

発がんと染色体：染色体の可変性について

渡部 真

神戸市看護大学

Carcinogenesis and Chromosome : On the Variability of Chromosome

Makoto WATANABE

Kobe City College of Nursing

Abstract

The variability of chromosome plays a key role in molecular control mechanism involved in carcinogenic mutations induced by radiations or chemical carcinogens. The author has proposed a rheological model for the highly variable chromosomal structure that consists of fragile and variable segments in the fluctuating assembly of nucleosome clusters (chromatin superbeads) and their linked network system (chromatin network).

In the present report the morphological bases for the variability of chromosome were summarized, and the latest evidences for the carcinogenic mutations due to genetic instability were reviewed.

Key words: carcinogenesis (発がん), genetic instability (遺伝的不安定性), chromatin network (クロマチン・ネットワーク), variability of chromosome (染色体の可変性)

1. はじめに

筆者はこれまで40年間、染色体内部の微細構造の研究を続けてきた。筆者が大学を受験した1954年3月、ビキニ環礁における米国の水爆実験により日本のマグロ漁船がいわゆる死の灰を浴び、それを契機として人体に対する放射線影響の研究が日本国内でめざましい勢いで開始された。入学したばかりの東京大学においてそれらの研究の最先端を身近にして、筆者は1958年以降、放射線による染色体異常の仕組みを研究テーマに選んだ。放射線の影響を受けて最も敏感に変化するものが染色体だからである。また高校の生物学の恩師が、直前にがんで亡くなられたことも、染色体をテーマに選んだ理由の一つであった。染色体の構造の変化と発がんとの相関関係が当時から疑われていたからである。その後40年以上経った現在では、当時の予想をはるかに超えて、染色体の変化こそ発がんの最初の引き金にはかならないことが明確になってきた。

しかし当時は染色体内部の微細構造に関しては、ほ

とんど何も分かってはいなかった。1953年にワトソン・クリックのDNA二重らせんモデルが発表されたばかりで、染色体の内部で遺伝子の本体のDNAがどのようなになっているのか、全く見当がつかなかった。筆者は当時のいくつかの染色体モデルを統一的に説明するための最初の染色体モデルを1961年に発表した¹⁻⁴⁾。またその染色体モデルに基づいて、染色体の構造が多様に変化し、その結果として発がんや免疫などの種々の課題を説明することが可能なことを示した^{2, 6)}。その後はこのモデルの修正と実験・観察による検証を続けて今日に至った。

この過程で筆者は、主として電子顕微鏡とX線顕微鏡、さらに最近開発された原子間力顕微鏡を応用して、染色体の微細構造についての重要な事実を発見した。すなわち放射線が当たる標的としての染色体は、放射線研究の初期の頃から想像されて来たような単純な均一構造ではなく、長いDNA分子が凝縮した粒子の連鎖と、それがさらに複雑にからみ合ったネットワークの、可変性に富んだ不均一な構造を取っていることを

証明した⁷⁻¹⁰⁾。

一方、がんに関する最近の研究成果によって、がんがDNAの病気であることが今や確定的となった。放射線や発がん物質や活性酸素によってDNAに与えられた傷が原因で、正常な遺伝子の働きが異常になり(突然変異)、長い潜伏期の後に一部の細胞ががん細胞として増殖する。がんの種類によって、突然変異を起こした遺伝子(発がん遺伝子・がん抑制遺伝子・修復遺伝子など)が幾種類も発見されており、それぞれの遺伝子の染色体上の位置も明らかになってきた¹¹⁾。

しかし、現在でも未解決の大きな謎が残されている。正常な1個の細胞ががん細胞に発達するまでに、同じ一つの細胞の中で突然変異が幾度も繰り返されて幾つものがん遺伝子(oncogene)が生まれることは、従来の遺伝学の常識からは確率論的に説明不可能である。唯一の説明として3、4年前から関心を集めているのが、「遺伝的不安定性(genetic instability)」の介在である。遺伝子ないしは染色体の構造上の可変性が、何代もの細胞分裂を経て受け継がれ、数十年にも及ぶ潜伏期の間に幾度もの突然変異が染色体上に起きてがん遺伝子が蓄積され、最後に悪性のがん細胞に成長していくというのである¹²⁾。この遺伝的不安定性の実体についてはまだ未知の部分が多い。しかし問題の重大性から急速に研究者が増えつつあり、1998年10月に開催された第57回日本癌学会総会では、「遺伝的不安定性とがん」をテーマにシンポジウムが組まれた¹³⁾。

筆者も染色体微細構造の可変性に関する知識を総動員して、この課題の解答を得ようと努力している。以下に総説的に筆者のこれまでの研究の過程を跡づけてみたい。紙数が限られているので、個々の文献の内容の説明は最小限にとどめる。

2. 染色体のモデル

筆者は1961年、染色体の内部でDNA分子が折りたたまれて凝縮していく過程を図式的に推定して、高等動植物の染色体に関する最初の「DNA折りたたみモデル」として発表した¹⁻⁴⁾。筆者の当初の目的は、当時提唱されていた一見矛盾し合う幾つもの染色体モデルの各々の根拠と、染色体異常誘発機構の諸説とを、統一的に説明できることを示すことにあった。電子顕微鏡で見た大腸菌のDNAが一定の長さごとに折りたたまれて、円筒状の凝縮構造をとっているのではない

かという、前年にロンドンで開かれたシンポジウムでの報告がヒントになった。しかしこのモデルの真の狙いは、生体高分子の大きな特長である伸縮屈撓性やよじれ運動の結果として、当時明らかになりつつあったDNAないしは染色体のセグメント(分節)構造が形成される分子レベルの必然性と機能的な重要性とを説明することにあった⁵⁾。

このモデルで予想したDNA分子の折りたたみ結晶化の可能性は、1969年にアメリカの研究者らによって証明された¹⁴⁾。筆者もその後直ちに、サケの精子から取り出した高分子量のDNAの溶液に適度の濃度の塩とエタノールを添加し、熱変性と徐冷などの処理を加えて、折りたたみに必要な歪力をDNA二重らせんに与えることにより、DNA分子が凝縮して光学顕微鏡でも観察可能なガラスビーズ状の繊維と、それがからみ合った網の目構造をとることを証明した^{15, 16)}。

1960年代に提唱されていた染色体のモデルでは、DNAと特異的に結合すると当時考えられていたヒストンやその他の未知のタンパク質とDNAとの結びつきの、質的もしくは量的な差によって、DNAないしは染色体の内部構造の分化が受動的かつ一方的に決定されるという、暗黙の前提に立って多くの観察事実が説明されていた¹⁶⁾。それに対して、DNA分子固有の折りたたみ、よじれ、ループなどの多様な高次構造のレオロジカルな変形として、染色体構造の形成とその働きを動的に説明しようとする所に筆者のモデルの独自性があると考え、最初「メカノケミカル・モデル」と名づけ⁴⁾、その後「レオロジカル・モデル」と呼ぶようになった^{5, 17)}。レオロジーとは、物質の変形・流動・歪力・破壊などに関する科学の総称である。

3. 電子顕微鏡による観察

この初期のモデルに、その後の電子顕微鏡観察の知見を組み入れて、筆者は1968年に「DNA高次よじれ折りたたみモデル」を発表した¹⁸⁾。染色体の微細な内部構造を電子顕微鏡で観察しようという試みは1950年代から始まったが、当時の電子顕微鏡の常套手段であった超薄切片法では、染色体の微細構造は破壊されてほとんど無構造な外観を呈するに過ぎなかった。筆者は光学顕微鏡レベルの染色体押しつぶし法を電子顕微鏡レベルに応用し、固定包埋はいっさい行わずに、染色体やクロマチンの微細な繊維構造の全体を丸ごとそ

くり試料メッシュに載せて電顕観察を行う「界面展開全載電顕法 (surface-spreading whole-mount electron microscopy)」を独自に開発改良し、1967年以降その観察結果を報告してきた¹⁸⁻²²⁾。

特に筆者は、DNA二重らせんの回旋に伴う歪力と高次よじれ化との関係に注目した。DNAの複製に伴う二重らせんの巻き戻しあるいは巻き直しの回旋運動が抑制または束縛された場合には、その時の条件において最も安定な二重らせん構造に対して、巻き過ぎあるいは巻き不足の状態を強いられ、分子鎖の内部には歪力（ストレス）が生ずる。その不安定な状態を解消し安定化させるためには、ストレスのかかった部分の分子鎖を切断して切断末端を自由に回旋させるか、DNA二重らせん全体がさらに三次元のらせん回旋を行い、高次らせん（superhelix）または高次コイル（supercoil）に進むことによって、らせんの巻き数の収支を償い、内在するストレスを緩和させるか、いずれかの方法によらねばならない。よじった輪ゴムの場合のように、らせんの回旋軸に対して直交方向にループ状となって、らせんの一部がほどけ出し、折り返って全体がよじれ合った場合を、特に「高次よじれ（supertwist）」と呼ぶ。この高次よじれの可能性を筆者らは界面展開全載電顕法を用いて観察してきた²⁰⁾。その知見を組み入れたモデルにおいて、高次よじれの凝集したセグメントとして説明された粒子状のセグメントは、その後ヌクレオソームと呼ばれるようになった。

1975年頃から、染色体を構成するクロマチン繊維の基本粒子としての「ヌクレオソーム (nucleosome)」が注目されるようになった。その段階で「DNA高次よじれ折りたたみモデル」の修正モデルとして、ヌクレオソームのヒストン・コアの周囲に二重に折れ返ってよじれ合った、ひと続きの高次よじれDNAセグメントが巻きついて安定化されているという「高次よじれ粒子モデル」を筆者は提唱した（図1）^{23, 24)}。

図1の左上半分には、S期（DNA合成期）に複製中のDNA二重らせんを模式的に描いた。ヒトの体細胞の場合、細胞核1個に含まれる全長約2mのDNA分子が約10時間のS期の間に複製される。そのためにはDNA二重らせんが親鎖と娘鎖を合わせて、約18億回の巻き戻しと巻き直しの回旋運動をし、約60億対の塩基対を倍加する必要がある。実際には短いセグメントに区切って不連続かつ同時的に複製が進行する。こ

のY字状に二叉に分かれた部分（DNA複製フォーク）では、多数の酵素群や特殊なタンパク質の巧妙な連携プレーが行われている¹⁰⁾。発がんの鍵を握っている遺伝的不安定性と染色体の可変性は、この連携プレーがうまくいかなかった結果として説明がつく事実が発見されつつある¹³⁾。そのことは後の章で論じたい。

さて、このようにして複製されるDNA二重らせんの連鎖は、決して均一な構造ではあり得ない。二重らせんの完成に必要な回旋運動が、各セグメントごとに異なるいろいろな程度の抑制あるいは束縛を受け、局部的な歪力を生じて変形するからである。DNAのセグメントの内部に高まった局部的なストレスを緩和するためには、図の右上半部に描いたように、DNA分子鎖上に一連のループから左巻きの高次らせんが生じ、さらに歪力が集中した一点で折れ返って右巻きの「高次よじれ」に進むと想像される。

さらにヒストンとの結合の結果、DNA分子鎖の回旋は局部的に一層束縛され、歪力は局在化されて、高次よじれの形成が促進され、DNA-ヒストン複合体のクロマチン基本粒子、すなわち「ヌクレオソーム」が完成すると考えられる。図の右半分の模式図では、1977年当時の報告の平均値をとって、約200塩基対（全長70nm）のDNAセグメントが直径約11nmの粒子内に1/6に凝縮された状態を描いている。粒子の外形は球状に単純化して描いたが、実際にはもっと複

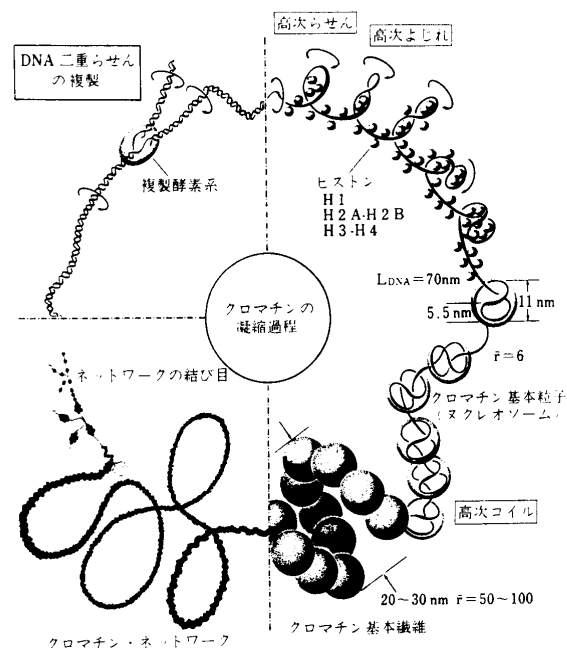


図1 DNA高次よじれ粒子モデル（渡部1982）^{23, 24)}

雑な立体構造をとっている。

このモデルで筆者が予想したヌクレオソームの高次よじれDNA構造は、その後1984年に発表されたRichmondらの高分解能のX線回折の結果と一致した²⁵⁾。しかし、それ以前から別のX線回折データに基づいて、ヌクレオソームのヒストン・コアの周囲に1.8周分のDNA二重らせんが並列に巻き取られているという「巻き取りモデル」が提唱されていた²⁶⁾。一般にはこのモデルが有名で、あたかも確定的な事実のように教科書や参考書では扱われている。しかしこれら二つのモデルのいずれかを決定づけるX線回折以外の直接的根拠は、未だ保留されている。

4. クロマチン・スーパービーズ

筆者らが応用してきた界面展開全電顕法で分裂期の染色体や間期のクロマチンを観察すると、界面圧によって水面上に引き伸ばされたクロマチン基本繊維は、凝縮構造を保持した部分と、DNA二重らせんのレベルまで解きほぐされた糸状の部分との交互連鎖構造に容易に移行し、一見して糸で連ねたガラス・ビーズ状を呈する。筆者らは電顕観察による研究の初期の頃からこの構造に注目してきた^{16, 20, 23, 24)}。

さらに筆者は、DNAの塩基対間に割り込んで二重らせんに歪力を誘起し、高次らせんないしは高次よじれに変形を与える特殊な薬剤（エチジウムブロマイド）によって、このガラス・ビーズ状構造が顕著になり、溶液濃度と処理時間を増すと、著しく収縮した繊維構造に移ることを発見した。逆に塩基類似体であるカフェインの処理では、DNAのレベルまでの解きほぐれが顕著になる。この構造変化と並行して、培養細胞の生存率で比較した放射線感受性に関して、エチジウムブロマイドによる抵抗性の増大とカフェインによる感受性増大の拮抗的作用があることも確かめた^{24, 27)}。すなわちエチジウムブロマイドによってクロマチン凝縮構造が安定化されるのに対して、カフェインは逆に凝縮構造を不安定にすると考えられる。これらの知見を説明するために、筆者は隣接するヌクレオソームが凝集し合って1本のクロマチン基本繊維が構築される方式を、図2のように模式的に描いた²⁸⁾。このような凝集構造は他の研究者によって「スーパービーズ (superbeads)」²⁹⁾ または (supranucleosomal particle)³⁰⁾ と名づけられている。

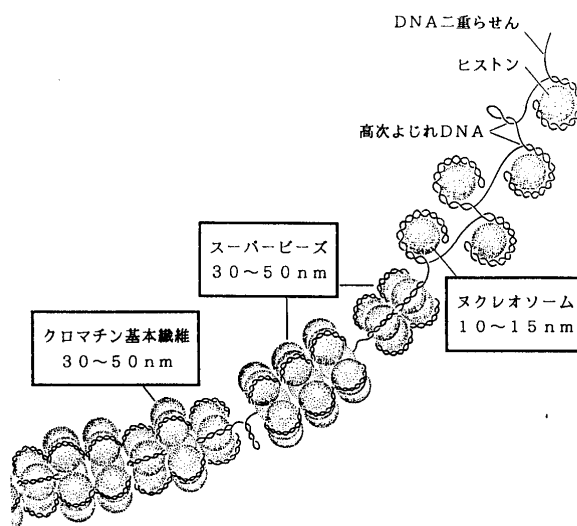


図2 スーパービーズ・モデル (渡部1986)²⁸⁾

この凝集粒子連鎖を縦につなぐ解きほぐれたDNA部分は、DNA分解酵素によって切断され、スーパービーズはバラバラになってしまう。ドイツのZentgrafらは種々の動物細胞からスーパービーズを単離して分析し、その平均直径 (32~48nm) や構成ヌクレオソーム数 (8~48個) が細胞の種類や細胞の分化の程度によって異なることを報告している³⁰⁾。筆者らも同じ方法でヒトの培養リンパ細胞からスーパービーズを単離し、そのサイズが不均一で染色体・クロマチン内部のセグメントの違いによって変動する可能性を確かめた³¹⁾。

細胞死 (アポトーシス) によって放射線照射後短時間で死んでいく胸腺リンパ球のクロマチンでも、スーパービーズ間のDNA部分で切断されバラバラにされることを、筆者らは1981年に最初に証明した³²⁾。この現象はその後アポトーシス (プログラムされた細胞死) が脚光を浴びるようになってから再び注目され、アポトーシスの初期段階における核の崩壊の仕組みとして、広く認められるようになった³³⁾。

5. クロマチン・ネットワーク

これまで述べてきたクロマチン凝縮構造は、ゆるく解きほぐれた部分と、接近して結び合ったセグメント同士の結び目との交互連鎖から成るクロマチン基本繊維の網の目すなわち「クロマチン・ネットワーク (chromatin network)」の構造をとる (図3)²³⁾。このクロマチン・ネットワークが細胞核の分裂期に凝縮

すると、染色体として顕微鏡で観察できるようになる(図4)²⁰⁾。図4はヒトの末梢血リンパ球から界面展開法により水面上に単離された中期染色体を、透過電子顕微鏡で観察した最初の1例である。白枠内のように光学顕微鏡では識別できない染色体の内部構造が、電子顕微鏡レベルでは微細なネットワークであることが分かる。この繊維は直径は均一ではなく細い部分で10 nm、最も太い部分で50nm、平均して20~30nmである。研究の初期の頃は研究者によりその呼び名は様々で、筆者は「クロマチン基本繊維 (elementary chromatin fibril)」と名づけた²⁰⁾。最近では「30nmクロマチン繊維 (30nm chromatin fiber)」と呼ばれることが多い³⁴⁾。

中期染色体の内部の基本繊維は、一見乱雑にからみ合いよじれ合って、複雑に重なり合った繊維の塊のように見えるが、界面張力を受けて水面上に薄く押し広げられた像(図4)で、姉妹染色分体の相同の位置を見比べてみると、基本繊維のループやネットワーク、もしくはそれらの重なり合った塊が、ほぼ対称的に等

しい形もしくは大きさをもって配列しているのを見分けることができる。すなわちDNA合成期(S期)に複製された30nmクロマチン繊維は、分裂期(M期)には遺伝子の配列に対応した特定の長さずつループ状にたぐりよせられて凝縮し、1本の染色分体(chromatid)を構成する。ループの1本分には2~10万塩基対のDNAが含まれ、平均0.5 μ mの長さの30nm繊維に相当し、ヒトの染色体1本は2,000本以上のループを持つと推定される³⁴⁾。ループの基部は特定の塩基配列を識別して、接近させ結び合わせるDNA結合タンパク(複製酵素系の各種の酵素や核骨格・核ラミナ・核膜などに含まれるタンパク)が結合していると考えられるが、その実体は今後の課題である。7章で述べるように、この部分の切断やつなぎ換えなどが染色体に可変性を与え、発がんにつながるものと想像される。

クロマチン・ネットワークの結び目(coupling)の方式には、その他にも多様な可能性が想像される³⁵⁾。図3にはDNA二重らせん・高次よじれDNA・ヌクレオソーム・スーパービーズ・クロマチン基本繊維の各レベルにおける可能性を模式的に書き加えてある。すなわち、①解きほぐれたDNA二重らせん相互の平行配列、②ヌクレオソーム間のDNA結合、③ヌクレオソーム間の凝集、④タンパク・膜結合、⑤解きほぐれたDNA結合、⑥基本繊維間からみ合い、⑦高次よじれDNA平行配列

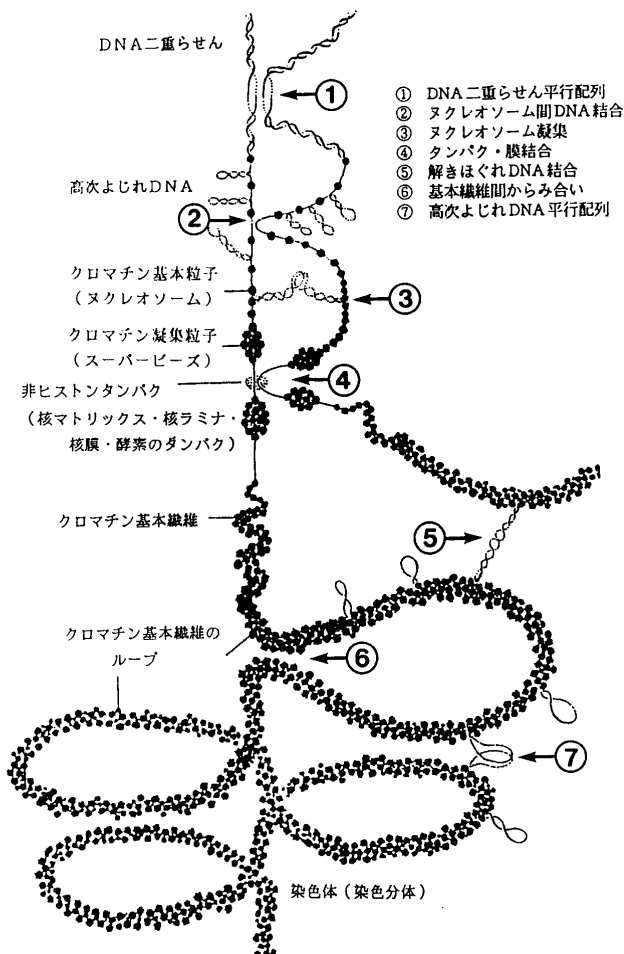


図3 クロマチン・ネットワーク・モデル (渡部1982)²³⁾

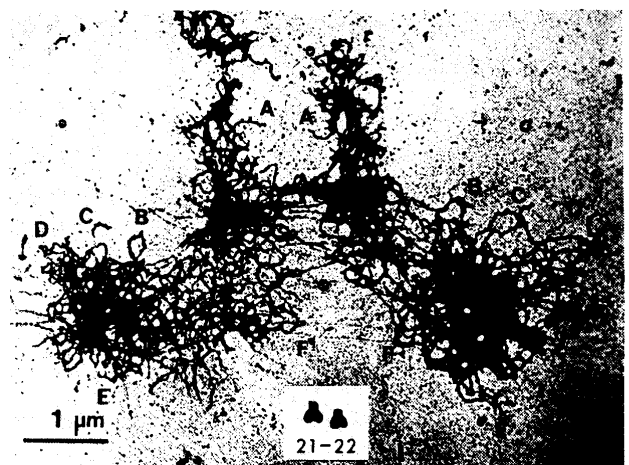


図4 ヒトの分裂中期染色体 (No.21-22) の界面展開全載電子顕微鏡写真 (Watanabe and Tanaka 1972)²⁰⁾

を招き、染色体の構造変化を経て発がんに至る可能性も十分考えられる。

クロマチン・ネットワークの基本繊維のからみぐあいやほどけぐあいの差による繊維の局所的な分布密度の粗密は、染色体の内部構造として光学顕微鏡でも識別可能で、古典的細胞学の時代から、ヘテロクロマチン領域、くびれ (constriction), セントロメア (centromere: 中心粒), テロメア (telomere: 末端小粒) などと呼ばれてきた。テロメアの構造変化は、発がんや老化との関連において最近注目を集めている (7章)。

中期染色体を光学顕微鏡で観察するための固定・染色の段階で、タンパク分解酵素・変性剤・熱・アルカリ・塩類溶液・低調液などの前処理を加えると、染色性の濃淡の差となって遺伝子の配列に対応した「染色体バンド」が見えるようになり、染色体上の遺伝子の位置を判別する重要な手がかりとなっている。種々の前処理によって、DNA分子内に塩基配列に応じて歪力の不均等な分布が誘発され、DNA二重らせんないしは高次よじれの巻き戻しあるいは巻き直しの難易の部分的な差に応じて、基本繊維のセグメントを単位とした多様な屈曲や変形の度合いに応じて、DNA結合タンパクの解離や染色色素の会合に局所的な差を生じ、その統計的な分布を反映して、光学顕微鏡でも識別可能な分染パターンが生じるのであろうと、筆者は初期の頃から説明してきた¹⁶⁾。

「染色体バンド」の例のように、クロマチンもしくは染色体の凝縮構造に種々の変動を与える要因を、筆者は「レオロジカル作用原」または「クロマチンひずみ誘発要因」と総称してきた³⁶⁾。その中には放射線をはじめ、多くの突然変異原と発がん物質とが含まれる^{23, 24)}。すなわちクロマチン構造を安定化させる方向へ作用する作用原としては、ヒストンなどのポリカチオン、 Ca^{++} ・ Mg^{++} などの金属カチオン、エチレンジグリコールなどの水和剤。一方クロマチン構造を不安定化させる方向へ作用する作用原としては、①機械的歪力、②熱運動、③放射線、④pHやアニオンなどのイオン環境、⑤アルコール・界面活性剤などの変性剤、⑥マイトマイシンなど種々の発がん剤が含まれるアルキル化剤、⑦エチジウムブロマイド・アクチノマイシンなどの塩基対間割込み剤、⑧カフェインなどの塩基類似体である。

筆者らはこれらの作用原によるクロマチン・ネットワークのレオロジカルな動的構造変化を直接的に解析

することを目的とした方法を「マイクロ・レオロジー解析法」と総称し、種々の方法を試みてきた^{7, 9, 27, 31, 35, 36, 37)}。

その中でも筆者らが最も力を注いだのが、新しい顕微鏡法の開発とその応用である。

6. 新しい顕微鏡の応用

筆者らは1967年以来界面展開全載電子顕微鏡法を開発改良し、多くの発見とそれによるモデルの修正を重ねてきた。しかし電子顕微鏡の最大の問題は人為的な変形である。試料の作成から観察・撮像までの過程で不可避の電子線照射・熱・乾燥・機械的外力・脱水剤・固定剤等は、すべてDNAないしはクロマチンの微細構造になんらかの歪力を誘起し、高次構造に種々の変化を与える「クロマチンひずみ誘発要因」である。染色体・クロマチンの可変性に人為的な変化を加える可能性を避けることができない。そこで筆者らは、できる限り生体条件に近い水溶液もしくは湿潤状態で、無固定・無染色のまま「生きている」クロマチンないしは染色体の可変性を観察し、その変化を定量的に観察できる顕微鏡の手法を新しく開発しようと試みてきた。

そのための一つの方法として「軟X線コンタクト顕微鏡 (soft X-ray contact microscopy)」を応用して、水溶液中のクロマチン凝集粒子内部の「桑の実状」の立体的なX線像の撮像に成功した^{10, 38, 39)}。しかしこの方法に必要な特殊な波長のX線源は、高エネルギー物理学研究所 (つくば市) のシンクロトロン放射光の軟X線や大阪大学核融合研究センターのレーザープラズマX線など、大規模な共同利用施設に依存せざるを得ない。

もっと簡便な顕微鏡の手法として筆者らが1991年以来応用してきたのが、「原子間力顕微鏡 (AFM: atomic force microscopy)」である。1982年に開発された走査型トンネル顕微鏡 (STM) に改良を加え、絶縁体である有機高分子や生体試料に応用できるように、探針-試料間の力学的情報を検出して、コンピューターにより試料表面の微細な凹凸を立体的な画像として描く。原子間の引力と斥力の他に、摩擦力・応力・粘弾性など、試料-探針間の種々の相互作用を検出することのできる各種のプロブが開発されており、走査型プロブ顕微鏡 (SPM) と総称される⁴⁰⁾。AFMには次の利点がある^{7, 9)}。①大気中・ガス中・真空中・

溶液中のいずれの環境下でも観察・測定が可能である。②ナノメーターレベルの解像度を有する。③試料の前処理（固定・染色・蒸着等）は不要である。④電離放射線・光・熱などによる試料の損傷がない。⑤短時間に同時的かつ経時的な定量的解析が可能である。⑥種々の画像処理が可能で、ディスクに保存した情報に関して随時解析できる。⑦探針の顕微操作によりナノメータースケールで試料を引き伸ばしたり、切断や移動など種々の操作を加えることができる。⑧歪力変形のマイクロ測定など微細構造のレオロジカルな特性の解析が可能である。

AFMを生物試料に応用した例がまだほとんどなかった1992年、筆者らは固定・染色を加えていないヒトの染色体の直接観察を最初に試みた⁴¹⁾。その後さらに液体中の試料の観察も試みた。図5はヒトの正常リンパ細胞株RPMIから界面展開法により水面上に単離し、シリコン基板上に接着採取した分裂中期の染色体(No.1)を、固定も染色も行わずに液体中観察用セルに移し、液体培養液中で観察したAFM像である。矢印の部分では、ほどけ出たループ状のクロマチン基本繊維が認められる。この基本繊維ループを拡大した図6では、直径30～50nmのスーパービーズの凝集連鎖構造を明瞭に識別することができる。原図ではカラーのため一層鮮明である。さらに探針の針圧を高めて局部的に変形を与えることも可能である^{7, 9, 42, 43)}。このAFMをはじめ走査型プローブ顕微鏡の種々のプローブを応用することによって、染色体・クロマチンの可変性ははいよいよ直接的かつ定量的な検証が可能になるうとしている。

7. 発がん機構と遺伝的不安定性

以上述べたように、染色体・クロマチン微細構造のレオロジカルな可変性を追求してきた筆者の経路は、最近になって、全く別の方向から発がん機構を追ってきた研究の流れと、「遺伝的不安定性」の地点で合流しようとしている。

発がん機構に関しては、初期の頃には予想もなかったことが最近分かってきた。すなわち、がんの発症までには平均数個の遺伝子突然変異の蓄積が必要で、例えば大腸がんでは、発がん遺伝子とがん抑制遺伝子の少なくとも5個の突然変異が関与している。遺伝子の自然に起きる突然変異の頻度は、1遺伝子座当たり $10^{-5} \sim 10^{-7}$ と考えられている。この頻度で1細胞に突然変異が自然に5回蓄積したとすると、ヒト1人の全身の細胞数は実際の細胞数約60兆個を越えてしまう計算になる。つまり確率論的に起こり得ない事象なのである⁴⁵⁾。

そこで放射線発がんの場合、放射線被ばくした細胞内に何らかの「遺伝的不安定性」が誘発され、その結果として自然突然変異誘発に関与する機構が変化して突然変異の頻度が上昇した（遅延型突然変異）という考え方が提唱された^{12, 45)}。

最初はその実体的な裏づけはほとんど無かった。しかしその後、この機構に関与していると思われる有力候補の名が続々と挙がってきた。それらは主としてDNA修復とチェックポイントの機構に関わっている。

DNA・クロマチン・染色体は自然の状態でも、放射線や紫外線・環境変異原物質などの外的要因のみな



図5 培養液中のヒトの分裂中期染色体(No.1)の原子間力顕微鏡写真(液体中: $16 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$) (Watanabe et al. 1994)⁴²⁾

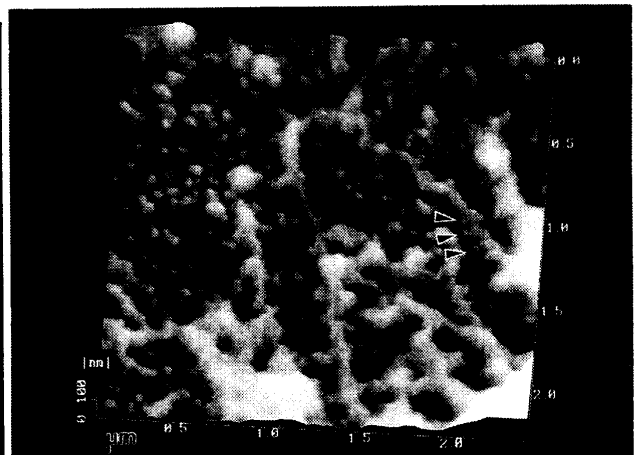


図6 ほどけ出たクロマチン繊維(図5の矢印)のスーパービーズ連鎖構造の原子間力顕微鏡写真(液体中: $2.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$) (Watanabe et al. 1994)⁴²⁾

らず、細胞内の代謝産物（活性酸素ラジカルなど）のような内的要因によっても絶えず多数の損傷を受けている。また分裂細胞では複製と分配の過程で様々な事故が起こりうる。それは筆者がモデルや顕微鏡写真で示した凝集粒子とそのネットワークの、複雑に入り組んだ構造からも容易に想像できることである。一方で細胞はそのような損傷や事故を検知し修復するシステムを、三十数億年の進化の歴史の過程で獲得した。そのシステムが無ければ生物は絶滅してしまっており、今まで生き延びることはできなかった。しかしそのシステムが正常に作動しなかった場合、DNA・クロマチン・染色体のいろいろなレベルに変異や構造異常が蓄積し、最後に発がんに至ると考えられている。

また細胞は分裂に必要な各作業ステップの完了をモニターするシステムをもっていて、事故が起こった時には一時的に細胞分裂の進行を停止し、事故が回復してから分裂を続行する。そのための一連の機構は「チェックポイント」と呼ばれている。もしも完全に回復できない異常細胞は、「アポトーシス」のプログラムが作動して自殺を命じられ、全身から排除される。しかしこのチェックポイント機構が異常になれば、事故による損傷は見逃され、さらに複製されれば損傷は増大し蓄積して、ついには奇形や発がんの原因となる。

これらの機構には次のような例が知られている。①塩基除去修復：加水分解やラジカルにより化学修飾されたDNA塩基の除去と修復。②ヌクレオチド除去修復：紫外線や化学物質によりDNA塩基間につくられた化学修飾（ピリミジン二量体など）の除去と修復。③ミスマッチ修復：DNA複製中に間違えて取り込まれた塩基部分（mismatch）の修復。④非同源性DNA二本鎖切断端結合（end-joining）：相同でない二本鎖切断末端の結合による修復。⑤組換え修復（recombination repair）：相同な二本鎖切断部分の交換による修復。⑥DNA損傷のチェックポイント：分裂中に生じたDNA損傷を検知し修復完了まで分裂を停止する。修復不可能な場合はアポトーシスを誘導する。⑦紡錘体形成チェックポイント：分裂中に姉妹染色分体が娘細胞に正確に分配されるように監視する。

これらの機構の一部は筆者の最初のモデルでもその重要性を指摘してきた⁶⁾。しかし最近ようやく各々の機能と各ステップに関与するタンパク分子およびそれらを指令する遺伝子、さらにその機構の異常によって起こる、がんその他の疾患が明らかになってきた⁴⁶⁾。

例えば大腸がん、特に常染色体性優性遺伝病で大腸・子宮体部・胃などにがんを多発する「遺伝性非腺腫性大腸癌（HNPCC）」の原因遺伝子が、ミスマッチ修復遺伝子であることが最近同定され、この遺伝子の突然変異によりHNPCCの腫瘍では、マイクロサテライト（1～数塩基の単位で繰返し配列する）領域に高率に異常が検出されている⁴⁷⁾。また大腸がんの細胞では高頻度で染色体異常が見られ、それが紡錘体チェックポイントに関わる変異遺伝子の異常によることが最近発見された⁴⁸⁾。

皮膚が光線過敏症状を呈し、皮膚癌や内部臓器癌を高発する「色素性乾皮症（XP）」がヌクレオチド除去修復欠損遺伝病であることは以前からよく知られていた⁴⁹⁾。

染色体の切断・転座・欠失・逆位などの構造異常や姉妹染色分体交換が高率に見られ、しかも高発がん性である遺伝病を「染色体不安定性症候群」と呼び、次の例が知られている。①「ブルーム症候群（BLM）・ウェルナー症候群（WRN）」：DNAの複製・修復・組換えの際、複製酵素系（図1）の連携プレーの一端を担う二重らせんを巻き戻す働きをする「DNAヘリカーゼ」が欠損したため、BLMではいろいろな臓器に高頻度で（正常人の100倍以上）若年において発がんし、発育不全・免疫不全を伴う。WRNでは悪性肉腫の多発に早老症を伴う^{50, 51)}。②「血管拡張性運動失調症（ataxia teleangiectasia）」：細胞周期のG2/M期のチェックポイント異常のため、DNA複製が未完了のまま、あるいはDNAの傷が修復されずに残ったまま染色体が分離され、高発がん性とともに染色体の異数化とリンパ系腫瘍・免疫不全・運動失調・毛細血管拡張・放射線感受性増大などを伴う^{48, 52)}。③「ナイミーヘン症候群（Nijmegen breakage syndrome）」：最近原因遺伝子が単離され、その遺伝子の指令によるタンパク質が相同組換え修復に関与することが示唆された⁵³⁾。神経症状に違いがあるが、ataxiaと同様に高発がん性とともに染色体不安定性・リンパ系腫瘍・免疫不全・放射線高感受性を伴う。④「ファンconi貧血症（Fanconi anemia）」：最近2群の原因遺伝子が単離され、それらの遺伝子の指令によるタンパク質が結合し合い、G2/M期チェックポイント因子と結合すること、DNA end-joining結合の正確さに関係していることなどが明らかになった⁵³⁾。白血病など高発がん性で、種々の先天性奇形を伴い、マイトマイシン

CなどのDNA架橋剤に高感受性で切断・ギャップなどの染色体異常が誘発される。

免疫機構に関しては、筆者が初期のモデルで予想したように⁶⁾、多様な抗体タンパク（免疫グロブリン）を産生するためにリンパ細胞の抗体遺伝子が高頻度の組換え（V-D-J joining）を行うことは、その後実証済みで、このプロセスに必要な非同源性DNA二本鎖切断のend-joining結合が異常になると免疫不全になる⁴⁶⁾。

染色体末端のテロメアはTTAGGGの繰返し配列からなるDNAと特異的タンパクとからなる高次複合体で、分裂の際には完全に複製されずに分裂の度に末端から短縮化する。限界を超えると染色体は安定を保てなくなり、分裂不可能になって老化する。一方この短縮化に拮抗してテロメアDNAを伸長させるための酵素テロメラーゼが存在する。ヒトのがん細胞や上皮系の前がん性病変の多くは、テロメアDNAは短いがテロメラーゼの活性を示す。骨肉腫ではテロメラーゼ活性はないが長いテロメアDNAを有する⁵⁴⁾。最近ataxiaの原因遺伝子ATMがテロメアの維持に必須で、ATMタンパクがDNA修復に関わるタンパクと相互作用してテロメア機能を維持していることが証明された⁵⁵⁾。

国立がんセンターの研究グループの報告によれば、ヒトの染色体中に広く分布するミニサテライト（5－100塩基対の反復領域）が不安定化して塩基配列の変異が誘発された例が、大腸がんの56%の症例、胃がんの25%の症例で観察された⁵⁶⁾。

8. むすび

さて、筆者が明らかにしてきたクロマチン凝集粒子連鎖およびそのネットワーク構造に、放射線によって損傷が与えられた場合、その後細胞が分裂停止や染色体異常、突然変異、発がんなどの放射線障害に進む可能性（放射線感受性）を決定する要因の一部として、筆者は次のようなクロマチン・染色体微細構造の可変性による可能性を論じてきた^{8, 9, 24)}。すなわち、①損傷部位が凝集クロマチン構造内に埋没して保護もしくは潜在して残存する可能性。②歪力集中と局部的構造の変動による分子鎖切断や分子間架橋形成の難易。③損傷の検出と修復に必要なDNA二本鎖の解きほぐしあるいはクロマチン凝縮構造の解きほぐれの難易。④

切断末端の再結合・連結・つなぎ換えに必要な、相補的分子鎖相互の近接と接触の難易。⑤修復に必要な酵素および特異的タンパクとの接触の難易。これらの難易を決定するのは図2のクロマチン凝縮連鎖構造の局部的な可変性と、図3に示したクロマチン・ネットワークの各レベルの結び目における切断とつなぎ換えの可変性に依存していると考えられる。

今やそれらの可変性は、発がんの過程において一層重大な鍵を握っていると考えざるを得ない。すなわち、放射線・紫外線・発がん物質・ウイルスなどによってDNA・クロマチン・染色体に最初に与えられた微小な損傷は、クロマチン・ネットワークの可変性を介して増幅され、さらに遺伝子の不安定性を増大させて変異率を高めるという正のフィードバック回路を何回も回ることによって、がん関連遺伝子が蓄積し、最後にはがんが発症するのであろう。筆者はこれまで新しい顕微鏡法を開発し応用してきた共同研究者と共に、現在もこのような染色体の可変性を追求しつつある。

文 献

- 1) 渡部 真：染色体の動的構造Ⅰ，科学，31：298-302（1961）。
- 2) 渡部 真：染色体の動的構造Ⅱ，科学，31：368-371（1961）。
- 3) 渡部 真：染色体の構造と増殖の機構，蛋白質・核酸・酵素，7：582-595（1962）。
- 4) Watanabe, M.: A mechanochemical model to conform with the organization and mode of duplication of chromosome. 東京大学生物系研究科博士論文（1963）。
- 5) 渡部 真：染色体の高次構造とその倍加，現代の生物学3，遺伝，pp.90-127，岩波書店 東京（1967）。
- 6) 渡部 真：染色体の編成換えによる変異，現代の生物学3，遺伝，151-172，岩波書店 東京（1967）。
- 7) 渡部 真：原子間力顕微鏡のバイオレオロジーへの応用－マイクロ・レオロジーの可能性－，日本バイオレオロジー学会誌（B&R），8：146-158（1994）。
- 8) 渡部 真：染色体モデル，放医研シンポジウムシリーズNo.26，放射線生物影響とリスクのモデル化，25-38，放射線医学総合研究所 千葉（1995）。
- 9) 渡部 真：放射線の標的としての染色体，東京都立アイソトープ総合研究所報告，13：1-26（1996）。

- 10) 渡部 真: 染色体の構造と行動, 臨床染色体診断法, 9-25, 金原出版, 東京 (1996).
- 11) 谷脇雅史: 腫瘍性疾患への染色体診断技術の応用, 臨床染色体診断法, 572-580, 金原出版, 東京 (1996).
- 12) 丹羽太貫: 放射線発がんモデル, 放医研シンポジウムシリーズNo.26, 放射線生物影響とリスクのモデル化, 193-198, 放射線医学総合研究所, 千葉 (1995).
- 13) 第57回日本癌学会総会記事: シンポジウム10「ゲノムの不安定性とがん」, 28-29 (1998).
- 14) Giannoni, G., Padden, F.J. and Keith, H.D.: Crystallization of DNA from dilution. Proc. Natl. Acad. Sci., 62: 964-971 (1969).
- 15) 渡部 真・金西信次: 染色体模型としてのDNA network. 昭和45年度都立アイソトープ研年報, 92-93 (1970).
- 16) 渡部 真: 染色体の構造と機能-染色体のセグメントとパッキング, 細胞生物学1「細胞の複製と形質発現」, 62-107, 理工学社 東京 (1977).
- 17) 渡部 真: 染色体の機能と高次微細構造-DNAの高次構造の分化と制御, 生物物理, 9: 121-137 (1969).
- 18) Watanabe, M. and Tanaka, N.: Supercoiling organization of chromatin fibrils studied by surface-spread electron microscopy. Proc. XII Internatl. Congress Genetics, 1: 160 (1968).
- 19) Watanabe, M., Kuroiwa, T., Tanaka, N. et al.: Surface-chemical isolation and electron microscopic studies on chromatin fibrils. Jap. J. Genetics, 42: 445 (1967).
- 20) Watanabe, M. and Tanaka, N.: Supertwisting organization of DNA molecules and their rheological properties in chromosomes and nuclei. Jap. J. Genetics, 47: 1-48 (1972).
- 21) 渡部 真・田中信徳: 染色体, 生物科学シリーズ4 遺伝, 81-107, 共立出版, 東京 (1968).
- 22) 渡部 真・田中信徳: 染色体の解析, 細胞生物学シリーズ1 新しい細胞遺伝学, 5-39, 朝倉書店, 東京 (1978).
- 23) 渡部 真: 染色体の構造と機能の変異, 体細胞遺伝学, 55-80, 理工学社, 東京 (1982).
- 24) 渡部 真: クロマチン, 放射線障害の機構, 304-346, 学会出版センター, 東京 (1982).
- 25) Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B. et al.: Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. Nature, 311: 532-537 (1984).
- 26) Kornberg, R. D. and Klug, A. (渡部 真訳): スクレオソーム, サイエンス, 11(4): 96-112 (1981).
- 27) 渡部 真: 放射線および薬剤による染色体微細構造の変化, 細胞, 6: 28-36 (1974).
- 28) 渡部 真: DNAの高次よじれ構造と染色体, 細胞, 18: 460-466 (1986).
- 29) Azorin, F., Perez-Grau, L. and Subirana, J.A.: Supranucleosomal organization of chromatin: Electron microscopic visualization of long polynucleosomal chains. Chromosoma (Berl.), 85: 251-260 (1982).
- 30) Zentgraf, H. and Franke, W.W.: Differences of supranucleosomal organization in different kinds of chromatin: Cell type-specific globular subunits containing different numbers of nucleosomes. J. Cell Biol., 99: 272-286 (1984).
- 31) 渡部 真・金城康人ほか: 昭和62年度原子力平和利用委託試験研究「染色体工学的手法による染色体物質の放射線初期損傷機構に関する研究」成果報告書, 20-29, 科学技術庁 (1988).
- 32) Yamada, T., Ohyama, Y., Watanabe, M. et al.: Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro. Radiat. Res., 85: 544-553 (1981).
- 33) 山田 武・大山ハルミ: アポトーシスの科学, 250, 講談社, 東京 (1994).
- 34) Alberts, B., Bray, D., Watson, J. D., et al.: 細胞の分子生物学 (第2版), 中村桂子, 松原謙一監修. 1261, 教育社, 東京 (1990).
- 35) 渡部 真・金城康人: クロマチン・ネットワークの放射線生物学的重要性, 都立アイソトープ研報告書, 9: 61-76 (1992).
- 36) 渡部 真・金城康人: 染色体突然変異のレオロジーⅡ. クロマチンのひずみと損傷, 日本バイオレオロジー学会論文集1980, 56-57 (1980).
- 37) Watanabe, M.: Superstructure of chromatin in chromosomes: Supertwisting organization and superbeads variations. Gamma Field Symposia No.26, Inst. Rad. Breeding, NIR, MAFF, 1-22 (1987).
- 38) Watanabe, M., Shinohara, K., Kinjo Y.: Observation of human chromosome by X-ray microscopy in comparison with electron

- microscopy. X-ray Microscopy in Biology and Medicine, 295-304, Japan Sci. Soc. Press/Springer-Verlag Tokyo (1990).
- 39) Kinjo, Y., Shinohara, K., Watanabe, M. et al.: Direct imaging in a water layer of human chromosome fibres composed of nucleosomes and their higher-order structures by laser plasma X-ray contact microscopy. J. Microscopy, 176: 63-74 (1994).
- 40) 森田清三：走査型プローブ顕微鏡のすべて, 252, 工業調査会 東京 (1992).
- 41) 渡部 真：原子間力顕微鏡の生物試料への応用, ISOTOPE NEWS, No.465(3), 10-15 (1993).
- 42) Watanabe, M., Kinjo, Y. and Shigeno, M.: Observation of human chromosomes by atomic force microscopy in comparison with electron microscopy. Internatl. Congress Electron Microscopy 13-Paris, 3A 445-446 (1994).
- 43) Watanabe, M. Kinjo, Y.: Heterogeneity of chromatin target analyzed by atomic force microscope. Radiation Research 1895-1995, Congress Proc., 1: 381 (1995).
- 44) Kinjo, Y. Shigeno, M. Watanabe, M. et al.: Studies on the fine structure of wet human chromosome fibers unstained with no fixative by atomic force microscopy in comparison with X-ray contact microscopy. Cytologia, 61: 327-336 (1996).
- 45) 田中公夫：放射線誘発の遺伝的不安定性と発癌, 実験医学, 16: 1642-1647 (1998).
- 46) 武田俊一：ゲノムの不安定性と癌, 実験医学, 16: 1610-1616 (1998).
- 47) 湯浅保二：マイクロサテライト不安定性と発がん, 第57回日本癌学会総会記事S10-2, 28 (1998).
- 48) 寺田泰比古：G 2/M期チェックポイント異常と染色体不安定性, 実験医学, 16: 1631-1637 (1998).
- 49) 菅澤 薫：除去修復損傷による突然変異の誘発と癌, 実験医学, 16: 1617-1623 (1998).
- 50) 池田日出男：DSB repairと発がん, 第57回日本癌学会総会記事S10-3, 28 (1998).
- 51) 古市泰宏：Wernerヘリカーゼと発がん, 同上S10-5, 29 (1998).
- 52) 園田英一朗・武田俊一：遺伝子組換え異常と発がん, 実験医学, 16: 1624-1630 (1998).
- 53) 中村麻子・松浦伸也・田内広他：日本人ファンconi患者における変異解析, 日本放射線影響学会41回大会講演要旨集1-C-23, 98 (1998).
- 54) 田原栄一：ヒトがんにおけるテロメア及びテロメラーゼの異常, 第57回日本癌学会総会記事S10-1, 28 (1998).
- 55) 石川冬木：染色体テロメア維持の分子機構, 日本放射線影響学会41回大会講演要旨集S2-04, 61 (1998).
- 56) 中釜齊・杉村隆・長尾美奈子他：ミニサテライト不安定性と発がん, 第57回日本癌学会総会記事S10-4, 28 (1998).

(受付：1998年12月10日；受理：1999年2月17日)