

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05627

研究課題名(和文) イオンビーム突然変異系統を用いたシシトウの不時辛味果発生に関わる遺伝子座の同定

研究課題名(英文) Identification of loci associated with fluctuation in pungency of Shishito (Capsicum annuum) using a mutant induced by ion beam in Shishito pepper

研究代表者

村上 賢治 (Murakami, Kenji)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：40200266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シシトウは、トウガラシ(Capsicum annuum)のうち小果で辛味の少ない品種群である。シシトウでは、しばしば非常に辛い果実を生じることが知られているが、その原因や機構、形質の遺伝は明らかにされていなかった。本研究では、辛味果の発生がほとんど無い突然変異系統を用い、元の系統との比較や交雑試験を行うことにより、辛味果発生形質の遺伝や、関与する遺伝子の解析を試みた。本研究の結果、辛味果発生は果実発育抑制に大きく関係しており、辛味果形質はほぼ優性に遺伝することを明らかにした。さらに、F2集団での分離とMutMap法による解析結果から、辛味果形質には少なくとも2個の遺伝子座の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トウガラシの辛味成分は、香辛料としてはその生成増大、青果物としてはその生成抑制が課題となってきた。とくにシシトウは、辛味成分生成量がいくつかの要因により大きく変動する興味深い特性を持っている。本研究では、シシトウの辛味生成に果実の発育が大きく関わっていること、少なくとも2個の遺伝子座の関与を明らかにした。この成果は、香辛料あるいは青果物としてのトウガラシ生産における重要な知見となりうると考える。

研究成果の概要(英文)：Shishito is a group of small-fruited, less pungent varieties of Capsicum annuum. Although it is well known that shishito often produces very pungent fruit, the causes, mechanisms, and inheritance of the trait have remained unknown. In this study, we attempted to analyze the inheritance of pungent fruit development traits and the genes involved by using low-pungent mutant lines that rarely produce pungent fruit and by comparing them with the original lines and conducting crossbreeding tests. The results of this study revealed that pungent fruit development is strongly related to the suppression of fruit development, and that the trait that produces pungent fruit is almost dominantly inherited. Furthermore, the segregation in the F2 population and the results of the MutMap method analysis suggested the involvement of at least two loci in the pungent fruit trait.

研究分野：野菜園芸学

キーワード：果実発育 辛味成分

1. 研究開始当初の背景

シントウは、小果で辛味の無いトウガラシの品種群であるが、しばしば辛味の強い果実を生じる。辛味果かどうかの判断は外観からでは難しく、口に入れてはじめて分かることが多い。シントウは大果・無辛味品種群であるピーマンとは異なり、辛味成分のカプサイシンを合成する遺伝子は欠損していないが発現が抑えられており、何らかの要因でその抑制が外れ、辛味果が発生すると考えられている。シントウの辛味果発生要因として、高温や乾燥などのストレスが知られており、土井ら(2011)は、シントウ果実の辛味果発生要因についての多変量解析を行った結果、高温・低湿度下で辛味果が発生しやすいことを示した。また、トウガラシ辛味品種において、乾燥ストレスによる辛味成分含量の上昇が報告されている(Estrada et al., 1999)。研究代表者らのこれまでの研究で、昼夜 28°C一定の高夜温条件でシントウを栽培すると、夜温 16°Cとした場合より辛味果割合が増加することが示された(村上ら, 2006)。

シントウにおいて、辛い果実は種子が少ないことが経験的に知られており、単為結果果実でカプサイシン濃度が高いことが報告されている(Ishikawa et al., 2004)。研究代表者らの研究では、28°C昼夜一定でシントウを栽培すると種子数が減少し、辛味果割合が増加した(村上ら, 2006)。種子数と辛味成分含量に負の相関がある理由として、種皮組織を構成するリグニンの生合成と、辛味成分カプサイシンの生合成において競合が生じるためであると考えられているが(Ishikawa et al., 2004; 松島, 2015)、このことについてはまだ明らかになっていない。受精後日数が経過し果実齢が進むと辛味成分が増えることから、種子数が少ないと果実肥大が遅れ、結果として辛味果となる可能性も考えられているが、研究代表者らの実験結果では、果実齢を揃えて比較しても、種子の少ない果実は辛味果となる割合が著しく高かった(村上ら, 2013 年園芸学会秋季大会)。また、除雄・柱頭切除して 2,4-D 処理を行い全て単為結果による無種子果とすると、盛夏期の栽培ではほぼ確実に辛味果を発生させることができた(村上ら, 2017 年春園芸学会大会)。

トウガラシの辛味成分であるカプサイシノイドの生合成抑制は、単一の優性遺伝子 *Pun1* の機能欠損が原因となっている場合が多く、劣性変異によってピーマンなどの非辛味品種が生じると考えられている。しかし、*Pun1* の機能欠損のみでは、シントウのような環境条件による辛味発現の変動や、遺伝的な辛味発現の強弱性を説明することは困難であった。また、シントウにおいて、辛味果が発生しやすい品種系統と、発生しにくい品種系統のあることが知られているが、これまで同一遺伝的背景で辛味果発生の異なる系統が得られていなかったため、遺伝解析が進んでいなかった。研究代表者らは、高知県の品種‘ししほまれ’種子に、理化学研究所において炭素イオンビームを照射し、その後代について辛味果が出やすい条件である連続照明・28°C一定の人工気象室内での選抜を繰り返すことにより、辛味果がほとんど発生しない系統(低辛味系統)を育成した(Murakami et al., 2011)。この低辛味系統と、もとの辛味が出る系統を用いることにより、辛味果発生の遺伝解析を効率的に行い得ると考えた。また、近年、次世代シーケンサー利用による遺伝子の解析法が開発・利用され、解析が迅速に行えるようになってきている。本研究では、シントウの辛味発現の遺伝様式を明らかにするとともに、次世代シーケンサーを用いた手法により、辛味原因遺伝子の遺伝子座を調べることも試みた。

2. 研究の目的

本研究は、最終的にはシントウの不時辛味果発生を制御する形質の原因遺伝子は何で、どのように働き、どのように遺伝するのか明らかにすることを目的とする。シントウの不時的な辛味果発生現象は広く知られているにも関わらず、その原因を解明しようとした学術研究は少なく、不時辛味果発生形質の遺伝に関する研究はこれまでに報告されていない。不時辛味果発生形質の遺伝解析が難しい理由として、以下の2つがあげられる。

シントウの辛味果発生は環境条件や果実の種子形成により辛味成分の生成が大きく変動する不時的なものであり、表現型同定のために辛味を高率で発現させることが困難であった。本研究で用いる低辛味系統は、研究代表者らがイオンビーム突然変異で育成した独自の材料であり、不時辛味果発生形質の遺伝子解析にきわめて有用である。

同一遺伝的背景で不時辛味果の発現性のみ異なる系統の組み合わせがこれまでになかった。本研究では、研究代表者らがこれまでに開発・確立した、高温下で単為結果させ安定して辛味を発現させる方法を用いる。

3. 研究の方法

(1) ‘ししほまれ’の系統間交雑後代での果実辛味

‘ししほまれ’の無選抜の自殖系統(自殖系統)、低辛味選抜系統(低辛味系統)、低辛味系統×自殖系統の F1 と F2 を供試した。辛味発現を促進させるため、盛夏期に、開花前日の花蕾に除雄・柱頭切除後 10 mg/L 2,4-D 処理し単為結果させた。着色開始時点で収穫して果実内の胎座・隔壁

組織を採取し、99%アセトニトリルに浸漬してカプサイシノイドを抽出し HPLC により測定した。同様の実験を 2018～2021 年の 4 年間行った。

(2) ‘鷹の爪’と‘ししほまれ’各系統との交雑後代での果実辛味

自殖系統，低辛味系統，‘鷹の爪’，鷹の爪×自殖系統，鷹の爪×低辛味系統の交雑 F1 と F2 を供試し、2020 年に行った。8 月上旬に受粉により株当たり 2～6 個の有種子果を着果させ、着色開始時点で収穫した。収穫果を 80℃で乾燥後に粉碎した試料から、99%アセトニトリルによりカプサイシノイドを抽出し、HPLC により測定した。

(3) MutMap 法による解析

2018 年の実験において栽培した F2 集団の個体ごとのカプサイシノイド含量に基づき、F2 個体群からカプサイシノイド含量の低かった個体と高かった個体をそれぞれ 50 個体ずつ選んだ。各個体から若い葉を採取して DNA を抽出し、低辛味個体群と高辛味個体群の DNA を、それぞれ低辛味バルク、および高辛味バルクとした。それぞれの DNA サンプルについて、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスを行い、MutMap 法による解析に供した。

4. 研究成果

(1) ‘ししほまれ’の系統間交雑後代での果実辛味

F1 は、両親の中間からやや低辛味寄りに分布した(図1)。F2 では、F1 よりさらに低辛味寄りに分布し、辛味形質の分離は明らかではなかった。両親系統および F1 では、果実重と辛味成分含量に明らかな負の相関がみられ、果実生体重がおよそ 3～5 g の果実で辛味成分含量が高くなった(図2)。

(2) ‘鷹の爪’と‘ししほまれ’各系統との交雑後代での果実辛味

鷹の爪×自殖系統の F1 は、両親のほぼ中間に分布した(図3)。鷹の爪×低辛味系統の F1 も、両親のほぼ中間に分布したが、カプサイシノイド含量がかなり低い個体がみられた。鷹の爪×自殖系統，鷹の爪×低辛味系統の F2 は両方とも、それぞれの F1 よりも低辛味寄りに分布し、分離は明らかではなかった。

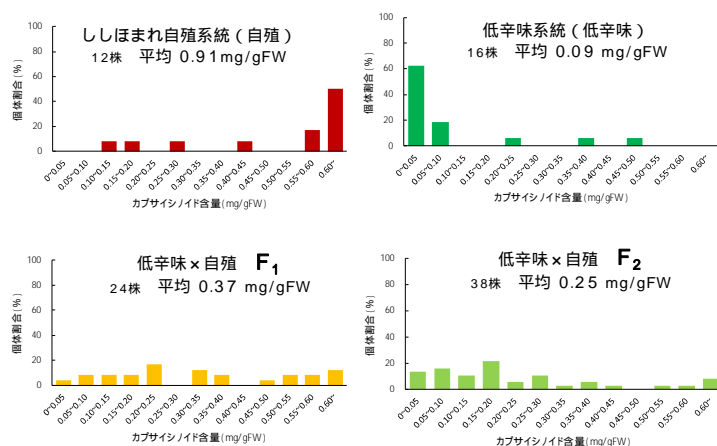


図1 ししほまれ自殖系統，低辛味系統，交雑F₁とF₂集団での個体ごとの胎座・隔壁カプサイシノイド(カプサイシン+ジヒドロカプサイシン)含量の頻度分布(2020年実験)

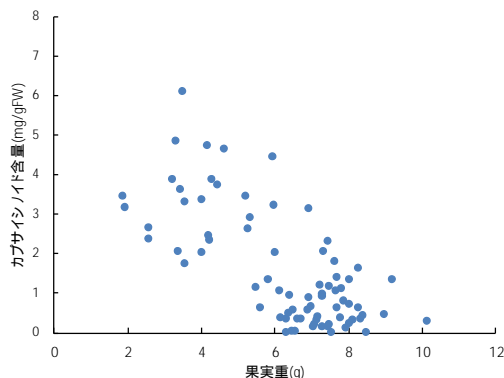


図2 自殖系統における果実重とカプサイシノイド含量の相関(2021年実験)

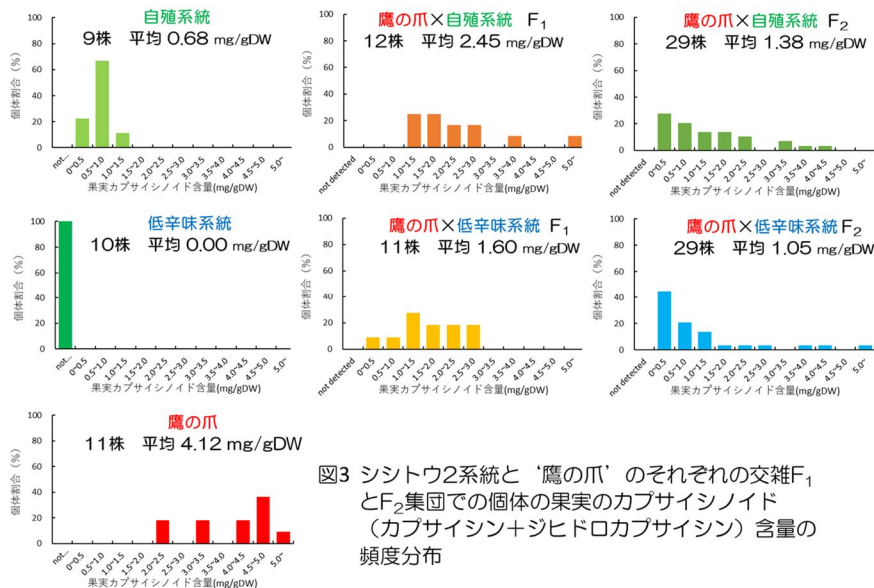


図3 シシトウ2系統と‘鷹の爪’のそれぞれの交雑F₁とF₂集団での個体の果実のカプサイシノイド（カプサイシン+ジヒドロカプサイシン）含量の頻度分布

(3) MutMap 法による解析

遺伝子解析の結果、2つの染色体のそれぞれ1箇所ずつ候補遺伝子が存在する領域のあることが示唆されたが、それらの領域での候補遺伝子については、本実験の結果からは絞り込むことができなかった。

(4) まとめと今後

本研究の結果、辛味果発生は果実発育抑制に大きく関係しており、辛味果形質はほぼ優性に遺伝することを明らかにした。さらに、辛味果形質には少なくとも2個の遺伝子座の関与が示唆された。シシトウの系統間での辛味果形質の遺伝については、果実発育による影響が大きく、F₂ 個体ごとの遺伝子型の同定は困難であったため、遺伝子座の同定にまでは至っていない。今後は、果実発育を適切に抑制することにより辛味形質を発現させ、F₂ 世代での個体ごとの遺伝子型を確実に同定し、分離比を明らかにするとともに、遺伝子座の同定を目指す研究を行う。

引用文献

- 土井元章ら, 2011, 園芸学研究 10 別 2: 472.
- Estrada et al., 1999, Scientia Hort. 81: 385-396.
- Garcés-Claver et al., 2007, J. Agric. Food Chem. 55: 6951-6957.
- Ishikawa, K. et al., 2004, HortScience 39 :153-155.
- 松島憲一, 2015, 特産種苗 . 20: 18-21.
- 村上賢治ら, 2006, 植物環境工学 18: 284-289.
- Murakami, K. et al., 2011, Acta Hort. 907: 243-246.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上賢治・田淵翔大・柄折真澄・細川宗孝
2. 発表標題 シシトウの低辛味形質の遺伝
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上大亮・村上賢治・高原浩之
2. 発表標題 低辛味シシトウ系統における DNAマーカーを用いた病害抵抗性遺伝子の解析
3. 学会等名 第 74回北陸病害虫研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	細川 宗孝 (Hosokawa Munetaka) (40301246)	近畿大学・農学部・教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------