

한국관박쥐 망막의 신경전달물질 및 수용체, 물러세포 동정

이준석^{1,†}, 권오주^{2,†}, 전태현³, 전창진^{1,*}

¹경북대학교 자연과학대학 생명과학부 (경북대학교 첨단복합 생명과학인력 양성사업단), 대구 41566

²부산과학기술대학교 보건웰빙학부 안경광학과, 부산 46639

³보스턴 트리니티 아카데미, 보스턴 02130

투고일(2015년 8월 20일), 수정일(2015년 9월 2일), 게재확정일(2015년 9월 3일)

목적: 본 연구에서는 한국관박쥐 망막에서의 시각계를 이해하기 위하여 한국관박쥐의 망막 내 글루타메이트 및 γ -aminobutyric acid (GABA), 아세틸콜린과 같은 중추신경계의 주요 신경전달물질과 수용체, 신경교세포인 물러세포의 분포를 분석하였다. **방법:** 성체 한국관박쥐의 망막을 대상으로 하였다. 망막을 수직 절편한 다음, 표준면역세포화학법을 적용하였다. 공초점 현미경을 사용하여 면역형광이미지 내 면역반응성을 확인하였다. **결과:** 한국관박쥐의 망막에서 글루타메이트에 대한 면역반응성을 나타내는 신경세포들은 주로 신경절세포층에 존재하였다. GABA에 대한 면역반응성을 가지는 신경세포들은 내핵층에 주요하게 분포했으며, GABA의 수용체들은 내망상층에 존재하였다. 아세틸콜린의 면역반응성 신경세포들은 주로 내핵층에 위치하고 있었으며, 니코틴성 아세틸콜린 수용체 각각의 면역반응성들은 대부분 내망상층에 밀집해 있었다. 한국관박쥐의 망막에서 신경교세포 중 하나인 물러세포는 신경절세포층에서 외핵층까지 길게 뻗어 있었다. **결론:** 본 연구를 통하여 한국관박쥐의 망막에도 다른 포유동물의 망막에 있는 주요 신경전달물질 및 수용체, 물러세포가 존재한다는 것이 밝혀졌다. 이와 같은 연구결과는 한국관박쥐는 조직화된 망막 신경회로를 가지는 기능적 망막을 가지고 있음을 의미한다.

주제어: 글루타메이트, 망막, 물러세포, 아세틸콜린, γ -aminobutyric acid, 표준면역세포화학법, 한국관박쥐

서 론

박쥐는 새와 같은 비행능력을 가진 유일한 포유동물이다. 이들은 위치를 정확하게 파악하여 비행하며, 조류보다도 뛰어난 방향선택을 하는 것으로 알려져 있다. 박쥐는 전 세계적으로 약 1,100여종이 있으며, 본 연구는 이들 중 작은박쥐아목(*Microchiroptera*)의 한 종인 한국관박쥐(*greater horseshoe bat, Rhinolophus ferrumequinum*)를 대상으로 하였다.^[1-3] 작은박쥐아목의 종들은 주변 환경을 파악할 때 시각능력보다 반향정위능력(echolocation)과 자외선 탐지능력을 사용하는 것으로 보고된 바 있다.^[4] 작은박쥐아목에 속한 박쥐들은 크기는 작지만 분명히 시각능력을 담당하는 눈을 가지고 있다. 그럼에도 불구하고 많은 사람들이 관념적으로 박쥐는 시각적 기능이 발달되어 있지 않을 것으로 생각하는 이유는 박쥐가 어두운 곳에 서식하는 생태적 특이성을 가지기 때문일 것으로 파악된다. 따라서 본 연구진은 박쥐에게 다른 포유동물과 같은 시각계가 있는지를 확인하기 위해, 한국관박쥐의 망막을 대상

으로 하여 표준면역세포화학법을 실시하였다.

한국관박쥐의 망막에 대한 지금까지의 연구결과에 의하면 한국관박쥐의 망막에는 광수용체세포,^[5] AII 무축삭세포,^[6] 신경절세포^[7]와 같은 망막세포들이 분포하는 것을 알 수 있다. 또한 한국관박쥐의 망막에는 원뿔세포의 시색소(photopigment)인 M (middle) opsin, L (long) opsin이 존재하는 것으로 밝혀졌는데,^[8] 이는 한국관박쥐가 야행성 동물이면서 주로 어두운 곳에 서식 함에도 불구하고 밝은 빛에서 색을 구별할 수 있음을 시사한다. 최근 실시된 연구에서는 한국관박쥐의 망막에 흥분성 신경전달물질을 받아들이는 글루타메이트 수용체인 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), kainate (KA)가 망막의 외망상층(outer plexiform layer)과 내망상층(inner plexiform layer)에 높은 밀도로 존재하고 있음을 알 수 있었다.^[9] 이와 같은 연구결과는 한국관박쥐 망막에 흥분성 신경회로가 존재함을 보여준다. 본 연구진이 실시한 한국관박쥐의 망막에 관한 선행연구를 종합하자면, 한국관박쥐의 망막에는 다른 포유동물의

[†]These authors contributed equally to this study.

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

시각계와 거의 같은 구성을 가지고 있으며, 이 같은 연구 결과는 한국관박쥐도 시각적 기능을 가지는 것을 의미한다. 뿐만 아니라, 한국관박쥐의 망막에 대한 면역세포학적 이해를 넘어선 후속연구가 필요한 시점이다.

따라서, 본 연구에서는 한국관박쥐의 기능적인 측면을 연구하고자 중추신경계의 주요 신경전달물질과 수용체 및 신경교세포의 분포를 연구하였다. 먼저, 중추신경계의 대표적인 신경전달물질인 글루타메이트, γ -aminobutyric acid (GABA), 아세틸콜린에 대해 조사하였다. 중추신경계에서는 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트와 억제성 신경전달물질인 GABA가 중요한 역할을 한다. 중추신경계인 망막에서 뇌로 시각정보를 전달하기 위해서는 글루타메이트를 방출하고,^[10] 신경세포들이 과하게 신경흥분이 일어나지 않도록 억제성 신경전달물질이 적절하게 조절해 주어야 한다. 아세틸콜린도 글루타메이트와 같은 대표적인 흥분성 신경전달물질로서, 중추신경계에서 전반적으로 분비되는 신경전달물질이다. 위와 같은 흥분성과 억제성 신경전달물질의 존재 유무에 대한 연구와 더불어 중추신경계에서 아세틸콜린을 받아들이는 아세틸콜린 수용체와 GABA에 반응하는 GABA 수용체의 분포도 확인하였다. 마지막으로, 신경세포에 필요한 물질을 공급하면서 신경세포를 도와주는 신경교세포인 물러세포의 존재 유무를 알아보기 위하여, 물러세포가 가지고 있는 신경섬유인 바이멘틴^[11]을 표준면역세포화학법을 이용하여 확인하였다. 위와 같은 연구를 통하여 아직 명확하게 규명되지 않은 한국관박쥐의 시각계를 이해하는 데 중요한 자료를 제공하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상 및 망막 조직 준비

본 연구는 한국관박쥐(greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*) 성체를 대상으로 실험하였다. 한국관박쥐들을 ketamin hydrochloride (30-40 mg/kg)와 xylazine (3-6 mg/kg)의 혼합액으로 마취하고, 안구를 적출한 후에는 동종의 마취제를 사용하여 안락사 시켰다. 눈꺼풀의 순목 반응을 억제하기 위하여 각막에 국소마취제(proparacaine hydrochloride, 100-200 μ L)를 점안한 후, 안구를 적출하였다. 적출한 안구는 해부현미경 상에서 망막을 분리하여 4% paraformaldehyde (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 동안 고정시킨 후, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)로 10분 간격으로 3회 세척을 실시하였다. 고정(fix)단계를 마친 조직은 신경절세포층을 위 쪽 방향으로 mounting 한 후에 2-3시간 정도 고정을 하였다. 이후 4% agarose gel을 이용하여 포매 한 후, vibratome (Vibratome 3000, The

Vibratome Company, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 40 μ m 두께로 수직 절편하여 망막의 단면을 볼 수 있게 하였고, 자른 조직은 형광 표준면역세포화학법을 실시하여 형광이미지를 얻을 수 있게 하였다. 또한, 망막 내 모든 세포를 관찰하기 위하여 SYTO 13 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)와 ethidium homodimer (Molecular Probes)로 염색하였다. 이 모든 실험과정은 National Institute of Health의 the Care and Use of Laboratory Animals 지침을 따랐다.

2. 표준면역세포화학법

한국관박쥐의 망막 내 각각의 신경전달물질을 가진 세포와 수용체 및 물러세포를 표지하기 위하여 1차 항체로서 글루타메이트는 rabbit anti-glutamate (1:1000; Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA)를, GABA는 rabbit anti-GABA (1:200; Chemicon International Inc.)를, GABA 수용체는 rabbit anti-GABA_A receptor α 1 (1:200; Chemicon International Inc.)를, 아세틸콜린은 rabbit anti-choline acetyltransferase (1:200; Millipore, Bedford, MA, USA)를, 아세틸콜린 수용체는 rabbit anti-nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) α 4, rabbit anti-nAChR α 7, rabbit anti-nAChR β 2 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)를, 물러세포는 mouse anti-vimentin (1:200; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)를 사용하였다. 1차 항체는 25°C shaker에서 약 24시간 동안 처리하였다. 그 후, 모든 절편 조직을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 10분 간격으로 3번 세척하였다. 2차 항체는 Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA)와 fluorescein (FITC)-conjugated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 및 FITC-conjugated anti-mouse IgG (Vector Laboratories)를 각각 1:100의 비율로 25°C shaker에서 약 2시간 동안 처리하였다. 이 후, 전과 같은 방법으로 절편 조직을 세척하고 슬라이드 글라스에 조직을 올려 Vectorshield mounting medium (Vector Laboratories)을 떨어뜨리고 난 후, 커버슬라스를 덮었다. 표준면역세포화학을 통해 최종적으로 염색된 조직은 Zeiss Axioplan (Version 4, Carl Zeiss Meditec Inc., Jena, Germany)과 공초점 현미경(LSM 700, Carl Zeiss)을 통하여 분석되었다. 위와 같은 표준면역세포화학법에 대한 절차 및 방법은 본 연구진의 이전 연구논문에서 상세히 기재되어 있다.^[12]

결과 및 고찰

글루타메이트는 척추동물의 망막에서 외부로부터 수용된 빛을 뇌의 시각피질로 전달하는 데 중요한 역할을 하

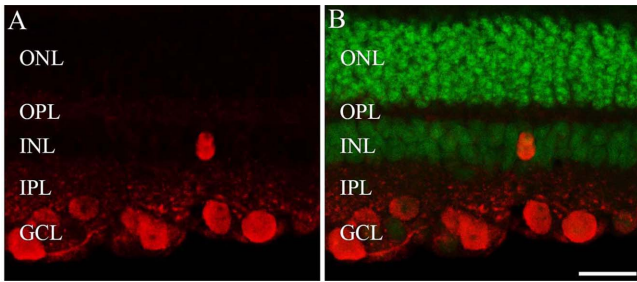


Fig. 1. Fluorescence confocal micrograph of vertical vibratome sections through midperipheral bat retina immunolabeled with antibodies against glutamate. (A) Glutamate-immunoreactive neurons were mainly localized in the GCL. (B) Glutamate-immunoreactive cells were double labeled with SYTO 13. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar = 10 μ m.

는 흥분성 신경전달물질로서, 망막 내에서 외핵층(outer nuclear layer, ONL)의 광수용체세포로부터 내핵층의 양극 세포, 신경절세포층의 신경절세포로 이어지는 수직적인 전달체계를 구성하는 세포에 주로 존재한다.^[13] Fig. 1에서는 한국관박쥐의 망막 내 글루타메이트에 대하여 면역반응을 가지는 세포의 분포를 관찰하였다. 글루타메이트에 면역반응을 띄는 신경세포들은 주로 신경절세포층(ganglion cell layer, GCL)에서 비교적 큰 크기의 세포체로써 관찰되었으며, 내핵층(inner nuclear layer, INL)에서도 면역반응을 나타내는 신경세포가 있는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 통하여, 한국관박쥐의 망막에도 다른 척추동물의 망막에서와 같이 양극세포와 신경절세포를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 한국관박쥐의 망막의 외핵층에 광수용체 세포가 존재한다는 선행연구를 바탕으로 한다면,^[14] 한국관박쥐도 빛에 대한 수직적인 시각정보전달체계를 가지고 있는 것으로 분석할 수 있다.

GABA는 척추동물의 망막에서 억제성 신경전달물질로서, 무축삭세포에 의해 분비되는 것으로 알려져 있다.^[15] 무축삭세포는 주로 내핵층에 존재하며, 일부는 신경절 세포층에도 존재한다. 한국관박쥐의 망막의 수직 절편 단층에서 GABA에 대하여 면역반응을 가지는 신경세포를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 형광 표준면역세포화학법을 통해서, 한국관박쥐의 망막 내 GABA에 대한 면역반응성을 나타내는 세포가 내핵층과 신경절세포층에 존재한다는 것을 동시에 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 그리고 3, 3'-Diaminobenzidine (DAB)를 이용한 산화 DAB 표지 항체법을 사용했을 때는, 산화된 갈색의 침전물에 의해 표지된 GABA 면역반응성 세포가 내핵층에 주로 있다는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 이와 같은 결과는 한국관박쥐의 망막에는 분명하게 무축삭세포가 있다는 것을 의미한다.

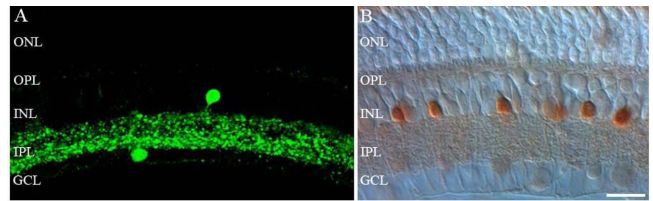


Fig. 2. GABA-immunoreactive cells in fluorescence-reacted (A) and DAB-reacted vertical bat retina (B). The majority of GABA-immunoreactive cells distributed in the INL. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar = 10 μ m.

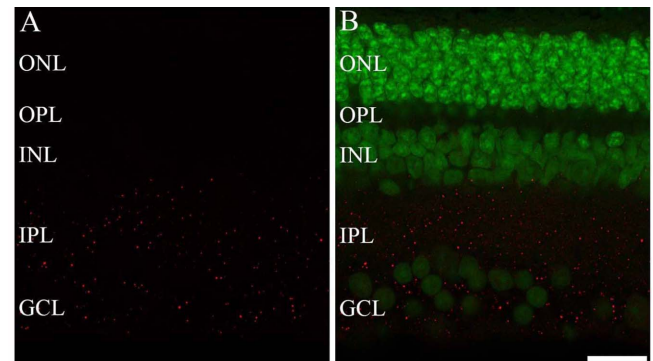


Fig. 3. Fluorescence confocal micrograph of vertical vibratome sections through midperipheral bat retina immunolabeled with antibodies against GABA_A receptors. (A) Strong punctate immunoreactivity is present in the IPL. (B) GABA_A receptor-immunoreactive puncta were double labeled with SYTO 13. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar = 10 μ m.

이를 확인하기 위해 GABA_A 수용체에 대하여 형광 표준면역세포화학법을 실시하였다. 수용체들은 표준면역세포화학법을 통하여 점(puncta)로 나타나는데, GABA_A 수용체는 내망상층에 집중적으로 밀집해 있으며 일부는 신경절세포층에 적게 분포하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 한국관박쥐의 망막에서의 GABA와 GABA_A 수용체 대한 면역반응성 결과를 종합하면, 내핵층에서 신경절세포층으로의 GABA를 통한 시각정보전달이 이루어짐을 알 수 있다.

아세틸콜린은 신호전달이 빠른 흥분성 신경전달물질이다. 아세틸콜린은 일반적으로 망막의 정상 무축삭세포에 의해 분비되는 것으로 알려져 있다. 이들은 주로 내핵층에 존재하며 일부는 신경절세포층에서도 관찰된다. 척추동물의 망막에서의 아세틸콜린에 대한 일반적인 연구결과와 마찬가지로 한국관박쥐의 망막에서도 아세틸콜린 면역반응성 세포가 내핵층과 신경절세포층에 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한, 대표적인 아세틸콜린 수용체인 니코틴성 아세틸콜린 수용체에 대한 면역반응성을 관찰하

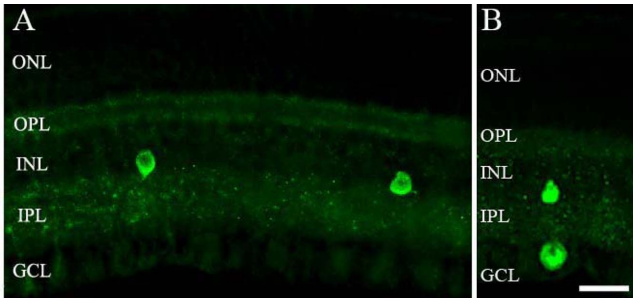


Fig. 4. Choline acetyltransferase-IR cholinergic cells in the bat retina. Choline acetyltransferase-immuoreactive cholinergic neurons were located in the INL and GCL. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar = 10 μ m.

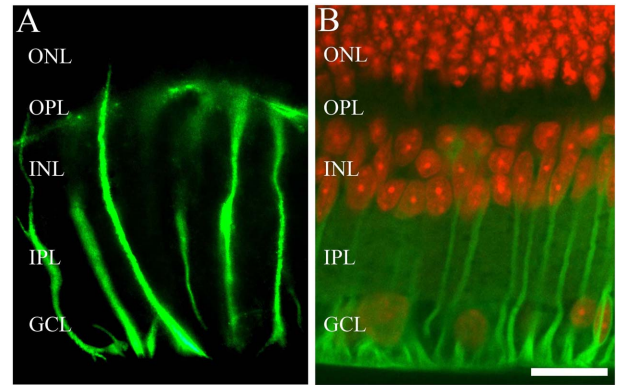


Fig. 6. Müller glial cells were distinctively labeled with antibody against vimentin. Double labeled with ethidium homodimer to stain all nuclei in the retina. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar = 10 μ m.

고자 수행한 실험에서도 니코틴성 아세틸콜린 수용체를 표지하는 면역반응성 반점이 내망상층에 높은 밀도로 분포하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 이와 같은 결과를 통하여 성상 무축삭세포에 의한 정보전달이 일어나는 시냅스가 내망상층에 주로 존재하면서 신경절세포에 활발하게 신호전달을 하는 것을 추론할 수 있다.

물러세포는 대표적인 신경교세포 중 하나로서, 신경세포가 건강할 수 있도록 영양공급과 불필요한 물질을 제거하는 역할을 한다. 이들은 망막 내에서 형태학적으로 신경절세포층에서부터 외핵층까지 뻗어 있는 줄기와 같은 모양을 지니고 있다.^[6] 물러세포는 vimentin이라는 단백질을 가지고 있어서, vimentin을 표지하는 표준면역세포화학법으로 망막 내 수직 절편 상 형태학적인 모양을 관찰할 수 있었다. 이를 통해, 한국관박쥐의 망막에서도 다른 척추동물의 망막 내 물러세포와 비슷한 모양을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

위와 같은 면역세포학적 동정을 통하여 한국관박쥐의 망막에 광수용체 세포로부터 신경절 세포까지의 시신경

회로 내 존재해야 하는 세포들이 있음을 알 수 있다. 본 연구진은 선행연구를 통하여 한국관박쥐 망막의 내핵층에 AII 무축삭 세포가 있는 것을 확인하였다. 한국관박쥐에 있는 AII 무축삭 세포도 그들의 형태적인 특징인 lobular appendage와 dendritic arboreal process를 명확하게 보여주고 있었다.^[6] 이처럼 AII 무축삭 세포의 존재와 뚜렷한 형태학적 특징의 확인은 본 연구와 큰 연결점을 가지고 있다. 본 연구에서 한국관박쥐의 망막에 anti-glutamate 항체를 처리하였을 때 내망상층에 glutamate 면역반응성 세포를 확인하였으며, 이 세포는 원뿔세포 혹은 막대세포로부터 오는 신호를 받아들이는 양극세포로 추측된다. 이 같은 추측은 한국관박쥐의 망막에 원뿔세포 및 막대세포의 존재를 확인한 연구결과와^[14] 종합하여 볼 때, 한국관박쥐는 외부의 빛을 광수용체 세포를 통해 감지하여 각각의 양극세포로 전달한 다음, AII 무축삭 세포들을 통하여 신경절 세포까지 전달되는 완전한 시신경 회로를 가지고 있음을

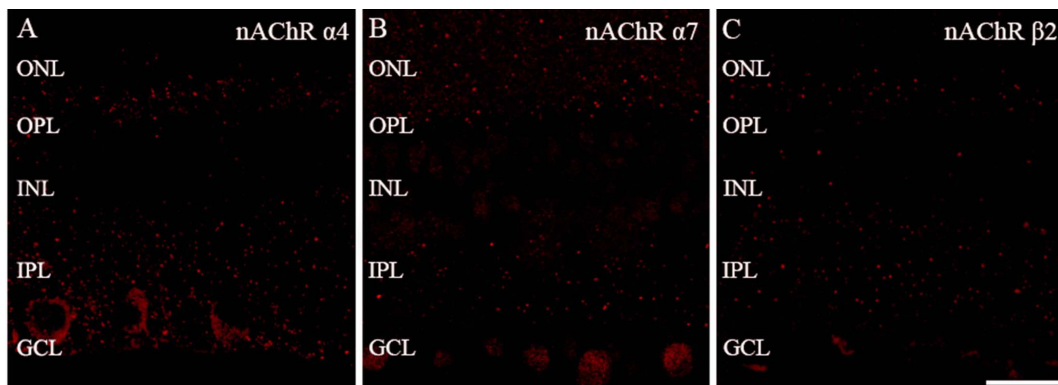


Fig. 5. Fluorescence confocal micrograph of vertical vibratome sections through midperipheral bat retina immunolabeled with antibodies against nicotinic acetylcholine receptor subunits α 4 (A), α 7 (B), β 2 (C). GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar = 10 μ m.

추론할 수 있다. 이 같은 신경회로는 이미 다른 포유동물에서 확인되었기에 위와 같은 추론의 신빙성에 힘을 실어 주고 있다.^[17-19]

한국관박쥐의 시각계에 대한 후속연구는 본 연구진의 앞 선 연구결과를 바탕으로 한국관박쥐의 망막이 생리·기능적인 역할을 명확히 가지고 있는지에 대한 연구로 나아가야 한다. 본 연구에서 한국관박쥐의 망막에 anti-choline acetyltransferase에 대한 면역반응성 세포가 내핵층과 신경절 세포층에 존재하는 것을 확인하였다. 이는 한국관박쥐의 망막에도 다른 포유동물과 마찬가지로 콜린성 세포가 있다는 것을 시사한다. 일반적으로 포유동물의 망막에서 아세틸콜린을 분비하는 세포는 정상 아마크라인(starburst amacrine cells) 세포이다. 정상 아마크라인 세포는 신경절 세포층에 있는 방향을 감지하는 방향특이성 망막 신경절 세포(direction selective retinal ganglion cells)와 연결되는 시냅스를 가지고 있다.^[20] 또한, 정상 아마크라인 세포의 비대칭적인 GABA 신경전달물질 분비를 통하여 방향특이성에 영향을 준다는 연구결과도 있다.^[21] 이 같은 연구결과와 본 연구를 종합한다면, 콜린성 세포를 가지고 있는 한국관박쥐의 망막에도 방향 특이성 망막 신경절 세포가 존재할 가능성이 있다. 그러므로 후속연구는 본 연구의 연구결과를 바탕으로 한 생리학적 연구로 이어져야 한다. 이와 더불어, 망막에서의 시신경 회로가 뇌의 시각피질(visual cortex) 및 상구(superior colliculus)까지 연결되어, 망막에서 전달된 시각정보를 인지할 수 있는가를 확인하는 연구도 이루어져야 할 것이다. 이와 같은 후속연구를 진행한다면, 한국관박쥐의 망막에서의 뇌까지의 시각계를 규명하는 데 큰 도움을 줄 것이다.

결 론

본 연구를 통하여 한국관박쥐의 망막에 글루타메이트, GABA 및 아세틸콜린과 같은 중추신경계의 주요 신경전달물질을 전달하는 망막 신경세포가 존재하는 것을 확인하였다. 또한, 주요 신경전달물질들의 수용체 분포 양상을 파악하였는데, 이는 다른 포유동물의 망막 내 분포 양상과 비교하여도 큰 차이점이 없음을 알 수 있었다. 주요 망막 신경세포들의 분포 양상뿐만 아니라, 신경세포에 필요한 영양분 공급 및 불필요한 물질을 제거해 주는 신경교세포의 면역세포학적 분포들도 다른 척추동물의 연구결과와 유사하게 나타났다. 본 연구진의 선행연구와 본 연구결과를 종합하자면, 한국관박쥐는 망막 내 잘 조직화된 신경회로를 통해 시각적 정보를 전달할 수 있다는 것을 나타낸다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2013R1A1A2059568).

REFERENCES

- [1] Jones G, Rayner JNV. Foraging behavior and echolocation of wild horseshoe bats *Rhinolophus ferrumequinum* and *R. hipposideros* (Chiroptera, Rhinolophidae). *Behav Ecol Sociobiol.* 1989;25(3):183-191.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Winter Y, Lopez J, von Helversen O. Ultraviolet vision in a bat. *NATURE.* 2003;425:612-614.
- [5] 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.
- [6] 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):1095-1112.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Kwon OJ, Jeon CJ. Distribution of Glutamate Receptors in the Retina of the Greater Horseshoe Bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2014;19(3):413-418.
- [10] Massey SC, Maguire G. The role of glutamate in retinal circuitry. In: Wheal H, Thomson A. (Eds.), *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission.* Academic Press. 1995; 201-221.
- [11] Jeon CJ, Masland RH. Selective accumulation of diaminodino yellow and chromomycin A3 by retinal glial cells. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(11):1651-1658.
- [12] Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci.* 1998;18(21):8936-8946.
- [13] Massey SC. Cell types using glutamate as a neurotrans-

- mitter in the vertebrate retina. *Prog Retinal Res.* 1990;9:399-425.
- [14] 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.
- [15] Marc RE, Murry RF, Basinger SF. Pattern recognition of amino acid signatures in retinal neurons. *J Neurosci.* 1995;15(7):5106-5129.
- [16] Reichenbach A, Robinson SR. The involvement of Müller cells in the outer retina. In: Djamgoz MBA, Archer SN, Vallergera S, editors. *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina*, London: Chapman & Hall, 1995;395-416.
- [17] 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.
- [18] Dacheux RF, Raviola E. The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci.* 1986;6(2):331-345.
- [19] 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.
- [20] Masland RH. The many roles of starburst amacrine cells. *Trends Neurosci.* 2005;28(8):395-396.
- [21] Briggman KL, Helmstaedter M, Denk W. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature.* 2011;471(7337):183-188.

Localization of the Major Retinal Neurotransmitters and Receptors and Müller Glia in the Retina of the Greater Horseshoe Bat (*Rhinolophus ferrumequinum*)

Jun-Seok Lee^{1,†}, Oh-Ju Kwon^{2,†}, Tae-Heon Jeon³, and Chang-Jin Jeon^{1,*}

¹Dept. of Biology, School of Life Sciences, BK21 Plus KNU Creative BioResearch Group, College of Natural Sciences, and Brain Science and Engineering Institute, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Dept. of Optometry, Busan Institute of Science and Technology, Busan 46639, Korea

³Boston Trinity Academy, Boston MA 02130, USA

(Received August 20, 2015; Revised September 2, 2015; Accepted September 3, 2015)

Purpose: The objective of this study was to investigate the visual system of the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) by location analysis of some major neurotransmitters glutamate, γ -aminobutyric acid (GABA), acetylcholine, and their receptors, and müller glial cells in retina. **Methods:** Standard immunocytochemical techniques were used after vibratome section of retinal tissues of adult greater horseshoe bat for this study. Immunoreactions in immunofluorescence images were analyzed using confocal microscope. **Results:** Anti-glutamate-immunoreactive neurons were mainly localized in the ganglion cell layer (GCL). The majority of anti-GABA-immunoreactive cells distributed in the inner nuclear layer (INL), and GABA_A receptors were localized in the inner plexiform layer (IPL). Anti-choline acetyltransferase-immunoreactive cholinergic neurons were mainly located in the INL and GCL, and most of nicotinic acetylcholine receptors were localized in the IPL. The müller cells in the retina of the greater horseshoe bat stretched their range from the GCL to outer nuclear layer (ONL). **Conclusions:** This study revealed that the retinas of the greater horseshoe bats contain the same major neurotransmitters and receptors, and glial cell in visually functional mammalian retinas. The present results may suggest that the greater horseshoe bats have the functional retinas for visual analysis through the organized retinal neural circuits.

Key words: Acetylcholine, γ -aminobutyric acid, Glutamate, Immunocytochemistry, Müller cell, Retina, The greater horseshoe bat