

【研究報告】

玉川大学に保存されていたコスモス系統のHPLCによる色素分析

上原 歩¹・肥塚信也²・大塚みゆき²・山崎 旬¹

要 約

玉川大学農学部で冷蔵保存されていたコスモス (*Cosmos bipinnatus* Cav.) 種子を播種し、その花色を分析した。花色分析にはクリムソン、ピンク、イエロー、ホホワイトなどの多様な花色を含む、玉川育成系統1系統および市販品種12系統を供試した。これらの花卉搾汁液のpHは5.2程度の弱酸性を示し、コスモスの花色の多様性に影響を与えている可能性は低いと考えられる。また、花卉粗抽出液をUV-Vis検出器を用いたHPLCで、異なる検出波長 (530, 380, 350 nm) で分析することにより、花色の発色に関与する色素であるアントシアニン、カルコン類、そしてフラボンを少量の試料から簡便に測定する方法を確立した。さらに、本研究で供試した13系統より、コスモスで知られている16通りの色素の表現型のうち、6通りが、アントシアニン、カルコン類、フラボンの有無、およびアントシアニンの量から確認された。

キーワード：コスモス、花卉、色素、フラボノイド、HPLC

緒言

キク科のコスモス (*Cosmos bipinnatus* Cav.) はメキシコ原産の1年生草本である。日本には明治中期に渡来し、現在では花壇やプランターなどで広く栽培され、切花としても親しまれており、日本の秋を代表する草花の一つとして知られる (高木, 1986)。花序は中心にある筒状花と周囲にある舌状花から構成され、花卉の色は野生種のピンク (桃色) の他に、クリムソン (深紅色)、ホホワイト (白色)、そして玉川大学農学部に所属していた佐俣淑彦元教授や稲津厚生元教授らの長年の育種により新たに作出されたイエロー (黄色)、スモーキーピンク (灰桃色)、ディープレッド (濃赤色) など多様な色が存在する (佐俣・稲津, 1983)。

コスモスの色素については赤 (シアニック) の発色に関与するアントシアニン2種類 (cyanidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-rutinoside) が花卉から報告されている (Hayashi, 1941; Saito, 1974, 1979; Yokoi, 1975)。また、黄色の発色に関与するカルコン類2種類 (2', 4', 3, 4-tetrahydroxychalcone “butein”, butein 4'-*O*-glucoside),

オーロン類1種類 (sulfuretin 6-*O*-glucoside) が筒状花や舌状花の花弁から報告されている (Saito, 1974, 1979; 稲津, 1993)。そして単体では無色だが、アントシアニンと相互作用することで花色を変化させることがあるフラボン (apigenin 7-*O*-glucoside, luteolin 7-*O*-glucuronide, chrysoeriol 7-*O*-glucuronide) やフラボノール (kaempferol 3-*O*-galactoside, quercetin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-glucuronide), および有機酸 (caffeic acid, chlorogenic acid) が地上部から報告されている (中沖, 1935; Saito, 1974, 1976, 1979)。これら無色のフラボノイドの中でも花卉に多量に蓄積するapigenin配糖体がアントシアニンとの相互作用に関与していると推定されている (佐俣, 1983)。

コスモスの花色はC遺伝子, Y遺伝子群, Sp遺伝子, そしてI遺伝子の4遺伝子 (群) によって制御されていることが報告されており (Miyake et al., 1927; 稲津, 1993), これらの遺伝子が色素の生合成経路のどこに関与するのかわいても、代謝産物の定性や定量分析から推定されている (表1; 稲津, 1993)。すなわちC遺伝子はフラバン-3,4-ジオールからアントシアニンの生合

¹ 玉川大学農学部環境農学科 東京都町田市玉川学園6-1-1

² 玉川大学農学部生産農学科 東京都町田市玉川学園6-1-1

責任著者：上原 歩 uehara@agr.tamagawa.ac.jp

表1 花色に関わる遺伝子型変異と16通りの色素表現型

シアニック 発色*	黄色発色*	C遺伝子および (Y)遺伝子群に関 わる遺伝子型変異	SpおよびI遺伝子に関わる遺伝子型変異			
			Sp-I	Sp-ii	spspI-	spspii
+	-	C- (Y)	クリムソン	ピンク	ディープレッド	スモーキーピンク
+	+	C- (y)	イエロー クリムソン	イエロー ピンク	イエロー ディープレッド	イエロー スモーキーピンク
-	-	cc (Y)	クリムソン型 ホワイト	ピンク型 ホワイト	ディープレッド型 ホワイト	スモーキーピンク型 ホワイト
(花色は全てホワイトとなる)						
-	+	cc (y)	クリムソン型 イエロー	ピンク型 イエロー	ディープレッド型 イエロー	スモーキーピンク型 イエロー
(花色は全てイエローとなる)						

稲津 (1993) を変更. *発色が認められる場合を (+), 認められない場合を (-) で示す. 各遺伝子の発現による色素への影響は, Cが優性でアントシアニンを生成, (Y) が劣性でカルコン類・オーロン類を生成, Spが優性でフラボンを生成, そしてIが優性でジヒドロフラボノールより下流の色素量 (アントシアニン or プロアントシアニジン) が増加することである. シアニック発色が認められる場合, 色素表現型の名称は花色と一致するが, 認められない場合, 色素表現型の名称と花色は一致しない.

成過程に関与し, 優性でシアニックを発色する. 複数遺伝子から成るY遺伝子群は5-デオキシ系フラボノイドの生合成に関与し, 優性で抑制される. 一方, 劣性で促進されると, カルコン類やブテイン類を合成することで黄色を発色する. Sp遺伝子はフラバノンからフラボンへの過程に関与し, 優性でフラボンを合成する. この遺伝子が劣性ホモであるディープレッドやスモーキーピンクは優性のクリムソンやピンクに比べてくすんだ花色を持つ. そして, I遺伝子はフラバノンからジヒドロフラボノールの過程に関与し, 優性でジヒドロフラボノールより下流の代謝産物の生成量が高める作用を持つ. 下流の代謝産物の中にはアントシアニンも含まれ, C遺伝子とI遺伝子が共に優性の場合にはクリムソンやディープレッドのような濃いシアニックを発色する. 一方, C遺伝子が劣性でアントシアニンを生成しない場合, I遺伝子が優性の際には無色のプロアントシアニジンの生成量が増加する (稲津, 1992). これら4遺伝子および対立遺伝子の組み合わせから, 色素の表現型は16通り存在する (表1). ただし, プロアントシアニジンの増加による影響を目視で確認することは難しい. よって, 色素表現型の名称は, シアニック発色が認められる場合は花色と一致するが, 認められない場合は一致しない. すなわち, ホワイトとイエローの花色は, それぞれにクリムソン型, ピンク型, ディープレッド型, スモーキーピンク型の4つの異なる色素表現型を含む (表1).

玉川大学での長年にわたる精力的なコスモスを用いた

研究はコスモスの新花色の作出や, 花色の遺伝学的機構が推定されただけでなく, その過程で交配に用いる多くの育成系統を作出した. これらの育成系統は親となる市販品種の種子とともに本学農学部で冷蔵保存されている. また, それらの色素についても薄層クロマトグラフィーと可視・紫外吸収スペクトル分析法を用い, 報告されている. しかし, 分析に多量の花弁を用いること, さらに分析の手法が色素ごとに異なり煩雑なため, その報告は一部の系統に限られている (佐俣・稲津, 1983; 稲津, 1993). 近年, 色素の分析は再現性と定量性に優れた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法が主流となっている. HPLC分析は少量の試料でも色素を検出でき, 分析条件を変更するだけで異なる特性の色素を分析できることから, 容易に多様な色素成分の情報が得られる. 本学で冷蔵保存されているコスモスについても, HPLCを用いて再分析することで, 今後の育種に貢献しうる基礎的な知見を得られると期待される.

そこで, 本研究では本学農学部で冷蔵保存されているコスモス種子の一部を栽培し, 得られた花弁を複数の方法で分析し, 花色に関する基礎的な知見を得た. また, HPLC分析により簡便に花弁に蓄積する色素を検出する方法を検証した.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

材料および方法

1. 植物材料

本学農学部で冷蔵保存されているコスモス (*Cosmos bipinnatus* Cav.) 種子のうち、育成系統37系統、および市販品種66系統 (同一品種であっても購入年、種苗会社が異なるものは分けて扱った)、および保管の途中で密封容器に移して保管されていた育成系統1系統、および市販品種12系統を供試した。使用した種子の内、花色の分析に供した13系統を表2に示した。

表2 花色の分析に供試したコスモス13系統

No.	品種もしくは系統	種苗会社	購入年
1	センセーションダズラ	タキイ	2008
2	ディープレッドキャンパス	サカタ	2008
3	センセーションピンキー	タキイ	2008
4	ピコティー	ミヨシ	不明
5	スモーキーピンク	玉川 育成系統	不明
6	アフタヌーンホホワイト	ミヨシ	2007
7	シーシェル	サカタ	不明
8	センセーションホホワイト	タキイ	2007
9	センセーションホホワイト	サカタ	不明
10	イエローキャンパス	サカタ	2007or8
11	クリムソンキャンパス	サカタ	2007
12	イエローガーデン	ムラカミ	2008
13	オレンジキャンパス	サカタ	2009

2. 栽培

栽培は2019年夏と2021年春におこなった。いずれも園芸用培養土 (プランター培養土、糸谷商店) を入れたポットに播種し、鹿沼土 (細粒) で覆土した。発芽後、本葉が4枚展開したのち圃場に定植した。ただし、コスモスは日長12~13時間以下で花芽形成することが知られているため、2021年春については短日条件である2月中旬に播種し、温室にて最低気温が20℃を下回らない条件で育苗した。

3. 花色の測定

花は採取後、花卉の花色を分光測色計 (CM-2500d, Konica Minolta) で $L^*a^*b^*$ 色空間 (CIE 1976) を測定した。測定は明度を示す L^* 、+で赤、-で青色方向を示す a^* 、そして+で黄、-で青色方向を示す b^* の3項目についておこない、さらに下式より、彩度を示す C^* を算出した。

4. 花卉搾汁液のpHの測定

コスモス花卉搾汁液のpH測定には、2019年に栽培したセンセーションダズラ (No. 1) 以外の12系統を供試した。pHは採取した新鮮花卉をプレパラート上で押しつぶし、得られた搾汁液を花卉の残渣ごとコンパクトpHメーター (LAQUA twin pH-22B, HORIBA) の電極部に乗せて測定した。

5. 色素の測定

花卉中の色素は8%ギ酸メタノールで新鮮花卉0.05 g/ml、室温、24時間の条件で浸漬抽出した。得られた粗抽出液はマイシヨリディスク (H-13-4, 東ソー) でろ過し、HPLC分析に供した。

HPLCはポンプ (L-7100, Hitachi) 2台、オートサンプラー (L-7200, Hitachi)、カラムオープン (L-7300, Hitachi)、UV-Vis検出器 (SPD-10A, Shimadzu)、脱気装置 (SSC-3415, センシユー科学) で構成されている。アントシアニンの分析時はカラムにPEGASIL ODS SP100AQ (4.6×250 mm, センシユー科学) を使用し、移動相はアセトニトリル:リン酸:酢酸:水=5:3:8:84、流速1.0 ml/min、検出波長530 nmで15分間分析した。次いで、黄色の発色に関与するカルコン類、オーロン類の分析にはカラムにL-column2 ODS (6.0×150 mm, 化学物質評価研究機構) を使用し、移動相アセトニトリル:リン酸:水=20:0.2:80、流速1.0 ml/min、検出波長380 nmで20分間分析した。フラボンなどの紫外域に吸収を持つ色素の分析条件はカルコン類、オーロン類と同様とし、検出波長のみ350 nmとした。いずれの色素も試料の注入量は10 μ l、カラムオープンは40℃とした。

HPLC分析によって得られた結果はクロマトグラム用データ処理装置 (Chromato-PRO, ランタイムインスツルメンツ) を用いてデジタルデータとして出力し、保持時間とピーク面積より系統間の比較を行った。

紫外可視 (UV-Vis) 吸収スペクトルは紫外可視分光光度計UV-1900i (Shimadzu) で測定した。

結果および考察

1. 保存種子の発芽状況

2019年夏に栽培した37の育成系統は全て発芽しなかった。種子を保管していた袋にカビが見られたことから、保管状況が不適切であったと考えられる。

表3 コスモスの花色の特徴

No.	花色	L^*	a^*	b^*	C^*
1	クリームソン	24.4 ± 4.5	45.4 ± 2.3	- 9.3 ± 3.2	46.4 ± 2.9
2	ディープレッド	21.0 ± 4.0	35.9 ± 1.2	4.4 ± 2.9	36.3 ± 1.0
3	ピンク	56.2 ± 4.0	19.3 ± 4.4	- 12.7 ± 2.4	23.1 ± 5.0
4	ピンク	61.8 ± 3.4	13.9 ± 3.2	- 10.0 ± 2.0	17.2 ± 3.7
5	スモーキーピンク	49.6 ± 4.5	21.9 ± 4.4	- 4.2 ± 1.4	22.4 ± 4.5
6	ホワイト	76.5 ± 0.9	- 2.2 ± 0.2	4.1 ± 0.4	4.7 ± 0.4
7	ホワイト	77.4 ± 1.3	- 2.2 ± 0.2	5.2 ± 0.6	5.6 ± 0.5
8	ホワイト	74.5 ± 0.9	- 2.5 ± 0.1	4.3 ± 0.7	5.0 ± 0.5
9	ホワイト	76.5 ± 1.3	- 2.1 ± 0.2	4.0 ± 0.5	4.5 ± 0.5
10	イエロー	70.5 ± 2.2	- 8.7 ± 1.1	35.1 ± 2.6	36.1 ± 2.8
11	イエロークリームソン	28.7 ± 5.2	32.3 ± 3.0	6.3 ± 9.8	34.1 ± 2.4
12	イエローピンク	71.7 ± 1.2	- 10.4 ± 2.1	41.2 ± 5.7	42.5 ± 6.0
13	イエローピンク	55.2 ± 3.9	10.1 ± 1.7	11.4 ± 5.6	15.7 ± 3.7

値は平均±SDを示す。 L^* は明度、 a^* は+で赤、-で青色方向を、 b^* は+で黄、-で青色方向を、 C^* は彩度を示す。No.は表2を参照。

同様の環境に保存されていた市販品種66系統については8系統が発芽し、内7系統が開花に至った。ただし、30粒播種した種子のうち、多くは10粒以下しか発芽しておらず、発芽率は大きく低下していると考えられる。

一方、途中で密封容器に移して保管されていた13系統は多くが60%以上発芽したことから、保存状況が発芽率に大きく影響を与えたと考えられる。以降の花色の分析にはこれらの13系統(表2)を用いた。

2. 花色の系統間差異

13系統(表2)の花弁について、花色の特徴を示す L^* 、 a^* 、 b^* および C^* を表3にまとめた。コスモス花色は1)濃シアニック、2)淡シアニック(黄色系の発色無し)、3)ホワイト、4)イエローおよびイエローピンク、の4グループに分けられた(表3)。1)はクリームソンやディープレッド、イエロークリームソンのような濃いシアニックの花色から成るグループで、明度を示す L^* が低く、 a^* が大きく+と、赤方向を示した。2)は、ピンクやスモーキーピンクのような、黄色を発色しない淡いシアニックのグループで、一つ目のグループと比較して L^* が高く、 a^* は小さくなる傾向が見られた。3)はホワイトから成るグループで、 L^* は高く、一方で彩度を示す C^* は低かった。最後に(4)はイエローとイエローピンクから成り、 L^* はホワイト程度に高く、かつ b^* が+と、黄色方向を示した。

$L^*a^*b^*$ 色空間を用いることでコスモス花色をシアニックの濃色と淡色、ホワイト、およびイエローの4グループに分けることができた。ただし、稲津(1993)に

よって報告されている16通りの色素の表現型を識別することは出来なかった。

3. コスモスの花弁搾汁液のpH

赤~紫~青色の発色に関与する色素であるアントシアニンは酸性では赤色、中性からアルカリ性で紫~青色へと、そのpHによって変化することが知られている。多くの植物の花弁の細胞液は弱酸性を示すが、一部の植物では弱アルカリ性を示す。例えばアサガオのヘブンリーブルー(*Ipomea tricolor* cv. Heavenly Blue)では開花時の細胞液のpHが7.5であり、これが花冠の青色の発色に関与することが報告されている(Yoshida et al., 2009)。

表4 コスモスの花弁搾汁液のpH

No.	pH
1	n.d.
2	5.0 ± 0.1
3	5.0 ± 0.1
4	5.1 ± 0.1
5	5.2 ± 0.2
6	5.2 ± 0.0
7	5.2 ± 0.1
8	5.3 ± 0.1
9	5.4 ± 0.1
10	5.4 ± 0.1
11	5.2 ± 0.0
12	5.3 ± 0.1
13	5.2 ± 0.1

値は平均値±SD。n.d.: no data。No.は表2を参照。

コスモスについてもアントシアニンを蓄積することから、コスモスの多様な花色の発色にpHが関与する可能性がある。そこで、細胞液を含む花卉搾汁液のpHを測定した結果、いずれもpH5.2程度の弱酸性を示した(表4)。過去に行った予備実験でもpH5.1~5.2と試料によるpHの差異は小さく(未発表)、pHがコスモスの花色の多様性に影響を与えている可能性は低いと考えられる。

4. HPLC分析による色素の簡易測定方法の確立

緒言で記したように、コスモスの多様な花色に関与する色素であるアントシアニン、カルコン類・オーロン類、フラボンに類別される物質のいずれが花卉中に蓄積するのは、花色からでは判断が難しく、化学的な分析が必要となる。しかし、従来の方法は煩雑かつ、多量の植物材料を要するため、本研究では近年汎用され、少量の植物材料でも分析が可能なHPLCを用い、コスモス花卉に蓄積する色素を正確、かつ迅速に測定する方法を検証した。供試した13系統のうち、各波長の代表的なHPLCクロマトグラムを図1に、検出された物質を表5に示した。

アントシアニンの吸収波長である530 nmで分析した結果、得られたHPLCクロマトグラムから最大で4つのピークが、それぞれ保持時間5.4, 6.1, 8.1, 9.9分に検出された(図1-a, ピークA1~4)。稲津(1993)はシアニックを発色する花色では最大で4種類のアントシアニンが蓄積することを報告しており、本研究においてもHPLCで4つのピークの内いずれかが検出されている(表5)。コスモスから報告されているアントシアニンはcyanidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O-rutinosideであるが(Hayashi, 1941; Yokoi, 1975), Yokoi(1975)と稲津(1993)は他にpeonidin配糖体の存在を報告しており、今回530 nmで検出されたピークもこれらの配糖体と予想された。

黄色の発色に関与するカルコン類もしくはオーロン類の吸収波長である380 nmで分析した結果、複数のピークが検出された(図1-b)。この波長では350 nm付近に吸収極大を持つ無色のフラボンやフラボノールも検出されることから、検出された複数のピークはフラボンやフラボノールである可能性も考えられる。そこで、稲津(1993)によってカルコン類、オーロン類の蓄積が報告されているイエローの花色を持つイエローキャンパスを用い、検出された各ピークの380 nmと350 nmのクロマトグラムにおける面積を比較した。この結果、ほとんどのピークは350 nmで検出した方が大きかったが、保持時間16.6分のピーク(C1)は380 nmで検出した方が明

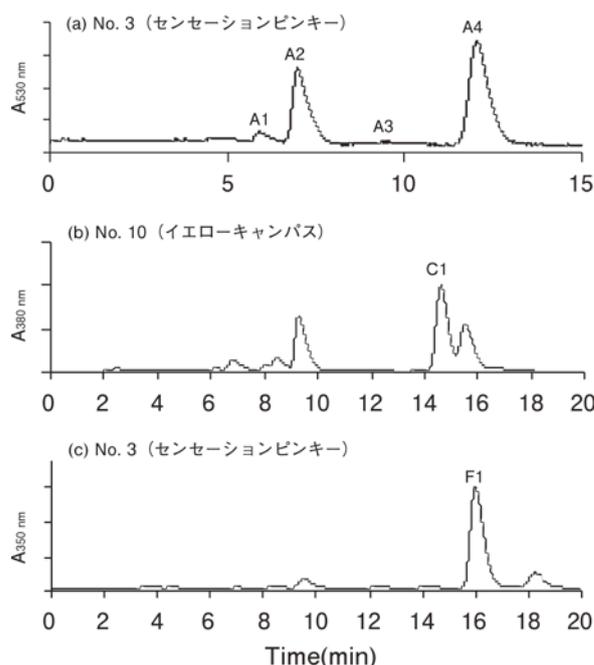


図1 異なる波長で分析したコスモス花卉粗抽出液のHPLCクロマトグラム

上から(a) 530, (b) 380, (c) 350 nmで検出した際のクロマトグラム。No.は表2を参照。A1-A4はアントシアニンと推定された物質。C1はカルコン類と推定された物質。F1はフラボンのApigenin配糖体と推定された物質。HPLC分析条件は本文の方法に記載した。

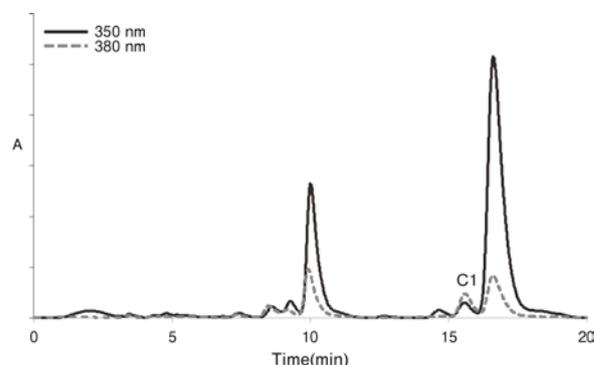


図2 No. 10 (イエローキャンパス)の花弁粗抽出液のHPLCクロマトグラム

実線は350 nm, 破線は380 nmで検出。C1は380 nmで面積値が顕著に大きくなったことから、コスモス花卉における黄色色素の主要成分として報告されているカルコン類と推定された物質。

らかに大きかった(図2)。これはカルコン類およびオーロン類の吸収パターンと一致する。また、C1はイエローピンクやイエロークリムソンからも同様に検出された(表5)。これまでにコスモスのイエロー花色の花弁に蓄積する黄色色素としてカルコン類のbutein 4'-O-glucosideとオーロン類のsulfuretin 6-O-glucosideが

知られており、中でも前者を多量に蓄積することが報告されている（稲津, 1993）。よって、C1はカルコン類の butein 4'-O-glucoside の可能性が極めて高い。

アントシアニンと相互作用することで花色を変化させるフラボンの吸収極大波長である350 nmのクロマトグラムでは、380 nmの分析時と同様に複数のピークが観測された（図1-c）。稲津（1993）は各花色におけるフラボン蓄積の有無を調査し、スモーキーピンクとディープレッド以外の花色ではフラボンを合成することを報告している（表1；稲津, 1993）。そこで、複数検出された物質の内、スモーキーピンクとディープレッドを除いた11系統に共通して検出された保持時間15.8分の物質（F1）を単離し、分光光度計で連続スペクトルを測定した結果、スペクトル特性からF1はフラボンのapigenin配糖体と推定された（図3）。これまでにコスモスの花弁に含まれるapigenin配糖体としてapigenin 7-O-glucosideが知られており、Saito（1979）はこの色素がフラボンの中で最も多量に含まれていることを報告している。しかし、本研究で単離されたF1は *Chrysanthemum* ssp.（キク科）の葉から得られたapigenin 7-O-glucosideの標品（Uehara et al., 2012）とHPLCで比較したところ、保持時間が一致しなかったことから、異なるapigenin配糖体と考えられた。F1については、今後さらなる定性分析を行う必要がある。

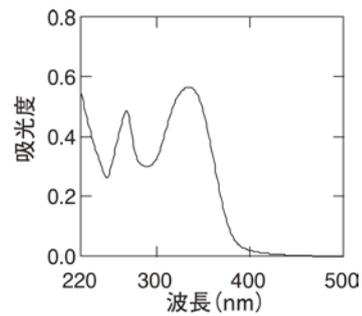


図3 F1のメタノール溶液中のUV-Vis吸収スペクトル

以上の結果より、異なる波長を用いたHPLC分析により花色に関与する色素であるアントシアニン（530 nm, A1~4）、カルコン類（380 nm, C1）、そしてフラボン（350 nm, F1）を検出できた。この方法は少量の花弁で分析でき、かつ手順も容易であることから、HPLCを用いることでコスモス花弁に蓄積する色素を簡便に測定する方法を確立できたと考えられる。

ただし、コスモスの花色に関わる色素の表現型を識別するためにはアントシアニン、カルコン類、フラボンの有無に加えて、アントシアニンやプロアントシアニジンなどのジヒドロフラボノールより下流の代謝産物の生成量を明らかにする必要がある（稲津, 1993）。このうち、アントシアニンはシアニックを発色する花色の濃淡に関与する。本研究で供試した13系統のコスモスについて、

表5 コスモス13系統の花弁に蓄積する色素と、推察された色素関連遺伝子の発現

No.	花色	色素						色素関連遺伝子の発現			
		A1	A2	A3	A4	C1	F1	C	Y	Sp	I
1	クリームソン	+	+	t	+	-	+	+	+	+	+
2	ディープレッド	+	+	t	+	-	-	+	+	-	+
3	ピンク	+	+	t	+	-	+	+	+	+	-
4	ピンク	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
5	スモーキーピンク	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
6	ホワイト	-	-	-	-	-	+	-	+	+	n.d.
7	ホワイト	-	-	-	-	-	+	-	+	+	n.d.
8	ホワイト	-	-	-	-	-	+	-	+	+	n.d.
9	ホワイト	-	-	-	-	-	+	-	+	+	n.d.
10	イエロー	-	-	-	-	+	+	-	-	+	n.d.
11	イエロークリームソン	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
12	イエローピンク	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
13	イエローピンク	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-

色素は+：検出，t：微量に検出，-：未検出を示す。A1-4：アントシアニン，C1：カルコン類，F1：フラボン。色素関連遺伝子の発現は+：優性，-：劣性を示す。C遺伝子：優性でアントシアニンの生成に関与，Y遺伝子群：劣性でカルコン類・オーロン類の生成に関与，Sp遺伝子：優性でフラボンの生成に関与，I遺伝子：優性で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。n.d.: not distinguishable. No.は表2を参照。

アントシアニン (A1~4) を合成する8系統について、HPLC分析で得られたピーク面積値を基に総アントシアニン量を算出し、センセーションピンキー (No. 3) を1とした時の相対アントシアニン量として図4に示した。シアニックを濃く発色するクリムソン (No. 1)、ディープレッド (No. 2) の相対アントシアニン量はシアニックを淡く発色するピンク (No. 3, 4) やスモーキーピンク (No. 5) よりも5~8倍程度、多量に含んだ。このことより、色素表現型の識別に必要なアントシアニンの量をHPLC分析により推定することは可能であった。

一方、アントシアニンを生成しないホワイトやイエローの花色では無色のプロアントシアニジンが蓄積される。しかし、本研究で用いたHPLC条件でプロアントシアニジンを検出することは難しい。稲津・間藤 (1992) はコスモスに蓄積するプロアントシアニジンの検出および定量をバニリン塩酸試薬による呈色、および加水分解によって得られたアントシアニジンの吸光度測定によって行っている。これらの手法を応用することで、将来的にHPLCを用いて16通りある色素の表現型の全てを識別できるようになると期待される。

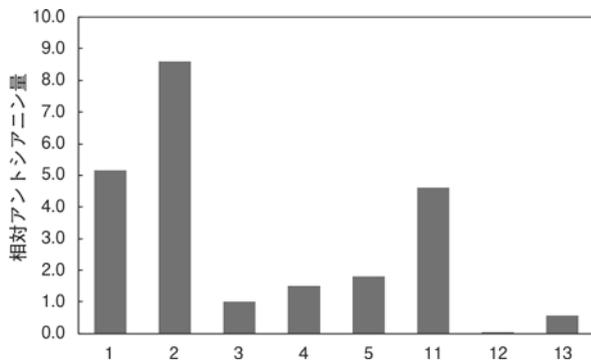


図4 花卉中の相対アントシアニン量

アントシアニンのピークが検出された系統を対象とした。相対アントシアニン量は530 nmで検出した際に得られたピーク面積の合計値を算出し、No. 3 (センセーションピンキー) を1とした時の相対値として示した。No. は表2を参照。

5. 色素関連遺伝子の推定と系統間差異

コスモスの花色はC, Sp, I遺伝子およびY遺伝子群の4遺伝子(群)によって制御されており (Miyake et al., 1927; 稲津, 1993), これらの遺伝子が色素の生合成経路のどこに関与するのかも推定されている (稲津, 1993)。本研究よりHPLC分析で花卉に蓄積する色素のアントシアニン(A1-4), カルコン類(C1), フラボン(F1)が検出できたことから、色素分析の結果を基に色素の有無に関する遺伝子(群)すなわちC, Y, Sp遺伝子(群)

の発現を推定した。さらにC遺伝子優性個体については、相対アントシアニン量からI遺伝子の発現を推定した(図4)。コスモスから検出された色素と、推定された遺伝子の発現様式を表5に示した。

これまでに16通りの色素の表現型が知られているコスモスにおいて、本研究で供試した13系統から6通りが確認された。確認されたのはシアニックを発色するクリムソン(遺伝子型はC-Y-Sp-I), ディープレッド(C-Y-spspI), ピンク(C-Y-Sp-ii), スモーキーピンク(C-Y-spspii), およびシアニックに加えて黄色も発色する、イエロークリムソン(C-yySp-I)とイエローピンク(C-yySp-ii)である。ホワイト(ccY-Sp-)とイエロー(ccyySp-)についてはI遺伝子の発現が区別できないため、一部のみの推定となる。今後、ホワイトやイエロー花色におけるI遺伝子の発現様式についてはプロアントシアニジン量の分析によって明らかにしていきたい。

本学農学部で冷蔵保存されていたコスモス種子のうち、過去に作出した育成系統のほとんどが保管の過程で失われてしまった可能性が高いことが、本研究を通じて明らかとなった。ただし、市販品種については発芽能が残っている系統も存在していた。残された市販品種の中には現在は販売されていない貴重な種子も存在する。コスモス園芸品種の色素の表現型についての報告はほとんどないことから、今後、多くの園芸品種の色素の表現型を明らかにすることでコスモスのさらなる育種に貢献しうる基礎的な知見を得られることが期待される。

謝辞

本研究は令和2年度農学部共同研究助成金の助成を受けて行われました。本論文をまとめるにあたりご高閲を賜りました農学部生産農学科堀浩教授に心より感謝申し上げます。また、栽培と分析にご協力いただきました農学部生産農学科植物科学領域の学生諸氏、および環境農学科持続的農業領域の学生諸氏に感謝いたします。特に2021年に卒業研究の一環として取り組み、本研究にご協力くださった河合瞬氏に深く感謝いたします。

引用文献

- Hayashi, K. 1941. Studien über Anthocyane VII. Über das Anthocyanin der roten Kosmosblüten, I. Acta Phytochimica 12: 83-95.
- 稲津厚生, 間藤正美. 1992. 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. 育種学雑誌 42: 605-613.

- 稲津厚生. 1993. コスモス (*Cosmos bipinatus* Cav.) におけるイエロー花色品種の成立に関する生化遺伝学的研究. 玉川大学農学部研究報告 33 : 75-140.
- Miyake, K., Imai, Y. and Tabuchi, K. 1927. Genetic experiments with Cosmos. Journal of the College of Agriculture, Imperial University of Tokyo 9: 139-146.
- 中沖太七郎. 1935. コスモス花の成分に就て白色花のフラボン族配糖体の研究 (第四報). 薬学雑誌 55 : 967-978.
- Saito, K. 1974. Distribution of flavonoids and related compounds in various parts of *Cosmos bipinnatus*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 71: 80-82.
- Saito, K. 1976. Flavone glycosides in the ray flowers of *Cosmos bipinnatus*. Planta medica 30: 349-355.
- Saito, K. 1979. Quantitative variation of flavonoids and related compounds in *Cosmos bipinnatus*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 48: 317-325.
- 佐俣淑彦, 稲津厚生. 1983. コスモスの新花色の育種—特に花色の遺伝ならびに生化学的分析—. 玉川大学共同研究報告 3 : 1-39.
- 高木誠. 1986. コスモス. 園芸大百科事典—デスク版・フルール (講談社編), pp. 998-999. 講談社, 東京.
- Uehara, A., Nakata, M., Kitajima, J. and Iwashina, T. 2012. Internal and external flavonoids from the leaves of Japanese *Chrysanthemum* species (Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology 41: 142-149.
- Yokoi, M. 1975. Flower colour and pigment distribution in the cultivar of *Cosmos bipinnatus* Cav. and *C. sulphureus* Cav. The Transactions of the Faculty of Horticulture, Chiba University 14: 10-13.
- Yoshida, K., Miki, N., Momonoi, K., Kawachi, M., Katou, K., Okazaki, Y., Uozumi, N., Maeshima, M. and Kondo, T. 2009. Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. Proceedings of the Japan Academy, Series B 85: 187-197.

Analysis of Pigments of *Cosmos bipinnatus* Cultivars Preserved at Tamagawa University

Ayumi Uehara¹, Nobuya Koizuka², Miyuki Otsuka², Jun Yamazaki¹

Abstract

Cosmos bipinnatus Cav. is one of major ornamental flower of autumn season in Japan. 13 strains of them which seeds were preserved in Tamagawa University, were cultivated, and surveyed varietal differences in floral color, pH and pigments. They showed various colors, such as crimson, pink, deep red, smoky pink, yellow crimson, yellow pink, yellow and white. The pH values of crude petal extracts of them were almost same; 5.2. We surveyed their pigments with HPLC at different wavelength, 530 nm for anthocyanin, 380 nm for chalcone and 350 nm for flavone, and characterized their phenotype of pigment. The phenotype of pigments in cosmos has been reported 16 types. Of them 6 types were identified from 13 strains by presence of anthocyanin, chalcone, flavone (+/-) and quantity of anthocyanin (+ +/+), such as crimson (anthocyanin + +, chalcone -, flavone +), pink (+, -, +), deep red (+ +, -, -), smoky pink (+, -, -), yellow crimson (+ +, +, +), yellow pink (+, +, +).

Keywords: *Cosmos bipinnatus*, Flower petal, Pigment, Flavonoid, HPLC

¹ Department of Agri-Environmental Sciences, College of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawagakuen, Machida, Tokyo, 194-8610, Japan

² Department of Agri- Production Sciences, College of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawagakuen, Machida, Tokyo, 194-8610, Japan