

カンゾウ培養細胞のフラボノイド生合成調節

綾部 真一*

(1989年9月25日受理)

1. はじめに

高等植物の二次代謝の発現は、植物の発生、成長の過程で生じる特定の組織、器官の分化と密接に結びついているのと同時に、植物を取り巻く生物、化学、物理的な環境によっても大きな影響を受ける。植物組織培養法は、形態形成の人為的制御や環境条件の厳密な調節などにより、二次代謝の生化学的、分子生物学的な解析に有効に使うことができる。環境要因のうちでもストレスに対する植物の防御反応に関連した二次代謝系、とくに抗微生物活性ストレス化合物であるファイトアレキシンの生成誘導については、植物培養細胞とエリシター (elicitor) と呼ばれる誘導物質をモデル系として、研究が急速に進展している。エリシターとファイトアレキシン合成誘導に関してはさまざまな観点からの総説がある¹⁻⁴⁾。

一方植物成分の生合成研究は天然物有機化学の重要な一分野であり、植物の二次代謝経路の系統化を通じて、未知成分の立体化学を含めた構造予測、chemotaxonomyへの寄与、有機合成への指針などに大きな貢献をしてきた。この分野でも生合成の単位反応を触媒する酵素レベルでの研究などには培養細胞が不可欠のものとなっている。

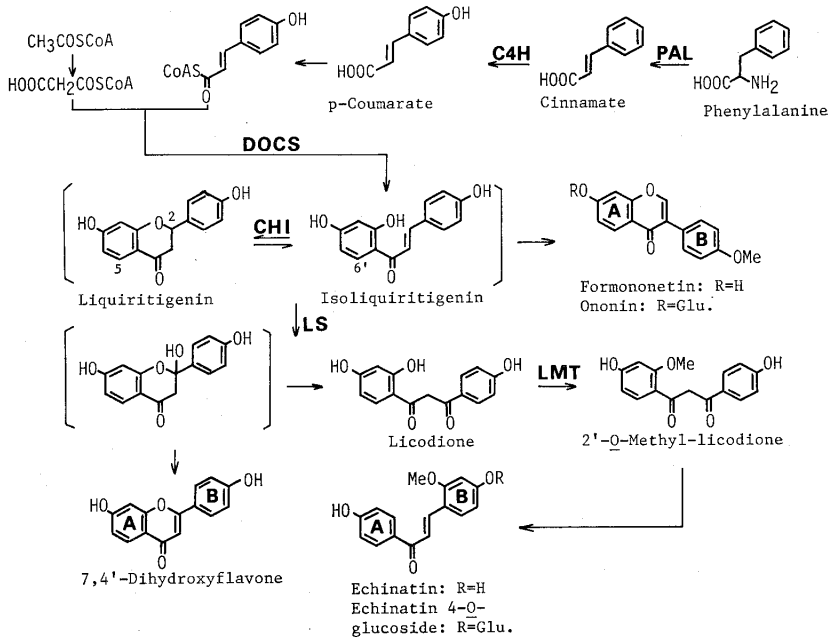
カンゾウの一種 *Glycyrrhiza echinata* 培養細胞が含有するフラボノイド成分の生合成は、この数年の間に、マメ科植物のファイトアレキシン生成と関連していることが想定されるようになってきた。本稿では、おもにこの生合成系の酵素の検出と活性変動について紹介し、他の植物での二次代謝のストレス誘導との関連を考察してみたい。

2. *Glycyrrhiza echinata* 培養細胞でのレトロカルコンの生合成誘導

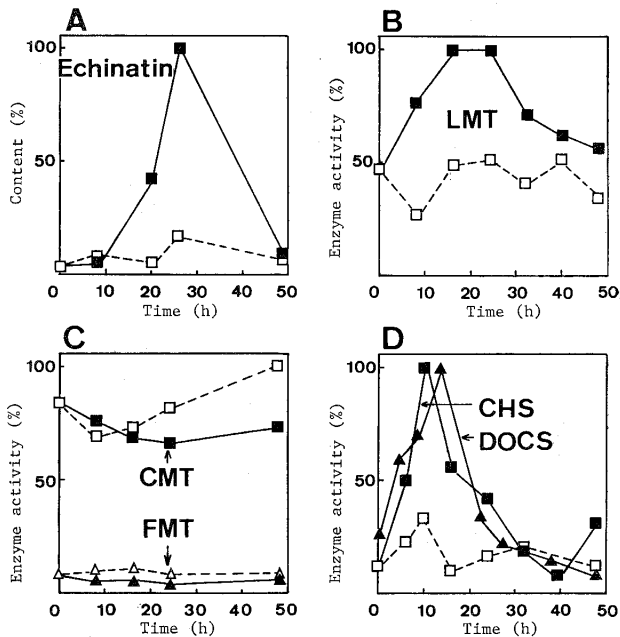
Glycyrrhiza echinata 培養細胞の生産するカルコン型黄色色素 echinatin は、酸素置換基のパターンが生合成的に異常である。フラボノイドの骨格はポリケチドの C₆ (A環) 部分と phenylalanine 起源の C₆ (B環)-C₃ 部分より構成されるが、echinatin ではA環と C₃ 部分が phenylalanine に、B環が acetyl-CoA に由来しており、レトロカルコンと呼ばれる⁵⁾。レトロカルコンの生合成過程では通常カルコンの α , β -不飽和ケトン部の配列が逆転するが、ジベンゾイルメタン licodione⁶⁾ はその中間体と考えられる。各種ラベル前駆体・中間体の投与実験より第1図に示す生合成経路が確立している⁷⁾。

G. echinata 培養細胞から、echinatin をほとんど含まずイソフラボン (formononetin, ononin) を主成分として生産する M-2 株が、培地調節と細胞選抜で得られている。M-2 細胞をアルギン酸カルシウムゲル中に包括固定化すると、1~2日という短期間に大量の echinatin が生成し、その大半が培地へ放出された⁸⁾。細胞を新鮮培地へ移植したり、ゲル化しないアルギン酸ナトリウムあるいは細胞を含まないゲルビーズを振盪培養に加えることによって、echinatin の一時的な生成が観察される。また echinatin 以外に、このような処理で生じる新化合物 5'-prenyl-licodione⁹⁾ が見出された。つまり M-2 株では、移植という物理的なストレスやアルギン酸という多糖が、レトロカルコン系の合成の trigger となっている。さらにこのような現象を引き起こす物質として酵母エキス (YE) (第2図 A)、重金属、植物細胞壁断片などが有効であることがわかったが、それらはいずれもファイトアレキシンエリシター活性が知られている¹⁾。このことから、レトロカルコンがカンゾウのファイトアレキシンであることが暗示されるが、マメ科一般のイソフラボノイド系ファイトアレキシン¹⁰⁾とは別経路

* Shin-ichi AYABE: Regulation of Flavonoid Biosynthesis in Cultured *Glycyrrhiza echinata* Cells
日本大学農獣医学部応用生物科学科 (〒252 神奈川県藤沢市亀井野 1866)
Department of Applied Biological Science, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University (Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252)



第1図 *Glycyrrhiza echinata* 培養細胞のフラボノイド生成



第2図 酵母エキス (YE) 処理した *Glycyrrhiza echinata* 培養細胞中の echinatin 生産量 (A) および LMT (B), CMT (C), FMT (C), CHS (D), DOCS (D) 各活性の経時変化

Echinatin 含量と酵素活性はそれぞれの最大含量, 活性に対する%で示した。ただし FMT については CMT の最大活性に対する%を示してある。■, ▲は YE 処理細胞, □, △は control 細胞 (YE 無処理) での結果を表す (文献 9, 13, 31) および未発表のデータより作製)。

が発現したことは大変興味深い。最近アルファルファ培養細胞でも糸状菌代謝産物処理によって licodione が生成することが報告されている¹¹⁾。

3. レトロカルコン生合成系の酵素誘導

酵母エキス (YE) 処理した *G. echinata* 細胞における酵素活性の変動を、とくにレトロカルコン系に独特な酵素およびマメ科に特徴的な生合成に関与する酵素を中心に検討した (第1図参照)。

3.1 S-Adenosylmethionine: licodione 2'-O-methyltransferase (LMT)

LMT は、ジベンゾイルメタン骨格のフェニル基に結合した *ortho* 水酸基への S-adenosylmethionine (SAM) からのメチル転移を触媒するユニークな酵素である¹²⁾。LMT の反応生成物 2'-O-methyl-licodione と echinatin の構造上の類似や、¹⁴C ラベルした licodione の echinatin への取り込み実験⁷⁾ から、LMT のレトロカルコン生合成における特異的関与が想定されている。

YE 処理した *G. echinata* で LMT 活性が 16~24 時間の間に一時的に上昇することが明らかになった (第2図 B)¹³⁾。LMT の活性上昇は翻訳阻害剤によって抑制されるので、この過程は少なくとも翻訳レベルで調節されている。

G. echinata 細胞には LMT 以外にも O-methyltransferase (OMT) の活性が検出される。SAM: caffeate OMT (CMT) と SAM: flavone/flavonol OMT (FMT) はすでにパセリ、ダイズなどの植物からも検出されている比較的一般的な酵素で、このうち CMT は植物細胞壁の構成成分であるリグニンの生合成経路の酵素である。植物が微生物感染や物理的傷害などのストレスを受けたとき、その部位を修復するためリグニン生成が誘導されることが知られている。しかし *G. echinata* 細胞ではつねに高 CMT 活性が観察され、YE 処理によってそれ以上の活性上昇はみられなかった (第2図 C)。おなじく FMT はパセリで光による誘導が報告されているが、*G. echinata* 細胞での実験では YE による活性の変動は観察されなかった (第2図 C)。*G. echinata* 細胞からは FMT の基質 (luteolin や quercetin) も生成物 (chrysoeriol や isorhamnetin) もこれまで検出されておらず、FMT の存在意義は不明である。

このように *G. echinata* の OMT のうち、細胞の YE 処理によってレトロカルコン系の LMT のみが短時間のうちに選択的に誘導されることが明らかになった。しかし YE 処理により echinatin 生産量は数倍から数十倍増大するのに対して、echinatin をほとんど生産しない YE 無処理細胞にも比較的高い LMT 活性が存在

するため、LMT 活性は 2~3 倍にしか上昇しない。したがって echinatin 生合成の調節は、LMT の *de novo* 合成も役割の一端を担っているが、これに加えて LMT 反応への基質 (licodione と/あるいは SAM) の供給のレベルでも行われており、LMT 以前の生合成段階に重要な役割があることが示唆された。

3.2 6'-Deoxychalcone synthase (DOCS)

フラボノイド骨格はスター分子の 4-coumaroyl-CoA に 3 分子の malonyl-CoA が順次結合した後閉環して生じるカルコンに由来しているが、この反応を触媒する酵素が chalcone synthase (CHS) である¹⁴⁾。CHS はフラボノイド合成の鍵酵素で、UV 光防御物質であるフラボン配糖体やアントシアニン色素の生合成に関連した CHS 遺伝子の構造およびその発現機構の研究は、植物分子生物学の焦点のひとつとなっている¹⁵⁻¹⁹⁾。また CHS タンパクの存在部位についても細胞生物学的な研究が行われている^{20,21)}。

マメ科では、ダイズや²²⁻²⁵⁾ インゲンマメ^{4,26,27)} を中心にイソフラボノイド系ファイトアレキシン生成に関連して CHS の誘導が研究されている。しかし CHS の反応生成物は 6'-ヒドロキシカルコンの naringenin chalcone であるのに対して、主要なファイトアレキシンは 6'-デオキシカルコン isoliquiritigenin に由来する 5-デオキシ型¹⁰⁾である (カルコンは他のフラボノイドとは炭素番号が異なることに注意: 第1図参照)。形式上 6'-ヒドロキシカルコン (あるいはその閉環異性体 5-ヒドロキシフラバノン) の脱水酸反応によって 6'-デオキシカルコン (あるいは 5-デオキシフラバノン) が生成するが、このような反応は ¹³C 二重標識酢酸塩のインゲンマメやエンドウマメへの投与実験により否定されている^{28,29)}。すなわち最終産物 (pisatin, phaseollin) のポリケタイド部分 A 環への酢酸分子単位の取り込みは一定の方向性を持っており、naringenin chalcone のように A 環が対称に水酸化された化合物は中間体となり得ない。これらのことから 5-デオキシ (イソ) フラボノイド生合成には、CHS 反応と同一の基質から直接 6'-デオキシカルコンの生成を触媒する 6'-deoxychalcone synthase (DOCS) が関与することが予想されていた³⁰⁾。

G. echinata 培養細胞から分離されているフラボノイドはすべて 5-デオキシ系の化合物であり⁶⁾、レトロカルコン echinatin も 6'-デオキシカルコン isoliquiritigenin に由来し、¹³C 二重標識酢酸塩の投与実験でも、pisatin や phaseollin の例と同じく、酢酸分子単位のポリケタイド部分の B 環に一定の方向で取り込まれた⁷⁾。

YE で処理した *G. echinata* 培養細胞から粗酵素液を

抽出し、4-coumaroyl-CoA と malonyl-CoA を基質として反応を行うと、おもな生成物は 5-ヒドロキシフラバノン naringenin であった³¹⁾。一般に粗酵素液による CHS アッセイでは、直接の生成物カルコンが、混在する chalcone isomerase (CHI) の作用で、あるいは自動的に閉環してフラバノンを与えるので、ここで見出された naringenin の生成は、CHS 活性を反映している。CHS 活性は細胞の YE 処理により急速かつ一次的に上昇し、約 10 時間で最大活性となった (第 2 図 D)。

ここまでの結果はエリシター処理したインゲンマメ³⁰⁾やダイズ²²⁾で得られている結果と同様、蓄積する最終産物が 5-デオキシ系の化合物であるのに酵素活性は 5-ヒドロキシ系の生合成に関与するものである。この時点でプロトプラストを用いた実験から大変興味深い事実が見出され³¹⁾、その後 DOCS 活性を検出する見通しをつけることができた。

G. echinata 細胞より調製したプロトプラストの成分は、単離直後は TLC 上 formononetin しか見出されないが、12 時間以上培養すると echinatin と licodione が検出され、含量は 20 時間で最大となった。このことはプロトプラスト化の際の浸透圧ストレスや生じる細胞壁断片のエリシター活性によるものと解釈される。なおダイズプロトプラストでもファイトアレキシンの蓄積が報告されているが²⁴⁾、パセリではプロトプラスト化のみでは特に代謝の変化は起きず³²⁾、UV 光やエリシターの刺激に対して細胞と類似の対応を示す。*G. echinata* プロトプラスト培養開始時に [¹⁴C] phenylalanine を加えると、きわめて効率的に echinatin や licodione などに放射能が取り込まれるが、早い時期に一時的に強くラベルされる化合物が検出され、5-デオキシフラバノンの liquiritigenin と同定された。すなわちレトロカルコン系の生合成が誘導されるとき、それまで仮説でしかなかった DOCS (あるいは 5-deoxyflavanone synthase) の活性発現が伴うことが強く示唆された。

さて DOCS 反応には還元過程が含まれているが、意外なことにそれまでマメ科植物抽出液でのアッセイで還元反応に必要な水素ドナーを用いた報告はあまりなかった。そこで YE 処理した *G. echinata* 細胞の抽出液について NADPH を添加してアッセイを行うと、2 つの CoA エステル基質 2.4 μ M (malonyl-CoA) ないし 19 μ M (4-coumaroyl-CoA) に対して非常に高濃度 (0.1 mM 以上) の NADPH 存在下で初めて DOCS 活性の検出に成功した³³⁾。すなわち反応生成物として、naringenin に加えて isoliquiritigenin と liquiritigenin が検出され、希釈分析で identity が確認されたのであ

る。CHS のアッセイでは通常カルコンの閉環異性体フラバノンのみが検出されるが、DOCS 反応の生成物としてはカルコン、フラノバンがともに検出される。このことは両者の平衡が 5-ヒドロキシ系では圧倒的にフラバノンに偏っているのに対して、5-デオキシ系ではカルコンの寄与が比較的大きいことを反映しており、isoliquiritigenin/liquiritigenin の比率はほぼ 1:3 であった。しかしごく短い時間 (5 分以下) の反応では前者の生成量が後者を上回り、検出された酵素活性が flavanone synthase でなく chalcone synthase であることが明らかである。YE 処理した細胞での DOCS 活性の経時変化は CHS と類似している (第 2 図 D)。

DOCS 反応の機構は、脂肪酸合成酵素 (FAS) や 6-メチルサリチル酸合成酵素による反応と類似である。CHS は、スターター分子および β -ketoacyl 中間体の酵素への転移と、malonyl 中間体との縮合反応を触媒することより、II 型 FAS (植物および原核生物型) 中の β -ketoacyl-(acyl carrier protein (ACP)) synthase との共通性が指摘されている^{34,35)}。DOCS (および 6-メチルサリチル酸合成酵素) は、これにさらに FAS 中の β -ketoacyl-ACP reductase (還元) と β -hydroxyacyl-ACP dehydratase (脱水) の機能が付け加わったものと考えられるが、生成する二重結合の方向、立体化学は、各酵素反応で異なっている。

DOCS 活性はその後、エリシター処理したクズ³⁶⁾とダイズ³⁷⁻³⁹⁾培養細胞からも検出された。それらはイソフラボン系ファイトアレキシンを生合成する系であるので、長年不明であったこの合成系の missing link がついに発見されたことになる。なかでも Welle と Grisebach は、ダイズの DOCS 活性が従来の CHS と新還元酵素 (chalcone reductase=CHR) の組合せによることを明らかにし、CHR を高度に精製した³⁹⁾。CHR は本来デオキシ型のフラボノイドを生産しないパセリより精製した CHS との組合せでも有効に機能し、6'-デオキシカルコンが生成する。さらに CHR 抗体を作製し、エリシター処理に対してダイズ培養細胞で CHR タンパク合成が誘導されることを、mRNA からの *in vitro* 翻訳と Western blotting 法で明らかにしている。なお彼らのシステムでは CHS と CHR の 2 種類のタンパクのみでデオキシカルコンが合成されるようであるが、脱水酵素が関与していない点不思議な感じがする。またこれらのタンパク同士の相互作用や、還元酵素の基質の本体など残された問題も多い。

3.3 その他の酵素

フラボノイド生合成の前半はフェニルアラニンから一

般のフェニルプロパノイドが導かれる経路と共通である。YE 処理した *G. echinata* 細胞からは、これまでにこの経路中 phenylalanine ammonia-lyase (PAL) と cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) が見だし、ともに 10~15 時間のうちに活性が一時的に上昇した⁴⁰⁾。一方フラボノイド骨格の形成に関与する CHS に引き続く酵素 chalcone isomerase (CHI) については、*G. echinata* 細胞中では構成的な活性が非常に高く、YE によるそれ以上の活性化はみられない。この結果はエリシター処理したインゲンマメ細胞での結果^{30,41)}と対照的であり、ヒヨコマメ細胞での結果⁴²⁾と一致する。

レトロカルコン生合成の重要なステップに licodione の合成反応がある。DOCS 反応によって調製した [¹⁴C]-liquiritigenin を、*G. echinata* 細胞のミクロソーム画分と NADPH とともに好氣的にインキュベートすると [¹⁴C]licodione の生成が認められた⁴⁰⁾。この反応については今後さらに詳細な検討が必要であるが、一応 licodione synthase (LS) 活性の存在を確認したと考えている。

Kochs らは、ダイズ培養細胞ではエリシター刺激によりイソフラボン合成酵素が誘導されるが、浸透圧ストレスによってフラボン合成酵素が検出されるようになると報告している⁴³⁾。この酵素による反応は naringenin の 2 位への水酸基の導入と引き続く脱水による apigenin の生成を触媒すると推察されている⁴⁴⁾。*G. echinata* 細胞から検出された LS の反応機構として liquiritigenin の 2 位への水酸基の導入が考えやすい。すなわち、生じた 2-hydroxy-liquiritigenin は容易にヘミアセタールの開環を起こすので、非酵素的に licodione を与えられ、これに対して 5-ヒドロキシ型の 2-hydroxy-naringenin は 5 位の水酸基とケトンとの間の水素結合を通じて環状構造が安定化される)。したがって LS はフラボン合成酵素と共通の反応を触媒するものと考えられ、レトロカルコンがフラボンと密接に関連していることが示唆される。ダイズのフラボン合成酵素は cytochrome P-450 依存の monooxygenase であり⁴⁴⁾、同じくダイズ⁴⁵⁾とクズ⁴⁶⁾から検出されたイソフラボン合成酵素も cofactor 要求性などから cytochrome P-450 関与の反応であることが推察される。異なるストレス（エリシターと浸透圧）によってこれらのよく似た（しかし生成物がまったく異なる）酵素活性が differential に誘導されるとするならば、その機構はきわめて興味深い問題である。

4. おわりに

フラボノイドは植物成分としてはありふれたものであ

るが、植物にとっての生理的役割が割合はっきりしているものが多い。花色色素、微生物や UV 光に対する防御機能のほか、根粒細菌とマメ科植物との共生や寄生植物の吸根形成のシグナル物質としての作用も報告されている。

フラボノイド生合成の分子生物学的解析はパセリ、インゲンマメを中心に、たとえば CHS 遺伝子が UV 光やエリシター刺激で発現する際の転写因子が結合する部位の同定といった段階にまで達している^{4,15,16)}。しかし、C4H、フラボンやイソフラボン合成酵素など膜結合性の酵素については精製、活性の再構成などタンパク質レベルでの研究がまだ必要とされる。一方外部刺激からファイトアレキシン等の生合成発現に至る情報伝達の機構についても、あまり多くの事は解っていない。しかしダイズ細胞のエリシター結合部位が原形質膜上に存在すること^{47,48)}、各種植物で情報伝達に cAMP⁴⁹⁾、Ca²⁺^{49,50)}、phosphoinositide の代謝回転⁵¹⁾などが関与していること、エリシター作用と関連のある細胞壁の分解にもなって原形質膜タンパクのリン酸化が起きること⁵²⁾などが報告され、この方面での進展も著しい。

G. echinata 細胞のレトロカルコン系は、特殊な生合成系と考えられたが、酵素レベルでの解析から、LMT を除いては一般のフラノボイド合成と共通する部分が多くあることが明かとなった。この系は、培養細胞における二次代謝発現のモデル系として、フラボノイド合成の分子生物学的解析、生合成産物の生理的な意味やストレスから生合成発現に至る過程の検討などに有効に利用されることが期待される。

本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言いただいた北里大学薬学部 古谷 力教授、吉川孝文助教授に厚く感謝する。また飯田久美子、宇田川昭洋両修士をはじめとする共同研究者に心からの謝意を表したい。

文 献

- 1) Darvill, A. G., P. Albersheim, 1984. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 243-275.
- 2) Ebel, J., 1986. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **24**: 235-264.
- 3) Eilert, U., 1987. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 4" (ed. by Constable, F., I. K. Vasil), p. 153-196, Academic Press, San Diego.
- 4) Lamb, C. J., M. A. Lawton, M. Dron, R. A. Dixon, 1989. *Cell*, **56**: 215-224.
- 5) Saitoh, T., S. Shibata, U. Sankawa, T. Furuya, S. Ayabe, 1975. *Tetrahedron Lett.*, 4463-4466.

- 6) Ayabe, S., M. Kobayashi, M. Hikichi, K. Matsumoto, T. Furuya, 1980. *Phytochemistry*, **19**: 2179-2183.
- 7) Ayabe, S., T. Furuya, 1982. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**: 2725-2734.
- 8) Ayabe, S., K. Iida, T. Furuya, 1986. *Plant Cell Rep.*, **5**: 186-189.
- 9) Ayabe, S., K. Iida, T. Furuya, 1986. *Phytochemistry*, **25**: 2803-2806.
- 10) Ingham, J. L., 1982. In "Phytoalexins" (ed. by Bailey, J. A., J. W. Mansfield), p. 21-80, Blackie, Glasgow.
- 11) Kobayashi, A., S. Yata, K. Kawazu, 1988. *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 3223-3227.
- 12) Ayabe, S., T. Yoshikawa, M. Kobayashi, T. Furuya, 1980. *Phytochemistry*, **19**: 2331-2336.
- 13) Ayabe, S., A. Udagawa, K. Iida, T. Yoshikawa, T. Furuya, 1987. *Plant Cell Rep.*, **6**: 16-19.
- 14) Ebel, J., K. Hahlbrock, 1982. In "The Flavonoids: Advances in Research" (ed. by Harborne, J. E., T. J. Mabry), p. 641-679, Chapman and Hall, London.
- 15) Shulze-Lefert, P., J. F. Dangl, M. Beckor-André, K. Hahlbrock, W. Schulz, 1989. *EMBO J.*, **8**: 651-656.
- 16) Schulze-Lefert, P., M. Becker-André, W. Schulz, K. Hahlbrock, J. L. Dangl, 1989. *Plant Cell*, **1**: 707-724.
- 17) Koes, R. E., C. E. Spelt, J. N. M. Mol, A. G. M. Gerats, 1987. *Plant Mol. Biol.*, **10**: 375-385.
- 18) Sommer, H., U. Bonas, H. Saedler, 1988. *Mol. Gen. Genet.*, **211**: 49-55.
- 19) 小関良宏, 1987. *植物組織培養*, **4**: 60-65.
- 20) Beerhues, L., H. Robenek, R. Wiermann, 1988. *Planta*, **173**: 544-553.
- 21) Hrazdina, G., A. M. Zobel, H. C. Hoch, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 8966-8970.
- 22) Ebel, J., W. E. Schmidt, R. Loyal, 1984. *Arch. Biochem. Biophys.*, **232**: 240-248.
- 23) Grab, D., R. Loyal, J. Ebel, 1985. *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**: 523-529.
- 24) Mieth, H., V. Speth, J. Ebel, 1986. *Z. Naturforsch. Teil C*, **41**: 193-201.
- 25) Welle, R., H. Grisebach, 1987. *Z. Naturforsch. Teil C*, **42**: 1200-1206.
- 26) Ryder, T. B., S. A. Hedrick, J. N. Bell, X. Liang, S. D. Clouse, C. J. Lamb, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **210**: 219-233.
- 27) Dron, M., S. D. Clouse, R. A. Dixon, M. A. Lawton, C. J. Lamb, 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 6738-6742.
- 28) Stoessl, A., J. B. Stothers, 1979. *Z. Naturforsch. Teil C*, **34**: 87-89.
- 29) Dewick, P. M., M. J. Steele, R. A. Dixon, I. M. Whitehead, 1982. *Z. Naturforsch. Teil C*, **37**: 363-368.
- 30) Robbins, M. P., G. P. Bolwell, R. A. Dixon, 1985. *Eur. J. Biochem.*, **148**: 563-569.
- 31) Ayabe, S., A. Udagawa, T. Furuya, 1988. *Plant Cell Rep.*, **7**: 35-38.
- 32) Dangl, J. L., K. D. Haufler, S. Lipphardt, K. Hahlbrock, D. Scheel, 1987. *EMBO J.*, **6**: 2551-2556.
- 33) Ayabe, S., A. Udagawa, T. Furuya, 1988. *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**: 458-462.
- 34) Kreuzaler, F., H. Ragg, W. Heller, R. Tesch, I. Witt, D. Hamme, K. Hahlbrock, 1979. *Eur. J. Biochem.*, **99**: 89-96.
- 35) Schuz, R., W. Heller, K. Hahlbrock, 1983. *J. Biol. Chem.*, **258**: 6730-6734.
- 36) Hakamatsuka, T., H. Noguchi, Y. Ebizuka, U. Sankawa, 1988. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**: 4225-4228.
- 37) Ayabe, S., A. Udagawa, T. Furuya, 1988. 16th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Abstracts, p. 555.
- 38) Welle, R., H. Grisebach, 1988. *FEBS Lett.*, **236**: 221-225.
- 39) Welle, R., H. Grisebach, 1989. *Arch. Biochem. Biophys.*, **272**: 97-102.
- 40) 綾部真一, 古谷 力, 日比博久, 武富良仁, 高橋武美, 1989. 日本薬学会第 109 年会講演要旨集 III, p. 194.
- 41) Mehdy, M. C., C. J. Lamb, 1987. *EMBO J.*, **6**: 1527-1533.
- 42) Daniel, S., W. Hinderer, W. Barz, 1988. *Z. Naturforsch. Teil C*, **43**: 536-544.
- 43) Kochs, G., R. Welle, H. Grisebach, 1987. *Planta*, **171**: 519-524.
- 44) Kochs, G., H. Grisebach, 1987. *Z. Naturforsch. Teil C*, **42**: 343-348.
- 45) Kochs, G., H. Grisebach, 1986. *Eur. J. Biochem.*, **155**: 311-318.
- 46) Hakamatsuka, T., H. Noguchi, Y. Ebizuka, U. Sankawa, 1989. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**: 249-252.
- 47) Yoshikawa, M., N. T. Keen, M. C. Wang, 1983. *Plant Physiol.*, **73**: 497-506.
- 48) Schmidt, W. E., J. Ebel, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 4117-4121.
- 49) Kurosaki, F., Y. Tsurusawa, A. Nishi, 1987. *Phytochemistry*, **26**: 1919-1923.
- 50) Stab, M. R., J. Ebel, 1987. *Arch. Biochem. Biophys.*, **257**: 416-423.
- 51) Kurosaki, F., Y. Tsurusawa, A. Nishi, 1987. *Plant Physiol.*, **85**: 601-604.
- 52) Farmer, E. E., G. Pearce, C. A. Ryan, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 1539-1542.