

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	李 建 宾
題 目	<p style="text-align: center;">カメリア節紅花ツバキのアントシアニン色素に関する研究</p> <p style="text-align: center;">(Research on Anthocyanins of the Red Flowers of the Section <i>Camellia</i> Species)</p>
<p>カメリア節のツバキはツバキ属でもっとも大きい節で、約 60 種を包括している。これらのうち大多数の種は中国に自生・分布しており、大輪、紅花、花卉基部が合着しているなどという特徴を持つ。</p> <p>ツバキ属の花弁のアントシアニン色素に関する研究については、ヤブツバキ、苑田紅花油茶、浙江紅花油茶、南山茶、ホンコンツバキ、サルウィンツバキあるいはトウツバキなどに、7種類のシアニジン配糖体もしくはデルフィニジン配糖体が含まれると発表されている。本研究は、カメリア節ツバキの野生種と園芸品種の花弁に含まれるアントシアニン色素に着目し、含有色素の精製と化学構造決定、ならびに色素組成に基づくカメリア節ツバキの化学分類を行った。</p> <p>まず、オープンカラムクロマトグラフィーによってホンコンツバキ、サルウィンツバキ、トウツバキおよびトウツバキの園芸種である大理茶から合計 25 種類のアントシアニン色素を抽出・単離・精製し、それぞれ ^1H-, ^{13}C-NMR、ESI-MS および UV-vis スペクトル測定、あるいは単離・精製した色素の酸加水分解による生成物の精査などから化学構造を決定した。25 種類のアントシアニン色素のうち、8 種の新規色素と 10 種の既知色素を含む計 18 種類は、ツバキ属から初めて発見したものである。</p> <p>次いで、33 種の野生型ツバキについて HPLC による色素組成分析を行い、色素組成に関する主成分分析に基づくクラスター解析を行なった。その結果、ツバキ属には、シアニジンとデルフィニジンの二つのアントシアニン型と、モノグリコシド型、ダイグリコシド型、モノダイグリコシド型の三つの配糖体型および 4 種類のアシル化誘導体型が花弁に存在することが判明した。モノダイグリコシド型の配糖体と 3 種類のアシル化誘導体型はツバキ属から初めて発見したものである。</p> <p>クラスター解析の結果、カメリア節ツバキの成立には二つの起源センター、すなわち、華南原始起源センターと西南二次起源センターがあることを初めて明らかにした。つまり、原始的ツバキとされる張氏ツバキ (カメリア・アザレア) と全縁紅山茶 (カメリア・サブインテグラ)、あるいはホンコンツバキやシアニジン 3-グルコシドを主体とする紅花ツバキは、ほとんどが華南原始起源センターに分布している。このことから、これらのツバキでは、ホンコンツバキ・全縁紅山茶 → 南山茶 → 浙江紅花油茶、または南山茶 → ヤブツバキへと続く系統発生の主系列が提唱できる。これは関 (1998) が提案した系列の一部と良く合致する。これに対し、シアニジン 3,5-ジグルコシド (Cy3G5G)、シアニジン 3-(2-キシロシル) グルコシド (Cy3GX) を主体とするものや Cy3G5G と Cy3GX の両者を主体とするものは、それぞれサルウィンツバキ、トウツバキあるいはピタルツバキが該当するが、これらのツバキは西南起源センターに分布している。したがって、これらのツバキでは、サルウィンツバキ → ピタルツバキへの分化、あるいはトウツバキ → ピタルツバキ・雲南種またはトウツバキ → 木果紅山茶へと続く主系列を提唱できる。前者の系統発生の系列は、坂田 (1988) が、後者のそれは津山 (1966) がそれぞれ提唱した系統発生の経路と一致するものである。</p> <p>このように、色素組成に関して主要因分析に基づくクラスター解析を行なえば、ツバキ種の系統発生や類縁関係、あるいはその種が雑種起源であるのかどうかなど、より詳細な情報を得ることが可能なことを実証した。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	LI JIANBIN
題 目	<p>Research on Anthocyanins of the Red Flowers of the Section <i>Camellia</i> Species</p> <p>(カメリア節紅花ツバキのアントシアニン色素に関する研究)</p>
<p>Section <i>Camellia</i> (L.) Dyer is the largest section in the genus <i>Camellia</i> with about 60 species. Most of them are native to China. Camellias of this section is characterized by large, usually red flowers, and basal fusion of the flower parts.</p> <p>Seven 3-monoglycosides of cyanidin- or delphinidin-series were found in the red flowers of the following camellia species, such as <i>C. japonica</i>, <i>C. polyodonta</i>, <i>C. chekiangoleosa</i>, <i>C. semiserrata</i>, <i>C. hongkongensis</i>, <i>C. saluenensis</i> and <i>C. reticulata</i>, according to the past research resulted to the floral anthocyanins of the genus <i>Camellia</i>.</p> <p>This study is focused on anthocyanins in red flowers of section <i>Camellia</i> species and relevant cultivars. Isolation and spectrometric identification of anthocyanins, and chemical taxonomy of these species based on camellia anthocyanins were studied. In this research, 25 anthocyanins were successfully isolated from red flowers of <i>C. hongkongensis</i>, <i>C. saluenensis</i> and <i>C. reticulata</i>, as well as cultivars of <i>C. reticulata</i> 'Dalicha' by using the various kinds of open column chromatography. Their chemical structures were identified jointly by spectroscopic analyses, i.e., ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-MS, UV-Vis, and by hydrolysis degradation. The eighteen anthocyanins, including eight novel anthocyanins and ten known anthocyanins of these pigments were newly found in the genus <i>Camellia</i>. Furthermore, qualitative and quantitative analyses of anthocyanins in 33 species were performed by HPLC. The relationship among these species was discussed according to PCA & cluster analyses based on the constitution of anthocyanins in the red flowers.</p> <p>Two types of anthocyanidin (cyanidin and delphinidin), three types of glycosylation (3-monoglycoside, 3,5-diglycoside and 3-(2-xylosyl) monoglycoside), and four kinds of acylated derivatives were found in red flowers of these species. Among them, 3-(2-xylosyl)monoglycoside and three kinds of acylation were also found in the genus <i>Camellia</i> for the first time.</p> <p>It is firstly suggested that there might be two centers of origin for this section, i.e. the South China primitive center and the Southwest China secondary center. The primitive species, such as <i>C. changii</i> (<i>C. azalea</i>), <i>C. subintegra</i> and <i>C. hongkongensis</i>, and most of species having pigments of cyanidin 3-glucoside, are native to South China center of origin. Therefore, the direction of species differentiation was suggested as <i>C. hongkongensis</i> (or <i>C. subintegra</i>) → <i>C. semiserrata</i> → <i>C. chekiangoleosa</i>, or <i>C. hongkongensis</i> (or <i>C. subintegra</i>) → <i>C. semiserrata</i> → <i>C. japonica</i> in this center of origin. This was consistent with a part of assumption of Ming (1998). On the other hand, many species such as <i>C. saluenensis</i>, <i>C. reticulata</i>, and other species (such as <i>C. pitardii</i>) having cyanidin 3,5-diglucoside (Cy3G5G), cyanidin 3-(2-xylosyl)glucoside (Cy3GX), and pigments of Cy3G5G-series with Cy3GX-series, are distributed in Southwest China center of origin. Therefore, the direction of differentiation was presented as <i>C. saluenensis</i> → <i>C. pitardii</i>, and <i>C. pitardii</i> var. <i>yunnanica</i> ← <i>C. reticulata</i> → <i>C. xylocarpa</i>. This was close with assumption of Sakata (1988) and Tuyama (1966), respectively. Based on PCA & cluster analyses, the particular information can be more briefly obtained on evolutionary development and phylogenetic relationship, as well as the origin of the interspecific hybrids of the genus <i>Camellia</i>.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	李 建 賓
審査委員	主 査 鹿児島 大学 教授 坂 田 祐 介
	副 査 鹿児島 大学 准教授 橋 本 文 雄
	副 査 宮 崎 大学 教授 藪 谷 勤
	副 査 佐 賀 大学 准教授 石 丸 幹 二
	副 査 鹿児島 大学 教授 松 尾 友 明
審査協力者	
題 目	Research on Anthocyanins of the Red Flowers of the Section <i>Camellia</i> Species (カメリア節紅花ツバキのアントシアニン色素に関する研究)
<p>カメリア節紅花のツバキは、ツバキ属でもっとも大きい節で、約60種を包括している。これらのうち大多数は中国に自生・分布することから、本邦では、これらを研究素材として用いるには、材料収集がかなり困難であるというハードルがあり、研究はさほど進展しなかったといえる。本研究は、中国からの留学生という地の利を活かして行なったもので、本邦未公開の紅花ツバキを含めたカメリア節ツバキ花卉のanthocyanin色素を駆使して、化学分類や類縁関係の解明、また系統発生を論じたものである。得られた成果を要約すれば以下の通りである。</p> <p>1. ツバキ属花卉のanthocyanin色素については、ヤブツバキ、ユキツバキ、苑田紅花油茶、浙江紅花油茶、南山茶、ホンコンツバキ、サルウィンツバキ、トウツバキあるいはサザンカなどの花卉に、7種類のcyanidinもしくはdelphinidin配糖体が含まれるという報告がある。まず、ホンコンツバキ、サルウィンツバキおよびトウツバキなど、カメリア節ツバキ野生種と園芸品種の花卉のanthocyanin色素をオープンカラムクロマトグラフィーによって単離・精製し、¹H-NMR、¹³C-NMR、ESI-MS および UV-visスペクトル測定、あるいは単離・精製した色素の酸加水分解による生成物を精査し、合計25種類に及ぶ anthocyanin 色素の化学構造を決定した。これらの色素のうち、8種類の新規色素と10種類の既知色素の計18種類は、ツバキ属から初めて見出したものである。</p>	

2. ついで、33種に及ぶ野生型紅花ツバキについて、HPLCによる色素組成分析を行い、個々のツバキの色素組成と、それらがどのような色素型に属するのかを検討した結果、カメリア節ツバキを(1) cyanidinとdelphinidin色素の二つの anthocyanidin 型、(2) monoglycoside 型、diglycoside型、monodiglycoside型の三つの配糖体型および(3) 4つのアシル化誘導体型に分類できることを明らかにした。monodiglycosideの配糖体型と3種類のアシル化誘導体型はツバキ属から初めて見出した色素型である。

さらに、個々のツバキの色素組成とそれらがどのような色素型を併せ持つのかを要因として、SASプログラムを用いた主成分分析に基づいてWard法によるクラスター解析を行なった。その結果、カメリア節ツバキの成立には二つの起源センター、すなわち、華南原始起源センター（広西省と広東省の交錯する地域）と西南二次起源センター（雲南省地域）があることを明らかにした。つまり、形態的に原始的なツバキとされる張氏紅山茶 (*C. azalea*) と全縁紅山茶 (*C. subintegra*)、あるいはホンコンツバキや cyanidin 3-glucosideを主体とする紅花ツバキはクラスター解析で近縁と見做されるが、それらのほとんどが華南原始起源センターに分布している。このことから、これらのツバキ間に、ホンコンツバキや全縁紅山茶→南山茶→浙江紅花油茶へ、あるいは南山茶→ヤブツバキへと続く系統発生の系列を提唱できる。これは関 (1998) が提案した系列と良く合致するものである。これに対し、cyanidin 3,5-diglucoside(Cy3G5G) または cyanidin 3-(2-xylosyl) glucoside (Cy3GX) を主体とするものやCy3G5GとCy3GXの両者を主体とするものは、サルウィンツバキ、トウツバキあるいはピターールツバキなど、クラスター解析でそれぞれ近縁と見做されるツバキが該当するが、これらのツバキのほとんどは西南起源センターに分布している。したがって、これらのツバキ間に、サルウィンツバキ→ピターールツバキへ、またトウツバキ→ピターールツバキ・雲南種への分化、あるいはトウツバキ→木果紅山茶 (*C. xylocarpa*) への分化をそれぞれ提案した。前者の系統発生の系列は坂田 (1988) が、後者のそれは津山 (1966) が提案した系統発生の経路と良く合致するものである。いずれにせよ、紅花ツバキの系統発生上の起源地を、中国華南地域および西南地域の二ヶ所に求めるという新たな仮説を提唱した点は、きわめて興味深い。

このように、色素組成や色素型に関して主成分分析に基づくクラスター解析を行なえば、ツバキ種の化学分類と系統発生あるいは類縁関係と、さらにはその種が雑種起源であるのかどうかなど、より詳細な情報に基づく新しい解析・解釈が可能なることを本研究は実証したものと見做すことができる。したがって、審査委員一同は、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨

氏名	李建宾
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 坂田 祐介
	副査 鹿児島大学 准教授 橋本文雄
	副査 宮崎大学 教授 藪谷 勤
	副査 佐賀大学 准教授 石丸 幹二
	副査 鹿児島大学 教授 松尾 友明
審査協力者	
実施年月日	平成20年1月26日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査の5名は、平成20年1月26日(土)の公開審査会において、学位申請者本人に対して学位申請論文について説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者として十分な学力ならびに識見を有するものと認め、博士(農学)の学位を与えるに足る十分な学力と識見を有する者と判定した。</p>	

学位申請者 氏 名	李 建 宾
<p>【質問1】 ツバキ花卉のサンプリングについて、例えば野生種のトウツバキは何個体採集し、その中の何個体について色素分析を行ないクラスター解析を行なったのか。また、野生種集団内で色素組成に大幅な個体間差異はあるのか。</p> <p>【回答1】 トウツバキに限らず野生種は、1種あたり5～25個体から花卉を採集し、全個体を色素分析に供した。一つの種内では色素組成は大きく異なることはなかったため、論文には、種の平均的数値を示す個体または種を代表する個体の色素組成値を示した。クラスター解析にもこの数値を用いた。</p> <p>【質問2】 一般的に内生成分はトランス型で存在するとされるが、ツバキでは色素本体に結合するパラクマル酸にシス型とトランス型のものがある。シス型のパラクマル酸は分析中に生じたアーティファクトの可能性はないのか。</p> <p>【回答2】 新鮮花卉を用いて慎重に色素を抽出し分析した結果、シス型とトランス型の共存が認められたため、どちらかがアーティファクトとして生じたものではないと考えられる。</p> <p>【質問3】 環境要因または花卉の発達ステージで色素組成は変化しないか。</p> <p>【回答3】 開花期に極端な高温や低温に遭遇すれば、色素組成が多少変化するという報告はあるが、本論文での花卉採集時期はそのような環境ではなかったため、問題はないと考えている。またツバキでは、半開の蕾から満開の花弁に至るまで、色素量は変化するが色素組成は変化しないとの報告があるが、実際にいくつかの花弁を継時的に分析したところ、色素組成の変化は認められなかった。</p> <p>【質問4】 色素の配糖体化について、バラでは5位の配糖体化が先に起こり、続いて3位が配糖体化されることがすでに報告されている。サルウインツバキの主要色素であるシアニジン 3,5-ジグルコシドの生合成について、同様なことが考えられるか。</p> <p>【回答4】 正確には答えられないが、ツバキでは、発達初期の蕾の花弁に5-グルコシド型の色素をまったく検出できないため、3位の配糖体化が先で、5位のそれが続いて起こるのではないかと推察できる。</p> <p>【質問5】 アシル化色素を多量に持つツバキの自生地環境適応性はどのようなものか。</p> <p>【回答5】 個々のツバキ種の自生地の標高、あるいは自生地がどのような地質（土壌）条件下にあるのかの如何にかかわらず、自生地を同じくするツバキ種間でアシル化色素を多量に持つ種と少量しか持たない種が見られることから、アシル化色素の蓄積割合と自生地環境とは、関係はないものと思える。</p>	

【質問6】 クラスタ分析では、カメラア節を4つのグループに分類しているのに対して、シリーズ（系）としては5つを設けたのはなぜか。

【回答6】 実際のクラスタは4群に分けることができる。しかし、ホンコンツバキは、同一サブクラスタ（論文で示すBクラスタ）内でこの種だけがかなり離れて位置していたので、類縁関係や系統発生を論じる上で理解・把握しやすいように一つのシリーズとして扱うことにしたために、5つのシリーズを設けた。

【質問7】 ツバキ種の分布域を決める要因と分布移動の要因は何か。

【回答7】 一般の植物においては、気候や土壌条件などの環境要因が考えられ、ツバキでも同様と思える。紅花ツバキ種の自生地（分布域）は、雲南省、四川省、貴州省、江西省など中国内陸部から浙江省、広東省など、中国東南部地域にかけてで、いずれも大河の流域にある。分布域成立の要因は、ツバキの生育に必要な適度の湿潤と温度、およびその土地の地質（土壌）であろう。また、分布移動の要因は、大河の流れや一部分ではあるが「人の手」も考えられる。例えば、雲南省に自生するトウツバキは、雲南省では良く育つが東南地域で育てるとうまくいかないことから、トウツバキがそのままの姿で東北進を開始したものではない。移動先の環境に合わせた種の改変が行われたであろう。したがって、種の持つ生育適応性について、その種がどこに分化したのかや、その種が生育にどのような環境を必要とするのかなど、詳しい調査に基づく分布移動を考えることが重要と思える。

【質問8】 ツバキに存在する倍数性と色素型の関連はどうか。

【回答8】 ツバキのほとんどは2倍性であるが、トウツバキやピタールツバキ・雲南種は6倍性である。この他にも高次倍数性の種がある。この点に関しては、非常に難しいことであるが、今後さらに精査して両者の関連を明らかにして行きたいと考えている。

【質問9】 二つの起源センターを提唱しているが、これは理に叶ったものなのか。

【回答9】 これまで、カメラア節ツバキの系統発生については、ツバキの形態や自生地域から発生地を一元的に捉えてきた。色素分析の結果、発生地を1ヶ所に限定するよりは複数の起源地を考えたほうが説明しやすい。偶然得られた結果かもしれないが、系統発生の経路に関して、二つの起源センターは、色素組成から裏付けることのできる一つの仮説として提案したものである。

【質問10】 ツバキ属ではDNAを用いた分子系統樹の作成に関する研究は進んでいるのか。

【回答10】 あまり進んではないが幾つかの報告がある。それによると、DNAによる分類と色素による分類とには大きな隔たりはないようである。

【質問11】 実際の花色と色素組成との関連はどうか。

【回答11】 実際にCIELAB表色系を用いて花色を測定した。色素組成との関連を明らかにしたかったが、サンプル数が膨大な量であったために、解析できなかった。