



# 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

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2006-04-21

(Date of Publication)

2014-10-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2884

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002884>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

キク科植物の花弁におけるカロテノイドに関する研究

平成 18 年 2 月

岸本 早苗



(目次)

(ページ)

緒言	1
第1章 キク花卉に含まれるカロテノイド成分の分析	3
第1節 キク花卉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	3
第2節 キク花卉に含まれるカロテノイド成分の同定	12
第2章 キク花卉および葉におけるカロテノイド蓄積の調節機構の解明	23
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	24
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 <i>CmCCD1</i> の 黄色品種および白色品種における発現解析	42
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	49
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	49
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	68
総合考察	81
謝辞	85
引用文献	86



## 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。花卉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  $C_{40}$  のテルペン骨格を持った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 (Britten ら 2004)。その生合成は、 $C_5H_8$  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  $C_{20}$  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  $\zeta$ -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  $\zeta$ -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  $\beta$ 環を付与する lycopene  $\beta$ -cyclase (LCYB) や  $\epsilon$ 環を付与する lycopene  $\epsilon$ -cyclase (LCYE) に触媒され、 $\beta$ -carotene や  $\alpha$ -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、様々な構造を持つカロテノイドに生合成される (Britten 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の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)。

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、 $\beta$ -carotene や lutein が検出される (Goodwin・Britten 1988)。対照的に、花卉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 $\beta$ -carotene の誘導体のみで構成されており,  $\alpha$ -carotene およびその誘導体をほとんど含んでいない(Deli ら 2000). 一方, キク科の植物は一般的に $\alpha$ -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 を花卉に蓄積し, 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. キク花卉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 (河瀬・塚本 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% であるスプレーギクの中で, 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). その原因は, 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卉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思われる. 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なく, 輪ギク栽培において最も労力を要する摘蕾作業を必要としない芽なし性を持つ品種が普及しつつあるが, その花色は現在のところ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 キク花卉に含まれるカロテノイド成分の分析

### 緒言

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。この花卉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; 河瀬・塚本 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、現在まで全く報告がない。

本章ではキク花卉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卉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 キク花卉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

キク花卉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。キク花卉に含まれるアントシアニンに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(河瀬・塚本 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、花卉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。

### 材料及び方法

#### 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(図1-1)。完全に展開した花卉を分析に供試した。



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

#### カロテノイド成分の分析

それぞれの品種の花弁 0.5g に 3ml のアセトンを加えて磨砕した。これに 5ml 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。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て HPLC 分析に供試した。また，violaxanthin, 9'Z-neoxanthin, lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -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  $\mu$  m, 250 $\times$ 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Buthyl methyl ether (MTBE): H<sub>2</sub>O = 95:1:4,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: H<sub>2</sub>O = 25:71:4

0分 A 100%/ B 0%，1 2分 A 100%/ B 0%，9 6分 A 0%/ B 100%

流速 1 ml/min, カラム温度 35 $^{\circ}$ C

#### 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。

#### 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砕した。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 1cm 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 : Brittenら, 1995) とした。

#### 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-ルチノサイド標品の 530 nm における吸光度から検量線を作成した。0.5 g の花卉を 1%塩酸メタノールで磨砕し、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。花卉抽出液の 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。

## 結果

#### 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 (図 1-2, 表 1-1)。しかし、これらのピークのうち、標品と一致したのはピーク 7 (lutein) のみであった (表 1-1, 1-2)。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。

#### 花卉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

花卉の色調、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表 1-3 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卉の色調にほとんど差がなかった (図 1-3)。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。

## 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（図1-3）。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（図1-3）。

## 要約

淡黄色～濃赤色のキク 1 2 品種の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。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の構成成分に差はなかった。HPLC 分析で得られた 9 つの主要なピークのうち、同定できたのは 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。アントシアニン量と花弁の明度との関係から、アントシアニン量の増加が花弁の赤みの増加と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ることが明らかになった。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と考えられた。

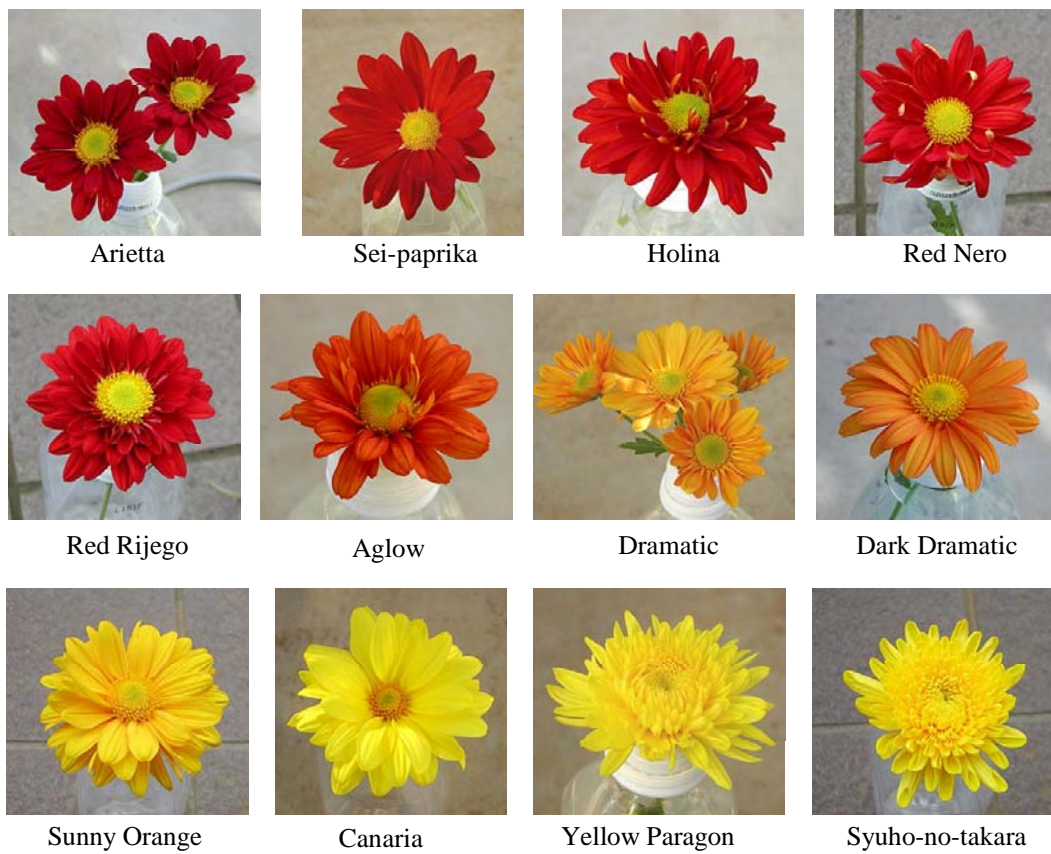


Figure 1-1. Flowers of chrysanthemum cultivars used for the experiment.

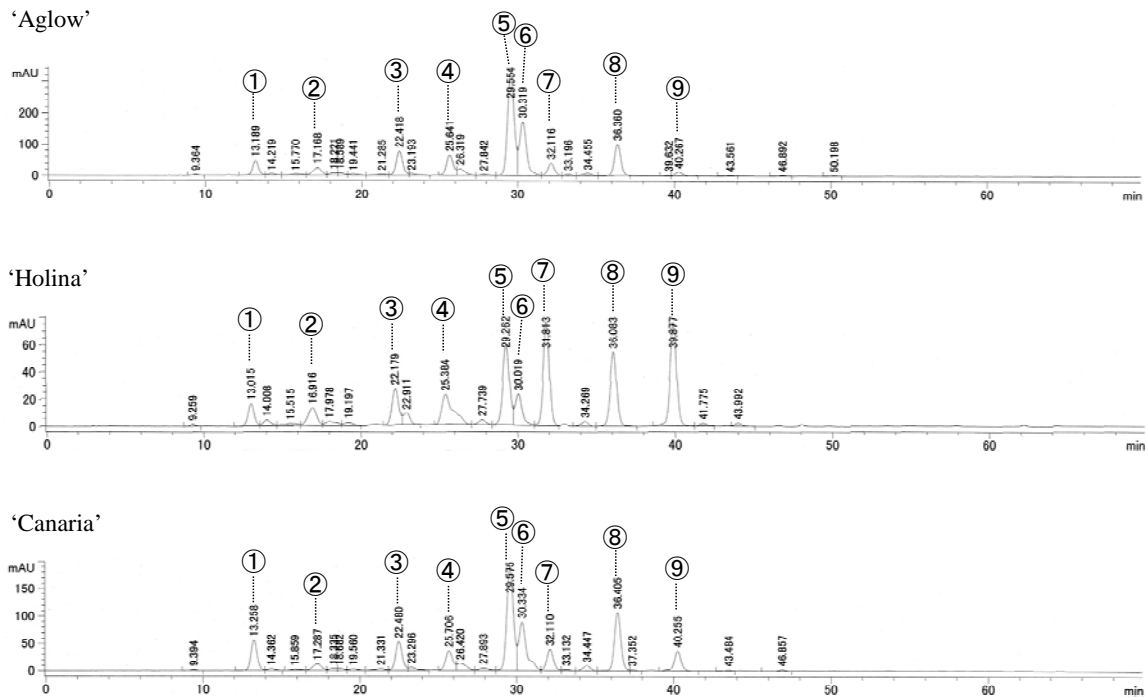


Figure 1-2. Carotenoid analysis in petals of chrysanthemum cultivars.  
Peak numbers as in Table 1-1.

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

Peak no.	R <sub>t</sub> (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 1-2 Standards used in this study.

Standards	R <sub>t</sub> (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	S426, 452, 478	428, 450, 478
β-Cryptoxanthin	49.5	S427, 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 1-3 Total carotenoid and anthocyanin contents, and chromaticity in petals of 12 chrysanthemum cultivars.

Cultivars	Total carotenoid content <sup>a</sup> ( $\mu$ g/g f. w.)	Total anthocyanin content <sup>b</sup> ( $\mu$ 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
Syuhono-chikara	307.5	1.5	87.5	-10.7	107.7

a: Lutein equivalent

b: Cyanidin 3-rutinoside equivalent

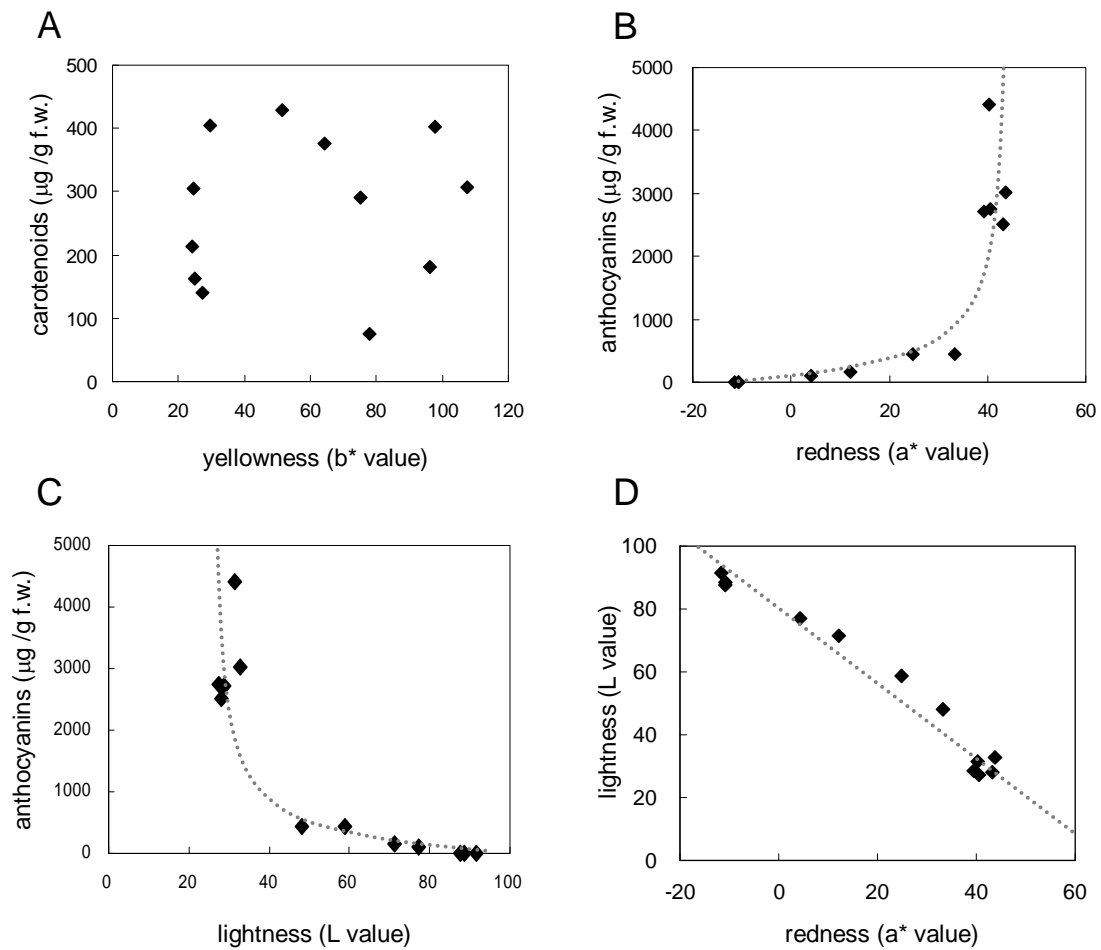


Figure 1-3. Correlation between total carotenoid and anthocyanin contents, and chromaticity in petals of 12 chrysanthemum cultivars. (A) Correlation between total carotenoid content and yellowness. (B) Correlation between total anthocyanin content and redness. (C) Correlation between total anthocyanin content and lightness. (D) Correlation between lightness and redness.



## 第2節 キク花卉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’花卉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。

### 材料および方法

#### 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卉を分析に供試した。

#### カロテノイドの抽出

花卉 100g に 30ml のアセトンを加えて磨砕した。これに 50ml 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。

#### 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、以下の条件で行った。

カラム: YMC Carotenoid (S 5  $\mu$  m, 250 $\times$ 20 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 : MeOH:H<sub>2</sub>O = 96 : 4

流速 10 ml/min, カラム温度 35 $^{\circ}$ 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 $\times$ 7.8 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 : hexane: Me<sub>2</sub>CO = 7 : 3

流速 2 ml/min

## カロテノイド成分の同定

カロテノイドの構造は UV-Vis,  $^1\text{H}$  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  $^{13}\text{C}$  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 alcohol を基質として質量分析装置 (JEOL, SX 102) で測定した。

### $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) および $^{13}\text{C}$ 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  $\text{CDCl}_3$  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。

## 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 (図 1-4, 表 1-4)。

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

化合物 **1** はピーク 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 (Britten 1995)。高分解能 FAB-MS 分析の結果、分子式は  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4$  であることが明らかになった。化合物 **1** の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル測定値の帰属は二次元 NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC および HMBC) スペクトル解析によって決定した (表 1-5)。その結果、2 つの 2 級水酸基 ( $\delta_{\text{C}}$  66.3,  $\delta_{\text{H}}$  3.97 および  $\delta_{\text{C}}$  65.9,  $\delta_{\text{H}}$  4.25) および 2 つの 3 級水酸基 ( $\delta_{\text{C}}$  79.4 and 76.3) の存在が示された。ルテインの  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  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- $\epsilon$ -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、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  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、 $\delta_c$  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、CH<sub>3</sub>-16, CH<sub>3</sub>-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、化合物は図 1-5 に示すような(3*S*,5*S*,6*R*)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(1998)によって化学合成された(3*S*,5*R*,6*R*)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。<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR のデータは化学合成された(3*S*,5*R*,6*S*), (3*S*,5*S*,6*S*) および (3*S*,5*S*,6*R*)配置を持つカロテノイドとは一致せず、Buchecker ら(1984) および Euguster (1985)によって報告された(3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*,6'*R*)-5,6-dihydro- $\beta,\epsilon$ -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(3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*,6'*R*)-5,6-dihydro- $\beta,\epsilon$ -carotene-3,5,6,3'-tetrol [(3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*,6'*R*)-5,6-dihydro-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 Euguster (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。

#### 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[9*Z*,13'*Z* (**2**, ピーク 2), 13*Z*,9'*Z* (**3**, ピーク 2), 9'*Z*,13'*Z* (**4**, ピーク 3), 9*Z*,13*Z* (**5**, ピーク 4), all-*E* (**6**, ピーク 5), 9*Z*,9'*Z* (**7**, ピーク 6), 9'*Z* (**8**, ピーク 9), and 9*Z* (**9**, ピーク 10)]を分離した(図 1-6)。これらのうち、5種の di-*Z* 体は新規カロテノイドであり、<sup>1</sup>H NMR スペクトル分析によって構造決定を行った。<sup>1</sup>H NMR シグナルは <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, NOESY および <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H decoupling 測定によって帰属を決定した。表 1-6 は all-*E* 体と di-*Z* 異性体のポリエーテル鎖部分の <sup>1</sup>H NMR シグナルを比較したものである。これらの立体配置は <sup>1</sup>H 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(表 1-6, 図 1-6)。例えば(9*Z*,13*Z*)-lutein-5,6-epoxide (**5**)の場合、H-7, H-8, H-11 および H-12 位の <sup>1</sup>H 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、9*Z*,13*Z* 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 9*Z*,13*Z* 立体配置と一致した結果を示し、化合物 **5** は(9*Z*,13*Z*)-lutein-5,6-epoxide であると決定した。(9*Z*,13'*Z*)- (**2**), (13*Z*,9'*Z*)- (**3**), (9'*Z*,13'*Z*)- (**4**) および (9*Z*,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。

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,  $^1\text{H NMR}$  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 (表 1-4, 図 1-4)。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卉中に存在することが報告されている。したがって、本解析ではキク花卉に存在する9種のカロテノイドを新たに同定した。

## 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(Buchecker ら 1984, Eugster 1985; 図 1-5)。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、キク花卉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** がキク花卉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 (図 1-5)。

本調査でキク花卉から検出されたカロテノイドは(9Z)-violaxanthin を除き、すべて $\beta,\epsilon$ -carotene ( $\alpha$ -carotene)誘導体であった。現在までに花卉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*; Bakó ら, 2002), ヒマワリ2種 (*Helianthus annuus*; Tóth・Szabolcs 1981; Deli ら 1988, *Helianthus debilis*; Tóth・Szabolcs 1981) およびマリーゴールド (*Tagetes electa*; 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、花卉におけるカロテノイド中の $\alpha$ -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 $\alpha$ -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、キク花卉からは8種の lutein-5,6-epoxide の立体異性体 (図 1-6), 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。

## 要約

キク花弁に含まれるカロテノイド成分から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,13'Z)-, (13Z,9'Z)-, (9'Z,13'Z)-, (9Z,13Z)-および (9Z,9'Z)-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 $\beta$ -carotene 誘導体である 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 $\alpha$ -carotene 誘導体であった。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。

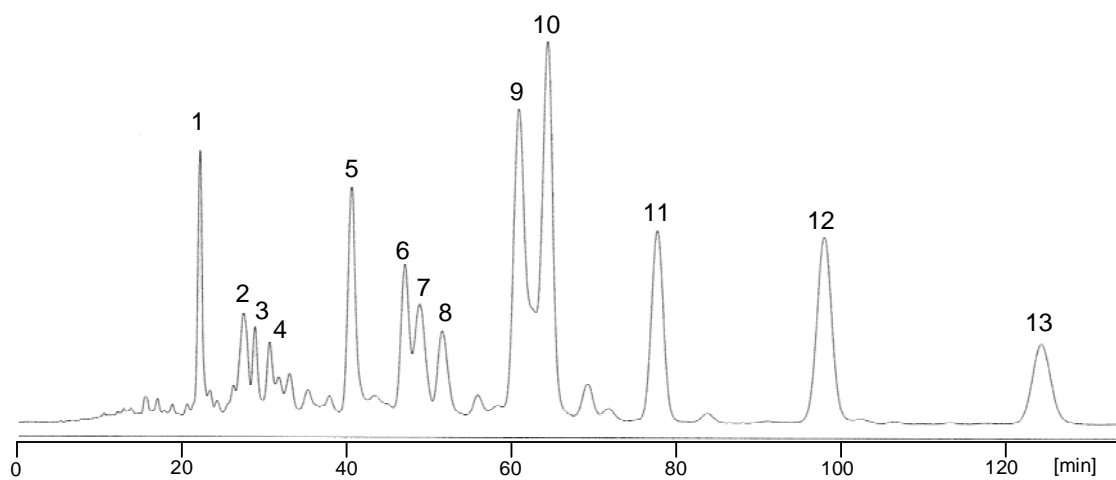


Figure 1-4. HPLC separation of carotenoids of an extract of chrysanthemum petals (cv. 'Sunny Orange'). Peak numbers as in Table 1-4.

Table 1-4. Carotenoid composition in petals of chrysanthemum (cv. 'Sunny Orange').

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

Table 1-5. <sup>1</sup>H (500 MHz) and <sup>13</sup>C (125 MHz) NMR data for **1** in CDCl<sub>3</sub>.

Position	δ <sub>C</sub> (mult.)	δ <sub>H</sub> (mult., J <sub>HZ</sub> )	Position	δ <sub>C</sub> (mult.)	δ <sub>H</sub> (mult., J <sub>HZ</sub> )
1	38.7 ( <i>s</i> )		1'	34.0 ( <i>s</i> )	
2	45.2 ( <i>t</i> )	α1.61 ( <i>dd</i> ) <sup>b</sup> β1.83 ( <i>dd</i> , 13.5, 6)	2'	44.6 ( <i>t</i> )	α1.37 ( <i>dd</i> , 13, 7) β1.85 ( <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> ) <sup>a</sup>	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> ) <sup>a</sup>	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> )

<sup>a</sup> Assignments may be interchanged.<sup>b</sup> Signal overlapped.



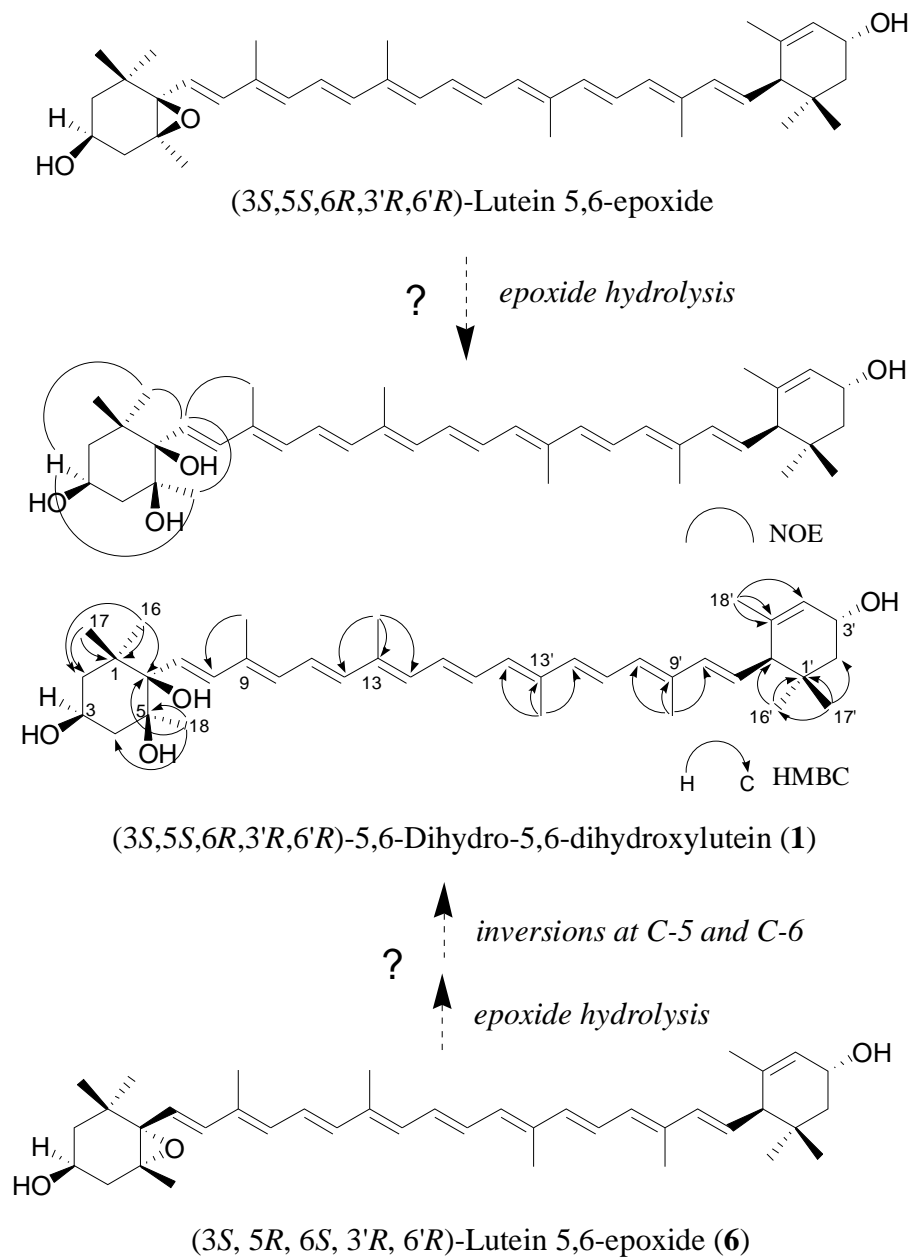


Figure 1-5. Structures of (3*S*, 5*S*, 6*R*, 3'*R*, 6'*R*)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein (**1**) and putative biosynthetic pathway of **1**.

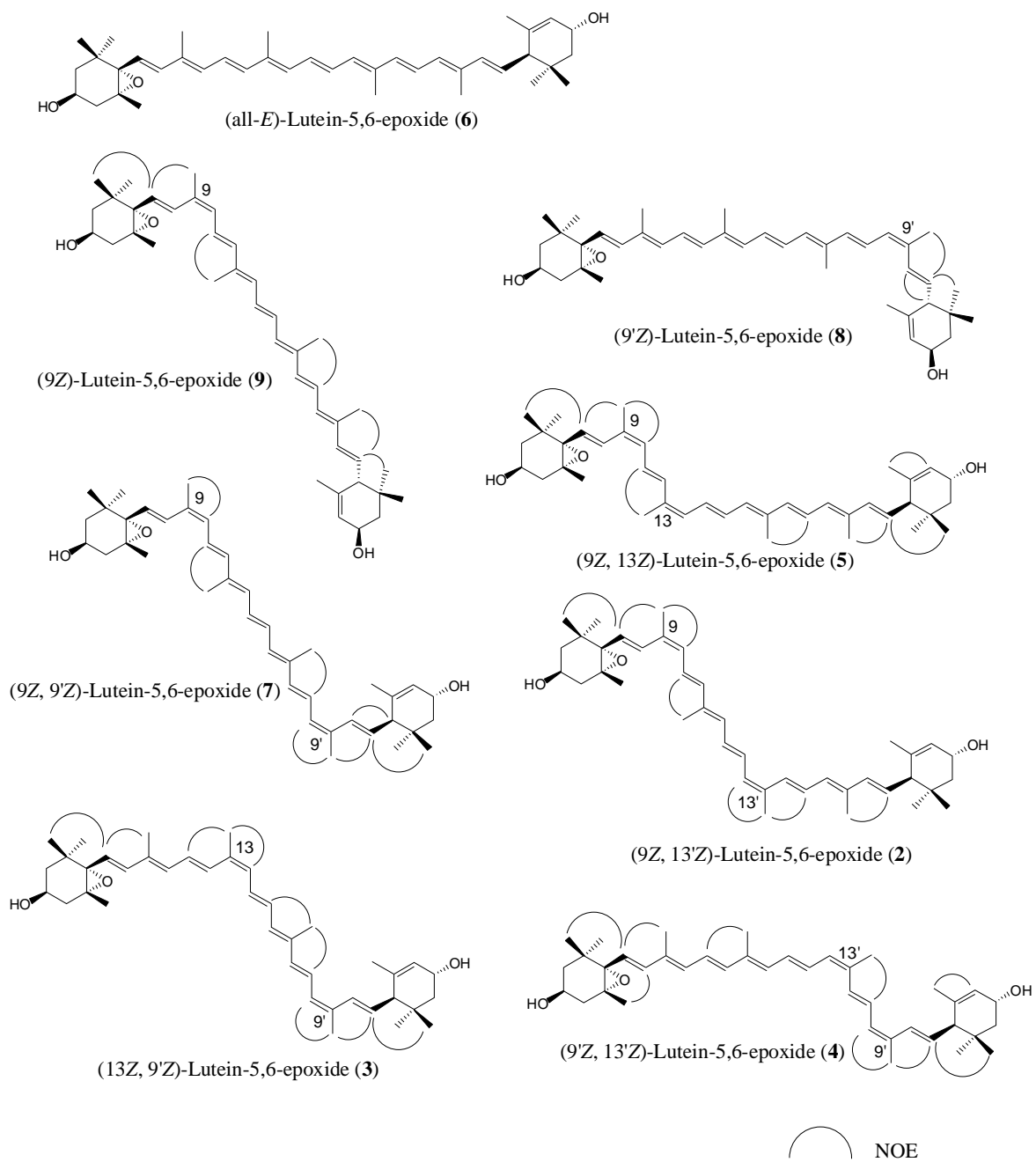


Figure 1-6. Structures of eight geometrical isomers of lutein-5,6-epoxide identified in this study.

Table 1-6. <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data relevant to the polyene part of (all-*E*)- and (di-*Z*)-lutein-5,6-epoxide in CDCl<sub>3</sub>.

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	δ	Δδ <sup>a</sup>	δ	Δδ	δ	Δδ	δ	Δδ	δ	Δδ	
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	

<sup>a</sup> Isomerization shift ( $\Delta\delta = \delta_Z - \delta_E$ ,  $|\Delta\delta| > 0.02$  ppm)

## 第2章 キク花卉および葉におけるカロテノイド蓄積の調節機構の解明

### 緒言

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, Guiliano ら 1993, Fraser ら 1994)、トウガラシでは GGPS (geranylgeranyl pyrophosphate synthase)、PSY および PDS である (Huguency 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. キク花卉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). 服部(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, キク花卉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卉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, キク花卉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行い, 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.

### 材料および方法

#### 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(図2-1). ‘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

ダマールブル' は 'ホワイトマールブル' の枝変わり品種である。花卉は発達段階別に 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 は花卉長 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。

#### カロテノイド成分の分析

花卉および葉の各段階のサンプル 0.5g に 3ml のアセトンを加えて磨砕した。これに 5ml 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  $\mu$  m, 250 $\times$ 4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Buthyl methyl ether (MTBE): H<sub>2</sub>O = 95:1:4,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: H<sub>2</sub>O = 25:71:4

0 分 A 100%/ B 0%, 1 2 分 A 100%/ B 0%, 9 6 分 A 0%/ B 100%

流速 1 ml/min, カラム温度 35 $^{\circ}$ C

#### Poly(A)<sup>+</sup> 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)<sup>+</sup> 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)<sup>+</sup> RNA から合成を行った。

#### 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] ; 図 2 - 2) の保存領域の配列からディジェネレートプライマーを作成し, RT-PCR で増幅を行った. 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. 予想される長さとも一致する 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.

#### 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)<sup>+</sup> 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)<sup>+</sup> 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.

#### ノーザン分析による遺伝子の発現解析

抽出した poly(A)<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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). プローブを増幅するためのプライマーは以下の通りである.

*DXS* : 5'-ATGGAGCGATGACCGCAGGACAAG-3' および 5'-GCGGGTAACCTTTGC-

CTTTTTCGGT-3' , *DXR* : 5'-TGTC AAGATTCTTCCTGCTGATTCA-3' および 5'-TGTGTCTCGACCATGGAATGTAGT-3' , *IPI* : 5'-ACGAGTTACTTCTTCAGCAACGGT-3' および 5'-ATCAGATGGAGCCTTGTAGAGCAT-3' , *GGPS* : 5'-GAGATGATTCACACCATGTCGYTAATGC-3' および 5'-CATCAAGAATATCATCCACCACCTGAAA-3' , *PSY* : 5'-CTAATGACACCCGAGMGACAA-3' および 5'-AGTATCTGATAAAGCGGCATC-3' , *PDS* : 5'-GCAAGGAATACCGGATAGAGTTAC-3' および 5'-GAATGTCAACTGGAGCAGCGAATAC-3' , *ZDS* : 5'-TGACTGTGCAACTTCGGTACAATG-3' および 5'-AAACCTGTTCTGTAACCCGTCTTAT-3' , *CRTISO* : 5'-CGATAACGGGAAAGCTGTAGGAGTGAA-3' および 5'-GGCTCCTCTAAGTTTTTCCAATCATCCTC-3' , *LCYB* : 5'-TGTATATCAAATGGGGTTAAGTTTC-3' および 5'-TGAATTCCTTTCCTTTATTTCCGGTA-3' , *LCYE* : 5'-GCTTGAATGTCGCACTTATCG-3' および 5'-GATATTGCC-TTCACACTCTATGA-3' , *CHYB* : 5'-CGGAACGATTTACTTATCTTGTT-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'-CCAGTCATCTTGGTAGTGAAG-3' , *actin* , : 5'-CTTGCGTTTGGATCTTGCTGGTCGTGA-3' および 5'-AGCAGCTTCCATCCCAATCATAGACGG-3' .

#### 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)<sup>+</sup> RNA から SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen)を用いて鋳型となる 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'-CTTAATTGCTGGCGGTCCCT-3' および 5'-CCTCCTGATGCGGTCAAGAT-3'; *PSY*, 5'-GCTTTGGCTTTAGGAATCGC-3' および 5'-TCTGATAGTCCGGCTTGTGC -3'; *LCYB*, 5'-AGAGCTTGTACCCGAAATCA-3' および 5'-CTACAGCTAAACCCGAAGGA-3'; *LCYE*, 5'-GGAGCGGCTTCGGGTAAACTTCTGCAA-3' および 5'-CTCTCTTGAAGCCAGACAGGTTTCCTC-3'; *actin*, 5'-ACATGCTATCTTGCGTTTGG-3' および 5'-CTCTCACAATTTCCCGTTCA-3'. 各サ



サンプルの Actin 量はそれぞれのサンプルの poly(A)<sup>+</sup> 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。

## 結果

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。

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’ 花卉の発達 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図 2-3 および 2-4 に示した。黄色品種である ‘イエローパラゴン’ の花卉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  $\beta$ -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  $\beta$ -carotene は消失し, lutein のみになった。M ステージでは lutein に加え, (3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*,6'*R*)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein, lutein の *cis* 体((9*Z*)-lutein, (9'*Z*)-lutein) および エポキシ化 lutein ((9*Z*)-lutein-5,6-epoxide, (9'*Z*)-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 (9'*Z*)-lutein の割合は減少したが, 一方, (9*Z*)-lutein と (9'*Z*)-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’ 花卉においても, VE ステージでは ‘イエローパラゴン’ 同様に lutein, violaxanthin, および  $\beta$ -carotene が検出された。しかしこれらは花卉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図2-3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,  $\beta$ -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(3*S*,5*S*,6*R*,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(9'*Z*)-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 $\beta$ , $\epsilon$ -carotenoid 類であったが、葉では43%であり、 $\beta$ , $\beta$ -carotenoid 類が $\beta$ , $\epsilon$ -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(図2-4)。

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

図2-5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  $\mu$ g の poly(A)<sup>+</sup> RNA 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)<sup>+</sup> RNA を4  $\mu$ 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った。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った。

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図2-6に示した。ほとんどの遺伝子の発現量に品種間差が見られたが、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。

#### 花卉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卉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 (図 2-6)。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 (図 2-7)。その結果、黄色花卉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。

葉は花卉と異なり、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* は花卉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。

#### 考察

##### 花卉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、花卉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 (図 2-3)。

カロテノイド生合成経路はリコペンから先 $\beta$ , $\beta$ -carotenoid 経路と $\beta$ , $\epsilon$ -carotenoid 経路に大きく分かれる (図 2-2)。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 $\beta$ -サイクレーズならびにリコペン $\epsilon$ -サイクレーズの機能を解析した。その結果、リコペン $\beta$ -サイクレーズは *lycopene* の両端に $\beta$ 環を導入し、 $\beta$ -carotene に変換することができるが、リコペン $\epsilon$ -サイクレーズ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 $\gamma$ -carotene や $\epsilon$ -carotene を基質として利用できないと報告している。従って、 $\alpha$ -carotene が生合成されるためには、まず *lycopene* がリコペン $\epsilon$ -サイクレーズに触媒されて $\epsilon$ 環が片側に付与された後、リコペン $\beta$ -サイクレーズによって残りの末端に $\beta$ 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 $\alpha$ -carotene に変換されるのか、あるいは $\beta$ -carotene に変換されるのかはまず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 らは、カロテノイドが $\beta$ , $\beta$ -carotenoid 経路と $\beta$ , $\epsilon$ -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 $\beta$ -サイクレーズと $\epsilon$ -サイクレーズ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、 $\beta,\epsilon$ -carotenoid 類がカロテノイドの大部分を占める花卉では *LCYE* の発現が *LCYB* の発現よりはるかに高かったが、一方、 $\beta,\beta$ -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。

#### 花卉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 (図 2-3)。*‘イエローパラゴン’* の花弁では、VE ステージでは  $\beta$ -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卉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った。エポキシ化および異性化は花卉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、(3*S*,5*S*,6*R*,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 (9'*Z*)-lutein を除き、ほとんど葉では検出されなかった。このことから、これらのカロテノイドの合成反応は花卉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っていない。

近年、 $\beta$ -carotene から (9*Z*)-violaxanthin もしくは (9'*Z*)-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った (Taylor・Ramsay, 2005)。一方、 $\alpha$ -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  $\epsilon$ -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、 $\beta$ -ring hydroxylase (CHYB) とは異なる起源を持つということが明らかになった (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 (図 2-6)。

近年の研究の結果、花卉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ってきた (Deli ら 1998, Molnár ら 1986)。しかしながら、花卉でカロテノイドがシス構造を取るこの意味は明らかになっていない。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ってきた。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

は検出されなかった (図 2-3). 従って, 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卉にのみ存在する可能性がある.

花卉の発達に伴う黄色品種および白品種の花卉におけるカロテノイド蓄積量の変動

‘イエローパラゴン’ 花卉では発達に伴い, カロテノイド含量が大きく増加する (図 2-3, 2-4). 調査を行っ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’ の花卉の発達に伴っ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 (図 2-4, 2-5). 一方, 白色品種ではカロテノイド量は次第に減少した (図 2-3, 2-4). 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  $\beta$ -carotene を含んでいた. これは, 白色花卉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卉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, 白色花卉を持つアサガオ (*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っている. 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卉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った.

このパラゴンにおける花卉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が考えられる. 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っており, 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 (Huguency ら 1996). パラゴン花卉においては, 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 (図 2-4, 2-5). *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、花卉の発達に伴う *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(図2-6)．‘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、白色花卉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、現在の栽培ギ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、花卉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ことが多いことから(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。服部(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服部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。

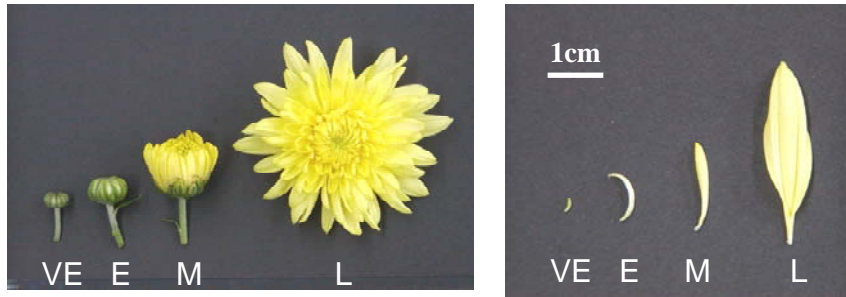
以上のことから、マリーゴールドの淡黄色花弁とキクの白色花弁は異なったメカニズムで発現する形質であり、キクの白色花色を決定する要因はカロテノイド生合成系酵素遺伝子の転写制御ではなく、カロテノイド蓄積を抑制する単一の優性遺伝子の存在であると結論付けた。

## 要約

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 $\beta,\epsilon$ -carotenoid 類であったが、葉では 43%であり、 $\beta,\beta$ -carotenoid 類が $\beta,\epsilon$ -carotenoid 類よりも高い割合で含まれていた。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* の発現量より多く、このことが葉と花弁の $\beta,\beta$ -carotenoid 類と $\beta,\epsilon$ -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’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* だけでなくその他の酵素遺伝子も‘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差では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。

A



B

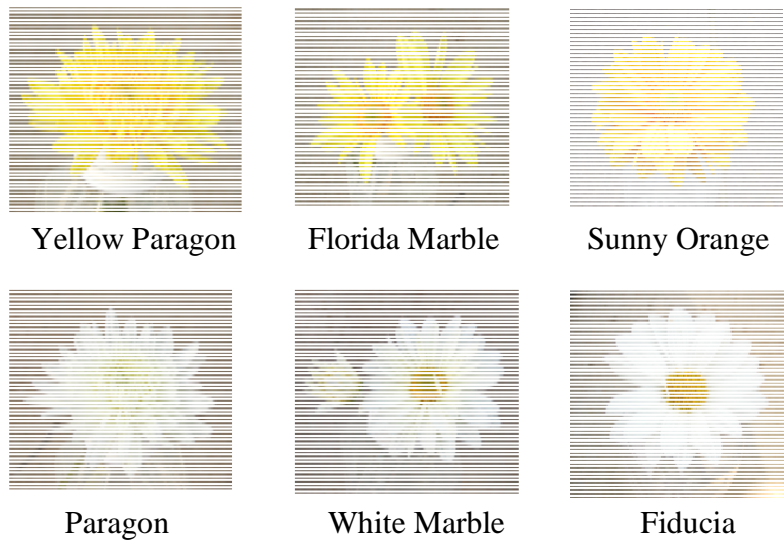


Figure 2-1. (A) Sampling stages of chrysanthemum petal development and (B) fully expanded flowers of chrysanthemum cultivars used for the experiment. VE = very early, E = early, M = medium, and L = late.



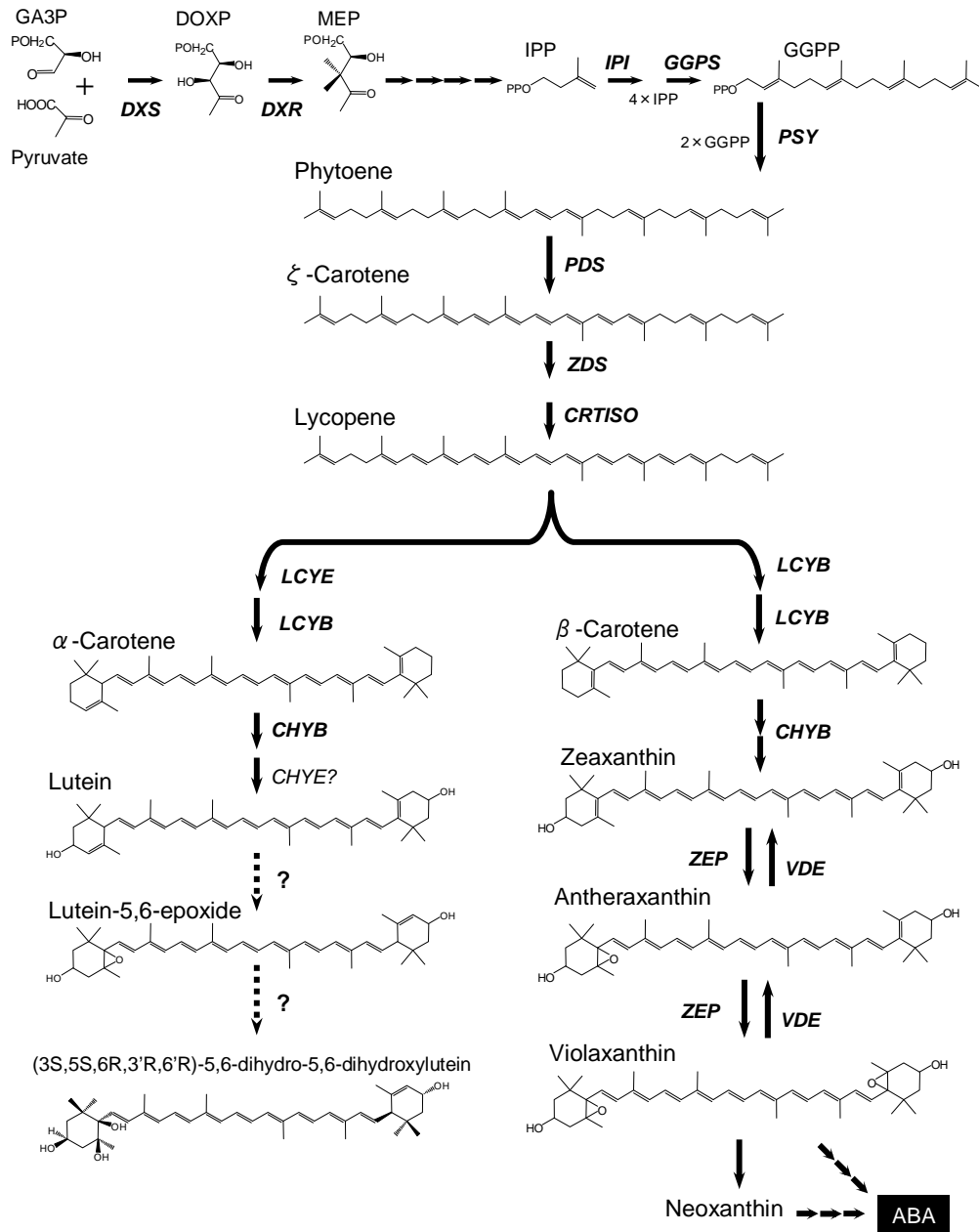
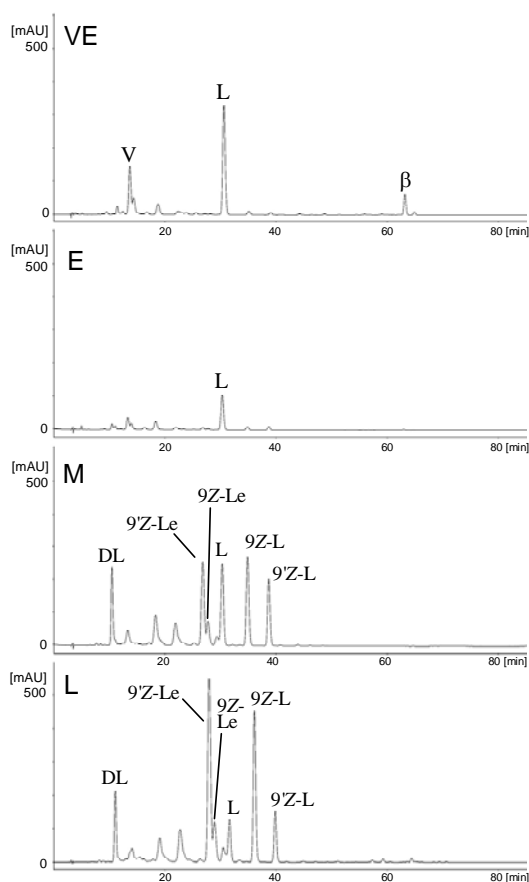


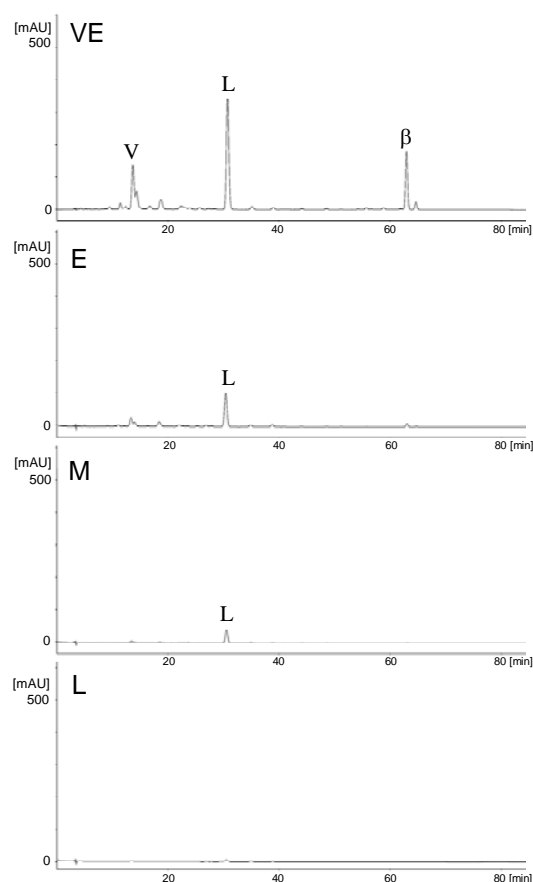
Figure 2-2. Putative carotenoid biosynthetic pathway in petals of chrysanthemum.

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.

### A. Yellow Paragon, petal



### B. Paragon, petal



### C. Yellow Paragon, leaf

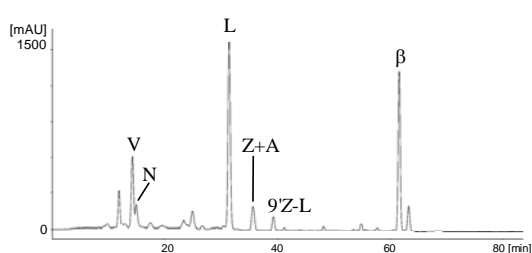


Figure 2-3. Carotenoid analysis in petals and leaves of Yellow Paragon and Paragon. Carotenoid extracts from 0.1 g f.w. of petals of (A) Yellow Paragon and (B) Paragon, and (C) leaves of Yellow Paragon were analyzed by HPLC.

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.

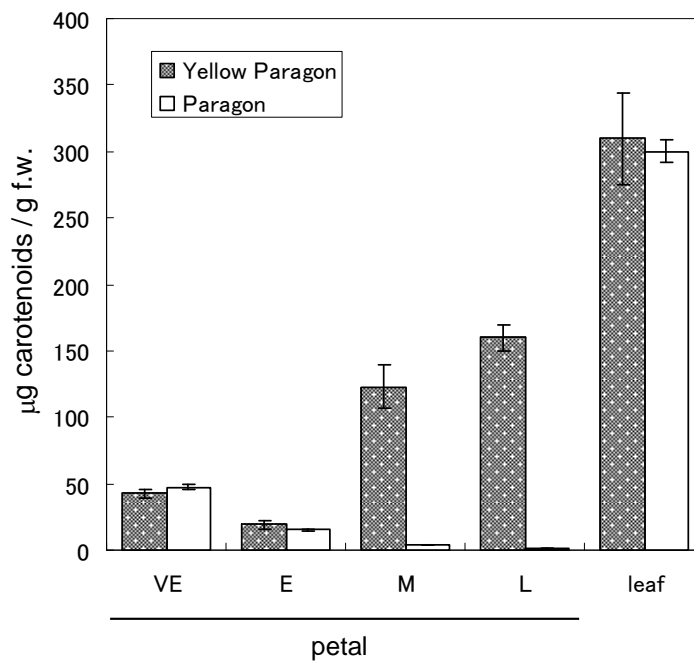


Figure 2-4. Total carotenoid contents in petals and leaves of Yellow Paragon and Paragon. Measurements were performed in triplicate, and the mean values  $\pm$  SE are shown.

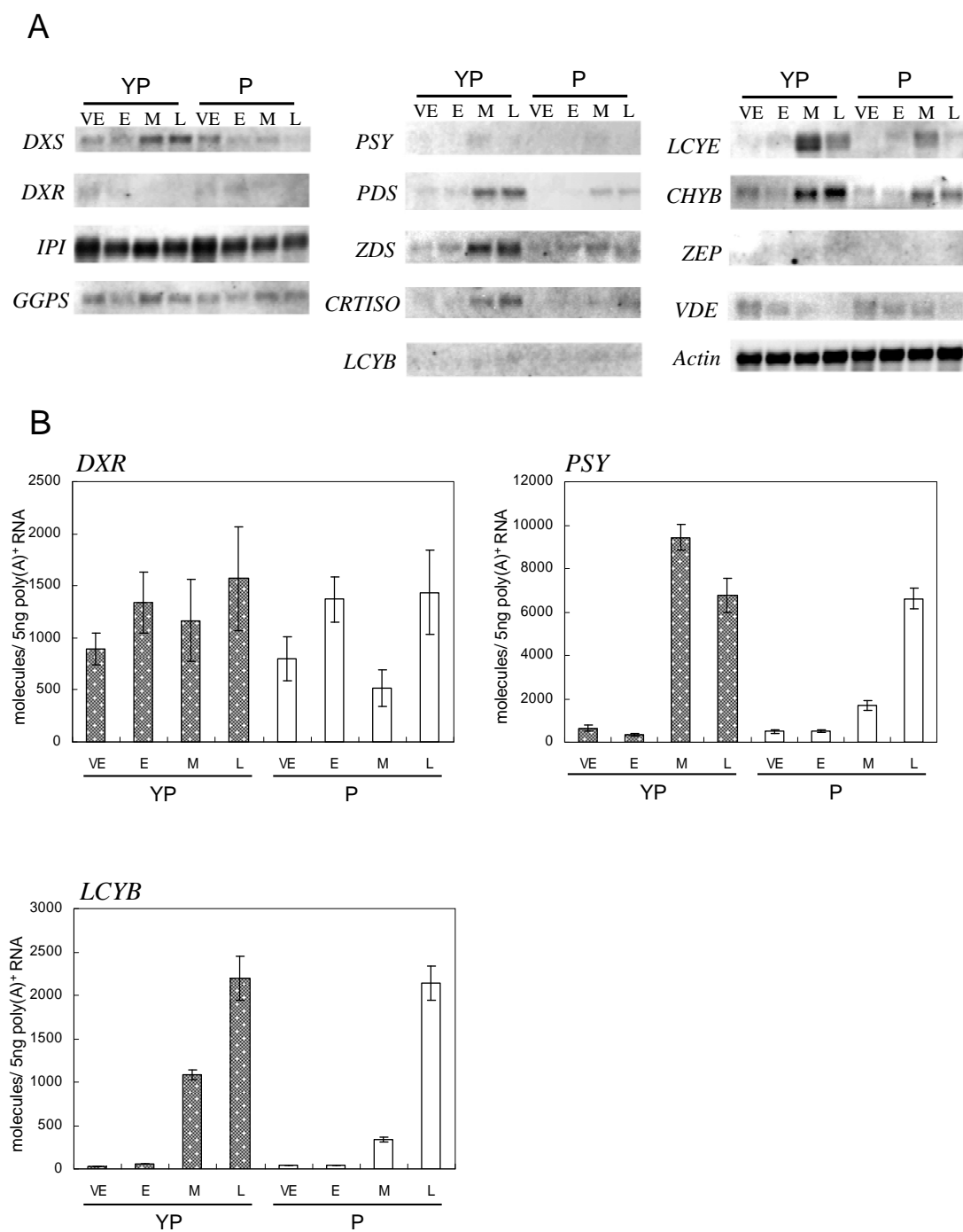


Figure 2-5. Analysis of the expression of genes for isoprenoid and carotenoid biosynthesis during petal development of Yellow Paragon and Paragon. (A) Northern analysis. 2  $\mu\text{g}$  of poly(A)<sup>+</sup> RNA per lane was loaded for *DXS*, *IPI*, *GGPS*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCYE*, *CHYB*, *ZEP*, *VDE*, and *Actin*. 4  $\mu\text{g}$  of poly(A)<sup>+</sup> 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.

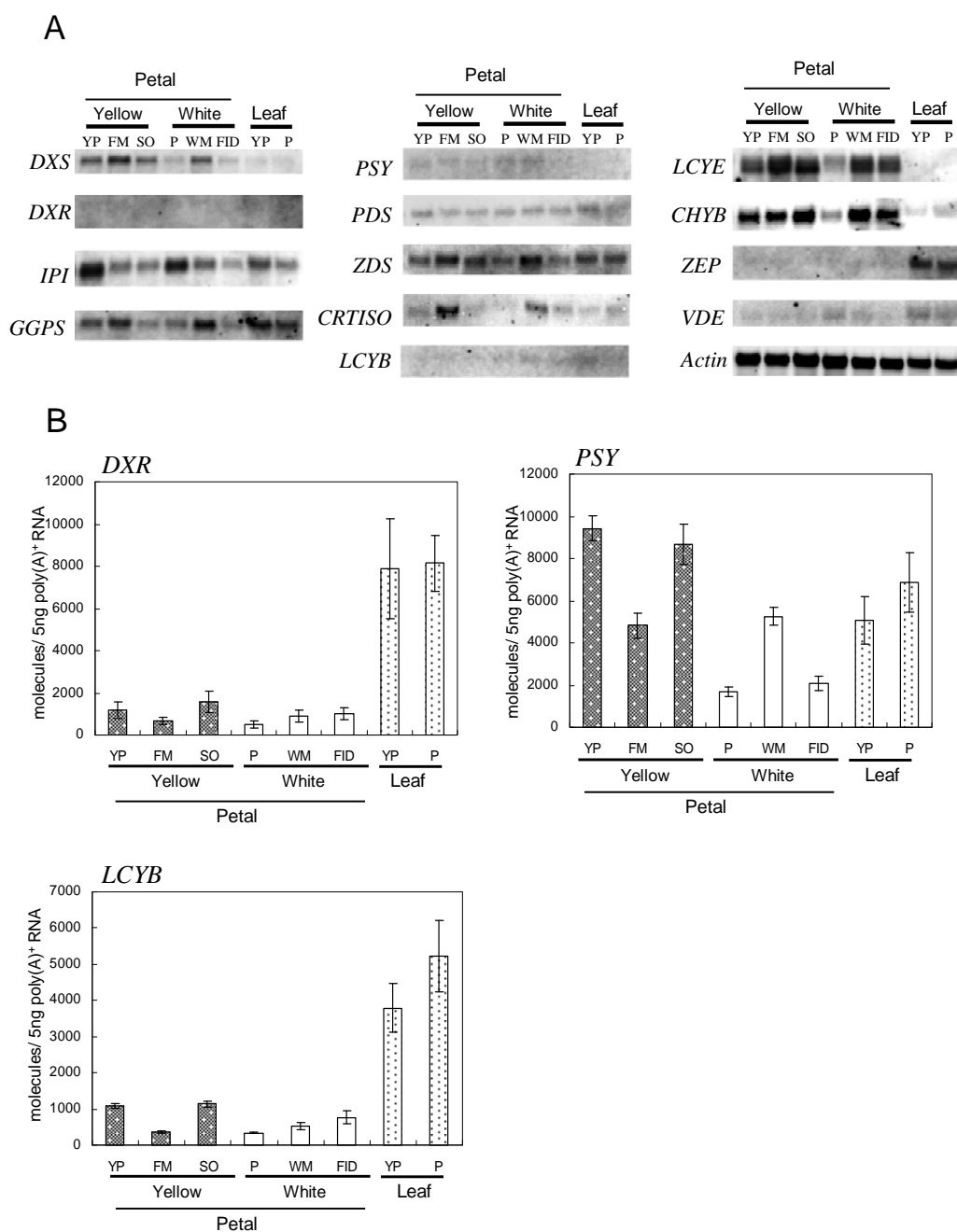


Figure 2-6. Analysis of the expression of genes for isoprenoid and carotenoid biosynthesis in flowers and leaves of yellow- and white-flowered cultivars. Petals at stage M and leaves at stage L were used for the analysis. (A) Northern analysis. 2  $\mu\text{g}$  of poly(A)<sup>+</sup> RNA per lane was loaded for *DXS*, *IPI*, *GGPS*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCYE*, *CHYB*, *ZEP*, *VDE*, and *Actin*. 4  $\mu\text{g}$  of poly(A)<sup>+</sup> 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.

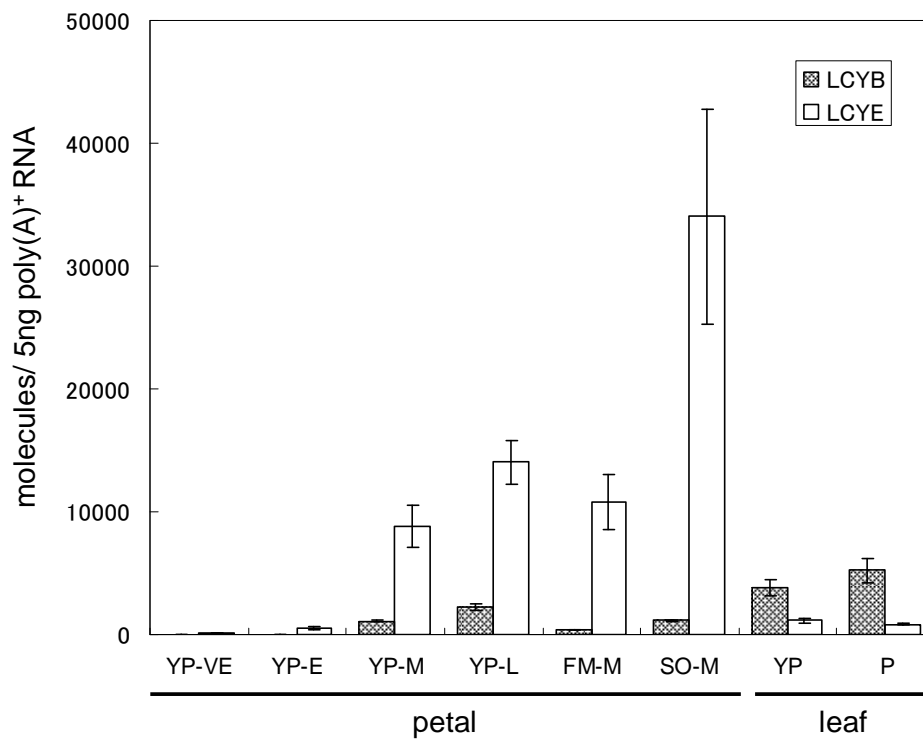


Figure 2-7. Quantitative real-time PCR of *LCYB* and *LCYE* genes in petals of yellow-flowered cultivars and leaves of Yellow Paragon and Paragon. Real-time PCR was performed in triplicate, and the mean values  $\pm$  SE are shown.

## 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, 2001) 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  $\beta$ -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。

### 材料および方法

#### 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.

#### 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.

#### 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'-CCATCCCATTTC AACATCAACCA-3' および 5'-ATTAGCTTTTTTCAGCCATTTTCTTT-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)<sup>+</sup> 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.

#### 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 (図 2-8). そこで, 'パラゴン' 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 (図 2-9). 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 (図 2-10).



## 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、*CmCCDI* 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 *CmCCDI* 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 *CmCCDI* 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 *CmCCDI* 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 *CmCCDI* 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 *CmCCDI* が発現しているのではないかと推測される。

また、*CmCCDI* 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。*CmCCDI* 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。

## 要約

‘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。

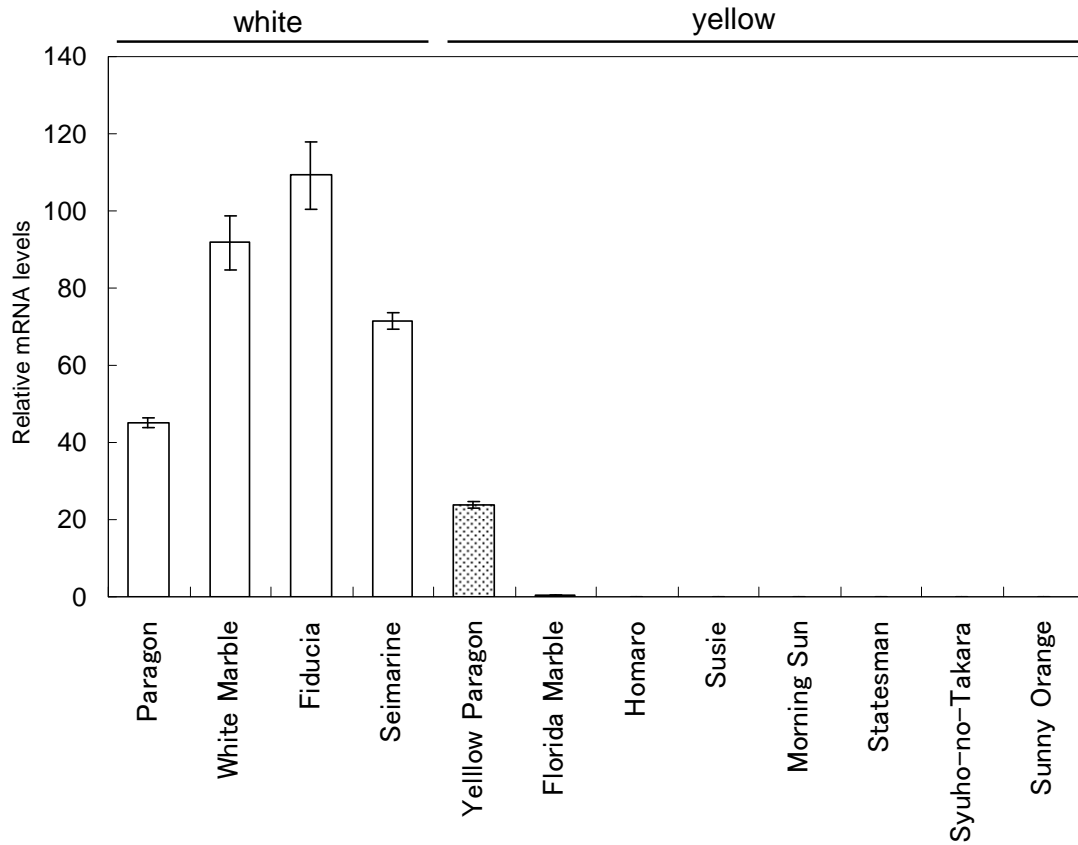


Figure 2-8. Real-time PCR analysis of a clone (*CmCCDI*) whose expression was higher in white petals than in yellow petals. Real-time PCR was performed in triplicate, and the mean values  $\pm$ SE are shown.

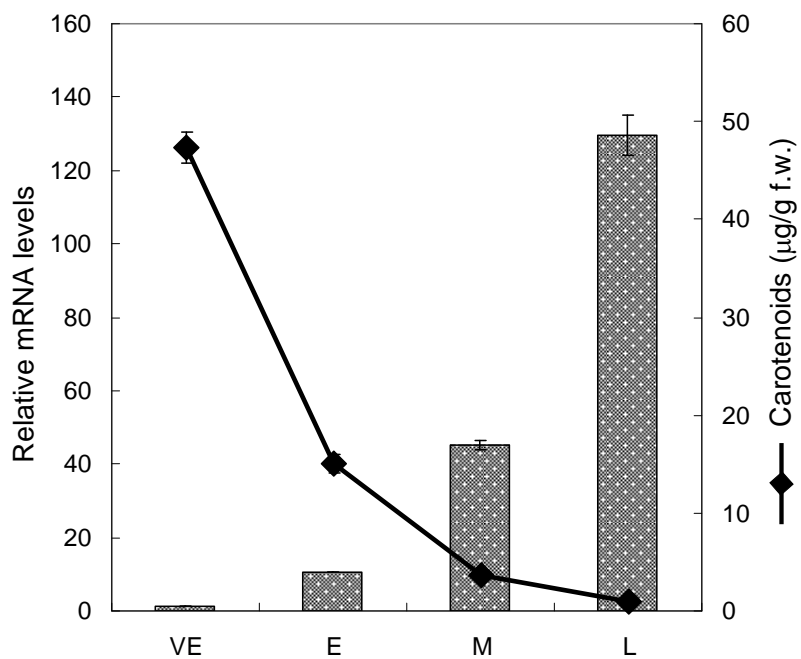


Figure 2-9. Changes in the level of carotenoids and *CmCCD1* transcripts during flower petal development of Paragon. Real-time PCR and total carotenoid quantitation was performed in triplicate, and the mean values  $\pm$ SE are shown.

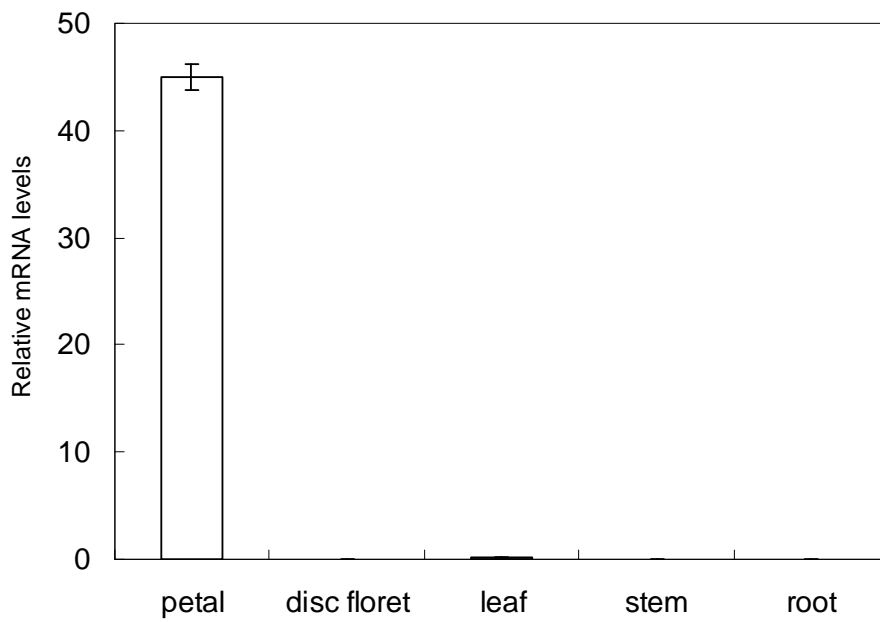


Figure 2-10. Expression of *CmCCDI* in different tissues of Paragon. Real-time PCR was performed in triplicate, and the mean values  $\pm$ SE are shown.

### 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

#### 緒言

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不向きである。

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・質的關係を解析し、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の重要な知見となる。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。

## 材料及び方法

### 材料

キク科植物 9 種 38 品種（オステオスペルマム，ガザニア，ガーベラ，キバナコスモス，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卉を材料とした（図 3-1）。

### 花卉の色調の測定

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

### カロテノイド成分の抽出

0.5g の花卉に 3ml のアセトンを加えて磨砕した。これに 5ml 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をカロテノイド溶液とした。

### 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 1cm 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 : Britten ら 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  $\mu\text{g/ml}$ （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 1 ml 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。

### 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，以下のような条件で用いた。

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Buthyl methyl ether (MTBE): H<sub>2</sub>O = 95:1:4,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: H<sub>2</sub>O = 25:71:4

0分 A 100%/ B 0%, 1 2分 A 100%/ B 0%, 9 6分 A 0%/ B 100%

流速 1ml/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 450nm の場合のピーク面積値から算出した。

#### 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品の 530nm における吸光度およびルテオリン標品の 340nm における吸光度から検量線を作成した。0.5g の花卉を 1%塩酸メタノールで磨砕し、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。花卉抽出液の 500nm 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 340nm 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。

## 結果

### 花卉の色度測定

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、花卉の色調の 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（表 3-1, 図 3-2）。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。

### 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 340nm 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、キバナコスモス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、その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（表3-1）。

#### カロテノイド類の定量

花卉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（表3-1）。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小さく、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。

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、30~3000 µg/g f.w.の間では濃度が濃いものほど a\*値が上昇した（図3-3）。

#### 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図3-4に示した。その結果、ガザニアとキンセンカ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（表3-2）。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 Rt, 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。これらの種のカロテノイド成分の割合を表3-2に示した。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。

## 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、キバナコスモス、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(図3-2)。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)、紫がかった赤色を示す色素である。一方、アントシアニンとカロテノイドの重なりによって橙色を作り出しているにもかかわらず鮮明な花色であったキバナコスモスのアントシアニンは480 nm付近に吸収極大値があり、朱赤色に近い。今回、これらのアントシアニン成分の同定は行わなかったが、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った。

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った。カロテノイド量が増加すると赤みが増えて橙色に近づくということは図3-3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った。

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つの要素が花卉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。キク花卉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卉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。

## 要約

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

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。調査を行ったキク科植物 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。

*Calendula officinalis*



Alice Orange    Alice Yellow



Orange Star    Gold Star



Orange Zem    Golden Zem

*Cosmos sulphureus*



Cosmic Orange    Cosmic Yellow



Road Orange    Road Yellow

*Gerbera*



Orphe



Dancer



Labyrinth



Lambada



Illusion



Esprit



Segá



Fresbee

*Gazania*



Daybreak Orange    Daybreak Yellow

*Helianthus annuus*



Sunrich Orange    Sunrich Lemon



Sonia



Valentine

*Osteospermum*



Jury    Mikey

*Tagetes erecta*



Orange Isis    Yellow Isis

*Tagetes petula*



Safari Tangerine    Safari Yellow



Bonanza Orange    Bonanza Yellow

*Zinnia elegans*



Dreamland Coral    Dreamland Yellow



Bonita Red    Bonita Yellow

Figure 3-1. Fully-opened flowers of orange- and yellow-flowered cultivars of Compositae plants.

Table 3-1. Chromaticity, total anthocyanin content, and total carotenoid content in petals of orange- and yellow-flowered cultivars of 9 Compositae species.

Species	Cultivar	Chromaticity			Total anthocyanins ( $\mu\text{g/g}$ f.w.)	Total carotenoids ( $\mu\text{g/g}$ f.w.)
		L	a*	b*		
<i>Calendula officinalis</i>	Alice Orange	65.88 $\pm$ 1.68	29.79 $\pm$ 2.58	103.78 $\pm$ 1.81	2.24	3431
	Orange Star	75.23 $\pm$ 1.12	29.72 $\pm$ 2.04	102.08 $\pm$ 2.73	2.96	2776
	Orange Zem	75.94 $\pm$ 0.93	31.47 $\pm$ 1.88	106.09 $\pm$ 3.61	2.06	1632
	Alice Yellow	88.14 $\pm$ 0.34	-4.68 $\pm$ 2.16	117.37 $\pm$ 2.86	17.76	1936
	Gold Star	87.73 $\pm$ 0.24	-5.51 $\pm$ 1.45	113.41 $\pm$ 0.35	1.88	1463
	Golden Zem	89.64 $\pm$ 0.65	-10.77 $\pm$ 0.12	110.67 $\pm$ 0.66	2.60	1571
<i>Cosmos sulphureus</i>	Cosmic Orange	70.84 $\pm$ 0.81	38.03 $\pm$ 0.69	117.43 $\pm$ 1.12	91.77	1488
	Road Orange	73.88 $\pm$ 0.04	31.14 $\pm$ 0.67	121.52 $\pm$ 0.13	45.92	692
	Cosmic Yellow	80.09 $\pm$ 0.24	13.28 $\pm$ 0.13	129.86 $\pm$ 0.56	3.32	914
	Road Yellow	80.72 $\pm$ 0.23	9.78 $\pm$ 0.37	129.17 $\pm$ 0.02	4.04	653
<i>Gerbera</i>	Orphe	53.41 $\pm$ 1.11	62.65 $\pm$ 1.00	53.10 $\pm$ 0.50	406.06	164
	Dancer	63.08 $\pm$ 0.87	50.14 $\pm$ 1.45	40.21 $\pm$ 0.52	446.79	107
	Labyrinth	73.34 $\pm$ 0.41	28.26 $\pm$ 1.35	85.90 $\pm$ 0.76	138.19	422
	Lambada	52.35 $\pm$ 1.06	64.64 $\pm$ 0.81	62.19 $\pm$ 0.94	471.77	253
	Illusion	84.12 $\pm$ 0.34	2.45 $\pm$ 0.53	85.71 $\pm$ 1.15	4.22	220
	Esprit	86.38 $\pm$ 0.55	-4.30 $\pm$ 0.54	101.39 $\pm$ 0.57	2.78	259
	Sega	92.62 $\pm$ 0.17	-13.01 $\pm$ 0.46	53.70 $\pm$ 1.40	17.22	30
	Fresbee	87.27 $\pm$ 1.45	-5.80 $\pm$ 0.26	104.19 $\pm$ 2.04	2.42	205
<i>Gazania</i>	Daybreak Orange	74.41 $\pm$ 1.14	23.75 $\pm$ 2.62	110.79 $\pm$ 1.26	100.07	3083
	Daybreak Yellow	79.19 $\pm$ 0.51	8.90 $\pm$ 0.74	122.20 $\pm$ 2.24	9.10	2613
<i>Helianthus annuus</i>	Sunrich Orange	78.73 $\pm$ 0.53	14.37 $\pm$ 0.58	122.66 $\pm$ 2.88	4.77	1853
	Sonia	75.16 $\pm$ 0.70	20.93 $\pm$ 0.64	113.56 $\pm$ 0.97	4.77	2430
	Sunrich Lemon	86.42 $\pm$ 0.44	-4.53 $\pm$ 0.76	106.17 $\pm$ 2.49	7.22	999
	Valentine	88.40 $\pm$ 0.69	-13.49 $\pm$ 0.43	67.68 $\pm$ 3.48	3.68	535
<i>Osteospermum</i>	Jury	78.01 $\pm$ 0.52	23.89 $\pm$ 0.99	67.59 $\pm$ 1.60	13.79	320
	Mikey	88.04 $\pm$ 0.19	-2.29 $\pm$ 0.39	74.89 $\pm$ 1.16	7.29	209
<i>Tagetes erecta</i>	Orange Isis	72.90 $\pm$ 0.73	34.61 $\pm$ 0.88	111.88 $\pm$ 2.01	4.95	2805
	Yellow Isis	92.97 $\pm$ 0.98	-15.35 $\pm$ 0.02	55.71 $\pm$ 1.29	4.58	62
<i>Tagetes petula</i>	Safari Tangerine	65.58 $\pm$ 0.61	45.02 $\pm$ 1.22	111.86 $\pm$ 0.98	3.32	3486
	Bonanza Orange	68.66 $\pm$ 2.31	41.10 $\pm$ 4.67	115.17 $\pm$ 2.31	4.77	1913
	Safari Yellow	87.63 $\pm$ 0.25	-7.75 $\pm$ 0.39	111.57 $\pm$ 2.64	2.78	760
	Bonanza Yellow	87.38 $\pm$ 0.21	-9.25 $\pm$ 1.26	109.86 $\pm$ 4.09	5.49	1017
<i>Zinnia elegans</i>	Dreamland Coral	58.92 $\pm$ 1.12	50.57 $\pm$ 1.44	48.16 $\pm$ 4.21	73.00	155
	Bonita Red	42.76 $\pm$ 1.88	50.42 $\pm$ 2.69	43.42 $\pm$ 0.39	1107.70	294
	Petitland Orange	77.54 $\pm$ 1.68	22.70 $\pm$ 4.43	122.09 $\pm$ 0.29	62.89	55
	Dreamland Yellow	76.74 $\pm$ 1.12	7.91 $\pm$ 0.56	116.17 $\pm$ 2.83	23.18	893
	Bonita Yellow	69.32 $\pm$ 0.48	5.31 $\pm$ 0.72	82.08 $\pm$ 2.46	40.87	273
	Petitland Yellow	85.67 $\pm$ 0.43	-1.20 $\pm$ 1.79	120.78 $\pm$ 2.02	11.08	58

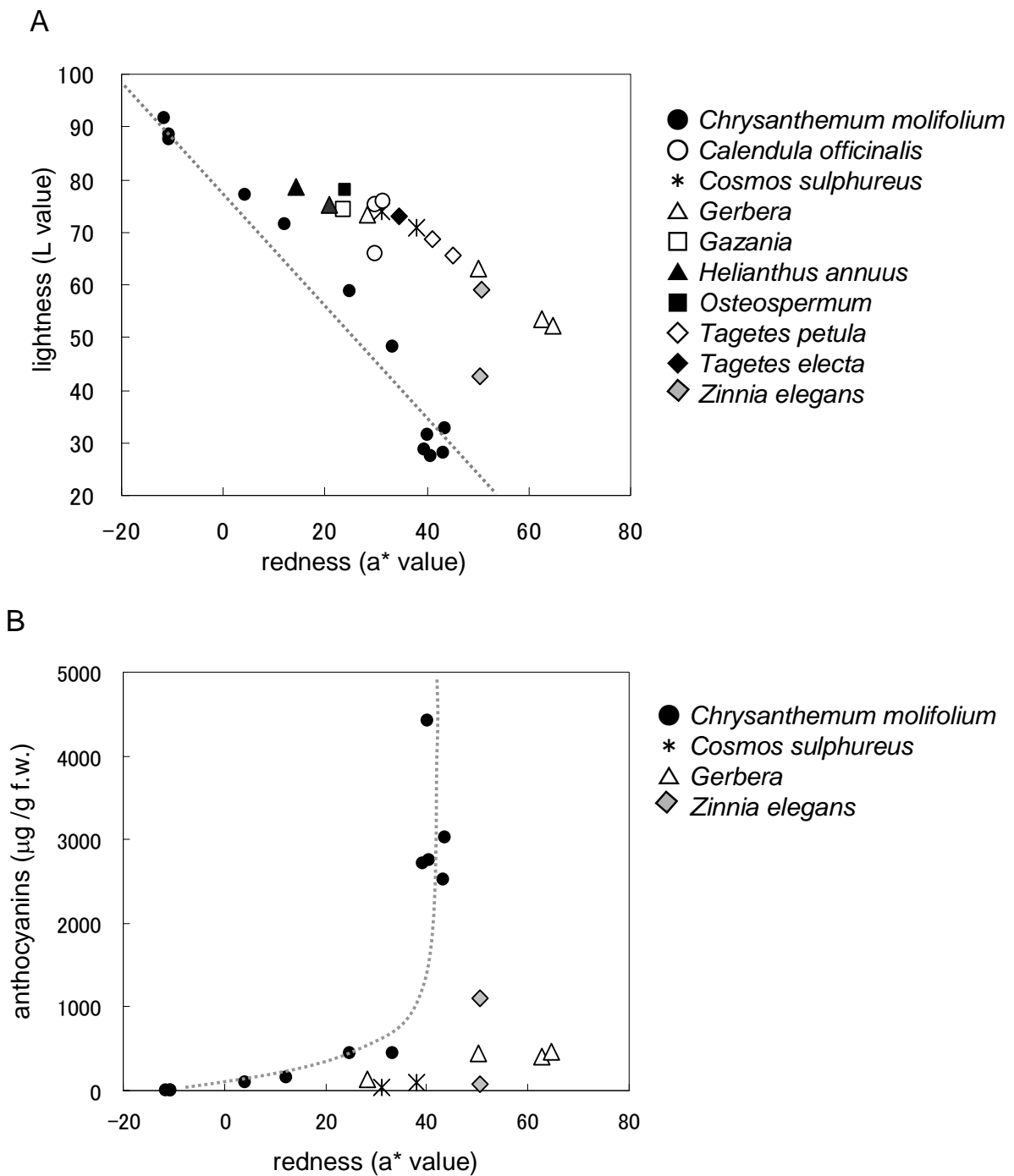


Figure 3-2. Correlation between color and anthocyanin content in petals of orange-flowered Compositae plants.

(A) Correlation between lightness and redness. (B) Correlation between anthocyanin content and redness in four species containing anthocyanins.

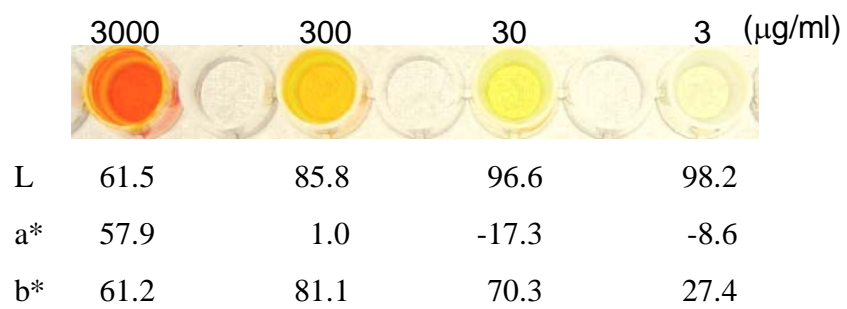


Figure 3-3. Effect of carotenoid content on color tone. Carotenoid solution was used at 1 ml per a hole.



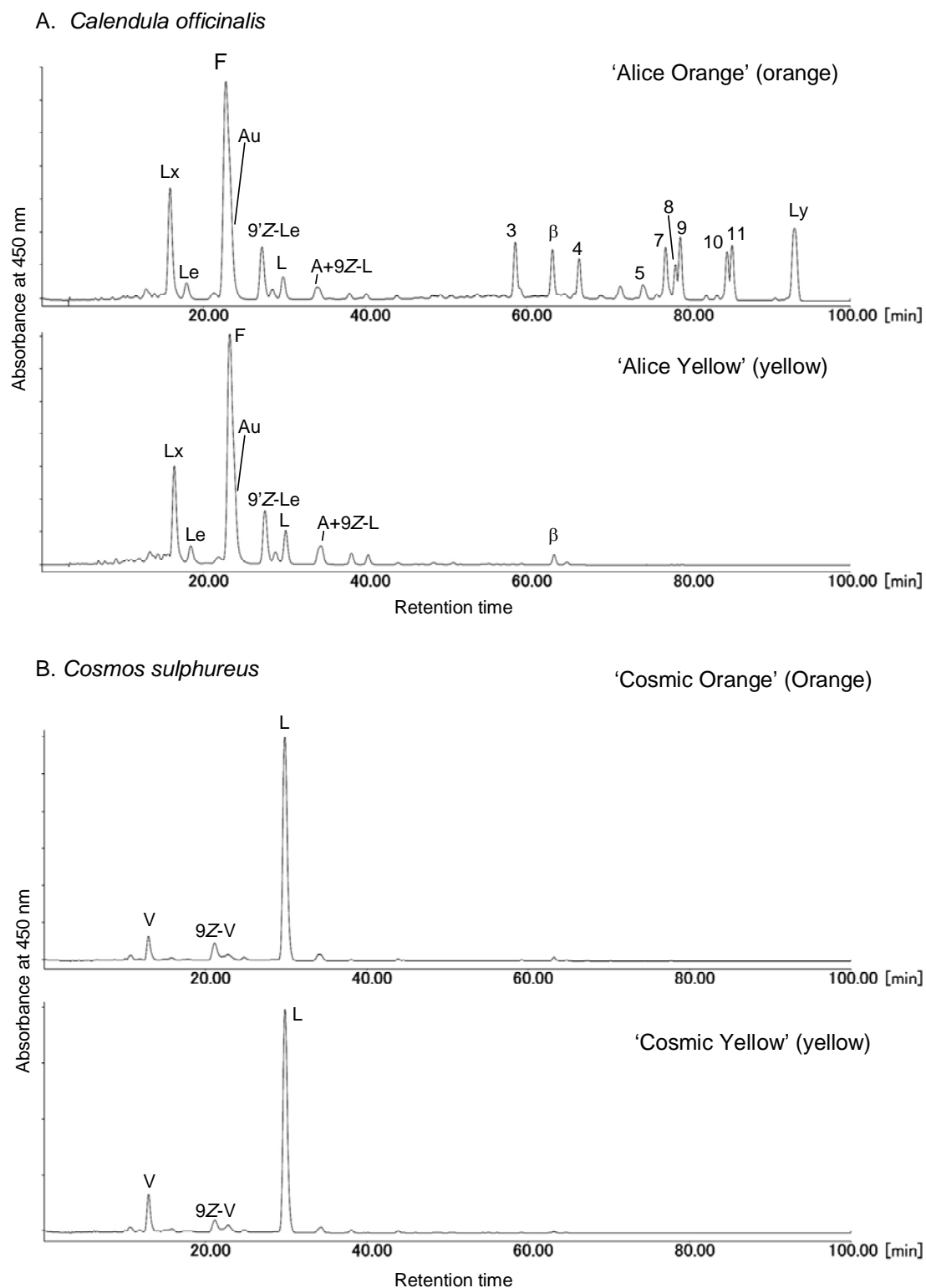
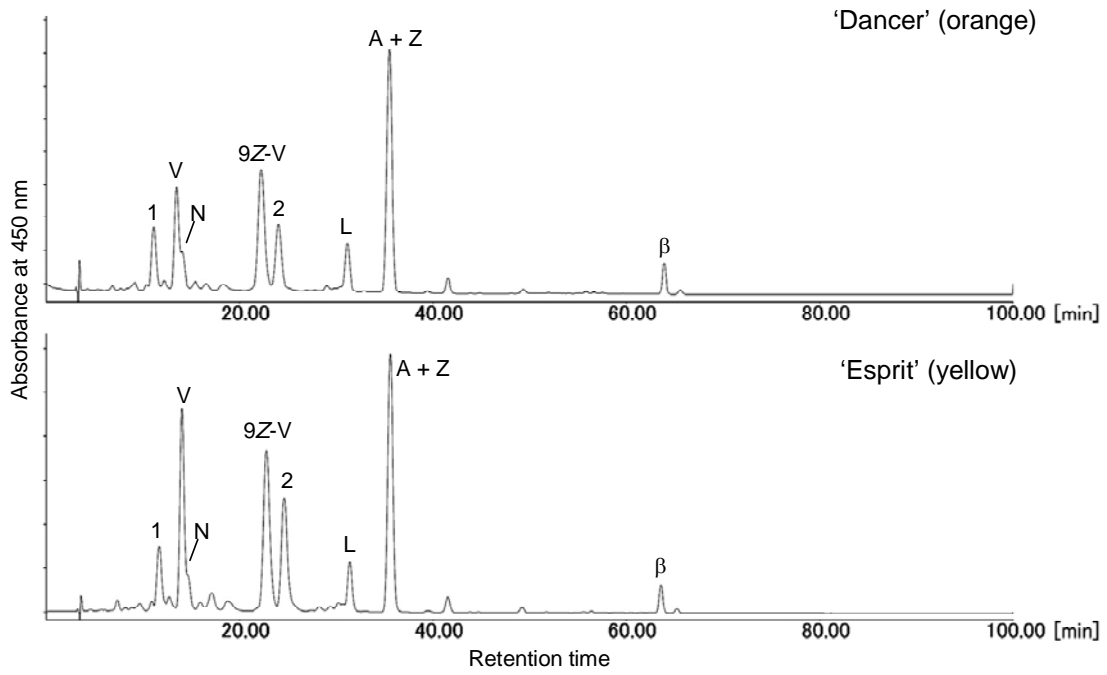


Figure 3-4.

C. *Gerbera*



D. *Gazania*

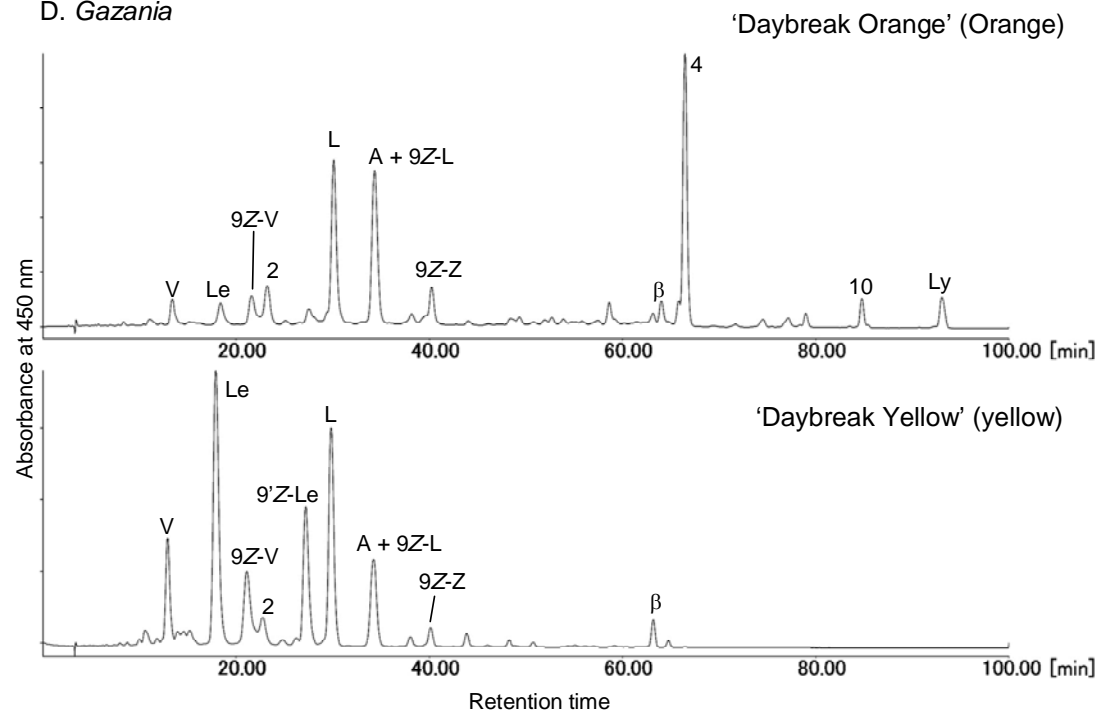
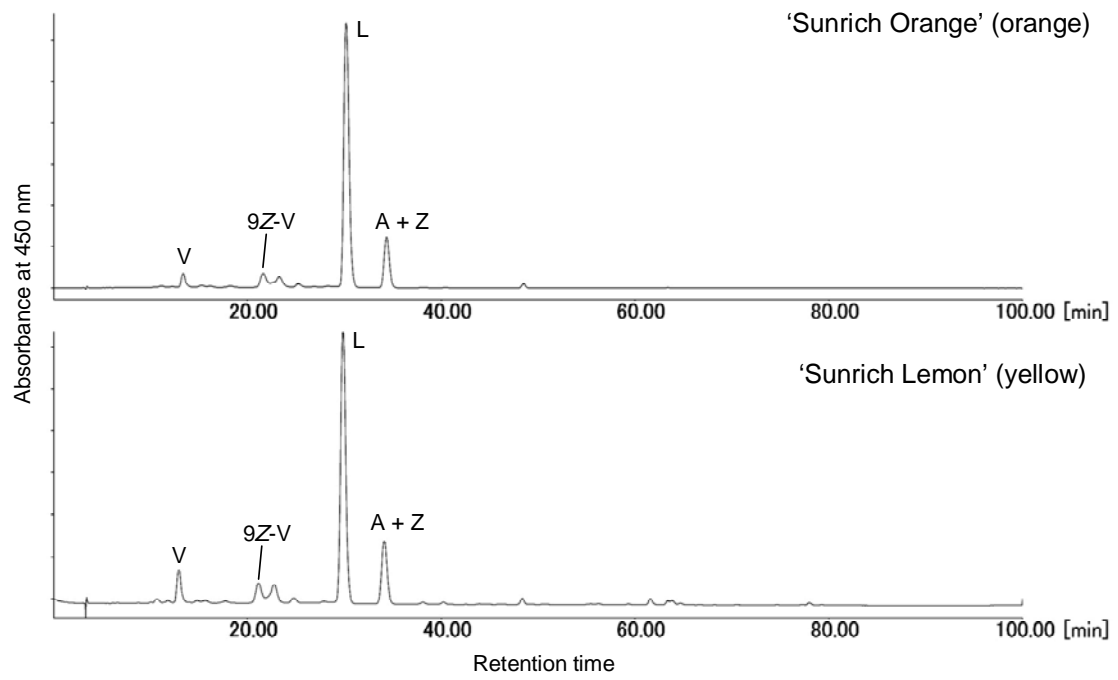


Figure 3-4.

E. *Helianthus annuus*



F. *Osteospermum*

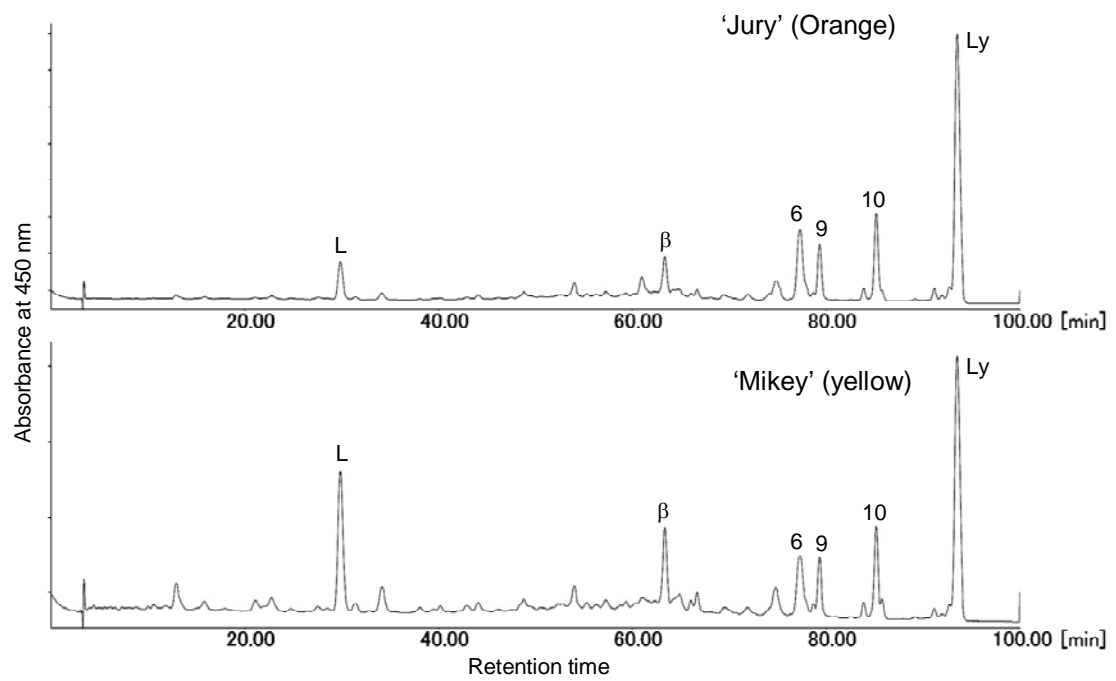
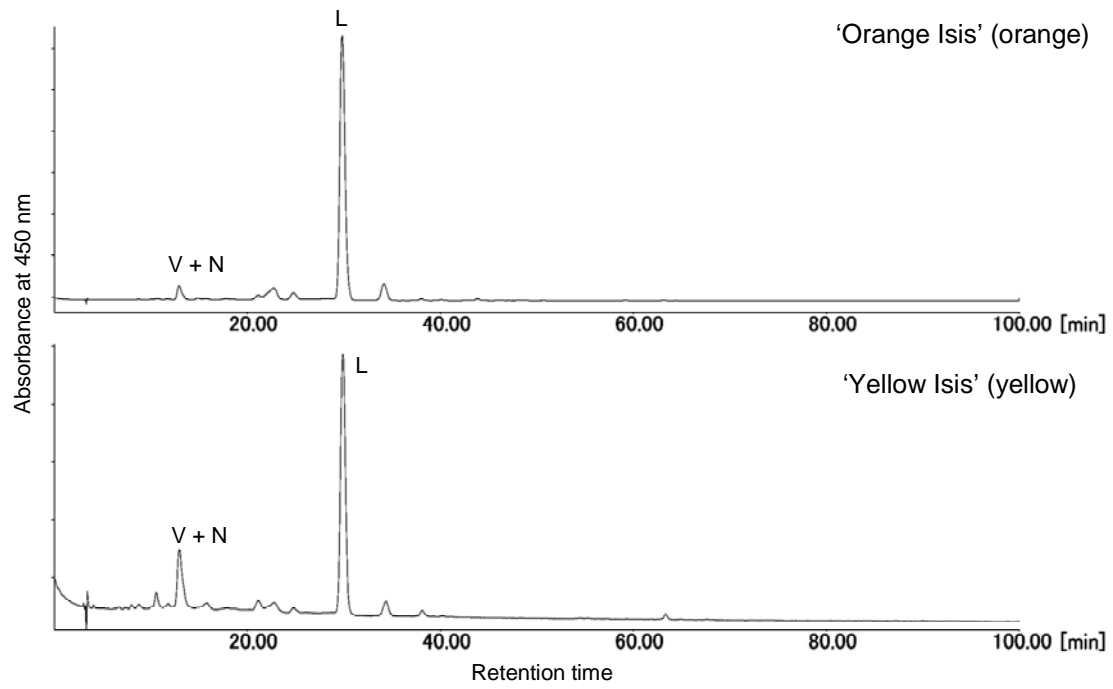


Figure 3-4.

G. *Tagetes erecta*



H. *Tagetes petula*

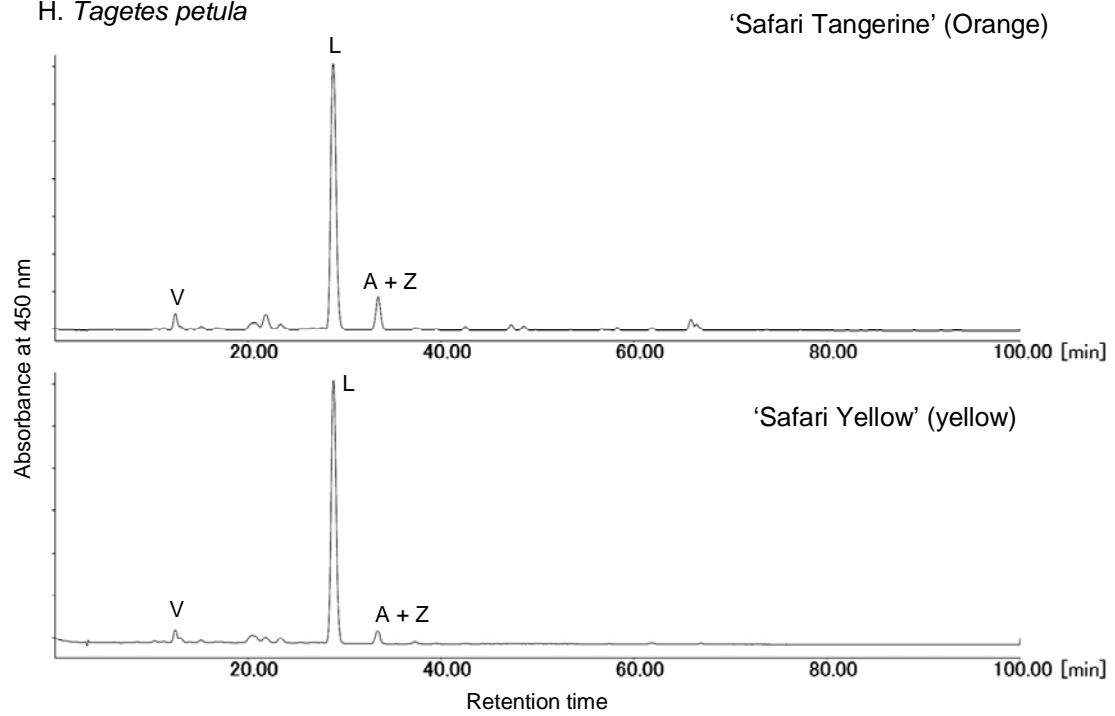


Figure 3-4.

I. *Zinnia elegans*

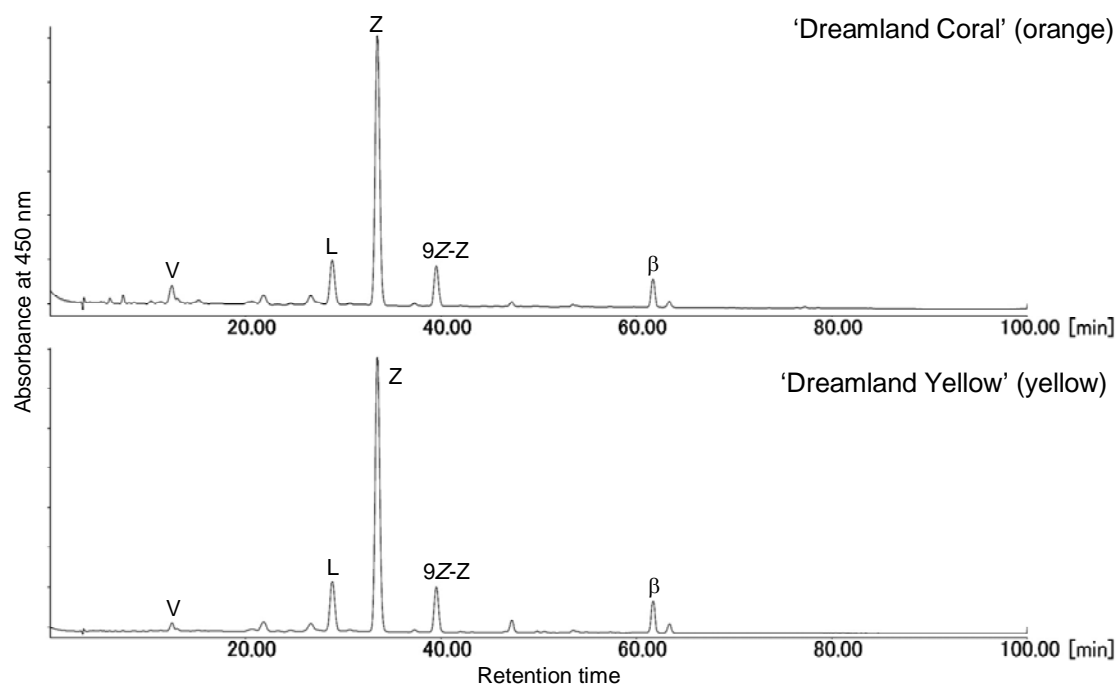


Figure 3-4. HPLC analysis of carotenoids of extracts of Compositae petals.

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

Table 3-2. Carotenoid composition in petals of *Calendula*, *Gazania*, and *Osteospermum*.

Carotenoids	Absorption maxima (nm)	<i>Calendula</i>			
		Alice Orange		Alice Yellow	
		% of total carotenoid <sup>a</sup>	Carotenoid content <sup>b</sup> (µg/g f.w.)	% of total carotenoid	Carotenoid content (µg/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
(9'Z)-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 <sup>c</sup>	56.8	1948.9	89.6	1734.3
	Reddish carotenoids <sup>d</sup>	38.6	1324.4	1.0	19.9
	Total carotenoids (µg/g f.w.)		3431.1		1935.6

<sup>a</sup> Percentage of peak area in the HPLC chromatogram at 450 nm.

<sup>b</sup> Lutein equivalent.

<sup>c</sup> Range in the main absorption maximum from 401 nm to 445 nm.

<sup>d</sup> Range in the main absorption maximum from 452 nm to 473 nm.

Table 3-2.

Carotenoids	Absorption maxima (nm)	<i>Gazania</i>			
		Daybreak Orange		Daybreak Yellow	
		% of total carotenoid	Carotenoid content ( $\mu\text{g/g f.w.}$ )	% 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
$\beta$ -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	63.8	1968.0	91.8	2399.4
	Reddish carotenoids	33.3	1026.5	1.7	44.4
	Total carotenoids ( $\mu\text{g/g f.w.}$ )		3082.7		2613.2

Table 3-2.

Carotenoids	Absorption maxima (nm)	<i>Osteospermum</i>			
		Jury		Mikey	
		% of total carotenoid	Carotenoid content ( $\mu\text{g/g f.w.}$ )	% of total carotenoid	Carotenoid content ( $\mu\text{g/g f.w.}$ )
Lutein	444, 473	6.3	20.1	19.1	40.0
$\beta$ -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	6.3	20.1	19.1	40.0
	Reddish carotenoids	88.9	284.6	75.1	157.2
	Total carotenoids ( $\mu\text{g/g f.w.}$ )		320.1		209.5



## 第2節 キンセンカ花卉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卉の色調の差には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。

### 材料および方法

#### 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 ‘ゴールドゼム’）の完全に展開した花卉を用いた (図3-5)。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。

#### カロテノイド成分の分析

それぞれの品種の花弁 0.5g に 3ml のアセトンを加えて磨砕した。これに 5ml 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  $\mu$  m, 250×4.6 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Buthyl methyl ether (MTBE): H<sub>2</sub>O = 95:1:4,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: H<sub>2</sub>O = 25:71:4

0分 A 100%/ B 0%, 1 2分 A 100%/ B 0%, 9 6分 A 0%/ B 100%

流速 1 ml/min, カラム温度 35°C

#### カロテノイド成分の分取

花卉 100g に 30ml のアセトンを加えて磨砕した。これに 50ml 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、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  $\mu$  m, 250 $\times$ 20 mm i.d., YMC Co. Ltd)

展開溶媒 A/ MeOH: *t*-Buthyl methyl ether (MTBE): H<sub>2</sub>O = 95:1:4,

展開溶媒 B/ MeOH: MTBE: H<sub>2</sub>O = 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

#### カロテノイド成分の同定

カロテノイドの構造は UV-Vis, <sup>1</sup>H 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 alcohol を基質として質量分析装置(JEOL, SX 102)で測定した。

##### <sup>1</sup>H NMR (500 MHz)および <sup>13</sup>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<sub>3</sub> を溶媒として用いた。

## 結果

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 (図 3-6)。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 450nm におけるピーク面積の割合、および吸収極大値を表 3-3 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。

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。

$^1\text{H-NMR}$  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), (5*Z*,9*Z*)-lycopene (**1**, peak 18), (5*Z*,9*Z*,5'*Z*)-lycopene (**2**, peak 17) および (5*Z*,9*Z*,5'*Z*,9'*Z*)-lycopene (**3**, peak 14) である。 $^1\text{H-NMR}$  シグナルは  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY, NOESY, および  $^1\text{H-}^1\text{H}$  decoupling 測定によって帰属を決定した (表 3-4, 図 3-7)。4 種類の立体異性体の  $^1\text{H-NMR}$  シグナルの比較を表 3-4 に示した。これらのポリエン鎖部分の立体配置は  $^1\text{H-NMR}$  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 5*Z*,9*Z* 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  $^1\text{H}$  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 5*Z*,9*Z* 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 5*Z*,9*Z* 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 (5*Z*,9*Z*)-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。(5*Z*,9*Z*)-lycopene (**1**) および (5*Z*,9*Z*,5'*Z*,9'*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、(5*Z*,9*Z*,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。

さらに、現在までに報告のない(5'Z)- $\gamma$ -carotene (**4**, ピーク 16)および(5'Z,9'Z)-rubixanthin (**5**, ピーク 9)を単離し、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および NOESY 実験を含む  $^1\text{H}$ -NMR 分析によって構造決定を行った(表 3-5, 図 3-7)。化合物 **4** および **5** の H-2 位から H-20 位までの  $^1\text{H}$  シグナルはそれぞれの all-*E* 体と一致していたため (Englert, 1995), 表 3-5 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  $^1\text{H}$  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 (Englert 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,  $^1\text{H}$ -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),  $\delta$ -carotene (ピーク 13), および  $\gamma$ -carotene (ピーク 15) であることが明らかになった(表 3-3)。

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,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -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。

## 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**),  $\alpha$ -carotene, (5'Z)-rubixanthin (**6**),  $\delta$ -carotene, (5Z,9Z,5'Z,9'Z)-lycopene (**3**),  $\gamma$ -carotene, (5'Z)- $\gamma$ -carotene (**4**), (5Z,9Z,5'Z)-lycopene (**2**), (5Z,9Z)-lycopene (**1**) および (all-*E*)-lycopene を同定した(図 3-6, 表 3-3)。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(表 3-3)。

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**, 図 3-7)。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*) 花卉の主要カロテノイドである(5'Z)-rubixanthin (6) (別名 gazaniaxanthin) 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 (Euguster・Märki-Fischer 1991, Hornero-Méndez・Mínguez-Mosquera 2000, Märki-Fischer ら 1983)。Märki-Fischer ら (1983) は(5Z)-neurosporene および(5'Z,13Z)-または (5'Z,13'Z)-rubixanthin というさらに2種類の5Z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5Z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、(5Z)-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(5Z)-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5Z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(5Z)-carotenoid類が蓄積すると推測した(図3-8)。5Z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卉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卉においてこれら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。

## 要約

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の構造解析を行った。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ことが明らかになった。(5Z,9Z,5'Z,9'Z)-lycopene, (5Z,9Z,5'Z)-lycopene, (5Z,9Z)-lycopene, および (5'Z,9'Z)-rubixanthin は天

然物として新規のカロテノイドであった。キンセンカ花卉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。

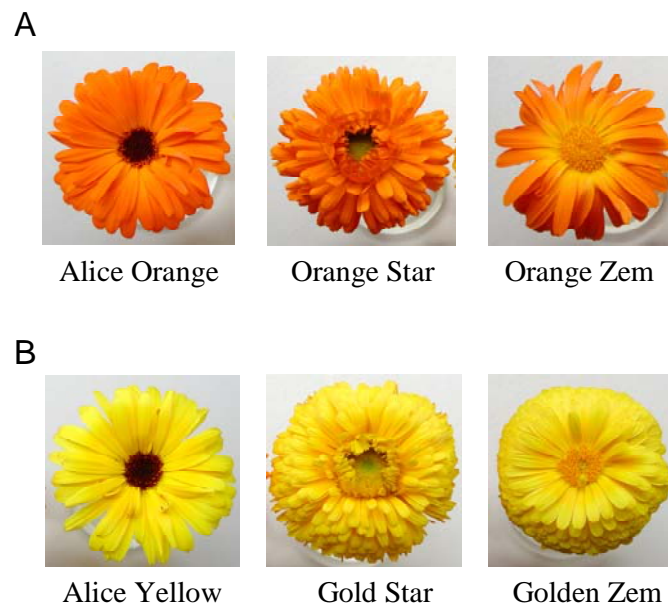


Figure 3-5. Fully-opened flowers of orange- (A) and yellow-flowered (B) cultivars of calendula.

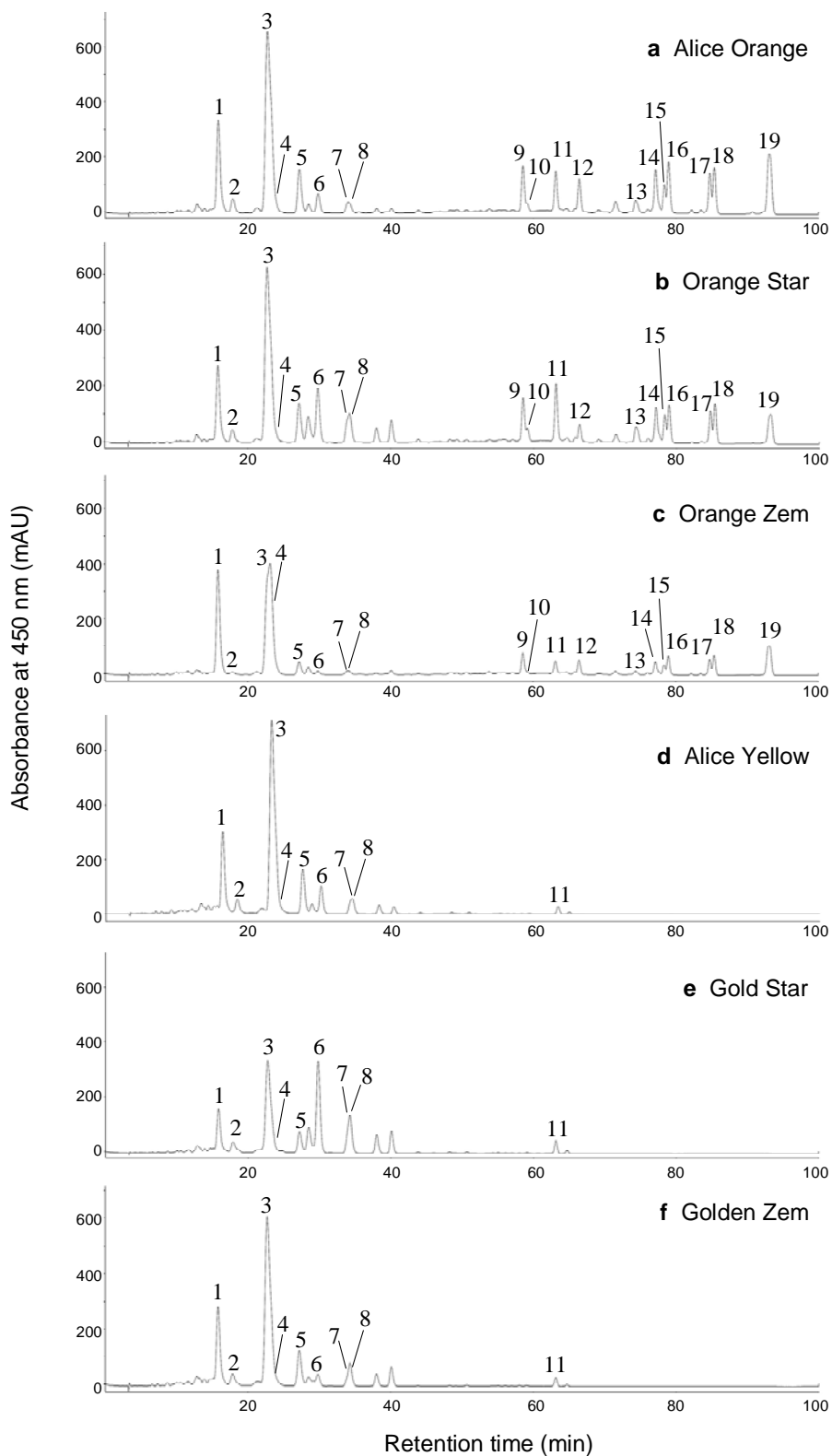


Figure 3-6. HPLC analysis of carotenoids of extracts of calendula petals. a, cv. Alice Orange; b, Orange Star; c, Orange Zem; d, Alice Orange; e, Gold Star; f, Golden Zem. Peak numbers are identified in Table 3-3.



Table 3-3. Carotenoid composition in petals of calendula (cv. Alice Orange).

Peak no. (Fig. 3-6)	Carotenoid	% of total carotenoids <sup>a</sup>	$\lambda_{\max}$ (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	(9'Z)-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	(5'Z,9'Z)-Rubixanthin ( <b>5</b> )	4.0	455, 485
10	$\alpha$ -Carotene	0.8	446, 475
11	$\beta$ -Carotene	3.4	452, 479
12	(5'Z)-Rubixanthin ( <b>6</b> )	3.0	461, 491
13	$\delta$ -Carotene	1.4	433, 457, 488
14	(5Z,9Z,5'Z,9'Z)-Lycopene ( <b>3</b> )	4.1	437, 461, 491
15	$\gamma$ -Carotene	2.0	461, 493
16	(5'Z)- $\gamma$ -Carotene ( <b>4</b> )	4.4	463, 493
17	(5Z,9Z,5'Z)-Lycopene ( <b>2</b> )	3.5	442, 467, 497
18	(5Z,9Z)-Lycopene ( <b>1</b> )	4.1	442, 467, 497
19	(all-E)-Lycopene	8.7	446, 473, 505

<sup>a</sup> Percentage of peak area in the HPLC chromatogram at 450 nm.

Table 3-4. <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data for lycopene geometrical isomers in CDCl<sub>3</sub>.

Position	All- <i>E</i>	5 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> (1)		5 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,5' <i>Z</i> (2)		5 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,5' <i>Z</i> ,9' <i>Z</i> (3)	
	δ	δ	Δδ <sup>a</sup>	δ	Δδ	δ	Δδ
2	5.11	5.15	0.04	5.15	0.04	5.15	0.04
2'		5.11		5.15		5.15	
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	2.24	0.13
4'		2.11		2.24		2.24	
6	5.95	6.02	0.07	6.03	0.08	6.03	0.08
6'		5.95		5.94		6.03	
7	6.49	6.50		6.51		6.51	
7'		6.49		6.49		6.51	
8	6.25	6.76	0.51	6.77	0.52	6.76	0.51
8'		6.25		6.23		6.76	
10	6.18	6.04	-0.14	6.04	-0.14	6.05	-0.13
10'		6.19		6.18		6.05	
11	6.64	6.79	0.15	6.79	0.15	6.79	0.15
11'		6.64		6.63		6.79	
12	6.35	6.29	-0.06	6.28	-0.07	6.29	-0.06
12'		6.36		6.35		6.29	
14	6.25	6.25		6.25		6.25	
14'		6.25		6.25		6.25	
15	6.62	6.62		6.63		6.63	
15'		6.62		6.63		6.63	
16	1.69	1.69		1.69		1.69	
16'		1.69		1.69		1.69	
17	1.61	1.62		1.63		1.63	
17'		1.61		1.63		1.63	
18	1.82	1.85	0.03	1.85	0.03	1.85	0.03
18'		1.82		1.83		1.85	
19	1.97	1.96		1.96		1.96	
19'		1.97		1.96		1.96	
20	1.97	1.98		1.98		1.98	
20'		1.97		1.97		1.98	

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

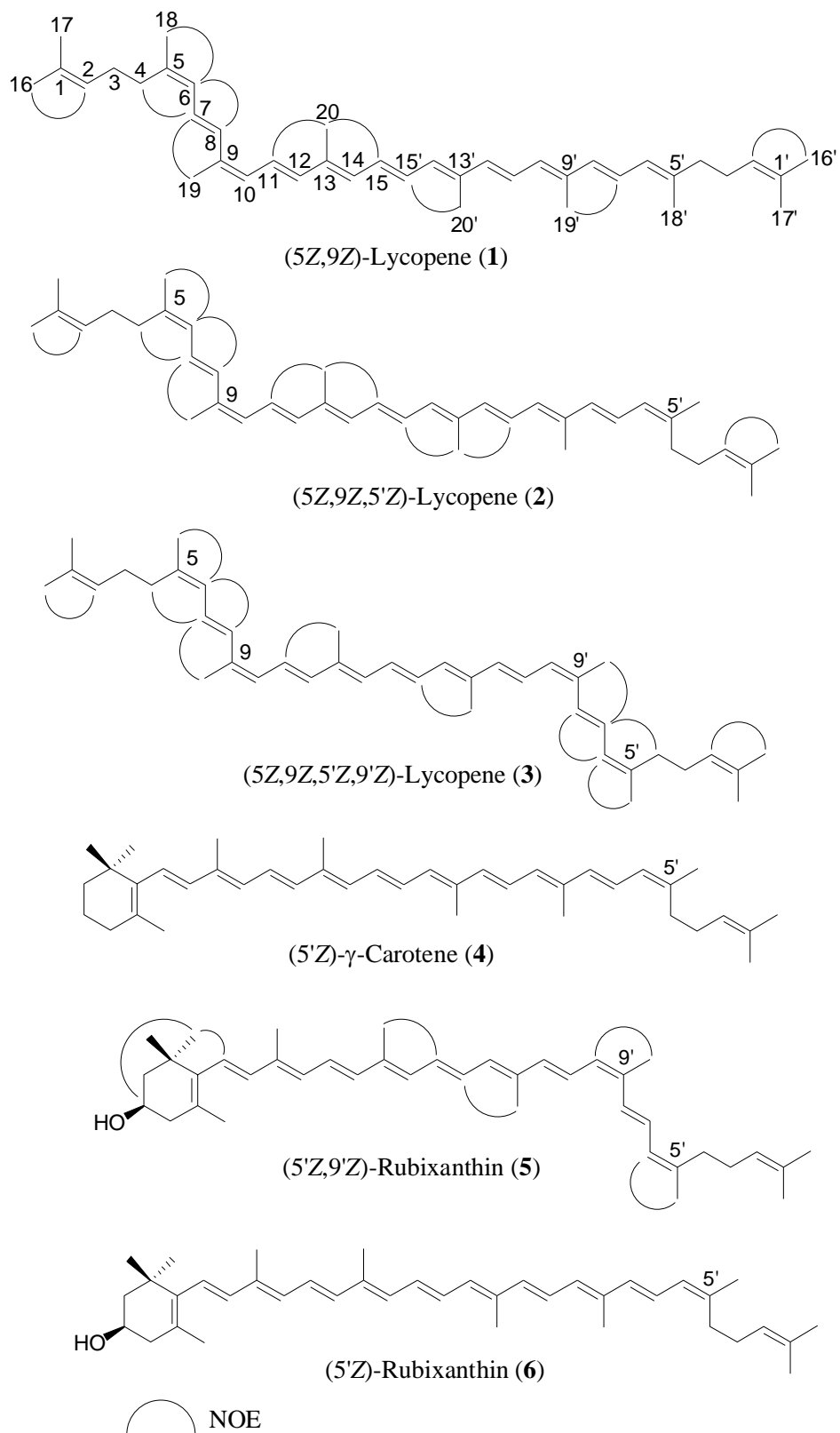


Figure 3-7. Stereochemistry of six carotenoids containing *cis* structures at C-5 or C-5' characteristic of orange-flowered cultivars of calendula.

Table 3-5. <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data relevant to H-2' to H-20' position of geometrical isomers of rubixanthin and  $\gamma$ -carotene in CDCl<sub>3</sub>.

Position	(All- <i>E</i> )- $\gamma$ -carotene	(5' <i>Z</i> )- $\gamma$ -carotene ( <b>4</b> )		(All- <i>E</i> )- rubixanthin	(5' <i>Z</i> ,9' <i>Z</i> )- rubixanthin ( <b>5</b> )	
	$\delta$	$\delta$	$\Delta\delta^a$	$\delta$	$\delta$	$\Delta\delta$
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	

<sup>a</sup> Isomerization shift ( $\Delta\delta = \delta Z - \delta E$ ,  $|\Delta\delta| > 0.02$  ppm).

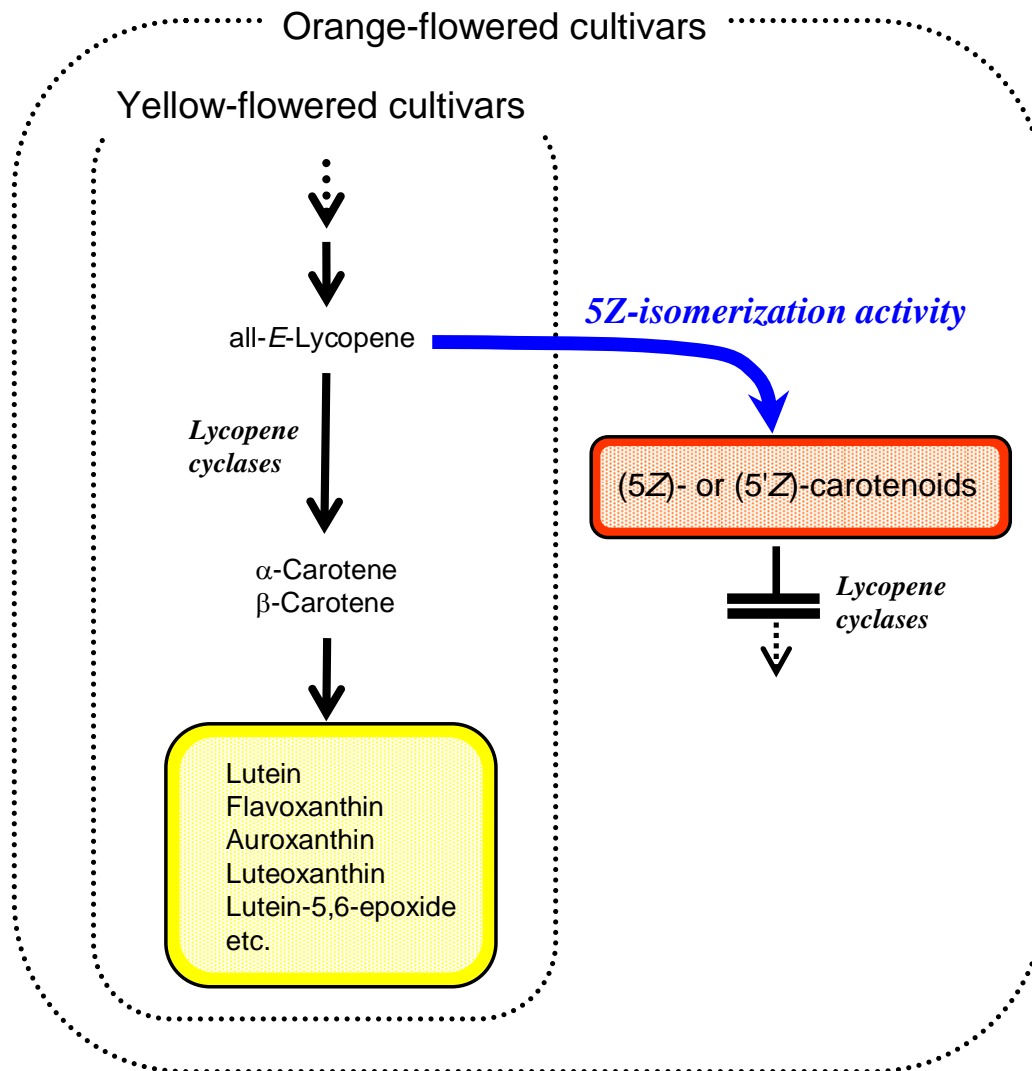


Figure 3-8. Putative carotenoid biosynthetic pathway in petals of orange- and yellow-flowered calendula. Main carotenoid components accumulating in each petals are boxed.

## 総合考察

キク花卉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、花卉の明度が低く、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、キク花卉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、キク花卉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。キバナコスモスや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、キク花卉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、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卉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卉 1 g 当たり 2 mg 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 *Adnis aestivalis* は花卉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  $\beta,\beta$ -carotenoid 類を基質として用いるものであり、 $\beta,\beta$ -carotenoid 類をほとんど含まないキク花卉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、 $\beta,\epsilon$ -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 位もしくは 5' 位にシス構造を持っていた。キンセンカ花卉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 polycopene, 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、花卉に赤みの強い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可能となる。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ずに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、キク花卉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(3*S*,5*S*,6*R*,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 $\beta,\beta$ -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、キク花卉に含まれるカロテノイドは(9*Z*)-violaxanthinを除き92%以上が $\beta,\epsilon$ -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卉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。花卉では全カロテノイドの92%以上が $\beta,\epsilon$ -carotenoid類であったが、葉では43%であり、 $\beta,\beta$ -carotenoid類が $\beta,\epsilon$ -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、逆に花卉では発達初期から *LCYE* の発現量が *LCYB* の発現量より遙かに多く、このことが葉と花卉の $\beta,\beta$ -carotenoid類と $\beta,\epsilon$ -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卉の発達ステージ後半に増加した。これは花卉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。唯一パラゴン花卉で



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* だけでなくその他の酵素遺伝子も‘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。

## 謝 辞

本論文をとりまとめるにあたり，終始懇切な御指導を頂きました神戸大学大学院自然科学研究科 稲垣 昇教授に謹んで感謝の意を表します．また，有意義な御助言と御校閲を頂きました神戸大学大学院自然科学研究科 安田武司教授，同 中西テツ教授，並びに同 金地通生助教授に心よりお礼申し上げます．

本研究を遂行するにあたり，終始御指導と御鞭撻を頂いた花き研究所生理遺伝部長 柴田道夫博士，並びに同研究所生理遺伝部育種工学研究室長 大宮あけみ博士に深くお礼申し上げます．財団法人生産開発科学研究所 眞岡孝至博士，花き研究所生理遺伝部品質生理研究室長 中山真義博士，並びに同研究所生産利用部機能解析利用研究室長 間 竜太郎博士には御指導と適切な御助言を頂き，心より感謝いたします．また，本研究に御助力いただいた生理遺伝部遺伝育種研究室 住友克彦氏，八木雅史氏，並びに多くの花き研究所職員および非常勤職員の皆様に心より厚くお礼申し上げます．

## 引用文献

大宮あけみ, 岸本早苗, 住友克彦 (2004) キクの白色花卉・黄色花卉で特異的に発現している遺伝子の探索. 園学雑. 73(別 2): 490.

河瀬晃四郎, 塚本洋太郎 (1976) キクの花色に関する研究 (第 3 報) 花色に対する主要色素の量的効果と花色の測色. 園学雑. 45: 65–75.

Al-Babili S, von Lintig J, Haubruck H, Beyer P (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 GA, Alberti M, Leach F, Hearst E (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, Deli J, Tóth G (2002) HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J. Biochem. Biophys. Methods* 53: 241–250.

Bartlett L, Klyne W, Mose WP, Scopes PM (1969) Optical rotatory dispersion of carotenoids. *J. Chem. Soc. C*, 2527–2544.

Bouvier F, Suire C, Mutterer J, Camara B (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 TW (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, Liaaen-Jensen S, Pfander H (2004) *Carotenoids Handbook*. Birkhäuser, Basel.

Buchecker R, Marti U, Eugster C H, (1984) Syntheses of optically active carotenoids with 3,5,6-trihydroxy-5,6-dihydro  $\beta$ -end groups. *Helv. Chim. Acta* 67:2043–2056.

Camara B, Bouvier F (2004) Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 430:16–21.

- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 11: 113–116.
- Cunningham FX Jr, Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996) Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8: 1613–1626.
- Cunningham FX Jr, Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557–583.
- Cunningham FX Jr, Gantt E (2001) One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2905–2910.
- Cunningham FX Jr, Gantt E (2005) A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant J.* 41: 478–492.
- Deli J, Molnár P, Tóth G, Szabolcs J, Radics L (1988) Determination of the geometrical configuration of naturally occurring mono-*cis*-lutein epoxides. *Phytochemistry* 27: 547–549.
- Deli J, Molnár P, Matus Z, Tóth G, Steck A, Pfander H (1998) Isolation and characterization of 3,5,6-trihydroxy-carotenoids from petals of *Lilium tigrinum*. *Chromatographia* 48: 27–31.
- Deli J, Molnár P, Matus Z, Tóth G, Steck A, Pfander H (1998) Partial synthesis and characterization of capsokarboxanthins and 3,6-epoxycapsanthins. *Helv. Chim. Acta* 81: 1242–1253.
- Deli J, Molnár P, Pfander H, Tóth G (1999) Isolation of capsanthin 5,6-epoxide from *Lilium tigrinum*. *Acta Bot. Hung.* 42: 105–110.
- Eugster CH (1985) Carotenoid structures, old and new problems. *Pure Appl. Chem.* 57: 639–647.
- Eugster CH, Märki-Fischer E (1991) The chemistry of rose pigments. *Angew. Chem., Int. Ed.* 30: 654–672.
- Englert G (1995) NMR spectrometry. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.), *Carotenoids*, Vol. 1B. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 147–160.
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P (2001) 1-Deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 276: 22901–22909.
- Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM (1994) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 105: 405–413.
- Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43: 228–265.

- Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5: 379–387.
- Goodwin TW, Britton G (1988) Distribution and analysis of carotenoids. In: Goodwin TW (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, Bernhard K, Meyer K (1992) Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes. *Helv. Chim. Acta* 75: 1848–1865.
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 210–218.
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI (2000) Carotenoid pigments in *Rosa mosqueta* hips, an alternative carotenoid source for foods. *J. Agric. Food Chem.* 48: 825–828.
- Huguency P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, d'Harlingue A, Camara B (1996) Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* 111: 619–626.
- Inagaki Y, Hisatomi Y, Suzuki T, Kasahara K, Iida S (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.
- Karrer P, Jucker E (1943) Carotinoide aus den Blüten von Winterastern, Chrysanthemaxanthin. *Helv. Chim. Acta* 26: 626–630.
- Karrer P, Jucker E, Rutschmann J, Steinlin K (1945) Zur Kenntnis der Carotinoid-epoxyd. Natürliches Vorkommen von Xanthophyll-epoxyd und  $\alpha$ -Carotin-epoxyd. *Helv. Chim. Acta* 28: 1146–1156.
- Kawase K, Tsukamoto Y, (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, Steck A, Pfander H (1999) Isolation and structural elucidation of (13Z,13'Z,3R,3'R,6'R)-lutein from marigold flowers, kale, and human plasma. *J. Agric. Food Chem.* 47: 455–461.

- Kull D, Pfander H (1995) Isolation and identification of carotenoids from the petals of rape (*Brassica napus*). J. Agric. Food Chem. 43: 2854–2857.
- Kull D, Pfander H (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 VG (2000) Biosynthesis of carotenoids in plastids of plants. Biochemistry (Moscow) 65: 1317–1333.
- Langton FA (1980) Chimerical structure and carotenoid inheritance in *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.). Euphytica 29: 807–812.
- Liu Y, Roof S, Ye Z, Barry C, van Tuinen A, Vrebalov J, Bowler C, Giovannoni J (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 LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate synthase. Plant J. 22: 503–513.
- Machin B, Scopes N (1978) Chrysanthemums year-round growing. Blandford Press, Dorset.
- Maoka T, Fujiwara Y, Hashimoto K, Takeda S, Takaragaki S, Ida K (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 *Rhodospseudomonas capsulata* by a promiscuous plasmid. J. Bacteriol. 146: 1003–1012.
- Märki-Fischer E, Marti U, Buchecker R, Eugster CH (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, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K, Harashima K (1990) Elucidation of *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172: 6704–6712.
- Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, DellaPenna D (2001) Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. Plant Mol. Biol. 45: 281C293.
- Molnár P, Szabolcs J, Radics L (1986) Naturally occurring di-*cis*-violaxanthins from *Viola tricolor*: isolation and identification by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of four di-*cis*-isomers. Phytochemistry 25: 195–199.
- Molnár P, Deli J, Matus Z, Tóth G, Steck A, Pfander H (1999) Partial synthesis and characterization of karboxanthins and cucurbitaxanthin A epimers. Helv. Chim. Acta 82: 1994–2002.

Nakayama M, Koshioka M, Shibata M, Hiradate S, Sugie H, Yamaguchi M (1997) Identification of cyanidin 3-*O*-(3'',6''-*O*-Dimalonyl- $\beta$ -glucopyranoside) as a flower pigment of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). Biosci. Biotech. Biochem. 61: 1607–1608

Nielsen KM, Lewis DH, Morgan ER (2003) Characterization of carotenoid pigments and their biosynthesis in two yellow flowered lines of *Sandersonia aurantiaca* (Hook.). Euphytica 130: 25–34.

Pecker I, Chamovitz D, Linden H, Sandmann G, Hirschberg J (1992) A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to  $\zeta$ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4962–4966.

Ralley L, Enfissi EMA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM, Fraser PD (2004) Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. Plant J. 39: 477–486.

Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD (2000) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. J. Biol. Chem. 276: 25208–25211.

Shibata M, Kawata J (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 AJ, Underwood BA, Auldridge M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E, Clark DG, Klee HJ (2004) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. Plant Physiol. 136: 3504–3514.

Simkin AJ, Schwartz SH, Auldridge M, Taylor MG, Klee HJ (2004) The tomato *carotenoid cleavage dioxygenase 1* genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. Plant J. 40: 882–892.

Stålberg K, Lindgren O, Ek B, Höglund A-S (2003) Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 36: 771–779.

Tai C-Y, Chen BH (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, Joseph LM, Deng W-T, Liu L, Li Q-B, Cline K, McCarty DR (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis* epoxy-carotenoid dioxygenase gene family, Plant J. 35: 44–56.

Taylor M, Ramsay G (2005) Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiol. Plant.* 124: 143–151.

Tian L, Magallanes-Lundback M, Musetti V, DellaPenna D (2003) Functional analysis of  $\beta$ - and  $\epsilon$ -ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1320–1332.

Tian L, Dellapenna D (2004) Progress in understanding the origin and functions of carotenoid hydroxylases in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 430: 22–29.

Tóth G, Szabolcs J (1981) Occurrence of some mono-*cis*-isomers of asymmetric C<sub>40</sub>-carotenoids. *Phytochemistry* 20: 2411–2415.

Vizir IY, Anderson ML, Wilson ZA, Mulligan BJ (1994) Isolation of deficiencies in the *Arabidopsis* genome by  $\gamma$ -irradiation of pollen. *Genetics* 137: 1111–1119.

Zhu C, Yamamura S, Nishihara M, Koiwa H, Sandmann G (2003) cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochim. Biophys. Acta* 1625: 305–308.