

一細胞科学によるアジサイの表現型からゲノム解析への統合研究

●吉田久美

名古屋大学大学院情報科学研究科

＜研究の目的と進め方＞

花色素アントシアニンとは、他の植物色素と比べて、その発色が赤から紫～青色と多彩であり、同時に、色が微妙に連続的に変化することに最大の特徴を持つ。花色は、細胞（液胞）pHの違い、金属イオンとの錯体形成、助色素や色素分子同士との疎水相互作用に基づく分子会合などにより影響を受けると同時に安定化される。ただし、多くの花では、ひとつの花弁の中の細胞の色はほぼ単一である。これに対して、アジサイ（*Hydrangea macrophylla*）の花色（厳密には萼片）は、環境変化や時間の経過により容易に変わるといわれる。土壌の酸性度と青色発色との関係も、古くから園芸家の間でよく知られている。さらに、青色と赤色のいずれの色のアジサイも、アントシアニンは全く同じデルフィニジン3-グルコシドであり、助色素も同一のキナ酸誘導体が含まれる（図1）。このことから、アジサイの花色変異機構は、古くから多くの研究者が興味を持ってきた。しかし、21世紀になっても未解決のまま残されている。

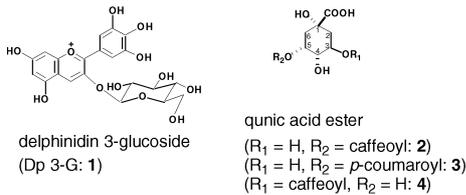


図1. アジサイ萼片に含まれる有機成分。萼片の色に関係なく、アントシアニンおよび助色素成分は同じである。

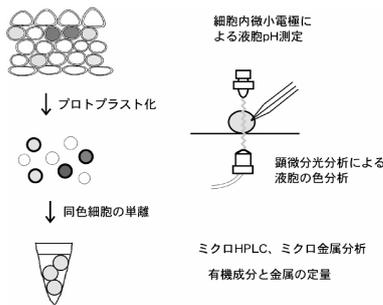


図2. アジサイの萼片の模式図と萼片の有色細胞の化学分析。着色細胞は表層より二層目に存在し、紫色萼片では、赤、紫、青色細胞のモザイクであるため、プロトプラスト化してから、ひとつの細胞を収集して、細胞の色と成分のマイクロ分析を同時に行う必要がある。

我々は、アジサイの萼片を顕微鏡観察することから、紫色の萼片では隣り合った細胞一つ一つの色合いが異なりモザイク状を呈することを見いだした。また、通常の花弁とは異なり、アジサイは表層細胞が無色で、同じ層でも無色と有色の細胞が混じりあっていることも明らかにした。即ち、アジサイは同じゲノムを持ちながら何らかの因子により表現型である花色が、隣同士の細胞ですら変異する興味深い生物である。そして、この現象の解明には、単一細胞で化学成分の違いや生理条件の違いを分析して、何が発色の違いをもたらすのかを明らかにする必要がある。本研究では、アジサイ萼片の個々の着色

細胞の液胞pH、有機成分、アルミニウムイオン濃度をマイクロ分析し、色と相関させる（図2）。さらに、*in vitro* でアジサイの花色を再現してし、花色の発色と変異の物質的な要因を特定して花色変異の化学的基盤を明らかにする。その上で、分子生物学研究者との連携により、アジサイで発現している遺伝子を見つけ、アジサイの表現型の違いが、いかなるゲノムの発現の違いによるものであるかの解明を目指す。これにより、表現型を支配する下流の物質レベルからたどり上流の遺伝子へと統合的に生命システムを解明する方法論を開拓する。

＜研究開始時の研究計画＞

- 1) アジサイを低温処理によって通年開花させ、材料供給を行なう（インキュベータは現有）。土壌、pH、アルミニウムの添加量など栽培条件を変え、色変わった萼片を作る。
- 2) 上記の方法で得られた青、赤、紫色の萼片をプロトプラス化し、顕微分光分析（現有）を用いて細胞の色により区分けする。微小電極法（測定装置は現有）により単一細胞で液胞pH、液胞内のカリウム、ナトリウム、カルシウム濃度の直接測定を行なう。
- 3) 液胞内の有機、無機成分は、従来数十個の細胞が必要であったが、マイクロHPLC（現有）およびマイクロ原子吸光分析の新手法の考案により、1個で可能となる技術を実現する。
- 4) 一細胞分析により得た着色細胞内の成分データ、および液胞pHデータをもとに、試験管内でアジサイの各色を再現できるかどうかを調べる。
- 5) アジサイ萼片よりcDNAライブラリを構築して、発現している遺伝子の配列を決定する。同時に、色と相関して発現する遺伝子を探索する。

＜研究期間の成果＞

- 1) 通年栽培は不可能であったが、インキュベーターの活用により、露地での開花期を超えて、9月末までの生細胞を用いた実験をすすめることができた。さらに、生産農家の協力を得て、細胞の色がモザイク状となる紫色アジサイを入手できることになった。紫色アジサイ萼片を用いて、細胞の色別の成分などの化学分析実験を進めることができた。
- 2) 液胞内イオン濃度は、液胞pHだけを測定できた。紫色の萼片より調製した、赤、紫、青色のプロトプラストを用いて、一つの細胞の色を顕微分光分析により測定後、細胞内微小pH電極を挿入した。これにより、細胞の色と液胞pHの相関データを得ることができた。細胞の吸収極大波長は赤色で540-550 nm、紫色で560-570 nm、青色で580-590nmとなったが、液胞pHと色との間には、相関は認められなかった。（成果3,4）
- 3) 花色に関与するアントシアニンおよび助色素類を一細胞で分析できる条件を確立できた。カラム径0.3 mmのODSカラムを用いた高圧グラジエントHPLC分析を行うことにより、2)と同様に細胞のスペクトルを測定後

収集して、デルフィニジン 3-グルコシド (1)、および、助色素成分であるキナ酸の5-カフェオイル体 (2)、5-p-クマロイル体 (3) および、3-カフェオイル体 (4)、を定量した。紫色アジサイから調製したそれぞれの色の細胞を比較したところ、1は、色との相関はなくほぼ一定量 (10 mM程度) 含まれた。一方、2、3の5位アシル化キナ酸は、細胞の色が青くなる有意に多くなることがわかった。4の含有量には、色による差は認められなかった。(成果3,4)

さらに、原子吸光法によるアルミニウム分析を行なったところ、細胞50個のデータでは紫色萼片を構成する各色の細胞において、色とアルミニウム濃度には、差が認められなかった。

- 4) デルフィニジン 3-グルコシド (1) を一定 (1 mM) にして、pH、助色素濃度、アルミニウムイオン濃度を変えて混合し、紫外可視吸収スペクトルおよび円二色性を測定して、萼片および有色プロトプラストのそれと比較した。pH 4以上で5-カフェオイルキナ酸 (2)、5-p-クマロイルキナ酸 (3) がアントシアニンに対して3当量以上あり、アルミニウムイオンが1当量存在すると青色が発現することがわかった。このときの吸収スペクトルとCDは萼片のものと同様一致した。また、この条件でpHだけ3-3.5へと下げると、紫色が発色した。2、3が存在せず、アルミニウムイオンが0.3当量以下であると、溶液は赤色となった。3-カフェオイルキナ酸 (4) は、発色には影響をほとんど与えなかった。以上より、アジサイの発色は、液胞pH、助色素の組成とアントシアニンに対する当量比、およびアルミニウムイオンの当量比という複数の要因に影響され、それらのバランスで発色が微妙に変化することがわかった。これが、アジサイの色が変わりやすい理由であると考えられる。(図3、成果3,4)

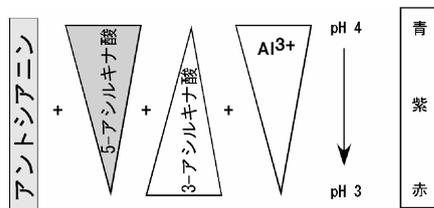


図3. アジサイの発色に関する要因。細胞の青、紫、赤色はそれぞれの成分の比率と液胞 pH の違いのバランスで決定される。

- 5) 研究期間内には実施できなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

単一細胞分析によるアジサイの花色変化の研究は、国内外でも唯一であり注目を集め、下記の学会で依頼を受け講演した。第21回植物細胞分子生物学会シンポジウム (2003.8.)、第40回植物化学シンポジウム (2003.11.)、Dynamic Vacuoles in Plants (2003.11.)、電気化学会第71回大会 (2004.3.)、XXII International Conference on Polyphenols (2004.8.)、German-Japan Seminar on Molecular Regulation of Plant Second Metabolism (2004.9.)、第16回植物色素研究会 (2004.11.)。また、一般社会人向け、および高校生対象の講演も行った。ロレアルアーツ&サイエンスファンデーション (2003.11.)、第19回「大学と科学」公開シンポジウム (2005.1.)。微小pH電極法による液胞pH測定についても実験依頼が多数あった。しかし、人的、装置的制約により、あまり受入れることができなかった。

しんぶん赤旗「アジサイ 花色変化の秘密わかる」

(2004年5月9日)、中日新聞「カメレオンアジサイ変色モミジと同じ美しき老化」(2004年6月19日)で報道された。化学と工業、57, 217-218 (2004)。FFIジャーナル、209, 369-378 (2004)。現代化学、No. 403, 52-53 (2004)。植物の生長調節、39, 232-240 (2004)に寄稿した。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- 1) アジサイの通年開花は、実現できなかった。しかし、研究期間中の2004年12月より、5鉢を6ヶ月間低温処理してから加温育成し、通常とほぼ同様の草体と花色を持つアジサイを開花させることができた。
- 2) 液胞内のナトリウム、カリウム、カルシウム濃度の微小電極による測定はできなかった。これは、一細胞での微量有機成分分析と、アルミニウム分析に集中したためである。ただし、ナトリウム、カリウムイオン電極については、作成方法は確立し応答も確認できた。
- 3) 着色液胞内のアルミニウム濃度の単細胞での分析ができなかった。これは、グラファイト炉フレームレス原子吸光分析法の検出感度の限界による。さらに、プロトプラストを調製して細胞を収集する際の環境よりの混入が予想外に大きかったためでもある。したがって、一細胞でのアルミニウムの定量分析は、別の高感度の分析手段に変える必要があることが明らかになった。
- 4) アジサイ萼片からのcDNAライブラリ構築は、萼片の入手が時期的に困難であったため、実施できなかった。しかし、研究期間終了後の2005年4月に入手した萼片を、開花ステージごとに三段階に分割してのmRNA調製を行うことができ、その後、cDNAライブラリを構築できた。

〈今後の課題〉

- 1) 多くの品種で単一細胞分析を実施して、紫色のみならず、青色、赤色萼片の細胞のデータを集め、花色を発現している環境と成分を定量的に明らかにする。
- 2) 現在の分析は、色と液胞pH、色と有機成分、色とアルミニウムのそれぞれのデータであるので、より精密な詳細な発色の解明には、すべての測定項目を一細胞で分析できる新たな手法を確立する。
- 3) In vitroでアジサイの花色の再現のできる条件を、より細胞内の実態に則した条件で精密に検討する。
- 4) アジサイの青色色素の高次構造を、精密化学的に明らかにする。
- 5) cDNAライブラリの構築と解析、アジサイの花色に関する遺伝子の発現解析をする。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 0310101806, Yoshida, K., Mori, M., Kawachi, M., Okuno, R., Kameda, K., and Kondo, T. A UV-B resistant polyacylated anthocyanin, HBA, from blue petals of morning glory. Tetrahedron Lett. 44, 7875-7880 (2003).
- 2) 0309011044, Yoshida, K., Osanai, M., Kondo, T.: Mechanism of dusky reddish-brown "kaki" color development of Japanese morning glory, Ipomoea nil cv. Danjuro. Phytochemistry, 63, 721-726 (2003).
- 3) 0406171239, 吉田久美、尾山公一、近藤忠雄：花の色とナノサイエンス、有合化、62, 490-499 (2004).
- 4) 青いバラを作る、吉田久美、日本語バイオポータルサイト、<http://www.bioportal.jp/columns/13/>
- 5) アジサイの花色変化—なぜ、移り変りやすいのか—、吉田久美、「不思議な生物現象の化学」(上村大輔編)クバプロ、pp.26-34 (2005).