

# Prominent Expression of Type1( $\gamma$ )Protein Kinase C in Purkinje Cells Located in the "Central Mass" of Reeler Mutant Mouse Cerebellum as Revealed by a Computer Image Analysis Technique

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8479">http://hdl.handle.net/2297/8479</a>

# リーラーマウス小脳中心白質部細胞集団プルキンエ細胞における プロテインキナーゼ C ( $\gamma$ ) の特異的発現に関して

— コンピューター画像解析法による定量報告 —

金沢大学医学部解剖学第二講座 (主任: 田中重徳教授)

守 屋 円

リーラーマウスにおいて、異常位置を示す小脳プルキンエ細胞が異常なシナプスを形成することが報告されてきた。本研究においては、異常な求心性入力をもつ中心白質部細胞集団の中のプルキンエ細胞と正常位置(すなわち分子層)に位置するプルキンエ細胞の間でタイプ1 ( $\gamma$ ) プロテインキナーゼ C (type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C, PKC) の発現に差異があるか否かを、免疫組織化学の手法にコンピューター画像解析を応用することにより検索した。その結果、正常位置の細胞集団と比較して、中心白質部にある異常位置プルキンエ細胞集団の PKC の発現が著明に高いという興味深い結果が得られた。この結果は PKC がプルキンエ細胞における異常なシナプス形成にも積極的な関与をしている可能性を強く示唆するものである。

**Key words** reeler mouse, cerebellum, type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C, computer image analysis, synaptogenesis

リーラーマウスは小脳失調性疾患のモデル動物の一つとして知られてきた<sup>1)</sup>。その形態学的な変化として、肉眼的には小脳小葉の萎縮が、顕微鏡的には小脳の層構造の消失が報告されている<sup>2)</sup>。分子層も顆粒層も薄くなり、正常ならば分子層に位置するはずのプルキンエ細胞は極く僅かであるのに対し、中心白質部は肥厚し、85%以上のプルキンエ細胞は細胞移動障害の結果、この中心白質部に留まっている<sup>3)</sup>。リーラーマウスのプルキンエ細胞は、小脳皮質表面にある正常位置(分子層)にあるもの、顆粒細胞層内にあるもの、中心白質部にあるもの (central mass)、深部小脳核と混在して存在するもの、にわけられ、それぞれ異なる細胞環境におかれている<sup>4)</sup>。中でも顆粒細胞層内にあるもの、中心白質部にあるもの (central mass)、深部小脳核と混在して存在するもの、に関しては細胞環境の違いに起因する様々な異常なシナプス (異所性シナプス) を形成することが報告されているが、特に中心白質部に存在する異常位置プルキンエ細胞では異常なシナプス形成が顕著であって、ここでは苔状線維とプルキンエ細胞間の異所性シナプス形成やプルキンエ細胞へ向かう登上線維が多数残存する等の異常がみられる<sup>4)</sup>。これに対して、正常位置に存在するプルキンエ細胞では、これらの異所性シナプスは認められない。このようにリーラーマウスでは、同一個体に見られる4種類の異なる位置にあるプルキンエ細胞が、それぞれがおかれている位置によって、様々なシナプスを形成するのである<sup>4)</sup>。それ故、このミュータントマウスはシナプス形成 (synaptogenesis) を決定もしくは修飾する条件を研究するのに格好なモデル動物であるといえる。更にリーラーマウスにおいては、入力系、出力系とも特に異常がなく、

中枢神経系の他の場所での神経連絡は小脳を除き正常である為<sup>5)</sup>、リーラーマウスで認められる異所性シナプスが機能代償的な意味をもつ可能性がある。つまり異所性シナプスが存在しなければ神経回路網全体が完結せず、リーラーマウスはこのシナプスを形成することによって、辛うじて神経回路全体の連絡を保っているということが考えられる。しかし、この機能代償的なシナプス形成に対しどのような物質的な機序が働かについては報告がなく、機能代償的なシナプス形成に対し、神経細胞シナプス間の可塑的変化が果たす役割も明らかではない。そこで、今回著者は以上の疑問に答える為の最初の手がかりを得るために、リーラーマウスの正常位置プルキンエ細胞及びとりわけ異所性シナプス形成が著明な中心白質部に位置する異常位置プルキンエ細胞の間で、キーとなる物質の発現量の差異を、コンピューター画像解析により明らかにすることを意図した。本研究ではキーとなる物質の候補としてタイプ1 ( $\gamma$ ) プロテインキナーゼ C (type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C, PKC) を選んだ。この物質は小脳に豊富に存在し<sup>6-8)</sup> イオンチャンネルのコンダクション制御<sup>9,10)</sup> 神経伝達物質の放出の増強<sup>11,12,13)</sup>、および神経細胞の可塑的変化に何等かの役割を果たすことが報告されている<sup>14,15)</sup>。また、発達途上のマウスで後天的シナプス形成に重要な時期である2週齢で特異的に上昇し、PKC がシナプス形成に積極的な役割を果たしていることが報告されている<sup>16,17)</sup>。

## 材料および方法

### 1. リーラーマウス

リーラーマウス (r1/r1) はそのヘテロ型 (r1/+)—(運動失調は

平成5年9月30日受付, 平成5年10月26日受理

Abbreviations: ABC, avidin biotylated horseradish peroxidase complex; CIE, commission international de L'Eclairage; DAB, diaminobenzidine; PBS, phosphate buffered solution; PKC, type 1 ( $\gamma$ ) prottein kinase C

認められない)を交配させることによりホモ型として得られる。このヘテロ型 (r1/+) のブリーディングペア (breeding pair) を Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) より入手し、本学動物施設で系統維持をおこなった。個体数 8 例のホモ型ミュータントマウスを経心的に 4% パラホルムアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) (phosphate buffered solution, PBS) により灌流固定した。脳は同液で 1 昼夜、後固定し、系列アルコールで脱水をした後、パラフィンに包埋した。2-6 $\mu$ m の厚みで矢状断ないし前額断し、連続切片を作成した。

## II. 免疫組織化学

切片はモノクローナル抗体 (MC-1a)-PBS 溶液 (最終濃度 2 $\mu$ g/ml IgG) で 20 時間反応させた。この MC-1a はタイプ 1 ( $\gamma$ ) プロテインキナーゼ C に対するモノクローナル抗体である (MBL, 名古屋)。免疫組織化学的染色方法はジアミノベンジジン (diamino benzidine, DAB) 反応を利用するアビジンビオチン化ホースラデッシュペーパーオキシダーゼ複合体 (avidin biotylated horseradish peroxidase complex, ABC) 法 (Vecstain Kit, Vector Laboratory, Burlingame, USA) に従った。

## III. コンピューター画像解析

免疫組織化学の結果を定量的に評価する為、本研究ではコンピュータ画像解析の方法を導入した。ハードウェアのシステム構成図 (ブロックダイアグラム) を図 1 に示す。DAB 呈色反応による濃度はアナログ値であるが、定量計測の為に画像処理の技術によりデジタル値に変換される。自然画像の信号処理は以下の 2 段階で処理される。まず、光学顕微鏡からの自然画像は CCD-TV カメラを通じてコンピュータに転送され、各々ピクセル毎のデジタル値に変換される。各ピクセルは 15bit のデジタル値 (カラーコード) として表され、各々 5bit の緑成分, 5bit の赤成分, 5bit の青成分からなる。色の三原則に従い、ピクセルの色は各々緑, 赤, 青成分の混合により表現される。解像度は 512 $\times$ 512 ピクセルである (第一段階)。次にデジタル値であるカラーコードは国際照明委員会 (Commission International de L'Eclairage, CIE) 算出式により白黒の濃淡値

(gray value) に変換される (第二段階)。この算出式はカラー TV 信号を白黒 TV 信号に変換するために汎用的に使われるものであって、以下の如くである<sup>19)</sup>。

$$\text{白黒濃淡値} = 0.299 \times \text{赤輝度値} + 0.587 \times \text{緑輝度値} + 0.114 \times \text{青輝度値} \quad (\text{CIE 算出式})$$

白黒濃淡値の強さは 32 段階とることになる。これは本システムで赤, 緑, 青, の各成分が 5bit の 2 進数をとるからである ( $2^5=32$ )。

プルキンエ細胞の免疫陽性反応を定量計測するための詳細な処理は以下の通りである。まず、計測対象となるプルキンエ細胞がトレースされ、通し番号がつけられる。次にトレースされたプルキンエ細胞において、そのトレースライン内の領域 (プルキンエ細胞の細胞体) に相当する全ての場所のピクセルのカラーコードの値が読み出され、CIE 算出式により白黒濃淡値に変換される。この 32 段階のうち、より低い値は呈色反応の色が濃いことを表す。これはコンピュータ-CRT の色彩表現が加法混色を採用しているからである<sup>20)</sup>。最後に白黒濃淡値数分布ヒストグラムがトレースされたプルキンエ細胞の 1 個個々に対しそれぞれ作られる。各白黒濃淡値数分布ヒストグラムにはそのデータのもととなった (つまりトレースされた) プルキンエ細胞の通し番号と同じ番号が付けられた。必要なコンピュータのソフトウェアは、著者が C 言語 (C-compiler pro 68K, シャープ, 東京) を用いて本研究の為に独自にプログラムしたものである。

## 成 績

コンピュータ画像処理による解析の結果、PKC 抗体に対する免疫陽性反応の呈色の強さは、リーラーマウス小脳において中心白質部細胞集団に位置する異常位置プルキンエ細胞の方が、分子層にある正常位置プルキンエ細胞に比べて、著明に強いという興味深い結果が得られた。このことは中心白質部異常位置プルキンエ細胞集団における PKC の発現が有意に上昇していることを明瞭に物語っている。リーラーマウス 1 個体の例

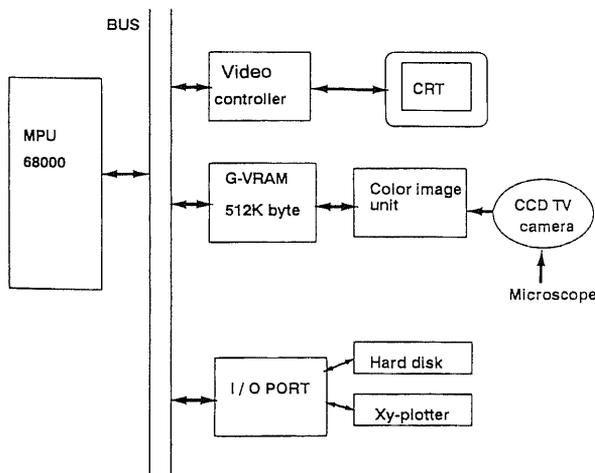


Fig. 1. Block diagram of computer image analysis system constructed for these experiments. Through a CCD TV camera, the natural image from a light microscope is sent to a computer and is converted into digital data for individual pixels. The resolution magnitude is 512 $\times$ 512 pixels in this system. See text for details.

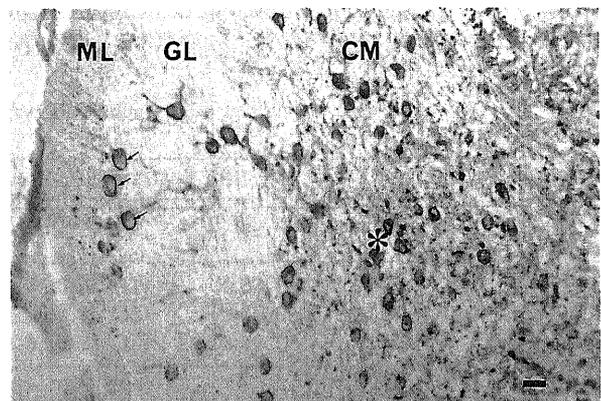
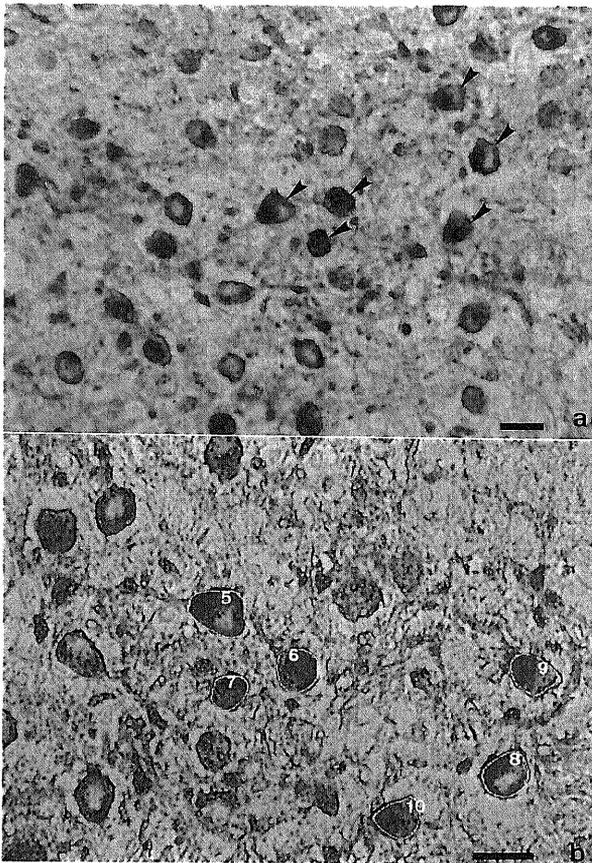


Fig. 2. Photograph from the Reeler mutant mouse cerebellum immunostained for type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C in a coronal section. Arrowheads, the Purkinje cells in the molecular cell layer; asterisk, the Purkinje cells in the central mass; ML, molecular layer; GL, granular layer; CM, central mass. Bar, 80  $\mu$ m.



では、分子層（正常位置）で5個プルキンエ細胞（通し番号0-4）をサンプリングし、中心白質部細胞集団で11個のプルキンエ細胞（通し番号5-15）をサンプリングした。その中で通し番号5-10をサンプリングした例をしめす（図3a, b）。この場合、分子層のプルキンエ細胞のサンプル数が少ないのは移動障害により、もともとこの位置にあるプルキンエ細胞が、中心白質部にある異常位置プルキンエ細胞よりも大幅に減少しているためである。白黒濃淡値数分布ヒストグラムはトレースされたプルキンエ細胞の白黒濃淡値に由来している（図4）。より低い白黒濃淡値はより暗い輝度を示す。中心白質部に位置する異常位置プルキンエ細胞の平均白黒濃淡値は  $17.9 \pm 0.95$  であり、分子層に位置する細胞のそれは  $23.6 \pm 1.48$  であった。中心白質部に位置する異常位置プルキンエ細胞（通し番号5-15）の免疫呈色反応の色の輝度は分子層に位置する正常位置プルキンエ細胞（通し番号0-4）の輝度よりも強かった。白黒濃淡値数分布ヒストグラムをすべてあわせた平均ヒストグラムを図5で示す。T検定の結果、この二つの細胞の集団（分子層と中心白質部）の呈色反応の色濃度には有意の差異があった ( $t_0 = 4.32$ ,  $p(t_0) < 0.005$ )。以上の結果より、中心白質部異常位置プルキンエ

Fig. 3. Immunopositive Purkinje cells in the white matter (central mass) of Reeler mutant mouse cerebellum for the computer image analysis. (a) Purkinje cells (arrowhead) located in the central mass of Reeler mutant mouse. (b) The 6 traced (encircled) Purkinje cells (tracing numbers 5-10) for image analysis at the same area as in Fig. 3a. Bar, 80  $\mu$ m. Eleven Purkinje cells (tracing numbers 5-15) were sampled in the central mass. (see Figs. 4-5).

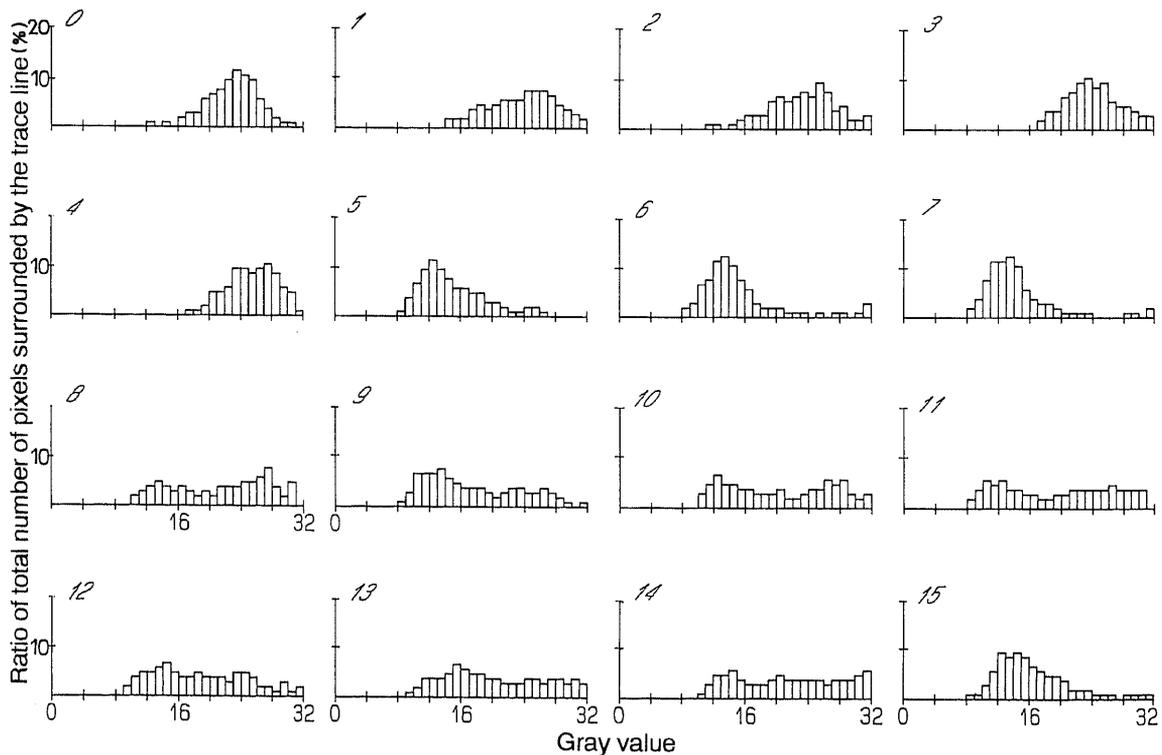


Fig. 4. Frequency distribution histograms of gray value calculated from the immunopositive density of the traced Purkinje cells in the "cortex" (sample numbers, 0-4) and "central mass" (sample number, 5-15) of Reeler mutant mouse. The horizontal line shows the 32-degree class of gray value. The vertical line shows the number of pixels. The vertical scale to the left indicates 10% of the total number of pixels that were surrounded by the trace line.

細胞集団に属し異所性シナプスをよく形成するプルキンエ細胞において、PKCの発現の上昇が明らかになった。表1は他の2匹のミュータントマウスのデータを含む平均白黒濃淡値をまとめて表示したものである。T検定の結果、全ての例で二つの細胞集団間に有意な差が認められた。

### 考 察

本研究で用いた一次抗体はマウスのIgGである為、偽陽性反応の可能性がありうるが、このことは以下に示す理由によりその可能性が極めて少ないものと考えられる。まずPKCモノクローナル抗体の正常マウス(r1/+ +/+)における染色結果が従来報告されてきた所見<sup>19,20)</sup>と一致していること。すなわち、PKCはプルキンエ細胞でのみ陽性であり、顆粒細胞、小脳核細胞をはじめ、他の細胞に関しては陰性であったことは染色技術

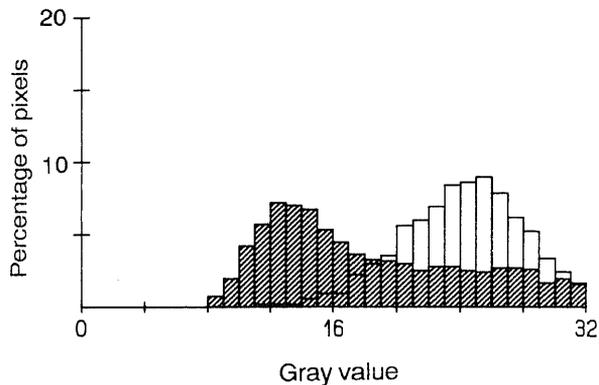


Fig. 5. The averaged histogram comparing the immunopositive density between Purkinje cells in the cortex and the central mass. The white histogram calculated from the gray value histogram (numbers 0-4) and the cross-hatched one from that (numbers 5-15) in Fig. 4, respectively. A significant difference between the white histogram and cross-hatched histogram is clearly obtained when the t-test is applied (to; 4.32;  $p$  (to) < 0.005). (See Table 1.) The peak value of the cross-hatched histogram is shifted to the left compared with that of the white histogram. Because the lower gray class indicated a higher density, a shift to the left means that the immunopositive density of Purkinje cells in the central mass (tracing numbers 5-15) is higher than that in the cortex (tracing numbers 0-4). The principle is the same as in Fig. 4.

に問題のないことを支持する。次に計測をすべて同一切片上で行ったことである。即ち位置の異なるプルキンエ細胞について、それぞれ免疫組織化学で得られたDAB免疫反応産物の濃度を比較するという方法をとった。この方法の長所は、同一切片上に載っている細胞であるならば染色条件が同一であり、バックグラウンドとなる輝度条件を全て同一に保つことができることにある。それゆえ、たとえバックグラウンドの染色反応がノイズとして存在し、細胞に重なってきたとしても、実験群の細胞の濃度からコントロール群の細胞の濃度をコンピューター画像処理の手法を利用して差し引けば、このようなノイズを殆ど相殺することができる。偽陽性反応の可能性は上記の理由により、可能性が極めて少ないものと考えられる。異なる位置にあるプルキンエ細胞間でも発現量に変化のないミエリンベースックプロテインとは異なり本研究の定量計測により、細胞内情報伝達物質PKCはリーラーマウス小脳の中心白質細胞集団に位置する異常位置のプルキンエ細胞で著明に上昇していることが明らかにされた。それでは何がPKCの発現の上昇をひきおこすかが問題となるが、この疑問に対しては現在のところ以下に述べる解答が考えられる。まず、移動障害をおこした異常位置プルキンエ細胞そのものに内在する異常がこのPKCの発現をひきおこすという考えであるが、この考えは妥当ではない。その理由はキメラマウスを用いたこれまでの研究によれば、異常位置の一次的な原因はリーラーマウスのプルキンエ細胞の異常はグリア細胞を含む細胞間の相互作用の異常に起因する可能性が高くプルキンエ細胞そのものにあるのではないことが既に示唆されているからである<sup>21)</sup>。次にあげられる理由は、プルキンエ細胞への求心性の入力に原因があるというものである。中心白質部細胞集団に位置する異常位置プルキンエ細胞を例にとれば、苔状線維とプルキンエ細胞間の直接のシナプス形成 (heterologous synapse) 及び未熟なシナプス形成 (プルキンエ細胞へ向かう多数の登上線維の残存) 等の求心性の入力との異常なシナプスを形成が報告されてきている。しかし、これに対して分子層に位置する正常位置プルキンエ細胞ではこのようなシナプス形成は一切認められない<sup>4)</sup>。それ故、異常位置プルキンエ細胞への異所性シナプス形成こそがPKCの発現に関与する可能性が高い。近年の報告によれば、生後14日にPKCの小脳シナプトソームにおける発現がピークに達する。この生後14日は発達途上の過渡的なシナプスの選択がおこなわれ、神経回路網が形成されていくと考えられている決定的な時期であ

Table 1. Comparison of the expression of PKC<sup>a)</sup> between Purkinje cells in the cortex and in the central mass in 3 Reeler mutant mice

Mouse number examined	Expression (means $\pm$ SEM, %) <sup>b)</sup> of PKC in		
	Molecular layer of cortex	Central mass	t-test <sup>d)</sup> to
1*	23.6 $\pm$ 1.48 (5) <sup>c)</sup>	17.9 $\pm$ 0.95 (11)	4.32 ( $P_{(to)} < 0.005$ )
2	24.8 $\pm$ 0.59 (11)	21.0 $\pm$ 0.49 (13)	9.10 ( $P_{(to)} < 0.005$ )
3	23.9 $\pm$ 0.91 (9)	18.9 $\pm$ 0.33 (28)	9.42 ( $P_{(to)} < 0.005$ )

a) Type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C.

b) Data derived from averaged "gray value" (see Fig. 5) was expressed as percentage to total pixels.

c) Number of sampling cells.

d) The t-test confirmed the significant differences in the expression of PKC between 2 cell groups in any cases of all 3 Reeler mutant mice.

\* Data in mouse number 1 were used in the microphotographs (see Fig. 3, a, b) and histograms (see Fig. 4, 5).

る。このことをあわせ考えると、シナプス形成において異所性シナプス形成に関して積極的な役割をはたしていることが考えられる。ここで PKC は過渡的なシナプスの選択、シナプス形成にどのような役割をはたしているであろうかという疑問が提起されるのであるが、現在の所、著者は以下にのべる仮説を考えている(図6)。PKC が DNA の翻訳を開始する調節蛋白質(regulatory protein) をリン酸化し、活性化(activate)すると、可塑的变化によって強化される後シナプス側(postsynaptic site)に発現するレセプター蛋白の mRNA が転写される。この mRNA はゴルジ装置で蛋白となり、強化(stabilizing)されるべき後シナプス側に運ばれ、その膜上で発現する。このことにより過渡的にシナプスの選択がおこる。著者は近年正常マウスの

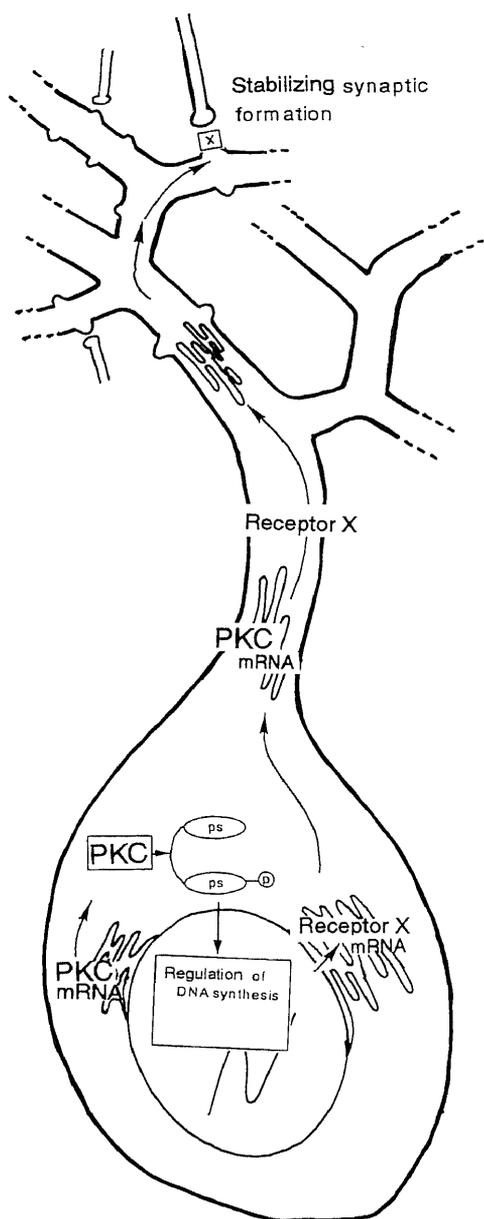


Fig. 6. The hypothesis of the role type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C for synaptogenesis. Type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C activates regulator protein by phosphorylation. This regulator protein regulates DNA synthesis of specific receptor which must be stabilized. ps; regulator protein; X; specific receptor at postsynaptic site.

発達途上の小脳において、PKC の mRNA レベルの発現量が、蛋白の場合と同様、14日で最大になることを観察した。その際、発現している場所は細胞体のほかに、樹状突起近位部でも認められることを観察した(投稿準備中)。このことから、樹状突起近位部に局在する PKC mRNA の量の調整を通じて、シナプス形成をより細かく制御する機構が存在する可能性が考えられる。

## 結 論

本研究では、画像処理による定量測定により、異常な求心性入力をもつリーラーマウス小脳ブルキンエ細胞において PKC が特異的に発現していることを明らかにした。このことは PKC が後シナプス側のレセプターの発現を行うことにより、異所性シナプスの形成に積極的に関与する可能性を示している。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導いただきました金沢大学医学部第二解剖学講座田中重徳教授に深く感謝の意を表します。更に御助言ならびに激励を賜りました理化学研究所伊藤正男博士ならびに東海大学関口雅樹博士、嶋井和世博士、また研究にあたり多大な強力を戴きました金沢大学第二解剖学講座の皆様へ深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Falconnew, D. S.: Two new mutants, "trembler" & "Reeler", with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus*, L.). *J. Genet.*, 50, 192-201 (1951).
- 2) Hamburgh, M.: Observations on the neuropathology of "Reeler", a neurobiological mutation in mice. *Experientia*, 16, 460-461 (1960).
- 3) Heckroth, J. A., Goldowitz, D. & Eisenman, L. M.: Purkinje cell reduction in the Reeler mutant mouse: a quantitative immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 279, 546-555 (1989).
- 4) Mariani, J., Crepel, F., Mikoshiba, K., Changeux, J. P. & Sotelo, C.: Anatomical, physiological & biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse. *Royal Soc. Lond. B. Biological Science.*, 281, 1-28 (1977).
- 5) Sekiguchi, M. & Terashima, T.: "personal communication" (1993).
- 6) Huang, F. L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H. & Huang, K. P.: Differential distribution of protein kinase C isozymes in the various regions of brain. *J. Biol. Chem.*, 262, 15714-15720 (1987).
- 7) Huang, F. L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., Knopf, J. L., Young, w. S. & Huang, K. P.: Immunocytochemical identification of protein kinase C isozymes as products of discrete genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 946-952 (1987).
- 8) Kitano, T., Hashimoto, T., Kikkawa, U., Ase, K., Saito, N., Tanaka, C., Ichimori, Y., Tsukamoto, C. & Nishizuka, Y.: Monoclonal antibodies against rat brain protein kinase C & their application to immunocytochemistry in nervous tissues. *J. Neurosci.*, 7, 1520-1525 (1987).

- 9) Kaczmarek, L. K.: The role of protein kinase C in the regulation of ion channels & neurotransmitter release. *Trends. Neurosci.*, 10, 30-34 (1987).
- 10) Madison, D.V., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A.: Phorbol ester blocks a voltage sensitive chloride current in the hippocampal pyramidal cells. *Nature (Lond.)*, 321, 695-697 (1986).
- 11) Huang, F. L., Youug, W. S., Yoshida, Y. & Huang, K. P.: Developmental expression of protein kinase C isozymes in rat cerebellum. *Developmental. Brain. Res.*, 52, 121-130 (1990).
- 12) Malenka, R. C., Ayoub, G. S. & Nicoll, R. A.: Phorbol ester enhances transmitter release in rat hippocampal slices. *Brain. Res.*, 403, 198-203 (1987).
- 13) Nicoll, R. A., Haycock, J. W., Wang, J. K. T. & Greengard, P.: Phorbol ester enhancement of neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 48, 615-621 (1987).
- 14) Colley, P. A., Sheau, F. S. & Routtenber, A.: Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact. *J. Neurosci.*, 10, 3353-3360 (1990).
- 15) Lindon, D. J. & Connor, J. A.: Participation of postsynaptic PKC in cerebellar Long-term depression in culture. *Science*, 254, 1656-1659 (1992).
- 16) Shearman, M. S., Shinomura, T., Oda, T. & Nishizuka, Y.: Synaptosomal protein kinase C subspecies: A dynamic changes in the hippocampus & cerebellar cortex concomitant with synaptogenesis. *J. Neurochem.*, 5, 1255-1262 (1991).
- 17) Pritchard, D. H.: US Color Television Fundamentals. IEEE (Inst. Electr. Electron. Eng.) Trans. Biomed. Eng., CE-23, 467-478 (1977).
- 18) 山口富士夫: 実践コンピュータグラフィックス, 第3版, 471-502頁, 日刊工業, 東京, 1989.
- 19) Huang, K. P. & Huang, F. L.: Expression & function of protein kinase C isozyme. *Acta. Endocrinologica.*, 121, 307-316 (1989).
- 20) Huang, F. L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., Young, W. S. & Huang, K. P.: Immunocytochemical localization of protein kinase C isozymes in rat brain. *J. Neurosci.*, 8, 4734-4744 (1988).
- 21) Terashima, T., Inoue, K., Inoue, Y., Yokoyama, M. & Itoh, K.: Observation on the cerebellum of normal-Reeler mutant mouse chimera. *J. Comp. Neurol.*, 252, 264-278 (1986).

**Prominent Expression of Type 1 ( $\gamma$ ) Protein Kinase C in Purkinje Cells Located in the "Central Mass" of Reeler Mutant Mouse Cerebellum as Revealed by a Computer Image Analysis Technique** Madoka Moriya, Department of anatomy (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 102, 714—719 (1993)

**Key words** reeler mouse, cerebellum, type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C, computer image analysis, synaptogenesis

#### Abstract

In Reeler mutant mice, cerebellar Purkinje cells exhibit abnormal synaptogenesis. In this study, Purkinje cells in the "central mass" with abnormal afferent connections were compared with those located in their normal position in the cortex in terms of immunoreactivity for type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C. A "computer image analysis technique" was developed for the purpose of this quantitative study, and it revealed that the immunoreactivity in the central mass was significantly higher than that in the cortex. These results suggest the type 1 ( $\gamma$ ) protein kinase C may be importantly related to the abnormal synaptic formation of the Purkinje cells.