

Mitomycin C에 의한 1, 9, 16번 및 Y 인체염색체의 다형현상

고신대학 의학부 해부학교실

우재형

Mitomycin C-induced Polymorphism in C-band Regions of Human 1, 9, 16 and Y

Jae Hyung Woo

*Department of Anatomy
Kosin Medical college, Pusan 602-030, Korea*

= Abstract =

Mitomycin C is known to induce somatic crossing over in lower eukaryotes. This study is carried out to find out that Mitomycin C might also induce mitotic crossing over in human lymphocytes. Peripheral blood lymphocyte from normal males were treated with mitomycin C. Mitomycin C was able to alter C-band polymorphism of human chromosomes 1, 9, 16. Evidence is presented which show that mitomycin C-induced C-band polymorphism arise from mitotic crossing over.

I. 서 론

1970년 Caspperson 등⁴⁾에 의하여 G-band법이 개발되면서 염색체 연구에 획기적인 전기를 마련한 후 각종 band(R, C, NOR, high resolution band)법이 개발되기 시작했다. 염색체를 C-band법으로 염색해 보면 동원체(centromere) 근처에 구조적 이염색질(constitutive heterochromatin)이 많이 농축되어 있으며 1, 9, 16번 염색체와 Y염색체에 독특하게 잘 나

타난다. 그런데 이와같은 염색체에 다형현상(polymorphism)이 나타나는 것을 볼 수 있다. 이런 현상은 12, 17, 21번 염색체¹⁵⁾ 및 19번 염색체에서도 나타나나 주로 1, 9, 16번 염색체에 잘 나타난다.

C-band 염색법으로 나타나는 구조적 이염색질의 다형현상은 각 개인에 있어서 일반적으로 안정된 성질을 나타낸다고 Hoehn 등⁹⁾은 보고하였다. 그러나 다른 연구자들은^{6, 20)} 1, 9, 16번 인체 염색체의 C-band 부분에서 체세포

포 모자이시즘(somatic mosaicism)이 나타나
는 것을 보고하면서 이와같은 변형이 생기는
이유는 체세포 유전자교환(somatic crossing
over)에 의한 것이라고 하였다.

구조적 이염색질의 다형현상은 생체에서 비
정상적 표현형(phenotype)과 관계없는 것¹⁸⁾으
로 보이기 때문에 염색체의 다형현상이 생기는
기전을 연구하기 위하여 시험관 내에서(in
vitro) 인체임파구의 이질염색질의 변이를 양
적으로 질적으로 유도할 필요가 있다.

Mitomycin C 는 하등동물의 성숙세포
(lower eukaryote)에서 체세포 유전자교환을
유도한다고 알려져 있고 Hoehn과 Martin¹⁰⁾은
인체 섬유세포에서 mitomycin C에 의한 1번
염색체의 C-band의 변화를 유도했다. 따라서
저자는 C-band 다형현상이 유사분열의 염색
체교환(mitotic crossing over)로 인해 생길 수
있는지를 알아보기 위하여 인체 임파구에 mi-
tomycin C를 처리하여 관찰한 바 그렇게 추론
할 수 있었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

실험재료 : 정상인 남자 6명의 말초혈액 임파
구

실험방법 :

A. 임파구 배양 및 C-band법

각 피실험자의 말초혈액 2ml를 채취하여
1ml는 15% fetal bovine serum과 5mg phytohe-
magglutinin이 첨가된 RPMI 1640 배지 1ml에
넣어 잘 저은 다음 37°C 5% CO₂ 항온기에 48
시간 배양한 후 1μg mitomycin C를 첨가하
고 22시간 후 0.1ml colcemid를 첨가하여 다
시 2시간 배양하였다. 나머지 1ml 혈액은 같
은 방법으로 하되 mitomycin C는 첨가하지
않았다. 배양액을 꺼내 1000rpm으로 6분간 원
심분리하여 세포를 모은 후 저장액 (hypoto-
nic solution : 0.075M KCl) 6ml를 첨가하여
37°C 항온 수조기에서 8분동안 세포를 팽창시
켰다. 다시 원심분리(1000rpm, 6분)하고 4°C

의 고정액(acetic acid : alcohol=1 : 3) 6ml로
고정한 다음 원심분리(1000rpm, 6분)를 3차례
시행하여 임파구를 모으고 70% alcohol에 담
귀두었던 슬라이드에 임파구를 2~3방울 떨어
뜨리고 alcohol lamp에 flame시켰다.

이 슬라이드를 3일간 37°C 항온기에서 완전
히 건조시킨 후 37°C 항온수조기에서 0.
2N HCl에 30분간 거친 후 3차 증류수에 수세
하고 다시 건조시켰다. 그리고 50°C, 1% Ba
(OH)₂에 5분간 담구었다가 3차 증류수에 수
세하고 건조시킨 후 60°C, 2×SSC에 1시간
동안 담구었다가 수세하고 건조시켰다. 완전
히 건조된 슬라이드를 mount한 후 1,000배로
관찰하였다.

B. Patil과 Lubs(1977)¹⁷⁾의 분류법에 의해
서 16번 염색체의 단완 (short arm)을 기준으
로 하여 5 level을 구분하였다.

level 1 : <0.5×16P

level 2 : 0.5-1×16P

level 3 : 1-1.5×16P

level 4 : 1.5-2×16P

level 5 : 2-2.5×16P

대부분이 염색체의 단완의 근위부에 band
가 나타나지만 단완에도 나타나는 band가 있
다. band의 일부가 단완에 있는 것을 부분적
전위(partial inversion:PI), 완전히 단완에 있
는 것은 전체적 역위(total inversion:TI)로
분류하여 조사하였다.

III. 결과 및 성적

〈표1〉에서 보는 바와 같이 mitomycin C를
처리하지 않은 임파구에서는 변이가 일어나지
않았고 mitomycin C를 처리한 임파구에서는
1, 9, 16번 염색체에서 변이를 관찰할 수 있
었고 Y염색체에서는 변이가 나타나지 않았
다.

1, 9, 16번 염색체 중에서 9번 염색체가 가
장 높은 빈도의 변이(15%)를 나타내었다. 1
번 염색체 변이 빈도(10%)보다 높지 나타난



Fig. 1. A Polymorphism of C-banded chromosomes treated with mitomycin C. Large arrow head indicates level 2. Small arrow indicates partial inversion of C-band in chromosome 16 and small arrow head level 2.

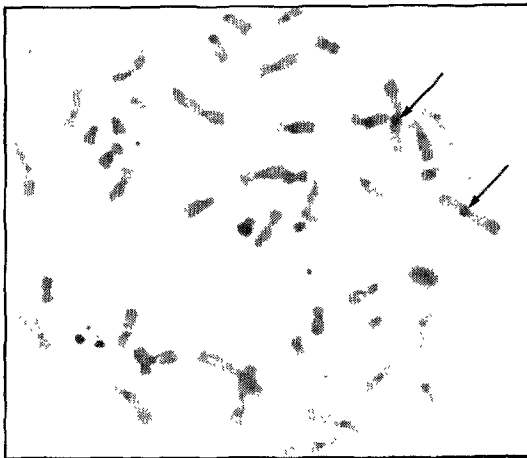


Fig. 2. A polymorphism of untreated C-banded chromosomes. Arrow indicates level 2 and level 3 C-band in chromosome 1.

Table 1. Mitomycin C 처리한 임파구의 1, 9, 16번 염색체의 C-band 양상

염색체	피검사	계수한 세포의 수		두 상동 염색체의 C-band 모양의 분류
		MMC 비처리군	MMC 처리군	
1	A	20	18	level 2, level 2
			2	level 2, level 1
	B	22	19	level 2, level 3
			2	level 2, level 1
			1	level 2, level 2
	C	18	17	level 2, level 2
			1	PI , level 2
	D	25	21	level 2, level 2
			3	level 1, level 2
			1	level 2, PI
	E	20	19	level 2, level 3
			1	PI , level 2
F	15	14	level 2, level 2	
		1	level 2, level 1	
9	A	20	15	level 1, level 2
			4	level 1, PI
			1	level 1, level 1
	B	22	19	level 2, level 2
			2	level 2, PI
			1	level 2, level 1
	C	18	15	level 2, level 3
			2	level 2, PI
			1	level 2, level 2
	D	25	21	level 2, level 2
			3	level 2, PI
			1	level 1, PI
E	20	18	level 2, level 2	
		2	level 2, level 1	
F	15	14	level 2, level 2	
		1	level 1, PI	
16	A	20	20	level 1, level 1
	B	22	22	level 1, level 2
	C	18	18	level 2, level 2
	D	25	24	level 1, level 2
			1	level 1, level 2
	E	20	20	level 1, level 2
F	15	15	level 1, level 1	

* Y염색체는 변이가 없었다.

Table 2. Mitomycin C 처리한 임파구의 1, 9, 16번 염색체의 변이의 빈도

염색체	계수한 염색체의 수	변이를 나타내는 염색체수	백분율
1	240	24	10%
9	240	36	15%
16	240	2	0.83%

것은 염색체 전체 길이에 대한 C-band의 비율이 높은 탓인 것 같다.

mitomycin C 처리군에서는 1, 9번 염색체에서 동시에 변이가 나타나는 것을 관찰할 수 있다. 변이한 염색체에서는 거의 다 구조적이염색질의 양이 줄어든 것을 볼 수 있다. mitomycin C를 처리하지 않은 임파구에서도 정상적으로 다형현상은 1, 9, 16번 염색체에서 모두 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

IV. 고 찰

염색체 다형현상 연구는 Q-, C-band법 그리고 NOR염색기법으로 주로 하고 있으며 C-band의 경우는 Y염색체를 제외한 동원체에 나타나고 선단동원체 염색체(acrocentric chromosome)의 단완에서도 나타날 수 있으며 1, 9, 16번과 Y염색체에서 특히 크게 나타나서 다형현상 연구에 이용되고 있다.

mitomycin C는 염색체의 breakage, gap, 자매염색분체교환(sister chromatid exchange: SCE)을 유도할 수 있다는 것은 잘 알려져 있으며¹⁾ Cohen과 Shaw⁵⁾은 염색체의 breakage point의 분포가 무작위하게 나타나는 것은 아니라고 했다. Shaw와 Cohen¹⁹⁾은 인체 염색체에서 mitomycin에 의한 breakage가 1, 9, 16번 염색체와 선단동원체의 이염색질(heterochromatin)에서 주로 일어난다고 하였다.

Morad¹⁶⁾는 band법을 이용하여 1, 9, 16번 염색체의 C-band지역에 일어나는 염색체 교환이상(interchange aberration)을 설명하고 있다.

한편 Kuhn은 Bloom증후군 환자에게 유사분열교차(mitotic chiasmata)의 위치를 조사하여 그와 같은 현상은 유사분열 유전자교환(mitotic crossing over)의 결과라고 보고하였다.¹²⁾ 또한 Bloom 증후군 환자의 임파구에 mitomycin C를 처리하여 유사분열교차의 빈도를 증가시켰으나 1, 9, 16번 염색체에서의 빈도는 의미있게 증가하지는 않았음을 보고하였다.¹³⁾

본 실험에서는 mitomycin C가 1, 9, 16번 염색체의 C-band지역에 다형현상을 유도할 수 있음을 알 수 있다. 또 mitomycin C 비처리군에서 다형현상이 나타나는 개체에서 mitomycin C 처리군에서 보면 변이가 나타나서 다형현상이 없어지는 경우도 있다. 그러나 변이가 나타나는 것이 어떤 일정한 양상을 나타내지는 않고 단지 16번과 Y염색체에서는 변이가 거의 나타나지 않고 1, 9번 염색체에서 변이가 주로 나타나는 것이다. 이러한 현상은 Joseph 등¹¹⁾이 mitomycin C에 의한 염색분체교환(chromatid exchange)의 빈도는 C-band의 크기에 관계있다고 하였다.

그러나 단순히 C-band의 크기로만 말할 수 없고 염색체의 길이에 대한 비율로 해석해야 할 것이다. 물론 2개의 다른 C-band level을 같은 level에 포함시킨다든지 같은 level을 다른 level에 포함시킬 수 있는 가능성을 배제할 수 없다.⁷⁾ 이런 점에서 숫자적으로 그 정도를 정확히 판단할 수 없지만 변이가 일어나는 것을 통해 다형현상이 나타나는 사실은 분명히 알 수 있다. 특히 부분적 역위나 전체적 역위가 나타나는 경우는 더욱 확실하다.

mitomycin C에 의한 염색체의 변이에는 자매염색체교환(SCE)¹⁴⁾과 생쥐 태아 염색체의 동원체 부분에 나타나는 lateral asymmetry²²⁾도 포함된다.

그러나 이상과 같은 현상이 나타나는 기전이나 의미는 잘 모르고 있다. 단지 mitomycin C에 의해 나타나는 현상들은 1, 9, 16번 염색체의 중심체 부위에 주로 일어나는 것을 알

수 있다.^{2,3)} 이와같은 염색체들의 중심체 부위에는 repetitive DNA를 갖고 있다는 것⁸⁾이 알려져 있기 때문에 염색분체의 짝짓기(pairing)와 교환(exchange)이 다른 부위보다 적게 일어날 수 있다고 생각된다.

이와 같은 사실들로 미루어 보아 mitomycin C를 처리한 후에 나타나는 다형현상은 체세포 유전자교환(somatic crossing over)에 의한 것이라 추론해 볼 수 있다.

V. 요약 및 결론

mitomycin C는 하등동물의 성숙세포(lower eukaryote)에서 체세포 유전자교환을 유도한다고 알려져 있기 때문에 인체 임파구에서도 같은 현상이 일어나는지를 알기 위해 본 실험을 하였다.

6명의 정상인 남자의 말초혈액 임파구를 채취하여 mitomycin C를 처리하여 C-band염색법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 1, 9, 16번 염색체에서 변이가 일어나서 다형현상이 나타났다. Y염색체는 변이가 일어나지 않았다.

2. 1, 9, 16번 염색체 중 9번 염색체가 가장 높은 빈도의 변이(15%)를 나타내었다. 이렇게 1번 염색체 변이 빈도(10%)보다 높게 나타난 것은 염색체 전체 길이에 대한 C-band의 비율이 높은 탓인 것 같다.

3. 16번 염색체에서는 0.83%의 비율로 변이가 나타나고 Y염색체에서는 변이가 나타나지 않은 것은 염색체 자체의 길이가 짧기 때문인 것으로 사료된다.

이와같은 사실로 미루어 직접적인 증거는 없으나 mitomycin C가 체세포 유전자 교환을 유도할 수 있는 것으로 추론된다.

REFERENCES

1. Bourgeois CA : Distribution of mitomycin C-induced damage in human chromosomes with special reference to regions

of repetitive DNA. Chromosoma 48 : 203, 1974.

2. Brogger A : Different patterns of chromosome exchange induced by methyl-methane sulfonate and mitomycin C in human cells. Hereditas 77 : 205, 1974.
3. Brogger A : Non-random localization of chromosome damage in human cells and targets for clastogenic action. Chromosomes Today 6 : 297, 1977.
4. Caspersson T, Zech L, Johansson C : Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. Exp Cell Res 60 : 315, 1970.
5. Cohen MM, Shaw MW : Effects of mitomycin C on human chromosomes. J Cell Biol 23 : 386, 1964.
6. Craig-Holmes AP, Moore FB, Shaw MW : Polymorphism of human C-band heterochromatin. II. family studies with suggestive evidence for somatic crossing over. Am J Hum Genet 27 : 178, 1975.
7. Erdtmann B : Aspects of evaluation of human C-band heteromorphism. Hum Genet 61 : 281, 1982.
8. Gosden JR, Michael AR, Buckland RA, Clyton RP, Evans HJ : The location of four human satellite DNAs on human chromosomes. Exp Cell Res 92 : 148, 1975.
9. Hoehn H, Kam Au, Karp LE, Martin GM : Somatic stability of variant C-band heterochromatin. Hum Genet 35 : 163, 1977.
10. Hoehn H, Martin GM : Clonal variants of constitutive heterochromatin of human fibroblast after recovery from mitomycin C treatment. Chromosoma 43 : 203, 1973.
11. Joseph JL, Brach JM, Smith DR : Pat-

- tern of exchange induced by mitomycin C in C-band of human chromosomes. I. relationship to C-band size in chromosomes 1, 9, 16. *Human Genet* 62 : 342, 1982.
12. Kuhn EM: Localization by Q-banding of mitotic chiasmata in cases of Bloom's syndrome. *Chromosoma* 57 : 1, 1976.
 13. Kuhn EM : Mitotic chiasmata and other quadriradials in mitomycin C-treated Bloom's syndrome lymphocytes. *Chromosoma* 66 : 287, 1978.
 14. Latt SA : Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair : Detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 3162, 1974.
 15. Mayer M, Matsuura J, Jacobs P : Inversions and other unusual heteromorphisms detected by C-banding. *Hum Genet* 45 : 43, 1978.
 16. Morad M, Jonasson J, Lindsten J : Distribution of mitomycin C-induced breaks on human chromosomes. *Hereditas* 74 : 273, 1973.
 17. Patil SR, Lubs MA : Classification of qh regions in human chromosomes 1, 9, 16 by C-banding. *Hum Genet* 38 : 35, 1977.
 18. Robinson JA, Buckton KE, Spowart G, Newton M, Jacobs PA, Evans HJ, Hill R : The segregation of human chromosome polymorphisms. *Ann Hum Genet* 40 : 113, 1976.
 19. Shaw MW, Cohen MM : Chromosome exchange in human leukocytes induced by mitomycin C. *Genetics* 51 : 181, 1965.
 20. Simi S, Tursi F : Polymorphism of human chromosomes 1, 9, 16, Y : Variations, segregation and mosaicism. *Hum Genet* 62 : 220, 1982.
 21. Trunca Doyle C : The cytogenesis of 90 patients with idiopathic mental retardation/malformation syndromes and of 90 normal subjects. *Hum Genet* 33 : 131, 1976.
 22. Tucci SM, Kaye GI : Detection of lateral asymmetry in the C-bands of mouse embryo chromosomes exposed in utero to mitomycin C. *Mutat Res* 72 : 115, 1980.