植物メタボロミクスの開拓と薬用資源植物ゲノミクスへの展開

齊藤 和季^{a,b}

Development of Plant Metabolomics and Medicinal Plant Genomics

Kazuki Saito^{a,b}

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University; Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan; and ^bRIKEN Center for Sustainable Resource Science; Suehiro-cho 1-7-22, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan.

(Received August 22, 2017)

A variety of chemicals produced by plants, often referred to as ‘phytochemicals’, have been used as medicines, food, fuels and industrial raw materials. Recent advances in the study of genomics and metabolomics in plant science have accelerated our understanding of the mechanisms, regulation and evolution of the biosynthesis of specialized plant products. We can now address such questions as how the metabolomic diversity of plants is originated at the levels of genome, and how we should apply this knowledge to drug discovery, industry and agriculture. Our research group has focused on metabolomics-based functional genomics over the last 15 years and we have developed a new research area called ‘Phytochemical Genomics’. In this review, the development of a research platform for plant metabolomics is discussed first, to provide a better understanding of the chemical diversity of plants. Then, representative applications of metabolomics to functional genomics in a model plant, *Arabidopsis thaliana*, are described. The extension of integrated multi-omics analyses to non-model specialized plants, e.g., medicinal plants, is presented, including the identification of novel genes, metabolites and networks for the biosynthesis of flavonoids, alkaloids, sulfur-containing metabolites and terpenoids. Further, functional genomics studies on a variety of medicinal plants is presented. I also discuss future trends in pharmacognosy and related sciences.

Key words—plant genomics; medicinal plant; metabolomics; secondary metabolite; biosynthesis; pharmacognosy

1. はじめに：研究の意義と目的

植物は、人類の生存に必須な医薬品、食料、工業原料となる化学的多様性に富んだ代謝産物を生産している。植物が生産する代謝産物の総数は 20 万種と考えられていたが、植物代謝産物の公開データベース構築とその統計学的な解析から 100 万種と見積もられている。¹⁾ これは植物代謝産物についてのデータベース KNApSack の解析から、1 植物種あたりのユニークな成分数が平均 4.76 種であり、それに一般に認められている植物種の総数 223000 種を乗じた推定数である。このように、膨大な数の植物化学成分が存在すると考えられ、この植物の持つ化学的多様性のゲノム基盤の解明とその応用が急務

である。

この化学多様性を生み出す原理とその意義を解明することは、植物の生存戦略の根源に迫ることができるとばかりでなく、この原理を応用することによって有用な植物代謝産物を合理的な戦略によって生産することができる。現在までに多くの薬学徒が植物等の天然資源を薬とする研究を続けてきたが、その過程で誰しもが「なぜ植物はこんなにも多くの多様性に富む化学成分を作るのだろうか?」「一体どういう原理で作られて、その植物にとってどんな意味があるのだろうか?」という疑問を持ったことであろう。この疑問は多くの研究者に共通する学術的興味だけでなく、どのように天然資源を薬として使うかという薬学の根源にも及ぶ問題である。

この目的のためには、網羅的な代謝産物解析に関するメタボロミクスを基盤としたゲノム機能科学によって根源的な答えに近づくことができる。つまり、ゲノムやメタボロームレベルでの植物代謝産物の生産とその制御の原理、その生物における生物学

^a千葉大学大学院薬学研究院 (〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)、^b理化学研究所環境資源科学研究センター (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22)
e-mail: ksaito@faculty.chiba-u.jp

本総説は、平成 29 年度日本薬学会賞の受賞を記念して記述したものである。

的意味、進化の痕跡や道程を明らかにし、その知見に基づきゲノムに基盤をおいたバイオテクノロジーへの道筋を提示することができる。このような根源的な理解は、植物科学や薬学分野全体に大きなインパクトを与え、持続的な薬用資源開発にもつながる。

筆者らは、過去約 15 年の研究により、世界で初めてメタボロミクスを中心とした統合オミクスの研究基盤を構築し、モデル植物シロイヌナズナや薬用植物・作物に展開して新規で重要な遺伝子、代謝産物、代謝ネットワークを同定、解明した。さらに、このように多様な植物代謝をゲノムレベルから理解し有効利用するための基幹分野である「ファイトケミカルゲノミクス」という新しい研究分野を開拓した。

なお、このようなある植物種や近縁種に特異的な植物成分は古くから「二次代謝産物」と呼ばれているが、この用語はどの生物にも共通に存在する「一次代謝産物」に対して重要度が低いという間違った印象を与え易いので、最近ではこの二次代謝産物を「特異的代謝産物 (Specialized metabolites)」と呼ぶことも多い。これらの二次代謝産物がそれを生産する植物の進化において極めて重要な役割を果たしてきたことは最近の研究で明らかにされつつある。²⁾

2. ファイトケミカルゲノミクスの基本的考え方

ファイトケミカルゲノミクスは Fig. 1 に示すように、植物成分とその生産に注目したゲノム機能科学とデータ駆動型のシステム生物学と捉えることができる。³⁾ そこでは、ゲノミクス、トランスクリプトミクスとともにメタボロミクスを統合し、システム全体の振る舞いを解析するシステム生物学が大きな役割を占める。ここではシステム生物学は検証可能な仮説形成ステップとして寄与する。次に、ここで得られた仮説は逆遺伝学、逆生化学、数学的モデルを通してゲノム機能科学として検証され、必要ならば仮説の修正を行う。さらに、検証された仮説は遺伝子組換えや合成生物学、ゲノム編集によってバイオテクノロジーとして応用される。

このように一貫した基本的コンセプトを確立し、ファイトケミカルゲノミクス研究を推進した。

3. メタボロミクスを中心とした統合オミクスの基盤構築

ゲノミクス、トランスクリプトミクスは核酸の 4

塩基 (4 デジット) で表現できるので、高速化、自動化は比較的容易であり、特に過去数年は次世代 DNA シークエンサーの発展により少なくともデータ取得は簡便にできるようになった。しかし、メタボロミクスに関してはその情報を格納している代謝産物が有する化学的性質の多様性と複雑性のために、核酸の塩基配列決定のような自動化は極めて困難であり、おそらく今後も不可能であろう。そこで、まず植物メタボロミクスの基盤技術開発を行い、各種質量分析装置によるメタボローム解析をゲノム、トランスクリプトームと統合して未知遺伝子の機能を決定する統合オミクス解析の研究プラットフォームを構築した。

具体的には以下の 2 項目の基盤開発を行った。

(i) 高機能質量分析計を用いた植物メタボローム分析,⁴⁻¹¹⁾ データベース開発,¹²⁻¹⁴⁾ 代謝産物を同定するためのピークアノテーション手法,¹⁵⁻¹⁷⁾ メタボロミクスを指向した植物成分の網羅的な単離と同定,^{18,19)} 単一細胞及びオルガネラにおけるメタボロミクス,^{20,21)} などのメタボローム解析の基盤技術開発^{22,23)}

(ii) メタボロミクスとトランスクリプトミクス、ゲノミクスを統合して遺伝子と代謝産物を対応させるゲノム機能科学のための統合オミクス手法の開発²⁴⁻³¹⁾

ついで、これらの開発したプラットフォームを用いて、植物におけるゲノム機能科学のための統合オミクスを推進し、新規遺伝子機能やネットワークを同定し、バイオテクノロジー応用につなげる新手法の開発と一般化を推進した。

これらは、2000 年に千葉大学で CREST プロジェクトとして開始し、さらに 2005 年に理化学研究所に日本の植物メタボロミクスのナショナルプラットフォームとして本格的に立ち上げ、その以降現在まで継続して世界の最先端プラットフォームと

齊藤和季

長野県出身。1977 年東京大学薬学部卒、同大学院博士課程中退、慶應義塾大学医学部助手、82 年薬学博士号取得。ゲント大学留学、千葉大学薬学部助手、講師、助教授を経て、95 年同教授に昇任。2005 年から理化学研究所グループディレクターを兼務、現在副センター長。専門は、生薬学、植物ゲノム機能科学、植物バイオテクノロジー。

Fig. 1. Data-driven Systems Biology and Functional Genomics

して機能し、研究コミュニティにも提供している。これを用いて、下記に述べるようにシロイヌナズナや薬用植物、作物のゲノム機能科学（未知遺伝子や新規代謝産物の同定、代謝物-遺伝子ネットワークの解明）に適用して、多くの新規遺伝子や代謝産物の発見につながった。^{22,23,32-35)}

4. モデル植物シロイヌナズナにおけるメタボロミクスとゲノム機能科学

アブラナ科の一年草シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、高等植物の中ではゲノムサイズが小さく、一世代が短く室内栽培が簡単で多数の種子が採れる、形質転換が容易であるなどの理由で、植物分子生物学のモデル植物として広く基礎研究に用いられている。2000年12月には高等植物として初めて全ゲノム配列が解読された。³⁶⁾

このようにゲノム配列が解読されたことにより、従来の変異体の形質からその変異遺伝子を同定する順（行）遺伝学に対して、ゲノム上の配列だけが分かっている機能未知遺伝子から、その遺伝子が規定する形質を解析することによって遺伝子機能を同定する逆（行）遺伝学が可能になった。この逆遺伝学の効率的な実現には、ゲノム配列に加えて、遺伝子アノテーション、全遺伝子についての挿入変異体パ

ネル、全遺伝子の完全長 cDNA コレクション、及びそれらのデータベースなどが必要であるが、幸いなことに日本も含めた国際的なシロイヌナズナ研究コミュニティの努力によって、2000年以降これらの公共的な研究リソースが揃えられた。そこで、このシロイヌナズナを用いてメタボロミクスを基盤とした統合ゲノム機能科学研究を推進した。^{29,37)}

4-1. シロイヌナズナにおける硫黄代謝系の遺伝子機能同定 硫黄を含んだ植物成分は特異な生物活性を有するものが多く、また植物細胞においても重要な役割を果たしている。^{38,39)} そこで、硫黄代謝系の新規遺伝子、制御ネットワーク及び制御機構をゲノムワイドに同定した。

硫黄同化や代謝系に重要な遺伝子として、ゲノム上に複数個存在する硫酸イオントランスポーター、⁴⁰⁻⁴⁵⁾ セリンアセチル転移酵素、⁴⁶⁻⁵⁰⁾ システイン合成酵素及び同族の β -シアノアラニン合成酵素、⁵¹⁻⁵³⁾ ATP スルフリラーゼ、^{54,55)} APS キナーゼ、⁵⁶⁾ グルタチオン関連代謝酵素、^{57,58)} セリン合成酵素⁵⁹⁻⁶²⁾などを主にシロイヌナズナから同定し、その機能や制御をメタボロミクスと組み合わせることにより世界に先駆けて解明した。また、硫黄同化と同時にグルコシノレートなど含硫黄代謝産物の分解

を制御する転写因子⁶³⁾やマイクロ RNA^{64,65)} など硫黄代謝に係わる新規な分子制御因子の同定にも成功した。

硫黄代謝に係わる個別の遺伝子の機能解明のほか、硫黄欠乏下でのトランスクリプトームとメタボローム解析^{66,67)}やプロテオーム解析⁶⁸⁾など統合オミクス研究を進めた。このような統合解析からグルコシノレート生合成の酵素遺伝子^{69,70)}や制御に係わる MYB 転写因子⁷¹⁾や新規制御因子⁷²⁾の同定を行った。また、このように得られた硫黄代謝系に関与する遺伝子を用いた有用植物の作出⁷³⁻⁷⁵⁾など薬学的な展開を図った。

4-2. シロイヌナズナでのフラボノイドの構造多様性を決定している生合成遺伝子多様性の解明

フラボノイドはグルコシノレートとならび、シロイヌナズナにおける代表的な二次代謝産物である。シロイヌナズナのフラボノイドとしてはアントシアニン、フラボノール、プロアントシアニジンなどが知られている。^{18,76)}

まず、単一の MYB 転写因子が過剰発現し、アントシアニンが高蓄積している機能獲得型変異体のトランスクリプトミクスとメタボロミクスによって、アントシアニン生産に係わるゲノム遺伝子候補を包括的にリスト化した。次に、これらの候補遺伝子のノックアウト変異体の代謝産物解析によって当該遺伝子の機能を同定することに成功した。⁷⁷⁾

さらにこの手法をより一般化して、シロイヌナズナの公共的なトランスクリプトームデータ⁷⁸⁾から遺伝子共発現ネットワークを解析して、フラボイド生合成遺伝子群のモジュールを抽出し、そのネットワークモジュールに含まれる遺伝子の欠失変異体の代謝産物解析から多くのフラボイド生合成遺伝子の機能を決定した。^{29,79-87)} その結果、フラボノイドの基本骨格の生合成遺伝子のみならず、構造的多様性に寄与する修飾酵素遺伝子群（配糖化酵素、アシル転移酵素など）の機能をほぼすべて同定することができた。

これにより、シロイヌナズナにおけるフラボノイドの構造的多様性と遺伝子多様性を統一的に議論することが可能になった。^{76,88)} これは高等植物で初めて二次代謝産物の化学構造の多様性の根源であるゲノム多様性を解明した歴史的な成果である。さらに、同定した遺伝子や変異体を用いて抗酸化活性な

どを増強した有用形質付与植物の作出などバイオテクノロジーに応用した。⁸⁹⁻⁹²⁾

4-3. シロイヌナズナでのその他の代謝系遺伝子の機能同定とネットワーク解明

環境ストレスなどの非生物学的ストレス下（硫黄やリンなどの栄養欠乏、紫外線、^{91,93)} 乾燥、⁹⁴⁾ 低温、⁹⁵⁾ 高温⁹⁶⁾ など）や代謝系遺伝子の変異体⁹⁷⁻¹⁰¹⁾でのメタボローム解析から、新規遺伝子、新規代謝産物、新規代謝ネットワークの同定に成功した。^{92,102)} これらの環境ストレスによってある種のアミノ酸、糖、フェニルプロパノイド、フラボノイド生産が誘導され、それぞれのストレス緩和機能を有することを実験的に明らかにした。

特に、脂質メタボロミクスを応用して、葉緑体での含硫黄脂質生合成に特異的に関与する新規配糖化酵素を同定したこと¹⁰³⁾や、リン欠乏に応答して誘導されリン欠乏緩和機能を有する新規なグルクロン酸脂質を発見し、その生合成経路と遺伝子群を同定したこと、¹⁰⁴⁻¹⁰⁷⁾ 高温ストレス下での脂質リモデリングを解明したこと⁹⁶⁾などが特筆すべき成果として挙げられる。これらは植物の生存にとって最も重要な環境ストレス耐性の新たな分子メカニズムの発見である。さらに、時計遺伝子変異体でのメタボローム解析から生物時計とミトコンドリア代謝の密接な相互作用を解明した。^{35,108)}

5. 薬用資源植物や作物におけるメタボロミクスとゲノム機能科学

植物科学の基礎的な研究はモデル植物であるシロイヌナズナを用いることによって最も効率的に推進できる。しかし、薬学的な応用を目指した研究は、実際に薬用として用いられている薬用資源植物や重要な作物において研究する必要がある。そこで、上記のシロイヌナズナで開発したゲノム機能科学の手法を、薬用資源植物や重要作物に応用して、多くの重要な遺伝子の機能を同定し、さらにバイオテクノロジーに応用した。

5-1. 世界で初めてのトランスジェニック薬用植物の作出

逆遺伝学的手法によって遺伝子機能を同定するためには、その遺伝子を有する植物において当該遺伝子を破壊したり、過剰発現した植物を作出する必要がある。また、薬用成分の生産制御などのバイオテクノロジー応用にも、遺伝子組換えしたトランスジェニック薬用植物を作出する技術の確立

が必須である。筆者らは、1990年代からアグロバクテリウム-Ti 又は Ri プラスミド系を使って、世界で初めてトランスジェニック（遺伝子組換え）薬用植物の作出に成功した。¹⁰⁹⁻¹¹¹ これらは、甘草、¹¹² ジギタリス、¹¹³ ベラドンナ、¹¹⁴ *Scoparia dulcis*,¹¹⁵ シソ、¹¹⁶ チャボイナモリ¹¹⁷などの薬用植物にモデル遺伝子や除草剤耐性遺伝子を導入発現した研究であり、その後大きく展開した薬用資源植物における代謝エンジニアリングやゲノム研究の重要な基盤となっている。

5.2. シソでのアントシアニン生合成 シソ (*Perilla frutescens* var. *crispa*) の葉及び枝先は生薬ソヨウ（紫蘇葉、蘇葉）として漢薬や民間薬、食品として広く用いられている。主成分はアントシアニンやロズマリン酸などのポリフェノール類、モノテルペンを主とする精油が知られている。

シソにはアントシアニンを生産する赤ジソと生産しない青ジソという成分変種が知られている。そこで、赤ジソ、青ジソを用いて、アントシアニンの生合成酵素遺伝子^{118,119}や転写制御因子¹²⁰⁻¹²³を網羅的にクローニングし、それらの遺伝子機能を解析した。¹²⁴ 特に、赤ジソ、青ジソについて、その発現に差のある遺伝子フラグメントを網羅的に同定できる mRNA ディファレンシャル発現解析¹²⁵⁻¹²⁷によって、新規のアントシアニン 5-O-配糖化酵素遺伝子^{128,129}を単離することができた。これが契機となり、その後他の植物種^{130,131}からも同様の遺伝子を単離することができた。また、アントシアニンの発色段階に関与するアントシアニン合成酵素遺伝子を単離し、その組換えタンパク質の酵素活性を初めて *in vitro* で検出することに成功し、^{132,133} 発色段階の生化学的な機構解明を計算化学も含めて詳細に行った。¹³⁴⁻¹³⁶ これらの分子生物学的なアントシアニン生合成研究は、さらに赤ジソ、青ジソのメタボローム解析¹³⁷や次世代シーケンサーによるディープ・トランスクリプトーム解析¹³⁸によって、より統合的に理解できる段階にきている。

5.3. カンプトテシン生合成と自己耐性機構

臨床的に用いられている抗がん成分カンプトテシン生産機構についてもゲノム機能科学によりいくつかの新発見をした。

まず、カンプトテシン生産性が安定的に良好なアカネ科チャボイナモリ (*Ophiorrhiza pumila*) と類

縁植物 (*O. liukuensis*, *O. kuroiwai*) の毛状根培養細胞を前述のアグロバクテリウム-Ri プラスミド系により確立した。^{117,139,140} この毛状根細胞から、カンプトテシン生合成に関与するいくつかの酵素遺伝子を単離する^{141,142}とともに、パイオリアクターでの生産系¹⁴⁰や毛状根細胞からのチャボイナモリ植物の再分化系も確立した。¹⁴³ さらに、¹³C で標識したグルコースを用いたトレーサー実験によって、カンプトテシンはいわゆる非メバロン酸経路である MEP 経路由来のセコイリドイドとシキミ酸経路由来のトリプタミンの複合経路によって生合成されることが確認された。¹⁴⁴ さらにこの毛状根からホルモン処理によってカンプトテシン生産性がほとんどみられない懸濁培養細胞系を確立し、遺伝的には同一なカンプトテシン生産細胞（毛状根）と非生産細胞（懸濁培養）について、代謝産物のターゲット解析、¹⁴⁵ メタボローム及びトランスクリプトーム解析¹⁴⁶を行った。このように二次代謝産物の生産細胞と非生産細胞でのディファレンシャル発現解析は、生合成関連遺伝子の同定に非常に有力な手段である。特に、このチャボイナモリのケースでは PCR-セレクトサブトラクションと次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析¹⁴⁶が有効であり、生合成に係わる2個の新規転写因子をコードする遺伝子を同定した。^{147,148} また、チャボイナモリ毛状根は二次代謝産物としてカンプトテシンのようなモノテルペノイドインドールアルカロイドだけでなく、アントラキノン類、クロロゲン酸などの二次代謝成分も生産するが、これらの生合成候補遺伝子も同定することができた。¹⁴⁶

このように統合オミクスから絞り込んだ生合成候補遺伝子の機能同定のためには、RNA 干渉による当該遺伝子のノックダウンが有効である。特に、チャボイナモリにおいて二次代謝生合成系を負に制御する MYB 転写因子¹⁴⁷や、正に制御する AP2/ERF 転写因子¹⁴⁸の機能を組換え毛状根を用いた RNA 干渉によって *in vivo* で決定することができた。また、カンプトテシン生合成の初発段階に係わるトリプトファン脱炭酸酵素遺伝子を RNA 干渉によってノックダウンしたチャボイナモリ毛状根から、生合成中間体あるいは代謝産物と考えられる未知成分ピークを高速液体クロマトグラフィー-フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析計 (LC-

FT/ICR-MS) によるメタボローム解析によって検出することができた。¹⁴⁹⁾

カンプトテシンはすべての真核細胞の核に存在する DNA トポイソメラーゼ I に作用し、その活性を阻害して細胞分裂を止め抗がん活性を発揮する。したがって、カンプトテシンを生産する植物細胞は、このカンプトテシンの毒性に対する自己耐性機構を備えているはずである。このような毒性成分に対する植物の自己耐性機構としては、特異的な輸送機構によるターゲット分子からの隔離などいくつかの機構が知られていた。¹⁵⁰⁾ そこで、カンプトテシンの細胞内外での輸送と隔離なども検討したが、¹⁵¹⁾ 最終的にカンプトテシンに対する自己耐性を付与する機構としてターゲット分子である DNA トポイソメラーゼ I の点突然変異を発見した。¹⁵²⁾ この突然変異は、トポイソメラーゼ I による酵素反応の中間体であるニックの入った DNA と共有結合を形成する活性中心残基に隣接する一アミノ酸残基アスパラギンからセリンへの変異であった。さらに、驚くべきことに全く同じ変異がカンプトテシンに対して耐性となったヒトの白血病細胞にも見つかったのである。¹⁵³⁾ 詳しい研究の結果、この保存性の高いアスパラギンからセリンへの変異は DNA トポイソメラーゼ I の酵素活性を維持しながら、カンプトテシンとトポイソメラーゼ I との水素結合が形成されず、その結果カンプトテシン-酵素-DNA の三者複合体が形成できないため耐性を付与する唯一の変異であった。^{152,153)} この変異は、アカネ科及びチャボイナモリ属の内外を含めて、カンプトテシンを生産する植物種にはかならず起こっており、同属の近縁種も含めて生産しない植物種にはみられないという、カンプトテシン生産性との極めて厳格な対応関係がみられた。^{152,154)} これらの事実から、この変異が自己耐性に必須であり、カンプトテシン生産能力と自己耐性能の獲得が密接に共進化したという植物二次代謝の遺伝子進化について新しい仮説を提唱することができた。^{153,155)} さらに計算化学によって別の変異も含めた DNA トポイソメラーゼ I の構造とカンプトテシン毒性について理論的な考察を行った。¹⁵⁶⁾ これらの成果は、植物二次代謝の分子進化学的な解明のみならず、将来の抗がん薬の開発や薬剤耐性メカニズムの解明にもつながる発見である。

5-4. キノリチジンアルカロイド生合成 生薬苦参(クジン)の主要成分マトリンに代表されるマメ科植物のキノリチジンアルカロイドに関する化学的研究は、日本の薬学の祖である長井長義博士による最初の報告¹⁵⁷⁾以来、日本の薬学の重要な研究テーマであった。^{158,159)} 筆者らは村越千葉大学名誉教授らが先駆的に開拓したこのマメ科植物キノリチジンアルカロイドに関する植物生理学及び化学分類学研究^{160,161)}を継続しながら、苦参の基原植物クララ(*Sophora flavescens*)の組織培養によるマトリンの生産¹⁶²⁾などバイオテクノロジー研究も推進した。その結果、マメ科ルピナス属植物を用いて、アシル型キノリチジンアルカロイドの生合成に係わるアルカロイドアシル転移酵素の精製^{163,164)}と分子クローニング¹⁶⁵⁾が世界で初めて成功した。

これらの生化学的なアプローチに加え、ルピナス(*Lupinus angustifolia*)のアルカロイドを含む成分変種と含まない成分変種を用いた分子生物学的なアプローチも取り入れた。アルカロイド成分パターン¹⁶⁶⁾と遺伝学的及び生化学的マーカーの解析^{167,168)}から始まり、ついで遺伝子発現のディファレンシャル解析を行った。このアルカロイドを含むビター種と含まないスイート種の遺伝子発現のディファレンシャル解析から、アルカロイド生産に関連していると予想される複数の遺伝子断片を得ることができた。それらの断片配列のアノテーションから、さらに候補遺伝子を絞り込み、完全長の cDNA を得た。その結果、*L. angustifolia* からキノリチジンアルカロイド生合成の初発段階を触媒し、リジンからカダベリンを生成するリジン脱炭酸酵素遺伝子を初めて単離した。¹⁶⁹⁾ さらに、クララやイヌクララなどの他のキノリチジンアルカロイド含有植物からも同様にリジン脱炭酸酵素遺伝子をクローン化した。これらは一次代謝のポリアミンの生産に関与するオルニチン脱炭酸酵素が変異した酵素と考えられ、活性中心の基質結合キャビティの大きさを決定する一アミノ酸残基の変異がリジン脱炭酸活性に必須であることを明らかにした。¹⁶⁹⁻¹⁷¹⁾ さらに、トウゲシバナなどのリジン-カダベリン由来アルカロイドを生産する遠縁の植物のリジン脱炭酸酵素においても、この重要なアミノ酸変異は保存されていた。¹⁷²⁾ さらに、進化学的な計算からこの変異は正の選択圧を受けていることを証明し、遠縁植物におけるアルカロ

イド生産遺伝子の収斂進化を実証した。^{172,173)} また、単離したリジン脱炭酸酵素遺伝子を用いてタバコ毛状根においてアナバシン生産などリジン由来アルカロイドの生合成工学を行った。¹⁷⁴⁾ このように、クララでのマトリン生合成の初発段階に係わる遺伝子を解明できたと考えている。長井博士以来の日本の薬学における中心テーマの末端に係わり、分子生物学的なアプローチで少しでも新しい展開に貢献できたことは望外の喜びである。

5-5. 含硫黄二次代謝成分の生合成と分解 含硫黄植物成分の生合成研究は、既に述べたようにシロイヌナズナでの研究がその基盤となっているが、モデル植物であるシロイヌナズナでのゲノム研究を開始する以前に、ホウレンソウからのシステイン合成酵素 cDNA を世界で初めてクローン化したのがその端緒である。⁵¹⁾ このときのクローニング手法は、精製した酵素タンパク質の部分アミノ酸配列を微量分析法によって決定し、その配列を基に合成した縮重 DNA プローブを用いての cDNA ライブラリーのスクリーニングであった。その後、大腸菌の変異体を用いた遺伝的相補によるスクリーニングも活用した。これらの手法によりホウレンソウからの局在性の異なるシステイン合成酵素や β -シアノアラニン合成酵素 cDNA,^{51,52,175-178)} システイン合成だけでなく β -置換アラニン類の生合成にも関与するスイカ酵素の cDNA,^{179,180)} さらにセリンアセチル転移酵素 cDNA^{46,181-183)} などを単離した。このように植物の硫黄同化及びシステイン生合成研究の分子生物学研究を世界に先駆けて開拓し、後のシロイヌナズナでのゲノム機能科学研究につなげた。

含硫黄性の二次代謝成分の生合成や代謝については、ニンニク、タマネギ、ニラなどのヒガンバナ科ネギ属植物に多く含まれ、特徴的な生物活性を有する香辛性成分であるアリインなどアルキル（アルケニル）システインスルフォキシドの生合成や代謝について分子生物学的な知見を得た。研究の初期にはアリインを分解して香氣成分を生成する段階に関与するアリナーゼ cDNA を単離し、¹⁸⁴⁾ その性質を調べるとともに植物での局在性を明らかにした。¹⁸⁵⁾ さらに最近、アリイン生合成の鍵反応に関与する γ -グルタミルトランスペプチダーゼ¹⁸⁶⁾ とスルフォキシド生成を触媒するフラビン含有型酸素添加酵素¹⁸⁷⁾ の cDNA をニンニクからクローニングするこ

とに成功し、生合成反応の詳細が解明されつつある。

また、超高分解能の FT-ICR/MS を用いた網羅的な含硫黄成分の解析法（S-オミクス）を開発し、^{10,188)} その手法をヒガンバナ科ネギ属植物の含硫黄成分の網羅的プロファイリングに応用した。¹⁸⁹⁾ さらに、この手法を用いてアスパラガスから血圧降下作用が期待される新規の含硫黄代謝産物（アスパラプチンと命名）の単離と同定にも成功した。¹⁹⁰⁾ また、シロイヌナズナでの研究を基にして、⁷¹⁾ 同じアブラナ科ケールでのグルコシノレート生合成制御因子の同定と機能解析も行った。¹⁹¹⁾

含硫黄植物成分は多くの場合特徴的な生物活性を有しており、特異な生合成機構や酵素によるものが多く、二次代謝産物の生合成の環境適応と進化の観点から興味深いテーマとなる。

5-6. 甘草（カンゾウ）でのグリチルリチン生合成 甘草は七割以上の漢方処方に配合されており、その主要甘味成分であるグリチルリチンには抗炎症作用や肝機能改善作用など多くの薬理活性が報告されている。甘草に関する研究の初期には甘草根からの DNA 抽出と DNA 判別¹⁶⁷⁾ やウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) 毛状根への外来遺伝子導入¹¹²⁾ を研究した。その後、甘草のゲノム研究を全日本レベルの研究コンソーシアムを組織、主導して、多くの方々との共同研究として推進した。甘草の基原植物であるウラルカンゾウの完全長 cDNA ライブラリーを作製し、それぞれの cDNA クローンの端読み配列データである expressed sequence tag (EST) データベースを作成した。¹⁹²⁾ それらを基にして、複数のシトクローム P450 遺伝子を抽出し、その発現パターンがグリチルリチンの蓄積とよく相関するクローンをグリチルリチン生合成遺伝子候補として、その機能を証明した。その結果、トリテルペノイドの共通中間体である β -アミリンからグリチルリチンのアグリコンであるグリチルレチン酸生合成に至る 2 つのシトクローム P450 遺伝子を同定し、^{193,194)} 同時に組換え酵母でグリチルレチン酸の生産を実現させた。¹⁹⁴⁾ さらに最近、グリチルリチン含有量の異なる複数のウラルカンゾウ品種と組織の RNA-Seq 解析を行い、¹⁹⁵⁾ ついでドラフトゲノム配列（約 400 Mb）を決定した。¹⁹⁶⁾ その結果、甘草の薬効成分の 1 つであるイソフラボノイドの生合成に係わる 3 個の酵素遺伝子がゲノム上でクラス

ター化して存在していることが明らかになった。¹⁹⁶⁾これは漢方にも用いられる生薬基原植物での初めてのゲノム配列決定の快挙であり、今後の甘草における基礎研究とバイオテクノロジー応用の基盤になる成果である。

5-7. 広範な薬用資源植物のゲノム科学 前述したように興味深い二次代謝産物を含むいくつかの薬用植物について、そのゲノム機能科学の基礎研究としてディープ・トランスクリプトーム解析やゲノム解析を行ったが、さらに最近では広範に多くの薬用植物について組織的なゲノム関連解析を行っている。

RNA-Seq 解析によるトランスクリプトミクスは、前述のシソ、¹³⁸⁾ チャボイナモリ、¹⁴⁶⁾ ウラルカンゾウ¹⁹⁵⁾に加え、クズ (*Pueraria lobata*),¹⁹⁷⁾ クララ (*Sophora flavescens*),¹⁹⁸⁾ トチバニンジン (*Panax japonicus*),¹⁹⁹⁾ センブリ (*Swertia japonica*),²⁰⁰⁾ ホオズキ (*Physalis alkekengi*),²⁰¹⁾ スイカズラ (*Lonicera japonica*),²⁰²⁾ レンギョウ (*Forsythia suspensa*), トリカブト (*Aconitum* sp.), サンシュユ (*Cornus officinalis*) (いずれも投稿準備中) などについて終了又は進行中である。これらのトランスクリプトーム解析は、それぞれの薬用部位を含む複数部位の解析に加え、可能な限り成分パターンの異なる近縁種の RNA-Seq データやメタボロームデータも統合して、それぞれに特異的な薬効成分の生合成や代謝、輸送に関する遺伝子候補を絞り込んでいる。

また、ゲノム配列解析は前述のウラル甘草のゲノム配列決定¹⁹⁶⁾に続き、現在、スペインカンゾウ、新疆カンゾウ、チャボイナモリ、シナニッケイなどのゲノム配列決定を進めている。これらの薬用植物のゲノム科学は将来の生薬学や薬用植物学の分野において重要な研究基盤となると確信している。^{203,204)}

5-8. イネなどの重要作物でのゲノム機能科学

メタボロミクスを基盤とした植物のゲノム機能科学研究は、薬用植物やその有効成分の生合成研究に留まらず、広く農作物などにも展開することが重要と考えられる。イネのバイオリソース (完全長 cDNA 発現体, コアコレクション, 組換え自殖系統, 特定遺伝子破壊など) のメタボローム解析を系統的に行い、^{8,19,23,205-210)} 窒素代謝と二次代謝を制御している新規遺伝子の同定、^{205,211,212)} イネの形質と関連する代謝産物や遺伝子の同定、^{213,214)} アミノ酸

生合成遺伝子や代謝ネットワークの役割、²¹⁵⁻²¹⁷⁾ 代謝産物を決定する量的形質遺伝子座 (QTL) の同定、^{218,219)} メタボローム・ゲノムワイド関連解析 (GWAS),²²⁰⁾ 形態形成やストレス応答²²¹⁻²²⁵⁾ など、薬学的観点からのイネ育種や有用性への分子レベルでの知見を得た。

また、メタボローム解析を遺伝子組換えトマト²²⁶⁾や遺伝子組換えダイズ²²⁷⁾の実質的同等性の評価に応用するなど、実用的及び社会的な問題についても取り組んでいる。

6. 本研究の国際的研究コミュニティへの貢献と今後の期待

幸いにして本研究は、メタボロミクスを中心とした植物ゲノム機能科学研究として国際的な研究コミュニティにおいて客観的な指標から高く評価された。特に、2004 年と 2005 年に出版した 2 報の論文^{67,77)}は、それぞれの翌年の植物バイオテクノロジー分野の最高被引用論文として連続して *Nature Biotechnology* 誌に取り上げられた。^{228,229)} また、2007 年に *PNAS* に発表した論文⁷¹⁾はトムソン・ロイター社の Fast Breaking Papers-2008 として表彰された。²³⁰⁾ さらに筆者は 3 年連続 (2014, 2015, 2016 年) してトムソン・ロイター社 (現・Clarivate Analytics 社) が選定した Highly Cited Researchers (植物・動物学分野) の一人に選ばれた。²³¹⁾ また、2010 年及び 2015 年には米国生物学会 (American Society of Plant Biologists; ASPB) が、同学会の 2 つの学術雑誌に過去 5 年間に出版された論文の被引用度調査から最も影響の大きな研究者として選定した ASPB TOP AUTHORS に連続して選ばれた。²³²⁾ このように、論文被引用件数という客観的な指標から、本研究が国際的な研究社会から評価され、その発展に大きく貢献したことが分かる。

さて、以上の研究成果から今後どのような展開が可能であろうか？ 以下に私見を述べたい。

前述したように植物が生産する代謝産物の総数は 20 万種から 100 万種と推定されているが、各種のデータベース登録数や生物活性プロジェクトでの研究成果に基づく筆者の推定によると、そのうち約 10% の植物種の化学成分や生物活性が調べられているにすぎない。したがって、残りの 90% の植物種の生物活性成分の探索は今後の重要な課題である。2015 年のノーベル生理学医学賞に輝いたクソニン

Fig. 2. Concept of Coherent Network from Plant Genome to Prevention and Therapeutics through Plant Metabolome, Biological Activity and Personal Genome

ジンからの抗マラリア薬アルテミニシンの発見には、中国の古典も寄与しており伝承医薬的な知識の重要性をも示唆している。²³³⁾ このような新活性成分の探索にも非ターゲット型のメタボロミクス研究が貢献できる。^{34,190)}

2016 年末時点でゲノム配列が報告されている植物は 200 種足らずであり、そのうち約 20 種が薬用植物である。²⁰⁴⁾ しかし、ゲノム配列決定技術の進歩は非常に急速であり、数年後には多くの薬用植物のゲノム配列が決定されていると思われる。そうすると、既にイネで行われたように、²²⁰⁾ メタボロミクスと組み合わせたメタボローム GWAS 解析によって、二次代謝産物の生産に必要なゲノム領域を容易に同定できるようになる。それによって現在はゲノムサイズの小さな微生物で成功しているゲノムマイニング手法²³⁴⁾ による生合成遺伝子の同定が、今後ゲノムサイズが巨大な植物ゲノムでも可能になると期待される。特に、植物ゲノムにおいても二次代謝産物の生合成関連遺伝子がゲノム上でクラスターを形成している例が多く報告されてきており、^{196,235-237)} ゲノム配列からの未知の生合成遺伝子の予測と同定が今後一層加速すると思われる。

さらに、このように新規に同定されたゲノム遺伝子を利用したバイオテクノロジーへの応用が期待できる。²³⁸⁾ 従来型の外来遺伝子の導入発現ではあるが生合成経路を構成する一連の複数遺伝子を組み合わせたコンビナトリアル生合成による実用的な物質生産の試み²³⁹⁾ や、最近注目を集めているゲノム編集技術による生合成経路の改変^{240,241)} などが期待される。また、植物によらず微生物を宿主とした植物二次代謝産物の生産のための合成生物学的なアプローチも期待される。酵母でのアルテミニン前駆体の生産²⁴²⁾ やモルヒネの生産²⁴³⁾ が既に成功している。今後、多くの稀少で高価な植物成分の工業生産や、複数の遺伝子を組み合わせたコンビナトリアル生合成による新規成分の生産が酵母などの微生物を

宿主とした合成生物学によって実現できる可能性がある。

その際、海外の植物資源から化学成分やその遺伝子を探索する研究は、資源提供国との間で、遺伝資源の取得とその公正かつ衡平な利益配分について定めた名古屋議定書²⁴⁴⁾ に則って行う必要がある。そのためにも植物多様性が豊富な資源提供国との国際連携がますます重要である点も指摘しておきたい。

最後に薬学及び生薬学・医療薬学的な観点からも展望を述べてみたい。生薬や漢方は多くの化学成分からなる混合物を医薬として用いて、ヒトの病態をかならずしも個別要素や分子に還元せずむしろこれを全体として捉え、システム全体として予防や治療を試みるところに特徴がある。われわれ人類はこれらの経験的な知恵を数千年に渡り暗黙知として蓄積してきたと見なすことができる。その暗黙知を現代的な言葉での形式知に変換しようとする試みが、生薬学や漢方医療学という学問であるとも言える。一方、ゲノムも地球に誕生した生命が 30 数億年の間に蓄積してきた暗黙知であり、これを形式知に読み解こうとする試みがゲノム科学である。このように考えると暗黙知から形式知への解読とその原理への昇華は共通した作業であると言える。したがって、生薬として用いる植物のゲノム情報からはじまり、それらを用いての個別のゲノムを有する個人の予防・治療を一貫した軸で考えることが可能であろう (Fig. 2)。この、(1)植物ゲノム、(2)植物からの混合成分 (生薬メタボローム)、(3)それが示す生物活性スペクトル、(4)予防・治療すべきヒトの個人ゲノム、(5)最終的な予防・治療効果、という 5 つのモジュールに対して一貫した情報ネットワークを構築できれば、個人の健康・疾患に対して最適な予防・治療効果を与える生薬の組み合わせを、植物ゲノムまで落とし込んで特定することができるはずである。これはまさしく個人のテーラーメイド医薬を、植物ゲノムまで遡って多様な化学成分からなる植物医薬とし

てデザインし、予防や治療に供給できることになる。実は、このような方向の研究は生薬の組み合わせである漢方医薬の情報学的解析から部分的に試みられ始めている。²⁴⁵⁾ 今後、このような方向に発展するためには、植物ゲノム多様性や生薬メタボローム、その生物活性スペクトルなどのデータ蓄積が必須であることは言うまでもない。さらに、個人のゲノム解析の一般化とともに、急速に発展している人工知能 (AI) の導入によってこの方向は確実に加速すると期待される。

7. おわりに

以上のように、本研究成果は、植物由来の薬用成分のみならず、植物の有する化学的多様性の根源的理解とそのバイオテクノロジー研究に大きく貢献し、将来の生薬学や天然資源系薬学の方向性をも提示する。今後、植物成分としてだけでなく、植物の有効利用によって地球的規模で人類が直面している健康、食料、環境に関する根本的な諸問題の解決に植物科学が大きく寄与することが期待されている。²⁾

謝辞 本研究は、千葉大学大学院薬学研究院遺伝子資源応用研究室及び理化学研究所環境資源科学研究センター統合メタボロミクス研究グループを中心とする国内外の共同研究者により遂行されたものです。これらのすべての共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Afendi F. M., Okada T., Yamazaki M., Hirai-Morita A., Nakamura Y., Nakamura K., Ikeda S., Takahashi H., Altaf-Ul-Amin M., Darusman L. K., Saito K., Kanaya S., *Plant Cell Physiol.*, **53**, e1 (2012).
- 2) Saito K., “Shokubutsu wa Naze Kusuri o Tsukurunoka,” Bungeishunju Ltd., Tokyo, 2017.
- 3) Saito K., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **16**, 373–380 (2013).
- 4) Suzuki H., Sasaki R., Ogata Y., Nakamura Y., Sakurai N., Kitajima M., Takayama H., Kanaya S., Aoki K., Shibata D., Saito K., *Phytochemistry*, **69**, 99–111 (2008).
- 5) Matsuda F., Yonekura-Sakakibara K., Niida R., Kuromori T., Shinozaki K., Saito K., *Plant J.*, **57**, 555–577 (2009).
- 6) Nakabayashi R., Tsugawa H., Kitajima M., Takayama H., Saito K., *Front. Plant Sci.*, **6**, 1127 (2015).
- 7) Nakabayashi R., Saito K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 5005–5011 (2013).
- 8) Kusano M., Fukushima A., Kobayashi M., Hayashi N., Jonsson P., Moritz T., Ebana K., Saito K., *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **855**, 71–79 (2007).
- 9) Okazaki Y., Kamide Y., Hirai M., Saito K., *Metabolomics*, **9**, 121–131 (2013).
- 10) Nakabayashi R., Sawada Y., Yamada Y., Suzuki M., Hirai M. Y., Sakurai T., Saito K., *Anal. Chem.*, **85**, 1310–1315 (2013).
- 11) Nakabayashi R., Hashimoto K., Toyooka K., Saito K., *Anal. Chem.*, **89**, 2698–2703 (2017).
- 12) Horai H., Arita M., Kanaya S., Nihei Y., Ikeda T., Suwa K., Ojima Y., Tanaka K., Tanaka S., Aoshima K., Oda Y., Kakazu Y., Kusano M., Tohge T., Matsuda F., Sawada Y., Hirai M. Y., Nakanishi H., Ikeda K., Akimoto N., Maoka T., Takahashi H., Ara T., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Neumann S., Iida T., Funatsu K., Matsuura F., Soga T., Taguchi R., Saito K., Nishioka T., *J. Mass Spectrom.*, **45**, 703–714 (2010).
- 13) Sawada Y., Nakabayashi R., Yamada Y., Suzuki M., Sato M., Sakata A., Akiyama K., Sakurai T., Matsuda F., Aoki T., Hirai M. Y., Saito K., *Phytochemistry*, **82**, 38–45 (2012).
- 14) Kind T., Okazaki Y., Saito K., Fiehn O., *Anal. Chem.*, **86**, 11024–11027 (2014).
- 15) Matsuda F., Shinbo Y., Oikawa A., Hirai M. Y., Fiehn O., Kanaya S., Saito K., *PLoS One*, **4**, e7490 (2009).
- 16) Tsugawa H., Kind T., Nakabayashi R., Yukihiro D., Tanaka W., Cajka T., Saito K., Fiehn O., Arita M., *Anal. Chem.*, **88**, 7946–7958 (2016).
- 17) Nakabayashi R., Tsugawa H., Mori T., Saito K., *Metabolomics*, **12**, 168 (2016).
- 18) Nakabayashi R., Kusano M., Kobayashi M., Tohge T., Yonekura-Sakakibara K., Kogure N., Yamazaki M., Kitajima M., Saito K., Takayama H., *Phytochemistry*, **70**, 1017–1029

- (2009).
- 19) Yang Z., Nakabayashi R., Okazaki Y., Mori T., Takamatsu S., Kitanaka S., Kikuchi J., Saito K., *Metabolomics*, **10**, 543–555 (2014).
 - 20) Oikawa A., Matsuda F., Kikuyama M., Mimura T., Saito K., *Plant Physiol.*, **157**, 544–551 (2011).
 - 21) Oikawa A., Saito K., *Plant J.*, **70**, 30–38 (2012).
 - 22) Okazaki Y., Saito K., *Plant Biotechnol. Rep.*, **6**, 1–15 (2012).
 - 23) Okazaki Y., Saito K., *GigaScience*, **5**, 11 (2016).
 - 24) Akiyama K., Chikayama E., Yuasa H., Shimada Y., Tohge T., Shinozaki K., Hirai M. Y., Sakurai T., Kikuchi J., Saito K., *In Silico Biol.*, **8**, 339–345 (2008).
 - 25) Sakurai N., Ara T., Ogata Y., Sano R., Ohno T., Sugiyama K., Hiruta A., Yamazaki K., Yano K., Aoki K., Aharoni A., Hamada K., Yokoyama K., Kawamura S., Otsuka H., Tokimatsu T., Kanehisa M., Suzuki H., Saito K., Shibata D., *Nucleic Acids Res.*, **39**, D677–D684 (2011).
 - 26) Sakurai T., Yamada Y., Sawada Y., Matsuda F., Akiyama K., Shinozaki K., Hirai M. Y., Saito K., *Plant Cell Physiol.*, **54**, e5 (2013).
 - 27) Matsuda F., Hirai M. Y., Sasaki E., Akiyama K., Yonekura-Sakakibara K., Provart N. J., Sakurai T., Shimada Y., Saito K., *Plant Physiol.*, **152**, 566–578 (2010).
 - 28) Morioka R., Kanaya S., Hirai M. Y., Yano M., Ogasawara N., Saito K., *BMC Bioinformatics*, **8**, 343 (2007).
 - 29) Saito K., Hirai M. Y., Yonekura-Sakakibara K., *Trends Plant Sci.*, **13**, 36–43 (2008).
 - 30) Fukushima A., Kusano M., Mejia R. F., Iwasa M., Kobayashi M., Hayashi N., Watanabe-Takahashi A., Narisawa T., Tohge T., Hur M., Wurtele E. S., Nikolau B. J., Saito K., *Plant Physiol.*, **165**, 948–961 (2014).
 - 31) Yano M., Kanaya S., Altaf-Ul-Amin M., Kurokawa K., Hirai M. Y., Saito K., *J. Comput. Aided Chem.*, **7**, 125–136 (2006).
 - 32) Saito K., Matsuda F., *Ann. Rev. Plant Biol.*, **61**, 463–489 (2010).
 - 33) Kusano M., Saito K., *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, **21**, 24–31 (2012).
 - 34) Sumner L. W., Lei Z., Nikolau B. J., Saito K., *Nat. Prod. Rep.*, **32**, 212–229 (2015).
 - 35) Fukushima A., Kusano M., Redestig H., Arita M., Saito K., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, 532–538 (2009).
 - 36) Arabidopsis Genome Initiative, *Nature* (London), **408**, 796–815 (2000).
 - 37) Nakabayashi R., Yamazaki M., Saito K., *New Biotechnol.*, **27**, 829–836 (2010).
 - 38) Saito K., *Plant Physiol.*, **136**, 2443–2450 (2004).
 - 39) Takahashi H., Kopriva S., Giordano M., Saito K., Hell R., *Ann. Rev. Plant Biol.*, **62**, 157–184 (2011).
 - 40) Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Smith F. W., Blake-Kalff M., Hawkesford M. J., Saito K., *Plant J.*, **23**, 171–182 (2000).
 - 41) Yoshimoto N., Takahashi H., Smith F. W., Yamaya T., Saito K., *Plant J.*, **29**, 465–743 (2002).
 - 42) Yoshimoto N., Inoue E., Saito K., Yamaya T., Takahashi H., *Plant Physiol.*, **131**, 1511–1517 (2003).
 - 43) Awazuhara M., Fujiwara T., Hayashi H., Watanabe-Takahashi A., Takahashi H., Saito K., *Physiol. Plant.*, **125**, 95–105 (2005).
 - 44) Yoshimoto N., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Saito K., Takahashi H., *Plant Physiol.*, **145**, 378–388 (2007).
 - 45) Maruyama-Nakashita A., Watanabe-Takahashi A., Inoue E., Yamaya T., Saito K., Takahashi H., *Plant Cell*, **27**, 1279–1296 (2015).
 - 46) Saito K., Yokoyama H., Noji M., Murakoshi I., *J. Biol. Chem.*, **270**, 16321–16326 (1995).
 - 47) Noji M., Inoue K., Kimura N., Gouda A., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 32739–32745 (1998).
 - 48) Noji M., Takagi Y., Kimura N., Inoue K., Saito M., Horikoshi M., Saito F., Takahashi H., Saito K., *Plant Cell Physiol.*, **42**, 627–634 (2001).
 - 49) Kawashima C. G., Berkowitz O., Hell R., Noji M., Saito K., *Plant Physiol.*, **137**, 220–230 (2005).
 - 50) Watanabe M., Mochida K., Kato T., Tabata S., Yoshimoto N., Noji M., Saito K., *Plant Cell*, **20**, 2484–2496 (2008).
 - 51) Saito K., Miura N., Yamazaki M., Hirano H., Murakoshi I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**,

- 8078–8082 (1992).
- 52) Hatzfeld Y., Maruyama A., Schmidt A., Noji M., Ishizawa K., Saito K., *Plant Physiol.*, **123**, 1163–1171 (2000).
- 53) Watanabe M., Kusano M., Oikawa A., Fukushima A., Noji M., Saito K., *Plant Physiol.*, **146**, 310–320 (2008).
- 54) Hatzfeld Y., Lee S., Lee M., Leustek T., Saito K., *Gene*, **248**, 51–58 (2000).
- 55) Bohrer A.-S., Yoshimoto N., Sekiguchi A., Rykalski N., Saito K., Takahashi H., *Front. Plant Sci.*, **5**, 750 (2015).
- 56) Mugford S. G., Yoshimoto N., Reichelt M., Wirtz M., Hill L., Mugford S. T., Nakazato Y., Noji M., Takahashi H., Kramell R., Gigolashvili T., Flügge U. I., Wasternack C., Gershenzon J., Hell R., Saito K., Kopriva S., *Plant Cell*, **21**, 910–927 (2009).
- 57) Ohkama-Ohtsu N., Oikawa A., Zhao P., Xiang C., Saito K., Oliver D. J., *Plant Physiol.*, **148**, 1603–1613 (2008).
- 58) Ohkama-Ohtsu N., Sasaki-Sekimoto Y., Oikawa A., Jikumaru Y., Shinoda S., Inoue E., Kamide Y., Yokoyama T., Hirai M. Y., Shirasu K., Kamiya Y., Oliver D. J., Saito K., *Plant Cell Physiol.*, **52**, 205–209 (2011).
- 59) Ho C. L., Noji M., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 11007–11012 (1999).
- 60) Ho C. L., Noji M., Saito M., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 397–402 (1999).
- 61) Ho C. L., Noji M., Saito M., Yamazaki M., Saito K., *Plant J.*, **16**, 443–452 (1998).
- 62) Ho C. L., Saito K., *Amino Acids*, **20**, 243–259 (2001).
- 63) Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Tohge T., Saito K., Takahashi H., *Plant Cell*, **18**, 3235–3251 (2006).
- 64) Kawashima C. G., Yoshimoto N., Maruyama-Nakashita A., Tsuchiya Y. N., Saito K., Takahashi H., Dalmay T., *Plant J.*, **57**, 313–321 (2009).
- 65) Kawashima C. G., Matthewman C. A., Huang S., Lee B. R., Yoshimoto N., Koprivova A., Rubio-Somoza I., Todesco M., Rathjen T., Saito K., Takahashi H., Dalmay T., Kopriva S., *Plant J.*, **66**, 863–876 (2011).
- 66) Hirai M. Y., Fujiwara T., Awazuhara M., Kimura T., Noji M., Saito K., *Plant J.*, **33**, 651–663 (2003).
- 67) Hirai M. Y., Yano M., Goodenowe D. B., Kanaya S., Kimura T., Awazuhara M., Arita M., Fujiwara T., Saito K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10205–10210 (2004).
- 68) Higashi Y., Hirai M. Y., Fujiwara T., Naito S., Noji M., Saito K., *Plant J.*, **48**, 557–571 (2006).
- 69) Hirai M. Y., Klein M., Fujikawa Y., Yano M., Goodenowe D. B., Yamazaki Y., Kanaya S., Nakamura Y., Kitayama M., Suzuki H., Sakurai N., Shibata D., Tokuhisa J., Reichelt M., Gershenzon J., Papenbrock J., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **280**, 25590–25595 (2005).
- 70) Sawada Y., Kuwahara A., Nagano M., Narisawa T., Sakata A., Saito K., Yokota Hirai M., *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1181–1190 (2009).
- 71) Hirai M. Y., Sugiyama K., Sawada Y., Tohge T., Obayashi T., Suzuki A., Araki R., Sakurai N., Suzuki H., Aoki K., Goda H., Nishizawa O. I., Shibata D., Saito K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6478–6483 (2007).
- 72) Aarabi F., Kusajima M., Tohge T., Konishi T., Gigolashvili T., Takamune M., Sasazaki Y., Watanabe M., Nakashita H., Fernie A. R., Saito K., Takahashi H., Hubberten H. M., Hoefgen R., Maruyama-Nakashita A., *Sci. Adv.*, **2**, e1601087 (2016).
- 73) Noji M., Saito M., Nakamura M., Aono M., Saji H., Saito K., *Plant Physiol.*, **126**, 973–980 (2001).
- 74) Kawashima C. G., Noji M., Nakamura M., Ogra Y., Suzuki K. T., Saito K., *Biotechnol. Lett.*, **26**, 153–157 (2004).
- 75) Nakamura M., Ochiai T., Noji M., Ogura Y., Suzuki K. T., Yoshimoto N., Yamazaki M., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **31**, 141–147 (2014).
- 76) Saito K., Yonekura-Sakakibara K., Nakabayashi R., Higashi Y., Yamazaki M., Tohge T., Fernie A. R., *Plant Physiol. Biochem.*, **72**, 21–34 (2013).
- 77) Tohge T., Nishiyama Y., Hirai M. Y., Yano M., Nakajima J., Awazuhara M., Inoue E., Takahashi H., Goodenowe D. B., Kitayama M., Noji M., Yamazaki M., Saito K., *Plant J.*, **42**, 218–235 (2005).
- 78) Goda H., Sasaki E., Akiyama K., Maruyama-Nakashita A., Nakabayashi K., Li W., Ogawa

- M., Yamauchi Y., Preston J., Aoki K., Kiba T., Takatsuto S., Fujioka S., Asami T., Nakano T., Kato H., Mizuno T., Sakakibara H., Yamaguchi S., Nambara E., Kamiya Y., Takahashi H., Hirai M. Y., Sakurai T., Shinozaki K., Saito K., Yoshida S., Shimada Y., *Plant J.*, **55**, 526–542 (2008).
- 79) Tohge T., Yonekura-Sakakibara K., Niida R., Watanabe-Takahashi A., Saito K., *Pure Appl. Chem.*, **79**, 811–823 (2007).
- 80) Yonekura-Sakakibara K., Tohge T., Niida R., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **282**, 14932–14941 (2007).
- 81) Yonekura-Sakakibara K., Tohge T., Matsuda F., Nakabayashi R., Takayama H., Niida R., Watanabe-Takahashi A., Inoue E., Saito K., *Plant Cell*, **20**, 2160–2176 (2008).
- 82) Kitamura S., Matsuda F., Tohge T., Yonekura-Sakakibara K., Yamazaki M., Saito K., Narumi I., *Plant J.*, **62**, 549–559 (2010).
- 83) Yonekura-Sakakibara K., Fukushima A., Nakabayashi R., Hanada K., Matsuda F., Sugawara S., Inoue E., Kuromori T., Ito T., Shinozaki K., Wangwattana B., Yamazaki M., Saito K., *Plant J.*, **69**, 154–167 (2012).
- 84) Yonekura-Sakakibara K., Fukushima A., Saito K., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24**, 285–290 (2013).
- 85) Yonekura-Sakakibara K., Nakabayashi R., Sugawara S., Tohge T., Ito T., Koyanagi M., Kitajima M., Takayama H., Saito K., *Plant J.*, **79**, 769–782 (2014).
- 86) Luo J., Nishiyama Y., Fuell C., Taguchi G., Elliott K., Hill L., Tanaka Y., Kitayama M., Yamazaki M., Bailey P., Parr A., Michael A. J., Saito K., Martin C., *Plant J.*, **50**, 678–695 (2007).
- 87) Wangwattana B., Koyama Y., Nishiyama Y., Kitayama M., Yamazaki M., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **25**, 191–196 (2008).
- 88) Yonekura-Sakakibara K., Saito K., *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 1466–1487 (2009).
- 89) Tohge T., Matsui K., Ohme-Takagi M., Yamazaki M., Saito K., *Biotechnol. Lett.*, **27**, 297–303 (2005).
- 90) Nakabayashi R., Yonekura-Sakakibara K., Urano K., Suzuki M., Yamada Y., Nishizawa T., Matsuda F., Kojima M., Sakakibara H., Shinozaki K., Michael A. J., Tohge T., Yamazaki M., Saito K., *Plant J.*, **77**, 367–379 (2014).
- 91) Tohge T., Wendenburg R., Ishihara H., Nakabayashi R., Watanabe M., Sulpice R., Hoefgen R., Takayama H., Saito K., Stitt M., Fernie A. R., *Nat. Commun.*, **7**, 12399 (2016).
- 92) Nakabayashi R., Saito K., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **24**, 10–16 (2015).
- 93) Kusano M., Tohge T., Fukushima A., Kobayashi M., Hayashi N., Otsuki H., Kondou Y., Goto H., Kawashima M., Matsuda F., Niida R., Matsui M., Saito K., Fernie A. R., *Plant J.*, **67**, 354–369 (2011).
- 94) Urano K., Maruyama K., Ogata Y., Morishita Y., Takeda M., Sakurai N., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., *Plant J.*, **57**, 1065–1078 (2009).
- 95) Maruyama K., Takeda M., Kidokoro S., Yamada K., Sakuma Y., Urano K., Fujita M., Yoshiwara K., Matsukura S., Morishita Y., Sasaki R., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., *Plant Physiol.*, **150**, 1972–1980 (2009).
- 96) Higashi Y., Okazaki Y., Myouga F., Shinozaki K., Saito K., *Sci. Rep.*, **5**, 10533 (2015).
- 97) Kusano M., Fukushima A., Arita M., Jonsson P., Moritz T., Kobayashi M., Hayashi N., Tohge T., Saito K., *BMC Syst. Biol.*, **1**, 53 (2007).
- 98) Kusano M., Fukushima A., Redestig H., Kobayashi M., Otsuki H., Onouchi H., Naito S., Hirai M. Y., Saito K., *Amino Acids*, **39**, 1013–1021 (2010).
- 99) Diaz C., Kusano M., Sulpice R., Araki M., Redestig H., Saito K., Stitt M., Shin R., *BMC Syst. Biol.*, **5**, 192 (2011).
- 100) Satou M., Enoki H., Oikawa A., Ohta D., Saito K., Hachiya T., Sakakibara H., Kusano M., Fukushima A., Saito K., Kobayashi M., Nagata N., Myouga F., Shinozaki K., Motohashi R., *Plant Mol. Biol.*, **85**, 411–428 (2014).
- 101) Fukushima A., Iwasa M., Nakabayashi R., Kobayashi M., Nishizawa T., Okazaki Y., Saito K., Kusano M., *Front. Plant Sci.*, **8**,

- 1464 (2017).
- 102) Fukushima A., Kusano M., Redestig H., Arita M., Saito K., *BMC Syst. Biol.*, **5**, 1 (2011).
- 103) Okazaki Y., Shimojima M., Sawada Y., Toyooka K., Narisawa T., Mochida K., Tanaka H., Matsuda F., Hirai A., Hirai M. Y., Ohta H., Saito K., *Plant Cell*, **21**, 892–909 (2009).
- 104) Okazaki Y., Otsuki H., Narisawa T., Kobayashi M., Sawai S., Kamide Y., Kusano M., Aoki T., Hirai M. Y., Saito K., *Nat. Commun.*, **4**, 1510 (2013).
- 105) Okazaki Y., Saito K., *Plant J.*, **79**, 584–596 (2014).
- 106) Okazaki Y., Nishizawa T., Takano K., Ohnishi M., Mimura T., Saito K., *Physiol. Plant.*, **155**, 33–42 (2015).
- 107) Okazaki Y., Takano K., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **34**, 57–63 (2017).
- 108) Fukushima A., Kusano M., Nakamichi N., Kobayashi M., Hayashi N., Sakakibara H., Mizuno T., Saito K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 7251–7256 (2009).
- 109) Saito K., *Yakugaku Zasshi*, **114**, 1–20 (1994).
- 110) Saito K., Yamazaki M., Kaneko H., Murakoshi I., Fukuda Y., Van Montagu M., *Planta*, **184**, 40–46 (1991).
- 111) Saito K., Yamazaki M., Murakoshi I., *J. Nat. Prod.*, **55**, 149–162 (1992).
- 112) Saito K., Kaneko H., Yamazaki M., Yoshida M., Murakoshi I., *Plant Cell Rep.*, **8**, 718–721 (1990).
- 113) Saito K., Yamazaki M., Shimomura K., Yoshimatsu K., Murakoshi I., *Plant Cell Rep.*, **9**, 121–124 (1990).
- 114) Saito K., Yamazaki M., Anzai H., Yoneyama K., Murakoshi I., *Plant Cell Rep.*, **11**, 219–224 (1992).
- 115) Yamazaki M., Son L., Hayashi T., Morita N., Asamizu T., Murakoshi I., Saito K., *Plant Cell Rep.*, **15**, 317–321 (1996).
- 116) Yamazaki M., Kobayashi M., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **14**, 169–173 (1997).
- 117) Saito K., Sudo H., Yamazaki M., Koseki-Nakamura M., Kitajima M., Takayama H., Aimi N., *Plant Cell Rep.*, **20**, 267–271 (2001).
- 118) Gong Z., Yamazaki M., Sugiyama M., Tanaka Y., Saito K., *Plant Mol. Biol.*, **35**, 915–927 (1997).
- 119) Kitada C., Gong Z., Tanaka Y., Yamazaki M., Saito K., *Plant Cell Physiol.*, **42**, 1338–1344 (2001).
- 120) Gong Z. Z., Yamagishi E., Yamazaki M., Saito K., *Plant Mol. Biol.*, **41**, 33–44 (1999).
- 121) Gong Z. Z., Yamazaki M., Saito K., *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 65–72 (1999).
- 122) Gong Z.-Z., Yamazaki M., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **17**, 309–314 (2000).
- 123) Sompornpailin K., Makita Y., Yamazaki M., Saito K., *Plant Mol. Biol.*, **50**, 485–495 (2002).
- 124) Saito K., Yamazaki M., *New Phytol.*, **155**, 9–23 (2002).
- 125) Yamazaki M., Saito K., *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1246–1255 (2002).
- 126) Yamazaki M., Shibata M., Nishiyama Y., Springob K., Kitayama M., Shimada N., Aoki T., Ayabe S., Saito K., *FEBS J.*, **275**, 3494–3502 (2008).
- 127) Yamazaki M., Saito K., *Nat. Prod. Commun.*, **6**, 423–427 (2011).
- 128) Yamazaki M., Gong Z., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Tanaka Y., Kusumi T., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 7405–7411 (1999).
- 129) Yamazaki M., Saito K., *Methods Mol. Biol.*, **317**, 255–266 (2006).
- 130) Yamazaki M., Yamagishi E., Gong Z., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Tanaka Y., Kusumi T., Yamaguchi M., Saito K., *Plant Mol. Biol.*, **48**, 401–411 (2002).
- 131) Springob K., Nakajima J., Yamazaki M., Saito K., *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 288–303 (2003).
- 132) Saito K., Kobayashi M., Gong Z., Tanaka Y., Yamazaki M., *Plant J.*, **17**, 181–189 (1999).
- 133) Nakajima J., Tanaka Y., Yamazaki M., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **17**, 331–335 (2000).
- 134) Nakajima J., Tanaka Y., Yamazaki M., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 25797–25803 (2001).
- 135) Turnbull J. J., Nakajima J., Welford R. W., Yamazaki M., Saito K., Schofield C. J., *J. Biol. Chem.*, **279**, 1206–1216 (2004).
- 136) Nakajima J., Sato Y., Hoshino T., Yamazaki M., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **281**, 21387–21398 (2006).
- 137) Yamazaki M., Nakajima J., Yamanashi M., Sugiyama M., Makita Y., Springob K., Awazuhara M., Saito K., *Phytochemistry*, **62**, 987–995 (2003).

- 138) Fukushima A., Nakamura M., Suzuki H., Saito K., Yamazaki M., *PLoS One*, **10**, e0129154 (2015).
- 139) Asano T., Watase I., Sudo H., Kitajima M., Takayama H., Aimi N., Yamazaki M., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **21**, 275–281 (2004).
- 140) Sudo H., Yamakawa T., Yamazaki M., Aimi N., Saito K., *Biotechnol. Lett.*, **24**, 359–363 (2002).
- 141) Yamazaki Y., Sudo H., Yamazaki M., Aimi N., Saito K., *Plant Cell Physiol.*, **44**, 395–403 (2003).
- 142) Yamazaki M., Asano T., Yamazaki Y., Sirikantaramas S., Sudo H., Saito K., *Pure Appl. Chem.*, **82**, 213–218 (2010).
- 143) Watase I., Sudo H., Yamazaki M., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **21**, 337–342 (2004).
- 144) Yamazaki Y., Kitajima M., Arita M., Takayama H., Sudo H., Yamazaki M., Aimi N., Saito K., *Plant Physiol.*, **134**, 161–170 (2004).
- 145) Yamazaki Y., Urano A., Sudo H., Kitajima M., Takayama H., Yamazaki M., Aimi N., Saito K., *Phytochemistry*, **62**, 461–470 (2003).
- 146) Yamazaki M., Mochida K., Asano T., Nakabayashi R., Chiba M., Udomson N., Yamazaki Y., Goodenowe D. B., Sankawa U., Yoshida T., Toyoda A., Totoki Y., Sakaki Y., Gongora-Castillo E., Buell C. R., Sakurai T., Saito K., *Plant Cell Physiol.*, **54**, 686–696 (2013).
- 147) Rohani E. R., Chiba M., Kawaharada M., Asano T., Oshima Y., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Fukushima A., Rai A., Saito K., Yamazaki M., *Plant Biotechnol.*, **33**, 1–9 (2016).
- 148) Udomsom N., Rai A., Suzuki H., Okuyama J., Imai R., Mori T., Nakabayashi R., Saito K., Yamazaki M., *Front. Plant Sci.*, **7**, 1861 (2016).
- 149) Asano T., Kobayashi K., Kashihara E., Sudo H., Sasaki R., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Saito K., Yamazaki M., *Phytochemistry*, **91**, 128–139 (2013).
- 150) Sirikantaramas S., Yamazaki M., Saito K., *Phytochem. Rev.*, **7**, 467–477 (2008).
- 151) Sirikantaramas S., Sudo H., Asano T., Yamazaki M., Saito K., *Phytochemistry*, **68**, 2881–2886 (2007).
- 152) Sirikantaramas S., Yamazaki M., Saito K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6782–6786 (2008).
- 153) Sirikantaramas S., Yamazaki M., Saito K., *Phytochemistry*, **70**, 1894–1898 (2009).
- 154) Viraporn V., Yamazaki M., Saito K., Denduangboripant J., Chayamarit K., Chuanasa T., Sukrong S., *Planta Med.*, **77**, 759–764 (2011).
- 155) Sirikantaramas S., Yamazaki M., Saito K., “Natural Products: Discourse, Diversity, and Design,” ed. by Osbourn A., Goss R. J., Carter G. T., Wiley-Blackwell, Oxford, 2014, pp. 67–82.
- 156) Sirikantaramas S., Meeprasert A., Rungrotmongkol T., Fuji H., Hoshino T., Sudo H., Yamazaki M., Saito K., *Phytochemistry*, **113**, 50–56 (2015).
- 157) Nagai N., *Yakugaku Zasshi*, 54–87 (1889).
- 158) Okuda S., “Ochiai Eiji Sensei Kaisoroku,” ed. by Okamoto T., Hirokawa Shoten, Tokyo, 1992, pp. 211–234.
- 159) Murakoshi I., “Yakugaku to Tomoni 65 Nen—Tsuda Kyosuke Sensei 85 sai Kinen Bunshu,” ed. by Ikekawa N., Sato Y., Iwasaki S., Hirokawa Shoten, Tokyo, 1992, pp. 143–162.
- 160) Ohmiya S., Saito K., Murakoshi I., *The Alkaloids*, **47**, 1–114 (1995).
- 161) Ohmiya S., Saito K., Murakoshi I., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 923–934 (2000).
- 162) Saito K., Yamazaki M., Yamakawa K., Fujisawa S., Takamatsu S., Kawaguchi A., Murakoshi I., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3001–3004 (1989).
- 163) Saito K., Suzuki H., Takamatsu S., Murakoshi I., *Phytochemistry*, **32**, 87–91 (1992).
- 164) Suzuki H., Murakoshi I., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **269**, 15853–15860 (1994).
- 165) Okada T., Hirai M. Y., Suzuki H., Yamazaki M., Saito K., *Plant Cell Physiol.*, **46**, 233–244 (2005).
- 166) Saito K., Koike Y., Suzuki H., Murakoshi I., *Phytochemistry*, **34**, 1041–1044 (1993).
- 167) Yamazaki M., Sato A., Shimomura K., Inoue K., Ebizuka Y., Murakoshi I., Saito K., *Natural Medicines*, **49**, 488–490 (1995).
- 168) Hirai M. Y., Suzuki H., Yamazaki M., Saito K., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1458–1461 (2000).
- 169) Bunsupa S., Katayama K., Ikeura E., Oikawa

- A., Toyooka K., Saito K., Yamazaki M., *Plant Cell*, **24**, 1202–1216 (2012).
- 170) Bunsupa S., Yamazaki M., Saito K., *Front. Plant Sci.*, **3**, 239 (2012).
- 171) Bunsupa S., Saito K., Yamazaki M., “Biotechnology for Medicinal Plants,” ed. by Chandra S., Lata H., Varma A., Springer, Heidelberg, 2013, pp. 263–273.
- 172) Bunsupa S., Hanada K., Maruyama A., Aoyagi K., Komatsu K., Ueno H., Yamashita M., Sasaki R., Oikawa A., Saito K., Yamazaki M., *Plant Physiol.*, **171**, 2432–2444 (2016).
- 173) Bunsupa S., Yamazaki M., Saito K., *Mini-Rev. Med. Chem.*, **12**, 1002–1012 (2017).
- 174) Bunsupa S., Komatsu K., Nakabayashi R., Saito K., Yamazaki M., *Plant Biotechnol.*, **31**, 511–518 (2014).
- 175) Saito K., Tatsuguchi K., Murakoshi I., Hirano H., *FEBS Lett.*, **324**, 247–252 (1993).
- 176) Saito K., Tatsuguchi K., Takagi Y., Murakoshi I., *J. Biol. Chem.*, **269**, 28187–28192 (1994).
- 177) Takahashi H., Saito K., *Plant Physiol.*, **112**, 273–280 (1996).
- 178) Maruyama A., Saito K., Ishizawa K., *Plant Mol. Biol.*, **46**, 749–760 (2001).
- 179) Noji M., Murakoshi I., Saito K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 1111–1117 (1993).
- 180) Noji M., Murakoshi I., Saito K., *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 57–66 (1994).
- 181) Inoue K., Noji M., Saito K., *Eur. J. Biochem.*, **266**, 220–227 (1999).
- 182) Urano Y., Manabe T., Noji M., Saito K., *Gene*, **257**, 269–277 (2000).
- 183) Saito K., Inoue K., Fukushima R., Noji M., *Gene*, **189**, 57–63 (1997).
- 184) Manabe T., Hasumi A., Sugiyama M., Yamazaki M., Saito K., *Eur. J. Biochem.*, **257**, 21–30 (1998).
- 185) Yamazaki M., Sugiyama M., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **19**, 7–10 (2002).
- 186) Yoshimoto N., Yabe A., Sugino Y., Murakami S., Sai-Ngam N., Sumi S., Tsuneyoshi T., Saito K., *Front. Plant Sci.*, **5**, 758 (2014).
- 187) Yoshimoto N., Onuma M., Mizuno S., Sugino Y., Nakabayashi R., Imai S., Tsuneyoshi T., Sumi S., Saito K., *Plant J.*, **83**, 941–951 (2015).
- 188) Nakabayashi R., Saito K., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **43**, 8–16 (2017).
- 189) Nakabayashi R., Sawada Y., Aoyagi M., Yamada Y., Hirai M. Y., Sakurai T., Kamoi T., Rowan D. D., Saito K., *J. Nutr.*, **146**, 397S–402S (2016).
- 190) Nakabayashi R., Yang Z., Nishizawa T., Mori T., Saito K., *J. Nat. Prod.*, **78**, 1179–1183 (2015).
- 191) Araki R., Hasumi A., Nishizawa O. I., Sasaki K., Kuwahara A., Sawada Y., Totoki Y., Toyoda A., Sakaki Y., Li Y., Saito K., Ogawa T., Hirai M. Y., *Plant Biotechnol. J.*, **11**, 1017–1027 (2013).
- 192) Sudo H., Seki H., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Toyoda A., Totoki Y., Sakaki Y., Iida O., Shibata T., Kojoma M., Muranaka T., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **26**, 105–107 (2009).
- 193) Seki H., Ohyama K., Sawai S., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Akashi T., Aoki T., Saito K., Muranaka T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14204–14209 (2008).
- 194) Seki H., Sawai S., Ohyama K., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Fukushima E. O., Akashi T., Aoki T., Saito K., Muranaka T., *Plant Cell*, **23**, 4112–4123 (2011).
- 195) Ramilowski J. A., Sawai S., Seki H., Mochida K., Yoshida T., Sakurai T., Muranaka T., Saito K., Daub C. O., *Plant Cell Physiol.*, **54**, 697–710 (2013).
- 196) Mochida K., Sakurai T., Seki H., Yoshida T., Takahagi K., Sawai S., Uchiyama H., Muranaka T., Saito K., *Plant J.*, **89**, 181–194 (2017).
- 197) Han R., Takahashi H., Nakamura M., Yoshimoto N., Suzuki H., Shibata D., Yamazaki M., Saito K., *Front. Plant Sci.*, **6**, 426 (2015).
- 198) Han R., Takahashi H., Nakamura M., Bunsupa S., Yoshimoto N., Yamamoto H., Suzuki H., Shibata D., Yamazaki M., Saito K., *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 876–883 (2015).
- 199) Rai A., Yamazaki M., Takahashi H., Nakamura M., Kojoma M., Suzuki H., Saito K., *Front. Plant Sci.*, **7**, 481 (2016).
- 200) Rai A., Nakamura M., Takahashi H., Suzuki H., Saito K., Yamazaki M., *Plant Cell Rep.*, **35**, 2091–2111 (2016).

- 201) Fukushima A., Nakamura M., Suzuki H., Yamazaki M., Knoch E., Mori T., Umemoto N., Morita M., Hirai G., Sodeoka M., Saito K., *Front. Plant Sci.*, **7**, 1883 (2016).
- 202) Rai A., Kamochi H., Suzuki H., Nakamura M., Takahashi H., Hatada T., Saito K., Yamazaki M., *J. Nat. Med.*, **71**, 1–15 (2017).
- 203) Rai A., Saito K., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **37**, 127–134 (2016).
- 204) Rai A., Saito K., Yamazaki M., *Plant J.*, **90**, 764–787 (2017).
- 205) Albinsky D., Kusano M., Higuchi M., Hayashi N., Kobayashi M., Fukushima A., Mori M., Ichikawa T., Matsui K., Kuroda H., Horii Y., Tsumoto Y., Sakakibara H., Hirochika H., Matsui M., Saito K., *Mol. Plant*, **3**, 125–142 (2010).
- 206) Kusano M., Fukushima A., Fujita N., Okazaki Y., Kobayashi M., Oitome N. F., Ebana K., Saito K., *Mol. Plant*, **5**, 442–451 (2012).
- 207) Kusano M., Yang Z., Okazaki Y., Nakabayashi R., Fukushima A., Saito K., *Mol. Plant*, **8**, 58–67 (2015).
- 208) Oikawa A., Matsuda F., Kusano M., Okazaki Y., Saito K., *Rice*, **1**, 63–71 (2008).
- 209) Sakurai T., Kondou Y., Akiyama K., Kurotani A., Higuchi M., Ichikawa T., Kuroda H., Kusano M., Mori M., Saitou T., Sakakibara H., Sugano S., Suzuki M., Takahashi H., Takahashi S., Takatsuji H., Yokotani N., Yoshizumi T., Saito K., Shinozaki K., Oda K., Hirochika H., Matsui M., *Plant Cell Physiol.*, **52**, 265–273 (2011).
- 210) Suzuki M., Kusano M., Takahashi H., Nakamura Y., Hayashi N., Kobayashi M., Ichikawa T., Matsui M., Hirochika H., Saito K., *Metabolomics*, **6**, 137–145 (2010).
- 211) Kusano M., Fukushima A., Redestig H., Saito K., *J. Exp. Bot.*, **62**, 1439–1453 (2011).
- 212) Kusano M., Tabuchi M., Fukushima A., Funayama K., Diaz C., Kobayashi M., Hayashi N., Tsuchiya Y. N., Takahashi H., Kamata A., Yamaya T., Saito K., *Plant J.*, **66**, 456–466 (2011).
- 213) Toyosawa Y., Kawagoe Y., Matsushima R., Crofts N., Ogawa M., Fukuda M., Kumamaru T., Okazaki Y., Kusano M., Saito K., Toyooka K., Sato M., Ai Y., Jane J. L., Nakamura Y., Fujita N., *Plant Physiol.*, **170**, 1255–1270 (2016).
- 214) Yang Z., Nakabayashi R., Mori T., Takamatsu S., Kitanaka S., Saito K., *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 952–956 (2016).
- 215) Masumoto C., Miyazawa S., Ohkawa H., Fukuda T., Taniguchi Y., Murayama S., Kusano M., Saito K., Fukayama H., Miyao M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 5226–5231 (2010).
- 216) Saika H., Oikawa A., Matsuda F., Onodera H., Saito K., Toki S., *Plant Physiol.*, **156**, 1269–1277 (2011).
- 217) Saika H., Oikawa A., Nakabayashi R., Matsuda F., Saito K., Toki S., *Metabolites*, **2**, 1123–1138 (2012).
- 218) Matsuda F., Okazaki Y., Oikawa A., Kusano M., Nakabayashi R., Kikuchi J., Yonemaru J., Ebana K., Yano M., Saito K., *Plant J.*, **70**, 624–636 (2012).
- 219) Redestig H., Kusano M., Ebana K., Kobayashi M., Oikawa A., Okazaki Y., Matsuda F., Arita M., Fujita N., Saito K., *BMC Syst. Biol.*, **5**, 176 (2011).
- 220) Matsuda F., Nakabayashi R., Yang Z., Okazaki Y., Yonemaru J., Ebana K., Yano M., Saito K., *Plant J.*, **81**, 13–23 (2015).
- 221) 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., Maki-no A., Saito K., Ishida H., Kinoshita T., Kurata N., Kuchitsu K., *Autophagy*, **10**, 878–888 (2014).
- 222) Kusuda H., Koga W., Kusano M., Oikawa A., Saito K., Hirai M. Y., Yoshida K. T., *Plant Sci.*, **232**, 49–56 (2015).
- 223) Maruyama K., Urano K., Yoshiwara K., Morishita Y., Sakurai N., Suzuki H., Kojima M., Sakakibara H., Shibata D., Saito K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., *Plant Physiol.*, **164**, 1759–1771 (2014).
- 224) Selvaraj M. G., Ishizaki T., Valencia M., Ogawa S., Dedicova B., Ogata T., Yoshiwara K., Maruyama K., Kusano M., Saito K., Takahashi F., Shinozaki K., Nakashima K., Ishitani M., *Plant Biotechnol. J.*, **15**, 1465–1477 (2017).

- 225) Tawaraya K., Horie R., Saito A., Shinano T., Wagatsuma T., Saito K., Oikawa A., *J. Plant Nutr.*, **36**, 1138–1159 (2013).
- 226) Kusano M., Redestig H., Hirai T., Oikawa A., Matsuda F., Fukushima A., Arita M., Watanabe S., Yano M., Hiwasa-Tanase K., Ezura H., Saito K., *PLoS One*, **6**, e16989 (2011).
- 227) Kusano M., Baxter I., Fukushima A., Oikawa A., Okazaki Y., Nakabayashi R., Bouvrette D. J., Achard F., Jakubowski A. R., Ballam J. M., Phillips J. R., Culler A. H., Saito K., Harrigan G. G., *Metabolomics*, **11**, 261–270 (2015).
- 228) Lawrence S., *Nat. Biotechnol.*, **24**, 380 (2006).
- 229) Taroncher-Oldenburg G., Marshall A., *Nat. Biotechnol.*, **25**, 961 (2007).
- 230) Thomson Reuters. “Kazuki Saito & Masami Yokota Hirai talk with ScienceWatch.com and answer a few questions about this month’s Fast Breaking Paper in the field of Plant & Animal Science.”: http://archive.sciencewatch.com/dr/fbp/2008/08junfbp/08junfbpHirai_Sa/, cited 26 August, 2017.
- 231) Clarivate Analytics. “Highly Cited Researchers.”: <http://hcr.stateofinnovation.com/>, cited 26 August, 2017.
- 232) American Society of Plant Biologists. “Recognizing Our Authors.”: <http://aspb.org/publications/aspb-journals/aspb-top-authors/>, cited 26 August, 2017.
- 233) Tu Y., *Nat. Med.*, **17**, 1217–1220 (2011).
- 234) Bachmann B. O., Van Lanen S. G., Baltz R. H., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 175–184 (2014).
- 235) Nützmann H. W., Osbourn A., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **26**, 91–99 (2014).
- 236) Nakayasu M., Umemoto N., Ohya K., Fujimoto Y., Lee H. J., Watanabe B., Muranaka T., Saito K., Sugimoto Y., Mizutani M., *Plant Physiol.*, **175**, 120–133 (2017).
- 237) Itkin M., Heinig U., Tzfadia O., Bhide A. J., Shinde B., Cardenas P. D., Bocobza S. E., Unger T., Malitsky S., Finkers R., Tikunov Y., Bovy A., Chikate Y., Singh P., Rogachev I., Beekwilder J., Giri A. P., Aharoni A., *Science*, **341**, 175–179 (2013).
- 238) Owen C., Patron N. J., Huang A., Osbourn A., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **40**, 24–30 (2017).
- 239) Reed J., Stephenson M. J., Miettinen K., Brouwer B., Leveau A., Brett P., Goss R. J. M., Goossens A., O’Connell M. A., Osbourn A., *Metab. Eng.*, **42**, 185–193 (2017).
- 240) Sawai S., Ohya K., Yasumoto S., Seki H., Sakuma T., Yamamoto T., Takebayashi Y., Kojima M., Sakakibara H., Aoki T., Muranaka T., Saito K., Umemoto N., *Plant Cell*, **26**, 3763–3774 (2014).
- 241) Nonaka S., Arai C., Takayama M., Matsukura C., Ezura H., *Sci. Rep.*, **7**, 7057 (2017).
- 242) Westfall P. J., Pitera D. J., Lenihan J. R., Eng D., Woolard F. X., Regentin R., Horning T., Tsuruta H., Melis D. J., Owens A., Fickes S., Diola D., Benjamin K. R., Keasling J. D., Leavell M. D., McPhee D. J., Renninger N. S., Newman J. D., Paddon C. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E111–E118 (2012).
- 243) Galanie S., Thodey K., Trenchard I. J., Filsinger Interrante M., Smolke C. D., *Science*, **349**, 1095–1100 (2015).
- 244) Ministry of the Environment, Government of Japan. “Access to Genetic Resource and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization.”: <http://www.env.go.jp/nature/biodic-abs/index.html>, cited 26 August, 2017.
- 245) Okada T., Afendi F. M., Yamazaki M., Chida K. N., Suzuki M., Kawai R., Kim M., Namiki T., Kanaya S., Saito K., *J. Nat. Med.*, **70**, 107–114 (2016).