

초파리 *rdgA* 시각돌연변이체 단안의 형태적 연구

윤 춘 식

생명공학연구소 분자세포생물학연구부

Ultrastructure of Ocellus in *Drosophila melanogaster* Visual Mutant *rdgA*

Chun-Sik Yoon

Department of Molecular and Cell Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Taejon 305-333, Korea

Abstract

Ocellar morphological abnormality was studied in *Drosophila rdgA* mutant. In the mutant, ocellar photoreceptor cells were generally affected by the defection of *rdgA* molecules. Among organelles of photoreceptor cell, rhabdomeres were remarkably degenerated. The *rdgA* molecule, diacylglycerol kinase, was localized around SRC just below the rhabdomeric region. As a secondary phenomenon of photoreceptor degeneration, rER, multivesicular body and multilamella body were appeared in cytoplasm and these were known as to clean the cellular debris. These morphological abnormality was generally observed in degenerating cells. In *Drosophila* mutant, the degeneration of ocellar photoreceptor cell was facilitated to time. More intense morphological defection was observed in *rdgA*^{KS60} rather than in *yw;rdgA*^{PC47}.

Key words – *Drosophila*, Ocellus, *RdgA* mutant, Photoreceptor

서 론

초파리는 잘 확립된 유전적인 특성에 의해 좋은 실험체
료로 널리 사용되고 있다. 특히 그들의 시각계는 규칙적이
고 반복적인 구조를 가지므로 돌연변이에 의한 영향을 쉽
게 관찰 할 수 있는 장점때문에 현재까지 많은 연구가 수
행되어오고 있으며, 돌연변이 초파리를 제작하여 그 유전
자의 결손에 의해 일어나는 여러 가지 현상들로 유전자의
기능을 해석하여 왔다[9]. 그들 시각계의 여러 돌연변이체

중에서 *retinal degeneration A(rdgA)*는 초기에 보고되었고,
동시에 그 유전자의 기능 연구도 이루어져 왔다. *rdgA* 돌
연변이체는 diacylglycerol kinase가 결손된 상태이며[5],
이 분자의 결손으로 시각계에 심각한 이상을 초래하고 시
간이 경과하면서 완전히 시각기능을 상실하게 된다. 이 단
백질은 시각계에서도 특히 간상분체의 바로 아래에 있는
소포체의 일종인 subrhabdomeric cisternae(SRC)에 집중적
으로 분포한다는 사실이 보고되어 있다. Diacylglycerol
kinase는 인지질(phosphatidylinositol) 대사에 중요한 경

*Corresponding author

로를 조절하는 효소로서, 이 분자의 결손에 의해 시세포는 전반적인 퇴행을 초래할 것으로 생각되고 있다[6]. 초파리 성충은 복안과 단안으로 나누어지는 두 종류의 시각계를 가지고 있는데, 복안은 상을 보는데 주 기능을 하고, 단안은 적은 빛의 변화를 예민하게 인지하며, 특히 자외선과 청색광에 민감한 기관으로 비행(flying)에 관여한다고 알려져 있다[4,7,10]. *rdgA* 돌연변이체의 형태적 이상은 복안에서는 잘 알려져 있으나, 단안에서는 아직 연구가 미비한 상태이다[12,13,20]. 따라서 본 연구에서는 *rdgA* 돌연변이체의 단안에서 일어나는 시각계의 형태적인 이상을 미세 형태학적으로 연구하였고 시세포의 전체적인 부분에서 나타나는 비정상적인 특징을 중점적으로 조사하였다. 결과적으로 *rdgA* 단백질의 결손에 의해 초파리의 단안은 심한 영향을 받았고, 그 결과에 의한 시세포내 소기관들의 붕괴와 증가를 관찰 할 수 있었다.

재료 및 방법

초파리의 준비

정상 초파리(*Drosophila melanogaster*, C-S)와 시각돌연변이체인 *yw;rdgA^{PC47}*과 *rdgA^{KS60}*가 실험에 사용되었다. 초파리는 일반적인 먹이를 공급하여 24-25°C에서 성장시켰으며, 우화 후 3일 또는 7일된 초파리를 각각 5-10마리씩 사용하였다.

주사전자현미경적 관찰

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

투과전자현미경적 관찰

초파리의 머리를 분리하고 0.1M sodium cacodylate (pH 7.3) 완충액으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde와 2% formaldehyde 용액으로 4-5시간 고정하였다. 고정액은 체내 침투가 잘 되도록 구문(proboscis)을 절단하였다. 고정 후 3% sucrose 용액으로 2번 세척하고 1% osmium tetroxide 용액으로 4°C에서 1시간 고정한 뒤, *en bloc* 상태에서 0.5% uranyl acetate 용액으로 2시간 염색하였다. 이

를 증류수로 세척후 에탄올로 탈수하고 epon-araldite 혼합물로 포매하였다. 블록을 초박절편하고, 2% uranyl acetate 용액과 Reynolds' lead citrate 용액[11]으로 염색한 후 JEOL 1200EX 투과전자현미경, 80kV로 관찰하였다.

결 과

성충 초파리의 시각계는 두 종류가 존재한다. 먼저, 사물의 상을 주로 관찰하는 복안이 두부양측으로 크게 두 개가 존재하는데 한 쪽 복안은 약 600-700개의 개안으로 구성되어 있고, 다음으로 두부의 정수리 부분에 빛의 변화를 빠르게 감지하면서 비행에 도움을 주는 것으로 알려진 세 개의 단안이 존재한다(Fig. 1). 정상 초파리의 단안에는 큰 각막렌즈 밑에 평편한 한 층의 각막형성세포가 존재하고, 그 바로 아래에 75-90개 정도의 시세포를 가지고 있다. 그리고 각 시세포의 위쪽 측면부에 비정형의 광수용막인 간상분체(rhabdomeres)를 가지고 있다(Fig. 2). 우화 후 3일된 *rdgA* 돌연변이체 초파리에서는 분자의 결손에 의한 시세포의 퇴행현상이 나타나는데, *yw;rdgA^{PC47}* 돌연변이체 대립형질에서는 시세포의 퇴행현상이 약하게 나타났으나(Fig. 3), 같은 발달시기의 *rdgA^{KS60}* 대립형질체에서는 더욱 심하게 시세포의 퇴행이 진행된 것을 보여주었다. 특히 광수용막인 간상분체의 붕괴가 두드러졌다(Fig. 4). 그리고 *yw;rdgA^{PC47}*에서는 각막형성세포의 붕괴는 거의 나타나지 않았지만, *rdgA^{KS60}*에서는 이들 세포도 많은 영향을 받는 것으로 나타났다. 우화 후 7일된 단안의 횡단면관찰에서, *yw;rdgA^{PC47}*에서도 붕괴의 정도가 우화 후 3일된 개체에 비하여 심한 것으로 나타났다. 특히 붕괴에 의해 생긴 물질들을 처리하는 과정에서 생기는 multivesicular body와 multilamella body가 다수 관찰되었다. 시세포들 사이를 연결해주는 부착반이 잘 관찰되고, 퇴행에 따라 생긴 물질을 처리해주는 다량의 소포체가 관찰되었다. 각막형성세포에서는 형태적인 이상이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 5). 우화 후 7일된 *rdgA^{KS60}* 타입에서는 시세포들의 심한 퇴행이 관찰되었다. 간상분체는 거의 없어진 상태이고, 시세포 내에 크고 작은 액포가 관찰되었다. 그리고 각막형성세포에 퇴행에 따른 커다란 액포가 형성되어 있었다(Fig. 6). 정상 시세포의 고배율관찰에서는 간상분체의 미세용모간격이 좁으나(Fig. 7), 우화 후 7일된 *rdgA^{KS60}* 돌연변이

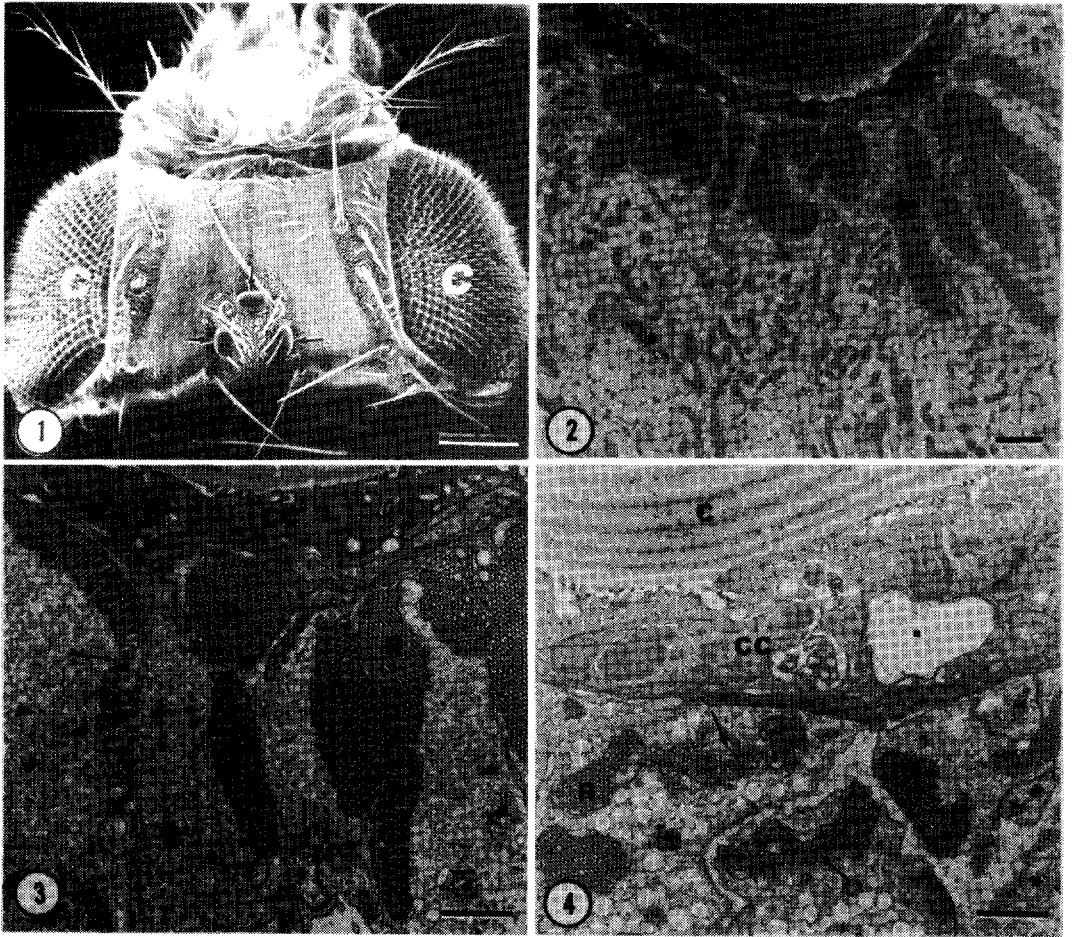


Fig. 1. Scanning electron micrograph of a wild type adult *Drosophila* head showing two compound eyes(C) and 3 ocelli(arrows). Bar=100 μ m

Fig. 2. Electron micrograph showing frontally sectioned ocellus of wild type adult *Drosophila*.

Ocellar photoreceptor cells are positioned under one layer of corneogenous cells(CC) that lie under corneal lens(C). Note rhabdomeres(R) at distal ends of photoreceptor cells. Bar=2 μ m

Figs. 3 and 4. Conventional electron micrograph showing frontally sectioned adult ocellus of aged 3 days.

In *yw;rdgA^{PC47}* mutant(Fig. 3), rhabdomeres(R) are slightly degenerated(arrows). Numerous rER(arrowheads) are found in cytoplasm of photoreceptor cell.

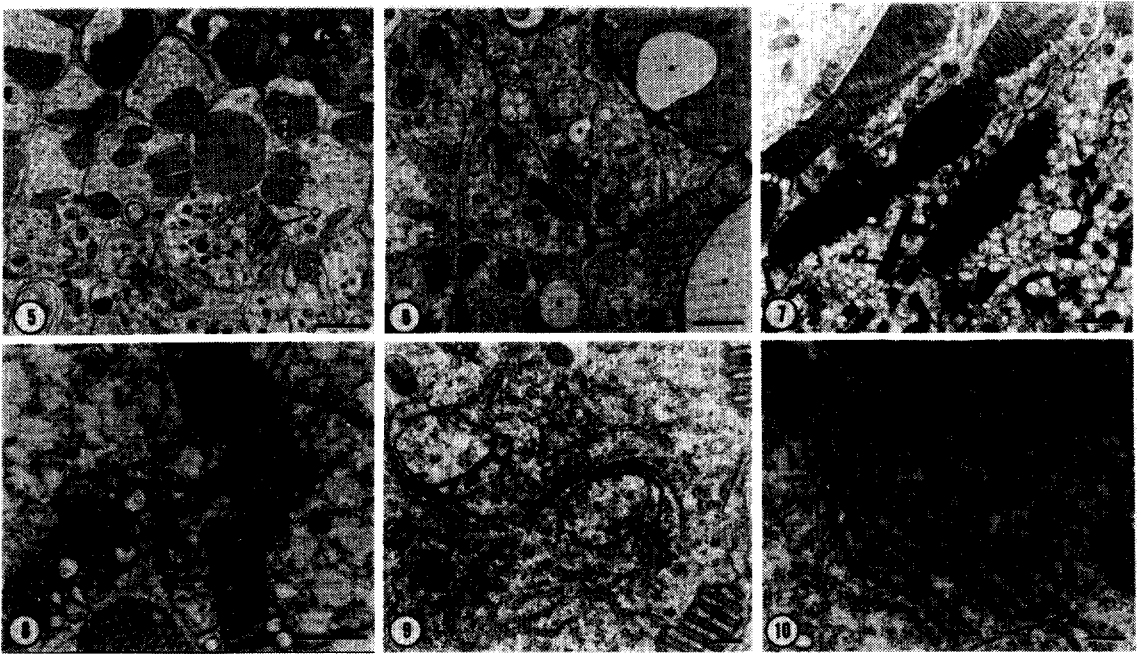
In *rdgA^{KS60}* mutant(Fig. 4), severely degenerated rhabdomeres(R) are observed. In corneogenous cells(CC), large-sized vacuoles(square) are found. C(corneal lens). Bars=1 μ m

체에서는 미세용모간 간격이 넓어져 있는 것이 관찰되었다(Fig. 8). 또한 돌연변이체들에서 미토콘드리아가 간상분체의 근방에서 사라진 것이 전반적으로 관찰되나, 정상 시세포에서는 다수의 미토콘드리아가 확인되었다(Figs. 2~8). 우화 후 7일된 *yw;rdgA^{PC47}* 돌연변이체의 시세포에는 퇴행에 따른 물질의 분해와 처리를 위해 다수의

Golgi체와 소포체가 관찰되었다(Figs. 9 and 10).

고찰

초파리 시각계에 관한 다양한 돌연변이체들이 알려져 있고, 여러 측면에서 연구가 이루어져 오고있다[9,14]. 성



Figs. 5 and 6. Cross section of adult ocellus of aged 7 days.

In *yw;rdgA^{PC47}* mutant(Fig. 5), severely degenerated (arrows) rhabdomeres(R) are seen. Multivesicular body and multilamellar body(arrowheads) are frequently observed in photoreceptor cell.

In *rdgA^{K560}* mutant(Fig. 6), under the influence of severe mutant, rhabdomeres are almost disappeared(arrows). In cytoplasm of photoreceptor cell, MVB(arrowheads) and various size of vacuoles(squares) are found. Large-sized vacuoles are also found in corneagenous cell(CC). Bars=1 μm

Figs. 7 and 8. High magnified ocellus photoreceptor cell of 3 days old.

In wild type *Drosophila*(Fig. 7), normal rhabdomeres(R) are seen. Numerous mitochondria are distributed near rhabdomeres.

Aged 3 days *rdgA^{K560}* mutant(Fig. 8), degenerated rhabdomeres are found(arrows). Mitochondria near rhabdomeres are disappeared. Bars=1 μm

Figs. 9 and 10. High magnified ocellus photoreceptor cell of *yw;rdgA^{PC47}* mutant at 7 days old.

In cytoplasm of photoreceptor cell, Golgi(G) body and well developed rER are frequently observed. Bars=200nm

충 초파리의 시각계 중에서 복안에 대한 연구는 활발히 진행되어왔지만, 그에 비하여 단안의 연구는 미비한 상태이다. 본 연구에서는 *rdgA* 분자의 결손에 따른 단안의 형태적 이상을 전자현미경 수준에서 관찰하였다. 이 돌연변이체에서 시간의 경과에 따른 시세포의 퇴행정도 그리고 돌연변이체 *yw;rdgA^{PC47}*와 *rdgA^{K560}*의 대립형질에 따른 차이 등을 조사하였다.

돌연변이체 *rdgA*에서 나타나는 가장 일반적인 형태적 이상은 시세포의 퇴행에 따른 광수용체인 간상분체의 붕괴가 두드러지게 나타난다[3,19]. 이는 간상분체의 바로 밑에 존재하는 SRC에 국재하는 *rdgA* 분자의 결손에 따른

이차적인 현상이라 사료된다. 돌연변이체 *rdgA*에서 간상분체의 붕괴에 앞서 SRC가 사라진다는 사실이 복안과 단안에서 알려져 있다. 이는 *rdgA* 분자가 diacylglycerol kinase(DGK)라는 것이 밝혀졌고, 이 분자의 결손에 의한 시세포내 인지질 대사에 전체적 이상이 일어나 나타나는 최종적 결과로서 시세포의 퇴행을 초래한다고 생각되고 있다[6,15]. 돌연변이체의 시세포에는 rER이 정상에 비하여 크게 증가한 것을 볼 수 있는데, 이는 시세포의 퇴행 의해 생긴 물질들의 처리를 위해서 나타나는 현상이라 사료된다. 이와 같은 현상은 여러 다른 시각계 돌연변이체에서 나타나는 일반적인 현상이다[8,18]. 그리고 multivesicular

body(MVB), 액포 그리고 multilamella body등이 자주 관찰되는데, 이들은 파손된 세포소기관들의 잔존물들을 처리하는 기관으로 알려져 있고, 이러한 현상들은 퇴행이 진행되고 있는 세포들에서 자주 관찰되는 것들이다[1,17]. 특히 MVB내에서 간상분체의 주된 구성성분인 옴신의 존재가 확인됨으로써 신빙성을 높이고 있다[16]. 돌연변이체 *rdgA^{KS60}*에서 나타나는 큰 액포는 퇴행의 정도가 아주 심각하여 처리 할 수 없을 정도의 과량의 세포 잔존물의 집합에 의해서 생기는 결과라 사료된다[2]. 각막형성세포의 이상도 *rdgA^{KS60}* 돌연변이체 대립형질에서만 관찰되는데 그 이유는 잘 알 수 없으나 시세포의 심각한 퇴행에 따른 이차적인 결손의 한 형태로 사료된다. 정상 시세포에서는 간상분체의 인근에서 다수 관찰되는 미토콘드리아가 돌연변이체에서는 간상분체의 부근에서 사라지는 것을 보여주는데 이는 아주 흥미 있는 결과라 생각된다. 한편, 돌연변이체 대립형질에 따라서 시세포 퇴행정도에 차이를 보여주는데 이는 *yw;rdgA^{PC47}* 보다 *rdgA^{KS60}*에서 이 분자의 결손이 더 심하게 일어나기 때문인 것으로 판단된다. 결론적으로 *rdgA* 돌연변이체 단안에서 보여주는 여러 이상을 볼 때, 복안과 마찬가지로 단안에서도 이 분자의 결손에 의해서 시세포에 심각한 이상을 초래한다는 것을 알 수 있었다.

요 약

초파리 *rdgA* 돌연변이체에서 단안의 형태적 이상을 조사한 결과, *rdgA* 분자의 결손에 의해서 단안의 시세포가 전반적으로 영향을 받았다. 특히 시세포 내의 소기관 중에서 광수용막인 간상분체의 붕괴가 가장 두드러졌다. 이는 *rdgA* 분자인 diacylglycerol kinase가 간상분체의 바로 아래에 있는 SRC와 그 부근에 집중적으로 분포하고 있다는 연구결과와 관계가 있을 것으로 생각된다. 시세포의 퇴행에 따른 이차적인 현상으로, 세포질 내에 rER, multivesicular body 그리고 multilamella body 등이 나타나는데, 이들은 붕괴된 세포잔존물들을 처리하는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이런 형태적인 이상은 퇴행이 일어나고 있는 세포들에서 일반적으로 관찰되는 현상이다. 초파리 *rdgA* 돌연변이체 단안의 시세포 퇴행정도는 시간이 경과함에 따라 그 정도가 심화되었고, *yw;rdgA^{PC47}* 보다는 *rdgA^{KS60}* 대립형질체에서 더 심한 형태적 결손이 관찰되었다.

참 고 문 헌

1. Blest, A. D. 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
2. Blest, A. D., S. Stowe, and H. G. De Couet. 1984. Turnover of photoreceptor membranes in arthropods. *Sci. Prog. Oxf.* 69, 83-100
3. Harris, W. A. and W. S. Stark. 1977. Hereditary retinal degeneration in *Drosophila melanogaster*: A mutant defect associated with the phototransduction process. *J. Gen. Physiol.* 69, 261-291
4. Hu, K. G., H. Reichert and W. S. Stark. 1978. Electrophysiological characterization of *Drosophila* ocelli. *J. Comp. Physiol.* 126, 15-24
5. Masai, I., A. Okazaki, T. Hosoya and Y. Hotta. 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
6. Masai, I., E. Suzuki, C.-S. Yoon, A. Kohyama and Y. Hotta. 1997. Immunolocalization of *Drosophila* eye-specific diacylglycerol kinase, *rdgA*, which is essential for the maintenance of the photoreceptor. *J. Neurobiol.* 32, 695-709
7. 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
8. Montini, E., E. I. Rugarli, E. Van de Vosse, G. Andolfi, M. Mariani, A. A. Puca, G. G. Consalez, J. T. den Dunnen, A. Ballabio and B. Franco. 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
9. Pak, W. L. 1995. *Drosophila* in vision research. *Vision Res.* 36, 2340-2357
10. Pollock, J. A. and S. Benzer. 1988. Transcript localization of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*; RH2 is ocellus specific. *Nature* 333, 779-782
11. Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212

12. Schmidt, B. 1975. Die neuronale organisation in den ocellen von *Drosophila*. Ph.D. Dissertation, Univ Freiburg
13. Stark, W. S., R. Sapp and C. D. Carlson. 1989. Ultrastructure of the ocellar visual system in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenetics* 5, 127-153
14. Steele, F. R., T. Washburn, R. Rieger and J. E. O'Tousa. 1992. *Drosophila retinal degeneration C (rdgC)* encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. *Cell* 69, 669-676
15. Suzuki, E., K. Hirosawa and Y. Hotta. 1990. Analysis of photoreceptor membrane turnover in a *Drosophila* visual mutant, *rdgA*, by electron microscope autoradiography. *J. Electron Microsc.* 39, 50-53
16. Suzuki, E. and K. Hirosawa. 1991. Immunoelectron microscopic study of the opsin distribution in the photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *J. Electron Microsc.* 40, 187-192
17. Van Deurs, B., P. K. Holm, L. Kayser, K. Sandvig and S. H. Hansen. 1993. Multivesicular bodies in HEP-2 cells are maturing endosomes. *Eur. J. Cell. Biol.* 61, 208-224
18. Vihtelic, T. S., M. Goebel, S. Milligan, J. E. O'Tousa and D. R. Hyde. 1993. Localization of *Drosophila retinal degeneration B*, a membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein. *J. Cell Biol.* 122, 1013-1022
19. Yamada, T. and Y. Hotta. 1988. Localization of a *Drosophila* eye protein which is phosphorylated after light stimulation. *Biomedical Research* 9, 437-442
20. Yoon, C.-S., K. Hirosawa and E. Suzuki. 1996. Studies on the structure of ocellar photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster* with special reference to subrhabdomeric cisternae. *Cell Tissue Res.* 284, 77-85