

壊れた葉緑体はオートファジーで丸ごと除去される

中村咲耶¹, 泉正範^{1,2,3}

¹ 東北大学 大学院生命科学研究科
〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

² 東北大学学際科学フロンティア研究所
〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

³ 科学技術振興機構 さきがけ
〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

Sakuya Nakamura¹ & Masanori Izumi^{1,2,3}

Removal of entire damaged chloroplasts by autophagy

Key words: autophagy; chlorophagy; chloroplasts; photodamage; Rubisco-containing bodies

¹Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
Sendai, Miyagi 980-8577, Japan

²Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University
Sendai, Miyagi 980-8578, Japan

³PRESTO, Japan Science and Technology Agency
Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9a6.00132

1. はじめに

オートファジーは、真核生物に広く保存される細胞内分解系である (図 1)。栄養飢餓や老化といったシグナルによって活性化されることから、栄養リサイクルを目的とし細胞質成分が非選択的に分解されると考えられてきた。植物や藻類に特有のオルガネラである葉緑体も、栄養飢餓や老化時にオートファジーの分解対象となる。これは、葉緑体ストロマ成分を含む一部分が隔離されて Rubisco-containing body (RCB) を形成し、この小胞がオートファゴソームとして液胞内へと輸送、分解される「RCB 経路」として知られている (図 1)。近年では、動物細胞や酵母において、損傷オルガネラを選択的に除去する「品質管理」としてのオートファジー機構が多数報告されている。しかしながら、損傷を受けた葉緑体を選択的に分解する品質管理機構としてのオートファジー経路が存在するかどうかは不明であった。

葉緑体は光合成を行う一方で、太陽光に含まれる紫外線 B (UVB; 波長領域 280~315 nm) や過剰な可視光エネルギー (強光; 波長領域 400~700 nm) による障害を常に受けている。我々はごく最近、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、UVB や強光といった光障害によって、オートファジーによる葉緑体丸ごとの分解「クロロファジー」が誘導されることを見出した (図 1)。本稿では、これまでに明らかとなっている葉緑体オートファジーの経路について解説し、動物細胞や酵母における選択的マイトファジーの例と比較しながら、クロロファジー駆動モデルの構築に向けた議論を行いたい。

S. Nakamura & M. Izumi – 1

2. オートファジー研究の進展

2-1. オートファジー経路の概要

オートファジーは、植物、動物、酵母といった真核生物に広く保存される細胞内分解系である。特に栄養飢餓や老化といったシグナルによって活性化され、不要な細胞内成分の除去や、栄養素リサイクルを担う重要な機構である (Ohsumi, 2001)。オートファジーの基本的なメカニズムは、主に酵母を用いた研究により解明されてきており、膜動態の違いからマクロオートファジー、ミクロオートファジーと呼ばれる経路が存在することが知られている。マクロオートファジーでは、オルガネラやタンパク質といった基質が、新たに形成された隔離二重膜によって包み込まれ、輸送体オートファゴソームを形成する (図 1)。このオートファゴソームの外膜は、動物細胞ではリソソーム、植物細胞や酵母では液胞と融合し、オートファジックボディと呼ばれる内膜構造とその内容物は液胞内へと放出され、種々の加水分解酵素によって分解される (Nakatogawa et al., 2009; Mizushima and Komatsu, 2011)。ミクロオートファジーでは、リソソームあるいは液胞の膜が陥入することで直接的に基質が取り込まれ、ルーメン内に放出された後に分解される (Li et al., 2012)。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* においては、メタノール培地からグルコース培地へ移行した際に、ペルオキシソームがミクロオートファジーの経路を介して分解されることが知られている (Oku and Sakai, 2016)。

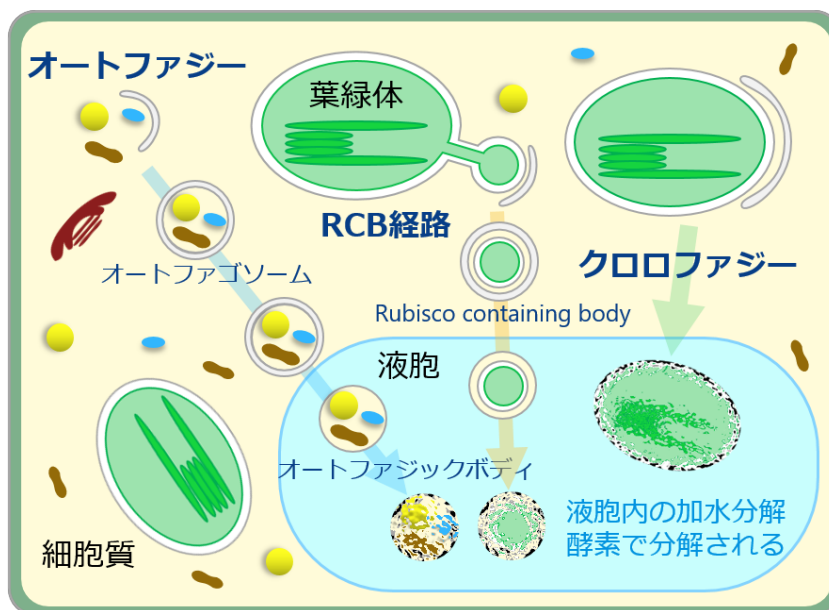


図 1. オートファジーの概念図
 栄養飢餓や老化時に特に活性化され、オルガネラやタンパク質を含む細胞内成分が、オートファゴソームによって隔離される。オートファゴソームは液胞へ移行後、その外膜が液胞膜と融合し、内容物はオートファジックボディとして液胞内へ放出され、液胞の加水分解酵素によって分解される。

植物特有のオルガネラである葉緑体においては、ストロマ成分を部分的に隔離・分解する「RCB経路」と、葉緑体を丸ごと分解する「クロロファジー」の2つの経路が明らかとなっている。

現在までに、出芽酵母において、オートファジーの過程で機能する遺伝子群

(*autophagy-related genes; ATGs*) が 41 種類同定されており、そのうち 15 遺伝子 (*ATG1-10, 12-14, 16, 18*) はオートファゴソーム膜の形成・伸長などに関わり、あらゆるオートファジー経路に必須とされる「コア *ATG* 遺伝子」と呼ばれている (Klionsky et al., 2003)。植物においては、コア *ATG* 遺伝子のホモログが保存されており、モデル植物シロイヌナズナのコア *ATG* 遺伝子欠損変異体を用いた解析から、オートファゴソーム形成の基本メカニズムは植物においても保存されていることが明らかになりつつある (Liu and Bassham, 2012; Yoshimoto, 2012)。

さらに、近年では動物細胞や酵母において、損傷したオルガネラを選択的に除去する「品質管

理」としてのオートファジー機構が報告されている。酵母では、酸化損傷を受けたミトコンドリアが、ATG32 という特異的なレセプタータンパク質によって認識されることで、選択的にオートファゴソームに隔離、分解される「選択的マイトファジー」の経路が存在する (Kanki et al., 2015)。動物細胞では、PINK1/Parkin 介在型のマイトファジーがよく知られている。ATP を生産するための膜電位 ($\Delta\Psi$) が損失したミトコンドリアの外膜に、PTEN-induced putative kinase protein 1 (PINK1) が蓄積し、ユビキチン転移酵素 Parkin によるミトコンドリアのユビキチン化を誘導することで、オートファゴソームによって基質と認識され選択的に隔離される (Youle and Narendra, 2011)。このように、酵母や動物細胞では、特定のレセプターやトリガータンパク質を介した選択性に関わる高度なメカニズムが存在する。

2-2. 葉緑体の部分分解を担う RCB 経路の発見

植物特有のオルガネラである葉緑体に対するオートファジーは、栄養飢餓や老化ストレスに応答して、葉緑体の一部分を隔離二重膜が包み込み、オートファゴソームを介して液胞へ輸送される RCB 経路が知られている。RCB 経路は、コムギ葉を用いた電子顕微鏡観察で、Rubisco を含む葉緑体ストロマ成分が小胞として細胞質や液胞に存在していたことからその存在が提唱された (Chiba et al., 2003)。しかしながら、電子顕微鏡を用いた固定細胞観察は時間情報を失っているため、RCB 経路におけるオートファジーの必要性や、小胞形成時のオートファゴソーム膜の動態やストロマ成分の切り離しなど、詳細な RCB 形成の過程を明らかにすることは難しかった。そこで、葉緑体ストロマや Rubisco を緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) あるいは赤色蛍光タンパク質 (red fluorescent protein; RFP) でラベルした融合タンパク質を発現するシロイヌナズナ形質転換体が作出され、生細胞で RCB 経路をモニタリングすることが可能になった (図 2A; Ishida et al., 2008; Ono et al., 2013)。この形質転換体の切離葉を、液胞内の分解活性を抑制する Concanamycin A 存在下、暗所でインキュベート後に共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、葉緑体ストロマ成分が小胞として液胞内で浮遊している様子が捉えられた。図 2B には、ストロマ移行性 GFP を発現するシロイヌナズナ形質転換体 (Kohler et al., 1997) において、RCB を実際に検出した顕微鏡画像を示した。生育 15 日目の植物体の第 2 葉を切り取り、これに Concanamycin A を注入し、24 時間暗所に静置することにより一時的な糖飢餓状態を誘導すると、ストロマ成分由来の GFP のみをもつ RCB 小胞が、中央液胞内に多数浮遊している様子が見られた (図 2B)。電子顕微鏡観察で RCB 小胞がオートファゴソーム様二重膜に覆われていること、生細胞観察で RCB がオートファゴソーム上に局在する ATG8 と共局在していること、オートファジー機能欠損変異体 *atg* において RCB が形成されないことから、RCB 経路は *ATG* 遺伝子に依存したマクロオートファジーであると考えられている (図 1; Ishida et al., 2008; Ishida et al., 2014)。また、RCB 経路は、老化初期や、光合成が抑制されてエネルギー不足に陥った葉で特に活性化し、葉緑体タンパク質の分解によるアミノ酸リサイクルを促進していることが明らかになりつつある (Izumi et al., 2013; Ono et al., 2013; Izumi et al., 2015; Wada et al., 2015; Hirota et al., 2018)。

3. 葉緑体を丸ごと分解するクロロファジー経路の発見

葉緑体は、太陽光に含まれる UVB や強光による障害を常に受けている。UVB は、地表に到達する太陽光のうち、最もエネルギーが高く、タンパク質や DNA、脂質などの生体成分に直接損傷を引き起こす。また、可視光は光合成に有効な光であるが、光合成に利用しきれない過剰な光エネルギーは、光障害と呼ばれる光合成能の低下を引き起こす (Barber and Andersson, 1992; Aro et al., 1993)。これは、活性酸素種の蓄積や二酸化炭素固定能の低下、ひいては成長障害を引き起こすため、光障害を受けた成分は適切に除去・修復される必要がある (Takahashi and Murata, 2008)。

植物は、損傷を受けた光合成関連タンパク質のターンオーバーを行うために、複数の修復機構を有している (Aro et al., 1993; Nishimura et al., 2017)。光障害は、葉緑体チラコイド膜内にある光化学系 II 複合体を形成する D1 タンパク質に第一に起こることが知られている。ダメージを受けた D1 タンパク質は、チラコイド膜上に局在する FtsH プロテアーゼにより、他の光合成タンパク質に比べ迅速に分解・除去される (Aro et al., 1993; Kato et al., 2012)。さらに葉緑体内では、熱放散による過剰エネルギーの散逸、ステート遷移による励起エネルギーの分配、water-water サイクルによる活性酸素種の消去、サイクリック電子伝達による電子伝達系の調節、など多段階からなる防御機構が働く (Takahashi and Badger, 2011)。しかしながら、重篤な障害に至り壊れた葉緑体はどう処理されるのか、その詳細は不明であった。

そこでまず我々は、強光障害時に葉緑体のオートファジーが機能するかどうかを調べるために、地表に到達する太陽光の半分から 8 割程度の強さの強光 ($1200 \sim 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を 2 時間照射したシロイヌナズナの葉を、2 日後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。植物材料には、ストロマ移行性 GFP を発現するシロイヌナズナ形質転換体を用いた。無処理区の葉緑体は、ストロマ移行性 GFP とクロロフィルの自家蛍光が共局在する (図 2A)。一方、光障害を与えた植物体では、ストロマ移行性 GFP が消失し、クロロフィル蛍光のみを示す葉緑体が細胞の中心部で浮遊している様子が観察された (図 2C)。電子顕微鏡観察でも、強光照射後の細胞の中心部に分解途中の葉緑体が観察された。このような現象は、コア *ATG* 遺伝子の欠損株である *atg5* および *atg7* では見られなかった。以上の解析結果から、光障害時には、オートファジーを介した葉緑体丸ごとの分

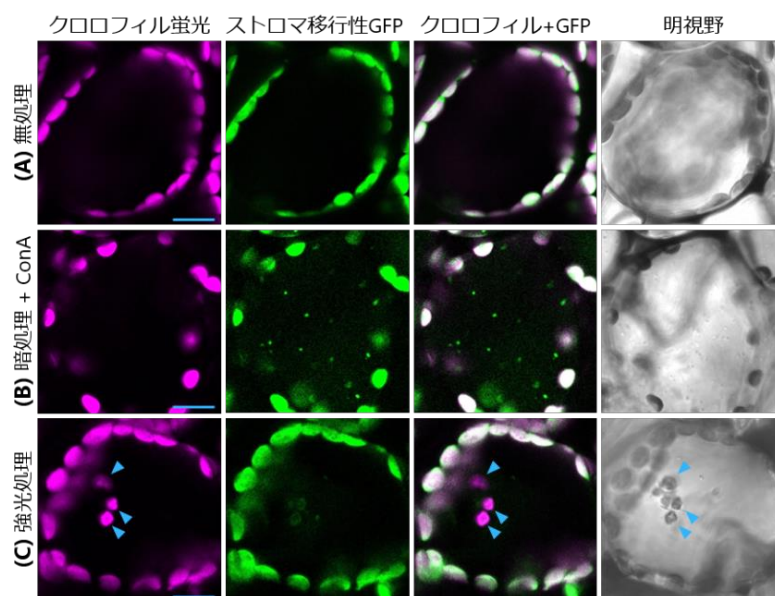


図 2. ストロマ成分の可視化による RCB 経路とクロロファジーの検出

葉緑体ストロマ移行性 GFP を発現するシロイヌナズナ葉肉細胞の顕微鏡画像。マゼンタはクロロフィルの自家蛍光、緑色はストロマ移行性 GFP を示す。

(A) 無処理区では、クロロフィル自家蛍光とストロマ GFP は共局在する。

(B) 切離葉の暗処理により RCB 形成を誘導すると、ストロマ成分のみをもつ小胞 RCB が、液胞内に多数観察される。

(C) 光障害によりクロロファジーを誘導すると、ストロマ成分を失った葉緑体が、液胞内で浮遊している様子が観察される (矢じり)。

スケールバーは 10 μm 。

解, クロロファジーが誘導されている可能性が見出された (Izumi et al., 2017)。

次に, クロロフィル蛍光のみを示し, 浮遊している葉緑体が確かに液胞内に局在することを確認するため, 液胞膜を GFP により可視化した GFP-delta tonoplast intrinsic protein (GFP- δ TIP; Cutler et al., 2000) 発現系統を用いて, 細胞内の観察を行った。通常, 細胞質に局在する葉緑体は, 液胞膜の外側に位置している。一方で, 図 2C で示したような, 細胞の中心部で浮遊している葉緑体は, 液胞膜の内側にあることが示された (図 3A)。また, コア ATG 遺伝子の 1 つである *ATG5* が欠損したオートファジー 欠損株 *atg5* では, 強光処理後も葉緑体が液胞内へと移行する様子は見られなかった (図 3B)。液胞膜マーカー-GFP- δ TIP および葉緑体ストロマタンパク質である Rubisco small subunit (RBCS) を RFP によりラベルした RBCS-RFP を共発現する系統を用いて, 同様の観察を行い, 図 2C に示したようなクロロフィル蛍光のみをもつ葉緑体は, 液胞膜の内側にあることをさらに確認した (図 3C)。このことは, 青破線上の各蛍光の相対強度を測定することでも確認することができた (図 3D)。これらの結果より, 強光処理によって確かに葉緑体が「クロロファジー」によって液胞内へと除去されることが証明された (Izumi et al., 2017)。

電子顕微鏡で観察された液胞内の葉緑体は, チラコイド膜構造は維持していたが包膜やストロマ成分が既に失われており (Izumi et al., 2017), 包膜が消化されることでストロマ成分がチラコイド膜よりも速く拡散・消化されたと考えられる。そのため共焦点レーザー顕微鏡による *in vivo* 観察では, 液胞内の葉緑体はチラコイド膜上のクロロフィル蛍光のみを示す葉緑体として観察される。液胞内に運ばれた葉緑体の数は, 強光処理 2 日後に最大となり, その後緩やかに減少した (Nakamura et al., 2018)。ゆえに液胞内で葉緑体が完全に消化されるには 1 日から 2 日程度の時間を要するようである。

4. クロロファジー駆動モデルの構築に向けて

当初, オートファジーは「栄養素リサイクル」を目的とした非選択的な細胞内自己分解機構としてその基本メカニズムの解明が進められた (Takeshige et al., 1992)。近年は, 損傷したオルガネラを選択的に除去する「細胞内品質管理」としてのオートファジー機構の存在が示され, 現在は様々な生物種でその制御メカニズムの解明が盛んに進められている。中でも, 損傷ミトコンドリアがオートファジーによって除去される「選択的マイトファジー」は, その機能不全がある種のパーキンソン病の発症と関わることを示されており, 詳細な分子機構の解明が進んでいる (Green et al., 2011; Youle and Narendra, 2011; Kanki et al., 2015)。上述したように, PINK1/Parkin 介在型マイトファジーでは, 膜電位が低下し ATP 産生能力が低下したミトコンドリアの外膜に PINK1 タンパク質が蓄積し, ユビキチン転移酵素 Parkin によるユビキチン化を誘導することで, オートファジーの分解対象となる (Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010; Vives-Bauza et al., 2010)(図 4, 左図)。この例を踏まえると, 光障害時に葉緑体を除去するクロロファジーも, 壊れたことを示す「何らかのシグナル」を出す葉緑体を, 「何らかのタンパク質」が認識し, 選択的に除去する, という高度な制御機構を有している可能性が高い(図 4, 右図)。

まず, クロロファジー誘導におけるユビキチン化の関与については検討する必要がある。これまでに, 葉緑体に関与するユビキチンリガーゼとして, Plant U-BOX 4 (PUB4; Woodson et al., 2015)

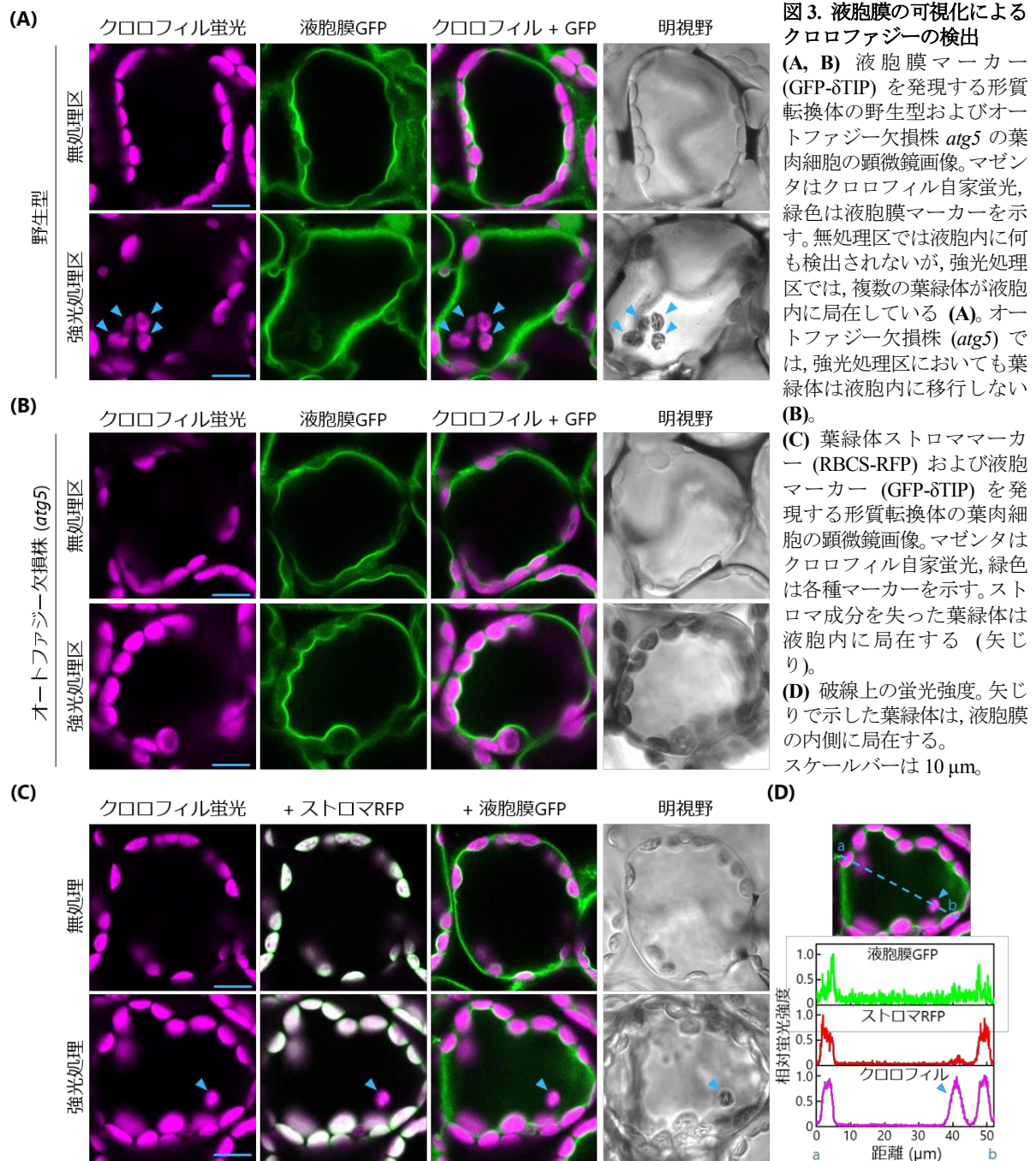


図3. 液胞膜の可視化によるクロロファジーの検出

(A, B) 液胞膜マーカー (GFP- δ TIP) を発現する形質転換体の野生型およびオートファジー欠損株 *atg5* の葉肉細胞の顕微鏡画像。マゼンタはクロロフィル自家蛍光, 緑色は液胞膜マーカーを示す。無処理区では液胞内に何も検出されないが, 強光処理区では, 複数の葉緑体が液胞内に局在している (A)。オートファジー欠損株 (*atg5*) では, 強光処理区においても葉緑体は液胞内に移行しない (B)。

(C) 葉緑体ストロママーカー (RBCS-RFP) および液胞マーカー (GFP- δ TIP) を発現する形質転換体の葉肉細胞の顕微鏡画像。マゼンタはクロロフィル自家蛍光, 緑色は各種マーカーを示す。ストロマ成分を失った葉緑体は液胞内に局在する (矢じり)。

(D) 破線上の蛍光強度。矢じりで示した葉緑体は, 液胞膜の内側に局在する。スケールバーは 10 μ m。

および Suppressor of PPI Locus 1 (SP1; Ling et al., 2012) の 2 種類が報告されている。PUB4 は, 活性酸素種のひとつである一重項酸素が蓄積した葉緑体を選択的にユビキチン化するが, その後は細胞質内で小球状の液胞様構造を形成し, その場で葉緑体が分解される様子が観察されている (Woodson et al., 2015)。また, SP1 は葉緑体包膜に局在し葉緑体内部へのタンパク質インポートを担うトランスロコン TIC-TOC 複合体の TOC タンパク質をユビキチン化し, 26S プロテアソームによる分解を誘導する (Ling et al., 2012)。これら 2 種類のユビキチンリガーゼの挙動からは, クロロファジーの誘導とは別経路で機能していることが想定されるが, 未知のユビキチンリガーゼが関与していることも考えられるため, ユビキチン化のクロロファジーへの関与はさらに解析し

ていく必要がある。また、ミトコンドリアと葉緑体には、ATP 生産のための膜電位の性質や膜構造に大きな違いがあるため、葉緑体を対象とするクロロファジー独自の機構の解明を進めるためには、ミトコンドリアの例にならうだけでない未知のトリガー・レセプタータンパク質同定を試みる必要があるかもしれない。

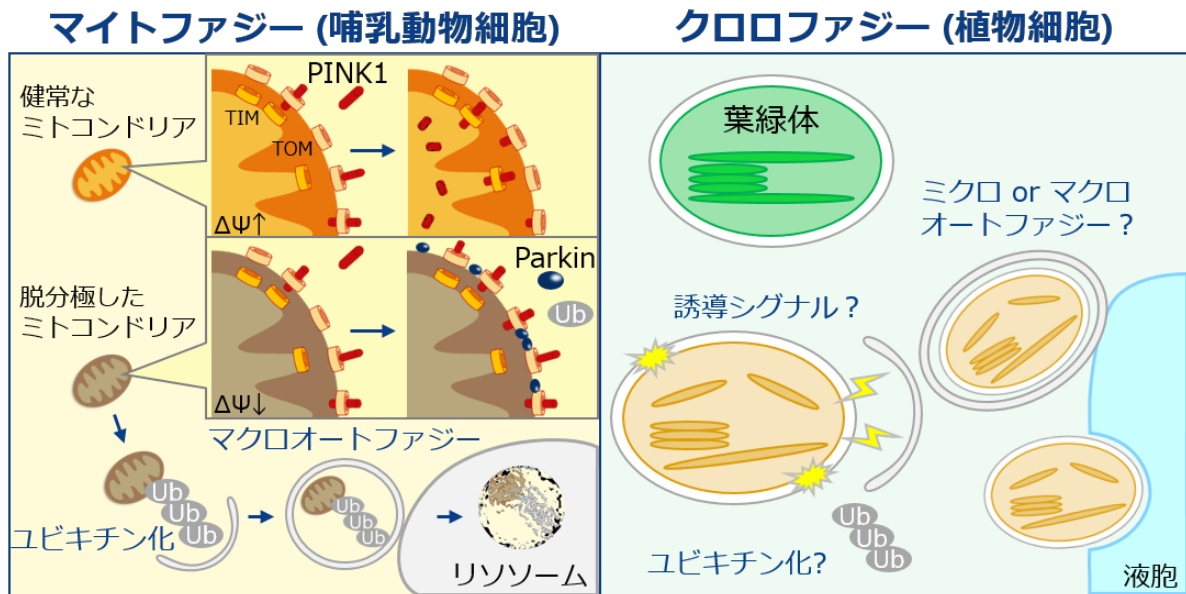


図 4. 選択的マイトファジーの誘導メカニズムから考えられるクロロファジーの駆動モデル

動物細胞では、PINK1 は恒常的に発現しているが健全なミトコンドリアでは膜電位依存的にミトコンドリア内腔に輸送され、プロテアーゼにより分解される。一方、脱分極した、つまり膜電位を失ったミトコンドリアでは、内腔へのタンパク質移行も阻害されることで、外膜上に PINK1 が蓄積する。PINK1 によるユビキチンのリン酸化がトリガーとなり、Parkin が脱分極ミトコンドリア上に誘導され、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。ユビキチン化されたミトコンドリアは、オートファゴソームによって選択的に隔離・分解される。よってクロロファジーにおいても、特定の状態に陥った葉緑体を認識するトリガータンパク質や、ユビキチン化が関与することが予想されるが、その実態はまだ不明である。

一般的なオートファジーは、輸送体オートファゴソームを介して基質を輸送し、分解するマクロオートファジーの経路をとっている。葉緑体オートファジーについては、これまでに葉緑体の一部が分解される RCB 経路と、葉緑体を丸ごと液胞へと除去するクロロファジーの 2 経路が知られている。RCB 経路では、一般的なマクロオートファジーと同様に、直径 1 μm ほどのオートファゴソームを形成して、葉緑体の成分が液胞内へと輸送される (Ishida et al., 2008)。一方で、直径 5 μm ほどもある葉緑体を丸ごと除去するクロロファジーでは、マイクロオートファジー様の輸送経路が働くことが示唆された (Nakamura et al., 2018)。マイクロオートファジー経路の解析が進んでいるメタノール資化性酵母 *P. pastoris* では、ATG8 オルソログである Paz2 が、MIPA (micropexophagy-specific membrane apparatus) と呼ばれる構造体を形成することが知られている。この経路では、まず液胞膜が基質を取り込むために大きく陥入し、基質の大部分を包み込んだ後、MIPA が蓋のように液胞膜をつなぎ合わせることで、液胞内への基質取り込みを可能にしている (Mukaiyama et al., 2004)。これまでの解析で、クロロファジーにおいても ATG8 が分解対象の葉緑体に部分的に蓄積することが示されている (Izumi et al., 2017; Nakamura et al., 2018) が、その具体的な役割は明らかとなっていない。

また、部分分解を担う RCB 経路と葉緑体を丸ごと分解するクロロファジーの、2つのオートファジー経路は、環境ストレスに応じた使い分けがなされている可能性が高い。上記で述べたように、栄養飢餓においては RCB 経路が優先的に活性化されるが、光障害においてはクロロファジーが積極的に誘導される。一方で、葉の老化後期においては、RCB 形成が活発に誘導されたことで縮小した葉緑体がクロロファジーによって分解されると考えられている (Wada et al., 2009)。このような、環境ストレスに対応した葉緑体オートファジーの使い分けのメカニズムは、未だ明らかとなっていないが、何を誘導シグナルとして2経路を使い分けて駆動させているのかといった点は非常に興味深い (Izumi and Nakamura, 2018)。

ごく最近我々は、クロロファジーが強光障害によって生じる膨張した葉緑体を識別して除去していることを見出した (Nakamura et al., 2018)。今後は、その識別メカニズムの解明を進めると共に、RCB による部分分解の仕組みにも焦点を当て、両経路の制御系の違いについても明らかにしていきたい。この研究が進むことで、光合成生物に特異なオルガネラである葉緑体のオートファジーを介した分解機構の全容を理解することができると考えている。

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 17H05050・代表：泉, 18H04852・代表：泉, 16J03408・代表：中村), JST さきがけ (課題番号：JPMJPR16Q1・代表：泉) の支援を得て遂行した。また、ストロマ移行性 GFP 発現株、ストロマ移行性 RBCS-RFP 発現株、オートファジー欠損株 *atg5* は、それぞれ、Cornel 大学・Maureen R. Hanson 博士、東北大学・石田宏幸博士、明治大学・吉本光希博士から分与いただいたものである。

引用文献

- Aro, E.M., Virgin, I., Andersson, B. 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134
- Barber, J., Andersson, B. 1992. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17: 61-66
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A., Mae, T. 2003. Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 44: 914-921
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S., Somerville, C.R. 2000. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 3718-3723
- Green, D.R., Galluzzi, L., Kroemer, G. 2011. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333: 1109-1112
- 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., Izumi, M., Wada, S., Makino, A. 2014. Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochim. S. Nakamura & M. Izumi*—8

Biophys. Acta 1837: 512-521

- 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., Makino, A., Ishida, H. 2013. Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 161: 1682-1693
- 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
- Izumi, M., Nakamura, S. 2018. Chloroplast protein turnover: The influence of extraplastidic processes, including autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 828
- Kanki, T., Furukawa, K., Yamashita, S. 2015. Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta* 1853: 2756-2765
- Kato, Y., Sun, X., Zhang, L., Sakamoto, W. 2012. Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 159: 1428-1439
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* 5: 539-545
- Kohler, R.H., Cao, J., Zipfel, W.R., Webb, W.W., Hanson, M.R. 1997. Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science* 276: 2039-2042
- Li, W.W., Li, J., Bao, J.K. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol. Life Sci.* 69: 1125-1136
- 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, Y.M., Bassham, D.C. 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 215-237
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., Tanaka, K. 2010. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* 189: 211-221
- Mizushima, N., Komatsu, M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728-741
- Mukaiyama, H., Baba, M., Osumi, M., Aoyagi, S., Kato, N., Ohsumi, Y., Sakai, Y. 2004. Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure. *Mol. Biol. Cell* 15: 58-70
- 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., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. 2009. Dynamics and diversity in autophagy
S. Nakamura & M. Izumi—9

- mechanisms: Lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 458-467
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., Youle, R.J. 2010. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8: e1000298
- Nishimura, K., Kato, Y., Sakamoto, W. 2017. Essentials of proteolytic machineries in chloroplasts. *Mol. Plant* 10: 4-19
- Ohsumi, Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 211-216
- Ono, Y., Wada, S., Izumi, M., Makino, A., Ishida, H. 2013. Evidence for contribution of autophagy to rubisco degradation during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 36: 1147-1159
- Takahashi, S., Badger, M.R. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 16: 53-60
- Takahashi, S., Murata, N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* 13: 178-182
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., Ohsumi, Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119: 301-311
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., Magrane, J., Moore, D.J., Dawson, V.L., Grailhe, R., Dawson, T.M., Li, C., Tieu, K., Przedborski, S. 2010. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 378-383
- 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
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., Makino, A. 2009. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.* 149: 885-893
- 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
- Yoshimoto, K. 2012. Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol.* 53: 1355-1365
- Youle, R.J., Narendra, D.P. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 9-14