

ヒメネズミ (*Apodemus argenteus*) の C-ヘテロクロマチン

における QM 蛍光遅延の機構解明に関する研究

**Studies on the mechanism of the delayed quinacrine mustard
fluorescence in the C-heterochromatin of the small
Japanese field mouse, *Apodemus argenteus***

2009.3

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(弘前大学)

井 沼 道 子

目 次

序論・・・・・・・・・・・・・・1

材料と方法・・・・・・・・・・・・6

結果・・・・・・・・・・・・・・13

考察・・・・・・・・・・・・・・21

要約・・・・・・・・・・・・・・32

謝辞・・・・・・・・・・・・・・35

参考文献・・・・・・・・・・・・36

表・・・・・・・・・・・・・・40

図・・・・・・・・・・・・・・46

序 論

キナクリンマスタード (quinacrine mustard: QM) による染色体分染 (chromosome banding) は、ヒトを含む様々な生物の染色体の識別・同定において最も古くから行われてきた分染法である。QM は分子中に芳香環を持つアクリジン系の蛍光色素であり、塩基対間にその芳香環を挿入 (intercalation) することにより DNA へ結合する。QM 染色によって生じる染色体バンドは Q-band と呼ばれ、一般的には染色体 DNA の AT-rich な領域で強蛍光を発生し、GC-rich な領域では弱蛍光であるとされている (Sumner, 1990)。

QM を含む蛍光色素分子は、特定の波長の励起光を吸収することにより基底状態から励起状態へと遷移し、基底状態へと戻る際にエネルギーを蛍光として放出するが、励起光照射が長時間行われると分子自身も崩壊していく。そのため、蛍光顕微鏡下では励起光の照射開始からしばらくは強い蛍光を放つが、時間の経過に伴い発する蛍光強度は減衰してゆく。蛍光色素全般において、このような蛍光動態は、染色の対象となる生物種及び組織を問わず、普遍的に見られる現象である。

ところが、ネズミ目ネズミ科アカネズミ属に属する日本固有種、ヒメネズミ (*Apodemus argenteus*) の染色体は、QM 染色した際、この現象に当てはまらない特異な蛍光動態を示すことが当研究室により報告されている (Obara *et al.*, 1997)。本種の染色体には C-ヘテロクロマチン (constitutive heterochromatin) が多量に存在し、この領域は QM で染色し波長 435 nm の励起光 (blue light: BL) を照射すると、照射を開始した直後は弱い蛍光を放つが、その後徐々に蛍光強度が増大し、ピークに達した後減衰してゆく。強蛍光が遅れて発すること

から、この現象は“QM 蛍光遅延” (delayed QM-fluorescence) と呼ばれている (Obara *et al.*, 1997)。このような現象は動物・植物及び下等生物まで含めてもこれまで報告されておらず、唯一ヒメネズミでのみ確認されているものである。従って、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンにはこの現象の要因となる未知の構造あるいは構成成分が存在すると推測される。

C-ヘテロクロマチンとは C-band 染色法により濃染される、間期においても強く凝縮しているクロマチンを指す。この領域は一般的に S 期後期に複製され、多様な高頻度反復配列から成る遺伝的に不活性な領域であるが、その生物学的意義には未だ不明な点も多い。QM 蛍光遅延のメカニズム解明は、未知の部分の多い C-ヘテロクロマチンの構造・機能研究に大きく寄与するものと考えられる。また、これまで普遍的と考えられていた蛍光減衰のメカニズムにおいて、新たな概念を導入する可能性を持つ。

当研究室では、QM 蛍光遅延のメカニズム解明のために様々な面から研究を行っており、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンの性状に関して次のようなことが判明している。

- (1) 230 bp の反復単位から成る AT-rich な高頻度反復配列 (*Dra* I fragment) を含む (Fukushi *et al.*, 2001)。
- (2) AT-rich 領域を特異的に染色する DA/DAPI (distamycin A/4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) 染色においても QM 蛍光遅延と類似した蛍光動態を示す (Obara and Sasaki, 1997; Obara *et al.*, 1997) が、同じく AT-rich 領域を染める Hoechst 33258 染色では弱蛍光のみを発し、蛍光遅延も示さない (Nomura *et al.*, 2001)。
- (3) 分裂前期の低凝縮な染色体、あるいはシチジン類似体の

5-aza-deoxycytidine を DNA に取り込ませ、人為的にクロマチンを脱凝縮させた染色体の C-ヘテロクロマチンにおいても QM 蛍光遅延は観察される (岡田, 1998)。

- (4) HCl 及び NaCl によるヒストン除去処理を染色体に施しても QM 蛍光遅延は観察される (Obara *et al.*, 1997)。
- (5) メチレンブルー (methylene blue: MB) を介した光酸化処理を施すことにより、QM 蛍光動態は BL 照射直後から強蛍光を放つ“一般的な”蛍光動態に転換する (Nomura *et al.*, 2001)。
- (6) 制限酵素 *Alu* I、*Rsa* I で処理することにより、(5) の光酸化処理と同様に“一般的な”蛍光動態となる (Nomura *et al.*, 2001)。
- (7) タンパク質変性剤 Dithiothreitol (DTT) で処理した場合、QM 蛍光遅延は観察される (Inuma and Obara, 2006) が、タンパク質分解酵素 Proteinase K 及び Trypsin 処理により、QM 蛍光動態の変化がある程度見られる (野村, 1999)。

これらの事実から、QM 蛍光遅延は単なる DNA の塩基組成やクロマチンの凝縮度合などが原因で生じるものではなく、複数の要因が関わる複雑な現象であることが示唆される。特に (5) (6) (7) のように、染色体高次構造に影響を及ぼすような処理を施した場合に QM 蛍光動態が変化することから、QM 蛍光遅延は C-ヘテロクロマチンにおける何らかの構造的変化により起こる可能性が推測される。しかし過去においては、この現象に伴い染色体上にどのような変化が生じているかは調査されていない。

本研究では始めに、蛍光色素アクリジンオレンジ (acridine orange: AO) 及び *in situ* nick translation 法を用い、QM 染色及び BL 照射により本種の染色体

DNA に起こる変化を調査した (Inuma *et al.*, 2007)。AO は単量体の蛍光波長が 533 nm で緑の色調だが、多量体になると波長が 656 nm の赤色に変化する性質を持つ。AO が二本鎖の核酸に結合すると塩基対間に AO 分子が *intercalation* するため、分子は単量体として核酸中に分散する形になり、蛍光色調は緑になる。一方、核酸が一本鎖 (変性 DNA、RNA 等) の場合、AO 分子は核酸分子のリン酸部分に結合し、多数の分子が重なり合い (*stacking*) 集合体を形成するため、発する蛍光色調は赤色となる (Rigler, 1973; Sumner, 1990)。このような性質から、AO は DNA の変性の有無を調べる目的にしばしば利用されている。また、*in situ* nick translation 法は染色体 DNA 上の nick (二本鎖 DNA の一方の分子鎖の切断) 部位を標識するための手法で、DNA polymerase I が DNA 上に nick の存在する部位からヌクレオチドの除去修復を行い、新たな DNA 分子を合成していく性質を利用し、nick の生じた染色体領域に biotin-16-dUTP 等の標識したヌクレオチドを取り込ませ、検出可能にするというものである (Adolph and Hameister, 1985)。ビオチン標識の場合、検出はビオチンに強い親和性を持つアビジン (*avidin*) に色素を結合させたものが使用される。今回は赤色蛍光の rhodamine-*avidin* を用い、染色体の対比染色には QM を用いた。

ヒメネズミの染色体に対する比較対照として、ヒメネズミと同属の近縁種であり、北海道からサハリン、シベリア、中国、朝鮮半島にかけて分布するハントウアカネズミ (*Apodemus peninsulae*) を用いた。この種の染色体にはヒメネズミのような大型の C-ヘテロクロマチン領域は存在しないため、そのような領域を持つ種として、ネズミ目ネズミ科のハタネズミ (*Microtus montebelli*)、モグラ目モグラ科ヒミズ亜科のヒミズ (*Urotrichus talpoides*) も使用した。

また、上記 (5) で示したように、光酸化処理により QM 蛍光動態が大きく変化することは、光すなわち BL の照射自体が QM 蛍光遅延において重要な役割を果たしていることを示唆する。MB を介した光酸化は DNA 中のグアニン残基を特異的に破壊するとされており、この反応がキナクリンの蛍光強度を変化させる可能性が Ferrucci and Mezzanotte (1982) により指摘されている。光酸化がヒメネズミ染色体に及ぼす影響を調査するため、MB 光酸化処理による QM 蛍光動態の転換と、染色体 DNA の変化 (nick の有無) との関連性を *in situ* nick translation 法を用い分析した。

さらに上記 (7) に示されるように、QM 蛍光遅延のメカニズムには DNA のみならず染色体のタンパク質成分 (上記 (4) より、おそらくはノンヒストンタンパク) も関与している可能性が示唆されるが、この点において、過去には確定的な結果は得られていない。これを検証する目的で、タンパク質分解酵素トリプシンによるヒメネズミ染色体の処理を行い、QM 蛍光動態の変化を調査した。また、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンに特有のタンパク質成分が存在するかを探るため、核タンパク質の電気泳動及び質量分析も試みた。核タンパク質分析の比較対照として、ヒメネズミの同属近縁種で日本固有種のアカネズミ (*Apodemus speciosus*)、及びマウス (*Mus musculus*, BALB/c 系統) も使用した。

材 料 と 方 法

材料

ヒメネズミ (*Apodemus argenteus*) は青森県の弘前市、田子町、十三湖近辺、岩木山及び白神山地の落葉広葉樹林にてシャーメントラップを用い捕獲した個体、又は捕獲した雌から産まれた個体を使用。染色体標本の材料として雄 3 個体、雌 5 個体を用い、核タンパク質の抽出には雄 2 個体、雌 3 個体を用いた。

ハントウアカネズミ (*A. peninsulae*) はロシアと北朝鮮の国境付近、Khasan にて捕獲された個体の子孫である雌 1 個体を用いた。アカネズミ (*A. speciosus*) は青森県田子町又は白神山地にて捕獲した雌より産まれた雄 2 個体、雌 1 個体を使用。ハタネズミ (*Microtus montebelli*) 雄 1 個体、及びヒミズ (*Urotrichus talpoides*) 雌 1 個体は青森県弘前市で捕獲したものを使用。マウス (*Mus musculus*) は BALB/c 系統の雄・雌 1 個体ずつを用いた。

方法

染色体標本作製

染色体標本は主に尾部又は肺組織より培養した線維芽細胞から作製した。無菌的に摘出した尾の先端部(皮膚は除去)、又は肺組織を細切し培養瓶に塗抹し、15% bovine serum (Invitrogen) を含む Eagle's MEM (Sigma-Aldrich) を 10 ml 加え、37°C の CO₂ インキュベーターで静置培養した。1 ~ 2 回の継代培養を経て、細胞が対数増殖期にある状態でコルヒチン(最終濃度 37.5 ~ 50.0 ng/ml) 処理を 60 分施し、細胞をトリプシンで剥離させ回収、0.075 M KCl 溶

液で 37°C・20 分の低張処理を行った。カルノア固定液 (methanol : acetic acid = 3:1) により細胞を固定、空気乾燥法によりプレパラートを作製。完成したプレパラートは -50°C で保存した。

一部の標本については、骨髓細胞より作製した。摘出した大腿骨から注射器を用いて骨髓細胞を Eagle's MEM 内へ洗い出し、上記と同じコルヒチン濃度で 37°C・60 分処理する短期培養法、また個体に 12.5 µg/ml のコルヒチン溶液 0.1~0.15 ml を腹腔内注射し、50~60 分処理した後大腿骨から骨髓細胞を取り出す直接法の二通りが用いられた。どちらも低張処理以降の手順は上記同様である。

C-band 染色

Sumner (1972) の BSG (barium hydroxide/saline/Giemsa) 法を用いた。プレパラートのエイジングは室温で 7 日とし、0.2 N HCl で 60 分 (室温)、50°C の 5% Ba(OH)₂ 溶液で 2~2.5 分、60°C の 2×SSC (standard saline-citrate: 0.3 M NaCl + 0.03 M sodium citrate) で 60 分処理し、Sørensen's buffer (0.2 M Na₂HPO₄ + 0.2 M NaH₂PO₄, pH 7.0) で希釈した 4% ギムザ溶液で 2.5~3.5 時間染色した。

蛍光色素染色及び脱色

QM 染色は Caspersson *et al.* (1971) の手法を基に行った。McIlvaine's buffer (0.2 M Na₂HPO₄ + 0.1 M citric acid, pH 7.0) に 3 分間浸し、同 buffer で希釈した 50 µg/ml の QM 溶液で 10 分間染色、同 buffer で洗浄・封入した。

QM の脱色には、カバーガラスをはがしたプレパラートを McIlvaine's buffer 及び蒸留水で各 10 分 × 2 回ずつ洗浄し、カルノア固定液により 10 分 × 2 回脱色・脱水した。37°C でオーバーナイト乾燥させた後、AO 染色及び *in situ* nick translation 法に供した。

AO 染色は Bobrow *et al.* (1972) の R-band 法を基に行った。1/15 M phosphate buffer (1/15 M Na₂HPO₄ + 1/15 M NaH₂PO₄, pH 7.0) で希釈した 50 µg/ml の AO 溶液で 20 分染色し、同 buffer で洗浄・封入した。

***In situ* nick translation 法**

Adolph and Hameister (1985) の *in situ* nick translation 法を参考に、当研究室で改変した手法を用いた。ビオチン標識のための reaction mixture 作製には、Roche Diagnostics の Nick Translation Kit 及び DNA polymerase I、Biotin-16-dUTP を用いた。mixture の組成は DNA polymerase I が 2.4 ~ 4.8 units/slide、dATP・dCTP・dGTP 各 40 µM、biotin-16-dUTP が 50 µM とし、Kit に添付の 10 × buffer により調整した。mixture 全量は 30 ~ 60 µl/slide とした。プレパラート上の細胞面にこの reaction mixture をのせ、パラフィルムをかぶせて mixture を広げ、37°C の湿潤箱で 90 分処理。4°C の 5% トリクロロ酢酸溶液で 5 分洗浄、4 × SSC (室温) で 5 分ずつ 2 回洗浄。

Rhodamine-avidin による染色は、Kubota *et al.* (1993) を参考に行った。4 × SSC + 1% bovine serum albumin に Rhodamine-avidin DCS (Vector Laboratories) を最終濃度 20 ~ 30 µg/ml になるように加え、プレパラートに 100 µl/slide ずつのせ、パラフィルムをかぶせ 37°C の湿潤箱で 60 分処理。続いてシェーカーを用い、順に 4 × SSC、4 × SSC + 0.05% Triton X-100、4 × SSC、

2 × SSC でそれぞれ 5 分ずつ、100 rpm で洗浄。QM による対比染色は前述の手法と同様に行い、最後は antifade mounting medium (1.0 mg/ml para-phenylenediamine in glycerol with 10% PBS) で封入した。

メチレンブルー (MB) 光酸化処理

Ferrucci and Mezzanotte (1982) の手法に基づき行った。シャーレ内でプレパラートを 3.34×10^{-5} M の MB 溶液に浸し、20 W の蛍光灯を用い、可視光をプレパラート表面より 10 cm の距離から 24 時間室温で照射。終了後、カルノア固定液で 5 分間洗浄し MB を除去、QM 染色又は *in situ* nick translation 法を施した。コントロールとしては、MB 溶液に浸し光照射をしないもの (A) と、蒸留水に浸し光照射を同時間施したもの (B) の 2 種類を行った。

染色体のトリプシン処理

Seabright (1971) の trypsin G-band 法を参考に行った。プレパラートのエイジングは 37°C で 18 時間とし、PBS(-) (phosphate-buffered saline; Mg²⁺, Ca²⁺ free) で希釈した種々の濃度 (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0063, 0.0031, 0.0016%, w/v) の trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) で 37°C・10 秒ずつ処理し、氷冷 PBS(-) で 2 回、氷冷蒸留水で 1 回洗浄した後、前述のように QM 染色した。コントロールとしては、PBS(-) のみ又は熱により不活性化 (100°C で 10 分間煮沸) したトリプシン (0.1% 相当) で同様に処理した。

標本観察及び写真撮影

ヒメネズミ C-ヘテロクロマチン領域の観察は、基本的に X 染色体の大型の C-ヘテロクロマチン領域 (C-block) に着目して行った。C-band 標本の観察には、オリンパス・システム生物顕微鏡 BHS を、蛍光染色標本の観察には同顕微鏡に落射蛍光装置 BH2-RFK (USH-102D lamp 使用) を装着し用いた。QM・AO 観察の場合は B 励起フィルター (BP490: 励起波長 410 ~ 490 nm、主波長 435 nm)、rhodamine 観察の場合は G 励起フィルター (BP545: 励起波長 515 ~ 560 nm、主波長 546 nm) を用いた。デジタル写真撮影には cooled CCD camera、MicroPublisher 5.0 RTV (QImaging)、及びソフトウェア QCapture PRO 5.0 (QImaging) を使用し、一部必要に応じて Fujifilm Minicopy film HR II、Kodak Technical Pan 2415 film 及び Kodak Ektachrom DYNA EX 400 film を用い、オリンパス・全自動顕微写真撮影装置 PM-30 で撮影した。

核タンパク質成分の抽出

複数個体より肝臓を摘出、湿重量を測定後、氷冷 PBS(-) で血液等を洗い落とし、(以下全工程でサンプルは氷冷しながら扱う) メスで細切し、湿重量の 9 倍容の homogenization buffer {10 mM HEPES (nacalai tesque), pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0.25 M sucrose; 10% glycerol; 0.2 mM PMSF; 0.5 mM DTT; 1 × Complete (protease inhibitor cocktail tablets, Roche)} へ懸濁。ダウンスホモジナイザー (Wheaton Science Products) へ移し、loose pestle を用い 10 ~ 20 回ストローク。3 枚重ねのガーゼで濾過、日立の遠心分離機 SCR18B 及びアングルローター RPR20-2 を用い、5,200 rpm で 15 分遠心 (3,300 × g, 2 ~ 4°C に設定)。沈殿を 1 倍容の homogenization buffer へ懸濁、

ホモジナイズ・遠心をさらに 2 回繰り返して細胞質を除いた。沈殿の約 1/2 容量の low-salt buffer (20 mM HEPES, pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 0.02 M KCl; 0.2 mM EDTA; 25% glycerol; 0.2 mM PMSF; 0.5 mM DTT; 1 × Complete) へ懸濁、スターラー・攪拌子を用い穏やかに攪拌しながら high-salt buffer (1.2 M KCl, 他の組成は low-salt buffer と同) を同じく 1/2 容量滴下。1 時間穏やかに (100 rpm 程度) 攪拌を続け、14,000 rpm で 30 分 (25,000 × g, 2 ~ 4°C) 遠心。上清を核タンパク質成分として -50°C で保存。濃度測定には Bradford 法を用いた。

タンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE)

分離ゲルのアクリルアミド mixture (29.2% acrylamide + 0.8% N-N'-methylenebisacrylamide) 濃度は 6・9・12% とし、buffer 組成は 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.05% SDS。濃縮ゲルはいずれの場合もアクリルアミド mix. 4%、buffer 組成は 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.1% SDS。両ゲル共に 0.24% TEMED、0.05% ammonium persulfate を添加。サンプルは sample buffer (0.005% bromophenol blue; 1.2 mM EDTA; 2% SDS; 5% 2-mercaptoethanol; 0.06 M Tris-HCl, pH 6.8) により調整し、3 分間の煮沸により変性させた。分子マーカーには BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen) を用いた。

泳動装置 Bio-Rad ミニプロテアン 3 セルにゲルをセットし、running buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS) を注ぎ、サンプルをアプライしたら、パワーサプライ Bio-Rad パワーパック 1000 につなぎ、100 V 定電圧で 70 ~ 90 分泳動。泳動後のゲルは CBB (0.1% coomassie brilliant blue

R-250 + 50% methanol) 染色液に 30 分浸し染色、全体が青く染まったら脱色液 (25% methanol + 7.5% acetic acid) へ浸し、バンドが見えるまで脱色。数時間程度でゲルを引き上げ、透明なプラスチックファイルに挟んでスキャナーで読み込んだ。

タンパク質の質量分析 (Nano LC-MS/MS)

泳動・CBB 染色後のゲルより分析するバンドをメスで切り出し、ゲル片を 0.1 M (NH₄)HCO₃: アセトニトリル = 1:1 の脱色液により脱色、100% アセトニトリルにより脱水。減圧濃縮遠心機 Concentrator CC-180 (Tomy) で乾燥させ、10 mM DTT + 25 mM (NH₄)HCO₃ により 56°C・45 分還元処理、0.1 M ICH₂CONH₂ + 25 mM (NH₄)HCO₃ により暗所で 37°C・45 分アルキル化。25 mM (NH₄)HCO₃ で洗い、再度上記のように脱水・乾燥。ゲル内トリプシン消化はチューブ内のゲルにトリプシン溶液 {0.1 µg/µl trypsin + 0.1 M (NH₄)HCO₃} を数滴加え、ゲルが十分に浸った状態で 0°C・30 分置き、余分なトリプシン溶液を吸い取り 0.1 M (NH₄)HCO₃ を加え、37°C でオーバーナイト処理を行った。5% trifluoroacetic acid (TFA) + 50% アセトニトリルでペプチドの抽出処理を 2 回繰り返す、抽出物は減圧濃縮遠心で乾燥、0.1% TFA に再溶解し、ZipTip (Millipore) を用いて脱塩処理を行った。75% アセトニトリル + 0.1% TFA でサンプルを洗い出し、減圧濃縮遠心で乾燥させ、質量分析用サンプルとして -80°C で保存。

Nano LC-MS/MS の装置は日立 NanoFrontier LD、データベース検索用ソフトウェアは PEAKS (infocom) を使用。検索データベースは NCBIInr、検索時の Taxon は Rodentia で行った。

結 果

C-band 染色及び QM 染色

Fig. 1 は C-band 染色法により C-ヘテロクロマチン領域を濃染したヒメネズミの中期核板である。本種の染色体数は $2n=46$ で、常染色体は大きさの異なる 20 対のアクロセントリック染色体、中型と小型 2 対のメタセントリック染色体から成り、X 染色体は全染色体中最大のサブテロセントリック染色体、Y 染色体は中型のアクロセントリック染色体であった。常染色体の動原体及びその周辺部には顕著な C-band 濃染部が見られ、X 染色体には、短腕から長腕基部にかけて、全長の約 40% にも及ぶ C-block と呼ばれる大きな濃染領域が存在した。C-block のサイズには相同対間で異型性 (heteromorphism) が見られる場合もあった。また、Y 染色体は全体が濃染された。これらの観察結果は過去の報告 (Yoshida *et al.*, 1975; Fukushi and Obara, 1997; Obara *et al.*, 1997; Fukushi *et al.*, 2001) と一致した。

Fig. 2 は C-ヘテロクロマチン領域の比較に用いた 4 種について、C-band 染色した染色体を並べたものである。ヒメネズミ (Aa) は前述のとおり X 染色体に C-block を持つ。ハタネズミ (Mm) はメタセントリックの X 染色体の動原体及びその周辺部に、ヒミズ (Ut) はサブメタセントリックの 13 番染色体の短腕基部から動原体部にかけて、それぞれ大型の C-block を持つ。ハントウアカネズミ (Ap) の C-ヘテロクロマチン領域は他 3 種に比べ小さいが、アクロセントリックの X 染色体動原体部に比較的大きな領域があるため、便宜上これを C-block と呼ぶことにする。

Fig. 3 は QM 染色したヒメネズミ中期核板の、BL 照射に伴う蛍光の変化を

示したものである。ヒメネズミの染色体ユークロマチン領域は、一般的な蛍光動態と同じく、BL 照射開始直後に最も蛍光強度が強く、その後は照射時間の経過に伴って蛍光強度が弱まっていった。一方 C-ヘテロクロマチン領域は照射開始直後には弱蛍光であるが、照射時間の経過に伴い徐々に蛍光強度が強まってゆき、この強蛍光の状態をしばらく維持した後、徐々に蛍光が減衰していくという“蛍光遅延”を示した。ただし小型のアクロセントリック染色体 2 対、小型のメタセントリック染色体 1 対及び Y 染色体においては QM 蛍光遅延は見られなかった。これらの観察結果は過去の報告 (Obara and Sasaki, 1997; Obara *et al.*, 1997; Fukushi *et al.*, 2001; Nomura *et al.*, 2001) と一致していた。

QM 染色・BL 照射後の AO 染色

Fig. 4 は QM 染色及び BL 照射が 4 種の染色体の AO 蛍光色調に及ぼす変化を調べた結果である。それぞれの種の C-block を持つ染色体を Fig. 2 と同様に並べてある。Table 1 はヒメネズミの X 染色体について、AO 蛍光色調を C-ヘテロクロマチン (C-block) とユークロマチン領域ごとに分けて示したものである。AO の色調は赤 (red)、橙 (orange)、黄 (yellow)、緑 (green) の 4 種類に分類した。

Fig. 4 a は前処理なしで AO 染色のみ施したもので、4 種いずれの染色体も緑の蛍光を発していた。核板によっては黄色に近い色調の染色体も見られた (Table 1)。いずれの種でも C-ヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域の間に明確な差異は確認されず、Q-band のようなバンドパターンも観察されなかった。また、蛍光遅延は見られなかった。

Fig. 4 b は染色体を QM 染色した後、BL 照射を行わずに遮光して室温に置

き、その後脱色、AO 染色したものである（以下 QM-noBL-AO と記す）。ハントウアカネズミ (Ap)、ハタネズミ (Mm) 及びヒミズ (Ut) の染色体は全体にほぼ均一な黄色の蛍光を示した。ヒメネズミ (Aa) の染色体ではユークロマチン領域は他の 3 種と同じ黄色を示したが、C-ヘテロクロマチン領域はユークロマチンより赤味がかかり、橙から赤を示すものが多く見られた (Table 1; X 染色体で 89/106, 84.0%)。

Fig. 4 c は染色体を QM 染色し、各核板に 10 分ずつ BL を照射し脱色、AO 染色したものである（以下 QM-BL-AO と記す）。ハントウアカネズミ、ハタネズミ及びヒミズの染色体では全体に赤味が強くなり橙から赤の蛍光を発していたが、C-ヘテロクロマチンとユークロマチン領域との間に差異は見られず、全体にほぼ均一な色調を示した。一方ヒメネズミでは、ユークロマチンは橙色を示し、C-ヘテロクロマチン領域はより赤い蛍光を発するものが多く見られた。

(Table 1; X 染色体で 96/114, 84.2%)。また、これらの標本では、BL 照射時の顕微鏡の視野内に入る核・核板のみが橙から赤に変色し、その他の領域では QM-noBL-AO (Fig. 4 b) と同様の色調であった。

QM 染色・BL 照射後の *in situ* nick translation

Fig. 5, 6 は QM 染色及び BL 照射後の染色体上の nick の分布を *in situ* nick translation により調べた結果で、Fig. 5 はヒメネズミの部分核板、Fig. 6 は 4 種の C-block を持つ染色体を Fig. 2, 4 と同様に並べたものである。DNA 中に組み込まれた biotin-16-dUTP の検出には rhodamine-avidin を用いており、従って rhodamine の赤いシグナルが染色体 DNA 上の nick の存在を示している。Fig. 5, 6 は 2 種類の蛍光画像を重ね合わせたものであり、対

比染色の QM 蛍光と rhodamine の蛍光が重なる部分が黄又はオレンジ色に見える。

Fig. 5 a, 6 a は、QM 染色の後 BL 照射を行わず脱色、標識及び rhodamine 染色を施したもの（以下 QM-noBL-Rh と記す）、Fig. 5 b, 6 b は QM 染色後各核板に 10 分ずつ BL 照射し脱色、標識したもの（以下 QM-BL-Rh と記す）である。4 種全ての核板で rhodamine によるシグナルが観察され、全体として、QM-BL-Rh 処理を施した方が QM-noBL-Rh 処理の方よりシグナルが強い傾向にあった。また、主に QM-noBL-Rh 処理後の染色体において、シグナルが不規則なバンド状のパターンを示すものが全種で見られた (Fig. 5 a, 6 a)。

Table 2 は 4 種の C-block を持つ染色体について、シグナル分布パターンを C-block とユークロマチン領域との対比により分類したものである。ヒメネズミにおいては、QM-noBL-Rh 処理ではユークロマチン領域に比較的弱く疎らなシグナルが見られ、X 染色体 C-block を含む C-ヘテロクロマチン領域にはほとんどないというパターンが多く核板で示された (Fig. 5 a, 6 a; Table 2)。それに対し、QM-BL-Rh 処理後は染色体全体にシグナルが見られたが、特に C-ヘテロクロマチン領域で強いシグナルが生じており、相対的にユークロマチン領域ではやや弱いシグナルというパターンが多く出現した (Fig. 5 b, 6 b; Table 2)。

ヒメネズミ以外の 3 種では、QM-noBL-Rh 処理の方は全体に弱いシグナルを発し、QM-BL-Rh 処理後はシグナルが強まる傾向にあったが、ヒメネズミの QM-BL-Rh 処理後に見られたような、C-ヘテロクロマチン領域における強いシグナルは観察されなかった。ハントウアカネズミ (Ap)、ハタネズミ (Mm) では C-ヘテロクロマチンとユークロマチン領域との間に明瞭な差異は見られず、

またヒミズ (Ut) では、Q-band negative である 13 番染色体の C-block 領域 (Nakata *et al.*, 2005) はシグナルがむしろ弱い傾向が見られた (Fig. 6, Table 2)。

当初、QM·noBL-Rh の方は標識されないものと想定していたが、予想に反して弱いながらもシグナルが確認されたため、染色体標本に既に nick が生じていた可能性を考え、ヒメネズミとハントウアカネズミの無処理のストック標本でも nick の検出を試みた。両種いずれの染色体にも、かろうじて写真に写る程度のごく弱いシグナルが見られた。パターンは全体にほぼ均一で、C-block 等の特定の領域でシグナルが強いものは見られなかった。

メチレンブルー光酸化処理後の QM 染色

Fig. 7 は MB 光酸化を施した後に QM 染色したヒメネズミ中期核板の、BL 照射に伴う蛍光の変化を示したものである。観察した X 染色体中 99.1% (114/115) において、C-block はユークロマチン領域と同様に、BL 照射開始直後に最も蛍光強度が強く、照射時間の経過に伴い蛍光強度が弱まるという、“一般的な” 蛍光動態を示した。常染色体 C-ヘテロクロマチン領域も C-block とほぼ同じ “一般的な” 蛍光動態を示した。すなわち、光酸化処理によりヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域の蛍光動態は “遅延型” から “一般型” へと転換したと言える。また、MB 光酸化処理後に QM 染色を施した染色体は全体に、直接 QM 染色のみを施した染色体よりも明るい傾向にあった。これらの結果は Nomura *et al.* (2001) による報告と同様である。

一方、2 種類のコントロール (材料と方法の項参照) では、コントロール A は 100% (84/84)、コントロール B は 92.4% (73/79) の C-block において “QM

蛍光遅延”が確認された。また、C-block が強蛍光を放つようになるまでの所要時間は、両コントロールにおいて約 2 分であり、直接 QM 染色のみを施した場合の約 4 分 (Fig. 3 参照) に比べ短い傾向にあった。

メチレンブルー光酸化処理後の *in situ* nick translation

Fig. 8 は MB 光酸化及びコントロール A (可視光照射なしで MB 浸漬) 処理後のヒメネズミ染色体上の nick の分布を *in situ* nick translation により調べたものである。2 種類の蛍光画像を重ね合わせたもの (Fig. 8 c, f) では QM と rhodamine の蛍光が重なる部分が黄又はオレンジ色に見える。Table 3 は X 染色体における nick 分布のパターンを、C-block とユークロマチン領域との対比により分類したものである。

MB 光酸化後の染色体では、C-block を含めほとんどの C-ヘテロクロマチン領域で rhodamine のシグナルが顕著に強く、ユークロマチン領域のシグナルは比較的弱かった (Fig. 8 a ~ c, Table 3)。対してコントロール A では、光酸化処理後の方では見られなかった、C-ヘテロクロマチン領域よりもユークロマチン領域でシグナルの強いパターンが比較的多く存在した (Fig. 8 d ~ f, Table 3)。しかし X 染色体のカウントにおいては、C-block の方に強いシグナルが見られるものも全体の約 1/3 存在していた (Table 3)。コントロール B 処理の方もコントロール A とおおむね同じ結果であり (Table 3)、コントロール処理によってもある程度 nick が増加することが示された。全体として、ユークロマチン領域ではいずれの場合もある程度の nick が生じていたが、C-ヘテロクロマチン領域においては MB 光酸化により nick が大幅に増加することが示された。

また、QM 染色処理が nick 形成パターンに影響するかどうかを調べる目的

で、光酸化処理又はコントロール処理後に QM 染色をした場合としなかった場合とを比較した結果、いずれの場合も nick の分布パターンに大きな差はみられなかった。

トリプシン処理後の QM 染色

Fig. 9 はトリプシン処理を施した後に QM 染色したヒメネズミ中期核板の、BL 照射に伴う蛍光の変化を示したものである。染色体 C-ヘテロクロマチン領域は BL 照射開始直後に弱い蛍光を放ち、その後照射時間が経過しても蛍光強度が強まることなく減衰してゆくという蛍光動態を示した。これは MB 光酸化処理で見られた、照射開始直後から強い蛍光を放つ“一般的な”蛍光動態とも異なった特異な動態である。著者らはこの蛍光動態を仮に“非遅延暗型”(non-delayed dull type) と名付けた。

一方ユークロマチン領域は、一般的な蛍光動態と同じく BL 照射開始直後に最も蛍光強度が強く、照射時間の経過に伴い蛍光強度が減衰した。高濃度(0.025%, 0.05%, 0.1%) のトリプシンで処理した染色体は Fig. 9 のように全体に膨潤しており、QM 染色により通常ユークロマチン領域に生じる Q-band が不鮮明なものが多く見られた。

Table 4 及び Fig. 10 はトリプシンの各種濃度における、“遅延型”(delayed) 及び“非遅延暗型”(non-delayed dull) を示す X 染色体 C-block の割合を示したものである。トリプシン濃度の上昇に伴い“非遅延暗型”の出現頻度も上昇しており、この反応がトリプシン濃度依存的であることが示された。また、コントロール処理 (PBS(-)、又は不活性化トリプシンで処理) したものでは、ほぼ全ての核板において“遅延型”が観察された (Table 4)。

核タンパク質成分の電気泳動及び質量分析

Fig. 11 はヒメネズミ (A)・アカネズミ (S)・マウス (M) の核タンパク質抽出物を SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した結果である。分離ゲルのアクリルアミド濃度は 6% (Fig. 11 a)、9% (同 b)、12% (同 c) とした。いずれの場合も、種間でタンパク質濃度や移動度の異なるバンドはいくつか見られたものの、明らかにヒメネズミに特有であると思われるバンドは確認できなかった。

そこで、種間で移動度の異なるバンドに着目し、質量分析 (Nano LC-MS/MS) によりタンパク質組成に差があるか分析することにした。ヒメネズミにおいて、他の 2 種と移動度が若干異なるバンドが 70~80 kDa 付近と 55 kDa 付近に一つずつ見られたため、他 2 種における最も近いバンドと比較することで、ヒメネズミの核タンパク質成分の特色を探った。分離には 9% ゲルを用い、3 種それぞれにおいて該当するバンド (Fig. 11 b) を切り出し質量分析した。なお、アカネズミ (S) の 80 kDa 付近には 9% ゲルにおいて大小 2 本のバンドが確認されたため (Fig. 11 b)、別々に 2 本共分析した。

Table 5 には上記バンドの質量分析の結果をデータベース (NCBIInr) より検索し、同定されたタンパク質のうち、スコア (分子量の一致率) が約 70% 以上のものをリストアップした。

考 察

当研究室では、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンが示す QM 蛍光遅延について様々な研究を行ってきたが、未だそのメカニズムは完全には解明されていない。当初の仮説として、次のようなシナリオが想定された。ヒメネズミの染色体を QM 染色すると DNA には QM 分子が結合するが、本種の C-ヘテロクロマチンには QM の励起もしくは発光を阻害するような何らかの構造が存在しており、クロマチン内部に結合した QM 分子が十分に励起されず弱蛍光を示す。しかし、BL 照射を続けることにより、それらの“励起（発光）阻害構造”の崩壊が誘発され、励起されていなかった QM 分子が遅れて蛍光を放つため、蛍光強度が増加してゆく“蛍光遅延”が起きる。この仮説によると、本種の C-ヘテロクロマチンは、“蛍光遅延”に伴いかなり大幅な構造的変化を受けていることになる。

本研究では、これまで調査されていない幾つかの新たな観点による実験を試みた。一つは AO 及び *in situ* nick translation 法を用いた、染色体 DNA の構造的変化の検出であり、もう一つは染色体タンパク質成分の関与の検証である。これらの結果を基に、この現象のメカニズムを考察する。

QM 染色・BL 照射後の染色体 DNA の変化 (AO 染色及び *in situ* nick translation による分析)

Fig. 4 及び Table 1 に示したように、QM 染色・BL 照射後の AO 染色の結果、調査した 4 種全てにおいて、染色体 DNA に大きな変化が起こることが確認された。AO は二本鎖の核酸に結合した時は蛍光色調が緑になり、一本鎖

の核酸に結合すると赤になる (Rigler, 1973; Sumner, 1990)。この性質から判断すると、全体として QM 染色・BL 照射とも施していない (AO 染色のみ施した) 染色体 (Fig 4 a) は DNA が二本鎖であるが、QM-BL-AO 処理後 (Fig 4 c) では染色体中に一本鎖 DNA が多く存在すると推測される。一方 QM-noBL-AO 処理 (Fig 4 b) では染色体が黄の色調を示すのが確認された。これは一本鎖 DNA が若干存在することを示唆するが、色調から判断すると、BL 照射を施したもの (QM-BL-AO) に比べその割合は少ないと推測される。従って、BL 照射により染色体 DNA の一本鎖化 (変性) が生じたものと考えられる。

ヒメネズミの場合、QM-noBL-AO、QM-BL-AO 処理 (Fig 4 b, c) のどちらでも C-ヘテロクロマチン領域はユークロマチン領域と比較してより赤みが強い色調であり、DNA 変性の程度がより強いことが示唆される。一方ハントウアカネズミ、ハタネズミ及びヒミズの染色体は、いずれの条件でも C-ヘテロクロマチンとユークロマチン領域との間に色調の差異は見られず、DNA 変性も両領域で同程度であると推測される。

ここで見られた染色体 DNA の変化をより詳細に調べるため、QM 染色・BL 照射後の染色体に *in situ* nick translation 法を施した。Fig. 5, 6 に示したように、nick の存在を示す rhodamine シグナルは全体として QM-BL-Rh 処理の方が QM-noBL-Rh より強く、即ち BL 照射により染色体 DNA 上に nick が増加したものと考えられる。無処理の標本では染色体上の nick はわずかに検出されるものの、無視できる程度のレベルであり、一方 QM-noBL-Rh 処理では比較的多くの (QM-BL-Rh 処理のものよりは少ない) nick が検出されている。これらの nick の量と AO 染色による色調変化の程度はおおむね一致する

(Fig. 4, 6)。従って、BL 照射により生じた nick が、AO 染色時に見られた染色体 DNA の一本鎖化 (変性) を引き起こしている原因であると推測される。BL 照射なし (QM-noBL-Rh) のもので見られた nick は QM 染色・脱色等の過程での物理的刺激により生じたものと考えられる。

ヒメネズミは、BL 照射による nick の増加が C-ヘテロクロマチン領域でより顕著である点で特異的である (Fig. 5, 6; Table 2)。他 3 種では C-ヘテロクロマチンとユークロマチン領域の間で増加量に差はほとんど見られなかった (Fig. 6, Table 2)。このことは、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域はユークロマチン領域と比較して、また他 3 種の C-ヘテロクロマチン領域と比較しても、BL 照射による nick が生じやすく、それにより起こる DNA の変性も生じやすいことを示している。ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンのこのような特異性は、これらの構造変化と本種特有の現象 QM 蛍光遅延との関連性を示唆させる。

QM 染色及び BL 照射が染色体 DNA を変化させるメカニズムとしては、BL により励起された QM 分子が放出するエネルギーにより DNA 分子の損傷・切断が生じ、その結果二本鎖 DNA の一部が一本鎖に遊離する、または断片化した一本鎖 DNA の流出が起き、DNA 分子の部分的変性を引き起こすという可能性が考えられる。しかし、ヒメネズミ QM-noBL-Rh 処理においては C-ヘテロクロマチン領域にほとんど nick が見られない (Fig. 5 a, 6 a; Table 2) のに対し、QM-noBL-AO 処理後の C-ヘテロクロマチン領域で色調に幾分赤みがあり (Fig. 4 b, Table 1)、DNA 変性が示唆されるという点は、この解釈と矛盾する。他の説明としては、nick による DNA 変性とは別に、染色体へ残留した QM 分子により AO 分子の DNA への intercalation が妨げられ、AO 分

子が二本鎖 DNA の外側に stacking している可能性が推測される。あるいは残留 QM 分子の DNA への intercalation そのものにより、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン DNA に何らかの構造変化が起きている可能性も考えられる。

いずれにせよ、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域は他種のそれに比べ、QM 染色及び BL 照射により引き起こされる構造変化に対し感受性が高いことが確認された。

MB 光酸化処理による QM 蛍光動態及び染色体 DNA の変化

Nomura *et al.* (2001) は、MB 光酸化処理によりヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域における QM 蛍光動態が“遅延型”から“一般型”へと転換することを報告している。本研究においても、その結果は支持された (Fig. 7)。

QM 及びその類似物質のキナクリンは、AT-rich な DNA (合成・天然を問わず) と結合すると強蛍光を発するが、GC-rich DNA との結合では弱蛍光であり、特にグアニン残基の存在により蛍光が弱められることが Weisblum and de Haseth (1972) により報告されている。また、MB による光酸化は DNA のグアニン残基を特異的に修飾し、何種類もの酸化物、例えば 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine、2-amino-5-[(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-4H-imidazol-4-one などを発生させる (Floyd *et al.*, 1989; Buchko *et al.*, 1995a)。これらの酸化物はピペリジン等の処理に対し不安定であり、その結果 DNA 分子の切断 (一本鎖・二本鎖とも) をもたらすとされている (Friedmann and Brown, 1978; Buchko *et al.*, 1995b)。Ferrucci and Mezzanotte (1982) は、MB 光酸化をショウジョウバエ・マウスの染色体標本に施すことにより、キナクリン蛍光の増大が見られることを報告しており、そ

これは染色体 DNA 中に散在するグアニン残基が MB 光酸化により崩壊した結果、弱められていた蛍光が増幅したためであると推測している。

ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンは、そこに含まれる反復配列 *Dra* I fragment の解析結果 (AT 含量約 65%; Fukushi *et al.*, 2001) 及び各種蛍光色素による染色パターン (Obara and Sasaki, 1997; Obara *et al.*, 1997) から判断すると AT-rich であることはほぼ間違いなく、本来の QM 蛍光動態であれば強蛍光を示すはずである。MB 光酸化によるグアニン残基の酸化・分解という反応が染色体標本上でも起きるとすると、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンが BL 照射開始直後から強い蛍光を発した (Fig. 7) のは、グアニン残基の崩壊により蛍光の抑制がなくなり、本来の強蛍光が表出したためと解釈できる。加えて、MB 光酸化により生ずるグアニンの種々の酸化物も QM の蛍光増幅に寄与している可能性が考えられる。

さらに MB 光酸化処理後に *in situ* nick translation を施した結果では、ヒメネズミ染色体には全体として nick が増加していることが示された (Fig. 8, Table 3)。これは前述のようなグアニン残基の崩壊の結果、染色体 DNA に切断が生じ、それが nick として検出されたものと推測される。特に C-ヘテロクロマチン領域において nick が大幅に増加するのが観察されたことから、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域は QM 染色及び BL 照射による反応 (Fig. 5, 6; Table 2) と同様、ユークロマチン領域よりも光酸化反応に伴う DNA の構造変化に対し感受性が高いといえる。

一方、2 種類のコントロール処理でも、C-ヘテロクロマチン・ユークロマチン領域ともにある程度の nick が生じており (Fig. 8 d ~ f, Table 3)、また“蛍光遅延”は示したが、C-block が強蛍光を放つまでの所要時間が短くなる傾向

にあったことから、MB 溶液への浸漬又は可視光照射のみでもある程度のグアニン酸化・分解が生じ、その結果、QM の強蛍光への変化が促進されたのではないかと考えられる。

ここまでの結果からは、QM 蛍光遅延において蛍光強度が増加する機構として、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域では MB なしでも顕微鏡下の BL 照射により QM の発光を抑制していたグアニン残基の酸化・崩壊が起き（その結果として nick が生ずる）、QM の発光量が後から増加するという考察が可能である。しかし、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンが他種に比べ BL に対する反応性が高いのは事実としても、BL 照射による nick 生成自体は、程度の差はあれ他種の染色体でも見られた現象である。従って、ヒメネズミに特異的な QM 蛍光遅延の根本的要因とするにはこの筋書きは不十分と考えられ、さらに別な観点からの検証も必要とされる。よってこれらの DNA 構造変化に対する分析に続き、もう一つの重要な染色体構成成分であるタンパク質との関連性も調査した。

トリプシン処理及び電気泳動・質量分析による核タンパク質成分の分析

トリプシン処理により、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域は BL 照射時間が経過しても QM 蛍光強度が強まることなく減衰してゆくという新たな動態を見せた (Fig. 9)。この動態は“蛍光遅延ではない”という点では MB 光酸化処理で見られた“一般的な”蛍光動態と同様であるが、蛍光強度が弱いという点ではそれと異なるため、“非遅延暗型”(non-delayed dull type) という別の呼び名を付けた。“非遅延暗型”の出現は明らかにトリプシン濃度依存的であり

(Table 4, Fig. 10)、トリプシンにより分解されたタンパク質成分の中に QM 蛍光遅延に関わる要素があることを示唆する。Obara *et al.* (1997) より、HCl 及び NaCl によるヒストン除去処理をヒメネズミ染色体に施しても QM 蛍光遅延は観察されることから、その成分はノンヒストンタンパクと考えられる。

一般的に C-ヘテロクロマチンはタンパク質組成においてもユークロマチンとは異なり、HP1 (heterochromatin protein 1) など特徴的なノンヒストンタンパクを含む (Eissenberg and Elgin, 2000)。従ってヒメネズミの C-ヘテロクロマチンには本種特有のタンパク質成分が存在し、それがこの種でのみ見られる QM 蛍光遅延に関与しているという可能性も考えられる。そのような成分の検出のために、核タンパク質抽出物の電気泳動及び質量分析を行い、近縁種との比較を行った。

ヒメネズミ・アカネズミ及びマウスの肝臓より抽出した核タンパク質成分を、広い範囲で分子の識別ができるように、3 種類 (6, 9, 12%) の濃度のゲルを用い SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を試みたが、明らかにヒメネズミに特有と思われるバンドは確認できなかった (Fig. 11)。しかし、いくつかのバンドにおいて種間でタンパク質濃度の異なるもの、又は移動度の若干異なるものが確認された。ヒメネズミにおいて、他の 2 種と移動度が異なると思われたバンド (70~80 kDa 付近と 55 kDa 付近、Fig. 11 b) を他 2 種における最も近いバンドと質量分析 (Nano LC-MS/MS) により比較することで、核タンパク質組成の差が検出できるか試みた。Table 5 は質量分析の結果同定されたタンパク質のリストである。結果的に、今回調べた中からはヒメネズミに特有な成分は検出されず、3 種の間でも明確な成分の差は見られなかった。

Fukushi *et al.* (2001) によると、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域に存

在する反復配列 *Dra* I fragment には CENP-B box に類似した配列が含まれる。CENP-B box とは動原体タンパク質の一種、centromere protein B (CENP-B, 80 kDa) の結合する配列であるため、70 ~ 80 kDa 付近のバンドにヒメネズミ固有の CENP-B 関連タンパク質が含まれることを想定したが、そのような成分は検出されなかった。

今回の分析において同定されたタンパク質 (Table 5) の中で、確実に核内に存在すると考えられるものは heat shock protein 70 (HSP70) family である。Heat shock protein (HSP) は熱や化学物質等のストレスにさらされることにより発現が誘導される一群のタンパク質で、分子シャペロンとして他のタンパク分子の立体構造形成を補助する、あるいは変性タンパク質の分解を促進する等の機能を持つ。HSP70 family は細胞質・核の両方に分布しており、ストレス応答時以外にも構成的に発現しているものも存在するため (Pelham, 1984; Welch and Feramisco, 1984)、ここで検出されたものはそのような分子と考えられる。HSP70 関連タンパク質はヒメネズミ固有成分ではなかったため、QM 蛍光遅延との関わりは定かではないが、Fukui and Uchiyama (2007) により、ヒト中期染色体の単離による染色体構造タンパク質のプロテオーム解析が行われており、それによると HSP70 はヒト染色体から単離され、染色体表面を覆うタンパク質群 (chromosome coating proteins) として分類されている。従って、ヒメネズミ及び他の哺乳類の中期染色体上にも存在する可能性はある。

今回同定された他のタンパク質 (Table 5) には、肝細胞質由来 (acyl-Coenzyme A oxidase, aldehyde dehydrogenase, UDP glucuronosyltransferase, signal recognition particle 68 kDa protein)、又はミトコンドリア由来 (glutamate dehydrogenase, Cytochrome P450) と思われるものが多く、核タン

パク質の分離効率があまり良くないことがうかがわれる。Fukui and Uchiyama (2007) によると、単離した染色体表面の **chromosome coating proteins** にも HSP70 を含め、細胞質・ミトコンドリア由来のタンパク質群が多く含まれている。これらは単離した染色体の精製度合いが進むと減少してゆくため、染色体表面に緩く結合してはいても、染色体形成に必須のものではないと述べられている。本研究で使用了ような通常の染色体標本では細胞質成分等も除去しきれず残るため、QM 蛍光遅延に関わるタンパク質もそのような染色体表面に付着している成分の可能性もあるが、一方で、ヒメネズミの QM 蛍光遅延は間期のクロマチンにおいても類似した動態がしばしば見られることから、QM 蛍光遅延関連タンパク質が単なる細胞質成分の **artifacts** とは考えられない。

HSP は分子シャペロンであるため、クロマチンの構造タンパク質の立体構造形成にも関与している可能性がある。HSP70 family の中にヒメネズミ固有の修飾や立体構造などを持つ分子種、もしくはヒメネズミにおいて他種より多く発現する分子種が存在するなら、それが QM 蛍光遅延関連タンパク質である可能性が高まる。今後タンパク質解析をさらに進めるには、前述の Fukui and Uchiyama (2007) のように、染色体のみを単離することでサンプルの精製度を高める必要があると思われる。また分解能の高い 2 次元電気泳動なども利用し、より精密な分析を行うのが望ましい。あるいは HSP70 を QM 蛍光遅延関連タンパク質の候補とみなし、RNA interference (RNAi) などによるノックダウン実験から蛍光遅延との関わりを探る手法も考えられる。

QM 蛍光遅延のメカニズムについて

QM 蛍光遅延に確実に関わっているタンパク質は発見できなかったものの、

トリプシン処理により“非遅延暗型”が生じることから、タンパク質が何らかの形でこの現象に関与することは間違いないと思われる。高濃度のトリプシンで処理した染色体は全体に膨潤しており Q-band も不鮮明なものが多く (Fig. 9)、トリプシン処理された染色体は本来のクロマチンの高次構造が崩れていることが示唆される。このことから、QM 蛍光遅延が起きるためには AT 塩基対の存在やグアニン残基の光酸化のみならず、C-ヘテロクロマチンにおける特定の高次構造が必要であると考えられる。実際、染色体上における QM 蛍光の強弱は必ずしも AT, GC 塩基対の割合のみでは決まらず、例えばマウスの AT-rich な動原体 C-ヘテロクロマチンは、QM 染色で弱蛍光を示す (Ferrucci and Mezzanotte, 1982; Obara *et al.*, 1997)。また、ヒメネズミ染色体を制限酵素 *Alu* I、*Rsa* I で処理すると、C-ヘテロクロマチン領域は MB 光酸化処理後と同様の“一般的な”QM 蛍光動態に変化することが報告されており (Nomura *et al.*, 2001)、グアニン残基の光分解とは関係なく、2 本鎖 DNA の切断自体が蛍光強度の変化を引き起こしている可能性もある。

これらのことから、QM 蛍光遅延は単に QM の発光を抑制していたグアニン残基の崩壊により起こるのではなく、グアニン分解による nick 生成が反応の引き金となって、さらなるクロマチン高次構造の変化が誘発されるのが重要な要素ではないかと考察される。当初の仮説に従うと、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンには、おそらく QM 分子の励起状態に影響を及ぼすような本種特有の高次構造が形成されており、通常は QM の励起・発光を抑制するような性質を持つ。機構としては BL (励起光) のエネルギーを吸収して QM 分子の励起を阻害する、あるいは励起された QM 分子が放出するエネルギーを熱などに変換し、蛍光発光を抑制するというようなことが考えられる (これらの機構にも

複数のタンパク質が関与しているかもしれない)。BL 照射により C-ヘテロクロマチン DNA にはグアニン分解による nick 及び 2 本鎖 DNA の切断が高頻度に生じ、それに伴い本来のクロマチン構造が変形してゆくと QM 分子の励起の抑制効果が消失し、それまで励起されていなかった QM 分子が蛍光を放ち、“蛍光遅延”が起きる。トリプシンによるタンパク質分解のためクロマチン構造が大きく崩壊すると、QM 分子の励起効率も変化し、QM 蛍光遅延の消失及び蛍光強度の低下が起こるものと考えられる。

クロマチンの高次構造に関する研究は、近年エピジェネティックな遺伝子発現制御などの観点から、分子生物学分野における研究が多くなっている。また、染色体タンパク質に関する網羅的な研究は過去にはあまり行われていなかったが、最近になり Fukui and Uchiyama (2007) らによりプロテオーム解析が試みられるなど、新たな局面を迎えている。C-ヘテロクロマチンに関しても、今後は従来の DNA 配列等からの理解に加え、HP1, CENPs などのようなタンパク質成分からの理解が進んでいくと思われる。ヒメネズミの QM 蛍光遅延の機構を探ることは、これらのクロマチン高次構造の研究において新たな発見をもたらす可能性を持っており、今後の発展を期待したい。

要 約

キナクリンマスタード (quinacrine mustard: QM) による染色体分染法 (chromosome banding) は、古くから染色体の識別・同定のために使用されてきた。QM を含む蛍光色素分子は、蛍光顕微鏡下で励起光の照射開始直後は強い蛍光を放つが、時間の経過に伴い発する蛍光強度は減衰してゆく。蛍光色素全般において、このような蛍光動態は、染色の対象となる生物種及び組織を問わず、普遍的に見られる現象である。ところが、ネズミ目ネズミ科アカネズミ属に属するヒメネズミ (*Apodemus argenteus*) の染色体 C-ヘテロクロマチン (constitutive heterochromatin) 領域は、QM 染色した際、“QM 蛍光遅延” (delayed QM-fluorescence) と呼ばれる、唯一本種でのみ確認されている特異な蛍光動態を示す。この領域は QM で染色し波長 435 nm の励起光 (blue light: BL) を照射すると、照射を開始した直後は弱い蛍光を放つが、その後徐々に蛍光強度が増大し、ピークに達した後減衰してゆく。ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンにはこの現象の要因となる未知の構造あるいは構成成分が存在すると推測され、QM 蛍光遅延のメカニズム解明は、未知の部分の多い C-ヘテロクロマチンの構造・機能に関し新たな知見をもたらす可能性を持つ。

本研究では、QM 染色・BL 照射により染色体 DNA に生ずる変化を調査するため、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA を染め分ける蛍光色素アクリジンオレンジ (acridine orange: AO) 及び染色体 DNA の一本鎖の切断 (nick) 部位を標識する手法 *in situ* nick translation 法を用いた。また、メチレンブルー (methylene blue: MB) を用いた光酸化処理による QM 蛍光動態の転換と、染色体 DNA の nick の有無との関連性を分析した。

QM 染色・BL 照射後の AO 染色より、ヒメネズミの染色体は BL 照射なしでは染色体 DNA が二本鎖であるが、BL 照射後は DNA が一本鎖に変性していることが示唆され、特に C-ヘテロクロマチン領域はユークロマチン領域に比べその度合がより大きいことが示された。また、*in situ* nick translation 法による分析の結果、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域は BL 照射なしでは nick がほとんど無いのに対し、QM 染色・BL 照射により多量の nick が生じることが示された。これは BL 照射による DNA の nick 生成が引き金となり、二本鎖 DNA の部分的な変性が起きたものと推測される。比較のため用いた他の哺乳類 3 種（ハントウアカネズミ、ハタネズミ、ヒミズ）では、C-ヘテロクロマチン領域における顕著な nick の増加は見られなかった。よってヒメネズミの C-ヘテロクロマチンは、ユークロマチンと比較して、また他 3 種の C-ヘテロクロマチンと比較しても、QM 染色及び BL 照射により引き起こされる構造変化に対し感受性が高いことが確認された。

また MB 光酸化処理により、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域は、BL 照射開始直後に最も蛍光強度が強く、照射時間の経過に伴い蛍光が弱まるといふ“一般的な”蛍光動態へと変化した。さらに *in situ* nick translation 法による分析の結果、ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域では MB 光酸化により nick が大幅に増加しており、BL 照射時と同様、nick 生成に関して高感受性であることが判明した。

MB 光酸化は DNA のグアニン残基を特異的に分解するとされる。QM はグアニン残基の存在により蛍光が弱められるため、染色体 DNA 中に散在するグアニン残基が MB 光酸化により崩壊した結果、蛍光が増幅し強蛍光が表出したものと推測される。また、グアニン残基の崩壊の結果として染色体 DNA に

nick が生じているものと考えられる。ヒメネズミの C-ヘテロクロマチン領域はユークロマチン領域に比べ、光酸化による構造変化に対して感受性が高いと言え、グアニンの酸化・崩壊が顕微鏡下の BL 照射により引き起こされ、QM の発光量が後から増加することが QM 蛍光遅延の一因であると考えられる。

一方、過去においてこの現象へのタンパク質成分の関与も示唆されていたため、タンパク質分解酵素トリプシンによるヒメネズミ染色体の処理を行い、QM 蛍光動態の変化を調査した。トリプシン処理後の C-ヘテロクロマチン領域は BL 照射開始直後に弱い蛍光を放ち、蛍光強度が強まることなく減衰してゆくという特異な蛍光動態を示し、その反応はトリプシン濃度依存的であった。よって、トリプシンにより分解されたヒメネズミの C-ヘテロクロマチンタンパク質の中に QM 蛍光遅延に関わる成分があることが示唆される。

さらにヒメネズミの核タンパク質に特有の成分が存在するか探るため、核タンパク質抽出物の電気泳動及び質量分析も試みた。比較対照としてヒメネズミの近縁種アカネズミ、及びマウスも使用した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の結果、明らかにヒメネズミに特有であると思われるバンドは確認できなかったが、種間で移動度の異なるバンドがいくつか確認されたため、それらに着目し、質量分析 (Nano LC-MS/MS) によりタンパク質組成に差があるか分析した。しかし結果的にヒメネズミに特有な成分は検出されず、3 種の間で明確な差は見られなかった。

今後タンパク質分析をさらに進めるためには、分裂期の細胞より染色体のみを単離するなどにより、サンプルの精製度を高める必要があると思われる。また 2 次元電気泳動なども利用し、より高い分解能により種間の差異を検出することが望ましいと考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始熱心にご指導していただきました、弘前大学農学生命科学部教授、小原良孝先生に深く感謝いたします。

本研究の、特にタンパク質解析の遂行にあたり熱心にご指導していただきました、弘前大学農学生命科学部教授、菊池英明先生に深く感謝いたします。

本研究について、多くの有益な助言をしていただきました帯広畜産大学畜産生命科学研究部門准教授、押田龍夫先生に深く感謝いたします。

実験を進めるにあたり有益な助言をいただきました弘前大学農学生命科学部教授、黒尾正樹先生に感謝いたします。

ハントウアカネズミの提供に協力していただきました株式会社応用生物特任研究員、土屋公幸様に感謝いたします。

タンパク質解析の実験を進めるにあたり協力していただきました、岩手大学連合農学研究科大学院生の蝦名真行様、葛西秋宅様、工藤恭子様に感謝いたします。

最後に、材料採集に大いに協力していただき、また数々の励ましの言葉をいただきました研究室の先輩・後輩諸氏に御礼申し上げます。

参 考 文 献

- Adolph, S., Hameister, H. (1985) In situ nick translation of metaphase chromosomes with biotin-labeled d-UTP. *Hum. Genet.* 69: 117-121.
- Bobrow, M., Collacott, H. E. A. C., Madan, K. (1972) Chromosome banding with acridine orange. *Lancet* 2: 1311.
- Buchko, G. W., Wagner, J. R., Cadet, J., Raoul, S., Weinfeld, M. (1995a) Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Biochim. Biophys. Acta* 1263: 17-24.
- Buchko, G. W., Cadet, J., Morin, B., Weinfeld, M. (1995b) Photooxidation of d(TpG) by riboflavin and methylene blue. Isolation and characterization of thymidylyl-(3',5')-2-amino-5-[(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-amino]-4*H*-imidazol-4-one and its primary decomposition product thymidylyl-(3',5')-2,2-diamino-4-[(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-amino]-5(2*H*)-oxazolone. *Nucleic Acids Res.* 23: 3954-3961.
- Caspersson, T., Lomakka, G., Zech, L. (1971) The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes — distinguishing characters and variability. *Hereditas* 67: 89-102.
- Eissenberg, J. C., Elgin, S. C. R. (2000) The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 204-210.
- Ferrucci, L., Mezzanotte, R. (1982) A cytological approach to the role of guanine in determining quinacrine fluorescence response in eukaryotic chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 1289-1292.

- Floyd, R. A., West, M. S., Eneff, K. L., Schneider, J. E. (1989) Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 273: 106-111.
- Friedmann, T., Brown, D. M. (1978) Base-specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue-sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxide modification of thymine. *Nucleic Acids Res.* 5: 615-622.
- Fukui, K., Uchiyama, S. (2007) Chromosome protein framework from proteome analysis of isolated human metaphase chromosomes. *Chem. Rec.* 7: 230-237.
- Fukushi, D., Kuro-o, M., Shichiri, M., Obara, Y., Tsuchiya, K. (2001) Molecular cytogenetic analysis of the highly repetitive DNA in the genome of *Apodemus argenteus*, with comments on the phylogenetic relationships in the genus *Apodemus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 92: 254-263.
- Fukushi, N., Obara, Y. (1997) C-block heteromorphism and its quantification in the X chromosomes of the small Japanese field mouse, *Apodemus argenteus*. *Chrom. Sci.* 1: 147 (Abstract).
- Inuma, M., Obara, Y. (2006) Involvement of chromosomal protein(s) in delayed QM-fluorescence from the C-blocks of *Apodemus argenteus*. *Chrom. Sci.* 9: 117 (Abstract).
- Inuma, M., Obara, Y., Kuro-o, M. (2007) The delayed quinacrine mustard fluorescence from the C-blocks of *Apodemus argenteus* is due to the introduction of nicks into the DNA. *Zool. Sci.* 24: 588-595.
- Kubota, S., Kuro-o, M., Mizuno, S., Kohno, S. (1993) Germ line-restricted,

- highly repeated DNA sequences and their chromosomal localization in a Japanese hagfish (*Eptatretus okinoseanus*). *Chromosoma* 102: 163-173.
- Nakata, A., Yoshimura, A., Kuro-o, M., Obara, Y. (2005) Karyotypic evolution and organization of the highly repetitive DNA sequences in the Japanese shrew-moles, *Dymecodon pilirostris* and *Urotrichus talpoides*. *Cytogenet. Genome Res.* 111: 152-158.
- 野村 禎介 (1999) ヒメネズミ *Apodemus argenteus* の蛍光遅延性 C-ヘテロクロマチンに関する細胞遺伝学的研究. 平成十年度 弘前大学大学院 理学研究科 生物学専攻 修士論文.
- Nomura, T., Saigusa, K., Fukushi, D., Obara, Y., Kuro-o, M. (2001) Restriction endonuclease banding and photooxidation studies of delayed QM-fluorescence of the C-heterochromatin of the small Japanese field mouse, *Apodemus argenteus*. *Chrom. Sci.* 5: 123-131.
- Obara, Y., Sasaki, S. (1997) Fluorescent approaches on the origin of B chromosomes of *Apodemus argenteus hokkaidi*. *Chrom. Sci.* 1: 1-5.
- Obara, Y., Sasaki, S., Igarashi, Y. (1997) Delayed response of QM- and DA/DAPI-fluorescence in C-heterochromatin of the small Japanese field mouse, *Apodemus argenteus*. *Zool. Sci.* 14: 57-64.
- 岡田 道忠 (1998) 哺乳類における X 染色体 C-ヘテロクロマチンの非同調複製に関する研究. 平成九年度 弘前大学大学院 理学研究科 生物学専攻 修士論文.
- Pelham, H. R. B. (1984) Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* 3: 3095-3100.

- Rigler, R. (1973) Interactions between acridines and DNA. A key to the understanding of banding patterns in chromosomes. *In* Chromosome identification, Proceedings of the Twenty-Third Nobel Symposium. Edited by Caspersson, T., and Zech, L., Academic Press, New York, pp. 335-341.
- Seabright, M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
- Sumner, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell Res.* 75: 304-306.
- Sumner, A. T. (1990) Chromosome banding. Unwin Hyman Ltd, London
- Weisblum, B., de Haseth, P. L. (1972) Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 629-632.
- Welch, W. J., Feramisco, J. R. (1984) Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 259: 4501-4513.
- Yoshida, M. C., Sasaki, M., Oshimura, M. (1975) Karyotype and heterochromatin pattern of the field mouse, *Apodemus argenteus* Temminck. *Genetica* 45: 397-403.

表

Table 1. Analysis of coloration of AO-fluorescence from the X chromosomes of *A. argenteus* that had been processed as described in the legend to Figure 4.

Coloration of AO-fluorescence	Numbers of X chromosomes analyzed					
	AO only		QM-noBL-AO		QM-BL-AO	
	C	E	C	E	C	E
Green	70	70	0	6	0	0
Yellow	38	38	17	98	0	6
Orange	0	0	82	2	18	64
Red	0	0	7	0	96	44

C, C-blocks; E, euchromatic regions.

Total numbers of metaphases analyzed: 54 after AO only, 53 after QM-noBL-AO, and 57 after QM-BL-AO.

Table 2. Analysis of the rhodamine signals on C-block-carrying chromosomes after application of the nick detection method.

Pattern of rhodamine signals	Nos. of chromosomes labeled with rhodamine-avidin							
	QM-noBL-Rh				QM-BL-Rh			
	Aa	Ap	Mm	Ut	Aa	Ap	Mm	Ut
C<E	26	0	0	14	0	0	0	4
C=E	10	20	9	0	23	10	11	18
C>E	0	0	0	0	27	0	0	0

Aa, *A. argenteus*; Ap, *A. peninsulae*; Mm, *M. montebelli*; Ut, *U. talpoides*. C<E, The rhodamine signals were stronger in the euchromatic regions than in the C-blocks. C=E, The rhodamine signals were similar in the C-blocks and the euchromatic regions. C>E, The rhodamine signals were stronger in the C-blocks than in the euchromatic regions.

Total numbers of metaphases analyzed were as follows: Aa, 18; Ap, 10; Mm, 9; and Ut, 7 after QM-noBL-Rh; and Aa, 25; Ap, 5; Mm, 11; and Ut, 11 after QM-BL-Rh.

Table 3. Distribution of nick signals on X chromosomes of *A. argenteus* with and without prior photooxidation.

Relative intensity of nick signals on X chromosomes	Number of X chromosomes analyzed (%)		
	Photooxidized*	Control A**	Control B***
C-block < Euchromatin	0 (0.0)	25 (28.4)	11 (18.3)
C-block = Euchromatin	2 (5.0)	32 (36.4)	27 (45.0)
C-block > Euchromatin	38 (95.0)	31 (35.2)	22 (36.7)
Total	40	88	60

*: soaked in MB with exposure to visible light and subsequent QM-staining.

** : soaked in MB without exposure to visible light but with subsequent QM-staining. ***: soaked in distilled water with exposure to visible light and

subsequent QM-staining.

Table 4. The actual numbers (%) of X chromosomes of *A. argenteus* in terms of the types of QM-fluorescence after trypsin treatment under varying doses.

Type of QM-fluorescence	Dose of trypsin ($\times 10^{-2}$ %, w/v)								
	0	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5.0	10.0	Heated
Delayed	81 (96.4)	79 (87.8)	66 (88.0)	40 (54.1)	37 (47.4)	37 (44.0)	15 (17.9)	2 (3.2)	38 (95.0)
Non-delayed dull	3 (3.6)	11 (12.2)	9 (12.0)	34 (45.9)	41 (52.6)	47 (56.0)	69 (82.1)	60 (96.8)	2 (5.0)
Total	84	90	75	74	78	84	84	62	40

Heated: treated with heat-inactivated trypsin (10.0×10^{-2} %).

Table 5. The list of identified proteins from NCBI database with LC-MS/MS.

The approx. size of analyzed bands	Identified proteins (score: %)		
	<i>Apodemus argenteus</i>	<i>Apodemus speciosus</i>	<i>Mus musculus</i>
70 ~ 80 kDa	heat shock protein 70 family (65~99)	rCG57965, HSP 70 related (99)	heat shock protein 70 family (99)
	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain (93~98)	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain (89~97)	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain (48~89)
	albumin (78)	albumin (98~99)	albumin (82~98)
	fatty acid transport protein 5 (68)	fatty acid transport protein 5 (72)	
		peroxisomal acyl-CoA oxidase (98~99)	peroxisomal acyl-CoA oxidase (73~99)
45 55 kDa		acyl-Coenzyme A oxidase 3 (96)	acyl-CoA synthetase long-chain family (88)
		phenylalanine-RNA synthetase-like, beta subunit (70)	signal recognition particle 68 kDa protein (81)
			solute carrier family 27 (76)
	glutamate dehydrogenase(99)	glutamate dehydrogenase 1 (99)	glutamate dehydrogenase 1 (98)
	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex (99)	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex (78)	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex (73)
	Cytochrome P450 (57~99)	Cytochrome P450 (62~97)	
	aldehyde dehydrogenase (96)	aldehyde dehydrogenase (93)	aldehyde dehydrogenase (97)
	UDP glucuronosyltransferase 2 family (65~90)	mCG14318, UDP glucuronosyltransferase 1 related (83)	
		eukaryotic translation termination factor 1 (97)	
		Chain A, Trivalent Antibody Fragment (72)	
	mCG125538, selenium binding protein related (71)		



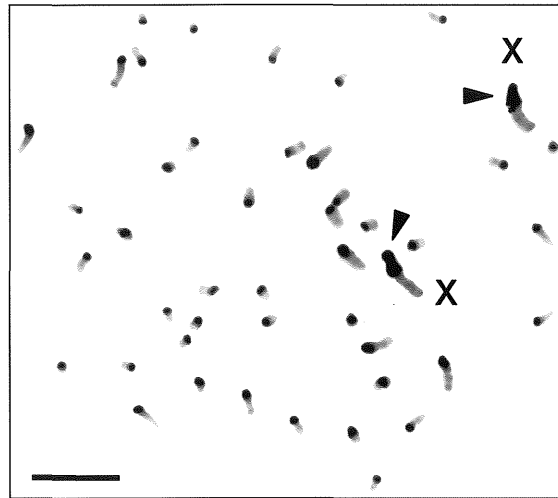


Fig. 1. A C-banded metaphase plate of *Apodemus argenteus*. X indicates an X chromosome, and each arrowhead points to a C-block. Bar represents 10 μm .

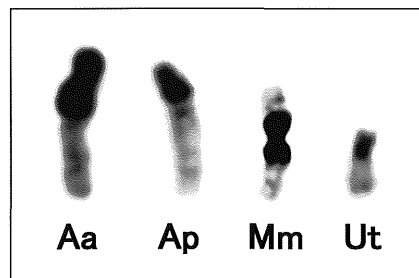


Fig. 2. C-banded chromosomes from the four species examined, all of which include a C-block. Aa, X chromosome of *A. argenteus*; Ap, X chromosome of *A. peninsulae*; Mm, X chromosome of *M. montebelli*; and Ut, chromosome 13 of *U. talpoides*.

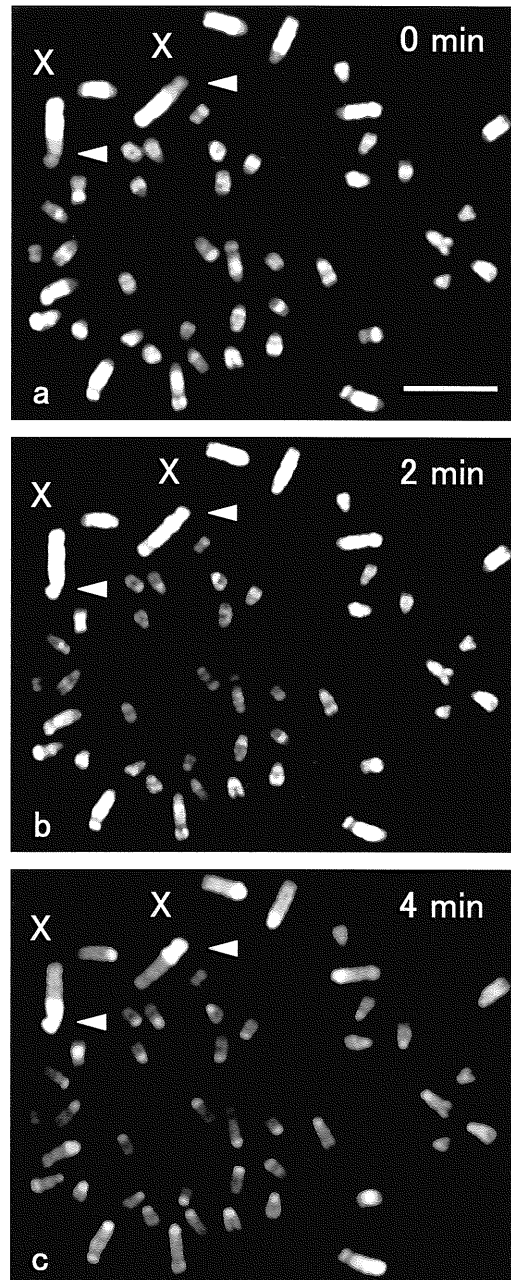


Fig. 3. Sequentially photographed profiles of QM-fluorescence from a single metaphase plate of *A. argenteus*. **(a)** At the start of exposure to BL. **(b)** 2 min after the start of exposure. **(c)** 4 min after the start of exposure. Exposure time for all photographs was the same. X indicates an X chromosome and each arrowhead points to a C-block. Bar represents 10 μm .

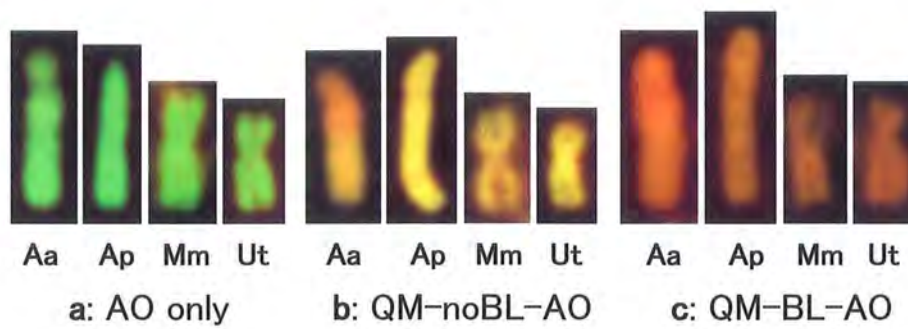


Fig. 4. Profiles of AO-fluorescence from chromosomes processed with **(a)** AO only, **(b)** QM-noBL-AO (QM-staining, removal of QM without exposure to BL and AO-staining), and **(c)** QM-BL-AO (QM-staining, exposure to BL, removal of QM and AO-staining). Aa, X chromosome of *A. argenteus*; Ap, X chromosome of *A. peninsulae*; Mm, probable X chromosome of *M. montebelli*; and Ut, probable chromosome 13 of *U. talpoides*.

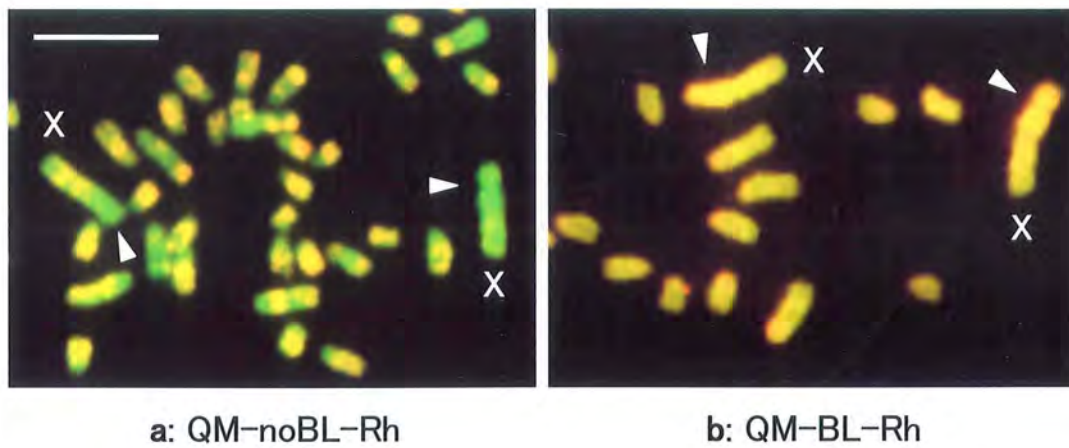


Fig. 5. Partial metaphase plates of *A. argenteus* processed with (a) QM-noBL-Rh (QM-staining, removal of QM without exposure to BL and rhodamine-avidin staining for nick detection) and (b) QM-BL-Rh (QM-staining, exposure to BL, removal of QM and rhodamine-avidin staining for nick detection). X indicates an X chromosome and each arrowhead points to a C-block. Bar represents 10 μm .

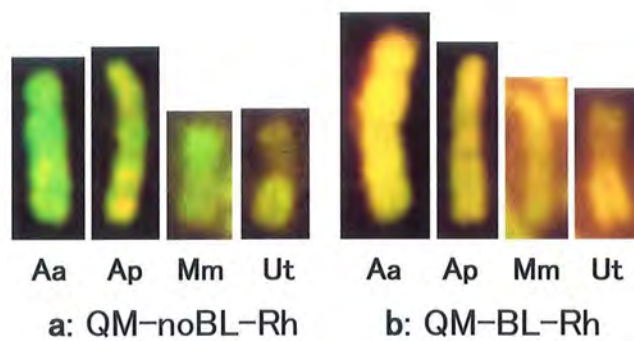


Fig. 6. Profiles of fluorescence from chromosomes processed with (a) QM-noBL-Rh and (b) QM-BL-Rh. Aa, X chromosome of *A. argenteus*; Ap, X chromosome of *A. peninsulae*; Mm, probable X chromosome of *M. montebelli*; and Ut, chromosome 13 of *U. talpoides*.

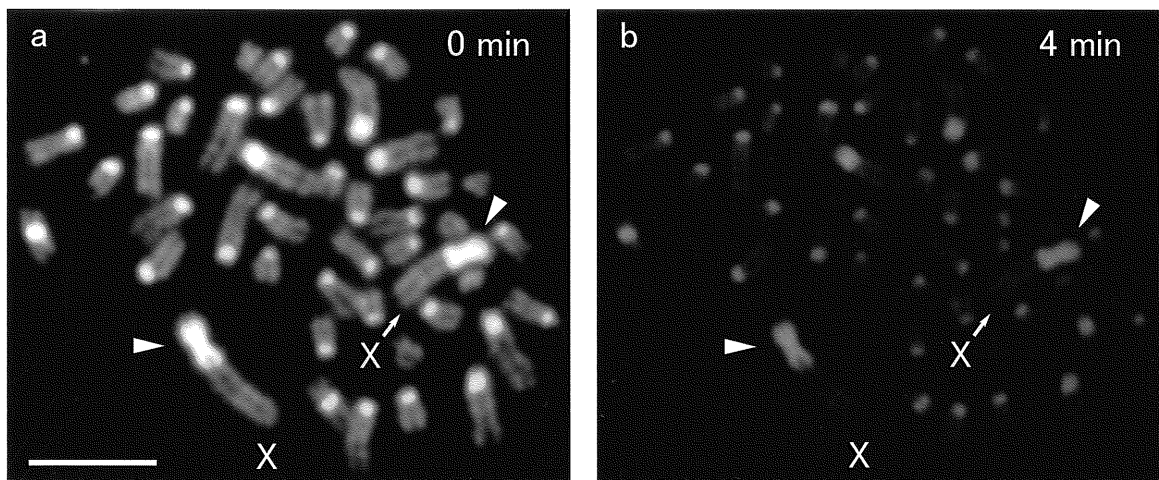


Fig. 7. Sequentially photographed profiles of QM-fluorescence on a metaphase plate, from a female specimen of *A. argenteus*, that had been photooxidized with MB. **(a)** At the start of exposure to BL. **(b)** 4 min after the start of exposure. Exposure time for the two photographs was the same. X indicates an X chromosome and each arrow-head points to a C-block. Bar represents 10 μ m.

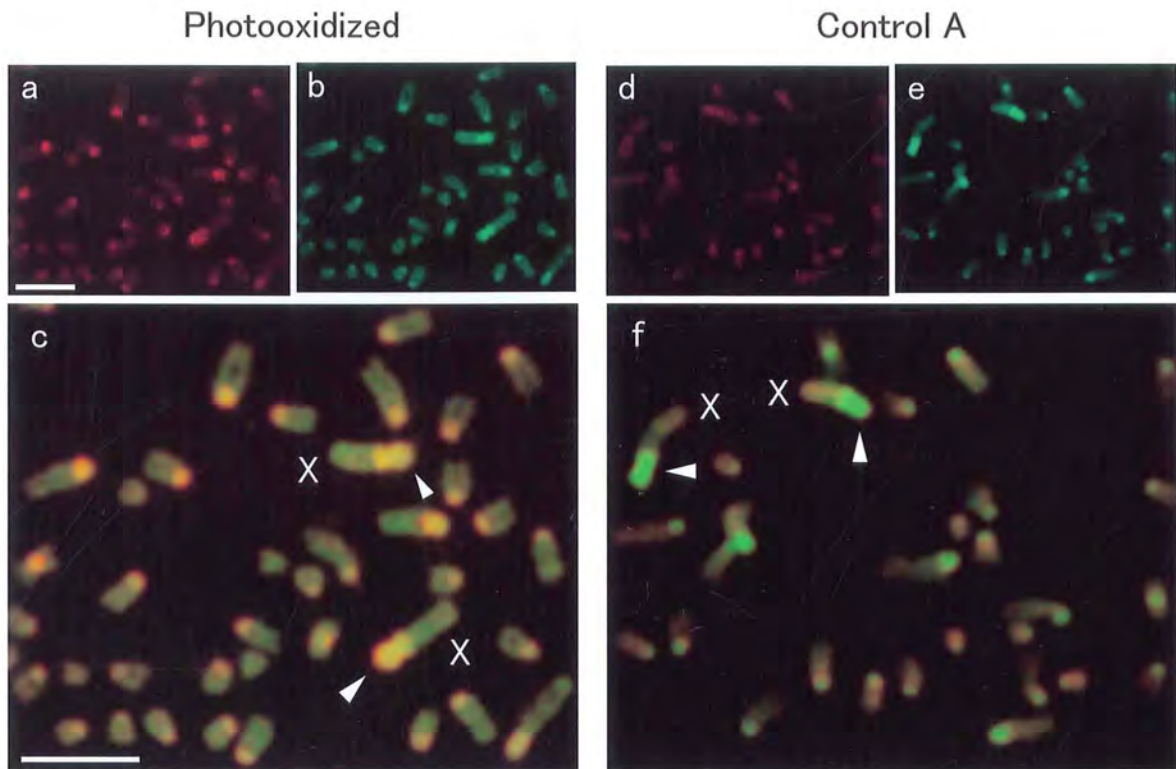


Fig. 8. Partial metaphase plates, from a female specimen of *A. argenteus*, that were subjected to QM-staining and *in situ* nick translation analysis. Rhodamine-avidin (red; **a**, **d**) was used for visualization of incorporated biotin-16-dUTP and QM (green; **b**, **e**) was used for counterstaining. (**c**) and (**f**) show the merged red and green fluorescence. (**a-c**): Photooxidized with MB. (**d-f**): Control A; soaked in a solution of MB without exposure to visible light. X indicates an X chromosome and each arrowhead points to a C-block. Bars represent 10 μ m.

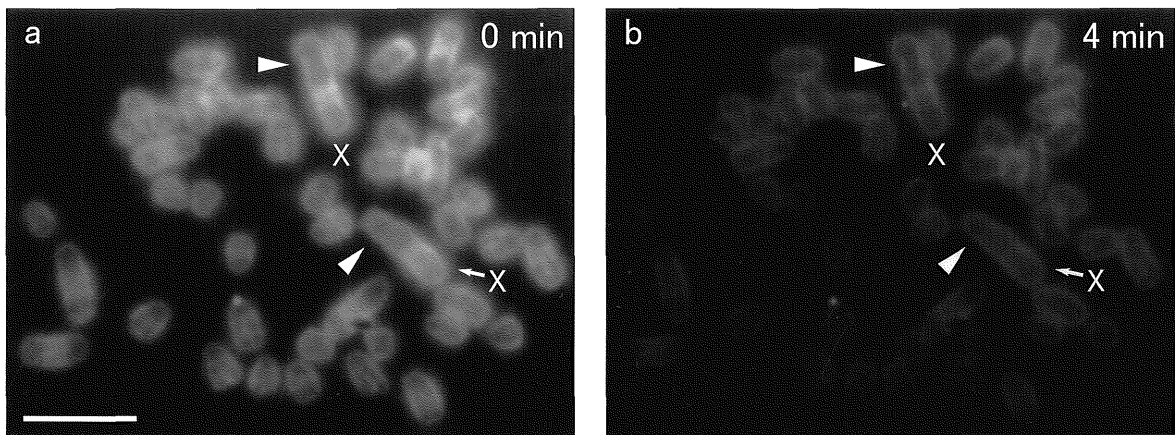


Fig. 9. Sequentially photographed profiles of QM-fluorescence on a metaphase plate, from a female specimen of *A. argenteus*, that had been digested with trypsin (0.05%). **(a)** At the start of exposure to BL. **(b)** 4 min after the start of exposure. Exposure time for the two photographs was the same. X indicates an X chromosome and each arrow-head points to a C-block. Bar represents 10 μ m.

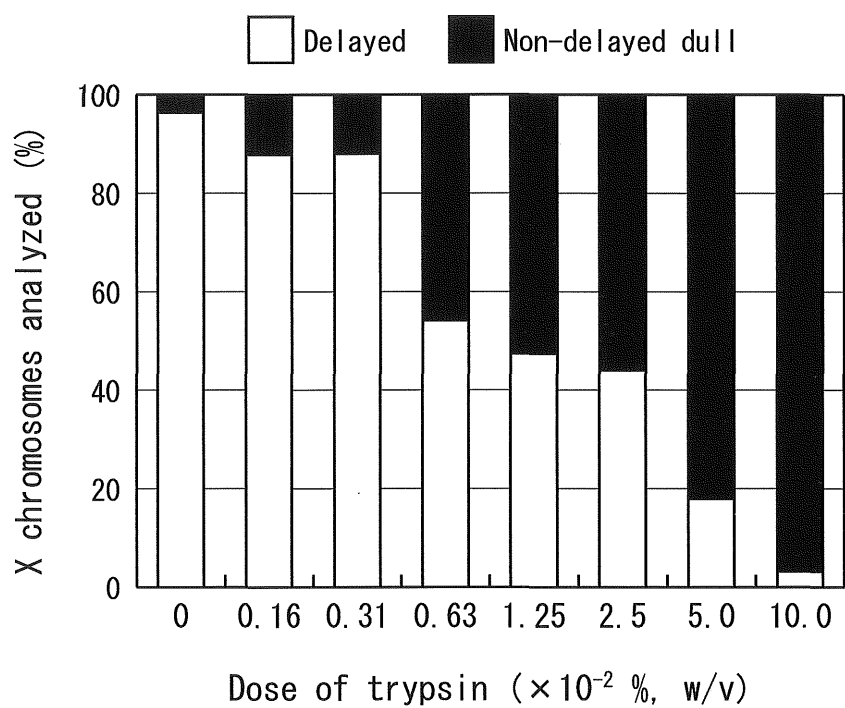


Fig. 10. Dose-dependent effects of trypsin on the kinetics of QM-fluorescence on the X chromosomes of *A. argenteus*. Between 62 and 90 X chromosomes were analyzed at each dose of trypsin.

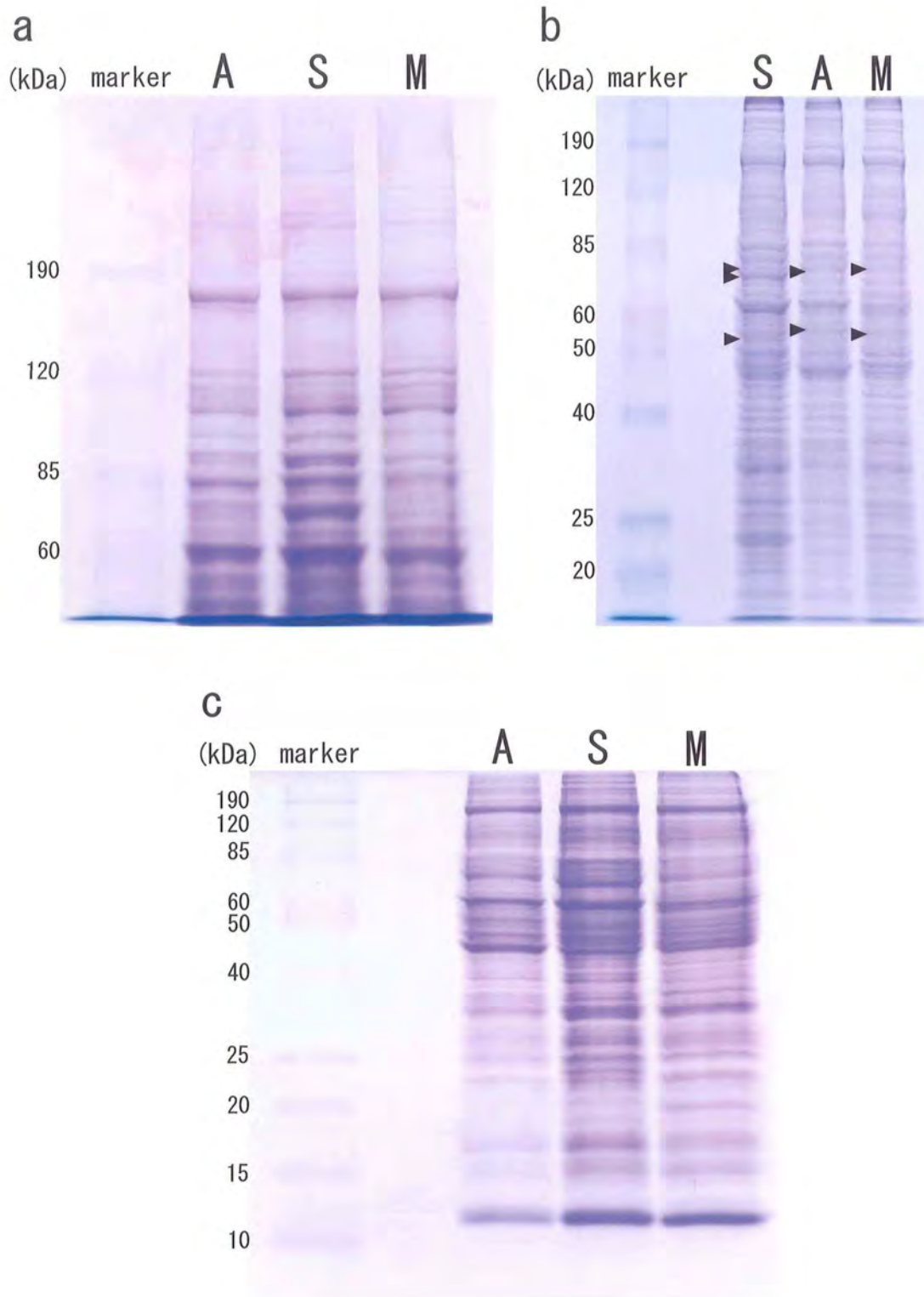


Fig. 11. Result of electrophoresis (SDS-PAGE) of nucleoprotein extracts of *Apodemus argenteus* (A), *A. speciosus* (S), and *Mus musculus* (M). **(a)** 6% gel, **(b)** 9% gel, **(c)** 12% gel. Total volume of protein was 50 μ g in **(a)** and **(c)**, 20 μ g in **(b)**. Each arrowhead points to a protein band analyzed with LC-MS/MS.