



生物情報科学・細胞生物学的手法から見てきた 植物栄養応答

2. イネの窒素リサイクルとオートファジー

和田慎也¹・泉 正範²

¹東北大学大学院農学研究科, ²東北大学学際科学フロンティア研究所

キーワード 窒素, 葉緑体, 老化, オートファジー

1. はじめに

窒素は、植物にとって最も要求量が多く、かつ成長に強く影響を及ぼす必須元素である。固着性である植物は、栄養獲得の問題からも、隣接個体との競争からも、根から吸収した限られた窒素を効率的に利用し成長する必要がある。葉へ輸送された窒素の大部分は、光合成タンパク質として葉緑体へ分配される。植物の葉には個体の死とは別に寿命があり、通常完全展開をピークに経時的に、また環境ストレスによる影響を受けながら、光合成能力の低下や見た目の黄化を伴う老化現象が進行する。一方で葉の老化には、構成タンパク質の分解を介し、そこへ投資されていた多くの窒素を新たに形成する葉、もしくは子実へと転流するという窒素リサイクルの意義がある。これは、独立栄養である植物が進化させてきた、刻々と変化する自己・相互被陰などによる光環境の変化を時空間的に認知し、個体として最大限光合成を行うために体内の窒素を効率的に分配する戦略的成長機構として、また次世代の初期成長の原動力となる種子栄養の蓄積機構としてとらえることができる。

本稿は、『生物情報科学、並びに細胞生物学的手法から見てきた植物栄養応答』への寄稿として、細胞内のバルクなタンパク質分解系『オートファジー』による、老化葉の窒素栄養リサイクル機構について紹介する。我々が研究対象とするオートファジーは、当初哺乳類で観察された現象であったが、その後の大隅良典教授らによる出芽酵母におけるオートファジー関連遺伝子の同定から (Tsukada and Ohsumi, 1993)、ゲノム情報を基盤とした解析により、植物を含むさまざまな

生物へ飛躍的に研究分野が拡大した。また、オートファジーの分解様式は、後述するように細胞の一部が膜小胞として隔離、液胞へ輸送分解される非常に膜動態に富むダイナミックな機構であり、蛍光タンパク質などプロテインタグを応用した細胞生物学的な解析が、分解過程のライブイメージングからその定量解析にまで応用され、同分野へブレイクスルーをもたらしてきた。本稿では、筆者らが直近に報告した、イネ (*Oryza sativa* L.) を材料とした、オートファジーの可視化法 (Izumi *et al.*, 2015)、並びにイネの葉の老化過程における窒素リサイクルとオートファジーの役割 (Wada *et al.*, 2015) を中心に、植物オートファジー研究の一端を解説する。

2. 葉の老化過程における窒素リサイクルに関する研究の流れ

葉の老化と窒素リサイクルに関する研究は古く、Leopold (1961) は既に、植物の死のポジティブな側面として、葉の老化に伴う窒素リサイクルについて報告している。C₃植物の葉において、約8割の窒素は光合成タンパク質として葉緑体に投資される (Makino *et al.*, 2003)。即ち、葉の老化過程における窒素リサイクルは、これら葉緑体タンパク質を主要窒素源とし、転流形態であるアミノ酸への分解反応を初発とする。光合成の炭酸固定反応を担う酵素 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は、単一タンパク質として葉身窒素のおよそ12–35%を占める特異的に多い葉緑体タンパク質である (Evans and Seemann, 1989)。また Rubisco は、現大気 CO₂ 環境下における光合成の律速因子の一つであり、葉の老化過程における光合成能力の低下は、Rubisco タンパク質の減少に大きく起因する。そのため Rubisco の分解は、光合成と窒素リサイクルの両方に重要であり、機能的な葉の老化を示す指標とされ、またその分解メカニズムに関して数多くの報告がされてきた (Feller *et al.*, 2008)。これまで Rubisco の分解経路は、葉の老化過程において Rubisco が葉緑体数に先立って減少することから、葉緑体内部において分解される、もしくは特異的に葉緑体から放出された後に分解されるという2つの分解経路が推測され

Shinya WADA and Masanori IZUMI: Plant responses to nutrition revealed by bioinformatics and cell biology. 2. The role of autophagy in nitrogen remobilization during leaf senescence in rice

¹ 981-8555 仙台市青葉区堤通南宮町1-1

² 980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3

2016年6月6日受付・2016年8月5日受理

日本土壤肥科学雑誌 第87巻 第5号 p.388~393 (2016)

てきた (Hörtensteiner and Feller, 2002). 前者の内部分解に関して、葉緑体には、共生進化の起源とされるバクテリア遺伝子のホモログとなる内在性プロテアーゼが多数分子同定されているものの、葉の老化過程におけるそれら葉緑体プロテアーゼの機能はほとんど明らかになっていない (Kato and Sakamoto, 2013). また唯一、Rubisco に対する分解活性が示唆されたものは、CND41 と呼ばれる真核生物由来のアスパラギン酸プロテアーゼのみである (Kato *et al.*, 2004). 一方で後者の葉緑体タンパク質の特異的排出、並びに外部分解に関しては現在、細胞生物学的な解析技術の進歩により明らかとなった、葉緑体ストロマタンパク質の排出経路として、Otegui *et al.*, (2006) が報告する senescence-associated vacuole (SAV) と、オートファジーを介した rubisco-containing body (RCB) (Ishida *et al.*, 2008) がある. SAV は、タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) やシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) の老化葉の細胞質において観察される、タンパク質分解活性に富む 1 重膜の液胞様小胞とされる. 一方 RCB は、Chiba *et al.*, (2004) らの電子顕微鏡観察が発端となった、葉緑体ストロマ成分のみを含んだ葉緑体包膜から派生したと思われる二重膜小胞である. 両者ともに、ストロマタンパク質を含有する葉緑体から隔離された小胞という点は共通する. しかしながら RCB は、Ishida *et al.*, (2008) の解析より、オートファジー関連遺伝子 (Autophagy related genes: ATG) 依存的に小胞形成が行われることが明らかにされたのに対し、SAV は ATG 非依的な経路とされ、両者は分子機構の面からそれぞれ独立した経路であると考えられる. Ishida *et al.*, (2008) は、シロイヌナズナを材料に蛍光タンパク質を用いたライブイメージング解析により、葉緑体ストロマタンパク質 (Rubisco) が小胞として液胞へ輸送分解される RCB 経路を直接的に証明した. それ以降、筆者らも所属する同グループでは、シロイヌナズナを材料に、葉緑体に対するオートファジー分解の役割や制御機構について研究を行ってきた. (それらシロイヌナズナにおける葉緑体のオートファジー分解、また SAV との詳細な比較に関しては、Ishida *et al.*, (2014) の総説を参照していただきたい.) シロイヌナズナにおける個体全体の成長や種子形成に対して、オートファジーの担う窒素リサイクルの重要性が明らかにされる一方で (Avila-Ospina *et al.*, 2014), 有用作物、特に穀物の生産性や窒素利用率へ、オートファジーが本当に寄与しているのかどうか農学的な応用性を込めた疑問が高まってきた. そこで筆者らは、アジアの主要作物であり、これまでに葉の窒素リサイクルに関する知見が蓄積されたイネを材料に、葉の窒素リサイクルとオートファジー分解の関係を解析しており、それについて解説する.

3. オートファジー (Autophagy) とは

オートファジーとは、真核生物に広く保存される、細胞質成分のバルクな分解リサイクル機構である. 酵母や哺乳

類におけるオートファジー研究の飛躍的な進展に対し、植物オートファジーの研究は遅れている部分が多い. これまで、植物オートファジーは酵母において確立された作用機構をモデルに、酵母 ATG のシロイヌナズナホモログの欠損変異体を材料とした逆遺伝学的手法によって主として解析が進められてきた (Liu and Bassham, 2012). その結果、植物においても酵母と同様なオートファジー分解の中核となる分子機構が存在し、それに依存した中心液胞への細胞質成分 (オルガネラを含む) の輸送分解機構が存在することが証明されてきた. その一方で、生活環における役割や細かい分子機構など、植物オートファジーの独自性に関しては未だ不明な点が多い. 先進の酵母ではさまざまなタイプのオートファジーが存在するが、ここでは基本的なオートファジー分解を概観する.

オートファジーの最も基本的な分解機構は、マクロオートファジーと呼ばれるものである (図 1:A). マクロオートファジーは、栄養飢餓などをシグナルに誘導され、細胞質において新規に合成される二重の隔離膜が、オルガネラを含む細胞質成分をランダムに取り囲みながら、オートファゴソームと呼ばれる小胞を形成する. オートファゴソームは、その後、液胞へと輸送され、二重膜の外膜が液胞膜と融合し、内膜内の隔離した細胞質成分は、液胞ルーメンへと放出、分解される. このようにバルクな細胞質成分を非選択的に分解するオートファジーの他に、特定のタンパク質やオルガネラを認識し、分解ターゲットとする選択的オートファジーも存在する. このように分解対象を隔離する際の様式から選択的 / 非選択的の 2 つに大別できるオートファジーは、シロイヌナズナにおいても両者ともに確認されている (Michaeli *et al.*, 2016).

これまで分子同定されてきた酵母 ATG は 40 を超え、それらは大きく 2 つに大別される. 一つは、オートファゴソームの膜形成に関与する因子群であり、コアマシーナリーと呼ばれる. シロイヌナズナを始め、植物ゲノムにおいて確認される酵母 ATG ホモログのほとんどは、このコア ATG に該当する. 選択的 / 非選択的いずれのタイプのオートファジーにおいても共通して必須なコア ATG タンパク質は、そのいずれか一つでも欠損してしまうと、全てのオートファジー分解システム全体が崩壊する. もう一つは、特定のタイプのオートファジーにのみ必須となる ATG であり、選択的に特定のオルガネラをオートファジー分解するときのみ必要となる ATG などが該当する. コア ATG とは対照的に、特定の経路に必須となる因子は他の生物におけるホモログが見つからないことが多く、植物においても、ミトコンドリアやペルオキシソームの選択的オートファジーにのみ必要とされる酵母 ATG のホモログは見つかっていない.

4. オートファジーによる葉緑体分解機構とその可視化技術

植物独自のオルガネラである葉緑体に対するオートファジー分解は、前出の RCB 経路に加え、クロロファジー

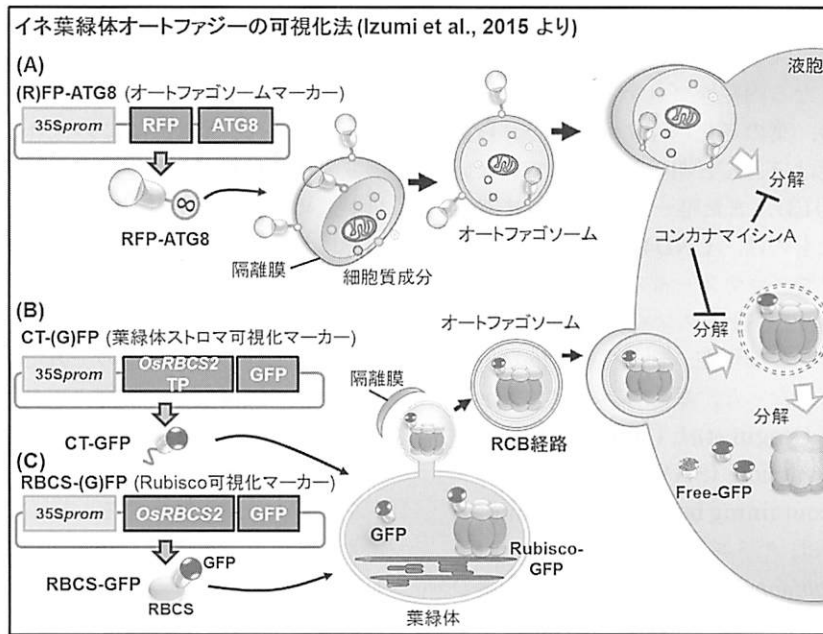


図1 イネにおける葉緑体オートファジーの可視化法

(A) FP-ATG8によるマクロオートファジーにおけるオートファゴソームの可視化モデル
(B, C) 葉緑体移行型FP, Rubisco-FP融合タンパク質による葉緑体ストロマの可視化と、RCBの輸送分解モデル

(Chlorophagy) と呼ばれる2つの経路が存在する (Wada *et al.*, 2009). 両者は、液胞へ輸送される葉緑体成分の違いにより区分され、RCB経路は可溶性のストロマ成分のみを輸送分解する葉緑体の部分分解経路であるのに対し、クロロファジー経路ではチラコイド膜を含む葉緑体まるごとが液胞へ輸送分解される。RCB経路は、これまでにコアATG (ATG4, ATG5) に依存性があり、マクロオートファジー様の機構により隔離膜によって細胞質にてオートファゴソームに取り込まれ、液胞へ輸送分解されていくことが示唆されている (Ishida *et al.*, 2008). 一方でクロロファジーは、コアATG (ATG4) に依存することは共通するものの、液胞への輸送機構に関しては不明であり、液胞膜の陥入によって細胞質成分を取り込むミクロオートファジー様の輸送形式を介しているのではないかと推測される。

オートファジーによる分解は、最終的に液胞へ分解物を輸送する。そのため、オートファゴソーム膜もしくはATGに依存した液胞への輸送の有無を観察することが、オートファジー分解の直接的証拠となる。以下では、筆者らが行ったイネにおける葉緑体オートファジーの可視化法を紹介する。なお、基本的にシロイヌナズナにおいても同様な手法により観察が可能である (Ishida *et al.*, 2008). まず、オートファジーを観察するためには、隔離膜に局在するATG8タンパク質のN末端側に蛍光タンパク質 (Fluorescent protein; FP) を結合させた融合タンパク質を形質転換法により導入し、観察する手法が一般的に用いられる (図1:A). ATG8は、翻訳後の成熟プロセスにおいて、C末端側のグリシン残基が露出する形で、ATG4プロテアーゼによってプロセッシングを受ける。

そのためC末端へのFP融合タンパク質は、FPが切り離されてしまうためオートファゴソームを可視化することはできない。また、植物は特徴的にATG8遺伝子をゲノム上に複数保持するものが多い。それらファミリー遺伝子を形成したATG8は、発現する組織の特異性など使い分けがなされているものや、アミノ酸配列に長短の違いがあり、前述のC末端側のグリシン残基を保持しない分子種が存在するなど、可視化に際し、用いるプロモーターや分子種に注意が必要である。筆者らは、イネオートファジーの可視化に際し、OsATG8aとOsATG8dというアミノ酸配列の長さの異なる2分子種を利用し、それらのN末端側へ赤色蛍光タンパク質 (RFP) を結合した融合タンパク質によって、根や葉の細胞におけるオートファジーの観察に成功した (Izumi *et al.*, 2015). FP-ATG8は、通常細胞質全体に広がって蛍光が観察される。オートファジーによる液胞輸送を観察するためには、液胞へ輸送されたオートファゴソームの分解を抑えるために、液胞膜のH⁺-ATPase阻害剤であるコンカナマイシンAを組織へ浸潤させ、6時間程度暗所において処理を行う必要がある。処理後、オートファジーが誘導されている組織ならば、液胞内腔にFP-ATG8の蛍光を保持した直径0.5–1 μm程度のオートファジー小胞がランダムに動く様子が観察される。さらにイネの葉は、大きな成熟葉身は組織が硬く、また葉肉細胞が小さく、有腕細胞という特殊な形状であるため、オートファジー観察に非常に不向きであることに注意しなければならない。筆者らは、葉のオートファジー観察においては、播種後5–7日目の幼植物期のイネ第1葉身を観察対象とした。

次に、葉緑体オートファジー (RCB) を観察するためには、ストロマ移行型のトランジットペプチドと FP の融合タンパク質を導入し、ストロマ成分を可視化する必要がある。筆者らは、イネのストロマ成分の可視化に際し、核ゲノム上に座する Rubisco 小サブユニット遺伝子 (*RBCS2*) のトランジットペプチドを利用し、その C 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させたコンストラクト (chloroplast targeted GFP; CT-GFP) をイネへ導入し、葉緑体ストロマ成分の可視化に成功した (Izumi *et al.*, 2015) (図 1: B)。ちなみに CT-GFP は、プロモーター次第で葉緑体以外の色素体の内腔も可視化することが可能となる。筆者らの 35S プロモーター制御下で発現させた CT-GFP では、イネ根の色素体オートファジーも可視化されている。さらに、Rubisco に直接 FP を融合することで、老化過程の葉で生じる真の Rubisco containing body を直接観察することができる。Rubisco は、大小 8 つずつのサブユニットからなる 16 量体であり、その可視化には小サブユニット RBCS の C 末端へ FP を結合させる (図 1: C)。Rubisco (ストロマタンパク質) を FP で可視化した形質転換体においても、コンカナマイシン A を浸潤処理することで、液胞へ蓄積した RCB が観察できる。さらに、RBCS-FP 融合タンパク質は、RCB 経路を介した Rubisco 分解量の定量的指標として応用することができる。RBCS-FP は、オートファジーにより液胞内へ輸送、分解される際、FP の液胞内における安定性が RBCS より相対的に高く、RBCS-FP 融合タンパク質から脱離されるような形で Free-FP が液胞内へ蓄積する。この Free-FP を電気泳動で RBCS-FP と分離し、両者を蛍光強度もしくは抗体検出により定量を行う。それにより、ある一定の時間に蓄積した、Free-FP 量を、同期間に減少した RBCS-FP 量 (Rubisco 量) で割ることにより、オートファジー (RCB 経路) への依存度を見積もることができる。しかしながら、FP も液胞内において徐々に分解されるため、この方法で見積もられるオートファジーの依存度は過小評価されたものとなる可能性が高い。

5. イネオートファジー欠損変異体 (*Osatg7-1*)

イネオートファジー欠損変異体 (*Osatg7-1*) は、農業生物資源研究所の所有する TOS17 ミュータントパネルより Kurusu *et al.*, (2014) によって単離された、それまでのシロイヌナズナ以外では初の、植物オートファジー欠損変異体である (現在ではさらにトウモロコシの欠損変異体を確認されている (Li *et al.*, 2015))。TOS17 の挿入変異が確認された *ATG7* はコア *ATG* の一つであり、*Osatg7-1* においては、オートファゴソーム、また RCB が全く形成されないことが確認された (Izumi *et al.*, 2015)。*Osatg7-1* は、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と異なり、雄性不稔形質を示す。つまり、イネはライフサイクルの完結にオートファジーを必須とする (Kurusu *et al.*, 2014)。TOS17 の挿入変異が

ヘテロに起こった *OsATG7* (+/-) の次世代からは、メンデルの法則よりも若干少ない確立ではあるがホモ挿入株 *Osatg7-1* が分離されてくることから、ヘテロ親における減数分裂後の生殖細胞においてオートファジーが欠損することは、稔性に決定的な影響を与えていないと考えられる。しかしながら、*Osatg7-1* からは種子が全く実らないことから、生殖器官の体細胞部分においてオートファジーが重要な役割を担っていることが考えられる。しかしながら、*Osatg7-1* における雄性不稔形質がどのようなメカニズムで引き起こされるのか、その直接的な原因はこれまでのところ不明である。一方で Kurusu *et al.*, (2014) は、*Osatg7-1* において花粉活性の低下、及び葯の開裂が不完全であることを観察し、その原因として花粉成熟時のタベート細胞層におけるオートファジーがイネの花粉成熟に決定的な役割を持つ可能性を指摘している。なお以降の筆者らの実験では、ヘテロ親から採種した次世代を播種後、幼植物期において PCR によりジェノタイプングし、単離される *Osatg7-1* を使用している。

6. イネ葉の老化における窒素リサイクルとオートファジーの関係

栄養成長期における生育表現型として、*Osatg7-1* は野生体イネ (ヘテロ親より分離する *OsATG7* (+/+)) に対し個体サイズが低下する (図 2)。過不足の無い、標準的な窒素条件下 (2 mM-N) において水耕栽培した野生体と *Osatg7-1* の生育を比較すると、*Osatg7-1* は野生体に比べ個体サイズが地上部地下部ともに一回り小さく、播種後 77 日目の乾物重が約 3 割低下した (表 1)。しかしながら、主幹の葉齢は野生体と変わらず、生育が遅延するわけではなかった。また、それら植物体の含有窒素量を測定すると、*Osatg7-1* と野生体との間に有意な差はなかった (表 1)。そのため *Osatg7-1* は、個体乾物重を含有窒素量で割った窒素利用効率が有意に低下し、バイオマス低下の原因は、



図2 播種後 77 日目の野生体イネ (左) と *Osatg7-1* (右) の様子

体内の窒素利用に問題があると考えられた。また、現在詳細を解析中であるが、*Osatg7-1*と野生体のバイオマス差はより効率的な窒素利用が求められる低窒素条件下で拡大し、高窒素条件下では縮小する傾向にあり、*Osatg7-1*のバイオマス低下の原因が窒素の体内利用効率の低下にあることが強く示唆される。

筆者らは、次に葉の老化過程におけるオートファジー欠損の影響を解析した。播種後77日目の最上位完全展開葉となった若い第12葉から、葉の黄化が確認される老化した第8葉までをサンプリングし、見た目の老化の指標となるクロロフィルと、葉身窒素を測定した(図3)。結果として、上位の葉には葉面積当たりのクロロフィルレベル、窒素レベルともに、*Osatg7-1*と野生体には差がなく、その後老化するに従い、*Osatg7-1*の葉では、クロロフィルは野生体に先行して減少し、見た目には老化の進行が速い一方で、窒素レベルは野生体よりも高く維持された。

次に筆者らは、*Osatg7-1*の葉の一生を通じた窒素の流入出を明らかにするため、窒素安定同位体¹⁵Nを用いたバルスチェイス解析を行った。実験にあたり筆者らは、同様な解析より、葉身の展開期において流入してくる窒素の由来と、完全展開後の老化期における窒素の流入量を測定したMae^{et al.}, (1981)らの方法を参照した。結果として、展開期における野生体の葉への流入窒素は、根から吸収し直接輸送される窒素と、老化葉からの転流窒素にはほぼ半々

に由来するのに対し、*Osatg7-1*は転流窒素が大きく減少し、流入量全体が約20%減少していた(図4)。また、老化期の野生体の葉は、窒素の流出量が流入量を大きく上回る一方で、*Osatg7-1*は流出量が大きく抑制された(図4)。この結果は、*Osatg7-1*の老化葉において特異的に窒素レベルが高く維持されるのは、窒素の転流が抑制されることが原因であることを示している。さらに、*Osatg7-1*の老化葉に残留する窒素組成を、遠心分画を行い詳細に解析すると、野生体との差のほとんどは可溶性タンパク質に由来した。特にRubiscoは蓄積が顕著であり、筆者らが解析した中で最も老化した第8葉身における*Osatg7-1*の残存Rubisco量は野生体の2.5倍となった。また、電子顕微鏡観察の結果、*Osatg7-1*の老化葉には、ミトコンドリアやペルオキシソームなど多数の細胞小器官が蓄積しており、葉緑体のみならず、さまざまなオルガネラの分解にオートファジーが寄与することを示唆している。筆者らはこれらの結果、イネの葉の老化過程において、オートファジーは窒素リサイクルのための主要なタンパク質分解系を担っていると結論した。

7. これからのイネオートファジー研究に関して

筆者らのこれらの研究は、これまで提唱されてきた穀物における老化葉からの窒素リサイクルの重要性を、イネの栄養成長期のバイオマス形成において実証するものとなった。またシロイヌナズナと比較すると、個々の葉の窒素リサイクルにおけるオートファジーの貢献度は、イネの方が高く、個体サイズが大きく、より多くの窒素を要求するイネにおいてオートファジーが効率的な窒素利用を支えていると考えられる。筆者らの実験は、ポット栽培により個体間の相互被陰はあまり影響のない環境で栽培を行ったが、実際の水田に密植されるイネの生育環境を想定すると、オートファジーによる窒素リサイクルのバイオマス生産に対する貢献は、水田でより大きなものになると考えられる。今回用いた*Osatg7-1*は、雄性不稔形質を示すため、生殖

表1 野生体イネと *Osatg7-1* の乾物重、窒素量並びに窒素利用効率 (平均値±標準偏差, n=4)

	野生体	<i>Osatg7-1</i>
個体乾物重 (g)	6.95±0.38	5.16*±0.25
含有質素量 (mg)	120.4±10.1	109.8 ^{n.s.} ±2.3
窒素利用効率 (gDW/gN)	56.7±3.0	49.2*±0.4

(* : p<0.05, t 検定による有意差有, n.s., 有意差無)

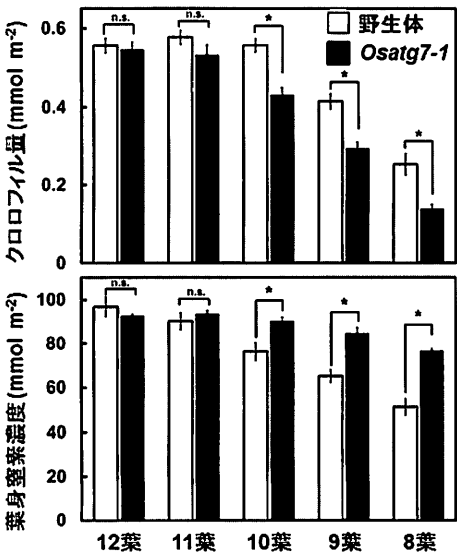


図3 野生体イネと *Osatg7-1* の葉位別クロロフィル(上)、葉身窒素レベル(下) (平均値±標準偏差, n=4) (* : p<0.05, t 検定による有意差有, n.s., 有意差無)

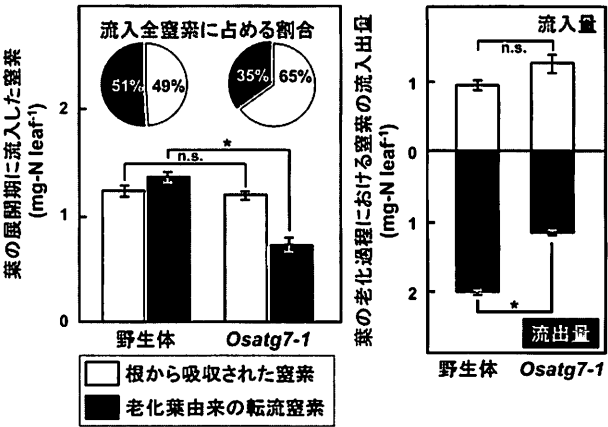


図4 野生体イネと *Osatg7-1* の葉の展開期に流入する窒素の由来(左)と、老化期における窒素の流入出力(右) (平均値±標準偏差, n=3-4) (* : p<0.05, t 検定による有意差有, n.s., 有意差無)

成長への影響、とりわけ穂の稔実におけるオートファジーによる窒素リサイクルの貢献を解析することができていない。Mae, (1997) によると、イネの穂に集積される窒素のおよそ7-9割は栄養成長器官からの転流窒素に由来する。また、本稿では解説を省略したが、*Osatg7-1*の葉は葉緑体タンパク質を残留するだけでなく、その光合成ポテンシャルを長く維持する傾向にある。生殖成長期へ生活環が切り替わったイネは、基本的に新たな葉を形成せず、イネの種子への炭素栄養の集積には、栄養成長器官の個体光合成能力が高く維持されることが重要であり、葉の窒素転流を抑制することが稔実にポジティブな影響を生む可能性もある。それら、炭素と窒素両面からの重要性を考慮し、*Osatg7-1*を背景に、生殖器官におけるオートファジーのみを回復させるような種子の実る形質転換体をデザインし、実際に作出、解析することが今後の第一の課題となる。

また、筆者らの解析によって見えてきたイネにおけるオートファジーと窒素利用との関係は、葉組織だけではなく、*Osatg7-1*では葉鞘や、根においても窒素の蓄積が見られた。筆者らの観察では、根の色素体が丸ごと液胞へ取り込まれるような、クロロファジー様のオートファジーも観察されており、根の成長過程におけるそれらオートファジー分解と効率的な窒素利用の関係について解析を行うことで、まだその存在すら明らかになっていない、植物の新たな栄養成長戦略を明らかにすることができるのではないかと期待している。

文 献

- Avilla-Ospina, L., Moison, M., Yoshimoto, K., and Masclaux-Daubresse, C. 2014. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J. Exp. Bot.*, **65**, 3799-3811.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N. K., Makino, A., and 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.
- Evans, J. R., and Seemann, J. R., 1989. The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences, and control. In W. R. Briggs (ed.) *Photosynthesis*, p. 183-205. Alan R Liss, Inc., New York.
- Feller, U., Anders, I., and Mae, T. 2008. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J. Exp. Bot.*, **59**, 1615-1624.
- Hörtensteiner, S., and Feller, U. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.*, **53**, 927-937.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M. R., and 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.
- Ishida, H., Izumi, M., Wada, S., and Makino, A. 2014. Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 512-521.
- Izumi, M., Hidema, J., Wada, S., Kondo, E., Kurusu, T., Kuchitsu, K., Makino, A., and 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.
- Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A., and Sato, F. 2004. The DNA-binding protease CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*, **220**, 97-104.
- Kato, Y., and Sakamoto, W. 2013. Plastid protein degradation during leaf development and senescence: role of proteases and chaperones. In B. Biswal, K. Krupinska, and U. C. Biswal (ed.) *Plastid development in leaves during growth and senescence*, *Advances in photosynthesis and respiration* 36, p. 453-477. Springer, Dordrecht.
- 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., and Kuchitsu, K. 2014. OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy*, **10**, 878-888.
- Leopold, A. C. 1961. Senescence in Plant development. *Science*, **134**, 1727-1732.
- Li, F., Chung, T., Pennington, J. G., Kaeppler, H. F., Kaeppler, S. M., Otegui, M. S., and Vierstra, R. D. 2015. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell*, **27**, 1389-1408.
- Liu, Y. M., and Bassham, D. C. 2012. Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **63**, 215-237.
- Mae, T. 1997. Physiological nitrogen efficiency in rice: Nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. In T. Ando, K. Fujita, T. Mae, H. Matsumoto, S. Mori, and J. Sekiya (ed.) *Plant Nutrition for sustainable food production and environment*, p. 51-60. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.
- Mae, T., and Ohira, K. 1981. The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.*, **22**, 1067-1074.
- Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E., and Mae, T. 2003. Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 952-956.
- Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A. R., and Avin-Wittenberg, T. 2016. Autophagy in plants-What's new on the menu? *Trends Plant Science*, **21**, 134-144.
- Otegui, M. S., Noh, Y. S., Martinez, D. E., Staehelin, L. A., Amasino, R. M., and Guamét, J. J. 2005. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *Plant J.*, **41**, 831-844.
- Tsukada M., and Ohsumi Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **333**, 169-174.
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., and Makino, A. 2009. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.*, **149**, 885-893.
- Wada, S., Hayashida, Y., Izumi, M., Kurusu, T., Hanamata, S., Kanno, K., Kojima, S., Yamaya, T., Kuchitsu, K., Makino, A., and Ishida, H. 2015. Autophagy Supports Biomass Production and Nitrogen Use Efficiency at the Vegetative Stage in Rice. *Plant Physiol.*, **168**, 60-73.