

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07655

研究課題名（和文）より美しい青色花品種育成のための花色発現メカニズムの研究

研究課題名（英文）A study on a flower color development mechanism for the breeding of ornamental flowers with a more beautiful blue color

研究代表者

谷川 奈津（TANIKAWA, Natsu）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員

研究者番号：20355720

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：より美しい青色花色品種を育成する上で有用な情報を蓄積するため、アントシアニンによる新規の青色発現条件を見つけることとともに、赤味のない純粋な青色発現機構の解明を目指した。ニゲラやヒメツルニチニチソウなどを対象として、それぞれの青色花と赤色花について、花弁(ガク片)のpH、色素組成および色素の構造など、花色発現に関わる因子を調査して比較した。その結果見出されたアントシアニンの青色化に関与する新たな候補因子について検証を進めている。また、一連の研究の中で、これまで未報告であったアントシアニン3種類を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青色花色を担う色素はアントシアニンである。アントシアニンがどのような条件で青く発色するようになるのかについて解明することは、花色研究分野で長い間取り組まれてきたテーマであり、新たな知見が蓄積されることになる。園芸花きの中には青色花色を欠く品目が多い。青色花色品種の育種を行う上でも、アントシアニンの青色発現の仕組みは、基礎科学的な情報として有用である。新たなアントシアニン青色化条件の候補因子が見つかることは、青色花色品種育成が潜在的に可能となる植物種の幅を広げる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Here, we aimed to identify novel factors that make anthocyanins blue and to elucidate the mechanism that yields a pure blue flower color through anthocyanins. This work is useful for breeding ornamental flowers that possess a more beautiful, vibrant blue color. Using the species *Nigella damascena* and *Vinca minor*, factors related to the development of blue flowers including the pH, pigment composition, and pigment structures of petals and sepals were investigated and compared between the blue and red flowers of each plant. We are currently proceeding with further verification about the new candidate factors that could influence the blue pigmentation of the anthocyanins identified here. Furthermore, we identified three novel anthocyanins in a series of studies.

研究分野：農学

キーワード：アントシアニン 色素 青色花色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

花色は、鑑賞を目的とする園芸花き品種に求められる最も重要な形質である。園芸花きで青色花色を欠く品目は多く、青色花と呼ばれる品種があっても、実際には青紫に近い花色であることが多い。こうした品目では、青色花の育成、さらにはできる限り赤味の少ない純粋な青色花の育成が、育種上の大きな目標となっている。青色花色を担う色素はアントシアニンである。これまで、アントシアニンの主要6種類の基本構造のうち、デルフィニジン型が最も青い色調を呈すると一般に説明されてきた。そのため、青色花品種の育種といえば、“デルフィニジン型アントシアニンの導入”が定石であった。三大商業切り花のキク、バラ、カーネーションには本来青色花色が存在しない。これらの遺伝子組換えによる青色化の取り組みも、デルフィニジン型アントシアニンを導入する方針で進められた。しかし、デルフィニジン型アントシアニンを導入した結果の花色は、いずれも赤紫～青紫色の範囲にとどまることが報告された¹⁻³。また、シクラメンでは、イオンビーム照射により、デルフィニジン型アントシアニンを導入した結果、本来のマルビジン型アントシアニンによる花色よりも赤い花色となることが示されていた⁴。こうした事例から、アントシアニンをデルフィニジン型にするだけでは、青色花色を生み出すことが難しいことが明らかになっていた。一方、様々な研究者による長年の青色花色発現に関する研究により、アントシアニンが青く発色するには、「アントシアニンに芳香族有機酸が多重結合する」、「高い液胞 pH」、「補助色素の関与」、「金属イオンの関与」の4つの条件のいずれか、または複数の条件が関与することが報告されている⁵。こうした背景を鑑みて、効率よく青色花色品種育種を行うためには、青色花色発現メカニズムについて、より広く深く正しく理解することが必要であり、そのために様々な植物による多様な青色花色発現メカニズムの解明を進めたいと考えた。

2. 研究の目的

青色発現メカニズムの知識は、それぞれの植物が持つ固有の色素生合成系に即して、交配親の組み合わせをしばりこめる等、効率的な育種計画をたてる上で有用である。しかし、その前提として、知識が深く正確なものであることが重要である。そこで、本研究では、アントシアニンによる青色発現について正しい情報を蓄積することで、より効率的な青色品種育種を展開することを目指し、アントシアニンによる新規の青色花色発現に関わる条件を明らかにするとともに、より赤味のない青色花色発現機構の解明を行った。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

ニゲラおよびヒメツルニチニチソウ、*Aconitum* 属植物、キキョウを扱った。

(2) 花弁(ガク片)の測色

RHS カラーチャートとの比較および測色計による測定により花色を数値化した。また、分光光度計で花色の吸収スペクトルを測定し、その特性を調べた。

(3) 花弁(ガク片)の搾汁 pH の測定

すりつぶした花弁(ガク片)を、コンパクト pH メーターに押し付けて測定した。

(4) 色素関連化合物の分析

乾燥花弁(ガク片)抽出液について、色素関連化合物の組成を HPLC により分析した。アグリコンの分析は、乾燥花弁(ガク片)の 2N 塩酸抽出液の酸加水分解産物について、TLC および HPLC により行った。

(5) 色素関連化合物の単離精製および構造決定

色素関連化合物について、乾燥花弁(ガク片)から溶媒抽出し、Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、および分取 HPLC によって各化合物を単離、精製した。精製した各化合物およびその酸加水分解産物について、HPLC や TLC 分析、UV-Vis、FAB-MS および NMR スペクトル解析などにより構造決定を行った。

(6) 花色再現実験

花弁(ガク片)の搾汁と同じ pH に調整した酢酸、リン酸、McIlvaine 緩衝液に、色素関連化合物を混合し、溶液の色を観察し、分光光度計で溶液の吸収スペクトルを測定した。花弁(ガク片)と同じ青色と吸収スペクトルを再現できる条件を検討した。

4. 研究成果

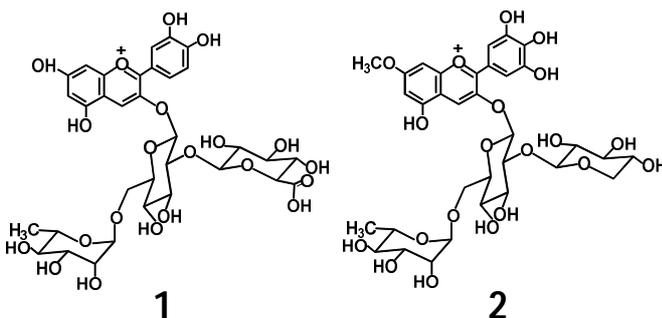
(1) ニゲラ(*Nigella damascena* L.)

栽培品種 'Miss Jekyll' シリーズの赤紫、青(第1図) および白色花色について、花色に関する測色値、吸収スペクトル等、基礎的なデータを収集した。また、各花色で検出された主要アントシアニンおよびフラボノールについて単離精製し、構造決定を行った。赤紫、青、白色花色のいずれからも同じ3種類のフラボノールが検出された。赤紫花色から、Cyanidin 3-glycoside

型の 4 種類のアントシアニンを同定した。このうち、Cyanidin 3-[2-(glucuronosyl)-6-(rhamnosyl)-glucoside]がこれまで未報告の化合物であった(第 2 図-1)。青色花色からは 2 種類のアントシアニンを同定した。主要成分であった 7-Methyl delphinidin 3-[2-(xylosyl)-6-(rhamnosyl)-glucoside]が新規化合物であった(第 2 図-2)。過去に、同じ青色花色品種の主要色素として、今回構造決定したアントシアニンとは異なる構造を持つアントシアニンが報告されている⁶。詳細に検討した結果、本研究で決定した構造が正しいことが明らかになった。これまで多くのアントシアニンが報告されている中で、7-Methyl delphinidin を基本骨格にもつもの報告は 1 種だけであり⁷⁻⁸、今回報告したアントシアニンが 2 例目となる。この稀な 7-Methyl delphinidin 基本骨格がニゲラの青色花色発現に関与している可能性が考えられる。



第 1 図 ニゲラの赤紫花色と青色花色



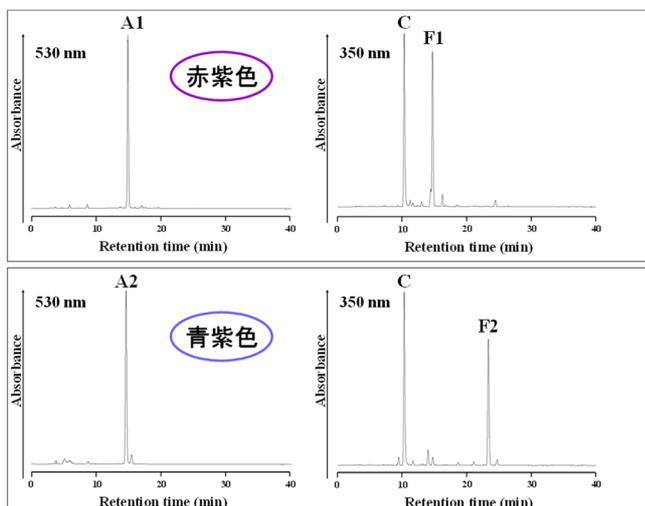
第 2 図 ニゲラから同定された新規アントシアニン

(2)ヒメツルニチニチソウ(*Vinca minor* L.)

ヒメツルニチニチソウの代表的な花色は青紫色である(第 3 図)。園芸品種には赤紫色花があり(第 3 図)。まず、この花色について色素関連化合物組成の分析を行い、さらに主要アントシアニンおよびフラボノールの単離精製、構造決定を行った。その結果、アントシアニンはこれまで未報告の化合物であった。既報⁹である青紫色花の色素関連化合物の組成と比較すると、どちらの花も、アントシアニン、フラボノールおよび桂皮酸誘導体が、それぞれ 1 種類ずつ主要成分として生合成されていた(第 3 図)。桂皮酸誘導体はどちらもクロロゲン酸であった。主要アントシアニンおよびフラボノールのアグリコンは、両花色とも同じデルフィニジンおよびケンフェロールであり、糖の結合の有無、あるいは結合する糖の種類に違いが認められた。花色再現実験のため、赤紫色花と青紫色花から色素関連化合物を大量精製した。両花色について、花弁の測色、花弁の吸収スペクトルや搾汁 pH の測定等、花色に関する基礎的なデータを収集した。精製した色素関連化合物を用いて、得られた花色に関するデータを元に *in vitro*での花色再現実験を行い、青色発現に関与する可能性が考えられた候補因子について検討した。しかし、アントシアニンが、使用した緩衝液中で非常に不安定な性質で、すぐに退色してしまったため、証明するデータを得るまでには至らなかった。実験方法について現在も検討中であり、今後の解明につなげたいと考えている。



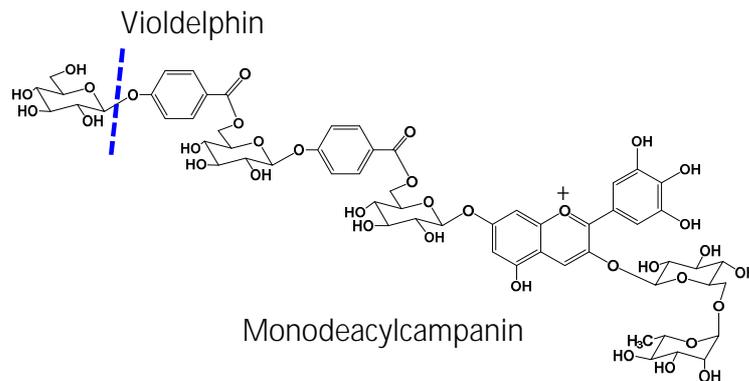
第 3 図 ヒメツルニチニチソウの赤紫花と青紫花



第 4 図 ヒメツルニチニチソウ花弁抽出液の HPLC データ
 A1 および A2: アントシアニン
 F1 および F2: フラボノール
 C: クロロゲン酸

(3) *Aconitum* 属植物

青紫色を代表的な花色としてもち、花のアントシアニンについての情報が少ない *Aconitum* 属について調査した。*Aconitum* 属 30 系統についてアントシアニン(アグリコン)を分析した結果、青紫色花 29 系統ではデルフィニジンが大部分を占めていたものの、30 系統全てから微量のシアニジンが検出された。さらに、ほぼ白色に近い花色の 1 系統を含む 11 系統からは、これまで *Aconitum* 属で報告されていなかったペラルゴニジンが検出された。*Aconitum* 属では、*A. napellus* L. や *A. carmichaelii* Debeaux が園芸花きとして利用されている。本結果から、シアニジン系やペラルゴニジン系アントシアニンを高濃度に蓄積させることで、青紫色以外の多彩な花色に発展させられる可能性が示唆された。また、アントシアニンの分析を行った。青紫色花で検出された主要アントシアニン成分について単離精製して構造を決定した。その結果、これまで報告されていた Violdelphin の他にも、Monodeacylcampanin が青紫色花の主要アントシアニンとして生合成されていることが明らかになった(第 5 図)。



第 5 図 *Aconitum* 属植物の青紫色花の主要アントシアニン

(4) キキョウ(*Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC.)

代表的な花色である青紫色の他、淡紫色、白色などがある。キキョウ園芸品種の様々な花色について、アントシアニジンの分析を行った。その結果、これまでキキョウの花では報告されていないシアニジンとペラルゴニジンが検出された。現在、アントシアニンの単離精製と化学構造の解明を進めている。

(引用文献)

1. Fukui et al. (2003) *Phytochemistry* 63: 15-23.
2. Katsumoto et al. (2007) *Plant Cell Physiol.* 48: 1589-1600.
3. Noda et al. (2013) *Plant Cell Physiol.* 54: 1684-1695.
4. Kondo et al. (2009) *Plant Biotechnol.* 26: 565-569.
5. Yoshida et al. (2009) *Nat. Prod. Rep.* 26: 884-915.
6. Toki et al. (2009) *Heterocycles* 78: 2287-2294.
7. Toki et al. (2011) *Heterocycles* 83: 2803-2810.
8. 立澤ら. (2015) *園芸学研究* 14: 221-230.
9. Tatsuzawa (2015) *Phytochem. Lett.* 13: 365-369.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanikawa Natsu, Honma Kazuki, Tatsuzawa Fumi	4. 巻 257
2. 論文標題 Flavonoids of the rose-pink, blue, and white flowers of <i>Nigella damascena</i> L. (Ranunculaceae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 <i>Scientia Horticulturae</i>	6. 最初と最後の頁 108609 ~ 108609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scienta.2019.108609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuzawa Fumi, Mukai Chisato, Igarashi Motoko, Hishida Atsuyuki, Satta Naoya, Honda Kazushige, Nakajo Shiduko, Takehara Akihide, Tanikawa Natsu	4. 巻 87
2. 論文標題 Anthocyanins and anthocyanidins in the flowers of <i>Aconitum</i> (Ranunculaceae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 <i>Biochemical Systematics and Ecology</i>	6. 最初と最後の頁 103937 ~ 103937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bse.2019.103937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷川奈津・本間和樹・立澤文見
2. 発表標題 ニゲラ (<i>Nigella damascena</i> L.) 青色花のアントシアニン
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷川奈津・本間和樹・立澤文見
2. 発表標題 ニゲラ (<i>Nigella damascena</i> L.) 赤紫色花のアントシアニン
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 迎千里・五十嵐元子・菱田敦之・颯田尚哉・本多和茂・谷川奈津・立澤文見
2. 発表標題 トリカブト属 (Aconitum L.) の花のアントシアニン
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立澤文見・谷川奈津
2. 発表標題 ヒメツルニチニチソウ (Vinca minor) の花色と花色素について
3. 学会等名 園芸学会平成29年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 立澤文見・谷川奈津
2. 発表標題 ヒメツルニチニチソウ (Vinca minor) 赤紫色花のフラボノイドの構造決定
3. 学会等名 園芸学会平成30年度春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立澤文見・迎千里・五十嵐元子・菱田敦之・颯田尚哉・本多和茂・谷川奈津
2. 発表標題 トリカブト属 (Aconitum L.) の花のアントシアニン
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野広之・谷川奈津・立澤文見
2. 発表標題 キキョウの花のアントシアニン
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	立澤 文見 (TATSUZAWA Fumi) (30320576)	岩手大学・農学部・准教授 (11201)	