J. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric., *68 (1), 7-12 (2023)*
東京農大農学集報，68（1），7-12（2023）

カプサイシノイド生合成とは独立した トウガラシ属における分泌細胞の形成

杉　山　立　志*†

（令和4年8月24日受付/令和5年1月20日受理）

要約：トウガラシの辛味成分カプサイシノイドは，果実内部の隔壁表皮細胞で合成され細胞外に分泌している。カプサイシノイドを含まないパプリカなどにおける分泌細胞の存在の有無はこれまで意見が分かれてきた。特にカプサイシノイドの生合成関連遺伝子と分泌細胞形成との関係性については研究報告がない。カプサイシノイド生合成に関わる遺伝子として*Pun1*と*pAMT*が知られている。そこで，*Pun1*遺伝子の欠損株としてカリフォルニアワンダー，*pAMT*遺伝子の欠損株としてAji Dulce strain 2，両者を正常に持つもにもかかわらずカプサイシノイドを含まないシシトウについて，パラフィン切片から分泌細胞と分泌物を蓄積するブリスターの有無を確認した。その結果，分泌細胞は全てのトウガラシ品種で観察された。すなわち，辛味成分カプサイシノイドを合成できなくても分泌細胞は形成されることが明らかとなった。また，カプサイシノイドを含まないシシトウの果実は分泌細胞を持たないことが示唆された。パラフィン切片から分泌細胞の存在領域の比率の数値化を試たところ，分泌細胞の存在比率に品種間差があることが示された。本研究により，カプサイシノイド生合成関連遺伝子とは独立した分泌細胞の分化誘導に関わる因子の存在が確認できた。

キーワード：甘トウガラシ，隔壁，辛味，ブリスター

1.　緒　　言

トウガラシ（*Capsicum*）は世界でスパイスや野菜として食され，その特徴は辛味を持つことである。トウガラシの辛味成分であるカプサイシノイドは，果実内の隔壁表皮細胞で合成され，細胞外に分泌し，クチクラと細胞壁の間に蓄積している[1,2]。激辛と呼ばれるジョロキア（*Capsicum chinense*）などの品種では，隔壁だけではなく，果皮の裏側にも分泌細胞がある[3]。分泌したカプサイシノイドがクチクラと細胞壁の間に蓄積している水疱状の構造をブリスターと呼んでいる[1,4]。タカノツメ（*C. annuum*）に見られる分泌細胞とブリスター構造を図1に示した。開花後15日には細胞質が密な分泌細胞，クチクラの乖離している小さいブリスターが観察される（図1B, 黒矢印）。開花後日数が進むと，合成されるカプサイシノイド量が増え，ブリスターは大きくなる（図1C, D, 黒矢印）。

ブリスターの形成はカプサイシノイドの蓄積と関係があると考えられている[5]。カプサイシノイドを含まないトウガラシであるパプリカやピーマンでは，カプサイシノイド合成酵素をコードする*Pun1*遺伝子の一部が欠損し，機能していない[6,7]。*Pun1*変異体でカプサイシノイドを含まないトウガラシでは，ブリスターはないという報告がある[5]。その一方で，*Pun1*遺伝子が単離される以前の研究では，カプサイシノイドを含まないトウガラシにもブリスターがあるという報告もある[8]。

*Pun1*遺伝子はカプサイシノイド合成の最終合成に関わる酵素をコードしている[6,9]。そのため，*Pun1*の機能を失っても中間産物は合成されているはずなので，*Pun1*の機能欠損だけで，分泌細胞の形成を抑制するような制御機構が働くことは考えにくい。一方，正常な*Pun1*をもつシシトウでは，カプサイシノイドを含まない果実には生合成を行う分泌細胞がないのか，もしくは分泌細胞があっても辛味成分を作らないのかはこれまで明らかになっていない。また，カプサイシノイド合成経路遺伝子のうちバニリンからバニリルアミン合成に関わる*pAMT*遺伝子の機能を失うと，カプサイシノイドの類縁体で辛味の少ないカプシノイドが合成される[10]。最初にカプシノイドを含む品種として報告された品種CH19甘（*C. annuum*）には分泌細胞があり，成分が分泌していることが報告されている[11]。

これまでのカプサイシノイド含量の決定因子の探索は生合成関連遺伝子の制御に焦点を当ててられてきた。しかし，カプサイシノイドの生合成とは独立して分泌細胞が制御されているのであれば，分泌細胞への分化誘導する因子もカプサイシノイド含量へ影響を与える因子として探索する必要がある。しかし，これまでの分泌細胞やブリスターに関する形態学的研究は，*Pun1*や*pAMT*の単離以前に行われていたため，遺伝子の機能欠損と分泌細胞の有無については明確な結論は出ていない。そこで本研究では，*Pun1*の機能欠損をしているカリフォルニアワンダー（*C. annuum*），*pAMT*の機能欠損をしているAji Dulce strain

* 東京農業大学農学部植物園
† Corresponding author（E-mail : rs207428@nodai.ac.jp）

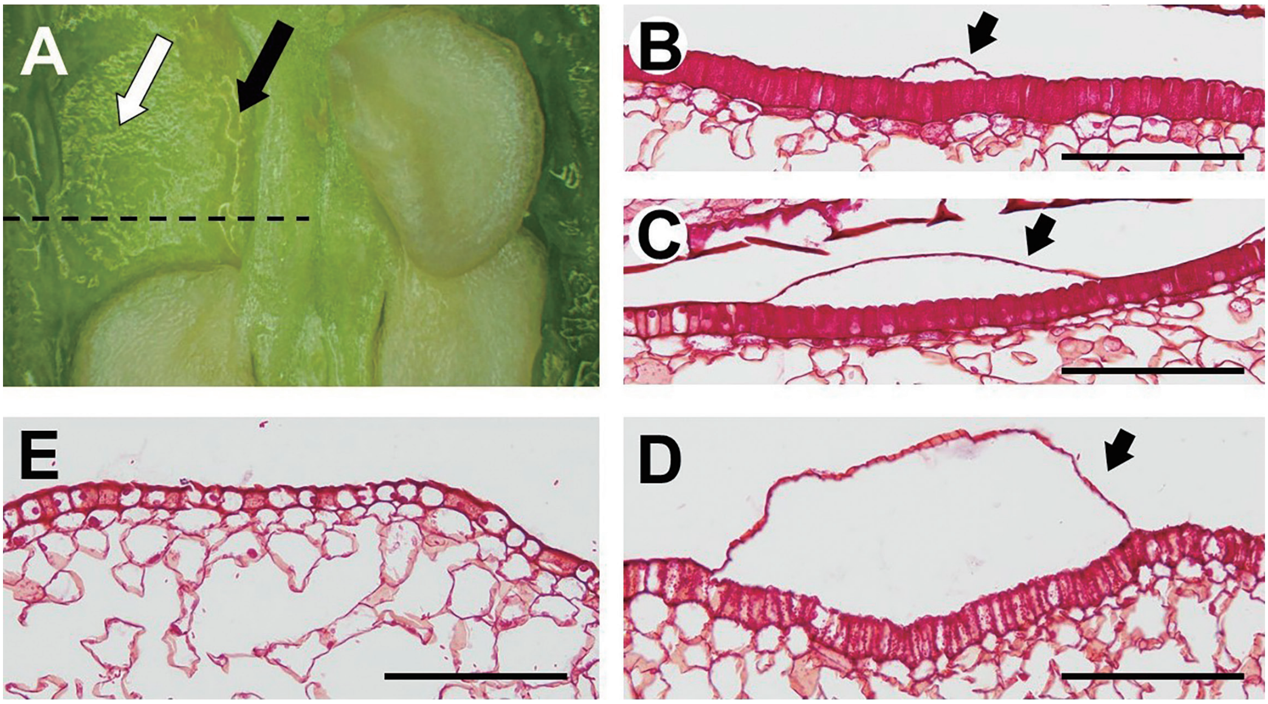

図 1 タカノツメの分泌細胞とブリスター
A 開花後 30 日の果実の内部．種子を取り除いて隔壁を示した．黒矢印で示した部分がブリスター，白矢印で示した部分は分泌の見られない領域．点線の方向にパラフィン切片を作製した．B 開花後 15 日の隔壁表皮細胞．C 開花後 30 日の隔壁表皮細胞．D 開花後 45 日の隔壁表皮細胞．クチクラが大きく乖離したブリスターが見られる（黒矢印）．E 開花後 45 日の隔壁表皮細胞で分泌細胞の存在しない領域．液胞が大きく，細胞内部が染色されない細胞が見られる．スケールバーは 200 μm（B-E）.

2（*C. chinense*）と，両者の遺伝子を持つシシトウ（*C. annuum*）を用いて分泌細胞とブリスターの存在を形態学的に確認し，その存在比率を比較することで，品種間での差異を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

(1) 実験材料

カリフォルニアワンダーの果実は開花後 40 日程度の未成熟果実を南九州大学の杉田亘博士から頂いた。シシトウはスーパーで市販されているパックを用いた。Aji Dulce strain 2 は京都大学の田中義行博士から種子を分与いただいた。Aji Dulce strain 2 と在来品種であるタカノツメは東京農業大学厚木キャンパスの圃場にてプラスチックポットで栽培した。

(2) パラフィン切片の作製

トウガラシ果実から隔壁部分を，果実の横断面方向に厚み 5 mm 前後にカミソリで切り出した（図 1 点線部分に相当）。切り出した組織をホルマリン固定液（50% エタノール，5% 酢酸，3.7% ホルマリン）につけ，1 時間常温で固定し，さらに 4℃で一晩固定した。固定液を除去し，イソプロパノールに置換して脱水する操作を 4 回行った。脱水した組織をキシレンで 3 回置換したのち，60℃で溶解したパラフィンに置換した。パラフィンは 2 回交換し，その後包埋した。包埋した組織は，滑走式ミクロトームを用いて 10 μm の厚さの切片とした。

(3) サフラニン染色

切片は脱パラフィンをせずに，サフラニン染色を行い[12]，組織観察に適している標本選んだ。選抜した標本はサフラニン染色後に 1 晩 37℃で乾燥させた後，キシレンで 3 回脱パラフィンを行い，封入剤（HRS 液，Sysmex）で封入し，顕微鏡観察に用いた。

(4) 顕微鏡観察

生物顕微鏡 BX-43（オリンパス）を組織観察に用いた。写真は 0.5 倍の中間レンズを用いてデジタルカメラ DP-22（オリンパス）で撮影し，JPEG 形式のファイルとして保存した。

(5) 組織サイズの計測

パラフィン切片において隔壁表皮の長さ，分泌細胞の存在する領域の長さ，ブリスターを形成している分泌細胞の存在する領域の長さは，Swift Imaging 3.0 ソフトウエア（Swift Optical Instruments）を用いてトレースし，トレースのピクセル数から求めた。胎座の末端から果皮の末端までを含むパラフィン切片から撮影した複数の画像を Image Composite Editor（Microsoft）により結合させ，胎座の全体像を作り，トレースに用いた。細胞や組織の凹凸の影響を排除するため，細胞中央付近をトレースし，3 回のトレース結果を平均してそれぞれの長さとした。分泌細胞は形態学的解析[2]やカプサイシノイド合成経路の遺伝子を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析[13]により，細胞質

が密で，表皮細胞よりも縦方向に伸びた細胞であることが示されいる。また，それらは組織染色でも区別することができる（図1）[13]。そこで，トレースした隔壁表皮の長さに対する分泌細胞の存在領域の長さの百分率を分泌細胞比率とし，分泌細胞の存在領域の長さに対するブリスターの存在領域の長さの百分率をブリスター比率として表記した。

3. 結　　果

(1) カプサイシノイドを含まないトウガラシにおける分泌細胞とブリスターの存在

カリフォルニアワンダーの分泌細胞の観察結果を図2Aに示した。胎座に結合する隔壁部分のパラフィン切片のうち，分泌細胞と通常の表皮細胞の存在する領域を示した。通常の表皮細胞は，巨大液胞が細胞内部を占めるためサフラニンではほとんど染色されない（図2A, *より右側）。一方，分泌細胞は細胞質が密となり，サフラニンでよく染色された（図2A, *より左側）。加えて，分泌細胞は通常の表皮細胞に比べて2倍程度縦方向に伸びているため区別しやすい。カリフォルニアワンダーは*Pun1*の機能を失っていることが確認されているが[14]，*Pun1*遺伝子を持つタカノツメ（図1）と同様にサフラニンでよく染まる分泌細胞が存在することがわかった。*pAMT*の機能を失っているAji Dulce strain 2にも同様に分泌細胞が観察された（図2B）。カプサイシノイドを含まないシシトウでは，分泌細胞は観察した14果実中13果実で見られなかった（図2C）。一方，1果実に分泌細胞のような特徴が観察された（図2D）が，分泌細胞に特徴的な細胞質が密であるものの，縦方向の細胞伸長が少ないことから断定できない。今後*in situ*ハイブリダイゼーション解析などによって，合成関連遺伝子の発現を確認し，カプサイシノイド合成能力を有しているか明らかにする必要がある。

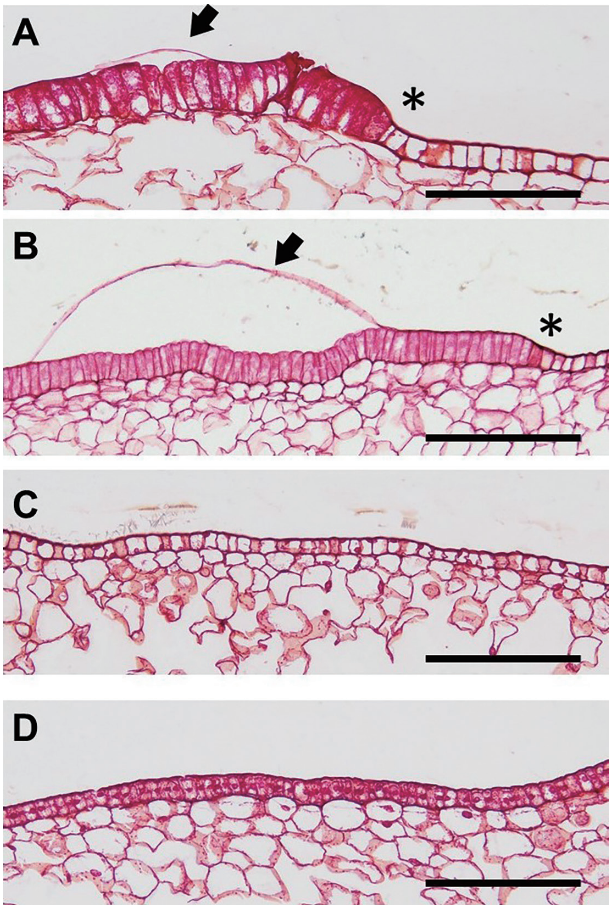

図2　3種のトウガラシの隔壁表皮細胞とブリスター
A カリフォルニアワンダー．分泌細胞（左側）と通常の表皮細胞（右側）の境界を示した．B Aji dulce strain 2の分泌細胞．C シシトウで分泌細胞の観察されなかった果実の隔壁表皮細胞．D シシトウで分泌細胞と思われる細胞が観察された果実の隔壁表皮細胞．黒矢印はブリスターを示す．*は分泌細胞と表皮細胞の境界を示す．スケールバーは200 μm.

カプサイシノイド，その類縁体であるカプシノイドは細胞外に分泌しクチクラと細胞壁の間に蓄積する。その結果，水疱状のブリスターを形成する（図1B, C, D）[1,2]。カリフォルニアワンダーではわずかにクチクラが乖離し，ブリスターの形成が見られる（図2A, 矢印）。一般に，ピーマン類でも肉眼で黄色い油滴のようなものが観察されることがある[5]（タカノツメの隔壁で観察されるブリスターを図1Aに示した）。肉眼で観察できる油滴のある部位をパラフィン切片で観察すると，ブリスターの位置と形態が一致する。Aji Dulce strain 2ではタカノツメと同様に大きくクチクラの乖離しているブリスターが観察された（図2B）。Aji Dulce strain 2で観察されたブリスターは*pAMT*の機能を失っているCH19甘（*C. annuum*）で報告されている分泌状態と同じであった[11]。シシトウでは，14果実から合計28の隔壁を確認したが，1果実しか分泌細胞は無く，その組織ではブリスターを見つけることが出来なかった。

(2) 細胞存在比率についての数値化の試み

植物に限らず形態学における問題は定性的であり定量化が難しいことである。図2Aで観察された写真では，カリフォルニアワンダーで分泌細胞が隔壁全体でどの程度あるのか，ブリスター構造がどれだけ形成されているのかを示すことができない。そこで，異なる果実サンプル由来のパラフィン切片から，隔壁の表皮の長さ（図3, EC），分泌細胞の存在する領域の長さ（図3, SC），ブリスターを形成している分泌細胞の存在する領域の長さ（図3, BS）を測定し，それぞれ比率を求めた（表1）。

サンプル数が少ないが（n＝3），カリフォルニアワンダーでは分泌細胞比率は16.1%であった。これらの観察に用いた切片ではブリスターは存在しなかった。図2Aではブリスターを確認できたが，長さ測定に用いた果皮から胎座までを含むパラフィン切片ではブリスターは存在しなかった。そのため，ブリスター比率はゼロではなく，観察できなかったとしてN.O.（Not Observed）と示した。Aji Dulce strain 2の分泌細胞比率は用いたサンプルの中で最も高く74.7%であった。これは隔壁表皮細胞の多くが分泌細胞に分化していることを意味する。Aji Dulce strain 2のブリスター比率は24.1%であった。シシトウでは分泌細胞と推定される細胞の比率は29.1%で，ブリスターは観察されなかった。コントロールとして用いたタカノツメでは開花後

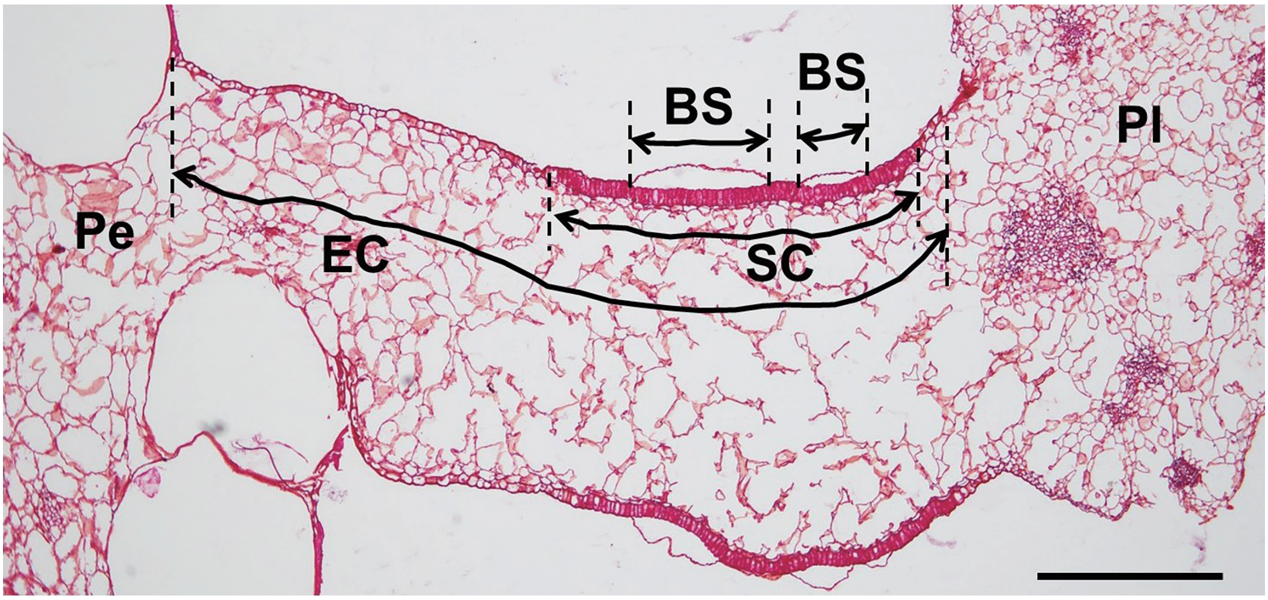

図 3 隔壁表面，分泌細胞，ブリスターの長さの測定例
開花後 45 日のタカノツメの隔壁パラフィン切片を示した．BS ブリスターの領域．SC：分泌細胞の領域．EC：隔壁表面の領域．Pe：果皮．Pl：胎座．スケールバーは 500 μm.

表 1 分泌細胞比率，ブリスター比率の試算結果

サンプル[z]	分泌細胞比率[y] (% ± 標準偏差)	分泌率[x] (% ± 標準偏差)
カリフォルニアワンダー(n=3)	16.1±5.2	N.O.
Aji Dulce strain 2 (n=5)	74.7±12.3	24.1±8.3
シシトウ (n=2)	29.1±3.2	N.O.
タカノツメ（開花後15日）(n=14)	47.0±7.5	15.8±12.8
タカノツメ（開花後30日）(n=12)	47.7±9.3	41.2±15.3
タカノツメ（開花後45日）(n=10)	38.1±9.9	52.5±25.7

z n 数は隔壁表皮を全長測定した数．断片化したサンプルなどは含めていない．そのため，本文中の果実数等とは一致しない．
y トレースした隔壁表皮の長さ対する分泌細胞の存在領域の長さの百分率．隔壁中の分泌細胞の存在比率を示す．
x 分泌細胞の存在領域の長さに対するブリスターの存在領域の長さの百分率．分泌を示す細胞の割合を示す．分泌を示さないサンプルでは分泌率はゼロとなるため，標準偏差が大きい．
N.O. 隔壁の全長測定に用いたサンプルでは観察されなかったことを示す（Not observed）

15 日には分泌細胞は隔壁の長さに対して，47.0% を占めた。また分泌細胞の長さあたりのブリスターの存在比率は 15.8% となった。開花後日数が進むと 45 日では分泌細胞の比率は，38.1% に低下するのに対して，ブリスターの存在比率は 52.5% となった。タカノツメでは開花後 45 日に分泌細胞の半分以上でブリスターを形成していることがわかった。

成分は異るものの，タカノツメのカプサイシノイド含量は 1.3 mg/g D.W.[13] で，Aji Dulce strain 2 のカプシノイド含量は 1.7 mg/g D.W.[15] と報告され，Aji Dulce strain 2 の分泌成分がやや多い。今回測定したタカノツメと Aji Dulce strain 2 の分泌細胞比率は 38.1% と 74.7% で，成分含量が増えると，分泌細胞比率も高くなる傾向が見られた。この結果は，タカノツメより高含量を示すハバネロで分泌細胞が多いという我々の以前の研究[13] に一致し，果実あたりのカプシノイド含量は分泌細胞比率の影響を受けることが考えられる。

4. 考　　察

トウガラシの辛味成分であるカプサイシノイド合成関連遺伝子のうち，*Pun1* 又は *pAMT* の機能を失い，カプサイシノイドを含まないトウガラシについて分泌細胞，ブリスターの存在を確認した。これらの 2 つの遺伝子の機能の有無とは関係なく，分泌細胞の形成が行われていることは明らかである。我々の以前の研究成果でも示された通り[13]，カプサイシノイド含量が多いと分泌細胞の量も多い傾向がある。しかし，これまでのカプサイシノイド含量を決定する因子の探索は，RNA-seq や QTL 解析等によって，生合成関連遺伝子とその制御因子をターゲットとして行われてきた[16,17]。*pAMT* の変異を除き，生合成量と関連した因子は単離されていない[18]。一方，本研究で *pAMT* の欠損株でも，カプサイシノイドの生合成関連遺伝子と関係なく，独立して分泌細胞が形成されていることを確認できた。今後は，カプサイシノイド量に影響する因子の 1 つとして，分泌細胞分化を誘導する因子や分泌細胞量を決める因子に

も着目する必要がある。

このような因子を探索するには，分泌細胞等の量的比較が必要になる。通常，組織特異的な遺伝子や成分の解析は，その組織を単離して研究が行われる。そしてハウスキーピング遺伝子の発現量や使用した組織量などで標準化して試料間を比較する。しかし，トウガラシのカプサイシノイド生合成関連の研究では，果実内における分泌細胞量を配慮せず，果実全体や隔壁を単離して解析が行われてきた。本研究の結果，同種内のカリフォルニアワンダー，シシトウ，タカノツメで分泌細胞比率が異なっていることがわかった。トウガラシの隔壁表皮細胞では，分泌細胞やブラスター構造を維持して表皮細胞のみを剥がすことが難しいため，標準化して比較するには分泌細胞数や組織量を定量化する必要がある。本研究ではパラフィン切片から細胞の存在領域をトレースすることで比率の算定を試みたが，本来隔壁という立体的な組織に存在する分泌細胞をパラフィン切片で観察した組織の一部から算出しているため正確な比較とはいえない。特にブリスターの構造はドーム状であるため，中央付近の切片でなければ正しい値とならない。今後，三次元として分泌細胞やブリスターの比率を測定する必要がある。そのためには共焦点顕微鏡観察[19]など他の手法での解析が必要となる。

謝辞：サンプルの供与を頂いた南九州大学の杉田亘博士，京都大学の田中義行博士に感謝致します。

参考文献

1) 古谷　力，橋本かず（1957）蕃椒の研究（第2報）Capsaicinの分泌器官について．薬学雑誌 **74**：771–772.
2) Fujiwake H, Suzuki T, Iwai K (1980) 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.
3) Sugiyama R (2017) Capsaicinoids production and accumulation in epidermal cells on the internal side of the fruit pericarp in 'Bhut Jolokia' (*Capsicum chinense*). *Cytologia* **82** : 303–306.
4) Roland B J, Villalon B, Burns E E (1983) Capsaicin production in sweet bell and pungent Jalapeno peppers. *J. Agric. Food Chem.* **31** : 484–487.
5) Stewart C J, Mazourek M, Stellari G M, O'connell M, Jahn M (2007) Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *pun1* locus. *J. Exp. Bot.* **58** : 979–991.
6) Stewart C, Kang B C, Liu K, Mazourek M, Moore S L, Yoo E Y, Kim B D, Paran I, Jahn M M (2005) The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J.* **42** : 675–688.
7) Lee C J, Yoo E, Shin J, Lee J, Hwang H S, Kim B D (2005) Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the capsaicinoid synthetase gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Mol. Cell* **19** : 262–267.
8) Zamski E, Shoham O, Palevitch D, Levy A (1987) Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Bot. Gaz.* **148** : 1–6.
9) Lang Y, Yanagawa S, Sasanuma T, Sasakuma T (2006) A gene encoding a putative acyl-transferase involved in pungency of *Capsicum*. *Breed. Sci.* **56** : 55–62.
10) Lang Y, Kisaka H, Sugiyama R, Nomura K, Morita A, Watanabe T, Tanaka Y, Yazawa S, Miwa T (2009) Functional loss of *pAMT* results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet. *Plant J.* **59** : 953–961.
11) 前田　智，米田祥二，細川宗孝，林孝洋，渡辺達夫，矢澤進（2006）トウガラシ'CH-19 甘'（*Capsicum annuum* L.）の果実発育中の新規物質カプシノイド含量の変化と胎座組織の形態変化ならびに果実の貯蔵条件とカプシノイド含量．京大農場報告 **15**：5–10.
12) Xi K, Burnett P A (1997) Staining paraffin embedded sections of scald of barley before paraffin removal. *Biotech. Histochem.* **72** : 173–177.
13) 杉山立志，志手真人，藤野廣春，辰尾良秋，中村佐紀子，覚正信德，伊藤昌夫，横田秀夫，加瀬　究，黒崎文也（2006）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．*Plant Morphol.* **18**：75–82.
14) Prasad B, Radha T, Khan R G, Ravi C, Reuben T. C (2013) Detection of pungent and non-pungent chili pepper (*Capsicum* sp.) varieties at seed level, using *Pun* allele specific primer MAP1. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **4** : 889–892.
15) Tanaka Y, Hosokawa M, Miwa T, Watanabe T, Yazawa S (2010) 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.
16) Liu S, Chen C, Chen G, Cao B, Chen Q, Lei J (2012) RNA-sequencing tag profiling of the placenta and pericarp of pungent pepper provides robust candidates contributing to capsaicinoid biosynthesis. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* **110** : 111–121.
17) Han K, Lee H Y, Ro N Y, Hur O S, Lee J H, Kwon J K, Kang B C (2018) QTL mapping and GWAS reveal candidate genes controlling capsaicinoid content in Capsicum. *Plant Biotech. J.* **16** : 1546–1558.
18) Tanaka Y, Asano T, Kanemitsu Y, Goto T, Yoshida Y, Yasuba K, Misawa Y, Nakatani S, Kobata K (2019) Positional differences of intronic transposons in *pAMT* affect the pungency level in chili pepper through altered splicing efficiency. *Plant J.* **100** : 698–705.
19) Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, Barthelemy J, Palauqui J C (2008) High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20** : 1494–1503.

Differentiation of Secretory Cells Independent of Capsaicinoid Biosynthesis in Chili Pepper (*Capsicum*)

By

Ryuji SUGIYAMA*†

(Received August 24, 2022/Accepted January 20, 2023)

Summary：The pungency of chili pepper (*Capsicum*) is induced by capsaicinoids, which accumulate in the interlocular septa defining the fruit locules. Capsaicinoids accumulate in the extracellular space between epidermal cells and the cuticle on the interlocular septum. No studies have been reported on the relationship between capsaicinoid biosynthesis-related genes and secretory cell formation. *Pun1* and *pAMT* are known as capsaicinoid biosynthesis-related genes determining pungency. Paraffin sections of a cultivar deficient in the *Pun1* gene 'California Wonder', a cultivar deficient in the *pAMT* gene 'Aji Dulce strain 2', and the pungent variable hot chili pepper 'Shishito' were examined for the presence of secretory cells and blisters. Secretory cells were observed in all pepper cultivars. This means that secretory cells were formed even if capsaicinoids could not be synthesized. In the case of 'Shishito', it was suggested that fruits without pungency did not have secretory cells. The ratio of the area of secretory cells in paraffin sections was quantified, and the results showed that the ratio of secretory cells varied among the cultivars. This study confirms the existence of factors involved in the induction of secretory cell differentiation independent of capsaicinoid biosynthesis-related genes.

Key words：blister, placental septum, pungency, sweet pepper

* Botanical Garden, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture
† Corresponding author (E-mail : rs207428@nodai.ac.jp)