

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05618

研究課題名（和文）トウガラシpAMT遺伝子の構造変異による辛味低下メカニズム解明と成分育種への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of pungency reduction by structural mutation of pAMT gene and its application to chili pepper breeding

研究代表者

田中 義行 (Tanaka, Yoshiyuki)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：20704480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：辛味はトウガラシ果実の重要形質である。辛味の強弱に関する嗜好性は、国・地域・用途で異なっており、辛味成分含量を制御できる育種技術が求められている。本研究では、合成経路の一遺伝子putative aminotransferase(pAMT)遺伝子を解析し、トランスポゾンの挿入が関与した複数の機能低下アレルを同定した。また、その機能低下メカニズムを解析し、イントロン領域のトランスポゾン挿入によりスプライシング異常が起こっていること、挿入位置のわずかな違いによって機能低下程度が変化することを明らかにした。さらに、異なる変異アレルを戻し交雑で導入することで、辛味の強弱を調整できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの辛味育種は、カプサイシド含量の異なるトウガラシを交雑し、その後代で偶然生じたちょうど良い辛味の個体を選抜するという手法で行われてきた。この育種法では、多数の遺伝子間での相互作用のために、育種家の目的通りの辛味をつくるのが困難だった。本研究を通して様々なpAMTタイプが発見されてきたことにより、育種開始前にpAMTのタイプを機能型か機能欠損型か、それともleaky型かを選択し、遺伝子マーカーを利用することで、どの程度まで辛味を抑えるかを計画的かつ効率的に進めることが可能になるだろう。

研究成果の概要（英文）：Pungency is an important trait of pepper fruits. Preferences for pungency differ among countries, regions, and uses, and breeding techniques that can control pungency level are needed. In this study, we analyzed the putative aminotransferase (pAMT) gene in capsaicinoid biosynthetic pathway, and identified multiple leaky alleles involving transposon insertion. We also analyzed the mechanism underlying reduction of pungency level, and found that the insertion of a transposon in the intron caused aberrant splicing, and that reduction level in pungency depend on the slight difference in the position of the transposon. Furthermore, we have demonstrated that allelic variation in pAMT would be useful to adjust pungency level by introducing different mutant alleles in backcrossing program.

研究分野：園芸科学

キーワード：トウガラシ 辛味 カプサイシノイド トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

トウガラシは、辛味種は香辛料として、ピーマンなど非辛味種は野菜として利用される重要な作物である。辛味の強弱は辛味成分カプサイシノイド含量の違いによるものである。辛味の強弱に関する嗜好性は国・地域・用途で異なっており、カプサイシノイド含量を制御できる技術が求められている。その含量は複数の遺伝要因によって複雑に制御されているとされており、辛味の強弱をコントロールすることは困難とされてきた (Reviewed in Aza-Gonzalez et al, Plant Cell Rep. 2010 etc).

2. 研究の目的

これまでに、辛味成分生合成経路の一遺伝子である *putative aminotransferase(pAMT)* 遺伝子の機能欠損がカプサイシノイド含量を激減させることを示した。さらに我々は近年、① カリブ原産の栽培種 *Capsicum chinense* には、トランスポゾンの挿入と転移を介した様々な *pAMT* 変異が存在すること、② トランスポゾンの挿入位置が辛味の強弱と相関していることを明らかにしつつある。これら種々の *pAMT* 変異を導入し、その遺伝子マーカーを利用することで辛味程度を簡単に調整できる育種技術を確立できる可能性がある。本研究課題では、*pAMT* 遺伝子の構造変異がトウガラシの辛味低下を引き起こすメカニズムを解明し、それに基づいてカプサイシノイド含量の新規調整法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *pAMT* 遺伝子におけるトランスポゾン挿入位置の違いが、辛味におよぼす影響の調査と辛味低下メカニズムの解析

<異なる *pAMT* アレルがカプサイシノイド含量に及ぼす影響> ‘Red Habanero’ (野生型 *pAMT*) (RH) に ‘Devil’s Yellow’ (*pamt^{L1}*) (DY), LP13 (*pamt^{L2}*) のそれぞれを交雑して得た集団 RH×DY F₂ (122 個体) および RH×LP13 F₂ (117 個体) を供試した。genomic PCR による *pAMT* 遺伝子型判定と HPLC による辛味成分カプサイシノイド含量の測定を行い、*pAMT* 遺伝子型が辛味成分含量に及ぼす影響を評価した。

<*pAMT* 酵素活性の測定> RH, DY, LP13 および AD2(機能欠損型 *pamt*) を供試した。緑熟果実の胎座 (0.1g) をリン酸カリウム buffer 中でホモジナイズし、遠心後上清を得た。上清をバニリン, GABA, PLP と混合し 30°C で 24 時間インキュベートし、生成されたバニルアミン量を HPLC で測定した。胎座タンパク 1mg・24h 当たりのバニルアミン生成量として *pAMT* 酵素活性を評価した。

<*pAMT* mRNA の転写パターン解析> RH, DY および LP13 の緑熟果実の胎座部より total RNA を抽出し、RNA-seq および RT-PCR により各 *pAMT* アレルからの転写産物の塩基配列とその存在量を評価した。

(2) 新規 leaky *pAMT* アレルの同定と他のアレルとの構造比較

<辛味成分カプサイシノイドおよび低辛味成分カプサイノイドの測定> ‘Red Habanero’ (RH) および ‘Rocotillo’ (RO) (いずれも *C. chinense*) を実験に供試した。各系統の緑熟果実を収穫し、HPLC 分析によりカプサイシノイドおよびカプサイノイドの含量を決定した。

<*pAMT* アレルの構造決定> RO の *pAMT* 遺伝子領域をゲノミック PCR で増幅し、全塩基配列を決定した。

<*pAMT* 遺伝子型がカプサイシノイド類の成分組成および酵素活性に及ぼす影響> RH に RO を交雑して得た交雑集団 RH×RO F₂ (50 個体) を供試した。genomic PCR による *pAMT* 遺伝子型判定と HPLC による成分分析を行い、*pAMT* 遺伝子型が辛味成分カプサイシノイド含量に及ぼす影響を評価した。また RH×RO F₂ 集団の緑熟果実を遺伝子型ごとにバルク化し、遺伝子型間で *pAMT* 酵素活性を比較した。

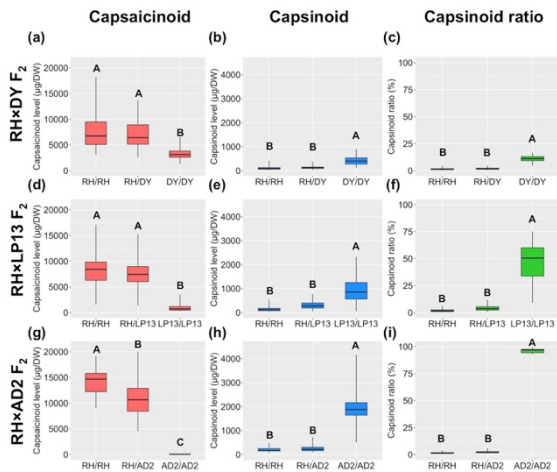
(3) トウガラシの辛味強弱調整のための変異型 *pAMT* 遺伝子マーカーを用いた戻し交雑育種

RH (機能型 *pAMT*) に DY (*pamt^{L1}*), LP13 (*pamt^{L2}*) および AD2 (loss-of-function *pamt^S*) のそれぞれを交雑して得た F₁ に RH を戻し交雑した。BC₁F₁ を栽培し、DNA マーカーで *pAMT* 遺伝子型がヘテロである個体を選抜し、自殖を行い、BC₁F₂ 集団を作成した。genomic PCR により BC₁F₂ 各個体の *pAMT* 遺伝子型を判定し、HPLC によりカプサイシノイド含量の測定を行うことで、変異型 *pAMT* が辛味程度に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

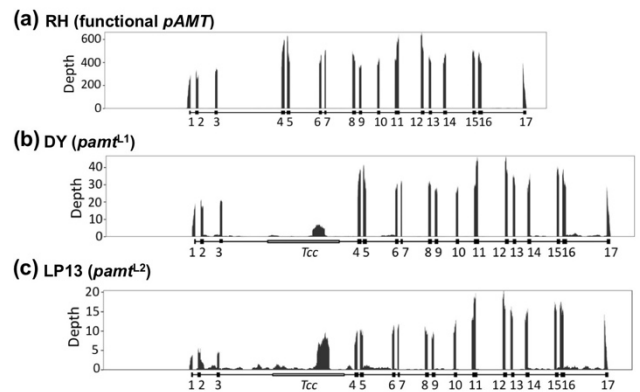
(1) *pAMT* 遺伝子におけるトランスポゾン挿入位置の違いが、辛味におよぼ影響の調査と辛味低下メカニズムの解析

DY と LP13 は、エキソンに領域に変異がないものの、共通して第 3 イントロンにトランスポゾン *Tcc* の挿入をもっていた。しかし、トランスポゾンの挿入位置はわずかに異なっていた。DY と LP13 が持つ *pAMT* 変異アレルをそれぞれ *pamt^{d1}*、*pamt^{d2}* と名付けた。RH×DY F₂ 集団において、機能型 *pAMT* をもつ個体群と比較して、*pamt^{d1}* ホモ個体群ではカプサイシノイド含量が 50%程度に減少した。一方、RH×LP13 F₂ 集団において、*pamt^{d2}* ホモ個体群では、カプサイシノイド含量が 10%程度に減少した。カプサイシノイドの減少程度が大きいアレルほど、低辛味成分カプシノイドの合成割合が増加していた（第 1 図）。*pAMT* 酵素活性は RH, DY, LP13 の順に低く、AD2(機能欠損型 *pamt*)では活性は認められなかった。以上のことから、*pamt^{d1}* と *pamt^{d2}* は、共に機能型と機能欠損型の間接的な活性を示す leaky アレルであるが、その活性程度は異なると考えられた。RNA-seq 解析の結果、機能型 *pAMT* においては、17 個のエキソンが正常にスプライシングされた機能型 mRNA のみが検出された。一方で、*pamt^{d1}* および *pamt^{d2}* においては、*Tcc* 挿入がある第 3 イントロン部でスプライシングが変化し、機能型 mRNA と *Tcc* 部分配列を含む非機能型 mRNA が共存していることが示唆された（第 2 図）。非機能型 mRNA は、DY と比べて LP13 でより優占的に発現していた。以上より、*pamt^{d1}* と *pamt^{d2}* の機能低下程度の違いは、イントロンにおけるトランスポゾン挿入位置の違いがスプライシング効率を変化させることによるものであり、それにより異なる程度の *pAMT* 酵素活性およびカプサイシノイド含量の低下が起きると考えられた。



第 1 図 異なる変異型 *pAMT* が辛味成分組成に及ぼす影響

異なる文字間で有意差あり (Tukey 検定, $P < 0.05$) バーは標準誤差

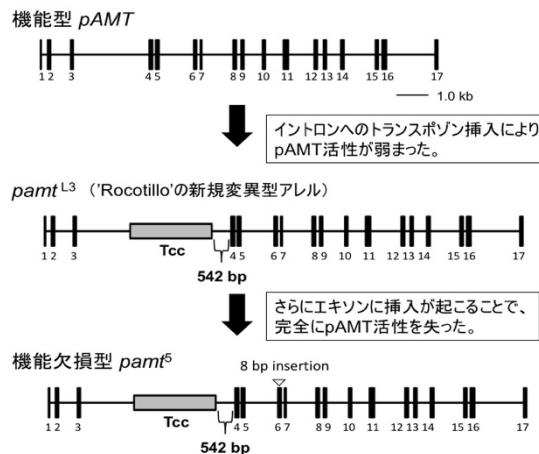


第 2 図 異なる変異型 *pAMT* アレルにおける転写物解析

(2) トウガラシにおける新規 leaky *pAMT* アレルの同定と他のアレルとの構造比較

RH と RO のカプサイシノイド含量はそれぞれ $19,483 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{DW}$, $5,771 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{DW}$ であった。カプシノイド含量は、それぞれ $394 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{DW}$, $367 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{DW}$ であった。RO のカプサイシノイドとカプシノイドの含有比率が機能型アレルをもつ RH と異なっていたことから、RO の *pAMT* 遺伝子に変異があると予想し、その全塩基配列を決定した。RO 型 *pAMT* アレルは、機能型アレルと同様に 17 個のエキソンで構成されており、エキソン内に変異はなかったが、第 3 イントロンにトランスポゾン *Tcc* が挿入されていた（第 3 図）。RH×RO F₂ 集団において、RH 型（機能型 *pAMT*）をもつ個体群と比較して、RO 型ホモ個体群では辛味成分含量が 50%程度に低かった。*pAMT* 酵素活性は RH 型ホモが最も高く、ヘテロ型、RO ホモ型の順に低くなった。イントロンに *Tcc* が挿入することにより、前述の 2 つの変異型アレル (*pamt^{d1}*, *pamt^{d2}*) とは挿入位置が異なることから、RO 型アレルを *pamt^{d3}* とした。興味深いことに、*pamt^{d3}* のトランスポゾン挿入位置は、既報の機能欠損型アレル *pamt^d* と同一の位置であった。*pamt^d* は複数の *C. chinense* 系統から報告されている機能欠損アレルであり、低辛味系統群の成立に関与した重要な変異アレルと考えられる。*pamt^d* はイントロンのトランスポゾン挿入だけでなく、第 6 エキソンにも

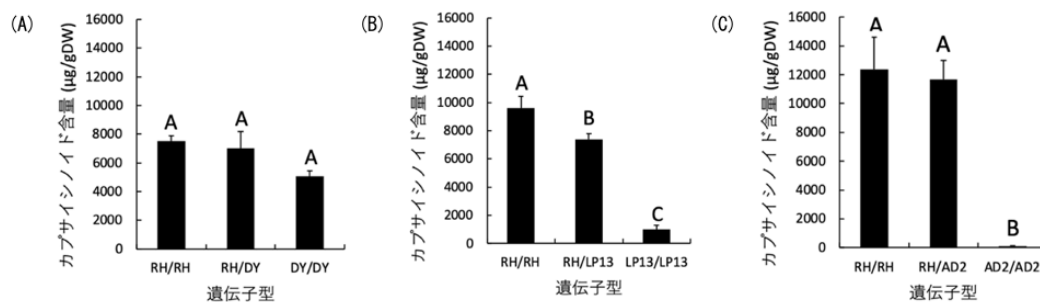
8 bp 挿入があり、フレームシフト変異を起こしている (第 3 図). 今回の *pamt*^{L3} の同定により, 「① まず機能型 *pAMT* のイントロンへのトランスポゾン挿入により活性が低下する, ② その後, さらにエクソンに 8 bp の挿入が生じることで, 完全に *pAMT* 活性を失う」という段階的な活性低下を経て機能欠損アレル *pamt*⁵ が出現したと考えられた (第 3 図).



第3図 *pamt*^{L3} および機能欠損型 *pamt*⁵ の成立過程
ボックスと横線はそれぞれエクソン、イントロンを示す。

(3) トウガラシの辛味強弱調整のための変異型 *pAMT* 遺伝子マーカーを用いた戻し交雑育種

RH×DY BC₁F₂ 集団 (n=24) において, *pamt*^{L1} 型ホモにおけるカプサイシノイド含量は 5059.7 μg·g⁻¹DW であり, 機能型ホモの 67.2%であった (第 4 図 A). RH×LP13 BC₁F₂ 集団 (n=23) において, *pamt*^{L2} 型ホモにおけるカプサイシノイド含量は 1018.8 μg·g⁻¹DW であり, 機能型ホモの 10.6%であった (第 4 図 B). RH×AD2 BC₁F₂ 集団 (n=20) において, loss-of-function *pamt*⁵ 型ホモにおけるカプサイシノイド含量は 99.6 μg·g⁻¹DW であり, 機能型ホモの 0.80%であった (第 4 図 C). 以上より, 戻し交雑集団においても *pAMT* 遺伝子型によりカプサイシノイド含量が異なる程度に低下することが示された. さらに戻し交雑を続けることで, 辛味程度の異なる 'Red Habanero' を育成できると思われる.



第 4 図 異なる変異型 *pAMT* がカプサイシノイド含量に及ぼす影響

(A) RH×DY BC₁F₂ 集団 (B) RH×LP13 BC₁F₂ 集団 (C) RH×AD2 BC₁F₂ 集団

異なる文字間で有意差あり (Tukey 検定, $P < 0.05$) バーは標準誤差

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Yoshiyuki, Watachi Mayuko, Nemoto Wakana, Goto Tanjuro, Yoshida Yuichi, Yasuba Ken-ichiro, Ohno Sho, Doi Motoaki	4. 巻 40
2. 論文標題 Capsaicinoid biosynthesis in the pericarp of chili pepper fruits is associated with a placental septum-like transcriptome profile and tissue structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00299-021-02750-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yoshiyuki, Mitani Ami, Shimizu Nodoka, Goto Tanjuro, Yoshida Yuichi, Yasuba Ken-ichiro	4. 巻 276
2. 論文標題 Characterization and bulk segregant analysis of a novel seedless mutant tn-1 of chili pepper (<i>Capsicum annuum</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 109729 ~ 109729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scienta.2020.109729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yoshiyuki, Asano Takaya, Kanemitsu Yorika, Goto Tanjuro, Yoshida Yuichi, Yasuba Kenichiro, Misawa Yuki, Nakatani Sachie, Kobata Kenji	4. 巻 100
2. 論文標題 Positional differences of intronic transposons in pAMT affect the pungency level in chili pepper through altered splicing efficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 693 ~ 705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tbj.14462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根本和香那・大野 翔・土井元章・田中義行
2. 発表標題 トウガラシ果皮におけるカプサイシノイド生合成と組織学的特徴の関連
3. 学会等名 令和3年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中義行・根本和香那・大野 翔・土井元章・三澤悠貴・佐野香織・中谷祥恵・古旗賢二
2. 発表標題 トウガラシにおける新規 leaky pAMT アレルの同定とそれが示す機能欠損アレルの段階的な成立過程
3. 学会等名 令和3年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中義行・浅野高弥・金光世利香・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎・三澤悠貴・中谷祥恵・古旗賢二
2. 発表標題 pAMT 遺伝子におけるトランスポゾン挿入位置の違いは、トウガラシの辛味程度に影響を及ぼす
3. 学会等名 令和元年度園芸学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中義行
2. 発表標題 トウガラシの辛味成分カプサイシンおよび類似成分に関する成分育種
3. 学会等名 第15回 京大植物縦横無尽の会 ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中義行・三谷亜実・清水のどか・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎
2. 発表標題 トウガラシにおける少種子突然変異体とその遺伝解析
3. 学会等名 令和2年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根本和香那・野喜亮祐・後藤丹十郎・吉田裕一・安場健一郎・土井元章・田中義行
2. 発表標題 トウガラシの辛味強弱調整のための変異型pAMT遺伝子マーカーを用いた戻し交雑育種
3. 学会等名 令和2年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田瑞季・大野 翔・土井元章・田中義行
2. 発表標題 トウガラシ EMS 突然変異集団から単離された奇形果実変異体の解析
3. 学会等名 令和3年度園芸学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中義行・根本和香那・大野 翔・土井元章
2. 発表標題 低辛味成分カプシノイドの含量増強を目的としたトウガラシ系統の比較解析
3. 学会等名 令和3年度園芸学会秋季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

トウガラシの辛味レベルを変化させる遺伝子変異を発見 - 激辛・中辛・辛くないを作り分ける -
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190719_1.html

日経サイエンス 2022年5月号 特集「辛い!の科学」 p36-43 「ゲノムが語る食の文化史」

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
研究協力者	古旗 賢二 (Kobata Kenji) (70275105)	城西大学・薬学部・教授 (32403)	
研究協力者	大野 翔 (Ohno Sho) (10722001)	京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教 (14301)	

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