C57BL/6マウス ES 細胞を用いたプルキンエ細胞および時期特異的遺伝子組換え系の開発

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）
北 山 和 子

Purkinje Cell Specific and Inducible Gene Recombination System Generated from C57BL/6 Mouse ES Cells

Kazuko KITAYAMA

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

Spatio－temporally restricted gene targeting is needed for analyzing the functions of various molecules in a variety of biological phenomena. We have generated an inducible cerebellar Purkinje cell-specific gene targeting system. This was achieved by establishing a mutant mouse line (D2CPR) from a C57BL/6 mouse ES cell line, which expressed a fusion protein consisting of the Cre recombinase and the progesterone receptor (CrePR). The Purkinje cell-specific expression of CrePR was attained by inserting CrePR into the glutamate receptor δ2 subunit (GluR δ2) gene, which was expressed specifically in the Purkinje cells. Using the transgenic mice carrying the Cre－mediated reporter gene expression, we showed that the antiprogesterone RU486 could induce recombinase activity of the CrePR protein specifically in the mature cerebellar Purkinje cells of the D2CPR line. Thus this mutant line will be a useful tool for studying the molecular function of mature Purkinje cells by manipulating gene expression in a temporally restricted manner.

Key words: Cerebellar Purkinje cell, spatio-temporally restricted gene targeting, C57BL/6 mouse, ES cell, antiprogesterone
小脳プルキンエ細胞，部位・時期特異的ジーンターゲティング，C57BL/6マウス，胚性幹細胞，アンチプロゲステロン

Reprint requests to: Kazuko KITAYAMA,
Department of Cellular Neurobiology,
Brain Research Institute,
Niigata University,
Niigata, 951-8585, Japan.

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

はじめに

プルエンキ細胞は，小脳唯一の出力ニューロンで，2種の神経線維から興奮性の入力を受けている．一方は，顆粒細胞の軸索である平行線維で，一つのプルキンエ細胞に15万本もの平行線維が入力する．他方は下オリーブ核から連絡する登上線維で，成熟個体においては，一つのプルキンエ細胞に対して，一本の登上線維が連絡している．小脳の運動学習の一基礎過程と考えられているシナプス可塑性に，長期抑圧（LTD）がある．これは，プルキンエ細胞への平行線維入力と，登上線維入力が同調することによって，平行線維プルキンエ細胞間のシナプス伝達効率が減弱する現象である[1]．

小脳 LTD の働きは，運動時における不適切な神経情報伝達を減弱することによって，適切な運動制御がなされるようにすることで，登上線維はプルキンエ細胞に不適切な運動結果であるという誤差情報を伝えると考えられている．小脳 LTD に関与する分子の同定と生体内での作用機序を理解するために，ノックアウトマウスや，トランスジェニックマウスの作製と解析は有効な手段である．これまでに，グルタミン酸受容体δ2サブユニット（GluRδ2），代謝型グルタミン酸受容体1（mGluR1），GFAP ノックアウトマウスおよびプルキンエ細胞特異的に C キナーゼγが不活化されるトランスジェニックマウスの解析より，これらの分子が LTD に関与することが示された[2)-5)]．しかし，従来の方法で作成されたノックアウトマウスでは，標的遺伝子欠損が個体の全ての細胞におよぶ．そのため標的遺伝子発現が，発生初期から認められる場合，遺伝子欠損が形態形成に影響を及ぼし，胎生致死や代償作用が起こることもある．小脳 LTD に関与すると示唆されたこれらの分子の変異マウスのうち，GFAP 欠損マウス以外は，生後幼若期に形成されるプルキンエ細胞－平行線維間のシナプス連絡や，プルキンエ細胞－登上線維の一対一対応に異常がみられた[2)-7)]．つまり厳密にいうと，ノックアウトマウスを用いて，発生初期から機能する分子が成体小脳でのシナプス可塑性に関与しているかを直接検証することはできない．

P1ファージ由来の Cre リコンビネースは34bp の塩基配列よりなる loxP 配列を認識し2つの loxP 間での組換えを引き起こす[8]．この酵素の発現領域を限定した変異マウスと，標的遺伝子の機能ドメイン領域近傍に loxP 配列を挿入した変異マウスを個別に作製し，交配によって両変異遺伝子を併せ持った変異体を作製することで，ノックアウトの領域を限定した個体解析が可能になった[9)10)]．

ステロイドホルモン受容体のホルモン結合領域を，Cre と融合することによって，ホルモン依存的に組換え酵素が活性化されることが示された[11)]．また，ヒトプロゲステロン受容体のホルモン結合領域のうち，アンタゴニスト結合領域を残し，プロゲステロン結合領域を削った変異型のプロゲステロン受容体は，プロゲステロン存在下では転写調節因子として作用せず，かわりにアンチプロゲステロン（RU 486）がアゴニストとして作用し転写活性をひきおこすことが示された[12)]．

これらの事実をもとに，Kellendonk らは，Cre と変異型プロゲステロン受容体ホルモン結合領域を結合させた融合蛋白（CrePR）を作製し，CrePR の組換え酵素活性がアンチプロゲステロンによって誘導できることを示した[13)]．これまでに，CaMKⅡプロモーター制御下で前脳に CrePR を発現するトランスジェニックマウスと，NMDA 受容体ε3サブユニットプロモーター制御で小脳顆粒細胞に特異的に CrePR を発現するトランスジェニックマウスでの，部位・時期特異的な標的遺伝子組換え系の開発が報告されている[14)15)]．

本研究では，小脳プルキンエ細胞特異的にかつ誘導可能な標的遺伝子組換え系の開発を目的とする．そこでグルタミン酸受容体δ2サブユニット（GluRδ2）遺伝子がプルキンエ細胞に特異的に強く発現することを利用し[16)-18)]，この分子のプロモーター制御下で CrePR を発現する変異マウス（D2CPR）を作製した．そして，実際に RU 486 によってプルキンエ細胞特異的な遺伝子組換え誘導を確認した．

材料と方法

1）ターゲティングベクターの作製

AflⅡ－AgeⅠ 123 bp を pNCre[15)]，pd2bB（**図1A** 参照）をテンプレートとして，2段階 PCR によって増幅した．SacⅠ－AflⅡ 2 kbpDNA 断片（pd2bB 由来），AflⅡ－AgeⅠ 123 bp 断片，AgeⅠ－EcoRⅠ 2.4 kbp 断片（pCrePR[15)] 由来），EcoRⅠ－XhoⅠ 1.6 kbp 断片（pGKneo2[19)] 由来）を，SacⅠ，EcoRⅠ（平滑化）で開いた pBluescriptⅡ（SK－）（NotⅠと SacⅠの位置を入れ替えてある）に挿入し，pKSNECPRN を得た．pMC1DTApA[20)] を NotⅠ，HindⅢ（平滑化）で開き，pBluescriptⅡ由来の NotⅠ－BSSHⅡ（平滑化）123 bp 断片を挿入し，pMC1DTApAM を得た．pd2aE（**図1A** 参照）由来の XhoⅠ－ApaⅠ

6.5 kbp 断片を pBluescriptⅡ（SK－）にライゲーションし，pKSⅠを得た．NotⅠ，ApaⅠ（部分消化）で開いた pMC1DTApAM に pKSNECPRN 由来の NotⅠ－SalpⅠ 6.1断片と，pKSⅠ由来の SalⅠ－ApaⅠ 6.5 kbp 断片を挿入し，ターゲティングベクター pD2CPRTVS を得た．

2） 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）を用いて相同組換えをおこなった．ES 細胞培養は，マイトマイシン C 処理したネオマイシン耐性のマウス胚線維芽細胞上で37℃，5％CO_2 条件下で行った．ES 培地は DMEM（高グルコース，GIBCO BRL）に以下のものを加えて調製した．数字は最終濃度．17.7％ウシ胎仔血清，88 μM 非必須アミノ酸（GIBCO BRL），0.88 mM ピルビン酸ナトリウム（ICN），88 μM 2－メルカプトエタノール（Sigma），8.8 $\times 10^2$/ml 白血病抑制因子（AMRAD－ESGRO）．NotⅠで消化したターゲティングベクター 6 pmol を10^7個の ES 細胞にエレクトロポーレーションにより導入した（250 V，960 μF，R＝∞）．トランスフェクション後38－48時間後に G418 選別を開始し（175 μg/ml），7日後に耐性コロニーをピックアップした．

3） キメラマウスの作製

G418耐性 ES 細胞クローンの遺伝子型判定にはサザンブロット法を用いた．1 μg のゲノム DNA を EcoRⅠ消化し，プローブ A（pd2aE 由来の EcoRⅠ－SacⅠ 188 bp 断片），プローブ B（pd2aE 由来の AatⅠ－BamHⅠ 1 kbp 断片），プローブ Cre（pNCre 由来の AgeⅠ－BamHⅠ 0.3 kbp 断片）をもちいて相同組換えを確認した．ハイブリダイゼーションは文献21に記載された方法でおこなった．相同組み換え体 ES 細胞は，8細胞期の ICR マウス胚に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．キメラ率は，キメラマウスの体色で判定した．D2CPR 系統は，♂のキメラマウスと♀の C57BL/6 を交配することによって確立した．

4） *in situ* ハイブリダイゼーション

5週齢の D2CPR ヘテロ変異体の脳矢状切片をオリゴヌクレオチドプローブ CrePR 898[15] と GluRδ2[16] プローブを用いて行った．プローブは，^{33}P－dATP でラベルした．ハイブリダイゼーションは文献22に記載された方法でおこなった．

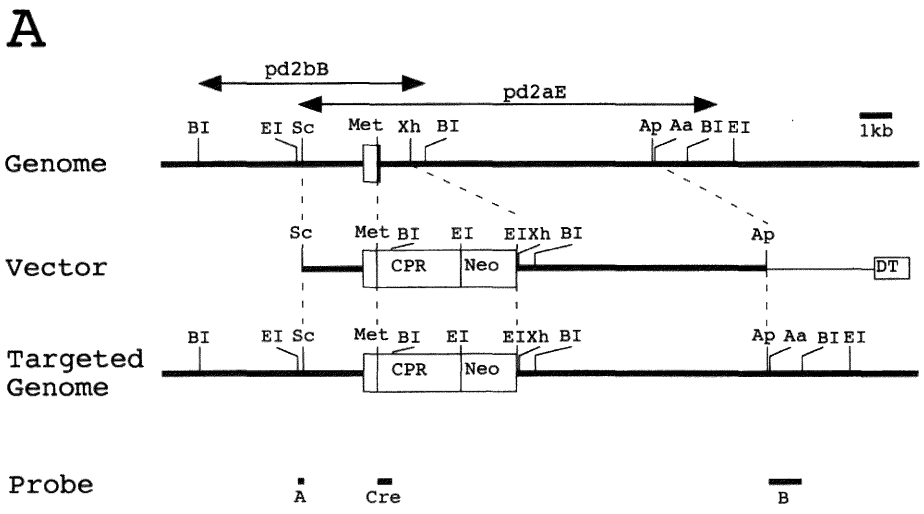
5） アンチプロゲステロン投与による組換え効率の検定

アンチプロゲステロン RU 486 による CrePR タンパクの組み換え酵素活性の誘導を確認するために，Cre 活性によって lacZ が発現する CAG－CAT－Z11トランスジェニックマウス[23] と D2CPR マウスを交配し，両遺伝子をヘテロにもつ変異マウス（D2CPR/＋，Z/＋）をレポーターマウスとして使用した．生後5－7週齢（P35－P49）のレポーターマウスに RU 486 懸濁液を1日1回体重1 kg あたり 500 mg 連続4日間腹腔に投与した．RU 486 懸濁液調整法は，文献14に準じた．RU 486 投与開始から1週，3週，6週，9週，12週経過後にネンブタール麻酔下でマウスの灌流固定を行った（4％パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液＝PB pH 7.5）．全脳摘出し，同じ固定液で2時間後固定し，30％しょ糖/0.1 M PB に脳が完全に沈むまで4℃で保存した．コントロールには，RU 486 を投与していない6週齢のレポーターマウスを用いた．正中付近の矢状切片（厚さ1 mm）を作製し，βガラクトシダーゼ（β－gal）活性染色反応を行った．方法は，文献15に準じた．染色反応後，厚さ30 μm の凍結切片を作製し，メチルグリーンピロニン（MGP）で共染色した．プルキンエ細胞層にあり，色素でピンク色に染色された細胞をプルキンエ細胞とみなした．光学顕微鏡下（倍率10×10または，10×20）でプルキンエ細胞数を数え，β－gal 活性のあったプルキンエ細胞の割合を計算した．1個体あたり，5枚の凍結切片を調査し，その平均値を個体の組換え率と定義した．

結　　果

1） D2CPR 変異マウスの作製

GluRδ2 翻訳開始点にフレームを合わせて NLSCrePRpA の cDNA を挿入したベクターを作製し，これを Bruce ES 細胞にエレクトロポーレーションした．G418耐性クローンから，5/425 の確率で相同組換え体が得られた（**図1**）．そのうち1クローン（20－116）より，キメラ率の高い♂のキメラマウスが1匹得られた．このキメラマウスと C57BL/6 マウスを交配して得られた仔において変異遺伝子の伝達を確認し，D2CPR マウス系統を確立した．



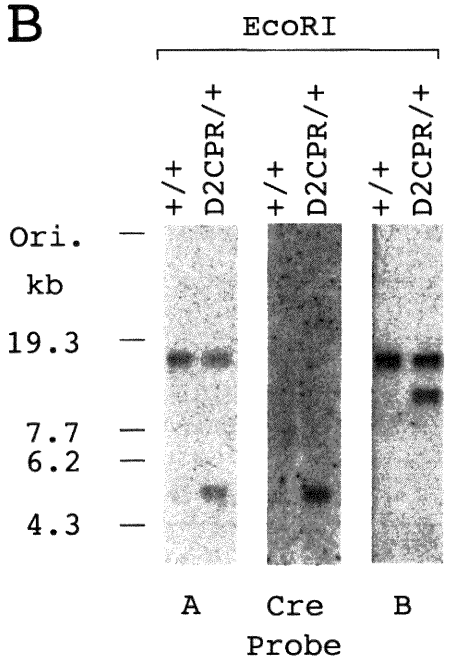


図1 相同組換え法による D2CPR 変異マウスの作製.

（A）翻訳開始点近傍のグルタミン酸受容体δ2サブユニット（GluRδ2）遺伝子の構造，ターゲティングベクター，相同組換え体遺伝子の構造．■と□はそれぞれ，コーディング，非コーディングのエクソンを示す．太線はサザンブロットハイブリダイゼーションに用いたプローブ（A, Cre, B）を示す．細線は GluRδ2ゲノム DNA のサブクローンを示す．略語 CPR, NLS−CrePR pA; Neo, pgk−neo−pA カセット；Met, 翻訳開始点；DT, ジフテリア毒素 A 断片遺伝子；Aa, AatⅠ；Ap, ApaⅠ；BⅠ, BamHⅠ, EⅠ, EcoRⅠ；Sc, SacⅠ；Xh, XhoⅠ．（B）EcoRⅠ消化した野生型および D2CPR ヘテロ変異 ES 細胞ゲノム DNA のサザンブロットハイブリダイゼーション．

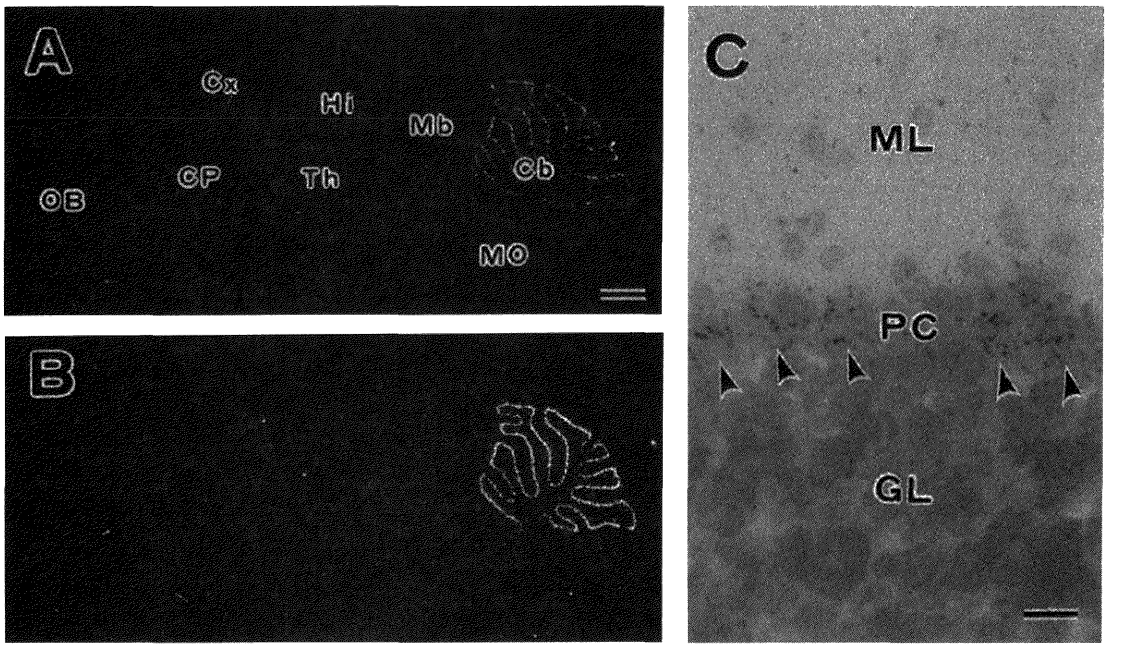


図2　プルキンエ細胞特異的な CrePR 遺伝子の発現.

（A, B）5週齢 D2CPR ヘテロ変異マウス脳矢状切片を（A, C）CrePR および，（B）GluRδ2 mRNA に対するオリゴヌクレオチドプローブでハイブリダイゼーションした．(C) 明視野強拡大. OB, olfactory bulb; Cx, cerebral cortex; CP, caudate putamen; Hi, Hippocumpus; Th, thalamus; Mb, mid brain; MO, medulla oblongata; Cb, cerebellum. ML, molecular layer; PC, Purkinje cell layer; GL, granule layer. 縮尺，1 mm (A, B), 10μm (C).

2）*in situ* ハイブリダイゼーション

5週齢の D2CPR ヘテロ変異体マウス全脳矢状切片を用いて，CrePR, GluRδ2mRNA の発現を調べた結果 CrePR の発現は，GluRδ2と同様にプルキンエ細胞層に特異的に認められた（**図2A－B**）．また，明視野高倍率の像より，CrePR の mRNA はプルキンエ細胞特異的に発現していることが示された（**図2C**）．

3）CrePR 組換え酵素活性の RU 486 による誘導

Cre 活性によって lacZ 遺伝子発現が起こるトランスジェニックマウス CAG－CAT－Z11マウス[23]を用いて，RU 486 に依存した CrePR 活性誘導を測定した．まず，CAG－CAT－Z11マウスと D2CPR マウスを交配し，両者の変異遺伝子をヘテロにもつ個体を選別した．これらのマウスに RU 486 を腹腔投与し，脳における CrePR の組換え酵素活性を，β－gal 活性染色により検索した．その結果，**図3A－C** に示すとおり，染色は，RU 486 投与を行ったレポーターマウスのプルキンエ細胞に限局して認められた．また，プルキンエ細胞の染色反応は，小脳全体にわたって認められ，領域による大きな変化は認められなかった（**図3D－E**）．

4）RU 486 投与後の経過時間と組換え率の変化

RU 486 による遺伝子組換えの効率を測定するために，薬物投与開始から経時的に，全プルキンエ細胞中の組換えによるβ－gal 発現細胞の割合を計測した．その結果，組換え率は時間経過とともに上昇し，投与後6週において約80％であった（**図4，表1**）．さらに，各小葉ごとに組換え率を計算した結果，小葉Ⅰ－Ⅱの組換え率が若干高く，小葉ⅫとⅩの組換え率がやや低かった．また，RU 486 投与方法をこれまでおこなってきた1日1回 500 mg/kg 連続4日投与という方法の他に，(1) 1日1回 1 g/kg を連続2日投与，(2) 500 mg/kg を週に1回4回投与，(3) 1.6 g/kg 1回投与という方法も試み

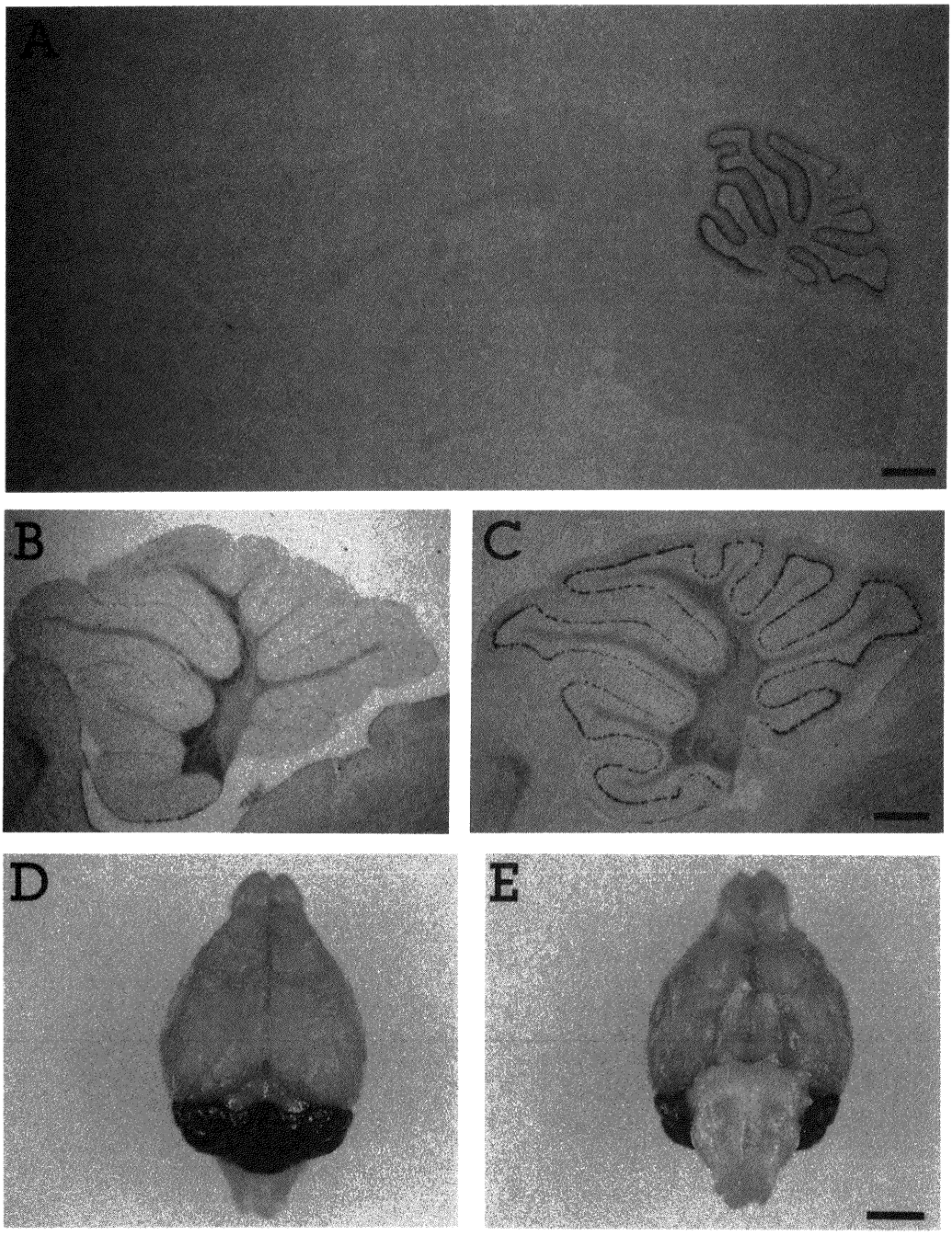


図 3 レポーターマウス（D 2 CPR/＋, Z/＋）を用いた CrePR 活性誘導.

（A）RU 486 投与 6 週後における全脳矢状切片のβガラクトシダーゼ活性染色.（B, C）RU 486 投与前（B）, 投与後 6 週（C）における小脳矢状切片のβガラクトシダーゼ活性染色.（D, E）RU 486 投与12週後における全脳βガラクトシダーゼ活性染色. 切片の厚さ,（A）200 μm,（B, C）30μm. 縮尺,（A） 1 mm,（B, C）500 μm,（D, E）2.5 mm.

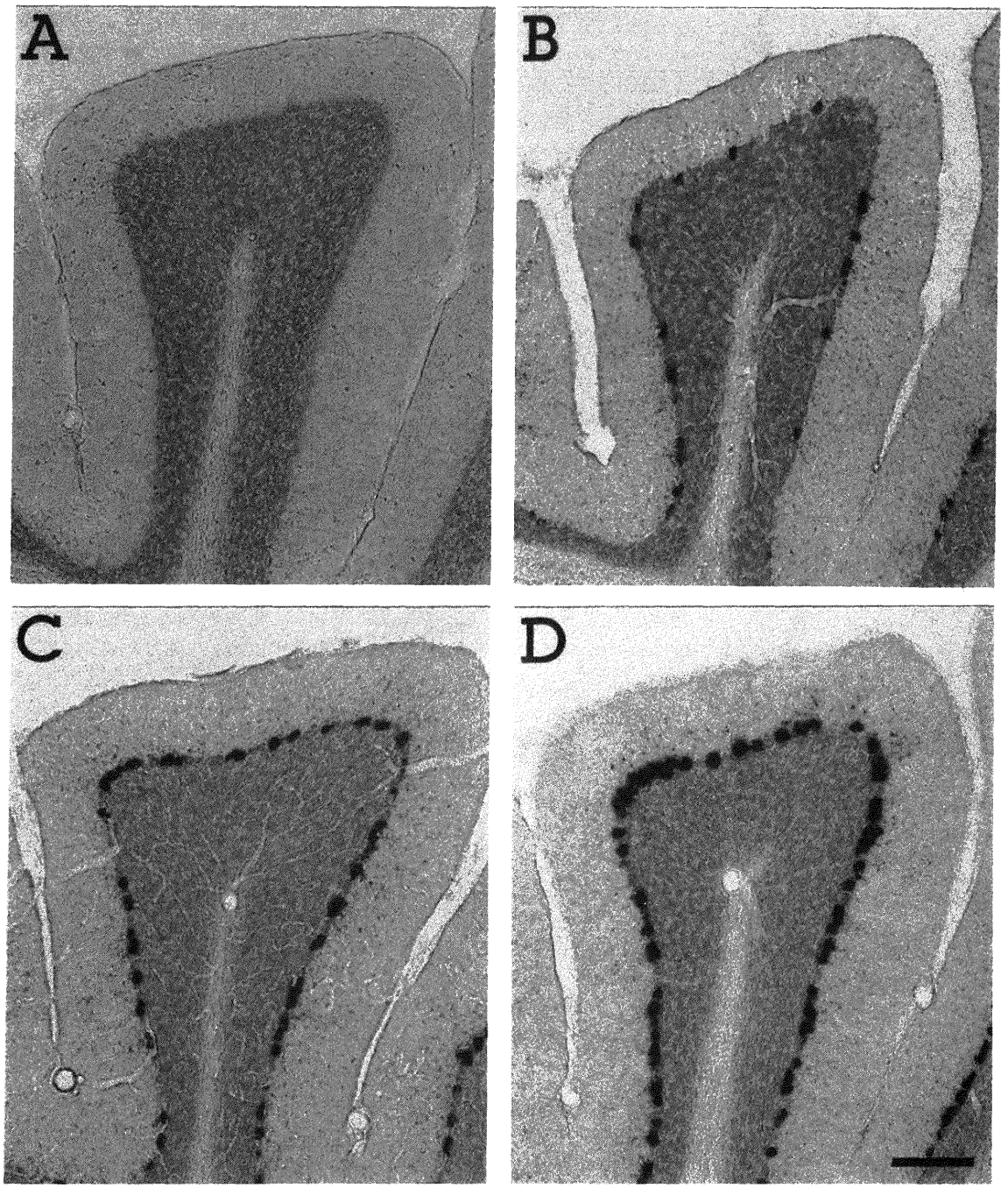


図4　RU 486 投与後の経過時間と組換え率の変化.

βガラクトシダーゼ活性染色とメチルグリーンピロニン染色した小脳矢状切片写真（小葉Ⅷ）.（A）RU 486 投与前,（B－D）RU 486 投与開始から各1週, 3週, 6週後の小脳. 切片の厚さは, 全て30μm. 縮尺, 125 μm.

表 1　D 2 CPR マウスプルキンエ細胞における RU 486 投与後の時間経過と遺伝子組換え率の変化の関係

小脳小葉	CrePR による遺伝子組換えのあったプルキンエ細胞の割合 (a)			
	誘導前 (N＝4) (b)	1 週後 (N＝6)	3 週後 (N＝6)	6 週後 (N＝6)
Ⅰ, Ⅱ	0.50±0.19	35.9±4.89**	66.4±6.22*	85.6±5.53**
Ⅲ	0.28±0.03	32.0±5.94	61.5±6.46	82.9±4.89
Ⅳ, Ⅴ	0.53±0.003	28.9±5.57	61.5±5.32*	82.7±5.03
Ⅵ	0.21±0.03	26.6±4.33	60.3±8.10	80.6±6.28
Ⅶ	0.19±0.14	22.1±6.63**	53.2±6.42*	72.3±6.73*
Ⅷ	0.27±0.10	31.9±6.66	62.0±4.29	84.3±4.12*
Ⅸ	0.29±0.035	31.8±4.87	67.1±8.25*	82.7±6.88
Ⅹ	0	22.6±8.31	48.7±7.98**	62.9±8.41**
平均値	0.28±0.013	29.0±4.40	60.1±4.99	79.2±3.58

注. (a) 数値はプルキンエ細胞層においてβガラクトシダーゼ活性染色のあった細胞の割合を示す（%）. (Mean±SD) (b) N は調査したマウスの匹数. 雌雄比は 1 : 1 . 各々の時間において組換え率の平均値と各小葉の組換え率の値に対して, 対応のある t 検定をおこなった.
*P< 0.05, **P< 0.01.

た. 最初の投与から 6 週後の小脳全体での組換え率はどの条件でもおよそ80%であった. また, 9 週後, 12週後の組換え率は, それぞれ～85%, ～90%であった.

考　　察

D 2 CPR 変異マウスは, ノックイン法を用いて, CluRδ 2 遺伝子の翻訳開始点に CrePR 遺伝子を挿入するように設計した. その結果, CrePR 遺伝子は, GluRδ 2 のプロモーター制御下でプルキンエ細胞特異的に発現が認められた. また, β－gal 活性染色の結果, 小脳全体のプルキンエ細胞で組換えが認められ, L 7 (pcp 2) 遺伝子のプロモーター制御下で外来遺伝子を発現させたトランスジェニックマウス脳にみられたような, 矢状方向に区画性を持った挿入遺伝子の発現はなかった[24]. また, ノックイン法を用いた利点は, D 2 CPR マウスにおいて, CrePR 遺伝子が GluRδ 2 の遺伝子座（6 番染色体 29.05 cM）に挿入されているという情報が予めわかっていることである. DNA を受精卵にインジェクションするトランスジェニックマウス作製においては, 挿入される DNA のコピー数が多く発現量の増大が期待される一方で, 挿入された外来遺伝子の場所を予め特定することができない. Cre－loxP 組換え系を用いたコンディショナルターゲティング法においては, 別に作製した標的遺伝子に loxP 配列を挿入した変異マウス（loxP マウス）と交配し, loxP 挿入染色体をホモに持ちかつ Cre 遺伝子をもつ変異マウス（loxP/loxP, Cre/＋）を解析する. そのため, もし両者の遺伝子が連鎖していたら, 目的のマウスを交配によって得られる確率が著しく低下する.

D 2 CPR マウスにおいて, RU 486 投与により, CrePR が活性化し, プルキンエ細胞特異的に遺伝子組換えが誘導されることが示せた. RU 486 投与から, 遺伝子組換え誘導までにかかる時間を短縮するために, RU 486 投与方法をいくつか試みた. しかし, 6 週経過後の組換え率は, どの方法でも約80%であった. RU 486 投与開始から 9 週, 12週の組換え率は 6 週よりも若干高かった. また, 腹腔内に残存している RU 486 の量は, 時間と共に減少していくことが観察された. これらのことから, 腹腔内に投与した RU 486 懸濁液は, ゆっくり時間をかけて吸収され, 血流によって小脳に運ばれて CrePR のアゴニストとして作用し, 組換えを誘導することが示唆された. 迅速かつ簡便に組換えを誘導する方法として, RU 486 の代わりに, セサミオイルに溶かした Org 31806 を投与したり[15], アンチプロゲステロンを餌にまぜて口腔投与することなどは試す価値があるだろう. RU 486 投与による神経系への影響は明らか

ではないが，1 g/kg の急性の投与や，1ケ月にわたる 200 mg/kg/day の連続投与でも毒性がなかったことはラットを用いた実験より確認されている[25]．

脳の高次機能解析をおこなうときに，マウスの系統や遺伝的背景は非常に重要な問題である．これまでノックアウトマウス作製には，129系統のマウス ES 細胞が主に用いられてきた．しかし，この系統は，脳梁が無いなどの奇形があり，行動解析による脳高次機能の推定には向かないことが報告されている．そのため変異マウスを行動解析に実績のある C57BL/6系統のマウスと戻し交配を行って，遺伝的背景を C57BL/6系統のマウスにそろえることで問題を解決してきた[26]．D2CPR マウスは，C57BL/6系の ES 細胞を用いて作製され，C57BL/6の遺伝的背景を持っているので，戻し交雑することなく解析できる．

これらのことより，D2CPR マウスは，基本的神経回路形成が終了した成体小脳において，シナプス可塑性や運動学習にかかわる分子の同定とその作用機序の解析に有用な手段となりうる．

謝　辞

変異マウス作製にあたっては，ES 細胞培養，キメラマウス作製を分業した阿部学君，柿崎利和君，本間大輔君，夏目里恵さん，（新潟大学脳研究所細胞神経生物学），*in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった深谷昌弘君，組み換えの起こった細胞数の計測についてのアドバイスをくださった渡辺雅彦先生（北海道大学大学院医学研究科生体機能構造学），レポーターマウスをくださった，宮崎純一先生（大阪大学大学院医学研究科分子防御学），RU 486投与に関するアドバイスをくださった辻田実加先生（東京大学大学院医学部薬理学・分子神経生物学），直接指導して下さった崎村建司先生に御礼申し上げます．

参　考　文　献

1) **Ito, M.**: Long－term depression. Ann. Rev. Neurosci., **12**: 85～102, 1989.

2) **Aiba, A., Kano, M., Chen C., Stanton, M.E., Fox, G.D., Herrup, K., Zwingman, T.A. and Tonegawa, S.**: Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR 1 mutant mice. Cell, **79**: 377～388, 1994.

3) **Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., Kang, Y., Aizawa, S. and Mishina, M.**: Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluRδ 2 mutant mice. Cell, **81**: 245～252, 1995.

4) **Shibuki, K., Gomi, H., Chen, L., Bao, S., Kim, J.J., Wakatsuki, H., Fujisaki, T., Fujimoto, K., Katoh, A., Ikeda, T., Chen, C., Thompson, R.F. and Itohara, S.**: Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. Neuron, **16**: 587～599, 1996.

5) **De Zeeuw, C.I., Hansel, C., Bian, F., Koekkoek, S.K.E., van Alphen, A.M., Linden, D.J. and Oberdick, J.**: Expression of protein kinase C inhibitor in Purkinje cells blocks cerebellar LTD and adaptation of the vestibulo-ocular reflex. Neuron, **20**: 495～508, 1998.

6) **Kano, M., Hashimoto, K., Kurihara, H., Watanabe, M., Inoue, Y., Aiba, A. and Tonegawa, S.**: Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR 1. Neuron, **18**: 71～79, 1997.

7) **Kurihara, H., Hashimoto, K., Kano, M., Takayama, C., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. and Watanabe, M.**: Impaired parallel fiver→Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor δ 2 subunit. J. Neurosci., **17 (24)**: 9613～9623, 1997.

8) **Sternberg, N. and Hamilton, D.**: Bacteriophage P 1 site-specific recombination. I. Recombination between *loxP* sites. J. Mol. Biol., **150**: 467～486, 1981.

9) **Gu, H., Zou, Y.R. and Rajewsky, K.**: Independent control of immunoglobin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre－*loxP*－mediated gene targeting. Cell, **73**: 1155～1164, 1993.

10) **Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R. and Tonegawa, S.**: Subregion− and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. Cell, **87**: 1317～1326, 1996.

11) **Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H. and Chambon, P.**: Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**: 6991～6995, 1995.

12) **Vegeto, E., Allan, G.F., Schrader, W.T., Tsai, M.J., McDonnell, D.P. and O'Malley, B.W.**: The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. Cell, **69**: 703～713, 1992.

13) **Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A.P., Angrand, P.O., Stewart, F. and Schütz, G.**: Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU486. Nucl. Acids Res., **24** (8): 1404～1411, 1996.

14) **Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherk, C. and Schütz, G.**: Inducible site-specific recombination in the brain. J. Mol. Biol., **285**: 175～182, 1999.

15) **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** (**23**): 10318～10323, 1999.

16) **Araki, K., Meguro, H., Kushiya, E., Takayama, C., Inoue, Y. and Mishina, M.**: Selective expression of the glutamate receptor channel δ 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., **197**(3): 1267～1276, 1993.

17) **Takayama, C., Nakagawa, S., Watanabe, M., Mishina, M. and Inoue, Y.**: Light− and electron-microscopic localization of the glutamate receptor channel δ 2 subunit in the mouse Purkinje cell. Neurosci. Lett., **188**: 89～92, 1995.

18) **Takayama, C., Nakagawa, S., Watanabe, M., Mishina, M. and Inoue, Y.**: Developmental changes in expression and distribution of the glutamate receptor channel δ 2 subunit according to the Purkinje cell maturation. Dev. Brain Res., **92**: 147～155, 1996.

19) **Yagi, T., Nada, S., Watanabe, N, Tamemoto, H., Kohmura, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S.**: A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. Anal. Biochem., **214**: 77～86, 1993.

20) **Yanagawa, Y., Kobayashi, T., Ohnishi, M., Kobayashi, T., Tamura, S., Tsuzuki, T., Sanbo, M., Yagi, T., Tashiro, F. and Miyazaki, J.**: Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT−A gene with the polyadenylation signal as a negative selection marker. Transgenic Res. 8: 215～221, 1999.

21) **Nagasawa, M., Sakimura, K., Mori, K.J., Bedell, M.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Mishina, M.**: Gene structure and chromosomal localization of the mouse NMDA receptor channel subunits. Mol Brain Res., **36**: 1～11, 1996.

22) **Watanabe, M., Inoue, T., Sakimura, K. and Mishina, M.**: Distinct distributions of five *N*−Methyl−D−Aspertate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. J. Comp. Neurol., **338**: 377～390, 1993.

23) **Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J. and Vassalli, P.**: Site−specific recombination of transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**: 160～164, 1995.

24) **Vandaele, S., Nordquist, D.T., Feddersen, R.M., Tretjakoff, I., Peterson, A.C. and Orr, H.T.**: *Purkinje cell protein − 2* regulatory regions and transgene expression in cerebellar compartments. Genes and Dev., **5**: 1136～1148, 1991.

25) **Deraedt, R., Vannier, B. and Fournex, R.**: Toxicological study of RU486. In: Baulieu, E.E. and Segal, S.J. (eds.) The antiprogestin steroid RU486 and Human fertility control.

Plenum Publishing Corporation: New York, pp123～127, 1985.

26) **Gerlai, R.**: Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or background genotyps? Trends. Neurosci., **19**: 177～181, 1996.

（平成13年1月30日受付）