# 篩要素分化におけるオルガネラ消失のダイナミクス

 古田 かおり<sup>1,2</sup>, 宮島 俊介<sup>1</sup>, 中島 敬二<sup>1</sup>, Yka Helariutta<sup>3,4,5</sup>
 <sup>1</sup>奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

<sup>2</sup>日本学術振興会、〒102-0083 東京都千代田区麹町5-3-1

<sup>3</sup>Institute of Biotechnology/Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, FIN-00014, Finland.

<sup>4</sup>Cardiff University Cardiff School of Biosciences, The Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff, CF10 3AX, UK.

<sup>5</sup>The Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Bateman Street, Cambridge, CB2 1LR, UK.

Kaori Miyashima Furuta<sup>1,2</sup>, Shunsuke Miyashima<sup>1</sup>, Keiji Nakajima<sup>1</sup>, Yka Helariutta<sup>3,4,5</sup> The dynamics of organelle degradation in Arabidopsis sieve element differentiation Keywords; Arabidopsis, enucleation, NAC45/86, phloem, sieve element
<sup>1</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology. 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan
<sup>2</sup>Japan Society for the Promotion of Science. 5-3-1 Koujimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083, Japan
<sup>3</sup>Institute of Biotechnology/Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, FIN-00014, Finland.
<sup>4</sup>Cardiff University Cardiff School of Biosciences, The Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff, CF10 3AX, UK.

<sup>5</sup>The Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Bateman Street, Cambridge, CB2 1LR, UK.

1. はじめに

細胞は細胞分化を経て,各々の細胞機能を獲得する。iPS 細胞などの報告により細胞分化の 可塑性が注目される中,不可逆的な細胞分化過程をたどるものがある。特に一部の細胞では, その細胞機能を獲得するためにオルガネラ消失を伴う。哺乳類の赤血球や目の水晶体線維細 胞では,酸素の運搬やレンズによる集光というそれぞれの細胞機能に関連して,プログラム された核の消失が見られる (Nagata 2005)。この核を含むオルガネラの消失は,酸素の運搬に おける細胞内のヘモグロビン含有量の増大や,集光のためのレンズの透明性の維持に,それ ぞれ役立っていると考えられている。維管束植物では導管と篩管が,それぞれの細胞内で水 や光合成産物を輸送するという輸送管としての細胞機能に関連して,その細胞分化過程で, 導管の細胞は細胞壁を残してプログラム細胞死を引き起こし,篩管の細胞は核などのオルガ ネラを消失する (Esau 1950, Furuta et al. 2014a)。

維管束の原生篩部は、主に篩要素と篩伴細胞からなる。篩要素は輸送路を形成し、高度に 連結する篩伴細胞によって機能的にサポートされている。細胞分化過程で細胞死を起こす木 部導管とは異なり、篩要素は生細胞である。篩要素の輸送管としての細胞機能に関連した細 胞の特徴は、古くから多くの植物学者によって詳細に記述されてきた(Evert 1977, Cronshaw 1981, Sjolund 1997)。興味深い特徴の一つは、種によって程度は異なるが、篩要素が成熟過 程で細胞質成分を簡素化することである。細胞質成分の簡素化において、核の消失、粗面小 胞体やゴルジ体の不活性化、細胞質基質の希釈などが起こる(図 1A)。また、細胞質成分の 簡素化だけではなく細胞壁成分の形態も機能的に変化し、細胞壁の肥厚や、篩要素間に篩孔 を持つ篩板の形成が起こる。さらに、転流を調節するのではないかと推測されている Pprotein など、篩要素特異的な細胞構造の構築が見られる。このような細胞の形質の獲得は、 結果的に効率のよい物質輸送に関与していると考えられる。

しかし,細胞分化の側面から見ると,篩要素細胞がこの特徴を獲得するうえでの分子制御 機構については,ほとんどわかっていなかった。そこで本稿では,私たちが明らかにした篩 要素の細胞分化の分子制御機構を紹介する。



**図1. 篩要素の形態**(A) 篩要素の細胞分化の模式図。(B) シロイヌナズナの根の原生篩部の 篩要素。Furuta et al. (2014a)の図を一部改変。

# 2. 篩要素の不可逆的な細胞分化過程

# 2-1. 核消失

篩要素の細胞分化をその不可逆性から考える上で、大きな特徴の一つにプログラムされた 核消失が挙げられる。真核生細胞におけるプログラム核分解過程は、様々な生物種で見ら れ、その様式は様々である。哺乳類の赤血球では細胞成熟における核消失過程が一番研究さ れている例であるが、核はわずかな細胞質とともに細胞から押し出され、押し出された核は マクロファージにより貪食されることで脱核する(Bessis & Bricka 1952, Sadahira & Mori 1999)。繊毛虫のテトラヒメナでは、飢餓状態などで接合による有性生殖が起こり、このと き減数分裂、接合核の融合、有糸分裂、核分解を経て核の再編成が起こるが、この核の分解 にはオートファジーが関与している(Liu & Yao 2012)。水晶体繊維細胞の核消失には動物特

異的な DLAD という DNA 分解酵素が関与していることが報告されている (Nishimoto et al. 2003)。

篩要素の核消失過程では、これまで切片を用いた観察などにより、細胞分化過程で核小体の断片化やクロマチンの凝集, DNA の切断がみられることは報告されていた(Eleftheriou & Tsekos 1982, Wang et al. 2008)。そこで我々は、シロイヌナズナの根の篩要素の核消失過程を3次元的な電子顕微鏡解析や蛍光マーカーを用いた生細胞イメージングにより、さらに詳細に観察した。シロイヌナズナの根では、静止中心(QC)付近で、根の放射パターンに沿って細胞系譜が決定されるため、篩要素は一列の細胞列で観察される(Mähönen et al. 2000, Bonke et al. 2003)。また、メリステムで細胞が生み出され、順々に分化していくので、一細胞列で経時変化を追うことができる(図1B)。

我々は、Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy(SBF-SEM; Denk & Horstmann 2004)を用いた3次元的な走査型電子顕微鏡解析を行った。化学固定したシロイヌナズナの 根をブロックに埋め、1サンプルごとに10-20細胞の篩部要素細胞について、40 nmの間隔 で数千から1万枚の SEM 画像を取得した。その後、3View ソフトウェアで3次元構築し た。その結果、核消失後も核膜は残ること、核消失と細胞質基質の希釈は近いタイミングで 起こるということ、核消失に伴い核の容量が小さくなることなどが見出された(図 2)。残 存する核膜様構造が核の残存物であることは、この構造体に核膜孔があることから判断して いる。



図2. SBF-SEM を用いた篩要素の核消失過程の観察(A)篩要素細胞列。左から順に分化がす すんだ細胞。徐々に分化がすすむ段階を stage 1,核消失の直前を stage 2,核消失直後を stage 3 と表示。Stage 3 では核消失と細胞質基質の希釈が同時に見られる。(B)各分化段階の篩要 素細胞を抜き出して表示。核消失後(stage 3)も核膜が残っている様子が見られる。Furuta et al. (2014b)の図を一部改変。

核消失に関与するメカニズムについて、シロイヌナズナのオートファゴソームをマークするマーカーATG8a(Yoshimoto et al. 2004)が細胞分化途中の篩要素で選択的に発現していることを見出し、篩要素の核消失におけるオートファジーの関与が期待された(図 3A)。しかしATG8aは、細胞質で点様のシグナルとして観察され、テトラヒメナのように核を包むようなシグナルは観察されなかった(図 3B)。同様に、lytic vacuole 形成の核消失への関与も

考え,液胞マーカーである VAMP711 (Geldner et al. 2009)の局在も調べたところ,ATG8a と同様に細胞質に点様のシグナルが観察され,核を包むようなシグナルは見られなかった (図 3C)。さらに,SBF-SEM を用いた解析からも,オートファゴソームや Lytic vacuoleの 核への関与は見られなかった。

では、どのように核は消失するのだろうか。先述の通り、3次元的走査型電子顕微鏡の観察から、シロイヌナズナの篩要素の核消失では核膜が残ること、また核の容積が小さくなったため、どのように核の内容物が消失するのかを観察した。核の内容物のマーカーとして YFP 結合型ヒストン2B (H2B-YFP)を用い、これを篩要素特異的に発現させ、動画解析した。その結果、H2B シグナルは核から細胞質へ拡散し、その後シグナルが消えることがわかった(図3D)。これにより、核の中身が核外へ出て分解され、核膜は縮小して残るという、哺乳類の赤血球やテトラヒメナとは異なる過程を経て、核消失が起こるということが明らかになった。



図3. シロイヌナズナの篩要素の核消失(A)オートファゴソームマーカーpATG8a:GFP-ATG8aは篩要素細胞列で選択的にシグナルが見られる。野生型と同様の篩要素分化を示す nac86 変異体背景で PI 染色と二重染色。(bar = 50 µm)(B)オートファゴソームマーカー GFP-ATG8a の篩要素細胞内での点様の局在。 nac86 変異体背景で DAPI 染色と二重染色。 黄矢印:核消失直前の篩要素細胞,青矢印:核消失直後の篩要素細胞。(C)液胞マーカー GFP-VAMP711 の篩要素細胞内での点様の局在。 nac86 変異体背景で DAPI 染色と二重染 色。黄矢印:核消失直前の篩要素細胞。(D)核マーカーH2B-YFP の篩要素核消失における 経時変化。矢印は,核様のシグナルが細胞質へと拡散し消失する様子を示す。Furuta et al. (2014b)の図を一部改変。

# 2-2. 核以外のオルガネラの形態変化

篩要素の細胞分化において、核以外のオルガネラ形態変化は、いつどのように起こるのだろうか。SBF-SEMを用いて篩要素のオルガネラ形態変化を観察すると、核小体の断片化やオートファゴソームの形成、細胞壁の肥厚、篩板の形成は、篩要素分化の初期にすでに見ら

れることがわかった。これに対し、ゴルジ体の不活性化は核消失の直前に起こることがわかった。これにより、篩要素の細胞分化過程には、若い篩要素から徐々に起こるイベント (stage 1) と、核消失直前に短時間で起こるイベント(stage 2)の少なくとも2つの段階が あると考えられた。



図4. シロイヌナズナの篩要素分化におけるミトコンドリア形態の変化(A)篩要素細胞列 の各細胞における代表的な形のミトコンドリアを示す。SBF-SEMで画像から3次元構築し た。右の方が分化のすすんだ篩要素細胞。若い篩要素細胞では細長いミトコンドリアが, 徐々に丸くなり,核消失後はお椀型になる。(B)篩要素細胞列の各細胞におけるミトコンド リアの数。ミトコンドリアの断片化を推測させる数の増大はみられなかった。(C) stage 1 (cell 2)と stage 2 (cell 6)のミトコンドリアの容積と長軸の長さ。Stage 2 (cell 6)ではミ トコンドリアの長軸の長さが短いものが増えるが,容積は大きくは変わらない。Furuta et al. (2014b)の図を一部改変。

また興味深いことに,篩要素の分化に伴って,ミトコンドリアの形態が変化していくこと を見出した(図4A)。未分化な篩要素細胞(stage 1)では細長いミトコンドリアが観察され るが,核消失の直前(stage 2)になると丸いミトコンドリアが観察された。核消失後の篩要 素(stage 3)では,お椀型のミトコンドリアが観察された。当初は,ミトコンドリアの不活 化を伴う断片化がおこっていると考えたが,SBF-SEMにより各篩要素細胞内のミトコンド リアの数を数えたところ,予備的であるが,ミトコンドリアの形が変わってもミトコンドリ アの数の増加はみられなかった(図4B)。また,各篩要素細胞のミトコンドリアの容積を調 べたところ,未分化な篩要素細胞と核消失の直前の篩要素細胞では,ミトコンドリアの容積

は大きく違わないことがわかった(図4C)。これらの結果から,若い篩要素では細長いミト コンドリアが観察されていたのが,核消失直前に丸いミトコンドリアが観察されるのは,ミ トコンドリアの断片化の結果ではなく,形の変化であることが推測された。この形の変化に ついての生物学的意義は今後解明していきたいと考えている。

#### 3. 篩要素分化の分子制御機構

これまでに篩部の形成に必要な因子として MYB 型転写因子の ALTERED PHLOEM (APL) 転写因子が篩部の運命決定に必要な因子として報告されている (Bonke et al. 2003)。この APL は,篩要素と篩伴細胞で発現し,篩要素特異的なマーカーJ0701 や篩伴細胞特異的な AtSUC2 の正常な発現に必要である。また *apl* 突然変異体の根では篩要素の位置に木部の環状要素が できる。しかし,篩部系譜の細胞を作る非対称分裂は起こっていることから,初期の篩部形 成はおこっていると考えられる。

私たちは, 篩要素の細胞分化過程を制御する機構を明らかにするため, APL の下流の制御 因子を探索することを目的とした。野生型と *apl* 変異体の篩部の細胞のトランスクリプトー ムをマイクロアレイで比較し, 18 個の転写因子を含む篩要素特異的な遺伝子を見いだし た。そのうち, NAC ドメイン転写因子の NAC45 と NAC86 は篩要素特異的に発現しており (図 5A, B), その発現は APL 依存的であった。また *nac45/86* 二重変異体は植物体が小さく なり, 強いアレルでは芽生え致死になるという *apl* 変異体様の表現型を示した。さらに *nac45/86* 二重変異体では, 篩部輸送に異常があることを明らかにした。

そこで私たちは、篩要素の細胞分化過程に異常があるかどうかを調べた。そこで、まず篩 要素の篩板形成を SBF-SEM を用いて調べた。その結果、nac45/86 二重変異体でも、野生型 同様に細胞壁に肥厚や篩板形成は起こることがわかった(図 5C)。次に、nac45/86 二重変異 体における細胞内消化を調べるために、核マーカー(H2B-YFP)の篩要素分化過程における 挙動を調べた。野生型では篩要素分化に伴い H2B-YFP シグナルが消失するが、nac45/86 二 重変異体では伸長した篩要素でも H2B-YFP のシグナルが検出され、核消失が正常に起こっ ていないことが分かった(図 5D)。さらに、SBF-SEM 解析により、nac45/86 二重変異体で は、核小体の断片化やミトコンドリアの形態変化は起こるが、細胞質基質の希釈やゴルジ体 の不活性化が正常に起こらないことが分かった(図 5E)。これらのことから、NAC45/86 は 篩板形成など篩要素の細胞壁の分化や、比較的若い篩要素で起こる細胞内変化の制御には関 与しないが、篩要素分化における細胞内消化を特異的に、かつ統合的に制御することがわか った。

では、NAC45/86 転写因子はどのように篩要素の細胞内消化を制御しているのだろうか。 私たちは、NAC45/86 のターゲット因子を探索するために、マイクロアレイにより野生型と nac45/86 二重変異体の根端のトランスクリプトームを比較した。この解析から、核酸分解ド メインを持つ核局在タンパク質、NAC45/86-DEPENDENT EXONUCLEASE-DOMAIN PROTEIN (NEN4) が同定された。NEN4 は篩要素特異的に発現し、その発現は NAC45/86 に依存していた (図 6 A-C)。そこで、NEN4 の機能を調べるために、nen4 変異体を解析した ところ、野生型と比べて根がやや短いという表現型が見られた。次に nen4 変異体の篩要素 分化における核消失を調べた。野生型では篩要素分化に伴い H2B-YFP シグナルが消失する が, nen4 変異体では根の伸長領域の篩要素でも H2B-YFP シグナルが残っていた(図6D, E)。興味深いことに, nen4 変異体の H2B-YFP シグナルは,若い篩要素細胞では楕円形の核 に一様のシグナルが見られるが,本来なら核消失が完了していると考えられる篩要素細胞で は,核の周縁部でシグナルの強いドーナツ様のシグナルが観察された(図6D,E)。そこで SBF-SEM を用いて詳細に nen4 変異体の篩要素を観察したところ,野生型では核の内容物が 消失しているが, nen4 変異体では核の内容物が一部核膜に付着するように残っていた(図 6F,G)。これは,H2B-YFP のドーナツ様のシグナルと一致すると考えられる。この nen4 変 異体では,細胞質基質の希釈は起こっていた(図6F)。このことから,NEN4 は核消失の完 了に特異的に必要であることが分かった。



図5. NAC45/86は篩要素分化の細胞内消化を特異的に、かつ統合的に制御する (A と B) NAC45 と NAC86 の発現場所。pNAC45:GFP-GUS (A) と pNAC86:GFP-GUS (B) のシグナルは篩要素で特異的に見られる。細胞の輪郭は PI 染色。(C) 野生型と nac45/86 二重変異体 における篩板形成。SBF-SEM で観察した。二重変異体でも篩板は形成される。(D) 野生型 と nac45/86 二重変異体における核消失。核マーカーH2B-YFP (白矢印)は、野生型では細胞分化に伴い消失する(青矢印)が、二重変異体ではシグナルが残っている(黄矢印)。細胞の輪郭は PI 染色。(E) 野生型と nac45/86 二重変異体における細胞内消化。SBF-SEM で観察した。二重変異体では核消失だけではなく、細胞質基質の希釈もおこらない (stage 3)。Furuta et al. (2014b)の図を一部改変。

# 4. おわりに

私たちの研究から, 篩要素の不可逆的な細胞分化の象徴とも言える細胞内消化を統合的に, かつ特異的に制御する分子機構が明らかになった。特に同定された NAC45/86 は, 核小体の断

片化など篩要素分化の初期イベントは制御しないが,核消失やゴルジ体の不活化,細胞質基 質の希釈など,細胞内消化の最終ステップを開始する因子であると考えられた。また核の内 容物が核外へ拡散し分解されるという機構を明らかにし,真核細胞のプログラムされた核消 失機構の多様性の新たな理解に貢献することができた。本研究結果は2014年に学術誌に報告 した(Furuta et al 2014b)。





図6. NEN4はNAC45/86の下流で核消失の完了に必要である (A) NEN4の発現場所。 pNEN4:erYFPのシグナルは篩要素特異的に見られる。細胞の輪郭はPI染色。(B) NEN4の NAC45/86依存性。pNEN4:erYFPのシグナルはnac45/86二重変異体では見られなくなる。 細胞 の輪郭はPI染色。(C) NEN4は核に局在する。pNEN4:NEN4-YFPは篩要素特異的に核にシグナ ルが見られる。細胞の輪郭はPI染色。(DとE) 野生型とnen4変異体における核消失。核マーカ ーH2B-YFP(白矢印)は、野生型では細胞分化に伴い消失する(青矢印)が、変異体ではシグ ナルが残っている(黄矢印)。細胞の輪郭はPI染色。(FとG) 野生型(F) とnen4変異体(G) における細胞内消化。野生型では核内のクロマチン様構造は見られなくなるが、変異体では 核膜付近にクロマチン様構造が見られる(赤矢印)。細胞質基質の希釈やゴルジ体の消失は起 こる。 SBF-SEMで観察した。黒矢印は核膜の破れを示す。 Furuta et al. (2014b)の図を一部 改変。

篩要素の核消失はダイナミックな現象である。他の生物種の核消失と比べると異様だが、 篩要素の輸送管としての細胞機能を獲得するために、NAC45/86 転写因子を含め様々な分子機 構によって厳密に制御されていると考えられる。現在私たちは、核消失に異常がある突然変異

体をスクリーニングしている。すでにいくつかの突然変異体を単離し,原因遺伝子について も同定をすすめている。未だ明らかになっていない実働的な分子制御機構を同定することか ら,細胞分化の本質に迫りたいと考えている。

また,核小体の断片化やミトコンドリアの形態変化など,NAC45/86 非依存的なプロセス を制御する機構についてもよくわかっていない。篩要素特異的に発現する Callose synthase 7 (Cals7) や篩要素で強く発現する CHOLINE TRANSPORTER-LIKE1 (CHER1) は正常な篩 板の篩孔形成に必要であることが報告されている (Barratt et al. 2011, Xie et al. 2011, Dettmer et al. 2014) が,細胞壁の肥厚や篩板形成などの篩要素の細胞壁成分の分化を制御する機構は

未だ不明である。今後研究が発展することが期待される。

# 謝辞

本研究をすすめるにあたり,共著者のHelsinki UniversityのSatu Lehesranta博士, Ilya Belevich 博士, Jung-ok Heoさん, Ove Lindgren博士, Panu Somervuo博士, Raffael Lichtenbergerさん, Raquel Rochaさん, Sari Tähtiharju博士, Petri Auvinen教授, Eija Jokitalo教授, Indian Institute of Technology のShri Ram Yadav博士, Stanford UniversityのAnne Vatén博士, Wageningen University のBert De Rybel博士, Ghent UniversityのGert Van Isterdaelさん, Tom Beeckman教授, Mahidol UniversityのSiripong Thitamadee博士に感謝いたします。また,技術面で支援してくださった, Helsinki UniversityのAri Pekka Mähönen博士, Ricardo Siligatoさん, Iris Sevilemさん, Katia Kainulainenさん, Mikko Herpolaさん, M. Lindmanさん, A. Salminenさん, 奈良先端科学技 術大学院大学の乾奈布子さんにも感謝いたします。

また、本稿を書くに当たり、大阪大学の柴岡弘郎名誉教授と東京大学の福田裕穂教授にア ドバイスをいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

## 引用文献

- Barratt, D.H.P., Kölling, K., Graf, A., Pike, M., Calder, G., Findlay, K., Zeeman, S.C., & Smith, A.M. 2011. Callose synthase GSL7 is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155: 328-341.
- Bessis, M. & Bricka, M. 1952. Dynamic aspect of blood cells; study by phase contrast microcinematography. *Revue d'hematologie* 7: 407-435.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mähönen, A.P., Hauser, M.T., & Helariutta, Y. 2003. APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. *Nature* 426: 181-186.
- Cronshaw, J. 1981. Phloem structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. 32: 465-484
- Denk, W. & Horstmann, H. 2004. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct threedimensional tissue nanostructure. *PLOS Biol.* 2: e329.
- Dettmer, J., Ursache, R., Campilho, A., Miyashima, S., Belevich, I., O'Regan, S., Mullendore, D.L.,
  Yadav, S.R., Lanz, C., Beverina, L., Papagni, A., Schneeberger, K., Weigel, D., Stierhof, Y.D.,
  Moritz, T., Knoblauch, M., Jokitalo, E., & Helariutta, Y. 2014. CHOLINE TRANSPORTER-LIKE1
  is required for sieve plate development to mediate long-distance cell-to-cell communication. *Nat. Commun.* 5: 4276.

- Eleftheriou, E.P. & Tsekos, I. 1982. Development of protophloem in roots of *Aegilops comosa* var. *thessalica*. II. Sieve-element differentiation. *Protoplasma* 113: 221-233.
- Esau, K. 1950. Development and structure of the phloem tissue. II. The botanical review 16: 67-114.
- Evert, R.F. 1977. Phloem structure and histochemistry. Annu. Rev. Plant Physiol. 28: 199-222.
- Furuta, K.M., Hellmann, E., & Helariutta, Y. 2014. Molecular control of cell specification and cell differentiation during procambial development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 607-638.
- Furuta, K.M., Yadav, S.R., Lehesranta, S., Belevich, I., Miyashima, S., Heo, J.O., Vatén, A., Lindgren, O., De Rybel, B., Van Isterdael, G., Somervuo, P., Lichtenberger, R., Rocha, R., Thitamadee, S., Tähtiharju, S., Auvinen, P., Beeckman, T., Jokitalo, E., & Helariutta, Y. 2014. Arabidopsis NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation. *Science* 345: 933-937.
- Geldner, N., Dénervaud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.D., & Chory, J. 2009. Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J*. 59: 169-178.
- Liu, M.L. & Yao, M.C. 2012. Role of ATG8 and autophagy in programmed nuclear degradation in Tetrahymena thermophile. *Eukaryot. Cell* 11: 494-506.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., & Helariutta, Y. 2000. A novel two component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev.* 14: 2938-2943.
- Nagata, S. 2005. DNA degradation in development & programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol*. 23: 853-875.
- Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y. Uchiyama. Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y., & Nagata, S. 2003. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* 424: 1071-1074.
- Sadahira, Y. & Mori M. 1999. Role of the macrophage in erythropoiesis. Pathol. Int. 49: 841-848.
- Sjolund, R. D. 1997. The phloem sieve element: A river runs through it. Plant Cell 9: 1137-1146
- Wang, L., Zhou, Z., Song, X., Li, J., Deng, X., & Mei, F., 2008, Evidence of ceased programmed cell death in metaphloem sieve elements in the developing caryopsis of *Triticum aestivum* L. *Protoplasma* 234: 87-96.
- Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z., & Hong, Z. 2011. CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant J.* 65: 1-14.
- 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.