

第1章 緒論

多彩な色で美しい被子植物の花は人々を魅了し、その生活に潤いを与えている。このように植物が鮮やかな花色を纏うのは、花粉媒介者（ポリネーター）を誘引するためである。植物は移動することができないため、その多くは他家受粉の際、受粉媒介者としての昆虫や鳥の存在が不可欠であり、これら生物と共進化しながら花色を多様化させてきた (Harborn and Grayer 1994)。風媒花に比べ、虫媒花や鳥媒花が鮮やかな色彩を持つのはそのことを指摘している。これらの植物の赤、紫、青、白および黄色などの多彩な花色は、主としてフラボノイド、カロチノイドおよびベタレインといった色素のいずれか、またはこれらが共存することによって発現される。

これら色素のうち、植物界で最も広く分布し、多彩な色を発現する色素がフラボノイド色素である。フラボノイドとは、A環およびB環の2つのフェニル環が3つの炭素原子を介して結合した $C_6-C_3-C_6$ の構造を持つ一群の総称で、 C_3 の構造によって種々のフラボノイドが分類されている (Fig. 1-1)。代表的なフラボノイド色素として、カルコン、オーロン、フラボン、フラボノールおよびアントシアニンが花や葉などの色素として植物界に広く存在しており、その中でもアントシアニジンの配糖体であるアントシアニンは特に多彩な色を発現するため、花色育種の重要な標的となっている。

アントシアニンの生合成は、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンを出発点とする、フェニルプロパノイド代謝系に含まれる経路で行われる。最初の安定なアントシアニンであるアントシアニジン3-グリコシド (3G) が形成されるまでは、多くの植物種に共通する経路が用いられる (Fig. 1-2)。アントシアニジン3Gの形成後、植物種ごとにメチル化や配糖化、アシル化などの修飾が施され、それぞれの種により異なる多様なアントシアニンが合成される。アントシアニンの特性や性質は、水酸化、メチル化、配糖化およびアシル化の4つの修飾パターンにより変化する。まず、アントシアニンの発色に影響を及ぼす一番の要因は、アントシアニジン母核のB環の水酸化とメチル化である。アントシアニジ

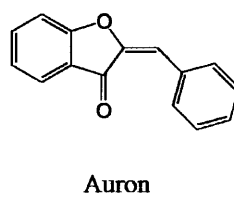
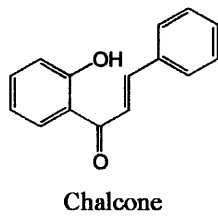
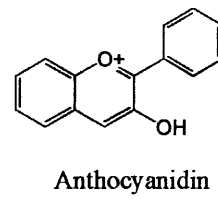
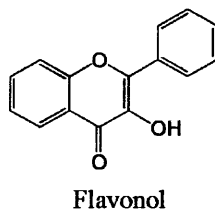
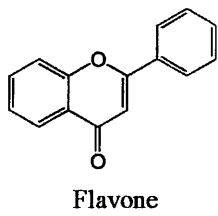
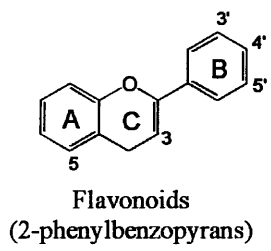


Fig. 1-1. Basic skeletons of flavonoids (excerpt).

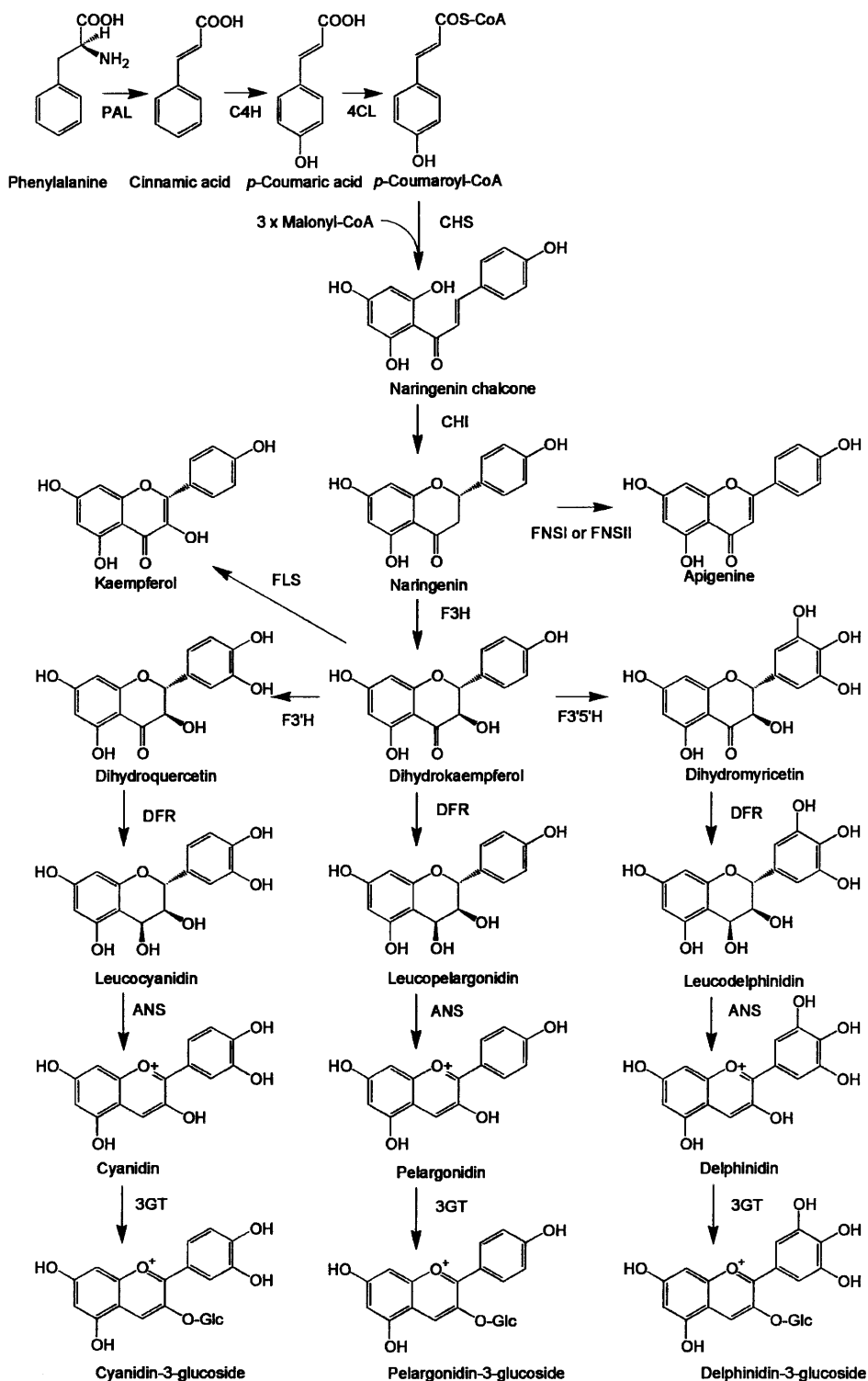


Fig. 1-2. Anthocyanin biosynthetic pathway. Abbreviations are as follows: PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate:CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; FNS, flavone synthase; FLS, flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; ANS, anthocyanidin synthase; 3GT, anthocyanidin 3-*O*-glucosyltransferase.

ンはB環の水酸基の違いによって pelargonidin (3'=OH, オレンジ赤)、cyanidin (3',4'=OH, 赤)、delphinidin (3',4',5'=OH, 青) の3種に分類され、水酸基の数が多いほど青色化する傾向にある (Fig. 1-2)。加えて、これらのアントシアニジンのB環水酸基のメチル化誘導体である peonidin (3'=OH, 4'=OCH₃, マゼンタ)、petunidin (3',5'=OH, 4'=OCH₃, 5'=OH, 紫)、malvidin (3'=OH, 4', 5'=OCH₃, 紫) も多くの植物種で見いだされており、先の3種に加えて主要6種のアントシアニジンを構成している。

アントシアニジン母核の水酸化やメチル化に加えて、配糖化やアシル化などの修飾が植物細胞内において施される。アントシアニジンは不安定な色素であるため、植物細胞内で検出されることはほとんどない。しかし、グルコース、ガラクトースおよびラムノースなどの単糖類によってアントシアニジンの3位が配糖化され、配糖体であるアントシアニンになることによって水溶性が増加し、安定化する。そのため、アントシアニジン3-モノシドが主要なタイプであるが、その他に3-ビオシド、3-トリオシド、3,5-ジグリコシドや、稀に3,7-ジグリコシドなど、2つ以上の糖が結合したものも存在している。強い効果はないものの、アントシアニジンの配糖化は花の色調に赤色化をもたらすことが知られている。

アントシアニジンの配糖体は有機酸と結合するものもあり、これをアシル化アントシアニンと呼んでいる。有機酸としては、*p*-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸などの芳香族有機酸とマレイン酸、マロン酸、コハク酸などの脂肪族有機酸が利用される。また、有機酸が2つ以上結合しているものはポリアシル化アントシアニンと呼ばれ、100種以上の色素が単離されている (Honda *et al.* 2002)。その中でも結合有機酸の種類が芳香族である場合、分子内コピグメンテーション (intramolecular copigmentation) 作用によって花色の青色化と安定化をもたらされる (Saito *et al.* 1971)。この現象は、色素の側鎖に含まれている芳香族性残基 (分子内コピグメント) とアントシアニジンの中で生じる相互作用によって分子内に積層構造が作られ、水和が妨げられるとともに、吸収波長が長波長側にシフト (bathochromic shift) するためだと考えられている。これに対して、脂肪族有機酸は安定化には寄与するものの、青色化効果は持たない。

植物細胞の液胞内に局在するアントシアニンは、その多様な化学構造ばかりでなく、液胞中に共存するポリフェノールや液胞の pH にも影響を受ける。すなわちアントシアニンの色調は、アントシアニジンの水酸化、メチル化、配糖化、アシル化などの修飾に加え、液胞内の pH、自己会合、分子間コピグメンテーション (intermolecular copigmentation) 作用や金属錯体の形成などによっても変化するのである。そのため同じ構造のアントシアニンを有する場合でも、pH やアントシアニン以外の成分の影響により、花色の変異が起こることが報告されている (Yabuya *et al.* 1994a)。

pH の変化は、アントシアニンに対して、アルカリ性で青色、中性から弱酸性で青紫色から赤紫色、強い酸性では比較的長い時間安定な赤色をもたらす。この変化は、溶液の pH に応じてアントシアニジンが水素原子をすばやく放出したり、取り込んだりする互変異性を起こし、その結果生じる構造が関係すると言われている (斎藤 2002)。pH による花色変異の研究は、ニホンアサガオ (*Ipomoea nil*) とその近縁種で進んでおり、1995 年にニホンアサガオ (*I. nil*)、および 2005 年にセイヨウアサガオ (*I. tricolor*) において、アントシアニン色素を含む液胞 pH が開花に伴って弱アルカリ性にシフトし、青色花を発現することが報告された (Yoshida *et al.* 1995、2005)。さらに、ニホンアサガオ (Yamaguchi *et al.* 2001、Ohnishi *et al.* 2005) およびセイヨウアサガオ (Fukuda *et al.* 2000)、では液胞の水素イオン濃度を調節する遺伝子がクローニングされている。しかしながら、多くの植物種の液胞 pH は弱酸性であり、アサガオのように開花に伴って pH が 1 以上も上昇する植物は稀である。また、アントシアニンは弱酸性からアルカリ性領域では非常に不安定であり、水和反応を受けやすいため、速やかに退色してしまう。これに対して、アントシアニンは自己会合、分子内コピグメンテーション、分子間コピグメンテーションおよび金属複合体の構造をとることによって水和反応を抑制し、液胞中で安定的に存在している (Goto and Kondo 1991、Kondo *et al.* 1992、斎藤 2002)。

溶液中でアントシアニンがフラボン、フラボノールなどのコピグメント (補助色素) と会合することを分子間コピグメンテーションと呼び、それによってアントシアニンは青色

化・濃色化するとともに安定性を増す。これまで多くの植物種において、この分子間コピグメンテーションによる花色の青色化が報告されている (Robinson and Robinson 1931、Asen *et al.* 1970、Yazaki 1976、Davies and Schwinn 1997、Yabuya *et al.* 1997)。一方、アントシアニン、コピグメントおよび金属イオンにより構成される金属複合体は、非常に安定的であり、青色の色調を発現する (武田 1988)。ツユクサ (*Commelina communis*) の青い色素であるコンメリニンは、アントシアニン (malonylawobanin)、フラボン (flavocommelin) および Mg^{2+} がそれぞれ 6、6、2 分子からなる金属複合体であり (Kondo *et al.* 1992)、またヤグルマギク (*Centaurea cyanus*) の青色色素であるプロトシアニン (protocyanin) は、アントシアニンとフラボンが各 6 分子、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} がそれぞれ 1 分子、そして Ca^{2+} が 2 分子からなる金属複合体構造であることが明らかにされている (Shiono *et al.* 2005)。

単子葉類に属する *Iris* 属植物では、代表的な園芸種のジャーマンアイリス (*I. germanica*)、ダッチアイリス (*I. hollandica*) およびハナショウブ (*I. ensata*) など多くの種において、アントシアニンを中心とするフラボノイド色素の特性解明に関する研究が進められている (岩科・大谷 1998)。これらの種のうち、ダッチアイリスおよびハナショウブでは、アントシアニンやフラボンの特性解明ばかりでなく (林ら 1978、Ishikura and Yamamoto 1978、Yabuya 1991、Yabuya *et al.* 1994b、岩科・大谷 1998、Yabuya *et al.* 2001b、Imayama and Yabuya 2003)、アントシアニンとフラボンの分子間コピグメンテーションによる花色の青色化機構が検討されている。ダッチアイリス品種「Prof. Blaauw」では、delphinidin 3-(*p*-coumaroyl)-rutinoside 5-glucoside (delphinidin 3*p*CRG5G) とスウェルチジン (swertisin)、ビテキシン (vitexin) などのフラボンとの分子間コピグメンテーションにより青色花が発現することが報告されており (Asen *et al.* 1970)、ハナショウブの malvidin 3*p*CRG5G - petunidin3RG5G 型品種の青色化についても細胞内の pH や金属錯体によるものではなく、これらのアントシアニンと、フラボン種であるイソビテキシン (isovitexin) との分子間コピグメンテーションに由来することが明らかにされている

(Yabuya *et al.* 1994a, Yabuya *et al.* 1997)。また、このようなコピグメンテーションはハナショウブ花卉の退色防止や、アントシアニン溶液の安定性にも貢献していることも報告されている (Yabuya *et al.* 2000)。先に述べたように、分子間コピグメンテーションは多くの植物種において花色の青色化に関与しているため、その分子機構の解明は delphinidin 型アントシアニンを有するにもかかわらず、青色花品種のないハナショウブ、チューリップおよびペチュニアなどの花色育種に極めて重要だと考えられる。

Fig. 1-2 に示したように、アントシアニン生合成経路には多くの酵素および遺伝子が関与しており、これまでにかなりの植物種で酵素の特性が解明され、その遺伝子の単離と解析も進んでいる (Heller and Forkmann 1994, Davies and Schwinn 1997, Forkmann and Heller 1999, Springob *et al.* 2003, Tanaka and Brugliera 2006)。しかしながら、このような知見の多くは双子葉植物から得られたものであり、単子葉植物のアントシアニン生合成酵素や遺伝子に関する知見は限定されている。特に、*Iris* 属植物における研究はほとんど進展していないのが現状である。本属植物におけるアントシアニン生合成に関与する遺伝子の分子遺伝学的研究を進めることにより、分子遺伝学的アプローチや分子育種に利用できる有用なツールとともに、先に述べた分子間コピグメンテーションの分子機構を解明する知見が得られることが期待される。

そこで、ダッチアイリスのアントシアニン生合成を分子遺伝学的に解析し、花色育種を促進するために本研究を遂行した。まず、ダッチアイリスの花蕾より構築した cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、アントシアニン生合成酵素であるカルコンシンターゼ (CHS)、カルコンイソメラーゼ (CHI)、フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ (F3H)、ジヒドロフラボノール 4-レダクターゼ (DFR)、アントシアニンシンターゼ (ANS) およびアントシアニン 3-グルコシルトランスフェラーゼ (3GT) をコードする 6 種類の cDNA クロンを単離・解析した。さらに、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*3GT*、アントシアニン 5-グルコシルトランスフェラーゼ (*5GT*) およびアントシアニン 3-アシルトランスフェラーゼ (*3AT*) の 7 種の遺伝子発現がアントシアニンおよびフラボンの蓄積量に及ぼす影響について

て調査するため、これらの遺伝子の時期・器官特異的発現とともに、ダッチアイリスの花の発育時期ごとや器官ごとのアントシアニン・フラボン蓄積量の変化や差異を調査した。また、本種の青紫色花品種「ブルーダイヤモンド」、白色花品種「White Wedgewood」および複色花品種「Surprise」の間でこれらの遺伝子発現を比較解析することにより、「White Wedgewood」の内、外両花被と雌蕊、および「Surprise」の外花被と雌蕊の白色化の原因を明らかにした。また、単離した6種類のcDNAのうち、アントシアニンとフラボン生合成の分岐点に位置し、コピグメンテーション発現の鍵となる*F3H*cDNA、アントシアニンの安定性に重要である*3GT*cDNAを大腸菌において異種発現させ、その酵素特性を明らかにした。次いで、分子遺伝学的知見がこれまでほとんど得られていないアントシアニンのメチル化に関与する*O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) の単離とその機能解析も試みた。さらに、上記の3品種を用いて、*DFR*構造遺伝子とその5'上流領域配列を単離・解析し、「White Wedgewood」の内・外両花被と雌蕊、および「Surprise」の外花被と雌蕊における*DFR*遺伝子発現の欠損または減少の原因を解明した。最後に、本研究で得られたアントシアニン生合成に関する知見を基にして、花色の育種戦略について論じた。