

Mouse 제 1정모세포에서의 X-Y 염색체 조기 분리; *in vivo* 환경성 변이원 검출계로서의 응용 가능성

최영현 · 권용원 · 최병태* · 조운복* · 이원호

부산대학교 자연과학대학 생물학과, 사범대학 생물교육과*

Application of X-Y Dissociation of Mice as the *in vivo* Assaying System for Environmental Mutagens

Yung-Hyun Choi, Yong-Won Kwon, Byung-Tae Choi*,
Un-Bock Jo* and Won-Ho Lee

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

(Received April 17, 1995)

(Accepted April 28, 1995)

ABSTRACT : The present experiment was carried out to investigate whether X and Y chromosome dissociation in the primary spermatocytes of mice can be used as an *in vivo* assaying system that detect environmental mutagens. For this purpose, alkylating agents (EMS, MMS and MMC), which are strong mutagens, were administered to ICR male mice 12-15 weeks old. The mean frequencies of previously dissociated X-Y chromosomes and autosomes of the control group were 7.34-7.45% and 0.92-1.04%, respectively. The frequencies of X-Y dissociation in the mutagen-treated groups with 10.0 mM EMS and 5.0 mM MMS were about 3.3-4.6 times higher than that in the control group, but there were no significant differences in dissociation of autosomes in both the control and the mutagen-treated groups. These results suggest that X-Y dissociation in the primary spermatocytes of mice can be used as an *in vivo* short-term assaying system for environmental mutagens.

Key Words : X and Y chromosome dissociation, Mutagens, Mice

I. 서 론

Ames(Ames *et al.*, 1975)에 의해 개발된 *Salmonella*/mammalian-microsome 돌연변이 검출계는 환경성 변이원들을 검출하는데 매우 성공적이었으며, 많은 발암물질들이 이 검출계에서 돌연변이원인 것으로 알려져 돌연변이와 발암의 생성기구에 대한 공통성이 시사되었다(MaCann *et al.*, 1975; Sugimura, 1982). 그러나 동물의 발암실험에서 발암성이 높은 물질로 판명된 것들 중에서 원핵생물에서는 전혀 돌연변이원성을 나타내지 않는 물질이 존재한다는 점과 진핵생물과의 돌연변이원성 비교에서의 정량적인 불일치성 등으로 인하여(Vogel *et al.*, 1980; Sugimura, 1982; Wurgler and Vogel, 1985), 고등동물에서 검출할 수 있는 다양한 변이를 포함할 수 있는 새로운 돌연변이 검출계의 필요성이 요구되어져 왔다. 그 결과 실험의 목적에 따른 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 검출

계들이 고안되어져 널리 사용되어지고 있다(Venitt and Party, 1984; Wurgler and Vogel, 1985; McPherson, 1991).

한편 감수분열과 연관된 염색체의 연구는 체세포 염색체에서 볼 수 없는 상염색체 및 성염색체 사이의 결합과 이에 연관된 chiasma의 특징 등의 정보를 얻을 수 있는데, 인간을 포함한 거의 모든 포유동물에서 모계의 연령 증가는 생식력의 감소와 연관성을 지니며(Lurhardt *et al.*, 1973), 표현형적으로 비정상적인 자손의 빈도 증가와 염색체의 수적 및 구조적 비정상성을 초래하는 것으로 보고되어지고 있다(Synder *et al.*, 1987). 특히 난모세포의 감수분열 동안 염색체의 불분리 빈도의 증가와 연관된 수적 비정상은 일반화된 현상이며, chiasma 위치와 빈도의 변화 및 2가염색체가 분리된 univalent의 빈도가 증가하는 것이 생쥐 등을 대상으로 하여 많은 보고가 이루어지고 있다(Henderson and Edwards, 1968; Sugawara and Mikamo, 1983). 특히 Henderson과 Edwards(1968)은 uni-

valent 비율의 증가를 포함한 암컷에서의 연령 의존적 염색체 비정상 증가 현상을 'production-line'이라 한 바 있으나, 대부분 실험동물에서 수컷의 경우에는 연령의 증가에 따른 뚜렷한 경향성을 보여 주지 못하고 있다(Lin *et al.*, 1971; Speed, 1977; Jagiello and Fang, 1979; Gollapudi *et al.*, 1981; Choi *et al.*, 1994 a,c).

감수분열에서 XY형의 성염색체를 가지는 다양한 종들의 성염색체 결합은 X와 Y 염색체의 크기와 상동성의 정도에 따라 다양하나(Purnell, 1974; Kaul *et al.*, 1980), 많은 동물들에서 제 1 감수분열 중기동안에 end-to-end 형태의 결합을 하고 있다(Solari, 1970; Rapp *et al.*, 1973). 그러나 인간을 포함한 포유동물들에서 side-by-side 결합을 하는 상염색체뿐만 아니라 성염색체들도 이 동기와 중기에 때때로 univalent를 형성하는데, 특히 수컷에서 X와 Y 염색체가 서로 분리되는 현상을 X-Y 염색체 조기분리(X-Y dissociation or X-Y nonpairing)라 하며(Solari, 1970; Beechey, 1973; Rapp *et al.*, 1977), 다양한 생쥐 계통들에서 많은 선행 연구가 수행되어져 오고 있다.

본 연구에서는 환경성 변이원에 노출된 생쥐들의 정소에서 관찰되는 X와 Y 염색체 및 상염색체들의 조기분리 현상이 *in vivo* 환경성 변이원 검출계의 지표로서 사용될 수 있는지의 가능성을 알아보기 위하여, 강력한 돌연변이원으로 알려진 3가지 종류의 alkylating agents 처리에 의한 염색체 조기분리의 정도를 비교 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

한국생명과학연구소(주)에서 구입한 동계교배 ICR 계통의 생후 2-3개월 된 30 g 내외의 생쥐 수컷들을 사용하였다.

2. 변이원의 처리

본 실험에 사용된 돌연변이원은 EMS (ethyl methanesulfonate), MMS (methyl methanesulfonate), 및 MMC (mitomycin C) 등 3가지 종류의 alkylating agents (Sigma Co. USA)로서 적정량을 PO₄ buffer(pH 6.8)에 희석하여 사용하였다. 투여는 Tates와 Natarajan(1976)의 방법을 응용하여 개체당 희석된 변이원 1 ml씩을 복강 주사하였으며, 대조군은 동일량의 PO₄ buffer만을 투여하였고, 농도당 24시간 간격으로 3-4개체 정도를 대상으로 염색체 조기분리의 정도를 조사하였다.

3. 염색체 표본 작성

염색체 관찰을 위한 표본작성은 기본적으로 Imai *et al.* (1981)의 방법에 준하였다. 먼저 조사 대상 개체의 정소를 적출하여 30분간 저장처리 하고, Carnoy 용액에서 1시간 고정 후 원심분리(1,500 rpm)하여 얻은 세포부유액을 다시 2시간 동안 재고정하였다. 다시 원심분리하여 얻은 세포들을 slide glass상에 적하하여 공기 건조시켰으며, 4% Giemsa액으로 염색하여 표본을 작성하였다. 대조군 및 변이원 처리군 개체들의 염색체 조기분리 정도의 비교는 중기 I세포를 대상으로 하였다.

III. 결과 및 고찰

강력한 돌연변이 유발원인 3가지 종류의 alkylating agents가 처리된 생쥐의 감수분열 제 1 정모세포에서 염색체의 조기분리 정도를 대조군과의 비교에 의하여 환경성 변이원 검출계로서의 응용 가능성 여부를 ICR 계통을 사용하여 조사하였다.

Fig. 1A는 통상적으로 관찰되는 생쥐 수컷의 감수분열 중기 I세포로서 총 40개의 염색체들 중 19쌍의 상염색체는 side-by-side 결합에 의한 chiasma 형성의 과정을 관찰할 수 있으며, X와 Y의 성염색체는 end-to-end 결합 형태를 하고 있다. Fig. 1의 B는 조기분리된 univalent형의 성염색체를 가진 세포로서, 조기분리된 X와 Y 염색체는 두 염색체의 크기 차이로 쉽게 구별이 가능하다. 그리고 조기분리된 상염색체의 경우 Table 1은 조사된 정상 ICR 수컷에서의 염색체 조기분리 정도를 BALB/c 및 몇 가지 다른 계통과 야생 생쥐들에서 조사된 결과를 비교한 것인데, X와 Y 염색체 및 상염색체의 조기분리 빈도는 약 7.45% 및 0.92% 정도였다. 몇 가지 선행 연구들의 결과 비교에서 알 수 있듯이 정상 계통들에서 성염색체의 조기분리 정도는 평균 9.6% 내외이고, 상염색체의 경우도 1-2% 수준임을 알 수 있었다(Lin *et al.*, 1971; Rapp *et al.*, 1973; Gollapudi *et al.*, 1981; Imai *et al.*, 1981,1982; Matsuda *et al.*, 1982, 1983; Choi *et al.*, 1994a,b).

Table 2는 3가지 종류의 alkylating agent를 복강 주사한 후 24시간 간격마다 경추 탈구 도살 후, 정소의 제 1 정모세포에서 관찰된 염색체 조기분리의 빈도를 나타낸 것이다. 동일량의 PO₄ buffer(pH 6.8)만을 처리한 대조군의 경우는 X와 Y 염색체의 조기분리 빈도는 6.71%에서 8.02%로 평균 7.34%였으며, 상염색체의 경우는 1.04% 내외로서 Table 1에 나타낸 결과 및 선행연구들의 결과와 유사하였다.

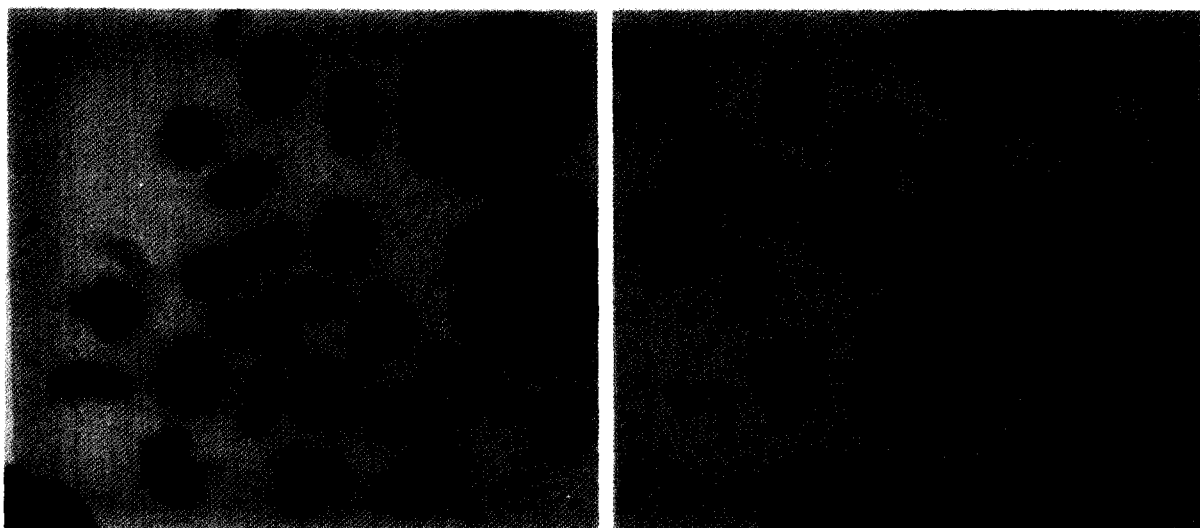


Fig. 1. Meiotic stages in spermatocytes of ICR mice (1,000x). A; A normal cell with paired chromosomes (Arrows; sex chromosomes present as a bivalent type). B; A cells with dissociated X and Y chromosomes (Arrows; Sex chromosomes present as univalents type).

Table 1. Frequency of previously dissociated X-Y chromosomes and autosomes in spermatocytes at MI of ICR mice.

Mice	No. of cells observed	%±SD(No.) of dissociation		References
		X-Y chromosomes	Autosomes	
ICR	2,108	7.45±0.58(157)	0.92±0.42(18)	Present result
BALB/c	950	7.33±0.72(70)	1.10±0.73(11)	Choi <i>et al.</i> (1994b)
DCH	467	9.20(43)	1.9(9)	Gollapudi <i>et al.</i> (1981)
B10BR	600	5.00±3.10	1.2 ±1.00	Imai <i>et al.</i> (1982)
wild mice	2,200 ¹	6.60±5.10	2.50±2.60	Matsuda <i>et al.</i> (1982)
	1,027 ²	6.33±2.18(65)	1.25±0.57(13)	Choi <i>et al.</i> (1994a)

1; *Mus musculus domesticus*, 2 ; *Mus musculus* subspecies

Table 2. Effects of alkylating agents (AAs) on the induction of X-Y chromosomes and autosomes dissociation in spermatocytes at MI of ICR mice.

AAs (mM)	Hour after treatment	No. of cells observed	%±SD(No.) of dissociation	
			X-Y chromosomes	Autosomes
Control ¹	24	425	7.29±0.67(31)	0.97±0.45(4)
	48	432	6.71±0.93(29)	1.32±0.73(5)
	72	424	8.02±0.62(34)	0.82±0.62(3)
		mean		7.34±0.74
EMS 10.0	24	422	35.54±1.41(147)	2.52±0.89(4)
	48	457	33.37±0.54(151)	0.00±0.00(0)
	72	467	32.63±0.83(152)	1.96±1.02(3)
		mean		33.84±0.93
MMS 5.0	24	460	25.30±0.42(115)	6.00±2.47(23)
	48	450	24.52±0.63(110)	1.62±0.82(7)
	72	469	22.42±0.37(105)	7.40±1.34(28)
		mean		24.08±0.47
MMC 0.5	24	482	15.07±0.67(73)	1.17±0.86(6)
	48	416	17.63±0.93(76)	0.00±0.00(0)
	72	477	11.76±0.62(57)	1.77±2.50(8)
		mean		14.82±0.74

1; only PO₄ buffer(pH 6.8).

10.0 mM의 EMS를 투여한 경우, 시간의 경과에 따라 univalent형 성염색체 빈도는 35.54%에서 32.63%로 다소 감소하는 추세를 보여 주었으며, EMS가 처리된 실험군 전체의 평균은 약 33.84%로 대조군의 4.6배 수준이었다. 그러나 상염색체의 경우는 대조군과 유사한 경향성을 보여주었다. MMS를 5.0 mM 투여한 경우는 조사된 3가지 실험군에서 X-Y 염색체의 조기분리는 평균 24.08%로 대조군에 비하여 3.3배 높게 나타났다. MMC의 경우도 성염색체의 조기분리 정도는 약 2배 정도 높게 나타났으나, 상염색체의 경우 뚜렷한 경향성을 나타내지 않았다.

이상의 결과에서 상염색체의 경우 돌연변이원 투여로 인한 조기분리 유도현상은 관찰되지 않았지만, X와 Y 염색체의 조기분리는 환경성 변이원 투여로 인하여 고빈도로 높게 유도되었음을 알 수 있었다.

정상인 생쥐에서 지금까지 보고된 수십종의 동계교배 계나 자연집단에서 채집된 각 지역계통들의 평균 X-Y 조기분리율은 1.0% 내외이지만, 계통에 따라 매우 낮은 빈도(Rapp *et al.*, 1973; Majumdar *et al.*, 1979; Imai *et al.*, 1981) 또는 그 반대의 경우(Rapp *et al.*, 1973; Imai *et al.*, 1981; Matsuda *et al.*, 1982, 1983; Choi *et al.*, 1994c)도 있으며, 어떤 불임 개체는 100% 조기 분리된 성염색체를 가진 경우도 보고되어진 바 있다(Beechey, 1973). 그리고 수컷에서 상염색체의 univalent는 거의 모든 계통들에서 낮은 빈도로 관찰되지만, 암컷에서는 연령증가에 따라 일반적으로 증가한다고 보고되어져 오고 있다(Henderson and Edwards, 1968; Luthardt *et al.*, 1973; Jagiello and Fang, 1979; Sugawara and Mikamo, 1983).

한편 Federley(1931)에 의해 수컷 동물들에서 감수분열 동안 염색체의 결합은 임상에 있어서 중요한 역할을 한다는 점이 제안된 후, 염색체의 결합과 불임이 상호 연관성을 가진다는 가설이 초파리, 생쥐 등에서 실험적으로 입증되어지고 있다(Miklos, 1974). Evans와 Burtenshaw(1982), 그리고 Mahadevaiah *et al.*(1988) 등은 생쥐의 정모세포에서 두 성염색체 사이의 결합에 관여하는 인자(Sxr)를 가정하였으며, 이는 수컷 생쥐가 지닌다고 하였다. Matsuda *et al.*(1983)과 Imai *et al.*(1990) 등도 end-to-end 형태의 결합은 어떤 유전자(Sxc)에 의하며, 그러한 X-Y 조기분리를 지배하는 유전인자의 위치와 계통간의 차이에 관하여 언급한 바 있다.

본 연구에서 조사된 돌연변이원 처리에 의한 염색체의 univalent 증가 현상은 전적으로 성염색체에 국한되어 나타났으며, 이는 돌연변이원 처리에 의해 특이적으로 X와 Y 염색체 사이의 결합에 관여하는 부위(유전자)에 어떤 이상이 초래되었음을 의미한다. 처리 후 72시간이 경과하였을 경우 초기보다 다소 감소하는 경향성을 보여주었

으나, 평균 빈도와 비교해 볼 때 univalent 빈도상의 큰 변화는 없었던 점으로 미루어, 시간의 경과에 따른 염색체 조기분리 정도의 회복 가능성에 대한 연구 및 처리된 개체들의 임상 능력 등과 연관지은 부가적인 연구가 요구된다. 아울러 환경성 변이원의 종류에 따른 반응성의 차이점 등을 좀 더 조사해야겠지만, 본 실험의 결과로 미루어 감수분열 제 1 정모세포에서 X와 Y 염색체의 조기분리를 단기간의 *in vivo* 환경성 변이원 검출에 대한 지표로서 충분한 응용가능성이 있다고 사료된다.

참고문헌

- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-369.
- Beechey, C.V. (1973): X-Y chromosome dissociation and sterility in the mouse. *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**, 60-67.
- Choi, Y.H., Kwon, Y.W. and Lee, W.H. (1994a): Analysis of chiasma, univalents and X-Y dissociation in Korean wild mice (*Mus musculus* subspecies). *Kor. J. Zoology*, **37**, 104-112.
- Choi, Y.H., Choi, B.T., Jo, U.B. and Lee, W.H. (1994b): Chromosome dissociation and histological study of testis in the sterile male ICR mice. *Kor. J. Lab. Ani. Sci.*, **10**, 25-31.
- Choi, Y.H., Choi, B.T., Chung, H.Y., Jo, U.B. and Lee, W.H. (1994c): Study on age-related meiotic chromosomal and histological changes in the testis of Senescence accelerated mice. *Kor. J. Gerontol.*, **4**, 46-50.
- Evans, E.P. and Burtenshaw, M.D. (1982): Meiotic crossing-over between the X and Y chromosomes of male mice carrying the sex-reversing (Sxr) factor. *Nature*, **300**, 443-445.
- Federley, H. (1931): Chromosomen analyse der reziproken Bastarde zwischen *Pygaera pigra* und *P. curtula* sowie ihrer Ruckkreuzungsbastarde. *Z. mikr.-anat. Forsch.*, **12**, 772-816.
- Gollapudi, B.B., Kamra, O.P. and Blecher, S.R. (1981): A search for a genetic basis for gonosomal univalency in mice. *Cytogenet. Cell Genet.*, **29**, 241-249.
- Henderson, S.A. and Edwards, R.G. (1968): Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature*, **218**, 22-28.
- Imai, H.T., Wada, M.Y. and Moriwaki, K. (1990): The sex chromosome association (Scx) gene is located on the X-chromosome in mice. *Jpn. J. Genet.*, **65**,

- 65-69.
- Imai, H.T., Matsuda, Y., Shiroishi, T. and Moriwaki, K. (1981): 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.*, **2**, 166-175.
- Imai, H.T. and Moriwaki, K. (1982): A re-examination of chiasma terminalization and chiasma frequency in male mice. *Chromosoma*, **85**, 439-452.
- Jagiello, G. and Fang, J.S. (1979): Analysis of diplotene chiasma frequencies in mouse oocytes and spermatocytes in relation to ageing and sexual dimorphism. *Cytogenet. Cell Genet.*, **23**, 53-60.
- Kaul, D., Gaur, P. and Tewari, R.R. (1980): Male meiosis in flesh-flies of the genus *Parasarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). *Jpn. J. Genet.*, **44**, 267-274.
- Lin, C.C., Tsuchida, W.S. and Morris, S.A. (1971): Spontaneous meiotic chromosome abnormalities in male mice (*Mus musculus*). *Can. J. Genet. Cytol.*, **13**, 95-100.
- Luthardt, F.W., Palmer, C.G. and Yu, P.-L. (1973): Chiasma and univalent frequencies in aging female mice. *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**, 68-79.
- Mahadevaiah, S., Setterfield, L.A. and Mittwoch, U. (1988): Univalent sex chromosomes in spermatocytes of *Sxr*-carrying mice. *Chromosoma*, **97**, 145-153.
- Majumdar, S.K., Buchanan, B. and Feinstein, S. (1979): Mutagenicity studies with 5-thio-D-glucose. *J. Heredity*, **70**, 325-328.
- Matsuda, Y., Imai, H.T., Moriwaki, K., Kondo, K. and Bonhomme, E. (1982): X-Y chromosome dissociation in wild derived *Mus musculus molossinus* subspecies, laboratory mice, and their F1 hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.*, **34**, 241-252.
- Matsuda, Y., Imai, H.T., Moriwaki, K. and Kondo, K. (1983): Modes of inheritance of X-Y dissociation in intersubspecies hybrids between BALB/c mice and *Mus musculus molossinus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, **35**, 209-215.
- McCann, J., Choi, E., Yamazaki, E. and Ames, B.N. (1975): Detection of carcinogens as mutagens in *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, **72**, 5135-5139.
- McPherson, M.J., (1991): Directed Mutagenesis; a practical approach, IRL Press.
- Miklos, G.L.G. (1974): Sex-chromosome pairing and male fertility. *Cytogenet. Cell Genet.*, **13**, 558-577.
- Purnell, D.J., (1973): Spontaneous univalence at male meiosis in the mouse. *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**, 327-335.
- Rapp, M., Therman, E. and Denniston, C. (1977): Nonpairing of the X and Y chromosomes in the spermatocytes of BDF1 mice. *Cytogenet. Cell Genet.*, **19**, 85-93.
- Solari, A.J., (1970): The spatial relationship of X and Y chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *Chromosoma*, **29**, 217-236.
- Speed, R.M., (1977): The effects of ageing on the meiotic chromosomes of male and female mice. *Chromosoma*, **64**, 241-254.
- Sugawara, S., and Mikamo, K. (1983): Absence of correlation between univalent formation and meiotic nondisjunction in aged female Chinese hamster. *Cytogenet. Cell Genet.*, **35**, 34-40.
- Sugimura, T., (1982): Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily foods. *Cancer*, **49**, 1970-1984.
- Synder, L.A., Freifelder, D. and Hartl, D.L. (1987): General Genetics, Jones and Bartlett Publishers Inc., Boston.
- Tates, A.D. and Natarajan, A.T. (1976): A correlative study on the genetic damage induced by chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia of mice. I. CNU-ethanol, *Mutat. Res.*, **37**, 267-278.
- Venitt, S. and Party, J.M. (1984): Mutagenicity testing; a practical approach, IRL Press.
- Vogel, E.W., Bljileven, W.G.H., Klapwijk, P.M. and Zjilstra, J.A. (1980): Some current perspectives of the application of *Drosophila* in the evaluation of carcinogens in *The Predictive Value of Short-term Screening Tests in Carcinogens*(Williams, G.M. et al., Eds), (Elsevier, Amsterdam), p. 125-147.
- Wurgler, F.E. and Vogel, E.W. (1985): In vivo mutagenicity tests using somatic cells of *Drosophila melanogaster* in *Chemical Mutagens*, Vol. 10(de Serres, F.J. Ed), (Plenum Press, New York), p. 1-72.