

(様式第4号)

実施課題名※軟 X 線光電子分光法及び吸収分光法による DNA 分子 薄膜の研究 (III)

Study for DNA thin film by photoelectron spectroscopy and X-ray absorption spectroscopy (III)

藤井 健太郎
Kentaro Fujii

日本原子力研究開発機構
Japan Atomic Energy Agency

※長期利用課題は、実施課題名の末尾に期を表す (I)、(II)、(III) を追記すること。

1. 概要

DNA 構成元素のイオン化領域において、光電子スペクトルおよび軟 X 線吸収スペクトルを測定し、薄膜における DNA の電子状態を明らかにする。

(English)

To reveal the electronic structure of DNA thin films, we observed the photoelectron spectrum and soft X-ray absorption spectrum.

2. 背景と研究目的：

これまでに我々は単色軟 X 線の照射によって DNA 中に生成する DNA 主鎖切断や塩基損傷といった各種分子の変化について研究を行ってきた。その結果、窒素および酸素 K 殻イオン化によって遺伝子である塩基部位や DNA 主鎖の切断が顕著に増加すること、さらに塩基の種類によって誘発頻度が照射エネルギーによって変化することを明らかにした[1-3]。これらの損傷のメカニズムには、各元素の内殻励起後に生じる Auger 電子などの二次電子および、分子内に生成した正孔が分子内で移動する電荷移動や DNA 分子に強固に結合した水和水分子のイオン化が深く関わっていると推測されている。しかしながら、その損傷生成過程がどのようなメカニズムで起きているか詳細には明らかになっていない。その解明には、内殻イオン化後に生じる DNA 分子の電子状態、化学結合状態の変化や水と DNA と未水と DNA との電子状態、化学結合状態の違いに関する知見が必要である。そこで、本課題では以下の2つを主な目的とする。(1) 軟 X 線照射前後の DNA 分子の光電子及びオージェ電子スペクトルを測定し、生化学実験の結果との比較より DNA の損傷生成過程のメカニズムを明らかにする。(2) 水と未水と DNA に関して軟 X 線吸収スペクトル測定を行い、生化学実験の結果との比較より DNA 損傷の誘発に水和水分子がどのように寄与しているかを明らかにする。

3. 実験内容 (試料、実験方法の説明)

3.1. DNA 薄膜の軟 X 線光電子分光実験

炭素、窒素および酸素 K 殻イオン化前後のエネルギーにおいて、軟 X 線照射により DNA 薄膜試料から生じた電子スペクトルを測定した。実験に用いた試料の条件は表 1 にまとめた。

表 1

試料	子牛胸腺 DNA
製造元	Sigma (D-1501)
作成方法	1mg/mL 水溶液を 20 μ L 基板上に滴下後大気中で自然乾燥
基板	Si(100) (10mm x 10mm)
面密度	$\sim 2 \times 10^{-4}$ kg/m ²
膜厚	130~170nm

3.2. DNA 薄膜および DNA 繊維の軟 X 線吸収分光実験

DNA 薄膜に対して、形状の異なる試料における軟 X 線吸収スペクトルの違いを観測するため、薄膜状の DNA に対して、炭素、窒素および酸素 K 殻吸収端領域において、軟 X 線吸収スペクトルの測定を行った。実験に用いた試料の条件は表 2 にまとめた。

表 2

試料	仔牛胸腺 DNA
形状	薄膜
製造元	Sigma (D-1501)
作成方法	1mg/mL 水溶液を 20 μ L 基板の上に滴下後大気中で自然乾燥
基板	Si(100) (10mm x 10mm)
膜厚	50~2500nm

4-5. 結果と考察

DNA 薄膜の軟 X 線光電子分光実験

本実験により、単色軟 X 線光子の吸収後に生成する光電子の運動エネルギー分布についての定量的な知見を得ることができた。軟 X 線照射による DNA 損傷のメカニズムについては、これまで鎖切断収量を求める実験が行われているが、突然変異や発ガンの主要な原因のひとつとされる塩基損傷については、あまり報告がないのが現状である。最近、モンテカルロシミュレーションを用いた研究によって、軟 X 線照射後の鎖切断や塩基損傷の収量を求める研究が報告されている。しかし、その計算の元となる、二次電子スペクトルの分布は各電子状態間の遷移確率のデータテーブルから求めた、理論値であるため、非弾性散乱電子のエネルギー分布などを含めた実効的な値とは異なると予想される。今後、本実験で得られた実験値を用いてシミュレーションを行うことで、より精度の高い軟 X 線照射後の鎖切断や塩基損傷の収量を求めることができる。それらの結果から、高い生物効果を示すとされる、軟 X 線の生物影響の解析が進むものと期待される。

DNA 薄膜および DNA 繊維の軟 X 線吸収分光実験

DNA 分子は、真空中においても一塩基あたり五分子の水分子が強固に吸着 (水和) していることが分かっている。そこで、水和による軟 X 線吸収スペクトルの変化を観測できるかどうかを明らかにするため、DNA を構成する元素である炭素、窒素および酸素 K 殻吸収端領域の全蛍光および全電子収量

法による吸収スペクトルの測定を行った。表面状態の違いによる電子状態の変化を観測するため、バルク敏感な蛍光スペクトル (FY) と表面敏感な全電子スペクトル (TEY) を同時に測定した。DNA 薄膜や粉末についてはこれまでに、様々な形状において NEXAFS スペクトルの報告があり、図 1 下のような形状が一般的であった。しかし、DNA 薄膜の膜厚の違いによる NEXAFS スペクトルの変化を測定した結果、TEY 法により測定された窒素 K 殻 NEXAFS スペクトルの低エネルギー側 (399-403eV 付近) に現れる 2 つのピークの強度比が、DNA 薄膜の厚みに依存して顕著に変化することが明らかになった。膜厚が増加するにつれて、399eV 付近の第 1 ピークは若干減少し、401eV 付近の第 2 ピークが増加した。それらのピークは、Kummer ら [4] によりそれぞれ、 $N1s \rightarrow \pi^*(N=C)$ および $N1s \rightarrow \pi^*(N-C=O)$ あるいは $N1s \rightarrow \pi^*(C=C-N)$ と同定されており、強度変化が顕著に現れた 401eV 付近の共鳴ピークは、塩基の環外に近接した窒素原子由来の励起である。これまで DNA の NEXAFS スペクトルについては多くの報告があるが、このようなピーク強度比の変化について報告した例はない。また、ピーク強度変化の起源について調べるため、基板として Si だけでなく、Si 上に Au を蒸着したものをを用いても同様の結果が見られた。さらに、表面に対する放射光の入射角度に NEXAFS ピークの相対強度比は変化しなかったことから、表面構造は基板に依存しないこと、表面上で DNA 薄膜は配向していないことが明らかになった。イオン化閾値よりも低エネルギー側の励起を行った場合、数 eV の運動エネルギーを持つ光電子が数多く放出される。一般に 50eV の運動エネルギーを持つ電子の平均自由行程は、0.5-1nm 程度であるが、2eV 以下では数十 nm と非常に長い。このような電子の運動エネルギーに対する平均自由行程の違いによって、吸収スペクトルの検出効率の違いが、今回のピーク強度の変化に現れたものと推測される。本実験により、DNA デバイスの評価を行う際に、全電子収量法を用いた軟 X 線吸収分光を行うときは、特に膜厚が 1 μm 以上に及ぶ場合は、低運動エネルギー成分を除去した部分電子収量法による評価が最適であることを明らかにした。

また、本実験で DNA 薄膜中に生成する二次電子について、0-数 eV 程度の運動エネルギーを持つ低速電子が数百 eV の運動エネルギーを持つ Auger 電子に比べて非常に多いことが推測される。これらの低速電子は電子付着過程を通して、DNA の主鎖切断を引き起こすことが知られている。今後、これらの低速電子と Auger 電子がそれぞれどのように DNA 損傷に関係するか、また、それらが水和にどのように関わっているかを明らかにすることは、放射線による DNA 損傷のメカニズムを明らかにする上で重要である。

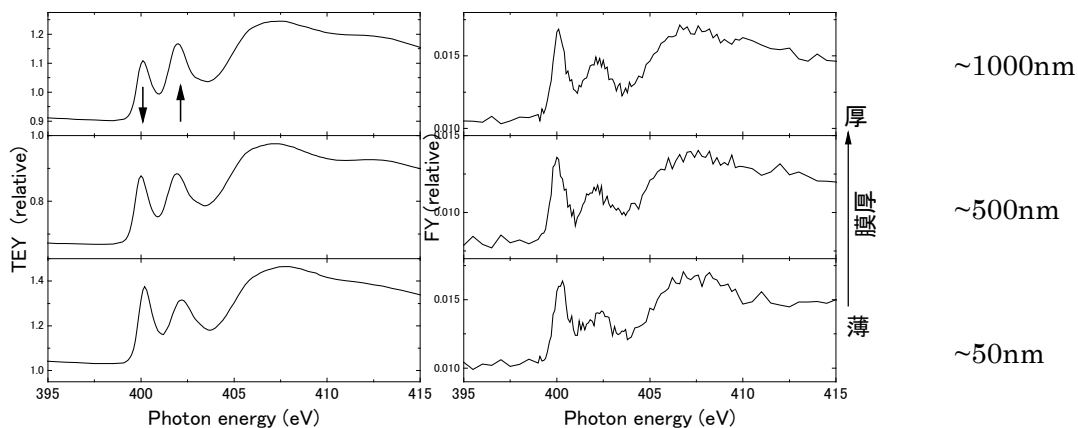


図 1 DNA 薄膜の窒素 K 殻吸収端近傍の NEXAFS スペクトル

左図：全電子収量 (TEY) 法により測定したスペクトルと、右図：蛍光収量 (FY) 法により測定したスペクトル

5. 今後の課題：

今後は、DNA の軟 X 線吸収スペクトルの水和量依存性の測定などから、DNA に強固に吸着した水和水分子が電子状態変化にどのように寄与しているかを明らかにする。

6. 論文発表状況・特許状況

軟 X 線吸収スペクトルのデータをまとめて、現在論文投稿準備中である。

7. 参考文献

- [1] K. Fujii, N. Shikazono, and A. Yokoya, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 16007-16015.
- [2] 藤井健太郎、放射線化学、90 17-22 (2010).
- [3] Yokoya, A., Fujii, K., Shikazono, N., and Ukai, M., Spectroscopic study of radiation-induced DNA lesions and their susceptibility to enzymatic repair. *Charged Particle and Photon Interactions with Matter - Recent Advances, Applications, and Interfaces*, ed. by Y. Hatano, Y. Katsumura, A. Mozumder, Taylor & Francis, Boca Raton **Chapter 20** 543-574 (2010).
- [4] K. Kummer et al. *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 9645-9652.

8. キーワード (試料及び実験方法を特定する用語を 2～3)

・軟 X 線吸収スペクトル (X 線吸収端近傍微細構造 (NEXAFS) スペクトル)

X 線の吸収が起こるとき、一部が物質に吸収される。入射 X 線のエネルギーを変化させて、X 線の吸収率を測定すると、あるエネルギーで吸収率が急激に変化する部分がある。この部分を吸収端と呼び、吸収端近傍の吸収スペクトルを NEXAFS (Near Edge X-ray Absorption Fine Structure) と呼び、この部分の解析から、物質中の特定元素の電子構造に関する情報が得られる。