OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | The Ragulator complex and lysosomal calcium release are crucial for cell migration |
| Author(s) | 徐, 立恒 |
| Citation | 大阪大学, 2026, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/105694 |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

## Synopsis of Thesis

| 氏　　名<br>Name | 徐　立恒<br>Jo Tatsunori |
|---|---|
| 論文題名<br>Title | The Ragulator complex and lysosomal calcium release are crucial for cell migration<br>(Ragulator複合体およびリソソームカルシウム放出の細胞移動制御における中心的役割) |

論文内容の要旨

〔目　的(Objective)〕

白血球の遊走は、ミオシン軽鎖のリン酸化によるミオシン II の活性化と脱リン酸化のバランスによって制御される。 リソソームは細胞移動中に細胞後部へ集積し、TRPML1 チャネルを介した $Ca^{2+}$放出によりミオシン II を活性化することが知られているが、その詳細な機構は未解明であった。 我々の先行研究において、リソソーム膜上の栄養感知ハブである Ragulator 複合体が myosin phosphatase Rho-interacting protein (MPRIP) と結合し、MPRIP-MYPT1 相互作用を阻害することでミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (MLCP) 活性を低下させることを報告してきた。 本研究では、リソソーム $Ca^{2+}$シグナルと Ragulator-MPRIP 相互作用の連関およびそれらを介したミオシン活性化機構を解明するとともに、この経路を薬理学的に制御しうる分子を同定し、抗炎症戦略としての可能性を検証した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず、リソソームからの $Ca^{2+}$放出が Ragulator-MPRIP-ミオシン IIの軸を介して白血球遊走を制御するか検討した。 HEK293T 細胞を用いた免疫沈降および NanoBRET 解析により、TRPML1 アゴニスト／アンタゴニスト刺激に応じて Lamtor1-MPRIP 結合がそれぞれ増強／低下することを確認し、ウエスタンブロット解析からミオシン IIA のリン酸化状態も同方向に変化することを示した。 CCL2 による THP-1 細胞走化性トランズウェルアッセイにおいても、TRPML1 活性の制御に応じて細胞走化性が同様の傾向で変化した。 さらに、3D マトリックス中で BMDC の遊走をライブイメージングにより解析し、TRPML1 アンタゴニスト処理により細胞後部におけるアクトミオシン収縮が障害されることを示唆した。

次に、リソソームに局在しない Lamtor1 変異体 Lamtor1-G2A を HEK293T に発現させたところ、免疫沈降解析で Lamtor1-G2AとMPRIP 結合の低下を認めた。 同変異体を導入した THP-1 細胞では、トランスウェルアッセイによる走化性の低下およびウエスタンブロット解析での MLCP 活性低下がみられ、これらの表現型はいずれも TRPML1 アゴニスト／アンタゴニスト刺激の影響を受けなかった。

さらに、NanoBRET 解析を用いた化合物・天然物ライブラリーのスクリーニングにより、強心配糖体 ouabain を同定した。 Ouabain 処理により Lamtor1-MPRIP 結合が減弱し、THP-1 細胞の遊走も抑制された。 リソソーム画分の解析および免疫染色により、ouabain によってリソソーム中のLamtor1発現およびLamtor1のリソソームへの局在が低下することが示された。 In vivo では、ouabain 前処理した樹状細胞 (DC) のリンパ節移行が低下し、MSU 誘発関節炎、LPS 誘発急性肺障害、alum 誘発腹膜炎モデルにおいて白血球浸潤と組織炎症が軽減した。 一方で、ouabain 処理 THP-1 細胞に対する ELISA 解析では TNF-α 産生に変化はみられず、ouabain 処理 BMDC の FACS 解析でも共刺激分子発現は保持されていたことから、ouabain は主として白血球リクルートの抑制を介して炎症を軽減すると考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究により、リソソーム膜上 TRPML1 チャネルを介した $Ca^{2+}$流出が Ragulator 複合体と MPRIP の相互作用を促進し、Ragulator-MPRIP-ミオシン II 軸を介して白血球遊走を制御することが示された。 Lamtor1 のリソソーム局在を阻害すると Ragulator 複合体のリソソーム移行が妨げられ、TRPML1 依存的な白血球移動能および Lamtor1-MPRIP 結合が低下することが明らかとなった。 さらに、強心配糖体 ouabain が Lamtor1 をリソソーム膜から解離させ、Ragulator-MPRIP 相互作用およびミオシン IIA 活性化を阻害することで細胞移動を抑制し、尿酸結晶誘発性関節炎および LPS 誘発性肺障害モデルにおいて白血球浸潤と疾患重症度を軽減することを見出した。 Ragulator 複合体のリソソーム膜からの解離を介して細胞遊走を制御する ouabain の作用は、異常な白血球遊走を標的とする新規抗炎症治療戦略の候補となることを示唆する。

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）徐　立恒

| | | （職） | 氏　　名 | |
|---|---|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査 | 大阪大学教授 | 保仙　直毅 | 署名 |
| | 副　査 | 大阪大学教授 | 竹田　潔 | 署名 |
| | 副　査 | 大阪大学教授 | 篠王　子 | 署名 |

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、リソソーム膜上の TRPML1 チャネルを介した $Ca^{2+}$ 流出が Ragulator 複合体と MPRIP の相互作用を促進し、Ragulator-MPRIP-ミオシン II 軸を通じて白血球遊走を制御するという新規機構を明らかにした。 Lamtor1 のリソソーム局在を阻害することで Ragulator 複合体のリソソーム移行が妨げられ、TRPML1 依存的な白血球移動能および Lamtor1-MPRIP 結合が低下することを示した結果は、本シグナル軸の成立にリソソーム局在が不可欠であることを明瞭に示している。 さらに、強心配糖体 ouabain が Lamtor1 をリソソーム膜から解離させ、Ragulator-MPRIP 相互作用およびミオシン IIA 活性化を抑制することで細胞移動を制御し、MSU 誘発性関節炎や LPS 誘発性肺障害モデルにおいて白血球浸潤と疾患重症度を軽減しうることを示した点は、異常な白血球遊走を標的とする新規抗炎症治療戦略の可能性を具体的に提示するものである。 以上より、本研究は細胞遊走制御および炎症病態の理解と治療応用の両面において重要な貢献をなすものであり、学位授与に十分値する内容と認められる