

한국관박쥐 망막 원뿔세포의 조직화학적 분석

전영기¹, 주영락², 예은아², 김문숙², 전창진^{2,*}

¹대구과학대학교 안경광학과, 대구 702-723

²경북대학교 자연과학대학 생물학과, 대구 702-701

투고일(2013년 4월 29일), 수정일(2013년 6월 8일), 게재확정일(2013년 6월 15일)

목적: 한국관박쥐의 망막에서 원뿔세포의 middle/long(ML) opsin cone photoreceptors의 분포를 분석하여 박쥐의 시각계를 이해하고자 하였다. **방법:** 표준면역세포화학법을 이용하여 성체 한국관박쥐의 망막을 대상으로 조사하였다. **결과:** 4 개체의 망막 전체에서 추정된 ML opsin은 $27,336 \pm 2,130$ 개였으며, 평균밀도는 $7,854 \pm 268$ cells/mm²이었다. S opsin은 외핵층에 위치한 세포외절에서 일부 면역반응성을 보였다. **결론:** ML opsin의 조직화된 분포와 S opsin의 발현 결과는 한국관박쥐가 밝은 빛에도 반응하며 색을 구별할 수 있는 기능을 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

주제어: 한국관박쥐, ML opsin, S opsin

서 론

유일하게 날수 있는 포유류인 박쥐는 그 종류가 약 1,100여종에 이르는데 크게 큰박쥐아목(*megachiroptera*)과 작은박쥐아목(*microchiroptera*)으로 나뉜다. 큰박쥐아목에 속하는 종들은 주로 시각기능(vision)을 사용하여 활동하는 것으로 알려진 반면, 작은박쥐아목의 종들은 일반적으로 작은 크기의 눈을 가지며 시각기능이 발달되어 있지 않고 주로 반향정위능력(echolocation)과 자외선 탐지능력에 의해 포식자를 피하고 꽃의 꿀 위치를 파악하는 것으로 알려져 있다.^[1-2] 이번 실험의 대상인 한국관박쥐(*greater horseshoe bat, Rhinolophus ferrumequim*)는 유럽, 아시아, 아메리카에 걸쳐 넓게 분포하는 대표적인 작은박쥐아목의 한 종으로 주로 동굴과 같이 어두운 곳에서 서식하며, 야행성으로 알려져 있다.^[3-5] 이런 생태적 특징에도 불구하고 한국관박쥐는 눈이라는 시각기능에 있어 중요한 기능을 담당하는 기관을 분명히 가지고 있다. 즉, 한국관박쥐 망막에서 원뿔세포(*cone cell*), 막대세포(*rod cell*)와 같은 광수용체세포^[6]와 이들 두 가지 종류의 광수용체세포에서 이어지는 신호전달과정에 모두 관여하는 것으로 알려진 AII 무축삭세포(AII amacrine cell)^[7] 및 이들에서 이어진 신호를 뇌의 시각계 관련 여러 부위에 전달하는 신경절세포(*ganglion cell*)^[8]와 같은 대표적인 망막세포들이 특징적으로 분포하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 이전의 연구들에서 이미 망막에서의 신경회로

(*neural circuit*) 구성 가능성이 제기된 바 있어 나아가 세분화된 시각 기능연구에 있어 훌륭한 연구대상이 될 수 있다.

망막에서 빛에 반응하는 광수용체세포 중 원뿔세포는 명소시 혹은 색각시, 분해능과 탐지능력, 공간지각능력과 형태각 같은 시각능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.^[9-15] 원뿔세포의 외절(*outer pigment*)은 푸른빛인 430 nm파장에 반응하는 S (*short*) opsin, 초록빛인 530 nm파장에 반응하는 M (*middle*) opsin, 붉은빛인 560 nm파장에 반응하는 L (*long*) opsin, 이 세 가지 종류의 시색소(*photopigment*)가 위치하는 곳이다. 이들 특이한 가시광선 파장에 반응하는 opsin 단백질은 색 구별 능력에 있어 반드시 필요한 요소이다. 망막에서 이들의 분포 및 밀도에 관한 연구는 척추동물의 시각 기능과 관련된 망막 형태학적 구조의 관점에서 볼 때, 시각기능의 특징과 그 발달된 정도를 판단하는데 있어 반드시 필요한 가치가 있다.

이러한 점에서 이번 연구의 목적은 아직 이루어지지 않았던 한국관박쥐 망막에서 색의 구별과 관계되는 opsin 단백질들의 분포에 대한 형태학적 분석을 통해, 한국관박쥐 망막의 구조에 대한 이해 뿐 아니라, 일반적으로 낮은 시각기능을 가진 것으로 알려진 한국관박쥐의 색의 구별능력, 망막에서 이루어지는 명소시(*photopic vision*), 그리고 이에 대한 신경회로(*neural circuit*)의 구성 가능성을 제시하여 한국관박쥐의 시각계에 대하여 이해, 고찰하는 것이다.

*Corresponding author: Chang-Jin Jeon, TEL: +82-53-950-5343, E-mail: cjjeon@knu.ac.kr

대상 및 방법

1. 대상

한국관박쥐(greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*) 4 개체의 망막을 대상으로 실험 하였다. 한국관박쥐 성체를 ketamine hydrochloride(30~40 mg/kg)와 xylazine (3~6 mg/kg)의 혼합액으로 마취한 다음, 순목반응(eye blink)을 억제하기 위해 각막에 국소마취제(proparacaine hydrochloride, 100~200 μ l)를 점안하여 안구를 적출하고 동종의 마취제를 과다 투여하여 안락사 시켰다. 적출한 안구는 전반부 조직들을 제거하고, 망막을 외막에서 분리하여 4% paraformaldehyde(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 동안 4~5°C에서 고정시킨 후 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)로 10분 간격으로 3회 세척하였다. 온조직표본(whole mount)으로 처리한 조직 외에, 수직조직표본은 4% agarose에 고정한 후 vibratome을 이용하여 50 μ m 두께로 절단하였다. 이 모든 실험과정은 National Institute of Health의 the Care and Use of Laboratory Animals 지침을 따랐다.

2. 방법

표준면역세포화학법의 실시를 위하여 ML opsin에 대한 항체(polyclonal antibody against middle-to-long wave sensitive cone opsin)는 Sigma Chemical (Sigma, USA)에서 제작한 것을 1:200의 비율로 처리했고, 면역반응 확인을 위해 2차 항체는 anti-rabbit Ig G (Vector Lab., USA)와 결합한 fluorescein (FITC)를 사용하였다.

S opsin에 대한 항체(polyclonal antibody against short wave sensitive cone opsin)는 Sigma Chemical (Sigma, USA)에서 제작한 것을 1:100의 비율로 처리했고 면역형광검사법으로 확인하기 위해 2차 항체는 anti-goat Ig G (Vector Lab., USA)와 결합한 Texas Red를 사용하였다. 이전 과정은 Jeon 등(1998)의 연구에 제시된 표준면역세포화학법^[16]을 이용하여 실험하였다. 다른 4 개의 조직은 대조군으로 1차 항체 처리 없이 같은 용액에서 실험하였다. 세포밀도는 망막 표면의 mm² 당 면역화학반응 세포들의 수로 나타내었다. 3개 망막의 온조직표본에서 40 \times 대물렌즈(Plan-Apochromat, Zeiss, Germany)와 디지털카메라(AxioCam HRc, Zeiss, Germany)를 이용해 시상축(dorso-ventral)과 관상축(nasotemporal)을 따라 100 μ m의 간격으로 컴퓨터 모니터 상에서 관찰했다. S opsin을 발현하는 원뿔세포를 관찰하기 위하여 1개 망막에서 위와 동일한 방법으로 수직조직표본에서 면역화학반응 세포들을 관찰하였다. ML opsin을 발현하는 원뿔세포의 분포를 구하기 위한 표본 영역은 100 \times 100 μ m²로 하였고 투명층이름 컴

퓨터모니터 상에 올려놓아 세포를 표지하여 측정하였다. 각각의 표본영역에서의 세포수를 cells/mm² 단위로 추정하여 표시하였고 한 개의 망막에서는 세포의 전체 수를 측정하여 등고선 그래프로 도식하였다.

결 과

Fig. 1에서는 50 μ m 두께로 절편한 망막조직에서 ML opsin 면역반응성을 지닌 세포의 형태를 보여준다. 박쥐망막의 외핵층에 존재하는 세포의 외절부위에서의 ML opsin 면역반응성은 Fig. 1의 수직절편상과 Fig. 2의 평면상의 온조직표본의 망막에서 관찰되었는데, 이는 사람,^[17] 원숭이,^[18] 쥐(mouse)^[19] 등에서 일반적으로 관찰되는 ML opsin 면역반응성과 유사한 양상을 보였다.

ML opsin 면역반응성을 지니는 전체적인 원뿔세포의 분포는 Fig. 3과 Table 1에서 보여주는 바와 같다. 전체망

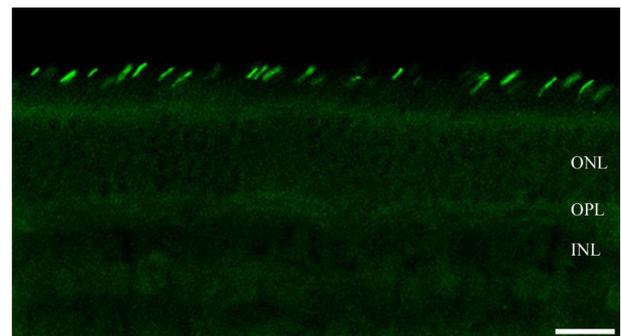


Fig. 1. Anti-ML opsin immunoreactivity in a vertical section of fluorescence-reacted bat retina. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer. Bar=20 μ m.

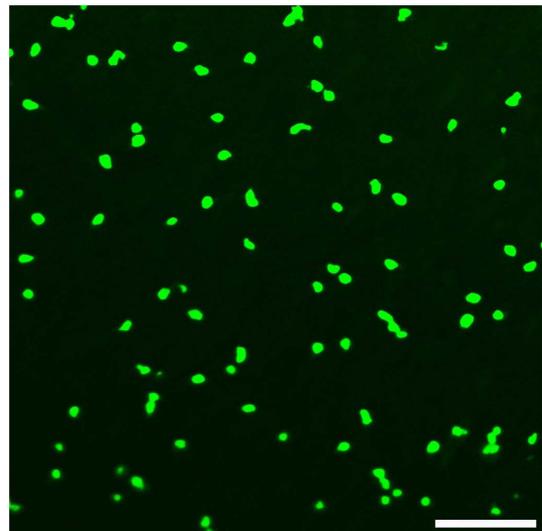


Fig. 2. Anti-ML opsin immunoreactivity in a whole mount of fluorescence-reacted bat retina. Bar=20 μ m.

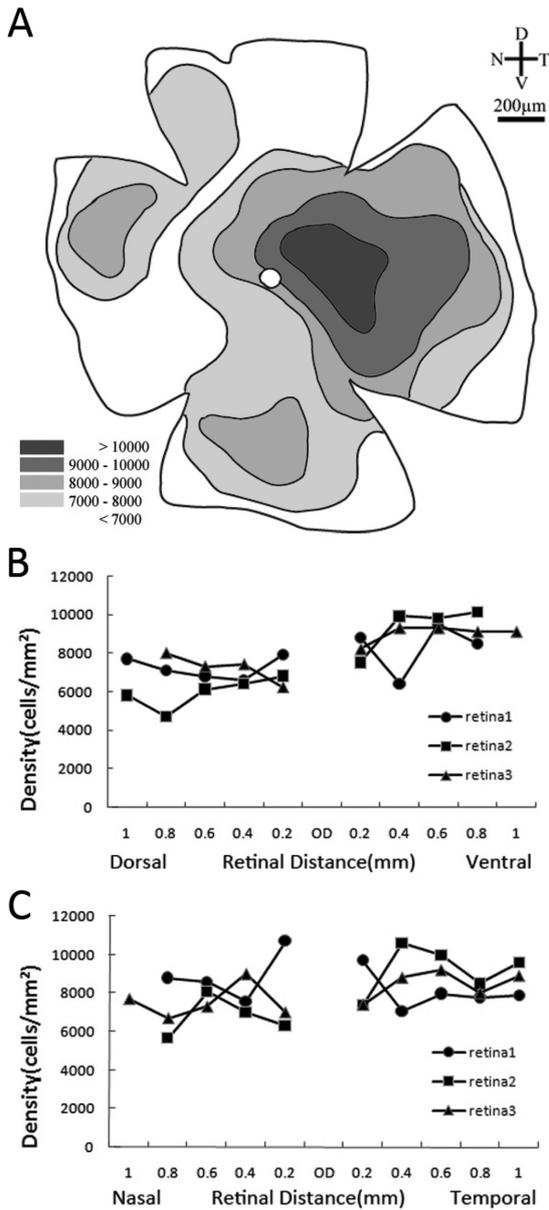


Fig. 3. ML cones in the bat retina. (A). Distributions of ML cones in whole mount retina. The map shows isodensity lines and the density values are given as cells/mm². (B), (C). The two graphs show the numbers of neurons encountered along the two axes intersecting the optic nerve head.

막에서 추정되는 ML 원뿔세포는 4개의 망막에 대해 27,336±2,130개였으며 평균밀도는 7,854±268 cells/mm² 이었다. 외핵층에 위치하는 ML 원뿔세포는 망막에서 부위에 따라 밀도의 차이를 보이는데, 한 개 망막에서 세포의 밀도를 등고선에 따라서 나타낸 Fig. 3A에서 보이는 것과 같이 ML 원뿔세포의 밀도는 망막의 외측(temporal)에서 가장 높게 나타나며, 등쪽(dorsal)과 후두부(nasal)에서 낮게 나타난다. 또한 시상축과 관상축을 따라 세포밀도를 측정된 결과에 의하면(Fig. 3B, 3C), 최고밀도는 시신경중심(optic nerve head)에서 배쪽(ventral)으로 약 0.6 mm 떨어진 지점에서 보였으며(9,533 cells/mm², 평균; n=4), 최저밀도는 등 쪽으로 약 0.8 mm 떨어진 지점에서 보였다(6,600 cells/mm², 평균; n=4).

박쥐망막에서 원뿔세포가 푸른빛인 430 nm 파장에 반응하는 S opsin을 가지는지 확인하기 위해 면역세포 화학실험을 실시한 결과 Fig. 4에서와 같이 50 μm로 절편한 조직의 외핵층에 위치한 세포외절에서 면역반응성을 보였다. 대조군으로 실험한 다른 4개의 조직에서 ML opsin과 S opsin 모두에 대한 면역반응은 관찰되지 않았다.

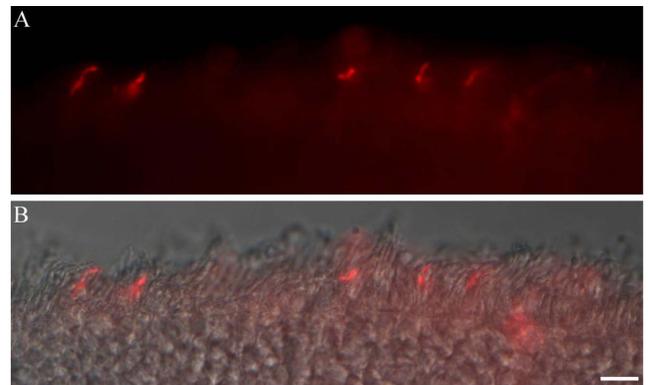


Fig. 4 Anti-S opsin immunoreactivity in a vertical section of fluorescence-reacted bat retina (A). (B). Anti-S opsin immunoreactivity was overlapped in the differential interference micrograph. Bar=10 μm.

Table 1. Total ML opsin immunoreactive neurons in bat retina

Retina	Sampled Area (mm ²)	Neurons Counted	Total Retinal Area (mm ²)	Mean Density (cells/mm ²)	Total ML opsin-IR neurons
Retina1R	180,000	1,455	3,486,474	8,083	28,182
Retina2L	180,000	1,403	3,572,710	7,749	27,847
Retina3R	190,000	1,539	3,643,169	8,100	29,509
Retina4L	3,400,000	23,807	3,244,279	7,439	23,807
Mean±S.D.				7,854±268	27,336±2,130

IR, immunoreactive; L, left; R, right; S.D., standard deviation

고 찰

기존 연구에서 작은박쥐목에 속하는 한국관박쥐는 이미 망막에 어두운 빛에 반응하는 막대세포와 밝은 빛과 400 nm 이하의 자외선에 반응하는 원뿔세포를 함유하는 것으로 밝혀졌다.^[1,2,6] 망막에서 원뿔세포의 평균밀도는 $9,535 \pm 1,070$ 이었는데, 본 연구에서 ML 원뿔세포의 평균 밀도가 $7,854 \pm 268$ 로서 전체 원뿔세포 중 약 76.9%가 ML opsin을 발현하였다. 한국관박쥐는 전체 광수용체세포 중 원뿔세포가 2.5%로서 시각기능을 가지는 것으로 알려진 큰박쥐아목에 속하는 종보다 원뿔세포의 비율이 상대적으로 높는데, 이 중 약 76.9%가 색의 인식 및 구별에 관여하는 ML opsin을 가진다는 것은 작은박쥐아목이 특정의 가시광선 파장에 반응하며 그 파장을 인식할 수 있다는 가능성을 제시한다.

또한 일부 광수용체세포에서는 S opsin에 대한 면역반응성을 보였다. 2004년 Wang 연구팀의 큰박쥐아목과 작은박쥐아목에 속하는 종 모두에서 높은 파장과 낮은 파장에 반응하는 opsin을 발현하는 기능적 유전자가 있는 것으로 밝혀졌는데,^[20] 이와 더불어 한국관박쥐 망막의 외절 부위에서 S opsin에 대한 면역반응성을 일부 보였다는 것은 한국관박쥐가 일반적으로 포유동물에서 색을 구별하는데 사용하는 빛인 붉은색, 초록색, 푸른색에 반응하는 기능을 가져 명확히 색을 구별할 수 있는 다른 포유동물과 유사한 시각계를 가지고 있을 가능성을 보여준다.

한국관박쥐 망막에는 AII 무축삭세포가 일정한 분포를 나타내어 존재한다. AII 무축삭세포는 내망상층의 ON, OFF 층 모두에서 시냅스를 형성할 뿐 아니라 원뿔세포와 막대세포에서 이어지는 신경전달신호 모두를 받아들여 망막에서 명반응회로와 암반응회로를 구성하는데 중요한 역할을 하는 세포이다.^[21-23] 이렇게 명반응회로 구성에 중요하게 작용하는 AII 무축삭세포의 존재와 이 세포에 신호를 전달하는 역할을 하는 원뿔세포 중 다수가 ML opsin에 대한 면역반응성을 전체 망막에서 규칙적 분포를 보이고, 일부 S opsin에 대한 면역반응성도 보였다는 것은 한국관박쥐 망막에 가시광선의 색을 구별할 수 있는 시스템이 형성되어있다는 것을 시사하고 있으며, 작은박쥐아목에 속하는 종들이 단지 반향정위에 의해서만 활동하고 시각기능은 퇴화되어있다는 일반적으로 알려져 왔던 내용에 반해 작은박쥐아목에 속하는 종 또한 분명한 시각적 기능을 가지고 있을 가능성을 강력하게 제시하는 것이다.

결 론

본 연구에서 한국관박쥐는 망막에 조직화된 ML 원뿔세

포가 전체 원뿔세포에서 약 76.9%로서 3/4 정도를 차지하고 있었으며 일부 S 원뿔세포를 가지고 있었다. 일반적으로 반향정위능력을 이용하는 것으로 알려져 있는 것에 더하여, 주로 어두운 곳에 서식하는 것으로 알려진 작은박쥐아목에 속하는 한국관박쥐가 분명 ML opsin의 조직화된 분포를 보이며 일부 광수용체세포는 S opsin을 발현했다는 것은 한국관박쥐가 어두운 빛에서 뿐 아니라 밝은 빛에도 반응하고, 또한 색을 구별할 수 있는 기능적 눈을 가지고 있다는 것을 제시하며, 이는 여러 동물 종에서의 연구결과와 더불어 아직 밝혀지지 않은 시각기능을 연구하는데 반영되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012학년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- [1] Mller B, Glösmann M, Peichl L, Knop GC, Hagemann C, Ammermüller J. Bat eyes have ultraviolet-sensitive cone photoreceptors. PLoS One. 2009;4(7):1-7.
- [2] Winter Y, López J, von Helversen O. Ultraviolet vision in a bat. NATURE. 2003;425:612-614.
- [3] Jones G, Rayner JNV. Foraging behavior and echolocation of wild horseshoe bats *Rhinolophus ferrumequinum* and *R. hipposideros* (Chiroptera, Rhinolophidae). Behav Ecol Sociobiol. 1989;25:183-191.
- [4] Ransome RD. The distribution of the Greater horse-shoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*, during hibernation, in relation to environmental factors. J Zool. 1968;154(1):77-112.
- [5] Ransome RD, Hutson AM. Action plan for the conservation of the greater horseshoe bat in Europe (*Rhinolophus ferrumequinum*). Nature and Environment. 2000;109:7-52.
- [6] Kim TJ, Jeon YK, Lee JY, Lee ES, Jeon CJ. The photoreceptor populations in the retina of the greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. Mol Cells. 2008;26(4):373-379.
- [7] Jeon YK, Kim TJ, Lee JY, Choi JS, Jeon CJ. AII amacrine cells in the inner nuclear layer of bat retina: identification by parvalbumin immunoreactivity. Neuroreport. 2007;18(11):1095-1099.
- [8] Jeon YK, Kim TJ, Lee ES, Joo YR, Jeon CJ. Distribution of parvalbumin-immunoreactive retinal ganglion cells in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. Journal of Life Science. 2007;17(8):1068-1074.
- [9] Hirsch J, Miller WH. Does cone positional disorder limit resolution?. JOSA A. 1987;4(8):1481-1492.
- [10] Jacobs GH, Bowmaker JK, Mollon JD. Behavioural and

- microspectro-photometric measurements of colour vision in monkeys. *Nature*. 1981;292(5283):541-543.
- [11] Thibos LN, Walsh DJ, Cheney FE. Vision beyond the resolution limit: aliasing in the periphery. *Vision Res*. 1987; 27(1):2193-2197.
- [12] Thibos LN, Cheney FE, Walsh DJ. Retinal limits to the detection and resolution of gratings. *J Opt Soc Am A*. 1987;4(8):1524-1529.
- [13] Thibos LN, Walsh DJ, Cheney FE. Vision beyond the resolution limit: aliasing in the periphery. *Vision Res*. 1987; 27(12):2193-2197.
- [14] Williams DR, Coletta NJ. Cone spacing and the visual resolution limit. *J Opt Soc Am A*. 1987;4(8):1514-1523.
- [15] Wikler KC, Rakic P. Distribution of photoreceptor subtypes in the retina of diurnal and nocturnal primates. *J Neurosci*. 1990;10(10):3390-3401.
- [16] Jeon MH, Jeon CJ. Immunocytochemical localization of calretinin containing neurons in retina from rabbit, cat, and dog. *Neurosci Res*. 1998;32(1):75-84.
- [17] Hofer H, Carroll J, Neitz J, Neitz M, Williams DR. Organization of the human trichromatic cone mosaic. *J Neurosci*. 2005;25(4):9669-9679.
- [18] Wikler KC, Rakic P, Bhattacharyya B, Macleish PR. Early emergence of photoreceptor mosaicism in the primate retina revealed by a novel cone-specific monoclonal antibody. *J. Comp Neurol*. 1997;377(4):500-508.
- [19] Wikler KC, Szel A, Jacobsen AL. Positional information and opsin identity in retinal cones. *J. Comp Neurol*. 1996; 374(1):96-107.
- [20] Wang D, Oakley T, Mower J, Shimmin LC, Yim S, Honeycutt RL, et al. Molecular evolution of bat color vision genes. *Mol Biol Evol*. 2004;21(2):295-302.
- [21] Chun MH, Han SH, Chung JW, Wassle H. Electron microscopic analysis of the rod pathway of the rat retina. *J. Comp. Neurol*. 1993;332(4):421-432.
- [22] Dacheux RF, Raviola E. The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J. Neurosci*. 1986;6(2):331-345.
- [23] Famiglietti EV, Kolb H. A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res*. 1975;84(2):293-300.

Histochemical Analysis of the Cone cells in the Retina of the Greater Horseshoe Bat *Rhinolophus ferrumequinum*

Young-Ki Jeon¹, Young-Rak Joo², Eun-Ah Ye², Moon-Sook Kim², and Chang-Jin Jeon^{2,*}

¹Dept. of Ophthalmic Optics, Taegu Science University, Daegu 702-723, Korea

²Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea

(Received April 24, 2013; Revised June 8, 2013; Accepted June 15, 2013)

Purpose: This study was done to understand the visual system of bat by analyzing the distribution of middle/long (ML) opsin cone photoreceptors in the retina of the greater horseshoe bat. **Methods:** Experiments have been performed by standard immunocytochemical techniques on retina of the greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. **Results:** The estimated numbers of ML cones were $27,336 \pm 2,130$ cells and the mean density of them was $7,854 \pm 268$ cells/mm² among the four retinas. S opsin was appeared a little immunoreactivity in the outer segments of outer nuclear layer of cones. **Conclusions:** From the well organized spatial distributions of ML opsin and the immunoreactivity of S opsin in the retinas, the greater horseshoe bats have the functions not only reacting in the photopic vision but being able to distinguish the colors.

Key words: the greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*, ML opsin, S opsin