

# アジサイの花色の発色機構に関する研究

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	10
2.	材料および方法	10
3.	結果	11
4.	考察	13
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	21
2.	材料および方法	21
3.	結果	22
4.	考察	25
第4章	アジサイの秋色花色の発現に関わる要素	
1.	諸言	44
2.	材料および方法	44
3.	結果	45
4.	考察	47
第5章	総合考察	57
	摘要	61
	Summary	62
	謝辞	63
	引用文献	63

## 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 (第 1-1 図)。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 (図 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 (第 1-2 図)。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 年代に真岡市 (旧二宮町) 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。

アジサイの花色には、ピンク色、赤色、紫色、青色、白色がある (第 1-3A~E 図)。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 (第 1-4 図)。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 (第 1-3F, G 図)。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 (第 1-5A 図) 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 (第 1-5B 図) および、3-O-カフェオイルキナ酸 (第 1-5C 図) 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。

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(表 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、酸性培養土とアルカリ性培養土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(第 1-1-1 表)で得られた F<sub>2</sub> 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(第 1-1-2 表). 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。

第1-1-1表 本論文において供試したアジサイの品種・系統

---

---

安定赤色品種・系統



ルビーレッド



HH9



HH13



HH19

---

---

安定青色品種・系統



ブルースカイ



HH11



HH12

---

---

可変品種・系統



フラウヨシコ



フラウヨシミ



HH2

---

---

がく片の花色とリン酸の関連解析に用いた材料集団の交配親



きらきら星



フラウヨシコ

第 1-1-2 表 本論文において供試したアジサイの品種・系統.









秋色アジサイの研究に供試した品種・系統

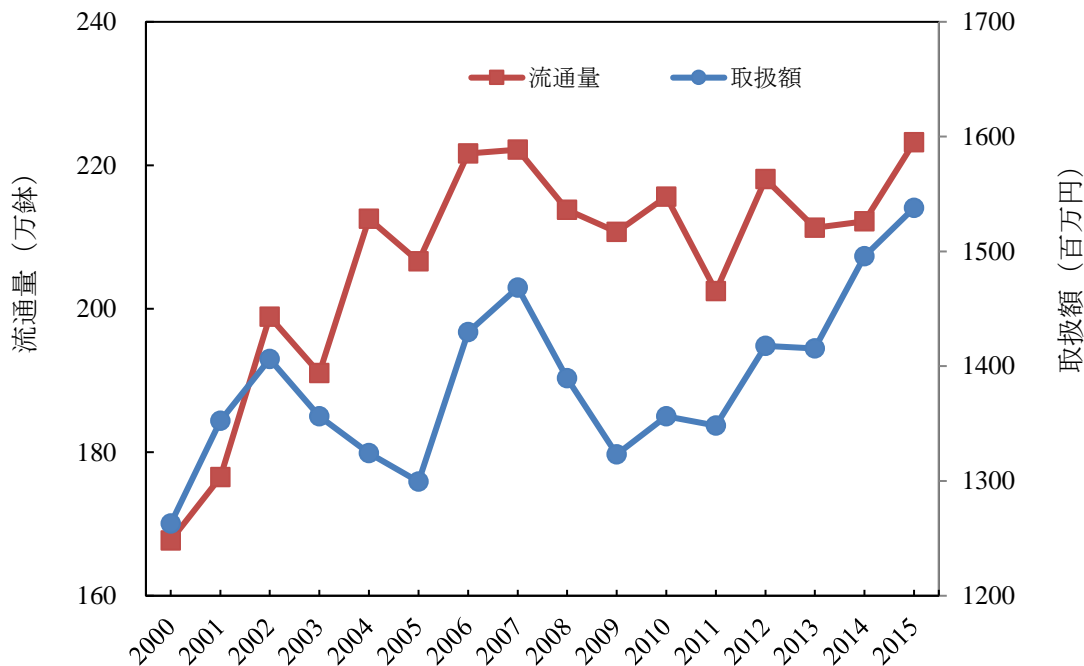
夏色				
秋色				
	きらきら星	城ヶ崎	ボーデンゼー	フラウヨシコ

秋色アジサイの研究に供試した品種・系統

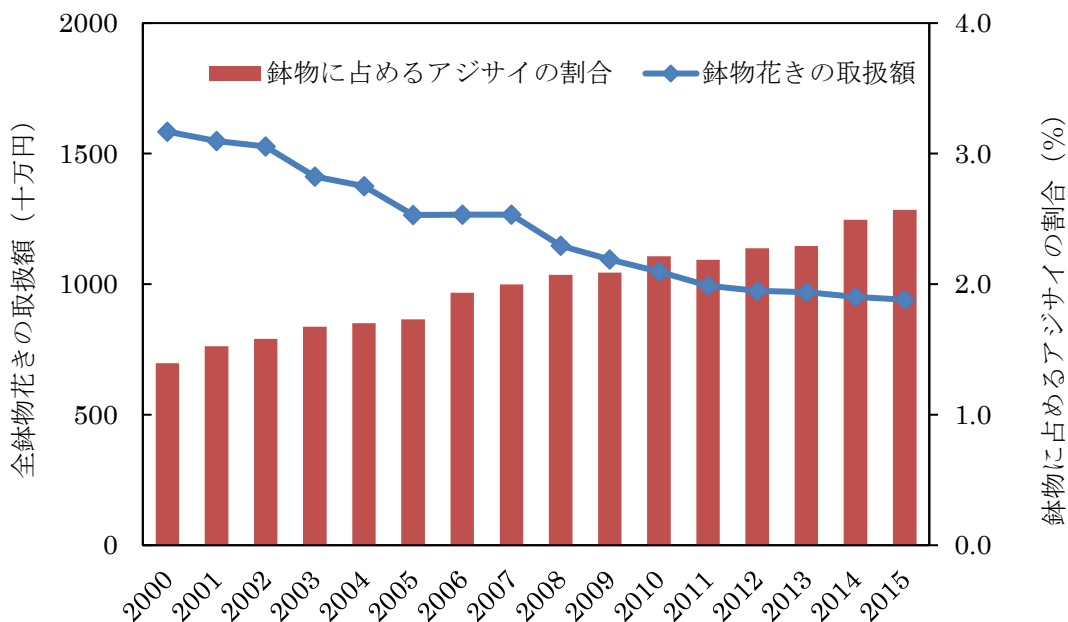
夏色				
秋色				
	フラウヨシミ	ピーチ姫	HH2	HH6

秋色アジサイの研究に供試した品種・系統

夏色				
秋色				
	HH11	HH12	HH13	HH20



第 1-1 図 鉢物アジサイの流通量の変化 (鉢物花き流通量調査 2016)



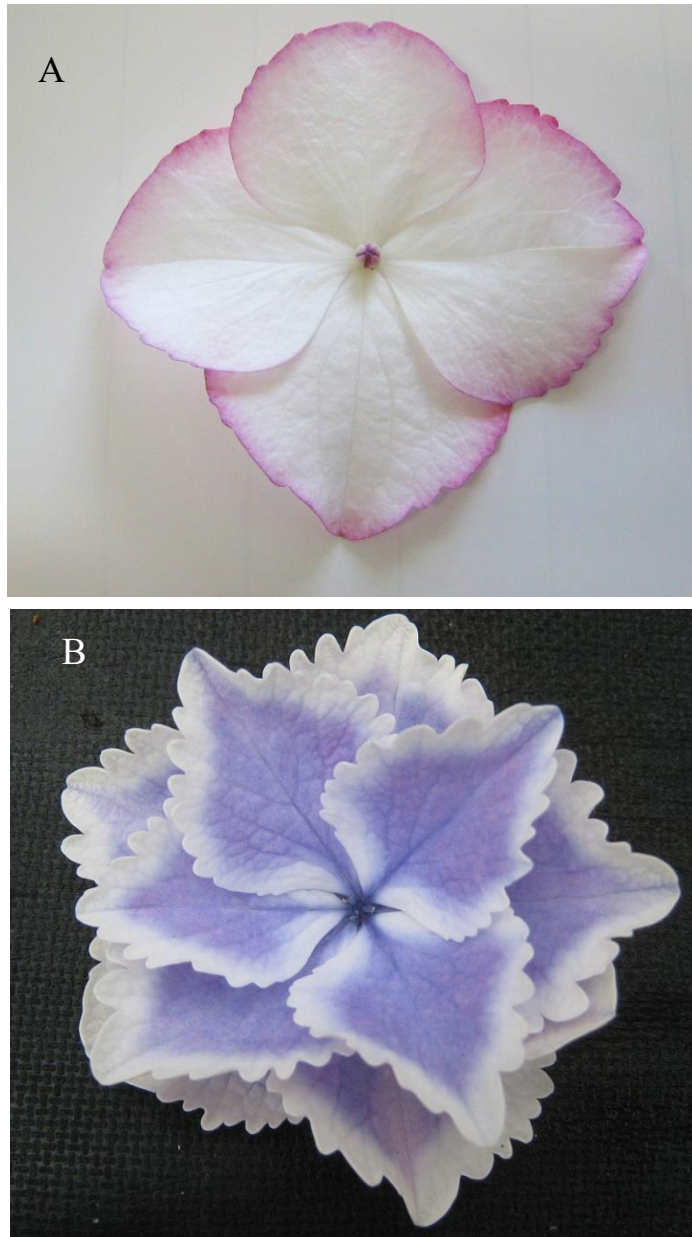
第 1-2 図 鉢物花きの取扱い額および鉢物に占めるアジサイの割合 (フラワーオークションジャパン統計レポート 2016)



第 1-3 図 アジサイの装飾花の様々な花色

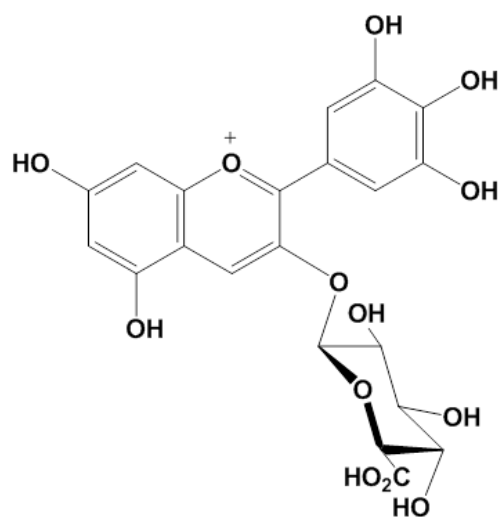
(A) ピンク色：‘HH19’ (B) 赤色：‘ルビーレッド’ (C) 紫色：‘HH7’ (D) 青色：‘HH17’ (E) 白色：‘ロイヤルホワイト’ (F) 緑色（開花後にピンク色や青色を発色した後に緑色に変化）：‘HH6’ (G) 秋色（緑色に重ねて赤色が発色）：‘HH19’.





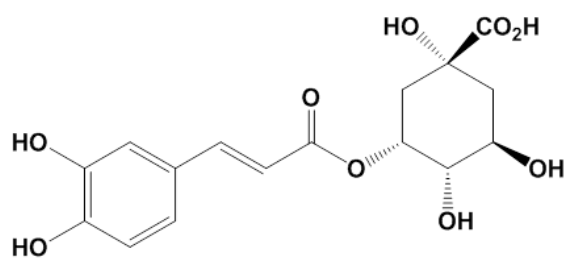
第1-4図 アジサイの装飾花の覆輪の種類  
(A) 赤色の縁取り (B) 白色の縁取り

A



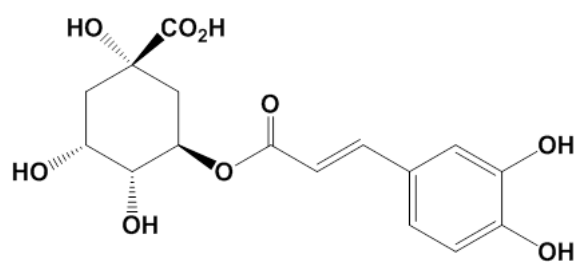
デルフィニジン 3-グルコサイド

B



5-O-カフェオイルキナ酸

C



3-O-カフェオイルキナ酸

第 1-5 図 アジサイがく片のアントシアニン色素および助色素

## 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. 緒言

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（第 1-3 図 A~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変化し、色彩

が変化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（第 1-1-1 表）。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（第 1-1-1 表）。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（第 1-1-1 表）。予備調査において分類した赤色安定品種は‘ルビーレッド’（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‘ブルースカイ’（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‘フラウヨシコ’（海老原園芸、栃木県真岡市）、‘フラウヨシミ’（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月に表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・pot<sup>-1</sup>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<sup>-1</sup>、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ェントで混合した。

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

‘ルビーレッド’、‘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(第2-2表)。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。

‘ブルースカイ’、‘HH11’、‘HH12’の3品種は、どちらの培養土においても青色に発色した。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。

‘フラウヨシコ’、‘フラウヨシミ’、‘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‘フラウヨシコ’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（第2-1図）。

## 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（第2-2図）。

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（図2-2）。

花色が変化しやすい品種である‘フラウヨシコ’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がく片と比較して酸性培養土で栽培したがく片には、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（第2-2図）。

## 4) がく片 pH

培養土条件に関わらず、安定赤色品種（‘ルビーレッド’，‘HH9’，‘HH13’，‘HH19’）の pH は 3.9–4.3 に、安定青色品種（‘ブルースカイ’，‘HH11’，‘HH12’）の pH は、4.0–4.5 に分布した（表2-2）。花色が変化しやすい品種（‘フラウヨシコ’，‘フラウヨシミ’，‘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（第2-3-1図A）。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 1.0–3.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に、安定青色品種においては 2.5–7.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に、花色が変化しやすい品種においては 1.5–2.7  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に分布した（第2-3-1図B）。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 25.0–38.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に、安定青色品種においては 8.0–11.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に、花色が変化しやすい品種においては 22.0–38.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に分布した（第2-3-2図C）。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  $7.0\text{--}13.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{FW}$  に、安定赤青色品種においては  $8.0\text{--}20.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{FW}$  に、花色が変化しやすい品種においては  $8.0\text{--}10.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{FW}$  に分布した（第 2-3-2 図 D）。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はがく片の色相角が減少した（第 2-2 表）。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（第 2-2 図）。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、花の色は土壤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（第 2-1 図）。土壤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、土壤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（第 2-2 表、第 2-3-1 図 A, B、第 2-3-2 図 C, 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。

これまで土壤条件の違いによるアジサイの発色の変化は、土壤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・系統による土壤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（第 2-3-2 図 D）。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（第 2-3-2 図 D）。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、土壤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、執筆者は土壤条件の違いによるアジサイの発色が変化する主要な原因を、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（第 2-3-2 図 C）。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（第 2-2 表、第 2-3-1 図 B、第 2-3-2 図 D）。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(第2-3-2図C)。

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(第2-2表)。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。

第 2-1 表 アジサイの栽培に供試する培養土の配合割合, 基肥, pH および施肥条件

	アルカリ性培養土		酸性培養土	
培養土組成 (v/v)	赤玉土	35%	赤玉土	50%
	調製ピートモス <sup>z</sup>	35%	無調整ピート	30%
	腐葉土	20%	腐葉土	10%
	パーライト	10%	もみ殻堆肥	10%
基肥	苦土重焼りん	3 g・L <sup>-1</sup>	硫酸カリ	2 g・L <sup>-1</sup>
	ようりん	2 g・L <sup>-1</sup>	ようりん	1 g・L <sup>-1</sup>
	バッドグアノ	1 g・L <sup>-1</sup>	過りん酸石灰	0.5 g・L <sup>-1</sup>
	マグアンプ II <sup>z</sup>	1 g・L <sup>-1</sup>	NKエコロング2038-70 <sup>z</sup>	2 g・L <sup>-1</sup>
	ロング413-70 <sup>z</sup>	2 g・L <sup>-1</sup>		
pH <sup>y</sup>	6.5		5.5	
施肥管理 <sup>x</sup>	ピーターズ15-30-15 1500倍液		ピーターズ20-10-20 2500倍液 0.2% 硫酸アルミニウム溶液 <sup>w</sup>	

<sup>z</sup> 調製ピートモス:PRO-MIX BX, Premier Tech Ltd., ; マグアンプ II, ハイボネックスジャパン; ロング413-70および NKエコロング, ジェイカムアグリ

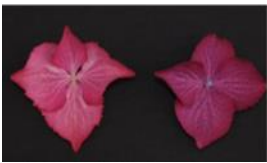

<sup>y</sup> 培養土のpHは配合材料に基肥を添加し, 培養土:蒸留水=1:10で30分間振とう抽出後測定



<sup>x</sup> 液肥は週2回施用

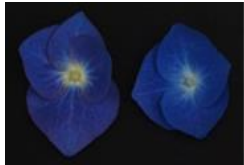
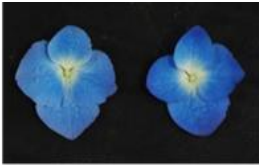

<sup>w</sup> 硫酸アルミ溶液は定植1か月後から300 mL/potを10日おきに3回灌注






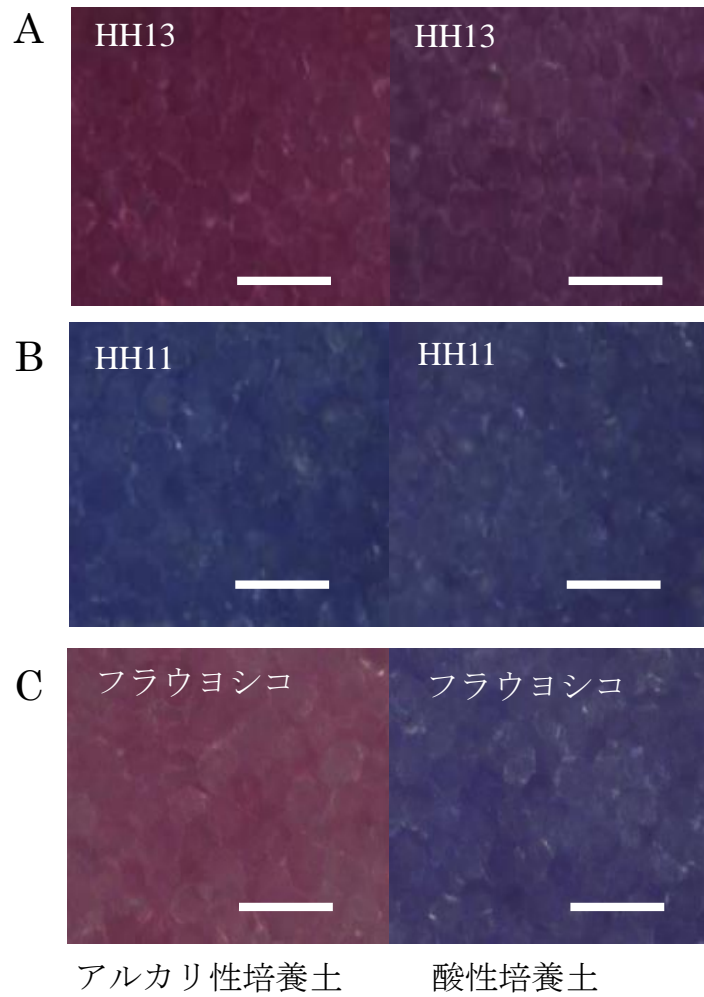
第2-2表 培養土条件の違いによるがく片の色彩値、色相角およびpH

品種・系統	ルビーレッド		HH9	
	アルカリ性	酸性	アルカリ性	酸性
花色				
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
色相角(°)	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

品種・系統	HH13		HH19	
	アルカリ性	酸性	アルカリ性	酸性
花色				
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
色相角(°)	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

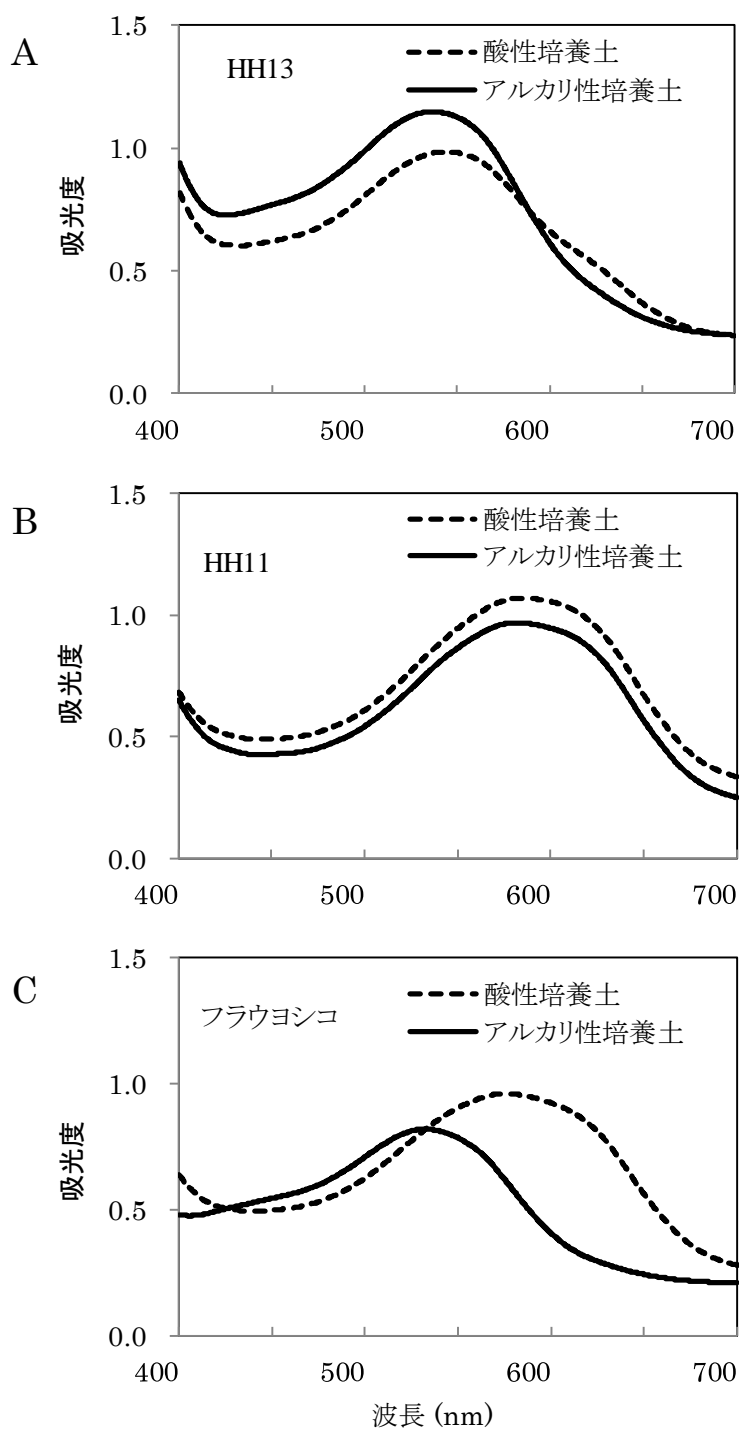
品種・系統	ブルースカイ		HH11		HH12	
	アルカリ性	酸性	アルカリ性	酸性	アルカリ性	酸性
花色						
L*	37.4 ±1.6	35.8 ±2.1	49.5 ±1.7	44.7 ±1.4	58.9 ±0.8	56.1 ±0.3
a*	25.6 ±2.8	24.9 ±1.5	11.5 ±0.7	15.2 ±1.7	9.3 ±0.1	11.4 ±0.7
b*	-38.3 ±1.0	-44.3 ±1.0	-35.1 ±0.3	-37.5 ±0.5	-28.5 ±0.8	-32.7 ±0.4
色相角(°)	303.7	299.3	288.0	292.0	288.0	289.2
pH	4.0 ±0.1	4.1 ±0.1	4.2 ±0.0	4.3 ±0.1	4.5 ±0.1	4.3 ±0.1

品種・系統	フラウヨシコ		フラウヨシミ		HH2	
	アルカリ性	酸性	アルカリ性	酸性	アルカリ性	酸性
花色						
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 ±2.3	27.0 ±2.0
b*	-5.2 ±0.6	-29.4 ±1.5	-2.3 ±0.8	-30.9 ±2.3	-10.2 ±0.6	-27.3 ±1.9
色相角(°)	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	4.0 ±0.1	4.1 ±0.1	4.1 ±0.1



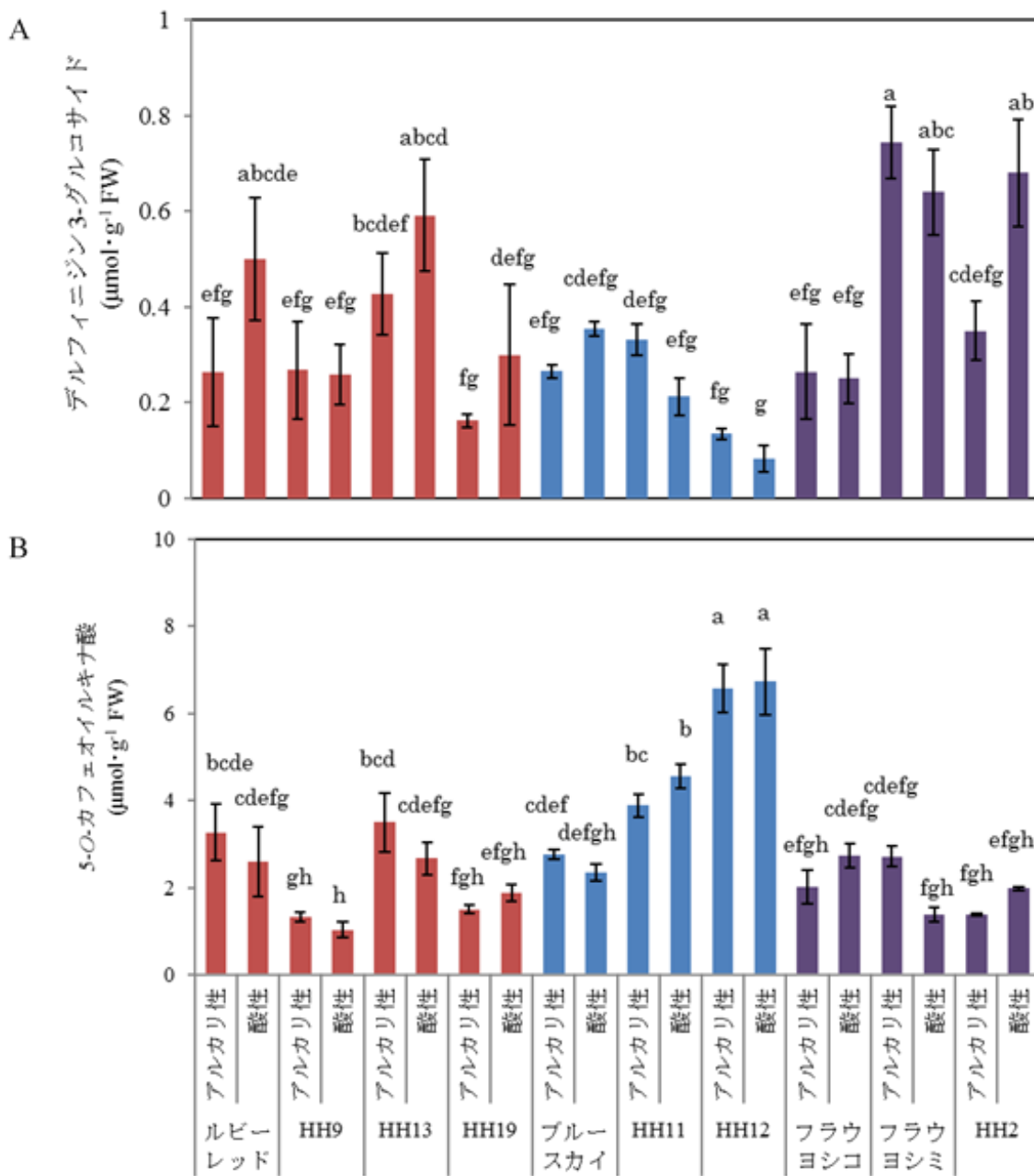
第 2-1 図 かく片細胞の顕微鏡写真

(A) 安定赤色系統‘HH13’ (B) 安定青色系統‘HH11’ (C) 可変品種‘フラウヨシコ’  
スケールは 100  $\mu\text{m}$ .



第2-2図 がく片の吸光スペクトル

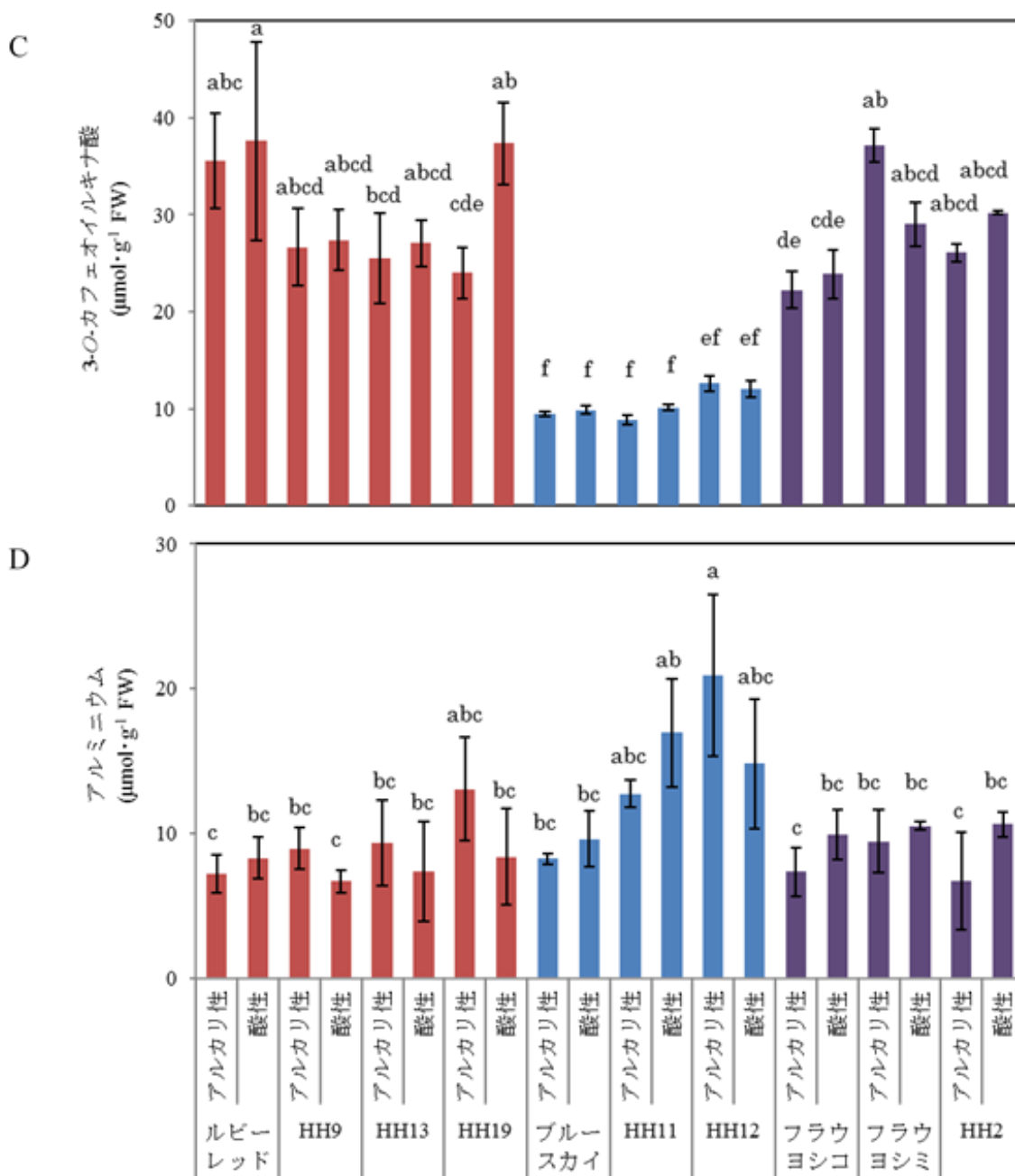
(A) 安定赤色系系統‘HH13’ (B) 安定青色系統‘HH11’ (C) 可変品種‘フラウヨシコ’



第 2-3-1 図 アルカリ性培養土および酸性培養土で栽培したアジサイがく片の色素関連成分の含量

(A) デルフィニジン3-グルコサイド, (B) 5-O-カフェオイルキナ酸

グラフ中の赤色: 安定赤色品種・系統, 青色: 安定青色品種・系統, 紫色: 可変品種・系統を示す.  
 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3), Tukey 多重比較により異符号間に 1%水準で有意差あり.



第 2-3-2 図 アルカリ性培養土および酸性培養土で栽培したアジサイがく片の色素関連成分の含量 (C) 3-O-カフェオイルキナ酸, (D) アルミニウム

グラフ中の赤色：安定赤色品種・系統，青色：安定青色品種・系統，紫色：可変品種・系統を示す。値は平均値±標準偏差 (n=3)，Tukey 多重比較により異符号間に 1%水準で有意差あり。

### 第3章 アジサイの花色発現におけるリン酸の関与

#### 1. 緒言

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F<sub>2</sub>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F<sub>2</sub>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‘フラウヨシミ’ (海老原園芸育成品種) のF<sub>2</sub>集団95個体のがく片を採取した。F<sub>2</sub>集団の育成は、2011年6月に種子親に‘きらきら星’、花粉親に‘フラウヨシコ’ (第3-1図A, B) の組み合わせで交雑を行いF<sub>1</sub>種子を得た。F<sub>1</sub>が開花した2013年5月にピンク色に発色する個体‘HY11-01-02’ (第3-1図C) を自殖交配しF<sub>2</sub>を得た。

##### 2) 栽培方法

F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>種子の播種は、採取後の9月下旬にタキセル培土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7.5cm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10.5cm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3g/L、ようりん、およびロング413-70を各2g/L、バッドグアノ、およびマグアンプIIを各1g/L加えて使用した。施肥条件は、7.5cmポットの育苗時が、ロング413 (JCAM AGRICo. Ltd., Tokyo, Japan) の70日溶出タイプと140日溶出タイプを各1g、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℃, 換気温度 22℃とし, 以降定植前までが最低温度 3℃, 換気温度 15℃とした. 定植から開花までが最低温度 15℃, 換気温度 22℃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 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 40℃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℃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, AlCl<sub>3</sub> 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, AlCl<sub>3</sub> 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

F<sub>2</sub> 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 (図. 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 (図. 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 (第 3-1-2 表~第 3-1-6 表). がく片の色彩と pH には関連性は認められなかった (第 3-1-1 表).

### 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

イニジン 3-グルコサイドであった。わずかに、デルフィニジン 3-サブピ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（第 3-1-2 表～第 3-1-6 表）。

#### 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(第 3-1-1 表)。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  $310^\circ$ 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 F<sub>2</sub> 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 $0.005\text{--}0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW (第 3-1-2 表, 第 3-4-1 図 A)

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  $310^\circ$ 以下のがく片においては  $0.09\text{--}0.19 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に分布した一方で、色相角  $310^\circ$ 以上のがく片においては  $0.08\text{--}0.17 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に分布した。アルミニウムの含量は、色相角  $310^\circ$ 以下のがく片においては  $9.34\text{--}17.66 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に分布した一方で、色相角  $310^\circ$ 以上のがく片においては  $11.54\text{--}27.19 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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  $310^\circ$ 以下のが

く片においては  $1.79\text{--}3.40 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に分布した一方で、色相角  $310^\circ$ 以上のがく片においては  $4.33\text{--}7.27 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW に分布した。リンの含量は、色相角  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 以上のがく片においては  $0.52\text{--}1.74 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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。

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

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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 以下のがく片においては  $2.22 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW であった一方で、色相角  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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 (第 3-1-2 表, 第 3-4-2 図 C)

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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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  $310^\circ$ 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7.24–13.28  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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0.62–2.40  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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 0.04–0.08  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW (第3-1-3表, 第3-4-2図D)

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0.06–0.80  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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8.91–22.89  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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 であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては5.40–19.48  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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0.69–3.27  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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 0.08–0.16  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW (第3-1-4表, 第3-4-3図E)

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0.08–0.39  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては0.06–0.55  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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12.96–20.90  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては6.35–21.09  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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5.42–11.53  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては11.19–21.60  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$

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0.14–1.08  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW であった一方で、色相角 310°以上のがく片においては0.85–3.54  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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 0.16–0.32  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW (第3-1-5表, 第3-4-3図F)

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 (第3-1-6表, 第3-4-4図G)

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  $310^\circ$  以下のがく片においては  $1.47 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$  であった一方で、色相角  $310^\circ$  以上のがく片においては  $0.98\text{--}4.03 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$  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 (第 3-5-1 図 A)。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 (第 3-5-1 図 B)。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 (第 3-5-2 図 A)。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 (第 3-5-2 図 B)。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 (第 3-5-3 図 A)。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 (第 3-5-3 図 B)。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 (第 3-1-1 表～第 3-1-6 表)。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 (第 3-1-1 表)。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 (第 3-1-2 表～第 3-1-6 表, 第 3-4-1 図～第 3-4-4 図)。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 (第 3-1-2 表～第 3-1-6 表, 第 3-4-1 図～第 3-4-4 図)。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 (第 3-5-1 図～第 3-5-3 図)。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 (第 3-5-1 図)。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 (第 3-5-2 図, 第 3-5-3 図)。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 (第 3-1-2 表～第 3-1-6 表, 第 3-4-1 図～第 3-4-4 図)。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、変動量が大きい (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 個体だけに認められた (第 3-1-5 表, 第 3-4-3 図 F)。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。

第3-1-1表 アジサイがく片の色彩値, pHおよび発色関連成分含量の相関関係

	L*	a*	b*	色相角	pH	デルファイニ 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	アルミニ ウム
a*	-0.74 **								
b*	0.16	0.43 **							
色相角	-0.33 **	0.83 **	0.79 **						
pH	-0.07	0.21	0.03	0.09					
デルファイニジン3-グルコサイド	-0.66 **	0.54 **	-0.06	0.24 *	-0.06				
3-O-カフェオイルキナ酸	-0.54 **	0.70 **	0.10	0.50 **	0.05	0.66 **			
5-O-カフェオイルキナ酸	-0.28 **	0.28 **	-0.08	0.11	-0.14	0.37 **	0.49 **		
アルミニウム	-0.08	0.11	0.15	0.16	0.11	0.03	0.01	0.06	
リン	-0.34 **	0.44 **	0.09	0.34 **	-0.05	0.16	0.50	0.35 **	0.06

\* および\*\* は, それぞれ  $p < 0.05$ ,  $0.01$  で有意な相関を示す (n=95)

表 3-1-2 アジサイのがく片の色彩値, pH および色素関連成分含有量

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

<sup>z</sup> がく片の pH は 2016 年に測定

<sup>y</sup> - は未測定

表 3-1-3 アジサイのがく片の色彩値, pH および色素関連成分含有量

#	色彩値		色相角 (°)	pH <sup>z</sup>	デルフィニジン 3-グルコไซด์ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	5-O-カフェオイル ルキナ酸 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	アルミニウム ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	3-O-カフェオイル ルキナ酸 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	リン ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	
	L*	a*								b*
No. 4 アントシアニン 0.04-0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$										
39	63.9	8.9	-19.9	294.1	4.0	0.055	0.26	8.77	5.15	0.74
23	66.4	13.7	-12.6	317.3	4.1	0.042	0.28	12.78	11.05	1.93
98	56.0	19.8	-15.0	322.8	4.1	0.067	0.06	10.61	6.81	1.08
85	53.4	26.3	-16.3	328.1	y	0.058	0.19	13.43	10.88	3.27
97	50.0	27.7	-15.3	331.1	-	0.061	0.14	16.05	9.14	2.42
40	65.1	21.1	-10.5	333.6	3.9	0.061	0.41	11.21	16.66	2.21
13	59.5	25.1	-10.4	337.4	4.3	0.059	0.25	12.66	19.48	2.33
69	58.5	26.9	-10.9	338.0	4.2	0.056	0.14	9.49	9.17	0.69
57	58.8	24.4	-8.8	340.1	-	0.059	0.23	20.58	5.40	1.01
71	52.7	31.6	-9.7	343.0	-	0.046	0.13	8.91	15.24	1.88
79	48.8	34.2	-6.4	349.4	4.2	0.079	0.24	21.62	10.61	1.70
19	64.2	24.1	-4.4	349.7	-	0.046	0.12	10.19	15.48	1.41
64	49.6	36.1	-4.2	353.3	4.1	0.069	0.80	21.82	14.11	1.24
84	54.9	34.0	-3.2	354.6	4.1	0.054	0.21	22.89	10.97	1.81
65	46.8	38.9	-2.6	356.1	4.0	0.072	0.20	22.32	10.02	1.54

<sup>z</sup> がく片の pH は 2016 年に測定

<sup>y</sup> - は未測定

第 3-1-4 表 アジサイのがく片の色彩値, pH および色素関連成分含有量

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

<sup>z</sup> がく片の pH は 2016 年に測定

y- は未測定



第3-1-5表 アジサイのがく片の色彩値, pHおよび色素関連成分含有量

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

<sup>z</sup> がく片の pH は 2016 年に測定

<sup>y</sup> - は未測定

第3-1-6表 アジサイのがく片の色彩値, pH および色素関連成分含有量

#	色彩値		色相角 (°)	pH <sup>z</sup>	デルフィニジン 3-グルコサイド ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )		5-O-カフェオイル ルキナ酸 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )		3-O-カフェオイル ルキナ酸 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )		リン
	L*	a*			b*	( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )		
No. 7 アントシアニン 0.32-0.64 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$											
9	51.4	19.1	-28.8	303.6	- <sup>y</sup>	0.358	0.84	14.71	16.28	1.47	
33	44.1	29.4	-22.4	322.7	4.0	0.373	0.24	10.42	21.17	1.82	
5	46.7	31.9	-12.4	338.7	4.0	0.533	0.25	18.89	18.00	0.98	
11	36.9	35.1	-13.0	339.7	-	0.444	0.11	12.20	16.51	1.96	
83	42.0	40.3	-9.1	347.3	4.0	0.361	0.52	16.26	19.73	4.03	
14	50.6	39.2	-5.9	351.5	-	0.380	0.26	11.12	15.96	1.63	
48	55.3	36.5	-5.3	351.7	4.1	0.371	1.37	11.68	18.11	2.43	
30	51.0	41.3	-5.2	352.8	4.3	0.354	0.47	16.36	18.88	1.87	
55	48.3	40.6	-2.6	356.4	4.1	0.400	0.57	19.50	25.52	2.57	
31	42.8	45.1	0.4	359.5	-	0.497	0.28	16.43	19.87	1.92	

<sup>z</sup> がく片の pH は 2016 年に測定

<sup>y</sup>- は未測定

A



B

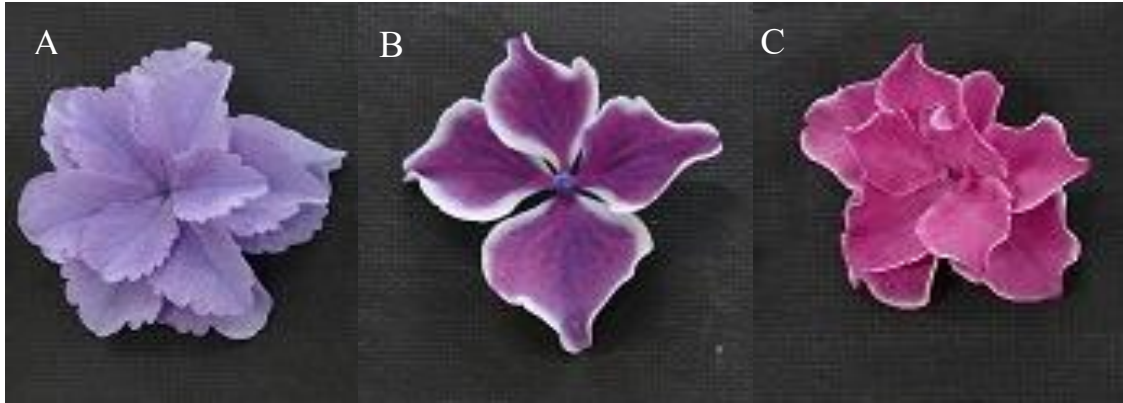


C



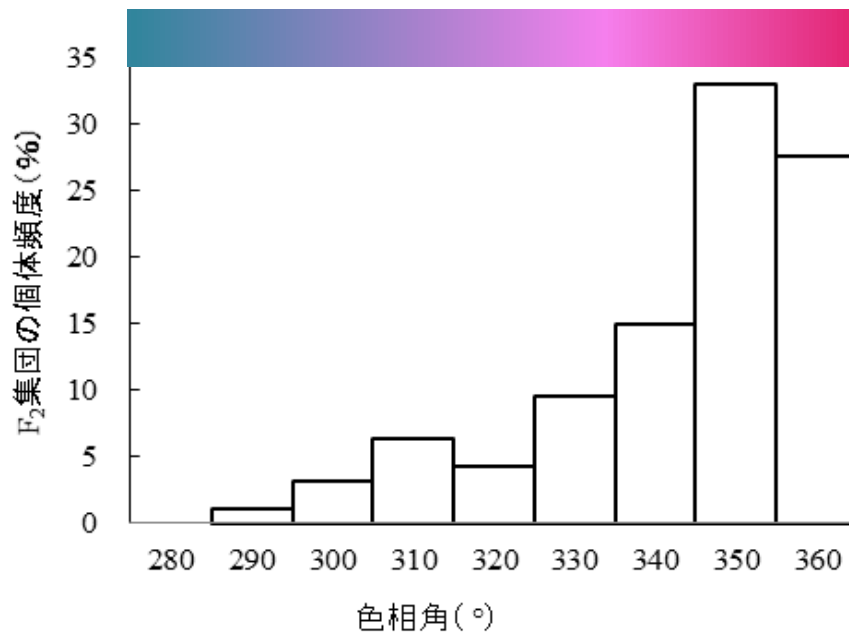
第3-1 図 交配親と F<sub>1</sub> 個体の特徴

A: 'きらきら星', B: 'フラウヨシミ', C: 'HY11-01-02' ('きらきら星' (種子親)  
× 'フラウヨシミ' (花粉親) の F<sub>1</sub> 個体)

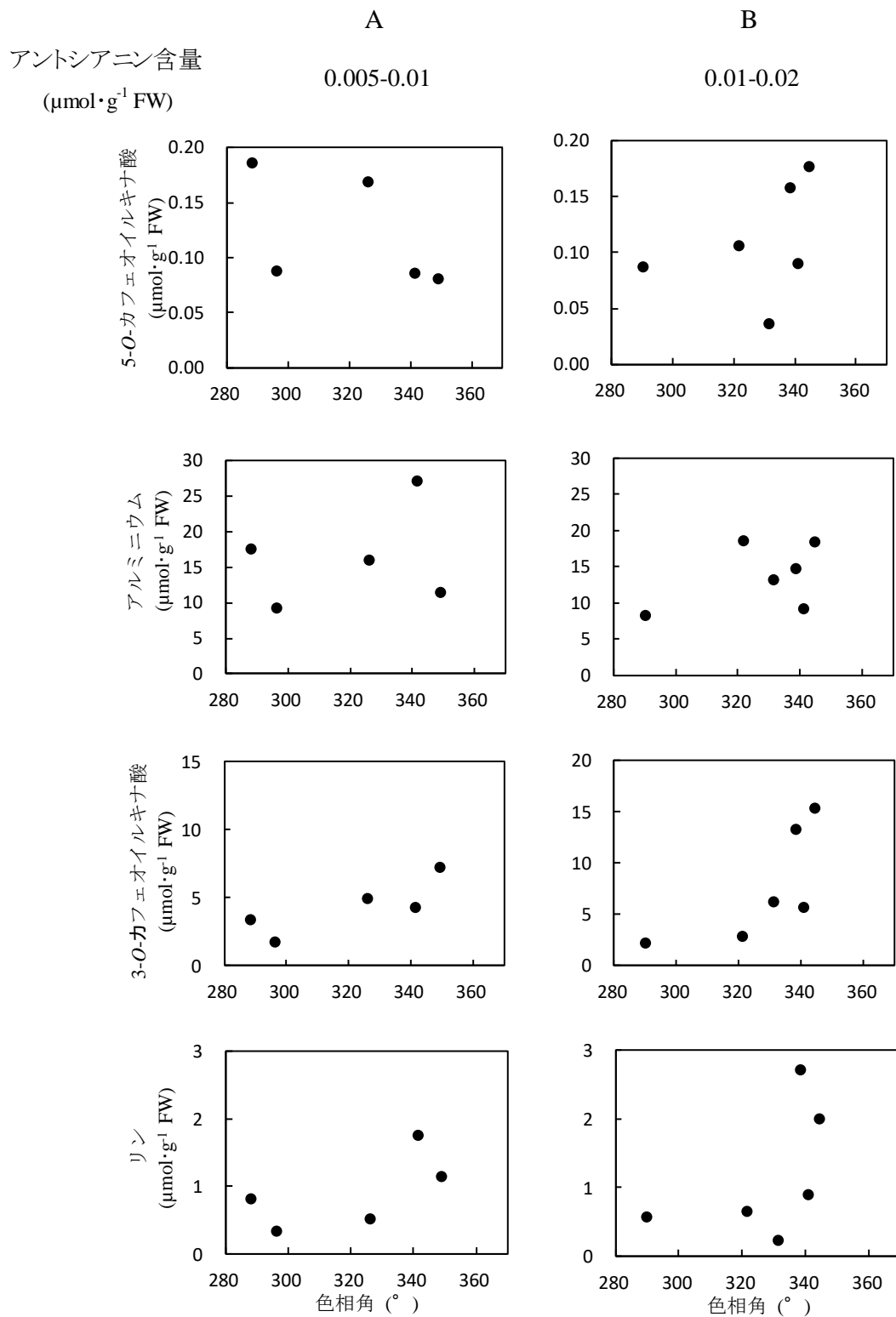


第 3-2 図 アジサイ F<sub>2</sub> 集団のがく片の異なる発色

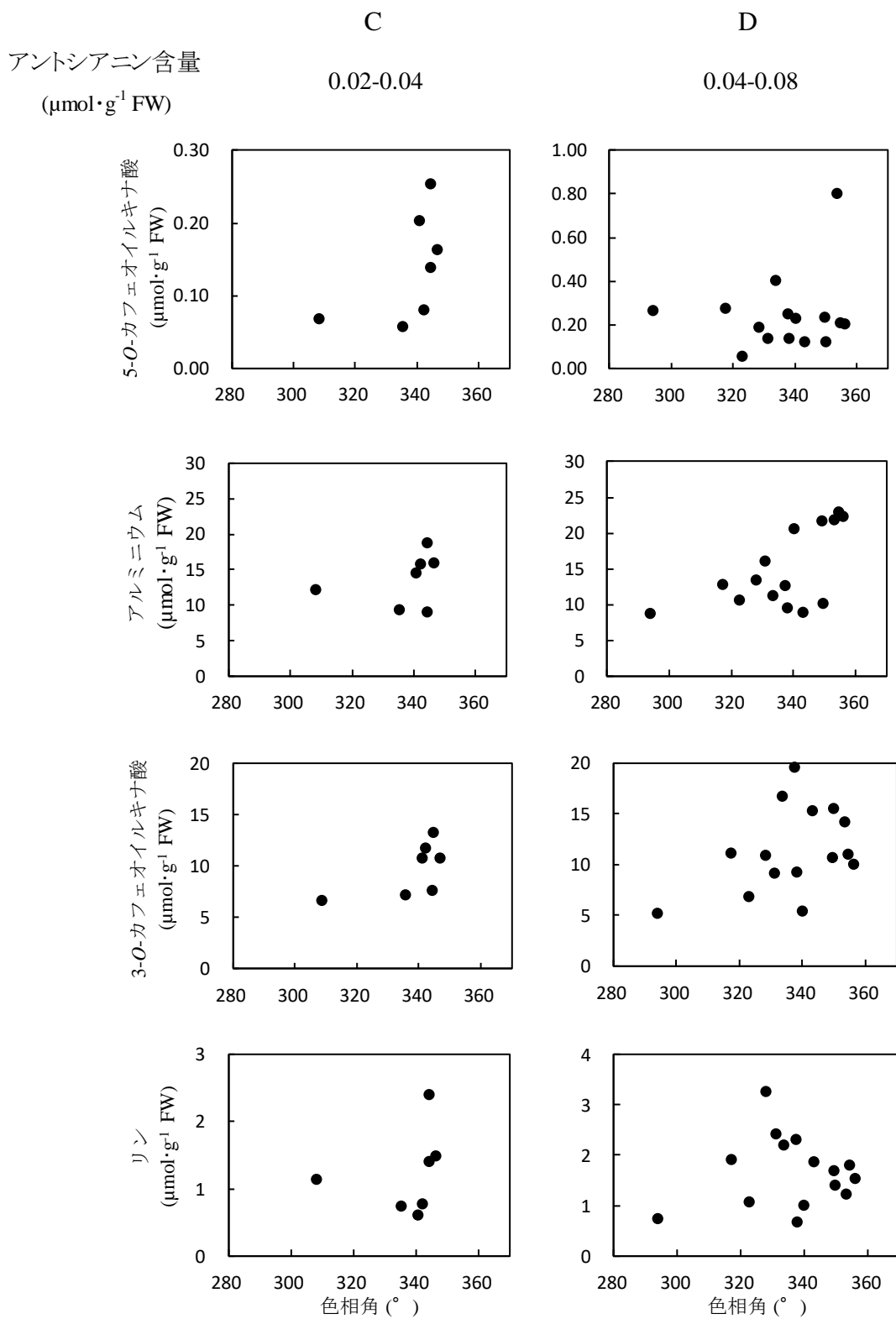
(A) 青紫色 ( $h$  288.4°–310°), (B) 紫色 ( $h$  310°–330°), (C) 赤紫色および赤色 ( $h$  330°–359.5°)



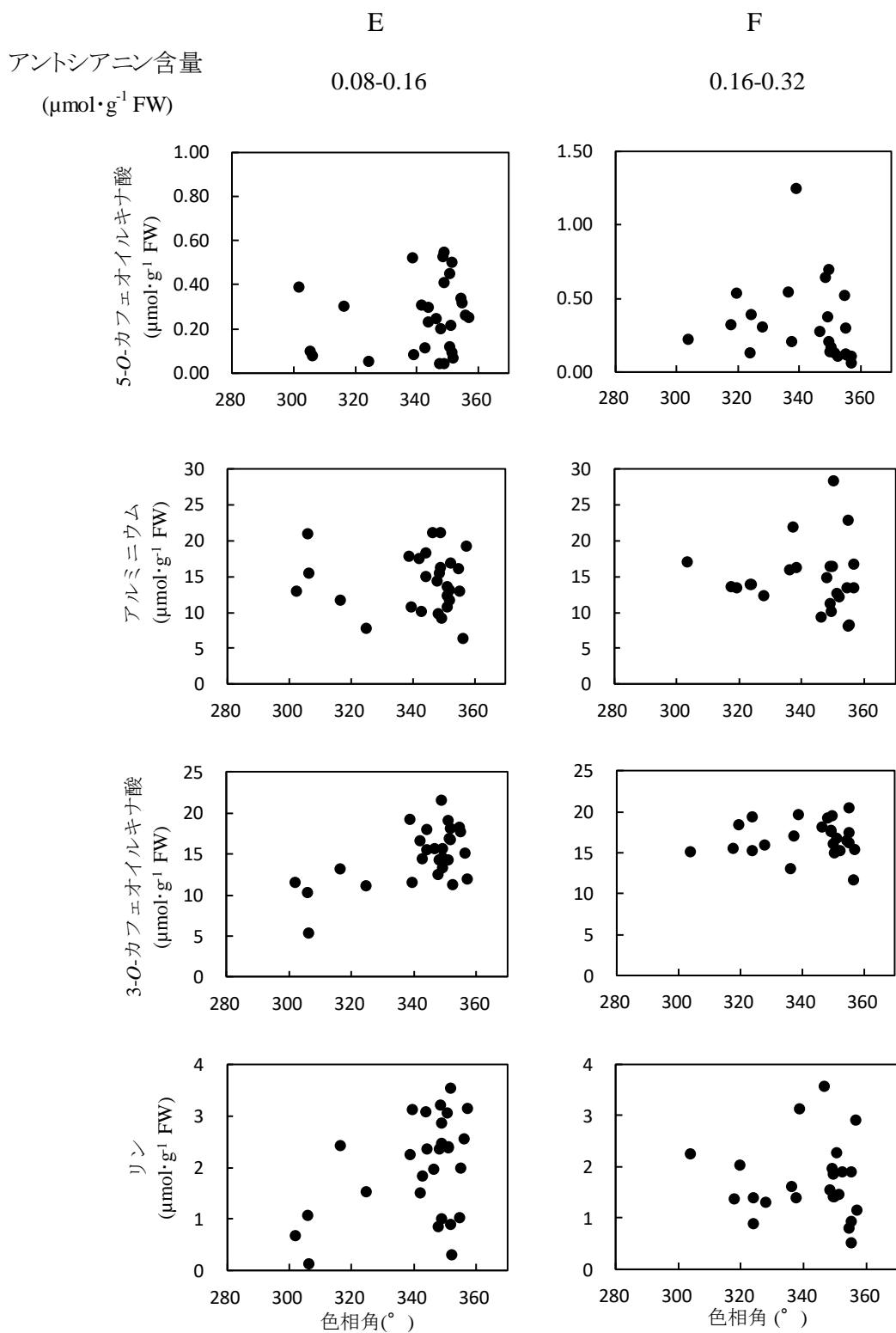
第3-3図 集団のがく片の色の分布  
カラーバーは色相角に対応した色を表示



第 3-4-1 図 　がく片の色相角に対するアントシアニン含量と発色関連成分含量の関係



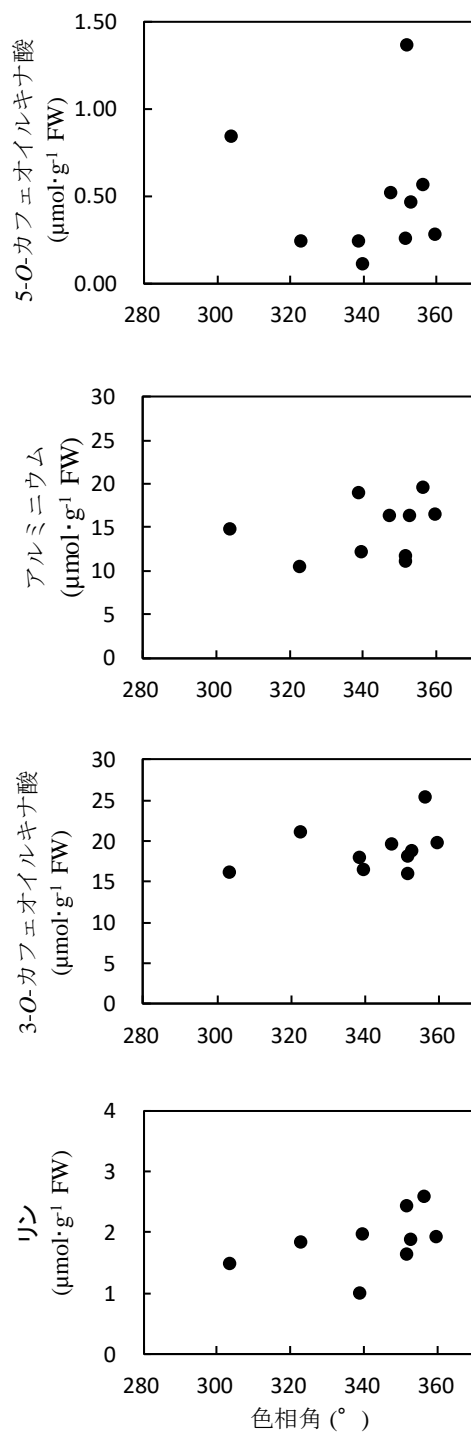
第3-4-2図 ぐく片の色相角に対するアントシアニン含量と発色関連成分含量の関係



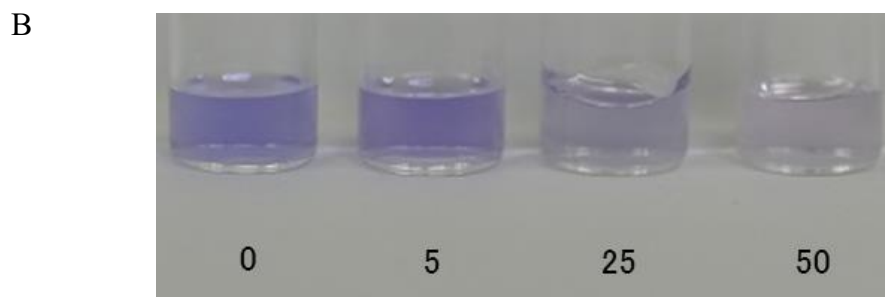
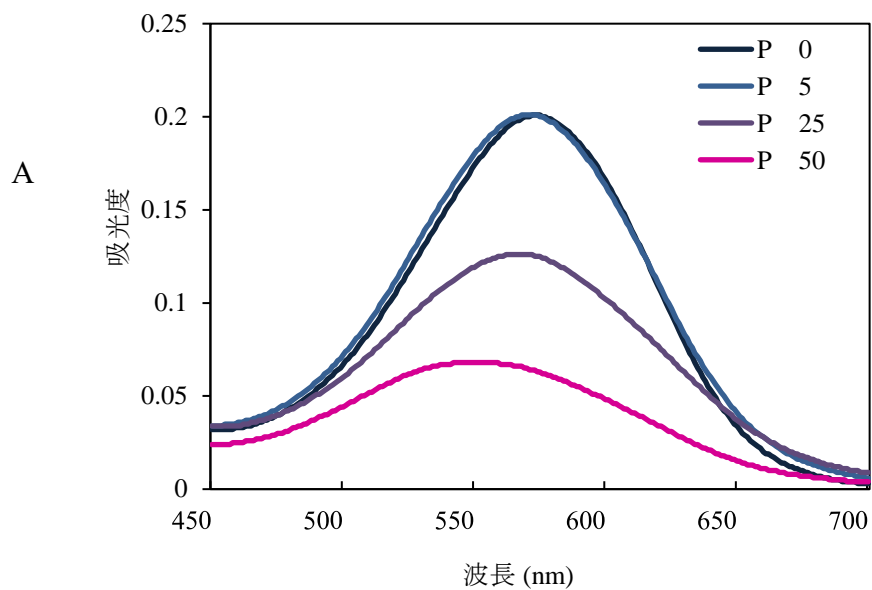
第 3-4-3 図 がく片の色相角に対するアントシアニン含量と発色関連成分含量の関係



G  
アントシアニン含量  
0.32-0.64  
( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ )

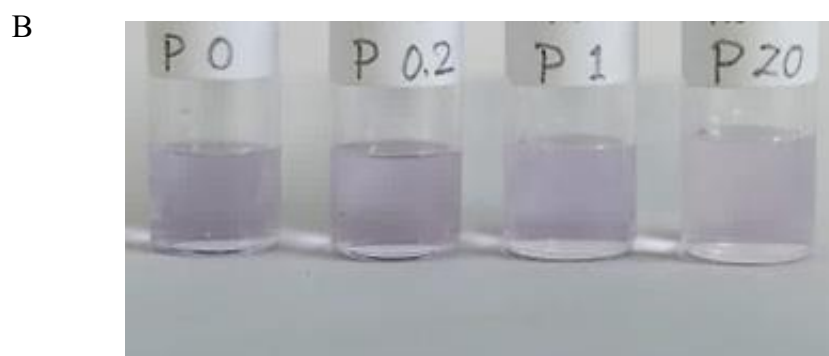
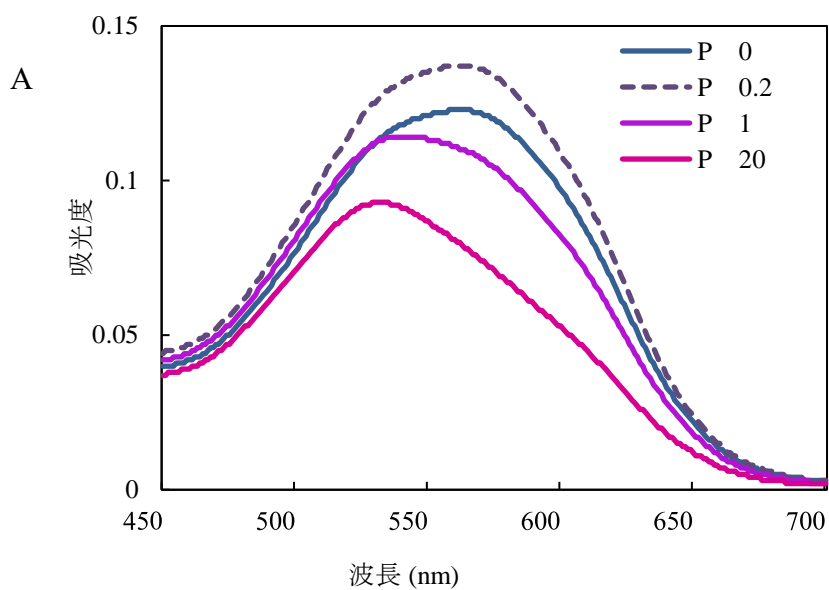


第 3-4-4 図 がく片の色相角に対するアントシアニン含量と発色関連成分含量の関係



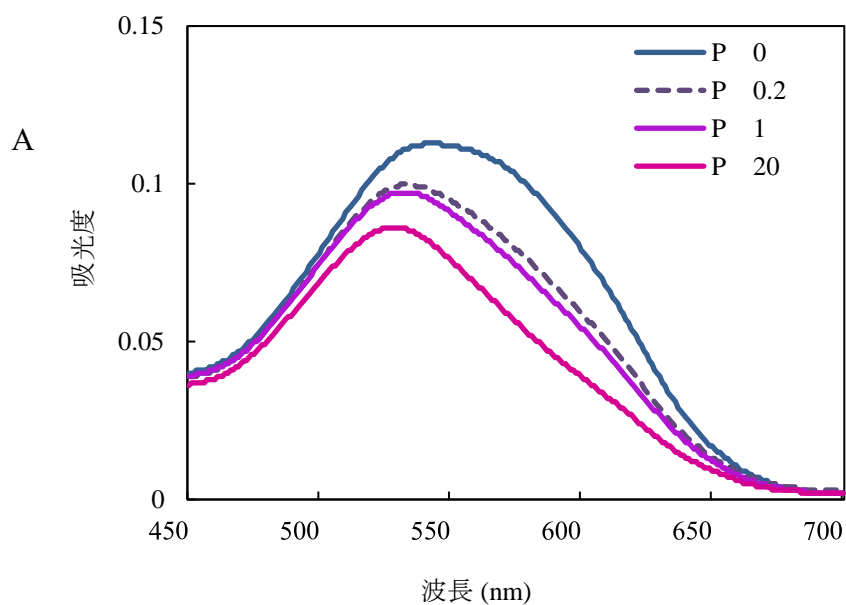
第 3-5-1 図 一般的ながく片の色素関連成分条件におけるアントシアニン溶液の発色に与えるリン酸の影響

pH 4.0 に調整した酢酸緩衝液にデルフィニジン 3-グルコサイド (35  $\mu$ M), 3-O-カフェオイルキナ酸 (25 eq.), 5-O-カフェオイルキナ酸 (0.5 eq.), アルミニウムイオン (25 eq.) の条件で混合した溶液にリン酸 (0 eq., 5 eq., 25 eq., 50 eq.) を混合.



第 3-5-2 図 青色のがく片の液胞中色素関連成分条件におけるアントシアニン溶液の発色に与えるリン酸の影響

pH 4.0 に調整した酢酸緩衝液にデルフィニジン 3-グルコサイド (20  $\mu$ M), 3-O-カフェオイルキナ酸 (10 eq.), 5-O-カフェオイルキナ酸 (1.3 eq.), アルミニウムイオン (1 eq.) の条件で混合した溶液にリン酸 (0 eq., 0.2 eq., 1 eq., 20 eq.) を混合。



B



第 3-5-3 図 赤色のがく片の液胞中色素関連成分条件におけるアントシアニン溶液の発色に与えるリン酸の影響

pH 4.0 に調整した酢酸緩衝液にデルフィニジン 3-グルコサイド (20  $\mu$ M), 3-O-カフェオイルキナ酸 (10 eq.), 5-O-カフェオイルキナ酸 (0.5 eq.), アルミニウムイオン (1 eq.) の条件で混合した溶液にリン酸 (0 eq., 0.2 eq., 1 eq., 20 eq.) を混合

## 第 4 章 アジサイの秋色花色の発現に関わる要素

### 1. 緒言

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（第 4-1 図）。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（第 1-1-2 表、第 4-2 図）、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*<sup>TM</sup> ‘Homigo’）の赤色の花色を対象に研究を行なっている。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）、‘フラウヨシコ’（海老原園芸、栃木県真岡市）、‘フラウヨシミ’（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・系統を試供した。2012 年 10 月に秋色を発色したのがく片を採取した。

#### 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 AGRI 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  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $40^\circ\text{C}$  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。アントシアニンは  $530 \text{ nm}$ , 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  $330 \text{ nm}$  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 ACQITY 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 ( $1.7 \mu\text{m}$ ,  $2.1 \text{ i.d.} \times 100 \text{ mm}$ , Waters) を用い, 流速  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $35^\circ\text{C}$  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  $360 \text{ nm}$ , フォトダイオードアレイスペクトルは  $200\text{-}800 \text{ nm}$  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,  $3.5 \text{ kV}$ ; イオン源温度,  $150^\circ\text{C}$ ; 脱溶媒温度,  $350^\circ\text{C}$ ; 脱溶媒気体流速,  $500 \text{ L/h}$ ; コーンガス流速,  $50 \text{ L/h}$ ; コリジョンエネルギー,  $6 \text{ V}$ ,  $20 \text{ V}$ ; 測定範囲,  $180\text{-}1080 \text{ m/z}$ ; 検出器電圧,  $1.7 \text{ kV}$ 。

#### 8) アルミニウムおよびリンの分析

生がく片を  $85^\circ\text{C}$  で 12 時間乾燥させた後,  $50 \text{ mg DW}$  を分解用サンプル管に量りとった。そこに硝酸  $2 \text{ mL}$  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,  $1 \text{ M}$  硝酸を  $10 \text{ mL}$  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,  $\text{AlCl}_3$  を  $0.1 \text{ M}$  酢酸緩衝液に溶解し,  $\text{pH}4.8$  に調製した。シアニジン 3-サブピ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-サブピオサイドの濃度を  $10 \mu\text{M}$  として, モル比でシアニジン 3-サブピオサイド: 3-*O*-カフェオイルキナ酸および, シアニジン 3-サブピオサイド: 5-*O*-カフェオイルキナ酸は 1: 10, シアニジン 3-サブピオサイド: アルミニウムは 1: 5, シアニジン 3-サブピオサイド: 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-サブピオサイド: 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  $400 \text{ nm}$  から  $700 \text{ nm}$  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 (第 4-1 図)。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 (第 4-2 図)。秋色ではがく片内側の着色が認められない花があった (第 4-4 図)。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 (第 4-1 図)。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  $0^\circ\text{-}19^\circ$  の範囲, 赤紫色の 2 品種は,  $332^\circ\text{-}343^\circ$

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。第4-5図に各グループの代表として‘フラウヨシミ’、‘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(第4-1表、第4-6図)。吸収極大値は、赤色品種が538–540 nmにピークを示し、550 nmより長波長側に急激に減少した。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(第4-2表)。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-サンプビオサイドと同定した(第4-2表)。

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。吸収極大波長を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(第4-3表、第4-7図、第4-8図)。

また3種類の微量アントシアニンを検出した。吸収極大波長を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-サンプビオサイド、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(第4-3表、第4-6図、第4-7図、第4-8図)。

### 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-サンプビ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0.10–1.78  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FWと0.01–0.19  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FWに、赤紫色品種では1.03–1.54  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FWと0.02–0.23  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FWに、青紫色品種では0.73–1.32  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FWと0.05–0.15  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FWに分布した(第4-2表、第4-9図)。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0.18–4.19  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW、赤紫色品種が0.56–1.87  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW、青紫色品種は0.90–1.28  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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(第4-9図)。

### 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4.51–30.37  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FWに対し、赤紫色と青紫色の品種は9.37–9.65  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  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(第4-9図)。

### 9) アルミニウム含量

アルミニウム含量は、赤色品種が0.94–4.96  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW、赤紫色の品種は5.38–6.03  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW、青紫色の品種は9.26–11.24  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FWに分布した(第4-9図)。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。

### 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 (第 4-10 図 A, B-a) . 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 (第 4-10 図 A, B-b) . 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 (第 4-10 図 A, B-c) . 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 (第 4-10 図 A, B-d) . 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 (第 4-10 図) . 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 (第 4-11 図 A, B-b) . 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 (第 4-11 図 A, B-c) .

#### 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 (第 4-3 図) . 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 (第 4-4 図) . 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 (第 1-1-2 表, 第 4-2 図) . 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-サンプビオサイドとともに、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 (第 4-3 表, 第 4-7 図) .

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-サンプビ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 (第 4-1 表, 第 4-6 図) . 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 (第 4-6 図) .

主要色素であるシアニジン 3-サンプ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 (第 4-10 図, 第 4-11 図) . シアニジン 3-サンプ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(第 4-11 図)。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 1:30:1.5:5 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(第 4-11 図)。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を考えられる。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。

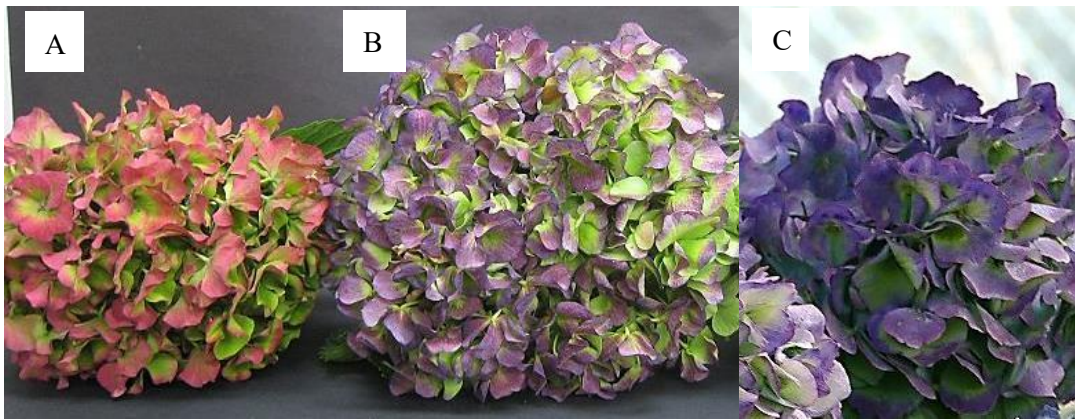
がく片を分析した結果、第 2 章と第 3 章で示した夏色の場合と同様に、秋色においても青みの強い青紫色は、赤色や赤紫色に比べて 3-O-カフェオイルキナ酸の含量が少なかった(第 4-9 図)。秋色でも 3-O-カフェオイルキナ酸が少ないことが青色の色彩の発色に必要なと考えられる。夏色の青色発色機構に関しては、3-O-カフェオイルキナ酸は 5-O-カフェオイルキナ酸の類縁体として、アントシアニンであるデルフィニジン 3-グルコサイドと 5-O-カフェオイルキナ酸とアルミニウムのキレート構造を阻害すると考えられている(武田, 2013)。シアニジン型アントシアニンを主要アントシアニンとする秋色の発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。

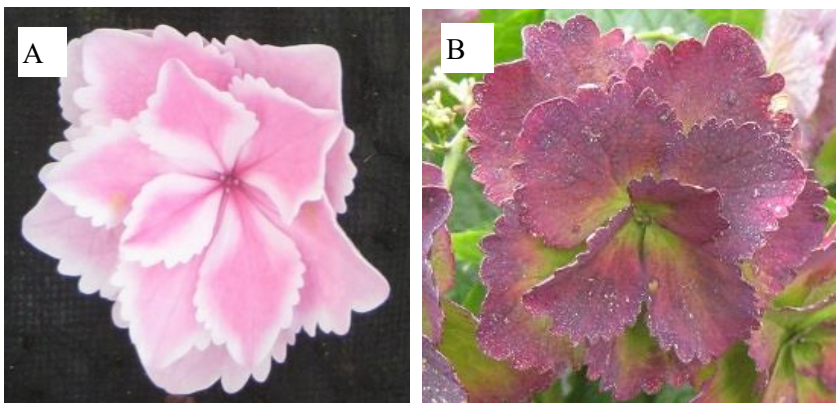
品種間の夏色と秋色の青色の色彩の強さには相関があることから、夏色と秋色における青色の色彩の発色は、類似の機構で制御されていると考えられる。夏色で認められているように(Kondo ら, 2005; Takeda ら, 1985a, 1985b, 1990; Yoshida ら, 2003), 青みの強いがく片にアルミニウムが多い傾向が認められた。アルミニウムの量が多いことは必須ではない一方で、そのような性質を持つ品種は青色発色に有利なものとして選抜されてきた可能性がある(第 4-9)。またリンの含量についても、夏色と同様に秋色においても青紫色のがく片で少ないことが予想された。しかし、リンの含量と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(第 3-5-1 図)、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。



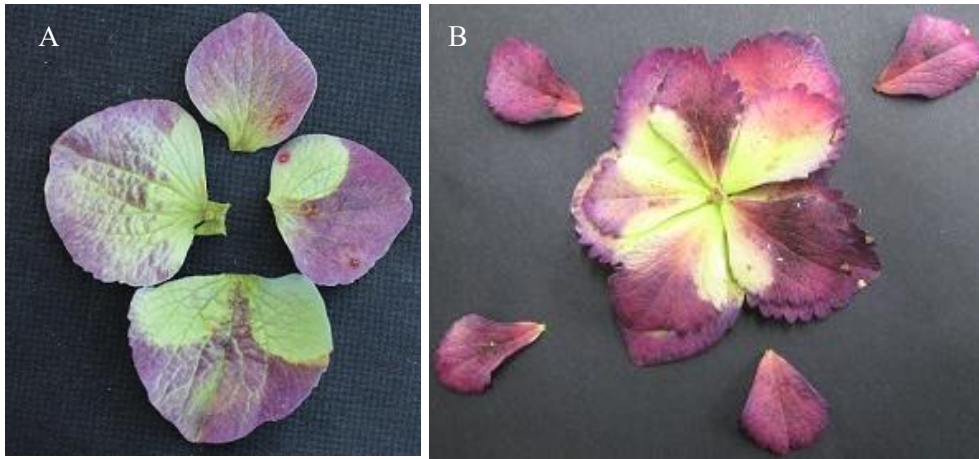
第4-1図 アジサイ‘フラヨシミ’の花色の季節変化  
(A) 夏色ステージ, (B) 緑色ステージ, (C) 秋色ステージ



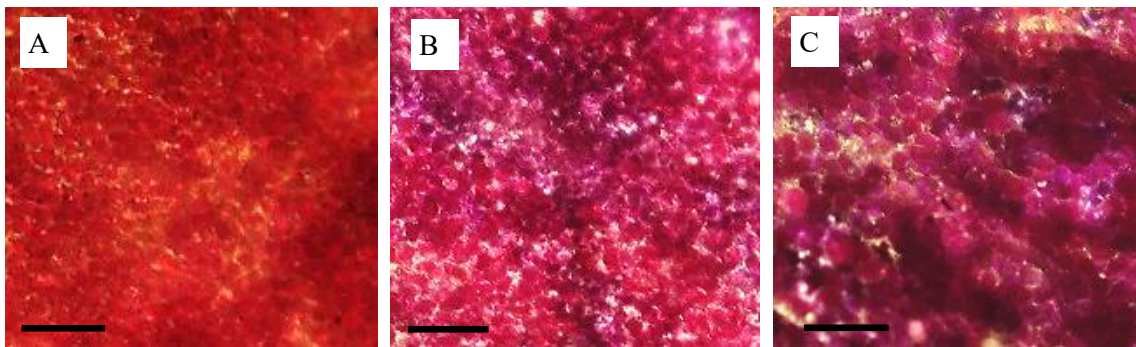
第4-2図 秋色ステージに発色したアジサイの種類  
(A) 赤色: ‘フラヨシミ’, (B) 赤紫色: HH6, (C) 青紫色: HH11



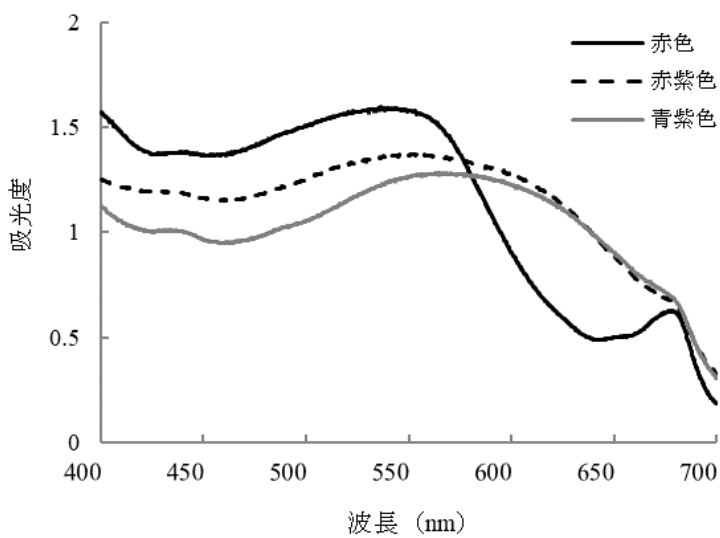
第4-3図 覆輪品種‘きらきら星’の夏色と秋色の着色の違い  
(A) 夏色, (B) 秋色



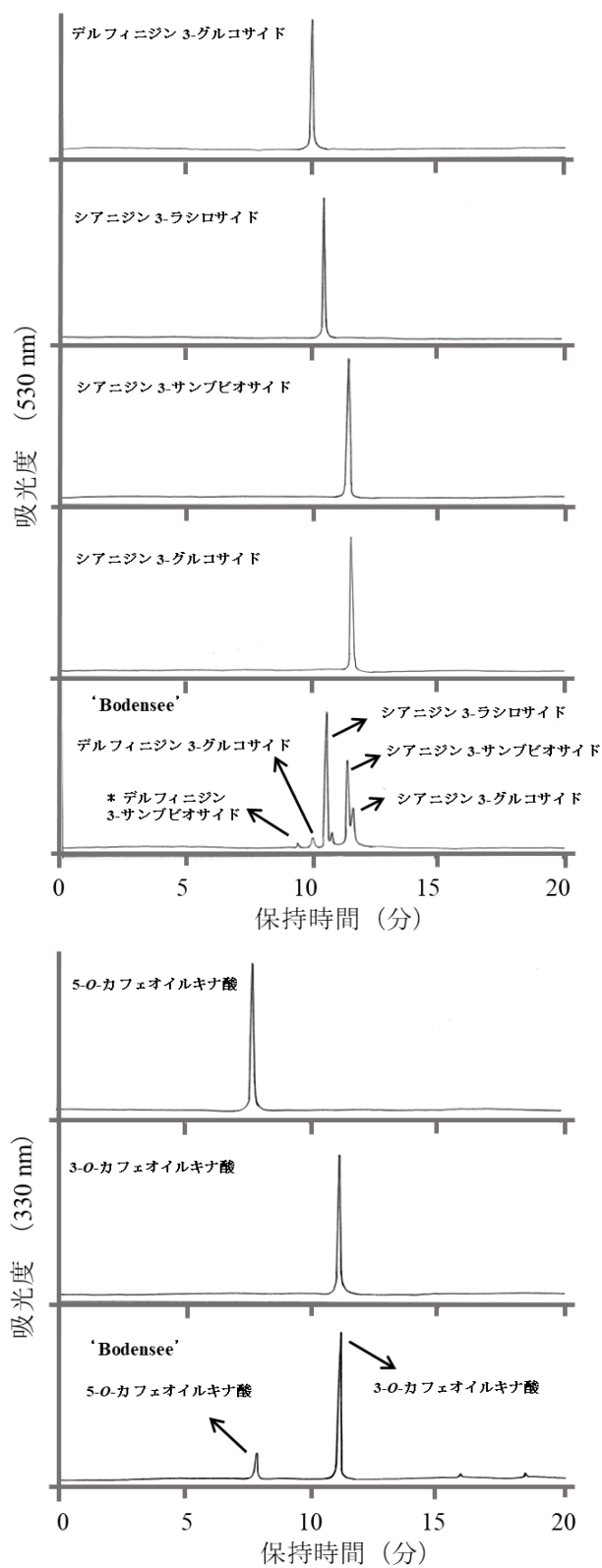
第4-4図 がく片部位による秋色発色の違い  
(A) 一重咲き, (B) 八重咲き



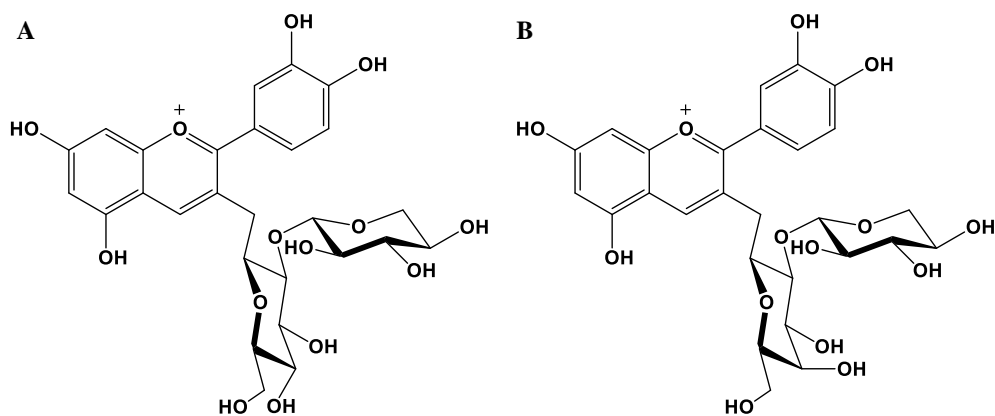
第4-5図 秋色がく片細胞の顕微鏡写真  
(A) フラウヨシミ, (B) HH6, (C) HH11  
スケールは 100  $\mu\text{m}$



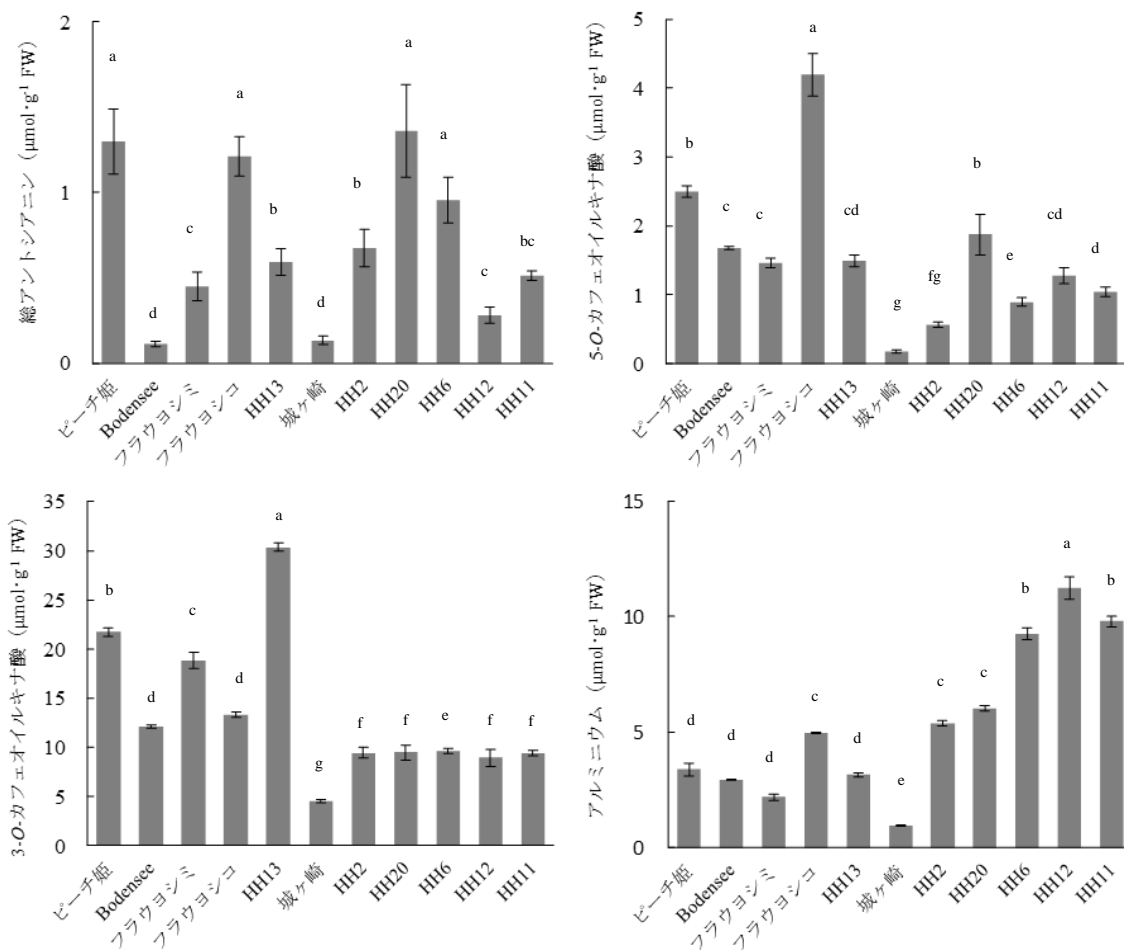
第4-6図 秋色がく片の吸収スペクトル  
赤色: 'フラウヨシミ', 赤紫色: HH6, 青紫色: HH11



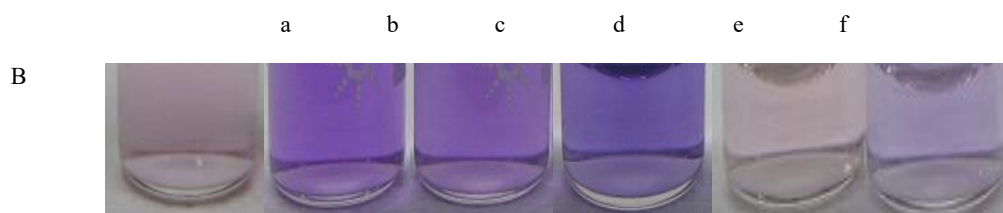
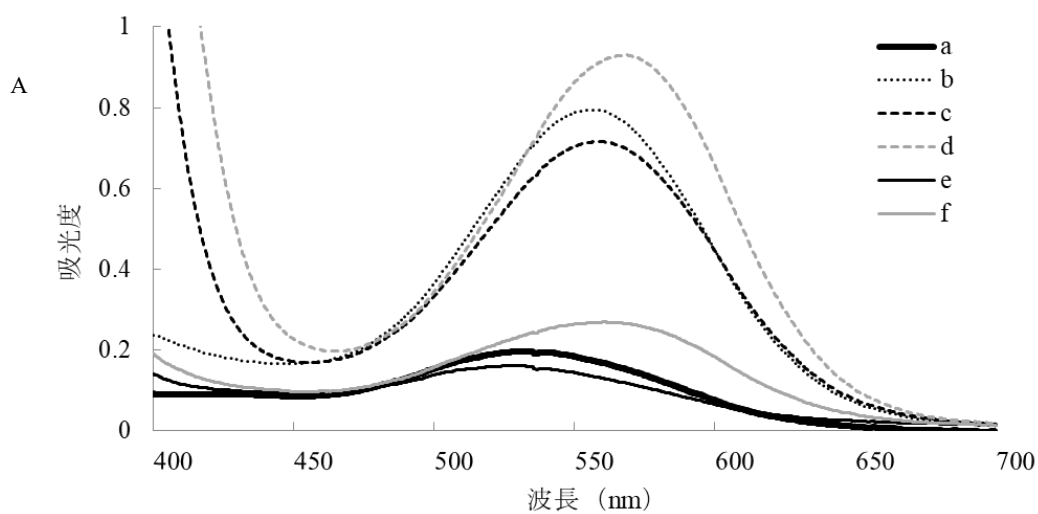
第4-7図 'Bodensee' の秋色がく片抽出液と化合物標品の  
HPLC クロマトグラム  
\*デルフィニジン 3-サンブピオサイドは 'Bodensee' とは  
異なる試料との比較をとおして同定した



第4-8図 秋色がく片のアントシアニン構造  
(A) シアニジン 3-サンブピオサイド, (B) シアニジン 3-ラシロサイド



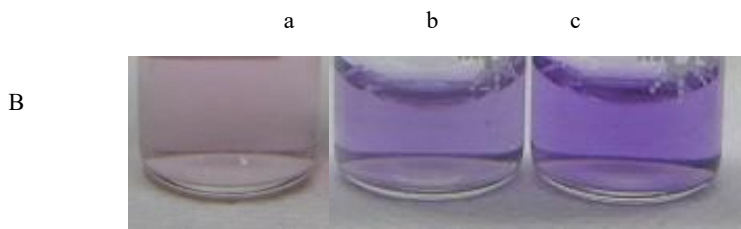
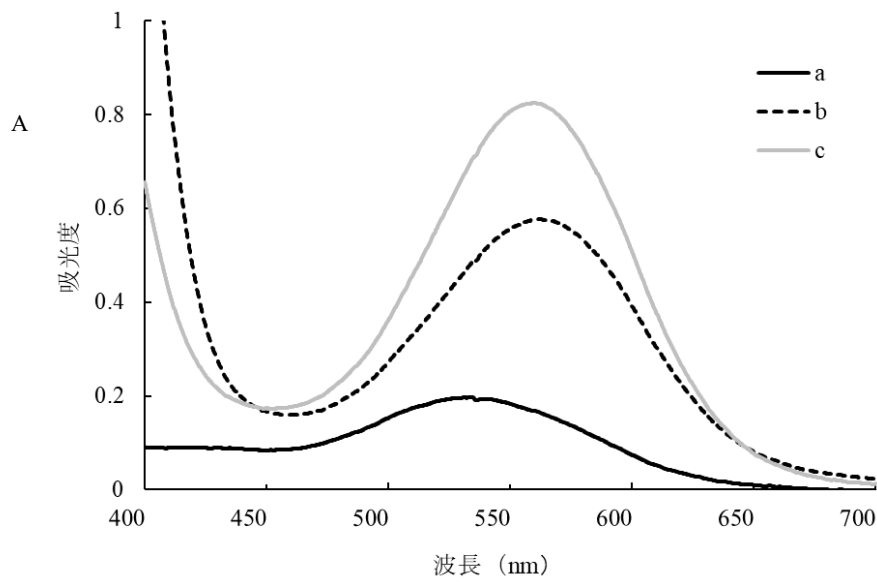
第4-9図 秋色がく片の色素の関連成分含量  
図中縦線は標準誤差を示す (n=3)  
また, 異なるアルファベット間には Tukey 多重比較により 1%水準で有意差あり



第4-10図 アントシアニン溶液に与える発色関連物質の影響

溶液 pH 4.8, アントシアニンの濃度は 10  $\mu\text{M}$ , 括弧の中の数値はシアニジン 3-サンプビオサイド, アルミニウムイオン, 3-O-カフェオイルキナ酸, 5-O-カフェオイルキナ酸の当量比を示す

(a) (1:0:0:0), (b) (1:5:0:0), (c) (1:5:10:0), (d) (1:5:0:10), (e) (1:0:10:0), (f) (1:0:0:10)



第4-11図 秋色がく片の色素関連成分含有比率に基づく花色の再現  
 溶液 pH 4.8, アントシアニンの濃度は 10  $\mu$ M, 括弧の中の数値はシアニジン 3-サ  
 ンブピオサイド, アルミニウムイオン, 3-O-カフェオイルキナ酸, 5-O-カフェオ  
 イルキナ酸の当量比を示す  
 (a) (1 : 0 : 0 : 0), (b) 赤色のがく片における組成 (1 : 5 : 30 : 1.5),  
 (c) 青紫色のがく片における組成 (1 : 5 : 5 : 1) .

第4-1表 アジサイの秋色がく片の色彩および吸収極大波長

	夏色	秋色	色 彩 値 <sup>z</sup>			色相角 (°)	吸収極大波長 (nm)
			L*	a*	b*		
ピーチ姫	ピンク	赤	37.0 ± 2.3 ab <sup>y</sup>	41.5 ± 1.8 a	11.4 ± 0.4 a	15	539
Baudensee	ピンク	赤	43.1 ± 1.5 a	33.2 ± 1.4 b	7.1 ± 1.0 b	12	538
フラウヨシミ	赤	赤	30.2 ± 1.0 cd	40.1 ± 0.6 a	12.4 ± 0.9 a	17	539
フラウヨシコ	赤ピンク	赤	28.8 ± 0.8 cde	32.5 ± 2.1 b	11.0 ± 0.8 a	19	539
HH13	赤ピンク	赤	31.1 ± 0.9 bcd	30.9 ± 1.1 b	3.4 ± 0.5 c	6	539
城ヶ崎	赤ピンク	赤	33.4 ± 0.7 bc	31.1 ± 0.8 b	-0.2 ± 0.8 cd	0	538
HH2	紫	赤紫	26.0 ± 2.0 de	12.5 ± 0.9 cd	-3.8 ± 0.6 de	-17	546
HH20	紫	赤紫	25.1 ± 1.0 de	15.9 ± 0.6 c	-8.4 ± 0.8 fg	-28	544
HH6	青紫	赤紫	25.9 ± 0.6 de	13.7 ± 1.7 cd	-5.5 ± 0.4 ef	-22	553
HH12	青紫	青紫	22.7 ± 0.6 e	10.8 ± 0.6 cd	-4.0 ± 0.7 e	-20	562
HH11	青紫	青紫	27.2 ± 0.6 de	9.6 ± 0.5 d	-10.8 ± 0.7 g	-48	565

<sup>z</sup> 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

<sup>y</sup> Tukey多重比較により異符号間に1%水準で有意差あり

第4-2表 アジサイの秋色がく片のpHおよびアントシアニン含量

	pH <sup>z</sup>	シアニン 3- サブピオサイト <sup>y</sup>	シアニン 3- ラシロサイト <sup>y</sup>	シアニン 3- グルコサイト <sup>y</sup>	総アントシアニン <sup>z</sup>
		(μmol · g <sup>-1</sup> FW)	(μmol · g <sup>-1</sup> FW)	(μmol · g <sup>-1</sup> FW)	(μmol · g <sup>-1</sup> FW)
ピーチ姫	4.9 ± 0.0	1.78	0.17	0.00	2.04 ± 0.23 a <sup>y</sup>
Baudensee	4.9 ± 0.0	0.10	0.15	0.05	0.30 ± 0.03 d
フラウヨシミ	4.8 ± 0.1	0.48	0.03	0.17	0.69 ± 0.87 cd
フラウヨシコ	4.9 ± 0.0	1.62	0.19	0.09	1.94 ± 0.12 a
HH13	4.7 ± 0.1	0.90	0.08	0.00	1.21 ± 0.10 bc
城ヶ崎	4.9 ± 0.0	0.15	0.01	0.00	0.18 ± 0.03 d
HH2	4.9 ± 0.0	1.03	0.02	0.00	1.12 ± 0.12 bc
HH20	4.8 ± 0.0	1.54	0.23	0.14	1.99 ± 0.30 a
HH6	4.9 ± 0.0	1.32	0.15	0.00	1.51 ± 0.15 ab
HH12	5.2 ± 0.0	0.54	0.05	0.00	0.66 ± 0.01 cd
HH11	5.1 ± 0.1	0.73	0.07	0.00	1.19 ± 0.04 bc

<sup>z</sup> 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

<sup>y</sup> Tukey多重比較により異符号間に1%水準で有意差あり



第4-3表 アジサイの秋色がく片抽出液とアントシアニン色素のHPLC分析における保持時間, および  
 吸収極大波長, TLC分析における $R_f$ 値, ならびにLC-MS分析における $m/z$ 値

	保持時間 (分)	吸収極大波長 (nm)	$R_f$ 値		$m/z$ 値
			10%酢酸	BAW (4 : 1 : 2) <sup>z</sup>	
秋色がく片抽出液	9.39	525	0.20	0.25	597
	9.92	523	0.06	0.23	465
	10.57	518	0.29	0.37	581
	11.47	516	0.30	0.39	581
	11.69	515	0.09	0.34	449
デルフィニジン 3-サンブピオサイド	9.30	525	0.20	0.25	597
デルフィニジン 3-グルコサイド	9.95	523	0.06	0.23	465
シアニジン 3-ラシロサイド	10.57	518	0.29	0.37	581
シアニジン 3-サンブピオサイド	11.48	516	0.30	0.39	581
シアニジン 3-グルコサイド	11.60	515	0.09	0.34	449

<sup>z</sup> BAW (4 : 1 : 2) はブタノール : 酢酸 : 水を4 : 1 : 2で混合した溶液

## 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、土壤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F<sub>2</sub>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。

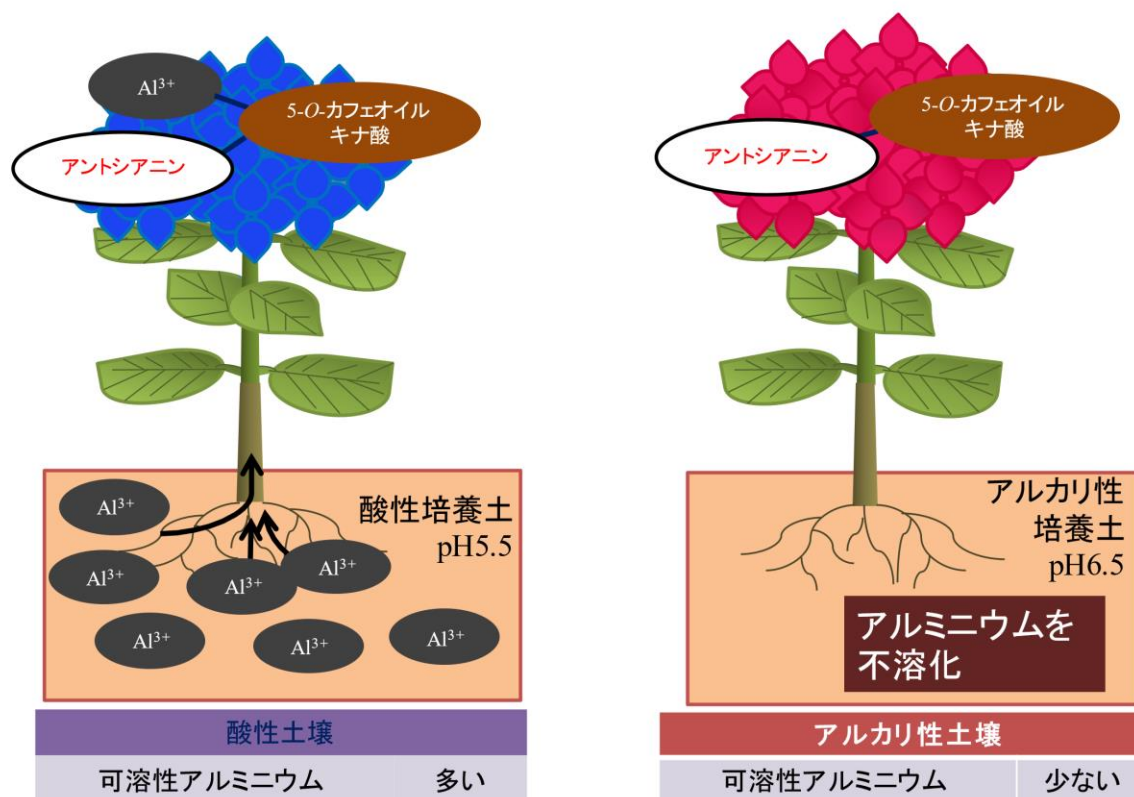
秋色の色彩には、赤色、赤紫色、青紫色があり、それぞれのがく片で発色する秋色は、夏色の赤色、紫色、青色と対応している。秋色の主要アントシアニンは、報告されているシアニジン3-サンブピオサイドとともに、新たにシアニジン3-ラシロサイドであることを明らかにした。秋色花色の色素は、夏色とは異なるシアニジン系アントシアニンが担っていた。シアニジン系アントシアニンの溶液は赤色を示すとともに、5-*O*-カフェオイルキナ酸とアルミニウムを加えることで青色が濃くなり、花色と類似の青紫色を発色した。3-*O*-カフェオイルキナ酸には青色を濃くする効果は無く、青紫色のがく片は赤色や赤紫色のがく片に比べて3-*O*-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抑制されることにあると考えられていた (Allen ら, 1943) (第 5-1 図)。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。

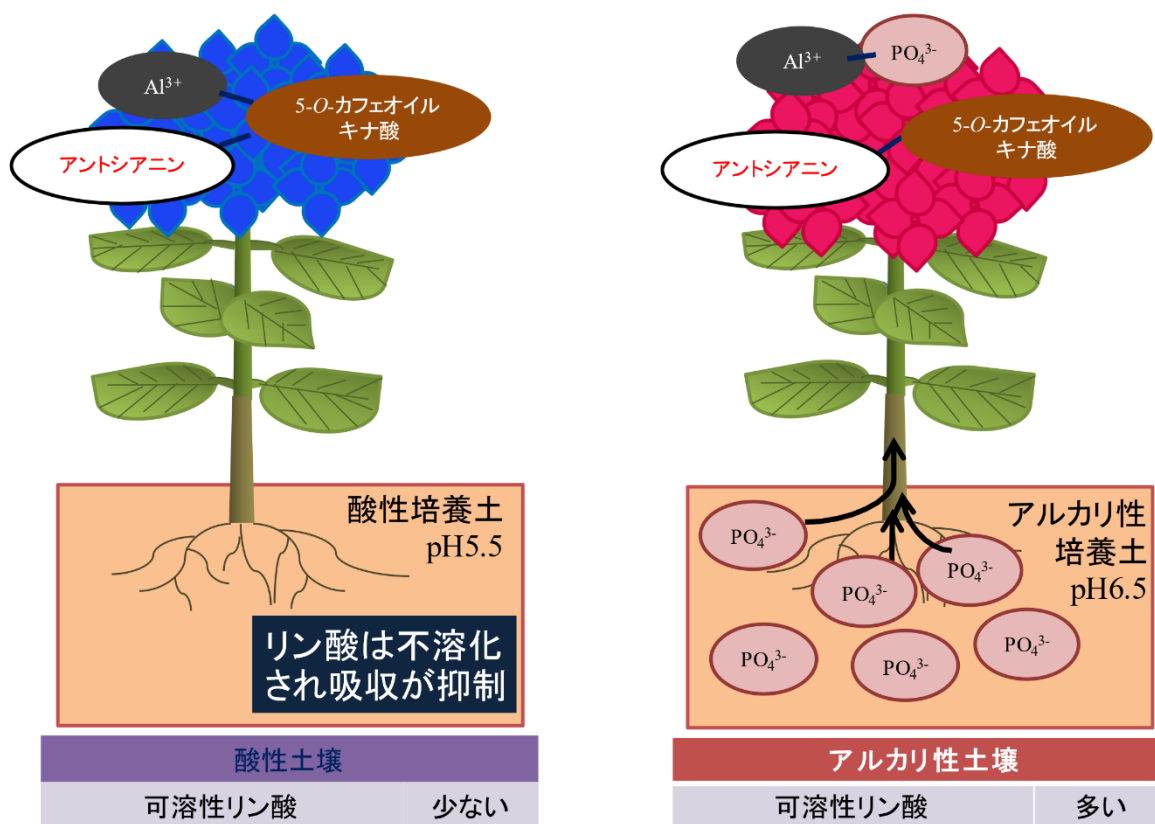
一方、新しい概念に基づくと、アルミニウムの吸収量は土壌条件に影響を受けないこと、アルカリ性土壌において青色の発色が阻害される原因は、土壌中の可溶性リン酸の増加によるリン酸の吸収量の増加にあり、その結果がく片の液胞内で形成しうるアントシアニンと 5-O-カフェオイルキナ酸によるアルミニウムのキレート結合がリン酸によって阻害されることにある (図 5-2)。ここではアルミニウムを多く含む赤玉土や黒ボク土を主体とした培養土での生育で青色の発色が促進される原因は、アルミニウムとの結合による土壌中の可溶性リン酸の減少にあると理解される。本研究の成果は、リン酸の利用による効率的なアジサイの花色の制御方法の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。



第 5-1 図 これまでのアジサイの発色概念イメージ

土壌 pH が高い条件で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る。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抑制される。



第 5-2 図 新たなアジサイの発色概念イメージ

アルミニウムの吸収量は土壌 pH 条件に影響を受けない。土壌 pH が高い条件で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る。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阻害される。

## 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 F<sub>2</sub> 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示した。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-サンプ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 F<sub>2</sub> 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  $\lambda_{\max}$  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

本博士論文をと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、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。

本研究の遂行にあたり栃木県農業試験場の元場長 安納義夫氏、同 小瀧勝久氏、同 高橋建夫氏には、仕事との両立にあたり終始暖かい励まし、御支援いただき、心より感謝申し上げます。

花き研究室で多大な労力のかかるアジサイの栽培管理に御尽力をいただいた研究員、技術員、パート職員の皆様に感謝いたします。

最後に、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。

## 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. 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调節に関する研究（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素変異機構の解明. 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. ハイドランジ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): ハイドランジ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. ハイドランジ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. ハイドランジ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. ハイドランジ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. *Arch. 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. S 表 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.