

コスモス属各種の園芸品種に含まれる
色素成分の解析と花色への貢献

2016. 3

東京農工大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻

雨宮 虎太郎

目次

第1章	緒論	1
第1節	コスモス属の野生種と園芸品種について	1
第2節	園芸植物における花色発現の機構	2
第2章	コスモス属園芸品種のフラボノイド成分の単離と同定	5
第1節	緒言	5
第2節	材料及び方法	6
1.	供試材料	6
2.	花弁からの色素の抽出と分離精製	6
3.	アントシアニンとその他のフラボノイドの同定	8
第3節	結果	14
1.	フラボン欠損変異型コスモス花弁に蓄積するフラボノイド	14
2.	チョコレートコスモス花弁に蓄積するフラボノイド	17
3.	キバナコスモス花弁に蓄積するフラボノイド	20
4.	キバナコスモス朱色・橙色花色品種に含まれる新規アントシアニン	21
第4節	考察	24
1.	コスモス花弁に含まれるフラボノイド	24
2.	チョコレートコスモス花弁に蓄積するフラボノイド	25
3.	キバナコスモス花弁に蓄積するフラボノイド	25
第3章	コスモス(<i>Cosmos bipinnatus</i>)の花色発現と多彩化	26
第1節	緒言	26
第2節	材料及び方法	28
1.	供試材料	28
2.	定量分析	28
3.	花弁粗抽出物のスペクトル測定	29
第3節	結果	30
1.	花弁粗抽出物のスペクトル測定	30
2.	定量分析	30
3.	<i>in vitro</i> での花色の再構築	30
第4節	考察	32
1.	コスモス各花色系統の構成成分について	32
2.	コスモス赤色系統におけるコピグメント効果の有無による花色の多彩化	32
第4章	チョコレートコスモス(<i>Cosmos atrosanguineus</i>)の花色発現と多彩化	34
第1節	緒言	34

第2節	材料及び方法	35
1.	供試材料	35
2.	定量分析	35
3.	花色の測定・評価	35
第3節	結果	37
1.	花色の測定・評価	37
2.	定量分析	37
第4節	考察	38
1.	チョコレートコスモスの黒色化の機構	38
2.	キバナコスモスとの種間雑種形成によるチョコレートコスモス花色の多彩化	38
第5章	キバナコスモス(<i>Cosmos sulphureus</i>)の花色発現と多彩化	39
第1節	緒言	39
第2節	材料及び方法	40
1.	供試材料	40
2.	定量分析	40
3.	花色の測定・評価	41
4.	花弁粗抽出物のスペクトル測定	41
5.	花弁中のカロテノイドの測定	41
第3節	結果	43
1.	定量分析	43
2.	花色の測定	43
3.	花弁粗抽出物の吸収スペクトル測定	43
4.	花弁石油エーテル抽出物の吸収スペクトル測定	43
第4節	考察	44
1.	キバナコスモスの花色の多彩化に關与するアントシアニン, 3-デオキシアントシアニン, カルコン, オーロンおよびカロテノイド	44
第6章	総合考察	46
摘要		49
SUMMARY(英文摘要)		51
謝辞		53
引用文献		54
TABLES(表)		61
FIGURES(図)		87

第 1 章 緒論

第 1 節 コスモス属の野生種と園芸品種について

コスモス属植物はメキシコを中心に中南米に分布するキク科(Asteraceae)の一年生もしくは多年生の草本である。コスモス属は *Cosmos* 節, *Discopoda* 節および *Mesinenia* 節の 3 節 35 種 4 変種に分類されている(Castro-Castro *et al.*, 2014)。 *Cosmos* 節の分類学的特徴には以下が挙げられる。茎は六角形から円柱形, 内外に 8 枚の花被片をもつ。舌状花は青紫, 白もしくは橙色で, 果実は瘦果であり表面は無毛もしくは剛毛がある。瘦果の長さの 30-50%の棘がある, もしくはない。 *Discopoda* 節は内外に 8~10 枚の花被片をもつ。舌状花は暗紫色, 紫もしくは紫がかった白。瘦果は明確な棘を持たず, 瘦果の表面は無毛もしくは剛毛をもち, 瘦果の表面は平滑もしくは節張っている。 *Mesinenia* 節は, 円柱形から六角形の茎, 木質の主根と根茎を持つ。総苞片は内外に 5-8 枚。舌状花は黄色から淡紫色, 青紫色もしくは白。瘦果には棘がなく, 表面に軟毛が生えるもしくは無毛である(Castro-Castro *et al.*, 2013)。

コスモス属において広く栽培されているのは, *Cosmos* 節に属するコスモス(*Cosmos bipinnatus* Cav.)とキバナコスモス(*C. sulphureus* Cav.), *Discopoda* 節に属するチョコレートコスモス(*C. atrosanguineus* (Hook.) A. Voss)の 3 種である。これらの園芸品種のうちコスモスは, 明治初期に日本へと持ち込まれた。現在では日本全国に帰化しており, 『市の花』『町の花』として登録している市町村も多く, 非常に知名度の高い植物の一つである。コスモスの園芸品種の花色は, 日本に導入されて以降, 長らくは野生種と同じ色であるピンク色や白色, 赤色が主であった。しかし, 1987年に玉川大学の佐俣淑彦教授および稲津厚生名誉教授らの約 30 年の歳月をかけた選抜育種により世界で初めて作られた黄色いコスモス品種であるイエローガーデンおよび, その後の品種改良によりさらに黄色味が鮮やかになったイエローキャンパスの作出により, その花色のバリエーションは大きく広がった。

チョコレートコスモスは、大正初期に日本へと導入された。野生種の花色は黒色とされているが、野生では 1970 年代に絶滅が確認されている(Hind and Fay, 2003)。現在はキバナコスモスとの交配種が複数作出され、園芸品種としての花色のバリエーションは黒色～濃赤色である。

キバナコスモスについては、チョコレートコスモスと同時期に園芸品種が日本に導入され、赤色品種のサンセットが 1966 年に All-America Selection で受賞されるなど、積極的な品種改良がなされている。サンセットが作出されて以降も、種苗各社から黄色～オレンジ～朱色花色の花色バリエーションだけでなく鉢植え用に適した矮性の品種など様々な品種が販売されている。

第 2 節 園芸植物における花色発現の機構

園芸植物には様々な花色の品種が存在する。それらの花色を構成する色素成分にはアントシアニンを含むフラボノイド、カロテノイド、ベタレイン、クロロフィルなどがある。一般に花卉中では、フラボノイドやベタレインなどの水溶性の色素は液胞内に存在し、カロテノイドやクロロフィルなどの脂溶性の色素は細胞質内の色素体に固形状に蓄積する事が知られている。黄色から橙色の花色を示す植物の多くはカロテノイドにより発現されている。マリーゴールド(*Tagetes erecta*)ではカロテノイド含有量の多寡により黄色～濃橙色の花色を示す事が報告されている(Moehs *et al.*, 2001)。一方、ベタレインによる花色の発現はナデシコ目のヒユ科(Amaranthaceae)、ツルムラサキ科(Basellaceae)、スベリヒユ科(Portulacaceae)、サボテン科(Cactaceae)、ツルナ科(Aizoaceae)、ヤマゴボウ科(Phytolaccaceae)およびオシロイバナ科(Nyctaginaceae)およびディディエレア科(Didiereaceae)の植物に限られ、花色としては黄、橙、赤色から紫色を示す。園芸植物としてはケイトウ(*Celosia argentea*)などが知られる(Schliemann *et al.*, 2001)。クロロフィルによる花色発現はキク(*Chrysanthemum morifolium*)、アジサイ(*Hydrangea macrophylla*)、カーネーション(*Dianthus caryophyllus*)、バラ(*Rosa*)などの緑色を呈する園芸植物のごく一部の品種でみられる。フラボノイドにより花色が発現されている植物は非常に多くの種類が知られており、その花色も淡黄色から黄、橙、赤、紫、青色や翡翠色、黒色など非常に多岐に渡っている。

フラボノイドはフェニルプロパノイド合成系の一部であるフラボノイド合成系により合成され、フェニルプロパノイド合成系と同じ phenylalanine を基に合成される *p*-coumaroyl-CoA を基質の一つとし、これに 3 分子の malonyl-CoA が脱炭酸反応により縮合して作られる C₆-C₃-C₆を基本構造とする 2つのベンゼン環が 3個の炭素原子により結合した構造を持つ物質である。これらのうち malonyl-CoA の縮合により形成されたベンゼン環を A 環、*p*-coumaroyl-CoA を由来とするベンゼン環を B 環、カルコンとジヒドロカルコンを除き、これらの環の間で A 環に縮合した形で存在する酸素原子を含むヘテロ環を C 環と呼ぶ。フラボノイドはこれまでに約 9000 種類ほどが報告されている(Williams and Grayer, 2004)。これらは、水酸基やメチル基の結合位置の違いによるフラボノイドの基本骨格(アグリコン)の多様性に加え、多くはそれらに単純に糖が 1 分子結合したのから複数の糖や有機酸が複雑に結合したものなど非常に変異に富んだ配糖体として報告されている。フラボノイドの基本骨格はその形状や性質からいくつかのグループに分けられている。無色～淡黄色のフラボン・フラバノンや淡黄色～黄色を示すフラボノール、黄色色素であるカルコンやオーロン、橙色～赤、紫色色素であるアントシニンなどがある。

フラボノイドにより花色が発現されている園芸植物のうち、橙、赤、紫、青や黒色

などの主要因となるのがアントシアニンである。アントシアニンはこれまでに約 650 種類ほどが報告されており、配糖化されていない基本骨格であるアントシアニジンは 31 種類が知られている (Andersen and Markham, 2006)。自然界ではアントシアニジンとして一般に広く存在するのは pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin および malvidin の 6 種類である。これらのアントシアニジンは単体では、pelargonidin, cyanidin および peonidin は橙赤～赤色を、delphinidin, petunidin や malvidin は赤紫～紫色を示す。これらのアントシアニジンは B 環部分に付加された水酸基の数とそれらのメチル化の度合いにより色を変化させる。しかしアントシアニジン単体で青色を示す事は無く、青色化にはアントシアニンへの複数の糖やアシル基の結合（ポリアシル化）による分子内コピグメントや、アントシアニンと補助色素（フラボン・フラボノールなど）との共在による分子間コピグメント、さらにアントシアニンと補助色素、金属イオンとの錯体形成や液胞内の pH のアルカリ化などの様々な機構によって生じている。

園芸植物における花色の青色化の例をいくつかあげると、分子間コピグメントの例としてはムラサキナズナ (*Aubrieta × cultorum*) やダッチアイリス (*Iris cultivars*) などがある (Tatsuzawa *et al.*, 2012; Mizuno *et al.*, 2013)。分子内コピグメントの例としてはキキョウ (*Platycodon grandiflorus*) やリンドウ (*Gentiana scabra*)、クレマチス (*Clematis cultivars*) などがある (Saito *et al.*, 1972; Hosokawa *et al.*, 1997; Sakaguchi *et al.*, 2013)。また金属錯体の例としてはヤグルマギク (*Centaurea cyanus*) やアジサイ (*Hydrangea macrophylla*) が挙げられる (Shiono *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 2003)。液胞内 pH のアルカリ化の例としてはヒスイカズラ (*Strongylodon macrobotrys*) やアサガオ (*Ipomoea tricolor*) などがある (Takeda *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2009)。

また園芸植物において黄色の花色を示す植物の多くはカロテノイドによって発色している事は先述したが、フラボノイドにより黄色を示す植物もいくつか知られている。カーネーションの黄色花には黄色フラボノイドであるカルコンの chalcononaringenin 2'-*O*-glucoside が、キンギョソウ *Antirrhinum majus* にはオーロンの aureusidin 6-*O*-glucoside が含まれることが知られている (Harborne, 1963, 1966)。またダリア (*Dahlia variabilis*) および本研究の植物材料の一つであるキバナコスモスの黄色花からはカルコンの butein 4'-*O*-glucoside やオーロンの sulphuretin 6-*O*-glucoside が報告されている (Shimokoriyama and Hattori, 1953; Geissman, 1942)。

雨宮 (2012) は、フラボン欠損変異型のコスモスを用い、その変異の原因であると推定されたフラボン合成酵素遺伝子 (*FNS II*) の配列の決定ならびに、通常フラボンを蓄積するコスモスに蓄積するアントシアニンおよびフラボンの同定を行った。この際

に、フラボン欠損変異型のコスモスには通常のコスモスには蓄積しない複数のフラバノン、ジヒドロフラボノールおよびフラボノールの蓄積を認めたが、これらの同定には至らなかった。このように1遺伝子座のみの変異により色素組成が大きく変化した変異体について、そのフラボノイド組成を調べた例はあまり多くない。またコスモスに関しては、花色ごとの遺伝子発現に関する知見が多く蓄積されている(堀川ら、未発表)。そのため遺伝子の発現と、それにより合成される最終産物である色素との両面から調査を行う事で、今後のより効率の良い育種改良を行うための指標となる可能性が示された。そこで、本研究では、コスモスに加え、近縁のコスモス属園芸品種であり、多彩な花色を持つキバナコスモスとチョコレートコスモスについても、色素成分を同定することで、コスモス属園芸品種全体の花色と色素の関係を明らかにする事を目的としている。

第2章 コスモス属園芸品種のフラボノイド成分の単離と同定

第1節 緒言

コスモスの花に含まれるフラボノイドとして、コスモス白色花の apigenin 7-*O*-glucoside (cosmosiin) (中沖, 1935), 赤色花からの cyanidin 3-*O*-rutinoside (keracyanin) (Hayashi, 1941), chrysoeriol 7-*O*-glucuronide および luteolin 7-*O*-glucuronide (Saito, 1976)が知られている。これらに加え、近年 cyanidin 3-*O*-glucoside, peonidin 3-*O*-glucoside, peonidin 3-*O*-rutinoside, apigenin 7-*O*-glucuronide および luteolin 7-*O*-glucoside がコスモスの赤色花から報告されている (Table 1, Fig. 1; 雨宮, 2012)。これらの研究によりコスモスの花卉ではアントシアニン以外にフラボン配糖体を主要成分として持つことが明らかとなった。一方、玉川大学が突然変異体を基に作出したフラボン欠損変異型のコスモス品種、ディープレッドキャンパスと、品種としては未登録の玉川大学保存系統であるスモーキーピンク系統が存在する。これらは他のコスモス品種との組成の比較から、フラボン配糖体を持たないことは示されたが、フラボノイドの存否は明らかとなっていない。

キバナコスモスの色素成分は黄色系園芸品種から単離されたカルコンの butein 4'-*O*-glucoside (coreopsin) とオーロンの sulphuretin 6-*O*-glucoside (sulphurein) の2成分が Shimokoriyama and Hattori (1953)により報告されているのみであり (Table 1, Fig. 1), これ以降キバナコスモスの含有色素に関する研究はほとんど行われていない。また, Saito (1974)や佐俣ら(1977)の研究において朱色品種の花卉に不明の橙色の色素の存在が記述されているが、まだ分離同定には到っていない。

チョコレートコスモスの色素成分についてはこれまで全く報告されていない。

そこで本章ではフラボン欠損変異型のコスモスに特異的に蓄積するフラボノイドとチョコレートコスモスおよびキバナコスモスのフラボノイド成分について報告する。

第 2 節 材料及び方法

1. 供試材料

コスモス(*Cosmos bipinnatus*)のフラボノイド成分の定性には, 玉川大学圃場で栽培されたフラボン欠損変異型品種のディープレッドキャンパス(CbDr)の新鮮花弁(100 g)を用いた.

チョコレートコスモス(*Cosmos atrosanguineus*)のフラボノイド成分の定性には チョコモカ品種(CaCm)とルージュールージュ品種(CaRr)の新鮮花弁(各 5 g および 10 g)を用いた. チョコレートコスモス植物体は有限会社園芸茶房より購入した.

キバナコスモス(*Cosmos sulphureus*)のフラボノイド成分の定性には, 玉川大学圃場で栽培されたディアボロ品種(CsDi) の新鮮花弁 50 g を用いた.

2. 花弁からの色素の抽出と分離精製

(1) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析

試料の分析ならびに単離されたフラボノイドの基準標品との比較のために HPLC 分析を行った.

ポンプ: 島津製作所製 LC-20AD

検出器: 島津製作所製 SPD-M20A

カラムオープン: 島津製作所製 CTO-20A

カラム(アントシアニン用): 株式会社ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-4 (6.0 mm I.D. × 150 mm)

カラム(その他のフラボノイド用): 化学物質評価研究機構(CERI)製 L-column 2 ODS (6.0 mm I.D. × 150 mm)

移動層(アントシアニン用): $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{HOAc}/\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O} = 3:8:10:79$

移動層(その他のフラボノイド用): $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O} = 0.2:20:80$

試料の注入量: 10 μl

流速・プログラム(アントシアニン用): 1.0 ml / min で 20 分

流速・プログラム(その他のフラボノイド用): 1.0 ml / min で 20 分, その後 2.0 ml / min で 20 分

検出波長: アントシアニンは 530 nm, 3-デオキシアントシアニンは 480 nm, フラボン・フラボノールは 350 nm, フラバノン・ジヒドロフラボノールは 280 nm, カルコン・オーロンは 380 nm で検出

(2) フラボノイドの分離・精製

① 生花弁からの抽出

新鮮花卉を MeOH もしくは 8% HCOOH -MeOH で一晩抽出し濾過した。得られた粗抽出液をエバポレーターで数 ml~数十 ml 程度まで濃縮した。

②吸着型カラムクロマトグラフィーによる多糖類の除去

アンバーライト XAD-7 (オルガノ製) をカラム(30 mm I.D. \times 500 mm)に充填し、試料がアントシアニンを含む場合は 5% HCOOH で、含まない場合は水で飽和・置換させた。試料を XAD に吸着させた後、1000 ml 程度と同溶媒を用い多糖類などの水溶性の不純物を除去する。その後、アントシアニンを含む試料の場合は 5% HCOOH -MeOH で、含まない場合は MeOH でフラボノイドを溶出した。

③マス・ペーパークロマトグラフィー(mass-PC)による分離

濃縮したフラボノイド溶液を濾紙(ADVANTEC No. 51A; 30 cm \times 60 cm)に添着し、BAW (*n*-BuOH/ HOAc / H_2O = 4:1:5, 上層)で約 12 時間展開した。展開後ドラフト内で十分に風乾させ、UV イルミネーター上で蛍光や色調をもとに分画し、アントシアニンを含む分画は 70%MAW (MeOH/ HOAc / H_2O = 70:5:25)で 12 時間、含まない分画は MeOH で 24 時間溶出し、濃縮した。これをさらに上記と同様に添着し、15% HOAc で 3 時間展開し、風乾後再度分画し各溶媒で溶出した。

④分配型カラムクロマトグラフィーによる抽出色素の分画・精製

セファデックス LH-20 (GE health care 社製) をカラム(15 mm I.D. \times 300 mm)に充填し、試料がアントシアニンを含む場合は 70%MAW で、含まない場合は 70%MeOH で飽和・置換させた。試料は可視光と UV 光(Mineralight UVGL-58; フナコシ株式会社製)での呈色をもとに分画した。

⑤分取高速液体クロマトグラフィー

得られた試料のうち、複数のフラボノイドが含まれる試料については下記の装置を用いて各種成分を分取した。

ポンプ：東ソー株式会社製 CCPS

検出器：東ソー株式会社製 UV-8020

カラム：株式会社ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-4(10 mm I.D. \times 250 mm)

記録計：東ソー株式会社製 Chromatocorder 21

移動層： $\text{HCOOH}/\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ = 5:12~20:83~75

試料の注入量：200~400 μl

検出波長：アントシアニンは 530 nm, 3-デオキシアントシアニンは 480 nm, フラボン・フラボノールは 350 nm, フラバノン・ジヒドロフラボノールは 280 nm で検出した。

流速：1.5～3.0 ml / min

3. アントシアニンとその他のフラボノイドの同定

① 紫外・可視吸収スペクトル測定によるフラボノイド配糖体の構造の推定

紫外・可視吸収スペクトルの測定には島津製作所製の島津マルチパーパス自記分光光度計 MPS-2000 もしくは Shimadzu UV-Vis-NIR UV-2600 を用いた。検出波長はアントシアニン、カルコンおよびオーロンの場合は 220～700 nm, その他のフラボノイドの場合は 220～500 nm とした。

● アントシアニン

1) 0.01% HCl-MeOH 中のスペクトル

乾涸させた試料を 0.01% HCl-MeOH に溶解し、測定する。

2) AlCl₃ 添加時のスペクトルの測定

アントシアニン溶液に AlCl₃ 溶液(5 g の無水 AlCl₃ を 100 ml の MeOH に溶解したものを)を 6 滴加え、軽く攪拌して測定する。

● その他のフラボノイド

1) MeOH 中のスペクトル

乾涸させた試料を MeOH に溶解し、測定する。

2) NaOMe 添加時のスペクトルの測定

フラボノイド溶液に NaOMe(市販の 28% ナトリウムメトキシドメタノール溶液)を 6 滴加え、軽く攪拌して測定する。

3) AlCl₃ と AlCl₃/HCl 添加時のスペクトルの測定

フラボノイド溶液に AlCl₃ を 6 滴加え、軽く攪拌して測定する。続いてこの溶液に 12% HCl を 3 滴加え、軽く攪拌して測定する。

4) NaOAc と NaOAc/H₃BO₃ 添加時のスペクトル測定

フラボノイド溶液に NaOAc(市販の特級・無水酢酸ナトリウム)の粉末をセルの底に 2 mm 程度堆積するまで加え、軽く攪拌し、2 分静置してから測定する。さらにこの溶液に H₃BO₃(市販の特級・ホウ酸)の粉末をセルの底に 2 mm 程度堆積するまで加え、軽く攪拌してから測定する。

一般的なアントシアニンおよびその他のフラボノイドについて上記の各種試薬を添加した際の吸収スペクトルによる構造の評価は以下の通りである。またフラボノイドは一般的に紫外・可視領域に 2 つの吸収極大を有するが、長波長側の極大を Band I, そして短波長側の極大を Band II と呼んでいる。

● アントシアニン

i) 0.01% HCl-MeOH 溶液中の吸収スペクトル特性

- Band I が 500~560 nm 域にあり, Band II が 270~280 nm 域にある
⇒ アントシアニン(3-位置換型)
 - Band I が 470~500 nm 域にあり, Band II が 270~280 nm 域にある
⇒ 3-デオキシアントシアニン
 - Band I と II に加え 310~335 nm に吸収極大を持つ
⇒ 分子内にケイ皮酸誘導体を結合している
- ii) 可視吸収極大での吸光係数と 440 nm での吸光係数の比率(E_{440}/E_{max})
⇒ 5-位の水酸基が遊離であるものと, 3,5-位が置換されているものの比率を比較すると, 前者の値が大きくなる(Harborne, 1958).
- iii) $AlCl_3$ 添加時の吸収スペクトル特性
- Band I が著しく長波長側に移動する
⇒ B 環に隣接した 2 つ以上の遊離水酸基が存在する

● フラボンおよびフラボノール

i) MeOH 溶液中の吸収スペクトル特性

- Band I が 320~340 nm 域にあり, Band II が 1 つのピーク ⇒ apigenin 誘導体
- Band I が 340~350 nm 域にあり, Band II が 2 つのピークもしくは 1 つのピークと 1 つのショルダー ⇒ luteolin 誘導体
- Band I が 340~370 nm 域にあり, Band II が 250~260 nm 域にある ⇒ quercetin もしくは myricetin 誘導体
- Band I が 340~370 nm 域にあり, Band II が 260~270 nm 域にある ⇒ kaempferol 誘導体

ii) NaOMe 添加時のスペクトル特性

- 添加後数分で吸収曲線が著しく変化する(分解) ⇒ 3, 4'-位の水酸基が遊離
- Band I が約 45~65 nm 深色移動し, 吸収強度が増大 ⇒ 4'-位の水酸基が遊離
- Band I が約 45~65 nm 深色移動し, 吸収強度が顕著に減少 ⇒ 4'-位の水酸基の欠如もしくは置換
- Band I・II の間(320~335 nm)に付加的な吸収極大が出現 ⇒ 7-位の水酸基が遊離

iii) $AlCl_3$ と $AlCl_3/HCl$ 添加時のスペクトル特性

$AlCl_3$ 添加後

- Band I が深色移動 ⇒ 3-位または 5-位もしくは両方の水酸基が遊離, または隣接する遊離水酸基が存在
- Band I に顕著な深色移動が生じない ⇒ 3, 5-位の水酸基が欠如あるいは置換, さらに隣接する遊離水酸基を持たない

HCl 添加後

- Band I が $AlCl_3$ 添加時より浅色移動するが MeOH 溶液中での吸収極大まで戻らない

⇒ 3-位または 5-位もしくは両方の水酸基が欠如もしくは置換，かつ B 環に隣接する遊離水酸基が存在

・ Band I が AlCl_3 添加時より浅色移動しない ⇒ 3-位または 5-位もしくは両方の水酸基は遊離であるが，B 環には隣接した遊離水酸基がない

・ Band I が AlCl_3 添加時からほぼ MeOH 溶液中での吸収極大まで戻る ⇒ 3, 5-位の水酸基の欠如もしくは置換，しかし B 環には 2 つ以上の隣接する遊離水酸基が存在

iv) NaOAc と NaOAc/ H_3BO_3 添加時のスペクトル特性

NaOAc 添加後

・ Band II が 5~20 nm 深色移動 ⇒ 7-位の水酸基が遊離

・ Band II が深色移動しない ⇒ 7-位の水酸基の欠如もしくは置換

・ Band I の長波長側にショルダーまたは小さなピークが出現する ⇒ 4'-位には遊離水酸基を持つが 3, 7-位の水酸基は欠如もしくは置換

● カルコンおよびオーロン

i) MeOH 溶液中の吸収スペクトル特性

・ Band I が 340~390 nm 域にあり，低い Band II が 230~270 nm 域にある
⇒ カルコン

・ Band I が 380~430 nm 域にあり，低い Band II が 230~270 nm 域にある
⇒ オーロン

ii) NaOMe 添加時のスペクトル特性

カルコン

・ Band I が 60~100 nm 深色移動し，吸収強度が増大 ⇒ 4-位の水酸基が遊離

・ Band I が 60~100 nm 深色移動し，吸収強度が顕著に減少 ⇒ 2-位もしくは 4'-位の水酸基が遊離かつ 4-位の水酸基が欠如か置換

・ Band I が 40~50 nm 深色移動 ⇒ 4'-位の水酸基が遊離

オーロン

・ Band I が 80~95 nm 深色移動し吸収強度が増大 ⇒ 4'-位の水酸基が遊離

・ Band I が 60~70 nm 深色移動し吸収強度が増大 ⇒ 6, 4'-位の水酸基が遊離

・ ほとんど移動しない ⇒ 6-位の水酸基が遊離かつ 4'-位の水酸基が置換

iii) AlCl_3 と AlCl_3/HCl 添加時のスペクトル特性

カルコン

・ AlCl_3 添加後 Band I が 48~64 nm 深色移動するが，HCl 添加時浅色移動しない
⇒ 2'-位の水酸基が遊離

カルコン・オーロン

・ AlCl_3 添加後 Band I が 80~130 nm 深色移動し，HCl 添加後 40~70 nm 浅色移動

⇒ B 環に隣接する遊離水酸基が存在

iv) NaOAc と NaOAc/H₃BO₃ 添加時のスペクトル特性

NaOAc 添加後

・ Band I が深色移動もしくは長波長側にショルダーが出現 (カルコン) ⇒ 4-位, 4'-位の両方もしくは片方が遊離

● フラバノンおよびジヒドロフラボノール

i) MeOH 溶液中の吸収スペクトル特性

・ Band I が 300~330 nm 域でショルダーになり, Band II が 275~295 nm 域にある

ii) NaOMe 添加時のスペクトル特性

・ 添加後数分で吸収曲線が著しく変化する(分解) ⇒ 3, 3', 4'-位の水酸基が遊離

・ Band II が約 45 nm の深色移動 ⇒ 5, 7-位の水酸基が遊離

iii) AlCl₃ と AlCl₃/HCl 添加時のスペクトル特性

AlCl₃ 添加後

・ Band II が 10~30 nm 深色移動 ⇒ A 環に隣接する遊離水酸基が存在

iv) NaOAc と NaOAc/H₃BO₃ 添加時のスペクトル特性

NaOAc 添加後

・ Band II が約 35 nm 深色移動 ⇒ 5, 7-位の水酸基が遊離

・ Band II が約 60 nm 深色移動 ⇒ 7-位の水酸基が遊離かつ 5-位の水酸基が置換

・ Band II が 10~15 nm 深色移動 ⇒ A 環に隣接する遊離水酸基が存在

上記の方法はすべて基本的に Mabry *et al.* (1970)に従って行われた。

②完全加水分解

・アントシアニン

乾潤させた試料を 12%HCl に溶解し, 直火で 3 分間加熱した。加熱後, 直ちに流水で冷却し, 少量のイソアミルアルコールを加えて振とうする。そこに過剰の蒸留水を加え, アントシアニン(イソアミルアルコール層)と糖(水層)を分取した。

・その他のフラボノイド配糖体

乾潤させた試料を少量の MeOH に溶解し, 試験管の 5 分の 1 まで 12%HCl を加え, 沸騰水浴上で 30 分間加熱した。冷却後, 等量のジエチルエーテルを加え, よく振とうし, アグリコン(エーテル層)と糖(水層)を得た。

③アグリコンの同定

・アントシアニン

イソアミルアルコール層に蒸留水を少量加えエバポレーターで乾涸させた。これを 0.01% HCl-MeOH で溶解した。HPLC で標品と UV スペクトル特性と保持時間を比較する事で同定を行った。

・その他のフラボノイド

ジエチルエーテル層をドラフト内で乾涸後、MeOH で溶解した。アグリコンの同定は、HPLC で標品との比較により行った。

④糖の同定

完全加水分解後に得られた糖を含む水層を乾涸させ蒸留水に溶解した。結合糖の同定は、PC (ADVANTEC No.50; 30 cm × 30 cm)により行い、展開溶媒には BBPW (*n*-BuOH/benzene/pyridine/H₂O = 5:1:3:3) と , BTPW (*n*-BuOH/toluene/pyridine/H₂O = 5:1:3:3)を用い、上昇法で 12 時間展開した。標品にはグルコース、ガラクトース、グルクロン酸、アラビノース、キシロース、ラムノースを用いた。これらの標品と試料を濾紙の下端から 4 cm の位置に先引きピペットで添着した。展開後、風乾させ、1%メタノール性塩酸アニリンを全体に噴霧し、80°C に設定したオーブンで 30 分間加熱し、スポットを発色させ、色と Rf 値を測定した。

⑤ 薄層クロマトグラフィー(TLC)

セルロース薄層プラスチックプレート(MERCK)を用い、室温上昇法で展開を行った。展開後はプレートを風乾させた後、UV 光下(365 nm)でスポットの色を観察し、Rf 値を測定した。展開溶媒として、アントシアニンは、BAW, BuHCl (*n*-BuOH/2N HCl = 1:1, 上層), AHW (HOAc/HCl/H₂O = 15:3:82)と 1% HCl を、一部のアントシアニンは上記に加え Forestal (HOAc/HCl/H₂O = 30:3:10)を、フラボノイド配糖体は 15%HOAc, BAW, BEW (*n*-BuOH/MeOH/H₂O = 4:1:2.2)を用いた。

⑥ 液体クロマトグラフ質量スペクトル(LC-MS)

質量分析計：島津製作所製 LCMS-2010EV

ポンプ：島津製作所製 LC-20AD

検出器：島津製作所製 SPD-20A

カラムオーブン：島津製作所製 CTO-20A

検出器電圧：1.5 kV

流速：0.2 ml / min

試料の注入量：5 μl

カラム(アントシアニン)：Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D. × 100 mm)

カラム(その他のフラボノイド)：CERI 製 L-column ODS2 (2.1 mm I.D. × 100 mm)

移動層(アントシアニン)：HCOOH/MeCN/H₂O = 5:10~30:85~65

移動層(その他のフラボノイド) : HCOOH/MeCN/H₂O = 1:30:70

検出波長(アントシアニン) : 530 nm

検出波長(カルコン・オーロン) : 380 nm

検出波長(フラボン・フラボノール) : 350 nm

検出波長(フラバノン・ジヒドロフラボノール) : 280 nm

⑦核磁気共鳴スペクトル(NMR)

単離された一部のフラボノイドは NMR スペクトルの測定を行った。試料はアントシアニンについては DMSO-*d*₆+CF₃COOD (9:1 もしくは 3:1)で、その他のフラボノイドは pyridine-*d*₅中で測定を行った。測定は ¹H-NMR (600 MHz), ¹³C-NMR (150 MHz), COSY, NOESY, HSQC, HMBC を行った。

⑧高分解能質量分析 (HR-FAB-MS)

キバナコスモスから単離された新規化合物の HR-FAB-MS を行った。機器は、JEOL HX-110 spectrometer を使用した。

第 3 節 結果

コスモスのフラボン欠損変異型品種，チョコレートコスモスおよびキバナコスモスからアントシアニン 5 種類，3-デオキシアントシアニン 1 種類，フラバノン 3 種類，ジヒドロフラボノール 4 種類，フラボン 1 種類，フラボノール 2 種類，カルコン 1 種類およびオーロン 1 種類の合計 18 種類のフラボノイドが分離された。

1. フラボン欠損変異型コスモス花卉に蓄積するフラボノイド

フラボン欠損変異型のコスモスにはディープレッドキャンパス品種と玉川大学保存系統であるスモーキーピンク系統がある。本研究で供試したディープレッドキャンパスは，スモーキーピンク系統と赤色花系統を交配する事により得られた濃赤色品種である。いずれの品種・系統も花卉にフラボンを蓄積していないことが知られている。また，予備実験によりその他のフラボノイドの組成は一致していることを確認している。本研究では物質の蓄積量が多いディープレッドキャンパスを用い，フラボン欠損系統コスモスに特異的に蓄積するフラボノイドの単離と同定を行った。

Taxifolin 3-*O*-glucoside(1)

1 は MeOH 中では 332 nm にショルダー状の Band I, 289 nm に Band II を持つ事からフラバノンもしくはジヒドロフラボノールであると推測された(Fig. 2-3-1)。これに NaOMe を添加したところ Band II が 35 nm ほど深色移動し，吸光度の増加が見られた。また，NaOAc を添加した時にも Band II に 35 nm ほどの深色移動がみられたことから 5-位と 7-位に遊離の水酸基が存在すると考えられた。またこれらに加え，各種試薬添加時の吸収特性は taxifolin 3-*O*-rhamnoside とほとんど同じであった(Mabry *et al.*, 1970)。次に完全加水分解を行った。HPLC による標品との比較からアグリコンは taxifolin と，遊離された糖は co-PC による標品との比較から glucose と同定された。また，LC-MS 解析の結果 m/z 465 [M-H]⁻の分子イオンピークと m/z 305 [M-162+H]⁺のフラグメントイオンピークが得られた。これらの結果より **1** は taxifolin 3-*O*-glucoside(Fig. 2-4-1)と同定された。

Taxifolin 3-*O*-galactoside(2)

2 の MeOH 中での吸収スペクトルを測定したところ，291 nm に Band II を，335 nm にショルダー状の Band I をもったことから，フラバノンもしくはジヒドロフラボノールと推測された(Fig. 2-3-2)。また，各種試薬添加時の吸収特性は **1** と同様に taxifolin 3-*O*-rhamnoside とほとんど同じであった(Mabry *et al.*, 1970)。次に完全加水分解を行い，得られたアグリコンは taxifolin と同定された。遊離された糖は

galactose と同定された。また、LC-MS 解析の結果 m/z 465 [M-H]⁻ の分子イオンピークと m/z 305 [M-162+H]⁺ のフラグメントイオンピークが得られた。以上より **2** は taxifolin 3-*O*-galactoside (Fig. 2-4-2) と同定された。

Aromadendrin 7-*O*-glucoside (**3**)

3 は MeOH 中で、Band II が 285 nm に、ショルダー状の Band I が 333 nm に出現したことから、フラバノンもしくはジヒドロフラボノールであると推測された (Fig. 2-3-3)。これに NaOMe を加えたところ、吸収曲線が著しく変形した事から 3-位と 4'-位に遊離の水酸基が存在する事が分かった。また NaOAc を添加した際に Band II が深色移動しなかった事から 7-位の水酸基がないもしくは置換している事が示された。さらに完全加水分解を行い、HPLC による標品との比較からアグリコンは aromadendrin と同定され、遊離された糖と標品との co-PC による比較から結合している糖は glucose と同定された。また、LC-MS 解析の結果 m/z 449 [M-H]⁻ の分子イオンピークと m/z 289 [M-162+H]⁺ のフラグメントイオンピークが得られた。これらの結果より **3** は aromadendrin 7-*O*-glucoside (Fig. 2-4-3) と同定された。

Aromadendrin 3-*O*-glucoside (**4**)

4 は MeOH 中での吸収スペクトル測定から、330 nm にショルダー状の Band I と 291 nm に Band II を持つフラバノンもしくはジヒドロフラボノールであると推測された (Fig. 2-3-4)。この MeOH 溶液に各種試薬を添加した際の吸収特性は aromadendrin 3-*O*-rhamnoside とほとんど一致した (Mabry *et al.*, 1970)。また完全加水分解により得られたアグリコンは HPLC 解析の結果 aromadendrin であった。遊離された糖は co-PC の結果、glucose であると示された。また LC-MS 解析では m/z 449 [M-H]⁻ の分子イオンピークと m/z 289 [M-162+H]⁺ のフラグメントイオンピークが得られた。さらに HPLC によりダイズ (*Glycine max*) の花より得られた標品の aromadendrin 3-*O*-glucoside (Iwashina *et al.*, 2007) と比較したところ (Table 2-1)、これと一致したため、**4** は aromadendrin 3-*O*-glucoside (Fig. 2-4-4) と同定した。

Eriodictyol 7-*O*-glucoside (**5**)

5 は MeOH 中で 284 nm に Band II と 325 nm にショルダー状の Band I を生じたことから、フラバノンもしくはジヒドロフラボノールであると推測された (Fig. 2-3-5)。これに各種試薬を添加したところ、eriodictyol 7-*O*-glucuronide の吸収特性とほとんど一致した (上原, 2010)。次に完全加水分解を行い、アグリコンを HPLC により標品と比較したところ eriodictyol と同定された。遊離した糖は co-PC による標品との比較から glucose と同定された。さらに LC-MS 解析では m/z 449 [M-H]⁻ の分子イオンピークと m/z 289 [M-162+H]⁺ のフラグメントイオンピークが得られた。以上より **5**

は eriodictyol 7-*O*-glucoside(Fig. 2-4-5)と同定された.

Quercetin 3-*O*-glucoside (6)

6 は MeOH 溶液中で 358 nm (Band I)と 257 nm (Band II)に吸収極大が存在した事からフラボノールであると推測された(Fig. 2-3-6). これに NaOMe を加えたところ Band I に 50 nm ほどの深色移動と吸収強度の増加が見られた. さらに 328 nm に付加的なピークが出現した事から 4'-位および 7-位に遊離水酸基が存在する事が分かった. また顕著な吸収曲線の変化が見られなかった事から 3-位の水酸基が置換もしくは欠失している事が分かった. また AlCl₃を添加した後に HCl を加えた際, Band I が完全にはもとの位置まで戻らなかった事から B 環に隣接する遊離の水酸基を持ち, 3-位もしくは 5-位に遊離水酸基が存在する事が分かった. また NaOAc を添加した際, Band II に 15 nm ほどの深色移動が見られたことから 7-位に遊離水酸基が存在する事が分かった. 次に完全加水分解を行い, 得られたアグリコンは HPLC による標品との比較から quercetin と同定され, 結合している糖は標品との co-PC 比較から glucose と同定された. また LC-MS 解析では m/z 463 [M-H]⁻の分子イオンピークと m/z 303 [M-162+H]⁺のフラグメントイオンピークを得た. さらに HPLC により 6 を *Osyris alba* から得られた quercetin 3-*O*-glucoside (Iwashina *et al.*, 2008)と比較したところ一致した(Table 2-1). これらの結果から 6 は quercetin 3-*O*-glucoside(isoquercitrin, Fig. 2-4-6)と同定された.

Quercetin 3-*O*-rutinoside (7)

7 は MeOH 中で 359 nm の Band I と 258 nm の Band II が出現した(Fig. 2-3-7). この事からフラボノールであると推測された. これに NaOMe を添加すると Band I の 52 nm 程の深色移動と吸収強度の増加がみられ, さらに 325 nm に付加的な極大が出現し, また吸収曲線の著しい変化は見られなかった. 以上より 4'-位と 7-位に遊離水酸基があり, さらに 3-位の水酸基が欠如もしくは置換している事が推測された. また AlCl₃を添加した際に Band I が深色移動した事から 5-位の水酸基が遊離であり, また B 環に隣接する 2 つの水酸基を持つことが分かった. さらに HCl を加えたところ, 吸収極大に浅色移動は見られるものの MeOH 中の極大までには戻らなかった事から B 環に隣接する遊離水酸基が存在する事が示された. また NaOAc を添加した際に Band II が 15 nm ほど深色移動したことから 7-位の水酸基が遊離である事が分かった. 次に完全加水分解を行った. アグリコンは HPLC による標品との比較から quercetin と同定された. 結合している糖は co-PC による標品との比較から rhamnose および glucose と同定された. また LC-MS 解析では m/z 609 [M-H]⁻の分子イオンピークと m/z 303 [M-308+H]⁺のフラグメントイオンピークが得られた. さらに HPLC により 7 をハマヒルガオ(*Calystegia soldanella* (L.) Roem. et Schult.)の葉から得ら

れた標品(Murai *et al.*, 2015)と比較したところ quercetin 3-*O*-rutinoside と一致した (Table 2-1). 以上より **7** は quercetin 3-*O*-rutinoside (rutin, Fig. 2-4-7)と同定された.

2. チョコレートコスモス花卉に蓄積するフラボノイド

Cyanidin 3-*O*-glucoside(**8**)

8は 0.01%*HCl*-*MeOH* 中で Band I が 529 nm に, Band II が 282 nm に出現した (Fig. 2-6-1). また AlCl_3 を添加した際に Band I が深色移動したことから B 環に隣接する遊離水酸基が存在する事が分かった. 次に完全加水分解を行い, HPLC による標品との比較からアントシアニジンは cyanidin と同定された. また糖の co-PC から結合している糖は glucose と同定された. また, LC-MS 分析から m/z 449 $[\text{M}]^+$ の分子イオンピークと m/z 287 $[\text{M}-162]^+$ のフラグメントイオンピークが得られた事から cyanidin に 1 分子の glucose が結合している事が判明した. また E_{440}/E_{max} は 23%であったことから, 5-位の水酸基は遊離と考えられた. そこで **8** を HPLC によりカエデ属植物 (*Acer* spp.) の紅葉から得られた標品 (Hattori and Hayashi, 1937) と比較したところ cyanidin 3-*O*-glucoside と保持時間が一致したため, **8** は cyanidin 3-*O*-glucoside (chrysanthemine, Fig. 2-7-8) と同定された.

Cyanidin 3-*O*-rutinoside(**9**)

9は 0.01%*HCl*-*MeOH* 溶液中で, Band I (531 nm) と Band II (283 nm) が出現した (Fig. 2-6-2). また AlCl_3 添加時に深色移動が見られた事から B 環に隣接する遊離水酸基が存在する事が示された. 次に完全加水分解を行った. アントシアニジンを HPLC で, 遊離した糖を co-PC でそれぞれ標品と比較したところ, アントシアニジンは cyanidin と, 糖は glucose および rhamnose と同定された. さらに LC-MS 分析の結果 m/z 595 $[\text{M}]^+$ の分子イオンピークと m/z 287 $[\text{M}-308]^+$ のフラグメントイオンピークが得られたので cyanidin に各 1 分子の rhamnose と glucose が結合している事が示された. また E_{440}/E_{max} の値は 24%であった事から糖の結合位置は 3-位であると推定された. そこで HPLC でカンナ (*Canna* cultivar) の花から得られた標品 (Hayashi *et al.*, 1954) の cyanidin 3-*O*-rutinoside と **9** を比較したところ, これらの保持時間は一致した. 以上より, **9** は cyanidin 3-*O*-rutinoside (keracyanin, Fig. 2-7-9) と同定された.

Cyanidin 3-*O*-malonylglucoside(**10**:部分同定)

10は 0.01%*HCl*-*MeOH* 中では, 530 nm (Band I) と 282 nm (Band II) に吸収極大を示した (Fig. 2-6-3). これに AlCl_3 を添加すると Band I が深色移動したため B 環に隣接する遊離水酸基が存在する事が分かった. 次に完全加水分解を行い, HPLC による

標品との比較からアントシアニジンは cyanidin と同定された。また糖の co-PC から糖は glucose と同定された。また E_{440}/E_{\max} の値は 23%であったことから、5-位に遊離水酸基が存在することが示された。さらに LC-MS 分析から m/z 535 [M]⁺の分子イオンピークと m/z 287 [M-248]⁺のフラグメントイオンピークが得られたことから、各 1 分子の glucose と分子量 86 の物質の結合が推定された。そこでこれをアルカリけん化し HPLC による標品との比較および LC-MS 解析を行ったところ脱アシル化産物は cyanidin 3-*O*-glucoside と決定された。また 86 の分子量は malonic acid に相当するので、10 は cyanidin 3-*O*-malonylglucoside (Fig. 2-7-10)と定性された。なお、malonic acid の glucose への結合位置は特定する事が出来なかった。

Pelargonidin 3-*O*-glucoside(11)

11 は 0.01% HCl-MeOH 中で、513 nm に Band I, 279 nm に Band II が出現した (Fig. 2-6-4)。また AlCl₃ を添加しても吸収極大が移動しない事から隣接する遊離水酸基を持たない事が分かった。これを完全加水分解し、アントシアニジンを HPLC で、遊離した糖を co-PC でそれぞれ標品と比較したところ、アントシアニジンは pelargonidin と、糖は glucose が同定された。糖の結合位置に関しては E_{440}/E_{\max} の値は 39%であったことから 3-位であると考えられた。次に LC-MS 解析を行ったところ、分子イオンピークとして m/z 433 [M]⁺が、フラグメントイオンピークとして m/z 271 [M-162]⁺が得られた。以上の結果を総合して HPLC で標品 (Extrasynthese 購入品) と比較して pelargonidin 3-*O*-glucoside (Fig. 2-7-11) と同定した。

Pelargonidin 3-*O*-rutinoside(12)

12 は 0.01% HCl-MeOH 中で 516 nm に Band I を、281 nm に Band II を示した (Fig. 2-6-5)。これに AlCl₃ を添加したが吸収極大の移動が見られなかったため、隣接する遊離の水酸基を持たない事が示された。次に完全加水分解を行った。アントシアニジンは HPLC による標品との比較から pelargonidin と同定された。結合している糖は co-PC による標品との比較から glucose と rhamnose が同定された。また LC-MS 解析では m/z 579 [M]⁺の分子イオンピークと m/z 271 [M-308]⁺のフラグメントイオンピークが得られたことから、この配糖体は pelargonidin に各 1 分子の rhamnose と glucose が結合していると考えられた。さらに糖の結合位置は E_{440}/E_{\max} の値が 36%であったことから 3-位と示された。最終的に HPLC により標品 (Extrasynthese 購入品) との比較から pelargonidin 3-*O*-rutinoside (Fig. 2-7-12) と同定した。

Eriodictyol 7-*O*-glucuronide(13)

13 は MeOH 中での吸収スペクトル特性、すなわち 329 nm にショルダー状の Band I を持ち、284 nm に Band II を持つことから、フラバノンもしくはジヒドロフラボ

ノールと推測された(Fig. 2-6-6). これに各種試薬を添加した際の吸収スペクトルの特性は eriodictyol 7-*O*-glucuronide とほとんど同一であった(上原, 2010). 次に完全加水分解を行い, 得られたアグリコンを HPLC により, 遊離された糖を co-PC によりそれぞれ標品と比較したところ, アグリコンは eriodictyol と, 結合している糖は glucuronic acid と同定された. さらに LC-MS 解析では m/z 465 [M+H]⁺の分子イオンピークと m/z 289 [M-176+H]⁺のフラグメントイオンピークが得られたので eriodictyol に 1 分子の glucuronic acid が結合している事が示された. さらにエゾヨモギギク (*Tanacetum vulgare*)から得られた標品の eriodictyol 7-*O*-glucuronide(上原, 2010)と HPLC で比較したところ, これらの保持時間は一致した. 以上より **13** は eriodictyol 7-*O*-glucuronide (Fig. 2-8-13)と同定された.

Eriodictyol *O*-glucoside(**14**)

14 は MeOH 溶液中での吸収スペクトルの測定で, Band II (287 nm)と, ショルダ一状の Band I (331 nm)を示した(Fig. 2-6-7). このことからフラバノンもしくはジヒドロフラボノールであると推測された. これに NaOMe を加えると吸光度の増加とともに Band II が 36 nm ほど深色移動した. また NaOAc を加えた際に, Band II が 36 nm ほど深色移動したことから 5-位と 7-位の水酸基が遊離である事が分かった. また H₃BO₃を加えた際のスペクトルは MeOH 中のものほぼ同じであったことから A 環と B 環ともに隣接する遊離の水酸基は存在しないと考えられた. つぎに完全加水分解を行い, HPLC により標品との比較を行ったところ, アグリコンは eriodictyol と同定された. 遊離された糖は co-PC による標品との比較から glucose と同定された. さらに LC-MS 解析では m/z 449 [M-H]⁻の分子イオンピークと m/z 289 [M-162+H]⁺のフラグメントイオンピークが得られたので eriodictyol に 1 分子の glucose の結合が確実である. しかし glucose の結合位置は特定できなかった (Fig. 2-8-14).

上記以外にフラボン欠損変異型コスモスの花から得られた eriodictyol 7-*O*-glucoside(**5**)も分離同定された.

3. キバナコスモス花卉に蓄積するフラボノイド

Luteolin 7-*O*-glucuronide(15)

15 は MeOH 中で 256 nm と 268 nm に Band II が, 351 nm に Band I が出現した事からフラボンもしくはフラボノールと推測された(Fig. 2-10-1). これに NaOMe を加えると Band I の 50 nm 程の深色移動が見られた. 次に AlCl₃を加えると Band I に深色移動が見られ, これにさらに HCl を加えたところ Band I に浅色移動が見られたが元の極大位置には戻らなかったことから, B 環に隣接する遊離水酸基を持ち 3-位または 5-位もしくはその両方の水酸基が遊離である事が分かった. さらに NaOAc を添加した際, Band I に深色移動が見られ, これに H₃BO₃を加えた際に, Band I が MeOH 中より 20 nm ほど長波長側に移動した事からも, B 環の隣接する遊離水酸基の存在が明らかになり, また 3-位と 7-位の水酸基が欠如もしくは置換している事も示された. これを完全加水分解し, アグリコンを HPLC により, 遊離した糖を co-PC により標品と比較した. その結果, アグリコンは luteolin と, 糖は glucuronic acid と同定された. また LC-MS 解析では分子イオンピークとして m/z 463 [M+H]⁺が得られ, さらに m/z 287 [M-176+H]⁺のフラグメントイオンピークが得られた. 以上より 15 は luteolin 7-*O*-glucuronide (Fig. 2-12-15)と同定された.

Butein 4'-*O*-glucoside(16)

16 は MeOH 溶液中で, 383 nm に Band I が, 270 nm に Band II が出現したことからカルコンもしくはオーロンであると推測された(Fig. 2-10-2). これに NaOMe を加えると Band I が 60 nm ほど深色移動し, 吸光度が増加したことから 4-位に遊離の水酸基がある事が分かった. 次に AlCl₃を加えると Band I に深色移動が見られ, さらに HCl を加えると浅色移動したが MeOH 中での極大までは戻らなかった事から, B 環に隣接する水酸基が存在する事が示された. また NaOAc を加えた際に Band I の深色移動とともに長波長側にショルダーが出現したことから 4-位と 4'-位の両方もしくはどちらかの水酸基が遊離である事が分かった. また LC-MS 解析では m/z 435 [M+H]⁺の分子イオンピークと m/z 273 [M-162+H]⁺のフラグメントイオンピークが得られた. このことからこの化合物は tetrahydroxychalcone に 1 分子の hexose が結合しているものと示された. 完全加水分解により遊離した糖を標品と co-PC で比較したところ, 糖は glucose と同定された. しかしアグリコンは該当する標品がなかったため, 16 については NMR による構造解析を行った(Table 2-16). アグリコンは butein 4-*O*-glucoside (Davis *et al.*, 1998)の NMR データを基に帰属を行った. 糖の結合位置に関しては, HMBC において δ_c 165.4 のカーボンシグナルとアノメリックプロトン (δ 5.94, $J=7.6$ Hz)との間で相関が見られたが, これは Davis *et al.* (1998)の報告で相互に入れ替え可能(interexchangeable)と報告された A 環の 2'-位もしくは 4'-位のカーボ

ンと考えられた。しかし α -位(δ 7.47)と β -位(δ 7.79)について NOESY 相関を見たところ 6'-位(δ 8.18)との間には相関を持ったが、糖のプロトンのいずれとも相関を持たなかったことから、糖の結合位置は 4'-位であると帰属された。以上より **16** は butein 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (coreopsin, Fig. 2-12-16)と同定された。

Sulphuretin 6-*O*-glucoside(**17**)

17 は MeOH 中で 402 nm に Band I が、273 nm、256 nm に小さな 2 つの Band II が出現した(Fig. 2-10-3)。これに NaOAc を加えると Band I が 95 nm ほど深色移動したことから 4'-位に遊離水酸基をもつと推測された。また AlCl₃ を添加した後 HCl を加えたところ Band I が 40 nm ほど深色移動した後、ほぼ MeOH 中の吸収極大まで戻った。NaOAc を加えたところ Band I の長波長側にピークが出現したことから、4-位と 4'-位もしくは両方の水酸基が遊離である事が分かった。これにさらに H₃BO₃ を加えたところ、Band I が MeOH 中に比べて 30 nm ほど長波長側に移動したため B 環に隣接する水酸基が存在する事が推測された。また LC-MS 解析では m/z 433 [M+H]⁺ の分子イオンピークと m/z 271 [M-162+H]⁺ のフラグメントイオンピークが得られた。これは trihydrxyaurone に 1 分子の hexose が結合している化合物に相当する。結合糖に関しては完全加水分解により遊離した糖を標品と比較し glucose である事が分かったが、アグリコンは該当する標品がないため、**17** については NMR による構造解析を行った(Table 2-16)。アグリコンに関しては Zhao *et al.* (2011)の sulphuretin の NMR データをもとに帰属を行った。また糖の結合位置は、HMBC において 6 位のカーボンシグナル(δ_c 167.8)とアノメリックプロトン(δ 5.80, $J = 7.7$ Hz)の間で相関が見られた事から 6-位である事が分かった。以上より **17** は sulphuretin 6-*O*- β -D-glucopyranoside(sulphurein, Fig. 2-12-18)と同定された。

上記のフラボノイド以外にフラボン欠損変異型コスモスに含まれている quercetin 3-*O*-glucoside (**6**)とチョコレートコスモスに含まれている eriodictyol *O*-glucoside (**14**)および eriodictyol 7-*O*-glucuronide(**13**)も分離同定された。

4. キバナコスモス朱色・橙色花色品種に含まれる新規アントシアニン

Cosmonidin 4'-*O*-glucoside (**18**)

18 は 0.01% HCl-MeOH 中での吸収スペクトル測定により、483 nm に Band I が、290 nm に Band II が出現したことからアントシアニンもしくは 3-デオキシアントシアニンであると推定した(Fig. 2-10-4)。また E₄₄₀/E_{max} の値は 43 %であった。AlCl₃ を添加した際に吸収極大が顕著な深色移動を生じなかった事から隣接する遊離水酸基は存在

しない事が分かった。また LC-MS 分析の結果 m/z 433 $[M+H]^+$ の分子イオンピークと m/z 271 $[M-162+H]^+$ のフラグメントイオンピークが得られた。さらに **18** と **18** のアントシアニジンそれぞれについて HR-FAB⁺-MS 解析を行ったところ、**18** では m/z 434.1230 $[M+H]^+$ の、アントシアニジンでは m/z 271.0649 $[M+H]^+$ の分子イオンピークを示した。このことから **18** は 4 つの水酸基と 1 分子の hexose を結合したアントシアニンもしくは 3-デオキシアントシアニンであると示された。そこでこれに相当するアントシアニジンである luteolinidin, pelargonidin の標品と HPLC および TLC で、**18** を加水分解して得られたアントシアニジンと比較したが、保持時間・Rf 値とも一致しなかった。また結合している糖は co-PC から glucose と同定された。

また **18** のアントシアニジンについても吸収スペクトルの測定を行ったが、0.01% HCl-MeOH 中で 494 nm (Band I) と 294 nm (Band II) に吸収極大が出現した。Band I の吸収極大が配糖体のものより 10 nm ほど長波長側に生じた事から B 環への糖の結合が示唆された。次に AlCl₃ を添加したところ配糖体と同様に顕著な深色移動は見られなかったことから **18** のアントシアニジンもまた隣接する遊離水酸基を持たない事が分かった。

以上より、**18** は隣接した水酸基を持たず、B 環が配糖化された tetrahydroxyanthocyanin monoglucoside である事が推定された。

次に **18** の構造を明らかにするために、**18** およびこれの加水分解で得られたアントシアニジンを用いて ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, NOESY, HSQC および HMBC の測定を行った。

アントシアニジンの ¹H-NMR では 7 つの芳香族プロトンのシグナルとして H-4 (δ 8.86, *d*), H-3 (δ 8.58, *d*), H-6' (δ 8.20, *d*), H-8 (δ 7.53, *s*), H-6 (δ 7.45, *s*), H-3' (δ 6.86, *d*) および H-5' (δ 6.64, *dd*) が得られた。H-3 と H-4 は apigeninidin 5-*O*-glucoside および luteolinidin 5-*O*-glucoside の ¹H-NMR データ (Swinny *et al.*, 2000; Iwashina *et al.*, 2010), H-5' と H-6' は norartocarpetin (5,7,2',4'-tetrahydroxyflavone) の ¹H-NMR データ (Ko *et al.*, 2013) を基に帰属を行った (Table 2-16)。また H-4 と H-3 は相互に COSY/NOESY 相関が見られ、結合定数も近い値を示した (Table 2-16)。さらに、H-6' は H-5' と COSY/NOESY 相関が、また H-3' とは NOESY 相関がみられた。H-8, H-6 は相互に COSY/NOESY 相関が、加えて H-6 は H-4 と NOESY 相関が見られた。また H-8 は 5-OH との COSY 相関が見られた。これらのプロトンシグナルのうち B 環上に存在するプロトンとして H-3', H-5' および H-6' が帰属された事により、この **18** は B 環の 2'-位と 4'-位に遊離の水酸基を持つアントシアニジンである事が示された。

18 のアントシアニジンの ¹³C-NMR では、**15** のカーボンシグナルが出現した。これらのうち C-3 (δ_c 116.3), C-4 (δ_c 150.5), C-6 (δ_c 111.2), C-8 (δ_c 103.3), C-3' (δ_c 104.0), C-5' (δ_c 111.5) および C-6' (δ_c 132.6) の 7 つのシグナルは HSQC をもとに帰属された。

次に HMBC では H-6 と H-8 が互いに相関がみられた事から, C-7 (δ_c 159.6) と C-9 (δ_c 149.3) が帰属された. また H-3 および H-4 との相関が見られたことから δ_c 168.4 は C-2 と帰属された. さらに H-4, H-7 および H-9 との相関が見られたことから δ_c 154.0 は C-5 と帰属された. さらに H-3 と H-8 との相関が見られたことから δ_c 119.4 は C-10 と帰属された. 加えて H-3' と H-5' との相関が見られたことから δ_c 108.8 は C-1 と帰属された. H-3' と H-6' は, δ_c 167.3 および δ_c 163.7 のそれぞれと等価な相関が見られたことから, C-2' と C-4' は相互に入れ替え可能 (interexchangeable) なカーボンとして帰属された (Fig. 2-10). 以上の結果から, **18** のアントシアニジンは 2'-hydroxyapigeninidin と同定された.

次に **18** の NMR 解析を行った. $^1\text{H-NMR}$ では 7 つの芳香族プロトンのシグナルと 7 つの糖プロトンのシグナルが出現した.

糖のプロトンシグナルはそれぞれ H-1'' (δ 5.10, *d*, $J = 7.4\text{Hz}$), H-2'' (δ 3.43, *t*), H-3'' (δ 3.47, *t*), H-4'' (δ 3.39, *t*), H-5'' (δ 3.49, *m*), H-6a'' (δ 3.84, *brd*) および H-6b'' (δ 3.69, *dd*) と帰属された. またアノメリックプロトンの結合定数から β -ピラノース型の glucose と示された.

芳香族プロトンはアントシアニジンと同様に帰属が行われた. また H-3' (δ 6.86, *brs*), H-5' (δ 6.85, *brd*) は理論上 H-3' は doublet, H-5' は double-doublet として出現するはずであるがそれぞれ broad な singlet と doublet として検出された. これは B 環の配糖化が原因であると推定された. またアノメリックプロトン H-1'' (δ 5.10, *d*) と, H-3' および H-5' の両方もしくはどちらかとの間で COSY/NOESY 相関が見られた. ここまでの結果から糖の結合位置は B 環の 2'-位もしくは 4'-位であることが示された. またアノメリックプロトンとカーボンの δ_c 165.0 との間に HMBC 相関が見られたが, このカーボンは δ_c 162.7 とともに C-2' もしくは C-4' として interexchangeable に帰属されているため, HMBC による糖の結合位置の決定は出来なかった.

次に糖の結合位置を確実に決定するために, NMR の測定条件を変更し (サンプル濃度を下げ, 測定温度を 60°C に加温, 混合係数を 100, 300, 600, 900 msec に設定) H-H NOESY の再測定を行った. その結果, 600 msec 条件において $^1\text{H-NMR}$ では H-3' (δ 6.91, *d*) および H-5' (δ 6.88, *dd*) として得られ, これらはアノメリックプロトン H-1'' (δ 5.10, *d*) との間にそれぞれ等価な NOESY 相関を持った (Fig. 2-10). このことから, 糖の結合位置は B 環の 4'-位と決定された. 以上の結果から, **18** は 2'-hydroxyapigeninidin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside と同定された (Fig. 2-14).

今回得られたアントシアニジンはこれまで報告された事のない新規の化合物であり, これを cosmonidin と命名する.

第4節 考察

1. コスモス花卉に含まれるフラボノイド

コスモス花卉に含まれるフラボノイド成分は本章の緒言でも触れた様に、アントシアニンとして cyanidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-rutinoside, peonidin 3-*O*-glucoside および peonidin 3-*O*-rutinoside, フラボンとして apigenin 7-*O*-glucoside, apigenin 7-*O*-glucuronide, luteolin 7-*O*-glucoside, luteolin 7-*O*-glucuronide および chrysoeriol 7-*O*-glucuronide が報告されている(中沖, 1935; Hayashi, 1941; Saito, 1976; 雨宮, 2012). これらのうち apigenin 7-*O*-glucuronide はコスモス花卉において特に主要なフラボノイド成分であった(雨宮, 2012). これまでの報告ではコスモスの主要なフラボノイド成分は, cosmosiin (apigenin 7-*O*-glucoside)であると考えられていた(中沖, 1935). 同報告では cosmosiin は融点不定(196-7°C, 207-8°C, 215°C)の淡黄色顆粒状結晶として分離され, 元素分析の結果, 炭素量・水素量は C = 56.43%, H = 4.44%と計測され示性式を $C_{22}H_{22}O_{11}+1\frac{1}{2}H_2O$ とする水和物であるとしていた. しかし, これは apigenin monoglucuronide の理論値(C = 56.43%, H = 4.92%)よりも apigenin monoglucuronide の理論値 (C = 56.43%, H = 4.47%)に近い. このことから cosmosiin として報告された物質は apigenin 7-*O*-glucuronide を主要物質とし, 融点不定であった事からも cosmosiin を含む複数のフラボン配糖体の混合物であったと推測される. 当時はフラボノイドのグルクロン酸配糖体の報告は, Goldschmiedt and Zerner (1910)による scutellarin (scutellarein 7-*O*-glucuronide) および Shibata *et al.* (1923)による baicalin (baicalein 7-*O*-glucuronide)のみで非常に稀であった. またフラボン欠損変異型コスモスには, これらのフラボン配糖体は一切含まれないことが知られている(佐俣ら, 1983).

本研究により, フラボン欠損変異型コスモスにはジヒドロフラボノールとして taxifolin 3-*O*-glucoside (1)や taxifolin 3-*O*-galactoside (2), aromadendrin 7-*O*-glucoside (3), aromadendrin 3-*O*-glucoside (4), フラバノンとして eriodictyol 7-*O*-glucoside (5), フラボノールとして quercetin 3-*O*-glucoside (6)や quercetin 3-*O*-rutinoside (7)が蓄積されている事が明らかになった. これらの物質はいずれもコスモス属では初の報告であった. 中でも taxifolin 3-*O*-glucoside (1)はヨーロッパナ (*Fagus sylvatica*)やヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)などの葉で報告されているが (Dübeler *et al.*, 1997; Sakushima *et al.*, 2002), 花からの報告はない. 同じく taxifolin 3-*O*-galactoside はツツジの仲間 (*Rhododendron speciosum*)の葉から, aromadendrin 7-*O*-glucoside はサクラソウの仲間 (*Primula sinensis*)から, aromadendrin 3-*O*-glucoside はタチアオイ (*Althaea rosea*)から, そして eriodictyol 7-*O*-glucoside は栽培ギク (*Chrysanthemum morifolium*)の花から報告されている (Harborne and Sherratt, 1961; 小原, 1964; Lin and Harnly, 2010).

2. チョコレートコスモス花卉に蓄積するフラボノイド

チョコレートコスモスに蓄積するフラボノイドは本研究で初めて報告された。園芸品種のチョコモカおよびルージュールージュの花弁には、アントシアニンとして cyanidin 3-*O*-glucoside (8) や cyanidin 3-*O*-rutinoside (9), cyanidin 3-*O*-malonylglucoside (10), pelargonidin 3-*O*-glucoside (11), pelargonidin 3-*O*-rutinoside (12)が、フラバノンとして eriodictyol 7-*O*-glucoside (5)や eriodictyol 7-*O*-glucuronide (13)が含まれる事が明らかになった。これらのうち pelargonidin 骨格のアントシアニン (11 および 12) および、有機酸が結合したアントシアニン(10) はチョコモカ品種からのみ単離された。これらのアントシアニンはいずれも多くは植物の花から報告されており、特にマロン酸が結合した cyanidin 3-*O*-malonylglucoside は栽培ギクの赤色品種の主要なアントシアニンとして報告されている(Nakayama *et al.*, 1997)。Eriodictyol 7-*O*-glucuronide (13) についてはキク属植物 (*Chrysanthemum* spp.)やエゾヨモギギク (*Tanacetum vulgare*)といった一部のキク科植物からのみ報告されている(Uehara *et al.*, 2012, 2015)。一方で2種類の cyanidin 配糖体(8 および 9), およびフラバノンの eriodictyol 7-*O*-glucoside (5)はコスモスと共通の成分として得られた。

3. キバナコスモス花卉に蓄積するフラボノイド

キバナコスモスの園芸品種からは以下のフラボノイド、すなわち 3-デオキシアントシアニンとして cosmonidin 4'-*O*-glucoside (18), フラバノンとして eriodictyol *O*-glucoside (14)と eriodictyol 7-*O*-glucuronide (13), フラボノールとして quercetin 3-*O*-glucoside (6), フラボンとして luteolin 7-*O*-glucuronide (15), カルコンとして butein 4'-*O*-glucoside (16), さらにオーロンとして sulfuretin 6-*O*-glucoside (17)が分離・同定された。これらのうち butein 4'-*O*-glucoside と sulfuretin 6-*O*-glucoside はすでにキバナコスモスから報告されている (Shimokoriyama and Hattori, 1953)。しかしその他のフラボノイド成分はいずれもキバナコスモスからは初の報告であった。このうち、3-デオキシアントシアニンの cosmonidin 4'-*O*-glucoside (18)は自然界における新規の化合物である。これまで自然界でアントシアニンは約 650 種類、アントシアニジンは 31 種類の報告があるが (Andersen and Markham, 2006), 18 は配糖体・アグリコン共に新規の化合物である。特に 2'-位が水酸化されることは極めてまれで、アントシアニンにおいて初めての 2'-位の水酸化の報告となった。一方で eriodictyol *O*-glucoside と eriodictyol 7-*O*-glucuronide はチョコレートコスモスと、quercetin 3-*O*-glucoside および luteolin 7-*O*-glucuronide はコスモスと共通の成分であった。

スモスの変異体を育種元としている。この変異体を自家受粉させた後、同系交配を繰り返し、さらに白色系統との交配によりアントシアニン蓄積のない個体を選抜し、約30年をかけて安定した黄色発現をもつ品種として作出された。この黄色発現は複数の遺伝子座により制御されていると考えられているが、このうちの一つであるカルコン3-ヒドロキシラーゼ遺伝子(*CH3H*)が単離されている(渡辺・肥塚, 未発表)。

この様にコスモスは長年の育種により様々な品種が作出されている。そして、これらの多彩な花色発現はフラボノイド合成系遺伝子の変異により起こっていることが遺伝学・遺伝子工学的な研究により明らかにされてきた。しかし、これら遺伝子の変異による発現物質についての報告はない。本章では各花色品種・系統の HPLC クロマトグラムによる色素成分の比較、花卉粗抽出物のスペクトル比較による花色の評価をおこなうと共に、特に多様な色調を示す赤色系コスモスについては、色素の定量的な解析および、雨宮(2012)で行われたスモーキーピンク変異体の花色の再構築実験のデータを基に、これらの花色の多彩化の原因を化学的に追及する。

第 2 節 材料及び方法

1. 供試材料(Fig. 3-1)

赤色系統

ピンク花色：センセーションピンキー品種 (CbP)

スモーキーピンク花色：スモーキーピンク育成系統 (CbSp)

クリムソン花色：クリムソンドズラ品種 (CbC)

ディープレッド花色：ディープレッドキャンパス品種 (CbDr)

白色系統

ピュアホワイト品種 (CbW)

黄色系統

イエローキャンパス品種 (CbYc)

イエローガーデン品種 (CbYg)

材料はいずれも玉川大学圃場で栽培されているものを供試した。

2. 定量分析

① 定量用試料の作製

HPLC による色素成分の比較・定量のために試料を作成した。新鮮花弁 0.1 g あたり 1.0 ml の抽出溶媒(HCOOH/MeCN/H₂O = 8:20:72)で、一晚抽出し、抽出液をシリンジ(ツベルクリン用 1 ml)と前処理カートリッジ(マイシヨリディスク H-13-5, 東ソー株式会社)で濾過した。

② HPLC 分析

定量サンプルの解析と基準標品との比較のために HPLC 分析を行った。分析には以下の装置を用いた。

ポンプ：島津製作所製 LC-20AD

検出器：島津製作所製 SPD-M20A

カラムオーブン：島津製作所製 CTO-20A

カラム(アントシアニン): 株式会社ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-4 (6.0 mm I. D. × 150 mm)

カラム(その他のフラボノイド): 化学物質評価研究機構(CERI)製 L-column 2 ODS (6.0 mm I. D. × 150 mm)

移動層(アントシアニン)：H₃PO₄/HOAc/MeCN/H₂O = 3:8:10:79

移動層(その他のフラボノイド)：H₃PO₄/MeCN/H₂O = 0.2:20:80

試料の注入量：10 μl

流速・プログラム(アントシアニン)：1.0 ml / min を 20 分間

流速・プログラム(その他のフラボノイド): 1.0 ml / min を 20 分間, 20 分以降 2.0 ml / min

検出波長: アントシアニンは 530 nm, フラボンは 350 nm, フラバノン・ジヒドロフラボノールは 280 nm で測定

3. 花卉粗抽出物のスペクトル測定

花卉粗抽出物をリン酸・クエン酸バッファー(pH 5.2)に溶解し, 可視吸収スペクトルの測定を行った. 測定には島津 MPS-2000 spectrophotometer を使い, 測定波長は 350~700 nm とした.

第 3 節 結果

1. 定量分析

定量分析の結果、赤色系統の CbP, CbSp, CbC および CbDr には Hayashi(1941)および雨宮 (2012)により報告された 4 種類のアントシアニン, cyanidin 3-*O*-glucoside(A1), cyanidin 3-*O*-rutinoside(A2), peonidin 3-*O*-glucoside(A3)および peonidin 3-*O*-rutinoside(A4)が蓄積していた(Fig. 3-3). 総アントシアニン量は CbP と CbSp はほぼ等量であったが, CbC と CbDr は CbP に対しそれぞれ 5 倍および 11 倍の蓄積が見られた(Table 3-1).

赤色系統の CbP と CbC, 白色系統の CbW, および黄色系統の CbYc と CbYg からは過去の報告(中沖, 1935; Hayashi, 1941; Saito, 1976; 雨宮, 2012)にあった 5 種類のフラボン luteolin 7-*O*-glucoside(F1), luteolin 7-*O*-glucuronide(F2), apigenin 7-*O*-glucoside(F3), apigenin 7-*O*-glucuronide(F4) および chrysoeriol 7-*O*-glucuronide(F5)の蓄積が見られた(Fig. 3-4). これらフラボンの総蓄積量を比較したところ CbC は CbP の半量程度の蓄積しか見られなかった(Table 3-2). またフラボンの種類ごとの蓄積量の比率としては apigenin 7-*O*-glucuronide (F4)が最も主要であり CbP では総フラボン量の 80%, CbC では 70%を占めていた. 一方で赤色系統の CbSp と CbDr にはフラボンの蓄積は見られなかった. また黄色系統の CbYc と CbYg ではこれらのフラボンに加え, カルコンの butein 4'-*O*-glucoside(16)が蓄積していた(Fig. 3-5). カルコン蓄積量は両品種で異なり, CbYc では CbYg の 1.8 倍ほどであった(Table 3-3). またフラボン蓄積量に関しても CbYg は CbYc の半量程度の蓄積であった. また白色系統である CbW では上記 5 種類のフラボン以外のフラボノイドの蓄積は見られなかった.

2. 花卉粗抽出物のスペクトル測定

花卉粗抽出物のスペクトルを測定したところ, 赤色系統の CbP, CbC, および白色系統の CbW, そして黄色系統の CbYc, CbYg では 400 nm よりも短波長側の紫外域に強い吸収が見られた. また黄色系統の CbYc, CbYg では紫外域の吸収に吸収極大があるが, 400 nm より長波長側の可視域(400~450 nm)にも吸収がある. 赤色系統についても可視域に吸収極大, すなわち CbP では 547 nm, CbC では 537 nm, CbSp では 525 nm, CbDr では 530 nm が存在した(Fig. 3-2).

3. *in vitro* での花色の再構築

雨宮(2012)において, 赤色系統の CbP および CbSp 花卉中において主要なアントシアニンである cyanidin 3-*O*-rutinoside, peonidin 3-*O*-rutinoside および CbP 花卉中

で主要なフラボンである apigenin 7-*O*-glucuronide の濃度がそれぞれ定量され、CbP 花弁中には 0.068 mM の cyanidin 3-*O*-rutinoside, 0.065 mM の peonidin 3-*O*-rutinoside および 3.23 mM の apigenin 7-*O*-glucuronide が含まれることが分かった。これはアントシアニン：フラボンのモル比では 1:24 となる。また CbSp 花弁中にはフラボンは含まれず cyanidin 3-*O*-rutinoside が 0.13 mM 含まれていた。これらを花弁中の pH 5.2 に調製したリン酸・クエン酸バッファーに溶解し得られた吸収スペクトルを Fig. 3-6 に示した。アントシアニンのみを用いた CbSp 花色再構築区では 524 nm に極大を示したが、フラボンを加えた CbP 再構築区では 552 nm に極大が得られ、フラボンが存在することにより、明らかに吸収スペクトルが長波長側に移動することが示された。

第4節 考察

1. コスモス各花色系統の構成成分について

コスモスの花色発現は赤色，白色，黄色の各花色系統ごとに吸収スペクトルと色素成分の組成に相関が見られた。

①赤色花系統

赤色花系統各品種の吸収スペクトルは，紫外域に加えて，アントシアニンの蓄積により可視域(525~547 nm)に吸収極大を生じると言う特徴が見られた。このアントシアニン量の多寡により花色の濃淡が生じていると考えられた。赤色系統におけるコピグメント効果による花色の多彩化については次項で考察する。

②白色花系統

白色花系統の CbW は吸収スペクトルの測定から，紫外域にはフラボン蓄積による強い吸収がある事が分かったが，可視域に吸収を持つアントシアニンのようなフラボノイドの蓄積がないために色がなく，白色が発現されている事が分かった。

③黄色花系統

黄色花系統である CbYc と CbYg は白色花系統と同様にフラボン蓄積による紫外域の強い吸収に加えて，450 nm 付近にも吸収があるという特徴が見られた。これはカルコンの蓄積によるものである。

2. コスモス赤色系統におけるコピグメント効果の有無による花色の多彩化

花の色においてフラボンやフラボノール等のほぼ無色の物質(補助色素；コピグメント)による有色色素(色素；ピグメント)であるアントシアニンの深色化・安定化に関しては，特に青色の発現に関して多く報告されている。ダッチアイリスではアントシアニンの delphinidin 3-O-[(4'''-p-coumaroylrhamnoside)-(1 → 6)-glucoside]-5-O-glucoside(violanin) に対するコピグメントであるフラボン(swertisin 2''-O-(4'''-acetylramnoside)の量比が増加するほどに花色の深色化・青色化が起こる事が明らかになっている(Mizuno *et al.*, 2013)。赤色～ピンク色の花色におけるコピグメンテーションの再構築は，Asen *et al.* (1971)により赤色のアザレア園芸品種を用いた報告があり，この際のコピグメントにはフラボノールの quercetin 3-O-rhamnoside を用いて行われ，同じくコピグメントの量比を増加させるほど吸収極大が長波長側に移動する事が示された。

定量分析から，本研究で用いた赤色系統コスモスのうち，ピンク花色コスモスである CbP と，フラボン欠損系統であるスモーキーピンク花色の CbSp の総アントシアニン量は，CbSp が CbP の 1.2 倍とやや高い蓄積が見られた。しかし佐俣ら(1983)によるハンター Lab を用いた評価では，CbSp に当たるスモーキーピンク花色は，CbP に当たるピンク花色に比べ青色味(*b*)，赤色味(*a*)ともに低い値を示すことが示されてい

る(Fig. 3-7). さらに花卉粗抽出物のスペクトルに関しても CbP と CbSp では吸収極大に 21 nm ほどの差が見られた(Fig. 3-2). また雨宮(2012)における *in vitro* 再構築実験の結果から, フラボンの apigenin 7-*O*-glucuronide による CbP 花卉中でのコピグメント作用が示された(Fig. 3-6). これらの結果から, CbSp と CbP の花色の差はフラボン欠損によりコピグメント物質を欠失することにより生じている事が示された.

このようなコピグメントの欠失による花色変化はダイズのフラボノール合成酵素遺伝子変異系統(*wm*)から報告されており, *wm* のダイズでは通常の花紫色系統で蓄積する kaempferol 3-*O*-gentiobioside がほとんど欠失することにより花色がマゼンタに変化することが報告されている (Takahashi *et al.*, 2007, 2010).

また, CbC は CbP の粗抽出物のスペクトルと比較して, 吸収極大が 10 nm ほど低波長側にあった. これは CbC が CbP と比較して 5 倍のアントシアニンを蓄積することにより赤色が発現されているが, 総フラボン量が半減することにより, pigment に対するコピグメントの量比が少なくなりコピグメント効果が弱まっていると考えられた. これは佐俣ら(1983)によるハンター *Lab* 評価の数値にも表れており CbC にあたるクリムソン花色は CbP に当たるピンク花色に比べ赤色味(*a*)の値は高いが, 青色味(*b*)の値は低くなっている. また CbDr の濃赤色花色は CbP と比較して 11 倍のアントシアニンを蓄積する事により発現されていると考えられたが, これに加え CbSp と同様にフラボンを蓄積しない事により CbDr もまたコピグメント効果を失っていると考えられた. これについてもハンター *Lab* 評価の数値に表れており, CbDr にあたるディープレッド花色はほとんど青色味を持たない(*b*>0)ことが示されている(Fig. 3-7)

第4章 チョコレートコスモス(*Cosmos atrosanguineus*)の花色の多彩化と評価

第1節 緒言

チョコレートコスモスは本来、その野生型の花色は黒色であると言われている。また自生地であるメキシコでは1970年代に野生絶滅しており、現存する *Cosmos atrosanguineus* の園芸品種は、イギリスのキュー王立植物園に存在した1個体をもとに挿し木繁殖されたものを基にしている(Hind and Fay, 2003)。近年では園芸家の奥隆善氏によりキバナコスモスとの種間交雑品種が作出されている(Mii, 2009)。これらは従来の黒色よりも赤味や黄色味を帯びた花色を示し、一般にルージュシリーズとして販売されている。

顕花植物における黒色花は、園芸品種ではチューリップ(*Tulipa gesneriana*)、ビオラ(*Viola tricolor*)、タチアオイ、ダリア(*Dahlia variabilis*)、野生種ではクロユリ(*Fritillaria camtschaticensis*)、オキナグサ(*Pulsatilla cernua*)などに見られる。これら花の黒色化の機構として、オキナグサではアントシアニン以外のフラボノイドの蓄積量は少ない事が報告されている(Yoshitama *et al.*, 1998)。トルコギキョウの仲間(*Lisianthus nigrescens*)ではアントシアニン以外のフラボノイドはほとんど蓄積せず、2種類のアントシアニン(delphinidin 3-*O*-robinobioside および 3-*O*-robinobioside-5-*O*-glucoside)が乾燥花卉の24%を占めるほど多量に蓄積する事が報告されている(Markham *et al.*, 2004)。これらに対して、タチアオイでは、黒色花と紫色花の比較により花色の濃色化にともなってアントシアニンだけでなくその他のフラボノイドの蓄積量もまた増加する事が報告されている(Hosaka *et al.*, 2012)。

本章ではチョコレートコスモスの園芸品種であるチョコモカならびにチョコレートコスモスとキバナコスモスとの交雑種(*C. atrosanguineus* × *sulphureus*)の園芸品種であるノエルルージュ、ルージュルージュ、フォルテルージュおよびブラウンルージュ品種を用い、これらの花色の発現、および黒色化の機構を解析する。

第 2 節 材料及び方法

1. 供試材料(Fig. 4-1)

チョコモカ品種 (CaCm)

ノエルルージュ品種 (CaNr)

ルージュルージュ品種 (CaRr)

フォルテルージュ品種 (CaFr)

ブラウンルージュ品種 (CaBr)

これらのうち CaCm はチョコレートコスモスの, その他の 4 品種は *C. atrosanguineus* × *sulphureus* の園芸品種である. いずれの品種も有限会社園芸茶房より植物体を購入した.

2. 定量分析

① 定量用試料の作製

HPLC による色素成分の比較・定量のために試料を作成した. 新鮮花弁 0.05 g あたり 1.0 ml の溶媒(HCOOH/MeCN/H₂O = 8:20:72)で一晩抽出し, 抽出液をシリンジ 1 ml(ツベルクリン用)で, 前処理カートリッジに通して濾過した.

② HPLC 分析

定量サンプルの解析と基準標品との比較のために HPLC 分析を行った. 分析には以下の装置を用いた.

ポンプ: 島津製作所製 LC-20AD

検出器: 島津製作所製 SPD-M20A

カラムオーブン: 島津製作所製 CTO-20A

カラム(アントシアニン): 株式会社ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-4 (6.0 mm I. D. × 150 mm)

カラム(カルコン): 化学物質評価研究機構(CERI)製 L-column 2 ODS (6.0 mm I. D. × 150 mm)

移動層(アントシアニン): H₃PO₄/HOAc/MeCN/H₂O = 3:8:10:79

移動層(カルコン): H₃PO₄/MeCN/H₂O = 0.2:20:80

試料の注入量: 5 μl

流速・プログラム(アントシアニン): 1.0 ml / min を 20 分間

流速・プログラム(カルコン): 1.0 ml / min を 20 分間, 20 分以降 2.0 ml / min

検出波長: アントシアニンは 530 nm, カルコンは 380 nm で測定

3. 花色の測定・評価

花色の評価には RHSCC(英国王立園芸協会カラーチャート)を用いた.

また花卉粗抽出物をリン酸・クエン酸バッファー(pH 5.1)に溶解し, 可視吸収スペクトルの測定を行った. 測定には島津 MPS-2000 spectrophotometer を用い, 測定波長は 350~700 nm とした.

第3節 結果

1. 花色の測定・評価

RHSCC による花色評価の結果, CaCm は‘Black 203-B’, CaBr は‘Greyed-Purple 187-A’, CaFr は‘Red 53-A’, CaRr は‘Red-Purple 61-B’, CaNr は‘Red 40-A’と評価された.

また花卉粗抽出物の可視吸収スペクトル測定の結果, CaCm, CaBr, CaFr, CaRr の4品種はいずれも 527 nm~529 nm の間に吸収極大を1つ持つ事が分かった. CaNr は 530 nm および 371 nm に2つの吸収極大を持った(Fig. 4-2).

2. 定量分析

5品種のチョコレートコスモスの花卉粗抽出物をチョコレートコスモス花卉およびキバナコスモス花卉から得られた標品と比較したところ, CaCm では3種類のアントシアニン(8-10)に加えて微量の2種類のアントシアニン(11, 12)が得られ(Fig. 4-3), CaBr, CaFr, CaRr および CaNr ではアントシアニン2種類(8, 9)に加えフラバノン3種類(5, 13, 14)そしてカルコン1種類(16)の存在が示された(Fig. 4-4,5). これらのうち, 可視域に吸収を持つ主要なアントシアニン3成分とカルコンに着目し, それぞれの総蓄積量を解析した.

その結果, CaCm, CaBr, などでは花卉1g当たり1.8~2.4mgのアントシアニンを蓄積する事が明らかになった (Table 4-1). またカルコン蓄積に関しては, CaNr で花卉1g当たり0.5mgほどの蓄積が見られたが, CaBr, CaFr, CaRr での蓄積はごく微量であった. また CaCm にはカルコンは蓄積していなかった(Table 4-2).

第4節 考察

1. チョコレートコスモスの黒色化の機構

頭花植物における黒色化の機構は、ダリア、オキナグサや *Lisianthus nigrescens* で報告されているアントシアニン以外のフラボノイドの蓄積量が抑制される機構や (Deguchi *et al.*, 2013; Yoshitama *et al.*, 1998; Markham *et al.*, 2004), タチアオイで報告されたアントシアニンを含む総フラボノイド蓄積量が増加する発色機構などが知られている (Hosaka *et al.*, 2012).

本研究では黒色花の CaCm ではアントシアニン以外のフラボノイドをほとんど蓄積しないことが明らかになった (Fig. 4-4,5). また、黒色花の CaBr や濃赤色花の CaFr, CaRr では CaNr に比べてカルコン蓄積量が抑制されていた (Table 4-2). 以上よりチョコレートコスモスは、ダリアやオキナグサ、*Lisianthus nigrescens* などと類似した黒色花機構を持つと考えられた.

2. キバナコスモスとの種間雑種形成によるチョコレートコスモス花色の多彩化

定量 HPLC により総アントシアニン蓄積量を比較したところ、RHSCC により 'Black' と評価された CaCm と、'Greyed-Purple' の CaBr では、'Red' である CaNr に比べ 3~4 倍のアントシアニンの蓄積が見られた (Table 4-1). 一方カルコン蓄積量は、CaNr が最も高く、'Red-Purple' の CaRr, 'Red' の CaFr, CaBr と比較して 10~77 倍のカルコンを蓄積している事が分かった (Table 4-2). また、CaCm にはカルコン蓄積は見られなかった事からも、チョコレートコスモス園芸品種におけるカルコン蓄積はキバナコスモス由来である事が分かった.

これらのアントシアニン・カルコン蓄積の品種間の差異は花卉粗抽出物のスペクトルにも現れており、CaNr を除く 4 品種では 527 nm~529 nm の間に一つの吸収極大を持っていたことからこれらの 4 品種の花色発現は単純にアントシアニン蓄積量の多寡により制御されていることが考えられた. これに対し、CaNr では 530 nm と 371 nm に 2 つの極大を持つ事から、CaNr の花色は多量のアントシアニン蓄積に加えてカルコン蓄積により発現されていると考えられた.

第 5 章 キバナコスモス(*Cosmos sulphureus*)の花色発現と多彩化

第 1 節 緒言

キバナコスモスの花色や色素に関する研究報告は少なく，色素に関しては第 2 章でも触れたが，Shimokoriyama and Hattori (1953)および Geissman (1942)により黄色成分であるカルコンの butein 4'-*O*-glucoside とオーロンの sulphuretin 6-*O*-glucoside が報告されているのみである．花色の評価に関しては，Yokoi (1975)によりキバナコスモス 5 品種(オレンジフレア，ゴールドクレスト，ブライトライト，サンセット，ディアボロ)を用いて，RHSCC による花色評価と TLC 上でのフラボノイド成分の有無に関する比較が行われている．いずれの研究も 40 年以上も前に行われたものであり，色素成分の詳細と花色発現の関係は明らかになっていなかった．第 2 章でキバナコスモスの花弁中の色素成分を分析した結果，既報のカルコンとオーロンに加え，新規の 3-デオキシアントシアニンや 2 種類のジヒドロフラボノール，フラボノールやフラボンなど様々なフラボノイドを得ることが出来た．中でも 3-デオキシアントシアニンは可視域に吸収をもつことから花色に影響を与えていると考えられ，キバナコスモスの花色評価は再検討の必要がある．

本章では，キバナコスモスの園芸品種複数を用いて，その花色の評価と色素成分の定量解析を行う事により，キバナコスモスの花色発現とその多様性の原因を明らかにする．

第 2 節 材料及び方法

1. 供試材料(Fig. 5-1)

リマラレモン (CsLL)

サンライズ (CsSun)

ドワーフイエロー (CsDy)

コスミックイエロー (CsCy)

カーペットゴールド (CsCg)

マンダリン (CsMn)

コスミックオレンジ (CsCo)

オレンジフレア (CsOf)

サンセット (CsSs)

コスミックレッド (CsCr)

CsLL, CsCy, CsCo および CsCr はエム・アンド・ビー・フローラから, CsSun と CsMn はサカタのタネから, CsDy と CsOf タキイ種苗から, CsCg と CsSs はムラカミシードからそれぞれ販売されている種子を購入し, 独立行政法人国立科学博物館筑波実験植物園の管理圃場で栽培した.

2. 定量分析

① 定量用試料の作製

HPLC による色素成分の比較・定量のために試料を作成した. 新鮮花卉 0.1 g あたり 1.0 ml の抽出溶媒(HCOOH/MeCN/H₂O = 8:20:72)で一晩抽出した. 抽出液をテルモシリレンジ(ツベルクリン用 1 ml)で前処理カートリッジに通して濾過した.

② HPLC 分析

定量サンプルの解析と基準標品との比較のために HPLC 分析を行った. 分析には以下の装置を用いた.

ポンプ: 島津製作所製 LC-20AD

検出器: 島津製作所製 SPD-M20A

カラムオーブン: 島津製作所製 CTO-20A

カラム(アントシアニン): 株式会社ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-4 (6.0 mm I. D. × 150 mm)

カラム(その他フラボノイド): 化学物質評価研究機構(CERI)製 L-column 2 ODS (6.0 mm I. D. × 150 mm)

移動層(アントシアニン): H₃PO₄/HOAc/MeCN/H₂O = 3:8:10:79

移動層(その他フラボノイド): H₃PO₄/MeCN/H₂O = 0.2:20:80

試料の注入量：10 μ l

流速・プログラム(アントシアニン)：1.0 ml / min を 20 分間

流速・プログラム(その他フラボノイド)：1.0 ml / min を 20 分間，20 分以降 2.0 ml / min

検出波長：アントシアニンは 530 nm，3-デオキシアントシアニンは 480 nm，フラボン・フラボノールは 350 nm，フラバノン・ジヒドロフラボノールは 280 nm，カルコン・オーロンは 380 nm で測定

3. 花色の測定・評価

花色の評価には RHSCC(英国王立園芸協会カラーチャート)を用いた。これに加えて色彩色差計(COLOR READER CR-10; KONICA MINOLTA 製)による花色の測定を行い，CIE $L^*a^*b^*$ 表色系を用いた花色の評価も行った。基準色には X-rite 製 Mini ColorChecker を用いた。

① 基準色設定

明るい屋内で CR-10 の測定部を上にして，平らな机等の上に置き，ColorChecker の white を基準色として測定する。

② 試料の測定

花卉を 2 枚重ねて CR-10 の測定部に乗せ，さらにその上に付属の保護キャップで覆い，花色を測定する。1 試料につき 3 反復測定を行う。

③ 花色の評価

花色の評価には CIE $L^*a^*b^*$ 表色系を用いた。これらは L^* 値は明度， a^* 値は赤色味， b^* 値は青色味として表される。これらに加えて， C^* (彩度)， h (色相)を以下の式を基に算出した(Gonnet, 1995, 1998)。

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}, \quad h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

4. 花卉粗抽出物のスペクトル測定

花卉粗抽出物を乾涸後，リン酸・クエン酸バッファー(pH 5.2)に溶解し，可視吸収スペクトルの測定を行った。測定には島津 MPS-2000 spectrophotometer を用い，測定波長は 350~700 nm とした。

5. 花卉中のカロテノイドの測定

① 花卉の石油エーテル抽出物のスペクトル測定

試料が入手できなかった一品種(CsSs)を除き，花卉中のカロテノイド量の測定のために生花卉の石油エーテル抽出物のスペクトルを測定した。生花卉 0.5 g に対して石油エーテル 10 ml を加え，抽出効率を上げるために石油エーテル中でガラス棒を用い

花卉を押し潰し、一晚抽出した。翌日、抽出液の上澄みの吸収スペクトルを測定した。測定には島津 MPS-2000 spectrophotometer を用い、測定波長は 220~700 nm とした。

②カロテノイドの呈色反応

花卉の石油エーテル抽出物中にカロテノイドが含まれているか調べるため濃硫酸を加えた際の呈色を観察した。これはカロテノイドのポリエン構造中の二重結合の個数に応じて起こる特有の呈色を利用したものであり、林(1980)の方法をもとに、石油エーテル抽出物中に少量の濃硫酸を静かに加えた際の溶液との境界面および硫酸層の呈色を観察した。

第3節 結果

1. 定量分析

キバナコスモスからは有色色素として 3-デオキシアントシアニンの *cosmonidin 4'-O-glucoside* (18), フラボノールの *quercetin 3-O-glucoside* (6), カルコンの *butein 4'-O-glucoside* (16) およびオーロンである *sulfuretin 6-O-glucoside* (17), 無色色素としてフラボンの *luteolin 7-O-glucuronide* (15), フラバノンの *eriodictyol O-glucoside* (14) と *eriodictyol 7-O-glucuronide* (13) がそれぞれ同定されている(第2章参照). これらのうち, 各品種を通じて比較的含有量の多い 3-デオキシアントシアニンの 18 とカルコン, オーロンである 16 および 17 (Fig. 5-2,3) について定量を行った.

その結果, 16 と 17 の含有量は CsLL を基準とした際の品種間の比較では CsMn や CsOf では 1.7 倍ほどの蓄積が見られた(Table 5-1).

18 は CsLL, CsSun, CsDy, CsCg および CsCy の 5 品種では少量の蓄積しか見られなかったが, CsCo, CsMn, CsOf, CsCr および CsSs の 5 品種では CsLL と比較して 180~400 倍ほどの蓄積が見られた(Table 5-2).

2. 花色の測定

RHSCC による花色評価の結果, CsLL, CsSun および CsDy は 'Yellow 9-A', CsCg と CsCy は 'Yellow 14-A', CsOf, CsCo と CsMn は 'Orange N25-C', CsCr は 'Orange-red N30-A', CsSs は 'Orange-red N30-B' と評価された. 色彩色差計による花色の測定結果は Table 5-3 に示した.

3. 花卉粗抽出物の吸収スペクトル測定

花卉粗抽出物の吸収スペクトル測定の結果, いずれの品種においても 400 nm 前後から短波長側にかけて強い吸収が見られた(Fig. 5-4). これに加えて, CsCo, CsMn および CsOf では 489~496 nm 付近に, CsCr と CsSs では 500~520 nm に吸収が見られた(Fig. 5-4).

4. 花卉石油エーテル抽出物の吸収スペクトル測定

新鮮花卉の石油エーテル抽出物の吸収スペクトル測定の結果, いずれの品種でも 470, 442, 420, 339, 320, 270 nm に吸収極大をもつ物質の蓄積が確認された(Fig. 5-4). この物質に関しては石油エーテル溶液中に少量の濃硫酸を加えた際に赤色の呈色が起こったことからカロテノイドであることが示された. また CsLL, CsSun および CsDy ではこれらのうち, 470, 442, 420 nm に極大をもつカロテノイドの吸光度が他の品種に比べ低い事が観察された(Fig. 5-4).

第4節 考察

1. キバナコスモスの花色の多彩化に関与するアントシアニン, 3-デオキシアントシアニン, カルコン, オーロンおよびカロテノイド

本研究においてキバナコスモス 10 品種の花色は CIE $L^*a^*b^*$ 表色系の a^* 値と b^* 値をもとに 4 つの花色グループに分ける事が出来た (Fig. 5-5). これらのグループ分けは RHSCC による評価とも対応していた, すなわち CsLL, CsSun および CsDy の 3 品種により構成される Yellow 9 グループ, CsCy と CsCg の 2 品種により構成される Yellow 14 グループ, CsMn, CsCo および CsOf の 3 品種により構成される Orange N25 グループ, CsSs と CsCr の 2 品種により構成される Orange-red N30 グループの 4 グループである. これらの花色発現のメカニズムはフラボノイドの定量解析, および花卉抽出物の吸収スペクトルの比較から明らかにされた.

①. Yellow 9 グループ (CsLL, CsSun および CsDy)

この花色グループは RHSCC による評価ではいずれの品種も 'Yellow 9-A' と評価された. また花卉の石油エーテル抽出物の吸収スペクトルから, 可視光域に吸収を持つカロテノイドの蓄積量が他のグループに比べて少ない事が分かった. さらに HPLC による定量分析から 3-デオキシアントシアニンをほとんど含まない事が分かった. 以上より Yellow 9 グループに含まれる品種はカルコンとオーロンとカロテノイドによって花色が発現されていると考えられた.

②. Yellow 14 グループ (CsCy と CsCg)

この花色グループは, RHSCC では Yellow 9 グループよりも濃色である 'Yellow 14-A' と評価された. これは色彩色差計の測定数値にも表れており, Yellow 9 グループの a^* 値が 3~4 程度であるのに対して Yellow 14 グループは 20~22 を示し, より赤色味が強い事が示された. 定量分析の結果, Yellow 9 と Yellow 14 グループでは各種フラボノイドの量的・質的な違いは見られなかった. しかし, 花卉の石油エーテル抽出物の吸収スペクトルを測定したところ, Yellow 14 グループには, Yellow 9 グループの 7 倍ほどのカロテノイド蓄積が見られた. 今回, これらのカロテノイド成分そのものの同定には到らなかったが, Yellow 14 グループの花色発現はカルコンとオーロンの蓄積に加え, Yellow 9 グループよりも多いカロテノイドの蓄積により行われている事が明らかになった.

③. Orange N25 グループ (CsMn, CsCo および CsOf)

この花色グループは, RHSCC ではいずれも 'Orange N25-C' と評価された. 色彩色差計による色評価では b^* 値は上記の Yellow 9・Yellow 14 グループと大きな差は見られなかったが, a^* 値は 47~49 ほどの高い値を示した. 粗抽出物の吸収スペクトルに関しては Yellow 9・Yellow 14 グループと同様のカルコンとオーロンによる吸収に加えて 3-デオキシアントシアニンによる吸収が見られた. さらに可視光域のカロテノイド

蓄積に関しては，Yellow 14 グループと同程度の蓄積が見られた．

以上より，Orange N25 グループはカルコン，オーロン，3-デオキシアントシアニンおよびカロテノイドにより花色が発現されている事が分かった．

④. Orange-red N30 グループ(CsSs と CsCr)

この花色グループは RHSCC では‘Orange-red N30’グループとしていずれも評価された．このグループは CIE $L^*a^*b^*$ 表色系による評価においても他グループと比べ a^* 値が顕著に高く，それに伴い b^* 値と L^* 値も低く測定された．

Orange-red N30 グループのフラボノイド組成は，定量解析の結果，Orange N25 グループのものに加えアントシアニンの蓄積が見られた．粗抽出物の吸収スペクトルにもアントシアニンによる吸収が見られた．

以上よりこのグループでは，カルコン，オーロン，3-デオキシアントシアニンおよびカロテノイドに加えてアントシアニンにより花色が発現されている事が示された．

第6章 総合考察

花卉園芸植物において花色とは、開花期や花形、花径、草丈などとならび育種における重要な選抜指標の1つであり、品種登録時の品種特性としても必須の記載事項の一つである。そのため花卉園芸植物にとって、花色の多彩化は園芸植物としての価値を直接的に高める事の出来る要素として非常に重要である。コスモス属の園芸植物としてはコスモス(*Cosmos bipinnatus*), チョコレートコスモス(*C. atrosanguineus*), キバナコスモス(*C. sulphureus*)の3種を基本とする園芸品種が広く知られている。これらの花色はコスモスはピンクから赤、濃赤、白、黄色など、キバナコスモスは黄から橙、橙赤色など、チョコレートコスモスは赤から濃赤、黒色など多彩である。本論文では、これら多彩な花色を持つコスモス属の園芸品種を用い、花に含まれる色素成分と、花色発現の機構を調査した。先行研究(中沖, 1935; Hayashi, 1941; Saito, 1976; 雨宮, 2012)から、コスモスからは、赤色系花色において主要なアントシアニン4種類とフラボン5種類が同定されている。キバナコスモスからは Shimokoriyama and Hattori (1953)および Geissman (1942)により黄色系花色の主要成分であるカルコンとオーロンが1種類ずつ報告されている。またチョコレートコスモスからの色素成分の報告はこれまでない。

本論文の第2章では、コスモスにおいて本来主要な成分であるフラボンを一切含まないフラボン欠損変異型の園芸品種であるディープレッドキャンパスと、チョコレートコスモスのチョコモカとルージュルージュ、およびキバナコスモスのディアボロを用いフラボノイド成分の単離と同定を行った。その結果、アントシアニン5種類、3-デオキシアントシアニン1種類、フラバノン3種類、ジヒドロフラボノール4種類、フラボン1種類、フラボノール2種類、カルコン1種類およびオーロン1種類の合計18種類のフラボノイドが分離された。これらのうち、アントシアニン2種類、フラボン、カルコンおよびオーロン1種類ずつを除く13種類はコスモス属からは初めての報告であった。特にキバナコスモスから単離された3-デオキシアントシアニンである *cosmonidin 4'-O-glucoside* (**18**)は基本骨格であるアントシアニンおよび配糖体ともに新規の化合物であり、これは自然界で初めて報告される2'-位に水酸基を持つアントシアニンであった。2'-位に水酸基を持つフラボノイドはこれまでフラバノン、ジヒドロフラボノール、フラボン、フラボノールなどでそれぞれ報告されているが、これらがどのような酵素の働きにより、どのような合成経路で合成されているかはほとんど明らかになっていない。これに対してイソフラボンではイソフラボン2'-ヒドロキシラーゼ遺伝子(*I2'H*)がタルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*)から単離されている。これにより合成されるシトクロムP450ファミリーに含まれる膜結合性酵素である *I2'H*は、基質となるイソフラボンの4'-位の水酸基がメチル基に置換されたもののみ特異

的に働く事が知られている(Liu *et al.* 2003). また cosmonidin 4'-*O*-glucoside は 3-位に水酸基を結合していないタイプのアントシアニンであった. この 3-デオキシアントシアニンはシダ植物のアカウキクサ (*Azolla cristata*) やモロコシ (*Sorghum bicolor*)の一部の品種などにおいて報告されている(Iwashina *et al.*, 2010; Nip and Burns, 1969). またモロコシでは病原菌などが接種された際のファイトアレキシンとして蓄積する事が知られている(Liu *et al.*, 2010). 花卉からの報告は非常に稀であり, 南米産のイワタバコ科 (Gesneriaceae) の *Alloplectus* 属, *Gesneria* 属, *Reichsteineria*(*Sinningia*)属の一部の植物からのみ報告されている(Harborne, 1966, 1967). この 3-デオキシアントシアニンに関してもその合成系の一部がモロコシから予測されているが, ほとんど明らかになっていない(Liu *et al.*, 2010). 以上より, 本研究で単離された cosmonidin 4'-*O*-glucoside は新規天然化合物としてだけでなく, 遺伝資源としてのキバナコスモスの酵素科学分野での価値をも高めるものでもあると考えている.

次に, 第 2 章での色素成分の分析結果を踏まえ, 第 3 章ではコスモスの, 第 4 章ではチョコレートコスモスの, そして第 5 章ではキバナコスモスの複数の園芸品種・系統を用いてそれぞれの種ごとに花色の評価および花色の発現機構を調査した.

第 3 章ではコスモス 6 品種と 1 系統を用いて花色の発現を明らかにした. これらのうち, 特に赤色系のコスモス品種では, ピンク花色のセンセーションピンキーと比べて赤色のクリムソンドズラでは 5 倍の, 濃赤色のディープレッドキャンパスでは 11 倍のアントシアニンが蓄積していた事から, アントシアニンの量的な違いにより花色の濃淡が表現されている事が分かった. さらに, 赤色系コスモスのうち, フラボン欠損変異型のスモーキーピンク系統ではコピグメント効果の欠如により淡いピンク色の花色が発現されていることが明らかになった. このことから赤色系のコスモスの花色発現には, アントシアニン蓄積量による花色の濃淡に加え, フラボン蓄積の有無による分子間コピグメンテーションの有無もまた重要な要因であると考えられた.

第 4 章では, 黒色花を示すチョコレートコスモス *C. atrosanguineus* の品種であるチョコモカと, 黒~赤色花を示すチョコレートコスモスとキバナコスモスの交雑品種であるブラウンルージュ, フォルテルージュ, ルージュルージュおよびノエルルージュでは蓄積する色素の組成に相違が見られた. チョコモカではアントシアニンが, 交雑品種ではアントシアニンに加えてキバナコスモス由来と考えられるカルコンとフラバノンの蓄積が見られた. 特に花色がより黒い品種であるチョコモカやブラウンルージュでは新鮮花卉 1g 当たり 1.8~2.4 mg という多量のアントシアニン蓄積が見られた. これは赤色のノエルルージュの 3~4 倍量である. さらに黒色のチョコモカではカルコンが蓄積せず, ブラウンルージュでは赤色のノエルルージュに比べ 77 分の 1 しかカルコン蓄積が見られなかった. 以上よりチョコレートコスモスの花色はアントシアニン蓄積の多寡により花色の濃淡が生じ, 特に黒色は他のフラボノイドの合成を抑制し

アントシアニンのみを多量に蓄積する事により発現されていると考えられた。

第 5 章では、黄から橙・橙赤色を示すキバナコスモスの 10 の園芸品種を用い、これらの花色発現を調査した。その結果、キバナコスモスは花卉に蓄積するカルコン、オーロン、3-デオキシアントシアニン、アントシアニンおよびカロテノイドの各種組み合わせにより花色が発現されている事が判明した。色彩色差計で測定した花色を、CIE $L^*a^*b^*$ 表色系による色空間上での分布を基に 4 つの花色グループ、Yellow 9, Yellow 14, Orange N25 および Orange-red N30 に分けた。Yellow 9 と Yellow 14 のグループにはいずれもカルコンとオーロンとカロテノイドの蓄積が見られたが、Yellow 9 では Yellow 14 と比べて可視域に吸収を持つカロテノイドの蓄積が少ない事から、可視域の吸収が減り、淡い色合いになっている事が分かった。また Orange N25 グループではカルコンとオーロンとカロテノイドに加えて、3-デオキシアントシアニンの蓄積が見られ、これにより橙色が発現されている事が考えられた。さらに Orange-red N30 グループではこれらに加えてアントシアニンが存在することによって花色が発現されていると考えられた。この様に、カルコン、オーロン、3-デオキシアントシアニン、アントシアニンおよびカロテノイドという複雑な色素組成により花色が発現されている例はこれまでに報告がなく、園芸植物における花色発現の仕組みとして新たな知見を得ることが出来たと考えている。

摘要

コスモス属植物はメキシコを中心に中南米に分布するキク科(Asteraceae)の一年性もしくは多年性の草本である。コスモス属において園芸植物として広く栽培されているのは、コスモス(*Cosmos bipinnatus*)とキバナコスモス(*C. sulphureus*), チョコレートコスモス(*C. atrosanguineus*)の3種である。その花色は、コスモスではピンクや赤、白、黄色、キバナコスモスでは黄からオレンジ、赤色、チョコレートコスモスでは黒から濃赤色などである。

先行研究により、コスモスでは主要な4種類のアントシアニンと主要な5種類のフラボンが報告されている(中沖, 1935; Hayashi, 1941; Saito, 1976; 雨宮, 2012)。しかし、雨宮(2012)においてフラボン欠損変異型コスモスに特異的に見られた成分に関しては未同定のままであった。またキバナコスモスでは黄色花色品種の主要な黄色色素であるカルコンとオーロンについては報告されているが、それ以外の成分の報告はなく、また、Saito (1974)や佐俣ら(1977)の研究で朱色品種で蓄積が認められた未同定の橙色色素など、その色素組成のほとんどは明らかになっていなかった。さらにチョコレートコスモスに関しては、色素成分に関する報告は一切なかった。そこで、本研究ではこれらのコスモスのフラボン欠損変異体であるディープレッドキャンパス品種、キバナコスモス朱色花色品種であるディアボロ、チョコレートコスモスの黒色花色品種であるチョコモカ、赤色花色品種であるルージュルージュを用い色素成分の単離・同定を行った。その結果、アントシアニン5種類、3-デオキシアントシアニン1種類、フラバノン3種類、ジヒドロフラボノール4種類、フラボン1種類、フラボノール2種類、カルコン1種類およびオーロン1種類の合計18種類のフラボノイドが分離された。これらのうちキバナコスモスから単離された3-デオキシアントシアニンは新規の天然化合物であった。その構造は、2'-hydroxyapigeninidin 4'-O-β-D-glucopyranosideと同定され、B環の2'-位に水酸基を結合した新規のアントシアニンであったため、そのアントシアニジンをcosmonidinと命名した。

次に、色素成分の結果を基に、コスモスとチョコレートコスモス、キバナコスモスの複数の園芸品種を用い、それぞれの種における花色の発現機構を調べた。

コスモスでは、ピンク花色のセンセーションピンキー、赤色花色のクリムソンダズラ、フラボン欠損変異型で淡いピンク花色のスモーキーピンク系統、同じくフラボン欠損変異型で濃赤色花のディープレッドキャンパスを赤色系として、白色花のピュアホワイトを白色系として、黄色花のイエローキャンパスとイエローガーデンを黄色系として、HPLCでの色素組成の定量と比較および粗抽出物の吸収スペクトルの測定をもとに3つの花色グループに分けた。これらのグループは蓄積しているフラボノイド組成に変異があり、白色系はフラボンのみの蓄積により、黄色系はフラボンに加えカルコ

ンの蓄積により花色が発現されている事が示された。さらに赤色系のグループはアントシアニンの量的な違いにより生じる花色の濃淡に加えて、フラボンを蓄積するセンセーションピンキー品種とフラボン欠損変異型であるスモーキーピンク系統の *in vitro* での花色の再構築実験により、コピグメンテーションの有無による深色化・浅色化によって花色が発現されている事が示された。

チョコレートコスモスでは、チョコモカ品種とチョコレートコスモスとキバナコスモスの交雑品種であるブラウンルージュ、フォルテルージュ、ルージュルージュおよびノエルルージュを用いて花色の発現を調査した。HPLCによるアントシアニンとカルコンの定量分析の結果、チョコモカやブラウンルージュなどの黒色花ではアントシアニンを多量に蓄積し、他のフラボノイドの蓄積を抑制する事により花色の黒色化が生じている事が示された。さらにキバナコスモスとの雑種品種ではアントシアニン蓄積量の多寡とカルコンの蓄積により花色の多彩さが生じている事が示された。

キバナコスモスは、リマラレモン、サンライズ、ドワーフイエロー、コスミックイエロー、カーペットゴールド、マンダリン、コスミックオレンジ、オレンジフレア、サンセット、コスミックレッドの10園芸品種を用いた。これらの花色はCIE $L^*a^*b^*$ 表色系による色空間上での分布を基に Yellow 9 グループ(リマラレモン、サンライズ、ドワーフイエロー)、Yellow 14 グループ(コスミックイエロー、カーペットゴールド)、Orange N25 グループ(マンダリン、コスミックオレンジ、オレンジフレア)および Orange-red N30 グループ(サンセット、コスミックレッド)の4グループに分けられた。HPLCによる色素組成の比較および花卉粗抽出物と花卉の石油エーテル抽出物の吸収スペクトルの測定により、Yellow 9 グループと Yellow 14 グループはカルコン、オーロンおよびカロテノイドにより花色が発現されている事が示された。さらに石油エーテル抽出物の吸収スペクトルの比較により、Yellow 9 グループでは Yellow 14 グループと比べて可視光域に吸収を持つカロテノイドの蓄積量が少ない事が示された。そのため Yellow 9 グループでは可視域の吸収が減る事により、Yellow 14 グループに較べ L^* (明度)が高く、 a^* (赤色味)が低くなった。また Orange N25 グループではカルコン、オーロン、カロテノイドに加えて3-デオキシアントシアニンの蓄積が見られ、これにより橙色が発現されている事が考えられた。さらに Orange-red N30 グループはこれらに加えてアントシアニンが蓄積することによって花色が発現されていることが示された。この様に、カルコンとオーロン、3-デオキシアントシアニン、アントシアニンおよびカロテノイドという複雑な色素組成により花色が発現されている例はこれまでに報告がなく、園芸植物における花色発現の仕組みとして新たな知見を得ることが出来たと考えている。

Summary

Flower pigments in some cultivars of *Cosmos* species and their contribution to flower colors

Kotarou Amamiya (United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

The genus *Cosmos* (Asteraceae) consists of 35 species and 4 varieties, and almost species are growing in Mexico (Castro-Castro *et al.*, 2013). Three species, i.e. *C. bipinnatus*, *C. sulphureus* and *C. atrosanguineus* are cultivated in the world as ornamentals. In *C. bipinnatus*, various flower color cultivars such as pink, red, white and yellow are present. Though the flower colors of *C. sulphureus* cultivars are mainly yellow to orange, those of *C. atrosanguineus* cultivars are deep red to black. The flavonoids of *Cosmos* species have been reported from the petals. In *C. bipinnatus*, four anthocyanins and five flavones have been reported (Nakaoki, 1935; Hayashi, 1941; Saito, 1976; Amamiya, 2012). In *C. sulphureus*, each one of chalcone and aurone was reported as the pigment of yellow flowers (Shimokoriyama and Hattori, 1953). However, some unknown flavonoids were found in the mutant line of *C. bipinnatus*, in our previous study. In addition, Saito (1974) has reported an unknown orange pigment from the flowers of *C. sulphureus* cultivars by paper chromatography. On the other hand, the flower flavonoids of *C. atrosanguineus* are not reported until now.

A new 3-deoxyanthocyanin, 2'-hydroxyapigeninidin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**18**) have been isolated from *C. sulphureus* 'Diabolo'. 2'-Hydroxylated anthocyanidin was found in nature for the first time and named as cosmonidin in this paper. As other compounds, five anthocyanins, three flavanones, four dihydroflavonols, a flavone, two flavonols, a chalcone and an aurone were isolated from *Cosmos* cultivars. There were identified as taxifolin 3-*O*-glucoside (**1**), taxifolin 3-*O*-galactoside (**2**), aromadendrin 7-*O*-glucoside (**3**), aromadendrin 3-*O*-glucoside (**4**), eriodictyol 7-*O*-glucoside (**5**), quercetin 3-*O*-glucoside (**6**), quercetin 3-*O*-rutinoside (**7**) cyanidin 3-*O*-glucoside (**8**), cyanidin 3-*O*-rutinoside (**9**), cyanidin 3-*O*-malonylglucoside (**10**), pelargonidin 3-*O*-glucoside (**11**), pelargonidin 3-*O*-rutinoside (**12**), eriodictyol 7-*O*-glucuronide (**13**), eriodictyol *O*-glucoside (**14**), luteolin 7-*O*-glucuronide (**15**), butein 4'-*O*-glucoside (**16**) and sulfuretin

6-*O*-glucoside (17).

The author performed the quantitative and qualitative HPLC analysis of flavonoids and survey of the flower colors of seven *C. bipinnatus*, five *C. atrosanguineus* and ten *C. sulphureus* cultivars.

The flower colors of *C. bipinnatus* were divided into three types, i.e. white, yellow and red. Their flower color types were characterized by qualitative analysis of flavonoids, i.e. white and yellow types contain flavones and chalcone, respectively. On the other hand, red type was controlled by two factors, anthocyanin accumulation and co-pigmentation.

In qualitative analysis of *C. atrosanguineus*, total anthocyanins of 'Choco Mocha' and 'Brown Rouge' (black flowers) were 3-4-folds compared with that of 'Noel Rouge' (red flower). Their results showed that the occurrence of the black flowers are due to high accumulation of anthocyanins. On the other hand, total chalcone of 'Noel Rouge' was 10-77-folds compared with those of 'Brown Rouge', 'Forte Rouge' and 'Rouge Rouge'. Thus, it was shown that flower color variations of Chocolate Cosmos cultivars are due to the difference of relative amounts of the anthocyanins and chalcone.

The flower colors of *C. sulphureus* were divided into four groups, i.e. 'Yellow 9', 'Yellow 14', 'Orange N25' and 'Orange-red N30', using CIE $L^*a^*b^*$ color space. These colors are controlled by the accumulation of four pigment classes, i.e. chalcone and aurone, 3-deoxyanthocyanin, anthocyanins and carotenoids. The flower colors of lemon and yellow groups are due to chalcone, aurone and carotenoids. However, spectroscopic analysis of petal extract of lemon group, the amount of carotenoids were decreased compared with yellow group. On the other hand, flower colors of orange and red groups composed of chalcone, aurone, carotenoids, 3-deoxyanthocyanin and anthocyanins, respectively.

謝辞

本研究の遂行にあたり，研究方針，実験計画，学会発表や論文執筆など，あらゆる面でのご指導いただきました，本研究の指導教官であります岩科司客員教授（国立科学博物館植物研究部部長兼東京農工大学連合農学研究科）に深く感謝の意を表するとともに，心より御礼申し上げます．また，終始適切な助言と多大なるご協力をいただいた副指導教官の國府方吾郎客員准教授（国立科学博物館植物研究部研究主幹兼東京農工大学連合農学研究科），同じく副指導教官の久保山勉教授（茨城大学農学部）に深く感謝の意を表するとともに，心より御礼申し上げます．さらに本論文を御校閲いただきました，藤井義晴教授（東京農工大学農学部）ならびに房相佑教授（宇都宮大学農学部）に篤く御礼申し上げます．

また，分析材料の提供および多くの助言をいただきました肥塚信也教授（玉川大学農学部），NMRの測定およびご指導いただきました北島潤一教授（昭和薬科大学医療薬学教育），加茂綱嗣主任研究員（農業環境技術研究所生物多様性研究領域）に篤く御礼申し上げます．

さらに，本研究を行うにあたり，数々のご助言，ご協力を賜りました村井良徳研究員（国立科学博物館植物研究部），上原歩助教（慶應義塾大学日吉化学教室），水野貴行研究員（農研機構花き研究所花き研究領域）ならびに植物化学分類学研究室（東京農工大学大学院連合農学研究科および茨城大学大学院農学研究科）所属の学生諸氏，そして，国立科学博物館筑波実験植物園の皆様にご心より御礼申し上げます．最後に，陰ながら暖かく見守ってくれた両親に心から感謝いたします．

引用文献

雨宮虎太郎 (2012) コスモスの *FNSII* 遺伝子の構造と花卉に蓄積する色素化合物の解析. 玉川大学大学院農学研究科. 修士論文, pp. 57-76.

Andersen, Ø. M., K. R. Markham (2006) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, pp. 475.

Asen, S., R. N. Stewart, K. H. Norris (1971) Co-pigmentation effect of quercetin glycosides on absorption characteristics of cyanidin glycosides and color of Red Wing azalea. *Phytochemistry*, 10, 171-175.

Castro-Castro, A., G. Vargas-Amado, M. Harker, A. Rodríguez-Contreras (2013) Two new species of *Cosmos* section *Discopoda* (Coreopsideae: Asteraceae) from Jalisco, Mexico. *Phytotaxa*, 146, 35-49.

Castro-Castro, A., G. Vargas-Amado, M. Harker, A. Rodríguez-Contreras (2014) Macromorphological analysis and cytogenetics of the genus *Cosmos* (asteraceae, coreopsideae), with a key for its identification. *Botanical Sciences*, 92, 363-388.

Deguchi, A., S. Ohno, M. Hosokawa, F. Tatsuzawa, M. Doi (2013) Endogenous post-transcriptional gene silencing of flavone synthase resulting in high accumulation of anthocyanins in black dahlia cultivars. *Planta*, 237, 1325-1335.

Davies, K. M., S. J. Bloor, G. B. Spiller, S. C. Deroles (1998) Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*. *The Plant Journal*, 13, 259-266.

Dübeler, A., G. Voltmer, V. Gora, J. Lunderstädt, A. Zeeck (1997) Phenols from *Fagus sylvatica* and their role in defence against *Cryptococcus fagisuga*. *Phytochemistry*, 45, 51-57.

Geissman, T. A. (1942) Anthochlor pigments. III. The pigments of *Cosmos sulphureus*. *Journal of the American Chemical Society*, 64, 1704-1707.

Goldschmiedt, G., E. Zerner (1910) Über das Scutellarin. Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly, 31, 439-491.

Gonnet, J. F. (1995) A colorimetric look at the RHS chart-perspectives for an instrumental determination of colour codes. Journal of Horticultural Science, 70, 191-206.

Gonnet, J. F. (1998) Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. Food Chemistry, 63, 409-415.

Harborne, J. B. (1958) Spectral methods of characterizing anthocyanins. Biochemical Journal, 70, 22-28.

Harborne, J. B. (1963) Plant polyphenols IX. The glycosidic pattern of anthocyanin pigments. Phytochemistry, 2, 85-97.

Harborne, J. B. (1966) Comparative biochemistry of flavonoids-I.: Distribution of chalcone and aurone pigments in plants. Phytochemistry, 5, 111-115.

Harborne, J. B. (1967) Comparative biochemistry of the flavonoids-VI.: Flavonoid patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. Phytochemistry, 6, 1643-1651.

Harborne, J. B., H. S. A. Sherratt (1961) Plant polyphenols. 3. Flavonoids in genotypes of *Primula sinensis*. Biochemical Journal, 78, 298.

Hattori, S., K. Hayashi (1937) Studien über Anthocyane II. Über die Farbstoffe aus den roten Herbstblättern von einigen *Acer*-Arten. Acta phytochimica, 10, 129-138.

Hayashi, K. (1941) Studien über Anthocyane VII. Über das Anthocyanin der roten Kosmosblüten, I. Acta Phytochimica, 12, 83-95.

林孝三 (1980) 植物色素 -実験・研究への手引-. 養賢堂, 東京, pp. 84.

Hayashi, K., T. Noguchi, Y. Abe (1954) Studien über Anthocyane XXIV. Keracyanin, ein Farbstoffprinzip in den feuerroten Blüten von *Canna generalis*.

Pharmaceutical Bulletin, 2, 41-45.

Hind, N., M. F. Fay (2003) *Cosmos atrosanguineus* Compositae. Curtis's Botanical Magazine, 20, 40-48.

Hosaka, H., T. Mizuno, T. Iwashina (2012) Flavonoid pigments and color expression in the flowers of black hollyhock (*Alcea rosea* Nigra). Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B, 38, 69-75.

Hosokawa, K., E. Fukushi, J. Kawabata, C. Fujii, T. Ito, S. Yamamura (1997) Seven acylated anthocyanins in blue flowers of *Gentiana*. Phytochemistry, 45, 167-171.

Iwashina, T., S. M. Githiri, E. R. Benitez, T. Takemura, J. Kitajima, R. Takahashi (2007) Analysis of flavonoids in flower petals of soybean near-isogenic lines for flower and pubescence color genes. Journal of Heredity, 98, 250-257.

Iwashina, T., J. A. López-Sáez, J. Kitajima (2008) Flavonoids from *Osyris alba*. Biochemical Systematics and Ecology, 36, 146-147.

Iwashina, T., J. Kitajima, S. Matsumoto (2010) Luteolinidin 5-*O*-glucoside from *Azolla* as a stable taxonomic marker. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, 36, 61-64.

Ko, H. H., Y. T. Tsai, M. H. Yen, C. C. Lin, C. J. Liang, T. H. Yang, C.W. Lee, L. F. Yen (2013) Norartocarpetin from a folk medicine *Artocarpus communis* plays a melanogenesis inhibitor without cytotoxicity in B16F10 cell and skin irritation in mice. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13, 348-359.

Lin, L. Z., J. M. Harnly (2010) Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). Food Chemistry, 120, 319-326.

Liu, C. J., D. Huhman, L. W. Sumner, R. A. Dixon (2003) Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome p450 81E enzymes from *Medicago truncatula*. The Plant Journal, 36, 471-484.

Mabry, T. J., K. R. Markham, M. B. Thomas (1970) The systematic identification of flavonoids. Springer Berlin Heidelberg, 152, 154.

Markham, K. R., S. J. Bloor, R. Nicholson, R. Rivera, M. Shemluck, P. G. Kevan, C. Michener (2004) Black flower coloration in wild *Lisianthus nigrescens*: its chemistry and ecological consequences. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59C, 625-630.

Mii, M. (2009) Breeding of ornamental plants through interspecific hybridization using advanced techniques with a special focus on *Dianthus*, *Primula*, *Cosmos* and *Kalanchoe*. *Acta Horticulturae*, 836, 63-72.

Mizuno, T., T. Yabuya, J. Kitajima, T. Iwashina (2013) Identification of novel C-glycosylflavones and their contribution to flower colour of the Dutch iris cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 116-124.

Moehs, C. P., L. Tian, K. W. Osteryoung, D. DellaPenna (2001) Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology*, 45, 281-293.

Murai, Y., H. Setoguchi, E. Ono, T. Iwashina (2015) Flavonoids and their qualitative variation in *Calystegia soldanella* and related species (Convolvulaceae). *Natural Product Communications*, 10, 429-432.

中沖太七郎 (1935) コスモス花の成分に就て白色花のフラボン族配糖体の研究(第四報). *薬学雑誌*, 55, 967-978.

Nakayama, M., M. Koshioka, M. Shibata, S. Hiradate, H. Sugie, M. A. Yamaguchi (1997) Identification of cyanidin 3-O-(3'',6''-O-dimalonyl- β -glucopyranoside) as a flower pigment of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 1607-1608.

Nip, W. K., E. E. Burns (1969) Pigment characterization in grain sorghum. I. Red varieties. *Cereal Chemistry*, 46, 490-495.

小原平太郎. (1964) タチアオイの花からアロマデンドリン-3-グルコシドの単離. 日

本化学雑誌, 85, 514-515.

Saito, K. (1974) Flower colour and pigment distribution in the cultivar of *Cosmos bipinnatus* Cav. and *C. sulphureus* Cav. Zeitschrift für Pflanzen Physiologie, 71, 80-82.

Saito, K. (1976) Flavone glycosides in the ray flowers of *Cosmos bipinnatus*. Planta Medica, 30, 349-355.

Saito, N., Y. Osawa, K. Hayashi (1972) Isolation of a blue-violet pigment from the flowers of *Platycodon grandiflorum*. The Botanical Magazine, Tokyo, 85, 105-110.

Sakaguchi, K., J. Kitajima, T. Iwashina (2013) Acylated delphinidin glycosides from violet and violet-blue flowers of *Clematis* cultivars and their coloration. Natural Product Communications, 8, 1563-1566.

Sakushima, A., K. Ohno, M. Coskun, K. Seki, K. Ohkura (2002) Separation and identification of taxifolin 3-*O*-glucoside isomers from *Chamaecyparis obtusa* (Cupressaceae). Natural Product Letters, 16, 383-387.

佐俣淑彦, 稲津厚生, 高橋賢 (1977) *Cosmos sulphureus* (キバナコスモス) と *Cosmos caudatus* の種間雑種の研究: 特に花色とその色素について. 育種学雑誌, 27, 223-236.

佐俣淑彦, 稲津厚生, 長谷川正男, 露木美英, 佐藤幸治 (1983) コスモスの新花色の育種 —特に花色の遺伝ならびに生化学的分析—. 玉川学園学術研究所共同研究報告, 3, 8-35.

Schliemann, W., Y. Cai, T. Degenkolb, J. Schmidt, H. Corke (2001) Betalains of *Celosia argentea*. Phytochemistry, 58, 159-165.

Shibata, K., S. Iwata, M. Nakamura (1923) Baicalin, a new flavone-glucuronic acid compound from the roots of *Scutellaria baicalensis*. Acta Phytochimica, 1, 105-139.

Shimokoriyama, M., S. Hattori (1953) Anthochlor pigments of *Cosmos sulphureus*, *Coreopsis lanceolata* and *C. saxicola*. Journal of the American Chemical Society,

75, 1900-1904.

Shiono, M, N. Masugaki, K. Takeda (2005) Structure of the blue cornflower pigment. *Nature*, 436, 791.

Swinny, E. E., S. J. Bloor, H. Wong (2000) ^1H and ^{13}C NMR assignments for the 3-deoxyanthocyanins, luteolinidin-5-glucoside and apigeninidin-5-glucoside. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 38, 1031-1033.

Takahashi, R., S. M. Githiri, K. Hatayama, E. G. Dubouzet, N. Shimada, T. Aoki, S. Ayabe, T. Iwashina, K. Toda, H. Matsumura (2007). A single-base deletion in soybean flavonol synthase gene is associated with magenta flower color. *Plant Molecular Biology*, 63, 125-135.

Takahashi, R., J. G. Dubouzet, H. Matsumura, K. Yasuda, T. Iwashina (2010) A new allele of flower color gene *W1* encoding flavonoid 3'5'-hydroxylase is responsible for light purple flowers in wild soybean *Glycine soja*. *BMC Plant Biology*, 10, 155-164.

Takeda, K., T. Yamashita, A. Takahashi, C. F. Timberlake (1990) Stable blue complexes of anthocyanin-aluminium-3-*p*-coumaroyl- or 3-caffeoyl-quinic acid involved in the blueing of *Hydrangea* flower. *Phytochemistry*, 29, 1089-1091.

Takeda, K., A. Fujii, Y. Senda, T. Iwashina (2010) Greenish blue flower colour of *Strongylodon macrobotrys*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 630-633.

Tatsuzawa, F., Y. Aiba, T. Morino, N. Saito, K. Shinoda, K. Kato, K. Toki, T. Honda (2012) Copigmentation with acylated anthocyanin and kaempferol glycosides in violet and purple flower cultivars of *Aubrieta* × *cultorum* (Brassicaceae). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 81, 275-284.

上原歩 (2010) キク属植物の葉におけるフラボノイドとその分布. 茨城大学大学院農学研究科, 修士論文. pp. 82.

Uehara, A., M. Nakata, J. Kitajima, T. Iwashina (2012) Internal and external flavonoids from the leaves of Japanese *Chrysanthemum* species (Asteraceae).

Biochemical Systematics and Ecology, 41, 142-149.

Uehara, A., S. Akiyama, T. Iwashina (2015) Foliar flavonoids from *Tanacetum vulgare* var. boreale and their geographical variation. Natural Product Communications, 10, 403-405.

Williams, C. A., R. J. Grayer, (2004) Anthocyanins and other flavonoids. Natural Product Reports, 21, 539-573.

Yokoi, M. (1975) Flower colour and pigment distribution in the cultivar of *Cosmos bipinnatus* Cav. and *C. sulphureus* Cav. The Transactions of Faculty of Horticulture, Chiba University, 14, 10-13.

Yoshida, K., N. Miki, K. Momonoi, M. Kawachi, K. Katou, Y. Okazaki, T. Kondo (2009) Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 85, 187-197.

Yoshida, K., Y. Toyama-Kato, K. Kameda, T. Kondo (2003) Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. Plant and Cell Physiology, 44, 262-268.

Yoshitama, K., A. Saeki, T. Iwata, N. Ishikura, S. Yahara (1998) An acylated pelargonidin diglycoside from *Pulsatilla cernua*. Phytochemistry, 47, 105-107.

Zhao, X., W. Mei, M. Gong, W. Zuo, H. Bai, H. Dai (2011) Antibacterial activity of the flavonoids from *Dalbergia odorifera* on *Ralstonia solanacearum*. Molecules, 16, 9775-9782.