

アジサイの花色の発色機構に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

先端農業技術科学専攻

博士（農学）学位論文

小玉雅晴

目 次

第1章	総合目的	・・・1
第2章	土壌条件によるアジサイの花色の可変性の原因となるがく片内の花 色関連成分の解析	
1.	諸言	・・・14
2.	材料および方法	・・・16
3.	結果	・・・18
4.	考察	・・・22
第3章	アジサイの花色発現におけるリン酸の関与	
1.	諸言	・・・32
2.	材料および方法	・・・33
3.	結果	・・・37
4.	考察	・・・44
第4章	アジサイの秋色花色の発現に関わる要素	
1.	諸言	・・・65
2.	材料および方法	・・・66
3.	結果	・・・70
4.	考察	・・・73
第5章	総合考察	・・・93

引用文献	· · · 99
摘要	· · · 104
Summary	· · · 107
謝辞	· · · 110

第1章 総合目的

アジサイはアジサイ科 (*Hydrangeaceae*) アジサイ属 (*Hydrangea*) の低木またはつる性の植物である。アジサイ属はアジアから南北アメリカにかけて約 40 種が分布しており、日本には 14 種が自生している (川原田ら, 2010)。ガクアジサイ (*Hydrangea macrophylla*) やヤマアジサイ (*Hydrangea serrata*) は日本固有種である。

アジサイが最初にヨーロッパに導入されたのは、1789 年にジョセフ・バンクスが日本から中国に渡っていたものをロンドンのキュー植物園に送ったものとされる (川原田ら, 2010)。2 年後にはアメリカ、また同時期にフランスへも中国から導入された。1900 年代にはフランスで品種改良が行われ、大型の手まり咲きの花房を付け、青色やピンク色の鮮やかな花色の品種が作出された。その後、ドイツ、オランダ、ベルギー、アメリカでも次々に品種が作出された。欧米で改良された品種は、大正時代に日本に導入され、西洋アジサイやハイドランジアと呼ばれ国内での需要が高まった。

日本における鉢物アジサイの流通は、国内主要 21 市場の取扱統計 (日本花き卸売市場協会統計, 2016) によると、2000 年に 166 万鉢であった取扱数量は、2007 年以降約 220 万鉢前後で推移し、2015 年は 223 万鉢で最も多い取扱数量となった (Fig. 1-1)。また、取扱金額は 2000 年の 12 億 6282 万円に対し、2015 年は 15 億 3792 万円に増加した (Fig. 1-1)。鉢物全品目の取扱金額に占めるアジサイの割合は 2000 年の 1.4% に対し、2015 年は 2.6% となり、重要な鉢物花き品目となっている (Fig. 1-2)。2015 年の東京都中央卸売市場フラワーオークションジャパン (FAJ) における鉢物アジサイの主な産地別の出荷割合は、愛知県が 35.3%、群馬県が 30.4%、埼玉県が 12.7%、千葉県が 6.1%、そして栃木県が 4.4% である (FAJ 市場調査統計, 2016)。一方、切り花の流通は、2015 年の FAJ 取扱量が約

41 万本で、2012 年から毎年 1 万本程度増加している。2015 年の取扱金額は 1 億 5943 万円である。ただし、輸入が取扱量の約 60%、金額では 83.9%を占めている (FAJ 市場統計調査, 2016)。

栃木県における鉢物アジサイの生産は、シクラメンやポインセチアとのローテーション品目として導入されてきた。1980 年代に二宮町 (現真岡市) の海老原廣氏と鹿沼市の谷田部元照氏の 2 名の生産者が育種を開始し、それぞれフラウシリーズとレディシリーズを作出し、これらの品種を利用して芳賀地区と鹿沼地区を中心に鉢物アジサイの産地が形成された。また、栃木県農業試験場においても 1999 年に品種育成を開始し、2015 年に品種登録された八重咲き性で覆輪の特徴を持つ ‘きらきら星’ (小玉ら, 2015a, 2015b) により、全県的に産地が拡大された。2015 年の栃木県内の鉢物アジサイ生産者は 16 名で、生産額は約 2 億円である (栃木県農業試験場内部資料)。

アジサイの花色には、ピンク色、赤色、紫色、青色、白色がある (Fig. 1-3A ~E)。鉢花として生産されるものは、母の日の贈り物としての需要が高く、ピンク色や赤色が約 70%、青色が約 20%を占める (宇都宮花き市場調査統計, 2016)。花として観賞する部分は、がく片が大型化した組織で装飾花と呼ばれる。また、がく片の縁が内側の色とは異なる白色や赤色の覆輪模様を持つものもある (Fig. 1-4)。鉢物の出荷時期は、最需要期である母の日が目標となり、促成栽培により 2 月から加温を始め、4 月下旬から 5 月上旬が出荷のピークである。また、近年は切り花としての需要が高まり、夏季には緑色、秋季には紅葉のように花色が変化したアジサイが出荷される (Fig. 1-3F, G)。後者は一般に秋色アジサイまたはアンティークアジサイと呼ばれる。

アジサイの赤色、紫色および青色の花色を担うのは、いずれも同じアントシアニン色素のデルフィニジン 3-グルコサイド (Fig. 1-5A) である (Asen・Siegelman, 1957 ; Asen ら, 1956 ; Hayashi・Abe, 1953 ; Lawrence ら, 1938)。これらの色

彩の発色には、アントシアニンに加え、アントシアニンと相互作用する性質を持つアルミニウムイオンと補助色素の 5-*O*-カフェオイルキナ酸 (Fig. 1-5B) および、3-*O*-カフェオイルキナ酸 (Fig. 1-5C) の含量、さらには、これらの化合物溶液の pH が関与している (Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, 1985b, 1990). デルフィニジン 3-グルコサイド溶液は、pH が 3 以下の酸性条件で赤色を呈する一方で、pH が 4 以上の環境では、アルミニウムイオンおよび 5-*O*-カフェオイルキナ酸とキレートすることで青色を発色する (Ito ら, 2009 ; Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, b, 1990 ; Yoshida ら, 2003). 5-*O*-カフェオイルキナ酸の異性体である 3-*O*-カフェオイルキナ酸は、このキレートを阻害する作用を持つ (武田, 2013). つまり、3-*O*-カフェオイルキナ酸の濃度が高い場合には、このキレートによる青色の発色が弱まることで紫色が発色する (Ito ら, 2009 ; Takeda ら, 1985a ; Yoshida ら, 2003, 2009). がく片の組織や細胞由来のプロトプラストの分析によって、細胞内液胞においても同様な作用が働くことで、アジサイの様々な花色が発現すると考えられている (Ito ら, 2009 ; Takeda ら, 1985a ; Yoshida ら, 2003, 2009).

多くのアジサイの花色は栽培する土壌条件によって変化することが知られている (Allen, 1943). アジサイを鉢花として営利生産する上では、花色を安定に発現させることが必要である (万豆・松田, 1972 ; Kodama ら, 2015 ; 松田ら, 1974 ; 長村ら, 1981 ; 南條ら, 1976). これまでに、培養土を組成する素材の種類、培養土の酸度、栽培時のアルミニウムの施与またはリン酸肥料の施与による花色の安定化が試みられている (万豆・松田, 1972 ; 松田ら, 1974 ; 南條ら, 1976 ; 長村ら, 1981). アルミニウムを含まないピートモスを主体とした培養土では赤色の発色が良く、一方アルミニウムを多く含む赤玉土や黒ボク土を主体とした培養土では青色が発色しやすい. また、土壌 pH が低い環境では、pH が高い環境よりもより青みがかった花色を発色するようになる (Allen, 1943 ;

Chenery, 1937). さらに、アルミニウムの施用によって青色を発色するようになる (Allen, 1943 ; Chenery, 1937 ; Ma ら, 2001). 逆にリン酸の施用によって赤色が発色するようになる (松田ら, 1974). この性質を利用して、同じ品種で異なる花色を発色するように生産することも行われている.

栽培条件による花色制御の本質は、土壌中の可溶性アルミニウムの濃度の制御を通じた、青色の発色に必要なアルミニウムの吸収量の制御と考えられている (松田ら, 1974). すなわち花色は、土壌からのアルミニウムイオンの吸収量の違いとがく片液胞へのアルミニウムの蓄積によって変化すると考えられている (Allen, 1932, 1943). 土壌 pH が低い環境では pH が高い環境よりも可溶性アルミニウムイオンの濃度が高くなる. リン酸はアルミニウムを不溶化する働きを持ち、培養土の素材は pH とともに含まれるアルミニウムとリン酸の量が、可溶性アルミニウムの濃度に影響を与える (Allen, 1943 ; 松田ら, 1974). ただし、培養土の pH やアルミニウムおよびリン酸量を同じ条件として栽培しても、花色発現の反応は品種によって異なる場合も多いことから (Allen, 1943 ; 万豆・松田, 1972 ; 松田ら, 1974), より安定的な花色制御の方法が求められている.

本博士論文執筆者は、アジサイの育種に取り組む中で育種母材の選定において、同一品種を同じ培養土および施肥条件で栽培した場合でも、花色が不安定に様々に発現する現象や青色の発色を良好にするためのアルミニウムの施用の有無にかかわらず安定して青色を発色する品種が存在することを見出した. また、培養土条件に関わらず青色あるいは赤色を安定して発色する品種も見出している (Table 1-1-1). これらの品種において花色が安定に発色する原因を明らかにすることで、アジサイの育種や栽培方法の開発に貢献できると考えた. 例えば、発色に関与する要素の中で花色の変化に伴って変化する要素がアルミニウムである場合には、土壌からのアルミニウムの吸収量の違いが関与していると考えられる. また、その要素が 5-O-カフェオイルキナ酸などの有機化合物で

ある場合には、それらの生合成活性が関与していると考えられる。それぞれの品種における化合物の組成に基づくことで、より精緻な栽培条件を設定することができる。

そこで本博士論文研究の第 2 章では、酸性土壌とアルカリ性土壌で栽培した安定発色品種の赤色あるいは青色のがく片と、可変品種の赤色あるいは紫色のがく片に含まれる発色関連成分を比較した。その結果、アルミニウムを含むいずれの発色関連成分の濃度にも、培養土の条件に伴う花色の変化との対応が認められなかった。この結果から、アジサイの花色発現に未知の要素が関与している可能性を考えた。

アジサイの花色発現に関与する新たな要素は、1. アントシアニンとアルミニウム、5-*O*-カフェオイルキナ酸の結合に影響を与える効果を持つ、2. 土壌から供給される要素を含むとともに、その量は土壌の pH に影響される、3. 花色とがく片に含まれる量に相関が認められる、といった特徴を持つと考えた。これらの性質をもつ物質として、リン酸を候補と考えるに至った。第 3 章では、青色と赤色が不安定に発色させる品種間の交配 (Table 1-1-1) で得られた F₂ 集団を材料に用いて、花色とがく片に含まれるリンの含量の関与を解析した。その結果、青色のがく片に含まれるリンの量が少ないこと、さらにリン酸が青色発色に必要なデルフィニジン 3-グルコシド、アルミニウムイオンおよび、5-*O*-カフェオイルキナ酸のキレートを阻害することを見出した。これらの結果に基づいて、リン酸がアジサイの花色発現を制御する要素であることを論ずる。

またアジサイは、夏季の開花時に赤色や青色などの花色を発色した後、緑色に変化し、さらに秋季には緑色に重ねてふたたび赤色、紫色および青紫色を発色する。このアジサイの秋季の花色は秋色と呼ばれている。以下、アジサイの夏季の花色を夏色、秋季の花色を秋色とする。秋色を発色したアジサイは、近年、園芸的価値が高まりつつある。秋色花色の色素は、夏色とは異なるシアニ

ジン系アントシアニンが担い、その発色に 3-O-カフェオイルキナ酸やアルミニウムは関与しないと報告されている (Yoshida ら, 2008). アジサイの秋色花色にも赤色以外の紫色, 青紫色がある (Table 1-1-2). これらの秋色の発色機構を解明することは, 秋色アジサイの多彩な色彩のコントロールを可能にし, 安定生産のための栽培技術の開発に貢献できるものと考えた. 本研究の第 4 章では, 様々な秋色花色を対象に, 発色に関わる要素について調査を行い, 秋色は夏色とは異なる色素の生合成制御機構が機能している一方で, 夏色と共通する要素が発色に関与していることを明らかにした.

第 5 章に総合考察として, 新たなアジサイの花色発現機構を提示した. そのうえで, アジサイの植物学的研究および, 育種や生産における本研究の成果の意義を論じた.

Table 1-1-1 *Hydrangea* cultivars or lines used in this doctoral dissertation.

Stable red cultivars or lines.



Ruby Red



HH9



HH13



HH19

Stable blue cultivars or lines.



Blue Sky



HH11



HH12

Variable-color cultivars or lines.



Frau Yoshiko

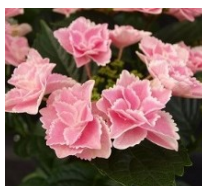


Frau Yoshimi



HH2

Crossing parent of the population used for analysis of relationship between sepal color and phosphorus.



























Kirakiraboshi



Frau Yoshimi

Table 1-1-2 *Hydrangea* cultivars or lines used in this doctoral dissertation.

Autumn color cultivars or lines.				
Summer color				
Autumn color				
	Kirakiraboshi	Jougasaki	Bodensee	Frau Yoshiko
Autumn color cultivars or lines.				
Summer color				
Autumn color				
	Frau Yoshimi	Peach-hime	HH2	HH6
Autumn color cultivars or lines.				
Summer color				
Autumn color				
	HH11	HH12	HH13	HH20

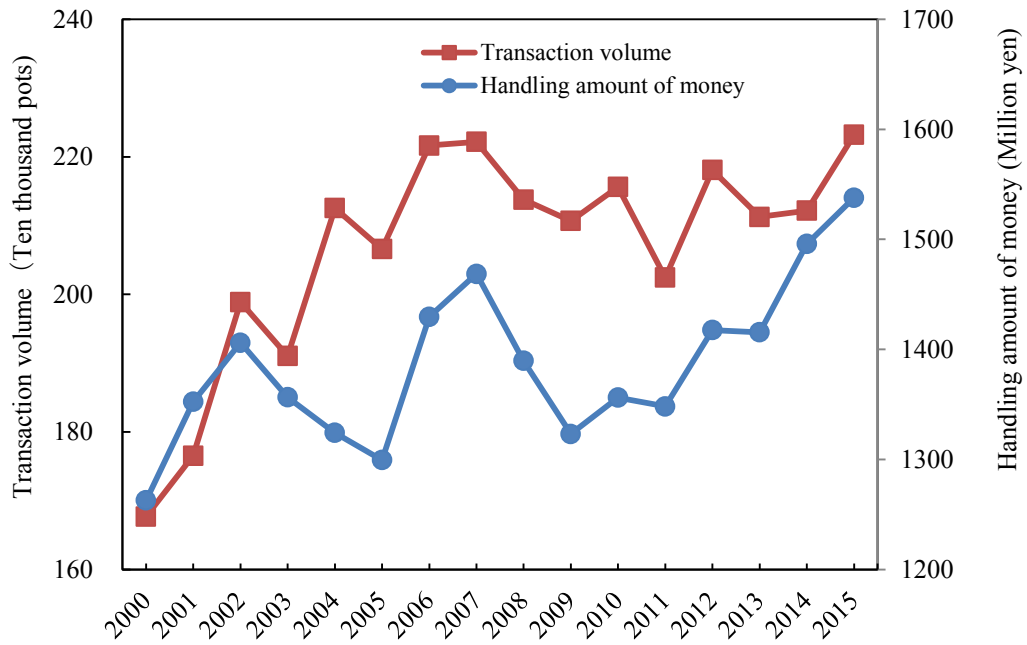


Fig. 1-1 Circulation amount of the potted *Hydrangea* plants. The Japanese flower association statistics report 2016.

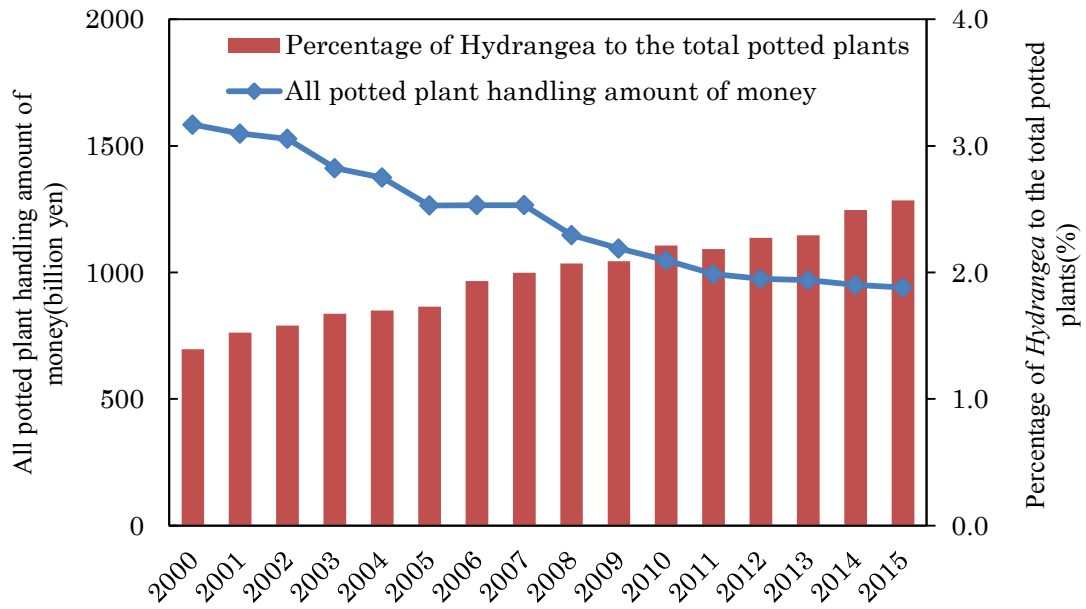


Fig. 1-2 All potted plant handling amount of money and percentage of *Hydrangea* to the total potted plants. Flower auction japan statistics report 2016.



Fig. 1-3 A variety of sepal coloration of *Hydrangea* plants. (A) Pink coloration, 'HH19'. (B) Red coloration, 'Ruby Red'. (C) Purple coloration, 'HH7'. (D) Blue coloration, 'HH17'. (E) White coloration, 'Royal-white'. (F) Green coloration, 'HH6'. (G) Autumn coloration (Red coloration on green coloration), 'HH19'.

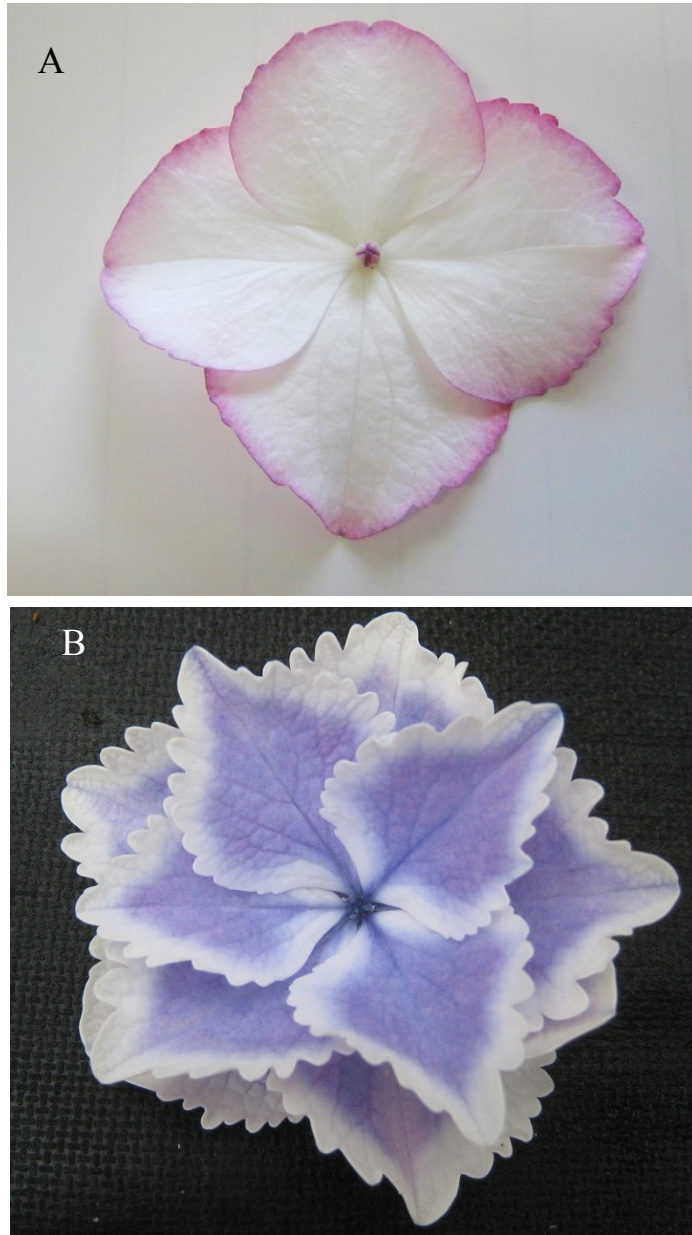
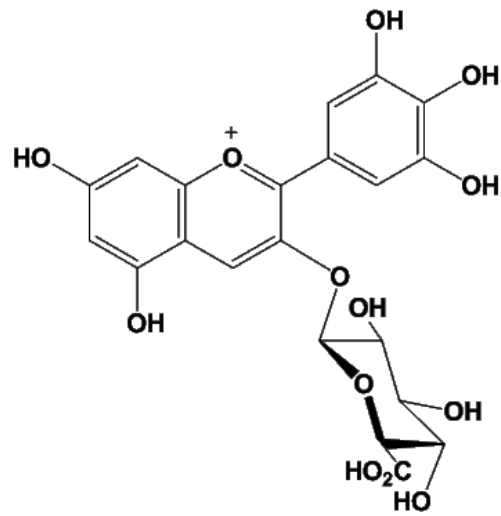


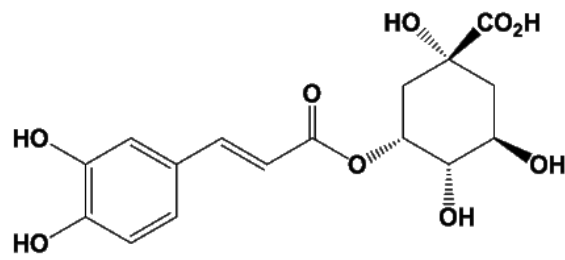
Fig. 1-4 Picotee type flowers of *Hydrangea* plants. (A) Red-edged sepal, (B) white-edged sepal.

A



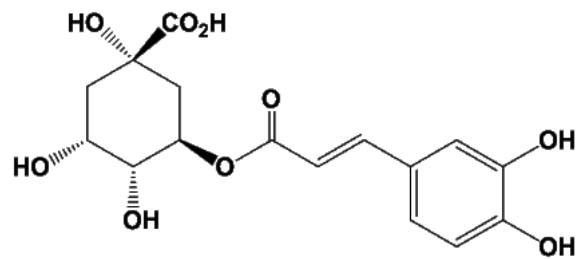
Delphinidin 3-glucoside

B



5-O-caffeoylquinic acid

C



3-O-caffeoylquinic acid

Fig. 1-5 Anthocyanin and co-pigments in *Hydrangea* sepals.

第2章 土壌条件によるアジサイの花色の可変性の原因となる がく片内の花色関連成分の解析

1. 諸言

アジサイの夏色の花色は、ピンク色、赤色、紫色、青色、白色等幅広い (Fig. 1-3A~E). アジサイの花色は栽培する土壌条件によって変化することが知られている (Allen, 1943). アジサイは土壌 pH が低い環境で生育した場合には、高い環境で生育した場合よりも、青みがかった花色を発色するようになる (Allen, 1943 ; Chenery, 1937). この性質は鉢花として営利生産する上で問題になっている. いくつかの品種ではこの性質を利用して、同じ品種に異なる花色を発色させることで、生産物の多様化を図っている. 本章では、アジサイを鉢花として営利生産する上で重要な、花色を安定して発現させる技術開発を目的に、アジサイの花色の可変性に関わる要素を見出す研究を行った.

アジサイの夏色の花色を担うのは、いずれも同じアントシアニン色素のデルフィニジン 3-グルコサイドである (Asen・Siegelman, 1957 ; Asen ら, 1956 ; Hayashi・Abe, 1953 ; Lawrence ら, 1938). 花色の発色にはアントシアニンに加え、アントシアニンと相互作用する性質を持つアルミニウムイオンと補助色素の 5-O-カフェオイルキナ酸および、3-O-カフェオイルキナ酸の含量、さらには、これらの化合物溶液の pH が関与している (Kondo ら, 2005 ; Oyama ら, 2015 ; Takeda ら, 1985a, 1985b, 1990). 赤色は液胞液の pH が 3 以下の条件で発色する (Yoshida ら, 2003). 一方青色は液胞液の pH が 4 以上の条件で、アントシアニンがアルミニウムと 5-O-カフェオイルキナ酸とキレート結合することで発色する (Ito ら, 2009 ; Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, b, 1990 ; Yoshida ら, 2003). これらの要素の不足や、5-O-カフェオイルキナ酸の類縁体である 3-O-カ

フェオイルキナ酸によって、このキレート結合が出来なくなると紫色を発色する (Ito ら, 2009 ; Takeda ら, 1985a ; Yoshida ら, 2003, 2009).

これまでに、培養土を構成する素材の種類や培養土の酸度の調製、栽培時のアルミニウムの施与またはアルミニウムの不溶化を目的にリン酸肥料の施与による花色の安定化が試みられている (万豆ら, 1972 ; 松田ら, 1974 ; 南條ら 1976 ; 長村ら, 1981). これらの試みの本質は、可溶性アルミニウムの濃度の制御と考えられている。それによってアジサイに吸収されて、がく片の着色細胞の液胞に蓄積するアルミニウム濃度が増加し、色彩が増加すると理解されている。ただし、花色発現の反応は品種によって異なる場合も多いことから (Allen, 1943 ; 万豆・松田, 1972 ; 松田ら, 1974), より安定的な花色制御の方法が求められている。そのためのがく片において花色の可変性に寄与する要素を明らかにすることで、花色の安定的な制御を行うための知見が得られると考えた。

執筆者は、これまでアジサイの育種を行う過程で、培養土条件に関わらず青色あるいは赤色を安定して発色する品種を見出している (Table 1-1-1). また、土壌条件によって花色が青色から紫色に変化する品種も見出している (Table 1-1-1). 酸性土壌とアルカリ性土壌で栽培した可変品種の赤色あるいは紫色のがく片に含まれる発色関連成分を比較することで、土壌条件によるアジサイの花色の可変性の原因となる要素が理解できると考えた。その要素が安定発色品種の赤色あるいは青色のがく片においては土壌条件によって変化しないこと、および色彩との関連性を確認することで、花色の安定性に寄与していることを示すことができると考えた。

Ito ら (2009) は、がく片の着色細胞から調製したプロトプラストを用いて、液胞の pH と発色関連成分について精密な分析を行った。この方法は、がく片搾汁液あるいはがく片全体を用いた pH と発色関連成分の分析よりも、アントシアニンが蓄積している環境を正確に測定できると考えられる。しかし、本研究に

においては、多くの品種の比較を行うため、簡易な方法であるがく片搾汁液あるいはがく片全体を用いた分析方法を採用した。予想に反して、アルミニウムを含むいずれの発色関連成分の含量にも、培養土の条件に伴う花色の変化との対応が認められなかった。

2. 材料および方法

1) 植物材料

Hydrangea macrophylla の 4 品種および、栃木県農業試験場所有系統 (HH 系統) の 6 系統の合計 10 種の品種・系統を供試した (Table 1-1-1)。予備調査において分類した赤色安定品種は ‘Ruby Red’ (イッセイ花園, 栃木県日光市), ‘HH9’, ‘HH13’, ‘HH19’ の 4 種の品種・系統, 青色安定品種は ‘Bule Sky’ (東京都農林総合研究センターから導入), ‘HH11’, ‘HH12’ の 3 種の品種・系統, 可変品種は ‘Frau Yoshiko’ (海老原園芸, 栃木県真岡市), ‘Frau Yoshimi’ (海老原園芸, 栃木県真岡市), ‘HH2’ の 3 種の品種・系統である。

2) 栽培方法

2013 年 6 月に挿し木し, 7 月に赤玉土 2 : ピートモス 1 : 腐葉土 1 の培養土を用いて 7.5 cm ポットに鉢上げし, ガラス温室で栽培した。2014 年 2 月に Table 2-1 に示したアルカリ性 (赤色用) または酸性 (青色用) に配合した培養土を用いて, 12 cm ポットへ定植し, ガラス温室で栽培した。温度条件は, 鉢上げ後の育苗時が最低温度 3°C, 換気温度 18°C, 定植から開花までが最低温度 15°C, 換気温度 22°C とした。定植後は液体肥料を施用した。アルカリ性培養土の条件は, Peters 15-30-15 (HYPONeX JAPAN Co. Ltd., Osaka, Japan) の 1,500 倍液, 酸性培養土の条件は, Peters 20-10-20 の 2,500 倍液を 1 週間に 2 回与えた。また, 酸性培養土条件では定植 1 か月後から 10 日おきに硫酸アルミニウム溶液を 300 mL・

pot¹の量を3回灌注した。開花した5月に装飾花がく片を採取し、分析用の材料とした。

3) がく片の色彩, 吸収スペクトルの測定および顕微鏡観察

生がく片の色差値 (L*, a*, b*) は色彩色差計 (CR-200, Konica Minolta Co. Ltd., Tokyo, Japan) で測定した。また, 吸収スペクトルは分光光度計 (UV2450, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) で 400 nm から 700 nm までの吸光度を測定した。生がく片の着色細胞を CCD カメラを装着した顕微鏡 (VH-8000, Keyence Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いて観察した。

4) がく片の pH 測定

生がく片 4 枚を 1.5 mL 試験管に詰め, がく片のみを潰して得られた搾汁液を pH メーター (B-212, Horiba Co. Ltd., Tokyo, Japan) で測定した。

5) がく片内成分の HPLC 分析

がく片 700 mg を 2 mL の 10%酢酸で 24 時間抽出し, さらに 1 mL の 10%酢酸で 3 時間抽出した。抽出液に含まれるアントシアニン, 3-*O*-カフェオイルキナ酸および, 5-*O*-カフェオイルキナ酸について HPLC (Agilent1100 system (Agilent, USA) に Agilent 1200 のポンプと検出器を組み合わせた) を用いて測定した。測定条件は ODS-2 カラム (250 mm × 4.6 mm φ ; GL Sciences, Tokyo, Japan) , 流速 : 0.8 mL・min⁻¹, カラム温度 : 40°C とした。溶出溶媒は, 溶媒 A (1.5%リン酸) と溶媒 B (1.5%リン酸, 20%酢酸, 25%アセトニトリル) の混合比率を 40 分で A が 80% - 0%, B が 20% - 100%となるリニアグラジエントで混合した。

アントシアニン, 3-*O*-カフェオイルキナ酸および, 5-*O*-カフェオイルキナ酸の標準物質をフナコシ (Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan) から購入し, HPLC の保

持時間とフォトダイオードアレイ検出器を用いた吸収スペクトルの比較によって同定した。アントシアニンは 530 nm, 3-O-カフェオイルキナ酸および 5-O-カフェオイルキナ酸は 330 nm の吸光度に基づいて定量した。

6) アルミニウム分析

生がく片を 85°C で 12 時間乾燥させた後, 50 mg DW (乾物重) を分解用サンプル管に量りとった。そこに硝酸 2 mL を入れ, 電子レンジで湿式灰化した。分解液を試験管に移し, 1 M 硝酸を 10 mL 加え希釈したものを ICP 発光分析装置 (Varian 820-MS, Carifornia, USA) により分析した。

7) 統計分析

得られたデータは, 分散分析および Tukey の多重比較検定を行った。

3. 結果

1) がく片の色彩

‘Ruby Red’, ‘HH9’, ‘HH13’, ‘HH19’ の 4 品種は, アルカリ性培養土と酸性培養土, どちらで栽培した場合においても赤色を発色した (Table 2-2)。これらの品種の色相角は, 培養土条件に関わらず 336.8°–359.5°の赤色の色彩領域に分布した。個々の品種で比較すると, アルカリ性培養土で栽培した個体に比べて酸性培養土で栽培した個体は a*値が 3–14, b*値が 4–11 減少するとともに, 色相角が 4°–11°減少し, 青色を示す 270° に近づいた。

‘Bule Sky’, ‘HH11’, ‘HH12’ の 3 品種は, どちらの培養土においても青色を発色した。これらの品種の色相角は, 培養土条件に関わらず, 288.0°–303.7°の青色の色彩領域に分布した。個々の品種で比較すると, アルカリ性培養土で栽培した個体に比べて酸性培養土で栽培した個体は, 色相角と a*値に一定

の変化は認められなかった一方で、 b^* 値が 2-6 減少し、青色を示す 270° に近づいた。

‘Frau Yoshiko’，‘Frau Yoshimi’，‘HH2’の3品種は培養土の条件によって発色が大きく変化した品種であり、アルカリ性培養土で栽培した場合には赤色，酸性培養土で栽培した場合には紫色を発色した。これらの品種の色相角は，アルカリ性培養土で栽培した場合は 344.7° - 357.2° ，酸性培養土で栽培した場合は 307.2° - 314.7° に分布した。個々の品種で比較すると，アルカリ性培養土で栽培した個体に比べて酸性培養土で栽培した個体は， a^* 値が 13-18 と b^* 値が 14-18 減少するとともに，色相角が 30° - 45° 減少し，青色を示す 270° に近づいた。

2) がく片細胞の構成

安定赤色品種である‘HH13’，安定青色品種である‘HH11’，および花色が変化しやすい品種である‘Frau Yoshiko’のがく片は，いずれも培養土条件とそれに伴う色彩の変化に関わらず，均一な色彩の細胞で構成されていた (Fig. 2-1)。

3) がく片の吸収スペクトル

安定赤色品種である‘HH13’のがく片の吸収スペクトルの極大吸収波長は，アルカリ性培養土で栽培した場合は 535 nm，酸性培養土で栽培した場合は 544 nm だった。アルカリ性培養土で栽培したがく片と比較して酸性培養土で栽培したがく片には，400 nm-600 nm の領域の吸光度の減少と 600 nm-700 nm の領域の吸光度の増加が認められた (Fig. 2-2)。

安定青色品種である‘HH11’のがく片の吸収スペクトルの極大吸収波長は，アルカリ性培養土で栽培した場合は 582 nm，酸性培養土で栽培した場合は 584 nm を示した。異なる培養土条件で栽培したがく片の間には，吸収スペクトルの

波形に顕著な違いは認められなかった (Fig. 2-2) .

花色が変化しやすい品種である ‘Frau Yoshiko’ のがく片の吸収スペクトルの極大吸収波長は、アルカリ性培養土で栽培した場合は 543 nm, 酸性培養土で栽培した場合は 576 nm を示した. さらに, アルカリ性培養土で栽培したのがく片と比較して酸性培養土で栽培したのがく片には, 580 nm–700 nm の領域における吸光度の著しい増加が認められた (Fig. 2-2) .

4) がく片 pH

培養土条件に関わらず, 安定赤色品種 (‘Ruby Red’ , ‘HH9’ , ‘HH13’ , ‘HH19’) の pH は 3.9–4.3 に, 安定青色品種 (‘Bule Sky’ , ‘HH11’ , ‘HH12’) の pH は, 4.0–4.5 に分布した (Table 2-2) . 花色が変化しやすい品種 (‘Frau Yoshiko’ , ‘Frau Yoshimi’ , ‘HH2’) の pH は 4.1–4.3 の範囲に分布した. がく片の pH には, 色彩との関連は認められなかった.

それぞれの品種におけるアルカリ性培養土で栽培した個体と, 酸性培養土で栽培した個体のがく片の pH の違いについては, いずれの品種群の中においても, 共通する違いは認められなかった. がく片の pH には, 色彩の安定性・可変性との関連は認められなかった.

5) アントシアニン含量

すべての個体におけるがく片の主要色素は, デルフィニジン 3-グルコシドであった. アントシアニンの含量は, 培養土条件に関わらず安定赤色品種では 0.16–0.59 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に, 安定青色品種では 0.08–0.35 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に, 花色が変化しやすい品種では 0.25–0.74 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した (Fig. 2-3-1A) . アントシアニンの含量には色彩との相関は認められなかった.

それぞれの品種におけるアルカリ性培養土で栽培した個体と, 酸性培養土で

栽培した個体のがく片のアントシアニンの含量については、花色が変化しやすい品種である‘HH2’以外には、いずれの品種においても、有意な違いは認められなかった。アントシアニンの含量には色彩の安定性・可変性と相関は認められなかった。

6) 5-O-カフェオイルキナ酸含量

5-O-カフェオイルキナ酸の含量は、培養土条件に関わらず安定赤色品種においては $1.0\text{--}3.5 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に、安定青色品種においては $2.5\text{--}7.0 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に、花色が変化しやすい品種においては $1.5\text{--}2.7 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した (Fig. 2-3-1B) 。 5-O-カフェオイルキナ酸の含量は、品種群の間に明確な有意差は認められないものの、安定青色品種の方が他の品種より高い傾向があった。

それぞれの品種におけるアルカリ性培養土で栽培した個体と、酸性培養土で栽培した個体のがく片の 5-O-カフェオイルキナ酸の含量の違いについては、いずれの品種においても、有意な違いは認められなかった。5-O-カフェオイルキナ酸の含量には、色彩の安定性・可変性との関連は認められなかった。

7) 3-O-カフェオイルキナ酸含量

3-O-カフェオイルキナ酸の含量は、培養土条件に関わらず安定赤色品種においては $25.0\text{--}38.0 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に、安定青色品種においては $8.0\text{--}11.0 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に、花色が変化しやすい品種においては $22.0\text{--}38.0 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した (Fig. 2-3-2C) 。 安定青色品種群における 3-O-カフェオイルキナ酸の含量は、他の品種群の含量よりも有意に低かった。

アルカリ性培養土で栽培した個体と、酸性培養土で栽培した個体のがく片の 3-O-カフェオイルキナ酸の含量の違いについては、安定赤色品種である‘HH19’以外には、いずれの品種においても、有意な違いは認められなかった。3-O-カフ

ェオイルキナ酸の含量には、色彩の安定性・可変性との関連は認められなかった。

8) アルミニウム含量

アルミニウムの含量は、培養土条件に関わらず安定赤色品種においては 7.0–13.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に、安定赤青色品種においては 8.0–20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に、花色が変化しやすい品種においては 8.0–10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した (Fig. 2-3-2D)。

アルミニウムの含量は、品種群の間に明確な有意差は認められないものの、安定青色品種の方が他の品種より高い傾向があった。

アルカリ性培養土で栽培した個体と、酸性培養土で栽培した個体のがく片のアルミニウムの含量の違いについては、いずれの品種においても、有意な違いは認められなかった。アルミニウムの含量には色彩の安定性との明確な相関は認められなかった。

4. 考察

培養土条件に関わらず安定的に赤色あるいは青色を発色する品種においても、アルカリ性培養土で栽培した個体に比べて、酸性培養土で栽培した個体のがく片の色相角が減少した (Table 2-2)。さらに、がく片の吸収スペクトルも極大吸収波長が長波長側への移動が認められたことに加え、安定赤色品種では長波長領域の吸光度の増加が認められた (Fig. 2-2)。いずれのデータも、酸性培養土で栽培した個体のがく片はアルカリ性培養土で栽培した個体に比べて、青色の色彩が強いことを示している。アジサイではほとんどの品種が、程度の差はあっても、花の色は土壌条件に影響を受けていると思われる。この時、花色が変化しやすい品種のがく片で起こっている花色発現に関する要素の変化の少なくとも一部は、安定的に花色を発色する品種のがく片においても起こっていると

考えられる。

今回執筆者が調べた品種の着色細胞は、ほぼ均一な色彩の細胞で構成されていた (Fig. 2-1) . 土壌条件による発色の変化の原因となる要素の変化は、全ての着色細胞で生じていると考えられる。これまで肉眼による観察で発色安定品種と分類していた品種についても、土壌条件が色彩に与える影響を色彩色差計および分光光度計を用いて調査した結果、安定的に花色を発色する品種のがく片においても、わずかな変化が起こっていることが示された。

花色の発現に関する要素として、がく片の pH, アントシアニン, 5-O-カフェオイルキナ酸, 3-O-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量を調べた (Table 2-2, Fig. 2-3-1A, B, Fig. 2-3-2C, D) . 花色が変化しやすい品種である ‘HH2’ のアントシアニン含量および、赤色安定品種である ‘HH19’ の 3-O-カフェオイルキナ酸含量以外には、全ての要素に関して、アルカリ性培養土で栽培した個体と酸性培養土で栽培した個体の違いについて、全ての品種に有意な違いは認められなかった。

これまで土壌条件の違いによるアジサイの発色の変化は、土壌中のアルミニウムの溶解性の違いによるがく片へのアルミニウムの吸収・蓄積によって生じると考えられてきた (Allen, 1932, 1943 ; 岡田・船木, 1967) . がく片の組織や細胞由来のプロトプラストの分析によって、細胞内液胞のアルミニウムイオン含量がアジサイの様々な花色発現に関与していることが示されている (Ito ら, 2009 ; Takeda ら, 1985a ; Yoshida ら, 2003, 2009) .

一方南條ら (1976) は、花色が変化しやすい ‘Frambeau’ を材料に、培養土の pH を下げ、かつ硫酸アルミニウムの添加量を増やして花色を赤色から紫色に変化させた場合でも、花部のアルミニウム含量は増加していなかったことを報告している。今回の異なる発色安定性を持つ 10 品種・系統による土壌条件の違いと発色の変化においても、南條ら (1976) と同様の結果を得た (Fig. 2-3-2D) .

本研究によって、こういった品種がより普遍的に存在することが示された。

Takeda ら (1985b) は、アルミニウムはアントシアニンと同程度の含量でも青色を発色しうることを示している。本研究で調べた品種においては、アルミニウムはアントシアニンの 10 倍以上の含量でがく片から検出された (Fig. 2-3-2D)。これらの品種のがく片におけるアルミニウムの局在性は不明である。それでもアントシアニンが存在する着色細胞の液胞におけるアルミニウムの局在性が、土壌条件によって著しく変化することは困難と考えられる。以上のことから、我々は土壌条件の違いによるアジサイの発色が変わる主要な原因を、アルミニウム以外の要素に求める必要があると考えるに至った。

本研究で分析したすべての成分の中で 3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量だけが、安定青色品種群において他の品種群より低かった (Fig. 2-3-2C)。がく片の pH、アルミニウムイオンおよび 5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は有意な差は認められないが、安定青色品種の方が他の品種より高い傾向があった (Table 2-2, Fig. 2-3-1B, Fig. 2-3-2D)。Yoshida (2003) は青色品種のがく片は赤色品種に比べて液胞の pH が高いことを報告している。一方で、Toyama-Kato ら (2003) は青色品種と赤色品種のがく片搾汁液の pH はいずれも 4 程度であると報告している。したがって、搾汁液の pH が液胞の pH を正しく反映していない可能性があることから、今後の研究において、液胞の pH と花色の関連性を明らかにする必要がある。

Takeda ら (1985a) は、青色品種のがく片は赤色品種に比べて、アントシアニンの含量に違いは無いこと、アルミニウムと 5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量が高いこと、3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量が低いことを報告している。また、Ito ら (2009) は、青色品種と赤色品種の各 1 品種について、がく片から調製したプロトプラストを用いて、青色の細胞のアルミニウムイオン濃度が赤色の細胞より高いことを報告している。前述で示したように、本研究の結果では 3-*O*-カ

フェオイルキナ酸だけが、花色と有意な差が認められた (Fig. 2-3-2C).

武田 (2013) は、3-*O*-カフェオイルキナ酸は青色の発色に必要な 5-*O*-カフェオイルキナ酸とアントシアニンおよびアルミニウムイオンとのキレート構造を競争的に阻害する効果を持つと考察し、青色の発現には 3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量や割合が低いことが必要になることを述べている。本研究で用いた花色が変化しやすい品種は、青色品種よりも 3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量が高い品種であり、酸性培養土で栽培した場合でも紫色であり、青色品種のような青色は発現しなかった (Table 2-2)。このことから 3-*O*-カフェオイルキナ酸がアジサイの品種間の発色の違いの原因となる要素であることが支持される。

本研究においても、青色品種においてアルミニウムと 5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量が高い傾向が認められた。ただし、一部の青色品種ではこれらの含量は赤色品種より低かった。これは、青色の発色に有利な性質として、青色品種の育種の過程で、アルミニウムと 5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量が高いものが選抜されているものと推測される。

Table 2-1. Components of alkaline and acid soils and fertilizers for cultivation of *Hydrangea*

		Alkaline soil		Acid soil	
Soil composition (v/v)	Akadama soil	35%	Akadama soil	50%	
	PRO-MIX BX ^z	35%	Peatmoss	30%	
	Leaf mold	20%	Leaf mold	10%	
	Pearlite	10%	Chaff mold	10%	
Pre-planting fertilizer	Magnesium multi-phosphate	3 g·L ⁻¹	Potassium sulfate	2 g·L ⁻¹	
	Fused phosphate	2 g·L ⁻¹	Fused phosphate	1 g·L ⁻¹	
	Badguano	1 g·L ⁻¹	Superphosphate	0.5 g·L ⁻¹	
	Maganp II ^z	1 g·L ⁻¹	NK ECOLONG 2038-100 ^z	2 g·L ⁻¹	
	LONG413-70 ^z	2 g·L ⁻¹			
pH ^y	6.5		5.5		
Fertilizer ^x	Peters 15-30-15, diluted 1500×		Peters 20-10-20, diluted 2500×		
			0.2% aluminum sulfate solution ^w		





^z PRO-MIX BX (Peatmoss mix) is produced by Premier Tech Ltd., Rivière-du-Loup QC Canada; Maganp II is produced by HYPONEX JAPAN Co. Ltd., Osaka, Japan; LONG 413-70 and NK ECOLONG are produced by JCAM AGRIC Co. Ltd., Tokyo, Japan.





^y pH was measured in soil mixed with distilled water (1: 10); the mixture was shaken for 30 min before the measurement.


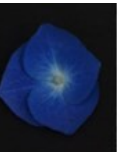




^x Each fertilizer was applied twice a week.







^w Aluminum sulfate solution (0.2%, 300 mL) was injected 10, 20, and 30 days after planting.

Table 2-2. Images, chromatic values, and pH of the sepals of *Hydrangea* grown in alkaline and acid soils

	Ruby Red		HH9	
	Alkaline soil	Acid soil	Alkaline soil	Acid soil
Sepal color				
L*	50.0 ± 3.7	37.2 ± 3.1	39.6 ± 2.7	36.6 ± 1.4
a*	42.6 ± 1.7	39.0 ± 1.0	41.4 ± 1.3	35.1 ± 3.3
b*	-1.5 ± 3.5	-8.9 ± 1.1	-10.1 ± 1.5	-15.1 ± 1.8
Hue-angle (°)	358.0	347.2	346.3	336.8
pH	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.4 ± 0.1

	HH13		HH19	
	Alkaline soil	Acid soil	Alkaline soil	Acid soil
Sepal color				
L*	46.3 ± 2.3	44.1 ± 2.3	60.6 ± 2.3	46.6 ± 1.3
a*	49.1 ± 0.5	35.8 ± 1.8	38.5 ± 2.3	47.4 ± 1.9
b*	-0.4 ± 0.9	-14.1 ± 1.4	-0.8 ± 0.9	-4.6 ± 1.0
Hue-angle (°)	359.5	338.5	358.9	354.4
pH	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.0	4.3 ± 0.1	4.0 ± 0.0

	Blue Sky		HH11		HH12	
	Alkaline soil	Acid soil	Alkaline soil	Acid soil	Alkaline soil	Acid soil
Sepal color						
L*	37.4 ± 1.6	35.8 ± 2.1	49.5 ± 1.7	44.7 ± 1.4	58.9 ± 0.8	56.1 ± 0.3
a*	25.6 ± 2.8	24.9 ± 1.5	11.5 ± 0.7	15.2 ± 1.7	9.3 ± 0.1	11.4 ± 0.7
b*	-38.3 ± 1.0	-44.3 ± 1.0	-35.1 ± 0.3	-37.5 ± 0.5	-28.5 ± 0.8	-32.7 ± 0.4
Hue-angle (°)	303.7	299.3	288.1	292.1	288.0	289.2
pH	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.0	4.3 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.3 ± 0.1

	Frau Yoshiko		Frau Yoshimi		HH2	
	Alkaline soil	Acid soil	Alkaline soil	Acid soil	Alkaline soil	Acid soil
Sepal color						
L*	63.5 ± 2.9	50.7 ± 1.7	44.5 ± 1.0	30.3 ± 0.6	52.2 ± 4.8	47.6 ± 0.6
a*	36.0 ± 3.3	22.7 ± 1.0	46.4 ± 1.2	28.0 ± 0.1	37.5 ± 2.8	27.0 ± 2.0
b*	-5.2 ± 0.6	-29.7 ± 1.5	-2.3 ± 0.8	-30.9 ± 2.3	-10.2 ± 0.6	-27.3 ± 1.9
Hue-angle (°)	351.7	307.2	357.2	312.2	344.7	314.7
pH	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1

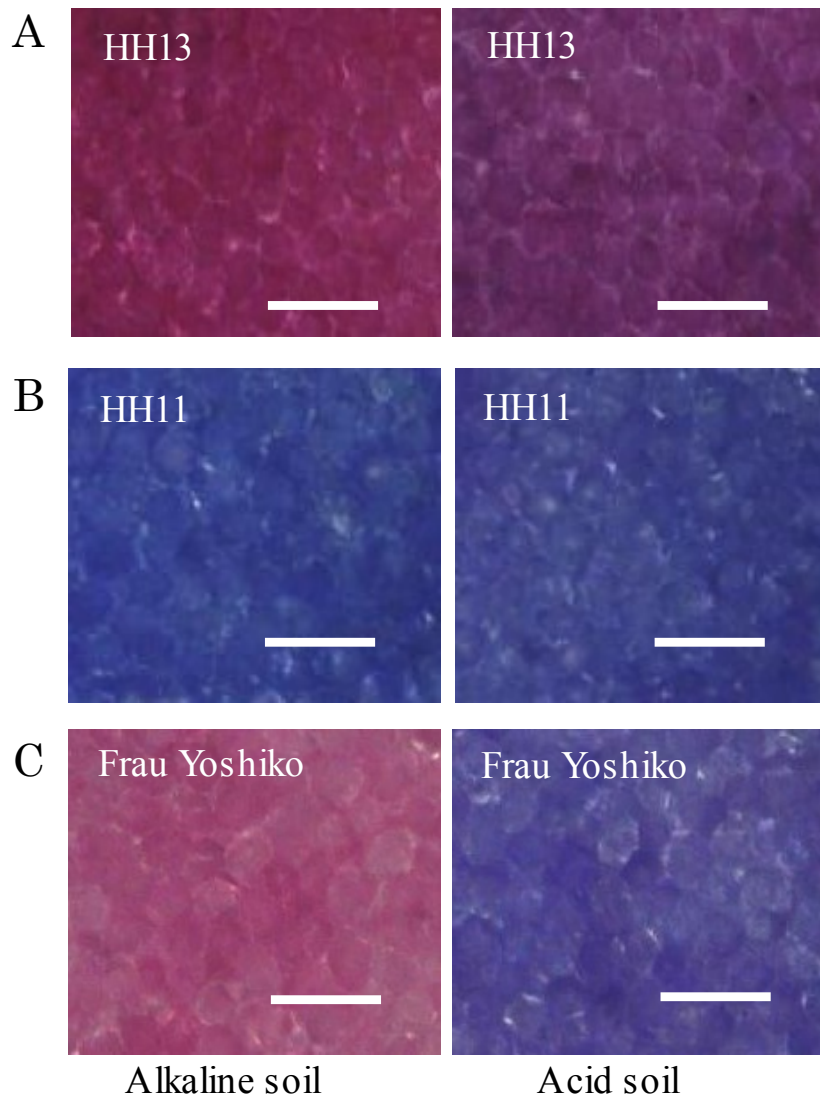


Fig. 2-1. Microscopic images of sepal cells. (A) Stable red line 'HH13'. (B) Stable blue line 'HH11'. (C) Variable-color cultivar 'Frau Yoshiko'. Bars: 100 μ m.

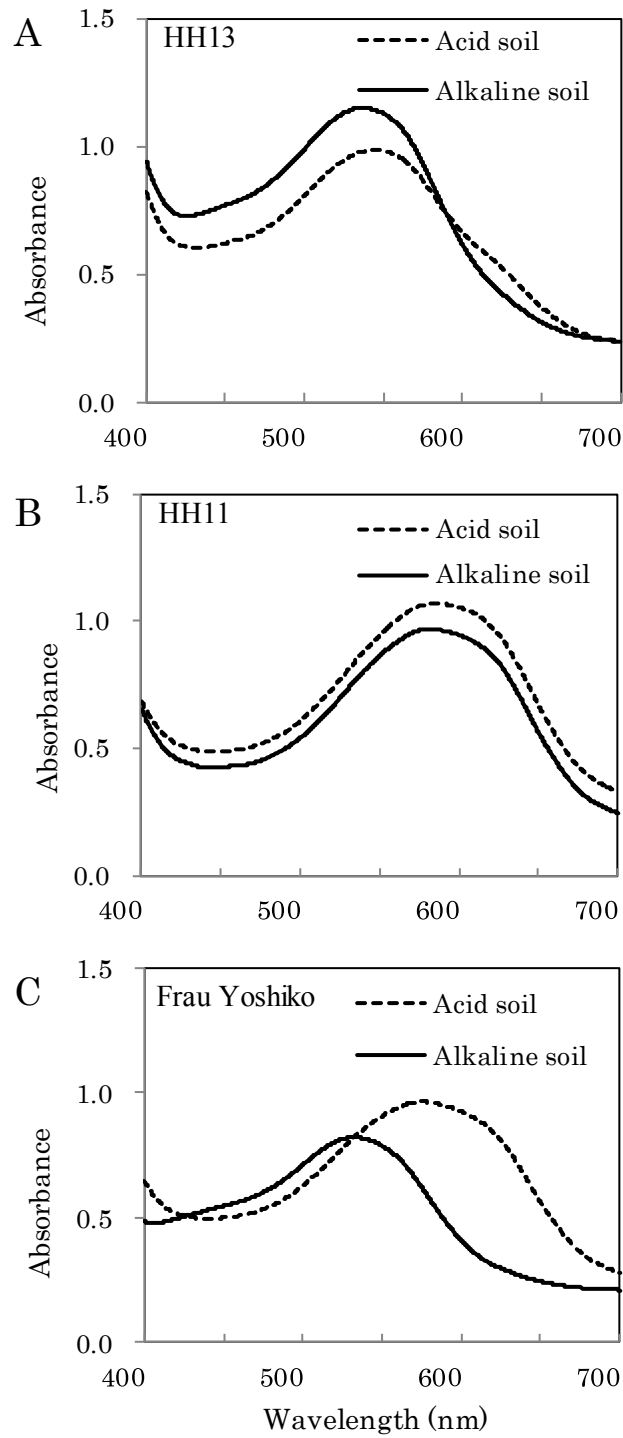


Fig. 2-2. Sepal absorption spectra. (A) Stable red line 'HH13'. (B) Stable blue line 'HH11'. (C) Variable-color cultivar 'Frau Yoshiko'.

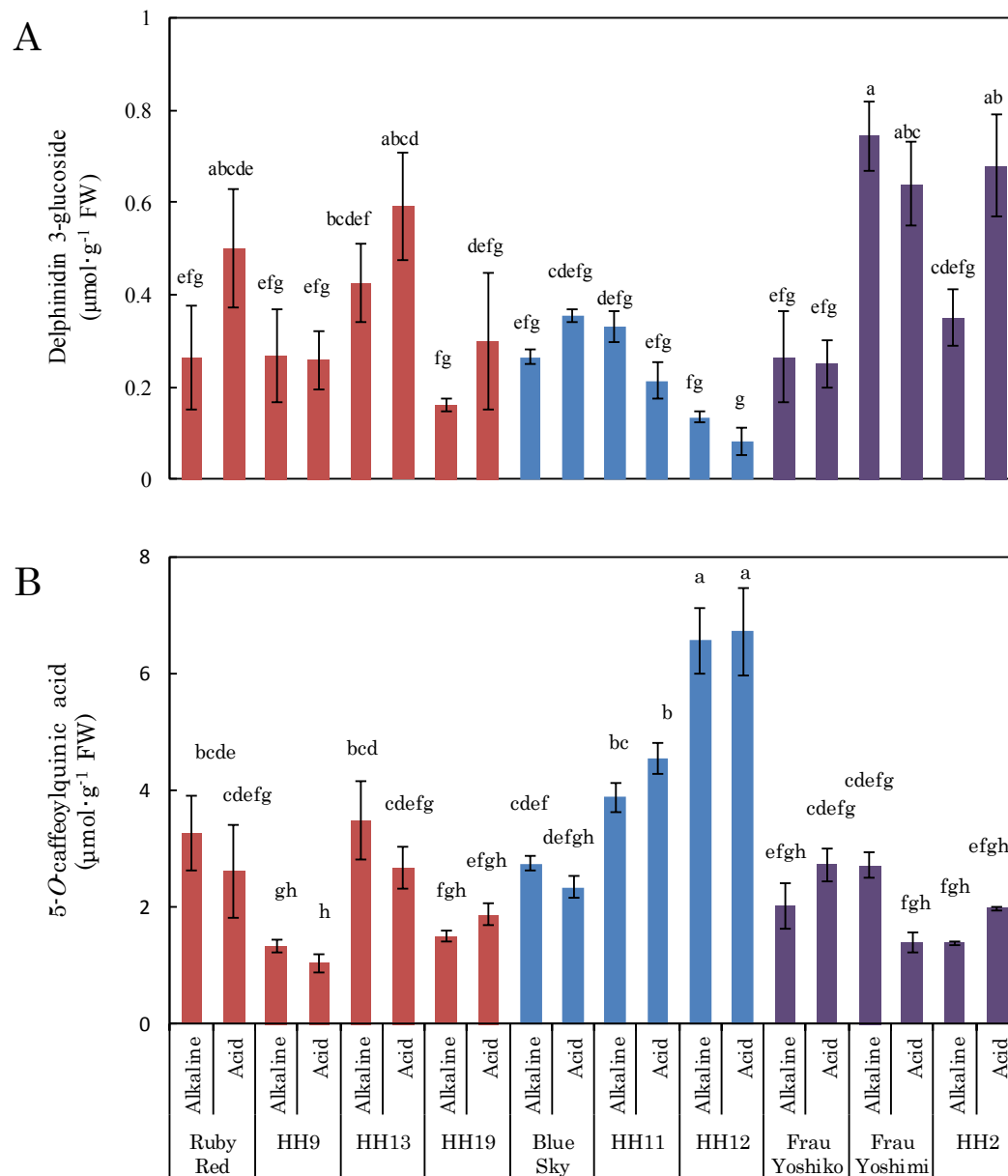


Fig.2-3-1 Contents of coloration-related components in *Hydrangea* sepals. (A) Delphinidin 3-glucoside, (B) 5-O-caffeoylquinic acid. Red bars, stable red cultivars or lines; blue bars, stable blue cultivars or lines; purple bars, variable-color cultivars or lines. For each cultivar, data for plants cultivated in alkaline and acid soil are shown. Values are the means \pm SD (n=3); different letters indicate significant differences ($P < 0.01$ by Tukey's test).

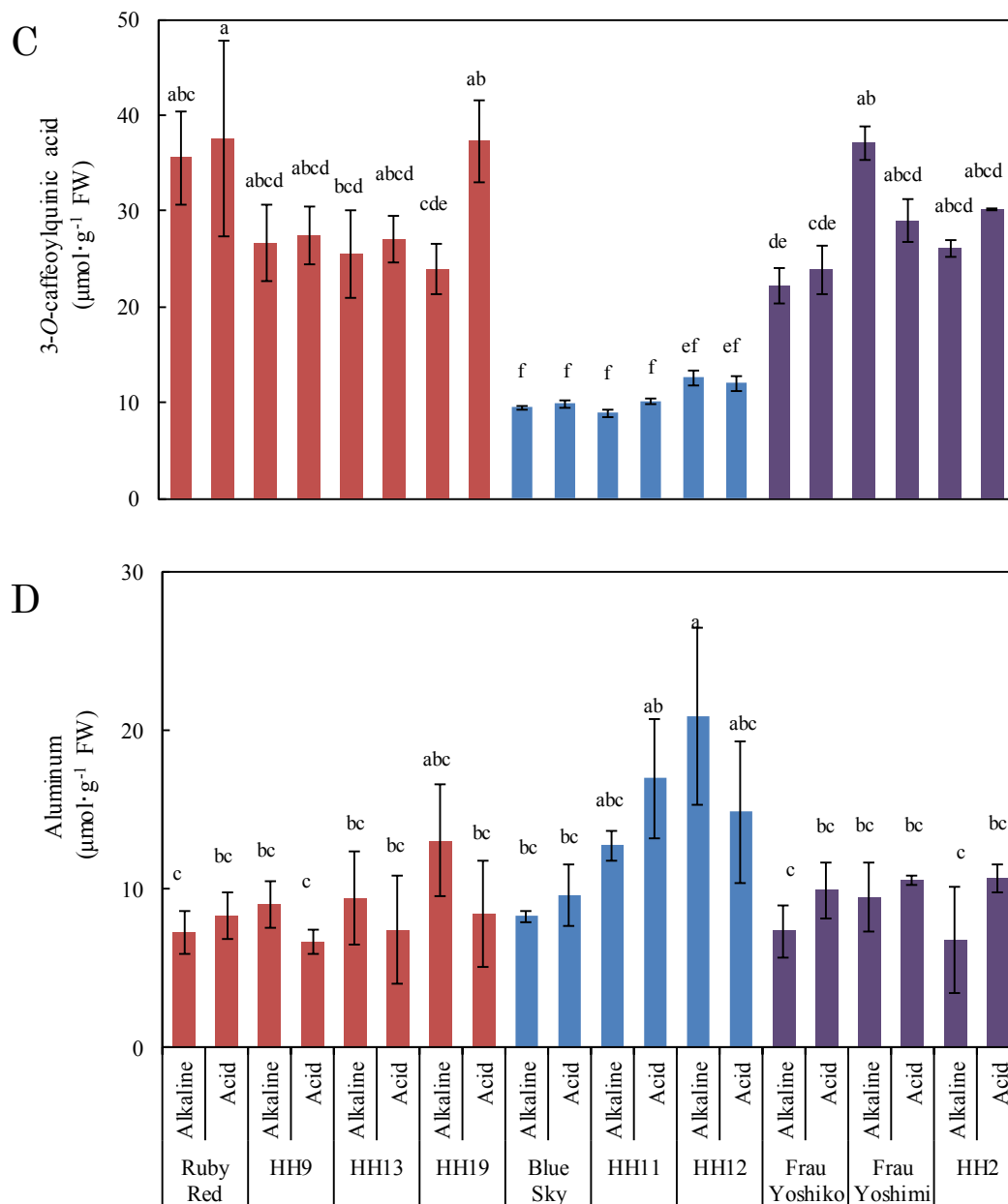


Fig.2-3-2 Contents of coloration-related components in *Hydrangea* sepals. (C) 3-O-caffeoylquinic acid, (D) Aluminum. Red bars, stable red cultivars; blue bars, stable blue cultivars or lines; purple bars: variable-color cultivars or lines. For each cultivar or line, data for plants cultivated in alkaline and acid soil are shown. Values are the means \pm SD (n=3); different letters indicate significant differences ($P < 0.01$ by Tukey's test).

第3章 アジサイの花色発現におけるリン酸の関与

1. 諸言

第2章においては、*Hydrangea macrophylla* の発色発現の安定性および可変性をもたらす原因を明らかにするために、10個の品種あるいは系統について、酸性土壌とアルカリ性土壌で栽培した安定発色品種の赤色あるいは青色のがく片と、可変品種の赤色あるいは紫色のがく片に含まれる発色関連成分を比較した。花の色彩と発色の安定性、発色関連成分であるアントシアニン、アルミニウム、3-O-カフェオイルキナ酸および5-O-カフェオイルキナ酸のがく片に含まれる量およびがく片のpHとの関係を調査した結果、アルミニウムを含むいずれの発色関連成分の濃度にも、培養土の条件に伴う花色の変化との対応が認められなかった (Kodama ら, 2016)。この現象は別の1つの品種についても報告されている (南條ら, 1976)。執筆者はアジサイの花色の可変性には、ここで調査した発色関連成分以外の要素が関与していると考えに至った。

アジサイの花色の可変性に関与する新たな要素は、1. アントシアニンとアルミニウム、5-O-カフェオイルキナ酸の結合に影響を与える効果を持つ、2. 土壌から供給される要素を含むとともに、その量は土壌のpHに影響される、3. 花色とがく片に含まれる量に相関が認められる、といった性質を持つと考えた。アルミニウムはアントシアニンや5-O-カフェオイルキナ酸、3-O-カフェオイルキナ酸以外にも、クエン酸を始めとする有機酸やリン酸など様々な化合物にキレート結合する (Ma ら, 1997 ; Pierre・Stuart, 1933 ; Wright, 1937)。さらに吸収されたリン酸は、細胞の中でアルミニウムを不溶化すると考えられている (岡田・大川, 1974)。これらのことから、リン酸は要素1を満たすことが期待される。また、上述したアルミニウムにキレート結合する化合物の中で、リン酸は土壌から供給される。植物が吸収できる可溶性リン酸の濃度は、土壌pHが

高い条件で増加することが知られていることから、要素 2 を満たすことが期待できる。さらに、南條ら (1976) はアジサイに対してリン酸の施与による赤色の発色促進を報告している。栽培現場においてはリン酸の施与は赤色の発色を目的に行なわれている。これらのことから、リン酸は要素 3 を満たすことが期待できる。以上の様にリン酸はすべての要素を満たすことから、アジサイの花色の可変性に関与する有力な候補と考えられる。

花色の可変性におけるリン酸の関与を明らかにするためには、土壌条件の違いで異なる花色を発現したのがく片におけるリン酸の量を調べることで、要素 2 と 3 を満たすことを示す必要がある。執筆者はこれまでに青色と赤色が不安定に発色させる品種間の交配で得られた、花色の異なる F₂ 集団を得ている。そこで、第 3 章では、まず花色の発現におけるリン酸の関与を示すために、これらの F₂ 集団のがく片を材料に用いて、要素 1 と 3 を満たすことを調べた。

前述の発色関連成分に加えて、リン酸の構成成分であるリンのがく片に含まれる量を分析し、花色との相関を調べた。またリン酸がアントシアニンとアルミニウム、5-O-カフェオイルキナ酸の結合による青色の発色に与える効果を、がく片に含まれる割合に基づいて調製した *in vitro* 系で調べ、花色の制御におけるリン酸の関与を考察した。さらに、3-O-カフェオイルキナ酸の含量が少ないことが青色発色の条件であるという考えを、第 2 章に引き続き第 3 章においても検証した。

2. 材料および方法

1) 植物材料

2015 年および 2016 年 5 月に開花した‘きらきら星’ (栃木県育成品種) と ‘Frau Yoshimi’ (海老原園芸育成品種) の F₂ 集団 95 個体のがく片を採取した。F₂ 集団の育成は、2011 年 6 月に種子親に‘きらきら星’、花粉親に‘Frau Yoshiko’

(Fig. 3-1A, B) の組み合わせで交雑を行い F₁ 種子を得た。F₁ が開花した 2013 年 5 月にピンク色に発色する個体 ‘HY11-01-02’ (Fig. 3-1C) を自殖交配し F₂ を得た。

2) 栽培方法

F₁ および F₂ 種子の播種は、採取後の 9 月下旬にタキイセル培土 TM-1 を詰めた播種箱にばらまきし、本葉が 1 対展開した後、同培養土を詰めた 128 穴セルトレーに移植した。本葉が 3 から 4 対展開した稚苗を 12 月に 7.5 cm ポットへ鉢上げし、約 1 年育苗した。定植は翌々年の 2 月に 10.5 cm ポットに行い、5 月に開花させた。いずれもガラス温室で育成した。鉢上げ以降の培養土は、赤玉土、調整ピート、腐葉土、パーライトを 35%、35%、20%、10% で配合し、基肥に苦土重焼りんを 3 g/L、ようりん、およびロング 413-70 を各 2 g/L、バッドグアノ、およびマグアンプ II を各 1 g/L 加えて使用した。施肥条件は、7.5 cm ポットの育苗時が、ロング 413 (JCAM AGRIC Co. Ltd., Tokyo, Japan) の 70 日溶出タイプと 140 日溶出タイプを各 1 g、定植後は液体肥料 Peters 15-30-15 (HYPONeX JAPAN Co. Ltd., Osaka, Japan) の 1,500 倍液を週 2 回施用した。温度条件は、播種から鉢上げ 4 か月後までの育苗時が最低温度 18°C、換気温度 22°C とし、以降定植前までが最低温度 3°C、換気温度 15°C とした。定植から開花までが最低温度 15°C、換気温度 22°C とした。

3) がく片の色彩

生がく片の色差値 (L*, a*, b*) は色彩色差計 (CR-200, Konica Minolta Co. Ltd., Tokyo, Japan) で測定した。

4) がく片の pH 測定

測定時に開花していた系統の生がく片 4 枚を 1.5 mL 試験管内で、がく片のみ潰して得られた搾汁液を pH メーター (B-212, Horiba Co. Ltd. Tokyo, Japan) で測定した。各系統につき 3 回測定した。

5) がく片内成分の HPLC 分析

がく片 500 mg を 2 mL の 10%酢酸で 24 時間抽出し、さらに 1 mL の 10%酢酸で 3 時間抽出した。ただし、がく片の縁が白色覆輪の場合は、白色部分を除いて調製した。抽出液に含まれるアントシアニン、3-*O*-カフェオイルキナ酸および、5-*O*-カフェオイルキナ酸について HPLC (Agilent1100 system (Agilent, USA) に Agilent 1200 のポンプと検出器を組み合わせた) を用いて測定した。測定条件は ODS-2 カラム (GL Sciences, Tokyo, Japan) , 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 40°C とした。溶出溶媒は、溶媒 A (1.5%リン酸) と溶媒 B (1.5%リン酸, 20%酢酸, 25%アセトニトリル) の混合比率を 40 分で A が 80% - 0% , B が 20% - 100% となるリニアグラジエントで混合した。

アントシアニン、3-*O*-カフェオイルキナ酸および、5-*O*-カフェオイルキナ酸の標準物質をフナコシ (Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan) から購入し、HPLC の保持時間とフォトダイオードアレイ検出器を用いた吸収スペクトルの比較によって同定した。アントシアニンは 530 nm , 3-*O*-カフェオイルキナ酸および、5-*O*-カフェオイルキナ酸は 330 nm の吸光度に基づいて定量した。

6) アルミニウムおよびリン分析

生がく片を 85°C で 12 時間乾燥させた後、50 mg DW を分解用サンプル管に量りとった。そこに硝酸 2 mL を入れ電子レンジで湿式灰化した。分解液を試験管に移し、1 M 硝酸を 10 mL 加え希釈したものを ICP 発光分析装置 (Varian 820-MS, Carifornia, USA) により分析した。また、リンは分解液 8 mL にバナドモリブデ

ン酸溶液を 2 mL を加えたものを分光光度計 (HITACHI U-2900, Hitachi High-Tech Science Corporation, Tokyo, Japan) で 420 nm の吸光度に基づき定量した.

7) 統計分析

得られたデータから色彩および発色関連成分の相関係数を求めた.

8) アントシアニン溶液の発色に与えるリン酸の影響

0.1 M 酢酸緩衝液に溶解し pH 4.0 に調製したデルフィニジン 3-グルコサイド, 3-*O*-カフェオイルキナ酸および, 5-*O*-カフェオイルキナ酸, AlCl₃ 各溶液を, がく片に含まれる成分比に基づきモル比で 1 : 25 : 0.5 : 25 になるように混合した. この溶液にアントシアニンに対してリン酸の量がモル比で 0, 5, 25, 50 倍になるようにリン酸アンモニウム溶液を加え, 最終的にアントシアニンの濃度を 20 μM とする pH 4.0 の溶液を調製した.

Ito ら (2009) が報告したアジサイの液胞に含まれる成分比に基づきデルフィニジン 3-グルコサイド, 3-*O*-カフェオイルキナ酸, 5-*O*-カフェオイルキナ酸, AlCl₃ 各溶液を, 青色の液胞に含まれる成分比に基づきモル比で 1 : 10 : 1.3 : 1, また赤色の液胞に含まれる成分比に基づきモル比で 1 : 10 : 0.5 : 1 の割合で混合した. これらの溶液にアントシアニンに対してリン酸の量がモル比で 0, 0.2, 1, 20 倍になるようにリン酸アンモニウム溶液を加え, 最終的にアントシアニンの濃度を 35 μM とする pH 4.0 の溶液を調製した.

これらの溶液の 450 nm から 700 nm の吸収スペクトルを, 分光光度計 (HITACHI U-2900, Hitachi High-Tech Science Corporation, Tokyo, Japan) により測定した.

3. 結果

1) がく片の花色

F₂集団の花色は、青紫色から赤色まで幅広い発現が見られた (Fig. 3-2) . 最も青色味が強い個体の色相角は 288.4°で、赤色味が強い個体の色相角は 359.5°であった (Fig. 3-3) . 本章においては 288.4°–310°に属する色を青色、310°–330°に属する色を紫色、330°–359.5°に属する色を赤紫色から赤色とした . 多くの個体は 330°–360°の色相角を持つ領域に分布した .

2) がく片の pH

がく片搾汁液の pH は、3.9–4.3 の範囲であった (Table 3-1-2–3-1-6) . がく片の色彩と pH には関連性は認められなかった (Table 3-1-1) .

3) アントシアニン含量

いずれの個体においても主要アントシアニンは、デルフィニジン 3-グルコサイドであった . わずかに、デルフィニジン 3-サンブビオサイドが含まれていた (データ省略) . アントシアニン含量は 0.005 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW から 0.64 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布していた (Table 3-1-2~3-1-6) .

4) 発色関連成分と花色の関係

a*値と発色関連成分の関係は、デルフィニジン 3-グルコサイド ($r=0.54$) , 3-O-カフェオイルキナ酸 ($r=0.70$) , 5-O-カフェオイルキナ酸 ($r=0.28$) およびリン ($r=0.44$) において 1%水準で有意な相関が認められた (Table 3-1-1) . b*値はいずれの成分とも相関は認められなかった . 色相角は、3-O-カフェオイルキナ酸 ($r=0.50$) とリン ($r=0.34$) において 1%水準で有意な相関が認められた . アルミニウムは、花色およびいずれの成分とも相関が認められなかった .

今回の結果では、個体間のアントシアニンの含量の違いが大きかった。青色の発色はアントシアニンと 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの結合によって生じる。また 3-*O*-カフェオイルキナ酸とリン酸はその結合を阻害すると考えられる。したがって青色のがく片においては、他の花色のがく片よりも 5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムの量が多い領域に、3-*O*-カフェオイルキナ酸とリン酸の構成元素であるリンの量が少ない領域に分布していると期待される。したがって本章では、青色の色相角 310°以下を示した青色を示した個体と、それ以外の個体について、各関連化合物について含量の分布を比較した。アントシアニンの含量が異なると、アントシアニンとの結合あるいはその阻害に必要な発色関連化合物の含量が異なると考えられる。そこでアントシアニンの含量の差が 2 倍以内になるように F₂ 個体を 7 区に分け、それぞれの濃度において色相角と発色関連成分の含量を比較した。

(1) アントシアニン含量 0.005–0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (Table 3-1-2, Fig. 3-4-1A)

このグループには 5 個体が属した。5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310°以下のがく片においては 0.09–0.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した一方で、色相角 310°以上のがく片においては 0.08–0.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。アルミニウムの含量は、色相角 310°以下のがく片においては 9.34–17.66 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した一方で、色相角 310°以上のがく片においては 11.54–27.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて高い領域に特異的に分布している傾向は認められなかった。

3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310°以下のがく片においては 1.79–3.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した一方で、色相角 310°以上のがく片においては 4.33–7.27 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。リンの含量は、色相角 310°以下のがく片において

は $0.32\text{--}0.80 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $0.52\text{--}1.74 \text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 3-*O*-カフェオイルキナ酸およびリンの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布している傾向が認められた。

(2) アントシアニン含量 $0.01\text{--}0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (Table 3-1-2, Fig. 3-4-1B)

このグループには 6 個体が属した。5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $0.04\text{--}0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。アルミニウムの含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $8.24 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $9.21\text{--}18.54 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて高い領域に特異的に分布している傾向は認められなかった。

3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $2.22 \text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $2.89\text{--}15.35 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。リンの含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $0.56 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $0.23\text{--}2.71 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 3-*O*-カフェオイルキナ酸およびリンの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布している傾向が認められた。

(3) アントシアニン含量 $0.02\text{--}0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (Table 3-1-2, Fig. 3-4-2C)

このグループには 7 個体が属した。5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $0.07 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以

上のがく片においては $0.06\text{--}0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。アルミニウムの含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $12.28 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $9.18\text{--}18.78 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて高い領域に特異的に分布している傾向は認められなかった。

5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $6.65 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $7.24\text{--}13.28 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。リンの含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $1.14 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $0.62\text{--}2.40 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 3-*O*-カフェオイルキナ酸およびリンの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布している傾向が認められた。

(4) アントシアニン含量 $0.04\text{--}0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (Table 3-1-3, Fig. 3-4-2D)

このグループには 15 個体が属した。5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $0.06\text{--}0.80 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。アルミニウムの含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $8.77 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW にであった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $8.91\text{--}22.89 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて高い領域に特異的に分布している傾向は認められなかった。

3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $5.15 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW にであった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $5.40\text{--}19.48$

$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。リンの含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $0.74 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $0.69\text{--}3.27 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 3-*O*-カフェオイルキナ酸およびリンの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布している傾向が認められた。

(5) アントシアニン含量 $0.08\text{--}0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (Table 3-1-4, Fig.3-4-3E)

このグループには 28 個体が属した。5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $0.08\text{--}0.39 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $0.06\text{--}0.55 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。アルミニウムの含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $12.96\text{--}20.90 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $6.35\text{--}21.09 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて高い領域に特異的に分布している傾向は認められなかった。

3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $5.42\text{--}11.53 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $11.19\text{--}21.60 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。リンの含量は、色相角 310° 以下のがく片においては $0.14\text{--}1.08 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310° 以上のがく片においては $0.85\text{--}3.54 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 3-*O*-カフェオイルキナ酸およびリンの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布している傾向が認められた。

(6) アントシアニン含量 $0.16\text{--}0.32 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (Table 3-1-5, Fig. 3-4-3F)

このグループには 24 個体が属した。5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相

角 310°以下のがく片においては 0.22 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては 0.06–1.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。アルミニウムの含量は、色相角 310°以下のがく片においては 16.93 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては 7.99–28.21 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて高い領域に特異的に分布している傾向は認められなかった。

3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310°以下のがく片においては 15.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては 11.76–20.52 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。リンの含量は、色相角 310°以下のがく片においては 2.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。色相角 310°以上のがく片においては 0.54–3.59 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 3-*O*-カフェオイルキナ酸含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布している傾向が認められた一方で、リンの含量は、赤紫・赤色のがく片との特異的な差は認められなかった。

(7) アントシアニン含量 0.32–0.64 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (Table 3-1-6, Fig. 3-4-4G)

このグループには 10 個体が属した。5-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310°以下のがく片においては 0.84 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては 0.11–1.37 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。アルミニウムの含量は、色相角 310°以下のがく片においては 14.71 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては 10.42–19.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて高い領域に特異的に分布している傾向は認められなかった。

3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量は、色相角 310°以下のがく片においては 16.28 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては 15.96–25.52 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。リンの含量は、色相角 310°以下のがく片においては 1.47 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては 0.98–4.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。青色のがく片に含まれる 3-*O*-カフェオイルキナ酸およびリンの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布している傾向が認められた。

5) アントシアニン溶液の発色に与えるリン酸の影響

がく片に含まれる凡その比率に基づいてデルフィニジン 3-グルコサイド、3-*O*-カフェオイルキナ酸、5-*O*-カフェオイルキナ酸および、アルミニウムをモル比で 1 : 25 : 0.5 : 25 になるように混合した溶液の吸収極大波長は、アントシアニンに対してリン酸の濃度が 0 倍、5 倍、25 倍、50 倍と高くなるに伴い、573 nm から 570 nm、565 nm、550 nm となり短波長側にシフトした (Fig. 3-5-1A)。リン酸の濃度が 25 倍と 50 倍の溶液では、リン酸の濃度の増加に伴い吸収極大波長の吸光度が低下した。溶液の色は、アントシアニンに対してリン酸の濃度が 0 倍、5 倍、25 倍、50 倍と高くなるに伴い、青色から青紫色、赤紫色、ピンク色に変化した (Fig. 3-5-1B)。リン酸の濃度が 25 倍と 50 倍の溶液では、リン酸の濃度の増加に伴い色が薄くなった。

特に青色のがく片の液胞に含まれる比率に基づいてデルフィニジン 3-グルコサイド、3-*O*-カフェオイルキナ酸、5-*O*-カフェオイルキナ酸および、アルミニウムをモル比で 1:10:1.3:1 の割合になるように混合した溶液の吸収極大波長は、アントシアニンに対してリン酸の濃度が 0 倍と 0.2 倍の時は 562 nm であり、1 倍、20 倍と高くなるに伴い、540 nm から 532 nm となり短波長側にシフトした (Fig. 3-5-2A)。リン酸の濃度の増加に伴い吸収極大波長の吸光度が低下した。

アントシアニンに対してリン酸の濃度が 0 倍と 0.2 倍の溶液は青紫色を呈し、1 倍、20 倍と高くなるに伴い赤紫色からピンク色に変化した (Fig. 3-5-2B) . リン酸の濃度の増加に伴い溶液の色が薄くなった.

特に赤色のがく片の液胞に含まれる比率に基づいて 5-*O*-カフェオイルキナ酸を低比率にし、1 : 10 : 0.5 : 1 の割合になるように混合した溶液の吸収極大波長は、アントシアニンに対してリン酸の濃度が 0 倍の時は 543 nm であり、0.2 倍、1 倍、20 倍と高くなるに伴い、534 nm から 532 nm, 528 nm となり短波長側にシフトした (Fig. 3-5-3A) . リン酸の濃度の増加に伴い吸収極大波長の吸光度が低下した. アントシアニンに対してリン酸の濃度が 0 倍、0.2 倍、1 倍の溶液は赤紫色を呈し、20 倍と高くなるに伴いピンク色に変化した (Fig. 3-5-3B) . リン酸の濃度の増加に伴い溶液の色が薄くなった.

4. 考察

アジサイの花色においては、弱酸性条件でアントシアニンが助色素の 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムと結合することによって青色が発色し、この結合が阻害されると赤色が発色するすると考えられている (Ito ら, 2009 ; Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, b, 1990, 武田, 2013 ; Yoshida ら, 2003, 2009) . 結合が阻害される原因には、5-*O*-カフェオイルキナ酸あるいはアルミニウムの量の不足がある. または、5-*O*-カフェオイルキナ酸と競合する 3-*O*-カフェオイルキナ酸やアルミニウムと結合する化合物の量が多い場合にもこの結合が阻害されると考えられる (Kodama ら, 2016 ; 武田, 2013) . リン酸はアルミニウムと結合する化合物であり、細胞内でも結合していることが知られている (Pierre ら, 1933 ; Wright ら, 1937) .

これらの考えに基づいて、アジサイのがく片の pH とともに、がく片に含まれるこれらの化合物の量と色彩の関係を調査した. 液胞の pH が反映されると考え

られているがく片搾汁液の pH は、第 2 章の結果 (Kodama ら, 2016) と同様に 3.9 から 4.3 の範囲にあり、色彩との関係が認められなかったことから、花色の発色の違いの原因となる要素ではないと考えられる (Table 3-1-1-3-1-6) . 花色と発色関連成分の関係では、色相角が 3-*O*-カフェオイルキナ酸とリンとの間に正の相関が認められた (Table 3-1-1) . このことは、3-*O*-カフェオイルキナ酸とリン含量が高いと色相角が大きくなり、赤みを強く発現することを示している. 一方で、アルミニウムは、花色およびいずれの成分とも相関は認められなかった. 今回分析した試料の間では、がく片に含まれるアントシアニンの量に顕著な違いがあったことから、試料をそれぞれ 2 倍以内のアントシアニンの量を持つ区に分類して、それぞれの区において化合物の量を調べた. 赤紫・赤色のがく片と比較した場合、青色のがく片においては、5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムの含量が高い領域に、3-*O*-カフェオイルキナ酸とリン酸の構成元素であるリンの含量が低い領域に特異的に分布しているかに着目した.

全てのアントシアニンの含量のグループにおいて、紫色および赤紫・赤色のがく片と比較した場合、青色のがく片に含まれる 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの含量が高い領域に特異的に分布している傾向は認められなかった (Table 3-1-2-3-1-6, Fig. 3-4-1-3-4-4) . 第 2 章の研究においても同様な結果が得られている (Kodama ら, 2016) . 第 2 章では南條ら (1976) によって得られたアルミニウムについての同様な結果と合わせて、5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムの量はアジサイの花色を制限する因子ではない可能性を議論した. Ma ら (1997) は、アジサイの根から吸収されたアルミニウムの多くが液胞に蓄積されると報告している. しかし、Ito ら (2009) の報告を参照すると、液胞に含まれるアルミニウムの量は、がく片に全体に含まれる量の 1/10 程度である. 液胞に含まれるアルミニウムは、がく片に全体に含まれる量の一部であると考えられる. そのため、がく片全体のアルミニウムの量は発色に関与してい

る量を反映していない可能性もあることから、アルミニウム量と発色の関係については詳細な検討が必要と考えている。

全てのアントシアニンの濃度のグループにおいて、紫色および赤紫・赤色のがく片と比較した場合、青色のがく片に含まれる 3-O-カフェオイルキナ酸の含量は低い領域に特異的に分布している傾向が認められた (Table 3-1-2-3-1-6, Fig. 3-4-1-3-4-4) . 第 2 章の研究と同様に、アジサイの青色の発色には 3-O-カフェオイルキナ酸の量が少ないことが必要であるという考えを支持する結果が得られた (武田, 2013 ; Kodama ら, 2016) .

リン酸にはアルミニウムにキレート結合する性質がある。がく片の凡その発色関連成分比率に基づいた溶液を用いた発色実験においては、リン酸濃度が高くなるに伴い吸収極大波長が短波長に移行し、青色の色彩が弱まり赤色の色彩が強まった (Fig. 3-5-1-3-5-3) . 特にアルミニウムと同程度以上の濃度のリン酸を加えた場合に大きな変化が生じた (Fig. 3-5-1) . 青色のがく片や赤色のがく片の液胞内の色素関連成分に基づいた溶液を用いた発色実験においても、同様の現象が認められた (Fig. 3-5-2, Fig. 3-5-3) . リン酸は濃度依存的に、青色の発色をもたらすアントシアニン-5-O-カフェオイルキナ酸-アルミニウムの結合を阻害する効果があることが明らかになった。この反応はリン酸のアルミニウムとの結合を通して発現していると考えられる。

伊藤ら (2007, 2009) は、紫色に発色したがく片は、赤色から青色までの様々な色の細胞で構成され、これらの色彩と液胞 pH に関連は認められないこと示している。本研究では溶液の pH が 4.0 の条件において、リン酸の濃度変化によって青紫色から赤色の発色を示した。このことは、液胞の pH とアルミニウム含量が青色の発色が可能な条件を満たしている場合でも、液胞に含まれているリン酸含量によって発色の制御が可能であることを示すものである。

第 6 区における No. 22 の個体を除いて、全てのアントシアニンの含量のグル

ープにおいて、青色のがく片に含まれるリンの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布している傾向が認められた (Table 3-1-2-3-1-6, Fig. 3-4-1-3-4-4). リン酸の量が多いがく片においては, *in vitro* の場合と同様に, アントシアニンと 5-O-カフェオイルキナ酸と結合するアルミニウムの量がリン酸との結合によって少なくなっていると考えられる.

一般に, 植物体内の無機リン酸濃度は, リン酸が代謝される細胞質ではほぼ一定の濃度で存在するが, 液胞は過剰に吸収したリン酸の多くを液胞内に蓄積する機構をもつことから, 変動量が多い (Rebeille ら, 1983). 本実験で検出されたリンの内, 液胞にリン酸として存在する割合は不明である. それでも検出されたリンの値は, アントシアニンと同程度と推測される液胞のアルミニウム量よりも多いことから, 液胞には色彩の変化を生ずるために十分な量のリン酸が存在すると期待できる. したがって, 3-O-カフェオイルキナ酸と同様に, アジサイの青色の発色にはリン酸が少ないことが必要と考えられる.

3-O-カフェオイルキナ酸とリンの含量が高くても青色を示す系統が第 6 区における No. 22 の 1 個体のみ認められた (Table 3-1-5, Fig.3-4-3F). この個体では, 3-O-カフェオイルキナ酸およびリン酸以外にもアントシアニンとアルミニウムの結合を阻害する要素の存在が推測される. Ma ら (2001) は, アルミニウムが植物体内でクエン酸やシュウ酸と結合することを報告していることから, これらの化合物もアジサイの花色の発色に関与している可能性が示された. リン酸は土壌からのみ供給されることから, アントシアニンとアルミニウムの結合を阻害する要素の中で, 液胞中の濃度が土壌条件の影響を最も受けやすい化合物と考えられる.

岡田ら (1974) は, アルカリ性土壌では可溶性リン酸の含有率が高まり, 吸収されたリン酸が植物体内でアルミニウムと結合して不溶化することを推定している. また南條ら (1976) は, 出蕾時にリン酸を施用することで赤色の発色

を良好にするとしている。これらの報告に基づくと、土壌条件の違いによる花色が変化する現象にもリン酸が関与している可能性がある。日本の多くの地域では、リン酸吸収係数が極めて高く、アルミニウムを多く含む火山灰由来の土壌である。この土壌条件下において自生や地植えで生育したアジサイは、リン酸の吸収量が少なく、アルミニウムの吸収量が多いことは容易に推測される。そのため日本に自生するアジサイの多くは、リン酸吸収量が少なく、液胞へのリン酸の蓄積量が少ないことによって青紫や青色を呈しているものと考えられる。

従来、アジサイの発色の変化は、土壌中のアルミニウムの溶解性の違いによるがく片へのアルミニウムの吸収・蓄積によって生じると考えられてきた。本章では第1章で提起した、アジサイの花色発現における主要な要素はアルミニウムではなく、リン酸である可能性を支持する結果が得られた。

Table 3-1-1 Correlation (Pearson's r coefficient) between chromatic values, pH, and content of coloration-related components of the sepals of *Hydrangea*

	L*	a*	b*	Hue-angle	pH	Delphinidin 3-glucoside	3-O- caffeoylquinic acid	5-O- caffeoylquinic acid	Aluminum
a*	-0.74 **								
b*	0.16	0.43 **							
Hue-angle	-0.33 **	0.83 **	0.79 **						
pH	-0.07	0.21	0.03	0.09					
Delphinidin 3-glucoside	-0.66 **	0.54 **	-0.06	0.24 *	-0.06				
3-O-caffeoylquinic acid	-0.54 **	0.70 **	0.10	0.50 **	0.05	0.66 **			
5-O-caffeoylquinic acid	-0.28 **	0.28 **	-0.08	0.11	-0.14	0.37 **	0.49 **		
Aluminum	-0.08	0.11	0.15	0.16	0.11	0.03	0.01	0.06	
Phosphorus	-0.34 **	0.44 **	0.09	0.34 **	-0.05	0.16	0.50	0.35 **	0.06

* and ** indicate a significant correlation at $p < 0.05$, and 0.01, respectively (n=95).

Table 3-1-2 Chromatic values, pH, and content of coloration-related components of the sepals of *Hydrangea*

#	L*	a*	b*	Hue-angle (°)	pH ^z	Delphinidin 3- glucoside ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)	3-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)	5-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)	Aluminum ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)	Phosphorus ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)
No. 1 Anthocyanin 0.005-0.01										
58	75.3	2.5	-7.5	288.4	4.0	0.007	3.40	0.19	17.66	0.80
82	63.0	8.5	-17.2	296.4	4.1	0.004	1.79	0.09	9.34	0.32
54	77.5	3.6	-2.4	326.2	_y	0.005	4.91	0.17	16.06	0.52
77	67.1	17.1	-5.7	341.6	-	0.004	4.33	0.09	27.19	1.74
91	55.8	33.1	-6.3	349.2	4.3	0.005	7.27	0.08	11.54	1.14
No. 2 Anthocyanin 0.01-0.02										
21	70.0	5.6	-15.2	290.1	4.1	0.012	2.22	0.09	8.24	0.56
17	80.0	4.2	-3.3	321.5	-	0.010	2.89	0.11	18.54	0.65
53	70.1	11.9	-6.5	331.5	4.1	0.013	6.21	0.04	13.24	0.23
90	64.4	22.4	-8.8	338.5	-	0.016	13.27	0.16	14.79	2.71
10	60.1	22.3	-7.7	340.9	3.9	0.020	5.68	0.09	9.21	0.89
44	64.0	26.9	-7.5	344.5	4.0	0.018	15.35	0.18	18.45	2.00
No. 3 Anthocyanin 0.02-0.04										
34	70.4	9.7	-12.3	308.4	4.0	0.031	6.65	0.07	12.28	1.14
29	69.0	15.4	-7.0	335.5	4.0	0.037	7.24	0.06	9.42	0.74
60	55.3	31.2	-10.8	340.8	4.2	0.039	10.74	0.20	14.53	0.62
28	67.0	21.3	-6.9	342.1	3.9	0.024	11.74	0.08	15.79	0.78
81	58.3	29.1	-8.2	344.3	-	0.022	7.62	0.14	18.78	1.41
95	63.3	21.7	-6.1	344.4	4.2	0.035	13.28	0.25	9.18	2.40
52	68.1	17.3	-4.1	346.6	4.1	0.032	10.76	0.16	15.94	1.48

^z Sepals pH was measured in 2016.

_y - mark is not measured.

Table 3-1-3 Chromatic values, pH, and content of coloration-related components of the sepals of *Hydrangea*

#	L*	a*	b*	Hue-angle (°)	pH ^z	Delphinidin 3- glucoside ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	3-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	5-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Aluminum ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Phosphorus ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)
No. 4 Anthocyanin 0.04-0.08										
39	63.9	8.9	-19.9	294.1	4.0	0.055	5.15	0.26	8.77	0.74
23	66.4	13.7	-12.6	317.3	4.1	0.042	11.05	0.28	12.78	1.93
98	56.0	19.8	-15.0	322.8	4.1	0.067	6.81	0.06	10.61	1.08
85	53.4	26.3	-16.3	328.1	-	0.058	10.88	0.19	13.43	3.27
97	50.0	27.7	-15.3	331.1	-	0.061	9.14	0.14	16.05	2.42
40	65.1	21.1	-10.5	333.6	3.9	0.061	16.66	0.41	11.21	2.21
13	59.5	25.1	-10.4	337.4	4.3	0.059	19.48	0.25	12.66	2.33
69	58.5	26.9	-10.9	338.0	4.2	0.056	9.17	0.14	9.49	0.69
57	58.8	24.4	-8.8	340.1	-	0.059	5.40	0.23	20.58	1.01
71	52.7	31.6	-9.7	343.0	-	0.046	15.24	0.13	8.91	1.88
79	48.8	34.2	-6.4	349.4	4.2	0.079	10.61	0.24	21.62	1.70
19	64.2	24.1	-4.4	349.7	-	0.046	15.48	0.12	10.19	1.41
64	49.6	36.1	-4.2	353.3	4.1	0.069	14.11	0.80	21.82	1.24
84	54.9	34.0	-3.2	354.6	4.1	0.054	10.97	0.21	22.89	1.81
65	46.8	38.9	-2.6	356.1	4.0	0.072	10.02	0.20	22.32	1.54

^z Sepals pH was measured in 2016.

^y - mark is not measured.

Table 3-1-4 Chromatic values, pH, and content of coloration-related components of the sepals of *Hydrangea*

#	L*	a*	b*	Hue-angle (°)	pH ^z	Delphinidin 3- glucoside ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	3-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	5-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Aluminum ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Phosphorus ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)
No. 5 Anthocyanin 0.08-0.16										
41	58.3	14.1	-22.5	302.0	4.0	0.088	11.53	0.39	12.96	0.68
36	52.1	18.2	-25.4	305.6	4.2	0.116	10.32	0.10	20.90	1.08
4	62.3	10.2	-13.9	306.2	-	0.114	5.42	0.08	15.40	0.14
100	47.5	23.9	-22.8	316.4	4.0	0.123	13.31	0.30	11.62	2.44
68	59.0	18.7	-13.3	324.5	4.1	0.126	11.19	0.06	7.68	1.53
2	51.7	34.4	-13.4	338.7	4.1	0.154	19.30	0.53	17.75	2.25
94	50.5	31.1	-11.8	339.3	4.0	0.151	11.64	0.09	10.68	3.14
42	55.6	31.3	-10.3	341.9	-	0.100	16.71	0.31	17.50	1.51
67	60.1	25.8	-8.1	342.7	4.2	0.123	14.55	0.12	10.02	1.83
78	55.7	32.1	-9.3	343.9	4.1	0.101	15.56	0.23	18.20	3.09
66	60.2	26.9	-7.7	344.0	-	0.155	17.99	0.30	14.89	2.36
75	54.6	31.6	-7.7	346.4	-	0.102	15.69	0.25	21.09	1.96
1	64.1	23.6	-5.2	347.7	-	0.094	12.55	0.05	14.34	0.85
47	66.2	23.0	-4.9	348.0	3.9	0.106	14.40	0.20	9.77	2.37
86	62.4	29.0	-5.9	348.5	4.2	0.134	21.60	0.53	15.50	3.22
88	50.8	37.5	-7.4	348.9	-	0.152	15.76	0.55	21.00	2.87
27	52.3	38.1	-7.5	348.9	4.3	0.139	14.57	0.05	16.26	1.02
72	51.5	35.0	-6.8	349.0	4.0	0.090	13.32	0.41	9.16	2.47
24	57.7	34.1	-5.5	350.8	4.1	0.110	14.32	0.12	10.65	3.06
45	55.6	35.8	-5.7	351.0	4.0	0.114	19.13	0.45	12.23	2.41
89	59.2	32.8	-5.2	351.1	4.3	0.082	16.89	0.22	13.48	2.39
87	55.5	36.6	-5.4	351.5	-	0.108	18.12	0.51	13.03	3.54
70	55.9	32.7	-4.8	351.6	4.0	0.134	16.78	0.09	11.61	0.91
6	60.6	28.8	-4.0	352.1	-	0.148	11.36	0.07	16.80	0.32
3	56.2	38.6	-3.7	354.5	4.3	0.142	18.25	0.34	16.11	1.02
99	50.0	39.0	-3.6	354.8	4.1	0.123	17.72	0.32	12.99	2.00
73	52.1	38.2	-2.6	356.1	4.0	0.128	15.14	0.27	6.35	2.55
74	50.9	40.3	-2.1	357.0	3.9	0.096	12.02	0.26	19.20	3.14

^z Sepals pH was measured in 2016.

^y - mark is not measured.

Table 3-1-5 Chromatic values, pH, and content of coloration-related components of the sepals of *Hydrangea*

#	L*	a*	b*	Hue-angle (°)	pH ^z	Delphinidin 3- glucoside ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	3-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	5-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Aluminum ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Phosphorus ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)
No. 6 Anthocyanin 0.16-0.32										
22	59.6	14.1	-21.2	303.6	-	0.175	15.17	0.22	16.93	2.25
12	46.9	25.1	-23.0	317.5	4.2	0.278	15.54	0.32	13.54	1.39
35	51.9	24.2	-20.6	319.5	4.1	0.248	18.47	0.54	13.46	2.05
25	52.5	25.4	-18.6	323.8	4.1	0.200	15.30	0.13	13.83	0.90
46	44.8	29.1	-21.2	323.9	-	0.277	19.41	0.39	13.89	1.41
38	51.6	26.8	-16.8	327.9	-	0.252	15.93	0.30	12.29	1.31
62	33.6	32.6	-14.4	336.2	4.0	0.267	13.04	0.54	15.87	1.63
7	58.2	26.3	-10.9	337.4	-	0.190	17.07	0.21	21.78	1.41
16	56.5	29.9	-11.7	338.6	3.9	0.216	19.72	1.25	16.17	3.14
96	53.4	35.1	-8.5	346.5	4.2	0.183	18.18	0.27	9.30	3.59
26	60.7	32.5	-6.8	348.3	4.0	0.237	19.30	0.64	14.82	1.56
32	49.8	38.5	-7.4	349.1	-	0.211	17.59	0.37	11.21	1.97
8	63.2	30.8	-5.9	349.2	4.0	0.254	17.74	0.21	16.38	1.42
49	49.2	41.2	-7.7	349.5	3.9	0.243	19.50	0.70	10.13	1.86
63	57.1	31.5	-5.7	349.8	4.1	0.194	16.10	0.14	16.38	1.42
56	49.7	35.0	-6.0	350.2	4.1	0.294	15.06	0.17	28.21	2.29
37	54.9	36.4	-5.6	351.2	-	0.306	16.82	0.13	12.59	1.46
15	56.4	38.4	-5.3	352.1	4.0	0.181	15.29	0.10	12.12	1.92
76	50.2	39.0	-3.8	354.5	4.2	0.189	16.49	0.52	13.34	0.80
20	48.7	43.5	-3.9	354.9	4.0	0.318	17.45	0.29	7.99	0.95
43	49.1	42.7	-3.7	355.0	4.1	0.232	20.52	0.12	22.71	1.91
50	55.8	36.2	-3.0	355.2	-	0.299	16.28	0.12	8.23	0.54
92	48.4	40.6	-2.4	356.6	4.2	0.191	11.76	0.06	16.65	2.93
51	50.2	38.9	-2.2	356.8	4.0	0.318	15.46	0.11	13.46	1.16

^z Sepals pH was measured in 2016.

^y - mark is not measured.

Table 3-1-6 Chromatic values, pH, and content of coloration-related components of the sepals of *Hydrangea*

#	L*	a*	b*	Hue-angle (°)	pH ^z	Delphinidin 3- glucoside ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)	3-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)	5-O- caffeoylquinic acid ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)	Aluminum ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)	Phosphorus ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$)
No. 7 Anthocyanin 0.32-0.64										
9	51.4	19.1	-28.8	303.6	-	0.358	16.28	0.84	14.71	1.47
33	44.1	29.4	-22.4	322.7	4.0	0.373	21.17	0.24	10.42	1.82
5	46.7	31.9	-12.4	338.7	4.0	0.533	18.00	0.25	18.89	0.98
11	36.9	35.1	-13.0	339.7	-	0.444	16.51	0.11	12.20	1.96
83	42.0	40.3	-9.1	347.3	4.0	0.361	19.73	0.52	16.26	4.03
14	50.6	39.2	-5.9	351.5	-	0.380	15.96	0.26	11.12	1.63
48	55.3	36.5	-5.3	351.7	4.1	0.371	18.11	1.37	11.68	2.43
30	51.0	41.3	-5.2	352.8	4.3	0.354	18.88	0.47	16.36	1.87
55	48.3	40.6	-2.6	356.4	4.1	0.400	25.52	0.57	19.50	2.57
31	42.8	45.1	0.4	359.5	-	0.497	19.87	0.28	16.43	1.92

^z Sepals pH was measured in 2016.

^y - mark is not measured.

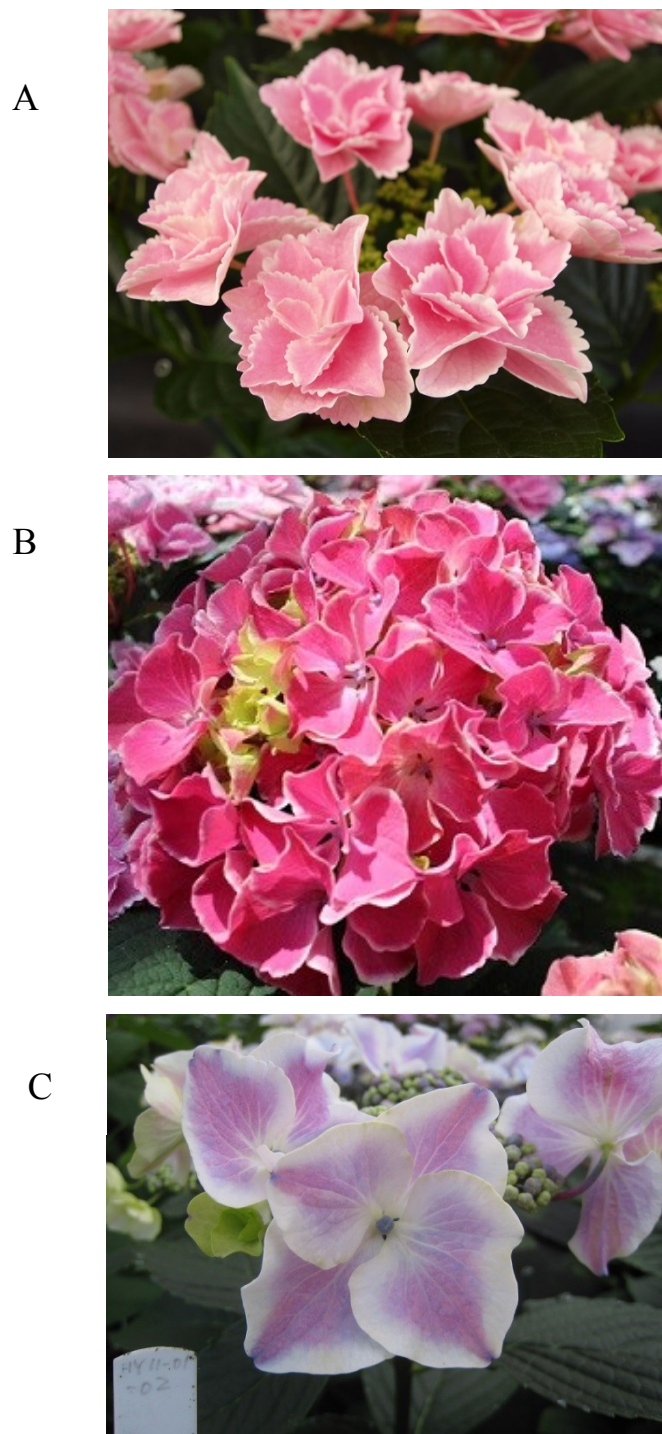


Fig. 3-1 Trait of mating parents and F₁. A, 'Kirakiraboshi', B, 'Frau Yoshimi', C, 'HY11-01-02' (F₁ progeny between 'Kirakiraboshi' and 'Frau Yoshimi').

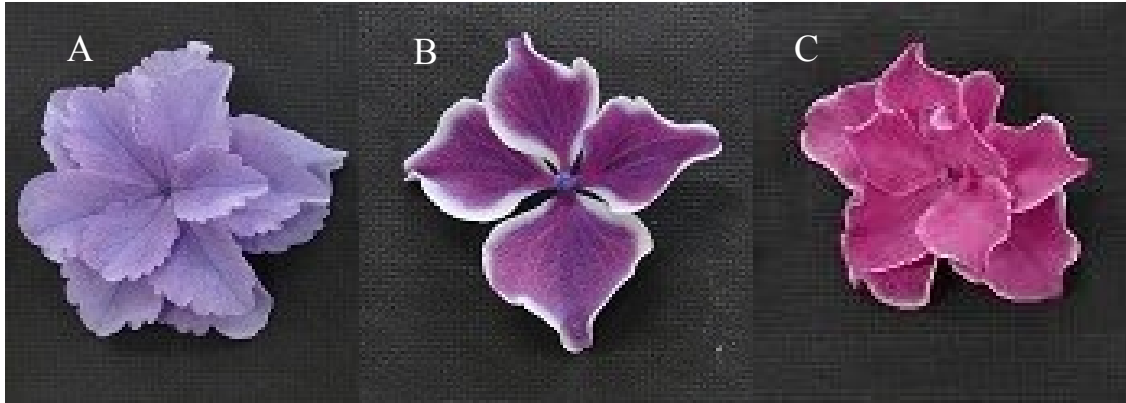


Fig. 3-2 Sepal color of F₂ population of *Hydrangea*. Show the color of the typical sepals. (A) Blue sepal (h 288.4°–310°), (B) purple sepal (h 310°–330°), (C) red purple and red sepal (h 330°–359.5°)

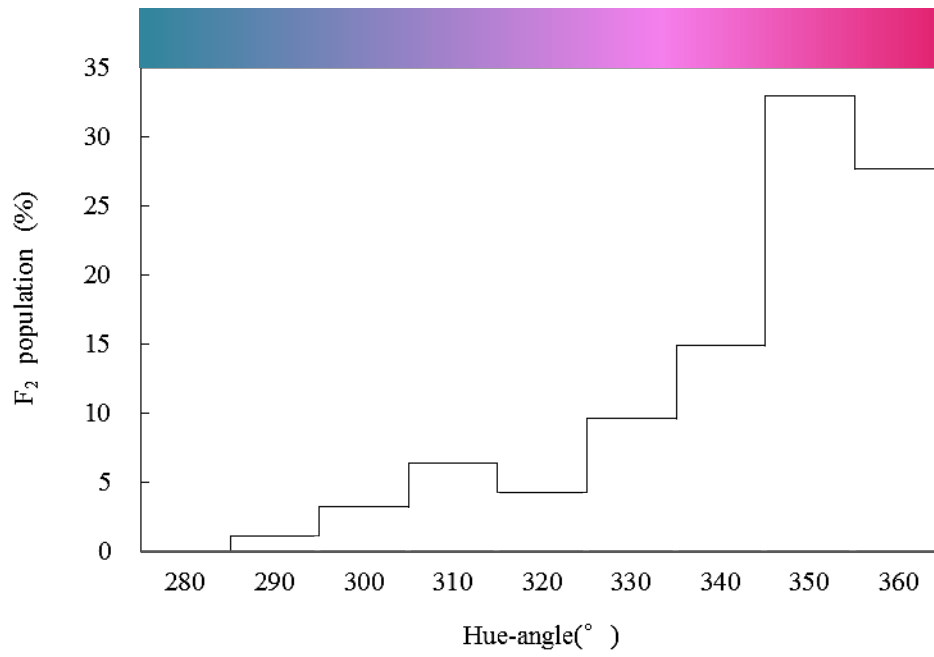


Fig. 3-3 Distribution of F₂ population based on sepal coloration. Color corresponding to the hue-angle values are presented upon the histogram.

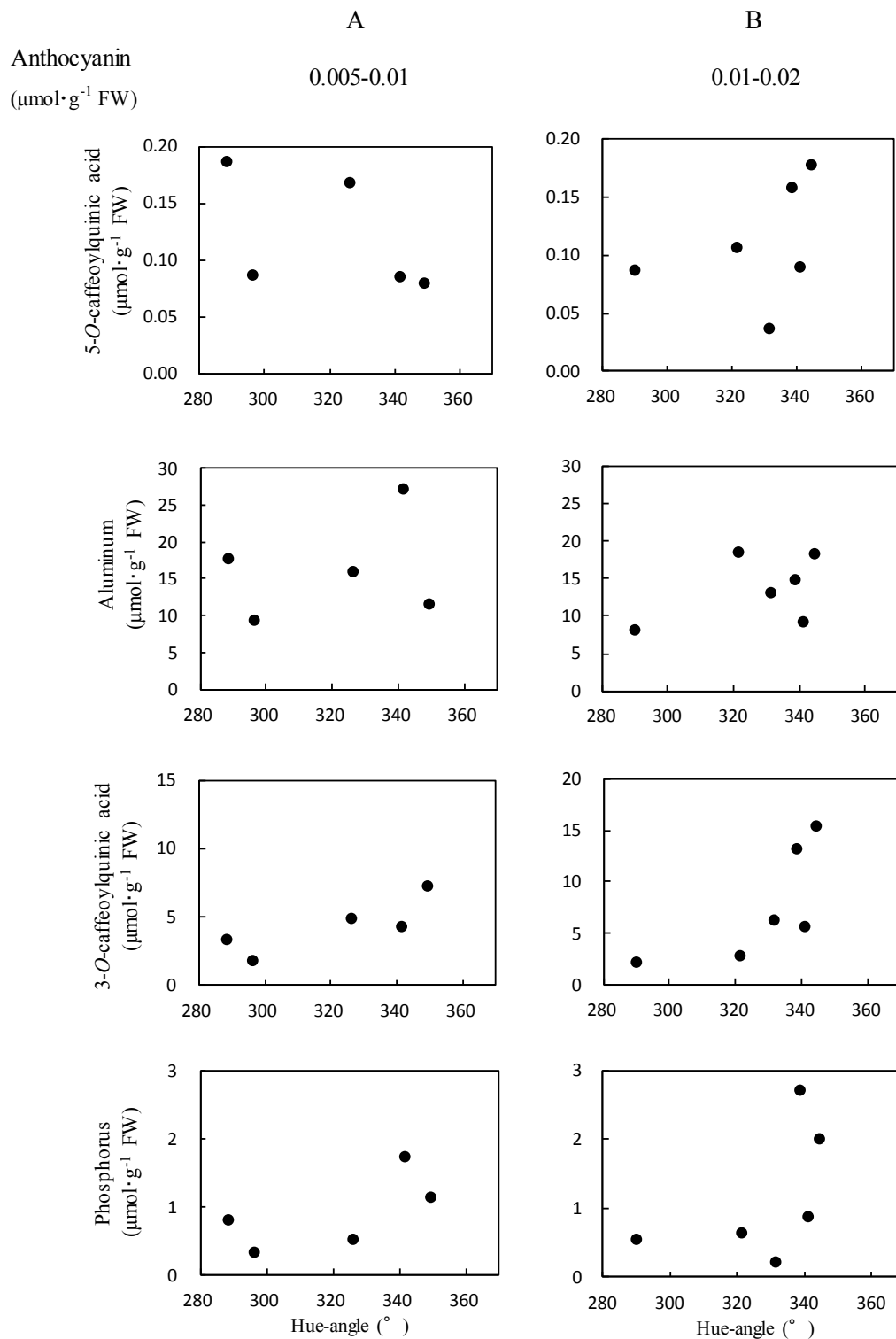


Fig. 3-4-1 Relationship of sepal coloration and contents of 5-O-caffeoylquinic acid, aluminum ion, 3-O-caffeoylquinic acid and phosphorus in the sepals. The comparison is conducted in each anthocyanin content.

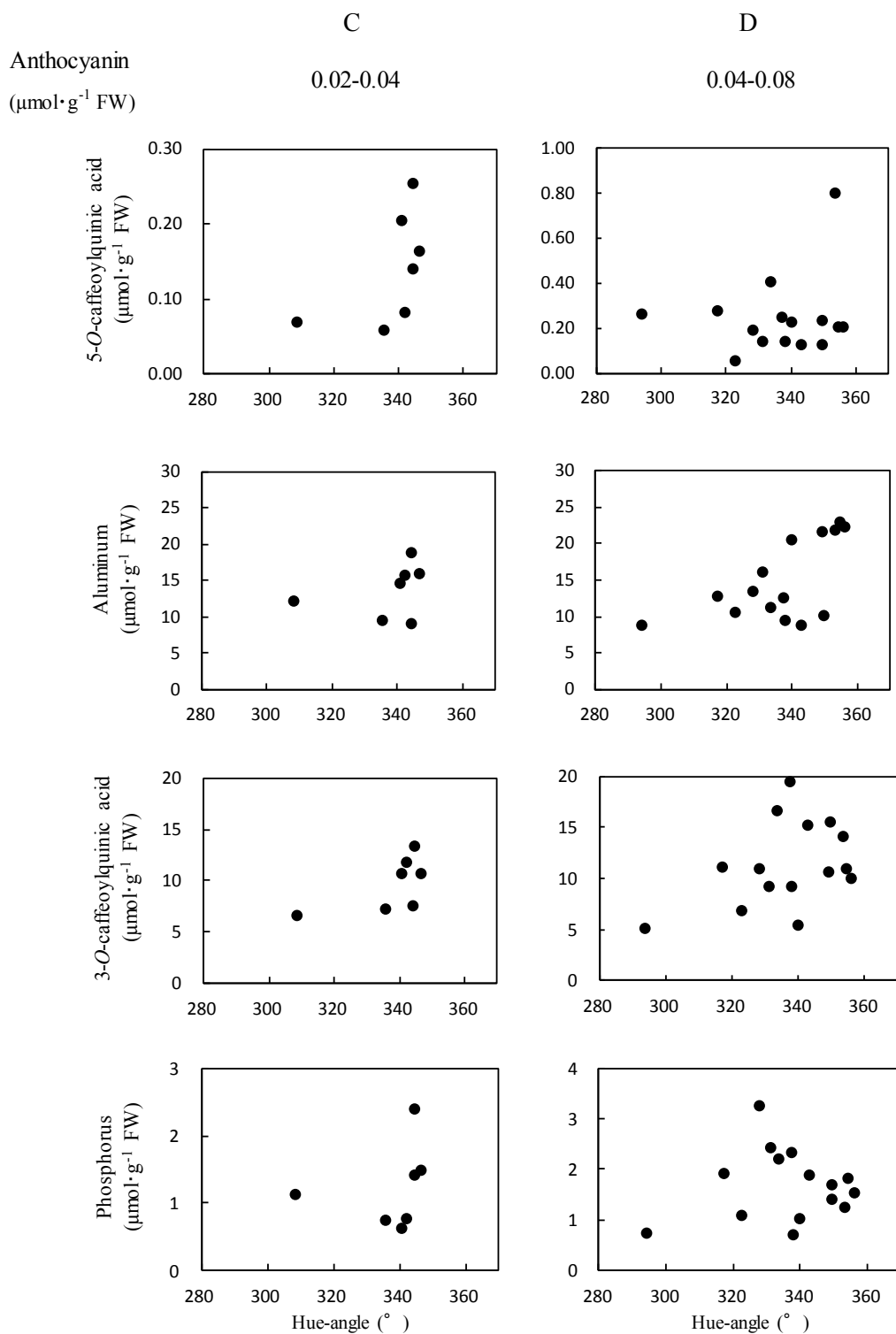


Fig. 3-4-2 Relationship of sepal coloration and contents of 5-*O*-caffeoylquinic acid, aluminum ion, 3-*O*-caffeoylquinic acid and phosphorus in the sepals. The comparison is conducted in each anthocyanin content.

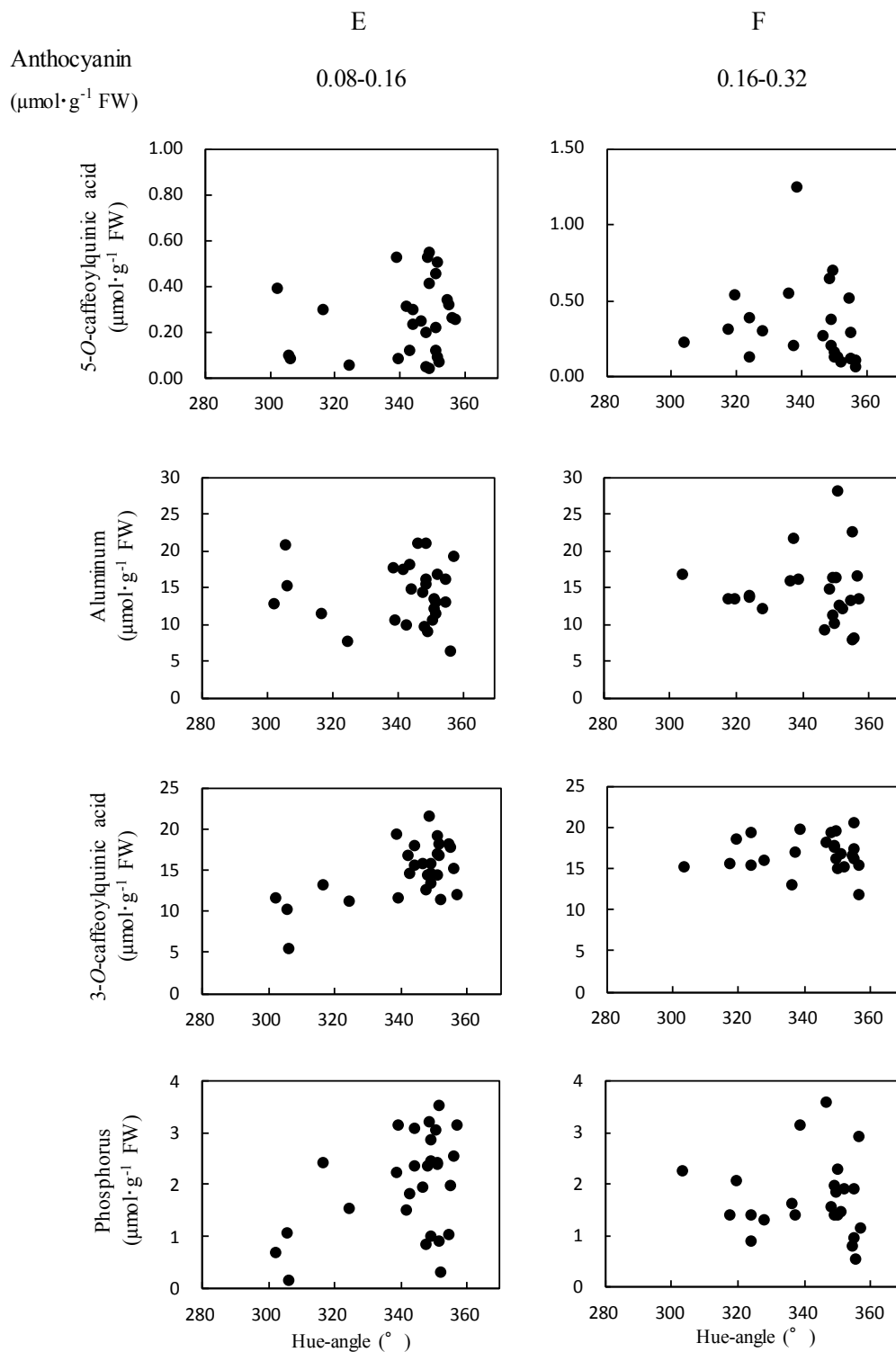


Fig. 3-4-3 Relationship of sepal coloration and contents of 5-*O*-caffeoylquinic acid, aluminum ion, 3-*O*-caffeoylquinic acid and phosphorus in the sepals. The comparison is conducted in each anthocyanin content.

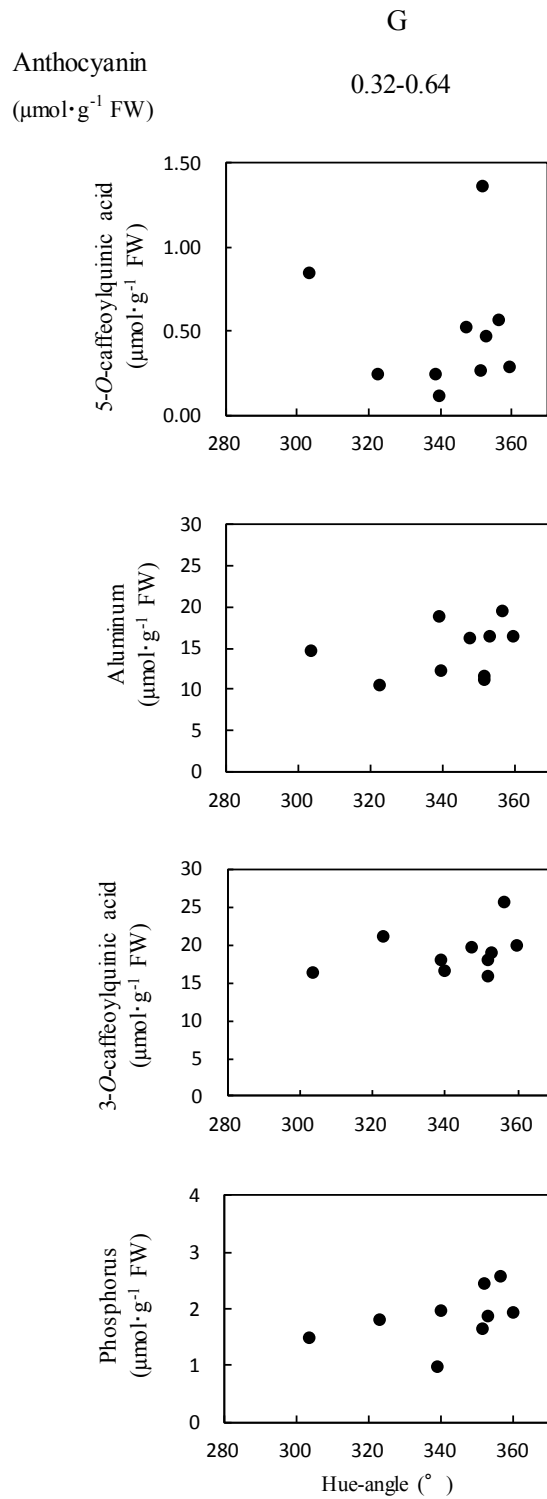


Fig. 3-4-4 Relationship of sepal coloration and contents of 5-*O*-caffeoylquinic acid, aluminum ion, 3-*O*-caffeoylquinic acid and phosphorus in the sepals. The comparison is conducted in each anthocyanin content.

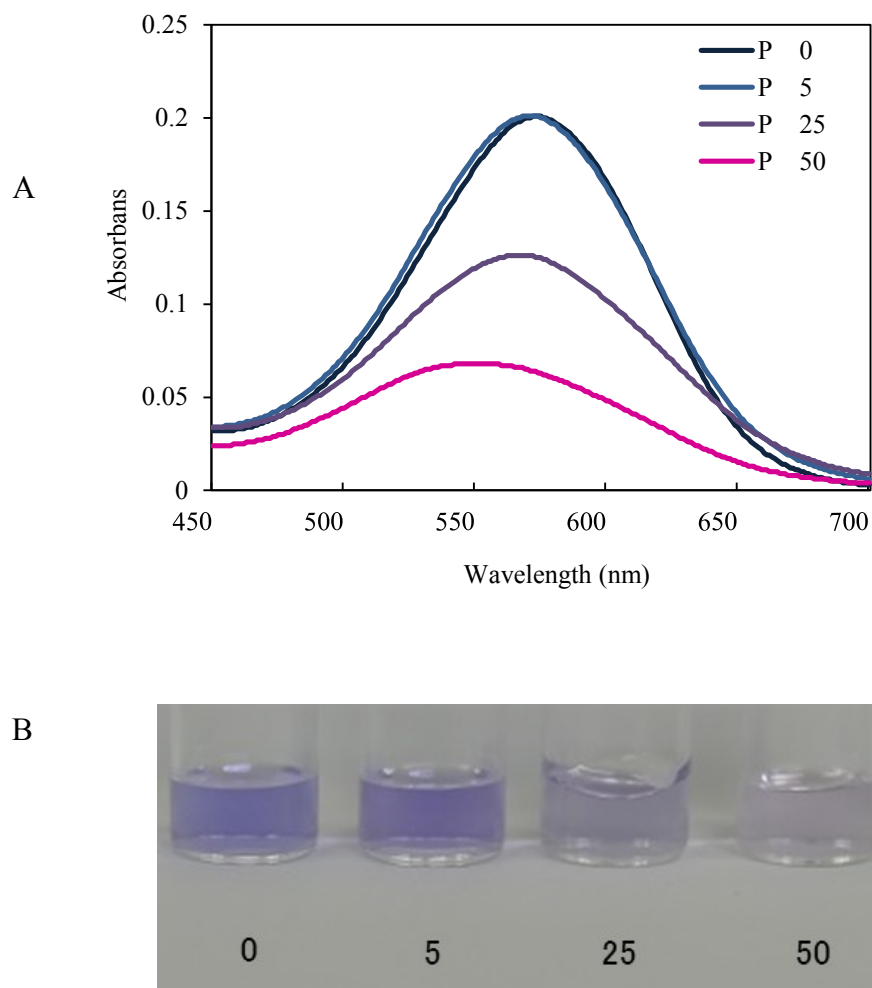


Fig. 3-5-1 Effects of phosphoric acid on absorption spectra and coloration of anthocyanin solution. The solutions were prepared at pH 4.0 based on the general content ratio in the sepals: solutions of delphinidin 3-glucoside (35 μ M), 3-*O*-caffeoylquinic acid (25 eq.), 5-*O*-caffeoylquinic acid (0.5 eq.), Al^{3+} (25 eq.) and each content of phosphoric acid (0 eq., 5 eq., 25 eq., 50 eq.).

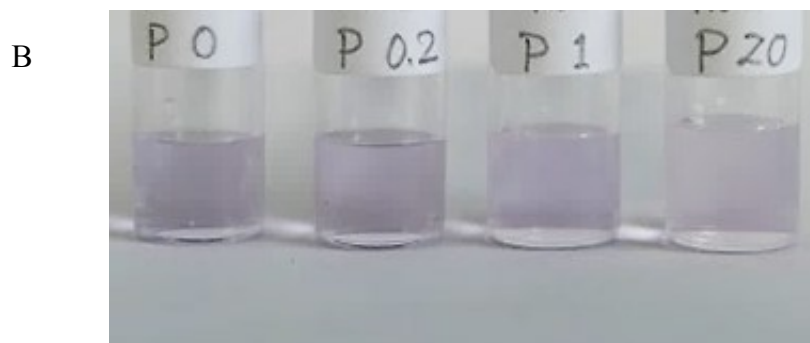
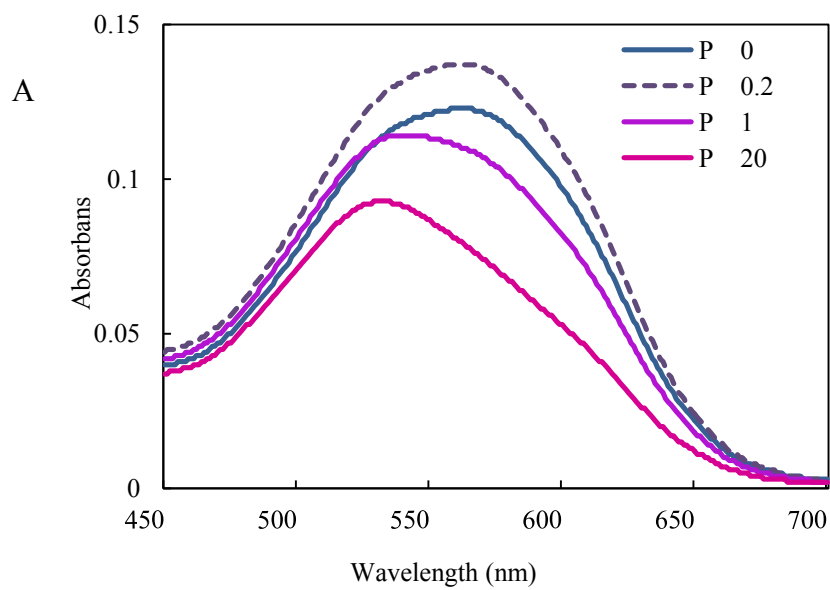
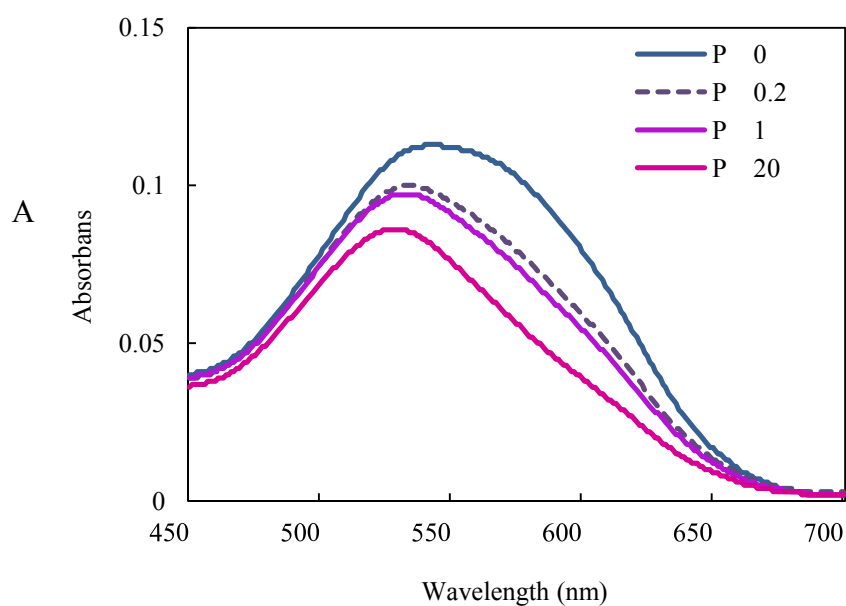


Fig. 3-5-2 Effects of phosphoric acid on absorption spectra and coloration of anthocyanin solution. The solutions were prepared at pH 4.0 based on the general content ratio in the vacuole of blue sepal: solutions of delphinidin 3-glucoside (20 μ M), 3-*O*-caffeoylquinic acid (10 eq.), 5-*O*-caffeoylquinic acid (1.3 eq.), Al^{3+} (1 eq.) and each content of phosphoric acid (0 eq., 0.2 eq., 1 eq., 20 eq.).



B



Fig. 3-5-3 Effects of phosphoric acid on absorption spectra and coloration of anthocyanin solution. The solutions were prepared at pH 4.0 based on the general content ratio in the vacuole of red sepal: solutions of delphinidin 3-glucoside (20 μM), 3-*O*-caffeoylquinic acid (10 eq.), 5-*O*-caffeoylquinic acid (0.5 eq.), Al^{3+} (1 eq.) and each content of phosphoric acid (0 eq., 0.2 eq., 1 eq., 20 eq.).

第4章 アジサイの秋色花色の発現に関わる要素

1. 諸言

アジサイは夏季の開花時に赤色や青色などの花色を発色した後、緑色に変化し、さらに秋季には緑色に重ねてふたたび赤色を発色する (Fig. 4-1)。秋色を発色したアジサイは、近年、新たな園芸的価値が高まりつつあり、‘秋色アジサイ’ または ‘アンティークアジサイ’ と呼ばれ流通している。秋色にも赤色から青紫色の花色があるものの (Fig. 1-1-2, 4-2)、夏色と同じような青色は無い。また同じがく片においても秋色は夏色と異なる部位に着色する現象が認められる。

秋色花色の特徴については、Yoshida ら (2008) がカメレオンアジサイ (*Hydrangea macrophylla* cv. *Hovaria*TM ‘Homigo’) の赤色の花色を対象に研究を行っている。彼らは、秋色は夏色の発色に関わる色素であるデルフィニジン系アントシアニンとは異なり、シアニジン系アントシアニンが担っていることを報告している。また、その発色は第2章および第3章で述べた夏色と異なり、5-O-カフェオイルキナ酸やアルミニウムの関与は認められないことを示している。夏色については様々な花色について発色機構が研究されているのに対して、秋色花色に関する報告は他に無いことから、赤色以外の紫色、青紫色の発色機構は不明である。したがって夏色で発色と関連して問題にされている花色の安定性に関しても議論されていない。秋色が夏色と異なる部位に着色する現象に関しても学術的な報告は見当たらない。よってこの現象に関する正確な情報を収集および整理して、生産者や販売関係者、消費者に発信する必要がある。

上述のように秋色には夏色に比べて、理解されていることが少ない。秋色の発色機構を解明することで、秋色アジサイの多彩な色彩のコントロールが可能になり、安定生産のための技術開発に貢献できると考えた。そこで、第4章においては、まずアジサイのがく片における秋色の着色組織の特徴を調査した。

次に秋色花色の発色機構および発色関連成分を分析し、花色との相関を調べた。夏色と同様にアントシアニン、アルミニウム、3-O-カフェオイルキナ酸および5-O-カフェオイルキナ酸、リンを発色関連成分として、がく片のpHとともに分析した。さらに、がく片の発色関連成分と発色の関係を化学的に証明するため発色の再現を試み、秋色花色を制御する要因について考察した。秋色の多彩な花色発現には夏色と同様にアントシアニンと5-O-カフェオイルキナ酸によるアルミニウムのキレート結合が関与していることが示された。また夏色と同様に品種の色彩の違いは、3-O-カフェオイルキナ酸の含量の違いの関与とともに、夏色と異なりアルミニウムの含量の違いも関与していることが示された。

2. 材料および方法

1) 植物材料

Hydrangea macrophylla ‘きらきら星’（栃木県育成品種）、‘城ヶ崎’（東京都農林総合研究センターから導入）、‘Bodensee’（東京都農林総合研究センターから導入）、‘Frau Yoshiko’（海老原園芸、栃木県真岡市）、‘Frau Yoshimi’（海老原園芸、栃木県真岡市）、‘ピーチ姫’（谷田部園芸、栃木県鹿沼市）の6種、および栃木県農業試験場所有系統‘HH2’、‘HH6’、‘HH11’、‘HH12’、‘HH13’、‘HH20’の6種、合計12品種・系統を供試した。2012年10月に秋色を発色したがく片を採取した。

2) 栽培方法

2010年に、黒土、ピートモス、もみ殻堆肥を4:2:1の割合で混合した培養土を用いて9号ポットへ定植し、ガラス温室で栽培した。管理温度は、最低温度3℃、換気温度18℃とした。肥料は、2011年および2012年4月にロング424

(JCAM AGRIC Co. Ltd., Tokyo, Japan) の 100 日および 180 日タイプを各 10 g/鉢施肥した。かん水は概ね週に 3 回行った。

3) がく片の色彩，吸収スペクトルの測定および顕微鏡観察

生がく片の色差値 (L^* , a^* , b^*) は色彩色差計 (CR-200, Konica Minolta Co. Ltd., Tokyo, Japan) で測定した。また，吸収スペクトルは分光光度計 (UV2450, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) で 400 nm から 700 nm までの吸光度を測定した。生がく片の着色細胞を CCD カメラを装着した顕微鏡 (VH-8000, Keyence Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いて観察した。

4) がく片の pH 測定

生がく片 4 枚を 1.5 mL 試験管に詰め，がく片のみを潰して得られた搾汁液を pH メーター (B-212, Horiba Co. Ltd., Tokyo, Japan) で測定した。

5) がく片内成分の HPLC 分析

‘きらきら星’を除く 11 品種・系統のがく片 700 mg を 2 mL の 10%酢酸で 24 時間抽出し，さらに 1 mL の 10%酢酸で 3 時間抽出した。抽出液に含まれるアントシアニン，3-*O*-カフェオイルキナ酸および 5-*O*-カフェオイルキナ酸について HPLC (Agilent1100 system (Agilent, USA) に Agilent 1200 のポンプと検出器を組み合わせた) を用いて測定した。測定条件は ODS-2 カラム (GL Sciences, Tokyo, Japan) ，流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 40°C とした。溶出溶媒は，溶媒 A (1.5%リン酸) と溶媒 B (1.5%リン酸，20%酢酸，25%アセトニトリル) の比率を 40 分で A が 80% - 0%となるリニアグラジエントで混合した。

アントシアニン，3-*O*-カフェオイルキナ酸および 5-*O*-カフェオイルキナ酸の標準物質をフナコシ (Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan) から購入し，HPLC の保

持時間とフォトダイオードアレイ検出器を用いた吸光スペクトルの一致によって行った。アントシアニン³は 530 nm, 3-O-カフェオイルキナ酸および 5-O-カフェオイルキナ酸は 330 nm の吸光度に基づいて定量した。

6) シアニジン 3-ラシロサイドの精製と分析

‘Bodensee’のアントシアニンを Cellulose TLC (Merck, Darmstadt, Germany) で 10% 酢酸水によって展開した。Rf 値 0.29 の領域のアントシアニン色素を分取し, 10% 酢酸水で抽出した。抽出液を Cellulose TLC で, ブタノール : 酢酸 : 水 (BAW) を 4 : 1 : 2 の比で混合した溶媒で展開した。Rf 値 0.37 の領域のアントシアニン色素を分取し, 10% 酢酸水で抽出した。精製したアントシアニンを標品のシアニジン 3-ラシロサイドとともに, 再度 Cellulose TLC で 10% 酢酸水あるいは BAW 4 : 1 : 2 を用いて展開した。

7) LC-MS 分析

LC-MS の分析は, ACQUITY UPLC with ACQUITY TQD tandem mass spectrometer (Waters Japan) を用いて測定した。測定条件は, ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (1.7 μ m, 2.1 i.d. x 100 mm, Waters) を用い, 流速 0.1 mL \cdot min⁻¹, 35°C で行った。溶出溶媒は, 溶媒 A (1%ギ酸) と溶媒 B (アセトニトリルに 1%ギ酸) の比率を 0-5 分は A が 100% - 95%, 5-20 分は A が 95% - 65%, 20-25 分は A が 65% となるリニアグラジエントで混合した。クロマトグラムは 360 nm, フォトダイオードアレイスペクトルは 200-800 nm で測定した。

質量分析は以下の条件で行った。測定電荷, ポジティブイオンモード; キャピラリー電圧, 3.5 kV; イオン源温度, 150°C; 脱溶媒温度, 350°C; 脱溶媒気体流速, 500 L/h; コーンガス流速, 50 L/h; コリジョンエネルギー, 6 V, 20 V; 測定範囲, 180–1080 m/z; 検出器電圧, 1.7 kV。

8) アルミニウムおよびリンの分析

生がく片を 85°C で 12 時間乾燥させた後、50 mg DW を分解用サンプル管に量りとった。そこに硝酸 2 mL を入れ電子レンジで湿式灰化した。分解液を試験管に移し、1 M 硝酸を 10 mL 加え希釈したものを ICP 発光分析装置 (CIROS CCD, Rigaku Co. Ltd., Tokyo, Japan) により分析した。

9) アントシアニンの発色に与える発色関連成分の効果

がく片に含まれる発色関連成分を混合し発色反応を調べるため、シアニジン 3-サンプビオサイド、3-*O*-カフェオイルキナ酸、5-*O*-カフェオイルキナ酸、AlCl₃ を 0.1 M 酢酸緩衝液に溶解し、pH4.8 に調製した。シアニジン 3-サンプビオサイドと各成分の反応による発色を調べるため、シアニジン 3-サンプビオサイドの濃度を 10 μM として、モル比でシアニジン 3-サンプビオサイド : 3-*O*-カフェオイルキナ酸および、シアニジン 3-サンプビオサイド : 5-*O*-カフェオイルキナ酸は 1 : 10、シアニジン 3-サンプビオサイド : アルミニウムは 1 : 5、シアニジン 3-サンプビオサイド : 3-*O*-カフェオイルキナ酸 : アルミニウムおよび、シアニジン 3-サンプビオサイド : 5-*O*-カフェオイルキナ酸 : アルミニウムは 1 : 10 : 5 の割合で混合した。また、赤色および青色のがく片に含まれる成分比に基づき、モル比でシアニジン 3-サンプビオサイド : 3-*O*-カフェオイルキナ酸 : 5-*O*-カフェオイルキナ酸 : アルミニウムが赤色では 1 : 30 : 1.5 : 5、青色では 1 : 5 : 1 : 5 の割合で混合した。それぞれの溶液の吸収スペクトルは、分光光度計 (UV2450, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) を用いて 400 nm から 700 nm までの吸光度を測定した。

3. 結果

1) 花色発現の形態的特徴

秋色の着色は、がく片の外縁部から始まっていた (Fig. 4-1) . 夏色では着色しない覆輪品種白色の外縁部も、秋色では着色していた (Fig. 4-3) . 秋色ではがく片内側の着色が認められない花があった (Fig. 4-4) . 秋色が着色していない部分は、他のがく片が重なっていた部分であった. 秋色が着色していないがく片は、がく片の重なりが著しい八重咲き品種でも認められた.

2) がく片細胞の構成

夏色において赤色、紫色、青色を発色した花は、秋色では赤色、赤紫色、青紫色を発色した (Table 4-1) . 秋色は同じ花の夏色より赤みが強かった. 秋色の色相角は、赤色の 6 品種が 0° – 19° の範囲、赤紫色の 2 品種は、 332° – 343° の範囲、そして青紫色の 3 品種は、 312° – 340° の範囲にあった.

赤色品種のがく片は赤色の濃淡の異なる細胞で構成されていた. 赤紫色および青紫色品種のがく片は、赤色から青紫色の色調と濃淡の異なる細胞で構成されていた. Fig. 4-5 に各グループの代表として ‘Frau Yoshimi’ , ‘HH6’ , ‘HH11’ の着色細胞の分布を示す.

3) がく片の吸収スペクトル

赤色品種に比べて、赤紫色および青紫色の品種は吸収スペクトルの尖度が低かった (Table 4-1, Fig. 4-6) . 極大吸収値は、赤色品種が 538–540 nm にピークを示し、550 nm より長波長側で急激に減少した. 680 nm 付近で再びピークを示した. 赤紫色品種は、538–546 nm にピークを示し、630 nm 付近までなだらかに減少した. 680 nm 付近に小さなピークを示した. 青紫色グループは 554–565 nm にピークを示し、640 nm 付近までなだらかに減少した. 680 nm 付近に小さなピ

ークを示した.

4) がく片 pH

がく片搾汁液の pH は, 赤色品種は 4.7–4.9, 紫色品種が 4.8–4.9, 青紫色品種が 4.9–5.2 であった (Table 4-2) . 色彩と pH には相関は認められなかった.

5) アントシアニンの同定

HPLC 分析の結果, 秋色を発色しているすべての色彩の品種には, 主に 2 種類の主要アントシアニンが含まれていた. 標品との HPLC における保持時間と吸収スペクトルの一致から, 最も主要なアントシアニンは Yoshida ら (2008) にあるシアニジン 3-サンブビオサイドと同定した (Table 4-3) .

次に多く含まれるアントシアニンを, ‘Bodensee’ から精製, 分析した. 極大吸収波長を 518 nm に持つ吸収スペクトルの特徴と質量分析の結果 m/z 581 であったことから, このアントシアニンをシアニジン 3-ラシロサイドと推定した. 標品との HPLC における保持時間と吸収スペクトル, および TLC における Rf 値が一致したことで同定した (Table 4-3, Fig. 4-7) .

また 3 種類の微量アントシアニンを検出した. 極大吸収波長を 525 nm に持つ吸収スペクトルの特徴と質量分析の結果 m/z 597 となったことからデルフィニジン 3-サンブビオサイド, 極大吸収を 523 nm に持つ吸収スペクトルの特徴と質量分析の結果 m/z 464 となったことからデルフィニジン 3-グルコサイド, 極大吸収波長を 515 nm に持つ吸収スペクトルの特徴と質量分析の結果 m/z 449 となったことからシアニジン 3-グルコサイドと推定した. これらのアントシアニンは標品との HPLC における保持時間と吸収スペクトル, および TLC における Rf 値が一致したことで同定した (Table 4-3, Fig. 4-6–4-7) .

6) アントシアニン含量

秋色を発色したがく片における主要アントシアニンであるシアニジン 3-サンブジオサイドとシアニジン 3-ラシロサイドの含量は、それぞれ赤色品種では $0.10\text{--}1.78 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW と $0.01\text{--}0.19 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に、赤紫色品種では $1.03\text{--}1.54 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW と $0.02\text{--}0.23 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に、青紫色品種では $0.73\text{--}1.32 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW と $0.05\text{--}0.15 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した (Table 4-2, Fig. 4-8-1A) . それぞれのアントシアニン含量と色彩の間には関連が認められなかった.

7) 5-O-カフェオイルキナ酸含量

5-O-カフェオイルキナ酸含量は、赤色品種が $0.18\text{--}4.19 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, 赤紫色品種が $0.56\text{--}1.87 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, 青紫色品種は $0.90\text{--}1.28 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した. 5-O-カフェオイルキナ酸含量と色彩の間には関連が認められなかった (Fig. 4-8-1B) .

8) 3-O-カフェオイルキナ酸含量

3-O-カフェオイルキナ酸含量は、赤色品種の $4.51\text{--}30.37 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に対し、赤紫色と青紫色の品種は $9.37\text{--}9.65 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した. 赤紫色と青紫色のがく片に含まれる 3-O-カフェオイルキナ酸含量は、城ヶ崎を除いて赤色のがく片に含まれる量よりも少ない領域に分布していた (Fig. 4-8-2C) .

9) アルミニウム含量

アルミニウム含量は、赤色品種が $0.94\text{--}4.96 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, 赤紫色の品種は $5.38\text{--}6.03 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, 青紫色の品種は $9.26\text{--}11.24 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した (Fig. 4-8-2D) . 赤色品種と赤紫色品種に比べて青紫色品種のアルミニウムの含量は高い領域に分布していた.

10) リン含量

リン含量は、赤色品種が 4.53–19.92 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, 赤紫色品種が 9.34–17.31 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, 青紫色品種は 14.62–31.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW に分布した。リン含量と色彩の間には関連が認められなかった (Fig. 4-8-3E)。

11) アントシアニン溶液に与える発色関連物質の影響

主要アントシアニンであるシアニジン 3-サンプビオサイドの溶液の最大吸収波長は 531 nm を示し、赤色を呈した (Fig. 4-9A, B)。シアニジン 3-サンプビオサイドとアルミニウムを混合した溶液は 556 nm を示し、赤紫色を呈した (Fig. 4-11C)。シアニジン 3-サンプビオサイドとアルミニウムおよび 3-*O*-カフェオイルキナ酸を混合した溶液は 561 nm を示し、赤紫色を呈した (Fig. 4-9D)。また、シアニジン 3-サンプビオサイドとアルミニウムおよび 5-*O*-カフェオイルキナ酸を混合した溶液は 568 nm を示し青紫色を呈した (Fig. 4-9E)。アルミニウムを加えた溶液は吸光度が増加し色が濃くなった (Fig. 4-9D~G)。また、赤色のがく片の成分比率に基づいてシアニジン 3-サンプビオサイド, 3-*O*-カフェオイルキナ酸, 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムを混合した溶液は, 562 nm を示し赤紫色を呈した (Fig. 4-10A, C)。青紫色のがく片の成分比率に基づいてシアニジン 3-サンプビオサイド, 3-*O*-カフェオイルキナ酸, 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムを混合した溶液は, 560 nm を示し赤紫色を呈した (Fig. 4-10A, D)。

4. 考察

夏色では白色の覆輪品種のがく片の外縁部も、秋色では着色する (Fig4-3)。夏色と秋色では色素生合成の内生的な制御機構が異なることが示唆された。ま

た、夏色ではがく片のすべての部分が着色する品種でも、秋色ではがく片が重なり合った部分は着色していなかった (Fig. 4-4) . この現象は特に八重咲き品種で顕著に認められた. 秋色の着色とそれを担うアントシアニンの生合成は光要求性があることが示唆された. 光を受けにくい花房の内部に着色が認められないことも、この考えを支持する. 同様の発色の光要求性は夏色には認められないことから、秋色に特異的な性質と考えられる. リンゴ果実の赤色着色には光要求性があり、着色を担うアントシアニンの生合成は UV-B によって誘導されることが報告されている (渡部ら, 1983 ; Ubi ら, 2006) . また、多くの紅葉は紫外線の影響を受け発色する (武田, 1996) . Yoshida ら (2008) はカメレオンアジサイの赤色変化も紅葉と同じ仕組みではないかと推測している. 秋色アジサイの花色発現の光要求性も、これらと同様の現象と考えられる. 秋色におけるアントシアニンの生合成は、部位特異性と光要求性に関して、夏色と異なる制御を受けていることが示唆された.

秋色の色彩には、赤色、赤紫色、青紫色がある (Table 1-1-2, Fig. 4-2) . いずれの品種においても主要アントシアニンは、Yoshida ら (2008) の報告にあるシアニジン 3-サブピオサイドとともに、新たにシアニジン 3-ラシロサイドも含まれることを明らかにした (Table 4-3, Fig. 4-7) . アントシアニンの組成には品種間差があり、多くの品種ではシアニジン 3-サブピオサイドが最も高い割合で含まれていた一方で、‘**Bodensee**’ はシアニジン 3-ラシロサイドを最も高い割合で含んでいた. ただしアントシアニンの組成と含量には色彩との間に関連が認められなかったことから、色彩に影響を与える要素ではなかった.

本研究に用いた材料の品種・系統は、夏色が赤色、紫色、青色の花は、秋色では赤色、赤紫色、青紫色になった. 秋色は夏色と対応した花色発現が見られることから、色彩の発色機構には夏色と秋色で類似性があると考えられる. 夏色の青色の発色には、アントシアニンであるデルフィニジン 3-グルコサイドと

ともに 5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムのキレート構造が担っている (Ito ら, 2009 ; Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, b, 1990 ; Yoshida ら, 2003) . また 3-*O*-カフェオイルキナ酸はこのキレート結合を阻害する要素である (武田, 2013) 秋色においても, アントシアニンとともにこれらの成分が発色を担っているかを調べた.

秋色の赤色品種, 赤紫色品種と青紫色品種の吸収極大波長はそれぞれ 539 nm , 545 nm, 560 nm であり, 赤色品種に比べて, 赤紫色品種と青紫色品種は約 5 nm と約 30 nm 長波長側にシフトしていた (Table 4-1, Fig. 4-6) . また赤色品種が 550 nm より長波長領域で吸収スペクトルが急激に減少するのに対し, 赤紫色品種と青紫色品種は 640 nm 付近までなだらかに低下する違いが見られた (Fig. 4-6) .

主要色素であるシアニジン 3-サンプルビオサイドを用いて, がく片の吸収スペクトルの構成を試みた (Fig. 4-9, 4-10) . シアニジン 3-サンプルビオサイド溶液は吸収極大波長が 521 nm の赤色を示した. それにアルミニウムを加えると吸収極大波長は 556 nm へと長波長側に移動し赤紫色を呈した. シアニジン 3-サンプルビオサイドと 5-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの混合では吸収極大波長が 568 nm となり, より長波長側に移動し青紫色を呈した. シアニジン 3-サンプルビオサイドと 3-*O*-カフェオイルキナ酸およびアルミニウムの混合では吸収極大波長は 559 nm であり, 3-*O*-カフェオイルキナ酸が吸収極大波長の長波長移動に与える効果は 5-*O*-カフェオイルキナ酸よりも小さかった. これらのことから, 秋色の主要アントシアニンの青紫色の発色は, 主にアントシアニンと 5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムによるものと考えられた.

3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量が少ない青紫色のがく片の成分比率で, シアニジン 3-サンプルビオサイド : 3-*O*-カフェオイルキナ酸 : 5-*O*-カフェオイルキナ酸 : アルミニウムを 1 : 5 : 1 : 5 の割合で混合した溶液は, 赤紫色を呈し色彩を再現

できた (Fig. 4-10) . これによって秋色でも青色の色彩は、基本的にはアントシアニンと 5-O-カフェオイルキナ酸とアルミニウムの相互作用で発色していることが示された. Yoshida ら (2008) は秋色と思われるカメレオンアジサイの赤色の発色の再現として、シアニジン 3-グルコサイドを用いた実験において、アルミニウムは青色への関与が認められず、赤色のみ発現することを論じていた. 本研究によって、秋色の発色機構に関する新たな知見を得ることができた.

一方で 3-O-カフェオイルキナ酸の含量が多い赤色のがく片の成分比率で、シアニジン 3-サンブピオサイド:3-O-カフェオイルキナ酸:5-O-カフェオイルキナ酸:アルミニウムを 1:30:1.5:5 の割合で混合した溶液は、赤紫色を呈し赤色を再現することはできなかった (Fig. 4-10) . 夏色では液胞中のアルミニウムはがく片全体の含量よりも少ないことが示されている (近藤ら, 1999) . 赤色の秋色を示すがく片においても、液胞に含まれて発色に関与しているアルミニウムの量は、がく片全体に含まれている量より少ない可能性がある.

溶液の吸収極大波長が、がく片の吸収極大波長に一致を示した一方で、それ以外の波長領域の形には違いが認められた. いずれの色彩においても溶液に比べてがく片の 500 nm 以下の吸光度が高い原因は、共存する緑色を担うクロロフィルとカロテノイドによるものと考えられる. がく片の 780 nm 付近の吸収もクロロフィルによるものと考えられる. 秋色を発色しているがく片の着色細胞の分布は、赤色品種が赤色の細胞が濃淡を変えて構成されていたのに対し、赤紫色および青紫色の品種は赤色や紫色の細胞が比率と濃淡を変えて構成されていた. Yoshida ら (2008) の報告でも、秋色のがく片では赤色と紫色の細胞が混在していることが示されている. これら異なる色彩の細胞の混在も、赤紫色と青紫色品種において吸収スペクトルの尖度を低下させている原因と考えられる.

がく片を分析した結果、第 2 章と第 3 章で示した夏色の場合と同様に、秋色においても青みの強い青紫色は、赤色や赤紫色に比べて 3-O-カフェオイルキナ

酸の含量が少なかった (Fig.4-8-1B) . 秋色でも 3-O-カフェオイルキナ酸が少ないことが青色の色彩の発色に必要なと考えられる. 夏色の青色発色機構に関しては, 3-O-カフェオイルキナ酸は 5-O-カフェオイルキナ酸の類縁体として, アントシアニンであるデルフィニジン 3-グルコサイドと 5-O-カフェオイルキナ酸とアルミニウムのキレート構造を阻害すると考えられている (武田, 2013) . シアニジン型アントシアニンを主要アントシアニンとする秋色の発色においても同様の現象が関与していると推定した. 秋色は夏色より赤味が強いのは, 主要アントシアニンが夏色ではデルフィニジンであるのに対し, 夏色ではシアニジンであるためと考えられる.

品種間の夏色と秋色の青色の色彩の強さには相関があることから, 夏色と秋色における青色の色彩の発色は, 類似の機構で制御されていると考えられる. 夏色で認められているように (Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, 1985b, 1990 ; Yoshida ら, 2003) , 青みの強いがく片にアルミニウムが多い傾向が認められた. アルミニウムの量が多いことは必須ではない一方で, そのような性質を持つ品種は青色発色に有利なものとして選抜されてきた可能性がある (Fig. 4-8-2D) . またリンの含量についても, 夏色と同様に秋色においても青紫色のがく片で少ないことが予想された. しかし, リンの含量と秋色の色彩との相関は認められなかった. 秋色には夏色に比べて約 10 倍のリンが検出された. 第 3 章の結果に基づくと (Fig. 3-5-1) , このリンの含量に相当するリン酸が液胞に存在する場合には, アントシアニンと 5-O-カフェオイルキナ酸とアルミニウムの相互作用が阻害され, 青紫色は発色出来ないと考えられる. 秋色のがく片で増加したリンは, 夏色の退色から秋色の発色に至る間に, がく片の着色細胞の液胞以外の組織にリン酸が蓄積したと推測している.

Table 4-1 Chromatic values of autumn color sepals of *Hydrangea* cultivars and lines.

	Summer color	Autumn color	Color value			Hue-angle (°)	λvismax (nm)
			L*	a*	b*		
Peach-hime	Pink	Red	37.0 ± 3.9 ab	41.5 ± 3.1 a	11.4 ± 0.8 a	15	539
Baudensee	Pink	Red	43.1 ± 2.6 a	33.2 ± 2.4 b	7.1 ± 1.7 b	12	538
Frau Yoshimi	Red	Red	30.2 ± 1.7 cd	40.1 ± 1.0 a	12.4 ± 1.6 a	17	539
Frau Yoshiko	Red-pink	Red	28.8 ± 1.5 cde	32.5 ± 3.6 b	11.0 ± 1.4 a	19	539
HH13	Red-pink	Red	31.1 ± 1.6 bcd	30.9 ± 1.9 b	3.4 ± 0.9 c	6	539
Jougasaki	Red-pink	Red	33.4 ± 1.2 bc	31.1 ± 1.4 b	-0.2 ± 1.4 cd	0	538
HH2	Purple	Red-purple	26.0 ± 3.4 de	12.5 ± 1.6 cd	-3.8 ± 1.0 de	343	546
HH20	Purple	Red-purple	25.1 ± 1.7 de	15.9 ± 1.0 c	-8.4 ± 1.4 fg	332	544
HH6	Blue-purple	Blue-purple	25.9 ± 1.1 de	13.7 ± 2.9 cd	-5.5 ± 0.7 ef	338	553
HH12	Blue-purple	Blue-purple	22.7 ± 1.0 e	10.8 ± 1.1 cd	-4.0 ± 1.3 e	340	562
HH11	Blue-purple	Blue-purple	27.2 ± 1.1 de	9.6 ± 0.9 d	-10.8 ± 1.3 g	312	565

Table 4-2 pH and anthocyanin components in autumn color sepals of *Hydrangea* cultivars and lines.

	pH	Cyanidin 3- sambubioside ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Cyanidin 3- lathyroside ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Cyanidin 3- glucoside ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Total anthocyanin ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)
Peach-hime	4.9±0.1	1.78	0.17	0.00	2.04 ± 0.39 a
Baudensee	4.9±0.0	0.10	0.15	0.05	0.30 ± 0.06 d
Frau Yoshimi	4.8±0.1	0.48	0.03	0.17	0.69 ± 0.15 cd
Frau Yoshiko	4.9±0.1	1.62	0.19	0.09	1.94 ± 0.21 a
HH13	4.7±0.1	0.90	0.08	0.00	1.21 ± 0.17 bc
Jougasaki	4.9±0.1	0.15	0.01	0.00	0.18 ± 0.05 d
HH2	4.9±0.0	1.03	0.02	0.00	1.12 ± 0.21 bc
HH20	4.8±0.0	1.54	0.23	0.14	1.99 ± 0.52 a
HH6	4.9±0.1	1.32	0.15	0.00	1.51 ± 0.26 ab
HH12	5.2±0.0	0.54	0.05	0.00	0.66 ± 0.02 cd
HH11	5.1±0.1	0.73	0.07	0.00	1.19 ± 0.07 bc

Values are the means ± SD (n=3); different letters indicate significant differences ($P<0.01$ by Tukey's test).

Table 4-3 Comparison of anthocyanin in the autumn color sepal of *Hydrangea*.

	Retention time (min.)	λ_{\max} (nm)	Rf value	
			10% Acetic acid	BAW(4:1:2)
Autumn colored sepal extract	9.39	525.5	0.20	0.25
	9.92	523.5	0.06	0.23
	10.57	518.5	0.29	0.37
	11.47	516.5	0.30	0.39
	11.69	515.5	0.09	0.34
Delphinidin 3-sambubioside	9.30	525.5	0.20	0.25
Delphinidin 3-glucoside	9.95	523	0.06	0.23
Cyanidin 3-lathyroside	10.57	518	0.29	0.37
Cyanidin 3-sambubioside	11.48	516	0.30	0.39
Cyanidin 3-glucoside	11.60	515	0.09	0.34



Fig. 4-1 Seasonal changes in the flower color of *Hydrangea*. (A) Summer color stage, (B) green color stage, (C) autumn color stage.



Fig.4-2 A variety of flower color of autumn color *Hydrangea*. (A) Red, (B) red-purple, (C) blue-purple.

A



B



Fig. 4-3 Difference of coloration position in sepals of the same cultivar ‘Kirakiraboshi’ between summer and autumn color. (A) Summer color stage, (B) autumn color stage.



Fig.4-4 Positional coloration difference in a sepal expressing autumn color. (A) Single flower, (B) double flower.

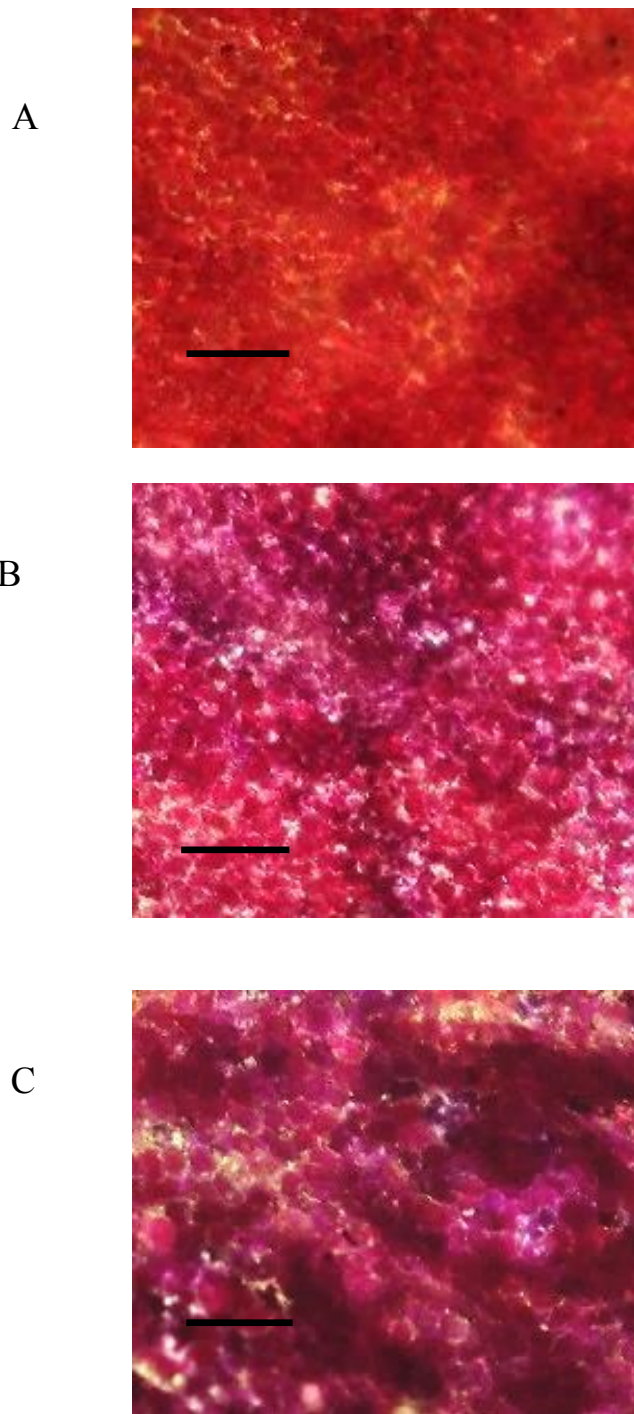


Fig. 4-5 Microscopic images of autumn color sepal cells. (A)Red cultivar 'Frau Yoshimi', (B)purple line 'HH6', (C)blue-purple line 'HH11'. Bars:100 µm.

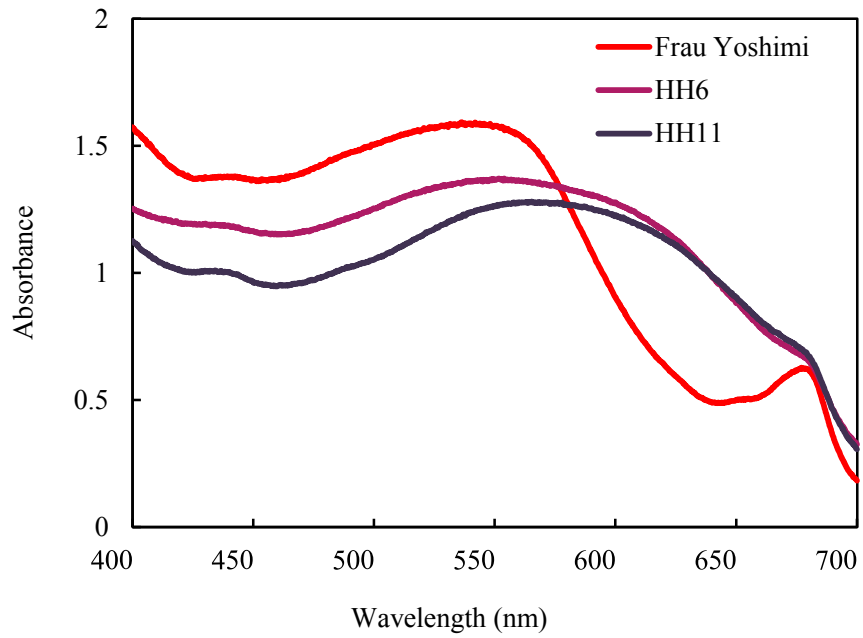


Fig. 4-6. Absorption spectra of autumn color *Hydrangea* sepal. Red-bars, Red cultivar 'Frau Yoshimi', purple-bars, purple line 'HH6', blue-bars, blue-purple line 'HH11'.

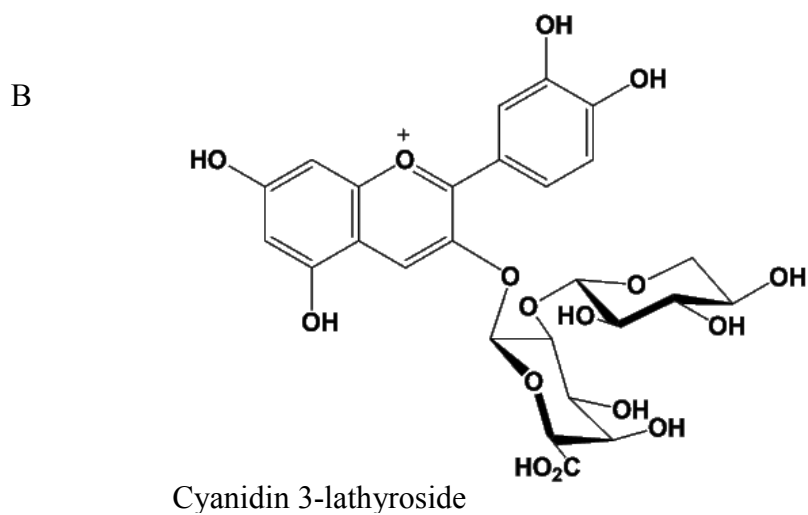
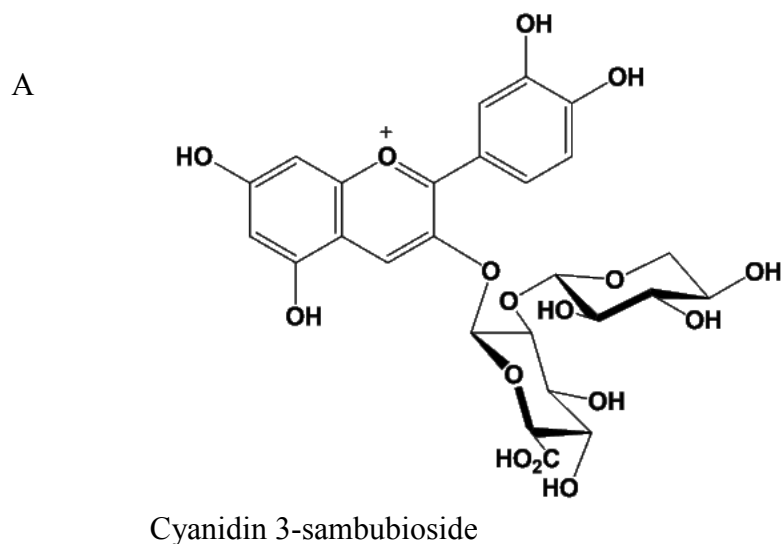


Fig.4-7 Structures of anthocyanins in autumn color *Hydrangea* sepals. (A) Cyanidin 3-sambubioside, (B) Cyanidin 3- lathyroside.

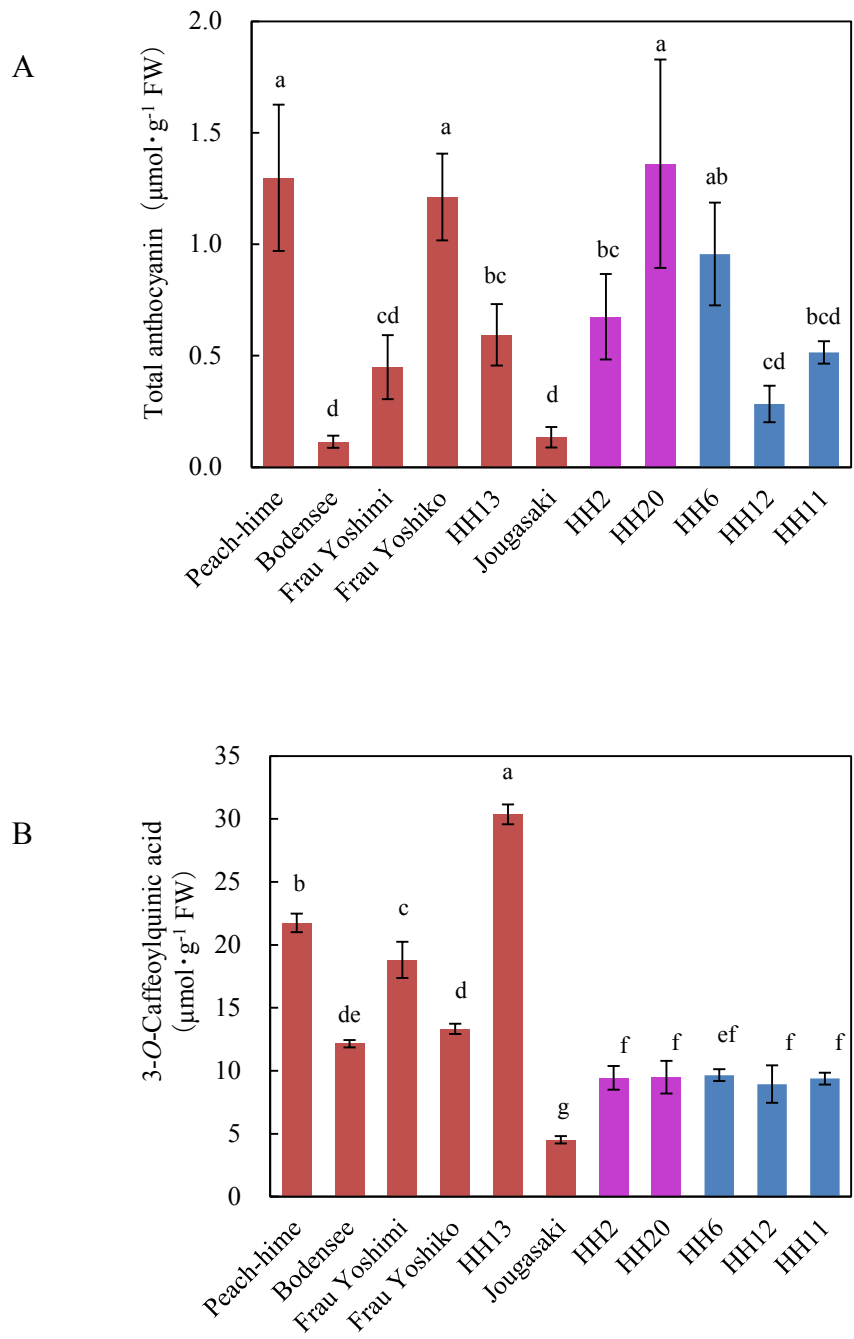


Fig. 4-8-1 Contents of coloration-related components in autumn color *Hydrangea* sepals.

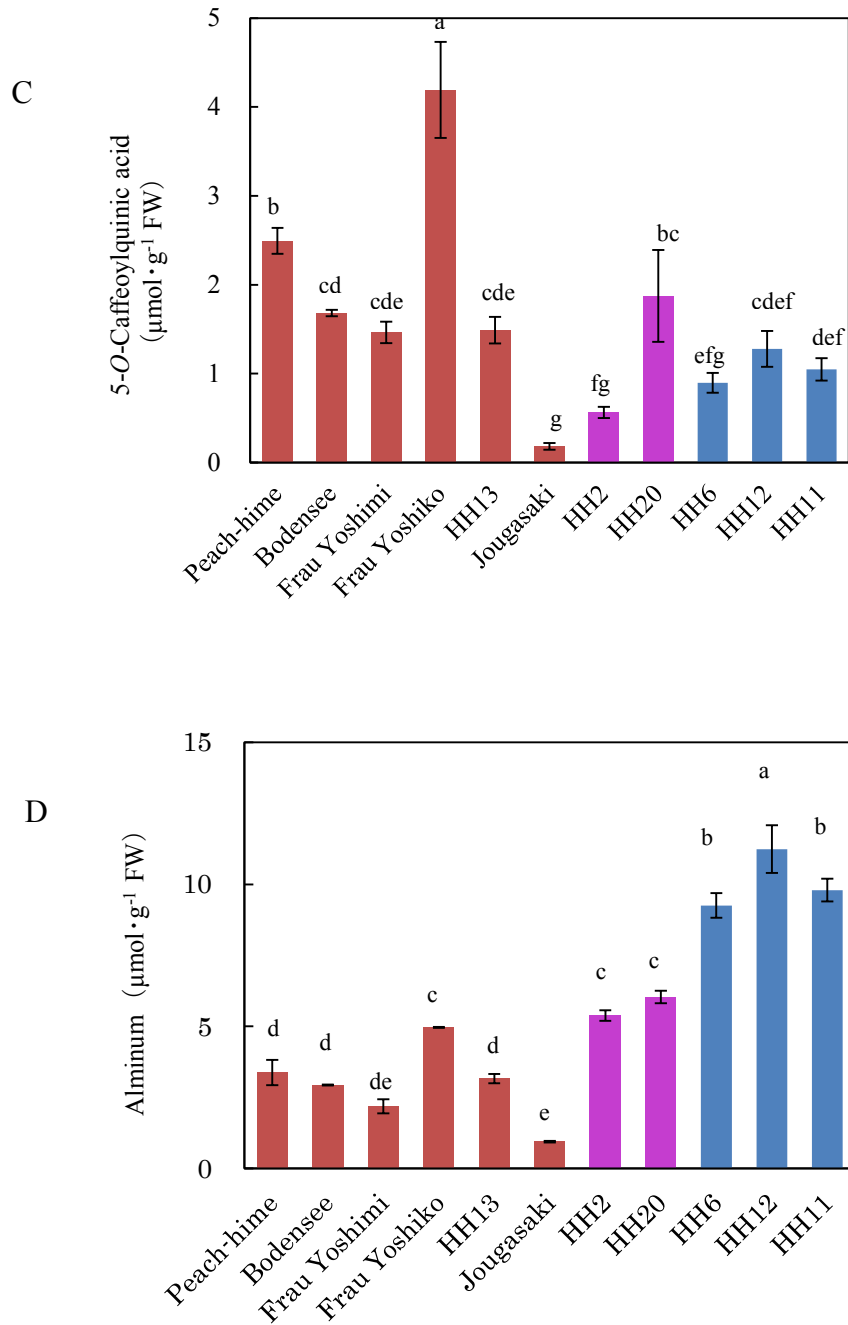


Fig. 4-8-2 Contents of coloration-related components in autumn color *Hydrangea* sepals.

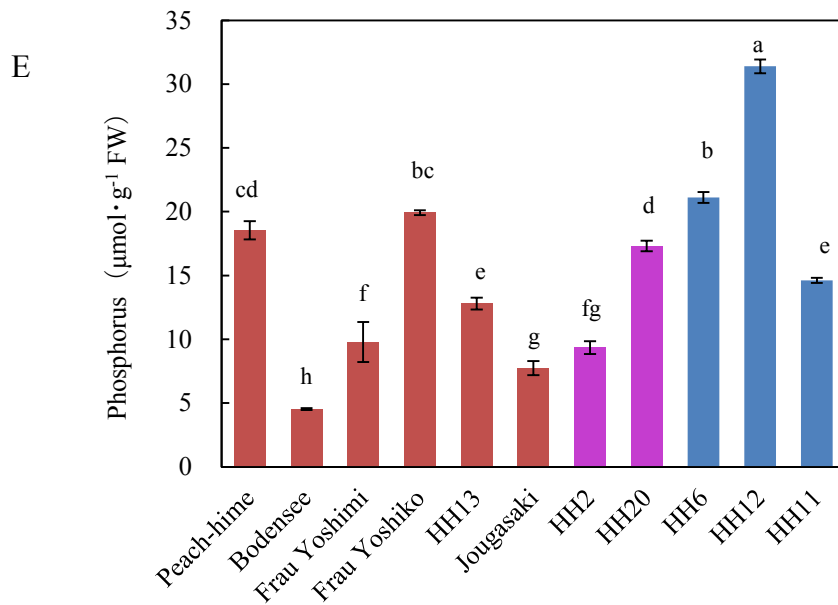


Fig. 4-8-3 Contents of coloration-related components in autumn color *Hydrangea* sepals.

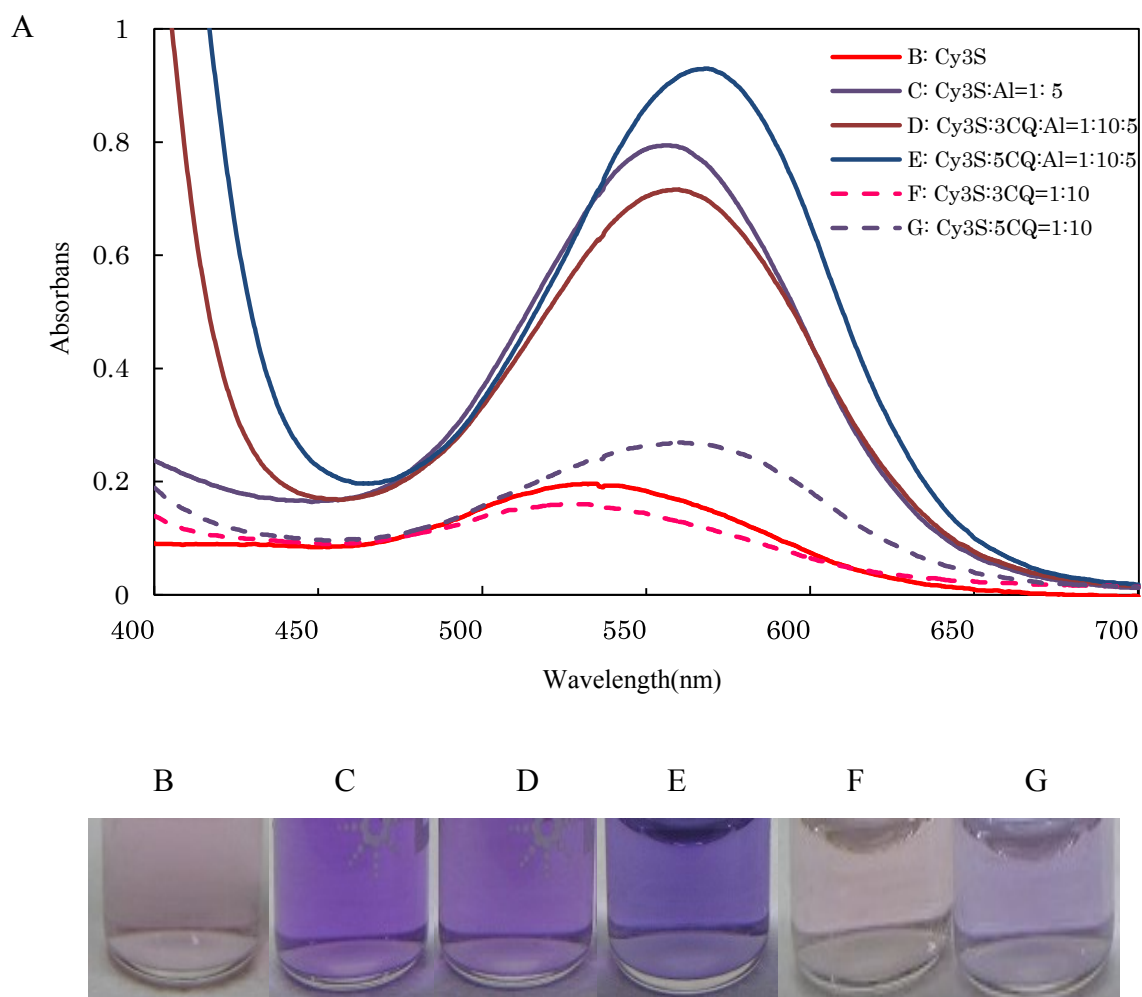
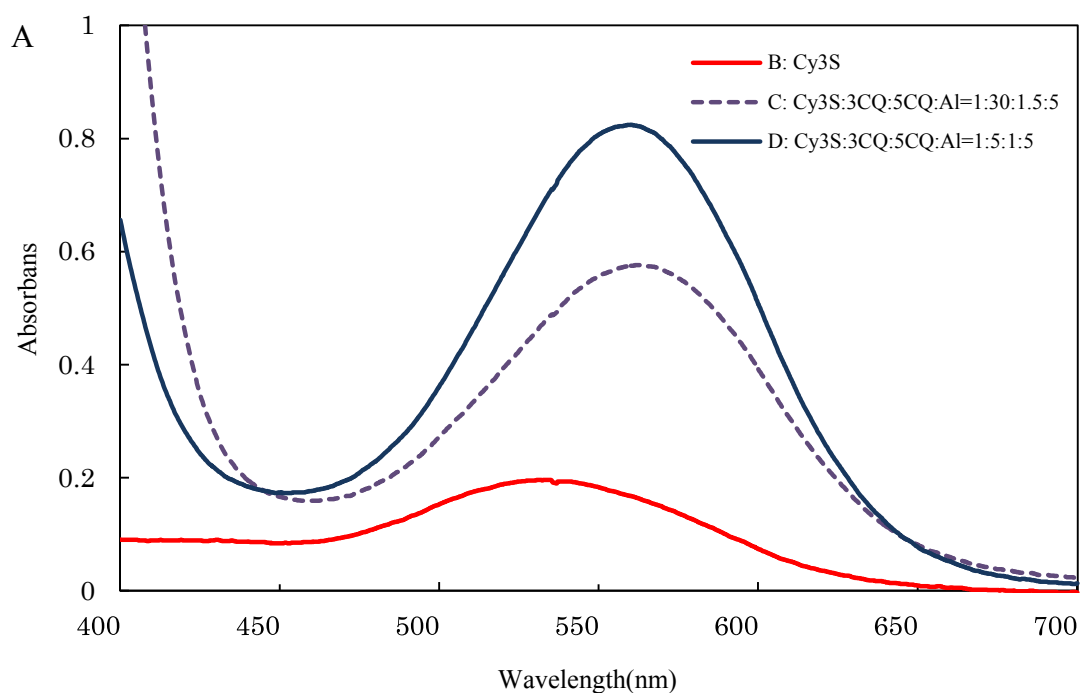


Fig. 4-9. Effects of the coloration-related components on absorption spectra and coloration of anthocyanin solution. The solutions were prepared at pH 4.8, (B) Cyanidin 3-sambubioside (10 μM), (C) Cyanidin 3-sambubioside: Al^{3+} (1 eq.:5 eq.) (D) Cyanidin 3-sambubioside:3-*O*-caffeoylquinic acid: Al^{3+} (1 eq.:10 eq.:5 eq.), (E) Cyanidin 3-sambubioside:5-*O*-caffeoylquinic acid: Al^{3+} (1 eq.:10 eq.:5 eq.). (F) Cyanidin 3-sambubioside:3-*O*-caffeoylquinic acid (1 eq.:10 eq.), (G) Cyanidin 3-sambubioside:5-*O*-caffeoylquinic acid (1 eq.:10 eq.).



B

C

D

Fig. 4-10. Reproduction by mixing the coloration-related component. The solutions were prepared at pH 4.8 based on the general content ratio in autumn color *Hydrangea* sepals, (B) Cyanidin 3-sambubioside (10 μM), (C) Cyanidin 3-sambubioside: 3-*O*-caffeoylquinic acid: 5-*O*-caffeoylquinic acid: Al^{3+} (1 eq.:30 eq.:1.5 eq.:5 eq.), (D) Cyanidin 3-sambubioside: 3-*O*-caffeoylquinic acid: 5-*O*-caffeoylquinic acid: Al^{3+} (1 eq.:5 eq.:1 eq.:5 eq.).

第5章 総合考察

アジサイは、栽培条件により花色が赤色、紫色および青色に変化する特徴を持つ。本博士論文研究では、アジサイを鉢花として営利生産する上で重要な、花色を安定に発現させる技術開発を目的に、がく片に含まれる発色関連成分を比較し、花色の可変性を制御する要因を見出すことを試みた。

夏色のアジサイの色彩の発色には、アントシアニン色素、アルミニウムイオン、5-*O*-カフェオイルキナ酸と 3-*O*-カフェオイルキナ酸の濃度、さらには、これらの化合物が溶解している液胞の pH が関与していると理解されて来た (Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, 1985b, 1990). 即ち、青色の発色は主要アントシアニンであるデルフィニジン 3-グルコサイドと補助色素である 5-*O*-カフェオイルキナ酸のアルミニウムへのキレート結合によること、低い pH の溶液への溶解や 3-*O*-カフェオイルキナ酸によってこのキレート結合が阻害されると赤色を発色することが論じられてきた (Ito ら, 2009 ; Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, b, 1990, 武田, 2013 ; Yoshida ら, 2003, 2009). また、花色を変化させる栽培条件の本質は、土壌中の可溶性アルミニウムの濃度であり、これが植物体へのアルミニウムの吸収に影響を与えていると考えられている。

これらの知見に基づいて、第 2 章では酸性土壌とアルカリ性土壌で栽培した安定発色品種の赤色あるいは青色のがく片と、可変品種の赤色あるいは紫色のがく片に含まれる発色関連成分を比較した。その結果、青色の発色には 3-*O*-カフェオイルキナ酸が少ないことが必要であるという従来の説を支持する結果が得られた一方で、がく片に含まれるアルミニウムの含量と花色との間は相関が認められなかった。つまり、従来の説と異なり、がく片のアルミニウムの含量は可変性を含むアジサイの花色を制御する要素ではないことが示された。

この考察に基づいて、アジサイの花色発現に関与する新たな要素を追求した。

当該要素の性質として、1. アントシアニンとアルミニウム、5-*O*-カフェオイルキナ酸の結合に影響を与える、2. 土壌から供給される、3. 赤色と青色用の培養土で大きな違いを示す性質を持つと推定し、アルミニウムをキレートすること、土壌 pH が高い条件で濃度が増加すること、さらにアジサイに対して赤色の発色を促進する、これらの性質を有する物質として、リン酸を想定するに至った。

そこで第 3 章では、花色の発現におけるリン酸の関与を明らかにするため、青色と赤色が不安定に発色させる品種間の交配で得られた花色の異なる F₂ 集団のがく片を材料に用いて、リン酸の構成成分であるリンの含量を分析し、色彩との相関を調査した。がく片によってアントシアニンの含量の差が大きかったことから、アントシアニンの含量が 2 倍以内のがく片の間で比較を行った。その結果、青色のがく片に含まれるリンの含量は、一つの例を除いて赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布していた。一方で、第 2 章の材料と同様、花色とアルミニウムの含量には明確な相関は認められなかった。

さらに花色発現におけるリン酸の効果を調べるために、がく片に含まれる発色関連成分の組成比率に基づいて調製した溶液で発色実験を行った。デルフィニジン 3-グルコサイドと 5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムが含まれる青色の溶液にリン酸を加えると、リン酸の濃度の上昇に伴い吸収極大波長が短波長に移行し、青色の色彩が弱まり赤色の色彩が強まった。リン酸はアルミニウムと結合する性質があることから、青色発色を担うキレート構造の構成を阻害すると考えられる。以上のことから、アジサイの花色を制御する主要因子は、従来議論されてきたアルミニウムではなく、リン酸であることが示された。

アジサイのがく片は初めに夏色を発色し、その後アントシアニンが退色してクロロフィルが生成されて緑色になり、再びアントシアニンによる秋色を発色する。第 4 章では、夏色では白色の覆輪品種のがく片の外縁部も、秋色では着

色することから、夏色と秋色では色素生合成の内生的な制御機構が異なることを示した。また秋色の着色とそれを担うアントシアニンの生合成は光要求性があることが示唆された。秋色におけるアントシアニンの生合成は、部位特異性と光要求性に関して、夏色と異なる制御を受けているようである。

秋色の色彩には、赤色、赤紫色、青紫色があり、それぞれのがく片で発色する秋色は、夏色の赤色、紫色、青色と対応している。秋色の主要アントシアニンは、報告されているシアニジン 3-サブピオサイドとともに、新たにシアニジン 3-ラシロサイドであることを明らかにした。秋色花色の色素は、夏色とは異なるシアニジン系アントシアニンが担っていた。シアニジン系アントシアニンの溶液は赤色を示すとともに、5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムを加えることで青色が濃くなり、花色と類似の青紫色を発色した。3-*O*-カフェオイルキナ酸には青色を濃くする効果は無く、青紫色のがく片は赤色や赤紫色のがく片に比べて 3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量が少なかった。秋色の花色の発色制御機構については、多くの要素に関して夏色との類似性が認められた。一方、秋色におけるリン酸の関与は興味ある課題として残された。

これまでの多くの研究によって、アジサイの花色を決定する要因が議論されてきた (Ito ら, 2009 ; Kondo ら, 2005 ; Takeda ら, 1985a, b, 1990, 武田, 2013 ; Yoshida ら, 2003, 2009)。ただしこれらの研究においては、リン酸の影響は考慮されていなかった。アジサイの花色制御の主要な因子がアルミニウムではなくリン酸であるという考え方の提示は、アジサイの花色の発色機構についての概念を改める、本研究の主要な成果である。即ち、これまでアルカリ性土壌において青色の発色が阻害される原因は、土壌中の可溶性アルミニウムの減少によるアルミニウムの吸収量の減少にあり、その結果がく片の液胞内でアントシアニンと 5-*O*-カフェオイルキナ酸によるアルミニウムのキレート結合が促進することにあると考えられていた (Allen ら, 1943) (Fig.5-1)。ここではリン酸の

投与は土壌中のアルミニウムを不溶化する働きを通して、花色に影響を与えていると理解されていた。

一方、新しい概念に基づくと、アルミニウムの吸収量は土壌条件に影響を受けないこと、アルカリ性土壌において青色の発色が阻害される原因は、土壌中の可溶性リン酸の増加によるリン酸の吸収量の増加にあり、その結果がく片の液胞内で形成しうるアントシアニンと 5-O-カフェオイルキナ酸によるアルミニウムのキレート結合がリン酸によって阻害されることにある (Fig.5-2)。ここではアルミニウムを多く含む赤玉土や黒ボク土を主体とした培養土での生育で青色の発色が促進される原因は、アルミニウムとの結合による土壌中の可溶性リン酸の減少にあると理解される。本研究の成果は、リン酸の利用による効率的なアジサイの花色の制御方法の開発に貢献するものと期待している。また秋色の着色および発色機構についての情報が得られたことで、秋色アジサイの均一な着色と多彩な色彩の制御も貢献できると期待している。

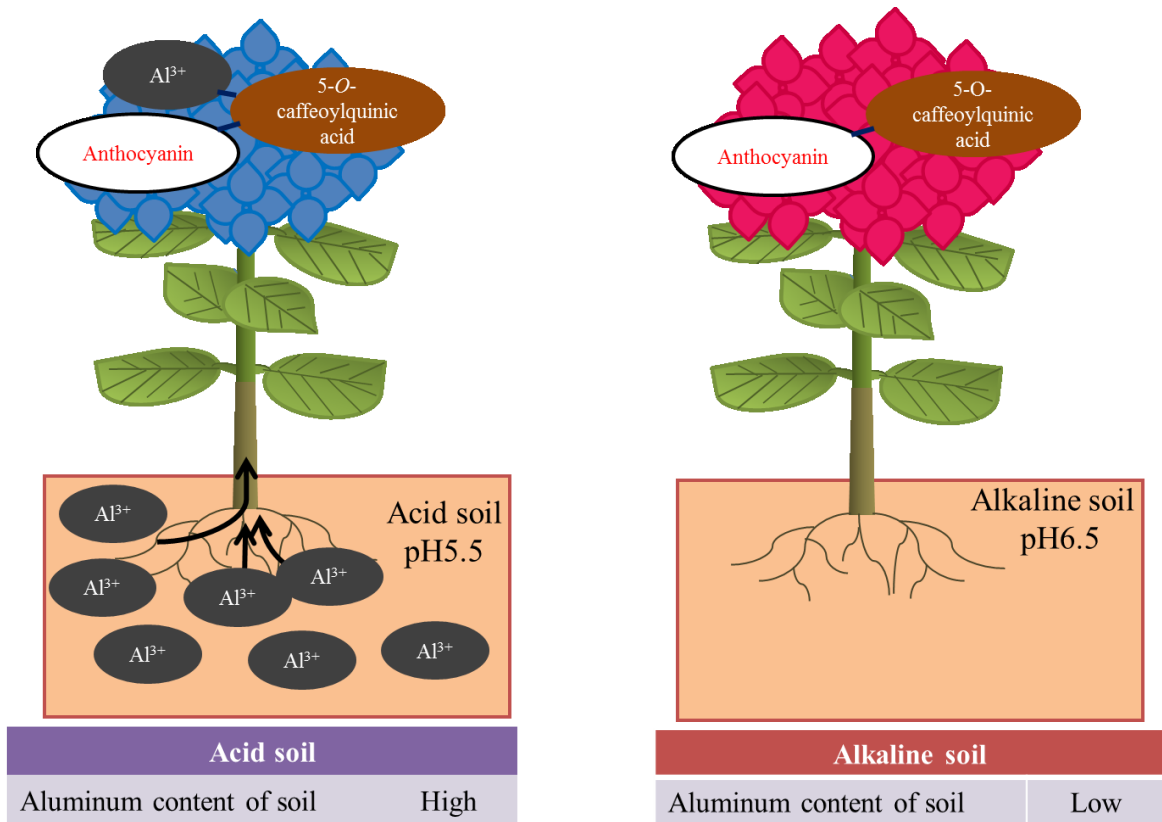


Fig.5-1 The existing conceptual image of *Hydrangea* coloration mechanism depending on pH condition of cultivation soil focusing aluminum ion content in the soil.

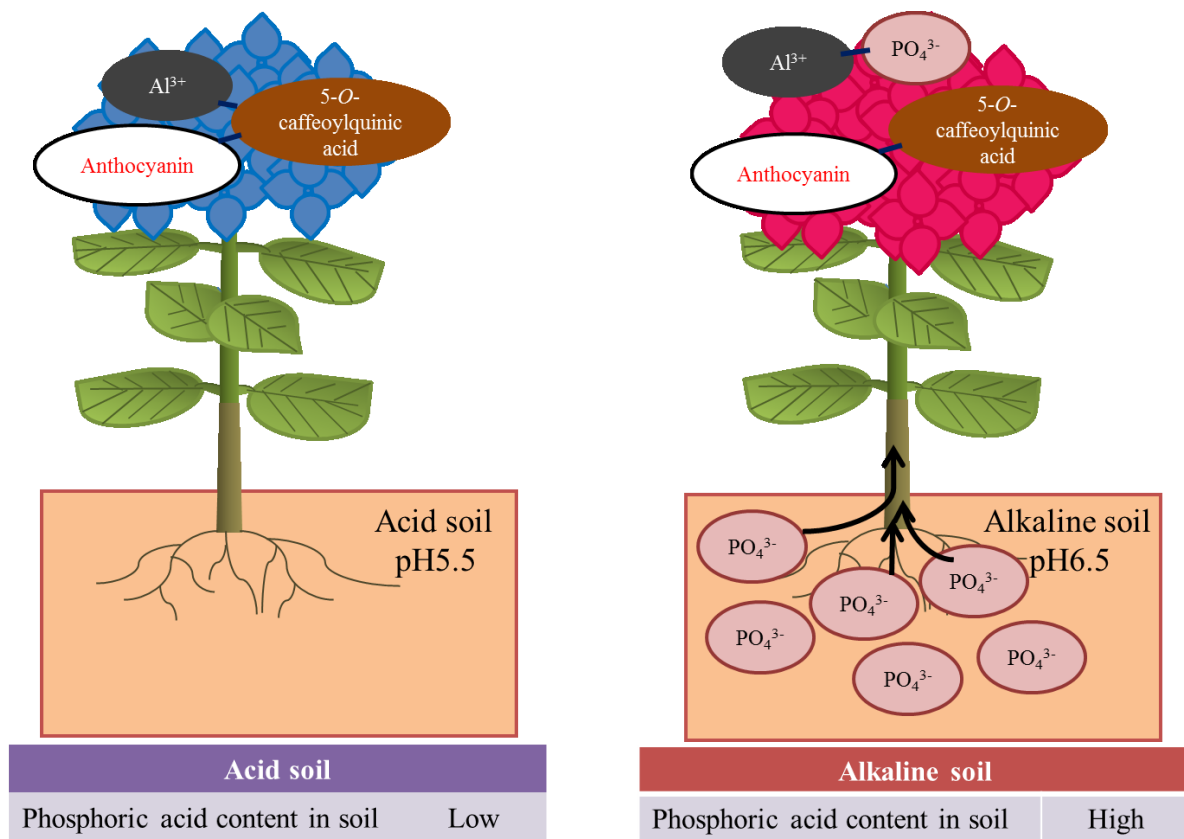


Fig.5-2 The revised conceptual image of *Hydrangea* coloration mechanism depending on pH condition of cultivation soil focusing phosphoric acid content in the soil. Aluminum ion contents in sepals are similar in both conditions.

引用文献

- Allen, R. C. 1932. Factors influencing the color of hydrangea. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 28: 410–412.
- Allen, R. C. 1943. Influence of aluminum on the flower color of *Hydrangea macrophylla* D.C. Contrib. Boyce Thompson Inst. 13: 221–242.
- Asen, S. and H. W. Siegelman. 1957. Effect of aluminum on absorption spectra of the anthocyanin and flavonols from sepals of *Hydrangea macrophylla* var. Merveille. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 70: 478–481.
- Asen, S., H. W. Siegelman and N. W. Stuart. 1956. Anthocyanin and other phenolic compounds in red and blue sepals of *Hydrangea macrophylla* var. Merveille. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 69: 561–569.
- Chenery, E. M. 1937. The problem of the blue *hydrangea*. J. R. Hort. Soc. 62: 320–604.
- フラワーオークションジャパン. 2016. 花き分類別・産地別販売実績調査. 株式会社フラワーオークションジャパン. 東京.
- Hayashi, K. and Y. Abe. 1953. Studien über anthocyane. XXIII. Papierchromatographischeübersicht der anthocyane im pflanzeneich. I. Misc. Rep. Res. Insf. Nar. Resow. 29: 1 (In German).
- 万豆剛一・松田岑夫. 1972. ハイドランジアの花色調節に関する研究 (第1報) 異なる pH の鉢土における花色発現の品種間差. 静岡農試研報 17: 55–63.
- 伊藤大輔・新海陽介・三木直子・加藤友紀・近藤忠雄・吉田久美. 2007. 単一細胞分析によるアジサイの花色変異機構の解明. 天然有機化合物討論会要旨集 49: 455-460

- 伊藤大輔. 2009. 単一細胞分析によるアジサイの花色素発現機構の化学的研究. 名古屋大学大学院情報科学研究科学位論文.
- Ito, D., Y. Shinkai, Y. Kato, T. Kondo and K. Yoshida. 2009. Chemical studies on different color development in blue- and red-colored cells of *Hydrangea macrophylla*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1054–1059
- 川原田邦彦・三上常夫・若林芳樹. 2010. アジサイを知る. p. 5–12. 日本のアジサイ図鑑. 柏書房. 東京.
- 小玉雅晴・坂本あすか・渡辺強. 2015a. きらきら星. 品種登録 24281.
- 小玉雅晴・坂本あすか・渡辺強. 2015b. アジサイ新品種‘きらきら星’の育成. 栃木農試研報 73: 27–34
- Kodama, M., Y. Tanabe and Y. Nakayama. 2016. Analyses of Coloration-related Components in *Hydrangea* Sepals Causing Color Variability According to Soil Conditions. *J. Japan. Soc. Hort.Sci.* 85: 372-379.
- 近藤忠雄・外山友紀・吉田久美・清水良泰・藤森英治・原口紘丞. 1999. アジサイが多彩な色を発現する機構. 天然有機化合物討論会講演要旨集 41: 265-270.
- Kondo, T., Y. Toyama-Koto and K. Yoshida. 2005. Essential structure of co-pigment for blue sepal-color development of hydrangea. *Tetrahedron Lett.* 46: 6645–6649.
- Lawrence, W. J. C., J. R. Prince, G. M. Robinson and R. Robinson, 1938. A survey of anthocyanins. *Biochem. J.* 32: 1661–1667.
- Ma, JF., S. Hiradate, K. Nomoto, T. Iwashita and H. Matsumoto. 1997. Detoxification Mechanism of Al in *Hydrangea* (Identification of Al Form in the

- Leaves). *Plant Physiol.* 113: 1033-1039.
- Ma, JF., R. Peter and E. Delhaize. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278
- 松田岑夫・万豆剛一・大長正文・坂上朗. 1974. ハイドラングシアの花色素調節に関する研究 (第 2 報) 土壌酸度及びアルミニウム, リン酸の添加が, 花色と品質に及ぼす影響. *静岡農試研報* 19: 70-77.
- 長村智司・横井邦彦・西村元男. 1981. はち物用標準培養土に関する研究 (第 6 報) : ハイドラングシアの花色素発現の安定化について. *奈良農試研報.* 12: 66-74.
- 南條一夫・八代昇・鎌田光邦・柴田秀男. 1976. ハイドラングシアの花色素に関する研究 (第 1 報) : アルミニウムとリン酸の施用が花色に及ぼす影響. *福島園試研報* 6: 63-72.
- 日本花き卸売市場協会. 2016. 鉢物花き流通量調査. 一般社団法人日本花き卸売市場協会事務局. 東京.
- 岡田正順・大川恭子. 1974. ハイドラングシアの花色素とアルミニウムおよびリン含有量の省長について. *園学雑.* 42: 361-370.
- 岡田正順・船木司郎. 1967. ハイドラングシアの花色素に対する土壌酸度の変化の影響について. *園学雑.* 36: 122-130.
- Oyama, K., T. Yamada, D. Ito, T. Kondo and K. Yoshida. 2015. Metal complex pigment involved in the blue sepal color development of *Hydrangea*. *J. Agric. Food Chem.* 63: 7630-7635.
- Pierre, W. H. and A. D. Stuart. 1933. Soluble aluminum studies IV. The effects of

- phosphorus in reducing the detrimental effects of soil acidity on plant growth. Soil Sci. 36: 211–227.
- Rebeille, F., R. Bligny, J. B. Martin and R. Douce. 1983. Relationship between the cytoplasm and vacuole phosphate pool in *Acer pseudoplatanus* cells. Arc. Biochem. Biophys. 225: 143-148.
- 武田幸作. 1996. 紅葉の正体. p. 109–132. アジサイはなぜ七色に変わるのか. PHP 研究所. 東京.
- 武田幸作. 2013. フラボノイドと植物の色. p. 45–270. 武田幸作, 齋藤規夫, 岩科司 編. 植物色素フラボノイド. 文一総合出版. 東京.
- Takeda, K., M. Kariura and H. Itoi. 1985a. Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. Phytochemistry 24: 2251–2254.
- Takeda, K., R. Kubota and C. Yagioka. 1985b. Copigments in the blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. Phytochemistry 24: 1207–1209.
- Takeda, K., T. Yamashita, A. Takashima and C. Timberlake. 1990. Stable blue complexes of anthocyanin–aluminum–3-*p*-coumaroyl–or 3-coffeoylquinic acid involved in the blueing of hydrangea flower. Phytochemistry 29: 1089–1091.
- Toyama-Kato, Y., K. Yoshida, E. Fujimori, H. Haraguchi, Y. Shimizu and T. Kondo. 2003. Analysis of metal elements of hydrangea sepals at various growing stages by ICP-AES. Biochem. Eng. J. 14: 237–241.
- Ubi, B.E., C. Honda, H. Bessho, S. Kondo, M. Wada, S. Kobayashi and T. Moriguchi. 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. Plant. Scie. 170: 571-578.
- 宇都宮花き. 2016. アジサイ取扱実績調査. 株式会社宇都宮花き. 栃木.

- 渡部俊三・荒川修. 1983. リンゴ果実の果皮組織における着色細胞の発現と分布.
山形大学紀要 9: 197-213.
- Wright, K. E. 1937. Effects of phosphorus and lime in reducing aluminum toxicity of acid soils. *Plant. Physiol.* 12: 173-181.
- 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.
- 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., D. Ito, Y. Shinkai and T. Kondo. 2008. Change of color and components in sepals of chameleon hydrangea during maturation and senescence. *Phytochemistry* 69: 3159–3165.

摘 要

アジサイは、栽培条件により花色が赤色、紫色および青色に変化する特徴を持つ。アジサイの夏色の青色は、液胞の pH が 4 以上の条件で、アントシアニンが 5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムとキレート結合することで発色すると考えられている。ここでは土壌から吸収したアルミニウムをがく片の着色細胞の液胞に蓄積する量によって色彩が変化すると理解されている。本博士論文研究では、アジサイを鉢花として営利生産する上で重要な、花色を安定に発現させる技術開発を目的に、がく片に含まれる発色関連成分を比較し、花色の可変性を制御する要因を見出すことを試みた。

本研究では、酸性土壌とアルカリ性土壌で栽培した安定発色品種の赤色あるいは青色のがく片と、可変品種の赤色あるいは紫色のがく片に含まれる発色関連成分を比較した。青色の発色には 3-*O*-カフェオイルキナ酸が少ないことが必要であるという従来の説を支持する結果が得られた一方で、がく片に含まれるアルミニウムの含量と花色との間には相関が認められなかった。従来の説と異なり、がく片のアルミニウムの含量は可変性を含むアジサイの花色を制御する要素ではないことを示した。

アジサイの花色の可変性に関与する新たな要素は、1. アントシアニンとアルミニウム、5-*O*-カフェオイルキナ酸の結合に影響を与える、2. 土壌から供給される、3. 赤色と青色用の培養土で大きな違いを示す、これらの性質を持つと推定し、リン酸をその候補とした。花色関連成分とリン酸の構成元素であるリンについて、花色の異なる F₂ 集団のがく片を材料に分析を行い、色彩との相関を調べた。青色のがく片に含まれるリンの含量は、赤紫・赤色のがく片に比べて低い領域に特異的に分布していた。また、がく片の組成比率に基づく発色実験では、デルフィニジン 3-グルコサイドと 5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウ

ムが含まれる pH 4.0 の青色の溶液にリン酸を加えると、吸収極大波長が短波長に移行し、赤色を呈した。リン酸は青色発色を担うキレート構造の構成を阻害する効果を持っている。これらの結果は、リン酸が花色発現に関与する要素であることを支持するものである。

また、アジサイには、季節に伴う花色変化がある。夏季の開花時に赤色や青色などの花色を発色した後、緑色に変化し、さらに秋季には緑色に重ねてふたたび赤色を発色する。夏色では白色の覆輪品種のがく片の外縁部も、秋色では着色することから、夏色と秋色では色素生合成の内生的な制御機構が異なることを明らかにした。また、秋色の着色とそれを担うアントシアニンの生合成には、光要求性があることを示した。秋色の主要アントシアニンとして、報告されているシアニジン 3-サンブビオサイドとともに、新たにシアニジン 3-ラシロサイドを見出した。

青色の強さに関して、秋色には夏色との相関が認められることから、色彩の制御には類似の機構が機能している可能性を検証した。シアニジン系アントシアニンの溶液に、5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムを加えることで青色が濃くなり、花色と類似の青紫色を発色した。一方 3-*O*-カフェオイルキナ酸には青色を濃くする効果は認められなかった。青紫色のがく片は赤色や赤紫色のがく片に比べて 3-*O*-カフェオイルキナ酸の含量が少なかった。夏色と同様に、秋色においても、青色の発色はアントシアニンと 5-*O*-カフェオイルキナ酸によるアルミニウムイオンのキレート結合によるものであり、その構成には 3-*O*-カフェオイルキナ酸が少ないことが必要と考えられる。ただし夏色とは異なり、秋色においてはリンの含量と色彩の間には相関が認められなかった。

アジサイの花色制御の主要な因子がアルミニウムではなくリン酸であるという考え方の提示は、アジサイの花色の発色機構についての概念を改め、栽培方法に大きな影響を与える本研究の主要な成果である。また秋色の着色および発

色機構についての情報が得られたことで、秋色アジサイの均一な着色と多彩な色彩の制御も貢献できると期待している。

Summary

Hydrangea cultivars have property to change the sepal coloration among red, purple, and blue depending on cultivation soil conditions. Chelation of aluminum ion by anthocyanin and 5-*O*-caffeoylquinic acid, which can be composed in the sepal cell vacuole at pH 4 or higher, is responsible for the blue coloration. It is understood that aluminum contents accumulated in vacuoles of the colored sepal cells through absorption from soil determine the coloration. In this doctoral dissertation, the ultimate purpose of this study being development of stable coloration technique required in *Hydrangea* production industry, I tried to detect a key factor to generate variability of *Hydrangea* coloration by comparing contents of the coloration-related components in the sepals.

In this study, I compared the contents of coloration-related compounds in red and blue sepals of stable color cultivars and red and purple sepals of variable color cultivars grown in acid soils and alkaline soils. I obtained results to support previously presented idea that less content of 3-*O*-caffeoylquinic acid is necessary for generation of blue sepals. On the other hand, significant difference could not be found in contents of aluminum related with sepal coloration. This suggests that different from previous idea, content of aluminum in the sepals is not a factor to regulate the sepal coloration of *Hydrangea*, including variability of the coloration.

I thought that another factor to regulate *Hydrangea* coloration must have following conditions: 1. Inhibition effect on construction of aluminum chelation, 2. Supply from soil depending on the soil acidic condition and 3. Relationship between its content and soil condition causing sepal coloration change. Here I concerned phosphoric acid as another factor. I analyzed contents of phosphorous, which is a constituent element of

phosphoric acid, as well as contents of the coloration-related compounds in sepals and studied relation of these factors to the coloration using sepals of F₂ populations of different coloration. The content of phosphorus contained in the blue sepals specifically distributed in lower region than those of the red purple and red sepals. *In vitro* coloration experiments based on composition ratio in the sepals, coloration of solution containing delphinidin 3-glucoside, 5-*O*-caffeoylquinic acid and aluminum at pH 4.0 changed from blue to red and λ_{\max} of the absorption spectra shifted to shorter wavelength region by addition of phosphoric acid. Phosphoric acid can inhibit chelation responsible for the blue coloration. These results support an idea that phosphoric acid is a factor to regulate coloration of *Hydrangea* sepal.

Hydrangea sepals show seasonal coloration change; summer coloration once fades and expresses green and then again newly colored in autumn. In the autumn color, sepal whose marginal tissue is white in the summer shows uniform color, indicating that positional anthocyanin biosynthetic regulation mechanism is different between summer and autumn color. In addition, light requirement for the anthocyanin biosynthesis is indicated in autumn color. I identified cyanidin 3-lathyroside as major anthocyanin of autumn color as well as cyanidin 3-sambubioside previously reported.

Because blue color expression of autumn color is related with that of summer color, I verified possibility that similar coloration mechanisms operate in autumn color to summer color. Cyanidin type anthocyanin solution changed bluer by addition of 5-*O*-caffeoylquinic acid and aluminum and showed blue-purple coloration like the autumn color sepal. 3-*O*-Caffeoylquinic acid did not have the effect. The contents of 3-*O*-caffeoylquinic acid in blue-purple sepals were less than sepals of red and red-purple sepals. Similar to the summer colors, the blue coloration in the autumn color is responsible for chelation of aluminum ion by anthocyanin and 5-*O*-caffeoylquinic

acid and less content of 3-*O*-caffeoylquinic acid is necessary for generation of the blue-purple sepals. However, unlike summer color, phosphorus content was not related to sepal color in autumn color.

Presentation of the new concept that a major factor to regulate coloration of *Hydrangea* sepals is not aluminum but phosphorus acid is a major achievement of this doctoral dissertation study to change the previous idea and give impact on cultivation method *Hydrangea* production industry. Knowledge of autumn coloration mechanism obtained in this study also contributes to regulate stable and uniform autumn coloration.

謝 辞

本博士論文を取りまとめるにあたり、筑波大学大学院生命環境科学研究科准教授 中山真義博士には終始、懇切なご指導と温かい激励を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また本研究を取りまとめるにあたり、貴重なご助言とご指導をいただくとともにご校閲の労を賜りました、筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 大宮あけみ博士、西島隆明博士、菅谷純子博士に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり貴重なアドバイスと激励を頂いた栃木県農業試験場花き研究室 室長 船山卓也氏、同 前室長 渡辺強氏に心より感謝申し上げます。同 場長 高橋建夫氏、同 前場長 小瀧勝久氏、同 元場長 安納義夫氏には、仕事との両立にあたりご支援いただきました。田邊雄太氏をはじめ花き研究室職員の皆様には、高度な知識と栽培技術で、多大な労力のかかるアジサイの栽培管理を担当して頂き、貴重な研究データを得ることができました。皆様に心より感謝いたします。

最後になりますが、博士課程入学を快く承諾し、終始応援してくれた妻と子供達に心から感謝します。