

令和元年6月5日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07605

研究課題名(和文) トウガラシが辛味を喪失する新規メカニズムおよび原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) A novel loss of pungency mechanism of Capsicum and identification of the causative gene

研究代表者

小枝 壮太 (Koeda, Sota)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：00629066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では非辛味品種No.3341と辛味品種Habaneroの交雑F2集団を用いて、非辛味性を制御する原因遺伝子を同定した。連鎖解析により約220kbの領域にある5つの遺伝子に候補を絞り込んだ。候補の一つであるputative ketoacyl-ACP reductase (CaKR1)においてNo.3341特異的に第1イントロンに約4.5kbのトランスポゾン配列の挿入が確認され、それにより酵素活性に必須の複数のドメインを欠失する異常な転写産物が生成されていることが明らかになった。さらに、VIGSによる機能解析とカプサイシノイド前駆体の定量から、CaKR1が原因遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではトウガラシの非辛味品種No.3341を解析することで分岐鎖脂肪酸合成に関与すると考えられるputative ketoacyl-ACP reductase (CaKR1)の変異によりカプサイシノイドの合成ができなくなり、結果として野菜用品種が誕生したことを明らかにした。研究成果はトウガラシ類の品種改良への利用が期待されるだけでなく、様々な非辛味品種を対象としてPun1、pAMTおよびCaKR1に着目して、その辛くない原因を調査することで、原産地のどの地域でどの遺伝子の自然変異が選抜され、品種改良に利用されてきたのかを解明し、ヒトと作物の長い歴史の1ページを明らかにできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, a single recessive gene responsible for the non-pungency of pepper No.3341 (*C. chinense*) was identified on chromosome 10 using an F2 population derived from a cross between Habanero and No.3341. Five candidate genes were identified in the target region, within a distance of 220 kb. A candidate gene, a putative ketoacyl-ACP reductase (CaKR1), of No.3341 had an insertion of a 4.5-kb transposable element (TE) sequence in the first intron, resulting in the production of a truncated transcript missing the region coding the catalytic domain. Virus-induced gene silencing of CaKR1 in pungent peppers resulted in the decreased accumulation of capsaicinoids, a phenotype consistent with No.3341. Moreover, GC-MS analysis of 8-Methyl-6-nonenoic acid, which is predicted to be synthesized during the elongation cycle of branched-chain fatty acid biosynthesis, revealed that its deficiency in No.3341.

研究分野：園芸科学

キーワード：トウガラシ・ピーマン 辛味・非辛味 カプサイシノイド 分岐鎖脂肪酸 CaKR1 Rad-seq リシーケ  
 エンス マップベースクローニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

トウガラシ(*Capsicum* spp.)には辛い香辛料用の品種群と、辛くない野菜用の品種群があり、これら辛くない品種群は辛味品種から生じた変異系統を選抜・育成したものである。辛味成分であるカプサイシノイドの有無は、香辛料になるか野菜になるかを左右する重要な形質であるが、その合成機構、とりわけ分子機構は十分に理解されていない。カプサイシノイド合成能の有無を質的に決める因子としては、合成経路上で機能する *acyltransferase* (*Pun1*)および *putative aminotransferase* (*pAMT*)が報告されている (Stewart et al., 2005, *Plant Journal*; Lang et al., 2009, *Plant Journal*)。しかし、これら2遺伝子以外に報告はなく、解析することで新規因子の同定につながるような品種・系統も報告されていない。

研究代表者はトウガラシを対象として遺伝資源の収集、形質評価および遺伝子同定に取り組んできた。収集した遺伝資源の形質評価を進める過程で、興味深いトウガラシを発見した。ボリビア原産の No.3341 (*C. chinense*)は果実に辛味成分カプサイシノイドをまったく蓄積せず、その原因は既知の情報では説明できない。これまでの研究において *Pun1* および *pAMT* の配列・発現解析、および *Pun1* あるいは *pAMT* 変異系統と No.3341 との交雑試験により、No.3341 は確かに新規因子を有していることを確認している (Koeda et al., 2015, *Horticulture Journal*)。このことから、No.3341 を用いることで、トウガラシ果実の辛味の有無を質的に決める新規因子を同定できると考えた。

## 2. 研究の目的

近年ナス科作物のゲノム解析が急速に進んでいる。トウガラシについても全ゲノム配列が既に公開されており遺伝子の情報が豊富である (Kim et al., 2013, *Nature Genetics*; Qin et al., 2014, *PNAS*)。本研究ではこれらの情報を利用し、No.3341 が辛味を呈さない原因遺伝子を同定する。さらに、原産地より収集した複数の非辛味系統を調査し、No.3341 と同様のメカニズムで辛味を喪失していることが示唆されている複数の系統を選抜している。これらについても調査することで、本メカニズムが広く利用されていることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では辛味品種 Habanero と非辛味品種 No.3341 と交雑 F<sub>2</sub> 集団を用いた原因遺伝子のマップベースクローニングを試みた。なお、これまでの研究(若手研究B, 研究課題番号:25850018)により Rad-seq 解析を行い、単一の劣性遺伝子が座上するおおよその位置は特定している。本研究では親品種である Habanero と No.3341 の全ゲノムリシーケンスを行い、原因遺伝子が座上する領域に見られる品種間の一塩基多型 (SNP) および配列の挿入・欠損 (indel) についての情報を整理した。それらの情報に基づいて新たな DNA マーカーを設計し、候補領域の絞り込みを行った。最終的な候補領域に座上していた遺伝子については全遺伝子について転写産物の配列解読および Realtime-PCR による発現量調査を行った。また、最有力の候補遺伝子についてはウイルス誘導性ジーンサイレンシング (VIGS) により辛味品種で発現を抑制し、果実におけるカプサイシノイド蓄積量に与える影響を調査した。さらに、Habanero と No.3341 の果実におけるカプサイシノイドの前駆物質である 8-methyl-6-nonenic acid の蓄積量を GC-MS により定量した。

## 4. 研究成果

Habanero および No.3341 を 2012 年~2017 年に合計 6 回栽培したところ、Habanero は辛味形質を、No.3341 は非辛味形質を一貫して示し、これらの形質は遺伝的に支配されていることを確認した。No.3341 の非辛味性を制御する遺伝子を同定するために Habanero と No.3341 の交雑 F<sub>2</sub> 集団 (98 個体) 由来の DNA を用いて Rad-seq 解析を行ったところ、両親間で多型の検出できた 726 の SNP を同定できた。その中から、242 の SNP を用いて連鎖地図を作成し、形質データを用いて原因遺伝子の座上位置を調査したところ、第 10 染色体に座上することが明らかになった。

候補領域をさらに絞り込むために、当該領域に dCAPs マーカー (×8)、CAPs マーカー (×1)、indel マーカー (×7) をリシーケンス情報より新たに設計し、連鎖解析を行ったところ、F<sub>2</sub> 集団 (98 個体) のうち、15 個体が本領域において組換えを起こしていた。最終的に INDEL03 マーカーと CAPs01 マーカーに挟まれる約 220kbp の領域 (CM334 リファレンス配列の 227,428 k ~ 227,647 k に相当) まで絞り込みを行えた。リファレンス配列として CM334 の本領域には 5 つの遺伝子 (CA10g18820 ~ CA10g18860) が座上しており、-ketoacyl-ACP reductase FabG-like をコードする CA10g18840 および CA10g18850 が原因遺伝子の最有力候補であった。5 つの遺伝子全てについて転写産物およびゲノム配列を解読したところ、CA10g18820、CA10g18830、CA10g18850 および CA10g18860 には非辛味性に関与する可能性のあるアミノ酸変異は認められなかった。一方、CA10g18840 では No.3341 の第 1 イントロンにおいて約 4.5kbp のトランスポゾン配列 (hAT-Tam3/Actransposon) の挿入が認められ、No.3341 では第 1 エキソンに約 550bp のトランスポゾン配列が結合した異常な転写産物の発現が確認された。

No.3341 の CA10g18840 と他の short-chain dehydrogenase (SDR) のアミノ酸配列を比較したところ、No.3341 では高度に保存されている YXXXK モチーフ、活性ドメインの上流にある S, N, NAD(P)(H)-binding ドメインなどの全てを欠失していたことから、変異により機能喪失が生じ

ていることが示唆された。

トウガラシゲノム上にコードされている CA10g18840 の相同配列および他植物種の配列を含めて分子系統解析を行ったところ、CA10g18840 はジャガイモにおいて塊茎の形態形成に関与することが報告されている Stgan (NP\_001274762) に最も高い相同性を示した。また、大腸菌において脂肪酸合成に関与する FabG (NP\_415611.1\_3)。これらの SDR にはトウモロコシの Ts2 (NP\_001105322.1) など含まれ、ステロイドを含め脂肪酸の合成に関与していることが示唆されている。これらのことから、我々は本遺伝子を *putative ketoacyl-ACP reductase* (*CaKR1*) と命名した。

解析に用いた全 F<sub>2</sub> 個体においてトランスポゾンの挿入を検出するプライマーを新たに設計し、連鎖解析を行ったところ、遺伝子型と表現型が完全に一致することを確認した。本 DNA マーカーは辛味性を確実に判定できるため育種に利用できると考えられた。

候補領域にある遺伝子 (CA10g18820 ~ CA10g18860) の発現について調査した。公開されている CM334 の RNA-seq データを分析したところ、CA10g18840 (*CaKR1*) は特に果実胎座・隔壁部において高い発現を示すことが確認された。さらに、Realtime-PCR を行ったところ、果実胎座・隔壁部において Habanero と No.3341 で発現量が明確に異なるのは CA10g18840 (*CaKR1*) のみであった。

CA10g18840 (*CaKR1*) は No.3341 の非辛味性に関与する最も有力な候補遺伝子である。そこで、VIGS を用いて CA10g18840 (*CaKR1*) とカプサイシノイド合成の関係を調査した。なお、CA10g18840 (*CaKR1*) の DNA 配列は CA10g18850 と高い相同性を示すため、CA10g18840 (*CaKR1*) を特異的にサイレンシングするベクターを構築した。辛味品種である NMH において VIGS で CA10g18840 (*CaKR1*) の発現を抑制したところ、CA10g18840 (*CaKR1*) の発現量は対照区と比較して有意に低下し、CA10g18850 の発現量は対照区と同様であることが確認でき、目標通りのサイレンシングが確認できた。サイレンシングが確認できた果実においてはカプサイシノイドの蓄積量が有意に減少したことから、CA10g18840 (*CaKR1*) はカプサイシノイドの合成に必須の遺伝子であることが確認できた。

カプサイシノイドはフェニルプロパノイド経路と分岐鎖脂肪酸経路において合成された前駆体が縮合され生合成される。*CaKR1* は分岐鎖脂肪酸経路において機能すると推定されたことから、No.3341 では遺伝子変異により 8-methyl-6-nonenic acid の合成・蓄積が阻害されると推定される。そこで、Habanero と No.3341 の果実における 8-methyl-6-nonenic acid の蓄積量を GC-MS により定量した。その結果、予想された通りに 8-methyl-6-nonenic acid は Habanero においては蓄積が確認できたが、No.3341 では検出することができなかった。以上のことから、No.3341 では *CaKR1* の変異により分岐鎖脂肪酸経路のカプサイシノイド前駆体が合成できず、結果として辛味を呈さなくなっていることが明らかになった。

本研究では原因遺伝子のマッピング、配列解読、分子系統解析、発現解析、サイレンシングによる機能解析、および前駆体の定量により、*CaKR1* がカプサイシノイド生合成に関与していること、また本遺伝子の変異により非辛味化することを解明した (Fig)。過去に行われたいずれの研究において *CaKR1* はカプサイシノイド生合成に関与する候補遺伝子として認識されていなかった。このことから、遺伝子組換え体の作出が現在でも困難であるトウガラシにおいては自然変異体の解析による重要遺伝子の同定は非常に重要なアプローチであると考えられた。現在、*CaKR1* が変異したことにより辛味を呈さないと考えられる複数のトウガラシ品種を選抜しており、これらを含めた *C. chinense* を調査することでトウガラシにおける非辛味品種の栽培の歴史を紐解くことが可能であると期待され、現在研究を継続している。

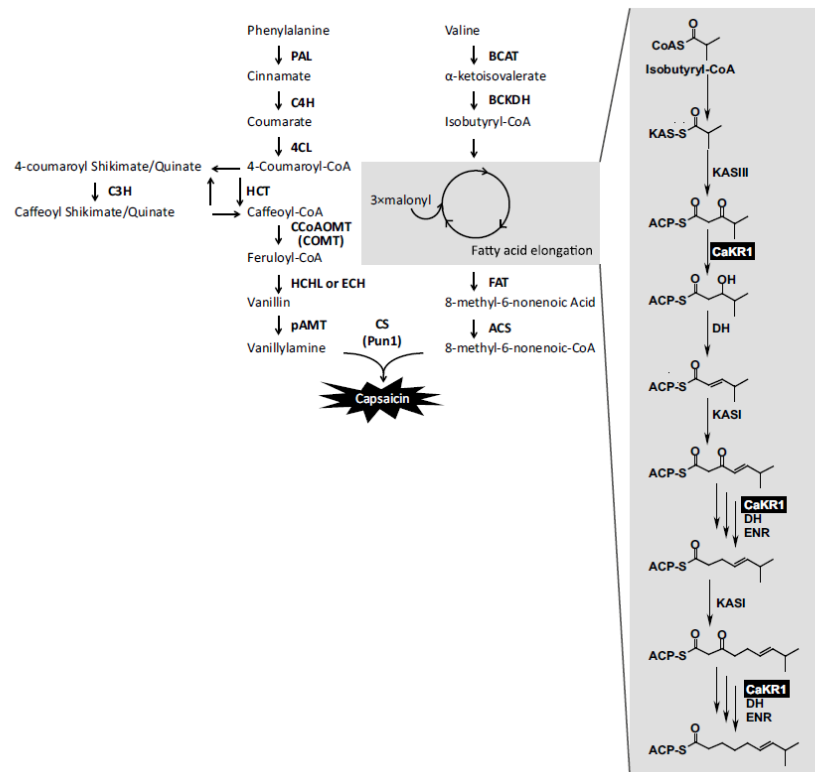


Fig Capsaicin biosynthetic pathway and the predicted CaKR1-related steps. PAL phenylalanine ammonia lyase, C4H cinnamate 4-hydroxylase, 4CL 4-coumaroyl-CoA ligase, HCT hydroxycinnamoyl transferase, C3H coumaroyl shikimate/quinate 3-hydroxylase, CCoAOMT caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, COMT caffeic acid O-methyltransferase, HCHL hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/

lyase, pAMT putative aminotransferase, BCAT branched-chain amino acid transferase, BCKDH branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase, KASI ketoacyl-ACP synthase I, KASIII ketoacyl-ACP synthase III, DH hydroxyacyl-ACP dehydratase, ENR enoyl-ACP reductase, FAT acyl-ACP thioesterase, ACS acyl-CoA synthetase, CS capsaicin or capsaicinoid synthase (Pun1) [modified from Mazourek et al. (2009)]

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sota Koeda, Kosuke Sato, Hiroki Saito, Atsushi J. Nagano, Masaki Yasugi, Hiroshi Kudoh, Yoshiyuki Tanaka. 2019. Mutation in the putative ketoacyl-ACP reductase *CaKR1* induces loss of pungency in *Capsicum*. Theoretical and Applied Genetics. 132: 65-80. (査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

小枝壮太・佐藤恒亮・斎藤大樹・永野 惇・八杉公基・工藤 洋・田中義行 . 2018 . putative ketoacyl -ACP reductase *CaKR1* の変異によりトウガラシは辛味を喪失する . 園芸学研究 17 (別2): 261 . 鹿児島県鹿児島市 . 2018年9月23日 .

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：

取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://sites.google.com/site/sotakoeda/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。