カプサイシン含有率と隔壁表面積計測によるトウガラシ果実におけるカプサイシン生合成能の評価

杉山立志¹, 志手真人¹, 藤野廣春¹, 辰尾良秋¹, 中村佐紀子², 覚正信徳², 伊藤昌夫^{3,4}, 横田秀夫², 加瀬究³, 黒崎文也¹

¹ 富山大学 大学院 医学薬学研究部 環境・生命システム学域生命分子薬学系 〒930-0194 富山市杉谷 2630

² 独立行政法人 理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

³ 独立行政法人理化学研究所 VCAD モデリングチーム 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

⁴ 有限会社 VCAD ソリューションズ 〒157-0073 東京都世田谷区砧 2-17-7

要旨: トウガラシの辛さは、辛味成分のカプサイシンとジヒドロカプサイシンの含有量に比例する。世界一辛いトウガラシといわれるハバネロは日本のタカノツメの 10 倍以上の辛さを持つ。これらの辛さの違いの主な要因はどこにあるのか、二つの仮説を立てて検証した。一つは生合成関連酵素の量や活性が異なり、いわゆる生合成能が高いことである。もう一つは「生合成の場」が相対的に広いということである。そこで、生合成細胞を特定して、生合成組織あたりのカプサイシン含有量を生合成能として評価した。生合成関連遺伝子による *in situ* ハイブリダイゼーションにより果実内部の隔壁表皮細胞が生合成を行う細胞であることがわかった。そこで、隔壁表面積を 3 次元立体構築から算定し、液体高速クロマトグラフィーによるカプサイシン量の測定結果とあわせて、生合成組織あたりのカプサイシン含有量を試算した。辛さの異なる 3 つのトウガラシにおいて、組織あたりのカプサイシン含有量に大きな差はなく、果実に占める生合成組織の割合の違いが辛さの差を生み出していることが示唆された。

Estimation of capsaicinoid biosynthetic capacity from capsaicinoid content and surface area of the placental dissepiment in *Capsicum* fruits

Ryuji Sugiyama¹, Masato Shite¹, Hiroharu Fujino¹, Yoshiaki Tatsuo¹, Sakiko Nakamura², Nobunori Kakusho², Masao Ito^{3,4}, Hideo Yokota², Kiwamu Kase³, Fumiya Kurosaki¹

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Univ. Toyama Sugiyama 2630, Toyama 930-0194, Japan

² Computational Biomechanics Unit, RIKEN Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

³ RIKEN VCAD Modeling Team Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

⁴ VCAD Solutions Co., LTD, Tokyo, Japan

Summary: Pungency in *Capsicum* fruits is due to the accumulation of capsaicin and dihydrocapsaicin. *Capsicum chinense* cv. Habanero is the most pungent peppers in the world. Capsaicinoids are accumulated in Habanero at least 10 times higher levels than in *C. annuum* cv. Takanotsume. This variation in capsaicinoid content might result from difference in biosynthesis activity, number of biosynthesis cells, or both. We estimated capsaicinoid biosynthesis activity as capsaicinoid content per tissue volume which biosynthesize capsaicinoids. *In-situ* hybridization analysis of keto acyl synthase (Kas) demonstrated that capsaicinoids were synthesized in the epidermal cells on the placental dissepiment. Then, the total surface area of the placental dissepiment was calculated by 3-dimensional images of *Capsicum* fruits. Biosynthesis activity of capsaicinoids per surface area of the placental dissepiment was calculated in three types of *Capsicum* fruits. Biosynthesis activity was almost same levels. Difference in pungency would result from the amount of cells which synthesized capsaicinoids.

Key words: 3-Dimension internal structure, biosynthetic capacity, *Capsicum*, *in situ* hybridization

Author for correspondence: Ryuji Sugiyama, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Univ. Toyama Sugiyama 2630, Toyama 930-0194, Japan

はじめに

トウガラシは世界に数百種類あるといわれる。それらは各地域の気候に順化したものであるが、形や風味、そして辛さにも違いがある。辛さの違いは、辛味成分で

あるカプサイシン類の含有量の差によって生じている。

世界一辛いのはユカタン半島原産のハバネロ (*Capsicum chinense*) で、日本のタカノツメ (*C. annuum*) の 10 倍以上の辛さがある。カプサイシンの含有量は乾

乾燥果実の重量あたりのカプサイシン量の100分率で表される。例えば、本研究で用いたハバネロでは乾燥果実重量に対するカプサイシンの含有率は1.35%である。一方、タカノツメは0.14%であった(表2)。なお、辛さの主成分はカプサイシンとジヒドロカプサイシンであり、両者の辛さは同じと考えられるので、両者の和をカプサイシン量とした(岩井ら2000)。

このような品種ごとのカプサイシン含有量の違いは、何が主要因となって生じているのだろう。一般に、「ハバネロは生合成能が高い」と表現されるが、この生合成能をどのようにして数値化すればよいのか。タバコ培養細胞など均一の細胞系では、RNAやタンパク質の量、タンパク質の活性を測定すれば、単位重量あたりの生合成能を計算できる。一方、トウガラシの場合、果実であっても複数の組織から構成されるので、果実の乾燥重量あたりのカプサイシン量では、生合成能とはいえない。

本研究では、生合成を行っている組織を特定して、組織あたりのカプサイシン量を生合成能として評価する試みを行った。生合成能を次のような式から求めた。

$$\text{生合成能} = \frac{\text{果実に含まれるカプサイシン量}}{\text{生合成に関わる組織の量}}$$

最初に、果実を組織ごとに分けて、カプサイシン含有量を測定し、蓄積組織を特定した。その後、RT-PCRと*in situ*ハイブリダイゼーションにより、生合成を行っている組織と其中的細胞を特定した。続いて、コンピュータを用いてトウガラシの果実の内部構造を立体構築し、生合成組織の量を算出した。これらの測定を3種類のトウガラシについて行い、生合成能を算定し、比較した。

材料と方法

材料

本研究では、富山大学薬学附属薬用植物園で栽培したハバネロ(*C. chinense*)、キムチトウガラシ(*C. annuum*)、タカノツメ(*C. annuum*)の3種類のトウガラシを用いた。

カプサイシン含有量の測定

カプサイシン含有量が高くなる開花後日数40日前後(豊田ら1999, Kim et al. 2001)に果皮の色が緑から黄

色に変化する時期の果実を採取し、60℃で4日間乾燥させた。組織ごとの測定については、採取後すぐに各組織に分け、乾燥させた。乾燥後にミルを用いて粉末とし、メタノールでカプサイシン類の抽出した。抽出サンプルを希釈して、高速液体クロマトグラフィーでカプサイシン量を測定した(Karnka et al. 2002)。カラムにはInertsil ODS-80A(GLサイエンス)を用い、移動相には0.1%リン酸水溶液:アセトニトリル(6:4)混合液を用いた。カプサイシン類は281 nmの吸光により検出した。濃度は、カプサイシン純物質を用いた外部標準から算定した。辛さとしては、カプサイシンとジヒドロカプサイシンは同じなので、ジヒドロカプサイシンはカプサイシンとして扱った。組織ごとの測定には3つの果実由来の組織を混合して用い、異なる7つの混合サンプルについて測定した。

RT-PCRによる発現解析

各組織から全RNAを単離し、cDNAを合成した。cDNAをテンプレートとし、アクチン遺伝子(*Actin*)をコントロールとして用いた(Sugiyama et al. 2006a)。生合成関連遺伝子のうちAcyl carrier protein (*Acl*)、Keto acyl synthase (*Kas*)、Phenylalanine ammonia lyase (*Pal*) (Curry et al. 1999, Aluru et al. 2003)の3つを用いた。表1にプライマー配列を示した。それぞれのPCR条件は次の通りである。*Actin*は94℃・1分、(94℃・1分、55℃・1分、72℃・1分)×30サイクルとした。*Acl*は94℃・1分、(94℃・1分、63℃・1分、72℃・1分)×25サイクルとした。*Kas*は、94℃・1分、(94℃・1分、65℃・1分、72℃・1分)×25サイクルとした。*Pal*は、94℃・1分、(94℃・1分、65℃・1分、72℃・1分)×30サイクルとした。

表1 RT-PCRに用いたプライマーとその配列

プライマー	配列
Actin F	5'-GGATCTTGCTGGACGTGACC-3'
Actin R	5'-TTGGAAGAGGACCTCTGGGC-3'
Acl F	5'-TGAAGAGCTCCTCCCTTCCG-3'
Acl R	5'-ACTCTCCCTTCTACCAGACC-3'
Kas F	5'-GTGAACGTCGGTATCTCCAACCTCG-3'
Kas R	5'-AGGTAGAAGGGGTGCTCTCCTATC-3'
Pal F	5'-GCTTCGAGTCGTGGACAGGG-3'
Pal R	5'-CGGGCGATCGGACTCTTTCA-3'

*In situ*ハイブリダイゼーション

プローブには、*Kas* (GenBank accession number AF085148)の3'UTRを用い、DigoxigeninラベルRNAプローブを生合成した。パラフィン包埋した組織から10 μmの切片を作製し、脱パラフィン後ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションは65℃で行い、2

回の洗浄を行った後、アルカリフォスファターゼを結合した抗 Digoxigenin 抗体を用いて反応した。シグナルの検出は、BCIP/NBT (4-nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) による発色法を用いた (Sugiyama et al. 2006b)。

3 次元内部構造顕微鏡を用いた立体構築

トウガラシの内部構造の立体構築には、3 次元内部構造顕微鏡 (横田ら 1998a) によって撮影したスライス画像を用いた。立体構築及び算定方法については、本文中で詳しく述べる。

結果

トウガラシの内部構造とカプサイシン蓄積の場

本研究で用いた 3 種のトウガラシのカプサイシン含有率を表 2 に示す。

品種	果実乾燥重量 [g]	カプサイシン	
		含有量[mg]	含有率[%]
ハバネロ	1.12	15.10	1.35
キムチトウガラシ	0.73	1.85	0.25
タカノツメ	0.33	0.44	0.14

一般にトウガラシの種子が最も辛いといわれる。最近の論文では、胎座での RNA の発現や酵素の局在が報告されている (Prasad et al. 2006)。研究に用いられるトウガラシの多くは *C. annuum* や *C. frutescens* で、主に長細い形をしている (図 1A)。日本のタカノツメもこの *C. annuum* である。そのため、胎座と隔壁という組織を分離するのが難しく、研究論文における胎座という表現は隔壁を含んでいるケースが多かった (Suzuki et al. 1980, Prasad et al. 2006)。一方、世界一辛いトウガラシであるハバネロは *C. chinense* であり、ベル型と呼ばれるピーマンのような形をしている。このベル型の特色は、タカノツメなどでは胎座と同一視されてきた隔壁を分けて研究できる点にある (図 1)。最初にハバネロを用いて、果皮、隔壁、胎座、種子に組織を分けてカプサイシン蓄積器官の特定を行った。

図 2A に組織ごとのカプサイシン含有率を示した。隔壁の含有率は 10.6% と非常に高い。また、胎座も 3.0% と高い。種子にはほとんどカプサイシンは含まれていなかった。しかし、胎座はスポンジ状の組織のため、乾燥重量が軽く、わずかな量のカプサイシンの付着により含有

図 1 トウガラシの果実形態と内部組織。A. タカノツメ。B. ハバネロ。C. ハバネロの縦方向の断面。D. キムチトウガラシの横断面。中心が胎座なので、隔壁は上下 2ヶ所ある。E. ハバネロの横断面。ハバネロは隔壁が 3 つの場合と 4 つの場合がある。白矢印は胎座を、黒矢印は隔壁を示す。スケールバーは 1 cm。

図 2 ハバネロ果実一個あたりの各組織におけるカプサイシン含有量。A: 各組織の乾燥重量あたりのカプサイシン含有率。B: 各組織に含まれる平均カプサイシン量。

率が高く算定される可能性がある。そこで、各組織に含まれるカプサイシンの平均量を求めたものが図 2B である。この場合でも、カプサイシンの多くは隔壁に存在す

ることが明らかである。次に多いのは果皮であった。すでに述べたように、これまでの研究では胎座と隔壁との区別がされてこなかった (Kim et al. 2001, Prasad et al. 2006)。ハバネロを用いることによってカプサイシンは隔壁に蓄積していることが明瞭になった。

カプサイシン生合成にかかわる細胞の特定

カプサイシンの定量によって、蓄積の場は隔壁であることがわかったが、実際にカプサイシンは隔壁で生合成されているのだろうか、それとも生合成後に隔壁に輸送されているのだろうか。そこで、3つの生合成関連遺伝子 *Acl*, *Kas*, *Pal* を用いて組織ごとの発現を RT-PCR によって解析した (図 3)。

図 3 生合成にかかわる遺伝子の RT-PCR 解析。各組織から、Total RNA を単離し、逆転写産物をテンプレートとして用いた。*Actin* はコントロールである。L: 葉, Fw: 果皮, Pd: 隔壁, P: 胎座, S: 種子。

Pal と *Acl* はカプサイシン生合成以外にフェニルプロパノイド生合成経路に関わっているため、隔壁以外での発現も見られた (図 3)。一方、*Kas* は隔壁で最も多く発

現していることがわかった。図 3 では明瞭ではないが、*Kas* は胎座で薄くバンドが確認された。これは組織の分離が完全ではないので、隔壁の一部が混入したことも考えられる。*Kas* の発現部位はカプサイシンの蓄積との関係が明瞭で、カプサイシンは隔壁で生合成されていると考えられる。なお、近年 Prasad et al. (2006) によって単離されたカプサイシン生合成酵素遺伝子の候補 *Csy1* を用いた RT-PCR 解析ではすべての組織で発現がみられ、他の遺伝子を検出している可能性があり、本研究に用いることが出来なかった (未発表データ)。

隔壁を構成するどの細胞がカプサイシンを生合成しているのだろうか。*Kas* をプローブとして、*in situ* ハイブリダイゼーションによって発現部位を特定した。*Kas* の発現シグナルは、隔壁表皮細胞にみられた (図 4)。表皮細胞のうち、特に、細胞質密度が高く、表皮のクチクラが乖離している細胞にシグナルは観察された (図 4C)。形態学的な観察から、カプサイシンが表皮細胞で生合成され、クチクラ層と細胞壁との間に分泌されると考えられてきた (Suzuki et al. 1980)。今回、*Kas* の *in situ* ハイブリダイゼーション解析により、遺伝子発現から表皮細胞が生合成の場であることが明瞭となった。果実が小さなタカノツメでは、果実を輪切りにしてパラフィンに包埋することができた。その結果、*Kas* が隔壁の表皮全体ではなく、その一部で発現していることがよくわかる (図 4B)。

3次元内部構造顕微鏡を用いた隔壁表面積の算定

Kas の *in situ* ハイブリダイゼーション解析によって、カプサイシンの生合成は隔壁の表皮細胞で行われていることがわかった。つまり、隔壁の表面積を算定すれば、

図 4 *Kas* の発現部位。*in situ* ハイブリダイゼーションによって、*Kas* の発現部位を解析した。紫色のシグナルが発現部位である (矢印)。A: ハバネロ隔壁。上部が果皮側、下部が胎座側。B: タカノツメ。C: ハバネロ隔壁の拡大。D: センスプローブによるコントロール実験。スケールバーは 1 mm (A, B), 100 μ m (C, D)。

生合成組織の量を面積として解析することができる。そこで、果実内部の構造を立体構築することによって、隔壁の表面積の算定を試みた。

果実内部構造を解析する方法は、Computed Tomography (CT) スキャンなどの方法もある。本研究では扱う組織が小さいので、より解像度の高い3次元内部構造顕微鏡を用いた(横田ら 1998a)。3次元内部構造顕微鏡は、凍結包埋したサンプルを回転刃によってスライスし、切片ではなく断面を観察し、連続的に画像を撮影する装置である。この装置の特色は解像度が高いこととサンプルの本来の色を維持していることである。しかしながら、破壊検査であるため、内部構造を解析したサンプルを直接カブサイシン含有量の測定に用いることができないという欠点はある。

図5 3次元内部構造顕微鏡によるハバネロ果実の断面画像。ハバネロの成熟果実は1324枚の画像を撮影した。ここには150枚おきに例を示した。

着色した凍結包埋剤をトウガラシ内部に充填したのち、包埋剤に埋め、 -80°C で凍結した。凍結したサンプルを3次元内部構造顕微鏡を用いて、 $30\text{ }\mu\text{m}$ 間隔でスライスしながら連続画像を撮影した(図5)。立体構築には、5枚おきの画像を利用した。さらに、不要な領域を削除し、RVエディタ(RIKEN, 横田ら 2004)を利用して領域指定をした(図6A)。隔壁表面積の算定には隔壁表面部分のみを指定した。果実体積の算定には、内部をすべて領域指定した。指定作業はペンタプレット(WACOM)を用いて手作業で行った(図6A)。RVエディタでボクセルデータに変換し、そのデータを用いて隔壁表面積、果実体積を算定した。隔壁表面積は各ボクセルを点に置き換え、連続した三角形による面を作製し、さらにこれらをスムージングによりなめらかに処理をした後、三角形の面積を計算し、総和を求めた(図6B)。果実体積は内部についてはボクセルを積み上げて計算し、表面の境

界に位置するボクセルに関してはスムージング処理をしたのちVCAD(Kase et al. 2005)を用いて多角形の体積を算定した(図6C)。

図6 ハバネロの立体構築例。A: RVエディタによる隔壁領域の指定例。ハバネロの場合、隔壁表面は8つになる。例えば、下に位置する隔壁の場合、橙色と黄色で表面を指定した。B: 隔壁表面積計算に用いた立体構築例。C: 体積計算に用いた立体構築例。

3次元内部構造顕微鏡による解析には、大きさの異なる複数のトウガラシを用いたが、隔壁領域が明瞭な解像度を得るためには大きな果実が必要であることがわかった。そこで、3次元立体構築には成熟時に近いハバネロと、細長いタイプでは大きな果実を形成するキムチトウガラシを用いた。ハバネロは265枚の画像を、キムチトウガラシは462枚の画像を用いた。計算された果実体積と隔壁表面積を表3に示す。立体構築に用いたサンプルは隔壁数が4つであった。しかし、ハバネロは生育環境によって隔壁の数が3又は4と変化する。そこで、ハバネロについては隔壁数が3つの場合と、4つの場合について計算した。体積に対する隔壁表面積の比率は隔壁数で大きく異なる。

表3 各品種の隔壁表面積			
品種	体積 [mm^3]	隔壁表面積 [mm^2]	表面積/体積比
ハバネロ(隔壁3つ)	14,309	1,666	0.116
ハバネロ(隔壁4つ)	14,309	2,222	0.155
キムチトウガラシ	5,829	779	0.134

立体構築に用いたトウガラシの形態は必ずしも代表的ではない。そこで、果実体積と隔壁表面積には比例関係があると仮定して、成熟果実の平均体積から、隔壁表面積を補正した(表4)。タカノツメについてもキムチトウガラシと同じ形態であると仮定して、表3に示した隔壁表面積比率を用いて果実体積から隔壁面積を算定した。

表4 平均体積からの隔壁表面積の補正

品種	平均体積 [mm ³]	推定隔壁表面積 [mm ²]
ハバネロ(隔壁3つ)	23,570	2,744
ハバネロ(隔壁4つ)	23,570	3,660
キムチトウガラシ	5,450	728
タカノツメ	1,033	138

組織染色による生合成細胞比率の算定

Kas の発現シグナルからわかるように、隔壁表皮細胞のすべてがカプサイシンを生合成しているのではない(図4B)。今回は簡易的に、パラフィン切片から生合成を行っている細胞の比率を算定した。図7E~Gに例を示すように、隔壁の両端がみられる切片を利用して、両端の長さに対して、生合成細胞が存在する長さの比率を求めた。

図7 *in situ* ハイブリダイゼーションによる *Kas* シグナルと染色による生合成細胞の比較。A: ハバネロ隔壁表皮細胞における *in situ* ハイブリダイゼーション法による *Kas* のシグナル。B: ハバネロ隔壁表皮細胞のサフラニン染色。C: キムチトウガラシ隔壁表皮細胞のサフラニン染色。D: タカノツメ隔壁表皮細胞のトルイジンブルー染色。E: ハバネロ隔壁表皮における生合成細胞のサフラニン染色例。F: キムチトウガラシ隔壁表皮細胞における生合成細胞のサフラニン染色例。G: タカノツメ隔壁表皮細胞における生合成細胞のトルイジンブルー染色例。スケールバーは 100 μ m (A-D), 1 mm (E-G)。

in situ ハイブリダイゼーション解析では大量のデータを処理することが困難なので、組織染色を用いて生合成細胞の比率を求めた。図7Aは *in situ* ハイブリダイゼーション解析におけるハバネロ隔壁での *Kas* のシグナルを示している。ハバネロ隔壁をサフラニン染色したものが図7Bである。*Kas* のシグナルが観察された細胞密度の高い細胞がサフラニンで染色されているのがわか

る。図7Cはキムチトウガラシの隔壁表皮細胞のサフラニン染色である。細胞内部の染色は弱いものの、クチクラの垂離している細胞は細胞壁が薄いなどの特色が見られた。図7Dはタカノツメ隔壁表皮細胞のトルイジンブルー染色である。トルイジンブルー染色ではサフラニンよりも細胞質の染色の違いが比較的わかりやすかった。このような、細胞質染色密度が高く、細胞壁が薄い細胞をカプサイシン合成細胞と判断し、さらにクチクラが垂離しているという特色をもとにトルイジンブルー又はサフラニン染色切片からその存在比率を算定した。手法の限界もあり、正しい値は算定されないが、すべてのサンプルについて10ヶ所での比率を求め、平均値を利用した。算定結果を表5に示す。ハバネロでは8割近くが生合成を行っている細胞であるのに対して、キムチトウガラシとタカノツメではその半分程度の3から4割であった。

表5 生合成細胞の存在比率

品種	合成細胞領域 [mm]	隔壁の幅 [mm]	細胞比率 [%]
ハバネロ	5.88	7.56	78
キムチトウガラシ	1.23	2.92	42
タカノツメ	0.67	2.03	33

単位面積あたりのカプサイシン含量の評価

in situ ハイブリダイゼーション解析により、カプサイシン生合成組織が表皮細胞であることが明らかになった。そこでトウガラシの場合については、生合成組織の単位面積あたりのカプサイシン量を生合成能として評価することができる。生合成細胞が存在する隔壁の表面積、細胞の存在比率がわかったので、カプサイシン含有量から、3種のトウガラシについて生合成組織単位面積あたりの含有量を求めたのが表6である。

表6 カプサイシン生合成能

品種	カプサイシン 含量[mg]	生合成領域 [mm ²]	生合成能 [μ g/mm ²]
ハバネロ(隔壁3つ)	15.10 (34.3)	2,134 (46.8)	7.08 (0.7)
ハバネロ(隔壁4つ)	15.10 (34.3)	2,847 (62.5)	5.30 (0.6)
キムチトウガラシ	1.85 (4.2)	307 (6.7)	6.03 (0.6)
タカノツメ	0.44 (1.0)	46 (1.0)	9.66 (1.0)

()内はタカノツメを1としたときの相対的な値を示す。

このように、生合成能については世界一辛いハバネロはタカノツメの0.55~0.73倍となり、低い値になった。表6には果実あたりのカプサイシン含有量、表面積などについても比率を示した。タカノツメを1としたとき、カプサイシン含有量では、ハバネロは34.3倍もの量を持つ。

一方、生合成細胞面積では、ハバネロは 46.8~62.5 倍となる。このように、ハバネロが世界一辛いトウガラシとなっているのは、生合成能力の差よりも、生合成を行う細胞数が多いことが大きな要因となっている事がわかった。

考察

カプサイシン含有量へ影響を与える要因

植物の生合成能について、トウガラシを事例にして算定し、品種間で比較した。トウガラシは生合成組織が隔壁表皮細胞であったため、隔壁表面積を算定して、単位面積あたりのカプサイシン含有量を生合成能とした。その結果、生合成能にはほとんど差がなかった。今回のデータは少ないものの、ハバネロの生合成能はタカノツメよりも低く、生合成を行う領域が広くなり、カプサイシン含有量が増えている事が示唆された。

キムチトウガラシとハバネロを比較すると、生合成能はほぼ同じなので、カプサイシン含有率の差は果実の形の違いが影響しているといえる。キムチトウガラシで表 5 に示した細胞比率を 2 倍の 84%と仮定しても、カプサイシン含有率は 0.5%にしかならない。一方、ハバネロのカプサイシン含有率は 1.35%であり、キムチトウガラシの細胞比率が 100%となっても到達できない含有率となっている。このことは生合成細胞比率に加えて、果実あたりの隔壁表面積が増加することが大きな影響を与えていることを意味する。特にハバネロの場合、内部空間が大きくなることで、おそらく形態の維持や胎座の保持のために、隔壁数が増えていると考えられる。しかし、トウガラシは種類が多く、必ずしも生合成細胞比率と隔壁表面積のみで説明できるものではないだろう。カプサイシン含有量が、生合成能と生合成領域の広さによってどのように決まるのか一般性を導き出すには、形やカプサイシン含有率の異なる他のトウガラシ類でも同様の解析が必要である。

これまで、代謝産物の生産性の改変はその生合成経路において律速となる酵素を過剰発現させるなどのことが考えられていた。しかしながら、ハバネロとタカノツメのように 10 倍もの含有量の差を示すトウガラシを比較することによって、生合成経路の改変よりも、むしろ生合成細胞の比率を増やすことが効果的である可能性が示唆された。応用を目指すには、生合成細胞がどのようにして分化するのかの解明が必要である。また、今回のトウ

ガラシを事例に考えるように、形を変化させることで、結果的に生合成細胞の比率が変わる可能性もある。形態、細胞の分化ということが生産性向上においても重要な要因といえる。

手法の限界

本研究で生合成組織の表面積を隔壁表面積と細胞比率から概算した。そのため、生合成能は正確な値であるとはいえない。今回使用した 3 次元内部構造顕微鏡には、サンプルは小さくなるが、さらに解像度の高く、細胞単位で観察できるものがある。この装置は、蛍光測定も可能である(横田ら 1998b)。今回は解像度の関係もあり、大きなトウガラシを利用したが、本研究で生合成能を評価することが有効であることが証明されたので、より多くの情報を得るために細胞単位で観察できる事を検討したい。細胞壁の自家蛍光を用いれば、生合成細胞が占める表面積をより正確に算定できる可能性がある。

トウガラシは多くの品種があり、沖縄のシマトウガラシが属する種 *C. frutescens* は小型のものがある。キダチトウガラシと呼ばれるものでは、果実の直径は 5 mm 程度で、長さは 2 cm ほどである。このようなトウガラシを使えば、果実全体の細胞を直接カウントでできるかもしれない。さらに、カプサイシンとともに分泌している油状成分は蛍光を発するので、油状成分の分泌体積もわかる。

一方、内部構造を測定したものをカプサイシン含有量の測定に用いることも検討すべきである。その場合は非破壊検査である Magnetic Resonance Imaging (MRI) などが必要になる。これらの装置の解像度で今回の測定に近い結果が得られるか確認が必要であろう。

3 種のトウガラシを用いた本研究の結果は圧倒的に細胞数の影響が大きいことを示しているが、正確な値を知るためにはこのようにいくつかの課題が残っている。

他の生物への応用

トウガラシでは隔壁表皮細胞が生合成の場であった。そのため、表面積という測定しやすい指標を用いることができた。今後、生合成の場として組織という細胞の固まりをいかに測定していくのが課題となる。トウガラシでは生合成を行う細胞を形態学的な特色などから容易に見分けることができたが、組織の境界線をどのように認識するかも課題である。形質転換が可能で特異的プ

ロモーターが単離されているものであれば, Green fluorescent protein (GFP)を導入して蛍光観察する方法があるが, 多くの有用植物では困難であろう。やはりその場合は形態的な特色を指標とせざるを得ない。その場合は, 本研究で用いた手法, 3次元内部構造顕微鏡, *in situ* ハイブリダイゼーションという方法が有効である。

生合成能を評価することは, 生物学的にも重要であり, 応用面でも必要な情報である。生合成能を明らかにすることで, 有用植物の生産性を上げる場合, どの要因を操作すべきか明確になる。本研究は, 多細胞生物における, 生合成能の算定方法の一例となるだろう。

謝辞

本研究は財団法人山崎香辛料振興財団の研究助成を受けて行った。スライス画像処理の一部については, 東京大学大学院の岡田悟さんからアドバイスをいただきました。

引用文献

- Aluru, M.R., Mazourek, M., Landry, L.G., Curry, J., Jahn, M., O'Connell, M.A. (2003) Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *Journal of Experimental Botany* 54: 1655-1664.
- Curry, J., Aluru, M., Mendoza, M., Nevarez, J., Melendrez, M. O'Connell, M.A. (1999) Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science* 148: 47-57.
- 岩井和夫, 渡辺達夫 (2000) トウガラシ 辛味の科学 幸書房 p22.
- Karnka, R., Rayanakorn, M., Watanesk, S., Vaneesorn, Y. (2002) Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Analytical Sciences* 18: 661-665.
- Kase, K., Teshima, Y., Usami, S., Kato, M., Yamazaki, S., Ito, M., Makinouchi, A. (2005) Volume CAD : CW-complexes based approach. *Computer-Aided Design* 37: 1509-1520.
- Kim, M., Kim, S., Kim, S., Kim, B.D. (2001) Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Molecules and Cells* 11: 213-219.
- Prasad, B.C.N., Kumar, V., Gururaj, H.B., Parimalan, R., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. (2006) Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103: 13315-13320.

- Sugiyama, R., Oda, H., Kurosaki, F. (2006a) Expression of *ASK1*-like genes in arrested stamens of female *Silene latifolia* plants. *Journal of Plant Research* 119: 329-336.
- Sugiyama, R., Oda, H., Kurosaki, F. (2006b) Two distinct phases of glandular trichome development in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Biotechnology* 23: 493-496.
- Suzuki, T., Fujiwake, H., Iwai, K. (1980) Intercellular 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 and Cell Physiology* 21: 839-853.
- 豊田美和子, 井上匡, 小仁所邦彦, 松島憲一, 南峰夫, 根本和洋 (1999) トウガラシ辛味成分含量の登熟に伴う変化 北陸作物学会報 33: 141-143.
- 横田秀夫, 工藤謙一, 樋口俊郎, 佐藤嘉兵 (1998a) 発現遺伝子観察用 3次元内部構造顕微鏡の開発 医用電子と生体工学 36: 244-251.
- 横田秀夫, 工藤謙一, 樋口俊郎, 相良泰行, 都甲洙 (1998b) 3次元内部構造顕微鏡による凍結生体試料の観察と計測 低温生物工学会誌 44: 1-9.
- 横田秀夫, 覚正信徳, 中村佐紀子, 西村将臣, 姫野龍太郎, 牧野内昭武 (2004) ボクセルエディタを用いた生物内部の3次元構造解析 日本バイオイメーjing学会第13回学術集会要旨集 13: 103-104.