaeri.go.jp

専門：放射線生物物理学

(SPring-8 共同チーム)
 1992年 1月 博士(理学)(筑波大学)
 2000年 3月 英国 Medical Research Council 客員研究員
 2001年 4月 日本原子力研究所放射光科学研究センター副主任研究員
 2004年 4月 日本原子力研究所先端基礎研究センター(放射光科学研究センター兼務)主任研究員
 SPring-8 の軟 X 線ビームライン (BL23SU) の建設・立ち上げを行うと同時に、生体分子に関する分光実験を続けている。2004年 4月から新たに、“修復され難い DNA 損傷”の実体の解明に向けたプロジェクトを開始し、新しい展開を図る予定である。

略歴：

1991年 3月 筑波大学大学院生物科学研究科博士課程後期単位取得退学

1991年 4月 日本原子力研究所大型放射光計画推進室

Production Mechanism of DNA Bases Radical Induced by Inner-shell Excitation

Akinari YOKOYA Advanced Science Research Center, Japan Atomic Energy Research Institute
 2-4, Shirakatashirane, Tokai, Naka, Ibaraki, 319-1195, Japan

Abstract

To reveal the precursor of oxidative nucleobase damages, such as 8-oxo-G in a DNA molecule, induced by ionizing radiation, DNA base radicals were examined around oxygen and nitrogen K-edge region using an EPR spectrometer installed in a synchrotron soft X-ray beamline (BL23SU) in SPring-8. In situ measurements of EPR spectrum of guanine base revealed that short-lived transient radical species are specifically induced by photoexcitation of a 1s electron to σ^* antibonding orbital at the carbonyl oxygen atom. They promptly disappear by “beam-off”. On the other hand, a long-lived radical whose EPR spectrum is consistent with previous reports for guanine cation radical was accumulated during the irradiation. The stable radical shows a smaller yield by the oxygen σ^* resonance than that by irradiation at off-resonance energy. These results indicate that these two radical processes would be induced competitively after decay from the Auger final state.