

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580042

研究課題名(和文)アントシアニン着色における環境要因および遺伝要因を探る

研究課題名(英文)Environmental and genetic factors for anthocyanin pigmentation

研究代表者

中務 明(Nakatsuka, Akira)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：40304258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アントシアニン色素による色調を評価するため、色素構成や花弁内pHおよびアントシアニン関連遺伝子の発現解析を行った。ツツジ花弁の色の多様化は、アントシアニン組成とコピグメント効果に加え、一部の高いpHの花弁を持つツツジでは青色化の傾向が認められた。花弁の着色制御はフラボノイドの合成能力と配糖化酵素遺伝子の発現パターンから、アントシアニンの配糖化でなく、液胞への輸送以降に起こっている可能性が示唆された。またダイコンは複数のアントシアニンの合成経路遺伝子が着色の有無と一致したため、転写因子による着色制御が予想された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate anthocyanin pigmentation, we investigated pigment composition, pH value in the petal and anthocyanin synthesis related gene expression. In azalea flower, color variation can be explained by anthocyanidin and co-pigment effect of flavonol, and high pH value of petal showed bluer color tendency. Anthocyanin pigmentation of azalea petal may be regulated by a later step of glycosylation step because white flower can produce flavonol and proanthocyanidin pigment and was expressed glycosylation related genes as well as anthocyanin pigmented flower. In Japanese radish, several structural genes of anthocyanin pathway is not expressed in white root, suggesting that MYB transcriptional factor is related to pigmentation.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：ツツジ ダイコン アントシアニン 遺伝子 pH

## 1. 研究開始当初の背景

アントシアニンによる着色は、アントシアニン色素組成とその含量や、コピグメント色素（フラボノールやフラボン）の有無および花弁表皮細胞の pH などによってその色調が決定されていることが知られている。多くの場合はアントシアニン組成が花の色調を決定しているが、それ以外の要因が強く影響することもある。これまでにツツジの花色に関してフラボノイド組成とその生合成経路の遺伝子発現を調査してきたが、その総合的な評価は行われていない。

## 2. 研究の目的

ツツジとダイコンを主な植物材料に用いて、色調に関連する色素構成や着色組織液胞内 pH など細胞内の環境要因と、その環境要因を成立させている遺伝的要因（RNA や DNA）の関係を調査することで、色調を決定している要因を多角的に評価する。

## 3. 研究の方法

### 植物材料

ツツジは野生種 8 種 35 個体および園芸品種 13 個体を供試した。ダイコンは「出雲おろち大根」とその紫系統・赤系統を各 3 個体供試した。

### アントシアニン着色の評価

アントシアニン着色器官（ツツジ花弁とダイコン根部）は、カラーチャートと色差計（ $a^*$  と  $b^*$ ）により色調を評価した。フラボノイド含量（アントシアニンやフラボノールなど）は、塩酸メタノールで抽出した後、分光光度計にて測定した。また組織内 pH は、着色器官のホモジネートを簡易 pH メーターにより測定した。これらの測定項目について SPSS による主成分分析を行い、花色と各種要素との関係を考察した。

### アントシアニン合成遺伝子の解析

ツツジ花弁とダイコン根部からアントシアニン合成経路の関連遺伝子を単離した。ツツジはこれまでに単離できていないアントシアニンの配糖化に関する酵素遺伝子を、ダイコンに関してはカルコン合成酵素（CHS）・ジヒドロフラバノール還元酵素（DFR）・フラボノイド 3'-水酸化酵素（F3'H）・アントシアニン合成酵素（ANS）および転写因子 MYB の遺伝子を単離したのち、RT-PCR による発現解析を行った。遺伝子発現の有無がアントシアニン着色の変化と一致した場合は、色調を制御する候補遺伝子として DNA 構造を解析した。

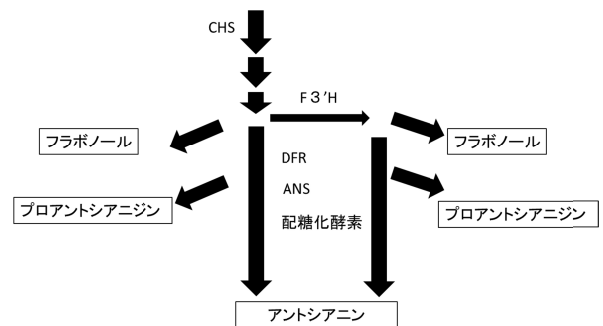


図 アントシアニン合成経路の概略  
CHS:カルコン合成酵素, DFR:ジヒドロフラバノール還元酵素  
ANS:アントシアニン合成酵素, F3'H:フラボノイド3'水酸化酵素

## 4. 研究成果

**ツツジ:** ツツジ野生種の花弁内 pH は一部のツツジを除き pH3.0-3.3 の範囲であり、異なる花色（有色花および白色花）でも同程度の値を示した。モチツツジおよびキシツツジの個体は pH3.9 を超えており、特に pH4.5 以上の個体はカラーチャートが Violet を示した。

主成分分析の結果、アントシアニン含量に対するフラボノールの割合の増加に伴って、カラーチャートが青色化したことより、フラボノールのコピグメント効果が示唆された。

花卉のフラボノイドのうち、アントシアニン含量は有色花で発育段階に伴い増加したが、白色花でほとんど増加しなかった。フラボノールおよびプロアントシアニン含量は白色および有色花で生育に伴い減少した。

グルコースおよびガラクトースの配糖化に関連する遺伝子(3GTおよび3GalT)の発現解析を行うと、着色の有無に関わらず、3GTは開花直後のみで発現が認められ、3GalTは花卉の発育に伴い増加した。このことから、ツツジのアントシアニン着色は配糖化以降で制御されている可能性が示唆された。

**ダイコン**：紫系統および赤系統は交配親と同じアントシアニン色素を持っており、ソホロシドとグルコシドの配糖化に加えてアシル化されたシアニジンとペラルゴニジンがそれぞれ主要色素であった。

CHS・DFR・ANS・F3'HおよびMYB遺伝子を紫系統から単離出来た。白色の「出雲おろち大根」は紫系統および赤系統と比較して、すべての遺伝子発現が認められなかったため、転写因子によるアントシアニン合成経路の調節が行われていることが示唆された。またF3'H遺伝子の発現の有無がシアニジンの有無に一致しており、さらにDNA構造の変異が水酸化能力を欠損させる可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ](計6件)

Nakatsuka, A., Hitomi, M., Tsuma, M., Ito, A., Mizuta, D. and Kobayashi, N. Effect of anthocyanin profile and petal pH on flower coloration in evergreen azalea. Acta Hort. 査読有, in press. 2015.

Mizuta, D., Nakatsuka, A., Ban, T., Miyajima, I. and Kobayashi, N. Pigment composition patterns and expression of anthocyanin biosynthesis genes in *Rhododendron kiusianum*, *R. kaempferi*, and their natural hybrids on Kirishima mountain mass, Japan. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 査読有, 83:156-162. 2014.

Tasaki, K., Nakatsuka, A., Cheon, K-S. and Kobayashi, N. Expression of MADS-box genes in narrow-petaled cultivars of *Rhododendron macrosepalum* Maxim. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 査読有, 83:52-58. 2014.

加藤一幾・佐藤和成・金澤俊成・庄野浩資・小林伸雄・立澤文見.ダイコン類(*Raphanus sativus* L.)における根色とアントシアニン. 園芸学研究, 査読有, 12:229-234. 2013.

Kobayashi, N. Evaluation and application of evergreen azalea resources of Japan. Acta Hort. 査読有, 990:213-219. 2013.

Cheon, K.S., Nakatsuka, A., Tasaki, K. and Kobayashi, N. Expression pattern of several flowering-related genes during flower bud formation in *Rhododendron × pulchrum* 'Oomurasaki'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 査読有, 82:263-269. 2013.

### [ 学会発表 ](計10件)

枅川 貴紀・門脇 正行・松本 敏一・中務 明・加藤 一幾・立澤 文見・小林 伸雄. 紫系および赤系「出雲おろち大根」育成系統における

アントシアニン組成と根部内成分について．  
園芸学会平成 26 年度秋季大会，2014 年 9 月  
27 日 - 28 日．(佐賀大)

Nakatsuka, A., Tsuma, M., Ito, A., Hitomi,  
M., Mizuta, D. and Kobayashi, N. Effect of  
multiple factors on flower coloration in  
evergreen azalea. The 29th International  
Horticultural Congress, 17-22 Aug. 2014,  
Brisbane, Australia.

松本 稔・中務 明・田崎啓介・小林伸雄． ツ  
ツジ属植物の遺伝資源の活用に関する研究  
(第 39 報) 常緑性ツツジの八重咲き形質に関  
連する AGAMOUS-like 遺伝子の解析． 園芸学  
会平成 26 年度春季大会，2014 年 3 月 29 日 -  
30 日． (筑波大)．

榊川貴紀・中務 明・門脇正行・小林伸雄．  
紫系および赤系‘出雲おろち大根’育成系統  
における形質評価とアントシアニン生成遺  
伝子の解析．園芸学会平成 26 年度春季大会，  
2014 年 3 月 29 日 - 30 日． (筑波大)．

田崎啓介・中務 明・千 慶晟・小林伸雄． ツ  
ツジ属植物の遺伝資源の活用に関する研究  
(第 38 報) 常緑性ツツジ園芸品種が有する采  
咲き変異形質の遺伝性について． 園芸学会  
平成 25 年度秋季大会，2013 年 9 月 20 日 - 21  
日． (岩手大)．

千 慶晟・中務 明・田崎啓介・川良将一郎・  
小林伸雄． ツツジ属植物の遺伝資源の活用  
に関する研究(第 37 報) ツツジ園芸品種の見  
染性(花冠持続)形質に関する AP3/DEF 遺  
伝子由来マーカーの開発．園芸学会平成 25 年  
度秋季大会，2013 年 9 月 20 日 - 21 日． (岩手  
大)．

中務 明・伊東あかね・人見菜美・小林伸雄．  
常緑性ツツジの花色における諸要因について．  
園芸学会平成 25 年度中四国支部大会， 2013

年 7 月 20 日 (香川大)

千 慶晟・中務 明・小林伸雄． ツツジ属植物  
の遺伝資源の活用に関する研究(第 36 報)見  
染性(花冠持続)形質に関する MADS-box 遺伝  
子の解析，園芸学会平成 25 年度春季大会，  
2013 年 3 月 23 日 - 24 日．(東京農工大)．

小林伸雄・榊川貴紀・田中万美子・星田知亜  
紀・水田大輝・門脇正行・安田 登・中務 明・  
伴 琢也．紫系および赤系‘出雲おろち大根’  
育成系統の作出とその特性評価．園芸学会平  
成 24 年度中四国支部大会，2012 年 7 月 21 日  
(岡山大)

Kobayashi, N. Evaluation and application  
of evergreen azalea resources of Japan. 2nd  
International Symposium on Woody  
Ornamentals of the Temperate Zone. 1-4 July  
2012, Ghent, Belgium.

[図書](計 1 件)

倉重祐二・小林伸雄・秋山伸一．「津ゞし絵  
本」解説，発行:島根大学生物資源科学部(財)  
新潟県都市緑化センター新潟県立植物園，  
2013 年，ISBN 978-4-905400-06-6 C3645，  
pp.114

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中務 明 (NAKATSUKA, Akira)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 40304258

### (2) 研究分担者

小林 伸雄 (KOBAYASHI, Nobuo)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 00362426