

ハナショウブにおけるアントシアニンの アシル化機構の解明

(課題番号：11660007)

平成11年度～平成13年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者： 藪谷 勤
(宮崎大学農学部教授)

ハナショウブにおけるアントシアニンのアシル化機構の解明

研究組織

研究代表者：藪谷 勤 (宮崎大学農学部教授)

研究分担者：なし

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 11 年度	1,900	0	1,900
平成 12 年度	600	0	600
平成 13 年度	600	0	600
総 計	3,100	0	3,100

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) Hida, A., K. Shimizu, R. Nagata, T. Yabuya and T. Adachi 1999. Plant regeneration from protoplasts of *Iris hollandica*. *Euphytica* 105: 99-102.
- 2) Shimizu, K., Y. Miyabe, H. Nagaike, T. Yabuya and T. Adachi 1999. Production of somatic hybrid plants between *Iris ensata* Thunb. and *I. germanica*. *Euphytica* 107: 105-113.
- 3) Yabuya, T., M. Saito, T. Iwashina and M. Yamaguchi 2000. Stability of flower colors due to anthocyanin-flavone copigmentation in Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb. *Euphytica* 115: 1-5.
- 4) Yabuya, T., M. Yamaguchi, Y. Fukui, K. Katoh, Y. Imayama and I. Ino 2001(February 5). Characterization of anthocyanin *p*-coumaroyl-transferase in flowers of *Iris ensata*. *Plant Science* 160: 499-503.
- 5) Yabuya, T., T. Imayama, T. Shimomura, R. Urushihara and M. Yamaguchi 2001. New types of major anthocyanins detected in Japanese garden iris and its wild forms. *Euphytica* 118: 253-256.
- 6) Yabuya, T., M. Yamaguchi, K. Katoh, Y. Imayama and I. Ino 2002. Anthocyanin 5-*O*-glucocyltransferase in flowers of *Iris ensata*. *Plant Science* (in press).

(2) 口頭発表

- 1) 藪谷 勤・今山輝之・下村朋幹・橋原ルミ子・山口雅篤 1999. ハナショウブおよびノハナショウブにおける含有アントシアニンの HPLC 分析(3). 日本育種学会第 95 回講演会, 4 月 4 日.
- 2) 塚谷延枝・相井城太郎・宮邊由香・清水圭一・藪谷 勤・足立泰二 1999. リボソーム DNA の ITS 領域によるハナショウブ(*Iris ensata* Thunb.)とジャーマンアイリス(*I. germanica* L.)の雑種性検定. 日本育種学会第 96 回講演会, 9 月 25 日.
- 3) 藪谷 勤 2000. ハナショウブにおけるアントシアニンのアシル化機構. 植物色素研究会第 12 回集会, 11 月 18 日.
- 4) 藪谷 勤・山口雅篤・今山輝之・加藤研治・井野郁男 2001. ハナショウブの花におけるアントシアニン 5-グルコシルトランスフェラーゼの特性解明. 日本育種学会第 100 回講演会, 10 月 8 日.
- 5) 今山輝之・藪谷 勤 2001. ハナショウブにおけるアントシアニンのアシル化とグルコシル化の順序. 植物色素研究会第 13 回集会, 12 月 1 日.

目 次

第1章 緒論	1
第2章 アントシアニンの有用変異の探索	3
緒言	3
材料および方法	3
結果および考察	4
第3章 アントシアニンのアシル化に関する遺伝分析	10
緒言	10
材料および方法	10
結果および考察	10
第4章 アントシアニンの安定性に及ぼすアシル化および コピグメンテーションの影響	14
緒言	14
材料および方法	14
結果および考察	15
第5章 アントシアニンアシル基転移酵素の特性解明	25
緒言	25
材料および方法	26
結果および考察	27
摘要	36
英文要約	39

第1章 緒論

我が国の代表的な園芸種であるハナショウブ (*Iris ensata* Thunb. var. *ensata* (Makino) Nakai) は、ノハナショウブ (*I. ensata* Thunb. var. *spontanea* (Makino) Nakai) から改良されたもので、庭園、鉢植えおよび切り花にと幅広く栽培されている。その花色は、紫を基本として青、白、赤などの方向に変化が広がり、絞り、編み目、覆輪、濃淡および無地といった模様も多様である。このような多様性にもかかわらず、本種の花色には赤、青、黄、オレンジなどを欠き、一層の多彩化が望まれている。ハナショウブの花色の多彩化育種を促進するためには、花色素、特にアントシアニンの有用変異の探索が必要である。また、このような変異型の発見は本種のアントシアニン生合成の遺伝分析を進める上でも重要なことである。

ハナショウブにおける花色素の研究は、その最も主要なアントシアニンである *ensatin* (malvidin 3-(*p*-coumaroyl)-rutinosido-5-glucoside)(malvidin 3RGac5G) の単離・同定に関する林(1940a, b, 1941)の研究により開始された。その後、林ら(1978)は 200 以上の品種を用いて、アントシアニンの種内変異を明らかにし、また Ishikura and Yamamoto(1978)も肥後(熊本)系ハナショウブにおけるアントシアニンの特性を報告している。更に藪谷ら(1983)は、アントシアニンの有用変異を探索するために高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析を開始し、これまでにハナショウブの品種やその野生系統(ノハナショウブ)を主要アントシアニンの構成により、(1) malvidin 3RGac5G - petunidin 3-(*p*-coumaroyl)-rutinosido-5-glucoside (petunidin 3RGac5G)、(2) petunidin 3RGac5G - malvidin 3RGac5G、(3) malvidin 3-rutinosido-5-glucoside (malvidin 3RG5G) - petunidin 3-rutinosido-5-glucoside (petunidin 3RG5G)、(4) malvidin 3RGac5G、(5) petunidin 3RGac5G、(6) delphinidin 3-(*p*-coumaroyl)-rutinosido-5-glucoside (delphinidin 3RGac5G)、(7) peonidin 3-(*p*-coumaroyl)-rutinosido-5-glucoside (peonidin 3RGac5G) および (8) cyanidin 3-(*p*-coumaroyl)-rutinosido-5-glucoside (cyanidin 3RGac5G) の 8 種類の型に分類している(藪谷 1988、Yabuya 1991、Yabuya *et al.* 1994a)。

これらの主要アントシアニンのうち、delphinidin 3RGac5G は青色花を (Yabuya 1991)、一方 cyanidin 3RGac5G または peonidin 3RGac5G は赤色花やマゼンタ花を育成するのに重要な色素として注目されている (Yabuya *et al.* 1994a)。また、先に述べた型のうち、malvidin 3RGac5G - petunidin 3RGac5G はハナショウブにおける主要アントシアニンの基本(野生)型とみなされており (Yabuya 1991)、しかも両アントシアニンとも芳香族有機酸の *p*-クマール酸でアシル化されている。この型の変異型(非アシル)として、malvidin 3RG5G - petunidin 3RG5G 型品種群も発見され (Yabuya 1991)、これらの品種はアシル型(malvidin 3RGac5G - petunidin 3RGac5G)品種と比較して、退色しやすい特徴を有していた。更に、アントシアニンは *p*-クマール酸、カフェ酸などの芳香族有機酸のアシル化によって安定性が増し、しかもその効果はポリアシル化により顕著になるばかりでなく、花色に青色化をもたらすことが報告されている (武田 1994)。これに対して、ハナショウブのアシル化アントシアニンは *p*-クマール酸による単独のアシル型であるので、これを遺伝子導入によりポリアシル化型に改良すれば、青色花品種の育成やアントシアニン安定性の著しい増大が期待できる。

そこで、アントシアニンのポリアシル化により、花色の青色化および安定化を達成してハナショウブの鑑賞価値を高めるために、本研究ではハナショウブにおける有用アントシアニンの探索およびアントシアニンアシル基転移酵素の特性解明を行うとともに、*in vivo* および *in vitro* でのアシル化および非アシル化アントシアニンの安定性を比較検討した。

本研究を遂行するに当たり、宮崎大学農学部育種学研究室専攻生各位、特に今山輝之氏および斎藤みずえ氏に多くのご協力をいただいた。また、植物材料を加茂花菖蒲園の一江豊一氏および日本花菖蒲協会の清水 弘氏から、フラボンおよびアントシアニンの標品を国立科学博物館・筑波実験植物園の岩科 司博士および南九州大学園芸学部教授山口雅篤博士から快く分譲していただいた。更に、アントシアニンアシル基転移酵素のアッセイでは宮崎大学教育文化学部教授井野郁男博士に多大なご協力をいただいた。ここに各氏に対して心より感謝の意を表す。

第2章 アントシアニンの有用変異の探索

緒言

先に述べたように、ハナショウブでは8種類の主要アントシアニンの型が存在するが(Yabuya 1991、Yabuya *et al.* 1994a)、オレンジ赤の花を育成するのに重要な色素である peralgonidin 型アントシアニンについては全く報告されていない。また、delphinidin 3RGac5G、cyanidin 3RGac5G および peonidin 3RGac5G は主要アントシアニンとして確認されているにもかかわらず、これらの非アシル化アントシアニンもこれまでのところ、発見されていない。

そこで、本章ではハナショウブおよびその野生型(ノハナショウブ)における有用アントシアニンの探索を行った。

材料および方法

植物材料としてハナショウブ 130 品種、13 系統およびその野生型 3 系統を試し(第 1 表参照)、外花被含有アントシアニンの HPLC 分析を以下の方法により行った。

- (1) アントシアニンの抽出: Yabuya(1991)の方法に従って新鮮花卉からアントシアニンを抽出した。
- (2) 分析システム: 島津 HPLC 分析用走液ユニット(LC-9A)、サンプルインジェクター(9L)、逆相カラム(STR ODS-II)、カラムオーブン(CTO-10A)(35℃)、紫外可視分光光度計検出器(SPD-10A)およびクロマトパック(C-R6A)を分析装置として用いた。溶出システムは、移動相(流量 1ml/min)の A 液に水:酢酸:リン酸=89.9:10:0.1(V/V)混合液、B 液に 50%アセトニトリル水溶液を用い、A 液から 2%/min の直線勾配で 40%B 液まで 20 分間のグラジェント溶出を行い、その後は 40%B 液を 20 分間保持した。アントシアニンの検出は、紫外可視分光光度計検出器により 540nm で測定し、各アントシアニン成分の保持時間お

よび面積の算出はクロマトパックによった。

(3) 同定: 本実験で検出されたアントシアニンの同定は Yabuya *et al.*(1994a)の方法に従い、既知のアントシアニンとの λ_{\max} の比較およびコクロマトグラフィーにより行った。既知の malvidin 3RG5G、malvidin 3RGac5G、petunidin 3RG5G、petunidin 3RGac5G、delphinidin 3RGac5G、cyanidin 3RGac5G および peonidin 3RGac5G は Yabuya(1991)や Yabuya *et al.*(1994a)の方法により得られた。また、既知の cyanidin 3RG、delphinidin 3RG、delphinidin 3RGac および peonidin 3RG は keracyanin(フナコシ株式会社)、tulipanin(国立科学博物館、筑波実験植物園の岩科 司博士より分譲された。)、パンジー(Ootani 1973)およびヘビイチゴ(Ishikura and Sugawara 1979)から準備された。cyanidin 3RGac5G および peonidin 3RGac5G の脱アシル化は Yabuya(1987)の方法に従った。

結果および考察

ハナショウブおよびその野生型の外花被含有アントシアニンの HPLC 分析を行った結果、20%以上の相対量を有する主要アントシアニンはいずれの品種(系統)も 1 または 2 の成分で構成され、その結果を第 1 表に示した。16 の主要アントシアニンの型のうち、petunidin 3RGac5G – delphinidin 3RGac5G、delphinidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G、cyanidin 3RGac5G – peonidin 3RGac5G、delphinidin 3RG - delphinidin 3RGac(第 1 図 A)、petunidin 3RG5G – malvidin 3RG5G、malvidin 3RG5G – peonidin 3RG5G(第 1 図 B)、peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G(第 1 図 C)および peonidin 3RG – cyanidin 3RG(第 1 図 D)の 8 種類が本実験により新たに発見された型である(第 1 表)。

これらの新しい型のうち、peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G(第 1 図 C)および peonidin 3RG – cyanidin 3RG(第 1 図 D)の両型は赤色花を育種する上で非常に注目された。何故ならば、ペチュニアの赤色花は cyanidin 3G および 3RG に発現されており(Wiering and de Vlaming 1984)、cyanidin 3RG5G および cyanidin 3RG は赤色花を発現するのに重要なアントシアニンであるからである。更に、cyanidin 3RG5G は cyanidin 型アントシアニンの中で最も低い λ_{\max}

Table 1. Classification based on major anthocyanins in Japanese garden iris and its forms(*)

1. Malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G: Geishoui, Benitsubaki, Maisenryo, Dewanoakebono, Kosenryo, Ageha, Kyomai, Beninoito, Benirenge, Kaguragishi, Goshozakura, Enkaishu, Beniwashi, Shojyo, Hagoromo, Isonoasakaze, Mizuhonokuni, Gosannotakara, H12-21a, Dwarf 2*, H5A-60, Ginnokoto, Soho*, Ooyodo, Kamogawa, Meiji 5, Matsubagasane, Chitose, Yoroimusha, Venetian Velvet, Yamataikoku, Hanakago, Shiinohomare, Ryoka, Toyoashihara, Hanakonjyo, Fujiyakko, Oshokun, Enrai, Miyamamurasaki, Kokuryunotsume, Shin-uchu, Tsukinotamagawa, Gun-en, Maikonohama, Minokotobuki, Atsumori, Miyakonotatsumi, Hanakotobuki, Asatobiraki, Nue, Sennennotomo, Aoshibagaki, Hekiho, Uchu, Hekigyoku, Koromonokasumi, Fujibakama, Shin-ariake, Ge-kkyuden, Aogadakejyo, Kongojyo, Suido, Mikawayatsuhashi, Gunjyou, Meiji 3, Kokuryujishi, Shorai, Kasumigaura, Shoryu, Gokonoasobi, Isemonogatari, Shiunnomine, Goshosobi, Saigyozakura
2. Petunidin 3RGac5G – malvidin 3RGac5G: Meiji 2, Benigata, Jyunihitoe, Orihime, Aoinoue, Tennyonokanmuri, Hananoame, Kakkoudori, Yoakemae, Naminoribune, Nemurijishi, Zamanobi, Hoshizora, Kamiyonomukashi, Senrinokasumi, Tamanokasumi, Ryofu, Hoonokanmuri, Ryunohige, Usuzuki, Hamahagi, Ishikarigawa
3. Petunidin 3RGac5G – delphinidin 3RGac5G: Asahizora, Hanamonogatari, Chikubushima, Isobe
4. Delphinidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G: H12-11a, H12-17a
5. Cyanidin 3RGac5G – peonidin 3RGac5G: Yayoikagami
6. Delphinidin 3RG – delphinidin 3RGac: Shibukake
7. Malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G: Shoyosei, Yamatohime, Renjyonotama, Mitsuzakura, Yuhi
8. Petunidin 3RG5G – malvidin 3RG5G: Jyanomegasa, Kokonoenosakura
9. Malvidin 3RG5G – peonidin 3RG5G: Momojido
10. Peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G: Miyakei 2
11. Peonidin 3RG – cyanidin 3RG: Giondaiko
12. Malvidin 3RGac5G: Nijinotomoe, H9A-18, Yumenokuni, Miyoshino, Shuzenji, Yoshinoyama
13. Petunidin 3RGac5G: Kyomaiko, Dewabanri, Murasame
14. Delphinidin 3RGac5G: H5A-53, H5A-62, H12-2c, H12-6b, H12-7a
15. Peonidin 3RGac5G: Otomekagami, Komatsunagi, Kitanotenshi*, Usugesho, Fujinogaki, Hino-mai, Saganoharu, Hinosei, Hiwatari, H91-15, Sakurajishi, Senbonzakura, Momomatsuri, Anono-otome, Benizakura, H92-107
16. Cyanidin 3RGac5G: Midareito

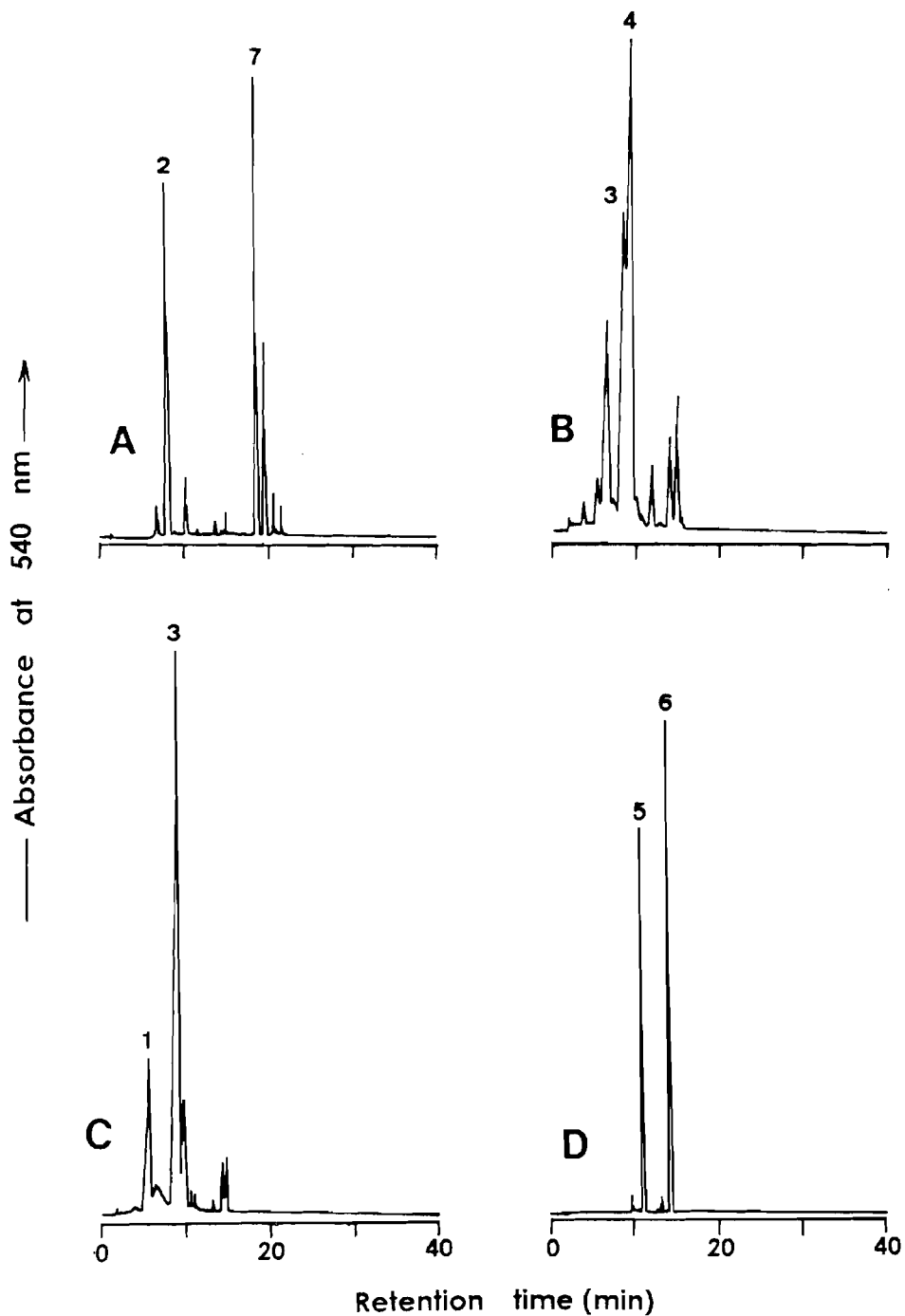


Fig. 1. The representative HPLC chromatograms of delphinidin 3RG (peak No. 2) – delphinidin 3Rgac (peak No. 7) (A: Shibukake), malvidin 3RG5G (peak No. 4) – peonidin 3RG5G (peak No. 3) (B: Momojido), peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G (peak No. 1) (C: Miyakei 2) and peonidin 3RG (peak No. 6) – cyanidin 3RG (peak No. 5) (D: Giondaiko) types in *Iris ensata*.

Table 2. λ_{\max} of cyanidin and peonidin type anthocyanins in *Iris ensata*

Anthocyanins	λ_{\max} (nm)
Cyanidin 3RG	519.7
Cyanidin 3RG5G	516.7
Cyanidin 3RGac5G	523.8
Peonidin 3RG	519.7
Peonidin 3RG5G	517.8
Peonidin 3Rgac5G	523.6

を示したことから(第 2 表)、このアントシアニンがハナショウブに赤色花を育成する上で最も適した色素である。従って、**peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G** 型の系統「宮系 2」(第 2 図 A)はピンクの花色を呈していたが、赤色花を育種するための重要な遺伝資源である。

malvidin 3RG5G – peonidin 3RG5G 型(第 1 図 B)の発見も花色育種を展開する上で興味深いことである。このような **delphinidin** 型と **cyanidin** 型のアントシアニンの混在型は本実験が最初の報告である。この型に属する「桃児童」(第 2 図 B)は、ピンクの花色であったが、**malvidin 3RG5G** による紫と **peonidin 3RG5G** によるマゼンタの混在した新たな花色の育種に遺伝資源として貢献するものである。

Yabuya(1991)は、ハナショウブおよびその野生型における主要アントシアニンの基本(野生)型は **malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G** であることを報告した。このような報告は、林ら(1978)および Ishikura and Yamamoto(1978)の知見とも一致し、しかも本実験結果からも支持された。従って、第 1 表に示したように、**malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G** を除いた 15 の主要アントシアニンの型はいずれも変異型と見なせる。例えば、**malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G** および **petunidin 3RG5G – malvidin 3RG5G** の両型はアントシアニンのアシル化 (*Ac*)、また **delphinidin 3RG – delphinidin 3RGac** 型はアントシアニンの配糖化(*5G*)および **methylation**(*Mt*)の劣性突然変異体であると考えられる。そこで、次章においてハナショウブにおけるアントシアニンのアシル化に関する遺伝分析を行った。

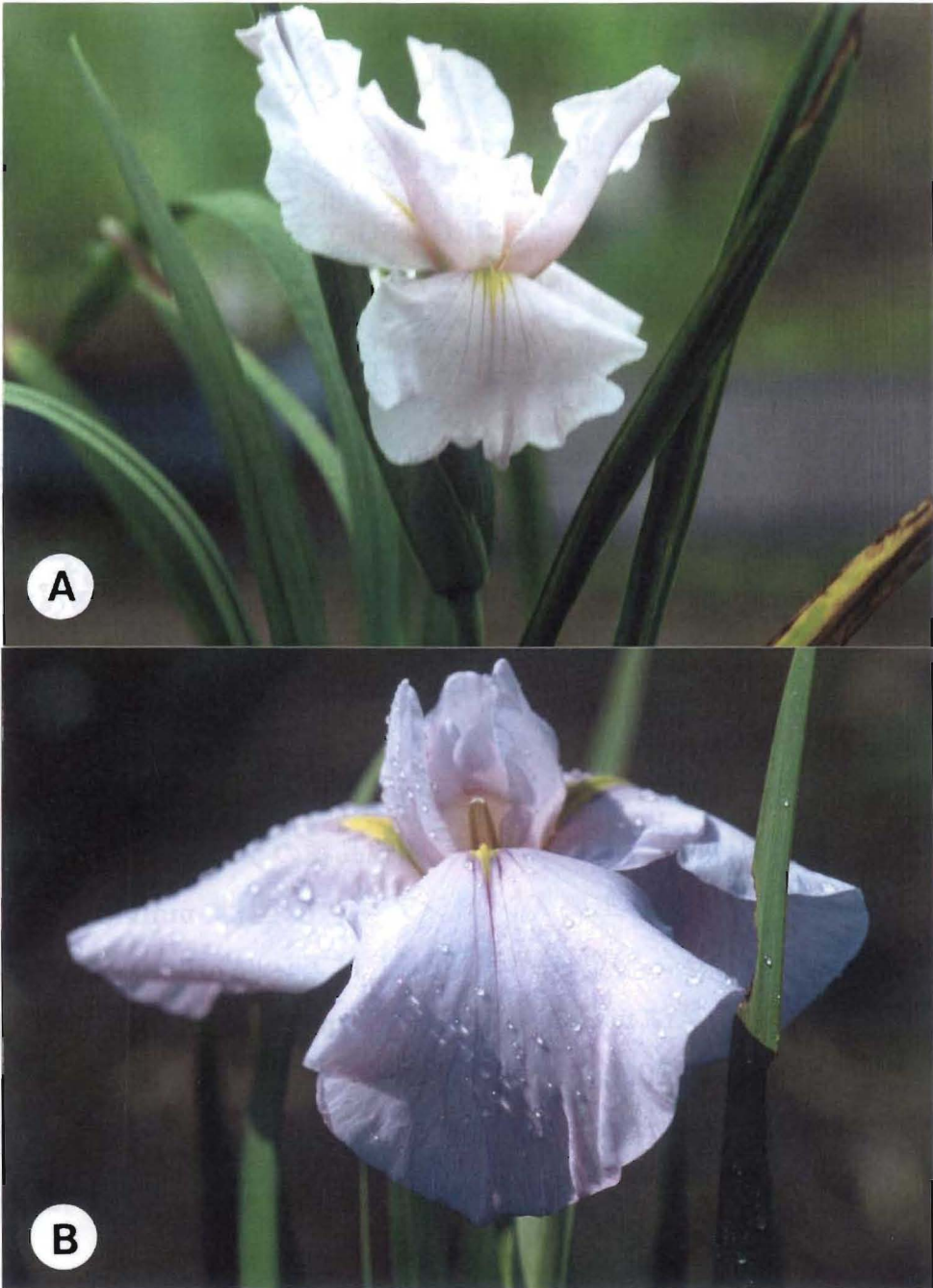


Fig. 2. Flowers of peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G type cultivar 'Miyakei 2'(A) and malvidin 3RG5G – peonidin 3RG5G type cultivar 'Momojido'(B) of *Iris ensata*.

第3章 アントシアニンのアシル化に関する遺伝分析

緒言

先に述べたように、ハナショウブの主要アントシアニンに関する基本(野生)型は malvidin 3RGac5G - petunidin 3RGac5G であり、この非アシル型である malvidin 3RG5G - petunidin 3RG5G はアントシアニンのアシル化に関する劣性突然変異体と見なされている。しかしながら、本種ではアントシアニンのアシル化に関する遺伝学的知見は全く蓄積されていないのが現状である。そこで、本章ではハナショウブの malvidin 3RGac5G - petunidin 3RGac5G 型品種「花鳥」と malvidin 3RG5G - petunidin 3RG5G 型品種「大江戸」との F₁ および F₂ 植物を用いて、アントシアニンのアシル化に関する遺伝分析を行った。

材料および方法

ハナショウブの品種間交雑、「大江戸」x「花鳥」の F₁ 植物 5 個体および F₂ 植物 47 個体を植物材料として供試した。両親品種のうち、「大江戸」は非アシル化アントシアニン(その主要アントシアニンの型は malvidin 3RG5G - petunidin 3RG5G である。)を、一方「花鳥」はアシル化アントシアニン(その主要アントシアニンの型は malvidin 3RGac5G - petunidin 3RGac5G である。)を有している (Yabuya 1991)。

上記の F₁ および F₂ 植物における外花被含有アントシアニンの HPLC 分析は前章の方法に従って行い、これらの個体がアシル化および非アシル化のいずれのアントシアニンを有するのかを判定した。

結果および考察

ハナショウブの品種間交雑、「大江戸」x「花鳥」の F₂ 植物におけるアシル化アントシアニンおよび非アシル化アントシアニンの分離に関する χ^2 検定の結

果を第3表に、またその代表的なアントシアニンの HPLC クロマトグラムを第3図に示した。これらの図表から明らかなように、アシル化アントシアニンと非アシル化アントシアニンの分離比を1遺伝子雑種における F_2 の分離比(3:1)と仮定して χ^2 検定を行ったところ、この仮定は極めて適合していた。また、 F_1 植物の5個体はすべてアシル化アントシアニン(その主要成分は malvidin 3RGac5G - petunidin 3RGac5G である。)を有していた。以上のことから、ハナショウブにおけるアントシアニンアシル基の転移は単一遺伝子の関与によるものであり、アシル化は非アシル化に対して優性であった。そこで、アントシアニンアシル基転移遺伝子を *Ac* と表すならば、両親品種の「大江戸」および「花鳥」におけるアシル化の遺伝子型は *acac* および *AcAc* と推定される。

ハナショウブではアントシアニンのメチル化遺伝子も分析され、メチル化 (*Mt*) は非メチル化 (*mt*) に対して優性であった(藪谷 1998)。このようなアントシアニンの生合成に関する遺伝学的知見が蓄積することは、本種の花色の多彩化育種を進める上で極めて重要なことである。

Table 3. Segregation for acylation of anthocyanins in F₂ plants

No. of F ₂ plants		Expected ratio	χ^2	P
Acylated anthocyanins ¹⁾	Non-acylated anthocyanins ²⁾			
35	12	3 : 1	0.007	0.90 < P

1) Petunidin 3RGac5G and malvidin 3RGac5G were detected as major anthocyanins.

2) Delphinidin 3RG5G, petunidin 3RG5G and malvidin 3RG5G were detected as a major anthocyanin.

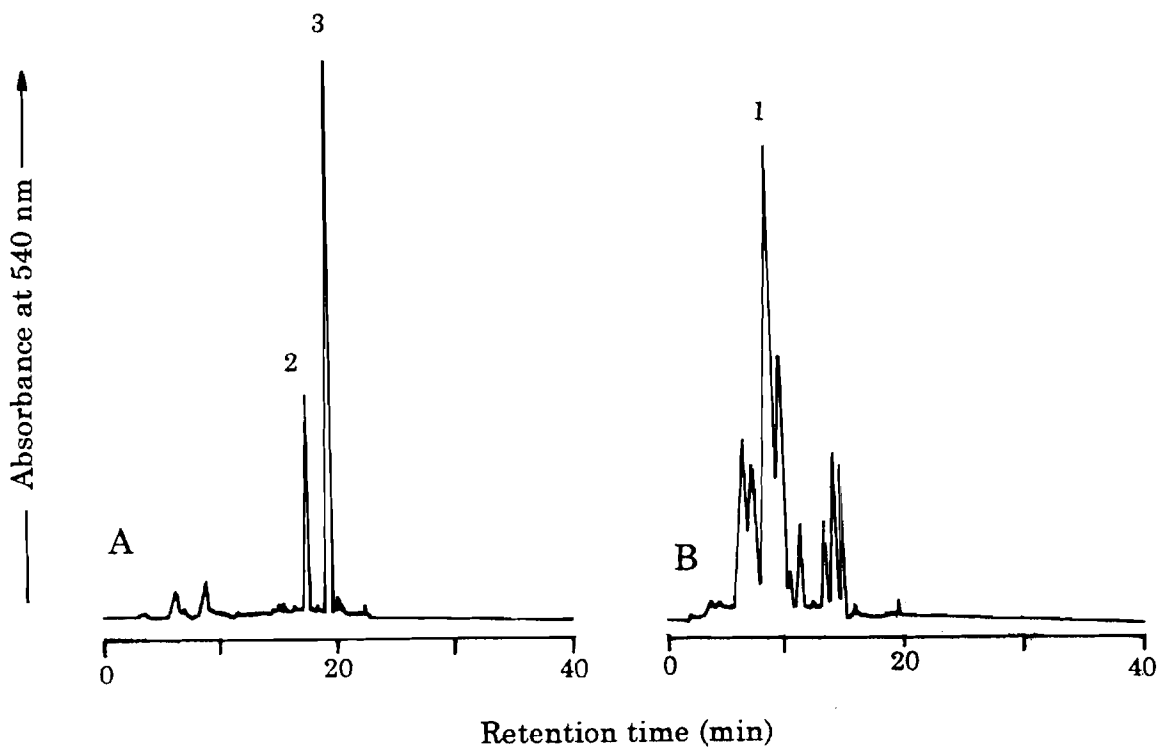


Fig. 3. The representative HPLC chromatograms of acylated anthocyanin type(A) and non-acylated one(B) in F_2 plants. Peak No. 1: petunidin 3RG5G; No. 2: malvidin 3RG5G; No. 3: petunidin 3RGac5G; No. 4: malvidin 3RGac5G.

第4章 アントシアニンの安定性に及ぼすアシル化およびコピグメンテーションの影響

緒言

ハナショウブの malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G 型における青紫品種では、両アントシアニンとフラボンの isovitexin とのコピグメンテーションにより花色の青色化ばかりでなく、安定化も促進することが明らかにされている(Yabuya *et al.* 1994b、1997、2000)。これに対して、本種にはその非アシル型である malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G 型の品種も存在しているにもかかわらず、花色やアントシアニンの安定性に及ぼすアシル化の影響に関してはほとんど検討されていない。

そこで、本章ではアシル化アントシアニン(malvidin 3RGac5G、petunidin 3RGac5G)と非アシル化アントシアニン(malvidin 3RG5G、petunidin 3RG5G)を用いて、McIlvaine 緩衝液中でのアントシアニンの安定性に及ぼす pH、アシル化および isovitexin とのコピグメンテーションの影響について明らかにした。また、ハナショウブの malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G 型と malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G 型の品種における花色の安定性も比較検討した。

材料および方法

(1) *in vivo* での安定性試験

ハナショウブの外花被における花色の安定性試験のために、植物材料として malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G 型の 2 品種、「花籬」、「邪馬台国」およびその非アシル型である malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G 型の 2 品種、「大江戸」、「水の光」を供試した。これらの品種の花を開花当日に採取して水の入った容器に差して 20℃で保存し、3 枚の外花被をそれぞれ開花当日、1 日および 2 日後の試料として用いた。各試料は、島津マルチパーパス自記分光光

度計(MPS-2000)によりその吸光度を測定した。

(2) *in vitro* での安定性試験

McIlvaine 緩衝液中におけるアントシアニンの安定性試験のために、アントシアニンとして malvidin 3RGac5G、3RG5G、petunidin 3RGac5G、3RG5G、フラボンとして isovitexin の標品を供試した。ハナショウブのシアニック品種から単離されたアントシアニンの標品は、Yamaguchi *et al.* (1990、1996)の方法により精製した。アントシアニンの精製に際して、山口雅篤博士(南九州大学園芸学部)に多大のご協力をしていただいた。また、isovitexin は岩科司博士(国立科学博物館筑波実験植物園)より分譲されたものである。この場で両氏に厚くお礼を申し上げたい。

まず、アントシアニンの単独区ではその標品を微量の EGME(Ethylene glycol monomethyl ether)で溶解後、各 pH(3.2、4.2、5.2、6.2)の McIlvaine 緩衝液を加え 0.1mM になるように調整した。次に、アントシアニン+ isovitexin 区では、先に述べた方法により各アントシアニンを McIlvaine 緩衝液(pH5.2)で 0.1mM になるように、また isovitexin は微量の 0.02mMNaOH で溶解後、McIlvaine 緩衝液(pH5.2)を加え、malvidin 3RGac5G、3RG5G では 1.0mM に、petunidin 3RGac5G、3RG5G では 1.4mM になるように調整した。各試料について溶解直後、2分、4分、6分、8分、10分、30分、1時間、3時間、6時間、1日、2日および3日後に島津マルチパーパス自記分光光度計(MPS-2000)によりその吸光度を測定した。

結果および考察

まず、malvidin 3RGac5G、petunidin 3RGac5G とその非アシル化型の malvidin 3RG5G、petunidin 3RG5G を用いて、McIlvaine 緩衝液中におけるアントシアニンの安定性に及ぼす pH およびアシル化の影響を比較検討した(第4～7図)。その結果、pH3.2の水溶液中ではアシル化と非アシル化の malvidin 型および petunidin 型アントシアニン間の安定性に顕著な差異は認められなく、しかも両者ともかなりの安定性を示した(第4図)。これは、アントシアニンが

pH3.2 の酸性水溶液中ではフラビリウムイオンの安定な構造を取るからである。これに対して、pH4.2~6.2 の弱酸性水溶液中ではアシル化、非アシル化の malvidin 型および petunidin 型アントシアニンともかなりの不安定性を示したが、前者は後者よりも安定性が幾分高かった(第 5~7 図)。このようなアシル化アントシアニンの安定性は、アントシアニジンの C 環と芳香族アシル基のベンゼン環との分子内スタッキングによるものと推測される。

次に、McIlvaine 緩衝液中におけるアントシアニンの安定性に及ぼすアシル化および isovitexin とのコピグメンテーションの影響を調べ、その結果を第 8 および 9 図に示した。malvidin 型アントシアニン(第 8 図)についてみると、malvidin 3RGac5G 区では溶解 30 分後までかなりの退色が進んだのに対して、malvidin 3RGac5G + isovitexin 区では溶解後あまり退色が認められず、かなりの安定性を示した。一方、非アシル化型の malvidin 3RG5G 区では溶解直後に著しい退色が見られ、2 分後にはほぼ完全に退色した。これに対して、malvidin 3RG5G + isovitexin 区では溶解 30 分後までかなりの退色が進んだが、その後の退色はほぼ停止した。また、先の実験結果と同様、malvidin 3RGac5G は malvidin 3RG5G よりも幾分安定性を示した。

このように、malvidin 型アントシアニンの安定性は *p*-クマール酸によるアシル化および isovitexin とのコピグメンテーションより促進されるが、その効果は前者よりも後者の方がはるかに優れていた。更に、同様のことが petunidin 型アントシアニンの *in vitro* での安定性の実験結果からも認められた(第 9 図)。このようなコピグメンテーションによる malvidin 型および petunidin 型アントシアニンの安定性は、isovitexin との共存による分子間スタッキング(Hoshino *et al.* 1980、後藤・近藤 1989、Goto and Kondo 1991)に由来するものと考えられる。Yabuya *et al.* (2000)は、pH4.2~6.2 の弱酸性水溶液中での malvidin 3RGac5G および petunidin 3RGac5G の不安定性は、isovitexin とのコピグメンテーションにより顕著に克服されることを既に明らかにしているが、その非アシル化アントシアニンの malvidin 3RG5G および petunidin 3RG5G がコピグメンテーションにより安定化が促進されることを報告したのは本研究が最初である。

第 10 図は、malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G 型品種、「花籬」、「邪

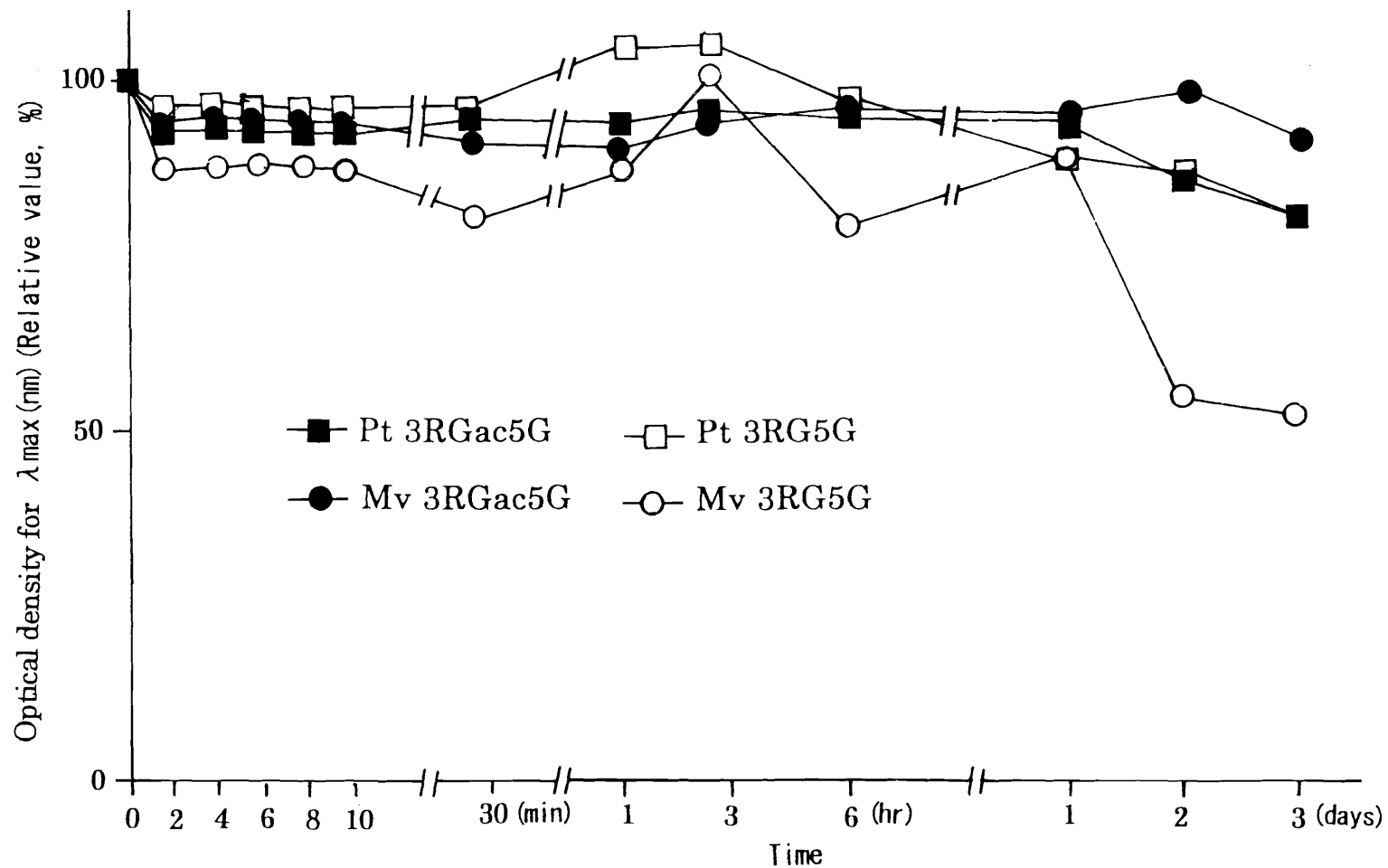


Fig. 4. Effect of acylaton on stability of petunidin and malvidin type anthocyanins in McIlvaine's citrate phosphate buffer (pH 3.2).

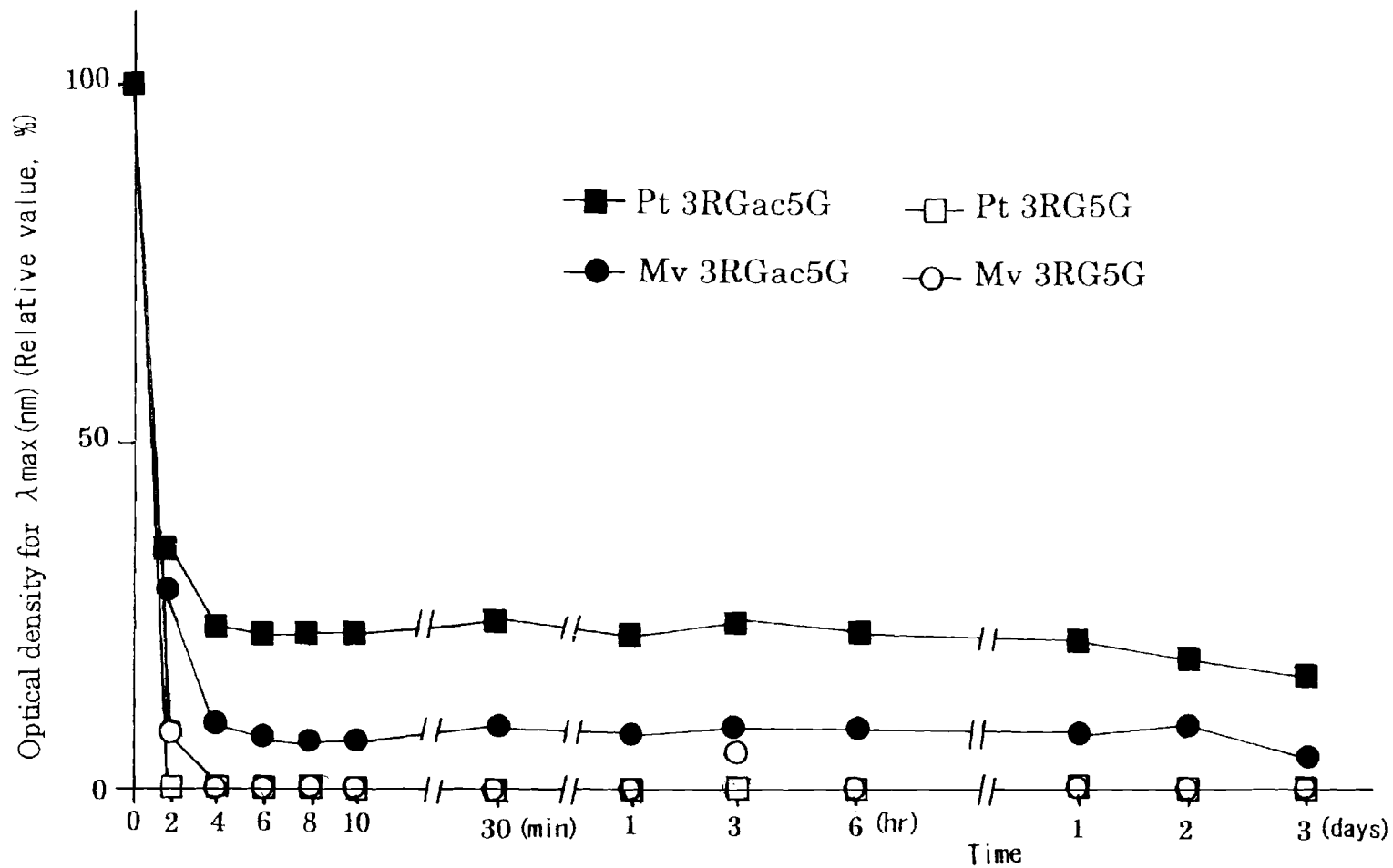


Fig. 5. Effect of acylation on stability of petunidin and malvidin type anthocyanins in McIlvaine's citrate phosphate buffer (pH 4.2).

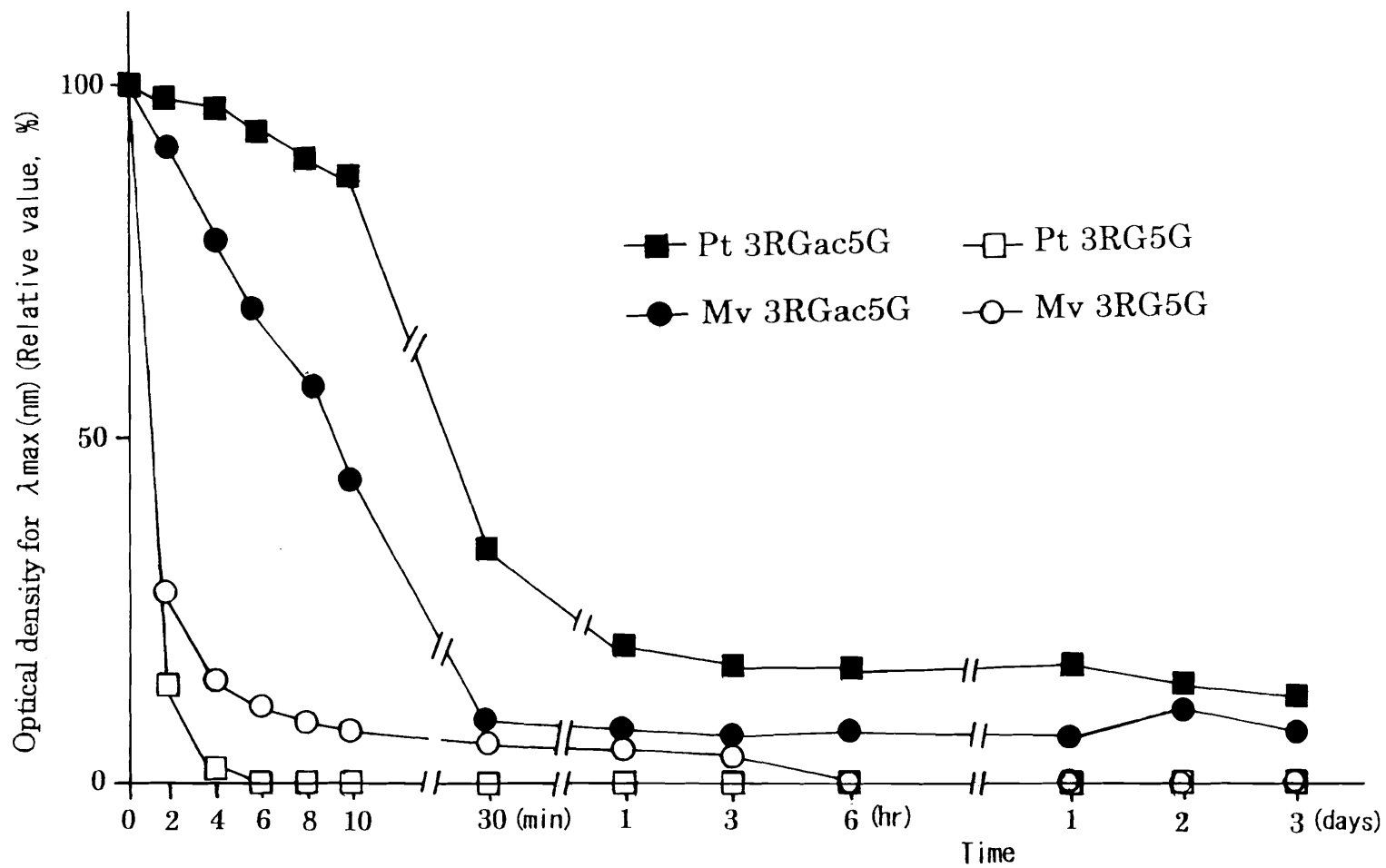


Fig. 6. Effect of acylaton on stability of petunidin and malvidin type anthocyanins in McIlvaine's citrate phosphate buffer (pH 5.2).

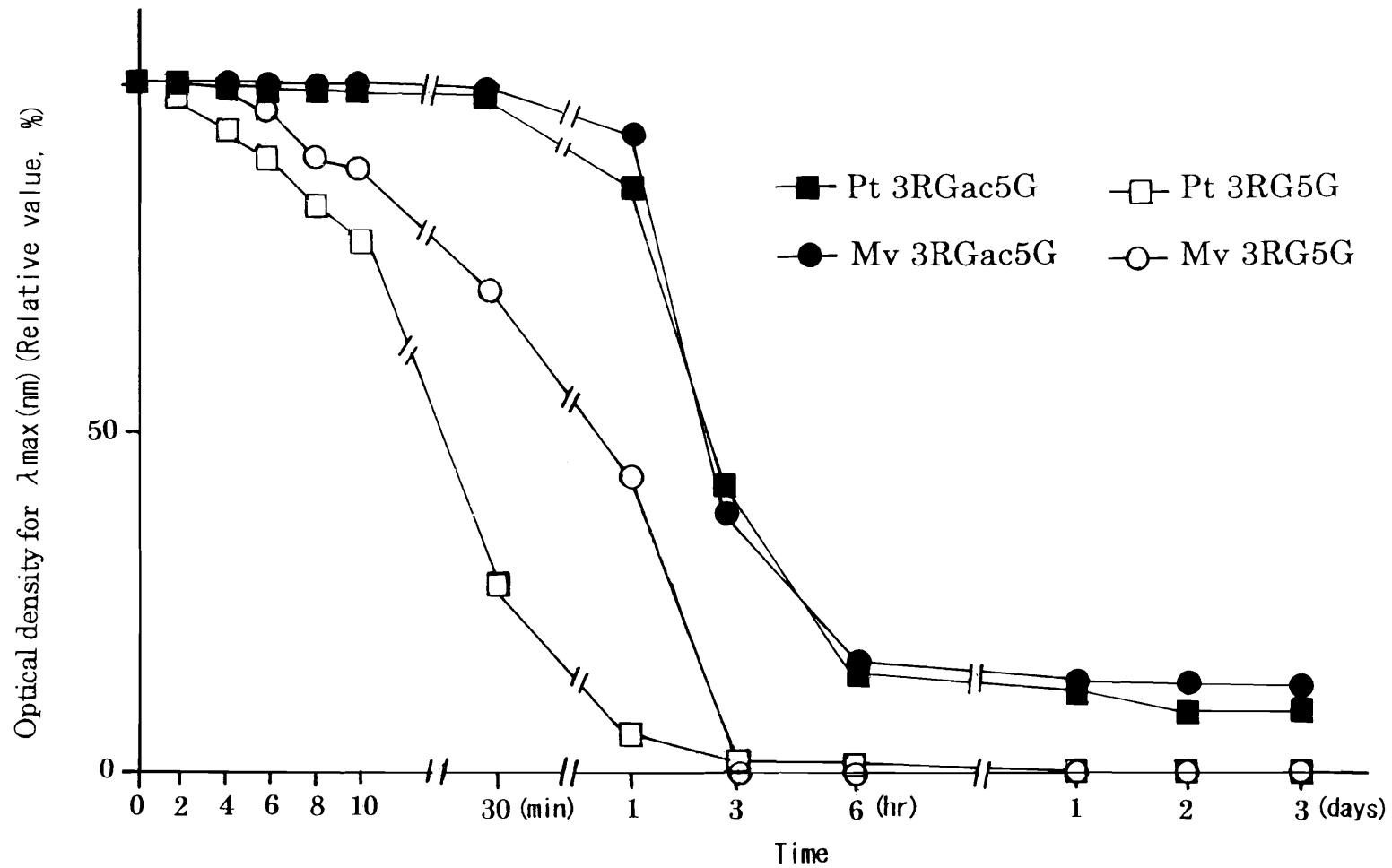


Fig. 7. Effect of acylaton on stability of petunidin and malvidin type anthocyanins in McIlvaine's citrate phosphate buffer (pH 6.2).

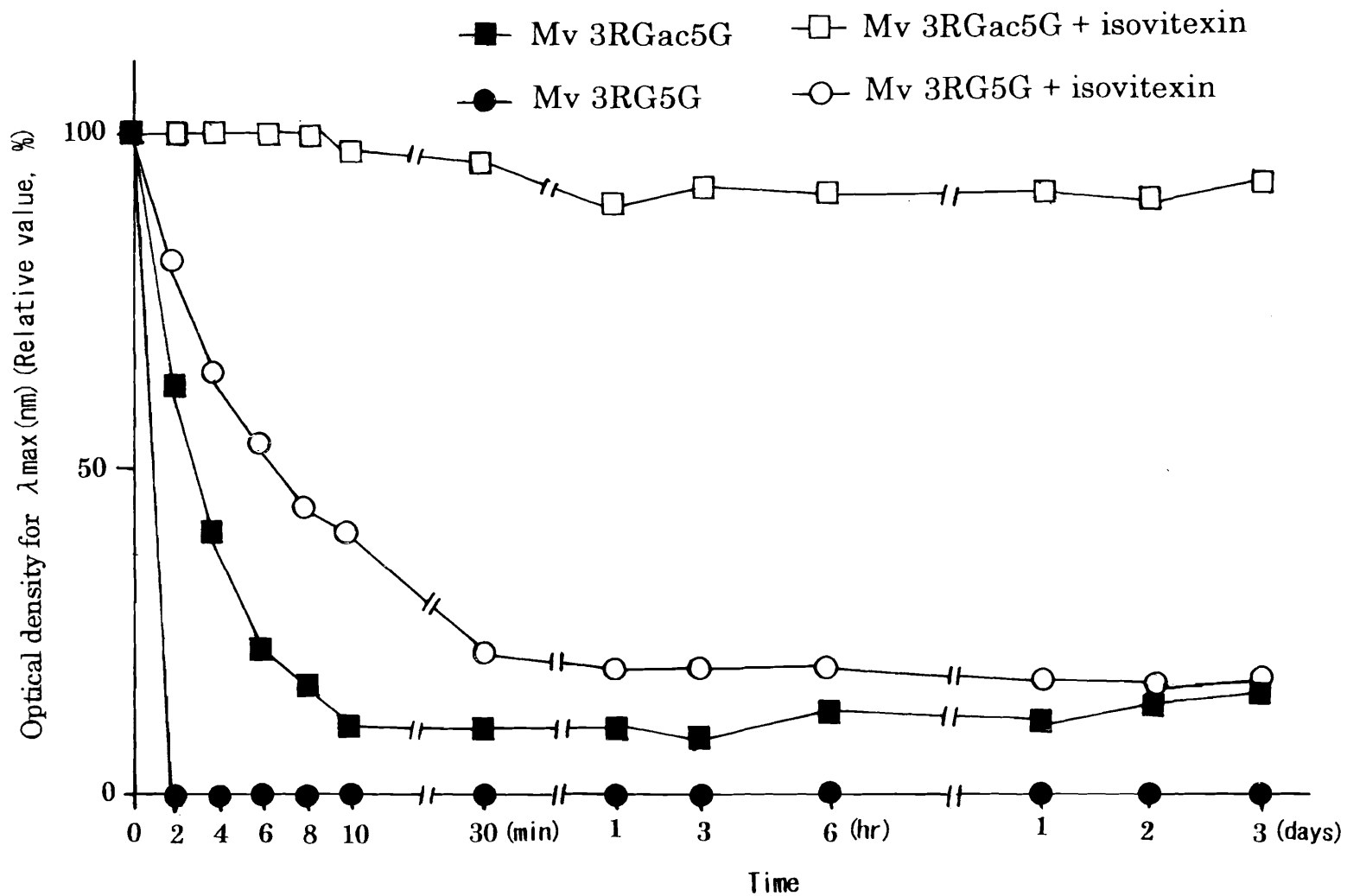


Fig. 8. Effect of copigmentation and acylation on stability of malvidin type anthocyanins in McIlvaine's citrate phosphate buffer (pH 5.2).

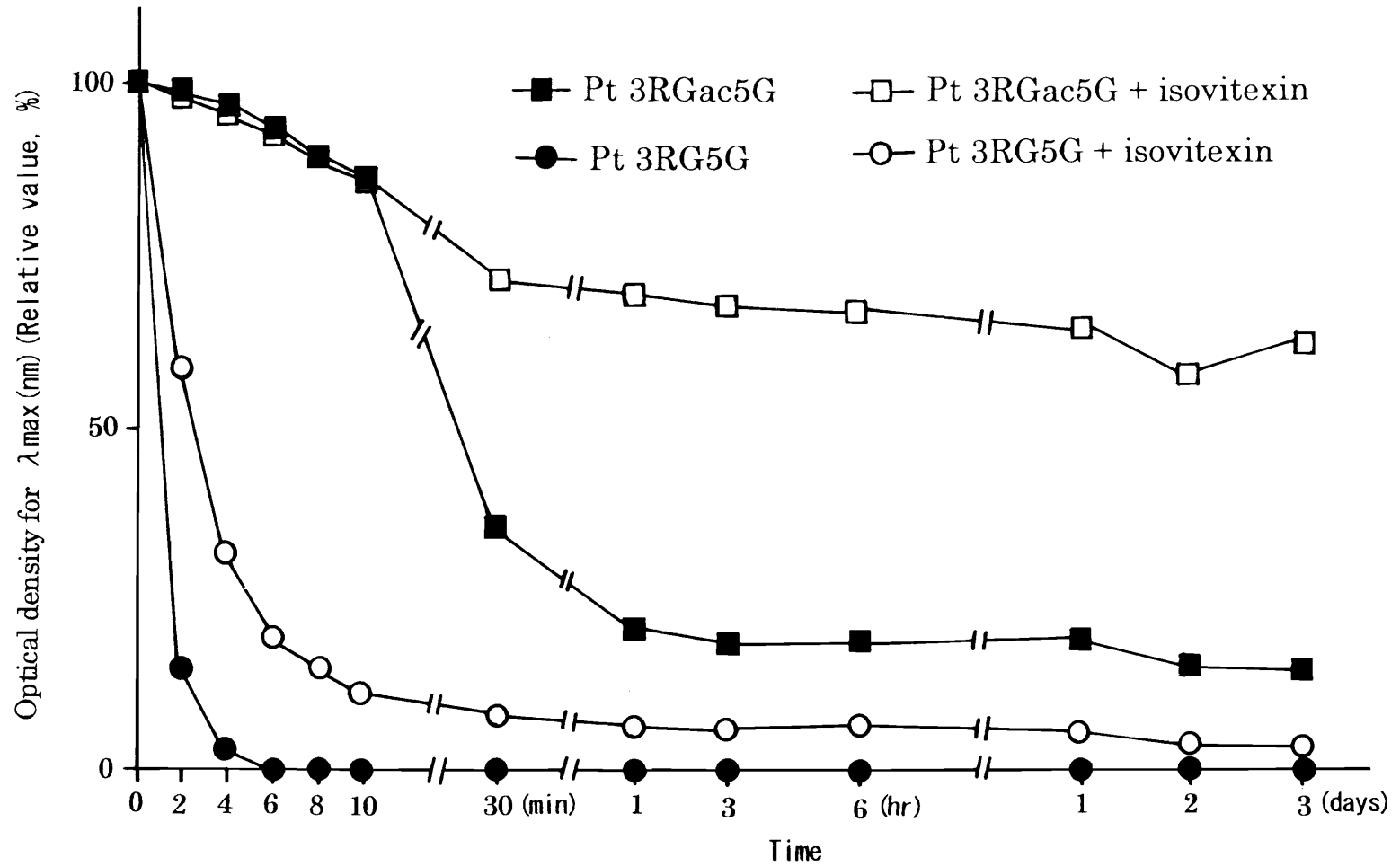


Fig. 9. Effect of copigmentation and acylation on stability of petunidin type anthocyanins in McIlvaine's citrate phosphate buffer (pH 5.2).

馬台国」および malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G 型品種、「大江戸」、「水の光」における開花後の花色の変化を示したものである。この図から明らかなように、非アシル型品種はアシル型品種よりも花色の退色が進んでいた。先に述べたアントシアニンの *in vitro* での安定性に関する実験結果より、このようなアシル型品種における花色の安定性には、コピグメンテーションやアントシアニンのアシル化が関与しているものとみなされるが、前者に較べて後者の花色安定性への貢献は小さいものと思われる。また、非アシル型品種における花色の安定化はフラボン(isovitexin)とのコピグメンテーションを利用することで可能である。

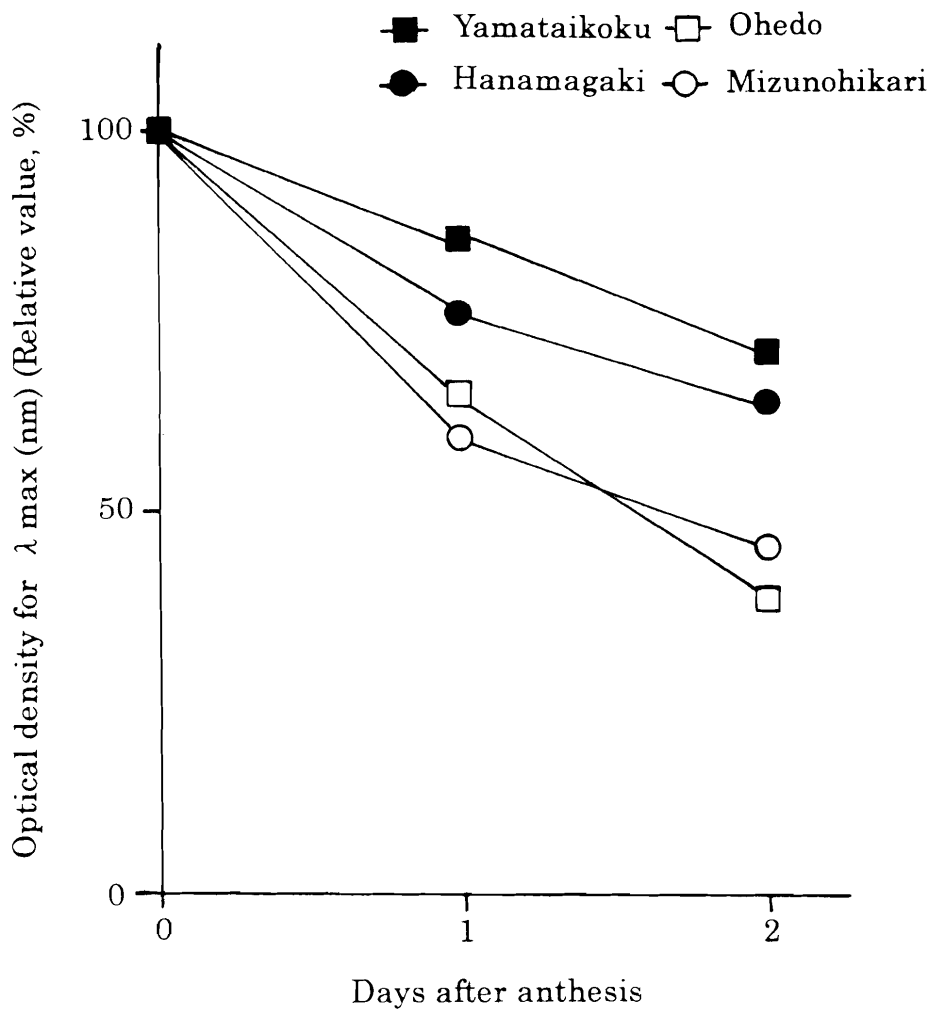


Fig. 10. Comparison of optical density for visible λ max (nm) of outer perianths at anthesis, one and two days after anthesis between malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G type cultivars ‘Yamataikoku’, ‘Hanamagaki’ and malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G type ones ‘Ohedo’, ‘Mizunohikari’ of *Iris ensata*.

第5章 アントシアニンアシル基転移酵素の特性解明

緒言

最も重要な花色素であるアントシアニンは、アントシアニジンに糖が結合した配糖体のことであり、時にはこの配糖体が芳香族または脂肪族の有機酸によりアシル化された構造をとることもある。芳香族有機酸によるアントシアニンのアシル化において、*p*-クマロイル CoA とカフェオイル CoA から *p*-クマール酸とカフェ酸をアントシアニジン 3RG および 3RG5G へ転移する酵素が *Silene dioica* で最初に報告された(Kamsteeg *et al.* 1980)。その後、他の植物種でも CoA-エステルを経由して芳香族有機酸をアントシアニジン 3G に転移する酵素の特性が明らかにされてきた(Teusch *et al.* 1987、Callebaut *et al.* 1996)。

酢酸、コハク酸などの脂肪族有機酸によるアントシアニジン 3G5G(3, 5-diglucoside)のアシル化アントシアニンを有する花卉から抽出したアシル基転移酵素の分析では、アントシアニジン 3G のアシル化は、アントシアニンの生合成での 5-配糖化の前提となることが *Zinnia elegans* (Ino and Yamaguchi 1993)、*Centaurea cyanus* (Yamaguchi *et al.* 1995) および *Dahlia variabilis* (Yamaguchi *et al.* 1999) で報告されている。これに対して、芳香族有機酸によるアシル化と 5-配糖化の順序は植物種により異なることが指摘されている。すなわち、アントシアニジン 3G のアシル化は、*Silene dioica* (Kamsteeg *et al.* 1980) では最終ステップであり、一方 *Petunia hybrida* (Jonsson *et al.* 1984)、*Matthiola incana* (Teusch *et al.* 1987) および *Ajuga reptans* (Callebaut *et al.* 1996) では 3G のアシル化は 5-配糖化に先行している。更に、*Perilla frutescens* (Yamazaki *et al.* 1999) ではアントシアニジン 3-(*p*-coumaroyl)-glucosido-5-glucoside を生産するために、3G-アシル化→5-配糖化および 5-配糖化→3G-アシル化の両方とも機能している。

ハナショウブ (*Iris ensata* Thunb.) の花では、アントシアニジン 3RG や 3RG5G が *p*-クマール酸でアシル化された delphinidin 3RGac、malvidin 3RGac、delphinidin 3RGac5G、petunidin 3RGac5G および malvidin 3RGac5G が発見

されている(Ishikura and Yamamoto 1978、Yabuya 1991、Yabuya *et al.* 1997、2001a)。そこで本研究では、ハナショウブの花蕾から抽出した *p*-クマール酸転移酵素の特性やシアニックおよびアシアニック品種における同酵素の活性を明らかにするとともに、アントシアニン生合成におけるアントシアニジン 3RG のアシル化と 5-配糖化の順序についても検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

ハナショウブのシアニック系として、「花籬」、「水天一色」、「紫式部」、「艶小町」、「紫宸殿」、「座間の美」の 6 品種を、またアシアニック系として「浮寝鳥」、「雪燕」、「磯打波」、「鶴の毛衣」の 4 品種を植物材料として供試した。

(2) アントシアニンおよび *p*-クマロイル CoA の精製

ハナショウブのシアニック系品種および他の植物種から単離されたアントシアニンの標品は、Yamaguchi *et al.* (1990、1996)の方法により精製し、また *p*-クマロイル CoA は Stöckigt and Zenk(1975)の方法により調製した。なお、アントシアニンの精製では山口雅篤博士(南九州大学園芸学部)、一方 *p*-クマロイル CoA の調製では加藤研治氏(塩野義製薬)にご協力をいただいたので、両氏に厚くお礼申し上げる。

(3) アントシアニン試料の作製

ハナショウブの品種当たり 3~5 花を供試し、前章で述べた方法によりアントシアニンの HPLC 分析用の試料を作製した。

(4) 酵素調製

酵素抽出物は、2~4 個の花蕾から Yamaguchi *et al.* (1999)の方法により調製した。また、アシル基転移酵素は、-20℃で 2、3 週間その活性をほとんど低下させずに保存することができた。

(5) タンパク質濃度の決定および酵素アッセイ

タンパク質濃度は、Bradford(1976)の方法により決定した。酵素アッセイに用いた標準反応液は、100 μ l 当たり 20 μ l 酵素抽出物(約 15~20 μ g タンパク質)、500 μ M malvidin 3RG5G または delphinidin 3RG、300 μ M *p*-クマロイル CoA および 10mM L-cysteine を含む 70 μ lKPi 緩衝液(pH6.5)の組成であった。酵素反応が 35°C、20 分間で行われた後、Folch *et al.* (1957)の方法によりその反応を停止した。最終産物のアントシアニンは HPLC で確認した。

(6) 酵素の特性

ハナショウブ品種「花籬」の花蕾から抽出した酵素の特性は、Ino and Yamaguchi(1993)および Ino *et al.* (1993)の方法により明らかにした。アシル基受容体として malvidin 3RG5G または delphinidin 3RG を、アシル基供与体として *p*-クマロイル CoA を用いて、至適 pH、二価イオン(1mM)および酵素阻害剤(1mM)の効果が調べられた。基質の飽和テストは、各基質の濃度以外は標準の酵素アッセイ法に従った。基質の飽和テストを除いて、基質特異性を含むすべての測定は、各基質の飽和濃度中の反応液で行った。

(7) 分析法

HPLC(島津 LC-10)は、Inertsil ODS- II カラム(6x100mm)と移動層(流量 1ml/min)の A 液に 1.5% H₃PO₄(水溶液)を、B 液に 1.5% H₃PO₄、20%HOAc、25%MeCN(水溶液)を用い、35°Cで 25%B 液から 85%B 液までの直線勾配のグラジェント溶出により行った。また、FAB-MS スペクトルは JOEL-SX102A により分析した。FAB-MS スペクトルの分析では福井祐子氏(サントリー・基礎研究所)にご協力をいただいたので、厚くお礼申し上げる。

結果および考察

アントシアニンアシル基転移酵素のアッセイのために、種々のアントシアニン標品が必要であった。これらのアントシアニンは数種の植物種から単離・精製し HPLC で分析され、また一部は FAB-MS でも測定され、その結果を第 4

表に示した。

malvidin 3RG5G、*p*-クマロイル CoA および品種「花籬」の花蕾からの粗酵素抽出物の反応は、基質(malvidin 3RG5G、9.8 分)よりも長い HPLC 保持時間(23.1 分)の反応産物を形成し、後者の値は malvidin 3RGac5G に対応するものであった(第 4 表)。*p*-クマロイル CoA が反応液から除外された時、この産物は検出されなかった。また、malvidin 3RG がアシル基受容体として用いられた時も、同様の方法により反応産物は malvidin 3RGac と同定された。

p-クマロイル転移酵素の活性特性は、malvidin 3RG5G または delphinidin 3RG および *p*-クマロイル CoA を用いて明らかにされた。malvidin 3RG5G (delphinidin 3RG)に対する 3-AT の活性は pH6.5(6.5)で至適となり、1/2 max 活性は pH5.4(5.0)と 7.7(7.6)であった。また、アシル化は種々の 2 価イオン(Mg²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Hg²⁺)および EDTA のいずれにも影響されなかった。また、diethylpyrocarbonate、diethyldithiocarbamate および N-ethylmaleimide によっても、アシル化の阻害は認められなかった。300 μM *p*-クマロイル CoA の条件下で、petunidin 3RG5G は 700 μM、また delphinidin 3RG、delphinidin 3RG5G および malvidin 3RG5G は 500 μM でアシル化率が最高に達した。

第 5 表は、ハナショウブの品種から抽出したアントシアニンを HPLC で分析した結果を示している。シアニック品種におけるアシル化アントシアニンの相対量は、花色に関係なく非アシル化アントシアニンよりもかなり高かった。これらのアントシアニンに加えて、すべての品種は微量で未同定のアントシアニン成分も有していた。

アントシアニン量を分析したのと同じ品種から調製された粗酵素抽出物は、花卉新鮮重 1g 当たり 3.1–4.2mg のタンパク質を含んでいた。この抽出物、アシル基受容体として malvidin 3RG5G または malvidin 3RG およびアシル基供与体として *p*-クマロイル CoA を用いて、アシル基転移酵素の特異性が調べられた(第 5 表)。花卉新鮮重(g)当たりの総 *p*-クマロイル転移酵素の値は、特異的活性の値とよく比例していた。シアニック品種間の特異的活性は約 $1.7 \times 10^{-2} \sim 1.9 \times 10^{-1} \text{pkat } \mu \text{g}^{-1}$ の広いレンジで変異が見られ、これを主要アントシアニン量と関係づけることは困難であった。一方、シアニック 5 品種のうち、「浮寝鳥」

Table 4. HPLC and FAB-MS analyses of anthocyanins used in this study

Anthocyanin	<i>Rt</i> (min)	[M] ⁺	Plant source[Reference]
Malvidin 3G	15.5	NT ^a	<i>Lagerstroemia indica</i> [26]
Malvidin 3RG	16.6	639	<i>Iris ensata</i> [14]
Malvidin 3RGac	27.6	785	<i>I. ensata</i> [14]
Malvidin 3RG5G	9.8	NT	<i>I. ensata</i> [30]
Malvidin 3RGac5G	23.1	947	<i>I. ensata</i> [35]
Petunidin 3G	11.3	NT	<i>L. indica</i> [26]
Petunidin 3RG5G	7.2	NT	<i>I. ensata</i> [30]
Petunidin 3RGac5G	20.5	933	<i>I. ensata</i> [35]
Delphinidin 3G	7.9	NT	<i>L. indica</i> [26]
Delphinidin 3RG	8.6	611	<i>I. ensata</i> [14]
Delphinidin 3RGac	21.1	757	<i>I. ensata</i> [37]
Delphinidin 3RG5G	4.8	NT	<i>Solanum melongena</i> [20]
Delphinidin 3RGac5G	18.2	919	<i>I. ensata</i> [30]

^a Not tested.

Table 5. Content of major anthocyanins and specific activity of *p*-coumaroyltransferase in flowers of *Iris ensata* cultivars

Flower color	Cultivars	Content of major anthocyanin (%)				Specific activity ($10^{-2} \times \text{pkat } \mu\text{g}^{-1}$) (Substrate)	
		Malvidin 3RGac5G	Petunidin 3RGac5G	Malvidin 3RG5G	Petunidin 3RG5G	Malvidin 3RG5G	Malvidin 3RG
Purple	Hanamagaki	47.6	24.4	13.1	4.6	18.97	4.02
Bluish purple	Suiten-issshoku	53.7	30.9	6.5	3.6	13.31	3.03
Reddish purple	Murasakishikibu	50.5	31.5	7.6	2.6	12.30	2.45
	Tsuyakomachi	46.6	39.1	4.0	2.4	5.97	1.22
	Shishinden	44.2	31.0	9.8	5.6	4.77	1.08
Purple with white vein	Zamanobi	23.4	39.9	1.2	3.1	1.74	0.30
White	Ukinedori	ND ^a	ND	ND	ND	0.79	0.19
	Yukitsubame	ND	ND	ND	ND	0.59	>0.01
	Isoutsunami	ND	ND	ND	ND	0	0
	Asahinomine Tsurunokegoromo						

^aNot detected.

および「雪燕」の2品種では、後者が malvidin 3RG を基質に用いた時に極めて低い活性を示した以外、両者ともかなりの特異的活性を有していた(第5表)。従って、芳香族有機酸のアシル基転移酵素をコードしている遺伝子は、アントシアニンの生合成遺伝子と独立に発現しているものと考えられる。このような考えは、脂肪族有機酸のアシル基転移酵素に関する報告からも支持される(Ino and Yamaguchi 1993、Ino *et al.* 1993、Yamaguchi *et al.* 1996、Yamaguchi *et al.* 1999)。

典型的なアントシアニン 3G、3RG および 3RG5G のアシル基受容体としての能力を品種「花籬」の酵素抽出液を用いた酵素アッセイにより検定した(第6表)。検定されたすべてのアントシアニン 3RG5G はどれも受容体として等しく機能し、一方アントシアニン 3RG の両者(delphinidin 3RG、malvidin 3RG) は 3RG5G の活性と比較して約 1/5 の活性を有していた。これに対して、すべてのアントシアニン 3G はアシル基受容体として機能していなかった。また、アントシアニン 3RG はハナショウブの花蕾からの酵素抽出液を用いた5-配糖化反応に基質として利用されたが、アントシアニン 3G および 3RGac は基質として利用できなかった(Yabuya *et al.* 2002)。これらの結果は、アントシアニン 3RG または 3RG5G のアシル化はハナショウブのアントシアニン生合成において最終ステップであることを指摘している(第11図)。

アントシアニンの生合成における3-アシル化と5-配糖化の順序は、これまでの報告により4種類の型に分類された(第7表)。ハナショウブは、*S. dioica* (Kamsteeg *et al.* 1980)とは少し異なるが、第4の型に属した。何故ならば、*Silene* の5-配糖化酵素はアントシアニン 3G を基質として利用できるが(Kamsteeg *et al.* 1978、1980)、ハナショウブのものは利用できなかったからである(Yabuya *et al.* 2002)。著者の知る限りでは、ハナショウブにおける3-アシル化と5-配糖化の順序およびアシル基転移酵素の特性に関する知見は単子葉植物で最初のものである。

最近、リンドウ(*Gentiana triflora*)やシソ(*Perilla frutescens*)では、アントシアニンアシル基転移酵素の特性ばかりでなく、この酵素をコードするcDNAが単離され、その特性まで解明されつつある(Fujiwara *et al.* 1998、Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000)。一方、*Iris* 属植物ではハナショウブ品種「紫式部」の

Table 6. Substrate specificity of *p*-coumaroyltransferase for various anthocyanins

Anthocyanin	Reaction product	Relative activity ^a (%)
Malvidin 3RG5G	Malvidin 3RGac5G	100
Petunidin 3RG5G	Petunidin 3RGac5G	107
Delphinidin 3RG5G	Delphinidin 3RGac5G	105
Malvidin 3RG	Malvidin 3RGac	18
Delphinidin 3RG	Delphinidin 3RGac	26
Malvidin 3G	Not detected	0
Petunidin 3G	Not detected	0
Delphinidin 3G	Not detected	0

^aThe acyltransferase activity obtained with Mv 3RG5G was expressed as 100%.

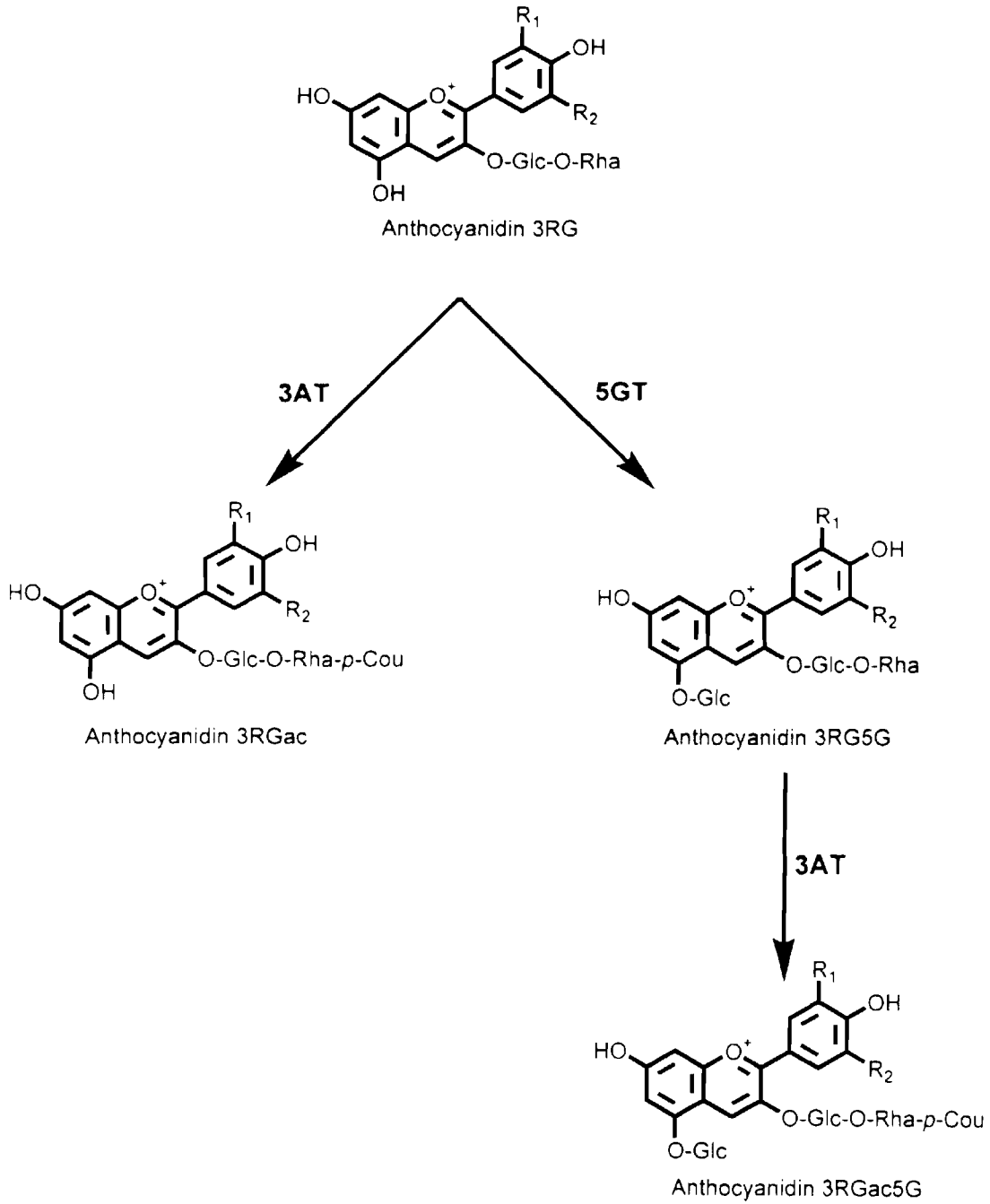


Fig. 11. The proposed pathway of the last part in anthocyanin biosynthesis in flowers of *Iris ensata*.

Table 7. The sequence types of 3-acylation and 5-glucosylation in anthocyanin biosynthesis of plants

Type	Description and proposed main sequence	Plant source [Reference]
1	3-acylation prior to 5-glucosylation 3RG → 3RGac → 3RGac5G 3XG ¹⁾ → 3XGac → 3XGac5G 3S ²⁾ → 3Sac → 3Sac5G 3G → 3Gac → 3Gac5G	<i>Petunia hybrida</i> [16] <i>Matthiola incana</i> [25] <i>Ajuga reptans</i> [2] <i>Zinnia elegans</i> [13] <i>Centaurea cyanus</i> [41]
2	3-acylation prior to 5-glucosylation or only 5-glucosylation 3G → 3Gac → 3Gac5G or 3G → 3G5G	<i>Dahlia variabilis</i> [21, 43]
3	Simultaneously 3-acylation and 5-glucosylation, following vice versa 3G → 3Gac → 3Gac5G and 3G → 3G5G → 3Gac5G	<i>Perilla frutescens</i> [44]
4	3-acylation after 5-glucosylation or only 3-acylation of 3-sugars 3G → 3G5G → 3Gac5G 3RG → 3RG5G → 3RGac5G or 3G → 3Gac 3RG → 3RGac 3RG → 3RG5G → 3RGac5G or 3RG → 3RGac	<i>Silene dioica</i> [18] <i>Iris ensata</i> [38, 39]

1) Anthocyanidin 3-xylosylglucoside.

2) Anthocyanidin 3-sophoroside.

蕾から得られた cDNA を鋳型として、AT プライマー、AT2 プライマーおよびオリゴ dT プライマーを用いて PCR(polymerase chain reaction)を行い、その産物からプローブを作成した。現在、このプローブを用いたダッチアイリス花弁の cDNA ライブラリーからのスクリーニングにより、アントシアニンアシル基転移酵素をコードする cDNA の単離を試みている。

摘要

アントシアニンとは *p*-クマール酸、カフェ酸などの芳香族有機酸のアシル化によって安定性が増し、しかもその効果はポリアシル化により顕著になるばかりでなく、花色に青色化をもたらすことが知られている。ハナショウブの外花被含有アシル化アントシアニンは *p*-クマール酸による単独のアシル型であるので、これを遺伝子導入によりポリアシル化型に改良すれば、青色花品種の育成やアントシアニン安定性の増大が期待できる。そこで、アントシアニンのポリアシル化によりハナショウブの花色発現の安定化を促進し、その観賞価値を高めるために、本研究ではアントシアニンの有用変異の探索、アントシアニンのアシル化に関する遺伝分析、アントシアニンの安定性に及ぼすアシル化およびコピグメンテーションの影響およびアントシアニンアシル基転移酵素の特性解明を実施してきた。

まず、ハナショウブ 130 品種、13 系統およびその野生型(ノハナショウブ)3 系統における外花被含有アントシアニンが HPLC により分析され、これらの品種(系統)は 16 種類の主要アントシアニンの型に分類された。これらの型うち、基本(野生)型である malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G を除いた 15 種類は変異型とみなされた。これらの変異型は今後、本種のアントシアニン生合成の遺伝分析を進める上で貴重な材料となるものである。また、16 種類の型のうち、petunidin 3RGac5G – delphinidin 3RGac5G、delphinidin 3RGac5G – petunidin 3RGac 5G、cyanidin 3RGac5G – peonidin 3RGac5G、delphinidin 3RG – delphinidin 3RGac、petunidin 3RG5G – malvidin 3RG5G、malvidin 3RG5G – peonidin 3RG5G、peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G および peonidin 3RG – cyanidin 3RG の 8 種類の型は本研究で最初に発見されたものであり、しかも peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G 型に属する系統「宮系 2」は赤色花を育種する上で重要な遺伝資源として注目された。

次に、アントシアニンの安定性に及ぼす pH およびアシル化の影響についてみると、pH3.2 の水溶液中では malvidin 型および petunidin 型のアシル化と非アシル化アントシアニン間の安定性に顕著な差異はなく、しかも両者ともかな

りの安定性を示した。これに対して、pH4.2~6.2の弱酸性水溶液中ではアシル化、非アシル化の malvidin 型および petunidin 型アントシアニンともかなりの不安定性を示したが、前者は後者よりも安定性が幾分か高かった。また、McIlvaine 緩衝液中におけるアントシアニンの安定性に及ぼすアシル化および isovitexin とのコピグメンテーションの影響についてみると、malvidin 型および petunidin 型アントシアニンともその安定性は *p*-クマール酸によるアシル化および isovitexin とのコピグメンテーションにより促進されるが、その効果は前者よりも後者の方がはるかに優れていた。このようなコピグメンテーションによる両型アントシアニンの安定性は、isovitexin との共存による分子間スタッキングに由来するものと考察した。

また、花色の安定性についてハナショウブのアシル(malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G)型品種と非アシル(malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G)型品種を比較すると、非アシル型品種はアシル型品種よりも花色の退色が進んでいた。従って、先に述べた *in vitro* の結果より、アシル型品種における花色の安定性には、コピグメンテーションやアントシアニンのアシル化が関与しているものとみなされるが、前者に較べて後者の花色安定性への貢献は小さいものと思われる。

ハナショウブのシアニック系アシル型品種「花籬」の花蕾に含まれるアントシアニンアシル基転移酵素は *p*-クマロイル CoA を介して *p*-クマール酸をアントシアニン 3RG および 3RG5G の両方へ転移し、その比率(前者:後者)は約 1 : 4 であった。これに対して、アントシアニンアシル基転移酵素は *p*-クマール酸をアントシアニン 3G へ転移しなかった。また、「花籬」以外のシアニック系アシル型品種における酵素活性も malvidin 3RG よりも malvidin 3RG5G の方が高かったが、その活性度は品種により異なっていた。一方、アシアニック系の品種では、「磯打波」および「鶴の毛衣」の酵素活性が認められなかったが、「浮寝鳥」および「雪燕」では弱い酵素活性を示した。このように、アシアニック系ではアントシアニンの生合成系が機能していないにもかかわらず、アントシアニンアシル基転移酵素活性を有する品種の存在は極めて興味深い。

最後に、ハナショウブにおけるアントシアニンアシル基転移酵素は単一遺伝子に支配されており、アシル化は非アシル化に対して優性であった。現在、ハ

ナショウブに cDNA ライブラリーを作製し、アントシアニンアシル基転移酵素をコードする遺伝子の単離を試みている。

Characterization of acylated anthocyanins and anthocyanin *p*-coumaroyltransferase in Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb.

Tsutomu Yabuya

Summary

Anthocyanins produce a wide range of flower colors such as pink, red, orange, scarlet, purple, blue and so on. They consist of an aglycon (an anthocyanidin) linked with one or more sugar moieties and occasionally with one or more acid moieties. The main anthocyanidins consist of pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin and malvidin, and they differ on in the degree of hydroxylation and methylation of the B-ring. All the anthocyanidins except pelargonidin have been detected in the flowers of Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb.(Table 1).

Modification of the anthocyanidins with glycosylation and acylation produces a wide variety of anthocyanins. The glycosylation of the anthocyanidins is important in stabilizing the molecule and increasing its water solubility. On the other hand, anthocyanins were acylated with aromatic acids and /or aliphatic acids, and the aromatic acylation stabilizes anthocyanins and makes their color bluer. Also, the effects of bluing and stabilization enhance by increasing number of aromatic moieties. As shown in Table 1, all the acylated anthocyanins detected in *I. ensata* were acylated with one aromatic acid, *p*-coumaric acid. Therefore, genetic engineering for highly acylated anthocyanins in this species can promote to make blue flowers and to stabilize the anthocyanins. The main objective of the present study was to characterize acylated anthocyanins and anthocyanin *p*-coumaroyltransferase of *I. ensata*.

The anthocyanins of 130 cultivars, 13 lines and 3 wild forms of *I. ensata* were analyzed by HPLC, and these plants were classified into 16 types of major anthocyanins (Table 1). Fifteen types except the basic (wild) type, malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G type, were regarded as variants for this type and these are useful materials for genetic analysis of anthocyanin biosynthesis in this species. Among 16 types, 8 types such as petunidin 3RGac5G – delphinidin 3RGac5G, delphinidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G, cyanidin 3RGac5G – peonidin 3RGac5G, delphinidin 3RG – delphinidin 3RGac, petunidin 3RG5G – malvidin 3RG5G, malvidin 3RG5G – peonidin 3RG5G, peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G and peonidin 3RG – cyanidin 3RG were obtained as new types. In these new types, peonidin 3RG – cyanidin 3RG and peonidin 3RG5G – cyanidin 3RG5G were noteworthy because cyanidin 3RG and 3RG5G are useful for the breeding of red flowers in *I. ensata*.

The fading of flower color in acylated anthocyanin (malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G) type cultivars and non-acylated anthocyanin (malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G) ones of *I. ensata* and the *in vitro* stability of malvidin 3RGac5G, 3RG5G, petunidin 3RGac5G and 3RG5G due to different pH conditions and copigmentation with isovitexin were examined. The acylated anthocyanin cultivars exhibited higher flower color stability than the non-acylated anthocyanin ones 2 days after anthesis. Malvidin 3RGac5G, 3RG5G, petunidin 3RGac5G and 3RG5G were not stable except at the lowest pH 3.2, although the acylated anthocyanins showed slightly more stable than the non-acylated ones. On the contrary, the stability of these anthocyanins was increased by copigmentation with isovitexin. Therefore, it may be concluded that the stability of flower color in the cultivars with the acylated anthocyanins is caused by the copigmentation and acylation of anthocyanins.

Enzyme extracts from flower buds of acylated anthocyanin (malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G) type cultivars of *I. ensata* catalyzed in

transfer of the *p*-coumaroyl moiety from *p*-coumaroyl-CoA to both the anthocyanidins 3RG and 3RG5G, at a ratio ca. 1 to 4, respectively. Specific activities of *p*-coumaroyltransferase among the cyanic cultivars were found in the wide range of ca. 1.7×10^{-2} – 1.9×10^{-1} pkat μ g⁻¹. On the other hand, two among 5 acyanic cultivars showed considerable specific activities, though that in cv. Yukitsubame with malvidin 3RG as a substrate was extremely low. It is much interest that the gene encoding an aromatic acyltransferase is expressed independently of genes for anthocyanin biosynthesis. Moreover, typical anthocyanidin 3G, 3RG and 3RG5G were examined for their ability to serve as acyl acceptors by the standard enzyme assay method using enzyme extracts from cv. Hanamagaki of *I. ensata*. All the 3RG5G of anthocyanidins tested functioned equally well as acceptors, while anthocyanidin 3RG was roughly one fifth as effective as the 3RG5G. In contrast, anthocyanidin 3G did not serve as acyl acceptors at all. The sequence of 3-acylation and 5-glucosylation in the anthocyanin biosynthesis of this plant was discussed.

Finally, genetic analysis was carried out for acylation of malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G in *I. ensata*. The F₂ plants derived from non-acylated(malvidin 3RG5G – petunidin 3RG5G) cv. Ohedo x acylated (malvidin 3RGac5G – petunidin 3RGac5G) cv. Kacho segregated into acylated anthocyanin type and non-acylated one, giving a good fit to a 3 : 1 ratio(Table 3). This result shows that anthocyanin *p*-coumaroyltransferase is controlled by a dominant gene, which is symbolized as *Ac*. Further studies on the molecular characterization of this gene in *I. ensata* are now underway.

引用文献

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
2. Callebaut, A., N. Terahara and M. Decleire 1996. Anthocyanin acyltransferases in cell cultures of *Ajuga reptans*. *Plant Sci.* 118: 109-118.
3. Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane-Stanley 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
4. Fujiwara, H., Y. Tanaka, K. Sakakibara, M. Mizutani, M. Nakao, Y. Fukui, M. Yamaguchi, T. Ashikari and T. Kusumi 1998. cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant J.* 16: 421-431.
5. 後藤俊夫・近藤忠雄 1989. 青い花、その色の不思議. *現代化学* 221: 24-30.
6. Goto, T. and T. Kondo 1991. Structure and molecular staching of anthocyanins – Flower color variation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 17-33.
7. 林 孝三 1940a. ハナショウブの花色素について(予報). *植雑* 54: 23-28.
8. Hayashi, K. 1940b. Isolation of ensatin, an acylated anthocyanin from the flowers of Japanese *Iris*. *Proc. Imp. Acad. Tokyo* 16: 478-481.
9. Hayashi, K. 1941. Studien über Anthocyane. IV. Über Ensatin, ein neues Anthocyanin der Blüten von japanischen Schwertlilien. *Acta Phytochim.* 12: 65-82.
10. 林 孝三・大谷俊二・佐藤克二・津山 尚・石倉成行 1978. 花色構成物

質による日本産 Iris の類縁と系統. (財)進化生物学研究所, 研究報告 1: 1-16.

11. Hoshino, T., U. Matsumoto and T. Goto 1980. The Stabilizing effect of the acyl group on the co-pigmentation of acylated anthocyanins with C-glucosyl flavones. *Phytochemistry* 19: 663-667.
12. Ino, I., H. Nishiyama and M. Yamaguchi 1993. Malonylation of anthocyanins by extracts of flower buds in *Dendranthema morifolium* cultivars. *Phytochemistry* 32: 1425-1426.
13. Ino, I. and M. Yamaguchi 1993. Acetyl-coenzyme A: anthocyanidin 3-glucoside acetyltransferase from flowers of *Zinnia elegans*. *Phytochemistry* 33: 1415-1417.
14. Ishikura, N. and E. Yamamoto 1978. Anthocyanins in the flowers of Japanese garden iris belonging to 'Higo' line. *Kumamoto J. Sci. Biol.* 14: 9-15.
15. Ishikura, N. and K. Sugawara 1979. A survey of anthocyanins in fruits of some angiosperms, II. *Bot. Mag. Tokyo.* 92: 157-161.
16. Jonsson, L. M. V., M. E. G. Aarsman, J. von Diepen, P. de Vlaming, N. Smit and A. W. Schram 1984. Properties and genetic control of anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*. *Planta* 160: 341-347.
17. Kamsteeg, J., J. van Brederode and G. van Nigtevecht 1978. Identification, properties and genetic control of UDP-glucose: cyanidin 3-rhamnosyl (1-6) glucose 5-*O*-glucosyltransferase isolated from petals of the Red Champion (*Silene dioica*). *Biochem. Genet.* 16: 1059-1071.
18. Kamsteeg, J., J. van Brederode, C. H. Hommels and G. van Nigtevecht 1980. Identification, properties and genetic control of hydroxycinnamoyl coenzyme A: anthocyanidin 3-rhamnosyl (1→6) glucoside, 4''-hydroxycinnamoyltransferase isolated from petals of *Silene dioica*. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 175: 403-411.
19. Kamsteeg, J., J. van Brederode and G. van Nigtevecht 1980. The pH

- dependent substrate specificity of UDP-glucose: anthocyanidin 3-rhamnosylglucoside 5-*O*-glucosyltransferase in petals of *Silene dioica*: The formation of anthocyanidin 3, 5-diglucosides. P. Pflanzenphysiol. 96: 87-93.
20. Matsuzoe, N., M. Yamaguchi, S. Kawanobu, Y. Watanabe, H. Higashi and Y. Sakata 1999. Effect of dark treatment of the eggplant on fruit skin color and its anthocyanin component. J. Japan Soc. Hort. Sci. 68: 138-145.
 21. Ogata, J., T. Sakamoto, M. Yamaguchi, S. Kawanobu and K. Yoshitama 2001. Isolation and characterization of anthocyanin 5-*O*-glucosylation from flowers of *Dahlia variabilis*. J. Plant Physiol. 158: 709-714.
 22. Ootani, S. 1973. Chemico-genetical studies on the flower colors and pigment components in wild and cultivated pansies, with special regard to their intervarietal relationship. Rep. Inst. Breed. Res. Tokyo Univ. of Agric. Suppl.: 1-72.
 23. Stöckigt, J. and M. H. Zenk 1975. Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. Z. Naturforsch. 30c: 352-358.
 24. 武田幸作 1994. 日本における花色変異の研究の歩みと現状、特に青色の発現機構をめぐって. 育種学最近の進歩 36: 47-50.
 25. Teusch, M., G. Forkmann and W. Seyffert 1987. Genetic control of hydroxy-cinnamoyl-coenzyme A: anthocyanidin 3-glucoside-hydroxy-cinnamoyltransferase from petals of *Matthiola incana*. Phytochemistry 26: 991-994.
 26. Toki, K. and N. Katsuyama 1995. Pigments and colour variation in flowers of *Lagerstroemia indica*. J. Japan Soc. Hort. Sci. 63: 853-861.
 27. Wiering, H. and P. de Vlaming 1984. Inheritance and biochemistry of pigments. In: K. C. Sink (Ed). *Petunia*. pp. 49-67. Springer-Verlag, Germany.
 28. Yabuya, T. 1987. High-performance liquid chromatographic analysis

- of anthocyanins in induced amphidiploids of *Iris laevigata* Fisch. x *I. ensata* Thunb.. *Euphytica* 36: 381-387.
29. 藪谷 勤 1988. ハナショウブおよびノハナショウブにおける含有アントシアニンの HPLC 分析. 育雑(別 2)38: 248-249.
 30. Yabuya, T. 1991. High-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in Japanese garden iris and its wild forms. *Euphytica* 52: 215-219.
 31. 藪谷 勤 1998. ハナショウブにおける花の青色化機構の解明とその育種的利用. 平成 8~9 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書: 1-33.
 32. 藪谷 勤・横田耕二・足立泰二・長友 大 1983. 高速液体クロマトグラフィによるハナショウブのアントシアニンの分析. 宮崎大農報 30: 7-13.
 33. Yabuya, T., M. Nakamura and A. Yamasaki 1994a. *p*-coumaroyl glycosides of cyanidin and peonidin in the flowers of Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb.. *Euphytica* 74: 47-50.
 34. Yabuya, T., M. Nakamura and T. Iwashina 1994b. Flower color variations due to copigments in Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb.. Proc. of IPBA, Rogla, pp. 239-250.
 35. Yabuya, T., M. Nakamura, T. Iwashina, M. Yamaguchi and T. Takehara 1997. Anthocyanin-flavone copigmentation in bluish purple flowers of Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb.). *Euphytica* 98: 163-167.
 36. Yabuya, T., M. Saito, T. Iwashina and M. Yamaguchi 2000. Stability of flower color due to anthocyanin-flavone copigmentation in Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb.. *Euphytica* 115: 1-5.
 37. Yabuya, T., T. Imayama, T. Shimomura, R. Urushihara and M. Yamaguchi 2001a. New types of major anthocyanins detected in Japanese garden iris and its wild forms. *Euphytica* 118: 253-256.
 38. Yabuya, T., M. Yamaguchi, Y. Fukui, K. Katoh, T. Imayama and I. Ino 2001b. Characterization of anthocyanin *p*-coumaroyltransferase in

- flowers of *Iris ensata*. *Plant Sci.* 160: 499-503.
39. Yabuya, T., M. Yamaguchi, T. Imayama, K. Katoh and I. Ino 2002. Anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase in flowers of *Iris ensata*. *Plant Sci.* (in press).
 40. Yamaguchi, M., N. Terahara and K. Shizukuishi 1990. Acetylated anthocyanins in *Zinnia elegans* flowers. *Phytochemistry* 29: 1269-1270.
 41. Yamaguchi, M., T. Maki, T. Ohishi and I. Ino 1995. Succinylcoenzyme A: anthocyanidin 3-glucoside succinyltransferase in flowers of *Centaurea cyanus*. *Phytochemistry* 39: 311-313.
 42. Yamaguchi, M., T. Maki, T. Ohishi and I. Ino 1996. Cyanidin 3-malonylglucoside and malonyl-coenzyme A: anthocyanidin malonyltransferase in *Lactuca sativa* leaves. *Phytochemistry* 42: 661-663.
 43. Yamaguchi, M., N. Oshida, M. Nakayama, M. Koshioka, Y. Yamaguchi and I. Ino 1999. Anthocyanidin 3-glucoside malonyltransferase from *Dahlia variabilis*. *Phytochemistry* 52: 15-18.
 44. Yamazaki, M., Z. Gong, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, Y. Tanaka, T. Kusumi and K. Saito 1999. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J. Biol. Chem.* 274: 7405-7411.
 45. Yonekura-Sakakibara, K., Y. Tanaka, M. Fukuchi-Mizutani, H. Fujiwara, Y. Fukui, T. Ashikari, Y. Murakami, M. Yamaguchi and T. Kusumi 2000. Molecular and biochemical characterization of a novel hydroxycinnamoyl-CoA: anthocyanin 3-*O*-glucoside-6''-*O*-acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol.* 41: 495-502.