―Reviews―

アントシアニン生合成系を中心とした薬用植物二次代謝の多様性の解明とトランスジェニック植物への分子生物学的展開

山崎真巳

Molecular Biological Studies on Diversity of Secondary Metabolism in Medicinal Plants and Application to the Production in Transgenic Plants

Mami YAMAZAKI
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Yayoi-cho 1-33, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

(Received September 7, 2001)

A molecular biological approach was applied to the study of diversity and regulation of secondary metabolism in medicinal plants at various levels. For the inter-species diversity, RFLP (restriction fragment length polymorphysm) and RAPD (random amplified polymorphic DNA) analyses of genomic DNA were performed on the plants, belonging to the same genus or family and containing related compounds. Phylogenetic trees of lupin alkaloid containing plants and other medicinal plants, based on RFLP and/or RAPD profiles, showed the relationship between the diversities in genomes and secondary metabolisms. The chemotypes regarding anthocyanin production in *Perilla frutescens* var. *crispa*, were subjected to the study on intra-species diversity. The structural genes and the regulatory genes involved in anthocyanin biosynthesis were isolated and their expression in red and green forms was determined by Northern blot analysis. The expression of all structural genes examined was co-ordinately regulated in form-specific manner and by light illumination. The anthocyanin production was enhanced in transgenic plants over-expressing *Myc* homologue genes from perilla. These results suggested that a protein complex including bHLH factors might regulate the expression of a series of structural genes. Additionally, cDNAs coding anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase and anthocyanidin synthase were isolated and characterized using recombinant proteins for the first time. In conclusion, it was indicated that the molecular biological techniques are powerful tools for the investigation of diversity and regulation of and for the genetic engineering of secondary metabolism in medicinal plants.

Key words――diversity of secondary metabolism; medicinal plant; transgenic plant; anthocyanin; chemotype

1. はじめに

植物は，我々人類が最も古くから利用してきた重要な薬用資源であり，その多様な二次代謝により多くの有用物質が生産される．これらの植物二次代謝に関してこれまでに，化合物・細胞組織・種あるいは変種レベルでの多様性に関する厖大な記述的情報が蓄積されてきた．しかしながら従来の薬用資源研究は，成分化学や形態による系統分類，新規化合物探索等が主流であり，どちらかというと天然資源に対して記述的あるいは受動的な立場をとっていた．一方，近年著しく発展した分子生物学は生物全般に共通な「普遍性」を明らかにし，これにより生物における複雑な事象のメカニズムが次々と解明されてきた．そこで，従来の薬用資源研究で明らかにされてきた植物二次代謝の「多様性」について生物普遍原理に基づく分子生物学的手法によって根本的に理解し，その知見を新しい薬用資源の生物工学的創出に応用することを着想した．すなわち，従来の伝統的な植物学や生薬学と新興の植物分子生物学の融合による新分野の開拓を目指した．

2. 成分変異と分子遺伝学的系統解析

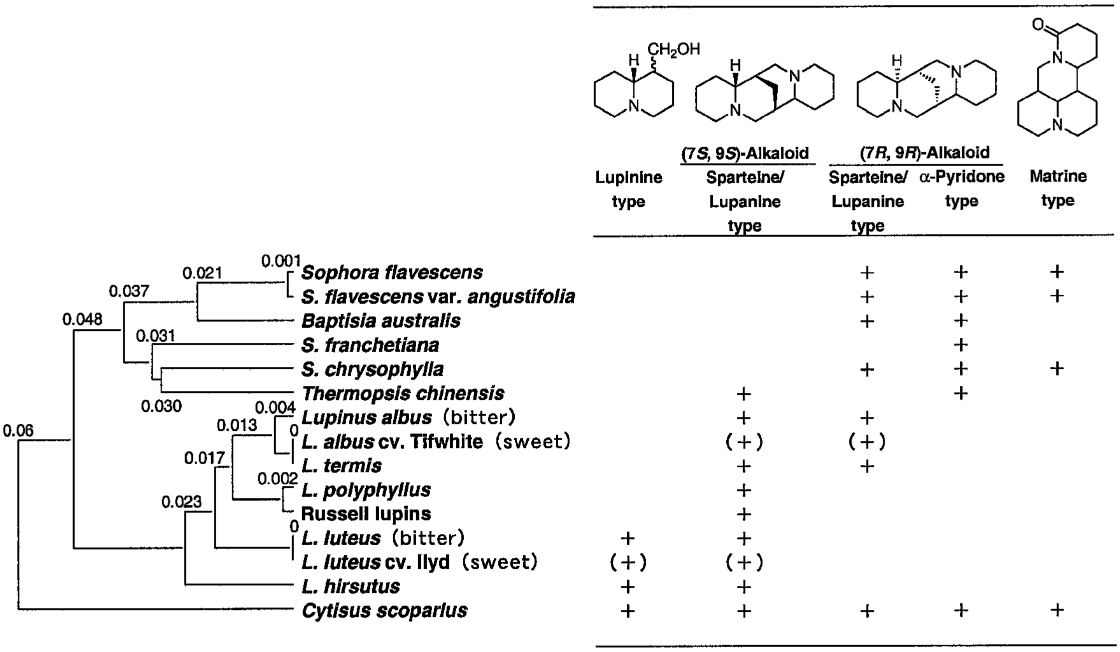
人々は，植物を識別して利用する立場から形態観察による種の識別や同定を行い，さらに含有成分に基づく化学的確認試験によるケモタキソノミーを行ってきた．このようにして分類と成分の関係について様々な情報が重ねられてきたが，近年分子生物学が発展するまではこれらを大局的に結ぶ法則性はなかった．現在では，様々な生物種について分子系統

千葉大学大学院薬学研究院（〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33）
e-mail: mamiy@p.chiba-u.ac.jp
*本総説は，平成 13 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである．

分類が行われており，生物である植物の識別，鑑定及び系統解析にはゲノムそのものを用いるのが最も決定的であると考えられている．さらに二次代謝の多様性はゲノム上の変異を反映していると考えられ，DNA の変異を調べることによって二次代謝の進化や多様化を解明する鍵となることが期待された．そこで種間で成分変異のみられる関連植物種においてゲノム DNA の RFLP（restriction fragment length polymorphysm）及び RAPD（random amplified polymorphic DNA）を用いた分子系統解析を行い，二次代謝パターンとの比較を行った．

ルピンアルカロイドは，キノリチジン骨格を有する一連のアルカロイドで主にマメ科植物に含有される．漢薬「苦参」の主成分マトリンもルピンアルカロイドの 1 つである．この苦参の基原植物である *Sophora flavescens* var. *angustifolia*（クララ）をはじめ，*Sophora* 属，*Lupinus* 属，*Baptisia* 属，*Thermopsis* 属，*Cytisus* 属の 5 属 13 種のルピンアルカロイド含有植物についてゲノム DNA の RFLP 解析を行い，含有アルカロイドのパターンと比較した．[1,2] その結果，RFLP パターンから推測される遺伝的相異度に基づいて作成された分子系統樹は，含有アルカロイドの炭素骨格型に基づく化学系統分類の結果と一致した（Fig. 1）．特に，4 環性スパルテイン骨格の 7 位，9 位の立体配置に関して，（7*R*, 9*R*）型アルカロイド含有種と（7*S*, 9*S*）型アルカロイド含有種が進化過程において比較的初期に種分化したことが示唆された．また，これらの植物のうち，*Lupinus albus* や *L. luteus* は食料や飼料として利用され育種がすすんでいることから，アルカロイド含有量が著しく低くなった sweet 系品種が存在する．これらをアルカロイドを含有する bitter 系品種と比較し，種内成分変異に関する分子生物学的解析にも着手した．[3]

また，我が国において最も大量に使用される重要生薬である「甘草」の基原植物であるマメ科の *Glycyrrhiza* 属植物とその近縁種について，ゲノム DNA の RFLP 分析及び RAPD 分析による系統解析を行った．[4,5] その結果，種間の DNA 多型から推測される遺伝的相異度から系統樹を作成すると，有効成分グリチルリチンを高濃度で含有する *G. uralensis, G. glabla, G. inflata* が，グリチルリチン非含有の *G. echinata* や *G. palidiflora* と比べると遺伝的に近い分類クラスターを形成することが示された（Fig. 2）．この結果は，*rbcL*（リブロース 2 リン酸脱炭酸酵素）遺伝子の塩基配列による分子系統解析の結果[6]ともよく一致した．さらに，乾燥生薬「甘草」の RAPD 分析を行い，市場品生薬の DNA 鑑定の可能性が示された．[5] また，この他に生薬「当帰」の基原植物を含むセリ科 *Angerlica* 属植物等に



	Lupinine type	(7S, 9S)-Alkaloid Sparteine/Lupanine type	(7R, 9R)-Alkaloid Sparteine/Lupanine type	(7R, 9R)-Alkaloid α-Pyridone type	Matrine type
Sophora flavescens			+	+	+
S. flavescens var. *angustifolia*			+	+	+
Baptisia australis			+	+	
S. franchetiana				+	
S. chrysophylla			+	+	+
Thermopsis chinensis		+		+	
Lupinus albus (bitter)		+	+		
L. albus cv. Tifwhite (sweet)		(+)	(+)		
L. termis		+	+		
L. polyphyllus		+			
Russell lupins		+			
L. luteus (bitter)	+	+			
L. luteus cv. llyd (sweet)	(+)	(+)			
L. hirsutus	+	+			
Cytisus scoparius	+	+	+	+	+

Fig. 1. Phylogenetic Tree Based on RFLP Profiles and Alkaloid Production in Species Containing Lupin Alkaloid

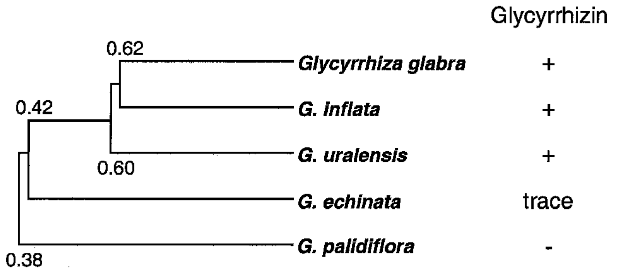


Fig. 2. Phylogenetic Tree Based on RAPD in *Glycyrrhiza* Plants

ついても RAPD 分析による分子遺伝学的系統解析を行った.[7,8] このような植物分子遺伝学的系統解析の方法は今後，識別，鑑定，系統分類の決定的な方法として薬用資源植物に応用されると考えられる.

3. アントシアニン成分変種における構造遺伝子と転写制御因子

3-1. アントシアニン生合成に関与する構造遺伝子の単離と発現解析　さらに，成分変異を決定づける二次代謝の制御に関与する遺伝因子を明らかにする系を構築することを目的として，同一種でありながら二次代謝パターンのみが異なるいわゆる「成分変種」について，種内変異に関する分子遺伝学的解析を行った．シソ（*Perilla frutescens* var. *crispa*）は，生薬「蘇葉」として古くから薬用に，食品及び食品の着色に多く用いられてきた．この種には多くの品種があり，アントシアニン色素を生産するいわゆる「アカジソ」と生産しない「アオジソ」が存在する．アカジソの葉及び茎の表皮細胞の液胞には，マロニルシソニン（Fig. 3）が主なアントシアニンとして蓄積されるのに対してアオジソでは蓄積されていない．この形質については既に古典的遺伝解析が行われ，葉の表と裏，茎の表皮細胞におけるアントシアニン生合成の発現に少なくとも 3 つの遺伝子座が関与することが明らかにされている.[9] また，アカジソとアオジソの間で RAPD によるゲノム DNA のフィンガープリンティングを行うと 99.5% 以上の増幅断片は同一であることから，アカジソとアオジソのゲノム DNA における変異は小さいことが示唆された.[10] このようにバックグラウンドの遺伝的差異が小さい成分変種は，分子生物学的手法による系統特異的遺伝子クローニングの材料として適していると考えられる．そこでアカジソ特異的に発現するアントシアニン生合成遺伝子のクローニングと解析を行った．遺伝子クローニングのストラテジーとして，既知遺伝子についてはヘテロプローブや PCR プローブを用いた cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い，その他にアカジソとアオジソの間での mRNA ディファレンシャルディスプレイ法により新規遺伝子を単離した．その結果，アントシアニン生合成経路の各段階を触媒する酵素，CHS（カルコン合成酵素），F3H（フラバノン 3-水酸化酵素），DFR（ジヒドロフラボノール還元酵素），ANS（アントシアニジン合成酵素），3GT（アントシアニジン 3-*O*-グルコシル転移酵素），5GT（アントシアニン 5-*O*-グルコシル転移酵素），をそれぞれコードする構造遺伝子 cDNA を得た.[11,12] これらの遺伝子と *F3′H*（フラボノイド 3′水酸化酵素遺伝子）[13]及び *AAT*（アントシアニンアシル転移酵素遺伝子）[14]のサザンハイブリダイゼーションの結果から，これらの構造遺伝子はゲノム上で小さなマルチジーンファミリーを形成し，*CHS* 遺伝子は 3 コピー以上が，他の遺伝子は 2 コピーずつがアカジソとアオジソのゲノム DNA に存在することが示された．さらに，*CHS* 遺伝子を除くすべての構造遺伝子がアカジソ葉で発現し，アオジソ葉では発現していないことが示された（Fig. 4）．*CHS* 遺伝子は，アオジソ葉においてもアカジソ葉の 10% 程度の mRNA が蓄積されていた．さらに，アカジソを暗所で育成するとアントシアニン含有量とアントシアニン生合成遺伝子の mRNA 量がともに減少するが，これに強い白色光を照射するとすべての構造遺伝子発現が協調的に誘導された（Fig. 5）．これらの結果から，これらの構造遺伝子の発現は系統特異的に協調的な発現調節を受けていることが示され，シソ成分変種では少数の制御遺伝子が一連のアントシアニン生合成遺伝子の発現を統合的に制御し，そのことがアカジソとアオジソというアントシアニン成分変種を決定しているという重要な結論を得た.

3-2. アントシアニン生合成を制御する転写制御因子の単離と解析　これまでにキンギョソウ，ペチュニア，トウモロコシ等で *Myc* 様遺伝子及び *Myb* 様遺伝子がマスター遺伝子としてアントシアニン生合成を制御することが明らかにされており，シソにおいても同様の転写制御因子がアントシアニン生合成制御に関与することが推定された．そこで，アカジソ及びアオジソから転写制御因子 *Myc*,

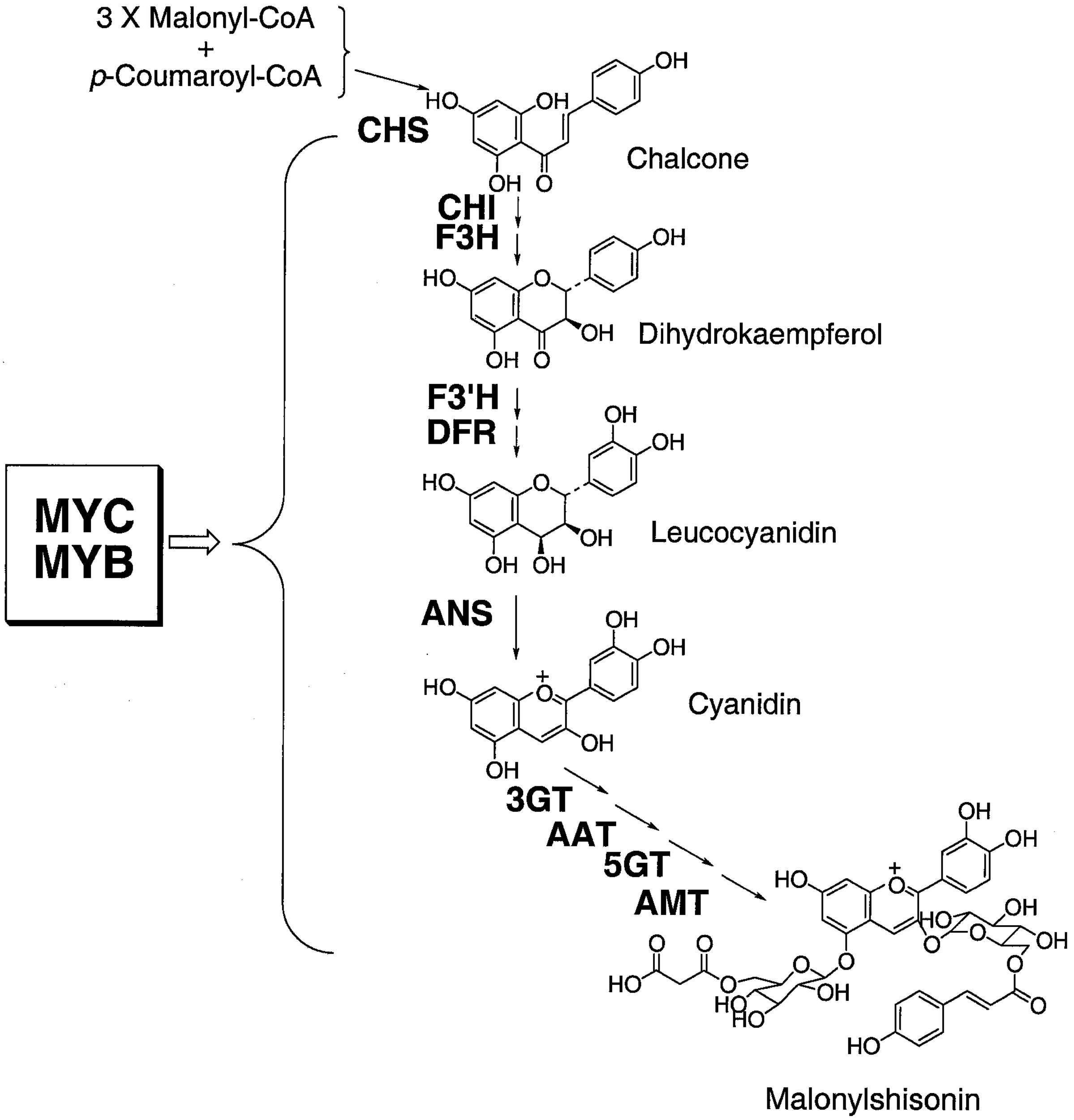


Fig. 3. Biosynthetic Pathway of Anthocyanin in *P. frutescens* var. *crispa*

Myb 様遺伝子を単離し解析した．まず，キンギョソウの *Myc* 様遺伝子 *Delila* をプローブとしてアカジソ葉 cDNA ライブラリーをスクリーニングし，*Myc–rp* を単離し，さらに *Myc–rp* をプローブとしてアオジソから *Myc–gp* を単離した．[15] *Myc–rp/gp* 遺伝子は，MYC 因子の特徴的な bHLH（塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス）構造を有するタンパク質をコードし，アカジソと青ジソの葉と根においてほぼ等量発現していた．MYC–GP では，MYC–RP の 132 番目のアラニンがセリンに変異していた．

Myc–rp あるいは *Myc–gp* をタバコ及びトマトで過剰発現させたトランスジェニック植物では，タバコの花弁及びトマトの茎と花弁においてアントシアニン蓄積量が増加し，*Myc* 様遺伝子がアントシアニンの生合成制御に関与していることが示された（Fig. 6）．また MYC–RP, MYC–GP 及びキンギョソウ由来の *Delila* タンパク質は，酵母内で酵母由来の *GAL–1* プロモーターとシソ由来の *DFR* プロモーターからの転写を活性化した．さらにエンジニアリングした MYC–RP/GP を用いた実験により，

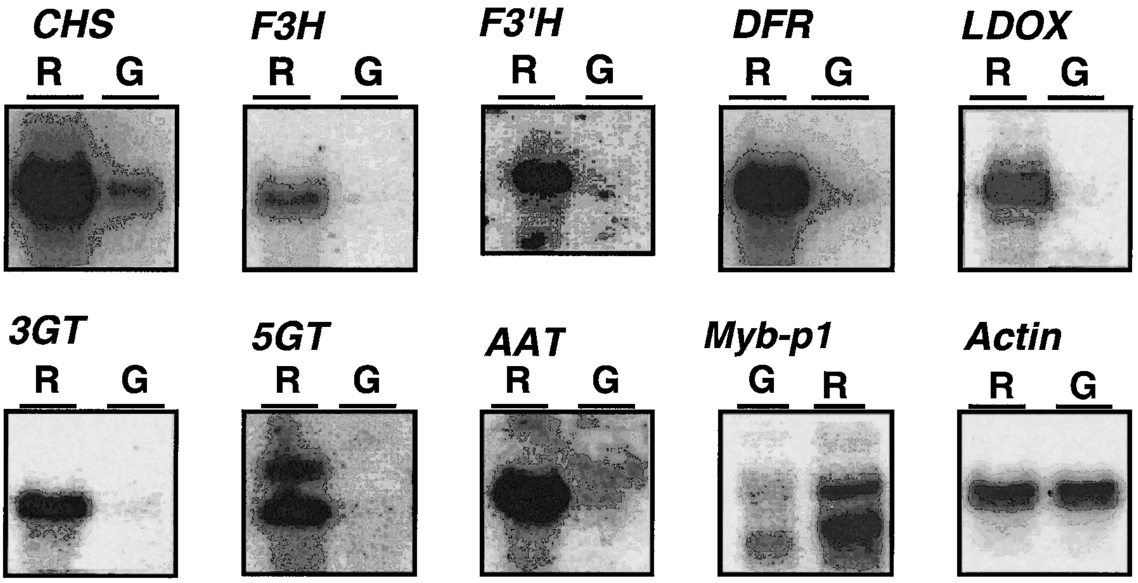


Fig. 4. Differential Expression of cDNAs in Red and Green Forms of *P. frutescens* var. *crispa*

Five mg poly(A)$^+$RNA from leaves of red (R) and green (G) forma was separated in an agarose gel and then hybridized with cDNAs for *CHS, F3H, F3′H DFR, 3GT, 5GT, AAT* cloned from *P. frutescens*.

MYC–RP/GP の 193–420 番目のアミノ酸領域に転写活性化領域が存在することが示された．また，点変異を導入した *Delila* の転写活性化能を調べることにより，161 番目のアラニンが転写活性化能に必須であることを明らかにした.[16]

次に，アカジソ cDNA を鋳型とし *Myb* 転写因子のアミノ酸の保存領域からデザインした縮重プライマーを用いた PCR によって得られた DNA フラグメントをプローブとしてアカジソ葉 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い，11 種の *Myb* 様遺伝子を単離した.[17] ノーザン解析の結果，これらのうち *Myb–p1* のみがアカジソとアオジソにおける発現量に差があり，アカジソでアオジソにおける 10 倍程度発現していた（Fig. 4)．さらにアントシアニン生合成遺伝子と同様に光照射による発現誘導を受けることが明らかになった（Fig. 5)．MYB–P1 は，通常の MYB 因子に 3 個存在する DNA 結合領域のうちリピート III のみを有する短い MYB 因子である．*Myb–p1* を過剰発現させたトランスジェニック植物ではアントシアニン量の変化はみられなかった．しかしながら酵母の two-hybrid system において MYB–P1 が MYC–RP と相互作用することが示され，酵母内で MYB–P1 タンパク質はアカジソの *DFR* 遺伝子プロモーターに結合することが示された．

これらの結果から，MYC–RP と MYB–P1 がタンパク質間相互作用を介してアントシアニン生合成遺伝子のプロモーターからの発現を制御し，アカジソとアオジソの成分変種決定に関与していることが示唆された．さらに，単一のマスター遺伝子 *Myc–rp* の導入によるアントシアニン生合成系の分子エンジニアリングにも成功した．このことは，薬用植物における一連の複雑な天然物生合成系を少数の制御遺伝子で一挙に制御するという生物工学的戦略へ展開されることが期待される．

4. 成分変種からの新規酵素遺伝子の単離と反応機構の解明

二次代謝物質の生合成研究において最も大きな障壁は，多くの場合，触媒酵素の生化学的精製が困難であったり，触媒酵素の類似タンパク質の情報が利用できないことである．筆者らは，前項の研究を進める中で，mRNA ディファレンシャルディスプレイ法.[18,19] を応用することによりタンパク質の 1 次構造に関する情報を用いることなく，成分変種特異的に発現する二次代謝に関与する新規酵素遺伝子を得た．具体的には，アカジソとアオジソ間の mRNA ディファレンシャルディスプレイによってアントシアニン生合成に関与する新規酵素 cDNA を複数単離し，これらにコードされるタンパク質による触媒反応機構の詳細を解析することに成功し

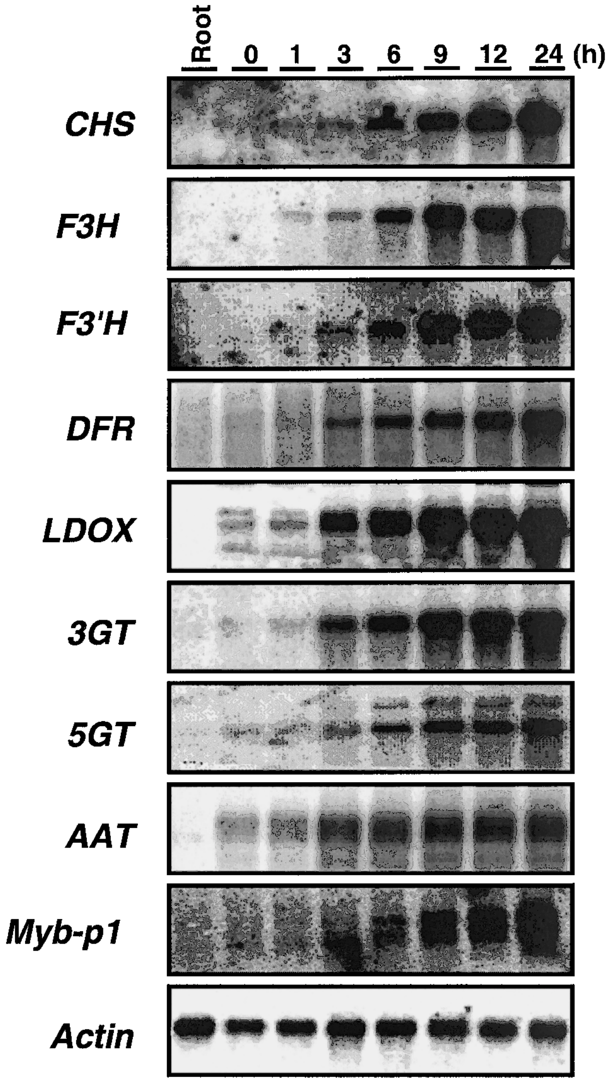


Fig. 5. Induction of Gene Expression by White Light Irradiation in Red Forma of *P. frutescens* var. *crispa*

Plants grown in weak light (<480 lux) for three weeks were illuminated with strong white light (14,000 lux) for 1, 3, 6, 9, 12 and 24 h. Poly(A)$^+$ RNA was isolated from leaves at each time point. The filter was hybridized with cDNA clones for *CHS, F3H, F3′H, DFR, 3GT, 5GT, AAT* and actin. Root, poly(A)$^+$RNA from roots of red form of *P. frutescens*.

た．アカジソとアオジソからそれぞれ抽出したmRNAを1塩基付加されたオリゴdTプライマーを用いてcDNAに逆転写し，これを鋳型として短い任意プライマーとオリゴdTプライマーの組合わせで［α-^{32}P］dCTPの存在下PCR増幅を行い，増幅産物をシークエンスゲルで電気泳動することにより展開し，オートラジオグラフィーを行った．そしてアカジソとアオジソのPCR産物を比較してアカジソ特異的に増幅されたDNA断片を切り出し，再びPCR増幅した後クローニングした．これらのフラグメントについてノーザン解析を行ってアカジソ

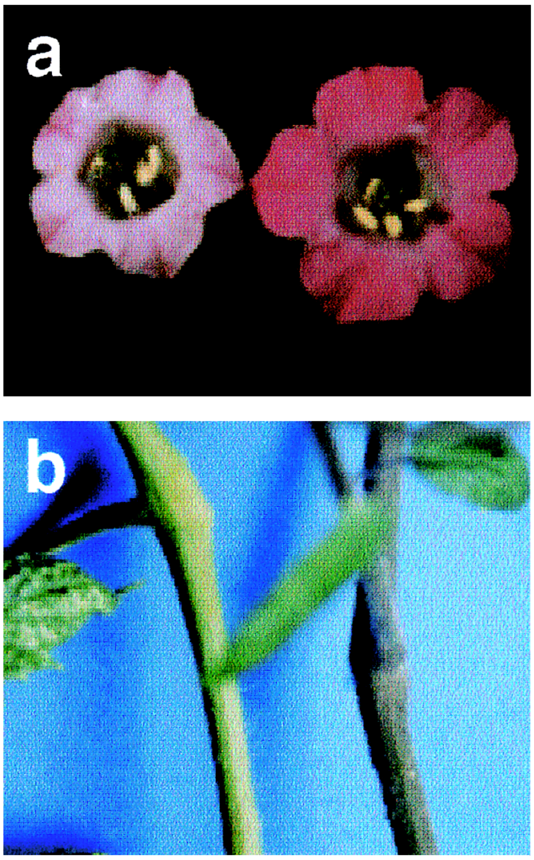


Fig. 6. Enhanced Anthocyanin Production in Trasgenic Plants Over-Expressing *Myc-rp*

a) flowers of normal and transgenic plants of *Nicotiana tabacum*, b) Stems of normal and transgenic plants of *Lycoperisicon esculentum*.

特異的発現を確認したものについてさらにアカジソcDNAライブラリーのスクリーニングを行った．

フラボノイド5-*O*-グルコシル転移酵素（5GT）は，アントシアニン分子の安定性，水溶性及び色調を決定する極めて重要な酵素である．長年多くの研究者が本酵素の生化学的精製を試みてきたがいずれも不成功に終わっていた．また，既に数種の植物から単離されているアントシアニジン3-*O*-グルコシル転移酵素(3GT)遺伝子をプローブとしたスクリーニングでも，5GT遺伝子は単離されなかった．本研究では，cDNAを単離することによって*5GT* cDNAを得た.[12] 大腸菌で発現させた組み換え5GTは，UDP-グルコースの存在下でアントシアニンの5位をグルコシル化する活性を有した．このグルコシル化には基質の3位がすでにグルコシル化されていることが必要であり，さらに3位のグルコシル基がアシル化を受けていると5GT活性が低下することが明らかになった．この結果から，植物細胞内で

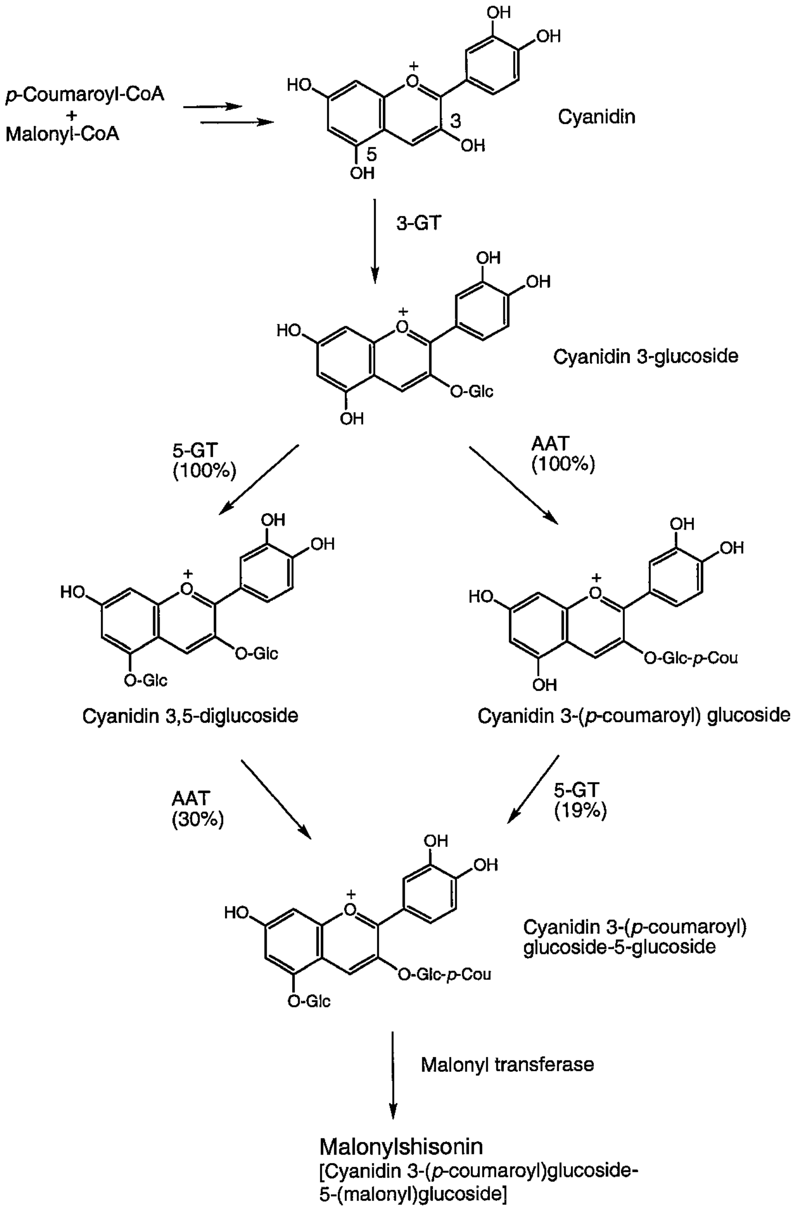


Fig. 7. The Postulated Late-Stage Pathway of Anthocyanin Biosynthesis in *P. frutescens* var. *crispa*

The numbers in parentheses indicate relative activities of the recombinant 5–GT and the acyltransferase in crude extracts of perilla red leaves reported by Matsune *et al.*[19]

は 5–*O*–グルコシル化と 3, 5 位のグルコシル基のアシル化について Fig. 7 の様な代謝グリッドが存在することが示唆された.[12,20] さらに，種によって基質特異性が異なることを明らかにした.[21,22]

また，アントシアニン生合成経路の内，無色のロイコシアニジンが有色のアントシアニジンに変換される反応はアントシアニンの発色段階として重要である．この反応を触媒する酵素はアントシアニジン合成酵素（ANS）であるが，その反応機構の詳細は不明であった．また，トランスポゾンタギングによりトウモロコシから *ANS* 遺伝子[23]が単離されて以来，ホモログ遺伝子が数種の植物から単離されていたが，酵素活性の不安定さからそれらにコードされるタンパク質の機能は確認されていなかった．そこで，シソの ANS 組換えタンパク質を用いて酵素化学的解析を行った.[24] シソ *ANS* cDNA を大腸菌で発現させて得た組み換えタンパク質を高濃度のジチオスレイトール存在下でロイコシアニジンとインキュベートすると，有色のアントシアニジンが生じた．この反応は，生成物と等モルの 2–オキソグル

(1) ANS + 2-oxoglutarate + O_2 +Fe ⟶ ANS=Fe=O +Succinate + CO_2

(2)

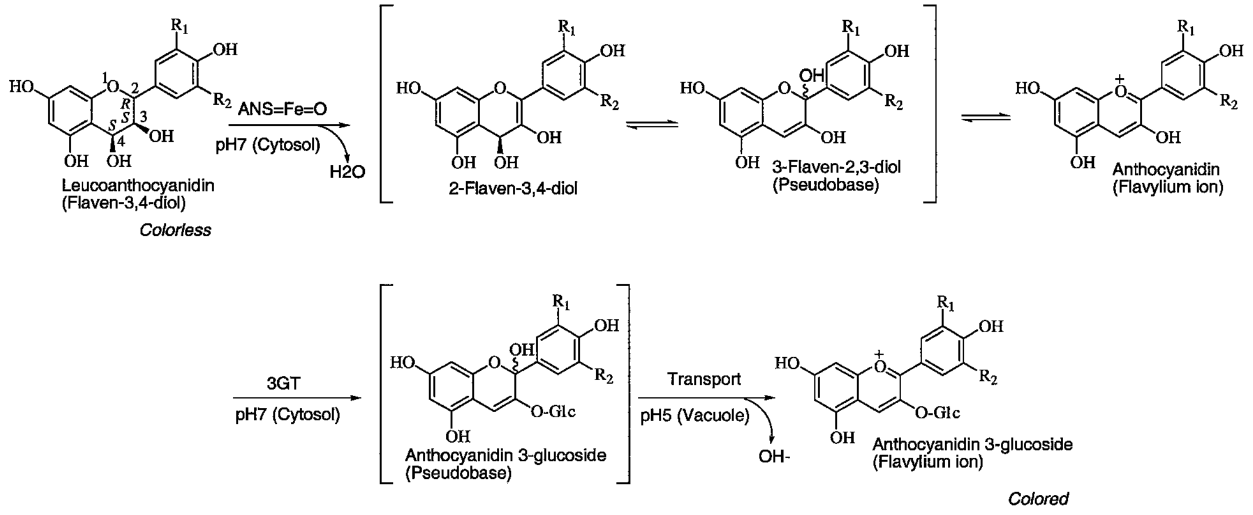


Fig. 8. Reaction Mechanism from Leucocyanidin to Anthocyanidin 3-*O*-Glucoside, Catalyzed by ANS and 3GT, and Transport into Vacuoles

タル酸を消費し，等モルの二酸化炭素が放出され，アスコルビン酸と2価の鉄イオンを必要とすることが明らかになった．このことからANSは2-オキソグルタル酸依存的に無色のロイコアントシアニジンを有色のアントシアニジンに変換する活性を有し，この反応は他に脱水酵素などを必要とせずANSタンパク質のみで進行することが明らかになり，世界で初めてその反応機構が解明された（Fig. 8）．さらに，複数の植物の*ANS* cDNAを大腸菌内で発現させて得た組み換えタンパク質を用いて酵素反応の詳細を明らかにした．[25,26]

このようにタンパク質レベルでの生化学的解析が難しかった生合成ステップについて，遺伝子からのアプローチを行い，得られた植物cDNAを大腸菌や酵母等の微生物で高発現させた組み換えタンパク質を用いることにより触媒反応機構を詳細に調べることに成功した．とくにアントシアニン生合成の後期過程に関与する2つの重要酵素の分子クローニングと反応機構を解明した．このように成分変種，組織等に特異的に発現する遺伝子に対する分子生物学的アプローチは今後，様々な植物二次代謝に応用され，それぞれの生合成経路の詳細が明らかにされることが期待される．

5. 含硫黄代謝産物の生産に関する分子細胞生物学

さらに細胞，組織レベルでの多様性を解析するため硫黄代謝系の分子細胞生物学的解析を行った．植物の硫黄同化系は，自然界の硫黄循環において無機硫黄が含硫黄有機化合物に変換される最も重要な生化学的ステップである．そこで，植物の硫黄同化に関与するシステイン合成酵素及びその前駆体セリン合成に関連するホスホセリンアミノ転移酵素について，それぞれをコードするcDNAを世界で初めて単離し，その機能と発現様式を組織化学的に解明した．[27,28] また，*in situ*ハイブリダイゼーション法により硫酸イオンの植物体への取込みに関与する細胞膜局在性の硫酸トランスポーター遺伝子の細胞特異的発現を解明した．[29] さらに，*Allium*属に特徴的な含硫黄香気成分の代謝分解に関与する酵素アリナーゼがシステイン合成酵素とともに維管束鞘に特異的に局在することを免疫組織化学的に初めて明らかにした．[30]

以上のように植物における硫黄代謝系の複数の重要ステップについての分子細胞生物学的解明に世界に先駆けて成功した．

6. 薬用植物への有用外来遺伝子の導入と発現（トランスジェニック植物の作出）

さらに本研究では，薬用植物に外来遺伝子を導入

して有用形質を付与したトランスジェニック薬用植物を得ることに成功している.[31—36] これらの基礎的な研究は将来の新薬用植物の生物工学的創出のために必要不可欠である.

7. おわりに

本研究では，植物における有用物質生産の化合物群，植物種・変種及び組織という様々なレベルでの多様性を分子生物学的な一般原理で解析した．これらの成果から，有用物質生産の制御機構に関する分子細胞レベルでの基礎的な知見が得られた．特に従来の生化学的アプローチでは得られなかった未知の新知見（新規生合成遺伝子，新規反応機構）を得，さらに新しい戦略（単一制御遺伝子の導入発現による複数ステップの生合成系の増強）による有用物質生産への応用に成功した.

以上のように植物における有用物質生産の多様性を生物有機化学・生化学・分子生物学及び分子遺伝学的手法を活用して解明しエンジニアリングする複合的研究を行ってきた．このような研究は，これまでに多くの薬用資源を生んだ「生物多様性」の根源的理解と天然資源の「持続可能な有効利用（sustainable utilization）」を展開するための新学問分野として必須である．さらに，これらの成果は将来分子育種等の能動的な新薬用資源の創出に応用できる.

ヒトゲノムのほぼ全塩基配列の解読が終了した．植物においてもモデル植物であるシロイヌナズナのゲノム解読が終了し，いよいよ本格的なポストゲノム世代に突入した．そして遺伝子機能を解明するファンクショナルゲノム学及び多様性を対象とする比較ゲノム学が可能となった．我々は，先人が蓄積してきた厖大な植物二次代謝の多様性に関する情報を詳細にかつ根源的に理解する術を漸く手に入れたのである.

謝辞　本研究を行うにあたり御指導と御支援を賜りました千葉大学薬学部　斉藤和季教授並びに村越　勇　名誉教授に厚く御礼申し上げます．また本研究に御協力いただいた多くの共同研究者の皆様に心より感謝いたします．なお，本研究の一部は，文部省科学研究費補助金による援助により行われたものであり，ここに御礼申し上げます.

REFERENCES

1) Yamazaki M., Sato A., Saito K., Murakoshi I., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1182–1184 (1993).
2) Yamazaki M., Murakoshi I., Saito K., ‘‘Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 26, Medicinal and Aromatic Plants VI,’’ ed. by Bajaj Y.P.S., Springer-Verlag, Berlin 1994, pp. 370–376.
3) Yokota-Hirai M., Suzuki H., Yamazaki M., Saito K., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1458–1461 (2000).
4) Yamazaki M., Sato A., Shimomura K., Saito K., Murakoshi I., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1529–1531 (1994).
5) Yamazaki M., Sato A., Shimomura K., Inoue K., Ebizuka Y., Murakoshi I., Saito K., *Natural Med.*, **49**, 488–490 (1995).
6) Hayashi H., Hosono N., Kondo M., Hiraoka N., Ikeshiro Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 782–783 (1998).
7) Watanabe A., Araki S., Kobari S., Sudo H., Tsuchida T., Uno T., Kosaka N., Shimomura K., Yamazaki M., Saito K., *Plant Cell Rep.*, **18**, 187–192 (1998).
8) Shirota O., Watanabe A., Yamazaki M., Saito K., Shibano K., Sekita S., Satake M., *Natural Med.*, **52**, 160–166 (1998).
9) Koezuka Y., Honda G., Tabata M., Phytochemistry **25**, 2085–2087 (1986).
10) Gong Z-Z., PhD thesis, Chiba University (1998).
11) Gong Z-Z., Yamazaki M., Sugiyama M., Tanaka Y., Saito K., *Plant Mol. Biol.*, **35**, 915–927 (1997).
12) Yamazaki M., Gong Z-Z., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Tanaka Y., Kusumi T., Saito K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 7405–7411 (1999).
13) Kitada C., Gong Z-Z., Tanaka Y., Yamazaki M., Saito K., Plant Cell Physiol., **42**, 131–137 (2001).
14) Yonekura-Sakakibara K., Tanaka Y., Fukuchi-Mizutani M., Fujiwara H., Fukui Y., Ashikari T., Murakami Y., Yamaguchi M., Kusumi T., *Plant Cell Physiol.*, **41**, 495–502 (2000).
15) Gong Z-Z., Yamagishi E. , Yamazaki M., Saito K., *Plant Mol. Biol.*, **41**, 33–44 (1999).
16) Gong Z-Z., Yamazaki M., Saito K., *Plant*

Biotech., **17**, 309–314 (2000).
17) Gong Z-Z., Yamazaki M., Saito K., *Mol. Gen. Genet*., **262**, 65–72 (1999).
18) Liang P., Pardee A. B., *Science*, **257**, 967–970 (1992).
19) Yamazaki M., Gong Z-Z., Saito K., ''PERILLA The Genus Perilla,'' ed. by Yu H.-C., Kosuna K., Haga M., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997, pp. 143–148.
20) Matsune T., Koike A., Kato K., Kawanobu S., Ino I., Yamaguchi M., *Engeigaku Zasshi*, **66**, 92–93 (1997).
21) Yamagishi E., Gong Z-Z., Yamazaki M., Saito K., *Plant Physiol*., **118**, 1102 (1998).
22) Yamazaki M., Yamagishi E., Gong Z-Z., Fukuchi–Mizutani M., Fukui Y., Tanaka Y., Kusumi T., Yamaguchi M., Saito K., Plant Mol. Biol., in press (2001).
23) Messen A., Hohmann S., Martin W., Schnable P. S., Peterson P. A., Saeler H., Giel A., *EMBO J*., **9**, 3051–3057 (1990).
24) Saito K., Kobayashi M., Gong Z-Z., Tanaka Y., Yamazaki M., *Plant J*., **17**, 181–190 (1999).
25) Nakajima J., Tanaka Y., Yamazaki M., Saito K., *Plant Biotech*., **17**, 331–335 (2000).
26) Nakajima J., Tanaka Y., Yamazaki M., and Saito K., *J. Biol. Chem*., **276**, 25797–25803 (2001).
27) Saito K., Miura N., Yamazaki M., Hirano H., Murakoshi I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*., **89**, 8078–8082 (1992).
28) Ho C.-L., Noji M., Saito M., Yamazaki M., Saito K., *Plant J*., **16**, 443–452 (1998).
29) Takahashi H., Yamazaki M., Sasakura N., Watanabe A., Leustek T., de Almeida Engler J., Engler G., Van Montagu M., Saito K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*., **94**, 11102–11107 (1997).
30) Manabe T., Hasumi A., Sugiyama M., Yamazaki M., Saito K., *Eur. J. Biochem*., **257**, 21–30 (1998).
31) Saito K., Yamazaki M., Anzai H., Yoneyama K. and Murakoshi I., *Plant Cell Rep*., **11**, 219–224 (1992).
32) Yamazaki M., Son L., Hayashi T., Morita N., Asamizu T., Murakoshi I., Saito K., *Plant Cell Rep*., **15**, 317–321 (1996).
33) Yamazaki M., Kobayashi M., Saito K., *Plant Biotechnology*, **14**, 169–173 (1997).
34) Saito K., Yamazaki M., *Gene*, **47**, 60–65 (1993).
35) Yamazaki M., Saito K., ''Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 36, Somaclonal Variation in Crop Improvement II,'' ed. by Bajaj Y.P.S., Springer-Verlag, Berlin 1996, pp. 241–249.
36) Yamazaki M., *Pharmacia*, **32**, 666–669 (1996).