

## マイレビュー

## ダイズグリシニン遺伝子の遺伝子工学的研究の現状

門馬孝之\*

(1990年6月4日受理)

種子は植物性タンパク質のもっとも豊かな源の一つである。主要作物において、種子は10~50%のタンパク質を含んでおり、その大半は貯蔵タンパク質である。貯蔵タンパク質は酵素活性をもたず、単に生長のためのアミノ酸、窒素、炭素骨格の源になっているに過ぎない。貯蔵タンパク質は種子中のプロテインボディ中に不溶性の状態で蓄積され長期間の乾燥状態でも生き残れるのに役に立っている。それらは高いアミドアミノ酸（グルタミン、アスパラギン）を含み、他のアミノ酸が少ないという特徴を持っている。穀類の貯蔵タンパク質はリジン、豆類の貯蔵タンパク質はメチオニンやシステインといった含硫アミノ酸が制限アミノ酸となっている。種子は人類や家畜類の栄養源としてのタンパク質の供給源となっているので、多くの研究が必須アミノ酸含量の増加や種子タンパク質の栄養価の改良に注がれている<sup>1)</sup>。

ダイズ種子は乾燥重当たり30~50%のタンパク質を含み、このうち75%程度がいわゆる貯蔵タンパクとして子葉細胞内のタンパク顆粒(protein bodies)に蓄えられている。これらのプロテインスコアは高く、“畠の肉”と呼ばれているほどであるが、含硫アミノ酸が少ないと欠点である。したがってダイズ種子タンパク質の利用拡大や高度に利用を図る上で、栄養性、嗜好性、機能特性の改善に努力を傾注する必要がある。上記のタンパク質の特性改善のために、古くから交配による新しい形質をもつダイズの育種や、その生産力を最大限に發揮させるための栽培条件の検討が行われてきた。この目的のために、種子タンパク質構成成分の栄養性やタンパク質化学的性質を知ることが必須であり、数多くの研究がタンパク質レベルでなされてきた。また、これらダイズ種子

タンパク質の分離精製が精力的に行われ、タンパク質の機能特性をタンパク質の構造上の特徴から議論する試みも多数なされたが、一次構造が不明のままでは不十分の感を免れ得なかった。すなわち、種子タンパク質の機能特性を一次構造との関連でとらえることなしには、新しい機能を持つタンパク質を持つタンパク質の開発はかなり困難であると考える。

このような観点から、遺伝子工学的技術を用いる長所の一つは特定のダイズタンパク質に対応したcDNAをクローニングし、直接的にその構造的特徴について知ることができることである。もう一つはダイズタンパク質に対応したcDNAを得るため、その構造を核酸レベルで自由に交換し、適当な発現系に組み込んで発現させ、直接的に構造と機能の関係を知ること（タンパク工学的解析）ができるし、さらにcDNAを用いて遺伝子の構造を解明することにより、他の豆科植物や穀類と比較して発現量の多いダイズ貯蔵タンパク質遺伝子の発現制御機構の解明に迫る第一歩を踏み出せることである。ここでは、ダイズ種子貯蔵タンパク質の一つであるグリシニンに注目して、グリシニンを構成する主要なサブユニット前駆体の完全一次構造を決定し、これらの解析からグリシニンの構造的特徴について明らかにし、さらには発現制御を知るためにグリシニン構成サブユニットのうち発現量の多いA2B1a核遺伝子の完全一次構造を明らかにした<sup>2~7)</sup>。その後、これらの遺伝子をもとにしてモデル系としての形質転換系の確立、遺伝子の発現調節技術の確立に関する研究を行ってきた。これまでの成果について簡単に総括してみたい。

## 1. グリシニン研究の現状

グリシニンタンパク質の大半は、塩可溶性のグロブリンで、完熟種子タンパク質の約70~80%を占めており、いわゆる貯蔵タンパクとして子葉細胞内のプロテインボディ(protein bodies)に蓄えられている。その他に、ダイズ種子に含まれるグロブリン以外のタンパク質には、全タンパクの約5%を占めるレクチンをはじめと

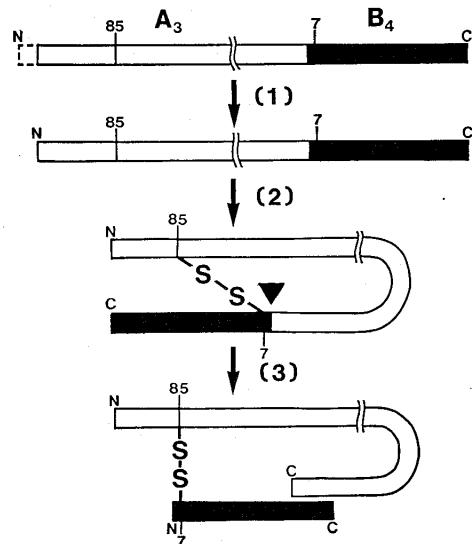
\* Takayuki MOMMA: Recent Study for Genetic Engineering of Soybean Glycinin Gene.

キリンピール(株)基盤技術研究所 (〒329-14 栃木県塙谷郡喜連川町大字早乙女字申塙 3377)

Central Laboratory for Key Technology (3377  
Kitsuregawa-Machi, Shioya-Gun, Tochigi-Ken, 329-  
14 Japan)

して、トリプシンインヒビター、ウレアーゼ、リポキシゲナーゼ、プロテイナーゼ・インヒビター、および  $\beta$ -アミラーゼなどが知られている。このグロブリンは超遠心分離法で 7S 成分と 11S 成分に大きく分けられる。ダイズの場合、前者を特にコングリシン (conglycinin)、後者をグリシン (glycinin) と呼んでいる。筆者らは、この中でも比較的含硫アミノ酸も含みかつ、蓄積量も多いグリシンに重点をおいてこのタンパク質の一次構造を遺伝子工学的手法を用いて決定することを試みた。ダイズの主要貯蔵タンパク質であるグリシンは、沈降係数 (S 20, W) は、~12、分子量約 360,000 で 6 量体を形成している。すなわち、酸性サブユニット成分 ( $Mr=35,000$ ) と塩基性サブユニット成分 ( $Mr=22,000$ ) が S-S 結合した 6 つのサブユニット対から成っている。いくつかの酸性・塩基性サブユニット対があり、6種類の異なった酸性成分と 5種類の異なった塩基性成分が、それらの N 末端領域の部分的なアミノ酸配列の違いに基づいて同定されている<sup>8)</sup>。グリシン分子のこれらのサブユニット対は、ランダムではなく、しかし多様性があり、すべてのサブユニットは、A<sub>4</sub> をのぞいて共有結合した酸性・塩基性サブユニット対からなることがわかっている<sup>9)</sup>。筆者らは、グリシン酸性・塩基性サブユニットは、[A-B] サブユニット中間体をコードする 1 本の mRNA から合成され翻訳後の切断過程で A と B サブユニットに分断されることをグリシン中間サブユニット A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> において世界で初めて実証し、世界に先駆けてグリシンを構成する主要な 5種類のサブユニット前駆体のすべての完全一次構造を決定し、これらの構造的特徴を明らかにすることことができた<sup>2-6)</sup>。Tumer ら<sup>8)</sup>によつて報告された部分的アミノ酸配列とグリシンサブユニット mRNA の翻訳領域の解析から、グリシン A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> サブユニット対は、24 アミノ酸に相当するシグナルペプチド配列、320 アミノ酸 ( $Mr=36,392$ ) に相当する A<sub>3</sub> 酸性サブユニットと 172 アミノ酸 ( $Mr=19,072$ ) に相当する B<sub>4</sub> 塩基性サブユニット、A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> サブユニット対は、シグナルペプチド配列が、23 アミノ酸、成熟 A<sub>5</sub> サブユニットは、97 アミノ酸 ( $Mr=10,556$ )、成熟 A<sub>4</sub> と B<sub>3</sub> サブユニットはそれぞれ 257 アミノ酸 ( $Mr=29,967$ ) と 555 アミノ酸 ( $Mr=20,732$ ) から成っていた。また、グリシン A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> サブユニット対は、18 アミノ酸のシグナルペプチド配列、282 アミノ酸 ( $Mr=32,078$ ) 成熟 A<sub>2</sub> サブユニット、185 アミノ酸の成熟 B<sub>1a</sub> サブユニット ( $Mr=20,340$ )、A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub> サブユニット対は、19 アミノ酸のシグナルペプチド配列、291 アミノ酸 ( $Mr=33,032$ ) の成熟 A<sub>1a</sub> サブユニット、185 アミノ酸

( $Mr=20,408$ ) の成熟 B<sub>1b</sub> サブユニット、そして A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> サブユニット対は、19 アミノ酸のシグナルペプチド配列、278 アミノ酸 ( $Mr=31,867$ ) の成熟 A<sub>1b</sub> サブユニット、185 アミノ酸 ( $Mr=20,493$ ) の成熟 B<sub>2</sub> サブユニットから成っていた。各サブユニットは、ポリソーム上でシグナルペプチドに始まり、A 成分と B 成分と続く一本の前駆体ポリペプチドとして合成される。シグナルペプチドが翻訳に伴つて切断され (ステップ 1)，このグリシン前駆体は A サブユニットと B サブユニットの間でジスルフィド結合を形成し (ステップ 2)，粗面小胞体 (ER) に移行し 3 量体を形成する。ER からプロテインボディへ移行する際に、A 成分と B 成分の間が切断され成熟型になる (ステップ 3)。その後に、6 量体としてプロテインボディ中に蓄積する<sup>8,10,11)</sup>。第 1 図にこれらの過程を模式的に示す。グリシン A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> 中間サブユニットが A<sub>3</sub> と B<sub>4</sub> サブユニットに切断される翻訳後の切断の機作を知ることは非常に興味がある。Chou と Fasman のアルゴリズムによって切断部位近傍のアミノ酸配列に対する推定二次構造を解析したところ A<sub>3</sub> サブユニットの C 末端領域が  $\beta$ -構造を持ち、B<sub>4</sub> サブユニットの C 末端領域が  $\alpha$ -構造を持ち、B<sub>4</sub> サブユニットの C 末端領域が  $\beta$ -構造を持ち、B<sub>4</sub> サブユニットの C 末端領域が  $\alpha$ -構造を持つことである。



第 1 図 グリシン A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> サブユニット前駆体におけるタンパク質分解酵素によるプロセッシング過程の模式図  
 (□) はシグナルペプチド領域、(■) は A<sub>3</sub> サブユニット領域、(■) は B<sub>4</sub> サブユニット領域、N, C はそれぞれのタンパク質の N 末端と C 末端、数字は A<sub>3</sub> と B<sub>4</sub> サブユニットの間にジスルフィド結合を形成するシステイン残基の位置、(▼) はタンパク質分解酵素によるプロセッシングの時の切断部位を示す。

ットの N 末端領域が  $\alpha$ -ヘリックスを持つことが示された。一方、A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> の同じ様な配列を持ち、切断されない領域に対して同様に解析をしたところ  $\beta$ -構造のみをとることが示された。このことから、グリシニン[A-B] 中間サブユニットを分断して酸性(A)と塩基性(B)サブユニットにするタンパク質分解酵素が、特異的な Asn-Gly 配列を持つ領域の構造(特殊な  $\beta$ -構造- $\alpha$ -ヘリックス)を認識し、Asn と Gly の間で切断するということが示された<sup>2)</sup>。これらのドメイン構造については、すべてのグリシニンサブユニット前駆体に共通に存在することが推測された。

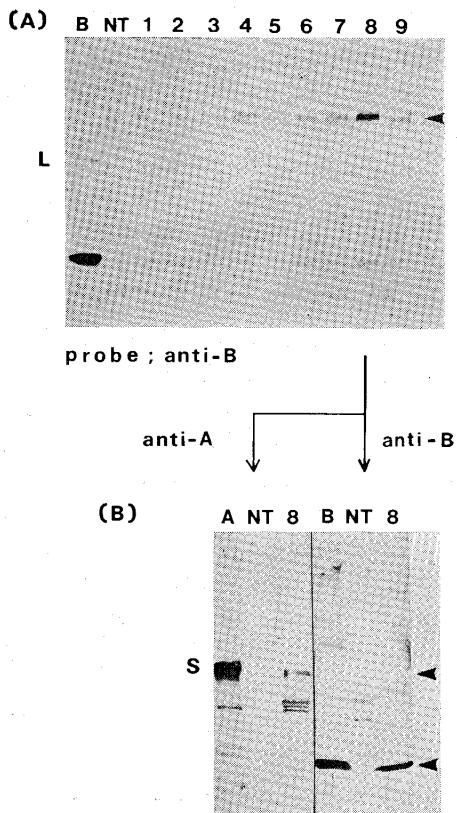
ダイズ貯蔵タンパク質は種子の発達過程の短時間に急速に合成され、その発現は組織特異的であるとともに時期特異的でもある。ダイズ貯蔵タンパク質の遺伝子発現制御機構を明らかにする目的で、まず発現量の最も多いと考えられるグリシニンサブユニット A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> の核遺伝子の完全構造を決定した<sup>7)</sup>。Boulter のグループはエンドウ豆レグミンをコードする遺伝子の構造を明らかにしたが<sup>12)</sup>、グリシニンサブユニット前駆体とのエンドウ豆レグミンの一次構造を比較すると、40~60% の相同性が存在する<sup>2)</sup>。ダイズグリシニン A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> 遺伝子の構造とエンドウ豆レグミン遺伝子を比較すると、イントロンの数やその入り方がほとんど同じで 3 つのイントロンにより分断された 4 つのエクソンからなり、全長 2864 bp であることを明らかにした<sup>7)</sup>。グリシニンサブユニット間で、アミノ酸配列を比較すると、酸性サブユニットの C 末端領域は、相同性が低く親水性に富んだ領域であり、塩基性サブユニットの N 末端領域では相同性が高いという構造的特徴を持つが、このように相同性が保存されていない部分と保存されている部分がダイズグリシニン遺伝子上の同一のエクソン(第三エクソン)上にコードされていること<sup>7)</sup>は、プロセッシングに必要な特殊なドメイン構造を常に保存するために、これらの領域を必要とするのか、あるいは、グリシニン分子を正確に形成するのに役立っているのかを考える上で非常に興味深い問題である。

また、ダイズ貯蔵タンパク質の登熟期に種子特異的に合成されるときの制御に関与していると考えられる 5'-末端の上流を調べてみると、A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> cDNA の 5'-末端に対応する塩基から 23~31 bp 上流に典型的な TATA ボックス配列が存在し、この cDNA の 5'-末端に対応する部分、ないしはその近傍がグリシニン A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> 遺伝子の転写開始点であると推定される<sup>7)</sup>。多くの動物遺伝子で見いだされる CAAT ボックスコンセンサス配列<sup>13)</sup>に相当する配列がこの上流 74~84 bp の所に存在する

が、植物遺伝子での CAAT ボックス配列の転写における役割は明らかでない。グリシニン A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> 遺伝子の 5'-末端上流域とレグミン A 遺伝子のそれを比較すると転写開始点と思われる領域から約 120 bp 前後上流までは非常に高い相同性を示しているので、この領域に種子特異性、時期特異性に関与する配列(シスに働く要素)が存在すると推定される。今後、これらの領域を解析、同定し、植物の遺伝子導入系を利用して発現、制御機構が解明されるものと期待している。

## 2. グリシニン中間サブユニット A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> cDNA のタバコ植物への導入と発見<sup>14~17)</sup>

遺伝子の性質を知るためにには、最終的にはもとの植物に戻すことが必要であると考えるが、育種的な立場にたつと、有用遺伝子を有用作物に導入し、この有用形質を実用レベルで発現させることが重要である。はじめに、筆者らは、モデル系として、一般に使用されているタバコの系で有用遺伝子であるダイズ貯蔵タンパク質の一つグリシニンタンパク質を発現させることに成功した。グリシニン中間サブユニット A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> cDNA、カリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモーターおよびノパリン合成酵素ターミネーターを組み合わせたキメラ遺伝子を構築し、中間ベクター pLGVneo 1103 に組み込み、アグロバクテリアを介して、タバコ細胞に導入した。すなわち、タバコ・リーフディスクにアグロバクテリアを感染させ、そのリーフディスクをカナマイシンを含む選択培地に置床したところ、3~4 週間目に多数のシュートを得ることができた。さらに、これらを育成し、花を咲かせ種子を得ることができた。形質転換タバコ葉から DNA を抽出し、サザンプロット解析を行ったところ、数コピー~10 数コピーのグリシニン遺伝子が導入されているを確認した。タンパク質の検出をするためにウェスタンプロット解析を試み、葉および種子でグリシニン A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> と推定されるタンパク質を確認した(第 2 図-A, B)。一方、岡田ら(1988)<sup>15,16)</sup>は、エレクトロポレーション法によってグリシニン A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> cDNA を導入した形質転換タバコの解析からも同様の結果を得ている。グリシニンサブユニットは、種子中では A と B に切断されてプロテインボディ中に局在するが、人為的に本来のプロモーターとは違ったものを使ったために、葉においても発現してしまい、しかも葉で発現しているグリシニンタンパク質は、成熟できずに前駆体の状態で存在していた(第 2 図-A)。このことは、種子中には、グリシニン前駆体が成熟するのに必要な成熟化酵素が局在していると推定される。この酵素の候補としては、西村ら(1987)<sup>17)</sup>によって、カボチャの 11 S グロブリンの成熟化酵素と

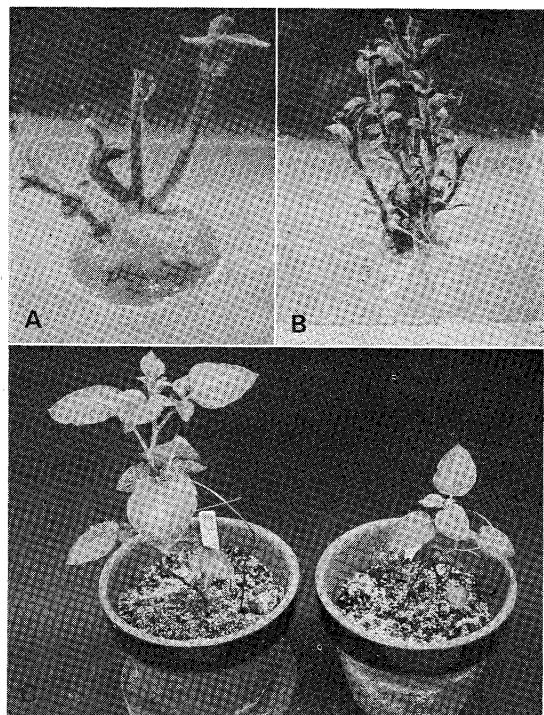


**第2図** 形質転換タバコ葉(A)と種子(B)におけるウエスタンプロット解析  
AはグリシニンAサブユニット(50 ng), BはグリシニンBサブユニット(50 ng)を示す。(A)においてNTは非形質転換体, 1~9は形質転換体を示す。(B)においてNTは非形質転換体(10 µg全タンパク質), 8は(A)における形質転換体8と同じもの(10 µg全タンパク質)を示している。また、グリシニンAサブユニット、Bサブユニットに対してそれぞれ抗グリシニンA、あるいはB抗体を用いて反応を行つた。(◀)はグリシニンポリペプチドを示す。

して報告されたチオール系のプロテアーゼ(プログロブリンプロセッシング酵素)が考えられる。

### 3. バレイショ栽培品種への外来遺伝子導入系の確立<sup>18)</sup>

筆者らは、すでにネオマイシン・フォスフォトランスクレーベルⅡ(NPTⅡ)遺伝子を用いて日本におけるバレイショ主要品種(農林一号、マイクイーン、男爵、デジマ、紅丸等)とキリンビール育成系統において、外来遺伝子を導入する方法を確立した。すなわち、チューバーあるいはマイクロチューバーから直径約1cm、厚

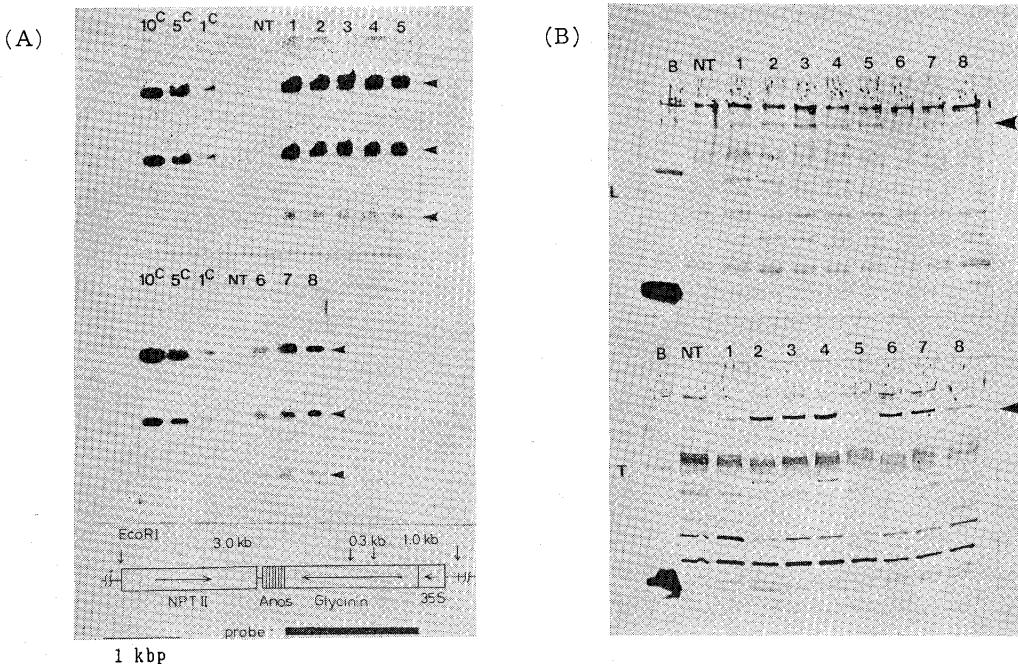


**第3図** 形質転換体バレイショの作出過程  
(A) 選択培地上に置床されたアグロバクテリア感染後4週間後のチューバーディスク。  
(B) (A)においてディスクから切り取ったショートを選択培地上で発根させたもの。  
(C) 創化して人工気象室で生育中の形質転換体(左)と非形質転換体(右)。

さ約2~3mmのチューバーディスクを作り、NPTⅡ遺伝子の組み込まれた中間ベクターあるいはバイナリーベクターを持つアグロバクテリアをチューバーディスクに感染させた。その後、MS修正培地に4時間置床し、再分化培地(0.1mg/l IAA, 1mg/l Zeatine, 0.5g/l Claforan [Hoechst Co., Ltd.], 100mg/l Kanamycin)に移し、25°C、16時間照明で培養した。1~3ヶ月後に、ショートを得ることができた(第3図-A)。その後、100mg/l Kanamycinを含むMSフリー培地に移し、発根した個体(第3図-B)について創化を行い人工気象室に移した(第3図-C)。草丈約30cmに生育したバレイショ植物体から上位葉を採取し、NPTⅡ検定を行つたところ、NPTⅡ活性の発現を確認できた。

### 4. 形質転換バレイショにおけるグリシニン遺伝子の発現<sup>19,20)</sup>

前述したタバコへの導入に用いた有用遺伝子のグリシニン中間サブユニットA<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>cDNAを含むキメラ遺伝子をアグロバクテリアを介し、上記3の方法によって、



第4図 (A) 形質転換バレイショのサザンプロット解析 10 C, 5 C, 1 C はそれぞれグリシニン遺伝子のコピー数を示す。NT は非形質転換体, 1~8 は形質転換体を示す。バレイショ葉から抽出した DNA (10 µg) を制限酵素 Eco RI で切断し、電気泳動後、ゼータ・プローブにプロットした後、<sup>32</sup>P-標識したグリシニン A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> cDNA をプローブとして反応を行った。(◀) はグリシニン遺伝子断片を示す。(B) 形質転換バレイショ葉 (L) と塊茎 (T) のウェスタンプロット解析 B はグリシニン B サブユニット (50 ng) を示す。NT は非形質転換体 (10 µg 全タンパク質), 1~8 は形質転換体 (10 µg 全タンパク質) を示す。プローブとして抗グリシニン B 抗体を使い、二次抗体にアルカリフェオズファターゼを使い発色させた。(◀) はグリシニンペプチドを示す。

バレイショ細胞に導入した、形質転換バレイショを育成し、塊茎を形成させることもできた。形質転換バレイショの葉から DNA を抽出し、サザンプロット解析を行ったところ、数コピー～10 数コピーのグリシニン遺伝子が導入されているのを確認した(第4図-A)。グリシニンタンパク質の検出をするためにウェスタンプロット解析を試み、葉、塊茎でグリシニン中間サブユニット A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> と推定されるタンパク質を確認した(第4図-B-L, T)。バレイショの塊茎で検出されたグリシニンと考えられるタンパク質はタバコの葉でみられたのと同様に切断されない形で存在していた。さらに、このタンパク質をショ糖密度勾配遠心法により解析したところ、7S 近傍に沈降しており、3量体を形成しているものと推測された<sup>21)</sup>。また、形質転換個体間で、明らかに発現量に差が認められ、解析した数十個体の内、多いものでは全タンパク質の約 0.5% の発現を示すものもあった。前者の理解としては、タバコの葉の場合と同様にバレイショの葉と塊茎にも成熟化酵素がないと考えられる。さら

に、沈降係数からみてジャガイモで発現しているグリシニンタンパク質がダイズ種子中でとっている中間体の形態と同様な形態をとっていることは興味深い。おそらく、種子での貯蔵形態と芋での貯蔵形態ではかなり貯蔵様式が違っていると考えられる。このことは、この分野の研究者にとって非常に興味のあるところではないかと考える。後者については、位置効果(ポジション・エフェクト)の影響と考えられる。

### 5. おわりに

ダイズグリシニンを構成する主要な 5 種類のサブユニット前駆体の完全一次構造の解明により、グリシニンの酸性および塩基性サブユニット対は、もともと同一の mRNA から一つのポリペプチド鎖として合成され、ジスルフィド結合を形成し、特殊なドメイン構造を認識するタンパク質分解酵素による翻訳後のプロセッシングにより酸性および塩基性サブユニットに分断されることが示された。これらは、構造の比較から A<sub>2</sub> および A<sub>3</sub> サブユニットファミリーの 2 つのサブクラスに分けられ、

それぞれのサブユニットファミリー内の遺伝子は非常に高い相同性を持っていた。ところで、英國の Boulter のグループはエンドウ豆レグミンをコードする遺伝子の構造を明らかにしたが、グリシニンサブユニット前駆体とこのエンドウ豆レグミンの一次構造を比較すると、40～60% のホモロジーが存在した。また、ダイズ A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> 遺伝子と比較してイントロン/エクソンの関係はほとんど同じであった。のことからダイズとエンドウ豆の 11S グロブリンは、共通の祖先から進化したものと見なされた。グリシニンサブユニット mRNA の濃度変化がタンパク質の量的変化と相対的に一致することから、グリシニンサブユニットの発現は一義的に転写レベルで制御されていることが明らかになった。構造遺伝子の発現を調節する遺伝子の 5'-上流域の構造を明らかにしたが、遺伝子のどのような構造が、種子特異的に、特定の時期に、多量に発現するに関与しているのかを解明することが今後のこの分野の大きな課題となるであろう。

一方、アグロバクテリアを用いた系でグリシニン遺伝子をタバコとジャガイモ細胞に導入する系ができたので、これらの系を用いてグリシニンタンパク質の各プロセッシングがどこで、どのように行われているのかを知るための研究を行いつつある。さらに、ある意味ではグリシニン遺伝子をジャガイモ細胞に導入することは有用遺伝子を有用作物に導入していることになるが、果してこの発現レベルでタンパク質の改良につながっているかどうかは、はなはだ疑問に思われる。ただし、この遺伝子の発現の影響で他の成分が変化するというような副産物がないともいえないが。今後、さらにこの研究を進展させるためには、組織あるいは器官特異的発現、たとえば、芋でのみ遺伝子を働く技術を開発しなければならないし、あるいは、大量発現、たとえば、タンパク質レベルで 0.5% の発現量だと環境要因によって変化するレベルなので、それを越えるレベルにまで高める技術を開発することが必要になる。また、位置効果によって発現の仕方が変わってくるのでそれをどう使って行くかもポイントになるだろう。遺伝子工学的技術を用いて、将来これらの貯蔵タンパク質の栄養価を向上させるとか物性の改良を行うことは可能となると考えるがまだまだ越えなければならないハードルがたくさんあるように思われる。また、貯蔵タンパク質の生合成や蓄積機構を解明し、それらを物質生産の制御に利用して行くため、遺伝子工学的手法と細胞融合などの細胞工学的手法を組み合わせて、この研究をさらに発展させることが必要であろう。

なお、以上の研究を行うにあたり、農林水産省・食品

総合研究所・深澤親房博士、同研究所・微生物工学研究室の皆様、キリンビール・基盤技術研究所、植物開発研究所の皆様には、この研究に対して貴重なアドバイスや助力を頂いた。特に形質転換系の仕事では、高橋久恵さんと白石朋子さんに優秀なアシスタントをして頂いた。これらの方々に厚く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Nelson, O. E., 1979. *Adv. Cereal. Sci. Technol.*, **3**: 41-71.
- 2) Fukazawa, C., T. Momma, H. Hirano, K. Harada, K. Ueda, 1985. *J. Biol. Chem.*, **260**: 6234-6239.
- 3) Momma, T., T. Negoro, H. Hirano, A. Matsu-moto, K. Ueda, C. Fukazawa, 1985. *Eur. J. Biochem.*, **149**: 491-496.
- 4) Momma, T., T. Negoro, K. Ueda, C. Fukazawa, 1985. *FEBS Lett.*, **188**: 117-122.
- 5) Negoro, T., T. Momma, C. Fukazawa, 1985. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 6719-6731.
- 6) 根来尚温、小川俊也、宇高京子、深澤親房、1986. 第9回日本分子生物学会年会要旨、p. 221, 4E-03.
- 7) Fukazawa, C., T. Momma, W. Higuchi, K. Ueda, 1987. *Nucleic Acids Res.*, **15**: 8117.
- 8) Turner, N. E., J. D. Richter, N. C. Nielsen, 1982. *J. Biol. Chem.*, **257**: 4016-4018.
- 9) Staswick, P. E., M. A. Hermodson, N. C. Nielsen, 1981. *J. Biol. Chem.*, **256**: 8752-8755.
- 10) Chrispeels, M. J., T. J. V. Higgins, D. Spencer, 1982. *J. Cell Biol.*, **93**: 306-313.
- 11) Barton, K. A., J. F. Thompson, J. T. Madison, R. Rosenthal, N. P. Javis, R. M. Beachy, 1982. *J. Biol. Chem.*, **257**: 6089-6095.
- 12) Lycett, G. W., A. J. Delauney, W. Zhao, J. A. Gatehouse, R. R. D. Croy, D. Boulter, 1984. *Plant Mol. Biol.*, **3**: 91-96.
- 13) Messing, J., D. Geraghty, G. Heidecker, N.-T. Hu, J. Kridl, I. Rubenstein, 1982. In "Genetic Engineering of Plants" (eds. Kosuge, T., C. P. Meredith, A. Hollaender), p. 211-227, Plenum Press, New York.
- 14) 門馬孝之、深澤親房、加藤 忠、1988. 第 11 回日本分子生物学会年会要旨、p. 167, 3D-28.
- 15) 岡田和也、深澤親房、加藤 忠、1988. 第 11 回日本分子生物学会年会要旨、p. 168, 3D-29.
- 16) Okada, K., T. Ohtani, T. Momma, C. Fukazawa, T. Kato, 1989. UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology 18th Annual Meetings, p. 309, M 341.
- 17) 西村いくこ、1987. 植物の細胞生物学的研究法(赤沢 堯、杉浦昌弘、西村幹夫編), p. 408-419, 共立出版、東京。
- 18) 門馬孝之、深澤親房、1988. 育種学雑誌, **38**, 別

- 冊 2: 120-121.
- 19) Ohtani, T., T. Momma, K. Okada, C. Fukazawa, and T. Kato, 1989. UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology 18 th Annual Meetings, p. 309, M 340.
- 20) 門馬孝之, 深澤親房, 加藤 忠, 1989. 育種学雑誌, 39, 別冊 1: p. 284-285.
- 21) Momma, T., T. Toguri, K. Okada, C. Fukazawa, T. Ohtani, 1990. UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology 19 th Annual Meetings, p. 354, R 528.