



Title	Functional characterisation of Tudor domain-containing proteins, Kotsubu and Kumo, in the piRNA pathway.
Author(s)	Lim, Lin Xenia
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92131
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (Lim Lin Xenia)	
論文題名	Functional characterisation of Tudor domain-containing proteins, Kotsubu and Kumo, in the piRNA pathway. (piRNA経路におけるTudor ドメインタンパク質、KotsubuとKumoの機能解析)
論文内容の要旨	
In vertebrates' germline, transposon silencing is a crucial event to maintain genome integrity and fertility. One way to achieve this is via Piwi-interacting RNAs (piRNAs), which are small non-coding RNAs expressed in the gonads. In germline cells, one of the major piRNAs processing sites is the nuage, membraneless perinuclear organelles where PIWI-family Argonautes, Tudor domain-containing, and other proteins co-localise to facilitate piRNA biogenesis and transposon silencing. However, the molecular function of nuage-localising factors that are important for piRNA biogenesis is not fully understood. Therefore, this thesis addresses some of these questions by characterizing an unreported nuage protein, Kotsubu, and further elucidate the role of Kumo, a key Tudor domain-containing protein in the piRNA pathway. Kotsubu is one of the <i>Drosophila</i> orthologs of the mammalian Tudor domain-containing protein-1 (Tdrd1). In this work, I show that the loss of <i>kots</i> resulted in the downregulation of piRNAs in a male-dominant manner. Additionally, Kots forms large condensates in the spermatocytes that co-localises with components constituting the nuage-associated organelle, called piNG-bodies, which is not observed in ovaries. Notably, the loss of other piRNA pathway components resulted in the displacement of Kots from the nuage. Particularly, the absence of <i>kumo</i> led to a reduction in the number of Kots foci in spermatocytes. Kumo is a nuage component that has an N-terminal RING (Really Interesting New Gene) and B-box domains. RING domains are known to be characteristic of proteins that function as E3 ubiquitin ligases. To study the potential E3 ligase activity of Kumo and understand how its function might correlate to the reduction of Kots foci in spermatocytes, conserved residues in the Kumo RING domain were mutated to generate a non-functional motif. Mutations in Kumo RING domain resulted in defects in transposon silencing. Additionally, using cultured cell system and immunoprecipitation, I show that Kumo RING domain was enhanced in the ubiquitin fraction. Finally, the potential substrates of Kumo were analysed using TUBE (Tandem ubiquitin binding entity), and piRNA pathway proteins including Kots were identified, suggesting the possible role of Kumo in regulating nuage components via ubiquitination. Through this study on Kots and Kumo, I thereby reveal the complexities in nuage organisation and piRNA biogenesis.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Lim Lin Xenia)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	甲斐 歳恵
	副 査	教 授	廣瀬 哲郎
	副 査	教 授	池田 史代

論文審査の結果の要旨

本論文では、ショウジョウバエ生殖細胞におけるトランスポゾンサイレンシングに機能する小分子piRNAの生合成に関わる2つのTudor domainタンパク質、Kotsubu(Kots)とKumo(またはQin)についての機能解析を報告した。多くの動物では、生殖巣に特異的なpiRNAは、生殖細胞に特異的にみられるヌアージュという非膜オルガネラでプロセシングされる。論文の前半ではマウスのTdrd1ホモログの1つで新規タンパク質Kotsについての解析を報告した。Kotsはヌアージュに局在し、変異体を用いた解析から、その機能が特に精巣におけるpiRNAの生合成によってトランスポゾンの抑制に関与していることがしめされた。この成果は、2022年にLim氏を共同第一著者としてピアレビューを経て国際的なジャーナルに発表された。

また、本論文の後半では、Kotsタンパク質がユビキチンリガーゼとして機能している可能性を報告した。Kumoタンパク質はユビキチンリガーゼによく認められるRINGモチーフを持ち、すでにpiRNAの生合成に関与していることが明らかとなっている。本論文の前半で報告したKotsはこのKumoと相互作用し、Kumoの精巣での局在に関与している。さらにKumoのリングモチーフが卵巣内でpiRNAによるトランスポゾンの抑制に必須であることを明らかにした。

piRNA生合成経路は多くのタンパク質が関与する複雑な系であり、本論文でも、上記2つのタンパク質の分子機構は未だ明確に明らかとはならなかったが、新たな因子・Kotsの同定と機能解析、また既知のKumoタンパク質のユビキチンリガーゼとしての機能は当該分野における新規な知見であり、本論文の成果は博士の学位を授与するに値するものと認める。

なお、チェックツール“iThenticate”を使用し、剽窃、引用漏れ、二重投稿等のチェックを終えていることを申し添えます。