

アジサイの赤色覆輪の色素構成と遺伝特性

小玉雅晴・田邊雄太¹⁾・杉山直美²⁾・寺内信秀³⁾

摘要：アジサイの装飾花がく片に発現する赤色覆輪は、シアニジン3-サンブジオサイドおよびシアニジン3-グルコサイドの2種類のシアニジン系アントシアニン色素によって発色することを明らかにした。また、赤色覆輪の発現には、2つの独立した優性遺伝子の存在が推定された。さらに、赤色覆輪形質を持つ個体は、葉身が赤色に着色する形質が確認された。がく片の赤色覆輪と葉身の赤色着色の形質は遺伝的に連鎖していることが示唆された。赤色覆輪個体の選抜法として、幼植物体の葉身による赤色着色を指標とした早期選抜が可能であると考えられた。

キーワード：アジサイ、アントシアニン、花色、選抜、複色、覆輪

Pigment structure and genetic characteristics of red picotee Hydrangea cultivars.

Masaharu KODAMA, Yuta TANABE, Naomi SUGIYAMA, Nobuhide, TERAUCHI

Summary: The red picotee of hydrangea cultivars mainly contained two anthocyanins; cyanidin 3-sambubioside and cyanidin 3-glucoside. Two dominant genes independent of each other were ascribable due to the expression of the picotee. The cultivars with the picotee carried a characteristic of red leaves. The results indicated a genetic linkage between both the characteristics. The use of the young plants with red leaves will be greatly helpful in the early selection for red picotee.

Key words: anthocyanin, double-colored, flower color, hydrangea, picotee, selection

I 緒言

アジサイは、母の日の贈答用鉢花として、カーネーションに並ぶ需要の高い花き品目である。特に近年、花型に特徴のある品種が次々と開発され、希少性の高い品種は高単価で取引されるなど、市場が活性化している。

栃木県内の鉢物アジサイは、主にシクラメンと組合せた品目として鉢物経営に導入されている。栃木県農業試験場では、八重咲き性に着目した県オリジナル品種の開発に取り組み、2021 年までに‘きらきら星’、‘パラソルロマン’、‘エンジェルリング’ および ‘プリンセスリング’ の 4 品種を育成した(小玉ら, 2015; 寺内ら, 2021; 寺内ら, 2022)。本県育成品種を含めた令和 3 年度の県内のアジサイ生産額は、約 1 億 4 千万円となっている。

アジサイ (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) は、日本原産の植物であり、ヨーロッパ、アメリカを中心にガクアジサイやヤマアジサイ (*H. serrata* (Thunb.) Ser.) などとの交配によって園芸品種が改良されてきた。海外で品種改良されたアジサイが日本に輸入され、西洋アジサイ (ハイドラランジア) として流行し、庭木や公園の栽植、鉢物など身近な園芸植物として利用されている。アジサイの花は、装飾花と呼ばれるがく片が花弁状に肥大化した組織である。花色は、青、紫、ピンク、赤などを発色する。また、がく片全体が同一の主色のみ発現する単色、主色とは異なる二次色を併せて発現する複色がある(第 1 図)。複色の種類には、二次色の分布が、がく片の周縁部に現れる覆輪、がく片内部に点在する絞りなどがある。さらに、覆輪の種類には周縁部の色が、白色(以下、白色覆輪)と赤色(以下、赤色覆輪)のものがある。

アジサイのがく片の発色の特徴については、これまでの研究によって、その仕組みが解明されてきた。青色から赤色までの発色を担う色素は、アントシアニンの一種であるデルフィニジン 3-グルコサイドである(Asen・Siegelman, 1957; Asen ら, 1956; Lawrence ら, 1938)。また、デルフィニジン 3-グルコサイドとアルミニウムおよびネオクロロゲン酸の共存によるキレート結合によって、青色を発現することがわかっている(Ito ら, 2009; Kondo ら, 2005; Takeda ら, 1985a, 1985b, 1990; Yoshida ら, 2003)。

筆者らは、育種目標として八重咲きと複色の 2 つの形質獲得を目指し、交配を行っている。赤色覆輪の形質は、ヤマアジサイの‘キヨスミサワ’が由来とされ、民間育種では *H. macrophylla* との交配から一重咲きの品種が育成されている(第 1 図)。我々が品種育成に利用する交配母本や交配によって得られた後代には、がく片の主色がピンクや赤紫で、かつ赤色覆輪を発現するものがある。このがく片の

発色について色素の特徴を調査する中で、これまでに報告のあるデルフィニジン 3-グルコサイドに加え複数の色素の存在を示唆する結果が得られた。また、赤色覆輪個体には、葉身が赤色に着色するものが多いことがわかってきた。

そこで、本研究では、赤色覆輪のがく片および葉身の色素構成を明らかにするとともに、これらの遺伝様式の特徴について報告する。

II 材料および方法

試験 1 がく片および葉身のアントシアニン分析

材料は、2014 年 5 月に栃木県農業試験場ガラス温室で開花した赤色覆輪品種‘キヨスミサワ’(がく片の主色：白色、周縁部：赤色)、および‘トキメキ’(がく片の主色：薄赤紫、周縁部：赤色)のがく片および葉身(赤色に着色)を供試した。各サンプルを 500 mg 採取し、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・min⁻¹、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。アントシアニンの標準物質をフナコシ(株)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 nm 吸光度に基づいて定量した。

TLC による分析は、10% 酢酸水で抽出したアントシアニンおよび標品のシアニジン 3-ラシロサイドとともに、Cellulose TLC で 10% 酢酸水あるいは BAW 溶液(ブタノール：酢酸：水=4：1：2)を用いて展開した。

LC-MS の分析は、ACQUITY UPLC with ACQUITY TQD tandem mass spectrometer (ウォーターズ(株))を用いて測定した。測定条件は、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (1.7 μm, 2.1 i.d. × 100 mm, ウォーターズ(株))を用い、流速 0.1 mL・min⁻¹、35℃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℃；脱溶媒温度，350℃；脱溶媒気体流速，500 L・h⁻¹；コーンガス流速，50 L・h⁻¹；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。

なお，‘トキメキ’は赤色覆輪のがく片周縁部の着色組織は小さいため，周縁部を含むがく片全体と周縁部を除いたがく片中央部を分析し，周縁部とそれ以外の部分のアントシアニンを比較した。

試験 2 赤色覆輪の遺伝特性の検討

2015 年 5 月に赤色覆輪を持つ‘トキメキ’を花粉親，赤色覆輪を持たない‘きらきら星’を種子親として交雑を行い，後代を育成した。2017 年 5 月に開花した実生 142 個体のがく片の花色形質を調査した。また，2016 年 5 月に‘トキメキ’の自殖交配を行い，2018 年 5 月に開花した実生 20 個体の花色発現の分離比を調査した。

Ⅲ 結果

1. 色素特性

(1) がく片の色素

‘キヨスミサワ’には主に 2 種類の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光スペクトルの一致および質量分析の結果から，最も主要なアントシアニンはシアニジン 3-サブピオサイドと同定した（第 1 表，第 3 図，第 4 図）。もう一つのアントシアニンは，シアニジン 3-グルコサイドと同定した（第 1 表，第 3 図，第 4 図）。発色団としてシアニジンを持ち，結合糖として 1 分子のグルコースを持つシアニジン 3-グルコサイドとそこにさらにキシロースが結合したシアニジン 3-サブピオサイドであった。一方，がく片全体の主色がピンク色で周縁部が濃赤色の覆輪を持つ‘トキメキ’は，がく片全体の抽出液からは上記のシアニジン 2 種類に加え，デルフィニジン 3-グルコサイド，デルフィニジン 3-サブピオサイドの 4 種のアントシアニンが検出された（第 1 表，第 3 図，第 4 図）。一方，周縁部を除いたがく片の内部の抽出液からはデルフィニジン 3-グルコサイド，デルフィニジン 3-サブピオサイドが検出された（第 1 表，第 3 図，第 4 図）。

(2) 葉身の色素

‘キヨスミサワ’および‘トキメキ’の赤色に着色した葉には，2 種類のアントシアニンが含まれていた（第 1 表，



第 1 図 開花時の‘キヨスミサワ’（上）と‘トキメキ’（下）

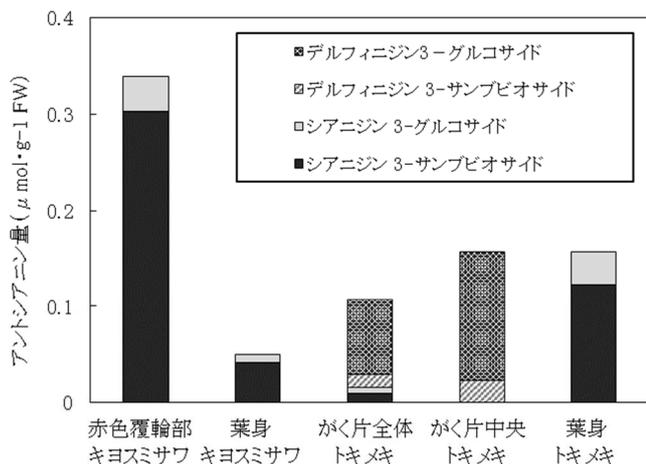


第 2 図 トキメキの葉身の赤色着色

第 2 図，第 3 図，第 4 図）。標品との HPLC における保持時間と吸光スペクトルの一致および質量分析の結果，がく片と同じシアニジン 3-サブピオサイドおよびシアニジン 3-グルコサイドと同定した（第 1 表）。

2. 遺伝特性

‘トキメキ’（赤色覆輪）と‘きらきら星’（非赤色覆輪）の交雑で得られた実生 142 個体の赤色覆輪の発現状況を調査した結果，赤色覆輪は 104 個体，非赤色覆輪は 38 個



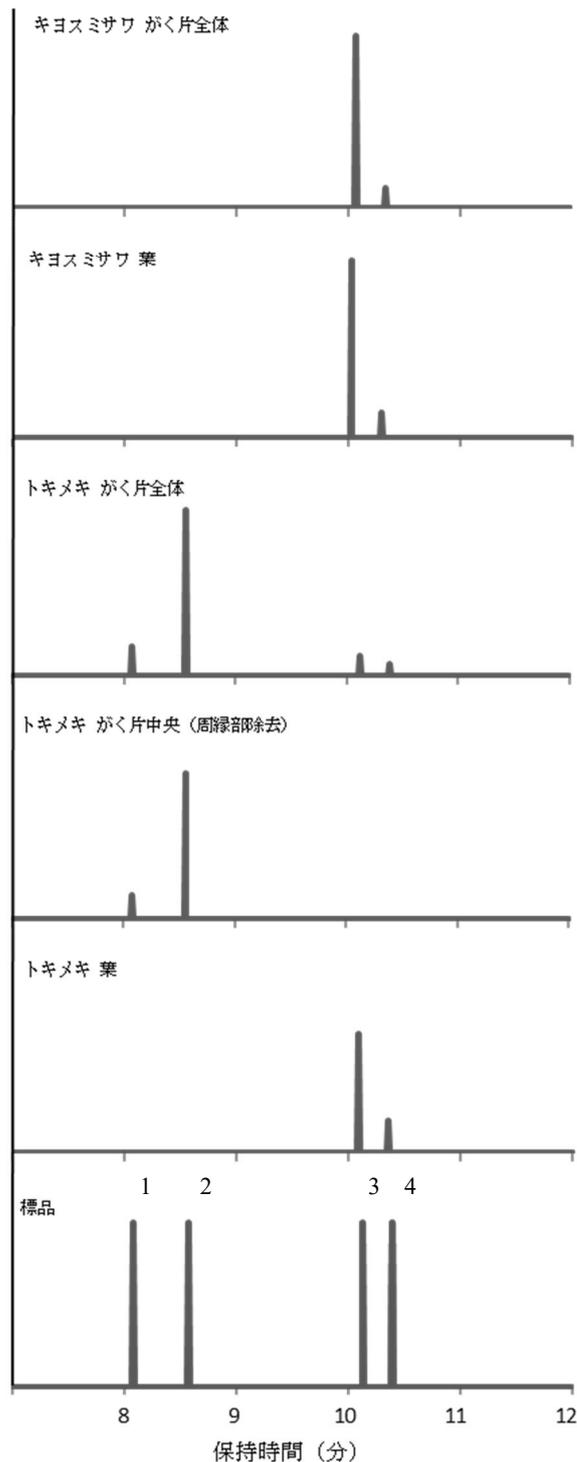
第3図 部位ごとのアントシアニン含量

体であった。赤色覆輪の発現率は73.2%となり、赤色覆輪：非赤色覆輪は、ほぼ3：1に分離した（第2表）。一方、‘トキメキ’を自殖交配して得られた実生20個体のうち、赤色覆輪は15個体、非赤色覆輪は5個体であった。赤色覆輪：非赤色覆輪は、3：1に分離した。また、葉身の赤色着色は、赤色覆輪個体のすべてに発現が見られ、非赤色覆輪個体には見られなかった（第3表）。

IV 考察

がく片の周縁部のみに赤色覆輪を発現する‘キヨスマサワ’の色素構成は、シアニジン3-サンプビオサイドおよびシアニジン3-グルコサイドであった。一方、がく片の主色が赤紫色で周縁部に赤色覆輪を発現する‘トキメキ’は、シアニジン系とデルフィニジン系のアントシアニンによって構成され、周縁部の赤色覆輪部を除いた部分ではデルフィニジン系色素のみ検出された。このことから、赤色覆輪部には、主にシアニジン3-グルコサイドとシアニジン3-サンプビオサイドが存在することが示唆された。がく片内部のアントシアニン組成は、発色団は*H. macrophylla*と同じデルフィニジン型である一方で、結合糖は縁の部分のアントシアニンの物と同じであり、‘キヨスマサワ’の形質の影響を受けていることがわかった。

シアニジンは、デルフィニジンに比べ鮮やかな赤色を示す特徴があることから、赤色覆輪部分は、主色部分とは異なる発色特性を持つことが示唆された。がく片の主色部分が赤紫に発色したのは、*H. macrophylla*のがく片に含まれるデルフィニジン3-グルコサイドとアルミニウムイオンのキレートによるものと考えられる（Kondoら、2005；Takedaら、1985a, 1985b, 1990；Yoshidaら、2003）。



第4図 HPLCによるアントシアニンの検出

- 1 デルフィニジン3-サンプビオサイド
- 2 デルフィニジン3-グルコサイド
- 3 シアニジン3-サンプビオサイド
- 4 シアニジン3-グルコサイド

第1表 トキメキの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

品種部位 標品	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) ^z	
トキメキ かく片全体	8.06	518	0.29	0.37	581
	8.56	515	0.07	0.33	449
	10.12	525	0.19	0.24	597
	10.39	523	0.06	0.22	465
デルフィニジン 3-サンブピオサイド	8.08	525	0.20	0.25	597
デルフィニジン 3-グルコサイド	8.59	523	0.06	0.23	465
シアニジン 3-サンブピオサイド	10.14	516	0.30	0.39	581
シアニジン 3-グルコサイド	10.40	515	0.09	0.34	449

^z 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2表 トキメキ×きらきら星の雑種第1代における赤色覆輪の発現

交配組合せ ♀ × ♂	発現個体数		期待値		χ^2 検定
	赤色覆輪	非赤色覆輪	赤色覆輪	非赤色覆輪	
きらきら星×トキメキ	104	38	106 75%	36 25%	0.15 ($P=0.63$)

第3表 トキメキの自殖後代における赤色覆輪および葉身の赤色着色の発現

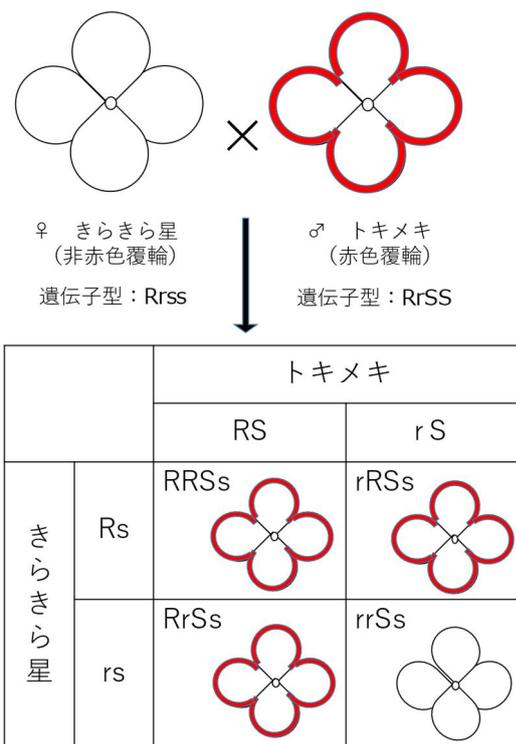
交配組合せ	発現個体数		期待値		χ^2 検定
	赤色覆輪	非赤色覆輪	赤色覆輪	非赤色覆輪	
トキメキ self	15 (15)	5 (0)	15 75%	5 25%	0.07 ($P=0.66$)

赤色覆輪部に含まれるシアニジンについては、Yoshidaら (2008) がカメレオンアジサイにおいて青から緑、さらに緑から赤と変化する最終過程の老化に伴い発現すること、また、Kodamaら (2016) は秋色アジサイの主要な成分であることを報告しているが、赤色覆輪の発現は開花初期にみられることから、これらの発現とは異なる現象であると考えられる。

また、‘キヨスミサワ’ および ‘トキメキ’ の葉身に赤色の着色が見られる現象では、葉身の色素から赤色覆輪のかく片と同じシアニジン 3-グルコサイドおよびシアニジン 3-サンブピオサイドが検出された。かく片の赤色覆輪と葉身の赤色着色は、共に同じシアニジン系アントシアニンによる発現であることが明らかとなった。

赤色覆輪の遺伝特性について、赤色覆輪を持つ ‘トキメキ’ を花粉親として、赤色覆輪を持たない ‘きらきら星’ との交雑で得られた実生個体の分離比は、赤色覆輪と非赤

色覆輪が、ほぼ 3 : 1 となったことから、赤色覆輪は優性形質と推察された。この組合せ交配による赤色覆輪形質の遺伝について、赤色覆輪に関する遺伝子を R として、1 遺伝子による制御を仮定すると、赤色覆輪と非赤色覆輪が 3:1 の分離比を得るためには、‘トキメキ’ および ‘きらきら星’ は、同じ優性劣性ヘテロである必要がある。つまり赤色覆輪の形成には複数の遺伝子の関与が推定された。そこで赤色覆輪は、優性遺伝子 R とともに、もう一つの優性遺伝子 S との共存によって形成されると仮定する。‘きらきら星’ の遺伝子型を Rrss、‘トキメキ’ の遺伝子型を RrSS とすると、‘きらきら星’ の表現型は非赤色覆輪、‘トキメキ’ の表現型は赤色覆輪となり、雑種第1代では赤色覆輪と非赤色覆輪が 3 : 1 に分離することになり、結果と一致する (第2表, 第5図)。‘きらきら星’ の遺伝子型が Rrss と考えられたことから、R 遺伝子に関してアジサイは優性と劣性の対立遺伝子を持ち、RR, Rr, rr の3種類の遺伝子



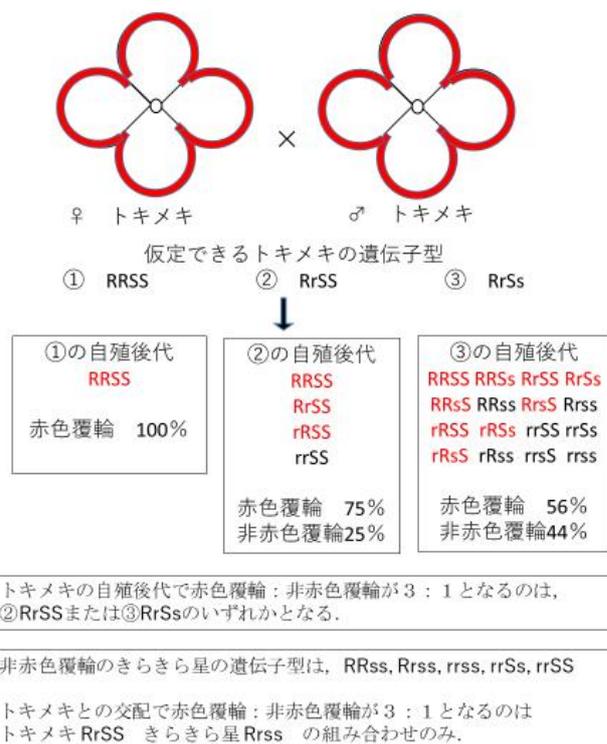
2つの優性遺伝子 R と S の共存で赤色覆輪が発現

第5図 トキメキときらきら星の交配による雑種第一代の赤色覆輪の発現率から推定される遺伝子型

型が存在すると考えられる。つまり、非赤色覆輪のアジサイへの赤縁覆輪形質の導入の本質は S 遺伝子の導入であると理解される。

次に、‘トキメキ’の遺伝子型が RrSS であるという想定を検証を試みた。‘トキメキ’を自殖した後代の分離比は、赤色覆輪が 15 個体、非赤色覆輪が 5 個体で 3 : 1 に分離した (第3表) 。‘トキメキ’の自殖後代で赤色覆輪 : 非赤色覆輪が 3 : 1 に分離する遺伝子型は RrSS または RrSs である (第6図) 。非赤色覆輪の‘きらきら星’の遺伝子型は、RRss, Rrss, rrss, rrSs, rrSS のいずれかである。このとき、‘トキメキ’との交配後代において赤色覆輪 : 非赤色覆輪が 3 : 1 となるのは、‘トキメキ’が RrSS, ‘きらきら星’が Rrss の組み合わせのみとなる。したがって、‘トキメキ’の遺伝子型が RrSS であるという想定は受け入れられることが示唆された。

一方、‘トキメキ’の自殖後代において、赤色覆輪個体のすべてに葉身の赤色着色が見られたことから、赤色覆輪の形成と葉身の赤色着色が遺伝的に連鎖していると考えられる。この特徴は、赤色覆輪を育種目標とした選抜において、幼植物体の葉身の赤色着色を指標とした選抜の可能性を示唆するものである。もう一つの育種目標である八重咲



第6図 トキメキの自殖後代の赤色覆輪の発現率から推定される遺伝子型

き形質については、これまでにDNAマーカーを開発し、幼植物体でのマーカー選抜を実用化している (阿久津ら, 2018 ; Nashima ら, 2020 ; Waki ら, 2019) 。赤色覆輪形質についても幼植物体での選抜を行うことにより、八重咲かつ赤色覆輪の個体が効率的に選抜でき、早期の品種開発が期待できる。

赤色覆輪は、ヤマアジサイ ‘キヨスミサワ’ に特有の形質とされるが、これまでに様々なアジサイとの複雑な交配が繰り返され、それぞれの色素特性を持つ品種が育成されてきたと考えられる。本研究で推定した赤色覆輪形質の遺伝特性については、今後さらに材料を増やして検証を行う予定である。また、近年飛躍的に進みつつあるゲノム情報の解析により、本形質の由来や遺伝子の特定について解明されることを期待したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、農研機構野菜花き研究部門の中山真義博士には多くのご助言をいただいた。栃木県農業試験場の高崎恭子技査には分析に協力をいただいた。花き研究室の歴代職員には栽培管理、調査に多大なご協力をいただいた。ここに心から感謝の意を表する。

引用文献

- 阿久津翠・和氣貴光・生井潔・小玉雅晴. (2017). あじさいの八重咲き性と手まり咲き性を識別するDNAマーカーの開発. 栃木農試研究成果集 35 : 49–50
- 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.
- 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
- 小玉雅晴・坂本あすか・渡辺強. (2015). 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.
- 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.
- Nashima K, Shirasawa K, Ghelfi A, Hirakawa H, Isobe, S, Suyama T, Wada T, Kurokura T, Uemachi T, Azuma M, Akutsu M, Kodama M, Nakazawa Y, Namai K. (2020) Genome sequence of *Hydrangea macrophylla* and its application for analysis of double flower phenotype. *BioRxiv* 10.1101/2020.06.14.151431
- 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.
- 寺内信秀・菊地あすか・杉山直美. (2021) あじさい新品種「エンジェルリング」、「プリンセスリング」の育成. 栃木県農業試験場研究成果集 39号:17-18.
- 寺内信秀・杉山直美・木田理紗子・小玉雅晴・田邊雄太・船山卓也. (2022) あじさい新品種「パラソルロマン」の育成. 栃木農試研報 86: : 35–40.
- Waki T., M. Kodama, M. Akutsu, K. Namai, M. Iigo, T. Kurokura, T. Yamamoto, K. Nashima, M. Nakayama and M. Yagi. 2018. Development of DNA Markers Linked to Double-Flower and Hortensia Traits in *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 87 (2): 264.
- 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.

