

## 한국관박쥐 망막에서 글루타메이트 수용체의 분포 양상

권오주<sup>1</sup>, 전창진<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>부산과학기술대학교 보건웰빙학부 안경광학과, 부산 616-737

<sup>2</sup>경북대학교 생명과학부 생물학과, 대구 702-701

투고일(2014년 08월 1일), 수정일(2014년 09월 2일), 게재확정일(2014년 9월 18일)

**목적:** 한국관박쥐 망막의 기능을 알아보기 위해서 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트 수용체의 분포도를 분석하였다. **방법:** 성체 한국관 박쥐의 망막을 40  $\mu\text{m}$  수직 절편 한 후 표준면역세포화학법을 이용하였다. 면역형광이미지는 Bio-Rad MRC 1024 공초점 현미경을 사용하여 얻었다. **결과:** AMPA (GluR1-4), Kainate (GluR5-7, KA1-2), NMDA (1, 2A, 2B)는 내망상층과 외망상층에 주로 분포되어 있었다. KA1은 신경절세포층에도 많은 수의 수용체가 존재하였다. **결론:** 한국관박쥐는 포유류망막에 있는 신경세포와 신경전달물질을 동일하게 가지고 있었다. 한국관박쥐도 기능적 망막을 가지고 있음을 제시한다.

**주제어:** AMPA 수용체, KA 수용체, NMDA 수용체, 표준면역세포화학법, 한국관박쥐

### 서 론

박쥐는 조류가 아닌 비행이 가능한 유일한 포유류로, 동굴이나 나무 속, 삼림, 폐광 등에서 서식한다.<sup>[1]</sup> 박쥐가 주변 환경을 파악하고 살아가는데 있어서 시각적인 감각을 사용하지 않는다는 것이 일반적인 생각이지만 박쥐는 분명 2개의 안구를 가지고 있어 이에 박쥐의 시각기능에 대한 이해를 하고자 박쥐 망막의 조직학적 특징을 살펴보고자 한다.

박쥐는 크게 큰박쥐아목(*Megachiroptera*)과 작은박쥐아목(*Microchiroptera*)으로 나뉘는데, 본 실험에 대상으로 한 한국관박쥐(*Rhinolophus ferrumequinum*)는 작은박쥐아목이다. 큰박쥐아목은 주로 시각기능을 사용하여 활동하는 것으로 알려져 있다. 그러나 작은박쥐아목은 시각기능이 아닌 반향위치측정(echolocation)으로 통해 주변을 파악하는 것으로 보고되고 있다. 작은박쥐아목의 서식지는 유럽, 아프리카, 중국, 일본, 한국까지 널리 분포하고 있으며 야행성 동물이다.<sup>[2-5]</sup> 본 연구실의 이전 연구에서 한국관박쥐 망막의 광수용체세포,<sup>[6]</sup> AII 무축삭세포,<sup>[7]</sup> 신경절세포<sup>[8]</sup>와 같은 신경세포들이 분포하고 있음을 보고하였다. 망막의 정보전달은 빛의 정보가 눈으로 들어와 광수용체세포에서 양극세포로 정보를 전달하고, 이 정보는 다시 신경절세포로 이어지고 시신경을 거쳐 뇌에 도달하는 회로로 연결되어 이루어진다. 박쥐의 망막에도 신경 회로가 연결되어 있

음을 이전 연구를 통해 확인하였고 본 연구에서는 신경세포 사이에 신경전달물질을 받아들이는 수용체에 대한 연구를 한국관박쥐 망막에서 시행하였다.

중추신경계인 망막에서 광수용체세포, 양극세포, 신경절세포는 뇌로 시각 정보 전달을 조절하기 위한 글루타메이트를 방출한다.<sup>[9]</sup> 망막의 신경세포는 다양한 종류의 글루타메이트 수용체를 가지며 이들은  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), kainate (KA), N-methyl-D-aspartate (NMDA)의 3가지 주요한 아형으로 분류된다. 또한 AMPA 수용체는 적어도 GluR1-4의 4가지 아형이 있으며<sup>[10]</sup> 이들은 망막의 방향특이성 신경절세포의 기능에도 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.<sup>[11-12]</sup> KA 수용체는 적어도 GluR5-7, KA1, KA2 5가지 아형이 존재한다.<sup>[13-14]</sup> KA 수용체는 일부 신경절세포의 수상돌기에서 관찰되며<sup>[15-16]</sup> 신경절세포 반응과 관련이 있다고 알려졌다.<sup>[17]</sup> NMDA 수용체는 NMDAR1, NMDA2A-D, NMDA3A-B의 아형이 있으며<sup>[18-19]</sup> 이들 다른 수용체 아형들은 각각 생리적 약리학적 특징이 다르다.<sup>[20-21]</sup> 또한 NMDA 수용체의 과도한 자극은 흥분성 세포사(cell death)를 유발하기도 한다. NMDA 수용체가 세포사 연구의 매우 중요한 부분이듯 글루타메이트 수용체에 대한 연구는 망막 세포의 기능을 이해할 수 있는 중요한 요소이다.<sup>[22]</sup> 이들 글루타메이트 수용체에 대한 연구로 박쥐 망막의 시각기능을 여부를 확인하고자 한다.

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

## 대상 및 방법

### 1. 재료 및 망막 조직 준비

성체 한국관박쥐(*Rhinolophus ferrumequinum*)를 본 연구에서 실험하였다. 한국관박쥐들은 ketamine hydrochloride (30-40 mg/kg)와 xylazine (3-6 mg/kg)의 혼합액으로 마취하였고 안구 적출한 후에는 동종의 마취제를 사용하여 안락사 시켰다. 눈꺼풀의 순목반응을 억제하기 위하여 각막에 국소마취제(proparacaine hydrochloride, 100~200 µl)를 점안한 후 안구를 적출하였다. 적출한 안구는 해부현미경 상에서 망막을 분리하여 4% para-formaldehyde (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 동안 고정시킨 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 10분 간격으로 3회 세척을 실시하였다. 고정(fix)단계를 마친 조직은 신경절세포층(ganglion cell layer)을 위 쪽 방향으로 mounting 한 후 2-3시간정도 고정을 하였다. 이후 4% agarose gel을 이용하여 포매(embedding) 한 후, vibratome (Vibratome 3000, The Vibratome Company, USA)을 이용해서 40 µm 두께로 수직절편하여 망막의 단면을 볼 수 있게 하였고 자른 조직은 형광 표준면역세포화학법(Immunocytochemistry)을 실시하여 형광이미지를 얻을 수 있게 하였다. 박쥐 안구 전체의 단면이미지를 보기 위하여 적출한 직후 안구전체를 고정하여 절편을 만들어 thionin 염색을 하였고, 망막의 모든 세포를 염색하여 관찰하기 위하여 50 µm 두께의 망막 절편을 thionin, cyto 13, DAPI로 각각 염색하였다. 이 모든 실험과정은 National Institute of Health의 the Care and Use of Laboratory Animals 지침을 따랐다.

### 2. 표준면역세포화학법

AMPA 수용체를 연구하기 위하여 1차 항체로 anti-GluR1, anti-GluR2/3, anti-GluR4 (Chemicon, CA)를 각각 1:1000의 비율로 사용하였다. KA 수용체를 연구하기 위하여 1차 항체로 anti-GluR5, anti-GluR6, anti-GluR7, anti-KA1, anti-KA2 (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 각각 1:100의 비율로 사용하였다. NMDA 수용체를 연구하기 위하여 1차 항체로 anti-NMDAR1, anti-NMDAR2A, anti-NMDAR2B (Chemicon, CA)를 각각 1:1000의 비율로 사용하여 표준면역세포화학법을 진행하였다. 1차 항체는 72 시간 동안 25°C shaker에서 처리하였다. 2차 항체는 Cy5-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:100; Jackson Immuno Research Lab., PA)을 사용하여 2시간 동안 처리하였다. 각각의 단계 사이에는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 10분 간격으로 3회 세척을 실시하였다. 마지막으로 세척 후 슬라이드글라스에 조직을 올려 Vectashield mounting medium (Vector Lab., USA)을 떨어뜨리고 커버글라스를

덮었다. 표준면역세포화학법을 통해 조직을 염색한 후 Bio-Rad MRC 1024 공초점 현미경(emission filter 680DF32)을 이용하여 분석하고 사진 촬영을 하였다.

## 결과 및 고찰

Fig. 1에서는 박쥐 망막이 가지고 있는 모든 세포를 염색하여 구조적인 특징을 보고자 하였다. 특정 세포가 아닌 조직의 존재하는 모든 세포의 핵을 염색하기 위한 방법으로 thionin (Fig. 1B), cyto 13 (Fig. 1C), DAPI (Fig. 1D)를 사용하였다. Fig. 1A는 박쥐 안구의 전체 이미지로 각막, 공막, 수정체, 홍채, 모양체, 망막 등의 구조적 특징을 확인할 수 있다. Fig. 1(B-D)에서 망막의 구조를 보다 자세하게 확인 할 수 있는데 염색된 3개의 층은 세포의 핵들만 염색이 된 것으로 위에서부터 외핵층(ONL), 내핵층(INL), 신경절세포층(GCL)이다. 일반 포유류의 망막의 구조와 동일한 세포 배열을 보여주고 있다. 외핵층에는 추체와 간체가 있고 내핵층에는 양극세포, 무축삭세포, 수평세포가 존재하며 신경절세포층에는 신경절세포가 존재한다.

면역세포화학법 처리 후 수용체들은 점(Punctate)으로 표현되는데 AMPA 수용체 아형들은 망막의 내망상층(IPL)과 외망상층(OPL)에서 높은 밀도로 관찰되었다. 일부는 신경절세포층에서도 낮은 밀도로 관찰되었다. 수용체는 분포도는 수용체에 따라서 약간의 차이가 나타나는데 AMPA에서는 GluR2/3가 GluR1과 4보다 내망상층에

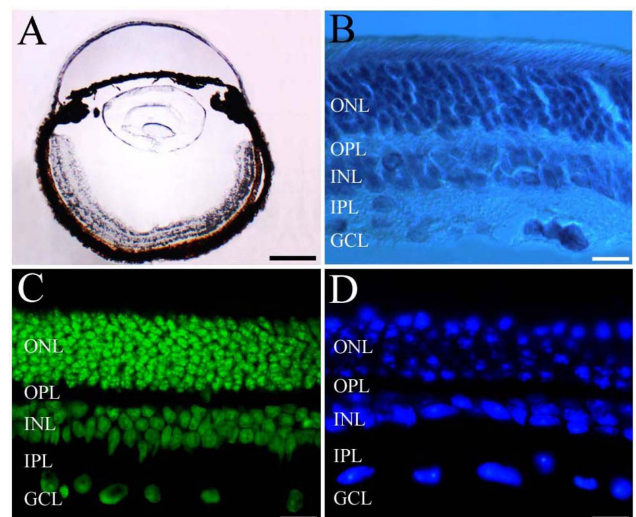


Fig. 1. (A) Bat eyeball stained with thionin. The thionin (B), cyto 13 (C) and DAPI (D) stained bat retina. Bat retina shows distinctive plexiform and nuclear layers as seen in other mammalian retinas. Scale bar=20 µm. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar=100 µm (A), and=20 (B-D) µm.

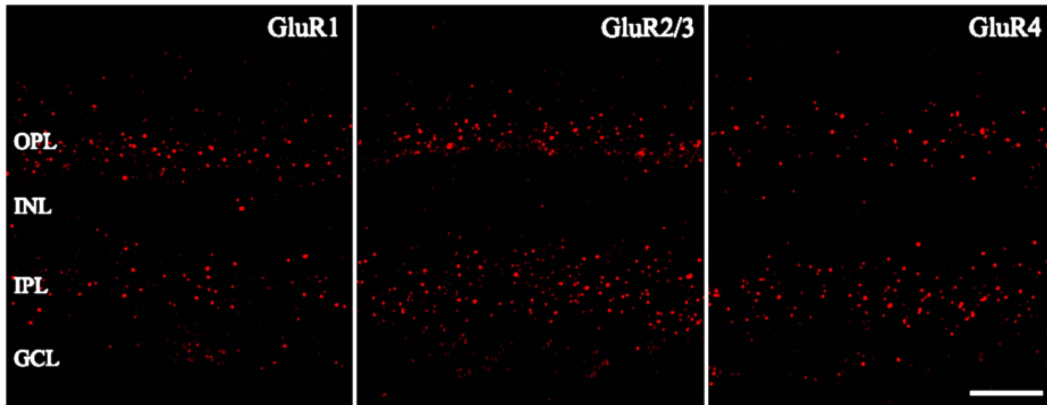


Fig. 2. Fluorescence confocal micrographs of vertical vibratome sections through midperipheral rabbit retina immunolabeled with antibodies against AMPA receptor subtypes GluR1, GluR2/3, and GluR4. Strong punctate immunoreactivity is present in the inner plexiform layer (IPL). Some punctate immunoreactivities are also found in outer plexiform layer (OPL), inner nuclear layer (INL), and ganglion cell layer (GCL). OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar=10 mm.

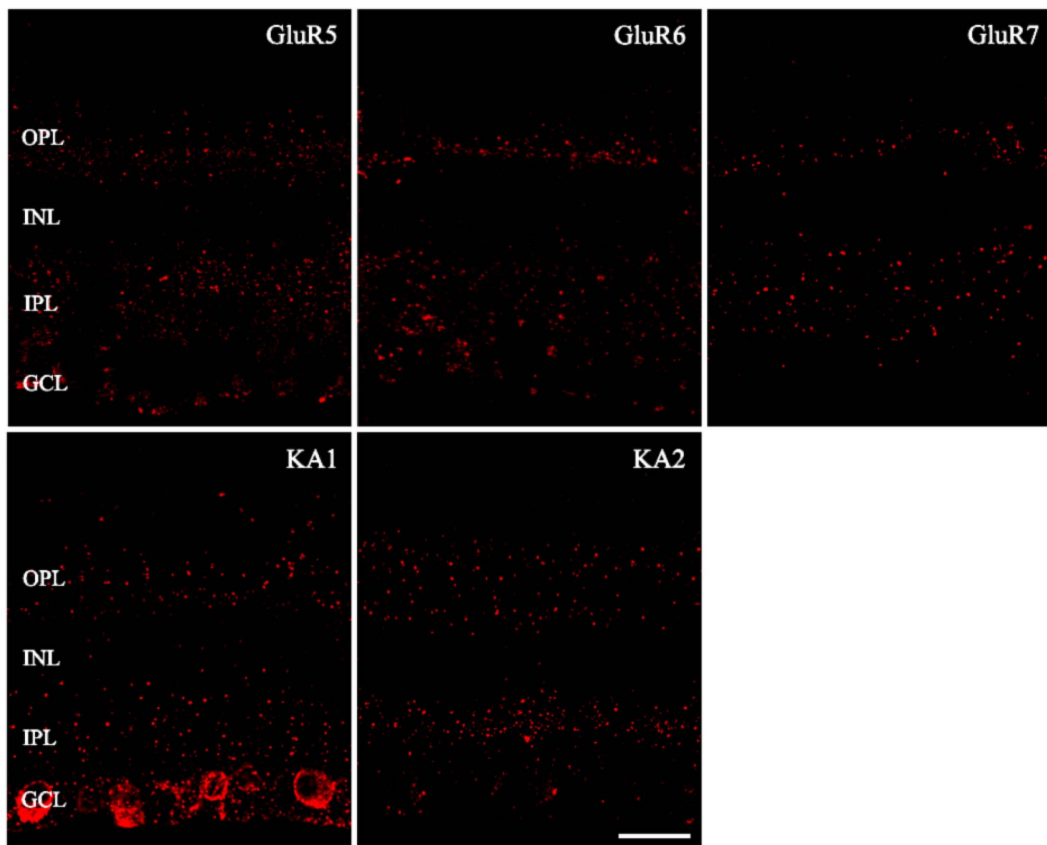


Fig. 3. Fluorescence confocal micrographs of vertical vibratome sections through midperipheral rabbit retina immunolabeled with antibodies against kainate glutamate receptor subtypes GluR5, GluR6, GluR7, KA1, and KA2. Strong punctate immunoreactivity is present in the inner plexiform layer (IPL). KA1 punctate immunoreactivities are found in ganglion cell layer (GCL) strongly. OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar=10 mm.

서 그 수가 많았다(Fig. 2). 정보전달이 일어나는 시냅스가 있는 곳에서 주로 수용체가 많기 때문에 내망상층과 외망상층에서 높은 밀도로 존재한다. KA 수용체의 5개 아형

들은 내망상층과 외망상층에 주로 분포하였고, GluR5, GluR6, KA1은 신경절세포층에서도 수용체가 관찰되었으며, 특히 KA1은 높은 밀도로 신경절세포층에서 관찰되었

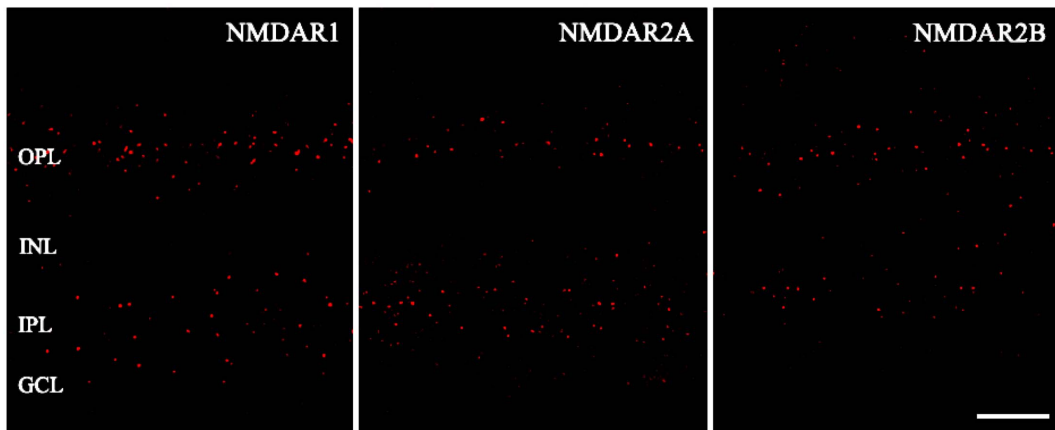


Fig. 4. Fluorescence confocal micrographs of vertical vibratome sections through midperipheral rabbit retina immunolabeled with antibodies against kainate glutamate receptor subtypes NMDAR1, NMDAR2A and NMDAR2B. Punctate immunoreactivity is present in the inner plexiform layer (IPL) and outer plexiform layer (OPL). OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar=10 mm.

다. KA2는 다른 아형보다 외망상층에서 높은 밀도로 분포하고 있음이 관찰되었다(Fig. 3). NMDA 수용체 중 본 연구에 사용된 NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B는 수용체의 밀도가 AMPA와 KA보다 낮게 나타났지만 외망상층과 내망상층에 주로 분포하고 있음을 확인하였다(Fig. 4). 글루타메이트 수용체의 망막 분포에 대한 연구는 여러 동물에서 이루어져 왔으며 다른 동물들에서도 외망상층과 내망상층에 분포하고 있다.<sup>[23-25]</sup> 한국관박쥐 망막에서 역시 다른 동물들과의 차이점은 발견하기 어려웠으며 글루타메이트 수용체를 통한 흥분성 신경전달이 망막에서 이루어지고 있음을 확인하였다. 한국관박쥐의 망막의 단면을 관찰한 결과 신경세포들이 층별로 위치하고 있었으며 이 층별 구조는 일반 포유류의 망막과 다르지 않았으며 핵층과 망상층의 구분이 분명했다. 망막 신경세포의 세포체는 신경절세포층의 세포체가 가장 크고 내핵층 외핵층의 순으로 세포체의 크기가 작아지는 특징을 보여주는데 박쥐망막에서도 동일하게 확인할 수 있었다(Fig. 1).

빛을 받아들이는 광수용세포인 간체와 추체가 있으며 특히 명소시, 색각시, 형태시의 기능을 하는 추체에 대한 연구결과를 보면 한국관박쥐도 ML opsin을 가지고 있어 가시광선 파장을 인식이 가능하다고 보고되었다.<sup>[26]</sup> 높은 파장과 낮은 파장에 반응하는 opsin 발현 유전자가 있음도 보고되었다.<sup>[27]</sup> 한국관박쥐가 400 nm 이하의 자외선에 반응할 뿐만 아니라<sup>[28]</sup> 색을 구별할 수 있는 색각시를 가지고 있을 수 있다는 결과이다. 야행성 동물이지만 밝은 빛에서도 사물을 볼 수 있는 기능이 있으며 박쥐도 시각이 중요한 감각적 특성일 될 수 있는 가능성을 제시하는 것이다. 또한 AII 무축삭세포가 일정한 분포를 나타내어 존재하고

있음도 확인하였다.<sup>[7]</sup> AII 무축삭세포는 추체와 간체의 시각 정보를 받아 연결하는 중요한 역할을 하는 세포이다.<sup>[29]</sup>

본 연구팀은 이전연구에서 박쥐 망막의 신경절세포의 규칙적인 분포양상에 대한 논문을 보고하였다.<sup>[8]</sup> 광수용세포와 신경절세포를 이어주는 양극세포의 분포 또한 본 연구실에서는 이미 면역반응을 통해 확인을 하였다. 이렇듯 망막의 신경회로는 다른 포유류 동물들처럼 잘 구성되어 있음을 확인하였다.

신경회로가 있다면 이들 사이에 과연 정보전달이 이루어지고 있는지를 알아보기 위해서 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트에 대한 연구를 본 실험에서 진행하였다. 연구 결과 AMPA, KA, NMDA 수용체가 박쥐 망막에 존재하는 것을 확인하였다. 수상돌기와 축삭들이 만나는 곳인 외망상층과 내망상층에서 수용체의 분포가 가장 많았고, 일부 신경절세포층과 다른 핵층에서도 적은 밀도로 발견되었다. 수용체들마다 그 기능과 특징은 조금씩 차이가 나므로<sup>[20,21]</sup> 망막의 층에서 수용체 별로 분포정도가 차이가 있을 가능성도 충분히 있다. 또한 같은 내망상층에서도 수용체의 밀도가 다르게 나타난다는 연구결과도 보고되었다.<sup>[30]</sup> 본 연구에서 박쥐 망막에서 글루타메이트 수용체가 분포되어 있음을 확인하였고 다음 연구에서 수용체의 망막 층별 밀도와 수상돌기 상에 분포에 대한 연구를 진행할 계획이다.

## 결 론

본 연구는 작은박쥐아목인 한국관박쥐 망막이 글루타메이트 수용체를 가지고 있으며 글루타메이트의 방출을 통해 시각 정보 전달이 이루어지고 있는 기능적 눈을 가지고 있음을 제시한다.

## 감사의 글

이 논문은 2014년도 동일문화장학재단의 지원을 받아 수행되었습니다.

## REFERENCES

- [1] 'bat' doopedia dictionary.
- [2] Winter Y, Lopez 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. All 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] Massey SC, Maguire G. The role of glutamate in retinal circuitry. In: Wheal H, Thomson A., *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission*. Academic Press. 1995;201-221.
- [10] Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17:31-108.
- [11] Cohen ED, Miller RF. Quinoxalines block the mechanism of directional selectivity in ganglion cells of the rabbit retina. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1995; 92:1127-1131.
- [12] Jensen RJ. Responses of directionally selective retinal ganglion cells to activation of AMPA glutamate receptors. *Vis Neurosci*. 1999;16:205-219.
- [13] Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol*. 1998;54:369-415.
- [14] Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 1999; 51:7-61.
- [15] Brandsttter JH, Koulen P, Wssle H. Selective synaptic distribution of kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina. *J Neurosci*. 1997;17:9298-9307.
- [16] Qin P, Pourcho RG. Immunocytochemical localization of kainateselective gluta-mate receptor subunits GluR5, GluR6, and GluR7 in the cat retina. *Brain Res*. 2001;890:211-221.
- [17] Marc RE. Kainate activation of horizontal, bipolar, amacrine, and ganglion cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol*. 1999;407:65-76.
- [18] Furukawa H. Structure and function of glutamate receptor amino terminal domains. *J Physiol*. 2012;590:63-72.
- [19] Stephenson FA. Structure and trafficking of NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors. *Biochem Soc Trans*. 2006;34:877-881.
- [20] Stephenson FA. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets*. 2001;2:233-239.
- [21] Paoletti P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci*. 2011;33:1351-1365.
- [22] Thoreson WB, Witkovsky P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res*. 1999; 18:765-810.
- [23] Jeong SA, Kwon OJ, Lee JY, Kim TJ, Jeon CJ. Synaptic pattern of AMPA receptor subtypes upon direction-selective retinal ganglion cells. *Neuroscience Research*. 2006; 56:427-434.
- [24] Kwon OJ, Kim MS, Kim TJ, Jeon CJ. Identification of synaptic pattern of kainate glutamate receptor subtypes on direction-selective retinal ganglion cells. *Neuroscience Research*. 2007;58:255-264.
- [25] Lee JG, Kwon OJ, Jeon CJ. Synaptic pattern of NMDA R1 upon the direction-selective retinal ganglion cells in developing mouse retina. *J Korean Ophthalmic Opt Soc*. 2013; 18(4):533-540.
- [26] Jeon YK, Joo YR, Ye EA, Kim MS, Jeon CJ. Histochemical analysis of the cone cells in the retina of the greater horseshoe bat. *J Korean Ophthalmic Opt Soc*. 2013;18(2): 187-191.
- [27] Wang D, Oakley T, Mower J, Shimmin LC, Yim S, Honeycutt RL. Molecular evolution of bat color vision genes. *Mol Biol Evol*. 2004;21(2):295-302.
- [28] Winter Y, Lopez J, von Halversen O. Ultraviolet vision in a bat. *Nature*. 2003;425:612-614.
- [29] Dacheu RF, Raviola E. The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci*. 1986;6(2):331-345.
- [30] Michael K, Daniel S, Lisa F, Silke H, Heinz W. Localization of NMDA receptor subunits and mapping NMDA drive within the mammalian retina. *Visual Neuroscience*. 2004;21:587-597.

## Distribution of Glutamate Receptors in the Retina of the Greater Horseshoe Bat (*Rhinolophus ferrumequinum*)

Oh-Ju Kwon<sup>1</sup> and Chang-Jin Jeon<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Optometry, Busan Institute of Science and Technology, Busan 616-737, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Biology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received August 1, 2014; Revised September 2, 2014; Accepted September 18, 2014)

**Purpose:** The objective of this study was analyzing the distribution of the excitatory neurotransmitter glutamate receptor to investigate the function in the retina of the greater horseshoe bat. **Methods:** After retinal tissues of adult greater horseshoe bat were cut into 40  $\mu\text{m}$  vertical sections, standard immuno-cytochemical techniques was applied for analysis. Immunofluorescence images were obtained using the Bio-Rad MRC 1024 laser scanning confocal microscope. **Results:** AMPA (GluR1-4), Kainate (GluR5-7, KA1-2) and NMDA (1, 2A, 2B) mainly distributed in the inner plexiform layer and outer plexiform layer. KA1 receptors have existed not only plexiform layer but also ganglion cell layer. **Conclusions:** The greater horseshoe bat has same neuron and neurotransmitter to mammalian retina. These findings suggest that bat has a functional retina for visual analysis.

**Key words:** AMPA receptor, KA receptor, NMDA receptor, Immuno cytochemistry, The greater horseshoe bat.