

水溶液生体分子構造に対する
放射光励起・液体分子線分光研究（後編）

東京農工大学大学院 工学研究院

島田 紘行, 鵜飼 正敏*

A new spectroscopic research of radiation induced damage on DNA and its constituent molecules is proposed, which is made possible using a liquid microjet technique for bio-solution under vacuum in combination with synchrotron-radiation aided site-selective excitation. The latter part of the proposal article describes the present state of research on the selective primary radiation interaction by looking at base moieties of nucleotides. X-ray absorption near edge structure (XANES) spectra at energies around the nitrogen K-edge for nucleotides, adenosine-5'-monophosphate (AMP), guanosine-5'-monophosphate (GMP), cytidine-5'-monophosphate (CMP), and adenosine-5'-triphosphate (ATP) in aqueous solutions are presented. Selective excitation of a base moiety using a synchrotron radiation allows us to investigate the interaction of the base moiety with water solvent. We discuss the change of spectral character of XANES which reveals to the structural change of the base moiety under different pH environmental condition of water solution. Through the present research a scope for cooperative direct and indirect primary radiation effects is given.

Keywords: liquid microjet, DNA, nucleotide, site-selective synchrotron-radiation irradiation, X-ray Absorption Near Edge Structure (XANES)

Liquid microjet synchrotron-radiation spectroscopy for bio-molecules in water solution II
Hiroyuki SHIMADA and Masatoshi UKAI* (Department of Applied Physics, Tokyo University of Agriculture and Technology),
〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16
TEL: 042-388-7222, FAX: 042-385-6255,
E-mail: ukai3@cc.tuat.ac.jp

1 はじめに

本稿前編において、日本原子力研究開発機構との共同研究により進めている、生体分子、特に DNA の放射線損傷に関する時間発展的な分光実験の目的と原理、そして研究開発の現状について、水についての成果を示すことにより解説した¹⁾。後編では、新規開発された方法を用いて得られた、DNA 構成要素であるヌクレオチドの結果について述べる^{2,3)}。

本解説では、DNA, RNA といった遺伝情報物質の放射線損傷における直接効果を観察対象とし、試料として注目するのはこれらの物質の構成単位であるヌクレオチドである。ヌクレオチドは核酸塩基、糖 (DNA ではデオキシリボース, RNA ではリボース)、およびリン酸からなる分子であり (Figure 1)、リン酸と糖のエステル結合により DNA, RNA の鎖状構造がつけられている。試料分子を含む水溶液分子線に対する軟 X 線領域のシンクロトン放射光励起による分光実験が本解説の概要である。

前編で述べたように、細胞中の DNA は、分子自体の構造とともにその周囲に存在する水素結合のネットワークにより二重に規定された安定構造があり自己修復をうながす形状記憶の役割があると考えられる。また、放射線によって誘起された非定常状態が定常状態へと緩和する際に、放射線照射前の定常状態に回帰する可能性があると考えられる¹⁾。そこで放射線照射後の緩和現象における不安定化学種の生成・消滅を時間発展的に追跡することを通じて途中経路を共有しながら損傷・修復にいたる択一的な反応経路を明らかにすることができると考えられる。後編では放射線によって誘起される反応の起点となる元素と分子内結合サイトに特有な励起過程に着目する。すなわち、窒素の K 殻吸収端付近のエネルギー領域の単色化放射光を用いたヌクレオチドの内殻吸収端近傍軟 X 線吸収スペクト

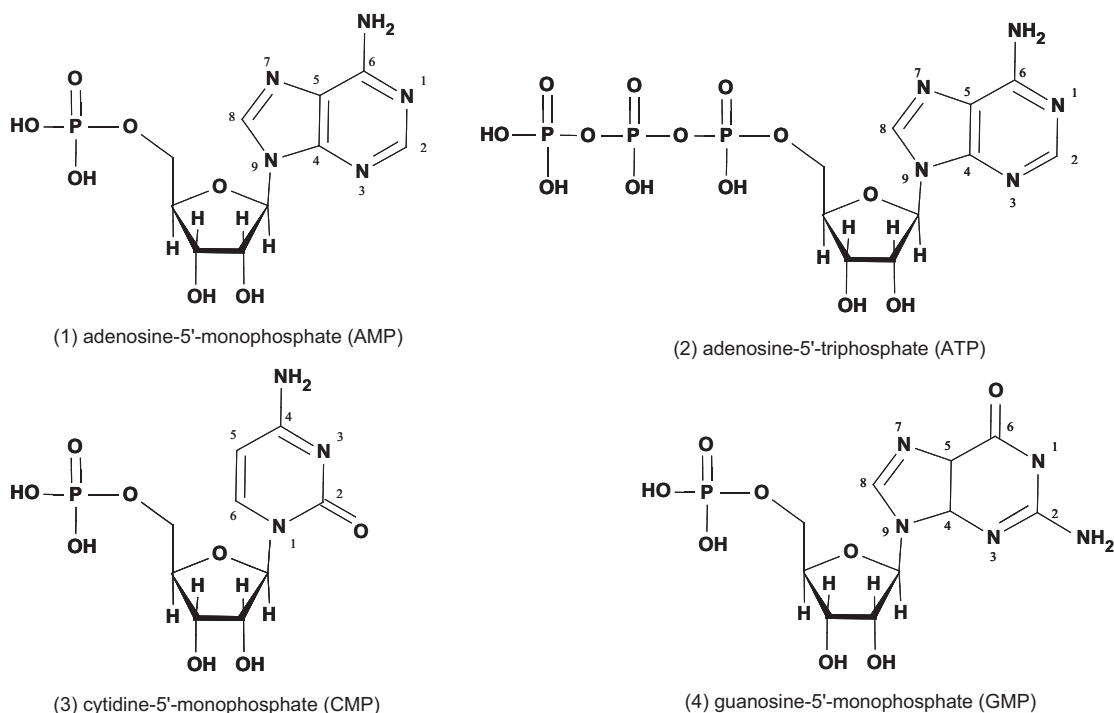


Figure 1. Structural diagrams of the nucleotides examined in the present study: (1) adenosine-5'-monophosphate (AMP), (2) adenosine-5'-triphosphate (ATP), (3) cytidine-5'-monophosphate (CMP), and (4) guanosine-5'-monophosphate (GMP).

ル (XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure) の結果と意味について解説する。

1.1 放射光による放射線初期相互作用のサイト選別

シンクロトロン放射光のエネルギー選択性という特徴は、放射線誘起反応の起点を分子内結合サイトまで選択してエネルギー付与を起こさせることを可能にした。また、量子化学計算が通常のパソコンでも簡便に行うことができるまでにパッケージ化され、分光実験との組み合わせにより重要なツールとなった。放射光による分子内サイト選択的励起については前編でも述べたが、後編の内容に即して概説する。

ヌクレオチドに含まれる元素の内殻吸収端は、上述した窒素の K 殻吸収端が 400 eV 付近にあるほか、酸素の K 殻吸収端は 530 eV 付近に、炭素の K 殻吸収端は 300 eV 弱に、リンの K 殻、 L_I 殻の吸収端は、それぞれ、2145 eV, 189 eV 付近にある。また水溶液試料を用いるため、溶媒の水の酸素の内殻吸収がある。これらの元素の吸収断面積 (イオン化断面積) は 400 eV 付近の窒素吸収端近傍では軟 X 線エネルギーの増大とともに、なだらかな単調減衰を示すことが知られて

いる⁴⁾。これに対して窒素原子では、エネルギーの増大とともに K 殻電子の非占有軌道への励起、そして、イオン化という劇的な応答を示すため、これらの電子遷移の有無を反映して断面積の増減が生じ、400 eV 付近のエネルギー領域の XANES スペクトルに見られる断面積強調はすべて窒素によるものと考えることができる。Figure 1 に示したとおり窒素原子はヌクレオチド内の塩基部位にのみ含まれており、窒素に注目して観測する電子遷移は塩基部位の選択励起に相当するものである。したがって、窒素の K 殻吸収端付近の XANES スペクトルはヌクレオチド内の塩基部位が水溶液中でどのような溶媒相互作用を受けているかについての重要な知見を与えるものと期待される。

また、このエネルギー領域は酸素の内殻吸収よりも低エネルギー側にあり、いわゆる“水の窓” (water window) と呼ばれ、溶質分子に水の吸収による放射線遮蔽効果が出にくい領域であるため、分子は直接的な放射線相互作用を受けやすく、これらの吸収極大は放射線損傷と密接な関係をもつと想像される。Figure 2 は異なるエネルギーの軟 X 線に対する原子の感受率に相当する吸収断面積の大きさを原子の大きさとして示

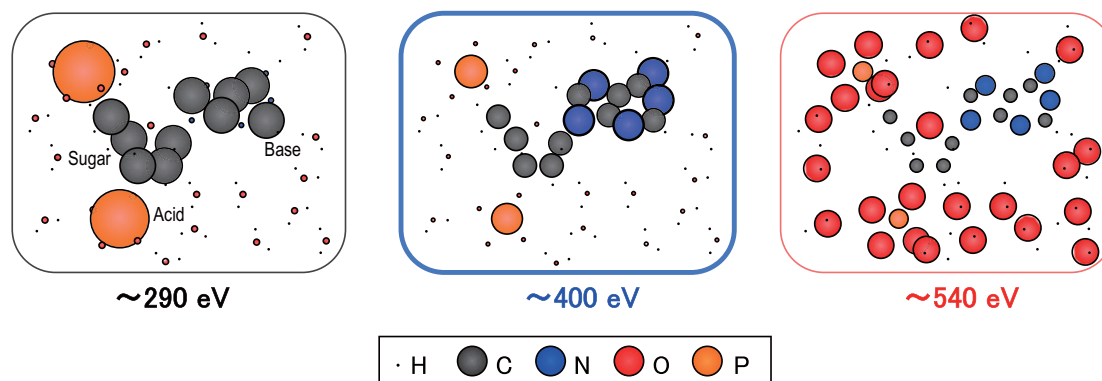


Figure 2. Pictorial image of contributions of cross sections of constituent atoms of AMP in a strand to radiation damage. The sizes of atoms represent the amplitudes of atomic X-ray absorption cross sections.

した模式図である。

1.2 放射線損傷における間接・直接同時相互作用

前編では放射線効果を直接効果と間接効果に大別し、特に近年その重要性の高さが再認識されているDNA, RNAへの直接効果が本解説のねらいとする観測対象であることを述べた。また、間接効果においては細胞液の主成分である水に由来するOHラジカルの反応が重要な寄与を果たすものと理解されていることにも触れた。DNAを直接的に攻撃する粒子の反応活性という点ではラジカル反応は重要であると考えられるが、そのほかにも溶媒によって間接的に誘起される反応があるのではないかとこの点に着目する。OHラジカル等の間接効果に関わる二次粒子は、細胞液中を拡散する途中でラジカル捕捉剤としてはたらく数多くの不純物分子と出会って消滅する。これに対して、 $\text{H}^+(\text{H}_3\text{O}^+)$ や OH^- のようなイオン種は酸・塩基中和反応でよく知られているように、電子移動によって水素結合間を容易に飛び回り電荷の安定局在位置まで高速に拡散する。電荷の安定局在位置として重要なものに、非共有電子対をもつ原子の存在する分子内サイトがあると考えられる。このような電荷拡散により非共有電子対の存在する原子にプロトン化、脱プロトン化の構造変化が起こると、分子内の電荷密度が変化し、軌道エネルギーに化学シフトを生じる。いわば、放射線照射による酸・塩基イオン強度の変化という間接効果の存在下で、分子への直接放射線相互作用もまた影響を受けることになる。このような観点もまた、本研究におけるねらいの一つである。ここでも、単色化されたシンクロトロン放射光によるエネルギー選択的励

起が有効な方法となると考えられる。

2 実験方法

実験は前編と同じく西播磨科学公園都市にあるSPRING-8大型放射光施設内の日本原子力研究開発機構ビームラインBL23SUの生物分光ステーションにおいて行った。

水溶液試料には、Milli-Qシステムを用いて精製された純水にヌクレオチド（グアノシン-5'-リン酸（GMP）、シチジン-5'-リン酸（CMP）、アデノシン-5'-リン酸（AMP）、アデノシン-5'-3リン酸（ATP））のナトリウム塩粉末を溶解させ、必要に応じて水溶液のpHを調整したのち、0.45 μm の細孔径の滅菌フィルターを通過させて会合体を除去したものをを用いた。水溶液試料をクロマトグラフ用の送液ポンプにより加圧し、直径20 μm の白金製ノズルを介して液体分子線を発生させた¹⁾。水に対するヌクレオチドの濃度は、AMP, ATP, GMPでは0.1 g/mLであり、CMPでは0.1 g/mLおよび0.2 g/mLである。液体試料は高濃度ながら透明で、赤色レーザー光を通してチンダル現象がほとんど見られないまでに溶解されていることを確認した。また、CMP試料で確認したところ異なる濃度に対するスペクトルの変化はなかった。以上から水溶液中のヌクレオチドには会合はなく、均質に溶解したものと考えている。比較のため、上記により調製した液体試料をシリコン基板上に滴下・乾燥させたヌクレオチドの固体薄膜を作製した^{2,3)}。なお、室温でも分解してしまうヌクレオチドでは真空蒸着膜を作ることができないため、滴下乾燥の方法を用いたが、ヌクレオチドで

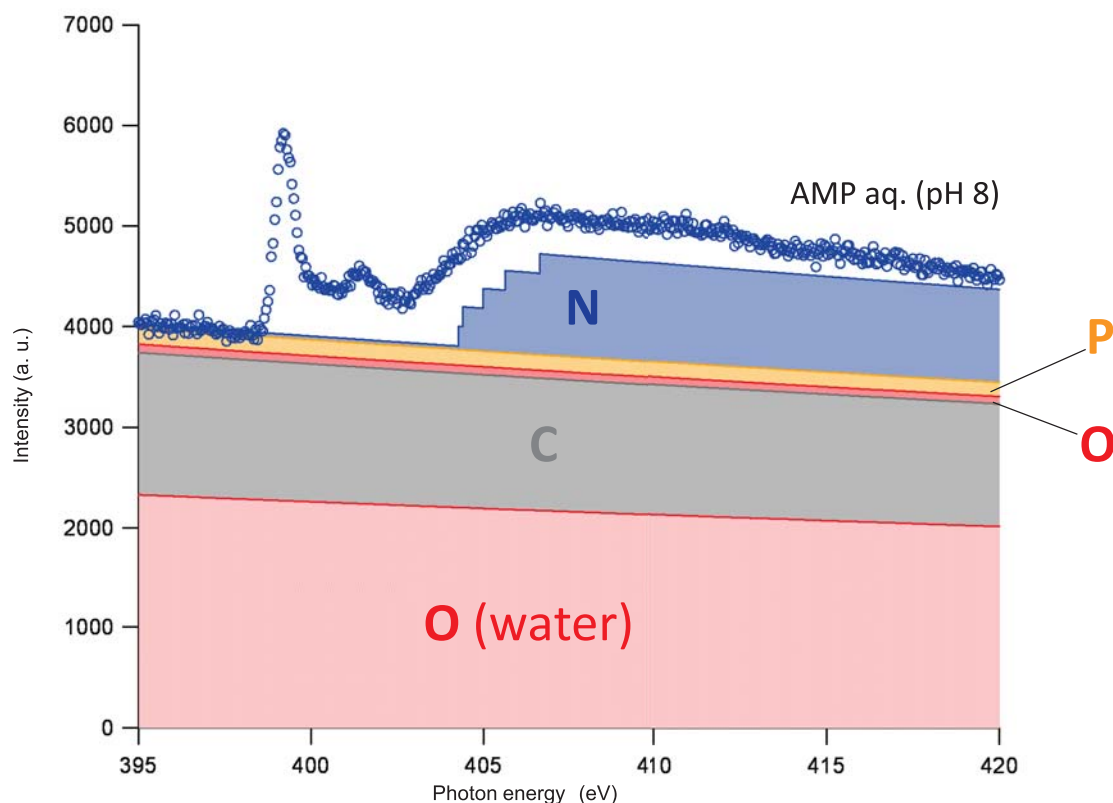


Figure 3. Ejected electron yields of AMP as a function of X-ray photon energy. The contribution of cross sections of constituent atoms in AMP is accounted (see text).

なくアデニン塩基の参照試料を作る際には、真空蒸着によりシリコン基板上に固体薄膜試料を作製した⁵⁾。

水溶液試料の実験には液体分子線分光装置を用い、二段の集光鏡により $50\ \mu\text{m}$ 程度のスポットにまで集光した放射光を液体分子線試料に照射し、放出される電子を静電レンズシステムを通し、エネルギー分析器は動作させずに計測し、放射光エネルギーの関数として X 線吸収スペクトル (XANES) を求めた。また、固体薄膜試料は、同一のビームラインに接続された別個の照射真空装置を用い、放射光照射時の試料の放出電流を測定することにより XANES を求めた。水溶液試料と固体薄膜試料の測定における光源の分光特性は同一であり、共通のエネルギー軸上で比較できる。単色化放射光のエネルギー幅は水溶液試料の場合、測定範囲において $0.38\ \text{eV}$ であり、その強度はおおよそ $10^{11}\ \text{photon/s}$ である。固体薄膜試料の場合には試料の光電子放出による帯電を防ぐためにさらにエネルギー幅をせばめ、放射光強度を減じて照射したが、後述のとおりエネルギー幅の違いによる変化は見られな

かった。

3 結果と考察

3.1 ヌクレオチドの窒素 K 殻吸収端付近の XANES スペクトル²⁾

まずはじめに Figure 3 に、AMP の水溶液試料について得られた放出電子収量を示す。これはヌクレオチドを構成する窒素、リン、酸素、炭素、および、溶媒の水の原子数と断面積^{6,7)} の比を考慮して放出電子収量への寄与を割り当てたものである (水素の断面積の寄与はほとんど皆無といえる程度であるため無視した)。窒素の断面積は内殻吸収の寄与の含まれていない $395\ \text{eV}$ – $398\ \text{eV}$ 付近 (もっとも低エネルギーのピークよりもさらに低エネルギー側) における $2s$, $2p$ 電子遷移のものを用いた。1.1 節で述べたとおり、窒素以外の原子の内殻吸収端から十分に離れているため、断面積に振動的な変化を生じさせているものは窒素だけであり、すなわち、ヌクレオチド中の塩基部位の

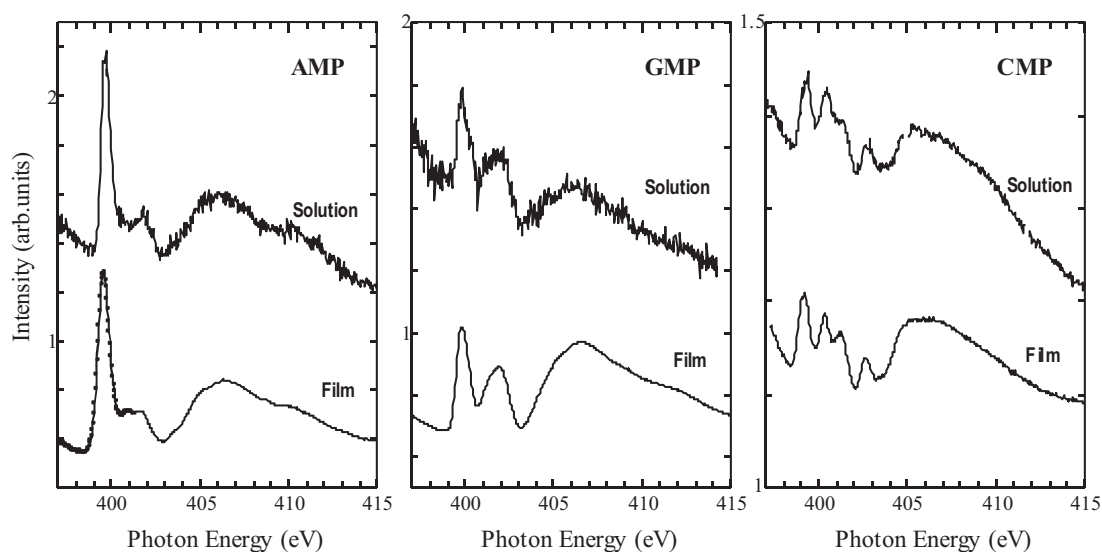


Figure 4. XANES spectra of nucleotides (AMP, GMP, and CMP) in aqueous solutions (Solution) and thin solid films (Film) as a function of photon energy.

選択的内殻遷移によるものである。また、窒素とそれ以外の原子の断面積への寄与は原子数比と断面積比（特にバックグラウンドの主要部を占める水との比）をほぼ反映していることから、前節で述べたようにヌクレオチドは水溶液中で均質に溶解していると考えられる。以下では、初期の結果である Figure 4 では液体分子線試料の位置の経時変化が見られたため縦軸スケールは全電子収量で示すが、それ以降のスペクトルは窒素以外の断面積の寄与を差し引いたものを示す。Figure 4 には AMP, GMP, CMP の固体薄膜試料、ならびに、水溶液中の試料についての、X 線エネルギー 396 eV–415 eV における XANES スペクトルを示す²⁾。上述のように縦軸の数字は任意単位で示した水溶液分子線から放出された電子の収量である（Solution と書かれた上側のものについて）。Film と書かれたものは固体薄膜試料の XANES スペクトルである。スペクトル中のピークエネルギーのみの比較であるため、固体薄膜の XANES は、強度変化を水溶液試料のものにそろえ、適宜、縦軸位置をシフトさせて示した。

いずれも 400 eV 付近の電子収量のピーク状の増大（以下、ピークと略す）と 405 eV 付近のなだらかな極大が特徴的である。400 eV 付近のピークと 405 eV 付近のなだらかな極大は、おおまかには、窒素 $1s \rightarrow \pi^*$ 励起と σ^* 励起に相当すると帰属できる^{2,8)}。

まず、XANES には Table 1 のように窒素 $1s \rightarrow \pi^*$ 励起の断面積ピークが出現しており、それぞれ該当す

る塩基分子の XANES とを比較すると^{9–11)}、そのエネルギーはおおむね一致する。しかし、塩基では見られていなかった断面積ピークも出現しており、AMP では 401.7 eV の、GMP では 401.8 eV の、CMP では 401.3 eV のピークが新たにみられている。ヌクレオチドの塩基サイト内の窒素原子（AMP, GMP では N9, CMP では N1）が糖に結合しているのに対して、塩基分子そのものではこれらの窒素原子は水素と結合することによる化学シフトの違いの反映ではないかと考えている。

次に水溶液中の AMP, GMP, CMP についての XANES スペクトルに注目すると、一見してわかるように、水溶液試料と固体薄膜試料とでは、測定 of S/N の違いがあるものの、スペクトルの概形にはほとんど違いが見られない。また Table 1 に示すように、窒素 $1s \rightarrow \pi^*$ 励起による断面積ピークのエネルギーにも有意な差は見られない²⁾。環境の違いが分子の電子状態に及ぼす影響は、XANES スペクトルで観察した場合には、内殻軌道エネルギーだけでなく吸収の上準位である非占有軌道にも現れる。しかも、ほぼ原子核付近に局在する内殻軌道に比べ、分子軌道である非占有軌道にはより大きな環境の違いが現れるのではないかと予想したが、このように水溶液と固体とで大きな違いがないということは著者らにとって驚きであった。その原因は以下のいずれかではないかと考えられる。すなわち、(1) ヌクレオチドの水への溶解は、主とし

Table 1. Observed energies for N 1s→ π^* for AMP, GMP, and CMP in the form of thin solid films and aqueous solutions.

	Film (eV)	Solution (eV)
AMP	399.6	399.7
	400.9	400.9
	401.7	401.8
GMP	399.8	399.8
	401.3	401.3
	401.8	401.9
CMP	399.2	399.3
	400.3	400.4
	401.3	401.4
	402.7	402.7

て、電離したリン酸基の水和による。塩基分子そのものの溶解度はいちじるしく低い。いわば、ヌクレオチド中の塩基部位は疎水的であるため、水溶液中でも塩基部位には強い水和による非占有軌道エネルギーの化学シフトが生じていない。もしくは、(2) X線結晶構造解析による DNA の水和水はヌクレオチド一単位当たり 2 分子程度とされているが、本研究のように分子としてのヌクレオチドを溶解させた場合にはより多くの水分子が水合している可能性がある。ヌクレオチドの固体薄膜試料は水溶液試料を乾燥させて作製したため、乾燥させても除去できない結晶水状の水が含まれている。水溶液試料も固体薄膜試料もほぼ同様な水合の影響下にあり、二種類の試料の XANES スペクトルに大きな違いがなかった。以上の二つであるが、結論としては次節に述べるようにこの原因は (2) に落ち着いた。また、密度汎関数法による塩基の水和状態についての計算を行っているところであるが、その結果も (2) を支持している¹²⁾。

3.2 XANES スペクトルに見る塩基部位の構造変化と電子状態変化³⁾

3.2.1 アデニン塩基をもつヌクレオチドの XANES スペクトル

Figure 5 に示す XANES はアデニン塩基部位を持つ (i) AMP と (ii) ATP, ならびに、(iii) アデニン分子のものである。ここではピークエネルギーだけでなくスペクトル形状についても比較するために、上述のとおり窒素以外の断面積の寄与を差し引いたものを示す。

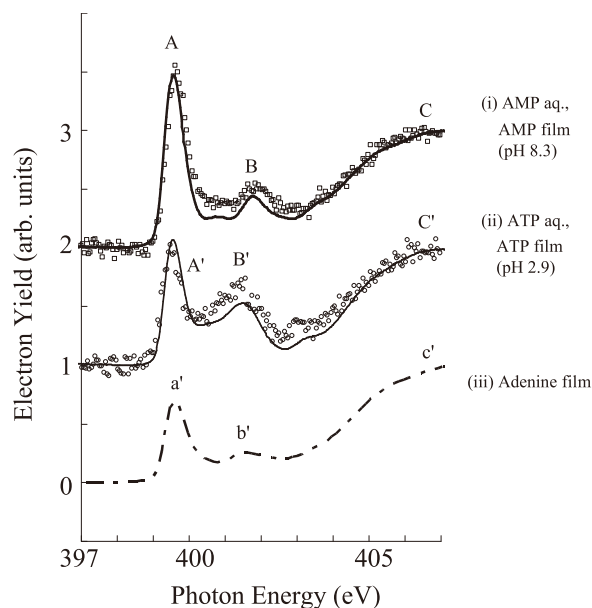


Figure 5. XANES spectra of AMP, ATP, and adenine. Open squares (i) and open circles (ii) represent the yields for AMP and ATP in aqueous solution; solid curves, the yields for AMP and ATP in thin solid films; and dot-dashed curve in the bottom (iii), the yield for adenine film.

ドットで示したものが水溶液試料に対する XANES であり、実線あるいは破線で示したものが固体薄膜試料に対するものである³⁾。また、Figure 4 で見たように、AMP だけでなく ATP の場合でも、水溶液試料と固体薄膜試料の XANES はほぼ同様であり、必要に応じてヌクレオチドの固体薄膜試料の XANES によって水溶液試料の XANES を代用できると考えられる。これらのスペクトル構造に顕著なものは 400 eV 前後の二つの窒素 1s→ π^* 励起による断面積ピーク (AMP では A, B, ATP では A', B', アデニンでは a', b'。以下、同様) と、403 eV あたりからはじまるゆるやかな σ^* 励起の断面積増大である (C, C', c')。いずれもアデニン分子内のそれぞれに対応する同一の電子遷移に由来するものであろうことを示唆する。しかし、以下に述べるように AMP と ATP の XANES スペクトルはまったく同一ではない。まず、A, A', a' の断面積ピークのエネルギーは気相で得られたものにほぼ一致する。ところが、ピーク A'(ATP) の断面積の大きさはピーク A(AMP) のものに比べて 30 % 程度小さい。また、ピーク B' (ATP) の極大は 401.3 eV にあり、ピーク B

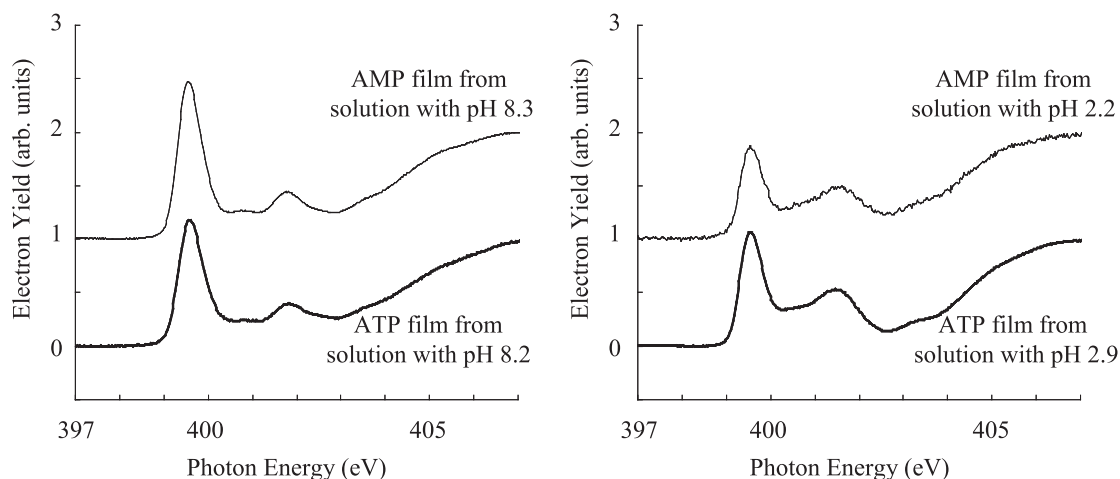


Figure 6. XANES spectra of AMP and ATP at different pH.

(AMP) の極大よりも 0.6 eV 程度低エネルギー側にシフトしており、かつ、ピーク B' (ATP) は幅が広く面積強度としてもピーク B (AMP) よりも大きい。二つのピークの間で断面積の逆転が起こっているかのようである。他グループにより報告された ATP の XANES スペクトルも同様な特徴が見られている¹³⁾。AMP と ATP、ともにヌクレオチド中のアデニン部位の選択励起を観測しながらこのような違いが生じるのはどのような原因によるものであろうか？ まず、AMP と ATP とではリン酸基長が違う。しかし、アデニン部位は糖の電子状態変化を介してリン酸基の影響を受けるため、リン酸基の長さだけでこのようなスペクトル変化が生じるとは考えにくい。あるいは、水溶液中ではリン酸基が塩基と直接に相互作用するような立体配置にあるのだろうか。しかし、親水基であるリン酸基は強く水和され、アデニン部位とは水和圏の障壁によって隔てられているのではないだろうか。これに対して、AMP と ATP の違いを明快に説明する以下のような直接的な実験結果を得た。

3.2.2 pH 変化に対するアデニン部位の構造変化

Figure 5 の測定では、AMP、ATP 試料をほぼ等濃度になるように純水に溶かしただけの水溶液試料を用いたため、これらの試料の置かれた水溶液環境は同様であると考えていた。しかし pH を測定すると、AMP 水溶液では pH 8.3 であり、ATP 水溶液では pH 2.9 であった。したがって水溶液中での酸・塩基イオン強度の違いがアデニン部位の電子状態に影響を与える可能性が示唆される。しかし、前節最後に述べたように、

水溶液試料と固体薄膜試料の XANES が同様であることの原因を、当初は、(1) の“塩基の疎水性”ではないかと考えていたため、酸・塩基イオン強度の違いによる影響は意外だった。

Figure 6 に、AMP と ATP の水溶液の pH をほぼ同様に調製したうえで、シリコン基板上に滴下乾燥した固体薄膜試料についての、窒素 K 吸収端近傍における XANES を示す³⁾。左側が中性付近 (AMP; pH 8.3, ATP; pH 8.2) の水溶液から作製した試料についての XANES であり、右側が酸性水溶液 (AMP; pH 2.2, ATP; pH 2.9) から作製した試料についての XANES である。pH のほぼ等しい水溶液から作製した AMP と ATP の固体薄膜試料についての結果は同一の試料と錯覚するほどによく類似しており、上記した AMP と ATP の XANES スペクトルの違いは、pH による水溶液環境の違いがアデニン部位の電子状態に与えた影響の違いによることがわかった。では、pH による XANES スペクトルの違いはどのようにしてアデニン部位の電子状態に影響を与えたのだろうか？

まず、アデニン部位に存在する 5 個の窒素原子は、Figure 1 の塩基上の番号を付して示すと、次のように異なる結合状態にある¹⁴⁻¹⁶⁾。

- A) 複素環内イミン結合 (=N-) : N1, N3, N7
- B₁) 複素環の C6 位に結合するアミノ基 (-NH₂) : N6'
- B₂) 複素環内アミン結合 (>N-) : N9

気相におけるアデニン分子の X 線光電子分光実験とその量子化学解析により、これらの窒素原子の 1s 軌

道電子の束縛エネルギーは、 $A < B_1 < B_2$ の順に、約 1 eV の間隔で大きくなると報告されている¹⁴⁾。したがって、これらの電子が同一の空軌道に励起された際に XANES スペクトルに現れる吸収断面積のピークは、X 線エネルギーの増大にともないこの順に出現すると考えられる。また、同一の文献での気相アデニン分子の XANES 測定とその量子化学解析の結果により、399.5 eV (Table 1 では 399.7 eV) の断面積ピークは N1, N3, N7 原子の $1s \rightarrow \pi^*$ 励起によるものであり、401.9 eV (Table 1 では 401.8 eV) の断面積ピークは N9 原子の $1s \rightarrow \pi^*$ 励起によるものと同定されている¹⁴⁾。N6' 原子の $1s \rightarrow \pi^*, 3s$ 励起は 401.9 eV よりやや低エネルギー側に見えるわずかな強度の断面積ピークと報告されている^{11,14)}。ヌクレオチドの XANES スペクトルでは N6' と N9 の断面積ピークはほぼ重なって見えたものと想像される。なお、気相のアデニン分子にはいくつかの互変異構造があることが知られているが¹⁷⁾、報告された量子化学計算は、主成分である正準構造 (Figure 1) に対して行われたものである¹⁴⁾。水溶液中の AMP, ATP のアデニン部位は Figure 1 の正準構造をとると報告されている^{18,19)}。つまり、Figure 5 に A, A' の記号をつけた 399.7 eV の断面積ピークは正準構造においてイミン結合にある窒素の $1s \rightarrow \pi^*$ 励起によるものであり、B, B' の断面積ピークはアミン結合にある窒素の同様の励起に対応するものと同定できる。

ではつぎに、pH の変化によって水溶液中の AMP, ATP の塩基部位にある上記の窒素原子はどのような影響を受けるのだろうか。異なる pH の溶液を結晶化させて構造を調べると、中性付近では正準構造にあるアデニン部位の N1 原子が酸性条件下ではプロトン化されることが報告されている²⁰⁾。N1 のプロトン化反応の平衡定数^{21,22)}を用いて試算すると、Figure 5 の測定条件の下では、AMP (pH 8.3) の 99% の塩基部位は Figure 1 の正準構造にあり、ATP (pH 2.9) の 89% は N1 原子がプロトン化された構造にある。アデニン部位をもつヌクレオチドに限らず、一般にヌクレオチド内の塩基部位は酸・塩基の雰囲気敏感であり、酸性条件下ではイミン結合する窒素にプロトン化が起こり、またアルカリ性条件下ではアミン結合する窒素からプロトン引きぬきが起こる。したがって、中性付近の水溶液中の AMP, ATP ではイミン結合する窒素が 3 個であるのに対して、酸性水溶液中では N1 がプロトン化されることにより 1 個のイミン結合性が失われると考えられる。プロトン化したアデニン部位には複数の共鳴構造が存在するため、単純にイミンの二重結

合が開裂してアミン結合になるとは言い切れないようであるが、このような電子密度の変化により N1 原子の結合状態がアミン結合とイミン結合の中間のようなものに変質するため²³⁾、B, B' と記号をつけた高エネルギー側の断面積ピークに向かってシフトし、これが Figure 5 の XANES スペクトルにおいて A' (ATP) の断面積ピーク強度が A(AMP) と比べて 30% 程度減少し、これに対して、B' (ATP) の断面積ピークが B (AMP) に比べて幅広く、かつ面積強度が大きくなることの原因であったと考察できる。

Figure 7 には Figure 5 の AMP, ATP に加えて GMP の XANES をあわせて示した^{2,3)}。Figure 1 に示したよ

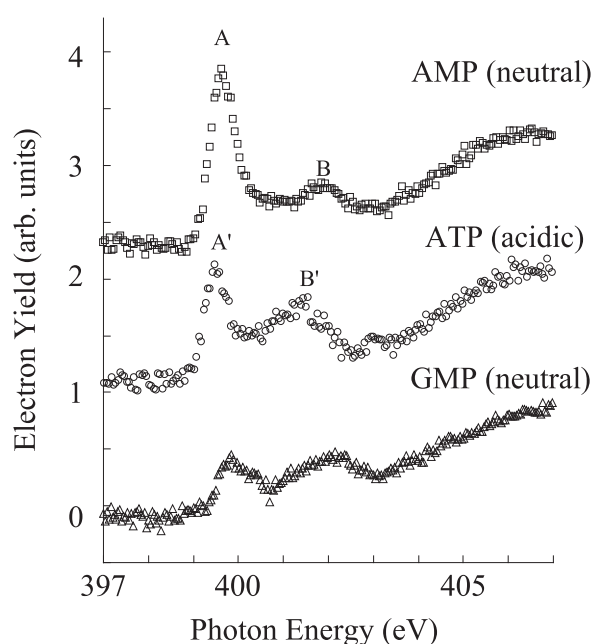


Figure 7. Comparison of the XANES spectra of AMP and ATP in aqueous solutions with the spectrum for GMP.

うに、中性付近の GMP 中には 2 個のイミン結合する窒素原子 (N3, N7) と 2 個のアミン結合する窒素 (N1, N7) 原子、および、C2 に結合するアミノ基を含み、これらの窒素原子の結合状態は酸性水溶液中のアデニン部位と同様である。Figure 7 には示さないが、アルカリ性水溶液では B, B' に相当する断面積強調が弱まり、A, A' に相当する断面積ピークが強調されることが観測され、これは N1 の脱プロトン化による電子状態変化であると考察できる。さらに、シトシン、チミン、ウラシルといったピリミジン誘導体塩基の部位を持つヌクレオチドに対しても、上記と同様な、pH に依

存する塩基部位の構造変化を XANES スペクトル上に観測しつつある²⁴⁾。これらのことから、前節最後に述べた、なぜ水溶液試料と固体薄膜試料の XANES が同様なのかという疑問の原因は、(1) の“塩基の疎水性”によるものではなく、(2) の固体薄膜の塩基部位付近には除去しきれない水分子が存在するためであると思われる。塩基部位はプロトンの授受を行うほど水溶媒との親密な相互作用がある。このような塩基部位が溶媒からの攻撃を容易に受けないように、DNA ではさらに高い親水性をもつリン酸基が二重鎖となって塩基部位を取り囲むことによって疎水環境を作り塩基部位を防護していると考えられるべきなのであろう。

4 終わりに

以上のようにシンクロトロン放射光を用いて水溶液中のヌクレオチド内の塩基部位の選択励起を行うことにより、直接作用における放射線初期過程の断面積を知ることができた。また、水溶液の pH に依存するプロトン化・脱プロトン化の構造変化に注目することにより、放射線効果の起点を塩基サイト選択にとどまらず、塩基内原子の位置まで特定して調べるための糸口を得たと考えられる。

しかし、はたして細胞内で pH 2 などという状況が出現するだろうか。放射線効果の現場からは恐ろしく人工的な、あるいは極限環境下の研究をしているのではないかという批判があるかもしれない。しかし、放射線量が増加し水の解離性電離が起こり、1 個の H^+ あるいは OH^- が発生すれば、近隣の分子がこうむる影響の大きさは pH 2 をはるかに超えた大きなものになるだろう。これらのイオンの移動が電荷移動によるきわめてはやいものであることを考えると、格別の極限環境下でなくとも、pH レベルでは異常とも見える細胞雰囲気、局所的には、容易に発生してしまうと考えることは極端な見方ではないと思われる (Figure 8)。直接効果と間接効果という分類を前編で示したが、これらは決して別個に存在して線量率とともに線形に増大してやがて非線形現象を見せるといったものではなく、実は、低レベルの放射線量でも直接・間接効果が同時に発生してシナジー効果を生じているのかもしれない。たとえばアミン結合の窒素であれば直接放射線相互作用によって単純な一重結合を断裂させるだけであるのに対して、近隣で発生した OH^- 基によって脱プロトン化が起こると、もっと広範な領域に電子移動を可能にして放射線誘起反応を複雑化させるといったことが直ちに想像できる。そのときのイオンやラジカ

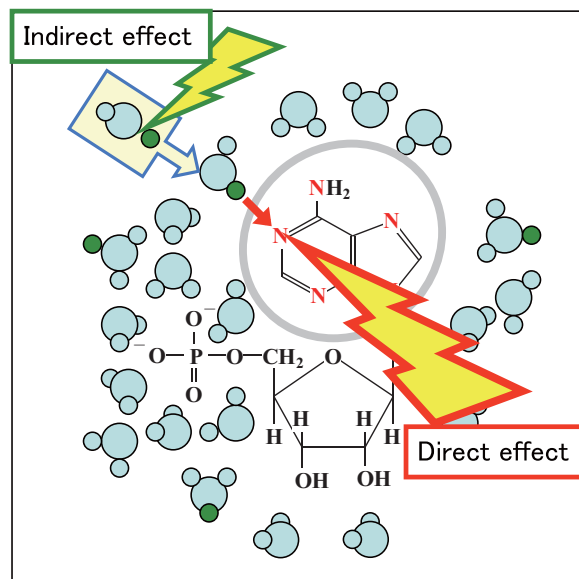


Figure 8. Pictorial image for the cooperative direct and indirect radiation effects to nucleotide.

ルはどのようなものが生成するだろうか？ 電子状態の違いはポテンシャル曲面の違いに相当し、反応の経路は利用されるポテンシャル曲面によって異なる。前編で述べたとおり、本研究の最終目標はこのような反応経路の違いを二次生成物の発生の経時変化によって追跡することにある。このような知見を集積していくことによって放射線損傷の発生と、それとは途中の経路を共有しながら“その場修復”にいたるというプロセスについて明らかにできるだろうと期待している。

5 謝辞

本研究は科学研究費補助金（課題番号 13304033, 17204035, 21241017, 25241010）、ならびに、原子力機構先端基礎研究センター黎明研究（H20, H21）の援助を受けて行われてきました。また、原子力機構先端基礎研究センターの横谷明德博士、藤井健太郎博士、同機構放射光研究ユニットの斎藤祐児博士らとの共同研究により行われてきたものです（SPRING-8 原子力機構専用ビームライン 課題：2005B3805, 2006A3804, 2006B3833, 2007A3820, 2007B3810, 2008A-2012B3810/BL23SU）。同ユニットの福田義博氏には実験・保守の上で重要な協力をいただいています。また、農工大の多くの修士課程修了者や、卒業生、在籍者とともに進められて来ました。最後に、こ

これらの研究の第一報を鵜飼が International Workshop on Radiation Damage to DNA (2004) にて講演した際には、故 Bill Bernhard 先生から “I would like to hear the rest of your talk.” という格別の激励を受け、本研究を継続する上での大切な支えであります。以上、記して感謝いたします。

〈参 考 文 献〉

- 1) 鵜飼正敏, 島田紘行, 放射線化学, 94 (2012) 14.
- 2) M. Ukai, A. Yokoya, K. Fujii, Y. Saitoh, Chem. Phys. Lett., 495 (2010) 90.
- 3) H. Shimada, T. Fukao, H. Minami, M. Ukai, K. Fujii, A. Yokoya, Y. Fukuda, Y. Saitoh, Chem. Phys. Lett., 591 (2014) 137.
- 4) J. Berkowitz, Atomic and Molecular Photoabsorption: Absolute Total Cross Sections, Academic, London and San Diego, 2002.
- 5) K. Fujii, K. Akamatsu, Y. Muramatsu, A. Yokoya, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B, 199 (2003) 249.
- 6) J. J. Yeh, I. Lindau, Atom. Data Nucl. Data Tables 32 (1985) 1.
- 7) B. L. Henke, E. M. Gullikson, J. C. Davis, Atom. Data Nucl. Data Tables 54 (1985) 181.
- 8) S. M. Kirtley, O. Mullins, J. Chen, J. van Elp, S. J. George, C. T. Chen, T. O'Halloran, S. P. Cramer, Biochim. Biophys. Acta, 1132 (1992) 249.
- 9) Y. Zubavichus, A. Shaporenko, V. Korolkov, M. Grunze, M. Zharnikov, J. Phys. Chem., 112 (2008) 13711.
- 10) Y. Harada, T. Takeuchi, H. Kino, A. Fukushima, K. Takakura, K. Hieda, A. Nakao, S. Shin, H. Fukuyama, J. Phys. Chem., 110 (2006) 13227.
- 11) J. MacNaughton, A. Moewes, E. Z. Kurmaev, J. Phys. Chem., 109 (2005) 7749.
- 12) 武田泰明, 島田紘行, 鵜飼正敏, 原子衝突学会第 38 回年会, P8, November 16th, 2013.
- 13) D. N. Kelly, C. P. Schwartz, J. S. Uejio, A. M. Duffin, A. H. England, R. J. Saykally, J. Chem. Phys., 133 (2010) 101103.
- 14) O. Plekan, V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, M. de Simone, K. C. Prince, A. B. Trofimov, E. V. Gromov, I. L. Zaytseva, J. Schirmer, Chem. Phys., 347 (2008) 360.
- 15) F. Wang, Q. Zhua, E. Ivanova, J. Synchrotron Radiat., 15 (2008) 624.
- 16) Y. Mochiduki, H. Koide, T. Imamura, H. Takemiya, J. Synchrotron Radiat., 8 (2001) 1003.
- 17) R. D. Brown, P. D. Godfrey, D. McNaughton, A. P. Pierlot, Chem. Phys. Lett., 156 (1989) 61.
- 18) B. Lippert, H. Schöllhorn, U. Thewalt, Inorg. Chim. Acta, 198 (1992) 723.
- 19) H. Sigel, Pure Appl. Chem., 76 (2004) 1869.
- 20) J. Kraut, L. H. Jensen, Acta Crystallogr, 16 (1963) 79.
- 21) R. Tribolet, H. Sigel, Eur. J. Biochem., 163 (1987) 353.
- 22) R. Tribolet, H. Sigel, Eur. J. Biochem., 170 (1988) 617.
- 23) L. M. Cunane, M. R. Taylor, Acta Crystallogr, D, 53 (1997) 765.
- 24) 島田紘行, 深尾太志, 南寛威, 佐久間一郎, 奥泉直人, 横谷明德, 藤井健太郎, 福田義博, 斎藤祐児, 鵜飼正敏, 第 56 回放射線化学討論会, 3O-07, September 29th, 2013.

〈著 者 略 歴〉

島田 紘行：2006 年 東京大学大学院総合文化研究科博士後期課程修了。2006 年 分子科学研究所 CREST 研究員。2008 年 東京農工大学工学部特任助教。2011 年 同大学院工学研究院助教（現職）。学術博士。専門：原子分子物理学・量子エレクトロニクス。趣味等：読書・楽器演奏

鵜飼 正敏：1987 年 東京工業大学大学院理工学研究科博士後期課程修了。日本学術振興会特別研究員を経て、1988 年 東京工業大学理学部助手。1995 年 東京農工大学工学部助教授。2010 年より同大学院工学研究院教授（現職）。理学博士。専門：放射線化学・原子分子物理学。趣味：雑学。