

## 초파리 *rdgC* 돌연변이체 단안 시각계의 퇴행현상

윤 춘 식

한국생명공학연구소 분자세포생물학연구부 바이러스/종양 유니트

### Degeneration of Ocellar Photoreceptor System on *Drosophila rdgC* Mutant

Chun Sik Yoon

Virus/Oncology Unit, Molecular and Cell Biology Research Division, Korea Research  
Institute of Bioscience and Biotechnology, Yuseong, Taejeon 305-600, Korea

(Received August 7, 1998; revised August 25, 1998)

#### ABSTRACT

The morphological phenotype on ocellus of *Drosophila rdgC* mutant was observed with electron microscope. The result showed the particular phenotype that was not found in other retinal degenerative mutants. The most distinct difference was the orientation of photoreceptor cells. The photoreceptor cells did not attached to corneagenous cells but dropped under corneagenous cells and assembled around newly formed space. Enormous multivesicle bodies caused by the degeneration of photoreceptor cells were frequently found. Rhabdomeres were also severely degenerated in consequence of the mutant. Another degeneration was found in a part of photoreceptor cell, but the degeneration of subrhabdomeric cisternae (SRC) was not found. It was a obvious difference of *rdgC* comparing with other two retinal degenerative mutants, *rdgA* and *rdgB*. As a result, *rdgC* mutant was affected on the attachment between photoreceptor cells and corneagenous cells, and it suggested the defect of cell-cell attachment. In addition, *rdgC* mutant was accompanied by the defect not only in retina but nerve system. The results were agreed to the reference discussion that the *rdgC* molecule is exist in the nerve.

**Key words** : *Drosophila*, *rdgC* mutant, Photoreceptor system, Degeneration

#### 서 론

무척추동물의 시각계는 많은 영역에서 연구 되고 있다. 특히 곤충의 시각계는 형태적으로 매우 규칙

적이고 반복적인 구조를 갖는 덕분에 시각계에 일어난 여러 가지 돌연변이의 영향을 관찰하고 해석하는데 커다란 장점을 가지고 있다. 그 중에서 초파리 (*Drosophila*)의 시각계는 그들이 가지고 있는 유전적, 그리고 분자적 유용성 때문에 깊이 있는 연구가

이루어져 왔다(Pak, 1995). 성충 초파리는 2 종류의 시각계를 가지고 있는데, 사물의 상을 볼 수 있는 복안(compound eyes)과 광도의 변화에 민감한 단안(ocelli)으로 구성되어 있다. 단안은 무척추동물의 시각기능 연구에 있어서 신경망에 대한 전기생리적, 그리고 반사행동적인 측면에서 좋은 실험모델로 알려져 왔으나(Mizunami, 1994), 신경망의 형태 및 분자적 수준에서는 약간의 연구가 보고되어 있을 뿐이다(Pollock와 Banzer, 1988; Stark 등, 1989). 현재까지의 연구 결과로 본다면 시각계의 인지질(phosphatidylinositol)대사에 관여하는 단백질이 시각계의 관련기작에 중요한 역할을 한다는 보고가 복안에서 주로 알려져 왔고(Masai 등, 1993; Milligan 등, 1997; Suzuki와 Hirose, 1994; Vihtelic 등, 1993), 최근 세포내에서 인지질대사에 관여하는 분자인 rdgA (diacylglycerol kinase)와 rdgB (phosphatidylinositol transfer protein)가 복안에 뿐만 아니라 단안에도 국재하여 시각계의 유지에 중요한 기능을 한다는 것이 본 저자에 의해서 밝혀졌다(Masai 등, 1997; Yoon 등, 1996). 이 외에도 dgq와 arrestin 등도 복안과 단안 모두에 국재한다는 것이 보고되어 있다(Lee 등, 1994; Yamada와 Hotta, 1988; Yamada 등 1990). 그리고 serine/threonine 단백질 인산화 효소인 rdgC 분자도 단안에 국재한다는 것이 보고되어 있고, *retinal degeneration C* (rdgC) 돌연변이체에서 복안의 형태 및 전기생리의 패턴에는 이상이 있다는 것을 밝혔으나(Steele과 O'Tousa, 1990; Steele 등, 1992), 단안에 있어 돌연변이에 의한 영향에 대하여는 알려진 바가 지금까지 없었다. 더구나 최근 인간의 신경세포와 식물에서도 rdgC 상동분자가 발견됨으로써 rdgC 분자는 보다 다양하고 광범위한 역할을 할 것으로 예상되고 있다(Andreeva 등, 1997; Montini 등, 1997). 따라서 본 연구에서는 serine/threonine 단백질 인산화 효소가 결손된, 즉 rdgC 돌연변이체의 단안에서 일어나는 형태학적 변화를 전자현미경 수준에서 관찰하고, 나아가 *retinal degeneration A* (rdgA)와 *retinal degeneration B* (rdgB) 돌연변이체에서의 결과(Yoon 등, 1996)와 비교하였다. 그 결과 rdgC 돌연변이체의 단안에서도 시세포의 퇴행이 관찰되었고, 더불어 신경조직

과 각막형성세포(corneagenous cell)에서도 형태적 이상이 관찰되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 초파리의 준비

정상 초파리(*Drosophila melanogaster*, C-S)와 시각돌연변이체인 rdgC가 실험에 사용되었다. 초파리는 일반적인 먹이를 공급하여 24~25°C에서 성장시켰으며, 우화 후 2일, 7일, 14일된 초파리를 각각 5~10마리씩 사용하였다.

### 2. 주사전자현미경적 관찰

초파리는 ethyl-acetate로 마취시킨 뒤 고정하지 않은 상태에서 acetone series로 탈수시키고, 공기건조 하였다. 표본을 gold: palladium coating 한 후 Hitachi S-700 주사전자현미경으로 15 kV에서 조영하였다.

### 3. 투과전자현미경적 관찰

초파리 머리를 분리하고 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.3) 완충액으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde와 2% formaldehyde용액으로 4~5시간 고정시켰다. 고정액은 체내 침투가 잘 되도록 구문(proboscis)을 절단하였다. 고정후 3% sucrose 용액으로 2번 세척하고 1% osmium tetroxide 용액으로 4°C에서 1시간 고정한 뒤, *en bloc* 상태에서 0.5% uranyl acetate 용액으로 2시간 염색하였다. 이를 증류수로 세척후 에탄올로 탈수하고 epon-araldite 혼합물로 포매하였다. 블록을 초박절편하고, 2% uranyl acetate 용액과 Reynolds' lead citrate 용액(Reynolds, 1963)으로 염색한 후 JEOL 1200EX 투과전자현미경, 80 kV로 관찰하였다.

## 결 과

성충 초파리의 시각계는 두부 양측에 상을 감지하는 2개의 복안과 두부의 정수리 부분에 광도의 변화에 민감한 3개의 단안으로 구성되어 있다(Fig. 1). 정상 초파리의 단안은 하나의 큰 렌즈 바로 밑에 렌

즈의 형성과 유지에 관계하는 각막형성세포들이 편평하게 1층을 이루면서 배열되어 있고, 그 아래에 각각의 단안에 대하여 75~90개 정도의 시세포가 분포되어 있다. 각 시세포에는 하나씩의 비정형 광수용막(phoreceptor membrane)인 간상분체(rhabdome)가 측면에 위치하고 있다. 그리고 이들 시세포 전체를 색소세포가 감싸고 있고, 색소과립은 간상분체의 바로 아래에서부터 분포해 있다(Fig. 2). 반면, *rdgC* 돌연변이체의 단안에서는 특징적인 형태적 이상을 보여주고 있다. 먼저 시세포가 각막형성세포와 결합하지 못하고 분리되어 있는 것이 자주 관찰되었다(Figs. 3-6). Fig. 3의 우화 후 2일 된 *rdgC* 돌연변이체 단안과 비교하였을 때 Fig. 4의 14일 된 *rdgC* 돌연변이체에서 시세포의 퇴행이 더욱 진행되었고, 각막형성세포와 시세포의 간격이 더욱 커진 것을 보여주었다. 시세포가 각막형성세포로부터 멀어지면서 아래쪽으로 처져서 마치 하나의 공간을 두고 시세포들이 모여있는 것 같은 형태를 취하고 있다. 즉, 시세포와 각막형성세포 사이에 커다란 공간을 형성하고 있는 것을 볼 수 있다. 또한 시세포와 시세포사이의 세포의 기질인 interphotoreceptor space (IS)가 상당히 넓은 공간을 이루고 있는 것이 관찰되었으나, 시세포간을 결합시켜 주는 belt desmosomes은 정상에 가까운 형태를 보여주고 있었다(Fig. 5). 요약하면, 시세포의 붕괴와 더불어 각막형성세포의 이상이 관찰되고, 시세포와 각막형성세포 사이에 결합이 잘 이루어지지 못한 것 같은 상태를 보여준다. 또한 시세포의 붕괴에 따른 multivesicle body (MVB)가 많이 관찰되고, 크기 또한 정상조직의 것과는 비교되지 않을 만큼 컸다(Figs. 5-7). 이들 MVB는 피사된 세포기질의 노폐물을 처리하는 기능을 담당하는데 이들의 증가는 여러 다른 돌연변이체에서도 관찰되었다. 붕괴된 시세포에서는 미토콘드리아가 간상분체로부터 떨어진 것이 종종 관찰되며, 간상분체들은 붕괴를 일으켜 표면이 거칠게 되거나 절단된 비정상적 형태를 보여 주었다(Figs. 4-6). 간상분체내의 미세융모(microvilli)간 간격도 정상적 것보다 넓었으며, 미세융모의 길이가 짧았다. 그러나 간상분체의 바로 아래에 존재하는 sub-rhabdomeric cisternae (SRC)는 시세포의 붕괴와는

관계없이 남아 있었다(Fig. 7). 이는 *rdgA*와 *rdgB*에서 시세포 퇴행 초기부터 SRC가 사라지는 것과는 양상이 다름을 나타낸다. 뿐만 아니라, 단안의 시신경세포에서도 약간의 형태적 이상을 관찰할 수 있었다. 3종류의 단안 시신경 가운데서 가장 밝게 보이는 개재신경(interneuron) 세포에만 특이적으로 이상이 관찰되었고, 신경교(glia)와 가장 어둡게 보이는 수용기 말단(receptor terminal)은 정상이었다(Fig. 8).

## 고 찰

세포내에서 serine/threonine 단백질의 인산화 및 탈인산화과정은 많은 단백질의 활성을 조절한다. 초파리 뿐만 아니라 다른 여러 동물군에서 많은 단백질 키나제들이 동정되어 있다(Hunter, 1991; Siegfried 등, 1990). 그 중에서도 단백질 인산화 효소는 몇 종류 보고되어 왔으나 크게 관심을 받지 못하고 있었다(Cohen, 1989; Cohen과 Cohen, 1989). 그러나 이들은 세포내 메카니즘에 중요한 역할을 할 것으로 예상되었다. 최근의 연구에서 보여준 것과 같이, *rdgC* 돌연변이 초파리는 이 serine/threonine 단백질 인산화 효소가 결손된 상태로서, 이들이 보여주는 이상상태는 세포내 메카니즘에서 단백질 인산화 효소의 중요성을 강조하고 있다(Steele와 O'Tousa, 1990; Steele 등, 1992).

본 연구에서는 *rdgC* 돌연변이체 초파리 복안에서 일어난 여러 가지 이상상태가 단안에서도 관찰되는지를 조사하였는데, 단안에서도 역시 이상상태가 관찰되었다. 그러나 이 이상상태는 복안에서는 볼 수 없었던 특이한 것들 이었다. *rdgA*와 *rdgB* 단백질은 복안과 단안의 간상분체의 바로 밑에 존재하는 SRC에 특이적으로 분포하는 것으로 알려져 있고, 이들 분자의 결손이 일어난 돌연변이체에서는 시세포의 퇴행 초기에 SRC의 붕괴가 일어나는 것을 보여준다(Masai 등, 1997; Suzuki와 Hirosawa, 1994; Vihtelic 등, 1993; Yoon 등, 1996). 그러나 *rdgC* 돌연변이체에서는 이 SRC의 붕괴가 관찰되지 않는 것으로 보아 전술한 두 돌연변이체와는 다른 대사경로를 거치는 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 *rdgA*와

B 분자는 시세포 특이적인 퇴행과 국채를 보여주지만, *rdgC*에서는 각막형성세포와 신경세포의 붕괴가 동반하는 것이 관찰된다. 이것은 *rdgA*와 B 분자에 비하여 *rdgC* 분자는 보다 광범위하게 분포 및 작용한다는 것이 예상되는데, 이는 이들 분자가 시세포 뿐만 아니라 신경의 여러 부분에 분포하고 있다는 보고와 일치하는 결과를 보여주는 것으로 해석된다 (Steele 등, 1992). 그리고 최근 인간의 신경세포에 *rdgC* 상동분자가 존재하는 것이 확인된 것과도 일치하는 결과라 사료되고 (Montini 등, 1997), 식물에서도 상동분자가 확인 (Andreeva 등, 1997)되고 있는 것으로 보아 *rdgC* 분자는 보다 광범위하고 다양한 메카니즘에 관여 하리라 예상할 수 있다. *rdgC* 돌연변이체에서 시세포 뿐만 아니라 각막형성세포에도 심각한 영향을 초래한다는 것을 보여 주는데, 이것은 시세포가 각막형성세포에 결합되지 못하여 분리되어 있고, 아래로 처져서 모여있는 상태를 보여 주고 있는데 아마도 이런 현상은 세포간 결합에 어떤 영향을 받은 것으로 예상 할 수 있다. *rdgC* 돌연변이체의 시세포에서는 큰 MVB가 자주 관찰되는데 이것은 퇴행이 일어나는 세포에서 전형적으로 관찰되고 (Blest, 1980; Blest 등, 1984) 다른 시각돌연변이체 초파리에서도 보고되어 있다 (Yoon 등, 1996). *rdgC* 돌연변이체에서 간상분체의 퇴행은 복안의 경우와 같이 단안의 시세포에서도 일어나는 것이 관찰된다. 즉 serine/threonine 단백질 인산화 효소의 결손에 의해 단안에서는 시세포의 이상과 더불어 각막형성세포와 시신경세포의 이상도 관찰되는데, 이는 *rdgC* 분자가 복안 뿐만 아니라 단안에 대해서도 세포내의 대사에 중요한 역할을 한다는 것을 시사해 준다.

## 결 론

초파리 *rdgC* 시각돌연변이체의 단안에서 일어난 형태적인 이상을 전자현미경적으로 해석하였다. 그 결과 이전의 다른 돌연변이체들에서 보여주지 않았던 특이적인 형태적 이상을 관찰할 수 있었다. Serine/threonine 단백질 인산화 효소의 결손에 의해 단안에서 보여준 가장 특이한 형태적 이상은 시

세포가 각막형성세포와 결합하지 못하고 아래로 처져서 모여있는 형태를 보여 주었다. 시세포의 퇴행에 의해 정상보다 큰 MVB가 자주 관찰 되었고, 돌연변이의 영향으로 간상분체도 심하게 퇴행된 것을 보여 주었다. 성충으로 우화한 후 시간의 경과에 따라 시세포의 퇴행은 더욱 증가하는 것을 보여준다. 특히 시신경의 일부에서도 퇴행이 일어난 것을 관찰하였는데, 이것은 기존의 *rdgC* 분자가 신경에도 분포 한다는 보고와 일치하는 결과로 생각된다. 그리고 *rdgA*와 *rdgB* 시각돌연변이체와는 다르게 SRC의 붕괴는 관찰되지 않았다. 이것은 *rdgA*와 *rdgB* 분자가 SRC에는 특이적으로 국채하지만 *rdgC* 분자는 다른 대사경로를 통하여 작용한다는 것을 암시해 준다.

결론적으로 *rdgC* 돌연변이체에서는 시세포와 각막형성세포 간의 결합에 심한 영향을 받은 것으로 보아서, 세포간 결합에 어떤 결손을 받은 것으로 예상된다. 또한 *rdgC* 돌연변이체는 시세포 뿐만 아니라 신경계통에도 결합을 가진 것으로 관찰되었다. 이상과 같이 *rdgC* 돌연변이체에서는 복안에서 처럼 단안의 시각제도 강하게 영향을 받았다는 것을 알 수 있었다.

## REFERENCES

- Andreeva AV, Hawes CR, Evans DE, Bennet N, Kutuzov MA, 1997. Gene of plant ser/thr protein phosphatases: detection of sequences related to PPT/*rdgC*. Bioorg. Khim. 23, 486-491
- Blest AD, 1980. Photoreceptor membrane turnover in arthropods: Comparative studies of breakdown processes and their implications. The effects of constant light on visual processes. Plenum Press, New York, pp.217-245
- Blest AD, Stowe S, De Couet HG, 1984. Turnover of photoreceptor membranes in arthropods. Sci. Prog. Oxf. 69, 83-100
- Cohen P, 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. Annu. Rev. Biochem. 58, 453-508
- Cohen P, Cohen PTW, 1989. Protein phosphatases come of age. J. Biol. Chem. 264, 21435-

- 21438
- Hunter T, 1991. Protein kinase classification. *Meth. Enzymol.* 200, 3-37
- Lee Y-J, Shah S, Suzuki E, Zars T, O'Day PM, Hyde DR, 1994. The *Drosophila* *dgq* gene encodes a Gq protein that mediates phototransduction. *Neuron* 13, 1143-1157
- Masai I, Okazaki A, Hosoya T, Hotta Y, 1993. *Drosophila* retinal degeneration A gene encodes an eye-specific diacylglycerol kinase with cysteine-rich zinc-finger motifs and ankyrin repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11157-11161
- Masai I, Suzuki E, Yoon C.-S, Kohyama A, Hotta Y, 1997. Immunolocalization of *Drosophila* eye-specific diacylglycerol kinase, *rdgA*, which is essential for the maintenance of the photoreceptor. *J. Neurobiol.* 32, 695-709
- Milligan SC, Alb JG, Elagina RB, Bankaitis VA, Hyde DR, 1997. The phosphatidylinositol transfer protein domain of *Drosophila* retinal degeneration B protein is essential for photoreceptor cell survival and recovery from light stimulation. *J. Cell Biol.* 139, 351-363
- Mizunami M, 1994. Information processing in the insect ocellar system: comparative approaches to the evolution of visual processing and neural circuits. In: Evans PD (ed) *Advances in insect physiology*. Academic Press, vol. 25, pp.151-265
- Montini E, Rugarli EI, Van de Vosse E, Andolfi G, Mariani M, Puca AA, Consalez GG, den Dunnen JT, Ballabio A, Franco B, 1997. A novel human serine-threonine phosphatase related to the *Drosophila* retinal degeneration C (*rdgC*) gene is selectively expressed in sensory neurons of neural crest origin. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1137-1145
- Pak WL, 1995. *Drosophila* in vision research. *Vision Res.* 36, 2340-2357
- Pollock JA, Benzer S, 1988. Transcript localization of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*; RH2 is ocellus specific. *Nature* 333, 779-782
- Reynolds ES, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212
- Siegfried E, Ambrosia L, Perrimon N, 1990. Serine/threonine protein kinases in *Drosophila*. *Trends. Genet.* 6, 357-362
- Stark WS, Sapp R, Carlson SD, 1989. Ultrastructure of the ocellar visual system in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenetics* 5, 127-153
- Steele FR, O'Tousa JE, 1990. Rhodopsin activation causes retinal degeneration in *Drosophila rdgC* mutant. *Neuron* 4, 883-890
- Steele FR, Washburn T, Rieger R, O'Tousa JE, 1992. *Drosophila* retinal degeneration C (*rdgC*) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. *Cell* 69, 669-676
- Suzuki E, Hirosawa K, 1994. Immunolocalization of a *Drosophila* phosphatidylinositol transfer protein (*rdgB*) in normal and *rdgA* mutant photoreceptor cells with special reference to the subrhabdomeric cisternae. *J. Electron Microsc.* 43, 183-189
- Vihtelic TS, Goebel M, Milligan S, O'Tousa JE, Hyde DR, 1993. Localization of *Drosophila* retinal degeneration B, a membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein. *J. Cell Biol.* 122, 1013-1022
- Yamada T, Hotta Y, 1988. Localization of a *Drosophila* eye protein which is phosphorylated after light stimulation. *Biomedical Research* 9, 437-442
- Yamada T, Takeuchi Y, Komori N, Kobayashi H, Sakai Y, Hotta Y, Matsumoto H, 1990. A 49-kilodalton phosphoprotein in the *Drosophila* photoreceptor is an arrestin homolog. *Science* 248, 483-486
- Yoon C-S, Hirosawa K, Suzuki E, 1996. Studies on the structure of ocellar photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster* with special reference to subrhabdomeric cisternae. *Cell Tissue Res.* 284, 77-85

**FIGURE LEGENDS**

- Fig. 1.** Scanning electron micrograph of a wild-type *Drosophila* head showing two compound eyes (C) and 3 ocelli (arrows). Bar=100  $\mu$ m
- Fig. 2.** Electron micrograph showing frontally sectioned ocellus of wild type. Ocellar photoreceptor cells are compacted under one layer of corneagenous cells (CG) that lie under corneal lens (C). Rhabdomeres (R) are positioned between distal ends of photoreceptor cells. Open arrows: belt desmosomes, PG: pigment granules. Bar=1  $\mu$ m
- Fig. 3.** Electron micrograph of three days old *rdgC* mutant ocelli. Photoreceptor cells are not attached to corneagenous cells (CG). Corneagenous cells and photoreceptor cells do not show distinct degeneration at this stage. R: rhabdomere. Bar=1  $\mu$ m
- Figs. 4 - 6.** Electron micrograph of fifteen days old *rdgC* mutant ocelli. At this stage, distinct degeneration appear in ocelli showing large spaces (asterisks) between photoreceptor cells and corneagenous cells (CG). Multivesicle bodies (arrows) caused by the degeneration of photoreceptor cells are frequently observed, and rhabdomeres (R) are also degenerated. However, fig. 5 shows almost normal belt desmosomes (open arrow heads). Photoreceptor cells are dropped under corneagenous cells and are assembled around newly formed space (asterisk). C: corneal lens. Bar = 1  $\mu$ m
- Fig. 7.** A high magnification of seven days old *rdgC* mutant ocelli. Note subrhabdomeric cisternae (SRC) that lie directly under rhabdomeres (R). Intervals between rhabdomeric microvilli are wide, and large multivesicle bodies (arrows) are located near by rhabdomeres. Bar=500 nm
- Fig. 8.** Electron micrograph of seven days old *rdgC* mutant ocelli. The cross section of ocelli optic neural region shows that vesicles represent defects (asterisks) is localized in electron lucent interneurons (I). Electron dense receptor terminal cells (R) and intermediate electron dense glial cells (G) are normal. Bar=1  $\mu$ m



