

ダイアンサス属植物における花弁色素構成及び 色素生合成関連遺伝子の解析

柳下良美・大矢武志¹⁾・北 宜裕

Pigment Composition and Characterization of Anthocyanin Synthesis Gene in *Dianthus*

Yoshimi YAGISHITA, Takeshi OHYA¹⁾ and Nobuhiro KITA

摘 要

ダイアンサス属植物137種・品種・系統の花弁色素成分の比較・分析と色素生合成関連遺伝子の単離及び構造解析を行った。野生種には、紫、紫赤、赤及び橙赤の色相に属する花弁色素を持つ種・系統は認められず、いずれもリンゴ酸でアシル化されたCy3MaG及びCyclic MaCy3G5Gを主要色素として有していた。数種・品種・系統のダイアンサス属植物からRT-PCR及びPCRによりカルコン合成酵素(CHS)、ジヒドロフラボノール4-還元酵素(DFR)、フラバノン3-水酸化酵素(F3H)及びアントシアニン合成酵素(ANS)のcDNA及び構造遺伝子を単離し、構造解析を行ったところ、いずれも、種・品種・系統間におけるコード領域配列は高度に保存されていた。一方、それらの構造遺伝子について調べてみたところ、CHSとDFRでは、エクソン配列は高度に保存されているのに対し、イントロン配列は種間で変異が認められた。また、DFRのcDNA及び構造遺伝子には、既報のカーネーションのdfr-cDNAには存在しない25bpの挿入配列が認められたことから、花弁組織内で複数のDFRが発現していることが示唆された。

以上の結果から、ダイアンサス属植物においては、花色発現に関する基本的な生合成系は共通していることが示された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、南九州大学園芸学部山口雅篤教授には終始ご指導いただくとともに、本報告を作成するにあたってはご校閲の労をとっていただいた。ここに記して感謝の意を表する。

キーワード：ダイアンサス属、花弁色素成分、色素生合成関連遺伝子

Summary

Petal pigment composition of *Dianthus* plants has been analyzed using 137 species and strains and comparatively evaluated in relation to the genes involved in their biosynthesis. All the wild species contain cyanidin 3-malyl glucoside and cyclic malyl cyanidin as their major pigments and no species showed purple, purplish red, red or orange red petals. Structural analysis of cDNAs and their corresponding structural genes for chalcone synthase (CHS), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), flavanone 3-hydroxylase (F3H) and anthocyanidin synthase (ANS), all of which have been cloned by RT-PCR and PCR, respectively, revealed that the coding region within each of the structural genes were highly conserved among the species whereas interspecific variation was detected in the intron. Interestingly, dfr-cDNA and the corresponding structural gene contained 25 bp insert at the 3' end region, which is not present in carnation dfr-cDNA, suggesting that multiple types of DFRs might be expressed in the petal tissue. These results indicate that *Dianthus* plants share fundamentally the same biosynthetic pathway for pigmentation each other.

Keywords: *Dianthus*, major pigment, biosynthesis

緒 言

ダイアンサス(*Dianthus*)属植物は、約300種あまりがアジア、アメリカ、地中海沿岸地域、アフリカ北部などに広く分布しており、日本にはエゾカワラナデシコ(*Dianthus superbus*)、ハマナデシコ(*Dianthus japonicus*)、シナノナデシコ(*Dianthus shinanensis*)、ヒメハマナデシコ(*Dianthus kiusianus*)の4種及びカワラナデシコ(*Dianthus superbus* var. *longicalycinus*)、タカネナデシコ(*Dianthus superbus* var. *speciosus*)の2変種が自生している。草姿や開花特性等が多様性に富んでおり、また、カーネーション(*Dianthus caryophyllus*)をはじめとして美女ナデシコ(*Dianthus barbatus*)、セキチク(*Dianthus chinensis*)等の園芸種も多く作出されているなど園芸的にも重要な属となっている。これらのうち、世界的にも最も重要な観賞作物のひとつであるカーネーションは、*D. caryophyllus*を原種として*D. chinensis*など複数の種がその育成に関与していると考えられている(塚本ら 1968, 伊藤ら 1989)。種間雑種の作出が容易なことから、現在でも*D. barbatus*と*D. chinensis*との交雑による四季咲き性の強い花壇苗用の一代雑種品種が数多く育成されている。

カーネーションを含む数種のダイアンサス属植物の花弁色素の原因物質はアントシアニンであり、これらは、主にシアニジン(Cy)あるいはペラルゴニジン(Pg)のアントシアニンにグルコースが結合し、さらにリンゴ酸でアシル化されたマリル化アントシアニンである。園芸的に最も利用の進んでいるカーネーションには、シアニジン3-マリルグルコシド(Cy3MaG)とペラルゴニジン3-マリルグルコシド(Pg3MaG)及び環状に架橋されたサイクリックマリルシアニン(Cyclic MaCy3G5G)とサイクリックマリルペラルゴニン(Cyclic MaPg3G5G)の4種類の色素が存在する(山口 1989, Nakayamaら 2000)。また、美女ナデシコ及びセキチクは主要色素としてPg3MaGを含み、さらにCyをアグリコンとする同様な色素をもつ他の園芸種もいくつか知られている(山口 1986)。これらのマリル化アントシアニンは、ダイアンサス属にのみ存在する特異的な色素であり、植物分類上のマーカーとしても興味を持たれている(山口 1991)。近年、アントシアニンの生合成に関わる酵素をコードする構造遺伝子やそれらの発現制御遺伝子が多くの植物種において単離されており、その構造解析や発現解析が活発に行われている。カーネーションにおいても白花及びピンク花での花色発現とフラボノイド生合成酵素遺伝子群の発現との解析が進められている(Holton and Cornish 1995,

Tanakaら 1998, Matoら 2000, 2001)

ダイアンサス属野生種には、多様な草姿と開花特性及び花色変異が存在することから、育種素材としての利用価値は高い。そこで筆者らは、ダイアンサス属植物の花弁色素発現に着目し、色素成分の比較・同定と色素生成系関連遺伝子の単離及び構造解析を行うとともに、ダイアンサス属内でのアントシアニン生合成パターンに基づいた種間の類縁関係について検討した。

材料及び方法

1. 研究材料

本研究では、平成8から10年度の3か年間にわたる農林水産省ジーンバンク事業中の「植物遺伝資源の地域振興作物特性調査事業」において特性調査を行った137種・品種・系統のカーネーション及びセキチク等の園芸種を含むダイアンサス属植物を用いた(第1表)。特性調査、mRNA及び全DNAの抽出には、ビニルハウスで育成した複数の挿し芽による栄養繁殖個体を用いた。

2. 花弁色及び花色模様の測定

植物遺伝資源特性調査マニュアル(農林水産省生物資源研究所 1992)に基づき137種・品種・系統の花弁の色及び花色模様を調査した。花弁色は日本園芸植物標準色票の色票番号で測定し、色票番号が属する色相を調査した。花色模様は色彩模様の観察により調査した。

3. アグリコンの分析

107種・品種・系統について、それらの開花時の花弁を酢酸：メタノール溶液(1:1 V/V)に浸し、4°Cで12時間静置することにより、アントシアニン系色素を抽出した。このアントシアニン系色素の粗抽出液に、等量の濃塩酸を加えて3分間煮沸することにより色素を加水分解した。冷却後、水を等量加え、さらに等量のイソアミルアルコールを加えて強く振とうしてかくはんし、アグリコンをアルコール層へ転溶することにより、色素試料を調製した。この色素試料をBAW溶媒(n-ブタノール：酢酸：水=4:1:5 V/V)を展開溶媒として、セルロースの(アゼセルSF, フラコン製)薄層クロマトグラフィー(TLC)によりアグリコンを分析した(武田・林 1980)。標準色素には、シアニジン及びペラルゴニジン(Extrasynthese S.A.製)を用いた。

4. アントシアニン系色素成分の分析

ダイアンサス属11種・品種・系統のアントシアニン系色素粗抽出液について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、標準色素とのクロマトグラフィーにより色素成分を同定した。標準色素としては、バラの

第1表 本研究で使用したダイアンサス属植物とその花弁色及び花色模様

種名・品種名	花弁色 _z	花色模様 _v	種名・品種名	花弁色 _z	花色模様 _v	種名・品種名	花弁色 _z	花色模様 _v
<i>D.acicularis</i>	8903	中心淡	<i>D.giganteus</i>	8902	中心濃	<i>D.plumarius</i>	9202	—
<i>D.allwoodii</i>	8903	中心濃	<i>D.giganteus</i>	8902	中心濃	<i>D.polymorphus</i>	8901	単色
<i>D.allwoodii</i>	8904	蛇の目	<i>D.giganteus</i>	8902	中心濃	<i>D.polymorphus</i>	8902	単色
<i>D.allwoodii</i>	9710	その他	<i>D.glacialis</i>	8902	単色	<i>D.pontedeae</i>	8902	蛇の目
<i>D.allwoodii</i>	9710	その他	<i>D.graniticus</i>	2701	単色	<i>D.pontedeae</i>	9202	蛇の目
<i>D.allwoodii alpinus</i>	9205	蛇の目	<i>D.graniticus</i>	8901	単色	<i>D.prolifer</i>	8901	単色
<i>D.alpinus</i>	8904	単色	<i>D.graniticus</i>	8903	蛇の目	<i>D.pungens</i>	9201	—
<i>D.anarensis</i>	8902	単色	<i>D.graniticus</i>	8906	—	<i>D.pungens</i>	9501	単色
<i>D.anatilius</i>	8902	単色	<i>D.graniticus</i>	9201	単色	<i>D.pyrenaicus</i>	8901	蛇の目
<i>D.anatolicus</i>	8901	中心濃	<i>D.gratianopolitanus</i>	8901	単色	<i>D.reggisstephanii</i>	8901	蛇の目
<i>D.anatolicus</i>	8904	単色	<i>D.gratianopolitanus</i>	8902	単色	<i>D.regis</i>	8902	中心淡
<i>D.anatolicus</i>	8904	単色	<i>D.gratianopolitanus</i>	8903	蛇の目	<i>D.regisstephanii</i>	8901	蛇の目
<i>D.anderwoodii</i>	8902	中心濃	<i>D.gratianopolitanus</i>	8903	単色	<i>D.regisstephanii</i>	8901	蛇の目
<i>D.andronakii</i>	9202	単色	<i>D.gratianopolitanus</i>	8904	単色	<i>D.scaber</i>	8902	蛇の目
<i>D.arenarius</i>	2701	蛇の目	<i>D.gratianopolitanus</i>	8904	—	<i>D.sequieri</i>	8901	蛇の目
<i>D.arenarius</i>	2701	単色	<i>D.gratianopolitanus</i>	8910	単色	<i>D.sequioeri</i>	8904	中心淡
<i>D.armeria</i>	9507	単色	<i>D.gratianopolitanus</i>	9205	単色	<i>D.sequioeri</i>	9205	中心濃
<i>D.barbatus</i>	8903	単色	<i>D.gratianopolitanus</i> I	8904	蛇の目	<i>D.serotinus</i>	8901	単色
<i>D.barbatus</i>	9506	単色	<i>D.gratianopolitanus</i> II	8905	蛇の目	<i>D.serotinus</i>	8902	単色
<i>D.biflorus</i>	8905	中心淡	<i>D.gratianopolitanus</i> III	9206	蛇の目	<i>D.spiculifolius</i>	2701	単色
<i>D.boisieri</i>	9205	単色	<i>D.haematocalyx</i>	9202	中心淡	<i>D.squarrosus</i>	8903	中心濃
<i>D.brevicaulis</i>	8903	中心濃	<i>D.henteri</i>	8903	蛇の目	<i>D.subcaulis</i>	9205	中心淡
<i>D.capitatus</i>	8906	単色	<i>D.hungricus</i>	8903	蛇の目	<i>D.superbus</i>	2901	—
<i>D.carthusianorum</i>	8904	中心濃	<i>D.japonicus</i>	-	単色	<i>D.superbus</i>	8902	中心濃
<i>D.caryophyllus</i>	8901	単色	<i>D.ktaibelii</i>	2701	単色	<i>D.tainshanicus</i>	8901	蛇の目
<i>D.caryophyllus</i>	8902	単色	<i>D.meyrichii</i>	8902	—	<i>D.tristis</i>	8903	中心濃
<i>D.caryophyllus</i>	8902	単色	<i>D.monspessulanus</i>	8904	単色	<i>D.turcestanicus</i>	8902	中心濃
<i>D.chinensis</i>	8901	中心濃	<i>D.myrtinervius</i>	8904	蛇の目	<i>D.turcestanicus</i>	8903	蛇の目
<i>D.collinus</i>	8904	中心濃	<i>D.npicola</i>	8904	—	<i>D.tymphaestens</i>	8903	中心濃
<i>D.collinus</i>	9207	中心淡	<i>D.orientalis</i>	8902	中心濃	<i>D.tymphaestens</i>	8904	単色
<i>D.correvonianus</i>	8903	中心濃	<i>D.pallens</i>	8903	単色	<i>D.tymphaestens</i>	8904	中心濃
<i>D.crinitus</i>	8904	単色	<i>D.pavonius</i>	8903	中心濃	<i>D.tymphaestens</i>	9501	単色
<i>D.cruentus</i>	9507	単色	<i>D.petraeus</i>	8902	単色	<i>D.uralensis</i>	8902	中心濃
<i>D.deltoides</i>	8906	蛇の目	<i>D.pinifolius</i>	8901	単色	<i>D.uralensis</i>	8903	単色
<i>D.deltoides</i> I	9205	蛇の目	<i>D.pinifolius</i>	8902	単色	<i>D.velebiticus</i>	8902	中心濃
<i>D.deltoides</i> II	9206	蛇の目	<i>D.pinifolius</i>	8904	蛇の目	<i>D.viscidus</i>	8903	蛇の目
<i>D.ferrugineus</i>	8902	中心濃	<i>D.plumarius</i>	8901	混合	Duches fealy	8904	蛇の目
<i>D.fragrans</i>	8902	単色	<i>D.plumarius</i>	8901	蛇の目	×'La Bourbrille'	8906	単色
<i>D.fragrans</i>	8904	中心濃	<i>D.plumarius</i>	8901	単色	×roysi	8901	単色
<i>D.galicus</i>	8906	単色	<i>D.plumarius</i>	8901	単色	Little tony	9708	蛇の目
<i>D.gallicus</i>	8901	中心濃	<i>D.plumarius</i>	8902	単色	コーラル	0707	単色
<i>D.gallicus</i>	8901	中心濃	<i>D.plumarius</i>	8902	中心淡	ダイアナレッド	0707	単色
<i>D.gallicus</i>	8902	単色	<i>D.plumarius</i>	8903	—	フランセスコ	0707	単色
<i>D.gallicus</i>	8903	中心濃	<i>D.plumarius</i>	8904	—	ミニルビー	0406	単色
<i>D.giganteus</i>	8603	中心淡	<i>D.plumarius</i>	9202	蛇の目	ローズクイーン	0104	単色
<i>D.giganteus</i>	8901	蛇の目	<i>D.plumarius</i>	9202	単色			

_z日本園芸植物標準色票のカラーコード、_v植物遺伝資源特性調査マニュアルに基づき花色模様を観察により混合、単色、覆輪、蛇の目、中心(目)濃色、中心(目)淡色、縞、砂子(点状)、ぼかし及びその他に分類した。

花弁から抽出したシアニジン 3, 5-ジグリコシド(Cy3G5G)、クロマメの種子から抽出したシアニジン 3-グルコシド(Cy3G)、ダリアの花弁から抽出したペラルゴニジン 3, 5-ジグルコシド(Pg3G5G)、イチゴ偽果から抽出したペラルゴニジン 3-グルコシド(Pg3G)及びカーネーション品種 'テッシノ'、'ロイアルテッシノ'、'シンフォニーローズ' 及び 'サティスファクション' からそれぞれ抽出した Cyclic MaCy3G5G、Cy3MaG、Cyclic

MaPg3G5G及びPg3MaGの8種類を用いた。また、27種・品種・系統のアントシアニン系色素粗抽出液については、HPLCによりアントシアニンを分析し、溶出パターンを比較した。HPLC分析はWakosil-II 5C18RS(φ 4.6×250mm)DDS系のカラムを用い、35℃で溶出させ、520 nmの波長で検出した。HPLCの条件は、A液を0.1%トリフルオロ酢酸、B液を1.5%トリフルオロ酢酸、20%酢酸、25%アセトニトリルとし、流速を0.8mL・min⁻¹と

第2表 本研究で作成したプライマーの塩基配列

名称	塩基配列	塩基数	対象配列	参照配列 ¹
car-chsFL	5'-TG TAGTAGAAAAAATGGCATCA-3'	22	カルコン合成酵素	Z67982
car-chs1180R	5'-CCAAAACCACATCTTCAACAA-3'	21		
car-dfr12F	5'-TTTGATACACACTTACAAAATACAATACAT-3'	30	ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ	Z67983
car-dfr1152R	5'-AAATCACTTATCGAAAACGTGCATCGTTAC-3'	30		
car-ans61F	5'-CATTCCTAAGGAGTATGTGA-3'	20	アントシアニン合成酵素	U82432
car-ans1093R	5'-ACAAACACACAATCGTAAAC-3'	20		
car-f3h87F	5'-ATCAACTACGACTGCATATT-3'	20	フラバノン3-ヒドロキシラーゼ	X72592
car-f3h1240R	5'-TATAATGAAACCAACCAAG-3'	20		
oligo dT M13M4Y	5'(T)2 0-GTTTCCAGTCACGAC-3'	37	ポリA付加配列	

プライマーはアマシャムファルマシアバイオテック社にカスタムプライマーとして合成委託した。²カスタムプライマーを作成するときに相同性解析等で参照した塩基配列のGenBank登録番号、³タカラ酒造社製

し、40分間にB液を20%~80%の直線的濃度勾配とした。

5. mRNA及び全DNAの抽出

植物体からのmRNAの抽出は、いずれもQuick Prep Micro mRNA Purification Kit(アマシャムファルマシアバイオテック; グアニジウムチオシアネート法)を用い、発色初期のつぼみの花卉100mgからKitのプロトコールに従って抽出した。全DNAについては、PhytoPure DNA Extraciton kit(アマシャムファルマシアバイオテック)を用い、若い葉の組織1gからキットのプロトコールに従って抽出した。

6. RT-PCR及びPCR

アントシアニン色素生成系のキーエンザイムであるカルコン合成酵素(chalcone synthase: CHS)、ジヒドロフラボノール4-還元酵素(dihydroflavonol 4-reductase: DFR)、フラバノン3-水酸化酵素(flavanone 3-hydroxylase: F3H)及びアントシアニン合成酵素(anthocyanidin synthase: ANS)の4種類のcDNAをRT-PCR法を用いて単離した。プライマーは、Genbankに登録されているカーネーションのchs-cDNA(Genbank accession番号Z67982(以下同様)), dfr-cDNA(Z67983), f3h-cDNA(X72592)及びans-cDNA(U82432)配列を参照し、Oligo™を用いて特異的領域を絞り込み、かつできるだけ大きいクローンが得られる部位に20~30塩基のフォワードプライマー及びリバースプライマーをそれぞれ設計した(第2表)。

RT-PCRはRNA PCR kit(AMV)ver.2.1(タカラ酒造製)を用い、kitのプロトコールに従って行った。全DNAを鋳型としたPCRステップでの反応液は、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、2.0mM MgCl₂、0.2mM dNTPs Mix、0.025U Takara ExTaq DNA polymerase、0.4 μM プライマー及び鋳型全DNAは10ngとなるように調製し、全量を25 μLとした。全DNAを鋳型にしたCHS構造遺伝子のPCRによる増幅は、熱変性94℃で30秒、

アニーリング56℃で30秒、伸長反応72℃で1分とし、40サイクル反応させた。DFR構造遺伝子については、熱変性94℃で30秒、アニーリング58℃で30秒、伸長反応は72℃30秒とし、35サイクル反応させた。

7. DNA断片の単離と塩基配列の決定及び構造解析

PCR及びRT-PCRで増幅されたDNA断片は、アガロースゲル電気泳動により分離し、用いたプライマーの位置から期待される大きさのDNA断片を切り出し、スピニカラムを用いて精製し、ligation Kit Ver.2(タカラ酒造)を用いて、pT7Blueベクター(ノバジェン)に挿入・連結した。このコンストラクトを大腸菌DH5系統(タカラ酒造)に形質転換し、常法によりプラスミドを精製し(Sambrookら 1989)、制限酵素によりDNA断片の挿入を確認後、ダイオキシサイクルシーケンシング法によりDNAシーケンサーABI373S(ABI社)を用いて塩基配列を決定した。読みとったDNA断片の塩基配列は、GENETYX™を用いて解析した。ダイアンサス属内での系統樹は、CLUSTALW(Thompsonら 1994)を用いてNJ法により作成した。

結果

1. 花卉色の分布

開花直後の137種・品種・系統のダイアンサス属植物の花卉色を日本園芸植物標準色票のカラーコードを用いて測定した。第1表に各植物の花卉色カラーコード及び花色模様を示した。137種・品種・系統の花卉色のカラーコードは23種類に分布し、それらのカラーコードが属する色相は7に分布した。また、99種・系統は赤味紫の色相に、22種・品種・系統は赤紫の色相に属するカラーコードに類別された。これら2つの色相には、それぞれ全体の73%及び16%が属し、結果として全体の89%を構成した。紫、紫赤、赤及び橙赤の色相には園芸品種として育成された9品種が属し、他の野生種・系統の中にはこれ

らの色相に類別される種・系統は認められなかった。

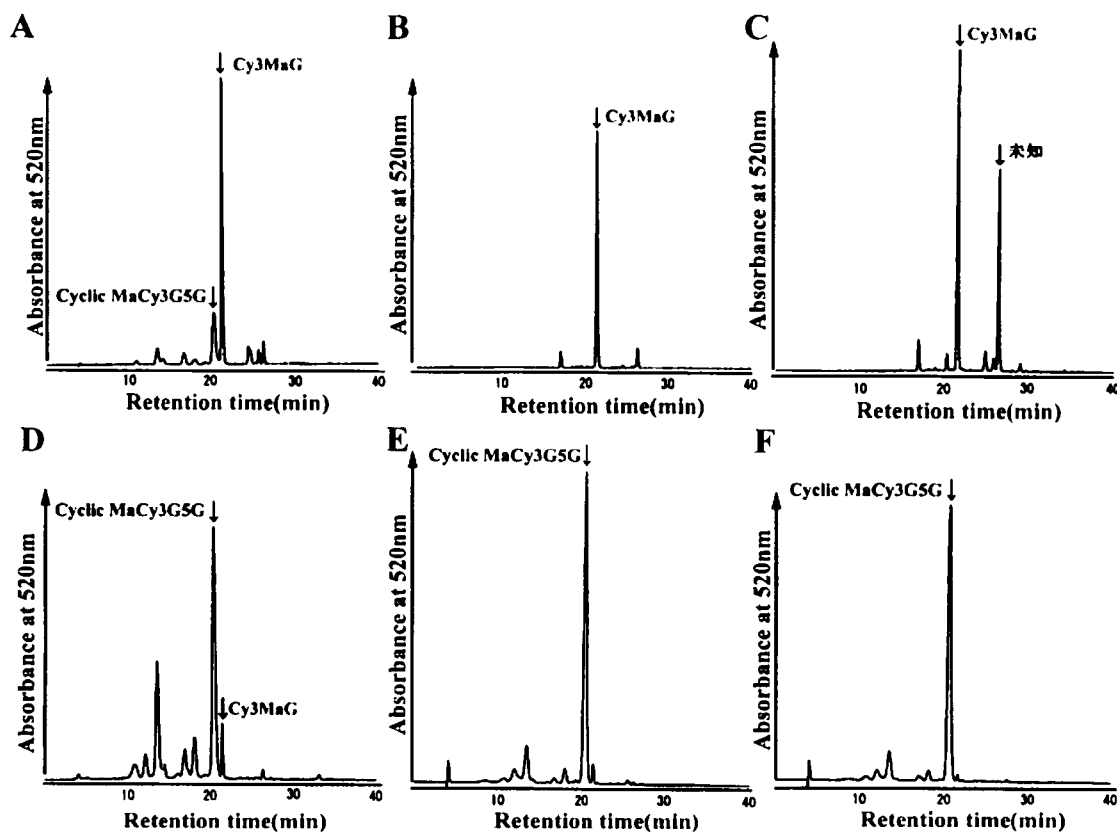
観察により花色模様を調査したところ、全体の44%は単色で、花弁内で色素発現に変化を示す種・系統が残りの56%を占めた。後者のうち、花弁中央部に明確な濃色蛇の目模様を有する種・系統は25%、花弁中央部に向かって色が濃くなる中心目濃色及び花弁中央部に向かって色が薄くなる中心目淡色の種・系統はそれぞれ21%及び7%を占めた。

2. アントシアニン系色素の分析

107種・品種・系統の花弁から抽出したアントシアニン系色素の粗抽出液を加水分解し、得られたアグリコンを標準色素とともにセルロースTLCにより分離した。その結果、赤色カーネーション品種(‘フランセスコ’、‘コーラル’、‘ダイアナレッド’)のアグリコン骨格は標準色素のペラルゴニンと、その他すべての種・品種・系統のアグリコン骨格は標準色素のシアニンと一致し、ペラルゴニンと一致する種・品種・系統は認められなかった。

HPLCを用いた標準色素とのクロマトグラフィー

により、カーネーション及び数種のダイアンサス属種・系統の色素成分を分析した。第1図にそのHPLC溶出クロマトグラムを示した。赤色カーネーション‘フランセスコ’の主要ピークはPg3MaGと一致し、また、*D.chinensis*及び*D.barbatus*の主要ピークはCy3MaGと一致し、さらに*D.deltoides*、*D.gratianopolitanus*及び*D.japonicus*の主要ピークはCyclic MaCy3G5Gと一致した。一方、*D.gratianopolitanus* I系統、*D.cruentus*及び*D.deltoides* II系統には2つの主要ピークが認められた。溶出時間の早いピークはCyclic MaCy3G5Gと一致し、遅いピークはCy3MaGとそれぞれ一致した。同様に、*D.gratianopolitanus* I系統及び*D.cruentus*は、Cyclic MaCy3G5GとCy3MaGの構成比率がそれぞれ10:1及び2:5を示した。また、*D.gratianopolitanus*の3系統のうち1系統はCy3MaG及びCyclic MaCy3G5Gを、また他の2系統はCyclic MaCy3G5Gのみを主要色素としていた。属する種名が明確でない園芸品種の‘Little tony’では、溶出時間の早いピークはCy3MaGと一致したが、いずれの標準色素とも一致しない、さらに溶出



第1図 ダイアンサス属植物の花弁アントシアニンのHPLCのクロマトグラム

Aは*D.cruentus*から抽出。主要ピークはCyclic MaCy3G5G及びCy3MaGと一致。Bはセキチクから抽出。主要ピークはCy3MaGと一致。Cは‘Little tony’ (種名不明)から抽出。Cy3MaGと一致したピーク及びいずれの標準サンプルとも一致しないピークが認められた。D~Fは*D.gratianopolitanus*の異なる3系統から抽出。D(系統I)の主要ピークは、Cyclic MaCy3G5G及びCy3MaGと一致。E(系統II)、F(系統III)の主要ピークはCyclic MaCy3G5Gと一致。

第3表 標準サンプルとのHPLC分析により同定されたダイアンサス属植物の花弁に含まれる主要色素

種名	カラーコード	主要色素 ²
<i>D.caryophyllus</i> 'フランセスコ'	0707	Pg3MaG
<i>D.gratianopolitanus</i> I	8904	Cyclic MaCy3G5G+Cy3MaG
<i>D.gratianopolitanus</i> II	8905	Cyclic MaCy3G5G
<i>D.gratianopolitanus</i> III	9206	Cyclic MaCy3G5G
<i>D.deltoides</i> I	9205	Cyclic MaCy3G5G
<i>D.deltoides</i> II	9206	Cyclic MaCy3G5G+Cy3MaG
<i>D.cruentus</i>	9507	Cy3MaG+Cyclic MaCy3G5G
<i>D.japonicus</i>	- ³	Cyclic MaCy3G5G
'Little tony'	9708	Cy3MaG+未知色素

²Pg3MaG:ペラルゴニジン3-マリルグルコシド, Cyclic MaCy3G5G:サイクリックマリルシアニン, Cy3MaG:シアニジン3-マリルグルコシド, 標準色素との共存HPLCを行い, 主要ピークの溶出時間により同定した. ³未測定

時間の遅い大きなピークが存在した(第1図及び第3表). さらに他の27種・品種・系統のHPLC溶出パターンを比較したところ, これらは溶出時間の早いピークと遅いピークのいずれか一方を有する2つのグループに類別された. これら2つのピークは, コクロマトグラフィーにより, それぞれCyclic MaCy3G5G及びCy3MaGと一致した(データ省略).

3. アントシアン合成系関連酵素の構造遺伝子の単離と構造解析

D.gratianopolitanus, *D.plumarius*, *D.sequieri* 及び *D.monspessulanus*の4種から抽出した全DNAを鋳型に, 開始コドン及び終始コドンを含むように設計したプライマー car-chsFL及び car-chs1180Rを用いたPCRにより CHSの構造遺伝子の単離を試みた. その結果, 得られた増幅DNA断片はいずれも*D.monspessulanus*の花弁から単離されたcDNA配列である*CHS-DMn*(AF267173)とその推定エキソン領域で高い相同性が認められたことからCHS構造遺伝子であると判断された. これらのCHS構造遺伝子は, いずれもペチュニア(Grisbachら 2000)等多くの植物で報告されているのと同様に, 1.6kbpのイントロンで分断された0.2kbpと1kbpの2つのエキソンから構成されていた(第2図). そこで, 得られたCHS構造遺伝子の相同性解析を行ったところ, *D.monspessulanus*と*D.sequieri*については, いずれの領域とも99%以上の高い相同性を示したが, 他の種間については, エキソン領域では相互に97.0~99.8%の高い相同性を示したものの,



第2図 ダイアンサス属植物の全DNAから単離したCHS構造遺伝子の一般構造

エキソン領域は, *D.monspessulanus*. 花弁から単離した chs-cDNA配列(AF267173)と比較して推定した.

□はエキソン領域を, □イントロン領域を示す.

イントロン領域では相同性が68.1~99.2%と大きく変動した.(第4表)

次に, *D.gratianopolitanus*, *D.plumarius*, *D.sequieri*, *D.monspessulanus*及び*D.caryophyllus* 4品種('スケニア', 'ライトピンクバーバラ', 'フランセスコ'及び'ノラ')から抽出した全DNAを鋳型に, 増幅産物に開始コドンと終始コドンが含まれるように設計したプライマー組合せ car-dfrF12及び car-dfr1152Rを用いたPCRによりDFR構造遺伝子の単離を試みた. その結果, いずれの種・品種から抽出した全DNAを鋳型とした場合とも, 1.7kbpの明りょうな増幅DNA断片が得られた(第3図). 得られた増幅DNA断片を*D.gratianopolitanus*の花弁から単離した*DFR-DGr*(AF291097)と比較したところ, いずれもペチュニア(*Petunia hybrida*), トウモロコシ(*Zea mays*), アラビドプシス(*Arabidopsis thaliana*), イネ(*Oryza sativa*)及びアサガオ(*Ipomoea*)で報告されているものと同様に(Beldら 1989, Schwarz-Sommerら 1987, Shirleyら 1992, Nakaiら 1998, Inagakiら 1999), 5つのイントロンと6つのエキソンから構成されていた(第4図). そこで, 単離した4種のDFR構造遺伝子断片のコード領域を既知のdfr-cDNAとの比較により推定し, それぞれコード領域及び推定アミノ酸配列における相同性について解析した(第5表). その結果, コード領域及び推定アミノ酸配列のいずれにおいても相互に96%以上の高い相同性を示し, DFR構造遺伝子のコード領域がダイアンサス属植物種間で高く保存されていることが明らかとなった.

次に, *D.plumarius*及び*D.gratianopolitanus*の花弁から単離したdfr-cDNA断片(*DFR-DPI*及び*DFR-DGr*; 北ら 2002)及び前述のDFR構造遺伝子断片と既報の*D.caryophyllus*('タンガ', Z67893)のdfr-cDNAとの構造を比較した. その結果, 今回単離したdfr-cDNA及びDFR構造遺伝子には, いずれも第6エキソンに相当する領域に25bpの挿入断片が存在していた(第5図). こ

の挿入断片の中に終始コドンが存在しているため推定アミノ酸配列は、*D.caryophyllus* ‘タンガ’で報告されているdfrより、7アミノ酸残基少なくなっていた。

*D.plumarius*及び*D.gratianopolitanus*の花弁から抽出したmRNAを鋳型としてcar-ans61Fとoligo dT M13M4とを組み合わせ、アニーリング温度50°CでRT-PCRを、続いて同RT-PCR産物を鋳型にcar-ans61Fとcar-ans1093Rとを組み合わせ、nested-PCRを行うことにより、*D.plumarius*及び*D.gratianopolitanus*のans-cDNA (*ANS-DPI*, *ANS-DGr*北ら 2002)を単離した。単離したans-cDNAは、いずれも1053bpで、推定アミノ酸配列は349残基であった。また、cDNA配列及び推定アミノ酸配列は、ともに相互に97.7%の高い相同性を示した。

*D.gratianopolitanus*の花弁から抽出したmRNAを鋳型としてcar-f3h87Fとoligo dT M13M4を用いて行ったRT-PCR産物を鋳型とし、続けてcar-f3h87Fとcar-f3h1240Rを用いたnested-PCRを行うことにより、*D.gratianopolitanus*のf3h-cDNA (*F3H-DGr*北ら 2002)を単離した。単離したf3h-cDNAは、カーネーションで報告されているf3h-cDNA (X72592)と99%の相同性を示した。

4. DFR構造遺伝子配列からみたダイアンサス属植物の遺伝的類縁関係

ダイアンサス属植物種の*D.gratianopolitanus*, *D.sequierei*, *D.monspessulanus*, *D.caryophyllus*及び園芸種であるカーネーションの‘ノラ’, ‘ライトピンクバーバラ’, ‘フランセスコ’, ‘ピンクフランセスコ’から単離したDFR構造遺伝子配列を基にクラスター分析を行い、



第3図 異なるダイアンサス属植物の全DNAを鋳型としたPCRによるDFR構造遺伝子断片の増幅像

M: マーカーλ DNA/*Hind* III・*Eco*RI, レーン1: *D.gratianopolitanus*, レーン2: *D.plumarius*, レーン3: *D.sequierei*, レーン4: *D.monspessulanus*, レーン5:カーネーション‘ノラ’, レーン6:カーネーション‘スケニア’, レーン7:カーネーション‘ライトピンクバーバラ’, レーン8:カーネーション‘フランセスコ’, レーン9:カーネーション‘ピンクフランセスコ’. 使用プライマーはcar-dfr12F及びcar-dfr1152R. PCRは熱変性94°C, 30秒, アニーリング58°C, 30秒, 伸長反応72°C, 30秒で35サイクル反応させた。

第4表 4種のダイアンサス属植物の全DNAから単離したCHS構造遺伝子断片²のエキソン及びイントロン配列における相同性(%)

略号	種名	エキソン				イントロン			
		A	B	C	D	A	B	C	D
A	<i>D.gratianopolitanus</i>	-	98.4	97.2	97.0	-	68.1	71.3	71.5
B	<i>D.plumarius</i>	-	-	97.6	97.6	-	-	72.7	73.8
C	<i>D.monspessulanus</i>	-	-	-	99.8	-	-	-	99.2
D	<i>D.sequierei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

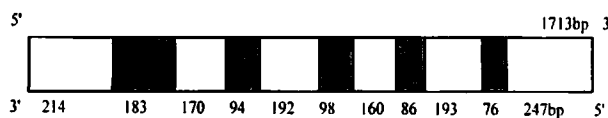
²ダイアンサス属植物の全DNAを鋳型としてcar-chsFL, car-chs1180Rのプライマーセットを用いたPCRにより単離した。PCRは熱変性94°C30秒, アニーリング56°C30秒, 伸長反応72°C1分で40サイクル反応させた。単離したいずれのクローンともCHS-DMn(AF267173)と配列を比較してエキソン及びイントロン領域を推定した。

ダイアンサス属植物の類縁関係を解析した。クラスター分析に基づいて系統樹を作成したところ、カーネーション4品種は同じクラスターに類別されたのに対し、カーネーションの原種と考えられている*D.caryophyllus*はカーネーションとは異なるクラスターに分類された(第6図)。

考 察

ダイアンサス属植物は、草姿や開花特性が多様で、種間交雑も容易であることから、これまでに多くの園芸品種が作出されてきた。本研究では、137種・品種・系統の花弁色の調査を行い、ダイアンサス属植物の花弁色は赤味紫と赤紫の2つの色相に全体の89%が含まれ、また、野生種には紫、紫赤、赤及び橙赤の色相に属する種は認められないことを明らかにした。このことは品種分化にともない花色が赤紫色から赤色にあるいは赤紫色から紫色へと二つの方向に分化していったことを示す。さらに、半数以上の種・系統で、蛇の目や中心目が濃色などを示す花弁色模様の変異が認められた。このことは野生種のもつダイアンサス属特有の目状の模様が広く分布していることを意味する。

カーネーション及び数種のダイアンサス属種の花色の原因物質として、これまでに4種類のマリル化アントシアニンが報告されている(山口 1989, 中山ら 2000)。今回、107種・品種・系統のダイアンサス属植物の花色素のアグリコン骨格を調べたところ、カーネーションの赤色品種以外にはPgをアグリコン骨格とする種・系統は認められず、すべてがCyの骨格を有していた。また、HPLCにより色素を分析したところ、野生種はいずれもCy3MaG及びCyclic MaCy3G5Gを主要色素とし、これらを単独で、または組み合わせて有していることが明らかとなった。しかし、山口(1989)によって報告されてい



第4図 *D.caryophyllus*, 'ノラ' のDFR構造遺伝子の構造

エキソン及びイントロン領域は*D.gratianopolitanus*及び*D.caryophyllus*の花弁から単離したdfr-cDNA配列AF291097及びZ67893とそれぞれ比較して推定した。
□はエキソン領域を, □はイントロン領域を示す。

るPg3MaGを有する種・系統及び中山ら(2000)によって報告されているCyclic MaPg3G5Gを有する種・系統は認められなかった。紫、紫赤、赤及び橙赤の色相に属するものは園芸種以外に認められないこと、また、ダイアンサス属植物には、広くCy3MaG及びCyclic MaCy3G5Gが含まれていることから、カーネーション、セキチク、美女ナデシコ等の園芸的利用の進んでいる種においては、Pgを生成する系統が選抜されてきた結果、多様な花色を有する品種が育成されてきたものと考えられる。一方、*D.gratianopolitanus*には、Cyclic MaCy3G5Gのみを主要色素とする系統とCy3MaGとCyclic MaCy3G5Gの2種類を主要色素とする2つの系統(I及びII)が存在した。この2系統は、花弁色のカラーコードも互いに異なることから、共存する色素の構成割合の差が2系統それぞれの花弁全体の色調の差となって表れているものと考えられる。

Pgは、アントシアニン合成経路の中でジヒドロケンフェロールがフラボノイド3-水酸化酵素(F3H)による修飾を受けずに、そのまま下流へと代謝が進むことにより合成される(第7図)。したがって、上記の園芸種では、F3Hの発現がブロックされることによってPgが合成されるようになったものと推察される。DFRはアン

トシアニン合成系の中で、ロイコ型アントシアニンを生成する酵素で、その遺伝子は多くの植物種で良く保存されていることが知られている。本研究においても、ダイアンサス属内では、このDFRの塩基配列が高度に保存されていることが確認された。したがって、ダイアンサス属のDFRは、B環の3'~5'位の水酸化の程度が異なるフラボノールをすべて基質として利用可能であるものと考えられる。DFRについては、今回単離したDFR-DPI、DFR-DGrのcDNA及びすべてのDFR構造遺伝子断片の構造解析により、これらには既報のカーネーションのdfr-cDNAには存在しない25bpの配列が挿入されていることが明らかとなった。この中には終始コドンが存在しているため、その推定アミノ酸配列は*D.caryophyllus* 'タンガ'で報告されているdfrと比較して7残基少なかった。カーネーションのdfrはマルチジーンファミリーを形成していることから(Matoら 2001)、ダイアンサス属植物の花弁組織内では複数のDFRが発現しているものと考えられる。

ダイアンサス属植物内においては、アントシアニン合成系に関与するいずれの酵素遺伝子とも、属内で高度に保存されていることから、花色発現に関する基本的な合成系は共通しているものと考えられる。さらに、ダイアンサス属植物のアントシアニンは、特異的にリンゴ酸でアシル化された4種のマリル化アントシアニンを主要な花色の原因物質としていることも明らかになったことから、個別の花色発現に関与するアントシアニンの修飾系についてもダイアンサス属植物に共通する基本経路が存在していることが示唆された。

ダイアンサス属の中でもカーネーションは、赤、ピンクをはじめとして、黄色、オレンジ、ライラックなど豊

第5表 ダイアンサス属野生種及びカーネーション品種から単離したDFR-cDNA及びDFR構造遺伝子から推定されるコード領域のDNA塩基配列間、及びそれらの推定アミノ酸配列間における相同性(%)

略号	種・品種 ²	A	B	C	D	E	F
A	<i>D.gratianopolitanus</i> ^Y	—	97.9	98.0	98.0	97.9	95.7
B	<i>D.plumarius</i> ^X	96.2	—	98.2	98.2	98.2	96.0
C	<i>D.caryophyllus</i> (スケニア) ^X	96.2	97.9	—	99.8	99.7	97.5
D	<i>D.caryophyllus</i> (ノラ) ^X	96.2	97.9	99.5	—	99.7	97.4
E	<i>D.caryophyllus</i> (ピンクフランセスコ) ^X	97.9	97.9	99.5	99.5	—	97.4
F	<i>D.caryophyllus</i> (タンガ) ^W	96.6	97.1	98.9	98.9	98.9	—

²()内は品種名を示す。^Y*D.gratianopolitanus*花弁から単離したDFR-cDNA配列(AF291097), ^X全DNAから単離したDFR構造遺伝子から推定したコード領域配列, ^WZ67893. 太字の数字は、DNAレベルでの相同性(%), 細字の数字は、DNA配列から推定されるアミノ酸配列での相同性(%)を示す。

<i>D. plumarius</i> ^z	1: ATTC AAGGACTACAAGGAGGACATGGGGCAAGTACAATTCTCGT CGAAGAACTGACGGATCTCGGGTTTGAGTTCAAAT	80
<i>D. gratianopolitanus</i> ^y	1: ATTC AAGGACTACAAGGAGGACATGGGGCAAGTACAATTCTCGT CGAAGAACTGACGGATCTCGGGTTTGAGTTCAAAT	80
<i>D. plumarius</i> ^x	1: ATTC AAGGACTACAAGGAGGACATGGGGCAAGTACAATTCTCGT CGAAGAACTGACGGATCTCGGGTTTGAGTTCAAAT	80
スケニア ^v	1: ATTC AAGGACTACAAGGAGGACGTTGGGGCAAGTACAATTCTCGT CGAAGAACTGACGGATCTCGGGTTTGAGTTCAAAT	80
ピンクフランセスコ ^v	1: ATTC AAGGACTACAAGGAGGACATGGGGCAAGTACAATTCTCGT CGAAGAACTGACGGATCTCGGGTTTGAGTTCAAAT	80
ノラ ^v	1: ATTC AAGGACTACAAGGAGGACATGGGGCAAGTACAATTCTCGT CGAAGAACTGACGGATCTCGGGTTTGAGTTCAAAT	80
<i>D. caryophyllus</i>	1: ATTC AAGGACTACAAGGAGGACATGGGGCAAGTACAATTCTCGT CGAAGAACTGACGGATCTCGGGTTTGAGTTCAAAT	80
<i>D. plumarius</i> ^z	81: ACGGGTTGAAGGACATGTACACAGAAGCTGTTGAGACTTGCAGAGCAAAAAGGGCTTCTCCCTATCCCTAGAACATCAT	160
<i>D. gratianopolitanus</i> ^y	81: ACGGGTTGAAGGACATGTACACAGAAGCTGTTGAGACTTGCAGAGCAAAAAGGGCTTCTCCCTATCCCTAGAACATCAT	160
<i>D. plumarius</i> ^x	81: ACGGGTTGAAGGACATGTACACAGAAGCTGTTGAGACTTGCAGAGCAAAAAGGGCTTCTCCCTATCCCTAGAACATCAT	160
スケニア ^v	81: ACGGGTTGAAGGACATGTACACAGAAGCTGTTGAGACTTGCAGAGCAAAAAGGGCTTCTCCCTATCCCTAGAACATCAT	160
ピンクフランセスコ ^v	81: ACGGGTTGAAGGACATGTACACAGAAGCTGTTGAGACTTGCAGAGCAAAAAGGGCTTCTCCCTATCCCTAGAACATCAT	160
ノラ ^v	81: ACGGGTTGAAGGACATGTACACAGAAGCTGTTGAGACTTGCAGAGCAAAAAGGGCTTCTCCCTATCCCTAGAACATCAT	160
<i>D. caryophyllus</i> ^w	81: ACGGGTTGAAGGACATGTACACAGAAGCTGTTGAGACTTGCAGAGCAAAAAGGGCTTCTCCCTATCCCTAGAACATCAT	160
<i>D. plumarius</i> ^z	161: GAAAATGGATCTGCT <u>TAA</u> TATCAGATTTGTGTTTTCCGAGTGAAGCTTATATTTTTTAAATAAATCAGTCTGATGTAA	240
<i>D. gratianopolitanus</i> ^y	161: GAAAATGGATCTGCT <u>TAA</u> TATCAGATTTGTGTTTTCCGAGTGAAGCTTATATTTTTTAAATAAATCAGTCTGATGTAA	240
<i>D. plumarius</i> ^x	161: GAAAATGGATCTGCT <u>TAA</u> TATCAGATTTGTGTTTTCCGAGTGAAGCTTATATTTTTTAAATAAATCAGTCTGATGTAA	240
スケニア ^v	161: GAAAATGGATCTGCT <u>TAA</u> TATCAGATTTGTGTTTTCCGAGTGAAGCTTATATTTTTTAAATAAATCAGTCTGATGTAA	240
ピンクフランセスコ ^v	161: GAAAATGGATCTGCT <u>TAA</u> TATCAGATTTGTGTTTTCCGAGTGAAGCTTATATTTTTTAAATAAATCAGTCTGATGTAA	240
ノラ ^v	161: GAAAATGGATCTGCT <u>TAA</u> TATCAGATTTGTGTTTTCCGAGTGAAGCTTATATTTTTTAAATAAATCAGTCTGATGTAA	240
<i>D. caryophyllus</i> ^w	161: GAAAATGGATCTGCT <u>TAA</u> TATCAGATTTGTGTTTTCCGAGTGAAGCTTATATTTTTTAAATAAATCAGTCTGATGTAA	240
	-----CTTTGTGTTTTCCGAGTGAAGCTTATATTTTTTAAATAAATCAGTCTGATGTAA	215
<i>D. plumarius</i> ^z	241: CGATGCACGTTTTTGATAAGTGATTTATAAATTTAATTCGTGTCGAAAAAATATGTGGACCATTTGTGAAATTTGTACT	320
<i>D. gratianopolitanus</i> ^y	241: ACGATGCA	248
<i>D. plumarius</i> ^x	241: CGATGCACGTTTTTCGATAAGTGATTT	266
スケニア ^v	241: CGATGCACGTTTTTCGATAAGTGATTT	266
ピンクフランセスコ ^v	241: CGATGCACGTTTTTCGATAAGTGATTT	266
ノラ ^v	241: CGATGCA	247
<i>D. caryophyllus</i> ^w	216: CGATGCACGTTTTTCGATAAGTGATTTATAAATTTAATTCGTGTCGAAAAAATATGTGGACCATTTGTGAAATTTGTACT	275
<i>D. plumarius</i>	321: CGTAGTTATTATTTTTACTCTTAAAAAATTTTTAATTCGTGTCGAAAAAATATGTGGACCATTTGTGAAATTTGTACT	357

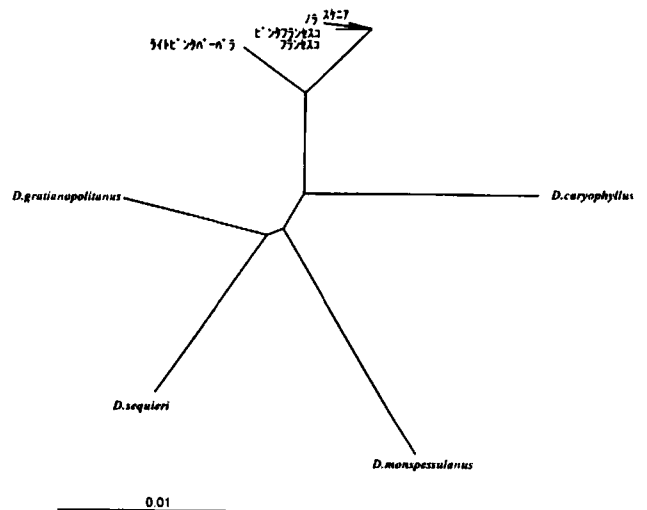
第5図 *D. caryophyllus* ‘タンガ’^wで報告されているdfr-cDNA配列と本研究で単離したdfr-cDNA及びDFR構造遺伝子配列から推定される第6エキソン領域の塩基配列の比較

^z*D. plumarius*花弁から単離したdfr-cDNA配列, ^y*D. gratianopolitanus*花弁から単離したdfr-cDNA配列, ^x*D. plumarius*全DNAから単離したDFR構造遺伝子配列, ^vカーネーション品種全DNAから単離したDFR構造遺伝子配列, ^zAF267172, ^yAF291097, ^wZ67983, 斜体字アンダーラインは終始コドンを示す。

富な花色を有している。さらに、それぞれの色と色素発現の濃淡が組み合わされることによって多様な花色を持つ品種が作出されている(武田ら 1996)。これらの品種は、アントシアニンのB環の水酸化やアントシアニンのグルコシル化の程度がそれぞれ異なり、特にピンクや赤の微妙な花卉色に影響しているとされている(Matoら 2001)。これらのことから、多様な草姿や開花特性を有するダイアンサス属野生種間の、または園芸品種との種間交雑によって、共存する色素の構成割合を変化させたり、B環の水酸化やグルコシル化の程度を改変することにより、より幅広い花卉色の変異を導入することが可能となるはずである。それによって、多様な草姿や開花特性を生かした、より多様な花壇苗や切り花用の園芸品種の作出が可能であるものと期待される。

今回行ったCHS及びDFRの構造遺伝子解析により、ダイアンサス属植物の類縁関係を遺伝子レベルで明らかにすることができた。CHS構造遺伝子では、そのエキソン配列は*D. gratianopolitanus*, *D. plumarius*, *D. mospessulanus*及び*D. sequieri*で高度に保存されているのに対し、イントロン配列には種間変異が認められた。この変異はイントロン領域の中央部で大きく、配列比較から特定の配列

の挿入又は欠損により変異が生じているものと推察された。これらの配列間の保存性と変異を利用することによりDNAマーカーの作出も可能であろう。また、DFR構造遺伝子配列を基にしたクラスター分析から、カーネーション品種は同一のクラスターに属することが明らかに



第6図 DFR構造遺伝子配列に基づいたダイアンサス属植物の系統樹

本研究でダイアンサス属植物から単離したDFR構造遺伝子配列を基にCLUSTALWを用いてNJ法により作成した。

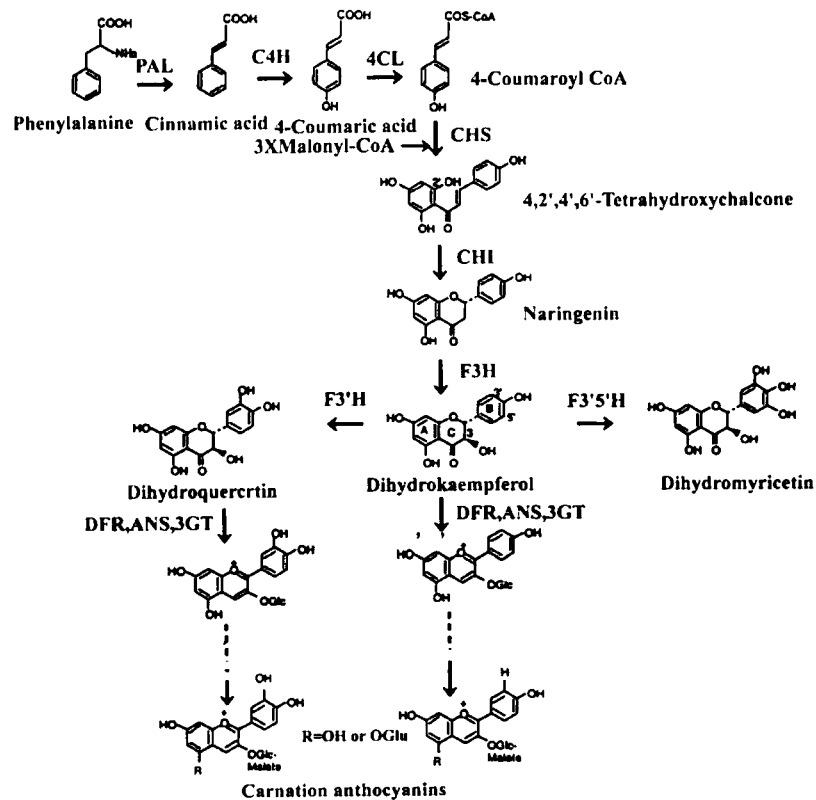
なった。一方、カーネーションの原種とされている *D.caryophyllus* はカーネーション品種とは明らかに別のクラスターに属した。この結果は、園芸的に最も利用の進んでいるカーネーションは、*D.caryophyllus* に複数の種が交配されて成立したという推定育成経過を支持するものであり興味深い。

カーネーションと同様にアントシアニン系色素を持つスイートピーやシクラメンなどには、鮮やかな黄やオレンジの花弁色を有する品種は存在しないことから、そのような花弁色を有する品種の作出が望まれている。カーネーションでは鮮やかな黄やオレンジの花色を有する品種が数多く作出されている。カーネーションの黄色花は、カルコンイソメラーゼの発現が抑制され、新たにカルコン2'-グルコシターゼの作用によりカルコン2'-グルコシドが蓄積することによって発現することが明らかにされているなど、花色発現と生成関連遺伝子の発現に関する研究も積極的に進められている(Itohら 2002)。今後、花きにおける黄色色素の発現機構が明らかにされ

ていけば、アントシアニン系色素は有するが黄色花の存在しない植物種でも黄色花品種の作出が可能になると期待される。

引用文献

- Beld,M., Martin,C., Huits,H., Stuije,A.S., Gerats,A.G.M. 1989. Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*:partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase genes. *Plant Mol.Biol.* 13:491-502.
- Grisbach,R.J., R.M.Beck. and J.R.Stehmann. 2000. Molecular heterogeneity of chalcone synthase intron in *Petunia*. *HortSci.* 35:1347-1349.
- Holton,T.A. and Cornish,E.C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell.*7:1071-1083.
- 伊藤秋夫・武田恭明・塚本洋太郎・富野耕治. 1989. ナデシコ属. 455-462. 園芸植物大辞典. 小学館. 東京.
- Inagaki,Y., Y.Johzuka-Hisatomi., T.Mori., S.Takahashi., Y.Hayakawa., S.Peyachoknagul., Y.Ozeki. and S.Iida. 1999. Genomic organization of the genes encoding



第7図 カーネーションにおけるアントシアニンの生合成経路 (Tanaka et al.1998改変)

PAL:フェニルアラニンアンモニアリアーゼ, C4H:桂皮酸4-水酸化酵素, 4CL:4-クマール酸, CoA:リガーゼ, CHS:カルコン合成酵素, CHI:カルコンイソメラーゼ, F3H:フラバノン3-水酸化酵素, F3'H:フラボノイド3-水酸化酵素, F3'5'H:フラボノイド3'5'-水酸化酵素, DFR:ジヒドロフラボノール4-還元酵素, ANS:アントシアニン合成酵素, 3GT:フラボノイド3-グルコシルトランフェラーゼ, Glu:グルコース

- dihydroflavonol 4-reductase for flower pigmentation in the Japanese and common morning glories. *Gene*. 226:181-188.
- Itoh, Y., D. Higeta., A. Suzuki., H. Yoshida. and Y. Ozeki. 2002. Exision of transposable element from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase gene may contribute to the variegation of the yellow-flower carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol*. 43:578-585.
- 北 宜裕・柳下良美・大矢武志・道券秀雄・河田隆弘・上西愛子・野村 研. 2002. RT-PCRによる植物有用遺伝子のcDNAクローニングと育種への応用. 神奈川県農業総合研究所研究報告. 142:37-48.
- Mato, M., Onozaki, T., Ozeki, Y., Higeta, D., Itoh, Y., Yoshimoto, Y., Ikeda, H., Yoshida, H. and Shibata, M. 2000. Flavonoid biosynthesis of white-flower Sim carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Sci. Hort.* 84:333-347.
- Mato, M., Onozaki, T., Ozeki, Y., Higeta, D., Itoh, Y., Hisamatsu, T., Yoshida, H. and Shibata, M. 2001. Flavonoid biosynthesis in pink-flowered cultivars derived from "William Sim" carnation (*Dianthus caryophyllus*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70:315-319.
- Nakai, K., Inagaki, Y., Nagata, H., Miyazaki, C. and Iida, S. 1998. Molecular characterization of the gene for dihydroflavonol 4-reductase of japonica rice varieties. *Plant Biotech.* 15:221-225.
- Nakayama, M., Koshioka, M., Yoshida, H., Kan, Y., Fukui, Y., Koike, A. and Yamaguchi, M. 2000. Cyclic anthocyanins in *Dianthus caryophyllus*. *Phytochemistry* 55:937-939.
- 農林水産省農業生物資源研究所. 1992. ダイアンサス. 植物遺伝資源特性調査マニュアル第5分冊. p.597-604.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch., T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Ny. Cold Spring Harbor Press.
- Schwarz-Sommer, Z., Shepherd, N., Tacke, E., Gierl, A., Rohde, W., Heclercq, L., Mattes, M., Berndtgen, R., Peterson, P. A., Saedler, H. 1987. Influence of transposable elements on the structure and function of the A1 gene of *Zea mays*. *EMBO J.* 6:287-294.
- Shirley, B. W., S. Hanley., H. M. Goodman. 1992. Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis transparent testa* mutations. *Plant Cell* 4:333-347.
- Tanaka, Y., S. Tsuda. and T. Kusumi. 1998. Metabolic engineering to modify flower color. *Plant Cell Physiol*. 39:1119-1126.
- 武田幸作・林孝三. 1980. 色素群の定性・定量分析各論 フラボノイド定性分析. p.157-173. 増訂植物色素. 林孝三編. 養賢堂. 東京
- 武田恭明・池田宗平・米村浩次. 1996. 農業技術大系花き編7巻. カーネーション(ダイアンサス)・バラ基礎編. p.5-79.
- 塚本洋太郎. 1968. ナデシコ属. p.680-687. 最新園芸大辞典. 最新園芸大辞典編集委員会編. 誠文堂新光社. 東京.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins., T. J. Gibson. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-80.
- 山口雅篤. 1986. 有機酸の結合したアントシアニンに関する研究(第2報)ナデシコ属植物のマリル化アントシアニンの分布と同定. 園芸要旨. 昭和61春: 304-305
- 山口雅篤. 1989. カーネーション(*Dianthus caryophyllus* L.)の花色素育種に関する基礎的研究. 南九州大園研報. 19.
- 山口雅篤. 1991. カーネーションの花色素と緑色花の育種. p.64-70. バイオホルティ5 農耕と園芸編. 誠文堂新光社. 東京.