

海馬 CA 3 錐体細胞特異的遺伝子組換え系の確立

— C57BL/6 系統 ES 細胞からのマウス作出 —

新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 (主任: 崎村建司教授)

明 石 馨

Hippocampal CA 3 Pyramidal Cell-specific and Efficient Cre Mediated Recombination in the C57BL/6 Mouse Line

Kaori AKASHI

*Department of Cellular Neurobiology,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Kenji SAKIMURA)*

Abstract

The hippocampal CA 3 region is thought to be an important place for formation of learning and memory. To understand the role of the hippocampal CA 3 region in the higher brain functions, we attempted to make a conditional targeting system specific for the hippocampal CA 3 region using the Cre/loxP recombination system. The CA 3 specific expression of Cre recombinase was attained by inserting Cre gene into the glutamate receptor $\gamma 1$ subunit (GluR $\gamma 1$) gene that was predominantly expressed in the CA 3 pyramidal neurons. Then we generated a mutant mouse line, $\gamma 1$ CreN from C57BL/6 ES cells, which is most suitable for behavioral studies. In the $\gamma 1$ CreN line, functional Cre recombinase activity was observed to be restricted almost only to the hippocampal CA 3 pyramidal neurons starting from newborn period to adulthood. The efficacy of Cre-mediated recombination was as high as 100% in the pyramidal cells of the hippocampal CA 3 region both at postnatal ages 8 days and 10 weeks. This $\gamma 1$ CreN line is expected to become a useful tool for studying molecular functions of the hippocampal CA 3 region.

Key words: hippocampal CA 3 region, conditional targeting system, Cre-loxP, GluR $\gamma 1$, C57BL/6 ES cell

はじめに

哺乳類の海馬は、形態学的に構造が単純で明瞭

であることと、記憶の形成や学習に関与すると考えられていることから中枢神経系でさかんに研究されている場所である。とりわけ、この領域で見

Reprint requests to: Kaori AKASHI
Department of Cellular Neurobiology
Brain Research Institute, Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 明石 馨

い出された長期増強 (Long term potentiation: LTP) や長期抑制 (Long term depression: LTD) というシナプス伝達の可塑的变化は記憶の礎過程と考えられており、学習との関連が示唆されることから、詳細な検討がなされている。海馬は形態学的にいくつかの領域に分けられるが、中でも CA 3 領域の錐体細胞は複数の入力を受けている。CA 3 錐体細胞は主に異なる 3 つの入力を受けており、それぞれ、交連/連合-CA 3 (Associational/commissural-CA 3) シナプス、海馬采-CA 3 (Fimbrial-CA 3) シナプス、苔状線維-CA 3 (Mossy fiber-CA 3) シナプスを形成する。交連/連合-CA 3 シナプスおよび、海馬采-CA 3 シナプスでは、LTP や LTD の誘導過程に NMDA 受容体が働くことが電気生理学的知見から示唆されているが、苔状線維-CA 3 シナプスにおいては、NMDA 受容体非依存の LTP, LTD が観察されることが報告されている¹⁾⁻⁵⁾。このように、CA 3 錐体細胞は複数の入力より受ける複雑なシグナル処理を担っていることが示唆されるが、その脳高次機能に果たす役割は明らかではない。そこで、我々は海馬 CA 3 領域の機能を知るために、海馬 CA 3 錐体細胞で標的分子をノックアウトする方法を立案した。

遺伝子ノックアウト法は、脳の機能を分子レベルで理解するうえで非常に有用な方法であり、現在まで非常に多くのことを明らかにしてきた。しかしながら、従来のノックアウトマウス作製の方法にはいくつかの問題点がある。脳の高次機能に関わる分子は、多様な働きをしているものも多く、標的分子欠損による致死は、脳における働きの解析を不可能にする。また、発達に関与する分子の欠損による発達異常もまた、脳高次機能におけるその分子の働きの解析を困難にする。さらに、発生初期から標的分子を欠損させることより、その分子機能が他の分子に代償される可能性もある。この問題を解決するには、脳の部位、時期特異的に標的分子欠損が可能なシステムが必要となってくる。

さらに、ノックアウトマウス作製には、生殖細胞に遺伝子変異が導入されやすいことから一般的

に 129 系統由来の ES 細胞が繁用されている。しかしながら、この系統は高い確率で脳梁に奇形を持ち、学習能力が低いため水迷路のような脳高次機能を解析する行動実験には適さない。マウスの脳高次機能を理解するためには行動学的実験が必須であるので、通常は、行動実験に適する C57BL/6 系マウスと戻し交配を行い解析する。しかし、変異遺伝子の近傍では完全に遺伝的背景を一致させることは不可能であるため、完全に C57BL/6 の遺伝的背景にすることはできない。この遺伝的背景の不一致も行動学的実験の結果に影響を与えることがわかっている⁸⁾⁻¹²⁾。これらの問題は C57BL/6 ES 細胞から遺伝的背景の均一なキメラマウスを作製することにより、解決することができる。

そこで本研究では、C57BL/6 系統由来の ES 細胞を用いてマウス作製をおこなった。C57BL/6 系統の ES 細胞はこれまで、キメラマウスの生殖細胞に遺伝子変異が導入されにくいため、遺伝子変異マウス作製への利用が困難であったが、当研究室で確立した、C57BL/6 ES 細胞からのキメラマウス作製法では高効率で生殖細胞に遺伝子変異が導入される。

さらに本研究では、バクテリオファージ P1 が有する Cre/loxP の組換えシステムを用いて、海馬 CA 3 錐体細胞特異的な遺伝子組換えを行った。Cre は配列特異的な組換え酵素で、loxP という 34 bp の配列を認識して組換え反応を起こす。この特異的な配列は哺乳類には存在せず、Cre 遺伝子を細胞内に発現させても影響はない⁶⁾⁷⁾。また、Cre を海馬 CA 3 錐体細胞に発現させるために、海馬 CA 3 錐体細胞に優位に発現する、カイニン酸型グルタミン酸受容体 γ 1 サブユニット¹³⁾⁻¹⁵⁾ の遺伝子プロモーターを利用して、Cre 蛋白質を発現するマウスの作製を C57BL/6 ES 細胞から試みた。

材料と方法

C57BL/6 ES 細胞培養

C57BL/6 マウス由来の ES 細胞である、Bruce

細胞 (Colin L. Stewart 博士から分与された) を用いた. ES 細胞培養方法の詳細については, 北山等の報告に従った¹⁶⁾.

ターゲティングベクターおよび $\gamma 1$ CreN マウスの作製

GluR $\gamma 1$ サブユニット遺伝子の cDNA より切り出した, 開始メチオニンを含む EcoR I -Nco I 215 bp をプローブに用い, C57BL/6 マウスゲノムライブラリーをスクリーニングし, $\gamma 1$ サブユニットの開始メチオニンをコードするエクソンを含むクローン $\gamma 1-6$ と $\gamma 1-10$ を得た. それぞれのインサート DNA を pBluescript II SK (-) にサブクローニングし, p $\gamma 1-6-7$ と p $\gamma 1-10-10$ とした. p $\gamma 1-6-7$ を Spe I で消化し, 3' 側の Spe I -Spe I 7.5 Kbp を欠失させ, Spe I サイトでセルフライゲーションして作製したクローンを p $\gamma 1-6-7-4$ とした.

p $\gamma 1-6-7-4$ より切り出した Pst I -Sph I 3 Kbp, pNCre¹⁷⁾ と p $\gamma 1-6-7$ をテンプレートとして二段階 PCR によって作製した Pst I -Age I までの 272 bp, Cre 遺伝子と pEF-BOS¹⁸⁾ 由来のポリ A 付加シグナルを含む Age I -EcoR I 1.6 Kbp, 両端を FRT 配列で挟んだ pgk-Neo-p (A) FRT カセット EcoR I -Sac I (平滑化) 1.6 Kbp, p $\gamma 1-6-7$ から切り出した Xba I (平滑化) -Sal I 7.5 Kbp, を pBluescript II SK (-) に結合したものを p5 $\gamma 1$ CNF3 とした. この p5 $\gamma 1$ CNF3 に挿入されている DNA 断片をジフテリア毒素遺伝子を内部に有するプラスミドベクター pMC1 DTApAM¹⁶⁾ につなぎかえて, ターゲティングベクター p $\gamma 1$ CreDT とした.

Sal I によって直線化した 6 pmol の p $\gamma 1$ CreDT を, エレクトロポレーション (250 V, 960 μ F, R= ∞) により 1×10^7 個の C57BL/6 マウス由来の ES 細胞に導入した. トランスフェクション後 38~48 時間後に G 418 (175 mg/ml) 選別を開始し, 7 日後に耐性コロニーをピックアップした. サザンブロットにより標的遺伝子組換えをおこした ES 細胞クローンを同定し, これらの ES 細胞クローンを 8 細胞期の ICR マウス胚にマイクロインジェクションし, 胞胚期まで培養した後,

偽妊娠した ICR マウスの子宮に戻した. 生まれてきたキメラマウスの中で生殖細胞に変異の導入されたキメラマウスと C57BL/6 マウスを交配させ, $\gamma 1$ CreN マウスを樹立した.

遺伝子型解析

ネオマイシン耐性を持つ ES 細胞クローンのゲノム DNA, もしくはマウス尻尾より抽出したゲノム DNA を Xba I, EcoT₂₂₋₁ で消化し, 0.8% アガロースゲルに電気泳動した. これをナイロンメンブレンに転写し, 5' アウタープローブ, 3' アウタープローブ及び Cre 遺伝子の Age I -EcoR I の 1.6 kbp の断片をプローブ (図 1-a) としてハイブリダイズした. Xba I で消化されたゲノムでは 5' アウタープローブにより野生型 5.5 kb, 変異型 7.3 kb が検出される. また, EcoT₂₂₋₁ で消化されたゲノムでは 3' アウタープローブにより野生型 9.5 kb, 変異型 12.9 kb がそれぞれ検出される. Xba I で消化されたゲノムにおいて Cre 遺伝子の Age I -EcoR I の 1.6 kbp の断片をプローブとすると, 5' アウタープローブと同様に変異型 7.3 kb が検出される (図 1-b).

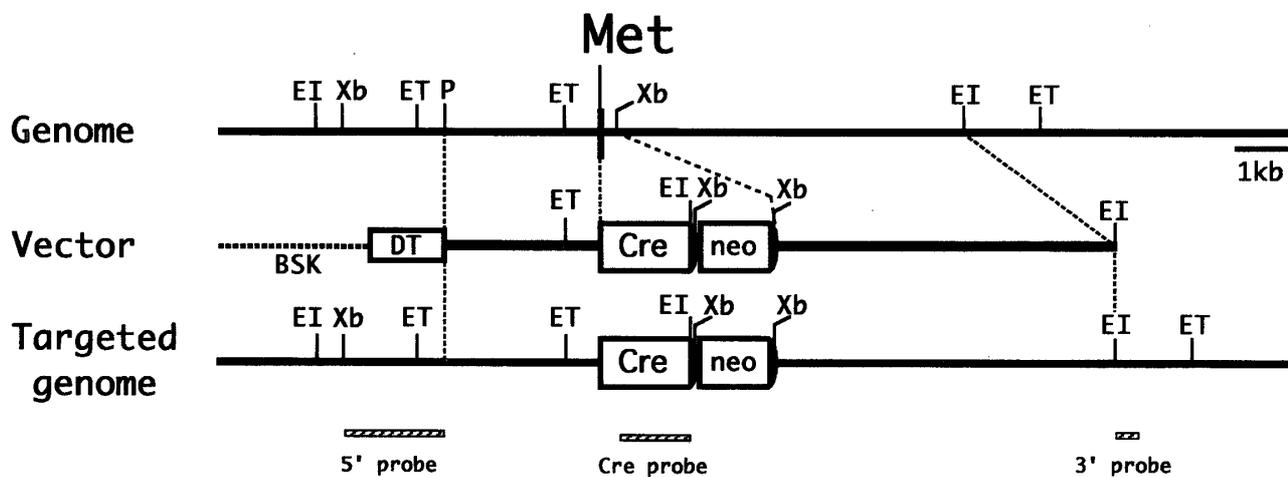
β -ガラクトシダーゼ活性染色

マウスをネンブタールで麻酔後, 4% パラホルムアルデヒド, 0.1 M リン酸バッファー (PH 7.5) で灌流固定し, 全脳を摘出した. 冠状断切片 (80 μ m 厚) は脳を O.C.T. コンパウンド (Sakura, Tokyo, Japan) に包埋後クライオスタットにて作製し, 矢状断切片 (50 μ m 厚) は脳をアガロースゲルに包埋後マイクロスライサー DT 1000 (Dosaka, Kyoto, Japan) にて作製した. 冠状断切片 (80 μ m 厚) は 4 週齢のマウスより作製し, 矢状断切片 (50 μ m 厚) は 0 日齢, 1 日齢, 3 日齢, 8 日齢, 2 週齢, 4 週齢, 10 週齢のマウスより作製した. β -ガラクトシダーゼ活性染色の行程は北山等, 辻田等の報告に従った¹⁶⁾¹⁷⁾.

免疫組織化学

4 週齢のマウスを灌流固定し, 全脳を摘出しパラフィンに包埋後, ミクロトームにて 5 μ m 厚切片を作製し, スライドガラスに貼付した. 以下の行程で免疫抗体染色を行った. ブロッキング (10% 正常ヤギ血清, 30 分間), 1 次抗体反応 (カ

a



b

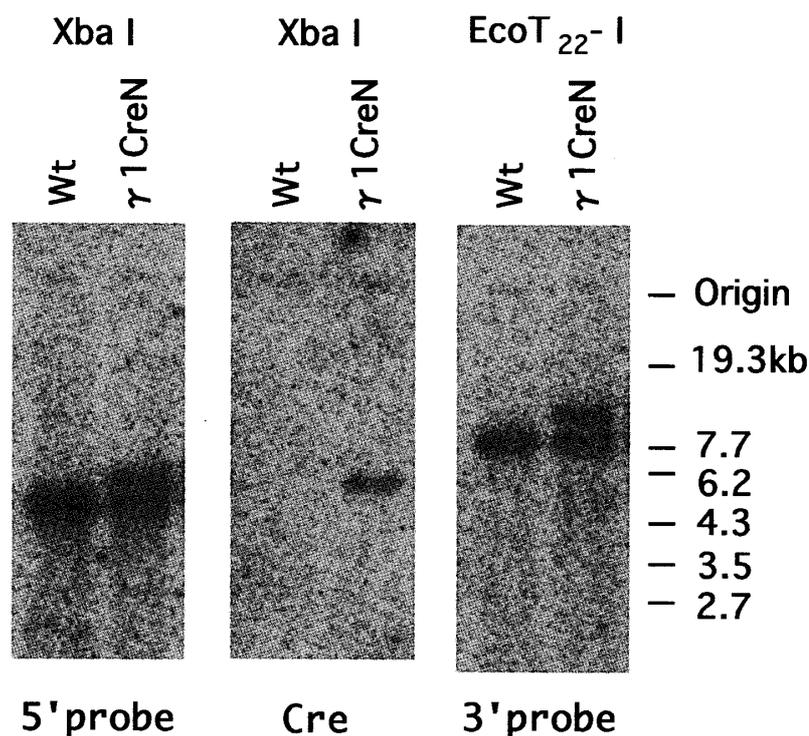


図1 相同組み換え法による $\gamma 1$ CreN マウスの作製

- 翻訳開始点近傍のグルタミン酸受容体 $\gamma 1$ サブユニット (GluR $\gamma 1$) 遺伝子の構造, ターゲッティングベクター, 相同組換え体遺伝子の構造, サザンプロットに用いたプローブ (5', Cre, 3'プローブ) を示している. ■部分はコーディングのエクソンを示す. 略語, Met; 翻訳開始点, EI; EcoR I, ET; EcoT₂₂-I, P; Pst I, Xb; Xba I, BSK; pBluescriptSK (-), DT; ジフテリア毒素 A 断片遺伝子, Cre; Cre リコンビナーゼ遺伝子, neo; pgk-neo-pA カセット, FRT 配列を黒い半円で示している.
- サザンプロットによる遺伝子型解析. マウスしっぽより抽出したゲノム DNA を Xba I もしくは EcoT₂₂-I で消化し, それぞれ 5', Cre, 3'プローブで検出した. Wt は野生型, $\gamma 1$ CreN は $\gamma 1$ CreN 変異型を表す.

ルビンジン抗体, パルブアルブミン抗体, マウスグルタミン合成酵素抗体, 室温で1昼夜), 2次抗体反応 (ビオチン標識抗モルモット IgG 抗体もしくはビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体, 室温で1時間), ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて30分間室温で反応後, 3,3',-ジアミノベンジンにて発色させた. ブロッキング, 2次抗体, ストレプトアビジンはヒストファイン SAB-PO (R) キット (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いた. 1次抗体として用いた, 抗カルビンジンモルモット抗体, 抗パルブアルブミンウサギ抗体は, 抗グルタミン合成酵素ウサギ抗体はそれぞれ, マウスカルビンジンのアミノ酸残基 1-262, マウスパルブアルブミンのアミノ酸残基 1-111, マウスグルタミン合成酵素のアミノ酸残基 346-375 に相当するペプチドを作製し, 動物に免疫し得た抗血清を精製したものを使用した. 核染色には Nuclear fast red (NFR, Nakarai, Kyoto, Japan) を使用した.

組換え率の評価

前述の矢状断切片の海馬 CA 1, CA 3, 歯状回, および小脳プルキンエ細胞層のそれぞれの領域における全細胞のうち, β -ガラクトシダーゼ活性の認められる細胞の割合をそれぞれの領域ごとに算出した.

結 果

$\gamma 1$ CreN マウスの樹立

本研究では, 海馬 CA 3 錐体細胞に優位に発現する, カイニン酸型受容体 $\gamma 1$ サブユニット遺伝子のプロモーターを利用して, 海馬 CA 3 錐体細胞に組換え酵素 Cre を発現するマウスを作製した. まず, 開始メチオニンを含む, GluR $\gamma 1$ 遺伝子のクローンを取得し, GluR $\gamma 1$ 遺伝子と Cre 遺伝子の開始メチオニンが一致するように GluR $\gamma 1$ ゲノム DNA 断片に Cre 遺伝子をノックインしたターゲティングベクターを作製した (図 1-a). このベクターを C57BL/6 ES 細胞に導入し, ネオマイシン耐性を持つ 135 クローンのゲノム DNA をサザンプロットにより解析し, 標的遺伝

子組換えを起こした4クローンを同定した. これらの ES 細胞クローンをマウス初期胚にマイクロインジェクションすることによりキメラマウスを作製した. その内で生殖細胞に変異の導入されたキメラマウスと C57BL/6 マウスを交配させ, $\gamma 1$ CreN マウスを樹立した.

Cre リコンビナーゼの発現部位と遺伝子組換え率の評価

このマウスの遺伝子組換え能を調べるために, Cre 活性により IacZ が発現する CAG-CAT-Z11 トランスジェニックマウス¹⁹⁾ と交配し, $\gamma 1$ CreN 遺伝子とレポーター遺伝子 (CAG-CAT-Z) をヘテロに持つマウスを作製し, その脳を解析した.

経時的に β -ガラクトシダーゼ活性を検索した結果, $\gamma 1$ CreN マウスは, 生後から CA 3 錐体細胞に優位に Cre 活性が発現し始め, その活性は成体に至る迄 CA 3 錐体細胞にほぼ限局していた. 成体で海馬以外の領域では, 大脳皮質, 中脳, 間脳, 橋, 小脳核に分散した弱い活性が認められた (図 2, 図 4-a, b, c, 表 1). さらに Cre が発現している細胞を同定するために, オリゴデンドロサイト, アストロサイトのマーカーであるグルタミン合成酵素, 抑制性のニューロンのマーカーであるパルブアルブミン, それぞれの抗体を用いて免疫染色と β -ガラクトシダーゼ活性染色との共染色を行った. その結果, 脳全体のオリゴデンドロサイト, アストロサイト, 海馬の抑制性のニューロンには, Cre 活性がないことが明らかになった (図 4-f, g).

各領域における遺伝子組換え効率を定量的に測定するために, β -ガラクトシダーゼ活性染色と核染色との共染色をおこなった. その結果, CA 1 錐体細胞においては, 生後1週間, 10週齢共に組換えは認められず, 歯状回顆粒細胞では生後1週間で0.4%, 10週齢で6.9%であった. 一方, CA 3 錐体細胞においては生後1週間で100%組換えが起こっており, 非常に高い効率であることが明らかになった. また, 小脳プルキンエ細胞においては, 生後1週間で0%, 10週齢で0.8%であった (表 2).

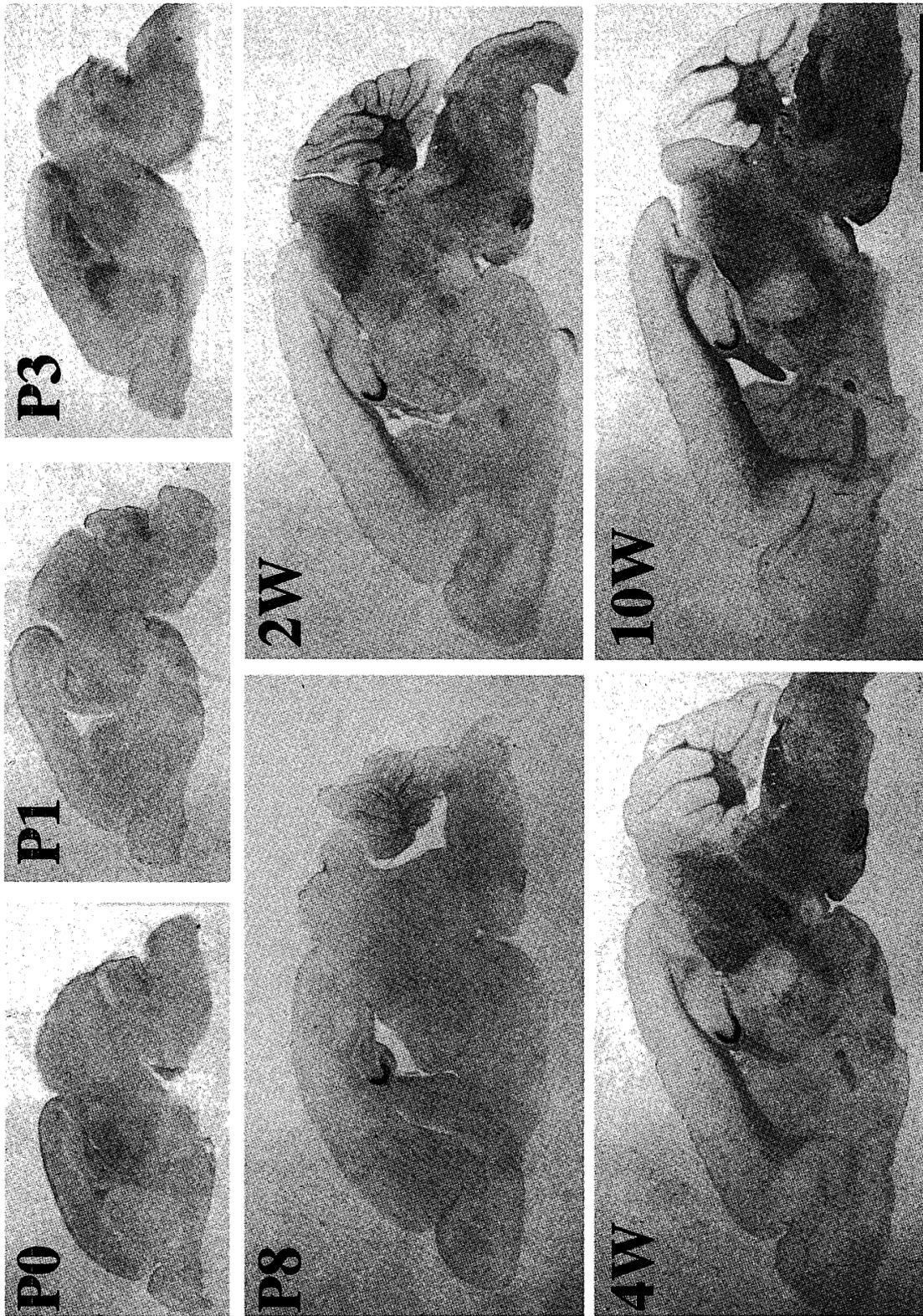


図2 $\gamma 1$ CreN マウス全脳における Cre リコンビナーゼ発現部位の経時的変化
 $\gamma 1$ CreN 遺伝子, CAG-CAT-Z 遺伝子をヘテロに持つマウス, P0 (生後0日齢), P1 (1日齢), P3 (3日齢), P8 (8日齢), 2W (2週齢), 4W (4週齢), 10W (10週齢) における全脳矢状断切片 (50 μ m 厚) に β -ガラクトシダーゼ活性染色を行った。図中のスケールバーは 3 mm を表す。

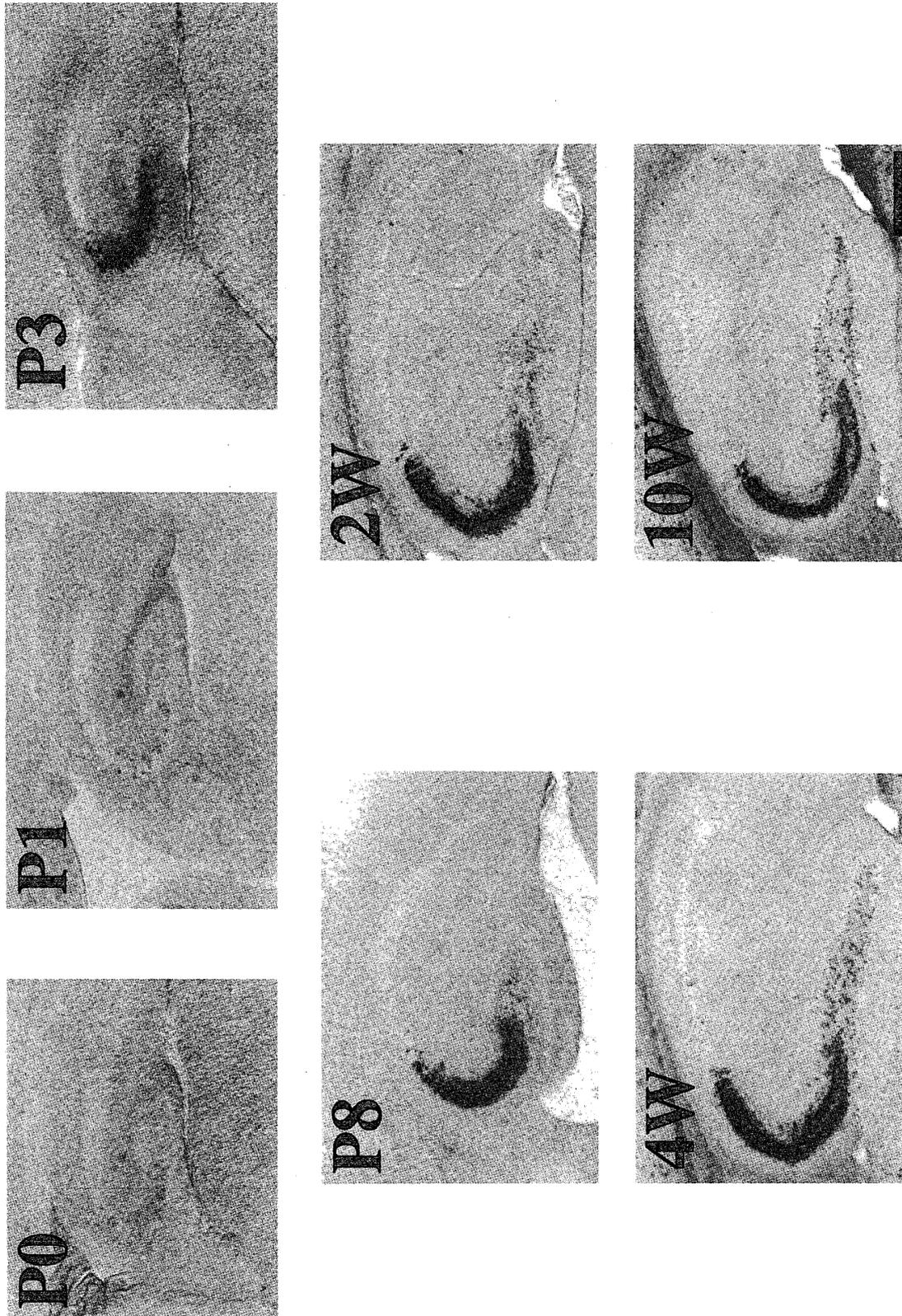


図3 $\gamma 1$ CreN マウス海馬における Cre リコンビナーゼ発現部位の経時的変化
 図2の β -ガラクトシダーゼ活性染色を行った全脳矢状断切片(50 μ m厚)の海馬部分を拡大した図. 図中のスケール
 バーは0.3mmを表す.

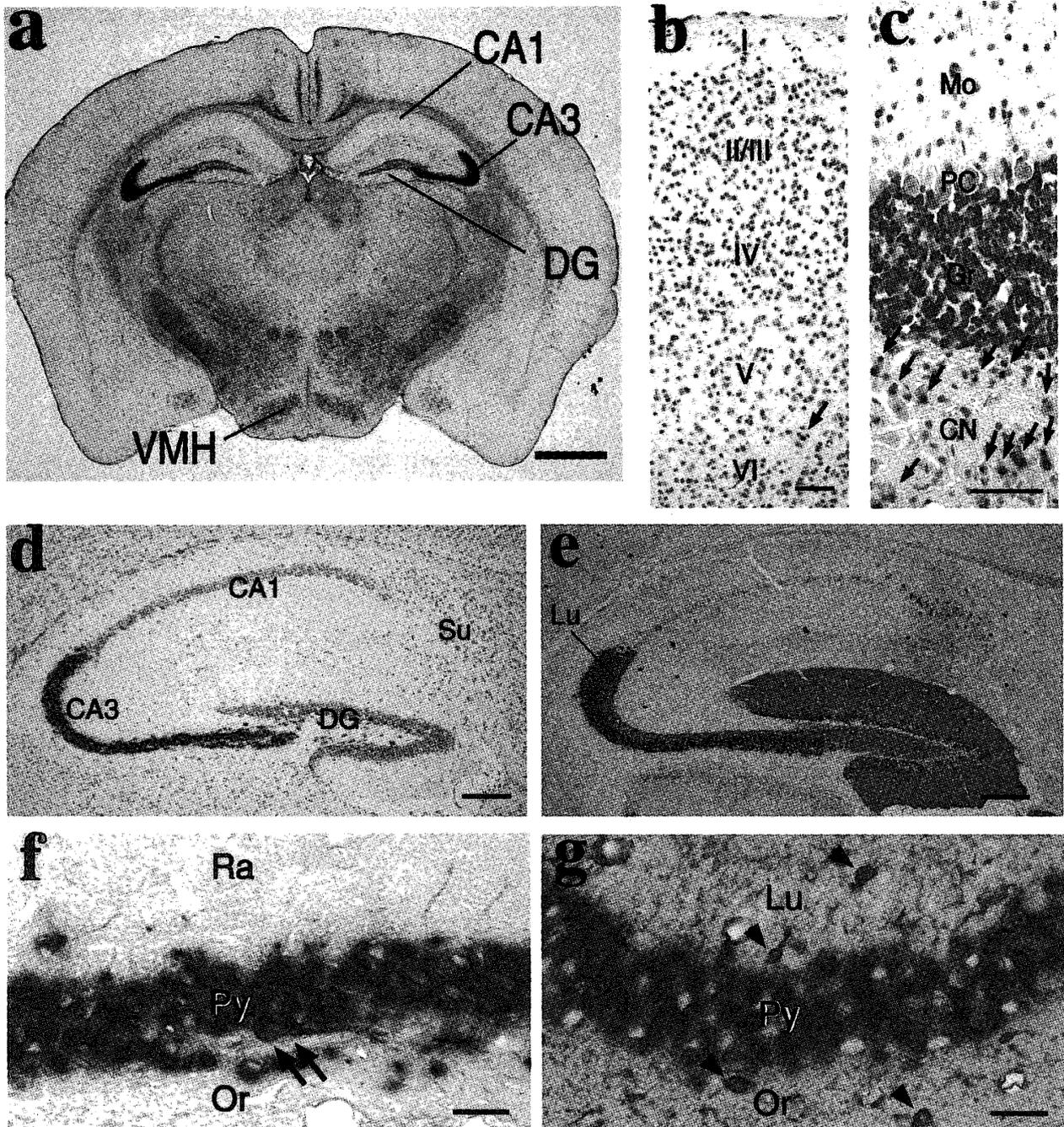


図4 $\gamma 1$ CreN マウスにおける Cre リコンビナーゼが発現する脳部位と Cre リコンビナーゼを発現する細胞の同定

4週齢の $\gamma 1$ CreN 遺伝子, CAG-CAT-Z 遺伝子をヘテロに持つマウスを使用した. a. 冠状断切片 ($80 \mu\text{m}$ 厚)における β -ガラクトシダーゼ活性染色像. b., c., d. は FNR による核染色と β -ガラクトシダーゼ活性染色の共染色像. b. は大脳, c. は小脳, d., e., f., g. は海馬である. 矢印は β -ガラクトシダーゼ活性染色陽性部位を示している. e., f., g. は免疫組織化学と β -ガラクトシダーゼ活性染色の共染色像. 使用した抗体は順にカルビンジン, パルプアルブミン, グルタミン合成酵素抗体である. f., g. 中の矢印はそれぞれ, パルプアルブミン, グルタミン合成酵素抗体陽性の細胞を示す. スケールバーは a.; 1 mm , b., c.; $50 \mu\text{m}$, d., e.; $200 \mu\text{m}$, f., g.; $20 \mu\text{m}$ である. 略語, VMH; Ventromedial hypothalamic nucleus, DG; Dentate gyrus, Mo; Molecular rayer, PC; Purkinje cell, Gr; Granule cell, CN; Deep cerebellar nuclei, Su; Subiculum, Lu; Stratum lucidum, Ra; Stratum raditatum, Py; Pyramidal cell, Or; Stratum oriens

表1 $\gamma 1$ CreN マウスにおける β -ガラクトシダーゼ活性の発現部位

脳における領域	β -ガラクトシダーゼ活性
Cerebral cortex	
Layer I	-
Layer II/III	-
Layer IV	-
Layer V	(+)
Layer VI	+
Cingulate cortex	(+)
Pyramidal cortex	(+)
Retrosplenial cortex	+
Hippocampus	
CA1	-
CA3	++++
Dentate gyrus	+
Subiculum	-
Cerebellum	
Purkinje cell	(+)
Granule cell	-
Basket/Stellate/Golgi cell	-
Deep cerebellar nuclei	++
Spinal cord	+
Corpus callosum	-

注) 4週齢の $\gamma 1$ CreNマウスの脳における β -ガラクトシダーゼ活性の発現部位とその強さを同定した。発現強度は6段階で示している。-, not detected, (+); very low, +; low, ++; moderate, +++; high, ++++; very high.

考 察

$\gamma 1$ CreN マウスは、カニン酸型グルタミン酸受容体 $\gamma 1$ サブユニットをコードする遺伝子の翻訳開始点に Cre リコンビナーゼ遺伝子の開始メチオニンを合わせてノックインしている。Cre 遺伝子が導入されていることにより、GluR $\gamma 1$ サブユニットをコードする遺伝子が働かなくなっているため、この変異アレルをホモに持つマウスにおいては、GluR $\gamma 1$ サブユニットがノックアウトされる。 $\gamma 1$ CreN ヘテロ接合体は正常に生まれ、生殖も正常であり、ホモ接合体でも顕著な異常は認められなかった。しかし、GluR $\gamma 1$ サブユニットのノックアウトによる影響を排除するために本研究においては、ヘテロ接合体で Cre リコンビナー

表2 $\gamma 1$ CreN マウスにおける遺伝子組換え効率の変化

	P8	10w
Hippocampal CA1 (Pyramidal cell)	0%	0%
Hippocampal CA3 (Pyramidal cell)	100%	100%
Dentate gyrus (Granule cell)	0.4%	6.9%
Purkinje cell	0%	0.8%

注) $\gamma 1$ CreNマウスの生後8日齢、および10週齢において海馬CA1、CA3、歯状回、小脳プルキンエ細胞層それぞれの領域で β -ガラクトシダーゼ活性の認められる細胞の割合を示す(%)。

ゼ活性を解析した。

このマウスにおいては、Cre リコンビナーゼが海馬 CA3 錐体細胞に特異性高く発現している。しかし、本来の GluR $\gamma 1$ の発現は、CA3 に優位ではあるが、海馬歯状回顆粒細胞、CA1 錐体細胞、小脳プルキンエ細胞、大脳皮質にも弱く認められるとの報告がある¹³⁾⁻¹⁵⁾。この発現の相違は、neoカセットに存在する pgk プロモーターの GluR $\gamma 1$ プロモーターへの干渉が原因であるかもしれない。

また、 $\gamma 1$ CreN マウスでは週齢が進むと、GluR $\gamma 1$ の発現が認められない中脳、間脳、橋に弱い陽性像が一部見られる(図2, 図3, 図4-a)。現在迄の KA1, GluR $\gamma 1$ の脳内の局在についての報告¹³⁾⁻¹⁵⁾ は In situ hybridization 法を用いて、ある週齢における mRNA の発現量を検出しているが、本研究では、Cre 活性により組換えが起こり IacZ が発現するというシステムを用いている。すなわち、Cre 活性検出システムでは、Cre が微量でも長期間発現するか、一過性に十分量発現することにより、いずれも組換えが起こる可能性がある。ひとたび loxP で挟み込まれた DNA が切り出されてしまうと、それ以降継続して IacZ が発現するため、マウスが週齢を経るとともに β -ガラクトシダーゼ活性染色部位が増えることになると考えられる。このような検出システムの性質の違いにより、結果が異なる可能性がある。

本研究で用いているノックイン法の利点は、核インジェクションにより作製されるトランスジェ

ニックマウスよりも、既知の遺伝子の発現をより忠実に反映できる点である。また、変異遺伝子を既知の遺伝子座に挿入するため、標的遺伝子の染色体との関係があらかじめ予測可能であるという点である。

$\gamma 1$ CreN マウスは、海馬 CA 3 錐体細胞に優位かつ高効率の遺伝子組換えが可能であるため、この領域で特定分子の機能を明らかにするために大変有効である。 $\gamma 1$ CreN マウスにおいて海馬 CA 3 錐体細胞に限局して Cre が発現している 1 ~ 2 週齢あたりでは、苔状線維-CA 3 シナプス形成時期と重なることから²⁰⁾、このマウスを用いることで、特定分子が苔状線維-CA 3 シナプス形成、および、シナプス可塑性に果たす役割を明らかにすることが可能であろう。

また、マウスにおいて脳高次機能を理解する為には行動学的解析は重要である。129 系統の ES 細胞から変異マウスを作製した場合には、一般的に、行動実験に適する C57BL/6 系マウスと戻し交配をする。遺伝的背景の不一致は行動学的解析の結果に影響を与えることがわかっているため⁸⁾⁻¹²⁾、遺伝的背景を一致させるためには、長い時間をかけて戻し交配をする必要がある。しかしながら、変異遺伝子の近傍では完全に遺伝的背景を一致させることは不可能であるため、このような遺伝的背景の不一致が影響を与えている可能性は否定できない。それに対し、 $\gamma 1$ CreN マウスは遺伝的背景が完全に C57BL/6 にそろっているため、長い時間をかけて戻し交配をする必要もなく、行動学的実験に最適なマウスであると言える。

この $\gamma 1$ CreN マウスは、海馬 CA 3 錐体細胞の細胞内分子メカニズムを理解し、さらに CA 3 領域の生理機能を明らかにするために大変重要な役割を果たすであろう。

謝 辞

ターゲットイングベクター作製、マウス解析の指導をして下さった、北山和子さん、ES 細胞培養を担当して下さい下さった阿部 学さん、柿崎利和さん、マイクロインジェクションを担当して下さい下さった夏目里恵さん、形態学的な解析を全面的に行って下さった、北海道大学の深谷昌弘

さん、直接御指導下さった崎村建司教授に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Harris EW and Cotman CW: Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett.* 70: 132-137 1986.
- 2) Zalutsky RA and Nicoll RA: Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampus neuron. *Science* 248: 1619-1624 1990.
- 3) Nicoll RA and Malenka RC: Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377: 115-118 1995.
- 4) Yokoi M, Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T, Sakaguchi I, Katsuura G, Shigemoto R, Ohishi H, Nomura S, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M and Nakanishi S: Impairment of Hippocampal Mossy Fiber LTD in Mice Lacking mGluR 2. *Science* 273: 645-647 1996.
- 5) Ito I, Futai K, Katagiri H, Watanabe M, Sakimura K, Mishina M and Sugiyama H: Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ or $\epsilon 2$ subunit. *J Physiol (London)* 500: 401-408 1997.
- 6) Stemberg N and Hamilton D: Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between IoxP sites. *J Mol Biol* 150: 467-486 1981.
- 7) Kühn R, Schwenk F, Aguet M and Rajewsky K: Inducible Gene Targeting in Mice. *Science* 269: 1427-1429 1995.
- 8) Crawley JN: Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *Trends Neurosci* 19: 181-182 1996.
- 9) Gerlai R: Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the

- background genotype? Trends Neurosci 19: 177-181 1996.
- 10) Lathe R: Mice, gene targeting and behavior: more than just genetic background. Trends Neurosci 19: 183-186 1996.
 - 11) Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL and Wehner JM: Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. Neuroscience 80: 1087-1099 1997.
 - 12) Kiyama Y, Manabe T, Sakimura K, Kawakami F, Mori H and Mishina M: Increased Thresholds for Long-Term Potentiation and Contextual Learning in Mice Lacking the NMDA-type Glutamate Receptor ϵ 1 subunit. J. Neurosci 18: 6704-6712 1998.
 - 13) Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W and Seeburg PH: Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. Nature 351: 742-744 1991.
 - 14) Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W and Seeburg PH: The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. Neuron 8: 775-785 1992.
 - 15) Bahn S, Volk B and Wisden W: Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. J Neurosci 14: 5525-5547 1994.
 - 16) Kitayama K, Abe M, Kakizaki T, Honma D, Natsume R, Fukaya M, Watanabe M, Miyazaki J, Mishina M and Sakimura K: Purkinje Cell-Specific and Inducible Gene Recombination System Generated from C57BL/6 Mouse ES Cells. Biochem Biophys Res Commun 281: 1134-1140 2001.
 - 17) Tsujita M, Mori H, Watanabe M, Suzuki M, Miyazaki J and Mishina M: Cerebellar Granule Cell-Specific and Inducible Expression of Cre Recombinase in the mouse. J Neurosci 19: 10318-10323 1999.
 - 18) Mizushima S and Nagata S: pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acids Res 18: 5322 1990.
 - 19) Araki K, Araki M, Miyazaki J and Vassalli P: Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. Proc. Natl Acad Sci USA 92: 160-164 1995.
 - 20) Mikuni N, Babb TL, Chakravarty DN and Chung CK: Postnatal expressions of non-phosphorylated and phosphorylated neurofilament proteins in the rat hippocampus and the Timm-stained moss fiber pathway. Brain Res 811: 1-9 1998.
-