

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892020

研究課題名(和文) トウガラシ遺伝資源を用いた強力な辛味制御因子の探索とその成分育種への応用

研究課題名(英文) A study on major genes controlling pungency in Capsicum bio-resource and its application for pepper breeding

研究代表者

田中 義行 (Tanaka, Yoshiyuki)

岡山大学・その他の研究科・助教

研究者番号：20704480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：トウガラシ(Capsicum属)果実の辛味成分はカプサイシノイドである。カプサイシノイド生合成の解明はトウガラシ育種上重要である。本実験では、トウガラシの辛味に大きな影響を及ぼす遺伝子を同定することを目的とした。その結果、pAMT(putative aminotransferase)の機能欠損がC. chinense種における低辛味性の主要な原因であることが明らかになった。pAMTはカプサイシノイドの前駆体合成に関わる遺伝子である。さらに、非辛味のC. baccatum系統を見出した。本研究は、低・非辛味トウガラシの育種に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The pungent component in Capsicum fruits is capsaicinoid. The understanding of the controlling capsaicinoid biosynthesis is important to allow the breeding and improvement of peppers. The aim of this study was to identify major genes controlling pungency in Capsicum. In this study, we identified non-functional alleles of putative aminotransferase (pAMT) as the main and most frequent gene controlling low pungency in C. chinense. pAMT catalyzes the formation of precursor in the capsaicinoid biosynthetic pathway. In addition, we found a non-pungent C. baccatum accession. It will be useful for future breeding of sweet peppers.

研究分野：園芸科学

キーワード：トウガラシ カプサイシン 遺伝資源

1. 研究開始当初の背景

トウガラシの辛味は辛味成分カプサイシノイドによるものである。カプサイシノイドは、香辛料としてのみでなく、それによる様々な生理作用や健康機能性から広く利用されており、野菜の成分育種上最も注目すべき成分のひとつである (Reviewed in Aza-Gonzalez et al, *Plant Cell Rep.* 2010 etc)。古くからの遺伝学研究により、辛味は単一の優性遺伝子 *Pun1* によって支配されていると考えられてきた。近年、*Pun1* 遺伝子が辛味成分の生合成に関わるアシルトランスフェラーゼをコードしており、その機能欠損が無辛味性の原因であることが報告された (Stewart et al, *Plant Journal*, 2005)。これにより、*Pun1* を DNA マーカーとして用いることで無辛味個体の早期選抜が可能になった。

このように *Pun1* の同定により無辛味性の原因は明らかになったが、依然として低辛味 (わずかに辛い) ~ 激辛という辛味の強弱がどのように生じるのかは不明なままである。トウガラシには 500 ~ 1,000,000 スコビル (辛味程度を表す単位) という非常に幅広い辛味程度の品種間差があるが、このような辛味の強弱は複数の遺伝子により量的に支配されていると考えられてきた。これまでに辛味性に関する量的遺伝子座 (QTL) の解析がいくつか報告されているが (Blum et al. *Ther. Appl. Genet.*, 2003; Ben-chaim et al. *Ther. Appl. Genet.*, 2006, etc)、多数の QTL を考慮しながら育種を行うことは煩雑であり、実用的ではない。

2. 研究の目的

世界で広く栽培されるトウガラシ種 *C. annuum* では、無辛味 ~ 辛味品種まで連続的な変異が観察され、前述のように多数の QTL が関与していると考えられるのに対して、南米で栽培される *C. baccatum* 種や *C. chinense* 種では同様の連続的な変異は認められたが、そこから逸脱した低辛味系統および激辛系統も存在している。これら逸脱した系統には、辛味に強力な影響を与える遺伝子が存在することが予想される。辛味に強い影響を与える遺伝子を明らかにできれば、単一遺伝子を考慮するだけで辛味を大幅に改変できるようになり、格段に簡便かつ計画的に辛味の成分育種を展開できる。そこで本研究課題では、未解析の低辛味・激辛品種について解析を行い、その原因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 低辛味 *C. chinense* 遺伝資源の遺伝解析 *pamt* 機能欠損アリルの解析

低辛味 *C. chinense* 12 系統 (LP1-12) を実験に用いた。HPLC 分析により各系統のカプサイシノイドおよび低辛味成分カプサイノイドの含量を決定した。これまでの研究から、低辛味性に関わる因子として辛味成分カプサイシノイド合成経路遺伝子 *pAMT* の機能欠損を見出している。そこで *pAMT* 遺伝子について解析を行った。各低辛味系統の葉から DNA を抽出し、各 *pAMT* アリルに特徴的なゲノム構造を検出するように設計したプライマーを用いて、ゲノミック PCR を行い、いずれのアリルか判定した。既知の機能欠損アリルに分類されなかった系統に関しては、*pAMT* 遺伝子領域をシーケンスし塩基配列を決定した。

pAMT アリルの分子系統解析

C. chinense 25 系統 (辛味 8 系統、低辛味 17 系統)、*C. annuum* 8 系統、*C. frutescens* 3 系統の合計 36 系統を用いた。各系統について *pAMT* 遺伝子のイントロン領域を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。MEGA (<http://www.megasoftware.net>) を用いて、分子系統樹を作成した。

(2) *C. baccatum* 遺伝資源における低辛味素材の探索とその特性評価

C. baccatum およびその近縁種を含めた 43 系統を圃場および温室で 3 株ずつ栽培した。各品種当たり完熟果を 9 果収穫し、果実形態 (果実長、果実径、果形指数 (果実長/果実径)、果実重) を調査した。辛味性は果実中のカプサイシノイド含量で評価した。カプサイシノイド含量は果実中のカプサイシン含量とジヒドロカプサイシン含量の合計とした。カプサイシノイドは未成熟果を収穫し凍結乾燥した後、有機溶媒で成分を抽出し HPLC で定量した。

4. 研究成果

(1) 低辛味 *C. chinense* 遺伝資源の解析

pamt 機能欠損アリルの解析

遺伝資源のスクリーニングの結果、低辛味系統を新たに 12 系統見出した。HPLC 分析の結果、いずれの系統もカプサイシノイドをほとんど含まずに低辛味成分カプサイノイドを多く含むという成分組成であった。そこで *pamt* アリルの判定をした結果、12 系統中 10 系統が既知の *pamt* に分類された。残る 2 系統 LP6 と LP12 はいずれのアリルにも該当しなかった。LP6 と LP12 の *pAMT* ゲノム配列を決定した結果、ともに第 2 エキソンにトランスポゾン (*Tcc2*) の挿入をもつ新規機能欠損 *pamt* アリル (*pamt*⁷) であることが明らかになった (図 1)。この挿入により *pAMT* の機能欠損が生じ、辛味性が軽減されていると考えられた。第 2 エキソンに 7bp の挿入配列をもつアリル *pamt*⁶ が報告されているが、これ

は *Tcc2* 離脱時に生じたフットプリントによって生じたアリルであると考えられた。*pamt*⁴ や *pamt*⁵ にはトランスポゾン *Tcc1* が挿入していることが報告されているが、*Tcc2* は *Tcc1* と同一の末端反復配列を有していた。これらのことから、*Tcc* ファミリートランスポゾンの *pAMT* への活発な転移が、*C. chinense* で低辛味品種群が生じる一因になっていることが推察された。

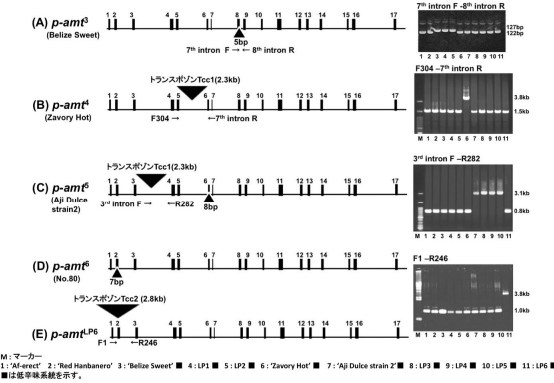


図1 機能欠損型 *p-amt* アリルとPCRによるアリル判定

pAMT アリルの分子系統解析
 続いて *pAMT* アリルの系統関係を明らかにするために、36 系統の *pAMT* イントロン配列を用いて系統樹を作成した。*pAMT* アリルは大きく 5 つのクラスターに分類された (図 2)。 *C. chinense* の *pAMT* アリルはクラスター - に位置しており、*C. frutescens* および *C. annuum* の *pAMT* アリルとは独立していた。 *C. annuum* 系統から見出された 2 つの *pamt* 機能欠損アリル (*pamt*¹, *pamt*²) はクラスター - , それぞれに位置しており、独立して生じたものと考えられた。 *C. chinense* 系統から見出された 5 つの *pamt* 機能欠損アリル (*pamt*³~*pamt*⁷) はすべてクラスター - に分類されたことから、*C. chinense* に種分化した後で生じたものであると考えられた。本研究により、機能欠損型 *pamt* が *C. chinense* における低辛味の主要因であることが示された。*pamt* を導入することにより、トウガラシの辛味を大きく軽減することが可能であり、本研究で見出した低辛味系統および開発した *pamt* マーカーはトウガラシの成分育種上有用と考えられた。

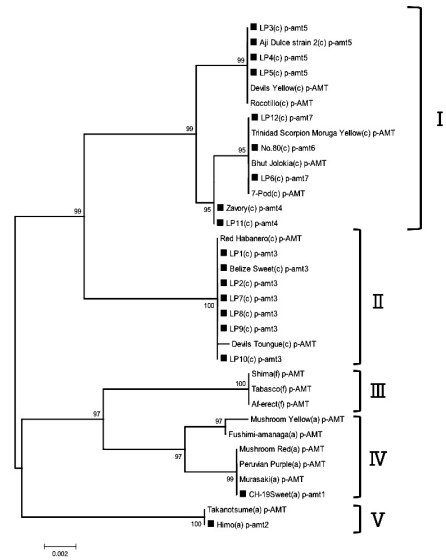


図2 イントロン塩基配列にもとづく *pAMT* アリルの分子系統樹
 ■は低辛味系統を示す。□系統名の(a), (c), (f)はそれぞれ *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* であることを示す

(2) *C. baccatum* 遺伝資源における低辛味素材の探索とその特性評価

南米原産のトウガラシ種 *C. baccatum* 遺伝資源の果実形態と辛味性について調査を行った。 *C. baccatum* において果実形態の多様性が認められた。果実重は 0.6-19.6g、果実長は 11.6-116.0mm、果実幅は 7.8-53.8mm、果形指数 0.54-6.04 の幅があった。多様な果実形態が認められ、ほとんどの系統が長型や球型の果実であったが、中には扁平型や UFO 型など特徴的な形状をしているものもあった。これらは他のトウガラシ種にはない形状であり、*C. baccatum* を新しい野菜として利用する上で一つの特徴になると考えられた。

カプサイシノイド含量に関しては、検出限界以下から 4258μg/gDW までの系統間差があった。最も辛味の強い系統は、0.8g 程度の小型果実をつける系統であった。果実重と辛味成分含量の間に弱い負の相関が認められ、小果の系統ほど辛味が強くなる傾向が認められた。カプサイシノイドは果実内の胎座組織特異的に生合成されることが知られているが、果実重と辛味成分含量の間の負の相関関係には、果実全体に対して胎座組織の占める割合が小果で大きくなることに関与していると考えられる。また大果の系統は生食用に選抜されてきているために、辛味が弱くなっているということも考えられる。 *C. baccatum* の辛味の強い系統におけるカプサイシノイド含量は 3000~4000μg/gDW 程度であり、一般的な辛味品種である‘タカノツメ’ (*C. annuum* 種 カプサイシノイド含量は 3000μg/gDW 程度)と同程度であった。激辛品種として知られる‘ハバネロ’ (*C. chinense*

種 カプサイシノイド含量は 10,000µg/gDW 程度)のような強い辛味の系統はなかった。

C. annuum では、ピーマンやパプリカと呼ばれる無辛味系統が多く存在している。これら無辛味系統は、カプサイシン生合成経路 *Pun1* の機能を欠損しており、これが *C. annuum* における無辛味性の原因であることが明らかにされている。一方 *C. annuum* と交雑が難しい *C. baccatum* ではこれまで無辛味の系統は報告されておらず、無辛味品種の育種が困難であった。本実験では、無辛味の *C. baccatum* 系統を 1 系統見出した。低辛味品種を育成する上で、本系統は重要な育種材料になると考えられた。この系統が安定して無辛味であるのかという点や、またその無辛味性の原因遺伝子を明らかにすることが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

田中義行、トウガラシの辛味成分に関する遺伝育種. 特産種苗. No.20、2015、13-17. 査読なし.

〔学会発表〕(計 5 件)

田中義行・園山知美・村賀湧次・小枝壮太・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎. 低辛味トウガラシ (*Capsicum chinense*) における *p-amt* 機能欠損アリルの系統解析. 平成 27 年度園芸学会春季大会. 2015 年 3 月 28-29 日. 千葉大学. 口頭発表.

原一仁・田中義行・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎. トウガラシ *Capsicum baccatum* 遺伝資源における低辛味素材の探索とその特性評価. 平成 27 年度園芸学会春季大会. 2015 年 3 月 28-29 日. 千葉大学. ポスター発表.

田中義行・園山知美・小枝壮太・安場健一郎・後藤丹十郎・吉田裕一. 低辛味トウガラシ (*Capsicum chinense*) における *p-amt* 機能欠損アリルの分類. 平成 26 年度園芸学会秋季大会. 2014 年 9 月 27-29 日. 佐賀大学. 口頭発表.

Y. Tanaka, M. Hara, K. Yasuba, T. Goto, Y. Yoshida. Characterization of pepper varieties in *Capsicum baccatum*. International Horticultural Congress 2014 (Australia, Brisbane) 2014 年 8 月 20 日. ポスター発表.

原一仁・田中義行・安場健一郎・後藤丹十郎・吉田裕一. 南米原産のトウガラシ *Capsicum baccatum* における果実形態および辛味性の評価. 平成 26 年度園芸学会春季大会. 2014 年 3 月 29-30 日. 筑波大学. 口頭発表.

〔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 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 義行 (TANAKA, Yoshiyuki)
岡山大学・環境生命科学研究科・助教
研究者番号 : 20704480

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉田 裕一 (YOSHIDA Yuichi)
岡山大学・環境生命科学研究科・教授
研究者番号 : 00141474

後藤 丹十郎 (GOTO Tanjuro)
岡山大学・環境生命科学研究科・教授
研究者番号 : 40195938

安場 健一郎 (YASUBA Kenichiro)
岡山大学・環境生命科学研究科・准教授
研究者番号 : 60343977