

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580125
 研究課題名（和文）新規トウガラシ成分カプシエイトの生合成経路の解明と辛味発現に関する因子の探索
 研究課題名（英文）Study on the biosynthesis pathway of novel *Capsicum* compound, capsiate, and the factor for the development of pungency in *Capsicum* plants.

研究代表者
 古旗 賢二（KOBATA KENJI）
 城西大学・薬学部・准教授
 研究者番号：70275105

研究成果の概要：

カプサイシン含有のトウガラシ品種にカプシエイト生合成能があり、カプシエイト含有品種にカプサイシン生合成能があることを明らかにした。両品種は、カプサイシンあるいはカプシエイトの最終生合成酵素と推定されるアシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を有しており、両品種で同一のものであった。カプサイシン、カプシエイトの最終合成酵素は同一であるが、前駆体としてバニルアルコールが供給される場合に、カプシエイト蓄積が優位になることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：カプシエイト、カプサイシン、生合成、安定同位体、LC-MS/MS、カプサイシン合成酵素、アシルトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

トウガラシの無辛味品種‘CH-19 甘’には、カプシエイトとその類縁体（総称してカプシノイドという）が含まれる。トウガラシ辛味成分カプサイシンには多くの有用な作用があるが、あまりの刺激の強さのためにその利用が困難となっている。一方、カプシエイトにはほとんど辛味は無いが、カプサイシンと同様に体脂肪の蓄積を抑制することが報告されている。この作用が、カプサイシン受容

体（TRPV1）を介して発揮されていることが明らかとなっている。また、最近ではカプシエイトの抗酸化作用、アポトーシス誘導作用、抗ガン作用などが報告されている。

以上のように、カプシエイトには低刺激性でありながらカプサイシン様の様々な有用作用があることから、カプシエイトは新たな医薬品や機能性食品の素材として非常に有望である。現在、カプシエイトの実用化にあたり、その大量供給系の開発が望まれている。

カプシエイト大量供給系の一つとして、環境調和型である酵素法による合成法がある。一方で、カプシエイトを多量に含む植物体の作出が実用的な供給系として挙げられるが、そのためには、カプシエイトの植物体内での生合成機構を解明することが重要である。

カプシエイト、カプサイシンの生合成経路については、共にフェニルプロパノイド経路で生成するフェルラ酸までは解明されているが、その後の代謝経路および関与する酵素・遺伝子に関しては不明である。おそらくカプシエイトの化学構造上、フェルラ酸→バニリン→バニリルアルコール→カプシエイトといった経路が推測される。一方、カプサイシンは、フェルラ酸→バニリン→バニリルアミン→カプサイシンと推測される。つまり、バニリンの代謝様式がカプシエイトとカプサイシンの生成分岐点と考えられる。また、バニリルアミン→カプサイシンを触媒する酵素とバニリルアルコール→カプシエイトを触媒する酵素は、特定されていない。

以上の様に、カプシエイト生合成経路の詳細は不明であり、これを解明することは、カプシエイト生産の向上に寄与するだけでなく、未だ不明なカプサイシン生合成経路と辛味発現因子の解明に繋がる。

2. 研究の目的

本研究では、カプシエイトのトウガラシ植物体での大量生産に向けた基礎研究の一環として、その生合成経路を解明し、カプシエイト生成ならびに辛味発現（カプサイシン生成）を制御する因子を探索することを目的とした。

具体的には、生合成経路のうち、フェルラ酸およびバニリンからカプシエイト、カプサイシンに至る物質の流れを明確にし、その代謝に関連する酵素・遺伝子の探索を行うために、以下の4項目を実施した。

- 1) 安定同位体前駆体と LC-MS/MS を用いた *in vivo* トレーサー実験による生合成経路の解明
- 2) 生合成関連酵素を解析するため、安定同

位体前駆体と LC-MS/MS を用いた酵素活性測定系の確立

- 3) 2)の測定系を指標とした生合成酵素の精製、解析
- 4) 生合成酵素をコードする遺伝子の解析

3. 研究の方法

- 1) 安定同位体前駆体と LC-MS/MS を用いた *in vivo* トレーサー実験

安定同位体前駆体の合成

カプシエイト、カプサイシンの生合成前駆体の候補物質として、フェルラ酸、バニリン、バニリルアミン、バニリルアルコールなどについて安定同位体を調製した。すなわち、市販の $[^{13}\text{C}]$ -バニリンと重水をアルカリ条件下で加熱することにより二重標識 $[^2\text{H}][^{13}\text{C}]$ -バニリンを調製した。これを出発物として、水素化ホウ素ナトリウムによる還元で二重標識バニリルアルコールを調製した。二重標識バニリルアミンは、二重標識バニリンとギ酸アンモニウムを加熱することにより調製した。

トウガラシへの安定同位体前駆体の投与

トウガラシ植物の栽培は静岡県立大学の薬草園あるいは、京都大学の農場で行った。実験には、カプサイシンを蓄積する品種、カプシエイトを蓄積する品種を用いた。

トウガラシ果実への安定同位体前駆体の投与は、各種前駆体の溶液を直接果実の胎座部分（カプサイシン、カプシエイト生合成部位）にマイクロシリンジで注入して行った。経時的に果実を採取し、液体窒素で果実を瞬時に凍結させ、LC-MS/MS 測定まで保存した。LC-MS/MS による安定同位体前駆体の代謝物の解析

トウガラシ果実を凍結乾燥物し、酢酸エチルによる抽出で、カプサイシン、カプシエイト含有画分を得た。一方、0.1%酢酸含有メタノール抽出で、各種前駆体を含む画分を得た。

得られた各画分中の、LC-MS/MS による安定同位体代謝物の定性・定量系については、LC ではメタノール/水/酢酸混合液のグラジエント溶出を行った。MS でのイオン化は

ESI法あるいはAPCI法で行い、それぞれの物質の親イオンならびに特徴的なプロダクトイオンを検出した。

2) 安定同位体前駆体と LC-MS/MS を用いた酵素活性測定系の確立

トウガラシ粗酵素液の調製

新鮮なトウガラシ果実の胎座を採取し、氷冷下で緩衝液を加え、ホモジナイズした。これを遠心分離した上澄みを粗酵素液とした。

トウガラシ粗酵素液の酵素活性の LC-MS/MS による測定

バニリルアルコール→カプシエイトおよびバニリルアミン→カプサイシンの酵素活性は次のように測定した。二重標識基質とオクタン酸-CoA を溶解した緩衝液に、粗酵素を加え反応を開始した。経時的に反応溶液を採取して、塩酸を加えて反応を停止した。酢酸エチルで抽出し、LC-MS/MS により生成した二重標識されたカプシエイト、カプサイシンを定量した。

3) 生合成酵素の精製、解析

トウガラシ胎座の破碎組織をアセトンで脱脂した後、トリス緩衝液で粗酵素を抽出した。続いて、カプサイシン合成活性を指標にして、陰イオン交換樹脂、限外濾過、ゲル濾過カラムによって酵素の精製を行った。

4) 生合成酵素をコードする遺伝子の解析

トウガラシのゲノム DNA の抽出は、各種トウガラシの葉より、キットを用いて行った。このゲノム DNA をテンプレートとし、カプサイシン合成酵素の候補遺伝子 *Pun1* の特異的なプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。

Pun1 遺伝子の発現については、各種トウガラシの胎座から、キットを用いて RNA を抽出し、これをキットを用いて cDNA とした。この cDNA をテンプレートとして *Pun1* 特異的なプライマーセットにより PCR 増幅を行った。

4. 研究成果

1) 安定同位体前駆体と LC-MS/MS を用いた *in vivo* トレーサー実験

カプサイシン含有品種の植物体果実にカプサイシンの前駆体であるバニリルアミンを与えると、新たにカプサイシンが生成した。カプシエイト含有品種では、バニリルアルコールを与えると、新たにカプシエイトが生成した。このことから、カプサイシンの前駆体がバニリルアミンであり、カプシエイトの前駆体がバニリルアルコールであることを確認した。一方、カプサイシン含有品種にバニリルアルコールを投与するとカプシエイトが、カプシエイト含有品種にバニリルアミンを投与するとカプサイシンが蓄積した。このことから、どちらの品種も、カプサイシンとカプシエイト両方の合成能を有することが明らかとなった。

次に、生合成的にバニリルアミンとバニリルアルコールの上流に位置すると推定されるバニリンを投与すると、カプサイシン含有品種ではバニリルアミンとバニリルアルコールの両方が蓄積したのに対し、カプシエイト含有品種ではバニリルアルコールのみが蓄積し、バニリルアミンは生成しなかった。さらに、バニリンの上流と推定されるフェルラ酸を投与した場合、カプサイシン含有品種ではバニリルアミンが優位に、カプシエイト含有品種ではバニリルアルコールのみが生成した。

以上のことから、カプサイシン合成酵素、カプシエイト合成酵素は同一である可能性が考えられた。つまり、カプサイシン含有品種では前駆体のバニリルアミンが優位に供給されるため、結果としてカプサイシンが蓄積し、カプシエイト含有品種ではバニリルアルコールのみが供給されるのでカプシエイトが蓄積すると考えられる。

また、本研究に関連して、新規のカプサイシン類縁体としてカプシコニエイトを単離し、化学構造を決定した。カプシコニエイトは、コニフェリルアルコールを部分構造に有していた。コニフェリルアルコールの安定同

位体を合成し、これをトウガラシに投与すると、カプシコニエイトが蓄積した。元来、カプシコニエイトを含まない品種においても、カプシコニエイトの蓄積が確認されたことから、この合成酵素も、カプサイシン合成酵素と同一であることが示唆された。

2) カプサイシン合成活性の測定系の確立

カプサイシン高含有品種‘ハバネロ’の胎座の粗酵素液を用いて、 ^2H 、 ^{13}C ラベル化したバニルアミンとオクタン酸-CoA を基質にカプサイシン合成活性測定系を構築した。カプサイシン合成酵素の速度論的解析を行ったところ、バニルアミンとオクタン酸-CoA に対する K_m はそれぞれ $200\sim 1000\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ であった。カプシエイト高含有品種であり、元来カプサイシンを含まない‘CH-19 甘’の粗酵素液についても上記の反応を行うと、カプサイシン合成活性が認められた。一方、バニルアルコールを基質としたカプシエイト合成活性測定法についても検討を行った。生成するカプシエイトが、水系に不安定であるため、正確な生成量は求められなかったが、明らかにカプシエイト含有品種のみならず、カプサイシン含有品種にもカプシエイト合成活性が認められた。

3) 生合成酵素の精製、解析

カプサイシン合成酵素とカプシエイト合成酵素、あるいはカプシコニエイト合成酵素が同一である可能性があることから、非常に強いカプサイシン合成活性を示したトウガラシ品種のハバネロについて、カプサイシン合成活性を指標に、当該酵素の単離を試みた。ハバネロ果実の胎座をアセトン脱脂の後、トリス緩衝液で溶出させた酵素原液は、 $272\mu\text{U}/\text{mg protein}$ の比活性を有していた。これを QAE-TOYOPEARL 550C 陰イオン交換樹脂で処理し、非吸着画分をさらに限外濾過により 10KDa 以下をカットして、原液の 11.4 倍の比活性画分を得た。さらに、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを試みたが、これ以上の酵素の精製には至らなかった。酵素

タンパク質の解析を行うためには、より詳細な精製条件の検討と、より大量のトウガラシ胎座サンプルからの精製が必要と考えられた。

4) 生合成酵素をコードする遺伝子の解析

カプサイシンを蓄積する辛味品種、カプシエイトを蓄積する品種、そしてどちらも含有しない無辛味品種について、カプサイシン合成酵素と推定されているアシルトランスフェラーゼの一種をコードしている *Pun1* 遺伝子のゲノムにおける解析を行った。その結果、無辛味品種では *Pun1* が部分欠損していた。一方、カプサイシン蓄積品種とカプシエイト蓄積品種では *Pun1* 遺伝子が完全長で存在していた。

胎座における *Pun1* 遺伝子の発現では、無辛味品種では、*Pun1* の発現は全く見られなかった。一方、カプサイシン蓄積品種とカプシエイト蓄積品種の両方で、*Pun1* の発現が見られた。また、両品種から得られた *Pun1* 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は完全に一致していた。

以上のことから、カプサイシン合成酵素とカプシエイト合成酵素は同一のもので、この酵素が発現している品種では、カプサイシンあるいはカプシエイトが蓄積し、コードする遺伝子が部分欠損している品種は、これらの物質を生合成できないと考えられる。

本研究より、カプサイシン合成酵素とカプシエイト合成酵素が同一で、供給される前駆体の種類により、蓄積する物質が異なることが示唆された。つまり、トウガラシにおける辛味の制御には、カプサイシン合成酵素発現の有無が関与しているが、それだけではなく、前駆体供給系も強く関与していることが明らかとなった。特に、カプサイシンとカプシエイトの生合成には、前駆体合成におけるバニルアミンとバニルアルコールへの分岐が深く関わっており、今後、この分岐に関与する酵素・遺伝子を解明することが、トウガラシにおける辛味発現の解明あるいは有

用物質の生産制御を目指す上で、重要なポイントであると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

K. Kobata, H. Tate, Y. Iwasaki, Y. Tanaka, K. Ohtsu, S. Yazawa, and T. Watanabe. Isolation of coniferyl esters from *Capsicum baccatum* L., and their enzymatic preparation and agonist activity for TRPV1. *Phytochemistry*, **69** (5), 1179-1184, 2008. 査読有

[学会発表] (計1件)

三村真琴, 菅原 舞, 古旗賢二, 矢澤 進, 渡辺達夫. トウガラシ辛味関連化合物生合成に関わる酵素の LS/MS/MS を用いた活性測定系の構築. 第22回 日本香辛料研究会, 東京, 2007年.

6. 研究組織

研究代表者

古旗 賢二 (KOBATA KENJI)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 70275105