

樹木の遺伝子工学*

酒井 富久美**

Gene Engineering of Woody Plants*

Fukumi SAKAI**

(平成7年8月31日受理)

1. はじめに

21世紀を間近に控え、生物資源の重要性が一段と高まるなかで、樹木は利用価値の大きい生物資源として見直されつつある。従来の樹木に新たな特性を付与することができれば、より利用度の高いものになる。樹木の育種は古くから行われてきているが、その一世代が長く、これまでの交雑と選抜による育種では、形質の改良を達成するまでに年月がかかり過ぎる。近年脚光を浴びている遺伝子組換えを行えば、どうであろうか。交雑も遺伝子の組換えには違いないが、ここでいう遺伝子組換えとは試験管の中で遺伝子を切ったり繋いだり、人工的に組換えることをさす。これは遺伝子工学と呼ばれるが、これを使えば改良を行いたい形質に的を絞って計画的に形質の改良を行うことが可能になり、効率よく短期間で育種を行い得るものと期待される。この基本技術は微生物を対象にして進展してきたが、次第に高等生物の分野へ応用され、草本植物のイネやトマトなど多くの農作物へ微生物の遺伝子を組み込み、耐病性や高品質のものへと形質の改良が図られるようになってきている。

組換え手法を応用するには、1) 目的とする形質に対応する遺伝子、2) その遺伝子を樹木へ導入する方法、3) 新たな遺伝子を受け取る樹木の三要素について考えなければならない。この2)と3)は併せて宿主・ベクター系と呼ばれている。交雑は同種あるいは近縁種の間でしか生じないのに対して、遺伝子組換えはどのような生物から単離した遺伝子間であっても行うことは可能である。バクテリアの遺伝子を樹木の遺伝子へ組換えることができる。実際に、これまでのところ導入された目的遺伝子の大部分は細菌やウイルス由来のものである。これは樹木遺伝子に関する研究がまだ少なく、それらを利用できる段階に至っていないことにも起因している¹⁾。以下に木本植物である樹木における遺伝子工学分野の研究の現状について述べる。

* 本報の内容は、第51回木研公開講演会（平成7年5月19日、宇治）において発表した。

** 遺伝子発現分野（Laboratory of Gene Expression）

Key words: Woody plants, Transformation, DNA cloning, Gene transfer, Electroporation

2. 樹木の遺伝子

1) 遺伝子の単離

樹木の遺伝子を単離し、解析する研究は1980年代の終わり頃から盛んになった。現在までに、単離されたおもな樹木遺伝子を表1に示す。マツの光合成に関与する遺伝子²⁾やポプラのセルラーゼ遺伝子³⁾などの樹木の生産性に関連する遺伝子が単離された。また、ペルオキシダーゼ⁴⁾、O-メチルトランスフェラーゼ⁵⁾、フェニールアラニンアンモニリアーゼ^{6),7)}、桂皮アルコール脱水素酵素⁸⁾⁻¹⁰⁾など木質成分の一つであるリグニンの生合成系に働く酵素遺伝子が単離されている。その他、レクチン¹¹⁾のような貯蔵蛋白質の遺伝子やキチナーゼ¹²⁾のような傷害・病害誘導性蛋白質の遺伝子も得られている。木本植物では草本植物に比べると遺伝子の単離は容易でない。細胞壁が固い。細胞一個あたりに含まれる核DNAの大きさは木本と草本植物の間で差は余り見られないが、広葉樹より針葉樹の方が概して大きい(図1)。しかしながら、このDNAのサイズが単純に遺伝情報の量を示すものではない。ウイルスや大腸菌に比べると高等動物のもつ遺伝子の数、遺伝情報量は間違いなく多いと考えられるが、アカマツがポプラより多くの遺伝子を有しているとは必ずしもいえない。それはイモリがヒトより大きいサイズのDNAを持っていることからわかる。ヒトのDNAでさえ、酵素や抗体等をコードする実際の遺伝子の数は約5万個と推定され、それが占める部分はDNA全体の10%にも満たない。残りは繰返し配列などの今のところ意味をもたない部

表1 単離された樹木遺伝子

樹木名	遺伝子
針葉樹	
クロマツ	光化学系I集光性葉緑素蛋白質, RuBisCo(リブロースリン酸カルボキシルゼ)
カラマツ	RuBisCoの大サブユニット蛋白質
スコツツマツ	光化学系I及びIIの集光性葉緑素蛋白質, スルホン合成酵素
ビーチマツ	葉緑素合成関連酵素, 光化学系II反応中心蛋白質, アカチ
モミ	RuBisCoの大サブユニット蛋白質
テダマツ	桂皮アルコール脱水素酵素, フェニールアラニンアンモニリアーゼ
ドイツトウヒ	桂皮アルコール脱水素酵素,
広葉樹	
ポプラ	
ギンドロ	エンド-1,4-β-グルコナーゼ
アメリカヤマナラシ	O-メチルトランスフェラーゼ
ハイブリッドヤマナラシ	酸性ペルオキシダーゼ, フェニールアンモニリアーゼ
セイヨウバalsa	キチナーゼ, リンゴ酸酵素
ハイブリッド	キチナーゼ, リンゴ酸酵素, トリプソインヒビター
パラゴムノキ	RuBisCoの小サブユニット蛋白質, ヘパイン
ユーカリ	桂皮アルコール脱水素酵素
ニセアカシヤ	レクチン

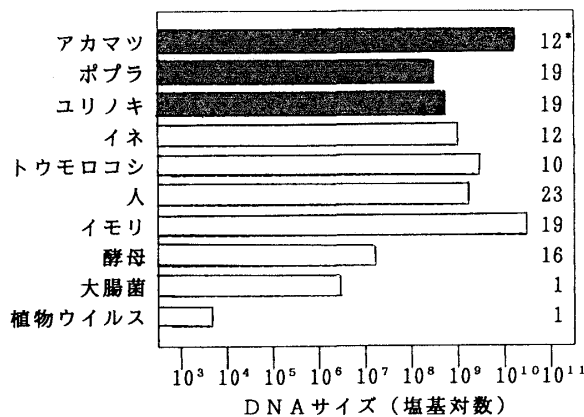


図1 半数体の細胞一個当りのDNAサイズと染色体数*

酒井：樹木の遺伝子工学

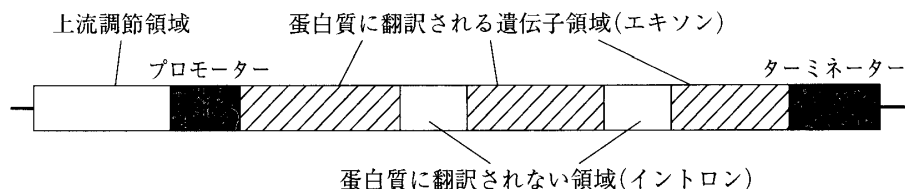


図2 樹木細胞核遺伝子の基本的構成

分である。従って、針葉樹のDNAは広葉樹のそれに比べて、遺伝子以外の領域を多く保有しているものと考えられる。

2) 樹木の遺伝子構成と PCR (Polymerase Chain Reaction)

遺伝情報はDNAからRNAへ伝達され(転写)、さらに蛋白質として発現される(翻訳)。従来遺伝子の単離はこの逆の流れ、すなわち、翻訳された蛋白質を基にそのRNAを調製し、遺伝子DNAを単離した(クローニング)。表1に示した遺伝子の大部分はこの手順によるものである。通常、樹木のような真核生物の核ゲノム遺伝子は、蛋白質に翻訳される領域(エキソン)と翻訳されない領域(イントロン)および前後の転写調節領域(プロモーター、ターミネーター)で構成されている(図2)。蛋白質を基に遺伝子をクローニング、すなわち、cDNA(complementary DNA)ライブラリーから取出せば、イントロンを含まないエキソン部分だけになる。一方、ゲノムDNAから遺伝子をクローニングすれば、イントロンや転写調節領域も併せて得られる。最近ではPCRによってゲノムDNAから直接遺伝子を得ることができる⁴⁾。遺伝子は細胞内ではDNAポリメラーゼによって高速度で合成され、その速度は大腸菌で1500塩基対/秒、真核細胞で10~100塩基対/秒と推定されている。生体内のこの酵素反応を試験管の中で行うのがPCR法である。DNAポリメラーゼは好熱細菌由来で、95℃でも失活しないものが用いられる。試験管内反応では鋳型DNAの熱変性ステップがあるので、耐熱性が要求される。ポリメラーゼ反応は20塩基程度のオリゴヌクレオチドプライマーが必要で、これは既に単離されている他の生物種の遺伝子とのホモロジーから化学合成を行って用いる。多くの遺伝子は生物進化を経ても、なおよく保存された部分が存在している。この試験管内反応は生体内反応ほど速くはないが、マイコンで正確に制御された反応装置を用いれば、2~3時間のうちに鋳型一個から10万個以上の遺伝子コピーを作り出すことが可能である。

3) PCRによる樹木細胞核からの直接遺伝子単離

PCR法を用いてポプラ(*Populus alba*)細胞核からの遺伝子の単離が試みられた¹³⁾。遺伝子としてはリボソームRNA(rRNA)の構成成分である5S rRNAの遺伝子をターゲットにした。この遺伝子はサイズが小さく(約120塩基対)、ゲノム中に多くのコピー数を含み、その塩基配列は生物間で極めてよく保存されているので、単離が容易である。プライマーはすでに報告されたイネ、オオムギなどの塩基配列をもとにデザインしたオリゴヌクレオチドが用いられ、鋳型にはポプラの分離核をデタージェント存在下で蛋白質分解酵素で処理した試料が直接用いられた。PCRの結果、計算上一個の核由来の鋳型を用いても十分量の5S rRNA遺伝子が得られ、そのプライマー領域を除く塩基配列は他の植物のものと高いホモロジーを示すことが明らかになった(表2)。また、同じ手法を用いて、ユリノキ(*Liriodendron tulipifera*)の葉肉細胞核から直接5S rRNA遺伝子を単離することにも成功した¹⁴⁾。

4) PCRによる染色体微細断片からの直接遺伝子単離

遺伝子DNAは塩基性蛋白質ヒストンと結合してクロマチンを形成し、染色体を構成する。樹木のような真核生物の細胞分裂中期の核内において染色体を明確に見ることができる。この染色体を顕微鏡下で微細断片化し、特定領域を含む断片を鋳型にしてPCRを行えば、遺伝子単離の効率を高められる。たとえば、アカマツのゲノムサイズは 10^{10} の塩基対であるが、核一個は12対の染色体を含むので(図1)、そのうちの

一対を選びだせれば、10⁹オーダーまで下げられ、さらに、その一本を10個の微細断片にすれば、断片一個は10⁸塩基対まで小さくなったことになる。このような染色体への微細加工を施すには各染色体を識別できなければならないが、樹木ではまだ十分ではない。識別が容易なオオムギの場合でみると、7対14本ある染色体の第6番目の特定領域を、小さく集光したレーザー光を用いて、顕微鏡下で切出すことが可能である(図3)¹⁵⁾。その染色体断片一個を鋳型にして、先に述べた細胞核と同様のPCR法により特定の遺伝子が単離できた(図4)¹⁶⁾。しかし、シーケンスが未知の場合、図5のようにして適当な制限酵素で染色体断片を切断した後、プライマー部位が形成されるようにデザインしたプライマー・リンカーを連結することによってPCR法で遺伝子が増幅でき、これは特定染色体部位の遺伝子ライブラリーとなる。このことは遺伝子が単離できると同時に染色体上の遺伝子の位置についての情報を得ることを意味する。最近、木本植物の染色体へも応用できるようになってきた¹⁷⁾。

表2 PCRにより直接単離したポプラ 5S rRNA コード領域塩基配列と既報の他植物種のデータとの比較

	1	21	41
ポプラ	5'----(プライマー 部位)---	TAATGCACCGGATCCCATCA	GAATCCGCAGTTAAACGTG
ラジアータマツ	GGGTGCGATCATACCAGCGT	*****	*****G**C*
メタセコイア	GGGTGCGATCATACCAGCTC	*G*****	*****G**C*
イチヨウ	GGGTGCGATCATACCAGCTC	*****	*****G*AC*
トマト	GGATGCGATCATACCAGCAC	*****	*****A*****G***
エンドウ	AGGTGCGATCATACCAGCAC	*****	*****G***
イネ	GGATGCGATCATACCAGCAC	***A*****	*****A*****G***
オオムギ	GGATGCGATCATACCAGCAC	***AT*****	*****A*****G***
コムギ	GGATGCGATCATACCAGCAC	***A*****	*****A*****G***
	61	81	101 120
ポプラ	CTTGGGCGAGAGTAGTACTA	GGATGGGTGACCTCCTGGGA	----(プライマー 部位)---
ラジアータマツ	*****T*****G	*****C****	AGTCCTAGTGTTCACCCCTC
メタセコイア	*****CG*****G	*****C****	AGTCCCGGTATTGCACCCTT
イチヨウ	*****TG*****	*****	AGTCCAGTGTTCACCCCTC
トマト	*****	*****C*****	AGTCCTCGTGTTCATCCCT
エンドウ	*****	*****	AGTCCTTGTGTTCACCTCT
イネ	*****	*****	AGTCCTTGTGTTCATCCCT
オオムギ	*****T*****	*****	AGTCCTCGTGTTCATCCCT
コムギ	*****	*****	AGTCCTCGTGTTCATCCCT

* ポプラと同じ塩基を示す。プライマーにはオオムギの両末端配列を用いた。

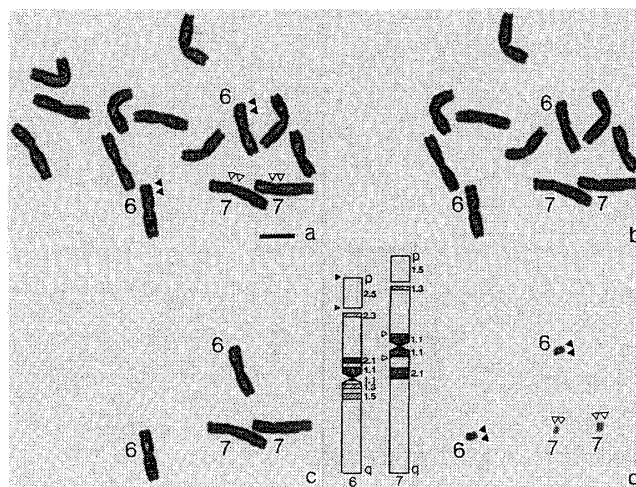


図3 レーザー光による染色体微細加工¹⁵⁾
 (オオムギの染色体7対をa, b, c, dの順序で焼却・切断・除去して特定微細断片とする。バーは5 μm)

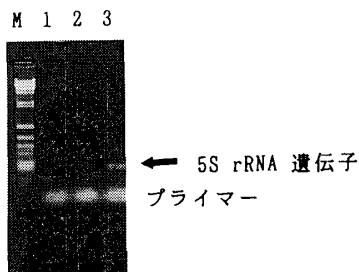


図4 染色体断片を鋳型にした PCR 産物のゲル電気泳動図

- 1：染色体なし
- 2：染色体断片 1 対
- 3：染色体断片 10 対
- M：分子サイズマーカー

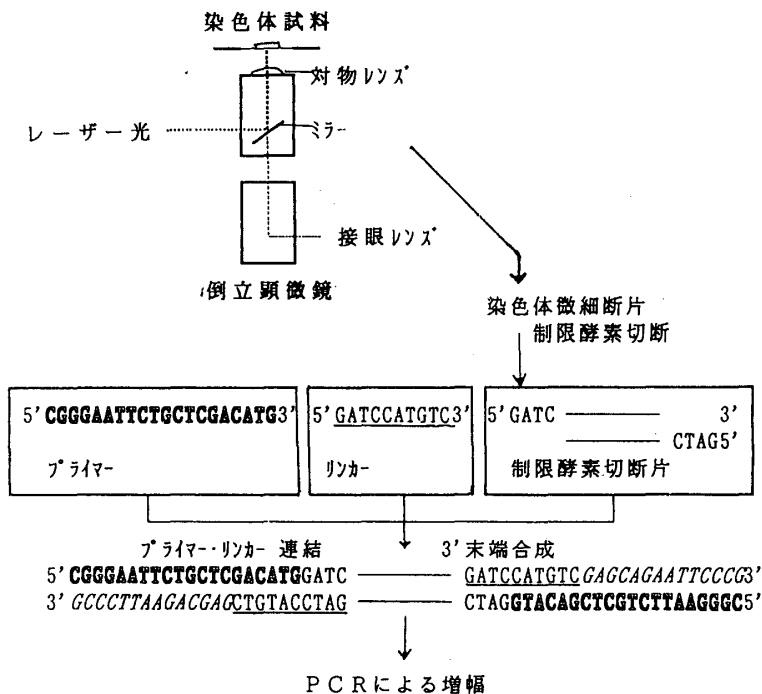


図5 レーザー光切断した染色体微細断片の制限酵素処理と PCR による特定部位ゲノムライブラリーの作成

3. 樹木の宿主・ベクター系

1) 遺伝子導入のための樹木プロトプラスト

生物は数多くの細胞で構成されている。ヒトは6千億個、樹木の葉一枚でさえ約一億個の細胞から成っていると推定される。植物の細胞は動物のそれと異なり、厚い細胞壁でおおわれている。木本植物の細胞壁は特に強固で、遺伝子のような高分子物質を容易に通さない。目的とする遺伝子を効果的に細胞内あるいは核内へ入れるために、細胞壁を取り除く必要がある。細胞壁のない「はだかの細胞」はプロトプラストと呼ばれ、遺伝子工学における宿主細胞として有用な素材となる。細胞間を接着しているペクチン質を

溶かすベクチナーゼと、細胞壁主成分であるセルロースを溶かすセルラーゼの二種類の市販酵素を植物組織に作用させるとプロトプラストは調製できる。現在までに多くの樹木の種々の組織、器官、カルス、培養細胞からプロトプラストがえられている。収率10%に見積もっても、一枚の葉から約一千万個のプロトプラストが得られることになる。プロトプラストは基本的に全能性を有しており、ポプラ、カラマツ、ユーカリ、ユリノキ、ニレ、ビャクダン、ハリモミ、キリ、コウゾウなどの樹種では、培養により完全な個体にまでなっている。従って、プロトプラストの段階で遺伝的な変異を与えることによって、新形質を有する樹木の創製へと進展する。また、プロトプラスト実験系のもう一つの長所は同時に多数の細胞を扱うことができ、それらを一集団として数量的に分析できるところにある。

2) 遺伝子導入による樹木の形質転換

表3にこれまでに行われた樹木への遺伝子導入実験の主なものをまとめた。ポプラではプロトプラストを用いず、葉や茎片に植物の腫瘍細菌であるアグロバクテリウムを感染させるか、あるいはカルス細胞へ遺伝子を金粒子とともに高速で機械的に打ち込むパーティクルガン法で除草剤耐性ポプラ¹⁸⁾、¹⁹⁾や虫害耐性ポプラ²⁰⁾が創製された。アグロバクテリウム法は目的遺伝子をプラスミド中へ組換えたアグロバクテリウムを宿主植物へ接種し、菌がもつ宿主染色体への組込み能を利用して遺伝子導入を行う方法で、単子葉植物以外の多くの植物に適用されている。現在、病原性を欠落させた菌株 LBA4404 が形質転換用に市販されており、容易に入手して使用できる(病原性が無いので輸入禁止菌から除外され、一般細菌として取り扱える)。T-DNA の領域が植物細胞内へ移行するために必要な Ti プラスミドの Vir 領域は、バイナリーベクターとして別のプラスミド上に保有され、T-DNA 領域は図6のように、選択マーカーのカナマイシン耐性遺伝子 (NPTII) と共に、 β -グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) がリポーター遺伝子として組換えられている。GUS の代わりに目的遺伝子を組換えることにより容易に使用できる(図6)。NPTII の代わりに、ハイグロマイシン耐性遺伝子が用いられることがあり、GUS の代わりに、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子やホタルのルシフェラーゼ遺伝子が用いられることもある。先に述べたように、樹木の核遺伝子はエクソンとイントロンで構成され、その上流および下流領域にそれぞれ真核型のプロモーターおよびターミネーターと呼ばれる発現調節領域が存在する(図2)。導入した遺伝子を発現させるには、プロモーター・遺伝子・ターミネーターという分子構成を最低限必要とする。アグロバクテリウム法の場合は、さらにその両端に T-DNA 左右境界領域を付加して、植物染色体中へ目的遺伝子が組込まれるように組換え DNA 分子を構築する(図6)。

表3 樹木への遺伝子導入

樹木名	導入遺伝子産物*	遺伝子の由来	導入系**	形質転換産物
針葉樹				
ハリモミ	CAT, GUS	大腸菌	PP:EP 法	実験系
トゲサワラ, テーグマツ	LUC	ホタル	PP:EP 法	実験系
ハンクスマツ	CAT	大腸菌	PP:EP 法	実験系
トウヒ	CAT	大腸菌	PP:EP 法	実験系
広葉樹				
ポプラ	EPSPS	サルモネラ菌	葉片:AB 法	除草剤耐性ポプラ
ポプラ	BT	バチルス菌	カルス:PG法	害耐性ポプラ
ポプラ	PTAT	放線菌	茎片:AB 法	除草剤耐性ポプラ
ハンキ	GUS	大腸菌	PP:EP 法	実験系
ユーカリ	GUS	大腸菌	PP:EP 法	実験系
ユリノキ	GUS	大腸菌	カルス:PG法	実験系

* CAT;クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ, GUS; β -グルクロニダーゼ, LUC;ルシフェラーゼ, EPSPS;エノールピルビルツキミ酸シンターゼ, BT;バチルスチオリジゲンス菌の産生する殺虫性毒素, PTAT;フォスフィノリジンアセチルトランスフェラーゼ

** PP:EP 法;プロトプラストヘレクトロポレーションにより導入, 葉片(茎片):AG 法;葉(茎)の切片にアグロバクテリウムを接種しTiプラスミドベクターにより導入, カルス:PG法;カルスや培養細胞へパーティクルガンを用いて導入

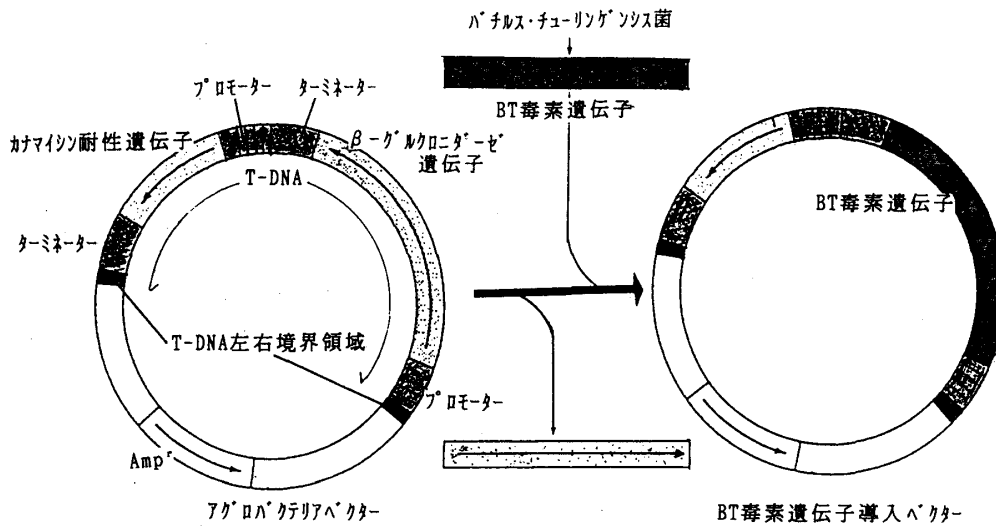


図6 アグロバクテリウム法に用いる基本ベクター（左）と目的遺伝子を組換えたベクター（右）

3) エレクトロポレーションによる遺伝子直接導入

針葉樹の場合はアグロバクテリウムによる感染が容易でないことから、これまで主としてエレクトロポレーション法で行われてきた（表3）。プロモーター・遺伝子・ターミネーターからなる組換え DNA 分子を、電気パルスで生じたプロトプラストの微細孔から直接導入する。T-DNA 左右境界領域は必要としない。筆者らは遺伝子発現の効率を高めるよう、プロモーターの前にエンハンサーを連結した GUS 発現プラスミドベクターを、樹木への遺伝子導入実験のモデル遺伝子として用いている（図7）。このエンハンサーはカリフラワーモザイクウイルス35S プロモーターの上流域327塩基対（-417~-90）で、5~10倍発現効率が上がる²¹⁾。図8はポプラプロトプラストへの GUS 遺伝子導入の概略を示した。電極間が4 mm の小さいエレクトロポレーションチャンバーにプロトプラストと目的遺伝子を入れ、800 V/cm の高圧電流を瞬間的に流すとプロトプラスト原形質膜に極微細な孔があき、周囲の DNA 溶液が侵入する。孔は短時間のうちに修復され、遺伝子は細胞核内へ取込まれ、一部は染色体へ組込まれることになる。最適な電圧は細胞の大きさ、原形質膜の強度、溶液のイオン強度などで異なるため、導入遺伝子の発現量や細胞生存率を検討して決める（図9）²²⁾。一般的に細胞が小さい程高い電圧が必要で、大腸菌のように小さいと1万 V/cm 近いものが必要となる。

4. 樹木の形質改良戦略

目的遺伝子が単離され、遺伝子導入のシステム（樹木の宿主・ベクター系）が開発されれば、遺伝子工学により樹木の形質をよりよいものにする戦略は二つある。一つは目的遺伝子を導入し、その遺伝情報を発現させる方法で、たとえば、ポプラで試みられたように除草剤に耐性の酵素を作る遺伝子を導入し、除草剤耐性を付与したり^{18), 19)}、昆虫に対して殺虫活性をもつ蛋白質を作る BT 毒素遺伝子を組換え、耐虫性ポプラを作出する²⁰⁾ケースである。もう一つは、最近盛んに行われはじめたアンチセンス遺伝子を導入する方法である（図10）。これは障害になる形質を取り除くやり方で、たとえば、リグニンはパルプを得るとき障害になるが、リグニンの生合成に関与する酵素を産生できなくする、すなわち、その酵素遺伝子を破壊すればよい。しかし、遺伝子それ自身を直接壊すのではなく、その逆向きの遺伝子（アンチセンス遺伝子）を組換えて導入する。そうすると、DNA から RNA への転写は RNA 合成酵素によって DNA 二本鎖の片方のみを一方方向に行われるだけであるので、アンチセンス遺伝子の転写で作られた RNA が、真の酵素遺伝

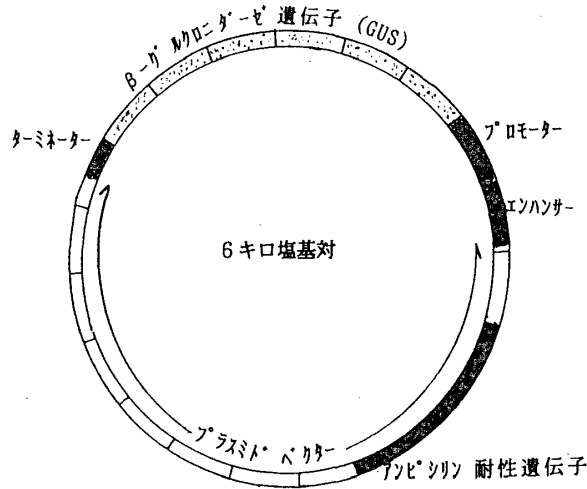


図7 GUS 遺伝子を連結したエレクトロポレーション用
発現ベクター

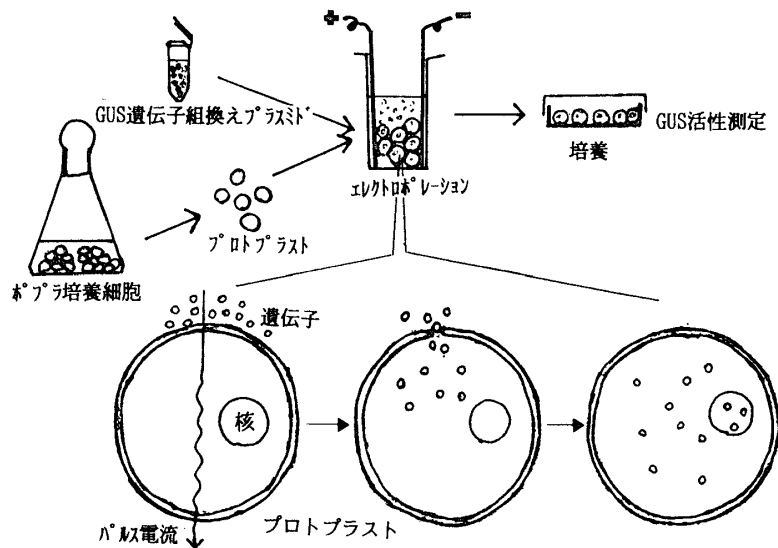


図8 エレクトロポレーションによるポプラ細胞へのβ-グルクロニ
ダーゼ遺伝子 (GUS) の導入

子の転写で作られたメッセンジャー RNA (mRNA) と細胞内で対合分子を形成し、酵素遺伝子の情報発現を阻止することになる。その結果、リグニンが蓄積されないか、あるいは蓄積量が減少するものと予測される。すでに、ポプラのリグニン生合成過程に関与するところの酵素のアンチセンス遺伝子が、アグロバクテリウム法を用いてポプラへ導入された²³⁾。得られた形質転換ポプラのうち、パーオキシダーゼアンチセンス遺伝子によるものは、パーオキシダーゼ活性の抑制および形態的異常が見られた。酵素活性抑制の程度は個体により異なり、80%以上抑制するものがあった。また、抑制効果はアンチセンス分子鎖を短くすると低下した。この結果は、アンチセンス戦略を展開していけば樹木の木質化過程を制御することも可能であることを示唆した²³⁾。一方、桂皮アルコール脱水素酵素のアンチセンスを使った同様の研究結果では、形質転換体の形態的变化は見られないが、リグニン含量の変化も見られず、何らかのバイパスによる代謝が生じているものと推測されている²⁴⁾。

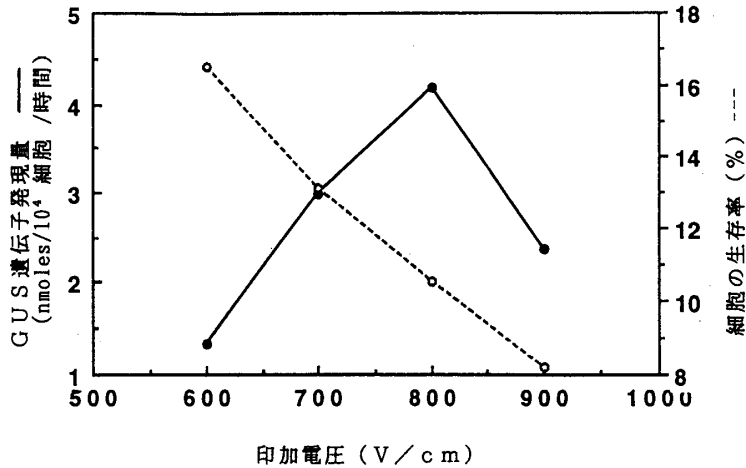


図9 エレクトロポレーションにおける電界強度と GUS 遺伝子発現量の関係²²⁾

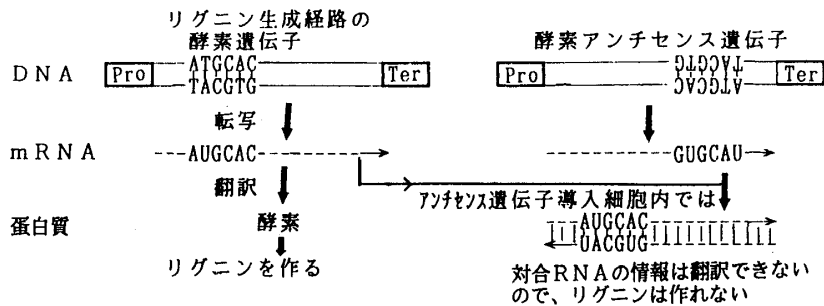


図10 アンチセンス遺伝子導入による障害形質の除去

DNA では A と T, G と C, RNA では A と U, G と C が水素結合による塩基対を形成。Pro: プロモーター, Ter: ターミネーター

5. おわりに

遺伝子工学の手法により樹木の形質改良を行うには、目的とする組換え遺伝子が樹木細胞内において効果的に機能しなければならない。すなわち、その遺伝子発現を自由に制御することが重要である。単離された遺伝子が樹木の生長や木質形成の過程でどのように機能するのか、樹木の分子生物学分野のより詳細な研究結果が要求される。ここに述べたのは、主として核ゲノムに関するものであるが、樹木細胞は核ゲノム以外に原核生物型の構造と情報伝達様式の葉緑体ゲノムおよびミトコンドリアゲノムを併せもっている。光合成を考えると、これらのゲノムの遺伝子操作は取分け重要であるが、葉緑体への遺伝子導入は植物全般をみても殆ど成功していない。樹木の遺伝子に関する研究は始まったばかりであるが、植物全般をみれば発生、分化、生長などの生命現象が遺伝子レベルで急速に解明されつつある。これらの研究成果はやがて遺伝子組換え技術を利用した樹木の形質改良を可能にし、高セルロース・低リグニン樹木、高生長樹木など新しい木質資源の創製、耐病虫害性や耐旱性などの環境保全に役立つストレス耐性樹木の作出をもたらす。

文 献

- 1) 山本直樹：木材学会誌, 38(7), 621-628 (1992)
- 2) N.Yamamoto, M.Matsuoka, Y.Kano-Murakami, Y.Tanaka and Y.Ohashi: *Nucleic Acids Res.*, 16(24), 11829-11830 (1988)
- 3) S.Nakamura: The doctoral thesis (1994, Kyoto Univ.)
- 4) S.Kawai, Y.Matsumoto, S.Kajita, K.Yamada, Y.Katayama and N.Morohoshi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(1), 131-133 (1993)
- 5) R.Bogos, V.Chaing and W.Campbell: *Plant Mol.Biol.*, 17(6), 1203-1215 (1991)
- 6) R.W.Whetten and R.R.Sederoff: *Plant Physiol.*, 98, 380-386 (1992)
- 7) Y.Osakabe, Y.Ohtsubo, S.Kawai, Y.Katayama and N.Morohoshi: *Plant Sci.*, 105, 217-226 (1995)
- 8) D.M.O'Malley, S.Porter and R.R.Sederoff: *Plant Physiol.*, 98(4), 1364-1371 (1992)
- 9) T.Hibino, J-Q.Chen, D.Shibata and T.Higuchi: *ibid.*, 104, 305-306 (1994)
- 10) H.Galliano, M.Cabane, C.Eckerskorn, F.Lottspeich, H.Sandermann and D.Erust: *Plant Mol.Biol.*, 23, 145-156 (1993)
- 11) K.Kusui, K.Yamamoto, Y.Konami and T.Osawa: *J.Biochem.*, 109(6), 899-903 (1991)
- 12) T.J.Parsons, H.D.Bradshaw, Jr. and M.P.Gordon: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 86(20) 7895-7899 (1989)
- 13) 林貴久子, 獅山慈孝, 黒田宏之, 林隆久, 酒井富久美：日本木材学会40周年記念大会 要旨集, p2 (1995年, 東京)
- 14) 林貴久子, 酒井富久美：未発表
- 15) K.Fukui, M.Minezawa, Y.Kamisugi, T.Yanagisawa, M.Fujishita and F.Sakai: *Theor. Appl.Genet.*, 84, 787-791 (1992)
- 16) 酒井富久美, 神杉泰子, 藤下まり子, 峰沢満, 福井希一：日本農芸化学会大会要旨集 p254, (1993年, 仙台)
- 17) 中村未樹, 長野克也, 戸田義広, 神杉泰子, 酒井富久美, 西口正通, 福井希一：日本分子生物学会年会要旨集, p397 (1993年, 千葉)
- 18) J.A.Fillatti, J.Sellmer, B.McCown, B.Haissig and L.Comai: *Mol.Gen.Genet.*, 206(2), 192-199 (1987)
- 19) M.DeBlock: *Plant Physiol.*, 93,1110-1116 (1990)
- 20) B.H.McCown, D.E.McCabe, D.R.Russell, D.J.Robison and K.F.Raffa: *Plant Cell Rep.*, 9, 590-594 (1991)
- 21) M.Ishikawa, K.Harada, F.Sakai, Y.Ohashi and T.Naito: *Japan J.Breed.*, 43, 53-60 (1993)
- 22) 喬景波, 黒田宏之, 林隆久, 酒井富久美：日本木材学会40周年記念大会要旨集, p1 (1995, 東京)
- 23) 片山義博：木材学会誌, 40(8), 785-794 (1994)
- 24) T.Higuchi, T.Ito, T.Umezawa, T.Hibino and D.Shibata: *J.Biotech.*, 37, 151-158 (1994)