

原

著

マウス胎生期におけるカルビンジン D28k
遺伝子の発現：レポーター遺伝子を用いた
トランスジェニックマウスの解析

新潟大学医学部第二内科（主任：荒川正昭教授¹，桑野良三助教授²）
（新潟大学第二内科¹，新潟大学遺伝子実験施設²）

中 嶋 治 彦

The Spot35/Calbindin-D28K Gene Expression in the Transgenic Mice

Haruhiko NAKAJIMA

*Department of Internal Medicine (II),
Niigata University School of Medicine*

(Director: Ass. Prof. Ryozo KUWANO, Prof. Masaaki ARAKAWA)

Spot35/calbindin-D28K gene expression was examined in the early embryonic stages of transgenic mice. *E. coli* β -galactosidase was used as a reporter gene fused with the 3.9 kb promoter region in which transcription regulatory sequences and vitamin D response element located. The eight amino acid residues at N-terminal of β -galactosidase were replaced with SV40 nuclear localization signal to distinguish from endogenous β -galactosidase activity. The promoter driven β -galactosidase was discerned in nuclei of Purkinje cells in the cerebellum and distal renal tubes in the kidney. These expression pattern was compatible with the results obtained by immunocytochemistry with anti-Spot35 antibody. In this transgenic mouse the transgene expression was detected first on the tip of tail, limb buds and nose except for cerebellum, intestine and kidney where the protein is mainly present in adult. Immunohistochemical analyses against Spot35/calbindin antiserum showed coincident with the lacZ expression in these tissues. These findings might provide a new aspect concerning biological function of this protein in the early embryonic stages.

Key words: Spot35/Calbindin-D28k, Transgenic mouse β -galactosidase, Embryo

Spot35 蛋白/Calbindin-D28k, トランスジェニックマウス β -ガラクトンダーゼ, 胎児

Reprint requests to: Haruhiko NAKAJIMA,
Department of Internal Medicine (II),
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951-8510, JAPAN.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第二内科学教室 中嶋治彦

はじめに

Spot35 蛋白は、吉田と高橋によってラットの小脳組織の可溶性分画から検出され¹⁾、その抗体を用いた免疫組織化学の研究からプルキンエ細胞に特異的に存在する事が示された²⁾³⁾。ビタミンD依存性カルシウム結合蛋白の1つであるカルビンジン D28K は、Wassermann と Taylor によって1966年に鶏の腸管から発見された⁴⁾。後に、アミノ酸配列並びに cDNA クローニングの結果から、Spot35 蛋白はカルビンジン D28k と同一であると証明された⁵⁾⁶⁾。Spot35 蛋白/カルビンジン D28k (Spot35/カルビンジン) はカルシウム結合蛋白ファミリーに所属し、その分子量は28,000 ダルトン (28 kDa) で、281のアミノ酸から構成される。6つの EF ハンド型カルシウム結合ドメインを持つが、そのうちカルシウムイオンと結合するのは4つである。

免疫組織化学の方法を用いた研究により、Spot35/カルビンジンは、多くの生物で腸管、腎、中枢神経、末梢神経、感覚器、骨、脾、子宮、精巣などの広い組織の特定の細胞に存在する事が明らかになった⁷⁾⁻¹⁰⁾。同様に、免疫組織化学の研究から、Spot35/カルビンジンは、マウスの胎児では、胎生11日に中腎細胞で最初に発現し、12日には後腎細胞に¹¹⁾、14日に初めてプルキンエ前駆細胞に見られる¹²⁾¹³⁾。神経系では、胎生13日までは発現が認められないが、胎生14日に将来の大脳皮質、視床下部の漏斗部、脊髄などで発現がみられる¹²⁾。他の臓器、特に胎生の初期の Spot35/カルビンジンの発現と機能についてはまだ不明確な点が多い。

しかし、Spot35/カルビンジンの発現を観察するのに、免疫組織化学を用いた場合¹¹⁾⁻¹⁵⁾、特に神経系では合成された蛋白は軸索輸送されるので、遺伝子が発現し蛋白を合成している細胞を同定するのは困難なことがある。抗体によっては交差反応によりアイソタイプや他の蛋白と反応する事がある。さらに抗体は有限である。遺伝子が発現している細胞は、in situ ハイブリダイゼーション法で転写された mRNA を検出することによって同定できるが¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、RNA の分解に注意して組織標本を準備する必要があり、また微量な発現量を検出するには解像度に限界がある。特に、着床以前の胎生3.5日から発生に伴って Spot35/カルビンジンが発現している組織を系統的に観察するのに、免疫組織化学や in situ ハイブリダイゼーション法は実際のでない。

遺伝子のプロモーター機能解析のモニターとして、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ (*lacZ*) は、*in vitro* に

おける酵素活性の測定に用いられるが、組織でも活性発色が可能であり、色調が青色でコントラストがつくことが、レポーター遺伝子として使用する上で優れていることが知られている¹⁹⁾。今回、筆者は、発生の初期の *Spot35*/カルビンジン遺伝子の発現を、全載標本における組織化学的解析に適した方法として、*lacZ* をレポーター遺伝子に用いて検討した。竹田ら²⁰⁾は、腎由来の培養細胞 (MDBK) 系における *Spot35*/カルビンジン遺伝子のプロモーター解析から、遺伝子上流 3.5 kb に転写制御領域が存在し、ビタミンD依存性に遺伝子が発現することを見出した。この転写調節領域を使えば、個体においてもプロモーターに依存してレポーター遺伝子 *lacZ* が発現するのに充分と予想された。

本研究においては、*Spot35*/カルビンジン遺伝子プロモーターに依存してレポーター遺伝子 *lacZ* を発現する融合遺伝子を作製し、マウス受精卵に顕微注入してトランスジェニックマウスを作出し、*Spot35*/カルビンジンの存在部位、遺伝子発現の開始時期を知ることを目的として胎生期マウスの解析を行った。

材料と方法

1. 導入遺伝子の作製

トランスジェニックマウスを作出するために、レポーター遺伝子に大腸菌のβガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を用いて、*Spot35*/カルビンジン遺伝子プロモーターとの融合遺伝子を作製した。動物細胞においては、細胞質にガラクトシダーゼ活性が弱いながら認められるため、導入遺伝子由来の *lacZ* 活性と混同されることがある。そこで、細胞質で合成された導入遺伝子由来の *lacZ* を強制的に核に移行させるため、SV40T 由来の核移行シグナル²¹⁾を、*lacZ* のN末の8アミノ酸残基と置換した。これによって内在性のガラクトシダーゼ活性と区別することができる。*lacZ* の3'側には、転写を終結させる単純性ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ由来 polyA シグナルを挿入した。*lacZ* の5'非翻訳領域には、真核細胞内で効率よく翻訳されるための Kozak 配列、リボソーム結合配列²²⁾、*lacZ* の翻訳開始点より上流からの翻訳を避けるために、3フレームのストップコドン的人工的に付加した。次に、遺伝子が導入された染色体の部位によっては、導入部位の上流から転写が起こることもあるので、プロモーター挿入部位の *Sma*I サイトの5'端に連結した SV40-polyA シグナルで転写が終結し、導入遺伝子の転写が上流からの影響を受けないようにした。更に、このレポーター遺伝子の両側に同じ制限酵素サイ

トを付加し，導入遺伝子をベクタープラスミドから分離できるようにした。

この基本レポーター遺伝子に Spot35/カルビンジン遺伝子プロモーター²⁰⁾を融合し，プラスミド pSPT19 に挿入した (pCBNuLacZ)。プロモーターには転写開始点の上流 *Bgl* II サイト (-3593 スクレオチド) から第 1 エクソンの *Ava* I サイト (+93 スクレオチド) までを使用した。この領域にはビタミン D レスポンスエレメントが 2 ケ所，MT (Mouse Transcript) くりかえし配列，GC Box が含まれている。

2. トランスジェニックマウスの作出

導入遺伝子の調製

pCBNuLacZ を 2 回の塩化セシウム平衡密度遠心法によって精製した²³⁾。トランスジェニックマウス作出用に *Spot35*/カルビンジンプロモーターとレポーター遺伝子との融合遺伝子は，制限酵素 *Hind* III で消化し，ベクター部分をアガロース電気泳動で除いた。この直鎖状の導入遺伝子を DNA 濃度が 5 µg/ml になるように，リン酸緩衝液 pH 7.0 含有生理的食塩水 (PBS) に溶解した。

トランスジェニックマウス作出用マウスの準備

受精卵を採取するマウスに 4～6 週齢の B6C3H F1 のメスを用いた。受精卵に導入遺伝子の顕微注入を行う日から 3 日前の午後 4 時から 6 時の間に，5IU の pregnant mare's serum (PMS, 帝国臓器) を腹腔注射する。実験日前日に 5IU の human chorionic gonadotropin (hCG, 帝国臓器) を腹腔注射し，B6C3H F1 オスマウスと交配させる。翌朝膀胱を形成しているメスマウスよ

り平均して 20～30 個の受精卵が得られる。導入遺伝子を雄性前核に顕微注入する。受精卵移植用メスマウス (ICR) は精管結紮手術を施されたオスマウス (ICR) と不妊交配させる。導入遺伝子が注入された受精卵 15 から 20 個を，偽妊娠 ICR マウスの左右の卵管に移植してトランスジェニックマウスを作出した。生後 2～3 週後にマウスの尾を 1 cm 程切断し，ProteinaseK 処理後フェノール抽出し DNA を調製した。尾 DNA を制限酵素で切断し，アガロース電気泳動を行った後，ニトロセルロースフィルターにブロットしてサザーン分析をおこなった。サザーン分析に用いるプローブはランダムラベリング法により [³²P] dCTP で標識した。

3. 免疫組織化学および lacZ 活性染色

生後のマウスは 4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で心臓から還流固定して，小脳，腎を摘出し凍結切片を作製した。胎児は 1% ホルムアルデヒド/0.2% グルタルアルデヒド/PBS 溶液で浸漬固定して，全載標本を作製した。これらの標本を PBS で洗浄後，免疫組織化学および lacZ 活性染色を行った。

凍結標本を抗 Spot35 家兎ポリクローナル抗体²⁾ (1.5% ヤギ血清含有 PBS で 2,000 倍に希釈して使用) で室温，1 晩反応後，PBS (Strept avidin-biotin) complex 法を用いて染色した。

β ガラクトシダーゼの活性染色は，0.1% X-gal 染色液 [5 mM K₃Fe (CN)₆，5 mM K₄Fe (CN)₆，1 mM MgCl₂，0.01% deoxycholate，0.02% NP-40，0.1% X-gal (TaKaRa)/PBS] で 37℃，4 時間から 1 晩反応させた。

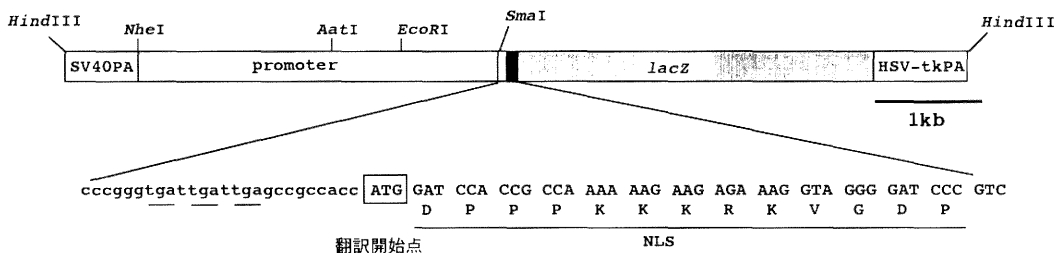


図 1 導入遺伝子の構造

トランスジェニックマウス作出に用いた導入遺伝子の構造
 promoter; カルビンジン遺伝子プロモーター，NLS; SV40 由来核移行シグナル，*lacZ*; β ガラクトシダーゼ遺伝子，SV40PA; SV40 由来ポリ A シグナル，HSV-tkPA; 単純性ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ由来ポリ A シグナル，下線部 TGA; ストップコドン，ATG; 翻訳開始点

結 果

1. トランスジェニックマウスの作出

得られたマウスは96匹であり、尾から抽出した DNA を制限酵素 *Bgl* II で消化し、サザン分析を行った。導入遺伝子の有無を解析するために、*Spot35*/カルビンジン遺伝子の *Pst* I ~ *Bam* HI 断片を [³²P] で標識しプローブに用いた。ハイブリダイゼーションの結果、プローブは、野生型マウスの DNA では *Bgl* II 断片の 3 kb とだけ反応し、遺伝子が導入されたマウスの DNA では 3 kb 以外に約 10 kb の DNA 断片と反応した (図 2)。96匹のうち、染色体に導入遺伝子が確認できたのは 3匹であった。そのうち、レポーター遺伝子 *lacZ* が発現していたのは 2匹であった。本論文では代表的な 1 系統についての *lacZ* の発現を観察した。この系統のマウ

スの約 10 kb のバンドのシグナルの強さを野生型で検出される内在性 *Spot35*/カルビンジン遺伝子の 3 kb のバンドと比較したところ、シグナルの強さは同程度であった。よって、導入遺伝子はハプロあたりシングルコピーであると推測された。

2. 小脳、腎における導入遺伝子の発現

導入遺伝子による *lacZ* 染色は NLS により細胞核内に限局され、非特異的な内在性の活性による細胞質のびまん性の染色と明確に区別できた。小脳においてはブルキンエ細胞に *Spot35*/カルビンジンが局在する。抗 *Spot35* 抗体による免疫染色 (褐色) と、*X-gal* 染色 (青色) との 2 重染色では、ブルキンエ細胞核の陽性染色が同時に観察された (図 3A)。これにより、*Spot35*/カルビンジン遺伝子プロモーターに依存して *lacZ* が発現していると考えられた。

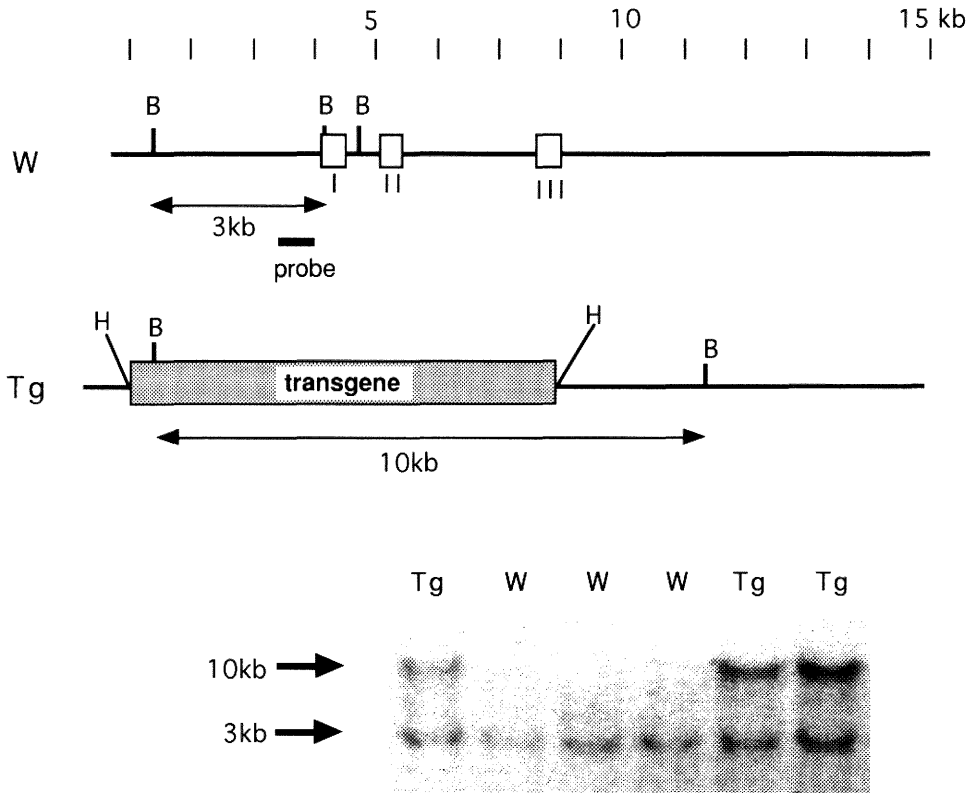


図 2 サザン分析

A. 野生型および導入遺伝子の検出に用いたプローブの位置. B, 野生型 (W) では約 3 kb, トランスジェニックマウス (Tg) では約 10 kb のバンドが検出される. B ; *Bgl* III, H ; *Hind* III, I, II, III ; エクソン

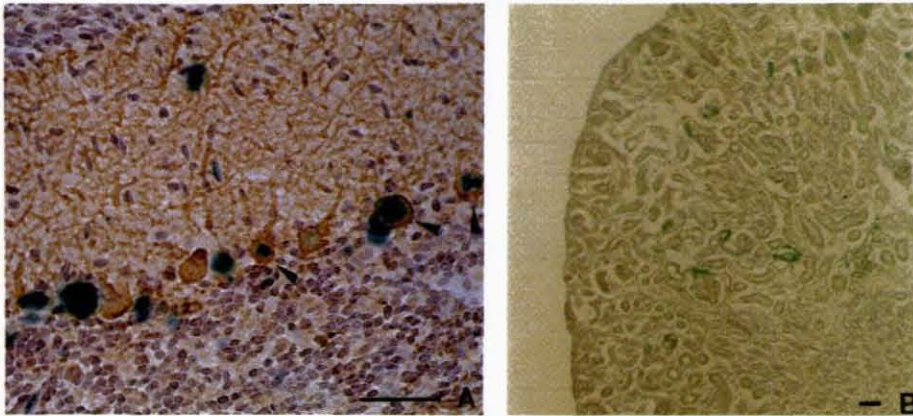


図 3 小脳、腎における導入遺伝子の発現

A. 成体小脳の抗 Spot35 抗体及び X-gal による二重染色。小脳プルキンエ細胞 (矢印) で抗カルビンジン抗体 (褐色) 及び X-gal 染色 (青色) が陽性である。B. 生後 4 日腎の X-gal による染色。遠位尿細管において X-gal 染色が陽性である。；スケール 100 μm

腎においては、X-gal 陽性細胞が皮質に散在し、遠位尿細管と集合管に認められた。また、糸球体部にわずかに陽性細胞が認められた (図 3B)。

3. 胎生早期における導入遺伝子の発現

胎児の解析にホモの雄マウスを準備した。サザーン解析による遺伝子型から、導入遺伝子がホモの雄マウスと、野生型雌マウスをかけ合わせて、得られるヘテロの胎児で解析した (図 4)。雌の膈に膈栓が確認された朝を胎生 0.5 日と判断し、7.5 日、8.5 日、10.5 日、12.5 日、14.5 日、16.5 日の胎児を使用した。

胎生 7.5 日では、全身のどこにも lacZ 陽性の組織は検出できず、導入遺伝子は発現していないと思われた。

胎生 8.5 日では、lacZ 陽性細胞が神経板の尾部及び後脳背側部に観察された (図 4A)。

胎生 10.5 日には、細胞分化と組織の形成に伴いその染色がさらに強くなり、前後肢尖にも染色が出現した (図 4B)。以後、肢の原基部での発現は次第に増強した。

胎生 12.5 日では、その空間的発現の度合が増し、鼻部の皮膚において lacZ 染色が初めて見られた (図 4C)。

胎生 14.5 日になると洞毛の部位が初めて染色された。12.5 日に比較して、全載標本での lacZ 陽性部位が減少しているのが観察された (図 4D)。

胎生 14.5 日で、胎児を矢状断にして染色を行った。将来の太脳皮質、小脳原基、脊髄、交感神経節、後腎に lacZ 陽性細胞が観察された。小脳にも染色が見られた

が、非特異的反応であると考えられた (図 4E)。

胎生 16.5 日では、14.5 日と同様の広範囲の神経組織に lacZ 陽性細胞が認められた。手掌と、爪の先端及び基部に強く限局しているのが観察された。全載標本での観察からすると、16.5 日では、導入遺伝子の発現は、報告されている Spot35/カルビンジンの存在部位をすべて含んでいた (図 4F)。

考 察

相同組換えマウスでの遺伝子発現部位の解析、転写制御因子の活性測定、プロモータートラップ、細胞系列等多くの研究にレポーター遺伝子として lacZ が使われ、lacZ が細胞や個体で発現しても正常の遺伝子発現に影響しないことが示されている²⁵⁾。本研究では、ビタミン D 依存性 Spot35/カルビンジン遺伝子発現を観察するためにレポーター遺伝子として lacZ 遺伝子を用いて、トランスジェニックマウスを作出した。その結果、免疫組織化学による Spot35/カルビンジンの局在¹²⁾¹⁵⁾ と、*in situ* ハイブリダイゼーションによる mRNA 発現^{16)~18)} をほぼ忠実に反映するトランスジェニックマウスを作出することができた。

Spot35/カルビンジン遺伝子のプロモーターは、培養細胞を用いた解析²⁰⁾ から、ビタミン D レスポンスエレメントをはじめとする転写調節領域を含む転写開始点上流 3.5 kb を用いた。このプロモーター領域は、トラン



図4 胎児期全載標本における導入遺伝子の発現
 全載標本においても X-gal 染色による十分な染色性が得られる。胎生 14.5 日以降は矢状断剖面の観察が可能である。
 A. 胎生 8.5 日, B. 胎生 10.5 日, C. 胎生 12.5 日, D. 胎生 14.5 日, E. 胎生 14.5 日正中矢状断, F. 胎生 16.5 日正中矢状断, G. 胎生 12.5 日野生型
 — ; スケール 1 mm

スジェニックマウスにおいても忠実に Spot35/カルビンジン遺伝子を発現することが示された。

lacZ の活性染色は組織によって大きく異なり、特に胎生15日以降の消化管では強い非特異的反応がみられた。野生型のマウスにおいて、組織の固定条件、X-gal 染色で30℃で長時間行わない等工夫することにより、非特異的染色は認められなかった。全載標本において、胎生12.5日より14.5日の方が染色部位が狭くなったのは(図4)、皮膚の成熟に伴って、X-gal 染色液の浸透性が低下しているためと思われる。

哺乳動物の腎において、カルシウムの主たる再吸収が行われる遠位尿管に Spot35/カルビンジンの存在が知られている¹⁰⁾¹⁵⁾。しかし、マウスの胎生期の腎における Spot35/カルビンジンの局在に関する研究は少ない。Spot35/カルビンジンが糸球体に存在するとの報告は今までにないが、今回のトランスジェニックマウスにおいては、糸球体の一部に陽性細胞が認められた。トランスジェニックマウスにおいては、糸球体の一部に陽性細胞が認められた。トランスジェニックマウスではじめて検出できた可能性もあるが、抗体や in situ ハイブリダイゼーションではこの細胞の検出、同定はできなかった。今後この細胞については、組織化学的に詳細な研究が必要であろう。

Spot35/カルビンジンは、細胞内においてカルシウムイオンの緩衝作用を持ち、高濃度のカルシウムイオンによる細胞毒性を抑制していると考えられている¹⁴⁾²⁶⁾。また、小腸や腎では、細胞内を通過してカルシウムイオンを輸送する作用が推定されている¹³⁾。血中のカルシウムイオン濃度を正常に保つため、腎尿管における再吸収の微妙な調節に関与していることも示唆されている¹⁰⁾²⁷⁾。小脳プルキンエ細胞では、細胞分裂が終わって移動を開始する頃に Spot35/カルビンジンが発現するが、その機能は不明である¹³⁾。これら複雑な生理機能を持つ成体の臓器における Spot35/カルビンジンの役割を明らかにするうえで、今回見つけた、比較的単純な形態である発芽初期の尾、肢芽、鼻の先に発現する Spot35/カルビンジンの機能を解析することは意義がある。また、転写因子 TEF-1 が同時期のこれらの組織に特徴的に発現している²⁸⁾が、Spot35/カルビンジンとの関連性は分からない。

本研究で報告したトランスジェニックマウス以外に、導入遺伝子が複数コピー導入されたマウスが得られたが、これらの系統においては、従来報告されている小脳プルキンエ細胞や腎で、レポーター遺伝子 lacZ の発現が観

察されなかった。これは、導入遺伝子の構造、あるいは挿入される染色体の部位によっては、転写に影響を受ける position effect によるのかもしれない。

トランスジェニックマウスにおいて、特に胎児の全載標本で lacZ 染色を用いて観察することは、比較的に日常に行える簡単な分析手段であることが判った。繁雑で神経を使う in situ ハイブリダイゼーション法に比べ、簡便で同等あるいはそれ以上の解像度を得ることができる。免疫組織化学的手法を用いた場合、胎児期の空間的、時間的連続切片を作製し検索するのは、標本が大量になり実際的ではなく、事実、そのような研究はみられない。

今までの研究によると、胎生初期における Spot35/カルビンジンの発現は、胎生11日の中腎管がもっとも早く、続いて12日の後腎管に出現する¹¹⁾。本研究によってはじめて、胎生8.5日に尾部、四肢の原基に Spot35/カルビンジンが発現することを見出した。この肢原基では、複雑にプログラムされた細胞増殖と細胞死を経て指の形成が行われるが、この形態形成に Spot35/カルビンジンが関与するのか、もし関与するとすれば、細胞内の急激なカルシウム濃度変化に対する緩衝作用があるのかといった研究に展開できる。

このように、免疫組織化学的手法で容易に検出できない組織、あるいは検索しなかった組織での遺伝子発現が、レポーター遺伝子を使ったトランスジェニックマウスで新たに見つけられた。今後、新たに見つけられた部位で、いつ、どのように、その遺伝子が機能しているかを研究するため、基礎的な情報を提供する方法としても優れている。

今後は、今までに報告もなく気がつかなかった組織や発生の時期における Spot35/カルビンジンの遺伝子発現に焦点を絞り、本カルシウム結合蛋白の生理機能を解明すると共に、病態の関連について研究する必要がある。

謝 辞

御指導をいただいた荒川正昭教授、桑野良三助教授ならびに遺伝子実験施設の皆様に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Yoshida, Y. and Takahashi, Y.: Compositional changes in soluble proteins of cerebral mantle, cerebellum and brain stem of rat brain during development: a two-dimensional gel electrophoretic analysis. Neurochem. Res., 5: 81~96, 1980.

- 2) **Yamakuni, T., Usui, H., Iwanaga, T., Kondoh, H. and Takahashi, Y.:** Isolation and immunohistochemical localization of a cerebellar protein. *Neurosci. Lett.*, **45**: 235~240, 1984.
- 3) **Yamakuni, T., Araki, K. and Takahashi, Y.:** The developmental changes of mRNA levels for a cerebellar protein (spot35 protein) in the rat brain. *FEBS Lett.*, **188**: 127~130, 1985.
- 4) **Wasserman, R.H. and Taylor, A.N.:** Vitamin D3 induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa. *Science*, **152**: 791, 1966.
- 5) **Yamakuni, T., Kuwano, R., Odani, S., Miki, N., Yamaguchi, K. and Takahashi, Y.:** Molecular cloning of cDNA to mRNA for a cerebellar spot35 protein. *J. Neurochem.*, **48**: 1590~1596, 1987.
- 6) **Hunziker, W. and Schrickel, S.:** Rat brain CalbindinD28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28. *Mol. Endocrinol.*, **2**: 465~473, 1988.
- 7) **Buffa, R., Mare, P., Salvatore, M., Solcia, E., Furness, J.B. and Lawson, D.E.M.:** Calbindin 28KDa in endocrine cells of known or putative calcium-regulating function. *Histochemistry*, **91**: 107~113, 1989.
- 8) **Baimbridge, K.G., Celio, M.R. and Rogers, J.H.:** Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.*, **15**: 303~308, 1992.
- 9) **Abe, H., Watanabe, M., Yamakuni, T., Kuwano, R., Takahashi, Y. and Kondo, H.:** Localization of gene expression of calbindin in the brain of adult rats. *Neurosci. Lett.*, **138**: 211~215, 1992.
- 10) **Kazama, J.J., Takeda, T., Katagiri, T., Kuwano, R., Kumanishi, T., Ozawa, H. and Arakawa, M.:** Histochemical study of Spot35-calbindin-28k and Ca²⁺ ATPase in rat kidney. *Nephrology*, **1**: 73~82, 1995.
- 11) **Shamley, D.R., Opperman, L.A., Buffenstein, R. and Ross, F.P.:** Ontogeny of calbindin-D28k and calbindin-D9k in the mouse kidney, duodenum, cerebellum and placenta. *Development*, **116**: 491~496, 1992.
- 12) **Enderlin, S., Norman, A.W. and Celio, M.R.:** Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat. Embriol.*, **177**: 15~28, 1987.
- 13) **Yuasa, S., Kawamura, K., Ono, K., Yamakuni, T. and Takahashi, Y.:** Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. *Anat. Embriol.*, **184**: 195~212, 1991.
- 14) **Christakos, S., Gabrielides, C. and Rhothen, W.:** Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocrine Review*, **10**: 3~26, 1989.
- 15) **Parmentier, M., Ghysens, M., Rypens, F., Lawson, D.E.M., Pasteels, J.L. and Pochet, R.:** Calbindin in vertebrate classes: Immunohistochemical localization and western blot analysis. *Gene. Comp. Endocrinol.*, **65**: 399~407, 1987.
- 16) **Rhoten, W.B. and Christakos, S.:** Cellular gene expression for calbindin-D28k in mouse kidney. *Anat. Recod.*, **227**: 145~151, 1990.
- 17) **Sequier, J-M., Hunziker, W. and Richards, G.P.:** Localization of calbindinD28 mRNA in rat tissues by in situ hybridization. *Neurosci. Lett.*, **86**: 155~160, 1988.
- 18) **Usi, H., Katagiri, T., Yoshida, Y., Nishiyama, A., Ichikawa, T., Kuwano, R., Takahashi, Y. and Kumanishi, T.:** In situ hybridization histochemistry of spot35 protein, a calcium-binding protein, in the rat brain. *Mol. Chem. Neuropharmacol.*, **15**: 207~216, 1991.
- 19) **Bonnerot, C., Rocanourt, D., Briand, P. and Grimber, G.:** A β -galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 6795~6799, 1987.
- 20) **Takeda, T., Arakawa, M. and Kuwano, R.:** Organization, sequence, and expression of the mouse Spot35/Calbindin-D28k gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**: 889~897, 1994.
- 21) **Rihs, H-P. and Peters, R.:** Nuclear transport kinetics depend on phosphorylation site-containing sequences flanking the karyophilic signal of the Simoan virus 40T-antigen, EMBPJ., **8**: 1479~1484, 1989.

- 22) **Kozak, M.:** The scanning model for translation: An update, *J. Cell. Biol.*, **108**: 229~241, 1989.
- 23) **Garger, S.J., Griffith, O.M. and Grill, L.K.:** Rapid purification of plasmid DNA by a single centrifugation in a two-step cesium chloride-ethidium bromide gradient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**: 835~842, 1983.
- 24) **Shirai, M., Miyashita, A., Ishii, N., Itoh, Y., Satokata, I., Watanabe, Y.G. and Kuwano, R.:** A gene trap strategy for identifying the gene expressed in the embryonic nervous system *Zool. Sci.*, **13**: 277~283, 1996.
- 25) **Bonnerot, C. and Nicolas, J-F.:** Application of lacZ gene fusion to postimplantation development. *Methods in Enzymol.*, **225**: 451~454, 1993.
- 26) **Mattson, M.P., Rychlik, B., Chu, C. and Christakos, S.:** Evidence for calcium-reducing and excitatory-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, **6**: 41~51, 1991.
- 27) **Bindels, R.J.M., Timmermans, J.A.H., Hartog, A., Coers, W. and van Os, C.H.:** Calbindin-D9k and parvalbumin are exclusively located along basolateral membranes in rat distal nephron. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2**: 1122~1129, 1991.
- 28) **Yasunami, M., Suzuki, K., Houtani, T., Sugimoto, T. and Ohkubo, H.:** Molecular characterization of cDNA encoding a novel protein related to transcriptional enhancer factor-1 from neural precursor cells. *J. Biol. Chem.*, **270**: 18649~18654, 1995.

(平成9年6月26日受付)