



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102365287 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 29

(21) 申请号 201080013953. 1

(22) 申请日 2010. 03. 25

(30) 优先权数据

2009-080524 2009. 03. 27 JP

2009-115722 2009. 05. 12 JP

2009-173096 2009. 07. 24 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 09. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/055262 2010. 03. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02010/110382 JA 2010. 09. 30

(71) 申请人 三得利控股株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 福井祐子 田中良和

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司 11290

代理人 张淑珍 王维玉

(51) Int. Cl.

C07D 493/16 (2006. 01)

A01H 1/00 (2006. 01)

A01H 5/00 (2006. 01)

A01H 5/02 (2006. 01)

C07H 9/02 (2006. 01)

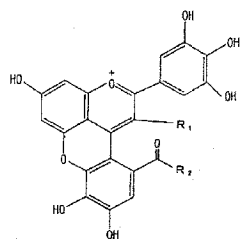
权利要求书 6 页 说明书 13 页 附图 12 页

(54) 发明名称

蓝月季中含有的新型化合物

(57) 摘要

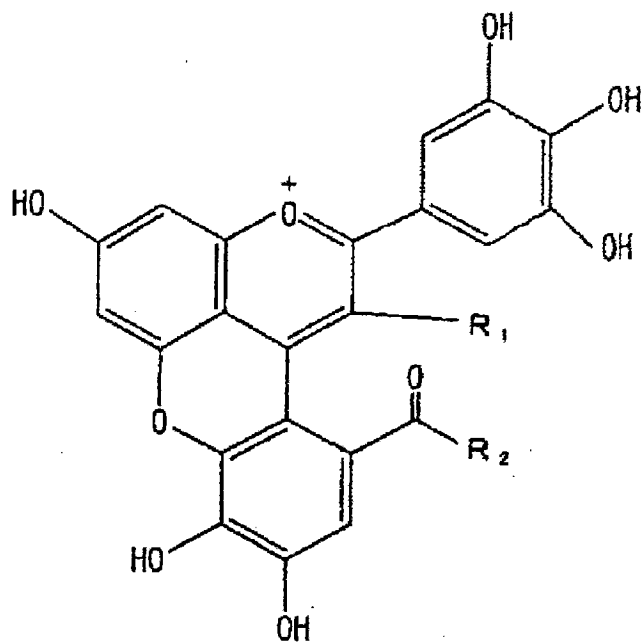
本发明提供蓝月季中含有的新型化合物。本发明涉及的新型化合物,存在于蓝月季中,具有下述通式(I)表示的化学结构。本发明还提供含有该新型化合物的月季植物及其部分。



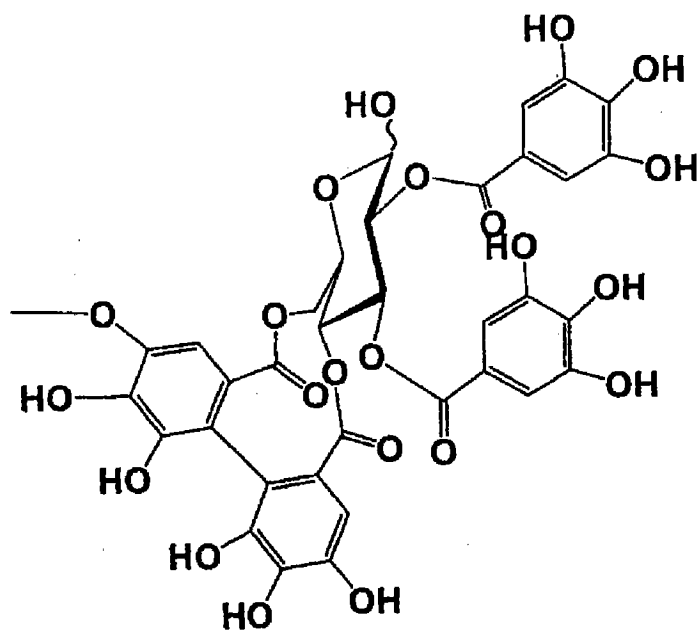
式中, R_1 为下述基团, 且 R_2

为 -OH, 或 R_1 和 R_2 一起形成 -O-, 或 R_1 为下述基团, 且 R_2 为 -OH, 其中, R_1 中葡萄糖的 1 位的羟基的配位 (波浪线) 显示 α 体与 β 体的互变异构性。

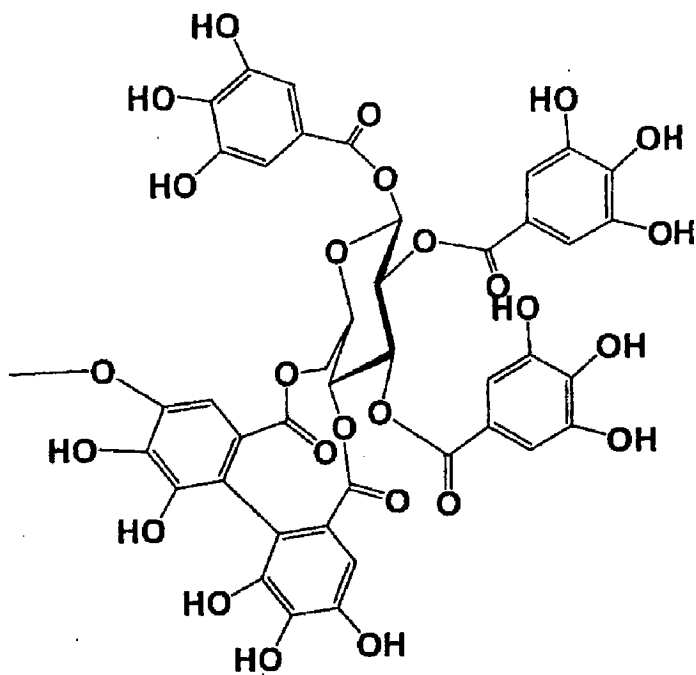
1. 一种化合物,其特征在于,由下述通式 (I) 表示,



式中, R_1 是下述基团:

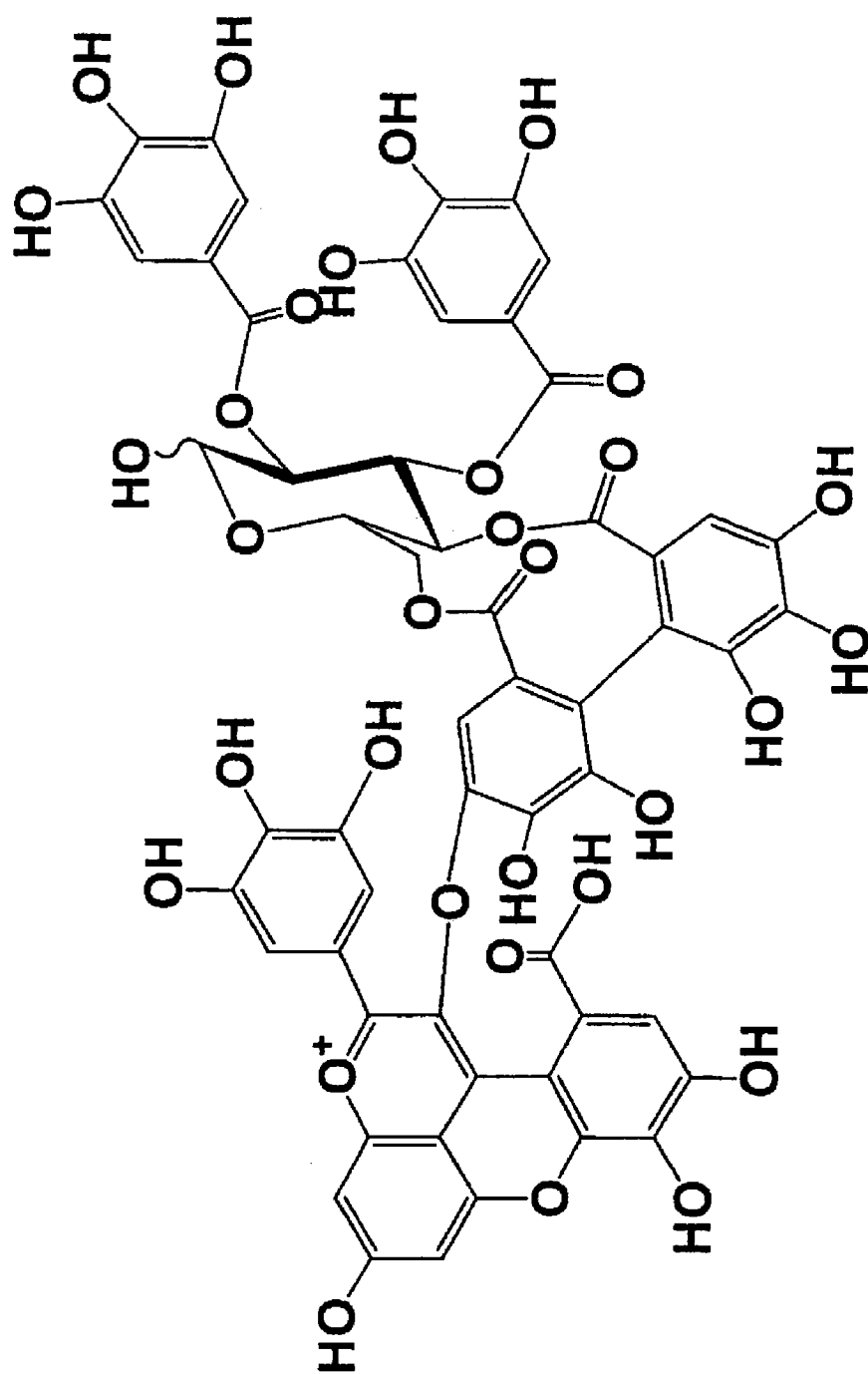


且 R_2 是 -OH, 或 R_1 和 R_2 一起形成 -O-, 或 R_1 是下述基团:

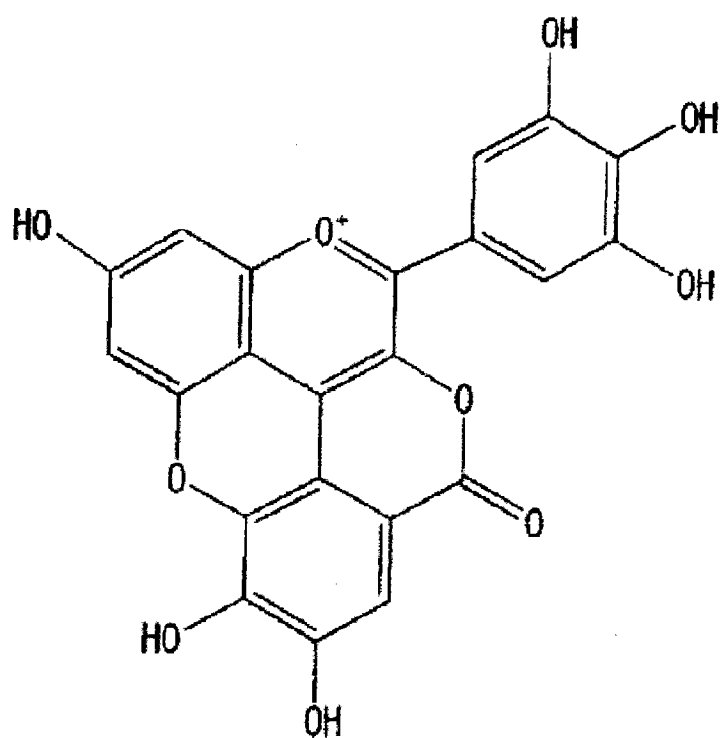


且 R_2 是 $-OH$, 其中, R_1 中葡萄糖的 1 位的羟基的配位即波浪线显示 α 体与 β 体的互变异构性。

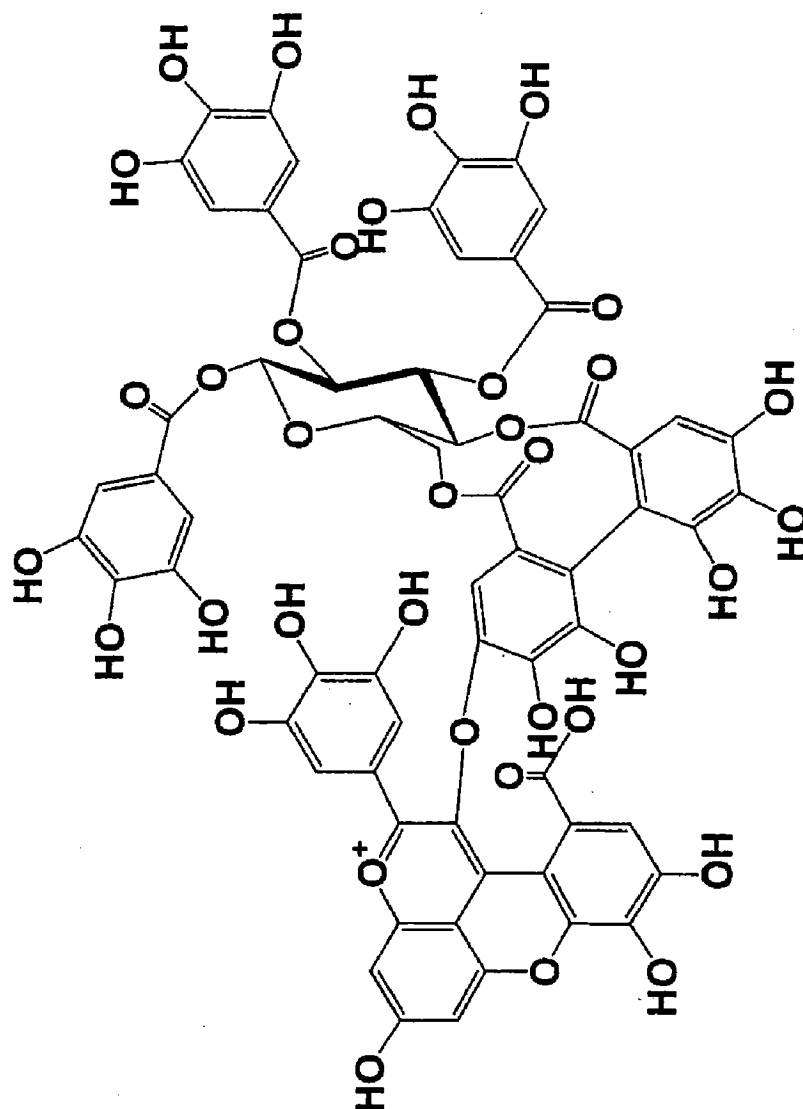
2. 一种化合物, 其特征在于, 由下式表示。



3. 一种化合物,其特征在于,由下式表示。



4. 一种化合物,其特征在于,由下式表示。



5. 一种植物,其特征在于,含有权利要求1~4中任一项所述的化合物,但该植物并非天然含有该化合物。

6. 根据权利要求5所述的植物,其特征在于,是蔷薇科的植物。

7. 根据权利要求6所述的植物,其特征在于,所述蔷薇科的植物是蔷薇科蔷薇属的植物。

8. 根据权利要求7所述的植物,其特征在于,所述蔷薇科蔷薇属的植物是蔷薇科蔷薇属月季。

9. 一种植物的部分,其特征在于,是权利要求5~8中任一项所述的植物的部分。

10. 根据权利要求9所述的植物的部分,其特征在于,是切花。

11. 一种切花加工品,其特征在于,使用了权利要求10所述的切花。

12. 一种改变植物花色的方法,其特征在于,使用权利要求1~4中任一项所述的化合物。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于,所述植物是蔷薇科的植物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述蔷薇科的植物是蔷薇科蔷薇属的植物。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于,所述蔷薇科蔷薇属的植物是蔷薇科蔷薇属月季。

蓝月季中含有的新型化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及植物、特别是通过基因重组而被赋予了生产花翠素的能力的月季的色素即新型化合物、以及含有该色素的月季等植物及其部分。本发明还涉及使用该化合物来改变植物花色的方法。

背景技术

[0002] 月季作为切花,是重要的植物,人们对其色素进行了详细调查。例如,作为花青素苷类色素,已知的有矢车菊素 3,5-二葡萄糖苷、天竺葵素 3,5-二葡萄糖苷、矢车菊素 3-葡萄糖苷、天竺葵素 3-葡萄糖苷、芍药花青素 3,5-二葡萄糖苷、芍药花青素 3-葡萄糖苷等。包含这些色素在内的花青素苷的生物合成途径已为人知。

[0003] 另外,通过基因重组而表达了类黄酮 3',5'-羟基化酶基因的月季(参照以下的专利文献 1、专利文献 2)生产花翠素二葡萄糖苷(以下也称为花翠素 3,5-二葡萄糖苷)。此时,认为类黄酮 B 环的 5'位的羟基化反应发生在黄烷酮或黄烷酮醇的阶段。由于类黄酮 3',5'-羟基化酶是存在于内质网的细胞色素 P450 的一种,因此认为该羟基化反应发生在内质网上。催化花青素苷类的生物合成反应的酶、例如花青素糖基转移酶不仅没有信号肽等序列,而且还是可溶性蛋白,因此存在于细胞的细胞质中。花青素苷类糖基化后,通过泵被运送到液泡。

[0004] 另一方面,据报道至少在一部分月季中存在化合物玫瑰花青苷类(参照图 1),玫瑰花青苷 A1、玫瑰花青苷 B 和玫瑰花青苷 A2 等的结构也已被确定(例如参照以下的专利文献 3 或非专利文献 1)。

[0005] 玫瑰花青苷由于其结构的一部分具有矢车菊素骨架,因此认为可能基于矢车菊素、或与矢车菊素共同的前体、或矢车菊素的类似物而合成。但是,这只是推测,实际上以何种物质为前体,经过何种途径被合成还尚不清楚。

[0006] 另一方面,在如上所述通过基因重组而表达了类黄酮 3',5'-羟基化酶基因的月季中,取代矢车菊素的部分,合成花翠素。如果上述有关玫瑰花青苷合成途径的假设、即以矢车菊素为前体合成玫瑰花青苷的假设正确,则在作为前体的矢车菊素几乎不存在的这些基因重组月季中,不会合成玫瑰花青苷类。

[0007] 发明者为了得知玫瑰花青苷合成体系,使用专利文献 1 或专利文献 2 中记载的几乎不含矢车菊素或矢车菊素含量明显低于宿主的上述基因重组月季,进行了分析,结果与预想的相反,发现存在与原本月季所具有的玫瑰花青苷类的化学结构明显不同的新型化合物。还发现该新型化合物特异性地存在于通过基因重组而表达了类黄酮 3',5'-羟基化酶基因的月季中,从而完成了本发明。

[0008] 专利文献 1 国际公开 W02004/020637 公报

[0009] 专利文献 2 国际公开 W02005/017147 公报

[0010] 专利文献 3 日本国特开 2002-201372 号公报

[0011] 非专利文献 1 Tetrahedron 62(2006)9661-9670

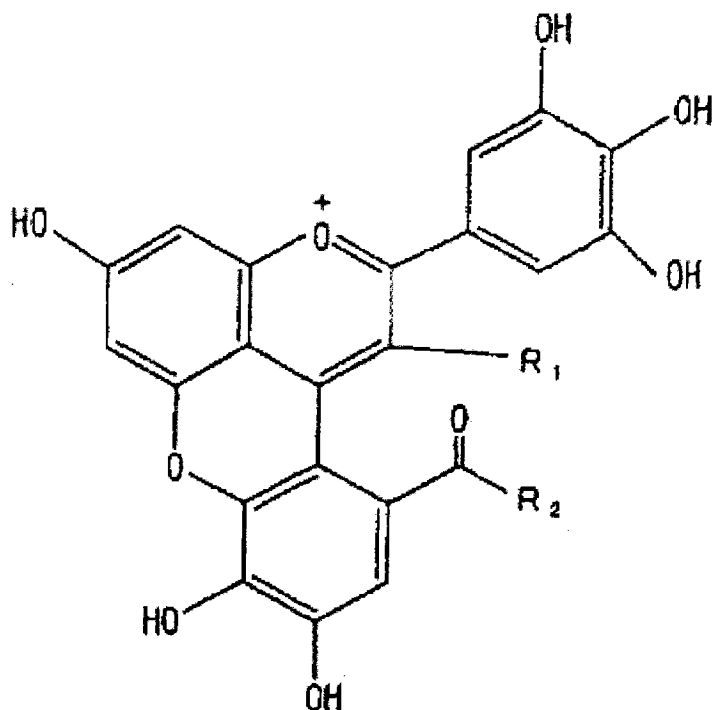
发明内容

[0012] 本发明要解决的技术问题在于,提供植物、特别是通过基因重组而被赋予了生产花翠素的能力的月季的色素即新型化合物,以及含有该色素的月季等植物及其部分。另外,本发明要解决的技术问题还在于,提供使用该化合物来改变植物花色的方法。

[0013] 本发明如下所述。

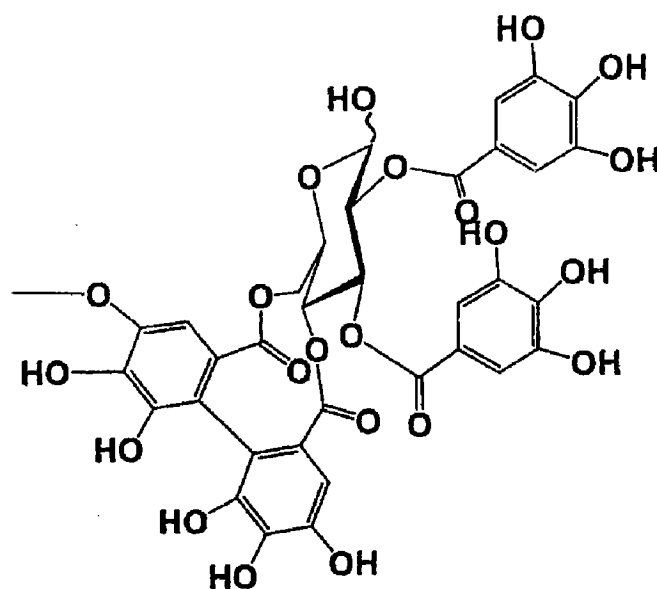
[0014] [1] 一种化合物,其特征在于,由下述通式 (I) 表示,

[0015]



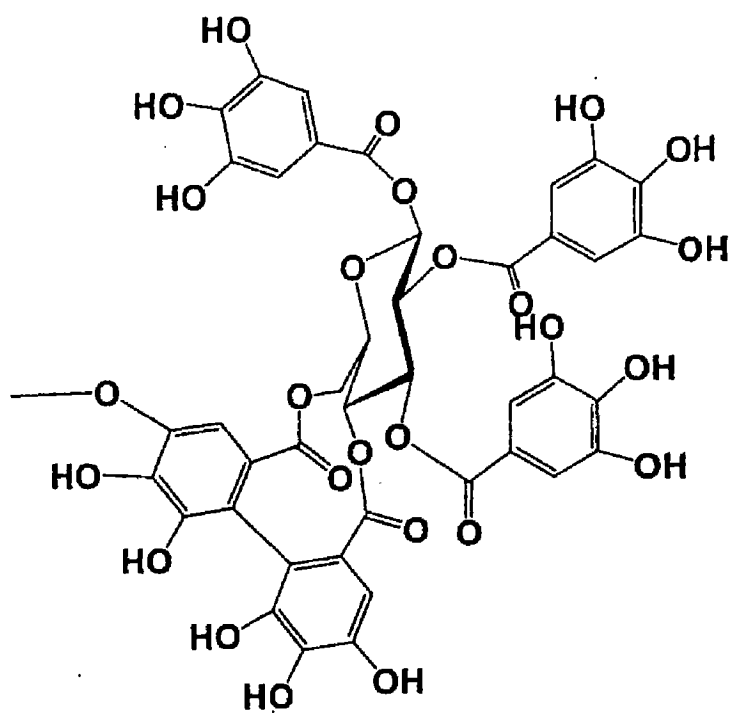
[0016] 式中, R_1 是下述基团:

[0017]



[0018] 且 R_2 是 -OH, 或 R_1 和 R_2 一起形成 -O-, 或 R_1 是下述基团:

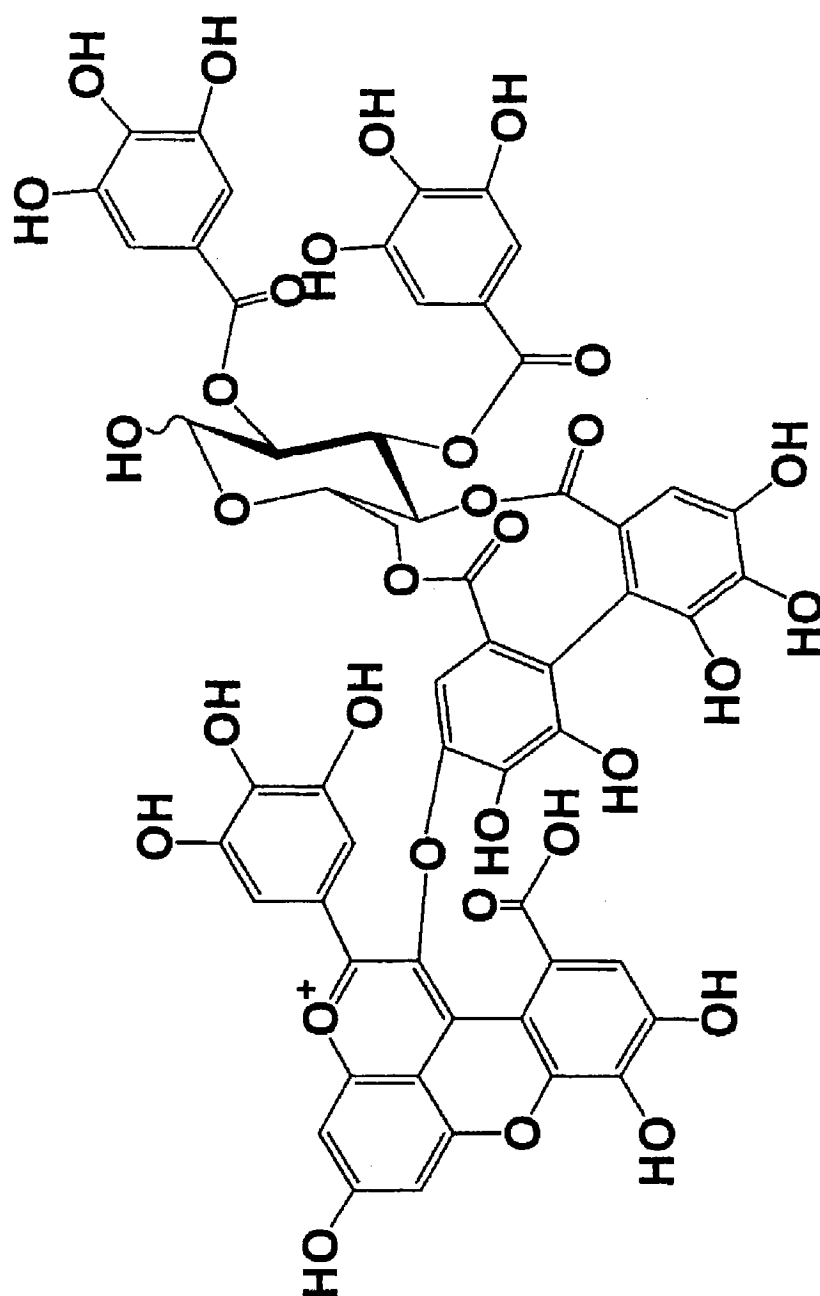
[0019]



[0020] 且 R_2 是 $-OH$, 其中, R_1 中葡萄糖的 1 位的羟基的配位 (波浪线) 显示 α 体与 β 体的互变异构性。

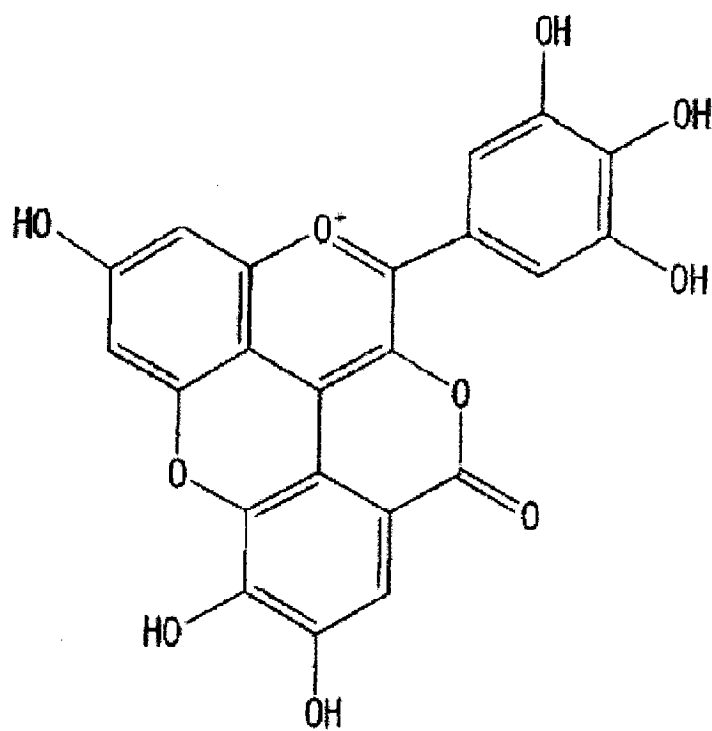
[0021] [2] 一种化合物, 其特征在于, 由下式表示。

[0022]



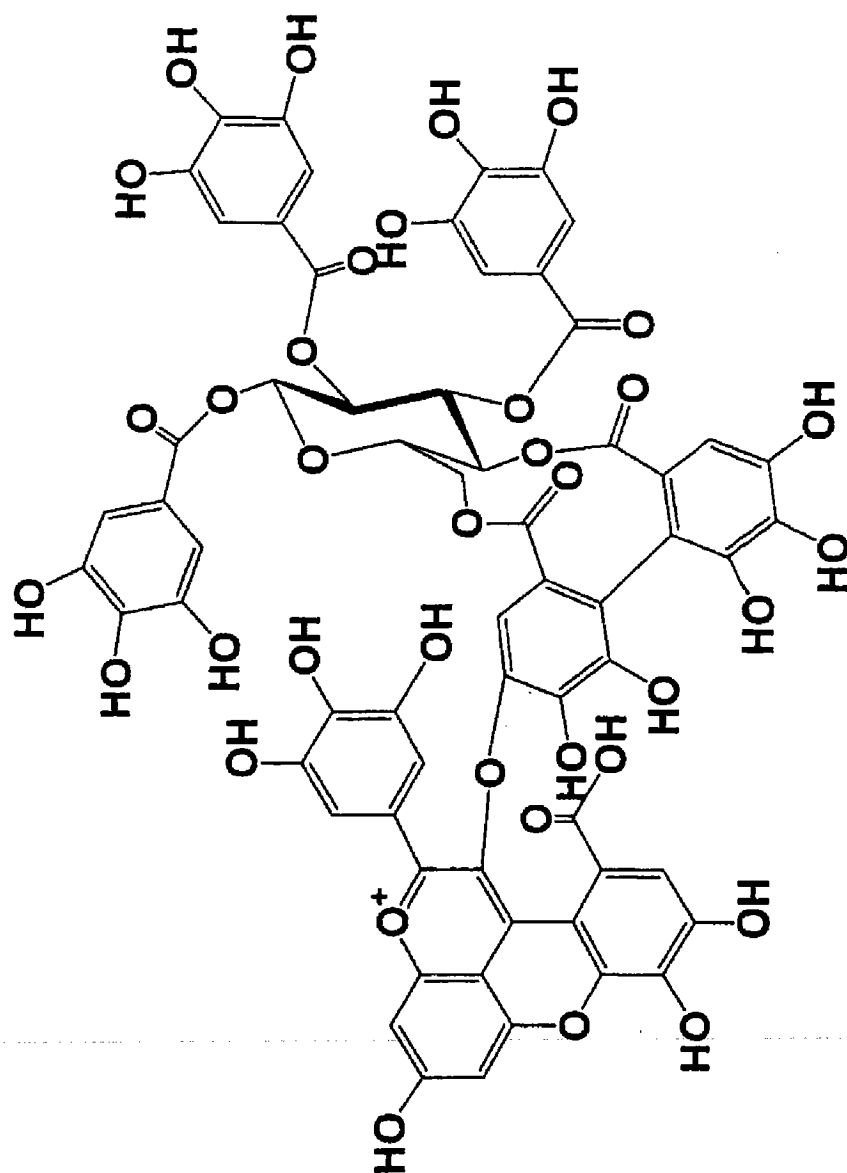
[0023] [3] 一种化合物,其特征在于,由下式表示。

[0024]



[0025] [4] 一种化合物,其特征在于,由下式表示。

[0026]



[0027] [5] 一种植物,其特征在于,含有上述[1]~[4]中任一项所述的化合物,但该植物并非天然含有该化合物。

[0028] [6] 根据上述[5]所述的植物,其特征在于,为蔷薇科的植物。

[0029] [7] 根据上述[6]所述的植物,其特征在于,上述蔷薇科的植物是蔷薇科蔷薇属的植物。

[0030] [8] 根据上述[7]所述的植物,其特征在于,上述蔷薇科蔷薇属的植物是蔷薇科蔷薇属月季。

[0031] [9] 一种植物的部分,其特征在于,是上述[5]~[8]中任一项所述的植物的部分。

[0032] [10] 根据上述[9]所述的植物的部分,其特征在于,是切花。

[0033] [11] 一种切花加工品,其特征在于,使用了上述[10]所述的切花。

[0034] [12] 一种改变植物花色的方法,其特征在于,使用上述[1]~[4]中任一项所述的化合物。

[0035] [13] 根据上述[12]所述的方法,其特征在于,上述植物是蔷薇科的植物。

[0036] [14] 根据上述[13]所述的方法,其特征在于,上述蔷薇科的植物是蔷薇科蔷薇属的植物。

[0037] [15] 根据上述 [14] 所述的方法,其特征在于,上述蔷薇科蔷薇属的植物是蔷薇科蔷薇属月季。

[0038] 通过本发明,提取、单离、精制蓝月季的花瓣中的新型色素,弄清楚了其化学结构。这是利用基因工程改变月季的颜色来制作新型蔷薇科植物的研究的基础。另外,本发明涉及的新型色素,例如可用于通过使月季等切花吸收来改良切花的颜色,还可作为植物性天然色素用于例如饮食物的着色等。

附图说明

[0039] 图 1 所示为矢车菊素、花翠素、玫瑰花青苷的化学结构式。

[0040] 图 2 所示为被导入到淡紫色系月季品种“Lavande”中的质粒 pSPB919 的结构。

[0041] 图 3 是蓝色色素 (1) 在 30% 乙腈、0.5% TFA 中的可见~紫外吸收光谱图。

[0042] 图 4 是蓝色色素 (1) 利用 HPLC 分析得到的色谱,该化合物由于葡萄糖的 1 位的羟基显示 α 体和 β 体互变异构性,因此可见 2 个峰。

[0043] 图 5 是红色色素 (2) 在 30% 乙腈、0.5% TFA 中的可见~紫外吸收光谱图。

[0044] 图 6 是红色色素 (2) 利用 HPLC 分析得到的色谱。

[0045] 图 7 是蓝色色素 (3) 在 30% 乙腈、0.5% TFA 中的可见~紫外吸收光谱图。

[0046] 图 8 是蓝色色素 (1) 的化学结构式。图中,葡萄糖羟基的配位 (波浪线) 显示 α 体和 β 体的互变异构性。

[0047] 图 9 是红色色素 (2) 的化学结构式。

[0048] 图 10 是蓝色色素 (3) 的化学结构式。

[0049] 图 11 是图 8 所示的蓝色色素 (1) 的 ^1H NMR 谱图。

[0050] 图 12 是图 8 所示的蓝色色素 (1) 的 ^{13}C NMR 谱图。

[0051] 图 13 是图 9 所示的红色色素 (2) 的 ^1H NMR 谱图。

[0052] 图 14 所示为被导入到淡紫色系月季“WKS82”中的质粒 pSPB130 的结构。

具体实施方式

[0053] 本发明涉及的新型色素,具有在公知物质玫瑰花青苷 A1、玫瑰花青苷 B 和玫瑰花青苷 A2 (B 环的羟基数为 2 个) 的 B 环上进一步追加了 1 个羟基得到的结构。换言之,本发明涉及的新型蓝色色素可以说是具有存在于蓝月季中的公知物质蓝色色素花翠素部分结构 (B 环的羟基数为 3 个) 的新型化合物。

[0054] 如专利文献 1 或专利文献 2 所述,通过发挥蓝色基因 (类黄酮 3',5'-羟基化酶) 的功能,使蓝月季中存在以往的月季品种植物中不存在的蓝色色素 (B 环具有 3 个羟基)。这次,作为这样的蓝色色素,单离・精制具有在公知物质玫瑰花青苷 A1、玫瑰花青苷 B 和玫瑰花青苷 A2 (B 环的羟基数为 2 个) 的 B 环上进一步追加了 1 个羟基得到的结构的化合物,用 TOF-MS 和 NMR 进行鉴定,确定了其结构。

[0055] 本发明的 3 种化合物是分别产生图 3、图 4、图 11 和 / 或图 12 所示数据的化合物,或产生图 5、图 6、图 9 和 / 或图 13 所示数据的化合物,或产生图 7 所示数据的化合物。

[0056] 与花青素苷类、例如矢车菊素相比,分子量大的玫瑰花青苷类通过在其 B 环上进一步追加了 1 个羟基而具有 3 个羟基,使溶解度提高效果进一步增强,因此从运送到花瓣细

胞的液泡显示蓝色的角度来讲是更有效的色素。另外,玫瑰花青苷类与普通的色素相比,具有在植物体内合成这一优点。此外,本发明还提供含有图 8~图 10 所示化合物的植物。但是,该植物并非天然含有该化合物或在其花瓣中不存在能检测到的量的该化合物。本发明还提供使用图 8~图 10 所示的化合物来改变植物花色的方法。例如,本发明涉及的化合物只能如下来获得:将参与本发明涉及的化合物的合成的酶的基因,利用遗传工程方法导入到目标植物中,使植物的花瓣内合成能检测到的规定量的该化合物。或者,还可以采用使植物直接吸收本发明涉及的化合物这样的物理方法,但目标植物含有该化合物的方式不限于这些。

[0057] 本发明的植物体在花瓣内含有图 8~图 10 所示的化合物。植物体的花瓣中这些化合物的含有率没有特殊限制,优选单位花瓣湿重为 0.00001mg/g 以上。下限值进一步优选为 0.0001mg/g 以上,更优选为 0.0007mg/g 以上。上限值优选为 1mg/g 以下,进一步优选为 0.5mg/g 以下,更优选为 0.13mg/g 以下。

[0058] 作为目标植物的例子,可以列举月季、菊花、康乃馨、金鱼草、仙客来、兰花、洋桔梗、香雪兰、非洲菊、唐菖蒲、丝石竹、长寿花、百合、天竺葵(一季开花)、老鹳草、矮牵牛、夏堇、郁金香、稻子、大麦、小麦、油菜籽、土豆、西红柿、杨树、香蕉、桉树、地瓜、大豆、紫花苜蓿、鲁冰花、玉米、花椰菜等,但不限于这些。

[0059] 其中优选蔷薇科的植物,进一步优选蔷薇科蔷薇属的植物,更优选以现代月季为代表的蔷薇科蔷薇属月季。

[0060] 本发明还涉及上述植物的部分、特别是切花、使用了该切花的切花加工品。这里,作为切花加工品,包含使用了该切花的压花、保鲜花、干花、树脂密封品等,但不限于此。

[0061] 实施例

[0062] 以下,结合实施例来具体地说明本发明。

[0063] 实施例 1:色素化合物的单离、精制

[0064] 以蓝月季为提取源,单离精制本发明的色素化合物。

[0065] 导入了质粒 pSPB919 的品种 Lavande 的制作

[0066] 制作提取源蓝月季。用以下所示的方法,制作导入了质粒 pSPB919 的品种 Lavande。

[0067] 从切花蓝鸢尾花瓣得到 RNA,然后制备 polyA⁺RNA。由该 polyA⁺RNA,使用 cDNA 文库构建试剂盒(Stratagene 公司),按照制造者推荐的方法,构建以 λ ZAPII(Stratagene 公司)为载体的 cDNA 文库。鸢尾的 DFR 基因片段,与得到龙胆的 DFR 基因片段的报告同样来获得(Tanaka et al.Plant Cell Physiol.37,711-716,1996)。

[0068] 使用 Gene Clean,按照制造者推荐的方法,将得到的约 400bp 的 DNA 片段回收,亚克隆到 pCR-TOPO。确定其碱基序列,结果发现了与月季 DFR 基因相同的序列。使用该 DNA 片段筛选鸢尾 cDNA 文库,得到含有全长的氨基酸序列的鸢尾 DFRcDNA。其中,确定作为 pSPB906 的克隆中含有的 cDNA 的全部碱基序列(碱基序列和氨基酸序列参照专利文献 2 的序列号 9 和序列号 10)。

[0069] 接着,将 pSPB580 经 BamHI 和 XhoI 酶切得到的约 3.9kb 的 DNA 片段与 pSPB906 经 BamHI 和 XhoI 酶切得到的约 1.5kb 的 DNA 片段连接得到的质粒作为 pSPB909。

[0070] 植物中月季 DFRcDNA 的双链 RNA 的转录如下来进行。将 pCGP1364(Tanaka et

al. Plant Cell Physiol. (1995) 36 1023-1031) 经 PstI 部分酶切得到的约 3.5kb 的 DNA 片段 (包含 MacI 启动子、月季 DFRcDNA、mas 终止子), 插入 pUC19 (Yanisch-Perron C et al., Gene 33 :103-119, 1985) 的 PstI 位点, 在由此得到的质粒中, 将 pUC19 的 Hind III 位点与 MacI 启动子接近的质粒作为 pCGP1394。

[0071] 接着, 将 pCGP1394 经 HindIII 和 SacII 酶切得到的约 1.4kb 的 DNA 片段、pCGP1394 经 PstI 酶切后进行平滑末端化然后经 SacII 酶切得到的约 1.9kb 的 DNA 片段、pBinPLUS 经 SacI 酶切后进行平滑末端化然后用 HindIII 酶切得到的双元载体片段连接, 得到 pSPB185。通过将 pSPB185 用 XbaI 酶切, 进行平滑末端化, 与 SalI 接头连接, 得到 pSPB521。将 pUE6 经 HindIII 和 BamHI 酶切得到的约 700bp 的 DNA 片段、pSPB521 经 HindIII 和 SacI 酶切得到的双元载体 DNA 片段、pE2113 经 BamHI 和 SacI 酶切得到的 GUS 基因 DNA 片段连接, 得到 pSPB528。

[0072] pSPB528 是能在具有增强子的花椰菜花叶病毒 35S 启动子和甘露碱合成酶终止子之间插入结构基因并使其在植物中表达的双元载体。由于 pCGP645 中含有的月季 DFRcDNA 的 5' 非翻译区序列变短, pCGP645 经 SmaI 和 PvuI 酶切后进行平滑末端化, 连接得到 pCGP645s。

[0073] 以 pCGP645s 为模板, 以反向引物和合成引物 RDF310 (参照专利文献 2 的序列号 19) 为引物, 通过 PCR 扩增得到月季 DFRcDNA 的 5' 旁侧序列, 克隆到 pCRTOP0。测定 DNA 的碱基序列, 证实了无 PCR 错误。将其作为 pSPB569。另外, 以 pCGP645s 为模板, 以反向引物和合成引物 RDF830 (参照专利文献 2 的序列号 20) 为引物, 通过 PCR 扩增得到长度不同的月季 DFRcDNA 的 5' 旁侧序列, 克隆到 pCRTOP0。测定 DNA 的碱基序列, 证实了无 PCR 错误。

[0074] 将其作为 pSPB570。将 pSPB528 经 BamHI 和 SacI 酶切得到的双元载体的 DNA 片段、pSPB569 经 SacI 和 XhoI 酶切得到的 0.3kb 的 DNA 片段、pSPB570 经 BamHI 和 SalI 酶切得到的 DNA 片段连接, 得到 pSPB572。该载体设计成在植物中转录月季 DFRcDNA 的双链 RNA。

[0075] 将 pUE6 用 SacI 酶切, 进行平滑末端化, 插入 SalI 接头, 得到 pUE8。将 pUE8 经 HindIII 和 EcoRI 酶切得到的 DNA 片段导入 pBinPLUS 的 HindIII 和 EcoRI 位点, 制成 pSPB189。将 pSPB189 经 BamHI 和 SalI 酶切得到的约 3.7kb 的 DNA 片段和 pCGP1961 经 BamHI 完全酶切后经 XhoI 部分酶切得到的约 1.8kb 的 DNA 片段连接, 得到 pSPB567。将 pSPB572 用 PacI 酶切, 进行去磷酸化处理后, 与 pSPB567 经 PacI 酶切得到的约 2.8kb 的 DNA 片段连接, 选择 nptII 基因和来自三色堇的 F3' 5' H#40 同向转录的质粒, 作为 pSPB905。

[0076] 将 pSPB905 用 AscI 酶切, 进行去磷酸化处理后, 与 pSPB909 经 AscI 酶切得到的约 2.5kb 的 DNA 片段连接, 得到与 nptII 基因同方向地转录鸢尾 DFR 基因的质粒, 作为 pSPB919 (参照图 2)。预期该质粒在月季中转录来自鸢尾的 DFR 基因和来自三色堇的 F3' 5' H#40 基因, 通过双链 RNA 的转录来控制月季的 DFR 基因的表达。将该质粒导入根癌农杆菌 Ag10 株。

[0077] 通过感染该农杆菌, 向淡紫色系月季品种“Lavande”导入 pSPB919 (参照图 2), 得到转化体。使转化细胞分化, 得到重组植物体蓝月季 (导入了质粒 pSPB919 的品种 Lavande), 使其开花。

[0078] 色素化合物的提取、单离、精制、鉴定

[0079] 由如上述那样得到的蓝月季 (导入了质粒 pSPB919 的品种 Lavande) 的花瓣 230g,

采用以下的方法,精制色素化合物。

[0080] 使用匀质机将花瓣 230g 在液氮中冷冻粉碎,加入 1L 含 0.5% TFA 的 50%乙腈,浸渍一晚。使用旋转蒸发器将经硅藻土过滤得到的滤液浓缩到约 2/5 的体积。

[0081] 将该浓缩得到的提取液载荷于吸附树脂 HP-20(三菱化成株式会社)400ml。800ml 水洗后,用 1L 含 0.1% TFA 的 20%乙腈、含 0.1% TFA 的 60%乙腈逐级洗脱。在 60%组分中洗脱出含蓝色色素的组分。

[0082] 用以下的制备 HPLC 将该组分精制。色谱柱采用 Develosil-ODS-UG(野村化学公司制)5cm ϕ ×50cm,流动相采用 A:水、B:50%乙腈 0.5% TFA,流速为 32ml/min,B30%(保持 30 分钟)B30→B100%的线性梯度(50 分钟)、B100%保持 20 分钟。检测在 A260nm 下进行。收集在 67~82 分钟洗脱出来的含有蓝色色素的组分,冷冻干燥。色谱重复两次。

[0083] 将该冷冻干燥品 1.2g 载荷于经 50%乙腈平衡后的 SephadexLH-20 柱(Pharmacia)(1.2L)。用 50%乙腈 2.5L 洗脱后,将进一步在 50%乙腈 2.5L 洗脱的含有蓝色色素的组分收集,冷冻干燥。

[0084] 用制备 HPLC 将得到的冷冻干燥品再次进行色谱分析。

[0085] 色谱柱采用 YMC pack PolymerC18(YMC 株式会社,2cm ϕ ×30cm),流动相为 A:0.5% TFA/水、B:0.5% TFA/50%乙腈,以 6ml/min 按以下的梯度进行。B65%(保持 30 分钟)B65→B90%的线性梯度(20 分钟)、B90%保持 30 分钟,检测在 A260nm 下进行。收集在 50~52 分钟洗脱出来的红色色素(2)、在 60~65 分钟洗脱出来的蓝色色素(1)、以及在 65~73 分钟洗脱出来的蓝色色素(3),冷冻干燥。色谱重复 3 次。

[0086] 对如此得到的冷冻干燥品、蓝色色素(1)、红色色素(2)以及蓝色色素(3),肉眼观察色调。其结果为,分别呈现深蓝、深红和深蓝。

[0087] 其中,对蓝色色素(1),测定了花瓣中的含量,其含量为,单位花瓣湿重为 0.0007mg/g~0.13mg/g 的范围。

[0088] 实施例 2:利用仪器分析进行色素化合物的结构解析

[0089] 对蓝色色素(1)、红色色素(2)和蓝色色素(3),使用根据需要进行了再次精制的样品,进行各种仪器分析。

[0090] 用 HPLC 分析蓝色色素(1)、红色色素(2)和蓝色色素(3),用光电二极管阵列检测器,测定 30%乙腈、0.5% TFA 中的 650~250nm 的吸收光谱(参照图 3、图 5、图 7)。

[0091] 关于 HPLC,色谱柱采用 Shodex-Asahipak-ODP50(昭和电工公司制)4.6mm ϕ ×25cm,流动相为 30%乙腈、0.5% TFA,流速为 0.6ml/min,进行无梯度洗脱。关于检测,使用光电二极管阵列检测器(SPD-M10Avp,岛津制作所株式会社制)测定 650~250nm 的吸收光谱,监测 A560nm 的色谱。

[0092] 结果总结如下(关于保留时间(R.T.),参照图 4 和图 6)。

[0093] 蓝色色素(1) $\lambda_{\max}$ 593nm R.T. 14.6 分钟和 18.5 分钟*

[0094] 红色色素(2) $\lambda_{\max}$ 535nm R.T. 8.9 分钟

[0095] 蓝色色素(3) $\lambda_{\max}$ 594nm R.T. 21.6 分钟

[0096] *蓝色色素(1)由于葡萄糖的 1 位的羟基显示 α 体和 β 体的互变异构性,因此出现 2 个峰。

[0097] 对蓝色色素(1)、红色色素(2)和蓝色色素(3)进行了 TOF-MS 测定。

[0098] MS 使用 Q-TOF Premier (Micromass 公司制, 英国), 使用在离子源配备了 Z 喷雾离子源的 ESI, 在正离子、V 模式下测定。锥孔电压 60V, 毛细管电压 3KV, 利用 Lock Spray 进行质量校准, 使用亮氨酸脑啡肽 (m/z 556. 2771 $[M+H]^+$) 作为参考。

[0099] 其结果是, 蓝色色素 (1) 产生 m/z 1221. 1352 $[M]^+$ 的分子离子, 红色色素 (2) 产生 m/z 435. 0380 $[M]^+$ 的分子离子, 蓝色色素 (2) 产生 m/z 1373. 1442 $[M]^+$ 的分子离子, 分别与分子式 $C_{56}H_{37}O_{32}$ (err. : +6. 9ppm)、 $C_{22}H_{11}O_{10}$ (err. : +6. 4ppm)、 $C_{63}H_{41}O_{36}$ (err. : +4. 6ppm) 很一致。

[0100] 蓝色色素 (1)、红色色素 (2) 和蓝色色素 (3) 在含有 0. 5% TFA 的 30% 乙腈中的吸收光谱分别如图 3、图 5 和图 7 所示。

[0101] 蓝色色素 (1) 和蓝色色素 (3) 在可见光区的最大吸收为 593nm, 与在专利文献 3 的实施例 1 中记载的式 (II) 的化合物的最大吸收相比, 略偏向长波长侧。

[0102] 专利文献 3 中记载的式 (II) 的化合物如专利文献 3 中所述那样呈现蓝色。但是, 这次得到的蓝色色素 (1)、蓝色色素 (3) 的最大吸收与在专利文献 3 中记载的式 (II) 的化合物的最大吸收相比, 位于长波长侧, 因此呈现比式 (II) 的化合物更蓝的颜色。由此表明, 本发明新发现的蓝色色素 (1)、蓝色色素 (3) 具有使植物的颜色更蓝的效果。用 TOF-MS 测定蓝色色素 (1) 的分子量, 结果为 m/z 1221. 13 $[M]^+$, 这与在专利文献 3 的实施例 1 中记载的式 (II) 的化合物的分子量 1205 相比, 大 16 个质量单位。这显示在导入了专利文献 2 中记载的质粒 pSPB919 的品种 Lavande 中, 含有比专利文献 3 中公知的上述色素化合物的分子量大 16 的色素化合物。由类黄酮 3', 5'-羟基化酶催化的羟基化反应引起的分子量的增加, 是因为附加 1 个氧原子而增加 16, 因此认为蓝色色素 (1) 与专利文献 3 的实施例 1 中记载的式 (II) 表示的化合物相比只多一个氧原子。类黄酮 3', 5'-羟基化酶由于将类黄酮的 B 环特异性羟基化, 因此此次鉴定得到的化合物不是非专利文献 1 中记载的玫瑰花青苷 A1 糖苷, 而是具有在 B 环上有 3 个羟基的花翠素部分结构的化合物。即, 蓝色色素 (1)、红色色素 (2) 和蓝色色素 (3) 的结构分别为图 8、图 9 和图 10 所示的结构。

[0103] 另外, 对各化合物进行了 NMR 测定。在含有 1% DCI (氟化氯) 的 DMSO-d₆ ((CD₃)₂SO 二甲基亚砜) 中溶解, 以 ¹H 和 ¹³C 的残峰 δ 2. 50、 δ 39. 43 为内标。测定项目为 ¹H NMR、¹³C NMR、¹H{¹³C}-HSQC、¹H{¹³C}-HMBC、TOCSY、DQF-COSY 和 ROE, 使用 DMX-750 光谱仪 (布鲁克拜厄斯宾, 德国) 测定。其结果为, 蓝色色素 (1)、红色色素 (2) 和蓝色色素 (3) 的结构分别是图 8、图 9 和图 10 所示的结构。

[0104] 蓝色色素 (1) 的 ¹H NMR 的解析结果如图 11 所示, ¹³C NMR 的解析结果如图 12 所示。

[0105] 蓝色色素 (1) 在 ¹H NMR 中观察到 δ 3. 67 (1H, d12, Glc-6 α)、 δ 4. 48 (1H, dd2, 9, Glc-5 α)、 δ 4. 84 (1H, t9, Glc-4 α)、 δ 4. 94 (1H, dd2, 9, Glc-2 α)、 δ 4. 99 (1H, dd2, 12, Glc-6 α)、 δ 5. 30 (1H, d2, Glc-1 α)、 δ 5. 64 (1H, t9, Glc-3 α)、 δ 6. 22 (1H, s, HHDP)、 δ 6. 27 (1H, s, HHDP)、 δ 6. 77 (2H, s, gallate-2, 6)、 δ 6. 79 (1H, s, D-3'')、 δ 6. 83 (1H d2, A-6)、 δ 6. 85 (2H, s, gallate-2, 6)、 δ 7. 03 (1H, d2, A-8)、 δ 7. 87 (2H, s, B-2', 6') 的信号。HHDP 是六羟基二苯甲酰基的简称。此外, 糖的 1 位的羟基作为 β 型葡萄糖的信号中的小信号被观察到。

[0106] 红色色素 (2) 的 ¹H NMR 的解析结果如图 13 所示。

[0107] 红色色素 (2) 在 ^1H NMR 中观察到 δ 7.32 (1H, d1.5, A-6)、 δ 7.40 (1H, d1.5, A-8)、 δ 7.68 (2H, s, B-2', 6')、 δ 7.92 (1H, s, D-3") 的信号。

[0108] 实施例 3:其他品种的蓝月季中的色素化合物的确认

[0109] 在与实施例 1 不同的品种的蓝月季中,证实了本发明的化合物的存在。

[0110] 导入了质粒 pSPB130 的品种“WKS82”的制作

[0111] 用以下方法制作导入了质粒 pSPB130 的品种“WKS82”。

[0112] 通过用芳酰基修饰花青素苷,能使花青素苷稳定,并能使其颜色变蓝(例如 W096/25500)。为了生产酰化的花翠素型花青素苷,进行了以下的实验。

[0113] 从夏堇品种 Summer Wave 花瓣得到 RNA,然后制备 polyA⁺RNA。由该 polyA⁺RNA,使用定向 cDNA 文库构建试剂盒(Stratagene 公司),按照制造者推荐的方法,构建以 λ ZAPII(Stratagene 公司)为载体的 cDNA 文库。夏堇的主要花青素苷由于其 5 位的葡萄糖被芳酰基修饰(Suzuki et al.Molecular Breeding 20006,239-246),因此在夏堇花瓣中表达花青素苷酰基转移酶。

[0114] 花青素苷酰基转移酶保留了特定的氨基酸序列,通过使用与之相应的合成 DNA 作为引物,能获得花青素苷酰基转移酶基因(W096/25500)。具体而言,以在夏堇 cDNA 文库构建时合成的单链 cDNA 10ng 为模板,以 100ng 的 ATC 引物(参照专利文献 2 的序列号 17)、100ng 的 oligo dT primer(参照专利文献 2 的序列号 18)为引物,使用 Taq 聚合酶(Takara, 日本),在制造者推荐的条件下进行 PCR。

[0115] PCR 反应进行 25 个循环,以 95℃ 下 1 分钟、55℃ 下 1 分钟以及 72℃ 下 1 分钟为 1 个循环。用 Gene Clean II(Bio,101, Inc.),按制造者推荐的方法,将得到的约 400bp 的 DNA 片段回收,亚克隆到 pCR-TOPO。确定其碱基序列,结果发现了与龙胆的酰基转移酶基因(Fujiwara et al.(1998)Plant J.16 421-431)相同的序列。另外,采用引物标记法(Applied Biosystems 公司),使用 Sequencer 310 或 377(均来自 Applied Biosystems 公司)来测定碱基序列。

[0116] 使用 DIG 标记检测试剂盒(日本罗氏),利用 DIG 将该 DNA 片段标记,按制造者推荐的方法,利用噬菌斑杂交法筛选夏堇的 cDNA 文库。随机筛选 12 个得到的显示阳性的克隆,回收质粒,确定碱基序列。它们显示出与花青素苷酰基转移酶很好的相同性。这些克隆中,对 pTAT7 的克隆中含有的 cDNA 的全部碱基序列进行测定(关于碱基序列,参照专利文献 2 的序列号 7,关于氨基酸序列,参照专利文献 2 的序列号 8)。

[0117] 将 pBE2113-GUS(Mitsuhara et al.Plant Vell Physiol.37,45-591996)用 SacI 酶切后,进行平滑末端化,插入 8bp 的 XhoI 接头(Takara)。在该质粒的 BamHI 和 XhoI 位点,插入 pTAT7 经 BamHI 和 XhoI 酶切得到的约 1.7kb 的 DNA,得到 pSPB120。将 pSPB120 用 SnaBI 和 BamHI 酶切后,进行平滑末端化,通过连接得到 pSPB120'。另一方面,将含有来自三色堇的 F3'5'H#40 cDNA 的质粒 pCGP1961 用 BamHI 完全酶切,然后用 XhoI 部分酶切,回收得到的约 1.8kb 的 DNA 片段,将其与经 BamHI 和 XhoI 酶切得到的 pUE5H 连接,将得到的质粒作为 pUEBP40。

[0118] 将 pUEBP40 用 SnaBI 和 BamHI 酶切后,进行平滑末端化,连接,得到 pUEBP40'。将 pUEBP40'经 HindIII 部分酶切得到的约 2.7kb 的 DNA 片段回收,与 pSPB120'经 HindIII 部分酶切得到的 DNA 片段连接。在得到的质粒中,将双元载体上从右边界侧依次分别同向连

接新霉素磷酸转移酶基因、来自三色堇的 F3'5'H#40 基因、来自夏堇的 5AT 基因的双元载体作为 pSPB130(参照图 12)。该质粒设计成在植物中组成性表达来自三色堇的 F3'5'H#40 基因和来自夏堇的 5AT 基因,在花瓣中特异性转录基因。将该质粒导入根癌农杆菌 Ag10 株。通过感染该农杆菌,向淡紫色系月季“WKS82”导入 pSPB130(图 12),得到转化体。将转化细胞分化,得到重组植物体蓝月季(导入了质粒 pSPB130 的品种“WKS82”),使其开花。

[0119] 色素化合物的提取、单离、精制、鉴定

[0120] 由如上述那样得到的蓝月季(导入了质粒 pSPB130 的品种“WKS82”)的花瓣 230g,采用与实施例 1 相同的方法进行提取、单离和精制,得到蓝色色素(1)、红色色素(2)和蓝色色素(3)。

[0121] 对得到的蓝色色素(1)、红色色素(2)以及蓝色色素(3),肉眼观察色调。其结果为,分别呈现深蓝、深红和深蓝。

[0122] 另外,对蓝色色素(1)、红色色素(2)和蓝色色素(3),使用 LC-TOF-MS,确认了与在实施例 1 中鉴定的色素成分分别相同的化合物。

[0123] 工业上利用可能性

[0124] 通过本发明,提取、单离、精制蓝月季的花瓣中的新型色素,弄清楚了其化学结构。本发明新发现的化合物与以往存在于淡紫色系月季中的玫瑰花青苷类相比,呈现蓝色。因此,使用本发明发现的上述化合物,能改变植物的花色。或者,通过将该化合物作为植物性色素使用,还可用于例如饮食物的着色等。

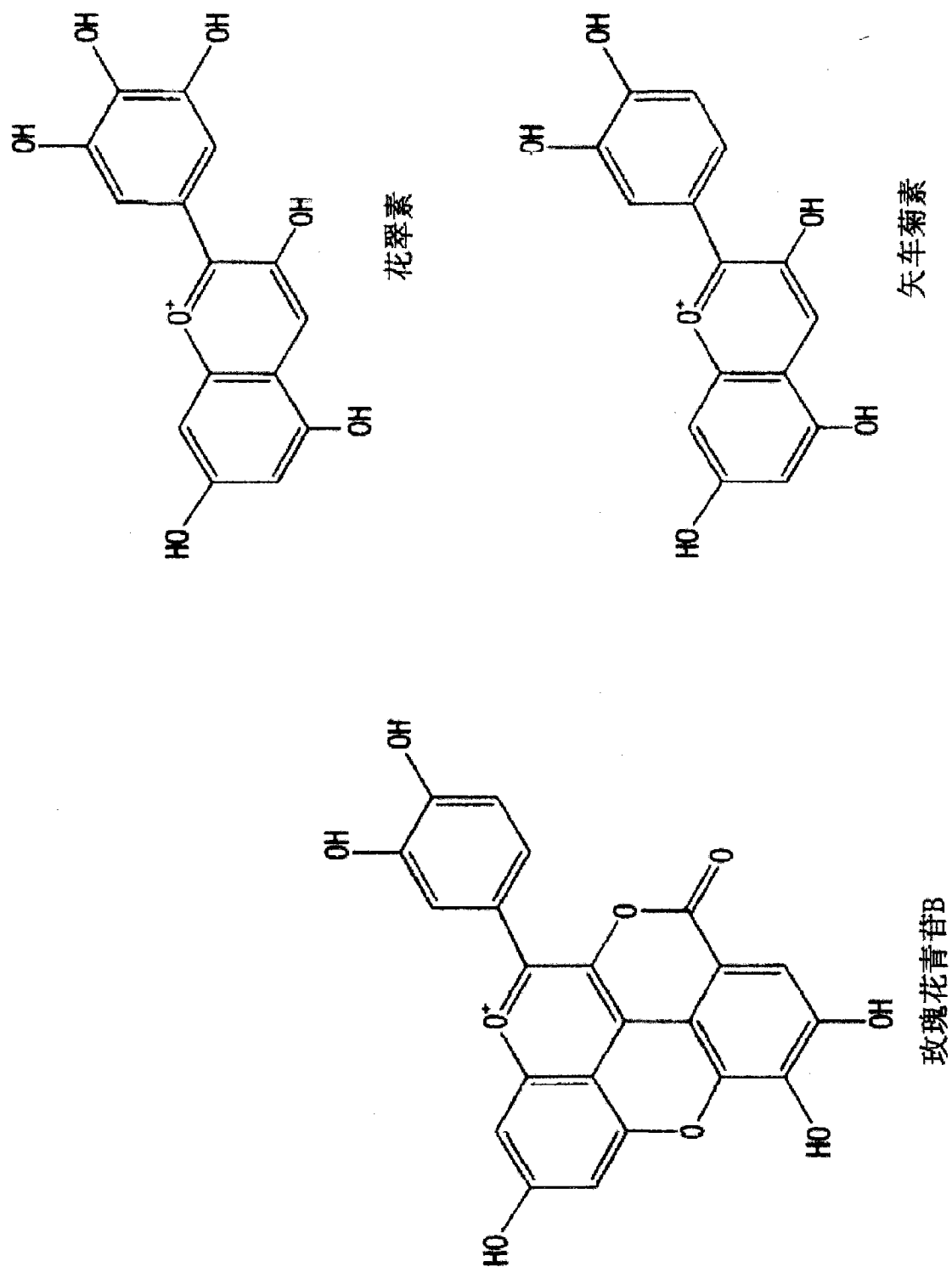


图 1

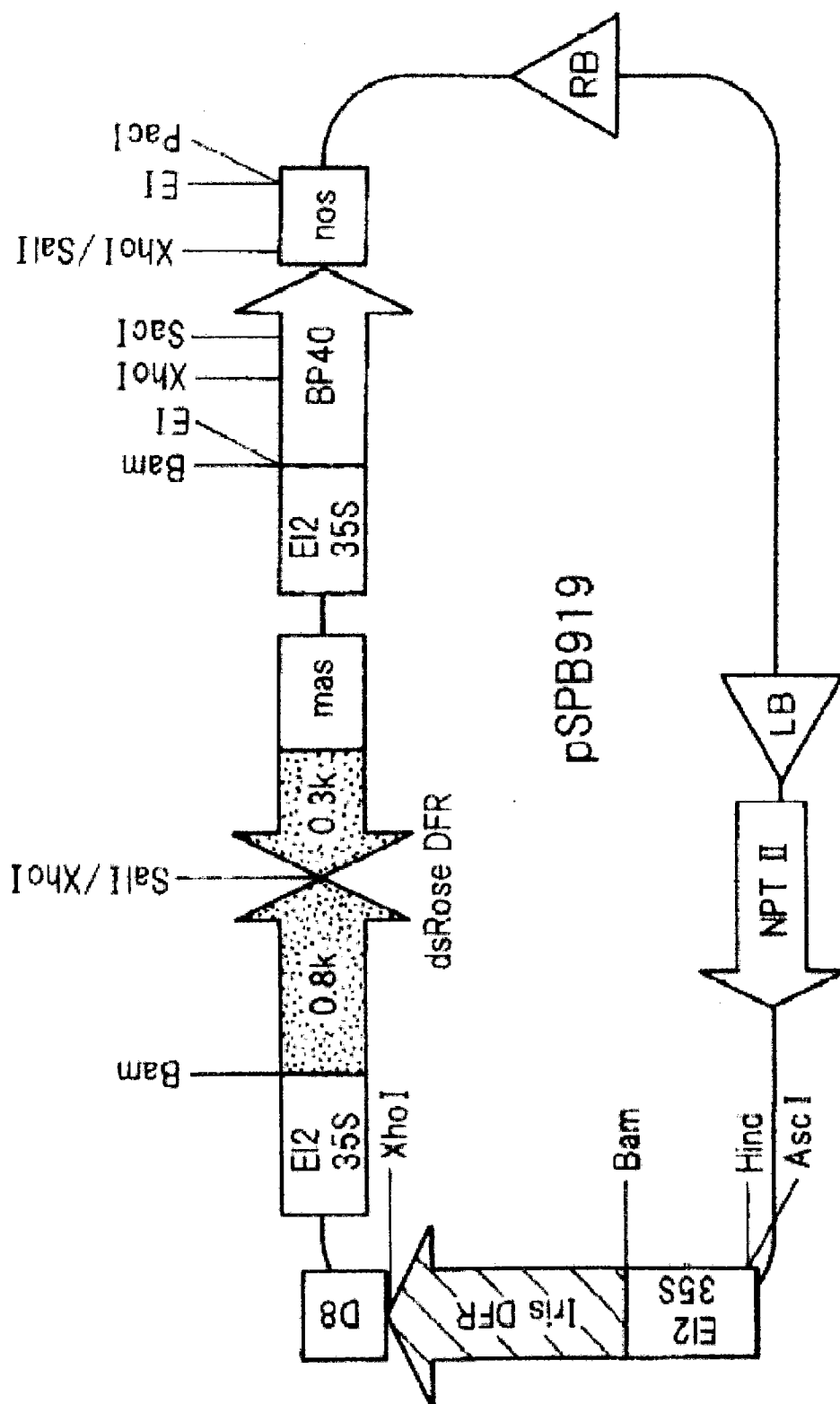


图 2

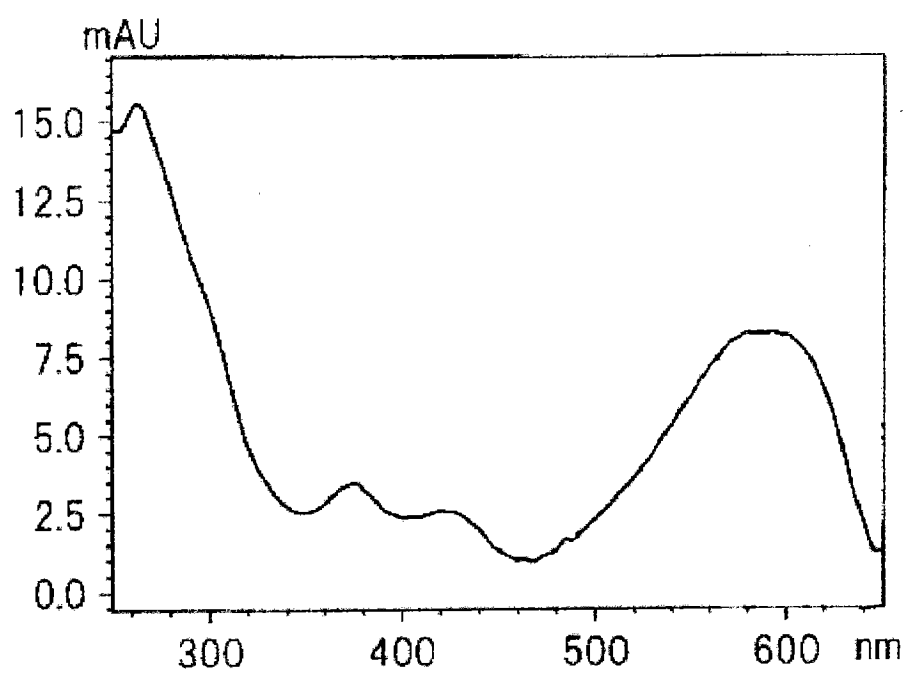


图 3

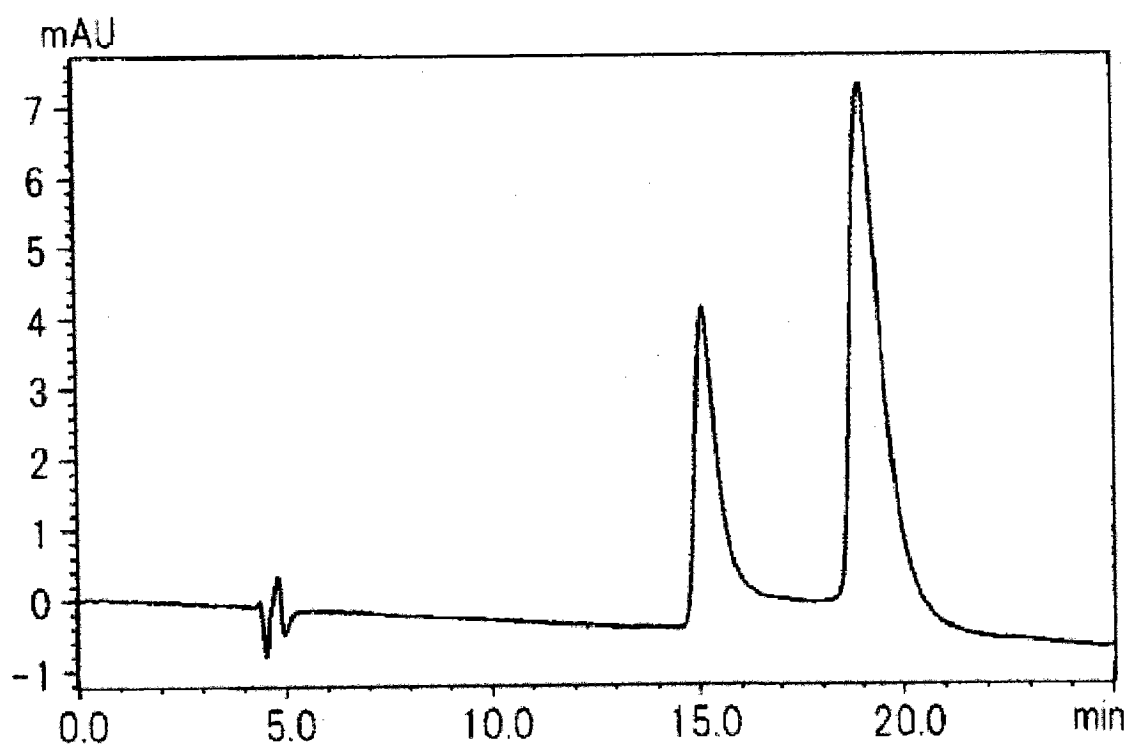


图 4

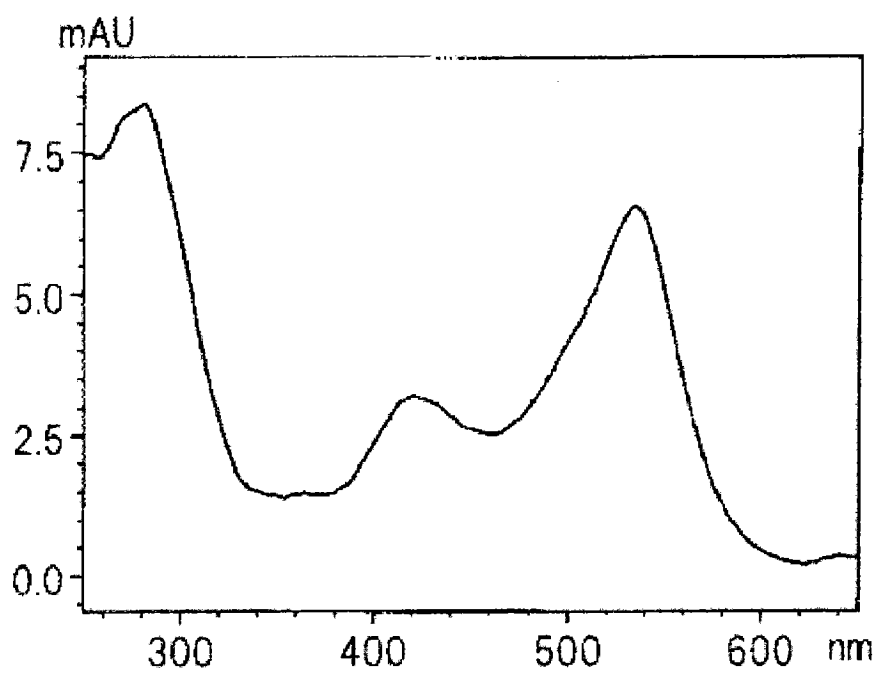


图 5

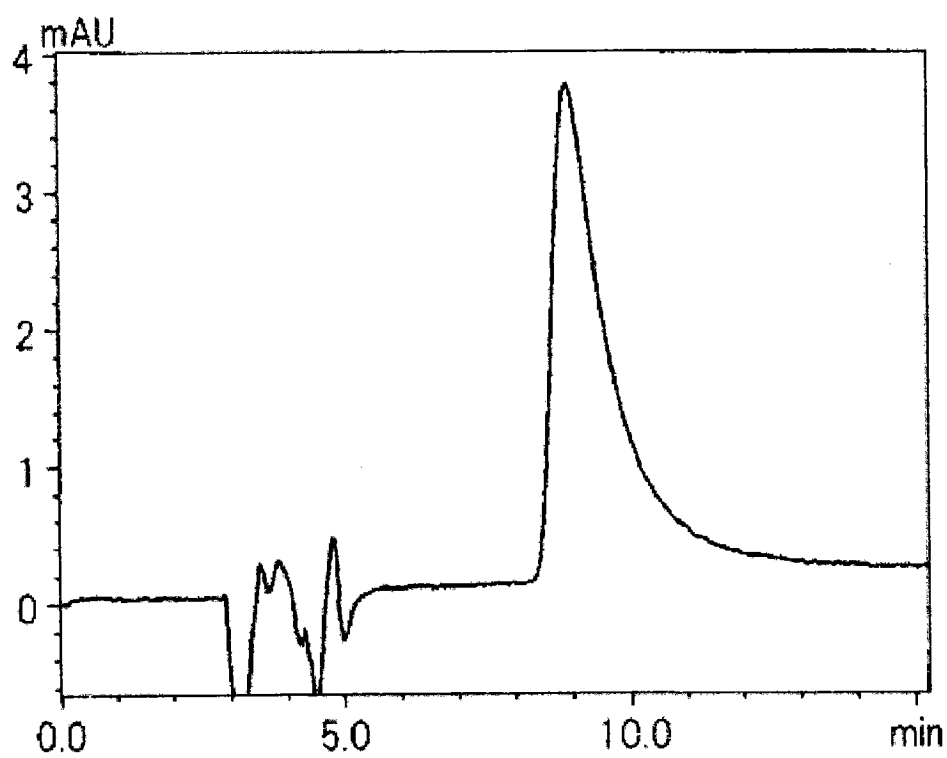


图 6

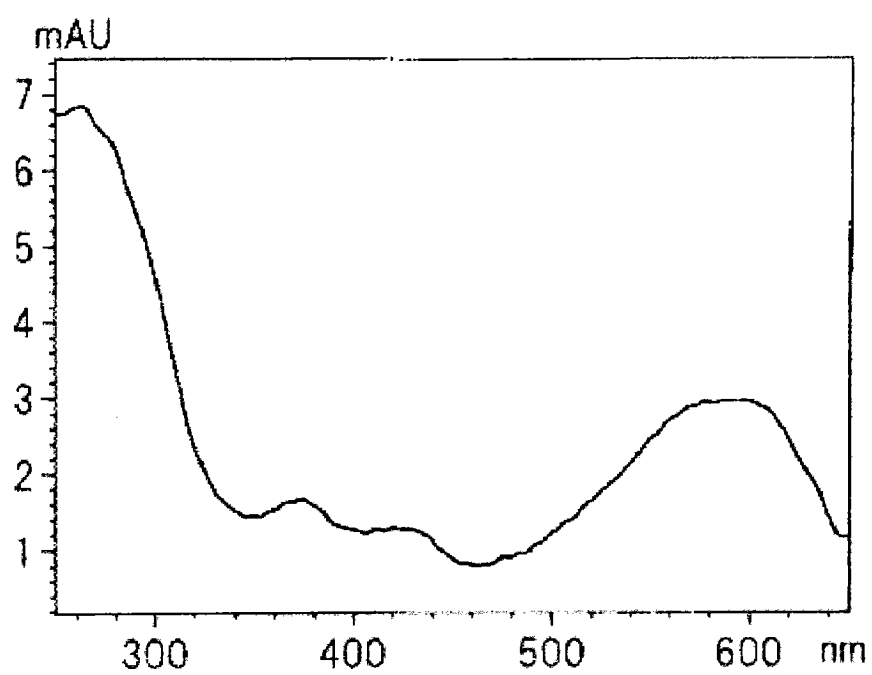


图 7

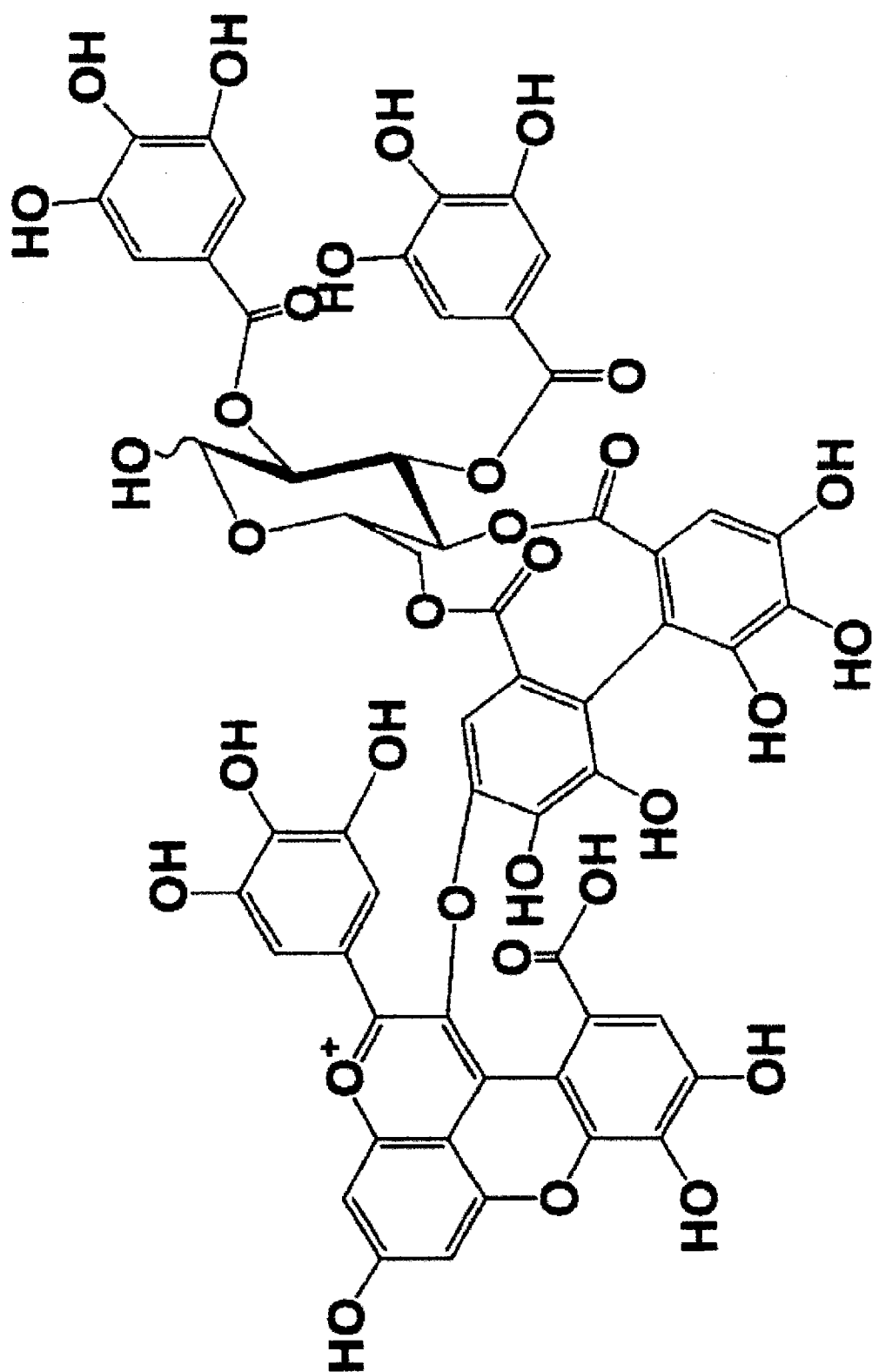


图 8

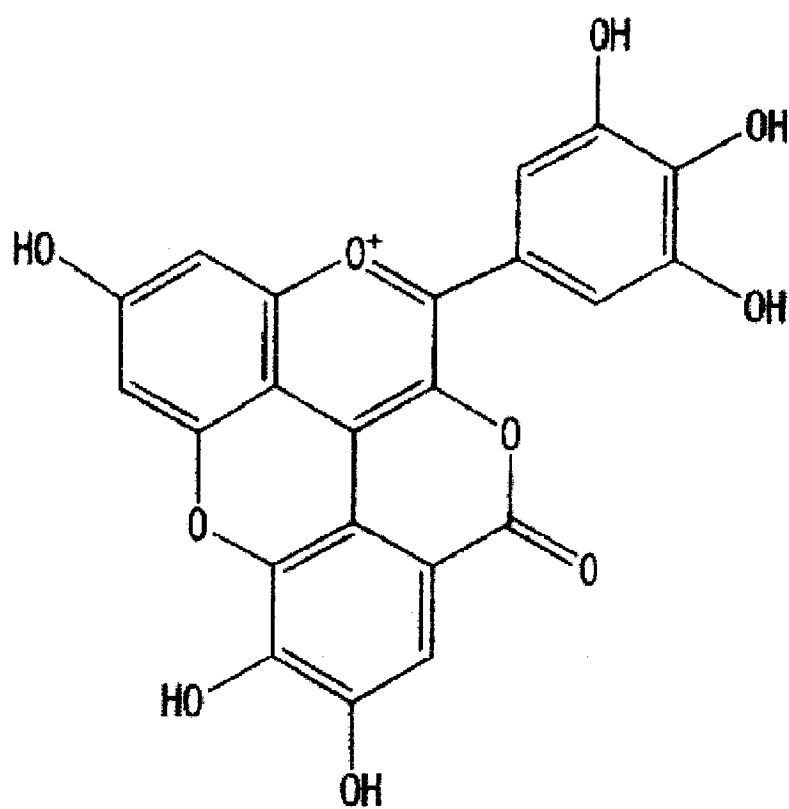


图 9

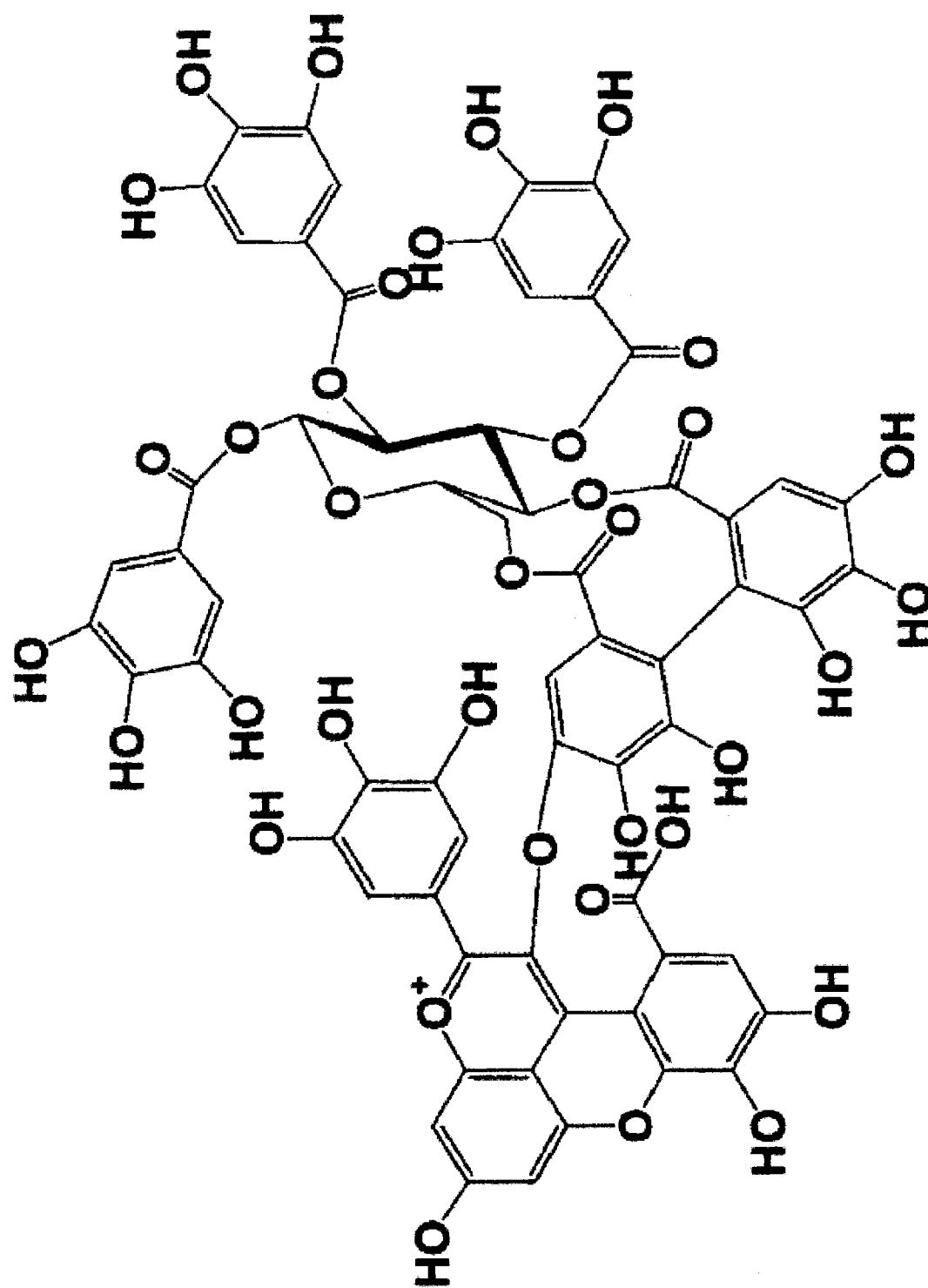


图 10

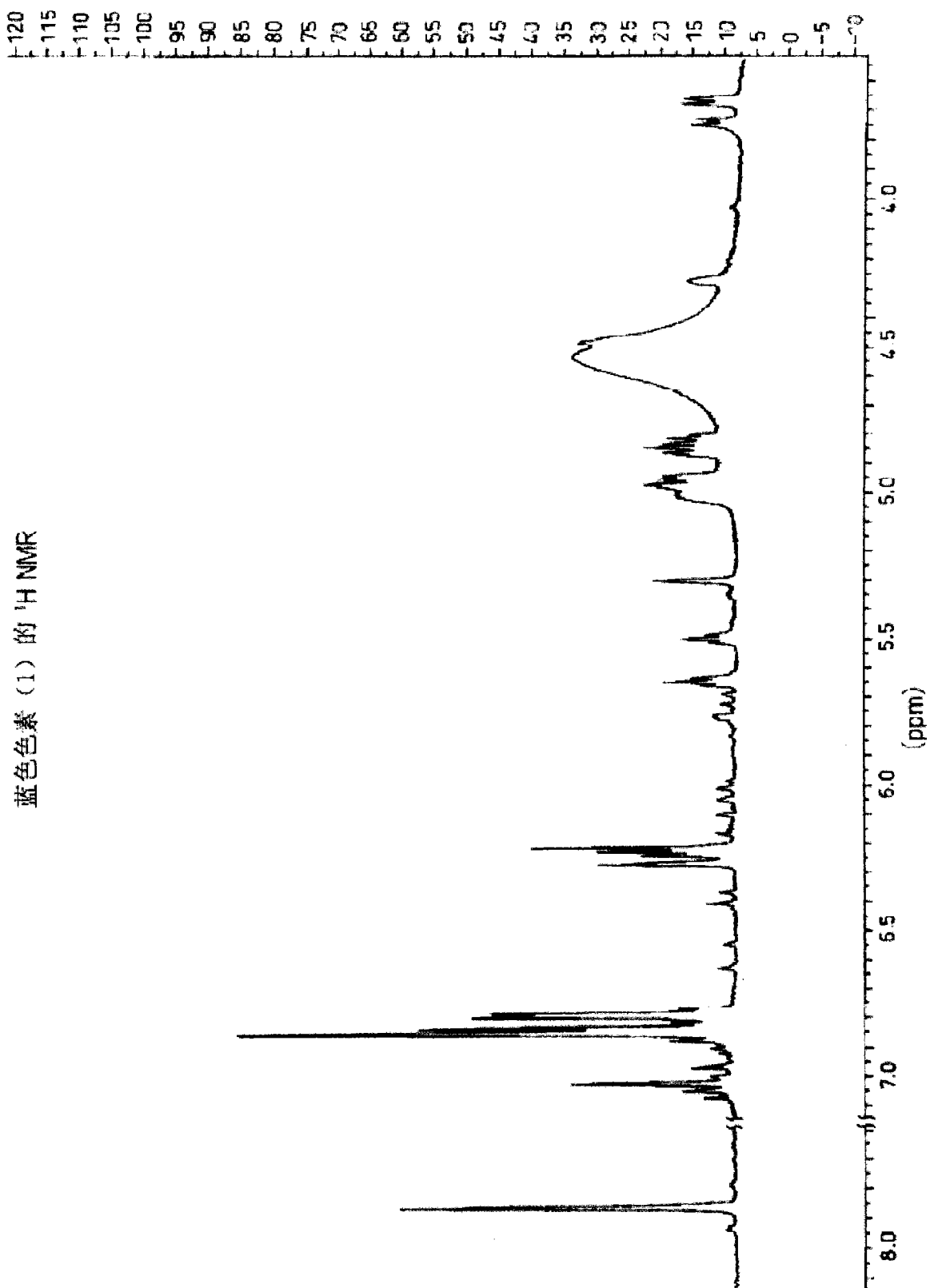


图 11

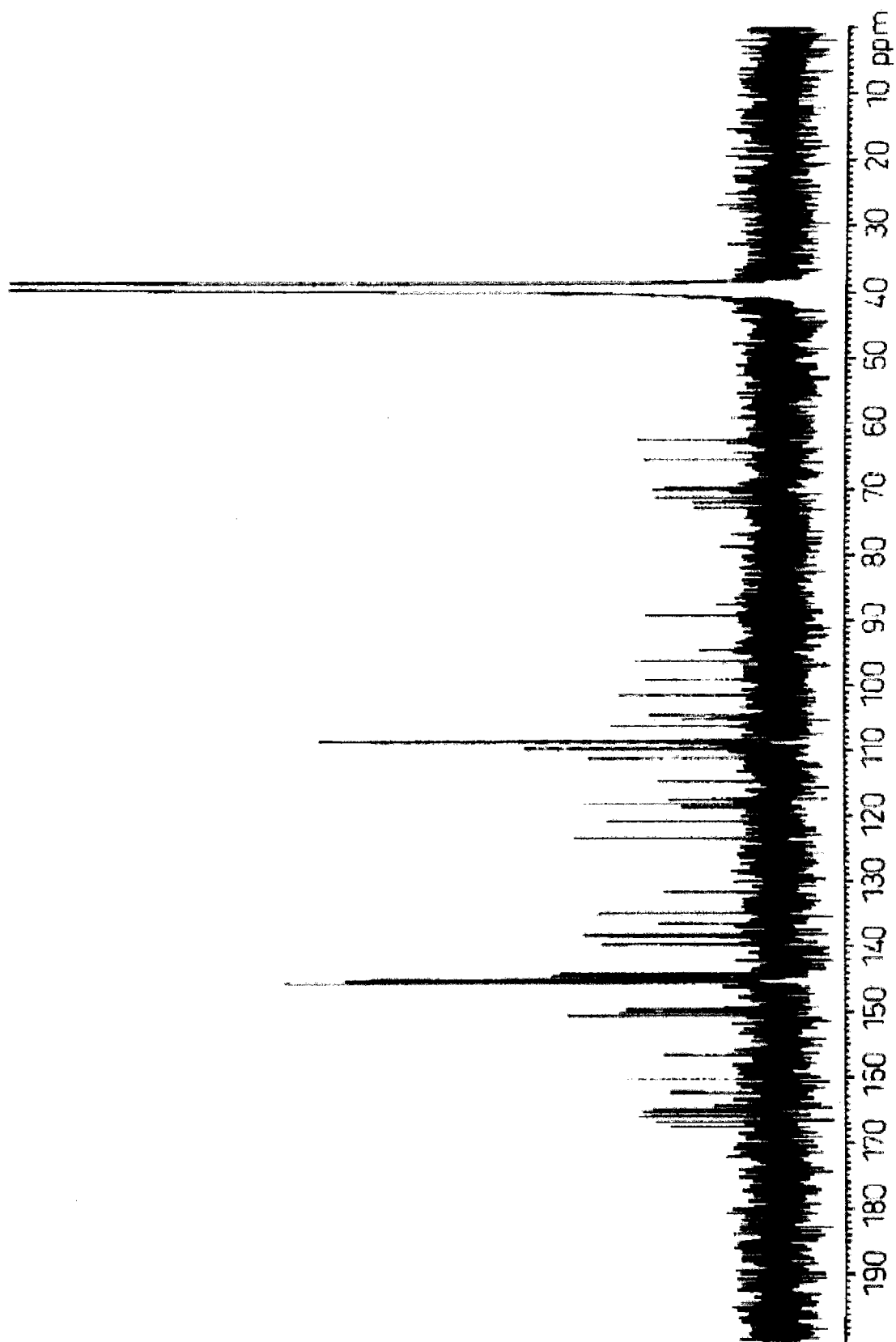
蓝色素 (1) 的 ^{13}C NMR

图 12

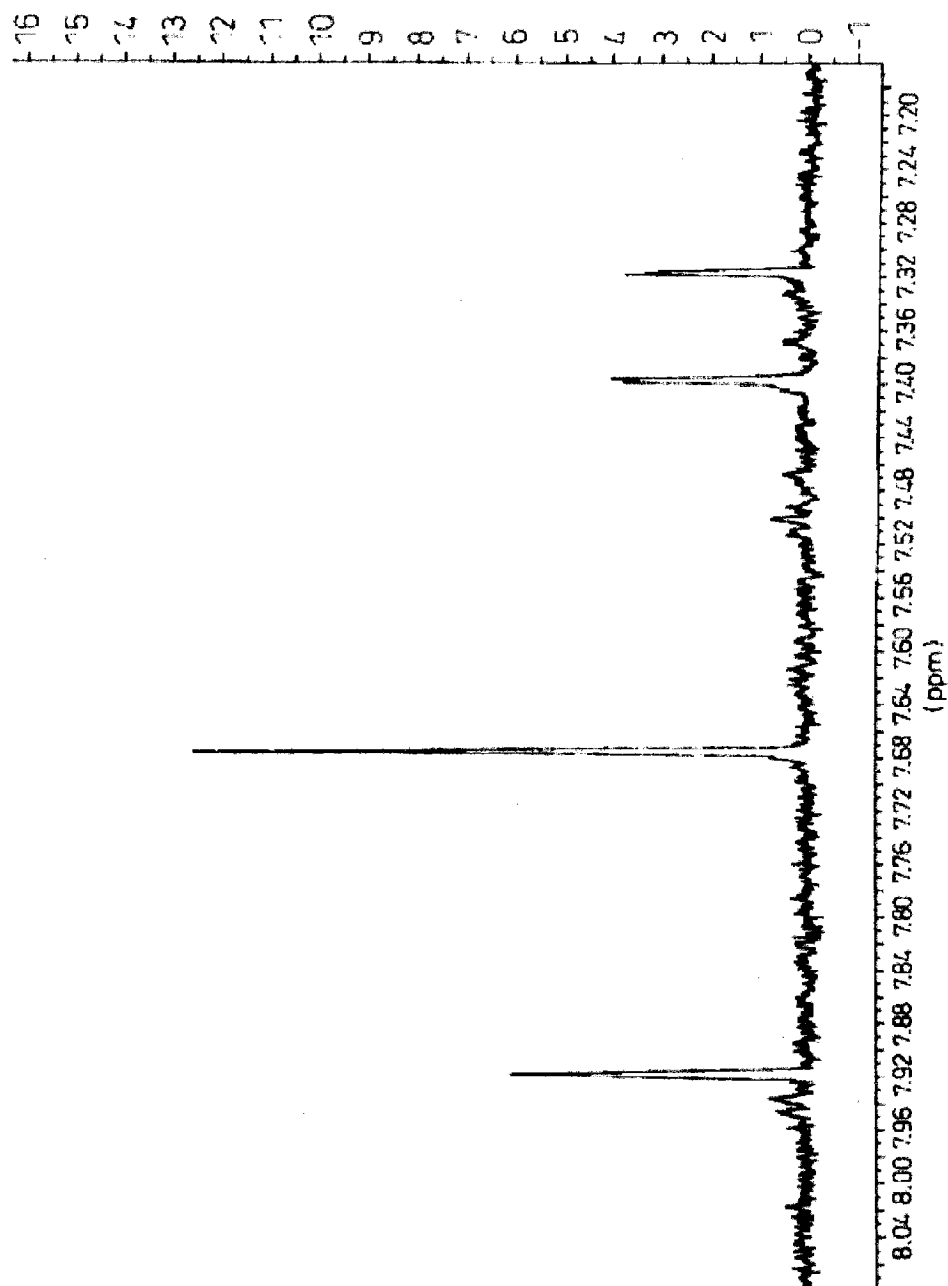
红色色素 (2) 的 ^1H NMR

图 13

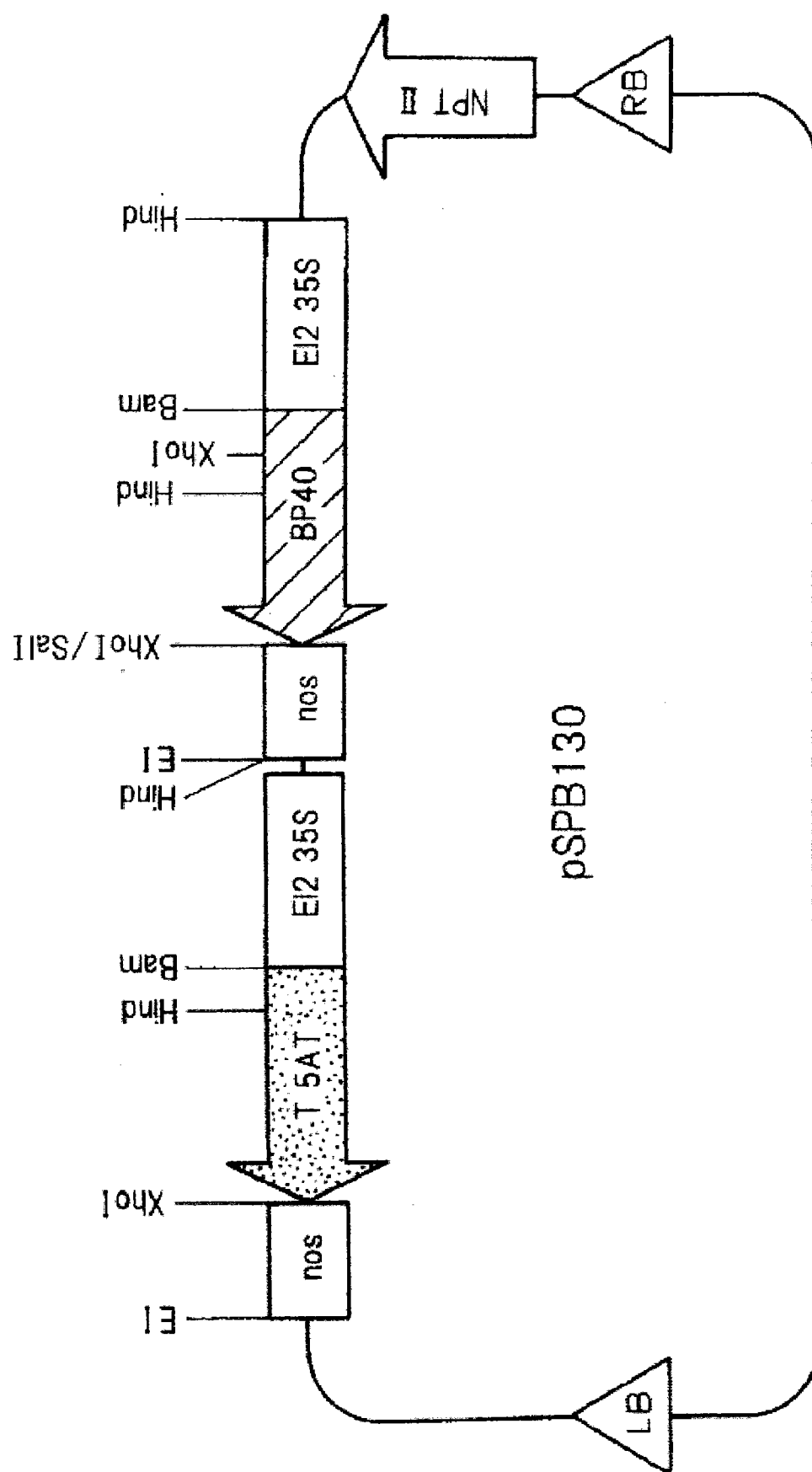


图 14