



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월23일
(11) 등록번호 10-1659525
(24) 등록일자 2016년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 493/04 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01)
C07D 493/16 (2006.01) C07H 9/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7022593
(22) 출원일자(국제) 2010년03월25일
심사청구일자 2014년12월08일
(85) 번역문제출일자 2011년09월26일
(65) 공개번호 10-2012-0018741
(43) 공개일자 2012년03월05일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/055262
(87) 국제공개번호 WO 2010/110382
국제공개일자 2010년09월30일
(30) 우선권주장
JP-P-2009-080524 2009년03월27일 일본(JP)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060081400 A*
Tetrahedron 2006, 62, 9661-9670
Tetrahedron Lett. 2002, 43, 2637-2639
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
산토리 홀딩스 가부시키키가이샤
일본 오사카후 오사카시 기타쿠 도지마하마 2쵸메
1방 40고
(72) 발명자
후쿠이 유코
일본 6188503 오사카 미시마군 시마모토초 와카야
마다이 1-1-1 선토리 리서치 센터 나이
다나카 요시카즈
일본 6188503 오사카 미시마군 시마모토초 와카야
마다이 1-1-1 선토리 리서치 센터 나이
(74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 이민정

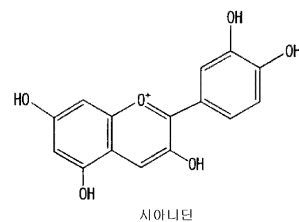
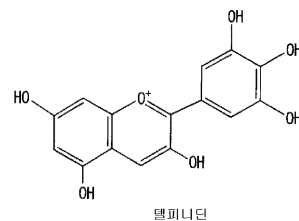
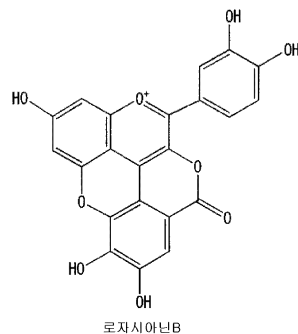
(54) 발명의 명칭 파란 장미에 함유되는 신규 화합물

(57) 요약

파란 장미에 함유되는 신규 화합물의 제공.

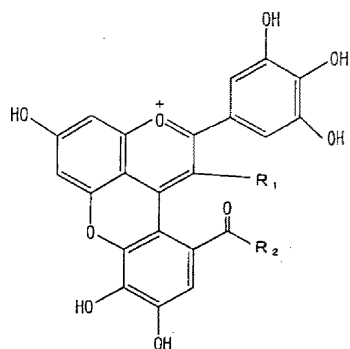
(뒷면에 계속)

대표도



본 발명에 관한 신규 화합물은 파란 장미에 함유되고, 아래의 일반식 (I) :

[화학식 1]



{식 중에서, R_1 은 청구의 범위 1에 기재된 기이고, 또한 R_2 는 -OH이거나, 또는 R_1 과 R_2 는 함께 -O-를 형성한다.}로 나타내는 화학 구조를 가진다. 이 신규 화합물을 함유하는 장미 식물 및 그 부분도 제공된다.

(30) 우선권주장

JP-P-2009-115722 2009년05월12일 일본(JP)

JP-P-2009-173096 2009년07월24일 일본(JP)

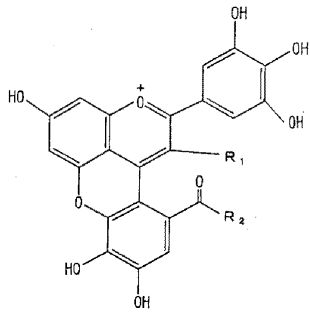
명세서

청구범위

청구항 1

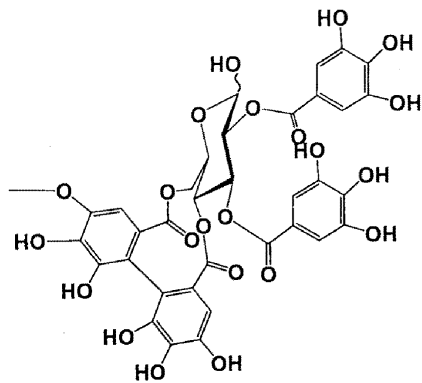
이하의 일반식 (I) :

[화학식 1]



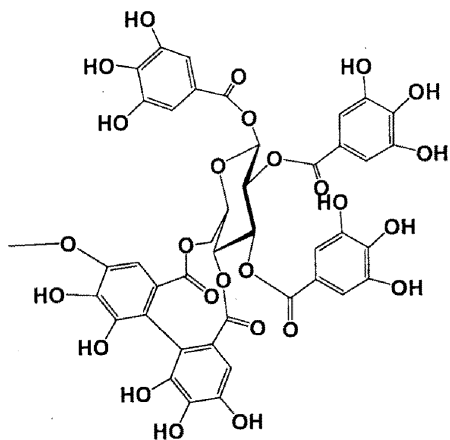
{상기 식 중에서, R₁은 아래의 기 :

[화학식 2]



이고, 또한, R₂는 -OH이거나, 또는 R₁와 R₂는 함께 -O-를 형성하거나, 또는 R₁은 아래의 기 :

[화학식 3]



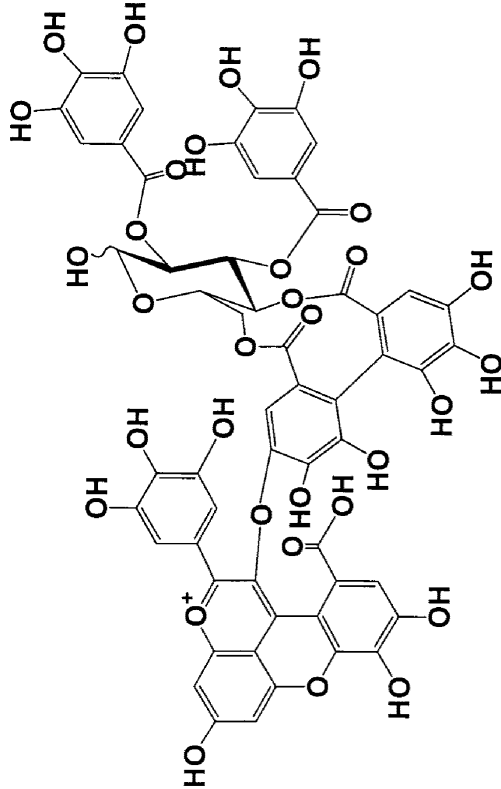
이고, 또한, R₂는 -OH이다. 다만, R₁ 중에서 글루코오스의 1위의 수산기의 배위 (과선)는 α체와 β체의 호변 이성인 것을 나타낸다.}

으로 나타내는 화합물.

청구항 2

이하의 화학식 :

[화학식 4]

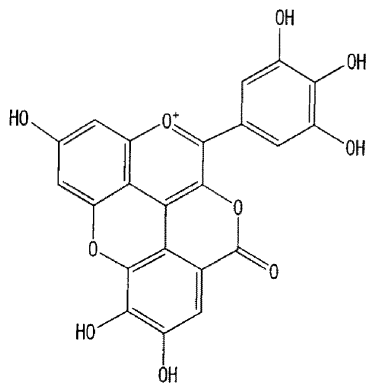


으로 나타내는 화합물.

청구항 3

이하의 화학식 :

[화학식 5]

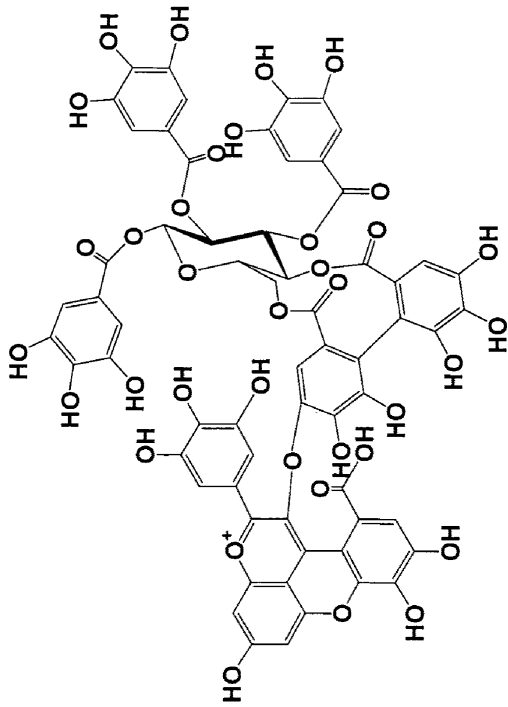


으로 나타내는 화합물.

청구항 4

이하의 화학식 :

[화학식 6]



으로 나타내는 화합물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물, 특히 유전자 재조합에 의하여 델피니딘을 생산하는 능력이 부여된 장미의 색소인 신규 화합물 및 이 색소를 함유하는 장미 등의 식물 및 그 부분에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 화합물을 사용하여, 식물의 꽃의 색을 개변하는 방법에 관한 것이기도 하다.

배경 기술

[0002] 장미는 절화로서 중요한 식물이며, 그 색소는 상세하게 조사되어 있다. 예를 들면, 안토시아닌계 색소로서는, 시아니딘 3,5-디글루코시드, 페탈고니딘 3,5-디글루코시드, 시아니딘 3-글루코시드, 페탈고니딘 3-글루코시드, 페오니딘 3,5-디글루코시드, 페오니딘 3-글루코시드 등이 알려져 있다. 이 색소들을 포함하는 안토시아닌의 생합성 경로는 알려져 있다.

[0003] 또한, 유전자 재조합에 의하여 플라보노이드 3',5'-수산화 효소 유전자를 발현하고 있는 장미 (이하의 특허 문헌 1, 특허 문헌 2 참조)는 델핀 (이하, 델피니딘 3,5-디글루코시드라고도 한다.)을 생산한다. 이 경우, 플라보노이드의 B환의 5' 위 (位)의 수산화 반응은 플라바논 또는 디히드로플라보논의 단계에서 일어난다고 생각된다. 이 수산화 반응은 플라보노이드 3',5'-수산화 효소가 소포체에 존재하는 시토크롬 P450의 일종이므로, 소포체상에서 일어난다고 생각되고 있다. 안토시아닌류의 생합성 반응을 촉매하는 효소, 예를 들면, 안토시아니딘 당 전이 효소는 시그널 펩티드 등의 배열을 가지지 않고, 가용성 단백질이기 때문에 세포의 세포질 내에 존재한다. 안토시아닌류는 당이 부가된 후에 펌프에 의하여 액포로 수송된다.

[0004] 한편, 적어도 일부의 장미에는 화합물 로자시아닌류 (도 1 참조)가 존재하는 것이 보고되었고, 로자시아닌 A 1, 로자시아닌 B 및 로자시아닌 A2 등의 구조도 결정되어 있다 (예를 들면, 이하의 특허 문헌 3 또는 비특허 문헌 1 참조).

[0005] 로자시아닌은 그 구조의 일부에 시아니딘 골격을 가지므로, 시아니딘 또는 시아니딘과 공통되는 전구체 또는 시아니딘의 유연체를 기초로 합성될 가능성을 생각할 수 있다. 그러나, 이것은 추측의 영역에 지나지 않고, 실제로 어떠한 물질을 전구체로 하여, 그러한 경로를 거쳐 합성되는지는 분명하게 밝혀져 있지 않다.

[0006] 한편, 전술한 바와 같이 유전자 재조합에 의하여, 플라보노이드 3',5'-수산화 효소 유전자를 발현시킨 장미에 있어서는, 시아니딘의 부분을 대신하여 델피니딘이 합성된다. 만약, 상기와 같은 로자시아닌 합성 경로에 대한 가설, 즉, 시아니딘을 전구체로 하여 로자시아닌이 합성되는 것은 아닐까 하는 가설이 옳다면, 전구체가 되는 시아니딘이 거의 존재하지 않는 이들 유전자 재조합 장미에서는 로자시아닌류는 합성되지 않게 된다.

[0007] 본 발명자들은 로자시아닌 합성계에 대한 지견을 얻기 위하여, 특허 문헌 1 또는 특허 문헌 2에 기재된 시아니딘을 거의 함유하지 않는, 또는 숙주와 비교하여 시아니딘 함량이 현저하게 저하된 상기 유전자 재조합 장미를 사용하여 해석을 하였는데, 예상에 반하여, 본래 장미가 가지고 있는 로자시아닌류와는 분명하게 화학 구조가 다른 신규 화합물이 존재하는 것을 밝혀내었다. 또한, 이 신규 화합물은 유전자 재조합에 의하여 플라보노이드 3',5'-수산화 효소 유전자를 발현시킨 장미에 특이적으로 존재하는 것을 밝혀내고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국제 공개 W02004/020637 공보
(특허문헌 0002) 국제 공개 W02005/017147 공보

(특허문헌 0003) 일본 공개 특허 공보 2002-201372호 공보

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Tetrahedron 62 (2006)9661-9670

발명의 내용

해결하려는 과제

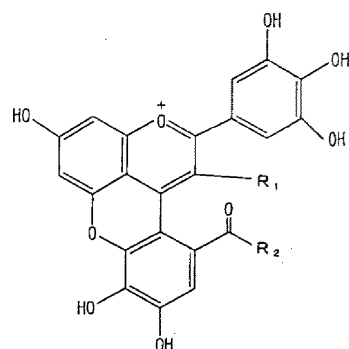
[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 식물, 특히 유전자 재조합에 의하여 델피니딘을 생산하는 능력이 부여된 장미의 색소인 신규 화합물 및 상기 색소를 포함하는 장미 등의 식물 및 그 부분을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 상기 화합물을 사용하여 식물의 꽃의 색을 개변하는 방법을 제공하는 것이기도 하다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 이하와 같다.

[0012] [1] 아래의 일반식 (I) :

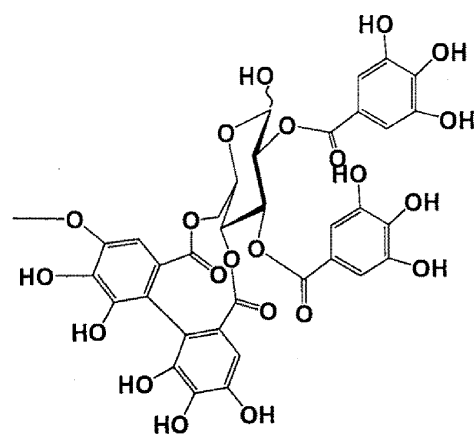
화학식 1



[0013]

[0014] {상기 식 중에서, R₁는 아래의 기 :

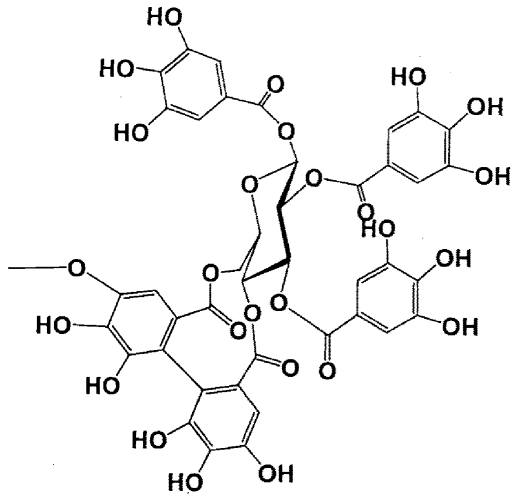
화학식 2



[0015]

[0016] 이고, 또한, R_2 는 -OH이거나, 또는 R_1 와 R_2 는 함께 -O-를 형성하거나, 또는 R_1 는 아래의 기 :

화학식 3

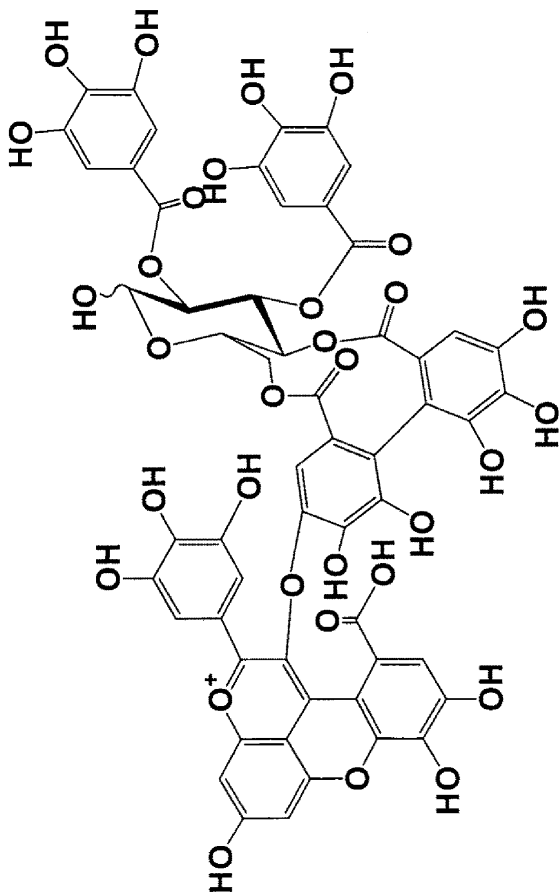


[0017]

[0018] 이고, 또한, R_2 는 -OH이다. 다만, R_1 중에서 글루코오스의 1위의 수산기의 배위 (파선)는 α 체와 β 체의 호변 이성인 것을 나타낸다.} 으로 나타내는 화합물.

[0019] [2] 이하의 화학식 :

화학식 4

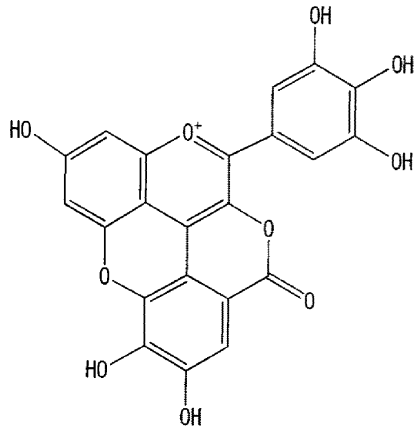


[0020]

[0021] 으로 나타내는 화합물.

[0022] [3] 이하의 화학식 :

화학식 5

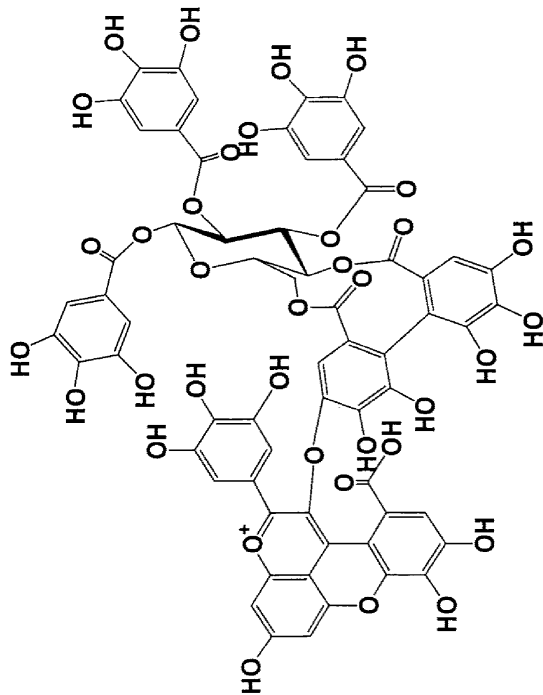


[0023]

[0024] 으로 나타내는 화합물.

[0025] [4] 이하의 화학식 :

화학식 6



[0026]

[0027] 으로 나타내는 화합물.

[0028] [5] 상기 [1] 내지 [4] 의 어느 하나에 기재된 화합물을 함유하는 식물.

[0029] 다만, 상기 식물은 천연에서는 상기 화합물을 함유하지 않는다.

[0030] [6] 장미과의 식물인 상기 [5] 에 기재된 식물.

[0031] [7] 상기 장미과의 식물은 장미과 장미속의 식물인, 상기 [6] 에 기재된 식물.

- [0032] [8] 상기 장미과 장미속의 식물은 장미과 장미속 장미인 상기 [7] 에 기재된 식물.
- [0033] [9] 상기 [5] 내지 [8] 의 어느 하나에 기재된 식물의 부분.
- [0034] [10] 절화인 상기 [9] 에 기재된 식물의 부분.
- [0035] [11] 상기 [10] 에 기재된 절화를 사용한 절화 가공품.
- [0036] [12] 상기 [1] 내지 [4] 의 어느 하나에 기재된 화합물을 사용하여, 식물의 꽃의 색을 개변하는 방법.
- [0037] [13] 상기 식물은 장미과의 식물인, 상기 [12] 에 기재되어 있는 방법.
- [0038] [14] 상기 장미과의 식물은 장미과 장미속의 식물인, 상기 [13] 에 기재되어 있는 방법.
- [0039] [15] 상기 장미과 장미속의 식물은 장미과 장미속 장미인, 상기 [14] 에 기재되어 있는 방법.

발명의 효과

- [0040] 본 발명에 의하여, 파란 장미의 꽃잎 중의 신규 색소가 추출, 단리, 정제되어 그 화학 구조가 해명되었다. 이것은 장미의 색을 유전자 공학적으로 개변하여 신규 장미과 식물을 작출하는 연구의 기초가 된다. 또한, 본 발명에 관한 신규 색소는, 예를 들면, 장미 등의 절화에 흡수시킴으로써 절화의 색을 개량하기 위하여 사용되고, 식물성 천연 색소로서, 예를 들면 음식물의 착색 등에도 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 시아닌딘, 텔피니딘, 로자시아닌의 화학 구조식을 나타낸다.
- 도 2는 연보라색계 장미 품종 「라반테」에 도입된 플라스미드 pSPB919의 구조를 나타낸다.
- 도 3은 청색 색소 (1)의 30% 아세트니트릴, 0.5% TFA 중에서의 가시 내지 자외 흡수 스펙트럼도이다.
- 도 4는 청색 색소 (1)의 HPLC에 의하여 분석하였을 때의 크로마토그램이며, 상기 화합물은 글루코오스의 1위의 수산기가 α 체와 β 체가 호변 이성을 나타내기 때문에 2개의 피크가 인정된다.
- 도 5는 적색 색소 (2)의 30% 아세트니트릴, 0.5% TFA 중에서의 가시 내지 자외 흡수 스펙트럼도이다.
- 도 6은 적색 색소 (2)의 HPLC에 의하여 분석하였을 때의 크로마토그램이다.
- 도 7은 청색 색소 (3)의 30% 아세트니트릴, 0.5% TFA 중에서의 가시 내지 자외 흡수 스펙트럼도이다.
- 도 8은 청색 색소 (1)의 화학 구조식이다.
- 도면 중에서, 글루코오스 수산기의 배위 (파선)는 α 체와 β 체의 호변 이성체를 나타낸다.
- 도 9는 적색 색소 (2)의 화학 구조식이다.
- 도 10은 청색 색소 (3)의 화학 구조식이다.
- 도 11은 도 8에 나타내는 청색 색소 (1)의 ^1H NMR의 스펙트럼도이다.
- 도 12는 도 8에 나타내는 청색 색소 (1)의 ^{13}C NMR의 스펙트럼도이다.
- 도 13은 도 9에 나타내는 적색 색소 (2)의 ^1H NMR의 스펙트럼도이다.
- 도 14는 연보라색계 장미 「WKS82」에 도입된 플라스미드 pSPB130의 구조를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 본 발명에 관한 신규 색소는 공지 물질인 로자시아닌 A1, 로자시아닌 B 및 로자시아닌 A2 (B환의 수산기의 수는 2개이다)의 B환에 수산기가 추가로 1개 추가된 구조를 가진다. 바꾸어 말하면, 본 발명에 관한 신규 청색 색소는 파란 장미 중에 존재하는 것이 확인된 공지 물질인 청색 색소 텔피니딘 부분 구조 (B환의 수산기의 수는 3개이다)를 가진 신규 화합물이라고도 할 수 있다.
- [0043] 특허 문헌 1 또는 2에 기재되어 있는 바와 같이, 청색 유전자 (플라보노이드 3',5'-수산화 효소)를 기능시킴으로써, 파란 장미에는 종래의 장미 품종 식물 중에는 존재하지 않는 청색 색소 (B환에 수산기가 3개 있다)가

존재하게 된다. 이번에, 이러한 청색 색소로서 공지 물질인 로자시아닌 A1, 로자시아닌 B 및 로자시아닌 A2 (B환의 수산기의 수는 2개이다)의 B환에 수산기가 추가로 1개 추가된 구조를 가진 화합물을, 단리·정제 하고, TOF-MS 및 NMR로 동정하여, 그 구조를 결정하였다.

[0044] 본 발명의 3 종류의 화합물은 각각, 도 3, 도 4, 도 11 및/또는 도 12에 나타내는 데이터를 제공하는 화합물이거나, 도 5, 도 6, 도 9 및/또는 도 13에 나타내는 데이터를 제공하는 화합물이거나, 또는 도 7에 나타내는 데이터를 제공하는 화합물이다.

[0045] 안토시아닌류, 예를 들면 시아니딘과 비교하여 분자량이 큰 로자시아닌류에서는 그 B환에 수산기가 추가적으로 1개 추가되어 3개의 수산기를 가지는 것에 의한 용해도 향상 효과가 더 높아지는 결과, 꽃잎 세포의 액포에 수송되어 청색을 발휘하는 데 있어서 더 유효한 색소라고 생각할 수 있다. 또한, 로자시아닌류는 일반적인 색소에 비하여, 식물체 내에서 합성된다는 점에 있어서 우수한 특징이 있다. 또한, 본 발명은 도 8 내지 도 10에 나타내는 화합물을 함유하는 식물을 제공한다. 다만, 상기 식물은 천연에는 상기 화합물을 함유하지 않거나 또는 상기 화합물은 검지할 수 있는 양으로 그 꽃잎 중에는 존재하지 않는다. 또한, 본 발명은 도 8 내지 도 10에 나타내는 화합물을 사용하여, 식물의 꽃의 색을 개변하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 본 발명에 관한 화합물은 본 발명에 관한 화합물의 합성에 관여하는 효소의 유전자를, 대상이 되는 식물에 유전자 공학적 수법에 따라 도입하고, 검지할 수 있는 소정량의 상기 화합물을 식물의 꽃잎 내에서 합성시킴으로써 비로소 취득할 수 있다. 또한, 본 발명에 관한 화합물을 직접 식물에 흡수시키는 물리적 방법에 의할 수도 있으나, 대상이 되는 식물이 상기 화합물을 함유하는 태양은 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 식물체는 도 8 내지 도 10에 나타내는 화합물을 꽃잎 내에 함유한다. 식물체의 꽃잎 중의 이 화합물들의 함유율은 특히 한정되지 않지만, 종기로는 꽃잎 습중량당, 0.00001 mg/g 이상이다. 하한값은, 더 종기로는 0.0001 mg/g 이상, 더 종기로는 0.0007 mg/g 이상이다. 상한값은 종기로는 1 mg/g 이하, 더 종기로는 0.5 mg/g 이하, 더 종기로는 0.13 mg/g 이하이다.

[0047] 대상이 되는 식물의 예로서는, 장미, 국화, 카네이션, 금어초, 시클라멘, 난, 리시안사스, 프리지아, 거베라, 글라디올러스, 안개꽃, 카랑코예, 백합, 페라르고니움, 제라늄, 페튜니아, 토레니아, 튜립, 벼, 대맥, 밀, 유채씨, 감자, 토마토, 포플러, 바나나, 유칼리투스, 고구마, 대두, 알파파, 루핀, 옥수수, 컬리플라워 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 그 중에서도 종기로는 장미과의 식물이며, 더 종기로는 장미과 장미속의 식물이며, 더 종기로는, 로자 하이브리다 (*Rosa hybrida*)로 대표되는 장미과 장미속 장미다. 본 발명은 상기 식물의 부분, 특히 절화, 이 절화를 이용한, 절화 가공품도 관한 것이기도 하다. 이 때, 절화 가공품으로서, 상기 절화를 사용한 프레스드 플라워, 프리저브드 플라워, 드라이 플라워, 수지 밀봉품 등을 포함하지만, 이것에 한정되는 것은 아니다.

[0049] [실시예]

[0050] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 구체적으로 설명한다.

[0051] 실시예 1: 색소 화합물의 단리, 정제

[0052] 파란 장미를 추출원으로 하여, 본 발명의 색소 화합물을 단리, 정제하였다.

[0053] 플라스미드 pSPB919를 도입한 품종 라반테의 작출

[0054] 추출원인 파란 장미를 작출하였다. 이하에 나타내는 방법에 의하여, 플라스미드 pSPB919를 도입한 품종 라반테를 작출하였다.

[0055] 절화인 파란 아이리스 꽃잎으로부터 RNA를 수득하고, 또한 이로부터 polyA⁺ RNA를 조제하였다. 이 polyA⁺ RNA로부터 λZAPII (Stratagene사)를 벡터로 하는 cDNA 라이브러리를 cDNA 라이브러리 제작 키트 (Stratagene사)를 사용하여 제조자가 권장하는 방법으로 제작하였다. 아이리스의 DFR 유전자 단편은 용담 (龍膽)의 DFR 유전자 단편을 취득한 보고와 동일하게 실시하였다 (Tanaka *et al.* Plant Cell Physiol. 37, 711-716, 1996).

[0056] 얻은 약 400 bp의 DNA 단편을 진 크린 (GeneClean)에 의하여 제조자가 권장하는 방법으로 회수하여, pCR-TOPO에 서브 클로닝하였다. 그 염기 배열을 결정한 바, 장미 DFR 유전자에 상동인 배열을 볼 수 있었다. 이 DNA 단편을 사용하여 아이리스 cDNA 라이브러리를 스크리닝하고, 전체 길이의 아미노산 배열을 포함하는 아이리스 DFRcDNA를 얻었다. 그 중 pSPB906로 한 클론에 포함되는 cDNA의 전체 염기 배열을 결정하였다 (염기 배열과 아미노산 배열은 특허 문헌 2의 배열 번호 9와 배열 번호 10을 참조).

- [0057] 다음으로, pSPB580를 BamHI와 XhoI로 소화하여 얻는 약 3.9 kb의 DNA 단편과 pSPB906를 BamHI와 XhoI로 소화하여 얻는 약 1.5 kb의 DNA 단편을 연결하여 얻은 플라스미드를 pSPB909로 하였다.
- [0058] 식물 중에서 장미 DFRcDNA의 2개의 사슬 RNA의 전사는 다음과 같이 실시하였다. pCGP1364 (Tanaka *et al.* Plant Cell Physiol. (1995) 36 1023-1031)을 PstI로 부분 소화하여 얻는 약 3.5 kb의 DNA 단편 (MacI 프로모터, 장미 DFRcDNA, mas 터미네이터를 포함한다)을 pUC19 (Yanisch-Perron C *et al.*, Gene 33: 103-119, 1985)의 PstI 부위에 삽입하는 것에 의하여 얻을 수 있는 플라스미드 중 pUC19의 HindIII 부위가 MacI 프로모터에 근접하고 있는 것을 pCGP1394로 하였다.
- [0059] 다음으로, pCGP1394를 HindIII와 SacII로 소화하여 얻는 약 1.4 kb의 DNA 단편과 pCGP1394를 PstI로 소화한 후 평활 말단화하고, 또한 SacII로 소화하여 얻는 약 1.9 kb의 DNA 단편과 pBinPLUS를 SacI로 소화한 후 평활 말단화하여 추가적으로 HindIII로 소화하여 얻는 바이너리 벡터 단편을 연결하여 pSPB185를 얻었다. pSPB185를 XbaI로 소화하여 평활 말단화하고, SalI 링커와 라이게이션함으로써, pSPB521를 얻었다. pUE6를 HindIII와 BamHI로 소화하여 얻는 약 700 bp의 DNA 단편과, pSPB521를 HindIII와 SacI로 소화하여 얻는 바이너리 벡터 DNA 단편과 pE2113를 BamHI와 SacI로 소화하여 얻는 GUS 유전자 DNA 단편을 연결함으로써 pSPB528를 얻었다.
- [0060] pSPB528는 인헨서를 가진 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터와 마노핀 신타제 터미네이터의 사이에 구조 유전자를 삽입하여 식물에서 발현시킬 수 있는 바이너리 벡터이다. 또한, pCGP645에 포함되는 장미 DFRcDNA의 5' 비번역 영역 배열을 짧게 하기 위하여 pCGP645를 SmaI와 PvuI로 소화한 후 평활 말단화하고, 라이게이션하여 얻은 pCGP645s를 얻었다.
- [0061] 장미 DFRcDNA의 5' 측 배열을, pCGP645s를 주형에, 리버스 프라이머와 합성 프라이머 RDF310 (특허 문헌 2의 배열 번호 19를 참조)를 프라이머에 사용하여 PCR에 의하여 증폭함으로써 취득하고, pCRTOP0에 클로닝하였다. DNA의 염기 배열을 결정하여 PCR에 의한 에러가 없는 것을 확인하였다. 이것을 pSPB569로 하였다. 또한, 길이가 다른 장미 DFRcDNA의 5' 측 배열을, pCGP645s를 주형에 리버스 프라이머와 합성 프라이머 RDF830 (특허 문헌 2의 배열 번호 20을 참조)를 프라이머에 사용하여 PCR에 의하여 증폭함으로써 취득하고, pCRTOP0에 클로닝하였다. DNA의 염기 배열을 결정하여 PCR에 의한 에러가 없는 것을 확인하였다.
- [0062] 이것을 pSPB570로 하였다. pSPB528를 BamHI와 SacI로 소화하여 얻는 바이너리 벡터의 DNA 단편과 pSPB569를 SacI와 XhoI로 소화하여 얻는 0.3 kb의 DNA 단편과 pSPB570를 BamHI와 SalI로 소화하여 얻는 DNA 단편을 연결하여 pSPB572를 얻었다. 본 벡터는 식물 중에서 장미 DFRcDNA의 2개 사슬 RNA를 전사하도록 디자인되어 있다.
- [0063] pUE6를 SacI로 소화하고, 평활 말단화하고, SalI 링크를 삽입하여 pUE8를 얻었다. pUE8를 HindIII와 EcoRI로 소화하여 얻는 DNA 단편을 pBinPLUS의 HindIII와 EcoRI 부위에 도입하고, pSPB189로 하였다. pSPB189를 BamHI와 SalI로 소화하여 얻는 약 3.7 kb의 DNA 단편과 pCGP1961를 BamHI로 완전 소화하고, 또한 XhoI로 부분 소화하여 얻는 약 1.8 kb의 DNA 단편을 연결하여 pSPB567를 얻었다. pSPB572를 PacI로 소화하고, 탈인산화 처리를 실시한 후, pSPB567를 PacI로 소화하여 얻는 약 2.8 kb의 DNA 단편을 연결하고, nptII 유전자와 팬지 유래의 F3' 5' H#40이 동일한 방향으로 전사되는 플라스미드를 선택하여, pSPB905로 하였다.
- [0064] pSPB905를 AscI로 소화하고, 탈인산화 처리를 실시한 후, pSPB909를 AscI로 소화하여 얻는 약 2.5 kb의 DNA 단편을 연결하고, nptII 유전자와 동일한 방향으로 아이리스 DFR 유전자가 전사되는 플라스미드를 얻고, pSPB919 (도 2 참조)로 하였다. 본 플라스미드는 장미에 있어서는 아이리스 유래의 DFR 유전자와 팬지 유래의 F3' 5' H#40 유전자를 전사하고, 장미의 DFR 유전자의 발현을 2개 사슬 RNA의 전사에 의하여 억제하는 것이 기대된다. 이 플라스미드를 아그로박테리움 투메페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*) Ag 10주에 도입하였다.
- [0065] 상기 아그로박테리움에 감염시킴으로써, 연보라색계 장미 품종 「라반데」에 pSPB919 (도 2 참조)를 도입하여 형질 전환체를 얻었다. 형질 전환 세포를 세분화시켜, 재조합 식물체인 파란 장미 (플라스미드 pSPB919를 도입한 품종 라반데)를 얻고, 그것을 개화시켰다.
- [0066] 색소 화합물의 추출, 단리, 정제, 동정
- [0067] 상기와 같이 해 얻은 파란 장미 (플라스미드 pSPB919를 도입한 품종 라반데)의 꽃잎 230 g로부터 이하의 방법으로 색소 화합물을 정제하였다.
- [0068] 꽃잎 230 g을, 호모디나이저를 이용하여 액체 질소 중에서 동결 분쇄하고, 1 L의 0.5% TFA를 포함하는 50% 아세토니트릴을 가하여 하룻밤 침지하였다. 규조토 여과한 여과액을 로터리 이배퍼레이터로 약 2/5의 체적까지 농축하였다.

- [0069] 이 농축한 추출액을 흡착 수지 HP-20 (미쓰비시카세이(주)) 400 ml에 부하하였다. 800 ml의 물로 세정한 후, 1L의 0.1% TFA를 포함하는 20% 아세토니트릴, 0.1% TFA를 포함하는 60% 아세토니트릴로 차례로 용출하였다. 60% 희분에 청색 색소를 포함하는 희분이 용출하였다.
- [0070] 이 희분을, 이하의 분취 HPLC로 정제하였다. 컬럼은 Develosil-ODS-UG (노무라카가쿠사제) 5 cmφ*50 cm, 이동상은 A: 물, B: 50% 아세토니트릴 0.5% TFA를 사용하여 유속 32 ml/분으로, B30% (30분 유지) B30→B100%의 리니어 경사 (50 분), B100%를 20분간 유지하였다. 검출은 A260 nm로 실시하였다. 67-82분에 용출된 청색 색소를 포함하는 희분을 모아 동결 건조하였다. 크로마토그래피는 2회 반복하였다.
- [0071] 해당 동결 건조품 1.2g을 50% 아세토니트릴로 평형화한 SephadexLH-20 컬럼 (팔마시아) (1.2 L)에 부하하였다. 50% 아세토니트릴 2.5L 용출한 후, 50% 아세토니트릴 2.5 L로 용출한 청색 색소를 포함하는 희분을 모아 동결 건조하였다.
- [0072] 얻은 동결 건조품을 분취 HPLC로 재차 크로마토그램을 실시하였다.
- [0073] 컬럼은 YMC pack PolymerC18 (와이엠시가부시키가이샤, 2 cmφ*30cm), 이동상은 A: 0.5% TFA/물, B: 0.5% TFA/50% 아세토니트릴, 6 ml/분, 이하의 경사로 실시하였다. B65% (30 분 유지) B65→B90%의 리니어 경사 (20 분), B 90%를 30분간 유지하고, 검출은 A260 nm로 실시하였다. 50-52 분으로 용출한 적색 색소 (2) 및 60-65 분으로 용출한 청색 색소 (1) 및 65-73 분으로 용출한 청색 색소 (3)를 모아 동결 건조하였다. 크로마토그래피는 총 3회 반복하였다.
- [0074] 이와 같이 하여 얻은 동결 건조품, 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)에 대하여 육안으로 색조를 관찰하였다. 그 결과, 각각, 진한 파랑, 진한 빨강 및 진한 파랑을 나타내었다.
- [0075] 이 중, 청색 색소 (1)에 대하여, 꽃잎중의 함유량을 측정하였더니, 그 함유량은 꽃잎 습중량당 0.0007 mg/g 내지 0.13 mg/g의 범위이었다.
- [0076] 실시에 2: 색소 화합물의 기기 분석에 의한 구조 해석
- [0077] 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)에 대하여, 필요에 의하여 재차 정제한 시료를 사용하여 각종 기기 분석을 실시하였다.
- [0078] 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)를 HPLC로 분석하고, 포토다이오드 어레이 (Photodiode array) 검출기로, 30% 아세토니트릴, 0.5% TFA 중에서의 650-250 nm의 흡수스펙트럼을 측정하였다 (도 3, 도 5, 도 7 참조).
- [0079] HPLC는 컬럼에 Shodex-Asahipak-ODP50 (쇼와덴코사제) 4.6 mmφ*25 cm를 사용하여 이동 상은 0.6 ml/분의 30% 아세토니트릴, 0.5% TFA 아이소크라틱 용출을 실시하였다. 검출은 Photodiode array 검출기 (SPD-M10Avp, (주) 시마즈세이사쿠쇼제) 그리고 650-250 nm의 흡수 스펙트럼을 측정하여 A560 nm의 크로마토그램을 모니터링 하였다.
- [0080] 결과를 이하에 요약한다 (대기 시간 (R.T.)에 대하여는 도 4와 6을 참조).
- [0081] 청색 색소 (1) $\lambda_{\max}$ 593 nm R.T. 14.6분 및 18.5분 *
- [0082] 적색 색소 (2) $\lambda_{\max}$ 535 nm R.T. 8.9분
- [0083] 청색 색소 (3) $\lambda_{\max}$ 594 nm R.T. 21.6분*
- [0084] 청색 색소 (1)는 글루코오스의 1위의 수산기가 α 체와 β 체가 호변 이성을 나타내기 때문에 2개의 피크를 나타낸다.
- [0085] 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)의 TOF-MS 측정을 실시하였다.
- [0086] MS는 Q-TOF Premier (마이크로매스 (Micromass)사제, 영국)로 이온원에 Z 스프레이 이온 소스를 붙인 ESI를 사용하여, 포지티브, V 모드로 측정하였다. Cone volt.: 60 V, Capillary voltage: 3 KV, 락 스프레이에 의한 질량 보정을 실시하고, 레퍼런스로는 로이신 엔케팔린 (m/z 556. 2771 $[M+H]^+$)을 사용하였다.
- [0087] 그 결과, 청색 색소 (1)는 m/z 1221.1352 $[M]^+$ 의 분자 이온, 적색 색소 (2)는 m/z 435.0380 $[M]^+$ 의 분자 이온, 청색 색소 (3)는 m/z 1373.1442 $[M]^+$ 의 분자 이온을 제공하고, 각각 분자 식 $C_{56}H_{37}O_{32}$ (err.: +6.9 pp

m), $C_{22}H_{11}O_{10}$ (err.: +6.4 ppm), $C_{63}H_{41}O_{36}$ (err.: +4.6 ppm)와 잘 일치하였다.

[0088] 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)의 0.5% TFA를 함유하는 30% 아세토니트릴 중에서의 흡수 스펙트럼을 각각, 도 3, 도 5 및 도 7에 나타낸다.

[0089] 청색 색소 (1) 및 청색 색소 (3)의 가시부의 흡수 최대값은 593 nm로, 특허 문헌 3의 실시예 1에 기재되어 있는 식 (II)의 화합물의 흡수 최대값보다 약간 긴 파장으로 시프트하였다.

[0090] 특허 문헌 3에 기재된 식 (II)의 화합물은 특허 문헌 3에 기재되어 있는 바와 같이 청색을 띤다. 그러나, 이번에 얻은 청색 색소 (1), 청색 색소 (3)의 흡수 최대값은 특허 문헌 3에 기재된 식 (II)의 화합물의 흡수 최대값보다 더욱 긴 파장측이었기 때문에, 식 (II)의 화합물보다 더 파란 색을 나타낸다. 따라서, 본 발명에서 새롭게 발견한 청색 색소 (1), 청색 색소 (3)는 식물의 색을 더욱 파랗게 하는 효과가 있는 것이 분명해졌다. 청색 색소 (1)의 분자량을 TOF-MS로 측정하였더니, m/z 1221.13[M]⁺이고, 이것은 특허 문헌 3의 실시예 1에 기재된 식 (II)의 화합물의 분자량 1205보다, 16 매스 유닛 컷다. 이것은 특허 문헌 2에 기재된 플라스미드 pSPB919를 도입한 품종 라반테에는 특허 문헌 3으로부터 공지된 상기 색소 화합물보다 분자량이 16 큰 색소 화합물이 포함되어 있는 것을 나타낸다. 플라보노이드 3',5'-수산화 효소에 의한 수산화 반응에 의한 분자량의 증가는 산소 원자 1개의 부가에 의한 16의 증가이기 때문에, 청색 색소 (1)는 특허 문헌 3의 실시예 1에 기재된 식 (II)에서 나타내는 화합물보다 산소 원자가 1개 더 많다고 생각되었다. 플라보노이드 3',5'-수산화 효소는 플라보노이드의 B환을 특이적으로 수산화하므로, 이번에 동정된 화합물은 비특히 특허 문헌 1에 기재된 로자시아닌 A1 배당체가 아니라, B환에 수산기를 3개 가진 델피니딘 부분 구조를 가진 화합물이라고 판단되었다. 즉, 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)의 구조는 각각, 도 8, 도 9 및 도 10에 나타내는 구조이라고 판단하였다.

[0091] 또한, 각 화합물에 대하여 NMR에 의한 측정을 실시하였다. 1% DCI (중염산 (重鹽酸))을 함유하는 DMSO-d₆ [(CD₃)₂SO] 디메틸설폭사이드]에 용해하고, ¹H와 ¹³C의 잔존 피크 δ 2.50, δ 39.43을 내부 표준으로 하였다. 측정 항목은 ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H {¹³C}-HSQC, ¹H {¹³C}-HMBC, TOCSY, DQF-COSY 및 ROE를 DMX-750 spectrometer (BRUKER BIOSPIN, Germany)로 측정하였다. 그 결과, 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)의 구조는 각각, 도 8, 도 9 및 도 10에 나타내는 구조라고 결정하였다.

[0092] 청색 색소 (1)의 ¹H NMR의 해석 결과를 도 11에, 그리고 ¹³C NMR의 해석 결과를 도 12에 나타낸다.

[0093] 청색 색소 (1)는 ¹H NMR에 있어서 δ 3.67 (1H, d12, Glc-6a), δ 4.48 (1H, dd2, 9, Glc-5a), δ 4.84 (1H, t9, Glc-4a), δ 4.94 (1H, dd2, 9, Glc-2a), δ 4.99 (1H, dd2, 12, Glc-6a), δ 5.30 (1H, d2, Glc-1a), δ 5.64 (1H, t9, Glc-3a), 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')의 시그널이 인정되었다. HHDP는 헥사하이드록시 디페노일 (hexahydroxy diphenoyl)기의 약효이다. 그 밖에, 당의 1위의 수산기가 β 타입인 글루코오스의 시그널도 마이너 시그널로서 관찰되었다.

[0094] 적색 색소 (2)의 ¹H NMR의 해석 결과를 도 13에 나타낸다.

[0095] 적색 색소 (2)는 ¹H NMR에 대해, 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")의 시그널이 인정되었다.

[0096] 실시예 3: 다른 품종의 파란 장미에 있어서의 색소 화합물의 확인

[0097] 실시예 1과는 다른 품종의 파란 장미에 대하여, 본 발명의 화합물의 존재를 확인하였다.

[0098] 플라스미드 pSPB130를 도입한 품종 「WKS82」의 작출

[0099] 이하의 방법으로 플라스미드 pSPB130를 도입한 품종 「WKS82」를 작출하였다.

[0100] 안토시아닌을 방향족 아실기로 수식함으로써 안토시아닌을 안정화시키고, 또한 그 색을 푸르게 할 수 있다 (예를 들면, W096/25500). 아실화한 델피니딘형 안토시아닌의 생산을 목표로 하여 이하의 실험을 실시하였다.

- [0101] 토레니아 품종 서머 웨이브 꽃잎으로부터 RNA를 수득하고, 또한 이로부터 polyA⁺ RNA를 조제하였다. 이 polyA⁺ RNA로부터 λZAPII (Stratagene사)를 벡터로 하는 cDNA 라이브러리를 directional cDNA 라이브러리 제작 키트 (Stratagene사)를 사용하여 제조자가 권장하는 방법으로 제작하였다. 토레니아의 주요 안토시아닌은 그 5 위의 글루코오스가 방향족 아실기에 의하여 수식되어 있기 때문에 (Suzuki *et al.* Molecular Breeding 2000 6, 239-246), 토레니아 꽃잎에 대하여는 안토시아닌 아실기 전이 효소가 발현하고 있다.
- [0102] 안토시아닌 아실기 전이 효소는 특정의 아미노산 배열이 보존되어 있어서, 이것에 대응하는 합성 DNA를 프라이머로서 사용함으로써 안토시아닌 아실기 전이 효소 유전자를 취득할 수 있다 (W096/25500). 구체적으로는, 토레니아 cDNA 라이브러리 제작시에 합성한 1개 사슬 cDNA 10 ng를 주형으로 하고, 100 ng의 ATC 프라이머 (특허 문헌 2의 배열 번호 17 참조), 100 ng의 올리고 dT 프라이머 (특허 문헌 2의 배열 번호 18 참조)를 프라이머로 하고, Taq 폴리메라제 (다카라, 일본)를 사용하여 제조자가 권장하는 조건으로 PCR를 실시하였다.
- [0103] PCR는 95℃에서 1분간, 55℃에서 1분간 및 72℃에서 1분간을 1 사이클로 하는 반응을 25 사이클 실시하였다. 얻은 약 400 bp의 DNA 단편을 진크린 II (BIO, 101. Inc.) 에 의하여 제조자가 권장하는 방법으로 회수하고, pCR-TOPO에 서브 클로닝하였다. 그 염기 배열을 결정하였더니 용담의 아실기 전이 효소 유전자 (Fujiwara *et al.* (1998) Plant J. 16 421-431)에 상동인 배열을 볼 수 있었다. 또한, 염기 배열은 다이 프라이머법 (어플라이드 바이오시스템즈사)을 이용하여 시퀀서 310 또는 377 (모두 어플라이드 바이오시스템즈사)을 사용하여 결정하였다.
- [0104] 이 DNA 단편을, DIG 표지 검출 키트 (일본 롯데)를 사용하여 DIG에 의하여 표지하고, 제조자가 권장하는 방법으로 토레니아의 cDNA 라이브러리를 플라크 하이브리다이제이션법에 의하여 스크리닝하였다. 얻은 포지티브 시그널을 가져온 클론을 무작위로 12개 선택하고, 그것으로부터 플라스미드를 회수하여, 염기 배열을 결정하였다. 이들은 안토시아닌 아실기 전이 효소에 좋은 상동성을 나타내었다. 이 클론들 중 pTAT7로 한 클론에 포함되는 cDNA의 전염기 배열을 결정하였다 (염기 배열에 대하여는 특허 문헌 2의 배열 번호 7을, 그리고 아미노산 배열에 대하여서는 특허 문헌 2의 배열 번호 8을 참조).
- [0105] pBE2113-GUS (Mitsuhara *et al.* Plant Vell Physiol. 37, 45-59 1996)을 SacI로 소화한 후, 평활 말단화하고, 8 bp의 XhoI 링커 (다카라)를 삽입하였다. 이 플라스미드의 BamHI와 XhoI 부위에 pTAT7를 BamHI와 XhoI로 소화하여 얻은 약 1.7 kb의 DNA를 삽입하고 pSPB120를 얻었다. pSPB120를 SnaBI와 BamHI로 소화한 후 평활 말단화하여 라이게이션함으로써 pSPB120 '를 얻었다. 한편, 팬지 유래의 F3 '5 'H#40 cDNA를 포함하는 플라스미드 pCGP1961를 BamHI로 완전 소화하고, 또한 XhoI로 부분 소화하여 얻을 수 있는 약 1.8 kb의 DNA 단편을 회수하고, 이것과 BamHI와 XhoI로 소화한 pUE5H와 라이게이션하여 얻은 플라스미드를 pUEBP40로 하였다.
- [0106] pUEBP40를 SnaBI와 BamHI로 소화한 후 평활 말단화하여 라이게이션함으로써 pUEBP40 '를 얻었다. pUEBP40 '를 HindIII로 부분 소화하여 얻은 약 2.7 kb의 DNA 단편을 회수하고, pSPB120 '를 HindIII로 부분 소화한 DNA 단편과 연결하였다. 얻은 플라스미드 중에서, 바이너리 벡터 상에서 라이트 보더측으로부터, 네오마이신 포스포트랜스페라제 유전자, 팬지 유래 F3 '5 'H#40 유전자, 토레니아 유래 5 AT 유전자의 순서로 각각 동일한 방향으로 연결된 바이너리 벡터를 pSPB130 (도 12 참조)로 하였다. 이 플라스미드는 식물에 있어서는 팬지 유래 F3 '5 'H#40 유전자와 토레니아 유래 5AT 유전자 구성적으로 발현하고, 유전자를 꽃잎 특이적으로 전사하도록 되어 있다. 이 플라스미드를 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) Ag 10주에 도입하였다. 이 아그로박테리움에 감염시킴으로써, 연보라색계 장미 「WKS82」에 pSPB130 (도 12)를 도입하고, 형질 전환체를 얻었다. 형질 전환 세포를 세분화시켜, 재조합 식물체인 파란 장미 (플라스미드 pSPB130를 도입한 품종 「WKS82」)를 얻고, 그것을 개화시켰다.
- [0107] 색소 화합물의 추출, 단리, 정제, 동정
- [0108] 전술한 바와 같이 하여 얻은 파란 장미 (플라스미드 pSPB130를 도입한 품종 「WKS82」)의 꽃잎 230 g로부터, 실시예 1과 동일한 방법으로, 추출, 단리 및 정제를 실시하여, 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)를 얻었다.
- [0109] 얻은 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)에 대하여 육안으로 색조를 관찰하였다. 그 결과, 각각, 진한 파랑, 진한 빨강 및 진한 파랑을 나타내고 있었다.
- [0110] 또한, 청색 색소 (1), 적색 색소 (2) 및 청색 색소 (3)에 대하여, LC-TOF-MS를 사용하여, 실시예 1에서 동정한 색소 성분과 각각 동일한 화합물인 것을 확인하였다.

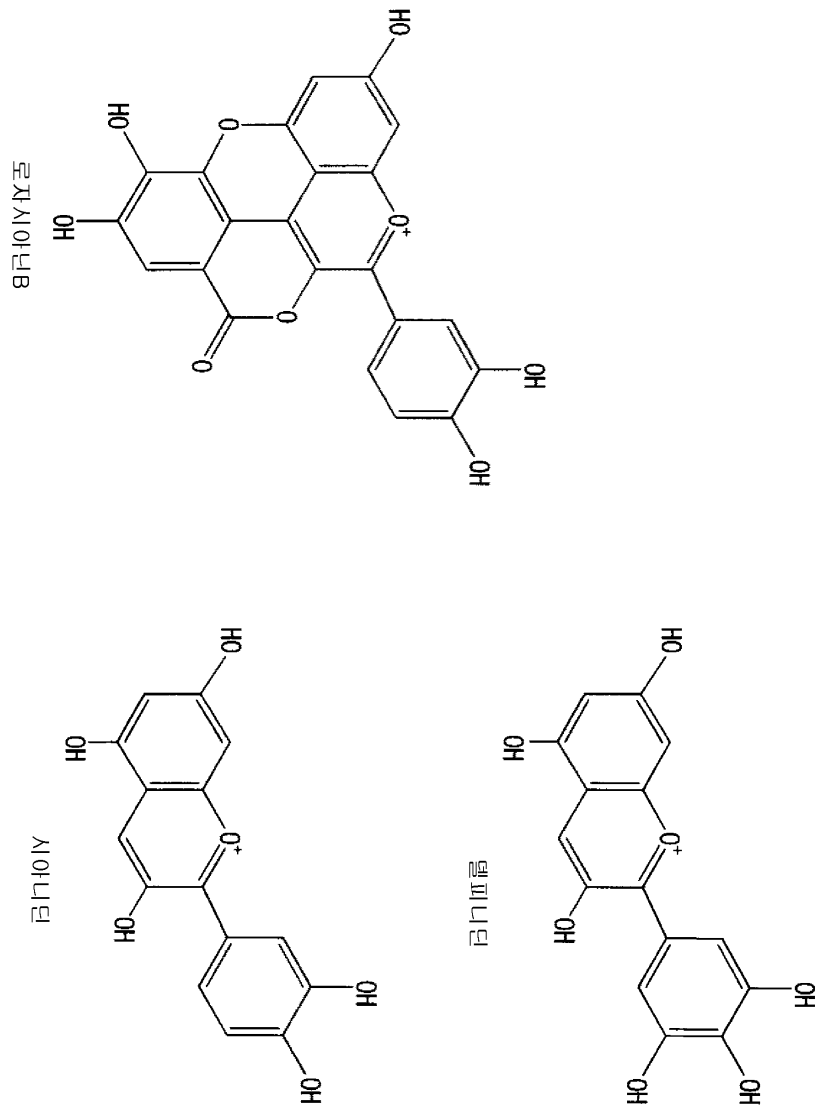
산업상 이용가능성

[0111]

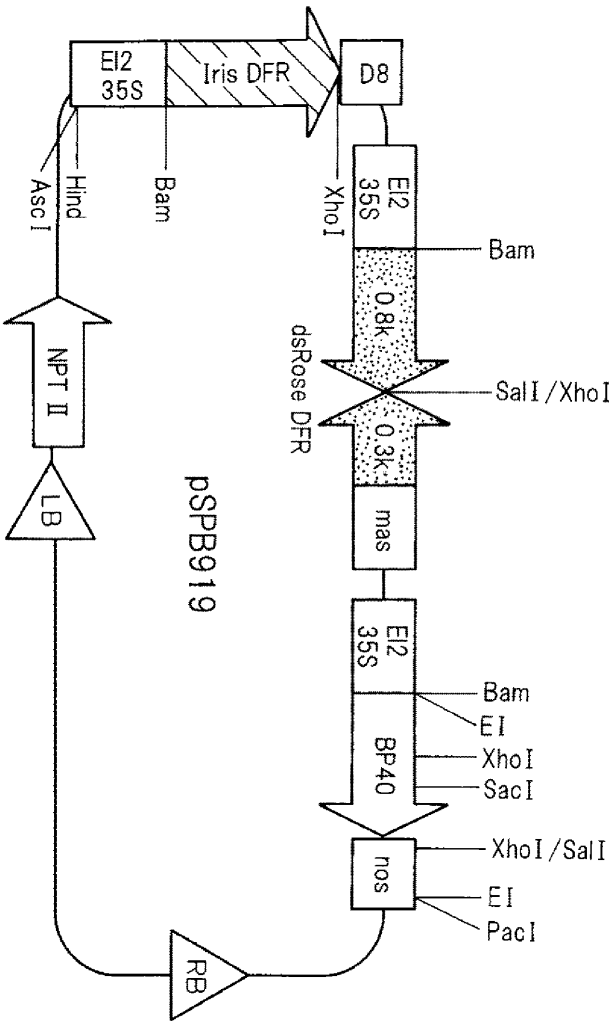
본 발명에 의하여, 파란 장미의 꽃잎 중의 신규 색소가 추출, 단리, 정제되고, 그의 화학 구조가 해명되었다. 본 발명에서 새롭게 밝혀낸 화합물은 종래 연보라색계의 장미에 존재하는 것이 알려져 있던 로자시아닌류에 비하여, 파란 색을 나타내는 것이다. 따라서, 본 발명에서 밝혀낸 상기 화합물을 사용하여, 식물의 꽃의 색을 개변할 수 있다. 또는, 또한, 이 화합물을 식물성 색소로서 사용함으로써, 예를 들면, 음식물의 착색 등에도 이용할 수 있다.

도면

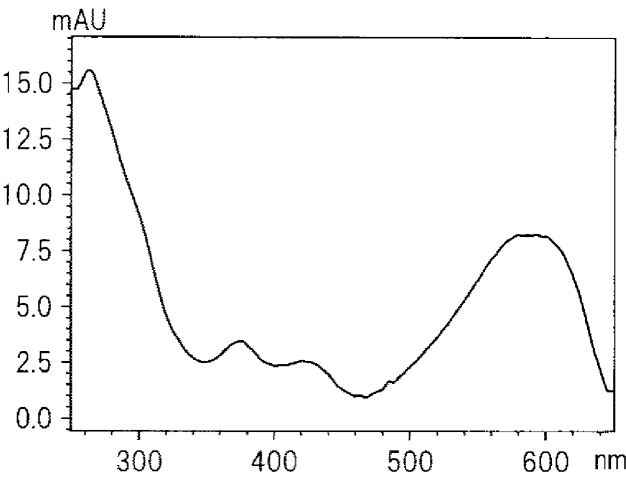
도면1



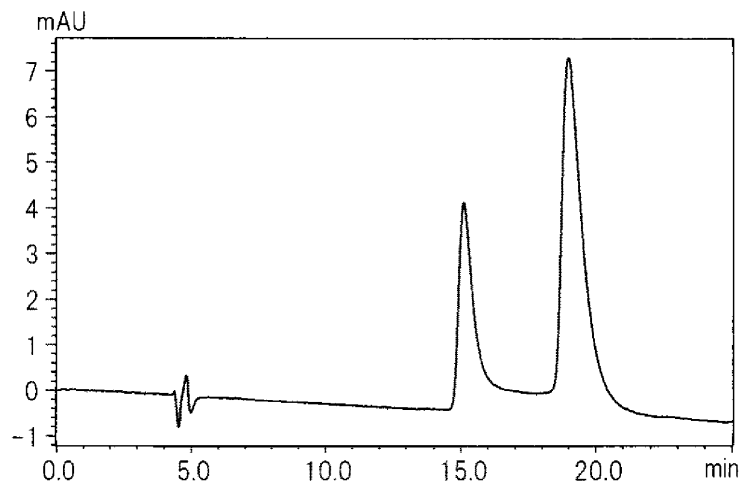
도면2



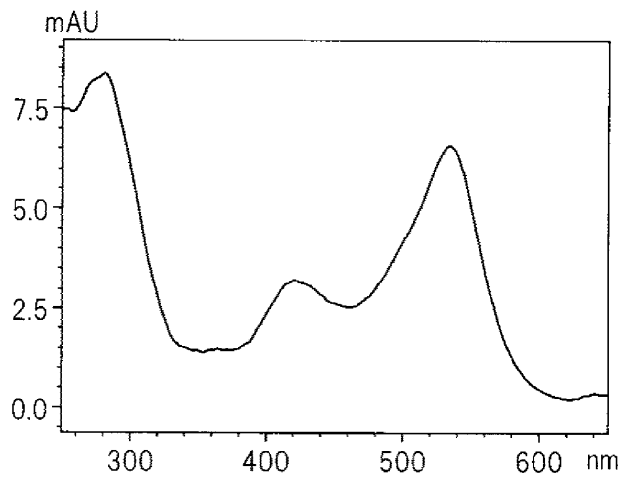
도면3



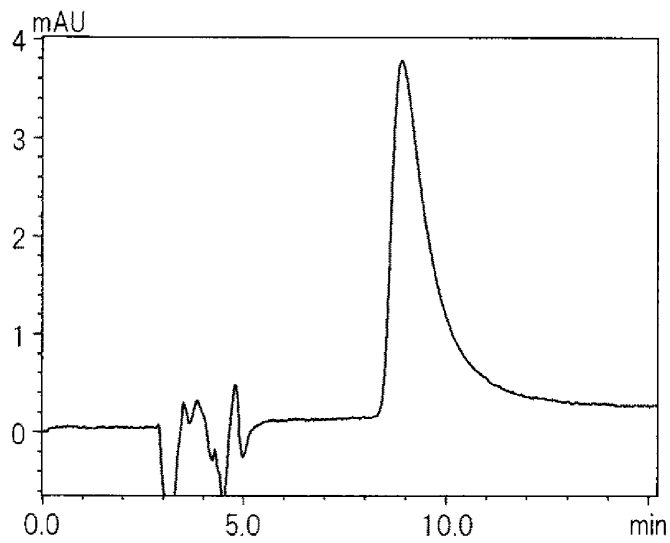
도면4



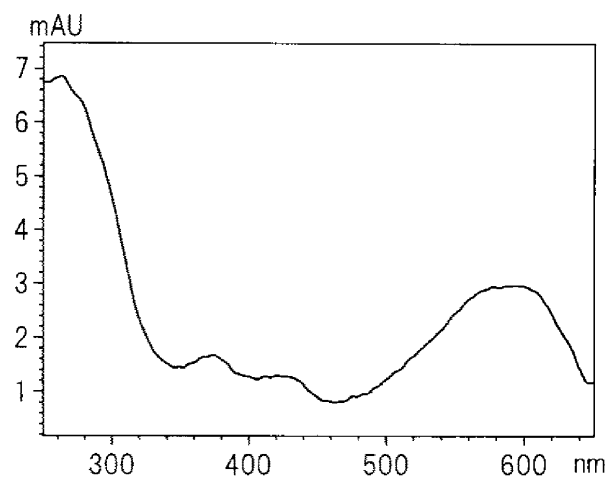
도면5



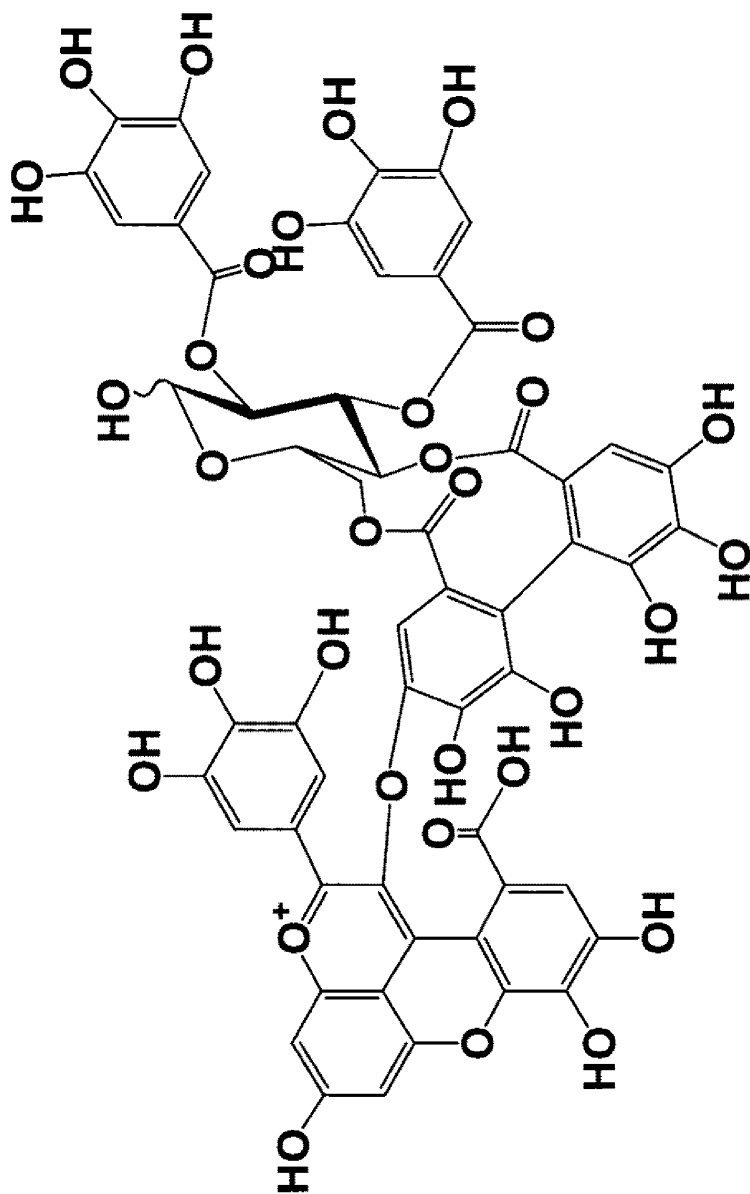
도면6



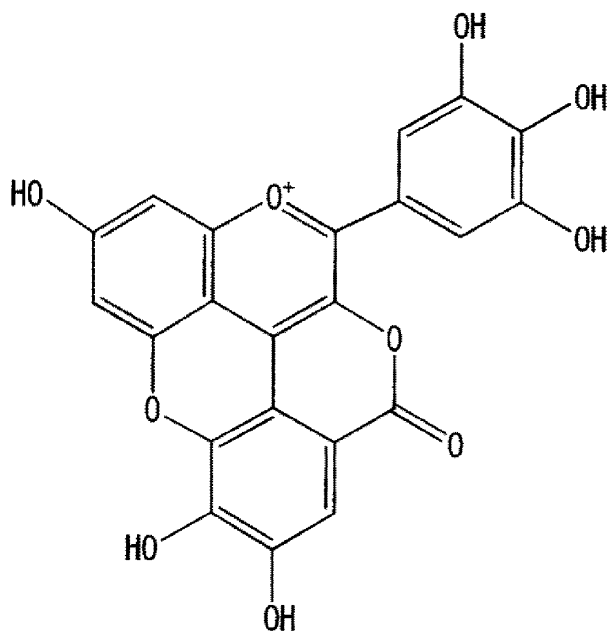
도면7



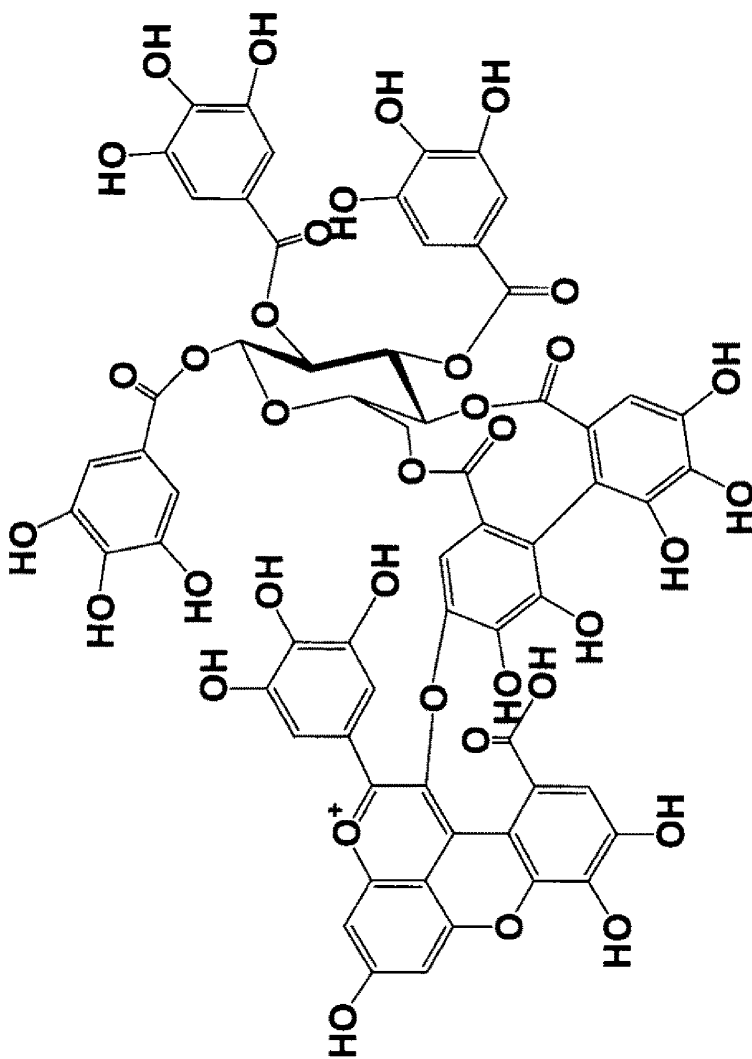
도면8



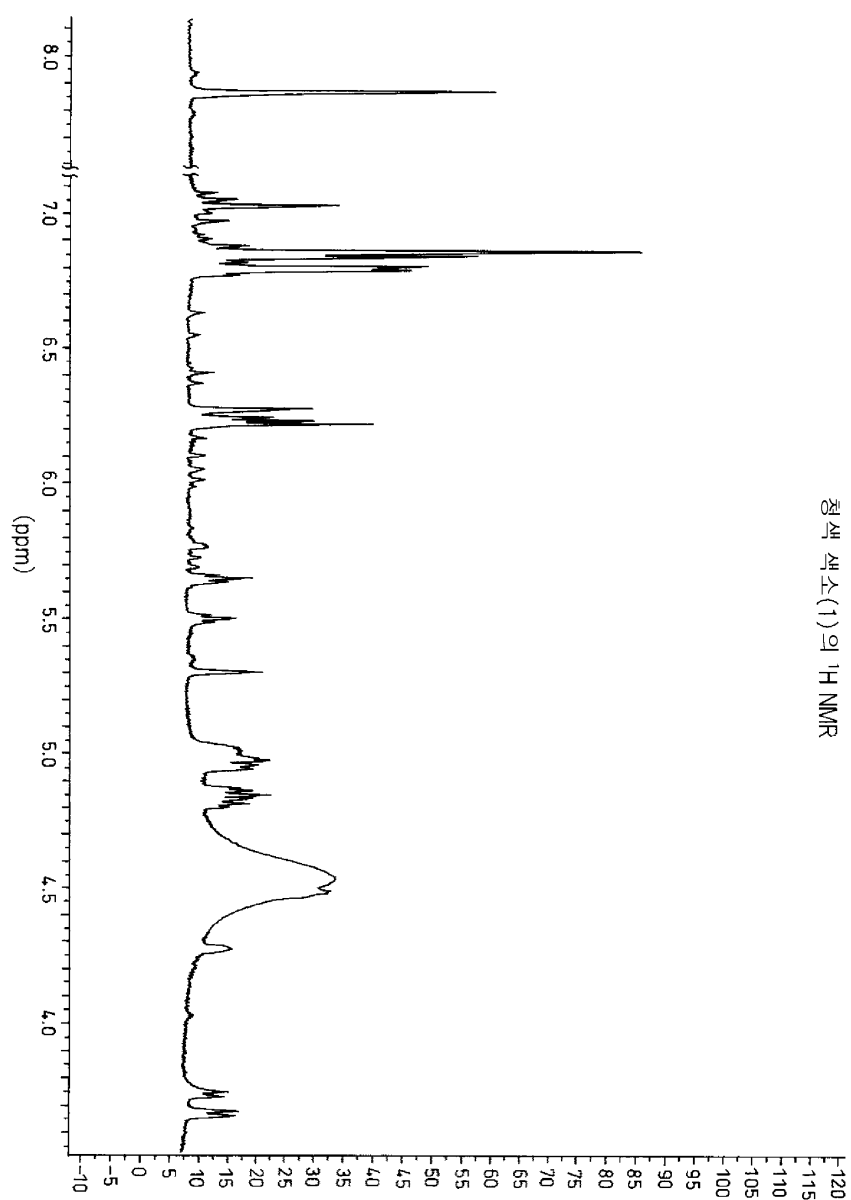
도면9



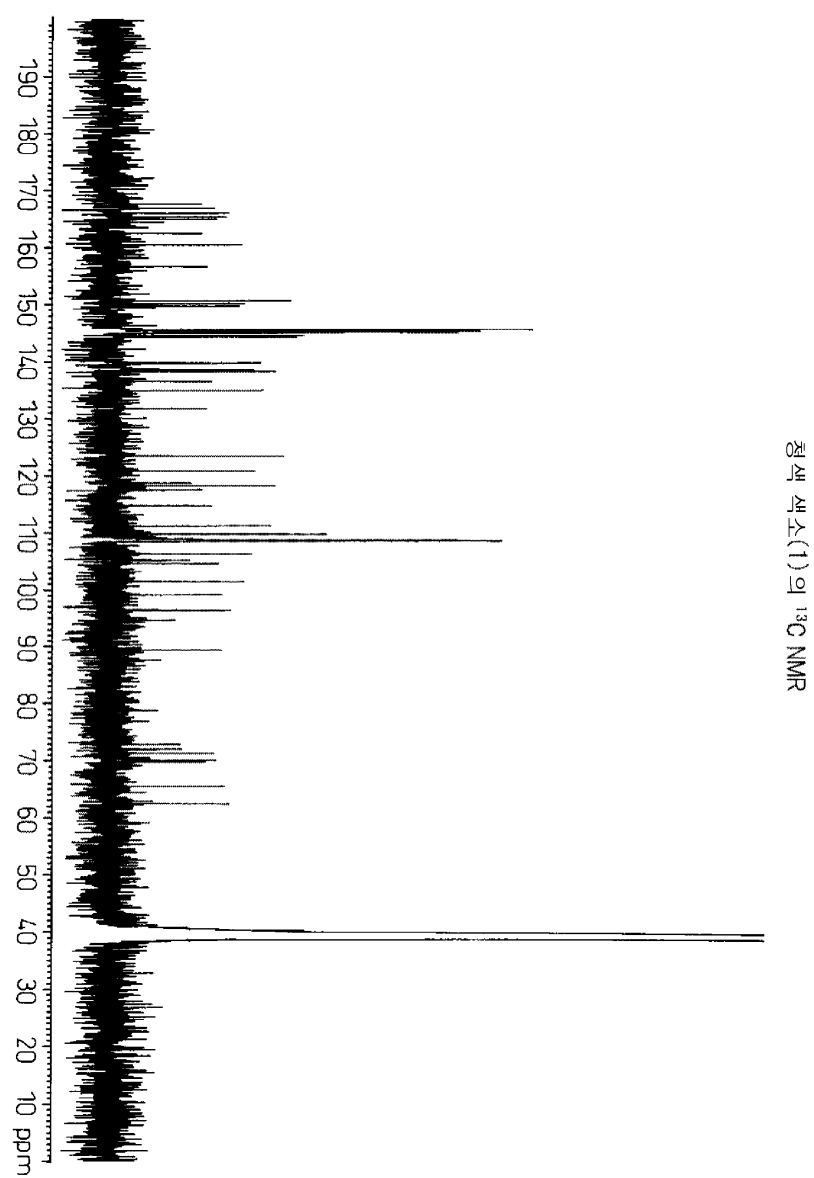
도면10



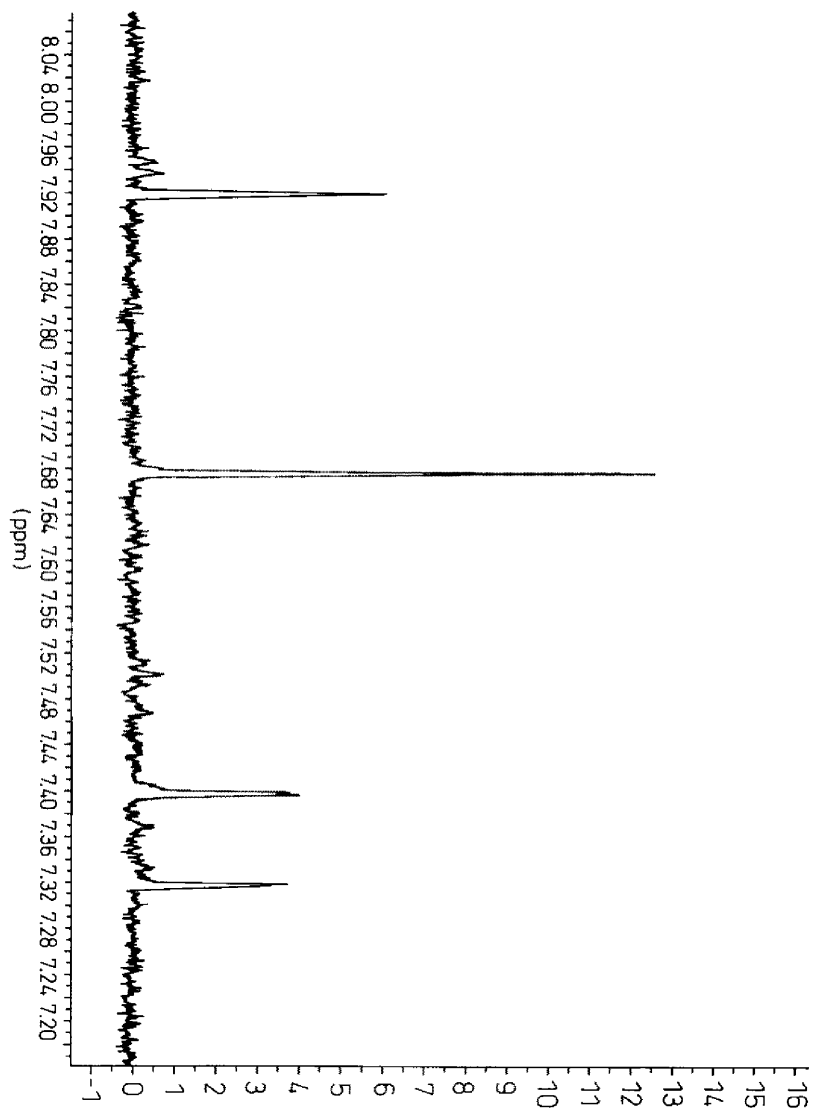
도면11



도면12



정색 색소(2)의 ^1H NMR



도면13

도면14

