

## 고압전자현미경을 이용한 소뇌 평행섬유-조롱박세포 간 신경연접의 3차원 재구성

이계주, 유임주

고려대학교 의과대학 해부학교실

신경연접은 신경세포 사이의 신호전달을 위해 형성되는 미세구조로 다양한 생리적, 병리적 상태에 반응하여 형태적, 기능적 변화를 보인다. 현재까지 투과전자현미경을 이용한 신경연접 미세구조의 2차원적 연구들이 많은 유용한 정보를 제공하여 왔으나 신경연접 구성요소들을 보다 정확하게 분석하고 전신경연접부위와 후신경연접부위의 공간적 연결 관계를 상세히 이해하기 위해서는 신경연접의 3차원 재구성이 요구된다. 현재 신경연접과 같은 미세구조의 3차원 구조복원은 일련의 연속절편을 이용하는 방법과 *tilting tomography*의 방법으로 구현될 수 있다. 고압전자현미경은 고해상도와 시료투과력의 증가로 인해 두꺼운 절편의 관찰이 가능하며 이를 통해 미세구조의 3차원적 특성을 규명하는 것이 용이하므로, 신경연접의 3차원 재구성에 고압전자현미경을 응용하는 것은 많은 수의 연속절편 제작과 오랜 기간의 영상처리가 요구되는 기존의 재구성 방법의 난점들을 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

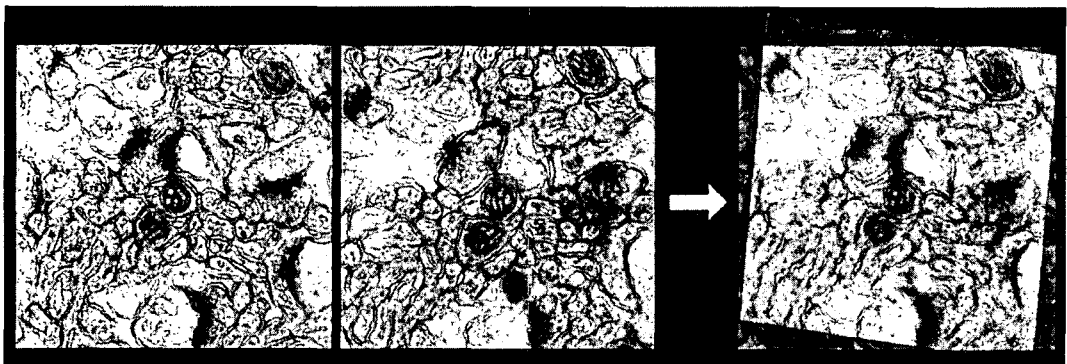
이에 본 연구에서는 고압전자현미경을 이용하여 흰쥐 소뇌 평행섬유와 조롱박세포 간 신경연접의 3차원 재구성을 시도하였다. 3차원 재구성에 앞서 염색방법과 절편 두께의 조절을 통해 고압전자현미경 하에서 신경연접의 적절한 관찰조건을 확립하고자 하였다. 관찰 결과, 절편의 두께가 증가하면 신경연접의 막, 소포와 같은 미세구조들의 겹침 현상이 비울적으로 증가되어 나타나기 때문에 용이한 3차원 재구성을 위해서는 250 nm 두께의 절편을 제작하는 것이 적합한 것으로 판단되었다. 또한 절편제작 이전의 *en bloc* 염색 반응시간을 증가시키는 것이 절편제작 후 염색시간을 조절하는 것에 비해 *contrast* 향상에 더 효과적이었다. 이상의 결과로부터 고압전자현미경을 이용하여 일련의 두꺼운 연속 절편을 촬영하고 3차원 재구성 프로그램(Reconstruct: available at <http://synapses.bu.edu/tools>)을 이용하여 이미지들을 정렬하였으며 각각의 이미지에서 신경연접 막의 윤곽선을 그린 후 모든 윤곽선을 규합하여 최종적으로

신경연접의 3차원적 구조를 복원하였다.

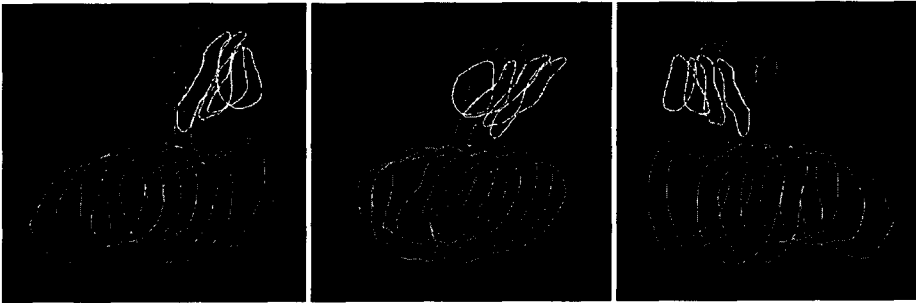
본 연구를 통하여 신경연접의 3차원 재구성에 있어 고압전자현미경의 적용 가능성을 검증하였고 관찰 조건을 확립하였다. 또한 고압전자현미경을 기반으로 두꺼운 연속절편을 이용한 신경연접의 재구성은 많은 수의 연속절편 제작과 오랜 영상처리 기간을 요구되는 기존의 재구성 방법에 비해 효율적이며 신경세포 간 연접의 형태적 변화에 관한 대규모의 정량 분석에 유용할 것으로 생각된다. 본 연구가 향후 고압전자현미경을 이용한 신경연접의 가소성 연구에 유용한 방법적 정보를 제공하기를 기대한다.



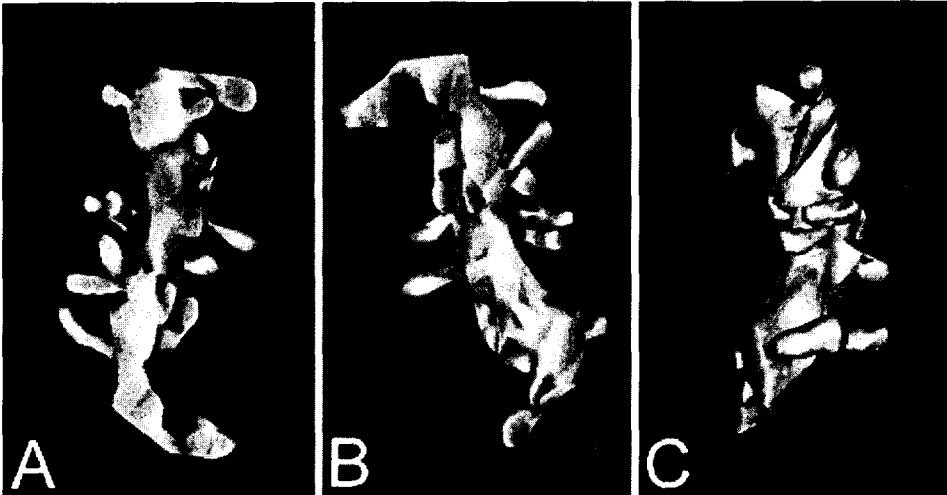
고압전자현미경 기반의 신경연접 3차원 재구성을 위한 적정 절편두께의 선정. 절편두께가 증가할수록 미세구조의 겹침 현상이 나타남. (A) 250nm, (B) 500nm, (C) 1000nm. Bar=2 $\mu$ m.



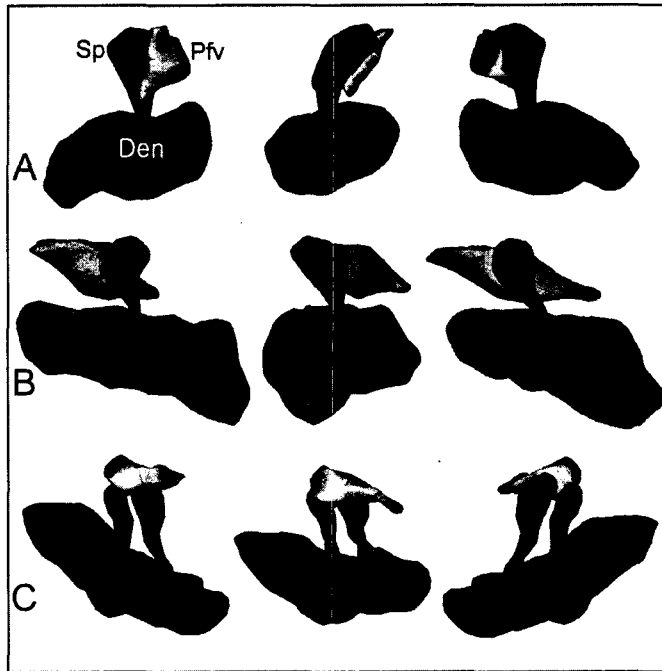
연속절편의 정렬: 앞, 뒤의 절편이 공통적으로 가지는 미세구조(미토콘드리아, 미세소관 등)를 컴퓨터 프로그램을 이용하여 정렬시킴.



각 절편의 신경연접 윤곽선을 규합한 영상



소뇌 조롱박세포 가지돌기의 일부를 3차원적으로 재구성한 영상



소뇌 평행섬유 팽대부와 조롱박세포 가지돌기가시 간 신경연접의 3차원 재구성