

トウガラシの重要形質に関する遺伝育種学的研究

2019 年 3 月 8 日

岩手大学大学院連合農学研究科
生物資源科学専攻 ゲノム工学連合講座
鶴巻 啓一

目次

| | |
|---|--------|
| 序論 | ・・・1 |
| 第1章 新規甘味トウガラシ遺伝資源‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失の遺伝機構の解明 | |
| 緒言 | ・・・10 |
| 材料と方法 | ・・・13 |
| 結果 | ・・・19 |
| 考察 | ・・・25 |
| 図表 | ・・・30 |
| 第2章 トウガラシ <i>chinense</i> 種‘チェイロホワイト’の白色果実変異の遺伝機構の解明 | |
| 緒言 | ・・・49 |
| 材料と方法 | ・・・55 |
| 結果 | ・・・61 |
| 考察 | ・・・67 |
| 図表 | ・・・73 |
| 第3章 トウガラシのカロテノイド生合成経路遺伝子 <i>Psy</i> 、 <i>Ccs</i> の多様性に関する研究 | |
| 緒言 | ・・・81 |
| 材料と方法 | ・・・85 |
| 結果 | ・・・89 |
| 考察 | ・・・95 |
| 図表 | ・・・102 |
| 総合考察 | ・・・111 |

| | |
|------|-----------|
| 摘要 | • • • 113 |
| 謝辭 | • • • 116 |
| 引用文献 | • • • 117 |

序論

トウガラシ（トウガラシ属、*Capsicum* spp.）は、トマトやジャガイモなどと同じ中南米原産のナス科植物である。起源地は現在のペルーからボリビアにかけてのアンデス地域と言われており、約 10,000 年前には野生種が採集されて調味料として利用されていたとされる。また、メキシコ南部のテワカン溪谷の遺跡における残存デンプン粒の分析から、遅くとも約 5000 年前には中南米地域でトウガラシが栽培化されていたようである（Aguilar-Meléndez *et al.* 2009、Perry *et al.* 2007、Pickersgill 2007、Walsh and Hoot 2001）。トウガラシは香辛料の中ではもっとも生産量が多い（岩井・渡辺 2008）。中国やメキシコ、トルコ、インドネシア、アメリカなどトウガラシ生産量の上位 20 か国の合計生産量は 1998 年に約 1670 万トンだったが、2010 年には約 2560 万トンに達するなど、約 10 年で生産量が約 1.5 倍に増加している（FAO 2010、Bosland and Votava 2012）。このように、トウガラシの栽培地域が世界中に広がるきっかけとなったのが、1492 年のコロンブスによる新大陸発見である。コロンブスによってヨーロッパに持ち込まれたトウガラシは、その後わずか 100 年ほどの間にアフリカ、インド、そしてアジアへとその栽培地域を広げ、今日では人類の食生活に欠かすことのできないものになっている。もっとも、コロンブスがトウガラシをヨーロッパに持ち込んだ当初は、香りに乏しく辛味が非常に強い品種ばかりであったためか、主としてその当時希少だったコショウの代わり、あるいは観賞用として利用されたようである（岩井・渡辺 2008）。

トウガラシ属は、現在のところ少なくとも 37 種に分類されている（Bosland and Votava 2012）が、そのうち栽培化されているのは *C. annuum* L.、*C. chinense* Jacq.、*C. frutescens* L.、*C. baccatum* L.、*C. pubescens* Ruiz and Pavon の 5 種である（小枝 2012、Perry *et al.* 2007、Pickersgill 1991、田中ら 2012、Thul *et al.* 2012）。染色体の基本数は一部の野生種を除いて $x=12$ である（Bosland and Votava 2012）。栽培 5 種はそれぞれ独立に栽培化され、*C. annuum* と *C. frutescens* は中米地域、

C. chinense、*C. baccatum*、*C. pubescens* は南米地域で栽培化されたと言われている (Pickersgill 2007)。これら 5 種のうち、商業的に重要なのは *C. annuum*、*C. chinense*、*C. frutescens* の 3 種である。*C. annuum* は 3 種のうちもっとも多く栽培されており、日本でおなじみの‘タカノツメ’や‘シシトウ’、‘ピーマン’や‘パプリカ’と呼ばれる大型で辛味を持たない果実をつける品種など、果実の辛味の有無・程度、色、形、大きさなどが異なる多様な品種がある (Bosland and Votava 2012、岩井・渡辺 2008)。*C. chinense* は、1776 年にオーストリアの植物学者 Kikolaus von Jacquinomist がこの種を中国原産であると誤解して *chinense* と名付けられたと言われる種で、主に熱帯地域で栽培が盛んである。この種の果実には独特の芳香がある他、‘ハバネロ’や‘スコッチボンネット’など極めて強い辛みを有する品種が多い (Bosland and Baral 2007、Canto-Flick *et al.* 2008、Bosland and Votava 2012、Purkayastha *et al.* 2012)。*C. frutescens* はソースの材料として有名な品種‘タバスコ’が属する種で、‘キダチトウガラシ’という和名が付けられている。主にカリブ海地域や東南アジアで栽培されているが、日本でも沖縄で‘島とうがらし’と呼ばれて栽培されているほか、小笠原諸島でも栽培されている (Yamamoto and Nawata 2006、岩井・渡辺 2008、小枝 2012、與那嶺ら 2013)。*C. baccatum* と *C. pubescens* は主にアンデス地域で栽培されており、これらの栽培種は一般にそれぞれ‘アヒ’ (Aji)、『ロコト』 (Rocoto) と呼ばれて栽培・利用されている (Rodríguez-Burruezo *et al.* 2010、Kollmannsberger *et al.* 2011)。

トウガラシにおいて商業的に最も重要な形質の一つが辛味である。トウガラシの辛味は、カプサイシノイドというトウガラシに特有のアルカロイド化合物により引き起こされる (Thresh 1876、小菅・稲垣 1961、1962、太田 1962a、Suzuki *et al.* 1980)。カプサイシノイドは脂溶性で、エタノール、ジエチルエーテル、ベンゼン、クロロホルムに自由に溶ける。香辛料に含まれる辛味成分にはトウガラシのカプサイシノイドの他にもコショウのピペリン類、サンショウのアミド類、

ショウガのジンゲロール類などがあるが、カプサイシノイドは其中最も辛味強い（岩井・渡辺 2008）。カプサイシノイドは芳香族化合物であるバニルアミンと各種脂肪酸がアミド結合を形成している化合物である（岩井・渡辺 2008）。トウガラシ果実に蓄積する主なカプサイシノイドにはカプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシンがあり、品種によって差はあるもののこれら 3 つで果実中のカプサイシノイドの 80~90%を占める（岩井・渡辺 2008）。辛味は甘味、酸味、塩味、苦味、旨味の 5 基本味と異なり、痛覚に温覚が複合したものと考えられており（岩井・渡辺 2008）、カプサイシノイド受容体として単離された TRPV1（transient receptor potential vanilloid super family 1）は、カプサイシノイドに加えて熱や酸によっても活性化されることが明らかになっている（Caterina *et al.* 1997、富永 2006）。トウガラシ果実を食べることで辛味を感じると同時に体温の上昇や発汗を体験するが、これはカプサイシノイドの生理作用の一つであり、カプサイシノイドがエネルギー代謝を亢進させることで生じる現象である（Yoshida *et al.* 1998）。このことから、カプサイシノイドに抗肥満作用があることが明らかになった（Lejeune *et al.* 2003）。また、カプサイシノイドは抗酸化作用（岩井・渡辺 2008）、抗癌作用（Beltran *et al.* 2007）を有することも報告されている。

カプサイシノイドはトウガラシ果実の胎座の表皮細胞で生合成・蓄積することがわかっている（Fujiwake *et al.* 1980a、Suzuki *et al.* 1980、Fujiwake *et al.* 1982b）。代表的なカプサイシノイドであるカプサイシンの生合成経路を図 1.1 に示した。カプサイシン生合成経路は、フェニルアラニンからカフェ酸などを経てバニルアミンが生合成される‘フェニルプロパノイド経路’と、バリンから α -ケトイソ吉草酸を経て 8-メチル-6-ノネノイル CoA が生合成される‘分岐鎖脂肪酸経路’の 2 つの経路から成る。カプサイシンは、これら 2 つの経路の最終産物間のアシル基転移反応による脱水縮合をカプサイシンシンターゼ（CS）が触媒することで

生合成される (Fujiwake *et al.* 1980b、Suzuki *et al.* 1981、Fujiwake *et al.* 1982a、Stewart *et al.* 2005、Lang *et al.* 2006)。フェニルプロパノイド経路のうち、フェニルアラニンからフェルロイル CoA までの経路はほとんどの植物に存在し、フラボノイド、タンニン、リグニン様化合物などの生合成に関与している。しかし、フェルロイル CoA より先のバニリン、バニルルアミンを経由してカプサイシンを生合成する経路はトウガラシ特有の経路である (岩井・渡辺 2008)。

これまでの研究で、カプサイシン生合成に関与する遺伝子のうち、いくつかが単離されている。Curry *et al.* (1999) は、フェニルアラニンからケイ皮酸を生合成している *PAL* (フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)、ケイ皮酸からクマル酸を生合成している *C4H* (ケイ皮酸 4-ヒドロキシラーゼ)、8-メチル-6-ノネノイル CoA の生合成に関わっている *KAS* (β -ケトアシル ACP シンターゼ)、そしてバニリンからバニルルアミンを生合成している *pAMT* (推定アミノトランスフェラーゼ) をディファレンシャルスクリーニング法で単離した。また、Aluru *et al.* (2003) は、同じくディファレンシャルスクリーニング法により、分岐鎖脂肪酸経路で反応を触媒する *ACL* (アシルキャリアタンパク質) と *FAT* (アシル-ACP チオエステラーゼ) を単離した。さらに Kim *et al.* (2001) は、サプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法により、辛味を失った系統では発現していない cDNA クローン‘SB2-66’を単離した。この‘SB2-66’はアシルトランスフェラーゼをコードしているとみられ、

トウガラシの辛味は、‘辛味の程度’と‘辛味の有無’の 2 つの要素に分けることができる。辛味の程度は、栽培環境による影響を受けることが知られている (太田 1962b、田中ら 2012) ほか、カプサイシノイド蓄積量に関わる QTL がいくつかマッピングされている (Blum *et al.* 2003、Ben-Chaim *et al.* 2006)。一方、辛味の有無は、古くから *C* と呼ばれていた遺伝子座による 1 遺伝子支配であり、優性対立遺伝子 *C* を持てば辛味を持ち、劣性対立遺伝子 *c* をホモで持てば辛味が

欠失することが報告されていた (Ramiah and Pillai 1935、Lippert *et al.* 1966)。本論文の第 1 章で詳しく述べるように、*C* 遺伝子座はその実体がカプサイシンシンターゼをコードする遺伝子であることが判明した後、改めて *Pun1* (英語で‘辛味’を意味する‘pungency’に由来すると思われる) と命名された (Stewart *et al.* 2005)。辛味の無い品種の利用は 1500 年代にヨーロッパで始まり (Stewart *et al.* 2005)、1774 年にアメリカで‘ベル’と‘ベルノーズ’という品種が発表されて以降、急速に広まったようである (岩井・渡辺 2008)。

一方、*Pun1* 遺伝子以外で辛味の有無に関与しているもう 1 つの遺伝子として *pAMT* 遺伝子が Lang *et al.* (2009) によって明らかにされた。Lang *et al.* (2009) は、この *pAMT* 遺伝子がカプサイシン生合成経路 (図 1.1) でバニリンからバニリルアミンへの変換反応を触媒しているアミノトランスフェラーゼをコードしていることを明らかにした。

トウガラシの辛味と並ぶ重要な農業および商業形質として果実色がある。トウガラシの果実色を構成する要素にはカロテノイド、アントシアニン、クロロフィルがある。アントシアニンは紫色果実色 (Chaim *et al.* 2003)、クロロフィルはトウガラシの未熟な果実や‘stay green’変異体 (Borovsky and Paran 2008) の果実色を構成する要素であり、カロテノイドはトウガラシの果実色でも完熟した際の赤や黄、オレンジをもたらす要素である。

カロテノイドは 8 個のイソプレレン単位が結合して構成された炭素数 40 のテトラテルペン的一种で、炭化水素であるカロテン類と、分子内にアルコール、ケトン、エポキシなどの酸素を含むキサントフィル類に大別され、現在までに 1000 種類を超えるカロテノイドが自然界から見つかっている (篠村 2018)。カロテノイドは植物や藻類などの光合成生物が生合成し、光合成の補助色素として、あるいは強光障害からの細胞の保護などに利用されている (篠村 2018、矢賀部ら 2013)。また、カロテノイドは植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) とストリゴ

ラクトンの前駆体としても重要である (Auldrige *et al.* 2006、Walter *et al.* 2010)。

動物はカロテノイドを生合成できないが、 β -カロテンなど一部のカロテノイドは食物連鎖によって体内に摂取され、レチナールに変換されてビタミン A として利用される。ヒトにおいてはカロテノイド欠乏が夜盲症を引き起こすことや、網膜にキサントフィル類のゼアキササンチンが集中的に分布していることが知られており、動物体内においても非常に重要な役割を果たしている (三室ら 2006)。

第 2 章でも詳しく述べるが、ほとんどの植物のカロテノイド生合成経路は、メバロン酸経路で生合成されたイソペンテニル二リン酸 (IPP) からフィトエン、リコペンなどを経てルテイン、ビオラキササンチン、ネオキササンチンが生合成される経路である (図 2.1)。トウガラシのカロテノイド生合成経路では、アンテラキササンチンからカプサンチン、ビオラキササンチンからカプソルビンという、いずれも赤色のカロテノイドが生合成される。トウガラシの完熟果実の赤色は果皮へのカプサンチンとカプソルビンの蓄積による。

カロテノイド生合成に関わる遺伝子の突然変異体はいくつかの植物で報告されている。たとえば、トウガラシと同じナス科植物であるトマトは、完熟すると果実の果皮にリコペンを蓄積することで鮮やかな赤色になるが、フィトエン合成酵素遺伝子 (*SIPSY1*) やカロテノイドイソメラーゼ遺伝子 (*SICRTISO*) の変異体は果実と果肉が黄色になることが知られている (Fray and Grierson 1993、Isaacson *et al.* 2002)。トマトではフィトエン合成酵素遺伝子が少なくとも 3 コピーあることがわかっており、それぞれ *SIPSY1* が果実特異的、*SIPSY2* は植物体全体、そして *SIPSY3* は根での非生物学的ストレスへの応答反応としてのカロテノイド生合成に関わっていることがわかっている (Bartley and Scolnik 1993、Fraser *et al.* 1999、Li *et al.* 2008)。また、カリフラワーやメロン、シロイヌナズナでは PSY と相互作用する OR というタンパク質が同定されている (Lu *et al.* 2006、Tzuri *et*

al. 2015、Zhou *et al.* 2015)。この OR は色素体移行シグナル、膜貫通ドメイン、そしてタンパク質間相互作用に関与する DnaJ シス테인リッチドメインを持つタンパク質で、二量体を形成した上で PSY と相互作用することで PSY の活性を高めていることが明らかになっている (Zhou *et al.* 2015)。トウガラシにおいても、*C. annuum* における *Or* のオーソログであるフィブリリン遺伝子 (*Fbn1*) の発現量がカプサンチン量と正の相関があることが報告されている (Kilcrease *et al.* 2015)。

本論文の第 1 章では、ベル型の *pAMT* 変異型甘味品種としては初めて発見された‘カラーピーマンイエロー’の遺伝学的解析を行い、甘味トウガラシ品種の起源とカラーピーマンイエローの育種への応用の可能性を考察した。第 2 章では、白色品種‘チェイロホワイト’を主たる対象として用い、TLC によるカロテノイド組成分析、*Psy*、*Ccs* 遺伝子を含むカロテノイド生合成経路遺伝子のシーケンシングと発現解析、交配実験によって白色果実色変異の遺伝機構の解明を行った。第 3 章では、既知の *Psy*、*Ccs* 遺伝子の変異アレルを識別する DNA マーカーを作成した。この DNA マーカーを使い、*C. chinense* の非赤色果実色の原因遺伝子の種レベルでの遺伝傾向の解明とトウガラシの果実色育種における有用遺伝資源の探索を目的として、*C. chinense* の非赤色果実系統の *Psy*、*Ccs* 両遺伝子の多様性解析を行った。

第 1 章

新規甘味トウガラシ遺伝資源‘カラーピーマン
イエロー’の辛味欠失の遺伝機構の解明

1. 緒言

トウガラシ (*Capsicum* L. spp.) は、中南米原産のナス科植物で、世界中で香辛料や野菜として利用されている。約 30 種に分類されているが、そのうち *C. annuum* L.、*C. chinense* Jacq.、*C. frutescens* L.、*C. baccatum* L.、*C. pubescens* Ruiz and Pavon の 5 種が栽培化されている (Pickersgill 1991、Thul *et al.* 2012)。これらのうち、*C. annuum* がもっとも広く世界中で栽培されており、地域の食文化と結びついた非常に多様な品種がある。*C. annuum* は、丸い果実を上向きにつける‘チェリー’、小さな果実を上向きにつける‘コーン’、比較的長く大きな果実をつける‘ロング’、大きい四角形の果実をつける‘ベル’など、果実のつき方や形態でいくつかの種類に分けられる (金目ら 1989)。日本ではベル型の非辛味 (以下、甘味) トウガラシ品種が‘ピーマン’や‘パプリカ’と呼ばれて野菜として利用されている。

果実の辛味はトウガラシの特徴的な形質の一つである。辛味成分はアルカロイドの一種であるカプサイシノイドで、果実の胎座で生合成され蓄積する (小菅ら 1961、小菅・稲垣 1962、太田 1962、Suzuki *et al.* 1980、Thresh 1876)。カプサイシノイド生合成経路は、フェニルアラニンからバニルルアミンを生合成するフェニルプロパノイド経路と、バリンまたはロイシンからアシル化合物を生合成する分岐鎖脂肪酸経路の 2 つから成る (Aza-González *et al.* 2011、Koeda *et al.* 2015)。カプサイシノイドのうち、果実への蓄積量が多いためカプサイシンの生合成経路を図 1.1 に示した。すなわち、2 つの経路の最終産物がカプサイシン合成酵素 (CS) によって結合してカプサイシンが作られる。トウガラシの辛味は人々を魅了し、香辛料として広く使われる一方で、その辛味ゆえに野菜として利用しにくい面もある。このため、突然変異で生じた甘味トウガラシはその野菜としての有用性から積極的に選抜され、世界中に広がったのかもしれない。

トウガラシの辛味の遺伝機構は、その科学的重要性のみならず農業・商業上

の重要性から長年に渡って研究されてきた。古典遺伝学的研究から、トウガラシの辛味の有無は第2染色体に座する *Pun1* 遺伝子座（以前は *C* 遺伝子座と呼ばれていた）による優性の一遺伝子支配であることがわかっていた（Blum *et al.* 2003、Lippert *et al.* 1966、Ramiah and Pillai 1935、Stewart *et al.* 2005）。分子遺伝学的解析から、*Pun1* 遺伝子がバニルアミンとアシル化合物の間の脱水縮合反応を触媒するアシル基転移酵素をコードしていること、このアシル基転移酵素がカプサイシン合成酵素そのものであることが明らかになった（Kim *et al.* 2001、Lang *et al.* 2006、Lee *et al.* 2005、Ogawa *et al.* 2015、Stewart *et al.* 2005）。*Pun1* 遺伝子の実体の解明は2つの研究グループによって独立に行われた（Lang *et al.* 2006、Stewart *et al.* 2005）が、興味深いことに、両グループでそれぞれ異なる甘味品種が解析されたにもかかわらず、どの甘味品種もプロモーターから第1エクソンにかけての約2.5kbpが欠失した同一の変異型 *Pun1* アリル '*pun1*' を持っていた。その後の Stewart *et al.* (2005) による *Pun1* 遺伝子の多様性解析の結果、*C. annuum* に属する甘味品種のほとんどが *pun1* を持つことがわかっている。これまで見つかっている *pun1* 以外の変異型 *Pun1* アリルはいずれもマイナーな在来品種でのみ見つかっており、メジャーな商業品種であるベル型品種からは見つかっていない（Kirii *et al.* 2017, Stellari *et al.* 2010, Stewart *et al.* 2007）。このような甘味トウガラシ品種の辛味欠失の原因に関する遺伝的多様性の低さは、先に述べたように、辛味が原因で野菜として利用できなかったトウガラシに辛味欠失をもたらす *pun1* 突然変異が好まれ、育種材料として積極的に利用されてきた結果かもしれない。

この10年の間に、*Pun1* 遺伝子とは別の辛味欠失を引き起こす遺伝子として、アミノ基転移酵素をコードする *pAMT* 遺伝子が同定された（Lang *et al.* 2009）。*pAMT* 遺伝子は、カプサイシン生合成経路のフェニルプロパノイド経路でバニリンからバニルアミンへの変換反応を触媒しており（Curry *et al.* 1999、Abraham-

Juárez *et al.* 2008)、*pAMT* 遺伝子が突然変異で機能を失うとカプサイシノイドの前駆体であるバニルアミンが作られなくなり、結果として辛味が欠失する。連鎖解析から、*pAMT* 遺伝子は第 3 染色体上に座しており、*Pun1* 遺伝子とは独立であることがわかっている (Ben-Chaim *et al.* 2006)。最初に見つかった *pAMT* 機能欠損変異体はタイの在来品種 *C. annuum* cv. CH-19 Sweet で、第 16 エキソンにフレームシフト変異を引き起こす 1bp の挿入がある (Lang *et al.* 2009、矢澤ら 1989)。CH-19 Sweet に続いて、日本の在来品種 *C. annuum* cv. Himo でも CH-19 Sweet とは別の変異型 *pAMT* アリルが見つかるなど、*Pun1* 遺伝子とは対照的に *pAMT* 遺伝子には様々な変異型アリルが見つかった (Tanaka *et al.* 2010a, 2018)。現在までに 9 つの変異型 *pAMT* アリルが見つかったが、いずれもマイナーな在来品種でのみ見つかり、特にピーマンやパプリカのような近代品種からは見つからない。もしかすると、*pAMT* 遺伝子の機能欠損変異自体は比較的生じやすいものの、甘味トウガラシ品種の育種過程で急速に広がった *pun1* アリルの存在が、変異型 *pAMT* アリルの育種への利用を妨げてきたのかもしれない。

本章では、ベル型の *pAMT* 変異型甘味品種としては初めて発見された‘カラーピーマンイエロー’の遺伝学的解析を行い、カラーピーマンイエローの育種への応用の可能性を考察した。

2. 材料と方法

植物材料

材料として、表 1.1 に示した *C. annuum* に属する 28 品種を用いた。このうち、‘カラーピーマンイエロー’、‘タカノツメ’、‘ひもとうがらし’を図 1.2 に示した。いずれも市販されているものを種子または苗の状態で購入した。これらのうち、‘タカノツメ’を除く 27 品種はすべて甘味品種である。また、‘ひもとうがらし’は Tanaka *et al.* (2010a) によって変異型 *pAMT* アリル‘*pamt*²’が原因で辛味を失っていることが明らかになっている甘味品種である。これらを山形大学農学部附属農場で栽培した。

DNA 抽出

Murray and Thompson (1980) の CTAB 法で、以下のように DNA を抽出した。新鮮な葉約 100mg を乳鉢に入れ、液体窒素で凍結させて乳棒で粉末状になるまで破砕した。破砕した葉を Tris 2.42g、NaCl 16.36g、EDTA 1.49g、CTAB 8g を滅菌ミリ Q 水で 200mL に定容して作った 4% CTAB バッファー 700μL に加え、65°C で 1 時間保温した。保温中は 15 分おきに転倒混和した。保温後、サンプルを室温に冷ましてからクロロホルムとイソアミルアルコールを 24 : 1 の体積比で混合したものを 600μL 加えた。これを 5 分間転倒混和した後、遠心分離機（トミー精工 MRX-150、以下、同機種を使用）で室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、上清 500μL を取り、そこにイソプロパノールを 500μL 加えて緩やかに転倒混和した。これを一晩、-20°C で静置後、室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、イソプロパノールを除去し、そこに 70%エタノールを 300μL 加えてタッピングし、遠心分離で生じた沈殿をリンスした。これを再び室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離後、70%エタノールを除去し、チューブ

の蓋を開放してエタノールを揮発させた。これに TE バッファー (pH 8.0、1M の Tris-HCl 1mL と pH 8.0、0.5M の EDTA 200 μ L を 100mL に定容したもの) と DNase free Ribonuclease Glycerol Solution (10mg/mL、ニッポンジーン) 0.4 μ L を加え、37°C で 1 時間保温した。抽出された DNA の確認を 1% アガロースゲル電気泳動で行った。また、Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies) の dsDNA BR Assay による濃度測定結果をもとに 20ng/ μ L の希釈液を調製し、以後の実験に使った。

Pun1 遺伝子のアリル特異的 PCR

本研究で使用したプライマーを表 1.2 に示した。*Pun1* 遺伝子のアリル特異的 PCR は、正常型アリル特異的な U16F プライマーと Wyatt *et al.* (2012) が設計した *pun1* アリル特異的な pun1-1fwd2 プライマーに共通の Reverse プライマー D14R を組み合わせたマルチプレックス PCR で行った。*Pun1* アリルを持てば 1,579bp、*pun1* アリルを持てば 1,055bp の増幅が得られる。PCR 反応液は、0.1 μ L の Ex Taq DNA ポリメラーゼ (5U/ μ L、タカラバイオ)、1.6 μ L の dNTP mixture (2.5mM)、2 μ L の 10x Ex Taq Buffer、各 0.5 μ L の Forward プライマー (各 10 μ M)、1 μ L の Reverse プライマー (10 μ M)、2 μ L の鋳型 DNA (20ng/ μ L) を混合して滅菌ミリ Q 水で全量 20 μ L にメスアップした。PCR 条件は、94°C、1 分間の初期変性の後、94°C、30 秒間の熱変性、60°C、30 秒間のアニーリング、72°C、2 分間の伸長反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C、7 分間の最終伸長をするというプログラムとした。

カプサイシン生合成経路遺伝子のシーケンシング

‘タカノツメ’と‘カラーピーマンイエロー’について、カプサイシン生合成経路で化学反応を触媒している *Pun1*、*pAMT*、*PAL*、*C4H*、*4CL*、*HCT*、*C3H*、*CCoAOMT*、*COMT2*、*BCAT*、*BCKDH*、*KAS*、*ACL*、*FAT*、*ACS* の 15 遺伝子の塩基配列を決定

した。鋳型増幅とシーケンシングで使ったプライマーを表 1.2 に示した。

Pun1 遺伝子ではプロモーター領域から 3'UTR にかけての約 3kbp を、*pAMT* 遺伝子では 5'UTR から 3'UTR にかけての約 11kbp を PCR 増幅した。*Pun1* 遺伝子については、PCR 反応液は、0.25 μ L の Ex TaqDNA ポリメラーゼ (5U/ μ L、タカラバイオ)、5 μ L の 10x Ex Taq Buffer、4 μ L の dNTP mixture (2.5mM)、それぞれ 10 μ M の F1148 プライマーと D1R プライマーを 2.5 μ L ずつ、20ng/ μ L の DNA 希釈液 3 μ L を滅菌ミリ Q 水で 50 μ L に定容して作り、PCR 条件を 94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、3 分の伸長を 30 サイクル行い、最後に 72°C、10 分の最終伸長を行うプログラムとした。*Pun1* 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列はシス配列データベース 'PLACE' (Higo *et al.* 1999、<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en>) で解析した。*pAMT* 遺伝子のシーケンシングに使った鋳型は、F1 プライマーから 7th-intron-R プライマーの間 (領域 1)、F443 プライマーから R788 プライマーの間 (領域 2)、F747 プライマーから R1313 プライマーの間 (領域 3)、14th-intron-F プライマーから R1616 プライマーの間 (領域 4) の 4 つに分けて PCR 増幅した。領域 1 と 3 については、PCR 反応液を 5U/ μ L の LA Taq DNA ポリメラーゼ 0.25 μ L、5 μ L の 10x LA PCR Buffer II、8 μ L の dNTP mixture (2.5mM)、5 μ L の MgCl₂ mixture (25mM)、それぞれ 10 μ M の Forward プライマーと Reverse プライマー 2.5 μ L ずつ、20ng/ μ L の DNA 希釈液 3 μ L を滅菌ミリ Q 水で 50 μ L に定容して作り、PCR 条件を Tanaka *et al.* (2010b) に従い、94°C、2 分の初期変性の後、98°C、10 秒の変性、55°C、30 秒のアニーリング、68°C、15 分の伸長を 35 サイクル行い、最後に 68°C、15 分の最終伸長を行うプログラムとした。領域 2 と 4 については、PCR 反応液の組成と PCR 条件を *Pun1* 遺伝子の鋳型増幅と同じとした。

Pun1、*pAMT* 以外のカプサイシン生合成経路遺伝子、*PAL*、*C4H*、*4CL*、*HCT*、*C3H*、*CCoAOMT*、*COMT2*、*BCAT*、*BCKDH*、*KAS*、*ACL*、*FAT*、*ACS* の 13 遺伝

子では、cDNA の ORF の塩基配列を決定した。PCR 反応液は、0.25 μ L の Ex Taq DNA ポリメラーゼ (5U/ μ L、タカラバイオ)、5 μ L の 10x Ex Taq Buffer、4 μ L の dNTP mixture (2.5mM)、それぞれ 10 μ M の Forward プライマーと Reverse プライマーを 2.5 μ L ずつ、20ng/ μ L の DNA 希釈液 3 μ L を滅菌ミリ Q 水で 50 μ L に定容して作った。PCR 条件は、*PAL*、*C4H*、*4CL*、*C3H*、*CCoAOMT*、*BCKDH*、*ACL*、*FAT*、*ACS* は 94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、2 分 30 秒の伸長を 35 サイクル行い、最後に 72°C、2 分 30 秒の最終伸長を行うプログラムとした。*HCT* と *COMT2* の PCR 条件は、94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、55°C、30 秒のアニーリング、72°C、2 分の伸長を 35 サイクル行い、最後に 72°C、2 分の最終伸長を行うプログラム、*BCAT* と *KAS* の PCR 条件は、94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、57°C、30 秒のアニーリング、72°C、2 分の伸長を 35 サイクル行い、最後に 72°C、2 分の最終伸長を行うプログラムとした。得られた PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動で確認後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) のプロトコールに従って精製した。塩基配列の決定にはユーロフィンジェノミクス社の DNA シーケンスサービスを利用した。

果実の辛味の有無と *Pun1*、*pAMT* 遺伝子型の連鎖解析

‘カラーピーマンイエロー’を母本、‘タカノツメ’を父本とした交配を行い、F₁ 10 個体と F₂ 93 個体を得た。F₁ と F₂ の各個体の辛味の有無は、個体ごとに 1～12 個の果実を食べて判定し、1 つでも辛味果実がある個体は辛味個体とした。各個体の *Pun1* 遺伝子型はプロモーター領域のシーケンシングで決定した。また、*pAMT* 遺伝子型の判別には本研究で作成した DNA マーカーを使用した(図 1.5a、表 1.2)。この DNA マーカーは、Forward プライマーの 3'末端を正常型と変異型それぞれの特異的 SNP 部位とし、共通の Reverse プライマーで PCR したときの

343bp の増幅産物の有無で遺伝子型を判別するものである。各 Forward プライマーはアニーリングの特異性を高めるため、3'末端から 2bp 上流を本来 T であるところ C に置換してある (図 1.5a)。 *pAMT* 遺伝子の DNA マーカーの PCR 反応液は、0.4μL の Tks Gflex DNA ポリメラーゼ (1.5U/μL、タカラバイオ)、10μL の 2x Gflex PCR Buffer、それぞれ 10μM の Forward プライマーと Reverse プライマーを 1μL ずつ、20ng/μL の DNA 希釈液 2μL を滅菌ミリ Q 水で 20μL に定容して作り、PCR 条件を 94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、67°C、15 秒のアニーリング、72°C、30 秒の伸長を 30 サイクル行い、最後に 72°C、30 秒の最終伸長を行うプログラムとした。

カプサイシン生合成経路遺伝子の発現解析

RNA を‘カラーピーマンイエロー’と‘タカノツメ’の開花後日数 20 日と 30 日 (以下、20DAF と 30DAF) の果実 3 つずつの胎座から、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) のプロトコールに従って抽出した。以前の研究で、カプサイシン生合成経路遺伝子の発現量は 20DAF から 30DAF にかけて最大となるとされている (Stewart *et al.* 2005) ため、20DAF と 30DAF の果実を抽出に用いた。抽出には RLT バッファーを使用し、途中でオプショナルキットの RNase-Free DNase Set (キアゲン) を用い DNA を分解した。抽出した RNA は Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies) の RNA BR Assay で濃度を測定し、125ng/μL に希釈した。cDNA は PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) のプロトコールに従って合成した。

半定量 RT-PCR は、*Pun1*、*pAMT*、*PAL*、*C4H*、*4CL*、*HCT*、*C3H*、*CCoAOMT*、*COMT2*、*BCAT*、*BCKDH*、*KAS*、*ACL*、*FAT*、*ACS* の 15 遺伝子で行った。PCR 反応液は、0.1μL の Ex Taq DNA ポリメラーゼ (5U/μL、タカラバイオ)、2μL の 10x Ex Taq Buffer、1.6μL の dNTP mixture (2.5mM)、それぞれ 10μM の Forward プラ

イマーと Reverse プライマー 1 μ L ずつ、cDNA 溶液 2 μ L を滅菌ミリ Q 水で 20 μ L に定容して作り、PCR 条件は、94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、30 秒の伸長のサイクル反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C、30 秒の最終伸長を行うプログラムとした。ポジティブコントロールとしてハウスキーピング遺伝子のユビキチン結合酵素 E2 を Ubiquitin-F プライマーと Ubiquitin-R プライマーで増幅した。PCR 条件は、94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、30 秒の伸長のサイクル反応を 25 サイクル行い、最後に 72°C、30 秒の最終伸長を行うプログラムとした。

リアルタイム RT-PCR は、TP850 Thermal Cycler Dice Real Time System Single (タカラバイオ) を用い、*Pun1* 遺伝子と *pAMT* 遺伝子で行った。*Pun1* 遺伝子については ex2_F1600 プライマーと D14R プライマーを、*pAMT* 遺伝子については ex17_F10721 プライマーと R10853 プライマーをそれぞれ使い、ノーマライザーとしてユビキチン結合酵素 E2 を Ubiquitin-F と Ubiquitin-R で増幅した。PCR 反応液は、12.5 μ L の SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus、タカラバイオ)、それぞれ 10 μ M の Forward プライマーと Reverse プライマー 1 μ L ずつ、cDNA 溶液 2 μ L 混合して作り、PCR 条件は、95°C、30 秒の後、95°C、5 分、60°C の反応を 40 回、60°C、30 秒、95°C、15 秒の反応を 2 回行うプログラムとした。

C. annuum の甘味品種の *pAMT* 遺伝子のジェノタイピング

pAMT の DNA マーカー (図 1.5a、表 1.2) を使い、*C. annuum* の甘味品種 25 品種の *pAMT* の遺伝子型を判定した。PCR 溶液の組成と PCR 条件は連鎖解析と同じとした。

3. 結果

Pun1 遺伝子のアレル特異的 PCR

C. annuum 27 品種の *Pun1* 遺伝子のアレル分析の結果を図 1.3 に示した。‘タカノツメ’と‘カラーピーマンイエロー’を除く 25 品種では、*pun1* 特異的な 1,055bp の増幅産物が得られ、‘タカノツメ’と‘カラーピーマンイエロー’では正常型 *Pun1* 特異的な 1,602bp の増幅産物が得られた。‘タカノツメ’は機能的に正常な *Pun1* 遺伝子を持つ辛味品種であるため、これは期待通りの結果であった。一方で、‘カラーピーマンイエロー’は、見た目は *pun1* アレルを持つ普通のベル型の甘味品種と変わらないにもかかわらず、*pun1* を持たないという予想外の結果になった。この結果から、‘カラーピーマンイエロー’が *pun1* アレル以外の変異型 *Pun1* アレルを持つ可能性、または *Pun1* 遺伝子以外のカプサイシン生合成に関わる遺伝子に変異を持つ可能性が示唆された。

Pun1 遺伝子のシーケンシング

Pun1 遺伝子のプロモーター領域から 3'非翻訳領域にかけて、‘タカノツメ’と‘カラーピーマンイエロー’でそれぞれ 2,939bp と 2,996bp の塩基配列を決定した。開始コドンから 3'非翻訳領域の塩基配列は両品種で同一だったが、開始コドンの上流 875bp に 1 塩基欠失、665bp 上流に 1 塩基置換があった。シス配列データベース PLACE による解析の結果、この 2 か所の変異箇所はデータベース上のシス配列には該当しなかった。これらの結果から、‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失が *Pun1* 遺伝子の変異によるものではないことが強く示唆された。

Pun1 遺伝子と F₂ 表現型の独立性検定

‘カラーピーマンイエロー’を母本、‘タカノツメ’を父本とした F₂ 集団の各個体

の辛味の有無と、*Pun1* 遺伝子の遺伝子型が独立かどうかを調べた。*Pun1* 遺伝子の遺伝子型は開始コドンの上流 875bp の 1 塩基欠失の有無をシーケンシングで調べることで決定した。

F₁ 10 個体はすべて辛味個体だった。また、F₂ 93 個体のうち、辛味は 70 個体、甘味は 23 個体で、カイ二乗検定の結果、辛味：甘味=3：1 の期待比とよく一致していた（表 1.5）（ $p=0.952$ ）。これらの結果は、‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失は劣性の一遺伝子支配の形質であることを示唆している。

F₂ の *Pun1* 遺伝子の遺伝子型ごとの辛味と甘味の個体数も辛味と *Pun1* 遺伝子が独立である場合の期待値とよく一致しており、遺伝子型による表現型の偏りは見られなかった（表 1.6）（ $p=0.985$ ）。これらの結果から、‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失の原因が *Pun1* 遺伝子ではないことが示唆された。

pAMT 遺伝子のシーケンシング

‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失の原因が *Pun1* 遺伝子ではないことが示されたため、辛味欠失をもたらすことが知られているもう一つの遺伝子、*pAMT* 遺伝子の塩基配列を決定した。‘カラーピーマンイエロー’と‘タカノツメ’の ORF 1,380bp と 16 個のイントロンのスプライシングジャンクションの塩基配列を決定した。その結果、ORF に 7 か所の塩基置換があり、そのうち 3 か所が同義置換、4 か所が非同義置換だった（表 1.3）。4 か所の非同義置換のうち、第 11 エキソン 99bp 目の塩基置換は終止コドンを生じるナンセンス変異で、この塩基置換によって *pAMT* の全アミノ酸配列のおよそ 40%に相当する領域が‘カラーピーマンイエロー’で欠損していた（図 1.4a、1.4b）。また、この塩基置換は *pAMT* のアミノ基転移酵素活性にとって重要とされている pyridoxal 5-phosphate (PLP) 結合ドメインに位置していた（図 1.4b）。スプライシングジャンクションの GT-AG モチーフはすべてのイントロンで保持されていた。これらの結果は、‘カラーピー

マンイエロー’の辛味欠失が *pAMT* 遺伝子第 11 エキシソンのナンセンス変異が原因であることを示唆している。この‘カラーピーマンイエロー’で見つかったナンセンス変異はこれまでに報告がない新規のものだったため、既報の *pamt*^l~*pamt*⁹ (Tanaka *et al.* 2018) に続く 10 番目の変異型 *pAMT* アリルということで *pamt*¹⁰ と名付けるとともに、*pamt*¹⁰ 特異的な DNA マーカーを作成した(図 1.5a、1.5b)。本研究で決定した *Pun1* 遺伝子と *pAMT* 遺伝子の塩基配列は LC423554~LC423557 として DDBJ に登録した。

pAMT 遺伝子と F₂ 表現型の独立性検定

‘カラーピーマンイエロー’を母本、‘タカノツメ’を父本とした F₂ 集団の各個体の辛味の有無と、*pAMT* 遺伝子の遺伝子型が独立かどうかを調べた。*pAMT* 遺伝子の遺伝子型は、*pamt*¹⁰ 特異的 DNA マーカーで決定した。

F₂ における *pAMT* 遺伝子の遺伝子型は、タカノツメ型ホモ(TT):ヘテロ(TY):カラーピーマンイエロー型ホモ(YY) = 22 : 50 : 21 と概ね 1 : 2 : 1 に分かれ、ほぼ遺伝子型で表現型が決まっていた(表 1.6)。すなわち、TT 型ホモ 22 個体はすべて辛味、ヘテロ 50 個体中 47 個体が辛味、YY 型 21 個体中 20 個体が甘味だった。ただし、ヘテロ 3 個体が甘味に、YY 型 1 個体が辛味というように 4 個体の例外があり、*pAMT* 遺伝子型と辛味の有無が数字上は完全連鎖ではなく、*pAMT* 遺伝子座に密接に連鎖した遺伝子に生じた突然変異が‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失の直接の原因である可能性も考えられた。しかし、これら例外個体が生じた原因として、甘味となったヘテロ 3 個体については‘シシトウ’などで報告(松島 2015)されているような個体内での辛味発現の不安定さによるもの、辛味となった YY 型 1 個体については既知の *pAMT* 変異体で報告されている甘味品種におけるカプサイシノイドの微量な蓄積 (Lang *et al.* 2009) によるものではないかと考えられる。本章の研究では、果実の辛味の判定を各個体 1~12 個の

果実の食味試験によって行い、一つでも辛味果実があった個体は辛味個体とした。しかし、同一の辛味個体で生じる果実に辛味の程度はもちろん、辛味の有無さえも異なる果実があり、辛味と判定した F₂ 個体 70 個体の半数以上にあたる 40 個体で辛味果実と甘味果実が混在していた。このような個体の中には、ほとんどの果実が辛くなかったが 1 つだけ辛味果実が出たために辛味とした個体もあった。このようなことがあるため、*pAMT* 遺伝子型がヘテロでありながら調べた果実がすべて甘味という個体が確率的には十分生じうる。このような同一個体内で辛味の発現が不安定な品種として代表的なものが、正常な *Pun1* 遺伝子と *pAMT* 遺伝子を持つにもかかわらず、同一個体内に辛味果実と甘味果実が混在する‘シシトウ’や‘万願寺’のような品種である（土井ら 2013、松島 2015）。辛味となった *pamt*^{l0} ホモ 1 個体については、この個体内で生じた辛味果実は 9 果実中 1 果実のみで、その辛味も弱いものだった。Lang *et al.* (2009) は *pAMT* 変異体が微量のカプサイシノイドを蓄積することを述べており、辛味となった *pamt*^{l0} ホモ 1 個体でも同様の現象が起こったと考えられた。よって、*pAMT* 遺伝子型と F₂ 表現型は事実上、完全連鎖であると言える。

次に、‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失の原因が *pAMT* 遺伝子エキソン 11 のナンセンス変異であるという結論を完全なものとするため、‘カラーピーマンイエロー’を母本、‘ひもとうがらし’を父本とした F₁ 個体の辛味の有無の判定による相補性検定を行った。‘ひもとうがらし’は *pAMT* 遺伝子の変異型アリル *pamt*² によって辛味を失っている品種（Tanaka *et al.* 2010a）であり、もし‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失が *pamt*^{l0} のナンセンス変異が原因であれば F₁ 個体は甘味に、そうでなければ F₁ 個体は相補によって辛味になるはずである。結果、F₁ 10 個体はすべて辛味だった（表 1.5）。

以上の結果から、‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失は *pAMT* 第 11 エキシンのナンセンス変異が原因であることが明らかになった。

Pun1、*pAMT* 以外のカプサイシン生合成経路遺伝子のシーケンシング

Pun1 遺伝子と *pAMT* 遺伝子以外のカプサイシン生合成経路色遺伝子の‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失との関係を確認するため、11 遺伝子で cDNA ORF の塩基配列のシーケンシングを行い、*PAL* で 2154bp、*C4H* で 1518bp、*4CL* で 1628bp、*HCT* で 1308bp、*C3H* で 1536bp、*CCoAOMT* で 744bp、*COMT2* で 1080bp、*BCAT* で 1209bp、*BCKDH* で 1086bp、*KAS* で 1467bp、*ACL* で 399bp、*FAT* で 1116bp、*ACS* で 1572bp をそれぞれ決定した（表 1.4）。*PAL*、*C4H*、*4CL*、*HCT*、*CCoAOMT*、*BCAT*、*KAS*、*ACL*、*FAT* の 9 遺伝子は‘カラーピーマンイエロー’と‘タカノツメ’で塩基配列が同一だった。残りの 4 つの遺伝子のうち、*C3H* には 2 か所の同義置換と 1 か所の非同義置換、*COMT2* には 1 か所の非同義置換、*BCKDH* には 1 か所の同義置換、*ACS* には 3 か所の同義置換と 7 か所の非同義置換があった。このうち、*C3H* の 1 か所、*COMT2* の 1 か所、および *ACS* の 3 か所の非同義置換はデータベース上の辛味品種にもあるものだった（表 1.4）。

カプサイシン生合成経路遺伝子の発現解析

‘カラーピーマンイエロー’と‘タカノツメ’のカプサイシン生合成経路遺伝子の発現に差があるかどうかを知るために、20DAF と 30DAF の果実の胎座 cDNA を使い、*Pun1*、*pAMT*、*PAL*、*C4H*、*4CL*、*HCT*、*C3H*、*CCoAOMT*、*COMT2*、*BCAT*、*BCKDH*、*KAS*、*ACL*、*FAT*、*ACS* の 15 遺伝子について半定量 RT-PCR を行った。また、*Pun1* 遺伝子と *pAMT* 遺伝子についてはリアルタイム RT-PCR も行った。

半定量 RT-PCR の結果、*pAMT* を除く 14 遺伝子は‘カラーピーマンイエロー’の 20DAF と 30DAF で発現していた（図 1.6a）。*pAMT* はいずれのステージでも、‘カラーピーマンイエロー’で発現が見られなかった。また、*C4H* は‘カラーピーマンイエロー’で顕著な発現量の低下が見られた他、*PAL*、*BCAT*、*KAS* でもわずか

ながら‘カラーピーマンイエロー’で発現量の低下が見られた（図 1.6a）。

リアルタイム RT-PCR の結果、RT-PCR の電気泳動で発現が確認できなかった‘カラーピーマンイエロー’の *pAMT* 発現量は、20DAF において‘タカノツメ’の 500 分の 1 以下に、30DAF でも 20 分の 1 以下にそれぞれ低下していた（図 1.6b）。また、RT-PCR の電気泳動レベルでは発現量の差が確認されなかった *Pun1* 遺伝子の発現量も‘カラーピーマンイエロー’の 20DAF が‘タカノツメ’のそれと比べて 10 分の 1 以下に低下していた（図 1.6b）。

C. annuum 甘味品種の *pAMT* 遺伝子のジェノタイプング

C. annuum の甘味 25 品種について、*pamt*¹⁰ を持つかどうかを調べるために *pamt*¹⁰ 特異的 DNA マーカーを使って遺伝子型判別を行った。その結果、25 品種中 24 品種は *pamt*¹⁰ を持たなかったが、唯一‘イエローパプリカ’のみが *pamt*¹⁰ をヘテロで持っていた（図 1.7）。

4. 考察

本研究では、甘味品種‘カラーピーマンイエロー’が新規の変異型 *pAMT* アリル *pamt*¹⁰ によって辛味を失っていることを明らかにした。‘カラーピーマンイエロー’は市販のベル型甘味品種である。ベル型の甘味トウガラシ品種は世界中で野菜として栽培・利用されているにもかかわらず、その辛味欠失は *pun1* というたった 1 種類の劣性対立遺伝子によってもたらされていると考えられてきた。他方、*pAMT* 遺伝子に目を向けると、以前の研究で見つかった変異型 *pAMT* アリルはマイナーな在来品種から見つかったのみで、ベル型甘味品種では見つかっていなかった (Tanaka *et al.* 2018)。これはおそらく、緒言にも書いたように、辛味がある故に野菜として利用できなかったトウガラシに辛味の欠失をもたらした *pun1* 突然変異が育種材料として積極的に利用されて急速に広がったためと考えられる。これについては、Stewart *et al.* (2005) も *pun1* アリルを持つ単一の甘味品種を起源として多くのベル型甘味品種が育種によって派生し、その結果として辛味をもたらす遺伝的要因が *pun1* アリルで席卷されるに至ったことを述べている。本章の研究により、*pAMT* 変異体として‘カラーピーマンイエロー’が見つかったことは、以上のような‘ベル型甘味品種の常識’を覆す発見であり、*pAMT* 変異体が人知れず甘味品種の育種で使われてきたことを示唆している。よって、‘カラーピーマンイエロー’のような *pAMT* 変異型のベル型甘味品種はこれまで調べられて来なかっただけで、他にも存在する可能性がある。また、本章で行った *pamt*¹⁰ 特異的 DNA マーカーによる甘味品種のジェノタイピングでは、‘イエローパプリカ’という品種が *pamt*¹⁰ をヘテロで持つことが明らかになった (図 1.7)。 *Pun1* 遺伝子のアリル分析で判明したように、‘イエローパプリカ’は *pun1* アリルをホモに持つ甘味品種であり (図 1.3)、他の *pun1* アリルを持つ品種の中に *pAMT* 変異型アリルを持つものが今後も見つかる可能性がある。

独立性検定と相補性検定によって、‘カラーピーマンイエロー’の辛味欠失の原因が *pAMT* 遺伝子第 11 エキソンのナンセンス変異、すなわち *pamt*^{l0} であることが確かめられた（表 1.5、1.6）。さらに、‘カラーピーマンイエロー’の *pAMT* 遺伝子の発現量が‘タカノツメ’と比較して 20DAF で 500 分の 1 以下、30DAF で 20 分の 1 以下と、いずれのステージでも劇的に低下していることが判明した（図 1.-6）。Tanaka *et al.* (2018) は、*pAMT* 変異型甘味系統で *pAMT* 発現量が有意に減少していることを報告し、その原因としてナンセンス変異が生じた mRNA を迅速に分解して細胞への悪影響を防ぐ‘nonsense-mediated mRNA decay’（NMD）と呼ばれる機構（Conti and Izaurralde 2005）を挙げている。*pamt*^{l0} を持つ‘カラーピーマンイエロー’における *pAMT* 発現量の劇的な低下も、この NMD によるものかもしれない。なお、本論文では記述しなかったが、5'UTR のシーケンス解析では、‘タカノツメ’との比較で‘カラーピーマンイエロー’に 21 か所の塩基置換が見ついている。これらが発現に関わる重要な部位の変異であるという証拠はないが、これらのプロモーター領域の変異が *pAMT* の発現量の低下につながった可能性もある。また、‘カラーピーマンイエロー’の *Pun1* 遺伝子の発現量も 20DAF で‘タカノツメ’の 10 分の 1 以下に低下していた。さらに、半定量 RT-PCR では、‘カラーピーマンイエロー’で *C4H*、*PAL*、*BCAT*、*KAS* の発現量も低下していることが示された（図 1.6）。‘カラーピーマンイエロー’の *Pun1* 遺伝子のコード領域は‘タカノツメ’と同一の塩基配列だった上、プロモーター領域に遺伝子発現に影響する塩基置換が見つからなかったことから、この *Pun1* など *pAMT* 以外の遺伝子の発現量の低下は、*pAMT* 遺伝子と他のカプサイシノイド生合成経路遺伝子の間にある未知の相互作用の存在を示唆しているのかもしれない。

‘カラーピーマンイエロー’はナンセンス変異を生じる新規変異型 *pAMT* アリル *pamt*^{l0} によって辛味を失っているが、一方で‘タカノツメ’との F₂ 集団では *pamt*^{l0} をホモに持つ個体で弱いながらも辛味を持つ果実を生じた。これと似た現

象として、既知の *pAMT* 変異系統が微量のカプサイシノイドを蓄積することが報告されている (Lang *et al.* 2009、Park *et al.* 2015、Tanaka *et al.* 2010a, 2015)。これらのことから、*pAMT* が機能を欠損してもカプサイシノイドの完全な欠失には至らないことがわかる。これはおそらく *pAMT* の機能欠損を補完する別の遺伝子の存在、あるいは本来 *pAMT* が触媒するバニリンからバニリンへの変換反応が酵素による触媒を経ずとも自発的に緩やかに進行する反応である可能性を示唆している。これらのことにもかかわらず、‘カラーピーマンイエロー’は辛味果実を生じない、安定した甘味を示す商業品種である。同じ *pAMT* 変異体でこのように甘味の安定性に差が生じる原因として遺伝的背景の違いが考えられる。辛味の有無に影響を与えるメジャーな遺伝子として *Pun1* 遺伝子と *pAMT* 遺伝子がある一方で、辛味の程度や安定性に影響する QTL がいくつか知られている (Ben-Chaim *et al.* 2006、Blum *et al.* 2003、Stewart *et al.* 2005) 他、果実のカプサイシン量に影響を与えている転写因子も単離されている (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo 2017、Keyhaninejad *et al.* 2014)。つまり、‘カラーピーマンイエロー’はそのような辛味の程度、言い換えればカプサイシノイドの蓄積量に正の効果を持つ因子に変異が蓄積して機能が欠損している‘甘味の遺伝背景’を持つため、辛味果実を生じない商業品種として成立していると考えられる。半定量 RT-PCR の結果、分岐差脂肪酸経路の *BCAT* と *KAS* の発現量が‘カラーピーマンイエロー’で低下していることが示された。さらに、同じ分岐差脂肪酸経路の *ACS* についても‘カラーピーマンイエロー’で 7 か所の非同義置換が見つかった。そのうちの 4 か所はデータベース上の辛味品種でも見られない塩基置換だった。特に開始コドンから 544bp の塩基は *ACS* の活性にとって重要だと考えられている‘putative AMP-binding domain’の一部である (Lee *et al.* 2001) が、‘タカノツメ’で G であるのに対し、‘カラーピーマンイエロー’では T に置換しており、この塩基置換によって非極性アミノ酸のアラニンが‘カラーピーマンイエロー’では極性

アミノ酸であるセリンに置換していた。また、開始コドンから 911bp の塩基が‘タカノツメ’では C であるのに対し‘カラーピーマンイエロー’では G に置換し、アミノ酸が非極性アミノ酸のアラニンから極性アミノ酸のグリシンに置換していた。これらの分岐差脂肪酸経路遺伝子の発現量低下やコード領域の非同義置換が、‘カラーピーマンイエロー’が安定した甘味品種として成立している要因の一つかもしれない。

以上のことを踏まえて、本章の研究で見つかった新規 *pAMT* 変異品種‘カラーピーマンイエロー’の起源の仮説を提示する（図 1.8）。最初に *pun1* アリルが辛味系統で生じて初期の甘味系統が生まれたが、これは遺伝的背景が辛味だったと考えられる。この甘味系統から育種によって様々な甘味品種が派生する過程で、生存性に影響しない中立的な遺伝子群であるカプサイシノイドの蓄積量や辛味の安定性に正の効果を持つ遺伝子群（辛味の遺伝背景）に突然変異が蓄積し、徐々に‘甘味の遺伝背景’に置き換わったと考えられる。このように甘味の遺伝背景で安定化した *pun1* 甘味品種であるとき、偶然 *pAMT* に突然変異が起こって *pamt*¹⁰ アリルが生じ、*pun1* と *pamt*¹⁰ をいずれもホモに持つ 2 重変異体が生じた。この 2 重変異体が耐病性の付与など育種上の必要性から辛味品種と交雑し、その後代から偶然 *Pun1* 遺伝子座が *pun1* アリルから *Pun1* アリルに置き換わりながらも *pamt*¹⁰ と甘味の遺伝背景を保持した甘味品種として意図せず選抜されたのが‘カラーピーマンイエロー’で、これが‘カラーピーマンイエロー’の起源であると考えた。もちろん、これは考えられる様々なシナリオの一つである。同じ種であれば容易に交雑するため、*pamt*¹⁰ がベル型ではない *C. annuum* 品種で生じ、これがベル型品種に偶然導入された可能性や、*C. chinense* など *C. annuum* と比較的近縁で種間交雑可能な種で生じた *pamt*¹⁰ がベル型品種に導入された可能性も考えられる。

以前の研究で述べられているように、*pAMT* 変異型甘味トウガラシはカプサ

イシノイド類縁物質である‘カプシノイド’を蓄積する (Koeda *et al.* 2014、Lang *et al.* 2009、Park *et al.* 2015、Tanaka *et al.* 2010a, b, 2015, 2018)。カプシノイドは辛味の程度がカプサイシノイドの約 1000 分の 1 であるにもかかわらず、代謝亢進作用などカプサイシノイドと同様の生理作用を持つ (Ohnuki *et al.* 2001)。辛味の弱さと優れた生理活性から、カプシノイドは味の素(株)のサプリメント「カプシ EX」と「アミノバイタル カプシ」の主成分として商品化されている。これらはいずれも加齢や活動量の現象により低下した基礎代謝をカプシノイドの代謝亢進作用によって補うものである。*pAMT* 変異体である‘カラーピーマンイエロー’もカプシノイドを蓄積している可能性が高く、‘カラーピーマンイエロー’自体が健康野菜としての可能性を秘めている。

本章の研究の結果、ベル型甘味品種としては初となる *pAMT* 変異体‘カラーピーマンイエロー’を発見した。この発見は甘味トウガラシ品種の遺伝的多様性の拡大に寄与するものである。また、本章で開発した *pamt*¹⁰ 特異的 DNA マーカーは *pamt*¹⁰ アリルを甘味トウガラシ育種に利用する際の有用なツールとなるだろう。

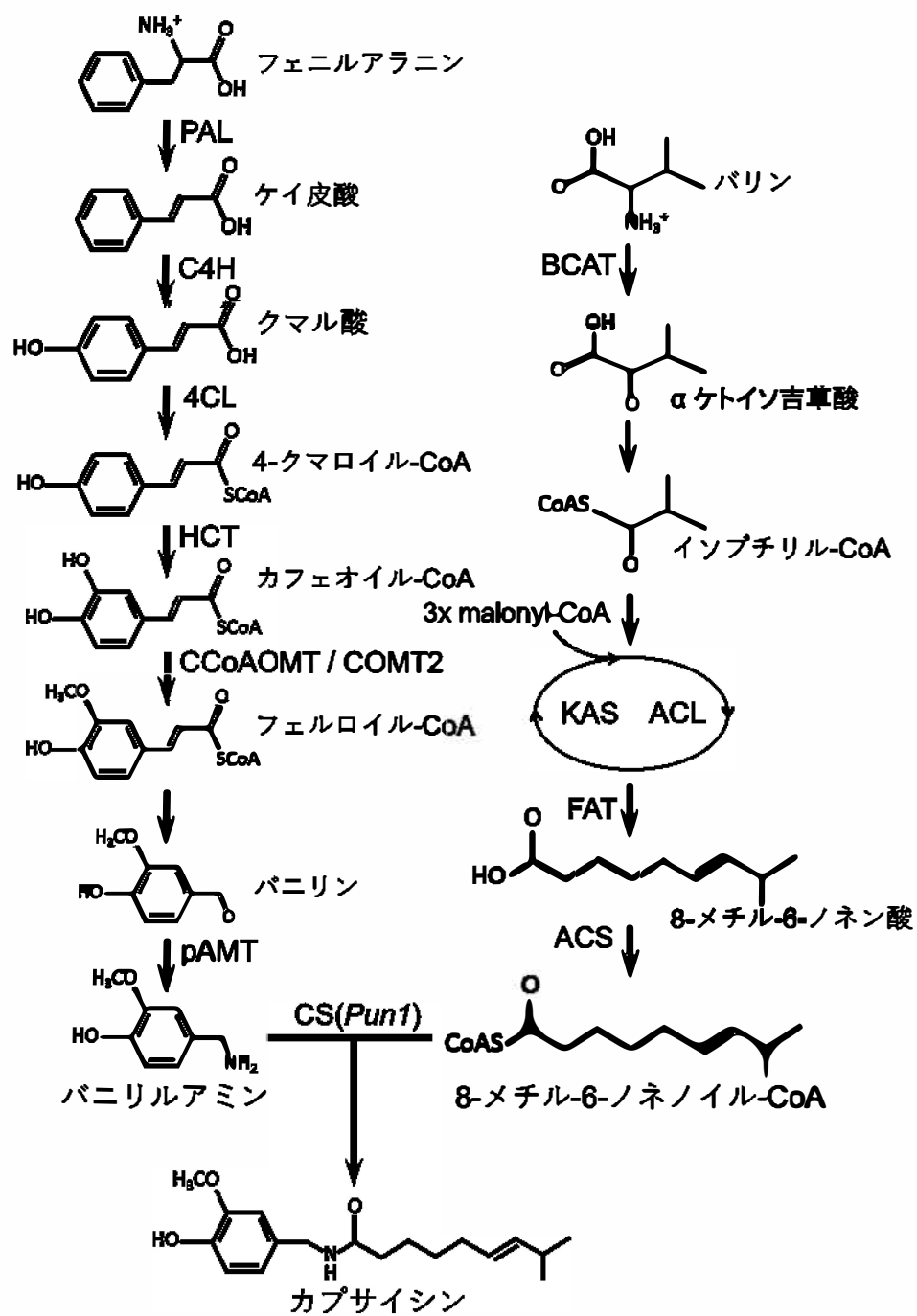


図1.1. カプサイシン生合成経路。各反応の矢印左または右は反応を触媒する酵素。

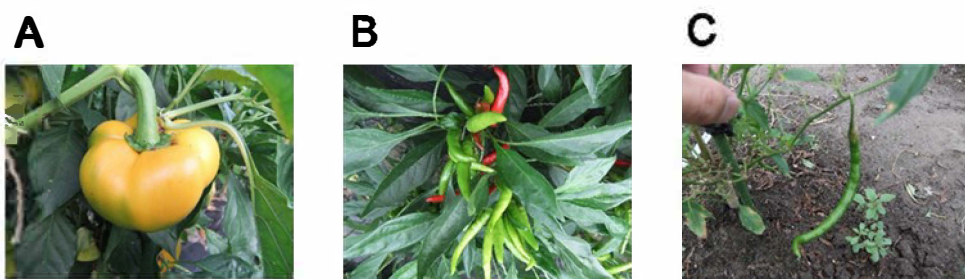


図1.2. 本章の実験で用いた植物材料。(A) カラーピーマンイエロー (B) タカノツメ (C) ひもとうがらし。

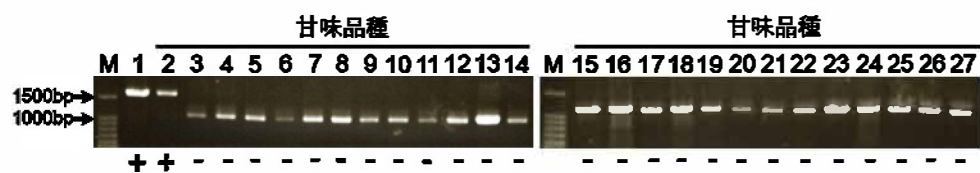


図1.3. *Pun1*遺伝子のアリル分析。+と-は遺伝子型を示し、+は正常型、-は $pamt^{10}$ 。MはDNAサイズマーカー(100bp Ladder、タカラバイオ)。

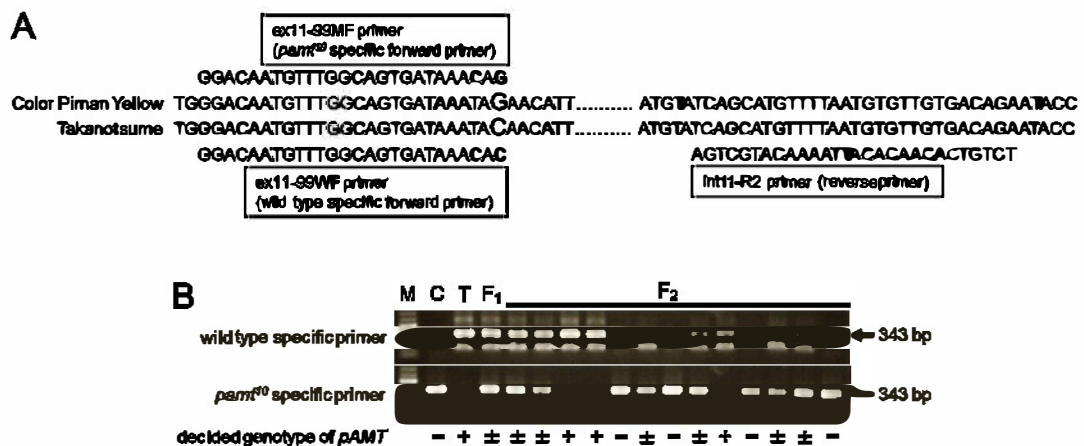


図1.5. *pamt*¹⁰特異的DNAマーカー。(A) プライマーの塩基配列とアニーリング模式図。アリル特異的SNPに加えて、アニーリングの特異性を上げるため、3'末端から3bp上流に人為的なミスマッチ塩基を入れてある。(B) *pamt*¹⁰特異的マーカーによる、カラーピーマンイエローとタカノツメのF₁、F₂のジェノタイプング。Cはカラーピーマンイエロー、Tはタカノツメ。MはDNAサイズマーカー(100bp Ladder、タカラバイオ)。

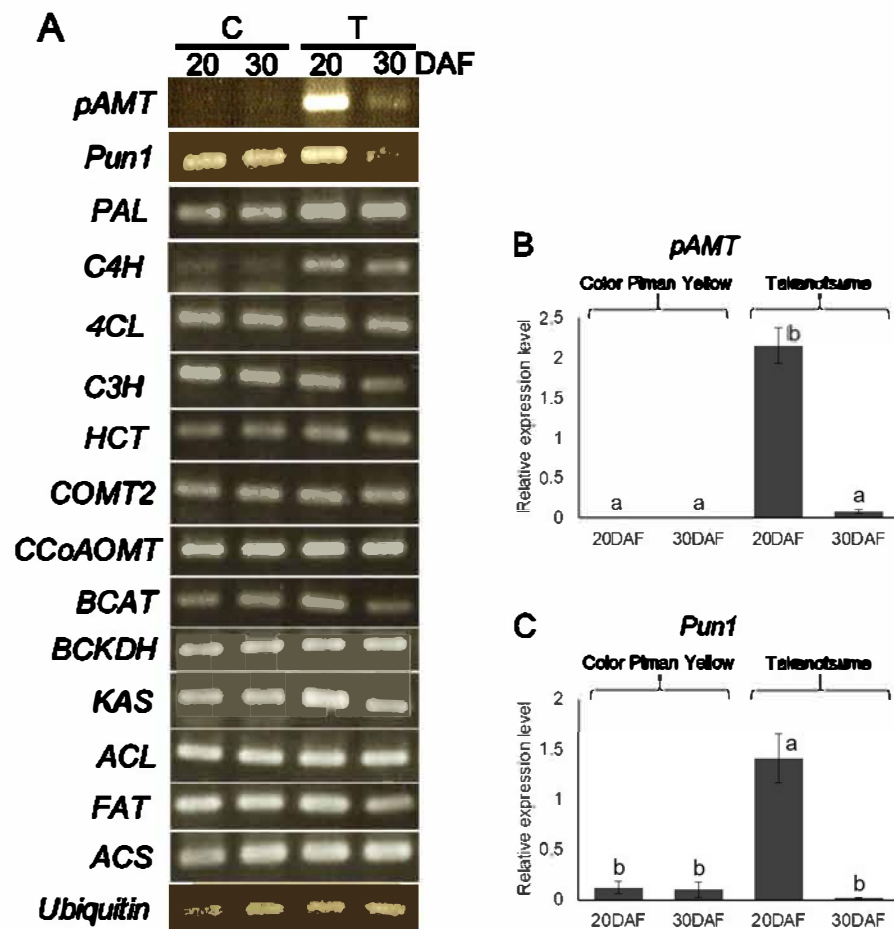


図1.6. カプサイシン生合成経路遺伝子の発現解析。(A)半定量RT-PCR (B) *pAMT*の定量RT-PCR。(C) *Pun1*の定量RT-PCR

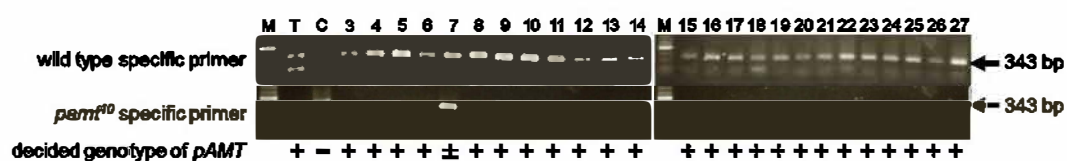


図1.7. *pamt¹⁰*特異的DNAマーカーによる甘味品種のジェノタイピング。数字は表1.1のサンプル番号に対応。+と-は遺伝子型を示し、+は正常型、-は*pamt¹⁰*。MはDNAサイズマーカー(100bp Ladder、タカラバイオ)。

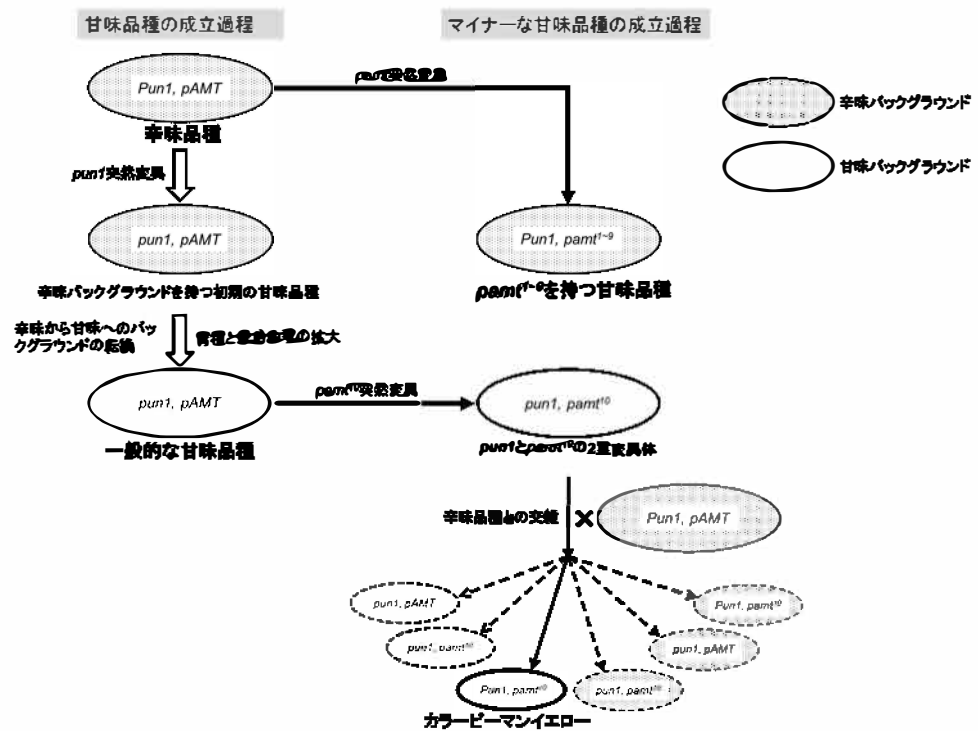


図1.8. カラーピーマンイエローの起源についての仮説。

表1.1. 本研究で使したトウガラシ品種

| No. | 品種名 ^a | 果実タイプ | 辛味/甘味 | 来歴、特徴 |
|-------|------------------|------------|-------|------------------|
| 1 (T) | タカノツメ | コーン | 辛味 | 日本の在来辛味品種 |
| 2 (C) | カラーピーマンイエロー | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 3 | バナナピーマン | ロングとベルの中間型 | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 4 | ピンニブフ | ベル | 甘味 | ロシアの品種 |
| 5 | カリフォルニアワンダー | ベル | 甘味 | アメリカで育成されたパプリカ品種 |
| 6 | カリフォルニアワンダーオレンジ | ベル | 甘味 | アメリカで育成されたパプリカ品種 |
| 7 | イエローパプリカ | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 8 | カラーピーマンオレンジ | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 9 | カラーピーマンパープル | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 10 | カラーピーマンレッド | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 11 | カラーピーマンホワイト | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 12 | ガブリエル | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 13 | 浜クロビー | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 14 | 京みどり | ベル | 甘味 | 近代ピーマン品種 |
| 15 | マルコーニレッド | ロング | 甘味 | イタリアの品種 |
| 16 | ビー太郎 | ロングとベルの中間型 | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 17 | ラウンドオブハンガリー | ベル | 甘味 | ハンガリーの品種 |
| 18 | さきがけ | ベル | 甘味 | 近代品種のピーマン |
| 19 | セニョリータ | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 20 | セニョリータゴールド | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 21 | セニョリータオレンジ | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 22 | ソニアゴールド | ベル | 甘味 | 近代品種のパプリカ |
| 23 | ピクトリヤ | ベル | 甘味 | ロシアの品種 |
| 24 | ピバパプリコット | ベル | 甘味 | 日本の近代品種 |
| 25 | ワンダーベル | ベル | 甘味 | 近代品種のピーマン |
| 26 | ワンダーベルイエロー | ベル | 甘味 | 近代品種のピーマン |
| 27 | ゾロトイユビレイ | ベル | 甘味 | ロシアの品種 |
| 28 | ひもとうがらし | ロング | 甘味 | 日本の在来甘味品種 |

^a 品種名は材料として入手した際の販売名。

表1.2 カプサイシン生合成経路遺伝子のシーケンシングとRT-PCRで使ったプライマー

| 遺伝子 | プライマー名 | プライマー配列 (5' to 3') | 使用した実験 | 来歴 ^a |
|------------------|---------------|------------------------------|--|-------------------------------|
| <i>Pun1</i> | U16F | CCCTTGTCATTTTTTACC | 遺伝子型判別 | Lang <i>et al.</i> (2006) |
| | pun1-1fwd2 | GCTCCACGGAAAAGACTCAT | 遺伝子型判別 | Wyatt <i>et al.</i> (2012) |
| | D14R | CTCTTCAATCAAACACCACA | 遺伝子型判別、RT-PCR、qRT-PCR | Lang <i>et al.</i> (2006) |
| | -F1148 | AATAGGTGCTGTTCAAATC | シーケンス鋳型の増幅 | 本研究 |
| | D1R | GTTGACCGTAAACTTCCGTT | シーケンス鋳型の増幅 | Lang <i>et al.</i> (2006) |
| | U1F | ATTTTGGATGGGGAAGACCT | RT-PCR | Lang <i>et al.</i> (2006) |
| | ex2_F1600 | CGGGTGATGTTGCACAAGC | qRT-PCR | 本研究 |
| <i>pAMT</i> | F1 | TCITTCITCTTCCTTAGCAAT | シーケンス領域1の増幅 | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | 7th-Intron-R | AAATGATCATGTTATGTTCAAAA | シーケンス領域1の増幅 | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | F443 | GGTGAAGATGGTGTGGTATT | シーケンス領域2の増幅 | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | R788 | AATATGTTGCGGGAGGAAGT | シーケンス領域2の増幅 | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | F747 | TCCTAGGAGCAGCAGGTGTAAT | シーケンス領域3の増幅 | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | R1313 | CCAACATCCCGTACTTAGCACA | シーケンス領域3の増幅 | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | 14th-Intron-F | AATATGCTTCGCCCCTAAAT | シーケンス領域4の増幅 | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | R1616 | TGTAAATAATTGTGGATAACAAAAGCTC | シーケンス領域4の増幅、qRT-PCR | Lang <i>et al.</i> (2009) |
| | ex15F | AAGGGGAAGTGGTTTGGCAC | RT-PCR | 本研究 |
| | ex17_F10721 | GAAGAACTCAAGTCTCAGAAGAAGTAA | qRT-PCR | 本研究 |
| | R10853 | GTTGCAAGGAGAACATTCTTTATTAC | qRT-PCR | 本研究 |
| | ex11-99WF | GGACAATGTTTGGCAGTGATAAACAC | 遺伝子型判別用正常型特異的プライマー | 本研究 |
| | ex11-99MF | GGACAATGTTTGGCAGTGATAAACAG | 遺伝子型判別用 <i>pamt</i> ^{2a} 特異的プライマー | 本研究 |
| | Int11-R2 | TCTGTCCACAACACATTAACATGCTGA | 遺伝子型判別用Reverseプライマー | 本研究 |
| <i>Ubiquitin</i> | Ubiquitin-F | TGTGTCTCAACATTCTTCGTGA | RT-PCR、qRT-PCR | Stellari <i>et al.</i> (2010) |
| | Ubiquitin-R | ATACAGCAGCTGCGTCTGT | RT-PCR、qRT-PCR | Stellari <i>et al.</i> (2010) |

^a: 以前の研究で設計されたプライマーは引用文献を示した。

表12 (続き)

| 遺伝子 | プライマー名 | プライマー配列 | 使用した実験 |
|---------|-----------------|-----------------------------|--------------------|
| PAL | Pal_F | CAACTCTAGCCATTTCCTTGATCCA | シーケンス増幅の増幅 |
| | Pal_R | AGCACTTGACAAGCACTAACA | シーケンス増幅の増幅 |
| | Pal_F2 | TGCTGGAGTTTTTGGAAATGGA | シーケンシング |
| | Pal_F3 | TCCTCTGCAGAACTAAAGCA | シーケンシング |
| | Pal_F4 | ACACAATCAGTCAAGTAGCT | シーケンシング |
| | Pal_R2 | TCGCTTCCAAGATCTCAACCT | シーケンシング |
| | Pal_RT-F | ACAGACTTGTGAGGAAGGAAT | RT-PCR |
| | Pal_RT-R | AGCACTTCAACAAGCACTAACA | RT-PCR |
| C4H | C4H_F | AGAAGAAGCCCATTTTTGTACCA | シーケンス増幅の増幅 |
| | C4H_R | TCAACTTTCTCCAGAGCCCC | シーケンス増幅の増幅 |
| | C4H_F2 | TGAGCATTGAGGAAGATGAGG | シーケンシング |
| | C4H_F3 | ACCACCTTCACATCCACAG | シーケンシング |
| | C4H_R2 | TCCCATTCGTAGCAGATTCAGG | シーケンシング |
| | C4H_RT-F | CTCGACCCACGGGAGAAAG | RT-PCR |
| | C4H_RT-R | CAGAAAGCTGAGTTACCTTGT | RT-PCR |
| 4CL | 4CL_F | GCTTTTCAGCGTGTCCAAA | シーケンス増幅の増幅 |
| | 4CL_R | CAGACATTTCCGCCGTTGTC | シーケンス増幅の増幅、シーケンシング |
| | 4CL_R2 | GGTAGCCCTGTAGTCCTGA | シーケンシング |
| | 4CL_R3 | TGCAATTTTCACCGGTTGG | シーケンシング |
| | 4CL_RT-F | TCGTGAAACGGTACCAAAA | RT-PCR |
| | 4CL_RT-R | CAGACATTTCCGCCGTTGTC | RT-PCR |
| HCT | HCT_F | TTAGTAATTTGTGAGAAGTTTT | シーケンス増幅の増幅 |
| | HCT_R | TGGAAGCAGCACAGGAACCT | シーケンス増幅の増幅 |
| | HCT_F2 | TGCAAGCTGAATCTGATGGTGT | シーケンシング |
| | HCT_F3 | ACCTTCTCTCCATCAGGCT | シーケンシング |
| | HCT_R2 | TCTGCAACACTAACAGAGCA | シーケンシング |
| | HCT_RT-F | GCTGCCAATCCATGATGCTG | RT-PCR |
| | HCT_RT-R | TGGAAGCAGCACAGGAACCT | RT-PCR |
| C3H | C3H_F | TCCTCCACCACCTTGAT | シーケンス増幅の増幅 |
| | C3H_R | GGCTGTTTGGACCTGGGTAA | シーケンス増幅の増幅 |
| | C3H_F2 | AGGCTTCAAGCACTTAGGCC | シーケンシング |
| | C3H_F3 | CCAAGAGGAGCTCGACCAAG | シーケンシング |
| | C3H_R2 | CACTAGCACACTCTTCCCG | シーケンシング |
| | C3H_RT-F | GAGGACTCCATTACAGGCCG | RT-PCR |
| | C3H_RT-R | CATTGGCAGCTCAAAGTCGA | RT-PCR |
| CCoAOMT | CCoAOMT_F | AAGCCAAAGCAAGGTAAAA | シーケンス増幅の増幅 |
| | CCoAOMT_R | TCACAAAACAAAAGCGAAAA | シーケンス増幅の増幅 |
| | CCoAOMT_F2 | GCTACTGCTCTTGTCTTCCA | シーケンシング |
| | CCoAOMT_R2 | ATCAAGAACAGTCAAGCCG | シーケンシング |
| | CCoAOMT_RT-F | GCTCCACCAGATGCACCAAT | RT-PCR |
| | CCoAOMT_RT-R | ACACGAGTAAGATTTTTACTACTTGIT | RT-PCR |
| Comt2 | Comt2_5UTR_F | TCTACTTCCCTTAGCTTGCCCT | シーケンス増幅の増幅 |
| | Comt2_5UTR_R | GCAGTCAAGCCACTCAGAGT | シーケンス増幅の増幅、シーケンシング |
| | Comt2_ex2_R1785 | GTAGCCCAATTCACAC | シーケンシング |
| | Comt2_RT-F | ACCCAGGAGCCAAAGAAAGG | RT-PCR |
| | Comt2_RT-R | GCAGTCAAGCCACTCAGAGT | RT-PCR |

表1.2. (続き)

| | | | |
|-------|-----------------|-----------------------------|--------------------|
| Bcat | Bcat_5UTR_F64 | TGCCTCTACCTAATCTGTTGCT | シーケンス鋳型の増幅、シーケンシング |
| | Bcat_3UTR_R3016 | ACAGCCTGCTAGCACATGAA | シーケンス鋳型の増幅、シーケンシング |
| | Bcat_RT-F | AGCTCAGATCTATCTTGTAAAG | RT-PCR |
| | Bcat_RT-R | ACAGCCTGCTAGCACATGAA | RT-PCR |
| BCKDH | BCKDH_F | CCTCCCACCTTCTCCAGCAG | シーケンス鋳型の増幅 |
| | BCKDH_R | GGCAAATTGGCAATACATGTGAC | シーケンス鋳型の増幅、シーケンシング |
| | BCKDH_R2 | GTGCAACGAAAGACACCACC | シーケンシング |
| | BCKDH_R3 | GCTCCCAGCCAACTAATGT | シーケンシング |
| | BCKDH_RT-F | TCCTCTCGTATTGGAACDCT | RT-PCR |
| | BCKDH_RT-R | ACGTCCAGTATCACAATAATGCT | RT-PCR |
| | | | |
| Kas | Kas_5UTR_F28 | AAAGATTTAGTTTCTCGTGTGTTGAGA | シーケンス鋳型の増幅 |
| | Kas_3UTR_R4689 | TGAGGGTTGAGTCACGTTG | シーケンス鋳型の増幅、シーケンシング |
| | Kas_ex2_R2653 | ACCTAACTGTGTAACCTGAGGCA | シーケンシング |
| | Kas_ex3_R3216 | CCACCAACACCAATAGCCGA | シーケンシング |
| | Kas_ex6_R4178 | TTGATGGTTGGATGAAGCCA | シーケンシング |
| | Kas_RT-F | CCAACTCGTTCGGATTCCGA | RT-PCR |
| | Kas_RT-R | GTTGAGCTCCTCCACCATCG | RT-PCR |
| ACL | ACL_F | CCTCTTCCCTTGACACTCC | シーケンス鋳型の増幅、シーケンシング |
| | ACL_R | ACAGCCAAAGCGAGATACCC | シーケンス鋳型の増幅 |
| | ACL_RT-F | AGAGTTTGGCATCTCCGTGG | RT-PCR |
| | ACL_RT-R | TGATTGCAGGGTTCAACCAA | RT-PCR |
| Fat | Fat_F | CGTTAAACCCAACATTGTTTCGG | シーケンス鋳型の増幅 |
| | Fat_R | TCCTCCGCTAGTACTTAGGCA | シーケンス鋳型の増幅、シーケンシング |
| | Fat_R2 | TGAAGGCGTCTTGTCCTCG | シーケンシング |
| | Fat_RT-F | AGAGCTTCTTGCAATTTGTTGAGA | RT-PCR |
| | Fat_RT-R | GGAGCTCCTCCGCTAGTACT | RT-PCR |
| ACS | ACS_F | GGGTATTGAATCTCTTATTCTTCGCC | シーケンス鋳型の増幅 |
| | ACS_R | AGGGCCTTACAACTGCACT | シーケンス鋳型の増幅、シーケンシング |
| | ACS_R3 | ACAGCTCCGAATGAACCGAA | シーケンシング |
| | ACS_R4 | TCGTCAGGGACTCCAAAAGC | シーケンシング |
| | ACS_R5 | GGACATCGATTCAAGGTCCGA | シーケンシング |
| | ACS_RT-F | GTTGCAGAGCACTTCCTTGC | RT-PCR |
| | ACS_RT-R | ACTTGCGCCATTACTGAAAATCT | RT-PCR |

すべてのプライマーは本研究で設計したものである。

表1.2. (続き)

| 遺伝子 | プライマー名 | プライマー配列 (5' to 3') | 来歴 ^a |
|-------------|------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>Pun1</i> | -F806 | ATTGGAGGGTGTTAGGTGTA | 本研究 |
| | -F409 | GGTGTGATGTTGATACTACT | 本研究 |
| | -F209 | TTCCTCTTAACCGTCTCCAT | 本研究 |
| | ex1_F3 | GGCTTTTGCATTACCATCAT | 本研究 |
| | ex1_F309 | GGGAGCTGAGTTCTTGAGTG | 本研究 |
| | ex1_F508 | AAGATTGGTGATGGTTGCTC | 本研究 |
| | U2F | TTCTCTACACAAAAATATGG | Lang <i>et al.</i> (2006) |
| | U3F | TGCGTACAGAAAAGACTCAT | Lang <i>et al.</i> (2006) |
| | int_F739 | GTAATACTACCATCGTCCAT | 本研究 |
| | int_F861 | CTACTCTTAAACGCCTCACT | 本研究 |
| | int_F961 | CGAACAGTAAAGTGGAGAAT | 本研究 |
| | ex2_F1087 | GTGGCAGAAGAATCAGGAGT | 本研究 |
| | ex2_F1258 | CTCTCGTCTATTTTCTCCAT | 本研究 |
| | -R663 | TGGCAAAGAAGGAACCTCC | 本研究 |
| | Pun1_5'NCR_-R505 | AACCTCGCCTTCGTGACAAT | 本研究 |
| | ex1_R67 | CTAAGTTTAGAGGGGGTGAG | 本研究 |
| | ex1_R295 | GCTCCCATATCGTTACAGTC | 本研究 |
| | ex1_R512 | CAGAGAGCAACCATCACCAA | 本研究 |
| | D3R | CTTATCTGTAGGAAAAATGA | Lang <i>et al.</i> (2006) |
| | int_R747 | AAACAATAATGGACGATGGT | 本研究 |
| | int_R888 | CAATAAGTGGAGTGCTA | 本研究 |
| | int_R903 | AAGAGTAGTTTTTGACACCA | 本研究 |
| | ex2_R1108 | TCTGCCCTTGTTGGATTTT | 本研究 |
| | ex2_R1313 | CCTTAAATTACGAACCAACG | 本研究 |
| | ex2_R1404 | GTTTCCCTTCTCTCATT | 本研究 |
| | ex2_R1510 | CACACTCTTTCAGGTCTTCC | 本研究 |
| | ex2_R1635 | GGAGTTCCTCATTGCGTTCA | 本研究 |
| | R1682 | ACATCCAATTACTCCAAAAC | 本研究 |

表1.2. (続き)

| | | | |
|-------------|---------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>pAMT</i> | int2F | CAGACTCCACGTTGTGAGACA | 本研究 |
| | ex3_F857 | TCTGGTTTATGGTGACAACA | 本研究 |
| | Int3_F1212 | GGGTTGTATATAGGTCAGGTTAGT | 本研究 |
| | 3rd-intron-F | CCCCCTCTTATGGGTGAAAC | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | F304 | GCCATTTTATCATTCAATTTGGA | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | int5_F3163 | AAGTGC GACTACTCTTGGGG | 本研究 |
| | ex7_F4109 | ACATTTCTGCTGGTCTCTCTGG | 本研究 |
| | int7_F4654 | GCGTACATCTTACCCTCCCC | 本研究 |
| | int9F | GCGCATGAGGATTGGAGTTG | 本研究 |
| | int10_F6075 | AGTGACTAGTGAGTAGCCCTC | 本研究 |
| | 10th-intron-F | CCCGCTTTGGTCCTCTCTCTG | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | ex11_F6314 | GTTCAAGCTATTTTAAGGAAACATGAC | 本研究 |
| | ex12F | ATATGCCAATTGCCGCTGTC | 本研究 |
| | int13F | ACCAGTGGAAGATTATTTTCCTTGT | 本研究 |
| | int14_F8416 | GCTGACGTGACATCTTTGACG | 本研究 |
| | F1183 | GGAGATAAGGGGAAGTGGTT | Lang <i>et al.</i> (2009) |
| | int16_F9426 | GCGGAGGCAGACAAATTAGG | 本研究 |
| | ex17_F10678 | ACGCATATATGGGAAAGCATTGA | 本研究 |
| | ex2_R245 | ATATCACTCTGCCATCCCGC | 本研究 |
| | int3_R2455 | GCCTCTGGCGTATAAAAAGATTT | 本研究 |
| | R282 | GCAGCTTCAACAAGTCGAGTC | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | ex5R | TCATTGGCTTCTGATCCGCT | 本研究 |
| | int5_R3558 | TCCAAACTGATTGATCTAGCCA | 本研究 |
| | int9R | CAACTCCAATCCTCATGCGC | 本研究 |
| | int10R | GAGGGCTACTCACTAGTCACT | 本研究 |
| | ex11_R6404 | CACTGCCAAACATTGTCCCA | 本研究 |
| | int11R | ACTGTTGTCTATAGGTATTCTGTGACA | 本研究 |
| | int11_R7077 | GAACCCCCAACCTCTTGCTT | 本研究 |
| | R1055 | CAGGGTGTCCGGAATAAGTAAA | Tanaka <i>et al.</i> (2010b) |
| | Int16_R10308 | ACCTCGAAAATGTCAGCATGG | 本研究 |
| | 3UTR_R10818 | AGCACAAAGAGGAAATCTGATCA | 本研究 |

a: 以前の研究で設計されたプライマーは引用文献を示した。

表1.3. *pAMT*遺伝子のエキソンで見つかった塩基置換

| エキソン | 位置 (bp) ^a | 塩基置換 | | 同義／非同義置換 |
|--------|----------------------|-------|-------------|-----------------------|
| | | タカノツメ | カラーピーマンイエロー | |
| エキソン7 | 447 | C | T | 同義置換 |
| エキソン9 | 630 | A | C | 非同義置換、Lys→Asn |
| エキソン11 | 819 | C | G | 非同義置換、Tyr→終止コドン (TAG) |
| エキソン12 | 918 | A | C | 同義置換 |
| エキソン15 | 1129 | A | G | 非同義置換、Thr→Ala |
| エキソン15 | 1149 | A | G | 同義置換 |
| エキソン15 | 1150 | G | A | 非同義置換、Asp→Asn |

^a 位置はORFの最初の塩基を1としたときの位置。

表1.4. *Pun1*遺伝子、*pAMT*遺伝子以外のカプサイシン生合成経路遺伝子cDNAのシーケンシング

| 遺伝子 | 決定長 | 塩基置換数 | |
|----------------|------|-------|--------------------|
| | | 同義置換 | 非同義置換 ^a |
| <i>Pal</i> | 2154 | 0 | 0 |
| <i>C4H</i> | 1518 | 0 | 0 |
| <i>4CL</i> | 1628 | 0 | 0 |
| <i>HCT</i> | 1308 | 0 | 0 |
| <i>C3H</i> | 1536 | 2 | 1(1) |
| <i>CCoAOMT</i> | 744 | 0 | 0 |
| <i>Comt2</i> | 1080 | 0 | 1(1) |
| <i>Bcat</i> | 1209 | 0 | 0 |
| <i>BCKDH</i> | 1086 | 1 | 0 |
| <i>Kas</i> | 1467 | 0 | 0 |
| <i>ACL</i> | 399 | 0 | 0 |
| <i>Fat</i> | 1116 | 0 | 0 |
| <i>ACS</i> | 1572 | 3 | 7(3) |

^a: ()内はデータベース上の辛味品種の塩基配列にもある非同義置換の数。

表1.5. カラーピーマンイエロー、タカノツメ、F₁およびF₂の表現型

| 交雑組合せと世代 | 個体数 | 表現型 | | 期待比 | カイ二乗値 (<i>p</i> -value) |
|--|-----|-----|----|-----|--------------------------|
| | | 辛味 | 甘味 | | |
| カラーピーマンイエロー (P ₁) | 5 | 0 | 5 | | |
| タカノツメ (P ₂) | 5 | 5 | 0 | | |
| ひもとうがらし (P ₃) | 5 | 0 | 5 | | |
| P ₁ × P ₂ F ₁ | 10 | 10 | 0 | | |
| P ₁ × P ₂ F ₂ | 93 | 70 | 23 | 3:1 | 0.952 |
| P ₁ × P ₃ F ₁ | 10 | 0 | 10 | | |

表1.6. カラーピーマンイエロー×タカノツメF₂集団の表現型と *Pun1* 遺伝子または *pAMT* 遺伝子の遺伝子型の連鎖解析

| 遺伝子 | 表現型 | 個体数 | 遺伝子型 ^a | | | カイ二乗値 (<i>p</i> -value) |
|-------------|-----|-----|-------------------|----|----|--------------------------|
| | | | TT | TY | YY | |
| <i>Pun1</i> | 辛味 | 70 | 20 | 31 | 19 | 0.985 |
| | 甘味 | 23 | 7 | 10 | 6 | |
| <i>pAMT</i> | 辛味 | 70 | 22 | 47 | 1 | 2.20E-16 |
| | 甘味 | 23 | 0 | 3 | 20 | |

^a: 遺伝子型の表記はそれぞれ、TTはタカノツメ型ホモ、TYはヘテロ、YYはカラーピーマンイエロー型ホモを示す。

第 2 章

トウガラシ *chinense* 種‘チェイロホワイト’の
白色果実変異の遺伝機構の解明

1. 緒言

果実色は、辛味と並ぶトウガラシの重要な農業形質の一つである。赤やオレンジ、黄色といった鮮やかなトウガラシの色は食卓を彩るだけでなく、食欲を増進させる効果もある。トウガラシの果実色を構成する主たる成分は、果実の成熟に伴って果皮に蓄積するカロテノイドである。カロテノイドは 8 個のイソプレ単位が結合して構成された炭素数 40 のテトラテルペン的一种で、炭化水素であるカロテン類と、分子内にアルコール、ケトン、エポキシなどの酸素を含むキサントフィル類に分けられる。カロテン類には α -カロテン、 β -カロテン、リコペン、フィトフルエン、フィトエンなどがあり、キサントフィル類には β -クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、ルテイン、カプサンチン、カプソルビンなどがある。完熟した赤色トウガラシ果実には 50 種類以上のカロテノイドが含まれているが、このうち赤色カロテノイドのカプサンチンが全カロテノイドの 34.7% と最も多く、次いで β -カロテンが 11.6%、ビオラキサンチンが 9.9% 含まれる (Arimboor *et al.* 2014、Gómez-García and Ochoa-Alejo 2013)。これまでの医学的、栄養学的研究によって、プロビタミン A (ビタミン A 前駆体)、活性酸素消去能、発癌リスクの低減など、カロテノイドが持つ様々な生理作用が明らかになっている (眞岡 2007)。 β -カロテンはプロビタミン A としてもっとも有名なカロテノイドであり、動物体内に取り込まれると β -カロテン-15,15'-ジオキシゲナーゼによりレチナールを経てレチノール (ビタミン A) に変換される (眞岡 2007)。プロビタミン A には β -カロテンの他にも α -カロテンや β -クリプトキサンチンなどがある (眞岡 2007)。また、カロテノイドは活性酸素のうち特に一重項酸素と脂質過酸化に対して強い消去活性を示すことが知られており、カロテノイドの持つ強力な活性酸素除去能が癌や循環器疾患の発症リスクを低下させるという報告もある (Li *et al.* 2007、眞岡 2007、Peto *et al.* 1981、Sporn and Liby 2013、

寺尾・長尾 1999)。

カロテノイドは、果実の成熟にともない葉緑体からの転換によって形成される有色体で作られる。すなわち、果実の成熟過程で葉緑体から有色体への転換に伴ってクロロフィルが分解され、代わってカロテノイドの生合成と蓄積が起こって果実が色付く (Camara and Brageon 1981)。トウガラシ果実におけるカロテノイド生合成経路を図 2.1 に示した。カロテノイド生合成は、カロテノイド前駆体であるゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) を生合成する過程と、GGPP からカロテノイドを生合成する過程の 2 つに分けられる。GGPP は、メバロン酸経路で作られたイソペンテニルニリン酸 (IPP) がイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (IPI) によってジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) に変換された後、3 分子の IPP と 1 分子の DMAPP からゲラニルゲラニルニリン酸シンターゼ (GGPS) によって作られる。この GGPP からフィトエン合成酵素 (PSY) によって最初のカロテノイドであるフィトエンが作られ、続いて 4 度の異性化と 2 度の不飽和化を経てリコペンが作られる。リコペンが作られると、カロテノイド生合成経路は、 δ -カロテンから α -カロテンを経てルテインに至る経路と、 γ -カロテンから β -カロテン、ゼアキサンチンなどを経てカプサンチンとカプソルビンが作られる経路の 2 つに分岐する。この 2 つに分岐した経路のうち、成熟段階のトウガラシ果実では β -カロテンを生合成する経路が優先的に活性化していることがわかっている (Camara *et al.* 1982、Gómez-García and Ochoa-Alejo 2013)。オレンジ色や黄色など、赤色以外の果実色を持つトウガラシ品種は、これらのカロテノイド生合成経路の何らかの変異により、カロテノイドの構成に変化が生じたことで生まれたと考えられる。

トウガラシの果実色の遺伝機構に関する研究の歴史は古く、赤色が黄色に対して優性であることは 1900 年代前半から知られていた (Atkins and Sherrard 1915、Khan and Munir 1954、Shaw and Khan 1928、Smith 1950、Webber 1911)。Kormos

and Kormos (1960) は、トウガラシの果実色は y と $y+$ 、 $c1$ と $c1+$ 、および $c2$ と $c2+$ という ‘three gene pairs’ で制御されているとした (表 2.1)。このモデルでは優性対立遺伝子を + と表記している。このモデルでは、 $c1$ と $c2$ は β -カロテンの合成を抑制することで $y+$ と y を抑制する。また、 $c1$ を持つと赤色カロテノイドが約 10 分の 1 に低下し、 $c2$ を持つと赤色カロテノイドが $c1$ よりさらに減少する。遺伝子型と表現型は、 $y+c1+$ が赤、 $y+c1$ がサーモンレッド、 $y+c2$ がピンク、 $yc1+$ がオレンジ、 $yc1$ がレモンイエロー、 $yc2$ がアイボリーまたは白になる (Lippert *et al.* 1966)。Hurtado-Hernandez and Smith (1985) は、この Kormos and Kormos のモデルに対し、1) ‘three gene pairs’ としながら 8 遺伝子型 8 色ではなく、6 遺伝子型 6 色しか示されていない点 2) 遺伝子型を表記するのに $y+c1+$ 、 $yc2$ などのように 2 つの遺伝子座の遺伝子記号しか使用していない点、の 2 点から、Kormos and Kormos のモデルは表現型の判別が不完全だったことから生まれたモデルであるとし、新たに 8 通りの遺伝子型が 1 対 1 で 8 通りの表現型に対応する完全な 3 遺伝子座モデルを提唱した (表 1)。トウガラシの果実色の遺伝学的解析では、Hurtado-Hernandez and Smith (1985) の 3 遺伝子座モデルが今日まで広く採用されてきた。

1990 年代から 2000 年代初頭にかけての分子遺伝学的解析によって、 y 遺伝子座と $c2$ 遺伝子座がそれぞれ第 6 染色体と第 4 染色体に座し、カプサンチン-カプソルビン合成酵素 (CCS) とフィトエン合成酵素 (PSY) をコードしていることが判明した (Huh *et al.* 2001、Lefebvre *et al.* 1998、Popovsky and Paran 2000、Thorup *et al.* 2000)。Ccs 遺伝子と Psy 遺伝子は、*C. annuum* の成熟途中の果皮で特異的に発現している遺伝子として単離された (Bouvier *et al.* 1994、Deruère *et al.* 1994、Römer *et al.* 1993)。Huh *et al.* (2001) は、*C. annuum* に属する赤色品種 ‘TF68’ と *C. chinense* に属するオレンジ色品種 ‘ハバネロオレンジ’ を交雑した F₂ 集団の連鎖解析から、 $c2$ 遺伝子座が Psy 遺伝子をコードしていることを明らかにした。

また、Lefebvre *et al.* (1998) は、*C. annuum* の赤色品種‘Lamuro’と黄色品種‘Lamuga’を交雑した F₂ 集団で、Popovsky and Paran (2000) は *C. chinense* の赤色系統‘PI 152225’に *C. annuum* の黄色系統‘Kelvin’と白色系統‘4751’を交雑して得た BC₁ 集団で連鎖解析を行い、それぞれ独立に *y* 遺伝子座が *Ccs* 遺伝子をコードしていることを明らかにした。CCS はカロテノイド生合成経路でアンテラキサンチンとビオラキサンチンからカプサンチンとカプソルビンを生合成する酵素であり、*Ccs* 遺伝子の変異はいずれも赤色カロテノイドのカプサンチンとカプソルビンの欠失を引き起こし、果実色が黄色やオレンジ色になる (Guzman *et al.* 2010、Ha *et al.* 2007、Huh *et al.* 2001、Lang *et al.* 2004、Popovsky and Paran 2000、Rodriguez-Uribe *et al.* 2012)。これまでに、もっとも広く栽培されている栽培種である *C. annuum* の品種では、非常に多様な変異型 *Ccs* アリルが発見されている (Guzman *et al.* 2010、市川ら 2009、Lang *et al.* 2004)。しかし、もう一つの主要な栽培種である *C. chinense* の非赤色品種では変異型 *Ccs* アリルとして、開始コドンから 599bp 目に C から A へのナンセンス変異があるもの (以下、‘*ccs*¹’と表記) と、開始コドンから 1430bp 目への 8bp の挿入によるフレームシフト変異が生じているもの (以下、‘*ccs*²’と表記) の 2 つしか見つかっていない (Ha *et al.* 2007)。一方、PSY は、カロテノイド生合成経路の上流で GGPP からフィトエンを生合成する酵素である。*Psy* 遺伝子の突然変異はカロテノイドの総量に影響することから、PSY が触媒している GGPP からフィトエンへの変換反応はカロテノイド生合成経路の律速段階と考えられている (Gómez-García and Ochoa-Alejo 2013、Huh *et al.* 2001)。Kim *et al.* (2010) は、*C. chinense* のオレンジ色品種‘ハバネロオレンジ’の *Psy* 遺伝子の塩基配列を決定し、第 5 イントロンのスプライシングジャンクションのうち 3’側の AG が CG に変異してフレームシフト変異 (以下、‘*psy*¹’と表記) が起きていることを突き止め、これにより‘ハバネロオレンジ’はカロテノイドの総量が約 6 分の 1 に低下してオレンジ色果実をつけることを明らかに

した。本研究室の稲葉（2013）は、多数の *C. chinense* の非赤色品種の果実色と *Psy* 遺伝子の多様性を調査し、クリーム色果実をつける *Psy* 変異体‘ハバネロレモン’が Kim *et al.*（2010）が‘ハバネロオレンジ’で発見したものとは異なる新規の変異型 *Psy* アリル（以下、‘*psy*²’と表記）を持っていることを発見した。この‘*psy*²’は、*Psy* 遺伝子の第 1 エキソン 120bp 目の G の欠失によるフレームシフト変異で 253bp 目に終止コドンが生じる変異アリルである。薄層クロマトグラフィー（TLC）によるカロテノイド組成分析の結果、‘ハバネロレモン’はカプサンチンとカプソルビンを含むカロテノイドの総量が著しく減少し、果実がクリーム色になっていることがわかった。稲葉（2013）は、同じ *Psy* 遺伝子の劣性対立遺伝子でありながら‘*psy*¹’と‘*psy*²’で表現型が異なる原因として、‘*psy*¹’は第 5 イントロンの 3’側スプライシングジャンクションの 1 塩基置換によるフレームシフト変異により、第 6 エキシソンのみが失われた‘機能低下型 *Psy*’であるのに対し、‘*psy*²’は第 1 エキシソンの 1 塩基欠失とフレームシフト変異により *PSY* を構成するアミノ酸の大部分が失われた‘機能喪失型 *Psy*’であることを指摘している。このように、変異型 *Psy* アリルは *C. chinense* の非赤色品種では‘*psy*¹’と‘*psy*²’の 2 つが発見されている一方で、*C. annuum* の非赤色品種では *Psy* 変異体が一切見つかっていない。

Psy 遺伝子に‘*psy*¹’と‘*psy*²’という、表現型に違いがある 2 つの劣性対立遺伝子があることから、笹沼ら（2013a, b）は、Kormos and Kormos（1960）の遺伝機構モデルの再考察を行った。笹沼は、Hurtado-Hernandez and Smith（1985）の *c1*、*c2* を別遺伝子座とする解釈は Lippert *et al.*（1966）の表記に基づく誤解であり、元々 Kormos and Kormos（1960）は *c1* と *c2* を同一座の複対立遺伝子と考えていたため 8 ではなく 6 表現型しか表記しなかったと解釈した。この解釈に基づき笹沼は、*Y* 遺伝子座が *Ccs* 遺伝子、*C* 遺伝子座が *Psy* 遺伝子にそれぞれ相当するとし、*Psy* 遺伝子について正常型アリルを *C*、Kim *et al.*（2010）の‘*psy*¹’を *c1*、稲

葉 (2013) の '*psy*' を *c2* というそれぞれ表現型が異なる対立遺伝子とした上で、Kormos and Kormos (1960) のモデルは、*YC* が赤色、*Yc1* がオレンジ色、*Yc2* がピンク色、*yC* がオレンジ、*yc1* がレモンイエロー、*yc2* がアイボリーまたは白になるという '2 遺伝子座複対立遺伝子モデル' であるとした。

このような果実色の遺伝機構の分子遺伝学的解析は黄色やオレンジ色、クリーム色の品種・系統に関するものばかりで、白色系統に関する報告例はない。笹沼の '2 遺伝子座複対立遺伝子座モデル' では白色品種の遺伝子型は *yc2*、すなわち変異型 *Ccs* アリルと '機能喪失型 *Psy*' アリルの 2 重変異体だと予想されている。一方で、先に述べたように *Psy* 遺伝子の変異の程度によって果実色が変わることが示唆されていることから、*Psy* 遺伝子自体の欠失やプロモーター領域の変異で転写されていない場合にカロテノイドが生合成されず *Psy* 遺伝子のみの 1 遺伝子の変異が原因で果実色が白くなっている可能性も考えられる。さらに、*Psy*、*Ccs* 以外のカロテノイド生合成経路遺伝子やそれらの発現を制御している転写因子など、*Psy*、*Ccs* とは別の遺伝子座の変異が単独で、あるいは *Psy*、*Ccs* の変異と組み合わせあって白色果実色の原因となっている可能性も考えられる。本章では、白色品種 'チェイロホワイト' を主たる対象として用い、TLC によるカロテノイド組成分析、*Psy*、*Ccs* 遺伝子を含むカロテノイド生合成経路遺伝子のシーケンシングと発現解析、交配実験によって白色果実色変異の遺伝機構の解明を行った。

2. 材料と方法

植物材料

本章では、*C. chinense* の白色品種である‘チェイロホワイト’を主たる対象とし、同じ *C. chinense* に属する赤色品種の‘ハバネロレッドサビナ’を果実色が正常の対象系統として用いた。その他、実験項目ごとにこれら以外のいくつかの品種を用いているが、それらは以下の各実験の項で個別に説明している。いずれの材料も市販の品種で、苗あるいは種子を購入して入手した。各実験には山形大学農学部附属農場で栽培したものをを用いた。

DNA 抽出

‘チェイロホワイト’と‘ハバネロレッドサビナ’に加えて、いずれも *C. chinense* に属する、黄色品種‘イエローブートジョロキア’、オレンジ色品種‘ハバネロスアーブオレンジ’、白色品種‘ホワイトファタリ’の葉から DNA を抽出した。‘イエローブートジョロキア’、‘ハバネロスアーブオレンジ’、‘ホワイトファタリ’は、それぞれ果実色変異の遺伝機構が不明の品種である。これらについても果実色変異の遺伝機構を調べる目的で DNA を抽出した。

DNA は Murray and Thompson (1980) の CTAB 法を使い、以下のように抽出した。新鮮な葉約 100mg を乳鉢に入れ、液体窒素で凍結させて乳棒で粉末状になるまで破碎した。破碎した葉を Tris 2.42g、NaCl 16.36g、EDTA 1.49g、CTAB 8g を滅菌ミリ Q 水で 200mL に定容して作った 4% CTAB バッファー 700μL に加え、65°C で 1 時間保温した。保温中は 15 分おきに転倒混和した。保温後、サンプルを室温に冷ましてからクロロホルムとイソアミルアルコールを 24 : 1 の体積比で混合したものを 600μL 加えた。これを 5 分間転倒混和した後、遠心分離機（トミー精工 MRX-150、以下、同機種を使用）で室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離

した。遠心分離後、上清 500 μ L を取り、そこにイソプロパノールを 500 μ L 加えて緩やかに転倒混和した。これを一晩、-20 $^{\circ}$ C で静置後、室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、イソプロパノールを除去し、そこに 70%エタノールを 300 μ L 加えてタッピングし、遠心分離で生じた沈殿をリンスした。これを再び室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離後、70%エタノールを除去し、チューブの蓋を開放してエタノールを揮発させた。これに TE バッファー (pH 8.0、1M の Tris-HCl 1mL と pH 8.0、0.5M の EDTA 200 μ L を 100mL に定容したもの) と DNase free Ribonuclease Glycerol Solution (10mg/mL、ニッポンジーン) 0.4 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。抽出された DNA の確認を 1%アガロースゲル電気泳動で行った。また、Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies) の dsDNA BR Assay による濃度測定結果をもとに 20ng/ μ L の希釈液を調製し、以後の実験に使った。

トウガラシ果実のカロテノイドの TLC 分析

‘チェイロホホワイト’と‘ハバネロレッドサビナ’に加え、比較用に用いた‘ハバネロオレンジ’、‘ハバネロレモン’、‘イエローブートジョロキア’の完熟果実からカロテノイドを抽出し、薄層クロマトグラフィー (Thin Layer Chromatography = TLC) 分析を行った。‘ハバネロオレンジ’は Kim *et al.* (2010) が報告した変異型 *Psy* アリル‘*psy*¹’を持つ *Psy* 変異体、‘ハバネロレモン’は稲葉 (2013) が報告した変異型 *Psy* アリル‘*psy*²’を持つ変異体であり、それぞれオレンジ色とクリーム色の果実色を持つ。‘イエローブートジョロキア’は黄色品種で、後述の塩基配列に加えてカロテノイド組成から果実色変異の遺伝機構を推測するために用いた。

まず、果皮のみを凍結乾燥機で乾燥させ、各サンプル 500mg を乳鉢で粉末状にすり潰した。粉末状になったサンプルを 50mL チューブに移し、エタノール：クロロホルム = 3：1 混合液を 15mL 加え、ウォーターバスで 50 $^{\circ}$ C、120rpm で 8 時間振とうした。保温振とう後、チューブを室温に戻し、ジエチルエーテルと減

菌ミリ水を 15mL ずつ加え、1 分間ボルテックスした後、スイングローター遠心機（久保田製作所 5100、以下、同機種を使用）で 2,500rpm、5 分間遠心分離した。遠心分離後、上層を 19mL 取って新しい 50mL チューブに移し、30% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 1.9mL を加えて 5 分間ボルテックスした。ボルテックス後、20.9mL の滅菌ミリ Q 水を加えて 1 分間ボルテックスした後、2,500rpm、10 分間遠心分離した。遠心分離後、下層をピペットで除去した後、20.9mL の滅菌ミリ水を加えて 1 分間ボルテックスした。ボルテックス後、3,000rpm で 20 分間遠心分離した。遠心分離後、下層をピペットで除去し、真空ポンプでジエチルエーテルを揮発させた。得られたカロテノイドの組成分析を TLC により行った。

TLC 分析は稲葉 (2013) の記載に基づき、林 (1980) と Oliver and Palou (2000) の方法により行った。最初に、石油エーテル:アセトン=8:2 の展開溶媒を 40mL 調製し、二層式展開槽に入れた後、蓋をして展開溶媒を展開槽内に十分に飽和させた。次に、縦 10cm、横 20cm に切ったシリカゲルプレート (Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄) の下端から 1cm のところに鉛筆で横線を引き、横線上の左端から 6mm の位置からサンプル滴下用の印を鉛筆で 12mm 間隔に打った。この印上に抽出したカロテノイド溶液をガラス毛细管 (DRUMMOND MICROCAPS 1μL、DRUMMOND) を使って 20 回滴下した。すべてのサンプルを滴下し終わったらシリカゲルプレートを展開槽に入れ、約 30 分展開した。

カロテノイド生合成経路遺伝子のシーケンシング

図 2.1 のカロテノイド生合成経路に示した遺伝子のうち、*Psy*、*Ccs* の塩基配列を‘チェイロホワイト’、‘ハバネロレッドサビナ’、及び‘イエローブートジョロキア’、‘ハバネロスアープオレンジ’、‘ホワイトファタリ’の 5 品種で決定した。‘チェイロホワイト’と‘ハバネロレッドサビナ’では *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の 5'UTR から 3'UTR にかけて、‘イエローブートジョロキア’、‘ハバネロスアープ

オレンジ’、‘ホワイトファタリ’では *Psy* 遺伝子の第 1 エキシソンの途中から第 6 エキシソンの途中までと *Ccs* 遺伝子の 5’UTR から 3’UTR にかけての塩基配列を決定した。また、*Ggps*、*Pds*、*Lcyb*、*Crtz-2* の塩基配列を‘チェイロホワイト’と‘ハバネロレッドサビナ’で決定した。*Ggps*、*Lcyb*、*Crtz-2* の 3 遺伝子については 5’UTR から 3’UTR にかけてのゲノム DNA 塩基配列を、*Pds* 遺伝子については cDNA の ORF 塩基配列をそれぞれ決定した。

本章で使ったプライマーを表 2.2 に示した。シーケンシングに使った鋳型は、*Ggps* 遺伝子は *Ggps-u* と *Ggps-d* のプライマーセットで約 1.3kbp、*Lcyb* 遺伝子は *Lcyb_-F118* と *Lcyb_R1707* のプライマーセットで約 1.8kbp、*Crtz-2* 遺伝子は *Crtz-2_-F93* と *Crtz-2_R2078* のプライマーセットで約 2.1kbp、*Ccs* 遺伝子は *Ccs24* と *CcsR+1566* のプライマーセットで約 1.8kbp をそれぞれ増幅した。*Psy* 遺伝子は 5’UTR から 3’UTR にかけての全長を一度に増幅することができなかったため、*Psy_-F143* と *Psy_ex2_550R* のプライマーセットで挟まれた 5’UTR から第 2 エキシソンにかけての約 700bp (領域 1)、*Psy-u* と *Psy-d* のプライマーセットで挟まれた第 1 エキシソンから 3’UTR にかけての約 2.8kbp (領域 2)、*Psy_int5_2453F* と *Psy_R3024* のプライマーセットで挟まれた第 5 イントロンから 3’UTR にかけての約 600bp (領域 3) の 3 つに分けて鋳型を得た。*Pds* 遺伝子は、全長が約 6kbp と大きかったため、果皮 cDNA から *Pds_-F37* と *Pds_R6409* のプライマーセットで挟まれた 5’UTR から 3’UTR にかけての約 1.9kbp を鋳型とした。

PCR 反応液は、5 μ L の 10x Ex Taq Buffer、4 μ L の dNTP mixture (2.5mM)、それぞれ 10 μ M の Forward プライマーと Reverse プライマー 2.5 μ L ずつ、5U/ μ L の Ex Taq DNA ポリメラーゼ (5U/ μ L、タカラバイオ) 0.25 μ L、20ng/ μ L の DNA 希釈液 3 μ L を滅菌ミリ Q 水で 50 μ L に定容した。なお、*Psy* 領域 2 は上記の他にジメチルスルホキシドを 2.5 μ L 加え、滅菌ミリ Q 水で 50 μ L に定容した。*Lcyb_-F118* と *Lcyb_R1707* のプライマーセット以外の PCR 条件は、94°C、1 分の初期

変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、3 分の伸長のサイクル反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C、3 分の最終伸長を行うプログラムとした。Lcyb_F118 と Lcyb_R1707 のプライマーセットでは、上記の PCR 条件のアニーリング条件を 68°C、30 秒とした。得られた PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動で確認後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) のプロトコールに従って精製した。塩基配列はユーロフィンジェノミクス社の DNA シーケンスサービスを利用して決定した。

カロテノイド生合成経路遺伝子の RT-PCR

‘チェイロホワイト’と‘ハバネロレッドサビナ’の完熟直前 (Turning) の果実の果皮から RNA を Qiagen の RNeasy Plant Mini Kit のプロトコールに従って抽出した。抽出には RLT バッファーを使用し、途中で Qiagen の RNase-Free DNase Set で DNA を分解した。抽出した RNA は Life Technologies の Qubit 3.0 Fluorometer の RNA HS Assay で濃度を測定し、50ng/μL に希釈した。cDNA はタカラバイオの PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit のプロトコールに従って合成した。

RT-PCR は *Ggps*、*Lcyb*、*Pds*、*Crtz-2*、*Psy*、*Ccs* について行い、使用したプライマーを表 2.2 に示した。RT-PCR 反応液は、2μL の 10x Ex Taq Buffer、1.6μL の dNTP mixture (2.5mM)、それぞれ 10μM の Forward プライマーと Reverse プライマー 1μL ずつ、5U/μL の Ex Taq DNA ポリメラーゼ (5U/μL、タカラバイオ) 0.1μL、cDNA 溶液 2μL を滅菌ミリ Q 水で 20μL に定容した。PCR 条件は、*Ggps*、*Lcyb*、*Pds*、*Crtz-2* では 94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、1 分の伸長のサイクル反応を 25 サイクル行い、最後に 72°C、1 分の最終伸長を行うプログラムとし、*Psy* と *Ccs* ではこのプログラムのアニーリング温度をそれぞれ 67°C と 64°C に変更した。ポジティブコントロールとしてハウスキーピング遺伝子のユビキチン結合酵素 E2 を Ubiquitin-F プライマー

と Ubiquitin-R プライマーで増幅した。PCR 条件は、94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、30 秒の伸長のサイクル反応を 25 サイクル行い、最後に 72°C、30 秒の最終伸長を行うプログラムとした。

交雑による遺伝解析

‘チェイロホワイト’を母本、‘ハバネロレッドサビナ’、‘ハバネロレモン’、‘ハバネロスアーブオレンジ’をそれぞれ父本とした F₁ 個体の果実色を調べた。

3. 結果

TLC によるカロテノイド組成分析

白色果実色品種の‘チェイロホワイト’と正常の赤色果実色品種の‘ハバネロレッドサビナ’、及び、比較用として加えた‘ハバネロオレンジ’、‘ハバネロレモン’、‘イエローブートジョロキア’の 5 品種の TLC の結果を図 2.2 に示した。TLC の結果、白色品種である‘チェイロホワイト’でもカロテノイドが検出された。しかし、その他の有色品種と比べると、色素量、色素構成ともに異なっていた。色素量については、‘チェイロホワイト’は‘ハバネロレッド’や‘ハバネロオレンジ’と比べるとクロマトグラフの色が非常に薄く、カロテノイド量の著しい減少が確認された。正常型の‘ハバネロレッドサビナ’がもっとも濃いクロマトグラフを示し、同じ TLC パターンをもつ品種間の比較では、‘ハバネロオレンジ’、‘ハバネロレモン’の順に薄くなっていた。この量の変化は、稲葉（2013）で報告されていたものと同じであり、稲葉（2013）が考察したように 3 品種間の *Psy* 遺伝子の対立遺伝子の違いによるものと考えられる。‘チェイロホワイト’のクロマトグラフは機能欠損型の *Psy* 遺伝子をもつ‘ハバネロレモン’よりも明らかに薄かった。色素構成に関しては、非赤色果実系統であっても正常な *Ccs* 遺伝子をもつ場合、カプサンチンとカプソルビンまでの生合成経路が正常に進むため、赤色系統と同じすべての色素構成が見られることが報告されている（稲葉 2013）が、‘チェイロホワイト’では、‘ハバネロレッドサビナ’、‘ハバネロオレンジ’、‘ハバネロレモン’で見られるカプサンチンとカプソルビンが検出されず、黄色品種である‘イエローブートジョロキア’と同じ TLC パターンが見られた。このことから、‘チェイロホワイト’の *Ccs* 遺伝子に機能に影響する何らかの変異があることが示唆された。また、‘イエローブートジョロキア’でも、カプサンチンとカプソルビンが検出されなかったが、このことは稲葉（2013）の結果でも報告されている。この結

果は、‘イエローブートジョロキア’の *Ccs* 遺伝子にも機能に影響する変異があることを示唆するが、イエローブートジョロキアの *Ccs* 遺伝子の塩基配列はまだ不明であるため、以下のシーケンシング解析で、‘チェイロホワイト’とともに‘イエローブートジョロキア’の *Ccs* 遺伝子の塩基配列も解読を行った。

Psy 遺伝子と *Ccs* 遺伝子のシーケンシング

Psy 遺伝子は、いずれも 5'UTR から 3'UTR にかけて、‘チェイロホワイト’で 3,208bp、‘ハバネロレッドサビナ’で 3,168bp を決定した。*Ccs* 遺伝子は、いずれも 5'UTR から 3'UTR にかけて、‘チェイロホワイト’で 1,903bp、‘ハバネロレッドサビナ’で 1,679bp を決定した。‘チェイロホワイト’の *Psy* 遺伝子では、‘ハバネロレッドサビナ’との比較で ORF に 4 か所の非同義置換があった。そのうち、開始コドンから 120bp の G が‘チェイロホワイト’では欠失し、フレームシフト変異で 134bp 下流に終止コドンが生じていた（表 2.3）。このフレームシフト変異は稲葉（2013）が報告した‘*psy*²’と同じものだった。また、開始コドン上流 33bp に 1 塩基欠失が見つかったが、シス配列データベース PLACE (Higo *et al.* 1999)

(<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=ja>) による解析の結果、この欠失は TATA ボックスなど重要な発現調節モチーフには位置していなかった。また、*Psy* 遺伝子の 5 つのイントロンのスプライシングジャンクションは‘チェイロホワイト’ではいずれも GT-AG モチーフを保持していた。一方、‘チェイロホワイト’の *Ccs* 遺伝子は、‘ハバネロレッドサビナ’との比較で ORF に非同義置換が 4 か所、同義置換が 3 か所あり、そのうち開始コドンから 599bp の C から A への 1 塩基置換によって終止コドンが生じていた（表 2.3）。これは Ha *et al.* (2007) が‘IT 164918’という *C. chinense* の 1 系統で発見し報告した‘*ccs*¹’と同じ変異だった。さらに、‘チェイロホワイト’の *Ccs* 遺伝子の開始コドン上流 12bp に G の 1 塩基挿入、29bp 上流、66bp 上流、84bp 上流の 3 か所に 1 塩基置換があったが、

PLACE による解析でいずれの挿入、置換も TATA ボックスのような重要な発現調節モチーフには位置していなかった。

以上の結果から、‘チェイロホワイト’は *Psy* 遺伝子第 1 エキシソンの 1 塩基欠失によるフレームシフト変異と、*Ccs* 遺伝子の 1 塩基置換によるナンセンス変異が原因で白色果実になっている可能性が強く示唆された。

続いて、比較用に決定した他の非赤色品種‘イエローブートジョロキア’と‘ハバネロスアープオレンジ’の結果について述べる。*Psy* 遺伝子のシーケンシングでは、‘イエローブートジョロキア’で第 1 エキシソンの開始コドン下流 60bp から第 6 エキシソン 5'側 154bp までの 2,780bp を、‘ハバネロスアープオレンジ’で第 1 エキシソンの開始コドン下流 56bp から第 6 エキシソン 5'側 154bp までの 2,784bp を決定した。*Ccs* 遺伝子では、いずれも 5'UTR から 3'UTR にかけて、‘イエローブートジョロキア’で 1,882bp、‘ハバネロスアープオレンジ’で 1,883bp、‘ホワイトファタリ’で 1,684bp をそれぞれ決定した。‘イエローブートジョロキア’と‘ハバネロスアープオレンジ’の *Psy* 遺伝子は‘ハバネロレッドサビナ’の塩基配列と同一だった。一方、*Ccs* 遺伝子は、‘イエローブートジョロキア’と‘ハバネロスアープオレンジ’が共に開始コドンから 599bp の C が A に置換することで終止コドンが生じていた。この変異は先に述べた‘チェイロホワイト’で見つかった‘*ccs*’と同一の変異だった。また、*Ccs* 遺伝子の開始コドン上流 12bp に G の 1 塩基挿入、29bp 上流、66bp 上流、84bp 上流の 3 か所に 1 塩基置換があったが、これらはいずれも‘チェイロホワイト’で見つかったものと同じものだった。

Ggps、*Pds*、*Lcyb*、*Crtz-2* のシーケンシング

他のカロテノイド生合成遺伝子が白色の表現型に関与しているかを明らかにするため、‘チェイロホワイト’と‘ハバネロレッドサビナ’で *Ggps*、*Pds*、*Lcyb*、*Crtz-2* の塩基配列を決定し、比較した。*Pds* 遺伝子については cDNA の ORF 全

長の塩基配列を決定した。*Ggps* 遺伝子は 5'UTR から 3'UTR にかけて、'チェイロホワイト'で 1,203bp、'ハバネロレッドサビナ'で 1,201bp、*Pds* 遺伝子は 5'UTR から 3'UTR にかけて、'チェイロホワイト'で 1,827bp、'ハバネロレッドサビナ'で 1,826bp、*Lcyb* 遺伝子は 5'UTR から 3'UTR にかけて、'チェイロホワイト'で 1,758bp、'ハバネロレッドサビナ'で 1,755bp、*Crtz-2* 遺伝子は 5'UTR から 3'UTR にかけて、'チェイロホワイト'で 2,125bp、'ハバネロレッドサビナ'で 2,103bp を決定した。*Ggps* 遺伝子と *Lcyb* 遺伝子は ORF にそれぞれ 1 か所ずつ塩基置換があったが、いずれも同義置換だった。*Pds* 遺伝子と *Crtz-2* 遺伝子の塩基配列は、'チェイロホワイト'と'ハバネロレッドサビナ'で同一だった。

カロテノイド生合成経路遺伝子の発現解析

白色果実品種と正常型品種の間で、カロテノイド生合成関連遺伝子の発現量の変化があるかどうかを確認するため、RT-PCR による発現解析を行った。その結果、*Psy*、*Ccs*、*Ggps*、*Pds*、*Lcyb*、*Crtz-2* のいずれも両品種で発現が確認された（図 2.3）。このことは、これらの遺伝子において、発現を全くさせなくなってしまうような遺伝子の大規模欠失やプロモータの致命的な変異がないことを意味しており、上述の塩基配列解析の結果と矛盾しない。しかし、発現量に関しては若干の変異があり、'チェイロホワイト'の *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の発現量が'ハバネロレッドサビナ'と比較して低下していた。一方で、*Ggps*、*Pds*、*Lcyb*、*Crtz-2* については両品種で発現量に差が見られなかった。

交雑による遺伝解析

'チェイロホワイト'を母本、'ハバネロレッドサビナ'、'ハバネロレモン'、'ハバネロスアーブオレンジ'のそれぞれを父本とした交雑の結果得られた F₁ 個体の果実色を図 2.4 に示した。'ハバネロレッドサビナ'を父本とした F₁ の果実は赤にな

った。この結果から、‘チェイロホワイト’の白色果実色は正常型の赤色果実色に対し劣性形質であることが明らかになった。また、‘ハバネロレモン’と‘ハバネロスアープオレンジ’を父本としたF₁の果実はそれぞれクリーム色と黄色という父本と同じ表現型になった。このことから、チェイロホワイトの白色果実色は、正常型の赤色のみならず、赤色に対して劣性形質である‘ハバネロレモン’のクリーム色、‘ハバネロスアープオレンジ’の黄色に対しても劣性形質であることが明らかになった。

白色品種‘ホワイトファタリ’の *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子のシーケンシング

上述のように、白色果実色品種チェイロホワイトが、*Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の2重変異体あることが示唆されたため、他の白色果実色品種も同じ遺伝要因で白色果実になっているのかを明らかにするため、白色果実変異の遺伝機構が不明の白色品種‘ホワイトファタリ’について、*Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の塩基配列を決定した。*Psy* 遺伝子は、第1エキソンの開始コドン下流83bpから第6エキソン5'側150bpまでの2,755bpを決定した。*Ccs* 遺伝子は、5'UTRから3'UTRにかけての1,684bpを決定した。その結果、‘ホワイトファタリ’の*Psy* 遺伝子第4エキソンに2塩基(AA)の挿入があり、フレームシフト変異によって66bp下流に終止コドンが生じていた(表2.3)。それ以外の領域は、‘ハバネロレッドサビナ’と同一の塩基配列だった。この変異型*Psy* アリルはこれまでに報告されていないものであったため、新たに‘*psy*³’と命名した。一方、*Ccs* 遺伝子では、開始コドンから599bpにCからAへの1塩基置換により終止コドンが生じていた。これは先に述べた‘チェイロホワイト’、‘イエローブートジョロキア’、‘ハバネロスアープオレンジ’が持っていた‘*ccs*¹’と同じ変異だった。

以上の結果から、‘ホワイトファタリ’は、チェイロホワイト同様、*Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の両方が変異型アリルになっているが、*Psy* 遺伝子のアリルは‘チ

エイロホワイト'の変異型アリルとは異なるものであり、*Ccs* 遺伝子の変異型ア
リルのみ共通していることが、明らかになった。

4. 考察

本章では、トウガラシの白色果実色の遺伝機構の解明を目的に、白色果実品種‘チェイロホワイト’を主たる対象として、カロテノイド生合成経路遺伝子のシーケンシング、発現解析および TLC 分析を行い、この品種が *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の 2 重変異体であることを明らかにした。緒言でも述べたように、これまで分子遺伝学的な解析が行われた果実色変異品種はいずれも黄やオレンジ、クリーム色のみで、白色品種を対象として使用したのは本研究が初めてである。本章では、‘チェイロホワイト’に加えて、もう一つの白色品種‘ホワイトファタリ’の *Psy* と *Ccs* の塩基配列を決定した。その結果、*Psy* 遺伝子の第 4 エキソンに 2 塩基 (AA) の挿入があり、フレームシフト変異によって 66bp 下流に終止コドンが生じていた。この変異型 *Psy* アリルはこれまでに報告がなかったものだったため、‘*psy*³’と名付けた。また、*Ccs* 遺伝子は開始コドンから 599bp に C から A への 1 塩基置換により終止コドンが生じる変異型アリル‘*ccs*¹’であり、‘チェイロホワイト’と同じものだった。‘ホワイトファタリ’が *Psy* と *Ccs* の 2 重変異体だったことは、‘チェイロホワイト’の解析結果に基づき *Psy* と *Ccs* の 2 重変異により白色品種が生じるという仮説を裏付ける結果であるとともに、先に述べた笹沼ら (2013a, b) のトウガラシ果実色の‘2 遺伝子座複対立遺伝子モデル’にも合致する結果である。

緒言では‘チェイロホワイト’の白色果実色変異の遺伝機構として、1) *Psy* と *Ccs* の 2 重変異、2) *Psy* 遺伝子のみの 1 遺伝子の変異、3) *Psy*、*Ccs* 以外のカロテノイド生合成経路に関わる遺伝子の単独の変異もしくは *Psy* や *Ccs* の変異との複合要因、の 3 つの仮説を述べた。TLC によるカロテノイド組成分析の結果、‘チェイロホワイト’はカプサンチンとカプソルビンが欠失していた。また、*Psy* と *Ccs* のシーケンシングの結果、‘チェイロホワイト’はクリーム色品種‘ハバネロレ

モン'と同じ変異型 *Psy* アリル '*psy*²'に加え、変異型 *Ccs* アリル '*ccs*¹'を持っていた。以上の結果から、'チェイロホワイト'の白色果実変異の原因が少なくとも仮説2)の *Psy* 遺伝子単独の変異ではないことは明らかである。また、仮説3)の *Psy*、*Ccs* 以外のカロテノイド生合成経路に関わる遺伝子の単独の変異もしくは *Psy* や *Ccs* の変異との複合要因かどうかについては、後述の'チェイロホワイト'を母本とした交雑実験についての項で述べる。

緒言で述べたように、*Ccs* 遺伝子の変異は赤色カロテノイドのカプサンチンとカプソルビンの欠失を引き起こす (Guzman *et al.* 2010、Ha *et al.* 2007、Lang *et al.* 2004、Popovsky and Paran 2000、Rodriguez-Uribe *et al.* 2012)。また、*Psy* 遺伝子の突然変異はカロテノイドの総量に影響する (Gómez-García and Ochoa-Alejo 2013、Huh *et al.* 2001)。以上のことから、'チェイロホワイト'は *Ccs* 遺伝子に生じたナンセンス変異によってカプサンチンとカプソルビンを欠失し、さらに *Psy* 遺伝子第1エキソンのフレームシフト変異によって総カロテノイド量が著しく減少していることが示され、'チェイロホワイト'の白色果実変異の原因として少なくとも *Psy* と *Ccs* の変異が関与していることが強く示唆された。*PSY* はカロテノイド生合成経路の上流で GGPP からフィトエンを生合成している酵素であり、変異によって *Psy* 遺伝子の機能が欠損するとカロテノイドが生合成されないはずである。にもかかわらず、機能を完全に失った変異型 *Psy* アリル '*psy*²'を持つ'チェイロホワイト'が微量ながらカロテノイドを蓄積していることは、稲葉 (2013) も指摘しているように、*PSY* 以外にフィトエンの生合成を触媒している酵素の存在、または GGPP からフィトエンを合成する反応が緩やかにではあるが自発的に進む反応であることを示唆しているのかもしれない。本章で用いたもう一つの白色品種'ホワイトファタリ'は'チェイロホワイト'より果実色がより白い。もしかしたら、'ホワイトファタリ'は *Psy* 以外にフィトエンの生合成を触媒している遺伝子にも変異を持つため、'チェイロホワイト'より果実色がより

白いのかもしれない。

カロテノイド合成経路遺伝子の RT-PCR の結果、‘チェイロホワイト’で *Psy* と *Ccs* の発現量が低下していた。これは本論文の第 1 章の考察でも述べた、ナンセンス変異やフレームシフト変異によって本来とは異なる位置に終止コドンが生じた mRNA を迅速に分解する nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (Conti and Izaurralde 2005) が原因と考えられる。Kim *et al.* (2010) は、第 5 イントロン 3'側スプライシングジャンクションの 1 塩基置換によってフレームシフトが生じる変異型 *Psy* アリル‘*psy*¹’について、PSY の活性が低下したため、ポジティブフィードバックによって *Psy* 遺伝子の転写量が増加したと述べているが、‘チェイロホワイト’ではそのような現象は見られなかった。‘*psy*¹’は第 5 エキソンまでは正常な PSY のアミノ酸配列を持っているため、フィトエン合成酵素としての機能が低下した状態になっている。一方、‘*psy*²’は第 1 エキソンでフレームシフト変異が生じて第 2 エキソン以降が翻訳されない状態と考えられ、フィトエン合成酵素としての機能が完全に失われている可能性が高い。これらのことから、‘*psy*¹’は NMD による mRNA の分解を免れ、むしろ PSY 活性の低下を補償するために転写量が上昇する一方、‘*psy*²’は完全にフィトエン合成酵素としての機能を失っているため、NMD によって mRNA が分解されていると考えられる。

黄色品種‘イエローブーツジョロキア’とオレンジ色品種‘ハバネロスアープオレンジ’の *Ccs* 遺伝子は、いずれも‘*ccs*¹’に相当する開始コドンから 599bp 下流の C が A に置換して終止コドンが生じるナンセンス変異があった。また、TLC によるカロテノイド組成分析の結果、‘イエローブーツジョロキア’ではカプサンチンとカプソルビンが検出されなかった。これらのことから、‘イエローブーツジョロキア’は変異型 *Ccs* アリル‘*ccs*¹’によって黄色果実をつけると考えられた。‘ハバネロスアープオレンジ’のオレンジ色果実についても‘*ccs*¹’が原因だと考えられるが、‘イエローブーツジョロキア’の果実色が黄色なのに対し、‘ハバネロスアープ

ブオレンジ’はオレンジ色である。この果実色の違いは‘*ccs*¹’だけでは説明できない。本章では、‘イエローブートジョロキア’と‘ハバネロスアープオレンジ’の *Psy* 遺伝子は第1エキソンの途中から第6エキソンの途中までの塩基配列を決定し、少なくともこの領域には表現型に影響を及ぼすような変異がないことを確認しているが、第1エキソンと第6エキソンに未決定の領域がある。また、プロモーター領域の塩基配列も決定していない。これら2品種の果実色の違いは、*Psy* 遺伝子の塩基配列未決定領域にあるのかもしれない変異が影響している可能性がある。また、*Psy*、*Ccs* 以外のカロテノイド生合成遺伝子の変異や、特定のカロテノイドの量やカロテノイドの総量に影響を及ぼす未知の因子、たとえばカロテノイド生合成経路遺伝子の発現量を調節している転写因子の変異なども原因として考えられる。たとえば、本論文の序論でも述べたように、カリフラワーやメロン、シロイヌナズナでは *PSY* と相互作用する *OR* というタンパク質が同定されている (Lu *et al.* 2006、Tzuri *et al.* 2015、Zhou *et al.* 2015)。この *OR* は色素体移行シグナル、膜貫通ドメイン、そしてタンパク質間相互作用に関与する *DnaJ* システインリッチドメインを持つタンパク質で、二量体を形成した上で *PSY* と相互作用することで *PSY* の活性を高めていることが明らかになっている (Zhou *et al.* 2015)。トウガラシにおいても、*C. annuum* における *Or* のオーソログであるフィブリリン遺伝子 (*Fbn1*) の発現量がカプサンチン量と正の相関があることが報告されている (Kilcrease *et al.* 2015)。

本章では、‘チェイロホワイト’を母本とし、‘ハバネロレッドサビナ’、‘ハバネロレモン’、‘ハバネロスアープオレンジ’の3品種をそれぞれ父本とした *F*₁ 個体を作り、果実色を見る実験を行った。‘ハバネロレッドサビナ’を父本とした *F*₁ 個体は赤色果実をつけた。このことから、‘チェイロホワイト’の白色果実変異は劣性形質であることが明らかになった。また、変異型 *Psy* アリル‘*psy*²’を持つ‘ハバネロレモン’との *F*₁ がクリーム色、変異型 *Ccs* アリル‘*ccs*¹’を持つ‘ハバネロスア

ーブオレンジ’との F_1 がオレンジ色の果実をつけた。笹沼ら (2013a, b) が再考察した Kormos and Kormos (1960) の‘2 遺伝子座複対立遺伝子モデル’では、 $c1$ を機能低下型 Psy アリル‘ psy^1 ’、 $c2$ を機能喪失型 Psy アリル‘ psy^2 ’とし、 $Yc2$ がクリーム色、 yC がオレンジ、 $yc2$ がアイボリーまたは白になっているとしている。このアリの定義に基づく‘チェイロホワイト’の遺伝子型は $yc2$ となり、 $Yc2$ の‘ハバネロレモン’の F_1 は遺伝子型 $Yyc2$ で、‘チェイロホワイト’と遺伝子型 yC の‘ハバネロスアーブオレンジ’の F_1 は遺伝子型 $yyCc$ となる。前者の F_1 の果実色が‘ハバネロレモン’と同じクリーム色、後者が‘ハバネロスアーブオレンジ’と同じオレンジ色になったことは、笹沼らが再考察した遺伝モデルと矛盾せず、少なくとも‘チェイロホワイト’の白色果実色を引き起こす要因に優性のものがないことを示している。しかし、Hurtado-Hernandez and Smith (1985) が提唱している 3 重劣性変異により白色果実になるという仮説も今回の F_1 の結果と矛盾しておらず、いずれの遺伝モデルが正しいかを検証するには今後の F_2 世代の表現型の決定が必要である。

本章で行った Psy と Ccs のシーケンシングの結果、‘チェイロホワイト’、‘イエローブートジョロキア’、‘ハバネロスアーブオレンジ’、‘ホワイトファタリ’が持っていた Ccs 変異アリルは、いずれも既知の‘ ccs^1 ’だった。また、‘チェイロホワイト’が持っていた Psy 変異アリルは‘ハバネロレモン’と同じ‘ psy^2 ’だった。以前の研究で見つかった Psy と Ccs の変異型アリルは、いずれも系統特異的なものと考えられてきた。しかし、本章の研究で得られた結果から、 Psy と Ccs の変異型アリルには複数の品種に共通して存在するものがあることが示唆された。一方で、‘ホワイトファタリ’からは、新規の変異型 Psy アリル‘ psy^3 ’が見つかった。この結果は、さらに多くの非赤色品種を調べることで、新規の変異型アリルが見つかる可能性を示唆している。

トウガラシの栽培種のうち、もっとも広く栽培されている *C. annuum* の非赤

色品種からは、非常に多様な *Ccs* 変異アリルが見つかったが、いずれの変異アリルも系統特異的である。また、*C. annuum* では *Psy* 変異によって生じた非赤色品種がこれまでに報告されていない。一方、*C. annuum* とは異なり、もう一つのメジャーな栽培種である *C. chinense* の非赤色品種では *Psy*、*Ccs* ともに複数の変異アリルが見つかった (Ha *et al.* 2007、稲葉 2013、Kim *et al.* 2010)。また、*C. chinense* の非赤色品種が持つ *Psy*、*Ccs* の変異アリルには複数の品種で共有されているものがあることが本章の研究で示された。これらのことは、栽培種によって非赤色品種の起源と育種の歴史が異なることを示している。

以上のように、本章では当初の目的であったトウガラシの白色果実色の遺伝機構の解明については、少なくとも *Psy*、*Ccs* 両遺伝子の 2 重変異が関わっていることが明らかになった。また、それに加え、‘イエローブートジョロキア’、‘ハバネロスアープオレンジ’、‘ホワイトファタリ’で行った *Psy* と *Ccs* のシーケンシングから、これまで系統特異的と考えられてきた *C. chinense* の非赤色品種が持つ *Psy* と *Ccs* の変異アリルが、複数の品種で共有されていることが示された。

しかしながら、本章で調べられた品種数が限られており、*C. chinense* の *Psy*、*Ccs* の変異アリルの中でどれがメジャーなものか、変異アリルの分布に地域による偏在性があるかどうか、‘チェイロホワイト’や‘ホワイトファタリ’のような *Psy* と *Ccs* の 2 重変異体がどのくらいあるのかは不明である。また、*Psy* と *Ccs* の変異によらない、未知の遺伝機構による非赤色系統が存在する可能性もある。第 3 章では、これらのことを解明するため、より多くの *C. chinense* の非赤色系統で *Psy* と *Ccs* の多様性を調べた。

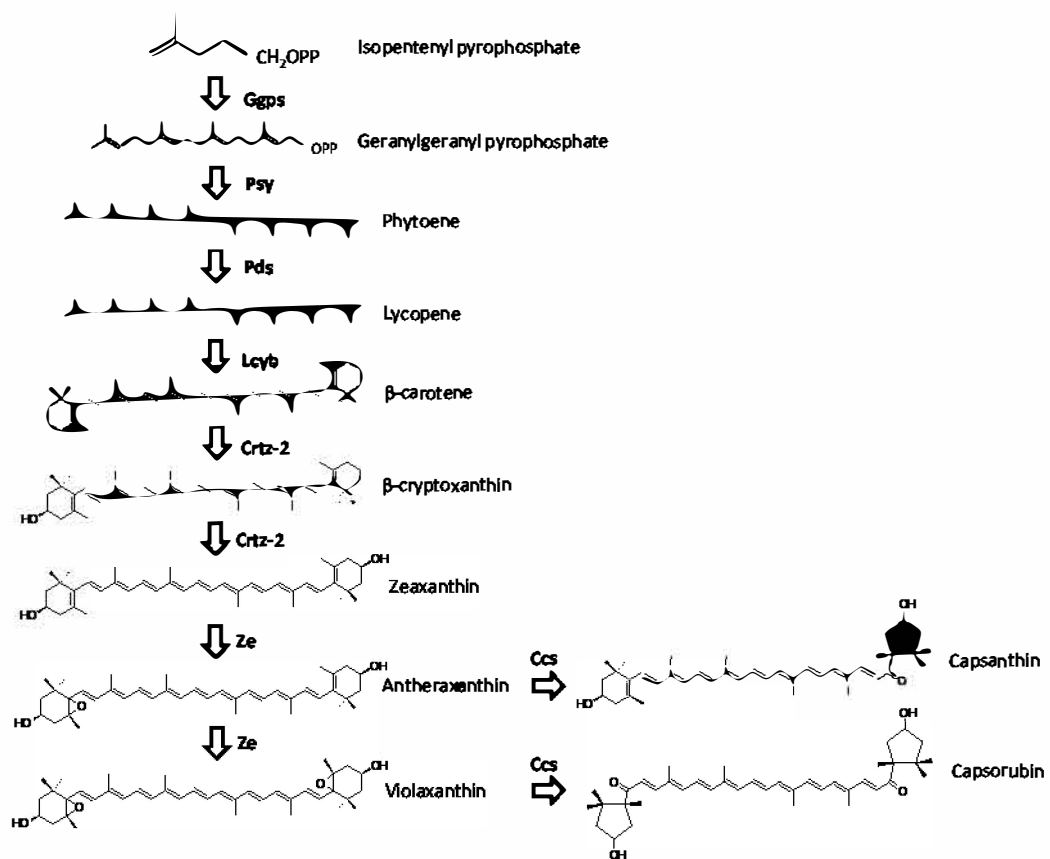


図2.1. カロテノイド生合成経路。

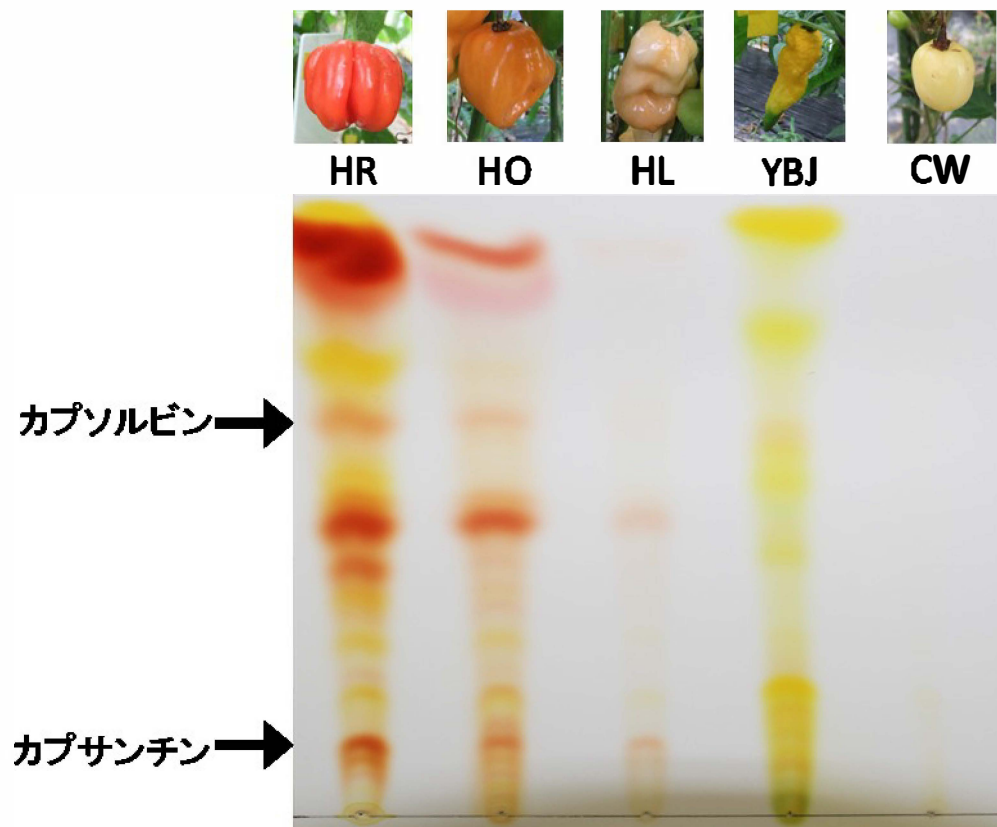


図2.2. TLCによるカロテノイド組成分析。矢印で示したバンドがカプサンチンとカプソルビン。

HR: ハバネロレッドサビナ

HO: ハバネロオレンジ

HL: ハバネロレモン

YBJ: イエローブーツジョロキア

CW: チェイロホホワイト

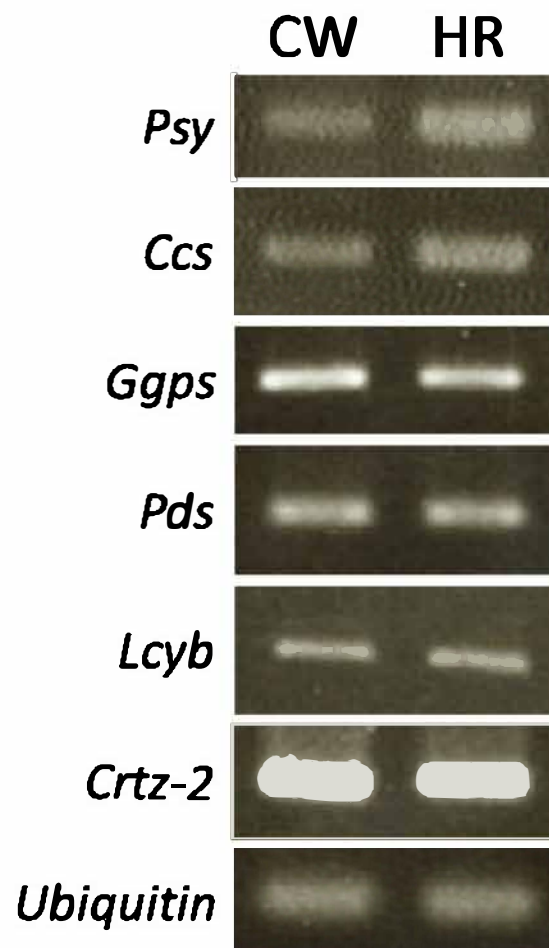


図2.3. カロテノイド生合成経路遺伝子のRT-PCR。

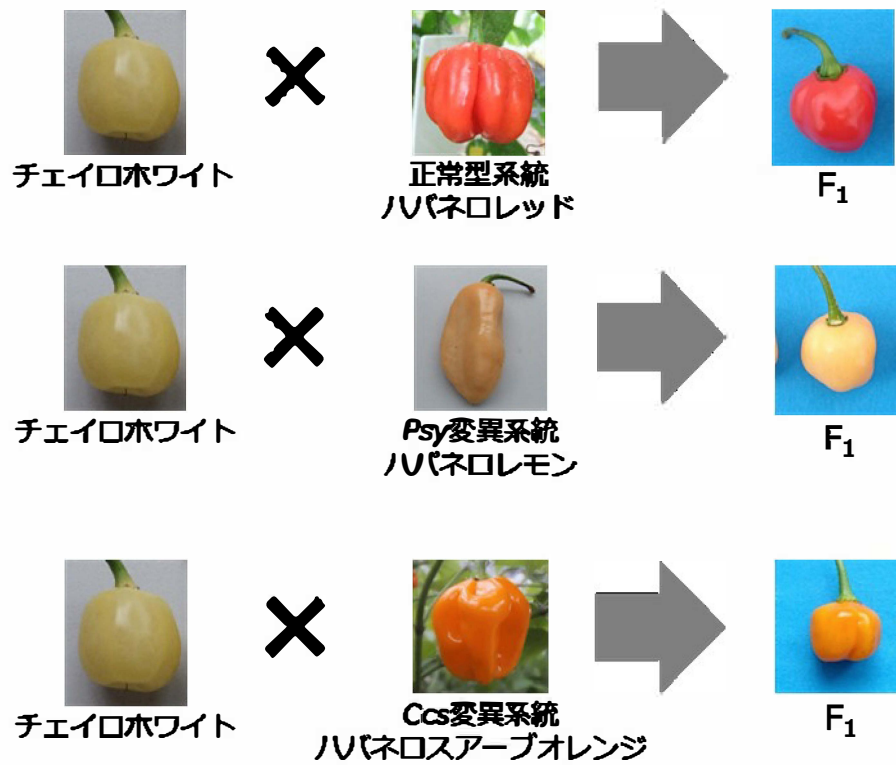


図2.4. チェイロホワイトを母本とした交雑実験の結果。

表2.1. トウガラシ果実色の遺伝モデル

| Kormos and Kormos (1960) | | Hurtado-Hernandez and Smith (1985) | |
|--------------------------|----------------|------------------------------------|--------------------|
| 遺伝子型 | 表現型 | 遺伝子型 | 表現型 |
| <i>y+c1+</i> | Red | <i>y+c1+c2+</i> | Red |
| <i>y+c1</i> | Salmon red | <i>y+c1c2+</i> | Light red |
| <i>y+c2</i> | Pink | <i>y+c1+c2</i> | Orange |
| | | <i>y+c1c2</i> | Pale orange |
| <i>yc1+</i> | Orange | <i>yc1+c2+</i> | Orange-yellow |
| <i>yc1</i> | Lemon yellow | <i>yc1+c2</i> | Pale orange-yellow |
| <i>yc2</i> | ivory or white | <i>yc1c2+</i> | Lemon-yellow |
| | | <i>yc1c2</i> | white |

表22. 本章で使ったプライマー

| 遺伝子 | プライマー名 | 塩基配列 (5'-3') | 目的 | リファレンス |
|--------|----------------|----------------------------|------------------------|-------------------------|
| Pay | Pay_F1 43 | TGCAGAAGCCAAAGAAATAGGTT | シーケンステンプレート1の増幅 | 本研究 |
| | Pay_ex2_550R | OTOTOGGAGTGAATTAGGAT | シーケンステンプレート1の増幅 | 稲葉 2013 |
| | Pay-u | ATGTGTGTTGCGTTGTTATGGGTTG | シーケンステンプレート2の増幅、シーケンス | Huh <i>et al.</i> 2001 |
| | Pay-d | OOTGATTTOATGTTTGTAGAAAGG | シーケンステンプレート2の増幅、RT-PCR | Huh <i>et al.</i> 2001 |
| | Pay_Int5_2453F | TCAGGACCTACAGACGAATG | シーケンステンプレート3の増幅 | 稲葉 2013 |
| | Pay_F3024 | CTTGCAATTTCTGCGAGAGG | シーケンステンプレート3の増幅 | 本研究 |
| | Pay_ex3_604F | CAGGAGAACAGACGAACCTTG | シーケンス | 稲葉 2013 |
| | Pay_ex4_1374F | TTGAAGGAATGGTATGGAC | シーケンス | 稲葉 2013 |
| | Pay_ex5_1878F | GAATTAGCACAGGCGAGTCT | シーケンス、RT-PCR | 稲葉 2013 |
| | Pay_Int5_2375F | GTGTGTCATTGTGCTAAGCC | シーケンス | 稲葉 2013 |
| | Pay_ex6_F2395 | TCTCTGCTGTTGTACCGCAG | シーケンス | 本研究 |
| Cae | Pay_ex1_164R | TCCCAAGTAAAGAACCAAAAC | シーケンス | 稲葉 2013 |
| | Pay_Int3_1154R | CTAGGACGACAGGAACTGAT | シーケンス | 稲葉 2013 |
| | Cae24 | TTTCTGTTTTTTGGGAAGAGGA | シーケンステンプレートの増幅、シーケンス | Lang <i>et al.</i> 2004 |
| | CaeR+1566 | AGOTTTTGTTCGATTTTGG | シーケンステンプレートの増幅、RT-PCR | 本研究 |
| | CaeF+617 | GTAGGAAGATAAGCGGTAGG | シーケンス | 本研究 |
| | CaeF+1047 | TATGGGTATTGGTGGGAOTT | シーケンス、RT-PCR | 本研究 |
| | CaeR+811 | TTAGTATTCTTCACCCCTACT | シーケンス | 本研究 |
| | Ggs-u | CTTTCTCGAAGTGAAATTGCAACGAC | シーケンステンプレートの増幅、RT-PCR | Huh <i>et al.</i> 2001 |
| | Ggs-d | TGATCAGCTTCATTTCGATTGG | シーケンステンプレートの増幅、RT-PCR | Huh <i>et al.</i> 2001 |
| | Ggs_F214 | ACGGAGGAGCCATTCAATTTCAA | シーケンス | 本研究 |
| | Ggs_F750 | CCACGTACACAAAAGGCGAG | シーケンス | 本研究 |
| Pds | Ggs_F377 | AGACAAAGCAATTGGCCGGA | シーケンス | 本研究 |
| | Pds_F37 | ATCCTCATGGCAGGTTTGAC | シーケンステンプレートの増幅 | 本研究 |
| | Pds_R6408 | TAGGAGCTTGTCCCGCTGAAT | シーケンステンプレートの増幅、シーケンス | 本研究 |
| | Pds_ex3-R1324 | AGAACATCCCTTGCCTCCAG | シーケンス | 本研究 |
| | Pds_ex7-R2605 | CTGAAGAAATCTGTTCACGCG | シーケンス | 本研究 |
| | Pds_ex12-R2890 | AGOTTTGATAGTTGCTTCAATTGT | シーケンス | 本研究 |
| | Pds-u | ATGTTGGAATTGGTCTTTGGGCTG | RT-PCR | Huh <i>et al.</i> 2001 |
| | Pds-d | GAATATAGTCCGATAGGGTAAG | RT-PCR | Huh <i>et al.</i> 2001 |
| | Lcyb_F118 | AGGGGACCCGATTTGTGTTG | シーケンステンプレートの増幅、シーケンス | 本研究 |
| | Lcyb_R1707 | TCAAGTGGAGTCTGGGGAGG | シーケンステンプレートの増幅 | 本研究 |
| | Lcyb_F243 | TGTGGATCTTGTGTGGTCG | シーケンス | 本研究 |
| Crtz-2 | Lcyb_F727 | GCTGAGCTTGAAGAGCACCC | シーケンス | 本研究 |
| | Lcyb_F1211 | TGTGGCGGATAGAGAGGAGG | シーケンス | 本研究 |
| | Lcyb-u | GCACCTTGTGGGAAATATGGATAGG | RT-PCR | Huh <i>et al.</i> 2001 |
| | Lcyb-d | GATCCGAGATAGTCCGAATTCATTC | RT-PCR | Huh <i>et al.</i> 2001 |
| | Crtz-2_F38 | ACACACTACAACCTTCGTC | シーケンステンプレートの増幅、シーケンス | 本研究 |
| | Crtz-2_F205 | GCACAAAGTGGAAAACAAAGCG | シーケンス、RT-PCR | 本研究 |
| | Crtz-2_F700 | AGTGAAGGGAGGGAATACCTGA | シーケンス | 本研究 |
| | Crtz-2_F1214 | ACCATAAAGGCGCTCATCCCT | シーケンス | 本研究 |
| | Crtz-2_F1706 | TGTGTGGGATGAGGTTTGA | シーケンス | 本研究 |
| | Crtz-2_R1418 | TGCGTATAGGAGGAGGAGG | RT-PCR | 本研究 |
| | Crtz-2_R2078 | TGGGTTAGAGGTTAAATAGAACTG | シーケンステンプレートの増幅 | 本研究 |

表2. 遺伝子型と変異の位置関係

| 遺伝子 | エクソン | 位置 | 塩基置換 | | | 同義置換/非同義置換 | | |
|-----|------|----------|------------|---------|---------------|------------------|-------------------------------|--|
| | | | ハバネロレッドサピナ | チユイロオウケ | イローブト ツヨキア | ハバネロスアープ オレンジ | オウケファタリ | |
| Per | 1 | 38A | G | A | A | A | 非同義置換, Glu → Asp | |
| | | 47A | G | A | A | A | 非同義置換, Asn → Ser | |
| | | 119G | T | G | G | G | 非同義置換, Ala → Val | |
| | | 120G | - | G | G | G | 欠失。フレームシフトにより3bp下流に終止コドン。 | |
| | | 4717-718 | - | - | - | AA | 2bp挿入。フレームシフトにより60bp下流に終止コドン。 | |
| Ocs | | 107A | G | G | G | G | 非同義置換, Lys → Arg | |
| | | 129A | G | G | G | G | 非同義置換, Tyr → Ser | |
| | | 248T | G | G | G | G | 同義置換, Asp → Asp | |
| | | 599G | A | A | A | A | 非同義置換, Ser → 終止コドン | |
| | | 865A | G | G | G | G | 非同義置換, Lys → Arg | |
| | | 1088T | G | G | G | G | 同義置換, Ser → Ser | |
| | | 1213T | G | G | G | G | 同義置換, Thr → Thr | |

第 3 章

トウガラシのカロテノイド生合成経路遺伝子

Psy、*Ccs* の多様性に関する研究

1. 緒言

トウガラシの果実色は辛味と並ぶ重要な商業形質である。異なる果実色をもつ様々な遺伝資源を収集し、その果実色変異の遺伝的要因を特徴づけることは、有用遺伝資源の拡大という観点からトウガラシの育種において重要な課題である。トウガラシの果実色変異の主たる原因遺伝子は、ともにカロテノイド生合成経路に含まれる *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子である。

その商業的価値および学術的な重要性から、トウガラシの非赤色果実色品種の遺伝解析はこれまで数多くなされており、これまでの研究では、トウガラシの栽培種のうち、もっとも広く栽培されている *C. annuum* の非赤色品種には非常に多様な *Ccs* 変異アレルがあり、いずれの変異アレルも系統特異的であることがわかっている。このことは、トウガラシの非赤色果実色を引き起こす突然変異が栽培化や育種の過程で比較的頻繁に起き、それらが淘汰されることなく、むしろ積極的に選抜され生き残ってきたことを意味する。おそらくこれは、果実色の変異が生存力においては中立的であること、果実色が見た目にわかりやすい表現型であること、またオレンジ色や黄色などこれまでにない変異型果実色の人々にとって魅力的であったことにより、表現型に違いをもたらすような新規突然変異が好んで選抜された結果であると考えられる。しかし、このような様々な変異型アレルは、*C. annuum* では *Ccs* 遺伝子でのみ報告されており、*Psy* 遺伝子の変異によって生じた非赤色品種はこれまでに報告されていない。一方、*C. annuum* とは異なり、もう一つのメジャーな栽培種である *C. chinense* の非赤色品種では *Psy*、*Ccs* とともに複数の変異アレルが見つかった（Ha *et al.* 2007、稲葉 2013、Kim *et al.* 2010）。色についても、*Ccs* 遺伝子の変異により生じた *C. annuum* の非赤色品種は黄色かオレンジ色のみであるのに対し、*C. chinense* の非赤色品種には黄色やオレンジ色の他に、*C. annuum* では見つからない *Psy* 遺伝子の

変異によって生じたクリーム色や白色の品種もある。*C. annuum* と *C. chinense* は別種であるが、比較的容易に交雑する。*Ccs* 遺伝子変異型の非赤色品種しか見つかっていない *C. annuum* に、*C. chinense* の変異型 *Psy* アリルを導入できれば、これまでになく *C. annuum* の非赤色品種を開発できると考えられる。

本論文の第 2 章では、*C. chinense* の白色果実品種‘チェイロホワイト’の果実色変異の遺伝要因が *Psy* と *Ccs* の 2 重変異体であることを明らかにしたが、それに加えて、いずれも *C. chinense* に属する黄色品種‘イエローブートジョロキア’、オレンジ色品種‘ハバネロスアーブオレンジ’、白色品種‘ホワイトファタリ’の *Psy* と *Ccs* のシーケンシングで、いくつかの同じ変異アリルが複数の系統で見つかるという興味深い結果を得た。これらのことは、*C. annuum* では *Ccs* の変異アリルを持つものしか見られず、その変異型アリルが系統特異的であることと対照的であり、栽培種によって非赤色品種の起源と育種の歴史が異なることを示している。しかしながら、本論文の第 2 章を含むこれまでの研究で調べられた *C. chinense* の品種数は限られており、*C. annuum* の非赤色果実色が系統ごとに独立に生じた *Ccs* 遺伝子の多数の様々な変異型アリルにより生じているのに対し、*C. chinense* では *Psy* 遺伝子、*Ccs* 遺伝子のいずれかあるいは両方の変異型アリルにより非赤色果実色系統が生じ、それらは複数種類ではあるものの限定された少数の変異型アリルが共有されることにより生じているのではないか、という仮説が正しいのかどうかは判断することができない。さらに、もし *C. chinense* の非赤色果実色系統が限られた少数の変異アリルにより生じていた場合、*Psy*、*Ccs* の変異アリルの中でどれがメジャーなものか、変異アリルの分布に地域による偏在性があるかどうか、さらには‘チェイロホワイト’や‘ホワイトファタリ’のような *Psy* と *Ccs* の 2 重変異体がどのくらいあるのかを解明することも、遺伝資源の特徴付けにおいて重要である。また、これまであまり多く調べられていない *C. chinense* には、*Psy* と *Ccs* の変異によらない、未知の遺伝機構による非赤色

系統が存在する可能性もある。以上のことから、第 3 章では、*C. chinense* の非赤色果実色の原因遺伝子の種レベルでの遺伝傾向の解明とトウガラシの果実色育種における有用遺伝資源の探索を目的として、*C. chinense* の非赤色果実系統の *Psy*、*Ccs* 両遺伝子の多様性解析を行った。

これまでに *C. chinense* で見つかった変異型アリルは、*Ccs* では Ha *et al.* (2007) が発見した開始コドン下流 599bp に 1 塩基置換を持つ '*ccs*¹' と、開始コドン下流 1430bp に 8bp の挿入を持つ '*ccs*²' の 2 種類、*Psy* では Kim *et al.* (2010) が発見した第 5 イントロン 3' 末端のスプライシングジャンクションに塩基置換を持つ '*psy*¹'、稲葉 (2013) が発見した第 1 エキソンに 1 塩基欠失を持つ '*psy*²'、さらに本論文の第 2 章で発見された第 4 エキソンに 2 塩基挿入を持つ '*psy*³' の 3 種類である。第 3 章では、これら既知の変異型アリルの遺伝資源における分布の解明と新規の変異型アリルの発見を目指し、まず、それぞれの変異型アリル特異的 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)、または dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) マーカーの開発を試みた。CAPS、dCAPS マーカーは、標的とする遺伝子領域の PCR 増幅と制限酵素処理により、既知の変異を識別する方法である。シーケンシングすることなく簡便に遺伝子型を判別することができることから、多くの作物でマーカー選抜育種や多様性解析に利用されている (Babu *et al.* 2017、Kushanov *et al.* 2016、Liu *et al.* 2016、Saini *et al.* 2016、Tanaka *et al.* 2010a)。CAPS は、判別したい塩基多型が特定の制限酵素サイトに含まれている場合にのみ使用できる方法であるが、dCAPS は判別したい塩基多型に隣接した部位にプライマーをアニールさせ、プライマーにミスマッチを入れ人為的に制限酵素サイトを構築し制限酵素多型を認識させる方法であり、Neff *et al.* (1998) がシロイヌナズナで使用したのを始めに、CAPS と同様多くの作物で利用されている (Lang *et al.* 2009、Song *et al.* 2016、Villemot and Rolland 2016、Yanagisawa *et al.* 2003)。本章では、開発した CAPS および dCAPS

マーカーを用いたジェノタイピングとシーケンシングを併用し、*C. chinense* 遺伝資源における *Psy* と *Ccs* の多様性解析を行った。

2. 材料と方法

植物材料

本章では、アメリカ合衆国農務省 (USDA) とオランダ遺伝資源センター (CGN) から分譲された *C. chinense* に属する非赤色系統 91 系統を材料として用いた (表 3.1)。具体的には、USDA 系統は 69 系統、CGN 系統は 22 系統である。これらは、ジーンバンクのデータベース上に果実色表現型の情報があり、オレンジや黄などの非赤色果実であることが記載されているものを選んだ。このうち白色との記載があったものは CGN17018 のみだった。採集国は 13 か国にわたり、ペルー 25 系統、ブラジル 19 系統、メキシコ 16 系統、ベネズエラ 8 系統など、中南米 11 か国から合わせて 85 系統を用いた。中南米以外では、アメリカ 5 系統、タンザニア 1 系統の、合わせて 6 系統を用いた。多様性解析では、Moses *et al.* (2014) の論文に従い、これらの地域を Central America、Upper Amazon、Lower Amazon、Guianas、Other の 5 つの地域に分けた。この分類によると、Central America が 21 系統、Upper Amazon が 33 系統、Lower Amazon が 20 系統、Guianas が 11 系統、Other が 6 系統である。これらを 2017 年に山形大学農学部附属農場で栽培し、各系統それぞれ 1 個体から DNA を抽出した。果実が実ったものに関してはその果実色を調べた。

DNA 抽出

全 91 系統の DNA を Murray and Thompson (1980) の CTAB 法に基づき、以下のように抽出した。新鮮な葉約 100mg を乳鉢に入れ、液体窒素で凍結させて乳棒で粉末状になるまで破碎した。破碎した葉を Tris 2.42g、NaCl 16.36g、EDTA 1.49g、CTAB 8g を滅菌ミリ Q 水で 200mL に定容して作った 4% CTAB バッファー 700 μ L に加え、65°C で 1 時間保温した。保温中は 15 分おきに転倒混和した。

保温後、サンプルを室温に冷ましてからクロロホルムとイソアミルアルコールを 24 : 1 の体積比で混合したものを 600 μ L 加えた。これを 5 分間転倒混和した後、遠心分離機（トミー精工 MRX-150、以下、同機種を使用）で室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、上清 500 μ L を取り、そこにイソプロパノールを 500 μ L 加えて緩やかに転倒混和した。これを一晩、-20°C で静置後、室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、イソプロパノールを除去し、そこに 70%エタノールを 300 μ L 加えてタッピングし、遠心分離で生じた沈殿をリンスした。これを再び室温、13,000rpm で 5 分間遠心分離後、70%エタノールを除去し、チューブの蓋を開放してエタノールを揮発させた。これに TE バッファー（pH 8.0、1M の Tris-HCl 1mL と pH 8.0、0.5M の EDTA 200 μ L を 100mL に定容したもの）と DNase free Ribonuclease Glycerol Solution（10mg/mL、ニッポンジーン）0.4 μ L を加え、37°C で 1 時間保温した。抽出された DNA の確認を 1%アガロースゲル電気泳動で行った。また、Qubit 3.0 Fluorometer（Life Technologies）の dsDNA BR Assay による濃度測定結果をもとに 20ng/ μ L の希釈液を調製し、以後の実験に使った。

Psy、*Ccs* 遺伝子のアリル分析

本章で作成した、‘*psy*¹’、‘*psy*²’、‘*ccs*¹’のそれぞれに特異的な DNA マーカーを用いて、非赤色系統 91 系統すべてについて *Psy* と *Ccs* のアリル分析を行った。‘*psy*¹’と‘*psy*²’については dCAPS 法を、‘*ccs*¹’については CAPS 法をそれぞれ用いた。

本章の研究で用いたプライマーを表 3.2 に示した。PCR 産物の増幅には、‘*psy*¹’では int5_2515F と *psy1*-1_dCAPS_StuI_R プライマーセットを、‘*psy*²’では *Psy*-u と *psy1*-2_dCAPS_Alw44I_R プライマーセットを、‘*ccs*¹’では *Ccs*F+326 と *Ccs*R+730 プライマーセットをそれぞれ用いた。PCR 反応液は、2 μ L の 10x Ex

Taq Buffer、1.6 μ L の dNTP mixture (2.5mM)、それぞれ 10 μ M の Forward プライマーと Reverse プライマー 1 μ L ずつ、5U/ μ L の TaKaRa Taq DNA ポリメラーゼ (5U/ μ L、タカラバイオ) 0.1 μ L、20ng/ μ L の DNA 希釈液 2 μ L を滅菌ミリ Q 水で 20 μ L に定容した。PCR 条件は、94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、30 秒の伸長のサイクル反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C、2 分の最終伸長を行うプログラムとした。

得られた PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動で確認後、‘*psy*’は *Stu*I、‘*psy*²’は *Alw*44I、‘*ccs*’は *Taq*I でそれぞれ制限酵素処理した。‘*psy*’反応液は、0.25 μ L の *Stu*I (8U/ μ L、ニッポンジーン)、0.8 μ L の 10x M Buffer、int5_2515F と psy1-1_dCAPS_*Stu*I_R プライマーセットの PCR 産物 5 μ L を滅菌ミリ Q 水で 8 μ L に定容した。‘*psy*²’反応液は、0.5 μ L の *Alw*44I (3U/ μ L、ニッポンジーン)、0.8 μ L の 10x L Buffer、0.8 μ L の 10x BSA Solution (1mg/mL)、Psy-u と psy1-2_dCAPS_*Alw*44I_R プライマーセットの PCR 産物 5 μ L を滅菌ミリ Q 水で 8 μ L に定容した。‘*ccs*’反応液は、0.2 μ L の *Taq*I (10U/ μ L、ニッポンジーン)、0.8 μ L の 10x A Buffer、CcsF+326 と CcsR+730 プライマーセットの PCR 産物 5 μ L を滅菌ミリ Q 水で 8 μ L に定容した。

制限酵素処理を *Stu*I と *Alw*44I は 37°C で一晩、*Taq*I は 65°C で一晩行った後、2%アガロースゲル電気泳動で結果を確認した。

Psy、*Ccs* 遺伝子のシーケンシング

Psy と *Ccs* のアリル分析でアリル判別ができなかった USDA の 45 系統と CGN の 17 系統の合計 62 系統について *Psy* と *Ccs* のシーケンシングを行った。また、‘*ccs*’を持つことが判明していたが、*Psy* のアリルが不明だった白色果実系統 CGN17018 についても *Psy* のみシーケンシングした。

シーケンシングの鋳型は、本論文の第 2 章とは異なり、*Psy* については Psy-u

と Psy-d プライマーセットで、*Ccs* については *Ccs24* と *CcsR+1566* プライマーセットで増幅した。シーケンシングに使用したプライマーは、本論文の第 2 章では使用していないものがあるため、表 3.2 にまとめた。

PCR 反応液は、5 μ L の 10x Ex Taq Buffer、4 μ L の dNTP mixture (2.5mM)、それぞれ 10 μ M の Forward プライマーと Reverse プライマー 2.5 μ L ずつ、5U/ μ L の Ex Taq DNA ポリメラーゼ (5U/ μ L、タカラバイオ) 0.25 μ L、20ng/ μ L の DNA 希釈液 3 μ L を滅菌ミリ Q 水で 50 μ L に定容した。PCR 条件は、94°C、1 分の初期変性の後、94°C、30 秒の変性、60°C、30 秒のアニーリング、72°C、3 分の伸長のサイクル反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C、3 分の最終伸長を行うプログラムとした。得られた PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動で確認後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) のプロトコールに従って精製した。塩基配列はユーロフィンジェノミクス社の DNA シーケンスサービスを利用して決定した。

Psy 遺伝子の分子系統解析

USDA の 45 系統と CGN の 18 系統で得られた *Psy* の塩基配列に基づき、近隣結合法 (Neighbor-Joining, NJ 法) による系統樹を作成した。系統樹の作成には MEGA Ver.7.0.26 (Kumar *et al.* 2016) を使用し、比較のため、稲葉 (2013) が決定した *C. chinense* の赤色品種‘ハバネロレッド’、‘*psy*¹’を持つオレンジ色品種‘ハバネロオレンジ’、‘*psy*²’を持つクリーム色品種‘ハバネロレモン’の 3 品種のに加えて、データベースに登録されている *C. annuum* cv. ‘NuMex Sunset’ (GU085274) の *Psy* 塩基配列も解析に加えた。

3. 結果

CAPS 及び dCAPS マーカーの開発

これまでに *C. chinense* で見つかっている *Psy* 遺伝子の 2 つの変異アリル '*psy*¹'、'*psy*²' と *Ccs* 遺伝子の変異アリル '*ccs*¹' についてアリル判別のための CAPS 及び dCAPS マーカーの開発を試みた。'*psy*¹' は、第 5 イントロンの 3' 側スプライシングジャンクションの AG の A が C に置換した変異アリルであり、近傍の配列を含めると変異部位は、正常型アリルが TTTCAGGT、変異型アリルが TTTCCGGT となっており、適当な制限酵素の認識サイトにはなっていなかった。そのため、この変異サイトに隣接した下流部位に 3' 末端が ~AAGGCC となっているミスマッチを含むプライマー (3' 末端から数えて 3 番目と 4 番目の GG がミスマッチとなっている) を設計し、変異部位の ACC あるいは TCC と合わせて正常型で AGGCCT、変異型で AGCCCT となるような制限酵素 *Stu*I の認識サイト多型を生じる dCAPS マーカーを作成した。'*psy*²' は、エキソン 1 の 119bp 目の C が T に置換し、120bp 目の G が欠失した変異アリルであり、近傍の配列を含めると変異部位は、正常型アリルが TGGCGTG、変異型アリルが TG GT-TG となっており、適当な制限酵素の認識サイトにはなっていなかった。そのため、この変異サイトに隣接した上流部位に 3' 末端が ~TCAGTGCA となっているミスマッチを含むプライマー (3' 末端から数えて 5 番目の G がミスマッチとなっている) を設計し、変異部位の ACC あるいは TCC と合わせて正常型で GTGCAC、変異型で GTGCAT となるような制限酵素 *Alw*44I の認識サイト多型を生じる dCAPS マーカーを作成した。'*ccs*¹' は、開始コドンから 599bp 目の C が A に置換した変異アリルであり、近傍の配列を含めると変異部位は、正常型アリルが CTTCGATT、変異型アリルが CTTAGATT となっており、制限酵素 *Taq*I のサイトになっているため、この制限酵素を用い、アリル識別を行った。作成した CAPS 及び、dCAPS

マーカーを用いてシーケンシングにより既にアリルが分かっている 3 系統のジェノタイピングを試みた結果を図 3.2 に示す。この図に示す通り、使用したマーカーは全て期待通りの切断パターンを示し、これらのマーカーがジェノタイピングに使用可能であることが明らかになった。以下、これらのマーカーを用いて、91 系統の *C. chinense* の *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子のアリル判別を行った。

DNA マーカーを用いた *Psy*、*Ccs* のアリル分析

‘*psy*¹’と‘*psy*²’については、‘91 系統中 20 系統が‘*psy*¹’を、8 系統が‘*psy*²’を持っており、頻度で表すと‘*psy*¹’が 0.220、‘*psy*²’が 0.088 で、いずれも頻度が 5%以上あり、レアアリルとは言えない頻度の高さだった（表 3.3）。地理的に見ると、‘*psy*¹’を持つ 20 系統のうち 16 系統がメキシコの系統であり、地理的な偏りが見られたが、‘*psy*²’についてはブラジルとベネズエラにそれぞれ 3 系統ずつ、エクアドルとギアナに 1 系統ずつと、地理的な偏りは見られなかった（表 3.3）。また、これら‘*psy*¹’、‘*psy*²’をもつ 28 系統中、実際に圃場で果実の表現型が確認できたものが 23 系統あったが、それらの果実色は、‘*psy*¹’をもつものは黄色だった PI 390611 を除いた 16 系統がオレンジ色、‘*psy*²’を持つものは 6 系統中、PI 439484、PI 441605、CGN17023、CGN22864 の 4 系統は果実色が黄色、PI 4416052 と CGN22864 の 2 系統はオレンジ色だった（表 3.1）。

一方、‘*ccs*¹’については、93 系統中 3 系統で見られた。頻度にするとも 0.033 であり、5%以下となり、一般的な集団遺伝学的なレアアリルの定義である 1%よりは高いものの、マイナーなアリルであることが示された。地理的に見ると、それらはいずれもブラジルの系統だった（表 3.3）。そのうち PI 441624 と PI 441629 の 2 系統は‘*psy*²’との 2 重変異系統で果実色はいずれも黄色だったが、残りの 1 系統の CGN17018 は白色だった（表 3.1）。

マーカーを用いたアリル判別により、91 系統中 29 系統が *Psy*、*Ccs* 遺伝子

のいずれかあるいは両方に既知の変異型アリルをもつことが明らかになった。残りの 62 系統については、いずれかあるいは両方の遺伝子に未知の変異型アリルをもつか、あるいはマーカーでは判別できない既知の変異型アリル‘*psy*³’または‘*ccs*²’を持つ可能性が考えられた。また、‘*ccs*¹’をもつ白色系統の CGN17018 は、マーカーで判別できる既知の *Psy* 変異型アリルをもっていなかったため、本論文の第 2 章で示された白色果実系統は *Ccs* 遺伝子と *Psy* 遺伝子の二重変異体であるという結果に基づくと、‘*psy*³’あるいは未知の *Psy* 変異型アリルを持っている可能性が考えられた。これらの遺伝子型を明らかにするため、以下に述べるように、マーカーにより果実色変異の原因となる遺伝子型が特定できなかった 62 系統について *Psy*、*Ccs* 両遺伝子の塩基配列の解読を行った。また、*Ccs* 遺伝子については既知の変異型‘*ccs*¹’を持つことが分かったものの、*Psy* の遺伝子型については遺伝子型が不明である白色果実系統 CGN17018 では、*Psy* 遺伝子のみの塩基配列の解読を行った。

Psy 遺伝子のシーケンシング

Psy については、マーカーが開発できなかった既知の変異アリル‘*psy*³’の判別を主たる目的とし、上述の 63 系統で‘*psy*³’の原因変異である第 4 エキシソンの 1 塩基欠失部位を含む開始コドン下流 16bp 目からイントロン 5 の 5’側 82bp にかけての約 2120bp を決定した。これは *Psy* の全長約 2800bp のうち約 75%に相当するため、‘*psy*³’の保有の有無の同定その他、この領域に変異をもつ新規のアリルの発見もできることが期待された（表 3.1）。シーケンシングの結果、63 系統のうち、18 系統が‘*psy*³’を持つことが分かった。地理的にみると偏りがあり、18 系統中 15 系統はペルーの系統だった（表 3.3）。残りの 45 系統のうち、14 系統は第 4 エキシソンに A から T の 1 塩基置換により終止コドンを生じるナンセンス変異を持っていた。この変異はこれまで報告されていないものだったため、新たに

‘*psy*⁴’と名付けた（図 3.3、表 3.3）。地理的に見ると、このアリの分布も偏りがあり、14 系統は全てブラジルの系統だった。‘*psy*³’も‘*psy*⁴’も持っていなかった 31 系統の *Psy* 遺伝子は、シーケンシングした領域に変異は見られたものの、確実に機能に影響があると考えられるフレームシフト変異や終止コドンを生じるナンセンス変異は見られなかった。シーケンシングにより‘*psy*³’、‘*psy*⁴’を持っていると考えられた 32 系統のうち、表現型が観察できたものは 26 系統あり、‘*psy*³’をもっていた 18 系統の果実色は 17 系統がオレンジ色だったがペルーの PI 315009 は赤色で、‘*psy*⁴’を持っていた 14 系統中では 13 系統がオレンジ色でブラジルの PI 441620 の 1 系統が赤色果実をつける系統だった。白色果実系統で、*Ccs* 遺伝子の変異型アリル‘*ccs*¹’をもっていることがマーカーによって明らかになった CGN17018 については、*Psy* 遺伝子は‘*psy*⁴’だった。

Ccs 遺伝子のシーケンシング

Ccs 遺伝子については、マーカーが開発できなかった既知の変異アリルである‘*ccs*²’が、開始コドンから 1430bp 目への 8bp の挿入を持つ変異であるため、60 系統について、その変異サイトを含む開始コドン下流 688bp から終止コドンまでの約 810bp をそれぞれ決定した。この領域は *Ccs* 全長の約 55%に相当するため、既知の変異の同定その他、新規の変異アリルを発見することも期待された。また、2 系統では *Ccs* 全長 1497bp のほぼ全長に相当する開始コドン下流 11bp から終止コドンにかけての約 1487bp を決定した。その結果、塩基配列を決定したこれら 62 系統のうち、3 系統で機能欠失を引き起こすと思われる変異をもつ新規アリルを発見した。このうち、ペルーの 1 系統 PI 260484 では、開始コドン下流 1003bp の 2 塩基欠失によって 102bp 下流にフレームシフト変異で終止コドンが生じていた（図 3.3）。また、タンザニアの PI 640898 とアメリカの PI 640902 の 2 系統では、いずれも開始コドン下流 1253bp の 1 塩基欠失によるフレームシフ

ト変異で 6bp 下流に終止コドンが生じていた (図 3.3)。いずれの変異もこれまで報告がなかったものだったため、それぞれ‘*ccs*³’、‘*ccs*⁴’と名付けた。残りの 59 系統には、フレームシフト変異、ナンセンス変異などの機能欠失を起こすような変異はみられず、既知の変異型アリルである‘*ccs*²’も本研究で用いた系統には見られなかった。

マーカーによるアリル判別とシーケンシングに基づく変異型アリルの頻度

調べた全 91 系統中、*Psy* 遺伝子には、既知の変異型アリル 3 種類とシーケンシングにより新たに見つかった新規の変異型アリル‘*psy*⁴’の 4 種類の変異型アリルが検出された。*Psy* 遺伝子の変異型アリルを持つものは合計で 60 系統あり頻度は 0.659 であった。*Ccs* 遺伝子では、既知の変異型アリル‘*ccs*¹’と新規に発見された変異型アリル‘*ccs*²’の 2 種類の変異型アリルがあり、変異型アリルをもつ系統は合計 6 系統で、頻度は 0.066 であった。また、3 系統が *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の 2 重変異体であり、頻度は 0.033 であった。これは、*Psy* 遺伝子の変異型アリルの頻度と *Ccs* 遺伝子の変異型アリルの頻度の積 0.043 とほぼ一致する。これらの二重変異体の遺伝子型は 2 系統が‘*psy*²’と‘*ccs*¹’で、1 系統が‘*psy*⁴’と‘*ccs*¹’であったが、地理的には 3 系統全てブラジルの系統だった。

表現型については、*Psy* 遺伝子の単独変異体 57 系統のうち果実色が確認できたものが 46 系統あり、それらはオレンジ色が 31 系統、黄色が 8 系統、白が 3 系統、赤が 2 系統、クリームが 2 系統だった。*Ccs* 遺伝子の単独変異体は 3 系統あったが、それらの果実色は 2 系統が黄色、1 系統がオレンジ色だった。*Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の 2 重変異体の 3 系統の果実色は、2 系統が黄色、1 系統が白だった。*Psy* と *Ccs* 両遺伝子のシーケンシングをした 62 系統のうち、いずれの遺伝子も正常型と同じ塩基配列だった系統は 28 系統あった (表 3.1、3.3) が、そのうち果実色を確認できた系統は 20 系統あり、7 系統はオレンジ色、5 系統は

黄色だった(表 3.1)。また、8 系統は果実色が赤、またはブラウンだった(表 3.1)。

Psy 遺伝子の分子系統解析

Psy のシーケンシングをした 63 系統の *Psy* 塩基配列に基づく NJ 系統樹を図 3.4 に示した。系統樹内で各系統は、‘*psy*³’を持つ系統と‘*psy*⁴’を持つ系統の大部分に加えて比較用として解析に加えた‘ハバネロレッド’の正常型 *Psy* や‘ハバネロオレンジ’の‘*psy*¹’、‘ハバネロレモン’の‘*psy*²’が含まれるクレード 1、CGN23234 や PI 315027 など‘*psy*³’を持つ 6 系統のみが含まれるクレード 2、‘*psy*⁴’を持つ PI 441620 や *C. annuum* cv. ‘NuMex Sunset’が含まれるクレード 3 の 3 つのクレードに分かれた。

4. 考察

本章では *C. chinense* で非赤色果実色を生じさせる変異型アリの種レベルでの多様性を明らかにするために、新たに開発した既知の変異アリル‘*psy*¹’、‘*psy*²’および‘*ccs*¹’の特異的 DNA マーカーを用いたアリル判別と、シーケンシングにより、果実色を決定する遺伝子である *Psy*、*Ccs* 両遺伝子の多様性解析を、*C. chinense* の非赤色系統 91 系統について行った。その結果、*Psy* 遺伝子には、既知の‘*psy*¹’、‘*psy*²’、‘*psy*³’と新規に発見された‘*psy*⁴’の 4 種類のアリルが見つかった。それぞれの変異型アリルは、‘*psy*¹’が 20 系統（頻度 0.220）、‘*psy*²’が 8 系統（頻度 0.088）、‘*psy*³’が 18 系統（頻度 0.198）、‘*psy*⁴’が 14 系統（頻度 0.154）だった。第 2 章では、5 系統の *C. chinense* のシーケンシングで、同じ *Psy* の変異型アリルが複数の系統で見つかったことから、*C. chinense* では、限定された少数のメジャー変異型アリルが種内で共有されているのではないかという仮説を立てたが、本章の結果は、非赤色系統の大部分の原因遺伝子となるようなメジャーな変異型アリルはないものの、やはり仮説の通り、*C. chinense* では、*Psy* 遺伝子のいくつかの変異型アリルが一定の頻度で複数の系統で共有され非赤色果実系統が生じていることが裏付けられた。これは、*C. annuum* の非赤色果実系統が、それぞれの系統特異的な変異型アリルにより生じているのと対照的である。*Ccs* 遺伝子については、既知の変異型アリル‘*ccs*¹’と新規に見つかった‘*ccs*³’、‘*ccs*⁴’の 3 種類の変異型アリルが見つかった。しかし、これらの変異型アリルを持つ系統数は、‘*ccs*¹’が 3 系統（頻度 0.033）‘*ccs*³’が 1 系統（頻度 0.011）、‘*ccs*⁴’が 2 系統（頻度 0.022）と *Psy* 遺伝子の変異型アリルと比べ明らかに低頻度だった。‘*ccs*¹’と‘*ccs*⁴’が複数の系統で見られたことから、変異型アリルが系統特異的に生じているとまでは言えないが、既知の変異型アリル‘*ccs*²’が本章で用いた 91 系統中に見られなかったことも含め、*Ccs* 遺伝子については、*C. annuum* 同様、*C. chinense* でもそれぞれ

の変異型アリルはあまり高頻度で種内に共有されてはいないということが明らかになった。以上の結果は、*C. chinense* の非赤色果実色系統の遺伝的要因は、2つの点で *C. annuum* と対照的であることを示している。すなわち、*C. annuum* の果実色変異の原因が *Ccs* 遺伝子の変異であるのに対し *C. chinense* では *Psy* 遺伝子の変異が非赤色果実色の主たる原因となっていること、及び、*C. annuum* の変異型アリルが系統特異的で多数存在するのに対し、*C. chinense* では少数の変異型アリルが高頻度で種内に共有されているという点である。2つの主要なトウガラシの栽培種で、果実色変異という重要形質について、これほど対照的な遺伝的特徴の違いがあるのは非常に興味深い。本章で明らかになった2種の果実色変異の遺伝的要因の違いは、今後の両種の果実色育種において重要な知見となるだろう。2種間で果実色変異の遺伝的要因が異なる理由について解釈することは難しいが、もしかすると主要な栽培種とはいえ主に原産地の中南米地域で栽培されている *C. chinense* では、最初に生じた非赤色果実色系統の変異型アリルが系統分化や系統間の自然交雑により地域内に広まることが可能であり、そのために後から生じた新規変異型アリルが選抜されにくかったのに対し、原産地の中南米から世界中に広がった *C. annuum* では、新しく栽培が始まった地域でリソースとなるような果実色変異がないことから、その地域で新たに出現した果実色変異が積極的に選抜されたためかもしれない。なぜ、*C. chinense* では主要因である *Psy* 遺伝子の変異が *C. annuum* ではないのかも理由はわからないが、*Psy* 遺伝子はカロテノイド全体の量を決定する遺伝子であることから、もしかするとカロテノイド量が減ることが、*C. annuum* が中南米から他の大陸へと広がる際に何らかの不利な要素であったのかもしれない。

Psy 遺伝子では、4種類の変異型アリルが見つかったが、それぞれのアリルの分布と多様性からアリルの起源に関して考察が可能である。分布に偏りが見られたのは、20系統中16系統がメキシコの系統だった‘*psy*¹’、18系統中15系統が

ペルーの系統だった‘*psy*³’、14 系統全てがブラジルの系統だった‘*psy*⁴’の 3 アリルで、8 系統見られた‘*psy*²’だけがギニア、エクアドル、ブラジル、ベネズエラと比較的広範囲に偏りなく見られた。偏りが見られた 3 つのアリルについては、その地域が起源であることが示唆され、地域内での系統分化や自然交雑により同一の変異型アリルがその地域に優占的に広まることで、新たに生じた変異型アリルに対する選抜を打消したのではないかという仮説に一致する。特に、‘*psy*¹’は *C. chinense* の代表的な品種群である‘ハバネロ’品種群の典型的な非赤色果実色品種である‘ハバネロオレンジ’から見つかったものであり (Kim *et al.* 2010)、‘ハバネロ’品種群はメキシコやベリーズを含む地域が原産と言われていること (Bosland and Votava 2012) から、今回得られた結果は‘*psy*¹’がメキシコなどユカタン半島で生じた可能性を強く支持する。‘*psy*³’と‘*psy*⁴’については、シーケンシングに基づきアリルを判別したため、アリル内の多様性を見ることができる。*Psy* 塩基配列に基づいて作成した NJ 系統樹 (図 3.4) では、18 系統あった‘*psy*³’系統は 12 系統がクレード 1 に、6 系統がクレード 2 に分かれた。また、14 系統の‘*psy*⁴’系統のうち 13 系統がクレード 1 に入ったが、PI 441620 のみクレード 3 に入った。クレード 1 は、正常型アリルであるハバネロレッドの *Psy* や、変異型の‘*psy*¹’、‘*psy*²’の配列が含まれるもっとも主要なクレードである。本章におけるアリルの判別は、終止コドンやフレームシフトといった直接機能欠失につながる変異サイトによって行っているため、‘*psy*³’に主要なクレードに入らないグループがあったことは、既に分化していた 2 つのハプロタイプに並行的に同一の変異が生じた可能性と、アリルを同定する変異が生じたのち、変異が出現して複数のアリルが生じた可能性の 2 つの可能性が考えられる。‘*psy*⁴’についても、1 系統が入ったクレード 3 は、別種である *C. annuum* の 1 品種 *C. annuum* cv. ‘NuMex Sunset’の正常型 *Psy* 遺伝子配列が含まれるクレードであり、‘*psy*³’と同様に既に分化したハプロタイプに並行突然変異が生じたか、アリル成立後に変異が生じ

分化したかの 2 つの可能性が考えられる。いずれにせよ、同一のアリルに配列レベルでの分化が見られたことから、地理的に分布が偏っているアリルである‘*psy*³’と‘*psy*⁴’ともに比較的古くに生じた変異アリルであり、その地域で生じた後、ある程度時間をかけてその地域に広がっていったことが示唆された。*Ccs* 遺伝子については、もっとも多い 3 系統で見られた‘*ccs*¹’が全てブラジルの系統で見られたことから、地理的な偏りが見られ、その地域が起源であることが示された。2 系統のみで見られた‘*ccs*⁴’については、タンザニアとアメリカという大きく離れた地域から見つかったことから、それらの地域で独立に生じたというより、原産地の中南米で生まれた変異型アリルが他の大陸に伝わったものだと考えられる。なお、*Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の二重変異体が 91 系統中 3 系統あったが、3 系統中 2 系統が‘*psy*¹’と‘*ccs*¹’の組合せ、1 系統が‘*psy*⁴’と‘*ccs*¹’の組合せを持っていた。いずれも複数系統が共有するアリルの組合せであったことから、これらの二重変異体はいずれかの遺伝子の単独変異体のもう一方に遺伝子に新規に突然変異が生じて生じたものではなく、*Psy* 遺伝子の変異型アリルを持つ系統と、*Ccs* 遺伝子の変異型アリルを持つ系統の自然交雑により生じたものだと考えられる。2 重変異体の頻度が、それぞれの単独変異体の頻度の積にほぼ等しいこともこの仮説に一致する。

果実色については、91 系統中 72 系統で表現型を確認できた。*Psy* 遺伝子の単独変異体 57 系統中、46 系統で表現型を確認できたが、それらのうち 39 系統はオレンジ色または黄色の非赤色果実色を示した。しかし、変異型の‘*psy*³’を持っていたペルーの PI 315009 と、‘*psy*⁴’を持っていたブラジルの PI 441620 の 2 系統が、変異型アリルを持つにもかかわらず赤色の果実色を示した。‘*psy*³’も‘*psy*⁴’も ORF の途中にナンセンス変異を生じており、これら 2 系統の *Psy* は PSY としての機能を完全に喪失していると考えられる。*Psy* 遺伝子はカロテノイド生合成系の上流に位置し、カロテノイドの総量を決定する遺伝子である。*Psy* 遺伝子に

機能欠失を引き起こす変異があるにもかかわらず赤色を示したということは、これらの 2 系統では *Psy* 遺伝子の機能を補うような遺伝子が働きカロテノイドが合成された可能性を示している。稲葉 (2013) や本論文の 2 章でも報告されている通り、エキソン 1 内のフレームシフトにより完全に機能を欠失していると考えられる '*psy*' を持っていたとしてもカロテノイドは合成されており果実色は白色にはならない。このことは、*Psy* 遺伝子の機能を補償するような遺伝子の存在を示唆している。本章で、機能欠失型の *Psy* 変異型アリルをもちながら赤色の果実色を示した 2 系統は、そのような *Psy* 遺伝子の補償をする遺伝子の機能が強いのかかもしれない。補償する遺伝子の候補としては、*Psy* 遺伝子のホモログが挙げられる、実際にナス科では複数の *Psy* 遺伝子がゲノム中に存在することが報告されており (Bartley and Scolnik 1993、Fraser *et al.* 1999、Li *et al.* 2008)、トウガラシでも果実で働く *Psy* の他に、機能が不明ながら *Psy* と構造がよく似ている *Psy2* という遺伝子の存在が知られている (Jeong *et al.* 2018)。系統によっては、この *Psy2* が *Psy* と相補的に果実でも機能しているのかかもしれない。*Ccs* の単独変異体に関しては、3 系統全てがオレンジ色や黄色の非赤色果実を示した。*Ccs* と *Psy* の 2 重変異体は本章で 3 系統見つかったが、そのうち果実色が白色であったものは CGN178018 の 1 系統のみであり、残りの 2 系統 PI441624 と PI441629 は黄色の果実色を示した。本章論文の第 2 章で、白色果実色品種である 'チェイロホワイト' と 'ホワイトファタリ' がどちらも *Psy* と *Ccs* の 2 重変異品種であるにもかかわらず、'チェイロホワイト' がわずかながらカロテノイドを蓄積していることを述べ、*PSY* 以外にフィトエンの生合成を触媒する酵素が存在する可能性について考察したが、CGN17018、PI 441624、PI 441629 の果実色の違いにもそのような酵素が関係しているのかかもしれない。この結果も、*Psy* の変異体で、*Psy* 遺伝子の機能欠失を補償するような他の遺伝子の存在を示唆している。*Psy* と *Ccs* 両遺伝子のシーケンシングをした 62 系統のうち、いずれの遺伝子も正常型

と同じ塩基配列だった系統は 28 系統あった (表 3.1、3.4)。そのうち 8 系統は果実色が赤、またはブラウンで、7 系統はオレンジ色、5 系統は黄色だった (表 3.1)。*Psy* と *Ccs* の両遺伝子が正常型と同じ塩基配列を持っていた赤色またはブラウンの 8 系統は、いずれも USDA と CGN に非赤色系統として分譲を依頼したものであるが、種子が不均一だったため、本章で使った個体が赤色個体だった可能性が考えられた。なお、果実色がブラウンだったアメリカの CGN17219 は、果実の成熟に伴うクロロフィルの分解に関係している *CaSGR* 遺伝子が突然変異で機能を失っている ‘stay green’ 変異体と考えられた。トウガラシの ‘stay green’ 変異体は、*CaSGR* の突然変異でクロロフィルが残ったままカロテノイドが蓄積するため、果実色がブラウンになる (Borovsky and Paran 2008)。果実色が黄色またはオレンジ色でありながら *Psy* と *Ccs* の両遺伝子が正常型と同じ塩基配列を持っていた 12 系統については、*Psy* または *Ccs* の塩基配列が未決定の部分に変異を持つ可能性がある。あるいは、*Psy* と *Ccs* 以外のカロテノイド生合成経路遺伝子か、カロテノイド生合成に関わる未知の遺伝子に変異を持つ可能性も考えられる。

本章では、*Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子のシーケンシングにより、新規の変異型アリル ‘*psy*⁴’ と ‘*ccs*³’、‘*ccs*⁴’ を発見した。*Psy* 遺伝子は、複数の系統で同じアリルが共有されているとわかったことから、新規アリルを発見できる可能性は必ずしも高くはないが、本章のように多くの系統を扱うことにより、今後も新規アリルを発見できる可能性がある。*Psy* はカロテノイド合成経路の上流に位置する遺伝子であり、カロテノイド全体の量を決定する。これまでの研究では、*Psy* 遺伝子の壊れ方により果実色の表現型が変わることが示されている。今後、様々な *Psy* 遺伝子が発見できれば、いろいろな濃さの果実色をもつトウガラシの育種が可能になるかもしれない。

また、本章では、アリルの判別に当たり、最初に *Psy* と *Ccs* の既知の変異型

アリル‘*psy*¹’、‘*psy*²’、‘*ccs*¹’それぞれに特異的な DNA マーカーを開発した。緒言でも述べたように、*C. chinense* は *C. annuum* と比較的容易に交雑することから、本章で作成した *Psy* と *Ccs* の変異型アリル特異的 DNA マーカーは、*C. annuum* にこれまでになかったクリーム色や白色の品種を作るのに有用であると考えられる。これまで、‘*psy*¹’特異的 DNA マーカーとしては Kim *et al.* (2010) が開発したものがあったが、PCR 条件の調節が難しく、偽陽性が出やすいものだった。そこで、本章では新たに、‘*psy*¹’特異的 DNA マーカーとして、‘*psy*¹’に特異的な *Psy* 第 5 イントロン 3’末端の SNP を持たなければ PCR 産物が *Stu*I で消化される dCAPS マーカーを開発した。また、稲葉 (2013) がクリーム色品種‘ハバネロレモン’の果実色変異の原因であることを解明した‘*psy*²’の特異的 DNA マーカーとして、‘*psy*²’に特異的な第 1 イントロンの 1 塩基欠失を持たない PCR 産物が *Alw*44I で消化される dCAPS マーカーを開発した。さらに、Ha *et al.* (2007) が *C. chinense* の黄色系統‘IT164918’の果実色変異の原因であることを解明した変異型 *Ccs* アリル‘*ccs*¹’に特異的な SNP を持たない PCR 産物が *Taq*I で消化される CAPS マーカーも開発した。CAPS や dCAPS は PCR 増幅多型マーカーに比べ、偽陽性が出にくいのが特徴であり、ヘテロの判別も可能な共優性マーカーである。劣性形質である非赤色果実色遺伝子を交雑育種により既存の赤色果実系統に導入するためには、育成過程でヘテロ型の赤色果実個体を選抜する必要がある。本章で開発した DNA マーカーは、今後のトウガラシ果実色育種に役立つことが期待される。

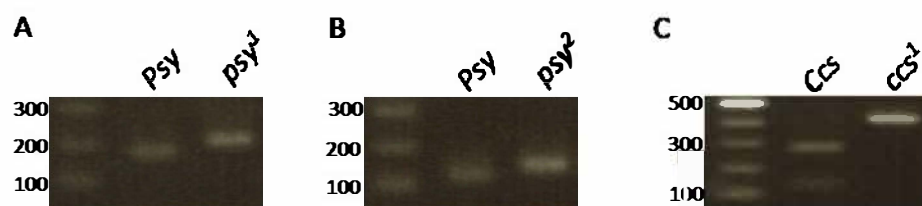


図3.1. (A) *psy1*、(B) *psy2*、(C) *ccs1*特異的DNAマーカー。各パネルの*Psy*はハバネロレッドサビナ、*psy1*はハバネロオレンジ、*psy2*はハバネロレモン、*ccs1*はハバネロスアープオレンジ。

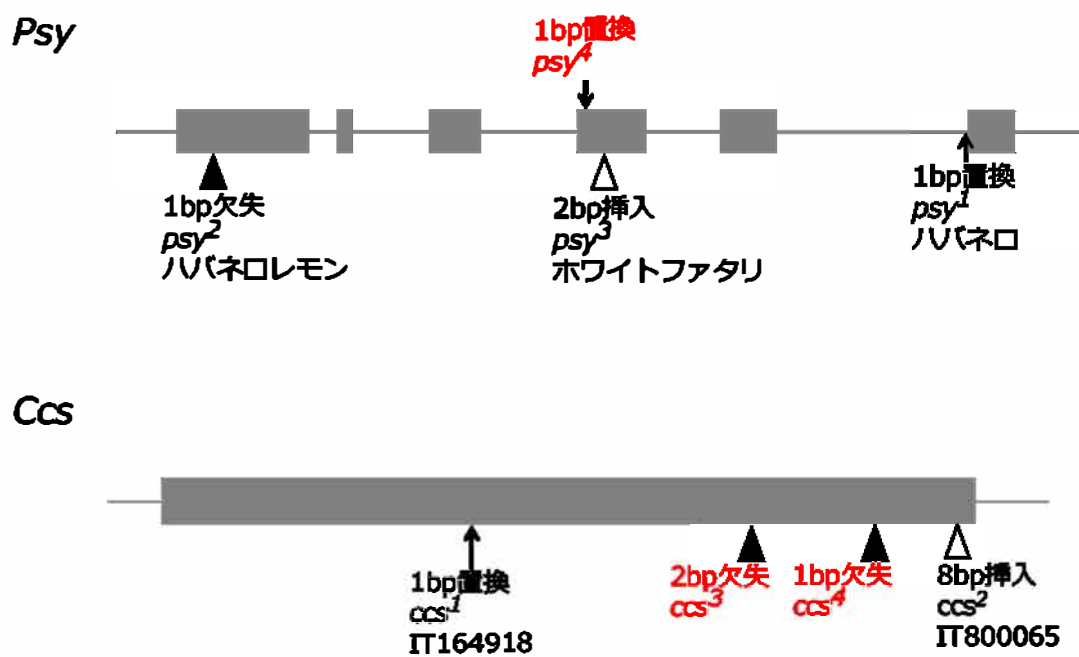


図3.2. *Psy*と*Ccs*の変異アレルごとの変異部位。既知アレルを黒字、本研究で発見した新規アレルを赤字で示した。

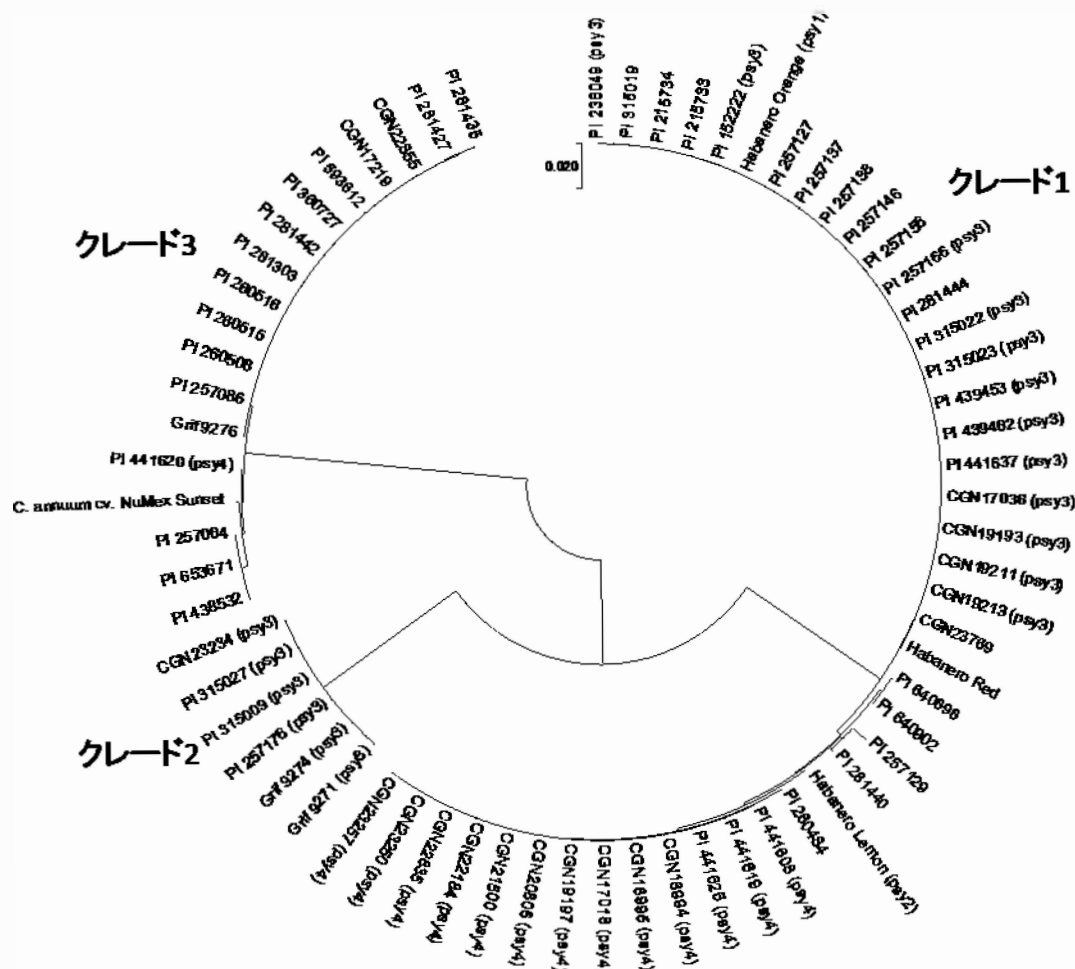


図3.3. *Psy*塩基配列に基づいたNJ系統樹。

表3.1. 使用した材料

| 系統No. | 国 | 地域 | 完熟果実色 | <i>Psy</i> アリル | <i>Psy</i> ノーケンス | <i>Ces</i> アリル | <i>Ces</i> ノーケンス |
|-----------|-------|-----------------|-------|----------------|------------------------|----------------|------------------|
| Grif 9271 | コスタリカ | Central America | | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| Grif 9274 | コスタリカ | Central America | | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| Grif 9276 | コスタリカ | Central America | | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 152222 | ペルー | Upper Amazon | 白 | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 215733 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 215734 | ペルー | Upper Amazon | オレンジ | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 238049 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257064 | コロンビア | Upper Amazon | | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257086 | コロンビア | Upper Amazon | | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257127 | コロンビア | Upper Amazon | 黄 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257129 | コロンビア | Upper Amazon | オレンジ | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257137 | エクアドル | Upper Amazon | 黄 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257138 | エクアドル | Upper Amazon | オレンジ | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257146 | ペルー | Upper Amazon | オレンジ | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257156 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257166 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 257176 | ペルー | Upper Amazon | | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 260484 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | <i>ces3</i> | 688bp~終止コドン |
| PI 260508 | ペルー | Upper Amazon | | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 260515 | ペルー | Upper Amazon | 赤 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 260516 | ペルー | Upper Amazon | | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 281303 | ボリビア | Lower Amazon | 赤 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 281427 | スリナム | Gulanas | 赤 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 281435 | アメリカ | Other | | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 281440 | ベネズエラ | Gulanas | オレンジ | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 281441 | ベネズエラ | Gulanas | | <i>psy1</i> | | | |
| PI 281442 | ベネズエラ | Gulanas | 赤 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 281443 | ベネズエラ | Gulanas | | <i>psy2</i> | | | |
| PI 281444 | ベネズエラ | Gulanas | オレンジ | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 315009 | ペルー | Upper Amazon | 赤 | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 315019 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |

表3.1. (続き)

| 系統No. | 国 | 地域 | 完熟果実色 | Psyアリル | Psyシーケンス | Ccsアリル | Ccsシーケンス |
|-----------|-------|-----------------|-------|--------|-----------------------|--------|-------------|
| PI 315022 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | psy3 | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 315023 | ペルー | Upper Amazon | オレンジ | psy3 | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 315027 | ペルー | Upper Amazon | | psy3 | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 360727 | エクアドル | Upper Amazon | 赤 | | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 390611 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | psy1 | | | |
| PI 435916 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 435917 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 435918 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438532 | ベリーズ | Central America | 赤 | | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 438614 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438622 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438629 | メキシコ | Central America | | psy1 | | | |
| PI 438630 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438635 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438636 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438637 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438638 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438639 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438640 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438641 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438642 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 438643 | メキシコ | Central America | オレンジ | psy1 | | | |
| PI 439453 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | psy3 | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 439462 | ペルー | Upper Amazon | オレンジ | psy3 | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 439484 | ベネズエラ | Gulanas | 黄 | psy2 | | | |
| PI 441605 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | psy2 | | | |
| PI 441608 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | psy4 | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 441619 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | psy4 | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 441620 | ブラジル | Lower Amazon | 赤 | psy4 | エキソン1 16bp~イントロン582bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 441624 | ブラジル | Lower Amazon | 黄 | psy2 | | ccs1 | |

表3.1. (続き)

| 系統No. | 国 | 地域 | 完熟果実色 | <i>Psy</i> アリル | <i>Psy</i> シーケンス | <i>Ces</i> アリル | <i>Ces</i> シーケンス |
|------------|-------|-----------------|-------|----------------|------------------------|----------------|------------------|
| PI 441 625 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 441 628 | ブラジル | Lower Amazon | 黄 | <i>psy2</i> | | <i>ces1</i> | |
| PI 441 637 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 572560 | アメリカ | Other | | <i>psy1</i> | | | |
| PI 588612 | アメリカ | Other | | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| PI 640898 | タンザニア | Other | 黄 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | <i>ces4</i> | 11bp~終止コドン |
| PI 640902 | アメリカ | Other | オレンジ | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | <i>ces4</i> | 11bp~終止コドン |
| PI 658671 | コスタリカ | Central America | 赤 | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN1 6884 | ブラジル | Lower Amazon | ピンク | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN1 6885 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN1 7018 | ブラジル | Lower Amazon | 白 | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | <i>ces1</i> | |
| OGN1 7022 | ベネズエラ | Guianas | オレンジ | <i>psy1</i> | | | |
| OGN1 7023 | ベネズエラ | Guianas | 黄 | <i>psy2</i> | | | |
| OGN1 7086 | ペルー | Upper Amazon | 黄 | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN1 7219 | アメリカ | Other | ブラウン | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN1 91 88 | ペルー | Upper Amazon | | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN1 91 97 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN1 9211 | ペルー | Upper Amazon | オレンジ | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN1 9213 | ペルー | Upper Amazon | オレンジ | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 0806 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 1500 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 21 84 | ブラジル | Lower Amazon | 白 | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 2835 | ブラジル | Lower Amazon | 白 | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 2855 | スリナム | Guianas | | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 2864 | ギアナ | Guianas | オレンジ | <i>psy2</i> | | | |
| OGN2 3234 | ペルー | Upper Amazon | | <i>psy3</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 3250 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 3257 | ブラジル | Lower Amazon | ピンク | <i>psy4</i> | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |
| OGN2 3259 | エクアドル | Upper Amazon | | <i>psy2</i> | | | |
| OGN2 3789 | ブラジル | Lower Amazon | オレンジ | | エキソン1 16bp~イントロン5 82bp | | 688bp~終止コドン |

表8.2. 本研究中使用したプライマー

| 遺伝子 | プライマー名 | 塩基配列(5'→3') | 目的 | リファレンス |
|-----|----------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
| Pay | Pay-u | ATGTCGTGTTGCCITGTTATGGGTTG | シーケンステンプレートの増幅 | Huh et al. 2001 |
| | Pay-d | CCTGATTTCATGTTCTTGTAGAAGGC | シーケンステンプレートの増幅 | Huh et al. 2001 |
| | Pay_int4_1676R | GGCCTGAAAGATAACTAAAT | シーケンシング | 結果 2013 |
| | Pay_int3_1154R | CTAGGATCAGAGGAACCTGAT | シーケンシング | 結果 2013 |
| | Pay_ex2_550R | CTCTCCGGAGTCATTAGCAT | シーケンシング | 結果 2013 |
| | Pay_ex6_F2685 | TCTCTGCTGTTGTACCCCTG | シーケンシング | 本研究 |
| | Pay_int5_2190R | AGCCACCCATCACCCTCTGT | シーケンシング | 結果 2013 |
| | pay1-1_dCAPS_Slu1R | CTGGGGTACACAGGAGGGATGCCAAGGCC | pay/特異的dCAPSマーカー | 本研究 |
| | Pay_int5_2515F | TGGGATCTCGAAATGCTTTGGA | pay/特異的dCAPSマーカー | 本研究 |
| | pay1-2_dCAPS_Aln44LR | CCACCTCTCTCTTGATTCTCTCAGTGCA | pay/特異的dCAPSマーカー | 本研究 |
| Ccs | Ccs24 | TTTCTGTTTTTTGGGAAGAGGA | シーケンステンプレートの増幅 | Lang et al. 2004 |
| | CcsR+1588 | AGCTTTTGTTCACCTTTTGC | シーケンステンプレートの増幅 | 本研究 |
| | CcsF-82 | CCTAGTTCGGTATTTTCATT | シーケンス | 結果 2013 |
| | CcsF+617 | GTAGGAAGATAAGCGGTAGC | シーケンス | 本研究 |
| | CcsF+1047 | TATGGCTATTGGTGGGACTT | シーケンス | 本研究 |
| | CcsF+326 | GCGTTGACCCCTCACCCTT | ccs/特異的CAPSマーカー | 本研究 |
| | CcsR+780 | CTGCTAAATCCCATGAGCAACT | ccs/特異的CAPSマーカー | 本研究 |

表3.3. *Psy*と*Ccs*の変異アリルの分布と頻度

| | | Psyアリル | | | | | Ccsアリル | | | | | |
|-----------------|-------|--------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| 地域 | 国 | 系統数 | psy ¹ | psy ² | psy ³ | psy ⁴ | その他 | ccs ¹ | ccs ² | ccs ³ | ccs ⁴ | その他 |
| Central America | メキシコ | 16 | 16 | | | | | | | | | 16 |
| | コスタリカ | 4 | | | | 2 | 2 | | | | | 4 |
| | ベリーズ | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| Upper Amazon | ペルー | 25 | 1 | | | 15 | 9 | | | 1 | | 24 |
| | コロンビア | 4 | | | | | 4 | | | | | 4 |
| | エクアドル | 4 | | | 1 | | 3 | | | | | 4 |
| Lower Amazon | ブラジル | 19 | | | 3 | 1 | 14 | 1 | 3 | | | 16 |
| | ボリビア | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| Guianas | ベネズエラ | 8 | 2 | | 3 | | 3 | | | | | 8 |
| | スリナム | 2 | | | | | 2 | | | | | 2 |
| | ギアナ | 1 | | | 1 | | | | | | | 1 |
| Other | アメリカ | 5 | 1 | | | | 4 | | | | | 4 |
| | タンザニア | 1 | | | | | 1 | | | | | 1 |
| 総数 | | 91 | 20 | 8 | 18 | 14 | 31 | 3 | | 1 | 2 | 85 |
| 頻度 | | | 0.220 | 0.088 | 0.198 | 0.154 | 0.341 | 0.033 | | 0.011 | 0.022 | 0.934 |

表3.4. 変異体ごとの頻度

| 地域 | 国 | 系統数 | <i>Psy</i> 単独変異体 | <i>Gcs</i> 単独変異体 | <i>Psy</i> , <i>Gcs</i> 2重変異体 | 不明 |
|-----------------|-------|-----|------------------|------------------|-------------------------------|-------|
| Central America | メキシコ | 16 | 16 | | | |
| | コスタリカ | 4 | 2 | | | 2 |
| | ベリーズ | 1 | | | | 1 |
| Upper Amazon | ペルー | 25 | 16 | 1 | | 8 |
| | コロンビア | 4 | | | | 4 |
| | エクアドル | 4 | 1 | | | 3 |
| Lower Amazon | ブラジル | 19 | 15 | | 3 | 1 |
| | ボリビア | 1 | | | | 1 |
| Guianas | ベネズエラ | 8 | 5 | | | 3 |
| | スリナム | 2 | | | | 2 |
| | ギアナ | 1 | 1 | | | |
| Other | アメリカ | 5 | 1 | 1 | | 3 |
| | タンザニア | 1 | | 1 | | |
| 総数 | | 91 | 57 | 3 | 3 | 28 |
| | | 頻度 | 0.626 | 0.033 | 0.033 | 0.308 |

総合考察

第 1 章では、新規甘味トウガラシ品種の‘カラーピーマンイエロー’が新規の *pAMT* 変異アリル *pamt*¹⁰ を持つ、ベル型品種として初めて見つかった *pAMT* 変異体であることを明らかにした。これまで、*C. annuum* のベル型甘味品種はすべて *Pun1* の変異アリル *pun1* によるものであると考えられてきたが、‘カラーピーマンイエロー’の発見により、ベル型甘味品種が *pun1* アリルのみの一元的な起源をもつものではないことが明らかになった。以前の研究で *pAMT* 変異体はカプサイシノイド類縁体のカプシノイドを果実に蓄積することがわかっている。カプシノイドは代謝促進作用などカプサイシノイドと同様の生理作用を持ちながら辛味は約 1000 分の 1 であり、機能性成分としての利用が期待されている成分である。‘カラーピーマンイエロー’も果実にカプシノイドを蓄積している可能性が高く、健康野菜としての可能性を秘めている。また、第 1 章で作成した *pamt*¹⁰ 特異的な DNA マーカーは、‘カラーピーマンイエロー’を育種材料として使い、*pamt*¹⁰ を持った甘味品種を開発する際に有用である。

第 2 章では、*C. chinense* の‘チェイロホワイト’と‘ホワイトファタリ’2 品種の白色果実色に *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の 2 重変異が関係していることが明らかになった。また、‘チェイロホワイト’、‘イエローブートジョロキア’、‘ハバネロスアープオレンジ’、‘ホワイトファタリ’で行った *Psy* と *Ccs* のシーケンシングから、これまで系統特異的と考えられてきた *C. chinense* の非赤色品種が持つ *Psy* と *Ccs* の変異アリルが、複数の品種で共有されていることが示された。

第 2 章の結果を受けて、第 3 章ではさらに多くの *C. chinense* 非赤色果実系統で *Psy*、*Ccs* 両遺伝子の塩基配列レベルでの多様性解析を行ない、*C. chinense* の非赤色果実系統には *Psy* 変異体が多いこと、*Psy* と *Ccs* 両遺伝子ともに複数の変異アリルが一定頻度で系統間で共有されていることが明らかになった。これら

のことは、もう一つのメジャーなトウガラシ栽培種の *C. annuum* の非赤色系統が *Ccs* 変異体のみで *Psy* 変異体が見つかっていないこと、*Ccs* アリルが非常に多様で系統特異的であることと対照的である。このように、本研究により、*C. annuum* と *C. chinense* という 2 つのメジャーな栽培種で異なる非赤色果実系統の育種の歴史が明らかになった。

以上のように、本論文では、辛味と果実色というトウガラシの重要商業形質のうち、辛味についてはほとんどの甘味品種が *pun1* アリルを起源としているのに対し、果実色については *C. annuum* と *C. chinense* の両栽培種で *Ccs* または *Psy* 遺伝子の多数の変異アリルによって成立しているという、対照的な進化過程が明らかになった。また、本論文で作成した *pAMT*、*Psy*、*Ccs* 遺伝子の変異アリル特異的な DNA マーカーは今後の甘味品種、非赤色品種の育種に有用であるとともに、多様性解析などの集団遺伝学的な研究にも有用であると考えられる。

摘要

トウガラシ（トウガラシ属、*Capsicum* spp.）は、トマトやジャガイモなどと同じ中南米原産のナス科植物である。辛味と果実色は、いずれもトウガラシの重要な商業形質である。

第 1 章では、ベル型甘味品種としては初となる *pAMT* 変異体‘カラーピーマンイエロー’を発見した。ベル型の甘味トウガラシ品種は世界中で野菜として栽培・利用されているにもかかわらず、その辛味欠失は *pun1* というたった 1 種類の劣性対立遺伝子によってもたらされていると考えられてきた。*pAMT* 変異体として‘カラーピーマンイエロー’が見つかったことは、以上のような‘ベル型甘味品種の常識’を覆す発見であり、*pAMT* 変異体が人知れず甘味品種の育種で使われてきたことを示唆している。また、本章で行った *pamt*^{l0} 特異的 DNA マーカーによる甘味品種のジェノタイピングでは、‘イエローパブリカ’という品種が *pamt*^{l0} をヘテロで持つことが明らかになった。以前の研究で述べられているように、*pAMT* 変異型甘味トウガラシはカプサイシノイド類縁物質である‘カプシノイド’を蓄積する。カプシノイドは辛味の程度がカプサイシノイドの約 1000 分の 1 であるにもかかわらず、代謝亢進作用などカプサイシノイドと同様の生理作用を持つ。*pAMT* 変異体である‘カラーピーマンイエロー’もカプシノイドを蓄積している可能性が高く、‘カラーピーマンイエロー’自体が健康野菜としての可能性を秘めている。本章で開発した *pamt*^{l0} 特異的 DNA マーカーは *pamt*^{l0} アリルを甘味トウガラシ育種に利用する際の有用なツールとなるだろう。

第 2 章では、トウガラシの白色果実色の遺伝機構の解明を目的に、白色果実品種‘チェイロホワイト’を主たる対象として、カロテノイド生合成経路遺伝子のシーケンシング、発現解析および TLC 分析を行い、この品種が *Psy* 遺伝子と *Ccs* 遺伝子の 2 重変異体であることを明らかにした。これまで分子遺伝学的な解析

が行われた果実色変異品種はいずれも黄やオレンジ、クリーム色のみで、白色品種を対象として使用したのは本研究が初めてである。また第2章では、‘チェイロホワイト’に加えて、もう一つの白色品種‘ホワイトファタリ’の *Psy* と *Ccs* の塩基配列を決定した。その結果、*Psy* 遺伝子の第4エキソンに2塩基(AA)の挿入があり、フレームシフト変異によって66bp下流に終止コドンが生じていた。この変異型 *Psy* アリルはこれまでに報告がなかったものだったため、‘*psy*³’と名付けた。また、‘ホワイトファタリ’の *Ccs* 遺伝子は変異型アリル‘*ccs*¹’であり、‘チェイロホワイト’と同じものだった。‘ホワイトファタリ’が *Psy* と *Ccs* の2重変異体だったことは、‘チェイロホワイト’の解析結果に基づき *Psy* と *Ccs* の2重変異により白色品種が生じるという仮説を裏付ける結果である。*Psy* と *Ccs* のシーケンシングの結果、‘チェイロホワイト’、‘イエローブートジョロキア’、‘ハバネロスアーブオレンジ’、‘ホワイトファタリ’が持っていた *Ccs* 変異アリルは、いずれも既知の‘*ccs*¹’だった。また、‘チェイロホワイト’が持っていた *Psy* 変異アリルは‘ハバネロレモン’と同じ‘*psy*²’だった。以前の研究で見つかった *Psy* と *Ccs* の変異型アリルは、いずれも系統特異的なものと考えられてきた。しかし、本章の研究で得られた結果から、*Psy* と *Ccs* の変異型アリルには複数の品種に共通して存在するものがあることが示唆された。一方で、‘ホワイトファタリ’からは、新規の変異型 *Psy* アリル‘*psy*³’が見つかった。この結果は、さらに多くの非赤色品種を調べることで、新規の変異型アリルが見つかる可能性を示唆している。

第3章では、第2章の結果から考えられた仮説を、より多くの *C. chinense* 非赤色系統の *Psy* と *Ccs* の多様性を調べることで検証した。その結果、*Psy* 遺伝子には、既知の‘*psy*¹’、‘*psy*²’、‘*psy*³’と新規に発見された‘*psy*⁴’の4種類のアリルが見つかり、*C. chinense* では *Psy* 遺伝子のいくつかの変異型アリルが一定の頻度で複数の系統で共有され非赤色果実系統が生じていることが裏付けられた。また、*Ccs* 遺伝子については、既知の変異型アリル‘*ccs*¹’と新規に見つかった‘*ccs*³’、‘*ccs*⁴’

の3種類の変異型アリルが見つかり、*Ccs* 遺伝子については、*C. annuum* 同様、*C. chinense* でもそれぞれの変異型アリルはあまり高頻度で種内に共有されていないということが明らかになった。以上の結果は、*C. chinense* の非赤色果実色系統の遺伝要因は、2つの点で *C. annuum* と対照的であることを示している。また、第3章では、*Psy* と *Ccs* の既知の変異型アリル '*psy*¹'、'*psy*²'、'*ccs*¹'それぞれに特異的な DNA マーカーを開発した。本章で作成した *Psy* と *Ccs* の変異型アリル特異的 DNA マーカーは、*C. annuum* にこれまでになかったクリーム色や白色の品種を作るのに有用であると考えられる。

本論文では、辛味と果実色というトウガラシの重要商業形質のうち、辛味についてはほとんどの甘味品種が *pun1* アリルを起源としているのに対し、果実色については *Ccs* または *Psy* 遺伝子の多数の変異アリルによって成立しているという、対照的な進化過程が明らかになった。また、本論文で作成した *pAMT*、*Psy*、*Ccs* 遺伝子の変異アリル特異的な DNA マーカーは今後の甘味品種、非赤色品種の育種に有用であるとともに、多様性解析などの集団遺伝学的な研究にも有用であると考えられる。

謝辞

本研究を行うに当たり、終始懇切丁寧なご指導を頂いた笹沼恒男准教授に深く感謝申し上げます。そして、副指導教員としての的確なご指導を頂いた星野友紀准教授、千田峰生教授、副査として審査して下さいました大西一光准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行う中で、阿部利徳山形大学農学部客員教授には多くのご助言、激励を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

最後になりますが、公私両面にわたって叱咤激励をいただいた植物遺伝・育種学分野の先輩、同輩、後輩の皆さんにこの場を借りてお礼申し上げます。

引用文献

Abraham-Juárez, M.d.R., M.d.C. Rocha-Granados, M.G. López, R.F. Rivera-Bustamante and N. Ochoa-Alejo (2008) Virus-induced silencing of *Comt*, *pAmt* and *Kas* genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chili pepper fruits. *Planta* 227: 681–695.

Aguilar-Meléndez, A., P.L. Morrell, M.L. Roose, and S.-C. Kim (2009) Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *Am. J. Bot.* 96: 1190–202.

Arce-Rodríguez, M.L. and N. Ochoa-Alejo (2017) An R2R3-MYB transcription factor in capsaicinoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 174: 1359–1370.

Arimboor, R., R.B. Natarajan, K.R. Menon, L.P. Chandrasekhar and V. Moorkoth (2014) Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. *J. Food Sci. Technol.* 52: 1258–1271.

Atkins, W.R. and G.O. Sherrard (1915) The pigments of fruits in relation to some genetic experiments of *Capsicum annuum*. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., New Series.* 14: 328–335.

Aza-González, C., H.G. Núñez-Palenius and N. Ochoa-Alejo (2011) Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Rep.* 30: 695–706.

Babu, B.K., R.K. Mathur, P.N. Kumar, D. Ramajayam, G. Ravichandran, M.V.B. Venu and S.S. Babu (2017) Development, identification and validation of CAPS marker for SHELL trait which governs dura, pisifera and tenera fruit forms in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). PLoS ONE 12: e0171933.

Bartley, G.E. and P.A. Scolnik (1993) cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. J. Biol. Chem. 268: 25718–25721.

Beltran, J., A.K. Ghosh and S. Basu (2007) Immunotherapy of tumors with neuroimmune ligand capsaicin. 178: 3260–3264.

Ben-Chaim, A., Y. Borovsky, M. Falise, M. Mazourek, B.-C. Kang, I. Paran and M. Jahn (2006) QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. Theor. Appl. Genet. 113: 1481–1490.

Blum, E., M. Mazourek, M. O’Connell, J. Curry, T. Thorup, K. Liu, M. Jahn and I. Paran (2003) Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. Theor. Appl. Genet. 108: 79–86.

Borovsky, Y., and I. Paran (2008) Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the *chlorophyll retainer* mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. Theor. Appl. Genet. 117: 235–240.

Bosland, P.W. and J.B. Baral (2007) ‘Bhut Jolokia’—the world’s hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. Hortsci. 42: 222–224.

Bosland, P.W., E.J. Votava (2012) Peppers: Vegetable and Spice Capsicums 2nd Edition. CABI, UK.

Bouvier, F., P. Hugueney, A. d’Harlingue, M. Kuntz and B. Camara (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. Plant J. 6: 45–54.

Camara, B., J. Brangeon (1981) Carotenoid metabolism during chloroplast to chromoplast transformation in *Capsicum annuum* fruit. Planta 151: 359–364.

Camara, B., F. Bardat and R. Monéger (1982) Sites of biosynthesis of carotenoids in *Capsicum* chromoplasts. Eur. J.Biochem. 127: 255–258.

Canto-Flick, A., E. Balam-Uc, J.J. Bello-Bello, C. Lecona-Guzmán, D. Solís-Marroquín, S. Avilés-Viñas, E. Gómez-Uc, G. López-Puc and N. Santana-Buzzy (2008) Capsaicinoid content in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): hottest known cultivars. Hortsci. 43: 1344–1349.

Caterina, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine and D. Julius (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389: 816–824.

Chaim, A.B., Y. Borovsky, W. De-Jong, I. Paran (2003) Linkage of the *A* locus for the presence of anthocyanin and *fs10.1*, a major fruit-shape QTL in pepper. Theor. Appl. Genet. 106: 889–894.

Conti, E. and E. Izaurralde (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. Curr. Opin. Cell Biol. 17: 316–325.

Curry, J., M. Aluru, M. Mendoza, J. Nevarez, M. Melendrez and M.A. O’Connell (1999) Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. Plant Sci. 148: 47–57.

Deruère, J., S. Römer, A. d’Harlingue, R.A. Backhaus, M. Kuntz and B. Camara (1994) Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: A model for supramolecular lipoprotein structures. Plant Cell 6: 119–133.

土井元章・松原幸子・小枝壮太 (2013) シシトウ果実におけるカプサイシン合成関連遺伝子の発現解析. 園学研 12 (別 1): 321.

FAO (Food and Agricultural Organization) (2010) Food and Agricultural Commodities Production. FAO, Rome [<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>]

Fraser, P.D., J.W. Kiano, M.R. Truesdale, W. Schuch and P.M. Bramley (1999) Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. Plant Mol. Biol. 40: 687–698.

Fray, R.G. and D. Grierson (1993) Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Mol. Biol.* 22: 589–602.

Fujiwake, H., T. Suzuki and K. Iwai (1980a) Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant Cell Physiol.* 21: 1023–1030.

Fujiwake, H., T. Suzuki, S. Oka and K. Iwai (1980b) Enzymatic formation of capsaicinoid from vanillylamine and iso-type fatty acids by cell-free extracts of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Agric. Biol. Chem.* 44: 2907–2912.

Fujiwake, H., T. Suzuki and K. Iwai (1982a) Capsaicinoid formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2591–2592.

Fujiwake, H., T. Suzuki and K. Iwai (1982b) Intracellular distribution of enzymes and intermediates involved in biosynthesis of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruits. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2685–2689.

Gómez-García, M.d.R. and N. Ochoa-Alejo (2013) Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *Int. J. Mol. Sci.* 14: 19025–19053.

Guzman, I., S. Hamby, J. Romero, P.W. Bosland and M.A. O’Connell (2010) Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Sci.* 179: 49–59.

Ha, S.-H., J.-B. Kim, J.-S. Park, S.-W. Lee and K.-J. Cho (2007) A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. J. Exp. Bot. 58: 3135–3144.

林孝三編 (1980) 植物色素 実験・研究への手引. 養賢堂, 東京. 205–227.

Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Res. 27: 297–300.

Huh, J.H., B.C. Kang, S.H. Nahm, S. Kim, K.S. Ha, M.H. Lee and B.D. Kim (2001) A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.). Theor. Appl. Genet. 102: 524–530.

Hurtado-Hernandez, H. and P.G. Smith (1985) Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annuum* L. J. Hered. 76: 211–213.

市川竜太郎・坂智広・笹沼恒男 (2009) トウガラシにおけるカロテノイド合成酵素遺伝子の多様性解析. 育種学研究 11 (別 1): 263.

稲葉有紀 (2013) トウガラシ果実色に関するカロテノイド生合成経路遺伝子の変異解析. 平成 24 年度山形大学農学部卒業論文.

Isaacson, T., G. Ronen, D. Zamir and J. Hirschberg (2002) Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and

xanthophylls in plants. *Plant Cell* 14: 333–342.

Iwai, K., T. Suzuki and H. Fujiwake (1979) Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Agric Biol. Chem.* 43: 2493–2498.

岩井和夫・渡辺達夫 (2008) 改訂増補 トウガラシ 辛味の科学, 幸書房, 東京.

Jeong, H.B., M.-Y. Kang, A. Jung, K. Han, J.-H. Lee, J. Jo, H.-Y. Lee, J.-W. An, S. Kim and B.-C. Kang (2018) Single-molecule real-time sequencing reveals diverse allelic variations in carotenoid biosynthetic genes in pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Biotechnol. J.* [<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.13039>].

金目武男・山本紀夫・鈴木晋一・鄭大聲 (1989) *Capsicum* L., “世界有用植物事典” 堀田満・緒方健・新田あや・星川清親・柳宗民・山崎耕宇編, 平凡社, 東京. 213–215.

Keyhaninejad, N., J. Curry, J. Romero and M.A. O’Connell (2014) Fruit specific variability in capsaicinoid accumulation and transcription of structural and regulatory genes in *Capsicum* fruit. *Plant Sci.* 215–216: 59–68.

Khan, A.R. and M. Munir (1954) Inheritance studies in the common chillies (*Capsicum annuum* L.). *Proc. Sixth Pakistan Sci. Conf.*: 14–16.

Kilcrease, J., L. Rodriguez-Urbe, R.D. Richins, J.M.G. Arcos, J. Victorino and M.A. O'Connell (2015) Correlations of carotenoid content and transcript abundances for fibrillin and carotenogenic enzymes in *Capsicum annuum* fruit pericarp. Plant Sci. 232: 57–66.

Kim, M., S. Kim, S. Kim and B.-D. Kim (2001) Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. Mol. Cells 11: 213–219.

Kim, O.R., M.-C. Cho, B.-D. Kim and J.-H. Huh (2010) A splicing mutation in the gene encoding phytoene synthase causes orange coloration in Habanero pepper fruits. Mol. Cells 30: 569–574.

Kirii, E., T. Goto, Y. Yoshida, K. Yasuba and Y. Tanaka (2017) Non-pungency in a Japanese chili pepper landrace (*Capsicum annuum*) is caused by a novel loss-of-function *Pun1* allele. Hort. J. 86: 61–69.

小枝壮太 (2012) 恒温性地域におけるトウガラシの栽培及び利用 *Capsicum chinense* および *C. frutescens* を中心として. 農業および園芸 87: 29–33.

Koeda, S., K. Sato, K. Tomi, Y. Tanaka, R. Takisawa, M. Hosokawa, M. Doi, T. Nakazaki and A. Kitajima (2014) Analysis of non-pungency, aroma, and origin of a *Capsicum chinense* cultivar from a Caribbean island. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 83: 244–251.

Kollmannsberger, H., A. Rodríguez-Burruezo, S. Nitz and F. Nuez (2011) Volatile and capsaicinoid composition of ají (*Capsicum baccatum*) and rocoto (*Capsicum pubescens*), two Andean species of chile peppers. J. Sci. Food Agric. 91: 1598–1611.

Kormos, J and K. Kormos (1960) Die genetischen typen der carotinoid-systeme der paprikafrucht. Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 6: 305–319.

小菅貞良・稲垣幸男・奥村弘 (1961) 蕃椒辛味成分に関する研究 8 辛味成分の化学構造について 5 辛味成分 II の化学構造. 日本農芸化学会誌 35: 923–927.

小菅貞良・稲垣幸男 (1962) 蕃椒辛味成分に関する研究 11 二辛味成分の定量と含量. 日本農芸化学会誌 36: 251–254.

Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33: 1870–1874.

Kushanov, F.N., A.E. Pepper, J.Z. Yu, Z.T. Buriev, S.E. Shermatov, S. Saha, M. Ulloa, J.N. Jenkins, A. Abdukarimov and I.Y. Abdurakhmonov (2016) Development, genetic mapping and QTL association of cotton *PHYA*, *PHYB*, and *HY5*-specific CAPS and dCAPS markers. BMC Genet. 17: 141.

Lang, Y., S. Yanagawa, T. Sasanuma and T. Sasakuma (2006) A gene encoding a putative acyl-transferase involved in pungency of *Capsicum*. Breed. Sci. 56: 55–62.

Lang, Y., H. Kisaka, R. Sugiyama, K. Nomura, A. Morita, T. Watanabe, Y. Tanaka, S. Yazawa and T. Miwa (2009) Functional loss of pAMT results in biosynthesis of

capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet. Plant J. 59: 953–961.

Lang, Y.-Q., S. Yanagawa, T. Sasanuma and T. Sasakuma (2004) Orange fruit color in *Capsicum* due to deletion of capsanthin-capsorubin synthase gene. Breed. Sci. 54: 33–39.

Lee, C.-J., E.Y. Yoo, J.H. Shin, J. Lee, H.-S. Hwang and B.-D. Kim (2005) Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the capsaicinoid synthetase gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. Mol. Cells 19: 262–267.

Lee, S.J., M.-C. Suh, S. Kim, J.-K. Kwon, M. Kim, K.-H. Paek, D. Choi and B.-D. Kim (2001) Molecular cloning of a novel pathogen-inducible cDNA encoding a putative acyl-CoA synthetase from *Capsicum annuum* L. Plant Mol. Biol. 46: 661–671.

Lefebvre, V., M. Kuntz, B. Camara and A. Palloix (1998) The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the γ locus controlling the red fruit colour in pepper. Plant Mol. Biol. 36: 785–789.

Li, F., R. Vallabhaneni and E.T. Wurtzel (2008) PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regular of abiotic stress-induced root carotenogenesis. Plant Physiol. 146: 1333–1345.

Li, L. and J. Van Eck (2007) Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink. Transgenic Res. 16: 581–585.

Lippert, L.F., P.G. Smith and B.O. Bergh (1966) Cytogenetics of the vegetable crops. Garden pepper, *Capsicum* sp. Bot. Rev. 32: 24–55.

Liu, S., P. Gao, Q. Zhu, F. Luan, A.R. Davis and X. Wang (2016) Development of cleaved amplified polymorphic sequence markers and a CAPS-based genetic linkage map in watermelon (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsum. and Nakai) constructed using whole-genome re-sequencing data. Breed Sci. 66: 244–259.

Lu S., J. Van Eck, X. Zhou, A.B. Lopez, D.M. O'Halloran, K.M. Cosman, B.J. Conlin, D.J. Paolillo, D.F. Garvin, J. Vrebalov, L.V. Kochian, H. Küpper, E.D. Earle, J.Cao and L. Li (2006) The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation. Plant Cell 18: 3594–3605.

眞岡孝至 (2007) カロテノイドの多様な生理作用. 食品・臨床栄養 2: 3-14.

松島憲一 (2015) トウガラシ栽培における果実の辛味変動とその要因. 特産種苗 20: 18–21.

三室守・高市真一・富田純史 (2006) カロテノイド その多様性と生理活その多様性. 裳華房, 東京.

Moses, M., P. Umaharan and S. Dayanandan (2014) Microsatellite based analysis of the genetic structure and diversity of *Capsicum chinense* in the Neotropics. Genet. Res. Crop Evol. 61: 741–755.

M.P.G.M. Lejeune, E.M.R. Kovacs and M.S. Westerterp-Plantenga (2003) Effect of capsaicin on substrate oxidation and weight maintenance after modest body-weight loss in human subjects. *Br. J. Nutr.* 90: 651–659.

Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4326.

Neff, M.M., J.D. Neff, J. Chory and A.E. Pepper (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* 14: 741–755.

Ogawa, K., K. Murota, H. Shimura, M. Furuya, Y. Togawa, T. Matsumura and C. Masuta (2015) Evidence of capsaicin synthase activity of the *Pun1*-encoded protein and its role as a determinant of capsaicinoid accumulation in pepper. *BMC Plant Biol.* 15: 93.

Ohnuki, K., S. Haramizu, K. Oki, T. Watanabe, S. Yazawa and T. Fushiki (2001) Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2735–2740.

太田泰雄 (1962a) トウガラシの辛味に関する生理学的ならびに遺伝学的研究 IV トウガラシ果実内における capsaicin の分泌器官, 貯蔵器と辛味の分布. *育種学雑誌* 12: 179–183.

太田泰雄 (1962b) トウガラシの辛味に関する生理学的ならびに遺伝学的研究 V
辛味の遺伝. 遺伝学雑誌 37: 169–175.

Oliver J. and A. Palou (2000) Chromatographic determination of carotenoids in foods. J.
Chromatogr. A 881: 543–555.

Park, Y.-J., T. Nishikawa, M. Minami, K. Nemoto, T. Iwasaki and K. Matsushima (2015)
A low-pungency S3212 genotype of *Capsicum frutescens* caused by a mutation in the
putative aminotransferase (p-AMT) gene. Mol. Genet. Genomics 290: 2217–2224.

Perry, L., R. Dickau, S. Zarrillo, I. Holst, D.M. Pearsall, D.R. Piperno, M.J. Berman, R.G.
Cooke, K. Rademaker, A.J. Ranere, J.S. Raymond, D.H. Sandweiss, F. Scaramelli, K.
Tarble, J.A. Zeidler (2007) Starch fossils and the domestication and dispersal of chili
peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. Science 315: 986–988.

Peto, R., R. Doll, J.D. Buckley and M.B. Sporn (1981) Can dietary beta-carotene
materially reduced human cancer rate? Nature 290: 201–208.

Pickersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T. and
P.K. Gupta (eds.) Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution,
Part B, Elsevier, Amsterdam, pp. 139–160.

Pickersgill, B. (2007) Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian
and Molecular Genetics. Ann. Bot. 100: 925–940.

Popovsky, S and I. Paran (2000) Molecular genetics of the *y* locus in pepper: its relation to capsanthin-capsorubin synthase and to fruit color. *Theor. Appl. Genet.* 101: 86–89.

Purkayastha, J., S.I. Alam, H.K. Gogoi, L. Singh and V. Veer (2012) Molecular characterization of ‘Bhut Jolokia’ the hottest chilli. *J. Biosci.* 37: 757–768.

Ramiah, K. and M.R. Pillai (1935) Pungency in chillies (*Capsicum annuum*). A Mendelian character. *Curr. Sci.* 4: 236–237.

Rodríguez-Burruezo, A., M.C. González-Mas and F. Nuez (2010) Carotenoid composition and vitamin A value in Ají (*Capsicum baccatum* L.) and Rocoto (*Capsicum pubescens* R. & P.), 2 pepper species from the Andean region. *J. of Food Sci.* 75: 446–453.

Rodriguez-Urbe, L., I. Guzman, W. Rajapakse, R.D. Richins and M.A. O’Connell (2012) Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *J. Exp.Bot.* 63: 517–526.

Römer, S., P. Hugueney, F. Bouvier, B. Camara and M. Kuntz (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414–1421.

Saini N, N. Singh, A. Kumar, N. Vihan, S. Yadav, S. Vasudev and D.K. Yadava (2016) Development and validation of functional CAPS markers for the FAE genes in *Brassica juncea* and their use in marker-assisted selection. *Breed. Sci.* 66: 831–837.

笹沼恒男・稲葉有紀・阿部利徳 (2013a) トウガラシの果実色を決定する遺伝機構に関する再考察. 育種学研究 15 (別 2): 191.

笹沼恒男・稲葉有紀・阿部利徳 (2013b) トウガラシ果実色決定遺伝機構における *Psy* 遺伝子の対立遺伝子変異の役割. 第 8 回東北育種研究集会.

Shaw, F.J.F. and A.R. Khan (1928) Studies in Indian chillies. I. The types of *Capsicum*. Mem. Dept. Agr. India Bot. Ser. 16: 59–82.

篠村 (2018) カロテノイド: その多様性と普遍が切り拓く新展開. 植物科学最前線 9: 46–49.

Smith, P.G. (1950) Inheritance of brown and green mature fruit color in peppers J. Hered. 41: 138–140.

Song, F.S., J.L.Ni, Y.L. Qian, L. Li, D.H. Ni and J.B. Yang (2016) Development of SNP-based dCAPS markers for identifying male sterile gene *tms5* in two-line hybrid rice. Genet. Mol. Res. 15: gmr.15038512.

Sporn, M.B. and K.T. Liby (2013) Is lycopene an effective agent for preventing prostate cancer? Cancer. Prev. Res. 6: 384–386.

Stellari, G.M., M. Mazourek and M.M. Jahn (2010) Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. Heredity 104: 460–471.

Stewart, C., Jr., B.-C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S.L. Moore, E.Y. Yoo, B.-D. Kim, I. Paran and M.M. Jahn (2005) The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J.* 42: 675–688.

Stewart, C., Jr., M. Mazourek, G.M. Stellari, M. O’Connell and M. Jahn (2007) Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus. *J. Exp. Bot.* 58: 979–991.

Suzuki, T., H. Fujiwake and K. Iwai (1980) Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol.* 21: 839–853.

Suzuki, T., T. Kawada and K. Iwai (1981) Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant Cell Physiol.* 22: 23–32.

Tanaka, Y., M. Hosokawa, T. Miwa, T. Watanabe and S. Yazawa (2010a) Newly mutated *putative-aminotransferase* in nonpungent pepper (*Capsicum annuum*) results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogues. *J. Agric. Food Chem.* 58: 1761–1767.

Tanaka, Y., M. Hosokawa, T. Miwa, T. Watanabe and S. Yazawa (2010b) Novel loss-of-function *putative aminotransferase* alleles cause biosynthesis of capsinoids, nonpungent capsaicinoid analogues, in mildly pungent chili peppers (*Capsicum chinense*). *J. Agric. Food Chem.* 58: 11762–11767.

田中義行・細川宗孝・渡辺達夫・三輪哲也・矢沢進 (2012) トウガラシの辛味成分カプサイシノイドおよびその類似物質の生合成を制御する遺伝子について. 京大農場報告 21: 9–14.

Tanaka, Y., T. Sonoyama, Y. Muraga, S. Koeda, T. Goto, Y. Yoshida and K. Yasuba (2015) Multiple loss-of-function putative aminotransferase alleles contribute to low pungency and capsinoid biosynthesis in *Capsicum chinense*. Mol. Breed. 35: 142.

Tanaka, Y., S. Fukuta, S. Koeda, T. Goto, Y. Yoshida and K. Yasuba (2018) Identification of a novel mutant *pAMT* allele responsible for low-pungency and capsinoid production in chili pepper: accession ‘No. 4034’ (*Capsicum chinense*). Hort. J. 87: 222–228.

寺尾純二・長尾明彦 (1999) カロテノイドの吸収代謝と生理活性. 日本油化学会誌 48: 1075–1085.

Tewksbury, J.J. and G.P. Nabhan (2001) Directed deterrence by capsaicin in chillies. Nature 412: 403–404.

Thorup, T.A., B. Tanyolac, K.D. Livingstone, S. Popovsky, I. Paran and M. Jahn (2000) Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 11192–11197.

Thresh, C.F. (1876) Capsaicin, the active principle of capsicum fruits. Pharmaceut. J. 315: 21.

Thul, S.T., M.P. Darokar, A.K. Shasany and S.P.S. Khanuja (2012) Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD Markers. Mol. Biotechnol. 51: 137–147.

Tzuri, G., X. Zhou, N. Chayut, H. Yuan, V. Portnoy, A. Meir, U. Sa'ar, F. Baumkoler, M. Mazourek, E. Lewinsohn, Z. Fei, A. A. Schaffer, L. Li, J. Burger, N. Katzir and Y. Tadmor (2015) A 'golden' SNP in *CmOr* governs the fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*). Plant J. 82: 267–279.

Villemot, J. and M. Rolland (2016) A dCAPS assay detects and characterizes BaYMV according to its ability to overcome rym4-mediated resistance. J. Virol. Methods. 234: 101–106.

Walsh, B.M., S.B. Hoot (2001) Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. Int. J. Plant Sci. 162: 1409–1418.

Webber, H.J. (1911) Preliminary notes on pepper hybrids. Ann. Rep. Amer. Breed. Assoc. 7: 188–199.

Wyatt, L.E., N.T. Eannetta, G.M. Stellari and 534 M. Mazourek (2012) Development and application of a suite of non-pungency markers for the *Pun1* gene in pepper (*Capsicum* spp.). Mol. Breed. 30: 1525–1529.

矢賀部隆史・宮下達也・吉田和敬・稲熊隆博 (2013) 野菜と果物の色に宿るチカラ 野菜や果物に含まれるカロテノイドと疾病の予防, 改善. 日薬理誌 141: 256–261.

Yamamoto, S. and E. Nawata (2006) Germination characteristics of *Capsicum frutescens* L. on the Ryukyu islands and domestication stages of *C. frutescens* L. in southeast asia. Jpn. J. Trop. Agr. 50: 142–153.

Yanagisawa, T., C. Kiribuchi-Otobe, H. Hirano, Y. Suzuki and M. Fujita (2003) Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the waxy character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker. Theor. Appl. Genet. 107: 84–87.

矢沢進・末留昇・岡本佳奈・並木隆和 (1989) ‘CH-19 甘’を片親としたトウガラシ(*Capsicum annuum* L.)の雑種におけるカプサイシノイドならびにカプシノイド様物質の含量. 園学雑 58: 601–607.

與那嶺かおる・宮城徳道・坂本守章・伊是名純二・石垣新・渡慶次美歌 (2013) 沖縄県内各地から採集したトウガラシ(*Capsicum* spp.)の果実特性と分類. 沖縄県農業研究センター研究報告 7: 55–60.

Yoshida, M., S. St-Pierre, M. Suzuki and A. Tremblay (1998) Effects of red pepper added to high-fat and high-carbohydrate meals on energy metabolism and substrate utilization in Japanese women. Br. J. Nutr. 80: 503–510.

Zhou X., R. Welsch, Y. Yang, D. Álvarez, M. Riediger, H. Yuan, T. Fish, J. Liu, T.W. Thannhauser and L. Li (2015) *Arabidopsis* OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112: 3558–3563.