

イネの生殖過程におけるオートファジーの重要性

来須孝光^{1,2,3}, 花俣繁^{2,3,4}, 瀬良ゆり², 朽津和幸^{2,3}

¹ 公立諏訪東京理科大学・工学部・機械電気工学科

〒391-0292 長野県茅野市豊平 5000-1

² 東京理科大学大学院・理工学研究科・応用生物学専攻

³ 東京理科大学・イメージングフロンティアセンター

〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

⁴ 新潟大学・自然科学系（農）

〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐 2 の町 8050

Takamitsu Kurusu^{1,2,3}, Shigeru Hanamata^{2,3,4}, Yuri Sera², Kazuyuki Kuchitsu^{2,3}

Crucial roles of autophagy during reproductive development in rice

Keywords: autophagy, rice, reproductive development, tapetum

¹Department of Mechanical and Electrical engineering, Suwa University of Science

Chino, Nagano, 391-0292, Japan

²Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science

Noda, Chiba, 278-8510, Japan

³Imaging Frontier Center, Tokyo University of Science, Noda, Chiba, 278-8510, Japan

⁴Graduate School of Science and Technology, Niigata University

Ikarashi, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9a5.00131

1. はじめに

オートファジーは、真核生物に共通に保存されている細胞内分解機構であり、生体内のアミノ酸や脂質に代表される栄養や材料のリサイクルに大きく寄与している。その実行過程に関与する *ATG* (Autophagy-related) 遺伝子群は、真核生物に高度に保存されている (Mizushima *et al.* 2011)。酵母、線虫、ショウジョウバエやマウス等の多様なモデル生物において、オートファジー欠損変異体は致死となり、オートファジーが、発生、変態および分化過程に重要な役割を果たすことが明らかにされている (Tsukamoto *et al.* 2008, Melendez & Levine 2009)。しかし、シロイヌナズナやトウモロコシのオートファジー欠損変異体は、通常栽培環境下において、胚発生、発芽、子葉の発達、花芽形成、種子生産を正常に遂行でき、生活環に異常は見出されていない (Yoshimoto *et al.* 2012, Li *et al.* 2015) ことから、植物の発生過程や生殖生長におけるオートファジーの生理的役割は、最近までほとんど未解明だった。

植物の花粉は、雄性生殖器官の葯で形成される。花粉形成初期に、葯の中の花粉母細胞が減数分裂し、将来の花粉となる小胞子が生じる。イネの葯は4つの層から構成され、その最内層はタペート層と呼ばれる。花粉形成の際、タペート細胞が必要な物質の供給を担う。花粉形成後期である花粉成熟期には、遺伝的にプログラムされた自律的な細胞死 (programmed cell death; PCD) が、タペート細胞に誘導されることにより、タペート層が消失する。このタペート細胞の分解は高度に制御されており、細胞質の萎縮、細胞壁の分離、染色体の凝縮、小胞体の肥大など、PCDに共通する様々な特徴が観察される。

一方、冷害や高温に代表される環境ストレスにより引き起こされる花粉形成の異常は、穀物の収量・品質低下の重要な原因ともなる。そのため、品種改良など農業への応用の基礎として、タペート層の PCD をはじめ、花粉や種子形成の仕組みを分子レベルで解明することの重要性が議論されて来た。

本稿では、単子葉植物のモデルであり、世界的にも最も重要な食糧源の一つであるイネにおいて最近明らかにされた、花粉成熟過程における葯タペート細胞内のオートファジー制御と、PCD、脂質・ホルモン代謝、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) シグナルとの関連性を中心に、生殖や種子登熟におけるオートファジーの役割について最新の知見を紹介する。

2. イネのオートファジー欠損は重篤な雄性不稔を引き起こす

ATG7 タンパク質は、オートファゴソームの形成に必須であり、ATG8 結合系と ATG12 結合系の 2 つのユビキチン様タンパク質結合系において E1 様酵素として働く (Li & Vierstra 2012)。イネにおいて ATG7 は単一遺伝子としてゲノム上に存在しており、根や葉、そして生殖器官である穂、葯、雌しべ、種子等のあらゆる組織で発現が見られる (Li & Vierstra 2012, Kurusu *et al.* 2014)。我々は、イネのレトロトランスポゾン *Tos17* 挿入変異系統群から、*Osatg7* 欠損変異株 (*Osatg7-1*) を単離・同定し、生活環を通して表現型を解析した。圃場における通常生育環境下での栄養生長期においては、野性型 (日本晴) と *Osatg7-1* の間で大きな差は見られなかった。一方、生殖生長期に移行すると、野性型に比べて *Osatg7-1* では出穂及び開花の遅延が観察されると共に、重篤な雄性不稔形質を示した (Kurusu *et al.* 2014)。

開花期に、雄性側の配偶子である花粉を観察した結果、野性型株と比べて *Osatg7-1* の葯内には未成熟な花粉が多く見られた。一般的にイネの成熟花粉では、澱粉や脂質顆粒が花粉内に蓄積しており、花粉成熟度の一つの指標として用いられる。そこで、*Osatg7-1* 花粉の澱粉や脂質顆粒の蓄積を解析したところ、野性型に比べ *Osatg7-1* では蓄積量が大幅に低下していた。併せて、*Osatg7-1* では花粉発芽・花粉管伸長も殆ど観察されなかったことから、イネのオートファジー欠損は花粉成熟過程に深刻な異常を引き起こすことが明らかとなった (Kurusu *et al.* 2014, Hanamata *et al.* 2014)。

次に、花粉異常が配偶子由来であるか、親である配偶体由来であるかを明らかにするために、遺伝子型がヘテロである *Osatg7-1* と野性型株との交配実験を行った。野性型の雌しべに、遺伝子型がヘテロの *Osatg7-1* 花粉を受粉させたところ、次世代における遺伝子型の比は、野性型とヘテロが 1 対 1 となった。この結果は、配偶子 (花粉) におけるオートファジー欠損は、花粉成熟に重大な影響を与えない、すなわち *Osatg7-1* の花粉異常は配偶体からの澱粉や脂質等の栄養供給異常に起因することを示唆する (Kurusu *et al.* 2014)。興味深いことに、野生型の花粉と遺伝子型がヘテロの *Osatg7-1* 雌しべとの交配では、次世代におけるヘテロの割合が明らかに低下していた (Kurusu & Kuchitsu 2017)。この結果は、オートファジー欠損により、雌性側の配偶子においても何らかの異常が生じている可能性を示唆している。オートファジーと受精との関連性についても今後の研究が期待される。

3. タペート細胞のプログラム細胞死におけるオートファジー誘導と活性酸素シグナル

正常な花粉成熟には、適切な時期にタペート細胞の崩壊が誘導されることが必要である。シロイヌナズナやイネの遺伝学的解析から、タペート崩壊は、MYB や MADS に代表される転写因子を起点とした転写ネットワークにより厳密に制御された PCD であることが判明している (Li *et al.* 2006, Phan *et al.* 2011, Niu *et al.* 2013, Ono *et al.* 2018)。タペート PCD のタイミングを決定する機構は、四分子期付近 (stage 8 付近) から開始されていると考えられている (Kawanabe *et al.* 2006)。オートファジーが、タペート PCD に関与しているのかを検証するために、花粉成熟ステージを追って、タペート細胞内を透過型電子顕微

鏡により観察した。その結果、野性型の一核期 (stage 10 付近) において、オートファゴソーム様構造体が多数観察された。一方、*Osatg7-1* ではそのような構造体は観察されなかった。さらに、野性型の一核期のタペート細胞の液胞内で、脂質顆粒が多数観察された (Kurusu *et al.* 2014, Hanamata *et al.* 2014)。タペート細胞特異的プロモーターと、オートファゴソームの可視化マーカー (GFP-ATG8a) を組み合わせた蛍光イメージング系を構築し、花粉発達期におけるタペート細胞内のオートファジー動態を詳細に解析した結果、タペート細胞におけるオートファジー誘導は、一核期の特定のステージで誘導されることが明らかになりつつある。

興味深いことに、*Osatg7-1* では、成熟葯においてもタペート崩壊の遅延および残存が観察された (Kurusu *et al.* 2014, Hanamata *et al.* 2014, Kurusu & Kuchitsu 2017)。近年、オートファジーが関与するさまざまな PCD (オートファジー様細胞死) が、動物において報告されている (Tsujiyama & Shimizu 2005, Gump & Thorburn 2011)。タペート細胞で誘導されるオートファジーが PCD 実行過程にも関与する可能性が示唆され、タペート PCD におけるオートファジーの生理的役割の解明が期待される。

従来、光合成や呼吸の過程で不可避免的に生成される ROS の毒性や、その消去機構が広く議論されていたが、近年、酵素的に積極的に生成された ROS が、ストレス応答や根系を含めた器官発達過程において、シグナル分子として機能することが明らかにされつつある (Takeda *et al.* 2008, Kärkönen & Kuchitsu 2015, Kurusu *et al.* 2015)。最近、イネ葯の発達過程においても ROS が一過的に生成されること (Yi *et al.* 2016)、イネの転写因子変異体である *mads3* では葯内の ROS 生成だけでなく、タペート PCD にも異常が生じることが報告された (Hu *et al.* 2011)。一方、シロイヌナズナのタペート細胞に発現する ROS 生成酵素 RbohE の変異体では、タペート細胞の ROS 生成に異常が生じるだけでなく、タペート PCD や花粉発達に異常が観察される (Xie *et al.* 2014)。シロイヌナズナのオートファジー変異体 (*atg5*) では、葉における ROS の異常蓄積が報告されており (Yoshimoto *et al.* 2009)、タペート PCD における転写因子を中心とする転写ネットワーク、ROS 生成酵素 Rboh や ROS 制御因子を介した ROS 蓄積、そしてオートファジー誘導制御との関連性について、今後の研究が期待される。

4. イネ葯におけるオートファジーとホルモン・脂質代謝

花粉の成熟過程、花粉の発芽・伸長には、種々の植物ホルモンが関与する (Hirano *et al.* 2008)。シロイヌナズナのオートファジー変異体の葉において、サリチル酸 (SA) の増加が見られ、シロイヌナズナのオートファジー欠損変異株の表現型の少なくとも一部は、SA の増加が原因であることが報告されている (Yoshimoto *et al.* 2009)。そこで、野性型および *Osatg7-1* の成熟葯における植物ホルモンの網羅的な定量比較解析を行った。その結果、*Osatg7-1* では野性型と比較して、SA には顕著な差はなく、ジベレリン (GA) とサイトカイニン (CK) 含量が低下していた (Kurusu *et al.* 2017)。

イネの GA 生合成酵素の変異体はタペート PCD 不全を示す (Aya *et al.* 2009)。GA の合成能が低下したイネ変異体では、花粉の発芽・伸長に異常が生じる (Chhun *et al.* 2007)。そこで、*Osatg7-1* における花粉発芽不全が成熟葯の GA 減少に起因するのかを検証するため、活性型 GA (GA₄) 処理による相補試験を行った。その結果、GA₄ 処理により *Osatg7-1* の花粉発芽率は部分的に回復したが、その効果は限定的で、野性型とは大きな隔たりがあった (Kurusu *et al.* 2017)。これらの結果は、*Osatg7-1* の花粉発芽不全は GA 含量の低下のみではなく、タペート細胞からの栄養・材料供給異常を含めた複合的な要因が関与する可能性を示唆している。

葯における CK の機能についてはほとんど報告がないが、トウモロコシにおいて葯または花粉特異的プロモーターを用いて cytokinin oxidase/dehydrogenase を発現させると、雄性不稔形質を示すという報告

から、CK が葯の発達において何らかの機能を担っている可能性がある (Huang *et al.* 2003, Slavikova *et al.* 2008)。花粉発芽を含めた *Osatg7-1* の表現型の一部が、CK の低下に起因している可能性も考えられる (Kurusu *et al.* 2017)。

Osatg7-1 では花粉放出に必須である葯の裂開能も低下していた (Kurusu *et al.* 2014, Hanamata *et al.* 2014)。シロイヌナズナの葯の裂開にはジャスモン酸 (JA) が必須である (Ishiguro *et al.* 2001)。しかし、成熟葯における JA 含量は、野生型と *Osatg7-1* の間で有意な差は見られず、*Osatg7-1* に JA を処理しても葯の裂開能の回復は見られなかった。*Osatg7-1* の裂開不全には JA 以外の因子が関与している可能性が示唆される (Kurusu *et al.* 2017)。一般的に、葯の裂開には植物ホルモンだけでなく、葯内の乾燥状態も重要である。*Osatg7-1* では葯のタペート層が残存しており、この残存したタペート層が葯内の乾燥の妨げとなり、結果として葯の裂開不全を引き起こしている可能性も考えられる。

一方、*Osatg7-1* の成熟花粉において、脂質顆粒の蓄積量が低下していたことから、成熟葯における野生型と *Osatg7-1* の脂質成分を網羅的に比較解析した。その結果、野生型と比べて *Osatg7-1* では、トリアシルグリセロール (TAG) が減少していた (Kurusu *et al.* 2014)。TAG は脂質顆粒の主成分であり、エネルギーの原料である (Kim *et al.* 2002)。さらに、*Osatg7-1* ではジアシルグリセロール (TAG 生合成の中間産物)、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミンの減少と、遊離脂肪酸の増加も観察された (Kurusu *et al.* 2014)。これらの結果から、タペート細胞、花粉を含む葯内の脂質代謝にオートファジーが重要であり、

Osatg7-1 では TAG 合成に必要な物質の供給に異常が生じた可能性が考えられる。オートファジーによる、植物ホルモンや脂質制御の分子的な機構解明は、今後の重要な課題である。

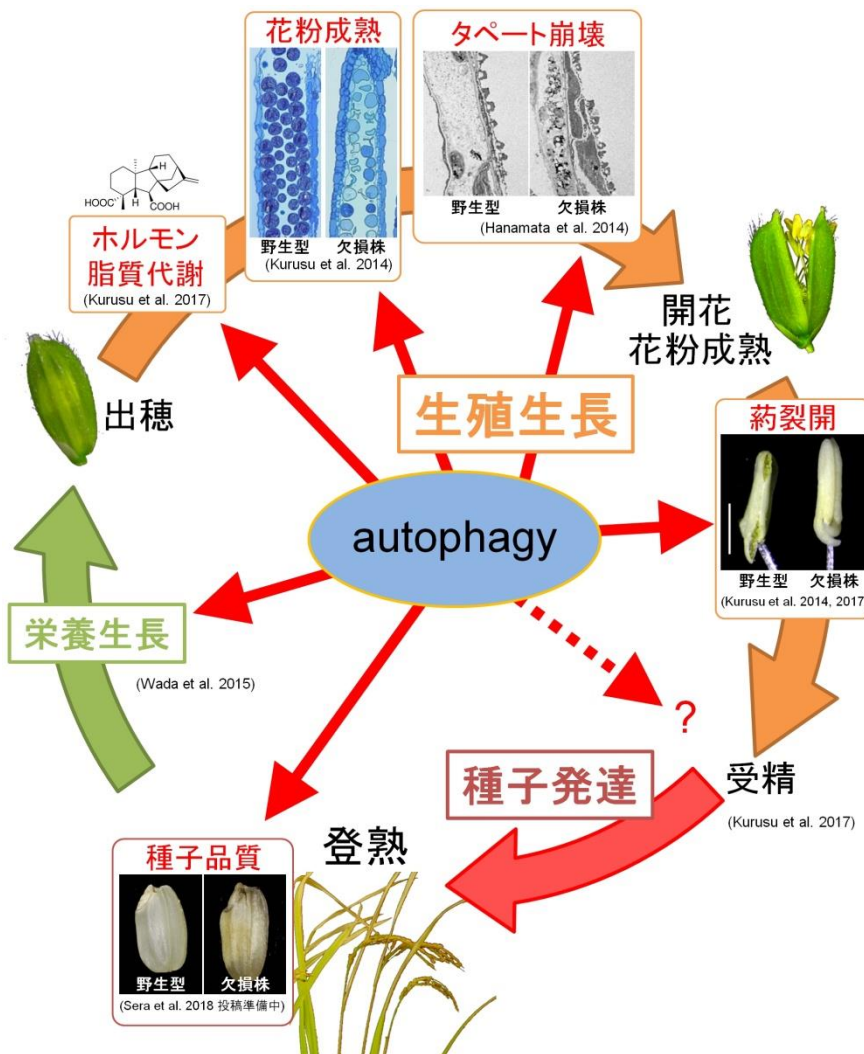


図 1. イネの生殖過程におけるオートファジーの重要性

イネのオートファジーは、葯発達や花粉成熟、ホルモン代謝、そして種子登熟を含む、多くの生殖発達過程において、重要な役割を担うことが明らかになりつつある。

5. おわりに

イネのオートファジー欠損変異体は、葯発達・花粉成熟過程に重篤な表現型が見られ、雄性不稔となる (Kurusu *et al.* 2014, Hanamata *et al.* 2014, Kurusu & Kuchitsu 2017, Kurusu *et al.* 2017; 図 1)。しかし最近、栽培環境によっては低頻度で稔実することが明らかになって来た。低頻度で稔実した *Osatg7-1* 種子の表現型の解析から、オートファジーは花粉形成過程以外に受精後の登熟過程にも影響を及ぼす可能性があることが明らかになりつつある (図 1)。近年の温暖化に伴い、日本を含めた多くの地域で高温ストレスによる米の品質低下が問題になっている (Hakata *et al.* 2012)。イネの種子登熟過程において、高温等の温度ストレスに対する適応機構にオートファジーが関与する可能性も示唆される。オートファジー活性を制御することによるストレス耐性付与の可能性や、イネの栽培種と野生種との比較研究は今後の重要な課題であり、現在研究を進めている。オートファジーは、イネのバイオマスとも密接に関連することも明らかになっており (Wada *et al.* 2015, Izumi *et al.* 2015)、オートファジーの農業上の重要性の解明が期待される。

引用文献

- Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., Kondo, M., Hamada, K., Yano, K., Nishimura, M. & Matsuoka, M. 2009. Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB. *Plant Cell* 21: 1453-1472.
- Chhun, T., Aya, K., Asano, K., Yamamoto, E., Morinaka, Y., Watanabe, M., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. & Ueguchi-Tanaka, M. 2007. Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. *Plant Cell* 19: 3876-3888.
- Gump, J.M. & Thorburn, A. 2011. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol.* 21: 387-392.
- Hakata, M., Kuroda, M., Miyashita, T., Yamaguchi, T., Kojima, M., Sakakibara, H., Mitsui, T. & Yamakawa, H. 2012. Suppression of α -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnol. J.* 10: 1110-1117.
- Hanamata, S., Kurusu, T. & Kuchitsu, K. 2014. Roles of autophagy in male reproductive development in plants. *Front. Plant Sci.* 5: e457. doi: 10.3389/fpls.2014.00457.
- Hu, L., Liang, W., Yin, C., Cui, X., Zong, J., Wang, X., Hu, J. & Zhang, D. 2011. Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development. *Plant Cell* 23: 515-533.
- Huang, S., Cerny, R.E., Qi, Y., Bhat, D., Aydt, C.M., Hanson, D.D., Malloy, K.P. & Ness, L.A. 2003. Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiol.* 131: 1270-1282.
- Hirano, K., Aya, K., Hobo, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Shim, R.A., Hasegawa, Y., Ueguchi-Tanaka, M. & Matsuoka, M. 2008. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant Cell Physiol.* 49: 1429-1450.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. & Okada, K. 2001. The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 2191-2209.
- Izumi, M., Hidema, J., Wada, S., Kondo, E., Kurusu, T., Kuchitsu, K., Makino, A. & Ishida, H. 2015. Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. *Plant Physiol.* 167: 1307-1320.
- Kärkönen, A. & Kuchitsu, K. 2015. Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants.

Phytochemistry 112: 22-32.

- Kawanabe, T., Ariizumi, T., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. & Toriyama, K. 2006. Abolition of the tapetum suicide program ruins microsporogenesis. *Plant Cell Physiol.* 47: 784-787.
- Kim, H.U., Hsieh, K., Ratnayake, C. & Huang, A.H. 2002. A novel group of oleosins is present inside the pollen of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 22677-22684.
- Kurusu, T., Kuchitsu, K. & Tada, Y. 2015. Plant signaling networks involving Ca^{2+} and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Front. Plant Sci.* 6: e427. doi: 10.3389/fpls.2015.00427.
- Kurusu, T. & Kuchitsu, K. 2017. Autophagy, programmed cell death and reactive oxygen species in sexual reproduction in plants. *J. Plant Res.* 130: 491-499.
- Kurusu, T., Koyano, T., Hanamata, S., Kubo, T., Noguchi, Y., Yagi, C., Nagata, N., Yamamoto, T., Ohnishi, T., Okazaki, Y., Kitahata, N., Ando, D., Ishikawa, M., Wada, S., Miyao, A., Hirochika, H., Shimada, H., Makino, A., Saito, K., Ishida, H., Kinoshita, T., Kurata, N. & Kuchitsu, K. 2014. OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy* 10: 878-888.
- Kurusu, T., Koyano, T., Kitahata, N., Kojima, M., Hanamata, S., Sakakibara, H. & Kuchitsu, K. 2017. Autophagy-mediated regulation of phytohormone metabolism during rice anther development. *Plant Signal. Behav.* 12: e1365211. doi: 10.1080/15592324.2017.1365211.
- Li, F. & Vierstra, R.D. 2012. Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci.* 17: 526-537.
- Li, F., Chung, T., Pennington, J.G., Federico, M.L., Kaeppler, H.F., Kaeppler, S.M., Otegui, M.S. & Vierstra, R.D. 2015. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell* 27: 1389-1408.
- Li, N., Zhang, D.S., Liu, H.S., Yin, C.S., Li, X.X., Liang, W.Q., Yuan, Z., Xu, B., Chu, H.W., Wang, J., Wen, T.Q., Huang, H., Luo, D., Ma, H. & Zhang, D.B. 2006. The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell* 18: 2999-3014.
- Meléndez, A. & Levine, B. 2009. Autophagy in *C. elegans*. In: Kramer, J.M. & Moerman, D.C. (eds.) *WormBook* doi:10.1895/wormbook.1.147.1
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 107-132.
- Niu, N., Liang, W., Yang, X., Jin, W., Wilson, Z.A., Hu, J. & Zhang, D. 2013. EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. *Nat. Commun* 4: e1445. doi: 10.1038/ncomms2396.
- Ono, S., Liu, H., Tsuda, K., Fukai, E., Tanaka, K., Sasaki, T. & Nonomura, K.I. 2018. EAT1 transcription factor, a non-cell-autonomous regulator of pollen production, activates meiotic small RNA biogenesis in rice anther tapetum. *PLoS Genet.* 14: e1007238. doi: 10.1371/journal.pgen.1007238.
- Phan, H.A., Iacuone, S., Li, S.F. & Parish, R.W. 2011. The MYB80 transcription factor is required for pollen development and the regulation of tapetal programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 2209-2224.

- Slavikova, S., Ufaz, S., Avin-Wittenberg, T., Levanony, H. & Galili, G. 2008. An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of Arabidopsis seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *J. Exp. Bot.* 59: 4029-4043.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K. & Dolan, L. 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319: 1241-1244.
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 12 (Suppl 2): 1528-1534.
- Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A. & Mizushima, N. 2008. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 321: 117-120.
- Wada, S., Hayashida, Y., Izumi, M., Kurusu, T., Hanamata, S., Kanno, K., Kojima, S., Yamaya, T., Kuchitsu, K., Makino, A. & Ishida, H. 2015. Autophagy supports biomass production and nitrogen use efficiency at the vegetative stage in rice. *Plant Physiol.* 168: 60-73.
- Xie, H.T., Wan, Z.Y., Li, S. & Zhang, Y. 2014. Spatiotemporal production of reactive oxygen species by NADPH Oxidase is critical for tapetal programmed cell death and pollen development in Arabidopsis. *Plant Cell* 26: 2007-2023.
- Yi, J., Moon, S., Lee, Y.S., Zhu, L., Liang, W., Zhang, D., Jung, K.H. & An, G. 2016. Defective Tapetum Cell Death 1 (DTC1) regulates ROS levels by binding to metallothionein during tapetum degeneration. *Plant Physiol.* 170: 1611-1623.
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y. & Shirasu, K. 2009. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *Plant Cell* 21: 2914-2927.
- Yoshimoto, K. 2012. Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol.* 53: 1355-1365.