OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The lysosomal Ragulator complex plays an essential role in leukocyte trafficking by activating myosin II
Author(s)	仲谷, 健史
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85303
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
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	仲谷　健史
論文題名 Title	The lysosomal Ragulator complex plays an essential role in leukocyte trafficking by activating myosin II（リソソーム上のラギュレーターコンプレックスという複合体はミオシンⅡを活性化することにより白血球の遊走を制御している）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

免疫細胞の遊走は、身体の免疫システムにおいて非常に重要な役割を担っている。近年、リソソームは単なる消化を担当するオルガネラではなく、細胞の移動にも関与しているということが報告されている。本研究の目的は、免疫細胞の遊走に、リソソームがどのように関わるかのメカニズムを明らかにすることである。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず、我々はコラーゲン内で移動している樹状細胞(DC)のリソソームの局在を観察した。樹状細胞は移動の際、突起を伸ばし、縦長に延びた形をとった後、ウロポッドと呼ばれる尾の部分を引っこめて、前進するが、その一連の動作の中で、もともと核周囲に存在するリソソームが、ウロポッドに移動する様子が観察された。リソソーム膜状にRagulator complex(RC)という、mTORC1の活性化に寄与する複合体が存在し、この複合体はLamtor2,3と4,5の複合体をLamtor1が包み、さらにリソソーム膜にアンカーする構造をしている。Lamtor1が細胞の動きに関与するという報告があるため、我々はLamtor1に注目した。免疫染色により、核周囲だけでなく、ウロポッドのリソソームともLamtor1が共局在していることが分かった。続いてLamtor1が樹状細胞の遊走に関わるかを明らかにするためにLamtor1を樹状細胞でノックアウト(KO)したマウス(KOマウス)を作成した。KOマウスの骨髄由来樹状細胞(KO-BMDC)はWTと比較して、Transwellを用いた細胞遊走実験で、遊走が有意に低下していた。さらにコラーゲン内で動きを観察すると、KO-BMDCはウロポッドを引っ込めることが出来ず、前進出来ないことが明らかとなった。このウロポッドを引っ込める動作は、ミオシン軽鎖(MLC)がリン酸化することでミオシンⅡが活性化し、アクトミオシンの収縮が起こり発生することが報告されている。KO-BMDCではWTと比較し、MLCのリン酸化が低下していた。さらにそのメカニズムを明らかにするために、Lamtor1と会合する蛋白を調べた。WT-BMDCとKO-BMDCをLamtor1抗体で免疫沈降し、得られた検体でLC/MS解析を行い、MPRIPという蛋白に注目した。MPRIPは、MLCフォスファターゼ(MLCP)のサブユニットのMYPT1と結合し、MLCPの働きを促進することが報告されている。免疫染色によりMPRIPとLamtor1がウロポッドで共局在していることが分かった。さらに我々は、Lamtor1がMPRIPと会合することで、MPRIPとMYPT１の会合を妨害するという仮説を立てた。CRISPR/Cas9システムを用いてLamtor1をKOしたTHP1(KO-THP1)と、この細胞株にfull-lengthのLamtor1を再び発現させたTHP1(Full-THP1)を作成した。KO-THP1はWT THP1と比較し、MPRIPとMYPT1の会合が著しく増加し、Full-THP1ではWTと同等の会合に戻った。MLCのリン酸化や遊走能はKO-THP1では有意に低下したが、Full-THP1ではWTと同等に回復した。Lamtor1がKOされるとRC自体が形成されないことから、RCがMPRIPの会合および細胞の遊走に重要である可能性を考慮した。RCが形成されないLamtor1の変異蛋白(Lamtor1のC末端の17アミノ酸を除いた蛋白と、α4領域に変異を加えた蛋白)はMPRIPと会合せず、それらをKO-THP1に発現させた細胞の遊走はWTやFull-THP1と比較し有意に低下していた。これらの結果から、RCがMPRIPの会合および細胞の遊走に重要であることが明らかとなった。

in vivoにおいても、KOマウスでは所属リンパ節で、migratory DCが低下し、T細胞のプライミングが低下し、接触性皮膚炎モデルでDNFBへの反応が著しく低下していた。さらにLamtor1をKOした好中球でも細胞の遊走が低下していた。

〔総　括(Conclusion)〕

RCはMPRIPと会合し、ミオシンⅡの活性化を通じて白血球の遊走を制御している。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名） 仲谷　健史

論文審査担当者	（職）	氏　名	
主　査	大阪大学教授	荒瀬 尚	署名
副　査	大阪大学教授	竹田 潔	署名
副　査	大阪大学教授	下村伊一郎	署名

論文審査の結果の要旨

この論文は、免疫システムにおいて必須の白血球の遊走のメカニズムを明らかにした非常に重要な論文である。白血球がケモタキシスを行う際、リソソーム膜状に存在するラギュレーターコンプレックスという複合体が、リソソームとともに、ウロポッドと呼ばれる尾側の部位に移動する。そこで、MPRIPという蛋白と結合することにより、MPRIPとMYPT1の会合を妨害し、ミオシン軽鎖のリン酸化を促進する。これによりアクトミオシンの収縮が促進され、細胞の前進に寄与することを明らかにした。さらに、ラギュレーターコンプレックスの構成要素のLamtor1を樹状細胞で、ノックアウトしたマウスにおいて、所属リンパ節で、migratory DCが低下し、T細胞のプライミングが低下し、接触性皮膚炎モデルでDNFBへの反応が著しく低下していた。本研究の成果は学位授与に値すると考えられる。