

【目的】咀嚼運動は、栄養を摂取するために必須の生体機能である。咀嚼機能が障害されると、発育障害や誤嚥性肺炎、さらには認知機能の低下が起こりうる。一方、咀嚼運動の充進は記憶／集中／覚醒といった脳機能を向上させることが知られている。このような背景から、近年、口腔の健康に対する関心が高まっている。

咀嚼に際しては、咀嚼筋をはじめ多くの筋が協調し、顎がスムーズかつリズムカルに動く。そのためには、上位脳や末梢臓器からの情報がセントラルパターンジェネレーター（CPG）により統合される必要がある。CPG の実体は不明であり、現状では概念的な存在でしかない。本研究では、既存の方法とは全く異なる CPG 探索法の確立を目的とした。

【方法】脳幹への侵襲の無い CPG 探索法として、逆行性神経伝達を利用した特異性の高い神経細胞の標識方法を考案した。シナプスを逆行性に伝達され、上位ニューロンに取り込まれる因子、retrogradely-transmitted and endocytosed CPG tracer (RTECT、仮称) と蛍光分子 tdTomato の融合タンパク質を咀嚼筋運動ニューロンで発現するマウスを作出することで、咀嚼筋運動ニューロンの上位ニューロンが標識できると考えた。

マウスの咀嚼筋運動ニューロンが存在する三叉神経運動核が位置する脳幹部の免疫組織学的解析により、RTECT の組織内での発現を評価した。RTECT と tdTomato の融合タンパク質 RTECT-tdTomato をレトロウイルスベクターにサブクローニングした。ウイルス感染細胞が産生する RTECT-tdTomato 分子の細胞外への分泌を tdTomato の蛍光を指標に評価した。RTECT-tdTomato を発現するノックイン細胞を作製するために、ベクターの設計と構築を行った。

【結果】免疫組織染色法により、三叉神経運動核における RTECT およびその受容体 RTECTR の発現が確認された。RTECT と tdTomato の融合タンパク質 RTECT-tdTomato を作製するために、マウスの *Rtect* 遺伝子及び tdTomato 遺伝子をクローニングした。*Rtect* と tdTomato の間にリンカー配列を挿入し、レトロウイルスベクターにサブクローニングした。ウイルス感染細胞には tdTomato の蛍光が認められ、融合タンパク質の tdTomato 部分が正常にフォールディングされていることが示唆された。ウイルス感染細胞の培養上清からも tdTomato の蛍光が検出され、RTECT-tdTomato の細胞外への分泌が示唆された。Cre 依存的に内因性の RTECT の代わりに RTECT-tdTomato を発現するノックイン細胞を作製するために、マウスゲノムを切断する gRNA および Cas9 タンパク質の発現ベクターの構築、そしてノックインアレルのサブクローニングを行った。

逆行性神経伝達を利用した CPG 細胞の同定

