



Title	日本型イネに導入した紫米における着色色素の同定
Author(s)	佐藤, 博二; SATO, Hiroji; 中野, 英樹 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 30, 47-53
Issue Date	1997-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13434
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p47-53.pdf



日本型イネに導入した紫米における着色色素の同定

佐藤 博二・中野 英樹

(北海道大学農学部附属農場)

前川 雅彦

(岡山大学資源生物科学研究所)

金内 里恵・市原 耿民

(北海道大学農学部生物機能化学科)

(1997年1月22日受理)

緒 言

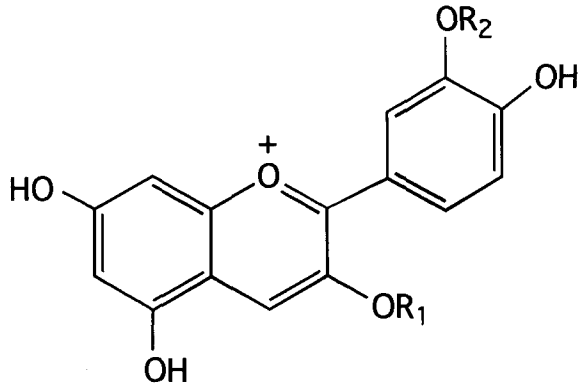
植物が合成するアントシアニンは、葉の表皮細胞に蓄積し有害な紫外線の防御機構として働くばかりでなく¹⁾、抗酸化作用やファイトアレキシンとして作用することも知られている。さらに、利用面においても安全で鮮やかな食品着色料として、あるいは生体調節機能をもつ色素としての価値があり、最近では、コレステロールの低下作用もあることが明らかとなった²⁾。一方、アントシアニンは可視的形質として古くから二次代謝経路の研究対象となり、天然物化学・生物化学の進展もあってその生合成経路が解明された。さらに最近では、分子生物学的手法の展開で、色素着色の組織特異性や発現時期といった転写制御系の解明が盛んになり、トウモロコシでは色素着色の転写制御ネットワークが構築されようとしている。イネでもトウモロコシと同様にアントシアニン着色は古くから遺伝分析の対象となってきたが³⁾、トウモロコシとは異り生合成経路も未だ明らかとなっておらず、また分子的転写制御系も不明である。最近、インド型の紫米から関与するアントシアニンが特定された⁴⁾。また1993年にイネとトウモロコシのシンテニーが明らかになったことから⁵⁾、イネのアントシアニン合成に係わる転写制御遺伝子 *Ra* がとられ⁶⁾、イネでも転写制御遺伝子系のネットワークが解明されようとしている。

イネにおける着色形態は茎・穎から玄米にいたるまで種々多岐にわたっている。茎・葉において

は、アントシアニンによる紫色のみであるが、玄米においては色調・模様にも多様な変異が認められる。イネの粒色に関する遺伝子系については木下が詳しく述べているが³⁾、大別して2種の遺伝子系に分かれ、アントシアニン生成に関与する3遺伝子の補足作用によって紫米となる系と⁷⁾、種皮着色の2遺伝子の補足作用により赤米となる系である⁸⁾。これら粒色に関しては、既に、紫米に関しては Nagai らによりアントシアニンが⁹⁾、赤米に関しては Nagao らによりカテキン、カテコールタンニンが関与することが報告されている¹⁰⁾。一般に有色米は赤米もしくは黒米と称されるが、着色色素の化学的成分を考慮すると用語はかならずしも統一されているわけではなく、前述のごとく、玄米における着色・形態は多岐にわたり、色調と構成色素が一致しない場合もある。本論文では、粒色の呈色の主成分としてアントシアニンが考えられる場合に紫米と記載した。

紫米のアントシアニンについてはインド型イネ紫米について、特に色素利用を背景に、酒類醸造の原料として、インド型の紫米¹¹⁾、および臭い紫米のアントシアニン色素の同定がおこなわれ¹²⁾、cyanidin-3-glucoside を主成分とする3種以上のアントシアニンが紫米構成色素として存在することが報告されている。

日本型イネの在来種には葉身のみ紫色する紫イネは存在するが、玄米がアントシアニンにより紫色もしくは黒色に着色するインド型イネに見られる紫米は存在しない。しかしイネにおける着色形



R₁ R₂

Pigment 1 :	Glucose	H	Cyanidin 3-glucoside
Pigment 2 :	Rutinose	H	Cyanidin 3-rutinoside
Pigment 3 :	Rutinose	CH ₃	Peonidin 3-rutinoside

Fig. 1. Structures of Pigment 1, 2, and 3 from purple pigmented rice.

態は遺伝子形質として古くから注目され、遺伝子分析の結果各種の色調あるいは模様に関する遺伝子が確立され、インド型イネの紫米系と日本型イネとの交雑後代で紫米に固定された日本型イネが研究室規模で存在する。インド型イネの紫米と日本稲との交雑後代で紫米に固定された日本型イネの紫米のアントシアニンについての研究報告は、著者の一人である前川らの報告があるのみである¹³⁾。紫米は、栽培上、耐病性、耐雑草性にすぐれており、この特性は紫米のアントシアニン色素生成との関連が推定される。また、農産加工原料として日本型イネの紫米はインド型イネの紫米で問題となる物理的特性や臭いなどの問題もなく、形質導入は多くの利点が考えられる。

本報告は、インド型イネの紫米系質を日本型イネに導入した系統と、茎葉部のみ紫色を示す *PI* 遺伝子を導入した、準同質遺伝子型系統を用い、種子や葉からアントシアニンを分離し、日本型イネに導入された紫米におけるアントシアニン色素を同定し、紫米の加工食品への利用および分子生物学的基礎知見を得ることを目的とした。

方法と結果

1. 供試紫米

茎葉部の色素抽出には、北海道品種しおかりに日本稲 A-77 (紫イネ) の *PI* 遺伝子を導入した準同質遺伝子型系統しおかり PIBCF2 を、着色粒の色素抽出には、フィリッピン原産の紫米系統 Pirurutong に A-5 (赤室) および北海道在来種 A-13 (茶穂) を交雑して紫米を導入した系統 H406 を用いた¹³⁾。

2. 色素の抽出

i) しおかり PIBCF2 茎葉部からの色素の抽出・分離、紫色の茎葉部 (1.5 kg) をエタノール：酢酸：水、10：0.5：5 (V/V) に浸漬し、室温に一夜放置して色素を抽出した (2 回)。ロ別した色素抽出液を濃縮後、少量の 4% 酢酸-メタノール溶液に溶解し、不溶物を遠心分離で除いた後、上清部をシリカゲル ODS-Q3 (富工ゲル) のカラムにサンプリングした。カラムは 4% 酢酸を含む水、30% メタノール、メタノールで順次溶出した。

Table 1. Rf values and spectral properties of anthocyanin from leaves and grains of purple pigmented rice

Antho- cyanin	Rf values*				spectral data in 0.01% HCl-MeOH			FAB-MS [M ⁺]
	BAW	AH	1%HCl	BHA	λ_{\max} (nm)	E ₄₄₀ /E _{max} (%)	AlCl ₃	
Cy-3-glu	0.39	0.58	0.04	0.23				449
1	0.39	0.59	0.04	0.23	279,570	35	+	449
2	0.41	0.73	0.11	0.28	280,530	29	+	595
3	0.46	0.83	0.18	0.34	279,530	35		609
4	0.39	0.58	0.05	0.24				449
5	0.41	0.73	0.10	0.28				595

*BAW n-BuOH : AcOH : H₂O 4 : 1 : 2 (v/v)AH AcOH : HCl : H₂O 5 : 1 : 51%HCl HCl : H₂O 2 : 71BHA n-BuOH : 4_nHCl : AcOH : H₂O 7 : 2 : 1 : 5

鮮明な赤色を示した 30%メタノール(4%酢酸含有) 溶出区分を濃縮して粗色素を得た。粗色素区分を TLC (フナセル SF 20×20 cm, AcOH : HCl : H₂O 5 : 1 : 5 v/v) で展開した結果 Rf 値 0.59, 0.73, 0.83 に少くとも 3 つのスポットが確認された, それぞれ Rf 値の低い方から順に Pigment 1, 2 および 3 と仮称した。

粗色素区分は調製用 TLC (フナセル SF 20×20 cm, AcOH : HCl : H₂O 5 : 1 : 5), で精製を繰り返して, Pigment 1 (13.8 mg 乾固物), Pigment 2 (2.7 mg), Pigment 3 (1 mg) を得た。

ii) H-406 着色粒から色素の抽出・精製

H-406 (玄米) を軽く粉砕後, 1%塩酸・メタノールに浸漬して抽出を行った。抽出液を濃縮後, セファデックス LH-20 カラムを通して, 色素区分を集めた。粗色素区分は TLC の結果主成分の強いスポットとマイナー成分の 2 スポットのみが確認された。粗色素区分を調製用 TLC で精製して, Pigment 4 と 5 を単離した。

3. 色素の同定

i) Pigment 1 : FAB-MS スペクトルから M⁺ は m/z 449 に, m/z 287 (M⁺ - glucose) のピークが認められた。Pigment 1 を少量とり, 3 N-塩酸-メタノール溶液中で 100°C, 30 分間の加水分解を行った。放冷後, メタノールを留去し, 水で希釈した後, n-ブタノール抽出を行ってアグリコ

ン部 (n-ブタノール層) と糖部 (水層部) に分けた。糖部は炭酸銀で中和後 PPC および TLC (n-BuOH : Pyridine : H₂O 6 : 4 : 3 v/v) で標品と共に展開し, グルコースを同定した。またアグリコン部は標品とともに TLC (AcOH : HCl : H₂O 5 : 1 : 5 v/v) で展開して cyanidin を同定した。¹H-NMR (CF₃CO₂D-DMSO-d₆ 1 : 9) (図-2) では, アグリコン部のシアニジン由来の δ 8.95 (s, H-4), 8.26 (dd, J=2, 9Hz, H-6'), 8.03 (d, J=2Hz, H-2'), 7.03 (d, J=9Hz, H-5'), 6.90 (d, J=2Hz, H-8), 6.68 (d, J=2Hz, H-4) の 6 個のプロトンおよび糖部グルコース由来のアノメリックプロトンが δ 5.44 (d, J=6.8) に, その他の 6 個分のプロトンが δ 3.20-4.52 に認められた事から Pigment 1 を cyanidin 3-O- β -D-glucopyranoside と同定した。UV-VIS-スペクトル (0.01% HCl-MeOH) では λ_{\max} 279,570 nm で AlCl₃ 添加では深色移動を示しアントシアニン骨格の B 環に隣接するフェノール性の水酸基を有する事, また, E₄₄₀/E_{max} 値が 35% であることから Pigment 1 はモノグルコシドであり, 糖の結合位置が cyanidin の 3 位であることを裏付けている。最終的には標品の cyanidin 3-glucoside と ¹H-NMR, FAR-MS のスペクトルデータと TLC の Rf 値 (表-1) を比較することにより決定した。

ii) Pigment 2 : FAB-MS スペクトルから M⁺ は m/z 595 および m/z 449 (M⁺-rhamnose) のピ

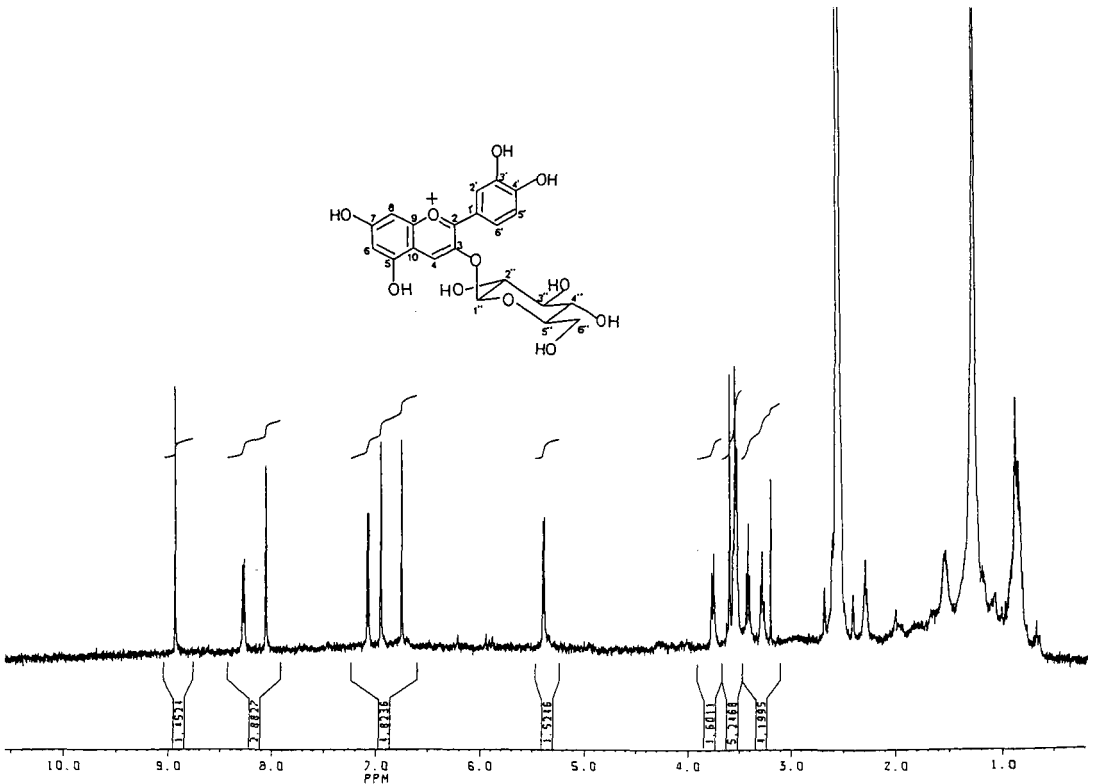


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Pigment 1 (cyanidin 3-O- β -D-glucopyranoside) isolated from leaves of purple pigmented rice.

ークが認められた。Pigment 2の塩酸による加水分解ではアグリコン部としては cyanidin を、糖部としてグルコースとラムノースを同定した。 $^1\text{H-NMR}$ -スペクトル(図-3)では、アグリコン部のシグナルは Pigment 1のシアニジンと同一ケミカルシフトカップリングで認められ、糖部グルコースのアノメリックプロトンが δ 5.34 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$)に、ラムノースのアノメリックプロトンが δ 4.49 (1H, brs)に認められる他グルコース、ラムノースに由来の各プロトンが δ 3.1~3.9に認められた事から Pigment 2を cyanidin 3-O-(6''-O-(α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, rutinoid)と同定した。UV-VIS-スペクトラムでは λ_{max} 280, 530 nm, AlCl_3 添加で深色移動を示し、E440/E_{max}は29%であり、Pigment 2の構造を裏付けた。

iii) Pigment 3 : FAB-MSから M^+ は m/z 609, また m/z 463 (M^+ -rhamnose),

301 (peonidin)のピークを認めた。Pigment 3の酸加水分解物から、アグリコンとして peonidin を、構成糖としてグルコースとラムノースを TLC上で確認した。 $^1\text{H-NMR}$ -スペクトルでは δ 3.93 (3H, s)にペオニジン3'位の $-\text{OCH}_3$ 基のシグナルが認められる以外は Pigment 2のNMRスペクトルはほぼ同一のケミカルシフトパターンを示した。Pigment 3を peonidin 3-O-(6''-O-(α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside)と同定した。UV-US-スペクトルでは λ_{max} 279, 530 nmで AlCl_3 添加では λ_{max} は移動を示さず、シアニジンのB環に存在した隣接するフェノール性水酸基が存在しない事を示している。E440/E_{max}35%であり、Pigment 3の構造を裏付けた。

iv) H-406着色粒からの色素の同定

H-406着色粒から抽出・精製した Pigment 4および5は表-1に示すごとく TLC上の R_f 値およびFAB-MSの M^+ ピークを比較し、それぞ

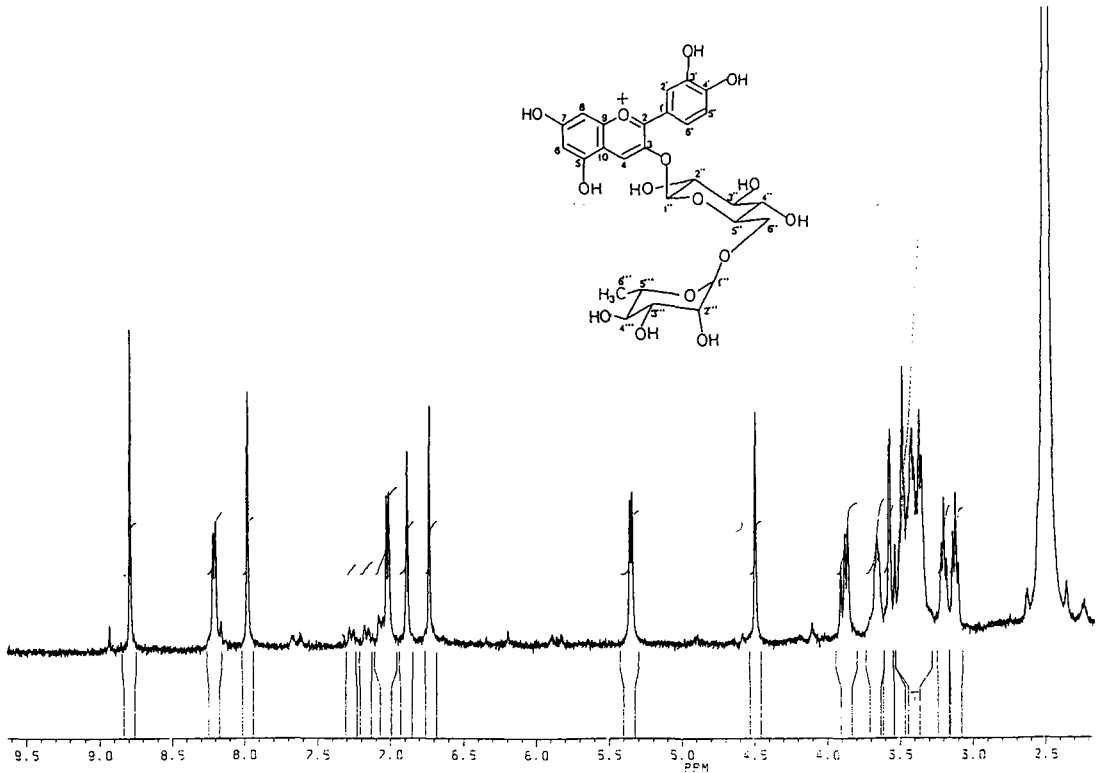


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Pigment 2 (cyanidin 3-O-(6''-O-(α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside) isolated from leaves of purple pigmented rice.

れ Pigment 1, 2 と同一であり, Pigment 4 を cyanidin 3-glucoside Pigment 5 を cyanidin 3-rutinoside と同定した。

考 察

紫米は C (花青素色原素), A (アクチベータ) と Pl^w (紫葉) の 3 遺伝子の補足作用によることが遺伝子分析から明らかにされている⁷⁾。

しおかり PIBCF 2 はしおかりに日本稲 A-77 (紫イネ) の Pl 遺伝子を導入し, 葉身・葉鞘のみ紫色となり玄米部は着色しない。しおかり PIBCF 2 の紫葉部から抽出したアントシアニンは cyanidin 3-glucoside を主成分とする cyanidin 3-rutinoside および peonidin 3-rutinoside の 3 種類であった。正確な定量は行なわなかったが, TLC に展開後の粗色素区の各スポットをかき取り, 単純に比色した結果では cyanidin 3-glucoside のアントシアニン中の存在

比は 70% 以上と測定された。 Pl^w 遺伝子を有し紫葉・紫米である H-406 の玄米部の色素抽出の結果も, 粗色素区分は, TLC 上で cyanidin 3-glucoside が大半であり, 少量の cyanidine 3-rutinoside を認めたにすぎない。インド型イネの紫米のアントシアニンの構成比においても cyanidin 3-glucoside が大半であり, 少量の cyanidine 3-rutinoside を認められてるにすぎない。インド型イネの紫米のアントシアニンの構成比においても cyanidin 3-glucoside が 60% 以上を占めるとの報告もあり^{11,12)}, これらの結果を考慮すると紫米の呈色主要成分は cyanidin 3-glucoside である。又, アントシアニンのアグリコン部はインド型イネ, 日本型イネの紫米とも cyanidin と peonidin の 2 種のみであり, 他のアントシアニジンの存在については今の所報告例がない。インド型イネの紫米から比較的多種類のアントシアニンが同定されているに比べ, Pl^w 遺伝

子導入で発現される日本型イネの紫米のアントシアニンは cyanidin 3-glucoside を圧倒的の多量な主成分とし、他のアントシアニンは質的にも量的にも微量であり、アントシアニンの構成は非常に単純化されている¹⁴⁾。Pl^w 遺伝子導入による紫米アントシアニンの発現制御は興味ある問題である。

天然色素の直接的利用という観点から、紫米アントシアニン(主構成成分 cyanidin 3-glucoside)の食品加工における有効利用は今後の課題である。既にインド型イネの紫米を原料として用いた、日本酒醸造やリキュールへの利用報告があるが、今後は日本型イネに Pl^w 遺伝子を導入した紫米による加工食品への原料として研究が多くなる事が予想される。利点は日本型イネを直接利用できる点であり、問題点は紫米における着色層は種皮部であり、清酒等への利用の場合精白で大部分の色素は「ヌカ」部に移行してしまう事である。紫米色素を「ヌカ」から抽出利用する場合はその原料の利点は大半は失なわれる。育種の改良が望まれる。

引用文献

1. Takahasi, A., Takeda, K. and Ohnishi, T. Light Induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centauna cyanus* cell in culture. *Plant Cell physiol* **32**, 541-547 (1991)
2. Igarashi, K., Abe, S. and Satoh, J. Effects of *Atsmi-Kabu* (Red Turnip, *Brassica campestris* L.) Anthocyanin on serum Cholesterol Levels in Cholesteron-fed Rats. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 171-175 (1990)
3. 木下俊郎：日本型・インド型間における連鎖群の異同。育種学最近の進歩、第17集：19-34 (1976)
4. Reddy, V. S., Dash, S. and Reddy, A. R. Anthocyanin pathway in rice (*Oryza sativa* L.) : identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf and accumulation of proanthocyanins in pericarp. *Theor. Appl. Genet.* **91** : 301-312 (1995)
5. Ahn, S. and Tanksley, S. D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90** : 7980-7984 (1993)
6. Hu, J., Anderson, B. and Wessler, S. R. Isolation and Characterization of *R* genes : evidence for distinct evolutionary plant in rice and maize. *Genet.* **142** : 1021-1031 (1996)
7. Nagao, S., Takahashi, M. and Kinoshita, T. Genetical studies on rice plant XXVI. Mode of inheritance and causal genes for one type of anthocyanin color character in foreign rice varieties. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **52** : 20-50 (1962)
8. Nagao, S. and Takahashi, M. Genetical studies on rice plant XXVII. Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **53** : 72-107 (1963)
9. Nagai, I., Suzushino, G. and Suzuki, Y. Anthoxanthins and anthocyanins in Orizaceae. *Japan. J. Breed.* **10** : 247-260 (1960)
10. Nagao, S., Takahashi, M. and Miyamoto, T. Genetical studies on rice plant. XXI. Biochemical studies on red rice pigmentation. *Japan. J. Genet.* **32** : 124-128 (1957)
11. Takahashi, K., Sugimoto, T., Miura, T., Washizu, Y. and Yoshizawa, K. Isolation and Identification of Red Rice Pigments. *J. Brew. Soc. Japan* **84** : 807-812 (1989)
12. Terahara, N., Saigusa, N., Ohba, R. and Ueda, S. Composition of Anthocyanin Pigments in Aromatic Red Rice and its Wine. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **41** : 519-522 (1994)
13. 前川雅彦, 喜多富美治 イネにおける遺伝的着色粒の抽出色素の分光特性. 北海道大学農学部農場研究報告 第23号 : 11-21 (1983)
14. 佐藤博二, 前川雅彦 未発表データ
15. Yoshinaga, K., Takahashi, K. and Yoshizawa, K. Liqueur Making Using Pigments of Red Rice J. *Brew. Soc. Japan* **81** : 337-340 (1986)

Anthocyanins from Purple Pigmented Rice (Japonica type)

Hiroji SATO, Hideki NAKANO

(Experiment Farms, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060 Japan)

Masahiko MAEKAWA

(Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710 Japan)

Rie KANAUCHI, Akitami ICHIHARA

(Department of Bioscience and Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060 Japan)

(Received January 22, 1997)

Summary

The chemical structure of anthocyanin in purple pigmented rice were studied. The chemical structure of three anthocyanins in purpul leaves of Shiokari PIBCF2 have been identified as cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-rutinoside, and peonidin 3-rutinoside by NMR and FABMS spectroscopy. The major anthocyanin of purpul pigmented brown rice (H406) has been identified as cyanidin 3-glucoside.