

原著論文

キク科植物の花弁におけるカロテノイドに関する研究[†]

岸本 早苗

(平成 18 年 9 月 5 日受理)

Studies on carotenoids in petals of Compositae plants

Sanae Kishimoto

† 本論文は神戸大学学位審査論文（平成 18 年 4 月）を基に編集・加筆したものである。本報告の一部は、*Phytochemistry*: 65, 2781-2787 (2004); *Physiologia Plantarum*: 128, 436-447 (2006); *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*: 69, 2122-2128 (2005) において発表した。

Summary

Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) is one of the most important ornamental plants in the world, and its range of petal colors originates mainly from carotenoid and anthocyanin pigments. It is known that the orange color in chrysanthemum petals, which results from the mixture anthocyanins and carotenoids, lacks brightness. In addition, yellow- and white-flowered cultivars are in great demand for funeral ceremonies in Japan, but the quality for cut flowers from yellow-flowered cultivars is generally lower than that of white-flowered cultivars. For this reason, the production of yellow-flowered cultivars has been falling gradually. Because of the importance of controlling flower color, the carotenoid components and the genetic causes that regulate the flower color due to the presence of carotenoids were analyzed in the petals of plants in the Compositae.

Twelve chrysanthemum cultivars with petal color ranging from pale yellow to deep red were analyzed by means of high-performance liquid chromatography. No difference was found in their carotenoid composition, but 16 xanthophylls were identified by means of nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. Among them, (3S,5S,6R,3'R,6'R)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxyxanthophyll and five di-Z geometrical isomers of lutein-5,6-epoxide had never before been identified as natural products.

The carotenoid composition, carotenoid content, and expression of genes encoding carotenoid biosynthetic

[†] 本論文は神戸大学学位審査論文（平成 18 年 4 月）を基に編集・加筆したものである。本報告の一部は、*Phytochemistry*: 65, 2781-2787 (2004); *Physiologia Plantarum*: 128, 436-447 (2006); *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*: 69, 2122-2128 (2005) において発表した。

enzymes were also analyzed using the petals and leaves of yellow- and white-flowered chrysanthemums. Most of the carotenoids in yellow petals were β , ε -carotenoids, lutein and its derivatives, reflecting the high expression levels of the gene for lycopene ε -cyclase (*LCYE*). In contrast, the ratios of β , β -carotenoids to total carotenoids in leaves were higher than those of β , ε -carotenoids to total carotenoids, reflecting the high expression levels of the gene for lycopene β -cyclase (*LCYB*). A between-cultivar comparison of the expression of the genes encoding carotenoid biosynthetic enzymes in the petals showed no distinct differences between petal colors. The expression of *CmCCD1*, a highly conserved homologue of the gene for carotenoid cleavage dioxygenase derived from the petals of white-flowered chrysanthemum, was then analyzed. Real-time PCR analysis showed that all white petals that were tested had high levels of expression of *CmCCD1*, which was not detected in yellow petals. Significant expression of *CmCCD1* was strictly limited to the flower petals, therefore we hypothesized that the formation of white petal color resulted from neither down-regulation nor destruction of the carotenoid biosynthesis pathway, but rather to enzymatic cleavage of carotenoids into colorless compounds.

Petals of orange- and yellow-flowered cultivars of nine Compositae species were analyzed to determine total anthocyanin content, total carotenoid content, and carotenoid composition in order to clarify the mechanisms responsible for differences in petal color. It became clear that the differences in petal color between orange- and yellow-flowered cultivars were caused by differences in three factors: total anthocyanin content, total carotenoid content, and carotenoid composition. *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) was one plant that differed in carotenoid composition between orange- and yellow-flowered cultivars. Nineteen carotenoids were identified in extracts from the petals of orange- and yellow-flowered cultivars of calendula by means of NMR analysis, and 10 of them were unique to the orange-flowered cultivars. These 10 were reddish, and it was clear that they were responsible for the orange color of the petals. Among them, (5 Z ,9 Z)-lycopene, (5 Z ,9 Z ,5' Z)-lycopene, (5 Z ,9 Z ,5' Z ,9' Z)-lycopene, (5' Z)- γ -carotene, and (5' Z ,9' Z)-rubixanthin had never before been identified as natural compounds. Since these (5 Z)- or (5' Z)-carotenoids are unique to orange-flowered cultivars and since yellow-flowered cultivars do not accumulate any 5 Z or 5' Z compounds, it appears that C-5 isomerization activity exists only in orange-flowered cultivars.

Key Words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat., *Calendula officinalis* L., Compositae, petal color, carotenoids, biosynthetic pathways, isomers

目 次

緒 言

第1章 キク花弁に含まれるカロテノイド成分の分析

第1節 キク花弁のカロテノイド成分、総カロテノイド量、総アントシアニン量および色調の品種間差の解析

第2節 キク花弁に含まれるカロテノイド成分の同定

第2章 キク花弁および葉におけるカロテノイド蓄積の調節機構の解明

第1節 白色品種および黄色品種の花弁および葉におけるカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現解析
第2節 キク白色品種から単離されたカロテノイド分解酵素ホモログ *CmCCD1* の黄色品種および白色品種における発現解析

第3章 キク科植物の花弁における橙色および黄色の発現様式

第1節 橙色および黄色を示すキク科植物花弁のアントシアニン量、カロテノイド量およびカロテノイド成分の解析

第2節 キンセンカ花弁に含まれるカロテノイド成分の同定

総合考察

摘要

引用文献

緒 言

花の色には様々な色調のものがあるが、非常に多種の色素成分が花色の形成に関与していることが知られている。これら色素成分の中で、幅広い植物種に渡って重要な働きをしているのが赤から青色を示すアントシアニンと黄色から橙色を示すカロテノイドである。花弁に存在する色素の役割は主に訪花昆虫の誘引であるが、カロテノイドの場合はそれだけでなく、光酸化から光合成器官を守るという重要な役割を担っており、植物にとって生存に不可欠な成分の一つである。近年、アントシアニンを含むフラボノイド類に関しては化学的、生理学的および遺伝学的なアプローチにより著しく研究が進展している。一方、カロテノイドについては、アントシアニンに比べ遅れているのが現状である。その大きな理由としてはカロテノイドの正確な構造決定が難しいということ、また、生合成に関わる酵素タンパク質が非常に不安定で

あり、なおかつ存在量が極めて少ないとために単離および機能確認が困難であったということがあげられる。

いくつかの例外はあるものの、基本的にカロテノイドは C₄₀ のテルペノイド骨格を持つイソプレノイドの一種である。現在までに 700 種以上のカロテノイドが天然物として報告されている (Britton ら 2004)。その生合成は、C₅H₈ の化学式を持つ isopentenyl pyrophosphate (IPP) を基本単位としてスタートする。4 分子の IPP は重合して C₂₀ の geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) となり、さらに 2 分子の GGPP が phytoene synthase (PSY) によって重合され、最初のカロテノイドである phytoene となる。Phytoene はさらに β -carotene を経由して lycopene へと変換されるが、このステップに関わっている phytoene desaturase (PDS) と β -carotene desaturase (ZDS) はアミノ酸配列の相同性が高く、同一の起源から派生した酵素であると考えられている。続けて lycopene は直線状の末端構造に β 環を付与する lycopene β -cyclase (LCYB) や ϵ 環を付与する lycopene ϵ -cyclase (LCYE) に触媒され、 β -carotene や α -carotene といったカロテン類になる。これらがさらに水酸化、エポキシ化および異性化といったステップを経ることによって、様々な構を持つカロテノイドに生合成される (Britton 1998, Cunningham ら 1998)。これらの基本的なカロテノイドの生合成を触媒する酵素遺伝子はごく近年まで明らかでなかったが、1989 年に初めてバクテリアで単離されたのをきっかけに、様々な生物から単離されるようになった (Armstrong ら 1989, Marrs 1981, Misawa ら, 1990)。

光合成器官のカロテノイド組成は多くの植物で同様のプロファイルを示し、光合成に不可欠な violaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin に加え、 β -carotene や lutein が検出される (Goodwin・Britton 1988)。対照的に、花弁に含まれるカロテノイドの構成は植物種によって様々であることが明らかになっている (Deli ら 1988, Eugster・Märki-Fischer 1991, Kull・Pfander 1997, Maoka ら 2000, Tai・Chen 2000)。例を挙げると、オニユリ (*Lilium lancifolium*) は β -carotene の誘導体のみで構成されており、 α -carotene およびその誘導体をほとんど含んでいない (Deli ら 1998a, 1999)。一方、キク科の植物は一般的に α -carotene 誘導体である lutein やその誘導体が主要なカロテノイドである (Deli ら 1988)。マリーゴールドは非常に多量の lutein を花弁に蓄積し、全体の約 91% が lutein である (Khachik ら 1999)。

キク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) は世界的に重要なキク科の園芸植物の1つであり、日本では切り花生産額が第1位を占める。キク花弁中に存在する色素は主にカロテノイドとアントシアニンであり、この両成分の組み合わせによって白～黄色、橙色、桃～赤紫色などの幅広い花色が作り出されている (Kawase・Tsukamoto 1976)。しかしながら、カロテノイドとアントシアニン両方を含む橙色品種の流通量は非常に少ない。橙色品種はスプレータイプのものがほとんどであるが、キク全体の総生産額の6.7%であるスプレーキクの中で、橙色が含まれる「その他の花色」に属する品種の総生産額は5.1%であり、キク全体のわずか0.3%を占めるに留まっている (花き需給調整協議会資料, 1990)。その原因是、アントシアニンの発現が環境条件、特に温度条件に対して不安定であるため、橙色を安定させることが難しいという生産者側の理由と、アントシアニンとカロテノイドが重なり合うと花弁の色彩の明度が下がり、特に蛍光灯下ではくすんで見えるために好まれないという消費者側の理由が重なっているためであると考えられる。従って、アントシアニンの関与しないカロテノイドのみの橙色花色をキクで作り出すことができれば、これらの問題を解決することができると考えられる。また、キクは仏事での需要が多く、日本におけるキク総生産額のうち、74%が輪ギクである。このうち白色品種が占める割合は59%，黄色品種は32%であり、黄色花色の重要性がうかがえる (花き需給調整協議会資料, 1990)。近年輪ギクは側蕾の発生が少なく、輪ギク栽培において最も労力を要する摘蕾作業を軽減できる無側枝性品種が普及しつつあるが、優良な品種の花色は白色に限られている。そのために、輪ギク全体の中の黄色品種のシェアは年々低下しつつある。また、その他の形質に関しても一般的に黄色品種は白色品種よりも性質が劣る傾向があり、高品質な黄色品種が求められている。従って黄色花色と白色花色を決定する要因を明らかにし、白色品種の性質を変えることなく花色のみを黄色にすることが可能になれば今後の品種開発に非常に貢献する。

そこで、本研究ではキクを含むキク科植物のカロテノイド構成を明らかにし、さらにカロテノイドによる花色発現を制御する遺伝的要因を明らかにすることを試みた。

第1章 キク花弁に含まれるカロテノイド成分の分析

キクは世界的に重要な園芸植物の一つであるが、その黄色花色は主にカロテノイドによるものである。この花弁に含まれるカロテノイドは薄層クロマトグラフィーや吸収スペクトルによる分析が行われてきたが、正確な構造決定にまでは至っていない (Karrer・Jucker, 1943; Karrerら, 1945; Kawase・Tsukamoto, 1976)。Tóth・Szabolcs (1981) は合成カロテノイドを標品として HPLC で比較を行い、5種の mono-cis 体を含む8種のカロテノイドを同定したが、さらに未同定のカロテノイドが存在することを報告している。これらカロテノイド成分の同定は今後キク黄色品種の改良を行う上で欠かせない情報である。また、カロテノイド成分の品種間差については、今まで全く報告がない。

本章ではキク花弁に含まれるカロテノイド成分の品種間差、およびカロテノイドの花弁の色調への影響について調査を行い、さらに、未同定であるカロテノイド成分について解析を試みた。

第1節 キク花弁のカロテノイド成分、総カロテノイド量、総アントシアニン量および色調の品種間差の解析

キク花弁の色調に大きく影響を与える色素は主にカロテノイドとアントシアニンである。キク花弁に含まれるアントシアニンは赤紫を示すシアニジンの配糖体が主成分であるが (Nakayamaら 1997)，色素組成の品種間差はほとんどないことが報告されている (Kawase・Tsukamoto, 1976)。カロテノイド組成に関しても品種間差がないことが報告されているが、正確な成分の同定は未だに行われていない。そこで、HPLC を用いてカロテノイド成分の品種間差について調査を行い、同時に標品との比較による成分の同定を試みた。また、花弁の色調とカロテノイド成分、総カロテノイド量、および総アントシアニン量との関係を調査した。

1. 材料及び方法

1) 材 料

以下の濃赤色から淡黄色のキク 12 品種を材料として用いた(第 1 図)。完全に展開した花弁を分析に供試した。

濃赤色品種:アリエッタ, セイパプリカ, ホリナ, レッドネロ, レッドリジェゴ

橙色品種:アグロー, ドラマチック, ダーク ドラマチック

黄色品種:サニーオレンジ, カナリア, イエローパラゴン, 秀芳の宝

2) カロテノイド成分の分析

それぞれの品種の花弁 0.5 g に 3 ml のアセトンを加えて磨碎した。これに 5 ml のジエチルエーテルを加えてよく搅拌し、上清を分液ろうとに移した。ジエチルエーテルによる抽出を上清の黄色の着色がなくなるまで繰り返した。得られたアセトン / エーテル溶液に等量の水

を加え、3 回洗浄を行った。エーテル層を取り出し、液量の半量の 5 % KOH-NaOH 溶液を加え、暗所で 3 時間静置し、けん化処理を行った。けん化が終了した溶液は中性になるまで水で洗净し、エバボレーターで濃縮乾固した。これをメタノールで溶解したものをカロテノイド溶液として HPLC 分析に供試した。また、violaxanthin, (9'Z)-neoxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene および lycopene の標品を入手し、比較を行った。

HPLC 分析条件は以下の通りである。

カラム:YMC Carotenoid (S5 μ m, 250 × 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Butyl methyl ether (MTBE): $\text{H}_2\text{O} = 95:1:4$,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: $\text{H}_2\text{O} = 25:71:4$

0 分 A 100% / B 0%, 12 分 A 100% / B 0%, 96 分 A 0% / B 100%

流速 1 ml/min, カラム温度 35°C

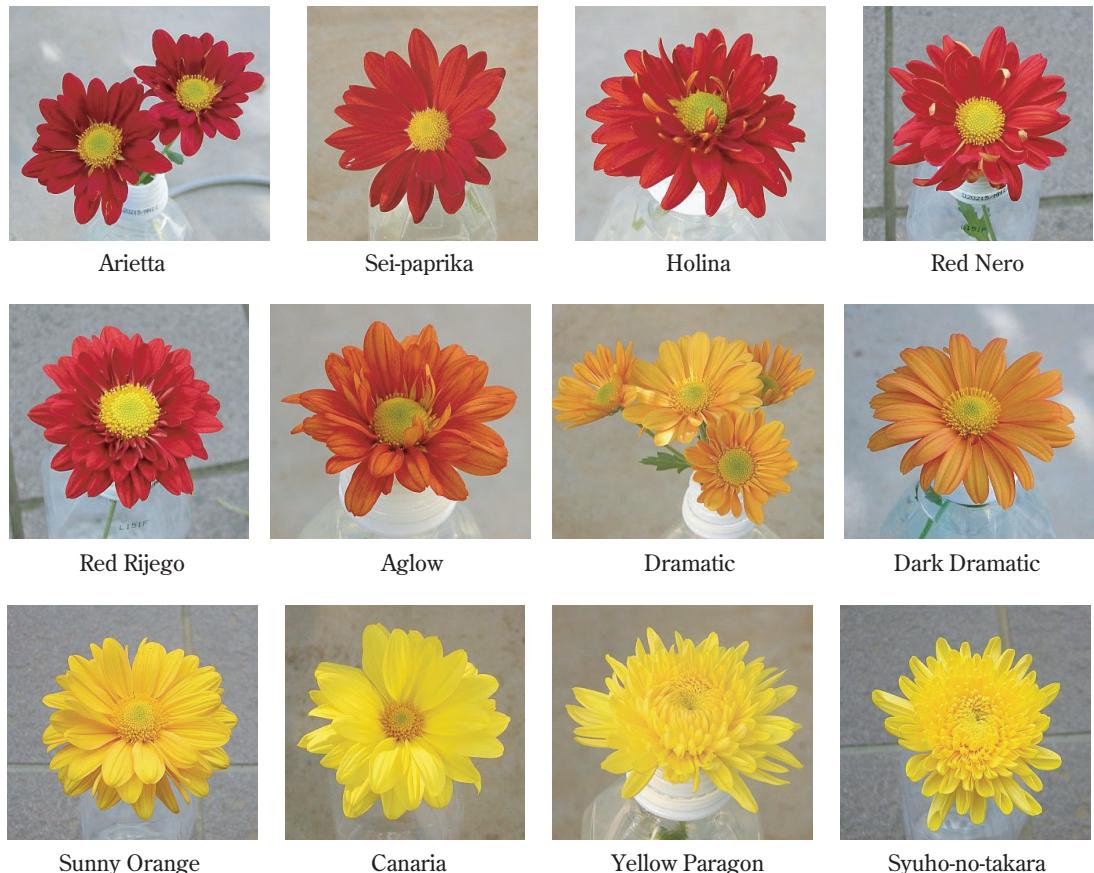


Figure 1. Flowers of chrysanthemum cultivars used for the experiment.

3) 花弁の色調の測定

各品種の完全に展開した花弁の中心部を分光測色計(CD100, YOKOGAWA)で測定した。1花につき3花弁を供試した。

4) 総カロテノイド量の測定

0.5 g の花弁に 3 ml のアセトンを加えて磨碎した。これに 3 ml のジエチルエーテルを加えてよく攪拌し、上清を分液ろうとに移した。この操作を上清の黄色の着色がなくなるまで繰り返した。得られた分液ろうと中の液に等量の水を加え、洗浄を行った。ジエチルエーテル液を取り出し、メタノールで 20 ml にメスアップ後、分光光度計で吸収スペクトル(200-600 nm)の測定を行った。吸収極大における吸光度を求め、比吸光係数(1%色素溶液を厚さ 1 cm のセルで測定した場合の吸光度)から総カロテノイド量を算出した。本実験ではルテイン等量(比吸光係数 2550 : Britton, 1995)とした。

5) 総アントシアニン量の測定

実験に先立ち、1%塩酸メタノール中に溶解させたシアニジン-3-ールチノサイド標準品の 530 nm における吸光度から検量線を作成した。0.5 g の花弁を 1% 塩酸メタノールで磨碎し、ジエチルエーテルを加えてカロテノ

イドを含む脂質類を取り除いた水層を遠心管に移した。3000 rpm で 10 分間遠心後、上清の吸光スペクトルを分光光度計で測定した。花弁抽出液の 530 nm の吸光度からシアニジン等量として総アントシアニン量を算出した。

2. 結 果

1) カロテノイド成分の分析

いずれの品種も花色に関わらず、9つの主要なピークが得られた(第2図、第1表)。しかし、これらのピークのうち、標準品と一致したのはピーク7(lutein)のみであった(第1表、第2表)。9つのピークはいずれも吸収極大値が 430 ~ 443 nm の範囲にあり、ほとんど色調に差がないカロテノイドであった。

2) 花弁の色調および総カロテノイド量、総アントシアニン量の測定

花弁の色調、総カロテノイド量および総アントシアニン量の測定結果は第3表に示した。今回調査を行った品種にはすべてカロテノイドが含まれていた。一方、アントシアニンに関しては‘秀芳の宝’および‘イエローパラゴン’のように黄色を示す品種からはほとんど検

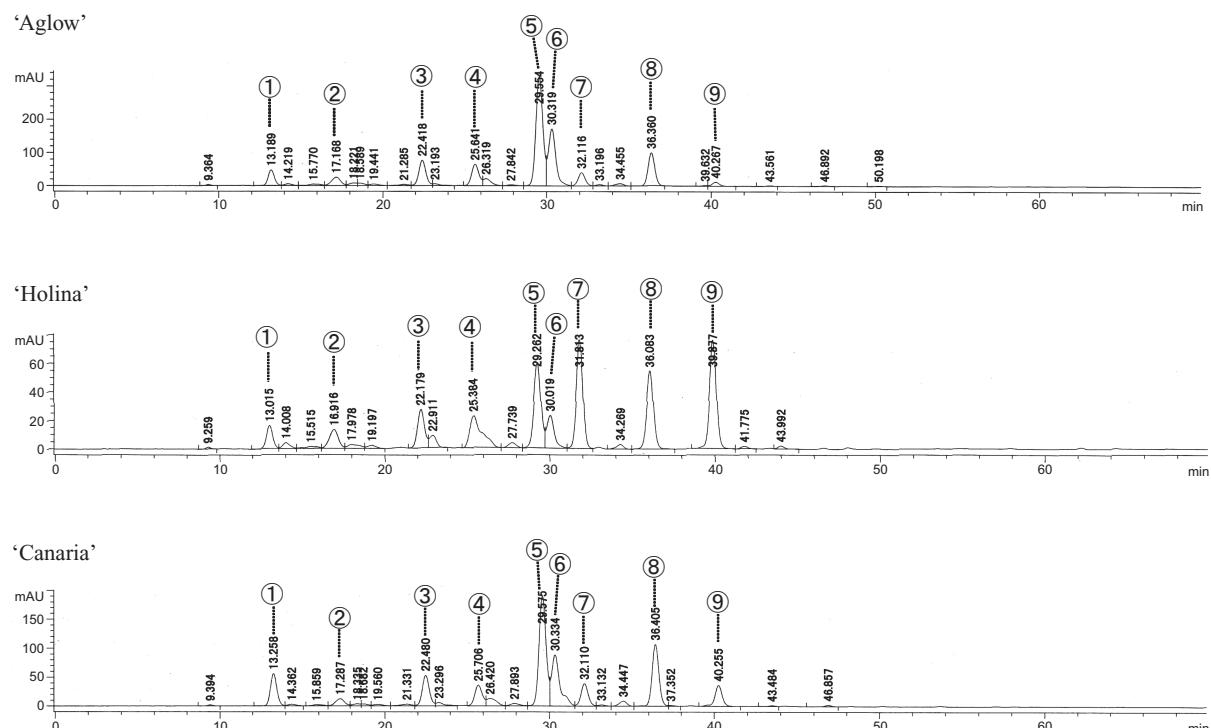


Figure 2. Carotenoid analysis in petals of chrysanthemum cultivars.
Peak numbers as in Table 1.

Table 1 Major carotenoid peaks in petals of chrysanthemum detected by HPLC analysis.

Peak no.	Rt(min)	Absorption maxima (nm)
1	13.6	413, 438, 468
2	17.7	417, 430, 456
3	22.9	416, 440, 468
4	26.1	413, 436, 464
5	30.0	412, 437, 465
6	30.8	413, 437, 465
7	32.6	420, 443, 472
8	36.8	418, 440, 468
9	40.6	416, 442, 470

Table 2 Standards used in this study.

Standards	Rt(min)	Absorption maxima (found value, nm)	Absorption maxima (literature data, nm)
Violaxanthin	17.5	416, 440, 470	419, 440, 470
9'Z-Neoxanthin	18.9	411, 436, 464	413, 435, 464
Lutein	32.9	420, 443, 472	422, 445, 474
Zeaxanthin	36.9	426, 452, 478	428, 450, 478
β -Cryptoxanthin	49.5	427, 451, 480	428, 450, 478
α -Carotene	58.9	422, 447, 476	423, 444, 473
β -Carotene	63.2	428, 452, 480	425, 450, 477

Table 3 Total carotenoid and anthocyanin contents, and chromaticity in petals of 12 chrysanthemum cultivars.

Cultivars	Total carotenoid content ^a (μ g/g f. w.)	Total anthocyanin content ^b (μ g/g f. w.)	Chromaticity		
			L	a*	b*
Arietta	139.8	2709.0	28.6	39.4	27.4
Sei-paprika	404.6	4410.1	31.6	40.2	29.5
Holina	305.6	2754.8	27.3	40.6	24.7
Red Nero	213.3	2514.2	28.0	43.2	24.1
Red Rijego	162.6	3020.7	32.7	43.7	24.8
Aglow	428.3	444.4	48.2	33.3	51.5
Dramatic	291.5	159.3	71.4	12.2	75.3
Dark Dramatic	376.5	444.7	58.9	24.9	64.3
Sunny Orange	401.6	99.4	77.2	4.2	97.8
Canaria	180.5	5.7	88.6	-10.7	96.1
Yellow Paragon	74.7	1.5	91.7	-11.5	77.9
Syuho-no-chikara	307.5	1.5	87.5	-10.7	107.7

a : Lutein equivalent

b : Cyanidin 3-rutinoside equivalent

出されなかった。目視によって濃赤色と判断した品種には多量のアントシアニンが含まれていたが、カロテノイド量も黄色品種と同様もしくはそれ以上であった。総アントシアニン量が $450 \mu\text{g/g f.w.}$ 以下である橙色および黄色品種では総アントシアニン量と赤み (a^* 値) および明度との間に相関が認められたが、アントシアニンが $2500 \mu\text{g/g f.w.}$ 以上含まれている濃赤色品種はアントシアニンの量に関わらず花弁の色調にほとんど差がなかった（第3図）。明度（L値）と赤み (a^* 値) の間には明確な相関が得られた。総カロテノイド量と黄み (b^* 値) の間には明確な相関はなかった。

3. 考 察

今回調査を行った品種の花弁中に含まれるカロテノイドは、各成分の割合は品種によって若干異なるものの、構成成分は同じであることが明らかになった。主要なピークの吸収極大値に大きな差がなかったことから、キク花弁に含まれるそれぞれのカロテノイド成分の色調には差がなく、含まれている成分の割合の差がカロテノイド全体の色調に影響を及ぼすことはないと考えられる。このことから、キク花弁においてカロテノイドが関与す

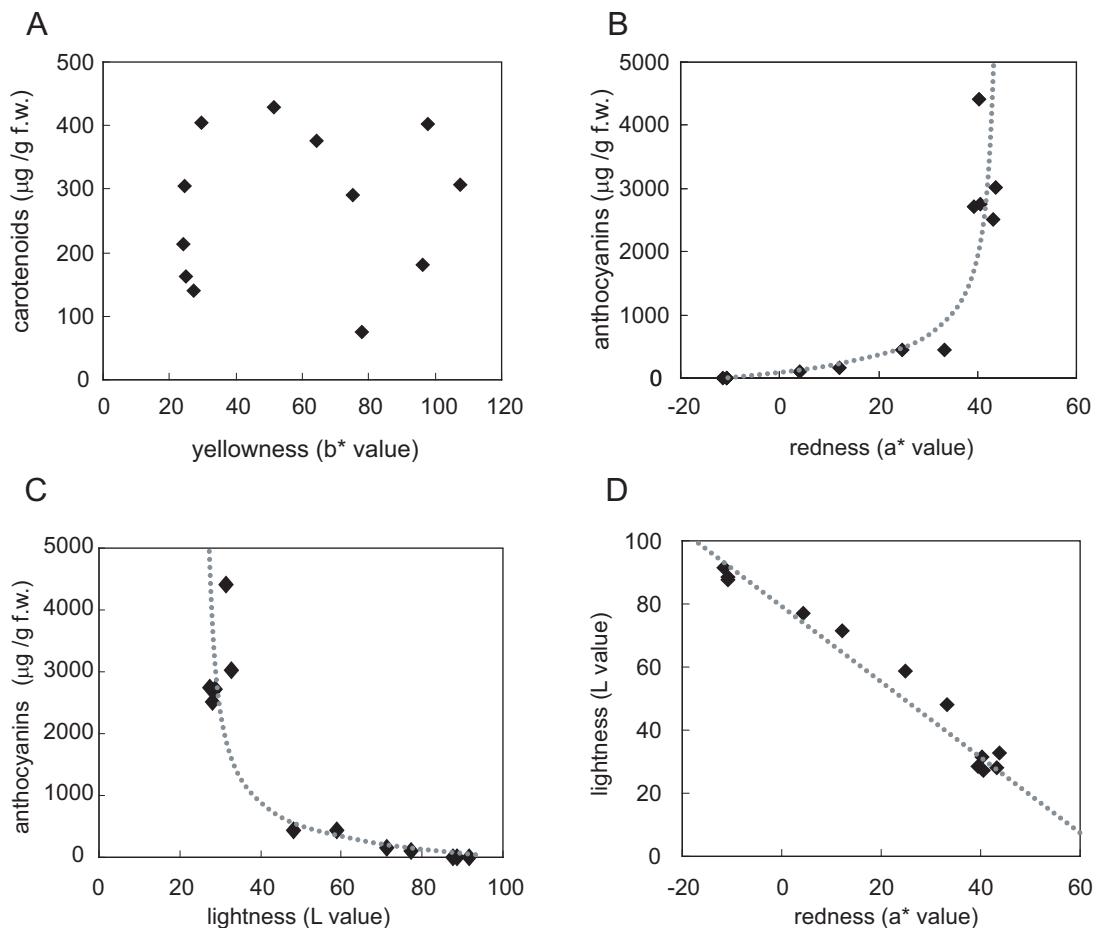


Figure 3. Correlation between total carotenoid and anthocyanin contents, and chromaticity in petals of 12 chrysanthemum cultivars. (A) Correlation between total carotenoid content and yellowness. (B) Correlation between total anthocyanin content and redness. (C) Correlation between total anthocyanin content and lightness. (D) Correlation between lightness and redness.

る色調は、量の違いによって作り出される淡黄色から濃黄色までの範囲であると推測される。

調査を行った橙色～濃赤色の品種にはいずれもアントシアニンおよびカロテノイドが含まれており、これらの品種の色調はすべて両色素の重なりによって作られていることが明らかになった（第3図）。橙色の色調を作り出すためには黄みに赤みが加わることが必要であるが、キクの場合赤みを作り出す手段であるアントシアニン量の増加が同時に明度の低下を引き起こし、結果的にくすんだ色調を作り出していた。従って、キクにおいて鮮やかな橙色花色を持つ品種を育成するためには、アントシアニン量の増加以外の手段で赤みを付与させることが必要である。なお、カロテノイド量と黄み（ b^* 値）との間に相関がみられなかったが、これはアントシアニンが多量に蓄積した品種ではカロテノイドの黄みが隠されてしまうためであると考えられる。アントシアニン量が同等であるものを比較した場合は、総カロテノイド量が多いものほど b^* 値が高かった。また、アントシアニンと赤みおよび明度との関係より、花弁に含まれるアントシアニン量がおよそ 1 mg/g f.w. 以上になると色調に差を生じないことが示された（第3図）。

第2節 キク花弁に含まれるカロテノイド成分の同定

第1節においてキク 12 品種に含まれるカロテノイド成分を HPLC にて分析した。しかし、標品と保持時間及びスペクトルが一致し、成分が同定できたのは lutein のみであった。そこで、濃黄色品種である‘サニーオレンジ’花弁に含まれるカロテノイド成分を NMR, FAB-MS および CD 分析に供試し、不明な成分の同定を試みた。

1. 材料および方法

1) 材 料

濃黄色のキク品種‘サニーオレンジ’の完全に展開した花弁を分析に供試した。

2) カロテノイドの抽出

花弁 100 g に 30 ml のアセトンを加えて磨碎した。これに 50 ml のジエチルエーテルを加えてよく攪拌し、上清を分液ろうとに移した。この操作を上清の黄色の着色がなくなるまで繰り返した。得られたアセトン / エーテ

ル溶液に等量の水を加え、3 回洗浄を行った。液量の半量の 5% KOH-NaOH 溶液を加え、暗所で 3 時間静置し、けん化処理を行った。けん化が終了した溶液は中性になるまで水で洗浄し、エバポレーターで濃縮乾固した。これをメタノールで溶解したものをカロテノイド溶液とした。

3) カロテノイド成分の分取

各成分の分取は分取用カラムを用い、以下の条件を行った。

カラム : YMC Carotenoid (S 5 μ m, 250 × 20 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 : MeOH:H₂O = 96 : 4

流速 10 ml/min, カラム温度 35°C

さらに成分が重なった画分については以下の条件で分離を行った。

カラム : ChemcoPak Si (300 × 7.8 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 : hexane: Me₂CO = 7 : 3

流速 2 ml/min

4) カロテノイド成分の同定

カロテノイドの構造は UV-Vis, ¹H NMR, および FAB-MS の各スペクトル値から決定した。また、これらのスペクトルデータからの構造決定が困難であったものについては、さらに ¹³C NMR および CD スペクトル分析を行った。これらのスペクトル解析条件は以下の通りである。

UV-Vis スペクトル

ジエチルエーテルに溶解したサンプルを分光光度計（島津、UV-240）で測定した。もしくは HPLC 移動相中のものをマルチチャンネル検出器（日本分光、MD-915）で測定した。

FAB-MS スペクトル

nitrobenzyl alchol を基質として質量分析装置（JEOL, SX 102）で測定した。

¹H NMR (500 MHz) および ¹³C NMR (125 MHz) スペクトル

NMR 装置 (Varian, Unity Inova 500 spectrometer) にて測定を行った。TMS を基準物質として含んだ CDCl₃ を溶媒として用いた。

CD スペクトル

CD スペクトル測定装置（Jasco, J-500C）を用いた。ジエチルエーテルを溶媒として用いた。

2. 結 果

分取用に条件を変更して HPLC を行ったところ、13 のピークが得られた。しかしながら、ピーク 2 およびピーク 4 は複数の成分が含まれていたため、さらにシリカゲルカラムで分離を行った（第 4 図、第 4 表）。

1) (*3S, 5S, 6R, 3R', 6'R*) -5, 6-dihydro-5, 6-dihydroxylutein (1) の構造決定

化合物 1 ピーク 1 から分取された成分であり、吸収極大値は 414, 438, 467 nm という非常にルテインに近い値を示した（Britton 1995）。高分解能 FAB-MS 分析の結果、分子式は $C_{40}H_{56}O_4$ であることが明らかになった。化合物 1 の 1H および ^{13}C NMR スペクトル測定値の帰属は二次元 NMR (1H - 1H COSY, NOESY, HSQC および HMBC) スペクトル解析によって決定した（第 5 表）。その結果、2 つの 2 級水酸基 (δ_c 66.3, δ_h 3.97 および δ_c 65.9, δ_h 4.25) および 2 つの 3 級水酸基 (δ_c 79.4 および 76.3) の存在が示された。ルテインの 1H および ^{13}C NMR スペクトル測定値 (Englert 1995) との比較より、この化合物が 3-hydroxy- ϵ -末端を持つということ、また、ポリエン鎖部がすべて E 配置であることが明らかになった。もう一方の末端基の構造を決定するために、 1H - 1H COSY および HSQC を用いて C-2 から C-4 にかけての炭素原子と水素原子の帰属を決定し、さらに C-3 位

の二級水素基の存在を明らかにした。また、HMBC 解析から、 δ_c 38.7, 76.3、および 79.4 の値を示す四級炭素を C-1, C-6、および C-5 位に帰属した。このことから、2 つの三級水素基は C-5 および C-6 位に位置すると決定した。また、HSQC および HMBC 相関から C-16, C-17 および C-18 の 3 つのメチル基の位置を決定した。NOESY 相関が H-16/H-2a, H-16/H-7, H-18/H-3 および H-18/H-7 で認められたことから、CH₃-16, CH₃-18, H-2a, H-3 および H-7 がこの末端基の同じ側面に位置していることが示された。従って、化合物は第 5 図に示すような (*3S,5S,6R*) の立体配置を有していると考えられる。この化合物の CD スペクトル測定値を Molnár ら (1999) および Deli ら (1998b) によって化学合成された (*3S,5R,6R*) 化合物のデータと比較したが、絶対配置の決定には至らなかった。 1H および ^{13}C NMR のデータは化学合成された (*3S,5R,6S*), (*3S,5S,6S*) および (*3S,5S,6R*) 配置を持つカロテノイドとは一致せず、Buchecker ら (1984) および Eugster (1985) によって報告された (*3S,5S,6R,3'R,6'R*)-5,6-dihydro- β , ϵ -carotene-3,5,6,3'-tetrol の構造と一致した。従って、化合物 1 の構造を (*3S,5S,6R,3'R,6'R*)-5,6-dihydro- β , ϵ -carotene-3,5,6,3'-tetrol [(*3S,5S,6R,3'R,6'R*)-5,6-dihydroxylutein] であると決定した。このカロテノイドは Buchecker ら (1984) および Eugster (1985) によって合成されているが、天然物としての報告はない。従って、化合物 1 は天然物としては新規カロテノイドであることが明らかになった。

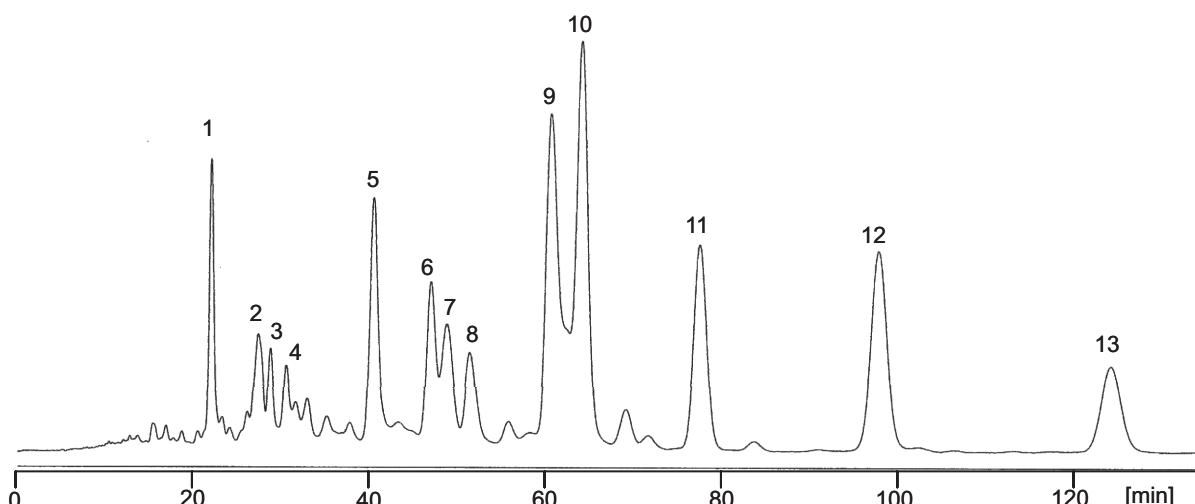


Figure 4. HPLC separation of carotenoids of an extract of chrysanthemum petals (cv. 'Sunny Orange'). Peak numbers as in Table 4.

Table 4 Carotenoid composition in petals of chrysanthemum (cv. 'Sunny Orange').

Peak no. (Fig. 1-4)	Carotenoids	% of total carotenoids
1	(3S,5S,6R,3'R,6'R)-5,6-Dihydro-5,6-dihydroxylutein (1)	5.1
2	(9Z,13'Z)-Lutein-5,6-epoxide (2)	1.8
	(13Z,9'Z)-Lutein-5,6-epoxide (3)	1.8
3	(9'Z,13'Z)-Lutein-5,6-epoxide (4)	2.2
4	(9Z,13Z)-Lutein-5,6-epoxide (5)	2.0
5	(all-E)-Lutein-5,6-epoxide (6)	7.7
6	(9Z,9'Z)-Lutein-5,6-epoxide (7)	2.5
	(9Z)-Violaxanthin	2.7
7	(8S)-Lutein-5,8-epoxide (= chrysanthemaxanthin)	5.0
8	(8R)-Lutein-5,8-epoxide (= flavoxanthin)	1.7
	(9Z-8'R)-Luteoxanthin	1.8
9	(9Z)-Lutein-5,6-epoxide (8)	16.6
10	(9Z)-Lutein-5,6-epoxide (9)	16.9
11	(all-E)-Lutein	9.4
12	(9Z)-Lutein	11.3
13	(9'Z)-Lutein	6.0

Table 5 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR data for 1 in CDCl_3

Position	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (mult., J_{Hz})	Position	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (mult., J_{Hz})
1	38.7 (<i>s</i>)		1'	34.0 (<i>s</i>)	
2	45.2 (<i>t</i>)	α 1.61 (<i>dd</i>) ^b β 1.83 (<i>dd</i> , 13.5, 6)	2'	44.6 (<i>t</i>)	α 1.37 (<i>dd</i> , 13, 7) β 1.85 (<i>dd</i> , 13, 5.5)
3	66.3 (<i>d</i>)	3.97 (<i>m</i>)	3'	65.9 (<i>d</i>)	4.25 (<i>m</i>)
4	43.9 (<i>t</i>)	1.92 (<i>m</i>) 1.92 (<i>m</i>)	4'	124.5 (<i>d</i>)	5.55 (<i>s</i>)
5	79.4 (<i>s</i>)		5'	138.0 (<i>s</i>)	
6	76.3 (<i>s</i>)		6'	55.0 (<i>d</i>)	2.40 (<i>d</i> , 10)
7	127.5 (<i>d</i>)	5.83 (<i>d</i> , 15.5)	7'	128.8 (<i>d</i>)	5.43 (<i>dd</i> , 15.5, 10)
8	137.5 (<i>d</i>)	6.56 (<i>d</i> , 15.5)	8'	137.7 (<i>d</i>)	6.14 (<i>d</i> , 15.5)
9	134.1 (<i>s</i>)		9'	135.1 (<i>s</i>)	
10	132.9 (<i>d</i>) ^a	6.23 (<i>d</i> , 11.0)	10'	130.8 (<i>d</i>)	6.14 (<i>d</i> , 11)
11	124.6 (<i>d</i>)	6.62 (<i>dd</i> , 15.5, 15.5)	11'	124.9 (<i>d</i>)	6.62 (<i>dd</i> , 15.5, 11)
12	138.3 (<i>d</i>)	6.39 (<i>d</i> , 15.5)	12'	138.3 (<i>d</i>)	6.36 (<i>d</i> , 15.5)
13	136.2 (<i>s</i>)		13'	136.6 (<i>s</i>)	
14	132.5 (<i>d</i>) ^a	6.25 (<i>m</i>)	14'	132.5 (<i>d</i>)	6.25 (<i>m</i>)
15	130.3 (<i>d</i>)	6.64 (<i>m</i>)	15'	130.0 (<i>d</i>)	6.64 (<i>m</i>)
16	26.9 (<i>q</i>)	1.03 (<i>s</i>)	16'	29.5 (<i>q</i>)	1.00 (<i>s</i>)
17	27.7 (<i>q</i>)	1.07 (<i>s</i>)	17'	24.3 (<i>q</i>)	0.85 (<i>s</i>)
18	27.7 (<i>q</i>)	1.36 (<i>s</i>)	18'	22.9 (<i>q</i>)	1.63 (<i>s</i>)
19	13.3 (<i>q</i>)	1.94 (<i>s</i>)	19'	13.1 (<i>q</i>)	1.92 (<i>s</i>)
20	12.8 (<i>q</i>)	1.97 (<i>s</i>)	20'	12.8 (<i>q</i>)	1.97 (<i>s</i>)

^aAssignments may be interchanged.^bSignal overlappe

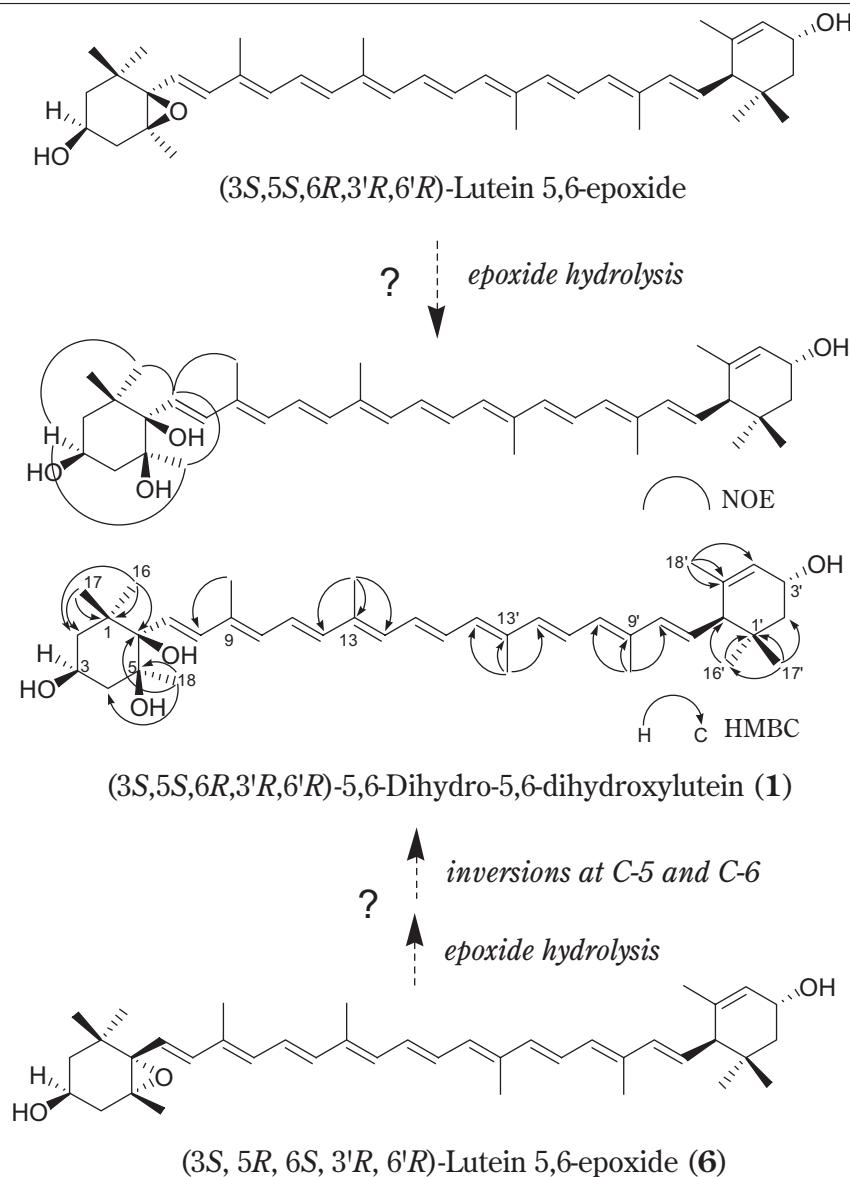


Figure 5. Structures of $(3S, 5S, 6R, 3'R, 6'R)$ -5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein (1) and putative biosynthetic pathway of 1.

2) Lutein-5,6-epoxide の立体異性体の構造決定

8種類の lutein-5,6-epoxide の立体異性体 [$9Z,13'Z$ (2), ピーク 2), $13Z,9'Z$ (3, ピーク 2), $9Z,13'Z$ (4, ピーク 3), $9Z,13Z$ (5, ピーク 4), all-E (6, ピーク 5), $9Z,9'Z$ (7, ピーク 6), $9Z$ (8, ピーク 9), and $9Z$ (9, ピーク 10)] を分離した(第6図). これらのうち, 5種の di-Z 体は新規カロテノイドであり, 1H NMR スペクトル分析によって構造決定を行った. 1H NMR シグナルは 1H - 1H COSY, NOESY および 1H - 1H decoupling 測定によって帰属を決定した. 第6表は all-E 体と di-Z 異性体のポリエン鎖部分の 1H NMR シグナルを比較したものである. これらの立体配置は 1H NMR シグナルの異性化シフト値 ($\Delta\delta = \Delta Z - \Delta$

E) (Englert, 1995) および NOESY 相関から決定された(第6表, 第6図). 例えば $(9Z,13Z)$ -lutein-5,6-epoxide (5) の場合, H-7, H-8, H-11 および H-12 位の 1H NMR シグナル値は all-E 体に比べて大きく低磁場シフトした一方で, H-10 および H-14 位は高磁場シフトした. これらの異性化シフトパターンは Englert (1995) が報告した, $9Z,13Z$ 立体配置の特徴と一致した. さらに, H-19/H-7, H-19/H-10, H-20/H-11 および H-20/H-14 の間で認められた NOESY 相関も $9Z,13Z$ 立体配置と一致した結果を示し, 化合物 5 は $(9Z,13Z)$ -lutein-5,6-epoxide であると決定した. $(9Z,13'Z)$ - (2), $(13Z,9'Z)$ - (3), $(9Z,13'Z)$ - (4) および $(9Z,9'Z)$ -lutein-5,6-epoxide (7) についても同様の手法で立体配置を決定した.

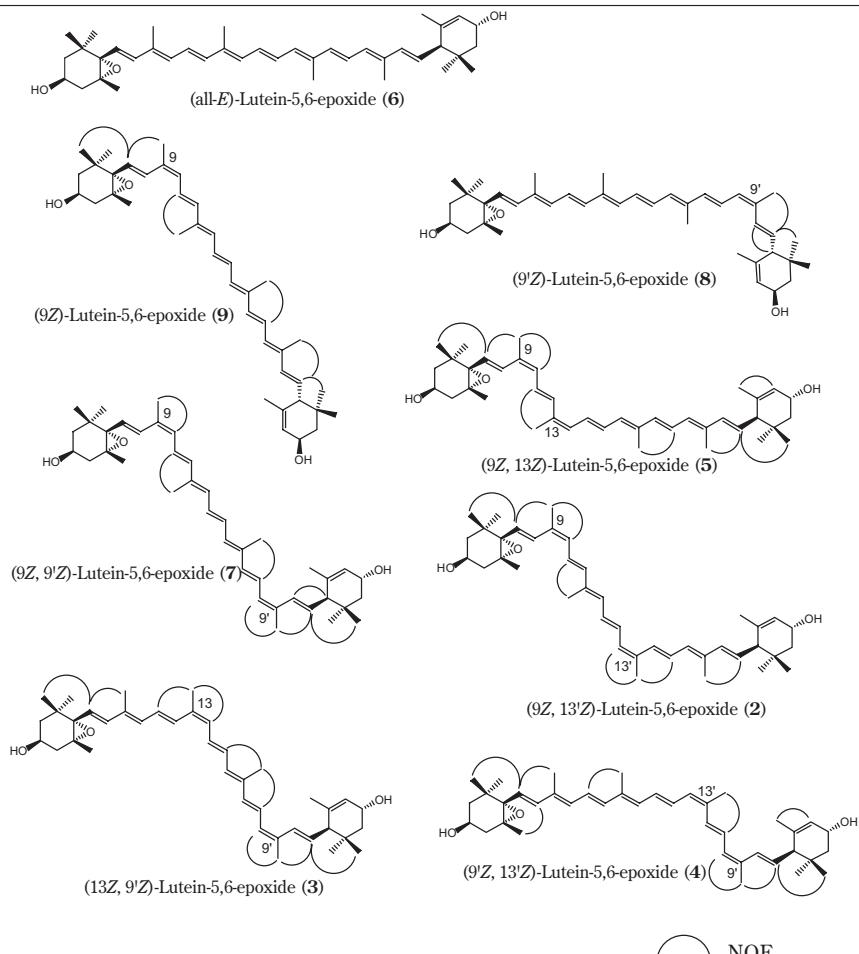


Figure 6. Structures of eight geometrical isomers of lutein-5,6-epoxide identified in this study.

Table 6 ^1H (500 MHz) NMR data relevant to the polyene part of (all-*E*)- and (di-*Z*)-lutein-5,6-epoxide in CDCl_3

Position	All- <i>E</i> (6)		9 <i>Z</i> ,9' <i>Z</i> (7)		9 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i> (5)		9 <i>Z</i> ,13' <i>Z</i> (2)		9' <i>Z</i> ,13' <i>Z</i> (4)		13 <i>Z</i> ,9' <i>Z</i> (3)	
	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta^a$	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta$
H-7	5.88		5.94	0.06	5.96	0.08	5.94	0.06	5.88		5.91	0.03
H-8	6.29		6.84	0.55	6.83	0.54	6.84	0.55	6.29		6.32	0.03
H-19	1.93		1.94		1.96	0.03	1.94		1.93		1.94	
H-10	6.20		6.08	-0.12	6.10	-0.10	6.08	-0.12	6.20		6.24	0.04
H-11	6.60		6.76	0.16	6.76	0.16	6.76	0.16	6.60		6.58	
H-12	6.38		6.30	-0.08	6.83	0.45	6.30	-0.08	6.38		6.70	0.32
H-20	1.97		1.97		1.99		1.96		1.97		1.99	
H-14	6.26		6.25		6.14	-0.12	6.19	-0.07	6.25		6.12	-0.14
H-15	6.66		6.63	-0.03	6.76	0.10	6.61	-0.05	6.56	-0.10	6.80	0.14
H-15'	6.66		6.63	-0.03	6.55	-0.11	6.78	0.12	6.80	0.14	6.60	-0.06
H-14'	6.26		6.25		6.23	-0.03	6.08	-0.18	6.12	-0.14	6.24	
H-20'	1.97		1.99		1.96		1.99		2.01	0.04	1.98	
H-12'	6.36		6.30	-0.06	6.36		6.88	0.52	6.82	0.46	6.30	-0.06
H-11'	6.60		6.74	0.14	6.60		6.56	-0.04	6.76	0.16	6.74	0.14
H-10'	6.14		6.03	-0.11	6.14		6.23	0.09	6.08	-0.06	6.03	-0.11
H-19'	1.91		1.91		1.91		1.92		1.93		1.91	
H-8'	6.14		6.67	0.53	6.14		6.16		6.67	0.53	6.67	0.53
H-7'	5.43		5.46	0.03	5.43		5.46	0.03	5.49	0.06	5.46	0.03

^a Isomerization shift ($\Delta\delta = \delta Z - \delta E$, $|\Delta\delta| > 0.02$ ppm)

3) その他のカロテノイドの同定

上述のカロテノイドに加え、既知のカロテノイド7種をUV-Vis, ¹H NMRおよびFAB-MSスペクトル解析から同定した。(*9Z*)-violaxanthin(ピーク6), (*8S*)-lutein-5,8-epoxide(ピーク7), (*8R*)-lutein-5,8-epoxide(ピーク8), (*9Z*-*8'R*)-luteoxanthin(ピーク8), (*all-E*)-lutein(ピーク11), (*9Z*)-lutein(ピーク12)および(*9'Z*)-lutein(ピーク13)である(第4表、第4図)。これらのカロテノイドはすべてキサントフィルに分類された。*(all-E)*-lutein, (*9Z*)-lutein, (*9'Z*)-lutein, (*9Z*)-violaxanthin, **6**, **8**および**9**はTóth・Szabolcs(1981)によってすでにキク花弁中に存在することが報告されている。したがって、本解析ではキク花弁に存在する9種のカロテノイドを新たに同定した。

3. 考 察

(*3S,5S,6R,3'R,6'R*)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein(**1**)の合成化合物は(*3S,5S,6R,3'R,6'R*)-lutein-5,6-epoxideのエポキシ環を穏やかに水酸化することによって得られる(Buchecckerら1984, Eugster 1985; 第5図)。しかしながら、(*3S,5S,6R,3'R,6'R*)-lutein-5,6-epoxideは現在までに天然物としての単離の報告はない。*(3S,5R,6S,3'R,6'R)*-lutein-5,6-epoxide[*(all-E)*-lutein-5,6-epoxide](**6**)は天然物として一般的な物質であり、キク花弁からも単離されたが、この化合物から**1**が形成されるためには、エポキシ環の水酸化に加えてC-5位およびC-6位の水酸基が続けて異性化される必要がある。どちらの経路を経由して化合物**1**がキク花弁内で生合成されているのかは不明であり、今後さらに調査を行う必要がある(第5図)。

本調査でキク花弁から検出されたカロテノイドは(*9Z*)-violaxanthinを除き、すべて β , ε -carotene(α -carotene)誘導体であった。今までに花弁に含まれるカロテノイド成分の分析が行われたキク科の植物としてはキンセンカ(*Calendula officinalis*; Bakoら, 2002), ヒマワリ2種(*Helianthus annus*; Tóth・Szabolcs 1981; Deliら1988, *Helianthus debilis*; Tóth・Szabolcs 1981)およびマリーゴールド(*Tagetes erecta*; Khachikら1999)があるが、いずれもluteinやその誘導体が主成分である。マリーゴールドはこれらのうち、花弁におけるカロテノイド中の α -carotene誘導体の割合が最も高い植物であり、総カロテノイド量の約92%を占める。しかしな

がら、キクはマリーゴールドよりもさらに α -carotene誘導体の割合が高いということが本調査で明らかになった。加えて、キク花弁からは8種のlutein-5,6-epoxideの立体異性体(第6図)、3種のluteinの立体異性体および2種のlutein-5,8-epoxideのエピ異性体といった、非常に様々な異性体が検出された。これらのうち、di-Z構造を持つ環化カロテノイドは天然物としては非常にまれであり、植物の花弁由来のものしか報告がない(*Brassica napus*[(*9Z,9'Z*)-lutein], *C. officinalis*[(*9Z,9'Z*)-luteinおよび(*13Z,13'Z*)-lutein], *T. erecta*[(*13Z,13'Z*)-lutein]および*Viola tricolor*[(*9Z,9'Z*)-violaxanthin, (*9Z,13Z*)-violaxanthin, (*9Z,13'Z*)-violaxanthinおよび(*9Z,15Z*)-violaxanthin; Molnárら1986])。

以上のことから、キク花弁に含まれるカロテノイドは他の植物種と比較して非常に特徴的な構成を示すということが明らかになった。

第2章 キク花弁および葉におけるカロテノイド蓄積の調節機構の解明

現在までに700種余りのカロテノイドが単離・同定されているが、これらカロテノイドの生合成を司る酵素ならびにその遺伝子に関しては長らく知見がなかった。その理由は、カロテノイド生合成酵素が非常に不安定であり、また存在量が非常に少なく、単離が困難であったためである。1989年になって初めて光合成細菌である*Rhodobacter*からの遺伝子の単離が報告された(Armstrongら1989)。この配列情報をもとに、高等植物から生合成酵素遺伝子の単離が報告されるようになった。従って、高等植物におけるカロテノイド生合成系酵素およびその遺伝子に関する基礎的研究はまだ始まったばかりであるといえる。

現在、最もカロテノイド生合成系に関する研究が進展している高等植物はトマトやトウガラシなどのナス科植物である。これらの植物は葉などの同化器官に比べて果実部分に大量のカロテノイドを蓄積するが、この器官によるカロテノイド蓄積量の差は生合成系酵素遺伝子の発現量の違いによってもたらされていると考えられている。トマトにおけるカロテノイド生合成の鍵酵素はPSY(phytoene synthase)およびPDS(phytoene desaturase)であり(Peckerら1992, Giulianoら1993, Fraserら1994), トウガラシではGGPS(geranylgeranyl pyrophosphate synthase), PSYおよびPDSである(Hugueney 1996)。

これらの植物をはじめとして、植物の花弁や果実におけるカロテノイドの蓄積量は生合成系酵素遺伝子の転写調節によって決定されるのが一般的だと考えられている (Fraser・Bramley 2004, Hirschberg 2001, Taylor・Ramsay 2005)。しかしながら近年、転写後の調節によってカロテノイド蓄積量が決定されている事例が報告されている (Liu ら 2004, Al-Babili ら 1996)。この他にも、カロテノイド蓄積量の調節には様々な未知の要因が関わっている可能性がある。

多くの園芸花き類では、花弁に含まれるカロテノイド量が異なる系統もしくは品種が存在し、そのことが花色のバリエーションに貢献している。しかし、このような花色の差をもつ植物をカロテノイド生合成系の調節という観点から調査した報告は限られている。Moehs ら (2001) は淡黄色から濃黄色花色を持つマリーゴールド 4 品種の花弁におけるカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現解析を行い、*DXS* (1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase) 遺伝子および *PSY* 遺伝子の転写調節によってこれらの花色の差が作り出されていることを報告した。また、Nielsen ら (2003) はサンダーソニアの淡黄色品種と黄色品種の比較を行ったが、淡黄色品種は相対的に *PDS* 遺伝子の発現量が低く、カロテノイド蓄積量と比例する傾向が見られた。

キクの黄色花色は主にカロテノイドによるものであり、92% 以上が lutein およびその誘導体であるという、非常に特徴的な構成を示すことを第 1 章において述べた。キク花弁の白色花色形質はカロテノイドによって着色される黄色花色形質に対して優性を示し、単一遺伝子座に座乗する優性遺伝子によって支配されていると推定されている (Langton 1980)。Hattori (1991) はこれを「カロテノイド生合成阻害遺伝子」と仮定した。この遺伝子は単離されておらず、キク花弁におけるカロテノイド蓄積の制御機構についても不明であるが、マリーゴールドやサンダーソニアとは異なった制御機構を持つことが推定される。

本章では、カロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現解析によって、キクの白色花色と黄色花色を決定付ける要因ならびにキク黄色花弁に含まれる特徴的なカロテノイド構成の原因を解明することを試みた。

第 1 節 白色品種および黄色品種の花弁および葉におけるカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現解析

キク科植物のカロテノイド生合成系酵素遺伝子の単離の報告は少ない。マリーゴールド、レタス、ヨモギ、ステビア、ヒマワリ等の配列がデータベース上に存在するが、部分配列であるものがほとんどであり、全長が報告されているものはマリーゴールドをはじめとしたごく一部である (Moehs ら, 2001)。また、*CRTISO* (carotenoid isomerase), *IPI* (isopentenyl pyrophosphate isomerase) および *DXS* など、キク科植物では全く報告がないものも多い。そこで、キク花弁で発現しているカロテノイド生合成系酵素遺伝子の単離を試み、その配列を用いて遺伝子の発現解析を行った。白色品種と黄色品種の花弁の発達段階別の発現解析とともにカロテノイド成分の分析を同時に実施し、遺伝子の発現とカロテノイド成分の推移との関係を調査した。また、葉についても同様に発現解析とカロテノイド成分の分析を行い、花弁の特徴的なカロテノイド蓄積に関わる遺伝子を明らかにすることを試みた。

1. 材料および方法

1) 材 料

キク白色品種 3 品種 ('パラゴン', 'ホワイトマーブル' および 'フィドシア') および黄色品種 3 品種 ('イエローパラゴン', 'フロリダマーブル' および 'サニーオレンジ') を材料として用いた (第 7 図)。'イエローパラゴン' は 'パラゴン' の枝変わり品種であり、同様に 'フロリダマーブル' は 'ホワイトマーブル' の枝変わり品種である。花弁は発達段階別に VE (very early), E (early), M (middle) および L (late) の 4 段階からサンプリングし、カロテノイドおよび RNA の抽出を行った。VE は花弁長 2 ~ 3 mm, E は 8 ~ 10 mm, M は 15 ~ 18 mm, および L は 30 ~ 35 mm とした。L ステージで完全に開花した状態であった。葉の発達は 3 段階 (E, M および L) に分け、カロテノイドの抽出を行った。また、RNA は L ステージから抽出した。葉長は E が 15 ~ 25 mm, M が 35 ~ 45 mm, および L が 60 ~ 70 mm とした。L ステージで完全に展開した状態であった。

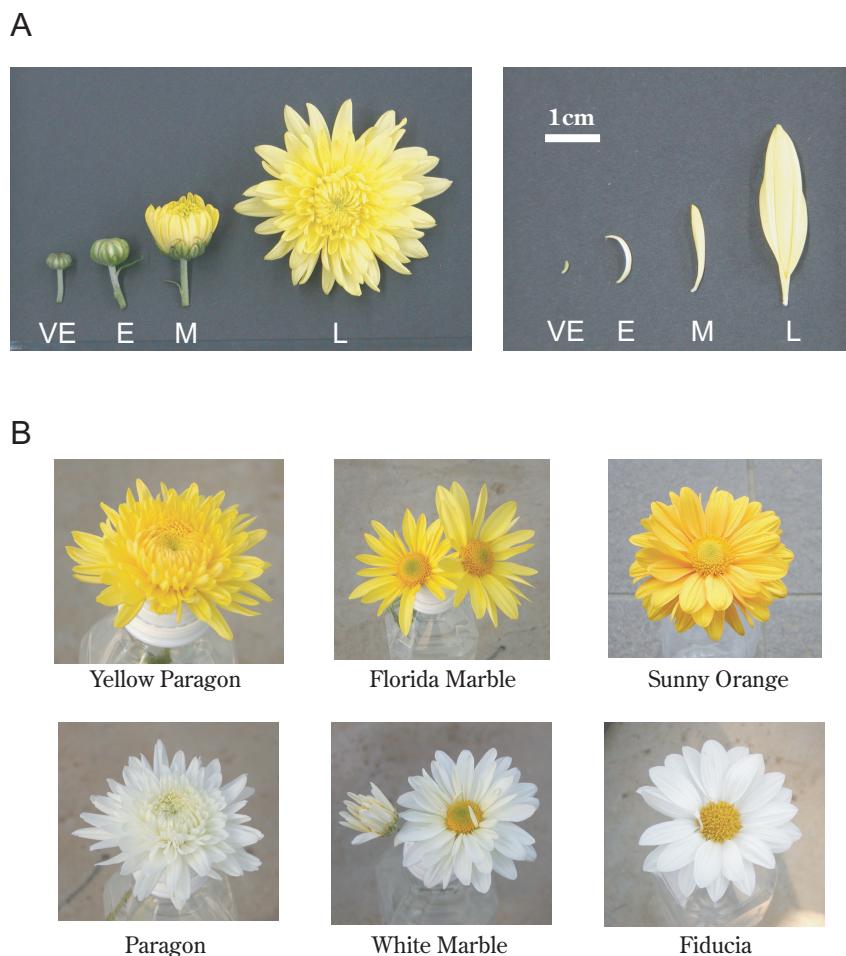


Figure 7. (A) Sampling stages of chrysanthemum petal development and (B) fully expanded flowers of chrysanthemum cultivars used for the experiment. VE = very early, E = early, M = medium, and L = late.

2) カロテノイド成分の分析

花弁および葉の各段階のサンプル 0.5 g に 3 ml のアセトンを加えて磨碎した。これに 5 ml のジエチルエーテルを加えてよく攪拌し、上清を分液ろうとに移した。この操作を上清の黄色の着色がなくなるまで繰り返した。得られたアセトン / エーテル溶液に等量の水を加え、3 回洗浄を行った。液量の半量の 5 % KOH-NaOH 溶液を加え、暗所で 3 時間静置し、けん化処理を行った。けん化が終了した溶液は中性になるまで水で洗浄し、エバボレーターで濃縮乾固した。これをメタノールで溶解したものを HPLC 分析に供試した。

HPLC 分析条件は以下の通りである。

カラム: YMC Carotenoid (S5 μ m, 250 \times 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 A/ MeOH: t-Buthyl methyl ether (MTBE): H₂O = 95:1:4,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: H₂O = 25:71:4

0 分 A 100% / B 0%, 12 分 A 100% / B 0%, 96 分 A 0% / B 100%

流速 1 ml/min, カラム温度 35°C

3) Poly(A)⁺ RNA の抽出および cDNA の合成

Total RNA は 改変 CTAB 法 (Chang ら, 1993) にて抽出し, mRNA purification kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) を用いて poly(A)⁺RNA の精製を行った。cDNA は SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて poly(A)⁺RNA から合成を行った。

4) カロテノイド生合成系酵素遺伝子の部分配列の決定

カロテノイド生合成系酵素遺伝子 13 種 (1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase [DXS], 1-deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase [DXR], isopentenyl pyrophosphate

isomerase [IPI], geranylgeranyl pyrophosphate synthase [GGPS], phytoene synthase [PSY], phytoene desaturase [PDS], ζ -carotene desaturase [ZDS], carotenoid isomerase [CRTISO], lycopene β -cyclase [LCYB], lycopene ϵ -cyclase [LCYE], β -ring hydroxylase [CHYB], zeaxanthin epoxidase [ZEP], および violaxanthin deepoxidase [VDE];第8図) の保存領域の配列からディジエネレートプライマーを作成し, RT-PCRで增幅を行った。各遺伝子の配列の単離には‘イエローパラゴン’のMステージの花弁のcDNAを用いた。予想される長さと一致するPCR産物をpCR2.1ベクター(Invitrogen)

にクローニングし、塩基配列を確認した。

5) カロテノイド生合成系酵素遺伝子の全長配列の単離

‘イエローパラゴン’のM段階の花弁から抽出したpoly(A)⁺RNAからSMART cDNA library construction kit(BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA)を用いてcDNAライブラリーを作製した。前項で単離したそれぞれの遺伝子の部分配列をDIGシステムでラベリングし、ライブラリーのスクリーニングのためのプローブとして用いた。最終的に全長cDNAをpTriplex2プラスミドに組

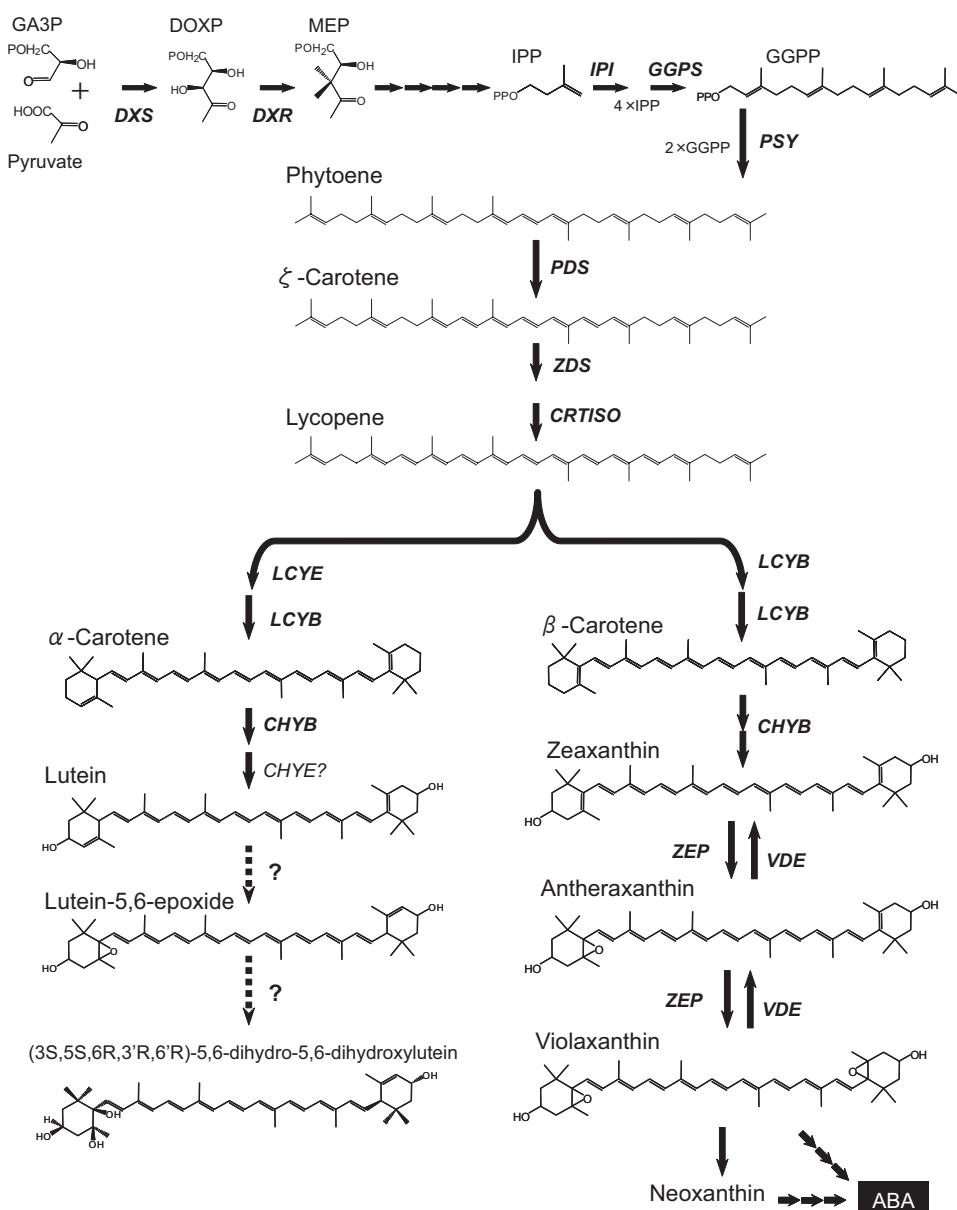


Figure 8. Putative carotenoid biosynthetic pathway in petals of chrysanthemum.

Abbreviations: GA3P, glyceraldehyde-3-phosphate; DOXP, D-1-deoxyxylulose-5-phosphate; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate.

み込んだ形で得た。BigDye DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) および自動シーケンサー (Genetic Analyzer 3100 [Applied Biosystems]) を用いて塩基配列を決定した。

また、cDNA ライブラリーのスクリーニングで全長 cDNA を単離できなかった遺伝子については、イエローパラゴンの M 段階の花弁から抽出した poly(A)⁺ RNA を用いて 3' および 5' RACE を行った。前項で得た部分配列情報を元に Oligo ソフトウェア (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA) でプライマーを設計し、SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences) を使用した。

6) ノーザン分析による遺伝子の発現解析

抽出した poly(A)⁺ RNA をホルムアミドを含む 1.2% アガロース変性ゲルで泳動し、ナイロンフィルター (Hybond-N⁺ membrane, Amersham Biosciences) に転写した。前項で単離したそれぞれの遺伝子の部分長 cDNA を DIG システムでラベリングし、プローブとして用いた。フィルターは 2 × SSC, 0.1% SDS 溶液で 5 分間、室温で 2 回洗浄ののち、0.1 × SSC, 0.1% SDS 溶液で 15 分間、68°C で 2 回洗浄を行った。特異的プローブは全長塩基配列を元に、各遺伝子間で保存されている領域を避けて設計した。*Actin* は Li らによってキクから単離された配列を用いて設計した (2005, GenBank accession no. AB205087)。プローブを增幅するためのプライマーは以下の通りである。*DXS* : 5'-ATGGAGCGATGACCG CAGGACAAG-3' および 5'-GC GGTAACCTTGCCTT TT CGGT-3', *DXR* : 5'-TGTCAAGATTCTCCTGCTGA TTCA-3' および 5'-TGTGTCTCGACCATGGAATGTAG T-3', *IPI* : 5'-ACGAGTTACTTCTCAGCAACGGT-3' および 5'-ATCAGATGGAGCCTTGTAGAGCAT-3', *GGPS* : 5'-GAGATGATTACACCAGTCGYTAATGC-3' および 5'-CATCAAGAATATCATCCACCACCTGAAA-3', *PSY* : 5'-CTATGACACCCGAGMGACAA-3' および 5'-AGTATC TGATAAAGCGGCATC-3', *PDS* : 5'-GCAAGGAATACCGG ATAGAGTTAC-3' および 5'-GAATGTCAACTGGAGCAG CGAATAC-3', *ZDS* : 5'-TGACTGTGCAACTTCGGTACAA TG-3' および 5'-AACACTGTTCTGTAACCCGTTCT-3', *CRTISO* : 5'-CGATAACGGAAAGCTGTAGGAGTGAA-3' および 5'-GGCTCCTCTAAGTTTCCAATCATCCTC-3', *LCYB* : 5'-TGTATATCAAATGGGGTTAAGTTTC-3' および 5'-TGAATTCCCTTCTTATTTCGGTA-3', *LCYE* : 5'-GCTGGAATGTCGCACTTATCG-3' および 5'-GATATTGCCTT

CACACTCTATGA-3', *CHYB* : 5'-CGGAACGATTACTTAT CTTGTT-3' および 5'-CAAAGACCCGGAATTATGCCT-3', *ZEP* : 5'-GGTGGTGAGAAAGAGAAGAAGATAAGG-3' および 5'-GACTGCTGGAGTGAATGTATCAAAC-3', *VDE* : 5'-CGAGACCGAATGTCAGATA-3' および 5'-CCAGTCAT CTTGGTAGTGAAG-3', *actin* : 5'-CTTGCCTTGGATCT TGCTGGTCGTGA-3' および 5'-AGCAGCTTCCATCCCA ATCATAGACGG-3'.

7) 定量リアルタイム PCR

リアルタイム PCR 法を用いて *DXR*, *PSY*, *LCYB* および *LCYE* 遺伝子の発現解析を行った。DNase 処理を行った poly(A)⁺ RNA から SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて鉄型となる cDNA を合成した。転写産物の蓄積量の解析は QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) および LightCycler System (Roche Diagnostics) を用い、添付のプロトコールに従って行った。リアルタイム PCR のための遺伝子特異的プライマーは Oligo ソフトウェアを用い、全長 cDNA 塩基配列の遺伝子間で保存された配列を持つ部分を避けて設計した。PCR で目的の長さの遺伝子が増幅されることを確認した。*Actin* は Li らによってキクから単離された配列を用いて設計した (2005, GenBank accession no. AB205087)。プライマーの配列は以下である。*DXR*, 5'-CTTAATTGCTG GCGGTCCCT-3' および 5'-CCTCCTGATGCGGTCAAG AT-3'; *PSY*, 5'-GCTTTGGCTTAGGAATCGC-3' および 5'-TCTGATAGTCCGGCTTGTGC-3'; *LCYB*, 5'-AGAGCTT GTACCCGAAATCA-3' および 5'-CTACAGCTAAACCCG AAGGA-3'; *LCYE*, 5'-GGAGCGGCTTCGGTAAACTTCT GCAA-3' および 5'-CTCTCTGAAGCCAGACAGGTTTC CTC-3'; *actin*, 5'-ACATGCTATCTTGCCTTGG-3' および 5'-CTCTCACAAATTCCCGTTCA-3'. 各サンプルの *Actin* 量はそれぞれのサンプルの poly(A)⁺ RNA 濃度のばらつきを均一化するためのスタンダードとして用いた。

3. 結 果

1) イソプレノイドおよびカロテノイド生合成系酵素遺伝子の単離

4 種類のイソプレノイド生合成系酵素遺伝子 (*DXS* [AB205044], *DXR* [AB205045], *IPI* [AB205048] および *GGPS* [AB205047])：括弧内は GenBank accession

no. を示す) および 9 種類のカロテノイド生合成系酵素遺伝子 (*PSY* [AB205050], *PDS* [AB205049], *ZDS* [AB205052], *CRTISO* [AB205043], *LCYB* [AB205041], *LCYE* [AB205046], *CHYB* [AB205042], *VDE* [AB205051], and *ZEP* [AB205053]) を単離した。これらのうち、*PSY*, *PDS*, *LCYB*, *LCYE* および *CHYB* の全長 cDNA は cDNA ライブラリーからのスクリーニングによって単離されたが、その他の 8 遺伝子 (*DXS*, *DXR*, *IPI*, *GGPS*, *ZDS*,

CRTISO, *ZEP* および *VDE*) はこの手法では単離することができず、最終的に RACE 法によって全長 cDNA を得た。

2) カロテノイド成分の HPLC 分析

‘イエローパラゴン’ および ‘パラゴン’ 花弁の発達 4 段階におけるカロテノイド成分およびカロテノイド含量は第 9 図および第 10 図に示した。黄色品種である‘イ

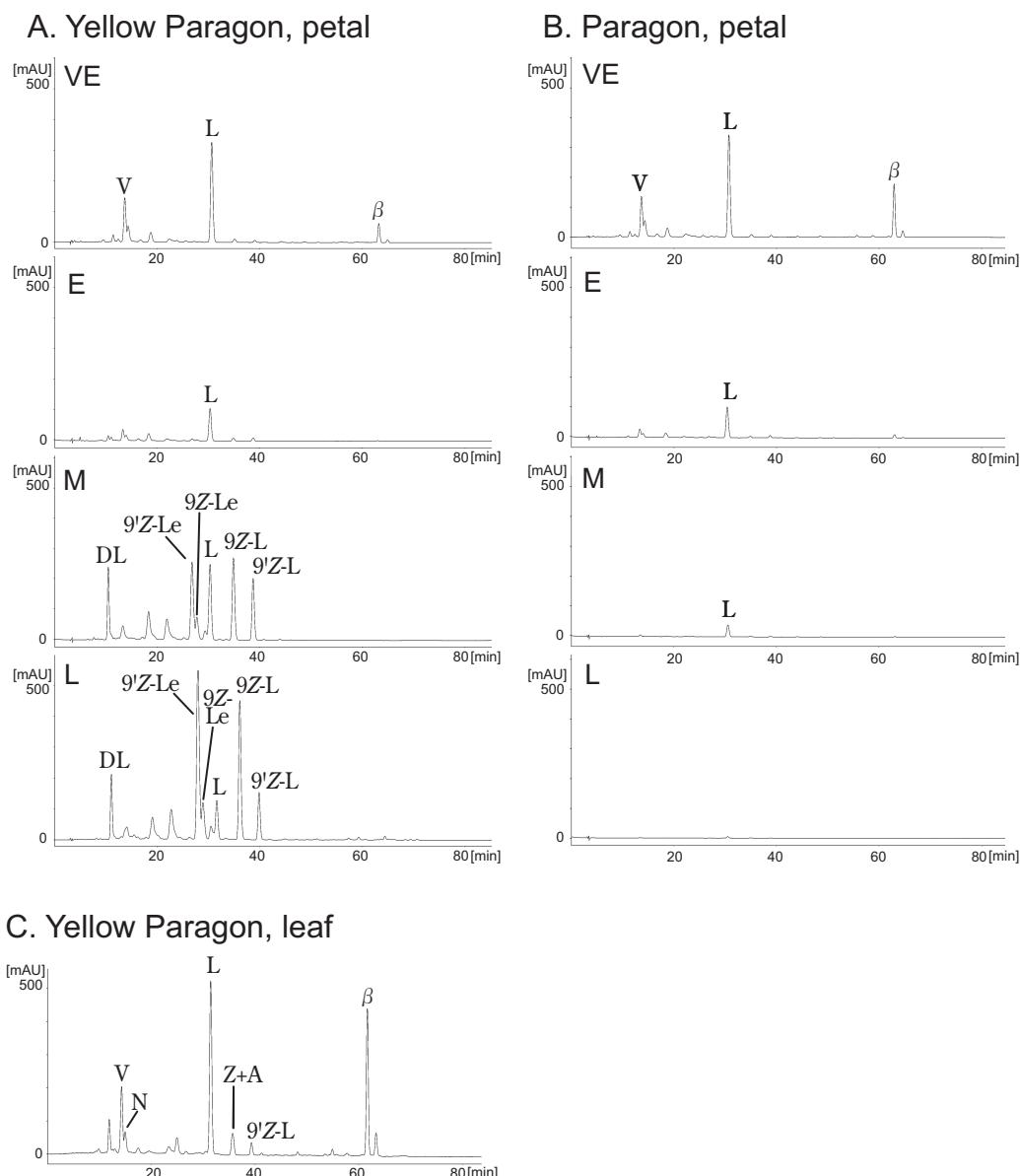


Figure 9. Carotenoid analysis in petals and leaves of Yellow Paragon and Paragon. Carotenoid extracts from 0.1 g f.w. of petals of (A) Yellow Paragon and (B) Paragon, and (C) leaves of Yellow Paragon were analyzed by HPLC.

Abbreviations: V, violaxanthin; L, all-*E*-lutein; β , β -carotene; DL, (3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*,6'*R*)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein; 9*Z*-L, (9*Z*)-lutein; 9'*Z*-L, (9'*Z*)-lutein; 9*Z*-Le, (9*Z*)-lutein-5,6-epoxide; 9'*Z*-Le, (9'*Z*)-lutein-5,6-epoxide; N, (9'*Z*)-neoxanthin; Z, zeaxanthin; A, antheraxanthin.

‘イエローパラゴン’の花弁では発達に従ってカロテノイド蓄積量が増加し、また、大きく構成成分が変化した。発達初期である VE ステージでは lutein, violaxanthin, および β -carotene が主要なカロテノイドとして検出されたが、E ステージになると violaxanthin と β -carotene は消失し、lutein のみになった。M ステージでは lutein に加え、(3S,5S,6R,3'R,6'R)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein, lutein の cis 体 ((9Z)-lutein, (9Z)-lutein) およびエポキシ化 lutein ((9Z)-lutein-5,6-epoxide, (9Z)-lutein-5,6-epoxide) 等のルテイン誘導体が検出された。L ステージでは lutein と (9Z)-lutein の割合は減少したが、一方、(9Z)-lutein と (9Z)-lutein-5,6-epoxide は大幅に増加した。一方、白色品種である ‘パラゴン’ 花弁においても、VE ステージでは ‘イエローパラゴン’ 同様に lutein, violaxanthin, および β -carotene が検出された。しかしこれらは花弁の発達に伴って減少し、L ステージのカロテノイド含量は検出限界以下であった。他の黄色 2 品種（フロリダマーブル、サニーオレンジ）および白色 2 品種（ホワイトマーブル、フィドシア）においてもそれぞれ ‘イエローパラゴン’ および ‘パラゴン’ と同様の成分および含量の推移を示した。

一方、葉の場合は生育ステージや品種が異なっていても同様のクロマトグラムを示した。‘イエローパラゴン’ のクロマトグラムを第 9 図に示した。Lutein が主要なカロテノイドであるのは花弁と同様であったが、加えて、violaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin, β -carotene といった光合成に不可欠なカロテノイドを含んでいた。花弁において大部分を占めていた lutein-5,6-epoxide および (3S,5S,6R,3'R,6'R)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein といった lutein 誘導体や、lutein のシス体は (9Z)-lutein を除きほとんど検出されなかった。花弁の場合、L ステージでは全カロテノイドの 92% 以上が β , ϵ -carotenoid 類であったが、葉では 43% であり、 β , β -carotenoid 類が β , ϵ -carotenoid 類よりも高い割合で含まれていた。‘イエローパラゴン’ の葉と花弁の総カロテノイド量を比較すると、葉は花弁の L ステージのおよそ 2 倍であった（第 10 図）。

3) イエローパラゴンおよびパラゴンの花弁における発達段階別の発現解析

第 11 図は ‘イエローパラゴン’ と ‘パラゴン’ の花弁の発達 4 段階におけるイソプレノイドおよびカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現を示したものである。ノーザン解析では 1 レーン当たり $2 \mu\text{g}$ の poly(A)⁺ RNA

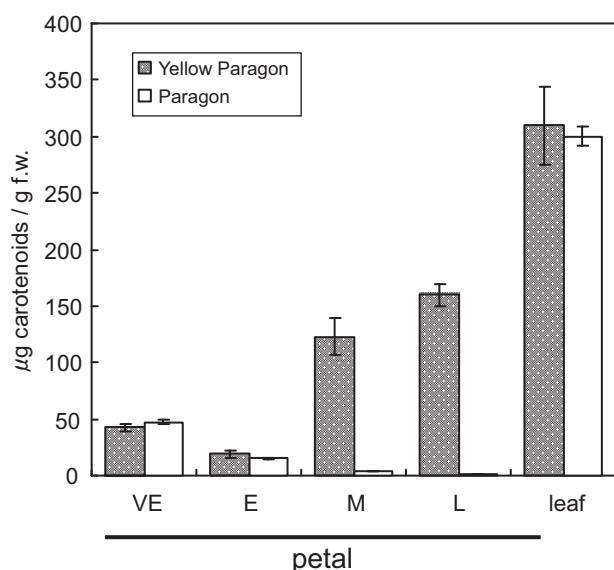


Figure 10. Total carotenoid contents in petals and leaves of Yellow Paragon and Paragon. Measurements were performed in triplicate, and the mean values \pm SE are shown.

を使用した。しかしながら、DXR, PSY および LCYB 遺伝子は 1 レーン当たりの poly(A)⁺ RNA を $4 \mu\text{g}$ に増やしても明確な転写産物のシグナルを検出することができなかつた。そこで、これらの遺伝子については定量的リアルタイム PCR による解析を行った。

‘イエローパラゴン’ では花弁の発達に伴い、DXS, PSY, PDS, ZDS, CRTISO, LCYB, LCYE、および CHYB 遺伝子の発現量は増加した。DXS を除き、これらの遺伝子は白色品種である ‘パラゴン’ においても発達後期に増加し、‘イエローパラゴン’ と同様の発現パターンを示した。しかし転写量は全体的に ‘イエローパラゴン’ に比べると低い傾向が見られた。唯一 DXS のみが花弁の発達に伴って減少し、‘パラゴン’ 花弁におけるカロテノイド蓄積の傾向と一致した。DXR, IPI および GGPS の発現量は両品種とも、発達段階に関わらず一定であった。また、VDE は発達に伴って減少し、ZEP はいずれの段階でもほとんど検出されなかつた。

4) 黄色品種と白品種の花弁における遺伝子発現の比較

6 品種の M ステージの花弁および ‘イエローパラゴン’ と ‘パラゴン’ の葉におけるカロテノイドとイソプレノイド生合成系酵素遺伝子の発現解析の結果を第 12 図に示した。ほとんどの遺伝子の発現量に品種間差が見ら

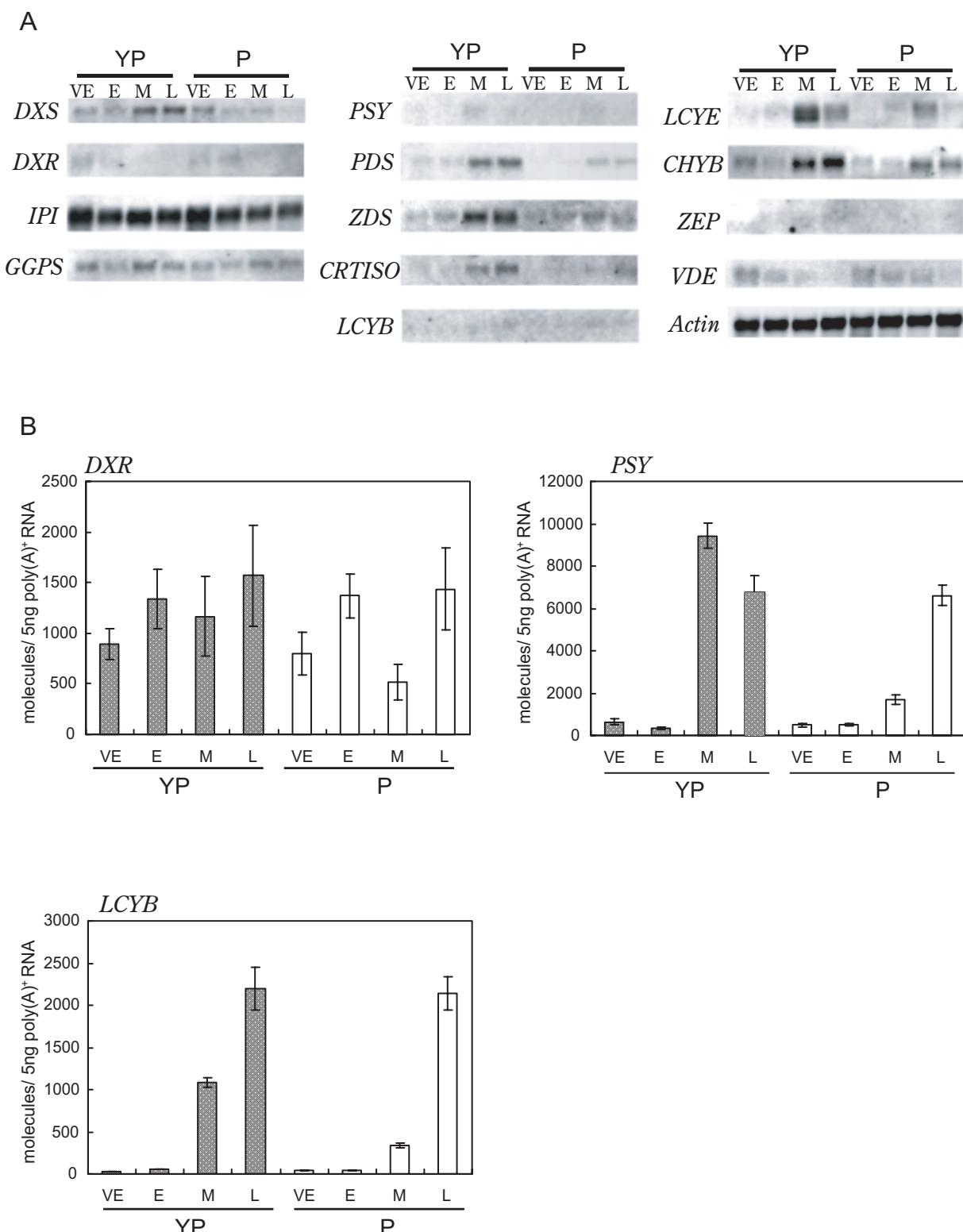


Figure 11. Analysis of the expression of genes for isoprenoid and carotenoid biosynthesis during petal development of Yellow Paragon and Paragon. (A) Northern analysis. 2 μ g of poly(A)⁺ RNA per lane was loaded for *DXS*, *IPI*, *GGPS*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCYE*, *CHYB*, *ZEP*, *VDE*, and *Actin*. 4 μ g of poly(A)⁺ RNA per lane was loaded for *DXR*, *PSY*, and *LCYB*. (B) Quantitative real-time PCR of *DXR*, *PSY*, and *LCYB*. Real-time PCR was performed in triplicate, and the mean values \pm SE are shown. Abbreviations: YP, Yellow Paragon; P, Paragon.

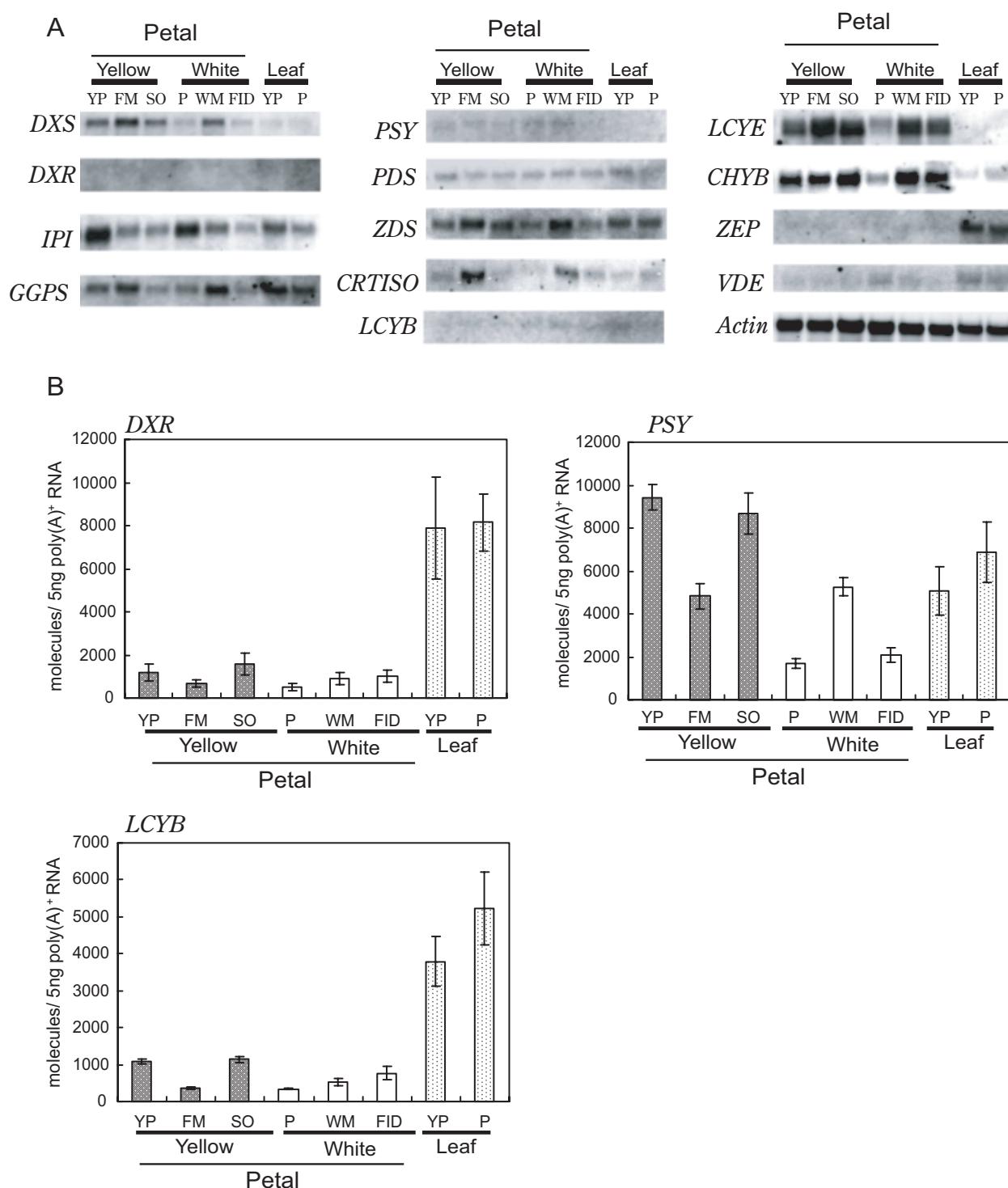


Figure 12. Analysis of the expression of genes for isoprenoid and carotenoid biosynthesis in flowers and leaves of yellow- and white-flowered cultivars.

Petals at stage M and leaves at stage L were used for the analysis. (A) Northern analysis. 2 μ g of poly(A)⁺ RNA per lane was loaded for *DXS*, *IPI*, *GGPS*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCYE*, *CHYB*, *ZEP*, *VDE*, and *Actin*. 4 μ g of poly(A)⁺ RNA per lane was loaded for *DXR*, *PSY*, and *LCYB*. (B) Quantitative real-time PCR of *DXR*, *PSY*, and *LCYB*. Real-time PCR was performed in triplicate, and the mean values \pm SE are shown.

Abbreviations: YP, Yellow Paragon; FM, Florida Marble; SO, Sunny Orange; P, Paragon; WM, White Marble; FID, Fiducia.

れたが、黄色品種と白品種の間で明確な発現量の違いを示す遺伝子はなかった。‘パラゴン’花弁における *DXS*, *PSY*, *CRTISO*, *LCYB*, *LCYE* および *CHYB* 遺伝子の発現量は‘パラゴン’の枝変わり品種である‘イエローパラゴン’に比べて全体的に低い傾向を示したが、一方、‘ホワイトマーブル’とその枝変わりである‘フロリダマーブル’を比較すると今回調査を行った遺伝子の発現量にはほとんど差がなかった。

5) 花弁と葉における遺伝子発現の比較

ノーザン解析によって花弁と葉の各遺伝子の発現量の比較を行ったところ、最も特徴的であったのが *LCYB* と *LCYE* の発現量の違いであった(第12図)。そこで、リアルタイムPCRによって *LCYB* と *LCYE* の発現量を数値化し、比較した(第13図)。その結果、黄色花弁の品種では発達段階、品種に関わらず *LCYE* は *LCYB* に比べて常に高い発現を示すことが明らかになった。対照的に、葉では *LCYB* に比べ *LCYE* の発現は非常に低かった。

葉は花弁と異なり、光合成に必須である *violaxanthin* や *zeaxanthin* 等のカロテノイド成分を含むことを前述したが、これらの生合成に関わる酵素遺伝子である、*VDE* と *ZEP* は花弁に比べて高い発現を示した。また、*DXR* も葉では高い発現を示した。一方、*DXS* や *CHYB* の発現は低かった。

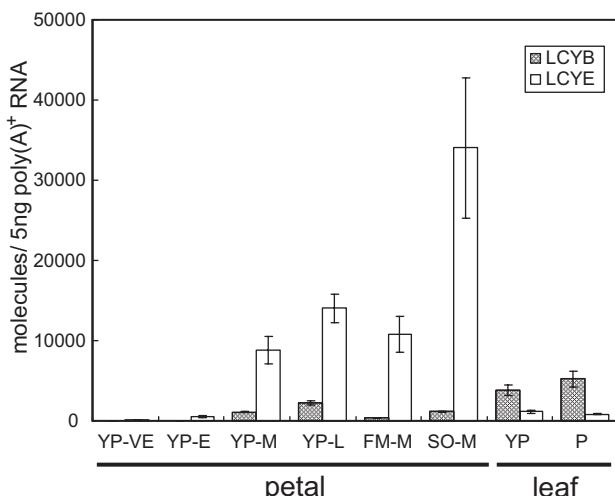


Figure 13. Quantitative real-time PCR of *LCYB* and *LCYE* genes in petals of yellow-flowered cultivars and leaves of Yellow Paragon and Paragon. Real-time PCR was performed in triplicate, and the mean values \pm SE are shown.

3. 考 察

1) 花弁および葉におけるカロテノイド成分の違い

キクの葉に含まれるカロテノイド成分は植物の緑色組織としては一般的な構成であり、光合成に必須なカロテノイドである *violaxanthin*, *zeaxanthin*, *antheraxanthin*などを含んでいた。一方、花弁に含まれるカロテノイドは非常に特徴的で *lutein* ならびにその誘導体がほとんどを占める(第9図)。

カロテノイド生合成経路はリコペンから先 β,β -carotenoid 経路と β,ε -carotenoid 経路に大きく分かれる(第8図)。Cunninghamら(1996, 2001)はアラビドプシスの *lycopene* を基質として環化を触媒する酵素であるリコペン β -サイクレースならびにリコペン ε -サイクレースの機能を解析した。その結果、リコペン β -サイクレースは *lycopene* の両端に β 環を導入し、 β -carotene に変換することができるが、リコペン ε -サイクレースは片側しか環化する能力がなく、また、すでに環を片側に持つ γ -carotene や ε -carotene を基質として利用できないと報告している。従って、 α -carotene が合成されるためには、まず *lycopene* がリコペン ε -サイクレースに触媒されて ε 環が片側に付与された後、リコペン β -サイクレースによって残りの末端に β 環が付与される必要があり、この順番を入れ替えることはできないと推測される。*Lycopene* から α -carotene に変換されるのか、あるいは β -carotene に変換されるのかはまだどちらの酵素に触媒されるのかによって決まると考えられる。Cunninghamら(2001)は、カロテノイドが β,β -carotenoid 経路と β,ε -carotenoid 経路のどちらに誘導されるのか、その割合を決定するのはリコペン β -サイクレースと ε -サイクレースの相対量もしくは活性ではないかと述べている。本実験の結果では、 β,ε -carotenoid 類がカロテノイドの大部分を占める花弁では *LCYE* の発現が *LCYB* の発現よりはるかに高かったが、一方、 β,β -carotenoid 類が高い割合を占めた葉では逆に *LCYB* の発現が *LCYE* の発現より高く、Cunninghamらの仮説を支持する結果となった。

2) 花弁の発達に伴う黄色品種の花弁に含まれるカロテノイド成分の変化

黄色品種の花弁のカロテノイド成分は発達に伴って大きく変動する(第9図)。‘イエローパラゴン’の花弁では、VEステージでは β -carotene および *violaxanthin* は

主要なカロテノイドであったが、これらのカロテノイドは花弁の発達に伴い減少し、Lステージではほとんど検出されなくなつた。エポキシ化および異性化は花弁の発達の後半に起こると考えられ、lutein の異性体、(all-E)-lutein-5,6-epoxide およびその異性体、(3S,5S,6R,3'R,6'R)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein 等の lutein の誘導体は Mステージから Lステージにかけて大きく増加した。これらのカロテノイドは(9Z)-lutein を除き、ほとんど葉では検出されなかつた。このことから、これらのカロテノイドの合成反応は花弁の発達段階後期に活性が増加する酵素によって触媒されていると考えられた。しかしながら、これらの反応を担う酵素は現在のところ明らかになつてない。

近年、 β -carotene から(9Z)-violaxanthin もしくは(9Z)-neoxanthin を経由してアブシジン酸の前駆体である xanthoxin までの生合成に関わる酵素のほとんどすべてが明らかになつた (Taylor・Ramsay, 2005)。一方、 α -carotene 誘導体の生合成に関しては知見が少ない。Zeinoxanthin を lutein に触媒する ϵ -ring hydroxylase (CHYE) 遺伝子を単離する試みは *Arabidopsis*において取り組まれてきたが、近年、この酵素遺伝子はチトクロム P450 と塩基配列の相同性が高く、 β -ring hydroxylase (CHYB) とは異なる起源を持つということが明らかになつた (Tian ら 2003, Tian・Dellapenna 2004)。しかしながら、lutein からさらにその誘導体へと触媒する酵素については未だ不明である。Ladygin (2000) は zeaxanthin epoxidase (ZEP) は zeaxanthin だけでなく lutein に対してもエポキシ化を触媒することが可能かもしれないと述べているが、本実験では ZEP 遺伝子の発現が確認できたのは葉のみであり、ZEP の機能については不明なままであった (第 12 図)。

近年の研究の結果、花弁にはさまざまなシス体カロテノイドが含まれることが明らかになつてきた (Deli ら 1988, Molnár ら 1986)。しかしながら、花弁でカロテノイドがシス構造を取ることの意味は明らかになつていな。これらの異性化反応に光化学作用が関わることは古くから知られているが、それに加え、近年、これらの形成に関わる酵素の存在が推測されるようになつてきた。今回、キクの花弁から様々な lutein および lutein-5,6-epoxide のシス体が得られたが、これらは葉では検出されなかつた (第 9 図)。従つて、キクでは lutein および lutein-5,6-epoxide の異性化を触媒する酵素が花弁にのみ存在する可能性がある。

3) 花弁の発達に伴う黄色品種および白品種の花弁におけるカロテノイド蓄積量の変動

‘イエローパラゴン’ 花弁では発達に伴い、カロテノイド含量が大きく増加する (第 9 図、第 10 図)。調査を行つたカロテノイド生合成系酵素遺伝子のうち、DXS, PSY, PDS, ZDS, CRTISO, LCYB, LCYE および CHYB は ‘イエローパラゴン’ の花弁の発達に伴つて発現量が増加したが、これらの発現パターンはカロテノイドの蓄積量のパターンとよく一致していた (第 10 図、第 11 図)。一方、白色品種ではカロテノイド量は次第に減少した (第 9 図、第 10 図)。興味深いことに、白色品種である ‘パラゴン’ は発育初期である VE から E ステージでは黄色品種である ‘イエローパラゴン’ とほとんど同量の violaxanthin, lutein および β -carotene を含んでいた。これは、白色花弁でのカロテノイド生合成が停止しているわけではないということを示唆するものである。もしイソプレノイドもしくはカロテノイド生合成系酵素遺伝子のいずれかが塩基配列の変異などによってその機能を失い、カロテノイド生合成経路が遮断されたことが原因となって白色花弁が形成されているのならば、おそらくこの白色形質は黄色形質に対して劣性を示すと推測される。アントシアニン生合成経路での例を挙げると、白色花弁を持つアサガオ (*Ipomea nil*) の一系統は dihydroflavonol-4-reductase (DFR) 遺伝子内部にトランスポゾンが挿入されており、酵素としての機能を失っている (Inagaki ら 1994)。この形質は劣性であり、中間代謝物である無色のフラボノールを蓄積することが明らかになつてゐる。ところがキクの場合、白色は優性形質であり (Hattori 1991, Langton 1980)、完全に展開した白色品種の花弁からは黄色を示すカロテノイドだけでなく、中間代謝物である phytoene や phytofluene といった無色のカロテノイドも検出することができなかつた。

このパラゴンにおける花弁の発達に伴うカロテノイド量の減少を引き起こす原因の一つとして生合成系酵素遺伝子の発現調節を考えられる。トマト果実の場合、果実の成熟に伴いカロテノイド量が 10 ~ 15 倍に上昇することが知られているが、このカロテノイド蓄積量の調節には PSY および PDS が重要な鍵酵素として関わつており、果実の成熟に伴いこれらの転写量も顕著に増加することが報告されている (Fraser ら 1994, Giuliano ら 1993, Pecker ら 1992)。また、トウガラシの場合、成熟に伴うカロテノイド蓄積量の上昇と GGPS, PSY および PDS 遺伝子の発現量は比例することが報告されている (Hugueney ら 1996)。パラゴン花弁におい

では、唯一 *DXS* 遺伝子のみがカロテノイド含量の推移と一致する発現量を示した（第 10 図、第 11 図）。*DXS* は methylerythritol phosphate (MEP) 経路の起点となる酵素であり、転写制御によってカロテノイド生合成量を調節しているという報告のある最も上流の酵素でもある (Estévez ら 2001, Lois ら 2000)。従って、花弁の発達に伴う *DXS* 遺伝子の発現量の減少が ‘パラゴン’ におけるカロテノイド量の減少の原因である可能性がある。ところが、本実験に供試した白色品種 3 品種の *DXS* 発現量は ‘パラゴン’ と ‘フィドシア’ が黄色品種よりも低い発現量を示したもの、‘ホワイトマーブル’ は黄色品種と同等もしくはそれ以上であった（第 12 図）。「フロリダマーブル」は ‘ホワイトマーブル’ の枝変わり品種であるが、この 2 品種の発現量を比較すると調査を行った全ての遺伝子についてほとんど差がなかった。従って、白色花弁が形成されるメカニズムは、カロテノイド生合成系酵素遺伝子による転写調節では完全に説明できないということが明らかになった。

マリーゴールドやサンダーソニアの淡黄色品種の花弁は少量ながらも黄色品種と同じ成分のカロテノイドを含んでいるが、これらの花色はカロテノイド生合成系酵素遺伝子の転写調節によって作り出されていると推測されている (Moehs ら 2001, Nielsen ら 2003)。いずれの種も白色花色を持つ原種が存在せず、黄色花色の野生種をもとに純白色の花弁を目指して育種を行ってきた過程でようやく得られたものである。従ってこの淡黄色形質は劣性であると推測される。対照的に、キク属野生種は白色花色と黄色花色の両方が存在し、現在の栽培キクはこれらの交雑によって成立したと考えられている (Shibata 1994, Machin・Scopes 1982)。キクの場合、花弁の白色形質は黄色に対して優性であり、加えて、黄色花色を持つ枝変わりは白色品種から生じ、その逆は起こらない (Jank 1957, Machin・Scopes 1978)。一般的に、放射線育種や枝変わりから生じる変異体はゲノム DNA の欠失を伴っている場合が多いことから (Vizir ら 1994)，白色品種から黄色花色を持つ変異体が生じる原因は何らかのカロテノイド蓄積に関与する遺伝子を失うためであると推測される。Hattori (1991) が白色品種にのみ存在すると推測した「カロテノイド生合成阻害遺伝子」がこれに相当すると考えられるが、実際にはこの遺伝子は Hattori が名付けたようにカロテノイド生合成経路を阻害するのではなく、カロテノイドの蓄積を阻害する機能を持つと推測される。

以上のことから、マリーゴールドの淡黄色花弁とキク

の白色花弁は異なったメカニズムで発現する形質であり、キクの白色花色を決定する要因はカロテノイド生合成系酵素遺伝子の転写制御ではなく、カロテノイド蓄積を抑制する単一の優性遺伝子の存在であると結論付けた。

第 2 節 キク白色品種から単離されたカロテノイド分解酵素ホモログ *CmCCD1* の黄色品種および白色品種における発現解析

カロテノイド分解酵素 (carotenoid cleavage dioxygenase: CCD) はカロテノイドの炭素鎖を様々な部分で切断し、分解産物を作り出す働きを持つ酵素である。最もよく知られているものが nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) であり、これは (9Z)-violaxanthin および (9'Z)-neoxanthin を分解し、アブシジン酸の前駆体である xanthoxin を作り出す機能を持つ。近年、いくつかの植物で CCD はファミリーを形成しているとの報告があり (Camara・Bouvier, 2004)，アラビドプシスでは現在までに 9 種類の CCD ファミリーのホモログが確認されている。これらのうちの 5 種類は NCED であることが確認されている (Tan ら, 2003)。しかし、他の 4 種は NCED とは相同性が低く、幅広い基質特異性を持っていることが確認されている。この 2 番目のグループに属する CCD はクロッカス (Bouvier ら, 2003), ペチュニア (Simkin ら, 2004a), トマト (Simkin ら, 2004b), およびインゲン (Schwartz ら, 2000) で単離および機能確認が報告されている。ペチュニアの CCD は様々なカロテノイドを分解し、香りに重要な役割を果たす β -ionone の生成に関与していると考えられている。また、バラでは酵素自体は単離されていないものの、白色品種にのみカロテノイドの分解産物である無色の C14 もしくは C27 骨格を持つイソプレノイドが蓄積しており、カロテノイド分解酵素の存在が推測されている (Eugster・Märki-Fischer 1991)。

大宮ら (2004) はキクの白色品種である ‘パラゴン’ と黄色品種である ‘イエローパラゴン’ の花弁を材料として、それぞれの品種で特異的に発現している遺伝子をサブトラクション法によって探索した。その結果、‘パラゴン’ 花弁で特異的に発現している CCD ホモログ *CmCCD1* を単離したことを報告した。そこで、複数のキク黄色品種および白色品種において *CmCCD1* の発現解析を行い、花色との関係を調査した。

1. 材料および方法

1) 材 料

白色品種4種（‘セイマリン’, ‘ホワイトマーブル’, ‘フィドシア’, ‘パラゴン’）および黄色品種8品種（‘イエローパラゴン’, ‘ホマロ’, ‘スージー’, ‘フロリダマーブル’, ‘モーニングサン’, ‘ステイツマン’, ‘秀芳の宝’）から花弁を採取した。‘ホワイトマーブル’はVE, E, M, Lの4段階、その他の品種はM段階を用いた。また、‘パラゴン’から管状花、葉（完全に展開したもの）、茎、および根を採取し、実験に供試した。

2) Total RNA の抽出およびcDNA の合成

Total RNA は改変 CTAB 法 (Chang ら, 1993) にて抽出した。DNase 処理を行った後、SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて鋳型となる cDNA を合成した。

3) 定量リアルタイム PCR

リアルタイム PCR 法を用いて *CmCCD1* 遺伝子の発現解析を行った。転写産物の蓄積量の解析は QuantiTect

SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) および LightCycler System (Roche Diagnostics) を用い、添付のプロトコールに従って行った。リアルタイム PCR のための遺伝子特異的プライマーは Oligo ソフトウェアを用いて、*CmCCD1* 遺伝子の全長配列から設計した。PCR にて目的の遺伝子が増幅されていることを確認した。Actin は Li らによってキクから単離された配列を用いて設計した (2005, GenBank accession no. AB205087)。使用したプライマーの配列は 5'-CCATCCCATTCAACATCAACCA-3' および 5'-ATTAGCTTTTCAGCCATTTCCT TT-3' である。各サンプルの Actin 量はそれぞれのサンプルの poly(A)⁺ RNA 濃度のばらつきを均一化するためのスタンダードとして測定した。

2. 結 果

白色品種と黄色品種の花弁における *CmCCD1* の発現をリアルタイム PCR 法を用いて調査したところ、いずれの白色品種も発現していることが確認された。それに対し、黄色品種は ‘イエローパラゴン’ を除いてほとんど発現が認められなかった（第14図）。そこで、‘パ

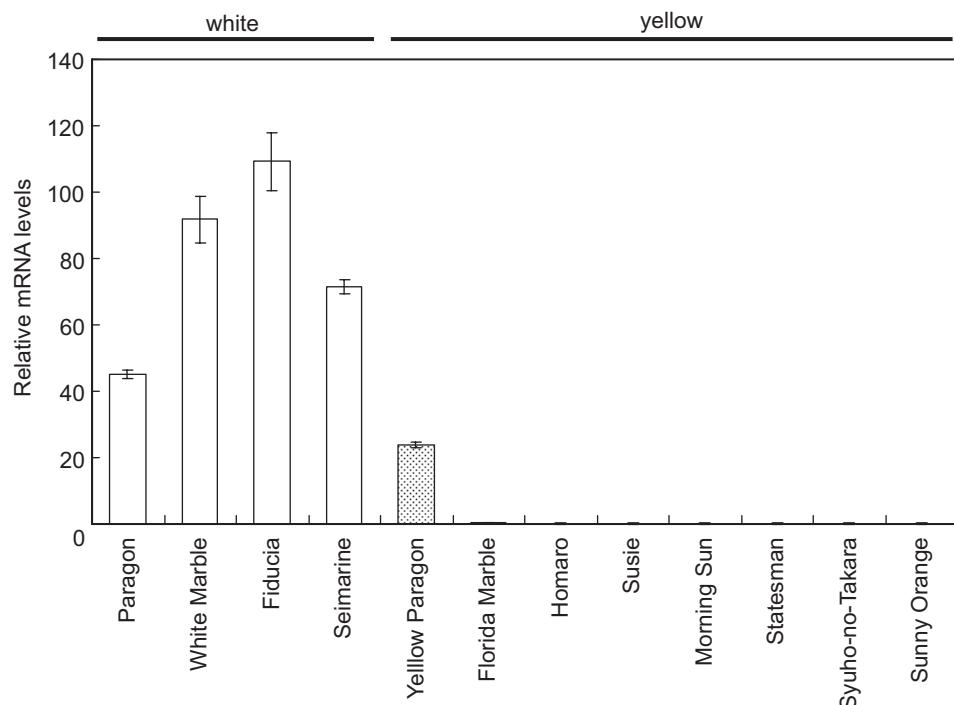


Figure 14. Real-time PCR analysis of a clone (*CmCCD1*) whose expression was higher in white petals than in yellow petals. Real-time PCR was performed in triplicate, and the mean values \pm SE are shown.

ラゴン' 花弁の発達に伴う *CmCCD1* 遺伝子の発現と第 1 節にて調査を行ったカロテノイド量の推移との比較を行った。*CmCCD1* 遺伝子は花弁の発達に伴い、急激な発現量の上昇を示したが、それに対し、カロテノイド量は減少し、最終的にはほとんど検出できないレベルにまで達した（第 15 図）。また、*CmCCD1* 遺伝子が花弁以外のカロテノイドが含まれている部位においても発現しているかどうかを調査するために管状花、花茎、葉および根についても発現解析を行った。その結果、花弁以外の部位ではほとんど発現が認められなかった（第 16 図）。

3. 考 察

他の植物で報告されているカロテノイド分解酵素遺伝子と塩基配列の相同性が高いということから、*CmCCD1* はカロテノイドを分解する活性を持つと推測されるが、この遺伝子の発現が白色品種の花弁でのみ確認されたことからこの遺伝子がコードする酵素は白色花弁の形成に関わりを持つことが示唆された。第 1 節において、キクの白色品種の花弁のカロテノイド生合成系は黄色品種同様に機能しており、カロテノイドを合成していると

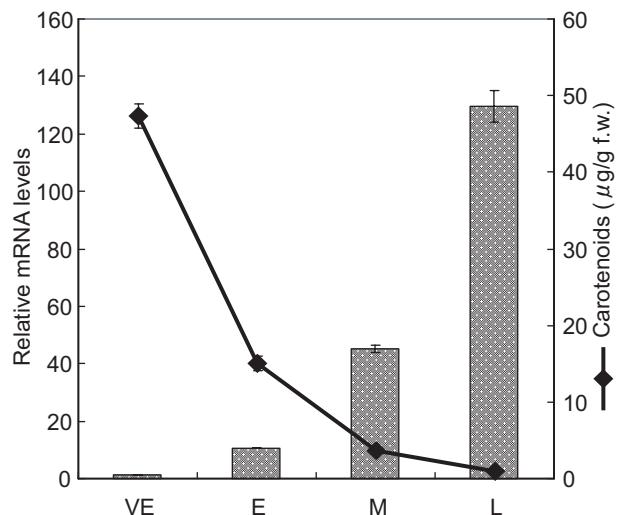


Figure 15. Changes in the level of carotenoids and *CmCCD1* transcripts during flower petal development of Paragon. Real-time PCR and total carotenoid quantitation was performed in triplicate, and the mean values \pm SE are shown.

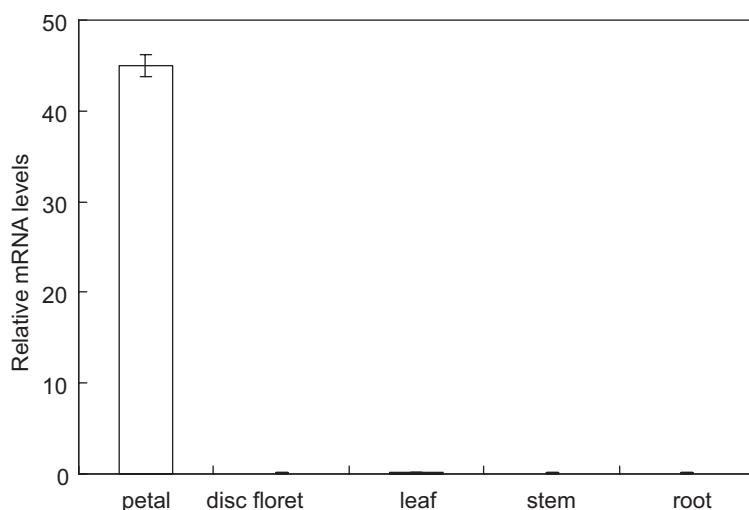


Figure 16. Expression of *CmCCD1* in different tissues of Paragon. Real-time PCR was performed in triplicate, and the mean values \pm SE are shown.

いう可能性を示したが、白色品種ではカロテノイドが生合成されると同時に *CmCCD1* によって無色の物質に分解されるために白色花弁が形成されると考えられた。白色品種である ‘パラゴン’ の花弁では発達に伴って *CmCCD1* の発現量は急激に増加していたが、逆にカロテノイド量は減少しており、この推測を裏付ける結果である。また、第一節においてキク花弁の白色形質は単一の優性遺伝子であり、黄色の枝変わり品種はこの形質を支配する遺伝子の欠損によって生じていると推測したが、この遺伝子が *CmCCD1* であり、この欠損によって酵素機能を失うとカロテノイドが蓄積し、黄色花弁が生じると考えると矛盾がない。

ただし、今回調査を行った品種のなかで、‘イエローパラゴン’ は唯一の例外であり、黄色品種であるにもかかわらず *CmCCD1* の発現が確認された。これはおそらく ‘イエローパラゴン’ が ‘パラゴン’ の枝変わりであるという育成経過に関係している。植物体の内層と外層が異なった遺伝的構成を持つことを周縁キメラというが、植物のある一層部分にのみ突然変異が起こった場合に生じることが多く、キクやカーネーションなど栄養繁殖によって増殖を行う植物はこの構造がそのまま維持されているものが多い。‘イエローパラゴン’ は ‘パラゴン’ の形質を部分的に含む周縁キメラであるため、花弁の一部の層では *CmCCD1* が発現しているのではないかと推測される。

また、*CmCCD1* 遺伝子の発現は花弁のみで確認され、その他の部位からはほとんど検出されなかった。白色品種であっても葉や茎、管状花にはカロテノイドが含まれている。特に緑色組織中のカロテノイドは光合成に必須の成分であり、非常に重要な働きを持っている。*CmCCD1* は花弁特異的に発現することによって、これらの植物の生存に欠かすことのできない重要なカロテノイドに影響を及ぼさない仕組みを持っていると考えられた。

第3章 キク科植物の花弁における橙色および黄色の発現様式

キク科植物は幅広い花色を示すが、これらの花色は主にアントシアニンとカロテノイドにより構成されている（林、1991）。桃色から青紫色までの花色はアントシアニンによるものであり、黄色はカルコンやオーロン類を含むダリアなど一部の花きを除いて主にカロテノイドによ

るものである。一方、橙色の花色についてはアントシアニンとカロテノイドが重なっている場合とカロテノイド単独による場合が考えられる。キクは前者のパターンであり、アントシアニンとカロテノイドの重なりによってオレンジ色が作り出されている。しかしながら、明度が低くすんだオレンジ色であり、特に蛍光灯が光源である室内では暗く沈んで見えるため、一般的に消費者から好まれない。ところが、同じキク科に属する植物の中にはキンセンカやマリーゴールドなど、非常に鮮やかな橙色を持つ花き類が数多く存在する。しかしこれら鮮やかな橙色花色を持つ植物は花持ち、花茎長、草姿といった点で切り花用として栽培するには向きである。

これら鮮やかな橙色を持つキク科植物の花色と色素成分の量的・質的関係を解析し、鮮やかさの原因を明らかにすることは、今後鮮やかな橙色のキクを育種する上で重要な知見となる。そこで第1節では黄色および橙色を示すキク科植物の花弁に含まれるカロテノイド、アントシアニンと花色との関係について調査を行った。また、第2節では鮮やかな橙色を持つキンセンカのカロテノイド成分の構造決定を行った。

第1節 橙色および黄色を示すキク科植物花弁のアントシアニン量、カロテノイド量およびカロテノイド成分の解析

キクの橙色花色はアントシアニンとカロテノイドの重なりによって作り出されているが、くすんだ色調である。キクの場合はアントシアニンの蓄積が原因で明度が下がり、鮮やかさを失うことを第1章で明らかにした。そこで、鮮やかな橙色品種を持つキク科植物と同種の黄色品種のアントシアニン量、カロテノイド量、及びカロテノイド成分について比較を行い、鮮やかな橙色の発現様式の解明を試みた。同時にこれらのキク科植物の花弁に含まれるカロテノイド成分の同定を行った。

1. 材料及び方法

1) 材 料

キク科植物8種38品種（オステオスペルマム、ガザニア、ガーベラ、キンセンカ、ジニア、ヒマワリ、フレンチマリーゴールド、アフリカンマリーゴールド）の完全に展開した花弁を材料とした（第17図）。

Calendula officinalisAlice
Orange Alice
YellowOrange
Star Gold
StarOrange
Zem Golden
Zem*Gerbera jamesonii*

Orphe Dancer



Labyrinth Lambada



Illusion Esprit



Sega



Fresbee

Gazania spp.Daybreak
Orange Daybreak
YellowSunrich
Orange Sunrich
Lemon

Sonia



Valentine

Osteospermum ecklonis

Jury Mikey

Orange
Isis Yellow
Isis*Tagetes erecta*Safari
Tangerine Safari
YellowBonanza
Orange Bonanza
Yellow*Zinnia elegans*Dreamland
Coral Dreamland
YellowBonita
Red Bonita
Yellow

Figure 17. Fully-opened flowers of orange- and yellow-flowered cultivars of Compositae plants.

2) 花弁の色調の測定

それぞれの花弁の中心部を分光測色計（CD100, YOKOGAWA）で測定した。一品種につき3花弁を供試した。

3) カロテノイド成分の抽出

0.5 g の花弁に3 ml のアセトンを加えて磨碎した。これに5 ml のジエチルエーテルを加えてよく攪拌し、上清を分液ろうとに移した。この操作を上清の黄色の着色がなくなるまで繰り返した。得られたアセトン / エーテル溶液に等量の水を加え、3回洗浄を行った。液量の半量の5% KOH-NaOH 溶液を加え、暗所で2時間静置し、けん化処理を行った。けん化が終了した溶液は中性になるまで水で洗浄し、エバポレーターで濃縮乾固した。これをメタノールで溶解したもののがカロテノイド溶液とした。

4) 総カロテノイド量の測定およびカロテノイド量と色調との関係の調査

上述の方法で得られたカロテノイド溶液の吸収極大における吸光度を分光光度計で測定し、比吸光係数（1% 色素溶液を厚さ1 cm のセルで測定した場合の吸光度）から総カロテノイド量を算出した。本実験ではルテイン等量（比吸光係数 2550 : Britton, 1995）とした。

また、キク‘秀芳の宝’から抽出したカロテノイドのメタノール溶液を $3000 \mu\text{g}/\text{ml}$ (ルテイン等量) に調整し、10倍～1000倍までの希釈系列を作成した。この溶液を $100 \mu\text{l}$ ずつ 96穴プレートに分注し、それぞれの色調を観察することによって、カロテノイド量が色調に及ぼす影響を調査した。色度の測定はデジタルカメラで撮影した画像を解析することによって代用した。

5) カロテノイド成分の分析

カロテノイド成分の分析は HPLC を用いて行った。カラムは Carotenoid カラム ($S5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm}$, YMC Co. Ltd) を使用し、以下の条件で用いた。

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Butyl methyl ether (MTBE): $\text{H}_2\text{O} = 95:1:4$,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: $\text{H}_2\text{O} = 25:71:4$

0 分 A 100% / B 0%, 12 分 A 100% / B 0%, 96 分 A 0% / B 100%

流速 $1\text{ml}/\text{min}$, カラム温度 35°C

また、各カロテノイド成分の割合は測定波長 450 nm の場合のピーク面積値から算出した。

6) フラボノイド成分の抽出および定量

実験に先立ち、1% 塩酸メタノール中に溶解させたシアニジン標準品の 530 nm における吸光度およびルテオリン標準品の 340 nm における吸光度から検量線を作成した。0.5 g の花弁を1% 塩酸メタノールで磨碎し、ジエチルエーテルを加えてカロテノイドを含む脂質類を取り除いた水層を遠心管に移した。3000 rpm で10分間遠心後、上清をフラボノイド抽出液として吸光スペクトルを分光光度計で測定した。花弁抽出液の 500 nm 前後に吸収極大を持つ物質をアントシアニン類とし、この吸光度からシアニジン等量として総アントシアニン量を算出した。また、同様に 340 nm 前後に吸収極大を持つフラボノイド類は同様にフラボンの一種であるルテオリン等量として算出した。

2. 結 果

1) 花弁の色度測定

材料として用いたキク科植物1種につき1品種の橙色品種を選び出し、花弁の色調の a^* 値（赤み）と L 値（明度）との相関を調査した。また、これを第1章にて調査を行ったキク品種と比較した（第7表、第18図）。キク品種のみの場合は赤みと明度は負の相関を示したが、キク科植物9種についても同様の傾向を示した。ただし、同じ a^* 値で比較を行った場合、いずれもキクよりも高い明度を示した。

2) フラボノイド類の定量

今回調査を行ったキク科植物のフラボノイド抽出液の分光スペクトルを調査したところ、吸収極大値が 340 nm 近辺にあるフラボノイド類の含量は、いずれの種についても橙色品種と黄色品種の間に明確な差がなかったため、本試験ではアントシアニン以外のフラボノイド類についての詳細は省略した。それぞれの種の橙色品種と黄色品種の花弁に含まれる総アントシアニン量を比較すると、ガザニア、ガーベラおよびジニアは明らかに橙色品種が高い含量を示した。また、オステオスペルマムは橙色品種の方がわずかに高い値を示したものの、その量の差がどの程度花色に影響するのか不明であった。一方、他の種については橙色品種と黄色品種の間に総アントシアニン量の大きな差はなかった（第7表）。

3) カロテノイド類の定量

花弁に含まれる総カロテノイド量をそれぞれの種の橙色品種と黄色品種の間で比較したところ、ヒマワリ、フレンチマリーゴールドおよびアフリカンマリーゴールドの橙色品種はいずれも 2 mg/g f.w. 以上の含量を示したが、これは黄色品種の 1.9 倍以上であった（第 7 表）。

オステオスペルマム、ガザニアおよびキンセンカも橙色品種が高い含量を示したが、ヒマワリ、フレンチマリーゴールドおよびアフリカンマリーゴールドほど橙色品種と黄色品種の間の量の差は大きくなく、どの程度この差が花色に影響しているのか不明であった。その他の種は花色と総カロテノイド量との間に明確な相関はなかった。

Table 7. Chromaticity, total anthocyanin content, and total carotenoid content in petals of orange- and yellow-flowered cultivars of 8 Compositae species

Species	Cultivar	Chromaticity			Total anthocyanins (μg/g f.w.)	Total carotenoids (μg/g f.w.)	
		L	a*	b*			
<i>Calendula officinalis</i>	Alice Orange	65.88 ± 1.68	29.79 ± 2.58	103.78 ± 1.81	2.24	3431	
	Orange Star	75.23 ± 1.12	29.72 ± 2.04	102.08 ± 2.73	2.96	2776	
	Orange Zem	75.94 ± 0.93	31.47 ± 1.88	106.09 ± 3.61	2.06	1632	
	Alice Yellow	88.14 ± 0.34	-4.68 ± 2.16	117.37 ± 2.86	17.76	1936	
	Gold Star	87.73 ± 0.24	-5.51 ± 1.45	113.41 ± 0.35	1.88	1463	
	Golden Zem	89.64 ± 0.65	-10.77 ± 0.12	110.67 ± 0.66	2.60	1571	
<i>Gerbera jamesonii</i>	Orphe	53.41 ± 1.11	62.65 ± 1.00	53.10 ± 0.50	406.06	164	
	Dancer	63.08 ± 0.87	50.14 ± 1.45	40.21 ± 0.52	446.79	107	
	Labryinth	73.34 ± 0.41	28.26 ± 1.35	85.90 ± 0.76	138.19	422	
	Lambada	52.35 ± 1.06	64.64 ± 0.81	62.19 ± 0.94	471.77	253	
	Illusion	84.12 ± 0.34	2.45 ± 0.53	85.71 ± 1.15	4.22	220	
	Esprit	86.38 ± 0.55	-4.30 ± 0.54	101.39 ± 0.57	2.78	259	
	Sega	92.62 ± 0.17	-13.01 ± 0.46	53.70 ± 1.40	17.22	30	
	Fresbee	87.27 ± 1.45	-5.80 ± 0.26	104.19 ± 2.04	2.42	205	
	<i>Gazania</i> spp.	Daybreak Orange	74.41 ± 1.14	23.75 ± 2.62	110.79 ± 1.26	100.07	3083
		Daybreak Yellow	79.19 ± 0.51	8.90 ± 0.74	122.20 ± 2.24	9.10	2613
<i>Helianthus annuus</i>	Sunrich Orange	78.73 ± 0.53	14.37 ± 0.58	122.66 ± 2.88	4.77	1853	
	Sonia	75.16 ± 0.70	20.93 ± 0.64	113.56 ± 0.97	4.77	2430	
	Sunrich Lemon	86.42 ± 0.44	-4.53 ± 0.76	106.17 ± 2.49	7.22	999	
	Valentine	88.40 ± 0.69	-13.49 ± 0.43	67.68 ± 3.48	3.68	535	
<i>Osteospermum ecklonis</i>	Jury	78.01 ± 0.52	23.89 ± 0.99	67.59 ± 1.60	13.79	320	
	Mikey	88.04 ± 0.19	-2.29 ± 0.39	74.89 ± 1.16	7.29	209	
<i>Tagetes erecta</i>	Orange Isis	72.90 ± 0.73	34.61 ± 0.88	111.88 ± 2.01	4.95	2805	
	Yellow Isis	92.97 ± 0.98	-15.35 ± 0.02	55.71 ± 1.29	4.58	62	
<i>Tagetes petula</i>	Safari Tangerine	65.58 ± 0.61	45.02 ± 1.22	111.86 ± 0.98	3.32	3486	
	Bonanza Orange	68.66 ± 2.31	41.10 ± 4.67	115.17 ± 2.31	4.77	1913	
	Safari Yellow	87.63 ± 0.25	-7.75 ± 0.39	111.57 ± 2.64	2.78	760	
	Bonanza Yellow	87.38 ± 0.21	-9.25 ± 1.26	109.86 ± 4.09	5.49	1017	
	<i>Zinnia elegans</i>	Dreamland Coral	58.92 ± 1.12	50.57 ± 1.44	48.16 ± 4.21	73.00	155
		Bonita Red	42.76 ± 1.88	50.42 ± 2.69	43.42 ± 0.39	1107.70	294
		Petitland Orange	77.54 ± 1.68	22.70 ± 4.43	122.09 ± 0.29	62.89	55
		Dreamland Yellow	76.74 ± 1.12	7.91 ± 0.56	116.17 ± 2.83	23.18	893
		Bonita Yellow	69.32 ± 0.48	5.31 ± 0.72	82.08 ± 2.46	40.87	273
		Petitland Yellow	85.67 ± 0.43	-1.20 ± 1.79	120.78 ± 2.02	11.08	58

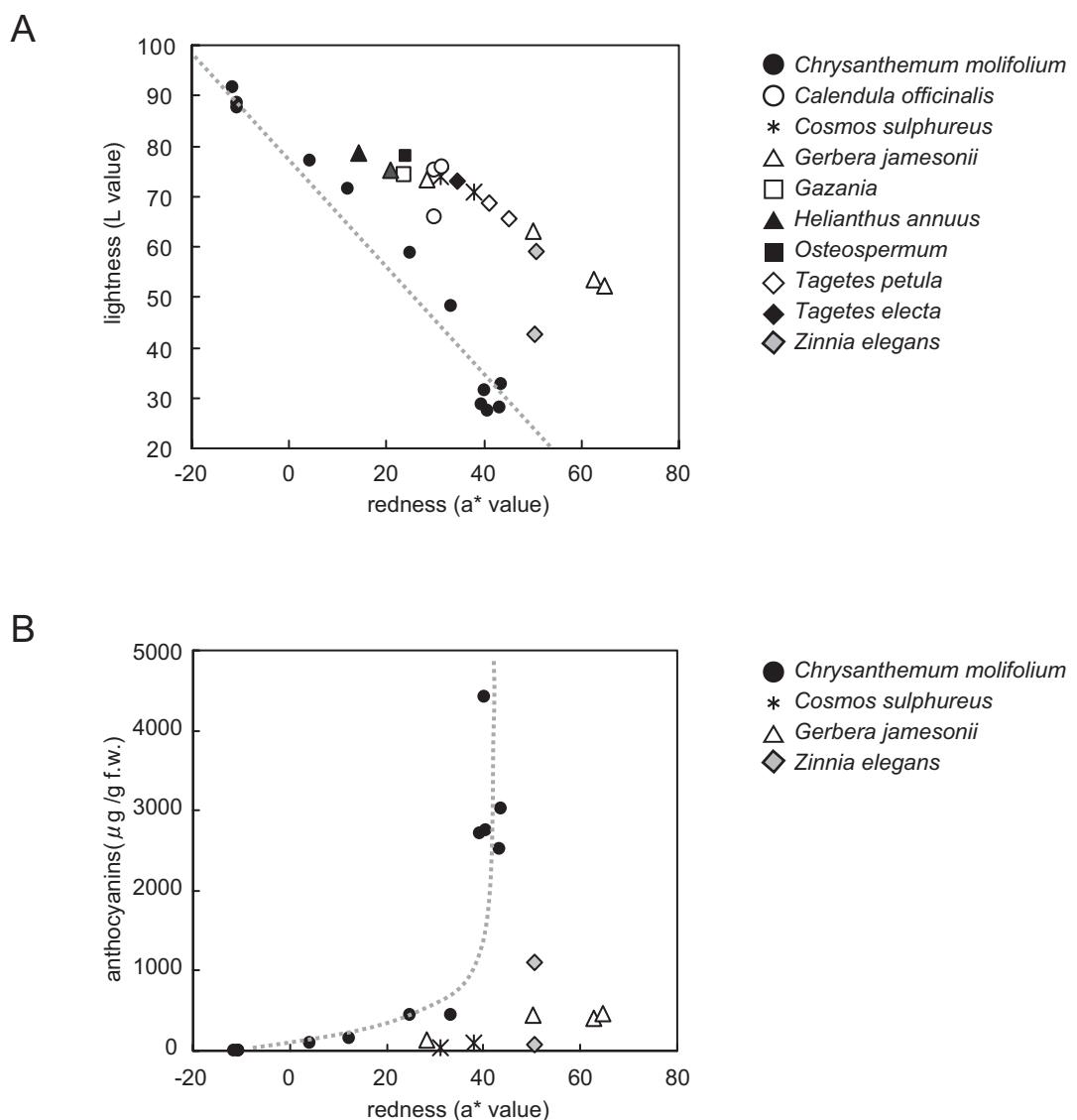


Figure 18. Correlation between color and anthocyanin content in petals of orange-flowered Compositae plants.
 (A) Correlation between lightness and redness. (B) Correlation between anthocyanin content and redness in four species containing anthocyanins.

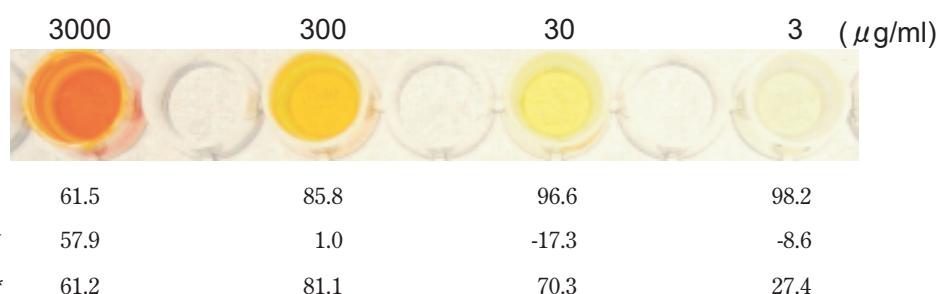


Figure 19. Effect of carotenoid content on color tone. Carotenoid solution was used at $100 \mu\text{l}$ per a hole.

また、カロテノイド量と色調の関係を調査したが、カロテノイド濃度が濃いものほど、橙色に近い色調を示した。色度の測定を行ったところ、 $30 \sim 3000 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間では濃度が濃いものほど a^* 値が上昇した（第 19 図）。

4) カロテノイド成分の分析

すべての品種について HPLC 分析を行い、それぞれの種で橙色品種と黄色品種のクロマトグラムの比較を行った。また、成分の同定を同時に行った。ジニアおよびオステオスペルマム以外の種はすべて lutein が主要なカロテノイドであった。それぞれの種の橙色品種と黄色品種から代表的な 1 品種のクロマトグラムを第 20 図に示した。その結果、キンセンカとガザニアは橙色と黄色でカロテノイド成分が異なっていることが明らかになった（第 8 表、第 9 表）。どちらの種も橙色品種にはキク科植物の主要なカロテノイドであるルテインより吸収極大値が長波長側にある赤みの強いカロテノイドが蓄積していた。これらのうち成分が同定できたのは lycopene のみであった。また、ガザニア橙色品種において検出された未知のピーク 4 および 10 はキンセンカから検出されたピークと R_t 、スペクトルがほぼ一致し、同じ成分であると考えられた。オステオスペルマムはピークの数や位置は橙色品種も黄色品種も同じであったが、赤みの強いカロテノイドの割合が黄色品種よりも橙色品種のほうが高い傾向を示した。オステオスペルマムから検出された未知のピーク 9 および 10 もまた、キンセンカに含まれる未知の成分と一致した（第 10 表）。その他の種は花色や品種が異なってもほぼ同じクロマトグラムを示し、成分に差はなかった。

3. 考 察

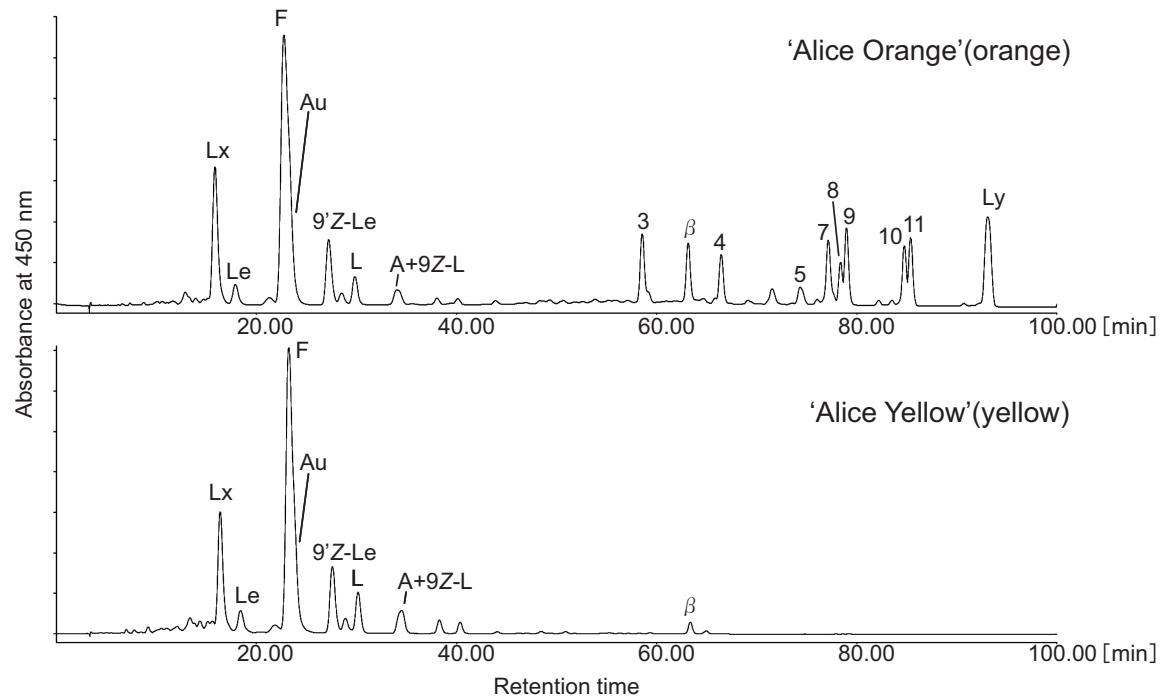
調査を行ったキク科植物 9 種の橙色品種と黄色品種を比較した結果、この花色の違いには 3 つの要因が関わっていることが明らかになった。一つ目の要因はアントシアニン量の差である。この量の差が主要因となって橙色と黄色の花色の違いが生じていると考えられるのはガーベラおよびジニアである。また、第 1 章にて調査を行ったキクもこのグループに属する。これらの橙色品種と黄色品種の花弁に含まれるカロテノイド量および成分に大きな差はなかったが、アントシアニンは明らかに橙色品種に多く含まれており、黄色のカロテノイドに赤色のアントシアニンが重なることによって橙色が作り出さ

れていた。これらのうち、橙色品種であるガーベラ ‘オルフェ’、‘ランバタ’、およびジニア ‘ボニータレッド’ は明度が低く、くすんだ印象の花色であったが、非常に大量のアントシアニンを花弁に蓄積していた。アントシアニン蓄積量が増加すると明度が下がるというのは第 1 章で述べたキクの場合と同様の傾向である。そこで、これらの種とキクの a^* 値と明度との関係を比較したところ、同じ程度の a^* 値を示す場合は、キク品種は明らかにこれらのキク科植物よりも明度が低い傾向を示した。また、 a^* 値とアントシアニン量との関係から、キクはこれらのキク科植物よりも同じ程度の a^* 値をもつ花色を作り出すのに必要とするアントシアニン量が多いことが明らかになった（第 18 図）。このことがキク橙色品種の花色の不鮮明さにつながっていると考えられる。キク花弁に含まれるアントシアニンはシアニジンであるが（Nakayama ら 1997），紫がかかった赤色を示す色素であり、本調査では 530 nm 付近に吸収極大値があった。一方、比較的鮮明な花色を示したガーベラのアントシアニンは 510 nm 付近に吸収極大値があり、朱赤色に近かった。今回、これらのアントシアニン成分の同定は行わなかつたが、このようなアントシアニンの色調の差がカロテノイドと重なった際の明度の差の原因になっている可能性がある。それに加え、花弁の構造やアントシアニン蓄積形態の差も要因の一つであると推測されるが、本調査で明らかにすることはできなかつた。

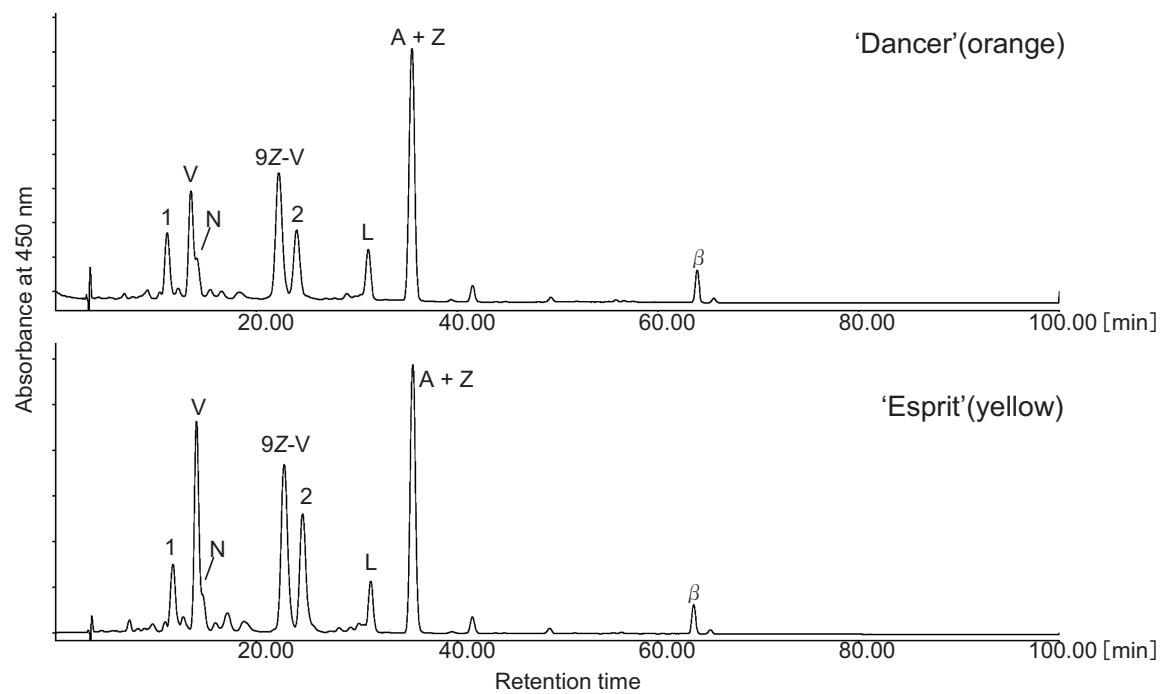
二番目の要因はカロテノイドの量の差である。この量の差が主要因となって橙色と黄色の花色の違いが生じていると考えられたのはヒマワリ、フレンチマリーゴールド、およびアフリカンマリーゴールドであった。これらの植物はアントシアニン量およびカロテノイド成分には橙色品種と黄色品種の間に大きな差はなかつた。カロテノイド量が増加すると赤みが増して橙色に近づくということは第 19 図に示したとおりであるが、いずれも橙色品種には黄色品種の 1.8 倍以上のカロテノイドが含まれていた。また、このタイプの橙色品種は他の植物種に比べてカロテノイド蓄積量が顕著に多かつた。

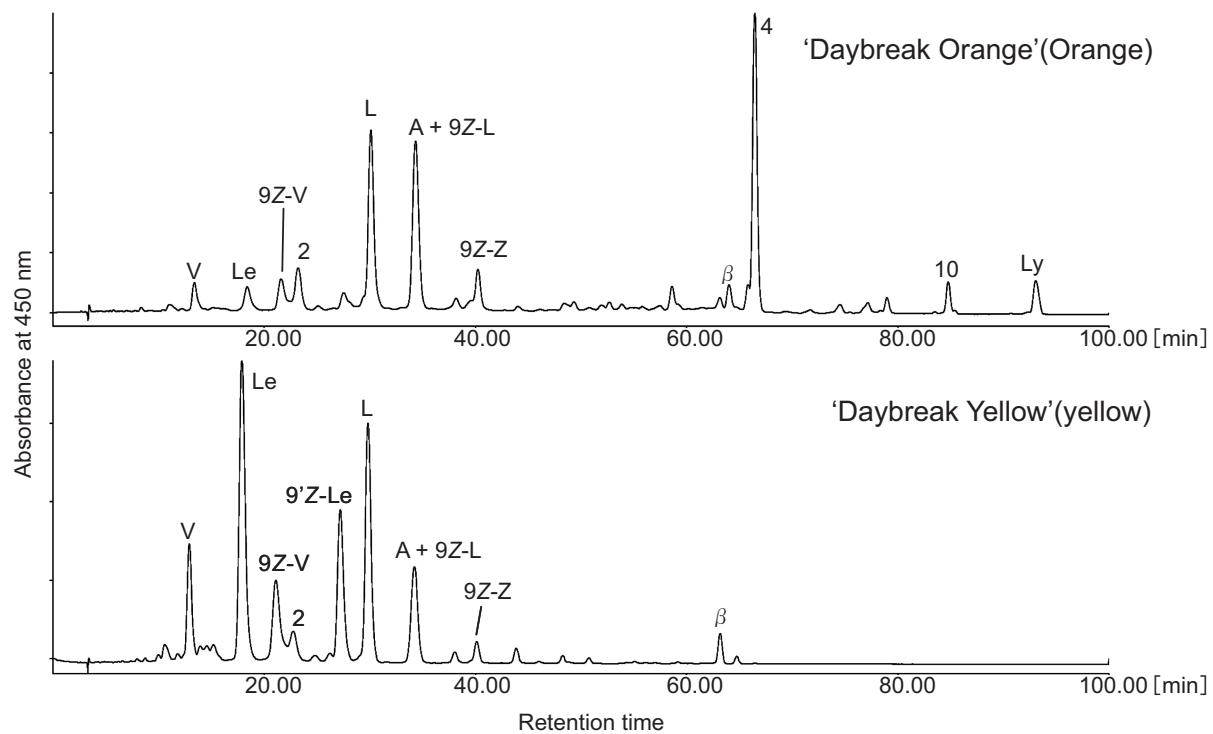
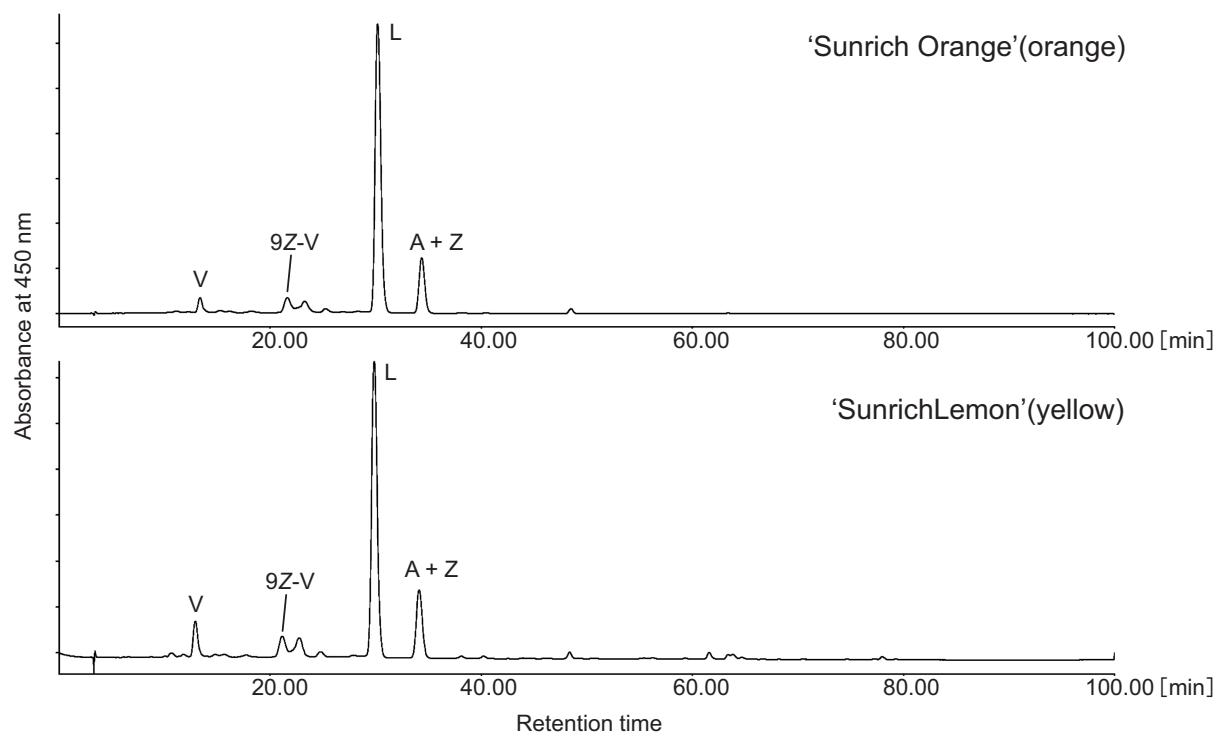
三番目の要因はカロテノイド成分の違いである。この成分の差が主要因となって橙色と黄色の花色の違いが生じていると考えられたのはキンセンカであり、橙色品種のみ赤みの強いカロテノイドが含まれていた。キンセンカの橙色品種と黄色品種のアントシアニン量には差がなく、また、総カロテノイド量は橙色品種の方が高い値を示したが、この量の差は橙色品種のみに含まれる赤みの強いカロテノイドの蓄積によって生じたものであり、橙

A. *Calendula officinalis*

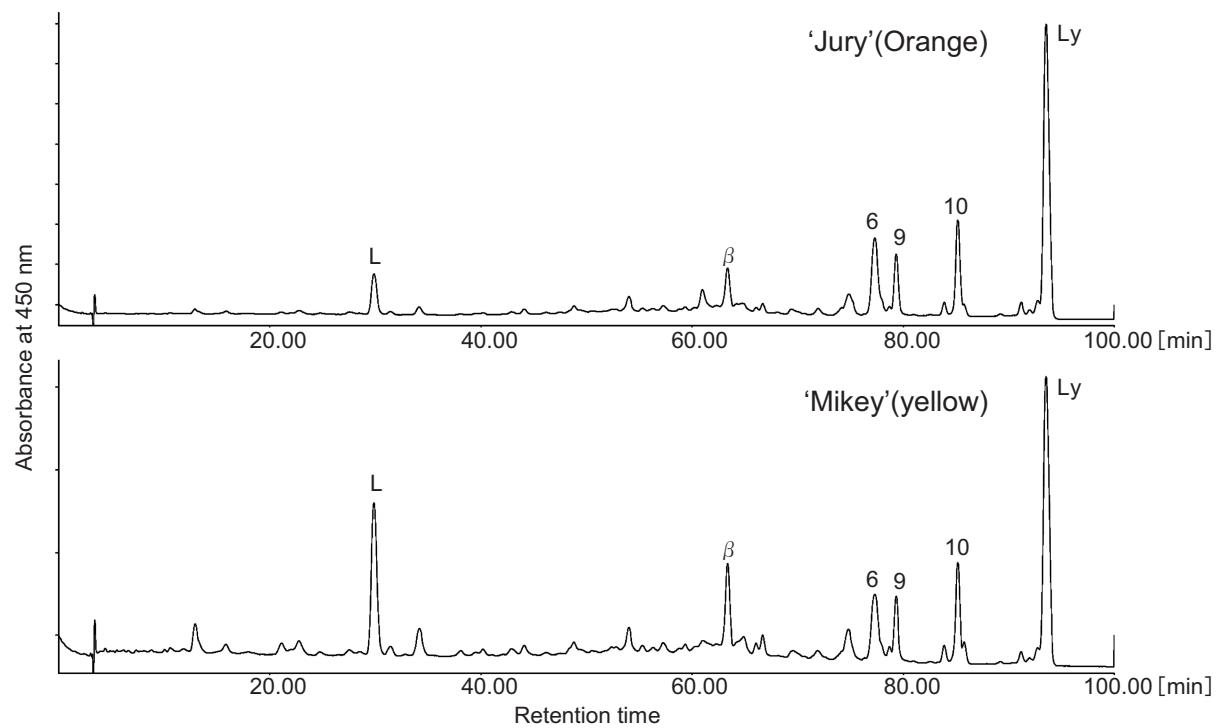


B. *Gerbera jamesonii*

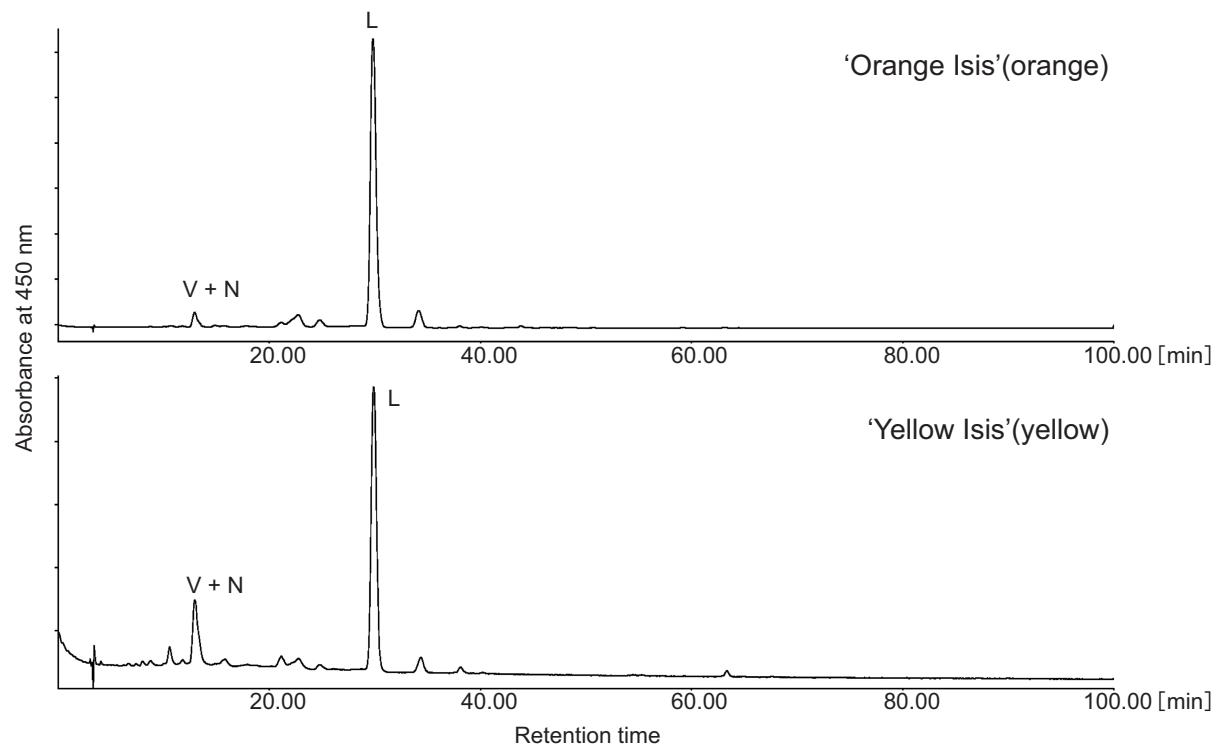


C. *Gazania*spp.D. *Helianthus annuus*

E. *Osteospermum ecklonis*



F. *Tagetes erecta*



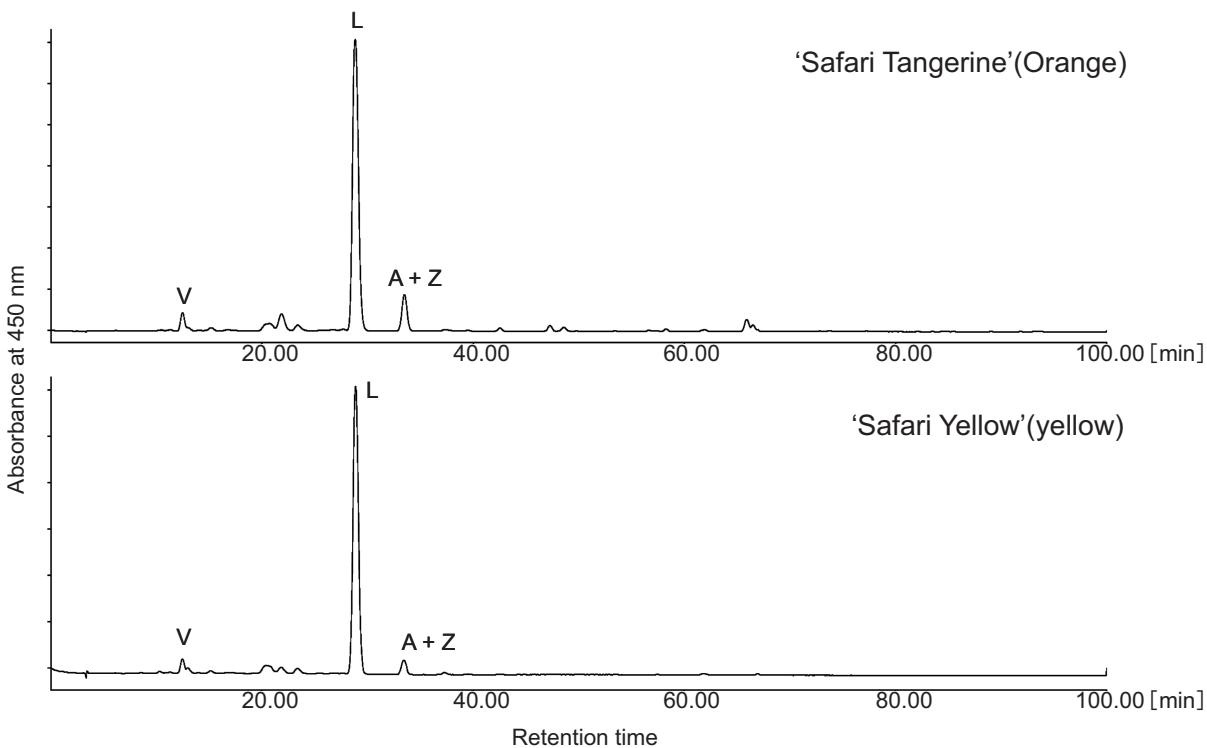
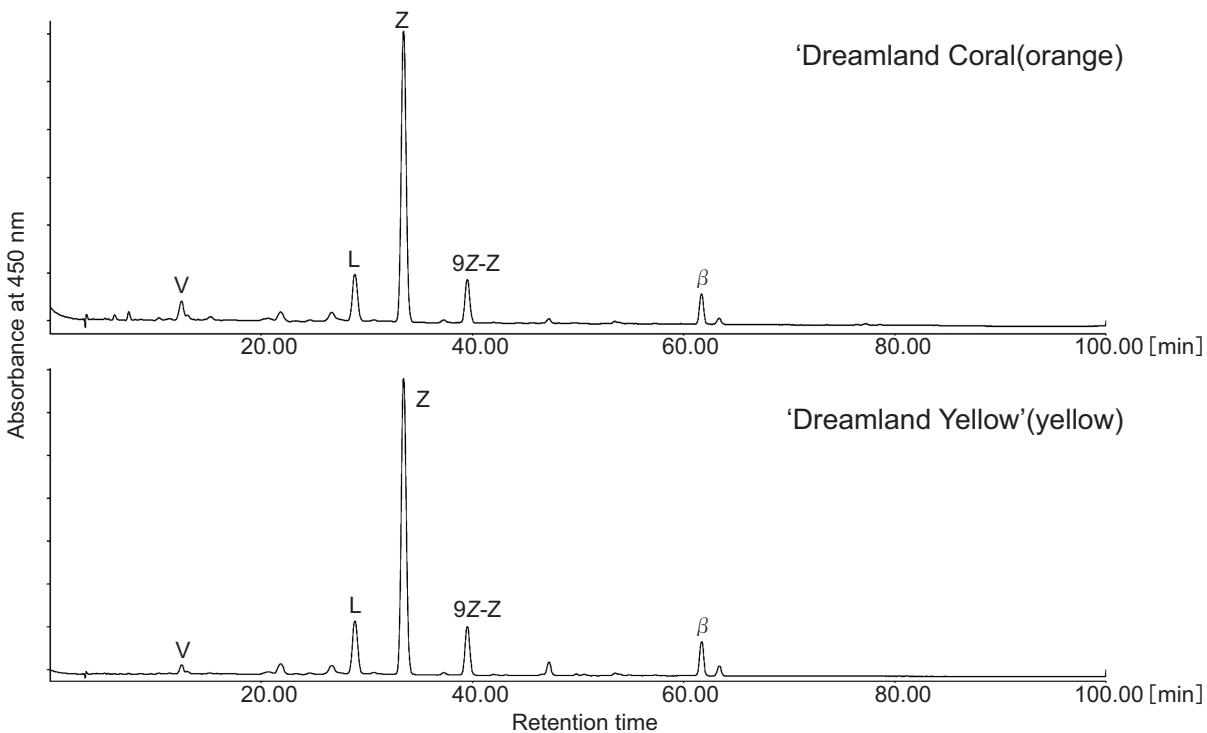
G. *Tagetes petula*H. *Zinnia elegans*

Figure 20. HPLC analysis of carotenoids of extracts of Compositae petals.

Abbreviations: V, violaxanthin; N, (9 Z)-neoxanthin; Lx, luteoxanthin; Le, lutein-5,6-epoxide; 9Z-V, (9 Z)-violaxanthin; F, Flavoxanthin[(8 R)-lutein-5,8-epoxide]; Au, Auroxanthin; 9 Z -Le, (9 Z)-lutein-5,6-epoxide; L, lutein; A, antheraxanthin; Z, zeaxanthin; 9Z-L, (9 Z)-lutein; 9Z-Z, (9 Z)-zeaxanthin; β , β -carotene; Ly, lycopene. Number 1-11 shows unknown carotenoids.

Table 8. Carotenoid composition in petals of *Calendula officinalis*

Carotenoids	Absorption maxima (nm)	Orange-flowered cultivar		Yellow-flowered cultivar	
		Alice Orange		Alice Yellow	
		% of total carotenoid ^a	Carotenoid content ^b ($\mu\text{g/g f.w.}$)	% of total carotenoid	Carotenoid content ($\mu\text{g/g f.w.}$)
Luteoxanthin	398, 411, 448	11.0	377.4	15.6	302.0
Lutein-5,6-epoxide	416, 438, 469	1.6	54.9	3.2	61.7
Flavoxanthin	398, 420, 448	28.5	977.9	42.6	825.1
Auroxanthin	380, 401, 425	7.1	243.6	10.7	206.3
(9Z)-Lutein-5,6-epoxide	413, 435, 463	5.0	171.6	8.5	165.3
Lutein	444, 473	2.0	68.6	5.0	96.2
Antheraxanthin	444, 474	1.0	34.3	2.5	48.6
(9Z)-Lutein	440, 467	0.6	20.6	1.5	29.0
unknown peak 3	455, 485	4.0	137.2	-	-
β -carotene	452, 479	3.4	116.7	1.0	29.9
unknown peak 4	461, 491	3.0	102.9	-	-
unknown peak 5	433, 457, 488	1.4	48.0	-	-
unknown peak 7	437, 461, 491	4.1	140.7	-	-
unknown peak 8	461, 493	2.0	68.6	-	-
unknown peak 9	463, 493	4.4	151.0	-	-
unknown peak 10	442, 467, 497	3.5	120.1	-	-
unknown peak 11	442, 467, 497	4.1	140.7	-	-
Lycopene	446, 473, 505	8.7	298.5	-	-
Yellowish carotenoids ^c		56.8	1948.9	89.6	1734.3
Reddish carotenoids ^d		38.6	1324.4	1.0	19.9
Total carotenoids ($\mu\text{g/g f.w.}$)			3431.1		1935.6

^a Percentage of peak area in the HPLC chromatogram at 450 nm.^b Lutein equivalent.^c Range in the main absorption maximum from 401 nm to 445 nm.^d Range in the main absorption maximum from 452 nm to 473 nm.

Table 9. Carotenoid composition in petals of *Gazania* spp.

Carotenoids	Absorption maxima (nm)	Orange-flowered cultivar		Yellow-flowered cultivar	
		Daybreak Orange		Daybreak Yellow	
		% of total carotenoid ^a	Carotenoid content ^b ($\mu\text{g/g f.w.}$)	% of total carotenoid	Carotenoid content ($\mu\text{g/g f.w.}$)
Violaxanthin	416, 439, 469	2.8	85.7	8.1	212.7
Lutein-5,6-epoxide	416, 438, 469	3.1	96.2	26.6	695.1
(9Z)-Violaxanthin	412, 436, 464	4.5	137.8	9.7	252.2
unknown peak 2	422, 445, 473	5.4	166.8	3.3	85.2
(9'Z)-Lutein-5,6-epoxide	413, 435, 463	2.5	77.7	13.4	350.2
Lutein	444, 473	20.4	628.2	19.8	517.7
Antheraxanthin	444, 474	10.0	307.6	4.7	122.3
(9Z)-Lutein	440, 467	10.0	307.6	4.7	122.3
(9Z)-Zeaxanthin	445, 471	5.2	160.3	1.6	41.8
β -carotene	452, 479	2.3	70.6	1.7	44.4
unknown peak 4	461, 491	25.0	770.4	-	-
unknown peak 10	442, 467, 497	2.5	76.4	-	-
Lycopene	446, 473, 505	3.5	109.1	-	-
Yellowish carotenoids ^c		63.8	1968.0	91.8	2399.4
Reddish carotenoids ^d		33.3	1026.5	1.7	44.4
Total carotenoids ($\mu\text{g/g f.w.}$)			3082.7		2613.2

^a Percentage of peak area in the HPLC chromatogram at 450 nm.^b Lutein equivalent.^c Range in the main absorption maximum from 401 nm to 445 nm.^d Range in the main absorption maximum from 452 nm to 473 nm.Table 10. Carotenoid composition in petals of *Osteospermum ecklonis*.

Carotenoids	Absorption maxima (nm)	Orange-flowered cultivar		Yellow-flowered cultivar	
		Jury		Mikey	
		% of total carotenoid ^a	Carotenoid content ^b ($\mu\text{g/g f.w.}$)	% of total carotenoid	Carotenoid content ($\mu\text{g/g f.w.}$)
Lutein	444, 473	6.3	20.1	19.1	40.0
β -carotene	452, 479	6.6	21.3	10.0	21.0
unknown peak 6	443, 469	15.6	50.1	11.6	24.2
unknown peak 9	463, 493	7.6	24.4	6.4	13.3
unknown peak 10	442, 467, 497	12.1	38.7	9.9	20.8
Lycopene	446, 473, 505	46.9	150.2	37.2	77.9
Yellowish carotenoids ^c		6.3	20.1	19.1	40.0
Reddish carotenoids ^d		88.9	284.6	75.1	157.2
Total carotenoids ($\mu\text{g/g f.w.}$)			320.1		209.5

^a Percentage of peak area in the HPLC chromatogram at 450 nm.^b Lutein equivalent.^c Range in the main absorption maximum from 401 nm to 445 nm.^d Range in the main absorption maximum from 452 nm to 473 nm.

色品種・黄色品種に共通して含まれる成分の蓄積量に大きな差はなかった。ガザニアもキンセンカ同様、橙色品種にのみ赤みの強いカロテノイドの蓄積が認められたが、同時にアントシアニン量も橙色品種が黄色品種に比べて高い値を示した。このことから、ガザニアの場合にはアントシアニン量とカロテノイド成分という2つの要素が花弁の色調に関わっていると考えられる。

なお、オステオスペルマムは3つの要素のうちのどれが主要な花色の決定要因であるのか不明であった。アントシアニン量およびカロテノイド量はいずれも橙色品種の方が高く、また、橙色品種の方が赤みの強いカロテノイドの割合が高かった。従って、オステオスペルマムは3つの要素が複合的に関わり、花色の差を生みだしていると考えられる。他の種についても、最も主要な要因についてのみ述べたが、品種単位で見ると、実際は複数の要因が複合的に関わって橙色と黄色の色調の差を作り出していた。

本調査は今後鮮やかな橙色のキクを育種する上で、どのような方向で改良を行うべきかという知見を得る目的で行われたものである。キク花弁はカロテノイドの黄色の上にアントシアニンが重なることによって橙色が作り出されているが、アントシアニンによる赤みの着色効率が悪く、橙色と認識されるために必要な a^* 値に達するためにには今回調査を行ったキク科植物に比べ多くの量が必要であることが明らかになった。しかし同時に、多量のアントシアニンの存在によって明度が下がり、不鮮明になってしまうということは先に述べたとおりである。また、アントシアニンの発現は栽培環境に左右されやすく、特に温度条件に大きく蓄積量が左右されるため、周年を通して同じ色調を維持することが難しいという欠点がある。従って、今後鮮やかな橙色のキクを目指すためには花弁に含まれるカロテノイド量を増加させる、もしくは赤みの強いカロテノイドを蓄積させるという方向に改良を行うことが適切であると考えられた。

第2節 キンセンカ花弁に含まれるカロテノイド成分の分析

第1節ではキク科植物の橙色と黄色花弁の色調の差には3つの要素が主に関わっており、鮮やかな橙色品種を作り出すためには黄色品種よりも多量のカロテノイドを蓄積させる、もしくは赤みの強いカロテノイドを蓄積させる必要があることを述べた。

キンセンカ (*Calendula officinalis* L.) の橙色品種は非常に鮮やかな花色を示すが、前節において橙色品種と黄色品種のカロテノイド成分が異なっており、橙色品種においてのみ赤みの強いカロテノイドが蓄積していることを明らかにした。キンセンカのカロテノイド成分は TLC ならびに HPLC を用いた分析によって一部の成分が明らかになっている (Tóth・Szabolcs, 1981; Bakóら, 2002)。しかし、正確な立体配置の解析は行われておらず、また、いくつかの未同定の成分が存在する。そこで、これらの各成分を明らかにし、橙色品種にのみ赤みの強いカロテノイドが蓄積する原因を明らかにすることを試みた。

1. 材料および方法

1) 材 料

キンセンカ橙色品種3品種 ('アリスオレンジ', 'オレンジスター' および 'オレンジゼム') および黄色品種3品種 ('アリスイエロー', 'ゴールドスター' および 'ゴールデンゼム') の完全に展開した花弁を用いた (第21図)。これらは全て、花き研究所(茨城県つくば市)の無加温ビニールハウス内にて栽培を行った。

2) カロテノイド成分の分析

それぞれの品種の花弁 0.5 g に 3 ml のアセトンを加えて磨碎した。これに 5 ml のジエチルエーテルを加えてよく攪拌し、上清を分液ろうとに移した。この操作を上清の黄色の着色がなくなるまで繰り返した。得られたアセトン/エーテル溶液に等量の水を加え、3回洗浄を行った。液量の半量の 5% KOH-NaOH 溶液を加え、暗所で3時間静置し、けん化処理を行った。けん化が終了した溶液は中性になるまで水で洗浄し、エバポレーターで濃縮乾固した。これをメタノールで溶解したものを HPLC 分析に供試した。

HPLC 分析条件は以下の通りである。

カラム: YMC Carotenoid (S5 μ m, 250 × 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Butyl methyl ether (MTBE): H_2O = 95:1:4;

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: H_2O = 25:71:4

0 分 A 100%/ B 0%, 12 分 A 100%/ B 0%, 96 分 A 0%/ B 100%

流速 1 ml/min, カラム温度 35°C



Figure 21. Fully-opened flowers of orange- (A) and yellow-flowered (B) cultivars of *calendula*.

3) カロテノイド成分の分取

花弁 100g に 30 ml のアセトンを加えて磨碎した。これに 50 ml のジエチルエーテルを加えてよく攪拌し、上清を分液ろうとに移した。この操作を上清の黄色の着色がなくなるまで繰り返した。得られたアセトン / エーテル溶液に等量の水を加え、3 回洗浄を行った。液量の半量の 5% KOH-NaOH 溶液を加え、暗所で 3 時間静置し、けん化処理を行った。けん化が終了した溶液は中性になるまで水で洗浄し、最終的に得られた溶液はエバボレーターで濃縮乾固した。これをメタノールで溶解したものを作成テノイド溶液とし、成分の分取に供試した。

各成分の分取は以下の条件で行った。分取用カラムを用い、成分が重なっている部分が分離するように溶媒条件を変更した。

カラム : YMC Carotenoid (S5 μ m, 250 × 20 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Butyl methyl ether (MTBE):

H_2O = 95:1:4,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: H_2O = 25:71:4

0 分 A 100% / B 0%, 120 分 A 0% / B 100%

流速 10 ml/min, カラム温度 35°C

4) カロテノイド成分の同定

カロテノイドの構造は UV-Vis, 1H NMR, および FAB-MS の各スペクトルのデータから決定した。これらスペクトルデータの解析条件は以下の通りである。

UV-Vis スペクトル

ジエチルエーテルに溶解したサンプルを分光光度計(島津, UV-240)で測定した。もしくは HPLC 移動相中のものをマルチチャンネル検出器(日本分光, MD-915)で測定した。

FAB-MS スペクトル

Nitrobenzyl alchol を基質として質量分析装置(JEOL, SX 102)で測定した。

1H NMR (500 MHz) および ^{13}C NMR (125 MHz) スペクトル

NMR 装置 (Varian, Unity Inova 500 spectrometer) にて測定を行った。TMS を基準物質として含んだ $CDCl_3$ を溶媒として用いた。

2. 結 果

1) 橙色品種 3 品種および黄色品種 3 品種の花弁に含まれるカロテノイド成分の比較

HPLC にてそれぞれの品種の花弁から抽出したカロテノイドを分析したところ、橙色品種と黄色品種の間にクロマトグラムに明確な差が見られた（第 22 図）。同じ花色を持つ品種間では成分の割合に差が見られたが、構成は同じであった。‘アリスオレンジ’を始めとした橙色品種では 19 のピークが確認されたが、これらのうち 10 ピーク（ピーク 9, 10 および 12～19）は橙色品種でのみ検出された。ピーク 2, 5～8, 10, 11 および 19 は既知のカロテノイドであり、HPLC で得られた吸収スペクトルおよび保持時間を標品もしくは第 1 章にて同定を行ったキク花弁に含まれるカロテノイドと比較すること

によって同定した。これら同定したピークの物質名、測定波長 450 nm におけるピーク面積の割合、および吸収極大値を第 11 表に示した。ピーク 1, 3, 4, 9 および 12～18 は不明な成分であったため、それぞれのピークを分取して NMR 分析に供試した。

2) カロテノイド成分の構造決定

未知なカロテノイド成分の同定には橙色品種 ‘アリスオレンジ’ の花弁から抽出したカロテノイド溶液を用いた。

¹H-NMR 解析の結果、キンセンカ橙色品種には 4 種類の lycopene の幾何異性体が含まれていることが明らかになった。*(All-E)-lycopene* (peak 19), *(5Z,9Z)-lycopene* (1, peak 18), *(5Z,9Z,5'Z)-lycopene* (2, peak 17) および *(5Z,9Z,5'Z,9'Z)-lycopene* (3, peak 14) である。¹H-NMR シグナルは ¹H-¹H COSY, NOESY, および ¹H-¹H decoupling

Table 11. Carotenoid composition in petals of calendula (cv. Alice Orange)

Peak no. (Fig. 22)	Carotenoid	% of total carotenoids ^a	λ_{\max} (nm)
1	(8'R)-Luteoxanthin	11.0	398, 422, 448
2	Lutein-5,6-epoxide	1.6	416, 438, 469
3	Flavoxanthin	28.5	398, 420, 448
4	(8R,8'R)-Auroxanthin	7.1	380, 401, 425
5	(9Z)-Lutein-5,6-epoxide	5.0	413, 435, 463
6	Lutein	2.0	444, 473
7	Antheraxanthin	1.0	440, 467
8	(9Z)-Lutein	0.6	440, 467
9	(5Z,9Z)-Rubixanthin (5)	4.0	455, 485
10	α -Carotene	0.8	446, 475
11	β -Carotene	3.4	452, 479
12	(5Z)-Rubixanthin (6)	3.0	461, 491
13	δ -Carotene	1.4	433, 457, 488
14	(5Z,9Z,5'Z,9'Z)-Lycopene (3)	4.1	437, 461, 491
15	γ -Carotene	2.0	461, 493
16	(5Z)- γ -Carotene (4)	4.4	463, 493
17	(5Z,9Z,5'Z)-Lycopene (2)	3.5	442, 467, 497
18	(5Z,9Z)-Lycopene (1)	4.1	442, 467, 497
19	(all-E)-Lycopene	8.7	446, 473, 505

^a Percentage of peak area in the HPLC chromatogram at 450 nm.

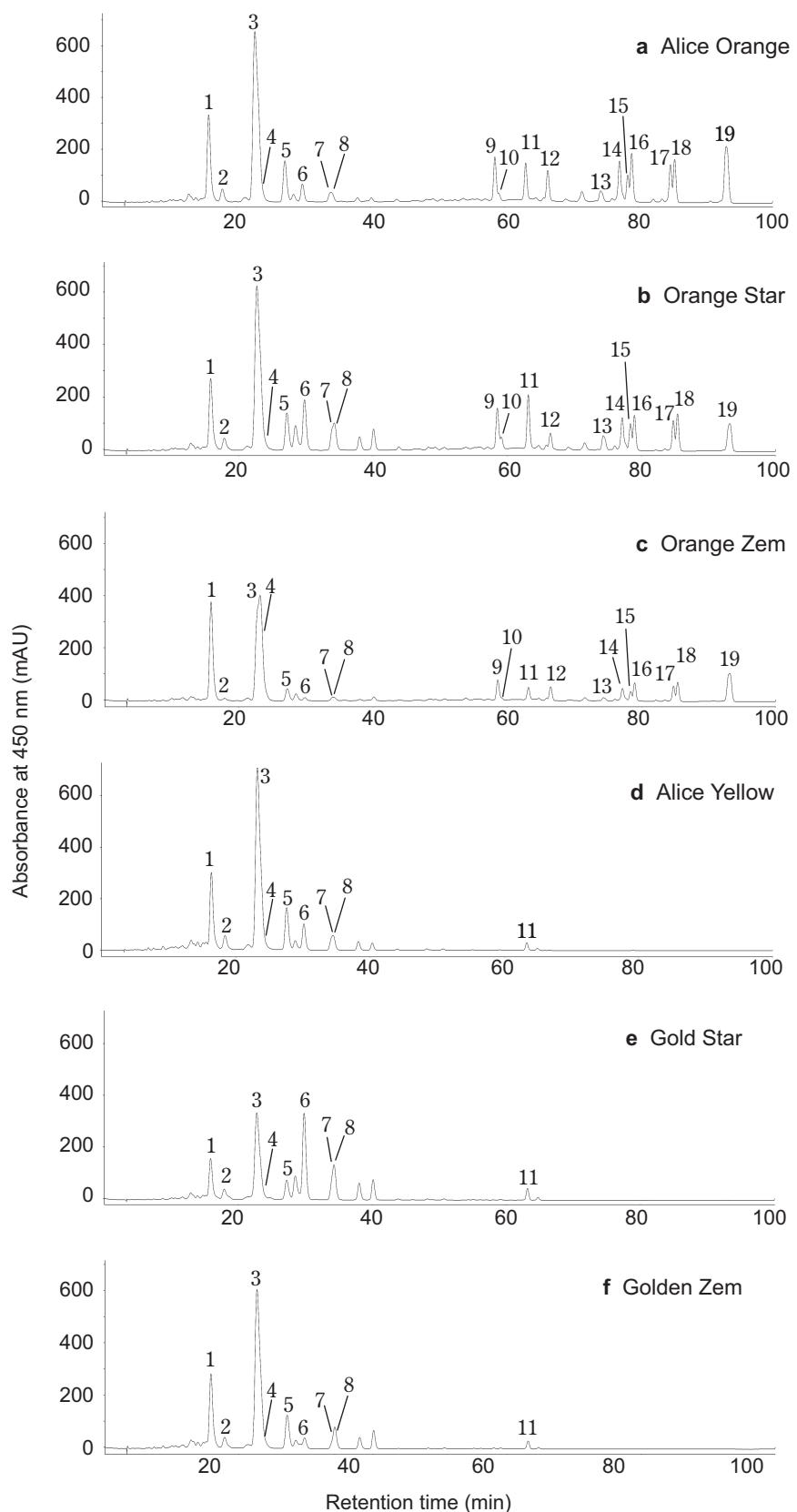


Figure 22. HPLC analysis of carotenoids of extracts of calendula petals.

a, cv. Alice Orange; b, Orange Star; c, Orange Zem; d, Alice Orange; e, Gold Star; f, Golden Zem. Peak numbers are identified in Table 11.

測定によって帰属を決定した(第12表、第23図)。4種類の立体異性体の¹H-NMRシグナルの比較を第12表に示した。これらのポリエン鎖部分の立体配置は¹H-NMRシグナルの異性化シフト値($\Delta\delta = \delta_Z - \delta_E$) (Englert, 1995)およびNOESY相関から決定した。例えば5Z,9Z構造を持つ化合物**1**の場合、H-2, H-4, H-6, H-8およびH-11位の¹H NMRシグナル値はall-E体に比べて大きく低磁場シフトした一方で、H-10およびH-12位は高磁場シフトした。これらの異性化シフトパターンはEnglert(1995)が報告した5Z,9Z立体配置の特徴と一致した。加えて、H-18/H-6, H-4/H-7およびH-19/H-7の間

で認められたNOESY相関も5Z,9Zの立体配置を有することを示している(Englert 1995, Hengartnerら 1992)。従って、化合物**1**は(5Z,9Z)-lycopeneであると決定した。化合物**2**および**3**についても同様の方法で立体配置を決定した。(5Z,9Z)-lycopene (**1**)および(5Z,9Z,5'Z)-lycopene (**3**)は現在までに報告のない立体配置を持つリコペン異性体であった。また、(5Z,9Z,5'Z)-lycopene (**2**)はHengartnerら(1992)によって合成されているが、天然物としての報告はない。従って、化合物**1,2**および**3**はいずれも天然物としては新規カロテノイドであることが明らかになった。

Table 12. ¹H (500 MHz) NMR data for lycopene geometrical isomers in CDCl₃

Position	All-E		5Z,9Z (1)		5Z,9Z,5'Z (2)		5Z,9Z,5'Z,9'Z (3)	
	δ		δ	$\Delta\delta^a$	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta$
2			5.11		5.15	0.04	5.15	0.04
2'					5.11		5.15	0.04
3			2.11		2.13		2.12	2.13
3'					2.11		2.12	2.13
4			2.11		2.24	0.13	2.24	0.13
4'					2.11		2.24	0.13
6			5.95		6.02	0.07	6.03	0.08
6'					5.95		5.94	
7			6.49		6.50		6.51	
7'					6.49		6.49	6.51
8			6.25		6.76	0.51	6.77	0.52
8'					6.25		6.23	
10			6.18		6.04	-0.14	6.04	-0.14
10'					6.19		6.18	
11			6.64		6.79	0.15	6.79	0.15
11'					6.64		6.63	
12			6.35		6.29	-0.06	6.28	-0.07
12'					6.36		6.35	
14			6.25		6.25		6.25	
14'					6.25		6.25	
15			6.62		6.62		6.63	
15'					6.62		6.63	
16			1.69		1.69		1.69	
16'					1.69		1.69	
17			1.61		1.62		1.63	
17'					1.61		1.63	
18			1.82		1.85	0.03	1.85	0.03
18'					1.82		1.83	
19			1.97		1.96		1.96	
19'					1.97		1.96	
20			1.97		1.98		1.98	
20'					1.97		1.97	

^a Isomerization shift ($\Delta\delta = \delta_Z - \delta_E, |\Delta\delta| > 0.02$ ppm).

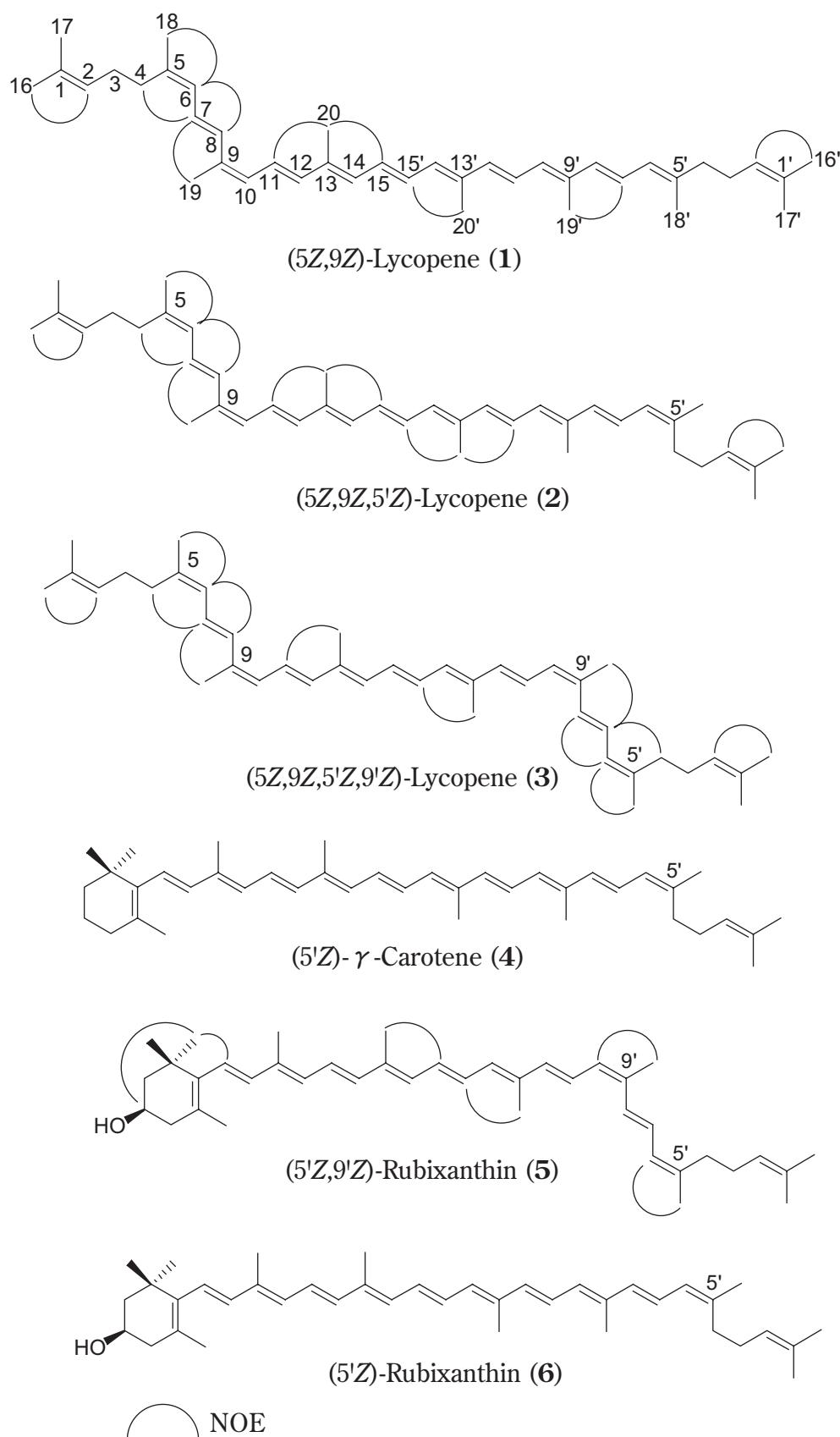


Figure 23. Stereochemistry of six carotenoids containing *cis* structures at C-5 or C-5' characteristic of orange-flowered cultivars of calendula.

さらに、現在までに報告のない(5'Z)- γ -carotene (**4**, ピーク 16)および(5'Z,9'Z)-rubixanthin (**5**, ピーク 9)を単離し、¹H-¹H COSY および NOESY 実験を含む¹H-NMR 分析によって構造決定を行った(第13表、第23図)。化合物**4**および**5**のH-2位からH-20位までの¹Hシグナルはそれぞれのall-E体と一致していたため(Englert, 1995), 第13表にはH-2'位からH-20'位までの範囲について示した。ポリエン鎖部分の立体配置は異性化シフト値およびNOESY相関から決定した。化合物**5**において、H-2', H-4', H-6', H-8' および H-11'位の¹Hシグナルは all-E 体に比べて大きく低磁場シフトした一方で、H-10' および H-12'位では、高磁場シフトした。これらの異性化シフト値は 5'Z,9'Z 立体配置の特徴と一致したため、化合物**5**は(5'Z,9'Z)-rubixanthin と決定した(Englart 1995, Hengartner ら, 1992)。また、化合物**4**についても同様に構造決定を行った。化合物**4**および**5**はいずれも天然物としての報告はなく、新規カロテノイドであることが明らかになった。

その他のHPLCでは同定することができなかったカロテノイド**6**種類は、¹H-NMR, FABMS および UV-Visスペクトル解析を行った結果、(8'R)-luteoxanthin

(ピーク 1, Fig. 2), (8R)-flavoxanthin (ピーク 3), (8R,8'R)-auroxanthin (ピーク 4), (5'Z)-rubixanthin (**6**, ピーク 12), δ -carotene (ピーク 13), および γ -carotene (ピーク 15)であることが明らかになった(第11表)。

今回単離した19種類のカロテノイドのうち、8種類((8'R)-luteoxanthin, (8R)-flavoxanthin, (8R,8'R)-auroxanthin, (all-E)-lutein, (9Z)-lutein, α -carotene, β -carotene および (all-E)-lycopene)はすでにキンセンカ花弁からの単離が報告されており(Bakó ら, 2002), 本実験で11種類のカロテノイドを新たに同定した。

3. 考 察

キンセンカ花弁に含まれるカロテノイド成分を解析した結果、橙色品種には含まれるが黄色品種には含まれないカロテノイドとして10種類のカロテノイド、(5'Z,9'Z)-rubixanthin (**5**), α -carotene, (5'Z)-rubixanthin (**6**), δ -carotene, (5Z,9Z,5'Z,9'Z)-lycopene (**3**), γ -carotene, (5'Z)- γ -carotene (**4**), (5Z,9Z,5'Z)-lycopene (**2**), (5Z,9Z)-lycopene (**1**) および (all-E)-lycopene を同定した(第22図, 第11

Table 13. ¹H (500 MHz) NMR data relevant to H-2' to H-20' position of geometrical isomers of rubixanthin and γ -carotene in CDCl₃

Position	(All-E)- γ -carotene		(5'Z)- γ -carotene (4)		(All-E)-rubixanthin		(5'Z,9'Z)-rubixanthin (5)	
	δ		δ	$\Delta\delta^a$	δ		δ	$\Delta\delta$
2'	5.11		5.15	0.04	5.11		5.11	
3'	2.11		2.12		2.11		2.11	
4'	2.11		2.23	0.12	2.11		2.24	0.13
6'	5.96		5.96		5.95		6.02	0.07
7'	6.49		6.49		6.49		6.51	
8'	6.25		6.22	-0.03	6.25		6.76	0.51
10'	6.18		6.18		6.18		6.04	-0.14
11'	6.64		6.63		6.64		6.79	0.15
12'	6.35		6.35		6.35		6.29	-0.06
14'	6.25		6.25		6.25		6.25	
15'	6.62		6.62		6.62		6.62	
16'	1.69		1.69		1.69		1.69	
17'	1.61		1.63		1.61		1.62	
18'	1.82		1.83		1.82		1.85	0.04
19'	1.97		1.95		1.97		1.96	
20'	1.97		1.97		1.97		1.97	

^a Isomerization shift ($\Delta\delta = \delta_Z - \delta_E$, $|\Delta\delta| > 0.02$ ppm).

表). これらのカロテノイドは前章でも述べたように赤みが強く、いずれもキンセンカにおいて主要なカロテノイドである flavoxanthin よりも吸収極大値が 20 ~ 50 nm 長波長側にあった（第 11 表）。

これらの橙色品種に特有な 10 種類のカロテノイドのうち、6 種類は C-5 もしくは C-5' 位にシス構造を持っていた（1-6、第 23 図）。一般的に C-5 もしくは C-5' 位にシス構造を持つカロテノイドは植物では非常にまれである。最もよく知られているものがガザニア (*Gazania rigens*) 花弁の主要カロテノイドである (5 Z)-rubixanthin (6)（別名 *gazaniamaxanthin*）である（Bartlett ら, 1969）。これはバラの花弁や果実からも検出されている（Eugster・Märki-Fischer 1991, Hornero-Méndez・Mínguez-Mosquera 2000, Märki-Fischer ら 1983）。Märki-Fischer ら（1983）は (5 Z)-neurosporene および (5 Z ,13 Z)- または (5 Z ,13 Z')-rubixanthin というさらに 2 種類の 5 Z もしくは 5' Z 構造を持つカロテノイドをバラ果実から単離している。彼らは 5 Z もしくは 5' Z 構造を

持つカロテノイドは ϵ 環を持つカロテノイドの前駆体であり、(5 Z)-carotenoid 類の単離はこの仮説を支持するものだと報告している。しかし 1996 年に Cunningham らがアラビドプシスから lycopene- ϵ -cyclase を単離し、この酵素が lycopene に ϵ 環を付与する過程で中間代謝物は生じないということを明らかにした。従って高等植物に存在する (5 Z)-carotenoid 類は ϵ 環を持つカロテノイドの前駆体ではなく、メインのカロテノイド生合成経路から逸れた形で酵素的に異性化されている可能性がある。Lycopene ϵ -cyclase や lycopene β -cyclase などの lycopene cyclase 類には 5 Z 構造を持ったカロテノイド末端に β 環や ϵ 環などの環状構造を付与する能力がなく、結果として (5 Z)-carotenoid 類が蓄積すると推測した（第 24 図）。5 Z もしくは 5' Z 構造を持つカロテノイドは橙色品種から特異的に検出されたことから炭素鎖の C-5 位を異性化する酵素が橙色品種にのみ存在している可能性がある。

以上の調査から、キンセンカのカロテノイド構成は花

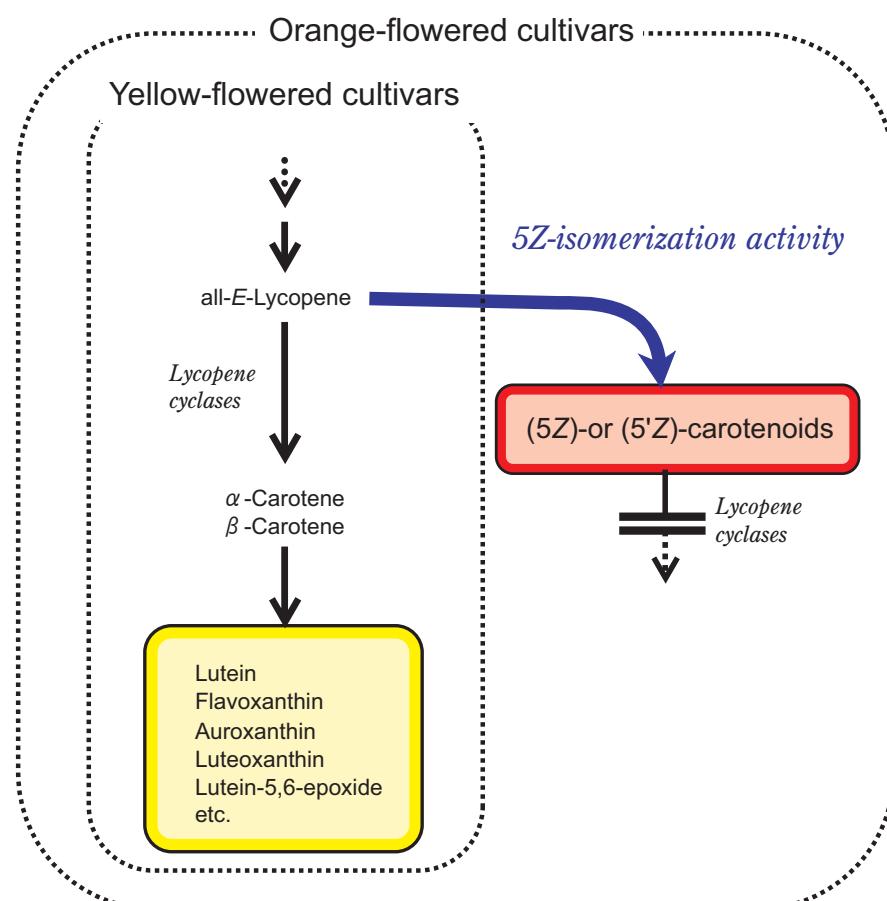


Figure 24. Putative carotenoid biosynthetic pathway in petals of orange- and yellow-flowered calendula.
Main carotenoid components accumulating in each petals are boxed.

弁の色調を反映した非常に興味深い構成であることが明らかになった。また、本結果に伴い、前節にて調査を行ったガザニア橙色品種には(5'Z)-rubixanthin (unknown peak 4) および(5Z,9Z,5'Z)-lycopene (unknown peak 10)が、またオステオスペルマムには(5'Z)- γ -carotene (unknown peak 9) および(5Z,9Z,5'Z)-lycopene (unknown peak 10)が含まれていることが明らかになった。ガザニア橙色品種およびオステオスペルマムの花弁においてこれら5位にシス構造を持つカロテノイドが蓄積する機構もまた、キンセンカ同様である可能性がある。これらの機構が明らかになれば、将来、赤みの強いカロテノイドが蓄積した橙色のキクを作出することができるかもしれない。

総合考察

キク花弁中に存在する色素は主にカロテノイドとアントシアニンである。カロテノイドとアントシアニン両方を含む橙色品種はアントシアニンの発現が環境条件に対して不安定であるため橙色を安定させることが難しいという生産者側の理由と、花弁の明度が低く、特に蛍光灯下ではくすんで見えるために好まれないという消費者側の理由から普及していない。しかしながら、同じキク科に属する花き類には非常に鮮やかな橙色のものが存在する。この鮮やかさの理由を明らかにすることは今後鮮やかな橙色のキクを育種する上での重要な知見となると考えた。そこで、第1章において淡黄色から濃赤色のキク品種の花弁の色調とカロテノイド成分、総カロテノイド量、および総アントシアニン量との関係を調査し、キク橙色花色に関する基礎的知見を得た。さらに第3章において鮮やかな橙色を持つキク科植物について同様の調査を行い、キク花弁の橙色花色発現様式との比較を行った。

淡黄色～濃赤色のキク12品種の花弁中に含まれるカロテノイドの構成成分は同じであった。また、それぞれのカロテノイド成分の色調には差がなく、含まれている成分の割合の差がカロテノイド全体の色調に影響を及ぼすことはないと考えられる。従って、キク花弁においてカロテノイドが関与する色調は総量の違いによって作り出される淡黄色から濃黄色までの範囲であると推測された。橙色～濃赤色の品種にはいずれもアントシアニンおよびカロテノイドが含まれており、これらの品種の色調はすべて両色素の重なりによって作られていた。

一方、鮮やかな橙色品種を持つキク科植物9種の橙色

品種と黄色品種の花色の違いにはアントシアニン量の差、カロテノイドの量の差およびカロテノイド成分の差という3つの要因が関わっていることが明らかになった。ガーベラの橙色品種はキク同様にアントシアニンとカロテノイドの重なりによって橙色花色を作り出していたが、比較的明度が高く、鮮やかな花色であった。これらとキクを比較した結果、キク花弁はアントシアニンによる赤みの着色効率が悪く、橙色と認識されるためにはより多くの量が必要であるが、同時に、この多量のアントシアニンが明度の低下を引き起こすため、結果として不鮮明になっていることが明らかになった。従って、キクの場合、鮮やかな橙色花色を作るためには、アントシアニンの関与しないカロテノイドのみによる橙色花色を目指すことが適切であると考えられる。カロテノイドのみによって花色が構成されるということはアントシアニンが関与する花色に比べ、利点が多い。カロテノイドの花弁での発現は生育条件、特に温度に左右されにくいため、周年を通して色調が安定しているという特徴がある。また、その発現に紫外線を必要とするアントシアニンと異なり、室内でつぼみの状態から開花させても比較的容易に着色するため、生産者にとっても消費者にとっても望ましい形質であるといえる。

マリーゴールドのように花弁に多量のカロテノイドを蓄積させる、もしくはキンセンカのように赤みの強いカロテノイドを蓄積させることによって橙色花色を持つキクを作出するためには、これらの形質に関与する遺伝子を単離し、遺伝子組換えを行うことが最も近道であると考えられる。ただし、カロテノイド蓄積量を増加させて橙色を作り出すためには、マリーゴールドの橙色品種のカロテノイド量測定の結果から推測すると生花弁1g当たり2mg程度が必要であり、これは第1章にて調査を行った最もカロテノイドを多く含むキク品種のおよそ5倍量である。しかし、カロテノイドの基質となるイソプレノイド類は様々な脂質類と共に共通な基質であることに加え、非常に多くの酵素がこの生合成経路に関与しているため、遺伝子組み換えによる生合成系の改変によってカロテノイド生合成量を大きく増加させることは困難であると予想される。また、カロテノイド蓄積量には生合成量だけでなく、蓄積器官であるプラスチドの構造が関係していると推測されているが(Taylor・Ramsay 2005)、プラスチド内でのカロテノイド蓄積に関与する遺伝子についてはほとんど知見がない。一方、アラビドプシスやタバコでは微生物由来のカロテノイド生合成系酵素遺伝子の組換えによって、astaxanthin をはじめとした赤色

を示すケトカロテノイド類を蓄積させることに成功している (Stålberg ら 2003, Ralley ら 2004)。また、キンポウゲ科に属し、濃赤色の花色を持つ *Adonis aestivalis* は花弁に多量のケトカロテノイド類を蓄積する非常に珍しい植物であるが、このケトカロテノイド生合成酵素遺伝子が近年、単離された (Cunningham・Gantt 2005)。しかし、これらのケトカロテノイド生合成酵素はいずれも β,β -carotenoid 類を基質として用いるものであり、 β,β -carotenoid 類をほとんど含まないキク花弁に導入を行ったとしても、ケトカロテノイド類の蓄積は期待できない。また、現在のところ、 β,ε -carotenoid 類から赤みの強いカロテノイドを触媒する酵素は見つかっていない。

そこで第3章第2節ではキンセンカの橙色品種および黄色品種に含まれるカロテノイド成分を同定し、橙色品種にのみ赤みの強いカロテノイドが蓄積する機構を明らかにすることを試みた。解析の結果、橙色品種および黄色品種から19種のカロテノイドが同定されたが、これらのうち10種は橙色品種にのみ存在する成分であった。このうち、6種類のカロテノイドが5位もししくは5'位にシス構造を持っていた。キンセンカ花弁には橙色品種のみに5位を異性化する酵素活性が存在し、橙色品種に特有なカロテノイドの蓄積に関与している可能性がある。また、この5位にシス構造を付与する反応の基質は lycopene やその前駆体である prolycopene, neurosporene などであると予想されるが、これらはほとんどのカロテノイドが生合成される際に経由する中間代謝物質である。従って、この酵素遺伝子を単離することができれば、キクにも適用可能であり、花弁に赤みの強い5位にシス構造をもつカロテノイドを蓄積させることができるとなる。ただし、キンセンカの黄色と橙色の花色の遺伝性については調査が行われていないため、この5位にシス構造を持つカロテノイドを蓄積するという形質が優性であるのか劣性であるのか、また、量的形質であるのか単一の遺伝子によって支配されているのか等、ほとんど明らかになっていない。また、染色体数や倍数性など基本的な情報も不足している。従って、今後は橙色花色形質に関わる遺伝子の単離を試みると同時に、花色の遺伝性に関する調査を行う必要がある。

キクの黄色品種は仏事での需要が多いため重要であるが、一般的に黄色品種は白色品種よりも性質が劣る傾向があり、高品質な黄色品種が求められている。黄色花色と白色花色を決定する要因を明らかにし、白色品種の性質を変えることなく花色のみを黄色にすることが可能になれば今後の品種開発に大きく貢献する。そこでキクの

カロテノイド構成を明らかにし、さらにカロテノイドによる花色発現を制御する遺伝的要因を明らかにすることを第1章および第2章にて試みた。

第1章では、キク花弁中に含まれるカロテノイド成分の構成に品種間差がないことを明らかにした。NMR分析等の結果、新規カロテノイドである (3S,5S,6R,3'R,6'R)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein を含む16種のキサントフィル類を同定した。また、様々なシス構造を持つ化合物を検出した。植物の光合成器官では β,β -carotenoid 類である violaxanthin や zeaxanthin などが一般的に主要な成分として検出されるが、キク花弁に含まれるカロテノイドは (9Z)-violaxanthin を除き92%以上が β,ε -carotenoid 類であり、非常に特徴的な構成であることが明らかになった。

第2章ではキク白色品種および黄色品種における花弁と葉のカロテノイド成分、カロテノイド含量、およびカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現について解析を行った。花弁では全カロテノイドの92%以上が β,ε -carotenoid 類であったが、葉では43%であり、 β,β -carotenoid 類が β,ε -carotenoid 類よりも高い割合で含まれていた。生合成系酵素遺伝子の発現を見ると、葉では *LCYB* の発現量が *LCYE* の発現量より多かったが、逆に花弁では発達初期から *LCYE* の発現量が *LCYB* の発現量より遙かに多く、このことが葉と花弁の β,β -carotenoid 類と β,ε -carotenoid 類の蓄積割合の差の原因となっていると考えられた。また、黄色品種と白色品種のカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現を比較したところ、発現量の多少はあったもののいずれの遺伝子も花色に関わらず発現していた。黄色品種である‘イエローパラゴン’では *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCYB*, *LCYE* および *CHYB* 遺伝子の発現量が花弁の発達ステージ後半に増加した。これは花弁でのカロテノイド量の増加傾向と一致していた。一方、カロテノイドをほとんど蓄積しない白色品種である‘パラゴン’においてもこれらの酵素遺伝子は同様の傾向を示した。唯一パラゴン花弁でのカロテノイドの動態と一致した傾向を示したのは *DXS* であった。しかし、白色品種である‘ホワイトマーブル’では *DXS* だけでなく他の酵素遺伝子も‘フロリダマーブル’(‘ホワイトマーブル’の枝変わり品種)と同等の発現量を示していた。このことから、カロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現量の多寡によって白色品種と黄色品種の花弁におけるカロテノイド蓄積量の違いを説明することはできなかった。

一方、‘パラゴン’(白色)とその枝変わり品種である‘イ

エローパラゴン'（黄色）の花弁を材料に用いたディファレンシャルスクリーニングにより、'パラゴン' 花弁に特異的に発現している遺伝子としてカロテノイド分解酵素ホモログ *CmCCD1* が大宮ら（2004）によって単離された。この遺伝子の発現が白色の形成に関わっている可能性が考えられたため、第2章第2節では *CmCCD1* の発現解析を行い、花色との関係を調査した。調査を行った全ての白色品種の花弁において *CmCCD1* は高い発現を示したが、黄色品種の花弁においては検出限界以下であった。また、*CmCCD1* の発現は花弁特異的であり、葉、茎、および根ではほとんど発現していなかった。第2章第1節において、白色品種であっても正常にカロテノイド生合成が行われているという可能性を示したが、カロテノイドが生合成されると同時に *CmCCD1* によって無色の物質に分解されるために、白色花弁が形成されているものと推測される。

黄色品種は白色品種よりも染色体数が少ない場合が多い（Shibata・Kawata 1986）。これは白色品種から黄色品種へと変異した際に *CmCCD1* 遺伝子が座乗する染色体が丸ごと欠落していることが原因であると考えられる。キクの黄色品種は概して白色品種に比べると品質が劣ると緒言にて述べたが、染色体の脱落に伴い、様々な栽培植物として優れた形質を担う遺伝子を失うため、白色品種よりも品質が劣る傾向にあると考えられる。今後、優れた黄色品種の育成を目指すためには、その他の形質を欠落させることなく *CmCCD1* 酵素の機能のみを抑制するということが必要であろう。

摘要

キク花弁中に存在する色素は主にカロテノイドとアントシアニンである。カロテノイドとアントシアニン両方を含む橙色品種はアントシアニンの発現が環境条件に対して不安定であるため橙色を安定させることが難しいという生産者側の理由と、花弁の明度が低く、特に蛍光灯下ではくすんで見えるために好まれないという消費者側の理由から普及していない。従って、アントシアニンの関与しないカロテノイドのみによる鮮やかな橙色品種を作ることができればこれらの問題を解決することができると考えられる。また、キクの黄色品種は仏事での需要が多いため重要であるが、一般的に黄色品種は白色品種よりも性質が劣る傾向があり、高品質な黄色品種が求められている。黄色花色と白色花色を決定する要因を明ら

かにし、白色品種の性質を変えることなく花色のみを黄色にすることが可能になれば今後の品種開発に大きく貢献する。そこで、本研究ではキクを含むキク科植物のカロテノイド構成を明らかにし、さらにカロテノイドによる花色発現を制御する遺伝的要因を明らかにすることを試みた。

第1章ではキク花弁におけるカロテノイド成分、総カロテノイド量、および総アントシアニン量と花色との関係を分析した。

淡黄色～濃赤色のキク 12 品種の花弁中に含まれるカロテノイド成分を HPLC にて分析を行ったところ、構成成分に品種間差はなかった。また、それぞれのカロテノイド成分の色調には差がなく、含まれている成分の割合の差がカロテノイド全体の色調に影響を及ぼすことはないため、キク花弁においてカロテノイドが関与する色調は総量の違いによって作り出される淡黄色から濃黄色までの範囲であると推測された。これらの成分とカロテノイド標準との比較をおこなったが、同定できた成分は lutein のみであった。橙色～濃赤色の品種にはいずれもアントシアニンおよびカロテノイドが含まれており、これらの品種の色調はすべて両色素の重なりによって作られていた。

キク花弁に含まれるカロテノイド成分を NMR 分析に供試し、16 種のキサントフィル類を同定した。これらのうち、(3S,5S,6R,3'R,6'R)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein はこれまでに天然物として報告のない新規カロテノイドであった。また、様々なシス構造を持つ化合物が検出された。Lutein-5,6-epoxide のシス体である (9Z,13Z)-, (13Z,9Z)-, (9Z,13Z)-, (9Z,13Z)- および (9Z,9Z)-lutein-5,6-epoxide は天然物として新規カロテノイドであった。植物の光合成器官では β, β -carotenoid 類である violaxanthin や zeaxanthin などが一般的に主要な成分として検出されるが、キク花弁に含まれるカロテノイドは (9Z)-violaxanthin を除き 92% 以上が β, ϵ -carotenoid 類であった。以上のことから、キク花弁に含まれるカロテノイドは非常に特徴的な構成であることが明らかになった。

第2章ではキク花弁のカロテノイドによる花色発現を制御する遺伝的要因を明らかにすることを試みた。

キク白色品種および黄色品種における花弁と葉のカロテノイド成分、カロテノイド含量、およびカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現について解析を行った。花弁では全カロテノイドの 92% 以上が β, ϵ -carotenoid 類であったが、葉では 43% であり、 β, β -carotenoid 類が β, ϵ -carotenoid 類よりも高い割合で含まれていた。生

合成系酵素遺伝子の発現を見ると、葉では *LCYB* の発現量が *LCYE* の発現量より多かったが、逆に花弁では発達初期から *LCYE* の発現量が *LCYB* の発現量より遙かに多く、このことが葉と花弁の β, β -carotenoid 類と β, ϵ -carotenoid 類の蓄積割合の差の原因となっていると考えられた。また、黄色品種と白色品種のカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現を比較したところ、発現量の多少はあったもののいずれの遺伝子も花色に関わらず発現していた。イエローパラゴン（黄色）では *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCYB*, *LCYE* および *CHYB* 遺伝子の発現量が花弁の発達ステージ後半に増加した。これは花弁でのカロテノイド量の増加傾向と一致していた。一方、カロテノイドをほとんど蓄積しないパラゴン（白色）においてもこれらの酵素遺伝子は同様の傾向を示した。唯一パラゴン花弁でのカロテノイドの動態と一致した傾向を示したのは *DXS* であった。しかし、白色品種であるホワイトマーブルは調査を行った全ての遺伝子において黄色品種であるフロリダマーブル（ホワイトマーブルの枝変わり品種）と同等の発現量を示していた。このことから、カロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現量の多寡によって白色品種と黄色品種の花弁におけるカロテノイド蓄積量の違いを説明することはできなかった。

パラゴン（白色）とその枝変わり品種であるイエローパラゴン（黄色）の花弁を材料に用いたディファレンシャルスクリーニングにより、パラゴン花弁に特異的に発現している遺伝子として単離されたカロテノイド分解酵素ホモログ *CmCCD1* が、白色の形成に関わっている可能性が考えられた。そこで、*CmCCD1* の発現解析を行い、花色との関係を調査した。調査を行った全ての白色品種の花弁において *CmCCD1* は高い発現を示したが、黄色品種の花弁においては検出限界以下であった。また、*CmCCD1* の発現は花弁特異的であり、葉、茎、および根ではほとんど発現していなかった。以上のことから、白色品種ではカロテノイドが生合成されると同時に *CmCCD1* によって無色の物質に分解されるために白色花弁が形成されると考えられた。

第3章では鮮やかな橙色花色を示すキク科植物の鮮やかさの理由を明らかにするために、カロテノイド成分、総カロテノイド量、および総アントシアニン量と花色との関係を調査した。

鮮やかな橙色品種を持つキク科植物 9 種の橙色品種と黄色品種の花色の違いにはアントシアニン量の差、カロテノイドの量の差およびカロテノイド成分の差という 3 つの要因が関わっていることが明らかになった。ガーベ

ラの橙色品種はキク同様にアントシアニンとカロテノイドの重なりによって橙色花色を作り出していたが、明度が高く、鮮やかな花色であった。これらとキクを比較した結果、キク花弁はアントシアニンによる赤みの着色効率が悪く、橙色と認識されるためにはより多くの量が必要であるが、同時に、この多量のアントシアニンが明度の低下を引き起こすため、結果として不鮮明になっているということが明らかになった。従って、今後鮮やかな橙色のキクを目指すためには花弁に含まれるカロテノイド量を増加させるか、もしくはキンセンカのように赤みの強いカロテノイドを蓄積させるという方向に改良を行うことが適切であると考えられた。

そこでキンセンカの橙色品種および黄色品種に含まれるカロテノイド成分を同定し、橙色品種にのみ赤みの強いカロテノイドが蓄積する機構を明らかにすることを試みた。解析の結果、橙色品種および黄色品種から 19 種のカロテノイドが同定されたが、これらのうち 10 種は橙色品種にのみ存在する成分であった。このうち、6 種類のカロテノイドが 5 位もしくは 5' 位にシス構造を持っている。*(5Z,9Z,5'Z,9'Z)-lycopene*, *(5Z,9Z,5'Z)-lycopene*, *(5Z,9Z)-lycopene*, および *(5'Z,9')-rubixanthin* は天然物として新規のカロテノイドであった。キンセンカ花弁には橙色品種のみに 5 位を異性化する酵素活性が存在し、橙色品種に特有なカロテノイドの蓄積に関与している可能性が示された。

引用文献

- Al-Babili, S., J. von Lintig, H. Haubruck, and P. Beyer. 1996. A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J.* 9: 601-612.
- Armstrong, G.A., M. Alberti, F. Leach and E. Hearst. 1989. Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* 216: 254-268.
- Bakó, E., J. Deli and G. Tóth. 2002. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J. Biochem. Biophys. Methods* 53: 241-250.
- Bartlett, L., W. Klyne, W.P. Mose and P.M. Scopes. 1969. Optical rotatory dispersion of carotenoids. *J. Chem. Soc. C*, 2527-2544.
- Bouvier, F., C. Suire, J. Mutterer and B. Camara. 2003. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15: 47-62.
- Britton, G. 1995. UV/visible spectrometry. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds), Carotenoids, Vol. 1B. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 13-62.
- Britton, G. 1988. Biosynthesis of carotenoids. In: Goodwin, T.W. (ed), Plant Pigments, Academic Press, London, pp 133-182.
- Britton, G. 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds), Carotenoids, Vol. 3. Birkhäuser, Basel, pp 13-147.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen and H. Pfander. 2004. Carotenoids Handbook. Birkhäuser, Basel.
- Bucherer, R., U. Marti and C.H. Eugster. 1984. Syntheses of optically active carotenoids with 3,5,6-trihydroxy-5,6-dihydro β -end groups. *Helv. Chim. Acta* 67:2043-2056.
- Camara, B. and F. Bouvier. 2004. Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 430:16-21.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
- Cunningham, F.X. Jr., B. Pogson, Z. Sun, K.A. McDonald, D. DellaPenna and E. Gantt. 1996. Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8: 1613-1626.
- Cunningham, F.X. Jr. and E. Gantt. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.
- Cunningham, F.X. Jr. and E. Gantt. 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ϵ -cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2905-2910.
- Cunningham, F.X. Jr. and E. Gantt. 2005. A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant J.* 41: 478-492.
- Deli, J., P. Molnár, G. Tóth, J. Szabolcs and L. Radics. 1988. Determination of the geometrical configuration of naturally occurring mono-*cis*-lutein epoxides. *Phytochemistry* 27: 547-549.
- Deli, J., P. Molnár, Z. Matus, G. Tóth, A. Steck and H. Pfander. 1998a. Isolation and characterization of 3,5,6-trihydroxy-carotenoids from petals of *Lilium tigrinum*. *Chromatographia* 48: 27-31.
- Deli, J., P. Molnár, Z. Matus, G. Tóth, A. Steck and H. Pfander. 1998b. Partial synthesis and characterization of capsokarpoxanthins and 3,6-epoxycapsanthins. *Helv. Chim. Acta* 81: 1242-1253.
- Deli, J., P. Molnár, H. Pfander and G. Tóth. 1999. Isolation of capsanthin 5,6-epoxide from *Lilium tigrinum*. *Acta Bot. Hung.* 42: 105-110.
- Englert, G. 1995. NMR spectrometry. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds), Carotenoids, Vol. 1B. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 147-160.
- Eugster, C.H. 1985. Carotenoid structures, old and new problems. *Pure Appl. Chem.* 57: 639-647.
- Eugster, C.H., E. Märki-Fischer. 1991. The chemistry of rose pigments. *Angew. Chem., Int. Ed.* 30: 654-672.
- Estévez, J.M., A. Cantero, A. Reindl, S. Reichler and P. Léon. 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 276: 22901-22909.
- Fraser, P.D., M.R. Truesdale, C.R. Bird, W. Schuch and P.M. Bramley. 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 105: 405-413.
- Fraser, P.D. and P.M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43: 228-265.
- Giuliano, G., G.E. Bartley and P.A. Scolnik. 1993. Regulation of

- carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5: 379-387.
- Goodwin, T.W. and G. Britton. 1988. Distribution and analysis of carotenoids. In: Goodwin, T.W. (ed), *Plant Pigments*, Academic Press, London, pp 62-132.
- Hattori, K. 1991. Inheritance of carotenoid pigmentation in flower color of chrysanthemum. *Jpn. J. Breed.* 41: 1-9.
- Hengartner, U., K. Bernhard and K. Meyer. 1992. Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopic characterization of fourteen (*Z*)-isomers of lycopene and of some acetylenic didehydro- and tetradehydrolycopenes. *Helv. Chim. Acta* 75: 1848-1865.
- Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 210-218.
- Hornero-Méndez, D. and M.I. Minguez-Mosquera. 2000. Carotenoid pigments in *Rosa mosqueta* hips, an alternative carotenoid source for foods. *J. Agric. Food Chem.* 48: 825-828.
- Hugueney, P., F. Bouvier, A. Badillo, J. Quennemet, A. d'Harlingue and B. Camara. 1996. Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* 111: 619-626.
- Inagaki, Y., Y. Hisatomi, T. Suzuki, K. Kasahara and S. Iida. 1994. Isolation of a *Suppressor-mutator/Enhancer*-like transposable element, *Tpn1*, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Plant Cell* 6: 375-383.
- Jank, H. 1957. Experimentelle Mutationsauslösung durch Röntgenstrahlen bei *Chrysanthemum indicum*. *Züchter* 27: 223-231.
- 花き需給調整協議会 . 1990. 花き需給調整協議会資料.
- Karrer, P. and E. Jucker. 1943. Carotinoide aus den Blüten von Winterastern, Chrysanthemaxanthin. *Helv. Chim. Acta* 26: 626-630.
- Karrer, P., E. Jucker, J. Rutschmann and K. Steinlin 1945. Zur Kenntnis der Carotinoid-epoxyd. Natürliches Vorkommen von Xanthophyll-epoxyd und α -Carotin-epoxyd. *Helv. Chim. Acta* 28: 1146-1156.
- Kawase, K. and Y. Tsukamoto. 1976. Studies on flower color in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. III. Quantitative effects of major pigments on flower color variation, and measurement of color qualities of petals with a color difference meter. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 45: 65-75.
- Khachik, F., A. Steck and H. Pfander. 1999. Isolation and structural elucidation of (13*Z*,13'*Z*,3*R*,3'*R*,6*R*)-lutein from marigold flowers, kale, and human plasma. *J. Agric. Food Chem.* 47: 455-461.
- Kull, D. and H. Pfander. 1995. Isolation and identification of carotenoids from the petals of rape (*Brassica napus*). *J. Agric. Food Chem.* 43: 2854-2857.
- Kull, D. and H. Pfander. 1997. Isolation and structure elucidation of two (*Z*)-isomers of lutein from the petals of rape (*Brassica napus*). *J. Agric. Food Chem.* 45: 4201-4203.
- Ladygin, V.G. 2000. Biosynthesis of carotenoids in plastids of plants. *Biochemistry (Moscow)* 65: 1317-1333.
- Langton, F.A. 1980. Chimerical structure and carotenoid inheritance in *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.). *Euphytica* 29: 807-812.
- Liu, Y., S. Roof, Z. Ye, C. Barry, A. van Tuinen, J. Vrebalov, C. Bowler and J. Giovannoni. 2004. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9897-9902.
- Lois, L.M., M. Rodriguez-Concepción, F. Gallego, N. Campos and A. Boronat. 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* 22: 503-513.
- Machin, B. and N. Scopes. 1978. *Chrysanthemums* year-round growing. Blandford Press, Dorset.
- Maoka, T., Y. Fujiwara, K. Hashimoto, S. Takeda, S. Takaragaki and K. Ida. 2000. A new retro-carotenoid from the petals of the Californian yellow poppy *Eschscholzia californica*. *J. Nat. Prod.* 63: 1288-1289.
- Marrs, B. 1981. Mobilization of the genes for photosynthesis from *Rhodopseudomonas capsulata* by a promiscuous plasmid. *J. Bacteriol.* 146: 1003-1012.
- Märki-Fischer, E., U. Marti, R. Buchecker and C.H. Eugster. 1983. Carotenoids from hips of *Rosa pomifera*: discovery of (5*Z*)-neurosporene; synthesis of (3*R*,5*Z*)-rubixanthin. *Helv. Chim. Acta* 66: 494-513.
- Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura and K. Harashima. 1990. Elucidation of *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 6704-6712.
- Moehs, C.P., L. Tian, K.W. Osteryoung and D. DellaPenna. 2001. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol. Biol.* 45: 281C293.
- Molnár, P., J. Szabolcs and L. Radics. 1986. Naturally occurring di-*cis*-violaxanthins from *Viola tricolor*: isolation and identification by ^1H NMR spectroscopy of four di-*cis*-

- isomers. *Phytochemistry* 25: 195-199.
- Molnár, P., J. Deli, Z. Matus, G. Tóth, A. Steck and H. Pfander. 1999. Partial synthesis and characterization of karpoxanthins and cucurbitaxanthin A epimers. *Helv. Chim. Acta* 82: 1994-2002.
- Nakayama, M., M. Koshioka, M. Shibata, S. Hiradate, H. Sugie and M. Yamaguchi. 1997. Identification of cyanidin 3-O-(3",6"-O-Dimalonyl- β -glucopyranoside) as a flower pigment of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 1607-1608.
- Nielsen, K.M., D.H. Lewis and E.R. Morgan. 2003. Characterization of carotenoid pigments and their biosynthesis in two yellow flowered lines of *Sandersonia aurantiaca* (Hook.). *Euphytica* 130: 25-34.
- 大宮あけみ・岸本早苗・住友克彦. 2004. キクの白色花弁・黄色花弁で特異的に発現している遺伝子の探索. 園学雑. 73(別2): 490.
- Pecker, I., D. Chamovitz, H. Linden, G. Sandmann and J. Hirschberg. 1992. A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to ζ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4962-4966.
- Ralley, L., E.M.A. Enfissi, N. Misawa, W. Schuch, P.M. Bramley and P.D. Fraser. 2004. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant J.* 39: 477-486.
- Schwartz, S.H., X. Qin and J.A.D. Zeevaart. 2000. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J. Biol. Chem.* 276: 25208-25211.
- Shibata, M. and J. Kawata. 1986. Chromosomal variation of recent chrysanthemum cultivars for cut flower. p. 41-45. In: K. Kitaura, T. Akihara, H. Kukimura, K. Nakajima, M. Horie and T. Kozaki (eds). *Development of New Technology for Identification and Classification of Tree Crops and Ornamentals*. Fruit Tree Research Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.
- Shibata, M. 1994. Chrysanthemum. In: Organizing Committee, XXIVth International Horticultural Congress, Publication Committee (ed). *Horticulture in Japan*. Asakura Publishing, Tokyo, pp 135-139.
- Simkin, A.J., B.A. Underwood, M. Auldrige, H.M. Loucas, K. Shibuya, E. Schmelz, D.G. Clark and H.J. Klee. 2004. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of β -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.* 136: 3504-3514.
- Simkin, A.J., S.H. Schwartz, M. Auldrige, M.G. Taylor and H.J. Klee. 2004. The tomato *carotenoid cleavage dioxygenase 1* genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* 40: 882-892.
- Stålberg, K., O. Lindgren, B. Ek and A.-S. Höglund. 2003. Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 36: 771-779.
- Tai, C.-Y. and B.H. Chen. 2000. Analysis and stability of carotenoids in the flowers of daylily (*Hemerocallis disticha*) as affected by various treatments. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5962-5968.
- Tan, B.-C., L.M. Joseph, W.-T. Deng, L. Liu, Q.-B. Li, K. Cline and D.R. McCarty. 2003. Molecular characterization of the *Arabidopsis 9-cis* epoxycarotenoid dioxygenase gene family, *Plant J.* 35: 44-56.
- Taylor, M. and G. Ramsay. 2005. Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiol. Plant.* 124: 143-151.
- Tian, L. and D. Dellapenna. 2004. Progress in understanding the origin and functions of carotenoid hydroxylases in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 430: 22-29.
- Tian, L., M. Magallanes-Lundback, V. Musetti and D. Dellapenna. 2003. Functional analysis of β - and ϵ -ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1320-1332.
- Tóth, G. and J. Szabolcs. 1981. Occurrence of some mono-*cis*-isomers of asymmetric C₄₀-carotenoids. *Phytochemistry* 20: 2411-2415.
- Vizir, I.Y., M.L. Anderson, Z.A. Wilson and B.J. Mulligan. 1994. Isolation of deficiencies in the *Arabidopsis* genome by γ -irradiation of pollen. *Genetics* 137: 1111-1119.

論文抄録

フィトクロムを介したシロイヌナズナの葉柄伸長調節におけるジベレリン 20 酸化酵素遺伝子の関与

久松 完

植物の赤色 (R)・遠赤色 (FR) 光の光受容体であるフィトクロムを介したシロイヌナズナの葉柄伸長調節とジベレリン (GA) 生合成との関連を調査し, GA20 酸化酵素遺伝子 (*GA20ox*) が重要な役割を担っていることを明らかにした。シロイヌナズナの葉柄伸長は, FR を多く含む光による長日処理 (FR-rich LD) あるいは明期終了時の短時間 (10 分間) FR 照射 (EOD-FR) 処理により伸長が促進された。伸長促進反応が認められる FR-rich LD あるいは EOD-FR 条件下で 10 種の GA 生合成関連遺伝子の発現動態を解析したところ, これらの遺伝子のうち *AtGA20ox 1* と *AtGA20ox 2* が FR に応答しており, 特に *AtGA20ox 2* の応答が大きいことが示された。また, *AtGA20ox 1* 変異体ならびに RNAi による *AtGA20ox 2* 発現抑制系統を供試した解析から, FR-rich LD あるいは EOD-FR による伸長促進反応に *AtGA20ox 2* が大きく関与していることが示された。さらに, フィトクロム A ならびにフィトクロム B 変異体 (*phyB*) を供試した解析において, *phyB* では, FR-rich LD あるいは EOD-FR による葉柄伸長促進ならびに EOD-FR による *AtGA20ox 1* と *AtGA20ox 2* の発現誘導がみられず, シロイヌナズナの葉柄伸長における R/FR 反応は主にフィトクロム B を介した反応であることが示された。

HISAMATSU, T., R. W. KING, C. A. HELLIWELL and M. KOSHIOKA: The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochrome-regulated petiole elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138 : 1106-1116 (2005)

トルコギキョウ白色系生花弁の紫外光下における明暗像と フラボノイド含量との関係

福田 直子

白色系トルコギキョウ 75 品種・系統の花弁を用いて, 365 nm の紫外光下での花弁の像とフラボノイド含量を調査した。紫外光下において黒く見える花弁には 10 mg/g 以上のフラボノイドが存在し, 白く見える花弁のフラボノイド含量は 3 mg/g 以下と少なかった。紫外光下における花弁の像の明暗とフラボノイド含量との間に明らかな相関が認められた。紫外光下で先端側が黒く基部が白い, 覆輪状の像を示す白色花弁が複数存在した。紫覆輪品種 ‘キャンディマリン’ から分離した白色花は紫外光下で同様の覆輪状の像を示し, 先端側は基部側の 30 倍のフラボノイドを含んでいた。紫覆輪品種の花弁の先端側と基部側のフラボノイド含量比が同じであることから, 白色花弁上のフラボノイドの局在は覆輪と同様の機構で発現していると考えられた。本方法は多くの試料について短時間に非破壊的にフラボノイドの情報が得られることから, 育種素材の選抜やフラボノイドアントシアニンの生合成の情報を得ることに役立つと期待される。

福田直子・宮坂昌実・斎藤涼子・朽津和幸・中山真義：トルコギキョウ白色系生花弁の紫外光下における明暗像とフラボノイド含量との関係. 園芸学研究 4 : 147-151(2005)

トルコギキョウにおける覆輪安定性の数量化による品種間変異の評価

福田 直子

トルコギキョウの覆輪安定性の品種間変異を明らかにする目的で、画像解析を用いて花弁の着色面積率を算出し、品種の覆輪安定性を着色面積率の標準偏差として数量化した。この方法を用いてガラス温室における季咲きの作型と20℃一定条件とで栽培した紫覆輪のトルコギキョウ16品種の覆輪形質を評価した。統計解析の結果、覆輪着色面積率の品種間変異および栽培条件による変動は有意であり、品種によって栽培条件の影響が異なることが明らかとなった。多くの品種において20℃栽培区において着色面積率の平均値が増加するとともに個体間変異が顕在化し、覆輪安定性が低下した。供試した16品種を2つの栽培条件における着色面積率の標準偏差を基に分類すると、標準偏差が10以下で栽培環境の影響が少なく覆輪安定性が高い品種群、16以上で常に不安定な品種群、20℃栽培条件で安定性が顕著に低下する品種群に類型化できた。「色流れ」状の着色部の変形は1品種を除いて標準偏差が16以上の覆輪安定性の低い品種で生じた。以上から覆輪形質の数量化によって統計解析を行い覆輪安定性の品種間差異の評価が可能であることが示された。

福田直子・大澤良・吉岡洋輔・中山真義：トルコギキョウにおける覆輪安定性の数量化による品種間変異の評価。園芸学研究4: 265-269(2005)

ブラシノステロイド欠損変異体ソラマメの子実の小粒化は 莢による物理的な制限が原因である

福田 直子

ブラシノステロイド欠損変異体のソラマメ「倫玲」は莢や子実を含む多くの器官が矮性化している。子実については小粒のものと通常の大きさのものが混在することから、子実の小粒化はブラシノステロイドの欠損が直接的に作用した結果ではないと考えられた。そこで「倫玲」と野生型の莢あたりの子実数と莢長との関係等について調査し、子実の小粒化の機構を明らかにした。2,3粒莢において「倫玲」の子実は密着して配置されており、莢当たりの子実数が多い場合や莢長が短い場合に子実が小さくなった。一方、野生型では莢あたりの子実数や莢長にかかわらず子実は一定の大きさであり、莢の中で子実間に物理的な制限は生じなかった。1粒莢の「倫玲」の子実は野生型と同じ大きさであった。ブラシノステロイドを「倫玲」の3粒莢に外生処理すると、莢と子実の長さが増加した。以上のことから「倫玲」の子実の大きさはブラシノステロイドの欠損による莢長の低下によって制御されている、すなわち莢による物理的な制限が子実の小粒化の原因であることが明らかになった。

N. FUKUTA, K. FUKUZONO, H. KAWAIDE, H. ABE, and M. NAKAYAMA : Physical restriction of pods causes seed size reduction of a brassinosteroid-deficient faba bean (*Vicia faba*). Ann. Bot. 97 : 65-69(2006)

キンセンカ花弁に含まれるカロテノイド成分の分析

岸本 早苗

橙色および黄色品種のキンセンカ花弁に含まれるカロテノイドの構成成分および化学構造について解析した。19種のカロテノイドが同定されたが、これらのうち10種は橙色品種にのみ存在し、赤みを帯びたカロテノイドであった。このうち、6種のカロテノイドは5位もしくは5'位にシス構造を持っており、(5Z,9Z,5'Z,9'Z)-lycopene, (5Z,9Z,5'Z)-lycopene, (5Z,9Z)-lycopene, (5'Z)- γ carotene および (5'Z,9Z)-rubixanthin は天然物として新規のカロテノイドであった。キンセンカ花弁には橙色品種にのみ5位を異性化する酵素活性が存在し、橙色品種に特有なこれらのカロテノイドの蓄積に関与していると推測された。

KISHIMOTO S., T. MAOKA, K. SUMITOMO and A. OHMIYA: Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). Biosci. Biotech. Biochem. 69: 2122-2128 (2005)

変異エチレンレセプター遺伝子導入による形質転換キクの作出： エチレン感受性能の低下に効果的な変異エチレンレセプター 遺伝子 (*mDG-ERS1*) と形質転換体の評価

鳴海 貴子

エチレンによるキクの葉の黄化を抑制するため、変異エチレンレセプター遺伝子導入によりエチレン感受性能を示さない形質転換体の作出を試みた。キクのエチレンレセプター遺伝子 (*DG-ERS1* cDNA) にシロイスナズナの変異エチレンレセプター遺伝子、*etr1-1*, *etr1-2*, *etr1-3*, *etr1-4*, とトマトの*Nr* に存在する変異（一塩基置換）を導入し、5種類の変異エチレンレセプター遺伝子 (*mDG-ERS1 series*) を作成した。タバコ由来のエロンゲーションファクター1 α 遺伝子のプロモーター (EF1 α プロモーター) に *DG-ERS1* あるいは *mDG-ERS1 (etr1-1)*, *mDG-ERS1 (etr1-2)* など計6種類の遺伝子を連結し、遺伝子導入ベクターを作成した。キク‘セイマリン’に遺伝子導入を行ったところ、各コンストラクトにおいてパロモマイシン耐性を示す形質転換体が得られ、その形質転換効率は 2.4 ~ 6.2% であった。形質転換体にエチレン処理を行ったところ、各系統でエチレン感受性を示さない系統が得られ、特に *mDG-ERS1 (etr1-4)* 導入系統で最も多くエチレン感受性を示さない形質転換体が得られた。以上のことから、効果的にキクのエチレン感受性能を低下させる変異部位を含む変異エチレンレセプター遺伝子は *mDG-ERS1 (etr1-4)* であることが明らかとなった。

NARUMI T., AIDA R., OHMIYA A. and SATOH S. : Transformation of chrysanthemum with mutated ethylene receptor genes: *mDG-ERS1* transgenes conferring reduced ethylene sensitivity and characterization of the transformants. Postharv. Biol. Technol. 37(2), 101-110 (2005)

RAPD および SSR マーカーによるカーネーションの連鎖地図作成 および萎凋細菌病抵抗性の QTL 解析

八木 雅史

カーネーションを含むダイアンサス属において初めての DNA マーカーによる連鎖地図を作成した。連鎖地図の作成には、カーネーション萎凋細菌病に抵抗性の「カーネーション農 1 号」および感受性の「プリティファボーレ」を交雑して得られた抵抗性分離集団 134 系統を用いた。作成された連鎖地図は、137 個の RAPD マーカーおよび 9 個の SSR マーカーが 124 遺伝子座に位置づけられ、16 の連鎖群に分類された。全長は 605.0 cM、遺伝子座間の平均距離は 4.9 cM であった。さらに 8 回の萎凋細菌病抵抗性検定の結果を用いて、QTL 解析を行った結果、以前に報告した作用の大きな QTL は第 6 連鎖群に座乗し、LOD 値 23.46、寄与率 60.5% であった。また、LOD 値 2.32 及び 2.87 の作用の小さな QTL のピークが第 2、第 5 連鎖群にそれぞれ検出された。本研究から、カーネーション萎凋細菌病の抵抗性には、一つの主働抵抗性遺伝子と少なくとも二つの微働抵抗性遺伝子が関与していることが明らかになった。

YAGI, M., T. ONOZAKI, M. TANEYA, H. WATANABE, T. YOSHIMURA, T. YOSHINARI, Y. OCHIAI and M. SHIBATA : Construction of a genetic linkage map for the carnation by using RAPD and SSR markers and mapping quantitative trait loci (QTL) for resistance to bacterial wilt caused by *Burkholderia caryophylli*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75: 166-172 (2006)

バラ ‘ソニア’ と ‘デリーラ’ 切り花の花持ちの違いにおける 花弁糖質濃度の関与

市村 一雄

バラ切り花の花持ちは一般に短いが、品種 ‘デリーラ’ 切り花の花持ちは比較的長いことが報告されている。そこで、花持ちは短い ‘ソニア’ と収穫後の生理特性を比較することにより ‘デリーラ’ の花持ちは長い原因を解析した。水に生けた場合の ‘ソニア’ 切り花の花持ちは 5. 6 日であり、花弁は十分に展開しなかったが、スクロース処理は花弁の展開を著しく促進した。それに対して、水に生けた場合の ‘デリーラ’ 切り花の花持ちは 10. 6 日であり、スクロースを処理した場合と同様に花弁は展開した。収穫時点での花弁中のグルコース、フルクトースおよびスクロース濃度は ‘デリーラ’ の方が ‘ソニア’ よりも著しく高かったが、茎と葉におけるこれらの糖質濃度には両品種の間で差がなかった。導管閉塞の指標である茎の水通導性は両品種ともに収穫後の時間の経過とともに低下した。エチレン生成量に両品種の間で差は認められなかった。エチレンに対する感受性は ‘デリーラ’ の方が ‘ソニア’ よりもむしろ高かった。以上の結果から、‘デリーラ’ の花弁展開が優れることと花持ちは長い原因是、花弁中の糖質濃度が高いことであると考えられた。

ICHIMURA, K., M. KISHIMOTO, R. NORIKOSHI, Y. KAWABATA and K. YAMADA : Soluble carbohydrates and variation in vase-life of cut rose cultivars ‘Delilah’ and ‘Sonia’ . J. Hort. Sci. Biotechnol. 80: 280-286 (2005)

光条件が鉢植えデルフィニウムの花持ちに及ぼす影響

市村 一雄

鉢植えのデルフィニウムを異なる光条件下 ($7, 70$ および $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) に保持したところ、がく片の落花で評価した花持ちはそれぞれ 6.4 日, 9.4 日および 9.4 日であった。実験開始時点での CO_2 固定速度は $7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 条件下で最も低かった。開花後 4 日目のがく片と雌蕊におけるグルコース, フルクトース, スクロースおよびマンニトール濃度は光量子束密度が低くなるにつれて低下した。開花後 6 日日のエチレン生成量は $7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 条件下で保持した花で最も高い値を示した。以上の結果から、鉢植えデルフィニウムを光量子束密度が低い条件下で保持すると CO_2 固定速度と糖質濃度が低下し、花のエチレン生成量が増加してがく片の脱落が促進されたことが明らかとなった。

TANASE, K., A. USHIO and K. ICHIMURA: Effects of light intensity on flower life of potted *Delphinium* plants. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 74: 395-397 (2005)

チオ硫酸銀錯塩 (STS), スクロースおよび両者を組み合わせた処理がトルコギキョウ切り花の収穫後の品質と花持ちに及ぼす影響

清水 弘子

トルコギキョウにおいて、チオ硫酸銀錯塩 (STS), スクロース、および STS とスクロースを組み合わせた前処理が切り花の品質と花持ちに及ぼす影響について調査を行った。切り花を小花が 2 輪開花し 4 輪つぼみの状態に調整し、 0.2 mM STS, 4% スクロース、および両者を組み合わせた溶液を 23°C , 相対湿度 70% , 暗黒条件下で 20 時間吸水処理した。切り花の花持ちは 2 花以上の中花が観賞価値を保持している期間とした。その結果、STS とスクロースを組み合わせた処理およびスクロース単用処理では、対照および STS 単用に比べて花持ちが延長した。また、スクロース単用および STS とスクロースを組み合わせた処理では、つぼみの開花率と花弁の覆輪部分のアントシアニン濃度が STS 単用に比べて著しく増加した。これらの結果から、エチレン感受性があまり高くなく、小花を多数つけるトルコギキョウでは、スクロースを含む溶液による前処理は STS 単独処理に比べて切り花の品質向上に有効であると考えられた。

SHIMIZU, H., K. ICHIMURA. 2005. Effects of silver thiosulfate complex (STS), sucrose and their combination on the quality and vase life of cut *Eustoma* flowers. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 74: 464-468.

トルコギキョウ小花の老化は柱頭の受粉面積の影響を受ける

湯本 弘子

トルコギキョウの小花の老化は受粉によって促進され、それにはエチレン生成の急激な増加が関与していることが知られている。本実験では、柱頭の受粉面積が花持ちに及ぼす影響について、トルコギキョウ 6 品種を用いて調査を行った。開花当日の柱頭が未熟な小花を採取し、ピンセットで薬を除去して除雄を行った。柱頭が開いた日に、当日開花した同一品種の小花から採取した花粉で受粉を行った。受粉は柱頭の全面に受粉する処理、 $1/8$ の面積に受粉する処理、未受粉の 3 処理を行った。受粉によって花の老化は促進され、いずれの品種においても全面受粉は $1/8$ 面積受粉に比べて花の老化が促進される傾向が認められた。また、3 品種において全面受粉では $1/8$ 面積受粉に比べて、有意に花弁の萎凋が促進された。次に、6 品種の 1 つである‘あすかの波’を用いて実験を行った。全面受粉では受粉 1 日後にエチレン生成が急増した。一方、 $1/8$ 面積受粉では受粉 3 日後にエチレン生成が増加し始め、5 日後にピークに達した。多くの花粉管が花柱基部に到達するまでに全面受粉では受粉後 2 日、 $1/8$ 面積受粉では 3 日かかった。また、全面受粉では、受粉による花弁の萎凋を抑制するためには高濃度のチオ硫酸銀錯塩 (STS) 処理が必要であった。これらの結果から、トルコギキョウ小花の受粉による老化促進は柱頭の受粉面積の影響を受け、受粉によるエチレン生成促進が関与していると考えられた。

SHIMIZU-YUMOTO, H., K. ICHIMURA. 2006. Senescence of *Eustoma* flowers as affected by pollinated area of the stigmatic surface. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75: 66-71.

ペチュニアの覆輪花弁の形成に関するアントシアニン生合成の制御

中山 真義

覆輪とは、花弁の外縁部と中央部において異なる色彩が発現するリング状の模様である。ペチュニアの花弁において、覆輪模様の形成に関与している色素の部位特異的な生合成制御機構を明らかにすることを試みた。覆輪花弁を色彩に基づいて切り分け、それぞれの組織におけるアントシアニン色素の生合成関連化合物と生合成関連酵素遺伝子の発現を分析した。外縁部が白色になる覆輪花弁においては、着色組織に比べて白色組織におけるカルコン合成酵素遺伝子の発現が抑制されるとともに、この酵素の基質の前駆体である桂皮酸誘導体の蓄積が認められた。従って、外縁部白色覆輪の形成にはカルコン合成酵素の白色部位特異的な発現抑制が関与していることが明らかになった。また内部が白色になる覆輪花弁においては、着色組織に比べて白色組織におけるフラボノール合成酵素遺伝子の発現が活性化しているとともに、この酵素の代謝物であるフラボノールの蓄積が認められた。内部白色覆輪品種では、フラボノール合成酵素の活性化によってアントシアニンとフラボノールの共通の前駆体であるジヒドロフラボノールの濃度が減少することでアントシアニンの生成が抑制され、その結果、白色組織が形成されると考えられる。

SAITO, R., N. FUKUTA, A. OHMIYA, Y. ITOH, Y. OZEKI, K. KUCHITSU and M. NAKAYAMA : Regulation of anthocyanin biosynthesis involved in the formation of marginal picotee petals in *Petunia*. Plant Science 170 : 828-834 (2006)

ペチュニア (*Petunia axillaris*) における花の香りの発散機構

大久保 直美

夜香性の花を持つ *Petunia axillaris* について、香気成分の発散機構に関する研究を行った。植物体を 25°C 一定、12 時間日長 (6:00 – 18:00・明 / 18:00 – 6:00・暗) の生育条件で順化させ、発散成分の経時変化を調べたところ、0 時頃最大値、12 時頃最小値を取るリズムを示した。発散量の最も多い時間帯である 0 時の花の発散成分組成は内生成分組成とは大きく異なっていた。この香気成分の内生成分組成と発散成分組成の違いは、各化合物の沸点に関係しているのではないかと考え、発散量／内生量の比の対数と沸点の関係を調べたところ、高い負の相関が得られ、この相関直線の傾きは 25°C における平衡系での熱力学的な理論値に極めて近かった。従って香気成分の発散量と内生量の組成比の違いは、化合物の気化速度の違いが反映しているものと考えられた。以上より、ペチュニアの花の香気成分は花弁表層で合成され、単純に拡散・気化して発散されるものと考えられた。次に発散リズムの発生する段階を明らかにするために内生量の経時変化を調べたところ、すべての関連化合物が発散量と同調して増減を繰り返した。従って発散リズムは内生量の増減の反映であると考えられた。以上より、ペチュニアの花の香気発散における生理的制御は、香気成分が気化する過程ではなく、合成と酵素的変換による内生量の調節を通して機能しているものと考えられた。

OYAMA-OKUBO, N., T. ANDO, N. WATANABE, E. MARCHESI, K. UCHIDA and M. NAKAYAMA: Emission Mechanism of Floral Scent in *Petunia axillaris*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(4): 773-777 (2005)