

植物培養細胞系における二次代謝系分化の制御

小 関 良 宏

(1987年6月24日受理)

植物培養細胞系の大きな特徴は、分化を誘導して再生植物体を生じることが可能なことである。すなわち、これは植物細胞が分化全能性を有していることである。このことは、Steward ら¹⁾、および Reinert²⁾ がニンジン培養細胞で不定胚形成を観察して以来、おもに生理学的観点から研究が進められてきた。しかし、生理学的研究が進んだにもかかわらず、その分化の分子レベルでの機構についての研究は進んでいない。この生理学的事実に分子生物学的なメスが入れられない原因の一つは、その分化の分子生物学的な“マーカー”となるものが見つかっていないためである。生理学的現象を解明するために、現在の生化学的・分子生物学的手法を用いる場合、何らかの機能のわかった物質（タンパク質など）をとらえて研究を進めていくという方法論のため、このような機能のわかった“マーカー”を捕えられないと、これら手法を用いて分化全能性の発現にメスを入れようとすることは、現時点では難しいと思われる。

一方、Steward らなどにより植物培養細胞における分化全能性が示されて以来、30年の間に、植物培養細胞系は、別の側面、その中でも応用面からの研究が進められた。とくに、植物培養細胞系を用いてタンク内で有用物質生産を行わせようとする試みが精力的に行われた。植物培養細胞系で生産しようとしている有用物質は、ユビキノン³⁾などの例を除くと、その多くは二次代謝系によるものである。しかし、多くの場合、培養細胞系として確立され、細胞が無限増殖を行うようになると、母植物体では発現していたはずの二次代謝活性は低下、消失したり、著しく変化してしまった。

母植物体を考えてみると、一次代謝系は個々の細胞が生きていく上において必須のものであるため、すべての生きている細胞で何らかの形で発現している。これに対し、二次代謝系は、分化した特定の組織・器官で特定の時期・環境においてのみ発現している。すなわち、二次代謝系の発現は、分化と環境に密接な関係があると考えられる。

母植物体に対し、植物培養細胞は、無限増殖する培養系として確立された時、多くの場合、脱分化状態にある。したがって、培養細胞系は脱分化状態であるために、分化した状態の母植物体では発現していた二次代謝系が消失していると考えることができる。また、そのような二次代謝系を偶発的に発現している細胞が培養系の中に存在していた場合でも、培養系という一つのフラスコ内での生存競争の中で、1個の細胞の中の限られたエネルギーと基質を二次代謝系に振分けている細胞にくらべ、すべてを一次代謝系に利用している細胞の方が増殖速度が速いため、生存競争に負け、次第に淘汰されていく。このため、一つの培養系の中で、初めのうちは二次代謝産物を生産していた培養系が、選抜法を常に用いない限り、次第に生産量が低下、消失していく。

それでは、植物培養細胞系で二次代謝系を安定に発現させるにはどのようにしたらよいか。二次代謝系は、母植物体において、分化した特定の組織・器官で特定の時期・環境で発現していることを考えると、培養細胞をそのような状態、すなわち、分化と環境を制御することによって二次代謝系を安定に誘導できると考えられる。環境に対する植物細胞の反応性を培養細胞系における二次代謝系の誘導に利用したものとして、光環境⁴⁻⁸⁾、特に紫外線照射による誘導、および elicitor による誘導⁹⁾などがあげられる。

もう一つの手段として考えられるのは、培養系を脱分化状態にせず、母植物体で二次代謝系を発現している組織・器官を分化した状態にすることである。これは茎葉

* Yoshihiro OZEKI: Regulation of Differentiation of Secondary Metabolism in Cultured Plant Cells.

東京大学教養学部生物学教室 (〒153 東京都目黒区駒場 3-8-1)

Department of Biology, College of Arts and Sciences, The University of Tokyo (Komaba 3-8-1, Meguro-ku, Tokyo 153)

分化体¹⁰⁾や根などを分化させることによって、葉や根などで作られる有用物質を生産させることである。しかも、一般的なカルス状態にあるような脱分化的増殖を行わせるのではなく、いわば“分化的増殖”を行わせて培養系として無限増殖可能、すなわち継代培養可能な形で培養できることが望ましい。筆者らは、*Datura innoxia* より、白色カルス、緑色カルス、莖葉を分化しながら増殖する培養系、根を分化しながら増殖する培養系など、種々の分化形態を有する培養系を、一個の無菌植物体より確立した。ここにおけるアトロピン、スコポラミンの生産を調べたところ、根を分化する培養系においてのみ生産されており、莖葉分化体やカルスにおいては生産はほとんど見られなかった¹¹⁾。この結果は、母植物体においてこれらアルカロイドは根で生産され全草に転流されるということと対応する¹²⁾。すなわち、これら代謝系の発現は、培養細胞系においても母植物体においてと同じく、根という形態的分化と密接な相関関係があることがわかる。それならば、より積極的に分化を誘導することを行えば、それに密接な相関関係のある二次代謝系の誘導をより強力になしうると考えられる。下村らは、*Datura innoxia* に *Agrobacterium rhizogenes* を感染させ、Ri プラスミドにより形質転換を行い、毛状根を形成させ、旺盛な増殖を行う毛状根でアトロピン、スコポラミンが生産されていることを見出した¹³⁾。この Ri プラスミドによる形質転換細胞での物質生産は、根という器官で発現している代謝系で生産されるものであれば、かなり広範囲にわたって応用できると考えられる^{14,15)}。

以上の結果から考えると、二次代謝系の発現には、形態的分化ということが必要のように思われる。しかし、培養系として見た場合には、分化した器官のレベル、たとえば根ということではいわば homo な系であるが、細胞のレベルで見た時、根として分化している中にも、表皮細胞をはじめ、種々な細胞分化を誘導したものの集合体であり、いわば hetero な系である。二次代謝系の発現においても、ある特定の細胞分化した細胞のみが発現しており、その他の細胞はまったく関与していない可能性が考えられる。二次代謝系の発現機構を分子生物学的、生化学的手法を用いて解明していこうとする場合、二次代謝系の発現に関与していない細胞が“biochemical noise”となってくるため、解析していく上で不利である。また有用物質生産という面から見ても、たとえば根という形態をとるためにエネルギーや基質が使われているわけであるから、生産効率を低下させていることになる。

そこで、このような形態的分化を誘導することなく二次代謝系を誘導できないか、ということが問題になる。植物細胞 1 個 1 個が分化全能性を有しているのであれば、形態的分化をとまわず、二次代謝系のみを培養系の中のすべての個々の細胞で誘導させる、分化させることは可能なはずである。

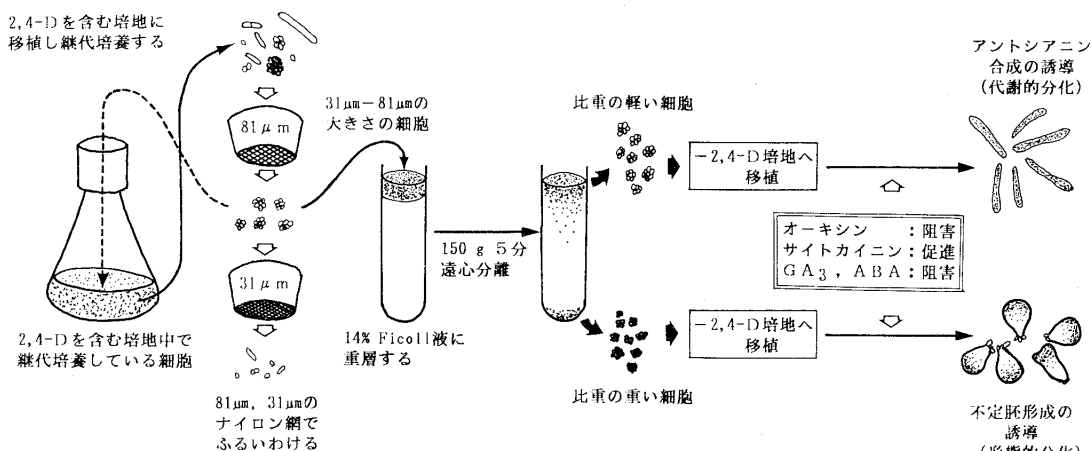
筆者と駒嶺は、ニンジン培養細胞において、二次代謝系の一つであるアントシアニン合成系を誘導できる系を確立し、これが不定胚形成という形態的分化と密接な相関関係があり、アントシアニン合成系の誘導という二次代謝系の分化、“代謝的分化”がおこることを示した¹⁶⁾。

以下、この系におけるアントシアニン合成の誘導と抑制について、現在までに得られた知見をまとめてみたい。

1. ニンジン培養細胞におけるアントシアニン合成誘導系の確立とその生理的性質

用いた培養細胞は、ニンジンの栽培品種「黒田五寸」の無菌植物体より下胚軸を切り出し、これを 5×10^{-7} M 2,4-D を含む Lin and Staba¹⁷⁾ の改変培地に植えこんで得られた液体培養細胞系である。この培養系を 1 年以上、同上の 2,4-D を含む培地で継代培養したものを、第 1 図に示すように、植え継ぎ時に 81 μ m と 31 μ m のナイロン網でふるい、31~81 μ m の大きさの細胞のみを集め、これを 2,4-D を含む培地に移植し、培養する。この操作を、7 日ごとの植え継ぎのたびに行い、継代培養する。2,4-D を含む培地中で継代培養している時は、脱分化的増殖が見られるだけであるが、植え継ぎ時に、細胞の一部をとり、これを 2,4-D を含まない培地に移植して培養すると、不定胚形成の誘導という形態的分化の誘導とともに、アントシアニン合成が誘導された。すなわち、この系においてはアントシアニン合成と不定胚形成とが -2,4-D という同一の trigger によって誘導される。

この系におけるアントシアニン合成の誘導と不定胚形成の誘導との関係を詳しく調べるため、2,4-D を含む培地中で培養している細胞を Ficoll の密度勾配遠心法で細胞の比重の違いによって分画し、分画した各画分を 2,4-D を含まない培地に移植し培養した。その結果、第 1 図に示すように、Ficoll 濃度 14% 以上で沈む、いわば重い細胞からは、Fujimura and Komamine¹⁸⁾ が報告したように、不定胚形成の誘導が見られたが、アントシアニン合成はほとんど見られなかった。これに対し、Ficoll 濃度 14% 以下の、いわば軽い細胞からは、不定胚形成は見られず、アントシアニン合成の誘導が見られた。しかも、重い画分における不定胚形成の誘導の時間



第1図 ニンジン培養細胞におけるアントシアニン合成誘導系の確立と、不定胚形成の誘導との関係

的経過と、軽い画分におけるアントシアニン合成の誘導の時間的経過は非常によく一致していた¹⁶⁾。

さらにこの両者の関係を調べるため、各種植物生長調節物質の効果を調べたところ、アントシアニン合成の誘導に対し、オーキシシンは阻害的、サイトカイニンは促進的、GA₃、ABAは阻害的であることがわかった¹⁹⁾。これら生長調節物質の効果は、不定胚形成の誘導に対する効果²⁰⁻²²⁾とよく一致していた(第1図)。以上の結果から、この系におけるアントシアニン合成の誘導と不定胚形成の誘導との間には、生理学的に見て密接な相関関係があることが考えられた。すなわち、不定胚形成の誘導を形態的分化というならば、この系におけるアントシアニン合成の誘導は“代謝的分化”と呼ぶことができる。

形態的分化についての研究では、前述したように生化学的な機能をもったマーカーが発見されていないのに対し、代謝的分化において、特にアントシアニン合成系に関しては、その代謝系の多くの部分が酵素レベルにおいてすべて知られているので、マーカーとなるような機能分子としての酵素を見出し、生化学的、分子生物学的手法を用いて、その制御機構にアプローチすることができる。そこで得られた成果が、代謝的分化のみならず、これと密接な相関関係がある形態的分化の機構の解明に重要なヒントを与えてくれる可能性が期待できる。

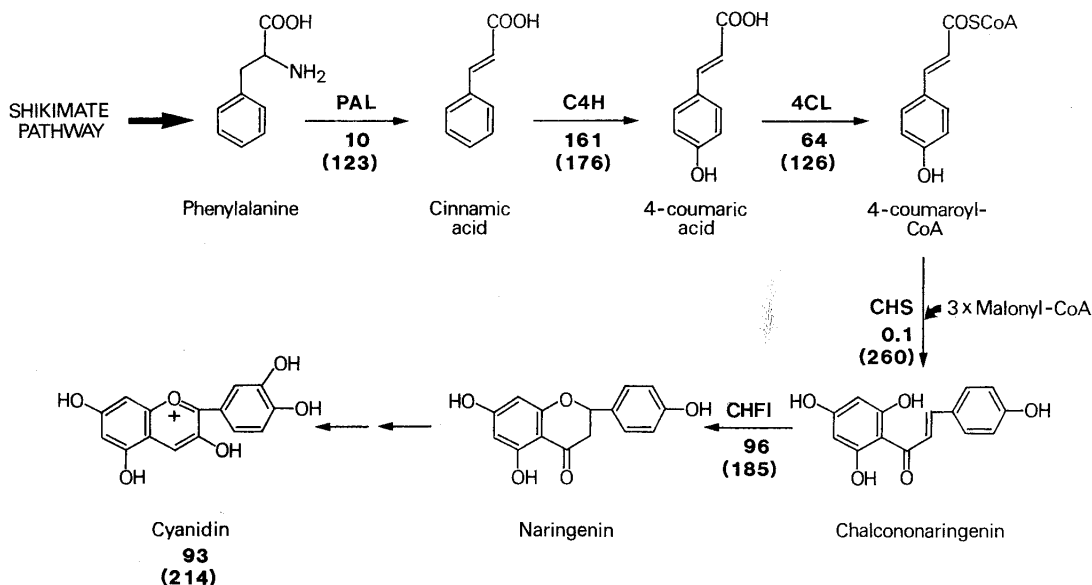
そこで、次に、この系におけるアントシアニン合成系の誘導と抑制が2,4-Dによってどのように制御されているのかを調べた。

2. アントシアニン合成系の2,4-Dによる制御機構の解明

アントシアニン(フラボノイド)合成系についての研究は、西ドイツの研究者、特に Hahlbrock ら^{23,24)}によ

って、パセリ培養細胞系を用いて酵素レベルの研究が進められていた。そこで、このアントシアニン合成に関与する酵素群の活性が2,4-Dによってどのように制御されているのか調べた。このアントシアニン合成系は、第2図に示すように、一次代謝系の phenylalanine より、phenylalanine ammonia-lyase (PAL) により cinnamic acid が生じ、さらにこれが cinnamate-4-hydroxylase (C4H)、4-coumarate: CoA ligase (4CL) により、4-coumaroyl-CoA が生じる。これと三つの malonyl-CoA とから、フラボノイドの基本構造である C₆-C₃-C₆ 物質である chalcononaringenin が chalcone synthase (CHS) により合成される。これが chalcone-flavanon isomerase (CHFI) によりフラバノンになり、これが以後数ステップの酵素反応を経て、アントシアニンが合成される。フラバノン以降のステップを行う酵素については、いまだ不明なところも多いので、PAL から CHFI までについて、ニンジン培養細胞における活性変動を調べた^{25,26)}。

その結果、新鮮培地に移植後、PAL 活性の一過的な上昇が2,4-Dを含む含まない培地にかかわらず見られた。これは、dilution effect もしくは transfer effect と呼ばれているものであり、多くの培養細胞系で観察されている²⁷⁾。しかし、これがなぜ起こるのか、また、この活性上昇に何の意味があるのかはわかっていない。2,4-Dを含む培地中では、PAL 活性はその後低下し、低いレベルに抑えられていた。また他の酵素も低いレベルを保ったままで、特に CHS 活性は検出限界以下であった。これに対し、2,4-Dを含まない培地に移植した場合、アントシアニン合成が開始する4~5日目ぐらいより、CHS 活性が検出できるようになり、また各酵素と



第2図 アントシアニン合成にかかわる酵素と 2,4-D による酵素活性の制御
図中の数字は、6日間 2,4-D を含まない培地で培養しアントシアニン合成を誘導した時の各酵素活性およびアントシアニン合成量を 100% とした時、

上段の数字：6日目の時点で 2,4-D を加えて 24 時間培養した後の相対活性およびアントシアニン合成量、下段の数字（カッコ内）：6日目の時点で 2,4-D を加えず 24 時間培養した後の相対活性およびアントシアニン合成量。

酵素の省略名については、本文参照。

もに活性上昇が始まり、アントシアニン合成が最もさかんに起こる 7 日目ぐらいで各酵素活性ともにピークになり、その後活性は低下した。しかし、この活性の中で、CHS 活性は他の酵素にくらべ、その比活性はピーク時でも 1/100 以下であり、この酵素がアントシアニン合成系の中で重要な働きをしていることが考えられる。

また、2,4-D を含まない培地で 6 日間培養して各酵素活性を誘導した細胞に、2,4-D を加えて 24 時間培養すると、第 2 図中の数字に示すように、アントシアニン合成はその時点で停止し、この時、これら酵素活性の中で PAL と CHS 活性が著しく低下した。この事は、2,4-D によるアントシアニン合成の制御において、PAL と CHS 活性が重要な役割をはたしていることを示唆するものである。さらに、6 日間 2,4-D を含まない培地で培養して各酵素活性を誘導した細胞を、2,4-D を含む新鮮培地に細胞密度が半分になるように移植して 24 時間培養したところ、やはりアントシアニン合成は停止した。この時、CHS 活性はやはり 2,4-D によって低下するのに対し、PAL 活性は transfer effect により上昇した。このことから PAL 活性よりも、CHS 活性の方がアントシアニン合成との相関関係が高く、より重要な働きを

していることが示唆された²⁶⁾。

そこで、この CHS をニンジン培養細胞より精製することを試みた。培養細胞より酵素を精製する上において、まず初めにぶつかる壁は、材料（細胞）を集めることにある。一般的に、タンパク質を精製する場合には、出発材料として kg オーダーの材料が必要となる。しかし、それだけの材料を培養細胞で集めようとすると、多くの場合、大変な労力と培養スペースが必要となる。そこで、筆者はまず一定の培地量の中に植えこめる細胞量を増やすための条件を調べた。その結果、4% ショ糖、 10^{-6} M ゼアチンを含む培地で最も良いアントシアニン合成の誘導と細胞量が見出された²⁸⁾。

この条件で大量の材料を得て抽出を行い、硫酸沈殿、CM-セファロース、ハイドロキシアパタイト、トヨパール HW-55F によるゲル濾過、クロマトフォーカシング、ブチル-トヨパールのステップを経て、電気泳動上で単一バンドになるところまで精製し、また、この標品を用いてマウスより抗 CHS 抗体を得た²⁹⁾。

また、農林水産省農業環境技術研究所 田中喜之博士により、このニンジン培養細胞より PAL を精製していただき、これを用いてウサギより抗 PAL 抗体を得た。

以上で得られた抗 CHS, PAL 抗体を用いて, ウェスタン・ブロット法と ^{125}I -標識抗体法により, CHS, PAL 酵素タンパク質量の変動を調べ, 活性変動と比較した. その結果, 両者の活性変動と酵素タンパク質量の変動とはほとんど一致した. すなわち, PAL タンパク質量は, 新鮮培地に移植後, transfer effect により活性と同様に一過的に上昇した. 2, 4-D を含む培地中では PAL タンパク質量はその後低下し, 低いレベルに抑えられていた. これに対し, CHS タンパク質は, 2, 4-D を含む培地中で培養した細胞では検出限界以下であった. 2, 4-D を含まない培地に移植した場合, 培養後 4 日目ぐらいから CHS タンパク質が検出されるようになり, その後その量は活性変動と同様に上昇, 低下した. また, PAL タンパク質量もその活性変動と同様に上昇, 低下した. 以上の結果より, この系における 2, 4-D による PAL, CHS 活性の制御は, 酵素タンパク質の活性化, 不活性化によるものではなく, 酵素タンパク質量の変動を通して行われていることが示唆された³⁰⁾.

次に, この酵素タンパク質の合成の変化と mRNA 量の変化との関係を調べるため, 細胞より mRNA を抽出し, これを *in vitro* 翻訳系と抗体沈殿法により PAL, CHS に対する mRNA 量を調べた³⁰⁾. また, PAL, CHS に対する cDNA をプローブとしてノーザン・ブロット法によっても mRNA 量の変動を調べた³¹⁾. その結果, 新鮮培地に移植した場合, 2, 4-D の有無にかかわらず, 移植後数時間で PAL に対する mRNA 量の著しい上昇が見られた. これは PAL タンパク質量, 活性量の上昇に先行しており, transfer effect による PAL 活性の上昇は, PAL に対する mRNA 量の急速な上昇により, PAL タンパク質が合成されたために起こることを示唆している. 2, 4-D を含む培地中では, その後 PAL に対する mRNA 量は低下し, 低いレベルに抑えられていた. CHS に対する mRNA は, 2, 4-D を含む培地中では, *in vitro* 翻訳系と免疫沈殿法を用いた方法でも, ノーザン・ブロット法と cDNA をプローブとして用いた方法でも, 検出限界以下であった. これに対し, 2, 4-D を含まない培地において, 移植後 4 日目ぐらいで, CHS に対する mRNA がいずれの方法においても検出できるようになり, また CHS タンパク質も検出できるようになった. その後, CHS に対する mRNA 量は CHS タンパク質量, CHS 活性と同様な時間的経過で上昇し, また PAL に対する mRNA 量, PAL タンパク質量, PAL 活性ともに上昇し, CHS, PAL いずれも 7~8 日目でピークとなり, 以後低下した. この時, PAL, CHS いずれも, その mRNA 量, 酵素タンパク

質量, 酵素活性とともにピークに達する時間的経過において明確な差は見られなかった.

また, 2, 4-D を含まない培地で培養して PAL, CHS に対する mRNA を誘導した後, 2, 4-D を加えると, これらに対する mRNA 量の減少が認められ, 24 時間後には, 非常に低いレベルまで低下した. また, この時, 酵素タンパク質量, 活性も低下した. このことは, 2, 4-D によるアントシアニン合成の抑制は, PAL, CHS に対する mRNA 量の低下によっておこることが示唆された.

以上の結果より, この系におけるアントシアニン合成の 2, 4-D による誘導と抑制は, PAL と CHS の mRNA 量の変動, そのうちでも特に CHS 遺伝子の転写レベルで行われていることが示唆された.

以上のような経過で研究を進めてきたが, いまだ研究途上である. また, たとえば, 基質レベルの変動や, transfer effect により上昇する PAL の機能と性質についてなど, やり残してきたことも多い.

現在, これら PAL, CHS 遺伝子発現の 2, 4-D による制御がどのようにして行われているのか遺伝子操作などの手法を用いて研究しているが, ここで問題になるのが, PAL, CHS の量の少なさである. PAL, CHS タンパク質を精製する時から問題であったが, 圧倒的に他のタンパク質が多く, 精製はかなり困難を極めた. また mRNA レベルにおいても, その specific content は著しく低く, やはり, 他の house keeping な mRNA が多かった. この問題点は, 代謝的分化のみならず, 形態的分化の場合にもあてはまり, 不定胚分化の際も, あれほど形態的にドラマチックな変化が生じているにもかかわらず, タンパク質, mRNA レベルでの質的違いは非常に少ない³²⁾. これは, 脱分化状態から誘導された分化初期においては, 脱分化状態と分化状態とのタンパク質, mRNA レベルでの切換えがほとんど生じていない状態であり, 分化誘導に必要な少数の mRNA, タンパク質が作られて分化を開始し, 残りの活発な細胞分裂などに必要な house keeping なものは, おそらく機能を失うことなく, 細胞が分化を完了して分裂能力を失うまで分解されずに残っている状態が生じているものと思われる. したがって, 分化しきった状態にある intact 植物とは異なっており, 実験操作上においても, intact 植物ではうまくいった方法が, そのまま応用できない状態が生じた.

さらにまた, intact 植物とは異なり, 水分含量が高い, 多糖類が多いなど, 培養細胞に特有な問題がある.

このため、たとえば核 DNA をとる時、intact 植物では成功した方法でも、培養細胞では、収率、精製度が低いなど、うまくいかない場合が多い。

以上のような難点は、いろいろな場面で生じており、intact 植物を扱うのとは異なった実験手段、方法論が必要とされることがある。これらの点を解決しつつ研究を進めていくことによって、分化の初期過程を研究するのに最適である植物培養細胞系において、植物細胞のもつ分化全能性の発現機構が明らかにされていくことを期待している。

以上の研究を行うにあたり、東北大学理学部 駒嶺 穆教授、東京大学理学部 田沢 仁教授、同薬学部 三川潮教授、野口博司博士、農林水産省農業環境技術研究所 田中喜之博士、農業生物資源研究所 坂野勝啓博士、松岡 信博士、大橋祐子博士、果樹試験所 村上(嘉納)ゆり子博士、林野庁林業試験場 山本直樹博士、北里研究所付属病院 鈴木達夫博士、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所 三ッ井洋司博士、福田裕二博士、厚生省国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場 下村講一郎博士、多くの方々の御助言、御協力をいただいたことを、ここに厚く感謝いたします。

文 献

- 1) Steward, F. C., M. O. Mapes, K. Mears, 1958. *Am. J. Bot.*, **45**: 705-708.
- 2) Reinert, J., 1958. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **71**: 15.
- 3) Ikeda, T., T. Matsumoto, K. Kato, M. Noguchi, 1974. *Agric. Biol. Chem.*, **38**: 2297-2303.
- 4) Reinert, J., H. Clauss, R. v. Ardenne, 1964. *Naturwissenschaften*, **51**: 87.
- 5) Hahlbrock, K., Kreuzaler, F., 1972. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**: 1522.
- 6) Fritsch, H., H. Grisebach, 1975. *Phytochemistry*, **14**: 2437-2442.
- 7) Knoblock, K. H., G. Bast, J. Berlin, 1982. *Phytochemistry*, **21**: 591-594.
- 8) 竹田淳子, 千田 貢, 1986. 日本植物生理学会年会講演要旨集, p. 98.
- 9) Dixon, R.A., P.M. Dey, M.A. Lawton, C.J. Lamb, 1983. *Plant Physiol.*, **71**: 251-256.
- 10) Hagimori, M., T. Matsumoto, T. Kiseki, 1980. *Plant Cell Physiol.*, **21**: 1391-1404.
- 11) 小関良宏, 下村講一郎, 三ッ井洋司, 1986. 日本植物学会第 51 回大会研究発表記録, p. 165.
- 12) Waller, G. R., E. K. Nowacki, 1978. *Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*, Plenum Press, New York.
- 13) 下村講一郎, 佐竹元吉, 鎌田 博, 1986. 日本薬学会 106 年会講演要旨集, p. 174.
- 14) 鎌田 博, 濱本 宏, 下村講一郎, 1987. 日本農芸化学会誌, **61**: 372-377.
- 15) 下村講一郎, 池田嘉代, 1987. 組織培養, **13**: 193-198.
- 16) Ozeki, Y., A. Komamine, 1981. *Physiol. Plant.*, **53**: 570-577.
- 17) Lin, M., J. Staba, 1961. *Lloydia*, **24**: 139-145.
- 18) Fujimura, T., A. Komamine, 1979. *Plant Physiol.*, **64**: 162-164.
- 19) Ozeki, Y., A. Komamine, 1986. *Plant Cell Physiol.*, **27**: 1361-1368.
- 20) Fujimura, T., A. Komamine, 1975. *Plant Sci. Lett.*, **5**: 359-364.
- 21) Fujimura, T., A. Komamine, 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, **95**: 13-19.
- 22) Fujimura, T., A. Komamine, 1980. *Z. Pflanzenphysiol.*, **99**: 1-8.
- 23) Grisebach, H., K. Hahlbrock, 1974. *Recent Adv. Phytochem.*, **8**: 21-52.
- 24) Hahlbrock, K., H. Grisebach, 1979. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **30**: 105-130.
- 25) Ozeki, Y., A. Komamine, 1985. *Plant Cell Physiol.*, **26**: 903-911.
- 26) Ozeki, Y., A. Komamine, H. Noguchi, U. Sankawa, 1987. *Physiol. Plant.*, **69**: 123-128.
- 27) Hahlbrock, K., J. Schroder, 1975. *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**: 500-506.
- 28) Ozeki, Y., A. Komamine, 1985. *Plant, Cell, Tissue Organ Cult.*, **5**: 45-53.
- 29) Ozeki, Y., K. Sakano, A. Komamine, Y. Tanaka, H. Noguchi, U. Sankawa, T. Suzuki, 1985. *J. Biochem.*, **98**: 9-17.
- 30) Ozeki, Y., A. Komamine, 1985. *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, p. 99-106, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 31) 小関良宏, 村上(嘉納)ゆり子, 松岡 信, 大橋祐子, 山本直樹, 田中喜之, 1987. 日本植物生理学会年会講演要旨集, p. 282.
- 32) Fujimura, T., A. Komamine, 1982. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 143-144, Maruzen, Tokyo.