

マイレビュー

植物の同調培養系と細胞周期

網野真一*, 赤田咲子**, 児玉浩明**, 駒嶺 穆**

(1985年12月18日受理)

1. 細胞周期と同調培養

細胞周期の発見は1953年に Howard と Pelc がソラマメの根端で行った研究とされるが¹⁾, この基本的な概念が植物材料で見出されたことは興味深い. 以来, 動物・植物を通じて多くの研究がなされている. 細胞周期の解析をする際, オートラジオグラフィー, 核の染色などの細胞学的手法や阻害剤の利用をはじめとする生理学的手法は非同調的な細胞集団を用いても可能であり, 実際多くの系で細胞周期の長さ等が決められている²⁾. しかし細胞周期を生化学的に研究するには同調的な細胞集団が不可欠である.

同調培養系を得るには, (1)自然に同調している細胞集団を用いる, (2)細胞周期の特定の時期にある細胞を選抜する, (3)同調を誘導する, の3つの方法がある. 植物では, 自然同調 (natural synchrony) はユリの花粉母細胞が有名だが³⁾, 選抜同調 (selection synchrony) では動物培養細胞の mitotic detachment のような有効な方法が開発されていない. しかし, プロトプラストを得た後, 表面電荷の差を利用し電気泳動や分配法で細胞周期の特定の時期にある細胞を分けとろうという考え方や⁴⁾, 近年発展しつつあるフローサイトメトリー・セルソーターによる選抜とその培養は考えられている. なお, キクイモ塊茎切片の初代培養にみられるような同調的な DNA 合成⁵⁾は細胞周期研究の好材料であるが, これを自然同調に含めて考えることもある.

さて誘導同調 (induction synchrony) のうち, 高等植

物の懸濁培養細胞を材料にしたおもなものを Table 1 にあげる (ただし同一の研究者グループによるほぼ同様の系は省略した). この他に同調培養としては, 組織 (片) に DNA 合成阻害剤を作用させたものや, 相当数の初代培養の系があるが, 懸濁培養細胞に材料を限るとさらに加えるべき報告の数はそう多くないはずである. 同調化の方法としては, 飢餓処理, DNA 合成阻害剤の処理, 植物生長調節物質の処理が主であり, 他に温度, 光, コルヒチンなども用いられている. 哺乳類の培養細胞に有効なチミジンの二段処理は植物には適さないようである. 同調性の確認のためにとられる指標には細胞数と分裂指数の変化が多い.

同調の誘導法と指標で最もすぐれているものは何かという問題は難しく, 結局は材料と目的次第であるが, 同調化には細胞に与えられる害作用が最少限でなるべく通常進行している細胞周期をそのまま再現できるものが望ましい. その他目的に応じて操作の簡便さや得られる細胞の量 (経済性) も重要な問題である. 分裂指数では一般に DNA 合成阻害剤を用いた誘導で飢餓処理に比べ高いピークが得られ, 特にアフィディコリンによる同調化で高い. また細胞数の変化などにより同調性を数値化する式や "principal control hypothesis" をはじめとする細胞周期の進行に関するモデルもいくつか提出されているが, これらは最近の成書¹⁹⁾および総説^{2, 20, 21)}にゆずる.

細胞周期に関する研究内容としては, 細胞周期そのものの解析のほか, 呼吸や核酸代謝の酵素活性の変化などが調べられているが¹⁰⁾, 最近では外来遺伝子の導入を細胞周期の観点からみた研究も出ている. ダイズ懸濁培養で FUDR を用いて誘導した同調系で細胞周期各期の細胞から調整したプロトプラストではプラスミド DNA の取り込みが S 期で高いという報告があるのをはじめ¹⁶⁾, 同じく DNA の取り込み²²⁾, タバコモザイクウイルスの感染¹⁵⁾, タバコ葉肉プロトプラストでのアグロバクテリウムによる形質転換²³⁾, 細胞融合²⁴⁾などと細胞周期との関連が報告されており, 今後ともこの種の研究は増加す

* Shin-ichi AMINO, **Sakiko AKADA, **Hiroaki KODAMA, **Atsushi KOMAMINE: Synchronous Culture and the Cell Cycle in Plants

* 東京大学理学部植物学教室 (〒113 東京都文京区本郷 7-3-1)
Department of Botany, Faculty of Science, University of Tokyo (Hongo, Tokyo 113)

** 東北大学理学部生物学教室 (〒980 宮城県仙台市荒巻字青葉)
Biological Institute, Faculty of Science, Tohoku University (Sendai, Miyagi 980)

Table 1. Synchronous cell division systems induced in suspension cultures of higher plants.

Species	Method	Index ^a	Reference
<i>Haplopappus</i>	hydroxyurea etc.	MI ^b	Eriksson 1966 ⁶⁾
<i>Acer</i>	cytokinin	MI	Roberts & Northcote 1970 ⁷⁾
<i>Nicotiana</i>	cytokinin	MI	Jouanneau 1971 ⁸⁾
<i>Daucus</i>	starvation+low temperature	CN ^c	Okamura et al. 1973 ⁹⁾
<i>Acer</i>	starvation ^d	CN	King et al. 1974 ¹⁰⁾
<i>Nicotiana</i>	starvation+light-dark	CN, MI	Nishinari & Yamaki 1976 ¹¹⁾
<i>Daucus</i>	auxin	CN	Nishi et al. 1977 ¹²⁾
<i>Glycine</i>	ethylen	MI	Constabel et al. 1977 ¹³⁾
<i>Triticum</i>	hydroxyurea+colchicin	MI	Szabados et al. 1981 ¹⁴⁾
<i>Nicotiana</i>	aphidicolin	MI	Nagata et al. 1982 ¹⁵⁾
<i>Glycine</i>	5-fluorodeoxyuridine	CN	Cress 1982 ¹⁶⁾
<i>Daucus</i>	aphidicolin	DNA synthesis	Sala et al. 1983 ¹⁷⁾
<i>Catharanthus</i>	starvation	CN	Amino et al. 1983 ¹⁸⁾

^a major indices to confirm the synchrony.

^b mitotic index.

^c cell number.

^d including "dilution" with or "transfer" to a fresh medium, but excluding starvation with growth regulators.

るものと思われる。

2. ニチニチソウの同調培養系

Fig. 1 は筆者らが材料に用いている同調培養系である。図で示したように、通常1週間毎に $2.2\mu\text{M}$ の 2,4-D を含む MS 培地で継代培養している細胞を2度にわたるリン酸飢餓処理をして誘導する。一般に培養細胞の増殖は培地中の制限栄養素の量によって支配されるが、この継代培養においては、リン酸濃度が通常の MS 培地の少なくとも2倍までは細胞の増殖と直線関係にあり、リン酸が生長制御要因のひとつであることが見出された¹⁹⁾。この事実からリン酸飢餓処理による同調誘導を試みたが、二段階の飢餓処理を用いると一段階の時より同調性がよく、また図からもわかるように飢餓処理中に長時間にわたって細胞分裂を休止させることなく細胞周期の進行を再開できる。飢餓処理中の細胞密度および2度のリン酸飢餓処理の間に与えるリン酸の量(図の条件では最終 0.2 mM) はかなり微妙で、細胞数をモニターしつつ多少の変更を加える。またリン酸飢餓処理による同調誘導の機構は現在のところ不明だが、リン酸添加により ATP レベルが上昇するというデータがある²⁵⁾。

リン酸飢餓処理を同調誘導に用いるメリットとして、まず飢餓処理全般に通じることで阻害剤の処理に比べ細胞への影響が少ないことがあげられる。特にニチニチソウの場合、バッチ培養の増殖制限要因もリン酸である。次にリン酸が制限要因である場合には細胞の viability が維持されることがある。これはリン酸が制限要因となって細胞への増殖が停止しても他の栄養素によって必要な代謝は維持されるためと考えられる。他の栄養素、特

に炭素源・エネルギー源であるショ糖が欠乏した時はリン酸飢餓に比べ viability が急速に低下することがシカモアカエデの懸濁培養でも報告されている²⁶⁾。そして飢餓状態を解除するとその結果として、速やかに細胞周期の進行が再開する。これにはリン酸の吸収が非常に速いことも関係していると思われるが、とにかく飢餓状態を解除した後の長い lag が無いことは、実用上の大きなメリットである。

細胞周期の長さは、同じニチニチソウで温度の変化による細胞周期の長さを調べた研究²⁷⁾と比べて大差はない。また細胞数の変化でみる限り、植物の同調培養系としては同調性がすぐれていると思われる。ただし2回目の同調的な分裂以後の細胞数密度が継代培養時の定常期と比べてもかなりの高さとなり、3回目以降の同調的な分裂は難しいという難点はある。^[³H]チミジンの DNA 相当画分への取り込みの同調性もかなり高い(**Fig. 1**)。分裂指数はピーク時に8%ぐらいとあまり高くないが、他の飢餓処理の系との比較や、核が小さく観察しづらいので有糸分裂の中期以後を数えたことを考えれば、低すぎることはないように思われる。

現在この同調系を用いて筆者らが関心をもって研究を進めている課題のうち、細胞周期の制御機構とタンパク質の変化、微細構造とくにオルガネラの変化、また細胞壁代謝について、以下にその背景と得られた知見について述べる。

3. 細胞周期の制御機構とタンパク質

細胞周期の制御機構の研究は、ひいては発生や分化の基礎となる知見を提供することにもなる。その細胞周

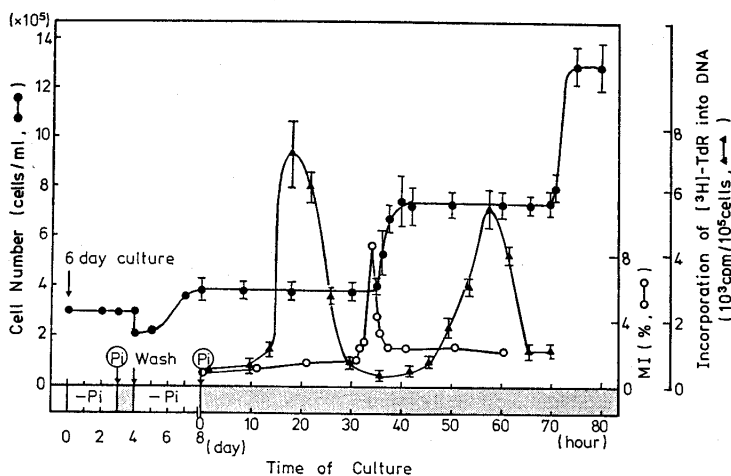


Fig. 1. Diagram of the procedure of synchronization and changes in cell number, mitotic index (MI) and incorporation of [^3H] thymidine into DNA fraction⁽⁸⁾. Cells (6 day subculture) were transferred in phosphate free medium at the cell population density of about 3×10^5 cells ml^{-1} for 3 days. Then inorganic phosphate (Pi) was added into the medium. After incubation for 24 h, the cells were washed with the phosphate free medium, transferred to the phosphate free medium at the cell population density of about 2×10^5 cells ml^{-1} and cultured for 4 days. Then, the second phosphate addition re-started the cell cycle.

期は、細胞をとりまく環境と遺伝情報の相互関係のもとで制御された遺伝子の順序だった発現の結果とみることができる。そこで遺伝子の発現の結果であるタンパク質の面から、細胞周期の制御機構を研究する試みが数多くなされてきた。

いわゆる G_0 期から G_1 期への移行 (増殖誘導) に関して動物ではその分岐点が G_1 期に存在すると考えられ、その時期を restriction (R) point と呼んでいる⁽²⁹⁾。R-point では、タンパク質合成阻害剤を用いた実験から DNA 複製の trigger protein が合成されることが示唆されており^(29,30)、trigger protein と思われるタンパク質の同定もなされている⁽³¹⁾。また数種類の oncogene が G_1 期で一定の順序で発現すること⁽³²⁾、カルモジュリンが G_1 期で増加すること⁽³³⁾なども DNA 複製開始に関与していると思われる。

一方で核タンパク、特にヒストンは細胞周期の進行に伴い化学修飾を受けることによりクロマチンの高次構造の変化に大きな影響を与える⁽³⁴⁾。ヒストン HI のリン酸化は細胞周期の進行に伴い段階的に生じ、DNA 複製や有糸分裂に重要な役割を果たしている。最近では heat-shock-protein が G_0 期に関係することが示されている⁽³⁵⁾。

酵母においては Hartwell らが多数の cdc (cell division cycle) mutant を単離したことにより、細胞周期の新しい研究の方向が生まれた。酵母においても “start”

と呼ばれる時期が G_1 期の中に存在し⁽³⁶⁾、そこでは DNA 複製の trigger-protein が合成され则认为られている⁽³⁷⁾。“start” に特異的な cdc-mutant があり、それを用いて trigger-protein の同定もなされている⁽³⁸⁾。一般に動物や酵母で考えられているこれらの trigger-protein は半減期が非常に短い不安定なタンパク質と推定されたので、labile protein と呼ばれることも多い。

さて植物においては細胞周期に関する報告はかなり限られてくる。タンパク質合成阻害剤を用いて細胞周期とタンパク質合成の関連を調べた例がいくつかあるが^(39,40)、根端細胞を材料にしているために、おもに M 期の進行とタンパク質合成阻害剤の関連について調べられているだけで、動物や酵母などにおけるように G_1 , S, G_2 の各期での関連についての報告例は少ない。また細胞周期の進行に伴って合成されてくるタンパク質の変化を調べることから、各時期で特異的に発現する遺伝子の有無について大きな情報が得られる。この点については、タバコ葉肉細胞から調製したプロトプラストの分裂過程において合成されてくるタンパク質を 2 次元電気泳動で調べたところ、細胞周期の進行に伴って合成されてくるタンパク質はほとんど変化しないという結果が得られている⁽⁴¹⁾。それに対し、Jouanneau はタバコ培養細胞で細胞分裂にサイトカイニンが必要であり、アミノ酸アナログでタンパク質合成を阻害すると、有糸分裂が始まらないことを示した⁽⁴²⁾。同じように Fosket らはサイトカイニ

ン要求性のダイズ培養細胞において、サイトカニンにより有糸分裂が誘導され、分裂前（おそらくは G_2 期）に細胞分裂に特異的なタンパク質が合成されてくることを示した⁴³⁾。しかし、Wang らは、同じくダイズ培養細胞において培地中のサイトカニンの除去、再添加の実験を行い、細胞が G_2 期で止まることはないこと、サイトカニンの再添加にともなうタンパク質の泳動パターンに変化が見られないことを示した⁴⁴⁾。

はたして、高等植物で細胞周期各期に特異的なタンパク質が合成されるのかという問題については、確立された同調培養系で調べられた例がない。そこで筆者らは前述のニチニチソウの同調培養系において、細胞周期で変化するペプチドがあるか2次元電気泳動法により解析を進めている。

植物の細胞周期における酵素活性の変化はいくつか報告例がある^{10,45)}。細胞周期の制御に重要な役割を果たしていると思われる核タンパク質については、同調的なDNA複製がみられるキクイモ塊茎切片の初代培養で、ヒストンのリン酸化⁴⁶⁾とヒストン分子間の量的変動⁴⁷⁾が調べられているにすぎない。heat-shock-proteinが各種の培養細胞系で調べられているが^{48,49)}、細胞周期との関連についての報告はない。総じて植物の細胞周期の制御機構の解明は今後の展開に負うところが大きい、組織培養の研究とともに進展が期待される。

4. 細胞周期とオルガネラの変化

細胞周期は核のDNA合成（S期）と核分裂（M期）によって規定されているが、植物細胞の機能を保つうえで重要な役割を果たし、かつ独自のDNAをもっているミトコンドリアと葉緑体の複製・分裂が細胞周期と関連しているか否かは重要な問題である。また細胞周期の進行と他の微細構造の変化も細胞周期における諸現象に重要な知見を与えるものと思われる。培養細胞の細胞分裂の観察報告はかなり以前よりあるが⁷⁾、近年DAPI（4'-6-diamino-2-phenylindole）染色法の開発、改良によりミトコンドリアや葉緑体にも核が存在する一すなわち“オルガネラ核”という考え方が提唱され⁵⁰⁾、上述の問題に対して新たな知見が得られるようになった。以下、ミトコンドリア、葉緑体、ゴルジ体について細胞周期との関連について述べる。

ミトコンドリアの分裂と細胞周期の関係については多くの研究者が酵母や真性粘菌 *Physarum*、藻類の *Chlamydomonas* や *Euglena* の同調培養系を用いた研究を報告しているが、高等植物ではまだほとんど報告がない。ミトコンドリアの分裂をミトコンドリアDNA（mtDNA）の複製、ミトコンドリア核（mt核）の分裂、ミトコン

ドリア自体の分裂に分けて考えると、mtDNAの複製の時期については、S期もしくはS期後半から G_2 期にかけて⁵¹⁻⁵⁴⁾、あるいは細胞周期の他の時期⁵⁵⁾、さらに細胞周期全体を通じて^{56,57)}とさまざまな報告がある。高等植物ではオオムギの胚でS期後半にmtDNA合成が最大となるという報告がある⁵⁴⁾。

一方、mt核とミトコンドリアの分裂については、酵母において出芽前、 G_1 期に約30個のミトコンドリアおよびmt核が融合し、1個のmt核をもった1個の長いミトコンドリアを形成し、細胞の分裂直前に2分裂して娘細胞へ分配されるという観察がある。分配されたミトコンドリアはさらに分裂をくり返して丸型のミトコンドリアが形成された⁵⁸⁾。よく似た現象として *Euglena* や *Chlamydomonas* の光誘導の同調培養系で、細胞分裂の起こらない明期で酸素吸収の減少に伴ってミトコンドリアが融合し、巨大ミトコンドリアとなり、酸素吸収が再び増加すると同時にミトコンドリアは分裂し、続く暗期で核分裂、細胞分裂が起こる⁵⁸⁻⁶⁰⁾。Kuroiwa らは、*Physarum* でミトコンドリアの数およびmt核の数がS期後半から G_2 期にかけて同調的に増加し、約14時間で2倍になることを示し、ミトコンドリアの分裂周期にも細胞核と同様に mG_1 , mS , mG_2 , mM の4つの時期があることを提唱した。*Physarum* のミトコンドリアの分裂周期は細胞周期と1周期の長さが同じである⁵³⁾。このようにミトコンドリアのDNA合成、分裂は細胞周期と密接に関わっていることが多い。

さて葉緑体については、植物の同調培養系を使った研究が他に比べてまだ少ないこと、高等植物の培養細胞では普通、発達した葉緑体をもたないこと、さらに葉緑体のDNA複製、分裂には光が大きな要因となっていることなどの理由から、細胞周期との関連についてはまだほとんど解明が進んでいない。

高等植物の葉組織では細胞あたりのmtDNAはその発達段階においてほぼ一定の量を保っているのに対し⁶²⁾、葉緑体DNA（cpDNA）の量は葉組織の発達に伴って数倍に増加する⁶¹⁾。ホウレンソウの葉では細胞分裂の盛んな初期発達過程でcpDNAが核DNAと同じペースで合成されるが、葉の生長につれcpDNAの合成速度が核DNAのそれを上まわってくる。次の段階ではcpDNA合成が続いたまま葉緑体の分裂が起こり、最終的には核DNA合成、cpDNA合成および細胞分裂が止まり葉緑体のみが分裂する⁶³⁾。このように葉組織中の葉緑体は、一見、細胞周期とは無関係にみえる。しかし、初期発達過程では細胞の分裂に見合うcpDNA合成が起こっていること、またコムギの倍数体では核DNAとcpDNA

の量に相関がみられる⁶³⁾ことなどから葉緑体の細胞あたりの数、DNA 量、分裂速度は核によって何らかの支配を受けている可能性は十分にある。光誘導の *Euglena* の同調系では、photoorganotrophic な条件下でミトコンドリアと同様に2~4個の葉緑体が明期に融合し1個の巨大な葉緑体となって核をとりまく。暗期の核分裂時またはその直後にこの葉緑体は分裂して娘細胞に分配されるが、巨大葉緑体が核をとりまいている間に核膜と葉緑体膜が接合し何らかの物質の伝達が起こっていることが示唆されている^{64,65)}。

高等植物でも一定条件下の同調培養系を解析することにより、ミトコンドリア、色素体と細胞周期の関係が明らかにされることが期待される。

ニチニチソウの同調培養系¹⁸⁾で細胞周期の各期の細胞を電子顕微鏡で観察したところ、現在までに、ゴルジ体の変化について若干の知見が得られた。ゴルジ体は細胞の分泌活動、特に植物では細胞壁合成に重要な役割を果たしているオルガネラであるが、G₂ 期には、シスターネの枚数および直径が小さく分泌活動が不活発であることを示していた。これらのゴルジ体は周囲の小包と融合しつつシスターネの枚数、直径を増加させ、M期にはいると G₂ 期の2倍程度の規模となり、はっきりと分泌活動にそなえた完成した構造をもつようになる。続く G₁ 期ではシスターネの両端の膨潤、巨大な分泌小胞、細胞膜を通過し細胞外へ放出されようとしている分泌小胞などが観察された。次項でも述べるように細胞壁は分裂後の G₁ 期にその量的増加が顕著に起こる⁶⁸⁾、以上のことは、この生化学的データが微細構造の面からも裏付けられたといえる。なお続く S 期では、分泌小胞が小さくなり、分泌活動が減退している様子がみられた。

5. 細胞壁多糖類の代謝変動

細胞壁は植物の生長・分化に重要な役割を担っているが、その構造に関する主要な研究は培養細胞においてなされた。これらは培養細胞の細胞壁がおもに一次壁より成り材料として好適なためであり、有名な Albersheim のモデル⁶⁶⁾もシカモアの懸濁培養細胞でのものである。また細胞分化や細胞伸長の過程における細胞壁成分や力学的性質の変化も調べられている⁶⁷⁾。しかし、生長のもう一つの側面である細胞分裂に注目し、細胞周期における細胞壁成分やその代謝に関して調べた研究は高等植物ではなかった。

そこで筆者らは、ニチニチソウの同調培養系¹⁸⁾を材料にして現在までに、(1)細胞壁の構成糖⁶⁹⁾、(2)合成や代謝回転の活性^{69,70)}、(3)細胞壁多糖類の基質と考えられる UDP-sugar の量と⁷¹⁾(4)それに関連する酵

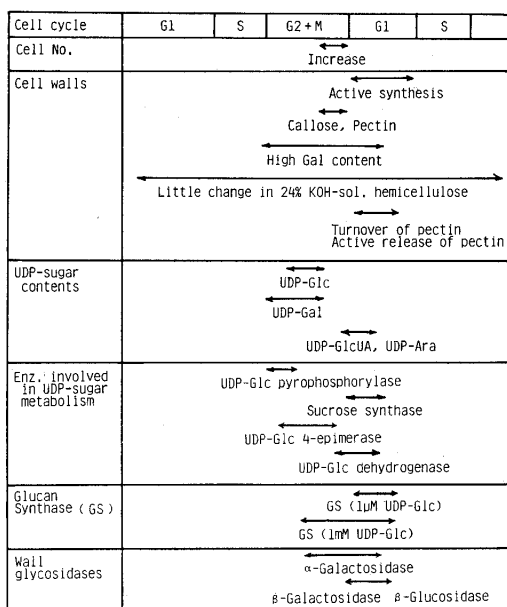


Fig. 2. Metabolism of cell wall polysaccharides during the cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*^{18,68-73)}

素の活性⁷²⁾、(5) UDP-glucose の重合活性としての glucan synthase 活性⁷³⁾、(6)細胞壁グリコンダーゼ活性のおおのについて、細胞周期における変化を調べた。

その結果は Fig. 2 に示したとおりであるが、同調培養系を用いることにより、細胞分裂とその後の容積増大の時期とに分けて細胞壁多糖類の変化をみることができた。細胞壁全体の変化としては、何よりも分裂後 G₁ 期での著しい量的増加が最大の特徴であったが、cytokinesis の起こる時期に pectin 画分と callose (3-linked glucose 残基) の相対的割合が増加することがわかり、従来細胞化学的に示唆されていた新しい細胞板に pectin や callose が存在するという知見を生化学的にも支持することになった。

他の物質レベルや酵素活性の高い時期は、Fig. 2 に示したとおりである。UDP-sugar の代謝では、各 UDP-sugar のプールサイズ、酵素活性の大きさとそれらの変化のパターンから UDP-glucose dehydrogenase が key ではないかと推察された。細胞壁多糖類の代謝の各側面の関連をみると、細胞分裂前に UDP-glucose の量の増加とそれに対応する UDP-glucose pyrophosphorylase 活性のピークがみられる。また細胞壁中の galactose 含量の増加に対応して UDP-galactose の量と UDP-glucose 4-epimerase 活性の上昇が観察された。

さらに細胞分裂後の G₁ 期には細胞壁の量的増加、代

謝回轉の活性化, UDP-glucose dehydrogenase 活性と UDP-glucuronic acid レベルのピーク, $1\mu\text{M}$ の UDP-glucose を基質とする glucan synthase 活性のピークなどがみられ, 細胞壁多糖類の活発な合成とその基質の合成, 重合活性が連動しているものと考えられた。

以上, 植物の細胞周期について, 二, 三の側面を概説したが, これらの問題は大量培養, カルス誘導, 低密度での細胞やプロトプラストの選抜の効率化などの応用的側面の基礎過程でもあり, 今後の研究の発展が期待される。

文 献

- 1) Howard, A., S.R. Pelc, 1953. *Heredity* (suppl.), 6 : 261-273.
- 2) King, P.J., 1980. *Adv. Biol. Eng.*, 18 : 1-38.
- 3) Bennett, M.D., 1976. In "Cell Division in Higher Plants" (ed. by Yoeman, M.M.), p. 161-198, Academic Press, New York.
- 4) Gould, A.R., S.E. Ashmore, A.J. Gibbs, 1981. *Protoplasma*, 108 : 211-223.
- 5) Harland, J., J.F. Jackson, M.M. Yoeman, 1973. *J. Cell Sci.*, 13 : 121-138.
- 6) Eriksson, T., 1966. *Physiol. Plant.*, 19 : 900-910.
- 7) Roberts, K., D.H. Northcote, 1970. *J. Cell Sci.*, 6 : 299-321.
- 8) Jouanneau, J.P., 1971. *Exp. Cell Res.*, 67 : 329-337.
- 9) Okamura, S., K. Miyasaka, A. Nishi, 1973. *Exp. Cell Res.*, 78 : 467-470.
- 10) King, P.J., B.J. Cox, M.W. Fowler, H.E. Street, 1974. *Planta*, 117 : 109-122.
- 11) Nishinari, N., T. Yamaki, 1976. *Bot. Mag. Tokyo*, 89 : 73-81.
- 12) Nishi, A., K. Kato, M. Takahashi, R. Yoshida, 1977. *Physiol. Plant.*, 39 : 9-12.
- 13) Constabel, F., W.G.W. Kurz, K.B. Chatson, J.W. Kirkpatrick, 1977. *Exp. Cell Res.*, 105 : 263-268.
- 14) Szabados, L., Gy. Hadlacký, D. Dudits, 1981. *Planta*, 151 : 141-145.
- 15) Nagata, T., K. Okada, I. Takebe, 1982. *Plant Cell Rep.*, 1 : 250-252.
- 16) Cress, D.E., 1982. *Z. Pflanzenphysiol.*, 105 : 467-470.
- 17) Sala, F., M.G. Galli, E. Nielsen, E. Magnien, M. Devreux, G. Pedrai-Noy, S. Spadari, 1983. *FEBS Lett.*, 153 : 204-208.
- 18) Amino, S., T. Fujimura, A. Komamine, 1983. *Physiol. Plant.*, 59 : 393-396.
- 19) "The Cell Division Cycle in Plants," 1985. ed. by Bryant, J.A., D. Francis, Cambridge University Press, Cambridge.
- 20) King, P.J., 1980. *Int. Rev. Cytol. suppl.*, II A, p. 25-53.
- 21) Gould, A.R., 1984. *CRC Critical Rev. Plant Sci.*, 1 : 315-344.
- 22) Gould, A.R., S.E. Ashmore, 1982. *Theor. Appl. Genet.*, 64 : 7-12.
- 23) Firoozabady, E., D.W. Galbraith, 1985. *International Symposium "Biotechnology in Plant Science"* (June 23-27) Ithaca NY, Poster # 33.
- 24) Ashmore, S.E., Gould, A.R., 1982. *Plant Cell Rep.*, 1 : 225-228.
- 25) Ashihara, H., T. Ukaji, 1986. *J. Plant Physiol.*, in press.
- 26) Gould, A.R., N.P. Everett, T.L. Wang, H.E. Street, 1981. *Protoplasma*, 106 : 1-13.
- 27) Courtois, D., J. Guern, 1980. *Plant Sci. Lett.*, 17 : 473-482.
- 28) Pardee, A.B., 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71 : 1286-1290.
- 29) Schneiderman, M.H., W.C. Dewey, D.P. Highfield, 1971. *Exp. Cell Res.*, 67 : 147-155.
- 30) Rossow, P.W., V.G.H. Riddle, A.B. Pardee, 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76 : 4446-4450.
- 31) Croy, R.G., A.B. Pardee, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80 : 4699-4703.
- 32) 井出利憲, 1985. *生化学*, 57 : 255-295.
- 33) Chafouleas, J.G., W.E. Bolton, H. Hidaka, A.E. Boyd III, A.R. Means, 1982. *Cell*, 28 : 41-50.
- 34) Isenberg, I., 1979. *Ann. Rev. Biochem.*, 48 : 159-192.
- 35) Iida, H., I. Yahara, 1984. *J. Cell Biol.*, 99 : 199-207.
- 36) Hartwell, L.H., 1974. *Bact. Rev.*, 38 : 164-198.
- 37) Shilo, B., D.G.H. Riddle, A.B. Pardee, 1979. *Exp. Cell Res.*, 123 : 221-227.
- 38) Popolo, L., L. Alberghina, 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 : 120-124.
- 39) Webster, P.L., 1973. *J. Exp. Bot.*, 24 : 239-244.
- 40) Rose, R.J., 1970. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23 : 573-583.
- 41) Meyer, Y., Y. Chartier, 1981. *Plant Physiol.*, 68 : 1273-1278.
- 42) Jouanneau, J.P., 1975. *Exp. Cell Res.*, 91 : 184-190.
- 43) Fosket, D.E., M.J. Volk, M.R. Goldsmith, 1977. *Plant Physiol.*, 60 : 554-562.
- 44) Wang, T.L., N.P. Everett, A.R. Gould, H.E. Street, 1981. *Protoplasma*, 106 : 23-35.
- 45) 駒嶺 穆, 1982. *細胞工学*, 1 : 227-232.
- 46) Stratton, B.R., A.J. Trenavas, 1981. *Plant Cell Environ.*, 4 : 419-426.
- 47) Yajima, Y., T. Yasuda, Y. Yamada, 1980. *Physiol. Plant.*, 48 : 564-567.
- 48) Nover, L., K.D. Scharf, 1984. *Eur. J. Biochem.*, 139 : 303-313.

- 49) Vierling, E., J.L. Key, 1985. *Plant Physiol.*, **78** : 155-162.
- 50) 河野重行, 黒岩常祥, 1982. *遺伝*, **36** : 34-44.
- 51) Wells, J.R., 1974. *Exp. Cell Res.*, **85** : 278-286.
- 52) Holt, C.E., E.G. Gurney, 1969. *J. Cell Biol.*, **40** : 484-496.
- 53) Kuroiwa, T., 1982. *Int. Rev. Cytol.*, **75** : 9-27.
- 54) Khan, A.M., K.C. Upadhyaya, 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, **94** : 159-161.
- 55) Cottrell, S.F., C.J. Avers, 1970. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38** : 973-980.
- 56) Braun, R., T.E. Evans, 1969. *Biochim. Biophys. Acta*, **182** : 511-522.
- 57) Seavey, D., P. Goldmark, D. Kessler, 1967. *J. Cell Biol.*, **35** : 187 A.
- 58) Osafune, T., S. Mihara, E. Hase, I. Ohkuro, 1975. *Plant Cell Physiol.*, **16** : 313-326.
- 59) Osafune, T., S. Mihara, E. Hase, I. Ohkuro, 1972. *Plant Cell Physiol.*, **13** : 211-277.
- 60) Osafune, T., S. Mihara, E. Hase, I. Ohkuro, 1972. *Plant Cell Physiol.*, **13** : 981-989.
- 61) Lamppa, G.K., A.J. Bendich, 1979. *Plant Physiol.*, **64** : 126-130.
- 62) Lamppa, G.K., A.J. Bendich, 1984. *Planta*, **162** : 463-468.
- 63) Boffey, S.A., 1985. In "The Cell Division Cycle in Plants" (ed. by Bryant, J.A., D. Francis), p. 233-246, Cambridge University Press, Cambridge.
- 64) Ehara, T., S. Sumida, T. Osafune, E. Hase, 1984. *Plant Cell Physiol.*, **25** : 1133-1146.
- 65) Ehara, T., T. Osafune, E. Hase, 1985. *Plant Cell Physiol.*, **26** : 1155-1165.
- 66) Keegstra, K., K.W. Talmadge, W.D. Bauer, P. Albersheim, 1973. *Plant Physiol.*, **51** : 188-196.
- 67) Masuda, Y., R. Yamamoto, 1985. In "Biochemistry of Plant Cell Walls" (ed. by Brett, C.T., J.R. Hillman), p. 279-300, Cambridge University Press, Cambridge.
- 68) Amino, S., Y. Takeuchi, A. Komamine, 1984. *Physiol. Plant.*, **60** : 326-332.
- 69) Amino, S., A. Komamine, 1985. *Plant Cell Physiol.*, **26** : 745-751.
- 70) Amino, S., Y. Takeuchi, A. Komamine, 1985. *Physiol. Plant.*, **64** : 202-206.
- 71) Amino, S., Y. Takeuchi, A. Komamine, 1985. *Physiol. Plant.*, **64** : 197-201.
- 72) Amino, S., Y. Takeuchi, A. Komamine, 1985. *Physiol. Plant.*, **64** : 111-117.
- 73) Amino, S., T. Yoshihisa, A. Komamine, 1985. *Physiol. Plant.*, **65** : 67-71.