

キンギョソウの花色素に関する研究：四倍体キン ギョソウにおけるanthocyaninおよびauroneの量的変 異について

中尾, 一男
福岡学芸大学

上本, 俊平
九州大学農学部園芸学教室

<https://doi.org/10.15017/22942>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 21 (4), pp.353-361, 1965-05. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

キンギョソウの花色素に関する研究¹⁾四倍体キンギョソウにおける anthocyanin および
aurone の量的変異について中尾 一 男²⁾・上本 俊 平Studies on the flower pigments in *Antirrhinum majus*Relative contents of anthocyanin and aurone
pigments in some tetraploid snapdragons

Kazuo Nakao and Shunpei Uemoto

緒 言

キンギョソウの花色素に関しては古くからその遺伝に関する研究が行なわれ (Baur 1910), 花色の遺伝機構には4因子が関与していることが見出されている。さらにその花色素に関しては, 主として anthocyanin の生化学的分析を Robinson test によつて行なつた Scott-Moncriff (1936)らの報告が見られるが, 近年に至つて Geissman およびその共同研究者 (1954, 1955a, 1955b, 1955c) によつて行なわれたペーパー・クロマト法および分光光度計による分光光学的な吸収測定による定性ならびに定量分析に関する研究は, キンギョソウ花色の遺伝生化学的解明に多大の貢献をもたらしたのみならず, flavonoid 花色素一般の生成機構についても多大の示唆をあたえた。すなわち, キンギョソウ花色素の生成に関しては, N, P, M および Y の4主要遺伝子が関与していると, N 遺伝子は flavonoid 色素の生成をもたらし, P 遺伝子は C₁₅-precursor₂ (Harborne 1962) より anthocyanidin, flavonol の生成に関与し, M 遺伝子は anthocyanidin, flavon および flavonol の B-ring における酸化を規定すること, および Y 遺伝子は C₁₅-precursor₁ から他の flavonoid 色素とは別の pathway によつて aurone の生成を制御するものとしている。さらに, これら色素間にはその量的な相互関係が存在すること, すなわち劣勢因子の数の増加は anthocyanin の減少をまねき, 同数の優勢因子の存在において cyanin は pelargonin より濃度が高いこと, 優勢因

子数の増加は aurone の生成を減少せしめること, および高濃度の anthocyanin の存在は低濃度の aurone と平衡的に関連することなどを見出している。これはいずれも二倍体のホモ接合体, およびそれらの間の F₁ 雑種における花色素分析の結果到達した結論である。その後, Böhme および Schütte (1956) によつて二倍体のほかに三倍体, ならびに四倍体キンギョソウを供試した花色素の分析が行なわれ, anthocyanin に関しては Geissman らのえた結論と同様の結果をえている。すなわち, 同一遺伝子の 2x から 4x への増加は色素生成の増減に影響をおよぼさなかつたのである。したがつて, キンギョソウの花色素に関しては, その倍数性の如何にかかわらず, 前記の仮説ならびに主張がみとめられているのが現状である。しかしながら, 市販四倍体キンギョソウにおける花色素は, 一応固定した系統と思われるものでは, 一般に二倍体よりも花色が濃厚になること, とくに黄色が強くあらわれることなどの現象が目される。そこで, 本研究では遺伝子数の倍加による因子量効果の存否を確かめるため, 著者らの一人上本が維持してきているキンギョソウの品種, ならびに系統を供試して, anthocyanin および aurone 色素についての比較定量分析を行なつた。

本研究の遂行に際して指導を頂いた九州大学農学部福島栄二教授, および常に助言と激励を賜つた九州大学名誉教授伊藤寿刀先生に対して深く謝意を表す。

材料および方法

1. 材 料

本実験に供した二倍体キンギョソウは導入 (1951) 後, 自殖8代目のもので, ほぼ完全に固定し, 少なくとも

¹⁾九州大学農学部園芸学教室業績

²⁾福岡学芸大学

も花色に関しては完全にホモ接合体となつていたと思われた Ball's Supreme Red (濃赤色花品種), および導入後 (1953) 自殖6代目の, これも固定系統とみなされた橙黄色花品種, およびその間の F₁ 雑種 (赤色花) の計3品種である。これら品種の花色に関する遺伝子型は, Geissman らの用いた遺伝子記号によれば, それぞれ PPMMyy, PPmmyy, およびその F₁ 雑種 PPMmyy に相当すると考えられる。

四倍体品種としてはその遺伝子型が前記二倍体品種に相対応すると考えられる2系統 (いずれも育成後3年目で花色に関してはホモ接合体と思われる) およびその F₁ 雑種を供用した。したがって, 花色に関する遺伝子記号は PPPPMMMMyyyy および PPPPmmmmyyyy, ならびにその F₁ 雑種 PPPPMMmmyyyy である。

前記各品種および系統を1959年9月播種し, 1960年2月, 温室内開花の個体から花卉を採取した。花器官のうちから萼, 雄蕊および雌蕊を, さらに無色部分を除いた花卉のみを用い, これを45~50°Cで24時間風乾し, 粉末にしたものを暗所においたデシケータ

ー内に貯蔵し, 随時とりだして実験に供用した。なおキンギョソウは花卉の部位によつて色素の分布が異なるため (Dayton 1956), 一部はとくに aurone 分布の多い palate 部位と残余の部分とに区別して別々に実験に供した。

2. 方法

上記の花弁乾燥粉末につき各試料とも100mgをとり, 1%塩酸性メタノール20mlをもつて乳鉢内で摩砕し, 東洋濾紙 No. 6 で濾過後1%塩酸性メタノールを20mlになるまで加えて粗抽出液とした。anthocyanin の相対量測定は, 上記粗抽出液より2mlとり, 1%塩酸性メタノールを加えて10mlまで希釈し, そのまま日立分光光度計でその光学的濃度を光吸収によつて測定し, さらに粗抽出液の2mlをとり, 東洋濾紙 No. 50 または No. 51 の20cm×20cmに線着し (Williams and Wender 1952), 1960年には m-クレゾール: 醋酸: 水=50:2:48 で展開し, anthocyanin および aurone の各色素帯を切り離し, 5%酢酸性メタノールで溶出した後10mlになるまで同溶媒を加えたものにつき分光光度計

Table 1. Rf values of anthocyanidin and aureusidin glycosides observed on paper-chromatograms developed by three distinct solvents.

Pigment	Iso-butanol: Acetic acid: Water 4:1:5		Iso-butanol: HCl: Water 4:1:5		n-butanol: Acetic acid: Water 4:1:5	
	Upper layer	Lower layer	Upper	Lower	Upper	Lower
Antirrhinin	0.36	0.60	0.41	0.44	—	0.69
Pelargonin	0.41	0.66	0.48	0.42	—	0.77
Aureusin	0.34	0.19	0.39	0.14	—	0.26

によつて最大光吸収値を測定した。

さらにクロマトグラム上において両色素の分離を良好ならしめるため, 1964年には iso-ブタノール4: 醋酸1: 水5の下層, すなわち, 水溶液層を展開液として使用した。なお, この醋酸のかわりに塩酸を使用しても良好な分離帯がえられた (Table 1 参照)。

実験結果

1. Anthocyanin の量的変異について

キンギョソウの花色素における anthocyanin は, 赤色, 濃赤色ないしは赤紫色, 濃赤紫色花に antirrhinin (cyanidin-3-rahnogluco-side) が, 桃色, 濃桃色ないしは橙黄色, 濃橙黄色花に pelargonidin-3-rhamnoglucoside が生成される (Harborne 1962)。それらのうち濃赤色花の二倍体とそれに対応する四倍体の花卉に含まれる antirrhinin の相対量を比較した

のが Fig. 1 である。光吸収曲線は粗抽出液を抽出操作後, 直ちに測定した光学的濃度を表わすが, その相対量は二倍体の値を100とした場合, 四倍体のそれは124となり (Table 2 参照), 遺伝子型が PPPPMMMyyyy のものは PPMMyy に比較して約25%の濃度増大をしめしたことになる。

Pelargonin は供試した橙黄色品種では二倍体, およびそれに対応した遺伝子型をもつ四倍体共にその花卉に生成される量が少なく, 粗抽出液では他の components の吸収曲線との重複のため, 正確な光吸収曲線は得られなかつた。

上記濃赤色ならびに橙黄色の二倍体2品種および四倍体2系統のそれぞれの間における F₁ 雑種の花卉に含まれる antirrhinin* の相対濃度は Fig. 2 にしめす

* Cyanin 生成の遺伝子 M は pelargonin 生成の遺伝子 m に対して単純優性である。

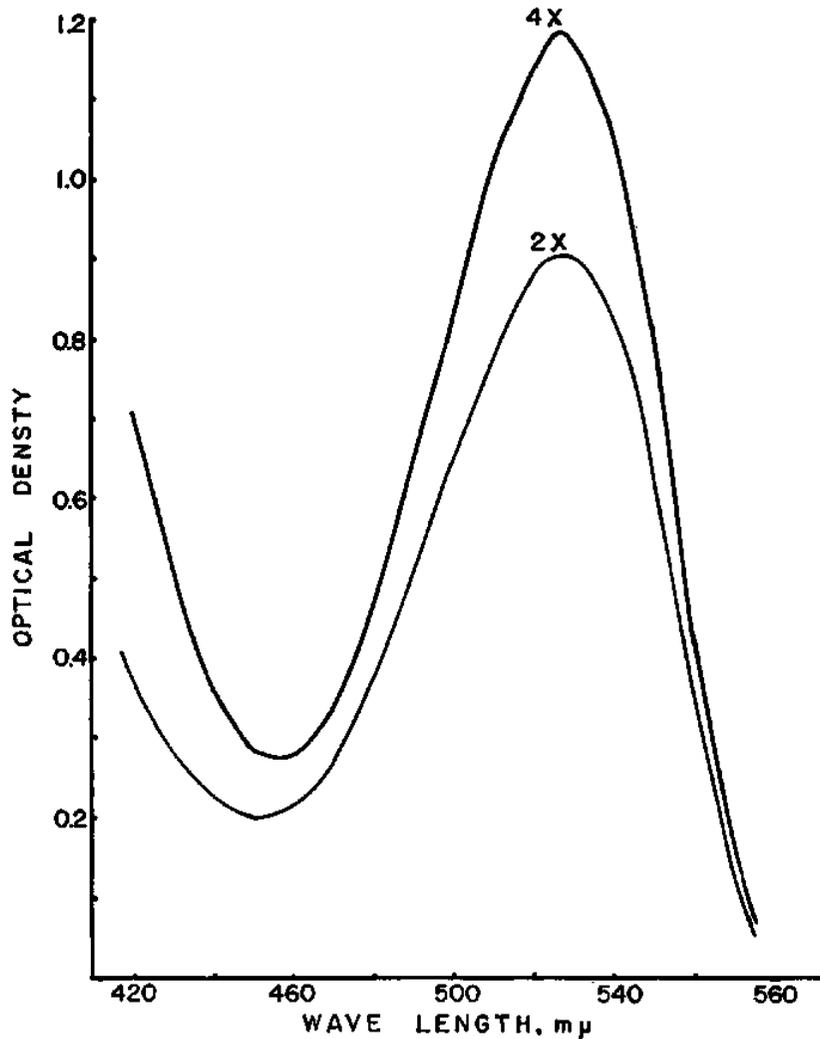


Fig. 1. Absorption spectra of antirrhinin in crude extracts of petals.

Table 2. Relative concentrations of antirrhinin and pelargonin observed, as compared between some diploid and tetraploid strains having corresponding genotypes of pigmentation.

(1960)				(1964)		
Flower colour (Pigment)	Genotype	Optical density at 540 m μ ^(a)	Percentage	Genotype	Optical density at 528 m μ ^(b)	Percentage
Crimson red (Antirrhinin)	PPMMyy (2x)	0.445	100 %	PPMMyy (2x)	1.105	100 %
	PPMMyy (4x)	0.631	142	PPMMyy (4x)	1.375	124
	PPMMyy			PPMMyy		
Red (Antirrhinin)	PPmmyy (2xF ₁)	0.570	100	PPmmyy (2xF ₁)	1.318	100
	PPMMyy (4xF ₁)	0.435	76	PPMMyy (4xF ₁)	0.805	64
	PPmmyy			PPmmyy		
Orange (Pelargonin)	PPmmyy (2x)	0.223	100			
	PPmmyy (4x)	0.173	78			
	PPmmyy					

N.B. a) An absorption measurements were carried out with crude extracts of petals, using HCl 1% aqueous methanol. b) An absorption measurements were carried out with eluted solutions from chromatograms, using 5% acetic methanol.

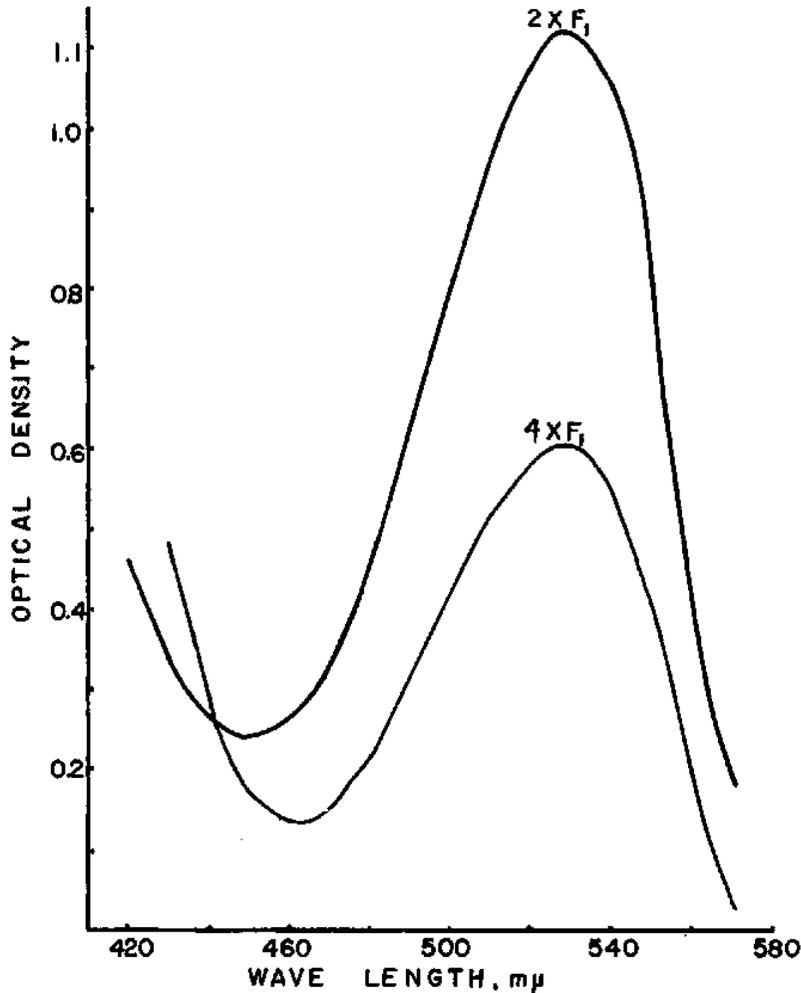


Fig. 2. Absorption spectra of antirrhinin in crude extracts of petals.

ごとくであつた。すなわち、この場合は固定品種とは逆に PPMmyy (2x F₁) は PPPPMMmmyyyy (4x F₁) に対して 64% も高い濃度差をもつていた。またいつたん、ペーパー・クロマト法によるそれぞれの分離帯より溶出した antirrhinin ならびに pelargonin の最大光吸収値 (optical density による) は粗抽出液の値とともに Table 2 にまとめてしめた。ひとたびペーパー・クロマトグラムとして展開した後の溶出液では、それらの操作の間に antirrhinin および pelargonin の相対濃度は可成り減少したが、粗抽出

液の直接測定と比較して、各遺伝子型間の比率には大きい変動はしめさなかつたので、いちおう相対濃度の比較には支障はないものと考えられる。この方法によれば、pelargonin の濃度も四倍体においては二倍体におけるよりも高いことが明らかである。

2. Aurone の量的変異について

キンギョソウの花色素に含まれる aurone は aureusin (aureusidin-6-glucoside) (Harborne 1962) のみである。Fig. 3 および Fig. 4 は濃赤色花品種ならびに橙色花品種における二倍体と四倍体の花卉に

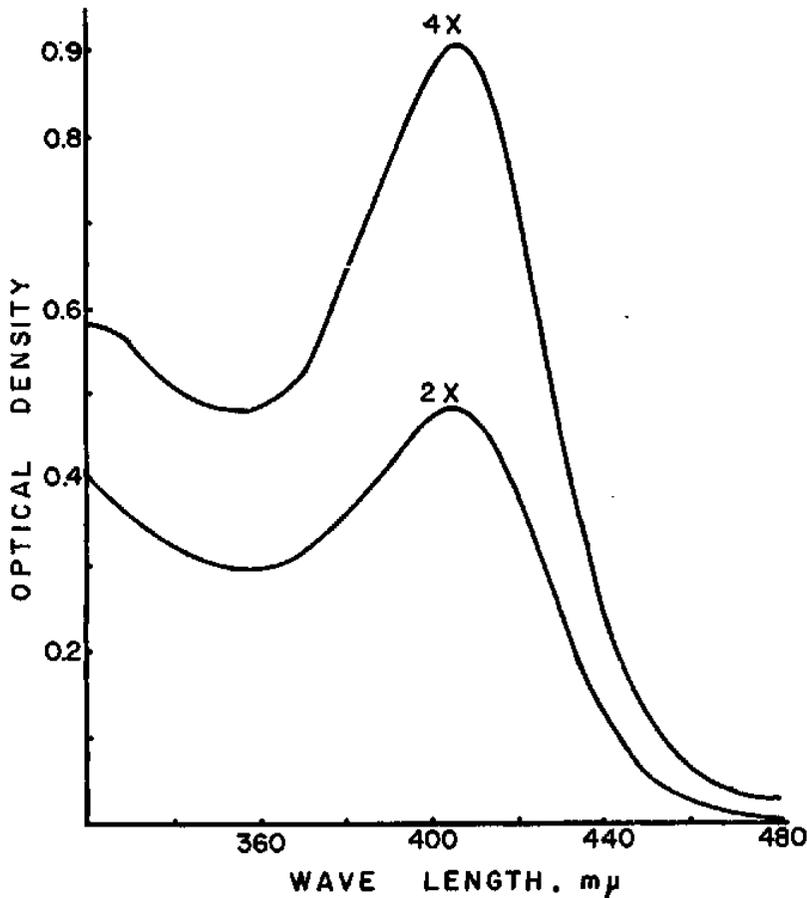


Fig. 3. Absorption spectra of aureusin in eluted solutions from chromatograms.

含まれる aureone の光吸収曲線の比較図である。すなわち、Fig. 3 における比較では四倍体の aureone 濃度は二倍体のそれに比較して 90% に近い増加を、また Fig. 4 における比較でもやはり四倍体の aureone 濃度が、二倍体のものより 84% も増加している。ほぼ 2 倍近い増加をしめしたものといえよう。それらの間における F_1 雑種のしめす二倍体と四倍体の比較によつて Fig. 5 のような曲線をえた。いずれも粗抽出液の線着ペーパー・クロマトグラムによる黄色帯の溶出液の光学的濃度である。

Jorgensen および Geissman (1955c) は、花卉よりの aureone 抽出にはメタノール単液を使用し、さらに塩化アルミニウム ($AlCl_3$) を加えて最大吸収値の波長を $400 m\mu$ 付近から $510 m\mu$ に移動させて短波長部位での他の components による吸収曲線との極端な over-lap を防いでいるが、著者らが同様にメタノ

ール単液での aureone 抽出を行なつた際には aureone の外に antirrhinin の溶出が見られ、塩化アルミニウムの加用による aureone の最大吸収値の波長域と重複して判定が困難であつた。それ故、あえて彼等の方法を用いなかつた。

なお、1960年における調査に際しては、当時使用した展開液 (*n*-ブタノール：醋酸：水 = 4 : 1 : 5 の上層、および *m*-クレゾール：醋酸：水 = 50 : 2 : 48) でのペーパー・クロマトグラムにおいて、anthocyanin と aureone の分離が不十分で、したがつて溶出ならびに吸収値の測定は anthocyanin に重きをおいたため、aureone についての正確な値は得られなかつた。しかし、花冠の palate 部位に含まれる aureone 量の四倍体 F_1 雑種における親品種よりの増加はとくに著しいことが注目された。Table 3 に付記した通りである。

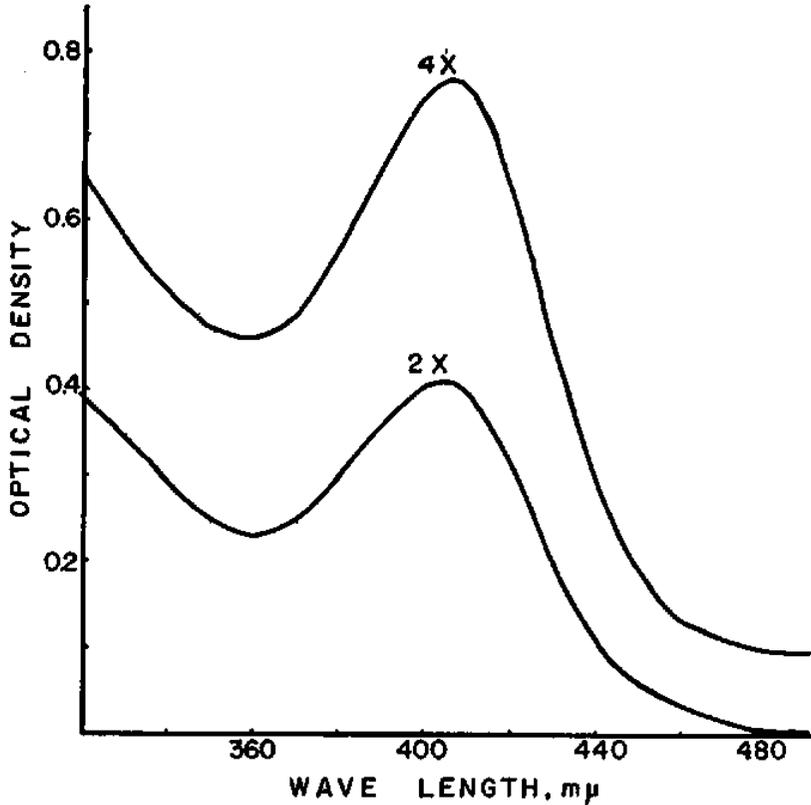


Fig. 4. Absorption spectra of aureusin in eluted solutions from chromatograms.

Table 3. Relative concentrations of aureusin observed, as compared between diploid and tetraploid strains having the corresponding genotypes of pigmentation. (1964)

Flower colour	Genotype	Optical density at 406 m μ	Percentage
Crimson red	PPMMyy (2x)	0.480	100
	PPMMyy (4x)	0.907	189
Red	PPmmyy (2xF ₁)	0.789	100
	PPMMyy (4xF ₁)	1.202	152
Orange	PPmmyy (2x)	0.415	100
	PPmmyy (4x)	0.763	184

考 察

Jorgensen および Geissman (1955c) は、彼らの報告において、二倍体キンギョソウの花弁に含まれる anthocyanin の相対量に関してそれらの品種、また

は系統が有している花色素に関する遺伝子のうち、劣勢因子の数の増加は anthocyanin の生成量の減少につながるものとしており、その後の Böhme および Schütte (1956) が倍数体を用いて行なつた実験において、allelomorph の倍加は、anthocyanin の色素生

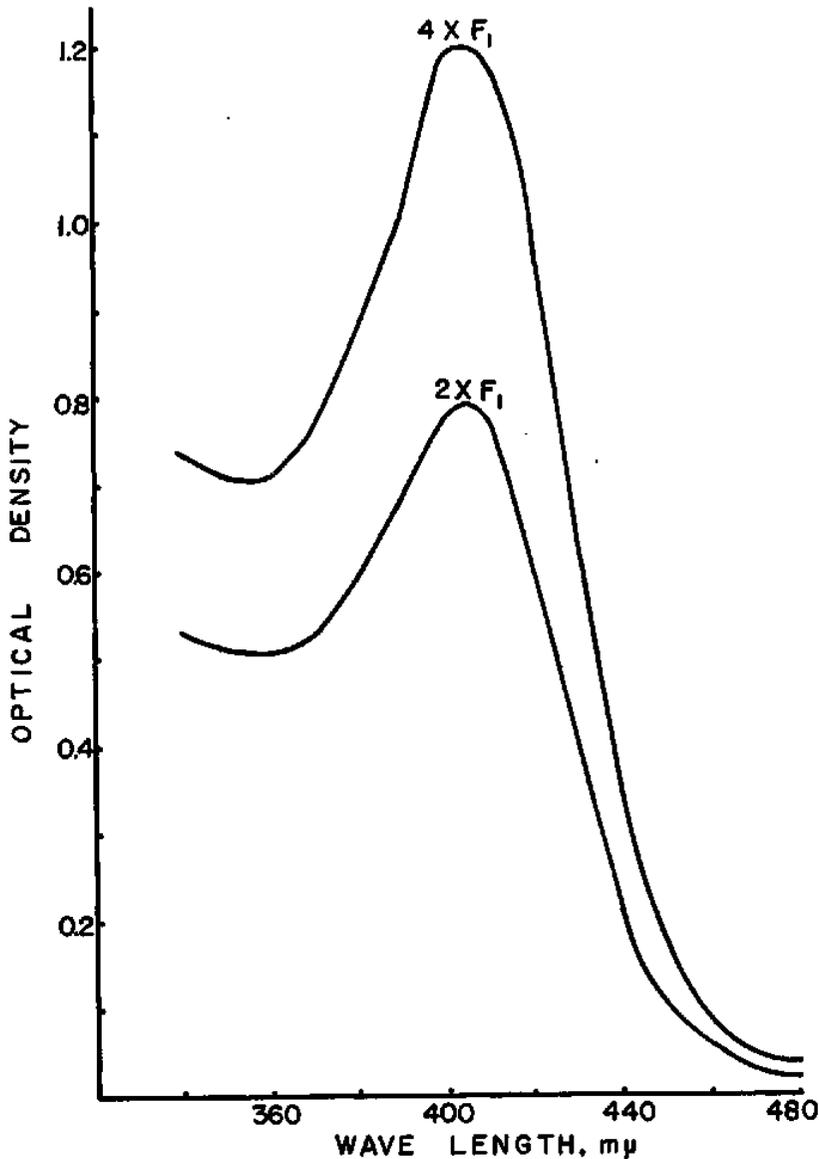


Fig. 5. Absorption spectra of aureusin in eluted solutions from chromatograms.

成に累積的効果をしめさなかつたことを報告している。

著者らの実験に供した四倍体系統においても、劣勢因子である m 遺伝子の増加は明らかに antirrhinin の生成を減少せしめた。Table 4 は濃赤色ないし赤色の四倍体キンギョソウのうち、 m 遺伝子と M 遺伝子が異なつた比率で混在する3種の系統についてそれぞれの antirrhinin の相対濃度について分析調査した結果である。すなわち、 m 遺伝子が1個増加するごとに

antirrhinin の相対量は約20%ずつ減少してゆくと見られる。Geissman らの仮説にいう、劣勢因子の増加が antirrhinin の減少をともなうことに一致する。この際の劣勢因子は m 遺伝子の数が主役を演ずるものと理解されよう。また F_1 雑種のしめす antirrhinin の濃度は四倍体 F_1 雑種においては二倍体 F_1 雑種よりも減少し、これも明らかに劣勢因子 m の数の絶対数の増加が antirrhinin 生成を減少せしめている (Table 2 参照)。当然のことながら m 遺伝子のホモ接合によ

つてのみその生成を許される pelargonin においても、四倍体系統はm遺伝子の倍加(劣勢因子の増加)によつて、その濃度が22%減少していることなど、m遺伝子という劣勢因子の増加が anthocyanin 生成の減少をともなう点は、Geissman らの主張と少しもくいちがわぬ。

しかし、著者らが供用した固定品種内における二倍体と四倍体の花色色素 antirrhinin の比較分析の結果は、やや趣きを異にしている。すなわち、Table 2 によつても明らかなごとく、四倍体系統はそれと遺伝子型において対応すると思われる二倍体品種より24%から46%も antirrhinin 濃度が高いのである。この場合の各品種ならびに系統の遺伝子型 PPMMyy (2x), および PPPPMMMMyyyy (4x) のうち、y 遺伝子は anthocyanin の生成に直接関与しないものとして考慮外におけば、四倍体と二倍体の相違はPおよびM遺伝子が倍加されていることである。しかも現実に四倍体の方が antirrhinin の濃度において高い測定値をしめすことは、それら allelomorph の倍加による因子量効果の或る程度の存在が仮定できよう。しかし、完全な因子量効果が存在するならば濃度も2倍に近づくべきであるから、他の劣勢因子y遺伝子が何らかの形で antirrhinin 生成を量的に制御しているとも考えられよう。

Table 4. Relative concentrations of antirrhinin in tetraploid strains having three distinct genotypes in reference to M gene.

Genotype	Optical density at 528 m μ	Percentage
PPMMyy PPMMyy	1.375	100
PPMMyy PPMmyy	1.075	78
PPMMyy PPmmyy	0.805	59

さらに四倍体キンギョソウの花色素生成において従来の説に著しくかけはなれるものに aurone がある。Jorgensen および Geissman はキンギョソウ花色素に関する遺伝子中、優勢因子の増加は aurone の濃度減少をまねき、また anthocyanin の増加は aurone の減少につながる事実を彼らの二倍体品種の分析結果から明らかにしているが、著者らの用いた四倍体系統の分析結果はこれらとはやや異なる結果である。すなわち、Y遺伝子を含まず、y遺伝子のみをも

つ遺伝子型においては、四倍体植物は二倍体植物に比較して約2倍値に近い aurone 濃度をしめし、濃赤色品種においては四倍体は二倍体に比して antirrhinin の濃度の増加が見られるにもかかわらず、aurone の生成も著しく増加している。しかも、その F₁ 雑種においてしめされる aurone 生成量の増加が、両親品種および系統のそれよりもとくに著しいことは注目し得るであろう。また、aurone は C₁₅-precursor₁ より C₁₅-precursor₂ に至る間で他の flavonoid 色素とは別の pathway によつて生成される色素であるという事実とも考えあわせ、その生成過程に因子量効果が明らかに存在することを示唆するものであろう。さらに F₁ 雑種においては花冠の palate 部位における aurone の極端な増加現象から考えてある程度のヘテロシス現象がそれに介在し得ることを暗示するものではなからうか。

摘 要

1. キンギョソウの四倍体系統および、それと花色色素に関して対応した遺伝子を有すると思われる二倍体品種における花色色素 (anthocyanin および aurone) の光学的スペクトル吸収分析を行ない、それら色素の相対量を比較検討した。

2. 赤色四倍体系統における antirrhinin の光吸収値測定による定量分析の結果、m遺伝子の増加にともなう M 遺伝子の減少は antirrhinin 生成量の減少をもたらすこと、また二倍体、および四倍体の比較において m 遺伝子の絶対量の増加は赤色品種においては antirrhinin の、橙色品種においては pelargonin の生成量の減少をもたらすことが明らかとなった。

3. PPPPMMMMyyyy なる遺伝子型の品種(濃赤色四倍体)はそれに対応する二倍体(PPMMyy)に比較してある程度の因子量効果を表わし、前者は後者より antirrhinin 生成量において25~40%増加していることを認めた。

4. 四倍体に含まれる aurone の濃度は、それと対応する二倍体品種に比して2倍近いこと、および F₁ 雑種の花冠の palate 部位においては、その生成量にある程度のヘテロシス現象が見出された。

参 考 文 献

1. 有隣健一, 1963. バラの花色に関する研究, 特に遺伝生化学的分析と育種に対する応用について I, 九大農芸誌, 20.

2. —, 1964. バラの花色に関する研究, 特に遺伝生化学分析と育種に対する応用について II. 九大農学芸誌, 21.
3. Baur, E., 1910. Vererbungs- und Bastardierungs-versuche mit *Antirrhinum*. Z. Indukt. Abstammungslehre, Berlin, III.
4. Böhme, H. und H. R. Schütte, 1956, Genetisch-biochemische Untersuchungen über Blütenfarbstoffe an Mutanten von *Antirrhinum majus* (L.). Biol. Zbl., 75.
5. Dayton, T. O., 1956. The inheritance of flower color pigments I. The genus *Antirrhinum*. Jour. Genet., 54.
6. Geissman, T. A., E. C. Jorgensen and B. L. Johnson, 1954. The Chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus* color genotypes. I. The flavonoid components of the homozygous P, M, Y color types. Arch. Biochem. Biophys., 49.
7. Geissman, T. A. and T. B. Harborne, 1955. The chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus*. IV. The albino (—mm—nn) form. Arch. Biochem. Biophys., 50.
8. Geissman, T. A., 1962. The chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press.
9. Jorgensen, E. C. and T. A. Geissman, 1955a. The chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus*. II. Glycosides of PPmmYY, PPMYY, ppmmYY and ppMMYY color genotypes. Arch. Biochem. Biophys., 54.
10. Jorgensen, E. C. and T. A. Geissman, 1955b. The chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus*. III. Relative anthocyanin and aurone concentrations. Arch. Biochem. Biophys., 55.
11. Scott-moncrieff, R., 1930. Natural anthocyanin pigments I. The magenta flower pigment of *Antirrhinum majus*. Biochem. J., 24.
12. 上本俊平, 1964. キンギョソウのF₁雑種に関する研究. I. 2倍性 F₁雑種のしめす生態的諸特性について. 九大農学芸誌, 21.

Summary

1. The biochemical analyses on certain colour pigments of flowers, such as anthocyanins and aurone glycosides, have been carried out spectrophotometrically in the snapdragon, *Antirrhinum majus*. Varieties and strains used were consisted of a certain diploid and tetraploid forms having the corresponding genotypes of pigmentation, and the patterns of relative concentrations of anthocyanins and aurone glycosides were compared with those varieties and strains.

2. As the result of quantitative spectro-photometric analyses upon the antirrhinin concentration with some red-flowered tetraploid varieties, it was made clear that the decreasing of *M* gene accompanied by the increase of *m* gene, had effected a reduced synthesis of antirrhinin, and, in consequence, that from the comparison of diploid and tetraploid forms, the increasing amount of *M* genes had directly correlated with a reduced antirrhinin formation in the red flowered varieties and with a reduced pelargonin synthesis in the orange flowered varieties.

3. A homozygous tetraploid varieties in reference to *M* gene, the crimson-red flowered one, showed a definite factor-dosage effect in the degree of pigmentation as compared with its corresponding diploid form, having the homologous genotype to its tetraploid form. The former could synthesize the antirrhinin 25%–40% more in amount than that of the latter.

4. The aurone pigment (aureusidin glycoside) in petals, was observed to be synthesized twice as much in amount in the tetraploid forms as in the diploid ones, which have homologous genotypes to the former. A certain heterotic phenomenon on the synthesis of aurone pigment in palate petals should be noticed in some F₁ hybrid individuals.

Horticultural Laboratory, Faculty of
Agriculture, Kyushu University