

Immunocytochemical Localization of Melanopsin-immunoreactive Neurons in the Mouse Visual Cortex

Won-Sig Lee, Eun-Jong Noh, Yoon-Dam Seo, Se-Jin Jeong, Eun-Shil Lee and Chang-Jin Jeon*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received March 20, 2013 / Revised May 22, 2013 / Accepted June 19, 2013

Melanopsin is an opsin-like photopigment found in the small proportion of photosensitive ganglion cells of the retina. It is involved in the regulation of the synchronization of the circadian cycle as well as in the control of pupillary light reflex. The purpose of the present study is to investigate whether melanopsin is also expressed in the other areas of the central visual system outside the retina. We have studied the distribution and morphology of neurons containing melanopsin in the mouse visual cortex with antibody immunocytochemistry. Melanopsin immunoreactivity was mostly present in neuronal soma, but not in nuclei. We found that melanopsin was present in a large subset of neurons within the adult mouse visual cortex with the highest density in layer II/III. In layer I of the visual cortex, melanopsin-immunoreactive (IR) neurons were rarely encountered. In the mouse visual cortex, the majority of the melanopsin-IR neurons consisted of round/oval cells, but was varied in morphology. Vertical fusiform and pyramidal cells were also rarely labeled with the anti-melanopsin antibody. The labeled cells did not show any distinctive distributional pattern. Some melanopsin-IR neurons in mouse visual cortex co-localized with nitricoxide synthase, calbindin and parvalbumin. Our data indicate that melanopsin is located in specific neurons and surprisingly widespread in visual cortex. This finding raises the need of the functional study of melanopsin in central visual areas outside the retina.

Key words : Immunocytochemistry, localization, melanopsin, visual cortex

서 론

Melanopsin은 척추동물 opsin 패밀리에 속하는 광색소로 비 시각적 광수용에 관여하며, *Xenopus laevis* 진피의 광민감성 멜라닌 색소포(melanophore)에서 최초로 발견되었다[28]. Melanopsin은 다른 opsin 패밀리와 같이 7번째 막 관통영역에 11-cis-retinaldehyde를 가지며, opsin 광색소처럼 빛으로 인해 11-cis-retinaldehyde에서 all- trans retinaldehyde 형태로 광이성질화 되면 G-protein 신호분지(cascade)의 활성을 유발한다[10, 37].

Melanopsin 광색소는 간상(rod), 원추(cone) 광수용 세포의 광색소들과 몇 가지 부분에서 다르다. 첫 번째, 광반응(light response)은 melanopsin을 가지는 retinal ganglion cell (RGC)에서는 탈분극을 야기하지만 간상, 원추 세포에서는 과분극을 야기한다[1]. 두 번째, melanopsin이 광반응을 일으키는 작용스펙트럼의 파장대는 간상, 원추 세포와 완전히 구분

된다[1]. 세 번째로, 간상, 원추 세포들이 지속된 빛에 노출되었을 때에는 적응하여 반응이 지속되지 않는 반면에 melanopsin을 가지는 RGC의 반응은 지속적으로 유지된다[32]. 네 번째로, 간상 그리고 원추 세포들에 비해서 melanopsin을 가지는 RGC들은 광활성이 더 높고, 광유도 탈분극이 되기까지 시간이 오래 걸렸다[32]. 그리고 melanopsin이 결핍된 mouse에서 빛의 영향을 받는 생물학적 주기 시스템은 약화되고[23, 33], 강한 빛일 때 동공반사가 불완전해진다[21]. 이러한 결과로 볼 때 melanopsin은 opsin 패밀리에 속하는 다른 광색소들과 다르게 생물학적 주기와 동공반사에 관여한다고 할 수 있다.

Melanopsin은 어류에서부터 포유류에까지 이르는 모든 척추동물 강(class)에서 발현되고, 강마다 발현양상이 다른 것으로 알려져 있다[7, 11, 29]. 과거 연구에서 melanopsin은 주로 망막에서 연구되어 왔으며, RGC는 포유류에서 melanopsin을 나타내는 유일한 세포로 알려져 왔다[29]. 그러나 최근 연구에서 melanopsin은 포유류와 비 포유류 척추동물의 망막에서만 아니라 송과선과 뇌에서도 발견되었다[27]. 비 포유류 척추동물인 대서양 연어의 좌측 고배 핵(left habenular nucleus), 시각상 핵(supraoptic nucleus), 시교차상 핵(suprachiasmatic nucleus), 등쪽 시상(dorsal thalamus), 배쪽 시상하부(ventral hypothalamus)에서 melanopsin이 발현되는 것으로 확인되었고[35], 또한 포유류 척추동물인 인간 뇌의 17개 영역에서도 발현되는 것을 확인했다[22].

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5343, Fax : +82-53-953-3066

E-mail : cjeon@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

CBP는 세포의 칼슘 신호 전달에 있어 칼슘을 붙잡는 중요한 조절자[36]로, 이번 연구에서 사용된 CBP의 종류는 calbindin (CB), parvalbumin (PV)이다. 본 연구실을 비롯한 다양한 연구에 따르면 CB, PV는 human [18, 19, 20], rat [4, 5, 6], mouse [24], hamster [14] 등의 시각피질에서 특별한 신경세포에 분포한다고 알려져 있다. 뉴런의 NOS는 시냅스 조절, 뉴런의 성장, 기억과 학습, 뉴런의 죽음과 같이 많은 중요한 생체 내 역할을 담당하는데 이들을 함유하는 신경세포도 시각피질의 특별한 신경세포에서 발현되는 것을 본 연구실의 연구에서 발표하였다[14, 15].

지금까지 mouse 시각피질에서 melanopsin의 존재에 대한 연구는 없었다. 시각피질은 망막의 정보가 인식되는 영역이기 때문에 이번 연구에서는 mouse 시각피질에 melanopsin이 존재하는지를 살펴보았다. 또한, melanopsin을 가지는 신경세포가 신경세포의 marker로 중요하게 작용하는 calcium-binding proteins (CBP)과 nitric oxide synthase (NOS)를 함께 가지고 있는지 알아보면서 melanopsin이 mouse 시각피질의 신경세포 아집단(neuronal subpopulation) 일부에 분포하는지를 확인하였다.

재료 및 방법

Perfusion and tissue processing

Mouse (C57BL/6, 8-12주, 25-30 g)는 에테르를 흡입시켜 마취하였다. 각 mouse는 5-10분간 20-30 ml의 고정액[4% paraformaldehyde and 0.1-0.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) with 0.002% calcium chloride]으로 관류고정 하였다. 그리고 두개골을 제거한 뒤 뇌를 꺼내어 동일한 고정액으로 하룻밤 동안 postfix하였다. Mouse 뇌 시각피질 부위를 vibratome을 이용하여 50 μ m 관상단면 (coronal section)으로 잘랐다. 조직은 자른 순서대로 1~7번 vial에 나누어 담았다. 1~3번 조직은 horse radish peroxidase (HRP) immunocytochemistry로 melanopsin-immunoreactive (IR)를 확인하는데 이용하였으며, 4번째 자른 조직은 thionin 염색을 하여 cortical layer를 확인하는데 이용하였다. 5~7번 조직은 fluorescence immunocytochemistry로 melanopsin과 CB, PV, NOS의 double labeling에 이용하였다.

모든 실험에서 실험동물사용은 The National Institute of Health guidelines에 따라 진행되었다. 실험동물이 받는 고통뿐 아니라 실험동물의 수를 최소화 하기 위해 노력하였다.

HRP immunocytochemistry

Melanopsin에 붙는 polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 immunocytochemistry를 진행하였다. Immunocytochemistry를 위해 자른 조직을 1% sodium borohydride (NaBH₄)에 넣고 상온의 incubator에 있는

shaker에서 30분간 흔들어 준 후, 조직을 Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 3 x 10분 세척하였다. 그리고 PBS에 4% normal goat serum, 0.5% Triton X-100를 넣어 준비하고 그 용액에 조직을 옮겨 담아 4°C incubator에 있는 shaker에서 하룻밤 동안 흔들어 주었다. 그 뒤에 PBS에 primary antiserum (1:500)을 넣고 4% normal goat serum, 0.5% Triton X-100를 넣은 용액에 조직을 넣어 48시간 동안 4°C incubator에 있는 shaker로 흔들어주었다. 그 뒤에 PBS로 3 x 10분 세척하였다. PBS에 1:200으로 희석한 biotinylated anti-rabbit igG를 넣고 4% normal goat serum, 0.5% Triton X-100 넣었다. 이 용액에 조직을 옮겨 담고 4°C incubator에서 하룻밤 동안 흔들어 주었다. 그 뒤에 PBS에 1:50으로 희석한 avidin-biotinylated horseradish peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 조직을 넣고 하룻밤 동안 4°C incubator에서 흔들어 주었다. 그 뒤에 0.25 M Tris buffer로 3 x 10분 세척하였다. 마지막으로 염색된 것을 볼 수 있게 해주는 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) reagent set (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하였다. DAB와 hydrogen peroxide를 0.25 M Tris buffer에 넣은 vial에 조직을 옮겼다. 조직은 1~3분간 염색하였다. 슬라이드에 올리기 전에 0.25 M Tris buffer로 3 x 10분 세척하였다. 조직은 superfrost plus slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 올렸다. 조직을 올린 뒤에 37°C 오븐에서 하룻밤 동안 건조시켰다. 알코올에 탈수시킨 뒤 xylene으로 세척하고 Permount (Fisher Scientific)를 떨어뜨린 후 커버 슬라이드를 덮었다. 조직은 Zeiss Axioplan microscope를 이용하여 관찰하고 사진을 찍었다. 사용렌즈는 기본 렌즈 또는 differential interference contrast (DIC) optic를 이용하였다.

Fluorescence immunocytochemistry

Immunocytochemistry는 본 연구실에서 발표된 다른 논문 [13, 24, 25]에 자세히 나와 있다. Double labeling된 조직은 CB, PV와 NOS 그리고 melanopsin이다. CB, PV는 monoclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA), 그리고 NOS는 monoclonal antibody (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하였다. Melanopsin은 polyclonal antibody (Abcam)를 사용하였다. Primary antiserum으로 PV, CB, NOS 그리고 melanopsin은 각각 1:500으로 희석하여 사용하였다. Secondary antibody로 melanopsin을 탐지하기 위해 Cy2 conjugated with anti-rabbit igG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West, PA, USA)를 사용하였다. CB, PV, NOS를 탐지하기 위해 Cy3 conjugated with anti-mouse igG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 이용하였다.

Quantitative analysis

양 적 분석을 위해, 3마리의 mouse에서 각각 3개의 조직을

선택했다. Melanopsin-IR 신경세포의 수를 세기 위해서 총 9개의 조직을 Zeiss Axioplanmicroscope의 20X를 이용하여 관찰하였다 조직의 폭은 500 μm 로 설정했다. 9개의 조직에서 각각 melanopsin-IR 신경세포를 수를 세고, 다른 9개의 조직에서 각각 thionin 염색된 세포의 수를 세어 그 평균값을 도출하여 비교하였다. 그리고 시각 피질의 층별 melanopsin-IR 신경세포 수의 비율을 구하였다.

결 과

Melanopsin-IR 신경세포의 분포

Mouse 뇌 피질의 층 구조를 알아보기 위해 모든 신경세포를 염색하는 thionin으로 염색하였다(Fig. 1A). 그리고 melanopsin-IR 신경세포의 층별 분포를 알아보기 위해 HRP 염색을 이용하였다(Fig. 1B). Melanopsin은 시각피질의 모든 층에서 염색되었으며 thionin에 비해 적은 비율로 염색되었다(Fig. 1A, 1B). 즉, 시각피질에 존재하는 melanopsin-IR 신경세포는 전체 신경세포 중 일부에만 존재한다. Thionin 염색된 세포와 melanopsin-IR 신경세포의 수를 비교하기 위해 각각 9개의 조직을 선택하여 폭 500 μm 안에 존재하는 세포의 수를 세었다. Fig. 2A는 각 층별 melanopsin-IR 신경세포의 분포비율을 보여준다. I층은 3.7%, II/III층은 37.2%, IV층은 14.8%, V층은 16.2%, VI층은 28.1%의 비율로 관찰되었다. Fig. 2B는 9개의 조직에서 각 층별로 염색된 세포 수의 평균값으로 비교한 것이다. I층의 경우 thionin 68.5개 melanopsin 16.3개, II/III층의 경우 thionin 588개 melanopsin 173개, IV층의 경우 thionin 294개 melanopsin 70.5개, V층의 경우 thionin 338개 melanopsin 78개, VI층의 경우 thionin 508개 melanop-

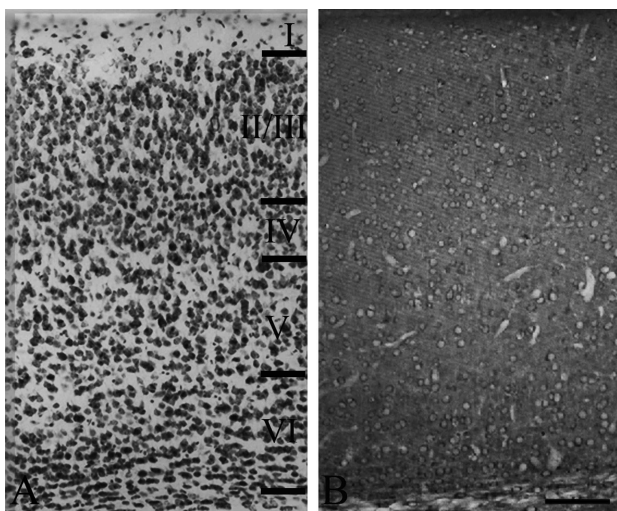


Fig. 1. Distribution of anti-melanopsin immunoreactivity in mouse visual cortex. Fig. 1 shows thionin staining (A) and melanopsin immunoreactivity (B). Scale bar=100 μm .

sin 134개로 각 층별 thionin 염색된 세포의 수는 melanopsin-IR 신경세포의 숫자보다 월등히 많았다.

Melanopsin-IR 신경세포의 형태

Mouse 시각피질의 melanopsin-IR 신경세포의 크기와 모양은 다양하다. 가장 많이 관찰된 melanopsin-IR 신경세포는 round/oval 세포 모양이었다. 이 세포들의 핵과 돌기는 염색되지 않았고, 세포체만 염색되었다(Fig. 3B, 3C). Vertical fusiform 세포는 연질막 표면 방향으로 길게 뻗은 돌기들을 가지는 세포이다. 그러나 melanopsin 염색에서 round/oval 세포와 마찬가지로 돌기들은 염색되지 않았으며 세포체만 염색되었다(Fig. 3B, 3C). Pyramidal 세포는 뇌의 연질막 쪽으로 뻗은 하나의 굵은 침단수상돌기와 수평으로 뻗은 수상돌기를 가진다. Pyramidal 세포 역시 돌기는 염색되지 않았

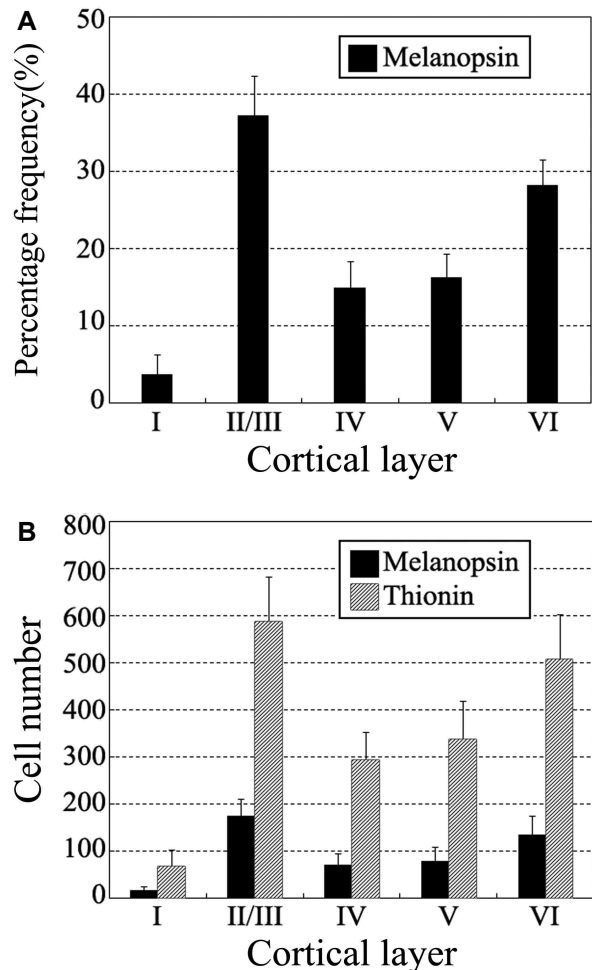


Fig. 2. Quantitative maps of cell distribution revealed the density of the melanopsin-immunoreactive neurons in each layer. In the mouse visual cortex, the highest density of melanopsin-immunoreactive neurons was located in layer II/III (A). Fig. 2B also shows numbers of thionin-stained cell.

으며 세포체만 염색되었다(Fig. 3D, 3E, 3F).

Melanopsin과 co-localization된 CBP, NOS

Mouse 시각 피질에서 melanopsin이 신경세포 중 일부에서만 발견되는 것을 알아보기 위해 우리는 CY2와 CY3를 이용한 immunocytochemistry 염색법으로 melanopsin이 CB, PV, NOS들과 각각 co-localization되는지를 알아보았다. Fig. 4A, D는 CY2 염색된 melanopsin-IR 신경세포를 보여주며 Fig. 4B, E는 CY3 염색된 PV-IR 신경세포를 보여준다. Fig. 4C는 Fig. 4의 A와 B의 사진을 겹쳐서 PV-IR 신경세포와 melanopsin-IR 신경세포의 co-localization을 확인한 사진으로 관찰된 PV-IR 신경세포(화살표, 화살표머리) 4개 중에 3개의 PV-IR 신경세포가 melanopsin-IR 신경세포와 co-localization되고(화살표머리) 나머지 하나는 co-localization되지 않았다(화살표). Fig. 4F는 Fig. 4의 D와 E의 사진을 겹쳐서 PV-IR 신경세포와 melanopsin-IR 신경세포의 co-localization을 확인한 사진으로 관찰된 PV-IR 신경세포(화살표, 화살표머리) 3개 중에 2개의 PV-IR 신경세포와 melanopsin-IR 신경세포가 co-localization되고(화살표머리) 나머지 하나는 co-localization되지 않았다(화살표). Fig. 4G, J는 CY2 염색된 melanopsin-IR 신경세포를

보여주며 Fig. 4H, K는 CY3 염색된 CB-IR 신경세포를 보여준다. Fig. 4I는 Fig. 4의 G와 H의 사진을 겹친 것이고, Fig. 4L은 Fig. 4의 J와 K의 사진을 겹친 것으로 Fig. 4I는 CB-IR 신경세포가 melanopsin-IR 신경세포와 모두 co-localization되나(화살표머리) Fig. 4L은 모두 co-localization되지 않았다(화살표). Fig. 4M, P는 CY2 염색된 melanopsin-IR 신경세포들을 보여주며 Fig. 4N, Q는 CY3 염색된 NOS-IR 신경세포를 보여준다. Fig. 4O는 Fig. 4의 M과 N의 사진을 겹쳐서 NOS-IR 신경세포와 melanopsin-IR 신경세포의 co-localization을 확인한 사진으로 관찰된 NOS-IR 신경세포는 1개이며 이 세포가 melanopsin-IR 신경세포와 co-localization되었다(화살표머리). Fig. 4R은 Fig. 4의 P와 Q 사진을 겹쳐서 NOS-IR 신경세포와 melanopsin-IR 신경세포의 co-localization을 확인한 사진으로 관찰된 NOS-IR 신경세포는 1개이며 이 세포는 melanopsin-IR 신경세포와 co-localization되지 않았다(화살표).

고 찰

본 연구는 성체 mouse의 시각피질에 있는 melanopsin을 가지는 신경세포의 존재를 밝히는 최초의 연구이다. 본 연구

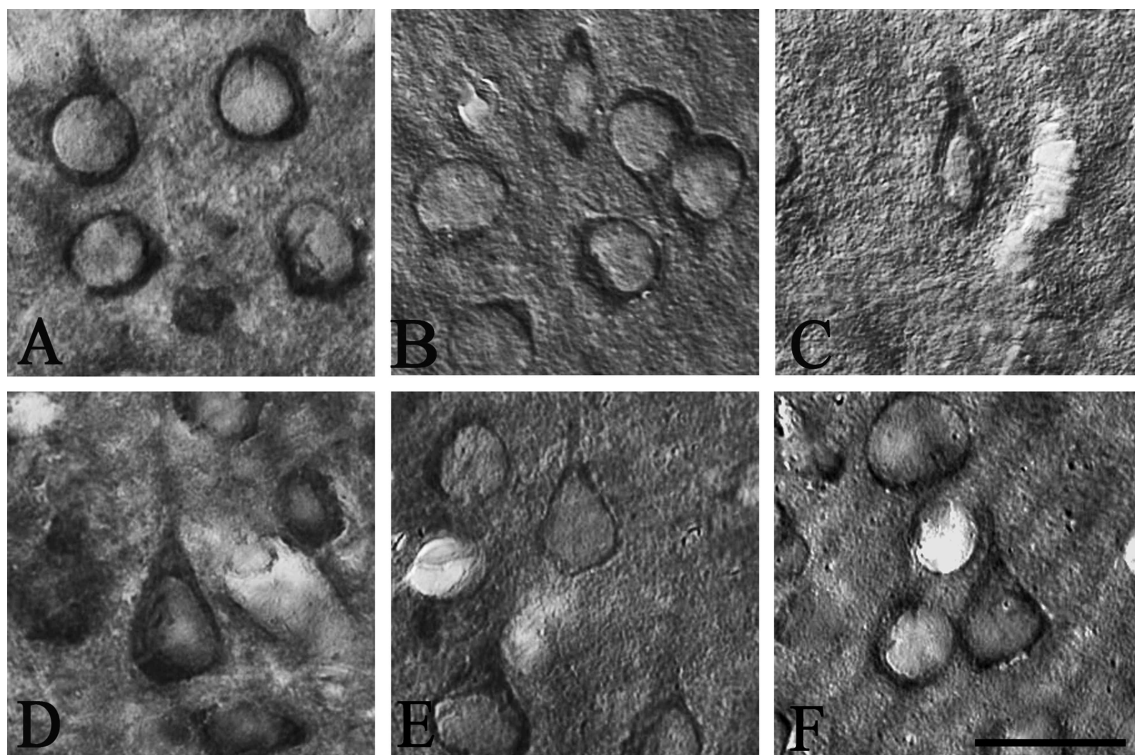


Fig. 3. Morphology of anti-melanopsin-immunoreactive neurons in mouse visual cortex. Melanopsin was present in granular pattern in many neurons in the mouse visual cortex. Immunoreaction took place mostly in neuronal soma, but not in nuclei. The staining of the melanopsin was robust in certain neurons in mouse visual cortex. The majority of anti-melanopsin-immunoreactive neurons were nonpyramidal round/oval neurons (A, B). However, vertical fusiform (C) or pyramidal (D, E, F) cells were also rarely found. Scale bar=20 μ m.

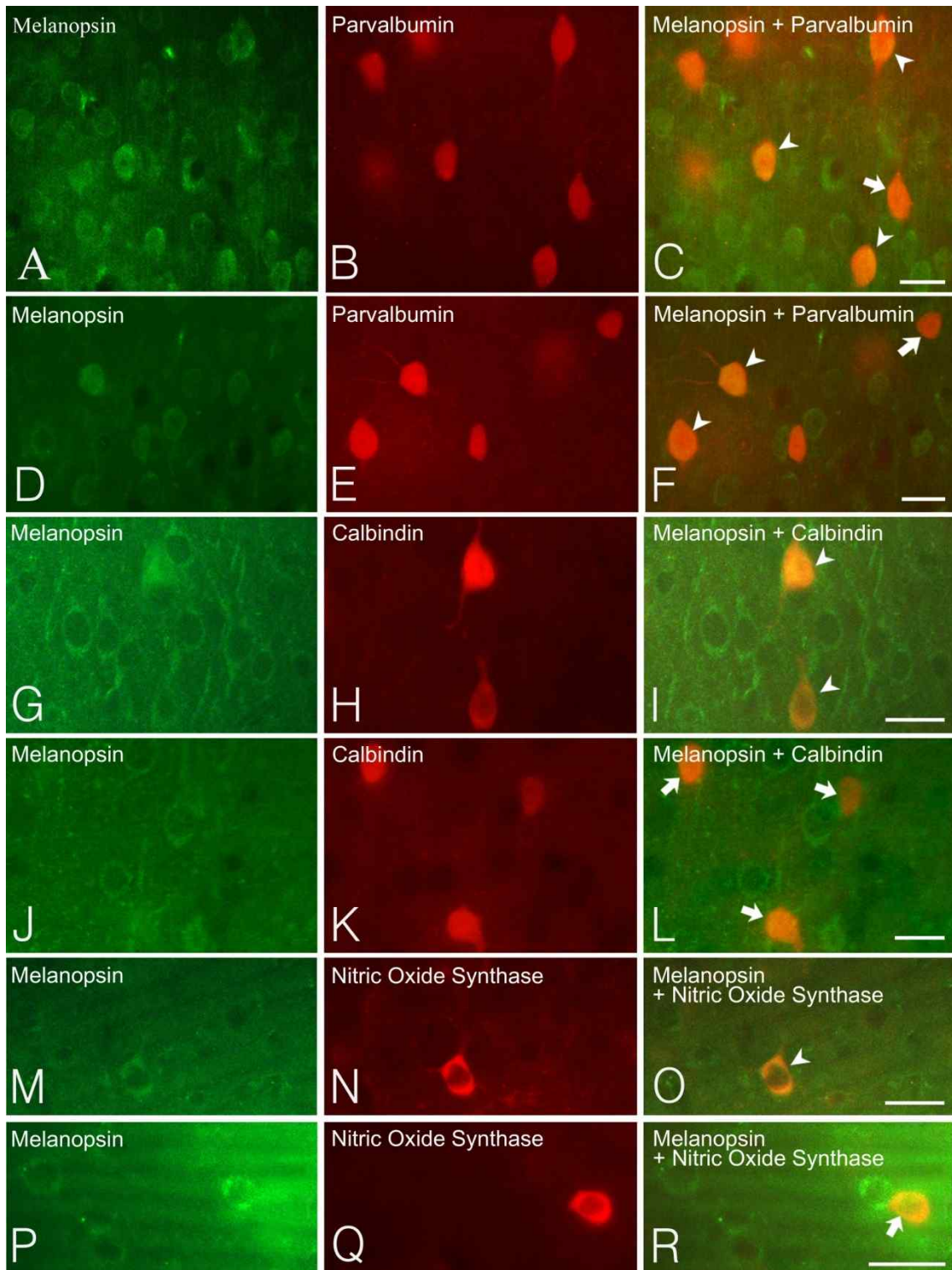


Fig. 4. Fluorescence photomicrographs of mouse visual cortex immuno-labeled for melanopsin (A, D, G, J, M, P) and parvalbumin (B, E) and calbindin (H, K) and NOS (N, Q). Superimposition of images in melanopsin and parvalbumin (C, F), melanopsin and calbindin (I, L), melanopsin and NOS (O, R). Arrowheads indicate co-localized neurons. And arrows indicate single labeled neurons. Scale bar=20 μ m.

에서 관찰된 melanopsin-IR 신경세포가 시각피질의 일부 신경세포에 존재한다는 것을 이번 실험과 본 연구실의 선행 연구를 통해서 알 수 있다. 첫째, melanopsin과 CB, PV, NOS들의 double labeling에서 melanopsin이 CB, PV, NOS와 double labeling되는 신경세포, melanopsin 만 발견되는 세포, CB, PV, NOS 만 발견되는 신경세포의 존재를 확인하였고, 이번 실험에서 melanopsin-IR 신경세포와 비교를 위해 사용한 CB-IR, PV-IR, NOS-IR 신경세포들에 대한 본 연구실의 선행 연구에서 mouse 시각피질의 특정한 신경세포 아집단에서 발견 된다는 것을 밝힌 바 있다. 선행된 연구내용에 따르면 먼저, 대부분의 CB-IR 신경세포들은 시각피질의 II/III, V층에 위치하며, 대부분의 CB-IR 신경세포들은 다극성 수상돌기를 가진 stellate 그리고 round/oval 형태의 세포이다[27]. 두 번째로, PV-IR 신경세포들은 시각피질의 I층을 제외한 모든 층에 위치하고 V층에서 가장 높은 밀도로 분포하며, 대부분의 PV-IR 신경세포들은 다극성 수상돌기를 가진 stellate 그리고 round/oval 세포이다[24]. 마지막으로 NOS-IR 신경세포들은 시각피질의 VI층에서 밀집되어 위치하며 일부는 II/III층에서 발견되기도 한다. 대부분의 NOS-IR 신경세포들은 모든 방향으로 뻗는 많은 수상돌기를 가진 round/oval 세포이다[15]. 이 연구들을 통하여 이번 연구에 사용한 CB, PV, NOS가 mouse 시각피질의 신경세포 중 일부에만 존재하는 것을 확인 하였다. 이러한 이번의 실험과 선행된 실험을 통해 melanopsin이 일부 신경세포 내에서만 발견되는 것을 확인할 수 있었다. 둘째, mouse 시각피질의 모든 신경세포를 염색하는 thionin 염색과 melanopsin-IR 신경세포를 비교하면 thionin 염색에 비하여 melanopsin-IR 신경세포가 확실히 적은 것을 확인할 수 있었다. 이 두 가지 결과를 통해 melanopsin-IR 신경세포가 mouse 시각피질의 일부 신경세포에만 존재하는 것을 알 수 있다.

Melanopsin-IR의 세포형태는 round/oval 세포가 많이 관찰되었고, 그 외에 pyramidal 세포, vertical fusiform 세포 등이 존재했다. 가장 많이 관찰된 melanopsin-IR 신경세포의 형태는 round/oval 세포로 이들은 국소적인 연결에 관여하는 interneuron의 역할을 수행한다. 그리고 pyramidal 세포는 인접한 뉴런으로 신호를 전달 할 뿐만 아니라 뇌의 다른 영역으로 신호를 전달한다. 망막에서 melanopsin은 RGC에서만 존재함으로써 projection neuron의 역할을 담당하나[13], 시각피질에서 melanopsin은 round/oval 형태와 pyramidal의 형태 둘 다 관찰되어 projection neuron의 기능뿐만 아니라 interneuron의 기능도 담당하는 것을 보여주고 있다. 하지만 melanopsin이 이들 각각의 신경세포에서 어떠한 기능을 담당하는 것인지에 대한 것은 앞으로 많은 연구가 필요한 부분이다.

최근 연구 결과로 RGC에 존재하는 melanopsin은 빛 자극을 받으면 빛-개폐 이온 채널이 열려 세포내부로 칼슘이 유입된다는 것이 밝혀졌다[9]. Melanopsin을 가지는 RGC 내부에

칼슘이 증가되면 RGC의 axon 말단이 뇌로 직접 투사되어 생체리듬[34]과 동공반사[11]에 영향을 준다. 지금까지 시각피질에 존재하는 melanopsin의 기능은 밝혀진 바가 없으나 뇌에서 발견되는 melanopsin이 뇌의 기능에 분명한 영향을 끼친다는 것을 다음 연구 결과[40]를 통해 알 수 있다. 이 연구에서 시상하부의 신경세포에 melanopsin을 주입하여 발현시켰으며, 발현된 melanopsin은 빛에 반응하여 생리적 현상에 영향을 주었다. 이 연구에서 빛은 두개골 안쪽에 이식된 광섬유를 통하여 직접적으로 뇌에 제공되었다. 그러나 다른 연구 결과에서 빛이 피부와 두개골을 투과하여(penetrate) 뇌에 직접적으로 도달 할 수 있다는 결과가 있다[41]. 이 연구에서 적은 양의 빛이지만 투과된 빛이 실험동물인 sheep, dog, rabbit, 및 mouse의 대뇌뿐만 아니라 시상하부에서도 관찰되었는데, 이러한 결과를 통해 뇌로 투과되어 들어오는 빛에 melanopsin이 직접적으로 반응 할 것이라고 추론 할 수 있다. 즉 시각피질에 존재하는 melanopsin 또한 광자극이 전달된 뒤 빛-개폐 이온 채널을 열리게 하고, 탈분극 시키면서 특정한 생리 현상을 유발 할 수 있을 것이다. 그러나 지금까지 연구로는 시각피질에 존재하는 melanopsin이 대뇌에 정확히 어떤 특정한 영향을 주는지는 알 수 없다. 앞으로의 연구를 통하여 대뇌 피질에 존재하는 melanopsin이 어떻게 대뇌 신경세포의 신경전달을 조절 하는 지 밝혀내야 할 것 이다.

감사의 글

이 논문은 2012 학년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

References

- Berson, D. M., Dunn, F. A. and Takao, M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* **295**, 1070-1073.
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. and Deisseroth, K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**, 1263-1268.
- Cassone, M. C., Lombard, A., Rossetti, V., Urciuoli, R. and Rolfo, P. M. 1993. Effect of in vivo He - Ne laser irradiation on biogenic amine levels in rat brain. *J Photochem Photobiol B* **18**, 291-294.
- Cellerino, A., Siciliano, R., Domenici, L. and Mafferi, L. 1992. Parvalbumin immunoreactivity: a reliable marker for the effects of monocular deprivation in the rat visual cortex. *Neuroscience* **51**, 749-753.
- Gonchar, Y. and Burkhalter, A. 1997. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex* **7**, 347-358.
- Gonchar, Y. and Burkhalter, A. 1999. Differential subcellular

- localization of forward and feedback interareal inputs to parvalbumin expressing GABAergic neurons in rat visual cortex. *J Comp Neurol* **406**, 346-360.
7. Hannibal, J., Hindersson, P., Nevo, E. and Fahrenkrug, J. 2002. The circadian photopigment melanopsin is expressed in the blind subterranean mole rat, Spalax. *Neuroreport* **13**, 1411-1414.
 8. Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., Georg, B. and Fahrenkrug, J. 2002. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci* **22**, RC191.
 9. Hartwick, A. T., Bramley, J. R., Yu, J., Stevens, K. T., Allen, C. N., Baldrige, W. H., Sollars, P. J. and Pickard, G. E. 2007. Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *J Neurosci* **27**, 13468-13480.
 10. Hatori, M. and Panda, S. 2010. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med* **16**, 435-446.
 11. Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D. M. and Yau, K.-W. 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* **295**, 1065-1070.
 12. Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K. W. and Berson, D. M. 2006. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* **497**, 326-349.
 13. Jeon, M. H., Jeon, C. J. and Yang, H. W. 1998. Calretinin and calbindin D28K immunoreactivity in the superficial layers of the rabbit superior colliculus. *Neuroreport* **9**, 3847-3852.
 14. Lee, J. E., Ahn, C. H., Lee, J. Y., Chung, E. S. and Jeon, C. J. 2004. Nitric oxide synthase and calcium-binding protein-containing neurons in the hamster visual cortex. *Mol Cells* **18**, 30-39.
 15. Lee, J. E. and Jeon, C. J. 2005. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-containing neurons in mouse and rabbit visual cortex and co-localization with calcium-binding proteins. *Mol Cells* **19**, 408-417.
 16. Leszkiewicz, D. N., Kandler, K. and Aizenman, E. 2000. Enhancement of NMDA receptor-mediated currents by light in rat neurones *in vitro*. *J Physiol* **524**, 365-374.
 17. Leszkiewicz, D. and Aizenman, E. 2003. Reversible modulation of GABA(A) receptor-mediated currents by light is dependent on the redox state of the receptor. *Eur J Neurosci* **17**, 2077-2083.
 18. Letinic, K. and Kostovic, I. 1998. Postnatal development of calcium-binding proteins calbindin and parvalbumin in human visual cortex. *Cereb Cortex* **8**, 660-669.
 19. Leuba, G. and Saini, K. 1996. Calcium-binding proteins immunoreactivity in the human subcortical and cortical visual structures. *Vis Neurosci* **13**, 997-1009.
 20. Leuba, G. and Saini, K. 1997. Colocalization of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k in the human cortical and subcortical visual structures. *J Chem Neuroanat* **13**, 41-52.
 21. Lucas, R., Hattar, S., Takao, M., Berson, D. M., Foster, R. G. and Yau, K. -W. 2003. Diminished papillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* **299**, 245-247.
 22. Nissilä, J., Mänttari, S., Tuominen, H., Takala, T., Saarela, S. and Timonen, M. 2012. The abundance and distribution of melanopsin (OPN4) protein in human brain. 20th *European Congress of Psychiatry*. March 3-6. Prague, Czech Republic.
 23. Panda, S., Sato, T. K., Castrucci, A. M., Rollag, M. D., DeGrip, W. J., Hogenesch, J. B., Provencio, I. and Kay, S. A. 2002. Melanopsin(Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* **298**, 2213-2216.
 24. Park, H. J., Hong, S. K., Kong, J. H. and Jeon, C. J. 1999. Localization of calcium-binding protein parvalbumin immunoreactive neurons in mouse and hamster visual cortex. *Mol Cells* **9**, 542-547.
 25. Park, H. J., Lee, S. N., Lim, H. R., Kong, J. H. and Jeon, C. J. 2000. Calcium-binding protein calbindin D28K, calretinin, and parvalbumin immunoreactivity in the rabbit visual cortex. *Mol Cells* **10**, 206-212.
 26. Park, H. J., Kong, J. H., Kang, Y. S., Park, W. M., Jeong, S. A., Park, S. M., Lim, J. K. and Jeon, C. J. 2002. The distribution and morphology of calbindin D-28K- and calretinin-immunoreactive neurons in the visual cortex of mouse. *Mol Cells* **14**, 143-149.
 27. Peirson, S. N., Halford, S. and Foster, R. G. 2009. The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 2849-2865.
 28. Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P. and Rollag, M. D. 1998. Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 340-345.
 29. Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F. and Rollag, M. D. 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* **20**, 600-605.
 30. Provencio, I., Rollag, M. D. and Castrucci, A. M. 2002. Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature* **415**, 493.
 31. Rahman, S. A., Marcu, S., Shapiro, C. M., Brown, T. J. and Casper, R. F. 2011. Spectral modulation attenuates molecular, endocrine, and neurobehavioral disruption induced by nocturnal light exposure. *Am J Physiol* **300**, E518-E527.
 32. Rollag, M. D., Berson, D. M. and Provencio, I. 2003. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* **18**, 227-234.
 33. Ruby, N. F., Brennan, T. J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H. C. and O'Hara, B. F. 2002. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* **298**, 2211-2213.
 34. Rusak, B., Meijer, J. H. and Harrington, M. E. 1989. Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculate-hypothalamic tract. *Brain Res* **493**, 283-291.
 35. Sandbakken, M., Ebbesson, L., Stefansson, S. and Helvik, J. V. 2012. Isolation and characterization of melanopsin photoreceptors of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Comp Neurol* **520**, 3732-3736.
 36. Schwaller, B. 2007. Emerging functions of the "Ca²⁺ buffers" parvalbumin, calbindin D-28k and calretinin in the brain, pp. 198-221. In: Lajtha, A. and Banik, N. (eds.), *Handbook*

- of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer Science+Business Media: Berlin Heidelberg, German.
37. Sexton, T., Buhr, E. and Van Gelder, R. N. 2012. Melanopsin and mechanisms of non-visual ocular photoreception. *J Biol Chem* **287**, 1649-1656.
 38. Shichida, Y. and Matsuyama, T. 2009. Evolution of opsins and phototransduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 2881-2895.
 39. Shen-Zeng, Xiao-Jian., Lin, S. Z. and Wang, L. H. 1982. Effects of a lowpower laser beam guided by optic fiber on rat brain striatal monoamines and amino acids. *Neurosci Lett* **32**, 203-208.
 40. Tsunematsu, T., Tanaka, K. F., Yamanaka, A. and Koizumi, A. 2012. Ectopic expression of melanopsin in orexin/hypocretin neurons enables control of wakefulness of mice *in vivo* by blue light. *Neurosci Res* **75**, 23-28.
 41. Van Brundt, E. E., Shepherd, M. D., Wale, J. R., Ganong, W. F. and Clegg, M.-T. 1964. Penetration of light into the brain of mammals. *Ann NY Acad Sci* **117**, 217-224.
 42. Wade, P. D., Taylor, J. and Siekevitz, P. 1988. Mammalian cerebral cortical tissue responds to low-intensity visible light. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 9322-9326.
 43. Warren, E. J., Allen, C. N., Brown, R. L. and Robinson, D. W. 2006. The light-activated signaling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* **23**, 2477-2487.
 44. Yamashita, T., Terakita, A., Kai, T. and Shichida, Y. 2008. Conformational change of the transmembrane helices II and IV of metabotropic glutamate receptor involved in G protein activation. *J Neurochem* **106**, 850-859.
 45. Zhang, D. Q., Wong, K. Y., Sollars, P. J., Berson, D. M., Pickard, G. E. and McMahon, D. G. 2008. Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14181-14186.

초록 : 생쥐 시각피질에서 melanopsin을 가지는 신경세포의 면역조직화학적 위치

이원식 · 노은종 · 서윤담 · 정세진 · 이은실 · 전창진*

(경북대학교 자연과학대학 생물학과)

Melanopsin은 옵신과 비슷한 광색소로 망막 광민감성 신경절 세포에서 적은 비율로 발견 된다. Melanopsin은 일주기 리듬조절에 관여 하고 동공반사를 조절한다. 이번 연구의 목적은 melanopsin이 망막 이외의 중추 시각계 에서도 발견 되는지를 알아 보는 것이다. 우리는 생쥐 시각 피질에 존재하는 melanopsin을 가지는 신경세포를 면역조직화화법을 통해 염색하여 melanopsin의 분포와 형태를 분석하였다. Melanopsin 면역반응은 핵을 제외한 신경세포의 세포체에서 일어났다. 우리는 melanopsin이 성체 생쥐의 시각 피질의 2,3층에서 높은 밀도로 모여서 존재하는 것을 확인했다. 시각 피질 1층에서 melanopsin 면역반응을 보인 신경세포는 드물게 발견 되었다. 생쥐 시각 피질에서 발견된 melanopsin의 세포종류는 주로 round/oval 세포였으나, vertical fusiform 그리고 pyramidal 세포 등도 드물게 발견 되었다. 염색된 세포들의 분포는 특이적이지 않았다. 우리의 실험 데이터로 melanopsin이 시각피질에도 분포한다는 것을 알 수 있었다. 또한, melanopsin을 가지는 신경세포는 nitric oxide synthase, calbindin and parvalbumin과도 같이 발현 되는 것을 관찰했다. 이러한 실험결과는 망막 이외의 부분에서 발견되는 melanopsin의 기능에 대한 연구가 필요함을 야기한다.