

氏 名 金子 隼也

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2423 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Mettl1-dependent tRNA m7G modification controls tRNA
expression and fertility in *Drosophila melanogaster*

論文審査委員 主 査 酒井 則良
遺伝学専攻 准教授
佐藤 豊
遺伝学専攻 教授
平田 たつみ
遺伝学専攻 教授
岩里 琢治
遺伝学専攻 教授
鈴木 勉
東京大学 大学院工学系研究科 教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Kaneko, Shunya

論文題目 *Mettl1*-dependent tRNA m7G modification controls tRNA expression and fertility in *Drosophila melanogaster*

The epitranscriptome is defined as the collection of biochemical modifications that occur on RNA transcripts. Extensive analysis of the epitranscriptome, which constitutes a key layer of gene regulation, has revealed more than 170 modifications, yet a complete picture of the functions of RNA modifications remains obscure. Methylation is the most frequently detected RNA modification, which is mediated by several families of methyltransferases. The methyltransferase-like (METTL) family comprises 35 genes in human. Some METTLs are linked to human diseases, indicating their importance; however, the overall significance of methylation mediated by METTLs is largely unknown.

In this thesis, I explored the functions of *Mettl* genes using *Drosophila melanogaster* as a model organism. Using the CRISPR/Cas9 system, I found that 7 of 21 *Mettl*s are required for normal growth and fertility of *D. melanogaster*, indicating that the regulation of the epitranscriptome has a great impact on higher eukaryotes. From the *Mettl*s I identified to be essential, I further investigated *Mettl1*.

Mettl1 induces N7-methylguanosine (m7G) modification of RNAs. To reveal the role of *Mettl1* in development, I generated *Mettl1* knockout (*Mettl1*-KO) flies using the CRISPR-Cas9 system. The fertility of male and female *Mettl1*-KO flies was significantly decreased. The sterility of *Mettl1*-KO flies was rescued by a wild-type *Mettl1* transgene, but not by a *Mettl1* transgene containing a mutation that removed methylation activity, indicating the methyltransferase activity of *Mettl1* to be critical for fertility. To characterize the role of *Mettl1* in spermatogenesis, I analyzed *Mettl1*

expression patterns and determined which steps of spermatogenesis are impaired in *Mettl1*-KO flies. Several marker antibodies showed that *Mettl1*-KO spermatogenesis arrests at the spermatid elongation stage. Tissue specific expression of *Mettl1* indicates that germ cell function of *Mettl1* is critical for fertility, on the other hands, somatic niche cells appear to be intact in *Mettl1*-KO flies. These results indicate that *Mettl1* plays a function in regulating a germ cell development in male spermatogenesis.

To reveal the molecular function of *Mettl1*, I searched for the RNA targets of m7G modification. Northern blot analyses identified a subset of tRNAs that possess *Mettl1*-dependent m7G modification *in vivo*. I also established an *in vitro* m7G methylation assay using recombinant *Mettl1* protein and confirmed that tRNAs can be modified *in vitro*. TRM8, an ortholog of *Mettl1* in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, forms a complex with TRM82, an *S. cerevisiae* ortholog of WD repeat protein 4 (WDR4), which acts as a non-catalytic subunit required for the m7G modification. I therefore studied the involvement of Wuho (Wh), a *Drosophila* WDR4 ortholog, in the m7G tRNA methylation and found that Wh is also required for m7G modification of tRNA. Moreover, I performed tRNA reduction and cleavage sequencing (TRAC-seq) analysis and identified 14 of 44 ovary tRNAs to be *Mettl1* targets. To study how the loss of *Mettl1* affects tRNAs, I measured tRNAs abundance. The amount of tRNA iMet-CAT, an m7G-modified tRNA, was decreased in male gonads, indicating that m7G modification is required for tRNA stability, as is observed in mammalian cultured cells and *S. cerevisiae*. In *S. cerevisiae*, loss of TRM8 makes tRNAs unstable because of degradation by exonucleases of the rapid tRNA decay (RTD) pathway. In addition, perturbation of the RTD pathway by ectopically expressed translational elongation factor EF-1 α suppresses the *TRM8*-mutant phenotypes. I therefore conducted a similar assay in *D. melanogaster*. As expected, male fertility was partially rescued by the ectopic expression of eEF1 α , which is a homolog of EF-1 α in *D. melanogaster*, indicating that the stabilization of tRNAs by *Mettl1*-mediated m7G modification is

required for the male fertility. Interestingly, the expression level of eEF1 α in the testis was slightly lower than that in other tissues, which may explain why Mettl1 depletion specifically affects fertility but not functions of other tissues. Taking my findings together, I conclude that Mettl1-mediated control of tRNA stability is essential for *Drosophila* fertility and I propose a model of Mettl1 functions.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 金子 隼也

Title
論文題目 Mettl1-dependent tRNA m⁷G modification controls tRNA expression and fertility in *Drosophila melanogaster*

転写産物である RNA は様々な生化学的修飾を受けることが知られている。メチル化は最も頻繁に検出される RNA 修飾であり、それに関与するメチルトランスフェラーゼ様 (*METTL*) ファミリーはヒトでは 35 遺伝子が存在し、一部はヒトの遺伝子疾患に関連することが示されている。しかしながら、*METTL* によって媒介される RNA メチル化の生物学的な意味については不明な点が多く残されている。

金子さんは、ショウジョウバエを材料に CRISPR/Cas9 システムを用いて *Mettl* ファミリー遺伝子 20 個の変異体を作成し、7 個で変異体の成長と生殖能力に異常が起きる事を示した。このうち、RNA の 7-メチルグアノシン (m⁷G) 修飾を導入する *Mettl1* のノックアウト (*Mettl1*-KO) では、オスもメスも生殖能力が大幅に低下していた。そして、その不稔性は野生型 *Mettl1* トランスジーンによって救済できるが、メチル化活性のない変異型 *Mettl1* では救済できないことを明らかにした。さらに、*Mettl1* が精巣で発現し精子形成に関与していること、生殖細胞特異的に *Mettl1* を発現するトランスジーンで不稔性を救済できることを示し、*Mettl1* が生殖細胞自律的に機能し、そのメチル化活性が精子形成に必要であると結論した。

次に、生殖能力における *Mettl1* の分子機構を明らかにするために、*Mettl1* による m⁷G 修飾のターゲットとなる RNA の検索を進めた。出芽酵母では、*METTL1* オルソログの *Trm8* は、m⁷G 修飾に必要な非触媒サブユニット *WDR4* オルソログの *Trm82* と複合体を形成する。そこで、ショウジョウバエの *WDR4* オルソログである *Wuho* (*Wh*) と *Mettl1* がヘテロダイマーを形成することを調べ、この複合体が *in vitro* で tRNA の m⁷G 修飾を引き起こすことを示した。さらに、tRNA reduction and cleavage sequencing (TRAC-seq) 法を用いて、卵巣で発現する 44 個の tRNA のうち 14 個が *Mettl1* のターゲットであることを特定した。精巣でも *Mettl1* 依存的に tRNA iMet-CAT の m⁷G 修飾が起こることを確認した。出芽酵母では、Rapid tRNA Decay pathway のエキソヌクレアーゼによる分解のために *TRM8* 変異体では tRNA が不安定になること、翻訳伸長因子 *Tef1* が tRNA と結合して保護するため *TEF1* の過剰発現が tRNA の分解を妨げることが報告されている。そこで、*TEF1* のショウジョウバエホモログである *eEF1 α* を過剰発現させて、*Mettl1*-KO の稔性が部分的に救済されることを示した。さらに、*Mettl1* の欠損が生殖能力に特に影響を与え、他の組織の機能には影響を与えない理由として、精巣の *eEF1 α* の発現レベルが他の組織よりもわずかに低いことを示した。これらの結果から、*Mettl1* を介した tRNA の安定性の制御はショウジョウバエの生殖細胞の発達に不可欠であると結論付けた。

以上の金子さんの研究成果は、*Mettl1* による tRNA のメチル化修飾がショウジョウバエ

の生殖細胞の発達に必要であるという重要な新規知見を与えるものであり、博士論文として質量ともに十分な内容を含んでいる。博士授与の水準を十分に満たしていると、審査員全員一致で判断した。