

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

## 主論文の要旨

論文題目            アジサイの花色を担う青色色素錯体の化学構造解明  
                             及びマスイメージングによるガク片組織内分布の解析

氏 名                伊藤 誉明

## 論文内容の要旨

多様な花色の中で、アントシアニンによる青色発色は、最も複雑な仕組みを持つことが知られている。アジサイ (*Hydrangea macrophylla*) は、日本原産の花木で、原種の花色（実際にはガク片の色）は青色である。しかし、花色は栽培条件などにより容易に変化し、紫色や赤色を呈する。20世紀初頭からその発色や色変異の機構が研究され、酸性土壌で栽培すると花色が青色となることは1930年代には知られていた。これは土壌中のアルミニウムが水溶性のイオン ( $\text{Al}^{3+}$ ) として溶出し、それを吸収するためと説明されてきた。さらに、1950年代頃までに、青色、赤色、紫色のいずれの色のガク片にも同じアントシアニンのデルフィニジン 3-O-グルコシドと、同じ助色素類（キナ酸エステル類）が含まれることが報告された。2000年以降、申請者の所属する研究室で、着色細胞だけの化学分析と助色素類の化学合成、並びに色再現実験が行われ、デルフィニジン 3-O-グルコシドと 5-O-アシル化キナ酸、および  $\text{Al}^{3+}$  の三成分を pH 4 の条件下、1 : 2 : 1 の比率で混合するとアジサイの青色が再現されることがわかった。しかし、アジサイの青色発色を担う分子の構造は同定されておらず、従ってなぜ容易に色が変わるかの化学機構も未解明であった。

本研究では、アジサイ青色色素錯体 (HBC) の化学構造の解明と、HBC の色変異の機構の解明を目的に行った。HBC の組成決定のための質量分析を行うにあたり、極めて薄い塩条件での色素錯体の再構成を実現した。再構成溶液の質量分析を行った結果 HBC の分子イオンピークを観測することができ、HBC の分子式を  $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{AlO}_{21}$  と決定した。これにより、HBC の組成がデルフィニジン 3-O-グルコシド : 5-O-アシル化キナ酸 :  $\text{Al}^{3+}$  = 1 : 1 : 1 であることが初めて明らかになった。さらに、HBC がガク片における青色を担う分子種かどうかを確かめる目的で、アジサイガク片から調製した凍結切片を用いた質量分析法である cryo-TOF-SIMS 分析を実行した。質量分子イメージングの結果、青色ガク片の青色細胞の位置にのみ、HBC イオンを検出し、同じ位置に  $\text{Al}^{3+}$  が局在することも明らかになった。これらの結果より、青色アジサイの発色は、このアジサイ青色色素錯体によることが実証できた。

本論文は4章から成る。第一章は、これまでの青色花色研究およびアジサイガク片の青色発色研究を概観し、残された課題とその解決法について述べた。

第二章では、質量分析を指向したアジサイ青色色素錯体 (HBC) の *in vitro* での再構成に関する研究を記述した。まず、アジサイガク片からの色の指標となる細胞液の調製と可視吸収スペクトルと円二色性の測定を行った。次に、pH や混合する成分の組成比を変えて再構成を行い、極めて薄い 2 mM という塩濃度で再構成する条件を見いだした。これにより、HBC の質量分析が実現した。この条件を用いて青色、赤色のガク片色を *in vitro* で再現し、それぞれについて ESI-TOF-MS 分析を行った結果、青色の溶液から HBC の分子量の精密観測に成功し、HBC の分子式を  $C_{37}H_{35}AlO_{21}$  と決定した。デルフィニジン 3-O-グルコシド : 5-O-アシル化キナ酸 :  $Al^{3+}$  の比は、従来推定されていた 1 : 2 : 1 では無く、1 : 1 : 1 であることが分子量から明らかになった。さらに、HBC の化学平衡についての実験を実施し、HBC の形成にはアントシアニン B 環のカテコール構造、助色素キナ酸 1 位のカルボン酸、5 位のカルボニル基が必須であり、5 位の芳香環が安定化に影響することがわかり、これらの情報を統合し、その化学構造を提出できた。微妙な pH 変化や構成成分の濃度変化で HBC の生成量は変化する、この化学平衡こそが、花色の多様さ、移ろいやすさの根源であるとの結論を得た。

第三章では、アジサイガク片組織を用いた有機成分及び無機成分の定量分析の結果、及びガク片の cryo-TOF-SIMS 分析の結果を述べた。青色のガク片、赤色のガク片それぞれに含有される、青色発色に関与する色素、助色素、金属の量を定量し、青色ガク片と赤色ガク片の間には、色素、助色素の量には差がなく、Al の蓄積量のみ大きな差があったことから、色の違いが主に Al 蓄積に由来することを明らかにした。次いで、凍結した青色ガク片、赤色ガク片それぞれについて cryo-TOF-SIMS を行い、それぞれ、青色発色を担う HBC、及びそれを構成する分子、金属に関し、マスイメージングを行った。HBC の cryo-TOF-SIMS 測定においては、ネガティブモードでの測定が適当であることが標品測定の結果わかった。一方、各種の金属イオン類は、ポジティブモードで観測した。アジサイガク片の切片の観察から、表層は無色で、着色細胞は 2 層目に局在することが既知であった。青色ガク片の cryo-TOF-SIMS 測定では、HBC に相当する分子イオンを検出し、この分子イオンのマスイメージングにより、HBC が青色ガク片の二層目に局在することが明らかになった。一方、赤色ガク片では、HBC に対応する分子イオンは全く検出されず、この錯体分子によってアジサイの青色が発現することを実証した。 $Al^{3+}$  も青色ガク片の二層目に局在し、 $K^{+}$  はいずれの色のガク片にもほぼ組織全体に分布が認められた。助色素は、青色、赤色いずれのガク片においても、表層の無色細胞にも局在が認められた。以上より、cryo-TOF-SIMS 測定は、植物組織において分子や原子の局在情報を得ることのできる極めて有用な方法であることも同時に証明した。

第四章では、本研究を総括し、今後の研究課題とその展望について述べた。HBC の形成の有無によるダイナミックな色変化は、肉眼でも容易に判別することが出来る。錯形成により色変化する特性は、微小金属などの検出指示薬として有用であることも示唆するものと考えられる。また、アントシアニンは食品着色料としても用いることが可能であり、本研究は、新たな鮮やかな青色の食品着色料開発の足掛かりになることが期待される。