

花の色—アントシアニンの色と安定性

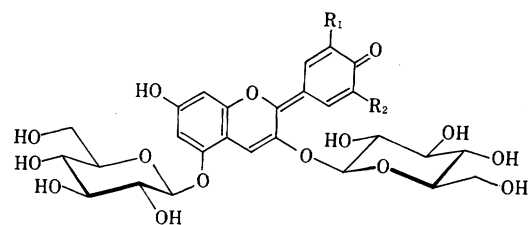
後藤俊夫*, 近藤忠雄**

「花」で連想するのに「色」をもってするのが一般的であろう。それほどに花の色のこまやかな違いや、うつろいはいつくしみられ、詩歌は言うに及ばず、日常の生活にうらおいを与えてくれている。ところが科学の面からの性格づけは予想されるほどまとまっていないという。身近に近い、一見わかり切ったと思われる事象にもまだ十分に解明されていない面がある。

花や果実の美しい色のうち、赤、紫、青系統は主にアントシアニン系色素である(図1)。これは一種の配糖体で、そのアグリコンはアントシアニンである。天然に見いだされるアントシアニンの種類は数種に過ぎず、色調も互によく似ているので、植物中でどのようにして多種多様な色調を示すのかが大きな疑問であり、古くより研究の対象となった。もう一つの疑問はアントシアニンの安定性である。通常のアントシアニン色素は強酸性溶液中では赤色を示し、安定であるが、花卉の細胞液のような中性から微弱酸性(pH 4~7)の水溶液中ではきわめて不安定で容易に脱色してしまうのに、なぜ花卉中では安定に存在しう

るのかという点である。この2つの疑問を解くための研究は今世紀の初め、R. Willstätter がアントシアニンの構造を決定して以来、続けられている。

アントシアニンは中性付近で不安定であるので、塩酸を少量加えたメタノールで抽出するのが常法である。このような強酸性溶液中では、アントシアニンはフラビリウムイオン(図2-A)として非常に安定に存在するが、pH 4~6 で生ずる紫色のアンヒドロ塩基(キノイド塩基)(B)は不安定で、容易に水和して無色のプソイド塩基(C)になってしまう。



R ₁	R ₂	
H	H	pelargonin (pelargonidin)
OH	H	cyanin (1) (cyanidin)
OCH ₃	H	peonin (peonidin) (4)
OH	OH	delphin (2) (delphinidin)
OCH ₃	OCH ₃	malvin (3) (malvidin)

図1 代表的アントシアニン
カッコ内はアグリコン

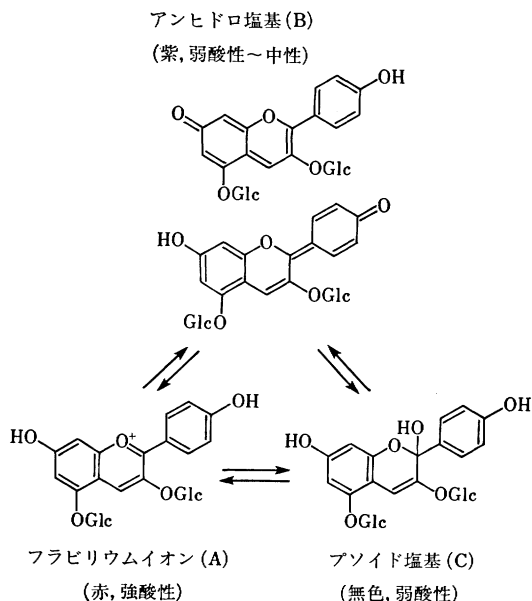


図2 pHによるアントシアニンの構造変化

* Toshio GOTO, 名古屋大学農学部

** Tadao KONDO, 名古屋大学化学測定機器センター

これまでの花色変異説

1914年ころ、アントシアニジンの骨格構造を決定した Willstätter は、この色素が pH によってリトマスと類似した色調変化を起こすことから、花色の変異は細胞中の pH の変化によると考えた。実際に塩基性溶液では青色から緑色を呈するが、これは速やかに退色してしまうので、この説に疑問を抱いた柴田桂太と柴田雄次(1919)⁽¹⁾は、花卉の細胞液が常に微弱酸性であること、フラボンをエタノール中、Mg/HCl で還元すると美しい青色を示すアントシアニン-マグネシウム錯体が生成することなどの事実より、青色花色素はアントシアニンの金属錯体であるという説を発表した。しかし、この説は Willstätter の共同研究者 A. E. Everest の強い反撃を受けて、しばらく立消えとなった。

R. Robinson⁽²⁾ (1931) は、アントシアニンと共存するフラボンやタンニンがアントシアニンに対して深色的効果(赤→赤紫)を示すことを発見し、これを co-pigmentation 効果と呼んだ。この効果は多糖類やペプチドにも見られた。この分子会合は溶液中でのみ認められ、単離することはできなかった。林孝三⁽³⁾ (1958) は、ツユクサの青色色素コンメリニンがアントシアニンとフラボンのほかにマグネシウムを含む結晶として得られることを示し、青色花色素が金属錯体であるという説を再燃させた。同じころ、A. von Baeyer⁽⁴⁾ もヤグルマギクの青色色素が鉄やアルミニウムを含む錯体であるという説を出したが、この試料は高分子をも含んでいた。

しかしながら、このような co-pigment や金属錯体による安定化以外にアントシアニンのみでの安定化はないのであろうか。実は、アントシアニンだけでも花卉細胞中で安定に存在しうる理由がわかってきたのである。最近判明した2種の安定化機構を次に述べよう。

アントシアニンの同分子間スタッキング

最も一般的なアントシアニンであるアントシアニン 3,5-ジグルコシド(図1)は、中性付近の

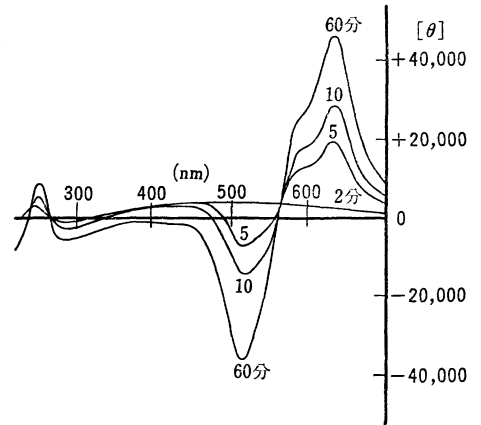


図3 中性水溶液におけるシアニン(1)のCDの時間変化(シアニン濃度 5×10^{-4} M)

希薄水溶液ではきわめて不安定で、容易に水和して無色のプソイド塩基(図2-C)になってしまうが、バラなどの赤色花卉中では安定に存在していると考えられる。S. Asen ら⁽⁵⁾は co-pigmentation の研究中に、pH 3.16 でアントシアニン 3,5-ジグルコシド(1)の濃度を 10^{-4} M から 10^{-2} M に上げると、可視吸収極大の吸光度が300倍になることを見だし、アントシアニン自身も自己会合するようであると述べている。これについて筆者ら⁽⁶⁾は、CD測定から中性付近でアントシアニン 3,5-ジグルコシドが濃度の上昇とともに非常に強く自己会合を起こすことを発見した。この自己会合のため、 10^{-5} M 程度の希薄溶液では水和して無色となるのに、花卉細胞中の濃度に近い 10^{-2} M では安定な色を保つのである。

すなわち、塩化シアニン(1)を pH 7.0 のリン酸緩衝液に溶かすと、ただちにアンヒドロ塩基による青色を示すが、円二色性(CD)はほとんど示さない(図3)。しかし時間とともに、CDは急速に増大して、1時間後には $[\theta]_{334} + 46,000$, $[\theta]_{520} - 36,000$ (5×10^{-4} M の場合)のように、非常に大きな exciton 型 Cotton 曲線を示す。不思議なことに、B環に OH が1個多いだけのデルフィン(2)では曲線がまったく対称的であり、この場合は溶解後ただちに CD を示す(図4)。このような典型的な exciton 型 CD を生ずるのは、アントシアニン発色団がグルコース部分の不斉

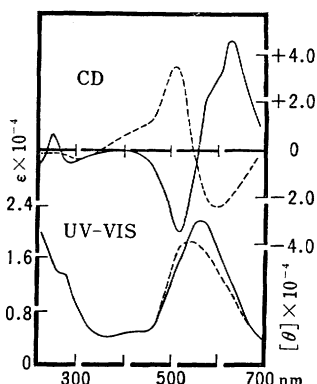


図4 中性水溶液中におけるシアニン(1)とデルフィン(2)の電子スペクトルとCD
 — シアニン(1), --- デルフィン(2), (5×10^4 M)

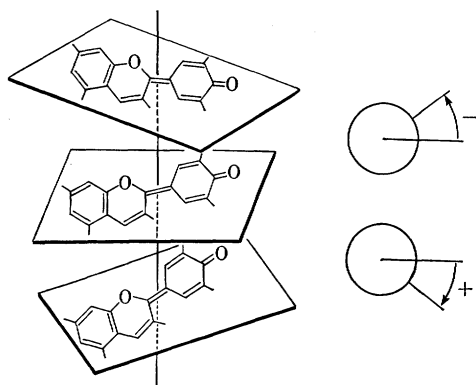


図5 アントシアニンのキラルなスタッキングモデル

を受けて右回りか左回りにスタッキングしたためと考えざるを得ない⁽⁷⁾。この CD は濃度の増大により加速的に増大するから、スタッキングは濃度とともに増大する。多分、ヘリックス型に多数の分子がスタッキングするものと考えられる(図5)。溶液中に DMSO や尿素を加えると会合が減少することから、アントシアニジン骨格の芳香環平面どうしの疎水結合が主な会合力となり、周囲を親水性のグルコースによって取りまかれた構造を推定した。これは実際に、マルビンアンヒドロ塩基(3)の¹H-NMR (PMR)によって裏付けられた⁽⁸⁾。すなわち、アントシアニジン骨格上のプロトンの化学シフト値は濃度の上昇とともに高磁場シフトするのである。これは芳香環が並列にならび、その環電流が隣接アントシアニジンのプロトンに影響を与えているためと考えられる。

このような会合によって、アントシアニジン骨

格が水分子の攻撃から保護されるため、色素が安定化されると考えられる。おもしろいことに、シアニンのように右回りスタッキング(+Cotton)をする場合には可視吸収スペクトルの極大は長波長に移動し、会合速度が遅いのに対して、デルフィンのように左回り(-Cotton)にスタッキングする場合はただちに会合が完結し、可視スペクトルは短波長シフトする。原田ら⁽⁹⁾の exciton coupling CD 理論に基づいた計算によれば、上記のような Cotton 曲線と可視スペクトルのシフトを説明できる。しかし、B環上の置換基数が少ないと右回り、多いと左回りにスタッキングする原因についてはまったくわかっていない。

ジアシル化アントシアニンの分子内スタッキング

1972年に斎藤規夫ら⁽¹⁰⁾は、キキョウの紫青色アントシアニンを抽出してプラチコニンと名づけ、これが中性水溶液中でも非常に安定な紫青色を保つことを発見した。吉玉国二郎ら⁽¹¹⁾(1974)はシネラリアから青色色素シネラリンを単離し、これがやはり安定なアントシアニンであることを示した。これらのアントシアニンには2分子のコーヒール酸が含まれていることから、彼らはこのような芳香族酸とアントシアニジン骨格との相互作用(水素結合?)によって安定化されるものと考えた。安部愷三ら⁽¹²⁾はRobinsonの分子間co-pigmentationに対して、このような相互作用を分子内co-pigmentationと呼んだ。筆者らはアントシアニンとフラボンの分子間co-pigmentation⁽¹³⁾やアントシアニンどうしの同分子間会合が主とし

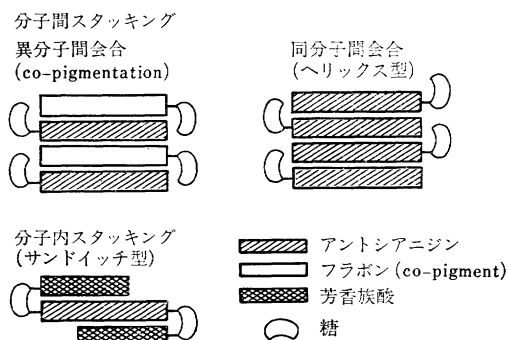


図6 アントシアニンの安定化機構

て芳香環どうしの疎水性相互作用に基づくという考えを提出していたので、前記のようなジアシル化アントシアニンの安定化も芳香族酸とアントシアニンの芳香環どうしの疎水性相互作用に基づくサンドイッチ型立体

配座によるものと考えた(図6)。これを証明するためには、まず分子構造を立体化学を含めて正確に決定し、ついでサンドイッチ型立体配座をとりうるか否かを見る必要がある。これまでにプラチコニン⁽¹⁰⁾、シネラリン⁽¹¹⁾、西洋アサガオの青色色素ヘブンリーブルーアントシアニン(HBA)⁽¹⁴⁾などの構造が部分的に推定されていたが、不完全であるので、まずこれらの構造決定を行なった。

1) 構造決定

シアニン(1)やデルフィン(2)など代表的アントシアニンの構造は1910年代にWillstätterによって決められ、1930年にRobinsonによって合成されて以来、アシル化アントシアニンなど複雑な構造のアントシアニンが多数、主として植物学者により単離された。しかし、構造決定は非常に不完全なままで、構成成分が推定されているだけのものが多かった。主な理由は、有機溶媒に難溶で極性が高いうえに結晶化しにくく、そのためか1978年に筆者ら⁽¹⁵⁾が発表するまでは天然アントシアニンのPMRの測定報告はなかったのである。また、極性がきわめて高いため、通常の質量分析で分子量を決めることができず、元素分析もよい結果が得られなかった。通常、アントシアニンは酸性で抽出され、フラビリウムイオン(A)の型で単離されるが、最近開発されたFAB-MS(Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry)はなぜかフラビリウムイオン型アントシアニンの分子イオンピークを出しやすいことがわかった。これによって、グルコース6分子、コーヒー酸3分子をもつHBAの分子イオンピーク(m/z 1759)も測定できるようになった(図7)⁽¹⁶⁾。分子中にグルコースのような同一の糖や同一の芳香族酸を多数もつアントシアニンでは、グルコースやコー

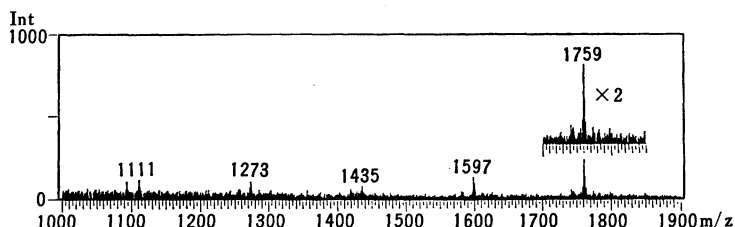


図7 ヘブンリーブルーアントシアニン(HBA)(7)のFAB-MSスペクトル

ヒー酸の結合位置を確定することが容易ではない。PMRでNOEやPRFT法を用いて結合位置を求めたが、きわめて類似した構造間の区別が必要なため、500MHzのPMRによってはじめて解析できるようになった場合もある。

たとえば、HBA⁽¹⁴⁾の場合はペオニジン(4)に3分子のグルコースと2分子のコーヒー酸が結合したものと推定されていたが、実際にはペオニジン(4)に6分子のグルコースと3分子のコーヒー酸が結合していた⁽¹⁶⁾。シネラリンの場合は、デルフィニジン3,7,3'-トリグルコシドに2分子のコーヒー酸が結合したものと考えられていたが⁽¹¹⁾、実際は4分子のグルコース、3分子のコーヒー酸とさらにマロン酸が含まれていることがわかった⁽¹⁷⁾。マロン酸は非常に見落としやすい酸で、色素を常法に従って塩酸メタノールで抽出すると容易に脱落するし、PMRでも発見しにくい。シネラリンの場合は、塩酸メタノールの代わりにトリフルオロ酢酸を加えた冷メタノールで手早く抽出したことで、FAB-MSで決めた分子量から他成分を差引くとマロン酸に相当する部分が残ったことにより、マロン酸の存在が推定され、化学的に証明することができたのである。

このような方法で、リンドウの青紫色色素ゲンチオデルフィン(5)⁽¹⁸⁾、プラチコニン(6)⁽¹⁹⁾、HBA(7)⁽¹⁶⁾、シネラリン(8)⁽¹⁷⁾の構造を立体配置を含めて決定した。

2) 安定化の機構

これらのアシル化アントシアニンの安定性は、図8からわかるように、2個以上のコーヒー酸が存在すると非常に安定であるが、1個になると相当不安定となり、アシル基がなくなると、希薄溶液では速やかに退色する。すなわち、コーヒー酸

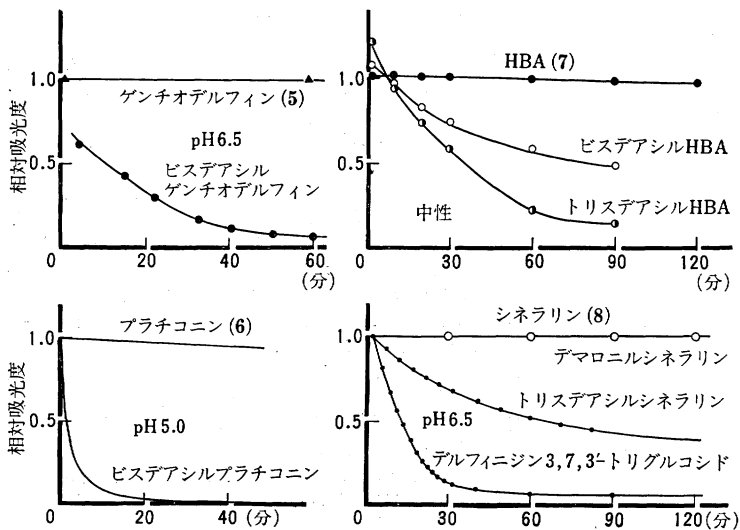
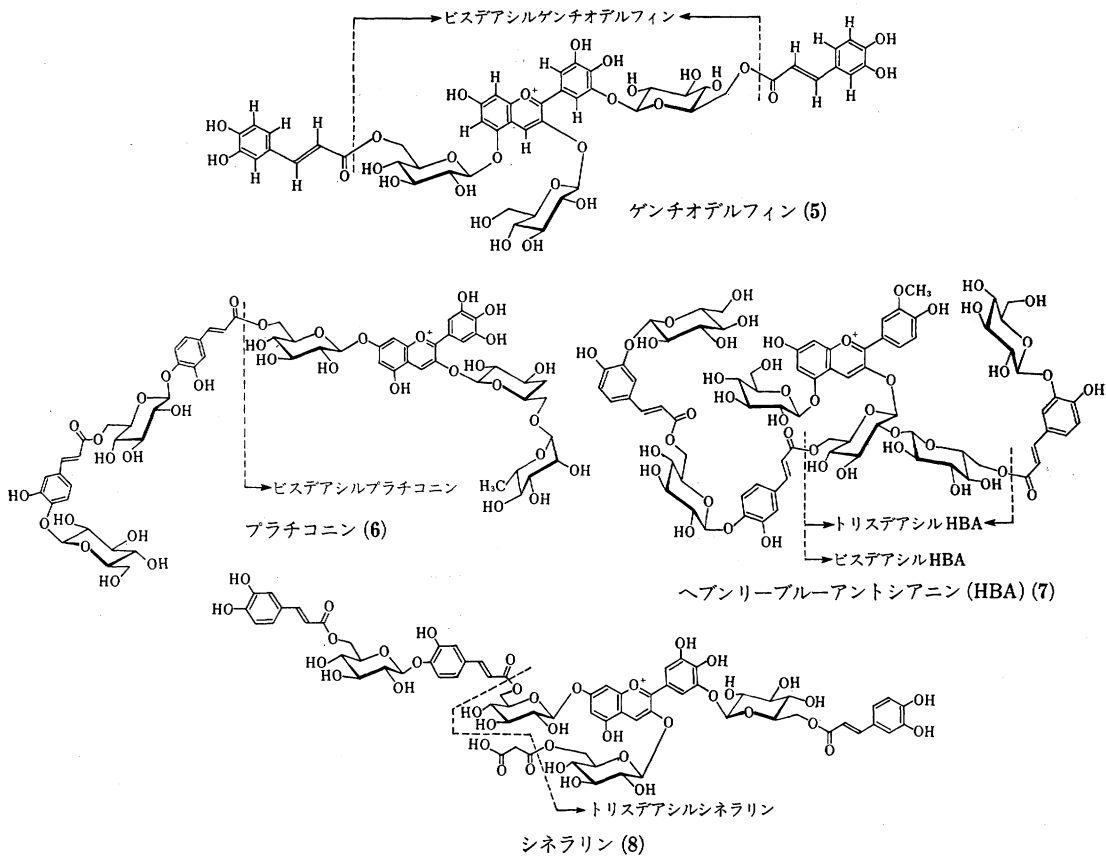


図 8 水溶液中でのアシル化アントシアニンの安定性 (約 5×10^{-5} M)

がアントシアニン骨格を安定化していることがわかる。実際に、これらの分子の CPK モデルをつくってみると、グルコース分子が馬蹄形をして

いるため、アントシアニン芳香環平面の上側と下側にコーヒー酸の平面をサンドイッチ型に重ねた立体配座が可能である (図 9)。このような立体配座は、芳香環どうしの疎水結合と、それを取りまくグルコース分子の親水性によって、水溶液中では有利になるものと考えられる。このような立体配座をとっていることの直接証明は、PMR シグナルの化学シフトや、構造上遠く離れた位置にあるプロトン間の NOE の測定から得られると期待され、実際に結果が得られつつある。

このようなアントシアニン分子は単分子で安定化されており、水和することなくアンヒドロ塩基のままで存在しうるので、濃度に関係なく、色素

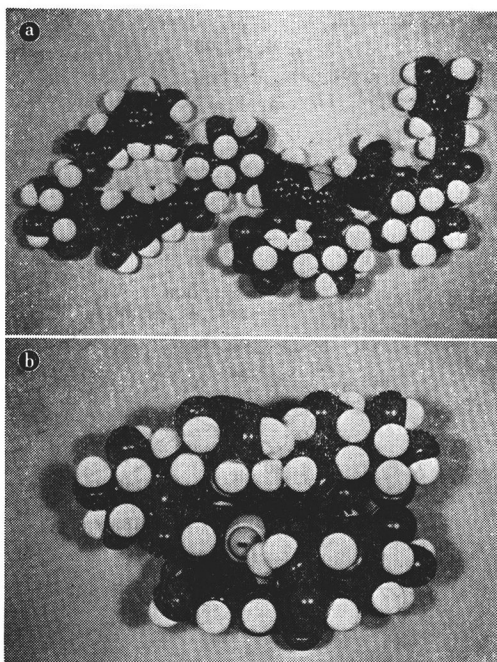


図 9 シネラリン(8)のCPK模型
(a) 伸展型, (b) 分子内スタッキング型

の色は溶液の pH の変化によって変わる。すなわち、この型のアントシアニンでは Willstätter の pH 説が適用できるのである。実際、西洋アサガオ“ヘブンリーブルー”は蕾の時は赤色であるが、咲くと完全な青色となる。この際、花卉細胞液の pH は 6.5 から 7.5 へ上昇する⁽²⁰⁾。HBA をこのような pH の水溶液に溶かすと花色とまったく同じ色調を示す。青色は HBA のアニオンの色と考えられる。

*

以上述べてきたように、天然アントシアニンの色と安定化機構にはアントシアニンの同分子間スタッキング、フラボンなどの異分子間スタッキング (co-pigmentation)、芳香族酸との分子内スタッキングがあり、いずれも芳香環どうしの疎水結合が主な力となり、親水性の糖部分がこれを取りまく形をとるものと考えられる。しかし、最初に述べたように、ツルクサの青色色素コンメリニンやヤグルマギクの青色色素プロトシアニン(シアノセントウリン)は、アントシアニンとフラボンのほかに金属イオン(前者はマグネシウム、後

者は鉄とマグネシウム?)を含んでいる。林⁽²¹⁾はこれらを Metalloanthocyanin と呼んだが、このような金属錯体がどのような構造をしているかについては、非常に興味のあるところであるが、まだ仮定の域を出ず、今後の研究がまたれる。

文 献

- 1) K. Shibata, Y. Shibata & I. Kasiwagi: *J. Am. Chem. Soc.*, 41, 208 (1919); 田中 実: “日本の化学と柴田雄次”, 大日本図書, 1975, pp. 169.
- 2) G. M. Robinson & R. Robinson: *Biochem. J.*, 25, 1687 (1931).
- 3) K. Hayashi, Y. Abe & S. Mitsui: *Proc. Jap. Acad.*, 34, 373 (1958).
- 4) E. von Baeyer: *Chem. Ber.*, 91, 1115 (1958).
- 5) S. Asen, R. N. Stewart & K. H. Norris: *Phytochemistry*, 11, 1139 (1972); 14, 2677 (1975).
- 6) T. Hoshino, U. Matsumoto & T. Goto: *Tetrahedron Lett.*, 21, 1751 (1980).
- 7) T. Hoshino, U. Matsumoto, N. Harada & T. Goto: *Tetrahedron Lett.*, 22, 3621 (1981).
- 8) T. Hoshino, U. Matsumoto, T. Goto & N. Harada: *Tetrahedron Lett.*, 23, 433 (1982).
- 9) 後藤俊夫(編): “動的天然物化学”, 講談社, 1983, p. 129.
- 10) N. Saito, Y. Osawa & K. Hayashi: *Bot. Mag. Tokyo*, 85, 105 (1972).
- 11) K. Yoshitama & K. Hayashi: *Bot. Mag. Tokyo*, 87, 33 (1974); K. Yoshitama, K. Hayashi, N. Abe & H. Kakisawa: *ibid.*, 88, 213 (1975).
- 12) 安部信三, 柿沢 寛, 吉玉国二郎, 斎藤規夫: 日本化学会第 36 回春季年会予稿集 II, 1209 (1977).
- 13) T. Goto, T. Hoshino & S. Takase: *Tetrahedron Lett.*, 2905 (1979).
- 14) N. Ishikura & M. Shimizu: *Kumamoto J. Sci. Biol.*, 12, 41 (1975); S. Asen, R. N. Stewart & K. H. Norris: *Phytochemistry*, 16, 1118 (1977).
- 15) T. Goto, S. Takase & T. Kondo: *Tetrahedron Lett.*, 2413 (1978).
- 16) T. Goto, T. Kondo, H. Imagawa, S. Takase, M. Atobe & I. Miura: *Chem. Lett.*, 883 (1981); T. Goto, T. Kondo, H. Imagawa & I. Miura: *Tetrahedron Lett.*, 22, 3213 (1981); T. Goto, H. Imagawa, T. Kondo & I. Miura: *Heterocycles*, 17, 355 (1982).
- 17) T. Goto, T. Kondo, T. Kawai & H. Tamura: *Tetrahedron Lett.*, in press.
- 18) T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, H. Imagawa, A. Iino & K. Takeda: *Tetrahedron Lett.*, 23, 3695 (1982).
- 19) T. Goto, T. Kondo, H. Tamura & K. Kawahori: *Tetrahedron Lett.*, 24, 2181 (1983).
- 20) S. Asen, R. N. Stewart & K. H. Norris: *Phytochemistry* 16, 1118 (1977).
- 21) 林 孝三(編): “植物色素”, 養賢堂, 1980, p. 288.