

## 学位論文抄録

NSUN3-mediated mitochondrial tRNA 5-formylcytidine modification is essential for embryonic development and respiratory complexes in mice  
(NSUN3 によるミトコンドリア tRNA の 5-ホルミルシチジン修飾はマウスの胎児発育と呼吸鎖複合体に必須である)

村 上 慶 高

指導教員

富澤 一仁 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子生理学

## Abstract of the Thesis

**Background and Purpose:** In mammalian mitochondria, translation of the AUA codon is supported by 5-formylcytidine( $f^5C$ ) modification in the mitochondrial methionine tRNA anticodon.  $f^5C$  is synthesized by two mitochondrial matrix-localized enzymes, NSUN3 and ALKBH1. After mitochondrial methionine tRNA is transcribed, NSUN3 first methylates cytidine to form 5-methylcytidine, and ALKBH1 then oxidizes the methyl group to form a formyl group. Human *NSUN3* mutations are associated with mitochondrial diseases, but the detailed mechanism is yet to be identified. The purposes of this study is to investigate the physiological functions of NSUN3-mediated  $f^5C$  modification.

**Methods:** To investigate the physiological functions of NSUN3-mediated  $f^5C$  modification, we generated *Nsun3* KO mice. We also generated heart-specific *Nsun3* knockout (*Nsun3<sup>HKO</sup>*) mice to clarify the possible roles of NSUN3-mediated tRNA  $f^5C$  modification in adult tissue.

**Results:** By mating *Nsun3*<sup>+/-</sup> mice, we obtained five wild-type mice and 13 heterozygous mice, with no homozygous *Nsun3* KO mice obtained after multiple generations of breeding. We examined the morphology of embryos at embryonic day (E) 10.5 and E 12.5. *Nsun3* KO embryos are alive at E10.5 but died before E12.5. In *Nsun3<sup>HKO</sup>* hearts, mass spectrometric analysis of heart total RNA nucleosides confirmed that  $f^5C$  was absent. By using transmission electron microscopy, we found that *Nsun3<sup>HKO</sup>* heart mitochondria were enlarged and contained fragmented cristae. In cardiac ultrasonography, *Nsun3<sup>HKO</sup>* resulted in enhanced heart contraction and age-associated mild heart enlargement. In *Nsun3<sup>HKO</sup>* hearts, mitochondrial mRNAs that encode respiratory complex subunits were not down regulated, but the enzymatic activities of the respiratory complexes decreased, especially in older mice.

**Conclusions:** Mitochondrial tRNA anticodon modification is essential for mammalian embryonic development, and tissue specific loss of a single mitochondrial tRNA modification can induce tissue aberration that worsens in later adulthood.

## 学位論文抄録

[ 目的 ] 哺乳類のミトコンドリアにおいて、遺伝暗号表は細胞質の遺伝暗号表と異なる。たとえば、AUA コドンは細胞質ではイソロイシンに翻訳されるが、ミトコンドリアではメチオニンに翻訳される。ミトコンドリアの AUA コドンの翻訳は、メチオニン tRNA アンチコドンに存在する 5-ホルミルシチジン( $f^C$ )修飾により補助されている。 $f^C$  修飾は NSUN3 と ALKBH1 という二つのミトコンドリアマトリックスに局在する酵素によって生成される。ミトコンドリアのメチオニン tRNA が転写された後、まず NSUN3 酵素がシチジンをメチル化して 5-メチルシチジンを生成し、さらに ALKBH1 酵素が酸化させることでメチル基をホルミル基へ変換する。ヒトにおける NSUN3 遺伝子の変異はミトコンドリア病に関連することが報告されているが、詳細なメカニズムは解明されていない。本研究は、NSUN3 によるミトコンドリア tRNA の  $f^C$  修飾の生理機能を明らかにすることを目的とした。

[ 方法 ] NSUN3 によるミトコンドリア tRNA の  $f^C$  修飾の生理機能を明らかにするため、*Nsun3* ノックアウトマウスを取得した。全身における NSUN3 ノックアウトマウスは胎生致死であり、成獣組織における NSUN3 による  $f^C$  修飾の機能を解明するために心臓特異的な *Nsun3* ノックアウト(*Nsun3*<sup>HKO</sup>)マウスも併せて取得した。

[ 結果 ] *Nsun3*<sup>+/-</sup>マウスを交配させたところ、5 匹の野生型マウスと 13 匹のヘテロ接合マウスを得たが、ホモ接合 *Nsun3* ノックアウトマウスは交配を世代にわたって繰り返しても得られなかった。胎生 10.5 日と 12.5 日の胎児の形態を確認した。*Nsun3* KO 胎児は胎生 10.5 日では生存していたが、12.5 日の前には死亡していた。*Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスの心臓において、心臓の全 RNA ヌクレオシドの質量分析で  $f^C$  修飾の消失を確認した。*Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスの心臓を透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、*Nsun3*<sup>HKO</sup> のミトコンドリアは肥大化し、内部のクリステは断片化していた。心臓超音波検査では *Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスの心臓の収縮の過剰化と加齢に伴った軽度の心肥大を認めた。*Nsun3*<sup>HKO</sup> 心臓において、呼吸鎖複合体サブユニットをコードするミトコンドリア mRNA の量は低下しなかったが、呼吸鎖複合体の酵素活性は特に加齢群において低下していた。

[ 考察 ] 全身における *Nsun3* ノックアウト胎児は胎生致死であり、ミトコンドリア tRNA のアンチコドン領域の修飾は哺乳類の胎児発生において重要であると考えられた。また、*Nsun3*<sup>HKO</sup> 心臓において組織の異常と加齢によって増悪する呼吸鎖酵素複合体の酵素活性の低下を認め、*Nsun3* の欠失は心臓に異常をきたすと考えられた。

[ 結論 ] ミトコンドリア tRNA アンチコドンの修飾は哺乳類の胎児発達に必須であること、一種類のミトコンドリア tRNA の一種類の修飾の組織特異的な欠失であっても組織の異常をきたし、加齢によって増悪することを示した。