

Mouse의 정소이용 염색체 조사에 G- 및 C-banding법의 적용

최영현* · 권용원 · 윤희선 · 유미애** · 이원호†

부산대학교 자연과학대학 생물학과

*미국 국립암연구소

**부산대학교 분자생물학과

Application of G- and C-banding Techniques for Chromosome Analysis Using Testis of Mouse

Yung-Hyun Choi*, Yong-Won Kwon, Hee-Sun Yun, Mi-Ae Yoo and Won-Ho Lee†

Department of biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*National Cancer Institute, NIH, Bethesda MD 20892, USA

**Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

The mitotic and meiotic chromosomal characteristics of ICR mice were investigated with G- and C-banding techniques. For the purposes, the chromosomal preparations were made with the modified air-drying method of Imai *et al.* Chromosomal analysis using testis could be observed mitotic as well as meiotic chromosomal behaviors, and the centromeric regions of all chromosomes including X chromosome were strongly stained in C-banded preparations. Nineteen autosomal bivalents and a single unequal terminally associated X-Y bivalent in normal cells were observed during the late prophase and the metaphase of the meiosis I. The mean frequencies of previously dissociated X-Y chromosomes in the primary spermatocytes of the control group were 7.45 %, but the frequencies of X-Y dissociation in the alkylating agents-treated groups were about 3-4 times higher than that in the control group. Application of C-banding in meiotic stages could be certainly distinguish between bivalent type and univalents type of sex chromosomes.

Key words : mice, chromosome, X-Y dissociation

서 론

최추동물의 핵형 분석에서 흔히 사용되는 multiple band (G- or C-banding)법들은 염색체에 분포하는 구조적 이질 염색질(constitutive heterochromatin)의 위치 및 양적 변화 등에 기인한 염색체 변화 기작의 설명이 가능하므로 핵

형이 유사한 종간 또는 종내 염색체의 비교에 많이 사용되고 있다. 아울러 일반염색법에 의해 차이가 나타나지 않는 이형적 성염색체도 구조적 이질 염색질의 분포 차이로서 확인할 수도 있다¹⁾. 또한 구조적 이질 염색질의 분포는 전체 이질 염색질의 양적 변화와는 독립적이며, 이질 염색질 분포의 위치가 종분화 과정에서도 중요한 역할을 할

† Corresponding author

수 있음이 알려지고 있다^{1,2)}.

이러한 이질 염색질에 대한 설치류를 재료로 한 보고들을 조사해 보면, Yoshida³⁾는 black rat(*Rattus rattus*)의 지역 종들간 잡종의 성염색체 비정상성을 G- 및 C-banding법에 의해 비교한 바 있고, Obara와 Miyai⁴⁾에 의한 house shrew(*Suncus murinus riukiuensis*) 지역종들의 성염색체 변이와, Saitoh와 Obara^{5,6)}의 field mouse(*Apodemus speciosus*) 지역종들 및 그들 잡종들의 비교 등이 G- 및 C-banding법에 의해 조사 보고 된 바 있다.

최근 Yoshida 등⁷⁾은 수종의 암생 들쥐들을 대상으로 한 염색체의 연구에서 상염색체로 구분이 곤란한 균연종들 간에 C-banding에 의한 성염색체, 특히 X 염색체의 뚜렷한 차이를 제시하여 이질염색질 부위의 분포가 종간 분류의 key가 될 수 있음을 제시한 바 있다. Wall과 Butler⁸⁾는 DNA의 양과 C-banding 양상에 의한 생쥐의 Y 염색체 다양성을 G-banding의 결과와 비교 분류하면서 C-banding에 양성 반응을 띠는 영역의 정도와 DNA 양과의 상관성을 논하였으며, Redi 등⁹⁾은 house mouse 두종(*Mus domesticus* 및 *M. musculus*)간의 염색체상 satellite DNA의 위치를 C-banding 등에 의해 분석하여 종간의 유연관계를 비교한 바 있다.

한편 고등동물의 감수분열에서 XY형 성염색체를 가지는 다양한 종들의 성염색체 결합은 X와 Y 염색체의 크기와 상동성의 정도에 따라 다양하나^{10,11)}, 많은 동물들에서 제1 감수분열 중기동안에 end-to-end 형태의 결합을 하고 있다^{12,13)}. 그러나 인간을 포함한 포유동물들에서 side-by-side 결합을 하는 상염색체 뿐만 아니라 성염색체들도 이동기와 중기에 때때로 univalent를 형성하는데, 수컷에서 X와 Y 염색체가 서로 분리되는 현상을 X-Y 염색체 조기분리(X-Y dissociation or X-Y nonpairing)라 한다¹²⁻¹⁴⁾. 특히 다양한 생쥐 계통들을 이용한 많은 연구를 통해 성염색체 결합에 관여하는 유전자를 동정하기 위한 세포 유전학적 분석이 수행 중이며¹⁵⁻¹⁸⁾, 본 연구실에서도 다양한 계통의 생쥐들을 대상으로 계속적인 연구를 수행해 오고 있다¹⁹⁻²¹⁾.

본 연구에서는 정상 및 돌연변이원이 처리된 생쥐의 정소를 이용한 염색체 표본 작성에 G- 및 C-banding을 적용하여 유사분열 및 감수분열 과정에서 나타나는 X와 Y 염색체 및 상염색체들의 관찰을 통한 몇가지 특징을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

한국생명과학연구소(주)에서 구입한 동계교배 ICR 계통의 생후 2~3개월 된 25g 내외의 수컷들을 사용하였다.

변이원의 처리

정상계통과의 비교를 위해 변이원 처리에 사용된 돌연변이원은 두가지 종류의 alkylating agents(EMS : ethyl methanesulfonate 및 MMS : methyl methanesulfonate, Sigma Co. USA)로서 적정량을 PO₄ buffer(pH 6.8)에 희석하여 사용하였다. 투여는 Tates와 Natarajan²²⁾의 방법을 응용하여 개체당 희석된 변이원 1ml씩을 복강 주사하였으며, 대조군은 동일량의 PO₄ buffer만을 투여하였고, 농도당 24시간 간격으로 3~4개체 정도를 대상으로 염색체 표본을 작성하여 조사하였다.

염색체 표본 작성

염색체 관찰을 위한 표본작성은 기본적으로 Imai 등⁶⁾의 방법에 준하였다. 먼저 조사 대상 개체의 정소를 적출하여 30분간 저장처리하고, Carnoy용액에서 1시간 고정 후 원심분리(1,500 rpm)하여 얻은 세포부유액을 다시 2시간 동안 재고정하였다. 다시 원심분리하여 얻은 세포들을 slide glass상에 적하하여 공기 건조시켰으며, 대조군 및 변이원 처리군 개체들의 염색체 조기분리 정도의 비교는 중기 I세포를 대상으로 하였다.

G-banding 분석

Yunis와 Sanchez²³⁾의 방법을 다소 변형하여, 염색체 표본을 60°C에서 3시간 동안 전조시킨 후, 0.025% trypsin 용액에 18초 정도 처리하였다. 이를 PBS(pH 6.8)에 10초간 처리하여 4% Giemsa 용액에 17분 정도 염색하고 흐르는 물에 가볍게 수세한 다음 공기 건조시켰다.

C-banding 분석

준비된 염색체 표본의 구조적 이질염색질을 선택적으로 염색하기 위한 방법은 Sumner²⁴⁾ 등의 방법을 다소 변형한 아래의 순서를 따랐다. 즉 0.2 N HCl에서 1시간 동안 처리한 후 증류수로 세척을 하고 건조 시켰다. 건조된 염색체

표본을 50°C 정도로 가온된 Ba(OH)₂ · 8H₂O 용액에 약 10분간 처리하고 증류수로 수세한 다음, 60°C의 2xSSC(0.03 M sodium citrate, 0.3 M sodium chloride) 용액에 1시간 둔 후 증류수로 다시 세척하고 4% Giemsa 용액에서 90분 정도 염색하였다.

결과 및 고찰

Benett²⁵⁾가 생쥐의 중기 분열상에서 Y 염색체와 가장 작은 상염색체인 제 19번 염색체를 구별한 후, 다양한 분염법들에 의한 염색체의 세포유전학적 지식이 크게 증가되어지고 있다. 특정 동물의 염색체 관찰을 위해 정소를 이용할 경우, 연속적인 유사분열과 감수분열의 제반단계들을 모두 관찰할 수 있으므로 풀수와 같은 체세포를 이용한 염색체 표본을 따로 작성할 필요가 없다. 즉 배 발생 초기에 체세포에서 분리, 독립된 시원 생식세포(primitive germ cell)는 일련의 유사분열을 통해 정원세포가 되며 성적 성숙 후 정모세포가 되기 때문이다. 이 정원세포에서 볼 수 있는 분열상은 체세포와 완전히 동일하므로 핵형도 작성에 이용할 수도 있다.

Fig. 1은 생쥐 정소내 시원 생식세포 유사분열 중기상의 G- 및 C-banding에 의한 결과로서 2n=40이며, 염색체의 분류상 모두 단부 염색체(acrocentric chromosome)임을

재확인 할 수 있다. 생쥐에서 G-banding의 양상에 따른 핵형도 작성에 관한 지침은 이미 1972년 국제위원회에 의한 분류 기준이 확립되어 있으나, band의 선명도가 염색체의 수축 정도에 따라 다소의 차이가 있으므로 지역 계통간 진화적 유연관계의 추정에 큰 도움이 되어왔다. 이러한 G-banding의 화학적인 기전은 DNA와 단백질로 구성된 chromatin의 강한 응축에 의하거나^{23,26)}, 염색체 내 단백질의 과다한 밀집 등으로 추정되고 있다²⁷⁾.

염색체내 고도의 반복적인 DNA로 구성된 A-T rich 영역인 구조적 이질염색질 부위는 C-banding에 의해 특이적으로 염색되며, 이러한 양상을 동일 종일지라도 계통간 다소 많은 변이가 있는 것으로 보고되어지고 있다^{24,28)}. 야생 생쥐(*Mus musculus*)에서 중국산의 경우 3, 14, 15 및 16번 염색체에서, 일본산의 경우 성염색체 둘 다를 포함하여 3, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 17 및 19번 염색체에서 C-banding에 의한 염색상이 negative였으나²⁹⁾, 한국산 야생 생쥐의 경우는 3, 8, 11, 15, 16 및 Y 염색체에서 C-band가 출현하지 않는 것으로 보고된 바 있다³⁰⁾. 그러나 본 실험에 사용한 ICR 계통은 전체 상염색체의 동원체 부위가 C-banding에 매우 강하게 염색되었으며, Y 염색체는 전체적으로 염색이 뚜렷하여 쉽게 구별이 가능하였다(Fig. 1B).

Fig. 2의 A와 B는 통상적으로 관찰되는 생쥐 수컷의 감수분열 중기 I세포로서 총 40개의 염색체를 중 19쌍의 상

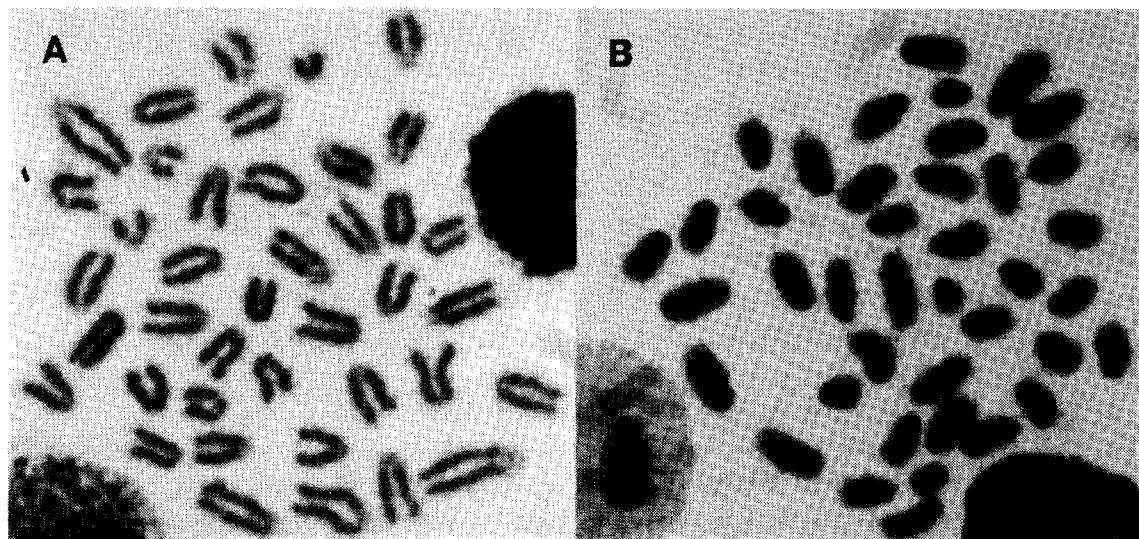


Fig. 1. G- (A) and C-banded (B) mitotic metaphase chromosomes of ICR mice (1,000x).

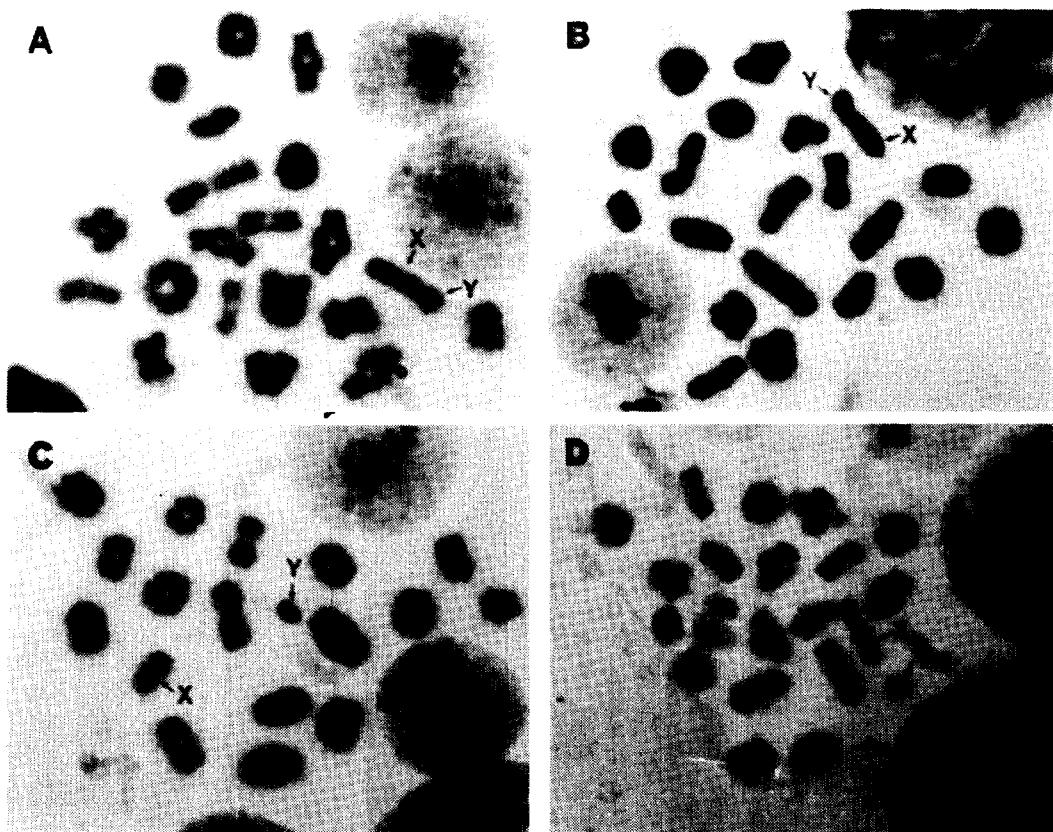


Fig. 2. G- (A & C) and C-banded (B & D) meiotic stages in spermatocytes of ICR mice (1,000x). A & B ; Normal cells with paired chromosomes (sex chromosomes present as a bivalent type). C & D ; Cells with dissociated X and Y chromosomes (sex chromosomes present as univalents type).

염색체는 side-by-side 결합에 의한 chiasma 형성의 과정을 관찰할 수 있으며, X와 Y의 성염색체는 end-to-end 결합 형태를 하고 있다. Fig. 2의 C와 D는 조기분리된 univalent 형의 성염색체를 가진 세포로서, 조기분리된 X와 Y 염색체는 우선 두 염색체의 크기 차이로 쉽게 구별이 가능하였다.

일반적으로 연령증가에 따라 난모세포의 감수분열 동안 염색체의 불분리 빈도의 증가와 연관된 수적 비정상은 일 반화된 현상이며, chiasma 위치와 빈도의 변화 및 univalent 빈도의 증가 등에 관한 연구가 많은 실험동물들을 대상으로 행하여져 오고 있다. 특히 Henderson과 Edwards³¹⁾ 는 univalent 비율의 증가를 포함한 암컷에서의 연령 의존적 염색체 비정상의 증가현상을 ‘production-line’이라 한 바 있으나, 대부분의 실험동물에서 수컷의 경우에는 연령의

증가에 따른 뚜렷한 경향성을 보여주지 못하고 있다^{19-21,32-34)}.

Fig. 2의 결과에서처럼 G-banding에 의한 경우, 성염색체 분리의 여부를 판별하는 데는 전체 염색체 수 및 크기의 차이점 비교로 큰 어려움은 없으나, end-to-end의 형으로 정상 결합을 하고 있는 경우는 특정 상염색체의 chiasma가 말단 부위에 존재하는 경우는 종종 구별이 어려운 경우가 있다. 그러나 감수분열 단계 염색체 관찰에 C-banding법을 도입할 경우(Fig. 2B & D), G-banding이나 일반염색에 의한 경우보다 뚜렷한 구분이 가능함을 알 수 있었다. ICR의 경우 Fig. 1에서처럼 C-banding에 의하면 전 염색체의 동원체 부위가 강하게 염색되므로 제 1 정모세포에서 chiasma의 수 및 위치에 따른 분류³⁵⁾에 보다 많은 도움을 줄

Table 1. Effects of two alkylating agents (AAs) on the induction of X-Y chromosomes dissociation in spermatocytes at MI of ICR mice

AAs (mM)	Hour after treatment	No. of cells observed	%±SD(No.) of X-Y chromosomes dissociation
Control	24	425	7.29±0.67(31)
	48	432	6.71±0.93(29)
	72	424	8.02±0.62(34)
	264	425	7.76±0.43(33)
	288	402	7.46±0.76(30)
		mean	7.45±0.68
EMS 10.0	24	422	35.54±1.41(147)
	48	457	33.37±0.54(151)
	72	467	32.63±0.83(152)
	264	403	16.18±0.35(65)
		mean	29.43±0.58
MMS 5.0	24	460	25.30±0.42(115)
	48	450	24.52±0.63(110)
	72	469	22.42±0.37(105)
	264	414	26.54±0.42(110)
	288	448	23.47±0.57(105)
		mean	24.45±0.48

수 있으며, 특히 성염색체의 univalent형 구분을 보다 뚜렷하게 할 수 있었다.

이러한 C-banding법의 장점을 이용하여 강력한 돌연변이원으로 알려진 alkylating agents 두가지가 처리된 생쥐들을 대상으로 변이원 처리 후 시간의 경과에 따른 성염색체의 조기분리 정도를 조사하였다(Table 1). 동일양의 PO₄ buffer(pH 6.8) 만을 처리한 대조군의 경우는 X와 Y 염색체의 조기분리 빈도는 6.71%에서 8.02%로 평균 7.45%였으며, 이는 다양한 생쥐계통들에서 조사된 선행연구들의 결과와 매우 유사하였다^{16,18-20,32,35}. 10.0mM의 EMS를 투여 한 경우, 시간의 경과에 따라 univalent형 성염색체 빈도는 35.54%에서 16.18%로 다소 감소하는 추세를 보여 주었으며, EMS가 처리된 실험군 전체의 평균은 약 29.43%로 대조군의 약 4배 수준이었다. MMS를 5.0mM 투여한 경우는 조사된 5가지 실험군에서 X-Y 염색체의 조기분리는 평균 24.45%로 대조군에 비하여 3.3배 정도 높게 나타났

다. 그리고 EMS 처리군에서는 시간의 경과에 따라 다소 빈도가 줄어들었으나, MMS 처리군의 경우에서는 시간의 경과에 따른 뚜렷한 경향성은 나타나지 않았다. 이러한 차이가 환경성 변이원의 종류에 따른 생체내 반응의 차이에 의한 것인지, 계통 및 개체간의 특이성에 의한 것인지에 대한 여부는 계속적인 분석이 필요하겠지만, 이러한 정소를 이용한 C-banding의 적용으로 감수분열 제 1 정도세포에서 X와 Y 염색체의 조기분리를 보다 효과적으로 조사할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

G- 및 C-banding법에 의한 ICR 생쥐의 유사분열과 감수분열 시기의 염색체 특징에 관하여 조사하였다. 이를 위한 염색체 표본 작성은 Imai *et al.*의 공기건조법을 다소 변형한 방법에 의하였다. 정소를 이용한 염색체 분석은 유사분열

뿐만 아니라 감수분열단계들을 모두 관찰할 수 있었으며, C-banding에 의하여 X 염색체를 포함한 모든 염색체의 동원체 부위가 강하게 염색되었다. 정상의 제 1 감수분열 전기와 중기 사이의 세포들에서 2가 염색체로 된 19쌍의 상염색체와 1개의 말단결합으로 된 X-Y 염색체를 관찰할 수 있었다. 대조군의 제 1 정모세포에서 조기분리된 성염색체를 가지는 세포의 비도는 약 7.45%였으나, alkylating agents 처리군에서는 대조군에서보다 약 3~4배 이상 높게 나타났다. 그리고 감수분열 단계의 염색체 표본에 C-banding을 적용함으로서 X-Y 염색체 조기분리의 관찰이 매우 용이하였다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 부산대학교 기성회 학술연구조성비 지원에 의하여 부산대학교 기초과학연구소에서 연구수행되었음.(RIBS-PNU-97-402)

참 고 문 헌

- Schmid, M., Grunert, D., Haaf, T. and Engel, W. : A direct demonstration of somatically paired heterochromatin of human chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* 36, 554(1983).
- Schmid, M. : Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77, 83(1980).
- Yoshida, T. H. : Sex chromosome anomalies in F₂ hybrids between Oceanian and Ceylonese type black rats. *Jpn. J. Genetics* 54, 27(1979).
- Obara, Y. and Miyai, T. : A preliminary study on the sex chromosome variation of the Ryukyu house shrew, *Suncus murinus riukiuanus*. *Jpn. J. Genet.* 56, 365(1981).
- Saitoh, M. and Obara, Y. : Chromosome banding patterns in five intraspecific taxa of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*. *Zool. Sci.* 3, 785(1986).
- Saitoh, M. and Obara, Y. : Meiotic studies of inter-racial hybrids from the wild population of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus speciosus*. *Zool. Sci.* 5, 815(1988).
- Yoshida, I., Obara, Y. and Matsuoka, N. : Phylogenetic relationships among seven taxa of the Japanese microtine voles revealed by karyological and biochemical techniques. *Zool. Sci.* 6, 409(1989).
- Wall, W. J. and Butler, L. J. : Classification of Y chromosome polymorphisms by DNA content and C-banding. *Chromosoma* 97, 296(1989).
- Redi, C. A., Garagna, S., Valle, G. D., Bottiroli, G., Dell'Orto P., Viale, G., Peverali, F. A., Raimondi, E. and Forejt, J. : Differences in the organization and chromosomal allocation of satellite DNA between the European long tailed house mice *Mus domesticus* and *Mus musculus*. *Chromosoma* 99, 11(1990).
- Kaul, D., Gaur, P. and Tewari, R. R. : Male meiosis in flesh-flies of the genus *Parasarcophaga* (Sarcophagidae : Diptera). *Jpn. J. Genet.* 44, 267(1980).
- Purnell, D. J. : Spontaneous univalence at male meiosis in the mouse. *Cytogenet. Cell Genet.* 12, 327(1973).
- Rapp, M., Therman, E. and Denniston, C. : Nonpairing of the X and Y chromosomes in the spermatocytes of BDF1 mice. *Cytogenet. Cell Genet.* 19, 85(1977).
- Solari, A. J. : The spatial relationship of X and Y chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 29, 217(1970).
- Beechey, C. V. : X-Y chromosome dissociation and sterility in the mouse. *Cytogenet. Cell Genet.* 12, 60(1973).
- Imai, H. T., Wada, M. Y. and Moriwaki, K. : The sex chromosome association (Scx) gene is located on the X-chromosome in mice. *Jpn. J. Genet.* 65, 65(1990).
- Imai, H. T., Matsuda, Y., Shiroishi, T. and Moriwaki, K. : High frequency of X-Y chromosome dissociation in primary spermatocytes of F₁ hybrids between Japanese wild mice (*Mus musculus molossinus*) and inbred laboratory mice. *Cytogenet. Cell Genet.* 29, 166(1981).
- Mahadevaiah, S., Setterfield, L. A. and Mittwoch, U. : Univalent sex chromosomes in spermatocytes of Sxr-carrying mice. *Chromosoma* 97, 145(1988).
- Matsuda, Y., Imai, H. T., Moriwaki, K. and Kondo, K. : Modes of inheritance of X-Y dissociation in intersubspecies hybrids between BALB/c mice and *Mus musculus molossinus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 35, 209(1983).
- Choi, Y. H., Choi, B. T., Chung, H. Y., Jo, U. B. and Lee, W. H. : Study on age-related meiotic chromosomal and histological changes in the testis of Senescence accelerated mice. *Kor. J. Gerontol.* 4, 46(1989).

- 94).
20. Choi, Y. H., Choi, B. T., Jo, U. B. and Lee, W. H. : Chromosome dissociation and histological study of testis in the sterile male ICR mice. *Kor. J. Lab. Ani. Sci.* 10, 25(1994).
 21. Choi, Y. H., Kwon, Y. W. and Lee, W. H. : Analysis of chiasma, univalents and X-Y dissociation in Korean wild mice (*Mus musculus* subspecies). *Kor. J. Zoology* 37, 104(1994).
 22. Tates, A. D. and Natarajan, A. T. : A correlative study on the genetic damage induced by chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia of mice. I. CNU-ethanol. *Mutat. Res.* 37, 267(1976).
 23. Yunis, J. J. and Sanchez, O. : G-banding and chromosome structure. *Chromosoma* 44, 15(1973).
 24. Sumner, A. T. : A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75, 304(1972).
 25. Benett, D. : The karyotype of the mouse, with identification of a translocation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53, 730(1965).
 26. Mckay, R. D. G. : The mechanism of G- and C-banding in mammalian metaphase chromosomes. *Chromosoma* 44, 1(1973).
 27. Burkholder, G. D. and Duczek, L. L. : The effect of chromosome banding techniques on the proteins of isolated chromosome. *Chromosoma* 87, 425(1982).
 28. Hsu, T. C. : A possible function of constitutive heterochromatin : the bodyguard hypothesis. *Genetics* 79, 137(1975).
 29. 森脇和郎 : 日本産 野生 マウスの 起源 創造の 世界 47, 62(1983).
 30. Kim, H. S. and Lee, W. H. : A study on the karyotype analysis of Korean wild mouse. *Kor. J. Lab. Ani. Sci.* 8, 175(1992).
 31. Henderson, S. A. and Edwards, R. G. : Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218, 22(1968).
 32. Gollapudi, B. B., Kamra, O. P. and Blecher, S. R. : A search for a genetic basis for gonosomal univalency in mice. *Cytogenet. Cell Genet.* 29, 241(1981).
 33. Jagiello, G. and Fang, J. S. : Analysis of diplotene chiasma frequencies in mouse oocytes and spermatocytes in relation to ageing and sexual dimorphism. *Cytogenet. Cell genet.* 23, 53(1979).
 34. Lin, C. C., Tsuchida, W. S. and Morris, S. A. : Spontaneous meiotic chromosome abnormalities in male mice (*Mus musculus*). *Can. J. Genet. Cytol.* 13, 95 (1971).
 35. Imai, H. T. and Moriwaki, K. : A re-examination of chiasma terminalization and chiasma frequency in male mice. *Chromosoma* 85, 439(1982).