Atsuo INAZU and Masami MATO : Expression of Color-Controlling Gene *C* in
Cosmos bipinnatus CAV. in Relation to the Anthocyanin Biosynthetic Pathway
(English Summary on p.613)

アントシアニン生合成経路におけるコスモスの花色遺伝子*C*の発現

稲津厚生・間藤正美

(玉川大学農学部, 町田市, 〒194)

コスモス (*Cosmos bipinnatus*) の花色遺伝子として, *C*, *I*, *Sp* の3対の対立遺伝子とイエロー花色に係わる複数の遺伝子対が知られている。これらのうち*C*遺伝子は, シアニック花色の発現にとって最重要の遺伝子であると考えられる。本研究は, *C*遺伝子に関して優性であるシアニック花色と劣性であるホワイト花色のそれぞれ4種類の遺伝子型を供試して舌状花卉の花色素特性を調査することにより, アントシアニン生合成経路における*C*遺伝子の発現部位を明らかにしたものである。*C*遺伝子に関して劣性であるホワイト花色の遺伝子型の花弁において, プロアントシアニン類のうちのプロシアニジンの存在が確認された。*C*遺伝子に関して優性であるシアニック花色の遺伝子型の場合には, プロシアニジンの存在が確認されなかった。また*I*, *Sp*遺伝子に関する遺伝子型間で比較すると, ホワイト花色の遺伝子型の花弁におけるプロシアニジン含量と, シアニック花色の遺伝子型の花弁におけるアントシアニン含量は, どちらも $IIspsp > IISpSp > iispsp > iiSpSp$ であった。以上の結果より, *C*遺伝子は, フラバン-3, 4-ジオールからアントシアニンへの過程に関与していると推定された。

KEY WORDS : *Cosmos bipinnatus* CAV., flower color, gene *C*, anthocyanin biosynthesis, flavan-3, 4-diol, procyanidins.

緒 言

ペチュニア (*Petunia hybrida*), ストック (*Matthiola incana*), アスター (*Callistephus chinensis*) などのシアニック花色系統およびホワイト花色やイエロー花色の変異体を用いて, 花色に係わるアントシアニン生合成経路の各段階に関与する遺伝子および酵素の存在が明らかにされてきた (HARBORNE 1988, HELLER and FORKMANN 1988)。このような知見は, 花色育種の基礎として重要であると考えられる。

コスモス (*Cosmos bipinnatus* CAV.) の花色に係わる遺伝子として, *C*, *I*, *Sp* の3対の対立遺伝子およびイエロー発色に係わる複数の対立遺伝子が知られており, これらの組合せによってラジアンズなどの複色花を除くすべての既存花色が説明され得る (佐俣・稲津 1983, 稲津ら 1988, 稲津 未発表)。

上記のような遺伝学的研究と平行して, フラボノイド生合成経路における花色遺伝子の発現が検討されてきた。その結果, *I*遺伝子はフラバノン→ジヒドロフラボノールの過程で発現し, 舌状花弁においてジヒドロフラボノール以降に生成する物質の生成量を高める作用をもつ遺伝子であると推定された (稲津ら 1988・1989)。また*Sp*, *sp*対立遺伝子に関して優性遺伝子型 (*SpSp* または *Spsp*) の場合においてのみ舌状花弁にフラボンが蓄積することが明らかになり, *Sp*遺伝子はフラバノン→フラボンの変換に係わる遺伝子であると推定された (稲津ら 1989)。

1991年10月2日 受領

1992年5月14日 受理

一方C遺伝子は, MIYAKE *et al.* (1927) がクリムソン花色およびピンク花色の発現に係わる遺伝子として推定した遺伝子である. その後育成されたスモーキーピンク花色やディープレッド花色の変異体もC, c対立遺伝子に関して優性遺伝子型であり, これらのシアニック花色における色素化学的発現要因は, 主としてアントシアニンの蓄積にある(佐俣・稲津1983). C遺伝子に関して劣性遺伝子型であると, アントシアニン合成はほぼ完全に抑制され, ホワイトまたはイエロー花色を発現する(佐俣・稲津1983, 稲津ら1988). これらのア(非)シアニック花色の舌状花弁においても, ジヒドロフラボノールや, ジヒドロフラボノールから派生するフラボノールが蓄積していること(稲津ら1988・1989)から, C遺伝子はジヒドロフラボノール以後のアントシアニン合成に関与していると考えられる. しかしながらストックの花弁を用いた実験によってジヒドロフラボノール→アントシアニジンの過程の中間体としてフラバン-3, 4-ジオール(ロイコアントシアニン)の存在が明らかになったこと(HELLER *et al.* 1985a・b)から, C遺伝子の発現段階がフラバン-3, 4-ジオール以前であるのか以後であるのかが問題となるが, この点についての詳細は検討されていない.

ホワイト花色の変異体では, IおよびSp遺伝子に関する優劣の組合せによって, 4種類の系統(遺伝子型)が育成されている(Table 1). これらの遺伝子型は, 花色を肉眼的に観察しても識別できないが, 舌状花弁に蓄積するフラボノイド成分の種類や量の違いから判定することができる. 本研究ではシアニック花色の変異体とともに, これら4種類のホワイト花色の遺伝子型を供試し, 舌状花弁のフラボノイド特性を調査することによって, アントシアニン生合成経路におけるC遺伝子の発現段階を明らかにしようと考えた.

材料および方法

材料 シアニック花色のクリムソン(C), ディープレッド(Dr), ピンク(P)およびスモーキーピンク(Sp)系統とホワイト花色のC型ホワイト(C-type white), Dr型ホワイト(Dr-type white), P型ホワイト(P-type white)およびSp型ホワイト(Sp-type white)系統(Table 1)の, 新鮮な舌状花弁を供試材料とした. また既知標品の入手が困難であったプロアントシアニジンのうち, とくにプロシアニジンを抽出するための材料として, STAFFORD and LESTER (1980)およびBATE-SMITH (1975)の報告に従って, イチゴ(*Fragaria chiloensis* var. *ananassa*)およびトチノキ(*Aesculus turbinata*)の生葉を供試した.

フラボノイドの抽出および分画 沸騰しているメタノール中で供試材料から抽出した抽出物を, 減圧濃縮した後に水溶液とした. この水溶液についてエーテル抽出と酢酸エチル抽出を行い, それぞれの画分を, 花弁3gあたり1mlのメタノール溶液とした.

二次元薄層クロマトグラフィー 酢酸エチル画分およびエーテル画分のそれぞれの試料について, 二次元薄層クロマトグラフィーを行った. 後者の画分試料のクロマトグラフィーでは, フラバン-3-オールである(+)-カテキンおよび(-)-エピカテキンの既知標品についても同時に展開した. 薄層板にはDC-Alufolien Cellulose (Merck, Art. 5552)を用い, 展開溶媒には, 1次の溶媒として*n*-ブタノール/酢酸/水(6:1:2, v/v=BAW 612)または(4:1:5, v/v=BAW 415)を, 2次の溶媒として5%または30%酢酸(=5%または30%AcOH)を使用した. クロマトグラムの観察(可視光下)の際には, フラバン-3-オールおよびプロアントシアニジンの発色試薬であるバニリン-塩酸試薬(MARKHAM 1982)を薄層板に噴霧した.

Table 1. Lines (indicated by the flower color) of *Cosmos bipinnatus* used in this study and their genotypes

Line ¹⁾	Genotype
Crimson (C)	<i>CCII SpSp</i>
Deep red (Dr)	<i>CCII spsp</i>
Pink (P)	<i>CCii SpSp</i>
Smoky pink (Sp)	<i>CCii spsp</i>
C-type white	<i>c c II SpSp</i>
Dr-type white	<i>c c II spsp</i>
P-type white	<i>c c ii SpSp</i>
Sp-type white	<i>c c ii spsp</i>

¹⁾ The lines with white flowers were discriminated by the presence of an identical genotype for *I* and *Sp* alleles with that of the lines with cyanic flowers.

Table 2. Identification of anthocyanidin produced by acid hydrolysis from petal compounds of Dr-type white line

Anthocyanidin	Rf value ¹⁾	
	a	b
Anthocyanidin produced	0.22	0.40
Authentic specimen		
Pelargonidin	0.37	0.63
Cyanidin	0.22	0.40
Delphinidin	0.11	0.21

¹⁾ Solvent system

a = Formic; b = Forestal.

プロアントシアニンからアントシアニンへの変換 酢酸エチル画分試料を濃縮乾固させた後、塩酸/*n*-ブタノール (5 : 95, v/v) 溶液を加え、95℃で60分間煮沸した (塩酸-ブタノール法: STAFFORD and LESTER 1980, MARKHAM 1982). この反応液について、島津自記分光光度計 (UV-240) を用いて吸収極大波長における吸光度を測定した. また反応液中に生じたアントシアニンと既知標品 [天然物中のアントシアニン (HARBORNE 1967) から調整した] の薄層クロマトグラフィーを行った. その際の薄層板にはDC-Plastikfolien Cellulose (Merck, Art. 5577) を用い、展開溶媒には酢酸/塩酸/水 (30 : 3 : 10, v/v = Forestal) およびギ酸/塩酸/水 (5 : 2 : 3, v/v = Formic) を使用した.

プロアントシアニン含量の測定 直径8 mmのコルクボーラーで打ち抜いた舌状花弁片8枚を、前出の塩酸/ブタノール溶液5 ml中に浸漬して塩酸-ブタノール法を適用し、反応液について550 nmにおける吸光度を測定した.

アントシアニン含量の測定 直径8 mmのコルクボーラーで打ち抜いた舌状花弁片4枚を、1%塩酸メタノール5 ml中に3時間浸漬し、上澄み液について530 nmにおける吸光度を測定した.

結 果

1. プロシアニンおよび (+) -カテキンの存在

ホワイト花色4系統の舌状花弁を供試して塩酸-ブタノール法を適用したところ、すべての系統について反応液は赤色となり、550 nmの吸収極大値を示した. この結果は、これらの花弁におけるプロアントシアニン—とくにプロシアニンの存在を示唆するものであった (BATE-SMITH 1975, STAFFORD and LESTER 1980).

そこで、550 nmの吸光度が最大であったDr型ホワイト系統の酢酸エチル画分について塩酸-ブタノール法を適用したところ、その反応液は赤色となり、550 nmに吸収極大が検出された. また反応液中に生じたアントシアニンはシアニンであった (Table 2).

ホワイト花色4系統の舌状花弁、イチゴおよびトチノキの生葉からの酢酸エチル画分の二次元クロマトグラムにおいて、バニリン-塩酸試薬に反応したスポットをFig. 1に示した. イチゴの葉か

Fig. 1. Two-dimensional thin-layer chromatograms of vanillin-HCl-positive compounds (in ethyl acetate soluble fraction) in the petals of lines with white flowers of *Cosmos* (A~D)¹⁾, and in the leaves of strawberry (E) and Japanese horse chestnut (F).

¹⁾ A=C-type white; B=Dr-type white; C=P-type white; D=Sp-type white.

らは、既報 (STAFFORD and LESTER 1980) のプロシアニジンであるB-3 (カテキン二量体), B-6 (カテキン二量体の異性体), C-2 (カテキン三量体) に相当するスポットが検出された (Fig. 1E). トチノキの葉からは、同属のマロニエ (*Aesculus hippocastanum*) で既報 (BATE-SMITH 1975) のプロシアニジンであるB-1 (エピカテキン-カテキン), B-2 (エピカテキン二量体), B-5 (エピカテキン二量体の異性体) に相当するスポット [スポットの位置についてはTHOMPSON *et al.* (1972) を参照した] が検出された (Fig. 1F). 一方P型ホワイト系統を除くコスモスのホワイト系統の舌状花卉からも、イチゴやトチノキの葉から検出された上記の物質と類似する呈色, *Rf* 値のスポットD, E, Fが検出された (Fig. 1A~D). シアニック4花色系統の場合、これらのスポットは検出されなかった。

C型ホワイト系統およびDr型ホワイト系統の舌状花卉由来のエーテル画分試料を供試した二次元クロマトグラムからは、(+)-カテキンと一致するスポットC1が検出された (Fig. 2). 一方P型ホワイト系統, Sp型ホワイト系統およびシアニック花色4系統の場合には、(+)-カテキンに相当するスポットは確認されなかった。

2. プロシアニジン含量

ホワイト花色4系統の生花卉について塩酸-ブタノール法を適用して測定した550 nmの吸光度から推定されるプロシアニジン含量 (Table 3) を, I, Sp遺伝子に関する遺伝子型についてみる

Fig. 2. Two-dimensional thin-layer chromatograms of vanillin-HCl-positive compounds (in diethyl ether soluble fraction) in the petals of white flowers of C-type (A) and of Dr-type (B).¹⁾

¹⁾ Authentic specimen a=(+)-Catechin; b=(-)-Epicatechin.

Table 3. Relative procyanidin content in the petals of lines with white flowers

Line	Absorbance ¹⁾
C-type white	0.650 ± 0.181
Dr-type white	0.760 ± 0.280
P-type white	0.084 ± 0.040
Sp-type white	0.375 ± 0.125

¹⁾ Fresh petals were soaked in *n*-butanol containing 5% of concentrated HCl and the solution was boiled for 1 hour. Absorbance at 550 nm was measured subsequently.

Table 4. Relative anthocyanin content in the petals of lines with cyanic flowers

Line	Absorbance ¹⁾
Crimson	1.032 ± 0.264
Deep red	2.403 ± 0.064
Pink	0.164 ± 0.013
Smoky pink	0.351 ± 0.014

¹⁾ Fresh petals were soaked in methanol containing 1% of concentrated HCl for 3 hours. Absorbance at 530 nm was measured subsequently.

と, *IIspsp* (Dr型) > *IISpSp* (C型) > *iispsp* (Sp型) > *iISpSp* (P型) であった。同様の傾向は, C遺伝子に関して優性遺伝子型であるシアニック花色系統の舌状花卉におけるアントシアニン含量 (Table 4) についても認められた。

考 察

C型, Dr型およびSp型ホワイト系統の舌状花卉からの酢酸エチル画分の二次元クロマトグラムにおいて検出されたスポットD, E, Fや, イチゴおよびトチノキの葉から同様にして検出されたプロシアニジンと類似のクロマトグラム特性を示す二量体もしくは三量体のプロシアニジンは, 多数知られている (THOMPSON *et al.* 1972, STAFFORD and LESTER 1980)。従って, 核磁気吸収スペクトル法などによる分析を行わなかった本実験では, コスモスからのスポットD, E, Fが, 既報の個々のプロシアニジンのどれに相当するかを明らかにすることはできなかった。しかしながら, スポッ

トD, E, Fの物質が二量体もしくは三量体のプロシアニジンであることは疑いないものと考えられる。P型ホワイト系統の場合にはこれらの物質の存在が確認されなかったが、生花卉の塩酸-ブタノール法による反応液が他のホワイト花色系統の場合と同様に赤色を呈し、550 nmに吸収極大値を示したことから、量的に少ないためであると推定される。またDr型ホワイト系統の花弁成分について例示したように、塩酸-ブタノール法による加水分解産物はシアニジンであり、ホワイト花色供試系統の舌状花卉におけるプロシアニジンの存在は明らかである。

さらにC型ホワイト系統およびDr型ホワイト系統の舌状花卉に由来するエーテル画分の二次元クロマトグラムにおいて検出された(+) -カテキンは、P型ホワイト系統およびSp型ホワイト系統の場合には検出されなかったが、ホワイト花色4系統におけるプロシアニジンの存在からみて、このような差異も量的である(後者の2系統における蓄積量が少ないことによる)可能性がある。

なおコスモスの舌状花卉由来の酢酸エチル画分の二次元クロマトグラムでは、イチゴおよびトキノキの葉の場合に検出された(+) -カテキンが検出されなかった。これもコスモスの花卉における(+) -カテキンの蓄積量が少ないこと、およびこの物質がエーテルに溶出し易いことによるものと考えられる。

アントシアニジン合成の最終段階における中間体であることが証明されたフラバン-3, 4-ジオールは、ジヒドロフラボノールの還元によって合成される(HELLER *et al.* 1985a・b)。また、これに続くアントシアニジン合成とは別に、フラバン-3, 4-ジオールの還元によってフラバン-3-オールが、さらにフラバン-3-オールとフラバン-3, 4-ジオールの重合によってプロアントシアニジンが、それぞれ合成されることが明らかになっている(HARBORNE 1988, HELLER and FORKMANN 1988)。

本研究のコスモスでは、C, c対立遺伝子について劣性遺伝子型であるホワイト花色系統の舌状花卉において、上記のようにフラバン-3-オールである(+) -カテキンやプロアントシアニジンであるプロシアニジンの存在が確認、または示唆(P型ホワイト系統の場合)された。従って劣性

Fig. 3. Biosynthetic pathways of flavonoids after dihydroflavonol synthesis and inferred expression site of the gene C.¹⁾

¹⁾ The compounds detected in the petals of *Cosmos* are represented as aglycone forms in brackets.

遺伝子型でもジヒドロフラボノールをフラバン-3, 4-ジオールに還元する能力があると考えられ、C遺伝子の発現段階は、フラバン-3, 4-ジオール→アントシアニジンの過程にあると推定された (Fig. 3).

C, c対立遺伝子について劣性遺伝子型であるホワイト花色系統の舌状花卉に蓄積するプロアントシアニジンと、優性遺伝子型であるシアニック花色系統の舌状花卉に蓄積するアントシアニンが、量的にみて、IおよびSp遺伝子の影響を同様に受けていることも、アントシアニン生合成経路におけるC遺伝子の発現段階が、フラバン-3, 4-ジオール→アントシアニジンの過程であることを裏付けている。

コスモスの花卉から検出されているアントシアニンはシアニジンおよびペオニジンの配糖体であり (佐俣・稲津 1983), それらの合成が抑制されるホワイト花色系統の花卉に蓄積するプロアントシアニジンがプロシアニジンであったことは、合理的であると解される。

フラバン-3, 4-ジオール→アントシアニジンの過程が遺伝的に閉鎖されたホワイト花色の劣性変異体としては、オダマキ属の栽培品種であるマッカナジャイアント (*Aquilegia hybrida* cv. McKana's Giant) におけるホワイト花色遺伝子型 (BESSHO 1988) やアスター (*Callistephus chinensis*) における系統 18 (RUHNAU and FORKMANN 1988) などが知られている。本研究で供試したコスモスでも、フラバン-3, 4-ジオール→アントシアニジンの過程に働く遺伝子が劣性方向へと突然変異を起こし、この過程が閉鎖されて、ホワイト花色を発現するようになったと考えられる。

HELLER and FORKMANN (1988) は、フラバン-3, 4-ジオールの2位の水酸化および2回の脱水反応を含む3段階の反応が、アントシアニジン合成には不可欠であると推定している。しかしこれらの過程に係わる酵素については明らかになっておらず、上記の過程の詳細も解明されていない。今後コスモスのホワイト発色花卉とシアニック発色花卉における酵素学的特性を比較することが、フラバン-3, 4-ジオール以後のアントシアニジン生合成過程を解明するために有意義であると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたって終始懇篤なるご指導を賜った玉川大学農学部教授中島哲夫博士に、心から感謝の意を表します。

引用文献

- BATE-SMITH, E. C. 1975. Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry* **14** : 1107-1113.
- BESSHO, M. 1988. Two genes controlling the conversion from flavanonol to anthocyanidin in sepals of genus *Aquilegia*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **57** : 462-466.
- HARBORNE, J.B. 1967. Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic Press, London. 383p.
- 1988. The flavonoids : Recent advances 4. Biosynthesis. In "Plant pigments." T.W.GOODWIN (ed.), Academic Press, London. 318-328.
- HELLER, W., L.BRITSCH, G. FORKMANN and H. GRISEBACH 1985a. Leucoanthocyanidins as intermediates in anthocyanidin biosynthesis in flower of *Matthiola incana* R. Br. *Planta* **163** : 191-196.
- and G. FORKMANN 1988. Biosynthesis. In "The flavonoids : Advances in research since 1980" J. B. HARBORNE (ed.), Chapman and Hall, London. 399-425.
- , ———, L. BRITSCH and H. GRISEBACH 1985b. Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to flavan-3, 4-*cis*-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis. *Planta* **165** : 284-287.

- 稲津厚生・間藤正美・中島哲夫 1989. コスモス花卉におけるフラバノールの蓄積からみた花色遺伝子の発現. 育雑 39 (別 1) : 458-459.
- ・中森紀世・中島哲夫 1988. コスモスの花色遺伝子 *I* の発現. 育雑 38 (別 2) : 246-247.
- MARKHAM, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London. 24, 70.
- MIYAKE, K., Y. IMAI and K. TABUCHI 1927. Genetic experiments with cosmos. Jour. Coll. Agric., Imperial University of Tokyo 9 : 139-147.
- RUHNAU, B. and G. FORKMANN 1988. Flavan-3, 4-diols in anthocyanin biosynthesis, enzymatic formation with flower extracts from *Callistephus chinensis*. Phytochemistry 22 : 1035-1039.
- 佐俣淑彦・稲津厚生 1983. コスモス新花色の育種—特に花色の遺伝ならびに生化学的分析—. 玉川大学学術教育研究所共同研究報告 3 : 1-39.
- STAFFORD, H.A. and H.H. LESTER 1980. Procyanidins (condensed tannins) in green cell suspension cultures of Douglas fir compared with those in strawberry and avocado leaves by means of C_{18} -reversed-phase chromatography. Plant Physiol. 66 : 1085-1090.
- THOMPSON, R.S., D. JACQUES, E. HASLAM and R. J. N. TANNER 1972. Plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction ; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. J. C. S. Perkin I 1387-1399.

Summary

In *Cosmos bipinnatus* CAV., besides the three genes: *C*, *I* and *Sp* which are responsible for the expression of the cyanic and the white flower colors, there are several genes involved in the expression of the yellow coloration. When the gene *C* operates under dominant condition, it controls the accumulation of anthocyanins and the cyanic color of flowers, whereas under the influence of recessive alleles, white or yellow flowers appear. Because the white and the yellow flowers accumulate dihydroflavonols, it is considered that the gene *C* expresses itself in the anthocyanin biosynthetic pathway after the appearance of dihydroflavonols while it remains to be determined whether the expression site is located before or after the flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidin) step. To analyse the expression of the gene *C*, the flavonoids synthesized after dihydroflavonols in the biosynthetic pathway were investigated using the ray petals of four lines with white flowers and four lines with cyanic flowers (Table 1) in this study.

Anthocyanidin produced by acid hydrolysis from the petal compounds of a line with white flowers was identified as cyanidin (Table 2) and procyanidins were detected on the two-dimensional chromatograms of the ethyl acetate soluble fraction prepared from the petals of the lines with white flowers (Fig. 1). (+)-Catechin (a flavan-3-ol) was detected on the two-dimensional chromatograms of the diethyl ether soluble fraction prepared from the same petals as in the case of the procyanidins (Fig. 2). Procyanidins and (+)-catechin were not observed in the lines with cyanic flowers. The procyanidin content in the lines with white flowers and the anthocyanin content in the lines with cyanic flowers were higher in the dominant *II* genotypes than in the recessive *ii* genotypes, as well as in the recessive *spsp* genotypes compared with the dominant *SpSp* genotypes (Table 3, 4).

On the basis of the above results and of previous data on flavan-3-ol, proanthocyanidin and anthocyanin biosynthetic pathways, it was suggested that since the recessive *cc* genotypes can reduce the dihydroflavonol to flavan-3,4-diol, gene *C* expresses itself in the conversion of flavan-3,4-diol to anthocyanidin (Fig. 3).

A. INAZU

M. MATO

Faculty of Agriculture, Tamagawa University, Machida, 194