「植物オートファジー研究の第二の夜明け」

オーガナイザー

吉本光希¹,朽津和幸² ¹明治大学 農学部 生命科学科 〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1 ²東京理科大学 理工学部 応用生物科学科/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

Kohki YOSHIMOTO¹ & Kazuyuki KUCHITSU² Second dawn of plant autophagy research

¹Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University Higashi-mita 1-1-1, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa 214-8571, Japan
²Department of Applied Biological Science & Imaging Frontier Center, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan DOI: 10.24480/bsj-review.9a1.00127

かつて日本植物学会の専務理事を務められ 2007 年に日本植物学会賞学術賞を受賞された 大隅良典先生が、「オートファジーのメカニズムの発見」により 2016 年 10 月にノーベル生理 学医学賞を受賞され、オートファジー研究が脚光を浴びたのは記憶に新しい。しかしオート ファジーという現象は、半世紀以上も前から見出されていた。1960 年前後、小胞体 (ER) や ミトコンドリアといったオルガネラやリボソームなど細胞質成分を含む膜小胞が透過電子顕 微鏡により観察され、さらに、それらが飢餓条件に伴って消化されつつある像が得られた。 細胞質成分が小胞としてリソソームと融合し分解される一連の過程を「オートファジー」、そ して、その小胞を「オートファゴソーム」と、やはり 1974 年にノーベル生理学医学賞を受賞 した Christian de Duve が命名したのは、今から 50 年以上前の 1963 年のことである(de Duve、 1963; Yang & Klionsky, 2010)。しかしながら、その過程の分子機構や生理的役割は、長年ほと んど明らかになっていなかった。

突破口を開いたのは、大隅教授による出芽酵母を用いた遺伝学的解析である(Tsukada & Ohsumi, 1993)。栄養飢餓条件下で酵母の液胞内の分解を止めると、液胞内に多くの顆粒、オートファジックボディが蓄積するが、オートファジーに異常をきたすと全く蓄積しない。このような変異体を酵母において探すことで現在までに 18 個もの *ATG* 遺伝子が単離された

(Mizushima et al. 2011)。これら遺伝子がコードする主要 ATG タンパク質は酵母から動植物 まで真核生物に広く保存されていることが明らかとなり、オートファジー研究の夜明けを迎 えることとなった。オートファジーを駆動する分子・ATG タンパク質の発見により、オート ファジー研究は飛躍的に進展し、飢餓応答における栄養の供給源としての役割に加え、動物 分野では不良タンパク質・オルガネラの浄化による細胞内品質管理、癌化抑制、細胞内感染 病原菌の分解など、オートファジーの多彩な機能が次々と明らかになった。

K. Yoshimoto & K. Kuchitsu-1

このようにオートファジー研究が脚光を浴びる一方で,植物のオートファジー研究は未だ 発展途上である。しかし最近,オートファジーを介した馴化・適応機構や発生の制御におい て,動物界と共通する基本コンポーネントを利用しつつも,植物独自のユニークな機能や役 割が存在することが次々と報告されつつあり,数少ない我が国の研究者の貢献も大きい。植 物オートファジー研究もようやく第二の夜明けを迎えたといえよう。

これまで植物のオートファジーを研究する研究者が一同に会する場や、討論の場はほとん ど設けられて来なかった。研究者人口が少なく、分野・世代を超えたつながりが弱いことが、 植物オートファジー研究の遅れの一因とも考えられる。そこで、2017年9月に東京理科大学 野田キャンパスで開催された日本植物学会第81回大会において、若手研究者や学生に植物オ ートファジーの魅力を知ってもらい、理解を深めてもらうことを目的として、シンポジウム 「植物オートファジー研究の第二の夜明け」を企画した。大学院生やポスドクを含む若手研 究者を中心に、大隅先生を含む老若男女の植物オートファジー研究者が集結して、植物オー トファジーの多様性とその高次機能について集中的かつ活発な議論が行われた。本総説集は、 その内容を基にして、最新の知見を加えて、植物におけるオートファジー研究をわかりやす く取りまとめたものである。研究者を目指す若者の減少と基礎科学の危機が叫ばれる中で、 本総説集が、生命の根幹となり得るオートファジーという細胞内現象の面白さを多くの方々 が知るきっかけとなり、植物オートファジー研究、そして生命科学や基礎科学の発展に少し でも貢献できれば幸いである。

引用文献

- de Duve, C. 1963. in *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*. A.V.S. de Reuck and M.P. Cameron, editors. London, J., and A. Churchill, Ltd.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27:107-132.
- Tsukada, M. & Ohsumi, Y.: Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett., 333, 169-174 (1993)
- Yang, Z. & Klionsky, D. J. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.*, 12: 814-822.

植物オートファジーの生理的意義 ~植物独自の機能の解明を目指して~

篠崎大樹,井上和也,吉本光希 明治大学 農学部 生命科学科 〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

Daiki Shinozaki, Kazuya Inoue & Kohki Yoshimoto Physiological meanings of autophagy in plants ~aiming to elucidate plant specific functions of autophagy~

Key words: Autophagy, Nutrient, Environmental response, Quality control Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University Higashi-mita 1-1-1, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa 214-8571, Japan DOI: 10.24480/bsj-review.9a2.00128

1. はじめに

オートファジーは、ユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ、真核細胞内の主要な分解メカ ニズムのひとつである。その過程は、細胞内に生じた隔離膜が伸長し、分解対象物を内包し たオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜で覆われた構造が形成され、これを分解コンパ ートメントに輸送することで内容物をオートファゴソーム内膜ごと分解するマクロオートフ ァジー、および、分解コンパートメントを形成する膜が窪むことで細胞質の一部を膜内部に 取り込み分解するミクロオートファジーに大別される(図1)。主要なオートファジー経路で あるマクロオートファジーはオートファジー関連(AuTophaGy-related, ATG)タンパク質によ り駆動される。分解コンパートメントは、動物細胞ではリソソーム、酵母や植物細胞では液 胞に相当し、生物種間で形態的な違いが観察されるものの、ATGタンパク質により駆動され るコアマシナリーは多様な真核生物において広く共通したものであることが知られている。 一方、ミクロオートファジーはこれとは別の機構により駆動されていると考えられるが、特 に植物においては、その分子機構や生理的意義はほとんど明らかとなっていない。

オートファジーの主要な役割としては、第一に栄養成分の再利用の促進が挙げられる。細 胞内の成分を分解して得た物質を用いて新規の成分の合成を行うことは生物において構成的 な過程であり、特に栄養飢餓条件下において重要なプロセスとなる。これに加え、オートフ ァジーは細胞内構造物の品質管理を担うという一面も持つ。細胞内の障害オルガネラや異常 なタンパク質凝集体等を分解することにより、これら有害物が細胞内に蓄積しないようにす る働きを担っている。本稿では植物におけるこれらオートファジーの役割について、栄養供 給と品質管理の両面から最新の知見を紹介する。

2. オートファジー活性の制御機構

オートファジーは通常基底レベルの活性を保っているが、特定の条件下において、その活 性が大きく上昇することが知られている。例えば、窒素欠乏時の劇的なオートファジー誘導 は多様な生物種において顕著であり、不要なタンパク質の分解によりアミノ酸を供給すると D. Shinozaki, K. Inoue & K. Yoshimoto-1



図1.植物細胞におけるオートファジーの概略とオートファジックボディーの観察

左は,植物細胞におけるマクロオートファジーとミクロオートファジーの過程の概略。マクロオートフ ァジーでは、細胞質に生じた隔離膜が伸長し、最終的に分解対象物を内包した脂質二重膜の特徴的なオル ガネラ、オートファゴソームを形成する。オートファゴソームの外膜は液胞膜と融合し、内膜と内容物が 液胞内へ放出され、オートファジックボディーとなる。オートファジックボディーは通常、液胞内の分解 酵素により速やかに消化される。液胞膜に局在する H⁺-ATPase (V-ATPase)の阻害剤であるコンカナマイ シンAを作用させると H⁺の液胞内への能動輸送が阻害され、液胞内の pH が上昇し、分解酵素活性が阻 害されるため、液胞内腔にオートファジックボディーが蓄積する様子を観察できる。右は、コンカナマイ シン A 処理後のシロイヌナズナの根の微分干渉検鏡像。野生型 (Col-0)ではオートファジックボディー (図中矢印およびその他顆粒状構造)の蓄積が観察される一方で、オートファジー関連遺伝子の欠損変異 体 (例として atg5 を挙げた)はオートファジックボディーが観察されない。スケールバーは 20 μm。

いう役割を持つ。これは、飢餓条件下で細胞が生存するための重要な過程において、オート ファジーが広く共通したシステムとして機能していることを示している。そのため、栄養欠 乏はオートファジー研究で広く用いられる条件として定着している。

オートファジー誘導機構については, Target Of Rapamycin (TOR) キナーゼを介した制御機 構が唯一既知のオートファジー活性を統括する主要な機構であり、多様な誘導シグナルを集 約して細胞内のオートファジー活性を調整していると考えられている。TOR キナーゼは富栄 養条件下において、ATG1 複合体の形成を阻害することでオートファジーを負に制御してい る (Mizushima et al. 2011)。ATG1 複合体の構成については生物種で差が見られるものの, TOR キナーゼによる負の制御を受ける点は共通している。シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) においても, RNAi による TOR キナーゼのノックダウンによりオートファジー活性が亢進す ることが示されている (Liu & Bassham 2010)。TOR キナーゼは TORC1 と呼ばれる複合体を形 成し、活性状態の TORC1 は ATG13 を高リン酸化することで ATG1 との相互作用を妨げ、 ATG1 複合体の形成を阻害する。植物の TORC1 の構成の全容は不明であるが、シロイヌナズ ナにおいて、哺乳類の TORC1 サブユニットのホモログの一部が同定されている (Zientara-Rytter et al. 2016)。植物において, TOR キナーゼの上流で機能する因子としては, 動物の AMPK 及び酵母の Snf-1 のオーソログである SnRK1 が知られている。SnRK1 のサブユニットである KIN10 の過剰発現体シロイヌナズナが野生型より顕著なオートファジー活性の上昇を示し、 kin10 変異体でオートファジー活性上昇が妨げられた。加えて、SnRK1 の阻害は活性化した TOR キナーゼによるオートファジーの抑制を阻害せず, TOR キナーゼが既に活性化状態にあ る場合SnRK1の活性上昇はオートファジー活性上昇を引き起こさなかった。これらのことは、 植物において SnRK1 が TOR キナーゼの上流でオートファジーの正の制御因子として機能し

ていることを示している (Soto-Burgos & Bassham 2017)。

3. オートファジーによる環境応答

酵母における *ATG* 遺伝子の同定 (Tsukada & Ohsumi 1993, Thumm et al. 1994) がブレイクス ルーとなり, オートファジー研究が躍進したことは植物においても例外ではない。酵母の ATG タンパク質のアミノ酸配列をもとに,シロイヌナズナにおいても *ATG* 遺伝子の同定が進み (Hanaoka et al. 2002), *ATG* 遺伝子がノックアウト (KO) された T-DNA 挿入変異体が同定さ れ (Doelling et al. 2002, Hanaoka et al. 2002, Yoshimoto et al. 2004, Thompson et al. 2005), それら を用いオートファジー不能植物の特徴的な表現型が明らかとされてきた。シロイヌナズナ *ATG* 遺伝子の多くはゲノム中に複数ホモログが存在するため,そのうちの1つを KO したと してもオートファジー不能にならないが, *ATG2* や *ATG5* といった 1 コピーしか存在しない *ATG* 遺伝子の KO 変異体を同定することでオートファジー不能植物 (*atg* 変異体) の作出が可 能となった。これらの植物は老化が促進されることに加え,様々な環境ストレスに対する耐 性が低いことが明らかとなっている。

オートファジーが誘導される条件として最も顕著なものは前述の通り、栄養飢餓であり、 植物においても窒素や炭素の欠乏はオートファジー観察の基本的な実験手法として定着して いる。GFP-ATG8 を用いたオートファゴソームの可視化により栄養飢餓時にオートファジー 誘導が観察される (Merkulova et al. 2014) ことに加え、窒素欠乏により atg 変異体の生育が顕 著に阻害された (Yoshimoto et al. 2004) ことは、植物においても飢餓応答にオートファジーが 重要な役割を果たしていることを意味している。オートファジーは細胞内の多様な構造物を 分解対象としているため、窒素や炭素の欠乏に加え、他の植物必須栄養素に関してもその恒 常性維持に重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。近年、酵母において微量必 須金属元素の亜鉛欠乏が非選択的なオートファジーを誘導し細胞内の亜鉛再利用に寄与して いることが報告され (Kawamata et al. 2017) 、オートファジーによる分解対象元素の幅広さが 明らかとなりつつある。亜鉛欠乏によるオートファジー誘導は植物においても観察されるこ とに加え、シロイヌナズナの atg 変異体が亜鉛欠乏条件下において顕著な成育阻害 (生育遅延 とクロロシス) を受けたことは、植物においても亜鉛恒常性維持にオートファジーが重要な 役割を果たしていることを示唆している (著者ら、未発表)。

その一方で、植物において、栄養素の欠乏以外にも様々な環境ストレスがオートファジー を誘導することが報告され、オートファジーによる環境適応の知見が蓄積されつつある。例 えば、塩ストレスがオートファジー誘導条件として知られる。Luo et al. (2017) は NaCl 処理 後 30 分という早期の時点でオートファジー活性のピーク (オートファゴソーム数の増加) が 見られることを明らかとした。しかし、一般的な栄養素欠乏によるオートファジー活性のピ ークはこれより遅く、欠乏移行後数時間後に観察されることが多い。atg 変異体は塩ストレス 耐性が低下していることに加え、NaCl 処理後に酸化タンパク質が野生型より多く蓄積してい た。さらに、液胞内への Na イオンの蓄積量が atg 変異体では野生型より少なく、ATG8 の過 剰発現体植物 (ATG8-OX) でこの蓄積量が増加することに加え、ATG8-OX は野生型より塩ス トレス耐性が向上していることが明らかとされ、オートファジーが塩ストレス耐性機構の一

端として重要な機能を果たしていることが判明した。加えて、乾燥ストレスや浸透圧ストレス、酸化ストレス耐性に関しても同様にオートファジーが機能していることが報告されている (Liu et al. 2009, Xiong et al. 2007)。これらは代表的なモデル植物であるシロイヌナズナを用いた実験であるが、トマトにおいて高温ストレス耐性にオートファジーが機能していることが報告されているように (Zhou et al. 2014) 、農作物における知見も蓄積しつつある。

これらストレス条件下におけるオートファジーの機能としては、細胞内に生じた損傷オル ガネラや機能不全タンパク質といった障害物あるいは有害物を分解することによる細胞内環 境の維持によるストレス耐性の向上が想定されるが、ストレス条件下において細胞膜のアク アポリンをオートファジーにより分解している例があるように (Hachez et al. 2014),特定の 分解ターゲットを選択的に分解することにより様々な環境適応がなされている可能性も指摘 できる。Pu et al. 2017 は、TOR キナーゼの過剰発現体シロイヌナズナにおいて、栄養飢餓、 塩ストレス、および浸透圧ストレス条件下のオートファジー活性上昇が阻害される一方で、 酸化ストレスや ER ストレス条件下ではオートファジーを阻害しないことを報告している。 このことは、ストレスによるオートファジー活性上昇はその誘導機構に関してもストレスの 種類に応じた使い分けがなされていることを意味している。

オートファジー誘導による環境応答の研究が進むにつれ,植物がオートファジーを活用す ることで多彩なストレス状況に適応していることが明らかとなってきた。オートファジーの メカニズムの誕生は真核細胞の誕生と時を同じくするほどに生物の進化の初期段階にあると 思われる。ゆえに,植物独自のオートファジーを介した環境応答機構の存在は,植物が過酷 な環境で生き残り,進化していく過程で独自にオートファジーを活用・発展させてきた証拠 であると言えよう。誘導型植物オートファジーの研究は,最も繁栄した固着性の生物である 植物の巧妙な進化を理解することにつながる上に,農作物への応用も期待され,今後の進展 が望まれる。

4. オートファジーによるオルガネラ品質管理

4-1. ペキソファジー

植物において、ペルオキシソームは機能によりグリオキシソームと緑葉ペルオキシソーム、 茎や根に存在するペルオキシソームに分けられる。グリオキシソームは発芽時に脂質からグ ルコースを生産し、発芽において重要な働きをしている。一方で、緑葉ペルオキシソームは 葉緑体、ミトコンドリアとともに光呼吸に働いている。シロイヌナズナのオートファジー欠 損体は野生型と比較して緑葉ペルオキシソームが多く蓄積する。したがって、オートファジ ーは光合成組織において、ペルオキシソームを積極的に分解していると考えられる。さらに オートファジー欠損体では不溶性の低活性カタラーゼが多く蓄積し、酸化し機能不全となっ た緑葉ペルオキシソームの凝集体が観察される。これより、ペキソファジーは緑葉ペルオキ シソームの品質管理を行っていると考えられる。また、低活性カタラーゼが蓄積していると 考えられる Electron Dense region (ED) 特異的に隔離膜が結合すること、オートファゴソーム 膜上に局在する ATG8 と ED が共局在することから ATG8 が選択的に ED を認識し、隔離膜を 異常ペルオキシソームへリクルートしていると思われ、ペルオキシソーム膜上に ATG8 と f

ンタラクトするレセプタータンパク質またはアダプタータンパク質が存在すると考えられている。

哺乳類ペキソファジーではユビキチン化されたペルオキシソームタンパク質を認識した Neighbor of BRCA1 gene 1 protein (NBR1; カーゴレセプター) が ATG8 と結合することでオ ートファジーに選択性を与えていると考えられている (Deosaran et al. 2013)。しかし, 植物に おいて, ユビキチン化と NBR1 はペキソファジーの選択性に関与していないと考えられ, 植 物ペキソファジーのメカニズムは哺乳類と異なると考えられている (Yoshimoto et al. 2014)。 また酵母においてペキソファジーアダプターである ATG30, ATG36 は植物に保存されていな い。これらを踏まえると植物ペキソファジーのレセプターないしアダプターは植物特有であ ると考えられる。しかし, それらタンパク質の同定には至っておらず, 詳しい分子機構は明 らかとなっていない。

4-2. 葉緑体とオートファジー

|葉緑体がオートファジーを介して分解される経路は主に 4 つ報告されている。1 つは葉緑 体から出芽した Rubisco-Containing bodies と呼ばれるストロマタンパク質を含む小胞を分解基 質としたマクロオートファジー経路である (Ishida et al. 2008)。この経路は炭素飢餓条件にお いて誘導され,暗条件下や弱光下での一時的な炭素供給源であると考えらえている (Izumi et al. 2010)。2 つ目はストロマタンパク質やチラコイドを含む ATG8-INTERACTING PROTEIN1 Bodies を介したオートファジー経路であり、この経路は塩ストレスにより誘導されると考え られている(Michaeli et al. 2014)。3 つ目は SSLG (small starch granule-like structure) を取り囲む オートファジー経路であり、炭素飢餓により誘導される経路である。4つ目は葉緑体全体を分 解基質とするオートファジー (クロロファジー) である。 葉緑体は光合成の過程において, 光 エネルギーを化学エネルギーへと変換するが、その光エネルギーが大きいと光合成の過程に おいて活性酸素種が発生し、ダメージを受ける。クロロファジーはそれら UV-B や強光、太 陽光による光障害を受けた葉緑体全体を分解基質とし、品質管理の役割を担うと考えられて いる。RCBs 経路とクロロファジーの誘導はそれぞれ異なる上流の制御機構によるものである と考えられている (Izumi & Nakamura. 2017)。これら4つのオートファジー経路の詳しい分子 機構は明らかとなっていない。詳しくは以降の中村咲耶氏、泉正範氏らの「壊れた葉緑体は オートファジーで丸ごと除去される」を参照されたい。

4-3. マイトファジー

植物には酵母でのマイトファジーレセプターである Atg32 および,哺乳類でのレセプター のホモログは見つかっていない。また、シロイヌナズナにおいて、マイトファジーに ATG11 が必要であると報告されている (Liu et al. 2014)。しかし、ATG11 は非選択的なオートファジ ーにも必要であるとされ、選択性を付与するものであるとの報告はない。筆者らの知る限り では、植物において、ミトコンドリアの品質管理にオートファジーが関与するとの報告は今 のところない。

4-4. ER ファジー

チュニカマイシンやジチオトレイトール処理による小胞体ストレス条件下において、オートファジーが誘導されることが報告されている。また、この小胞体ストレス誘導型オートファジーの誘導には小胞体ストレスセンサーの1つである INOSITOL- REQUIRING ENZYMElb (IRE1b) が必要であると考えられているが、IRE1b のスプライシングターゲットである bZIP60 は誘導に関与しておらず、IRE1b の機能は未知である (Liu et al. 2012)。加えて、ER ス トレス誘導型オートファジーは ER に変性タンパク質が蓄積することで活性化することが明 らかとなっており、熱ストレスによるオートファジーの活性にも IRE1b が一部関与している と考えられている (Yang et al. 2016)。また、炭素飢餓条件において、植物特異的な Atg8interacting Proteins (ATI) を持つ小胞が ER から液胞へと運ばれており、タンパク質の選択的代 謝に働くと考えられている (Honing et al. 2012)。しかしながら、ER ファジーが通常生育条件 下で起こっているのかはまだ分かっていない。



5. おわりに

酵母における ATG 遺伝子の単離・同定に端を発したオートファジー研究は、その後、爆発 的に進展し、ヒトの疾患との関連性に注目が集まるなど、多様な真核生物において興味深い 研究テーマとして定着しつつある。植物のオートファジー研究は酵母や動物の後塵を拝して いる面は否めないものの、近年の研究により植物特異的な面が次々と明らかとなってきてい る。今後、植物特有の機構の更なる理解により、植物の巧みな環境応答システムとその進化 の過程が解明されることを期待したい。

6. 引用文献

Deosaran, E., Larsen, KB., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., Brech, A., Johansen, T., & Kim, P.K. 2014. NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci.* 126: 939-952.

Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R., & Vierstra, R.D. 2002. The APG8/12-

activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 277: 33105-33114.

- Hachez, C., Veljanovski, V., Reinhardt, H., Guillaumot, D., Vanhee, C., Chaumont, F., & Batoko, H. 2014. The *Arabidopsis* abiotic stress-induced TSPO-related protein reduces cell-surface expression of the aquaporin PIP2;7 through protein-protein interactions and autophagic degradation. *Plant Cell* 26: 4974-4990.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., & Ohsumi, Y. 2002. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol.* 129: 1181-1193.
- Honing, A., Avin-Wittenberg, T., Ufaz, S., Galili, G., 2012. A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. *Plant Cell.* 24: 288-304.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hansen, M.R., & Mae, T. 2008. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteinsof chloroplasts to the vacuole by an *ATG* gene-dependentautophagic process. *Plant Physiol*. 148: 142-155.
- 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. 2017. Partial or entire: Distinct responses of two types of chloroplast autophagy. *Plant Signal. Behav.* 12: e1393137.
- Izumi, M., Wada, S., Makino, A., & Ishida, H. 2010. The autophagic degradation of chloroplasts via rubiscocontaining bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 154: 1196-1209.
- Kawamata, T., Horie, T., Matsunami, M., Sasaki, M., & Ohsumi, Y. 2017. Zinc starvation induces autophagy in yeast. J Biol Chem. 292: 8520-8530.
- Li, F., Chung, T., & Vierstra, D.R. 2014. AUTOPHAGY-RELATED-11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant cell*. 26: 788-807.
- Liu, Y., & Bassham, D.C. 2010. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 5: e11883.
- Liu, Y., Burgos, S. J., Deng, Y., Srivastava, R., & Howell, H.S. 2012. Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis*. *Pant Cell*. 24: 4635-4651.
- Liu, Y., Xiong, Y., & Bassham, D.C. 2009. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* 5: 954-963.
- Luo, L., Zhang, P., Zhu, R., Fu, J., Su, J., Zheng, J., Wang, Z., Wang, D., & Gong, Q. 2017. Autophagy is rapidly induced by salt stress and is required for salt tolerance in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* 8: 1459.
- Merkulova, E.A., Guiboileau, A., Naya, L., Masclaux-Daubresse, C., & Yoshimoto, K. 2014. Assessment and optimization of autophagy monitoring methods in Arabidopsis roots indicate direct

fusion of autophagosomes with vacuoles. Plant Cell Physiol. 55: 715-726.

- Michaeli, S., Honig, A., Levanony, H., Peled-Zehavi, H., & Galili, G. 2014. Arabidopsis ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plactid proteins to the vacuole. *Plant Cell*. 26: 4084-4101.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 107-132.
- Pu, Y., Luo, X., & Bassham, D.C. 2017. TOR-dependent and -independent pathways regulate autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 8: 1204.
- Soto-Burgos, J., & Bassham, D.C. 2017. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 12: e0182591.
- Thompson, A.R., Doelling, J.H., Suttangkakul, A., & Vierstra, R.D. 2005. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the *ATG8* and *ATG12* conjugation pathways. *Plant Physiol*. 138: 2097-2110.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., & Wolf, D.H. 1994. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 349: 275-780.
- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333: 169-174.
- Wang, Y., Yu, B., Zhao, J., Guo, J., Li, Y., Han, S., Huang, L., Du, Y., Hong, Y., Tang, D., & Liu, Y. 2013. Autophagy contributes to leaf starch degradation. *Plant Cell*. 25: 1383-1399.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q., & Bassham, D.C. 2007. Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 143: 291-299.
- Yang, X., Srivastava, R., Howell, H.S., & Bassham, C.D. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress. 2016. *Plant J.* 85: 83-95.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. 2004. Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16: 2967-2983.
- Yoshimoto, K., Shibata, M., Kondo, M., Oikawa, K., Sato, M., Toyooka, K., Shirasu, K., Nishimura, M.,
 & Ohsumi, Y. 2014. Organ-specific quality control of plant peroxisomes is mediated by autophagy. *J. Cell Sci.* 127: 1161-1168.
- Zhou, J., Wang, J., Yu, J.Q., & Chen, Z. 2014. Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Front Plant Sci.* 5: 174.
- Zientara-Rytter, K., & Sirko, A. 2016. To deliver or to degrade an interplay of the ubiquitin-proteasome system, autophagy and vesicular transport in plants. *FEBS J.* 283: 3534-3555.

タバコ BY-2 細胞を用いた植物オートファジーの解析

井上悠子¹, 高塚千広², 森安裕二¹

¹埼玉大学大学院理工学研究科 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 255 ²東海大学短期大学部 〒420-8511 静岡市葵区宮前町 101 番地

Inoue-Aono Y¹, Takatsuka C², Moriyasu Y¹

The analysis of plant autophagy using tobacco BY-2 cells

Key words: autophagy, BY-2 cell, E-64c, 3-methyladenine, vacuole ¹Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, 255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama, 338-8570, Japan. ²Tokai University Junior College, 101 Miyamae-cho, Aoi-ku, Shizuoka-shi, Shizuoka, 420-8511, Japan. DOI: 10.24480/bsj-review.9a3.00129

1. はじめに

BY-2 細胞は, Nicotiana tabacum の品種であるブライトイエロー2 号に由来する培養細胞で ある。BY-2 細胞は,新しい液体培地に植え継いで4日目には対数増殖期となり,1週間ほど で定常期になる。比較的均一の細胞集団として増殖し,液体培地を置換することによって細 胞のおかれた栄養条件を変えることや,阻害剤を添加してその影響を解析することが容易で ある。そのため,私たちはBY-2 細胞を材料として,生化学的および形態学的手法を中心と した植物オートファジーの解析を行なってきた。

本稿では、これまでに私たちが報告してきたオートファジーによるタンパク質分解および リン脂質分解、オートファジー経路、液胞形成に関わる新奇のオートファジーについて紹介 する。

2. BY-2 細胞のショ糖飢餓処理と細胞構成成分の分解

BY-2 細胞において、細胞構成成分の自己分解を誘導するために、ショ糖欠乏培地に細胞を 移す方法が用いられている。BY-2 細胞は、3%のショ糖と植物ホルモンである 2,4-D を含む ムラシゲスクーグ液体培地中で維持されている。植え継ぎ 4 日目の対数増殖期の BY-2 細胞 を遠心により沈殿させて上清を捨て、ショ糖を含まない液体培地で懸濁して再度遠心する。 同様に上清をのぞいて、ショ糖を含まない液体培地で BY-2 細胞を懸濁すると、細胞培養液中 からショ糖をほぼ完全にのぞくことができる。培地中のショ糖をのぞくことで、BY-2 細胞内 のショ糖も直ちに枯渇することが分かっている(未発表)。ショ糖飢餓処理をしたのち、タン パク質やリン脂質などの細胞構成成分の分解について調べた。

2-1. タンパク質分解

BY-2 細胞をショ糖飢餓条件下におくと、細胞内の正味のタンパク質量は2日間で 50%にまで減少した(Moriyasu and Ohsumi 1996)。その際、細胞の生重量はほとんど変化が起こらなかった。また1日間のショ糖飢餓に応答して、細胞内のシステインプロテアーゼの活性が顕著に上がった。BY-2 細胞をショ糖飢餓処理した際に、システインプロテアーゼの阻害剤である

E-64c を最終濃度 10 μM で加えると、システインプロテアーゼ活性の上昇と正味のタンパク 質量の減少が抑えられた。これらのことは、BY-2 細胞ではショ糖の欠乏に応答して、活性が 高まったシステインプロテアーゼによって、正味のタンパク質のダイナミックな分解が起こ ることを示している。それではこのタンパク質の自己分解は、BY-2 細胞のどこで行われてい るのであろうか。出芽酵母では、栄養飢餓条件下においてセリンプロテアーゼの阻害剤であ る PMSF を添加してプロテアーゼ活性を阻害すると、液胞内に細胞構成成分を含む顆粒が蓄 積することが報告されている(Takeshige et al. 1992)。液胞は、植物において分解コンパートメ ントとしての役割を果たしているが、BY-2 細胞におけるタンパク質分解は、液胞で行われて いるのであろうか。

2-2.オートリソソーム

ショ糖飢餓処理をして E-64c を加えた BY-2 細胞を1日間培養したのち,光学顕微鏡下で 観察を行うと,主に核の周辺の細胞質に顆粒状の構造が多数蓄積するのが観察された。この 顆粒構造がタンパク質分解に関わる構造であることを確かめるため,組織化学染色を行う と,顆粒状の構造内部には酸性ホスファターゼが存在することが明らかになった。またこの 顆粒状構造は,キナクリンによって強く染色された。キナクリンは細胞内の酸性のコンパー トメントに蓄積し強い蛍光を発することが知られている。これらのことは,蓄積する顆粒は 内部が酸性であり,酸性ホスファターゼを含んだリソソーム様の構造であることを示唆して いる。さらに電子顕微鏡を用いてこの構造を観察すると,内部に電子密度の高い構造が含ま れていることが分かった。これらは分解途上の細胞小器官であり,このことから,このリソ ソーム様の構造は,オートファジーの結果として生じた"オートリソソーム"であると考え られた。すなわち,BY-2 細胞では、ショ糖飢餓に応答したタンパク質の分解が、オートリソ ソームで行われていることが示された。

オートリソソームの分解コンパートメントとしての性質をより確かにするため,酸性ホス ファターゼの活性をマーカーとして、オートリソソームの単離を行なった(Takatsuka et al. 2011)。植え継ぎ4日目のBY-2細胞にショ糖飢餓処理をして、E-64cを加えたものと溶媒コ ントロールをそれぞれ1日間培養したのち、酵素処理によって細胞壁を取り除いてプロトプ ラスト化した。プロトプラストをゆるやかに破砕して、パーコールの密度勾配を利用した細 胞分画法によって分画した。各画分の酵素活性をE-64cを加えたものと加えていないものと で比較すると、E-64cを加えた場合のみ得られる酸性ホスファターゼ活性のピークがあっ た。この酸性ホスファターゼ活性はオートリソソームに由来するものであると考えられた。 そこでこのオートリソソームに由来すると思われる画分をさらに解析すると、液胞型プロト ン ATPase やプロテアーゼが存在することが分かった。オートリソソーム膜上に液胞型プロ トン ATPase が存在するという考察は、オートリソソームの内部が酸性であるというキナク リン染色の結果を支持するが、液胞型プロトン ATPase がオートリソソームの内包物に含ま れている可能性もあり、膜上に存在するという証拠はまだ得られていない。しかしオートリ ソソームは、その内部に酸性ホスファターゼやプロテアーゼを持っていることから、分解コ ンパートメントとしての役割を担っていることが明らかになった。

また,オートリソソームの成り立ちをさらに解析するため,FM4-64による膜の蛍光染色 を行った(Yano et al. 2004)。植え継ぎ4日目のBY-2細胞にショ糖飢餓処理をして,E-64cを加 えたものと溶媒コントロールをそれぞれ培養した。1日後,それぞれの培養液にFM4-64を

加えた。添加した直後に観察を行うと、細胞膜のみが蛍光で染色されていた。1日間、26 ℃ で培養したのち観察を行うと、E-64c を加えたものではオートリソソームの膜上に FM4-64 の 蛍光が観察され、液胞膜への蛍光の移行は見られなかった。一方で、溶媒コントロールでは 液胞膜に FM4-64 の蛍光が移行しているのが観察された。このことは、エンドサイトーシス による細胞膜から液胞膜への移動の途中にオートリソソームが存在し、細胞膜からオートリ ソソームへの膜の移行が起こっていることを示している。

次に液胞膜を FM4-64 で染色した解析を行なった。植え継ぎ3 日目の BY-2 細胞に FM4-64 を加えて0 ℃で30 分間培養し、細胞膜を蛍光染色した。0 ℃で冷やしたまま遠心を行い、細胞を沈殿させて上清を捨て、FM4-64 を含まない培地で懸濁することで細胞培養液中から FM4-64 をのぞいた。その後、26 ℃で1 日間培養し、液胞膜のみが FM4-64 でラベルされた BY-2 細胞を得た。この細胞にショ糖飢餓処理をして、 E-64c を加えたものと溶媒コントロールとをそれぞれ1 日間、26 ℃で培養した。興味深いことに、ショ糖飢餓処理を行う前に は液胞膜に存在していた FM4-64 の蛍光は、E-64c 存在下で現れるオートリソソームの膜に移行していることが明らかになった。さらに液胞膜タンパク質である Gamma-VM23 や AtVam3 に GFP を結合したタンパク質を発現する株を用いて実験を行った。結合タンパク質を発現した BY-2 細胞をショ糖飢餓処理し、10 µM E-64c を添加すると、液胞膜に局在していた GFP 蛍 光がオートリソソーム膜に移行した。これらの結果は、オートリソソーム膜には、細胞膜および液胞膜からの供給があることを示しており、オートリソソームの起源を明らかにする上で重要な知見であると考えられる。

2-3. リン脂質分解

ショ糖飢餓条件下において、主要なリン脂質のひとつであるホスファチジルコリンの分解 が起こり、分解産物であるホスホリルコリンの蓄積が起こることがカエデの培養細胞を用い た研究により報告された(Aubert et al. 1996)。そこで BY-2 細胞を用いて同様の実験を行なっ た。植え継ぎ4日目の BY-2 細胞をショ糖飢餓処理して2日間培養すると、正味のリン脂質 の量は約50%にまで減少することが分かった(Inoue and Moriyasu 2006)。またホスファチジル コリンが70%近く減少し、同時にその分解産物であるホスホリルコリンの蓄積が起こった。 このダイナミックなリン脂質分解がオートファジーの経路を介しているかどうかを調べるた め、オートファジーの阻害剤である3-methyladenine (3-MA)を用いた。

3-MA は、哺乳動物においてオートファジーの阻害剤として見出された(Seglen and Gordon 1982)。その後、BY-2 細胞においてもオートファジーを阻害することが確かめられた (Takatsuka et al. 2004)。植え継ぎ4日目のBY-2 細胞にショ糖飢餓処理をして、最終濃度5 mM の 3-MA を加えたものと加えないものをそれぞれ1日間培養し、タンパク質量を測定する と、3-MA を加えたものでは正味のタンパク質分解が阻害された。また、ショ糖飢餓処理を した BY-2 細胞に、3-MA と E-64c を加えて1日間培養しても、オートリソソームの蓄積が起 こらなかった。このことは、3-MA の添加は BY-2 細胞のオートファジーを阻害することを示 している。

そこで、植え継ぎ4日目のBY-2細胞をショ糖飢餓処理して、3-MAを加えたものと加えて いないものをそれぞれ2日間培養してリン脂質量を測定した。ショ糖飢餓に応答して起こる リン脂質の減少に対し、3-MAを加えても影響は見られなかった。そこで正味のリン脂質の 分解機構を明らかにするため、リン脂質を蛍光標識する実験を行なった。BY-2細胞に、蛍光

標識した脂肪酸(BODIPY-FA)を取り込ませると、細胞内の膜リン脂質を蛍光標識することができる(Inoue and Moriyasu 2006)。リン脂質を蛍光標識した細胞をショ糖飢餓処理したのち観察すると、ショ糖飢餓1日間で蛍光が液胞内に移行することが分かった。ショ糖飢餓処理と同時に 3-MA を加えてもこの挙動に変化は見られなかった。このことは、リン脂質分解には液胞が関わっている可能性を示唆しているが、液胞への輸送経路はマクロオートファジーとは異なる経路を介していることを示唆しており、その分解機構については明らかではない。

3. BY-2 細胞のオートファジー経路

これまでに述べたように、BY-2 細胞のマクロオートファジー経路は出芽酵母のマクロオー トファジー経路と異なる点が存在する。BY-2 細胞のマクロオートファジー経路の模式図を図 1に示した。マクロオートファジーは大きく分けると、1)遊離の膜構造が伸長して細胞構成 成分を包み込み、二重膜構造を持つオートファゴソームが形成される、2)リソソーム・液胞 とオートファゴソームが融合する、3)構成成分を分解する、の3つのプロセスから成ってい る。出芽酵母では2)のプロセスにおいて、オートファゴソームの外膜と液胞膜が融合し、内 腹に細胞構成成分が包まれたオートファジックボディが液胞内に放出される(Takeshige et al. 1992)。しかし、BY-2 細胞では、マクロオートファジー経路においてオートファゴソームと 液胞膜の融合は起こらず、まず液胞外で一重膜構造を持つオートリソソームとなり、その 後、オートリソソームと液胞の融合が起こる。オートリソソームがどのようにして分解酵素 を獲得しているのかはまだ明らかではないが、液胞からの膜輸送が確認できることから、分 解酵素の小胞輸送が行われている可能性もあるのではないかと考えられる。



図1. BY-2 細胞のマクロオートファジー経路

4. 液胞形成とオートファジー

これまでの章で述べてきたのは主にマクロオートファジーについてであるが、この章では

マクロオートファジー以外のオートファジーと液胞形成の関わりについて述べる。

植物細胞の液胞は、分解や貯蔵の役割を担うオルガネラである。分裂直後の植物細胞には 液胞は存在せず、細胞が成長するのに伴って液胞がその体積を増して、細胞が成熟する頃に は細胞体積の9割を占める巨大なオルガネラとなる。しかし液胞を持たない分裂直後の細胞 において、液胞が何を起源としてどのように形成されるのかについては十分に理解されてい ない。

これまでに、トウダイグサ科の植物の根の細胞においてゴルジ体由来のチューブ状の構造 同士で融合が起こって、その内側に封入された細胞質が分解され、最初の液胞になるという 報告がなされている(Marty, 1978)。さらにアマの種皮細胞において、ER 由来の平らな膜構造 に封入された細胞質が分解され、液胞ができるという報告もある(Amelunxen et al. 1984)。 これらはいずれも電子顕微鏡を用いた観察によって得られた知見である。またシロイヌナズ ナを用いた研究で、液胞の前駆体構造は ER 由来であるという報告もある(Viottie et al. 2013)。いずれの場合も、細胞質成分の自己分解を伴って液胞が形成されるということが報告 されているので、広義のオートファジーによって液胞が形成されるということが報告 れているが、これらの株は野生株と同様に液胞を形成できていることから、液胞形成に関わ るオートファジーはマクロオートファジーとは区別して考えなければならない。

液胞形成に関わるオートファジーの詳細な機構についてはほとんど明らかになっていない ことから、私たちは BY-2 細胞を用いて液胞形成モデルを作成し、液胞形成機構の解析を行 った(Yano et al. 2007)。BY-2 細胞を, 酵素処理によって細胞壁を取り除いてプロトプラスト 化し、超遠心によって液胞を取り去ったミニプロトプラストを作成した。液胞を持たないミ ニプロトプラストは、1日間の培養で液胞を持つプロトプラストに戻った。この過程を詳細 に調べることによって、液胞形成の過程を明らかにしようと試みた。植え継ぎ5日目のBY-2 細胞からミニプロトプラストを調製して培養し、経時的に観察を行なった。培養1時間でニ ュートラルレッドによって染色される酸性の顆粒が細胞質に蓄積し始め、顆粒が次第に数を 増して集まり、液胞が形成された。ミニプロトプラストを培養する際に E-64c を加えると、 出来上がった液胞内に細胞構成成分の未分解物が蓄積することが電子顕微鏡で観察された。 このことは、液胞の形成過程には自らの構成成分の分解を伴っていることを示唆している。 さらに、E-64cを加える同時にマクロオートファジーの阻害剤である 3-MA を加えても、液 胞内における未分解物の蓄積および液胞の形成は阻害されなかった。すなわち液胞形成過程 で起こるオートファジーは、マクロオートファジーとは異なる経路であると言える。しかし ながら,オートファゴソームに局在することが知られているタンパク質 Atg8 と GFP の融合 タンパク質を発現させた BY-2 細胞株からミニプロトプラストを調製して培養を行うと、 Atg8-GFPの蛍光が形成過程の液胞内に局在することが分かった(未発表)。このことは、液 胞形成過程にマクロオートファジーは必須ではないが、その過程に何らかの関わりがあるこ とを示唆しており、今後、解析を進めていく予定である。

5. おわりに

遺伝子のノックアウト技術の発達とともに、オートファジー研究に用いられる植物材料も 実に多様になり、新たな知見が多く得られることが期待される。しかしながら本稿にも述べ たように、一細胞における形態的な解析や定量解析に向いている BY-2 細胞では、オートフ

rジーの基本的な機能に関する解析が比較的行いやすく,これを材料として明らかにできる 多くの疑問が残されていると感じる。

6. 引用文献

- Amelunxen, F. and Heinze, U.1984. Zur Entwicklung der vacuole in Testa-Zellen des Leinsamens. *Eur J. Cell Biol.*, 35: 343-354.
- Aubert, S., Gout, E., Bligny, R., Marty-Mazars, D., Barrieu, F., Alabouvette, J., Marty, F. and Douce, R. 1996. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by supply of mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell Biol.*, 133: 1251-1263.
- Inoue, Y. and Moriyasu, Y. 2006. Autophagy is not a main contributor to the degradation of phospholipids in tobacco cells cultured under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiol.* 47(4): 471-480.
- Inoue, Y. and Moriyasu, Y. 2006. Degradation of membrane phospholipids in plant cells cultured in sucrose-free medium. *Autophagy*. 2(3): 244-246.
- Marty, F. 1978. Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of Euphorbia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 75: 852–856.
- Moriyasu, Y. and Ohsumi, Y. 1996. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol.* 111: 1233-1241.
- Seglen, P. O. and Gordon, P. B. 1982. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 79: 1889-1892.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119: 301-311.
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Higuchi, T., Hillmer, S., Robinson, D. G. and Moriyasu, Y. 2011. Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: Isolation of the autolysosome and its characterization. *Plant Cell Physiol.* 52(12): 2074-2087.
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Matsuoka, K. and Moriyasu, Y. 2004. 3-Methyladenine inihibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiol.* 45(3): 265-274.
- Viotti, C., Krüger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., Scheuring, D., Boutté, Y., Frescatada-Rosa, M., Wolfenstetter, S., Sauer, N., Hillmer, S., Grebe, M. and Schumacher, K. 2013. The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell*. 25(9): 3434-3449.
- Yano, K., Hattori, M. and Moriyasu, Y. 2007. A novel type of autophagy occurs together with vacuole genesis in miniprotoplasts prepares from tobacco culture cells. *Autophagy*. 3: 215-221.
- Yano, K., Matsui, S., Tsuchiya, T., Maeshima, M., Kutsuna, N., Hasezawa, S., and Moriyasu, Y. 2004. Contribution of the plasma membrane and central vacuole in the formation of autolysosomes in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 45(7): 951-957.

動植物の精子変態過程におけるオートファジーの役割

法月拓也^{1,2},南野尚紀²,上田貴志^{2,3} ¹東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 ²基礎生物学研究所 細胞動態研究部門 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38 ³総合研究大学院大学 生命科学研究科 基礎生物学専攻 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

Takuya Norizuki^{1,2}, Naoki Minamino² and Takashi Ueda^{2,3}

Roles of autophagy during spermiogenesis in animals and plants

Key words: autophagy, evolution, organelle remodeling, spermatozoid, spermiogenesis, ¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1

Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

²Division of Cellular Dynamics, National Institute for Basic Biology, Nishigonaka 38, Myodaiji, Okazaki, 444-8585 Japan

³Department of Basic Biology, School of Life Sciences, Graduate School for Advanced Studies, Nishigonaka 38, Myodaiji, Okazaki, 444-8585 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9a4.00130

1. はじめに

生殖はすべての生物において存続の基盤となる重要な生命現象である。無性生殖が遺伝的に同 質な次世代個体を生ずるのに対して,有性生殖においては両親(配偶子提供者)とは遺伝的に質 の異なる次世代個体を生ずる。そのため有性生殖は、多くの真核生物で遺伝子構成の多様性を増 加させる仕組みとしてはたらいている。有性生殖は配偶子間の形態の違いから同形配偶子接合と 異形配偶子接合に分けることができ、異形配偶子接合の中でも、精子(運動性の小型の雄性配偶 子)と卵(非運動性の大型の雌性配偶子)を介した接合様式が多くの動植物で用いられている。

哺乳類の精子形成においては、体細胞分裂によって多数の精母細胞(2n)が形成され、それが 減数分裂することで精細胞(n)が形成される(図1A)。その後精細胞は大規模な形態変化を経て 精子へと成熟する。一方コケ植物であるゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)では、単相の雄性生殖 器に納められた造精器において分裂方向が直交する細胞分裂により多くの精原細胞 (spermatogenous cell, n)が形成され、最後の直交分裂により多数の精母細胞(spermatid mother cell, n)となる(コケ植物では減数分裂は胞子形成の過程で起こる)。その後精母細胞の細胞壁に対し 分裂面が斜めに入る細胞分裂がおこり、精細胞(spermatid, n)が形成される(Shimamura, 2016)。 その後精細胞は大規模な形態変化と運動性の獲得を通じて、細長い螺旋型の細胞体と2本の鞭毛 をもつ精子(spermatozoid)へと変態する(図1B)。このコケ植物の精子変態過程における大規模 な細胞内構造の変化は、主に電子顕微鏡を用いた観察によって明らかにされてきた(Renzaglia



&Garbary, 2001)。しかしその分子機構にはいまだ明らかになっていない部分が多い。

図1. 動植物における精子形成過程

(A) 哺乳類における精子形成過程。体細胞分裂によって精原細胞 (2n) から精母細胞 (2n) が形成され,それが減数分 裂することで精細胞 (n) が形成される。その後,余剰な細胞質が residual body としてセルトリ細胞によって除去される などして,精子へと変態する。図は (O'Donnell et al., 2011; Yoshida, 2008) を基に作成。

(B) ゼニゴケにおける精子形成過程。体細胞分裂によって精母細胞 (n) が形成され,精母細胞の細胞壁に対して分裂 面が斜めに入る細胞分裂によって精細胞 (n) が形成される。精細胞は余剰な細胞質が除去されるなどして,精子へと変 態する。図は (Shimamura, 2016) を基に作成。

オートファジーは真核生物で広く保存され、細胞質中のタンパク質やオルガネラを液胞/リソ ソームへ運び、分解・リサイクリングする仕組みである。様々なタイプのオートファジーがこれ までに報告されているが、その中でもマクロオートファジーの解析が最も進んでいる。マクロオ ートファジー(以後オートファジーと称す)では、細胞質中に形成された隔離膜の両端が細胞質 を取り囲みながら伸長し、二重膜のオートファゴソームが形成される。オートファゴソームの外 膜が液胞/リソソーム膜と融合することで、液胞/リソソーム内に一重膜のオートファジックボ ディーが放出され、最終的に液胞/リソソーム内の加水分解酵素によって分解される。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)を用いた研究により、オートファジーに関わる多くの遺伝子(*ATG* 遺 伝子)が同定され、その機能が明らかにされてきた (Mizushima et al., 2011)。その後動植物におい ても、*ATG* 遺伝子のホモログに注目した逆遺伝学的解析が展開され、オートファジーが様々なタ ンパク質やオルガネラの分解を介して、発生やストレス応答など動植物の様々な生命現象に密接 に関わっていることが明らかにされている (Mizushima &Komatsu, 2011; Yang &Bassham, 2015)。動 植物の精子変態過程における大規模な細胞内構造の変化とオートファジーの関連は長い間不明で

あったが,近年精子変態においてオートファジーが果たす役割も明らかになりつつある (Liu et al., 2017; Sanchez-Vera et al., 2017; Shang et al., 2016; Wang et al., 2014)。そこで本稿では,動物と植物の 精子変態とオートファジーの関連を概観する。前半ではまず,マウス (*Mus musculus*)の精子変態 過程におけるオートファジーの機能についてこれまで得られている知見を紹介する。後半では, 著者らが注目しているコケ植物の精子変態過程におけるオートファジーの重要性について,精子 の形態や発生といった基本的な知見を交えて紹介する。

2. マウスの精子変態過程におけるオートファジーの機能

マウスの精子形成過程において、オートファゴソームマーカーとして使われている LC3 (ATG8 のホモログ) やオートファゴソーム形成に必要な ATG7 の発現を調べたところ、変態前の精細胞 ではこれらがあまり発現せず、精子へ変態している途中の精細胞で強く発現していることが示さ れた (Shang et al., 2016)。このことから、オートファジーは精細胞の形成過程でなく精子変態過程 で重要なはたらきを担うことが示唆された。

マウスでは多くの atg 変異体が出生後まもなく致死となるため (Cheong et al., 2014; Komatsu et al., 2005; Kuma et al., 2004; Saitoh et al., 2009; Saitoh et al., 2008; Sou et al., 2008), これらの変異体を用 いて精子変態過程におけるオートファジーの役割を解析することは不可能である。そこで生殖細 胞特異的に atg7 を欠失させた変異体を作出したところ、この変異体では精子の数が著しく少な く、形成された精子の頭部や尾部の形態や運動性が異常となり、不稔となることが明らかになっ た。また先体形成や細胞骨格関連の構造 [軸糸の 9+2 構造やマンシェット (manchette), アクチン フィラメント],細胞質の除去にも異常が観察された (Shang et al., 2016; Wang et al., 2014)。先体は 動物の精子のみに見られる、精子が卵膜を通過して卵の細胞膜に到達し受精するために必要な細 胞内構造である。先体はpHが低く、リソソームに含まれるカテプシンDやカテプシンHなどを 含むことから, リソソーム関連オルガネラ (LRO) の一種と考えられている (Moreno &Alvarado, 2006)。先体は精子変態時にゴルジ体由来の前先体顆粒 (proacrosomal granule) が融合することに よって形成される (Moreno & Alvarado, 2006)。またゴルジ体からの経路以外に、エンドサイトーシ ス経路も先体形成に寄与することが報告されている (Berruti & Paiardi, 2011)。Atg7 を欠失した生殖 細胞では前先体顆粒が融合できず細胞質中に蓄積しており、正常な先体が形成されない。また先 体形成過程でゴルジ体から先体へ輸送されゴルジ体由来の小胞の融合に関わる GOPC の輸送も 異常になっていた。また phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 阻害剤 (PI3K はオートファゴソーム 形成において重要なはたらきを担うため、PI3K 阻害剤を加えるとオートファジーが阻害される) である 3-MA や, オートファゴソームとリソソームの融合を阻害すると考えられる chloroquine (Mauthe et al., 2018) を処理しても、先体形成が異常になる。またオートファゴソームマーカーで ある LC3 は先体形成時に ATG7 依存的にゴルジ体由来の小胞と共局在する。以上のことから、先 体形成にオートリソソームのはたらきが必要であることが示唆される (Wang et al., 2014) (図 2)。 また LC3 や ATG7 を脱アセチル化することでオートファジーを正に制御していることが知られ ている Sirt1 は、先体形成においても LC3 や ATG7 の脱アセチル化を介して先体形成を正に制御 している (Huang et al., 2015; Lee et al., 2008; Liu et al., 2017)。先体が LRO であることも合わせ、こ

れらの結果はオートファゴソームをリソソームへと輸送する仕組みが,動物の進化の過程で先体 形成にリクルートされたことを示していると考えられる。

マンシェットは微小管やアクチンを含み、精子変態過程で一過的に形成される細胞内構造であ る (Fawcett et al., 1971; Kierszenbaum et al., 2003; Mochida et al., 1998; Mochida et al., 1999) (図 2)。核 膜と密に近接し、核の変形が終了するとマンシェットが消失することから、核の変形に関与して いると考えられている (Russell et al., 1991)。またマンシェット付近に小胞が観察され、モーター タンパク質がマンシェット上に局在することから、中心体や尾部への物質の輸送も担っていると 考えられている (Fawcett et al., 1971; Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum et al., 2003; Yoshida et al., 1994)。マンシェットを始めとする細胞骨格構造に異常が見られる変異体の精子は atg7 変異体の 精子と表現型が類似することから、Shang らは精子の頭部や尾部の形態や細胞質の除去の異常と いった atg7 変異体の精子の異常が細胞骨格の異常に起因するものと推察している (Shang et al., 2016)。atg 変異体による細胞骨格の異常はマウス胎児由来線維芽細胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF) などでも観察される (Zhuo et al., 2013)。そこで Atg7^{-/-}MEF で過剰に蓄積しているタンパク 質を質量分析で調べたところ, PDLIM1 が同定された (Shang et al., 2016)。PDLIM1 は α-actinin や palladin と相互作用し、アクチンフィラメントを制御していると考えられている (Hasegawa et al., 2010; Ohno et al., 2009; Tamura et al., 2007)。MEF において PDLIM1 を過剰発現するとアクチンフィ ラメントや微小管の配向に異常が見られることや,PDLIM1 をノックダウンすることで Atg7[≁] MEF の細胞骨格の異常が部分的に回復することから、PDLIM1 は細胞骨格を負に制御しており、 これがオートファジーによって分解されることで、細胞骨格が正常に配向できると考えられた (Shang et al., 2016)。 atg7 変異体の精細胞においても PDLIM1 が蓄積しており, 野生型の精細胞で はリソソームへ輸送される PDLIM1 が atg7 変異体ではリソソームへ運ばれない。このことから, 精子変態過程においても PDLIM1 は細胞骨格の配向を負に制御しており、オートファジーを介し てPDLIM1を分解することが細胞骨格の正常な配向に必要であると考えられる (Shang et al., 2016) **(図2)**₀

しかしながら、アクチンフィラメントの制御を行なっていると考えられている PDLIM1 がどの ようにして軸糸の 9+2 構造やマンシェット構造に関わるのかはいまだ不明である。オートファジ ーは鞭毛形成だけでなく、一次繊毛形成を制御していることも報告されている (Tang et al., 2013)。 LC3 の新奇相互作用因子を同定する試みにより、OFD1 が候補因子として同定された (Tang et al., 2013)。OFD1 は口顔指症候群 I型 (Oral-Facial-Digital Syndrome Type I, OFD1) と呼ばれる繊毛病の 原因遺伝子と考えられており、OFD1 は中心小体や centriolar satellite と呼ばれる中心小体近傍の電 子密度の高い領域、および基底小体や一次繊毛のストーク部分にも局在し、一次繊毛の形成に必 要な因子である (Ferrante et al., 2001; Ferrante et al., 2006; Lopes et al., 2011; Romio et al., 2004; Singla et al., 2010)。オートファジーは一次繊毛形成を負に制御すると考えられる centriolar satellite 上の OFD1 を分解することによって、一次繊毛形成を正に制御していると考えられる (Tang et al., 2013)。 OFD1 が精子変態過程にも関与するかは明らかになっていないが、オートファジーが PDLIM1 以 外の細胞骨格などの制御因子を分解することで、精子変態過程における細胞骨格を始めとする細 胞内構造のリモデリングの制御を行なっている可能性も考えられる。



図 2. マウスの精子変態過程におけるオートファジーの機能

マウスの精子変態過程において、オートファジーは先体形成と細胞骨格の制御に関わると考えられている。先体形成 においては、前先体顆粒が融合し先体を形成する過程でオートリソソームが重要なはたらきを担うと考えられる (Wang et al., 2014)。一方オートファジーは細胞骨格を負に制御する PDLIM1 を分解することにより、細胞骨格の配向を正に制 御していると考えられる (Shang et al., 2016)。図は (Shang et al., 2016; Wang et al., 2014)を基に作成。

3. コケ植物の精子変態過程におけるオートファジーの機能

被子植物や多くの裸子植物において雄性配偶子は非運動性であり、花粉管を介して雌性配偶子 のもとへ運ばれる。一方、シャジクモ類、コケ植物、シダ植物および一部の裸子植物(イチョウ やソテツなど)においては鞭毛を持つ運動性の雄性配偶子(精子)を形成する(イチョウやソテ ツの精子の発見は JPR の前身である植物学雑誌で報告された。http://bsj.or.jp/jpn/JPR/digital/を参 照。)(図3)。動物の精子と比較して、ストレプト植物の精子は鞭毛が複数存在するのが特徴であ る。細胞体の形態や鞭毛の数、細胞内構造の構成はシャジクモ類、コケ植物、シダ植物、裸子植 物で非常に多様であり、シャジクモ類やコケ植物の精子は2本の、イチョウの精子は1000本近 い数の鞭毛を持つ (Renzaglia & Garbary, 2001)(図3)。本稿ではコケ植物の精子変態過程における 細胞内構造の変化に特に焦点を絞り、これまで得られている知見を紹介する。

コケ植物の精子形成過程および成熟した精子の模式図を図 1B に示す。コケ植物の成熟した精 子には鞭毛が頭部に2本存在し、これらは他の生物の鞭毛と同様に2本の中心対微小管とその周 囲を取り囲むように配置された9本の周辺微小管からなる「9+2 構造」の軸糸をもつ。鞭毛の基 部には基底小体が存在し、これは精母細胞から精細胞が形成される過程で新規に出現した中心小 体から形成される。細胞体は哺乳類の精子同様大部分の細胞質が除去された細長い形態をとるが、 螺旋構造を取る点で哺乳類の精子と異なっている。核は細胞体内の大部分を占め、精子変態過程 で細長く変形する。核の内部ではヒストンがプロタミン様タンパク質に置換され、クロマチンの 凝集が起こる。スプラインと呼ばれる微小管構造が核に沿って存在し、これが細胞体の螺旋構造 の骨格となっていると考えられている。またミトコンドリアが頭部と尾部に1つずつ存在し、色 素体は尾部に1つ存在する。色素体では精子形成過程でチラコイド膜が崩壊し、デンプン粒が蓄 積する。このデンプン粒を含む色素体はシャジクモ類、コケ植物、シダ植物の精子に広く見られ るが、裸子植物の精子では見られない。デンプン粒を含む色素体は精子が運動をする際のバラン

サーとしてはたらくと考えられているが,詳細な機能は未解明である。小胞体やゴルジ体などの オルガネラは精子では観察されない (Renzaglia & Garbary, 2001; Shimamura, 2016) (図1B)。

これらの形態学的な知見は古くから電子顕微鏡観察により得られていたが,精子形成の分子機 構に関する知見は長らくほとんど皆無であった。しかし近年になり,コケ植物タイ類に属するゼ ニゴケの分子遺伝学的解析ツールが整備され (Bowman et al., 2017),それに伴って精子形成過程の ライブイメージング解析が可能となった (Minamino et al., 2017)。その結果ゼニゴケの精子変態の 過程でゴルジ体やエンドソームが液胞へ運ばれて分解される様子が観察され,さらに液胞も精子 の細胞体から最終的に除去されることが明らかとなった。これらのことから,精子変態過程では 細胞質やオルガネラは液胞へ運ばれて分解され,最終的に液胞を何らかの仕組みにより取り除く ことで,細胞質基質や不要なオルガネラが除去されることが明らかとなった (Minamino et al., 2017)。興味深いことに、ゼニゴケの精子変態過程では細胞質中に多数のオートファゴソーム様構 造が観察される。このことから,余剰な細胞質やオルガネラをオートファジーによって液胞へ運 んでいることが示唆される (Minamino et al., 2017)。この仮説と合致するように、ゼニゴケの*atg* 変 異体では余剰な細胞質を残した精子が観察される (法月,未発表)。

またセン類に属するヒメツリガネゴケ (Physcomitrella patens) においてもオートファジーが精 子変態過程で重要なはたらきをもつことが報告されている (Sanchez-Vera et al., 2017)。PpATG8e は 精原細胞の分裂が見られるステージ4 あたりで発現し始め,精細胞が形成されるステージ6 で強 く発現する。ステージ7,8 と精子変態が進むにつれて次第に発現量は減少し,ステージ8 から9 の精子が完全に成熟するあたりでは PpATG8e の発現が確認できなくなる。このことから精子変 態の過程で一過的にオートファジーが活発に起こることが示唆される。オートファジーの機能が 欠損した Ppatg5 変異体や Ppatg7 変異体の精子は不稔になり,余剰な細胞質が観察され,核の形 態も異常となる。電子顕微鏡による Ppatg5 変異体の精子形成過程の観察から,精子変態が始まる 以前の精細胞は大きな異常が観察されない一方で,精子変態期の精細胞においては,ミトコンド リアや色素体の数やサイズ,鞭毛の軸糸構造にも異常が観察される (Sanchez-Vera et al., 2017)。こ のことからヒメツリガネゴケの精子変態過程における様々な細胞内構造のリモデリングに,オー トファジーが寄与していると考えられる。

前節に述べた通り、マウスの atg7 変異体では微小管やアクチンフィラメントの構造が異常となり、その結果二次的に細胞質の除去に異常が生じると考えられている(Shang et al., 2016)。同様にヒメツリガネゴケやゼニゴケにおいても細胞骨格などの制御因子の分解を介して、オートファジーが精子変態過程における細胞内構造のリモデリングを制御している可能性が考えられる(図4)。 また別の可能性として、それぞれのオルガネラの分解を直接オートファジーが制御している可能性も考えられる(図4)。この仮説と合致するように、ゼニゴケの精子変態過程においてゴルジ体が液胞内部で観察される(Minamino et al., 2017)。核やミトコンドリア、色素体(葉緑体)など、様々なオルガネラがオートファジーにより選択的に分解されることが様々な生物で報告されている(Fukuda &Kanki, 2018; Izumi &Nakamura, 2018; Peng &Lavker, 2016)。ゼニゴケやヒメツリガネゴケの精子変態過程においても同様にオルガネラがオートファジーによって分解されているのかどうか、今後の解析が待たれる。



図3.ストレプト植物の雄性配偶子の特徴

被子植物は運動性の鞭毛を持つ雄性配偶子を形成しない。一方シャジクモ類、コケ植物、シダ植物および一部の裸子 植物は、運動性の鞭毛を持つ雄性配偶子を形成する。鞭毛の数や精子変態過程における細胞質の除去の程度は、植物間 で大きく多様化している。○: 運動性の鞭毛を持つ雄性配偶子を形成する、△: 一部の種で運動性の鞭毛を持つ雄性配 偶子を形成する、×: 運動性の鞭毛を持つ雄性配偶子を形成しない。(Renzaglia & Garbary, 2001) を基に作成。



図4. コケ植物の精子変態過程におけるオートファジーを介した細胞内構造のリモデリング

Sanchez-Vera らや著者らによってヒメツリガネゴケやゼニゴケでオートファジーが精子変態過程における細胞内構造 のリモデリングに寄与することが明らかになった (Sanchez-Vera et al., 2017; 法月,未発表)。オートファジーの基質はい まだ不明であるが,液胞内部にオートファジックボディーやゴルジ体が観察される (Minamino et al., 2017) ことから,オ ートファジーはゴルジ体やほかのオルガネラを液胞へと輸送することで,細胞内構造のリモデリングに寄与していると 考えられる。

4. 今後の展望

植物の精子は古くから電子顕微鏡を用いて観察され、その形態や発生過程について詳細に記述 されてきた。一方でその分子機構の研究は、近年に至るまでほとんど行なわれてこなかった。そ

の原因として、植物の分子生物学的・細胞生物学的研究の多くが精子を形成しないシロイヌナズ ナ (Arabidopsis thaliana) で行なわれ、ゼニゴケやヒメツリガネゴケを含む基部陸上植物を用いた 研究が非常に少なかったことがあげられる。オートファジーがコケ植物の精子変態過程で必要で あることは前節で述べたが、オートファジーの解析はシロイヌナズナにおいてもいまだ酵母や動 物のオートファジー研究の域には及んでおらず、コケ植物を用いたオートファジーの研究はよう やく黎明を迎えたばかりである (Mukae et al., 2015; Sanchez-Vera et al., 2017)。今後精子変態におけ るオートファジーの機能をより詳細に明らかにするためには、変異体や可視化マーカー等の解析 ツールを充実させるとともに、シロイヌナズナを含む植物におけるオートファジーの知見の拡充 が必要である。著者らはゼニゴケを用いたオートファジーの研究を展開することで、これらの問 題点の克服を目指しつつ、精子変態過程におけるオートファジーの機能を明らかにしようと研究 を行なっている。

精子変態における余剰な細胞質の除去は動植物において広く見られるが、その機構は多様であ る。哺乳類においては隣接するセルトリ細胞の貪食作用によって精細胞の細胞質が除去される (O'Donnell et al., 2011) (図 1A)。キイロショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) においては、 investment cone と呼ばれるアクチンフィラメントを含む構造が精子の頭部から尾部に向かって移 動する過程で、細胞質や不要なオルガネラが cystic bulge と呼ばれる構造内に取り込まれ、最終的 に waste bag として精子から取り除かれる (Fabian &Brill, 2012)。またヒメツリガネゴケにおいて は、オートファジーによって細胞自律的に細胞質が除去される (Sanchez-Vera et al., 2017)。運動性 の鞭毛を持つ雄性配偶子は動物と植物で独立に獲得され進化してきたと考えられており、その形 成機構が生物の系統間で異なっていても不思議はない。しかしながら、哺乳動物とコケ植物の精 子には細胞質を極限まで除去した形態や鞭毛による運動性などの共通点も存在し、さらに動物や 植物のそれぞれの系統内でも精子形態が多様化している。さまざまな生物の精子変態機構を明ら かにすることで、精子にこれらの共通性と多様性がもたらされた仕組みと意義が明らかになって いくであろう。

コケ植物の精子における興味深いオルガネラの特徴として、ミトコンドリアの数があげられる。 体細胞の多くには多数のミトコンドリアが存在するが、精子変態の過程ではミトコンドリアが2 つにまで減少する (Renzaglia & Garbary, 2001; Shimamura, 2016) (図 1B)。一方同じストレプト植物 に属するシャジクモ類や多くのシダ植物の精子には、多数のミトコンドリアが存在することが知 られている (Renzaglia & Garbary, 2001)。動物の精子においても、多様なミトコンドリアの特徴が 観察されている。哺乳類では鞘状のミトコンドリアが精子の中片部に存在する (Ho & Wey, 2007)。 キイロショウジョウバエの精子ではミトコンドリアが軸糸や核に沿う形で 1 つのみ存在する (Fabian & Brill, 2012)。また Urodasys 属においてミトコンドリアを含まない精子をもつ種も確認さ れている (Balsamo et al., 2007)。以上のように生物種によってミトコンドリアの数や形態に違いが 見られるが、この違いがなぜ生じたのかは不明である。前節で述べた通り、ヒメツリガネゴケの 精子変態過程では、ミトコンドリアの数がオートファジーにより制御されることが報告されてい る (Sanchez-Vera et al., 2017)。しかし分子機構はいまだ不明である。仮にオートファジーがミトコ ンドリアを識別しているとしたら、どのようにして分解するミトコンドリアと分解しないミ トコンドリアを識別しているのであろうか。近年オートファジーはバルクの分解に加え、選択的

に基質を認識し分解する役割を担うこと(選択的オートファジー)が明らかにされている。しか しながら植物における選択的オートファジーの分子機構に関する知見はいまだ限定的である。今 後の研究によって、オートファジーがどのようにして精子変態過程における細胞内構造のリモデ リングに関与しているのかが明らかになるであろう。また明らかになった分子機構を基にその変 異体を作出し、そのような精子にどのような影響が生じるかを調べることで、精子におけるミト コンドリアの数の制御の生物学的意義が解明出来るかもしれない。

植物の精子形成の分子細胞生物学的解析は始まったばかりである。オートファジーに注目した 研究を通して植物の精子形成機構に対する理解を深めることで、植物における雄性配偶子の進化 と多様化の理解に貢献したい。

5. 謝辞

本稿の執筆の機会を提供していただいた明治大学の吉本光希博士,ならびに研究の遂行にあた りお世話になった京都大学の河内孝之博士,西浜竜一博士,基礎生物学研究所の真野昌二博士, 金澤建彦博士にこの場を借りて深く感謝する。

6. 引用文献

- Balsamo, M., L. Guidi, L. Pierboni, R. Marotta, M.A. Todaro, & M. Ferraguti. 2007. Living without mitochondria: spermatozoa and spermatogenesis in two species of Urodasys (Gastrotricha, Macrodasyida) from dysoxic sediments. *Invertebr Biol*. 126: 1-9.
- Berruti, G. & C. Paiardi. 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*. 1: 95-98.
- Bowman, J.L., T. Kohchi, K.T. Yamato, J. Jenkins, S. Shu, K. Ishizaki, S. Yamaoka, R. Nishihama, Y. Nakamura, F. Berger, C. Adam, S.S. Aki, F. Althoff, T. Araki, M.A. Arteaga-Vazquez, S. Balasubrmanian, K. Barry, D. Bauer, C.R. Boehm, L. Briginshaw, J. Caballero-Perez, B. Catarino, F. Chen, S. Chiyoda, M. Chovatia, K.M. Davies, M. Delmans, T. Demura, T. Dierschke, L. Dolan, A.E. Dorantes-Acosta, D.M. Eklund, S.N. Florent, E. Flores-Sandoval, A. Fujiyama, H. Fukuzawa, B. Galik, D. Grimanelli, J. Grimwood, U. Grossniklaus, T. Hamada, J. Haseloff, A.J. Hetherington, A. Higo, Y. Hirakawa, H.N. Hundley, Y. Ikeda, K. Inoue, S. Ishida, Q. Jia, M. Kakita, T. Kanazawa, Y. Kawai, T. Kawashima, M. Kennedy, K. Kinose, T. Kinoshita, Y. Kohara, E. Koide, K. Komatsu, S. Kopischke, M. Kubo, J. Kyozuka, U. Lagercrantz, S.S. Lin, E. Lindquist, A.M. Lipzen, C.W. Lu, E. De Luna, R.A. Martienssen, N. Minamino, M. Mizutani, M. Mizutani, N. Mochizuki, I. Monte, R. Mosher, H. Nagasaki, H. Nakagami, S. Naramoto, K. Nishitani, M. Ohtani, T. Okamoto, M. Okumura, J. Phillips, B. Pollak, A. Reinders, M. Rovekamp, R. Sano, S. Sawa, M.W. Schmid, M. Shirakawa, R. Solano, A. Spunde, N. Suetsugu, S. Sugano, A. Sugiyama, R. Sun, Y. Suzuki, M. Takenaka, et al. 2017. Insights into Land Plant Evolution Garnered from the Marchantia polymorpha Genome. *Cell*. 171: 287-304 e215.
- Cheong, H., J. Wu, L.K. Gonzales, S.H. Guttentag, C.B. Thompson, & T. Lindsten. 2014. Analysis of a lung

defect in autophagy-deficient mouse strains. Autophagy. 10: 45-56.

- Fabian, L. & J.A. Brill. 2012. Drosophila spermiogenesis: Big things come from little packages. *Spermatogenesis*. 2: 197-212.
- Fawcett, D.W., W.A. Anderson, & D.M. Phillips. 1971. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Dev Biol.* 26: 220-251.
- Ferrante, M.I., S.A. Feather, A. Bulfone, V. Wright, M. Ghiani, A. Selicorni, L. Gammaro, F. Scolari, A.S. Woolf, O. Sylvie, L.M. Bernard, S. Malcolm, R. Winter, A. Ballabio, G. Giorgio, & B. Franco. 2001. Identification of the Gene for Oral-Facial-Digital Type I Syndrome. *Am J Hum Genet*. 68: 569-576.
- Ferrante, M.I., A. Zullo, A. Barra, S. Bimonte, N. Messaddeq, M. Studer, P. Dolle, & B. Franco. 2006. Oralfacial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nat Genet.* 38: 112-117.
- Fukuda, T. & T. Kanki. 2018. Mechanisms and Physiological Roles of Mitophagy in Yeast. *Mol Cells*. 41: 35-44.
- Hasegawa, T., K. Ohno, S. Funahashi, K. Miyazaki, A. Nagano, & K. Sato. 2010. CLP36 interacts with palladin in dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett.* 476: 53-57.
- Ho, H.C. & S. Wey. 2007. Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microsc Res Tech*. 70: 719-723.
- Huang, R., Y. Xu, W. Wan, X. Shou, J. Qian, Z. You, B. Liu, C. Chang, T. Zhou, J. Lippincott-Schwartz, & W. Liu. 2015. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell*. 57: 456-466.
- Izumi, M. & S. Nakamura. 2018. Chloroplast Protein Turnover: The Influence of Extraplastidic Processes, Including Autophagy. *Int J Mol Sci.* 19.
- Kierszenbaum, A.L. 2002. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev.* 63: 1-4.
- Kierszenbaum, A.L., E. Rivkin, & L.L. Tres. 2003. The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res.* 103: 337-344.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Ueno, J. Iwata, S. Murata, I. Tanida, J. Ezaki, N. Mizushima, Y. Ohsumi, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, & T. Chiba. 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*. 169: 425-434.
- Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhisa, & N. Mizushima. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 432: 1032-1036.
- Lee, I.H., L. Cao, R. Mostoslavsky, D.B. Lombard, J. Liu, N.E. Bruns, M. Tsokos, F.W. Alt, & T. Finkel. 2008. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 3374-3379.
- Liu, C., Z. Song, L. Wang, H. Yu, W. Liu, Y. Shang, Z. Xu, H. Zhao, F. Gao, J. Wen, L. Zhao, Y. Gui, J. Jiao,F. Gao, & W. Li. 2017. Sirt1 regulates acrossome biogenesis by modulating autophagic flux during

spermiogenesis in mice. Development. 144: 441-451.

- Lopes, C.A., S.L. Prosser, L. Romio, R.A. Hirst, C. O'Callaghan, A.S. Woolf, & A.M. Fry. 2011. Centriolar satellites are assembly points for proteins implicated in human ciliopathies, including oral-facial-digital syndrome 1. *J Cell Sci.* 124: 600-612.
- Mauthe, M., I. Orhon, C. Rocchi, X. Zhou, M. Luhr, K.J. Hijlkema, R.P. Coppes, N. Engedal, M. Mari, & F. Reggiori. 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*: 1-21.
- Minamino, N., T. Kanazawa, R. Nishihama, K.T. Yamato, K. Ishizaki, T. Kohchi, A. Nakano, & T. Ueda. 2017. Dynamic reorganization of the endomembrane system during spermatogenesis in Marchantia polymorpha. *J Plant Res.* 130: 433-441.
- Mizushima, N. & M. Komatsu. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell. 147: 728-741.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, & Y. Ohsumi. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 27: 107-132.
- Mochida, K., L.L. Tres, & A.L. Kierszenbaum. 1998. Isolation of the rat spermatid manchette and its perinuclear ring. *Dev Biol*. 200: 46-56.
- Mochida, K., L.L. Tres, & A.L. Kierszenbaum. 1999. Structural and biochemical features of fractionated spermatid manchettes and sperm axonemes of the azh/azh mutant mouse. *Mol Reprod Dev*. 52: 434-444.
- Moreno, R.D. & C.P. Alvarado. 2006. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev.* 73: 1430-1434.
- Mukae, K., Y. Inoue, & Y. Moriyasu. 2015. ATG5-knockout mutants of Physcomitrella provide a platform for analyzing the involvement of autophagy in senescence processes in plant cells. *Plant Signal Behav.* 10: e1086859.
- O'Donnell, L., P.K. Nicholls, M.K. O'Bryan, R.I. McLachlan, & P.G. Stanton. 2011. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*. 1: 14-35.
- Ohno, K., H. Kato, S. Funahashi, T. Hasegawa, & K. Sato. 2009. Characterization of CLP36/Elfin/PDLIM1 in the nervous system. *J Neurochem*. 111: 790-800.
- Peng, H. & R.M. Lavker. 2016. Nucleophagy: A New Look at Past Observations. *J Invest Dermatol*. 136: 1316-1318.
- Renzaglia, K.S. & D.J. Garbary. 2001. Motile Gametes of Land Plants: Diversity, Development, and Evolution. *Crit Rev Plant Sci.* 20: 107-213.
- Romio, L., A.M. Fry, P.J. Winyard, S. Malcolm, A.S. Woolf, & S.A. Feather. 2004. OFD1 is a centrosomal/basal body protein expressed during mesenchymal-epithelial transition in human nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 15: 2556-2568.
- Russell, L.D., J.A. Russell, G.R. MacGregor, & M.L. Meistrich. 1991. Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *Am J Anat.* 192: 97-120.
- Saitoh, T., N. Fujita, T. Hayashi, K. Takahara, T. Satoh, H. Lee, K. Matsunaga, S. Kageyama, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, T. Kawai, K. Ishii, O. Takeuchi, T. Yoshimori, & S. Akira. 2009. Atg9a controls

dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 20842-20846.

- Saitoh, T., N. Fujita, M.H. Jang, S. Uematsu, B.G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, & S. Akira. 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 456: 264-268.
- Sanchez-Vera, V., C.S. Kenchappa, K. Landberg, S. Bressendorff, S. Schwarzbach, T. Martin, J. Mundy, M. Petersen, M. Thelander, & E. Sundberg. 2017. Autophagy is required for gamete differentiation in the moss Physcomitrella patens. *Autophagy*: 1-13.
- Shang, Y., H. Wang, P. Jia, H. Zhao, C. Liu, W. Liu, Z. Song, Z. Xu, L. Yang, Y. Wang, & W. Li. 2016. Autophagy regulates spermatid differentiation via degradation of PDLIM1. *Autophagy*. 12: 1575-1592.
- Shimamura, M. 2016. Marchantia polymorpha: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant Cell Physiol.* 57: 230-256.
- Singla, V., M. Romaguera-Ros, J.M. Garcia-Verdugo, & J.F. Reiter. 2010. Ofd1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev Cell*. 18: 410-424.
- Sou, Y.S., S. Waguri, J. Iwata, T. Ueno, T. Fujimura, T. Hara, N. Sawada, A. Yamada, N. Mizushima, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, & M. Komatsu. 2008. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell*. 19: 4762-4775.
- Tamura, N., K. Ohno, T. Katayama, N. Kanayama, & K. Sato. 2007. The PDZ-LIM protein CLP36 is required for actin stress fiber formation and focal adhesion assembly in BeWo cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 364: 589-594.
- Tang, Z., M.G. Lin, T.R. Stowe, S. Chen, M. Zhu, T. Stearns, B. Franco, & Q. Zhong. 2013. Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature*. 502: 254-257.
- Wang, H., H. Wan, X. Li, W. Liu, Q. Chen, Y. Wang, L. Yang, H. Tang, X. Zhang, E. Duan, X. Zhao, F. Gao,
 & W. Li. 2014. Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell Res.* 24: 852-869.
- Yang, X. & D.C. Bassham. 2015. New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 320: 1-40.
- Yoshida, S. 2008. Spermatogenic stem cell system in the mouse testis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73: 25-32.
- Yoshida, T., S.O. Ioshii, K. Imanaka-Yoshida, & K. Izutsu. 1994. Association of cytoplasmic dynein with manchette microtubules and spermatid nuclear envelope during spermiogenesis in rats. *J Cell Sci.* 107 (Pt 3): 625-633.
- Zhuo, C., Y. Ji, Z. Chen, K. Kitazato, Y. Xiang, M. Zhong, Q. Wang, Y. Pei, H. Ju, & Y. Wang. 2013. Proteomics analysis of autophagy-deficient Atg7-/- MEFs reveals a close relationship between F-actin and autophagy. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 482-488.

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・応用生物科学専攻
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。

Kurusu et al.-1

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

Kurusu *et al.*-2

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 (Tsujimoto & 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 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,野性型と *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。

Kurusu et al.-4

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 Ca²⁺ 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. Autophagymediated 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.

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。

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、輪 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 (ΔΨ) 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 r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、光阻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、ひいては成長阻害を引き起こすた 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)。光阻害は,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(1200~2000 µmol m⁻² 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



S. Nakamura & M. Izumi-4

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-&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-&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 (Izuni 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が示されており、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)



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常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。

ー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、ミ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)。ミ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 アジー経路は、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., Griffitts, 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 membranedamaged 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
- Takeshige, 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