

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18640

研究課題名(和文) トウガラシ遺伝資源を利用した低辛味カプサイシノイド類似物質の成分育種学研究

研究課題名(英文) Genetic analysis of Capsicum bio-resource to improve low-pungent capsaicin analogs in chili pepper fruit

研究代表者

田中 義行 (Tanaka, Yoshiyuki)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：20704480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：カプシノイドは、トウガラシ果実に含まれる低辛味カプサイシノイド類似物質である。カプシノイドは低辛味ながら健康機能作用があり、食品への利用が期待されている。本実験では、その含量を増加させる遺伝子を同定することを目的とした。研究の結果、含量を増加させるpAMT(putative aminotransferase)の新規変異アレルを同定した。さらに、激辛品種と他品種を比較し、果皮での生合成が果実全体のカプサイシノイドや類似物質含量の増加に寄与すること、複数の生合成経路遺伝子が激辛品種の果皮でのみ強発現していることを明らかにした。本研究結果は、辛味やカプシノイドに関する育種に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Capsinoids are low-pungent capsaicinoid analogues in chili pepper fruits. They exhibit health-promoting properties in humans similar to capsaicinoids, but do not cause a nasty burning sensation, encouraging their application in foods. The aim of this study was to identify genetic factors to increase capsinoid in Capsicum. In this study, we identified novel mutant alleles of putative aminotransferase (pAMT) to enhance capsinoid biosynthesis. In addition, we compared an extremely pungent cultivar with other cultivars of different pungency levels. The results indicated that the capsaicinoid biosynthesis in the pericarp contributes to the higher capsaicinoid and its analogs concentrations in fruits, and multiple capsaicinoid biosynthetic genes were strongly expressed exclusively in the pericarp of the extremely pungent cultivar. The results will be useful for pungency and capsinoid breeding.

研究分野：野菜園芸学

キーワード：トウガラシ カプサイシン カプシノイド

### 1. 研究開始当初の背景

トウガラシの辛味成分カプサイシノイドには脂肪代謝促進作用など様々な健康機能性があることが知られている (Reviewed in Aza-Gonzalez et al, *Plant Cell Rep.* 2010 etc)。しかし、カプサイシノイドには激しい辛味があるために、多量に摂取することができない。近年、我々の研究グループはカプサイシノイドと構造が類似した新規物質としてカプシノイドを発見した (Kobata et al., *J.Agric.Food Chem.* 1998)。カプシノイドは、低辛味 (1/1000 程度の辛味) にも関わらずカプサイシノイドと同様の生理作用を示すトウガラシの新規機能性成分として注目されている (Reviewed in Luo et al. *Eur.J. Pharm.* 2010)。

これまでの我々の研究により、カプサイシノイド生合成経路遺伝子である *putative Aminotransferase (pAMT)* 遺伝子の機能欠損により、カプサイシノイド-カプシノイド生合成経路のスイッチングが起こることを明らかにした (Lang et al., *Plant J.* 2009 ; Tanaka et al., *J.Agric.Food Chem.* 2010)。*pAMT* についてはいくつかの変異アレルが報告されているが、その多様性は十分に明らかになっていない。また、複数の *pamt* 機能欠損系統を比較すると、系統間でカプシノイド含量に 5 倍以上の差があることが分かった。このことは、カプシノイド含量は *pamt* 以外の因子によっても制御されていることを示唆している。カプシノイド高含有系統を効率的に育種するには *pamt* と同時にこの因子を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

我々は、トウガラシ遺伝資源における辛味成分カプサイシノイドおよび低辛味類似成分の含量を評価してきた。その過程で、低辛味成分を傑出して高含量で含むユニークな系統を見出している。本研究課題では、これら高含量系統を解析し、辛味成分およびその低辛味類似物質の生合成機構の解明を目的とし、成分育種法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規の変異型 *pAMT* アレルの解析

##### 新規の *pamt* 変異アレルの解析

機能欠損型 *pamt* はカプシノイドの蓄積と低辛味化を同時に引き起こすことから、トウガラシの成分育種上重要な遺伝子と考えられる。本実験では、未解析系統について *pAMT* 遺伝子を解析し、新規アレルの同定を目的とした。

植物体は、岡山大学の圃場で栽培し、開花後約 30 日の果実を収穫し凍結乾燥させ、アセトンで成分を抽出した後、HPLC によって辛味成分カプサイシノイドと低辛味成分カプシノイド含量を測定した。また *pAMT* ゲノム配列と cDNA 配列を決定し、辛味品種‘レッドハバネロ’のものと比較した。

(2) カプサイシノイド類の含量増強に関わる要因の解析

#### <実験 1 : 果実部位別の辛味成分組成の調査>

カプサイシノイドは果実内の胎座特異的に合成されるとされており、胎座組織における合成能力が果実当たりのカプサイシノイド含量を決定していると考えられている。しかし、これまでの調査で辛味品種‘レッドハバネロ’より多くのカプサイシノイドを含む系統‘モルガ’が必ずしも胎座で高いカプサイシノイド含量を示すわけではないことが示されている。本実験では、‘レッドハバネロ’と‘モルガ’を比較することにより、‘モルガ’におけるカプサイシノイド高含量化の原因を明らかにすることを目的とした。‘レッドハバネロ’と‘モルガ’(共に *C. chinense*) を供試した。各系統 3 株ずつ岡山大学実験圃場で栽培した。緑色果実を凍結乾燥した後、有機溶媒で成分を抽出し HPLC でカプサイシノイド含量を測定した。カプサイシノイド含量はカプサイシンとジヒドロカプサイシンの総量として算出した。併せて、それぞれの緑色果実を果皮・種子・胎座に切り分け、各部位の乾物重およびカプサイシノイド含量を決定した。<実験 2 : カプサイシノイド生合成遺伝子の発現解析> 各系統の胎座組織および果皮から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。リアルタイム PCR で辛味成分生合成関連遺伝子の発現量を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規の変異型 *pAMT* アレルの解析

低辛味系統 ‘No. 4034’は他の *pamt* 機能欠損系統と同様に、辛味成分をほとんど含まずにカプシノイドを含むという成分組成をしていた。‘No. 4034’の *pAMT* 塩基配列を決定したところ、16th エキソンに辛味系統にはない 7bp の挿入配列が認められた(図 1)。この挿入によってフレームシフト変異が生じ、辛味系統よりも短いタンパク質をコードしていることが判明した。また、これまでに合計 8 つの機能欠損型 *pamt* アレルが報告されているが、本挿入は既知の *pamt* アレルには認められなかった。以上より、‘No. 4034’の低辛味性およびカプシノイド合成は新規の *pamt* アレルが原因であることが示された。‘No. 4034’は低辛味トウガラシの育成やカプシノイド成分育種において有用な遺伝資源になりうると考えられた。さらに、機能型と機能欠損型の間中間的な活性を示す *pAMT* アレルも発見し、これらのイントロンにはトランスポゾン挿入が認められた。

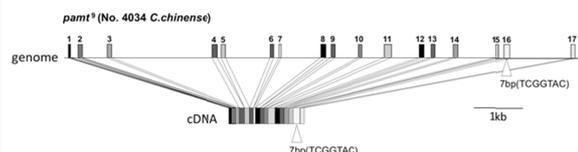


図 1. 低辛味系統 ‘No.4034’ (*C.chinense*) における *pAMT* 遺伝子の機能欠損変異

## (2) カプサイシノイド類の含量増強に関わる要因の解析

HPLC 分析の結果、'レッドハバネロ'果実におけるカプサイシノイド含量は 14.3mg/gDW であったのに対して、'モルガ'果実では 23.9 mg/gDW であった。果実を胎座、種子、果皮に切り分けて、各部位の乾物重とカプサイシノイド含量を調査した。果実全体に占める胎座の割合は両系統で 10%程度であり、系統間で違いは認められなかった。各部位のカプサイシノイド含量を調査したところ、両系統の胎座で同程度の高いカプサイシノイド含量を示した。一方、果皮におけるカプサイシノイド含量は'レッドハバネロ'では 1.8 mg/gDW であったのに対して、'モルガ'では 23.2 mg/gDW と 10 倍以上の含量を示した。果皮は果実の 70%以上を占める組織であり、果皮における高いカプサイシノイド含量が'モルガ'の果実全体のカプサイシノイド高含量化に関与していると考えられた。続いて、カプサイシノイド生合成経路遺伝子の発現量を比較したところ、胎座における遺伝子発現量に系統間で違いは認められなかった。一方果皮では 4 つの酵素遺伝子(*Pun1*, *pAMT*, *KAS*, *BCAT*)が'モルガ'果皮で'ハバネロ'果皮の 30 倍以上強く発現していた(図 2)。以上の結果から、'モルガ'の高い辛味成分含量には、果皮におけるカプサイシノイド生合成が関与していると考えられた。カプサイシノイドも辛味成分と共通の経路で合成されることから、'モルガ'に機能欠損型 *pamt* を導入することで、カプサイシノイド含量を増強した系統を育成できる可能性がある。

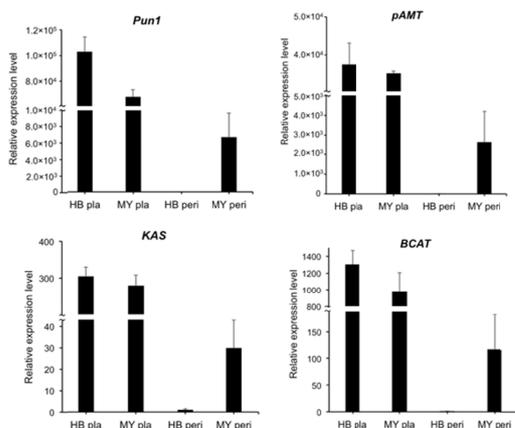


図 2. 'レッドハバネロ'および'モルガ'におけるカプサイシノイド生合成関連遺伝子の発現解析

## 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 4 件)

Y. Tanaka, S. Fukuta, S. Koeda, T. Goto, Y.

Yoshida, K. Yasuba. Identification of a Novel Mutant *pAMT* Allele Responsible for Low-pungency and Capsinoid Production in Chili Pepper: Accession 'No. 4034' (*Capsicum chinense*). 査読有, The Horticultural Journal, Vol.87, 2018, pp.222-228, DOI: 10.2503/hortj.OKD-115

Y. Tanaka, F. Nakashima, E. Kirii, T. Goto, Y.

Yoshida, K. Yasuba. Difference in capsaicinoid biosynthesis gene expression in the pericarp reveals elevation of capsaicinoid contents in chili peppers (*Capsicum chinense*). 査読有, Plant Cell Reports, Vol.36, 2017, pp.267-279, DOI:10.1007/s00299-016-2078-8

E. Kirii, T. Goto, Y. Yoshida, K. Yasuba, Y. Tanaka. Non-pungency in a Japanese Chili Pepper Landrace (*Capsicum annum*) is Caused by a Novel Loss-of-function *Pun1* Allele. 査読有, The Horticultural Journal, Vol.86, 2017, pp.61-69, DOI: 10.2503/hortj.MI-148

Y. Tanaka, T. Sonoyama, Y. Muraga, S. Koeda, T. Goto, Y. Yoshida, K. Yasuba. Multiple loss-of-function putative aminotransferase alleles contribute to low pungency and capsinoid biosynthesis in *Capsicum chinense*. 査読有, Molecular Breeding., Vol.35, 2015, 142, DOI:10.1007/s11032-015-0339-9

[学会発表](計 10 件)

浅野高弥・金光世利香・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎・田中義行・トウガラシ(*C. chinense*)における異なる *pAMT* アリルを利用した辛味調整の可能性と転写産物解析.平成 30 年度園芸学会秋季大会.2018 年 3 月 25 日.近畿大学.ポスター発表.

田中義行・キリーエラスムス・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎・トウガラシ(*Capsicum chinense*)交雑集団に

おける辛味関連成分に関する QTL pAMT とその効果. 平成 29 年度園芸学会秋季大会. 2017 年 9 月 3 日. 酪農学園大学. 口頭発表.

田中義行・福多志穂・小枝壮太・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎. トウガラシ(*Capsicum chinense*)におけるカプシノイド合成に関わる新規 putative aminotransferase (pAMT) 変異アレルの同定. 園芸学会中四国支部会. 2017 年 7 月 22 日. 愛媛大学. 口頭発表.

田中義行. トウガラシ遺伝資源を用いた辛味成分カプサイシノイドおよびその類似物質に関する成分育種学研究. 第 8 回 中国地域育種談話会・第 11 回 ムギ類研究会. 2016 年 12 月 10 日. 岡山大学 資源植物科学研究所. 招待講演.

Y. Tanaka, E. Kirii, F. Nakashima, T. Goto, Y. Yoshida, K. Yasuba. Spatial difference in capsaicinoid biosynthesis gene expression explains higher capsaicinoid contents in chili peppers. 11th JKUAT Scientific and Technological Conference. 2016 年 11 月 11 日. Kenya, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology. 口頭発表.

Y. Tanaka, Y. Muraga, S. Fukuta, T. Goto, Y. Yoshida, K. Yasuba. Multiple mutated putative aminotransferase alleles contribute to low pungency and capsinoid biosynthesis in *Capsicum chinense*. Eucarpia Capsicum and Eggplant Meeting. 2016 年 09 月 13 日. Kecskemet, Hungary. 口頭発表.

Kirii, Erasmus・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎・田中義行. Genetic analysis of capsaicinoid and its low pungent analogues in chilli pepper(*Capsicum chinense*). 平成 28 年度園芸学会秋季大会. 2016 年 09 月 11 日. 名城大学. ポスター発表.

田中義行・村賀湧次・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎. トウガラシ *Capsicum chinense* における pamt 遺伝子の構造変異とその辛味性への寄与. 平成 28 年度園芸学会春季大会. 2016 年 03 月 27 日. 東京農業大学厚木キャンパス. 口頭発表.

Kirii, Erasmus・田中義行・米田祥二・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎. A study on *Pun1* locus in sweet pepper, cv. 'Murasaki' (*Capsicum annuum*), relative to loss of pungency. 平成 27 年度園芸学会秋季大会. 2015 年 09 月 26 日. 徳島大学. 口頭発表.

田中義行・中島史裕・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎. 辛味成分高含有 トウガラシ系統(*C. chinense*)におけるカプサイシノイド生合成遺伝子の発現解析. 平成 27 年度園芸学会秋季大会. 2015 年 09 月 26 日. 徳島大学. 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:  
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・環境生命科学研究所・准教授  
研究者番号: 20704480

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

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

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

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