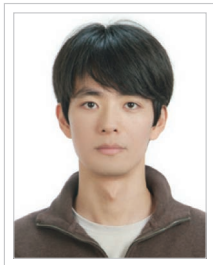


## 특별 기고

# 뇌과학을 위한 최신 광학이미징 동향



박정훈

울산과학기술원, 생명공학과  
✉ jh.park@unist.ac.kr

### 본문



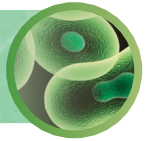
광학 이미징이란 말 그대로 빛을 이용하여 목표 대상을 가시화하는 모든 방법들을 일컫는다. 광학 이미징은 빛 중에서도 특히 가시광선 영역대의 파장을 사용함으로써 생기는 여러가지 장점들을 지니고 있어 생물학 연구에서 필수적으로 사용되고 있다. 지구 위 대부분의 생물들은 태양광 에너지를 통해 살아갈 수 있도록 진화하였으며, 이에 따라 가시광선대역의 빛을 이용하여 세포에 대한 손상 없이 살아있는 생체조직의 정밀한 측정이 가능하다. 현대 뇌과학 역시 많은 부분 뇌의 구조와 활동에 대한 정밀한 가시화에 의존하고 있다. 뇌는 생체조직 중에서도 매우 특수한 기관으로, 특히 개별 뇌세포 수준의 연구만으로는 뇌의 작동 원리를 절대로 이해할 수 없다는 큰 난제를 안고 있다. 이러한 난제를 풀기 위해 뇌 전체를 이루고 있는 모든 세포들을 동시에 측정하여 서로의 연관관계를 완벽히 밝히는 것이야말로 여느 뇌과학자의 궁극적인 꿈일 수 있을 것이다. 허나 현대 과학기

술로 이는 불가능한 상황이기 때문에 이에 준하는 지식을 취하기 위해 조금씩 나아가고 있는 실정이다. 이러한 상황에서 뇌과학의 발전을 위한 새로운 이미징 기술들의 개발은 필수적인 상황이 되었으며, 이러한 현실을 반영하여 최근 미국의 BRAIN (Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies) Initiative, HHMI Janelia 연구소 등의 거대 프로젝트들 역시 새로운 광학 이미징 기술들의 개발에 상당한 예산을 투자하고 있다. 본 기고문에서는 이에 발맞추어 뇌연구를 위해 개발된 최신 이미징 기법들에 대해 소개하고자 한다.

### Connectomics



뇌는 각각의 뉴런이 개개의 역할을 독립적으로 수행하는 것이 아니라 서로 긴밀한 네트워크를 이루어 함께 작동한다. 이에 따라 많은 뇌과학자들은 뇌를 이해하기 위한 첫번째 단계로

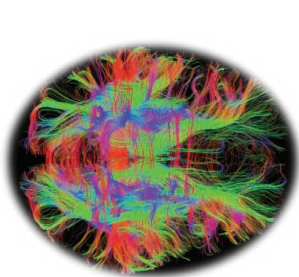


뇌의 3차원 연결구조를 정확히 매핑하는 것을 손 꼽는다. 이는 곧 모든 뇌세포의 연결구조에 대한 지도를 얻는 것을 말하며, 이를 이른바 커넥토믹스(connectomics)라 부른다. 1세대 커넥토믹스, 특히 인간의 뇌의 연결구조에 대한 직접적인 연구는 MRI를 이용한 diffusion tensor imaging을 기반으로 이루어졌으며, 뇌에 존재하는 신경다발들의 경로를 영상화하여 뇌의 각 영역간 연결성을 가시화하였다. 이는 백질(white matter)을 구성하는 축삭돌기의 myelin sheath에 의해 물 분자들이 diffusion하는 방향성이 축삭돌기와 나란해짐을 이용한 것으로, 인간의 뇌 전체에 대한 비침습적인 fiber tracking을 가능케 하였다. 허나 MRI는 뉴런 하나하나를 분석할 수 있는 해상도를 제공할 수 없으므로 각각의 단일 뉴런과 뉴런 사이의 연결구조인 시냅스를 관찰하기 위해서는 보다 높은 해상도의 영상기법이 필요하다.

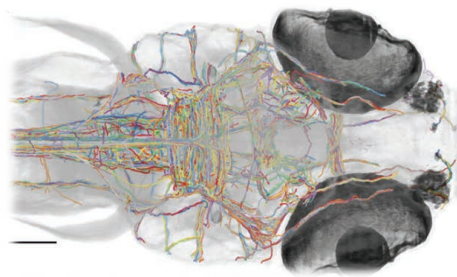
이와 같은 한계점을 해결하기 위해 전자현미경을 이용한 커넥토믹스 연구 역시 활발히 진행되고 있다. 전자현미경은 시냅스는 물론 단일 신경전달물질까지 영상화할 수 있는 해상도를 지닌다. 허나 고분해능을 유지하기 위해서는 약 100

나노미터 정도의 두께로 샘플을 절편하여 뇌의 부분 부분을 순차적으로 측정해야 한다는 기술적 한계점을 지니고 있다. 이러한 단점으로 인해 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 경우 커넥토믹스 전체를 얻기까지 10여년의 연구기간이 소요되었다(1). 최근에는 multi-beam 전자현미경과 자동 절편 기술의 발달로 상당한 속도 향상이 구현되어 zebrafish 유충의 뇌 전체를 영상화하는데까지 성공하였다(측정시간 100일 소요)(2). 허나 이와 같은 하드웨어의 발달로 전자현미경을 통해 얻을 수 있는 데이터 수집 속도는 향상되었지만, 전자현미경으로 측정된 이미지는 분자 특이성이 없으므로 실험적으로 얻어진 빅 데이터에서 각각의 뉴런들을 tracing하는데 상당한 전문 인력의 man-hour가 추가적으로 투입되어 실제 측정시간보다 훨씬 더 많은 노동력을 요하는 실정이다. 이와 같은 문제로 마우스와 같은 포유류의 뇌 전체를 전자현미경으로 측정하고 분석하기에는 아직까지는 현실적으로 어려운 상황이다.

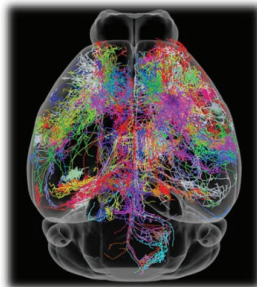
최근 커넥토믹스에 활발히 응용되고 있는 광학 이미징 기술들은 MRI와 전자현미경의 중간 정도의 특성을 보인다. 시냅스를 구성하는 수상돌기가지(dendritic spine)를 영상화할



McGovern Institute for Brain Research



Hildebrand et al., Nature (2017)



Mouselight, Janelia Research Campus (2017)

그림 1. MRI, 전자현미경, 광학이미징으로 영상화한 커넥토믹스.

수 있는 1 마이크로 이하의 해상도를 제공할 수 있으며, 수십~수백 마이크로 정도의 두께로 절편된 뇌조직을 고해상도로 이미징할 수 있어 측정시간을 전자현미경에 비해 대폭 줄일 수 있다는 장점이 있다. 뿐만 아니라 광학 이미징의 경우 다양한 contrast를 이용하여 신호를 측정할 수 있다는 특징이 있다. Optical coherence tomography(OCT), Raman 산란, holography 등의 이미징 기술의 경우 뇌조직의 intrinsic 산란신호를 이용하여 뇌를 이미징 할 수 있으며, 형광 현미경 기술들은 다양한 형광 탐침자(fluorescent probe)를 이용하여 분자 선택적(molecular specific)인 영상을 얻을 수 있다.

현재 커넥톰 연구에 있어서 광학 이미징의 가장 큰 한계는 뇌조직에 의한 빛의 산란이다. 뇌조직의 불균일한 굴절률 분포로 인해 뇌 내부에서의 빛의 경로는 무작위적으로 흐트러지게 된다. 이에 따라 뇌 심부로 도달할수록 이미징 해상도가 급격히 저하되어 큰 부피의 조직에 대한 고해상도 이미지를 구현하기 어렵다. 이러한 문제를 해결하기 위해 커넥톰을 위한 광학 현미경에는 일반적으로 vibratome을 결합하여 뇌조직의 상단부를 이미징한 후 절편, 제거하여 다음 층을 이미징하는 형식을 취하고 있다. 대부분의 광학 현미경 기법들이 이와 같은 구조 변경에 적합하므로 현재까지 OCT, 다광자 현미경, 단광자 structured illumination, 빔평면 현미경, 공초점 현미경 등의 다양한 기술들이 커넥톰스에 활용되었다. 이들 기술들은 각각의 이미징 기술의 특성 및 해상도에 따라 다광자 현미경의 경우 8-10 일(3), 단광자 structured illumination의 경우 3 일(4, 5), 빔평면 현미경의 경우 수시간만에(6) 마우스 뇌 전체를 이미징할 수 있다는 장점이 있다. 특히 형광신호를 사용할 경우 특정 뇌 세포들만 형광을 발현시켜 관찰할 수 있으므로 데이터 취득 후 네트워크 분석이 MRI 또는 전자현미경에 비해 훨씬 용이하다는 장점이 있다.

### Functional Imaging

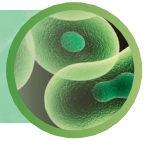


광학 이미징은 비단 뇌의 구조적 특성을 파악하는데에만 국한되지 않는다. 실제로 뇌의 구조적 특성을 완벽히 파악한다고 해서 뇌를 완벽히 이해했다고 말할 수는 없다. 예쁜 꼬마선충의 경우 뇌세포 전체에 대한 커넥톰이 밝혀졌지만 아직까지도 우리는 예쁜 꼬마선충의 뇌의 작동원리를 모두 이

해하지 못하는 실정이다. 이러한 상황에서 광학 이미징은 뇌의 구조적 지도 뿐만 아니라 실제 기능까지 동시에 측정할 수 있다는 커다란 장점을 지니고 있다. 뇌의 기능에 대한 가시화를 뇌 활성 지도라고 부르며 이를 획득하기 위해서는 커넥톰에서와는 달리 실제 뇌가 작동하는 환경에서 뇌세포의 활성신호를 직접 측정해야 한다. 뉴런은 전기적 신호를 통해 정보를 전달하므로 기존 뇌활성 관련 연구를 위한 전통적인 강자는 전기생리학적 방법들이었다. 이는 전도성 탐침을 목표 뉴런에 접합하여 막전위를 직접 측정하는 방식으로 단일 활동전위(action potential)를 측정할 수 있는 밀리초 이하의 시간 분해능을 자랑한다. 최근에는 실리콘 기반 미세탐침이 개발되어 350개의 독립적인 센서를 통한 전기신호를 동시에 측정할 수 있는 기기가 개발된 바 있다(7).

하나 신경생리학적 측정 방법들은 실제로 탐침을 뇌에 접촉시켜야 한다는 침습성 때문에 3차원 공간에 퍼져 있는 여러 세포의 활성 신호를 임의로 동시에 측정하기 어렵다는 단점이 있다. 이러한 단점들을 극복하기 위해 최근에는 뉴런의 활성신호를 측정하기 위한 다양한 형광 탐침자의 개발이 활발하다. 주변 환경의 전압 변화에 따라 형광의 세기가 변하는 전압 탐침자의 경우 전기생리학에 버금가는 시간 분해능으로 단일 활성신호를 측정할 수 있는 시간 분해능을 자랑한다. 하나 기존 전압 탐침자의 경우 형광 신호 자체가 워낙 작아 배양된 단일 뉴런에서 반복적인 실험을 통해 신호 대 잡음을 키워야 한다는 단점이 있었다. 최근 개발된 전압 탐침자의 경우 신호 대 잡음을 비약적으로 향상시켜 in-vivo 상황에서도 뇌신호를 측정할 수 있는 수준까지 발달이 이루어졌으나(8) 아직까지도 신호 대 잡음비의 한계로 인해 뇌 심부 이미징에 곧바로 적용하기에는 한계가 있는 상황이다.

이를 극복하기 위해서는 세포막 내외부 사이의 전압 차이를 직접적으로 측정하기 보다는 전기적 활성신호와 동반되는 세포내 칼슘 이온 농도의 증가를 이용하는 간접적인 방법이 in-vivo 광학 이미징에서는 주로 사용되고 있다. 특히 최근 각광받고 있는 genetically encoded calcium indicator(GECI)는 유전적 표적이 가능하기 때문에 특정 세포에만 선택적으로 형광을 발현하여 contrast 및 신호대 잡음을 향상시킬 수 있다는 장점이 있다. 현재 가장 널리 쓰이고 있는 GCaMP6의 경우 resting potential에서의 background 형광 신호를 최소화하고 단일 활동전위에 대해서 background 대비 약 20%의 형광 세기 증가를 보여 in-vivo 심부 뇌이미



징에도 적용되고 있다(9). 이는 빛을 이용하여 이온 채널을 열고 닫을 수 있는 광유전학(optogenetics)과(10) 함께 최근 뇌의 자극과 반응에 대한 연구를 능동적으로 구현할 수 있는 새로운 창구가 되었다.

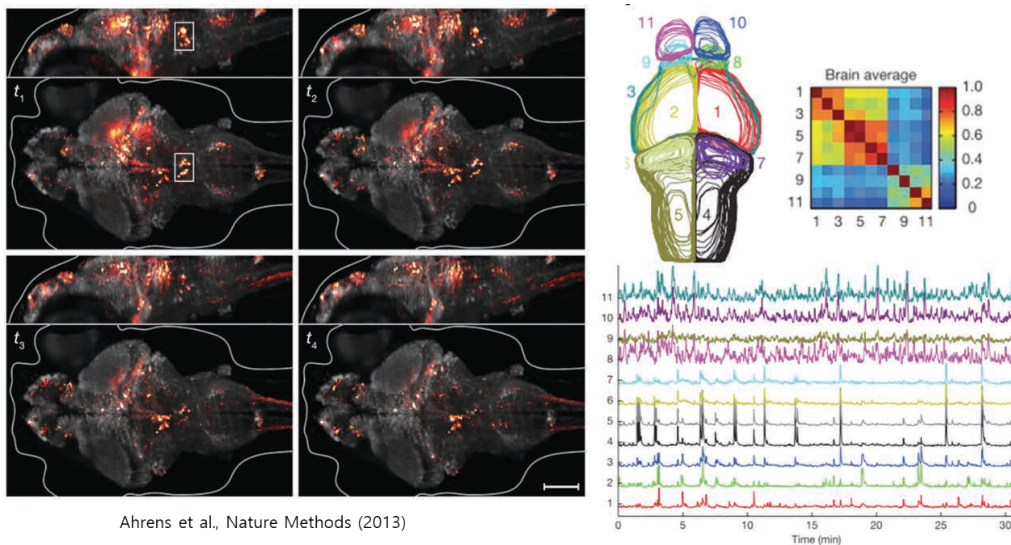
**Faster**



다른 바이오 이미징 분야에 비해 뇌이미징에서는 특히 3차원 깊이별 selectivity가 필수적이다. 이는 하나의 뉴런 바로 위에 분포하는 또다른 뉴런은 서로 전혀 상관 없이 또는 아주 강한 상관관계를 갖고 작동할 수 있기 때문에 이들 세포들의 활성화 신호를 독립적으로 측정해야 하기 때문이다. 이상적인 광학 이미징 시스템은 이러한 점을 해결하기 위해 3차원 등방향 해상도 및 깊이별 selectivity를 동시에 지녀야 한다. 허나 광학 이미징 렌즈는 2차원 평면으로 이루어져 있는 개구를 통해서만 정보를 제어 및 획득할 수 있으므로 일반적으로 깊이 방향 해상도는 이미지 평면 방향 해상도보다 수배 정도 낮다. 빛평면(lightsheet) 현미경은 이와 같은 문제를 해결하기 위해 입사되는 빛과 측정되는 빛을 제어하는 렌즈를 독립적으로 사용하여 특정 깊이에서만 형광이 여기

되도록 광학 설계를 이룬 시스템이다. 이 경우 일반적인 2차원 카메라를 이용하여 하나의 평면에서만 나오는 형광 신호를 동시에 측정할 수 있기 때문에 하나의 초점에서 나오는 신호를 순차적으로 측정하는 공초점 또는 다광자 현미경(기존 depth selective 현미경 기술들)에 비해 시간 분해능이 월등히 빠르다. 최신 SCMOS 카메라를 이용하면 100Hz 이상의 샘플링 속도로 각각의 평면을 촬영할 수 있으며 이에 따라 비교적 투명한 zebrafish 유충의 경우 몸 안에 분포하는 모든 뉴런(~100,000개)의 활성화 신호를 ~1초 마다 측정할 수 있다(11).

만약 이와 같은 시간 분해능도 불충분하다면 빛의 세기 뿐만 아니라 각도에 대한 정보까지 측정할 수 있는 light field microscopy(LFM)를 이용할 수 있다(12). LFM은 단 하나의 이미지만으로도 이미지 내에 촬영된 모든 뉴런의 3차원 분포에 대한 정보를 얻을 수 있다. 최근 LFM을 이용, 예쁜꼬마 선충의 모든 뉴런의 3차원 분포를 단 한장의 이미지로 촬영할 수 있음을 선보였으며, 이를 이용하여 20 Hz로 예쁜꼬마 선충의 모든 뉴런들의 활성화 신호 측정을 구현하였다. 허나 아직까지 LFM의 경우 빛의 각도 측정을 위한 추가적인 정보가 필요하여 공간 분해능은 타 광학 이미징 기법들에 비해 떨어진다는 단점이 있다.



Ahrens et al., Nature Methods (2013)

그림 2. 빛평면 현미경을 이용해 측정된 시간별 3차원 뇌 활성화지도, 세포단위로 활성화 신호를 측정하여 관심 지역별 correlation matrix를 추출.

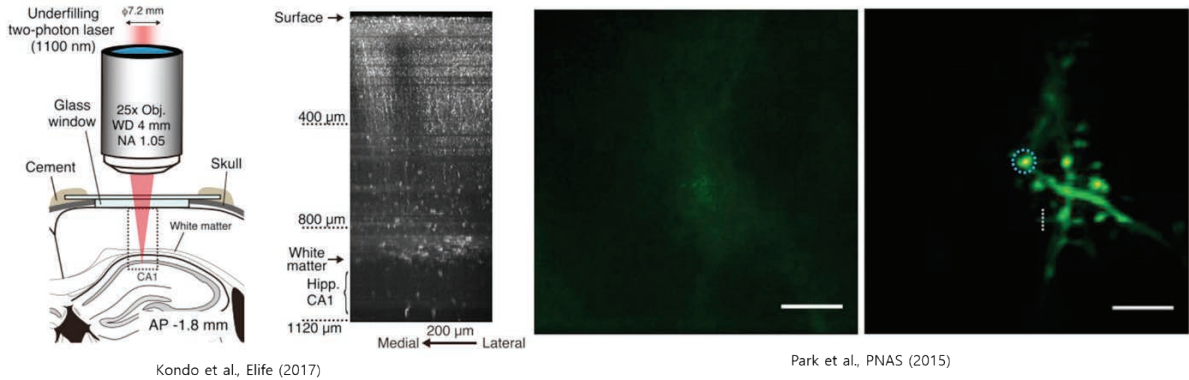


그림 3. (좌) Cranial window를 통한 장파장 이광자 현미경을 이용하여 CA1 영역까지 활성신호를 측정된 모습. (우) Cranial window 수술 없이 두개골을 그대로 통과하여 일반 이광자 현미경과 적응광학 이광자 현미경을 이용하여 이미징한 뉴런의 모습.

Deeper



현재까지 뇌과학에서 가장 널리 쓰이는 광학 이미징기술의 golden standard는 다광자 형광 기반 이미징 기술들이다(13). 이는 뇌 심부를 비침습적으로 관찰하기 위해서는 목표 지점을 뒤덮고 있는 추가적인 뇌조직을 빛이 통과해야 하기 때문이다. 앞서 언급한 바와 같이 뇌조직은 가시광선대역에서 산란이 매우 심한 물질이다. 하나 이광자 현미경을 사용할 경우 같은 형광 탐침자를 여기시키기 위해 단광자 현미경에 비해 약 2배 긴 파장의 빛을 사용하게 된다. 일반적으로 파장이 길어질수록 생체 조직에 의한 빛의 산란은 약해지므로 이광자 현미경은 단광자 현미경에 비해 보다 깊이(마우스 뇌의 경우 약 500 μm 정도) 세포단위 해상도로 관찰 가능해진다. 삼광자 현미경의 경우 이보다도 더 긴 파장을 사용하게 되므로 마우스의 경우 해마까지도 비침습적으로 관찰할 수 있게 된다 (14, 15). 이러한 논리로 접근해보면 점점 더 긴 파장을 이용할수록 보다 깊이 이미징할 수 있을 거라 생각할 수 있다. 하나 생체조직에 의한 이미지 품질 저하는 비단 산란 뿐만 아니라 빛의 흡수에 의해서도 일어난다. 뇌조직의 빛 흡수는 물에 의한 영향이 대부분이며 물의 흡수 스펙트럼은 적외선 대역의 경우 파장이 길어질수록 강해지는 특성이 있다. 이에 따라 빛의 산란과 흡수의 특성을 복합적으로 고려하여 일반적으로 1300 nm, 1700 nm 대역의 빛이 가장 뇌조직에 대한 침투능이 좋다고 알려져 있다. 이에 발맞추어

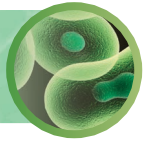
최근 많은 형광 탐침자들도 적색쪽으로 편이되어 활발히 개발되고 있으며, 뇌활성화 지도를 위한 GECI역시 RCaMP 등이 개발되어(16) 보다 깊은 뇌 심부에 대한 in-vivo 이미징을 가능케 하고 있다.

보다 긴 빛의 파장을 사용하는 것 외에도 입사되는 빛의 파면 자체를 제어하여 보다 높은 해상도를 유지한 채 뇌 심부까지 이미징 가능토록 하는 연구 역시 최근 활발히 진행 중이다. 이는 뇌 조직의 산란에 의해 왜곡된 빛의 파면을 광학적으로 보정하여 구현할 수 있으며, 생체 조직 등에 의해 생긴 광학수차에 적응하여 최상의 해상도를 유지할 수 있다하여 적응광학(adaptive optics)라 부른다(17). 최근 적응광학은 공초점 현미경, 이광자 현미경 등과 결합하여 두꺼운 뇌조직을 절편없이 고해상도로 관찰 가능케 하였다. 특히 적응광학 이광자 현미경의 경우 살아있는 마우스의 두개골을 통과하여서까지도 수상돌기까지를 구분할 수 있는 이미지 해상도를 복원할 수 있음을 선보였다(18).

맺음말



현대 뇌과학은 단일 뇌세포에 대한 연구에서부터 시작하여 점점 여러 뇌세포로 이루어진 네트워크에 대한 연구로 확대되고 있다. 이에 따라 관찰하고자 하는 영역은 계속 증가하는 반면 관찰해야 하는 최소 단위는 여전히 각 뉴런간 연결구조를



직접적으로 확인할 수 있는 수백 나노미터 정도의 해상도를 요하고 있다. 뿐만 아니라, 넓게 분포되어 있는 뇌세포 네트워크의 활성화지도를 이해하기 위해서는 넓은 영역에 대한 고속 고해상도 이미징 또한 필수적이다. 이러한 필요 요건들 하나 하나가 모두 최첨단 광학 이미징 기술들을 요하기 때문에 최근 많은 이미징 관련 전문가들이 뇌이미징을 위한 새로운 툴 개발에 참여하고 있다. 특히 최근에는 뇌연구에 필수적인 대면적, 고해상도 이미징을 위해 필수적인 고가의 특수 렌즈들의 개발(19), 공용량의 데이터 처리를 위한 전문인력 및 컴퓨팅 파워의 필요성(20) 등으로 인해 풍부한 자원을 자랑하는 연구센터 수준에서 괄목할 연구결과들이 주도적으로 나오고 있다. 허나 전자현미경 혹은 MRI에 비해 장비 구축을 위한 초기비용이 아직까지는 상대적으로 적기 때문에 연구실별 독립적인 아이디어 개발이 비교적 자유로워 연구실단위의 새로운 아이디어 개발 및 협업 또한 더욱 활성화될 것으로 예상된다.

## 참고문헌

- White JG, Southgate E, Thomson JN, & Brenner S (1986) The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 314(1165):1-340.
- Hildebrand DGC, et al. (2017) Whole-brain serial-section electron microscopy in larval zebrafish. *Nature* 545(7654):345-349.
- Economou MN, et al. (2016) A platform for brain-wide imaging and reconstruction of individual neurons. *Elife* 5:e10566.
- Li X, et al. (2018) Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(2):415-420.
- Gong H, et al. (2016) High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level. *Nat Commun* 7:12142.
- Tomer R, Ye L, Hsueh B, & Deisseroth K (2014) Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc* 9(7):1682-1697.
- Jun JJ, et al. (2017) Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature* 551(7679):232-236.
- Gong Y, et al. (2015) High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor. *Science* 350(6266):1361-1366.
- Chen TW, et al. (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499(7458):295-300.
- Lee D, Hyun JH, Jung K, Hannan P, & Kwon HB (2017) A calcium- and light-gated switch to induce gene expression in activated neurons. *Nat Biotechnol* 35(9):858-863.
- Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, & Keller PJ (2013) Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Methods* 10(5):413-420.
- Prevedel R, et al. (2014) Simultaneous whole-animal 3D imaging of neuronal activity using light-field microscopy. *Nat Methods* 11(7):727-730.
- Denk W & Svoboda K (1997) Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18(3):351-357.
- Horton NG, et al. (2013) In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nat Photonics* 7(3).
- Ouzounov DG, et al. (2017) In vivo three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain. *Nat Methods* 14(4):388-390.
- Kondo M, Kobayashi K, Ohkura M, Nakai J, & Matsuzaki M (2017) Two-photon calcium imaging of the medial prefrontal cortex and hippocampus without cortical invasion. *Elife* 6.
- Park JH, Kong L, Zhou Y, & Cui M (2017) Large-field-of-view imaging by multi-pupil adaptive optics. *Nat Methods* 14(6):581-583.
- Park JH, Sun W, & Cui M (2015) High-resolution in vivo imaging of mouse brain through the intact skull. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(30):9236-9241.
- Sofroniew NJ, Flickinger D, King J, & Svoboda K (2016) A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for in vivo imaging. *Elife* 5.
- Owens B (2017) The microscope makers. *Nature* 551(7682):659-662.

## 저자약력

### 박정훈

2003-2009

고려대학교 물리학과, 학사

2009-2014

한국과학기술원 물리학과, 박사

2014-2015

HHMI Janelia Research Campus, 박사후 연구원

2016-현재

울산과학기술원 생명공학과, 조교수