

## tRNA 修飾欠損による脳疾患の治療に向けた技術の開発

### [1] 組織

代表者：中條 岳志  
 (熊本大学大学院生命科学研究部 (医))  
 対応者：魏 范研  
 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 15 万円

### [2] 研究経過

表題の研究は加齢研の魏教授と共に実施しており、魏教授から研究に対するアドバイスをいただいた他に、全 61 種類のコドン翻訳レポータープラスミドをご分与いただいた。本来であれば、表題研究について記述すべきところであるが、関連成果を特許出願中であるために、その内容を公表できない。そこで大変恐縮だが、魏教授および大学院生の村上慶高と共に進めてきた、ミトコンドリア tRNA 修飾酵素の研究について書かせていただく。こちらの研究成果は、2021 年 12 月に論文を投稿し、現在リバイスを実施中である。

ミトコンドリアは、核ゲノムとは独立した DNA と遺伝子発現系を有する。ミトコンドリア内の遺伝暗号は核・細胞質とは一部異なり、たとえば AUA コドンは核・細胞質ではイソロイシンを指定するが、ミトコンドリアでは AUA は AUG と共にメチオニンを指定

する。ミトコンドリア DNA には、呼吸鎖複合体タンパク質、およびその翻訳に使われる tRNA などがコードされている。ミトコンドリア内で転写された tRNA は、様々な転写後修飾を受けて成熟するが、tRNA 修飾の一つとして、tRNA の 5-ホルミルシチジン修飾 (f<sup>5</sup>C 修飾) が知られる (図 1)。

f<sup>5</sup>C 修飾は、ミトコンドリアのメチオニン tRNA のアンチコドン 1 文字目のみに存在する修飾である。未修飾の CAU アンチコドンは AUG コドンのみと効率的な塩基対合が可能であるのに対して、f<sup>5</sup>C 修飾が付加された f<sup>5</sup>CAU アンチコドンは AUG のみならず AUA コドンとも効率的に塩基対合できる (図 1)。f<sup>5</sup>C 修飾反応では、初めに NSUN3 という酵素がシトシン塩基の 5 位にメチル基を付与し、次に ALKBH1 という酵素がメチル基をホルミル基へと酸化する。ヒトの培養細胞において、NSUN3 や ALKBH1 のノックアウト細胞はミトコンドリアの翻訳量の低下を示し、両アレルの NSUN3 遺伝子の変異はミトコンドリア病を引き起こすことが知られる。本研究は、*Nsun3* ノックアウトマウスを作製して個体における NSUN3 の役割の詳細な解明を目的とする。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

初めに、*Nsun3* 全身ノックアウトマウスの作製を試みた。*Nsun3* ヘテロマウス同士の交配により、野生型：ヘテロ：KO = 5 匹：13 匹：0 匹の割合で生まれた。次に、ヘテロマウス同士の交配後に E12.5 の段階で胎児を観察した結果、少なくとも E12.5 の段階で、KO の胎児は顕著に小さく子宮に吸収され始めているものもいた。従って、NSUN3 はマウスの正常な発生に必須であることを明らかにした。今後、E9.5 の段階で KO マウスが生きているかを観察する予定である。

次に、成獣での NSUN3 の生理学的および生化学的な意義の解明を目的とし、*Nsun3* Flox マウスと心筋特異的に Cre を発現する Myh6-Cre マウスとを交配することで、心臓特異的 *Nsun3* KO (*Nsun3* HKO) マウスを作製した。*Nsun3* HKO マウスは正常に生まれて成長し、20 週における体重は Flox マウスと同等であった。*Nsun3* HKO マウスの心臓を摘出し、RNA を抽出、分解し、f<sup>5</sup>C 修飾を液体クロマトグラフィ質量分析で定量した結果、*Nsun3* HKO マウスの心臓では

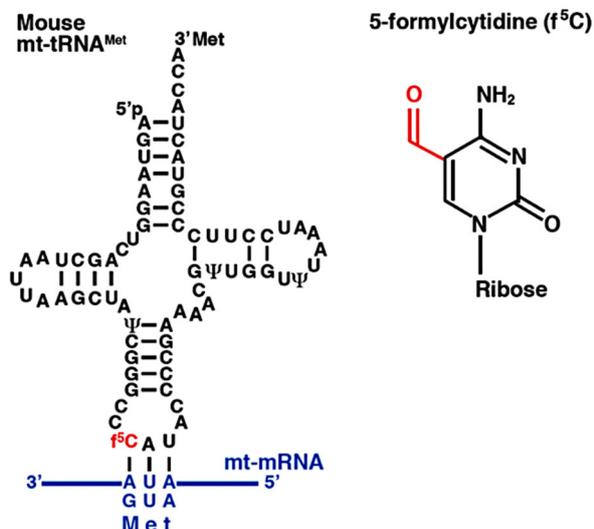


図1. ミトコンドリアtRNA<sup>Met</sup>におけるf<sup>5</sup>C修飾

5fC 修飾が無くなっていることを確認した。

成獣の加齢に伴う心臓の表現型の解明を目的とし、14 週齢および 50 週齢のマウス心臓を解析した。初めに心臓の重量を調べた結果、14 週齢では心重量が Flox マウスと *Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスで差が無かったのに対して、50 週齢では、*Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスの心臓が Flox マウスよりも 30%ほど重くなっていた(P=0.034)。次に、心エコーを実施した結果、左心室後壁の厚さは 14 週齢では Flox マウスと *Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスで有意差が無かったのに対し、50 週齢では、*Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスでは左心室後壁が有意に厚かった。一方で、14 週齢の段階から *Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスのほうが Flox マウスよりも心臓の駆出率が大きかった。以上より、*Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスの心臓では、心筋症とは言えない軽度の異常が見られ、加齢に伴いやや悪化する。

ミトコンドリアの機能異常は、ミトコンドリアの形態異常を伴うことが知られる。そこで、14 週齢および 50 週齢のマウス心臓のミトコンドリアを電子顕微鏡で観察した。その結果、(1) *Nsun3*<sup>HKO</sup> マウス心臓では Flox マウス心臓と比べてミトコンドリアの面積が 1.7 倍に増加していること、(2) Flox マウス心臓では 14 週齢と 50 週齢でミトコンドリア面積が変わらないのに対して *Nsun3*<sup>HKO</sup> マウス心臓では 14 週齢に比べて 50 週齢で 17%大きくなっていること、(3) *Nsun3*<sup>HKO</sup> マウス心臓ではクリステが断片化していることを見出した。以上より、*Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスの心臓ではクリステが断片化し、ミトコンドリアが特に加齢に伴い肥大化していることを明らかにした。

5fC 修飾は、ミトコンドリアにおけるタンパク質合成において重要であることがヒト培養細胞を用いた先行研究で明らかにされている。そこで次に、*Nsun3*<sup>HKO</sup> により心臓でミトコンドリアの呼吸鎖複合体に影響が出るかを検証するために、初めに、ミトコンドリアを単離して呼吸鎖複合体の Blue native-PAGE を実施した。その結果、14 週齢と 50 週齢の *Nsun3*<sup>HKO</sup> マウス心臓において、複合体 IV 量の顕著な低下が見られた。複合体 I, II, III, V については明確な定常状態量の低下は見られなかった。また、ウェスタンブロットでも、複合体 I, II, III, V のタンパク質量はほとんど変わらず、複合体 IV タンパク質量の顕著な低下が観察された。次に、心臓から単離したミトコンドリアを用いて呼吸鎖複合体 I-IV の活性を測定した。その結果、14 週齢での *Nsun3*<sup>HKO</sup> では Flox と比べて複合体 IV の活性が 6 割ほどに低下した。さらに、50 週齢では、*Nsun3*<sup>HKO</sup> では Flox と比べて複合体 IV の活性が 5 割ほどに低下したのみならず、複合体 I の活性も 5 割ほどに低下した。以上より、*Nsun3*<sup>HKO</sup> マウスの心臓では、若齢時から複合体 IV の活性が低下し、加齢に伴い複合体 I の活性も低下することを明らかにした。

(3-2) 波及効果と発展性など

ミトコンドリア tRNA アンチコドンの修飾酵素として、魏教授らは MTO1 と MTU1 がマウス胚発生に必須であることを解明していた。本研究によりさらに、3 番目の tRNA アンチコドンの修飾酵素 NSUN3 も胚発生に必須であることが示され、ミトコンドリア tRNA アンチコドン領域の修飾の生理的重要性がさらに強調された。一方、心臓特異的 KO は、*Mto1*<sup>HKO</sup> や *Mtu1*<sup>HKO</sup> が明確な心筋症とより顕著な呼吸鎖複合体活性低下を示すのに対して、*Nsun3*<sup>HKO</sup> は、比較的軽度な表現型を示した。これは、MTO1 や MTU1 がリジンやグルタミンなど複数のアミノ酸の翻訳に重要であるのに対して、NSUN3 はメチオニンのみの翻訳を促進するからだと考えられる。また、ミトコンドリアへの影響が比較的軽度であるからこそ成獣まで成長し、加齢に伴う表現型が見えてきたとも考えられる。

全身 *Nsun3* KO が胚性致死であるのに対して、ミトコンドリア機能が重要とされる心臓でさえ臓器特異的な *Nsun3* KO の表現型が比較的軽度であった。今後の課題としては、発生のどの段階のどの組織・細胞において NSUN3 が重要であるかの解明が待たれる。

#### [4] 成果資料

1. Murakami Y, **Wei F-Y**, **Chujo T\***, Horiguchi H, Kadomatsu T, Oike Y, Ando Y, Ueda M and Tomizawa K\*. NSUN3-mediated mitochondrial tRNA 5-formylcytidine modification is essential for embryonic development and respiratory complexes in mice. Under revision. \*Co-correspondence.
2. Fukuda H, **Chujo T\***, **Wei F-Y**, Shi S-L, Hirayama M, Kaitsuka T, Yamamoto T, Oshiumi H and Tomizawa K\*. (2021) Cooperative methylation of human tRNA<sub>3<sup>lys</sup></sub> at positions A58 and U54 drives the early and late steps of HIV replication. *Nucleic Acids Res.*, 49, 11855-11867. \*Co-correspondence.
3. Shi S-L, Fukuda H, **Chujo T**, Kouwaki T, Oshiumi H, Tomizawa K and **Wei F-Y**. (2021) Export of RNA-derived modified nucleosides by equilibrative nucleoside transporters defines the magnitude of autophagy response and Zika virus replication. *RNA Biol.*, 15, 478-495.