

# サクラ‘ソメイヨシノ’の着色に関する研究

2020 年

岩手大学大学院

連合農学研究科

生物生産科学

(弘前大学配属)

安松浩

# 目次

緒言	1
第一章. ‘ソメイヨシノ’の着色に効果的な光環境に関する研究	11
第一節. 青色光および赤色光の照射による‘ソメイヨシノ’の着色	11
緒言	11
材料および方法	13
結果	15
考察	17
摘要	20
図表	21
第二節. 光照射による‘ソメイヨシノ’の着色関連遺伝子発現	28
緒言	28
材料および方法	29
結果	30
考察	31
摘要	32
図表	33
第三節. オオシマザクラおよびエドヒガンの着色の光条件	38

緒言	38
材料および方法	38
結果	39
考察	40
摘要	41
図表	42
第二章. ‘ソメイヨシノ’の着色と開花段階に関する研究	42
第一節. ‘ソメイヨシノ’の着色と光照射時期	44
緒言	44
材料および方法	45
結果	46
考察	48
摘要	51
図表	52
第二節. ‘ソメイヨシノ’の光照射時期とアントシアニン組成	59
緒言	59
材料および方法	59
結果	60

考察	61
摘要	61
図表	63
第三章. 'ソメイヨシノ'の着色と形質を改善する処理方法に関する研究	72
第一節. 糖類および温度が'ソメイヨシノ'の花弁の着色に及ぼす影響	72
緒言	72
材料および方法	73
結果	75
考察	76
摘要	77
図表	79
第二節. 植物成長調節剤による'ソメイヨシノ'の花の形質改善	85
緒言	85
材料および方法	85
結果	85
考察	86
摘要	86
図表	87

第四章. 非破壊測定によるサクラ‘ソメイヨシノ’の花芽の休眠状態に関する研究	88
緒言	88
材料および方法	89
結果	90
考察	91
摘要	92
図表	93
総合考察	99
摘要	105
参考文献	107
謝辞	115

## 緒言

### サクラ ‘ソメイヨシノ’

サクラは北半球の温帯に分布する落葉樹であり、春の風物詩として、日本人に愛されている。サクラはサクラ属 (*Prunus*)、サクラ亜属 (*Cerasus*) に属している。日本では観賞用サクラは一般的に食用のセイヨウミザクラ (*Prunus avium*) と区別されている。日本には 10 種類の野生種サクラ: ヤマザクラ (*Cerasus jamasakura*)、オオヤマザクラ (*C. sargentii*)、オオシマザクラ (*C. speciosa*)、カスミザクラ (*C. leveilleana*)、エドヒガン (*C. itosakura*)、マメザクラ (*C. incisa*)、タカネザクラ (*C. nipponica*)、チョウジザク (*C. apetala*)、ミヤマザクラ (*C. maximowiczii*)、カンヒザクラ (*C. campanulata*) が生育している。サクラ ‘ソメイヨシノ’ (*Cerasus* × *yedoensis* ‘Someiyoshino’) は、野性種であるオオシマザクラとエドヒガンの間で生じた園芸品種であり (Innan ら、1995; Toshio ら、2016)、現在は、日本で最も栽培されている品種である。

‘ソメイヨシノ’の花芽は純正花芽であり、葉芽に比べて早く萌芽して開花する。花序は散形花序で、1 個の花序に 4~6 枚の花がある。花の基本構造は、一個の花に花弁が 5 枚あり、各花弁の下にがく片を持ち、一個の雌ずい、複数の雄ずいを持つ (図 1 A)。花弁の色は地域の様々な環境条件によって異なり、白から薄ピンク色となる。サクラの切り枝は採取後に室内で水挿しすることにより開花させて利用されるが、‘ソメイヨシノ’の切り枝は花弁に色がつかないことが知られている (図 1 B)。一方、‘啓翁桜’の切り枝は、室内での水挿しにより着色した花弁が得られる。しかし、これらのサクラの着色の違いに関しては、まだ不明なことが多い。

サクラは落葉樹であり、花芽は分化初期、花房分化、がく片形成、花弁

形成、雄ずい形成、雌ずい形成を経過し、地域と種により異なるが、10月頃までに花芽の形成が完了する(村上ら、2007、村上ら、2008)。花芽は鱗片で包まれ、休眠に入ることによって越冬する。これらの花芽は、翌年の温度上昇により生育を開始し、開花する。

休眠には2種類あり、自発休眠と他発休眠にわけられる。自発休眠が打破されると、高温の刺激によって開花できる。自発休眠の打破には低温による刺激を必要としているが、刺激時間は種または温度によって異なっている(Robinら、2019)。そのため、日本におけるサクラの休眠覚醒期は地域によって大きく異なると考えられる。早咲の‘カワヅザクラ’( *Cerasus × lannesiana* ‘Kawazu-zakura’)では、自発休眠は伊東地域で12月上旬に覚醒すると報告されている(村上ら、2007)。「ソメイヨシノ」では類似な報告はないが、弘前では、1月下旬、2月上旬から切り枝を室内で咲かせることが可能であり、この時期には自発休眠が打破されていると考えられる。

## アントシアニン

アントシアニンはサクラを含むほとんどの花と果実の赤色から青色の発色の元となる色素である。アントシアニンは昆虫を誘う、酸化の防止などの植物にとって重要な意味がある。さらに、アントシアニンは抗酸化作用をもち、近年は機能性成分として注目されている。

アントシアニンの基本骨格であるアントシアニジンは、現在約30種が発見されている(Keveinら、2009)。アントシアニンはアントシアニジンに糖が結合したもので、さらにアシル化した物を含めると700種類以上の物が報告されている(Wallace・Giusti、2013)。通常、赤色はシアニジンや

ペラルゴニジンを基本骨格としたアントシアニンにより発色する。‘ソメイヨシノ’には、アントシアニンが2種類あり、それぞれシアニジン 3-ルチノシドとシアニジン 3-グルコシドであることが報告されている（斎藤ら、1991）。

アントシアニンはフラボノイドの一種であり、植物の二次代謝であるフェノール、フラボノイド経路により生成され（図2、図3）、液胞へ蓄積し、発色する。これまで、アントシアニン生合成経路に関する研究は大きく進められ、大きく2種類の遺伝子が関わっていると考えられている。1つは *PAL*、*CHS*、*ANS* など（図3）の生合成酵素にかかわる遺伝子である。アントシアニン生合成で、最初に関わる酵素がフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*）である。植物一次代謝で作られたフェニルアラニンはこの酵素によってケイ皮酸となり、フェノール経路により最終的には4-クマロイル-CoAとなる（図2）。4-クマロイル-CoAは、カルコン合成酵素（Chalcone Synthase, *CHS*）によりフラボノイド経路の最初の代謝物であるテトラヒドロキシカルコンとなる。アントシアニンはフラボノイド経路により作られ、*ANS*により作られたアントシアニジンが、*UFGT*によって配糖体であるアントシアニンを生成する（図3）。もう1種類の遺伝子は *MYB*、*BHLH*、*WD40*などの転写因子であり、アントシアニン生合成において上述の酵素の生成を調整する。その中でも *MYB10* はアントシアニン生合成を促進することでよく知られている（Teliasら、2011）。

これらのアントシアニン生合成は光照射に依存し、温度の影響を大きく受ける。しかし、これらの条件は植物種または品種によって大きく違う。光照射には紫外線、青色光、赤色光が関わるが、植物によって必要として

いる光が異なる。一般的にアントシアニン生合成は低温により促進され、高温により抑制されると考えられる。‘ソメイヨシノ’は他の品種である‘カワヅザクラ’等に比べて、耐寒性が弱く、10℃以下では開花が困難になる(村上ら、2008)。しかし、これらの花では、アントシアニン含量は低温ほど増加した。したがって、アントシアニン生合成に最も適している温度も異なっていると考えられる。

光と温度以外にも多くの要因がアントシアニン生合成に影響する。糖類の添加はアントシアニン生合成を促進するといわれている。アントシアニン生合成の促進効果がショ糖(スクロース)で認められているが、その詳細はまだ調べられていない。糖類は植物の光受容能力を高めることによってアントシアニン生合成を促進するとする説もあるが、一般的には植物の浸透圧変化の刺激を起こし、アントシアニン生合成を促進すると考えられることが多い(Lindaら、1999)。

#### アントシアニン生合成と光受容体

多くの植物で、アントシアニン生合成は光照射を必要としている。バラなどの花に着色セロファンを被覆すると赤色を発現しない(志佐ら、1964)。また、ボケ、サクラの切花で、アントシアニンの生合成は暗黒下でほとんどなく、可視光の照射によって促進される(前川ら、1979)。さらに綿花では遮光処理により、フェノール、フラボノイド経路に関わる遺伝子の発現量が減少することが報告されている(Jiafuら、2013)。

光照射による着色とアントシアニン生合成は他の果実や花でよく研究されているが、植物によって異なる光照射条件を必要としている(前川、1980; 孟ら、2004; フェデリカら 1986; Arakawa、1988)。植物でアントシ

アントシアニンの蓄積には3つの波長域：紫外線（UV）、青色および赤色光が関与し、各波長は特定の光受容体によって吸収されることが知られている。たとえば、UV、特に330 nm未満の波長の光照射によりバラ（*Rosa hybrida* ‘Ehigasa’）のアントシアニン含量が増加した（前川ら、1980）。UV-Bの照射はリンゴ（*Malus × domestica* Borkh.）の花にアントシアニンの蓄積を引き起こしたが、そのほかのUV波長への曝露は、このようなアントシアニン蓄積への影響を及ぼしていない（Dongら、1998）。さらに、ガーベラの花弁に紫外線または青色光を照射すると、アントシアニンの含量が増加し、青色光がより効果的であると報告されている（Mengら、2004）。一部の植物では、有効波長間に相互作用が認められた。たとえば、紫外線照射の前に青色光を照射するとバラのアントシアニン含量が増加し（前川ら、1980）、青色光を赤色光と組み合わせて照射すると、トマト（*Lycopersicon × esculentum* ‘beefsteak’）のアントシアニン含量が増加した（Federicaら、1986）。また、赤色光と紫外線の組み合わせによる照射は、紫外線みの照射よりもリンゴ果実のアントシアニン含量が大きく増加した（Arakawa、1988）。同様に、サクラ‘十月サクラ’（*C. × subhirtella* ‘Autumnalis’）ではアントシアニン含量が青色光と紫外線により調節されることが報告されている（前川・直彦、1979；前川ら、1980）。

植物は光受容体を通じて光シグナルを感受し、下流の遺伝子発現を調節することにより光形態形成を調節する（渡辺ら、1994）。今まで紫外線受容体UVR8、青色光受容体クリプトクロム（CRY）、フォトトロピン（PHO）と赤色光受容体のフィトクロム（PHY）4種の光受容体が発見されている。

青色光受容体としてこれまで、クリプトクロムとフォトトロピンの二つが発見され、400 nm～500 nmの光シグナルを感受し、430 nm、450 nm、

490 nm の三つの極大吸収を持っている。PHO は主に気孔の開放、葉緑体の移動などに関係し、CRY は下胚軸の伸長、アントシアニンの生成などの光形態形質の調節に関わっている。

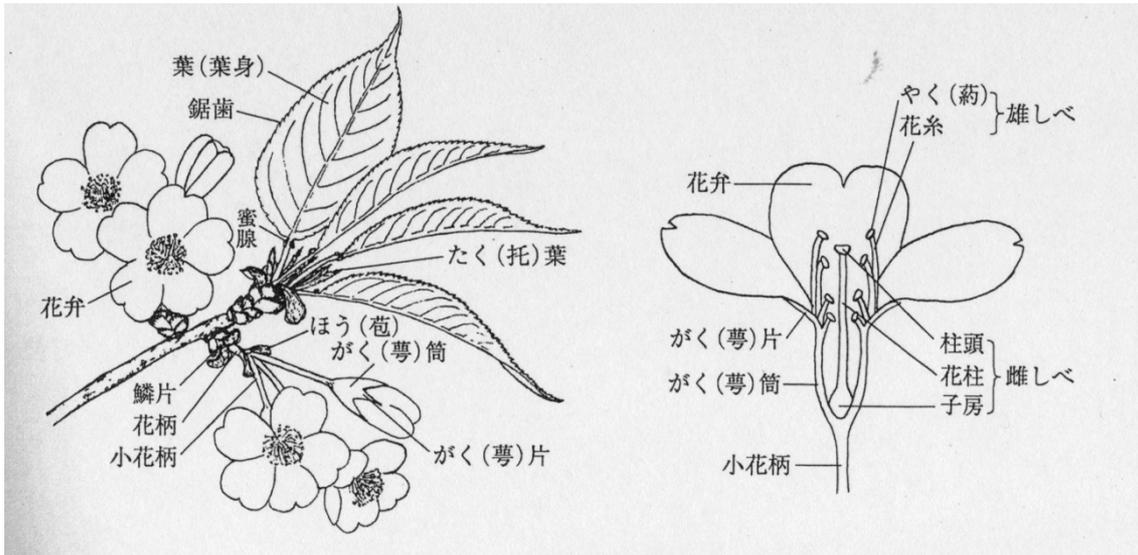
植物で特有であり、最も広く研究されている光受容体はフィトクロムである。フィトクロムは、赤/近赤外光可逆的反応の光受容体として 1959 年に Butler らにより発見され、今まで最も研究されている光受容体である。フィトクロムには赤色光域 (660 nm) に極大吸収を持つ  $P_r$  と遠赤色光域 (730 nm) に極大吸収を持つ  $P_{fr}$  二つの形態で存在している。 $P_r$  は赤色光の照射により  $P_{fr}$  に変換し、また  $P_{fr}$  は近赤色光の照射により  $P_r$  に変換する。この作用により植物は赤色光と近赤色光の交互に照射した時、最後に照射した光により光形態形成を誘発する (Masaki ら、1993)。フィトクロムを介する生理反応は、その誘導に必要な光照射時間や照射光エネルギー量などの特性の違いから、低エネルギー反応 (Low Energy Reaction) と高照射反応 (High Irradiance Response; HIR) に分類される。アントシアニン生合成では、フィトクロムは通常、高照射応答 (HIR) システムとしてアントシアニンの蓄積に関与している (荒川、1988)。

リンゴでは、これらの受容体によるアントシアニン生合成調節の分子レベルへの作用機構が研究されている。アントシアニン生合成にかかわる転写因子である *MYB* 遺伝子は、一般的に *COPI* 遺伝子によりその発現が抑制されているが、光照射によりこれらの *COPI* 遺伝子発現は抑制され、アントシアニン生合成を促進する (Laura、2013)。同じ作用機構はシロイヌナズナでも報告されている (Li ら、2012)。*MdMYB* 転写因子は一般的に 26 プロテアソームによりユビキチン化され機能していない。*COPI* は 26 プロテ

アソームの活性を促進するが、*COPI* の抑制により *MdMYB* 遺伝子の発現は促進され、下流のアントシアニン生合成関連遺伝子を調節する。

## 本研究の目的

‘ソメイヨシノ’は日本で最も栽培され、人々に愛されているサクラであるが、‘ソメイヨシノ’の着色に関する研究は少ない。また、着色に最も効果的な波長も知られていない。本研究では、光照射の影響を中心とし、糖類および温度などの要因が‘ソメイヨシノ’花卉の着色に及ぼす影響を明らかとすることを目的とした。また、これらの結果から、切り枝の花の品質を改善する技術を提案することを目的とした。さらに、非破壊分析を用いた花芽の測定により、‘ソメイヨシノ’の休眠および開花予測への応用可能性を検討した。



A



B

図 1. (A) サクラの花 (永田ら、2010)および (B) 切り枝を水挿しした‘ソメイヨシノ’

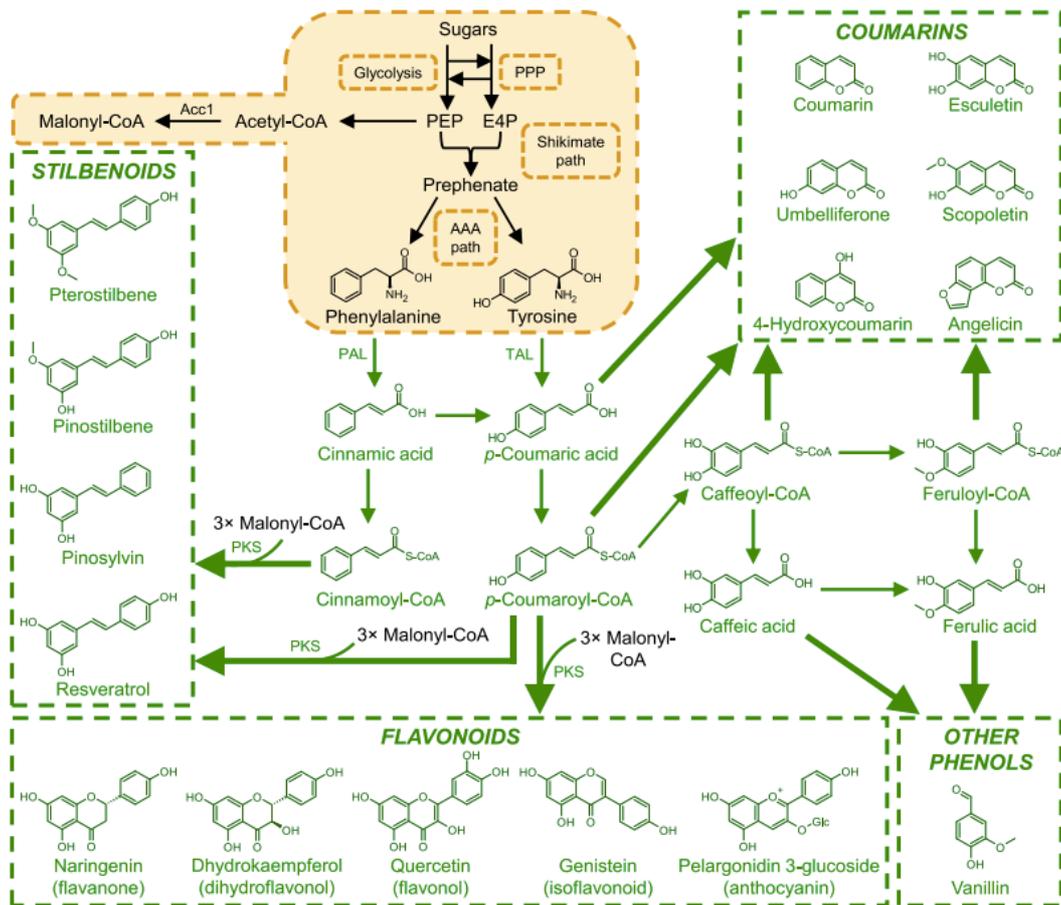


図 2. 植物の二次代謝。

緑色の部分は植物の二次代謝を示し、黄色の部分は植物の一次代謝を示す。

(Michael ら、2019)

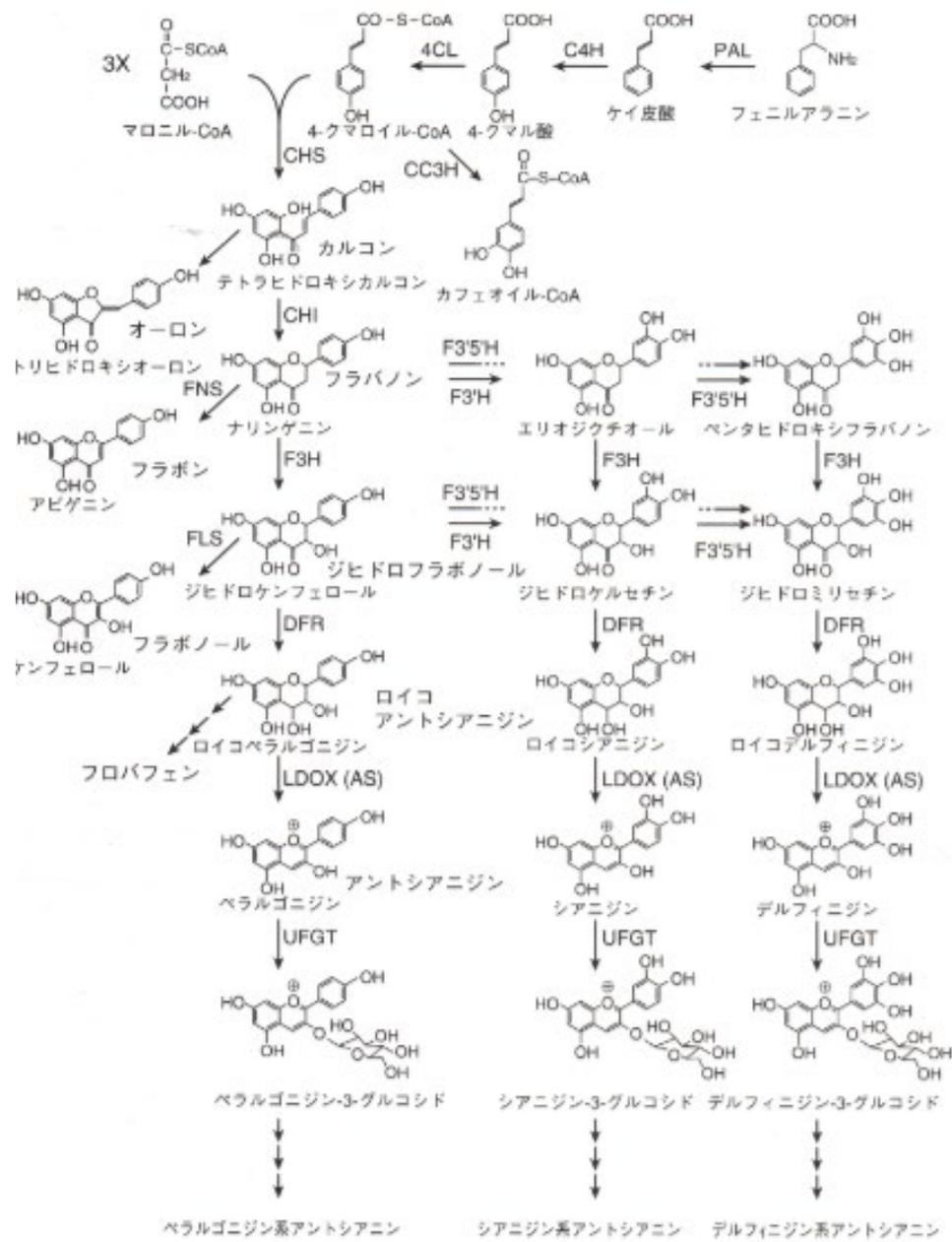


図 3. フラボノイド経路 (渡辺ら、1994)

## 第一章 ‘ソメイヨシノ’の着色に効果的な光環境に関する研究

### 第一節 青色光および赤色光の照射による‘ソメイヨシノ’の着色

#### 緒言

‘ソメイヨシノ’ (*Cerasus × yedoensis* ‘Shomei-yoshino’)は、日本だけでなく、日本から導入された他の国々でも人気のあるサクラの品種である。‘ソメイヨシノ’は美しく、大きいピンクの花弁を持っている。しかし、花の発色機構は十分に研究されておらず、環境条件が着色プロセスにどのように影響するかはまだ不明である。‘ソメイヨシノ’の切り枝は観賞植物として室内で開花させ使用されるが、花はピンクではなく白色となる。これは、光と温度が花弁の着色に影響を与える重要な要因であることを示唆している。

アントシアニン色素は花弁のピンク色の生成に関与しており、多くの植物でアントシアニン生合成は光照射と低温によって誘導される。光照射による着色とアントシアニン生合成は他の果実や花でよく研究されているが、植物によって異なる光照射条件を必要としている（前川、1980；Mengら；2004、Federicaら；1986、Arakawa、1988）。サクラの花色の発現には、品種ごとに異なる適切な条件が必要であることはよく知られている。その中でも、いくつかのサクラ品種は、光照射に依存せず、ピンク色の花弁となる。これまで、‘ソメイヨシノ’の花弁の花色発現メカニズムに関する研究はほとんどなく、発色に有効な光照射における波長は不明である。

植物におけるアントシアニンの蓄積には3つの波長域：紫外線（UV）、青色および赤色光が関与し、各波長は特定の光受容体によって吸収されることが知られている。たとえば、UV、特に330 nm未満の波長の光の照射に

よりバラ (*Rosa hybrida* 'Ehigasa') のアントシアニン含量が増加した (前川、1980)。UV-B の照射はリンゴ (*Malus × domestica* Borkh.) の花にアントシアニンの蓄積を引き起こしたが、そのほかの UV 波長は、アントシアニン生合成に影響しなかった (Dong ら、1998)。さらに、ガーベラの花弁に紫外線と青色光の両方を照射すると、アントシアニンの含量が増加し、青色光がより効果的であると報告されている (Meng ら、2004)。ただし、一部の植物では、有効波長間に相互作用が認められた。たとえば、紫外線照射の前に青色光を照射するとバラのアントシアニン含量が増加し (前川、1980)、青色光を赤色光と組み合わせて照射するとトマト (*Lycopersicon × esculentum* 'beefsteak') のアントシアニン含量が増加した (Federica ら、1986)。また、赤色光と紫外線の組み合わせによる照射は、紫外線だけの照射よりもリンゴ果実のアントシアニン含量が大きく増加した (Arakawa、1988)。同様に、サクラ '十月サクラ' (*C. × subhirtella* 'Autumnalis') ではアントシアニン含量が青色光と紫外線により調節されることが報告されている (前川・直彦、1979; 前川 ら、1980)。しかし、これらの研究では、植物は広範囲の波長を発する蛍光灯を使用して照射された。したがって、特定の波長が花の発色に及ぼす影響は不明なままである。さらに、サクラのアントシアニン生合成に対する赤色光、または青色光と赤色光の相互作用の影響に関する報告はされていない。

植物は光受容体を介して光信号を知覚し、下流の遺伝子を調節することによってアントシアニン生合成を調節する (Laura ら、2014)。植物で特有であり、最も広く研究されている光受容体はフィトクロムであり、これは赤色光と遠赤色光を受け取る。フィトクロムを介する生理反応は、その誘導に必要な光照射時間や照射光エネルギー量などの特性の違いから、低

エネルギー反応 (Low Energy Reaction) と高照射反応 (High Irradiance Response; HIR) に分類される (和田ら、2001)。アントシアニン生合成で、フィトクロムは通常、高照射応答 (HIR) システムとしてアントシアニンの蓄積に関与している (Arakawa、1988)。しかし、‘ソメイヨシノ’ で、アントシアニン蓄積におけるフィトクロムの役割は研究されていない。

本節は、‘ソメイヨシノ’ 花卉の着色に最も効果的な光の波長と、フィトクロムがこの過程にどのように関与するのかを解明することを目的とした。これらを調べるために、サクラの切り枝にさまざまな波長の青色光を単独照射、または赤色光と組み合わせて照射し、花色に最も大きな影響を与える波長を特定した。本節の結果は、‘ソメイヨシノ’ の切り枝による室内開花技術の基礎になるものである。さらに、本節の結果は、室内および屋外でアントシアニン生合成を制御するメカニズムの理解に役立つものである。

## 材料および方法

### 1. 植物材料

青森県弘前公園から剪定期間中 (2月~3月) に花芽をつけた ‘ソメイヨシノ’ の切り枝 (長さ 10~20 cm) を譲り受け、2℃の冷蔵室に保湿条件で保管した。実験中、切り枝は5%の切り枝延命剤 (パレス化学、神奈川) を含む養液中で水挿しした。花が咲いた時期に、短枝を同じ養液が入った容器に移した。容器は 17.5℃に設定した恒温器に入れ、発光ダイオード (LED) を使用して照射した。光照射処理は5日間行い、アントシアニン含量を測定した。

### 2. 青色光照射の影響

青色光の影響は、430 nm、450 nm、および470 nmの3つの波長の光を使用して照射を行った。LED光は2つの強度とし(表 1-1-1)、17.5°Cに温度制御された環境で5日間照射した。対照区には光照射を行っていない。

### 3. 赤色光と青色光の同時照射の影響

赤色光の影響を調べるために、切り枝に660 nm、強度9.39 W / m<sup>2</sup>の赤色LED光を、波長430 nm (20.67 W / m<sup>2</sup>)、450 nm (21.91 W / m<sup>2</sup>) および470 nm (24.16 W / m<sup>2</sup>) の青色光と組み合わせて照射した。青色光のみの照射と青色光と赤色光の同時照射の違いを見るために、この実験では低強度(表 1-1-1)の青色光を使用した。実験の間、サクラの切り枝は17.5°Cの恒温器で光照射を行った。

### 4. 光強度の影響

青色光強度の影響を調査するために、17.5°Cで水挿しし、3つの異なる強度の青色光(450 nm) LED: 6.04 W / m<sup>2</sup>、16.31 W / m<sup>2</sup>、25.04 W / m<sup>2</sup>を用いて照射した。3つの青色光は赤色光(660 nm) LED (19.34 W / m<sup>2</sup>) と同時に照射を行った。赤色光の影響を調査するために、3つの異なる強度の赤色(660 nm) LED: 3.15 W / m<sup>2</sup>、9.39 W / m<sup>2</sup>、19.34 W / m<sup>2</sup>を使用し、青色(450 nm) LED (25.04 W / m<sup>2</sup>) と同時に照射を行った。

### 5. 赤色光および遠赤色光照射の影響

青色光の光応答に対する赤色/遠赤色光照射の影響を調べるために、切り枝にの赤色光(660 nm、9.39 W / m<sup>2</sup>)、遠赤色光(730 nm、3.68 W / m<sup>2</sup>) または両方を15分間隔で照射した。450 nmの青色光の照射の間、赤色/

遠赤色光を照射間隔を変えて照射した（図 1-1-1）。また、他の実験区には、青色光を伴う赤色光または遠赤色光を連続照射した。青色光のみは対照として使用した。

アントシアニン含量の測定：各処理による切り枝から 5 個の花を採取し、それぞれから 5 枚の花弁を採取し、試験管内で 5 mL の 0.1% (v : v) 塩酸-メタノールに浸した。試験管は 2℃の冷蔵庫に一晩入れてアントシアニンを抽出した。530 nm での各抽出物の吸光度を分光光度計を使用して測定し、相対的なアントシアニン含量 ( $A_{530}$ ) を推定した (Arakawa, 1988)。

統計分析：青色光の波長および光強度に関する実験については、統計ソフトウェアエクセル統計 2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いて、二元配置分散分析および Tukey 多重比較検定を実行した。光強度、赤色および赤外光の照射に関するデータは、一元配置分散分析および Tukey による多重比較検定を行った。

## 結果

### 1. 青色光および波長の影響

光照射せずに水挿ししたサクラは白い花弁となり、その抽出物の 530 nm での吸光度は 0.003 を示し、暗い条件下でアントシアニンの蓄積は少なかった。逆に、3つの波長の青色光で照射した花は、花弁のアントシアニン含量が増加した（表 1-1-2）。高強度の青色 LED 照射中、450 nm の波長の LED 光は、430 および 470 nm の LED 光よりもアントシアニンを多く蓄積した。ただし、低い光強度では、450 nm の LED 光は 430 nm の LED 光と有意差はなかった（表 1-1-2）。

### 2. 赤色光と青色光の同時照射の影響

青色光のみを照射した花と比較して、青色光を波長 660 nm の赤色光と組み合わせて照射した花では、花卉のアントシアニン含量が有意に高かった（表 1-1-3）。さらに、450 nm の青色光と 660 nm の赤色光を組み合わせた照射は、430 nm または 470 nm の青色光と 660 nm の赤色光を組み合わせた照射による花卉に比べ、アントシアニン含量が有意に高かった。

### 3. 光強度の影響

450 nm の青色光のみを照射した花は、光強度の増加とともにアントシアニン含量が増加した。さらに、赤色光と同時に照射された花は、青色光強度の増加とともにアントシアニン含量が増加した（図 1-1-2 A および図 1-1-3a-c）。一方、花が同じ光強度の青色光と異なる強度の赤色光で照射された場合、青色光と類似した効果は観察されず、中間強度の赤色光の照射によりアントシアニン含量が最も多かった（図 1-1-2B）。光強度に関係なく、赤色光のみを照射した場合、アントシアニン生合成は認められなかった（図 1-1-2B）。

### 4. 赤/遠赤色光の影響

間隔照射実験では、450 nm の青色光と 660 nm の赤色光を連続的に照射した花でアントシアニンを最も多く蓄積した（図 1-1-4）。赤色光をより短い時間照射した場合、アントシアニンの蓄積は少なかった。しかし、アントシアニンの蓄積は、450 nm の連続照射と 660 nm の 15 分間隔の照射を受けた花では、両方の照射を連続で行った花に比べて有意な差は認められなかった。660 nm の間隔照射の間に 730 nm の遠赤色光を追加すると、660 nm のみの間隔照射と比較して、アントシアニン含量が大幅に減少した。ま

た、730 nm の遠赤色光と青色光の同時照射におけるアントシアニン含量は青色光単独照射と同じだった。

### 考察

本研究では、‘ソメイヨシノ’のアントシアニン生合成に及ぼす光の波長と強度の影響を調べた。430 nm、450 nm、470 nm の波長の青色光を照射すると、アントシアニンの生合成が促進されることが明らかとなった。特に、450 nm の青色光は、アントシアニンの蓄積を増加させ、他の波長と比べてアントシアニン蓄積に対する効果が大きかった（図 1-1-2、図 1-1-3）。したがって、‘ソメイヨシノ’の花にアントシアニンが最大に蓄積するための最適な光の波長は 450 nm であると考えられた。赤色光のみを照射した花ではアントシアニンの蓄積は観察されなかったが、赤色光と青色光を組み合わせた照射により、青色光のみを使用した場合に比べ、アントシアニン含量が大幅に増加した（表 1-1-2、表 1-1-3）。花卉の色に対する UV 光の影響を調査するために、樹上のサクラを用いて、380 nm 以下の波長を除去する UV フィルターを掛けたが、花卉の着色に有意な変化は観察されなかったことから、UV 光は‘ソメイヨシノ’花卉の着色に影響していないと考えられた（データは示していない）。

アントシアニン蓄積に対する赤色光の影響におけるフィトクロムの関与を調査するために、660 nm の赤色光と 730 nm の遠赤色光を用いて間隔的照射を行った。450 nm の青色光と組み合わせた 15 分間隔の赤色光を照射した花では、これらの波長で連続照射した花に比べ、アントシアニン含量に有意差はなかった（図 1-1-4）。これは、フィトクロムによる光受容のプロセスが HIR 反応を伴う可能性が高いことを示唆している。この効果は

シロイヌナズナの赤色光下での胚軸伸長で観察されており、12 分間隔で赤色光を照射した植物では胚軸長に有意差はなかったが、植物に 3~6 分間または連続照射した場合には差が現れる。したがって、これらの結果は、フィトクロムが光の吸収に関与している可能性があり、フィトクロム A が HIR 反応を介したアントシアニン生合成に関与している可能性があることを示している。また、シロイヌナズナの実験は 15 分未満の間隔で光を使用して行われたため、サクラの赤色光の光周期でも異なる条件下で検討する必要がある (Shinoura ら、2000)。

本節の結果は、サクラのアントシアニン生合成において赤色光と青色光の間に相互作用がある可能性を示唆している。光受容体間の相互作用の存在については以前に報告されており、その可能性について 2 つ挙げられた (Alberto ら、1991) : (a) クリプトクロムを介した青色光の効果には遠赤色吸収型のフィトクロム (Pfr) を必要としている可能性があり、フィトクロムの状態はこの効果の制限要因として働く。(b) クリプトクロムは、Pfr に対する応答系の感受性に応じて、光効果を増強する。本節で見られた赤色光と青色光の相互作用は前者と近似していた。

本節で使用した青色光の光強度は比較的弱いと考えられ、青色光のみでは光強度の変化によりアントシアニン蓄積への有意な変化は認められなかった (図 1-1-2A)。しかし、赤色光との同時照射の場合、アントシアニン含量は青色光強度の増加とともに増加した。アントシアニンの蓄積は青色光の強度の影響を受け (Federica ら、1986)、また、クリプトクロムは光強度の影響を受ける (Lin ら、1998) ことを考慮すると、本節の結果は青色光がクリプトクロムの活性に影響を与える可能性があることを示している。青色光はいくつかの光形態形成に関係しており、2 つの光受容体

が青色光効果に関与していると考えられている。クリプトクロムは、胚軸伸長、アントシアニン蓄積、開花時間と茎、および節間伸長に影響し、フォトトロピンは青色光に依存するクロロフィルの再配列と気孔運動を含む光形態形成を調節し (Kimura・Takatoshi、2006)、光形態形成において役割をしている (Kang ら、2008)。

結論として、660 nmの赤色光と組み合わせた450 nmの青色光の照射が、‘ソメイヨシノ’の花のピンク色の発色に最も適していると考えられる。この光の条件は、樹上の花卉がピンク色に発達するのに重要な役割を果たしている可能性がある。さらに、本節結果は室内と室外で育つ花卉の着色を促進する技術の参考になると考えられる。クリプトクロムとフィトクロムAはアントシアニンの蓄積に関与していると考えられており、これら2つの光受容体の間には相互作用がある可能性を示す。したがって、今後の研究で遺伝子解析などを通じてこの相互作用の詳細が明らかになることが期待される。

## 摘要

美しい大きなピンクの花を咲かせる‘ソメイヨシノ’ (*Cerasus × yedoensis* ‘Shomei-yoshio’) は、日本で最も一般的に栽培されているサクラの品種である。しかし、室内の水挿しでは好ましいピンク色の花と異なり、白い花卉となるが、この理由などの花の発色の生理機構はよく研究されていない。サクラの花弁のピンク色は、光照射によるアントシアニン色素の蓄積によって生じている。したがって本節では、光条件、特に青色光がアントシアニン生合成に及ぼす影響に関して調査した。光の波長域では、青色と赤色の両方の部分の波長が‘ソメイヨシノ’の着色に関与して

いることが明らかとなった。特に、450 nm の青色光が最も影響が大きいと考えられた。赤色単色光の照射はアントシアニン生合成への影響は認められなかった。しかし、青色光と赤色光の両方を同時に照射すると、青色単色光を照射した場合に比べ、アントシアニン含量が有意に増加し、青色光受容体と赤色光受容体の相互作用が示唆された。本節の結果は、‘ソメイヨシノ’の発色生理の理解に役立つものであると考えられた。

表 1-1-1. 青色光照射実験で使用した青色発光ダイオード (LED) の光強度 (W/m<sup>2</sup>)

	光強度(W/m <sup>2</sup> )		
	430 nm	450 nm	470 nm
低強度	20.67	21.91	24.16
高強度	37.25	45.48	45.92

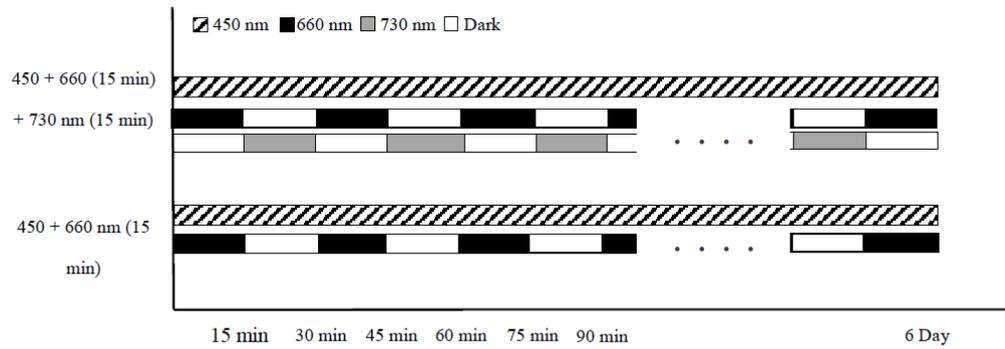


図 1-1-1. 間隔照射における照射スケジュール。

サクラの花は、450 nm の青色光を連続的に照射するとともに、660 nm の赤色光のみまたは 730 nm の遠赤色光と組み合わせ、照射間隔は 15 分として、照射を 6 日間続けた。

表 1-1-2. 異なる波長の青色光照射による‘ソメイヨシノ’花卉のアントシアニン含量  
(A<sub>530</sub>) (平均±SE、n = 3)

アントシアニン含量 (A <sub>530</sub> )				
処理	430 nm	450 nm	470 nm	対照
高強度	0.015 ± 0.003 b	0.076 ± 0.020 a	0.022 ± 0.005 b	0.003 ± 0.001
低強度	0.028 ± 0.001 a	0.042 ± 0.007 a	0.021 ± 0.002 b	
	P 値 (0.01)	有意差		
波長 (W)	0.0018	**		
光強度 (L)	0.3672	ns		
W × L	0.0683	ns		

異なる小文字は、有意差を表す (Tukey の検定、P < 0.05)

表 1-1-3. 青色光および赤色光の照射による‘ソメイヨシノ’のアントシアニン含量

(A<sub>530</sub>) (平均 ± SE, n = 5)

処理	アントシアニン含量 (A <sub>530</sub> )		
	430 nm	450 nm	470 nm
青色光のみ	0.0236 ± 0.003 b	0.0572 ± 0.004 a	0.0484 ± 0.002 a
青色光と赤色光の同時照射	0.0818 ± 0.004 B	0.1444 ± 0.005 A	0.091 ± 0.011 B
	P 値(0.01)	有意差	
波長 (W)	< 0.0001	**	
組み合わせによる照射 (Co)	< 0.0001	**	
W × Co	0.0034	**	

異なる英文字は有意差を示す(Tukey's test, P < 0.05)

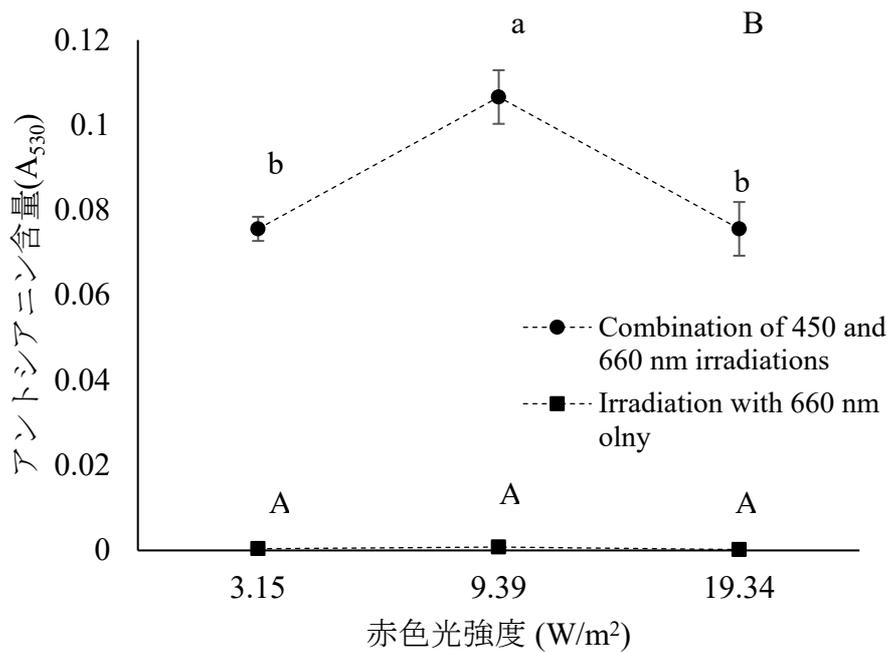
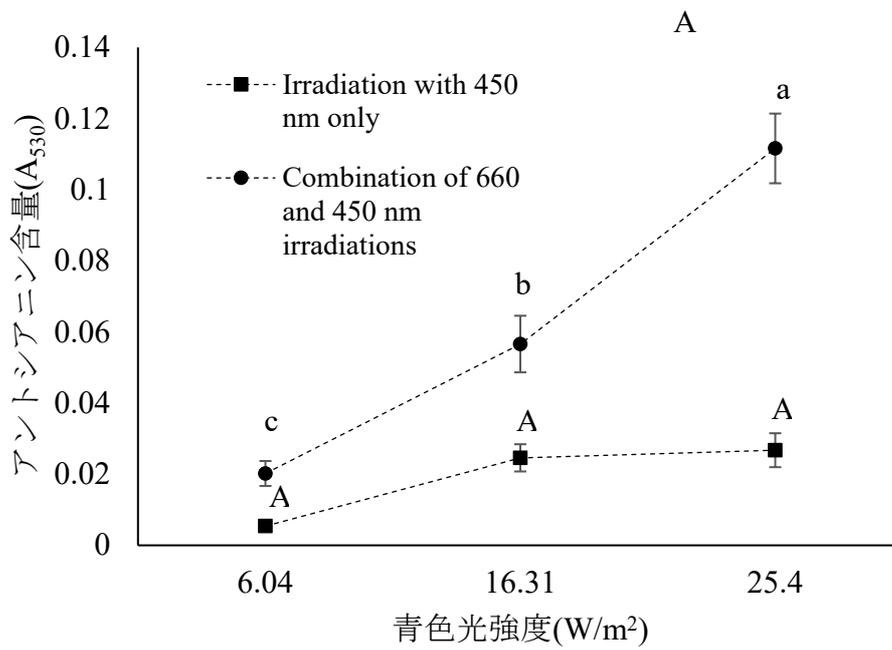


図1-1-2. 異なる光強度の A) 青色光のみ (■) と赤色光 (19.34  $W/m^2$ ) (●) の組み合わせおよび B) 異なる光強度の赤色光のみ (■) または青色光との組み合わせ (25.4  $W/m^2$ ) (●) で照射した‘ソメイヨシノ’のアントシアニン含量 ( $A_{530}$ ) (平均±SE、n = 5)。

異なる英文字は、統計的に有意であることを示す (Tukey's test,  $P < 0.05$ )



図 1-1-3. 光照射によるサクラ花卉の着色

a)  $6.04 \text{ W/m}^2$  の青色発光ダイオード (LED) と赤色 LED ( $19.34 \text{ W/m}^2$ ) による照射 b) 照射  $16.31 \text{ W/m}^2$  の青色 LED と赤色 LED ( $19.34 \text{ W/m}^2$ ) による照射、c)  $25.04 \text{ W/m}^2$  の青色 LED と赤色 LED ( $19.34 \text{ W/m}^2$ ) による照射、d) 赤色 LED のみによる照射 e) 開花後に樹上から取ったサクラ

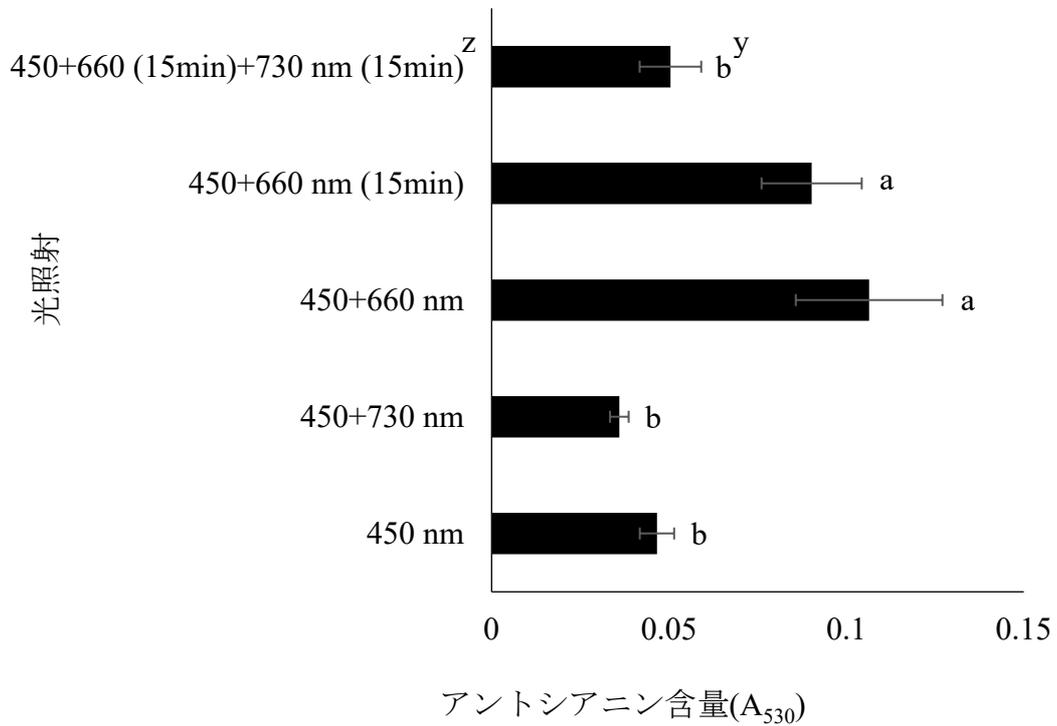


図1-1-4、450 nm の青色光の連続照射に伴う 660 nm の赤色光、または 730 nm の遠赤色光と組み合わせた間隔照射による‘ツメイヨシノ’の花弁のアントシアニン含量 (平均 ± SE、n = 5)。

z. 450 nm での連続照射と、660 nm と 730 nm の 15 分間隔の照射。

y. 異なる英文字は、統計的に有意であることを示す (Tukey's test,  $P < 0.05$ )

## 第二節 光照射による‘ソメイヨシノ’の着色関連遺伝子発現

### 緒言

アントシアニンフラボノイド物質で、植物の二次代謝であるフェノール、フラボノイド経路により生成され、液胞へ蓄積され、発色する(渡辺ら、1994; Laura、2013)。アントシアニン生合成経路はこれまで研究が大きく進められ、大きく2種類の遺伝子が関わっている。1種類は *PAL*、*CHS*、*ANS* など(図 2)の生合成酵素遺伝子である。アントシアニン生合成で、最初に関わる酵素がフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*) である。一次代謝で作られたフェニルアラニンはこの酵素によってケイ皮酸となる。ケイ皮酸はフェノール経路により 4-クマロイル-CoA となる。これはまた、カルコン合成酵素(Chalcone Synthase, *CHS*) によりフラボノイド類であるテトラヒドロキシカルコンとなる。アントシアニンはこのフラボノイド類経路により作られ、*ANS* により作られたアントシアニジンに、*UFGT* によってアントシアニンを生成する。もう一つの種類は *MYB*、*BHLH*、*WD40* などの生合成酵素を調節する転写因子であり、アントシアニン生合成酵素の発現を調整する。その中でも *MYB10* はアントシアニン生合成を促進することでよく知られている。

前節の結果により、‘ソメイヨシノ’で、アントシアニン生合成は青色光と赤色光により促進され、赤色光の効果にはフィトクロム A (PHYA) が関係していると考えられる。また、青色光によるアントシアニン生合成にはクリプトクロム 1(CYR1)が関係していることが多く報告されている。本節では、上述のフラボノイド経路に関わる遺伝子発現を調査することにより、光照射がアントシアニン生合成に及ぼす影響を調査することを目的とした。

## 材料および方法

材料には、前節で青色光 (450 nm、25.4 W / m<sup>2</sup>)、青色光と赤色光 (660 nm、19.34 W / m<sup>2</sup>) の同時照射による ‘ソメイヨシノ’ の切り枝を使用した。光照射は 17.5°C に設定された恒温器内で 6 日間行い、切り枝から花弁を採取し、-83°C で冷凍保存した。保存された花弁は RT-PCR および、qPCR 方法を用いて RNA 発現を調査した。

RNA 抽出：花弁 10 枚を液体窒素で粉砕し、2×臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) 1 mL とともにエッペンチューブに入れ、65°C で 10 分インキュベートした。その後、クロロホルム・イソアミルアルコール (24 : 1) (CIA) を 1 mL 加え、遠心分離 (14000 rpm、20°C、10 分) して上澄みを別のチューブに入れた。上澄みに 10M の塩化リチウムを 250 μL 加え、-20°C で一晩放置した。その後、遠心分離をし、ペレットに滅菌水 100 μL、TE フェノール 200 μL を加え、遠心分離した。上澄みを別のチューブに移し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1)、(PCI) を 200 μL 加え、遠心して上澄みのみをとり、10 M の塩化リチウムを 250 μL 加え、-20°C で一晩放置した。その後、エッペンチューブを遠心し、ペレットを残した。ペレットに 70% のエチルアルコール 200 μL を加え、遠心分離後、デシケーターを用いてエチルアルコールを完全にのぞいて RNA 抽出物を得た。抽出物に滅菌水を 100 μL 加え、Nano Drop (Thermo Fisher) を用いて RNA 濃度を測定した。測定後、99.5% のエチルアルコール 250 μL、3 M の酢酸ナトリウム 10 μL、グリコーゲン 2 μL を加え保存した。

cDNA 合成：RNA 溶液から、RNA が 1 μg になるように別のチューブに入れ、遠心分離をして RNA を得た。RNA に滅菌水 12 μL、ランダムプライマ

1  $\mu$  L、RT - Buffer 2 mM、dNTPs 2  $\mu$  L、ReverTra Ace 1  $\mu$  Lを加えて RT - 反応を行って cDNA を得た。反応条件は以下のように設定した：アニリングを 30°C で 10 分、RT 反応を 42°C で 60 分、変性を 99°C で 5 分行った。その後、滅菌水で 4 倍に薄め、cDNA 溶液を作成した。

PCR 反応：反応液は以下のように作成した。10×PCR buffer 1.5  $\mu$  L、2 mM dNTPs 1.5  $\mu$  L、25 mM MgCl<sub>2</sub> 1  $\mu$  L、Amplifaq gold(酵素) 0.5  $\mu$  L、滅菌水 7.5  $\mu$  L、プライマー 1  $\mu$  L (F 側と R 側各 0.5  $\mu$  l)、cDNA 用液を 2  $\mu$  L。反応液は ASTEC の Thermal Cycler Gene Atlas(ジャイアントモデル G02) システムを用いて PCR 反応を行った。95°C で 10 分予熱し、PCR 反応を 40 サイクル行った。反応は、熱変性を 94°C で 1 分、アニリングを 50°C で 1 分、伸長反応を 72°C で 2 分に設定した。

電気泳動：電気泳動は 1.5% のアガロースゲル、100 V で 30 分行った。

qPCR：cDNA 溶液をそれぞれ、1、10、100、1000、10000 倍に薄めて qPCR を行った。qPCR は Thermo Scientific の PikoReal システムを用いて行った。

プライマー：データバンクから近縁であるモモおよびオウトウの目的遺伝子配列を集め、プライマーを設計した。プライマーの配列は以下に表した (表 1-2-1)。

## 結果

RT-PCR の結果を見ると、光照射による青色光受容体である *CRY* と *PHO* および赤色光受容体である *PHYA* の発現が観察されなかった (図 1-2-1、図 1-2-2)。代謝経路では、*CHS* および *MYB10* の発現は観察されなかったが、*ANS*、*DFR*、*F3H* および *PAL* の発現が観察された。青色光および赤色光の同

時照射による花卉では *F3H* の発現が観察されなかった。また、同時照射の花卉では *ANS* の発現量が少なかった。これらの遺伝子発現を量的に比較するため、RT-qPCR を行った。しかし、全てのプライマーで発現量が観察されなかった。対照として使用した *Actin* をみると (図 1-2-4)、サンプルを入れていない場合にも RNA の増幅が観察された。しかし、サンプルおよびプライマーを入れていない場合には RNA の増幅が観察されなかった。

### 考察

本節では、‘ソメイヨシノ’の着色機構を解明するために、PCR を用いて遺伝子解析を行った。しかし、実験結果では、*ANS*、*DFR*、*F3H* 以外の全ての遺伝子発現量は観察されなかった。これらの結果からは、プライマー設計に問題が発生したと考えられた。上述の 3 つの遺伝子の中で、青色光と赤色光の同時照射により、*F3H* の遺伝子発現が認められなかった。しかし、実験の設計にも問題がある可能性を考えると、本実験での結果は信頼性は低い。また、上述の 3 つの遺伝子発現量を定量するため、qPCR を行ったが、全ての実験で DNA の発現量を定量することができなかった。DNA がサンプルを入れていない場合にも増幅したが、プライマーを入れていない場合には DNA 増幅が観察されなかった。また、増幅グラフをみると、Ct 値が cDNA 濃度との関係が観察されなかった。これらの結果は、プライマーの間でアニリングが起きた可能性が大きいと考えられた。今後の研究ではプライマーの設計をし直す必要があると考えられた。

### 摘要

前節の結果により、赤色光と青色光の光受容体の間で相互作用があることが示唆された。本研究では、RT-PCR 方法を用いて、光受容体と共に、ア

ントシアニン生合成に関する遺伝子発現を調査したが、結果を得ることができなかった。原因は、プライマー設計に問題があったと考えられる。

表 1-2-1. PCR に使用されたプライマーの配列

目的遺伝子名	配列
CRY-F	TTCTGCAGCTTCCATGGAGG
CRY-R	CTTCGAGTGGCAGGAAGGTT
PHYA-F	GCATTTGCTCACGCTCGTAG
PHYA-R	CTTGCTCACACACAACAGGC
PHO-F	GGGACCGCACTGAAAGAGAA
PHO-R	CCTTGGGAAGACAGGCTGAG
MYB10-F	GACGGGAAATGGAACCAGGT
MYB10-R	TCTGTTCTTGTCCACGGAGC
PAL-F	GCATTGTGCCAAGCTGTTGA
PAL-R	TTCAAGCAGTCCAGCAGAGG
DFR-F	AGACAGTTCGAAGGCTGGTG
DFR-R	GCAGAGGTCGTCCAAGTGAA
F3H-F	GGTTTCATCGTCTCCAGCCA
F3H-R	GGGCTTCTCTCCCTCTCTGA
ANS-F	CCTGAGGACAAGCGTGACTT
ANS-R	AAGATTGGCGGCTCAGTCTC

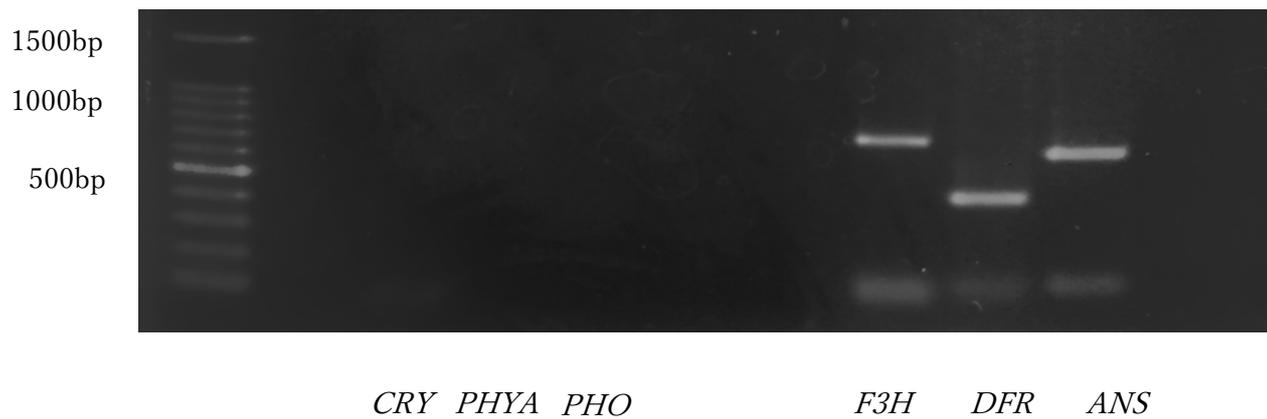


図 1-2-1. 450 nm の青色光の照射による‘ソメイヨシノ’のアントシアニン生合成関連遺伝子および光受容体遺伝子発現

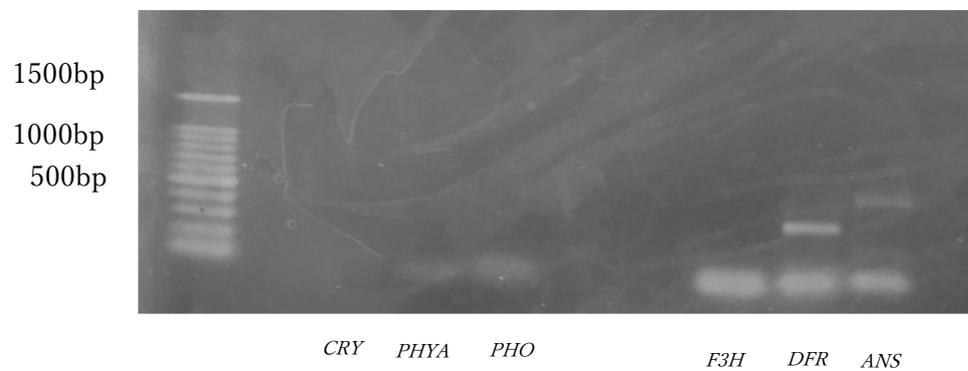
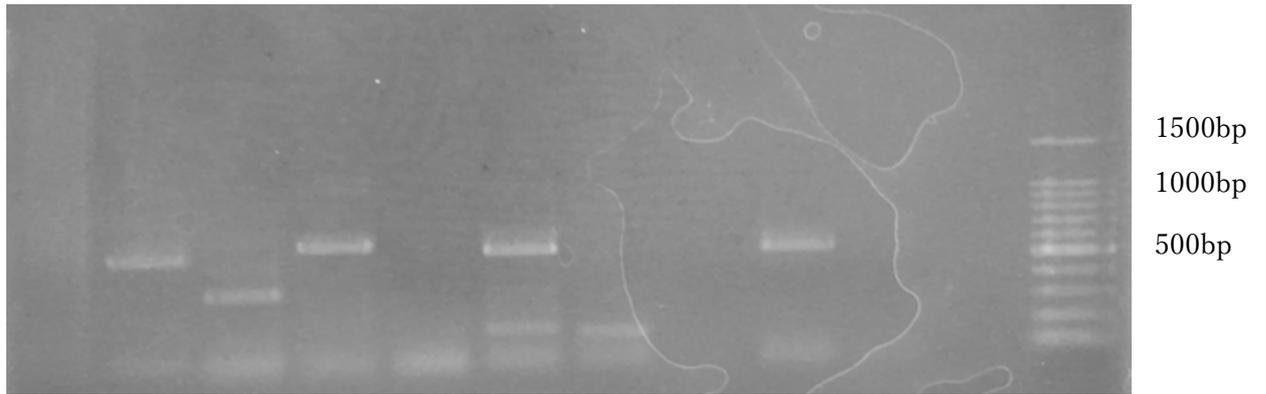


図 1-2-2 450 nm の青色光と 660 nm の組み合わせによる ‘ソメイヨシノ’ のアントシアニン生合成関連遺伝子および光受容体遺伝子発現



*ACT ANS DFR F3H CHS PAL MYB10 PHYA PHO CRY*

図 1-2-3. 450 および 660 nm の照射によるアントシアニン生合成遺伝子発現

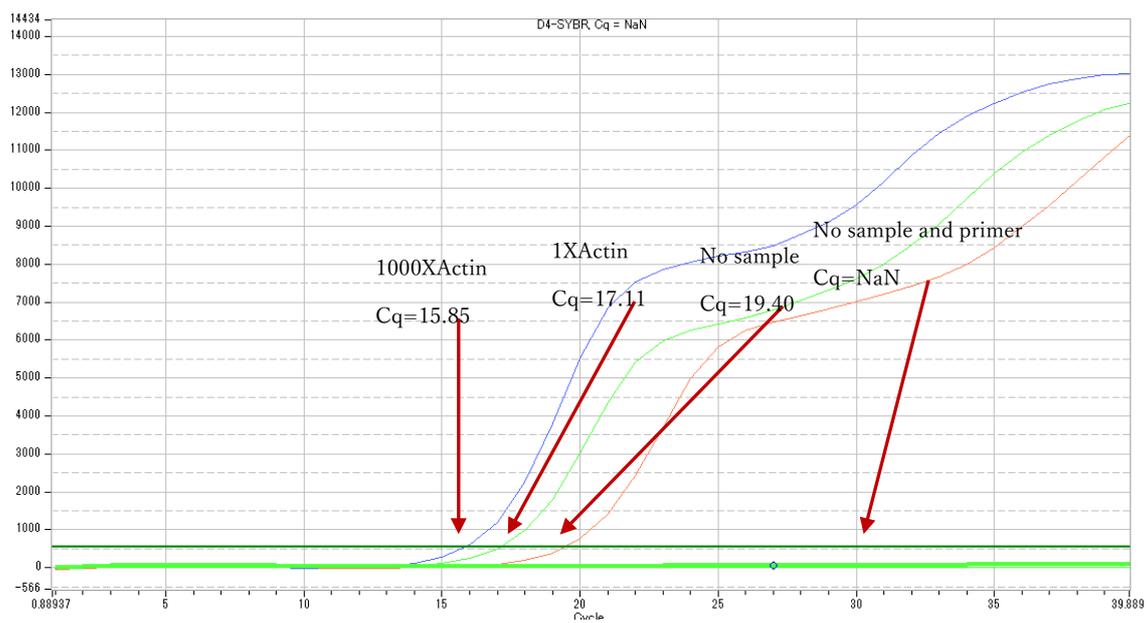


図 1-2-4. *Actin* の RT-qPCR 結果

cDNA サンプルを入れていない場合、増幅が観察された (赤色線)

### 第三節 オオシマザクラおよびエドヒガンの着色と光条件

#### 緒言

日本には多くの野生種のサクラが分布しており、‘ソメイヨシノ’ (*Cerasus × yedoensis* ‘Somei-yoshino’) は野生種であるオオシマザク (*C. speciosa*) ラとエドヒガン (*C. itosakura*) の間で生じた園芸品種である。オオシマザクラはソメイヨシノに比べて花弁が大きく、白い花弁を作る一方、エドヒガンは花弁が‘ソメイヨシノ’に比べて小さく、より濃いピンク色の花弁となる。前節の研究で、‘ソメイヨシノ’の着色には青色光と赤色光の照射に影響されることを報告した。しかし、これらの光の影響は植物種または品種によって異なることがある。オオシマザクラとエドヒガンでは、着色における光照射の影響に関する報告はまだされていない。本節では、‘ソメイヨシノ’の親であるオオシマザクラとエドヒガンを用いて、‘ソメイヨシノ’の着色機構と比較することを目的とした。

#### 材料及び方法

実験は弘前市公園から提供されたオオシマザクラおよびエドヒガンの切り枝を用いて行った。切り枝はそれぞれ満開後に提供され、弘前大学で、恒温器内で以下に示す光照射を行った。

エドヒガン：切り枝に 660 nm ( $9.39 \text{ W} / \text{m}^2$ ) の赤色 LED 光を、波長が 430 nm ( $20.67 \text{ W} / \text{m}^2$ )、450 nm ( $21.91 \text{ W} / \text{m}^2$ ) および 470 nm ( $24.16 \text{ W} / \text{m}^2$ ) の青色光と組み合わせて照射した。実験の間、サクラの切り枝は  $17.5^\circ \text{C}$  の恒温器で光照射を行った。アントシアニン含量は光照射 6 日後に測定した。

オオシマザクラ：切り枝に 450 nm ( $21.91 \text{ W} / \text{m}^2$ ) のみの照射、660 nm ( $9.39 \text{ W} / \text{m}^2$ ) のみの照射および両方の組み合わせの照射を行った。恒温器の温度は  $17.5^\circ\text{C}$  に設定し、アントシアニン含量は光照射 6 日後に測定した。

アントシアニン含量の測定：各処理による切り枝から 5 個の花をとり、それぞれから 5 枚の花弁を採取、試験管内で 5 mL の 0.1% (v : v) HCl-メタノールに浸した。試験管は  $2^\circ\text{C}$  の冷蔵庫に一晩入れて、アントシアニンを抽出した。530 nm での各抽出物の吸光度を分光光度計を使用して測定し、相対的なアントシアニン含量 ( $A_{530}$ ) を推定した。

## 結果

エドヒガンの花では (図 1-3-1)、450 nm および 470 nm の青色光で照射した花では、430 nm を用いて照射した花に比べ、アントシアニン含量が多かった。450 nm の青色光照射の花は 470 nm に比べ、わずかにアントシアニン含量が多かったが、有意差は認められなかった。赤色光との組み合わせによる照射を見ると、三つの青色光でアントシアニン含量は青色光のみで照射した場合に比べて増加した。青色光の波長の影響をみると、青色光のみと同じく、430 nm に比べて 450 nm と 470 nm が効果が大きく、450 nm と 470 nm の間では有意差が認められなかった。

オオシマザクラでは (図 1-3-2)、青色光と赤色光の同時照射と青色光のみの照射でアントシアニン含量に有意差はなかった。また、660 nm のみ照射した場合にもアントシアニンが生成され、吸光度は 0.12 となった。LED の照射により、オオシマザクラでは、アントシアニン抽出液の吸光度が最

大 3 となり、‘ソメイヨシノ’とエドヒガンに比べてアントシアニン含量が多かった。

## 考察

本節では、‘ソメイヨシノ’の親であるオオシマザクラとエドヒガンの着色への光照射の影響について調査した。オオシマザクラは、切り枝を室内で水挿しした場合にアントシアニン含量が大きく増加した(データは示していない)。オオシマザクラは一般的に、樹上ではピンク色をしていることを考慮すると、この着色過程には光照射が関係していないことが考えられた。光条件では、‘ソメイヨシノ’と大きい違いが見られ、450 nm の青色光の照射によりアントシアニン含量が大きく増加したが、660 nm の赤色光との同時照射によりアントシアニン含量の増加は認められなかった。これらのことは、光照射によるオオシマザクラの着色には、赤色光が関係していないこと示唆する。

一方、エドヒガンでは、青色光と赤色光の LED を用いて照射を行った場合、‘ソメイヨシノ’と同じ傾向がみられ、青色光と赤色光の同時照射によりアントシアニンが増加した。青色光の波長には、450 nm が最も効果的であると考えられた。本節では、エドヒガンにおいて、660 nm と暗条件で花の着色を調査することができなかった。これらの条件に関してさらに調べる必要があると考えられた。‘ソメイヨシノ’と似ている光条件を持つことから考えると、同じく 660 nm の赤色光は、単独で照射をした場合、アントシアニン蓄積への効果がないと考えられた。一般的に、エドヒガンは‘ソメイヨシノ’に比べて濃いピンク色をしているため、暗条件での着色状況に関して調べる必要がある。

オオシマザクラとエドヒガンの着色への理解は‘ソメイヨシノ’の着色機構を理解することに役立つと考えられた。本節の結果により、オオシマザクラは‘ソメイヨシノ’との着色機構が大きく異なるが、エドヒガンでは着色機構が‘ソメイヨシノ’と似て、青色光と赤色光両方の影響を受けていると考えられる。したがって、‘ソメイヨシノ’の光照射によるアントシアニン生合成機構はエドヒガンの影響を大きく受けていると考えられた。これらの推論を証明するためには、今後のさらなる実験が必要である。

### 摘要

‘ソメイヨシノ’は野生種であるオオシマザクラとエドヒガンの間で生じた園芸品種である。本節では、光照射が、親であるオオシマザクラとエドヒガン花卉の着色に及ぼす影響を調査した。オオシマザクラでは着色への光条件が‘ソメイヨシノ’と大きく異なり、赤色光に影響されなかった。また、暗黒条件でもアントシアニン含量が増加する可能性も考えられた。エドヒガンは‘ソメイヨシノ’と類似した光誘導アントシアニン生合成機構を持つと考えられた。したがって、‘ソメイヨシノ’の着色機構はエドヒガンの形質に大きく影響されていると考えられた。

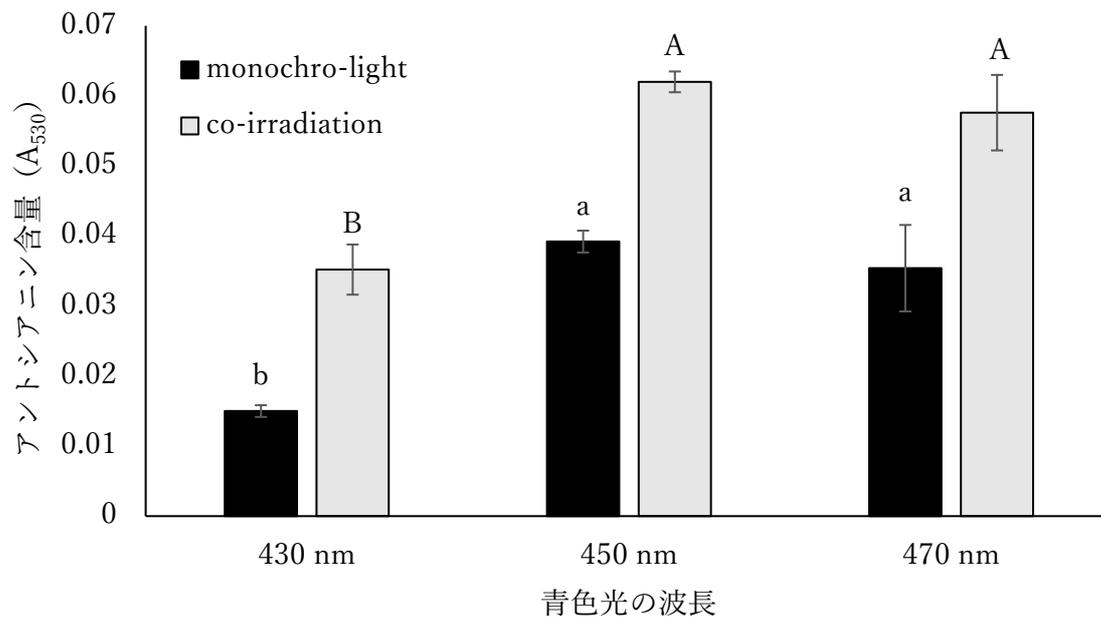


図 1-3-1.異なる波長の青色光および 660 nm の赤色光の照射によるエドヒガンのアントシアニン含量 (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE, n = 5). 異なる英文字は有意差を示す (Tukey's test, P < 0.05)

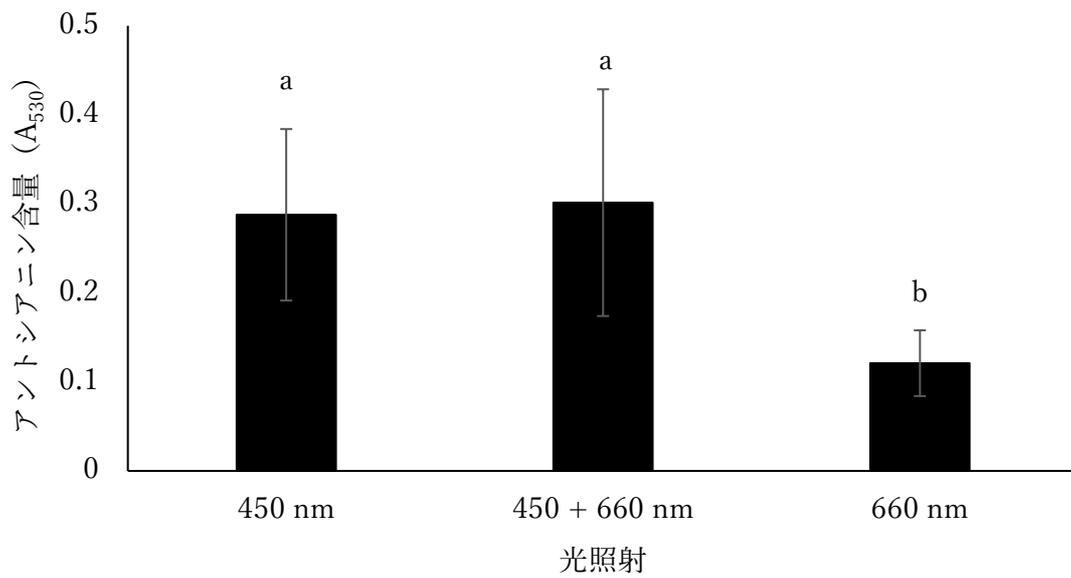


図 1-3-2. 450 nm の青色光および 660 nm の赤色光の照射によるオオシマザクラのアントシアニン含量 (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE, n = 5). 異なる英文字は有意差を示す (Tukey's test, P < 0.05)

## 第二章 ‘ソメイヨシノ’の着色と開花段階に関する研究

### 第一節 ‘ソメイヨシノ’の着色と光照射時期

#### 緒言

大きくて淡いピンク色の花で知られる‘ソメイヨシノ’は、日本では最も人気のあるサクラであり、世界中でもよく知られている。花のピンク色はアントシアニンの蓄積によって引き起こされる。アントシアニンは通常、光の照射を必要とし、低温によって促進される。‘ソメイヨシノ’の光照射による着色過程では、青色と赤色の光が大きく影響していることを前章で示した。アントシアニンの蓄積には光照射が不可欠であることを考えると、開花過程のさまざまなステージでアントシアニンの蓄積に対する光の反応がどの程度異なるのかを調べる必要がある。

花が光刺激を最も受け入れやすい花の成長ステージは十分に研究されていないが、開花にともなうアントシアニンの蓄積はよく研究されている。劇的なアントシアニンの蓄積は通常、花弁が展開し始める前に起こると考えられる。たとえば、バラの花 (Schmitzer ら、2009) やナス科の花 (Vaknin ら、2005) では、蕾から花弁が展開し始める時期に大量のアントシアニンが蓄積されている。一方、*Nicotiana × mutabilis* (Macnish ら、2010) では、老化中の花にのみにアントシアニンの蓄積が発生する。ペチュニアでは (Frerrante ら、2006)、花芽の膨らむ (蕾) 時と花の老化時に大量のアントシアニンを蓄積する。前川ら (1982) は‘ソメイヨシノ’の開花過程全体にわたるアントシアニン蓄積の変化を調べ、アントシアニン含量は開花前と老化の二つの時期に増加することを報告した。しかし、‘ソメイヨシノ’の花にアントシアニンが蓄積する際の光応答と開花ステージと

の関係はまだ研究されておらず、他の花についても研究されていない。

本研究の目的は、‘ソメイヨシノ’の光照射と開花過程のさまざまなステージとの関係を確立することである。したがって、花の発達は5つのステージに分けられた：1. 芽の膨らみ始め、2. 花弁の出現（蕾）、3. 花弁の展開、4. 満開、5. 老化（図 2-1-1）。光応答とアントシアニン蓄積に対する応答について、これらの5つのステージで光照射を行い、測定した。

### 材料および方法

サクラは弘前大学の学内圃場に栽植されている‘ソメイヨシノ’から枝を随時採取して実験に用いた。

#### 1. 樹上での‘ソメイヨシノ’の着色変化

2018と2020年4月、樹上の‘ソメイヨシノ’花弁のアントシアニン含量の変化を測定した。また、萌芽後から花を採取し、花の重さを測定した。

#### 2. 袋掛けによる‘ソメイヨシノ’の着色

袋掛けによる影響について2018と2020年、弘前大学学内の樹を使用して調査した。2018年には、個々の花序への袋掛けの影響を調査した。袋掛けは4月9日から始め、4月23日まで隔日で行った。その後、満開と考えられた4月25日にすべての袋を取り外した。本節では、リンゴの袋掛けに使用される2重袋を使用した。各花のアントシアニン含量は25日に測定した。2020年は、2018年に使用した同じ樹を使用し、異なるステージに事前に掛けた袋を外すことにより露光の影響を調査した。使用したすべての花序は3月25日に袋を掛け、4月の異なる日にはずした。アントシアニン含量は、袋をはずした日に測定し、その後も継続的に測定した。

### 3. LED 照射時期が ‘ソメイヨシノ’ 切り枝の着色に及ぼす影響

2020 年、3 月 18 日に弘前公園緑地課から譲り受けた ‘ソメイヨシノ’ の枝を用いて行った。枝はすぐに 2℃の冷蔵庫に保湿条件で貯蔵した。その後、実験中に枝を取り出し、12.5℃の暗所で水挿しした。光照射に必要な時間を把握するために、満開の短枝を用いて LED 光を 1～5 日間照射した。すべての枝のアントシアニン含量は 5 日目に測定した。照射期間を把握するために、枝を用いた別の実験を行った。枝を同じ条件下で水挿しし、5 つの開花ステージ（図 2-1-1）のそれぞれの枝に LED を 2 日間照射した後、暗所に戻した。本節では、青色 LED（450 nm）と赤色 LED（630 nm）を照射に使用した。

アントシアニンの測定：アントシアニンは 1 サンプルごとに花卉 5 枚を試験官に入れ、0.1%塩酸メタノール 5 mL を入れて一晩抽出した。抽出液は分光光度計を用いて 530 nm の吸光度を測定した。各照射で 5 処理を測定し、平均を求めた。

## 結果

### 樹上での ‘ソメイヨシノ’ の着色変化

弘前における、‘ソメイヨシノ’ の花芽は通常 4 月上旬に発育し、4 月 20 日前後から開花を始め、4 月 25 日前後には満開になる。測定を行った 2018、2020 の両年において、アントシアニンの蓄積は開花前のステージ 2 に増加し、その後減少した（図 2-1-2）。2020 年には、各花のアントシアニン蓄積がステージ 1 の 11 日から 13 日に大きく増加した。開花中（ステージ 3）にはアントシアニン含量の減少が観察された（図 2-1-2）。花重量

はステージ 3 の 21 日から 23 日に大きく増加し（図 2-1-3）、アントシアニン濃度は 21 日から減少した。

#### 袋掛けの時期が‘ソメイヨシノ’の着色に及ぼす影響

2018 年、アントシアニン蓄積への光照射の影響が最も大きいステージを確認するために、‘ソメイヨシノ’の花を 2 週間にわたって 1 日おきに袋掛けを行った。4 月 13 日より前に袋掛けをした花では、アントシアニン含量は 13 日以降に袋掛けをした花に比べて有意に低かった（図 2-1-4）。この期間中、蕾が形成され始めていた（図 2-1-1、A）。13 日から 25 日まで袋掛けした花では、アントシアニン含量には有意差は認められなかった。さらに、17 日以降に袋掛けをした花のアントシアニン含量は、25 日に測定した場合の袋掛け前に比べ、アントシアニン含量が低かった。

露光実験では、4 月 1 日に袋を外した花は、袋掛けをしていない花と比較して、アントシアニン含量に違いが観察されなかった（図 2-1-5）。6 日または 10 日で袋を取り外した花では、袋掛けをした花と比較した場合、より高いレベルのアントシアニン蓄積がみられた。20 日に袋を取り外した花では、アントシアニン含量は袋を取り外した後の増加がみられなかったが、25 日に袋を取り外した花では、その後にアントシアニン含量が増加した。

#### LED 照射時期が‘ソメイヨシノ’切り枝の着色に及ぼす影響

LED による照射では、最初に、どれだけの照射時間が必要なのかを確認するために、開花した短枝を用いて青色と赤色の LED を照射した（図 2-1-6）。照射の最初の 3 日間、アントシアニンの蓄積が増加した。しかし、

3日目以降、有意な増加は認められなかった。このことから、アントシアニン生合成の誘導には2日間の照射で十分であることがわかった。最も多い光誘導アントシアニンが蓄積するステージを決定するために、開花の5つのステージに、それぞれの枝(図2-1-7)に2日間の照射を行った。5つのステージの中で、最も多いアントシアニン蓄積が観察されたのはステージ1だった。アントシアニン含量は、この2日間の照射で急速に増加し、暗い環境に移された後も増加し続けた。最も低いアントシアニン含量は、ステージ3(花卉の展開)の花で観察された。ステージ5(老化)の間にも、アントシアニン含量は2日間の照射後に急速に増加した。

#### 考察

樹上のサクラでは両年ともに萌芽した蕾の状態ではアントシアニン含量が最も多く、開花とともに減少した。この結果は前川ら(前川ら、1982)の報告と一致した。また、本節では、光が‘ソメイヨシノ’の花のアントシアニン蓄積に対する反応は、開花の5つのステージ: 1. 芽の膨らみ始め, 2. 花卉の出現(蕾), 3. 花卉の展開, 4. 満開, 5. 老化で、開花のステージによって異なることが示された。ステージ1および2で袋掛けされた花では、アントシアニン含量は袋掛けされていない花に比べ、有意に低かったが(図2-1-4)、ステージ3および4では、袋掛けによってアントシアニン含量に有意な変化は生じなかった。さらに、このステージ1および2で太陽光にさらされた花は、アントシアニン含量の増加を示したが、ステージ3では、太陽光への露出によるアントシアニン含量の増加は観察されなかった(図2-1-5)。さらに、ステージ1と2では、LED照射によりステージ3と4に比べ、より高いアントシアニン含量がみられた。特に、ステージ1でLED照射されたものは、より高いアントシアニ

ン含量が観察された(図 2-1-7)。これらは、‘ソメイヨシノ’の開花の時、ステージ 1 と 2 での光照射が花の着色に最も効果的で不可欠であることを示す。*Matthiola incana* R.Br. 花ではアントシアニン蓄積と CHS (カルコンシンターゼ) などの酵素活性との関係が報告されている (Dangelmayr ら、1983)。アントシアニン生合成に関わる 5 つの酵素を調べたところ、開花を始める前から花弁ががく片の 2 倍の長さになる間に (本節でのステージ 1 からステージ 2 と見なされる) 最大酵素活性が見られた。これらの酵素は後のステージで開花とともに低下した。本節の結果は、初期ステージでの高い光応答がこれらの酵素の発現に関連している可能性があることを示している。

本節では、花弁の後のステージで展開中に袋掛けをした花では、アントシアニン含量の増加は認められなかった。LED による照射実験でも袋掛けと同様の傾向がみられ、アントシアニン含量はステージ 3 または 4 で LED 照射によってアントシアニン含量の増加は観察されなかった。この結果は、ステージ 3 と 4 での光応答性が低いことを示している。さらに、ステージ 3 で袋掛けされた花は、袋掛け前に比べ、満開後のアントシアニン含量が低くなった。この現象は、アントシアニン減少は光照射の影響を受けなかったことを示している (図 2-1-4)。多くの花で、ステージ 3 でアントシアニンが減少することが報告されているが、その理由は体系的に研究が進んでいない。しかし、アントシアニンが酵素の働きによって分解されたのが原因であると考えられる。

ステージ 5 の老化の段階では、光照射もアントシアニン含量が上昇した。*Nicotiana mutabilis* の花 (Macnish ら、2010) では、アントシアニンも老化中に増加した。ただし、カルコンシンターゼ (CHS) 酵素は初期

ステージで増加し、他の花種の場合と同様に減少した。老化中のアントシアニンの蓄積は、CHSではなく下流の遺伝子に関連している可能性があると考えられる。以上の本節で得られた結果によると、‘ソメイヨシノ’の光誘導アントシアニン蓄積過程では、開花が進むにつれて光に対する反応が低下し、その後、満開から老化へかけて増加する傾向が見られた。

アントシアニンは植物の光防護反応の産物であると考えられている。アントシアニンと光防護反応の関係は葉でよく研究が進んでいる。若い葉、および老化葉は、光阻害を受けやすいため (Steyn ら、2002)、葉のアントシアニンはこれらの初期ステージで蓄積される。たとえば、*Acmena acuminatissima* の葉では、アントシアニンが若い葉に蓄積し、光減衰剤として機能すると報告されている (Zhu ら、2018)。本研究で明らかにされた ‘ソメイヨシノ’ でのアントシアニンの蓄積が起こるステージは、葉でのアントシアニン蓄積と一致している。これは、開花 (ステージ 1 および 2) および老化 (ステージ 5) ステージの ‘ソメイヨシノ’ の花は光阻害を受けやすく、光刺激に対する応答性が高く、それに応じてアントシアニンを生合成することを示唆している。

結論として、アントシアニンの蓄積は、花芽が膨らみ始めるステージ (ステージ 1) から花弁の展開前 (ステージ 2) まで最も活発であり、より深いピンク色になる。したがって、長時間の照射は必要ではないが、この期間の光は ‘ソメイヨシノ’ の着色に不可欠である。花弁が展開を始めた後は (ステージ 3 および 4)、通常、外気温は上昇する。アントシアニン生合成は高温によって抑制されると言われているが、このステージで花の色が薄くなる現象は、温度とは関係なく、光に対する反応が低下しているためである。老化の間は、再び光応答が増加し、アントシアニン生合成が促

進される。これは、満開時と比較して、樹から落花した花卉の色が濃く見える理由だと考えられた。

### 摘要

本節では‘ソメイヨシノ’の花の発育段階における光によるアントシアニンの蓄積が最も高い時期を調査した。開花は5つのステージ：1. 芽の膨らみ始め、2. 花卉の出現（蕾）、3. 花卉の展開、4. 満開、5. 老化に分けて、それぞれの段階に袋掛けとLED照射を行い、アントシアニン含量を調査した。樹上での袋掛けおよび室内での切り枝への照射の結果、最も高い光応答性はステージ1と2で観察された。ステージ3と4では、光応答性が低かった。最後に、老化の間（ステージ5）、花卉の光応答は高かった。これらの結果から、‘ソメイヨシノ’の花の色は蕾ができる段階で決定され、この時期に花は最も光応答が高いことが明らかとなった。

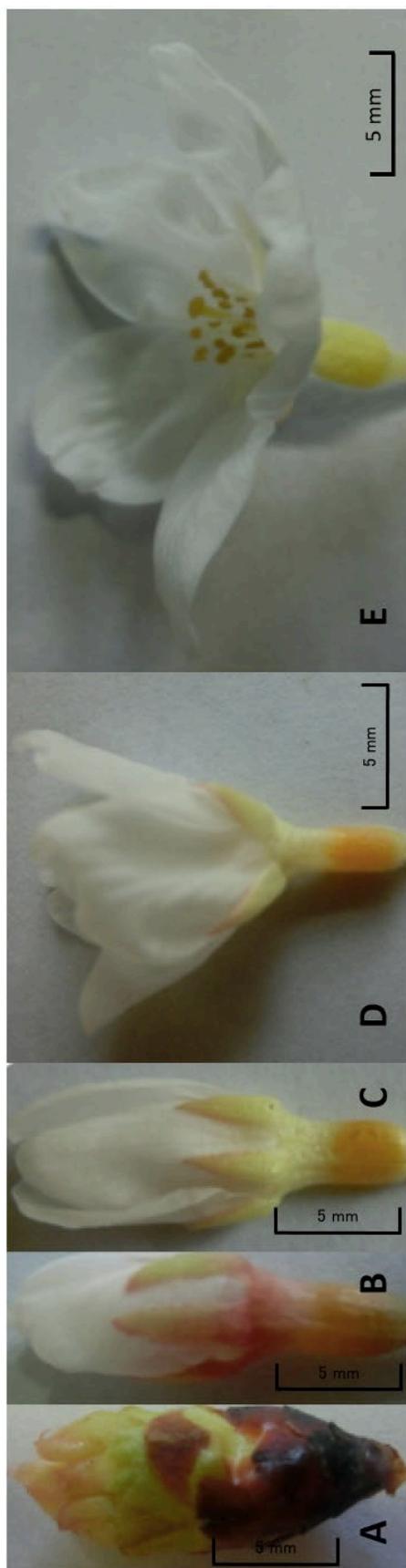


図2-1-1. 開花のステージ

ステージ1 (A) がく片で覆われたつぼみが始める、ステージ2 (B) 花弁が見える、ステージ3 (C

およびD) 花弁の展開、ステージ4 (E) 満開

スケールバーは5 mm を示す

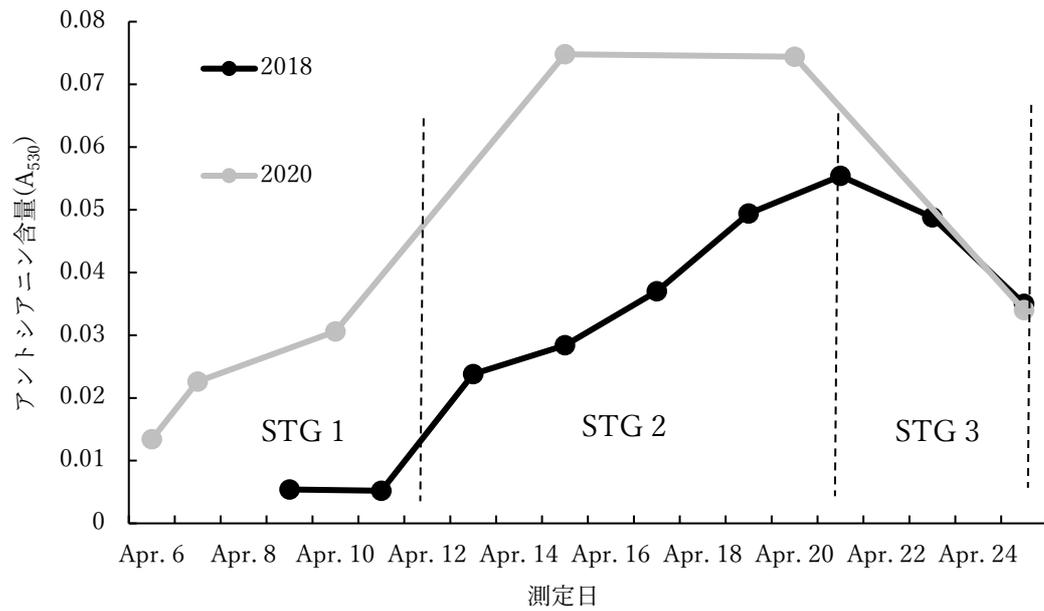


図 2-1-2. 樹上の‘ソメイヨシノ’のアントシアニン含量の推移

補助線は花芽の状態によって分けた異なるステージ (STG 1- ステージ 1、STG 2- ステージ 2、STG 3- ステージ 3) を示す。

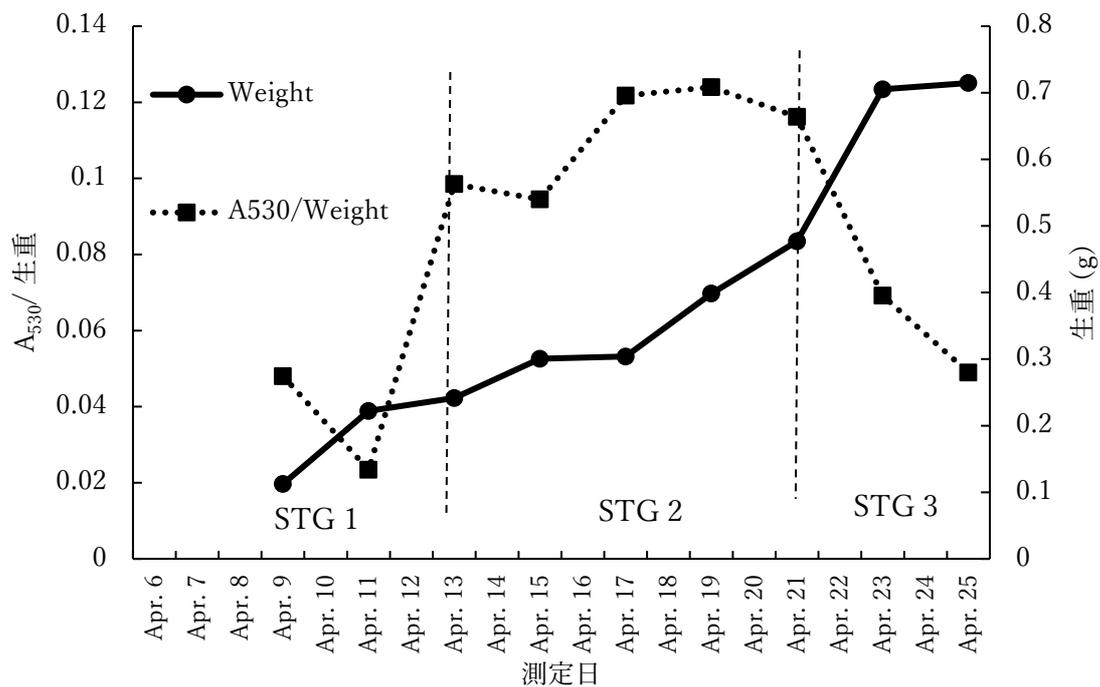


図 2-1-3. ‘ソメイヨシノ’花の重量および花弁のアントシアニン濃度の変化 (2018)。

アントシアニン濃度は、530 nm での吸光度を花の質量で割って計算した。

補助線は花芽の状態によって分けた異なるステージ (STG 1- ステージ 1、STG 2- ステージ 2、STG 3- ステージ 3) を示す。

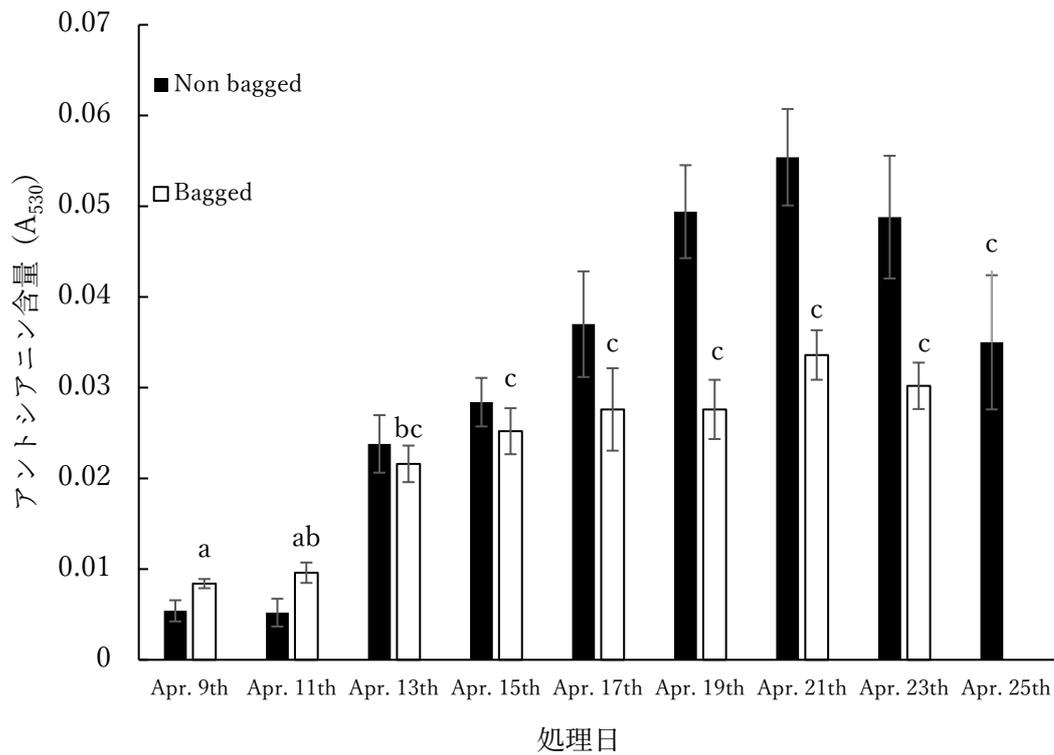


図 2-1-4. 樹上の花への袋掛けが‘ソメイヨシノ’のアントシアニン (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE) 蓄積に及ぼす影響。

白いバーは袋掛けの処理を表す。アントシアニン含量は4月25日に測定された。黒いバーは袋掛けをしていない処理を表す。アントシアニン含量は、袋を掛けた日に測定した。異なる英文字は、袋掛け処理間で統計的に有意な差があることを示す (Tukey's test、 $P < 0.05$ )。

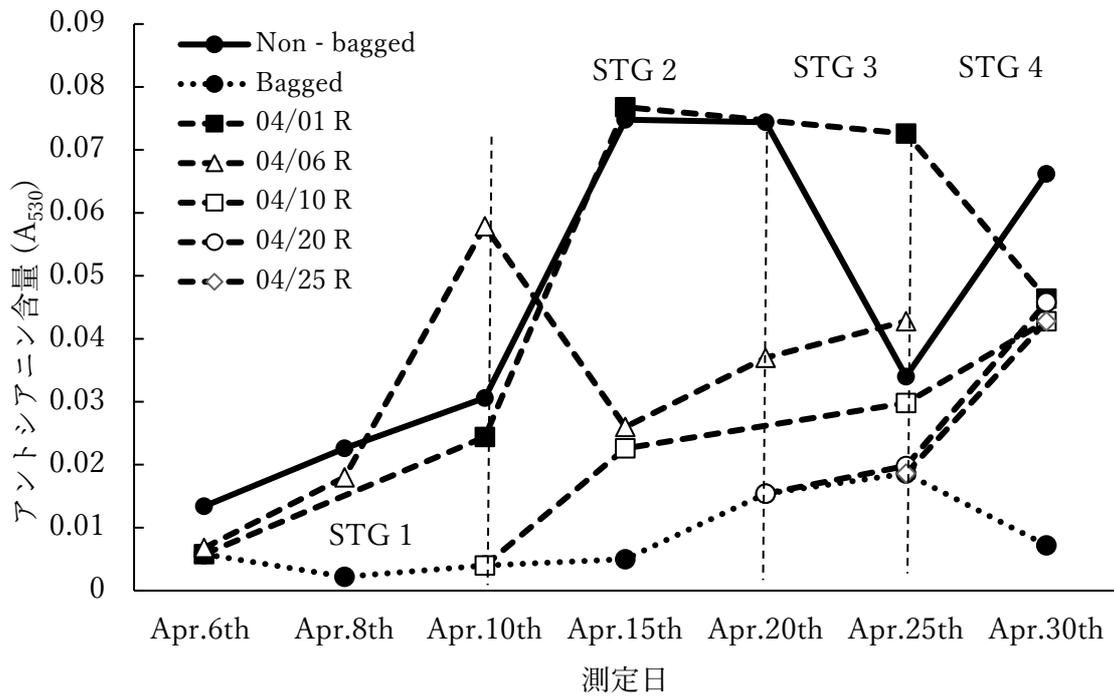


図 2-1-5. 暗条件からの露光が‘ソメイヨシノ’花のアントシアニン含量に及ぼす影響。

花は 3 月 25 日に袋掛けされ、それぞれ別の日に外された。各線は、異なる日に袋を外した処理を表す。(04/06 R - 4 月 6 日に袋を外した処理。04 / 10R - 4 月 10 日に袋を外した処理。04 / 20R - 4 月 6 日に袋を外した処理。04 / 20R - 6 日に袋を外した処理。4 月 25 日 R- 4 月 25 日に袋を外した処理。)。実線は袋掛けをしなかった花を表し、点線は実験中袋を掛けた処理を表す。補助線は花芽の状態によって分けた異なるステージ (STG 1 - ステージ 1、STG 2 - ステージ 2、STG 3 - ステージ 3、STG 4 - ステージ 4) を示す。

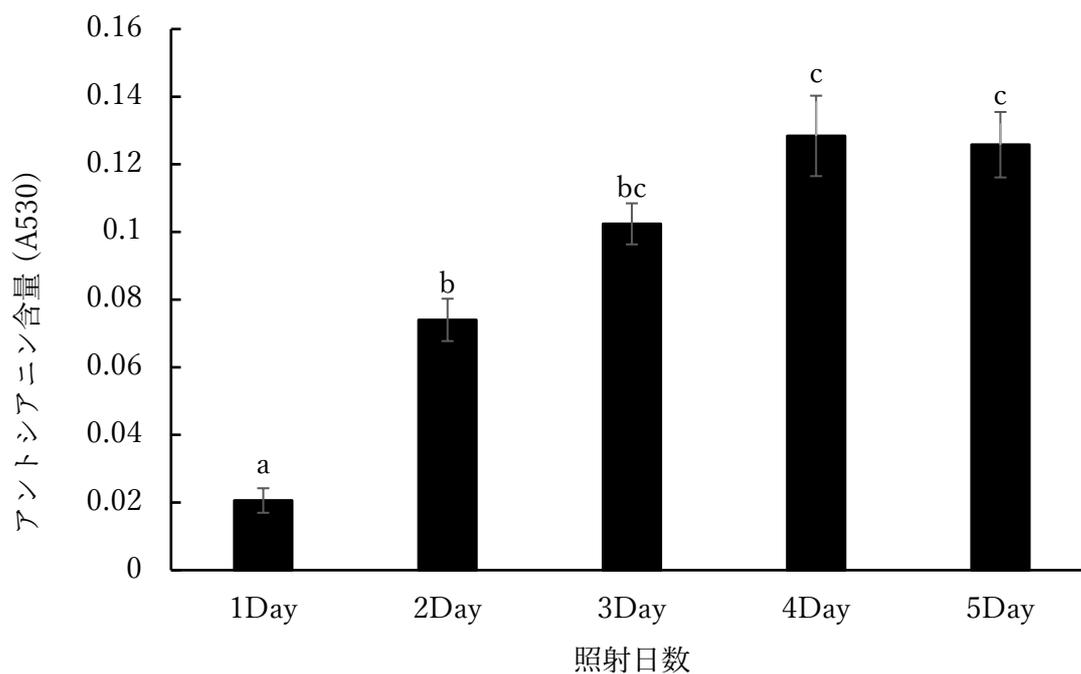


図 2-1-6. 照射時間が‘ソメイヨシノ’のアントシアニン含量 (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE) に及ぼす影響。

すべての処理で、アントシアニン含量は 5 日目に測定された。照射後を終えた切り枝は暗所で水挿しされた。異なる英文字は、統計的に有意な差があることを示す。(Tukey's test、 $P < 0.05$ )

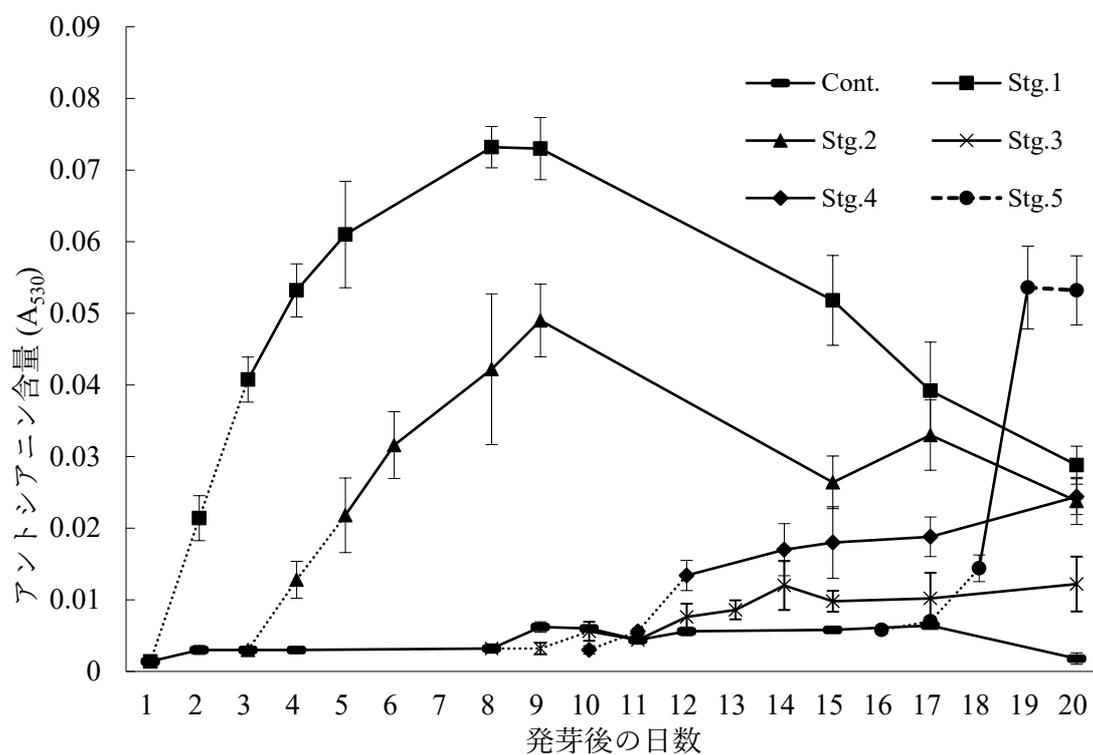


図 2-1-7. 異なる段階での LED 照射が‘ソメイヨシノ’切り枝の花のアントシアニン含量に及ぼす影響 (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE)。

各ステージにおいて、切り枝に 2 日間の照射を行った。光照射を行っていない時間は、暗所で水挿しした。点線は照射中を表し、実線は暗所で水挿しした時間を表す。対照区  
の切り枝には、光照射を行っていない。

## 第二節 ‘ソメイヨシノ’の照射時期とアントシアニン組成

### 緒言

アントシアニンはアントシアニジンを基本骨格として、様々な種類がある。その基本骨格であるアントシアニジンは、約 30 種類が発見されている (Kevin ら、2009)。一般的に、赤色はシアニジンを基本骨格としたアントシアニンとなっている。‘ソメイヨシノ’には、アントシアニンが 2 種類あり、それぞれシアニジン 3-ルチノシドとシアニジン 3-グルコシドであることが報告されている (斎藤ら、1991)。前節の研究では異なるステージによる光照射がアントシアニン蓄積への影響が異なることを報告した。しかし、先の研究では、アントシアニン総含量を調査し、個々のアントシアニンの変化に関しては調べられていない。花芽から開花までのステージが進むにつれて、花での生理反応には違いがあると考えられる。そのため、アントシアニン組成にも変化があることが考えられる。本節では、異なる時期に LED による光照射を行った ‘ソメイヨシノ’ 花卉におけるアントシアニン組成の変化の有無を調査した。

### 材料および方法

植物材料：3月18日に弘前公園緑地課から譲り受けた‘ソメイヨシノ’の枝を用いて行った。枝はすぐに2℃の冷蔵庫に保湿で貯蔵した。その後、実験中に枝を取り出し、12.5℃の暗所で水挿しした。切り枝は、5つの開花ステージ (図1) のそれぞれの枝にLEDを2日間照射した後、暗所に戻した。この調査では、青色LEDライト (450 nm) と赤色LEDライト (630 nm) を照射に使用した。花卉は各段階の異なる日に切り枝から採取され、-83℃で保存し、その後 Tatzawa ら (1996) の方法で高速液体クロマトグ

ラフィー（HPLC）により測定した。

HPLC 測定：アントシアニンの抽出には 5% 酢酸溶液を使用し、花卉の質量に応じて容量を計算し、すべてのサンプルを 0.1 g /  $\mu$ L に調整した。抽出物を遠心分離し、フィルター（ADVANTEC、0.50  $\mu$ m）でろ過してから、HPLC で測定した。HPLC は LC - 20 AD（島津製作所株式会社）システムで行われた。カラムには Waters C18（4.6 直径  $\times$  250 mm）が使用され、流速は 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> に設定した。アントシアニンは 530 nm でモニターされた。使用した溶媒システムは次のようにした：溶媒 A（H<sub>2</sub>O 中 1.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>）中の溶媒 B（1.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、20% HOAc、H<sub>2</sub>O 中 25% MeCN）を用い、B 溶液が 40 分で 25～85% となる直線的勾配で溶出した。

## 結果

本節での HPLC 分析で（図 2-2-1 から図 2-2-7）は、530 nm での吸光度をみると、3 つのピークが検出された。これらのピーク 1（19.3 min）とピーク 3（20.9 min）はシンビジウムのピークと一致した。シンビジウムでこの 2 つのピークはそれぞれシアニジン 3-グルコシドとシアニジン 3-ルチノシドであることが報告されている（Tatsuzawa ら、1996）。さらに 20.2 min でもう 1 つのピークが検出されたが、本節では同定することができなかった。さらに、自然のサクラの花弁では、シアニジン 3-グルコシドが約 25% でシアニジン 3-ルチノシドが 70% を占める。上述での実験 4 でのサンプルを用いて HPLC 測定をした結果（図 2-2-1～図 2-2-7）、シアニジン 3-グルコシドとシアニジン 3-ルチノシドの推移は同じ傾向を示した（図 2-2-8）。両方ともに最初のステージ 1、ステージ 2 およびステージ 5 での照射により、著しい増加がみられた。しかし、アントシアニンの組

成を見るとステージ 1 とステージ 2 での LED 照射により、シアニジン 3-グルコシドは 35%、シアニジン 3-ルチノシドが 60%となった。一方、ステージ 3、4、5 での LED 照射では、シアニジン 3-グルコシドが 20%前後で、シアニジン 3-ルチノシドが 70%となった。

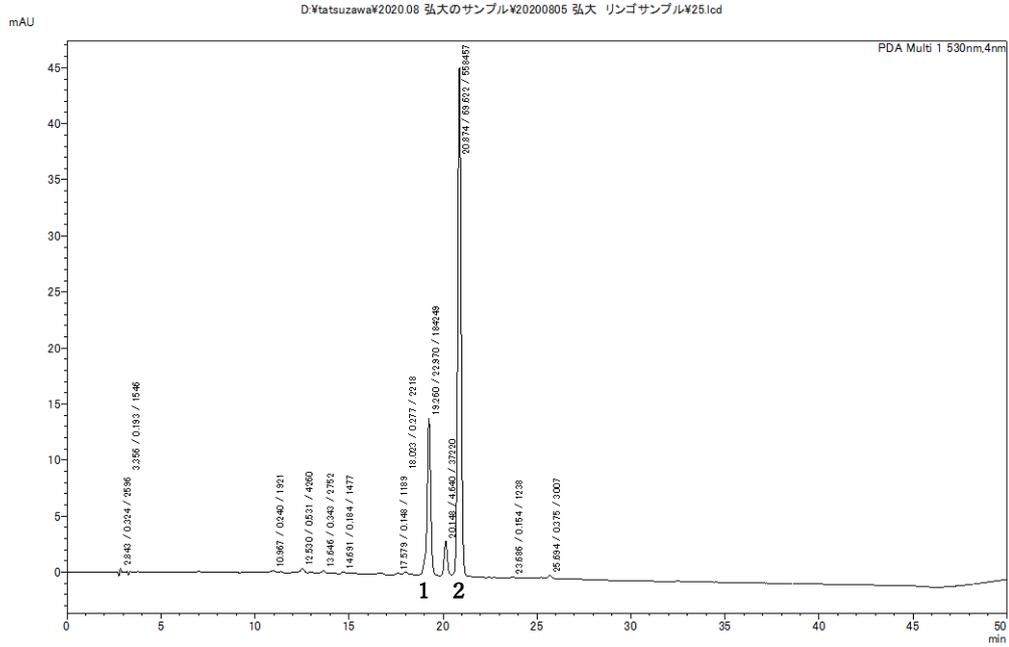
### 考察

本節での HPLC 分析結果により、各段階での LED 照射は、アントシアニン組成への変化をもたらした可能性があることが示された。シアニジン 3-グルコシドとシアニジン 3-ルチノシド、両方ともステージ 1 とステージ 2 での照射により大量に増加したが、シアニジン 3-グルコシドの割合が自然の花弁に比べ増加した。同じく LED 照射によりアントシアニンが大量に増加したステージ 5 ではステージ 1、2 と異なり、アントシアニン組成への変化がなかった。これらのことは、早い段階での光照射は、シアニジン 3-グルコシド生合成に関わる代謝が刺激されることを示す。さらに、本節では、‘ソメイヨシノ’で、シアニジン 3-グルコシドとシアニジン 3-ルチノシド以外のアントシアニンが検出されたが、今まで報告されていないため、特定することができなかった。今後の研究で、さらなる分析を通して、このアントシアニンの詳細を調査する必要がある。

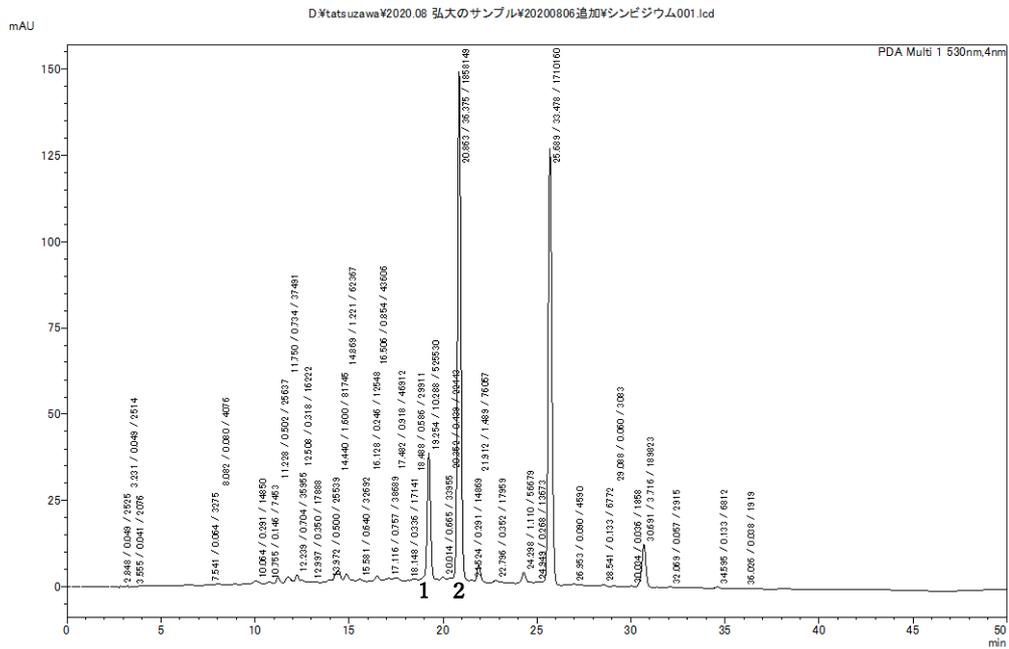
### 摘要

‘ソメイヨシノ’には 2 種類のアントシアニンが存在することが報告されているが、開花時における花の発達段階でアントシアニンの組成が異なることが考えられる。本節では、花の発達段階で LED 照射によって蓄積するアントシアニン組成の違いの有無を調査した。各ステージにおいて、2 日間の LED 照射により、シアニジン 3-グルコシドとシアニジン 3-ルチノ

シドの推移は同じ傾向が観察された。しかし、ステージ 1 と 2 では、他のステージで LED 照射した場合に比べ、シアニン 3-グルコシドのアントシアニン総含量に占める割合が増加した。これらの結果から、花の発達段階によって照射により誘導されるアントシアニン代謝が異なることが示唆された。



A

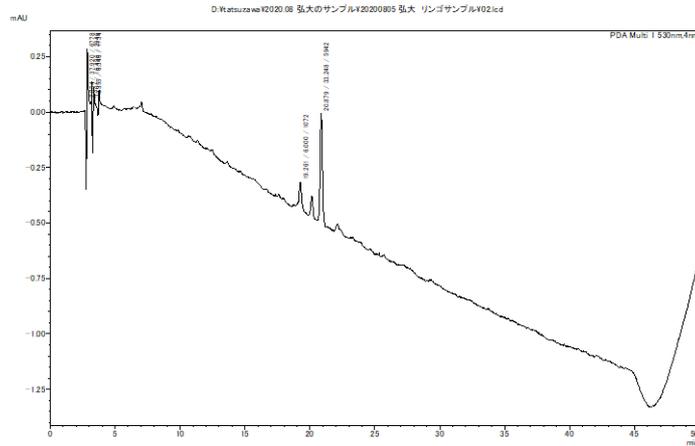


B

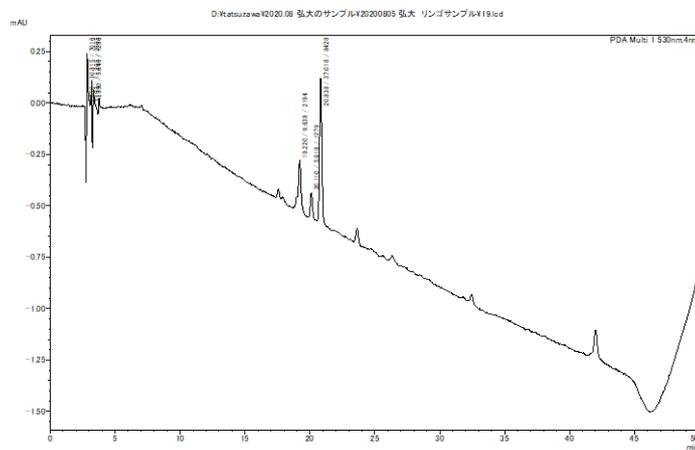
図 2-2-1. ‘ソメイヨシノ’ のアントシアニン組成

A. 樹上での ‘ソメイヨシノ’、B. シンビジウム

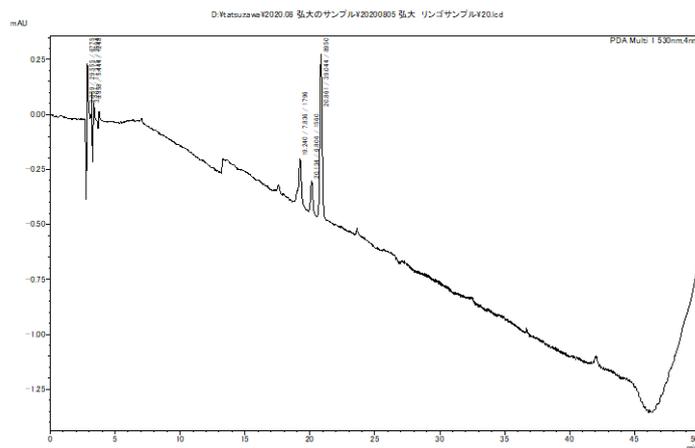
ピーク 1 はシアニジン 3-グルコシド、ピーク 2 はシアニジン 3-ルチノシドを示す



A



B



C

図 2-2-2. 光照射を行っていない切り枝の‘ソメイヨシノ’のアントシアニン組成。  
A 発芽後 2 日目、B 発芽後 10 日目、C 発芽後 15 日目

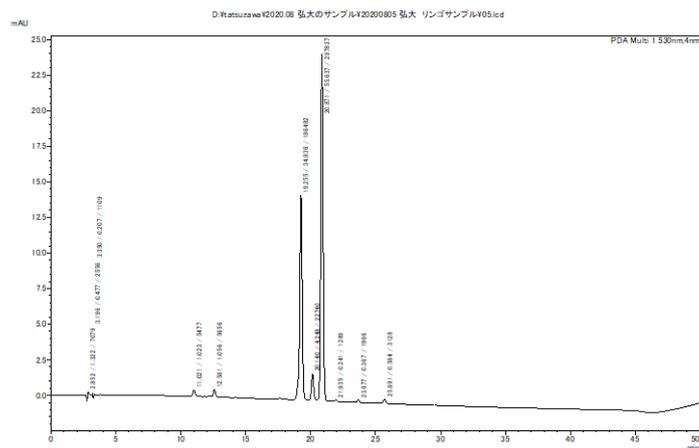
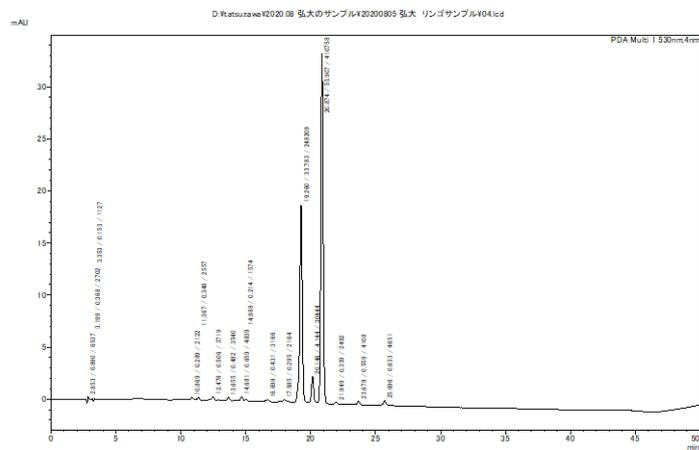
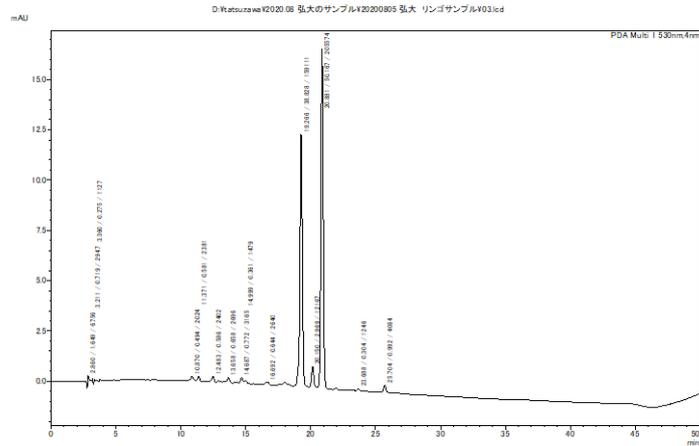
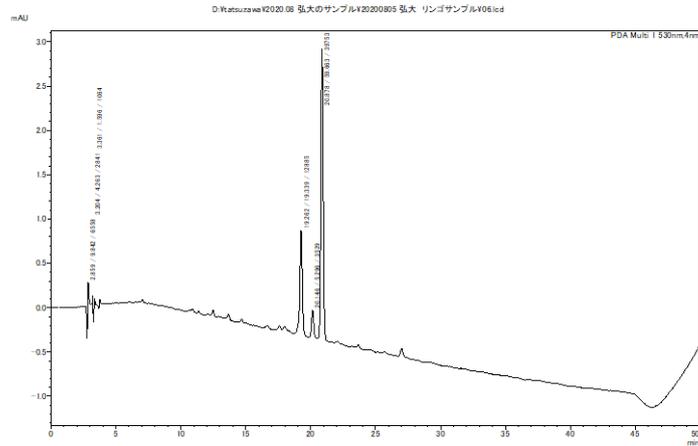
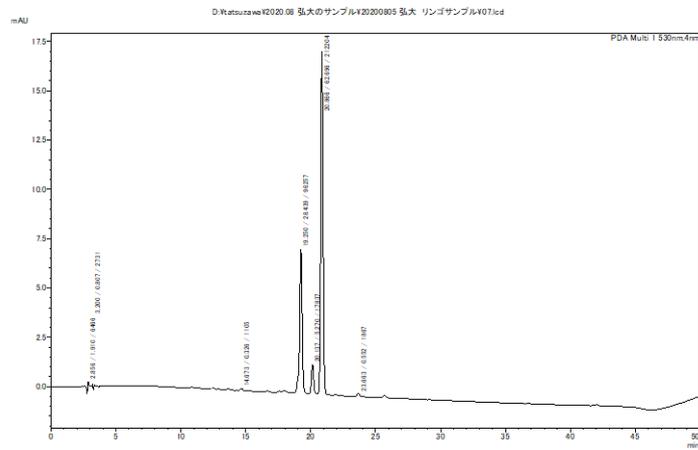


図 2-2-3. ステージ 1 で 2 日間光照射を行った ‘ソメイヨシノ’ のアントシアニン組成。

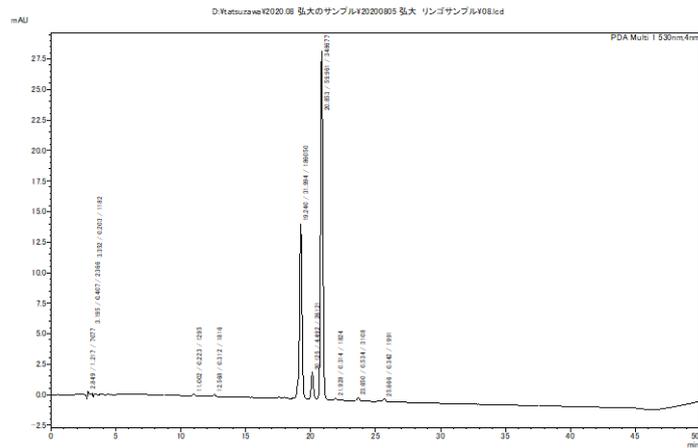
A 発芽後 2 日目、B 発芽後 4 日目、C 発芽後 15 日目



A



B

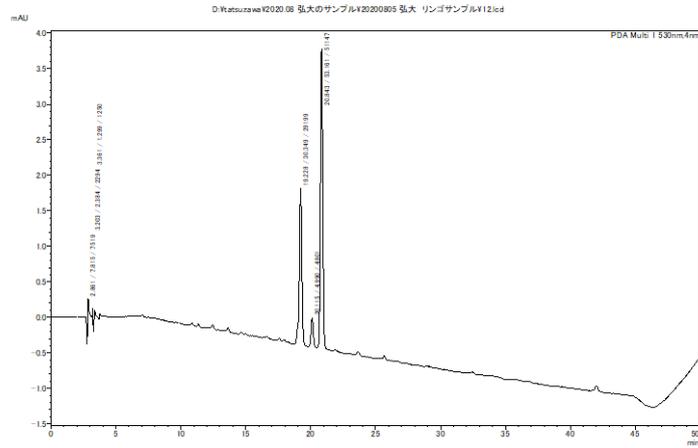


C

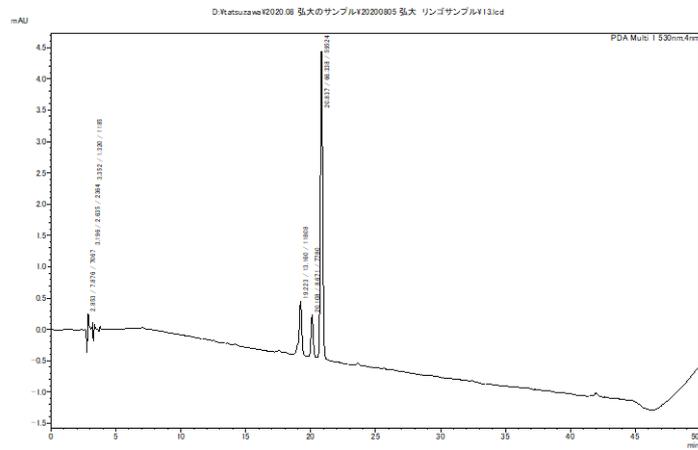
図 2-2-4. ステージ 2 で 2 日間光照射を行った ‘ソメイヨシノ’ のアントシアニン組成。

A. LED 照射後 2 日目、B. LED 照射後 4 日目、C. LED 照射後 13 日目

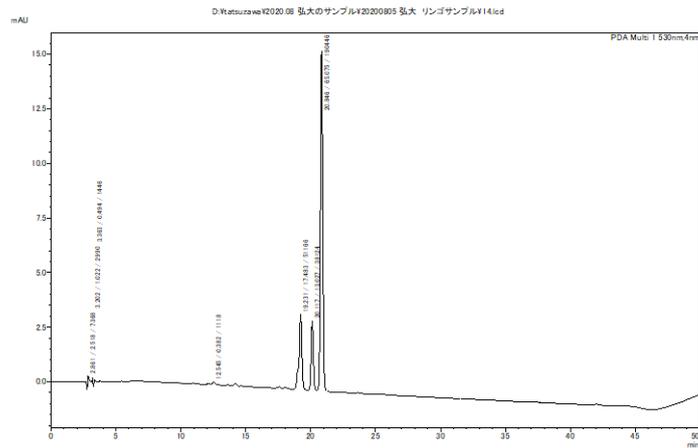




A



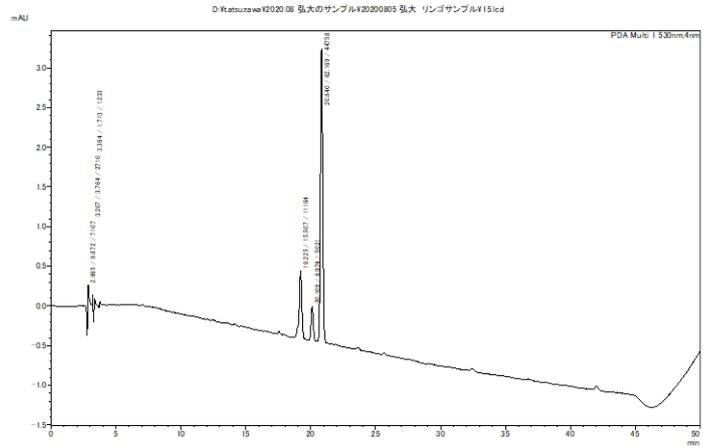
B



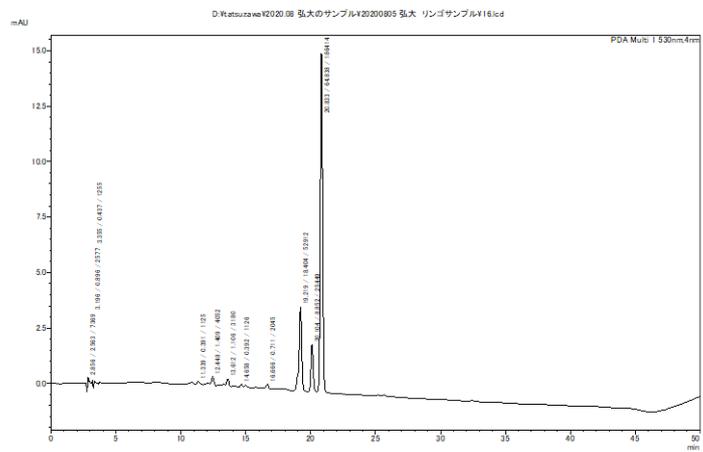
C

図 2-2-6. ステージ 4 で 2 日間光照射を行った ‘ソメイヨシノ’ のアントシアニン組成。

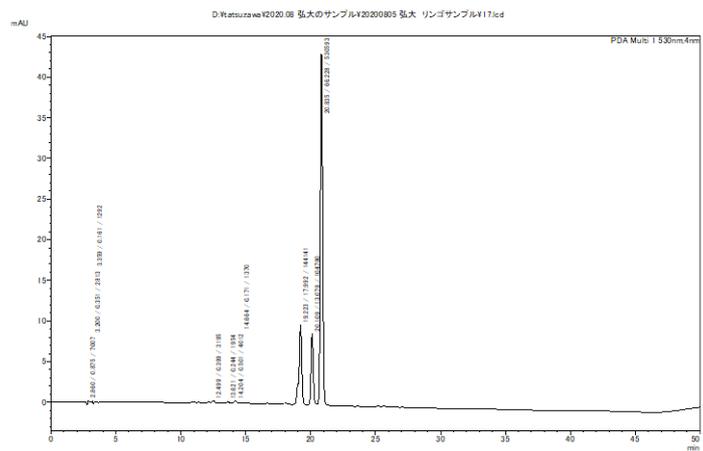
A. LED 照射後 2 日目、B. LED 照射後 4 日目、C. LED 照射後 8 日目



A



B



C

図 2-2-7. ステージ 5 日間照射を行った ‘ソメイヨシノ’ のアントシアニン組成。  
A. LED 照射後 2 日目、B. LED 照射後 3 日目、C. LED 照射後 4 日目

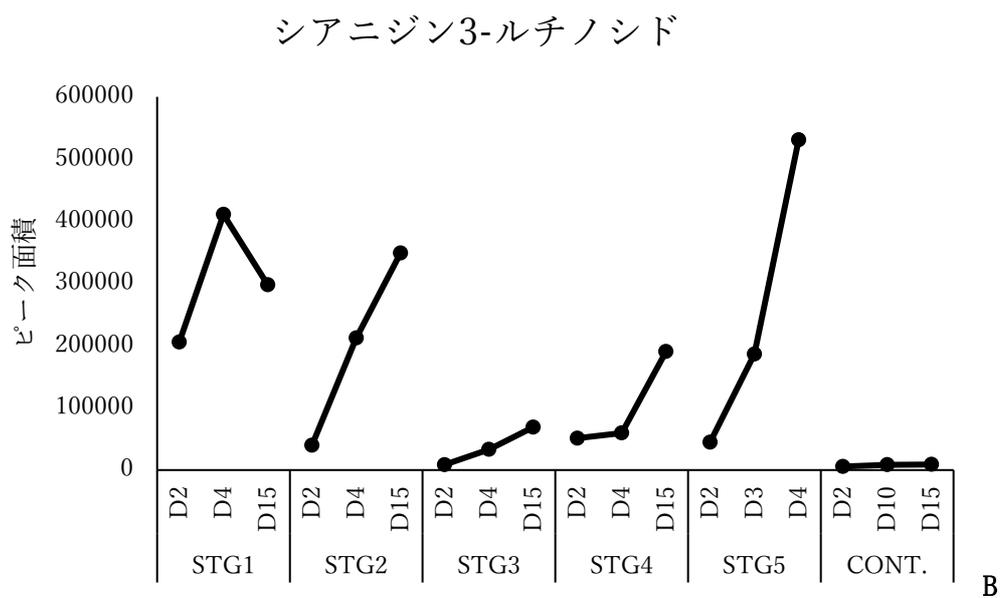
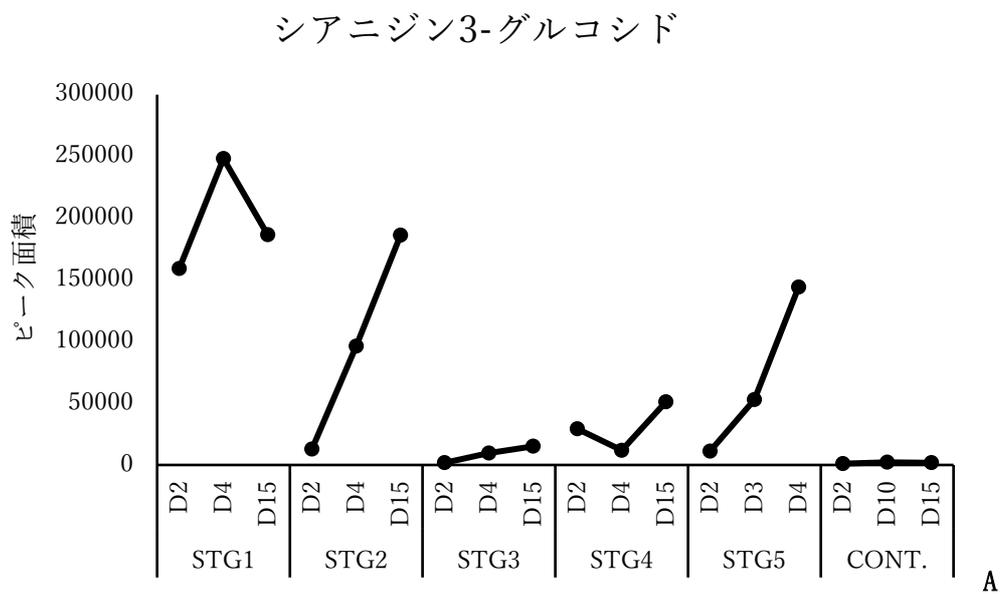


図 2-2-8. 各ステージでの光照射による‘ソメイヨシノ’の A: シアニジン 3-グルコシドおよび B: シアニジン 3-ルチノシドの推移

横軸は照射してからの日数を表し、2 日間の STG1-5 は LED 照射を行った異なる時期を表す

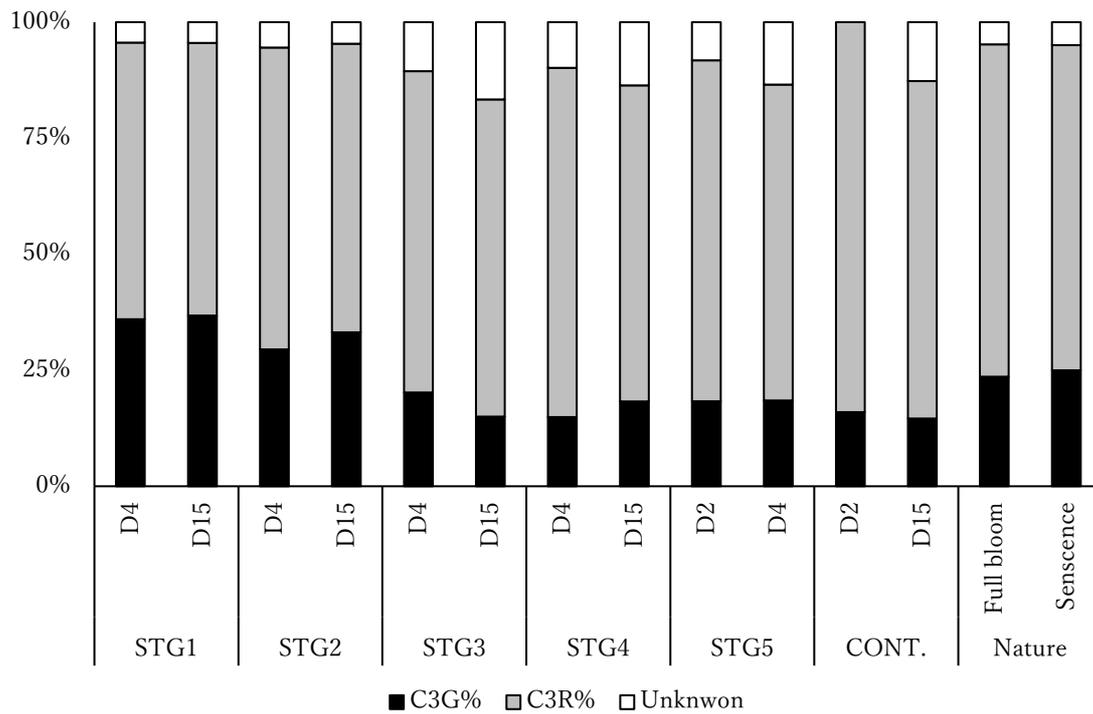


図 2-2-9. 各ステージでの光照射による‘ソメイヨシノ’のアントシアニン組成の変化

横軸は照射してからの日数を表し、STG1-5 は 2 日間の LED 照射を行った異なる時期を表す

### 第三章 ‘ソメイヨシノ’の着色と形質を改善する処理方法に

#### 関する研究

#### 第一節 糖類および温度が ‘ソメイヨシノ’の花弁の着色に及ぼす影響

##### 緒言

アントシアニン生合成には多くの要因が影響することが知られている。その中でも光と温度の影響は最も重要であるといわれている。一般的に、アントシアニン生合成は低温により促進され、高温により抑制される。前章の研究で、‘ソメイヨシノ’の切り枝を使用した場合、17.5℃の温度が最も適している結果を得た。しかし、これらの結果は切り枝の開花にも影響していると考えられるため、着色に最も適している温度は不明である。本節では、開花した‘ソメイヨシノ’の花弁のみを用いて、着色に最も適している温度を調査した。

糖類はアントシアニン生合成を促進するといわれており、その中でも、スクロースによるアントシアニン生合成の促進に関する研究が多い。アントシアニン生合成経路を見ると、最初に関わる酵素がフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) でフェニルアラニンからケイ皮酸がつくられ、アントシアニン生合成に関わる二次代謝に入る。フェニルアラニンは、糖類が、解糖経路、ペントースリン酸経路、シキミ酸経路によって作られる (Michel ら、2019)。これらのことから、糖類はアントシアニン生合成の基質になるとも考えられるが、一般的には、糖類はシグナル伝達の働きをされると考えられる。シロイヌナズナでは、スクロースはシグナル伝達働きをし、フラボノイド経路全体の酵素遺伝子の

発現量が増加したことが報告されている (Cinzia ら、2006)。アントシアニン生合成は植物が環境ストレスに応じる現象であると言われている (Linda、1999)。その中で、糖類の添加は浸透圧ストレスを起こし、アントシアニン生合成を促進するとの見解が多い (Chi・Francois、1990; Linda、1999 ; Tholakalabavi ら、1994)。

近年、サクラの切り枝を用いて室内で開花させ、観賞用として使用することがある。しかし、切り枝による開花では、品質が良い‘啓翁桜’など比べ、‘ソメイヨシノ’は切り枝を用いて開花させた場合、白い花となる。‘ソメイヨシノ’の着色には青色光が必要であるが、強い青色光を使用する場合、人の目に悪影響をもたらすため、実用に向いていないと考えられる。そのため、本節では光照射以外の糖類の刺激および温度がアントシアニン生合成に及ぼす影響について調査し、花の品質を高める可能性について検討した。切り枝による花卉の品質の影響を低減するため、本節では、切り枝により開花した花から花卉のみを採取して行った。

## 材料および方法

### 糖類が‘ソメイヨシノ’花卉の着色に及ぼす影響

実験 1 : 室内で開花させた切り枝から、花卉を採取して実験に使用した。採取した花卉を、処理に使う以下に示す溶液とともにビニル袋に入れ、密閉して実験を行った。ビニル袋は 17.5℃に設定した恒温器に入れ、LED を用いて照射を行った。処理には、5%のフルクトース、グルコース、ソルビトール、スクロース溶液を使用した。対照として蒸留水を使用した。LED 照射は 6 日間行い、その後アントシアニン含量を測定した。

実験 2: 室内で開花させた切り枝から、花卉を採取して実験に使用した。

採取された花卉は、処理に使う以下に示す溶液とともにビニル袋入れ、密閉して実験を行った。ビニル袋は 17.5℃に設定した恒温器に入れ、LED を用いて照射、または暗処理を行った。処理には 0.5%と 5%のスクロース溶液を使用した。対照として蒸留水を使い、アントシアニン含量の測定は 6 日後に行った。

実験 3:室内で開花させた切り枝から、花卉を採取して実験に使用した。シャーレの上に以下の処理溶液に浸したろ紙を載せ、その上に採取した花卉を並べて蓋をした。シャーレは 17.5℃に設定した恒温器内で 450 nm と 660 nm の LED を用いて光照射を行った。処理溶液には、0%、0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0%のスクロース、グルコース、フルクトース溶液を使用した。アントシアニン含量の測定は照射してから 6 日目に行った。

#### *スクロースの散布が‘ソメイヨシノ’切り枝の着色に及ぼす影響*

糖類の花弁の着色への影響を確かめるため、切り枝に糖類を直接散布した。室内で開花させた枝から短枝をとり、17.5℃に設定した恒温機内で光照射を行った。光照射は 450 nm と 660 nm の LED を用いて行った。処理区には 5%のスクロース溶液を散布し、対照区には蒸留水を散布した。アントシアニン測定は照射してから 6 日目に行った。

#### *温度が‘ソメイヨシノ’花弁の着色に及ぼす影響*

室内で開花させた切り枝から花卉を採取して実験に使用した。サクラの切り枝を室内で咲かせ、満開後、老化した花卉を採取した。花卉はシャーレに並べ、乾燥しないように蓋を閉めて 17.5℃に設定した恒温器で照射を行った。照射には 450 nm と 660 nm の組み合わせで行い、温度はそれぞれ 10℃、12.5℃、15℃、17.5℃と 20℃に設定した。

## アントシアニンの測定

アントシアニンは1測定あたりに花弁5枚を試験管に入れ、0.1%塩酸メタノール5 mLを入れて一晩抽出した。抽出液は分光光度計を用いて530 nmの吸光度を測定した。各処理で5反復測定し、平均を求めた。

## 結果

### 糖類が‘ソメイヨシノ’花弁の着色に及ぼす影響

花弁を袋に入れて、実験を行った結果、4種類の糖類を含む溶液に浸した花弁は、対照区に比べてアントシアニン含量が高多くなった。その中でも、スクロースに浸した花弁は他の3種類の糖類に比べ、アントシアニン含量が有意に多かった(図3-1-1)。0.5%と5%のスクロースを用いて花弁にLED照射を行った結果、5%のスクロース溶液で最も多いアントシアニン含量が認められた(図3-1-2)。また、3つの処理ともに、LED照射をしていない場合、アントシアニン含量が少なかった。シャーレによる実験でもアントシアニン含量は3種類の糖類の処理により増加した。花弁のアントシアニン含量は、糖類の溶液の濃度が増加するにつれて増加した。フルクトースの場合、5%と10%の間では大きな差が認められなかった。また、シャーレによる調査では、フルクトースの処理によるアントシアニン含量が最も大幅に増加した。

### スクロースの散布が‘ソメイヨシノ’切り枝の着色に及ぼす影響

切り枝の花にスクロース溶液を散布した場合、アントシアニン含量は蒸留水を散布した切り枝に比べて増加した(図3-1-4)。これは青色光の単独照射および青色光と赤色光の組み合わせによる照射の両方で観察された。

さらに、スクロースの処理では、赤色光と青色光の同時照射で青色光のみの照射に比べ、アントシアニン含量が増加した。

#### 温度が‘ソメイヨシノ’花卉の着色に及ぼす影響

花卉のみの実験では、10℃から 20℃の間で、20℃での光照射が他の処理に比べアントシアニン含量は有意に高くなった。しかし、10℃から 17.5℃の間では 15℃でアントシアニン含量が最も高くなった。

### 考察

本節では、3種類の糖類：スクロース、グルコースおよびフルクトースの処理により、花卉のアントシアニン含量が増加した。これらの糖類は濃度が増加するとともに、アントシアニン生合成への促進効果は増加した。切り枝への直接散布により、花卉のアントシアニン含量が増加したので、切り枝の花の着色促進へ応用できる可能性が考えられた。しかし、本節では、実験方法によってどの糖類が最も効果的であるのかに関しては一致した結果を得ることができなかった。多くの研究ではスクロースがアントシアニン生合成を促進することが報告されている。ブドウの果実でスクロース処理によりアントシアニン含量が増加し、スクロース濃度が増加するにつれてアントシアニン含量が増加した(Andrew ら、1976、Assia Belhadj、2008)。スクロースの働きに関して、シロイヌナズナでは、スクロースはシグナル伝達として働き、フラボノイド生合成関連の酵素遺伝子の発現量が増加したことが報告されている(Cinzia ら、2006)。しかし、本節の結果と違い、シロイヌナズナでのこのスクロースによるアントシアニン生合成促進効果は、スクロース特有の作用であると考えられている。この結果は、本節で糖類 3種類がともに効果があった結果と異なる。一方、スクロ

ースは高濃度の溶液により植物細胞の浸透圧刺激を起こし、アントシアニン合成を促進するとする解釈も報告されている (Chi・Francois、1990 ; Linda、1999)。これらの効果は、グルコースやマンニトールなどの他の糖類によっても報告されている (Tholakalabavi ら、1994;Tholakalabavi ら、1997)。したがって、本節の結果での糖類によるアントシアニン促進効果は、花卉への浸透圧の変化により発生した可能性が高いと考えられた。

花卉のみを用いて温度の影響を検討した結果、最も高い 20℃でアントシアニン蓄積が大きかった。しかし、本節では、恒温器の温度を高く設定するにつれて、シャーレでの花卉の乾燥が観察された (データは示していない)。したがって、温度の影響に関して結論は示せないが、糖類との影響と同じく、高温による乾燥状態では、花卉の浸透圧刺激を誘発し、アントシアニン蓄積が促進された可能性が高いと考えられた。

本節での花卉を用いた実験により、光は処理を行った花卉に均一に照射されたと考えられる。本節では一致した結果を得られず、最も有効な糖類や温度を特定することができなかった。しかし、これらの結果から、浸透圧刺激により‘ソメイヨシノ’花卉のアントシアニンが増加する可能性が推察される。また、切り枝へのスクロースの散布により、アントシアニン含量が増加した。今後の研究で、最も効果的である糖類を発見し、開花のステージにおける散布時期の影響を調べる予定である。また、LED 照射における光強度との関係を調べることも必要であると考えられた。

## 摘要

アントシアニン生合成は光照射を必要とし、様々な要因に影響される。本節では、糖類および温度が‘ソメイヨシノ’に及ぼす影響を調査した。本節では、花卉の品質と LED 照射の条件をより均一にし、処理効果が現れやすいように花卉のみを採取して行った。3 種類の糖類：グルコース、フルクトース、スクロースの処理によりアントシアニン含量の増加が観察されたが、最も影響が大きい糖類に関しては、統一した結果を得ることができなかった。一方、本節では、20℃でアントシアニン含量が最も多かったが、処理により花卉の乾燥が観察された。したがって、本節での結果から、アントシアニン含量は浸透圧の変化による刺激が影響したことが示唆された。また、切り枝への糖類の散布によりアントシアニン含量が増加し、室内での水挿しへの応用が可能であると考えられた。

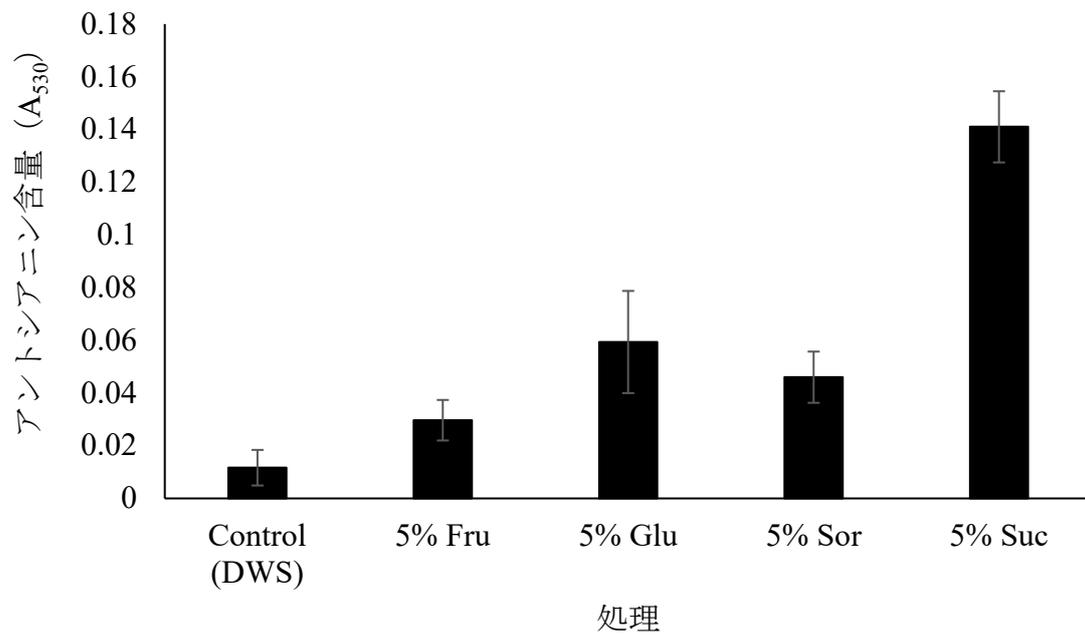


図 3-1-1. 異なる糖類 (Fru-フルクトース、Glu-グルコース、Sor-ソルビトール、Suc-スクロース) が‘ソメイヨシノ’花卉の光照射によるアントシアニン含量に及ぼす影響 (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE)

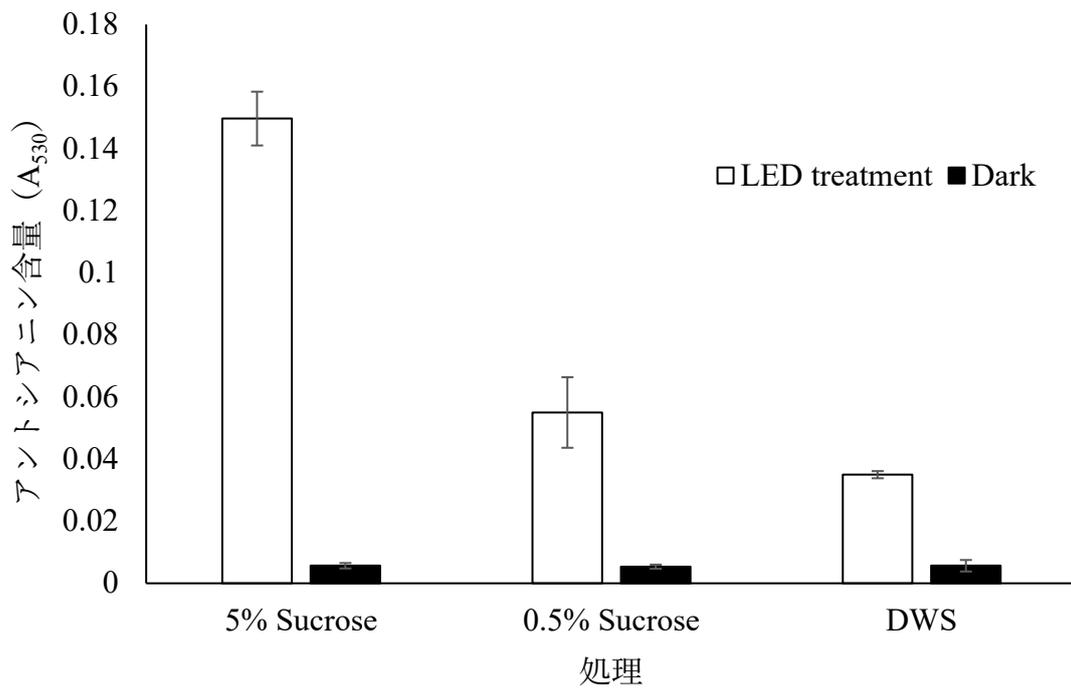


図 3-1-2. スクロース溶液が‘ソメイヨシノ’花卉の光照射によるアントシアニン含量に及ぼす影響 (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE)

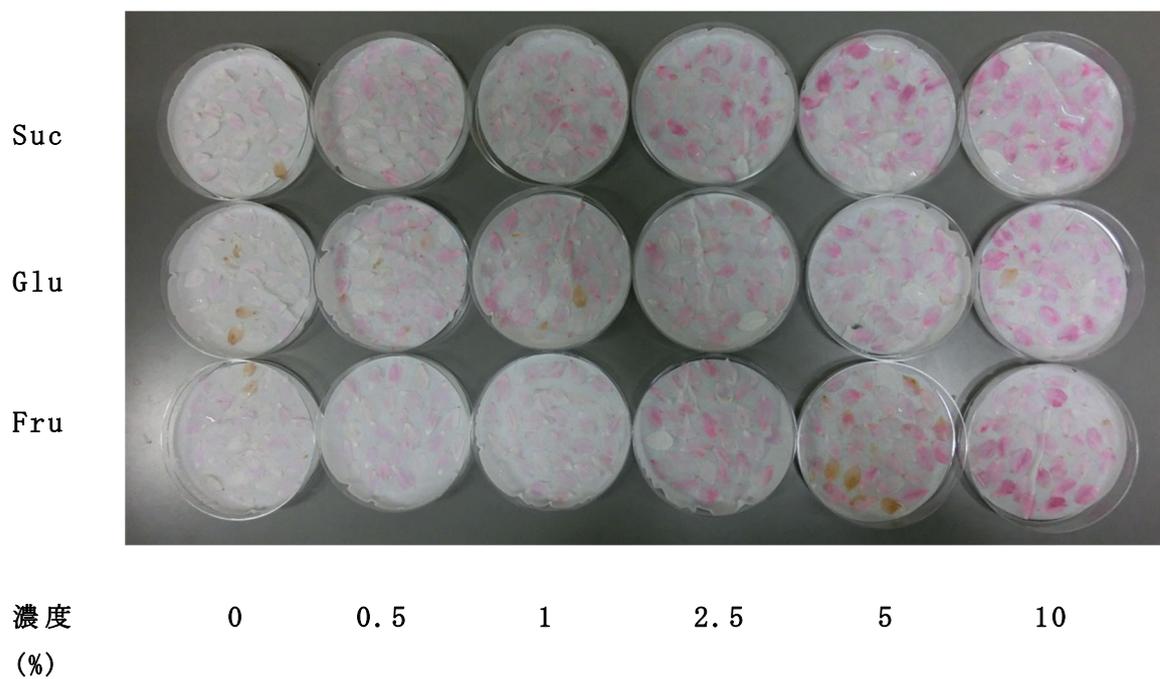
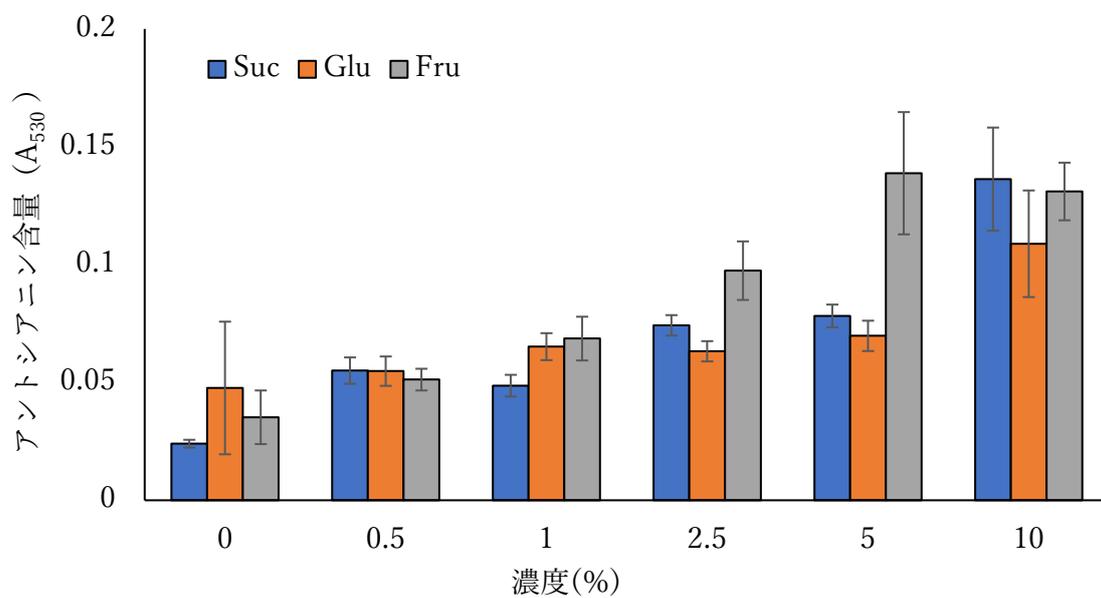


図 3-1-3 A. 異なる糖類 (Fru-フルクトース、Glu-グルコース、Suc-スクロース) を入れたシャーレを用いて光照射を行った‘ソメイヨシノ’花卉のアントシアニン含量 (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE)

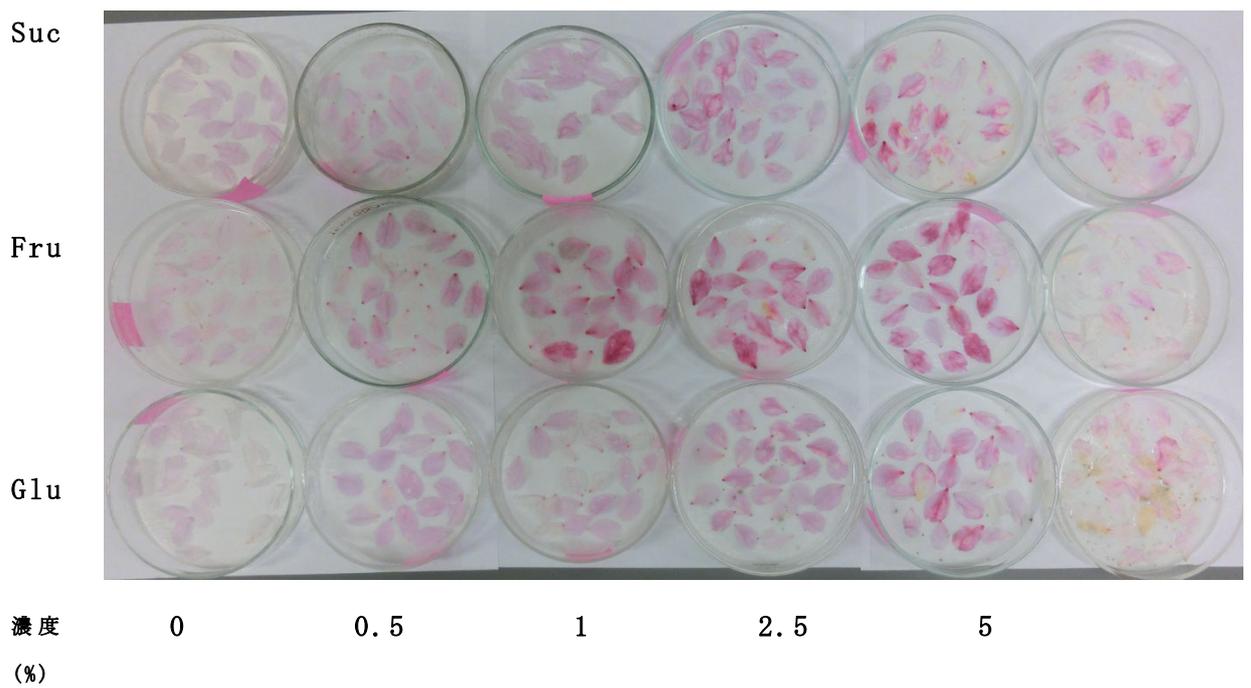
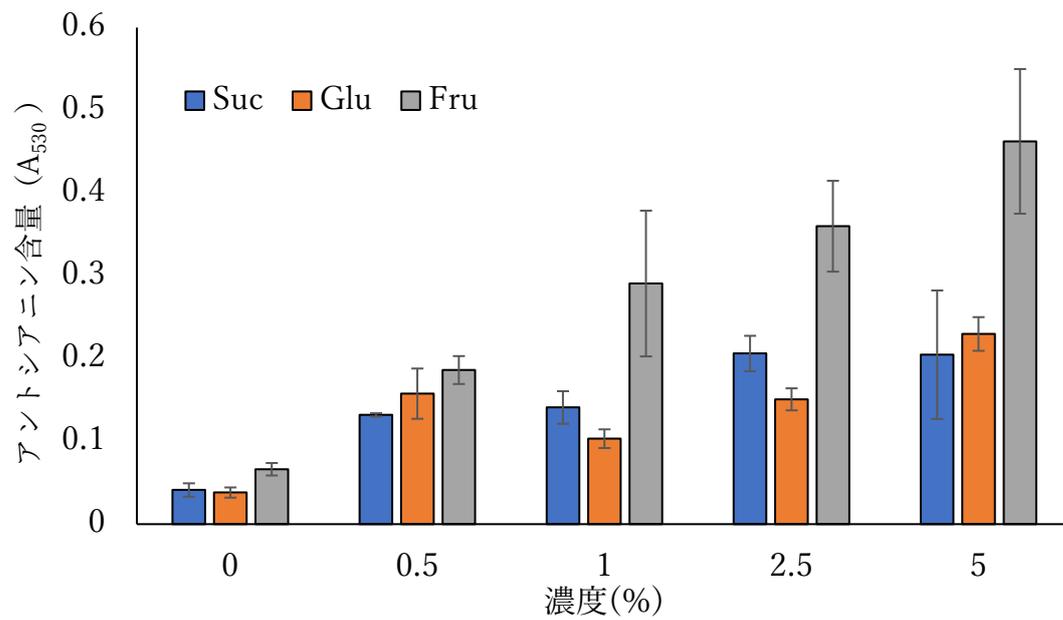


図 3-1-3 B. 異なる糖類 (Fru-フルクトース、Glu-グルコース、Suc-スクロース) を入れたシャーレを用いて光照射を行った‘ソメイヨシノ’花卉のアントシアニン含量 ( $A_{530}$ ) (平均  $\pm$  SE)

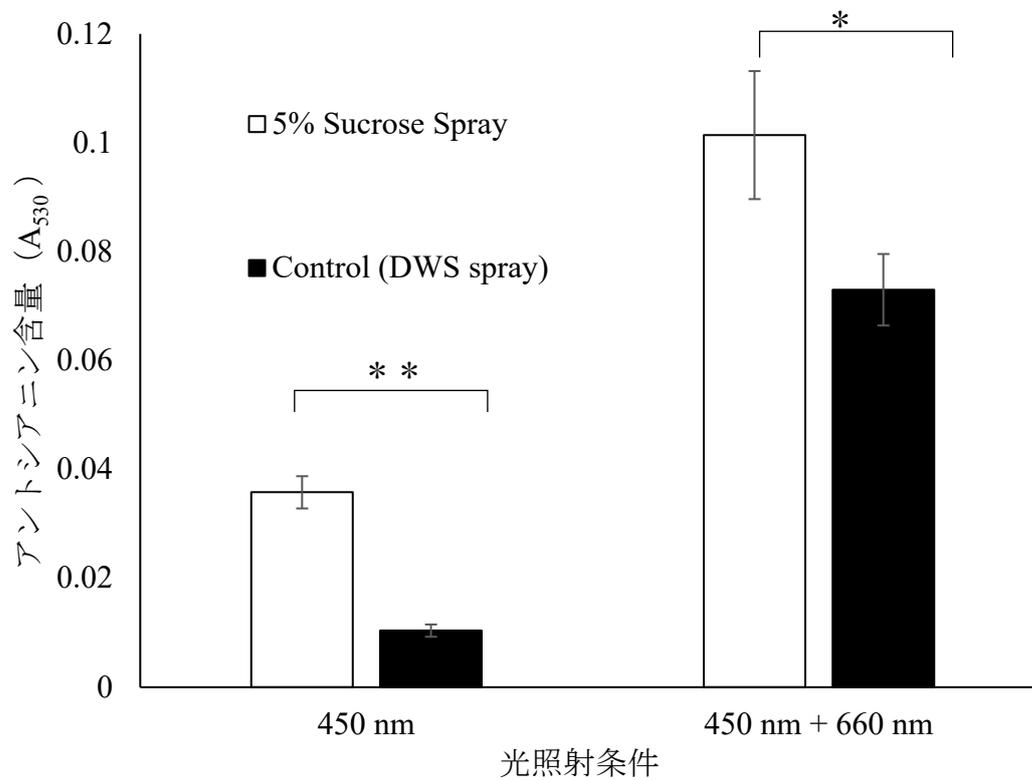


図 3-1-4. スクロースの散布および光照射による‘ソメイヨシノ’のアントシアニン含量 (A<sub>530</sub>) (平均 ± SE)。

\* 記号は、スクロースの散布により、統計的に有意な差があることを示す (Student's T-test、\*:P < 0.05、 \*\*: P < 0.01)

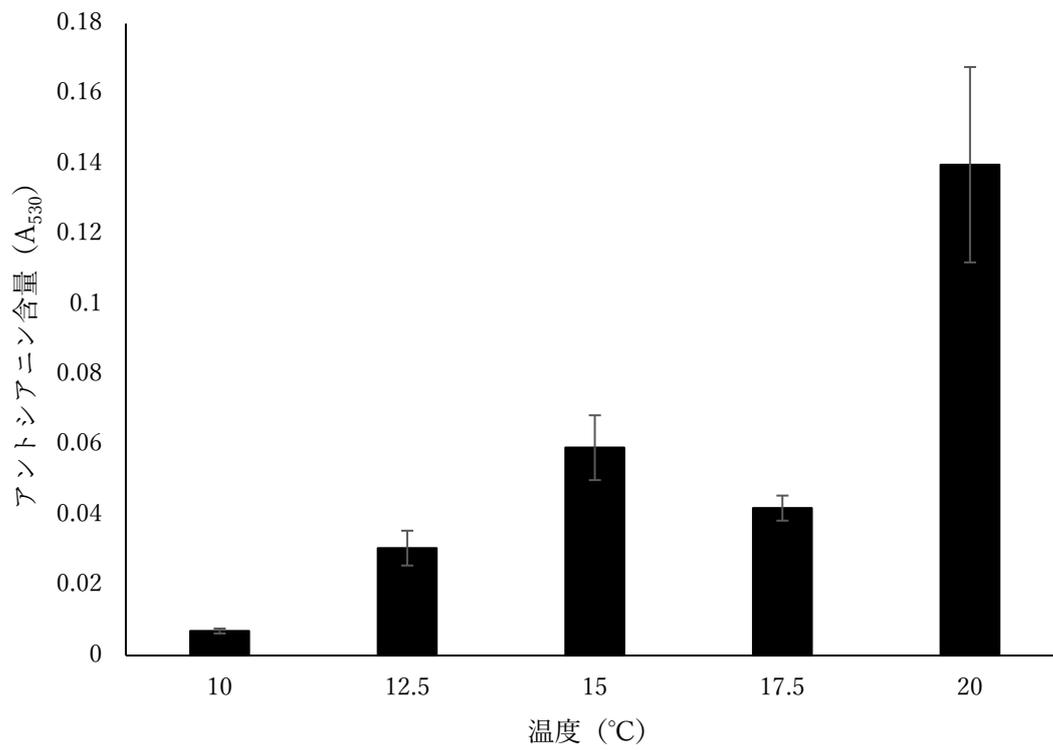


図 3-1-5. 異なる温度による‘ソメイヨシノ’花卉のアントシアニン含量 (A530) (平均 ± SE)。

## 第二節 植物成長調節剤による‘ソメイヨシノ’の花の形質改善

### 緒言

‘ソメイヨシノ’の切り枝は、室内で開花させた場合、樹上での開花に比べて品質が低下する。特に、樹上の花と比べ、花梗が短くなる。植物において植物成長調節剤は重要な働きをしており、バラの切り花では、オーキシシン処理により花卉の成長を促進することが報告されている (Takanori ら、2013)。また、多くの植物ではジャスモン酸はアントシアニン生合成を促進すると報告されている。本節では、植物成長調節剤が‘ソメイヨシノ’切り枝の形質に及ぼす影響について調査した。

### 材料および方法

切り枝を室内で水挿しし、蕾ができた時期に 50 ppm のインドール-3-酢酸 (IAA) とインドール-3-酪酸 (IBA) を散布した。対照として蒸留水を散布した。開花した花を 10 枚選び、花梗や花卉の長さを測定した。

### 結果

50 ppm の IAA を開花前の花芽に散布することにより花の花梗が伸長した。これに対して、50 ppm の IBA の散布では、花梗の伸長は認められなかった。また、これらの植物成長調節剤の散布では花卉への有意な変化は認められなかった。

## 考察

本節では IAA を開花前に散布することにより花梗が長くなった。しかし、花卉の形質には影響がみられなかった。糖類の散布によりアントシアニン含量が増加したことを考慮すると、切り枝を水挿しする場合、開花前にスクロースおよび IAA の混合溶液を散布することにより品質が良い花を得ることができると考えられた。

本節では、ジャスモン酸の効果について調査を行った。ジャスモン酸の散布により、花卉の枯死が認められ、結果を得ることができなかった。100 - 500 ppm の高濃度の溶液が枯死の原因になったと考えられる。多くの花では、ジャスモン酸は花卉のアントシアニン蓄積への影響は少ないと言われている。ジャスモン酸による‘ソメイヨシノ’の着色への影響に関してさらなる調査が必要である。

## 摘要

‘ソメイヨシノ’は、切り枝の水挿しにより、室内で開花させることができるが、着色および花の品質が低下する。本節では、植物成長調節剤を用いて、花の品質を改善することを目的として行った。オーキシン類縁体である IAA を散布した場合、花梗の伸長が観察されたが、花卉への影響は認められなかった。花の形質を改善するには、今後の研究で、さらに異なる植物成長調節剤の影響を調査する必要があると考えられた。

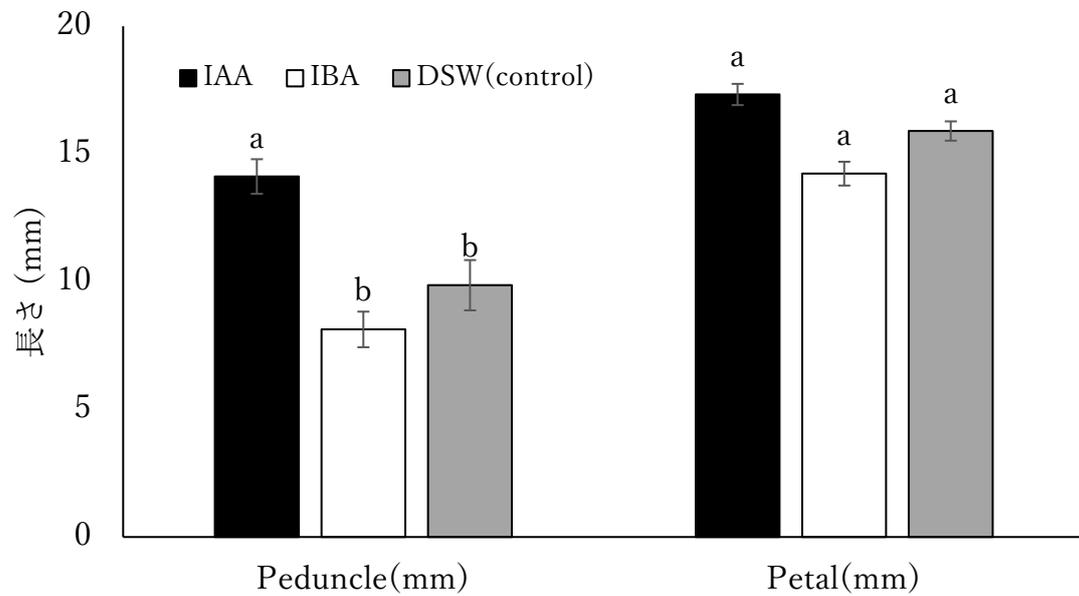


図 3-2-2. 開花前の IAA および IBA の散布が ‘ソメイヨシノ’ の花梗と花弁の長さには及ぼす影響  
異なる英文字は花梗または花弁が異なる処理により有意な差が発生したことを表す (Tukey' s test、 P < 0.05)

## 第四章 非破壊測定によるサクラ‘ソメイヨシノ’

### の花芽の休眠状態に関する研究

#### 緒言

サクラの花芽は純正花芽であり、花と葉は別々の芽から作られる。サクラの花芽は分化初期、花房分化、がく片形成、花弁形成、雄ずい形成、雌ずい形成を経過し、地域と種により異なるが、10月頃までに花芽の形成が完成する（村上ら、2007）。これらの花芽は鱗片で包まれ、休眠に入ることと越冬する。

花芽は秋の落葉前に作られるアブシジン酸により休眠に入る。休眠には自発休眠と他発休眠の2種類がある。自発休眠から覚醒した花芽は冬の低温が続くため、萌芽しない。これらの花芽は、春の気温上昇によって萌芽し開花する。サクラの花芽の自発休眠の覚醒時期は地域と種により異なっている。早咲の‘カワヅザクラ’では、自発休眠は伊東地域で12月上旬に覚醒すると報告されている（村上ら、2007）。「ソメイヨシノ」では類似な報告はないが、2月上旬から切り枝を室内で咲かせることが可能であり、この時期には自発休眠から覚醒している。自発休眠から他発休眠への移行は、芽の外観からは明確に判断することはできないが、成分の変化は以下のような報告がされている。アブシジン酸（ABA）レベルは、落葉する自発休眠の時期に最も高く、他発休眠期を通して減少する（Seeley・Powell、1981）。酸化桜桃（*Prunus cerasus* L.）の花芽では、自発休眠の時期にデンプンを蓄積することが報告されている（Felkerら、1983）。リンゴの花芽では、不飽和膜脂質が、自発休眠および他発休眠中に増加すると報告されている（Wang・Faust、1990）。さらに、モモの花芽の核磁気共鳴（NMR）

非破壊分析により、自発休眠が打破する時期に水分含量が変化している可能性が示唆されている (Toshihiko ら、1995)。

非破壊的分析の方法として、近年は近赤外分光計が使われている。近赤外分光計による糖類の測定は古くから研究され (Lanza・Li、1984 ; Sumio ら、1992)、近年は広く実用化されている。また、近赤外分析を用いた植物の水分含量の測定事例もある (Alejandra ら、2019)。本節は、小型近赤外分光計を用いて、‘ソメイヨシノ’の自発休眠から他発休眠への移行時に起きる変化を測定することで休眠状態を判別できる可能性について調査した。これらの結果は、サクラの休眠の理解に役に立ち、さらに開花日の予測への応用などが期待される。

#### 材料および方法

弘前大学の学内圃場に植栽されている‘ソメイヨシノ’から枝を随時採取して実験に用いた。実験は2019年10月から翌年の3月まで行い、毎月2回枝を採取して行った。採取した1本から2本の切り枝を用いて、室内で小型近赤外分光計を用いて全ての花芽を測定した。本実験で使用された小型近赤外分光計は、光源を内蔵し、640 nm から 1050 nm までの反射光の波長を 2 nm 単位で測定できるものである (オプトメカトロ株式会社)。測定後、切り枝は室温で水挿しし、開花の有無を調査した。切り枝から花芽 20 個を採取し、分析のため $-83^{\circ}\text{C}$ で保存した。本実験では、採取した花芽の中から 5 個を用いてクロロフィル含量を測定した。

クロロフィル含量の測定： $-83^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存した花芽を粉碎機を用いて粉碎し、クロロフィルを 80%のアセトン 1.5 mL を加えて 30 分抽出した。その後、室温、14000 rpm で 10 分遠心分離し、濾過して測定サンプルを作成した。サンプルは分光光度計を用いて、645 nm、663 nm、750 nm の吸光

度を測定した。クロロフィル含量は以下の公式を用いて計算した(公式で、Chはクロロフィル含量を示す。 $A_{645\text{ nm}}$ 、 $A_{663\text{ nm}}$ 、 $A_{750\text{ nm}}$ はそれぞれ 645 nm、663 nm、750 nm での吸光度を示す)。

$$Ch = [7.22 (A_{663\text{ nm}} - A_{750\text{ nm}}) + 20.30 (A_{645\text{ nm}} - A_{750\text{ nm}})] \text{ mg/L}$$

統計分析:主成分分析はフリー統計ソフト R(Ver. 4. 0. 2)を用いて行い、クロロフィルおよび開花日までの日数と測定値の相関は Microsoft Excel 2019 を用いて行った。

## 結果

本節において、2019年1月21日から採取した切り枝は室内での水挿しにより約20日で開花した。したがって、1月21日以降は自発休眠が完了していると考えられた。近赤外分光計を用いた結果は図4-1に表した。これらの測定値のデータは主成分分析(PCA)分析を行った。他発休眠期と考えられる花芽の一部は、PCA分析により(図4-2、A) Iに集中した。しかし、多くの花芽は、自発休眠中の花芽と区別することができなかった。花芽の測定値がどの波長で最も変化が大きいのかを調べるため、全ての測定値を用いて変動係数(RSD)を計算した結果、920 nmでピークが観察された(図4-3 A)。しかし、この波長での測定値の推移を見ると、自発休眠前後での変化は観察されなかった(図4-3 B)。そのため、測定した波長域で、いくつかの波長を選び、測定値の推移を観察した。その結果、720 nmと800 nmでは1月21日以前までには測定値の変化が少なく、21日後に測定値が減少する傾向が観察された(図4-4)。満開日までの関係をみると相関係数が0.5を下回った(図4-5 A)。しかし、1月21日以後の測定値は、満開日までの相関係数が680 nmから850 nmの間で0.8以上となり、

704 nm で 0.914 と高い値となった (図 4-5 B)。高い相関の原因を調べるため、植物に多く含まれているクロロフィルとの関係を調査した。クロロフィルと 720 nm での測定値は -0.83 の高い相関を示したが、クロロフィルの含量は測定値と異なり、その含量の増加は 3 月の末に大きく増加した (図 4-6)。

### 考察

本節では、近赤外分光計を用いて‘ソメイヨシノ’花芽の自発休眠と他発休眠の違いを調べることを目的とした。測定値の中では 920 nm の波長で変動係数が最も高くなったが、測定値の推移では明らかな傾向が観察されなかった。しかし、720 nm および 800 nm の波長の測定値は、自発休眠中には変化せずに、自発休眠を終えたと考えられる 1 月 21 日以後に減少する傾向が見られた。本節では、植物に多く含まれ、測定値への影響が大きいと考えられるクロロフィルを測定した。クロロフィル含量は 720 nm の測定値で高い相関が見られたが、1 月 21 ではなく、3 月末の時期に大きく増加する傾向が観察された。弘前で、‘ソメイヨシノ’の花芽は 4 月の初めに萌芽し、20 日前後で開花が始まる。クロロフィル含量の増加は、休眠状態ではなく、萌芽前後に増加したと考えられた。

主成分分析により、一部の他発休眠期の花芽のみ、自発休眠期と区別されたことが観察された。本節では、切り花の開花の有無のみを調べ、自発休眠および他発休眠を区別した。そのため、1 月 21 日以後に測定した切り枝には、自発休眠からの覚醒程度が異なる花芽も存在していると考えられた。したがって、本節での切り枝の開花の有無に基づいた休眠状態の判別は、個々の花芽の状態を表すことができないと考えられた。しかし、一部

の区別できた他発休眠中の花芽から、近赤外分光計による花芽の休眠状態の判別の可能性があると考えられた。現在の花芽休眠への理解は浅いため、個々の花芽の休眠状態を測定することは困難であると考えられる。開花率を記録し、近赤外分光計による測定値との関係を調べることにより花芽の休眠状態を測定できると考えられる。さらに、自発休眠覚醒期と考えられる時期から、萌芽するまでの 680 から 850 nm の測定値は満開日までの日数と相関が高く、満開日予測への応用が期待された。

### 摘要

‘ソメイヨシノ’は落葉樹であり、冬芽を作る。これらの花芽は自発休眠期および他発休眠期を終え春の気温上昇により発育し、開花する。しかし、花芽における自発休眠および他発休眠は外観により判断が困難になっている。本節では、近赤外分光計を用いて花芽の休眠状態を測定した。主成分分析により、近赤外分光計の測定値は自発休眠および他発休眠の判別はできなかったが、実験方法の改善により可能であると考えられた。また、自発休眠覚醒後の測定値は満開日までの日数と相関が高く、満開日予測での応用が期待された。

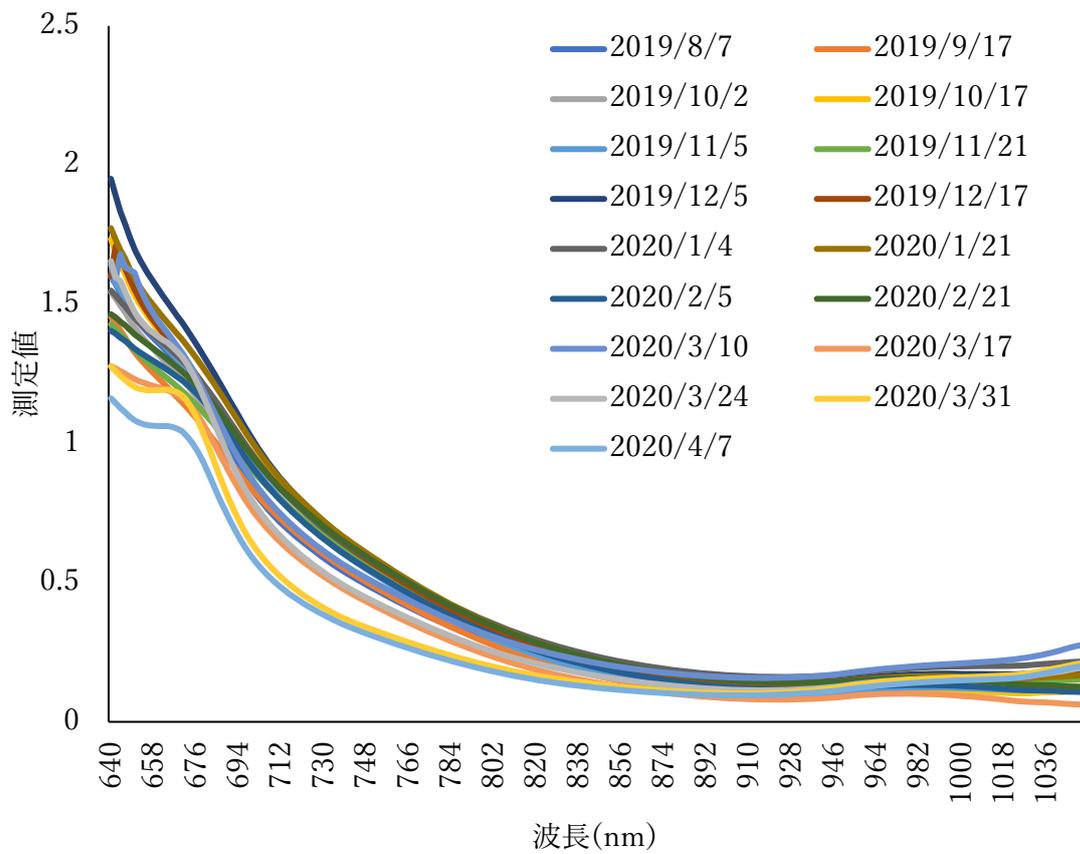
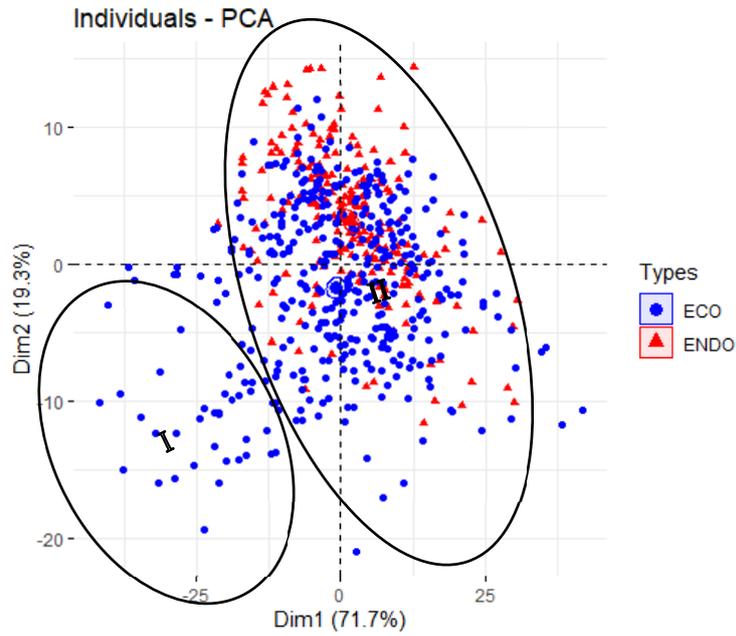
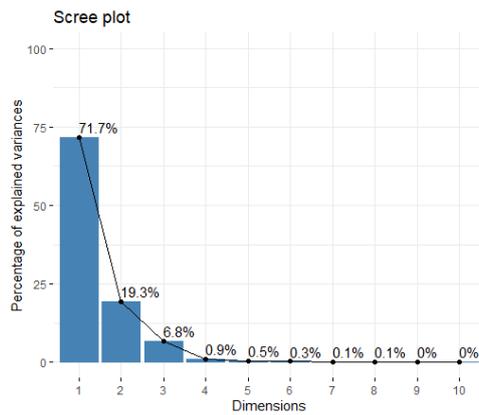


図 4-1. 近赤外分光計を用いた花芽の測定値（平均値）



A



B

図 4-2. 近赤外分光計測定値の主成分分析結果

A. Dmi1 および Dmi2 はそれぞれ主成分 1 および主成分 2 を表す。ENDO は自発休眠期における花芽（1 月 21 日前）を表し、ECO は他発休眠期における花芽（1 月 21 日後）を表す。一部の自発休眠における花芽が I に集中している

B. 主成分寄与率

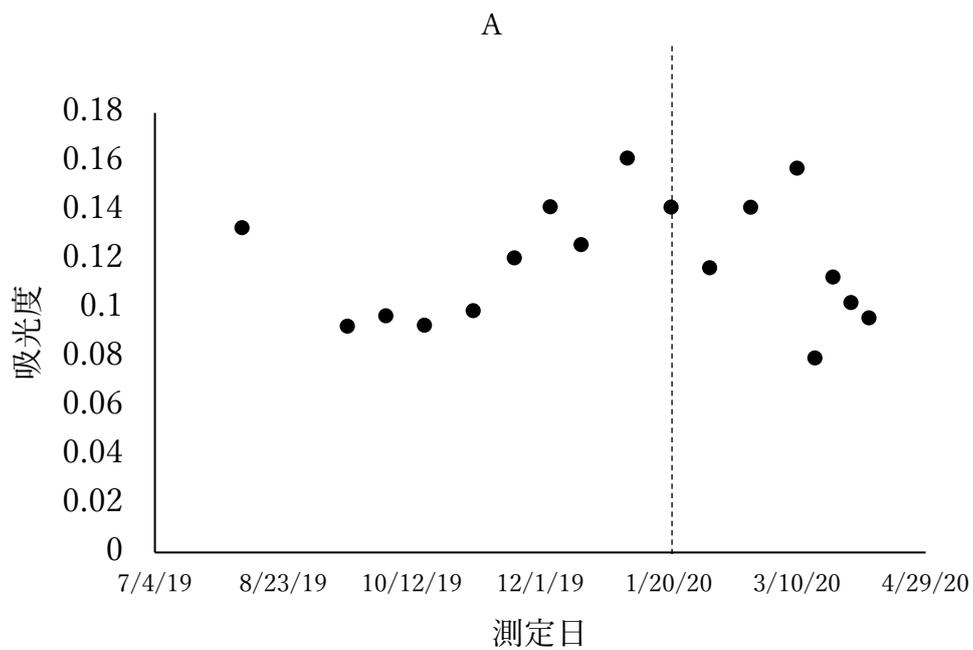
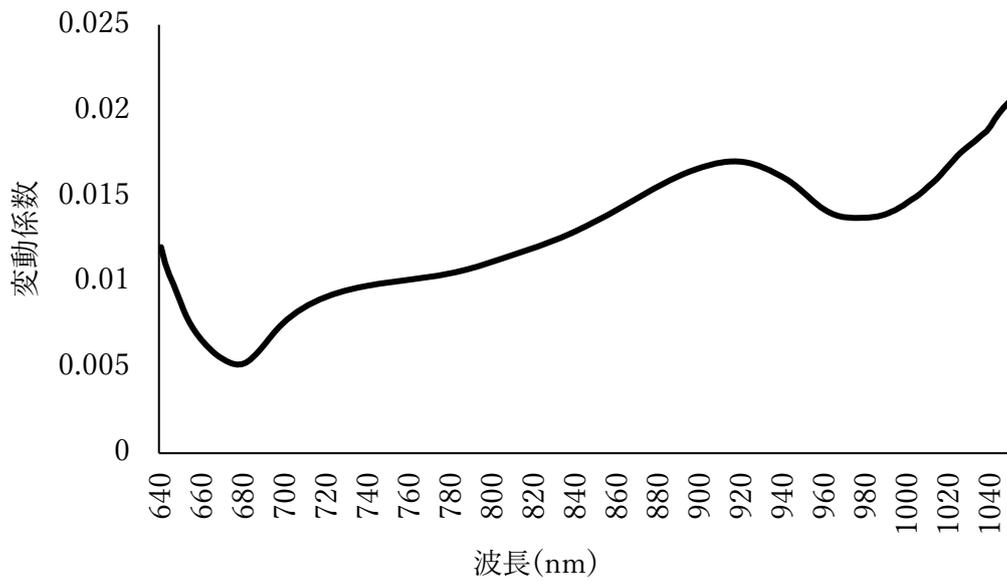


図 4-3. 近赤外分光計による花芽測定値の変動係数(RSD) (A)および、920 nm での測定値の推移 (B)。補助線は 1 月 21 日で、「ソメイヨシノ」花芽の自発休眠が完了したと考えられる日を示す。

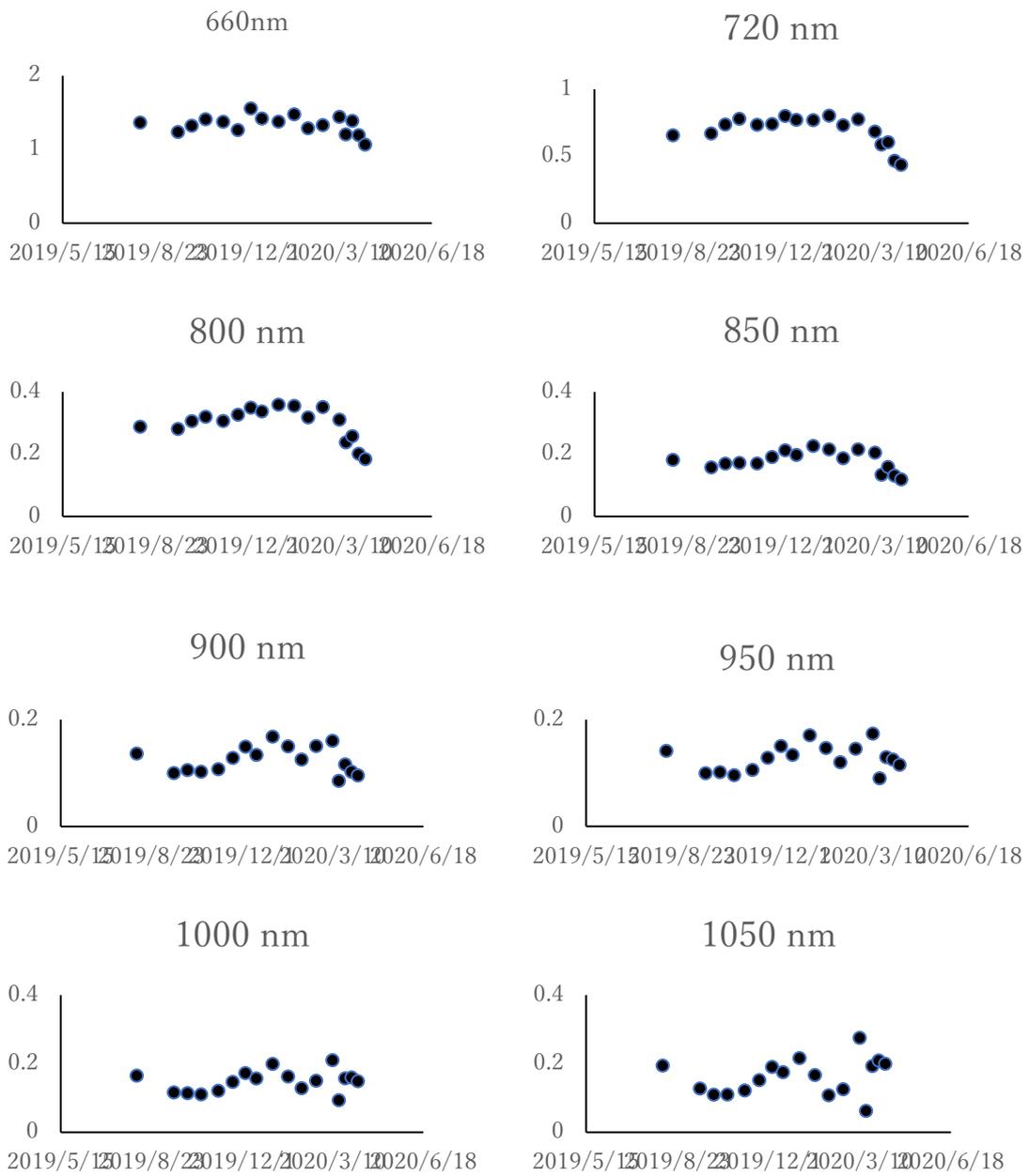


図 4-4. 異なる波長での測定値の推移

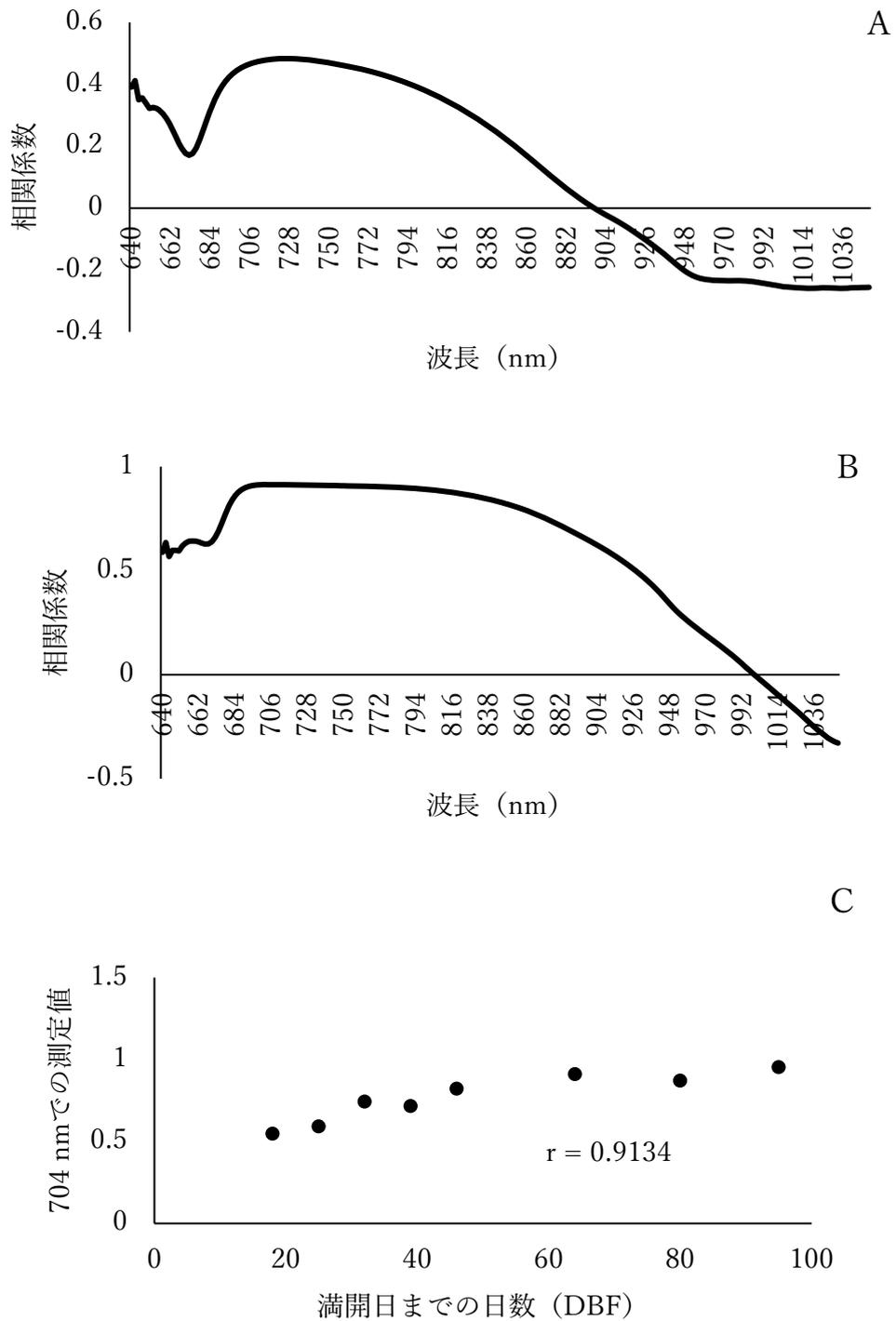


図 4-5. A. 満開日までの日数と測定値の関係。

A. 満開日までの日数と測定値の相関。B. 1月21日以後の測定値と満開日までの日数の相関。C. 704 nm での測定値と開花日までの関係。

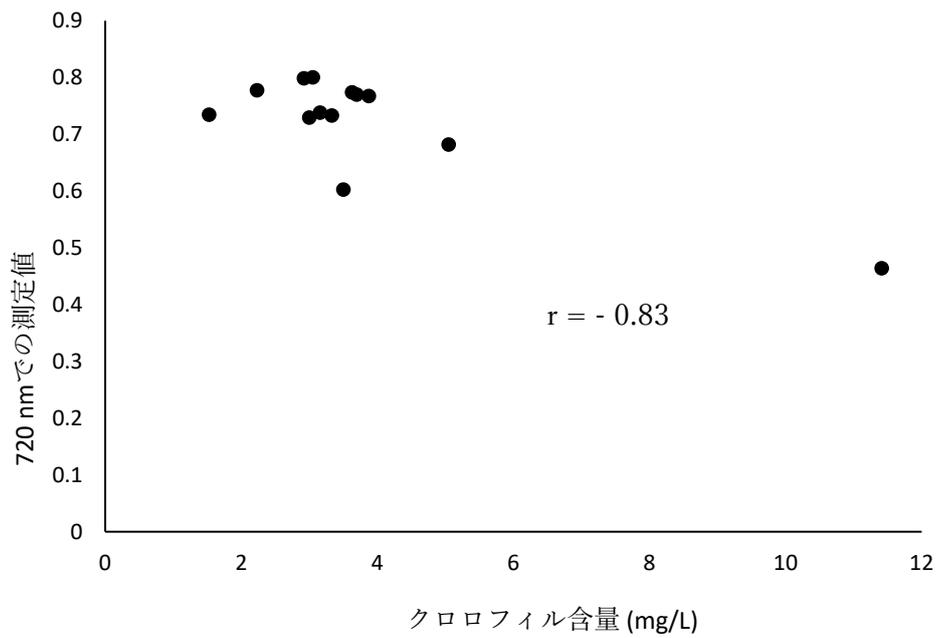
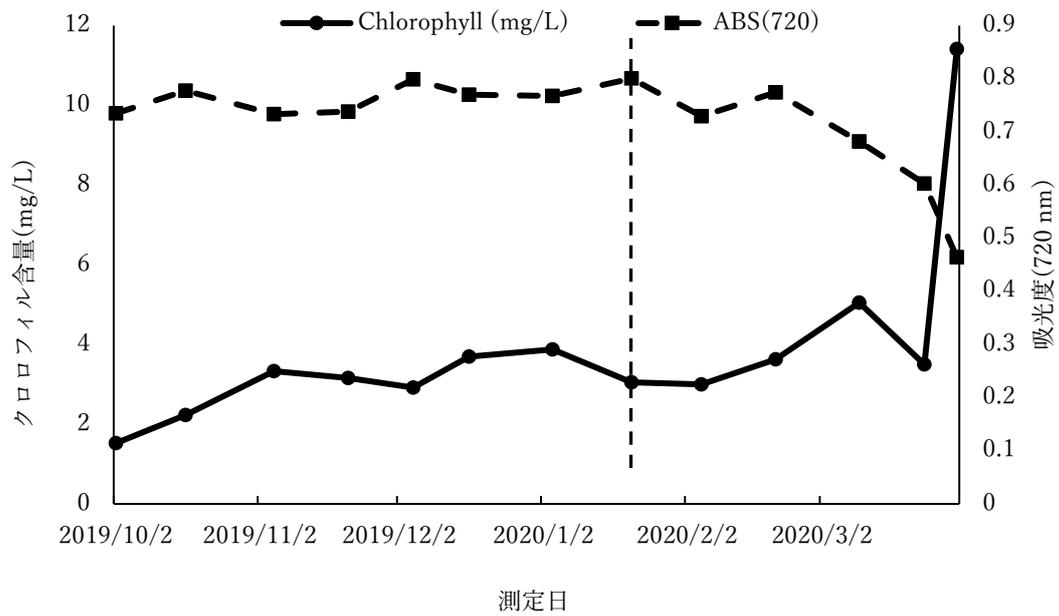


図 4-6. クロロフィル含量と 720 nm での測定値の関係。補助線は 1 月 21 日で、‘ソメイヨシノ’花芽の自発休眠が完了したと考えられる日を示す。

## 総合考察

サクラの花は日本で観賞用として人々に愛されている。そのため、サクラは食用のセイヨウミザクラザクラと区別される。‘ソメイヨシノ’ (*Cerasus × yedoensis* ‘Somei-yoshino’) は、大きい薄ピンクの綺麗な花弁を一斉に開くため、日本では最も栽培されている品種である。しかし、‘ソメイヨシノ’の花弁の着色機構はこれまで詳細に調べられていない。‘ソメイヨシノ’の枝は、樹上から採取し室内で水挿しすることにより開花するが、室内で開花した花は花色が白くなる。そこで本研究では花弁が綺麗に着色する条件を明らかにするために、‘ソメイヨシノ’の切り枝を用いて、光照射の影響を中心に‘ソメイヨシノ’花弁の着色に関して研究を行った。

弘前公園では、毎年2月から3月にかけてサクラの木の剪定を行う。本研究では主にこの剪定された枝を使用した。切り枝は2℃の冷蔵庫で保湿して保存し、実験中に室内で水挿しすることにより開花させた。切り枝は3月から8月まで水挿しにより開花でき、冷蔵状態で5ヶ月程度保存できると考えられる。暗所または赤色光の照射条件で水挿しした切り枝は白色となった。青色光、特に450 nmの青色光の照射によりアントシアニン含量が増加し、着色した。また、青色光の光強度が高くなるとともにアントシアニン含量が増加した。赤色光は光強度と関係なく、青色光と同時に照射した場合、同じ光強度の青色光のみで照射した場合に比べてアントシアニン含量が増加した。これらの光照射の影響は、開花におけるステージにより異なり、‘ソメイヨシノ’の花芽から蕾ができる時に光照射の影響が最も高かった。また、糖類の添加によりアントシアニン含量は増加したが、光照射をしていない場合には、アントシアニン含量が増加しなかった。こ

これらの結果は、‘ソメイヨシノ’花卉でのアントシアニン生合成は青色光照射を必須とし、様々の要因により促進されることを示唆している。アントシアニン生合成は光刺激による光保護現象であるといわれる。本研究の結果から、‘ソメイヨシノ’花卉では、青色光の刺激によりアントシアニンが生成されるが、赤色光の有無、花卉組織の生育状態、糖類、温度などにより光刺激への反応性が変化すると考えられた（図 4）。

本研究における赤色光と青色光のアントシアニン生合成への効果は、2つの光受容体の間に相互作用があることを示唆する。赤色光の間隔照射により、赤色光の効果にはフィトクロム A が関係しており、HIR 反応を介してアントシアニン生合成を調節すると考えられる。青色光の受容体およびフィトクロム A との関係に関して、本研究では RT-PCR を用いて行ったが、明らかな結果を得ることができなかった。多くの場合、アントシアニン生合成における青色光受容体は Cry1 が関係しているといわれている。

花の種々の発達段階におけるアントシアニン含量の違いは、開花の各段階における光刺激への応答性の違いによって生じると考えられる。若い葉、および老化葉は、光阻害を受けやすいため（Steyn ら、2002）、葉のアントシアニンはこれらの初期ステージで蓄積される。*Acmena acuminatissima* の葉では、アントシアニンが若い葉に蓄積し、光減衰剤として機能すると報告されている（Zhu ら、2018）。本研究で明らかにされた光照射による‘ソメイヨシノ’花卉のアントシアニンの蓄積が起こるステージは、葉でのアントシアニン蓄積と一致していた。光照射は比較的早い時期の萌芽および落花の時期に効果的である。

糖類は、植物の浸透圧刺激をおこし、アントシアニン生合成を促進すると考えられる。スクロースは高濃度の溶液により植物細胞の浸透圧刺激を

起こし、アントシアニン生合成を促進するとする解釈も報告されている (Chi・Francois、1990 ; Linda、1999)。これらの効果は、グルコースやマンニトールなどの他の糖類によっても報告されている (Tholakalabaviら、1994 ; Tholakalabaviら、1997)。本研究では、3種類の糖類の処理で、‘ソメイヨシノ’のアントシアニン含量が増加した。また、温度に関して、本研究では明らかな結果を得ることはできなかったが、高温による浸透圧刺激がアントシアニン含量に影響したと考えられた。したがって、‘ソメイヨシノ’の花弁も浸透圧刺激によりアントシアニン生合成を促進することが可能であると推察された。先行研究では、‘ソメイヨシノ’の切り枝を50倍の切り枝延命剤 (パレス化学、日本) 養液中で水挿しした場合、アントシアニン含量が増加した。切り枝延命剤の有効成分には糖類があり、着色に影響を及ぼしていると考えられる (安、2018)。枝の中で、水は引張力によって輸送されると考えられる (トーマス、2013、p45-p51)。切り枝を水挿しした場合、糖類は水とともに引張力によって花まで輸送され、着色に影響していると考えられる。

‘ソメイヨシノ’は日本の代表的な植物であり、春の到来を象徴するため、開花の予測に関する研究が多く行われている。花芽の休眠への理解不足は、開花予測の難点となっている。本研究では、非破壊測定として、近赤外分光計を用いて花芽休眠状態を判別する可能性に関して調査した。本研究での結果は、実験設計に問題があったため、明らかな結論は得られなかったが、花芽の休眠状態を表す可能性があることが推察された。一方、1月以後の花芽の測定値は、開花日までの日数と高い相関が観察され、開花日予測への応用の可能性も示唆された。

本研究による光照射、糖類および温度の影響の結果を踏まえ、‘ソメイ

ヨシノ' 切り枝の着色を促進する実用的な技術について検討した。切り枝を 12.5℃で水挿しし、LED を用いて照射を行った。高い光強度の青色光は人の目に悪影響を及ぼすと考えられる。そのため、光強度が比較的低い網状の LED (図 5、A) を用いて切り枝全体に照射を行った。また、青色光の光強度が低いため、同じく網状の赤色光 (図 5、B) と同時に照射し、萌芽し始める頃、50 ppm の IAA と 5% のスクロースを含む溶液を散布した。その結果、室内の水挿しに比べ、比較的良い品質の花を付けた切り枝となった (図 5、C)。市販の切り枝延命剤などの糖類を含む溶液に水挿しすることによって、着色を促進できると考えられる。本研究において、12.5℃の温度は恒温器で行っているため、一般家庭の条件を考えると、温度の影響を克服する方法を考える必要があると考えられた。

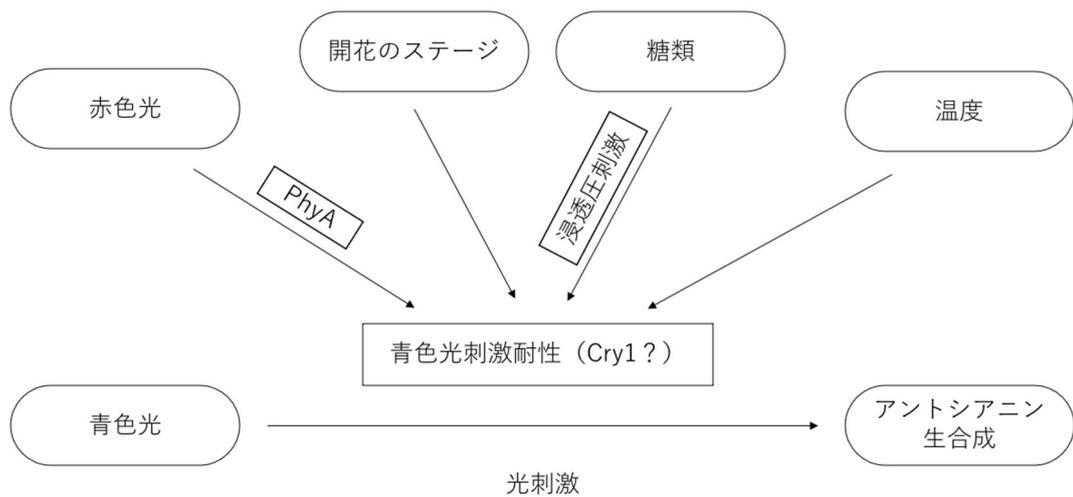
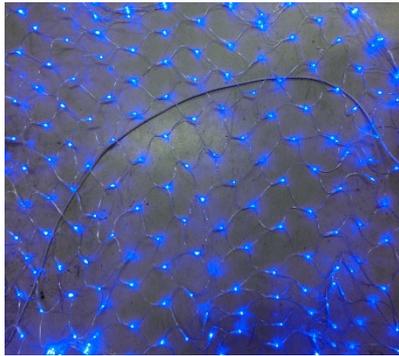
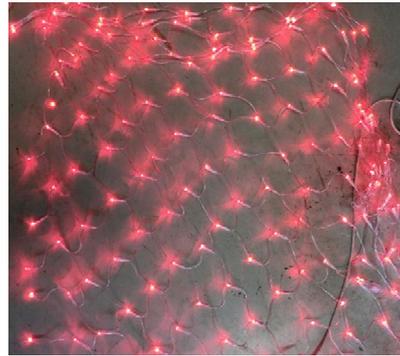


図 4. ‘ソメイヨシノ’ 花卉のアントシアニン合成に影響を及ぼす要因



A



B



C

図 5. 網状の LED を用いた 'ソメイヨシノ' 切り枝の着色促進。

## 摘要

‘ソメイヨシノ’は日本では鑑賞用として他の植物に比べ、特別な地位にある。‘ソメイヨシノ’の切り枝は、室内で水挿しされ、利用されている。しかし、これらの水挿しによる開花では、白い花となる問題がある。これまで、‘ソメイヨシノ’の着色機構に関して深く研究されていない。本研究では、‘ソメイヨシノ’の着色機構を明らかにすることを目的とした。また、室内での水挿しによる開花の着色を改善する技術を提案することを目的とした。

サクラはアントシアニンの蓄積によりピンク色に発色する。‘ソメイヨシノ’ではアントシアニン生合成には青色光照射が必須であり、光強度に依存していた。赤色光を青色光と同時に照射することにより、アントシアニン含量が大きく増加したが、赤色光の光強度の影響はなかった。光の照射は、花芽から蕾ができ始める時期と落花の時期にアントシアニン蓄積への効果が最も大きかった。花卉が展開し、満開になるまでには、光照射の影響が少なく、アントシアニン蓄積への促進効果が認められなかった。さらに本研究では糖の添加がアントシアニン生合成を促進したことなどから、‘ソメイヨシノ’花卉は、浸透圧の変化による刺激によりアントシアニン生合成が促進されたと考えられた。切り枝への糖類散布によってもアントシアニン生合成が多くなることも確認された。これらの結果から、室内での切り枝は、蕾ができる時期に糖類などを散布し、青色光および赤色光を同時照射することにより、花卉の着色を促進することができると考えられた。

‘ソメイヨシノ’の休眠状態は、外観で判断するのが困難である。本研究では、近年広く応用されている近赤外分光計を用いて花芽を非破壊的に

測定した結果、自発休眠と他発休眠状態の判別、満開日予測などへの応用が可能であることが考えられた。

## 参考文献

Alejandra R., Emilio J., Manuel C., Patricio A., Juan C., Marjorie R. (2019) Exploring VIS/NIR reflectance indices for the estimation of water status in highbush blueberry plants grown under full and deficit irrigation. *Scientia Horticulturae*, 259, DOI: doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108557

Alberto, L. M., Federica, R and Anna, M. (1991) Cryptochrome, phytochrome, and anthocyanin production. *Plant Physiol*, 96: 1079-1085

Arakawa, O. (1988) Photoregulation of anthocyanin synthesis in apple fruit under uv-b and red light. *Plant Cell Physiol*, 29(8):1385-1389

Assia B., Nadège T., Cassandrine S., Stéphanie C., François B., Saïd H., Mérillon J. (2008) Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol.46(4):493-499

安 松浩 (2018), サクラ ‘ソメイヨシノ’ の着色に関する研究. 弘前大学農学生命科学研究科修士論文 (未公刊資料)

Chi B., Francios C. (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9:143-146

Cinzia S., Alessandra P., Elena L., Amedeo A., Pierdomenico P. (2006) Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, vol.140(16); 637-646

Dangerlmayr, B., G. Stotz, R. Spribille and G. Forkmann (1983) Relationship between Flower Development, Anthocyanin Accumulation and Activity of Enzymes Involved in Flavonoid Biosynthesis in *Matthiola incana* R. Br. . *Zeitschrift für Naturforschung C*, 38 (7-8): doi.org/10.1515/znc-1983-7-810

Dong, Y.H., Lesley, B., Kevin, D., Deepali. M., Bret, M. and Arend, K. (1998) Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25(2):245-252. doi: 10.1071/PP97108

Federica, S., Gerald, F. D. and Alberto L. M. (1986) Cryptochrome, phytochrome, and the photoregulation of anthocyanin production under blue light. *Plant Physiol*, 82:952-955

Felker, F.C., H.A. Robitaille, and F.D. Hess. (1983) Morphological and ultrastructural development and starch accumulation during chilling of sour cherry flower buds. *American Journal of Botany*, 70:376-386

Ferante, A., P. Vernieri, F. Tognoni and G. Serra (2006) Changes in abscisic acid and flower pigments during floral senescence of petunia. *Biologia Plantarum*. 50 (4):581-585

Innan H., R.Terauchi, NT Miyashita, K Tsunewaki (1995). DNA fingerprinting study on the intraspecific variation and the origin of *Prunus yedoensis* (Someiyoshino). *Japanese Journal of Genetics* 70 (2):185–196.

Jiafu Tan, Maojun Wang, Lili Tu, Yongjun Lin, Xianlong Zhang. (2013) The Flavonoid Pathway Regulates the Petal Colors of Cotton Flower. PLOS ONE

Kang, B., Nicolas, G., Vladimir, K., Lardemer, D., Burney, S. and Margaret Ahmad (2008) Multiple interactions between cryptochrome and phototropin blue-light signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 227:1091-1099. doi: 10.1007

Kevin Gould, Kevin Davies and Chirs Winefield (2009) Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications. Springer: p50-p51

Kimura, M. and Kagawa, T. (2006) Phototropin and light-signaling in phototropism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:503-508

Lanza E. and B. W. Li (1984) Application for Near Infrared Spectroscopy for Predicting the Sugar Content of Fruit Juices. *Journal of Food Science*, vol.49:995-998

Laura J. (2013) New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in plant science*, 18(9):477-483

Laura, Z., Katja, K., Ana L. E., Hely, H. and Laura, J. (2014) Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. *Frontiers in Fruit Science*, doi: 10.3389/fpls.2014.00534

Lin, C. T., Yang, H. Y., Guo, H. W., Todd, M., Jeff, C. and Anthony, R. C. (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Plant Biology*, 95:2686-2690

Linda Charker-Scott (1999) Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70(1):1-9

Li Yuan-yuan, Ke Mao, Cheng Zhao, Xian-Yan Zhao, Hua-Lei Zhang, Huai-Rui Shu and Yu-Jin Hao (2012) MdCOP1 Ubiquitin E3 Ligases Interact with MdMYB1 to Regulate Light-Induced Anthocyanin Biosynthesis and Red Fruit Coloration in Apple. *Plant Physiol*, Vol.160:1011-1022

前川 進、中村直彦 (1979) 促成花木の花色発現に関する研究 第一報: モモ,ボケ, サクラ切花のアントシアニン生合成に及ぼす温度と光の影響. 神戸大学農学部研究報告, 13(2):181-184

前川 進, 寺分本一, 中村直彦 (1980) 促成花木の花色発現に関する研究 第二報: 促成花木の花色発現に関する研究. 神戸大学農学部研究報告, 14(1):51-55

前川 進, 寺分本一(1982)サクラ花卉の発育にともなうアントシアニンの蓄積. 神戸大学農学部研究報告 15(1):43-45

Masaki Furuya (1993) Phytochrome:Their Molecular species, gene families, and function, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, 44:617-45

Meng X.. C., Xing, T. and Wang, X. J. (2004) The role of light in the regulation of anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. *Plant Growth Regulation*, 44:243-250

Macnisha, A. J., C. Jiang, F. Negre-Zakharov and M. S. Reid (2010) Physiological and molecular changes during opening and senescence of *Nicotiana mutabilis* flowers. *Plant Science*,

179: 267–272

村上 覚, 加藤智恵美, 稲葉善太郎, 中村新市 (2007), ‘カワヅザクラ’における自発休眠  
覚醒期. 植物環境工学(J.SHITA), 19(3):132–136

Michael E. P., Lauren N., and Vincent J.J. M. (2019) Engineering Plant Secondary  
Metabolism in Microbial Systems. *Plant Physiology*, vol. 179:844 – 861

村上 覚, 加藤智恵美, 稲葉善太郎, 中村新市 (2008) ‘カワヅザクラ’の他発休眠期に  
おける発育則とモデルの作成ならびに切り枝での開花および花の品質に及ぼす気温の  
影響. 園学研, 7(4):579–584

永田 洋, 浅田信行, 石川晶生, 中村輝子(2010) さくらの百科. 丸善株式会社: p3

トーマス・ピーター(2013) 樹木学(第7刷). 築地書館: p45-p51

Robin L., Heikki H., Tino S., Helena A. and Zhang R.(2019) Beyond rest and quiescence  
(endodormancy and ecodormancy): A novel model for quantifying plant–environment interaction  
in bud dormancy release. *Plant Cell Environ*, 43:40–54.

斎藤 規夫, 嵯 世宝, 御巫 由紀(1991), 高等植物における Anthocyanin 分布. 明治学  
院論叢, 486: 40

Schmitzer, V., R. Veberic, G. Osterc and F. Stampar (2009) Changes in the Phenolic  
Concentration during Flower Development of Rose ‘KORcrisett’. *Journal of the American  
Society for Horticultural Science*, 134(5): 491-496

Seeley, S.D. and L.E. Powell. (1981). Seasonal changes of free and hydrolyzable abscisic acid in vegetative apple buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106:405-409

Shinomura, T., Uchida, K. and Furuya, M. (2000) Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122: 147-156

志佐 誠,高野泰吉,バラの花色発現に及ぼす温度ならびに光の影響 (196). 園芸学会雑誌,33(2):104-146

Sumio K., Hisayoshi W. and Mutsuo I.(1992) Determination of Sugar Content in Intact Peaches by Near Infrared Spectroscopy with Fiber Optics in Interactance Mode. *Journal of the Japan Society for Horticultural.*, 61(2):445-451

Styen, W. J., S. J. E. Wand, D. H. Holcroft and G. Jacobs (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection;. *New Phytologist* 155: 349-361

Tatsuzawa F., Saito N. and Yokoi M. (1996) Anthocyanins in the Flowers of *Cymbidium*. *Lindleyana*, 11(4): 214-219

Telias A., Kui L., David E. S., Janie M. C., Roger P. H., Andrew C. A., Emily E. H. and James M. B.(2011) Apple skin patterning is associated with differential expression of MYB10. *BMC Plant Biology*, 11:93

Tholakalabavi, A., J. J. Zwiabek and R. A. Thorpe (1997) Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition. *Journal of Plant Physiology*, vol.151(4):489-496

Tholakalabavi, A., J. J. Zwiabek and R. A. Thorpe (1994) Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 30P:164-170

Toshio K. and Iketani H. (2016) Nomenclature of Tokyo cherry (*Cerasus* × *yedoensis* 'Somei-yoshino', Rosaceae) and allied interspecific hybrids based on recent advances in population genetics. *The Journal of the international Association for Plant Taxonomy*, vol 65(6):1415-1419

Toshihiko S., Mitsura Y., Jun M., Sukeyuki O. (1995) Changes in Water Status of Peach Flower Buds During Endodormancy and Ecodormancy Measured by Differential Scanning Calorimetry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(2): 134–138

Vaknin, H., H. Vaknin, A. Bar-Akiva, R. Ovadia, A. Nissim-Levi, I. Forer, D. Weiss and M. Oren-Shamir (2005) Active anthocyanin degradation in *Brunfelsia calycina*(yesterday–today–tomorrow) flowers. *Planta* 222: 19-26, DOI: 10.1007/s00425-005-1509-5

和田正三, 徳富哲, 長谷あきら, 長谷部光泰 (2001) 植物の光センシング: 光情報の受容とシグナル伝達. 秀潤社; p39-p44

渡辺 昭, 島本 功, 福田裕穂, 内藤 哲 (1994) 植物の形を決める分子機構. 秀潤社:p83-p91

Wallace T. and Giusti M. (2013) Anthocyanins in Health and Disease. CRC Press; p13-p90

Zhu, H., T.-J. Zhang, J. Zheng, X.-D. Huang, Z.C. Yu, C.-L. Peng and W. S. Chow (2018) Anthocyanins function as a light attenuator to compensate for insufficient photoprotection mediated by nonphotochemical quenching in young leaves of *Acmena acuminatissima* in winter, *Photosynthetica*, 56(1): 445-454

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた学位論文指導教員の荒川修教授に感謝致します。非破壊測定に関する知識、統計方法に関して教えていただいた張樹塊教授、遺伝子解析における知識を教えいただき、論文の検閲していただいた田中紀充助教とアントシアニン組成解析における知識を教えいただき、論文の検閲していただいた立澤文見副教授に深く敬意を表します。本研究で実験を進めるために、サクラの材料を提供して頂いた弘前公園緑地課の皆さんに感謝します。