植物培養細胞の機能分化と物質生産に関する基盤的研究†

(昭和62年度日本農芸化学会賞受賞)

山 田 康 之

(京都大学農学部)

近年植物細胞培養技術を基本とする高等植物の分子、細胞レベルにおける基礎、および応用研究の進歩は著しい。これらの高等植物の分子、細胞育種の新知見は植物の品種改良、新品種育成ならびに有用物質生産のための有効な手段として利用され、一つの新しい研究領域としての展開をみせている。

高等植物における最大の利点は細胞から個体を再生させることである。植物細胞が個体再生の分化全能性を持ち、培養細胞から植物体を再生することが実験的に示されたのは1950年代である。もちろん、いずれの植物細胞からでも個体を再生させることができるわけではないが、ナス科植物の場合は容易である。

さらに1985年、現在までできないとされていたイネのプロトプラストから植物個体を再生することができた。植物細胞では組換えDNAまたは細胞融合の操作はプロトプラストレベルで行うことが前提であり、この結果は新しく組み込まれた遺伝情報を有するプロトプラストから直接に個体を再生させることが可能となったことを示している。これらの細胞育種学的研究は急速な展開を示しており、細胞レベルにおいて特殊な形質発現する細胞の選抜、たとえば薬剤耐性細胞の選抜とそれからの個体再生、有用二次代謝産物高産生細胞の選抜と培養など、これら細胞育種の基本的知見から応用的利用にまで発展している。

われわれの研究室では、高等植物細胞培養における植物生長調節物質による細胞分裂と器官分化の制御を解析するとともに、培養植物の形質発現に異質性の存在する

ことを見出し、それに基づき特定の機能を分化発現する細胞を選抜し、これらの細胞の諸特性を遺伝学的ならびに生化学的に究明した。さらにそれを応用して、色素、アルカロイド、酵素の物質生産に関する基盤的研究を行い、かつこれらのアルカロイド高産生培養細胞および培養組織を用いることにより現在まで未知であったイソキノリン系アルカロイド、トロパンアルカロイドなどの生合成経路を明確にするとともに、工業的生産への道を拓いた。また、遺伝子工学的手法を用いてアルカロイド生合成に関与する特定酵素のcDNAクローニングを行い、その全塩基配列をも決定した。

一方、新細胞工学技術として膜の流動性を利用した細胞融合法、電気的刺激による細胞融合装置の開発、ならびにその利用による有用物質生産の科間雑種細胞の作出などの新しい細胞工学的領域を開発した。その主な成果について概説する。

I. 植物培養細胞における機能分化とその機構に関する研究

1. 禾本科植物、とくにイネの細胞およびプロトプラストからの個体再生

過去、禾本科植物の培養細胞からの個体再生はきわめて困難とされており、とくにイネプロトプラストからの個体再生に関する成功例はなかった。著者らはイネ培養細胞からの個体再生のみならず⁽¹⁾、イネプロトプラストからの個体再生にも初めて成功し、禾本科植物の新品種作出への新しい途を拓いた^(2,3) (図1, 2)。

イネのプロトプラストから個体再生に成功した理由は①個体再生能の高いイネ品種を選抜した②細胞質の充実した分裂活性の高い培養細胞系統を選抜した③イネプロトプラストがよく分裂するRY-2培地を開発した④個体再生のためホルモンを含まないN₆培地を用いたことで

† Fundamental Studies on the Differentiation of Metabolic Function and the Production of Useful Compounds in Cultured Plant Cells. Yasuyuki YAMADA (Faculty of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606)

図 1 イネプロトプラストの分裂からコロニー形成

図 2 イネプロトプラスト由来の細胞塊から不定胚形成、個体再生

ある。

この研究においてイネの品種としてフジミノリのほか、細胞質雄性不稔品種 A-58 CMS についてもプロトプラストの分裂、個体再生に成功した。さらに、この A-58 CMS 培養細胞のミトコンドリア中に4本のプラスミド様環状DNAの存在を初めて見出し、B1 (2.1 kbp), B2 (1.4 kbp), B3 (1.4 kbp), B4 (0.9 kbp) と命名した。このプラスミド様DNA B1とB4の全塩基配列を決定し、データベース検索した結果、トウモロコシのミトコンドリアに広く分布する 1.9 kbp の小環状 DNA と高いホモロジーを有する4領域を見出し、かつこの4領域の位置関係が保存されていることを明らかにした⁽⁴⁾ (図3)。

2. カルス誘導における DNA 複製誘導機構と器官再分化

植物細胞培養には植物生長調節物質としてオーキシンとサイトカイニンが要求されるが、これらの低分子化合物の細胞内挙動に関しては、ほとんど判明していなかった。われわれは、カルス誘導に最も高い活性を示す 2,

4-D の細胞内挙動と DNA 複製との関係を明らかにした。細胞内に積極的に吸収された 2,4-D は、細胞核内に蓄積され、核内クロマチン、とくにリジンリッチヒストンと複合体形成し、その結果として、リジンリッチヒストンの塩基性度が変化し、塩基性核タンパク質としての性質を失った⁽⁵⁻⁸⁾。これと同様の現象が *in vitro* でも認められ、リジンリッチヒストンが可溶化し、DNA から解離することを初めて見出した^(9,10)。この複合体形成に続いて DNA の複製が起こり、2,4-D のこの挙動が組織からの脱分化細胞分裂に密接な関係のあることが示唆された。サイトカイニンによる器官分化に関して器官分化の第一次的变化として現れる細胞のリグニン合成系の酵素活性を追跡し、細胞集塊化との相関性を調べた⁽¹¹⁻¹³⁾。器官分化の指標としての仮導管様細胞の出現はリグニン合成関連酵素活性と密接な関係があり、サイトカイニンにより誘導されるコーヒール酸-O-メチル転移酵素、5-ヒドロキシフェルラ酸-O-メチル転移酵素活性がサイトカイニンによる器官分化の律速制御に関与していることを明らかにした^(14,15)。

図3 イネ A-58 CMS のミトコンドリア中の小環状 DNA B1 (2.1 kbp) とトウモロコシのミトコンドリア中の 1.9 kbp の小環状 DNA のホモロジー領域の位置関係

3. 植物培養細胞における葉緑体形成と光合成機能化

高等植物培養細胞は本来の光合成機能によって生育する性質を失い、通常培養培地に糖源を要求する。われわ

図4 光独立栄養培養細胞における炭酸固定酵素活性

れは、培養細胞内葉緑体形成の最適条件の設定と緑化細胞の選抜により、植物細胞の光独立栄養培養法を確立した^(16,17)。光合成のみにより生育する光独立栄養タバコ培養細胞は葉肉細胞に近似した葉緑体微細構造と光合成機能を有していた。しかし炭酸固定反応に関しては、 C_3 植物であるにもかかわらず、リンゴ酸等 C_4 化合物への高い光合成的炭酸固定能を示すとともに、 C_3 炭酸固定酵素である RuBP カルボキシラーゼより高い PEP カルボキシラーゼ活性の存在を見出した (図4)⁽¹⁸⁻²⁰⁾。PEP カルボキシラーゼは C_4 光合成の第1炭酸固定酵素として C_4 光合成において重要な役割を担っているが、 C_3 植物においては解糖系と TCA 回路をつなぐ重要な位置にありながらその機能は未だ不明な点が多い。われわれは放射能標識化合物の追跡実験により、 C_4 化合物への高い炭酸固定は C_4 植物や CAM 植物におけるような脱炭酸-RuBP カルボキシラーゼによる再固定反応ではなく、タンパク合成に伴う TCA 回路中間物質の補充 (anaplerotic) 反応と考えられることを示した。次いで本酵素を単一な活性タンパク質にまで精製し、分子量 11 万のサブユニットからなる 4 量体であること、またその諸性質を調べることににより、基質親和性等から本酵素が C_3 植物型 PEP カルボキシラーゼであることを初めて明らかにした。現在これらのデータをもとにして PEP カルボキシラーゼの遺伝子のクローニングを行っており、これにより C_3 植物と C_4 植物の分化について情報を得

表1 タバコ緑色培養細胞、 C_3 植物、 C_4 植物の PEP カルボキシラーゼの性質

Properties of PEP carboxylase	Cultured tobacco cells	C_3 plants	C_4 plants
M. W. (kd)	440	350*	400***
(native enzyme)		560**	
M. W. of subunit (kd)	110	130**	100***
Subunit No.	4	4(6)	4
pH Optimum	8.5~9.0	8.0~9.0	8.0~9.0
Isoelectric point	5.4	—	—
Substrate affinity (K_m values)			
PEP (mM)	0.06	0.14+0.07	0.59+0.3
HCO_3^- (mM)	0.20	0.10~0.30	0.10 (pH 8)
Mg^{2+} (mM)	0.08	0.097+0.057	0.50+0.30
Saturation curve	Michaelis-Menten type	Michaelis-Menten type	Sigmoid type

*, Peanut; **, Spinach; ***, Maize.

るとともに、植物細胞の新しい機能開発が行えるものと考えている(表1)。以上の基礎研究にあわせて、われわれはこの光独立栄養タバコ培養細胞を利用することにより、光化学系Ⅱの電子伝達系を阻害する除草剤アトラジンに対する抵抗性細胞を選抜した。過去、アオビユではチラコイド膜の 32 K ダルトンのポリペプチドがアトラジンの結合タンパク質であり、アトラジン抵抗性アオビユでは 32 K ダルトンポリペプチドの 264 番目のセリンがグリシンに変化している^(21,22)。すなわち DNA レベルで AGT が GGT に変異していることが判明していたが、今回われわれが光独立栄養培養タバコ細胞から選抜したアトラジン抵抗性細胞では同じ 264 番目のセリンがスレオニンに変化しており DNA レベルでは AGT の G が C に突然変異していることを見出した⁽²³⁾。このような突然変異を有するアトラジン抵抗性細胞が得られたのは初めてであり、将来抵抗性獲得についての 32 K ダルトンポリペプチドの高次構造と考え合わせると非常に興味ある知見である。

II. 植物培養細胞における二次代謝産物生産とその生成過程に関する研究

1. 物質生産と培養細胞のモザイク構成

われわれは、培養細胞が物質生産能に関してモザイク構成をなしていることを提唱するとともに、細胞小集塊法⁽²⁴⁾とプロトプラスト法⁽²⁵⁾の二つの細胞選抜法を考案、実施することによって親植物以上に高い有用物質生産能を有する細胞を獲得する手段を確立した。その結果として、アントシアニン、シコニン、ベルベリン、スコボラミン、レセルピン、ペルオキシダーゼなどの工業的大量培養の可能性を示した(表2)。

2. セリバオウレン培養細胞におけるベルベリン生産とその生成過程

イソキノリンアルカロイドであるベルベリンは、黄色ブドウ球菌など腸内病原性細菌に対して殺菌効果を有する重要な局方医薬品である。原料となるオウレンは生育が遅く、4～5年の栽培年月を要し、現在は一部輸入に依存している。セリバオウレンカルスに細胞小集塊法を適用してベルベリン高生産細胞を選抜し、細胞乾重当り8～13%のベルベリンを生産する優秀な細胞株を確立した^(29,30)。本細胞株は安定してベルベリンを生産し、増殖が旺盛である。さらに培地にジベレリンを添加することにより、そのベルベリン生産能が顕著に増大することが認められ、共同研究者らによって近く工業的生産に移される予定である。一方、ベルベリン高生産細胞が得られたので、2分子のチロシンからベルベリンに至る生成過程について調べた。ノルラウダノソリンからレチクリンを経てスクレリンに変換されることが推定されていたが、ノルラウダノソリンからレチクリンに変換される際に起こる3種類のメチル化反応の詳細は明らかでなかった。われわれはこのベルベリン高生産細胞を用いてこの興味深い問題の解明を試みた。2分子のチロシンがドーパミンとジヒドロキシフェニルアセトアルデヒドにそれぞれ変換され、その両者の縮合反応によりノルラウダノソリンができるとされているが、まずそのベンジルイソキノリン骨格の6位の水酸基にメチル基が導入され、ノルラウダノソリンが6-O-メチルノルラウダノソリンに変換されることが判明した。次に4位の水酸基にメチル基が導入され、6-O-メチルノルラウダノソリンはノルレチクリンに変換される。つづいて2位のN原子にメチル基が導入され、レチクリンが生成することが明らかとなった。このレチクリンは、他のイソキノリンアルカ

表 2 植物細胞、器官培養による有用物質生産の含量

Product	Source plant	Content	
		Cultured cells	Intact plant
Berberine	<i>Coptis japonica</i>	13.2% DW	5% DW
Berberamine	<i>Stephania cepharantha</i> ^a	1.46% DW ⁽²⁶⁾	0.3% DW
Hyoscyamine	<i>Hyoscyamus albus</i> ^a	1.2% DW	0.1% DW
Scopolamine	<i>Duboisia leichhardtii</i> ^a	1.16% DW	0.7% DW
Reserpine	<i>Rauwolfia serpentina</i>	0.16% DW ⁽²⁷⁾	0.06% DW
Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	23.2% DW ⁽²⁵⁾	0.02% DW
Anthocyanin	<i>Euphorbia millii</i>	8.02 A ₅₃₀ /mgFW	N. D. ^b
Biotin	<i>Lavandula vera</i>	3.5 μg/gFW	0.09 μg/gFW
Peroxidases	<i>Armoracia rusticana</i>	1820 μg/gFW ⁽²⁸⁾	300 μg/gFW

^a Root cultures. ^b N. D., not determined.

ロイドへの変換の分岐点に位置する重要な化合物であり、レチクリン生成に関与するこれらのメチル化反応を触媒する酵素を精製し、諸性質を調べた。その結果いずれの酵素も高度の基質特異性を有し、ノルラウダノソリンからレチクリンに至る各反応は図5に示すとおりであった^(81,82)。またレチクリンからスクレリンに至る架橋反応すなわちベルベリンブリッジ形成反応を触媒する酵素についても精製し、その性質が明らかとなった(図5)。

さらにベルベリン生成の最終反応、テトラヒドロベルベリンからベルベリンへの脱水素反応の酵素の立体化学的特異性およびその諸性質を明らかにし、初めて単一酵素として精製した⁽⁸³⁾。

さらにわれわれは、ベルベリン高産生細胞を用いてこのテトラヒドロベルベリンオキシダーゼ cDNA を得て

その全塩基配列を決定した。この塩基配列の解析結果、本 cDNA 中には250 アミノ酸をコードする唯一のORFが存在し、開始コドンにすぐ引き続いてテトラヒドロベルベリンオキシダーゼのN末端部のアミノ酸配列が認められた⁽⁸⁴⁾。

このように、培養細胞の大量培養によるベルベリンの生産方法に対し、遺伝子組換え技術によって生成に関与する酵素の大量生産が基本的には可能であることを初めて示した。

3. ヒヨス、ドゥボイシア培養根におけるトロパンアルカロイド産生とその生合成過程

トロパンアルカロイドは二環式アミン構造のトロパン環を有する二次代謝産物である。この一群のアルカロイドのうちで hyoscyamine (hyos) や scopolamine (scop) などの hydroxytropine と tropic acid とのエステルはヒ

図5 ノルラウダノソリンからレチクリン、スクウレリンを経由してベルベリンに至る生合成経路

ヨス等の数種のナス科植物に含まれる。これらナス科特有のアルカロイドは副交感神経末端抑制作用を持ち、重要な医薬品として利用されている。ナス科植物の細胞培養は数多く報告されているが、母植物以上のアルカロイドが蓄積された例はきわめて少ない。一方、トロパンアルカロイドの生合成経路は放射性同位体の投与実験等から、オルニチンとフェニルアラニンを出発物質としてそれぞれ tropine と tropic acid が生合成され、両者が脱水縮合して hyos が生成し、さらにエポキシ化されて scop が生合成されると推定されているが酵素学的証明はない。われわれは植物組織培養法を用いてアルカロイド生合成能の高い培養系を確立し、次にこの培養系を利用して scop 生合成に重要な役割を果たしていると考えられる新規の酵素を発見し、性質を調べた。

ヒヨス、ドゥボイシア両植物の培養細胞から分化した培養根の根端組織について選抜を行い、過去最高のスコポラミン高生産性のドゥボイシア培養根を得た^(85, 86)。また、ヒヨス培養根についても 1-ヒヨスシアミンのエポキシ化物であるスコポラミンを高生産する培養根を得た⁽⁸⁷⁾。スコポラミンは、副交感神経抑制作用を有するきわめて重要なトロパンアルカロイドであるが、天然植物ではその含量が 1-ヒヨスシアミンに比して少ない植物が多い。このエポキシ化の中間体としては、6 β -ヒドロキシヒヨスシアミンが同定されているのみで、その酵素反応はまったく不明であったが、われわれはスコポラミン高生産ヒヨス培養根を用いることにより、1-ヒヨスシアミンは 2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼにより 6 β -ヒドロキシヒヨスシアミンに変換するという注目すべき事実を見出し、本酵素を“ヒヨスシアミン 6 β -ヒドロキシラーゼ”と命名し、本酵素を精製しその性質を究明した⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾。このヒヨスシアミン 6 β -ヒドロキシラーゼは分子状酸素の 1 原子を 1-ヒヨスシアミンの 6 β 位に取り込み、水酸化すると同時に他の酸素 1 原子を 2-オキソグルタル酸に取り込み、コハク酸と二酸化炭素に脱炭酸する酵素で反応には 2 価鉄とアスコルビン酸が必要である (図 6)。また、ヒヨスシアミン、スコポラミンを生合成する植物の培養根、培養茎葉、カルスについて本酵素活性とトロパンアルカロイドの蓄積を調べたところ、スコポラミン生合成能力のない細胞には本酵素活性は見出せず、スコポラミン生合成能力のある細胞ではアルカロイド蓄積比にはほぼ比例した酵素活性が存在した。すなわち本酵素はスコポラミン生合成に特異的

図 6 ヒヨスシアミン 6 β -ヒドロキシラーゼによる 1-ヒヨスシアミンから 6 β -ヒドロキシヒヨスシアミンへの変換反応

であり、細胞中のスコポラミンと 6 β -ヒドロキシヒヨスシアミン含量は本酵素活性とヒヨスシアミン供給量によって制御されていることが推察される。本酵素の発見により、スコポラミンと類似の薬理作用がある 6 β -ヒドロキシヒヨスシアミンの大量生産が初めて可能となった。

一方、6,7-デヒドロヒヨスシアミンは植物体からも培養細胞からも単離されていないが、この化合物はヒヨスシアミン 6 β -ヒドロキシラーゼによりエポキシ化されスコポラミンに変換されたので、このデヒドロ体が *in vivo* でスコポラミン生合成の中間体となっているかを調べたところ、植物体中ではスコポラミン生合成は 6,7-デヒドロヒヨスシアミンを経過せず、6 β -ヒドロキシヒヨスシアミンの脱水素反応によりスコポラミンが生合成されるものと考えられ、またこの 6 β -ヒドロキシヒヨスシアミンからスコポラミンへの変換反応についても明らかになりつつあり、スコポラミンの生産開発も近いものと考えられる⁽⁴⁰⁾ (図 7)。

III. 新細胞融合法の開発と応用

1. 新細胞融合法の開発

われわれは、細胞融合速度の律速段階がプロトプラス

図 7 L-ヒオスシアミンから6β-ヒドロキシヒオスシアミンを経てスコポラミンへ至る生合成経路

トの膜流動性に起因するとの見地から、細胞を低温培養してその膜構成の不飽和脂肪酸含量比を上げることにより、細胞融合速度を促進する新しい方法を開発した^(41,42)。本法では、細胞融合速度が速く、また細胞融合促進剤を用いることなく融合させることも可能であった。この膜流動性を利用した融合法と電気融合法を組み合わせる新しい融合装置を開発、現在工業的に生産されている⁽⁴³⁾。

2. 細胞融合法を応用した雑種細胞と雑種植物の作出

前述のトウダイグサ科のハナキリン細胞とキンボウゲ科のセリバオウレン細胞を、電気融合法にて細胞融合させ、科間雑種細胞を作出し、その形質発現を調べた(図8)。ハナキリン培養細胞は明所下大量のアントシアニンを生じ、それを液胞内に蓄積する。一方、セリバオウレン培養細胞は暗所下黄色のベルペリンアルカロイドを液胞内に蓄積する。電気的刺激にて細胞融合させたこれら両者の雑種細胞を培養した。8000 lux の明所下培養した融合細胞は赤色のアントシアニン合成の形質発現を示し、暗所下培養した細胞は黄色のベルペリンの生成を示した。この研究によって、有用二次代謝産物産生する細胞の科間雑種が作出され、その二次代謝物質産生の遺伝的形質は光によって調節を受けて発現することが示された^(44,45)。以上のように、われわれの研究室では植物培養細胞を新しい研究の素材として、その機能分化の発現に関する研究を行い、その知見に基づいて有用物質の生産に関する基盤的研究を展開してきた。真核生物の培養細胞の機能的分化の発現機構はきわめて複雑であり、また精巧な仕組みから成り立っている。将来この研究領域

図 8 ハナキリン細胞とセリバオウレン細胞の電気融合がますます解明され、発展してゆくことを念願している。新しい領域として、高等植物の細胞培養を開始して以来終始ご指導、ご鞭撻を賜わった恩師京都大学名誉教授奥田東先生、ならびに本研究領域を長年月にわたり温かく見守り、応援していただいた京都大学農学部農芸化学科の高橋英一教授、ならびに諸先生、諸先輩、友人の方

方、さらに本研究領域の展開に種々の援助を賜った日本農芸化学会の皆様に心からお礼申し上げます。

本研究は京都大学農学部農芸化学教室、ならびに生物細胞生産制御実験センターにおいて、きわめて有能な多数の共同研究者とともに行われたものであり、これらの共同研究者のご協力とご努力に深甚の謝意を表します。

- (1) T. Nishi, Y. Yamada and E. Takahashi : *Nature*, **219**, 508 (1968).
- (2) Y. Yamada, Z. Q. Yang and D. T. Tang : *Rice Genetics Newsletter*, **2**, 94 (1985).
- (3) Y. Yamada, Z. Q. Yang and D. T. Tang : *Plant Cell Rep.*, **5**, 85 (1986).
- (4) T. Shikanai, Z. Q. Yang and Y. Yamada : *Plant Cell Physiol.*, in press (1987).
- (5) T. Yasuda and Y. Yamada : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 649 (1970).
- (6) Y. Yamada, T. Yasuda, M. Koge and J. Sekiya : *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 99 (1971).
- (7) Y. Yamada and T. Yasuda : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 488 (1971).
- (8) T. Yasuda and Y. Yamada : *FEBS Lett.*, **18**, 115 (1971).
- (9) 山田康之 : 植物の化学調節, **6**, 138 (1971).
- (10) Y. Yajima, T. Yasuda and Y. Yamada : *Phytochemistry*, **14**, 1939 (1975).
- (11) J. Sekiya and Y. Yamada : *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **52**, 246 (1974).
- (12) Y. Yamada and T. Kuboi : *Phytochemistry*, **15**, 395 (1976).
- (13) T. Kuboi and Y. Yamada : *Phytochemistry*, **15**, 397 (1976).
- (14) T. Kuboi and Y. Yamada : *Plant Cell Physiol.*, **19**, 437 (1978).
- (15) T. Kuboi and Y. Yamada : *Biochem. Biophys. Acta*, **542**, 181 (1978).
- (16) Y. Yamada and F. Sato : *Plant Cell Physiol.*, **19**, 691 (1978).
- (17) F. Sato, K. Asada and Y. Yamada : *Plant Cell Physiol.*, **20**, 193 (1979).
- (18) 佐藤文彦, 山田康之 : 植物の化学調節, **13**, 75 (1978).
- (19) K. Nishida, F. Sato and Y. Yamada : *Plant Cell Physiol.*, **21**, 47 (1980).
- (20) F. Sato, K. Nishida and Y. Yamada : *Plant Sci. Lett.*, **20**, 91 (1980).
- (21) J. Hirschberg and L. McIntosh : *Science*, **222**, 1346 (1984).
- (22) 古澤 敏, 山田康之 : 細胞工学, **4**, 62 (1985).
- (23) 佐藤文彦, 重松由夫, 山田康之 : 未発表.
- (24) Y. Yamamoto, R. Mizuguchi and Y. Yamada : *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 113 (1982).
- (25) Y. Fujita, S. Takahashi and Y. Yamada : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1755 (1985).
- (26) 杉本幸裕, 山田康之, 杉村順夫, 岡本暉公彦 : 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, 1987, p.711.
- (27) O. Yamamoto and Y. Yamada : *Plant Cell Rep.*, **5**, 50 (1986).
- (28) Y. Yamada, S. Kobayashi, K. Watanabe, U. Hayashi, Y. Yajima and H. Inoue : *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **37**, 1 (1987).
- (29) Y. Yamada and F. Sato : *Phytochemistry*, **20**, 545 (1981).
- (30) F. Sato and Y. Yamada : *Phytochemistry*, **23**, 281 (1984).
- (31) 山田康之 : 化学と生物, **22**, 475 (1984).
- (32) 山田康之, 吉田 茂, 岡田尚輔 : 日本農芸化学会昭和 61 年度大会講演要旨集, 1986, p. 288.
- (33) N. Okada and Y. Yamada : *Phytochemistry* (in press).
- (34) 岡田尚輔, 小泉 望, 山田康之, 田中俊宏, 大久保博品, 中西重忠 : 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, 1987, p.470.
- (35) Y. Yamada and T. Endo : *Plant Cell Rep.*, **3**, 186 (1984).
- (36) T. Endo and Y. Yamada : *Phytochemistry*, **24**, 1233 (1985).
- (37) T. Hashimoto and Y. Yamada : *Planta medica*, **47**, 195 (1983).
- (38) T. Hashimoto and Y. Yamada : *Plant Physiol.*, **81**, 619 (1986).
- (39) T. Hashimoto, Y. Yukimune and Y. Yamada : *J. Plant Physiol.*, **128**, 61 (1986).
- (40) T. Hashimoto and Y. Yamada : *Eur. J. Biochem.*, **164**, 277 (1987).
- (41) M. Senda, H. Morikawa, H. Katagi, T. Takada and Y. Yamada : *Theor. Appl. Genet.*, **57**, 33 (1980).
- (42) Y. Yamada, Y. Hara, H. Katagi and M. Senda : *Plant Physiol.*, **65**, 1099 (1980).
- (43) 十川好志, 三浦靖高, 岩崎 功, 山田康之 : 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, 1987, p.707.
- (44) Y. Yamada and H. Morikawa : "Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures," ed. by K.-H. Newmann, W. Barz and E. Reinhard : Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg, 1985, p. 255.
- (45) Y. Yamada, H. Morikawa, F. Sato and Y. Yamamoto : *Proc. Jpn. Acad.*, **63**, Ser. B, 1 (1987).