

ISSN 2185-1093

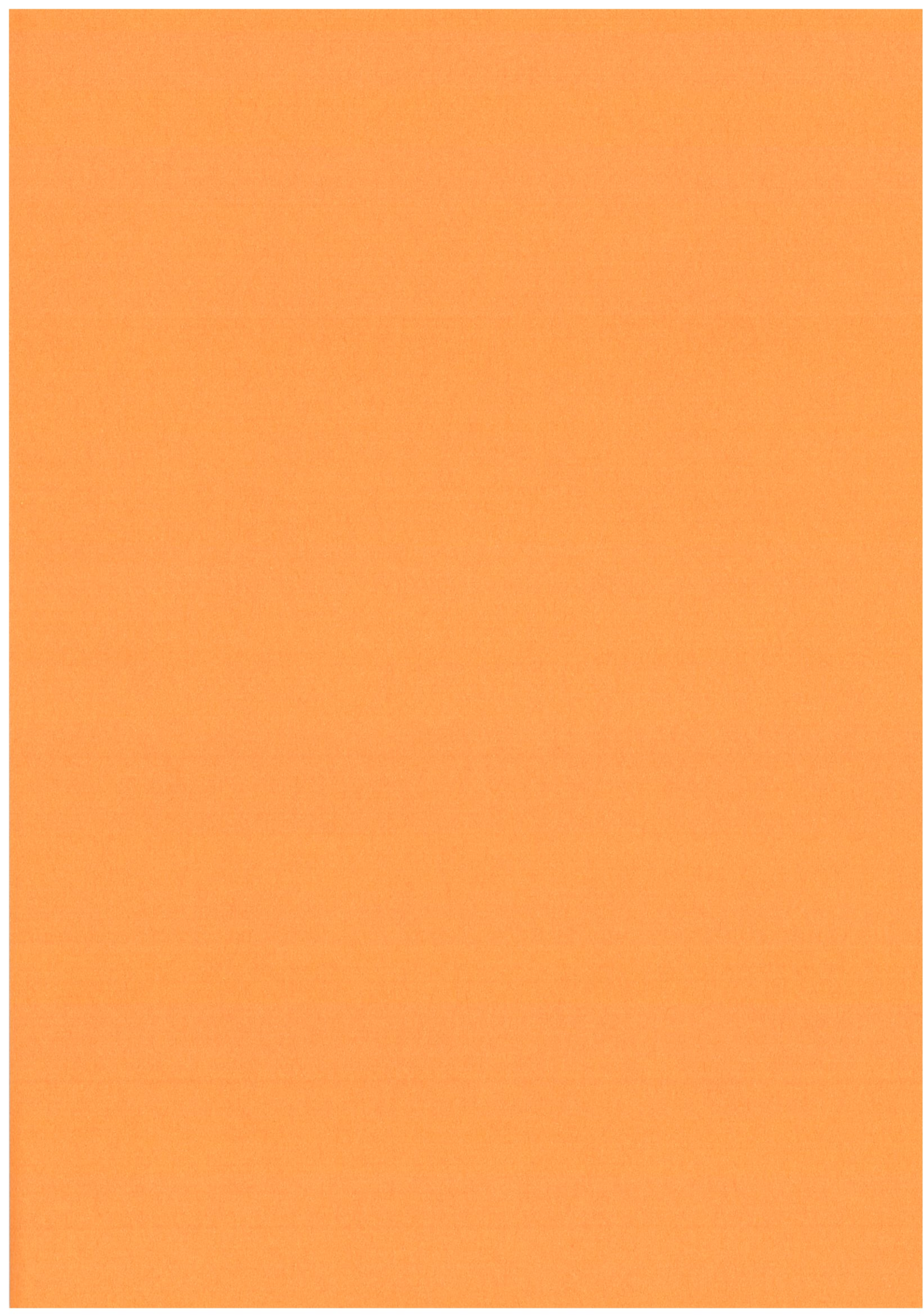
富山県農林水産総合技術センター 園芸研究所研究報告

第 3 号

平成25年 3 月

富山県農総セ園研研報
Bull.Hort.Res.Inst.,Toyama
Pref.Agr.,For.Fish.Res.Ctr.
No.3 Mar. 2013

富山県農林水産総合技術センター
園 芸 研 究 所



富山県農林水産総合技術センター園芸研究所研究報告

第3号 (1~52頁)

目 次

1. チューリップ花卉の青色発色に關与する鉄イオンの輸送と蓄積に關する研究
桃井千巳・莊司和明・辻 俊明・新田 朗
..... 1

2. JM7台‘ふじ’の生育に必要なほ場の排水条件
 - I. JM7台木の根域分布と湛水時間が生育に及ぼす影響
舟橋志津子・濱谷聡志・徳満慎一・松田 亨・関口英樹
..... 47

**Bulletin of the Horticultural Research Institute,
Toyama Prefectural Agricultural, Forestry and Fisheries Research Center**

Contents

| | |
|---|----|
| Kazumi MOMONOI , Kazuaki SHOJI , Toshiaki TSUJI and Akira NITTA : Studies on the Transport and Accumulation of Iron Ions involved in the Blue Coloration of Tulip Petals | 1 |
| Shizuko FUNAHASHI , Satoshi HAMATANI , Shinichi TOKUMAN , Toru MATSUDA and Hideki SEKIGUCHI : Drainage Conditions for 'Fuji' /JM7 Growth | 47 |

チューリップ花卉の青色発色に關与する鉄イオンの 輸送と蓄積に關する研究

桃井 千巳・莊司 和明¹⁾・辻 俊明・新田 朗¹⁾

目次

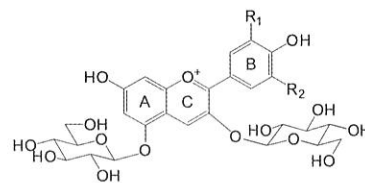
| | | | |
|-----------------------------------|----|---------------------------------|----|
| I. 緒論 | 2 | 3. 結果 | 18 |
| II. チューリップ花卉からの液胞型鉄輸送体遺伝子の探索 | | 4. 小括 | 21 |
| 1. はじめに | 7 | IV. 様々な花色のチューリップ花卉における青色発色と鉄の蓄積 | |
| 2. 材料および方法 | 7 | 1. はじめに | 21 |
| 3. 結果 | 9 | 2. 材料および方法 | 22 |
| 4. 小括 | 15 | 3. 結果 | 23 |
| III. 液胞型鉄輸送体タンパク質 (TgVit1) の発現と機能 | | 4. 小括 | 34 |
| 1. はじめに | 15 | V. 総括 | 35 |
| 2. 材料および方法 | 15 | 摘要 | 36 |
| | | 謝辞 | 38 |
| | | 引用文献 | 38 |
| | | 英文摘要 | 43 |

1) 富山県農林水産総合技術センター農業研究所

I. 緒 論

花色のうち赤～青までの多彩な色はアントシアニンによってつくられるといっても過言ではない。特に、青色花はそのほとんどがアントシアニンによって発色する上、通常の植物液胞が示すpH 4～6では青色は安定に発色しないことから、化学研究の中で青色花色発現の機構解明は最も重要な研究課題の一つである（下群山 1998, Strack and Wray 1986, Grotewold 2006, Andersen and Jordheim 2006）。天然に存在するアントシアニンはすべて配糖体で、これまで500種以上が報告されているが、主要な発色団（アントシアニン）は6種類で、しかもその構造の違いはB環の置換基の数と種類のわずかな相違によるものである（図1）（下群山

1998, Strack and Wray 1986）。そのため、これだけの発色団でなぜ多彩な色が発現するのかは古くからの疑問とされ、これまでに花色の違いに関する多くの化学的研究が行われた。Willstätterら（1913）は、アントシアニンが酸性で赤色、中性で紫色、アルカリ性で青色を示すことを見出し、花色の違いは細胞のpHの違いによるpH説を提唱した。Brouillardらによって1970年代にこの色変化の機構が詳細に解析され、図2に示す平衡反応によることが明らかになった（Brouillard and Dubois 1977）。ところで、WillstätterらのpH説によれば青色花の液胞はアルカリ性である必要がある。しかし、花卉細胞の液胞pHは普通弱酸性～中性であることから、ShibataらはpH説に反論し、青色花色はアントシアニンと金属元素が錯体を形成することによって発現する、金属錯体説を提唱した（Shibata et al



| R ₁ | R ₂ | anthocyanin | aglycon |
|------------------|------------------|-------------|--------------|
| H | H | pelargonin | pelargonidin |
| OH | H | cyanin | cyanidin |
| OCH ₃ | H | peonin | peonidin |
| OH | OH | delphin | delphinidin |
| OCH ₃ | OH | petunin | petunidin |
| OCH ₃ | OCH ₃ | malvin | malvidin |

図1 主要なアントシアニンの構造と名称。

アントシアニンは天然では配糖体として存在し、アグリコンは糖を除いた発色団を示す。

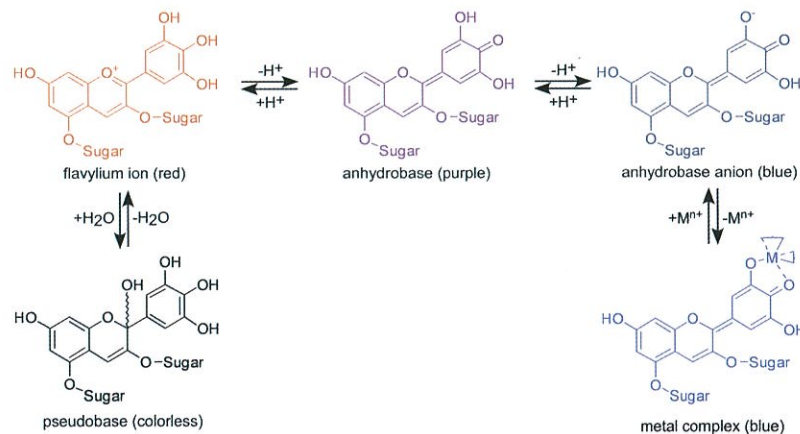


図2 液性によるアントシアニンの構造変化と溶液の色変化。

強酸性ではフラビリウムイオン型で赤色、中性域ではアンヒドロ塩基型で紫色、アルカリ性ではアンヒドロ塩基アニオン型で青色を示す。この反応は全て平衡で、弱酸性～塩基性条件ではフラビリウムイオン型を経由して容易に水合され退色する。アンヒドロ塩基アニオン型は金属イオンと錯体を形成すると、中性条件下でも青色を示す。

1919)。さらに、これ以降もアントシアニンによる青色花色安定化機構として、Robinsonら (1931) は助色素説を、Saitoら (1971) は分子内助色素説を提唱した。

一般に同一pHの溶液では、B環のOH基が増加すると青くなることが知られている。しかし、上述のようにアントシアニンが存在する液胞液はpH 4～6程度の弱酸性であるため、青色発色にはこのpHでアンヒドロ塩基アニオン型が安定に存在する機構が備わっている必要がある。この安定化機構としてYoshidaら (2009) は、これまでに明らかになったものを3種類にまとめ報告している (図3)。第一は自己組織化超分子金属錯体色素 (メタロアントシアニン) である。現在までにツユクサ (*Commelina communis*) (Kondo et al 1992)、ヤグルマギク (*Centaurea cyanus*) (Kondo et al 1994, Kondo et al, 1998, Shiono et al 2005)、サルビア (*Salvia patens*) (Takeda et al 1994, Kondo et al 2001), *Salvia uliginosa* (Mori et al 2008)、ネモフィラ (*Nemophila menziesii*) (Yoshida et al 2009, 北原 2005) の5種類のメタロアントシアニンによる青色花色発現が知られている。メタロアントシアニンは化学量論量のアントシアニン、フラボン、金属イオンが6:6:2で形成された分子量約9,000の錯体であり、これら成分を混合するだけで会合体が形成される。アントシアニンは金属錯体の形成によりアンヒドロ塩基アニオン型に固定され、母核は自己会合とコピグメンテーションにより水和から守られる。第二は、多アシル化アントシアニンによる青

色発色である。分子内に2残基以上の芳香族有機酸をもち、これらが発色団と分子内会合することによる電荷移動により、青色化と同時に安定化が実現される。第三は非化学量論量的金属錯体である。青いケシ (*Meconopsis grandis*) (Yoshida et al 2006) やアジサイ (*Hydrangea macrophylla*) (Takeda et al 1985, Takeda et al 1985, Takeda et al 1990, Kondo et al 1989, Yoshida et al 2003, Ito et al 2009) がこのカテゴリーに含まれ、pHや共存物質の僅かな構造の違いで錯体形成や安定性が影響を受け、ファジーに色が変わる。このように実際の花弁では、単体のアントシアニンは不安定なため、助色素 (または分子内芳香族酸残基)、金属イオン、液胞pHなどの因子が複雑に組み合わさって発色している (Yoshida et al 2009)。しかしながら、アントシアニンの花色発現機構、特に青色発色は花によって独自の機構が発達しており、そのすべてが解明されているわけではない。

富山県では数多くのチューリップ (*Tulipa gesneriana*) 品種を遺伝資源として保存し、育種研究が盛んに行われ (浦嶋 2000)、青いチューリップも開発目標の一つとなっている。チューリップの花色は、白、黄、オレンジ、ピンク、赤、紫、黒に近い紫など多種存在する。また、花弁上部と花底部の花色が異なる品種も多数あり、その中のいくつかは花底部が青色を呈する。しかし、花弁全体が青い品種は未だ育成されていない。チューリップのアントシアニン色素に関する研究は古くから行われ、最初にWillstätterとBoltonが*T. gesneriana*

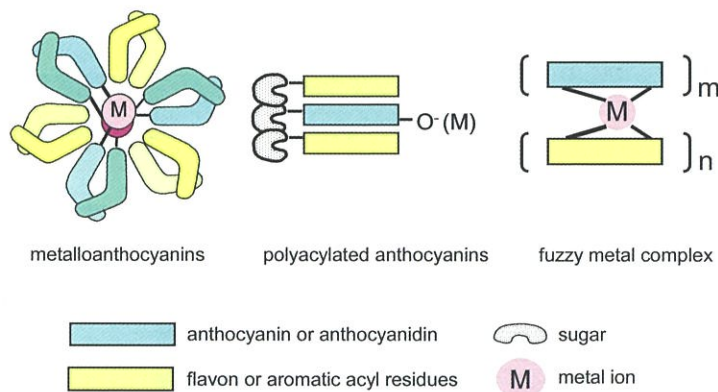


図3 吉田ら (2009) の提唱する3種類の青色花色発現機構の分類。メタロアントシアニン、多アシル化アントシアニン、非化学量論量的金属錯体の3種類に分けられる。メタロアントシアニンはアントシアニン、フラボン、金属イオンがそれぞれ6分子、6分子、2分子からなる自己組織化超分子金属錯体色素。多アシル化アントシアニンは分子内に複数の芳香族有機酸残基を有し、これらが分子内会合する。非化学量論量的金属錯体はアントシアニン、助色素、金属イオンの量比が一定ではない会合型金属錯体。

数種の赤色はシアニジンとカロテノイドの混合であることを明らかにした (Willstätter and Bolton 1916)。Robinsonらはシアニジンとペラルゴニジンの混合およびシアニジンとデルフィニジンの混合花弁の存在を示し、チューリップのアントシアニン色素研究は他の植物よりも複雑であると報告している (Robinson and Robinson 1931)。その後もチューリップのアントシアニン色素に関する研究は続けられ、HalevyとAsen(1959)やShibataとSasaki(1958)によって7種のシアニジンとデルフィニジン配糖体が報告されている。最近ではTorskangerpollら (1999, 2005)、Nakayamaら (1999)、中島と荘司 (2008) が網羅的な解析を行い、現在までに図4に示す8種類が報告されている。一方、チューリップに含まれるフラボノールは、最初KawaseとShibata (1963) によってルチンが報告され、その後、ケンフェロールおよびケルセチン配糖体を中心にHarborne (1965) によって葉から2種類、

BudzianowskiとSkrzypczak (1978, 1979) によって花から7種類、Strackら (1981) によって葯から5種類、Budzianowski (1991) によって花から6種類、中島と荘司 (2008) によって花から2種類の計23種が報告されている (図5)。

青色チューリップの開発を目指し、まず花底部の青色部分の発色機構の研究が富山県農業技術センター農業試験場 (現富山県農林水産総合技術センター農業研究所) で行われた。富山県育成のチューリップ品種「紫水晶」(図6)の花底部と上部の表

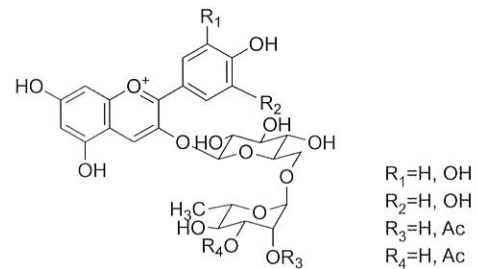
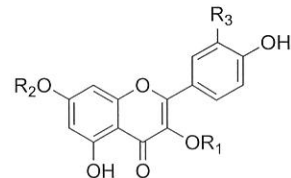
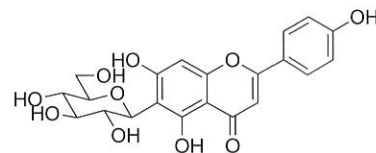


図4 これまでに知られているチューリップのアントシアニン。



$R_1 = \text{H, glc, rham, glc-glc, glc-rham, gla-rham, rham-rham, glc-rham, glc-rham, glc-xyl}$
 $R_2 = \text{H, glc, glucuronic acid}$
 $R_3 = \text{H, OH, OCH}_3$



C-glucosylflavanone (hemiphloin)

図5 これまでに知られているチューリップのフラボノール配糖体。



図6 チューリップ (*Tulipa gesneriana*) 「紫水晶」の花 (左) と内側花底部 (右)。内側花底部だけが青色を示す。

皮をそれぞれ酵素処理によりプロトプラスト化して有機成分を分析した結果、含まれるアントシアニンとフラボノール成分はいずれもDp 3-rut、マンガスリン、ルチン、モーリチアニンで違いは認められなかった(図7)。一方、金属分析の結果、青色細胞に紫色細胞の約25倍の鉄イオンが含まれ、これにより青くなることが明らかになった(Shoji et al 2007)。鉄イオンが青色発色に必須な例としては、これ以前にヤグルマギク(Kondo et al 1994, Kondo et al, 1998, Shiono et al 2005)、ネモフィラ(Yoshida et al 2009, 北原 2005)、青いケシ(Yoshida et al 2006)が報告されている(図8)。いずれの花もアントシアニンの発色団はシアニジン

あるいはペチュニジンであり、B環上のヒドロキシル基は2残基しかない。これらの発色団は、常磁性金属イオンの Fe^{3+} と錯体を形成すると、リガンド-金属電荷移動(LMCT)により650 nm付近に吸収帯が現れ、青色となることがわかっている(Kondo et al 1998)。一方、ツクサやサルビアなどのデルフィニジン発色団の金属錯体も青色となるが、この錯形成イオンは軽金属の Mg^{2+} であり、これで十分青色を発色する。従って、デルフィニジン発色団をもつチューリップが Fe^{3+} との錯体形成で青くなる機構は他に例がなく、その解明へ期待が持たれる。

植物のみならず生物にとって鉄イオンは必須元素である。その一方、遊離の鉄イオンは細胞内に過剰

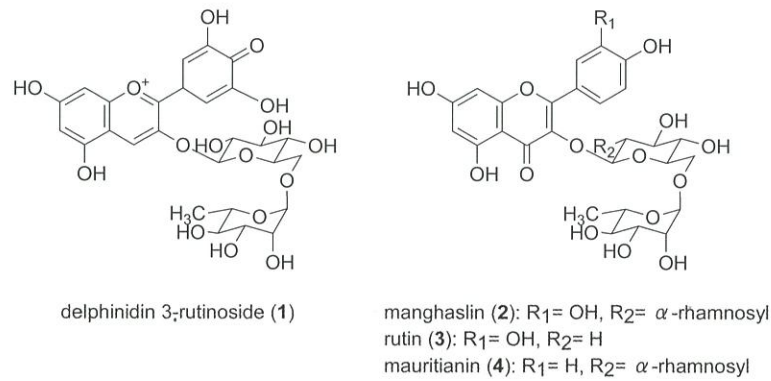


図7 「紫水晶」花卉のアントシアニンとフラボノールの構造。

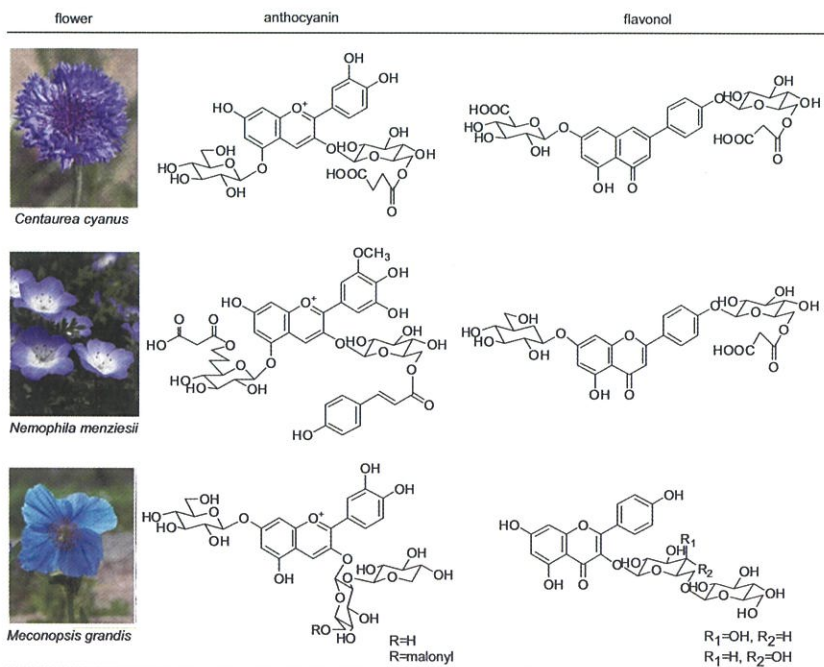


図8 鉄イオンとの錯体形成により青くなる花の例。

ヤグルマギクとネモフィラはメタロアントシアニンにより発色する。一方、青いケシは非化学量論的金属錯体による。

量存在すると活性酸素を発生させるため毒性を示す (Guerinot and Yi 1994, Briat et al 1999, Briat and Lebrun 1999)。従って、生物は鉄の分布、局在を厳密に制御している。通常鉄の隔離には液胞やフェリチンが機能する。植物において必要な鉄は土壌から根によって吸収される。その仕組みはイネ科植物とそれ以外の植物では異なっており、前者はストラテジーII、後者はストラテジーIと呼ばれる(図9) (Rudiger and Stephan 2003)。土壌中の鉄は、根から放出される緩い錯形成化合物であるフェノール性酸や、根圏生物が出す鉄溶解物質であるシデロフォアによってわずかに可溶化している。双子葉植物と非イネ科単子葉植物では、鉄欠乏になると根圏周辺にプロトンATPアーゼ (H^+ -ATPase) によって H^+ が放出され、それが根圏pHを低下させて不溶態の $Fe(OH)_3$ を可溶化する。この可溶化された Fe^{3+} が根の表面に到達し、根の細胞膜に存在する三価鉄還元酵素 (FRO2) (Robinson et al 1999) によって Fe^{2+} へと還元された後、 Fe^{2+} は細胞膜にある鉄制御輸送体 (IRT1) (Eide et al 1996) によって細胞内に取り込まれる (ストラテジーI)。一方、イネ科植物では、鉄欠乏になると根から強い鉄錯体を有するアミノ酸の一種であるムギネ酸 (MA) 類を分泌する。MA類は根圏の不溶態の Fe^{3+} と錯体を形成して可溶化し、植物はこのムギネ酸類三価鉄錯体 (MA類- Fe^{3+}) 複合体を根のMA類- Fe^{3+} 輸送体 (YS1) (Curie et al 2001) を介して吸収することにより鉄を獲得している (ストラテジーII)。

植物体内に入った鉄は導管を通り各組織へと運ばれ、ニコチアナミン (NA) がニコチアナミン二価鉄 ($NA-Fe^{2+}$) 錯体を形成し、YS1様の輸送体 (YSL)

が輸送機能を担うと考えられている (DiDonato et al 2004, Jean et al 2005)。また、細胞質内の鉄の循環 (図10) については、ミトコンドリアにおいて酵母のABCトランスポーターミトコンドリア1タンパク質 (ATM1p) のホモログで、ABCトランスポーターであるSTARIK1 (STA1) タンパク質が見つかっている (Kushnir et al 2001)。ATM1pはFe-Sクラスターをミトコンドリアマトリクスから細胞質に輸送するために必須の輸送体である。液胞では酵母の液胞膜鉄輸送体 (CCC1) (Liangtao et al 2001) のオソログとして、鉄流入型の液胞型鉄輸送体 (VIT1) が報告されている (Kim et al 2006)。一方、液胞からの鉄の流出にはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の自然抵抗性関連マクロファージタンパク質 AtNramp3と4が必要である (Lanquar et al 2005)。これらのVIT1やNramp3および4タンパク質の機能や重要性については、種子においてのみ明らかにされているが、花卉などその他の器官における鉄緩衝あるいは鉄の貯蔵についての研究は皆無であった。

そこで、著者らはチューリップ花卉の青色発色機構とこれに関与する鉄イオン輸送体の実体解明に興味をもち、研究を開始した。IIでは、既報のシロイヌナズナ液胞型鉄輸送体遺伝子 (*AtVIT1*) の配列を参考に、チューリップの液胞型鉄輸送体遺伝子のクローニングを行い、花底部の青色細胞だけで特異的に発現する同遺伝子 (*TgVIT1*) を見出した (Momonoi et al 2009)。この遺伝子の組織や開花ステージによる発現パターンを分析し、*TgVIT1* 遺伝子と青色発色とが強く関連することを明らかにした。

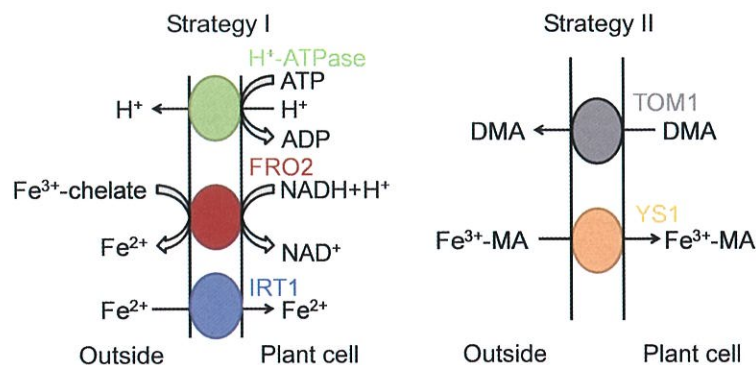


図9 植物の根における鉄輸送のしくみ (Rudiger and Stephan 2003)。

楕円は輸送体、矢印は輸送方向を示す。イネ科植物以外はストラテジーI、イネ科植物はストラテジーIIによって鉄が吸収される。DM: デオキシムギネ酸、MA: ムギネ酸、FRO2: 三価鉄還元酵素、IRT1: 鉄制御輸送体、TOM1: デオキシムギネ酸輸送体、YS1: ムギネ酸類三価鉄錯体輸送体。

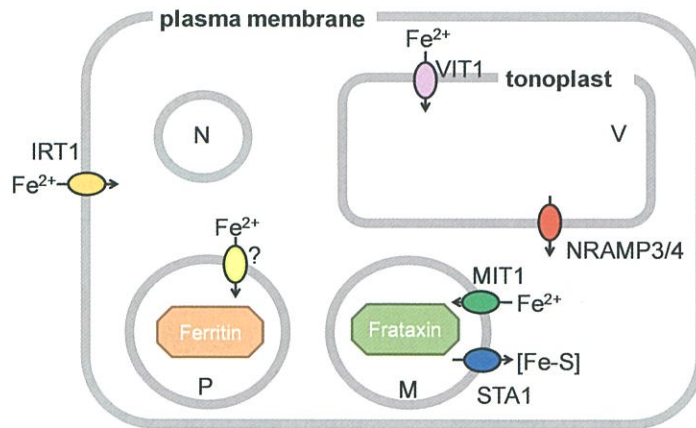


図 10 植物細胞における鉄の局在に関する輸送体。
 楕円は輸送体、矢印は輸送方向を示す。V: 液胞、P: 色素体、M: ミトコンドリア、
 N: 核、VIT1: 液胞型鉄輸送体、NRAMP3/4: 自然抵抗性関連マクロファージタン
 パク質、MIT1: ミトコンドリア型鉄輸送体、STA1: ミトコンドリア ABC 輸送体 I
 タンパク質の相同分子種。

IIIでは、TgVit1タンパク質の発現と機能解析を行った。抗TgVit1抗体を用いてタンパク質の発現を調べたところ、同じく青色発色と強い相関が認められた。さらに、*TgVit1*遺伝子をパーティクルガンで「紫水晶」花卉の紫色細胞に導入し、一過的に発現させる実験により、TgVit1の細胞青色化機能を明らかにした。酵母の液胞型鉄輸送体遺伝子欠損株 ($\Delta ccc1$) を用いても鉄輸送機能を証明した。以上から、チューリップ花卉の青色発色にはTgVit1の発現が必須で、このタンパク質が青色細胞の液胞膜上に存在して鉄イオンを液胞内へ輸送することにより、花卉細胞が青色になることを証明した。

IVでは、花底部が青い様々な品種における鉄蓄積と*TgVit1*遺伝子の発現を解析し、チューリップの青色化における*TgVit1*発現の普遍性を調べた。青色花底部の主要アントシアニンはDp 3-rutで、鉄の量も花底部は花卉上部より多く、その組織だけに液胞型鉄輸送体*TgVit1*遺伝子が発現することを明らかにした (Momonoi et al 2012)。さらに、成分からの青色再現実験を行い、発色に必要な要因と鉄の量を詳細に調べ、今後の青いチューリップの開発に向けた重要な知見を得た (Momonoi et al 2012)。

II. チューリップ花卉からの液胞型鉄輸送体遺伝子の探索

1. はじめに

チューリップにおける青色発色機構は、上部が紫色で内側花底部のみが青い「紫水晶」を用いて明ら

かにされた (Shoji et al 2007)。いずれの色の細胞も、含有されるアントシアニンはDp 3-rutで、助色素成分はマンガスリン、ルチン、モーリチアニンが検出された (図7)。また、花卉上部と花底部の表皮をプロトプラスト化して、細胞内微小電極法による液胞pHの測定、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による色素と助色素類の定量、誘導結合プラズマ (ICP) 発光分析による金属含有量の定量分析を行ったところ、いずれの色の細胞も液胞pHの平均値は5.6で、有機成分についても有意差は認められなかった。一方、鉄イオン含有量だけが、青色細胞で紫色細胞の約25倍と大きく異なることが明らかになった。さらに、色再現実験により、「紫水晶」の花卉の上下の発色の違いは、Fe³⁺の有無だけで決定されることが明らかになった (Shoji et al 2007)。

「紫水晶」花底部の青色化に鉄イオンが必須であることは、青色細胞特異的な鉄蓄積あるいは輸送機構の存在を示唆する。これまで、植物における液胞への鉄蓄積に関する輸送体遺伝子に関する研究報告は、シロイヌナズナの種子からクローニングされた液胞型鉄輸送体 (AtVIT1) の一例だけであった (Kim et al 2006)。そこで、*AtVIT1*の配列を参考にチューリップ青色花底部から鉄輸送体遺伝子の単離を試みた。

2. 材料および方法

1) 液胞型鉄輸送体遺伝子の単離

「紫水晶」の蕾 (開花ステージ3) をメスで花卉

上部(紫色)と花底部(青色)に切り分けピンセットで花底部から表皮細胞をはがし、1.5 mLチューブに約0.1 g集めマイクロチューブごと液体窒素で凍結しペッスル(アズワン)を用いて破碎した。Plant RNA Isolation Reagent (Invitrogen)を1 mL加え、添付のプロトコールに従って全RNAを抽出した。DNase I (Takara)で37°Cで30分間処理後、フェノール/クロロホルム溶液で処理し、2.5倍量のエタノール(EtOH)と1/10量の酢酸ナトリウムを加えて精製した。

得られた全RNAの一部をSuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)とOligo(dT)₁₂₋₁₈を用いて、添付のプロトコールに従って42°Cで50分間反応させ相補的DNA(cDNA)を合成した。得られたcDNAを鋳型として、設計したプライマーVit-F(5'-ATCWCNATGGGNCCTNGGNGGNTA-3')、Vit-R(5'-CCNARYTCRAANCKCATCAT-3')およびExTaq (Takara)を用いて、98°Cで10秒、50°Cで30秒、72°Cで30秒を35サイクルでPCRを行い、増幅された233 bpのPCR断片をpGEM-T Easyにクローニングし、シーケンス解析を行った。得られたDNA塩基配列を基に、特異的なプライマーVit-GS1(5'-TGCGCAAGAGTTCACGACTGG-3')、Vit-GS2(5'-TCCGCAGCCTCAACATCAGGAACG-3')を設計した。5'RACE System (Invitrogen)とプライマーVit-GS1を用いて、添付のプロトコールに従って42°Cで50分間反応させcDNAを合成し、Vit-GS2を用いて98°Cで10秒、55°Cで30秒、72°Cで1分を35サイクルでPCRを行い5'領域を増幅した。全長を得るために5'RACE Systemを用いてcDNAを合成し、TgVit-F(5'-AATGGTGATCGCCGGAGTATCGC-3')、Oligo(dT)₁₂₋₁₈、KOD Ver.2 (TOYOBO)を用いて94°Cで2分後98°Cで10秒、55°Cで30秒、72°Cで1分を35サイクルでPCRを行い、得られた約900 bpの断片をpGEM-T Easyへクローニングしてシーケンス解析を行った。この結果得られた液胞型輸送体遺伝子の全長を含むクローンをpTgVit1とした。

2) *TgActin*、*TgDFR*および*TgANS*遺伝子の単離

ハウスキーピング遺伝子である*TgActin*、色素合成に係るジヒドロフラボノール4-還元酵素遺伝子である*TgDFR*およびアントシアニン合成酵素である*TgANS*遺伝子はチューリップ花卉由来cDNAライブラリーから単離した。すなわち、「紫水晶」の開花時花卉から全RNAを抽出し、FastTrack 2.0 mRNA isolation kit (Invitrogen)を用いて、添付の

プロトコールに従いmRNAを調製した。CloneMiner cDNA library construction kit (Invitrogen)を用いて、添付のプロトコールに従いcDNAライブラリーを作製した。このライブラリーをランダムに約2,000個シーケンス解析し、*TgActin*、*TgDFR*および*TgANS*遺伝子の全長を含むクローンを得た。

3) *TgYSL* cDNAの全長取得

「紫水晶」の花弁上部、表皮(ステージ3)から抽出した全RNAを鋳型として、シロイヌナズナやイネのYellow stripe 1-like (YSL)の塩基配列を基に作製した縮重プライマーYsl-F(5'-TGGAGCTTCTTCCAGTGTT-3')とYsl-R(5'-GTCTTGAAGTCGTGCATCA-3')を用いてRT-PCRを行い*TgYSL*遺伝子断片を増幅した。5'RACE SystemによりdC tailed cDNAを合成し、プライマーYSL-GSP1(5'-TCCGACATACGTCAGACTAAATCAAAGAGATG-3')を用いてPCRを行った。さらに、プライマーYSL-GSP2(5'-CCACAACATCTCCTCCAGAGTAAAACCAC-3')を用いてnested PCRを行い約800 bpの断片を得た。YSLのcDNAの全長はGeneRacer™ Kit (Invitrogen)を用い、TgYSL-F(5'-ATGACCAGATCTAACCCTCTCATT-3')とGeneRacer™ 3' primerを用いて増幅しpGEM-T Easyへクローニング後、塩基配列を決定した。

4) *TgActin*、*TgVit1*、*TgDFR*、*TgANS*、*TgYSL* mRNAの発現解析

「紫水晶」の花弁(蕾から開花までの4ステージ)、開花時の茎、葉、球根、根、雌蕊および葯を採取し、花弁は表皮と柔組織に分けてすべての試料を約0.1 gずつ1.5 mLチューブに集め、-80°Cへ保存した。全RNA抽出とcDNA合成は上記方法と同様に行った。PCR反応液はSYBR Premix Ex Taq (Takara)を用いて、添付のプロトコールに従って調製した。定量リアルタイムPCRはABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用い、PCRは95°Cで10秒後、95°Cで5秒、60°Cで31秒を40サイクルで行った。相対定量解析には $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた。内部標準にはチューリップのアクチン遺伝子を用いた。以下に用いたプライマー配列を示す。
TgActin-F: AGTCAGTCATACAGTGCCAATC
TgActin-R: TCATAAGAGAGTCGGTCAAATCC
TgVit-F3: TGGTTGTCTTTGGCTACATCAA
TgVit-R3: TGGAACTCAGAACAGGATTGC
TgDFR-F: GTTGGTTCGTGGCTCGTAAT

TgDFR-R: GGTTTGGTCTTTCCCTGGTC
 TgANS-F: GTCCCTGACTCCCTTCTGGT
 TgANS-R: ATCCGAACCCTGTCCTTGT
 TgYSL-F: 5'-TCTTGGTTTCTGCAATGCCTATG-3'
 TgYSL-R: 5'-CCGTAGTTGTAGGCCATGTTCA-3'

5) ゲノミックサザンブロット解析

「紫水晶」の葉からCTAB法 (Murray and Thompson 1980) によりゲノミックDNAを抽出した。ゲノミックDNA (10 μg) を制限酵素EcoRI、HindIII、XbaIで37°Cで一晩切断した。切断されたDNAを1%アガロースゲル、TAE緩衝液中で25 V、6.5時間泳動した。0.25 M HClで脱プリン化、0.5 M NaOH/1.5 M NaClで変性、0.5 M Tris-HCl (pH 7)/1.5 M NaClで中和した後、20×SSCを用いてナイロンメンブレン (Roche) に転写した。プローブはPCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) とブ

ライマー (5'-GTTTGAGCTTGGATTGGAG-3')、(5'-TCACACAGATTGAACAGCC-3') を用いて作製し、DIG Easy Hyb (Roche) 中で42°Cで一晩ハイブリダイズさせた。メンブレンは0.5×SSC/0.1% SDSで65°C、15分間を2回で洗浄し、DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) を用いて発色した。検出はX線フィルム (RX-U;FUJIFILM) を用いて25°Cで1時間行った。

3. 結果

1) チューリップ液胞型鉄輸送体遺伝子 (TgVit1) の単離と配列解析

液胞型鉄輸送体として、植物では唯一シロイヌナズナの液胞型鉄輸送体遺伝子 (AtVIT1) が、酵母ではCCCIが報告されている (図11)。そこで、両者の配列を比較して相同性の高い領域から縮重プライマー (Vit-FおよびVit-R) を設計した。「紫水晶」

| | | | | | | | |
|--------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ATGTCCATTG | TAGCACTAAA | GAACGCAGTG | GTGACCCCTA | TACAGAAAGC | GAAGGTAGT | GGTGAAOCT |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | CAGAGTTGGG | GGGGTCTGAA | TCAACTCCCT | TGTTGAGGGG | TAGTAATAGC | AATAGTTCAA | GGCATGATAA |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | CTTATCCCTCA | TCTAGCTCGG | ATATTATCTA | TGGTAGAAAT | TCAGCGCAGG | ATCTAGAAAA | CTCACCGATG |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TgVit1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AtVIT1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ScCCCI | ----- | ----- | ----- | ----- | | | |

の青色花底部表皮細胞由来の全RNAを鋳型としてRT-PCRを行ったところ、233 bpのcDNA断片が増幅された。これをクローニングして、塩基配列を決定すると、*AtVIT1*に非常に相同性が高い断片が得られたので、次に5'RACEおよび3'RACEを行い、cDNAの全長をクローニングした。クローニングした遺伝子の全長は963 bp、コードされているタンパク質は247アミノ酸残基からなり、推定分子量は26.2 kDaであった。BLAST検索の結果、*AtVIT1*とアミノ酸配列で85%の相同性があり(図12)、チューリップの液胞型鉄輸送体遺伝子(*TgVit1*)であると考えられた。これまで*AtVIT1*以外に液胞型鉄輸送体遺伝子の研究報告はないが、NCBIデータベ

ス上には酵母の液胞型鉄輸送体(CCC1)のオーソログとして、イネ(*Oryza sativa*)の*OsVit1/2*、ポプラ(*Populus trichocarpa*)の*PtVit1*、ブドウ(*Vitis vinifera*)の*VvVit1*、トウモロコシ(*Zea mays*)の*ZmVit1*に相当する配列が登録されていた。そこで、系統樹解析を行ったところ、これらは単子葉と双子葉のグループに大きく分けられ(図13)、*TgVit1*はイネの*OsVit1*と最も相同性が高かった。

さらに、*TgVit1*のトポロジー解析と抗体作製のため、SOSUIプログラム(Hirokawa et al 1998)を用いて膜貫通領域の予測を行い(図12、14)、*TgVit1*には5つの膜貫通領域(I-V)が存在し、膜貫通領域も*AtVIT1*とほぼ同じで、立体構造もよ

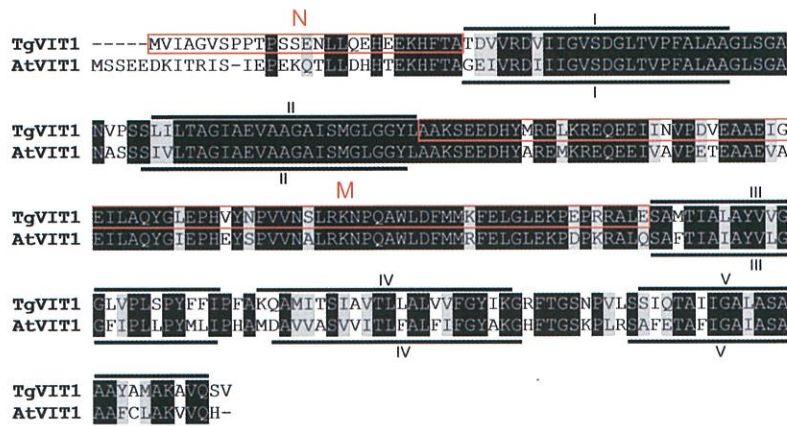


図12 チューリップ液胞型鉄輸送体(*TgVit1*)とシロイヌナズナ液胞型鉄輸送体(*AtVIT1*)のアミノ酸配列のアラインメント。網掛け(黒色)は同一アミノ酸、網掛け(灰色)は相同性が高いアミノ酸、I-Vは膜貫通領域、N、Mは抗体作製部位を示す。

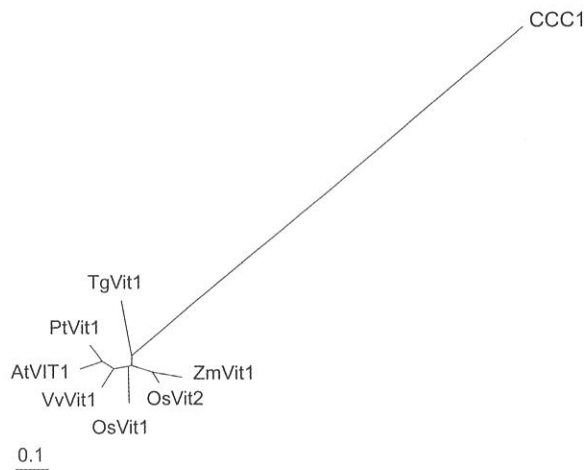


図13 *TgVit1*の系統樹解析。近隣接合法で解析を行った。*AtVIT1*(Accession nos. NM_126238)、*OsVit1*(NP001053010)、*OsVit2*(EAZ09015)、*PtVit1*(ABK94901)、*VvVit1*(CAN83350)、*ZmVit1*(DQ245806)、*CCC1*(L24112)。

く似ていることが想定された (図14)。

クローニングした*TgVit1*がゲノム中に何コピー存在するかを明らかにすることは、機能解析を行う上でも重要である。そこで、その手がかりを得るために、ゲノミックサザンブロット解析を行った。

「紫水晶」の葉から調製したゲノムDNAを制限酵素*EcoRI*, *HindIII*, *XbaI*で処理し、*TgVit1*に特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを行ったところ、*EcoRI*処理では4つ、*HindIII*処理では3つ、*XbaI*処理では3つのバンドが検出された (図15)。この結果から*TgVit1*は少なくとも3または4コピー存在すると予想された。

2) チューリップにおける*TgVit1* mRNAの発現

*TgVit1*が花底部の鉄の液胞輸送に関係する遺伝子であることの証明のために、組織および花卉の開花ステージごとの*TgVit1* mRNAの発現量を調べた。組織は紫色花卉上部、青色花底部、茎、葉、根、球根と雌蕊に分けて解析した。開花ステージは図16 (a)に示したように、蕾から完全に開花した状態までの4ステージに分けた。*TgVit1*は青色の花底部だけで多量に発現し、他の組織ではほとんど発現していなかった (図17(a))。花卉は表層の細胞だけが着色している (図16(b))。そこで、花卉をさらに表

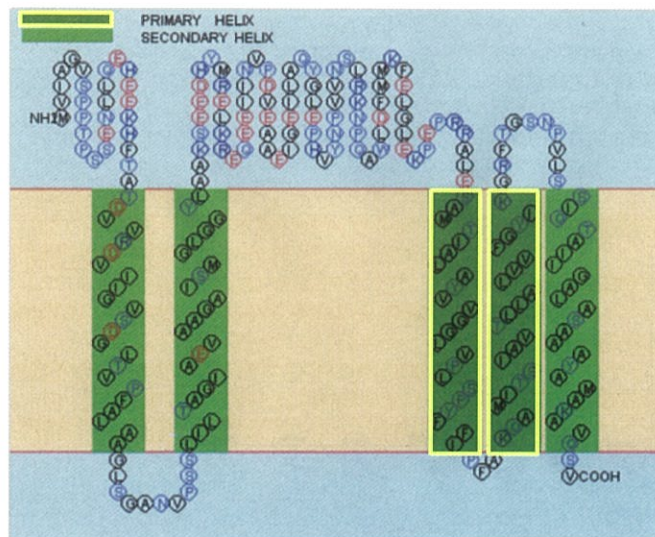


図14 SOSUIによる*TgVit1*のトポロジー解析。

PRIMARY HELIX (PH) は膜貫通の性質が強い領域、SECONDARY HELIX はPHが存在する状況下で膜貫通する可能性の高い領域を示す。

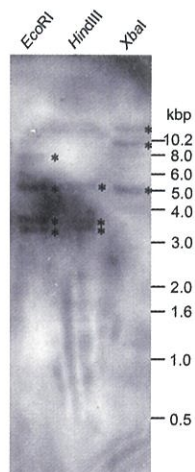


図15 *TgVit1*のゲノミックサザン解析。

チューリップの葉由来ゲノミックDNA (10 μ g) を制限酵素*EcoRI*, *HindIII*, *XbaI*で処理し、*TgVit1* 特異的プローブを用いて検出を行った。*は*TgVit1*を示す。

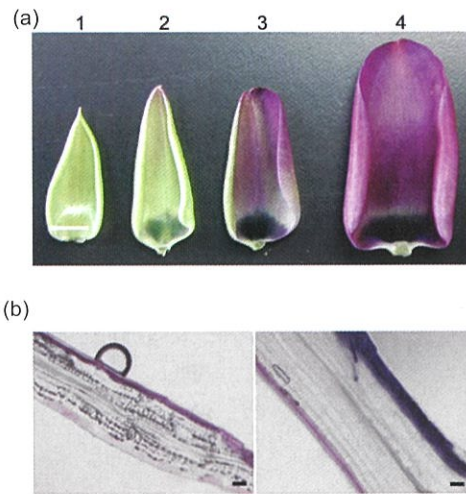


図16 チューリップ「紫水晶」の開花ステージと組織。

(a) 花弁の開花ステージ。蕾から開花までを4つのステージに分けた。ステージ1: 蕾 (花底部着色前)、ステージ2: 蕾 (花底部着色)、ステージ3: 蕾 (花弁着色)、ステージ4: 開花。スケールバー: 1 cm。

(b) 花弁切片の写真。左) 紫色花弁上部。右) 青色花底部。スケールバー: 100 μ m。

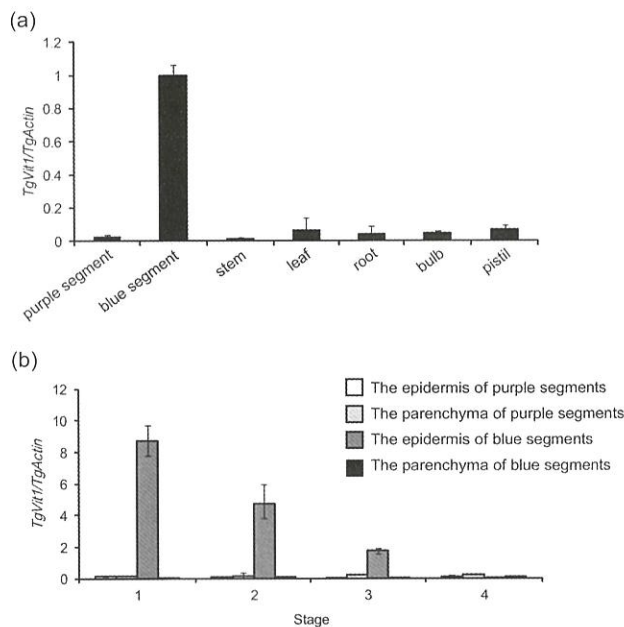


図17 チューリップ「紫水晶」の組織および開花ステージの違いによる *TgVit1* mRNA の発現。

(a) 組織別の発現の違い。(b) 開花ステージ別の紫色花弁上部と青色花底部の発現量。いずれも (a) の青色部分を1とした相対定量値で示した。

層の着色細胞と無色の中間柔組織細胞に分けて解析した結果を図17(b)に示した。*TgVit1*は花底部の青色表皮細胞だけで特異的に発現すること、発現はまだ花が色づく前のステージ1で最大値を示し、その後ステージが進みアントシアニンが増加し花底部が青くなると減少し、ステージ4ではほとんど発現していないことがわかった。

*TgVit1*の発現と花弁のアントシアニンの生合成系(図18)との関係を調べる目的で、チューリップのジヒドロフラボノール4-還元酵素遺伝子(*TgDFR*)およびアントシアニン合成酵素遺伝子(*TgANS*)を花弁からクローニングし、発現を解析した(図19)。*TgDFR*と*TgANS*の発現は、花弁上部と花底部とでは差は認められず、その発現パターンもステージ1

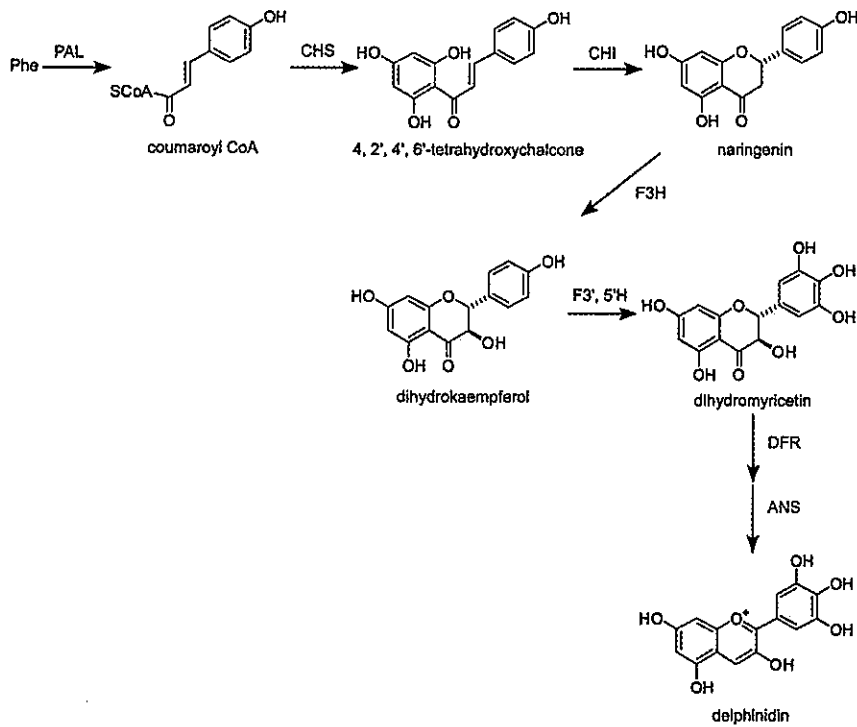


図 18 植物におけるデルフィニジンの生合成経路 (Heller et al 1994, Grotewold 2006, Davies and Schwinn 2006)

PAL: フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、CHS: カルコン合成酵素、CHI: カルコンイソメラーゼ、F3H: フラバノン 3-水酸化酵素、F3', 5'H: フラボノイド 3',5' 水酸化酵素、DFR: ジヒドロフラボノール 4-還元酵素、ANS: アントシアニン合成酵素。

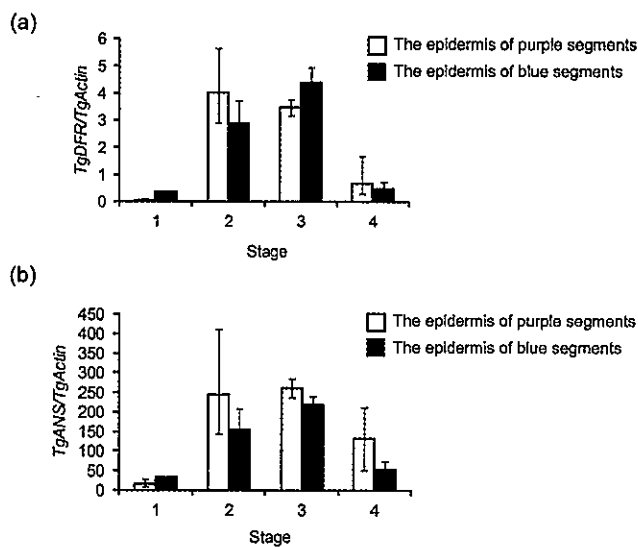


図 19 アントシアニン生合成関連酵素遺伝子 mRNA の発現。

図 16 で示した開花ステージ別に花卉上部と花底部着色表皮を調製し、ジヒドロフラボノール 4-還元酵素遺伝子 (*TgDFR*) とアントシアニン合成酵素遺伝子 (*TgANS*) mRNA の発現量を比較した。(a) *TgDFR* mRNA の発現。(b) *TgANS* mRNA の発現。図 17 (a) の青色部分を 1 とした相対定量値で示した。

では少なく、ステージ2および3で増加して最大となり、その後減少し、*TgVit1*の発現パターンとは異なった。このことから、*TgVit1*はアントシアニン生合成酵素遺伝子とは異なる発現制御を受けていることが示唆された。

液胞へ鉄イオンが流入するためには細胞膜上の鉄輸送体も解析する必要がある。シロイヌナズナなどでは、鉄欠乏に伴って発現が上昇する細胞質流入型鉄輸送体として、YS1様輸送体 (YSL) や鉄制御輸送体 (IRT) が知られている。*AtYSL1*は小花や顎片、さらにわずかであるが花卉で発現するとの報告がある (Le Jean et al 2005)。一方、*AtIRT1*は葯で発現している (Vert et al 2002)。そこで、これらの鉄

輸送体をチューリップからクローニングして青色化に関与するか否かを実験した。まず、縮重プライマーを設計し、*TgYSL* cDNAのクローニングを試みた結果、チューリップ花卉から*TgYSL*遺伝子を単離することができた。BLAST検索の結果、イネのOsYSL9とアミノ酸配列で79%、シロイヌナズナのAtYSL3と73%の相同性があり (図20)、チューリップのYS様輸送体遺伝子 (*TgYSL*) であると考えられた。*TgYSL* mRNAの発現解析を行ったところ、本mRNAは紫色細胞で多く発現していたものの、青色細胞ではほとんど発現しておらず、*TgVit1*の発現パターンとは全く異なった (図21)。同様に縮重プライマーを設計し、*TgIRT* cDNAの花卉からの単

| | |
|---------------|--|
| <i>TgYSL3</i> | -----MDHHHHPESHTPAEDDEADSAAEHLDSAEFDRAVPWRQQLTVRGLVAAALVVGVVYS |
| <i>AtYSL3</i> | MRSMMRREGRNEIEREVIDDLEETQNEGDQ--EKSIPPNKEQITFRGIVASLTIIGIIS |
| <i>TgYSL3</i> | VIVMKNLNTTGLVPTLNVSAAALSFVVLRTWTRVLHLKGVVATPFTROENTVVQTCAVAC |
| <i>AtYSL3</i> | VIVMKNLNTTGLVPTLNVSAAALFAVFLRSWTKLLTRAGIVTKPFTKQENTVVQTCAVAC |
| <i>TgYSL3</i> | YSVAVGGGFGSYLLGLNKKTYELAG-VDVGNTPGSKYKPEGIGWMTGFLFVSVFVGLLTI |
| <i>AtYSL3</i> | YSIAVGGGFGSYLLGLNRITIEQSGGTHDGNVEEGTKPEGIGWMTAFLEFTCFVGLLAI |
| <i>TgYSL3</i> | VPLRKIMIVDYKLSYPSGTATAVLINGFHTPHGDKMAKKQVHGFVKYFSLSPFWSFFQWF |
| <i>AtYSL3</i> | VPLRKIMIDYKLTSPSGTATAVLINGFHTPKGNKMAKKQVHGFVKYFSLSPFWSFFQWF |
| <i>TgYSL3</i> | YSGGDVCGFAQFPFTFGLKAWKQTEFFDFSLTYVGAGMICSHLVNLSLLGAVLSWGVMMWF |
| <i>AtYSL3</i> | FSGGTECGEIQPPTFGLKAWKQTEFFDFSLTYVGAGMICPHIVNISLLFGAVLSWGVMMWF |
| <i>TgYSL3</i> | LISELKGDWYFSNISEGSMRSLQGYKVFISIALILGDGLVNFLLKTLAFTARSNHARSRTK |
| <i>AtYSL3</i> | LKGLKGDWYFSTLIPENSMRSLNGYKVFISIALILGDGLVNFLLKTLAFTARSNHARSRTK |
| <i>TgYSL3</i> | -SLKKVADLETLIPDDEQRNEVFTRESIPMWIAYSAYGVLSSVSIITIQMFPPEVKWYVYV |
| <i>AtYSL3</i> | NSGKSNSEKDKQS IADLKRDEIFVRDSIELVVAAVGYAAFSVVSITAIPIMPPELKWYFT |
| <i>TgYSL3</i> | VISVLLAFAALGECNAYGAGLTDMMNAYNYGKVALFILAAMAGMDSGVVAGLVGCGLIKSV |
| <i>AtYSL3</i> | VVAYMLAFAALGECNAYGAGLTDMMNAYNYGKVALFILAAMAGKQNGVVAGLVGCGLIKSI |
| <i>TgYSL3</i> | VSISDLMHDFKTAHLTLTSPRSMILVSOAIGTAMGCVVAPLTFFIFPKAFDIGNPDGSKW |
| <i>AtYSL3</i> | VSISDLMHDFKTHLTLTSPRSMILVSOAIGTAMGCVVAPLTFFIFPKAFDIGNPDGSKW |
| <i>TgYSL3</i> | APYALIVRNMAILGVQGFSAIPHCLQLCYGFFGFVAVASNLVRDLFPARYGKVVPLPMAM |
| <i>AtYSL3</i> | APYALIVRNMAILGVQGFSAIPHCLQLCYGFFGFVAVASNLVRDLFPDKIGNVVPLPMAM |
| <i>TgYSL3</i> | AVPFLVGGVFAIDMCVGLIVFARHKMDKLSIMVPAVASGLICGDGLWILPSSLLLAAL |
| <i>AtYSL3</i> | AVPFLVGGVFAIDMCVGLIVFANMRDRVKAGLMVPAVASGLICGDGLWILPSS-VLAI |
| <i>TgYSL3</i> | AKINFPICMKEVASGKYK- |
| <i>AtYSL3</i> | AGVRFPPICMGEMPSSKYSS |

図20 *TgYSL3* (Accession nos. AB477531) と *AtYSL3* (NM_001203603) のアミノ酸配列のアラインメント。網掛けは同一アミノ酸を示す。

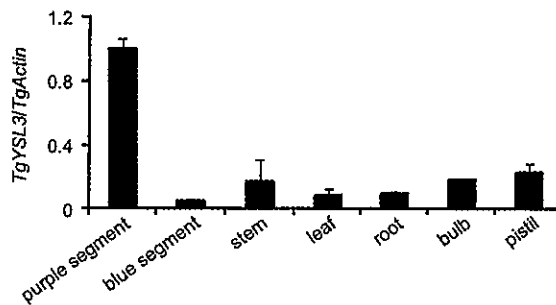


図21 チューリップ *TgYSL* mRNA の組織別の発現。紫色部分を1とした相対定量値で示した。

離を試みたが、花卉から得ることができなかった。

4. 小括

「紫水晶」の青色花底部から液胞型鉄輸送体遺伝子 (*TgVit1*) を単離することができた (Momonoi et al 2009)。*TgVit1* 遺伝子の塩基配列は *AtVIT1* 遺伝子の塩基配列と相同性が高く、2次構造もよく保存されていた。さらに、イネやトウモロコシの *Vit* 遺伝子と推定される配列とも相同性を有し、よく保存された構造をもつことがわかった。次に、チューリップの組織および開花ステージ別に *TgVit1* mRNA の発現を解析した結果、*TgVit1* はチューリップにおいて花底部の青色細胞特異的に発現し、発現量は花が色づく前のステージ I で最大であった。このことから、本遺伝子が鉄イオンの液胞蓄積を担うとともに、青色化の原因遺伝子であると強く推察された。一方、アントシアニン合成系遺伝子 (*TgDFR*、*TgANS*) および細胞膜型の鉄輸送体 (*TgYSL*) のクローニングと発現解析を行ったところ、*TgVit1* 遺伝子の発現は *TgDFR*、*TgANS* とは異なる発現制御を受けていることが示唆された。また、*TgYSL* 遺伝子は紫色細胞でのみ発現が認められ、青色細胞では検出されなかったことから青色化との直接的な関係はないと推察された。

III. 液胞型鉄輸送体タンパク質 (*TgVit1*) の発現と機能

1. はじめに

前章で、チューリップの青色細胞特異的鉄輸送体遺伝子 (*TgVit1*) が得られ、その mRNA 発現解析の結果から青色化との関連が強く示唆された。そこで本章では、*TgVit1* タンパク質が花卉に存在するか否かと、本タンパク質が鉄輸送機能を示し、花卉の青色化機能を果たしているかどうかを検証した。これは、チューリップの青色発色機構を担う実体が *TgVit1* であることを証明する上で必要不可欠である。液胞型鉄輸送体の鉄輸送能については、培地に高濃度の鉄があると生育できない酵母変異体 ($\Delta ccc1$) の機能相補実験がシロイヌナズナの *AtVIT1* で行われている (Kim et al 2006)。また、GFP-*AtVIT1* 融合タンパク質を細胞内で一過的に発現させることによる細胞内局在解析も行われている (Kim et al 2006)。本章では *TgVit1* タンパク質の発現と鉄輸送解析を *AtVIT1* と同様の方法 (Kim et al 2006) で行い、青色発現との関連を明らかにす

ることを試みた。さらに、パーティクルガンを用いた紫色細胞への *TgVit1* 遺伝子導入により、細胞青色化機能の証明実験を行った。

2. 材料および方法

1) シロイヌナズナ形質転換用プラスミドとアグロバクテリウムの調製

p*TgVit1* を鋳型として *TgVit1*-F (5'-CACCATG GTGATCGCCGGAGTAT-3')、*TgVit1*-R (5'-TCA CACAGATTGAACAGCCTTTG-3')、KOD Ver.2 (TOYOBO) を用いて 94°C で 2 分後 98°C で 10 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分を 35 サイクルで PCR を行い、pENTR/SD/Dヘクローニングし pENTR-*TgVit1* を作製した。このベクターと 35S プロモーターの下流で目的遺伝子と sGFP (S65T) を発現する pBI-OX-GW で LR clonase II Mix (Invitrogen) を用いて 25°C で 1 時間反応を行い、pBI-*TgVit1* を作製した。pBI-*TgVit1* 10~100 ng をアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) C58C1^{trf} のコンピテント細胞 50 μ L に Gene Pulser II (Bio-Rad) を用いて電圧 2.5 kV、電気容量 25 μ F、パルス制御 200 Ω でエレクトロポレーション法により導入した。導入したアグロバクテリウムに SOC 培地を 1 mL 加えて 28°C で 1 時間培養した後、YEB 培地に塗布して 28°C で 2 日間培養した。得られたコロニーは YEB 液体培地で 28°C で 1 晩培養し、感染させるまでグリセロールを加えて -80°C で保存した。

2) シロイヌナズナの形質転換

インフィルトレーション法 (Bechtold et al 1993) により行った。YEB 培地 5 mL にアグロバクテリウムを前培養し、翌日 YEB 培地 200 mL に移植した。28°C で一晩培養し、5,000 \times g、15 分間遠心後、インフィルトレーション用培地 400 mL に OD₆₀₀ が 0.8 になるように懸濁した。発芽 5 週間後の蕾だけにしたシロイヌナズナを準備し、アグロバクテリウム懸濁液入りの 500 mL ビーカーに地上部を浸した。0.5 気圧、10 分間減圧下で静置した後、22°C で 16 時間日長で栽培した。2 週間後に採った種子を培地で選抜し、*TgVit1* 過剰発現株を得た。

3) 抗体ペプチドの調製

TgVit1 の水溶性ループ部分で 2 種類の抗体を作製するために、p*TgVit1* を鋳型として *TgVitN*-F (5'-CACCATGGTGTGATCGCCGGAGTAT-3')、*TgVitN*-R (5'-TCATGCCGTGAAGTGCTTCTC-3')

と TgVitM-F (5'-CACCGCGGCTAAAAGTGAAGAAGAC-3'), TgVitM-R (5'-TCACTCTAGTGCTCTCCTCGG-3') の組み合わせで、KOD Ver.2 (TOYOBO) を用いて 94°C で 2 分後、98°C で 10 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 35 サイクルで PCR を行い、得られた増幅断片を pENTR/SD/D ヘクローニングし、pENTR-TgVitN および pENTR-TgVitM を作製した。これらと pET32aGW、LR clonase II Mix を用いて、それぞれ 25°C で 1 時間反応後、大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、pET32a-TgVitN および pET32a-TgVitM を作製した。

4) 抗体の作製

融合タンパク質の発現操作は植物のタンパク質実験プロトコール (中村ら 1998) に従って行った。すなわち、pET32a-TgVitN および pET32a-TgVitM のシングルコロニーをかきとり、LB (アンピシリン入り) 5 mL に懸濁し、37°C で培養した。OD₆₀₀ が 0.6 になった時点で 2.5 mL ずつに分け、一方に IPTG を終濃度 1 mM で加えた後、さらに 3 時間培養した。1.5 mL チューブに 500 μL をサンプリングし、20,000×g で 1 分間遠心した後、上清を除き -20°C で保存した。IPTG 誘導前と誘導後のサンプルをそれぞれ 80 μL の 1×サンプル緩衝液 (0.05 M Tris-HCl, pH6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) 2-メルカプトエタノール、10% (w/v) グリセロール、0.005% (w/v) BPB) に懸濁し、100°C で 5 分間熱処理後、5 μL を 15% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、融合タンパク質の発現量の確認を行った。発現誘導した大腸菌を 500 μL の開始緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液、pH7.4, 0.5 M NaCl, 10 mM Imidazole) に懸濁し、チューブを氷冷しながら超音波破碎機 (BRANSON 450D) で半透明になるまで破碎した。それを 20,000×g で 1 分間遠心し上清を 4°C で保存した (可溶性画分)。沈殿には 500 μL の尿素入り開始緩衝液 (開始緩衝液、8 M 尿素) を加え再懸濁後 20,000×g で 1 分間遠心し、上清を 4°C で保存し (尿素画分)、沈殿に 500 μL の 1×サンプル緩衝液を加えた。すべてに等量の 2×サンプル緩衝液 (0.1 M Tris-HCl, pH6.8, 4% (w/v) SDS, 10% (w/v) 2-メルカプトエタノール、20% (w/v) グリセロール、0.01% (w/v) BPB) を加え 100°C で 5 分間熱処理後、0.5 μL を 15% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し融合タンパク質の可溶性の確認を行った。小規模で検討した条件をもとに、100 mL の LB (アンピシリン入り)

培地で培養した菌体 0.5 g を 5 mL の開始緩衝液に懸濁し、半透明になるまで超音波破碎機を用いて破碎した。条件は DUTY50%、PULSE 1 秒、OUTPUT 2.5~3.0 で 1 分間を 5 回繰り返した。10,000×g で 10 分間遠心後、上清を 0.2 μm のフィルターで精製し試料とした。これを Hi-Trap Chelating column (GE Healthcare) で添付のプロトコールに従った。すなわち NiCl₂ で固定し、AKTA prime (GE Healthcare) を用いて圧力 0.5 MPa、流速 1 mL/min、フラクション 1 mL とし、A 液 (20 mM リン酸緩衝液 (pH7.4)、500 mM NaCl, 10 mM Imidazole) を 5 mL 流した後、試料を 6 mL 注入した。さらに、A 液を 5 mL、B 液 (20 mM リン酸緩衝液 (pH7.4)、500 mM NaCl, 1 M Imidazole) 0~100% の濃度勾配として 20 mL、B 液を 3 mL 流し、分取した。各試料のうち 10 μL を 37°C で 10 分間処理し、SDS-PAGE に供試した。γ-グロブリンを指標に Protein assay kit を用いてタンパク量を測定した。精製した組換えタンパク質を常法に従ってウサギに免疫し、約 4 週間後に全採血した。血清は HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare) を用いて、添付のプロトコールに従ってアフィニティー精製した。

5) 粗膜試料の調製

Yoshida ら (2005) の方法に従い行った。各ステージのチューリップ花卉を上部と花底部に分け、さらにそれぞれを表皮と柔組織に分け 0.5 g ずつ 50 mL チューブに集め -80°C に保存した。その他のチューリップ組織は各 1 g ずつを採取し -80°C に保存した。試料を液体窒素で破碎し、10 倍容の破碎緩衝液 (0.25 M sorbitol, 50 mM Tris-acetate, pH7.5, 1 mM EGTA, 20 μM APMSF, 1% (w/v) PVP, 2 mM DTT) に懸濁した後、3600×g (BECKMAN J2-21M, JA20) で 10 分間の遠心分離を 2 回繰り返す。ミラクロスを二重にしてろ過した。ろ液を 120,000×g (BECKMAN XL-90 Ultracentrifuge, 90Ti) で 40 分間遠心した。パスツールで上清を捨て、沈殿に 20% glycerol/Tris 緩衝液 (20% (v/v) glycerol, 20 mM Tris-acetate, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT) 100 μL を加え超音波処理により懸濁し、粗膜試料とした。

シロイヌナズナのカウレン葉は 3 倍容の抽出液 (0.02 M Stacking Buffer, 2% SDS, 10% βメルカプトエタノール, 24% glycerol) で抽出し、20,000×g で 10 分間、20,000×g で 5 分間の遠心を行い、上清を回収した。それぞれ γ-グロブリンを

指標にProtein assay kitとGeneQuantを用いてタンパク量を測定した。

6) SDS-PAGEとイムノブロット解析

SDS-PAGEはLaemmli(1970)の方法に準じて行った。チューリップの粗膜試料はタンパク量で40 μ g、シロイヌナズナの全タンパク質試料は10 μ gを試料溶解液(2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH6.8, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% BPB, 10% glycerol)に懸濁し、95°Cで5分間熱処理後、15%アクリルアミドゲルに供した。50 Vで90分間泳動後、ゲル中のタンパク質をBurnette(1981)の方法に準じてGVHPメンブレン(Nihon Millipore)に電気的に転写した。転写はセミドライプロッター装置(ATTO)を用いて1.5 mA/cm²で1時間行った。

タンパク質が転写されたメンブレンは、5% (w/v) スキムミルクを含むTBST緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) Tween 20)で1時間ブロッキング処理し、TBST緩衝液で15分間1回、5分間2回洗浄した後に、抗TgVit1抗体を1,000倍希釈したTBST緩衝液中でメンブレンを1時間振とうした。TBST緩衝液で15分間1回、5分間2回洗浄した後、2,500倍希釈のペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体(GE Healthcare)を含むTBST溶液中で30分間振とうした。メンブレンをTBSTで洗浄後、ECL system(GE Healthcare)を用いて特異抗体と反応するタンパク質を検出した。

7) 融合タンパク質発現ベクターの構築

pTgVit1を鋳型としてプライマー TgVit1-F (5'-CACCATGGTGATCGCCGAGTAT-3'), TgVit1-R (nonstop) (5'-CACAGATTGAACAGCCTTTGCC-3'), KOD Ver.2 (TOYOBO)を用いて94°Cで2分後、98°Cで10秒、55°Cで30秒、72°Cで1分を35サイクルでPCRを行い、PCR産物をpENTR/SD/Dへクローニングし、pENTR-TgVit1 (nonstop) を作製した。このベクターと蛍光タンパク質(GFP, mCherry, tdTomato)を目的遺伝子のC末およびN末に融合した状態で発現させることができるpUGW5 (Vit1, GFPの順)、pUGW6 (GFP, Vit1の順)、pGwM (Vit1, mCherryの順)、pmCGW (mCherry, Vit1の順)、pGWtd (Vit1, tdTomatoの順)、ptdGW (tdTomato, Vit1の順)(以上、島根大学 中川強教授より譲渡)とLR clonase II Mixを用いて25°Cで1時間反応し、pU5TgVit1, pU6TgVit1, pTgVit1mC, pmCTgVit1, pTgVit1td, ptdTgVit1

を作製した。

8) ネギ表皮細胞への遺伝子導入および共焦点レーザー顕微鏡による観察

pU5TgVit1, pU6TgVit1, pTgVit1mC, pmCTgVit1, pTgVit1td, ptdTgVit1をHelios Gene Gun system (Bio-Rad)を用いて、打ち込み圧200 psiでネギ表皮細胞に打ち込み、25°Cで16時間インキュベーション後、共焦点レーザー顕微鏡(Zweiss社, LSM510)を用いて観察した。次に、pTgVit1mC, pmCTgVit1, pTgVit1td, ptdTgVit1をHelios Gene Gun systemを用いてシロイヌナズナ δ TIP-GFP過剰発現株の根に打ち込んだ。さらに、p γ TIP-GFPおよびpAtVam3-GFP(京都大学 西村いくこ教授より譲渡)をpTgVit1mC, pmCTgVit1, pTgVit1td, ptdTgVit1それぞれと混ぜて、Helios Gene Gun systemを用いてネギ表皮細胞へ打ち込んだ。25°Cで16時間インキュベーション後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

9) チューリップ花卉への遺伝子導入

Bio-Radの標準的なプロトコールに従いpBI-TgVit1を金粒子1.0 μ mにコーティングし、パーティクルデリバリーシステム(PDS-1000/He, Bio-Rad)を用いて打ち込み圧1350 psi、距離9.0 cmの条件で、「紫水晶」の花卉の紫色部分に遺伝子導入を行い、20°Cで2日後蛍光実体顕微鏡による観察を行った。

10) 酵母変異体を用いた機能相補実験

pTgVit1を鋳型にプライマー Sc-F (5'-CGAATTCATGGTGATCGCCGAGT-3') およびSc-R (5'-CGTCGACTCACACAGATTGAACAGC-3'), KOD Ver.2を用いて、94°Cで2分後、98°Cで10秒、55°Cで30秒、68°Cで1分を35サイクルでPCRを行い、PCR産物をEcoRIとSalIで処理し、同じくEcoRIとSalIで処理したGAL1, ADH1, TEFpベクターへクローニングし、野生型BY4741, YKK430および $\Delta CCCI$ へ形質転換した。作製したWT+Vector, WT+Vit1, $\Delta CCCI$ +Vector, $\Delta CCCI$ +Vit1のコロニーをかきとり、滅菌水に懸濁し、分光光度計(SIMAZU1600)を用いてOD₆₀₀を測定し、OD₆₀₀が1 (10,000 cell/ μ L)になるように希釈した。これを0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001になるように段階希釈したものを調製し、FeSO₄をそれぞれ終濃度0 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mMで加

えたSDgal-Uraプレート培地に1.5 μ lずつスポットし、30°Cで4日間培養した。

3. 結果

1) TgVit1タンパク質の発現解析

(1) シロイヌナズナTgVit1過剰発現株の作製と抗TgVit1抗体の特異性の確認

タンパク質の発現解析を行う上で、目的のタンパク質を識別できる特異抗体の利用が有効である。そこで、TgVit1を検出するための抗体を作製した。TgVit1のN末側の27残基をコードするペプチドN (図12) および二番目と三番目の膜貫通領域の間の水溶性ループ部分のアミノ酸80残基をコードするペプチドM (図12) を大腸菌で発現させ、ウサギに免疫し、血清をアフィニティクロマトグラフィーで精製して、TgVit1のポリクローナル抗体を2種類作製した。得られた抗体がTgVit1タンパク質を識別できるかは重要である。また、モデル植物のシロイヌナズナに*TgVit1*遺伝子を導入して過剰発現させた形質転換体を作製することによって、抗体の反応性の確認のみならず、鉄蓄積や輸送など様々な今後の研究展開も期待できることから、シロイヌナズナ「コロンビア」を用いてTgVit1過剰発現株を作製した。この過剰発現株の葉から抽出した全タンパク質と作製した抗体を用いてイムノブロット解析を行った結果、クマシー染色ではシロイヌナズナ野生株とTgVit1過剰発現株とのタンパク量に差は認められなかったものの、抗TgVit1抗体によるイムノブロット解析では、TgVit1過剰発現株においてのみ32 kDaのサイズにバンドが特異的に検出された

(図22 (a))。TgVit1のアミノ酸配列から予想される分子量は26.2 kDaで、イムノブロット解析で検出されたバンド32 kDaよりも大きかった。これは、TgVit1タンパク質が細胞内で何らかの修飾を受けたためと推測される。抗TgVit1抗体として作製した抗体Mと抗体Nの性能を評価したところ、チューリップ花底部青色組織から抽出した膜タンパク質を用いた場合、抗体Mでは複数の非特異的なバンドが検出された (図22 (b))。一方、抗体Nは特異的かつ効果的にTgVit1を検出可能であった。そこで、以後の解析には抗体Nを用いることにした。

(2) チューリップにおけるTgVit1タンパク質の発現

青色発色とTgVit1タンパク質発現の関連を明らかにするために、抗体Nを用いて、チューリップ組織から抽出した膜タンパク質のイムノブロット解析を行った (図23)。花卉上部、花底部に分けて着色表皮と無色柔組織を比較したところ、TgVit1タンパク質は花底部の青色表皮細胞だけに存在することがわかった (図23 (a))。また、花卉以外の組織である、葉、茎、球根、根を用いて解析したところ、これらの組織ではTgVit1タンパク質は全く検出されなかった (図23 (b))。次に、青色花底部の表皮細胞を用いて、開花ステージの違いによるTgVit1タンパク質の発現量の変化を解析した (図23 (c))。TgVit1タンパク質はステージ1で最も多く検出され、その後ステージ4 (開花)まで段階的に減少した。TgVit1タンパク質の発現は細胞および開花ステージの比較いずれもmRNAの発現と相関が高く、青

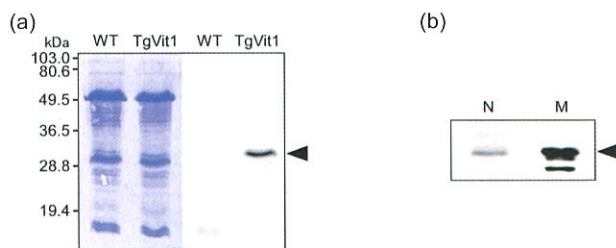


図22 抗TgVit1抗体の特異性の検証。

- (a) シロイヌナズナ野生株とTgVit1過剰発現株におけるイムノブロット解析。
作製した抗体Nを用いて、それぞれの株から抽出した全タンパク質 (10 μ g) のイムノブロット解析を行った。矢印はTgVit1を示す。
左) CBB染色, 右) イムノブロット解析. WT: 野生型, TgVit1: TgVit1過剰発現株。
- (b) 2種類の抗体NまたはMの反応の比較。
図12に示す部位で作製した2種類の抗体を用いて、開花ステージ4の青色表皮細胞から抽出した膜タンパク質 (40 μ g) のイムノブロット解析を行った。

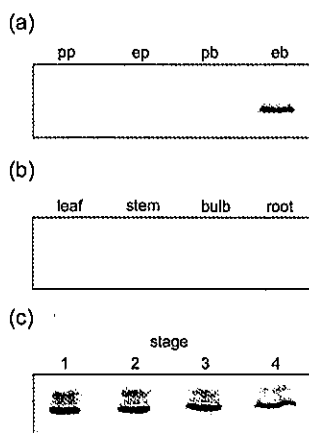


図 23 組織および開花ステージの違いによる TgVit1 タンパク質の発現の比較。
 (a) 花卉の部位の違いによる比較。
 pp: 紫色花卉上部の柔組織、ep: 紫色花卉上部の表皮、pb: 青色花底部の柔組織、
 eb: 青色花底部の表皮。
 (b) チューリップ花卉以外の組織別の比較。
 (c) 青色花底部の開花ステージの違いによる比較。
 チューリップから抽出した粗膜試料 (40 μg) を泳動し、抗 TgVit1 抗体(N) を用
 いてイムノブロット解析を行った。

色細胞特異的であった。以上の結果から、TgVit1 が花底部の青色発色と関わっていることが強く示唆された。

2) TgVit1タンパク質の細胞内局在解析

TgVit1が液胞膜タンパク質であることを証明するために、細胞内局在解析を行った。TgVit1とイソギンチャク由来赤色蛍光タンパク質 (RFP) とのN末融合タンパク質発現ベクター (pTgVit1-tdTomato) を作製し、パーティクルガンを用いてネギ表皮細胞に遺伝子導入し、細胞内でのRFPの蛍光を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。同時に液胞膜局在タンパク質のマーカーとして、液胞膜水チャネル遺伝子 (γTIP) とクラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP) とのN末融合タンパク質発現ベクター (pγTIP-GFP) を用いた。pTgVit1-tdTomatoとpγTIP-GFPとを同時にネギ表皮細胞に導入し、蛍光を確認した (図24)。その結果、pTgVit1-tdTomatoを導入した場合、核では蛍光が観察されず、膜でのみ観察された (図24 (c))。また、pTgVit1-tdTomatoとpγTIP-GFPを混ぜて同時に遺伝子導入し、同一細胞内で発現させると、赤色と緑色が混ざった黄色の蛍光が観察され、両者の共局在が確認された (図24 (f))。以上からTgVit1はγTIPと同様に液胞膜に局在することが確認された。

3) チューリップ花卉におけるTgVit1の細胞青色化機能

TgVit1の発現は、青色発色に強く関与していることや液胞膜に局在することを2) で示すことができたので、次の方法によって直接的な機能の証明を試みた。すなわち、「紫水晶」の上部紫色細胞は鉄のみの不足により青くならないことから、この部分へのTgVit1遺伝子の導入を行った。GFPとTgVit1を同時に発現するTgVit1発現ベクター (pBI-TgVit1) をパーティクルガンを用いて「紫水晶」の花卉上部に遺伝子導入し、48時間後の花卉細胞の色変化を蛍光実体顕微鏡により観察した (図25)。GFPを同時に発現するTgVit1発現ベクターを導入した場合、驚くべきことにGFPの緑色蛍光を発する細胞、すなわちTgVit1が導入され発現したと考えられる細胞は全て青色に変化した (図25 (a-d))。一方、GFPの蛍光を発しない紫色細胞はすべて紫色のままであった。TgVit1を発現せずGFPのみを発現するベクター (pBI-OX-GW) を導入した場合、GFPの緑色蛍光は観察されるものの青色への変化は観察されなかった (図25 (e, f))。自然条件で栽培した「紫水晶」の花では、花卉上部に青色細胞は全く観察されない。青色再現実験で、Dp 3-rutと助色素に鉄イオンを加えると青色を呈したことから (Shoji et al 2007)、この色変化はTgVit1タンパク質が液胞膜に発現して液胞内に鉄を輸送することにより生じた結果である。

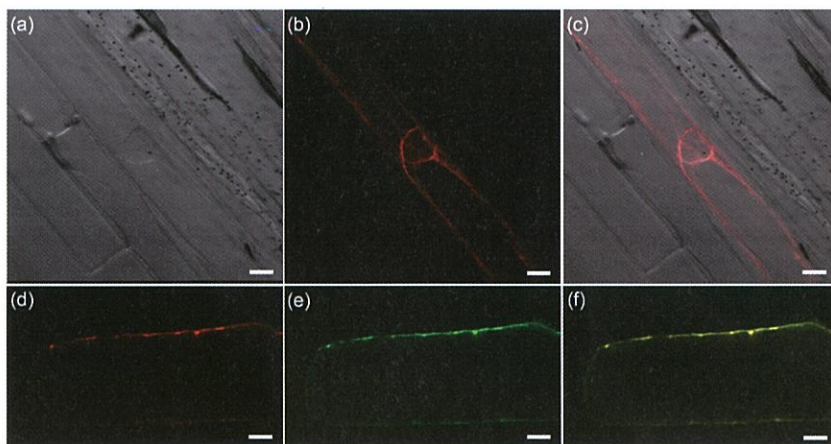


図 24 TgVit1 タンパク質の細胞内局在.

パーティクルガンを用いてネギ表皮細胞に pTgVit1-tdTomato と pγTIP-GFP を打ち込み、16 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(a) 明視野.

(b) TgVit1-tdTomato の発現による RFP 蛍光.

(c) (a)と(b)の重ね合わせ.

(d) TgVit1-tdTomato の発現による RFP 蛍光.

(e) pγTIP-GFP の発現による GFP 蛍光.

(f) (d)と(e)の重ね合わせ.

スケールバー: 20 μm.

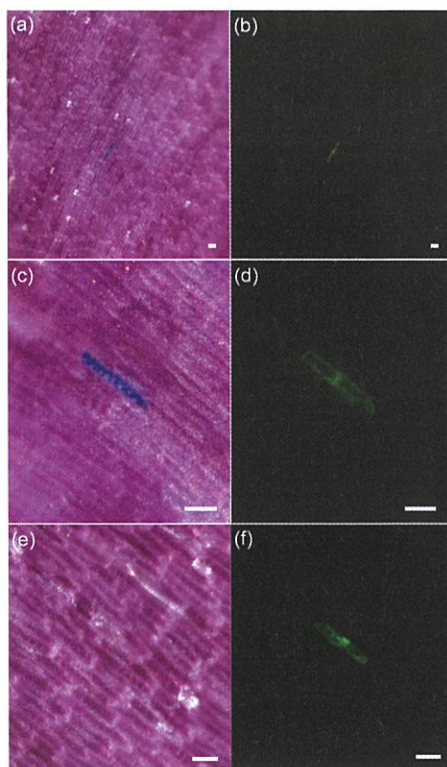


図 25 パーティクルガンによる「紫水晶」花弁上部への *TgVit1* 遺伝子の導入による紫色細胞の青色化.

パーティクルガンを用いて pBI-TgVit1 および pBI-OX-GW を導入し、48 時間後に蛍光実体顕微鏡を用いて観察した。

(a-d) pBI-TgVit1 導入. (e,f) pBI-OX-GW 導入. (a), (c), (e) は明視野画像、(b), (d), (f) はそれぞれ左側画像の蛍光観察画像を示す. スケールバー: 100 μm.

4) 酵母変異体を用いたTgVit1の鉄輸送能の解析

TgVit1の鉄輸送能をさらに確実に証明するため、酵母変異体を用いた機能相補実験を行った。植物で最初にVIT遺伝子をシロイヌナズナから単離したKimら(2006)は、高濃度の鉄添加培地で生育できない酵母の液胞型鉄輸送体(CCC1)欠損株($\Delta ccc1$)へAtVIT1を形質転換すると、高濃度鉄添加培地上での生育が回復して細胞内の鉄濃度が上昇することを確認しており、これをAtVIT1の鉄輸送機能の証明としている。そこで、チューリップからクローニングしたTgVit1を同様の方法で酵母に導入し、機能相補実験を行った。酵母用発現ベクター(p416GAL1-TgVit1)を、野生型と $\Delta ccc1$ 変異型酵母に導入してそれぞれ形質転換体を作製し、5 mMと10 mMの二価鉄(FeSO₄)を添加した培地上で培養した。p416GAL1ベクターのみを発現させた $\Delta ccc1$ 変異型酵母はFeSO₄を含む培地上で生育が阻害されたのに対して、 $\Delta ccc1$ 変異型酵母にTgVit1を発現させると、AtVIT1を発現させた時と同様に、FeSO₄を含む培地上でも生育が回復した(図26)。これは液胞膜上にTgVit1が発現し、細胞内に流入した鉄イオンが液胞へ輸送され、生育が可能になったことを示す。従って、TgVit1がCCC1同様に2価鉄イオンを液胞内に輸送する機能をもつと考えられた。

4. 小括

本章ではTgVit1タンパク質の発現と青色発色への関与を明らかにする目的で、TgVit1に対する抗

体を作製し、チューリップにおけるTgVit1タンパク質の発現を確認した。TgVit1タンパク質は花底部の青色表皮細胞のみで検出され、蕾が色づく前のステージIで最大量を示し、それ以降のステージでは減少していった。この変化はTgVit1 mRNAの発現の変化とよい相関を示した。また、蛍光タンパク質を用いた細胞内局在解析の結果から、TgVit1は液胞膜に局在することが示された。さらに、GFPとTgVit1を同時に発現するベクターを「紫水晶」の花弁上部に遺伝子導入すると、遺伝子導入された細胞が青色に変化し、TgVit1がチューリップ花卉において液胞へ鉄を運び、青色化する機能を直接的に実証することができた。加えて、酵母の鉄輸送変異体($\Delta ccc1$)を用いた実験により、TgVit1は液胞内に二価鉄イオンを輸送することが明らかになった。以上から、チューリップの青色花卉におけるTgVit1の機能を解明でき、TgVit1は青色化に不可欠であることを証明した(Momonoi et al 2009)。

IV. 様々な花色のチューリップ花卉における青色発色と鉄の蓄積

1. はじめに

花底部が青色のチューリップ品種は「紫水晶」以外にも多数ある。IIおよびIIIで述べた「紫水晶」における青色発色機構を他の品種についても検証することは、花卉全部が青いチューリップの育種においても重要である。そこで、他の品種の青色発色について実験を行うこととした。分析材料は、富山県農

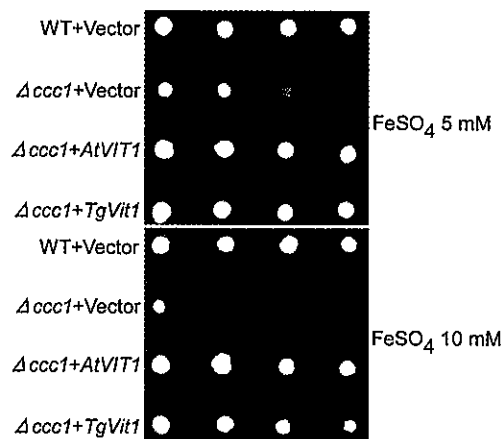


図 26 酵母変異体 ($\Delta ccc1$) を用いた鉄輸送機能解析。
酵母野生型 (WT) および変異型 ($\Delta ccc1$) に TgVit1、AtVIT1、GAL1 ベクターをそれぞれ導入し、5 mM および 10 mM の FeSO₄ を加えて鉄添加培地での生育を比較した。

林水産総合技術センター園芸研究所で保有している品種から花底部が青色の品種を中心に選んだ。これに加え、全体が黄色および白色の品種、対照として「紫水晶」の合計15品種のチューリップを対象に、花弁に含まれるアントシアニン、助色素、鉄の分析と*TgVit1* mRNAの発現解析を行った。その結果、Dp 3-rutの鉄錯体による*TgVit1*依存性の青色発色機構の普遍性を明らかにできたが、表皮着色部分に含まれる鉄含有量には変動があったことから、分析値をもとにした青色再現実験を行い、青色発色への鉄関与の普遍性について調査した。

2. 材料および方法

1) 色彩値の測定

採取した開花花卉の色を、分光測色計(コニカミノルタCM-2600d)を用いて測定した。花弁上部と花底部それぞれ3cm四方の花弁のL*a*b*値を測定した。測定は異なる花卉を用いて、花弁上部と花底部それぞれ3回行い平均値を計算した。

2) 「紫水晶」花弁からのDp 3-rutの単離

「紫水晶」の凍結花弁(ステージ4)上部約350gを3% TFA含有メタノール(MeOH) 1.5 Lに一晚浸漬し、抽出液をプフナーロートで吸引濾過した。抽出液を減圧下40°Cで濃縮乾固して3gの抽出物を得た。抽出物を500 mLの0.5% TFA含有CH₃CNに溶解し、予め水で洗浄後、0.5% TFA水溶液で置換したAmberlite XAD-7カラム(75 mm id.×250 mm)に吸着させ、0.5% TFA含有5%、10%、15%、20%、25%、30% CH₃CN水溶液をそれぞれ1 Lずつ流し溶出させた。0.5% TFA含有20%~25% CH₃CN水溶液画分に色素が溶出したので、この画分を集め、減圧下40°Cで濃縮乾固し、粗色素2.91 gを得た。この画分を再度先の方法でAmberlite XAD-7カラムに吸着させ、0.5% TFA含有5%、6% CH₃CN水溶液をそれぞれ1 Lずつ、0.5% TFA含有9%、12%、15%、18%、21% CH₃CN水溶液をそれぞれ2 Lずつ流し溶出させ、0.5% TFA含有15% CH₃CN水溶液画分を減圧下40°Cで濃縮乾固し、粗色素0.614 gを得た。得られた粗色素を100 mLの0.5% TFA水溶液に溶解し、Develosil ODS-HG-5(30 mm id.×250 mm, Nomura chemical)に吸着させ、0.5% TFA含有5% CH₃CN水溶液を用いて、流速5.0 mL/min、30°Cでイソクラティック溶出させた。色素は96分~142分に溶出したのでこの画分を集め、減圧下40°Cで濃縮乾固し、Dp 3-rut

をTFA塩として37.6 mg得た。これを0.5% TFA含有5% CH₃CN水溶液10 mLに溶解し、0.5% TFA水溶液で洗浄したLH-20(60 mm id.×250 mm, GE Healthcare)カラムに吸着させ、0.5% TFA含有5% CH₃CN水溶液を流速2.0 mL/minで流した。得られた色素画分を減圧下40°Cで濃縮乾固し、Dp 3-rutのTFA塩18.5 mgを赤色粉末として得た。

3) アントシアニンの定量

-80°Cで保存した開花時花弁表皮約0.1 gに、0.1% HCl-MeOHを5 mL加え、遮光下室温で24時間静置した。遠心分離(1,000×g, 5 min)後、上清を光路長10 mmのセルに入れ、紫外可視吸収スペクトルを測定した。別途、花弁より単離したDp 3-rutのTFA塩を0.1% HCl-MeOH 10 mLに溶解して段階希釈し、140 μM、70 μM、7 μM、3.5 μM溶液を調製して紫外可視吸収スペクトルを測定し、吸収極大波長(543 nm)における吸光度をプロットして検量線を作製した。試料の可視部の吸収極大における吸光度値を用いて、花弁含有アントシアニン量をDp 3-rut相当量として定量した。

4) 花弁に含まれる色素と助色素のHPLC分析

-80°Cで保存した開花時花弁(ステージ4)表皮約0.1 gに、3% TFA 50% CH₃CN水溶液を1 mL加え、遮光下室温で24時間静置した。遠心分離(20,600×g, 5 min)後、上清を別のサンプルチューブへ移し、HPLCで分析した。チューリップ花弁より単離した標品のDp 3-rut、シアニジン 3-ルチノシド(Cy 3-rut)、ペラルゴニジン 3-ルチノシド(Pg 3-rut)、市販のルチンを同様に分析した。

5) チューリップ品種「ピーター」花弁上部からのペラルゴニジン 3-ルチノシド(Pg 3-rut)の単離

「ピーター」の凍結花弁(ステージ4)上部約170 gを、3% TFA含有MeOH 1 Lに一晚浸漬し、抽出液をプフナーロートで減圧濾過した。残渣に1% TFA含有MeOHを1 L加え再度2時間浸漬し、抽出液を減圧濾過し、さらに残渣に1% TFA含有MeOHを500 mL加え1時間浸漬し、減圧濾過した。計2.5 Lの抽出液を減圧下35°Cで濃縮乾固し、18.74 gの抽出物を得た。これを200 mLの0.1% TFA含有CH₃CNに溶解し、予め水で洗浄後、0.1% TFA水溶液で置換したAmberlite XAD-7カラム(40 mm id.×260 mm)に吸着させた。0.1% TFA含有5%、10%、15%、20%、50% CH₃CN水溶液を各1 Lずつ

つ流し、溶出させた。色素を高い割合で含む0.1% TFA含有15%~20% CH₃CN水溶液画分を減圧下35°Cで濃縮して粗色素濃縮液15 mLを得た。得られた粗色素濃縮液のうち2.75 mLを、Develosil ODS-UG-5 (20 mm id.×250 mm、Nomura chemical) に吸着させ、0.38% TFA含有13% CH₃CN水溶液を用いて、流速5.0 mL/min、30°Cでイソクラティック溶出させた。色素を集め、減圧下35°Cで濃縮乾固し、粗色素7.36 mgを得た。これを10 mLの0.38% TFA含有5% CH₃CN水溶液に溶解し、LH-20 (60 mm id.×250 mm) カラムに吸着させ、0.38% TFA含有5% CH₃CN水溶液を流速1.7 mL/minで流した。得られた色素画分を減圧濃縮乾固し、Pg 3-rutのTFA塩4.0 mgの粉末を得た。

6) 花卉に含まれる鉄イオンの定量分析

-80°Cで保存した開花時花卉(ステージ4)の表皮約0.1 gに硝酸を1 mLを加え、室温で16時間静置した。硝酸を用いてマイクロチューブを洗いこみ、全量を内径16 mmのテフロン製試験管に移し、DigiPREP (GL science) を用いて105°Cで2時間加熱した。次に、30% 過酸化水素を200 μL加え、160°Cで16時間加熱分解した。超純水で洗いこみ、反応溶液全量を15 mLチューブに移し試料とした。試料は測定直前に0.45 μmのセルロースアセテートのメンブレンフィルター (ADVANTEC) でろ過し、ICP-AES (検出波長 238 nm) で以下の条件で鉄イオン量を分析した。

パワー: 1.20 KW、プラズマフロー: 15.0 L/分、補助フロー: 1.50 L/分、ネブライザーフロー: 0.8 L/分、繰り返し時間: 3.0秒、安定化時間: 10秒

なお、検量線はICP multi-element standard slution IV (1,000 ppm、Merck) を超純水で希釈し、0.01、0.1、0.5、1、5、10 ppmに調製して作製し、個別にサンプリングして湿式灰化した3試料をそれぞれ3回ずつ繰り返し測定して平均値を計算した。

7) チューリップ液胞型鉄輸送体 (*TgVit1*) 遺伝子のmRNA発現解析

蕾花卉(ステージ3)の花卉を上部と花底部に分け、それぞれの表皮をピンセットで剥離し、-20°Cで凍結した試料約0.1 gから、Trizol試薬(1 mL)を用いて、全RNAを抽出した。これにDNase Iを加え37°Cで30分処理後、フェノール/クロロホルム溶液で処理し、2.5倍量のEtOHと1/10量の酢酸ナトリウムを加えて精製した。

cDNAの合成はHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて37°Cで60分間反応させた。*TgVit1* 遺伝子の定量リアルタイムPCRはTaqMan^R Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) とStep one plus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて、95°Cで10秒後、95°Cで5秒、60°Cで34秒を40サイクルでPCRを行った。内在性コントロールにはチューリップのアクチン (*TgActin*) 遺伝子を用いた。相対定量解析にはΔΔCt法を用いた。供試したプローブとプライマーの配列は以下のとおりである。

TgVitFAMラベルプローブ: CAATGACGATTGCTCTC
TgVit-Fプライマー: GCCGAGGAGAGCACTAGAGAGT
TgVit-Rプライマー: CTAGACCGCCGACCACGTA
TgActinVICラベルプローブ: CATTTCAGGCTGTTCTC
TgActin-Fプライマー: TGTGCCGCCATGTATGTT
TgActin-Rプライマー: TGTTCGTCCACTGGCATAACAG

8) チューリップ花底部の青色再現実験

花卉から精製したDp 3-rutのTFA塩14.49 mgを1 mLの超純水に溶解し20 mMに調製し、ルチン122.1 mgは1 mLのMeOHに溶解し、200 mMに調製した。またモール氏塩 Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂/6H₂O、7.84 mgを1 mLの超純水に溶解し20 mMに調製した。酢酸緩衝液 (100 mM、pH5.6) に、Dp 3-rut、ルチン、モール氏塩水溶液の順でそれぞれの調製溶液を加え混合し、アントシアニンの終濃度が5 mM、0.5 mM、0.05 mMの時は、それぞれ光路長0.1 mm、1.0 mm、10 mmのセルに入れ、紫外可視吸収スペクトルを測定した。図34のでデータはJASCO V-560 spectrometer (JASCO) で、図35はUVI60A (Shimadzu) でそれぞれ測定した。

3. 結果

1) 花色とアントシアニンおよび助色素の分析

(1) チューリップ花卉の色彩

分析に用いたチューリップ品種を図27に示した。「紫水晶 (Murasakizuisho)」、「ビーター (Beator)」、「ジョージグラッペ (George Grappe)」、「チェリーブロッサム (Cherry Blossom)」、「ルイ14世 (Louis XIV)」、「バイオレットジム (Violet Gem)」、「グレーゼ (Greuze)」、「ブラックイーグル (Black Eagle)」、「神通 (Zinzu)」、「ブラックビューティ (Black Beauty)」、「ブラックパーロット (Black Parrot)」、「ブラックホース (Black Horse)」、「クイーンオブナイト (Queen of Night)」は花卉上



図 27. 分析に用いたチューリップ 15 品種.

A: 「紫水晶」、B: 「ピーター」、C: 「ジョージグラッペ」、D: 「チェリーブロッサム」、E: 「ルイ 14 世」、F: 「バイオレットジム」、G: 「グレーゼ」、H: 「ブラックイーグル」、I: 「神通」、J: 「ブラックビューティ」、K: 「ブラックパーロット」、L: 「ブラックホース」、M: 「クイーンオブナイト」、N: 「黄小町」、O: 「アルビノ」

部が紫色で花底部が青色、「ピーター」は花弁上部が赤色、「チェリーブロッサム」は花弁上部がピンク色、比較対象として花弁全体が黄色の「黄小町 (Kikomachi)」、花弁全体が白色の「アルビノ (Albino)」を用いた。

まず、分光測色計を用いて、開花期 (ステージ 4) にサンプリングした新鮮な花弁の $L^*a^*b^*$ 値を測定した。 L^* 値は低いほど濃色を示し、 a^* 値は正の値が大きいほど赤味、逆に負の値が大きいほど緑味が強いことを示す。 b^* 値は正の値が大きいほど黄味、逆に負の値が大きいほど青味が強いことを示す (Gonnet 1998)。 L^* 値は黄色、白色以外の品種では低く、これは花弁表皮中のアントシアニン量が比較的多いことが予想された (表 1)。 a^* 値は花弁上部と花底部の色が異なる品種において、花底部で低

く、緑味を示した (表 1)。 b^* 値は花底部が青い品種のうち「ルイ 14 世」を除く品種の花底部のは負の値を示したことから青味がかっていた (表 1)。花弁上部では赤やピンク色品種の a^* 値は紫色品種に比べて値が大きく、赤味を示し、紫色品種の b^* 値は花底部より負の値が小さいものの「ルイ 14 世」を除いて、負の値を示したことから、青味がかっていた。

(2) アントシアニンの定量分析

花弁のアントシアニンは表層の細胞だけに存在する。そこで、花弁のアントシアニン含有量を定量するために、花色で上、下に分けた開花時花弁組織 (ステージ 4) から表皮だけをはがし、試料とした。マロニル基のような非常に不安定なアシル基をもつアントシアニン以外は、抽出効率が高いため通常

表1 チューリップ15品種における花卉上部、花底部の色と色彩差値.

| Cultivar | Part | Color | CIE [※] | | |
|--------------------|--------|-------------|------------------|-------------|-------------|
| | | | L* | a* | b* |
| Murasakizuisho (A) | upper | purple | 35.9 ± 3.0 | 25.3 ± 1.3 | -12.9 ± 0.7 |
| | bottom | blue | 26.6 ± 1.1 | 0.6 ± 0.4 | -7.9 ± 1.0 |
| Beator (B) | upper | red | 48.6 ± 1.6 | 46.2 ± 1.4 | 6.7 ± 2.1 |
| | bottom | blue | 38.2 ± 2.8 | -4.5 ± 0.6 | -13.3 ± 1.2 |
| George Grappe (C) | upper | lilac | 41.1 ± 2.7 | 15.9 ± 1.6 | -16.0 ± 1.1 |
| | bottom | blue | 32.7 ± 4.9 | -6.5 ± 3.5 | -13.2 ± 2.1 |
| Cherry Blossom (D) | upper | pink | 49.0 ± 4.0 | 42.3 ± 2.5 | -3.7 ± 0.9 |
| | bottom | blue | 44.7 ± 4.0 | -10.3 ± 0.8 | -6.8 ± 4.2 |
| Louis XIV (E) | upper | purple | 41.7 ± 4.9 | 12.0 ± 1.9 | 21.0 ± 5.2 |
| | bottom | blue | 22.9 ± 0.6 | -0.4 ± 0.4 | 1.1 ± 0.9 |
| Violet Gem (F) | upper | purple | 29.1 ± 0.9 | 17.6 ± 0.9 | -13.0 ± 0.7 |
| | bottom | blue | 28.5 ± 1.4 | 2.4 ± 1.4 | -13.7 ± 0.6 |
| Greuze (G) | upper | purple | 33.9 ± 4.0 | 23.7 ± 1.3 | -15.9 ± 0.5 |
| | bottom | blue | 25.7 ± 1.4 | 5.0 ± 0.7 | -14.1 ± 0.6 |
| Black Eagle (H) | upper | dark purple | 22.5 ± 1.1 | 15.1 ± 2.3 | -5.2 ± 1.7 |
| | bottom | blue | 22.4 ± 2.0 | 3.3 ± 0.7 | -7.3 ± 1.4 |
| Zinzu (I) | upper | dark purple | 24.6 ± 1.2 | 11.0 ± 1.1 | -1.7 ± 0.2 |
| | bottom | blue | 24.8 ± 2.0 | 2.6 ± 0.7 | -5.9 ± 1.6 |
| Black Beauty (J) | upper | dark purple | 20.5 ± 0.5 | 2.8 ± 1.0 | 0.1 ± 0.4 |
| | bottom | blue | 24.5 ± 1.6 | 0.8 ± 0.1 | -0.1 ± 1.4 |
| Black Parrot (K) | upper | dark purple | 19.5 ± 2.6 | 2.5 ± 1.6 | -0.2 ± 1.0 |
| | bottom | blue | 23.3 ± 1.8 | 1.2 ± 0.4 | -3.4 ± 0.5 |
| Black Horse (L) | upper | dark purple | 22.6 ± 0.8 | 3.1 ± 0.5 | -0.4 ± 0.3 |
| | bottom | blue | 23.5 ± 1.4 | 0.9 ± 0.2 | -3.6 ± 0.5 |
| Queen of Night (M) | upper | dark purple | 20.6 ± 1.1 | 2.3 ± 0.9 | -2.5 ± 1.3 |
| | bottom | blue | 22.2 ± 1.1 | 1.1 ± 0.3 | -3.2 ± 1.2 |
| Kikomachi (N) | upper | yellow | 76.4 ± 1.2 | 2.6 ± 0.8 | 77.7 ± 2.2 |
| | bottom | yellow | 69.0 ± 1.4 | 10.2 ± 1.3 | 76.5 ± 1.5 |
| Albino (O) | upper | white | 83.6 ± 3.4 | -3.0 ± 0.5 | 12.3 ± 0.4 |
| | bottom | white | 80.0 ± 1.7 | -2.3 ± 0.2 | 14.3 ± 1.1 |

色は分光測色計を用いて、L*a*b*値を測定した。

※国際照明委員会

HCl-MeOHが用いられる(武田・林 1998)。そこで、花卉表皮を0.1% HCl-MeOHで一晩抽出し、アントシアニンの定量を行った。抽出液の可視吸収スペクトルを測定したところ、黄色の「黄小町」と白色の「アルビノ」以外のすべての品種の花底部抽出液のスペクトルは540 nmに吸収極大を示した。このことは、含まれる色素がデルフィニジン発色団をもつことを示す(Harborne 1958)。一方、上部表皮の抽出液はほとんどの品種で、540 nmに吸収極大を示したが、赤色の「ビーター」およびピンク色の「チェリーブロッサム」は、それぞれ516 nmと528 nmに吸収極大を示し、発色団が異なることが示唆された。

アントシアニンの定量は「紫水晶」花卉より精製したDp 3-rutの0.1% HCl-MeOH 溶液を標品に用いて行い、色素含有量はDp 3-rut相当量として計算した。青色花底部のアントシアニン量は4.0~91.5 μmol/g FWであり、品種によって様々であった。L*値が低

い黒紫色花卉の「ブラックイーグル」、「ブラックビューティ」、「ブラックパーロット」、「ブラックホース」、「クイーンオブナイト」のアントシアニン含有量は20 μmol/g FW以上と高く、一方、黄色と白色品種ではアントシアニンは検出されなかった(表2)。

(3) 「ビーター」花卉上部からのペラルゴニジン 3-ルチノシド (Pg 3-rut) の単離と同定

1)-(2) で「ビーター」の赤色花卉上部の主要アントシアニンはデルフィニジンやシアニジン発色団とは異なることが予想されたので、構造決定のためにアントシアニンの単離、精製を行った。ステージ4の赤色花卉上部約170 gを3% TFA含有MeOH (合計2.5 L) で抽出し、減圧下濃縮後、Amberlite XAD-7カラムに吸着させ、0~20%の0.1% TFA含有CH₃CN水溶液で溶出させた。色素を高い割合で

表2 チューリップ15品種における花卉上部、花底部の違いによるアントシアニン含有量およびアントシアニンとフラボノールの組成比.

| Cultivar | Part | Color | Anthocyanin | | | Flavonol | | | |
|--------------------|--------|-------------|-------------------------------------|----------------------|----|----------|----------------------|----|----|
| | | | content ($\mu\text{mol/g FW}$) | relative content (%) | | | relative content (%) | | |
| | | | | 1 | 5 | 6 | 2 | 3 | 4 |
| Murakizuisho (A) | upper | purple | 11.0 \pm 1.6 | 100 | ND | ND | 17 | 11 | 12 |
| | bottom | blue | 5.7 \pm 1.2 | 100 | ND | ND | 34 | 26 | 3 |
| Beator (B) | upper | red | 4.0 \pm 0.6 | ND | 23 | 62 | 1 | 3 | 47 |
| | bottom | blue | 4.6 \pm 0.7 | 83 | 10 | 7 | 4 | 21 | 37 |
| George Grappe (C) | upper | lilac | 4.6 \pm 0.4 | 96 | 4 | ND | 10 | 19 | 31 |
| | bottom | blue | 5.7 \pm 0.23 | 100 | ND | ND | 6 | 40 | 15 |
| Cherry Blossom (D) | upper | pink | 5.2 \pm 0.8 | ND | 86 | 14 | ND | 23 | 19 |
| | bottom | blue | 10.4 \pm 1.8 | 100 | ND | ND | 4 | 23 | 23 |
| Louis XIV (E) | upper | purple | 14.6 \pm 1.3 | 98 | 2 | ND | 13 | 26 | 24 |
| | bottom | blue | 15.7 \pm 6.1 | 85 | ND | ND | 8 | 69 | 6 |
| Violet Gem (F) | upper | purple | 14.7 \pm 3.1 | 98 | 2 | ND | 12 | 23 | 22 |
| | bottom | blue | 14.6 \pm 4.8 | 100 | ND | ND | 14 | 44 | 11 |
| Greuze (G) | upper | purple | 16.3 \pm 1.8 | 98 | 2 | ND | 9 | 26 | 16 |
| | bottom | blue | 15.4 \pm 2.7 | 100 | ND | ND | 7 | 44 | 11 |
| Black Eagle (H) | upper | dark purple | 27.5 \pm 1.7 | 99 | 1 | ND | 32 | 35 | 2 |
| | bottom | blue | 23.0 \pm 2.6 | 100 | ND | ND | 19 | 55 | 3 |
| Zinzu (I) | upper | dark purple | 32.2 \pm 1.9 | 92 | 6 | 1 | 11 | 12 | 13 |
| | bottom | blue | 7.5 \pm 1.3 | 100 | ND | ND | 16 | 26 | 6 |
| Black Beauty (J) | upper | dark purple | 56.4 \pm 7.0 | 92 | 5 | ND | 24 | 27 | 1 |
| | bottom | blue | 30.3 \pm 8.2 | 86 | 3 | ND | 14 | 45 | 2 |
| Black Parrot (K) | upper | dark purple | 56.5 \pm 9.0 | 86 | 10 | 2 | 21 | 18 | 3 |
| | bottom | blue | 21.3 \pm 3.8 | 86 | 2 | ND | 18 | 38 | 4 |
| Black Horse (L) | upper | dark purple | 70.3 \pm 17.6 | 92 | 2 | 1 | 17 | 14 | 9 |
| | bottom | blue | 31.5 \pm 10.1 | 88 | 2 | ND | 19 | 44 | 5 |
| Queen of Night (M) | upper | dark purple | 91.5 \pm 10.8 | 98 | 1 | ND | 26 | 28 | 4 |
| | bottom | blue | 29.9 \pm 2.9 | 100 | ND | ND | 27 | 41 | ND |
| Kikomachi (N) | upper | yellow | ND | ND | ND | ND | 11 | 4 | 18 |
| | bottom | yellow | ND | ND | ND | ND | 13 | 22 | 13 |
| Albino (O) | upper | white | ND | ND | ND | ND | 33 | 31 | 2 |
| | bottom | white | ND | ND | ND | ND | 17 | 53 | 4 |

各組成比は 3D-HPLC のクロマトグラムの相対ピーク面積から算出した。

ND は検出限界以下を示す。

含む0.1% TFA含有15%~20% CH₃CN水溶液画分を減圧下濃縮し、粗色素を得た。得られた粗色素を、Develosil ODS-UG-5に吸着させ、0.38% TFA含有13% CH₃CN水溶液を溶出液としたイソクラティック溶出により精製し、精製色素を得た。最後に、アントシアニン画分を含むフラクションをLH-20カラムに吸着させ、0.38% TFA含有5% CH₃CN水溶液のイソクラティック溶出により精製した。精製したアントシアニン画分を減圧下濃縮乾固し、4.0 mgの赤色粉末色素のTFA塩として得た。得られた色素をオービトラップMSで質量分析を行ったところ、m/z=579.171に分子イオンのピークが検出され、MS/MS分析によりm/z=433.125と271.166にフラグメントイオンが観測された(図28)。それぞれラムノースおよびルチノースの解離に相当するイオンと考えられたことから、この色素はPg 3-rutと推測さ

れた。さらに、¹H NMRスペクトルを測定してシグナルの帰属を行った結果(表3)と既報のデータ(Nakayama et al 2004, Tian et al 2006)とを比較してPg 3-rutと同定した(図29)。

(4) アントシアニンおよび助色素成分の構造と組成

次に、花卉に含まれる主要なアントシアニンおよび助色素の組成比を明らかにするために、抽出液の3D-HPLC分析を行った(図30)。IV-2-2)と同様に開花時花卉(ステージ4)を上部和花底部に分けて、表皮を取り凍結後、3% TFA含有50% CH₃CN水溶液で抽出した。アントシアニンの組成は単純で、ほぼ1種類の色素しか含まれないことがわかった。それぞれのアントシアニンは、標品のDp 3-rut、Cy 3-rut(吉田ら 2009)、Pg 3-rutの保持時間および

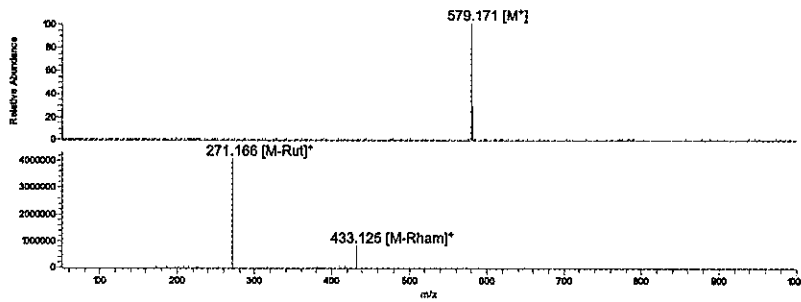


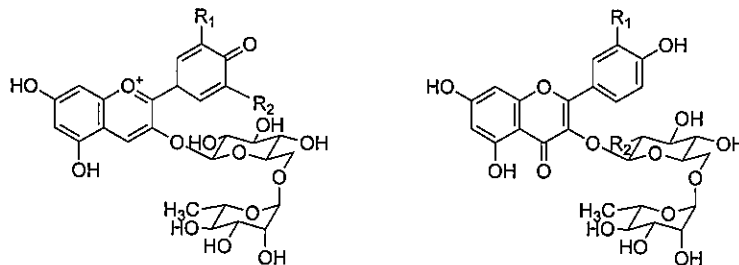
図 28 「ピーター」花卉から精製したアントシアニンのオービトラップ MS スペクトル。

上は MS スペクトル、下は $m/z=579.171$ のイオンを親とした MS/MS スペクトルを示す。

表 3 ペラルゴニジン 3-ルチノシド (6) の ^1H NMR の帰属。

| | δ (ppm) | multiplicity | J (Hz) | Intensity |
|------------------------|----------------|--------------|---------------|-----------|
| Pelargonidin | | | | |
| 4 | 8.98 | <i>s</i> | | 1H |
| 6 | 6.67 | <i>d</i> | 1.1 | 1H |
| 8 | 6.89 | <i>d</i> | 1.1 | 1H |
| 2' | 8.56 | <i>d</i> | 9.1 | 1H |
| 3' | 7.03 | <i>d</i> | 9.1 | 1H |
| 5' | 7.03 | <i>d</i> | 9.1 | 1H |
| 6' | 8.56 | <i>d</i> | 9.1 | 1H |
| 3-O-Glucosyl | | | | |
| 1'' | 5.23 | <i>d</i> | 7.8 | 1H |
| 2'' | 3.63 | <i>dd</i> | 7.8, 9.1 | 1H |
| 3'' | 3.52 | <i>t</i> | 9.1 | 1H |
| 4'' | 3.40 | <i>t</i> | 9.1 | 1H |
| 5'' | 3.69 | <i>ddd</i> | 1.0, 6.6, 9.1 | 1H |
| 6''a | 4.04 | <i>dd</i> | 1.0, 11.1 | 1H |
| 6''b | 3.58 | <i>dd</i> | 6.6, 11.1 | 1H |
| 6''-O-Rhamnosyl | | | | |
| 1 | 4.64 | <i>d</i> | 1.6 | 1H |
| 2 | 3.80 | <i>dd</i> | 1.6, 3.4 | 1H |
| 3 | 3.62 | <i>dd</i> | 3.4, 9.6 | 1H |
| 4 | 3.31 | <i>t</i> | 9.6 | 1H |
| 5 | 3.55 | <i>dq</i> | 6.2, 9.6 | 1H |
| 6 | 1.15 | <i>d</i> | 6.2 | 3H |

(10% $\text{CF}_3\text{OOD-CD}_3\text{OD}$, 29 °C, ^1H : 500 MHz)



delphinidin 3-rutinoside (1): $\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{OH}$ manghaslin (2): $\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\alpha\text{-rhamnosyl}$
 cyanidin 3-rutinoside (5): $\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{H}$ rutin (3): $\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{H}$
 pelargonidin 3-rutinoside (6): $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{H}$ mauritanin (4): $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\alpha\text{-rhamnosyl}$

図 29 チューリップ 15 品種に含まれていたアントシアニンと助色素の構造。

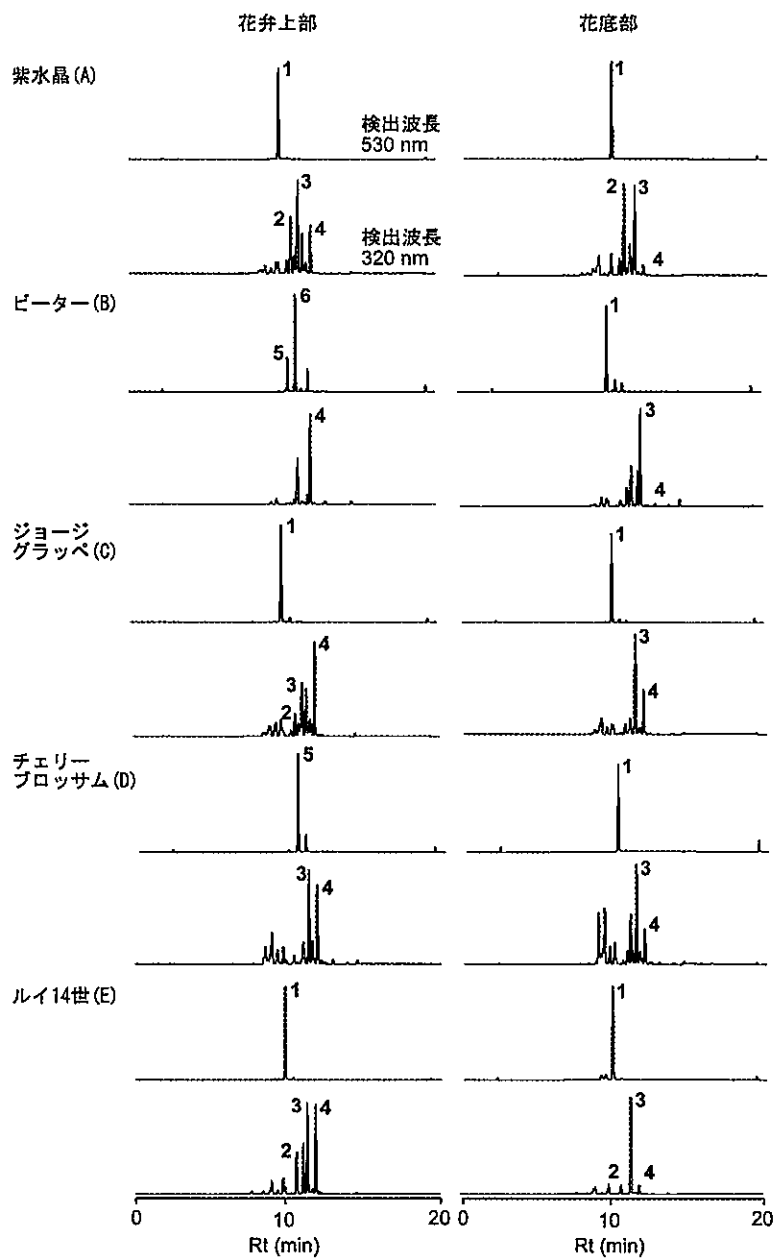


図 30 チューリップ 15 品種の花弁抽出液の HPLC クロマトグラム。
 それぞれの品種ごとのクロマトグラムにおいて、上が検出波長 530 nm、下が 320 nm、左は花弁上部、右は花底部の抽出液を示す。

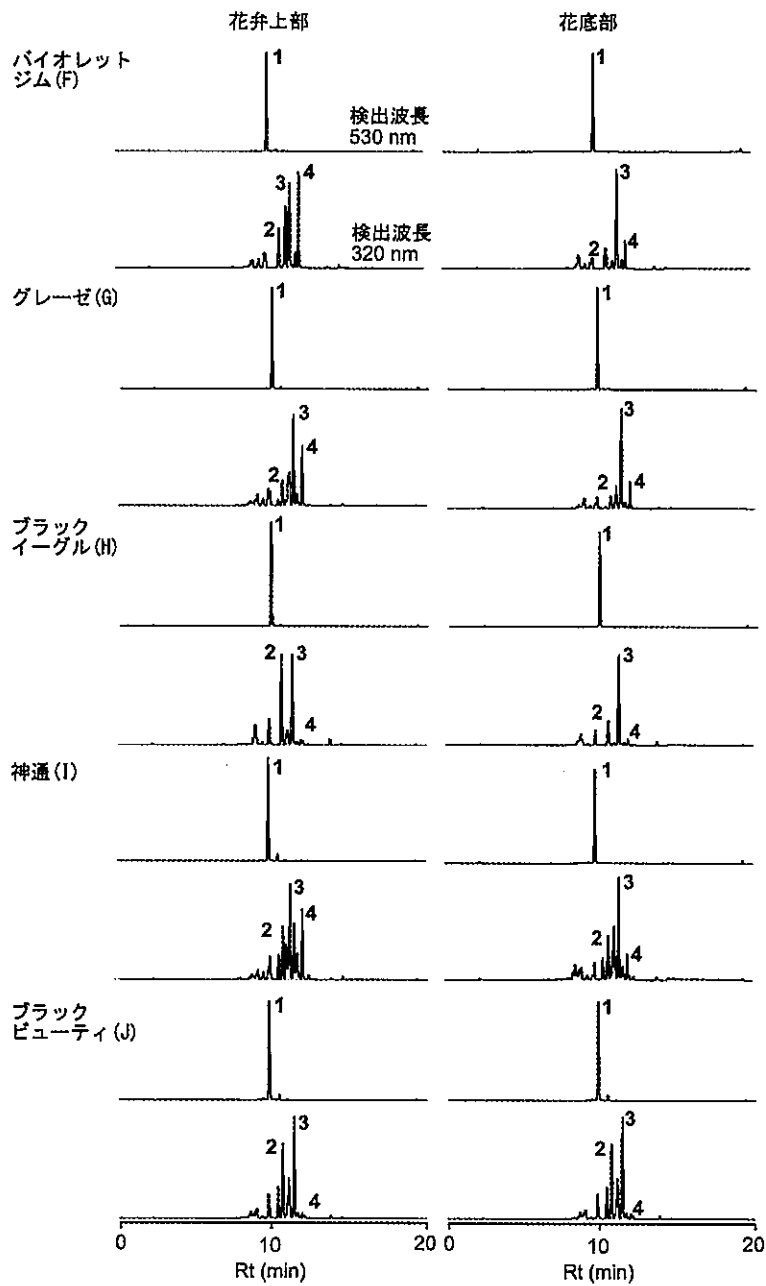


図 30 チューリップ 15 品種の花弁抽出液の HPLC クロマトグラム (続き).

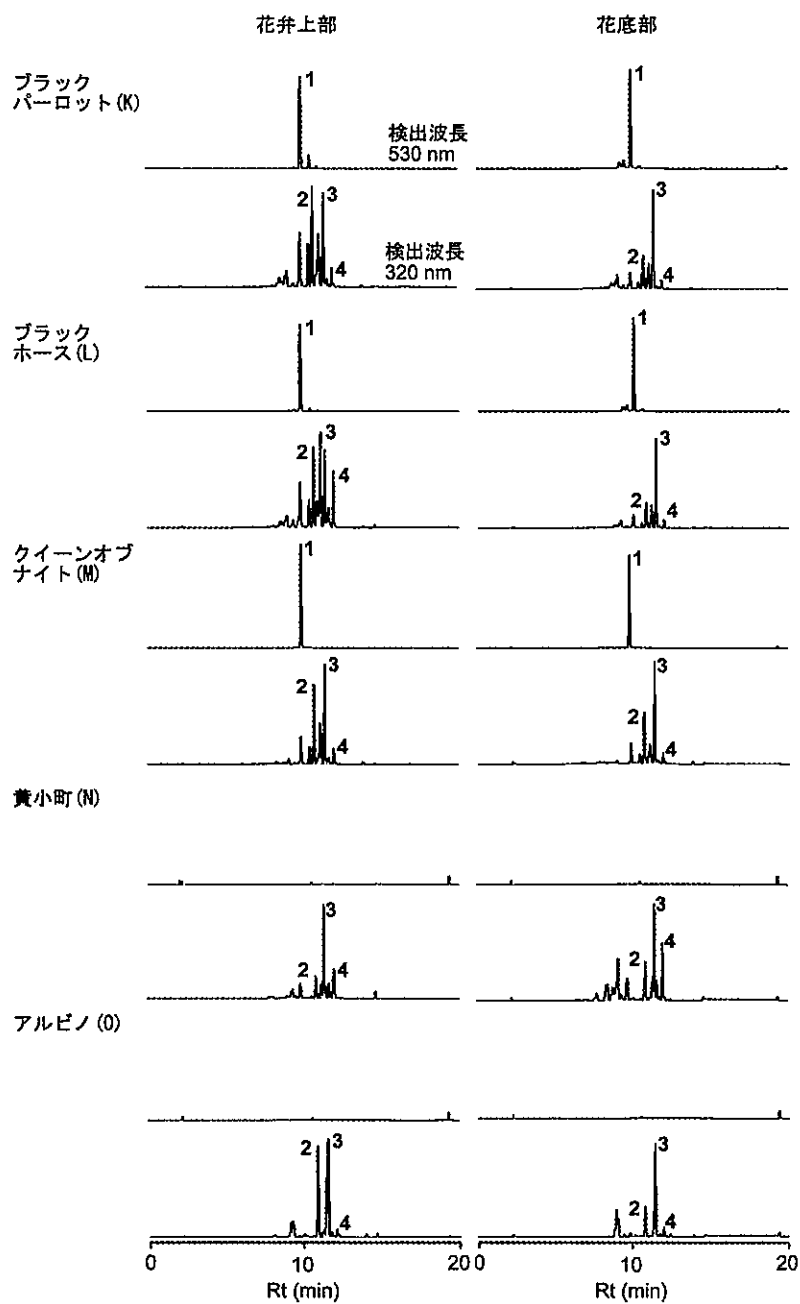


図30 チューリップ15品種の花弁抽出液のHPLCクロマトグラム(続き).

ピークの吸収スペクトルとの比較から同定した(図30, 31)。青色花底部の主アントシアニンはいずれもDp 3-rutで、530 nmで検出した相対ピーク面積から組成比が80%以上であることがわかった。上部のアントシアニンもほとんどの品種ではDp 3-rutが主要成分で、それ以外では赤色の「ピーター」ではCy 3-rutが23%、Pg 3-rutが62%、ピンク色の「チェリーブロッサム」ではCy 3-rutが86%、Pg 3-rutが14%の組成比であった。紫外吸収成分は図30で明らかかなように、多数の成分が混在していた。しかし、3D-HPLCで行ったスペクトル解析の結果(図31)、いずれも配糖化フラボノールと推定され、標品との比較からそれぞれマンガスリン、ルチン、モーリチアニンと同定した(図29)。分析したほとんどすべての花卉には、上部、花底部の差なくこれら3種のフラボノールが含まれていた。しかし、品種による違いおよび上部と花底部の差異はアントシアニンに比べ多様であった。

2) 鉄の含有量と*TgVit1*遺伝子の発現

(1) 花卉部位による鉄含有量の違い

次に、花卉表皮の鉄イオンを定量した(表4)。表皮を湿式灰化し、ICP-AESにより分析した。鉄含有量は試料g重量あたり、0.1~2.1 μmol と幅があり、黄色や白色花卉にも鉄が検出された。しかし、花卉の色に関わらず、いずれも花底部は花卉上部に比べて鉄含有量が多く、青色の花底部では1.0 $\mu\text{mol/g}$ FW以上、黄色、白色品種でも0.3 $\mu\text{mol/g}$ FWで、花卉上部に比べ花底部の含有比は5~10倍であった(表4)。表2で求めたアントシアニン含有量に対する鉄の当量を計算したところ、青色花底部のほとんどは0.1当量あるいはそれ以上で、「ブラックイーグル」と「クイーンオブナイト」は、0.04当量の低値であった(図32)。一方、花卉上部では、アントシアニン含量に対する鉄の当量はいずれも0.002~0.03当量であり、花底部より低値であった(図32)。

(2) 花卉部位による*TgVit1* mRNAの発現の違い

花底部の鉄含量と*TgVit1* mRNAの発現との関係を明らかにするために、開花ステージ3の表皮から全RNAを抽出し、*TgVit1* mRNAの発現をリアルタ

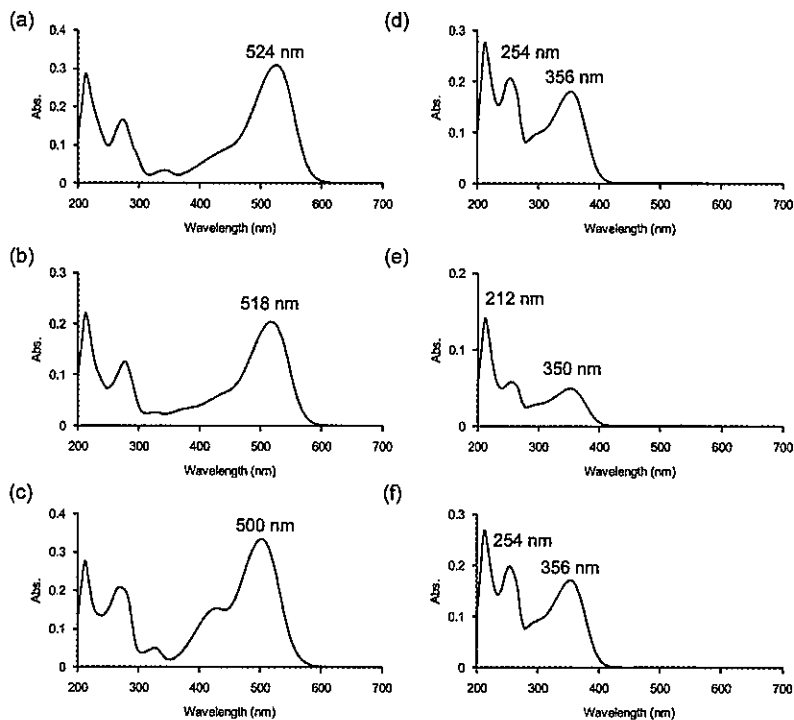


図31 3D-HPLCから得た主要アントシアニンおよびフラボノールの吸収スペクトル。左は530 nm、右は320 nmで検出したクロマトグラムの吸収スペクトルを示す。(a) 図30に示す「紫水晶」花底部抽出液のクロマトグラムのピーク1。(b) 図30に示す「チェリーブロッサム」花卉上部抽出液のクロマトグラムのピーク5。(c) 図30に示す「ピーター」花卉上部抽出液のクロマトグラムのピーク6。(d) (e) (f) それぞれ図30に示す「紫水晶」花底部抽出液のクロマトグラムのピーク2, 3, 4。

表4 チューリップ15品種の花弁における鉄含有量とアントシアニンに対する当量。

| Cultivar | Part | Fe content | | |
|--------------------|--------|--------------------------|--------------|------------|
| | | ($\mu\text{mol/g FW}$) | bottom/upper | (eq. to 1) |
| Murakizuisho (A) | upper | 0.2 ± 0.01 | 6.0 | 0.02 |
| | bottom | 1.2 ± 0.1 | | 0.20 |
| Beator (B) | upper | 0.1 ± 0.1 | 19.0 | 0.03 |
| | bottom | 1.9 ± 0.3 | | 0.40 |
| George Grappe (C) | upper | 0.1 ± 0.01 | 21.0 | 0.02 |
| | bottom | 2.1 ± 0.2 | | 0.40 |
| Cherry Blossom (D) | upper | 0.1 ± 0.1 | 14.0 | 0.02 |
| | bottom | 1.4 ± 0.1 | | 0.10 |
| Louis XIV (E) | upper | 0.1 ± 0.04 | 22.0 | 0.01 |
| | bottom | 2.2 ± 0.4 | | 0.10 |
| Violet Gem (F) | upper | 0.1 ± 0.005 | 17.0 | 0.01 |
| | bottom | 1.7 ± 0.2 | | 0.10 |
| Greuze (G) | upper | 0.2 ± 0.2 | 6.0 | 0.01 |
| | bottom | 1.2 ± 0.03 | | 0.10 |
| Black Eagle (H) | upper | 0.1 ± 0.1 | 10.0 | 0.004 |
| | bottom | 1.0 ± 0.1 | | 0.04 |
| Zinzu (I) | upper | 0.2 ± 0.04 | 5.5 | 0.01 |
| | bottom | 1.1 ± 0.1 | | 0.10 |
| Black Beauty (J) | upper | 0.1 ± 0.02 | 16.0 | 0.002 |
| | bottom | 1.6 ± 0.2 | | 0.10 |
| Black Parrot (K) | upper | 0.5 ± 0.1 | 4.2 | 0.01 |
| | bottom | 2.1 ± 0.2 | | 0.10 |
| Black Horse (L) | upper | 0.2 ± 0.1 | 8.5 | 0.003 |
| | bottom | 1.7 ± 0.1 | | 0.10 |
| Queen of Night (M) | upper | 0.2 ± 0.01 | 5.5 | 0.002 |
| | bottom | 1.1 ± 0.1 | | 0.04 |
| Kikomachi (N) | upper | 0.1 ± 0.002 | 3.0 | - |
| | bottom | 0.3 ± 0.01 | | - |
| Albino (O) | upper | 0.1 ± 0.01 | 3.0 | - |
| | bottom | 0.3 ± 0.01 | | - |

鉄含有量は ICP-AES で測定した。

アントシアニンに対する鉄の当量比は表2のアントシアニン含有量を用いて算出した。

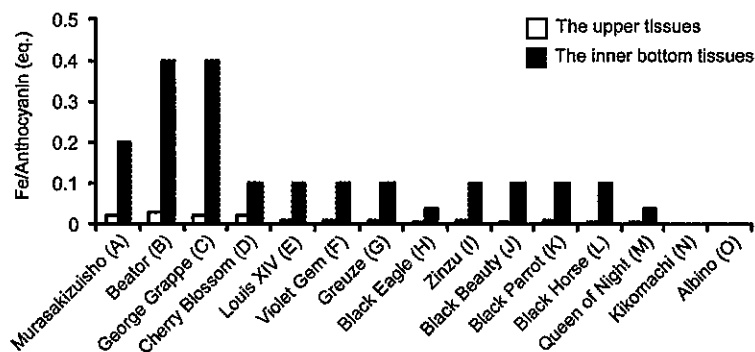


図32 チューリップ15品種の花弁上部と花底部に含まれる鉄イオン、アントシアニンに対する当量で示した。

イムPCRで測定した (図33)。その結果、分析したすべての品種の花底部において、発現量の多少はあるものの*TgVit1* mRNAの発現が認められた。一方、花卉上部ではほとんど発現は認められなかった。また、黄色や白色花卉においても花底部での*TgVit1* mRNAの発現が認められた。鉄の含有量と*TgVit1* の発現との関係は、分析したすべての品種の花底部で花卉上部より多く、「紫水晶」と同様、両者に相関があることがわかった (表4、図33)。

3) 花卉成分からの青色の再現

前述のとおり、今回分析した青色花底部の表皮には15品種すべてで鉄イオンが検出されたが、その含有量はアントシアニンに対して0.1~0.4当量であった。「紫水晶」のプロトプラストの分析結果では、Dp 3-rutに対する Fe^{3+} の当量は1当量であり、成分からの青色再現実験もDp 3-rutに対し1当量の Fe^{3+} で行った (Shoji et al 2007)。しかし、今回著者が行った分析結果では鉄イオン含有量は1当量より少なく、最大でも0.4当量であった。そこで、この当量の鉄イオンで花底部での青色が発現し得るかどうかを、成分を混合する実験によって調べた。

鉄イオンの価数には2価と3価があるが、過去の報告より Fe^{2+} でも Fe^{3+} でも得られる溶液の吸収スペクトルに違いは認められず (Kondo et al 1994, Kondo et al 1998, Yoshida et al 2006)、 Fe^{2+} をアントシアニンと混合すると錯体形成時に速やかに Fe^{3+} に酸化されることがわかっている。そこで、本実験では水に溶けやすい Fe^{2+} を用いた。溶液のpHは「紫水晶」の実測値である5.6とし、Dp 3-rutを0.05

~5.0 mMに対し、助色素ルチンを0~2当量および鉄イオンを0.1~1当量混合し、吸収スペクトルを測定した (図34、35)。

まず、助色素を2当量のルチンに固定し、Dp 3-rutの濃度を5.0 mM、0.5 mM、0.05 mMとし、それぞれ Fe^{2+} をDp 3-rutに対して0.1~1当量とした時の吸収スペクトルを測定した。その結果、いずれの濃度のアントシアニンでも2当量の助色素と1当量の Fe^{2+} を加えると溶液は青色を示した。また、 Fe^{2+} が0.5当量の場合も溶液は青色を示し、この場合溶液の吸収極大波長に違いはなかったが、吸光度は小さくなった。しかし、 Fe^{2+} が0.1~0.125当量と少ない場合は、溶液の吸収極大はわずかに短波長へ移り、スペクトル形状も変化した (図34)。

次に、実際の花卉に近い状態で青色発色に必須な助色素、鉄イオンの当量を明らかにするために、アントシアニンを液胞内の実測値に近い5.0 mMとし、アントシアニンに対して助色素を0~2当量、鉄イオンを0~1当量とし、光路長0.1 mmのセルを用いて吸収スペクトルを測定した (図35)。図35 (a)は助色素を加えない時の吸収スペクトルを示したが、アントシアニンのみでは赤紫色で退色も速やかであった。一方、 Fe^{2+} が共存すると一旦青色を示したが、すぐに青黒い沈殿を形成し、懸濁液は青黒くなし、吸収スペクトルも花卉とは全く異なっていた。次に、アントシアニンに対し助色素を1当量と Fe^{2+} を0、0.1、0.5または1当量加えた時の結果を図35 (b) に示したが、助色素のみでも図35 (a)の1のスペクトルと比べ、発色は安定化した。さらに、0.1当量の Fe^{2+} の混合では十分青色となり、 Fe^{2+} の

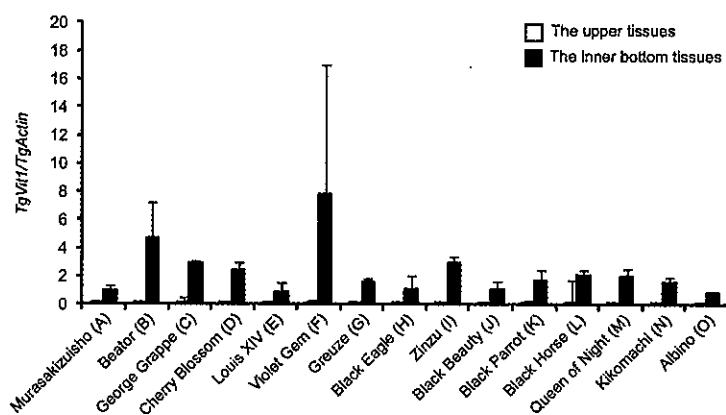


図33 チューリップ15品種の花卉上部と花底部別の*TgVit1* mRNA発現量。リアルタイムPCRにより定量し、紫水晶の花底部表皮の発現量を1とした時の相対値で示した。

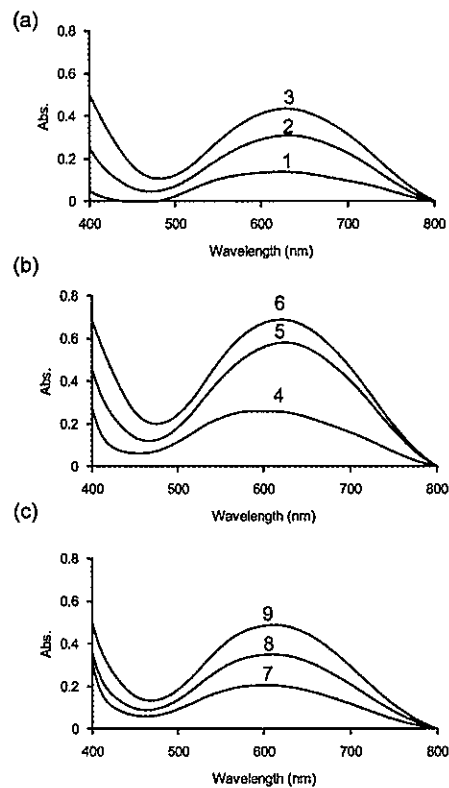


図34 チューリップ花底部表皮の青色再現実験1.

酢酸緩衝液 (pH5.6) 中で Dp 3-rut (0.05~5 mM) に対し、ルチンを 2 当量、 Fe^{2+} を 0.1~1 当量の割合で混合し、可視吸収スペクトルを測定した。

(a) Dp 3-rut (5.0 mM) とルチン (10 mM) に対し Fe^{2+} の量を変えた時の吸収スペクトル。光路長 0.1 mm。 Fe^{2+} の終濃度 1: 0.5 mM、2: 2.5 mM、3: 5.0 mM。

(b) Dp 3-rut (0.5 mM) とルチン (1.0 mM) に対し Fe^{2+} の量を変えた時の吸収スペクトル。光路長 1.0 mm。 4: 0.0625 mM、5: 0.25 mM、6: 0.5 mM。

(c) Dp 3-rut (0.05 mM) とルチン (0.1 mM) に対し Fe^{2+} の量を変えた時の吸収スペクトル。光路長 10 mm。 7: 0.0125 mM、8: 0.025 mM、9: 0.05 mM。

当量が増加するとより吸光度が増加することがわかった。ただし、吸収極大波長には大きな違いはなかった。この傾向は助色素を 2 当量に増やした時の結果である図35 (c) でより顕著となり、0.1~1 当量いずれの量の Fe^{2+} の混合でも吸収極大は、それぞれ 629 nm、627 nm、631 nm と大きな違いはなく、溶液は青色を示した。 Fe^{2+} を 0.1、0.5、1 当量と増やすに従い、吸光度は大きくなり、いずれも助色素が 1 当量の場合より大きくなった。

以上のことから、アントシアニンの濃度によって、青色発色に必要な鉄イオンの要求量は異なり、アントシアニンが実際の花弁液胞内濃度に近い 5.0 mM の時、助色素を 1 当量以上混合すれば、アントシアニンに対して Fe^{2+} が 0.1 当量のみ含まれている場合でも、十分に花卉と同様の青色を安定に発色することがわかった (Momonoi et al 2012)。アジサイの青色発色研究では、助色素類縁体がアントシアニン

-金属 (Al^{3+}) 錯体の可溶化と青色化を担っていると報告されている (Ito et al 2009)。今回、チューリップの青色発色の実験で得られた結果は、アジサイの例と類似していることから、不溶性アントシアニン-金属錯体の助色素による可溶化と青色安定化機構は、アジサイ以外の植物の青色花でも存在する可能性が示唆された。

4. 小括

本章では、チューリップで花底部が青い品種やそれ以外の品種も含め、TgVit1 による鉄蓄積と Dp 3-rut との鉄錯体形成およびフラボノール配糖体の錯体安定化による青色発色機構の普遍性を明らかにする目的で、15 品種を分析した。その結果、花底部が青いすべての品種の主要アントシアニンが Dp 3-rut であることがわかった。また、いずれの品種もルチンを主体とするフラボノール配糖体が含まれ

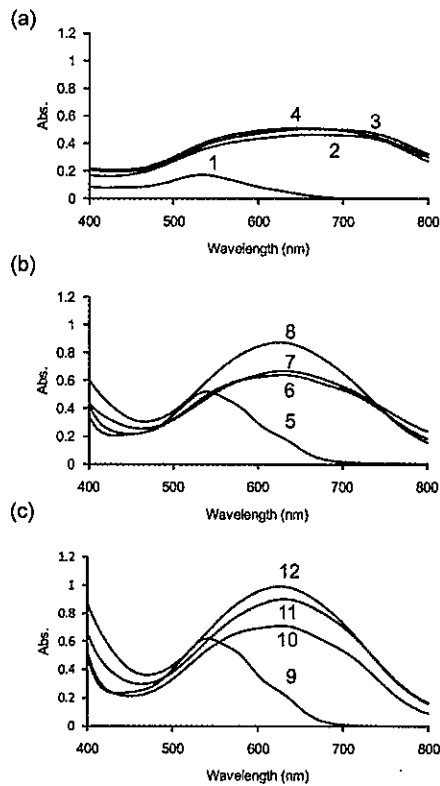


図 35 チューリップ花底部表皮の青色再現実験 2.

酢酸緩衝液 (pH5.6) 中で Dp 3-rut (5 mM) に対し、ルチンを 0 ~ 2 当量、 Fe^{2+} を 0 ~ 1 当量の割合で混合し、光路長 0.1 mm のセルを用いて可視吸収スペクトルを測定した。

(a) Dp 3-rut (5 mM) に対し量を変えて Fe^{2+} を加えた時の吸収スペクトル。 Fe^{2+} の終濃度 1: 0 mM, 2: 0.5 mM, 3: 2.5 mM, 4: 5.0 mM.

(b) Dp 3-rut (5 mM) とルチン (5 mM) に対し量を変えて Fe^{2+} を加えた時の吸収スペクトル。 Fe^{2+} の終濃度 5: 0 mM, 6: 0.5 mM, 7: 2.5 mM, 8: 5.0 mM.

(c) Dp 3-rut (5 mM) とルチン (10 mM) に対し量を変えて Fe^{2+} を加えた時の吸収スペクトル。 Fe^{2+} の終濃度 9: 0 mM, 10: 0.5 mM, 11: 2.5 mM, 12: 5.0 mM.

ていた。分析した15品種すべての花底部で鉄含有量が花弁上部と比べて多いことと、*TgVit1* mRNAが発現していることがわかり、このことから「紫水晶」と同様の青色発色の仕組みが他品種にも存在することを明らかにできた (Momonoi et al 2012)。

さらに、今回の花弁表皮の分析結果でわかったことは、青色花底部の液胞内のアントシアニン濃度はおおよそ 5 mM、鉄イオンはアントシアニンに対して 0.1 ~ 0.4 当量であり既報 (Shoji et al 2007) より低いことがわかった。そこで、この条件での花弁の青色発色の有無を確認した実験によりアントシアニン濃度が高い 5 mM の場合、鉄が 0.1 当量以上あれば、十分に青色が発色することがわかった (Momonoi et al 2012)。さらに、フラボノール配糖体を加えないアントシアニンと鉄イオンだけの複合溶液はすぐに青黒色の沈殿となることも観察され、助色素は青色鉄錯体の可溶化と安定化に必須で

あることを見出した (Momonoi et al 2012)。一方、鉄を加えない溶液は紫色であった。チューリップの青色花底部表皮の鉄含量は 1 ~ 2 $\mu\text{g/gFW}$ 程度と一定であり、異なるアントシアニン含量 (4.0 ~ 91.5 $\mu\text{mol/g FW}$) との組み合わせにより、多彩な青色が作り出されていると考えられた。

V. 総括

著者らは、未だ実現していない青色チューリップの開発研究の一環として、花底部特異的な青色発現機構に興味を持ち、その化学的解明と原因遺伝子の単離・解析研究を行った。

II の実験では、チューリップ花弁から初めて、植物ではシロイヌナズナに次いで二例目となる液胞型鉄輸送体遺伝子 (*TgVit1*) の単離に成功した (Momonoi et al 2009)。さらに、*TgVit1* mRNA

が青色花底部表皮特異的に発現していることを明らかにしたと同時に、その発現量は花が色づく前のステージ1で最大であり、開花にともなって減少することと、アントシアニン合成系遺伝子*TgDFR*や*TgANS*とは異なる発現制御を受けていることを明らかにした。

Ⅲでは、チューリップにおける*TgVit1*タンパク質の発現と機能解析を行った。*TgVit1*タンパク質は花底部の青色花底部表皮だけで発現し、その発現時期が*TgVit1* mRNAの発現時期と高い相関をもつことを明らかにした。また、細胞内で*TgVit1*は液胞膜に局在することを明らかにした。さらに、*TgVit1*発現ベクターを「紫水晶」の花弁上部に導入して紫色細胞を青色に変化させる実験により、*TgVit1*がチューリップ花弁の細胞の青色化に必須であり、これはその鉄輸送能によることを実証した。また、酵母鉄輸送変異体(*Δccc1*)を用いて二価鉄を輸送することも証明した。植物ではモデル植物のシロイヌナズナ以外で液胞型鉄輸送体遺伝子の機能を明らかにした最初の例であり、実際に目に見える機能として輸送基質の組織的蓄積で示した研究としては初めてとなる。本研究で得た知見は、今後の植物における鉄イオンの輸送と蓄積機構を明らかにする上でも重要なものと考えられる。

Ⅳでは、花底部が青い「紫水晶」以外のチューリップ12品種を含め、15品種のチューリップの分析を行った(Momonoi et al 2012)。チューリップの青色花底部では色素はすべてDp 3-rutであること、また花底部青色表皮は上部に比べて鉄含量が多く、*TgVit1* mRNAが発現していることを明らかにした。さらに、実際の液胞内濃度である5 mMのアントシアニン存在下では、0.1当量の鉄イオンと配糖化フラボノールの存在で十分に青色発色が実現することを明らかにした。このことは、アントシアニンと鉄イオンが厳密なモル比で構成されているケシ(Yoshida et al 2006)やヤグルマギク(Kondo et al 1994, Kondo et al 1998, Shiono et al 2005)で報告されている超分子錯体形成とは異なる青色発色機構によることを示唆する。

チューリップの花弁上部と花底部の色の違いは、一般的には蜜標によるものされている。チューリップの原産地は標高が高い中央アジアに位置し、昆虫が少ないため、生き残りを図るために生み出されたしくみなのかかもしれない。

液胞は植物特有の液胞内顆粒で不要になったタンパク質の分解や有害金属イオンの隔離・蓄積機

能も担う(Marty 1999, Staehelin and Newcomb 2005)。花卉細胞中ではアントシアニンを貯蔵して花色の決定に関わり、金属イオンを貯めて花色を変化させる働きも行っている(Marty 1999, Staehelin and Newcomb 2005)。鉄の貯蔵に関し、種子では主にファイトフェリチンの形で細胞内に蓄えられることが知られているが(Briat et al 2010, Briat et al 2010)、その他の組織での貯蔵に関する知見は少ない。今後、花卉を含む他の組織において液胞型鉄輸送体(Vit)を含めた細胞内への鉄流入、あるいは鉄貯蔵システムについて明らかにする必要があると考える。

ヤグルマギクや青いケシで報告があるように、鉄イオンはデルフィニジン発色団をもたないアントシアニンの青色発色に必須である(Kondo et al 1994, Kondo et al 1998, Shiono et al 2005, Yoshida et al 2006)。近年、従来の交配による育種のみならず、遺伝子組換えを用いた分子育種による新花色、特に青い色を目指した新品種の開発が盛んに行われている。世界三大大切り花のキク、バラ、カーネーションはデルフィニジン色素をもたず、青色花も存在しない。そこで、デルフィニジン色素を合成させるために、別の植物から取り出したフラボノイド3'5'水酸化酵素(F3'5'H)遺伝子を導入し、従来にはない、紫色や青色に近い花色をもつカーネーションやバラが既に作り出されている(Tanaka et al 2005, Stephen and Tanaka 2007, Katsumoto et al 2007)。しかし、真に青い品種の開発を目指すには、メタロアントシアニン、多アシル化アントシアニン、非化学量論的金属錯体のいずれかの青色安定化機構の存在が必須であり、液胞型金属輸送体は新たな改変のターゲット遺伝子になりうる可能性があると考えられる。鉄イオン輸送体の生体内、特に液胞輸送は未解明な部分が多く、本研究は、今後様々な青色花を育種するのみならず、生体における鉄イオンの輸送と蓄積の全貌を知る上でも重要と考えている。

摘 要

青色花の無い園芸植物は多く、たとえば、切り花ではキク、バラ、カーネーション、球根では、チューリップやユリがその代表例である。そのため、これらの花きにおける青色花の育種研究には、これまで多大な努力がなされてきた。富山県ではチューリップ(*Tulipa gesneriana*)の品種を数多く保存し、育種研究が盛んに行われており、青いチューリップ

の育成も目標の一つとなっている。しかし、全体が青い品種の育成は未だ達成されていない。チューリップの花色は、白、黄、オレンジ、ピンク、赤、紫、黒に近い紫など多種存在し、白色、黄色～橙色以外のほとんどの色はアントシアニンによる。花卉上部と花底部の花色が異なる品種も多数あり、富山県育成チューリップ品種の一つである「紫水晶」は、上部が紫色で花底部が青色である。しかし、この青色発色機構は不明でこれが明らかにできれば育種に重要な知見が得られるものと考えた。著者の所属した富山県農業技術センター農業試験場（現富山県農林水産総合技術センター農業研究所）で、本品種の青色発色機構の研究が行われ、2007年に、花卉上部と花底部で、アントシアニン成分とフラボノール成分が全く同じであることに加え、青色細胞に上部の紫色細胞と比較して約25倍もの高濃度の鉄イオンが含まれることが明らかになった。そして、青色発色には鉄イオンが必須であることがわかった。しかしながら、花卉における特異的な鉄の蓄積機構や、紫水晶以外にも多数存在する花底部が青いチューリップの発色機構は、全く解明されていなかった。

本研究では、「紫水晶」の花底部の青色細胞に特異的な鉄輸送システムが存在するのではないかと考え、原因遺伝子の単離と輸送体タンパク質の機能解析を行った。その結果、花底部の青色細胞だけに発現する鉄輸送体遺伝子 (*TgVit1*) を取得することができた。さらに、本鉄輸送体タンパク質 (*TgVit1*) が液胞膜上に局在して、青色細胞だけに発現することを証明した。その結果、チューリップ花卉の青色発色には *TgVit1* の発現が必須であり、このタンパク質が青色細胞の液胞膜上に存在して鉄イオンを液胞内へ輸送することにより、花卉細胞が青色になることを証明することができた。

さらに、「紫水晶」以外の花底部が青い品種、計12品種と黄色および白色品種のチューリップ花卉の鉄蓄積と鉄輸送体の発現を解析した結果、チューリップ花底部には、花色にかかわらず上部の5～10倍の鉄イオンが蓄積し、これに特異的な鉄輸送体が普遍的に関与することを明らかにできた。

本論文は5章からなる。

Iでは、チューリップの花色研究を含めたアントシアニンによる青色発色機構の研究、および植物における鉄輸送機構の研究を概観し、研究課題について述べた。

IIでは、「紫水晶」花卉の青色花底部からの鉄輸

送体遺伝子 (*TgVit1*) の取得研究とその遺伝子構造や他の植物の鉄輸送体遺伝子との相同性について述べた。シロイヌナズナの種子から単離された液胞型鉄輸送体遺伝子および酵母で報告されていた同遺伝子の塩基配列を参考にして、植物では2例目となる鉄輸送体遺伝子 (*TgVit1*) を単離することができた。さらに、チューリップの組織および花卉の開花ステージにおける *TgVit1* mRNA の発現を調べ、本遺伝子が青色細胞だけに特異的に発現し、まだ花が色づく前のステージ I で最大であり、開花にともなって減少することや、アントシアニンの生合成系遺伝子とは異なる発現制御を受けていることを明らかにした。

IIIでは、IIで単離した遺伝子の産物である *TgVit1* タンパク質の発現と機能解析を行った。本タンパク質は花底部の青色表皮細胞だけで発現し、それ以外の紫色細胞や葉、茎、根、球根などでは検出されないことを明らかにした。また、タンパク質の発現も花が色づく前のステージ I で最大であること、*TgVit1* が液胞膜に局在することを見出した。さらに *TgVit1* 遺伝子と同時に GFP も発現するように設計したベクターをパーティクルガンで「紫水晶」の上部の紫色花卉に打ち込んだ。すると、*TgVit1* が導入された証拠として蛍光を発する細胞が青色に変化した。細胞の青色化は、導入した遺伝子から鉄輸送タンパク質が生合成され、これが働いて鉄イオンが液胞へ運ばれた証拠である。さらに、液胞型鉄輸送体を欠損した鉄イオンの存在する培地では生育できない酵母へ *TgVit1* 遺伝子を導入したところ、耐性を復活して生育することもわかった。これらの結果から、*TgVit1* は青色細胞の液胞膜上に存在し、二価鉄イオンを液胞内へ輸送するタンパク質であること、この機能が花卉を青色化するのに必須であることを実証することができた。

IVでは、「紫水晶」以外の花底部の青いチューリップ12品種を含めた、15種類のチューリップの網羅的分析を行った。これら品種では、青色花底部のアントシアニンはすべてデルフィニジン 3-ルチノシドであることを明らかにした。また、花卉の色に関わらず全ての分析した品種で、花底部の表皮細胞の鉄含量が花卉上部に比べて高く、いずれも特異的に *TgVit1* mRNA が発現していることを明らかにした。このことは、花色と関係なく鉄蓄積機構が存在することを示唆する。さらに、今回得た分析値を元に青色花色の再現実験を行い、生理条件である 5 mM のデルフィニジン 3-ルチノシド存在下では、

0.1当量の鉄イオンと配糖化フラボノールの存在で十分に青色発色が実現することを明らかにした。このことはアントシアニンと鉄イオンの厳密なモル比で構成されているヤグルマギクのような超分子錯体形成とは異なるメカニズムの存在を示唆する。

Vでは、本研究を総括し、今後の研究課題とその展望について述べた。植物ではシロイヌナズナに次いで液胞型鉄輸送体遺伝子の機能を明らかにすることができた。しかも、実際に目に見える青色発色という機能を鉄の組織特異的な蓄積と関連させて解明したものとしては初めてとなった。今回明らかにした知見は、今後の植物における鉄イオンの輸送と蓄積機構を明らかにする上でも重要なものと考えられる。

謝 辞

本論文のとりまとめにあたり、名古屋大学大学院情報科学研究科吉田久美教授、太田元規教授、青木撰之准教授、前名古屋大学生命農学研究科近藤忠雄教授に有益なご助言と御校閲を頂き、心より感謝の意を表す。

本研究は、前富山県農業技術センター農業試験場および富山県農林水産総合技術センター園芸研究所の研究員、業務技師諸氏、研究補助の方々のご協力により遂行することができた。ここに心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、基礎生物学研究所西村幹夫教授、真野昌二助教、富山大学和漢医薬学総合研究所紺野勝弘客員教授、教馬恒平客員助教には、研究に関するご指導やご助言を頂き、心より感謝申し上げます。

引用文献

- Amberg D.C., D.J. Burke and J.N. Strathern (2005) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Andersen Ø. M. and M. Jordheim (2006) in *Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications*. ed. Ø. M. Andersen and K. R. Markham. CRC Press. Boca Raton. pp. 471-551.
- Bechtold N., J. Ellis and G. Pelletier (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sciences* 316: 1194-1199.
- Briat J.F., C. Duc, K. Ravet and F. Gaymard (2010) Ferritins and iron storage in plants. *BBA* 1800: 806-814.
- Briat J.F., I. Fobis-Loisy, N. Grignon, S. Lobréaux, N. Pascal, G. Savino, S. Thoiron, N. von Wiren, and O. van Wuytswinkel (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol. Cell* 84: 69-81.
- Briat J.F. and M. Lebrun (1999) Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci. Paris* 322: 43-54.
- Briat J.F., K. Ravet, N. Arnaud, C. Duc, J. Boucherez, B. Touraine, F. Cellier and F. Gaymard (2010) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany* 105: 811-822.
- Brouillard R. and J.E. Dubois (1977) Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 1359-1364.
- Budzianowski J. (1991) Six flavonol glucuronides from *Tulipa gesneriana*. *Phytochemistry* 30: 1679-1682.
- Budzianowski J. and L. Skrzypczak (1978) 6-C-Glucosylnaringenin from *Tulipa gesneriana*. *Phytochemistry* 17: 2044.
- Budzianowski J. and L. Skrzypczak (1979) Flavonoids of *Tulipa gesneriana* L. var. *paradae*. *Pol. J. Chem.* 53: 1489.
- Burnette W.N. (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- Curie C., Z. Panaviene, C. Loulergue, S.L. Dellaporta, J.F. Briat and E.L. Walker (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. *Nature* 409: 346-349.
- Davies K. M. and K. E. Schwinn (2006) in *Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications*. ed. Ø. M. Andersen and K. R.

- Markham. CRC Press. Boca Raton. PP. 143-218.
- DiDonato R.J., L.A. Jr. Roberts, T. Sanderson, R.B. Easley and E.L. Walker (2004) *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2)* : a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J.* 39: 403-414.
- Eide D., M. Broderius, J. Fett and M.L. Guerinot (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5624-5628.
- Gonnet J.F. (1998) Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited—I. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chem.* 63: 409 - 415.
- Grotewold E. (2006) THE GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF FLORAL PIGMENTS. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 761-780.
- Guerinot M.L. and Y. Yi (1994) Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol.* 104: 815-820.
- Halevy A.H. and S. Asen (1959) Identification of the Anthocyanins in Petals of Tulip Varieties Smiling Queen and Pride of Haarlem. *Plant Physiol.* 34: 494-499.
- Harborne J.B. (1958) Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* 70: 22-28.
- Harborne J.B. (1965) Plant polyphenols-XIV.: Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochemistry* 4: 107-120.
- Heller W. and G. Forkmann (1994) in *Flavonoids - Advances in Research since 1986.* ed. J. B. Harborne. Chapman & Hall. London. PP. 499-535.
- Hirokawa T., S. Boon-Chieng and S. Mitaku (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-379.
- Ito D., Y. Shinkai, Y. Kato, T. Kondo and K. Yoshida (2009) Chemical Studies on Different Color Development in Blue- and Red-Colored Sepal Cells of *Hydrangea macrophylla*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1054-1059.
- Jean M.L., A. Schikora, S. Mari, J.F. Briat and C. Curie (2005) A loss-of-function mutation in *AtYSL1* reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J.* 44: 769-782.
- Katsumoto K., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T. A. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K. Yonekura-Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G.-Q. Tao, N. S. Nehra, C.-Y. Lu, B. K. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J. G. Mason and Y. Tanaka (2007) Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating Delphinidin. *Plant Cell Physiol.* 48: 1589-1600.
- Kawase Y. and M. Shibata (1963) A glycoside of flavonol (rutin) isolated from tulip flowers. *Bot. Mug. Tokyo* 76: 89-91.
- Kim S. A., T. Punshon, A. Lanzirrotti, L. Li, J. M. Alonso, J. R. Ecker, J. Kaplan and M. L. Guerinot (2006) Localization of Iron in *Arabidopsis* Seed Requires the Vacuolar Membrane Transporter VIT1. *Science* 314: 1295-1298.
- 北原小夜子 (2005) Fe³⁺イオンを含むメタロアントシアニンによる青色花色発現の化学的研究. 名古屋大学情報科学研究科修士論文
- Kondo T., K. Oyama and K. Yoshida (2001) Chiral molecular recognition on formation of a metalloanthocyanin: A supramolecular metal complex pigment from blue flowers of *Salvia patens*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40: 894-897.
- Kondo T., M. Ueda, M. Isobe and T. Goto (1998) A new molecular mechanism of blue color development with protocyanin, a supramolecular pigment from cornflower, *Centaurea cyanus*. *Tetrahedron Lett.* 39: 8307-8310.
- Kondo T., M. Ueda, H. Tamura, K. Yoshida, M. Isobe and T. Goto (1994) Composition of Protocyanin, A Self-Assembled Supramolecular Pigment from the Blue Cornflower *Centaurea cyanus*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 978-979.
- Kondo T., K. Yoshida, A. Nakagawa, T. Kawai, H. Tamura and T. Goto (1992) Structural basis of

- blue-color development in flower petals from *Commelia communis*. *Nature* 358: 515-518.
- Kondo T., M. Yoshikane, K. Yoshida and T. Goto (1989) Structure of Anthocyanins in Scarlet, Purple, and Blue Flowers of *Salvia*. *Tetrahedron Lett.* 30: 6729-6732.
- Kushnir S., E. Babiychuk, S. Storozhenko, M. W. Davey, J. Papenbrock, R. De Rycke, G. Engler, U. W. Stephan, H. Lange, G. Kispal et al. (2001) A Mutation of the Mitochondrial ABC Transporter *Stal* Leads to Dwarfism and Chlorosis in the Arabidopsis Mutant *stark*. *Plant Cell* 13: 89-100.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lanquar V., F. Lelievre, S. Bolte, C. Hames, C. Alcon, D. Neumann, G. Vansuyt, C. Curie, A. Schroeder, U. Kramer et al. (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 24: 4041-4051.
- Liangtao L., S.C. Opal, M.W. Diane and K. Jerry (2001) CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *J.B.C.* 276: 29515-29519.
- Marty F. (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587-600.
- Momono K., T. Tsuji, K. Kazuma and K. Yoshida (2012) Specific Expression of the Vacuolar Iron Transporter, TgVit, Causes Iron Accumulation in Blue-Colored Inner Bottom Segments of Various Tulip Petals. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 319-325.
- Momono K., K. Yoshida, S. Mano, H. Takahashi, C. Nakamori, K. Shoji, A. Nitta and M. Nishimura (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant J.* 59: 437-447.
- Mori M., T. Kondo and K. Yoshida (2008) Cyanosalvianin, a supramolecular blue metalloanthocyanin, from petals of *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry* 69: 3151-3158.
- Murray M.G. and W.F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- 中村研三, 西村幹夫, 長谷俊治, 前島正義 (1998) 植物のタンパク質実験プロトコール. 秀潤社. PP.10-21.
- 中島範行・荘司和明 植物が含有するフラボノイドの組成比率による品種識別法. 特開2008-96317.
- Nakayama M., M. Okada, M. Taya-Kizu, M. Urashima, Y. Kan and M. Koshioka (2004) Coloration and Anthocyanin Profile in Tulip Flowers. *Jpn. Agric. Res. Quart.* 38:185-190.
- Nakayama M., M. Yamaguchi, O. Urashima, Y. Kan, Y. Fukui, Y. Yamaguchi and M. Koshioka (1999) Anthocyanins in The Dark Purple Anthers of *Tulipa gesneriana*: Identification of Two Novel Delphinidin 3-O- (6-O- (Acetyl- α -Rhamnopyranosyl) - β -Glucopyranosides) . *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:1509-1511.
- Robinson G. M. and R. Robinson (1931) CLXXXII. A SURVEY OF ANTHOCYANINS. I. *Biochem. J.* 25: 1687-1705.
- Robinson N.J., C.M. Procter, E.L. Connolly and M.L. Guerinot (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397: 694-697.
- Rudiger H. and U. W. Stephan (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216: 541-551.
- Saito N., Y. Osawa and K. Hayashi (1971) Platycyanin, a new acylated anthocyanin in Chinese bell-flower, *Platycodon grandiflorum*. *Phytochemistry* 10: 445-447.
- Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.
- Shibata K., Y. Shibata and I. Kasiwagi (1919) STUDIES ON ANTHOCYANINS: COLOR VARIATION IN ANTHOCYANINS. *J. Am. Chem. Soc.* 41: 208-220.
- Shibata M. (1956) Uber das Anthocyanin in den dunkelpurpurnen Blüten von *Tulipa gesneriana* L. Studien über die Physiologie von Liliaceen I. *Bot. Mag. Tokyo* 69: 462-468.
- Shibata M. and N. Ishikura (1960) Paper chromatographic survey of anthocyanin in tulip-flowers. I. *Jap. J. Bot.* 17: 230-238.

- Shibata M. and E. Sakai (1958) On the anthocyanin in the blood-red flower of *Tulipa gesneriana* L. Studies on the physiology of Liliaceae II. Bot. Mag. Tokyo 71: 6-11.
- 下群山正巳 (1988) 増訂植物色素. 林孝三編. 養賢堂. 東京. PP. 12-55.
- Shiono M., N. Matsugaki and K. Takeda (2005) Structure of the blue cornflower pigment. Nature 436: 791.
- Shoji K., N. Miki, N. Nakajima, K. Momonoi, C. Kato and K. Yoshida (2007) Perianth Bottom-Specific Blue Color Development in Tulip cv. Murasakizuisho Requires Ferric Ions. Plant Cell Physiol. 48: 243-251.
- Stachelin L.A. and E.H. Newcomb (2005) 植物の生化学・分子生物学. 学会出版センター. 東京. PP. 23-26.
- Stephen C. and Y. Tanaka (2007) Genetic Modification in Floriculture. Crit. Rev. Plant Sci. 26: 169-197.
- Strack D., G. Sachs and R. Wiermann (1981) Pollen of *Tulipa* cv. «Apeldoorn» as an Accumulation Site of Flavonol Di- and Triglycosides. Z. Pflanzenphysiol. 103: 291-296.
- Strack D. and V. Wray (1994) in Flavonoids - Advances in Research since 1986, ed. J. B. Harborne, Chapman & Hall, London, pp. 1-22.
- 武田幸作・林孝三 (1988) 増訂植物色素. 林孝三編. 養賢堂. 東京. PP. 151-267.
- Takeda K., M. Kariuda and H. Itoi (1985) Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. Phytochemistry 24: 2251-2254.
- Takeda K., R. Kubota and C. Yagioka (1985) Copigments in the blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. Phytochemistry 24: 1207-1209.
- Takeda K., T. Yamashita, A. Takahashi and C. F. Timberlake (1990) Stable blue complexes of anthocyanin-aluminium-3-*p*-coumaroyl- or 3-caffeoyl-quinic acid involved in the blueing of *Hydrangea flower*. Phytochemistry 29: 1089-1091.
- Takeda K., M. Yanagisawa, T. Kifune, T. Kinoshita and C. F. Timberlake (1994) A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*. Phytochemistry 35: 1167-1169.
- Tanaka Y., Y. Katsumoto, F. Brugliera and J. Mason (2005) Genetic engineering in floriculture. Plant Cell Tissue Organ Cult. 80: 1-24.
- Tian Q., M.M. Giusti, G.D. Stoner and S.J. Schwartz (2006) Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. Food Chem. 94: 465-468.
- Torskangerpoll K., T. Fossen and O. M. Andersen, O.M. (1999) Anthocyanin pigments of tulips. Phytochemistry 52: 1687-1692.
- Torskangerpoll K., R. Norbaek, E. Nodland, D. O. Ovstedal and M. Andersen (2005) Anthocyanin content of *Tulipa* species and cultivars and its impact on tepal colours. Biochem. Syst. Ecol. 33: 499-510.
- 浦嶋 修 (2000) わが国独自のチューリップ品種育成. 技術と経済. 科学技術と経済の会. 東京. PP.14-20.
- Vert G., N. Grotz, F. Dedaldechamp, F. Gaymard, M. L. Guerinot, J. F. Briat and C. Curie (2002) IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. Plant Cell 14: 1223-1233.
- Willstätter R. and E.K. Bolton (1916) Über ein Anthocyanin der Winteraster (*chrysanthemum*). Ann. Chem. Justus Liebig 412: 136-148.
- Willstätter R. and A. E. Everest (1913) Untersuchungen über die Anthocyane. I. Über den Farbstoff der Kornblume. Jus. L. Ann. Chem. 401: 189-232.
- Yoshida K., M. Kawachi, M. Mori, M. Maeshima, M. Kondo, M. Nishimura and T. Kondo (2005) The Involvement of Tonoplast Proton Pumps and Na⁺(K⁺) /H⁺ Exchangers in the Change of Petal Color During Flower Opening of Morning Glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. Plant Cell Physiol. 46: 407-415.
- Yoshida K., S. Kitahara, D. Ito and T. Kondo (2006) Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. Phytochemistry 67: 992-998.
- 吉田久美・近藤忠雄・尾山公一 アントシアニン類の製造方法及びフラベノール誘導體. 特開

2009-137904.

Yoshida K., M. Mori and T. Kondo (2009) Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. Nat. Prod. Rep. 26: 884-915.

Yoshida K., Y. Toyama-Kato, K. Kameda and T. Kondo (2003) Sepal Color Variation of *Hydrangea macrophylla* and Vacuolar pH Measured with a Proton-Selective Microelectrode. Plant Cell Physiol. 44: 262-268.

Studies on the Transport and Accumulation of Iron Ions involved in the Blue Coloration of Tulip Petals

Kazumi MOMONOI, Kazuaki SHOJI¹⁾, Toshiaki TSUJI and Akira NITTA¹⁾

Summary

Many garden plants, such as chrysanthemums, roses and carnations among cut flower types and tulips and lilies as representative bulb flowers, do not have flowers with blue petals. As a result, great efforts have been made to date in breeding studies to produce such plants having blue flowers. In Toyama prefecture, many varieties of tulip (*Tulipa gesneriana*) cultivars have been preserved and breeding studies have been actively carried out. Producing a novel tulip with blue flowers has become one of the goals of these breeding studies. However, in spite of many breeding attempts, a tulip cultivar having entirely blue perianths has not yet been produced. *T. gesneriana* exhibit a wide variation in flower color that is imparted by certain pigments: white, yellow, orange, pink, red, purple, and nearly black purple colors. Most of these colors, except for white and yellow to orange, are attributed to anthocyanins. In many tulip cultivars, the color of the bottom of the inner perianth differs from that of the perianth itself.

In one of the cultivars cultivated in Toyama prefecture, *T. gesneriana* cv. Murasakizuisho, the petals exhibit blue coloration at the bottom of the inner perianth, although the upper petals are purple. However, the mechanism for this blue coloring remained unknown, and if it could be clarified, the knowledge obtained would be of immense value to the breeding process. In research conducted at the Agricultural Experiment Station, Toyama Agricultural Research Center (now the Agricultural Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural, Forestry and Fisheries Research Center), we found that even though the anthocyanin and flavonol composition was the same in the petals and at the bottom of the inner perianth, the iron content in the blue cells was 25 times higher than that in the purple cells, thus revealing that iron ions are essential for the blue coloration (Shoji et al., 2007). This strongly suggested the existence of a blue cell specific vacuolar iron transport and/or storage system. However, the specific iron accumulation mechanisms and the mechanisms involved in the color development of blue cells in the bottom of the perianth in the majority of tulips other than Murasakizuisho have not been completely elucidated.

In this study, we performed a functional analysis of the transporter protein and isolated the responsible gene involved in blue coloration in Murasakizuisho tulip petals. As a result, we were able to obtain the iron transporter gene from *T. gesneriana* (*TgVit1*), the mRNA and protein of which are expressed only in blue cells at the bottom of the perianth. Furthermore, we demonstrated that TgVit1 is localized to the tonoplast, expressed in an iron transport protein present only in blue cells. As a result, TgVit1 expression is essential for blue coloration of the petals of a tulip, and by the transport of iron ions into the vacuole by this protein that is present in the tonoplast of blue cells, we were able to prove that petal cells exhibit blue coloration by means of *TgVit1*. Furthermore, we analyzed the mRNA expression of *TgVit1* and iron accumulation at the bottom of the perianth and in the upper petals in tulip flowers from a total of 12 cultivars other than Murasakizuisho, including white and yellow cultivars. Regardless of the flower color, we were able to show that iron ion accumulation is 5–10 times greater at the bottom of the perianth than it is in the upper petal, and that the involvement of a specific iron transporter is universal.

This paper consists of five parts.

Part I provides an overview of studies of the mechanism of blue coloration development by means of anthocyanin in flowers including tulips, studies of the iron transport mechanism in plants, and research issues.

Part II describes the acquisition of the iron transporter gene *TgVit1* from the bottom of the perianth of Murasakizuisho, its homology with other plants, and its gene structure. Referring to the nucleotide sequence of a gene that has been reported in the yeast gene and the isolation of a vacuolar iron transporter from the seeds of *Arabidopsis thaliana*, we were able to isolate an iron transporter gene, which was the second time for such a gene to be isolated in plants. In addition, we examined the expression of *TgVit1* mRNA in tissues and in the flowering stage of tulips. *TgVit1* is expressed only in the cells from the bottom of the perianth and is at its highest level before the petal develops blue coloration, after which it gradually decreases until the flowering time, and this gene is regulated differently from the structural genes for anthocyanin biosynthesis.

In Part III, we analyze the expression and function of the TgVit1 protein, a product of the gene we isolated in Part II. We show that this protein is expressed only in the blue epidermal cells at the bottom of the perianth, and is not detected in other purple cells, or in leaves, stems, roots, bulbs and so on. Also, we have found that TgVit1 protein is highly expressed at stage 1, and that TgVit1 is tonoplast-localized. We introduced the expression vector for *TgVit1* with green fluorescent protein (GFP) into the purple colored upper petals of Murasakizuisho by particle bombardment, and with GFP fluorescence from cells into which *TgVit1* had been introduced as evidence, the cells were changed from purple to blue. The blue color development in cells is evidence that the iron transport protein is synthesized from the introduced gene, and that iron ions were transported into the vacuole. In addition, *TgVit1* was introduced into a yeast mutant lacking a vacuolar iron transporter, which cannot grow in the presence of iron ions, and as a result *TgVit1* rescued the growth defect of the yeast mutant in the presence of iron ions. These results prove that TgVit1 is present in the tonoplast of blue cells, and demonstrated that it is a protein that transports divalent iron ions into vacuoles, which is an essential function for the blue coloration of petals.

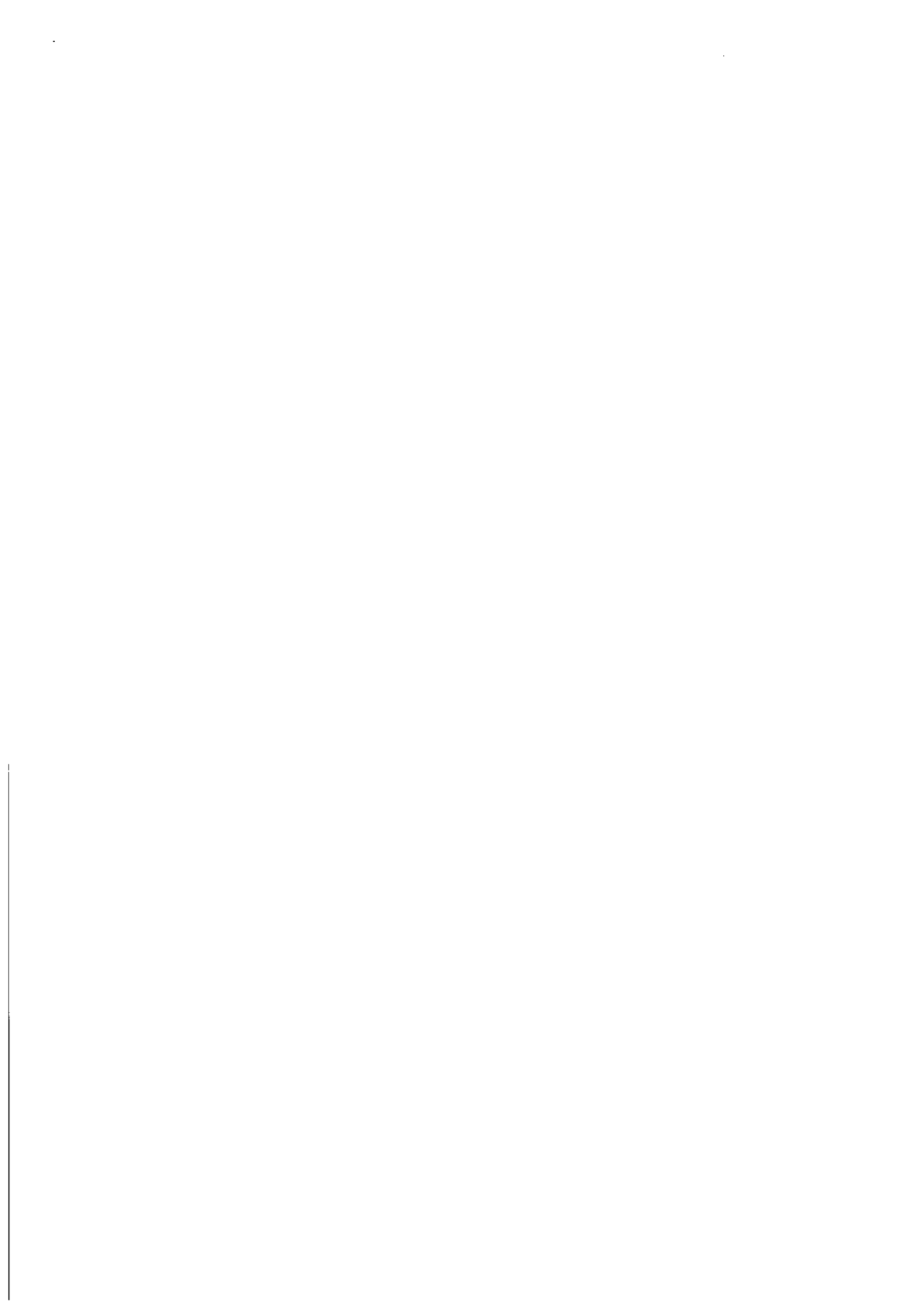
Part IV reports our comprehensive analysis of 15 kinds of tulips including 12 cultivars other than Murasakizuisho with blue coloration at the bottom of the perianth. In these cultivars, the anthocyanin in the blue epidermal cells at the bottom of the perianth in all cultivars is delphinidin 3-rutinoside. Furthermore, in all cultivars, regardless of the color of the petals, the iron content of epidermal cells at the bottom of the perianth is higher than it is in the upper petals, and *TgVit1* mRNA expression was apparent in all of the bottom tissues. This implies the existence of an iron storage mechanism at the bottom of the perianth regardless of flower coloration. Furthermore, we conducted experiments to reproduce blue flower coloration based on the analytical values we obtained, and we clarified that sufficiently blue coloration was obtained in the presence of 5 mM delphinidin 3-rutinoside in physiological conditions, flavonol glycosides and 0.1 equivalents of iron ions. This implies the existence of a mechanism that differs from supramolecular complex formation, such as that of the cornflower, which consists of iron ions and strong anthocyanin in a strict molar ratio.

Part V provides a summary of the present study, and presents issues and prospects for future research. We were able to clarify the function of the iron transporter gene from *T. gesneriana*, followed by that of the vacuolar iron transporter from *A. thaliana*. Moreover, our results clarified, for the first time, the actual relationship between the tissue-specific accumulation of iron and the function of blue coloration becoming visible. We believe that the knowledge revealed in the present research is an important contribution to the further clarification of the mechanism of iron ion transport and

accumulation in plants.

- 1) Agricultural Research Institute , Toyama Prefectural Agricultural , Forestry and Fisheries Research Center , Yoshioka , Toyama , Toyama , 939-8153

[Bull . Hort. Res. Inst., Toyama Pref. Agr., For. Fish. Res. Ctr. No.3 P1-P45 (2013)]



JM7台‘ふじ’の生育に必要なほ場の排水条件

I. JM7台木の根域分布と湛水時間が生育に及ぼす影響

舟橋志津子¹⁾・濱谷聡志²⁾・徳満慎一・松田亨³⁾・関口英樹

I. 緒言

富山県は農地の水田率が98%、農業総産出額の70%が米であるなど、水稻を主体とした生産構造になっている。しかし近年は米価が低迷し、今後も一定の生産調整が求められる中で、主穀作経営体の経営基盤を強化していくために、園芸作物を取り入れた経営複合化への取組みが重要となっている。その中でもリンゴは、主力品種である‘ふじ’の収穫時期が稲刈り時期と重ならないことや、冬季のせん定作業等、年間を通して構成員の就業を確保できるため、水稻中心の経営体に合った複合化品目として水田転換畑での作付が増えてきている。

新規に水田転換作物としてリンゴを植栽する場合、早期結実性を示すわい性台木が利用されることが多い。しかし、排水対策が十分に施されていない水田においては、わい性台木の中でも耐水性が高いとされるJM7台木（岩手農研セ、2000；河村、2002）を利用しても、湿害により初期生育を確保できず生育不良となる問題が発生している。

そこで、JM7台木を利用した‘ふじ’（以下‘ふじ’/JM7）を植栽する際に必要となる、湿害を回避できるほ場の排水条件について検討した。

II. 材料および方法

1. ‘ふじ’/JM7における根域分布

2007年10月、供試樹として富山県農林水産総合技術センター果樹研究センター（以下、果樹研と表記）内ほ場（魚津市六郎丸、土壌条件：礫質沖積砂壤土）に植栽された‘ふじ’/JM7の2年生樹および3年生樹を各3樹、8年生樹を2樹（植栽間隔：列間2m、樹間1m）、さらに現地リンゴほ場（魚津市六郎丸、土壌条件：礫質沖積砂壤土）に植栽された‘ふじ’/JM7の5年生樹（植栽間隔：列間4m、樹間

2m、主幹形樹形）3樹を用い、根量を調査した。根量は、2年生樹および3年生樹については根が存在するすべての範囲で、5年生樹および8年生樹については主幹中心部より半径90cmの範囲で、それぞれ地表面から10cmごとに土壌を層状に掘り下げながら根を採取し、直径20mm以下の生根重を計測した。

2. 湛水時間が‘ふじ’/JM7の生育に及ぼす影響

2006年3月および2008年3月、山砂：堆肥が容積比で3：1とした用土を用いて‘ふじ’/JM7、2年生樹を12L容ポット（口径23cm×深さ29cm）に植栽し、湛水処理を行った。湛水処理は、図1および写真1に示したように、果樹研ほ場内に設置した流水プール中に、30L容ポットを設置し、前述の12L容ポット植栽の‘ふじ’/JM7を用土表面まで水没させて行なった。処理時間は、2006年が24、48、72、144、288時間（以下24時間区、48時間区、72時間区、144

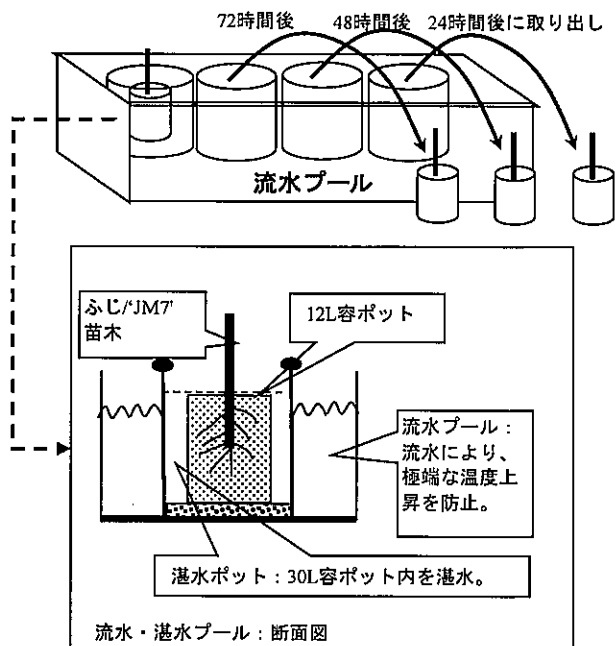


図1 湛水処理模式図

1) 現在：新川農林振興センター 2) 現在：高岡農林振興センター
3) 元園芸研究所果樹研究センター

時間区、288時間区、無処理を0時間区と記す)、2008年が18、24、48、72時間区(以下18時間区、24時間区、48時間区、72時間区、無処理を0時間区と記す)とし、同一樹で繰り返し湛水処理を行った。湛水処理は、2006年が表1に示した期間で年間計5回、2008年が表2に示した期間で年間計14回行ない、両年とも処理は1区1樹/ポット5反復とした。なお、湛水処理期間以外は適宜灌水を行った。樹体

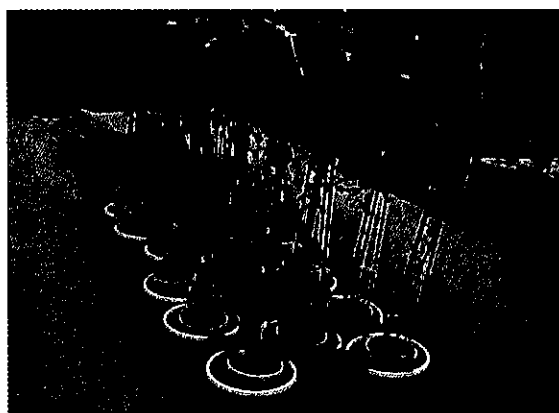


写真1 湛水処理状況(2006年)

生育への影響を評価するため、2006年に7月10日～8月1日の落葉率と同年9月27日の新梢長を調査した。また、2008年は、6月12日と8月16日時点の葉色(SPAD値)、6月12日～8月1日の落葉率、および同年12月2日には新梢長、主幹延長枝長、新梢乾物重を調査した。

III. 結果および考察

1. 'ふじ' /JM7における根域分布

表3には'ふじ'/JM7における土壌の深さ別の生根重の比率を示した。

2年生樹、3年生樹、5年生樹の根量は、いずれも地表～地下10cmの土層にもっとも多かった。また、根量は下層の土壌ほど少なく、30cm以下の土層では2%以下と極めて少なかった。8年生樹の根量は、地下10～20cmの土層にもっとも多く、次いで地表～地下10cm、地下20～30cmの順で多く、30cm以下の土層では7.2%と少なかった。5年生樹および8年生樹の根の伸長状況を観察したところ、10～30cmの土層に分布している根のほとんどは、主根からの発出

表1 ふじ'JM7'2年生樹の湛水処理期間 (2006年)

| | 24時間区 | 48時間区 | 72時間区 | 144時間区 | 288時間区 |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1回目 | 3月21日～3月22日 | 3月21日～3月23日 | 3月21日～3月24日 | 3月21日～3月27日 | 3月21日～4月2日 |
| 2回目 | 4月2日～4月3日 | 4月2日～4月4日 | 4月2日～4月5日 | 4月2日～4月8日 | 4月2日～4月14日 |
| 3回目 | 6月15日～6月16日 | 6月15日～6月17日 | 6月15日～6月18日 | 6月15日～6月21日 | 6月15日～6月27日 |
| 4回目 | 6月28日～6月29日 | 6月28日～6月30日 | 6月28日～7月1日 | 6月28日～7月4日 | 6月28日～7月10日 |
| 5回目 | 7月12日～7月13日 | 7月12日～7月14日 | 7月12日～7月15日 | 7月12日～7月18日 | 7月12日～7月24日 |

表2 ふじ'JM7'2年生樹の湛水処理期間 (2008年)

| | 18時間区* | 24時間区* | 48時間区 | 72時間区 |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1回目 | 3月26日～3月27日 | 3月26日～3月27日 | 3月26日～3月28日 | 3月26日～3月29日 |
| 2回目 | 4月1日～4月2日 | 4月1日～4月2日 | 4月1日～4月3日 | 4月1日～4月4日 |
| 3回目 | 4月6日～4月7日 | 4月6日～4月7日 | 4月6日～4月8日 | 4月6日～4月9日 |
| 4回目 | 6月12日～6月13日 | 6月12日～6月13日 | 6月12日～6月14日 | 6月12日～6月15日 |
| 5回目 | 6月16日～6月17日 | 6月16日～6月17日 | 6月16日～6月18日 | 6月16日～6月19日 |
| 6回目 | 6月20日～6月21日 | 6月20日～6月21日 | 6月20日～6月22日 | 6月20日～6月23日 |
| 7回目 | 6月24日～6月25日 | 6月24日～6月25日 | 6月24日～6月26日 | 6月24日～6月27日 |
| 8回目 | 7月1日～7月2日 | 7月1日～7月2日 | 7月1日～7月3日 | 7月1日～7月4日 |
| 9回目 | 7月8日～7月9日 | 7月8日～7月9日 | 7月8日～7月10日 | 7月8日～7月11日 |
| 10回目 | 7月14日～7月15日 | 7月14日～7月15日 | 7月14日～7月16日 | 7月14日～7月17日 |
| 11回目 | 7月21日～7月22日 | 7月21日～7月22日 | 7月21日～7月23日 | 7月21日～7月24日 |
| 12回目 | 9月11日～9月12日 | 9月11日～9月12日 | 9月11日～9月13日 | 9月11日～9月14日 |
| 13回目 | 9月16日～9月17日 | 9月16日～9月17日 | 9月16日～9月18日 | 9月16日～9月19日 |
| 14回目 | 9月21日～9月22日 | 9月21日～9月22日 | 9月21日～9月23日 | 9月21日～9月24日 |

*18時間区は開始日16:00より湛水処理を行い、翌日10:00(18時間後)に苗木を湛水ポットより引き上げた。24時間区は開始日16:00～翌日16:00まで湛水処理を行った。

の向きに関わらず水平方向に伸長していることが確認された。

一般にわい性台木使用樹は普通台木使用樹よりも根圏が狭く、浅根性であるとされている(工藤、1993; 別所、1994)。今回の調査では、土壌の過湿による根の伸長阻害を避けるため、供試樹はともに地表～地下70cmまで砂壤土である排水良好なほ場に植栽された樹を選んだ。樹齢の若い2年生樹、3年生樹、5年生樹では全根量の98%以上が地表～地下30cmの土層に分布しており、また、ほぼ成木に達した8年生樹においても、全根量の90%以上が地表～地下30cmまでの層に分布していた。また、根の伸長は地下方向ではなく、主として横方向への伸長が観察された。このことは、JM7台木を利用した‘ふじ’樹についても、他のわい性台木利用樹と同様に浅根性であることを示しており、その主要根域は深さ30cm程度と考えられる。

表3 ‘ふじ’/JM7根の樹齢別の分布割合(生根重比率)(2007年10月)

| 樹齢 | 地表～ | 地下10～ | 地下20～ | 地下30cm |
|------|--------|--------|--------|--------|
| | 地下10cm | 地下20cm | 地下30cm | 以下 |
| | (%) | (%) | (%) | (%) |
| 2年生樹 | 40.4 | 33.0 | 26.2 | 0.4 |
| 3年生樹 | 43.2 | 29.6 | 25.4 | 1.8 |
| 5年生樹 | 49.7 | 30.0 | 18.6 | 1.7 |
| 8年生樹 | 32.4 | 41.8 | 18.3 | 7.2 |

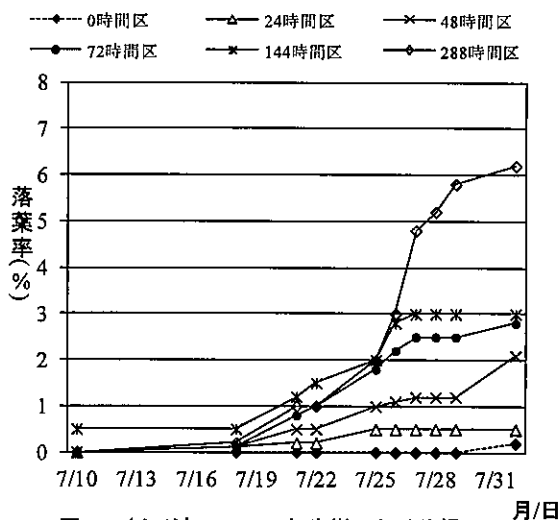


図2 ‘ふじ’/JM7の2年生樹における根の湛水時間が落葉率に及ぼす影響(2006年)

2. 湛水時間が‘ふじ’/JM7の生育に及ぼす影響

図2には2006年に供試した‘ふじ’/JM7、2年生樹の7月10日～8月1日における落葉率を示した。なお、7月10日は5回目の湛水処理開始2日前で、8月1日は5回目の湛水処理終了8日後である。

落葉率は0時間区を除き、7月18日から認められ、処理時間が長いほどその後の落葉率は高くなった。24時間区については、湛水期間中の落葉率が0.5%と0時間区の0.2%に比べるとやや高かったものの、その差は小さく、他の湛水処理区に比べると落葉率は低かった。

図3には2008年に供試した‘ふじ’/JM7、2年生樹の6月12日～8月1日における落葉率を、表4には6月12日と8月16日の葉色(SPAD値)を示した。なお、6月12日は4回目の湛水処理開始日で、8月16日は11回目の湛水処理終了23日後である。

落葉率について、0時間区で6月14日～6月20日に落葉が認められ、落葉率は4%と他の湛水処理区

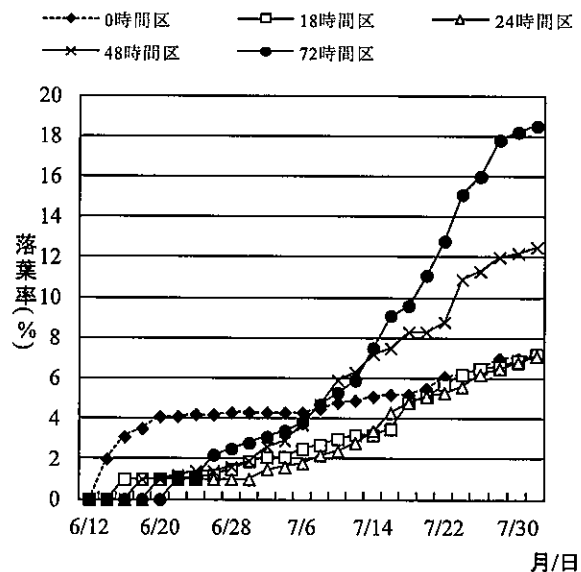


図3 ‘ふじ’/JM7の2年生樹における根の湛水時間が落葉率に及ぼす影響(2008年)

表4 ‘ふじ’/JM7の2年生樹における根の湛水時間が葉色に及ぼす影響(2008年)

| 処理区 | 葉色 (SPAD値) | |
|-------|------------|---------|
| | 6月12日 | 8月16日 |
| 0時間区 | 37.5 | 39.9 a |
| 18時間区 | 40.9 | 39.9 a |
| 24時間区 | 44.5 | 41.5 a |
| 48時間区 | 42.0 | 31.8 ab |
| 72時間区 | 41.2 | 28.2 b |

*tukeyの多重比較検定により、異符号間には有意差(p<0.05)があることを示す

よりも高い値を示したが、以降は急激な落葉は認められなかった。0時間区における落葉は、湛水処理期間前の6月7日より降雨がほとんどなく気温も高く推移しており、容量の小さいポットであったため土壌が乾燥状態になって生じたものである。6月26日以降は湛水処理区において落葉が進んだ。18時間区および24時間区は、調査期間中に落葉が進んだものの、7月18日以降の落葉率は5~7%で推移し、0時間区と変わらなかった。48時間区および72時間区は、0時間区、18時間区および24時間区に比べると落葉が多く、湛水時間の長かった72時間区は8月1日時点での落葉率が18.5%ともっとも高かった。

6月12日と8月16日時点の葉色(SPAD値)に関しては、6月12日では処理区間に有意差が認められなかったが、8月16日においては0~24時間区に対して72時間区のSPAD値は有意に低い値を示し、また48時間区についても有意差は認められないがかなり低い値を示した。なお、18時間区、24時間区は0時間区との間に有意差が認められなかった。

表5には2006年に供試した‘ふじ’/JM7、2年生樹の総新梢長を示したが、総新梢長は処理区間に有意差が認められなかった。

表6には2008年に供試した‘ふじ’/JM7、2年生樹の総新梢長、主幹延長枝長、新梢乾物重を示した。

表5 ‘ふじ’/JM7の2年生樹における根の湛水時間が総新梢長に及ぼす影響(2006年9月27日)

| 処理区 | 総新梢長 (cm/樹) |
|--------|----------------|
| 0時間区 | 217.4 |
| 24時間区 | 215.2 |
| 48時間区 | 203.0 |
| 72時間区 | 211.6 |
| 144時間区 | 189.2 |
| 288時間区 | 223.6 |
| 有意差* | n.s. |

*分散分析によりn.s.は有意差が無いことを示す

表6 ‘ふじ’/JM7の2年生樹における根の湛水時間が新梢生育に及ぼす影響(2008年12月2日)

| 処理区 | 総新梢長 (cm/樹) | 主幹延長枝長 (cm/樹) | 新梢乾物重 (g/樹) |
|-------|----------------|------------------|----------------|
| 0時間区 | 213.5 | 50.8 a* | 20.2 a |
| 18時間区 | 212.9 | 55.0 a | 20.4 a |
| 24時間区 | 232.5 | 50.8 ab | 22.6 a |
| 48時間区 | 194.3 | 38.0 bc | 13.8 b |
| 72時間区 | 163.2 | 33.2 c | 8.2 b |

*tukeyの多重比較検定により、異符号間には有意差(p<0.05)があることを示す

総新梢長は処理区間に有意差が認められなかったが、48時間区、72時間区は他の処理区に比べると短い傾向にあった。主幹延長枝長、新梢乾物重は0時間区、18時間区、24時間区で差が認められなかったが、48時間区、72時間区はこれら処理区に比べると劣った。

2006年と2008年の処理では落葉率に年次間差異が認められた。すなわち、落葉率は両年とも湛水時間が長いと落葉率は高い傾向にあったが、2008年の落葉率は全般に高かった。これは2006年が落葉率の調査を終えた8月1日までに5回の湛水処理を行っていたのに対し、2008年は11回と処理回数が多く、湛水による樹体ストレスが2008年の方でより大きかったことが要因の一つと考えられる。また、総新梢長は両年とも湛水処理時間の長短に関わらず有意な差が認められなかったが、2008年の調査では48時間区、72時間区において総新梢長が短くなる傾向が見られ、更に2008年は葉色の退色や主幹延長枝長、新梢乾物重が48時間区、72時間区では劣っていた。2006年は葉色、主幹延長枝、新梢乾物重を調査していないが、両年の調査において、24時間区での樹体生育は0時間区と大きな差異は認められておらず、48時間以上の湛水処理により生育への影響が認められていた。このことから、湛水時間が24時間程度以下であれば生育への影響が少なく、湿害は回避できると判断された。

以上の結果、JM7台木を利用した‘ふじ’において、湿害を回避するためのほ場の排水条件は、主要根域である地下30cmまでの土層において降雨等で地表面まで湛水状態となった場合でも24時間以内に排水されることと考えられた。ただし湛水状態となる回数が増えると生育への影響が大きくなるので、多少の降雨であっても速やかに地下部の排水が進み、根域が湛水状態になりにくい対策が必要であることが示唆された。

V. 摘要

JM7台木を利用した‘ふじ’において、根域分布とポット樹を用いた繰り返しの湛水処理による樹体生育への影響から、水田転換畑において湿害を回避できるほ場の排水条件について検討した。

- 1) 2年生樹、3年生樹、5年生樹は全根量の98%以上が0~30cmの土層に分布しており、8年生樹は全根量の90%以上が0~30cmの土層に分布していた。

- 2) 湛水処理を繰り返し行った結果、湛水時間が18時間、24時間では、樹体生育への影響は認められなかったが、湛水時間が48時間以上になると落葉率が高くなり、葉色の退色が認められた。
- 3) 主幹延長枝長、新梢乾物重は0時間区、18時間区、24時間区で差が認められなかったが、48時間区、72時間区はこれら処理区に比べると劣った。
- 4) これらの結果、JM7台木を利用した‘ふじ’においては、湿害を回避するためのほ場の排水条件として、主要根域である地下30cmまでの土層が降雨等で地表面まで地下水位が上昇しても24時間以内に排水されることと考えられた。

VI. 引用文献

- 別所 英男, 1994, わい性台木の種類と特性, 農業技術体系果樹編1 追録第9号: p技282-284.
- 岩手県農業研究センター, 2000, リンゴの新わい性台木「JM1」、「JM7」の耐水性: 平成12年度試験研究成果
- 河村 健, 2002, 水田転換畑におけるリンゴの生産安定化技術開発試験1, JM台‘ふじ’の耐水性検討, 果樹に関する試験成績書 富山農技セ果樹試験場: p115-116
- 工藤 仁郎, 1993, わい化での問題点 I 気象災害 = 風害, 農業技術体系果樹編1 追録第8号: p技282-284.

Drainage conditions for 'Fuji'/JM7 growth

I. The distribution of roots and the effect on tree growth of root flooding in 'Fuji'/JM7

Shizuko FUNAHASHI¹⁾, Satoshi HAMATANI²⁾, Shinichi TOKUMAN,
Toru MATSUDA³⁾ and Hideki SEKIGUCHI

(Toyama Prefectural Agricultural Forestry & Fisheries Research Center,
Fruit Tree Research Center, Rokuroumaru, Uozu, Toyama 937-0042, Japan)

Summary

To investigate drainage conditions so as to select locations where moisture damage can be avoided in cultivation using converted paddy fields, we employed repeated flooding of potted specimens to investigate the distribution of roots and the effect on tree growth of root flooding in Fuji apple trees grafted on JM7 rootstock. Of all Fuji/JM7 roots, about 98% after 2, 3 and 5 years, and about 90% after 8 years, were distributed between 0 and 30 cm below the soil surface. Regarding the results of repeated flooding, no influence on tree growth was observed with retention of water for 18 and 24 hours; however, after water retention for 48 hours, elevated leaf loss and faded leaf color were observed. In terms of main branch elongation, no change was seen in the dry weight of new tips in the 0, 18 and 24 hour sections; in comparison, the 48 and 72 hour sections were inferior. Our results indicate that, for Fuji/JM7, in order to avoid the negative effects of moisture, drainage conditions are necessary in which the main root zone is drained to a depth of 30 cm below the soil surface within 24 hours of elevation of the groundwater level due to rainfall and the like.

1) Present address : Niikawa Agriculture Forestry Promotion Center , Kurobe , Toyama 938-0801

2) Present address : Takaoka Agriculture Forestry Promotion Center , Takaoka , Toyama 933-0806

3) Present address : Kurobe , Toyama 938-0807

[Bull . Hort. Res. Inst., Toyama Pref. Agr., For. Fish. Res. Ctr. No.3 P47-P52 (2013)]

富山県農林水産総合技術センター園芸研究所研究報告第3号

富山県農林水産総合技術センター園芸研究所研究報告第3号

平成25年3月

編集 富山県農林水産総合技術センター 園芸研究所
〒939-1327 富山県砺波市五郎丸288
TEL 0763-32-2259 FAX 0763-33-2476

発行 富山県農林水産総合技術センター
〒939-8153 富山市吉岡1124-1
TEL 076-429-2111 FAX 076-429-2701

印刷所 いおぎ印刷株式会社

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry, no matter how small, should be recorded to ensure the integrity of the financial statements. This includes not only sales and purchases but also expenses, income, and any other financial activity. The text suggests that a consistent and thorough record-keeping system is essential for identifying trends, managing cash flow, and providing a clear picture of the company's financial health to stakeholders.

Furthermore, the document highlights the need for transparency and accountability. By maintaining detailed records, management can demonstrate to investors, creditors, and other interested parties that the company's financial reporting is reliable and based on verifiable data. This transparency is crucial for building trust and maintaining the company's reputation in the market. The text also notes that accurate records are necessary for compliance with various regulatory requirements and tax laws, helping to avoid penalties and legal issues.

In addition, the document discusses the role of technology in modern record-keeping. It mentions that while traditional paper-based systems were once common, the adoption of digital accounting software has significantly improved efficiency and accuracy. These systems often offer features such as automated data entry, real-time reporting, and secure storage, which can reduce the risk of human error and make it easier to access and analyze financial data. However, the text also cautions that companies must ensure that their digital systems are properly secured and that data is backed up regularly to prevent loss.

Overall, the document concludes that maintaining accurate and up-to-date financial records is a fundamental responsibility for any business. It is not just a matter of administrative convenience but a key component of sound financial management. By investing in a robust record-keeping system and ensuring that all transactions are properly documented, a company can gain valuable insights into its performance and position, ultimately leading to more informed decision-making and long-term success.