

Portulaca 属植物におけるベタレイン生合成の制御と
花色の育種に関する基礎的研究

野田 尚信

2000

①

The United Graduate School of Agricultural Sciences

Kagoshima University

JAPAN

Portulaca 属植物における
ベタレイン生合成の制御と花色の育種
に関する基礎的研究

Fundamental studies on regulation in betalain biosynthesis
and breeding for flower color in *Portulaca*

A Dissertation presented in partial fulfillment of
the requirements for the degree of
Doctor of Philosophy
in
Agricultural Science

野田 尚信

2000

Certification

We, the undersigned, herewith certify that this Dissertation, entitled "Fundamental studies on regulation in betalain biosynthesis and breeding for flower color in *Portulaca*" was not previously presented for the award of a degree, and those experiments contained herein were independently conducted by **Naonobu Noda** under our supervision, and hereby submitted to **The United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University, Japan**, in partial fulfillment of the requirements for the award of **Doctor of Philosophy (Ph. D.)** degree.

Approved by:

山下 研介
Kensuke Yamashita

Kensuke Yamashita, Ph. D.

Professor of Crop and Horticultural Science
Miyazaki University

藪谷 勤
T. Yabuya

Tsutomu Yabuya, Ph. D.

Professor of
Applied Genetics and Biotechnology
Miyazaki University

坂田 祐介
Y. Sakata

Yusuke Sakata, Ph. D.

Professor of
Ornamental Horticulture
Kagoshima University

高木 研
Y. Takagi

Yutaka Takagi, Ph. D.

Professor of
Plant Breeding
Saga University

續 美治
E. Tsuzuka

Eiji Tsuzuka, Ph. D.

Professor of
Crop and Horticultural Science
Miyazaki University

目次

| | |
|--|----|
| 1 緒論..... | 1 |
| 2 ベタレイン色素の分析 | |
| 2.1 <i>Portulaca</i> sp. 'Jewel' におけるベタレイン色素 | |
| 2.1.1 緒言..... | 11 |
| 2.1.2 材料および方法..... | 14 |
| 2.1.3 結果..... | 18 |
| 2.1.4 考察..... | 27 |
| 3 ベタレイン色素組成を異にするカルス培養細胞系 | |
| 3.1 培養細胞の色とベタレイン色素組成 | |
| 3.1.1 緒言..... | 31 |
| 3.1.2 材料および方法..... | 32 |
| 3.1.3 結果..... | 33 |
| 3.1.4 考察..... | 40 |
| 3.2 培養細胞の色における変異要因 | |
| 3.2.1 緒言..... | 47 |
| 3.2.2 材料および方法..... | 47 |
| 3.2.3 結果..... | 47 |
| 3.2.4 考察..... | 49 |
| 4 ベタレイン色素生産能を有する懸濁培養細胞系 | |
| 4.1 <i>Portulaca</i> 懸濁培養細胞系の確立 | |
| 4.1.1 緒言..... | 52 |
| 4.1.2 材料および方法..... | 53 |
| 4.1.3 結果..... | 54 |
| 4.1.4 考察..... | 63 |

| | |
|--------------------------|-----|
| 4.2 ベタレイン蓄積に対する植物ホルモンの作用 | |
| 4.2.1 緒言..... | 66 |
| 4.2.2 材料および方法..... | 66 |
| 4.2.3 結果..... | 67 |
| 4.2.4 考察..... | 73 |
| 4.3 ベタレイン合成と蓄積の光制御 | |
| 4.3.1 緒言..... | 76 |
| 4.3.2 材料および方法..... | 77 |
| 4.3.3 結果..... | 78 |
| 4.3.4 考察..... | 78 |
| 5 ベタレイン生合成系に関与する遺伝子の単離 | |
| 5.1 光照射下で特異的に発現する遺伝子の探索 | |
| 5.1.1 緒言..... | 83 |
| 5.1.2 材料および方法..... | 83 |
| 5.1.3 結果..... | 86 |
| 5.1.4 考察..... | 90 |
| 要約..... | 95 |
| Summary..... | 99 |
| 謝辞..... | 102 |
| 引用文献..... | 103 |

1 緒論

Portulaca 属植物について：*Portulaca* 属植物は、スベリヒユ科に属し、約 100 種が世界の熱帯、亜熱帯に分布し、南北アメリカに多くの種が分布している（塚本ら，1989）。園芸種としてマツバボタン（*P. grandiflora* Hook.）、ジュエル種（*Portulaca* sp. 'Jewel'）およびポーチュラカ（ハナスベリヒユ；*P. oleracea* L. cv.）が存在し、耐乾性および耐暑性に優れることから、初夏から秋にかけての花壇や露地植えによく利用されている。

マツバボタンは 19 世紀はじめにヨーロッパにて園芸化され、日本には江戸時代末期に導入された（斎藤，1969）。その花色は紫、赤、ピンク、オレンジ、黄、白のほかに斑入りなどと多彩である。マツバボタンには朝に開花し昼にはしぼむ問題点があったが、終日咲きの品種が近年作出されている。また、ジュエル種は昭和の初期にイギリスで発表され、一般的にマツバボタンの一品種として市販されているが（斎藤，1969）、マツバボタンの染色体基本数が $n=9$ であるのに対してジュエル種は $n=5$ であり、正逆交雑ともに種子形成がおきず、さらに花型、花色および草姿が異なることから、マツバボタンとは別種である（Syakudo *et al.*, 1960）。ジュエル種は他の二種に比べて大輪咲きで、耐寒性にも優れることから越冬可能であり、開花期が長いといった優良形質をもつにもかかわらず、花色変異に乏しくマゼンタ色花と自然突然変異系統の白色花、および X 線照射突然変異体後代を固定した赤色花が存在するのみである（足立，1972；足立ら，1985）（Fig. 1.1）。一方、日本に導入されてまだ 20 年ほどのポーチュラカは、花径が 2~3cm



Fig. 1.1 Flower color of *Portulaca* sp. 'Jewel'. a; original magenta flower strain (JM), b; white flower strain (JW), c; red flower strain (JR).

と小輪咲きながら多花性であり、花色の多彩化が行われたことによって、1990年に大阪で開かれた花と緑の万国博覧会以降に広く普及されるようになった。従って、ジュエル種は黄色系花および斑入りや覆輪などの複色花を作出し、マツバボタンやポーチュラカのような花色の多彩化を行うことで、春から秋にかけて花を楽しむことのできる優良な草花になるものと考えられる。

ベタレイン色素について: 花色を担う植物色素にはアントシアニンを含むフラボノイド、カロチノイド、クロロフィルおよびベタレインが存在し、*Portulaca* 属植物はベタレインによって花卉が発色している。ベタレインは赤紫色のベタシアニンおよび黄色のベタキサンチンから構成されており、ナデシコ目 (Caryophyllales) に属する 15 科のうち、ナデシコ科 (Caryophyllaceae) およびザクロソウ科 (Molluginaceae) を除く 13 科に限定された高等植物に存在する (Clement *et al.*, 1994; Clement and Mabry, 1996) (Table 1.1)。ベタレインは *Portulaca* 属植物をはじめ、サボテン類、ブーゲンビリア、オシロイバナ、ケイトウなどの花卉類、ビート、ハウレンソウなどの蔬菜類、またアマランサスなどの穀物類の花、葉、茎、根および果実などに広く生じて多彩な色を与えている。さらに、ベニテングタケ (*Amanita muscaria*) および *Hygrocybe* spp. などの高等菌類の一部にも分布し、菌傘の着色を担っている (Steglich and Strack, 1990)。ベタレインはフラボンやフラボノールと共存する場合があるが、アントシアニンとは相互排除の関係にある。また、ベタシアニンのグルコース転移酵素遺伝子 (5GT) はフラボノイドのグルコース転移酵素遺伝子 (UF3GT) 等との間に

Table 1.1 The distribution of betalains and anthocyanins
in the Caryophyllales*

Chenopodiinae (betalain-producing taxa)**

Achatocarpaceae
Aizoaceae
Amaranthaceae
Basellaceae
Cactaceae
Chenopodiaceae
Didiereaceae
Halophytaceae**
Hectorellaceae**
Nyctaginaceae
Phytolaccaceae
Portulacaceae
Stegnospermaceae**

Caryophyllinae (anthocyanin-producing taxa)**

Caryophyllaceae
Molluginaceae

*: Taxonomy follows Cronquist (1988).

** : Taxonomy follows Clement and Mabry (1996).

高い相同性があり、更に、ベタニジン、フラボノールおよびアントシアニジンを経質に用いた酵素活性の検定により、5GT はフラボノイド生合成系のグルコース転移酵素遺伝子から派生したことが示唆されていることから (Vogt *et al.*, 1997; Vogt *et al.*, 1999)、ベタレインは植物化学分類においても意義深いアルカロイド系の植物色素である。

ベタレイン生合成について：ベタレインの生合成経路は、アイソトープ標識した前駆体のフィーディング実験 (Chang *et al.*, 1974; Piattelli, 1981) および中間産物の同定 (Wyler *et al.*, 1984; Terradas and Wyler, 1991)、さらにマツバボタンおよびジュエル種の花蕾発育時における前駆体およびベタレイン色素の経時的变化の分析 (Kishima *et al.*, 1991a; 外山ら, 1992; 外山・足立, 1995) などにより解明されている (Fig. 1.2)。

まず、シキミ酸経路由来のチロシンがチロシナーゼの水酸化活性により 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) となり、更にチロシナーゼの酸化活性によって形成されるドーパクロムを経てシクロドーパ (ロイコドーパクロム) となる。このチロシナーゼは高等菌類のベニテングタケ (*Amanita muscaria*) から初めて精製されたが (Müller and Zrýd, 1996)、高等植物においても *Portulaca* カルス培養細胞から精製され、酵素活性が詳細に解析されるに至っている (Steiner *et al.*, 1999)。チロシナーゼ遺伝子の単離は *Phytolacca americana* (ヨウシュウヤマゴボウ) の懸濁培養細胞よりポリフェノールオキシダーゼ (PPOs) 遺伝子に保存されているアミノ酸配列から構築したプライマーを用いて試みられ、ベタレイ

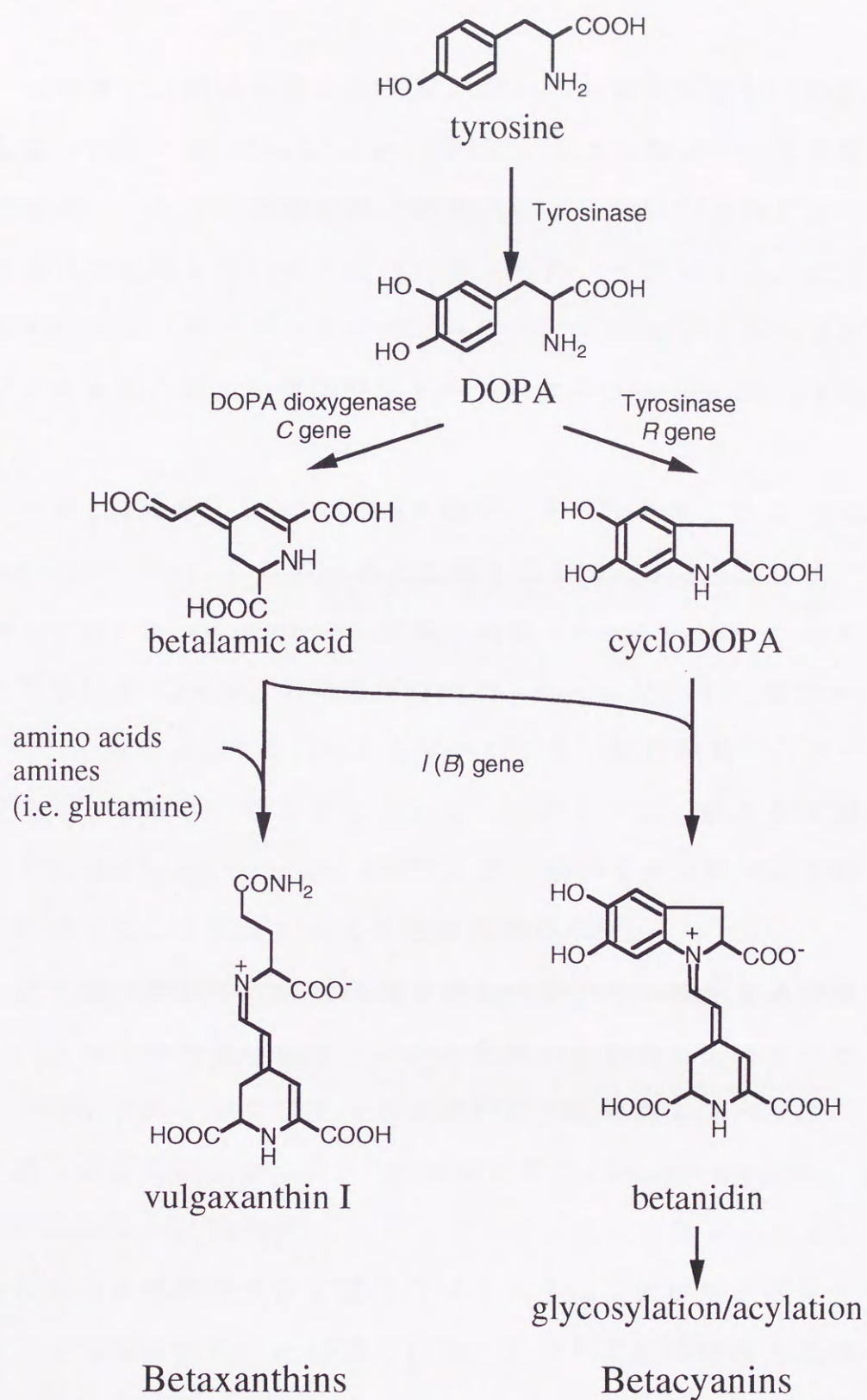


Fig. 1.2 Biosynthetic pathway of betalain. DOPA: 3,4-dihydroxyphenylalanine.

ンの蓄積により赤色化した果実において発現する遺伝子の断片が単離されている (Joy IV *et al.*, 1995)。しかしながら、この遺伝子は他のベタレイン蓄積組織では発現していないことから、一般的に果実で発現しているものとも考えられ、ベタレイン生合成に特異的なチロシナーゼ (またはポリフェノールオキシダーゼ) 遺伝子であることは、いまだ確認されていない (Müller and Zrýd, 1996)。

一方、DOPA は 4,5secodopa を経てベタラミン酸となる (Terradas and Wyler, 1991)。この反応を触媒する DOPA ジオキシゲナーゼに関しては、*A. muscaria* から酵素の精製 (Girod and Zrýd, 1991) および遺伝子 (*DodA*) の単離が行われ (Hinz *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1997)、更に *DodA* の cDNA をマツバボタンの白色花卉へパーティクルガンで導入することによって、ベタシアニンの形成が確認されているが (Müller *et al.*, 1997)、高等植物からの酵素および遺伝子の単離は、これまでのところ報告例がない。

全てのベタレインは発色団であるベタラミン酸を基本骨格にもち、アミノ酸あるいはアミンが非酵素的に縮合してベタキサンチンが形成され、シクロドーパが非酵素的に縮合してベタニジン (ベタシアニンのアグリコン) が形成される (Hempel and Böhm, 1997; Schliemann *et al.*, 1999)。ベタニジンは、更に配糖体化およびアシル化などの修飾を受けて様々なベタシアニンとなり、ベタキサンチンとともに液胞内に蓄積される。アシル基転移酵素およびグルコース転移酵素は、アカザ (*Chenopodium rubrum*) の懸濁培養細胞 (Bokern and Strack, 1988; Bokern *et al.*, 1991a; Bokern *et al.*, 1991b; Bokern *et al.*, 1992) およびリピングストーンデージー (*Dorotheanthus*

bellidiformis) の懸濁培養細胞 (Heuer and Strack, 1992; Heuer *et al.*, 1996; Vogt *et al.*, 1997) からそれぞれ精製し、両者の特性が明らかにされた。更に、ベタニジン 5-O-グルコース転移酵素については構造遺伝子がクローニングされた (Vogt *et al.*, 1999)。

以上が *Portulaca* 属植物における花色と花色素であるベタレインの生合成系に関する研究の現状であり、高等植物における DOPA ジオキシゲナーゼの解析、チロシンからベタラミン酸までを触媒する酵素の構造遺伝子および調節遺伝子の単離、生合成が行われる細胞質内における場の特定などが重要な課題として残っている。更に、共通の前駆体から誘導されるベタシアニンとベタキサンチンの制御機構、および液胞への輸送機構についても明らかにする必要がある。

花色の育種について：花色の育種は、主に交配などによる野生種からの新たな花色形質の導入や、突然変異の利用によって行われているが、近縁野生種に目的とする花色を発現する遺伝子が存在しない場合は、花色の多彩化を進める上で限界が生ずる。しかし、分子生物学の発展によって、どのような遺伝子資源でも種の壁を超えて利用可能となり、さらに特定の形質だけを改変することが可能になった (田中, 1997)。特にアントシアニン生合成系においては、その生合成に関与する構造遺伝子および調節遺伝子がほぼ特定され、巧みな発現の仕組みが解明されると、それらの成果を基礎に改変した遺伝子や cDNA を導入した花色の改変が可能になった (飯田・星野, 1994)。トウモロコシ (*Zea mays*) のペラルゴニジン合成活性をもつジヒドロフラボノール 4-レダクターゼ遺

伝子 (*DFR*) の導入による、レンガ色のペチュニア (*Petunia hybrida*) の作出が初めての報告であり (Meyer *et al.*, 1987)、またカルコン合成酵素遺伝子 (*CHS*) のセンスまたはアンチセンス DNA のペチュニアへの導入により、コサプレッションとよばれる色素合成の抑制が引き起こされて、様々な模様が形成されることが報告された (van der Krol *et al.*, 1988; Jorgensen *et al.*, 1996)。更に、ガーベラ (*Gerbera hybrida*) (Elomaa *et al.*, 1996) などの様々な植物種で遺伝子工学的手法による花色の改変の成果が得られ、カーネーション (*Dianthus caryophyllus*) においては紫色花の新品種が商品化されるまでに至っている (Tanaka *et al.*, 1998)。

以上のことから、本研究は *Portulaca* 属植物の花色の育種を行うために必要となるベタレイン生合成に関する新たな知見を得ることを目的として行った。酵素および遺伝子レベルでのベタレイン生合成機構を解明するために有利な実験系となる培養細胞系を利用したベタレイン色素合成および蓄積機構の解明を中心に、以下の事項について詳細な検討を加えた。まず第2章において、ジュエル種の植物体および培養細胞のベタレイン組成を解明して色素の現状を把握した。また第3章において、ベタレイン色素によって様々な色を呈するカルス培養細胞系統を獲得して色素特性を解明するとともに、ベタシアニンとベタキサンチンの合成制御および蓄積機構について生理学および遺伝学的観点から論述した。次に第4章において、より生化学的研究に適したベタシアニン生産能を有する懸濁細胞培養系を確立するために培養諸条件を検討するとともに、ベタシアニン色素の合成および蓄積の特性につい

て生理学的観点から論述した。更に第 5 章において、光に対する培養細胞におけるベタシアニン蓄積の特性を利用し、ベタレイン生合成に関与する遺伝子の単離を試みた。

2 ベタレイン色素の分析

2.1 *Portulaca* sp. 'Jewel'におけるベタレイン色素

2.1.1 緒言

Portulaca 属植物に含有されているベタレイン色素は、主にマツバボタンで研究されており、ベタニン（ベタニジン 5-*O*- β -グルコシド）、ベタニジン、イソベタニン（Adachi and Nakatsukasa, 1983）および neobetainin（Alard *et al.*, 1985）が花卉から検出されている（Fig. 2.1）。また、ベタキササンチンは *vulgaxanthin* I、*indicaxanthin*、*dopaxanthin* およびベタラミン酸が花卉の主要色素として検出され、更に *miraxanthin* I、*vulgaxanthin* II（Adachi and Nakatsukasa, 1983）、*portulacaxanthin*（Piattelli *et al.*, 1971）、*portulacaxanthin* II、*portulacaxanthin* III（Trezzini and Zryd, 1991a）および *humilixanthin*（Strack *et al.*, 1987）も検出されている（Fig. 2.2）。マツバボタンの赤紫色カルス培養細胞からは、ベタシアニンの *lampranthin* II（Steiner *et al.*, 1999）が、黄色カルス培養細胞からは、ベタキササンチンの *vulgaxanthin* I および *vulgaxanthin* II（Böhm *et al.*, 1991）が検出されている（Fig. 2.1, 2.2）。以上の様に、マツバボタンの花卉におけるベタレイン色素に関する報告がほとんどであり、他に数種の野生種の花卉が分析されているが（Adachi and Nakatsukasa, 1983）、他のベタレイン色素の同定は報告されていない。そこで本章では、*Portulaca* sp. 'Jewel'（ジュエル種）の花卉、雌雄蕊、茎、カルス培養細胞に含有されているベタレイン色素組成を詳細に調査し、今後の花色育種の基礎資料とするとともにベタレインの生

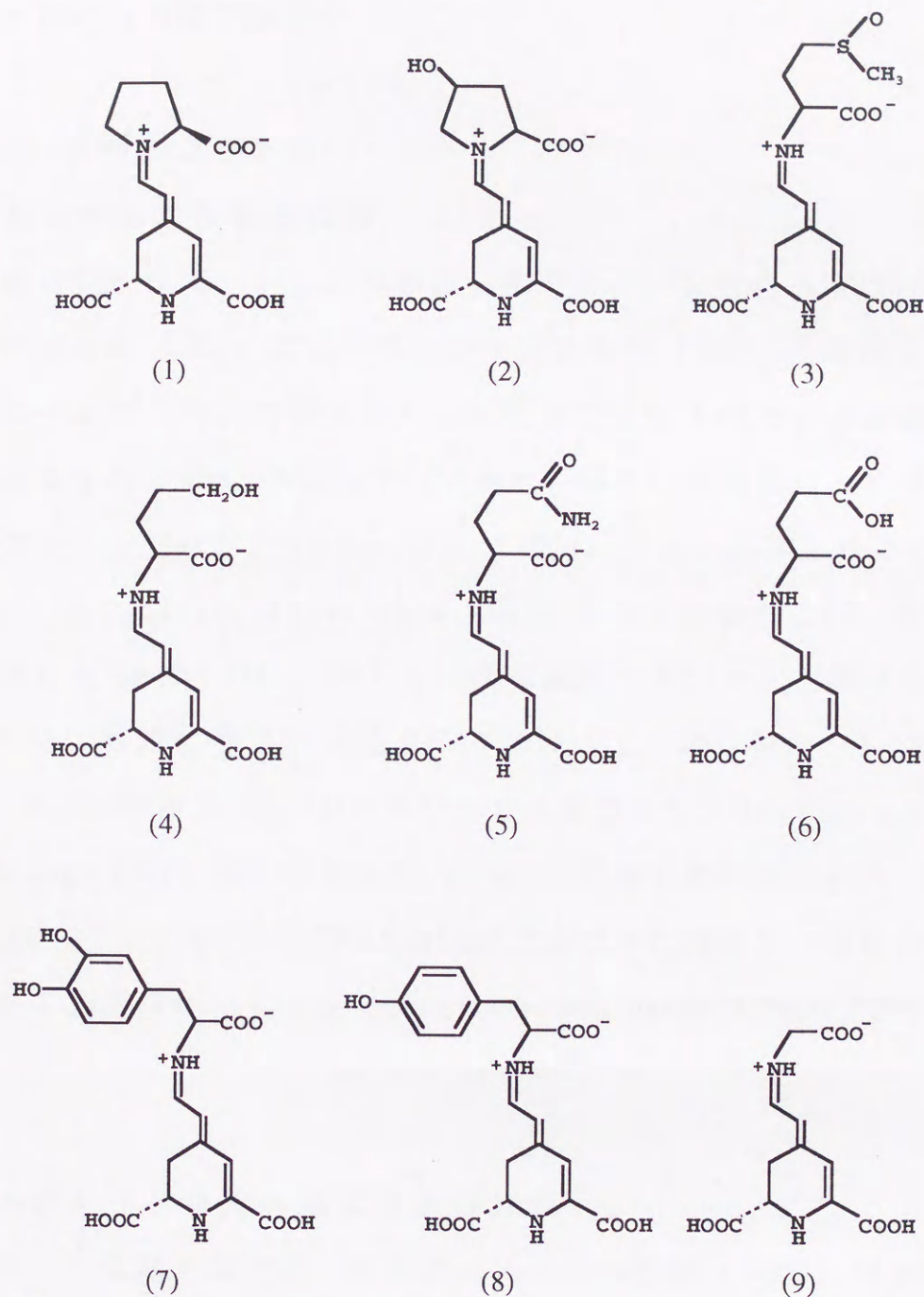


Fig. 2.2 Structure of betaxanthins in *Portulaca*. (1) indicaxanthin (Pro+betalamic acid (BA)), (2) portulacaxanthin (hydroxyproline+BA), (3) miraxanthin I (methionine sulfoxide+BA), (4) humilixanthin (5-hydroxynorvaline+BA), (5) vulgaxanthin I (Gln+BA), (6) vulgaxanthin II (Glu+BA), (7) dopaxanthin (DOPA+BA), (8) portulacaxanthin II (Tyr+BA), (9) portulacaxanthin III (Gly+BA).

合成に関する考察を加えた。

2.1.2 材料および方法

a. 植物体および培養細胞

植物材料として、ジュエル種近交系である、白色花系統 (JW4)、赤色花系統 (JR3) およびマゼンタ色花系統 (JM1) を供試して、ビニールハウス内で種子より自然光下で生育させた。培養細胞はジュエル種の JR、JW および JM 系統の実生の胚軸部位より誘導したカルスを用いた。Kishima *et al.* (1991) により誘導された JR2、JR4、JR 7、JR10、JR12、JR18、JR21 カルス系統および、新たに誘導した JR22、JM3、JW4 カルス系統をベタレイン色素分析に供試した。培地には、9 μ M 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、30g/l ショ糖および 2.5g/l ゲランガムを添加した MS (Murashige and Skoog, 1962) 固形培地を用い、25 日間隔で継代を行った。培地の pH は 1N NaOH および 1N HCl により 5.7 に調整し、培地および器具の滅菌はオートクレーブ (1.2kg/cm², 121°C, 15min) で行った。

b. ベタレイン色素の抽出および分析

試料の生重量を測定後、80% メタノール水溶液 (-30°C, 10 ml/g) に懸濁して、-20°C で色素を完全抽出した。色素粗抽出液を遠心分離 (1,750×g, 10min) し、上清を 30°C で減圧乾固した。乾固物を超純水 (1 μ l /mg 試料) に再溶解後、ミリポアフィルター (孔径: 0.2 μ m) で除塵して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析の試料とした。HPLC 分析は STR ODS-II カラム (150×4.6 mm i. d.

Shimadzu) を用いて、CTO-10A カラムオーブン (Shimadzu) にて 35℃ に保温して行った。5% 酢酸水溶液 (A 液) および 50% アセトニトリル水溶液 (B 液) を移動相に用いた。送液ユニットに LC-9A (Shimadzu) を用いて、流速を 1 ml/min とし、20 分間で溶媒 B を 0 から 40% (B/A+B) へと直線勾配させた後、40 分まで溶媒 B を 40% に保ちベタレイン色素を溶出した。SPD-10A (Shimadzu) を用いてベタシアニンを 540nm、ベタキササンチンを 480nm、ベタラミン酸を 430nm で検出した。各ピークの吸収スペクトルを測定し、540nm 付近に吸収極大をもつピークをベタシアニン、470nm 付近に吸収極大をもつピークをベタキササンチンであると判定した。ベタレインの同定はコクロマトグラフィーおよびクロマトグラムパターンの比較で行い、ベタニン、イソベタニンおよびベタニジンの標品は、レッドビート粉末より精製したものを、またベタキササンチンの標品には半合成ベタキササンチンを用いた (Trezza and Zrýd, 1991; 外山ら, 1992)。

c. ベタキササンチン標品の半合成

ジュエル種のカルス培養細胞 JR18 系統 (ベタニン : イソベタニン = 9 : 1) の冷 80% メタノールを用いた粗抽出液を遠心分離 (1750 ×g, 10min, 室温) して上清を減圧濃縮した。濃縮液 1 ml 当たり 5 μl 酢酸および 9 ml 95% エタノールを加え、直ちに激しく攪拌し、-30℃ で一晩静置して色素を沈殿した。粗結晶化した色素沈殿を水で溶解し、最終濃度 1.5M となるように 25% アンモニア水を添加してアルカリ加水分解を行った。反応は 20 分間、室温で行い、紫色から黄色へと変化した色素水溶液に 1N 塩酸水溶液を氷上で添加

して反応を停止した (Trezza and Zrýd, 1991)。ベタラミン酸水溶液に、酢酸エチルを添加して洗浄した後、遠心分離 ($8900\times g$, 10min, 4°C) してベタラミン酸水溶液層を室温で減圧濃縮した (Schliemann *et al.*, 1999)。100 μl の超純水に再溶解した試料を HPLC を用いて分析して、ベタラミン酸 (R_t 8.9, λ_{max} 408nm) を確認した。調整したベタラミン酸水溶液、又はベタニンの加水分解溶液に、任意のアミノ酸またはアミン (Table 2.3) 50mg を添加し (Hempel and Böhm, 1997)、懸濁した後、 4°C で 10 分間静置した。酢酸エチルによる洗浄を行った後に水層を減圧乾固し、50 μl の超純水に再溶解した試料を HPLC を用いて分析し、半合成したベタキサンチンの保持時間および吸収極大を調査した後、クロマトグラフィーの標品として用いた。

d. 色素抽出液の吸光度測定

試料の生重量を測定後、80% メタノール (-30°C , 100 mg/ml) に懸濁し、 -20°C に静置して色素を完全抽出した。粗抽出液を遠心分離 ($1750\times g$, 10min, 室温) して上清を試料とし、540nm および 480nm における吸光度をマルチパーパス分光光度計 (MPS-2000, Shimadzu) を用いて測定した。

e. ベタレイン色素の定量

HPLC により分離した各ピークの定量は、HPLC の Area 総数と Optical density (OD) 値 (A_{540} 又は A_{480}) から求めた回帰係数 5^{-7} (Fig. 2.3) を用いて、HPLC の Area 数を OD 値に換算した後、分子吸光係数 (ベタシアニン: $\epsilon = 56,000$, ベタキサンチン: $\epsilon = 48,000$,

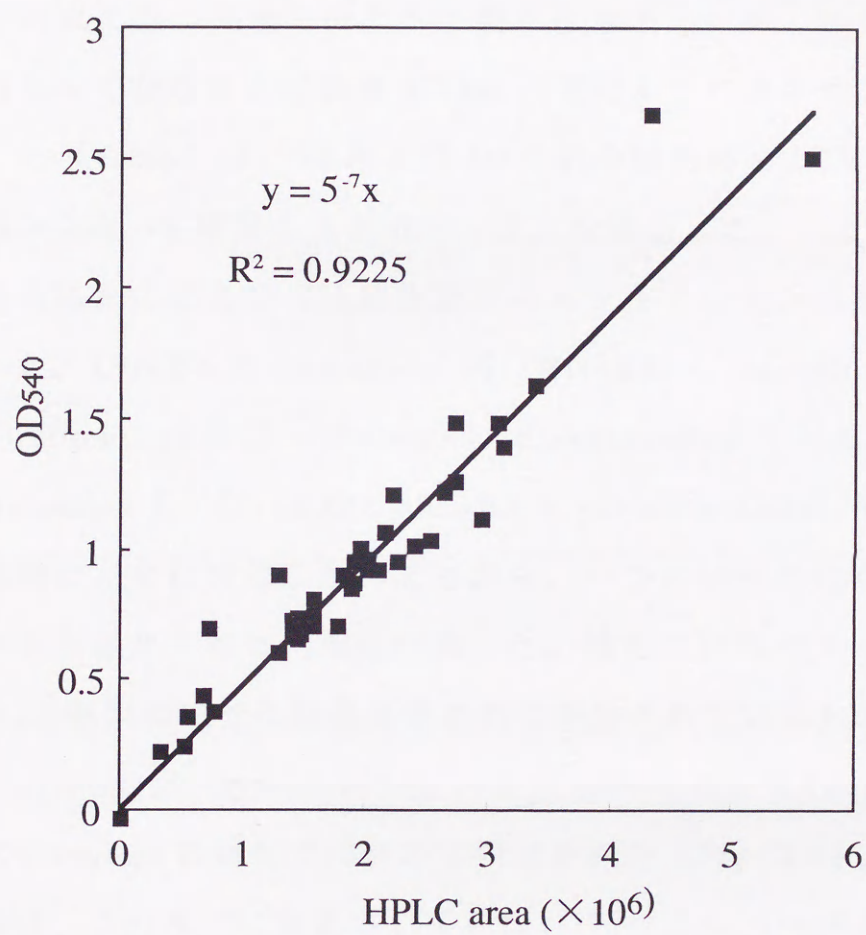


Fig. 2.3 Linear regression on HPLC area and OD₅₄₀. HPLC area; 10mgFWsample/10 μ l water. OD₅₄₀; 100mgFWsample/1 ml 80%MeOH.

ベタラミン酸 (BA) : $\epsilon = 25,000$ から (Girod and Zrýd, 1991; Trezzini and Zrýd, 1991)、試料の生重量 1g 当たりの濃度を求めた。

2.1.3 結果

a. ベタキサンチン色素の同定

半合成に用いた全てのアミノ酸またはアミンは、ベタラミン酸と縮合して吸収極大波長を 470nm 付近にもつベタキサンチンを形成した (Table 2.1)。JR および JM 系統の植物体およびカルス培養細胞から計 16 種類のベタキサンチンを検出した。一方、JW 系統の植物体およびカルス培養細胞からベタキサンチンは検出されなかった。Lys+BA と muscaaurin VII (His+BA)、Asn+BA と Ser+BA、portulacaxanthin I (Hyp+BA) と miraxanthin I (Asp+BA) と vulgaxanthin I (Gln+BA)、Met+BA と portulacaxanthin III (Gly+BA) は時に完全に分離しないことから、一つのピークに別のベタキサンチンも含まれる可能性が残った。検出されたベタキサンチンの内、9 種類はすでに構造決定されて命名されているものであるが、miraxanthin III (tyramine+BA) および miraxanthin V (dopamine+BA) は *Portulaca* 属植物では初めて同定された (Fig. 2.4)。残りの 7 種類は、これまでに命名されていない Lys+BA、Asn+BA、Val+BA、Leu+BA、Phe+BA、および半合成したベタキサンチン標品とは一致しないベタキサンチンであった (Table 2.2, 2.3)。

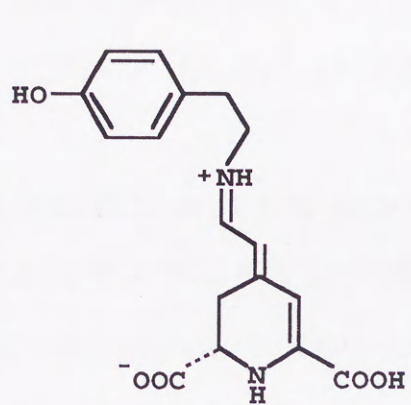
b. ベタシアニン色素の同定

JR および JM 系統の植物体およびカルス培養細胞から、計 9 種類のベタシアニンを検出した (Table 2.4, 2.5)。コクロマトグラフィ

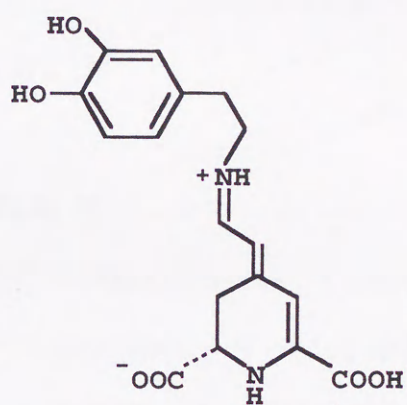
Table 2.1 HPLC and optical data for a range of partially synthesized betaxanthin standards and betalamic acid

| Amino acid / Amine | Trivial name | R_f | λ_{max} |
|--------------------|----------------------|-------|-----------------|
| Lysine | New | 2.2 | 474 |
| Histidine | Muscaurin VII | 2.4 | 472 |
| Arginine | New | 2.5 | 474 |
| Asparagine | New | 2.6 | 471 |
| Serine | New | 2.7 | 472 |
| Cysteine | New | 2.8 | n.t. |
| Hydroxyproline | Portulacaxanthin I | 2.9 | n.t. |
| Aspartic acid | Miraxanthin II | 2.9 | 474 |
| Glutamine | Vulgaxanthin I | 3.0 | 472 |
| Methionine | New | 3.1 | n.t. |
| Glycine | Portulacaxanthin III | 3.2 | n.t. |
| Threonine | New | 3.8 | 474 |
| Glutamic acid | Vulgaxanthin II | 3.9 | 469 |
| Alanine | New | 5.5 | 469 |
| Proline | Indicaxanthin | 7.9 | 478 |
| Dopa | Dopaxanthin | 8.4 | 477 |
| - | Betalamic acid | 9.0 | 408 |
| Dopamine | Miraxanthin V | 10.5 | 474 |
| Tyrosine | Portulacaxanthin II | 11.3 | 463 |
| Valine | New | 12.9 | 466 |
| Tyramine | Miraxanthin III | 13.8 | 475 |
| Isoleusine | New | 17.8 | 468 |
| Leusine | New | 18.1 | 465 |
| Phenylalanine | New | 19.4 | 471 |
| Tryptophan | New | 19.9 | 472 |

n.t.; no tested.



(1)



(2)

Fig. 2.4 Structure of miraxanthin III (1) and miraxanthin V (2).

ーによって3種のピークをベタニン(R_f 8.6)、イソベタニン(R_f 10.2) およびベタニジン (R_f 11.5) と同定した。 R_f 16.5~23.0 に検出された残りの6種のピークは吸光スペクトル測定により、315~328nm に吸収極大が存在し、また可視光領域の吸収極大波長の深色化がおこるアシル化ベタシアニンの特性 (Strack and Wray, 1993) を持つことが明らかになった。そこで、これらの色素をアシル化ベタシアニン (AcBc) 1~6 とした。

c. 花弁におけるベタレイン色素組成

花弁のベタキサンチンは、JR では vulgaxanthin I (Gln+BA)、JM では vulgaxanthin I (Gln+BA)、miraxanthin V (dopamine+BA)、portulacaxanthin II (Tyr+BA) が主要色素として検出された。JR 花弁における生重量 1 g 当たりのベタキサンチン量は、JR においてベタシアニン量の約 1/4 であり、JM において約 1/20 であった。JR 花弁の生重量 1 g 当たりのベタキサンチン量は JM 花弁の約 22 倍であった (Table 2.2)。一方、ベタシアニン組成は JR および JM とともに同じで、ベタニンが 80% 以上を占め、他にベタニジンおよびイソベタニンにより構成されていた。花弁においてアシル化ベタシアニンは検出されなかった。JR 花弁の生重量 1 g 当たりの総ベタシアニン量は JM 花弁の約 4 倍であった (Table 2.4)。

d. 雌蕊および雄蕊におけるベタレイン色素組成

雌雄蕊のベタキサンチンは、JR では vulgaxanthin I (Gln+BA)、Lys+BA、JM では miraxanthin V (dopamine+BA)、portulacaxanthin II (Tyr+BA)、Lys+BA、Asn+BA が主要色素として検出された。

雌雄蕊のベタキサンチンは花弁と同様の組成であり、JR と JM の含有量に差はなかった (Table 2.2)。一方、主要ベタシアニンは花弁とは異なり、JR および JM とともにベタニジンが約 60% を占めていた。また、両者ともベタニン、イソベタニンのほかに 6 種類のアシル化ベタシアニンが検出され、AcBc3 は 20% 以上を占めていた。雌雄蕊における生重量 1 g 当たりのベタシアニン量は JM の方が JR よりも 5.6 倍高かった (Table 2.4)。

e. 茎におけるベタレイン色素組成

茎におけるベタキサンチン含有量は JM において 0.1nmole/gFW に達しない値でしか検出されず、JR においても 1nmole/gFW と極微量であった (Table 2.2)。一方、ベタシアニンは JR および JM とともに蓄積し、主要色素は 30 から 40% を占めていた AcBc4 であった。また、他のアシル化ベタシアニンが 4 種類検出され、アシル化ベタシアニンが JR では 87%、JM では 67% を占めていた。このベタシアニン組成は実生の胚軸に類似していたが、実生においては約 30% を占めていたベタニジンの含有率が茎においては低下していた。JR の茎における生重量 1 g 当たりのベタシアニン量は JM の約 5 倍であった (Table 2.4)。

f. カルス培養細胞におけるベタレイン組成

JR カルス培養細胞におけるベタキサンチン組成は各カルス系統により異なっていたが、主要色素として miraxanthin III (tyramine+BA) を共通に含有していた。生重量 1 g 当たりのベタキサンチン量は、JR 系統においてベタシアニン量の約 1/8 から 1/17 であり、JM

Table 2.2 Betaxanthin content of the tissue in *Portulaca* sp. 'Jewel'

| Betaxanthin | Amino acid or Amine | <i>R_f</i> (min) | JR* | | | | | | JM* | | | |
|----------------------|---------------------------|-------------------------------|---------|-------|-----------------|-------|------|-------|---------|-------|-----------------|-------|
| | | | petal** | | pistil & stamen | | stem | | petal** | | pistil & stamen | |
| | | | Conc*** | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) |
| new | Lys | 2.2 | 70.4 | (12) | 15.8 | (22) | | | | | 9.6 | (19) |
| Muscaaurin VII | His | 2.4 | | | | | | | | | | |
| new | Asn | 2.6 | 39.8 | (7) | 5.3 | (8) | | | | | 10.8 | (21) |
| new | Ser | 2.7 | | | | | | | | | | |
| Portulacaxanthin I | Hyp [†] | 2.9 | 204.2 | (36) | 14.8 | (21) | | | 6.5 | (26) | 2.8 | (6) |
| Miraxanthin II | Asp | 2.9 | | | | | | | | | | |
| Vulgaxanthin I | Gln | 3.0 | | | | | | | | | | |
| new | Met | 3.1 | | | | | | | | | | |
| Portulacaxanthin III | Gly | 3.2 | 53.5 | (10) | 2.5 | (4) | | | | | 1.9 | (4) |
| Vulgaxanthin II | Glu | 3.9 | | | | | | | | | | |
| new | Ala | 5.5 | 39.9 | (7) | 2.3 | (3) | | | | | | |
| Indicaxanthin | Pro | 7.9 | 11.1 | (2) | 1.8 | (3) | | | | | | |
| Dopaxanthin | dopa | 8.4 | 24.3 | (4) | | | | | 2.3 | (9) | 1.2 | (2) |
| Betalamic acid | - | 8.9 | | | 7.3 | (10) | 0.3 | (25) | | | 1.7 | (3) |
| Miraxanthin V | Dopamine | 10.5 | 17.0 | (3) | 9.5 | (13) | 0.1 | (15) | 11.5 | (45) | 11.0 | (22) |
| Portulacaxanthin II | Tyr | 11.3 | 63.6 | (11) | 8.3 | (12) | 0.2 | (17) | 5.2 | (20) | 8.4 | (17) |
| new | Val | 12.9 | | | | | 0.2 | (17) | | | 0.5 | (1) |
| Miraxanthin III | Tyramine | 13.8 | | | | | 0.3 | (28) | | | 0.3 | (1) |
| new | Leu | 17.8 | | | | | | | | | 1.9 | (4) |
| new | Phe | 19.4 | | | 1.2 | (2) | | | | | 0.5 | (1) |
| total | | | 564.5 | (100) | 71.0 | (100) | 1.0 | (100) | 25.6 | (100) | 50.6 | (100) |

*; JR=red colored flower genotype, JM=magenta colored flower genotype.

**; full opened flower petals.

***; Conc=concentration (nmole/gFW).

†; Hyp=Hydroxyproline.

Table 2.3 Betaxanthin content of callus lines in *Portulaca* sp. 'Jewel'

| Betaxanthin | AA/ Amine † | R _f | JR2* | | JR4 | | JR7 | | JR10 | | JR12 | | JR18 | | JR21 | | JR22 | | JM3* | |
|----------------------|----------------|----------------|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
| | | | Conc** | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) |
| new | Lys | 2.2 | | | 0.5 | (3) | | | | | | | 1.8 | (10) | | | | | | |
| Muscaaurin VII | His | 2.4 | 0.9 | (6) | 2.8 | (15) | | | | | 0.8 | (3) | 0.7 | (4) | 0.8 | (10) | 0.6 | (5) | | |
| new | Asn | 2.6 | | | 1.0 | (5) | | | | | 0.8 | (3) | 0.8 | (5) | | | | | | |
| new | Ser | 2.7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Portulacaxanthin I | Hyp | 2.9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Miraxanthin II | Asp | 2.9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vulgaxanthin I | Gln | 3.0 | 1.9 | (11) | 6.8 | (38) | | | | | 3.7 | (13) | | | 0.7 | (9) | | | | |
| Portulacaxanthin III | Gly | 3.2 | | | 0.8 | (5) | | | | | 0.6 | (2) | | | | | | | | |
| Vulgaxanthin II | Glu | 3.9 | | | 0.9 | (5) | | | | | | | | | | | | | | |
| Betalamic acid | - | 9.0 | | | | | 1.8 | (11) | | | | | | | | | | | | |
| new | unknown | 9.5 | | | 1.2 | (6) | 1.9 | (12) | 0.9 | (15) | 1.4 | (5) | 2.2 | (13) | | | 1.3 | (10) | | |
| Miraxanthin V | Dpn | 10.5 | | | 0.7 | (4) | 0.6 | (4) | | | 0.7 | (2) | | | | | 1.8 | (13) | | |
| Portulacaxanthin II | Tyr | 11.3 | | | | | | | | | 1.9 | (6) | 0.7 | (4) | 0.8 | (10) | | | | |
| new | Val | 12.9 | | | | | | | | | 0.6 | (2) | | | | | | | | |
| Miraxanthin III | Tym | 13.8 | 13.5 | (83) | 2.5 | (14) | 9.7 | (59) | 4.0 | (66) | 12.5 | (42) | 7.2 | (43) | 4.9 | (64) | 7.5 | (55) | 2.8 | (76) |
| new | unknown | 16.0 | | | | | 0.5 | (3) | | | | | | | | | | | | |
| new | Leu | 18.1 | | | 0.9 | (5) | 0.5 | (3) | 1.2 | (19) | 0.6 | (2) | 2.5 | (15) | | | 2.3 | (17) | 0.9 | (24) |
| new | Phe | 19.4 | | | | | 1.2 | (7) | | | 6.2 | (21) | 0.8 | (5) | 0.6 | (7) | | | | |
| total | | | 16.3 | (100) | 18.1 | (100) | 16.3 | (100) | 6.1 | (100) | 29.8 | (100) | 16.8 | (100) | 7.7 | (100) | 13.6 | (100) | 3.8 | (100) |

*; JR=red colored flower genotype, JM=magenta colored flower genotype.

**; Conc=concentration (nmole/gFW).

†; AA=amino acid, Hyp=Hydroxyproline, Dpn=dopamine, Tym=tyramine.

Table 2.4 Betacyanin content of the tissue in *Portulaca sp.* 'Jewel'

| | <i>R</i> _f | HCA** | λ max | <i>A</i> ₃₂₀ / <i>A</i> ₅₄₀ | JR* | | | | | | JM* | | | | | |
|--------------------|-----------------------|-------|---------------|--|---------|-------|-----------------|-------|------|-------|-------|-------|-----------------|-------|------|-------|
| | | | | | petal | | pistil & stamen | | stem | | petal | | pistil & stamen | | stem | |
| | (min) | (nm) | (nm) | | Conc*** | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) |
| Betanin | 8.6 | - | 536 | 0.07 | 1702.5 | (80) | 22.2 | (9) | 4.1 | (9) | 477.2 | (87) | 78.1 | (6) | 2.0 | (22) |
| Isobetanin | 10.2 | - | 536 | 0.07 | 48.9 | (2) | 1.7 | (1) | 1.2 | (2) | trace | (0) | 14.7 | (1) | 0.4 | (4) |
| Betanidin | 11.5 | - | 536 | 0.04 | 391.1 | (18) | 140.9 | (59) | 0.9 | (2) | 73.0 | (13) | 883.1 | (66) | 0.7 | (7) |
| AcBc1 [†] | 16.5 | 324 | 541 | 0.77 | | | 0.8 | (0) | 7.6 | (16) | | | 3.8 | (0) | 1.5 | (16) |
| AcBc2 | 17.9 | 325 | 542 | 1.07 | | | 0.6 | (0) | 2.8 | (6) | | | 21.0 | (2) | 0.6 | (6) |
| AcBc3 | 19.8 | 321 | 538 | 0.52 | | | 63.5 | (27) | 20.5 | (43) | | | 285.3 | (21) | 3.1 | (33) |
| AcBc4 | 21.2 | 321 | 540 | 1.15 | | | 6.2 | (3) | 8.0 | (17) | | | 34.5 | (3) | 0.8 | (9) |
| AcBc5 | 22.4 | 328 | 538 | 0.99 | | | 0.5 | (0) | 2.5 | (5) | | | 16.2 | (1) | 0.3 | (3) |
| AcBc6 | 23.0 | 315 | 535 | 0.62 | | | 3.0 | (1) | | | | | 6.9 | (1) | | |
| total | | | | | 2142.4 | (100) | 239.4 | (100) | 47.6 | (100) | 550.2 | (100) | 1343.6 | (100) | 9.4 | (100) |

*; JR=red colored flower genotype, JM=magenta colored flower genotype.

**; HCA=hydroxycinnamic acid.

***; Conc=concentration (nmole/gFW).

[†]; AcBc=acylated betacyanin.

Table 2.5 Betacyanin content of callus line in *Portulaca sp.* 'Jewel'

| | JR2 | | JR4 | | JR7 | | JR10 | | JR12 | | JR18 | | JR21 | | JR22 | | JM3 | |
|-------------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
| Betacyanin | Conc* | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) | Conc | (%) |
| Betainin | 131 | (72) | 100 | (70) | 180 | (88) | 82 | (90) | 155 | (69) | 134 | (87) | 113 | (88) | 99 | (71) | 70 | (58) |
| Isobetainin | 18 | (10) | 9 | (6) | 9 | (5) | 6 | (7) | 31 | (14) | 13 | (8) | 7 | (6) | 23 | (17) | 11 | (9) |
| Betanidin | 5 | (3) | 2 | (2) | 6 | (3) | 2 | (2) | 1 | (0) | 1 | (0) | 2 | (2) | 1 | (1) | 1 | (1) |
| AcBc1** | 1 | (1) | 1 | (1) | 1 | (1) | | | | | | | | | 0 | (0) | | |
| AcBc2 | | | | | | | | | | | | | | | 1 | (0) | | |
| AcBc3 | 16 | (9) | 3 | (2) | 1 | (1) | 1 | (1) | 11 | (5) | 1 | (0) | | | 1 | (1) | 2 | (1) |
| AcBc4 | 6 | (3) | 2 | (1) | | | 0 | (0) | 6 | (3) | 1 | (0) | 0 | (0) | 1 | (1) | 1 | (1) |
| AcBc5 | 4 | (2) | 18 | (13) | 4 | (2) | 0 | (0) | 13 | (6) | 3 | (2) | 4 | (3) | 6 | (4) | 25 | (21) |
| AcBc6 | 2 | (1) | 7 | (5) | 2 | (1) | 0 | (0) | 7 | (3) | 1 | (1) | 1 | (1) | 6 | (5) | 10 | (9) |
| total | 182 | (100) | 142 | (100) | 203 | (100) | 91 | (100) | 223 | (100) | 154 | (100) | 128 | (100) | 138 | (100) | 120 | (100) |

*; Conc=concentration (nmole/gFW).

**; AcBc=acylated betacyanin.

においては約 1/32 であった (Table 2.3)。ベタシアニン量は、最も高い値を示した JR12 カルス系統においても花卉の約 1/10、茎の約 5 倍であった。全ての JR カルス系統における主要ベタシアニンは、70~90% を占めるベタニンであった。また、各カルス系統とも植物体では 0~4% しか占めていなかったイソベタニンを 5~17% も有していた。更に、花卉では検出されなかったアシル化ベタシアニンが検出され、その組成はカルス系統により異なっていた。JM カルスにおける主要ベタシアニンは JR と同様ベタニンであったが、アシル化ベタシアニン含有率が高く、32% を占めていた (Table 2.5)。

2.1.4 考察

本研究により、ジュエル種の様々な組織および培養細胞のベタレイン色素組成を明らかにし、新たにベタキサンチン 9 種類を同定するに至った。ベタキサンチンの同定に先立って行ったベタキサンチンの半合成において、用いた全てのアミノ酸またはアミンがベタキサンチンを形成した (Table 2.1)。吸収極大の測定によりベタキサンチンは構造の違いにも関わらず、ほぼ 470nm 付近に吸収極大をもつことから、本実験で用いたアミノ酸またはアミンがベタラミン酸と縮合しても生体の色調には影響しないと考えられた。植物において同定されている 200 以上のアミノ酸はベタキサンチンを形成する可能性があると考えられている (Strack and Vogt, 1994)。しかし、ジュエル種において検出されたベタキサンチンは 16 種類であり、生体内で合成されたベタキサンチンは限られていた。このことは、*in vitro* によるベタキサンチン合成 (Trezza and

Zrýd, 1991) および植物体へのアミノ酸の投与実験 (Hempel and Böhm, 1997; Schliemann *et al.*, 1999) から推測されている様に、液胞内に蓄積されている余剰のアミノ酸またはアミン類が、ベタラミン酸と非酵素的に縮合してベタキサンチンを形成するためであると考えられる。従って、黄色系の花を作出するためには、ベタラミン酸が液胞へ輸送される機構を解明することが必要であろう。

一方、ベタシアニンにおいてはベタニン、イソベタニン、ベタニジンの他に、新たに4種類のアシル化ベタシアニンを同定した。ベタシアニンは約30種類が構造決定されているが、配糖体化やアシル化による修飾を受けるため、更に多くのベタシアニンが存在していると考えられる。雌雄蕊において配糖体化されていないベタニジンが大部分を占めていたことから、液胞内への輸送に配糖体化は必ずしも必要でないことが示唆された。雌雄蕊および茎において検出されたアシル化ベタシアニンは、アシル基の吸収波長である320nmにおける吸光度と可視光域の吸収極大波長における吸光度の比率より、AcBc1、AcBc2、AcBc4 および AcBc5 はベタニジン配糖体にアシル基が2ないしは3つ、また、AcBc3 および AcBc6 はアシル基が1つ結合した構造をもつと推定された (Table 2.4, 2.5)。このように、ジュエル種の雌雄蕊、茎およびカルスにはアシル化ベタシアニンが蓄積しているにもかかわらず、花卉においてはベタニンが主要色素となっており、マツバボタンや近縁野生種においても主要色素は同様に、アシル化ベタシアニンは蓄積していなかったことから、アシル基転移酵素遺伝子は花卉で発現していないと考えられる。しかし、アシル化は

ベタシアニンの安定性を高める (Schliemann and Strack, 1998) とともに、吸収極大波長を長波長側へシフトさせることから (Table 2.4, 2.5) (Strack and Wray, 1993)、花卉においてアシル基転移酵素の遺伝子を発現させて、アシル化ベタシアニンを蓄積させることが、花色をより青色側へとシフトさせる上で重要であると考えられる。従って、ジュエル種のみならず *Portulaca* 属植物における花色の多彩化は、花卉においてアシル化ベタシアニンを蓄積させることにより可能であると考えられる。

JR は JM に比べて色素の生産能力が高く、特に花卉におけるベタキサンチン量は著しく増加しており、赤色を発現する原因となっていた。植物体における色素組成は系統間での差異はほとんど認められなかったが、各部位における組成は異なっており、特に茎は花卉や雌雄蕊と違ってベタシアニンのみによって発色しており、また主要色素がアシル化ベタシアニンによって占められていた。このことは、植物体の各部位によりベタレイン色素の役割および生合成を誘導するシグナルが異なることを示唆した。ジュエル種の茎において直射光を受けている表面の着色は、散乱光しか受けない裏面に比べ濃くなっている (Fig. 2.5)、茎におけるベタレイン色素の合成を誘導するシグナルは光であることが示唆される。さらに、茎の着色形質と花卉の着色形質は遺伝的に分離することから両形質を制御する遺伝子座は連鎖していないと推測される。以上のことから、ベタシアニン組成の違いを示す各組織におけるベタレイン色素の制御機構を明らかにすることが、ベタレイン生合成や色素生産を誘導するシグナル伝達系の解明につながるものと考えられる。



Fig. 2.5 Betalain pigmentation of stem in *Portulaca* sp. Jewel (JR).
a; dorsal side of stem b; ventral side of stem.

3 ベタレイン色素組成を異にするカルス培養細胞系

3.1 培養細胞の色とベタレイン色素組成

3.1.1 緒言

ベタレインによる色の発現は赤紫色のベタシアニンおよび黄色のベタキサンチンの量比により決定されるが (Ootani and Hagiwara, 1969)、共通の前駆体から誘導される両色素の生合成経路における分岐を制御する機構はいまだ不明である。この遺伝子の存在は、マツバボタンを用いた花色の遺伝学的研究において推定されており、ベタラミン酸を合成する *C* 遺伝子およびベタシアニン合成に作用する *R* 遺伝子 (Ikeno, 1921; Adachi, 1972; Trezzini and Zrýd, 1990) とともに機能することにより、赤色からマゼンタ色へと花色を変化させる *B* (bluing factor) 遺伝子 (Ikeno, 1921)、およびベタラミン酸とアミノ酸あるいはアミンの縮合を抑制あるいは調節する *I* (Inhibitor) 遺伝子 (Trezzini and Zrýd, 1990) が報告されている (Fig. 1.2)。

ベタレイン生産能を有する培養細胞のほとんどは主にベタシアニンを含有しており、紫からマゼンタ色を呈している。しかし、レッドビート (*Beta vulgaris*) においてマゼンタ色のカルス培養細胞からの黄色の細胞の出現が報告されており (Constabel and Nassif-Makki, 1971)、またベタキサンチンを主要色素として含有して黄色およびオレンジ色を呈するカルスが、白色、緑色、赤色および紫色といった様々な色を呈するカルスとともに獲得されている (Girod and Zrýd, 1991; Leathers *et al.*, 1992)。この様なベタキサ

ンチンを主要色素として含有する黄色のカルスは、マツバボタンにおいても報告されている (Böhm *et al.*, 1991; Böhm and Böhm, 1996)。そこで本節では、ジュエル種の JR 系統の胚軸より誘導したマゼンタ色を呈するカルスを用い、黄色、オレンジ色および赤色を呈し、同一の培養条件で維持可能なカルス系統の誘導を試みた。さらに、獲得したカルス系統の色素特性を解明するとともに、ベタシアニンとベタキサンチンの合成制御および蓄積機構について生理学および遺伝学的観点から論じる。

3.1.2 材料および方法

a. 材料

マゼンタ色を示すカルス系統 JR2、JR4、JR7、JR12 および JR18 を材料として用いた。これらのカルス系統は、ジュエル種 (JR 系統) の胚軸から誘導され (Kishima *et al.*, 1991b)、9 μ M 2,4-D、30 g/l ショ糖、2.5 g/l ゲランガムを添加した MS 固形培地を用いて 25 日ごとに選抜して継代を行い、5 年間維持されたものである。

b. 培養条件

ベタキサンチン高生産能を有するカルス誘導に JR2、JR10 および JR18 系統を用いた。2,4-D (0.09, 0.225, 0.45 μ M) およびベンジルアミノプリン (6BAP) (0, 0.225, 0.45 μ M) を組み合わせて添加した J130 および 5J110 培地 (Girod and Zrýd, 1991) で培養を行った。また、30g/l ショ糖、2.5g/l ゲランガムを添加した MS および J1 (Girod and Zrýd, 1991) 固形培地 (pH5.7) に 2,4-D を 0.1, 1, 5,

10, 50 μ M 濃度で添加して計 10 の培地区を設け、カルス培養細胞 JR4 および JR12 系統に出現した黄色およびオレンジ色カルスの安定的な維持増殖が得られる培地を検討した。培養は 25℃、連続照明下で行い、MS 培地および J1 培地ともに培養開始 25 日後に増殖率、ベタシアニン量およびベタキサンチン量を測定した。更に、MS 培地には添加されず、J1 培地にのみ添加されるビタミンの葉酸、パントテン酸カルシウムおよびビオチンのベタキサンチン蓄積への影響についても調査した。4.5 μ M 2,4-D、30g/l ショ糖、2.5g/l ゲランガムを添加した J1 固形培地 (pH5.7) を用いて、ビタミン各単独添加、全添加、および無添加の計 5 の培地区を設けて 25℃、連続照明下で培養を行い、培養開始 3 週間後にカルス増殖率、ベタシアニン量およびベタキサンチン量を測定した。ベタレイニン色素抽出および HPLC 分析は、第 2 章の方法に従って行った。

c. ベタレイニン色素の定量

カルスの生重量を測定後、80% メタノール (-30℃, 100 mg/ml) に懸濁し、-20℃ に静置して色素を完全に抽出した。色素粗抽出液を遠心分離 (1750 \times g, 10min, 室温) して上清を試料とし、540nm および 480nm における吸光度をマルチパーパス分光光度計 (MPS-2000, Shimadzu) を用いて測定した。生重量 1g 当たりのベタシアニンおよびベタキサンチン濃度を分子吸光係数を用いて算出した。

3.1.3 結果

a. 様々な色素表現型を示すカルス系統の獲得

レッドビート (*Beta vulgaris*) において、様々な色素表現型のカルス系統が、2,4-D および 6BA の添加濃度を調節することで誘導されている (Girod and Zrýd, 1991)。そこで、この報告の方法に従ってジュエル種のカルス系統 JR2、JR7 および JR18 を用いてベタキサンチン高生産性カルスの誘導を試みた。しかし、6BAP を添加した培地区ではクロロフィルを形成する緑色カルスが増殖し、更に全ての培地区におけるカルスの増殖率は非常に低く、褐変するものも見られ、ベタキサンチン高生産能を有する細胞は得られなかった。

カルス誘導 5 年後のマゼンタ色を呈する JR4 および JR12 カルス系統の対数増殖期の後半において、非常に低い率ではあったが、黄色とオレンジ色のモザイク状のカルス (JR4YO 系統) またはオレンジ色のカルス (JR12O 系統) が出現した。このカルス (JR4YO および JR12O 系統) を選抜し、 $4.5 \mu\text{M}$ 2,4-D、 30g/l ショ糖、 2.5g/l ゲランガムを添加した J1 固形培地 (pH5.7) を用いて増殖して、3 週間ごとに選抜して継代を行った。更に、この JR4YO 系統を用いて培地への 2,4-D 添加濃度 ($0.1, 1, 5, 10, 50 \mu\text{M}$) が、カルスの増殖および色の安定性に及ぼす影響を調査した。カルスの増殖率は MS および J1 培地ともに 5 または $10 \mu\text{M}$ 添加区において最大を示した。JR4YO 系統とマゼンタ色系統 (JR12M および JR18M) との間に増殖の違いは認められなかった (Fig. 3.1)。一方、カルス生重量当たりのベタシアニン量は、いずれのカルス系統においても $0.1 \mu\text{M}$ 2,4-D 添加区において最大を示した。しかし、2,4-D 濃度区間におけるベタキサンチン量の差異は認められなかった (Fig. 3.2)。カルスの色調を観察したところ、JR12M および JR18M

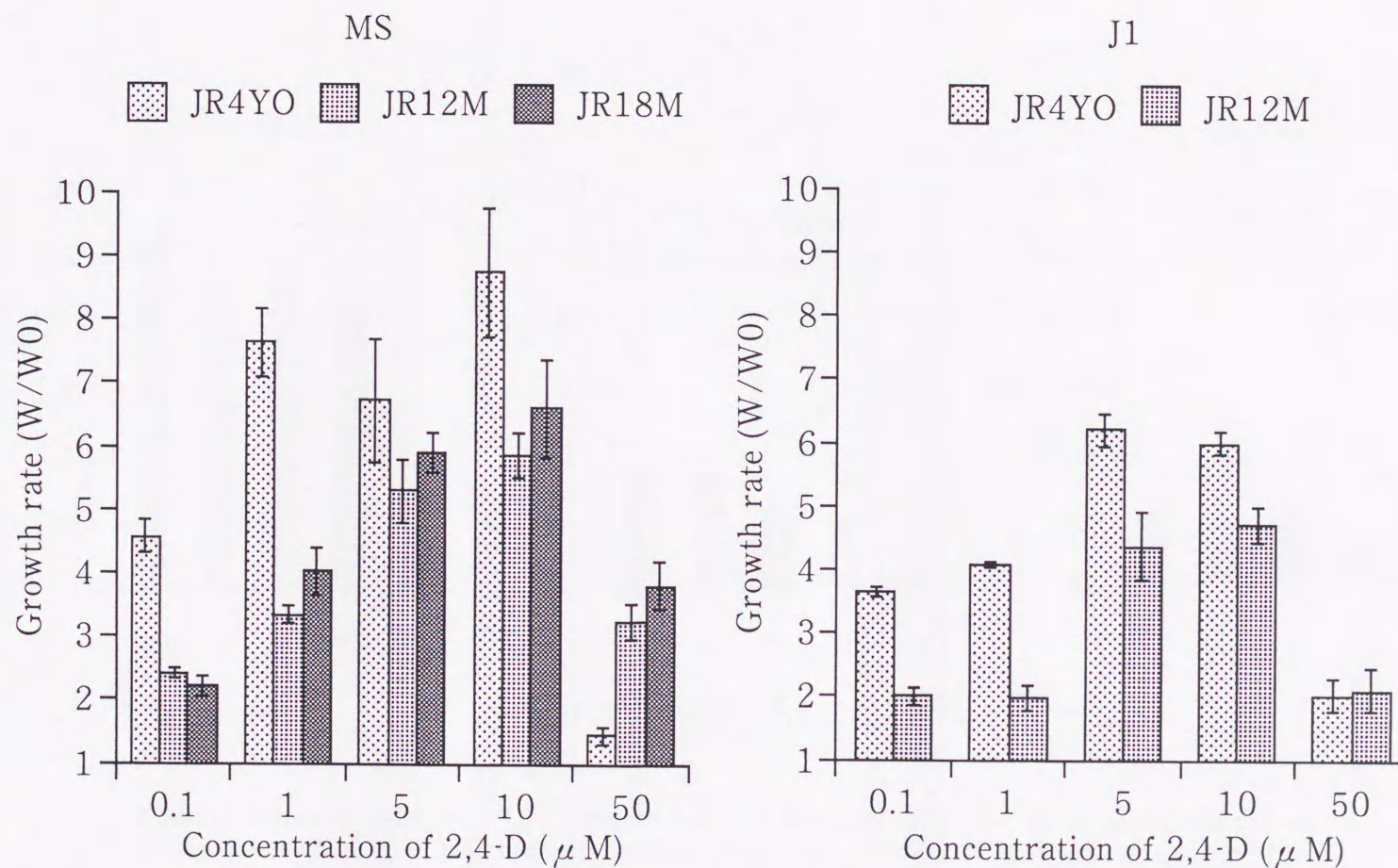


Fig. 3.1 Effect of different 2,4-D concentrations on growth of pigmented callus lines in *Portulaca*. Vertical lines indicate SE ($n=10$). W0 and W denote fresh weights at the start of experiment and sampling times. JR4YO: initial yellow and orange-colored JR4 line, JR12M: magenta colored JR12 line, JR18M: magenta colored JR18 line.

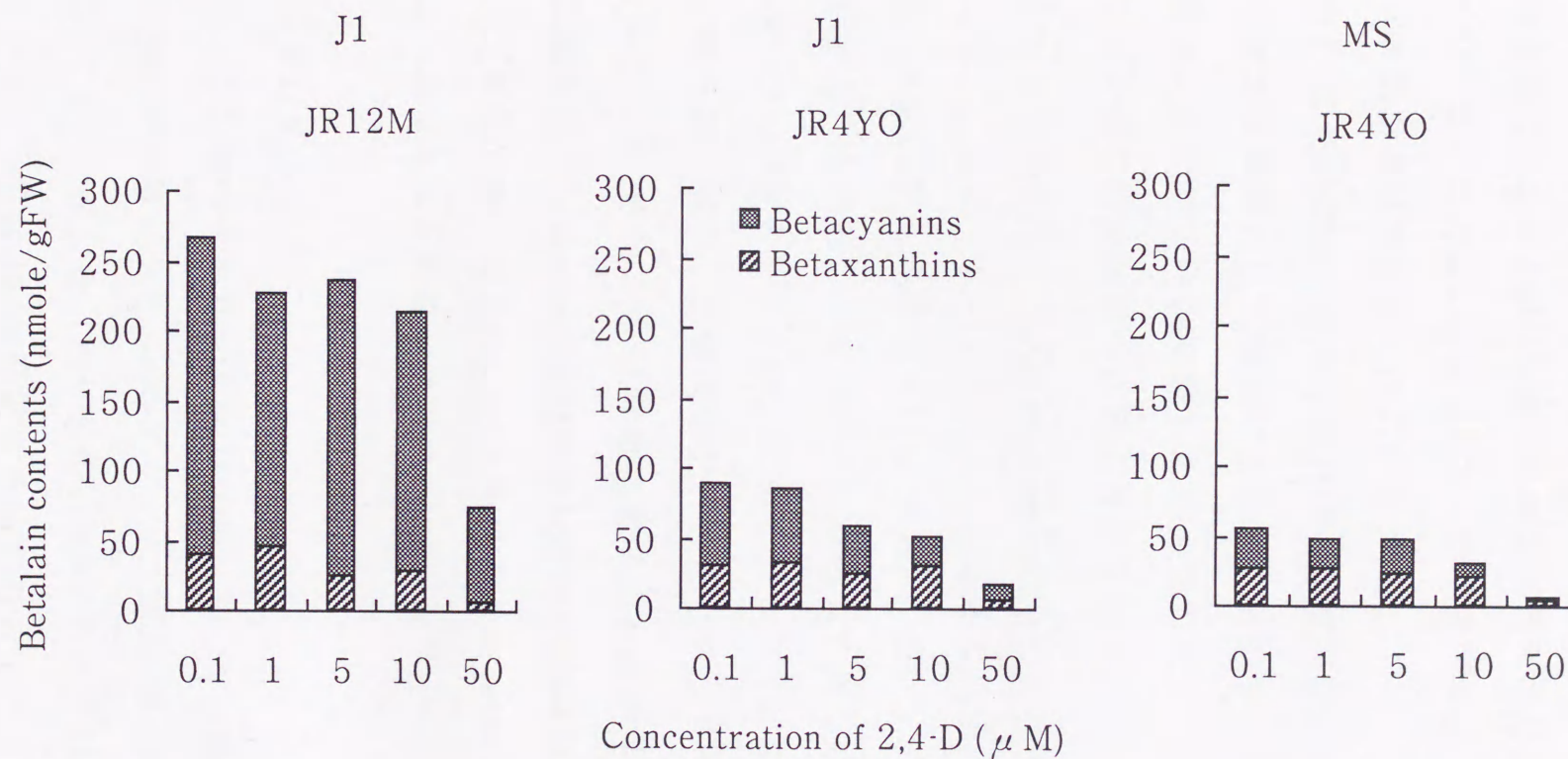


Fig. 3.2 Effect of different 2,4-D concentrations on betalain accumulation in pigmented callus lines in *Portulaca*. JR12M: magenta colored JR12 line, JR4YO: initial yellow and orange-colored JR4 line.

系統は 2,4-D 添加濃度による色調の変化を示さなかった。しかし、JR4YO 系統は 0.1 および 1 μ M 2,4-D 添加区において赤色化した (Fig. 3.3)。このことは、培地中の 2,4-D 濃度が減少したことによりベタシアニン合成が回復したことを示した。

一方、J1 培地のみに添加したビタミンはアミノ酸生合成などの一次代謝の補酵素として機能していることから、ベタキサンチン量の増加に効果があると推察したが、無添加区においても、ベタキサンチン量に有意な減少は認められなかった。

さらに、赤色カルスがオレンジ色カルスから体細胞突然変異により出現し、またマゼンタ色カルスが赤色カルスから出現することもあった。これらの黄色 (JR4Y 系統)、オレンジ色 (JR4O 系統)、赤色 (JR4R 系統) およびマゼンタ色カルス (JR4M 系統) は、4.5 μ M 2,4-D、30g/l ショ糖、2.5g/l ゲランガムを添加した J1 培地にて繰り返し選抜して継代を行うことによって色の発現が安定した。一方、MS 培地では J1 培地に比べて N4Y および N4M 系統の色の発現が安定しなかった。安定化した N4Y および N4M 系統はフライアブルなカルスであり、一方 N4O および N4R 系統は比較的コンパクトなカルスを形成した。

b. ベタレイン組成

カルスの色はベタキサンチンとベタシアニンの量比 (B_x/B_c 値) により決定する事ができ、JR4Y は 9.0、JR4O は 4.0、JR4R は 1.5、JR4M は 0.4 を示した (Fig. 3.4)。JR4Y および JR4O 系統におけるベタシアニン量は JR4M 系統のそれぞれ 1/50 および 1/8 であった。黄色およびオレンジ色カルスはマゼンタ色カルスの 2 から 3 倍

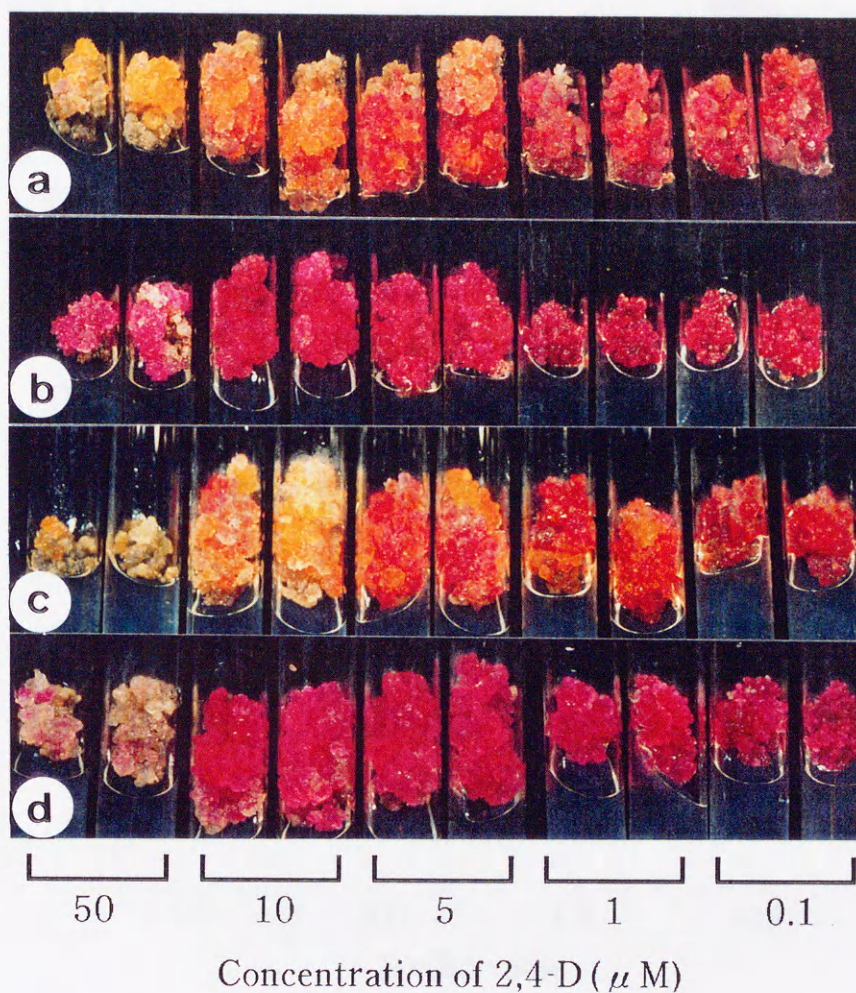


Fig. 3.3 *Portulaca* callus cultured on media containing different concentrations of 2,4-D. a and b: Callus cultured on J1 medium, c and d: callus cultured on MS medium, a and c: Yellow and orange callus derived from magenta JR4 line on MS medium, b and d: Magenta JR12 callus line on MS medium.

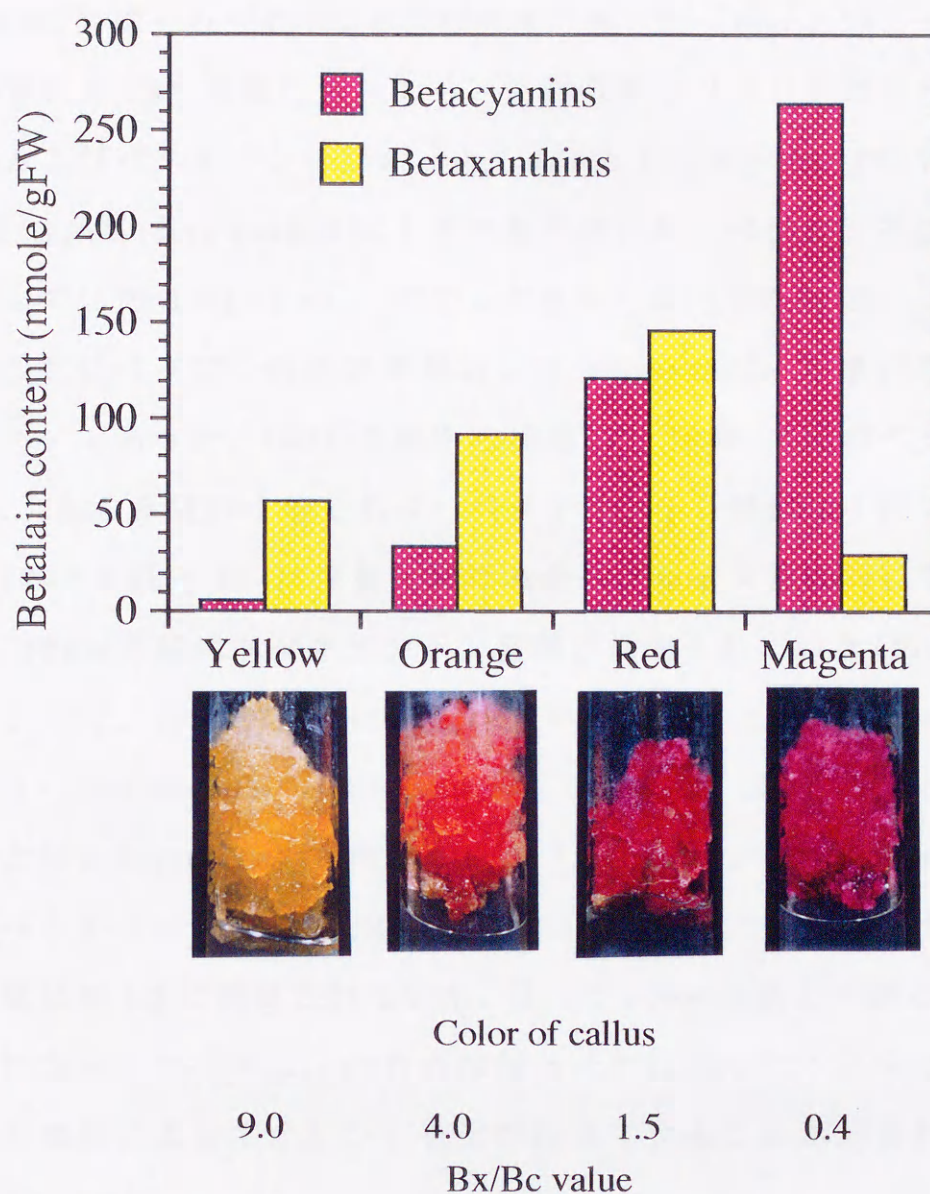


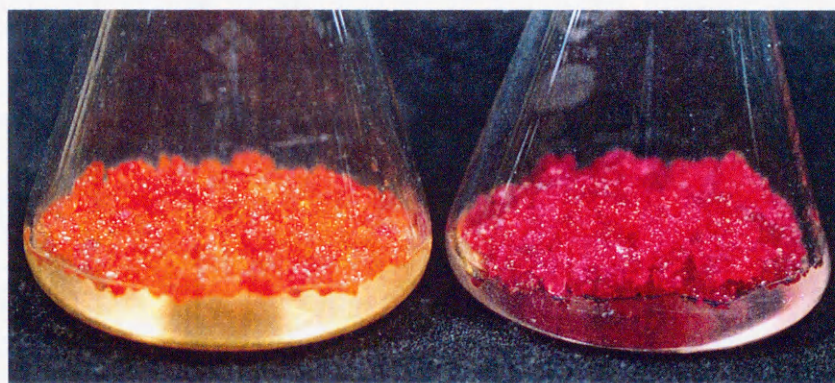
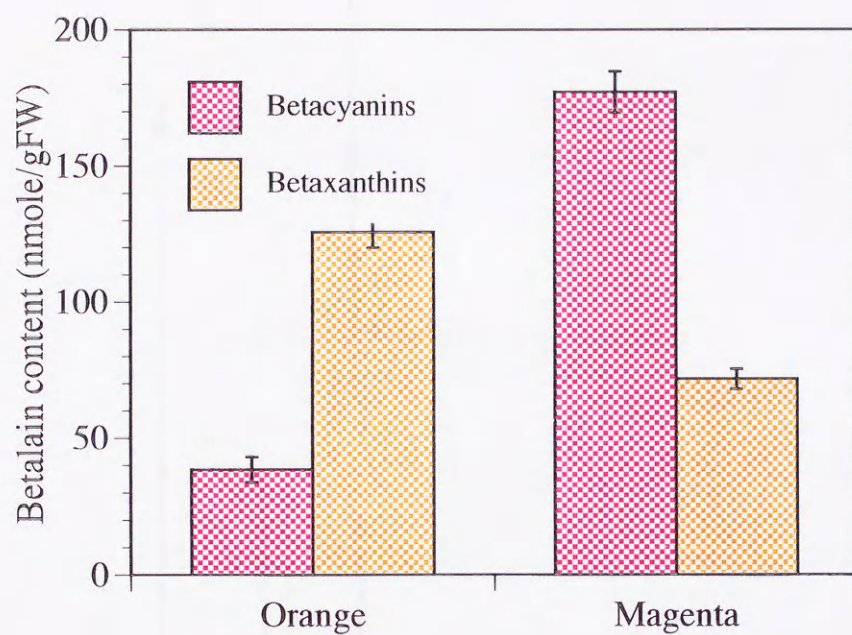
Fig. 3.4 Total content of betacyanin and betaxanthin and the betaxanthin/betacyanin (Bx/Bc) ratio in *Portulaca* callus lines (JR4-derived) displaying distinctly different color. Bx/Bc value was determined as follows: absorption at 480 nm/absorption at 540 nm.

高いベタキサンチン量を示した。一方、JR12OおよびJR12M系統のBx/Bc値はそれぞれ3.2および0.4であった (Fig. 3.5)。

いずれのJR4系統においても、主要色素はベタシアニンのベタニンおよびベタキサンチンのvulgaxanthin Iであった。JR4YおよびJR4O系統はvulgaxanthin Iを主要色素とし、ベタニンを極少量含有していた (Fig. 3.6)。マゼンタ色から黄色またはオレンジ色への変化はベタニン合成の抑制およびvulgaxanthin I量の増加によるものであった。JR4O系統から出現したJR4R系統のベタニンは、JR4O系統の7倍であり、ベタキサンチン量は1.5倍であった。JR4R系統とJR4M系統における全ベタレイン量は同じであったが、JR4M系統はベタキサンチン蓄積が抑制されていた (Fig. 3.4, 3.6)。一方、JR12O系統は主要ベタキサンチンとしてAsn+BA、Lys+BA、indicaxanthin、miraxanthin Vを含有し、またvulgaxanthin Iおよびmiraxanthin IIIも検出された (Fig. 3.7)。JR12O系統におけるベタキサンチン量はJR12M系統の約1.8倍であり、ベタシアニン量は約1/5に抑制されていた。従って、JR4系統と同様にJR12系統においてもベタニンの合成抑制とそれに伴ったベタキサンチン量の増加によってオレンジ色化が起きていることが示された (Fig. 3.5, 3.7)。

3.1.4 考察

ベタレイン色素の特徴的な点は黄色系から赤紫色系までの広い花色を発現し得る点である。共通の前駆体より誘導され、発色の多様性を決定するベタシアニンとベタキサンチン両色素の蓄積機構を解明する上で有効なカルス培養系を本研究において確立した



Color of callus

3.2

0.4

Bx/Bc value

Fig. 3.5 Total content of betacyanin and betaxanthin and the betaxanthin/betacyanin (Bx/Bc) ratio in *Portulaca* lines (JR12-derived) displaying distinctly different color.

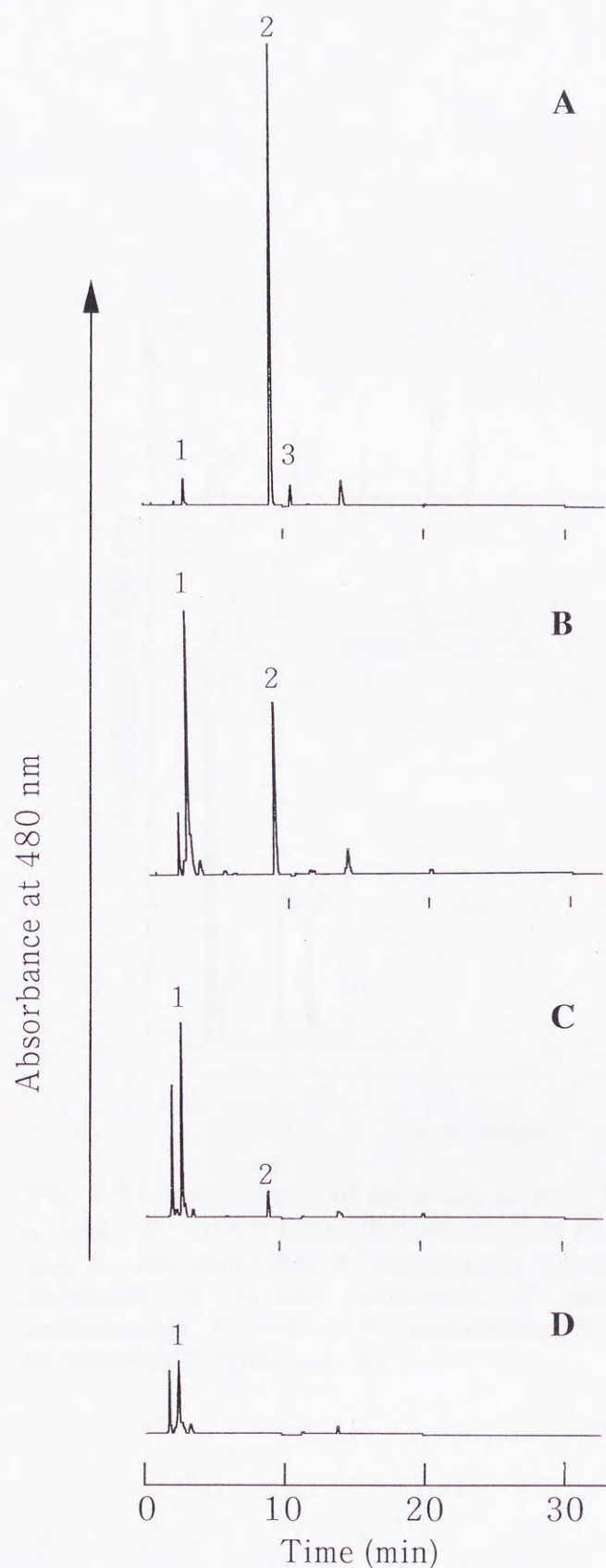


Fig. 3.6 Chromatogram of methanolic extracts from various colored callus lines (JR4-derived) in *Portulaca*. A: magenta colored callus line. B: red colored callus line. C: orange colored callus line. D: yellow colored callus line. (1) vulgaxanthin I, (2) betanin, (3) isobetanin.

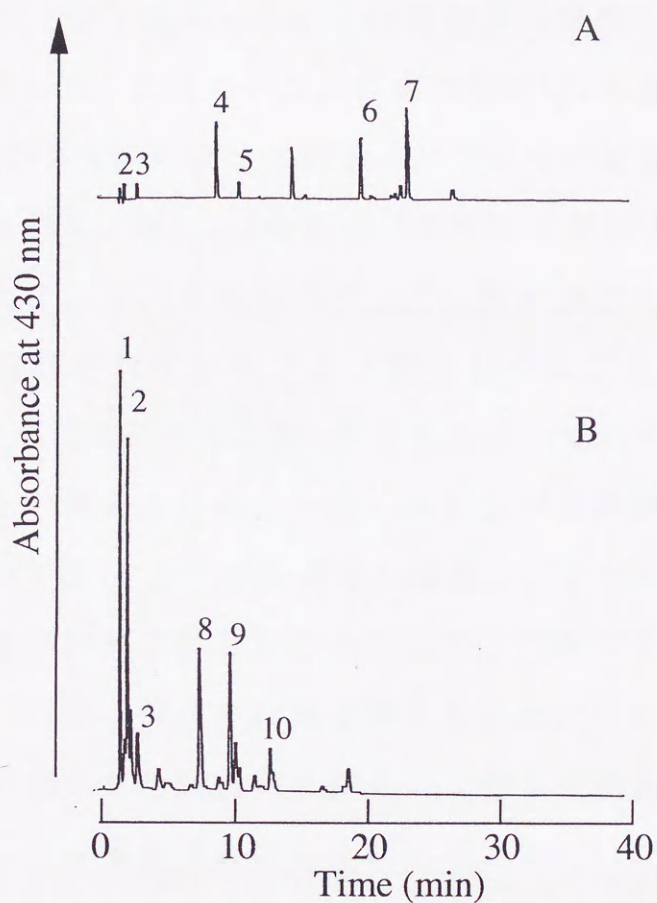


Fig. 3.7 Chromatogram of methanolic extracts from magenta (A) and orange (B) callus lines (JR12-derived) in *Portulaca*. 1: Lys (His)+BA, 2: Asn (Ser)+BA, 3: vulgaxanthin I (Gln+BA), 4: betanin, 5: isobetanin, 6: acylated betacyanin, 7: acylated betacyanin, 8: indicaxanthin (Pro+BA), 9: miraxanthin V (dopamine+BA), 10: miraxanthin III (tyramine+BA).

。

マゼンタ色カルス系統から体細胞突然変異によって出現した黄色、オレンジ色、赤色カルス系統における色素組成を解明し、マゼンタ色から黄色またはオレンジ色への色調の変化は、ベタニン合成の抑制および *vulgaxanthin I* の蓄積量の増加が原因であることを明らかにした。このベタニン合成の抑制は、*R* 遺伝子の発現が抑制されて、DOPA からサイクロドーパの形成が阻害されたことが原因と考えられる。更に、*I* 遺伝子（または *B* 遺伝子）の発現が抑制されたことにより、余剰のベタラミン酸が液胞内へと輸送され、液胞内に蓄積されているアミノ酸もしくはアミンと縮合して *vulgaxanthin I*（ベタラミン酸+グルタミン）等のベタキサンチンが形成されたと考えられる。一方、オレンジ色系統に出現した赤色系統においては *R* 遺伝子の発現が回復し、またベタラミン酸の液胞への輸送が抑制されないことにより、ベタシアニンおよびベタキサンチン両色素が共存したと考えられた。しかし、赤色系統に出現したマゼンタ色系統および元のマゼンタ色系統においては、ベタキサンチン蓄積がほぼ完全に抑制されていた。これらの事は、ベタシアニンおよびベタキサンチン生合成経路における分岐を制御する遺伝子の存在を示唆し、その機能はベタラミン酸の液胞への輸送の制御であることを示唆した（Fig. 3.8）。

これまでのマゼンタ色、白色および緑色カルス系統に加えて、本研究における黄色、オレンジ色、赤色カルス系統の安定的な増殖の成功により、様々な色調を示すカルス培養細胞系を獲得した。このジュエル種カルス系統は、カルスの色によって培養条件が異なるレッドビートの培養細胞（Girod and Zrýd, 1991; Leathers *et al.*,

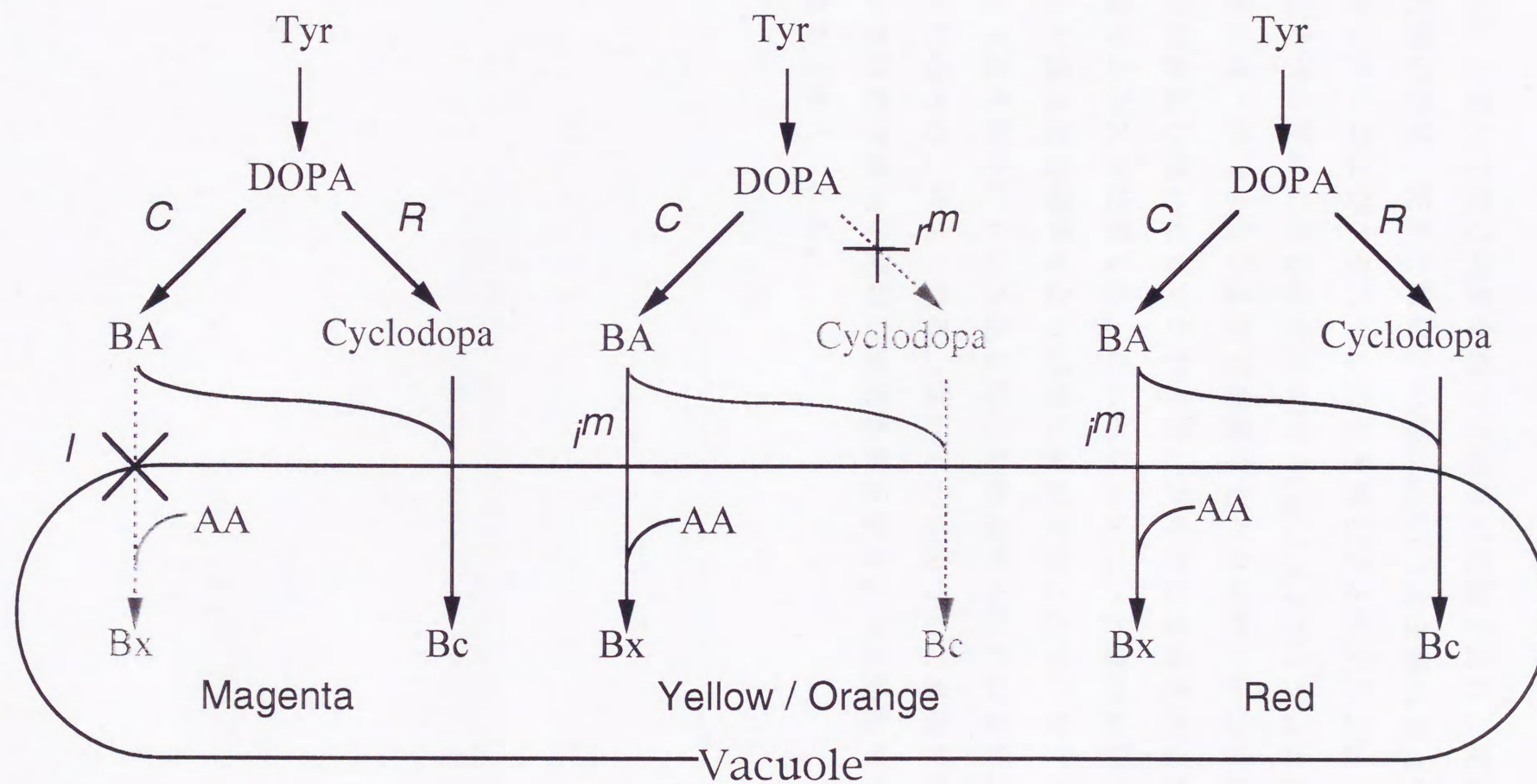


Fig. 3.8 The betalain accumulation mechanism of various colored callus lines in *Portulaca*. Tyr: tyrosine, DOPA: 3,4-dihydroxyphenylalanine, BA: betalamic acid, Bx: betaxanthin, Bc: betacyanin, AA: amino acid. r^m : mutated R gene, i^m : mutated I gene.

1992) と違って同じ培養条件下で増殖が可能であり、更にカルスの色調の差は、花卉と同様に vulgaxanthin I を主要色素とするベタキサンチンおよびベタニンを主要色素とするベタシアニンの量的な組合せの差によるものであった (Fig. 3.4-3.7)。ジュエル種の植物体にはベタシアニンよりも高濃度でベタキサンチンを含有する系統は存在しないにもかかわらず、カルスには黄色およびオレンジ色のカルスが出現した。このベタシアニン合成の抑制によるカルスの黄色化の機構をより詳細に解明することで、ジュエル種において黄色花やオレンジ色花などを作出するための重要な情報が得られるものと考えられる。従って、このカルス培養系はベタレイン生合成の遺伝子発現の差異を解析する上で有効なモデル材料になると考えられる。

3.2 培養細胞の色における変異要因

3.2.1 緒言

前節で述べたように、様々な色素表現型を示す全てのカルス系統は、ほぼベタシアニンのみを蓄積しているマゼンタ色カルスから誘導されたものであり (Fig. 3.9)、またベタシアニン合成の変異は 2,4-D を高濃度 ($9 \mu\text{M}$) で添加した培地にて継代を長期間にわたり続ける事により起きた。一方、JR4O 系統においてベタシアニン蓄積は、培地への 2,4-D 添加濃度を減少させることにより回復させることが可能であった。Lambé *et al.* (1997) は長期間にわたる培養および高濃度の 2,4-D 添加が DNA のメチル化を促進し培養変異の原因となることを示している。そこで、マゼンタ色カルス系統に起きた体細胞突然変異の原因を解明するために、黄色およびオレンジ色カルス系統に起きているベタシアニン蓄積の抑制に対する DNA メチル化の関与を検討した。

3.2.2 材料および方法

材料に JR4Y および JR4O 系統を用い、 $2.25 \mu\text{M}$ 2,4-D、 30g/l ショ糖、 2.5g/l ゲランガムおよびフィルター滅菌 (孔径; $0.22 \mu\text{m}$) した 5-アザシチジン (5AzaC) ($0, 5, 10, 50, 100, 1000 \mu\text{M}$) を添加した J1 固形培地 (pH5.7) に置床した。培養 25 日目にカルスを採取してベタレイン量の測定を第 2 章および第 3 章・第 1 節の方法に従って行った。

3.2.3 結果

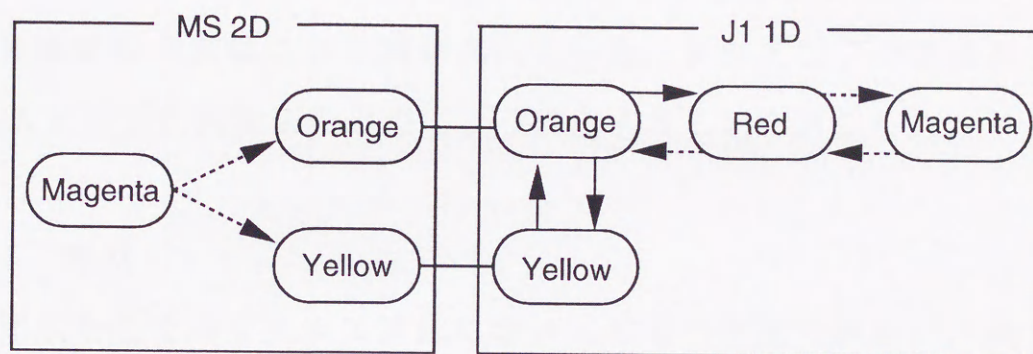


Fig. 3.9 Spontaneous color changes observed in JR4-derived callus lines of *Portulaca*. Normal arrows indicate low-frequency changes, broken arrows changes that occur at a very low frequency. MS 2D = MS medium supplemented with $9 \mu\text{M}$ 2,4-D; J1 1D = J1 medium supplemented with $4.5 \mu\text{M}$ 2,4-D.

JR4O 系統において 5AzaC 濃度の差は 100 μ M 区を除いてベタキサンチン量に対して影響を示さなかった (Fig. 3.10)。一方、JR4O 系統のベタシアニン量は 100 μ M および 1000 μ M 区においてわずかに増加し、さらにカルスの赤色化が誘導された。このベタシアニン量の増加は有意なものであり、0、5 および 10 μ M 区における Bx/Bc 比が約 7.3 であったのに対して、100 μ M および 1000 μ M 区においては Bx/Bc 値が 3.0 であることから確認できた。このことは体細胞突然変異により抑制されていたベタシアニンの合成が、DNA メチル化阻害剤の処理により回復することを示した。

3.2.4 考察

安定した色を示すカルス系統においても低い頻度であるが、体細胞突然変異により色調の変化したカルスの出現が見られた。また JR4YO 系統におけるベタシアニンの蓄積量は、添加した 2,4-D 濃度が低下するに従って増加した (Fig. 3.2, 3.3)。従って、*R* および *I* 遺伝子の両方に影響した体細胞突然変異は不安定なものであると考えられる。さらに、JR4O 系統を 100 μ M より高い濃度の 5AzaC を添加した培地で培養した場合、ベタシアニン量が増加してカルスが赤オレンジ色へと変化した。レッドビート培養細胞において 2,4-D を添加した培地では、5AzaC 処理を行ってもベタシアニン合成が回復せず、メチル化の関与は少ないと考えられた (Trezza and Zrýd, 1991)。ジュエル種カルスにおいても 5AzaC 処理によるベタシアニン合成の回復は完全なものではなく、培養時に添加した 2,4-D が影響していると考えられる。しかし、JR4O 系統において、5AzaC 処理によってベタシアニンの蓄積量が増加したことは、

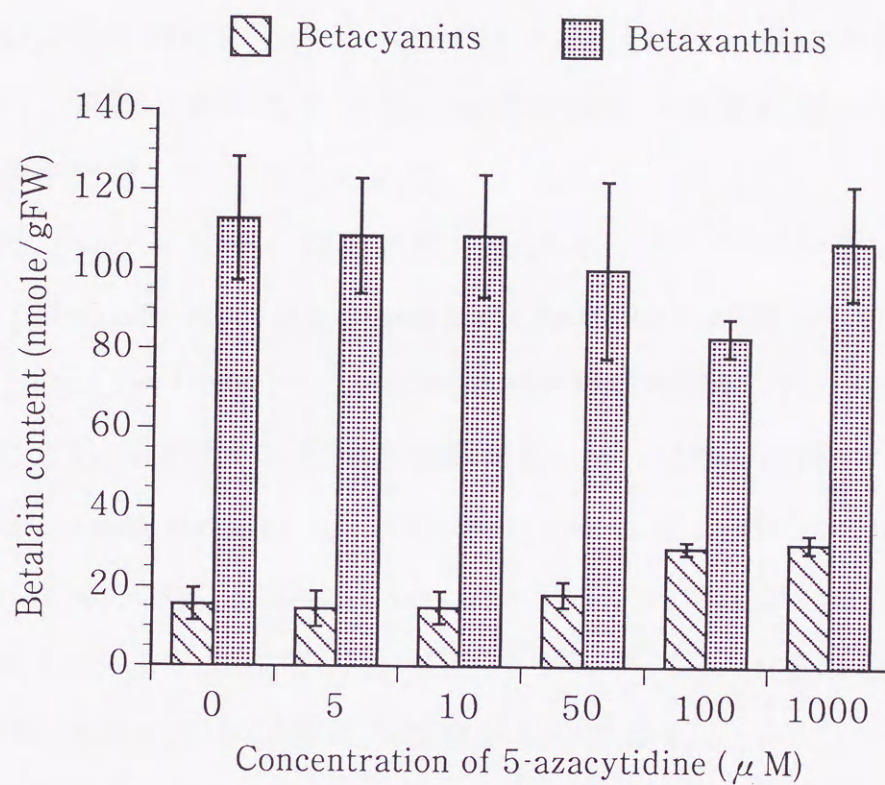


Fig. 3.10 Effect of 5-azacytidine concentration on betacyanin and betaxanthin accumulation of orange callus line (JR4) in *Portulaca*. Vertical lines indicate SE ($n=3$).

R 遺伝子の発現抑制を引き起こした突然変異の原因、または変異した遺伝子の状態の保持に、塩基配列における CpG/CpNpG 部位の高度のメチル化 (Diéguez *et al.*, 1998) が関与していると考えられる。高度にメチル化された状態は長期にわたる培養によっても維持または促進されることから (Lambé *et al.*, 1997)、選抜を伴う継代を行い、培養し続けることで、全てのカルス系統が均一で安定化した色を発現したと考えられる。

一方、レッドビート培養細胞におけるベタシアニン合成の抑制には poly (ADP-ribose) polymerase (PADPRP) が関与しており (Trezza and Zrýd, 1991)、この PADPRP は様々な酸化ストレスや変異原に対して防御する代謝系を誘導し、かつ DNA 修復にも関係している (Sato and Lindahl, 1992; Burglund *et al.*, 1996)。JR4Y 系統においては 5AzaC 処理によるベタシアニンの増加が起きなかったことから、ジュエル種カルスのベタシアニン合成の回復にも PADPRP が機能する必要があるのかもしれない。

本実験で得られた結果は、カルスの黄色化を引き起こした変異の原因の一部であり、培養細胞の染色体数における変化の有無などを調査する必要がある。また、組織培養における体細胞突然変異の要因には DNA メチル化の他に、トランスポゾン (Ozeki *et al.*, 1997) やレトロトランスポゾン (Hirochika 1993; Phillips *et al.*, 1994) の活性化などが関与しているとの報告があり、ベタレイン生合成経路におけるベタシアニン合成とベタキサンチン合成の分岐を制御する機構を解明するためにも、変異機構の解明には更に詳細な検討が必要であろう。

4 ベタシアニン生産能を有する懸濁細胞培養系

4.1 *Portulaca* 懸濁細胞培養系の確立

4.1.1 緒言

固形培地を用いるカルスは表面や培地との接触面で細胞増殖が速いが、内部には老廃物や有毒な代謝物が蓄積し、さらに形状および硬さが不均一で増殖が遅い。従って、小細胞塊の懸濁細胞培養系の確立は生理・生化学的研究には不可欠となる（駒嶺ら, 1990）。懸濁培養系は二次代謝産物であるシコニンなどの有用物質の生産効率向上を目的に多くの研究がなされており、発現機構についても酵素レベルないしは遺伝子レベルで解明されるようになっている（作田・駒嶺, 1988）。

ベタレイン産生植物においても懸濁細胞培養系を用いた様々な研究がなされており有効性が証明されている。ヨウシュウヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) の懸濁培養細胞では、ベタシアニン合成が 2,4-D により促進され (Sakuta *et al.*, 1991)、細胞分裂に伴って起きることが解明された (Hirano *et al.*, 1994)。また、ベタレイン合成におけるアシル基転移酵素およびグルコース転移酵素がアカザ (*Chenopodium rubrum*) の懸濁培養細胞 (Bokern and Strack, 1998; Bokern *et al.*, 1991) およびリビングストンデージー (*Dorotheanthus bellidiformis*) の懸濁培養細胞 (Heuer and Strack, 1992; Heuer *et al.*, 1996) からそれぞれ単離されて特性が解析された。更に、レッドビート (*Beta vulgaris*) などでも懸濁細胞培養系は確立されている (Leathers *et al.*, 1992; Rodríguez-Monroy *et al.*, 1994)。

一方、ベタレイン生産能を有するカルス培養系はマツバボタン (Schröder and Böhm, 1984; Trezzini and Zrýd, 1990) およびジュエル種 (Adachi, 1970; Kishima *et al.*, 1991) において確立されている。しかし、これまでに *Portulaca* 属植物においてベタレイン生産能を有する懸濁細胞培養系の確立は報告されていない。ベタレインを蓄積しているマツバボタンのカルスを液体培地にて培養すると、数回の継代の後に褐変化して枯死に至った (Böhm *et al.*, 1991)。また、*P. oleracea* subsp. *sativa* は懸濁培養細胞を容易に誘導できるが、ベタレイン色素生産能がなかった (Böhm and Böhm, 1996)。そこで、本節では *Portulaca* 属植物におけるベタレイン生産能を有する懸濁細胞培養系を確立するための培養諸条件を検討し、また培養細胞における色素蓄積の特性についても生理学的観点から論述した。

4.1.2 材料および方法

a. 培養条件

懸濁細胞培養系は MS および J1 固形培地にて増殖した高いベタシアニン生産能を有するカルス系統 (JR12-MS, JR12-J1, JR18-MS および JR18-J1) から、 $4.5 \mu\text{M}$ 2,4-D および 20 g/l ショ糖を添加した B5 液体培地 (Gamborg *et al.*, 1968)、MS 液体培地および J1 液体培地を用いて誘導した。液体振盪培養は 25 ml の培地を入れた 100 ml エルレンマイヤーフラスコを用いて、振盪回転数 100 rpm 、室温 25°C 、連続照明下 (photon flux density = $33.3 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) で行い、誘導初期は 7 日間隔、確立後は 10 日間隔で継代を行った。全ての液体培地は 5 N KOH 、 1 N NaOH および 1 N HCl を用いて $\text{pH} 5.7$ に調

節した。浸透圧調節物質としてマンニトールおよびソルビトールを用いた。アスコルビン酸（以下 AsA と略記）を添加した培地はフィルター滅菌（孔径：0.22 μm ）を行った。

b. 懸濁培養細胞の増殖率測定

培養細胞の生重量（湿重量）は測定時に液体培地のみをカルスピペットで取り除いて、培養器とカルスの合計量を測定し、培養器の重量を引くことによって算出した。測定後に取り除いた培地を加えて次の測定時まで培養を継続した。得られた生重量は継代時の生重量を 1 として換算した。生重量は少なくとも 3 回独立して測定し平均を算出した。細胞増殖率は W/W_0 （ W_0 は培養開始時の生重量を、 W は培養終了時の生重量を示す）で表した。

c. ベタレイン色素の抽出および分析

懸濁培養細胞を回収し、色素抽出時まで -30°C で保存した。色素抽出、HPLC 分析、可視光域の吸光度測定および色素定量は第 2 章の方法に従って行った。

4.1.3 結果

a. 懸濁培養細胞誘導におけるアスコルビン酸の効果

懸濁培養開始時に起きるカルスの褐変化、ベタレイン色素の分解および放出を抑制するためにアスコルビン酸（AsA）添加の効果を調査した。まず、B5 培地を用いてベタシアニン生産能を有する懸濁培養細胞の誘導を試みたが、カルスのまま増殖し小細胞塊が得られなかった。一年以上にわたる継代の後に、ベタシアニン量

の減少および細胞の褐変化が見られた。しかし誘導初期において、褐変化、ベタシアニンの放出および分解の有意な減少が AsA を添加した培地において確認され、1000 mg/ℓ AsA 添加培地では非添加培地に比べて約 1.2 倍のベタシアニン量を示した。そこで、MS 液体培地を用いて、AsA 添加試験区 (0, 10, 100, 1000, 10000 mg/ℓ) を設けて液体培地における培養細胞の増殖率およびベタシアニン量に対する効果を調査した。ベタシアニン量および細胞の増殖率の測定は誘導 10 日後に行った。

ベタシアニン量は MS および J1 固形培地において増殖した両カルス系統ともに、1000 mg/ℓ AsA 添加区が最大を示した (Fig. 4.1)。しかし、10000 mg/ℓ AsA 添加区は細胞の増殖を抑制し、完全にベタシアニンの蓄積を抑制した。ベタシアニンを蓄積していない白色細胞の増殖が 0 から 100 mg/ℓ AsA 添加区において一様に認められた。AsA 添加濃度の差はベタシアニン量に影響を及ぼしたが、細胞増殖率には有意な影響を及ぼさなかった。1000 mg/ℓ AsA を添加した MS 培地を MS-AsA 培地と命名した。

b. 懸濁培養細胞誘導における浸透圧調節物質の効果

懸濁培養誘導時において、培地の浸透圧が細胞増殖率およびベタシアニンの蓄積におよぼす影響を、MS-AsA 培地を用いて調査した。浸透圧調節物質としてマンニトールおよびソルビトールを 1:1 (w/w) の比率で用いた (Lu *et al.*, 1981)。浸透圧の上昇に伴い、ベタシアニン生産能を有する細胞の増殖率がわずかに減少した。JR12-MS および JR12-J1 カルス系統において、ベタシアニン蓄積量は 300mM 添加区において最大を示した (Fig. 4.2)。一方 JR18-MS

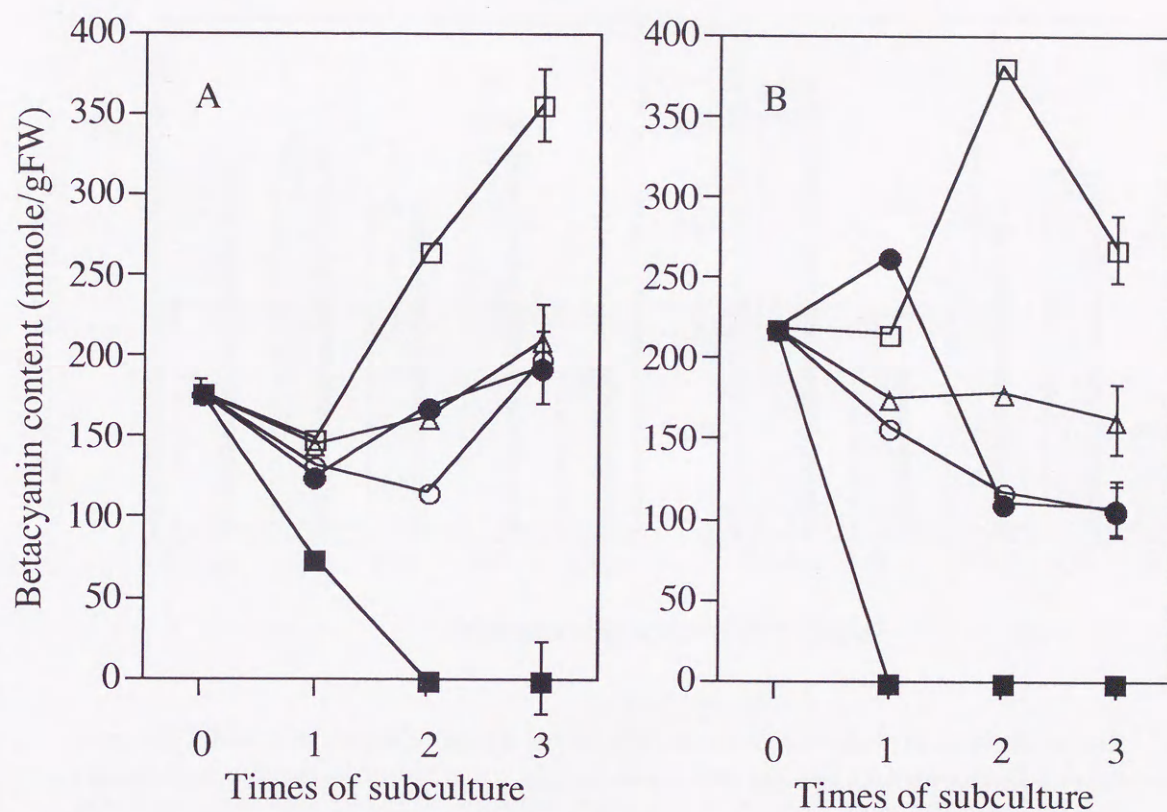


Fig. 4.1. Effects of ascorbic acid on accumulation of betacyanin in *Portulaca* cell suspension culture at initiation. Calli of JR12 line on MS (A) and J1 (B) solid medium were used as tested samples. Calli were transferred into liquid medium supplemented with several concentration (mg l^{-1}) of AsA ($0 = \text{○}$, $1 \times 10 = \text{●}$, $1 \times 10^2 = \text{△}$, $1 \times 10^3 = \text{□}$, $1 \times 10^4 = \text{■}$). Vertical lines indicate SD ($n=3$).

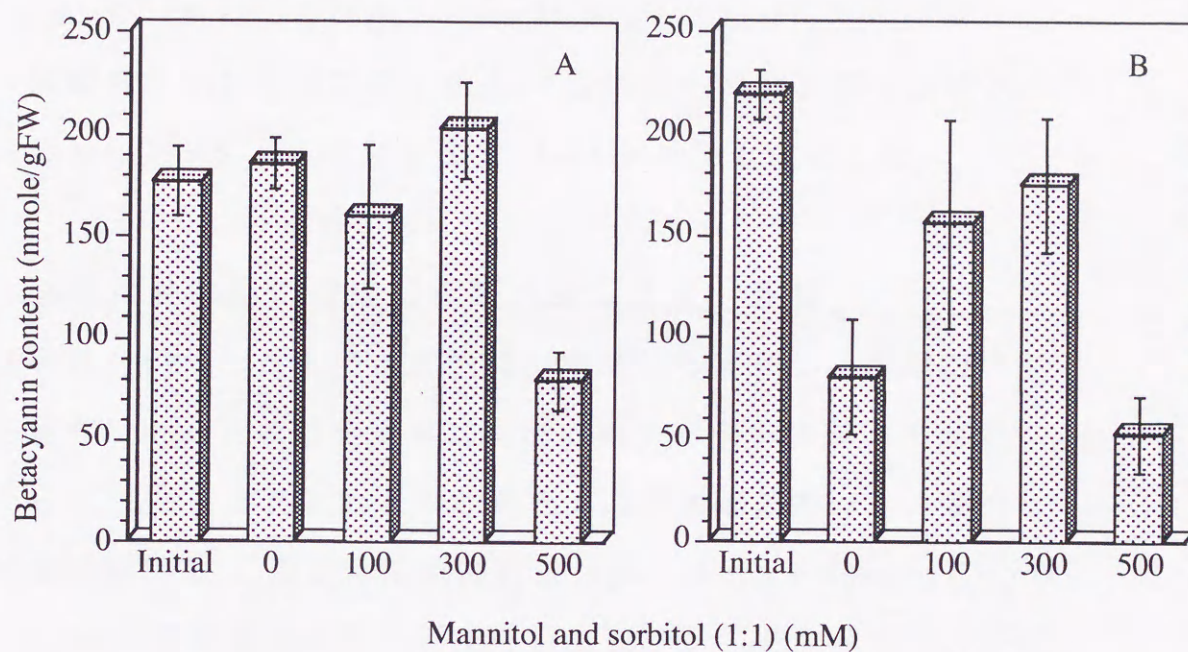


Fig. 4.2 Effects of osmoticum on accumulation of betacyanin in *Portulaca* cell suspension culture at initiation. Calli of JR12 line on MS (A) and J1 (B) solid medium were used as tested samples. Betacyanin contents were measured at day 10 after 2 cycles of subculture. Vertical lines indicate SD ($n=3$).

カルス系統では 100mM 添加区において最大を示した。JR12-MS カルス系統では無添加区との有意差が見られなかったが、JR12-J1 カルス系統では 300mM 添加区において、ベタシアニン量の有意な増加が起こっていた。ベタシアニン生産能を有する小細胞塊は、JR12-MS 系統からのみ増殖し 300mM 添加区において高いベタシアニン蓄積量を示した。この 150mM マンニトールおよびソルビトールを添加した MS-AsA 培地を改変 MS-AsA 培地と命名した。

c. 懸濁培養細胞の増殖およびベタシアニン蓄積

誘導後、約 6 ヶ月後に小細胞塊が増殖する完全な懸濁細胞培養系を確立した。この培養細胞における高いベタシアニン生産能は、今日まで約 3 年間にわたり維持する事が可能であった。獲得した培養細胞は 10 日置きに圧縮細胞量 (packed cell volume: PCV) 3 を、25 ml の新鮮培地を入れた 100 ml エルレンマイヤーフラスコに再懸濁することで維持した。培養細胞の増殖は、改変 J1-AsA 培地よりも改変 MS-AsA 培地にて継代を行う方がより旺盛であった。改変 MS-AsA 培地における培養細胞は連続照明下において、継代後 14 日間で 3 から 4 倍に増殖した (Fig. 4.3)。従って、更なる実験には 20g/l ショ糖、1000mg/l AsA, 150mM マンニトールおよび 150mM ソルビトールを添加した改変 MS-AsA 培地により増殖した培養細胞を用いた。

懸濁培養細胞におけるベタレインの蓄積は、新鮮培地への継代後、直ちに開始していた。ベタシアニン量は継代 2 日後に最大に達し、その後わずかに減少し、7 日後に再び増加を示した (Fig. 4.3)。AsA および浸透圧調節物質添加の効果を確認するための追試を

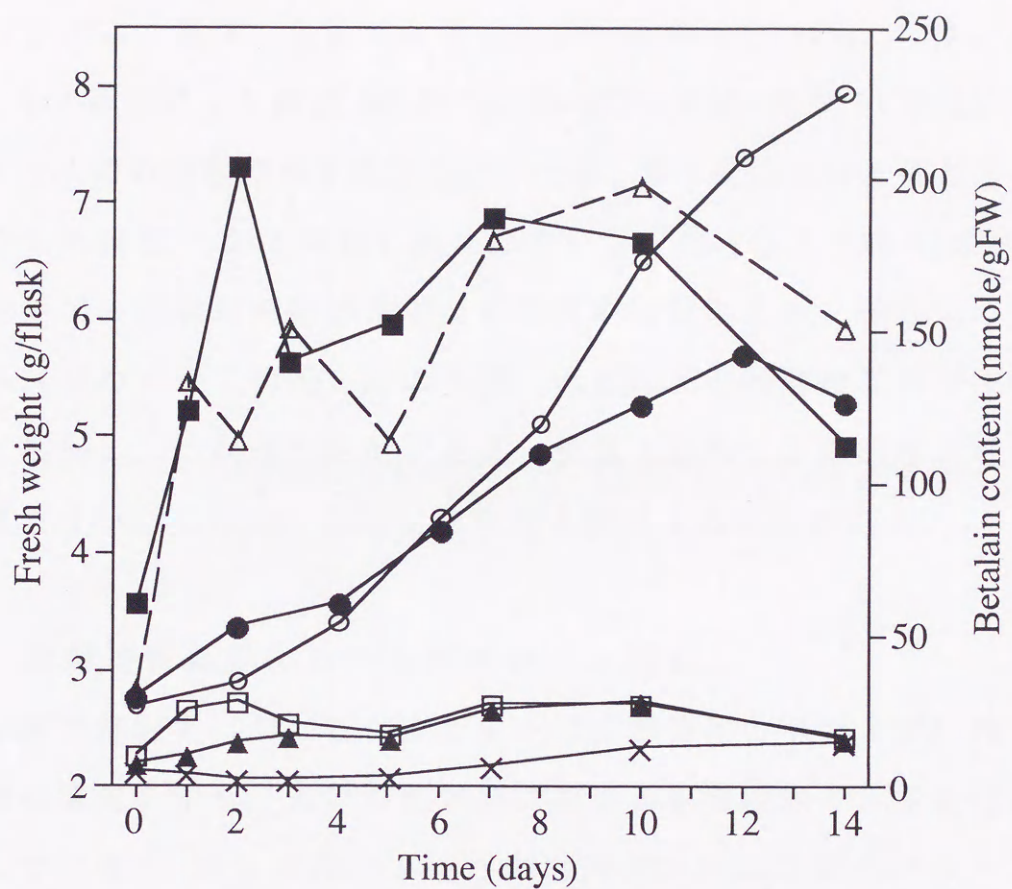


Fig. 4.3 Time courses of growth and betalain accumulation on modified MS-AsA medium in *Portulaca* cell suspension culture (JR12 M7 line). Betanin (-■-), isobetainin (-□-), betanidin (-▲-) and acylated betacyanins (-△-) are betacyanin. Vulgaxanthin I (-×-) is betaxanthin. -○- = light condition. -●- = dark condition.

、誘導 3 年後の懸濁培養細胞 (JR12-MS7 系統) を用いて行った。その結果、1000 mg/l AsA および 300mM 浸透圧調節物質の添加がベタシアニン蓄積に必須であることが確認された (Fig. 4.4)。また、AsA 添加により改変 MS 培地において 1.6 倍、改変 J1 培地において 1.8 倍の細胞増殖率を示した。一方、第 3 章において培養系を確立した黄色 (JR4Y 系統) およびオレンジ色カルス (JR4O 系統) を用いて、同様に細胞懸濁培養系の誘導を試みたが、赤色化したカルスがわずかに増殖したのみで、ほとんどの細胞の色素が脱色して枯死し、ベタキサンチンを高い濃度で蓄積する懸濁培養細胞を獲得するためには、更に培養条件を検討する必要がある。

d. 懸濁培養細胞におけるベタレイン組成

懸濁培養細胞におけるベタレインは、植物体の茎および胚軸と同様の組成を示し、用いた培地間における差異は無く、主要色素として全体の 50% を占めていたのはベタシアニンのベタニンであった。またイソベタニンが 10~15% をベタニジンが約 5% を占めていた。更に、未同定の四種類のベタシアニン類が R_f 19.8 以降に検出された (Fig. 4.5)。これらのベタシアニン類は植物体の茎および雌雄蕊においても検出されたアシル化ベタシアニンであった (第 2 章参照)。懸濁培養細胞におけるベタシアニン量は、カルス培養細胞に比べ 1.5~2 倍を示した。一方、ベタキサンチンは極微量しか蓄積していなかったが、vulgaxanthin I (グルタミン+ベタラミン酸) および miraxanthin III (チラミン+ベタラミン酸) が検出された。

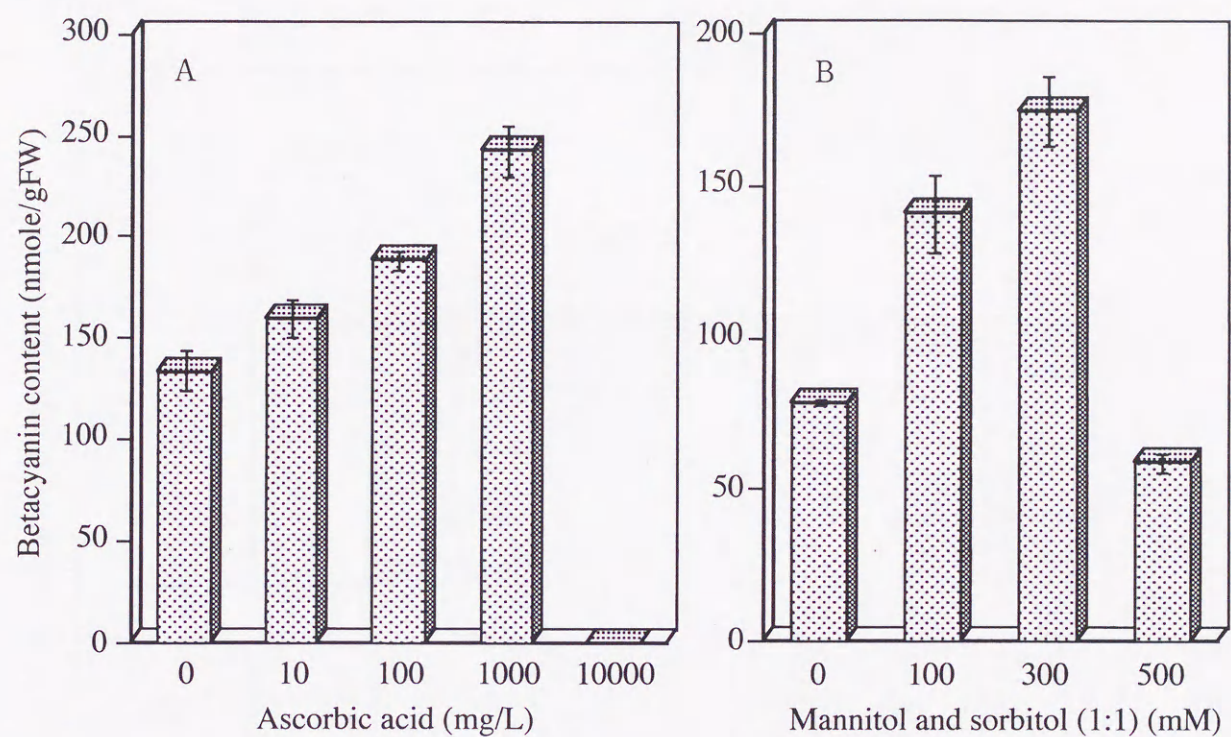


Fig. 4.4 Effects of ascorbic acid (A) and osmoticum (B) on accumulation of betacyanin in *Portulaca* cell suspension culture (JR12M7 line). Betacyanin contents were measured at day 10 after transfer. Vertical lines indicate SD ($n=3$).

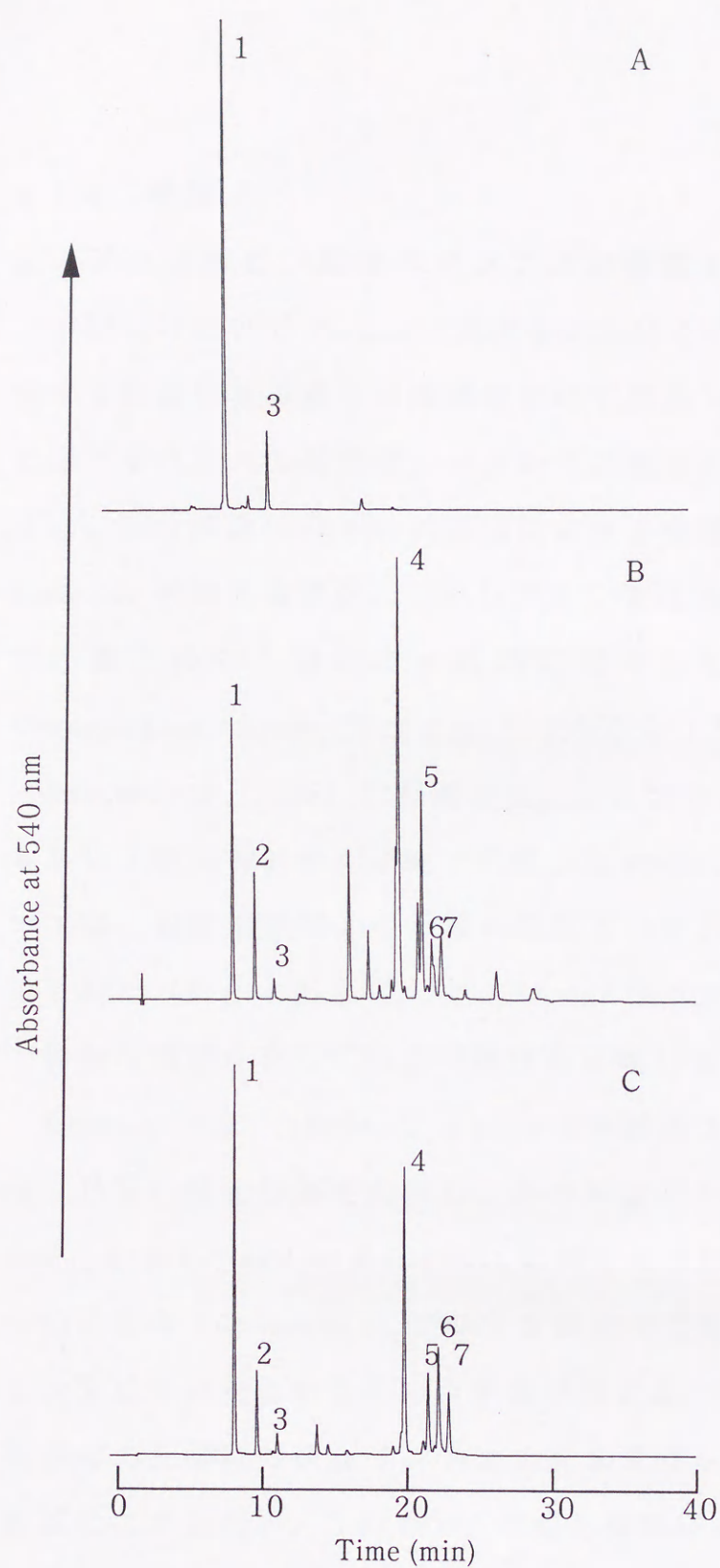


Fig. 4.5 Chromatograms of HPLC analyses of betacyanin from petals (A), stem (B), and cell suspension cultures (C) of *Portulaca sp.* 'Jewel' [inbred line JR (red flower)]. Betanin (1), isobetanin (2), betanidin (3), acylated betacyanin (4)-(7).

4.1.4 考察

a. アスコルビン酸はベタシアニン蓄積を促進する

本研究において *Portulaca* 属植物におけるベタシアニン生産能を有する懸濁培養細胞系の誘導に初めて成功した。懸濁培養誘導時に起きるカルスの褐変化、ベタレイン色素の減少および細胞の壊死は、液体培地への AsA の添加によって克服された (Fig. 4.2)。 *Portulaca* 懸濁培養細胞のベタシアニン量は AsA 非添加培地において、継代後の 1 日目に一時的に減少した。同様の現象が、 *Chenopodium rubrum* (Berlin *et al.*, 1986) および *Phytolacca americana* (Sakuta *et al.*, 1986) の懸濁培養細胞においても報告されている。しかし、改変 MS-AsA 培地で培養した *Portulaca* 懸濁培養細胞においては、対数増殖期よりも前の段階でベタレイン色素の蓄積が認められた (Fig. 4.3)。このことは AsA がベタレイン生合成において特別な機能を有している可能性を示唆した。

Reynoso *et al.* (1997) は *in vitro* の実験系において AsA がベタレイン色素の酸化分解を抑制し、色の安定化を促進すると報告している。しかし、AsA による DOPA に対するチロシナーゼによる酸化反応の阻害 (Steiner *et al.*, 1999) が細胞内で起きた場合にベタシアニン合成が抑制されるという矛盾が生じる。一方、DOPA 以降の酸化反応の抑制はベタレイン色素の基本骨格をなすベタラミン酸の形成に欠かせない。この DOPA の酸化抑制は、DOPA からベタラミン酸への反応を触媒する DOPA 4,5-dioxygenase (Girod and Zrýd, 1991) の働きによるのか、あるいは AsA 等の抗酸化物質の関与といった他の酸化抑制機構によるものなのかは不明である。また、*in vitro* の実験系において AsA は DOPA の酸化反応産物であるドーパ

クロムを還元しシクロドーパを形成する (Schliemann *et al.*, 1998)。従って、直接的にベタレイン生合成に AsA が関与しているとするれば、このベタシアニン合成に必須であるシクロドーパの形成に関してであると考えられる。

一方、AsA は生体内において形成されたフリーラジカル酸素分子を捕捉して脂質の過酸化、クロロフィルの分解および酵素の失活といった障害を防いでいる (重岡, 1996)。更に、AsA と関連する酵素は、植物体における成長および発育を制御する上で特に重要である (Córdoba and González-Reyes, 1994)。従って、培地に投与した AsA は、酸素飽和状態の新鮮な液体培地へ培養細胞を継代するときのショックによる酸化ストレスから培養細胞を保護し、その結果として効率的な細胞の増殖およびベタシアニンの合成が可能になったとも考えられる。また、投与した AsA が細胞内に吸収されているのか、そして吸収された場合にどのような機構で働いているのかは明かではない。今後、*Portulaca* 懸濁培養細胞におけるベタレイン蓄積および *in vivo* におけるベタレイン生合成における AsA の役割を解明することが必要である。

b. 浸透圧の上昇はベタシアニンの蓄積を促進する

Portulaca 懸濁培養細胞におけるベタシアニン蓄積はマンニトールおよびソルビトールの添加によって更に促進され (Fig. 4.2, 4.4)、ベタシアニン生産能を有する小細胞塊は、20 g/l ショ糖、150mM マンニトールおよび 150mM ソルビトールを添加した改変 MS-AsA 培地において増殖した。JR12-MS 系統では無添加区との有意差が見られなかったが、この原因として誘導初期に増殖したカルス塊

を分析したために、培地の浸透圧の影響がベタシアニン蓄積量に影響しなかったことが考えられる。細胞が小さくなるにつれて、マンニトール添加による水ポテンシャルの減少によりベタシアニン蓄積が増加する、細胞のサイズとベタシアニン蓄積との相関性が *Phytolacca* 懸濁培養細胞においても報告されている (Sakuta *et al.*, 1987)。また、液体培地へのマンニトール添加はブドウの懸濁培養細胞のアントシアニン蓄積において、有意な増加を誘導した (Chi and Cormier, 1990)。本実験においても、マンニトールおよびソルビトールを組み合わせた浸透圧調節物質の培地への添加は、細胞の最適浸透圧条件を作り出す一方で、ベタレインの蓄積を増加させる効果を示した。

4.2 ベタレイン蓄積に対する植物ホルモンの作用

4.2.1 緒言

植物二次代謝の多くは、植物ホルモン、光、および栄養素などの環境要因による影響を特に受けやすい事が知られている。懸濁細胞培養系は、これらの環境要因による植物の二次代謝の制御を研究する上で適した培養系である (Hirano *et al.*, 1996)。そこで、本節では、確立したベタレイン生産能を有する懸濁細胞培養系を用いて、様々な植物ホルモンによる色素蓄積および細胞増殖への影響を明らかにし、さらに効率的なベタレイン生産性を示す培養条件を検討するとともに、植物ホルモンによるベタレイン蓄積の制御機構についても考察を加えた。

4.2.2 材料および方法

a. 培養条件

材料として、5 μ M 2,4-D を添加した改変 MS-AsA 培地 (pH5.7) にて増殖した *Portulaca* 懸濁培養細胞、JR12-MS7 系統を用いた。植物ホルモンとして 2,4-D、ベンジルアデニン (6BA)、カイネチン (KIN)、ジベレリン酸 (GA_3) およびアブシジン酸 (ABA) を用いて、最終濃度 0, 0.05, 0.5, 5 および 50 μ M となるように、フィルター滅菌を行って液体培地へ添加した。なお、6BA、KIN、 GA_3 および ABA 添加実験においては、全ての実験区に 5 μ M 2,4-D を添加した。3PCV の培養細胞を新鮮培地に懸濁して連続照明下にて培養し、10 日後における培養細胞の増殖率およびベタシアニン量を測定した。

4.2.3 結果

2,4-D 添加濃度の差は懸濁培養細胞の増殖率に影響を及ぼし、0 ~ 0.5 μM 添加区においては、最も増殖率が高かった 5 μM 2,4-D 添加区と比較して 3/5 以下に低下し、また 50 μM 2,4-D 添加区において培養細胞は褐変枯死した (Fig. 4.6B)。しかしながら、生重量当たりのベタシアニン蓄積量は、50 μM 添加区を除いて培養細胞の増殖に最適でなかった濃度区においても、有意な差は認められなかった (Fig. 4.6A)。また、2,4-D 添加濃度が減少するに従って細胞集塊が大きくなり、非アシル化ベタシアニンの増加が認められた。

サイトカイニン、 GA_3 および ABA の添加は細胞増殖およびベタシアニン蓄積量の両方に影響を及ぼした。6BA および KIN の 0.05 ~ 5 μM 添加区において細胞増殖率は約 1/2 に減少し、50 μM 添加区においては褐変枯死に至った。また、ベタシアニン蓄積量は 0.05 μM 6BA 添加区においては、ほとんど影響を受けていなかったが、0.05 および 0.5 μM KIN 添加区においては約 1/2 に、0.5 μM 以上の 6BA 添加区、および 5 μM 以上の KIN 添加区においては約 1/5 以下に減少した (Fig. 4.7, 4.8)。 GA_3 添加により細胞増殖率は GA_3 濃度に関わらず、コントロールの約 1/3 に低下した。また、増殖率の低下に伴い、全ての濃度区においてベタシアニン蓄積量はコントロールの 2/9 から 1/6 に減少した (Fig. 4.9)。さらに、ABA を添加した全ての濃度区において、細胞増殖率およびベタシアニン蓄積量が減少した。0.05 μM ABA 添加区においても、細胞増殖率は 2/7 に低下し、ベタシアニン蓄積量も 1/2 に減少した。ABA 添加濃

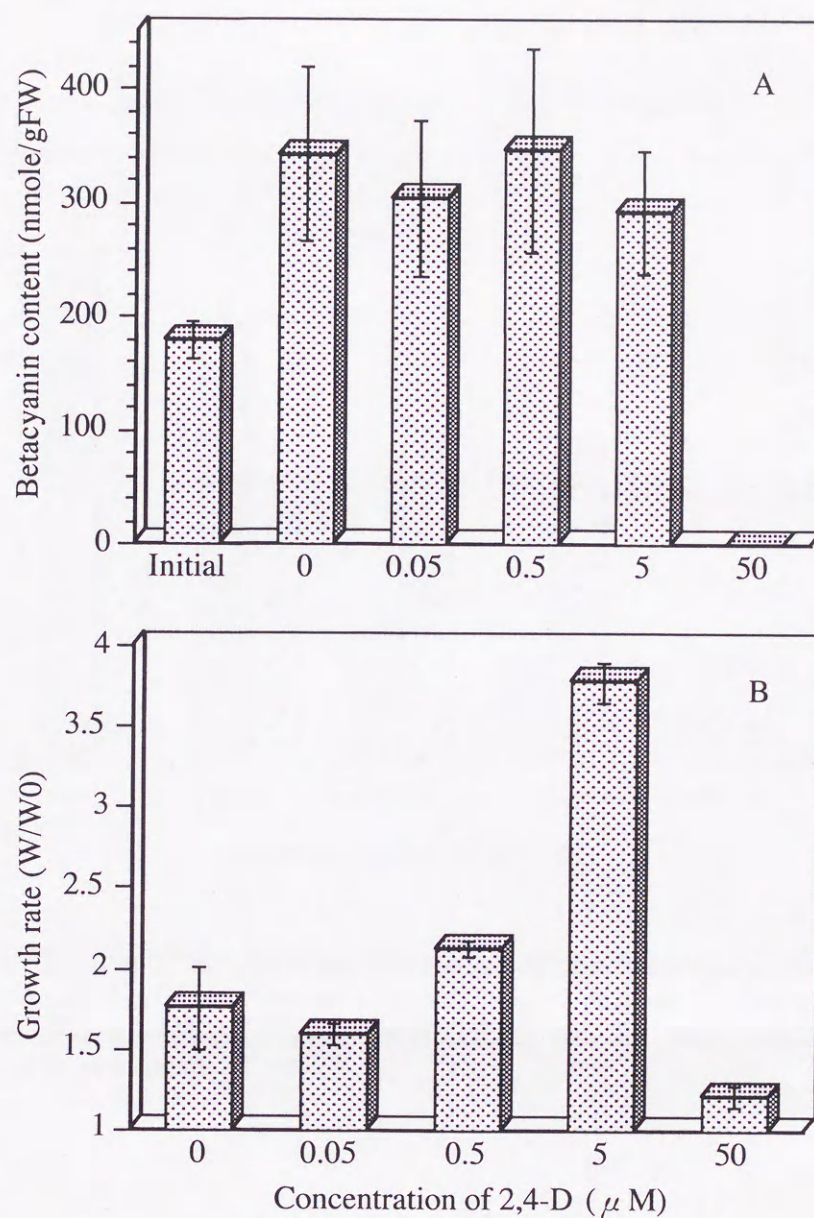


Fig. 4.6 Effects of various concentrations of 2,4-D on betacyanin accumulation and growth rate of cultures. Betacyanin content and growth rate were measured at day 10 after transfer. A: Vertical lines indicate SD ($n=5$). B: Vertical lines indicate SD ($n=3$).

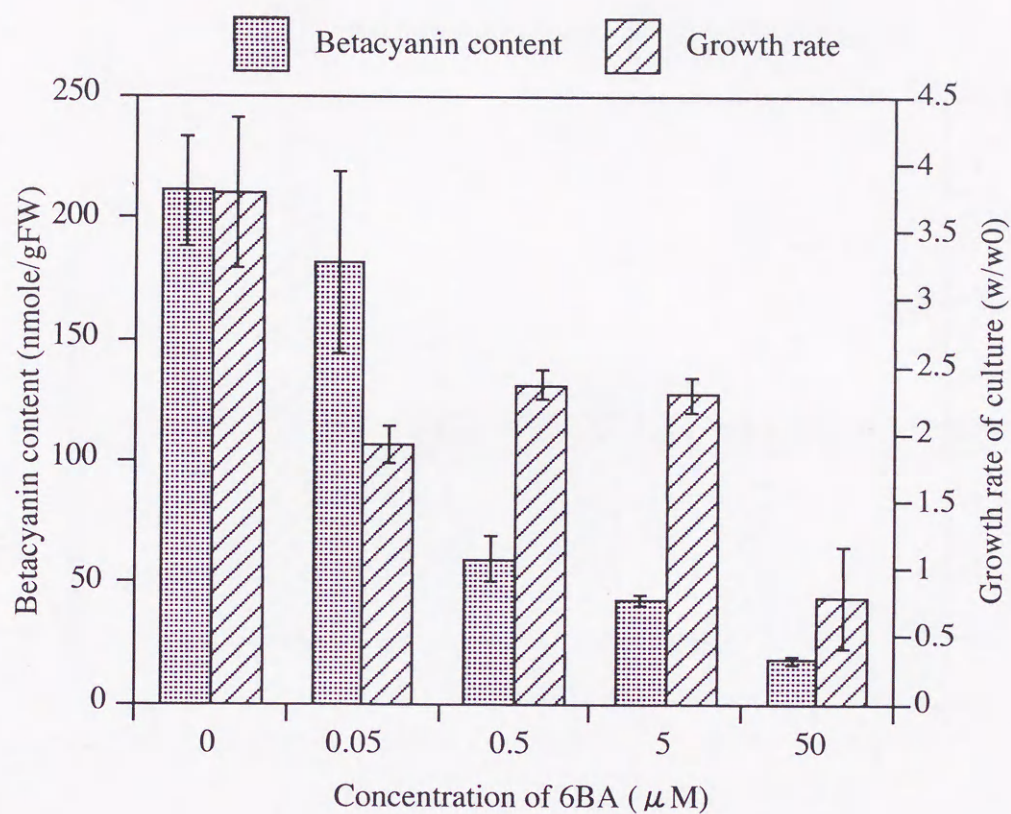


Fig. 4.7 Effects of various concentrations of N^6 -benzyladenine (6BA) on betacyanin accumulation and growth rate of cultures. Betacyanin content and growth rate were measured at day 10 after transfer. Vertical lines indicate SD ($n=3$).

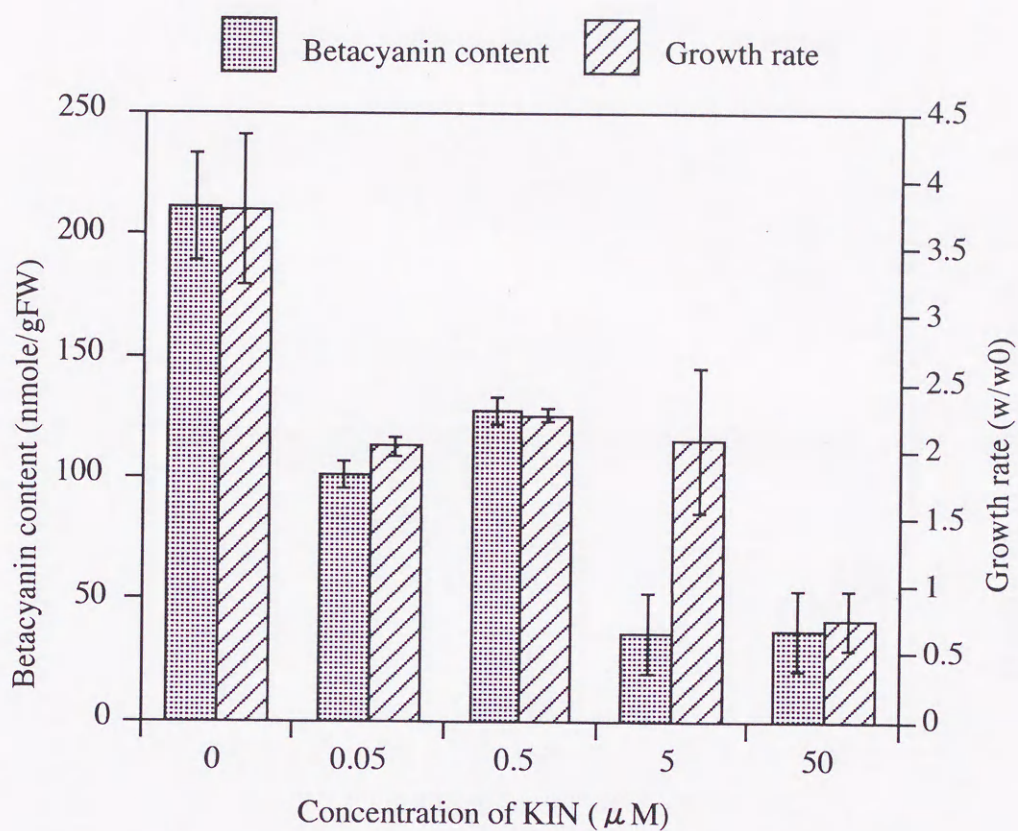


Fig. 4.8 Effects of various concentrations of kinetin (KIN) on betacyanin accumulation and growth rate of cultures. Betacyanin content and growth rate were measured at day 10 after transfer. Vertical lines indicate SD ($n=3$).

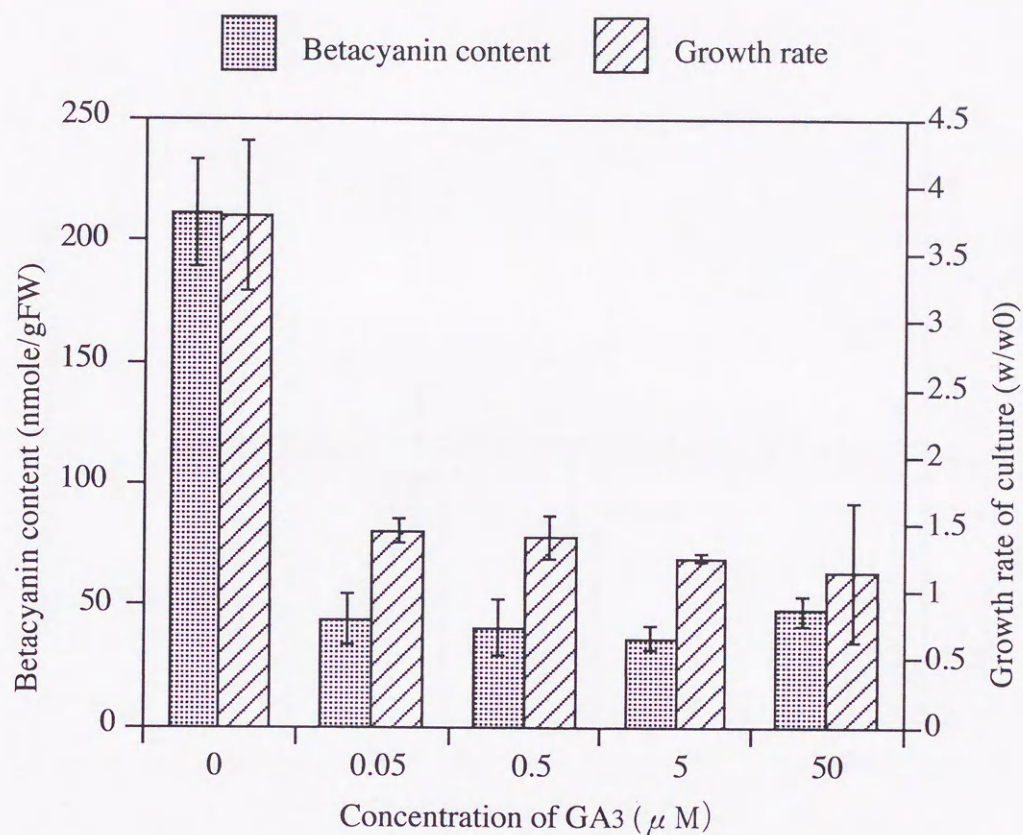


Fig. 4.9 Effects of various concentrations of gibberellic acid (GA3) on betacyanin accumulation and growth rate of cultures. Betacyanin content and growth rate were measured at day 10 after transfer. Vertical lines indicate SD ($n=3$).

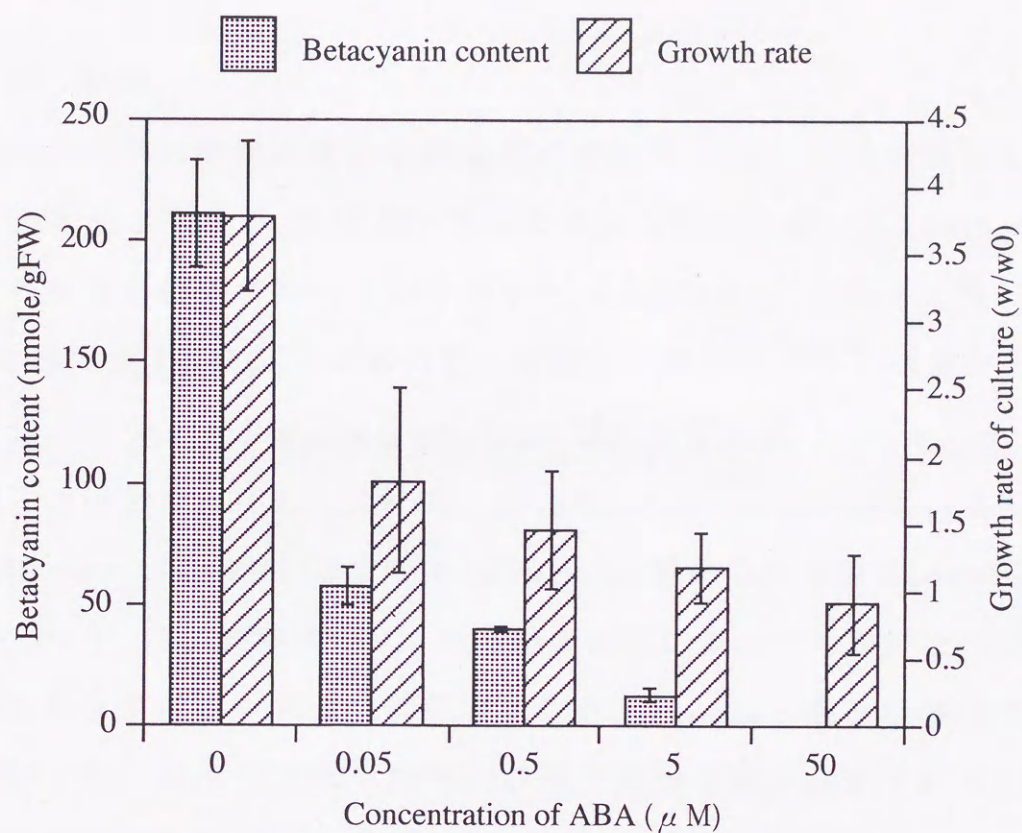


Fig. 4.10 Effects of various concentrations of abscisic acid (ABA) on betacyanin accumulation and growth rate of cultures. Betacyanin content and growth rate were measured at day 10 after transfer. Vertical lines indicate SD ($n=3$).

度が高くなるに従い、培養細胞の褐変化が激しくなり、50 μ M ABA 区では枯死に至った (Fig. 4.10)。

4.2.4 考察

Portulaca 懸濁細胞培養系の細胞増殖率は 5 μ M 2,4-D 添加区において最大を示したが、生重量当たりのベタシアニン量は 2,4-D 濃度による有意な影響は認められなかった (Fig. 4.6)。このことは、2,4-D 濃度が 1 μ M 以下において、細胞数の減少を伴ってベタシアニン量が減少する *Phytolacca americana* 懸濁培養細胞 (Sakuta *et al.*, 1991) とは異なっていた。一方、*Chenopodium rubrum* 懸濁培養細胞 (Berlin *et al.*, 1986) および *Beta vulgaris* 懸濁培養細胞 (Leathers *et al.*, 1992) は、低濃度の 2,4-D 添加条件下においても良好な細胞増殖に伴ってベタシアニン蓄積を示した。*Portulaca* 懸濁培養細胞においても、ベタシアニン蓄積は旺盛な細胞増殖が必須であると考えられていたが、低濃度の 2,4-D 添加条件下における細胞分裂の抑制といったストレス条件もベタシアニン合成を誘導する刺激となると考えられる。また一方で、*Portulaca* 懸濁培養細胞には外生オーキシンが減少した場合、内生オーキシンを作り出す能力があるとも考えられることから、この点については更なる研究が必要であろう。

培地へのサイトカイニン添加により、*Portulaca* 懸濁培養細胞の細胞増殖が抑制され、ベタシアニン蓄積量が減少した (Fig. 4.7, 4.8)。しかし、*Amaranthus tricolor* の実生 (Piattelli *et al.*, 1971) およびカルス (Bianco-Colomas and Hugues, 1990) では、KIN 添加によってベタシアニン蓄積量が増加することが報告されている。6BA を

投与することによっても、*A. caudatus* の実生のベタシアニン蓄積量が増加した (Féray *et al.*, 1992)。これらのことから、*Amaranthus* はサイトカイニンを検出するためのバイオアッセイ系によく利用されている (Biddington and Thomas, 1973; Nishikawa *et al.*, 1995; Kubota *et al.*, 1999)。一方、*Phytolacca* 懸濁培養細胞ではサイトカイニンの添加により、チロシン以降のベタシアニン合成活性が抑制されてベタシアニン蓄積が減少した (Hirano *et al.*, 1992)。しかし、*Phytolacca* 懸濁培養細胞において細胞増殖は抑制されていない。従って、*Portulaca* 培養細胞におけるサイトカイニン添加によるベタシアニン蓄積の減少は、ベタシアニン合成活性の抑制のみではなく、サイトカイニンが一次代謝に影響を及ぼして細胞増殖を抑制した結果、ベタシアニン合成に適さない生理状態になったことが原因であると考えられる。

GA₃ 添加による *Portulaca* 懸濁培養細胞におけるベタシアニン蓄積量および増殖率への影響は、添加濃度に関係なく一定の割合で起きていた (Fig. 4.9)。*Amaranthus* の実生においても GA₃ は光照射により誘導されるベタシアニンの合成を抑制し、その回復には前駆体のチロシンおよび DOPA の投与が有効であることを示した (Kinsman *et al.*, 1975a, Laloraya *et al.*, 1976)。しかし、細胞増殖の抑制に伴いベタシアニン合成が抑制された *Portulaca* 培養細胞とは異なり、GA₃ の投与によって *Amaranthus* の実生の伸長は促進されており、成長抑制物質の添加によってベタシアニン合成は回復した (Kinsman *et al.*, 1975b; Sweet and Guruprasad, 1992)。

また、ABA によっても添加濃度の増加に伴って、*Portulaca* 懸濁培養細胞におけるベタシアニンの蓄積は抑制された (Fig. 4.10)。

Phytolacca 懸濁培養細胞 (Hirano *et al.*, 1996) および *A. caudatus* 実生 (Ray *et al.*, 1983) においても ABA によるベタシアニンの蓄積は抑制され、GA₃ の添加時と同様に細胞増殖の抑制、内生チロシン量の減少、およびチロシンからベタシアニンへの合成活性の抑制が原因として挙げられている (Hirano *et al.*, 1996)。 *Phytolacca* 懸濁培養細胞では 0.1 μ M ABA 添加においても生重量当たりのベタシアニン量に有意な影響が見られないが、 *Portulaca* 懸濁培養細胞では 0.05 μ M 添加区においても強くベタシアニン蓄積が抑制された。

サイトカイニン、GA₃ および ABA による培養細胞の増殖抑制はベタシアニン合成の抑制につながったが、2,4-D 添加濃度の減少による増殖抑制ではベタシアニン合成を伴わなかった。このことは、前者 3 種の植物ホルモンの添加が細胞の一次代謝を阻害して細胞の生存そのものに影響を及ぼしたのに対して、低濃度の 2,4-D は細胞分裂の遅延を引き起こしたが、ベタシアニン合成の活性は抑制しなかったとを示唆した。

4.3 ベタレイン合成と蓄積の光制御

4.3.1 緒言

光が二次代謝の誘導を制御することは、特にアントシアニンなどのフラボノイド系代謝産物の発現において詳細に調査され、パセリ (Kreuzaler *et al.*, 1983) やニンジン (Gleitz and Seitz, 1989) の懸濁培養細胞では、UV や青色光など短波長の光が、ある因子を介してフラボノイド生合成遺伝子の転写を活性化して代謝産物を誘導することを明らかにされている。さらに、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) のインドールアルカロイドであるビンブラスチンおよびピンクリスチンの生合成における光誘導性の遺伝子 (Schröder *et al.*, 1999) や、ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) のナフトキノンであるシコニンの生合成に関与し、暗黒下で特異的に発現する遺伝子 (矢崎ら, 1997) が、それぞれの懸濁培養細胞から単離されている。

一方、*Portulaca* カルス培養細胞におけるベタレインの蓄積が、青色光に UV 光を組み合わせる照射することによって、効果的に促進されることが明らかにされ (Kishima *et al.*, 1995)、ジュエル種の着色系統の花弁で特異的に発現するタンパク質 (Kishima *et al.*, 1992) と同じ分子量をもつタンパク質が、光により発現することが示されている。そこで本節では、ベタレイン色素生産能を有する懸濁培養細胞において色素の合成および蓄積が、光に特異的であることを見出し、光照射によるベタレイン生合成の制御機構を調査し、生理学的観点から論述する。

4.3.2 材料および方法

a. 培養条件

材料には、5 μ M 2,4-D を添加した改変 MS-AsA 培地にて増殖した継代 10 日後の *Portulaca* 懸濁培養細胞 (JR12-MS7 系統) を用いた。暗黒処理によるベタレイン蓄積量の経時的変化を 2 週間ごとに調査した。光照射によるベタレインおよび前駆体の蓄積量は、光照射後 24 時間は 3 時間置きに、その後 1.5、2、3、5、7 および 10 日目の培養細胞について分析を行った。ベタレイン色素の分析および定量は第 2 章および第 3 章の方法に従って行い、更に前駆体であるチロシンおよび DOPA の蓄積量を以下の方法により分析した。

b. 細胞内遊離アミノ酸の抽出および分析

凍結乾燥した懸濁培養細胞 50mg を 0.1N HCl (10 ml/g) に懸濁した。粗抽出液を遠心分離 (20,000 \times g, 10min, 4 $^{\circ}$ C) し、上清にフェノール/クロロホルム (1:1) を当量加えて混合し、遠心分離 (20,000 \times g, 10min) した。水相にジエチルエーテル当量を加えて混合し、遠心分離後 (20,000 \times g, 30s, 4 $^{\circ}$ C)、水相を凍結乾燥した。アミノ酸溶液にフェニルイソチオシアネート (PITC) を添加し、アミノ酸をフェニルチオカルバミル (PTC) 化し HPLC で分析した。PTC アミノ酸の分析は以下の条件で行った。標品にアミノ酸混合標準液, H 型 (Wako) および L- β -(3,4-ジヒドロキシフェニル) アラニン (Wako) を用いた。カラムは Wakosil-PTC (Wako) を用い、カラムオープン内で 40 $^{\circ}$ C に保温した。溶媒 A に 3.6mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH6.0) を添加したアセトニトリル、溶媒 B に 24mM

酢酸ナトリウムバッファー (pH6.0) を添加したアセトニトリルを用いた。流速 1 ml/min とし、20 分間で溶媒 B を 0 から 70% (B/A+B) への直線勾配により PTC アミノ酸を溶出して 254nm で検出した。

4.3.3 結果

a. 暗黒処理によるベタレイン蓄積量の変化

懸濁培養細胞のベタレイン生合成は暗黒処理によって強く阻害され、ベタレイン蓄積量は処理 2 週間で急激に減少し薄いピンク色の細胞が増殖した。更に、処理 6 週間後に培養細胞は白色化し、8 週間後にはベタレイン色素は検出されなくなった (Fig. 4.11)。

b. 光照射による前駆体およびベタレイン蓄積量の変化

白色化した懸濁培養細胞を暗黒下にて培養し、7 日目に光照射下 ($33.3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) に移しところ、再びマゼンタ色へと変化した。暗黒下での 4 回の継代培養後、光照射下に移した培養細胞は 12 から 24 時間後には着色が目視で確認でき、主要色素であるベタニンを初めとするベタレインは光照射後 24 時間以降に急激に蓄積し、7 日で元の色素蓄積量に回復した (Fig. 4.11, 4.12)。更に、ベタレインの前駆体の経時的変化を分析した結果、光照射後に細胞内の遊離チロシンおよび DOPA の蓄積量は減少し、24 時間以降にわずかに増加した (Fig. 4.12)。

4.3.4 考察

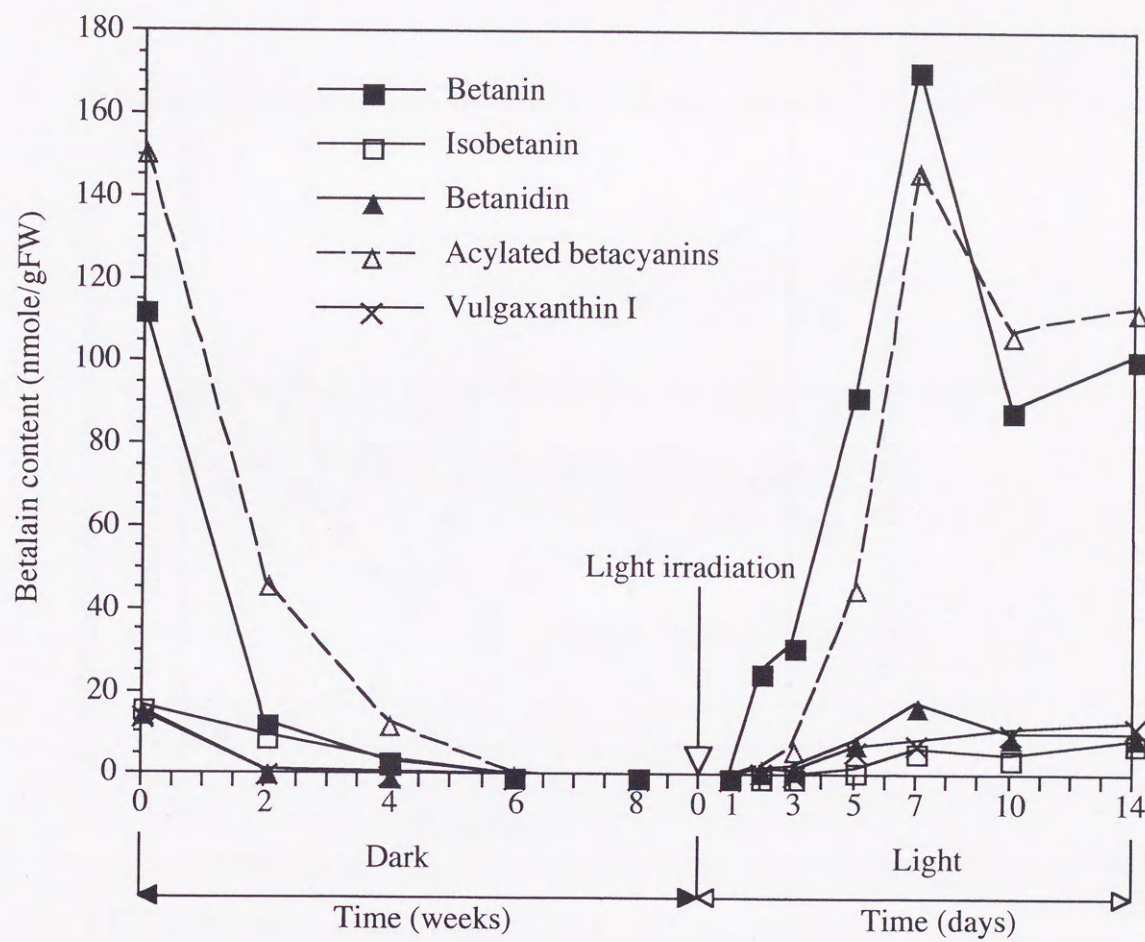


Fig. 4.11 Time courses of betalain accumulation in *Portulaca* cell suspension culture after dark and light treatment.

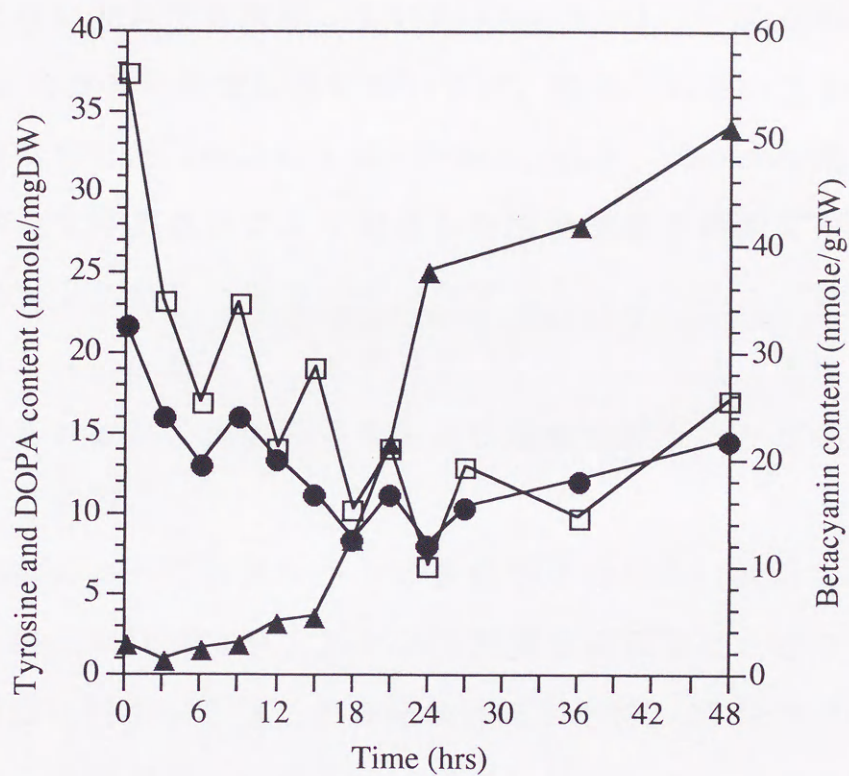


Fig. 4.12 Time courses of tyrosine and betacyanin accumulation after light irradiation. Cell suspension cultures were transferred to light condition at subculture. -□-=-tyrosine. -●-=-DOPA. -▲-=-betacyanin.

ジュエル種において懸濁培養細胞のベタシアニン蓄積は、カルス培養細胞 (Kishima *et al.*, 1991; Kishima *et al.*, 1995) と同様に、光によって制御できることが明らかになった (Fig. 4.13)。懸濁培養細胞におけるベタシアニン蓄積は、暗黒下にて1ヶ月間培養を行った後においても継続していた (Fig. 4.11)。一方、*Chenopodium rubrum* のカルス培養細胞においては、暗黒下においてもベタシアニンを生産した (Berlin *et al.*, 1986)。また、*Portulaca* 懸濁培養細胞において暗黒処理により脱色した培養細胞を細胞増殖の定常期に光照射下に移した場合、ベタシアニンの合成および蓄積は誘導されなかった。従って、ベタシアニン合成の開始は光により著しく刺激されるが、細胞の分裂および増殖を伴うことが必須であると考えられる。

光照射によってベタレインの合成が一日以内に誘導されたことから (Fig. 4.11, 4.12)、*Portulaca* 懸濁培養細胞におけるベタレイン生合成に関与する遺伝子の発現は光照射後、24時間以内に活性化されて細胞増殖の定常期まで発現し続けることが示された。この光による制御を利用することにより、光シグナル伝達系やベタレイン生合成を制御する遺伝子の単離および発現解析を行うことが可能になる。従って、ベタシアニン生産能を有する *Portulaca* 懸濁細胞培養系は、今後のベタレイン生合成の分子生物学的研究および酵素の生化学的研究のモデル系としての利用が期待される。

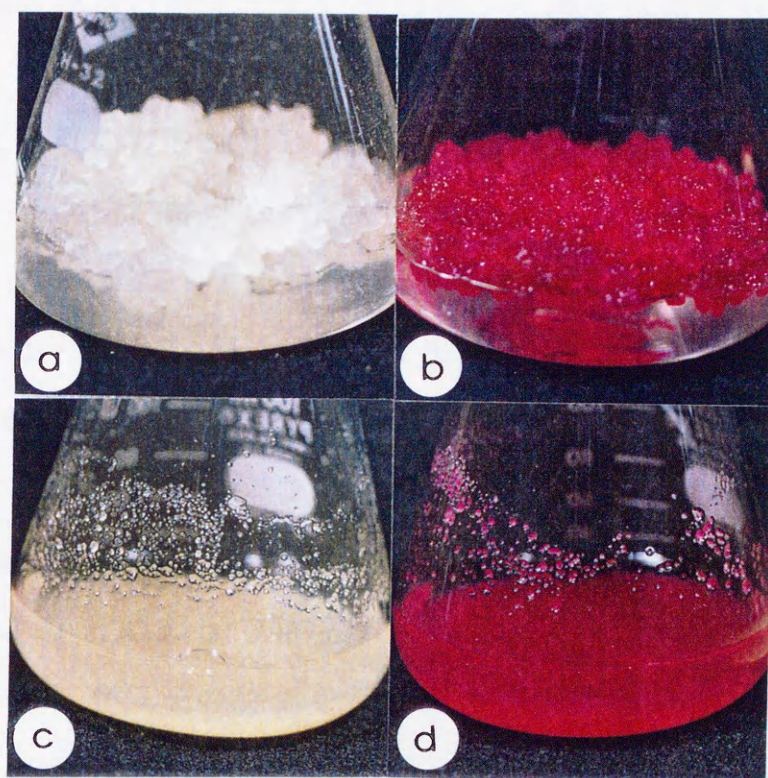


Fig. 4.13 Cell culture of *Portulaca* sp. 'Jewel'. a; callus culture in the dark condition (JR18), b; callus culture in the light condition (JR18), c; suspension culture in the dark condition (JR12MS7), d; suspension culture in the light condition (JR12MS7).

5 ベタレイン生合成系に関与する遺伝子の単離

5.1 光照射下で特異的に発現する遺伝子の探索

5.1.1 緒言

前章において述べたように *Portulaca* 懸濁培養細胞は光特異的にベタレイン色素合成が誘導され、カルスと同様に暗黒下において懸濁培養細胞は白色化する。白色化した細胞は光照射下にて培養することにより、速やかにベタレイン合成蓄積が誘導された。このような発現の差を利用して遺伝子を単離する方法としてはサブトラクション法が挙げられるが、より稀少転写産物の検出可能な方法として Polymerase Chain Reaction (PCR) を利用したディファレンシャル・ディスプレイ法 (DD 法) が開発され (Liang and Pardee, 1992)、さらに簡便で DD 法に比べてより長い遺伝子断片を単離することが可能な簡易ディファレンシャル・ディスプレイ法 (簡易 DD 法, Yoshida *et al.*, 1994) が開発された。そこで本章では、簡易 DD 法により光によって発現が誘導されているベタレイン生合成系に関与する遺伝子の探索を行った。

5.1.2 材料および方法

a. 材料

材料に 5 μ M 2,4-D 添加した改変 MS-AsA 培地で増殖した懸濁培養細胞を用いた。暗黒処理により白色化した培養細胞を継代 7 日後に光照射下に移した。光照射 0、12、24、36、48、72 時間後の培養細胞を液体窒素で瞬間的に凍結して RNA 抽出時まで -80°C で

保存した。

b. mRNA 単離および一本鎖 cDNA 合成

mRNA 単離は QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech) を用いて行った。液体窒素中で粉碎した約 200mgFW の培養細胞を抽出バッファー 600 μl に懸濁し、溶出バッファー 800 μl を添加した。懸濁液を遠心分離した上清を Oligo(dT)-cellulose 25mg に混合して mRNA を吸着させた後、遠心分離して上清を取り除いた。Oligo(dT)-cellulose を high-salt buffer および low-salt buffer で洗浄後、溶出バッファー 400 μl にて mRNA を溶出した。mRNA 溶液の濃度を分光光度計で測定後、65°C で 10 分間処理して急冷した。一本鎖 cDNA は First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech) を用いて合成した。mRNA (1.5~2ng/ μl) 20 μl 、Bulk first-Strand Reaction Mix 11 μl 、プライマー pd(N)₆ 1 μl 、200mM DTT 1 μl を混合して逆転写反応 (37°C, 1hr) を行った後、cDNA-RNA duplex を変性 (90°C, 5min) させ逆転写酵素を不活化した。

c. 簡易ディファレンシャル・ディスプレイ

簡易 DD には RAPD 10-Mer Kit A、B、C、D、S および 26 シリーズ (Operon) をプライマーとして用いた。PCR 反応のテンプレートには光照射後 0 から 72 時間の各 cDNA 6 種、または、光照射 0 時間後の cDNA、12 および 24 時間後の cDNA のバルク (1:1)、36, 48 および 72 時間後の cDNA のバルク (1:1:1) の cDNA 3 種を用いた。PCR 反応液は cDNA 1 μl 、プライマー (10pmole/ μl) 1 μl 、10×PCR buffer (Mg⁺) 2.5 μl 、80mM dNTPs mixture 2 μl 、rTaq DNA

ポリメラーゼ (5U/ μ l) (Takara) 0.2 μ l に滅菌超純水を加えて 25 μ l とした後、ミネラルオイル (Sigma) を加えて調整した。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C 5 分の熱変性反応後、94 $^{\circ}$ C 60 秒の熱変性、34 $^{\circ}$ C 90 秒のアニーリング反応、72 $^{\circ}$ C 90 秒の伸長反応を 43 サイクル行った後、72 $^{\circ}$ C 10 分間の伸長反応を行った (PC-700, Astec)。PCR 産物は 1 \times TAE バッファーを用いた 1.5% アガロース (ultraPURE Agarose, Gibco BRL) ゲル電気泳動で分画した後に、エチジウムブロマイドで染色し UV 照射により検出した。

d. クローニングおよびシーケンス

光照射 12 時間以降に共通して特異的な PCR 断片を pGEM-TEasy または pGEM-T Vector System (Promega) を用いてクローニングした。50 μ g/ml アンピシリンを添加した 2 \times YT 液体培地にて増殖させた大腸菌 JM109 より、プラスミドを一般的なアルカリ-SDS 法に PEG-NaCl (13% PEG6000, 0.8M NaCl) 沈殿を組み合わせた方法、または QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて精製した。シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Pharmacia Biotech) のプロトコールに従って行い、ABI 310 DNA Sequencer (Pharmacia Biotech) を用いて解析した。得られたシーケンスは、インターネット上で National Center for Biotechnology Information (NCBI) および Genbank の BLAST によるホモロジー検索を行った。

e. RT-PCR 解析

ベタレイン色素を合成している光照射後のステージにおける発

現の特異性を確認するために、クローンに特異的なプライマーを構築して RT-PCR 解析を行った。

5.1.3 結果

a. 特異的 PCR 断片の検出

簡易 DD 法による PCR 産物は 100 から 2000bp の範囲にバンドが検出され、PCR 一反応のバンド数は 1 から 15 であった。6 種の cDNA を鋳型に用いた結果、プライマー OPA-8、OPA-11、OPB-5、OPB-7、OPB-15、OPC-4、OPC-5 および OP26-24 で、一方バルクした 3 種の cDNA を鋳型に用いた結果、プライマー OPA-18、OPS-7、OPS-8、OPS-16、OPV-1、OP26-2、OP26-5、OP26-8 および OP26-20 で Fig. 5.1 に示すように光照射 12 時間以降に共通して特異的な PCR 断片が検出され、合計 18 個の特異的 PCR 断片が単離された (Table 5.1)。

b. ホモロジー検索

光照射 12 時間以降に特異的に発現した 18 個の PCR 断片をクローニングし、14 個のクローンの塩基配列を決定して BLASTX (ヌクレオチド vs タンパク質) によりホモロジー検索を行ったところ、膜輸送に関与するタンパク質 (クローン S7-900)、光合成系の酵素 (S8-700 および S16-650)、レセプター様プロテインキナーゼ、DNA ダメージ修復/耐性タンパク質および病害抵抗性遺伝子 (26-2-300) などと高いホモロジーを示すクローンが確認されたが、残りのクローンは既知のタンパク質との間に高いホモロジーを示さなかった (Table 5.2)。

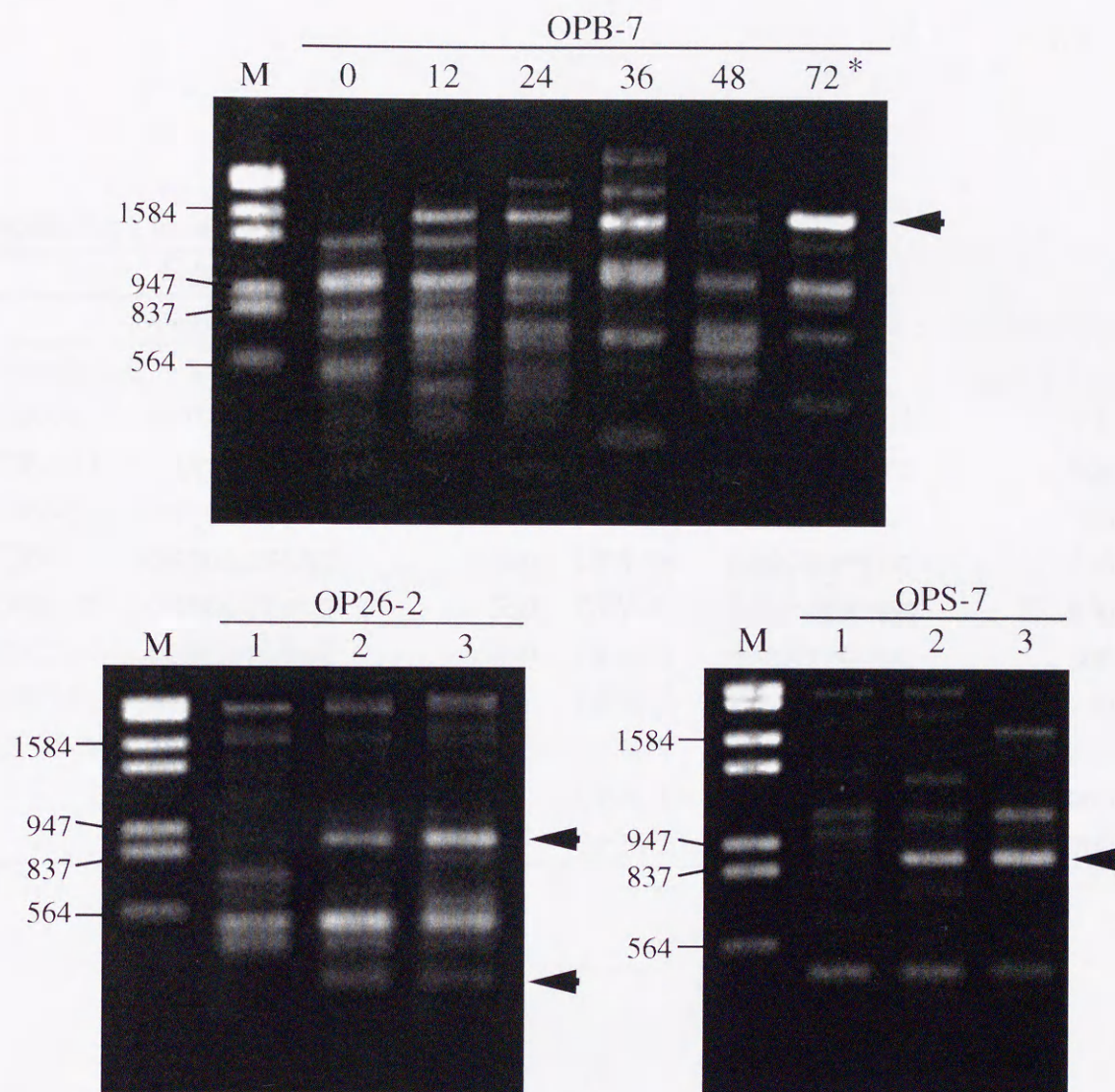


Fig. 5.1 Representative results of simplified differential display. *: Times (hrs) after light exposure. M: Molecular size marker (bp), 1: 0 hr after light exposure, 2: 12 and 24 hrs after light exposure, 3: 36, 48 and 72 hrs after light exposure. Arrow indicates specific PCR fragment.

Table 5.1 List of the primer that produced specific PCR fragment

| Individual cDNA | | | Bulked cDNA | | |
|-----------------|------------|-------------------------------|-------------|------------|-------------------------------|
| Primer | | Specific PCR fragment (bp) | Primer | | Specific PCR fragment (bp) |
| Description | Sequence | | Description | Sequence | |
| OPA-8 | GTGACGTAGG | 600 | OPA-18 | AGGTGACCGT | 1100 |
| OPA-11 | CAATCGCCGT | 450 | OPS-7 | TCCGATGCTG | 900 |
| OPB-5 | TGCGCCCTTC | 1200 | OPS-8 | TTCAGGGTGG | 700 |
| OPB-7 | GGTGACGCAG | 1400 | OPS-16 | AGGGGGTTCC | 650 |
| OPB-15 | GGAGGGTGTT | 550 | OPV-1 | TGACGCATGG | 650 |
| OPC-4 | CCGCATCTAC | 450 | OP26-2 | TGGATTGGTC | 300 |
| OPC-5 | GATGACCGCC | 750 | OP26-2 | TGGATTGGTC | 900 |
| OP26-24 | GATCATGGTC | 1000 | OP26-5 | GGAACCAATC | 850 |
| | | | OP26-8 | TGGTAAAGGG | 1000 |
| | | | OP26-20 | GATCAATCGC | 700 |

Table 5.2 Homologous protein with the cDNA clone

| cDNA clone | Protein | E value |
|------------|---|----------|
| A8-600 | Anther-specific protein SF2 precursor | 6.1 |
| A11-450 | Anther-specific proline-rich protein | 0.68 |
| | Abciscic acid-insensitive protein | 2.6 |
| B5-1200 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain | 2.2 |
| B7-1400 | no | - |
| B15-550 | Serine/threonine protein kinase | 5.1 |
| C4-450 | no | - |
| C5-750 | no | - |
| S7-900 | Putative transmembrane transport protein | 7.8e-127 |
| | Glutathione-regulated potassium-efflux system protein | 7.6e-19 |
| S8-700 | Fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase | 1.0e-124 |
| S16-650 | Malate dehydrogenase | 7e-05 |
| V1-650 | Transcription factor IIIB 70 KD subunit | 5e-12 |
| 26-2-300 | Disease resistance gene | 3e-20 |
| | Receptor-like protein kinase 5 precursor | 4e-13 |
| | DNA damage repair / toleration protein | 4e-12 |
| 26-2-850 | Engoglucanase B precursor | 0.017 |
| 26-8-1000 | no | - |

c. 光照射ステージに対する特異性

特異的なプライマー (Table 5.3) を構築することが可能であった 9 つのクローン (A8-600、B5-1200、B7-1400、B15-550、C5-750、S7-900、S8-700、26-2-300、26-2-850) の発現解析を RT-PCR により行ったところ、クローン 26-2-300 は光照射下で色素合成が起きているステージで特異的に発現し、一方クローン B7-1400 は光照射により発現量が増加することが明らかになった (Fig. 5.2)。残りのクローンは光照射に関わらず発現していることが確認された。

5.1.4 考察

懸濁培養細胞のベタシアニン合成における光に対する特性を利用してベタレイン生合成に関与した遺伝子の単離を試み、光照射下に特異的な二つの遺伝子断片のクローニングに至った。クローン B7-1400 は既知の遺伝子との相同性を示さず機能の予測はできなかったが、クローン 26-2-300 は様々な遺伝子との相同性を示した。26-2-300 は Swissprot データベースに対するホモロジー検索の結果、アラビドプシス (*Arabidopsis thaliana*) のレセプター様プロテインキナーゼ (49%) と、DNA ダメージ修復/耐性タンパク質 (43%) をはじめとする様々なタンパク質との相同性が明かとなり、さらに nr-aa データベースに対するホモロジー検索の結果、トマト (*Lycopersicon esculentum*) の様々な推定病害抵抗性タンパク質 (59%)、および様々なプロテインキナーゼとの推定アミノ酸レベルでの相同性が明かとなった。これらのタンパク質はすべてロイ

Table 5.3 Specific primers for RT-PCR analysis.

| Clone | Primer 1 | Primer 2 |
|----------|------------------------------|-----------------------------|
| A8-600 | 5'-TTCCGTAGCCTTGACTCC-3' | 5'-TCGGTCAGGATCGTTAGG-3' |
| B5-1200 | 5'-ATGTTTCCGATGCGACTCTCC-3' | 5'-ATGACCTCTTATGGCACGCAC-3' |
| B7-1400 | 5'-GCAGTGGGGCATTAGAAGTC-3' | 5'-AAGCAGCTGGCGTTGAGATC-3' |
| B15-550 | 5'-GGCCTGAGTTTCTGTTACCC-3' | 5'-AGTATCCTCTCTCGGGCTTG-3' |
| C5-750 | 5'-TTGTTAAGGAGATCGTCGCCG-3' | 5'-TTAGCGTTGTCCTTGGTGGTC-3' |
| S7-900 | 5'-CCACATCCAAGCTCCGTGTAG-3' | 5'-CCYAGTTCCAAGCTCAGACCC-3' |
| S8-700 | 5'-GATGCCCTTGTAAGTAATCGG-3' | 5'-ATAAGCCCCTCTGGAAGTAG-3' |
| 26-2-300 | 5'-ACATGAGAGGTCCAGCGATTTC-3' | 5'-TGGTCGGGTACTATGTGGATG-3' |
| 26-2-850 | 5'-GGCTGTAGTAGAGGTTTCATGC-3' | 5'-GTCGTATCTGTGGAGGTAAGG-3' |

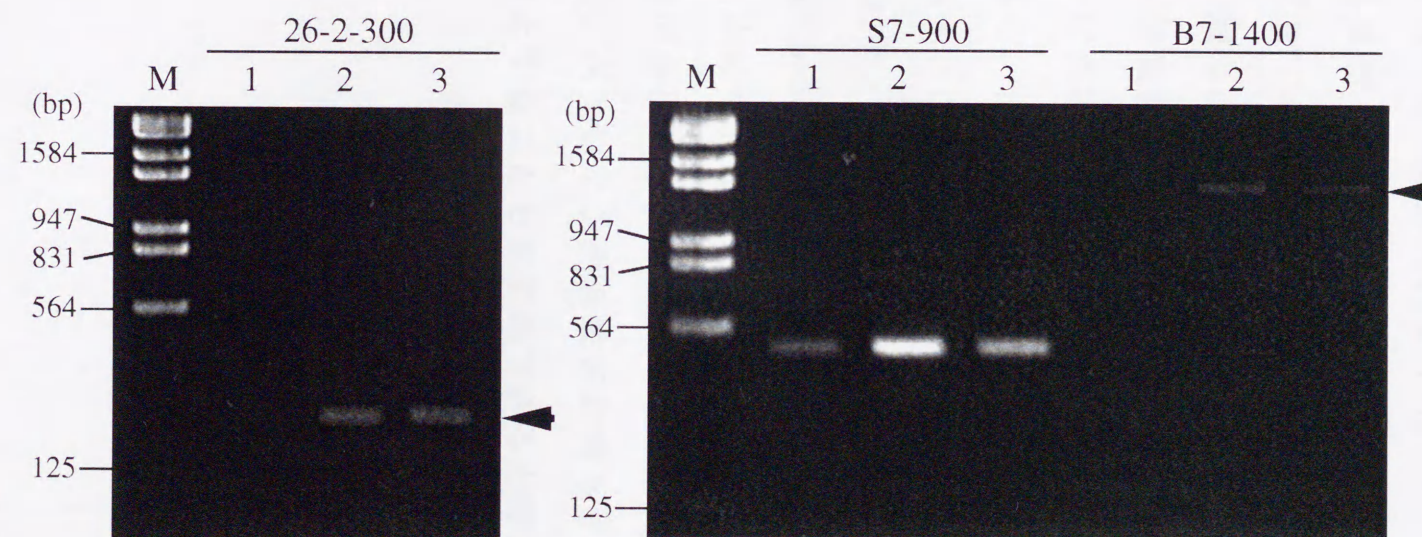


Fig. 5.2 RT-PCR analysis of the specificity of the clone with respect to light exposure. M: molecular size marker, 1: 0 hr after light exposure, 2: 12 and 24 hrs after light exposure, 3: 36, 48 and 72 hrs after light exposure.

シンリッチリピート (LRR) を保存しており、26-2-300 の推定アミノ酸配列にもその特徴が認められる (Fig 5.3)。しかし、ベタレイン生合成への特異性を確認するまでには至っていないことから、26-2-300 および B7-1400 の両クローンは、特異的なプライマーを構築できなかった残りのクローンとともに、RT-PCR 解析やノーザン解析などにより特異性の確認を行い、さらに cDNA の全長を獲得して発現ベクターに組み込み、*in vitro* 転写・翻訳系を利用した機能解析が必要である。また、簡易 DD 法に比べ、より多くのバンドが得られる DD 法や、PCR の再現性が高く偽陽性のバンドが少ない AFLP を応用したフィンガープリンティング法 (AMF 法) (Habu *et al.*, 1997) を用いることにより、ベタレイン生合成系の遺伝子を単離する可能性を高められるであろう。また、色素組成が異なるジュエル種植物体の各部位やジュエル種近交系における白色化と着色花を利用して、ベタレイン生合成系に関与する遺伝子の発現における差異を検出することも有意義であると考えられる。

1 GGATTGGTCGGGTACTATGTGGATGAATTTGAAGCTTCACCTTCAAAGGCAGAACTTTG
 G L V G Y Y V D E F E A S P S K A E T L

 61 AAATGGATAAGGTGCGGTAAATCTTCACCAGCATAGATTTGTCAAACAATGCATTTGAT
 K W I R C G K I F T S I D L S N N A F D

 121 GGAGAGATACCCAAAGAGCTGGGGAATCTAAAGGCTCTTATAGTTCTAGATCTTTCTCAC
 G E I P K E L G N L K A L I V L D L S H

 181 AATGCTCTGGTGGGCAACATTCCATCATCTTTAGGGAATCTGAGTGAAATTGAATCGCTG
 N A L V G N I P S S L G N L S E I E S L

 241 GACCTCTCATGTAACTCCCTTAGTGGAAGAATACCTCCTGAGTTTGCCAACCTTAACTTC
 D L S C N S L S G R I P P E F A N L N F

 301 CTGGAGTACTTGAATGTGTCTTTCAACAAGTTGGTAGGACCAATCCA
 L E Y L N V S F N K L V G P I

Fig. 5.3 Nucleotide sequence of the clone 26-2-300 and its derived amino acid sequence. Specific primers are underlined. Leucine and isoleucine are shown with red characters.

要旨

花卉園芸植物の需要拡大を進めるためには多様な花色をもつ品種を作出する必要がある、花色は花卉の育種目標として最も重要である。花色の育種は主に交雑育種や突然変異の利用により行われているが、アントシアニンにより花色が発現している植物種においては花色の分子育種が可能となり、育種法の選択肢が拡大された。しかし、花色を担う色素はアントシアニンだけではなく、他にクロロフィル、カロチノイドおよびベタレインが存在する。特に黄色のベタキサンチンおよび赤紫色のベタシアニンからなるベタレインは黄色、オレンジ色、赤色、ピンクおよび紫色といった多様な花色を発現する色素であるが、色素や生合成の酵素の易分解性からアントシアニンに比べて研究が立ち後れてきた。従って、ベタレインにより花卉が発色している *Portulaca* 属植物の花色育種を進めるためには、その色素生合成系に関する知見を得ることが重要である。そこで、本研究では *Portulaca* sp. 'Jewel' (ジュエル種) のベタレイン特性やその培養細胞系を用いた色素蓄積機構を解明するとともに、ベタレイン生合成系に関与する遺伝子の単離を試みた。得られた成果を要約すると以下の通りである。

1. *Portulaca* 属植物におけるベタレイン色素

ジュエル種の花弁、雌雄蕊および茎における主要ベタシアニンは、それぞれベタニン、ベタニジン、アシル化ベタシアニンであり、これらの内、アシル化ベタシアニンの蓄積は花卉で認められなかった。また、赤色花はマゼンタ色花に比べてベタレインを高

濃度に蓄積しており、特にベタキサンチン量の増加が赤色花に特徴的であった。更に、半合成ベタキサンチンを標品に用いた分析により、miraxanthin III [チラミン+ベタラミン酸 (BA)]、miraxanthin V [ドーパミン+BA]、Lys+BA、Asn+BA、Val+BA、Leu+BA および Phe+BA を *Portulaca* 属植物で初めて同定に成功した。このベタキサンチンの内、ジュエル種における主要色素となっていたのは、vulgaxanthin I、miraxanthin III、miraxanthin V および portulacaxanthin II であった。

2. ベタレイン色素組成を異にするカルス培養細胞系

ベタシアニンとベタキサンチンの量比を決定する機構を解明するために、様々な色を呈するジュエル種のカルス培養系の確立を検討した結果、体細胞突然変異により出現した黄、オレンジおよび赤色系統は、元のマゼンタ色系統とともに $4.5 \mu\text{M}$ 2,4-D、 30g/l ショ糖、 2.5g/l ゲランガムを添加した J1 培地において高い細胞増殖率を示し、かつ色の安定的な発現を示した。これら全ての系統において、主要ベタシアニンはベタニンであり、一方主要ベタキサンチンは vulgaxanthin I であった。黄色系統およびオレンジ色系統におけるベタシアニン量は、それぞれマゼンタ色系統の $1/50$ および $1/8$ であった。カルスの黄色化はベタニンの減少と vulgaxanthin I の増加が原因であった。一方、オレンジ色系統に出現した赤色系統ではベタシアニン量の増加だけではなく、ベタキサンチン量の更なる増加も認めた。更に、オレンジ色系統において培地への 2,4-D 添加濃度の減少、または 100 および $1000 \mu\text{M}$ といった高濃度のメチル化阻害剤、5-アザシチジンの添加により誘導され

たカルスの赤色化は、ベタシアニン量の増加によるものであった。従って、このことは高濃度の 2,4-D 添加および DNA メチル化がベタシアニンの生合成に關与する遺伝子の発現を抑制することを示唆した。

3. ベタシアニン生産能を有する懸濁細胞培養系

生化学的研究に適する均一な小細胞塊で、高い色素生産能をもつジュエル種の懸濁細胞培養系の誘導が、1000mg/l アスコルビン酸、150 mM マンニトール、150mM ソルビトール、20g/l ショ糖、5 μ M 2,4-D を添加した改変 MS-AsA 培地で成功した。この懸濁培養細胞はサイトカイニン、ジベレリン酸およびアブシジン酸の添加によって細胞増殖およびベタレインの蓄積が阻害された。一方、0.5 μ M 以下の 2,4-D の添加による細胞増殖の抑制においては、ベタシアニンの蓄積の阻害は伴わなかった。培養細胞の主要色素はベタニンおよびアシル化ベタシアニンで、ベタキサンチンは極微量であった。また、培養細胞のベタレイン生合成は暗黒処理により強く阻害され、ベタレイン蓄積量は処理 2 週間で急激に減少し、6 週間後に培養細胞は白色化した。この白色化細胞は光照射により再び色素の合成および蓄積を開始し、24 時間以内に目視で色素の蓄積が確認でき、7 日で元の色素蓄積量に回復した。更に、ベタレインの前駆体の経時的变化を分析した結果、光照射後チロシンおよび DOPA は減少し、24 時間以降にわずかに増加していた。このことは、ベタレイン生合成に關与する遺伝子の発現が光照射によって 24 時間以内に誘導されていることを示した。

4. ベタレイン生合成系に関与する遺伝子の単離

花色の分子育種に向けて、光照射により発現が誘導されるベタレイン生合成系に関与する遺伝子の単離を簡易ディファレンシャル・ディスプレイ法により試みた。光照射 12 時間以降に特異的に発現した 18 個の遺伝子断片をクローニングし、これらの塩基配列を決定してホモロジー検索を行った結果、膜輸送タンパク質、プロテインキナーゼおよび光合成経路の遺伝子の他には既知の遺伝子と相同性の高いものはわずかであった。また、特異的なプライマーが構築可能であった 9 つのクローンの発現解析を RT-PCR により行ったところ、レセプター様プロテインキナーゼなどのロイシンリッチリピートをもつ多様なタンパク質との相同性を示したクローン 26-2-300 は、光照射下で色素合成が起きているステージで特異的に発現した。一方、既知のタンパク質とは相同性を示さなかったクローン B5-1400 は、光照射により発現量が増加することが明らかになった。

以上、本研究において得られた成果は *Portulaca* 属植物における花色の育種に基礎資料を提供するものである。しかしながら、ベタレイン色素により発現する花色を分子レベルで制御するためには、形質転換系の確立およびベタレイン生合成系に関与する遺伝子の単離とその発現機構の解明を行うことが必要である。今後は、*Portulaca* 属植物における花色の分子育種の実現に向かって、一層研究に精進する所存である。

Summary

The color of pigmented *Portulaca* species is produced through various combinations of betalains, violet betacyanins and yellow betaxanthins. A thorough understanding of the betalain biosynthesis can be of great benefit in developing a breeding strategy for the flower color. Investigations were carried out on characterization of the betalains in *Portulaca* sp. 'Jewel' and clarification of the betalain accumulation mechanism using *in vitro* culture systems. Furthermore, isolation of light-inducible genes involved in betalain biosynthesis was carried out. The followings are the salient results of this investigation.

1. The main betalain component of petal, pistil/stamen and stem in *Portulaca* sp. 'Jewel' was betanin, betanidin and acylated betacyanin, respectively. The acylated betacyanins, main betacyanin in stem, were not produced in the petal. Seven novel betaxanthins, miraxanthin III (tyramine+betalmic acid (BA)), miraxanthin V (dopamine+BA), Lys+BA, Asn+BA, Val+BA, Leu+BA and Phe+BA, were identified in *Portulaca*. Red flower genotype was characterized by higher betalain content, especially in betaxanthins, than magenta flower genotype.

2. The stable pigmented callus lines in *P. sp.* 'Jewel' that express distinctly different qualities of color were isolated. In this process, yellow and orange lines could be separated from an established magenta callus. A red line was isolated from an orange line. In this pigmented calli,

the main component of betacyanins was betanin while betaxanthins were primarily represented by vulgaxanthin I. The betacyanin content in yellow and orange callus lines was fifty and eight times lower, respectively, than in magenta line. Suppression of betanin synthesis and the simultaneous increase of vulgaxanthin I accumulation was observed in all yellow and orange callus lines. The variously colored callus lines could be stably maintained on J1 solidified medium supplemented with $4.5 \mu\text{M}$ 2,4-D and 30 g/l sucrose. At low concentrations of 2,4-D, suppression of betacyanin synthesis in orange callus could be partially reversed. Betacyanin accumulation was also alleviated by treatment with the DNA methylation inhibitor 5-azacytidine. This callus culture system, combined with the possibility of controlling the colorization, should be useful for studying the gene regulation of the branching process of betacyanins and betaxanthins in the betalain biosynthetic pathway.

3. The betalain-producing cell suspension cultures in *Portulaca* is established for the first time. Addition of ascorbic acid (AsA) and sufficient osmotica to the culture medium was critical to the success. Betacyanin production was best at 1000 mg/l AsA. Small cell aggregates, formed in MS-AsA medium supplemented with 300 mM osmotica, accumulated the highest relative amounts of betacyanins. The growth rate of cell suspension culture increased 3- to 4-fold within 14 days in modified MS-AsA medium supplemented with $5 \mu\text{M}$ 2,4-D. The betalain content of cultured cells increased during the first 2 days, thereafter decreased slightly and increased again during the logarithmic phase of

cellular growth. A lower concentration of 2,4-D inhibited the growth of cultures but did not significantly affect betacyanin accumulation. Addition of cytokinin, gibberellic acid and abscisic acid inhibited growth and also resulted in decreased betacyanin accumulation. The pigmentation of cultured cells decolorized upon transfer to dark conditions but was regained in decolorized cells at 12 to 24 hr after light exposure. The levels of endogenous tyrosine and DOPA, precursors of betalains, decreased in response to light and slightly increased again after 24 hr of light treatment. Betanin, the main pigment component, dramatically increased after 24 hr under light conditions. These results indicated that expression of genes involved in betalain biosynthesis was activated within 24 hr after light exposure and continued up to the stationary phase of growth.

4. The cDNA clones of the light-inducible genes involved in betalain biosynthesis were obtained by simplified differential display method. The eighteen PCR fragments specific to the cultures at 12 to 72 hr stages after light exposure were cloned and sequenced. Specific primers designed for 9 clones and analyzed the specificity of PCR fragment using RT-PCR. The two clones, 26-2-300 and B5-1400, were specific to betalain-producing stages after light exposure. Analysis of these clones should provide useful information toward molecular breeding of flower color associated with betalains.

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文作成にあたり、終始懇切なる御指導および御鞭撻をいただいた、宮崎大学農学部名誉教授・足立泰二博士（現 大阪府立大学農学部教授）、宮崎大学農学部教授・山下研介博士、宮崎大学農学部教授・藪谷 勤博士、鹿児島大学農学部教授・坂田祐介博士に深く謝意を表する。また本論文において校閲の労をとられた宮崎大学農学部教授・續 栄治博士、佐賀大学農学部教授・高木 胖博士に厚く御礼申し上げる。暖かい指導と有益な助言を賜った University of California, Irvine 教授・Franz Hoffmann 博士、宮崎大学遺伝子実験施設助手・陳 蘭庄博士に心より謝意を表する。なお、研究を進めるに際し多大なる御協力をいただいた、宮崎大学農学部植物遺伝育種学研究室の専攻生諸兄姉に感謝の意を表する。ここに記して関係各位に対する謝辞とする。

引用文献

- Adachi, T. (1970) Studies of biochemical genetics on flower colour and its application to flower breeding. VI. Biogenesis of betalain pigment and variations of intracellular conditions in *Portulaca callus*. *Bull. Fac. Agric. Miyazaki Univ.* **17**: 143-150 (in Japanese).
- 足立泰二 (1972) *Portulaca* 属植物の花色変異に関する育種学的基礎研究. 宮崎大学農学部育種学研究室報告 **3**: 1-94.
- Adachi, T. and M. Nakatsukasa (1983) High-performance liquid chromatographic separation of betalains and their distribution in *Portulaca grandiflora* and related species. *Z. Pflanzenphysiol.* **109**: 155-162.
- 足立泰二・中務将弘・浅香康昌・宇多武久 (1985) *Portulaca* sp. 'Jewel' に見出された X 線突然変異系統の花色遺伝分析とその特性. 育種学雑誌 **35**: 183-192.
- Alard, D., V. Wray, L. Grotjahn, H. Reznik and D. Strack (1985) Neobetanin: Isolation and identification from *Beta vulgaris*. *Phytochem.* **24**: 2383-2385.
- Berlin, J., S. Sieg, D. Strack, M. Bokern and H. Harms (1986) Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L.. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **5**: 163-174.
- Bianco-Colomas, J. and M. Hugues (1990) Establishment and characterization of a betacyanin producing cell line of *Amaranthus tricolor*: Inductive effects of light and cytokinin. *J. Plant Physiol.* **136**: 734-739.
- Biddington, H.L. and T.H. Thomas (1973) A modified *Amaranthus* betacyanin bioassay for the rapid detection of cytokinins in plant extracts. *Planta* **111**: 183-186.
- Bokern, M. and D. Strack (1988) Synthesis of hydroxycinnamic acid esters of betacyanins via 1-O-acylglucosides of hydroxycinnamic acids by protein preparations from cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* and petals of *Lampranthus sociorum*. *Planta* **174**: 101-105.
- Bokern, M., V. Wray and D. Strack (1991a) Accumulation of phenolic

- acid conjugates and betacyanins, and changes in the activities of enzymes involved in feruloylglucose metabolism in cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L.. *Planta* **184**: 261-270.
- Bokern, M., S. Heuer, V. Wray, L. Witte, T. Macek, T. Vanek and D. Strack (1991b) Ferulic acid conjugates and betacyanins from cell cultures of *Beta vulgaris*. *Phytochem.* **30**: 3261-3265.
- Bokern, M., S. Heuer and D. Strack (1992) Hydroxycinnamic acid transferases in the biosynthesis of acylated betacyanins: Purification and characterization from cell cultures of *Chenopodium rubrum* and occurrence in some other members of the Caryophyllales. *Bot. Acta* **105**: 146-151.
- Böhm, H., L. Böhm and E. Rink (1991) Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **26**: 75-82.
- Böhm, H. and L. Böhm (1996) *Portulaca grandiflora* Hook. and *P. oleracea* L.: Formation of betalains and unsaturated fatty acids. In: Y.P.S. Bajaj (Eds.): Medical and Aromatic Plants IX, Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. **37**., pp. 335-354. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Burglund, T., G. Kalbin, A. Strid, J. Rydstrom, A.B. Ohlsson (1996) UV-B- and oxidative stress-induced increase in nicotinamide and trigoneline and inhibition of defensive metabolism induction by poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor in plant tissue. *FEBS Lett.*, **380**: 188-193.
- Chang, C., L. Kimler and T.J. Mabry (1974) Biogenesis of betalamic acid. *Phytochem.* **13**: 2771-2775.
- Chi, B.D. and F. Cormier (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep.* **9**: 143-146.
- Clement, J.S., T.J. Mabry, H. Wyler and A.S. Dreiding (1994) Chemical review and evolutionary significance of betalains. In: H.D. Behnke and T.J. Mabry (Eds.): Caryophyllales: evolution and systematics. pp. 247-261. Springer-Verlag, New York.
- Clement, J.S. and T.J. Mabry (1996) Pigment evolution in the Caryophyllales: a systematic overview. *Bot. Acta* **109**: 360-367.
- Constabel, F and H. Nassif-Makki (1971) Betalainbildung in Beta-

- Calluskulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **84**: 629-636.
- Córdoba, F. and J.A. González-Reyes (1994) Ascorbate and plant cell growth. *J. Bioenerg. Biomenbr.* **26**: 399-405.
- Cronquist, A. (1988) The evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Garden, New York.
- Diéguez, M.J., H. Vaucheret, J. Paszowski and O. Mittelsten Scheid (1998) Cytosine methylation at CG and CNG sites is not a prerequisite for the initiation of transcriptional gene silencing in plants, but it is required for its maintenance. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 207-215.
- Elomaa, P., Y. Helariutta, M. Kotilainen and H. Teeri (1996) Transformation of antisense constructs of the chalcone synthase gene superfamily into *Gerbera hybrida*; differential effect on the expression of family members. *Plant Mol. Biol.* **2**: 41-50.
- French, C.J., R.C. Peckett and H. Smith (1974) Effect of exogenous DOPA and tyrosine on amaranthin synthesis and pigment type in *Amaranthus*. *Phytochem.* **13**: 1505-1511.
- Féray, A., A. Hourmant, M. Penot, C. Moisan-Cann and J. Caroff (1992) Effects of interaction between polyamines and benzyladenine on betacyanin synthesis in *Amaranthus* seedlings. *J. Plant Physiol.* **139**: 680-684.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell. Res.* **50**: 151-158.
- Girod, P.-A. and J.-P. Zrýd (1991) Biogenesis of betalains: Purification and partial characterization of DOPA 4,5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochem.* **30**: 169-174.
- Girod, P.-A. and J.-P. Zrýd (1991) Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **25**: 1-12.
- Gleitz, J. and H. Seitz (1989) Induction of chalcone synthase in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*) by ultraviolet light: evidence for two different forms of chalcone synthase. *Planta* **179**: 323-330.
- Habu, Y., S. Fukuda-Tanaka, Y. Hisatomi and S. Iida (1997) Amplified

- restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**: 516-521.
- Hempel, J. and H. Böhm (1997) Betaxanthin pattern of hairy roots from *Beta vulgaris* var. *lutea* and its alteration by feeding of amino acids. *Phytochem.* **44**: 847-852.
- Heuer, S. and D. Strack (1992) Synthesis of betanin from betanidin and UDP-glucose by protein preparation from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burn. F.) N. E. Br.. *Planta* **186**: 626-628.
- Heuer, S., T. Vogt, H. Böhm and D. Strack (1996) Partial purification and characterization of UDP-glucose: betanidin 5-*O*- and 6-*O*-glucosyltransferases from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm. F.) N. E. Br.. *Planta* **199**: 244-250.
- Hirano, H., M. Sakuta and A. Komamine (1992) Inhibition by cytokinin of the accumulation of betacyanin in suspension culture of *Phytolacca americana*. *Z. Naturforsch.* **47c**: 705-710.
- Hirano, H. and A. Komamine (1994) Correlation of betacyanin synthesis with cell division in cell suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiol. Plant.* **90**: 239-245.
- Hirano, H., M. Sakuta and A. Komamine (1996) Inhibition of betacyanin accumulation by abscisic acid in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Z. Naturforsch.* **51c**: 818-822.
- Hirochika, H. (1993) Activation of retrotransposons during tissue culture. *EMBO J.* **12**: 2521-2528.
- Hirose, M., T. Yamakawa, T. Kodama and A. Komamine (1990) Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. *Plant Cell Physiol.* **31**: 267-271.
- 飯田 滋・星野 敦 (1994) 花の色の化学と分子生物学, 植物の形を決める分子機構 (監修, 渡邊 昭・島本 功・福田裕穂・内藤 哲). 秀潤社, pp. 83-95.
- Ikeno, S. (1921) Studies on the genetics of flower-colours in *Portulaca grandiflora*. *J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, **8**: 93-133.
- Jorgensen, R.A., P.D. Cluster, J. English, Q. Que and C.A. Napoli

- (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.* **31**: 957-973.
- Joy IV, R.W., M. Sugiyama, H. Fukuda and A. Komamine (1995) Cloning and characterization polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* **107**: 1083-1089.
- Kinsman, L.T., N.J. Pinfield and A.K. Stobart (1975a) A gibberellin bioassay based on betacyanin production in *Amaranthus caudatus* seedlings. *Planta* **127**: 149-152.
- Kinsman, L.T., N.J. Pinfield and A.K. Stobart (1975b) The hormonal control of amaranthin synthesis in *Amaranthus caudatus* seedling. *Planta* **127**: 207-212.
- Kishima, Y., A. Shimaya, M. Kuroki, T. Iki, A. Hirai and T. Adachi (1991a) Betalain pigmentation manners in flower petal and callus of *Portulaca*. *Proc. of ICOBB in Miyazaki*, pp. 49-58.
- Kishima, Y., K. Nozaki, R. Akashi and T. Adachi (1991b) Light-inducible pigmentation in *Portulaca* callus; selection of a high betalain producing cell line. *Plant Cell Rep.* **10**: 304-307.
- Kishima, Y., C. Hatade, M. Suiko and T. Adachi (1992) Comparative analysis of petal proteins in red and white lines from near-isogenic *Portulaca* sp. 'Jewel' plants. *Euphytica* **61**: 67-71.
- Kishima, Y., A. Shimaya and T. Adachi (1995) Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca* callus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **43**: 67-70.
- 駒嶺 穆・小島 邦彦・三川 潮・庄野 邦彦・原田 宏・日向 康吉・藤村 達人・山口 彦之 編 (1990) 懸濁培養. 植物バイオテクノロジー事典 朝倉書店 pp. 78-80.
- Komamine, A., M. Sakuta, M. Hirose, H. Hirano, T. Takagi, K. Kakegawa, and Y. Ozeki (1989) Regulation of secondary metabolism in relation to growth and differentiation. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, ed. by W.G.W. Kurz, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 49-52.
- Kreuzaler, F., H. Ragg, E. Fautz, D. N. Kuhn and K. Hahlbrock (1983) UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension culture of *Petroselinum hortense*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 2591-

2593.

- Kubota, S., H. Imamura, T. Hisamatsu and M. Koshioka (1999) An enhanced *Amaranthus* betacyanin bioassay for detection of cytokinins. *J. Plant Physiol.* **155**: 133-135.
- Laloraya, M.M., H.N. Srivastav and K.N. Guruprasad (1976) Recovery of gibberellic acid inhibition of betacyanin biosynthesis by pigment precursors. *Planta* **128**: 275-276.
- Lambé, P., H. Schié, H.S.N. Mutambel, J.-G. Fouché, R. Deltour, J.-M. Foidart and T. Gaspar (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **33**: 155-162.
- Leathers, R.R., C. Davin and J.-P. Zrýd (1992) Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. bikores monogerm (red beet). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **28**: 39-45.
- Liang, P. and A.B. Pardee (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971.
- Lu, C., V. Vasil and I.K. Vasil (1981) Isolation and culture of protoplast of *Panicum maximum* Jacq. (Guineagrass): somatic embryogenesis and plantlet formation. *Z. Pflanzenphysiol.* **104**: 311-318.
- Mabry, T.J. and A.S. Dreiding (1968) *In* : Recent Advances in Phytochem. (Mabry, T.J., R.E. Alston, V.C. Runeckles, eds.). Appleton-Century Crofts. 1: 145-160.
- Meyer, P., I. Heidemann, G. Forkmann and H. Saedler (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**: 677-678.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Müller, L.A., U. Hinz and J.-P. Zrýd (1996) Characterization of tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochem.* **42**: 1511-1515.
- Nishikawa, S., Y. Nishikimi, S. Maki, Z. Kumazawa and N. Kashimura (1995) Preparation and structure-activity relationships of 4-substituted amino-2-methylpyrido[3,4-*d*]pyrimidines as cytokinin analogs. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1034-1038.

- Ootani, S. and T. Hagiwara (1969) Inheritance of flower colors and related chymochromic pigments in F_1 hybrids of common Portulaca, *Portulaca grandiflora*. *Japan J. Genetics* **44**: 65-79.
- Ozeki, Y., E. Davis and J. Takeda (1997) Somatic variation during long term subculturing of plant cells caused by insertion of a transposable element in a phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 407-416.
- Phillips, R.L., S.M. Kaeppler and P. Olhoft (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5222-5226.
- Piattelli, M., M. Giudici de Nicola and V. Castrogiovanni (1971) The effect of kinetin on amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolor* in darkness. *Phytochem.* **10**: 289-293.
- Piattelli, M. (1981) The betalains; Structure, biosynthesis, and chemical taxonomy. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7, Academic Press, Inc. pp. 557-575.
- Ray, S.D., K.N. Guruprasad and M.M. Laloraya (1983) Reversal of abscisic acid-inhibited betacyanin synthesis by phenolic compounds in *Amaranthus caudatus* seedling. *Physiol. Plant.* **58**: 175-178.
- Reynoso, R., F.A. Garcia, D. Morales, E. Gonzalez de Mejia (1997) Stability of betalain pigments from Cactaceae fruit. *J. Agric. Food. Chem.* **45**: 2884-2889.
- Rink, E. and H. Böhm (1985) Changed betaxanthin pattern in violet flowers of *Portulaca grandiflora* after the feeding of DOPA. *Phytochem.* **24**: 1475-1477.
- Rink, E. and H. Böhm (1991) Effect of DOPA feeding on betaxanthins in various species of Centrospermae. *Phytochem.* **30**: 1109-1112.
- Rodríguez Monroy, M., A. Jiménez Aparicio, G. Dávila Ortiz and G. Sepúlveda Jimenez (1994) Effect of carbon source on cell growth and betalain production in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotech. Lett.* **16**: 853-858.
- Rossi-Hassani, B.-D., F. Bennani and J.-P. Zrýd (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of large-flowered purslane (*Portulaca grandiflora* H.). *Genome* **38**: 752-756.
- 斎藤 清 (1969) 花の育種. 誠文堂新光社, pp. 177-180.
- Sakuta, M., T. Takagi and A. Komamine (1986) Growth related

accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L.. *J. Plant Physiol.* **125**: 337-343.

作田正明・駒嶺 穆 (1988) バイオテクノロジーによる有用物質生産. 遺伝 別冊 1 号 pp. 94-101.

Sakuta, M., H. Hirano and A. Komamine (1991) Stimulation by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid of betacyanin accumulation in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiol. Plant.* **83**: 154-158.

Sakuta, M., H. Hirano, K. Kakegawa, J. Suda, M. Hirose, R.W. Joy IV, M. Sugiyama, and A. Komamine (1994) Regulatory mechanisms of biosynthesis of betalain and anthocyanin in relation to cell division activity in suspension cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **38**: 167-169.

Satoh, M.S. and T. Lindahl (1992) Role of poly (ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* **356**: 356-358.

Schliemann, W. and D. Strack (1998) Intramolecular stabilization of acylated betacyanins. *Phytochem.* **49**: 585-588.

Schliemann, W., U. Steiner and D. Strack (1998) Betanidin formation from dihydroxyphenylalanine in a model assay system. *Phytochem.* **49**: 1593-1598.

Schliemann, W., N. Kobayashi and D. Strack (1999) The decisive step betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol.* **119**: 1217-1232.

Schröder, G., E. Unterbusch, M. Kaltenbach, J. Schmidt, D. Strack, V. De Luca and J. Schröder (1999) Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Lett.* **458**: 97-102.

Schröder, J., F. Kreuzaler, E. Schäfer and K. Haulbrock (1979) Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavone synthase mRNAs in irradiated plant cells. *J. Biol. Chem.* **254**: 57-65.

Schröder, W. and H. Böhm (1984) Betacyanin concentration in young cell cultures from *Portulaca grandiflora* - an analysis of variation. *Plant Cell Rep.* **3**: 14-17.

重岡 成 (1996) なぜ植物にアスコルビン酸は多く存在するのか?

- Foods Food Ingredients J. Jpn.* No. 170: 66-74.
- Steglich, W. and D. Strack (1990) Betalains. *In: The Alkaloids Vol. 39*, Academic Press Inc. pp. 1-62.
- Steiner, U., W. Schliemann and D. Strack (1996) Assay for tyrosine hydroxylation activity of tyrosinase from betalain-forming plants and cell cultures. *Anal. Biochem.* **238**: 72-75.
- Steiner, U., W. Schliemann, H. Böhm and D. Strack (1999) Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* **208**: 114-124.
- Strack, D., D. Schmitt, H. Reznik, W. Boland, L. Grotjahn and V. Wray (1987) Humilixanthin, a new betaxanthin from *Rivia humilis*. *Phytochem.* **26**: 2285-2287.
- Strack, D. and V. Wray (1993) Recent Advances in Betalain Analysis. *In: Behnke, H. D. and Mabry, T. J. (Eds): Caryophyllales: evolution and systematics*, pp. 263-277. Springer Verlag, New York.
- Strack, D. and T. Vogt (1994) Recent advances in research on anthocyanins and betalains. 育種学最近の進歩 第 36 集, pp. 51-58.
- Sweet, S.S. and K.N. Guruprasad (1992) Effect of cycloheximide on light induced and GA₃ inhibited betacyanin synthesis in *Amaranthus caudatus* seedling. *Indian J. Plant Physiol.* **35**: 73-79.
- Syakudo, K., S. Kawabata and A. Ujihara (1960) On the plant having n=5 chromosomes in *Portulaca*. *Jap. J. Genet.* **35**: 107-109.
- 田中 良和 (1997) 花卉の分子育種. 育種学最近の進歩 第 39 集, pp. 3-6.
- Tanaka, Y., S. Tsuda and T. Kusumi (1998) Metabolic engineering to modify flower color. *Plant Cell Physiol.* **39**: 1119-1126.
- Takeda, J., S. Abe, Y. Hirose and Y. Ozeki (1993) Effect of light and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the level of mRNA for phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in carrot cells culture in suspension. *Physiol. Plant.* **89**: 4-10.
- Terradas, F. and H. Wyler (1991) 2,3- and 4,5-Secodopa, the biosynthetic intermediates generated from L-Dopa by an enzyme system extracted from the fly agaric, *Amanita muscaria* L., and their spontaneous conversion to muscaflavin and betalamic acid,

- respectively, and betalains. *Helvetica Chimica Acta* **74**: 124-140.
- 外山 潤・寺原 典彦・足立 泰二 (1992) *Portulaca* 属植物におけるベタレイン色素の同定と遺伝子型間構成色素の経時的推移. 育種学雑誌 **42** (別冊 2): 330-331.
- 外山 潤・足立 泰二 (1995) *Portulaca* 属植物におけるベタレイン色素および前駆体の花蕾発育段階での経時的追跡. 育種学雑誌 **45** (別冊 2): p.298.
- Trezzini, G.F. and J.-P. Zrýd (1990) *Portulaca grandiflora*: A model system for the study of the biochemistry and genetics of betalain synthesis. *Acta Horticulturae* **280**: 581-585.
- Trezzini, G.F. and J.-P. Zrýd (1991a) Two betalains from *Portulaca grandiflora*. *Phytochem.* **30**: 1897-1899.
- Trezzini, G.F. and J.-P. Zrýd (1991b) Characterization of some natural semi-synthetic betaxanthins. *Phytochem.* **30**: 1901-1903.
- 塚本 洋太郎 (総監修)(1989) 園芸植物大事典 第4巻 小学館, pp. 451-452.
- van der Krol, A.R., P.E. Lenting, J. Veenstra, I.M. van der Meer, R.E. Koes, A.G.M. Gerats, J.N.M. Mol and A.R. Stuitje (1988) An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* **333**: 866-869.
- Vogt, T., E. Zimmermann, R. Grimm, M. Meyer and D. Strack (1997) Are the characteristics of betanidin glucosyltransferases from cell-suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* indicative of their phylogenic relationship with flavonoid glucosyltransferases? *Planta* **203**: 349-361.
- Vogt, T., R. Grimm and D. Strack (1999) Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-*O*-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferase from the Solanaceae. *Plant J.* **19**: 509-519.
- Wyler, H., U. Meuer, J. Bauer and L. Stravs-Mombelli (1984) Cyclodopa glucoside (= (2*S*)-5-(β -D-Glucopyranosyloxy)-6-hydroxyindoline-2-carboxylic acid) and its occurrence in red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). *Helvetica Chimica Acta* **67**: 1348-1355.

矢崎一史・松岡秀明・佐藤文彦・田端守・A. Bechthold (1997) ムラサキ培養細胞の暗黒下発現遺伝子 LEDI-2 のクローニングとその発現制御. 第 15 回日本植物細胞分子生物学会要旨集. p.106.

Yoshida, K.T., S. Naito and G. Takeda (1994) cDNA cloning of regeneration-specific genes in rice by differential screening of randomly amplified cDNAs using RAPD primers. *Plant Cell Physiol.* **35**: 1003-1009.

