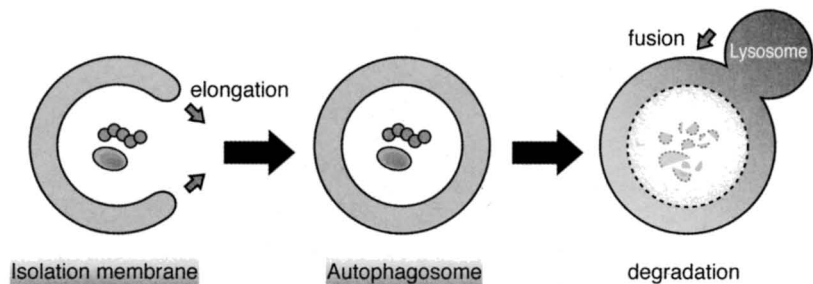


	いしばし こうたろう
氏名（本籍地）	石橋 弘太郎
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第216号
学位授与年月日	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	Studies on the Atg16L functions in autophagy and hormone secretion（オートファジーおよびホルモン分泌におけるAtg16Lの機能解析）
博士論文審査委員	（主査） 教授 福田 光則 教授 水野 健作 教授 杉本 亜砂子

Autophagy is a catabolic cellular process in all eukaryotic cells that is responsible for bulk degradation of proteins and organelles, particularly when cells exist under nutrient-deprived conditions. Autophagy is utilized for many aspects of cellular events besides nutrient supply, including defense against bacterial intrusion, antigen presentation, removal of aggregated proteins, and quality control of organelles, and thus dysfunction of autophagy leads to a variety of human diseases, including cancer, neurodegeneration, and microbial infections. In mammalian autophagy, a crescent-shaped small membrane compartment, called isolation membrane, is formed in the cytosol in the initial step of the autophagic process and it elongates to envelop cytoplasmic components and to form a characteristic double membrane structure, called autophagosome. The resulting autophagosome eventually fuses with lysosomes, which degrade their contents (Figure 1). Thus, the autophagic pathway accompanies unique dynamic membrane biogenesis, but the molecular mechanism of membrane trafficking regulating the autophagic pathway is poorly understood. Recently, Atg16L1, a protein essential for elongation of isolation membranes in canonical autophagy, has been shown to specifically interact with Rab33, a member of the Rab-type small GTPases that regulate a variety of membrane trafficking events, and the interaction between Rab33B and Atg16L1 has been shown to modulate autophagic activity (Itoh *et al.*, 2008). Thus, Atg16L1 is suggested to play an important role in connecting between autophagy and membrane trafficking; however, the physiological significance of the interaction between Atg16L1 and Rab33 in autophagy or other membrane trafficking events largely remains unknown. In this

thesis for doctoral degree, I characterized a novel isoform of mammalian Atg16L in autophagy and also investigated the involvement of Atg16L1 in hormone secretion to reveal the function of Atg16L1.

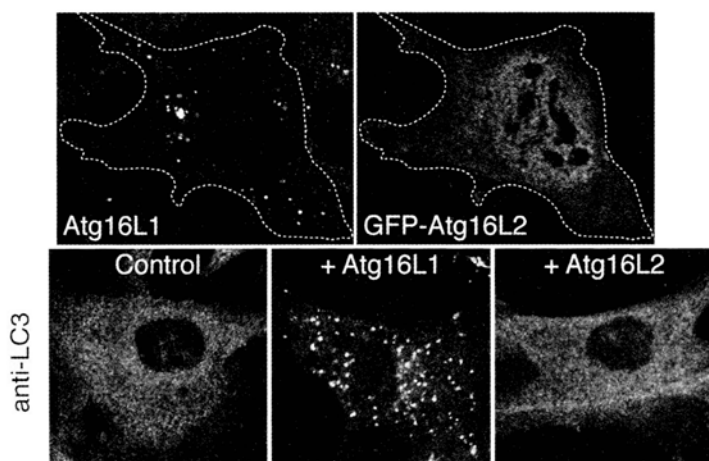


【Fig 1】 A schematic model of the autophagic pathway.

## 【SECTION 1】

### **Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12–5-16L2 complex**

A large protein complex consisting of Atg5, Atg12, and Atg16L1 has recently been shown to be essential for the elongation of isolation membranes during mammalian autophagy. However, the precise function and regulation of the Atg12–5-16L1 complex has largely remained unknown. In this thesis we identified a novel isoform of mammalian Atg16L, termed Atg16L2, that consists of the same domain structures as Atg16L1. Biochemical analysis revealed that Atg16L2 interacts with Atg5 and self-oligomerizes to form an ~800-kDa complex, the same as Atg16L1 does. A subcellular distribution analysis indicated that, despite forming the Atg12–5-16L2 complex, Atg16L2 is not recruited to isolation membranes and is mostly present in the cytosol (Figure 2). The results also showed that Atg16L2 is unable to compensate for the function of Atg16L1 in autophagosome formation (Figure 3), and knockdown of endogenous Atg16L2 did not affect autophagosome formation, indicating that Atg16L2 does not possess the ability to mediate canonical autophagy. Moreover, a chimeric analysis between Atg16L1 and Atg16L2 revealed that their difference in function in regard to autophagy is entirely attributable to the difference between their middle regions that contain a coiled-coil domain. Based on the above findings, we propose that formation of the Atg12–5-16L complex is necessary but insufficient to mediate mammalian autophagy and that an additional function of the middle region (especially around amino acid residues 229-242) of Atg16L1 (e.g., interaction with an unidentified binding partner on isolation membranes) is required for autophagosome formation.



【Figure 2】 The starved MEFs expressing transiently EGFP-Atg16L2 were fixed and stained with anti-Atg16L1 antibody. Note that EGFP-Atg16L2 did not form any dots and that it did not co-localize with Atg16L1 as an isolation membrane markers.

【Figure 3】 Expression of Atg16L2 in autophagy-deficient MEFs did not restore any formation of LC3-positive dots at all, in contrast to Atg16L1, indicating that Atg16L2 is unable to compensate for the function of Atg16L1 in autophagy. LC3: a marker of autophagosome.

## **【SECTION 2】**

### **Atg16L1, an essential factor for canonical autophagy, regulates hormone secretion from PC12 cells independently of autophagic activity**

Autophagy is a bulk degradation system in all eukaryotic cells and regulates a variety of biological activities in higher eukaryotes. Recently, involvement of autophagy in the regulation of the secretory pathway has also been reported, but the molecular mechanism linking autophagy with the secretory pathway remains largely unknown. Here we show that Atg16L1, an essential protein for canonical autophagy, is localized on hormone-containing dense-core vesicles in neuroendocrine PC12 cells and that knockdown of Atg16L1 causes a dramatic reduction in the level of hormone secretion independently of autophagic activity. We also discovered that Atg16L1 interacts with small GTPase Rab33A and that this interaction is required for the dense-core vesicle localization of Atg16L1 in PC12 cells. Our findings indicate that Atg16L1 regulates not only autophagy in all cell types but secretion from dense-core vesicles, presumably by acting as a Rab33A effector, in particular cell types.

## **【PUBLICATIONS】**

1. Ishibashi K., Fujita N., Kanno E., Omori H., Yoshimori T., Itoh T., and Fukuda M. (2011) Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex. *Autophagy* 7, 1500-1513
2. Ishibashi K., Uemura T., Waguri S., Itoh T., and Fukuda M. (2012) Atg16L1, an essential factor for canonical autophagy, regulates hormone secretion from PC12 cells independently of autophagic activity. *Submitted*

### **Other related papers**

3. Fukuda M., Kanno E., Ishibashi K., and Itoh T. (2008) *Mol. Cell. Proteomics*, 7, 1031-1042
4. Ishibashi K., Kanno E., Itoh T., and Fukuda M. (2009) *Genes Cells*, 14, 41-52
5. Kanno E.\* , Ishibashi K.\* , Kobayashi H.\* , Matsui T., Ohbayashi N., and Fukuda M. (2010) *Traffic*, 11, 491-507   \*, equal contribution

6. Ohbayashi N., Mamishi S., Ishibashi K., Maruta Y., Pourakbari B., Tamizifar B., Mohammadpour M., Fukuda M., and Parvaneh N. (2010) *Pigment Cell Melanoma Res.*, 23, 365-374
7. Tamura K., Ohbayashi N., Ishibashi K., and Fukuda M. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 7507-7521
8. Fukuda M., Kobayashi H., Ishibashi K., and Ohbayashi N. (2011) *Cell Struct. Funct.*, 36, 155-170
9. Imai A., Yoshie S., Ishibashi K., Haga-Tsujimura M., Nashida T., Shimomura H., and Fukuda M. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 33854-33862

## 論文審査結果の要旨

オートファジーは、細胞内に出現した隔離膜と呼ばれる膜構造がタンパク質やオルガネラを取り囲むように伸長し、オートファゴソームを形成した後、リソソームと融合することにより、内包物を分解し再利用する一連の機構である。オートファジーにはダイナミックな膜動態が伴うが、その制御メカニズムは未だほとんど明らかになっていない。最近、小胞輸送制御因子の一つ **Rab33A/B** とオートファジーに必須の因子 **Atg16L1** との結合が報告され、膜動態を担う小胞輸送とオートファジーとの直接的な関連性が注目されるようになったが、その生理学的な意義はこれまで明らかではなかった。本博士論文では、**Rab33**、**Atg16L1** 及びその関連タンパク質の機能解析を通して、新たな切り口からのオートファジー研究を行った。

まず、**Atg16L1** と一次構造が類似している新規 **Atg16L** アイソフォームとして、哺乳動物にのみ保存された機能未知の **Atg16L2** 分子を見出した。**Atg16L2** の各ドメインの機能を検討した結果、**Atg16L1** と同等の三者複合体形成能 (**Atg12-5-16L**) を示したが、**Rab33B** との結合能は減少していた。**Atg16L2** のオートファジーへの関与を検討したところ、**Atg16L2** はオートファゴソーム形成能を有していなかったことから、**Atg16L1** とのオートファゴソーム形成能の差異は **Rab33B** との結合能の減少に起因するものと推察された。しかし、さらに詳細な欠失変異体解析を行ったところ、予想に反して **Rab33B** の結合能の有無は関係なく、これまで未同定であった **Atg16L1** の隔離膜局在化領域がオートファゴソーム形成に必須であることを初めて明らかにした。

次に、**Rab33A** と **Atg16L1** の結合意義を調べるため、各種細胞株における **Rab33A** の発現を検討したところ、**Rab33B** が普遍的に発現するのに対し、**Rab33A** は非常に特異的な発現パターンを示し、放出研究のモデル細胞株である **PC12** 細胞に強い発現が認められた。**PC12** 細胞において **Atg16L1** は **Rab33A** 依存的にホルモン顆粒上に局在したことから、ホルモン分泌への関与をさらに検討したところ、**Atg16L1** がオートファジー活性とは無関係にホルモン顆粒の開口放出過程を制御することを初めて明らかにした。最近、オートファジーと分泌の関連性が注目されているが、その制御機構は十分に理解されておらず、本研究成果はオートファジー制御因子による分泌制御の分子機構解明に向けた新たなブレイクスルーとなるものと期待される。

以上のように、石橋氏は当該研究分野において卓越した研究成果を挙げており、自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有するものと判断できる。したがって、石橋弘太郎氏の提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。