

ラット脳における小脳酸性蛋白 spot 35 蛋白の発現

新潟大学脳研究所神経薬理学部門（主任：高橋康夫教授） 山 国 徹

Expression of a Cerebellar Protein (Spot 35 Protein) in Rat Brains

Tohru YAMAKUNI

Department of Neuropharmacology, Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Yasuo TAKAHASHI)

Spot 35 protein is a cerebellar soluble protein with Mr. 27K daltons and pI 5.3, which localizes in Purkinje cells. In order to understand the development of cerebellum at molecular level, it is necessary to reveal the mechanism controlling the biosynthesis of spot 35 protein. Here I examined the developmental and regional changes of mRNA levels for spot 35 protein in rat brain, by using in vitro translation system and dot-blot hybridization with spot 35 protein cDNA as a probe.

Dot-blot hybridization analysis revealed that the mRNA in rat cerebellum rapidly increased during postnatal 10–20 days and attained a plateau level after 20 days. This result was in agreement with the data of analysis of mRNA level for spot 35 protein by means of in vitro translation system containing rat cerebellar mRNA. The data on spot 35 protein mRNA correlate with the result of immunohistochemical examination using anti-spot 35 protein antiserum. Further, the regions except cerebellum in rat brain contained only negligible spot 35 protein mRNA. These results suggest a transcriptional control of the concentration of spot 35 protein in developing cerebellum and an intensive expression of its gene in cerebellum.

Key words: cerebellar protein, mRNA, translation, cDNA, hybridization, expression, development.

小脳蛋白, メッセンジャー RNA, 翻訳, 相補的 DNA, ハイブリダイゼーション, 発現, 発育

Reprint requests to: Tohru Yamakuni,
Department of Neuropharmacology,
Brain Research Institute, Niigata University,
Niigata City, 951, Japan.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経薬理学部門 山国 徹

略 語 表

poly (A) RNA, poly (adenylic acid)-RNA;
cDNA, complementary DNA; SDS, sodium
dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel
electrophoresis

spot 35 蛋白は、O'Farrell¹⁾ の二次元電気泳動法による脳の可溶性蛋白組成の分析の過程で成熟ラット小脳にのみ認められる蛋白質として最初に吉田と高橋²⁾によって報告された分子量 27K, 等電点5.3の小脳酸性蛋白質である。山国³⁾はこの蛋白質を牛小脳より精製し、その抗血清を作製した。この抗血清を用いた免疫組織化学的研究により spot 35 蛋白は小脳プルキンエ細胞に局在することが明らかとなった。また最近 spot 35 蛋白がカルシウム結合蛋白であることが報告された⁴⁾。更に、丸山⁵⁾は電気生理学的研究から spot 35 蛋白が小脳プルキンエ細胞の活動の調節に関与していることを示唆したが、このことはプルキンエ細胞における spot 35 蛋白の生理学的な機能を知る上で興味ある知見である。

この小脳プルキンエ細胞のマーカー蛋白質と考えられる spot 35 蛋白の遺伝子の脳の发育過程における発現調節機構を明らかにすることは中枢神経系の発生・分化過程、特に小脳の発生・分化過程を分子レベルで理解する上で重要な知見を与えてくれるものと考えられる。そこで spot 35 蛋白の遺伝子の発現を分析するため、ウサギ網状赤血球無細胞蛋白合成系と cDNA クローニングにより得たラット spot 35 蛋白の cDNA をプローブにした blot hybridization 法を利用して脳の部位または发育期による spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化を検討した。更に、小脳の发育過程における spot 35 蛋白の発現の調節機構についても考察する。

実 験 方 法

1. spot 35 蛋白の精製および抗体の調製

spot 35 蛋白は山国³⁾らの方法により牛またはラット小脳より精製された。抗 spot 35 抗血清は山国³⁾の方法に従い精製された牛 spot 35 蛋白を家兔に免疫して得た。Ouchterlony の二重拡散法, immuno-blotting⁶⁾ 法により抗牛 spot 35 抗血清は牛 spot 35 蛋白と特異的に反応し、またラット spot 35 蛋白と交叉反応することが示された。

2. RNA の調製

細胞質 RNA はラット脳より崎村⁸⁾の方法に従いフェノール・クロロホルム法で抽出した。ラット小脳の遊離ポリゾーム画分の調製は崎村⁸⁾の方法に従った。ラット小脳の遊離ポリゾーム画分からの spot 35 蛋白の mRNA の精製は堤と石川⁹⁾の方法に従って行なった。また各 RNA 標品から poly (A) RNA を精製する場合には oligo (dT)-cellulose クロマトグラフィーを用いた¹⁰⁾。

3. 無細胞蛋白合成系での poly (A) RNA の翻訳と翻訳産物の分析

poly (A) RNA の翻訳は既報^{11) 12)}のウサギ網状赤血球無細胞蛋白合成系中で行なった。反応は 30°C で90分行ない、反応終了後 5μl をとり、[³⁵S]-methionine (1,000Ci/mmol, Amersham, England) の総蛋白への取り込み量を Pelham and Jackson¹³⁾の方法に従い測定した。[³⁵S]-methionine 標識蛋白の分析は SDS-PAGE¹⁴⁾ (12.5%) および二次元電気泳動法^{11) 12)}で行なった。Fluorography は Bonner and Laskey¹⁵⁾の方法に従った。更に翻訳産物の抗 spot 35 抗体による免疫沈降は吉田¹²⁾の方法に従って行なった。免疫沈降物は SDS-PAGE または二次元電気泳動後 Fluorography を行ない分析した。

4. cDNA ライブラリーの作製

ラット小脳の遊離ポリゾームより免疫吸着法で精製した spot 35 蛋白の mRNA を鋳型にして Okayama and Berg 法¹⁶⁾で cDNA ライブラリーを作製した。

5. spot 35 蛋白の部分アミノ酸配列の決定とオリゴヌクレオチドの合成

精製ラット spot 35 蛋白を CNBr で切断後生じたフラグメントを SDS-PAGE で分離し染色後バンドを切り出した。この切り出したゲルよりフラグメントを70%ギ酸で抽出した。このフラグメントのアミノ酸配列を気相 micro-sequenator (Applied Biosystems, Forster City, CA) で決定した。決定されたアミノ酸配列に相応する2つのオリゴデオキシヌクレオチドプローブ 17mer と 14mer (いずれも32通り) を化学合成した。

6. Colony hybridization

cDNA ライブラリーのスクリーニングは桑野^{17) 18)}の方法に従って、2つの [³²P] 標識した合成デオキシヌクレオチドをプローブにして colony hybridization を行なった。17mer プローブでの hybridization は 35°C で行なった後 37°C で洗いを行なった。また 14mer

プローブを用いた場合には 27°C で hybridization を行ない 29°C で洗いを行なった。

7. 塩基配列の決定

Currier and Nester¹⁹⁾の方法で単離したプラスミドを制限酵素で切断した 5'末端を [³²p] 標識して cDNA のフラグメントの塩基配列を Maxam and Gilbert 法²⁰⁾で決定した。

8. RNA dot-blot hybridization と Northern blot-hybridization 分析

前記の方法で抽出した発育期のラットの脳と小脳の細胞質 RNA と、同様な方法で抽出した成熟ラットの脳皮質、小脳、海馬、線条体の細胞質 RNA を本実験に用いた。mRNA の blot hybridization 分析は基本的には既報の長谷川ら²¹⁾の方法に従った。プローブには nick-translation で [³²p] 標識した spot 35 蛋白 cDNA (pRS35-7) insert を用いた。

結 果

1. *in vitro* 系での spot 35 蛋白の合成

無細胞蛋白合成系において spot 35 蛋白の合成を確

かめるために、抗 spot 35 抗体で免疫沈降した翻訳産物を SDS-PAGE と二次元電気泳動法で分析した。図 1a1の成熟ラット小脳の poly(A)RNA の全翻訳産物を免疫沈降すると、spot 35 蛋白に相当する位置に単一のバンドが認められた (図 1a2)。また、この免疫沈降物を二次元電気泳動法で分析すると図 1b に示すように authentic の spot 35 蛋白と分子量と等電点の同じ単一スポットが検出された。従って、無細胞蛋白合成系において spot 35 蛋白が合成されたことは明らかである。

2. 発育過程における spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化

前述の如く、抗 spot 35 抗体による翻訳産物の免疫沈降物中には同じ分子量の爽雜物が検出されなかったことから、一次元の SDS-PAGE で免疫沈降物を分析することにより発育期の脳と小脳の spot 35 蛋白の mRNA レベルを観察することができると考えた。

新生仔、生後10日目、30日目および90日目のラットの脳、小脳の poly(A)RNA を用いて発育期に伴う spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化を調べた。図 2 に示すように、小脳では生後10日目から90日目のラット

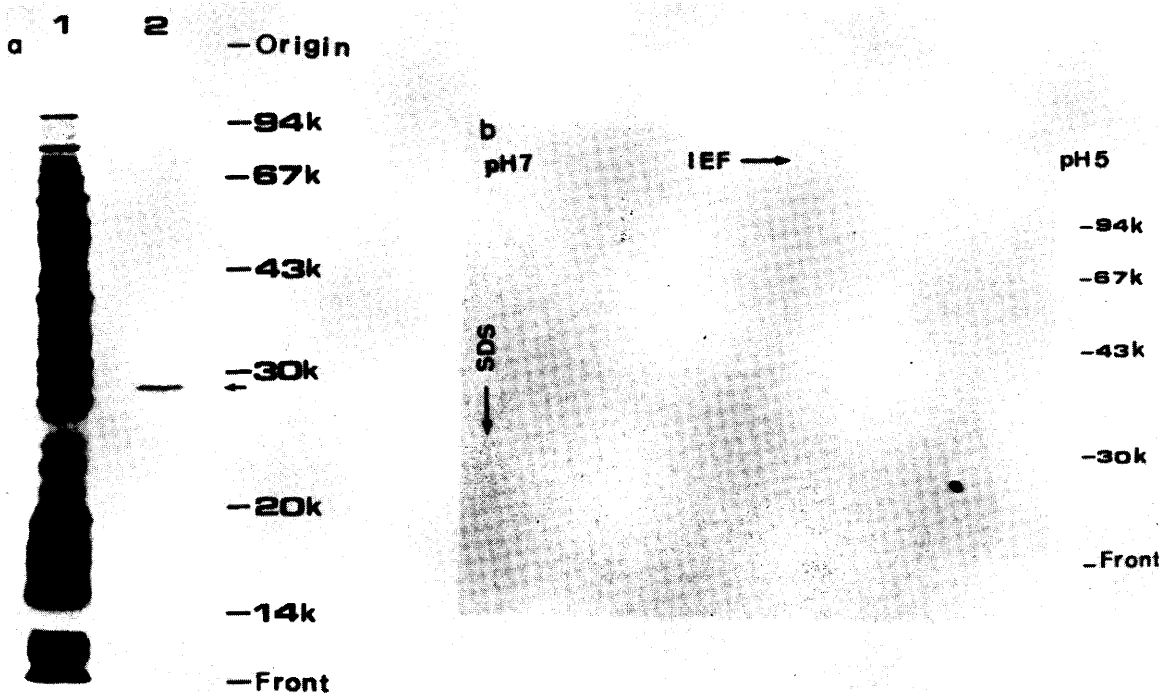


図 1 成熟ラット小脳の mRNA による網状赤血球無細胞系での翻訳産物の Fluorogram

(a1) 全翻訳産物の SDS-PAGE パターン, (a2) 抗 spot 35 抗体による全翻訳産物の免疫沈降物の SDS-PAGE パターン, (b) 同免疫沈降物の二次元電気泳動パターン。

で spot 35 蛋白の mRNA 活性が認められた。またその mRNA レベルは生後10日目から30日目の間に急激に上昇することが示された (図2, 6-8)。一方、大脳ではいずれの発育期でも spot 35 蛋白の mRNA 活性はほとんど認められなかった (図2, 1-5)。

3. spot 35 蛋白の cDNA クローンの単離と 同定

前述の如く、ラット小脳遊離ポリゾーム画分より免疫吸着法と Oligo (dT) cellulose クロマトグラフィーで spot 35 蛋白の mRNA を精製した。この mRNA の *in vitro* 翻訳系での翻訳産物を前記の方法で分析したところ、authentic の spot 35 蛋白と同じ分子量と等電点をもつスポットが認められた。また spot 35 蛋白の mRNA が高純度に精製されたことをその Fluoro-

gram は示していた。

この poly(A)RNA より Okayama and Berg 法で作製した cDNA ライブラリーを 17mer と 14mer の合成オリゴデオキシヌクレオチドをプローブにして colony hybridization を行なった結果、4,000個のコロニーより2つの合成プローブと反応する陽性クローン14個を検出することができた。これらの陽性クローンよりプラスミドを単離し、EcoRI で切断後アガロースゲル電気泳動にかけ各クローンの insert の長さを分析した。この14個のクローンの中で最長の insert を含むと考えられた cDNA クローン pRS 35-7 (図3) の insert の塩基配列を Maxam and Gilbert 法で決定した。またその制限酵素地図を作製した。現在のところ、なお一部分未決定の部分があるので本論文には spot

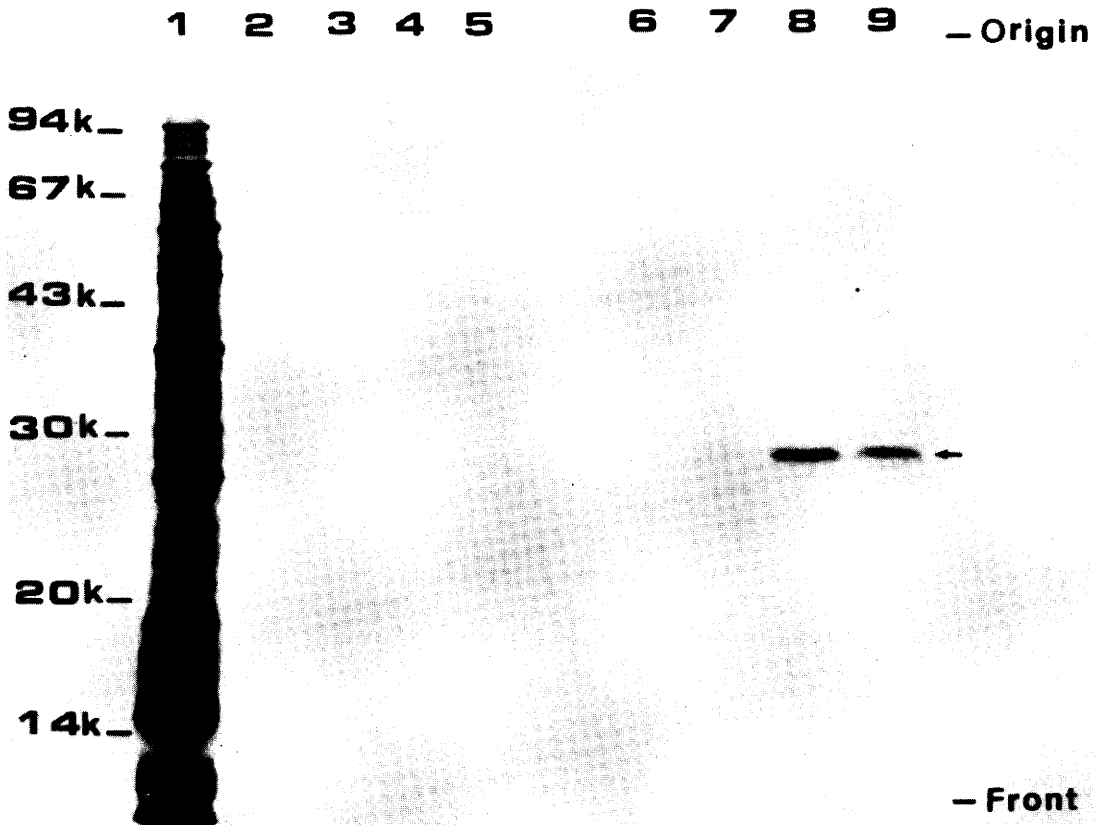


図2 発育過程での翻訳産物の Fluorogram の変化

(1) 小脳 poly(A)RNA による全翻訳産物, (2-5) 大脳の poly(A)RNA による全翻訳産物の免疫沈降物の Fluorogram, (2) 新生仔, (3) 生後10日目, (4) 30日目, (5) 90日目, (6-9) 小脳の poly(A)RNA による全翻訳産物の免疫沈降物の Fluorogram, (6) 新生仔, (7) 生後10日目, (8) 30日目, (9) 90日目。

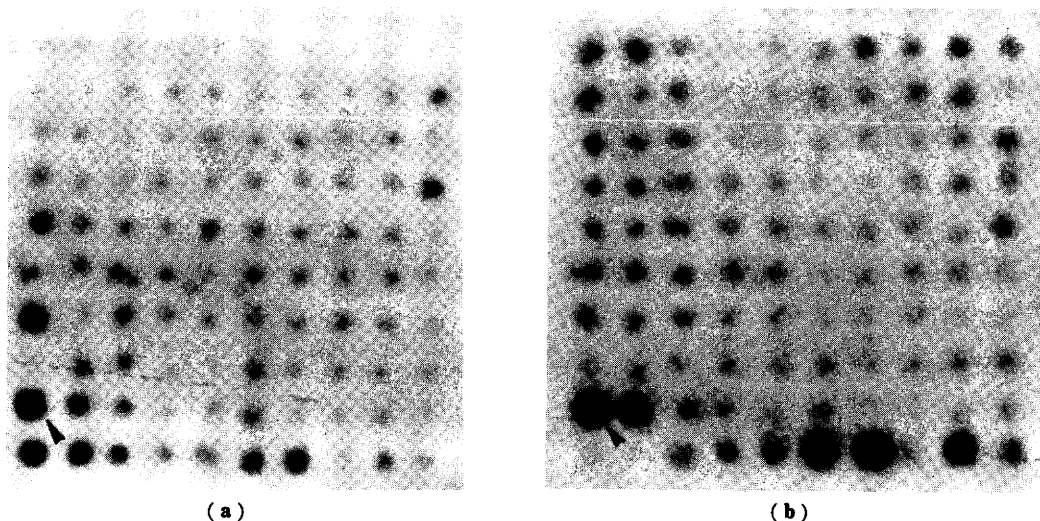


図 3 17mer と 14mer の合成プローブによる colony hybridization
(a) 17mer の合成プローブ, (b) 14mer 合成プローブによる. 矢印は pRS 35-7 の cDNA クローンを示す.

35蛋白の cDNA の塩基配列を記載しないが, 気相 microsequenator で決定した59個のアミノ酸配列に対応した塩基配列が認められた. 従って, この cDNA クローン (pRS 35-7) は spot 35 蛋白の cDNA クローンと考えられる.

4. Blot hybridization による spot 35 蛋白の mRNA 分析

spot 35 蛋白の cDNA クローン (pRS 35-7) を単離, 同定できたので, 本実験には nick-translation で [32 P] 標識した cDNA (pRS 35-7) をプローブに用いた. 成熟ラット小脳の細胞質 RNA を Northern blot 分析した結果, ラット 18S リボゾーム RNA (1919塩基) の位置に major なバンドが一本とこれよりも高分子の位置に minor バンドが認められた (図4). ここでは示さなかったが成熟ラット小脳の poly(A)RNA を用いても同様な結果が得られた.

次に, 発育期のラット小脳より抽出した細胞質 RNA を用いて発育過程における spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化を調べてみた. その結果, spot 35 蛋白の mRNA レベルは生後10日目から20日目の間に急激に上昇し, 20日目以降はほとんどプラトーに達した (図5). またデータは示さなかったが, 大脳ではいずれの発育期でも spot 35 蛋白の mRNA は検出できなかった. この結果は無細胞蛋白合成系で分析した発育期の小脳における spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化とよく一致

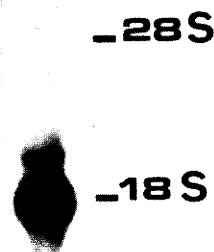


図 4 spot 35 蛋白の mRNA の northern blot 分析

ラット小脳の細胞質 RNA (20 μ g) を電気泳動後, ニトロセルロースフィルターにうつし, [32 P] 標識の cDNA と hybridization を行なった.

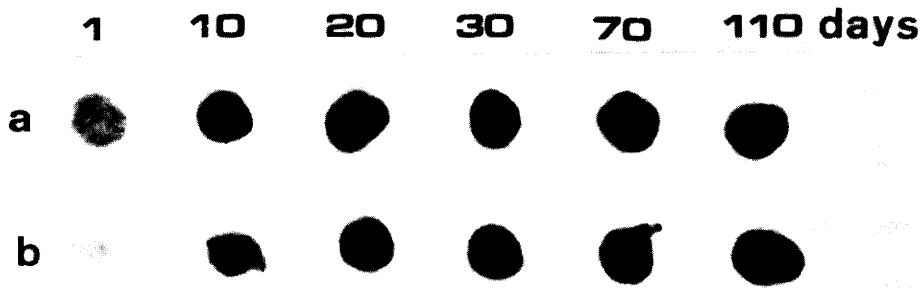


図5 ラット小脳における spot 35 蛋白の mRNA の発育過程における変化
発育期のラット小脳（新生仔から生後110日目）の細胞質 RNA をニトロセルロースメンブレンにスポットし、 $[^{32}\text{P}]$ 標識の cDNA と hybridization を行なった。細胞質 RNA の濃度は (a) $9\mu\text{g}$ 、(b) $4.5\mu\text{g}$ である。

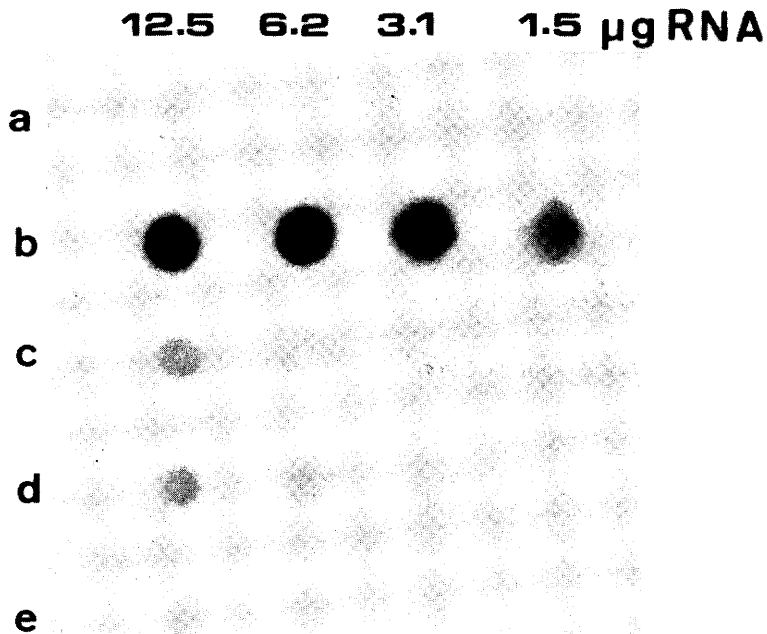


図6 ラット脳の各部位における spot 35 蛋白の mRNA の分布
脳の各部位より抽出した細胞質 RNA を dot-blot hybridization で分析した。(a) 大脳皮質、(b) 小脳、(c) 海馬、(d) 線条体、(e) リボゾーム RNA。

していた。また、図6には脳の部位別の spot 35 蛋白の mRNA レベルを示した。小脳以外の大脳皮質、海馬、線条体の mRNA レベルは対照のリボゾーム RNA のそれとほぼ同じであった。従って脳では spot 35 蛋白の遺伝子は小脳で非常に強く発現していると考えられる。

考 察

無細胞蛋白合成系とクローニングによって得た cDNA をプローブに用いて spot 35 蛋白の mRNA レベルを分析し、脳における spot 35 蛋白の発現について検討した。

先に荒木ら²²⁾は小脳の切片や網状赤血球無細胞蛋白合成系で小脳の蛋白合成を行ない spot 35 蛋白と分子

量、等電点ともに同じ蛋白の合成を観察した。また Morrison ら²³⁾、Soreq ら²⁴⁾は網状赤血球無細胞蛋白合成系で小脳の蛋白合成を行なった。今回、抗 spot 35 抗体を用いることにより無細胞蛋白合成系での spot 35 蛋白の合成を証明することができた。

また、発育期に伴う spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化を同様に無細胞蛋白合成系で観察し、小脳において生後10日目から30日目の間に spot 35 蛋白の mRNA レベルが急激に増加するという結果を得た。この点について更に正確を期するため、クローニングによって得た spot 35 蛋白の cDNA をプローブにして dot-blot hybridization 法により spot 35 蛋白の mRNA レベルを検討した。その結果は無細胞蛋白合成系で観察できた spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化とよい一致を示し、生後10日目から20日目の間にその mRNA レベルは急激に上昇し、それ以降はプラトーに達した。spot 35 蛋白は小脳のプルキンエ細胞に局在していることが報告されたが³⁾、最近抗 spot 35 抗体を用いた小脳プルキンエ細胞の発生、分化の過程の免疫組織化学的な研究²⁵⁾が行なわれた。これによればラット小脳のプルキンエ細胞は生後約1週間から2週の間はその樹状突起が発達し生後21日で成熟ラットと同様の拡がりを示した²⁵⁾。またこれと並行して抗 spot 35 抗体でのプルキンエ細胞の細胞体の染色性が強くなり、樹状突起と軸索も染色された²⁵⁾。従って小脳の発育過程における spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化はほぼプルキンエ細胞における蛋白レベルの変化と一致した。以上のことから、小脳における spot 35 蛋白の濃度は主に転写レベルで調節されていることが示唆される。

最近 spot 35 蛋白がプルキンエ細胞以外に、網膜の水平細胞、その他2,3の細胞にも存在することが示された²⁶⁾。今回調べた小脳以外の部位においては spot 35 蛋白の mRNA レベルは対照のリボソーム RNA とはほぼ同じことから、小脳以外の脳の部位では spot 35 蛋白はほとんど発現していないと考えられる。この点に関しては更に検討が必要であるが、spot 35 蛋白がプルキンエ細胞の発生、分化の研究上有力なマーカーとなる蛋白であることには変わりない。

今後 spot 35 蛋白の一次構造が明らかになれば、蛋白の生理学的な機能に関する情報が得られるかもしれない。また、遺伝子の発現機構を解明するためにも spot 35 蛋白の遺伝子構造は今後第1に解明されなければならない問題である。

要 約

小脳プルキンエ細胞に局在する蛋白である spot 35 蛋白の脳における発現機構を解明するため、spot 35 蛋白の mRNA レベルを1)無細胞蛋白合成系と2)spot 35 蛋白の cDNA を hybridization のプローブに利用して検討を行なった。

小脳の poly(A)RNA のウサギ網状赤血球無細胞蛋白合成系での翻訳産物を抗 spot 35 抗体で免疫沈降することにより、spot 35 蛋白の合成を確認できた。合成された spot 35 蛋白は、authentic の spot 35 蛋白と分子量、等電点共に同一であった。無細胞蛋白合成系で合成された spot 35 蛋白を測定することにより spot 35 蛋白の mRNA レベルを検討した。発育期のラット小脳では生後10日目から30日目の間に spot 35 蛋白の mRNA レベルは上昇した。一方、発育期のラット大脳について同様な検討を行なったが、いずれの発育期でも mRNA 活性はほとんど検出されなかった。

cDNA クローニングにより得た spot 35 蛋白の cDNA をプローブに用いて、dot-blot hybridization 法で小脳の発育過程における spot 35 蛋白の mRNA レベルを検討した。その結果、生後10日目以後から mRNA レベルは急激な上昇を示し、20日目以降はほぼプラトーに達した。これは翻訳可能な mRNA レベルの変化とよい相関を示した。小脳の発育過程での spot 35 蛋白の mRNA レベルの変化は小脳プルキンエ細胞における蛋白レベルの変化とよい一致をみた。また、成熟ラット脳を大脳皮質、小脳、海馬、線条体に分け、各々の spot 35 蛋白の mRNA レベルを dot-blot hybridization 法で検討したが、小脳以外の部位では mRNA はほとんど検出されなかった。

以上の結果より、小脳の発育過程における spot 35 蛋白の発現は転写レベルで制御されていることが示された。また spot 35 蛋白の遺伝子は小脳で強く発現していることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜った高橋康夫教授に深謝します。また御指導、御協力をいただいた医学部第2生化学教室の小谷昌司博士、第三解剖学教室の岩永敏彦博士に感謝いたします。併せて、終始研究に御協力いただいた教室の方々に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) O'Farrel, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.*, **250**: 4007~4021, 1975.
- 2) 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.
- 3) Yamakuni, T., Usui, H., Iwanaga, T., Kondo, H., Odani, S. and Takahashi, Y.: Isolation and immunohistochemical localization of a cerebellar protein. *Neurosci. Lett.*, **45**: 235~240, 1984.
- 4) Yamakuni, T., Araki, K. and Takahashi, Y.: The developmental changes of mRNA levels for a cerebellar protein (spot 35 protein) in the rat brain, *FEBS Lett.*, **188**: 127~130, 1985.
- 5) Maruyama, S., Zhang, G., Tamura, Y., Yamakuni, T. and Takahashi, Y.: Involvement of spot 35 protein, a cerebellar protein in modulation of Purkinje cell activity of the rat cerebellum, *Eur. J. Pharmacol.*, **108**: 309~314, 1985.
- 6) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 4350~4354, 1979.
- 7) Peteroen, M., Huybrechts, R., and DeLoof, A.: Vacuum-blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to nitrocellulose, *FEBS Lett.*, **145**: 369~372, 1982.
- 8) Sakimura, K., Araki, K., Kushiya, E. and Takahashi, Y.: Partial purification and characterization of messenger RNA coding 14-3-2 protein from rat brain, *J. Neurochem.*, **39**: 366~370, 1982.
- 9) Tsutsumi, K. and Ishikawa, K.: Purification of messenger RNA coding for rat liver aldolase B subunit., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**: 407~412, 1981.
- 10) Aviv, H. and Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**: 1408~1412, 1972.
- 11) Masuda, T., Sakimura, K., Yoshida, Y., Kuwano, R., Isobe, T. and Takahashi, Y.: Developmental changes in the translatable mRNA for β subunit of S-100 protein in rat brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **740**: 249~254, 1983.
- 12) Yoshida, Y., Sakimura, K., Masuda, T., Kushiya, E. and Takahashi, Y.: Changes in levels of translatable mRNA for neuron-specific enolase and non-neuronal enolase during development of rat brain and liver, *J. Biochem.*, **94**: 1443~1450, 1983.
- 13) Pelham, H.R.B. and Jackson, R.J.: An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysate, *Eur. J. Biochem.*, **67**: 247~256, 1976.
- 14) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (Lond.)*, **227**: 680~685, 1970.
- 15) Bonner, W.M. and Laskey, R.A.: A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels, *Eur. J. Biochem.*, **46**: 83~88, 1974.
- 16) Okayama, H. and Berg, P.: High efficiency cloning of full length cDNA, *Mol. Cell. Biol.*, **2**: 161~170, 1982.
- 17) Kuwano, R., Usui, H., Maeda, T., Fukui, T., Yamanari, N., Ohtsuka, E., Ikehara, M. and Takahashi, Y.: Molecular cloning and the complete nucleotide sequence of cDNA to mRNA for S-100 protein of rat brain, *Nucleic Acids Res.*, **12**: 7455~7465, 1984.
- 18) Kuwano, R., Araki, K., Usui, H., Fukui, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M. and Takahashi, Y.: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for rat brain Cholecystokinin precursor, *J. Biochem.*, **96**: 923~926, 1984.

- 1984.
- 19) Currier, T.C. and Nester, E.W.: Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria, *Anal. Biochem.*, **76**: 431~441, 1976.
- 20) Maxam, A.M. and Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages, *Methods Enzymol.*, **65**: 499~560, 1980.
- 21) Hasegawa, M., Usui, H., Araki, K., Kuwano, R. and Takahashi, Y.: Developmental and regional changes of cholecystokinin mRNA in rat brains, *FEBS Lett.*, **194**: 224~226, 1986.
- 22) 荒木一明, 崎村建司, 吉田 豊, 高橋康夫: 発達期のラット脳における蛋白合成及び mRNA レベル変化—二次元電気泳動法による分析, *神経化学*, **20**: 164~167, 1981.
- 23) Morrison, M.R., Pardue, S. and Griffin, W.S.T.: Developmental alteration in the levels of translationally active messenger RNAs in the postnatal rat cerebellum, *J. Biol. Chem.*, **256**: 3550~3556, 1981.
- 24) Soreq, H., Safran, A. and Zisling, R.: Variations in gene expression during development of the rat cerebellum, *Dev. Brain Res.*, **3**: 65~79, 1982.
- 25) Takahashi-Iwanaga, H., Kondo, H., Yamakuni, T. and Takahashi, Y.: An immunohistochemical study on the ontogeny of cell immunoreactive for spot,35 protein, a novel Purkinje cell-specific protein, in the rat cerebella, *Dev. Brain Res.* in press.
- 26) Iwanaga, T., Takahashi-Iwanaga, H., Fujita, T., Yamakuni, T. and Takahashi, T.: Immunohistochemical demonstration of a cerebellar protein (spot 35 protein) in some sensory cells of guinea pig, *Biomed. Res.*, **6**: 329~334, 1985.

(昭和61年 2 月 28 日受付)