

胎児期における小脳皮質の発生と DNA トポイソメラーゼ I および II β の発現

岡山大学医学部解剖学第三講座 (主任: 徳永 勲教授)

小 川 誠

(平成11年5月6日受理)

Key words: ラット小脳発生, 小脳板, DNA トポイソメラーゼ I,
DNA トポイソメラーゼ II β , 免疫組織化学

緒 言

遺伝子 DNA は二本の DNA 鎖がからみあった二重らせん構造をとり, さらに連環状化, 超らせん (スーパーコイル) 化などにより複雑な三次元構造をとるため, DNA の複製, 転写あるいは染色体の凝集や分離などの DNA 代謝には, DNA トポイソメラーゼ (トポ) による DNA 鎖の一時的な切断と再結合を介する DNA の高次構造の変換が不可欠となる¹⁾. 真核細胞では, トポは I 型 (トポ I) と II 型 (トポ II) があり, 後者では α と β の 2 種のアイソザイムが報告されている²⁻⁴⁾. トポ I は一本鎖の切断を介して転写や複製により DNA 鎖に生じたスーパーコイルを解消している. また, トポ I は核小体に局在し rRNA 合成に関与すると考えられている^{5,6)}. トポ II は DNA の 2 本鎖を一過性に切断して他の DNA 鎖をくぐらせることにより, 2 つの DNA 間に生じた絡まりや knotting を解消する作用を持っている. トポ II α は細胞分裂時に一過性に発現して染色体の凝集や分離過程に重要な役割を演じ, 細胞分裂完了後に消失する. また, その酵素量も細胞増殖に関連して増加する⁷⁾. 一方, トポ II β は細胞増殖に伴う酵素量の変動を示さない⁷⁾. Tsutsui ら⁸⁾ は, 分裂能を失った成熟ニューロンでトポ II の酵素活性が高いことを見いだし, ラット脳のトポ II cDNA クローニングによりこの活性がトポ II β によるものであることを明確にした⁴⁾. さらに, トポ II β が生後発生中の小脳の顆粒細胞はじめ, ニューロンへの分化途上

にある海馬, 嗅球, 大脳皮質の幼若な神経細胞および分化の完了した脳内ニューロンで発現していることを, *in situ* hybridization で示し, トポ II β は神経細胞に選択的に発現していることを明らかにした⁹⁾. トポ II の細胞核内局在に関する免疫組織化学法による形態学的解析のほとんどが培養細胞を対象にしたものであり, トポ II β は核小体に局在する, 核質に分布する, あるいは両方に存在すると諸説が出されている (考察参照). トポ II β の *in vivo* における局在の変動については今までほとんど報告されていない¹⁰⁾. 今回, ラット胎生期の小脳板発生での神経上皮細胞の分裂増殖と移動, 外胚芽層の形成過程におけるトポ I とトポ II β の発現様式について, 各特異抗体を用いた免疫染色標本で観察した.

材 料 と 方 法

本観察には Wistar 系ラット胎児および新生仔を使用した. 交配後, 膣栓あるいは膣内に精子を確認できた日を妊娠 1 日目 (E1), 出生日を P0 とした. E17 以前に子宮より摘出した胎児は, 実体顕微鏡下で脳を剖出し髄膜を切開後, 直ちに Zamboni 液に入れて脳全体を 24 時間 (4 $^{\circ}$ C) 浸潤固定した. E18 以降の胎児および生後のラットは心臓左心室より生食水 10ml を灌流して駆血後, 続けて Zamboni 液 150-200ml を 20-30 分間かけて灌流し全身を固定した. 灌流固定後, 脳を取りだし, 新しい Zamboni 液 (4 $^{\circ}$ C) で更に 5 時間後固定した. その後, 脳は 20% ショ糖添加リオン酸緩衝液 (pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C)

に2—3日間侵漬して cryoprotect し、クリオスタットによる12 μ m厚矢状凍結切片を作成した。切片を正常血清で30分間ブロッキングした後、抗トポI抗体(ヒト由来)、抗トポII β モノクローン抗体(MAb 3B6, 名古屋大学医学部, 菊池韶彦教授より供与)ないし抗カルピンジン抗体(ウサギ由来, 新潟大学, 桑野良三助教授より供与)を12時間, 室温で作用させた。切片はPBS-Txで洗った後, ABC法(avidin-biotin-peroxidase complex kit, Vector社)による免疫組織化学反応を施し, 0.05% DAB(3,3'-diaminobenzidine)と0.1% H₂O₂で発色させた。免疫染色された切片は必要に応じて, 0.5% cresyl violet 水溶液で後染色を施した。

正常ラットにおける小脳板の発生過程は, 教室所蔵のラット胎児(E12—22)の矢状断連続ヘマトキシリン染色標本(パラフィン埋包, 7 μ m厚)を用いて観察した。

所 見

1) 小脳板の発生過程: 菱脳前背側部は菱脳峽を形成するために脳室側に隆起してくるが, 小脳板(cerebellar plate, 小脳原基)はこの菱脳峽隆起部の尾側部に発達してくる。E12で菱脳峽隆起部が明瞭となり, 小脳板は円形ないし楕円形の細胞核をもつ暗調に染まる神経上皮細胞(neuroepithelial cells; ne)が15—20列配列する脳室面神経上皮細胞層(NEL)のみから構成されている。NELの内, 脳室に面した最腹側のneには分裂像が多く認められた(Fig. 1 A)。菱脳峽隆起尾背側の第四脳室脈絡組織に脈絡叢(pl)が出現して脳室側に突出するようになったE14では, NEL背側に明るく染まる10—12列の細胞集団(cn)が認められ, 中間層(intermediate layer; IML)が形成されていた(Fig. 1 B)。E15になると小脳板は大きくなり, IMLではcnの腹側に下小脳脚由来の線維層が認められるようになり, さらにこの線維層とNELとの間に明調の細胞集団(pc)が出現しはじめる(Fig. 1 C)。pcが増加するにつれ, NELは減少していき, E16以降のNELは5—6層となり, 小脳板尾側端のgerminal trigone(GT)を除

き分裂像を呈するneも非常に少なくなる(Fig. 1 D, E)。この時期にはGTに接する小脳板背側表面には暗調の細胞集団が現れ, 数層の細胞層として小脳板背側表面を覆いながら前方に広がり, 外胚芽層(external germinal layer; EGL)を形成する(Fig. 1 D)。IMLは厚さを増すが線維成分も増えて, pcの分布密度はNELやEGLよりもずっと低く散在性となる。EGLはE17—19には小脳板背側表面全体を覆うようになり, 6—8列の細胞層となる(Fig. 1 F)。IMLの背側部でEGLの接する部分では, pcが3—4列集積してEGLを裏打ちし, 将来のプルキンエ細胞層(PCL)を形成する。EGLとPCLの間には極く狭い無染色層(将来の分子層, MOL)が認められる(Fig. 1 G)。E22ないしP0の小脳板では, primary fissure等の小脳溝と小葉形成がまじまり, EGL(6—10層), MOL, PCL(5—6層)およびIMLが明瞭に区別される。IML背側部は生後EGLから下降した細胞が顆粒層(granule layer)を形成するが, IMLの腹側部は細胞の分布密度が減少し, 線維の量が増加してP1以降は髄質層(medullary layer, ML)となる。他方, NELではneがなくなり1層の上皮細胞層(EP)となる(Fig. 1 H)。

2) Calbindin および DNA トポイソメラーゼの発現: 抗 calbindin 抗体による免疫染色では, E15までの小脳板組織には calbindin 様免疫組織化学反応陽性構造物は全く認められず(Fig. 2 A), E16以降のPCLの全細胞, IML内の楕円形の細胞核を持ち, その長軸を小脳板表面に向けた細胞および多くの線維が陽性反応を示した(Fig. 2 D, Fig. 3 A, D)。しかしながら, NELやEGLの細胞, さらにIML内の若干の細胞は calbindin 様免疫組織化学反応は非常に低いか陰性であった(Fig. 2 D, arrows)。

トポIおよびトポII β の小脳板での発現を各特異抗体を用いて免疫組織化学的に観察したところ, トポIは, 小脳板のNELではE15に散在性に極く少数の細胞が陽性を呈しはじめ(Fig. 2 B arrows)。E16以降はNELの多くの細胞で

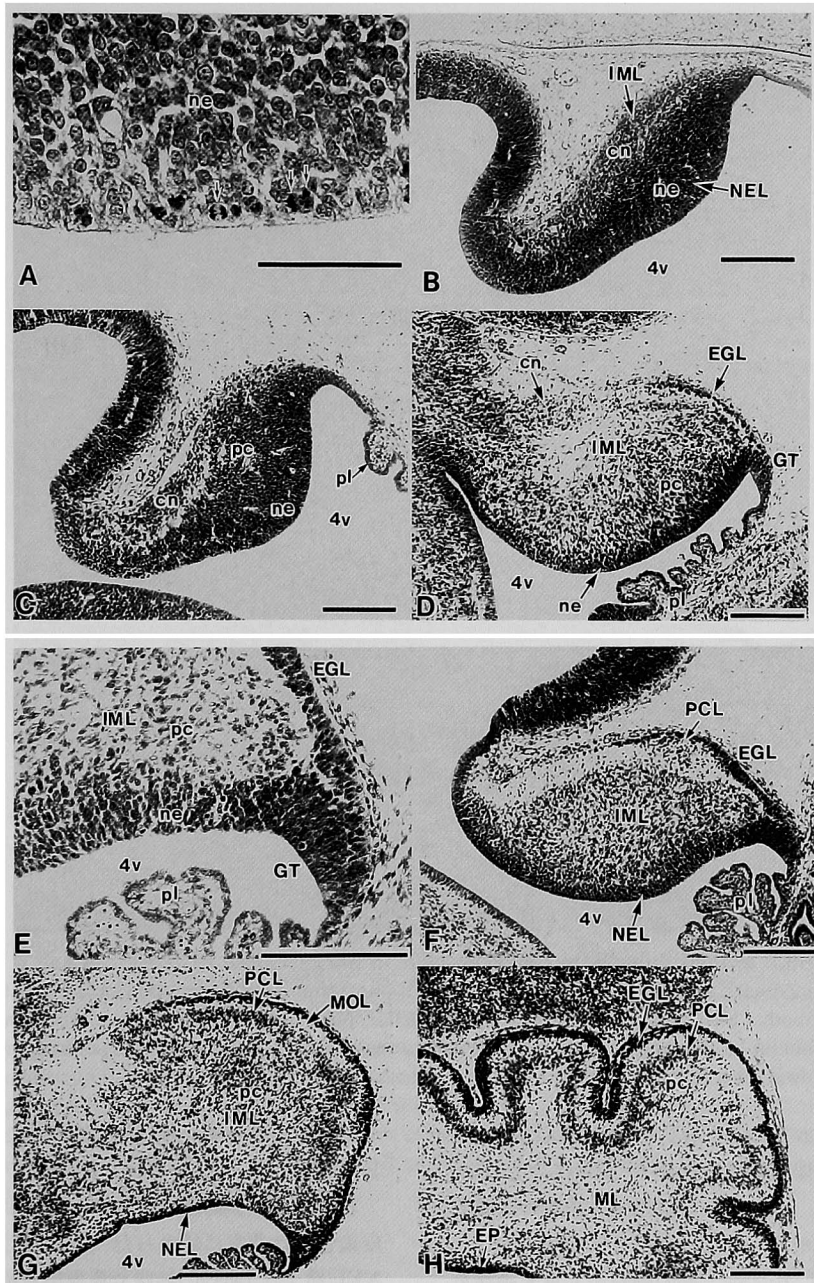


Fig. 1 Sagittal sections showing the developing cerebellar plate. A and B ; E14, C ; E15, D ; E16, E and F ; E17, G ; E19, and H ; E22. Hematoxylin staining. Bars in A and E, and in others indicate 100, and 200 μ m, respectively.

Abbreviations : EGL ; external germinal layer, EP ; ependyme, GT ; germinal trigone, IML ; intermediate layer, ML ; medullary layer, MOL ; molecular layer, NEL ; neuroepithelial layer, PCL ; layer of Purkinje cells, 4v ; 4th ventricle, cn ; differentiating cells to form the cerebellar nuclei, pc ; differentiating Purkinje cells, ne ; neuroepithelial cells, pl ; choroidal plexus. Arrows in A indicate proliferating neuroepithelial cells.

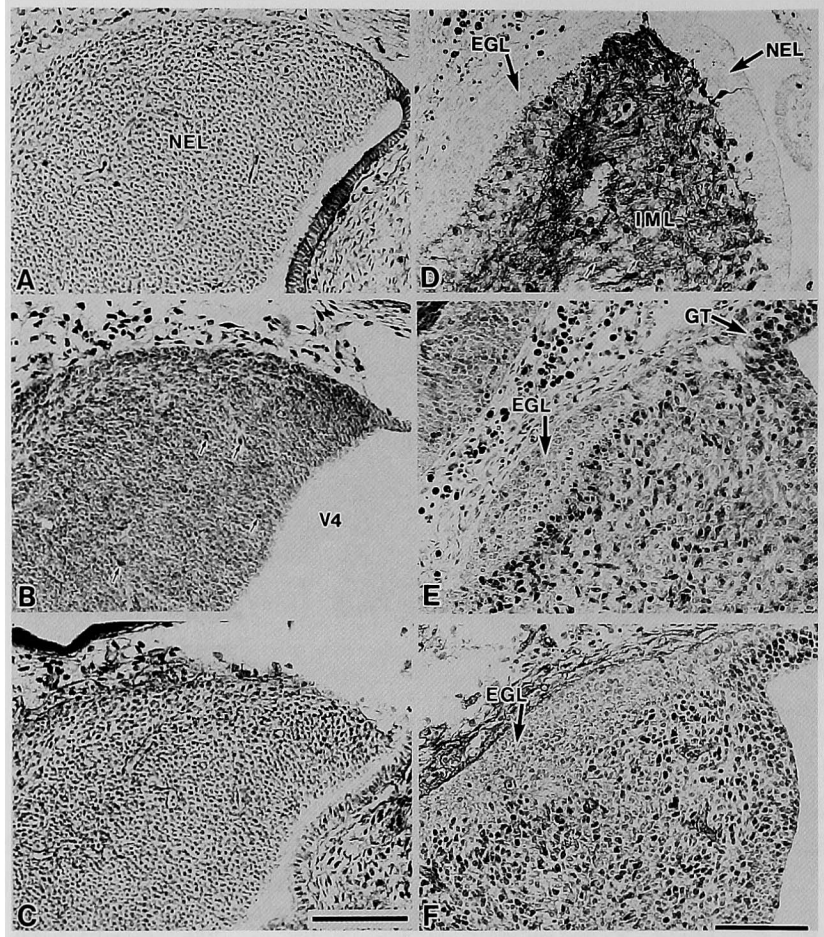


Fig. 2 Sagittal sections through the cerebellar plate in E15 (A-C) and E17 (D-F). A and D; immunostained with anti-calbindin antibody, B and E; anti-topo I antibody, and C and F; anti-topo II β antibody. Bars indicate 100 μ m. The cerebellar plate in E15 shows no immunoreactivity to calbindin (A). Strong immunoreactive cells were observed in E15 with anti-topo I antibody (B, arrows). See abbreviations in Fig. 1.

免疫染色性が続いた。GT となる NEL 尾端部ではトポ I 陽性細胞がやや多く認められた (Fig. 2 E, GT)。EGL では E17 以降に少数の細胞で免疫染色性がみられた (Fig. 2 E, Fig. 3 B)。E17 の IML 中では一部の細胞がトポ I 陽性を示し、E19 になると多くのものが強い免疫染色性を示すようになるが、これらの細胞は楕円形あるいは卵円形の細胞核をもち、その多くが長軸を小脳板外表面に向けていた (Fig. 2 E)。IML 中のトポ I 陽性細胞は E20 以降 P 0 に至るまで認められた (Fig. 3 B, E)。E17 の PCL の細胞でトポ I 陽性を示しはじめ、E19 以降、トポ

I に対する免疫染色性は増加していた (Fig. 3 B)。

E15 までの小脳板組織ではトポ II β に対する免疫染色性は非常に低かった (Fig. 2 C) E16 の NEL および IML の細胞で免疫染色性をしめすものがみられはじめ、E17 以降では PCL, GT にもトポ II β 陽性細胞が認められた (Fig. 2 F)。IML や PCL のトポ II β 陽性細胞の免疫染色性は E19 以降増強したが、特に IML 内の陽性細胞の細胞核は楕円形ないし卵円形で長軸を小脳板外表面に向けているものが多かった。IML 内の細胞ではトポ II β に対する免疫染色性を示さな

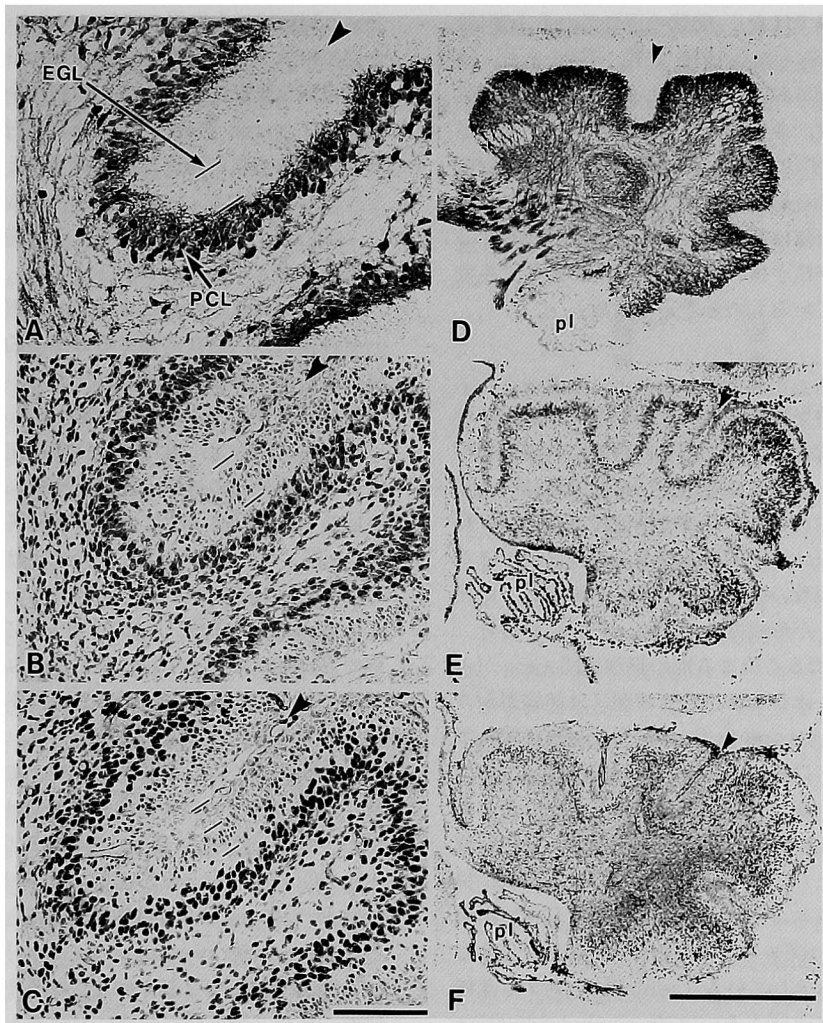


Fig. 3 photomicrographs of parasagittal sections of the developing cerebellar cortex on E22. A and D ; immunostained with anti-calbindin antibody, B and E ; anti-topo I antibody, and C and F ; anti-topo II β antibody. Arrowheads indicate the primary fissure. No calbindin-immunopositive cell in EGL (A), but many topo I-positive cells throughout the layer (B). Note immunopositive cells to topo II β (C) in the ventral half of EGL. Bars in C and F indicate 100 and 500 μ m, respectively. See abbreviations in Fig.1.

いものも相当数みられた (Fig. 2 F). NEL, GT, IML および PCL におけるトポII β 陽性細胞の出現時期はトポI陽性細胞のそれと類似していたが, EGL では両者の発現時期は大きく異なっていた. トポIはE17のEGL細胞ですでに陽性を示していた (Fig. 2 E) が, EGL におけるトポII β 陽性細胞はE22以降になって, 初めてEGL腹側1/2部に認められるようになった

(Fig. 3 C). トポI陽性細胞はEGL全層で認められたが (Fig. 3 B). EGL背側1/2部の細胞はトポII β に対する免疫染色性は極めて低かった (Fig. 3 C).

なお, E22以降の幼若な小脳皮質で小脳溝が形成され分葉化が起こるが, calbindin陽性細胞はすべての小葉に均等に分布していた (Fig. 3 D)のに反し, トポIおよびトポII β 陽性細胞の

分布は均等ではなく、発達の遅れている小葉(後葉)で多くみられた (Fig. 3 E, F). また、胎児期小脳板におけるトポ I およびトポ II β の細胞核内分布は、今回作製した DAB-H₂O₂ 発色標本では、いずれも細胞核内に強く均一にみられ、核小体のみ局在する像や核小体が染まらず透明に抜けた像は認められなかった。したがって、核質および核小体の両者が同程度の強さで免疫染色されているものと考えられた。

考 察

ラット胎児期における小脳原基(小脳板)の発達は、神経上皮層(NEL)背側に明調細胞が認められるようになる胎生13日目(E13)より始まるとされている¹¹⁾。教室所蔵の標本でも、E12の小脳板はNELのみであるが、E14ではその背側に少数の明調細胞(cn)がみられ、中間層(IML)が形成されていた。E15になると、IMLには明るく染まる別の細胞集団(pc)がみられるようになるが、cnとの間には線維層がみられる。Altmann & Bayer¹²⁾は、cnに相当する細胞はE13頃に小脳板の腹外側部にはじめに出現し、やがて背内側部へ移動していくことを観察し、腹外側部の細胞集団をdz1、背内側部にたまったものをdz2と呼び、これらは共に将来の小脳核ニューロンとなる細胞、E16に出現するdz3はプルキンエ細胞にそれぞれ分化する細胞であるとしている。Calbindinに対する免疫組織化学法¹³⁻¹⁶⁾あるいは *in situ* hybridization法¹⁷⁾より、プルキンエ細胞は分化の早い時期から calbindin 陽性となることが知られている。今回の観察で、E16以降に IML 中で calbindin 様免疫組織化学陽性反応を呈した細胞はプルキンエ細胞に分化しながら移動中の細胞 [pc, Altmann & Bayer¹²⁾の dz3に相当する] であり、calbindin 様免疫組織化学反応陰性のものは小脳核ニューロンとなる細胞 [cn, Altmann & Bayer¹²⁾の dz2, 3に相当する] であると考えられた。Enderlin ら¹⁴⁾は、E15ラットの 小脳板外尾側部に calbindin 様免疫組織化学陽性細胞を認め、これらは小脳核ニューロンになる細胞であるが、E21までには calbindin に対する免疫染色性は失われるとしている。小脳核ニューロンはE13

ないしE14に神経上皮層の背側に分化してくるが、今回の観察でこの時期の小脳板内に calbindin 様免疫組織化学反応陽性を示す細胞は全く認められず、また、pcが陽性となるE16以後に IML 内の全ての細胞が陽性反応を示すこともなかったため、小脳核ニューロンに分化する細胞(cn)に calbindin が一過性に発現する可能性は極めて低いと考えられる。

今までに報告されている DNA トポイソメラーゼの細胞核内局在に関する形態学的解析は、ほとんどが培養細胞でなされており、発生途上の組織内での局在に関する報告は極めて少ない^{4,9,10)}。小脳板におけるトポ I 様免疫組織化学陽性細胞は、E15の神経上皮層(NEL)で検出されはじめ、E16で NEL の全細胞が陽性を示した。一方、トポ II β の NEL での検出はトポ I のそれより一日遅れたE16から始まっていた。NEL, GT, IML および PCL におけるトポ II β 陽性細胞の出現時期はトポ I 陽性細胞のそれと類似していたが、E17に形成され始める外胚芽層(EGL)では両者の検出時期は異なっていた。トポ I は E17の EGL で弱い陽性反応がすでに認められたが、トポ II β に対する免疫染色性はE22まで極めて低かった。生後発生過程でトポ II α の発現する EGL 背側 1/2 部の細胞層 [proliferating zone,^{12,18)}] ではトポ II β 陽性細胞はほとんど検出されなかったが、premigratory zone^{12,18)}に相当する EGL 腹側 1/2 部の細胞では免疫染色性が認められた。胎児期小脳板におけるトポ I およびトポ II β の発見は核質に均等にみられたが、培養細胞の核質におけるトポ I は点状分布¹⁹⁻²²⁾あるいは核質全体に分布²³⁾とするとしている。Meyer ら²⁴⁾は蛍光免疫染色法で、分裂期間ではトポ I は核質内に均質に分布するが、S 期でのみ約30%の細胞核で点状に分布したと報告しており、細胞分裂周期によりトポ I の局在様式は変化している。今回観察された発生途上の小脳皮質で、分裂周期から抜け出し分化過程に入った幼弱な神経細胞ではトポ I は核質に均等に分布しており、培養細胞の分裂間期での所見に一致する。しかし、今回の DAB-H₂O₂ 発色では NEL 内のトポ I 陽性細胞でも核質内に点状に分布する免疫染色像はみられなかった。また、トポ I が

核小体に局在することが培養細胞で知られている^{5,6,19-22,25,26})が、幼若な神経細胞では核質の染色性が非常に強いので、核小体が明瞭に強く染まる像は見られなかった。しかしながら、細胞核全体にトポ I に対する強い免疫染色性がみられた今回の所見は、核小体にもトポ I が発現していることを意味している。

トポ II β の細胞核内の局在については、核小体ではなく核質に分布する^{24,27}、核質ではなく核小体に分布する²⁰⁻²²、あるいは核小体と核質の両方に分布する²⁸⁻³⁰)とする 3 通りの所見が報告されているが、いずれも培養細胞による免疫染色所見を基にしている。Chaly & Brown²⁹)は、固定液の種類と濃度および固定時間をそれぞれ変えて固定処理した HeLa 細胞とヒト末梢血中リンパ球を、数種類のトポ II β およびトポ II α の抗体で処理して免疫染色性を比較した結果、トポ II β の主たる局在部位は核質であるが、少量のトポ II β が核小体内に存在することを見出している。また、彼ら²⁹)は抗体の特異性に関しては、菊池らの作成したモノクローン抗体 (MAb 5 A 7) が一番優れている事を示しており、我々が今回の観察で使用した抗トポ II β モノクローン抗体 (MAb 3 B 6) も菊池らが MAb 5 A 7 と同時に作成したものであり、高い特異性を有している。胎児期小脳原基でのトポ II β は、トポ I 同様、神経上皮層 (NEL) から離れて移動し分化しはじめた幼若なプルキンエ細胞の核質と核小体とに均等に強く発現していた。一方、外胚芽層 (EGL) の細胞での両者の発現時期は異なり、germinal trigone (GT) で分裂後、小脳板表面を移動して EGL を形成しはじめた E17 でトポ I の発現は既にみられたが、トポ II β の方は遅れて E22 以降であった。EGL での発現部位もトポ I は全層に認められたのに反し、トポ II β の

発現は、表層での細胞分裂が終わって顆粒細胞への分化過程に入った細胞が集積する EGL 腹側 1/2 部 [premitratory zone^{12,18}] に限局していた。このことから、トポ I とトポ II β はともに発生途上の幼若な細胞の核質および核小体での DNA 代謝に関与するが、トポ II β は細胞分化と密接な関係をもって発現していると考えられた。

結 論

1. 小脳原基 (小脳板) の神経上皮層では胎生 15 日目 (E15) にトポ I が、E16 にトポ II β がそれぞれ免疫組織化学的に検出された。
2. E16 の中間層 [外套層] 内の将来プルキンエ細胞に分化する細胞で、calbindin、トポ I およびトポ II β 陽性細胞がそれぞれみられはじめ、E19 のプルキンエ細胞層で calbindin およびトポ II β の免疫染色性は強くなっていった。
3. E16 に germinal trigone から増殖した細胞が小脳板外表面を被って外胚芽層 (EGL) を形成しはじめるが、免疫組織化学的に検出されるトポ I の発現は E17 で EGL 全層に散在性に認められたのに反し、トポ II β の発現は E22 になって EGL 腹側 1/2 部の細胞にのみ認められた。
4. 小脳板組織の幼若なニューロンにおけるトポ I およびトポ II β の分布は、核質および核小体の両方に認められ、共に DNA 代謝に関与するが、トポ II β はニューロン分化と特に密接な関係をもっていると考えられた。

ご指導を賜りました徳永毅教授、筒井公子講師に心より御礼申し上げます。標本作製にあたった解剖学第三講座技術補佐員、竹内玲子氏に深謝します。本研究は第 21 回日本神経科学大会 (1998) で発表された。

文 献

- 1) Wang, JC : DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* (1996) **65**, 635-692.
- 2) Drake FH, Zimmerman JP, McCabe FL, Bartus HF, Per SR, Sullivan DM, Ross WE, Mattern MR, Johnson RK, Crooke ST and Mirabelli CK : Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme *J Biol Chem* (1987) **262**, 16739-16747.

- 3) Chung TD, Drake FH, Tan KB, Per SR, Crooke ST and Mirabelli CK: Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) **86**, 9431—9435.
- 4) Tsutsui K, Tsutsui K, Okada S, Watanabe M, Shohmori T, Seki S and Inoue Y: Molecular cloning of partial cDNAs for rat DNA topoisomerase II isoforms and their differential expression in brain development. *J Biol Chem* (1993) **268**, 19076—19083.
- 5) Muller MT, Pfund WP, Mehta VB and Trask DK: Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *EMBO J* (1985) **4**, 1237—1243.
- 6) Trask DK and Muller MT: Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) **85**, 1417—1421.
- 7) Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, Mattern MR, Crooke ST and Mirabelli CK: Biochemical and pharmacological properties of p 170 and p 180-forms of topoisomerase II. *Biochem* (1989) **28**, 8154—8160.
- 8) Tsutsui K, Tsutsui K, Sakurai H, Shohmori T and Oda T: Levels of topoisomerase II and DNA polymerase α are regulated independently in developing neuronal nuclei. *Biochem Biophys Res Commun* (1986) **138**, 1116—1122.
- 9) Watanabe M, Tsutsui K, Tsutsui K and Inoue Y: Differential expressions of the topoisomerase II α and II β mRNA in developing rat brain. *Neurosci Res* (1994) **19**, 51—57.
- 10) 筒井公子, 徳永 毅: 脳の発生・分化におけるトポイソメラーゼII β の役割. *細胞工学* (1997) **16**, 1625—1632.
- 11) Altman J and Bayer SA: Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neurol* (1978) **179**, 23—48.
- 12) Ibid: An overview of early cerebellar system development. An examination of histological sections in normal rat embryos: *in* Development of the cerebellar system. In relation to its evolution, structure, and functions. CRC Press, Boca Raton, NewYork, London, Tokyo (1997) pp. 83—97.
- 13) Legrand Ch, Thomasset M, Parkes CO, Clavel MC and Rabie A: Calcium-binding protein in the developing rat cerebellum. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* (1983) **223**, 389—402.
- 14) Enderlin S, Norman AW and Celio MR: Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol* (1987) **117**, 15—28.
- 15) Iacopino AM, Rhoten WB and Christakos S: Calcium binding protein (calbindin-D_{28k}) gene expression in the developing and aging mouse cerebellum. *Mol Brain Res* (1990) **8**, 283—290.
- 16) Yuasa S, Kawamura K, Ono K, Yamakuni T and Takahashi Y: Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. *Anat Embryol* (1991) **184**, 195—212.
- 17) Usui H, Katagiri T, Yoshida Y, Nishiyama A, Ichikawa T, Kuwano R, Takahashi Y and Kumanishi T: *In situ* hybridization histochemistry of spot 35 protein, a calcium-binding protein, in the rat brain. *Mol Chem Neuropathol* (1991) **15**, 207—216.
- 18) Altman J: Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol* (1972) **145**, 353—398.
- 19) Rose KM, Szopa J, Han F-S, Cheng Y-C, Richter A and Scheer U: Association of DNA topoisomerase I and RNA polymerase I: A possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription. *Chromosoma (Berl)* (1988) **96**, 411—416.
- 20) Negri C, Chiesa R, Cerino A, Bestagno M, Sala C, Zini N, Maraldi NM and Astaldi-Ricotti GCB:

- Monoclonal antibodies to human DNA topoisomerase I and the two isoforms of DNA topoisomerase II. 170- and 180 kDa isozymes. *Exp Cell Res* (1992) **200**, 452–459.
- 21) Zini N, Martelli AM, Sabatelli P, Santi S, Negri C, Astaldi-Ricotti GCB and Maraldi NM : The 180-kDa isoform of topoisomerase II is localized in the nucleolus and belongs to the structural elements of the nucleolar remnant. *Exp Cell Res* (1992) **200**, 460–466.
 - 22) Zini N, Santi S, Ognibene A, Bavelloni A, Neri LM, Valmori A, Mariani E, Negri C, Astaldi-Ricotti GCB and Maraldi NM : Discrete localization of different DNA topoisomerases in HeLa and K562 cell nuclei and subnuclear fractions, *Exp Cell Res* (1994) **210**, 336–348.
 - 23) Buckwalter CA, Lin AH, Tanizawa A, Pommier YG, Cheng Y-C and Kaufmann SH : RNA synthesis inhibitors alter the subnuclear distribution of DNA topoisomerase I. *Cancer Res* (1996) **56**, 1674–1681.
 - 24) Meyer KN, Kjeldsen E, Straub T, Knudsen BR, Hickson ID, Kikuchi A, Kreipe H and Boege F : Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities, *J Cell Biol* (1997) **136**, 775–788.
 - 25) Fleischmann G, Pflugfelder G, Steiner EK, Javaherian K, Howard GC, Wang JC and Elgin SCR : *Drosophila* DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) **81**, 6958–6962.
 - 26) Raska I, Dunder M, Koberna K, Melcak I, Risueno M-C and Torok I : Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? A critical appraisal. *J Struct Biol* (1995) **114**, 1–22.
 - 27) Cowell IG, Willmore E, Chalton D, Marsh KL, Jazrawi E, Fisher LM and Austin CA : Nuclear distribution of human DNA topoisomerase II β . A nuclear targeting signal resides in the 116-residue C-terminal tail. *Exp Cell Res* (1998) **243**, 232–240.
 - 28) Petrov P, Drake FH, Loranger A, Huang W and Hancock R : Localization of DNA topoisomerase II in chinese hamster fibroblasts by confocal and electron microscopy. *Exp Cell Res* (1993) **204**, 73–81.
 - 29) Chaly N and Brown DL : Is DNA topoisomerase II β a nucleolar protein? *J Cell Biochem* (1996) **63**, 162–173.
 - 30) Chaly N, Chen X, Dentry J and Brown DL : Organization of DNA topoisomerase II isotypes during the cell cycle of human lymphocytes and HeLa cells. *Chrom Res* (1996) **4**, 457–466.

Expression of DNA topoisomerase I and $\text{II}\beta$ in the developing cerebellar plate in rat embryos

Makoto OGAWA

Third Department of Anatomy,
Okayama University Medical School,

Okayama 700-8558, Japan

(Director : Prof. A. Tokunaga)

DNA topoisomerases are enzymes that catalyze topological changes of DNA by transiently cleaving one (topo I) and a pair of complementary DNA strands (topo $\text{II}\beta$), participating in cellular transactions of DNA. Expression of both enzymes in the developing cerebellar plate in rat embryos was studied immunohistochemically. Neuroepithelial cells in the ventricular layer expressed topo I and topo $\text{II}\beta$ on embryonic day 15 (E15) and E16, respectively. On E 16-22, cells in the intermediate layer (IML) are known to undergo extensive differentiation to become Purkinje cells and deep cerebellar neurons. Many IML cells, immunostained with not only anti-topo I and $\text{II}\beta$ but also-calbindin antibodies, were differentiating and migrating to form the Purkinje cell layer. Cells in the external germinal layer (EGL) on E17, originating from the germinal trigone and spreading over the surface of cerebellar plate, expressed topo I on E17. Topo $\text{II}\beta$ immunoreactive cells, however, were not readily recognized in EGL until E22. The topo $\text{II}\beta$ immunopositive cells resided in the ventral half of the layer, corresponding to the premigratory zone of postnatal EGL. These data suggest the involvement of topo I and $\text{II}\beta$ in DNA metabolism associated with cerebellar development in embryos, especially that of topo $\text{II}\beta$ in the processes of neuronal differentiation.