

葉緑体オートファジーの研究展開：植物を超えた議論の発展を目指して

中村咲耶¹, 泉正範¹

¹理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Study on chloroplast autophagy for the development of cell biology

Sakuya Nakamura¹ & Masanori Izumi¹

¹Center for Sustainable Resource Science (CSRS), RIKEN

2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Keywords: autophagy; chlorophagy; chloroplasts, organelle dynamics, ubiquitination

DOI: 10.24480/bsj-review.12a8.00201

1. はじめに

葉緑体は、光合成真核生物に特徴的なオルガネラであり、光合成を中心に様々な代謝反応を担っている。陸上植物は、葉の老化過程や栄養欠乏時に葉緑体タンパク質を活発に分解し、派生するアミノ酸などの栄養成分を何度もリサイクルしながら成長していく。近年、我々を含む複数の研究グループにより、真核生物に保存される細胞内自己分解システム・オートファジーが葉緑体分解を担うことが明らかにされ、さらにその詳細な分子機構の解明が進められている。

植物は、多量の栄養素を葉緑体に投資しているため、その分解機構は、派生する大量の栄養成分の体内再利用効率に深く関わる。また葉緑体分解は必然的に光合成活性を低下させるため、植物の炭素同化効率にも作用する現象である。ゆえに葉緑体分解機構は、複数の局面で植物の生き様、作物の生産性と密接に関わっており、その詳細な理解は植物科学研究の重要課題の一つであると言える。

しかしながら我々は、葉緑体分解の研究には、植物の枠に収まらずに、より広範な生物学分野の研究者にまで訴えかけることのできる強い魅力があると確信している。その研究展開を通して、植物の生き様の理解に加え、広範な生物学研究の発展にまで寄与することができれば、研究自体の学術的意義と、シンプルなおもしろさがより増すのではないかと。2020年9月に行われた日本植物学会第84回大会において、「植物学が先導する形で、生物全般に普遍的な現象や進化の仕組みなど、新しい発見を広く発信していく学問を創出するための一歩を踏み出す」ことを目指し「葉緑体学事始」と銘打って行われたシンポジウムに基づき執筆する本稿においては、上述のような幅広い生物学、特に複数の生物種における細胞生物学研究の知見とも比較しながら、最新の葉緑体分解機構の成果、今後の方向性を議論させていただきたい。

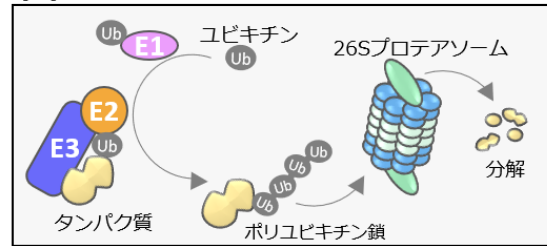
2. 葉緑体オートファジーにおけるユビキチン化の役割

2-1. ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー

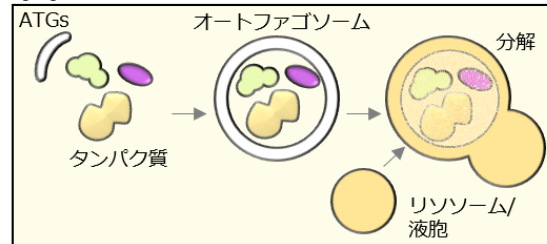
ユビキチン・プロテアソーム系は、真核生物に保存される主要な細胞内分解系であり、オートファジーと並ぶ二大分解系と称されることも多い (図 1; Dikic, 2017)。ユビキチン・プロテアソーム系に関する成果が 2004 年にノーベル化学賞を、オートファジーの成果が 2016 年にノーベル生理学・医学賞を受賞していることから、これら細胞内分解系の研究が学問の発展に大きく寄与してきたことが分かる。典型的なオートファジー経路である「マクロオートファジー」では、新生二重膜小胞であるオートファゴソームが細胞質の一部を隔離し、酸性オルガネラである液胞 (植物や酵母) あるいはリソソーム (動物細胞) に運んで分解する (図 1B; Nakatogawa, 2020)。一方のユビキチン・プロテアソーム系では、分子量 8.6 kDa ほどの小さなタンパク質ユビキチンが、ユビキチン活性化酵素 E1, ユビキチン結合酵素 E2, ユビキチン転移酵素 E3 の働きによって分解対象タンパク質のいわば「目印」として付与される (図 1A)。現在ではユビキチン化はタンパク質分解に限らず複数の細胞内現象を励起するシグナルになることが分かっているが、特にユビキチン自身の 48 番目のリシンを介して多数のユビキチンが連結するポリユビキチン鎖が形成されたタンパク質は、細胞質のタンパク質分解複合体である 26S プロテアソームにより分解される (Chau et al., 1989)。一般的に、生物は極めて多様なユビキチン転移酵素を有しており、それぞれが特異的なユビキチン化ターゲットを持つため、ユビキチン・プロテアソーム系は非常に基質特異性の高いタンパク質分解が可能とされている (Dikic, 2017)。この点において、細胞質の一部やオルガネラを「まとめて運んで分解する」オートファジーとは対照的な分解系であり、特性の異なる両分解系がそれぞれの役割を担うことにより、様々な生命機能を支えているものと考えられる。

一方で、特に哺乳類細胞における細胞内分解システム研究の進展により、ユビキチン化さ

(A) ユビキチン・プロテアソーム系



(B) マクロオートファジー



(C) ユビキチン化による選択的マイトファジー

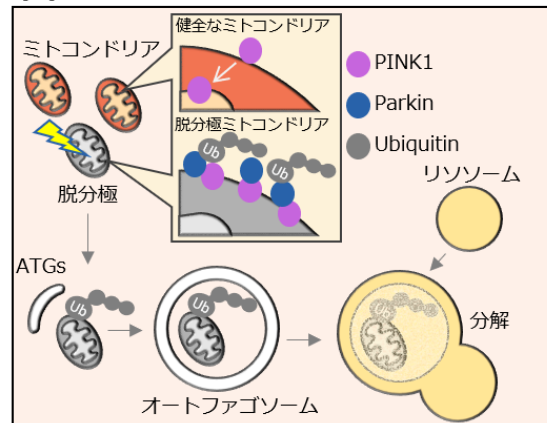


図 1. ユビキチン・プロテアソーム系, マクロオートファジー, マイトファジーの概要図

(A) ユビキチン・プロテアソーム系では、ユビキチン活性化酵素 E1, ユビキチン結合酵素 E2, ユビキチン転移酵素 E3 の働きにより、ユビキチンが分解対象タンパク質に付与される。48 番目のリシンを介してポリユビキチン鎖が付与されたタンパク質は 26S プロテアソーム複合体により分解される。

(B) マクロオートファジーでは、オートファジー関連タンパク質 (ATG タンパク質) の働きにより、新生二重膜小胞オートファゴソームが形成され、それにより隔離された細胞質成分が液胞/リソソームに運ばれる。外膜が液胞膜/リソソーム膜と融合し、内膜構造 (オートファジックボディ) が分解される。

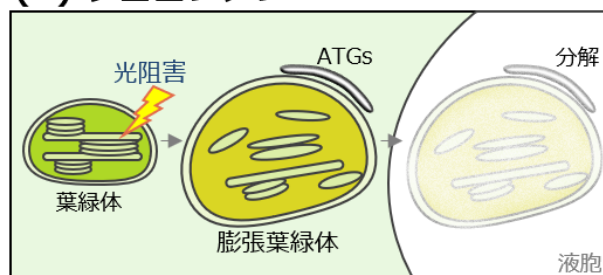
(C) 哺乳類細胞で起こる PINK1/Parkin 型マイトファジーでは、脱分極したミトコンドリア外膜にミトコンドリア移行キナーゼ PINK1 が蓄積し、細胞質に存在する E3, Parkin によるミトコンドリアのユビキチン化を促進する。ユビキチンが蓄積したミトコンドリアは、オートファゴソームの選択的分解基質となる。

れた基質がオートファジーの分解対象となる例が知られるようになった (Shaid et al., 2013)。特に研究が盛んにおこなわれてきた例が、哺乳類細胞において脱分極した故障ミトコンドリアを除去するオートファジーである PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/Parkin 型マイトファジーである (図 1C; Pickles et al., 2018)。この経路については極めて多数の学術論文が発表されており、本稿ではその説明は概要のみにとどめる。ミトコンドリアに移行するキナーゼ PINK1 は、正常なミトコンドリアではミトコンドリア内部にまで移行しプロテアーゼの作用で分解されるが、脱分極しエネルギー生産ができなくなったミトコンドリアでは、PINK1 がミトコンドリア外膜に蓄積し、細胞質の E3 である Parkin によるミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化を促進する。ユビキチン化したミトコンドリアはオートファゴソームの分解基質となり速やかに除去される。この過程で、PINK1 によるユビキチンのリン酸化が重要なトリガーとなること、分解対象とオートファゴソーム膜の橋渡しを担う「オートファジー受容体」がユビキチン鎖と結合することでオートファゴソームがミトコンドリアを隔離すること、などが明らかにされている (Koyano et al., 2014; Lazarou et al., 2015)。

2-2. ユビキチン化とクロロファジー

ミトコンドリアと同じく電子伝達鎖を介したプロトン勾配を利用して ATP を生産する葉緑体においても、機能破綻、ユビキチン化、オートファジー誘導という分解現象が起こることは多くの研究者がイメージしていたかもしれない。そして私たちは、シロイヌナズナにおいて、強い可視光や紫外線による光障害時に、葉緑体が丸ごと液胞に除去されるオートファジー・クロロファジーが起こることを発見した (Izumi et al., 2017)。さらにこの経路は、主に包膜障害が生じた葉緑体を選び取って除去するオルガネラ選択的オートファジーであることも示した (図 2A; Nakamura et al., 2018)。一方、これら成果に先んじて、活性酸素の一種、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が過剰蓄積した葉緑体が、細胞質局在の E3 である PLANT U-BOX4 (PUB4) によりユビキチン化された後に消化される経路の存在が提唱された (図 2B; Woodson et al., 2015)。これらの発見により、PUB4 によるユビキチン化がクロロファジーのトリガーとなる可能性が想起された。

(A) クロロファジー



(B) PUB4依存型分解

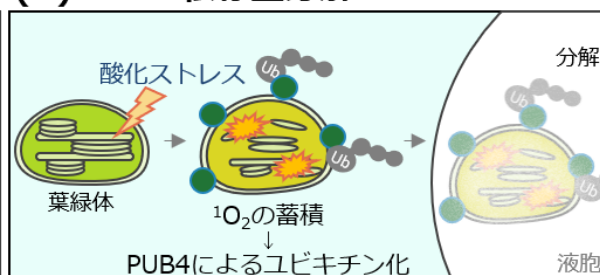


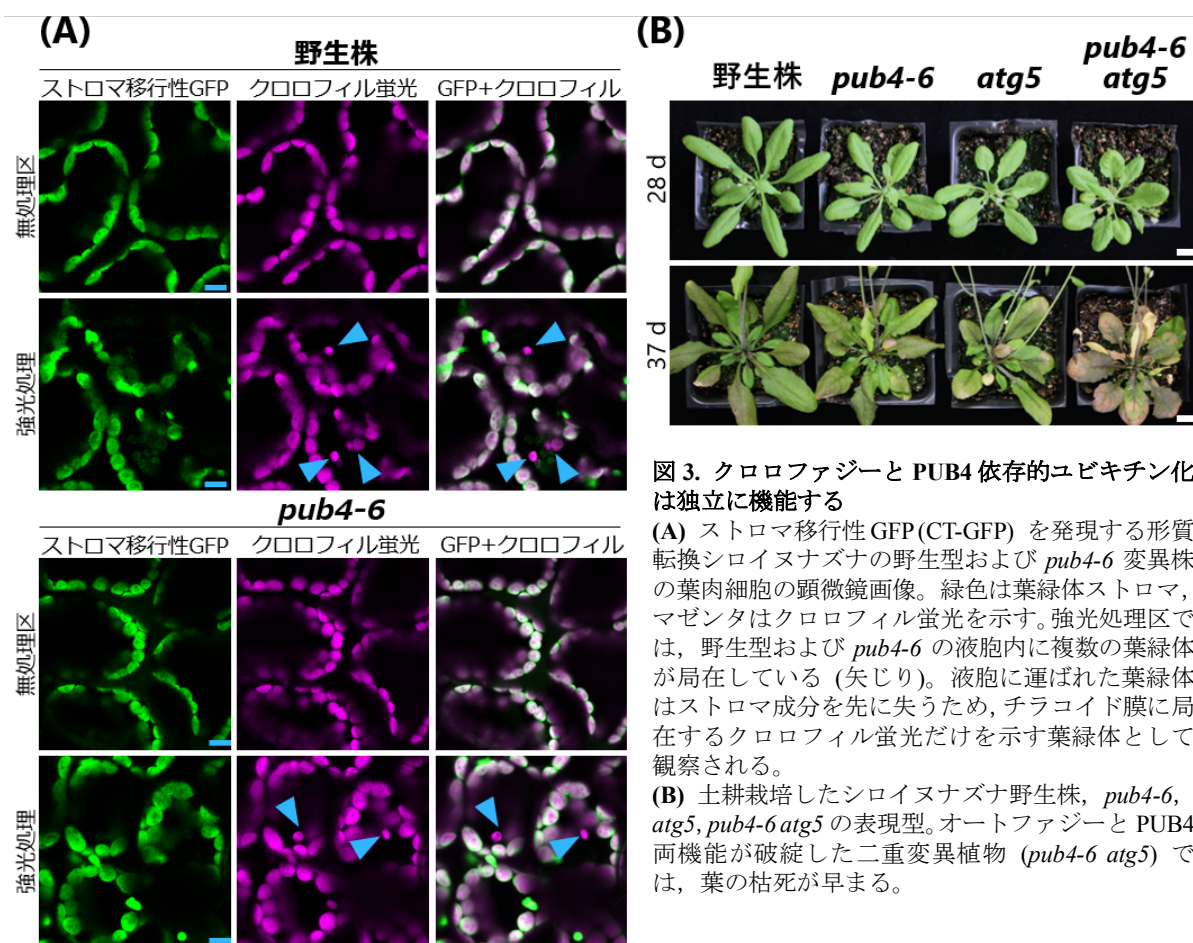
図 2. 葉緑体分解を担うクロロファジーと PUB4 によるユビキチン化の概要図

(A) 障害葉緑体を除去するクロロファジーの模式図。強い可視光による光障害にさらされると、一部の葉緑体が膜障害により膨張する。そのような葉緑体は、オートファジー関連タンパク質の働きにより液胞内部へ除去される。

(B) PUB4 が誘導する葉緑体分解のモデル図。一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が過剰蓄積した葉緑体は細胞質の E3, PUB4 によるユビキチン化を受け、最終的に液胞で消化される。この経路は、一重項酸素の一過的な過剰蓄積を誘起できる FERROCHELATASE 2 変異株 (*fc2*) において活発に起こることが報告されている。

そこで我々は、PUB4による葉緑体ユビキチン化を見出したグループとも協力し、*PUB4*のシロイヌナズナ点変異株 *pub4-6* を用いてクロロファジー活性の定量評価を行った (Kikuchi et al., 2020)。まず光障害処理を施したシロイヌナズナ生葉の共焦点レーザー顕微鏡観察において、*pub4-6* 変異株でクロロファジーが通常に起こることを確認した (図 3A)。生化学的な分解活性評価も、*pub4-6* 変異株でも野生株と同様にクロロファジーが起きていることを支持した (Kikuchi et al., 2020)。また、葉緑体タンパク質のユビキチン化を担う別の E3 として Suppressor of PPI1 locus 1 (SP1) も報告されていたが (Ling et al., 2012), *sp1* 変異株, *sp1 pub4-6* 二重変異株においても、クロロファジー活性が低下することは無かった。これらの成果から、PUB4 含む既知の葉緑体ユビキチン化はクロロファジーの誘導トリガーではないことが示された (Kikuchi et al., 2020)。現状、植物オートファジー研究においては、先行している哺乳類や酵母での成果を参考にしたトピック性をもって研究が発表されることも多いが、今回の我々の解析は、クロロファジーと PUB4 の関係性は、哺乳類ミトファジーと Parkin の関係性とは異なることを証明した。

上述した葉緑体に関わる 2 つの E3 のうち、SP1 は、葉緑体のタンパク質輸送装置 Translocon on the outer chloroplast membrane (TOC) サブユニットのユビキチン化、26S プロテアソームによる分解を担うことが明らかにされている (Ling et al., 2012; Ling et al., 2019)。一方で、PUB4 の具体的な機能は不明瞭である。そこで我々は PUB4 とオートファジーの関係性をより多角的に検証するため、*pub4-6* とオートファジー関連遺伝子 *AUTOPHAGY5* (*ATG5*) の二重変異株を作成し、表現型解析を行った (Kikuchi et al., 2020)。その結果、二重変異株は、複数の局面



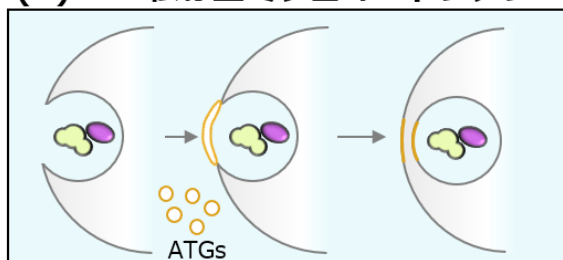
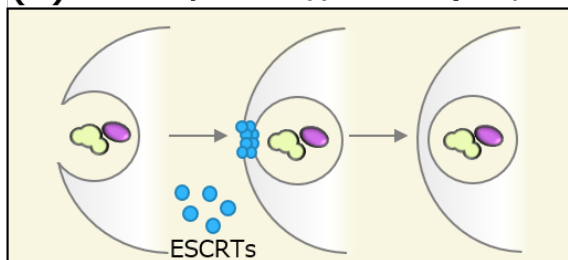
で一重変異体よりもシビアな表現型を示すことが分かった。例えば土耕 (富栄養条件) で栽培した際には、二重変異体の葉でより活性酸素が蓄積し、黄化 (クロロシス) が促進した (図 3B)。また種子の形成不全も観察された。そして、タンパク質分解による栄養素リサイクルが活性化される窒素欠乏、あるいは炭素欠乏 (暗所) 条件においては、葉・植物体の枯死が野生株、それぞれの一重変異株よりも早く起こった。これら二重変異による相加的な表現型は全て、オートファジーと PUB4 依存的ユビキチン化が独立に機能しており、その両者が共に機能不全となることで植物の成長や飢餓適応がより強く阻害されたことを示している。

以上、我々の研究成果は、PUB4 によるユビキチン化とクロロファジーはそれぞれ独立に機能していることを強く支持した。残念ではあるが「では何がクロロファジーのトリガー分子なのか」という質問に答える成果を今は持ち合わせていない。未知の E3 によるユビキチン化が関わっている可能性も残っているし、オートファジー受容体の関与も想定される。そのような因子を今後着実に同定していくことで、マイトファジーとクロロファジーの類似性、差異、生物種をまたいだオルガネラ・オートファジーの保存性についてより深く正確な議論を進めていきたいと考えている。

3. ミクロオートファジーの作動機構

「オートファジー」という言葉が示す現象の意味は拡大している。いわゆる典型的なオートファジーとして研究が進められてきた「マクロオートファジー」以外の複数のオートファジー経路の研究も盛んに行われるようになってきている。その中でも、古くからその存在が示唆されていたにも関わらず、明瞭な仕組みや定義が未だ確立されていない現象が「ミクロオートファジー」である。マクロオートファジーでは二重膜小胞オートファゴソームが分解対象を隔離するが、液胞・リソソームの膜自身が分解対象の隔離に関わることがミクロオートファジーの特徴である (Oku and Sakai, 2018)。マクロオートファジーに必要なオートファジー関連遺伝子群 (ATG 遺伝子群) が必要なタイプのミクロオートファジーと、ATG 遺伝子を必要とせず、主に Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) 因子が必要とされるタイプのミクロオートファジーがあることが報告されており (図 4A, B), 分解経路とし

(A) ESCRT依存型ミクロオートファジー (B) ATG依存型ミクロオートファジー



(C) ミクロクロロファジー

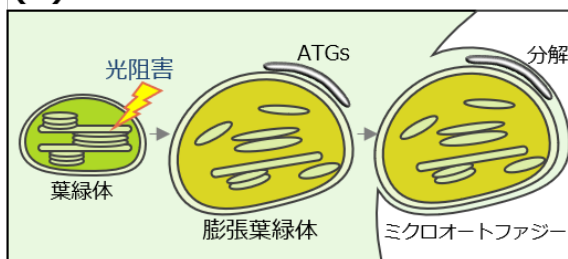


図 4. 様々なミクロオートファジーの概要図

(A) ESCRT 型ミクロオートファジーでは、ESCRT タンパク質群が最終的な液胞膜の切断・リモデリングを担い、分解対象物が液胞内へ取り込まれると考えられている。

(B) ATG 依存型のミクロオートファジーでは、ATG タンパク質群の働きにより形成された新生膜が液胞膜と融合することで、分解対象物が隔離されるモデルが示されている。

(C) 光阻害により大きく膨張した葉緑体の表面に ATG8 を含む構造体が蓄積し、液胞膜によって直接包み込まれる。この過程で ATG8 構造体が膜の閉じ込みを担っているか、あるいは別の役割を持つかははっきりしていない。

ての統一見解の構築に至っていない現状がある (Schuck, 2020)。なお、特に植物においては「マクロオートファジー」と「ミクロオートファジー」という呼称は混乱を呼ぶことが多い。それは、植物細胞では一般的に「液胞サイズ>オートファゴソムのサイズ」であることが主要因だと考えられる。これは、最初にミクロオートファジーという現象が示された哺乳類の細胞においては「オートファゴソムのサイズ>リソソムのサイズ」であったために「ミクロ」という言葉が使われ、その名称が現在まで使用されているという経緯があるようである。

我々は、障害葉緑体を除去するクロロファジーが、液胞膜が葉緑体の隔離に関わるミクロオートファジー動態を経ることを明らかにしている (Nakamura et al., 2018)。この経路は、オートファゴソム膜の伸長過程で起こる ATG8 とリン脂質 Phosphatidylethanolamine (PE) 結合反応に必要な遺伝子 *ATG5*, *ATG7* 等の欠損により起こらなくなることから、*ATG* 遺伝子を必要とするタイプのミクロオートファジーである。クロロファジーの過程で緑色蛍光タンパク質 (GFP)-ATG8 でラベルされた大きな構造体が分解対象の葉緑体表面に局在する様子を捉えており (Nakamura et al., 2018), これらオートファジー膜構造が分解対象の認識や隔離において必須の機能を担っていると考えられるが、その詳細な機能の同定には至っていない (図 4C)。*ATG* 遺伝子依存型ミクロオートファジーとして明確に確立されてきたのは、メタノール資化性酵母でおこるペルオキシソーム分解・ペキソファジー (Oku and Sakai, 2018) など一部に限られているため、今後クロロファジーに必要な遺伝子群を同定していくことで、ミクロオートファジーの駆動の仕組みの解明、生物種を超えた議論を発展させていくための新たな知見を得ることができると期待される。

4. 葉緑体部分分解オートファジーの局所分裂の仕組み

これまでは、光障害時に起こる障害葉緑体の全分解・クロロファジー について主に述べてきたが、葉緑体の一部を分解するピースミールタイプのオートファジーが起こることが複数のグループにより示されている。特に我々は、葉緑体ストロマと包膜の一部を含む小胞 Rubisco-containing body がオートファゴソムの積荷として運ばれるマクロオートファジー経路が、光合成阻害時のストロマトンパク質分解、アミノ酸再利用に寄与することを報告してきた (Ishida et al., 2008; Izumi et al., 2015; Hirota et al., 2018)。特に本経路は切離葉を暗所でインキュベートした際に活性化し、その際、液胞型 H-ATPase の阻害剤である Concanamycin A を添加し液胞分解活性を阻害すると、CO₂固定酵素 Rubisco を含む 1 μ m 程度のオートファジー小胞が液胞内に蓄積する様子を観察することが出来る (図 5A)。クロロファジーという葉緑体を丸ごと分解するオートファジーと、全体は維持しつつ中身だけを部分的に分解するオートファジーの両者が存在することが、環境変化や成長段階に応じて葉の光合成機能・栄養利用を適切にコントロールしている可能性があり、両者の作動原理の違いは非常に興味深いポイントである。

一方、ここで再び酵母・哺乳類マイトファジーの知見に目を向けると、マイトファジーにおいてもミトコンドリアの一部がオートファゴソムの発達に応じて「ちぎりとられる」こ

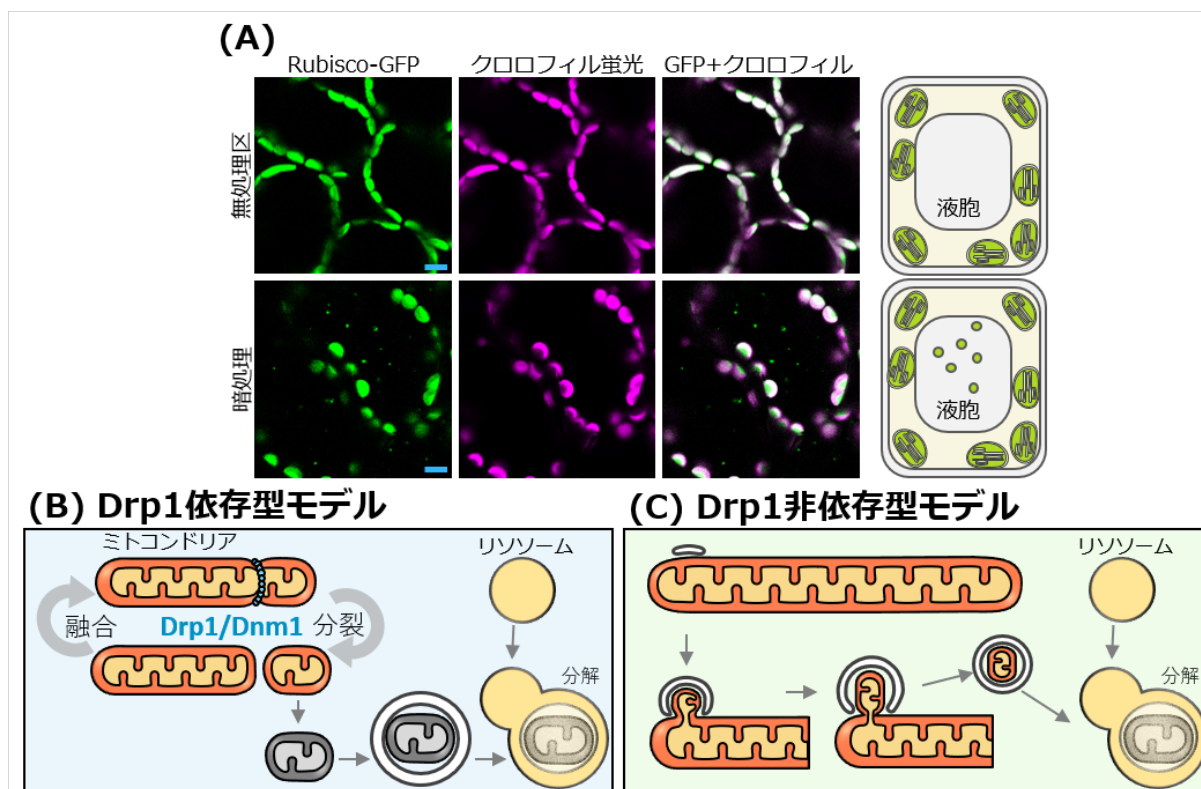


図 5. 二重膜オルガネラの局所分裂機構

(A) GFP でラベルした Rubisco (Rubisco-GFP) を発現するシロイヌナズナ形質転換体の葉肉細胞の顕微鏡画像。緑色は Rubisco-GFP 蛍光, マゼンタはクロロフィル蛍光を示す。暗処理による炭素飢餓条件, 液胞型 H^+ -ATPase の阻害剤 concanamycin A 存在下では, 液胞内に Rubisco-GFP をもつオートファジックボディが多数蓄積する。(B, C) Drp1 依存・非依存型マイトファジーの想定モデル図。哺乳類細胞や出芽酵母においては, ミトコンドリア分裂に関わる Drp1 欠損により巨大ミトコンドリアが生じる細胞においても, マイトファジーが起こることから, オートファジーと協調して働く分裂機構の存在が示唆されている。

とが報告されている (Yamashita et al., 2016)。マイトファジーのモデルとしては, 「ミトコンドリアは融合・分裂を繰り返しており, 障害を受けたミトコンドリアは断片化して取り残され, マイトファジーの分解基質となる」という概念が示されていたが (図5B; Twig and Shirihai, 2011), ミトコンドリア分裂に必要な因子DRP1 (Dynamin-related protein 1) が欠損したヒト細胞においても, 分裂異常により巨大化したミトコンドリアの一部がオートファゴソームの伸長に伴いちぎり取られる様子が観察され, 同様の現象は野生株Hela細胞でも検出された (Yamashita et al., 2016)。これらの現象は, マイトファジーと同調して起こるミトコンドリア分裂機構が存在することを示唆している (図5C)。なお, 表題2で述べたPINK1/Parkin型マイトファジーは脱共役剤による脱分極時に活性化するが, ここで述べたマイトファジーは, 酸素欠乏 (Hypoxia) や, 鉄キレート剤添加による鉄欠乏で活性化する経路である。このような経路では, ミトコンドリア外膜に局在するタンパク質FUN14 domain-containing protein 1 (FUDC1), あるいは, B-cell lymphoma 2 (BCL2) ファミリータンパク質であるBCL2 / adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (BNIP3), BNIP3L / Nix等が, オートファジー受容体として機能することが報告されている (Bellot et al., 2009; Liu et al., 2012)。よって上述のようなストレス時には, PINK1 / Parkin型マイトファジーとは異なるタイプのマイトファジーが起きているものと考えられる。

我々も, シロイヌナズナ生葉における葉緑体部分分解オートファジーのライブセルイメー

ジング解析を進めており、上述のマイトファジー同様に、葉緑体表面でオートファゴソーム膜が発達し、それに伴い葉緑体の一部が Rubisco-containing body として小胞化する様子を予備的に捉えている。よって、葉緑体においても、ピースミールなオートファジーと協調して葉緑体を局所的に分裂させる仕組みが備わっている可能性が高いと考えている。その仕組みに詳しく迫っていくことで、葉緑体とミトコンドリアの部分分解の仕組みの共通性、両二重膜オルガネラを対象とするオートファジー機構について、新たな知見を得ていきたい。

5. おわりに

以上、本稿では、我々の葉緑体オートファジー研究に関する最近の知見と、関連する他の生物種での知見を組みあわせ、植物科学の枠をこえた議論を展開した。現実的には、未発表のデータについて本稿で詳細に触れることが難しいこともあり、「広範な生物学研究への貢献」という目標には程遠い小さな議論になってしまっているが、このような場での議論を一つのきっかけとし、自分たちの研究を整理し意見を頂戴しながら、更なる発展につなげていきたい。また我々の場合、「オートファジー」という様々な生物種に保存されていることが分かっている現象に着目していることから、生物種をまたいだ議論がしやすいという点が現実にある。しかしながら、各々が非常におもしろい生命現象に着目している植物科学者達が、それぞれ自分の誇れる現象・要素を植物の枠を超えて発信していくことが、植物科学の更なる発展にも役立つのではないかと若輩者ながら感じている。我々もそのような植物科学の発展の一助となることを目指し、さらなる研究発展に取り組んでいきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、JSPS 科学研究費補助金(課題番号 JP17H05050・代表: 泉, JP19H04712・代表: 泉, JP20H04916・代表: 泉, JP20K21322・代表: 泉, JP19J01681・代表: 中村, JP20K15501・代表: 中村, JP20H05352・代表: 中村)の支援を得て遂行した。また本稿で示したデータに使用した、ストロマ移行 GFP 発現シロイヌナズナ, *atg5* 変異株, *pub4-6* 変異株は、それぞれ Cornell 大学・Maureen R. Hanson 博士, 明治大学・吉本光希博士, Arizona 大学・Jesse D. Woodson 博士から分与いただいたものである。

引用文献

- Bellet, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., Mazure, N.M. 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol.* 29: 2570–2581
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., Varshavsky, A. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science.* 243: 1576–1583
- Dikic, I. 2017. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem.* 86: 193–224
- Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., Ishida, H. 2018. Vacuolar protein degradation via autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 59:1363–1376

- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R., Mae, T. 2008. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* 148: 142–155
- 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
- Izumi, M., Ishida, H., Nakamura, S., Hidema, J. 2017. Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *Plant Cell.* 29: 377–394
- Kikuchi, Y., Nakamura, S., Woodson, J.D., Ishida, H., Ling, Q., Hidema, J., Jarvis, R.P., Hagihara, S., Izumi, M. 2020. Chloroplast Autophagy and Ubiquitination Combine to Manage Oxidative Damage and Starvation Responses. *Plant Physiol.* 183: 1531–1544
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.F., Saeki, Y., Tanaka, K., Matsuda, N. 2014. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature.* 510: 162–166
- Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., Youle, R.J. 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 524: 309–314
- Ling, Q., Broad, W., Trosch, R., Topel, M., Demiral Sert, T., Lymperopoulos, P., Baldwin, A., Jarvis, R.P. 2019. Ubiquitin-dependent chloroplast-associated protein degradation in plants. *Science.* 363: eaav4467
- Ling, Q.H., Huang, W.H., Baldwin, A., Jarvis, P. 2012. Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science.* 338: 655–659
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., Chen, Q. 2012. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 14: 177–185
- Nakamura, S., Hidema, J., Sakamoto, W., Ishida, H., Izumi, M. 2018. Selective elimination of membrane-damaged chloroplasts via microautophagy. *Plant Physiol.* 177: 1007–1026
- Nakatogawa, H. 2020. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21: 439–458
- Oku, M., Sakai, Y. 2018. Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *Bioessays.* 40: e1800008
- Pickles, S., Vigie, P., Youle, R.J. 2018. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr Biol.* 28: R170–R185
- Schuck, S. 2020. Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *J Cell Sci.* 133: jcs246322
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., Dikic, I. 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 20: 21–30
- Twig, G., Shirihai, O.S. 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid*

Redox Signal. 14: 1939–1951

Woodson, J.D., Joens, M.S., Sinson, A.B., Gilkerson, J., Salome, P.A., Weigel, D., Fitzpatrick, J.A., Chory, J. 2015. Ubiquitin facilitates a quality-control pathway that removes damaged chloroplasts. *Science*. 350: 450–454

Yamashita, S.I., Jin, X., Furukawa, K., Hamasaki, M., Nezu, A., Otera, H., Saigusa, T., Yoshimori, T., Sakai, Y., Mihara, K., Kanki, T. 2016. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol.* 215: 649–665