

## 랫드 수초좌골신경섬유에서 Neurofascin 분포에 대한 면역세포화학적연구

장병화<sup>1</sup>, 유관희<sup>2</sup>, 이종환, 조익현, 배춘식<sup>3</sup>

박창현<sup>4</sup>, 한정미<sup>5</sup>, 최농훈, 장병준\*

건국대학교 수의과대학, <sup>1</sup>건국대학교 의과대학 전자현미경실,

<sup>2</sup>충남대학교 생명과학부, <sup>3</sup>전남대학교 수의과대학 및 생물공학연구소,

<sup>4</sup>고려대학교 의과대학 전자현미경실,

<sup>5</sup>이화여자대학교 의과대학 전자현미경실

## A Study on the Localization of Neurofascin in the Myelinated Rat Sciatic Nerve Fibers

Byung-Hwa Chang<sup>1</sup>, Kwan-Hee You<sup>2</sup>, Jong-Hwan Lee,

Ik-Hyun Cho, Chun-Sik Bae<sup>3</sup>, Chang-Hyun Park<sup>4</sup>, Jeong-Mi Han<sup>5</sup>,

Nong-Hoon Choe and Byung-Joon Chang\*

College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

<sup>1</sup>Electron Microscope Facility, College of Medicine, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

<sup>2</sup>School of Bioscience & Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, and Biotechnology Research Institutes,  
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>4</sup>Electron Microscope Facility, College of Medicine, Korea University, Seoul 136-705, Korea

<sup>5</sup>Electron Microscope Facility, College of Medicine, Ewha Woman's University, Seoul 158-056, Korea

(Received May 18, 2006; Accepted June 25, 2006)

### ABSTRACT

Neurofascin, one of the members of LICAM, has been known to have some important roles during the development of nerve fibers. In order to investigate the role of neurofascin associated with the myelination of peripheral nerves, the localization of neurofascin in myelinated rat sciatic nerve fibers was studied with the immuno-fluorescence and immuno-electron microscopy and the results are as follows;

1. According to the myelination is going on, neurofascin localization was dramatically changed in the sciatic nerve fibers.
2. In the myelinated fibers, neurofascin was weakly localized along the axolemma at the node of Ranvier.
3. Neurofascin was also apparently localized at the non-compact area of Schwann cell membrane such as paranodal loop, Schmidt-Lantermann incisure, inner & outer mesaxons in the myelinated fibers.

이 연구는 2006년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의해 이루어졌음.

\* Correspondence should be addressed to Byung-Joon Chang, Ph.D., Department of Anatomy, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Ph.: (02) 450-3711, FAX: (02) 450-3037, E-mail: bjchang@konkuk.ac.kr

From the above results, neurofascin is likely to have a role to sustain the ideal gap of apposing membranes of Schwann cell, so it may enable to materials transport in the myelin sheath.

**Key words** : Immunocytochemistry, Neurofascin, Sciatic nerve

## 서 론

Neurofascin은 면역글로불린 superfamily의 한 소집단인 LICAM의 구성요소 중 하나로서 신경섬유의 축삭에 관련된 통합단백질의 하나이다. 이 단백질은 닭의 뇌에서 처음으로 동정되었고, 신경계통의 발생과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 신경세포사이 연결, 세포이동, 축삭의 성장, 다발형성 등에 대한 작용이 있는 것으로 보고되어 왔다(Rathjen & Schachner, 1984; Grumet et al., 1991; Volkmer et al., 1992; Cunningham, 1995; Hortsch, 1995).

Neurofascin은 특히 신경섬유의 발생초기 단계에 형성되는 섬유로(fiber tracts)를 따라 집중적으로 분포되어 있음이 보고되었고(Rathjen et al., 1987; Shiga & Oppenheim, 1991), 따라서, 신경섬유로의 발달에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 발생후기단계에 가서는 신경계통의 각 부위에 좀 더 광범위하게 분포하고 있음이 알려져 있다(Moscoco & Sanes, 1995).

Neurofascin은 세포막의 바깥에 공통적으로 6개의 면역글로불린영역을 가지고 있어서 면역글로불린 superfamily에 속하고, 그 밖의 구조적인 차이에 따라 몇 가지의 아형(subtype)이 있다. 186 kD neurofascin은 세번째 fibronectin 영역이 존재하지 않으며, mucin-like 영역을 가지고 있고(mucin+/3rd FN III-), Ranvier 마디와 축삭시작부에 분포가 보고되어 있다(Davis et al., 1996).

155 kD neurofascin은 세번째 fibronectin 영역을 가지고 있으며 mucin-like 영역을 가지고 있지 않은데(mucin-/3rd FN III+), 무수초섬유의 축삭막에서 분포되어 있음이 보고되었다(Davis et al., 1996). 또한 neurofascin의 세포질영역은 다른 L1 소집단의 CAMs와 마찬가지로 세포내에 ankyrin 결합부위를 공통적으로 함유하고 있다(Davis et al., 1993; Davis & Bennett, 1994; Dubreuil et al., 1996).

신경발생 및 재생의 과정에서 특이적으로 분포하여 그 기능이 매우 흥미있는 neurofascin의 역할을 규명하기 위한 연구의 일환으로 본 연구에서는 면역세포 화학적 연구를 통해 세번째 FN III 영역과 mucin-like 영역을 함께 인식하는 neurofascin (186 kD & 155 kD)의 말초신경에서의 분포를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

수초형성과정에 따른 좌골신경의 형태적 변화를 관찰하기 위해 Sprague-Dawley 랫드 30마리를 실험환경에 적응시켜 사용하였으며, 생후 5일령, 14일령, 8주령에서 각각 10마리씩 희생시켜 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 사료와 음수는 충분히 공급하였다.

### 면역형광염색

실험동물은 에테르 흡입마취하에 4% paraformaldehyde를 사용하여 심장을 통해 관류고정하였다.

대퇴상부에서 좌골신경을 노출시킨 후, 신경을 절취하여 동일한 고정액에 2시간 실온에서 침적시켜 흔들 어주며 고정시켰다. 고정이 끝난 조직은 PBS에 15분씩 3회 수세한 후 5, 10, 15% sucrose 용액에 각각 처리한 후 OCT compound에 포매하였다. 동결절편기로 10 $\mu$ m 절편을 작성하였으며, 얻은 절편은 TESPA 코팅된 슬라이드에 올려놓고 실온에서 2시간 건조 후 면역염색에 사용하였다.

신경절편을 PBS에 짧게 수세하여 OCT compound를 제거한 다음 10% goat serum in 0.2% gelatin, 0.3% Triton X-100 in PBS (buffer A)에 1시간 block한 후 4% goat serum in buffer A에 1:4000으로 희석된 goat anti-rabbit neurofascin (Dr. Brophy, Univ. of Edinburgh)에 하루밤 incubation한 후 buffer A에 20분씩 3회

수세하였다. 4% goat-serum in Buffer A에 1 : 200으로 희석된 goat anti-rabbit FITC (Cappel)에 실온에서 3시간 incubation한 다음 PBS에 5분씩 4회 수세하였다. PBS를 제거하고 적절하게 말린 슬라이드를 Vecta-shield를 점적하여 coverslip을 씌우고 형광현미경과 공초점주사현미경 (Confocal Laser Scanning Microscope, Model: BIO-RAD, MRC1024)으로 관찰하였다.

Teased fiber의 제작은 위에 기술한 방법으로 절취한 좌골신경조직을 고정처리후 PBS에 10분간 4회 수세한 다음 신경바깥막을 제거한 후 0.1% Triton X-100에 3시간 방치한 후 침구바늘을 사용하여 신경섬유를 입체현미경하에서 분리하였다.

### 면역전자현미경염색

실험동물을 에테르 마취하에 4% paraformaldehyde-0.2% glutaraldehyde 혼합액으로 심장을 통해 관류고정하였다. 대퇴상부에서 각각의 좌골신경을 절취하여 동일한 고정액에 3시간 침적 고정한 후 0.1 M phosphate buffer에 10분씩 3회 수세한 다음 30, 50, 70, 90, 100% ethanol에 각각 2분씩 짧게 탈수하였다. 50% LR gold monomer와 50% ethanol 혼합액에서 30분, 70% LR gold monomer와 30% ethanol 혼합액에서 1시간, 100% LR gold monomer에서 1시간 침투과정을 거친 후,  $-25^{\circ}\text{C}$ 에서 자외선등 (360 nm의 파장) 아래서 LR gold resin (London Resin Gold, Agar Scientific Ltd., U.K.)에 24시간 포매하였다. Ultramicrotome (LKB-Ultracut E, Germany)으로 1  $\mu\text{m}$  절편을 작성한 후 1% toluidine blue에 염색하여 광학현미경으로 관찰한 다음, 전자현미경으로 관찰할 부위를 선정하고 나머지 부분은 마름질한 다음, 60~70 nm의 두께로 초박절편을 얻었다. Formvar 코팅된 nickel grid에 초박절편을 올려놓은 다음 건조시킨 후 면역염색을 시행하였다. 초박절편을 PBS-Milk-Tween (0.1% PBS, 0.2% milk, 0.1% Tween 20)에 30분간 배경염색을 차단한 후, 1 : 200 goat anti-rabbit neurofascin에  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 반응시켰다.

PBS-BSA-Tween (0.1 M PBS, 0.2% BSA, 0.1% Tween 20)에 5회 수세한 후, 절편을 15 nm gold particles이 부착된 goat anti-rabbit IgG (British Biocell In-

ternational, U.K)를 1 : 50으로 희석해서 실온에서 2시간 반응시켰다. 절편을 PB-Tween (0.1 M phosphate buffer, 0.1% Tween 20)에 5회, 3차 증류수로 3회 각각 수세한 다음, 2.5% glutaraldehyde에 15분간 고정한 후, uranyl acetate와 lead citrate에 염색한 후 60 kV 가속전압 아래 JEOL 1200 EX II TEM으로 관찰하였다.

## 결 과

### 면역형광염색

면역형광염색을 실시한 좌골신경섬유의 세로단면에서 neurofascin의 면역반응이 확인되었다. 무수초축삭에서는 면역반응이 세로방향으로 좁고 길게 관찰되었으나 관찰이 용이하지는 않았다. 수초축삭에서는 비교적 강한 면역반응이 발현되는 부위가 간헐적으로 출현하였는데 (Fig. 4), 그 부위는 면역전자현미경염색에서 Ranvier 마디와 인접된 paranode인 것으로 밝혀졌다. 또한 약한 면역반응이 세로로 달리는 섬유의 주행 방향에 직각으로 국소적으로 관찰되었으며, 이것은 Schmidt-Lantermann incisure로 확인되었다 (Fig. 4).

Teased fibers에서도 유사한 면역반응을 관찰할 수 있었는데, 각각의 섬유들을 세로방향으로 분리시켜서 펼친 모양으로 절단표본에서보다 더욱 뚜렷한 면역반응의 추이를 관찰할 수 있었다. Teased fibers에서 간헐적으로 관찰되는 paranode에서 세로로 달리는 실처럼 매우 가는 고리를 확인할 수 있었는데, 이 고리는 면역전자현미경염색에서 바깥축삭사이막에 이어지는 고리인 것으로 보였다 (Fig. 5).

가로단면에서는 원주의 둘레를 따라가며 발현되는 강한 면역반응을 관찰할 수 있었는데, 이것으로 미루어 축삭의 형질내에서는 면역반응이 나타나지 않고 축삭막에서 면역반응이 발현하는 것으로 볼 수 있었다 (Fig. 6). 또한, 강하게 발현되는 면역반응의 부위는 paranode의 축삭막인 것으로 보였다. 그리고, 공초점현미경으로 조사한 neurofascin 면역반응의 강도는 출생 후 5일령 (Fig. 1)에 비해 출생 후 14일령에서는 조금 증가하는 양상을 보였고 (Fig. 2), 완전히 성장한 8주령에서는 14일령에 비해 큰 변화가 없는 것으로 나타났

다(Fig. 3).

### 면역전자현미경염색

전자현미경으로 관찰한 좌골신경은 수초섬유와 무수초섬유가 뚜렷이 구별되었고, 수초섬유와 무수초섬유 사이의 neurofascin 면역반응의 분포는 전혀 다른 양상을 보였다.

무수초신경섬유에서는 좌골신경의 축삭막에 광범위하게 neurofascin 면역반응을 관찰할 수 있었고, Schwann 세포의 세포질에서는 neurofascin의 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

수초신경섬유에서는 전형적인 Ranvier 마디를 확인할 수 있었으며, Ranvier 마디와 paranode에서 축삭막을 따라 neurofascin 면역반응이 관찰되었다(Fig. 9).

Paranode를 지나 길게 확장되어 있는 신경마디사이에서는 축삭막에서 neurofascin 면역반응을 관찰할 수 없었다. 그러나 신경마디사이에서도 수초가 치밀하게 형성되어 있지 않은 수초층의 틈새부위인 Schmidt-Lantermann incisures에서는 도처에서 neurofascin 면역반응이 관찰되었다(Fig. 11). Paranode에서 Schwann 세포의 막이 고리를 형성하여 축삭막에 접하는 paranodal loop를 볼 수 있었으며, 이 paranodal loop에서는 neurofascin 면역반응이 뚜렷이 확인되었다(Fig. 9).

치밀하게 형성된 수초층에서는 neurofascin 면역반응을 전혀 볼 수 없었으나, Schwann 세포의 막이 서로 치밀하게 접하고 있지 않은 바깥축삭사이막에서 neurofascin 양성반응을 확인할 수 있었고(Fig. 8), Schwann 세포의 나선형 감김이 느슨하여 아직 치밀한 수초층을 형성하지 못한 바깥축삭사이막에 가까운 Schwann 세포막에서는 neurofascin 면역반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 12). 따라서 랫드의 수초좌골신경섬유에서 전자현미경으로 관찰된 neurofascin 면역반응의 발현부위를 요약해보면 Ranvier 마디에서 paranode로 이어지는 축삭막(Fig. 9), paranodal loop의 Schwann 세포막(Fig. 9), Schmidt-Lantermann incisure(Fig. 11), 속축삭사이막(Fig. 10), 바깥축삭사이막(Fig. 8) 등으로 이는 Schwann 세포막이 치밀하게 밀착되어 있지 않은 부위라는 공통점이 있다.

## 고 찰

최근들어 세포내의 신호전달계에 대한 해석이 흥미를 끌게 되면서 세포부착분자(cell adhesion molecules; CAMs)에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데, 일반적으로 CAMs은 신경세포에서 축삭과 신경아교세포 사이의 접촉의 시발과 신호전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. LI 소집단에 속하는 neurofascin은 닭의 축삭에 관련된 표면당단백질로 처음 발견되었는데(Rathjen et al., 1987), 신경섬유의 발생과정이나 손상섬유의 재생이 일어날 때 축삭의 성장에 어떤 역할을 하는 것으로 보고되어 있고, 또한 신경섬유의 발달단계에서 신경아교세포와 축삭의 인지에 중요한 역할을 하는 단백질로 생각되어 왔다.

Neurofascin은 신경계통에 존재하는 CAM의 하나로 186 kD, 155 kD 및 140 kD의 3가지 isoform이 알려져 있고, 그 발현양상이 세포의 종류 및 발달단계에 따라 매우 특이적이어서 흥미를 끌고 있다. 3가지 isoform은 모두 Ranvier 마디에서 교차반응이 강하게 일어나는 것으로 알려져 있다(Davis et al., 1993).

중추신경계통에서 155 kD neurofascin은 수초형성의 시발과 함께 oligodendrocytes에서 일시적으로 강하게 발현한다. Oligodendrocytes에서 수초형성 초기에 neurofascin의 급격한 증가가 있으나, 어느 정도 시간이 경과하면 그 발현이 갑자기 줄어들면서 성숙한 동물에 이르기까지 주로 신경세포에 분포하게 된다(Collinson et al., 1998). Collinson et al. (1998)은 소뇌와 뇌량의 섬유로에서 생후 4일에 155 kD neurofascin의 발현이 나타나기 시작하여 생후 20일까지 발현이 증가하고, 또한 중추신경계통에서의 발현부위도 증가하는 것으로 보고했다.

20일령 이후에는 neurofascin의 발현이 감소하기 시작하여 32일령에서는 매우 급격한 감소를 보였음을 보고했다. Neurofascin의 발현 감소와 함께 중추신경계통의 수초에서 많이 존재하는 proteolipid protein (PLP)의 발현이 상대적으로 증가함은 수초의 형성과 함께 neurofascin의 발현감소가 일어남을 암시하는 것이다.

말초신경에서는 neurofascin의 발현양상에 대한 연

구가 많지 않다. Davis et al. (1996)은 155 kD neurofascin이 무수초축삭에서 발현한다고 했으며, Davis et al. (1993)은 좌골신경에서 가장 많이 존재하는 형태의 isoform은 155 kD neurofascin으로서 Ranvier 마디에서 발현함을 보고했다. 또한, Tait et al. (2000)은 155 kD neurofascin이 수초형성시 축삭의 싸임과 동시에 Caspr1과 함께 수초층의 paranode에 집중되는 것으로 보고했고, Davis et al. (1996)도 155 kD neurofascin이 paranode에 분포함을 보고했다.

본 연구에서 저자들은 랫드 좌골신경에서 155 kD 및 186 kD isoform을 함께 가진 (mucin/3rd FN III) neurofascin의 분포를 면역세포화학적으로 추구하여 몇 가지 특이한 분포양상을 발견하였다.

먼저 무수초섬유의 축삭막에서는 neurofascin의 면역반응이 광범위하게 관찰되어 155 kD isoform에 의해 인식됨을 추정할 수 있는데, 이는 Davis et al. (1996)의 연구결과와 일치하는 것이다. 수초섬유에서는 매우 특이한 발현양상을 나타내었는데, 본 연구에서 면역전자현미경으로 관찰된 수초신경섬유의 neurofascin 면역반응의 발현부위는 Ranvier 마디에서 paranode로 이어지는 축삭막에서 강하게 발현하였고, paranodal loop의 Schwann 세포막에서도 많은 면역반응을 볼 수 있었다.

그러나, Schmidt-Lantermann incisure, 속축삭사이막, 바깥축삭사이막 등에도 면역반응이 확인되었는데, 이는 공통적으로 Schwann 세포막이 치밀하게 밀착되어 있지 않은 부위인 것으로 요약할 수 있다. 또한, 수초가 형성되면서 층판으로 감아도는 Schwann 세포의 세포막이 속층에서는 수초화하고 바깥층이 아직 수초화하지 않은 모습을 관찰할 수 있었는데, 수초화가 일어난 안쪽에서는 neurofascin 면역반응이 관찰되지 않았고, 수초화가 진행되지 않은 바깥쪽에서는 neurofascin의 면역반응을 보인 것은 Schwann세포의 막이 치밀하게 수초화하면서 neurofascin 분자가 신속하게 사라짐을 의미하는데 그 원인에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

속축삭사이막과 바깥축삭사이막은 Schwann 세포의 세포막이 수초를 감아 들어가면서 마지막까지 밀착되지 않고 남아있는 고리형의 구조인데, 수초형성이 일어나는 과정이나 또는 수초형성후에도 밀착하지 않은

세포막의 고리로 남아 있다. 본 실험의 면역형광염색에서 neurofascin 항체에 가늘게 염색된 고리가 paranode에서 신경마디사이쪽으로 길게 뻗어나가는 것은 치밀하게 접착되어 있지 않은 Schwann 세포의 막으로 생각되고, 속축삭사이막 또는 바깥축삭사이막에 연결되는 것으로 보인다.

수초축삭의 경우 이미 형성된 수초층과 수초형성이 진행되고 있는 부위에는 neurofascin의 발현이 나타나지 않고, 수초형성이 일어나기 전에는 축삭막에서 neurofascin이 발현됨은 특징적인 현상이다. 본 실험에서 5일령 신경섬유의 세로단면에서 수초형성이 진행되고 있는 모습을 관찰할 수 있었는데, 아직 부분적으로 수초가 형성되어 있지 않은 부위에서는 축삭막에 neurofascin의 발현이 뚜렷이 관찰되었으나, 수초가 형성되고 있는 부위에서는 neurofascin의 면역반응이 관찰되지 않았다.

이것은 말초신경에서 수초형성전에는 폭넓게 분포하던 neurofascin이 수초형성이 시작되면서 분포가 급격하게 변하여 결국 세포막이 치밀하게 밀착되어 있지 않은 부위에서만 국재하는 경향을 보여준다. 이렇게 수초형성이 시작되면서 neurofascin의 분포가 급격하게 변하는 원인에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

Neurofascin이 Schmidt-Lantermann incisure에서 발현되는 것은 지금까지 보고된 바 없었다. 말초신경에서 정상 및 병적인 상태에서 Schmidt-Lantermann incisure에 대한 연구가 이루어져 왔으나 (Gabriel & Allt, 1981; Copper & Kidman, 1984; Krinke et al., 1986; Small et al., 1987; Reynolds & Heath, 1995), 아직 그 정확한 기능에 대해서는 밝혀지지 않았다. Gabriel & Allt (1981)는 Schmidt-Lantermann incisure는 수초층의 대사적 기능을 유지하고, 수초층을 통하여 축삭으로 대사산물의 수송에 관여하고, 수초분질의 세로성장 에 관여하며, 축삭내에서 물질의 연동성 이동에 작용하는 것으로 보고되었다.

본 연구에서 저자들은 neurofascin이 Schwann 세포의 세포막이 수초를 형성하면서 치밀하게 결합하지 않아 주치밀선이 형성되지 않은 부위인 Schmidt-Lantermann incisure, paranodal loop, 속축삭사이막, 바깥축삭사이막 등에 특이적으로 분포함을 알게 되었다.

Neurofascin은 이러한 부위에서 국소적으로 세포막의 치밀화를 방지하여 세포막의 일정한 간격을 유지하고 안정화시키며, 수초층 사이에서 물질교환등에 어떤 역할을 하는 것으로 사료된다. 본 연구를 통하여 paranodal loop에 분포하는 isoform은 155 kD인 것으로 알 수 있으나 Schmidt-Lantermann incisure와 축삭사이막, 바깥축삭사이막 등에 분포하는 isoform에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

### 참 고 문 헌

- Cunningham BA: Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr Opin Cell Biol* 7 : 628-633, 1995.
- Grumet M, Mauro V, Burgoon MP, Edelman GM, Cunningham BA: Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 113 : 1399-1412, 1991.
- Hortsch M: The L1 family of neuronal cell adhesion molecules: Old proteins performing new tricks. *Neuron* 17 : 587-593, 1995.
- Rathjen FG, Schachner M: Immunocytochemical and biochemical characterization of a new neuronal cell-surface component (L1-antigen) which is involved in cell-adhesion. *EMBO* 3 : 1-10, 1984.
- Volkmer H, Hassel B, Wolff JM, Frank R, Rathjen FG: Structure of the axonal surface recognition molecule neurofascin and its relationship to a neural subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J Cell Biol* 118 : 149-161, 1992.
- Rathjen FG, Wolff JM, Chang S, Bonhoeffer F, Raper JA: Neurofascin: A novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell* 51 : 841-849, 1987.
- Shiga T, Oppenheim RW: Immunolocalization studies of putative guidance molecules used by axons and growth cones of intersegmental interneurons in the chick embryo spinal cord. *J Comp Neurol* 310 : 234-252, 1991.
- Moscato LM, Sanes JR: Expression of 4 immunoglobulin superfamily adhesion molecules (L1, Nr-CAM/Bravo, neurofascin/ABGP, and N-CAM) in the developing mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 352 : 321-334, 1995.
- Davis JQ, Lambert S, Bennett V: Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FN III domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 135 : 1355-1367, 1996.
- Davis JQ, Bennett V: Ankyrin-binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 269 : 27163-27166, 1994.
- Davis JQ, McLaughlin T, Bennett V: Ankyrin-binding proteins related to nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intracellular connections in adult brain. *J Cell Biol* 121 : 121-133, 1993.
- Dubreuil RR, MacVicar G, Dissanayake S, Liu C, Homer D, Hortsch M: Neuroglial-mediated cell adhesion induces assembly of the membrane skeleton at cell contact sites. *J Cell Biol* 133 : 647-655, 1996.
- Collinson JM, Marshall D, Gillespie CS, Brophy PJ: Transient expression of neurofascin by oligodendrocytes at the onset of myelinogenesis: Implications for mechanisms of axon-glia interaction. *Glia* 23 : 11-23, 1998.
- Tait S, Gunn-More F, Collinson JM, Huang J, Lubetzki C, Pedraza L, Sherman DL, Colman DR, Brophy PJ: An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glia junction. *J Cell Biol* 150(3) : 657-666, 2000.
- Cooper NA, Kidman AD: Quantitation of the Schmidt-Lantermann incisures in juvenile, adult, remyelinated and regenerated fibers of the chicken sciatic nerve. *Acta Neuropathol* 64 : 251-258, 1984.
- Gabriel MN, Allt G: Incisures of Schmidt-Lanterman. *Prog Neurobiol* 17 : 25-58, 1981.
- Krinke G, Grieve AP, Schnider K: The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol* 69 : 168-170, 1986.
- Reynolds RJ, Heath JW: Patterns of morphological variation within myelin internodes of normal peripheral nerve: quantitative analysis by confocal microscopy. *J Anat* 187 : 369-378, 1995.
- Small JR, Ghabriel MN, Allt G: The development of Schmidt-Lantermann incisures: an electron microscope study. *J Anat* 150 : 277-286, 1987.

### < 국문초록 >

Neurofascin은 L1CAM의 하나로 신경섬유의 발달과정

에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 말초신경의 수초형성과 관련된 neurofascin의 역할을 알아볼 목적으로 면역형광염색과 면역전자현미경기법을 이용하여 랫드의 수초좌골신경섬유에서 neurofascin의 분포를 추구하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 수초형성이 진행됨에 따라 좌골신경섬유에서 neurofascin 분포는 매우 심하게 변화되었다.

2. 수초신경섬유에서 neurofascin은 Ranvier 마디에서 약하게 국재하였다.

3. Neurofascin은 수초신경섬유의 paranodal loop, Schmidt-Lantermann incisure, 속축삭사이막, 바깥축삭사이막처럼 Schwann 세포의 막이 밀착되지 않은 부위에서도 뚜렷하게 국재하였다.

이상의 연구결과로 neurofascin은 Schwann 세포의 마주보는 막사이에 이상적인 간격을 유지하는데 어떤 역할을 하는 것으로 생각되며, 수초층에서 물질이동이 가능하게 하는 것으로 보인다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Immunofluorescence of neurofascin in 5 days old rat longitudinal sectioned sciatic nerve. Neurofascin is expressed intermittently in the nerve fibers (arrow). Confocal images were acquired on a Bio-Rad MRC 1024 confocal microscope. bar=25  $\mu$ m
- Fig. 2.** Immunofluorescence of neurofascin in 14 days old longitudinal sectioned rat sciatic nerve. Neurofascin is expressed more strongly (arrow) than 5 days group. Confocal images were acquired on a Bio-Rad MRC 1024 confocal microscope. bar=25  $\mu$ m
- Fig. 3.** Immunofluorescence of neurofascin in 8 weeks old rat longitudinal sectioned sciatic nerve. Neurofascin expression (arrow) pattern is similar to the 14 days group. Confocal images were acquired on a Bio-Rad MRC 1024 confocal microscope. bar=25  $\mu$ m
- Fig. 4.** Immunofluorescence of neurofascin in 8 weeks old rat longitudinal sectioned sciatic nerve. Neurofascin expression is clearly observed in the paranodes (arrow head) and Schmidt-Lantermann's incisures (arrow). bar=50  $\mu$ m
- Fig. 5.** Immunofluorescence of neurofascin in 8 weeks old rat sciatic nerve. Teased fibers. Nodes of Ranvier are shown. The node is revealed as a cleft and neurofascin is strongly expressed in the paranodes (arrow head). A narrow band which is likely to be connected to inner and outer mesaxons expresses neurofascin immunoreactivity (arrow). bar=10  $\mu$ m
- Fig. 6.** Immunofluorescence of neurofascin in 8 weeks old rat cross sectioned sciatic nerve. Neurofascin expresses around the axonal circumference (arrow heads) strongly, not in the axoplasm and myelin sheath. bar=10  $\mu$ m
- Fig. 7.** Post-embedding immunoelectron micrograph of neurofascin in 14 days old rat sciatic nerve. Unmyelinated fiber (UM) expresses neurofascin strongly in the axolemma (arrow heads), but myelinated fiber (M) doesn't express neurofascin in the axolemma at all. SC; Schwann cell cytoplasm. bar=200 nm
- Fig. 8.** Post-embedding immunoelectron micrograph of neurofascin in 14 days old rat sciatic nerve. Neurofascin immunoreactive gold particles are labeled in the outer mesaxon (arrow heads). My; compact myelin sheath. bar=200 nm
- Fig. 9.** Post-embedding immunoelectron micrograph of neurofascin in 14 days old rat sciatic nerve. Node (N) and paranodal loops (PL) are shown. Many neurofascin immunoreactive gold particles are localized in the nodal axolemma (arrows). Neurofascin expression was revealed in the paranodal loops as well. bar=500 nm
- Fig. 10.** Post-embedding immunoelectron micrograph of neurofascin in 5 days old rat sciatic nerve. Neurofascin immunoreactive gold particles are labeled in the inner mesaxon (arrow head). My; compact myelin sheath. bar=200 nm
- Fig. 11.** Post-embedding immunoelectron micrograph of neurofascin in 14 days old rat sciatic nerve. Neurofascin immunoreactive gold particles are labeled in the Schmidt-Lantermann incisure (arrow heads). My; compact myelin sheath. bar=200 nm
- Fig. 12.** Post-embedding immunoelectron micrograph of neurofascin in 14 days old rat sciatic nerve. Non-compact myelin layer which is composed of apposing Schwann cell membranes expresses neurofascin immunoreactivity (arrow heads), but compact myelin layer doesn't express neurofascin at all. bar=200 nm





