

氏 名 廣 蒼太

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2512 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Optical analysis of organellar circadian rhythms in the master  
clock neurons

論文審査委員 主 査 富永 真琴  
生理科学コース 教授  
榎木 亮介  
生理科学コース 准教授  
北城 圭一  
生理科学コース 教授  
吉村 崇  
名古屋大学  
トランスフォーマティブ生命分子研究所 教授

# 博士論文の要旨

氏 名 : Hiro, Sota

論文題目 : Optical analysis of organellar circadian rhythms in the master clock neurons

Almost all living organisms on Earth are regulated by a circadian clock, which anticipates the environmental changes for their survival. In mammals, the master circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus in the brain, which controls various physiological functions (e.g., sleep-wake cycles, hormone secretion), and animal behavior. The rodent SCN is composed of ca. 20,000 neurons in the bilateral side of the hypothalamus. At the cellular level, the molecular machinery of circadian rhythms is thought to be based on the transcriptional-translational feedback loop (TTFL), which is composed of clock genes and their protein products. In individual SCN neurons, circadian rhythms are observed at the level of firing frequency, peptide release, and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. In general, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is regulated by internal organelles, such as the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria, and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling regulates various cellular functions, such as clock gene transcription in the nucleus. However, it remains to be elucidated what the  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in organelles are and how these organelles regulate the circadian  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms in the SCN neurons.

First, I examined the  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics and its regulatory mechanism in the nucleus of the SCN neuron on the circadian timescale. To visualize the  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics, I performed dual-color time-lapse  $\text{Ca}^{2+}$  imaging in the nucleus and cytosol using highly sensitive genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators, GCaMP6s and jRGECO1a. I found robust nuclear circadian  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms in phase with the cytosolic rhythms in single SCN neurons and entire regions. The nucleus is covered by a nuclear envelope with nuclear pores, and ryanodine and inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) receptors, which are mainly expressed in the endoplasmic reticulum (ER), are also expressed on the inner membrane. To investigate their involvement in the regulation of nuclear circadian  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms, I applied drugs that inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  influx via ryanodine receptors,  $\text{IP}_3$  receptors, or neuronal firing. Inhibiting action potentials reduced the amplitude of both nuclear and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms, whereas blocking  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER, either via ryanodine or  $\text{IP}_3$  receptors, had a minor effect on nuclear and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms. I conclude that the in-phasic circadian  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms in the cytosol and nucleus are primarily driven by  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular space, likely through the nuclear pores. It also raises the possibility that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms directly regulate transcription *in situ*.

Second, I examined the  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in the mitochondrial matrices of the SCN neurons, because the ER has a small contribution to circadian  $\text{Ca}^{2+}$  rhythm regulation

and mitochondria are known to function as  $\text{Ca}^{2+}$  stores. To directly visualize  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in the mitochondria, I expressed a genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, CEPIA2mt, in the mitochondrial metrics of SCN neurons. I found circadian rhythms of the CEPIA2mt signals, which were nearly antiphase to the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms. Since CEPIA2mt is known to be affected by pH, I expressed the circularly permuted EGFP (cpEGFP), which excludes the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site of CEPIA2mt. Unexpectedly, I detected the circadian rhythms of the cpEGFP signals, suggesting the existence of  $\text{Ca}^{2+}$ -independent rhythms. I further evaluated these signals using a high-sensitive pH indicator, superecliptic pHluorin. I observed the circadian  $\text{H}^+$  rhythm in mitochondrial metrics, where the level was high during the subjective day and low during the subjective night. In mitochondria, adenosine triphosphate (ATP) is produced when  $\text{H}^+$  flows into the matrix utilizing the electrochemical proton gradient. I hypothesized that mitochondrial  $\text{H}^+$  rhythms might be coupled with ATP synthesis. To test this, I expressed a genetically encoded ATP indicator, iATPSnFR, in the cytosol of SCN neurons. I found circadian ATP rhythms in the SCN neurons, where the level was high during the subjective night and low during the subjective day. During the subjective night, the  $\text{H}^+$  in the mitochondrial matrix is kept low, which may increase the concentration gradient and enhance the ATP production capacity.

In conclusion, I have identified organelle-level circadian rhythms in the nucleus and mitochondria of SCN neurons, which could be functionally coupled to the transcriptional regulation of clock genes in the nucleus and intracellular ATP demand, respectively. I also gained further insight into the origin of circadian  $\text{Ca}^{2+}$  rhythms in SCN neurons, where  $\text{Ca}^{2+}$  mainly comes from the extracellular space, but not via ryanodine or  $\text{IP}_3$  receptors on the ER and nuclear envelope. These ionic rhythms in organelles might be important for expressing robust and stable self-sustaining circadian rhythms in the SCN neurons.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 廣 蒼太

Title  
論文題目 Optical analysis of organellar circadian rhythms in the master clock neurons

出願者の廣蒼太氏は、哺乳類の概日時計中枢における神経細胞の細胞内オルガネラの高解像の長期光イメージング計測を行い、下記に述べるように、核、小胞体、ミトコンドリアにおける新しい概日時計の生理機能に発見に至った。

地球上のほぼすべての生物は概日時計を有し、環境変化を予測して生理機能を変化させ行動を起こすことで、自身の生存を有利にしている。哺乳類の概日時計の中枢は、脳の視床下部領域の視交叉上核 (SCN) に局在し、様々な生理機能や動物行動の約 24 時間リズムを制御している。SCN 神経細胞では、神経発火頻度、ペプチド放出、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度などの様々な生理機能の概日リズム変動が観察される。特に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、小胞体やミトコンドリアなどのオルガネラによって制御され、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは核における時計遺伝子の転写などさまざまな細胞機能を制御していると考えられる。しかしながら、SCN 神経細胞におけるオルガネラでの  $\text{Ca}^{2+}$ 動態や、概日  $\text{Ca}^{2+}$ リズムの制御メカニズムについては未だ不明であった。

廣氏はまず、SCN 神経細胞の核内における  $\text{Ca}^{2+}$ 動態と、その制御機構を解析した。高感度の遺伝子コード型  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光センサー(GCaMP6s, jRGECO1a)を核、細胞質に発現させ、高解像の 2 色タイムラプスイメージングを行ったところ、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ リズムと同位相の「核内概日  $\text{Ca}^{2+}$ リズム」を見いだした。核内概日  $\text{Ca}^{2+}$ リズムの制御機構を調べる為、核膜に存在するリアノジン受容体と  $\text{IP}_3$  受容体、および神経細胞の活動電位を阻害する薬剤を投与し、その効果を検証した。その結果、細胞質と核における概日  $\text{Ca}^{2+}$ リズムは、おそらく核膜孔を介し、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入によって主に駆動されていると結論づけた。この結果は、核の  $\text{Ca}^{2+}$ リズムが転写を直接制御するという、新たな遺伝子制御の存在を示唆している。

上記のように概日  $\text{Ca}^{2+}$ リズムは主に細胞外からの流入により駆動されるものの、リズムは継続していたことから、廣氏は概日  $\text{Ca}^{2+}$ リズムのさらなる振動源の探究のため、SCN 神経細胞のミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$ 動態の解析を行った。遺伝子コード型  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光センサー(CEPA2mt)をミトコンドリアのマトリックスに局在発現させ光イメージングを行ったところ、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ リズムとほぼ逆位相の概日リズムを検出した。一方で、カルシウムセンサーは pH により輝度が変動することから、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位を除いた円順列蛍光タンパク質(cpEGFP)を発現させ計測を行ったところ、この蛍光シグナルにも概日リズムがあることが分かった。この結果は、 $\text{Ca}^{2+}$ に依存しないリズムの存在を示している。廣氏はさらに、高感度 pH センサー(SuperEcliptic pHluorin)を用いて計測を行い、ミトコンドリアのマトリックスにおける新規の「概日 pH リズム」を発見した。さらに、ミトコンドリアの pH リズ

ムが ATP 合成と連動しているのではないかと考察し、遺伝子コード型 ATP センサー (iATPSnFR) を用いたイメージングを実施したところ、SCN 神経細胞の細胞質における「概日 ATP リズム」を見いだした。

このように廣氏は、様々な機能プローブを用いた緻密なイメージング計測と、得られたデータの緻密な解析と洞察により、概日時計発振における新たな生理機能の発見に繋がっている。得られた結果は、概日時計の理解をオルガネラレベルという新しい研究領域へと展開するものであり、今後の概日時計の理解に貢献することが期待される。

以上の理由から、審査委員会は全員一致で、本論文が学位の授与に値すると判断した。