

오스뮴침착법에 의한 초파리 단안시각계의 미세구조

윤 춘 식

한국생명공학연구원 유전체연구원

Ultrastructural Study of *Drosophila* Ocellar Visual System by Osmium Impregnation

Chun-Sik Yoon

Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology, Yuseong, Taejeon 305-600, KOREA

(Received August 21, 1999)

ABSTRACT

Ultrastructure of adult *Drosophila* ocellus was compared with conventional electron microscopic method and osmium impregnation. When osmium impregnation was applied, some organelles of cells were strongly stained. Especially, subrhabdomeric cisternae (SRC) were strongly stained and showed network-like structure as in compound eye. Other organelles including SSC, ER, nuclear envelope, pigment granules and mitochondria were also strongly stained. These organelles are known as a general calcium ion reservoir. In conclusion, the strong effect of light and shade by osmium impregnation was regarded as a result of strong binding between calcium ion and osmium tetroxide. Thus, we agree to the opinion that osmium impregnation is very useful methods to the comparative morphology of cell organelles.

Key words : *Drosophila*, Ocellar visual system, Osmium impregnation

서 론

성충 초파리에는 복안과 단안의 두 종류의 視覺系가 있다. 그 중 본 연구에서는 단안의 시각계를 재료로 하였으며 단안의 시세포를 일반적인 전자현미경방법으로 관찰한 것과 오스뮴(OsO₄) 침착법으로 관찰한 것의 형태적인 차이를 비교하였다.

일반적인 전자현미경법에 비해 오스뮴침착법은 세

포내 소기관인 막구조를 강조하는 효과를 나타낼 때 유용한 것으로 알려져 있으며 이러한 방법을 사용하여 특정 막구조, 특히 절지동물의 시세포내 subrhabdomeric cisternae (SRC) 구조를 강조한 연구가 있다 (Walz, 1982; Matsumoto-Suzuki et al., 1989; Pak, 1995).

본 연구에서도 이 SRC 구조에 초점을 맞추었으며, 특히 성충초파리의 단안구조내의 SRC는 오스뮴침착법으로 연구된 바 없으므로 처음으로 시도하였다. 먼저, SRC는 시세포의 광수용막인 간상분체의 바로 아

* Correspondence should be addressed to Dr. Chun-Sik Yoon, Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yuseong, Taejeon 305-600, Korea. Ph: (042) 860-4175, FAX: (042) 860-4597
Copyright © 1999 Korean Society of Electron Microscopy

래에 있는 막상 구조물이며 이는 한 층의 소포체로 구성되어 있다.

세포막에 인접한 안쪽에는 납작한 형태의 활면소포체가 한 층을 이루고 있는 것이 자주 관찰되는데 이를 subsurface cisternae (SSC)라고 부른다. 이러한 구조는 청각기관의 와우신경절을 비롯하여 (Rosenbluth, 1962) 다양한 신경조직에서 발견되었으며 (LeBeux, 1972; Fisher and Goldman 1975; Peters et al., 1976; Whittle, 1976; Saito, 1983), 근육세포에서도 관찰되었다 (Henkart et al., 1976). 이 SSC는 여러 종류의 세포에서 다양한 형태로 관찰되며, 특히 세포내의 칼슘저장에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되었다 (Liu et al., 1995; Tse et al., 1997). 특히 무척추동물 중 절지동물의 시각계에 존재하는 광수용막인 간상분체 아래에 특이적으로 분포하고 있는 한층의 소포체가 관찰되는데, 이들을 submicrovillar cisternae (SMC) 또는 subrhabdomeric cisternae (SRC)라 부르고 있다 (Stowe, 1980; Blest et al., 1984; Toh, 1987). 이 SRC는 시각계 메카니즘에 중요한 역할을 한다는 사실이 최근에 알려졌으며 SRC내에는 시각계의 유지에 중요한 rdgA와 rdgB 분자가 존재하여, 이들의 결손에 따라서 시세포에 퇴행이 일어나는 것이 관찰됨에 따라 더욱 그 중요성을 더해가고 있다 (Vihtelic et al., 1993; Masai et al., 1997). 또한, 이 SRC는 칼슘이온의 저장고로 알려져 있고 (Walz, 1982; Pak, 1995), 여러 종류의 초파리 시각 돌연변이체에서 시세포의 퇴행에 앞서 SRC가 초기에 붕괴된다는 사실도 이들이 시세포 유지에 중요한 역할을 수행한다는 사실을 뒷받침 해준다 (Matsumoto et al., 1988; Suzuki and Hirose 1994; Yoon et al., 1996).

본 연구에서 단안 시세포를 오스뮴침착법을 이용, 막구조물들을 강조해서 관찰한 결과 시세포내의 SRC 구조를 잘 관찰할 수 있었고, 오스뮴침착법과 일반적인 방법의 차이에 의한 세포내의 소기관들의 형태를 비교하였다.

재료 및 방법

1. 초파리의 준비

정상 초파리 (*Drosophila melanogaster*, C-S)를 사용하였으며, 일반적인 먹이를 공급하여 24~25°C에서

성장시켜 우화 후 3일된 초파리를 5~10마리씩 사용하였다.

2. 일반투과전자현미경적 관찰

초파리 머리를 분리하고 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.3) 완충액으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde와 2% formaldehyde 용액으로 4~5시간 고정시켰다. 고정시 고정액의 체내 침투가 잘 되도록 구문 (proboscis)을 절단하였다. 고정후 3% sucrose 용액으로 2번 세척하고 1% osmium tetroxide 용액으로 4°C에서 1시간 고정한 뒤, *en bloc* 상태에서 0.5% uranyl acetate 용액으로 2시간 염색하였다. 이를 증류수로 세척후 에탄올로 탈수하고 epon-araldite 혼합물로 포매하였다. 블록을 초박 절편하고, 2% uranyl acetate 용액과 Reynolds' lead citrate 용액 (Reynolds, 1963)으로 염색한 후 JEOL 1200 EX 투과전자현미경, 80kV로 관찰하였다.

3. 오스뮴침착전자현미경 관찰

오스뮴침착법은 Rambourg의 방법을 기초로 초파리의 시세포를 염색하는데 적용했다 (Rambourg et al., 1974). 초파리의 두부를 2% 오스뮴수용액에 4°C에서 1시간 동안, 그리고 40°C에서 4일 동안 염색하였다. 실온으로 냉각시킨 후에 증류수로 세척하고, *en bloc* 상태에서 0.5% uranyl acetate 용액으로 3시간 염색하였다. 이를 증류수로 세척후 에탄올로 탈수하고 epon-araldite 혼합물로 포매하였다. 블록을 초박절편 (0.1 μm 이하) 또는 반박절편 (0.3~0.4 μm)한 후 JEOL 2000EX 투과전자현미경, 100kV 또는 200kV로 관찰하였다.

결 과

초파리 성충 단안을 일반적인 전자현미경 방법과 오스뮴침착법으로 처리하였을 때 나타나는 형태학적인 특징을 조사해 보았다. 그 결과 일반적인 방법의 상과 비교했을 때 명암의 차이가 매우 큰 오스뮴침착법의 특징적인 상을 얻었다.

Fig. 1과 2를 비교해 보면 세포내에 검게 염색된 모양이 오스뮴침착법에서 많이 관찰되었다. Fig. 1의 일반적인 전자현미경상에서는 색소과립이 흰색으로 보이지만 오스뮴법에서는 검게 나타났다. 이들 색소과립

은 간상분체의 말단부분부터 존재하므로 사진의 밑 부분이 더 강하게 염색되었다. 특히 간상분체의 바로 아래에 있는 SRC가 강조되어 나타났으며, 뿐만 아니라 세포막 바로 안쪽에 존재하는 subsurface cisternae (SSC)도 강하게 염색된 것이 관찰되었다. 그리고 색소과립 외에도 세포내에서 매우 강하게 염색된 것이 보이는데, 이는 소포체들로 생각된다(Fig. 2). 단안의 횡단면에서도 일반적인 방법으로는 SRC구조가 두드러지게 나타나지 않으나 오스뮴법에서는 뚜렷하게 관찰되고, 색소과립과 소포체들도 강하게 염색되었다. 그리고 전체적으로 막구조물들이 강조된 상태를 보여주었다(Figs. 3 and 4). 간상분체 근방을 확대하여 관찰해보면, 일반적인 방법에서 보이는 SRC보다 오스뮴침착법에 의해 더욱 강하게 염색된 것이 잘 비교되었고, 더불어 SSC도 강조된 형태를 보여주었다. 미토콘드리아도 약간 강하게 염색되어 있었다(Figs. 5 and 6). 간상분체의 바로아래 부분을 정확하게 절단한 결과, 일반적인 방법의 초박절편법에서는 관찰할 수 없는 SRC의 입체적 구조를 나타내 보일 수가 있었다. 오스뮴침착법에 의한 반박편법으로, SRC가 간상분체와 밀착된 그물구조를 취하고 있는 것을 관찰할 수 있었다(Figs. 7 and 8). 저배율의 단안 횡단면인 Fig. 9에서 좌측 상부가 단안의 중심부로서 깊숙한 부분까지 간상분체가 관찰되었으나, 단안의 바깥부분을 보여주는 우측하부에는 간상분체의 말단을 지나 그 밑에 위치하고 있는 핵들이 나타났다. 그리고 색소과립이 간상분체의 말단에서 핵의 위쪽사이에 위치하고 있는 것이 잘 관찰되었다. 핵막도 오스뮴에 의해서 강하게 염색되고 주위에 있는 소포체, 미토콘드리아도 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 10).

고 찰

초파리 성충시각계 중에서 복안에 대한 연구는 상세히 보고되고 있으나, 단안의 연구는 미비한 상태이다. 특히 일반적인 방법이 아닌 특수기법으로 단안을 조사한 예는 거의 없다(Stark et al., 1989; Pak, 1995; Yoon et al., 1996).

본 연구에서는 오스뮴침착법에 의한 단안의 형태를 조사한 결과, 일반적인 전자현미경방법에 비해서

오스뮴법에 의해서는 명암이 분명한 형태를 나타내었다. 이는 세포내의 특정 막구조물이나 소기관에 강하게 오스뮴이 특이적으로 침착된 결과에 따른 것이다. 특히 복안에서와 같이 간상분체 바로 아래에 있는 SRC가 강하게 염색되어 그들의 구조를 강조해서 관찰할 수 있었다. 단안에서도 SRC는 간상분체의 바로 아래에 존재하면서 그물구조를 가지나, 복안에 비해서 약간 덜 규칙적인 형태를 보인다(Matsumoto et al., 1988; Matsumoto-Suzuki et al., 1989). SRC는 칼슘의 저장고로서의 역할을 비롯하여 시세포의 유지에 여러 측면에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Vihtelic et al., 1993; Yoon et al., 1996; Masai et al., 1997; Montini et al., 1997). SRC 뿐만 아니라 세포막 바로 아래에 있는 SSC도 강하게 염색되며 이 SSC도 SRC와 같이 칼슘이온의 저장장소로서의 역할을 수행하는 것으로 보고되어 있다(Liu et al., 1995; Tse et al., 1997). 즉, SRC가 시각의 메카니즘에서 간상분체에서 일어나는 과정에 필요한 칼슘이온을 공급해 주는 역할을 주로 담당한다면, SSC는 세포내외의 칼슘이온의 이동 메카니즘과 관계가 깊다. 한편, 일반적인 전자현미경방법에 의해서는 색소과립이 처리과정에서 변형되어 흰색을 나타내지만 오스뮴법에 의해서는 검은색으로 나타난다. 색소과립도 시세포내에서 칼슘의 저장고로 보고되어 있으며(Lo and Pak, 1981), 핵막과 미토콘드리아도 강하게 염색되는데 이들 역시 칼슘이온의 저장고로 잘 알려져 있다(Peng 1998; Petersen et al., 1998).

결론적으로, 단안 시각계에서 오스뮴에 의해 강하게 염색된 것들은 모두 칼슘이온의 저장과 관계가 깊은 기관들이다(Somlyo and Somlyo, 1986). 다시 말해서 이들 속에 존재하는 칼슘이온과 오스뮴이 강하게 결합함으로써 명암이 분명한 상으로 나타나고, 그래서 이들 소기관들의 관찰을 위한 특수 기법으로 오스뮴 침착법은 유용한 방법이라 사료된다.

참 고 문 헌

- Blest AD, Stowe S, DeCouet HG: Turnover of photoreceptor membranes in arthropods. *Sci Prog Oxf* 69: 83-100, 1984.
Fisher SK, Goldman K: Subsurface cisterns in the vertebrate

- retina. *Cell Tissue Res* 164: 473–480, 1975.
- Henkart M, Landis DMD, Reese TS: Similarity of junctions between plasma membranes and endoplasmic reticulum in muscle and neurons. *J Cell Biology* 70: 338–347, 1976.
- LeBeux YJ: Subsurface cisterns and lamellar bodies: Particular forms of the endoplasmic reticulum in the neurons. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 133: 327–352, 1972.
- Liu LW, Thuneberg L, Huizinga JD: Cyclopiazonic acid, inhibiting the endoplasmic reticulum calcium pump, reduces the canine colonic pacemaker frequency. *J pharmacol Exp Ther.* 275: 1058–1068, 1995.
- Lo MV, Pak WL: Light-induced pigment granule migration in the reticular cells of *Drosophila melanogaster*. Comparison of wild type with ERG-defective mutants. *J Gen Physiol* 77: 155–175, 1981.
- Masai I, Suzuki E, Yoon C.-S, Kohyama A, Hotta Y: Immunolocalization of *Drosophila* eye-specific diacylglycerol kinase, *rdgA*, which is essential for the maintenance of the photoreceptor. *J Neurobiol* 32: 695–709, 1997.
- Matsumoto E, Hirokawa K, Takagawa K, Hotta Y: Structure of reticular cells of a *Drosophila melanogaster* visual mutant, *rdgA* at early stages of degeneration. *Cell Tissue Res* 252: 293–300, 1988.
- Matsumoto-Suzuki E, Hirokawa K, Hotta Y: Structure of the subrhabdomeric cisternae in the photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *J Neurocytology* 18: 87–93, 1989.
- Montini E, Rugarli EI, Van de Vosse E, Andolfi G, Mariani M, Puca AA, Consalez GG, den Dunnen JT, Ballabio A, Franco B: 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, 1997.
- Pak WL: *Drosophila* in vision research. *Vision Res* 36: 2340–2357 1995.
- Peng YY: Effects of mitochondrion on calcium transients at intact presynaptic terminals depend on frequency of nerve firing. *J Neurophysiol* 80: 186–195, 1998.
- Peters A, Palay SL, Webster HF: The fine structure of the nervous system: The neurons and Supporting Cells, pp. 22–24, London: WB Saunders, 1976.
- Petersen OH, Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Mogami H, Tepikin AV: The calcium store in the nuclear envelope. *Cell Calcium* 23: 87–90, 1998.
- Rambourg A, Clermont Y, Marraud A: Three-dimensional structure of the osmium-impregnated Golgi apparatus as seen in the high voltage electron microscope. *American J Anatomy* 140: 27–46, 1974.
- Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208–212, 1963.
- Rosenbluth J: Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. *Journal of Cell Biology* 13: 405–421, 1962.
- Saito K: Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: Subsurface cisternae and lamellar bodies in the outer hair cells. *Cell Tissue Res* 229: 467–481, 1983.
- Somlyo AP, Somlyo AV: Electron probe analysis of calcium content and movements in sarcoplasmic reticulum, endoplasmic reticulum, mitochondria, and cytoplasm. *J Cardiovasc Pharmacol* S8: 42–47, 1986.
- Stark WS, Sapp R, Carlson SD: Ultrastructure of the ocellar visual system in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenetics* 5: 127–153, 1989.
- Stowe S: Rapid synthesis of photoreceptor membrane and assembly of new microvilli in a crab at dusk. *Cell Tissue Res* 211: 419–440, 1980.
- Suzuki E, Hirokawa K: Immunolocalization of a *Drosophila* phosphatidylinositol transfer protein (*rdgB*) in normal and *rdgA* mutant photoreceptor cells with special reference to the subrhabdomeric cisternae. *J Electron Microscop* 43: 183–189, 1994.
- Toh Y: Diurnal changes of rhabdom structures in the compound eye of the grapsid crab, *Hemigrapsus penicillatus*. *J Electron Microscopy* 36: 213–223, 1987.
- Tse FW, Tse A, Hille B, Horstmann H, Almers W: Local Ca^{2+} release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron* 18: 121–132, 1997.
- Vihetic TS, Goebel M, Milligan S, O'Tousa JE, Hyde DR: Localization of *Drosophila* retinal degeneration B, a membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein. *J Cell Biol* 122: 1013–1022, 1993.
- Walz B: Ca^{2+} -sequestering smooth endoplasmic reticulum in an invertebrate photoreceptor. Intracellular topography as revealed by OsFeCN staining and in situ Ca^{2+} accumulation.

- J Cell Biology 93 : 839–848, 1982.
- Whittle AC: Reticular specializations in photoreceptors: a review. *Zoologica Scripta* 5 : 191–206, 1976.
- Yoon C-S, Hirose K, Suzuki E: Studies on the structure of ocellar photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster* with special reference to subrhabdomeric cisternae. *Cell Tissue Res* 284 : 77–85, 1996.

< 국문초록 >

성충초파리의 단안을 일반적인 방법 (conventional) 과 오스뮴침착법 (osmium impregnation) 을 이용한 전자현미

경적 수준에서 미세구조를 비교하였다. 오스뮴침착법에 서는 세포내의 특정 소기관들이 강하게 염색되었는데, 그 중에서도 간상분체의 바로 아래에 있는 SRC가 강하게 염색되고, 복안에서와 같이 그물구조를 보이고 있었다. SSC, ER, 핵막, 색소과립, 미토콘드리아 등이 강하게 오스뮴에 의해서 염색된 것이 관찰되었다. 이들 소기관들은 공통적으로 칼슘이온의 저장과 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 결론적으로 오스뮴침착법에 의해 얻어진 강한 명암대비 및 막구조의 강조효과는 이들 칼슘 저장고에 존재하는 칼슘이온과 오스뮴의 강한 결합에 의한 것으로 사료된다. 그러므로 저자들은 세포소기관들의 형태를 비교하는 데에는 오스뮴침착법이 유용한 방법이 될 것이다.

FIGURE LEGENDS

- Figs. 1 and 2.** Electron micrograph showing frontal sectioned ocellus of wild type. The conventional method of figure 1 shows a general image of organelles, but figure 2 by osmium impregnation shows a strong effect of light and shade. SRC (arrows) at just below of rhabdomere (R) and pigment granules (arrowheads) are strongly stained. Bars: 1 μ m
- Figs. 3 and 4.** Cross sectioned ocellus of wild type. In conventional method of figure 3 SRC is not prominent, but in osmium impregnation of figure 4, not only ER (arrowheads) of photo-receptor cell but also SRC (arrows) are emphasized. Bars: 1 μ m
- Figs. 5 and 6.** High magnification of subrhabdomere region of ocellar photoreceptor cell. The SRC (arrows) structure, subrhabdomeric cisternae, is more clear in osmium impregnation of figure 6 than in conventional image. SSC (arrowheads) are also strongly stained. M: Mitochondria. Bars: 500 nm
- Figs. 7 and 8.** Section of immediately beneath of the rhabdomere. In conventional image of figure 7, we can see the definite structure of SRC. Figure 8 by osmium impregnation and semi-thin section shows a network-structured SRC (arrows) at the subrhabdomeric region. R: rhabdomere. Bars: 500 nm
- Figs. 9 and 10.** Cross sectioned ocellus impregnated with osmium tetroxide. Figure 9. Low magnification of cross sectioned ocellus. The upper side of left hand in photograph, the center of ocellus shows rhabdomeres to the deep part. The lower side of right hand, the outer region of ocellus shows nucleus (N) that posited at the beneath of terminal part of rhabdomere. Pigment granules (arrows) are clearly seen at a space between the terminal part of rhabdomere (R) and nucleus (N). Nuclear envelope (arrowheads) is also strongly stained with osmium tetroxide (Fig. 10). M: Mitochondria. Bars: 2 μ m and 500 nm



