

## 論文の内容の要旨

### Behavioral state- and olfactory sensory input-dependent regulation of life/death decision and dendritic morphology of adult-born granule cells in the olfactory bulb

(行動様式と嗅覚入力による嗅球新生顆粒細胞の生死及び樹状突起形態の調節)

氏名 持丸 大輔

嗅覚系の一次中枢である嗅球では、抑制性の介在神経である顆粒細胞（以下 GC）が成体においても産生され続け、既存の嗅球回路に組み込まれている。また、嗅球に到達した新生 GC の約半数はアポトーシスを起こして嗅球回路から排除され、残りの半分为生き残って既存の嗅球回路に組み込まれることがわかっている。当研究室の先行研究では、鼻孔閉塞を用いた嗅覚入力の遮断は新生 GC の長期生存率を著しく減少させることを報告している。

しかしながら、通常の嗅球では嗅覚入力が頻繁にある領域とあまり無い領域がモザイク状に存在していると考えられる。そこで私は、新生 GC の生死は嗅球全体への嗅覚入力程度によって調節されているのではなく、嗅球の局所領域への嗅覚入力の有無によってその局所領域で調節されるという仮説を着想した。この仮説を検証するため、私は嗅球の背側部に投射する嗅神経細胞が遺伝学的に除去されたマウス（ $\Delta D$  マウス）を用いて研究を行った。 $\Delta D$  マウスの嗅球には糸球が形成されず嗅覚入力欠失領域（以下 D-domain）と、糸球が存在し嗅覚入力保持領域（以下 V-domain）が共存している。最初に私は、BrdU によって  $\Delta D$  マウスの新生 GC をラベルし、その長期生存率を調べた。BrdU 投与後、9–13 日の新生 GC は嗅覚入力欠失した  $\Delta D$  マウスの嗅球の D-domain に高密度に集積するが、その後期間を追うごとにその密度は減少し、最終的には V-domain と同程度になっていた。その結果、 $\Delta D$  マウスの D-domain での新生 GC の長期生存率は有意に V-domain や通常マウスの各領域と比べ低くなっていた。

次に、食餌制限によってマウスの行動様式を一定にし、どの行動様式中にΔD マウス嗅球の D-domain で新生 GC の細胞死が増加するのかを caspase-3 の活性化を指標にし、解析した。その結果、ΔD マウス嗅球の D-domain で細胞死を起こした GC の密度は食餌開始前直前では V-domain と同程度であったが、食餌開始後 2 時間では V-domain よりも大きく増加していた。そこで、ΔD マウス及び通常マウス嗅球の D-domain と V-domain 間で caspase-3 が活性化した GC の密度の比率 (D-domain / V-domain) を解析すると、通常マウスの嗅球では食前と食後2時間の間で有意な差は見られなかったが、ΔD マウスの嗅球では食餌開始後 2 時間で有意に増加していた。この食後の時間帯にマウスは休眠行動をしており、ΔD マウスの食後の休眠行動を阻害すると D-及び V-domain の双方で食後の特異的な GC 細胞死の増加が見られなくなった。

これらの結果から私は、嗅球の局所領域への嗅覚入力欠失はその領域の新生 GC の長期生存率を低下させるが、個々の新生 GC の生死は覚醒時の嗅覚入力の有無によって決められ、食後休眠時の再編成シグナルによって引き起こされるということを明らかにした。

次に、嗅覚入力の有無が新生 GCs の形態的成熟にどのような影響を及ぼすのかを調べるため、ΔD マウスの新生 GC を EGFP を発現するレトロウイルスを用いてラベルし、嗅球の D-domain での形態を観察したところ、external plexiform layer (以下 EPL) のスパインが V-domain と比べ減少していた。GC は EPL で嗅球投射ニューロンと樹状突起間シナプスを形成し、嗅覚入力を受けていることが知られていることから、私は新生 GC の形態、中でも嗅覚入力を受ける EPL や mitral cell の細胞体から嗅覚入力を受ける mitral cell layer (MCL) の樹状突起の形態が嗅覚入力依存的に変化するのではないかと考えた。

そこで、通常のマウスの未成熟な GC s を EGFP を発現するレンチウイルスを用いてのラベルし、ラベルから 14 日後の嗅球での樹状突起の形態を通常マウス嗅球と鼻孔閉塞を用いて嗅覚入力を遮断した嗅球と比較することにした。最初に、GC s の EPL 及び MCL での樹状突起の形態を比較したところ、嗅覚入力遮断された嗅球の GC s は MCL での分岐やそこに含まれる樹状突起の長さの総長が、通常マウス嗅球の物と比べ有意に増加していた。次に、MCL 中に含まれる樹状突起上のスパイ

ンなどの突起に着目したところ、鼻孔閉塞を行った嗅球の GC s は通常の嗅球の物と比べ、EPL に含まれるスパインなどの突起は有意に減少していたのに対し、逆に MCL では有意に増加していた。そこで各 GC s の EPL 及び MCL に含まれる樹状突起上のスパインなどの突起の内、MCL に含まれる突起の比率を計測したところ、通常の嗅球では約 20%であったのに対し、嗅覚入力を遮断した嗅球では約 70%と大きく増加していた。最後に、樹状突起上のスパインなどの大きさを解析したところ、嗅覚入力を遮断した嗅球の GC s は EPL では通常の嗅球と差は見られなかったが、MCL では比較的大きな head size を持つスパインが占める割合が増加していた。

これらの結果は、嗅覚入力を遮断された嗅球の新生 GC は EPL で嗅覚入力をあまり受けることができない代わりに、MCL の mitral cell の細胞体から少しでも入力を受け取って生き残ろうと形態を変化させる機構があることを示唆している。