

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06034

研究課題名(和文)シクラメン特有の花色素発現のメカニズムとその花色への影響

研究課題名(英文) Mechanism of flower pigmentation specific to cyclamen and its effects on the flower coloration

研究代表者

高村 武二郎 (Takamura, Takejiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：40253257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： アプリコット色花シクラメンでは、花弁表皮において赤紫色と黄色の細胞とが混在してアプリコット色を呈していることが明らかになった。

赤色花シクラメン花弁に特有のペオニジン3位のラムノシル化によるペオニジン3ネオヘスペリドシド(Pn3Nh)の生成は顕性形質であることが明らかになった。また、そのラムノシル化酵素に基質特異性があることも示唆された。さらに、赤色花品種‘Largo’の突然変異により得られた濃赤紫色花系統および暗赤色花系統は、花弁スリップ部分にPn3Nhではなくマルビジン3グルコシドを多量に集積していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、シクラメンのアプリコット色花品種の育成に寄与するだけでなく、カルコンを花色素として含有する花きの育種に有用な知見である。また、シクラメン特有のネオヘスペリド型アントシアニンの遺伝性や配糖体酵素の基質特異性、および赤色花品種からの特異的な変異体の花色素構成の解明は、シクラメンの花色素育種だけではなく、花き全体の花色素育種の進展に貢献できるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)： Reddish-purple and yellow cells in the petal epidermis of apricot-flowered cyclamen indicated mixed distribution, giving the apricot color.

The results of this study suggested peonidin 3-O-neohesperidoside (Pn3Nh) accumulation, peculiar to the petals of red-flowered cyclamen, should be a dominant characteristic, and the characteristic might be controlled by a single dominant gene. It was also suggested that the rhamnosylation enzyme had substrate specificity. Deep red-purple and Dark-red flowered mutants, derived from a red-flowered cultivar ‘Largo’, accumulated malvidin 3-O-glucoside in the petals instead of Pn3Nh.

研究分野：園芸科学

キーワード：シクラメン 花色 花色素 アントシアニン カルコノナリンゲニン2'-グルコシド ペオニジン3-ネオヘスペリドシド マルビジン3-グルコシド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

花き品種名の多くに色を連想させる語句が含まれているように、花色は花きの最重要形質の1つである。したがって、花色発現のメカニズム、特に花色を第一義的に左右する花色色素発現のメカニズムとその花色への影響の解明は、花色育種および花きの高品質生産のために不可欠である。

1980年代に発見された黄色花シクラメンは、カルコンイソメラーゼ(CHI)が働いていないためにカルコンからフラバノンの生合成が阻害されてカルコノナリングニン2'グルコシド(Ch2'G)が集積して黄色を呈している(Miyajima et al., 1991, J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60, 409-414)。Ch2'Gが集積して黄色花となる植物はカーネーションなど限られたものであるが、そのカーネーションではCh2'Gとアントシアニンが花弁に混在したオレンジ色が存在する。これは、カーネーション花弁ではCHIが不活化していても、カルコンの化学的不安定さによる非酵素的反応でいくらかのフラバノンが生成されるため、下流のアントシアニン生成関連酵素がすべて働いていればCh2'Gとアントシアニンが両方花弁に集積されるためと考えられている(Stich et al., 1992, *Planta* 187: 103-108)。一方、シクラメンの現存の黄色花品種では、花弁の大部分を占めるスリップ部分(底紅と覆輪以外の部分)が赤みを帯びておらず、黄色花と赤や紫色花とのF₂後代でもカルコンとアントシアニンの両方が花色発現に貢献している個体は報告されていなかった(Takamura et al., 2000, *Acta Hort.* 508, 219-221)が、近年、研究代表者らは、花弁にCh2'G以外にアントシアニンを集積してアプリコット色を呈するシクラメンを見いだした(原・高村, 2019, *園芸学研究* 18(別1), 417)。しかしながら、その花弁にCh2'Gとアントシアニンが両方集積されるメカニズムは明らかになっていなかった。

また、シクラメンの赤色花の主要花色色素は、多くの植物で認められるペオニジン3グルコシド(Pn3G)のグルコース部分にさらにラムノースが修飾された、ペオニジン3ネオヘスペリドシド(Pn3Nh)である(Webby and Boase, 1999, *Phytochemistry* 52, 939-941; 高村・杉村, 2008, *香川大学農学部学術報告* 60, 39-45)。同じグルコースにさらにラムノースが修飾された3ルチノシド(3Rt)型のアントシアニンを含有する植物は多く報告されているが、花の主要アントシアニンの配糖体部分が3Nh型の個体は、他の主要花きでは見あたらない。シクラメンでは、Pn3Nhを含まずにPn3Gを主要花色色素とする個体は報告されておらず、Pn3Nh以外の3Nh型アントシアニンを主要花色色素とする個体も報告されていなかったため、シクラメンの赤色花の特異的な配糖体型(3Nh)が花色に及ぼす影響は明らかではなかった。しかしながら、桃色花系統からの突然変異により、Pn3Gが主要花色色素でPn3Nhは花弁からほとんど検出されない系統が研究代表者の研究室で育成された。また、形質固定されているはずのPn3Nhを主要花色色素とするシクラメン赤色花品種・系統において、しばしば黒がかかった色の花を持つ変異体が生じることが知られており、その頻度は他の花色の品種・系統における花色変異と比べて明らかに多く、生産上問題となることも多かったが、それら変異体の発現機構の解明を試みた研究はなかった。

2. 研究の目的

本研究の学術的「問い」を総じて言えば、シクラメンの特異的な花色色素発現を生じさせる要因は何か、それがどのように花色発現に寄与しているのか、そのメカニズムをどう制御し活用できるのか、ということである。具体的には、アプリコット色花の発現に関しては、Ch2'Gとアントシアニンの花弁での混在がなぜ生じて、これまでになかったシクラメン花弁でアプリコット色が発現したのかということが、赤色花品種における花弁の主要アントシアニンの特異的な配糖体型と変異個体の発現については、3Nh型のアントシアニンがなぜペオニジンでしか生じず、3位のラムノシル化が花色にどのように影響し、赤色花特有の変異体がなぜ発現するのかということがその「問い」になる。

そこで、本研究では、Ch2'Gとアントシアニンが両方花弁に集積されてこれまでに存在しなかったアプリコット色花シクラメンが生じたメカニズムを明らかにすること、およびシクラメンの赤色花の特異的な配糖体型(3Nh)が花色発現および花色変異の拡大に及ぼす影響とその遺伝性・安定性を明らかにすることの2つを解明すべき個別の課題とし、その解明と得られた知見の統合により、シクラメン特有の花色色素発現のメカニズムとその花色への影響を明らかにし、シクラメンの花色変異拡大と安定した花色発現による高品質生産に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アプリコット色花シクラメンの花色発現機構

① アプリコット色花系統の向軸面および背軸面での花色発現

香川大学農学部のガラス温室で開花させた黄色花品種2品種(‘ゴールドンボーイ’, ‘イエローガール’)およびアプリコット色花3系統の花弁を用いた。開花当日および開花3週間後の花弁を採取し、その向軸面と背軸面の花色をRHSカラーチャートおよび色彩計(NR-12A, 日本電色工業)を用いて調査した。

② 花弁細胞における色素発現の分布

黄色花 2 品種およびアプリコット色花 2 系統の開花当日の花弁の表面構造および細胞内花色素分布の観察を行った。すなわち、アプリコット色を呈している部分を、デジタルマイクロスコープを用いて観察した。なお、黄色花品種においてはアプリコット色花系統と同様の部分を観察した。さらに、スリップ中央部分から切片を切り出し 寒天に埋没し、マイクロスライサーを用いて 100-200 μm の薄切片を作成し、得られた薄切片を光学顕微鏡で観察した。

③ アプリコット色花シクラメンにおける *CHI* 遺伝子および *Ch2'GT* 遺伝子の発現

‘ゴールドンボーイ’およびアプリコット色花 3 系統の蕾ステージおよび開花当日の花弁を採取し、花弁のスリップ部分から total RNA を抽出した。その後、RT-PCR 法により *CHI* および *Ch2'GT* 遺伝子の発現解析を行った。

(2) 赤色花シクラメンの特異的な花色・花色素発現機構

① シクラメン花弁における Pn3Nh 生成の遺伝様式

Pn3Nh を花弁スリップ部分の主要アントシアニンとする赤色花シクラメン品種‘ピッコロ (赤色花)’と Pn3G を花弁スリップ部分の主要アントシアニンとする赤色花系統 523PM との正逆交雑により得られた F₁ 後代およびその自殖により得られた F₂ 後代、ならびに 523PM と Pn3Nh を花弁スリップ部分の主要アントシアニンとする赤色花シクラメン品種‘ラルゴ’との正逆交雑により得られた F₁ 後代およびその自殖により得られた F₂ 後代の開花個体を用いた。各個体の開花当日の花弁スリップ部分の花色を調査した後、スリップ部分と底紅部分に切り分けて乾燥させ、遮光・乾燥条件下で保存して適宜花色素分析に用いた。その乾燥花弁のスリップ部分から 5%ギ酸メタノールで色素類を抽出し、HPLC を用いて花弁中に含まれるアントシアニンを調査した。

② 赤色花シクラメンと赤紫色花シクラメンの交雑における花色素の遺伝

Pn3G を主要花色素とする赤色花シクラメン系統 523PM とマルビジン 3-グルコシド (Mv3G) を主要花色素とする赤紫色花品種‘ピッコロ (赤紫色花)’との正逆交雑により得られた F₁ 後代およびその F₁ 後代の自殖により得られた F₂ 後代の開花個体を用いた。各個体の開花当日の花弁スリップ部分の花色を調査した後、スリップ部分と底紅部分に切り分けて乾燥させ、遮光・乾燥条件下で保存して適宜花色素分析に用いた。その乾燥花弁のスリップ部分から 5%ギ酸メタノールで色素類を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いて花弁中に含まれるアントシアニンを調査した。

③ Pn3Nh を主要花色素とする赤色花シクラメンに生じる花色・花色素変異

赤色花シクラメン品種‘ラルゴ’、ならびにその自殖後代に生じた花色変異体由来の花弁スリップ部分がチョコレート色に近い暗赤色花を呈する 2 系統および濃赤紫色を呈する 4 系統の開花個体を用いた。各個体の開花当日の花弁スリップ部分の花色を調査した後、スリップ部分と底紅部分に切り分けて乾燥させた。乾燥花弁は、遮光・乾燥条件下で保存して適宜花色素分析に用いた。その乾燥花弁のスリップ部分から 5%ギ酸メタノールで色素類を抽出し、HPLC を用いて花弁中に含まれるアントシアニンを調査した。

4. 研究成果

(1) アプリコット色花シクラメンの花色発現機構

シクラメンの黄色花品種およびアプリコット色花系統 (第 1 図) のいずれにおいても、花弁スリップ部分の向軸面と背軸面では花色に明確な差異は認められなかった。シクラメンの黄色花 2 品種およびアプリコット色花 3 系統のうち開花時に多くの花が赤みを帯びていた 2 系統では、開花から 3 週間後にかけて C*値、すなわち彩度が低下することが明らかとなった。一方、開花時にほぼ薄黄色を呈していた残り 1 系統では、開花当日と比較して開花 3 週間後に a*値が増加して明らかに赤みを帯びたことから、他のアプリコット色花系統と異なり、開花時に黄色であった花色が開花後にアプリコット色に変化する色変わり花系統であることが示唆された。



第 1 図. 黄色花品種‘イエローガール’ (左) と
アプリコット色花系統 (右)

黄色花品種およびアプリコット色花系統の開花時の花弁の薄切片の観察の結果、アプリコット色花系統において赤紫色の色素は表皮細胞のみに分布していることが確認された。また、花弁表皮の観察の結果、アプリコット色花系統の花弁表皮においては、アプリコット色を呈している部分のすべての表皮細胞がアプリコット色を呈しているのではなく、黄色の色素を強く発現する細胞と赤紫色色素を強く発現する細胞とが混在していることにより花弁がアプリコット色を呈していることが示唆された。

また、*CHI* および *Ch2'GT* の発現解析の結果、黄色花品種およびアプリコット色花系統のいずれにおいても *CHI* の発現は認められなかった。一方、*Ch2'GT* に関しては、黄色花品種では、蕾、開花当日のいずれのステージでも強く発現していたが、アプリコット色花系統のうち1系統で蕾ステージの後期または開花当日の花弁で、もう1系統で早期の蕾ステージで発現が弱くなっていた。この *Ch2'GT* の弱い発現がカルコンからナリングニンへの非酵素的生成を促し、開花時に花弁でアントシアニンが生合成する要因となった可能性も考えられる。

第1表. 黄色花品種およびアプリコット色花系統の花弁表皮細胞の色発現

品種・系統	表皮細胞の色		
	黄	アプリコット	赤紫
ゴールデンボーイ	+	-	-
イエローガール	+	-	-
アプリコット-1	+	-(or±)	+
アプリコット-2	+	-(or±)	+

第2表. 黄色花品種およびアプリコット色花系統における *CHI* および *Ch2'GT* の発現

品種・系統	蕾ステージでの発現				開花当日の発現	
	<i>CHI</i>	<i>Ch2'GT</i>	<i>CHI</i>	<i>Ch2'GT</i>	<i>CHI</i>	<i>Ch2'GT</i>
ゴールデンボーイ	-	+	-	-	+	+
アプリコット-1	-	± ^z or +	-	-	±	±
アプリコット-2	-	± ^y or +	-	-	+	+
アプリコット-3	-	+	-	-	+	+

^z 蕾ステージ後期 ^y 蕾ステージ早期

以上のように、アプリコット色花シクラメンの花弁スリップ部分では、赤紫色の細胞と黄色の細胞とが混在してアプリコット色を呈していることが明らかになった。また、アプリコット色花では、カルコンからナリングニンへの生成が非酵素的に行われ、開花時までには花弁でアントシアニンが生合成された可能性が考えられたが、これについてはさらなる精査が必要であると思われる。

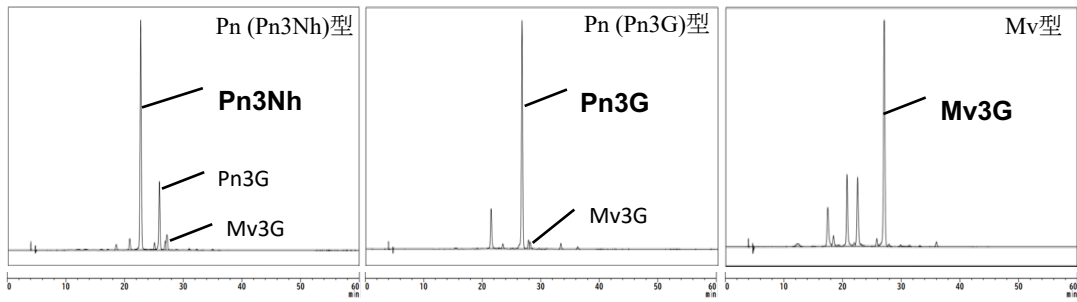
(2) 赤色花シクラメンの特異的な花色・花色発現機構

Pn3Nh を主要アントシアニンとする赤色花シクラメン品種と異なり 523PM の花弁スリップ部分では Pn3Nh が含まれておらず、主要アントシアニンとして Pn3G が検出されるとともにペオニジン 3-ルチノシド(Pn3Rt)と考えられるピークも認められた。523PM と‘ピッコロ(赤色花)’ F₁ 後代では交雑の正逆にかかわらず、すべての個体で主要アントシアニンとして Pn3Nh が検出されたが、F₂ 後代では主要アントシアニンが Pn3Nh の個体と Pn3G の個体に明確に分離し、その分離比は Pn3Nh の発現を顕性と仮定した場合の分離比(3Nh:3G = 3:1)に適合した。F₁ (523PM × ‘ラルゴ’) と F₁ (523PM × ‘ラルゴ’) では、いずれにおいても花弁スリップ部分の主要アントシアニンとして Pn3Nh が検出された個体と Pn3G と Pn3Nh の両方が検出された個体とが認められたが、F₂ 後代では、Pn3Nh を主要アントシアニンとする個体と Pn3G を主要アントシアニンとする個体とに明確に分離し、その分離比は Pn3Nh の発現を顕性と仮定した場合の分離比(3Nh:3G = 3:1)に適合した。なお、いずれの交雑組み合わせにおいても、Pn3G 型の F₂ 後代の花弁からは Pn3Rt が検出された。また、523PM の花弁スリップ部分においては、従来から存在する赤色花品種より低い C*値を示すとともに肉眼で見た際のつや感も弱くなったが、523PM と赤色花品種の F₂ 後代の花弁スリップ部分においても、Pn3Nh 型の個体で Pn3G 型の個体より高い C*値を示し、やや強いつやを有する傾向が認められた(第2図)。



第2図. 赤色花品種‘ピッコロ(赤色花)’(A)および‘ラルゴ’(B), 赤色花系統523PM(C), ならびにPn3Nh型(D)およびPn3G型(E)のF₂(‘ピッコロ(赤色花)’ × 523PM)の花色。

赤色花系統 523PM と赤紫色花品種‘ピッコロ(赤紫色花)’との交雑により得られた F₁ (523PM × ‘ピッコロ(赤紫色花)’) および F₁ (‘ピッコロ(赤紫色花)’ × 523PM) では、すべての個体で主要アントシアニンとしてペオニジン配糖体が検出された。一方、F₂ (523PM × ‘ピッコロ(赤紫色花)’) および F₂ (‘ピッコロ(赤紫色花)’ × 523PM) においては、主要アントシアニンがペオニジン配糖体の個体とマルビジン配糖体の個体とに明確に分離し、ペオニジン配糖体の発現を顕性と仮定した場合の分離比(ペオニジン配糖体: マルビジン配糖体 = 3:1)に適合した。いずれの個体においても、主要アントシアニンであるマルビジン配糖体としては Mv3G が検出され、ペオニジン配糖体としては Pn3Nh または Pn3G が検出された。また、Mv3G を主要アントシアニンとする F₂ 個体の花弁スリップ部分では Pn3Nh および Pn3G は認められなかったのに対し、Pn3Nh または Pn3G を主要アントシアニンとするほとんどの F₂ 個体で少量の Mv3G が検出された(第3図)。なお、ペオニジン配糖体を主要アントシアニンとする F₂ 個体において、Pn3Nh を主要アントシアニンとする個体と Pn3G を主要アントシアニンとする個体の分離比は、Pn3Nh の発現を顕性と仮定した場合の分離比(3Nh:3G = 3:1)に適合した。

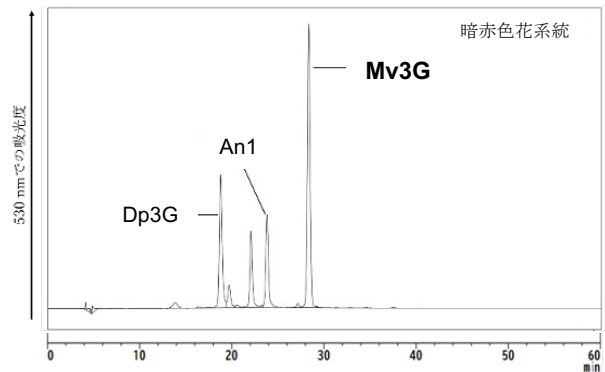


第3図. 赤色花系統523PMと赤紫色花品種‘ピッコロ (赤紫色花)’とのF₂後代の花弁スリップ部分より抽出されたアントシアニンの典型的HPLCクロマトグラム (吸収波長530 nm).

花弁が濃赤紫色を呈する4系統の花弁スリップ部分では、元品種である赤色花品種‘ラルゴ’花弁と比較して、L*, a*, b*, C*およびh値がいずれも明らかに低い値を示し、花色が暗く彩度が低くなるとともに色調もやや青みがかったことが示唆された。暗赤色花を有する2系統の花弁スリップ部分も、濃赤紫色花系統と同様に‘ラルゴ’花弁より、L*, a*, b*, C*およびh値がいずれも明らかに低い値を示していた。しかし、濃赤紫色花系統と比較すると、1系統ではL*, a*, b*およびC*値がさらに低い値を示し、花色の明度と彩度が低くなっていたが、もう1系統では数値に有意差が認められなかった。したがって、有意差が認められた1系統のみを暗赤色(チョコレート色)花系統として扱うこととした(第4図)。花色素のHPLC分析の結果、Pn3Nhを主要アントシアニンとする‘ラルゴ’と異なり、変異系統では主要アントシアニンとして‘ラルゴ’の花弁では少量しか検出されなかったMv3Gが検出された。また、変異系統ではデルフィニジン3グルコシド(Dp3G)およびシアニジン3グルコシド(Cy3G)と考えられるアントシアニンも少量検出されるとともに未同定のアントシアニン(An1)も検出され、この花色素構成の変動が花色変異の要因であると考えられた。なお、暗赤色花系統においては、他の変異系統と比較して比較的多量のDp3Gが検出され(第5図)、この比較的多量に含まれるDp3Gが濃赤紫色花系統と異なる暗赤色発現に寄与しているものと示唆された。



第4図. 暗赤色(チョコレート色)花系統の花冠



第5図. 暗赤色花系統の花弁より抽出されたアントシアニンの典型的HPLCクロマトグラム

以上のように、シクラメンの花弁スリップ部分において、ペオニジン3位のラムノシル化によるPn3Nhの生成は顕性形質であることが示唆され、F₂後代の花弁から、ペオニジン3位のラムノシル化によるPn3Nhの生成が花色に影響を及ぼしている可能性も考えられた。また、シクラメン園芸品種の花弁スリップ部分では、ペオニジンの発現がマルビジンの発現に対して顕性であることを示唆する結果が得られた。しかしながら、ペオニジンとマルビジンの構造とそれぞれの生合成経路、およびマルビジン配糖体を主要アントシアニンとする個体ではペオニジン配糖体がほとんど検出されなかったのに対してペオニジン配糖体を主要アントシアニンとするほとんどの個体ではマルビジン配糖体が検出されたこと等から、ペオニジンの発現とマルビジンの発現が単なる対立形質ではない可能性も示唆される。なお、ペオニジンと異なり、ネオヘスペリドースで修飾されたマルビジンがシクラメン花弁の主要花色素であったとの報告は見当たらないが、本研究においてもマルビジン配糖体を主要アントシアニンとするF₂個体ではすべてMv3Gが主要アントシアニンであった。これらのことから、シクラメン花弁中のアントシアニン3-グルコシドにラムノースを修飾する酵素に基質特異性があることも示唆される。さらに、赤色花品種‘ラルゴ’の自殖後代から得られた濃赤紫色花系統および暗赤色花系統は、突然変異によって、花弁スリップ部分にPn3NhではなくMv3Gを多量に集積するようになったため生じたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高村武二郎, 寺田ゆき乃
2. 発表標題 赤色花シクラメン‘ラルゴ’の自殖後代より生じた濃赤紫色花系統の花色素発現
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田ゆき乃, 高村武二郎
2. 発表標題 赤色花シクラメン‘ラルゴ’の自殖系統に生じた花色・花色素変異
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田ゆき乃, 高村武二郎
2. 発表標題 シクラメン花卉におけるペオニジン3位のラムノシル化の遺伝とその花色への影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高村武二郎, 寺田ゆき乃
2. 発表標題 赤色花シクラメンと赤紫色花シクラメンの交雑における花色素の遺伝
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takamura, T. and Terada, Y.
2. 発表標題 Inheritance of peonidin 3-O-neohesperidoside synthesis in the petals of cyclamen
3. 学会等名 Asian Horticultural Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関