

第1章 トウガラシの辛味成分カプサイシン類と低辛味類似物質の生合成および生物生産

田中義行^{*1}, 佐野香織^{*2}, 古旗賢二^{*3}

はじめに

トウガラシはナス科トウガラシ属 (*Capsicum*) の植物である。その果実には激しい辛味があり、香辛料として世界的に重要である。辛味の少ないトウガラシ系統もあり、ピーマンやパプリカと呼ばれ、野菜としても広く利用されている。トウガラシの辛味成分はカプサイシンとその類縁化合物からなるカプサイシノイドであり、様々な生理作用を示すことから注目されている。1990年代後半以降の研究により、低辛味でありながらカプサイシノイドと同様の生理作用を持つ類似物質もトウガラシから見出されている。本稿では、カプサイシノイドおよび低辛味類似物質の生合成に関わる酵素に関する知見を解説する。特にナス科植物の中で、トウガラシのみがカプサイシノイドを生合成するメカニズムに関する最新の研究を紹介する。また、カプサイシノイドや類似物質の生物生産の試みについても紹介する。

1 トウガラシのカプサイシノイド, カプシノイド, カプシコニノイド生合成の概要

トウガラシ果実の辛味成分は、カプサイシンと呼ばれる脂溶性アルカロイドである^{1~3)}。カプサイシンはバニリルアミンと 8-メチル-6*E*-ノネン酸がアミド結合した構造を持つ。カプサイシン以外にも脂肪酸側鎖が異なる約 20 種類の同族体がトウガラシ果実から同定されており、総称としてカプサイシノイドと呼ばれる。トウガラシの辛味の度合いは、品種によって大きく異なり、これはカプサイシノイド含量の違いにより決定される^{1~3)}。また、カプサイシノイドは辛味があるだけでなく、体熱産生作用、脂肪代謝促進作用など有用な生理作用を示すため、健康機能性成分としても利用される⁴⁾。これら種々の生理作用は、カプサイシノイドが Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) を活性化することによることが示されている。コショウのピペインやサンショウの辛味成分サンショオールによっても TRPV1 は活性化するが、カプサイシンによる TRPV1 抗進作用はそれらより強い。

* 1 Yoshiyuki Tanaka 京都大学 農学研究科 農学専攻 蔬菜花卉園芸学研究室 教授

* 2 Kaori Sano 城西大学 理学部 化学・生命科学科 生体分子生物学研究室 准教授

* 3 Kenji Kobata 城西大学 薬学部 薬科学科 機能性食品科学研究室 教授

カプサイシノイドは、トウガラシ属でのみ合成される特徴的な成分であり、生合成部位は、果実中の胎座・隔壁に限定されている^{1~3)}。胎座・隔壁には、細長い表皮細胞が発達しており、この特徴的な表皮細胞がカプサイシンの生合成部位とされている。生合成されたカプサイシノイドは、表皮細胞外へ輸送され、クチクラ間隙に蓄積し、その結果、胎座・隔壁の表面に水膨れした構造（プリスター）が形成される。また、生合成時期も果実発達の特定段階に限定されている^{1~3)}。トウガラシ果実は、受粉から30日前後にかけて果実が肥大し、その後成熟に伴い果実色が緑から赤へ変化していく。カプサイシノイド生合成は開花後20日ごろから開始されカプサイシノイド含量が増加するが、果実が赤く成熟してくると、生合成は緩慢になる。

トウガラシ果実におけるカプサイシノイド生合成は、フェニルアラニンからフェニルプロパノイド経路で合成されたバニリルアミンと、バリンやロイシンから生成された分枝脂肪酸が脱水縮合することによって生成する（図1）^{1~3)}。フェニルプロパノイド経路では、フェニルアラニンを基点として、桂皮酸、クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸の順に合成される。これらの反応には、phenylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H), coumaric acid 3-hydroxylase (C3H), caffeic acid O-methyl transferase (COMT) などが関与すると考えられている。続いて、フェルラ酸からバニリンを合成されるが、この合成酵素として Hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase (HCHL) が提唱されているが、不明な部分が多い。さらにバニリンから Vanillin aminotransferase (VAMT) の働きでバニリルアミンが合成される。分枝脂肪酸合成経路では、branched-chain amino acid transferase (BCAT), branched-chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKDH), ketoacyl-ACP synthase (KAS), ketoacyl-ACP reductase (KR), acyl-ACP thioesterase (FatA), や acyl-CoA synthetase (ACS) が関与して、バリンから、8-メチル-6E-ノネン酸など C9~11 の分枝脂肪酸が合成される。最終的に、カプサイシン合成酵素 CS (=Pun1/AT3) によってバニリルアミンと脂肪酸が脱水縮合することで、カプサイシンが合成される（図1）。

辛味成分と化学構造が類似した物質カプシエイトが低辛味系統‘CH-19 甘’の研究から発見されている^{5,6)}。カプシエイトはほとんど辛味を呈さずに辛味成分と同様の生理作用を持つことから、産業的価値が高い成分として期待されている⁷⁾。カプシエイトの構造は、カプサイシンの酸アミド結合がエステルに変化した構造である。カプサイシノイドと同様に脂肪酸側鎖が異なる同族体も‘CH-19 甘’から同定され、カプシエイト類の総称はカプシノイドと命名された。ここより後はカプシノイドとする。カプシノイドはカプサイシノイドの1000分の1程度しか辛味を呈さないが、カプサイシノイドと同程度に TRPV1 を活性化する作用がある⁷⁾。カプシノイドの生理作用としては、エネルギー代謝促進作用、体熱産生促進作用、脂肪代謝促進作用、抗酸化作用、抗がん作用などが報告されている。生理作用がありながらも低辛味であることから、カプシノイドには多量に摂取できるという利点がある。カプシノイドが低辛味なのは、カプサイシノイドより疎水性が高く、摂食した際に、舌上皮細胞層の三叉神経まで届かないためと考えられている^{8,9)}。カプシノイドは多くの辛味品種にも微量に含まれているが、‘CH-19 甘’ではカプサイシ

第1章 トウガラシの辛味成分カプサイシン類と低辛味類似物質の生合成および生物生産

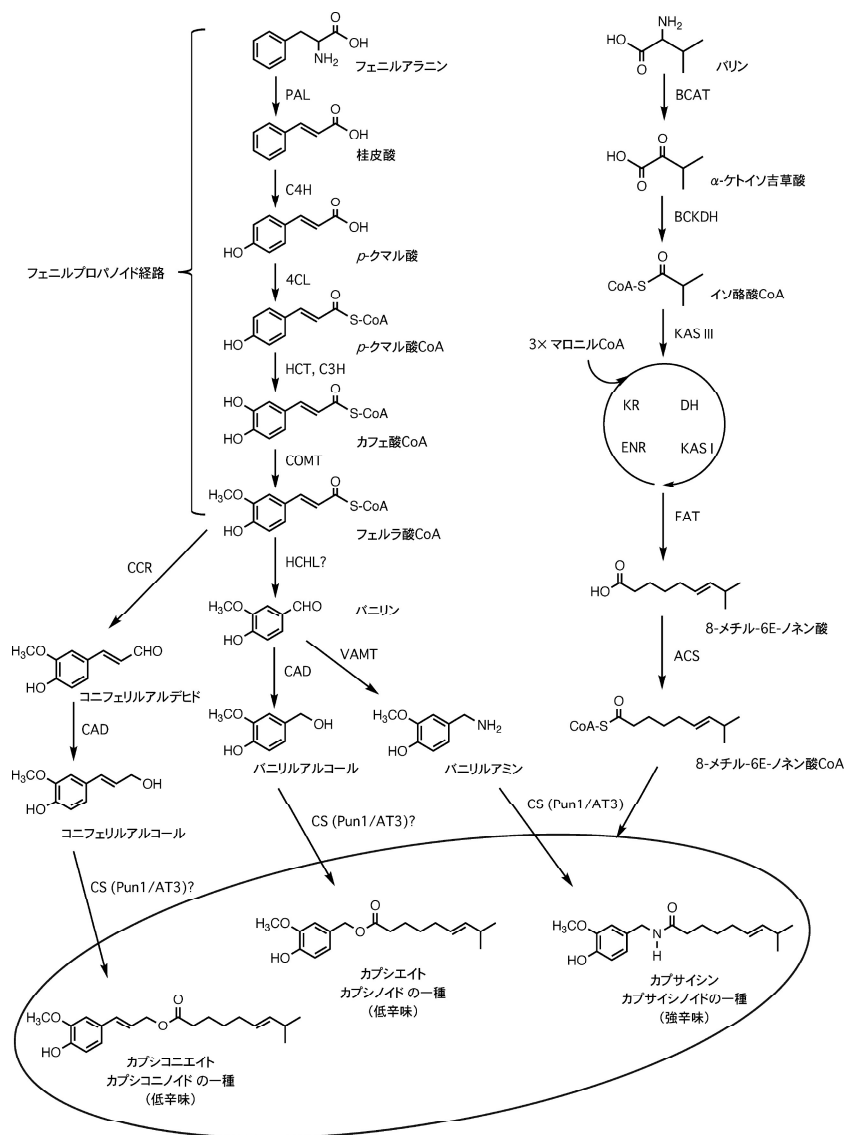


図 辛味成分カプサイシノイドおよび低辛味類似成分の生合成経路

PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamic acid 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumaroyl-CoA ligase; HCT, hydroxycinnamoyl transferase; C3H, coumaric acid 3-hydroxylase; COMT, caffeic acid O-methyl transferase; HCHL, hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase; VAMT: vanillin aminotransferase; BCAT, branched-chain amino acid transferase; BCKDH, branched-chain α -ketoacid dehydrogenase; KAS III, ketoacyl-ACP synthase III; KR, ketoacyl-ACP reductase; DH, hydroxyacyl-ACP dehydratase; ENR, enoyl-ACP reductase; KAS I, ketoacyl-ACP synthase I; FAT, acyl-ACP thioesterase; ACS, acyl-CoA synthetase; CS, capsaicin synthase (AT3, acyltransferase3); CCR, cinnamoyl-CoA reductase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase

ノイドを含まずカプシノイドを大量に含んでいる¹⁰⁾。

別の低辛味類似物質として、カプシコニノイドも報告されている¹¹⁾。カプシコニエイト (coniferyl 8-methyl-6*E*-nonenoate) およびジヒドロカプシコニエイト (coniferyl 8-methyl-nonanoate) がトウガラシ系統 CCB から単離され、総称はカプシコニノイドとされた (図 1)。カプシコニノイドはコニフェリルアルコールと脂肪酸側鎖がエステル結合した構造を有する。カプシコニノイドも辛味はほとんどなく、カプサイシンやカプシエイトよりは弱い、カプサイシンレセプター TRPV1 を活性化する作用がある¹¹⁾。カプシコニノイドは、多くのトウガラシに含まれるが、カプサイシノイドやカプシノイドと比べて微量にしか含まれていない¹⁰⁾。コニフェリルアルコールが前駆体と考えるが、生合成のメカニズムはよく分かっていない。

2 トウガラシ属植物に特有の生合成酵素

2.1 バニリンアミノトランスフェラーゼ (VAMT)

a) VAMT 研究の歴史とその辛味発現への関与

カプサイシン合成経路を概観すると、バニリンからバニリルアミンを合成する反応はトウガラシ属植物に特徴的な反応である。この反応は、VAMT によって触媒される。VAMT は、単離された当初 putative aminotransferase (pAMT) と呼ばれていた。Curry らは、辛味系統ハバネロの胎座組織の cDNA ライブラリーを作成し、differential screening 法により辛味品種で多く発現し、非辛味系統では検出されない転写産物を探索した¹²⁾。その結果、約 10 個の辛味系統特異的な cDNA クローンが単離され、それらの中に bacterial class III pyridoxal-phosphate-dependent aminotransferase と相同性のある遺伝子が含まれていた。本遺伝子はバニリンからバニリルアミン合成に関わるアミノ基転移酵素と推測され、*putative aminotransferase* (pAMT) と名付けられた。pAMT (=VAMT) は、緑熟果実の胎座・隔壁で強く発現し、種子や成熟果実などではほとんど発現しない。また辛味度合いの系統間差と VAMT の転写量にも相関が見られた。その後、‘CH-19 甘’の低辛味性原因遺伝子が VAMT であることが明らかにされた¹³⁾。VAMT 遺伝子が機能欠損すると、バニリンからバニリルアミンが合成されずに、代わりにバニリルアルコールとカプシノイドが蓄積する。‘CH-19 甘’以外にも、‘ヒモ’、‘Aji Dulce’といった低辛味系統がカプシノイドを蓄積していることが報告され、それらも VAMT の機能欠損変異を持っていることが明らかにされた¹⁴⁾。以上の一連の研究により、VAMT が遺伝学的にバニリルアミンやカプサイシノイドの生合成に関わることが示された。VAMT の機能欠損変異は、カプシノイドを多量に蓄積する低辛味系統を育種する上で有用な変異である。

b) VAMT の酵素特性

アミノトランスフェラーゼは生物界に広く存在し、一般にアミノ酸のアミノ基をピリドキサルリン酸 (PLP) を介して α -ケト酸などのアミノ基受容体に転移する酵素群である。VAMT タ

第1章 トウガラシの辛味成分カプサイシン類と低辛味類似物質の生合成および生物生産

ンパク質はトウガラシからの単離には至っていないが、大腸菌により作成したリコンビナント VAMT でその性質が調べられている^{15~17)}。VAMT はトウガラシと同じナス科のトマトやモデル植物として使用されるシロイナズナなどの植物 γ -アミノ酪酸 (GABA) アミノトランスフェラーゼと約 8 割のアミノ酸配列の相同性を有する。リコンビナント VAMT はバニリンをアミノ基受容体として、アミノ酸のアミノ基を PLP を介して転移させてバニリルアミンを生成させる。一方、アミノ基ドナーとしては GABA やアラニンが転移効率の良い基質であることが示された。VAMT の反応速度論解析では、バニリンからバニリルアミンへの反応速度よりも、逆反応の反応速度の方が 6 倍速いことが示されている。これはバニリンからバニリルアミンへの反応における生化学的な標準自由エネルギー変化が $\Delta G^{\circ} > 0$ と見積もられていることと一致する。植物体でバニリンからバニリルアミンへの変換が進むことの理由として、VAMT はトウガラシ細胞の細胞質に局在しており、おそらく細胞質に過剰量のアミノ酸が存在すること、また、GABA がアミノ基ドナーとして働く場合、その脱アミノ化物であるスクシニルセミアルデヒドは速やかに代謝されるなどして逆反応の基質にならないことが挙げられる。

c) VAMT のアミノ酸変異と酵素活性

VAMT はトウガラシ種間でよく保存された遺伝子であるが、突然変異によるアミノ酸置換のバリエーションが多い。前述の 'CH-19 甘' の VAMT では、ナンセンス変異が生じているため、VAMT の機能欠損となっている。一方、辛味系統のトウガラシの VAMT においても、様々なアミノ酸置換のバリエーションがあり、それらは VAMT 機能を失わせる変異ではないものの、酵素活性に影響している可能性は十分考えられる。そのひとつの例として、補酵素である PLP との親和性に関与する VAMT のアミノ酸置換が報告されている¹⁸⁾。VAMT の 56 番目のアミノ酸は、PLP 結合部位近傍に位置しており、*C. baccatum* や *C. annuum* では Thr、*C. frutescens* や *C. chinense* では Ala である。*C. annuum* の '夢祭り' (YM) および *C. chinense* の 'Red Habanero' (RH) の VAMT 活性は YM の方が約 15 倍活性が高く、PLP に対する K_m 値を比較すると、YM の方が PLP に対する親和性が高いことが明らかとなった。大腸菌の発現系を用いてリコンビナント VAMT を作製し解析したところ、YM VAMT の 56 番目の Thr を Ala に置換すると、酵素活性が低くなり、PLP との親和性も低くなる。反対に、RH VAMT の 56 番目の Ala を Thr に置換すると、酵素活性が高くなり、PLP との親和性も高くなる。これらの結果から、56 番目のアミノ酸置換は PLP への親和性に影響し、結果的に VAMT 活性に違いをもたらすことが示された。この例以外にも、基質特異性や 3 次元構造のゆがみなどに影響を与えると考えられるアミノ酸置換が見つかってきている。"All or nothing" ではない VAMT のバリエーションがトウガラシの様々な辛味に寄与していると考えられ、更なる解明が待たれる。

d) ナス科植物の進化におけるトウガラシ VAMT の起源に関する考察

トウガラシはナス科進化の過程でどのように VAMT 遺伝子を獲得したのだろうか。VAMT

は、前述のように γ -アミノ酪酸 (GABA) アミノトランスフェラーゼ (*GABA-T*) と塩基配列が似ている。トウガラシのゲノムには、*VAMT*を含めた3つの機能型 *GABA-T* 遺伝子および2つの偽遺伝子が存在する¹⁹⁾。他の植物 *GABA-T*を含めた系統解析により、ナス科植物は共通してミトコンドリア局在型 (*GABA-T1*)、葉緑体局在型 (*GABA-T3*)、細胞質局在型 (*GABA-T2/4*) という3種類の *GABA-T* 遺伝子を持つこと、*VAMT*が細胞質局在型 *GABA-T*の一種であることが明らかになった¹⁹⁾。細胞質局在型 *GABA-T*は、トマトやジャガイモにも存在しており、カプサイシンとは化学構造が全く異なるソラニンやトマチンのようなグルコアルカロイドの生合成に関わることが報告されている²⁰⁾。トマトの細胞質局在型 *GABA-T2/4*は *VAMT*とは異なり、植物体全体で発現していた。さらに、これらはバニリンをバニルアミンに変換する触媒活性はあるものの、*VAMT*と比べると30分の1ほどであった¹⁹⁾。以上の結果から、*VAMT*はナス科植物が広く持つ細胞質局在型 *GABA-T*の一種ながらも、他のオーソログにはない「胎座特異的な転写パターン」と「バニリンに対する高い触媒活性」という特徴を獲得することで、カプサイシン生合成に特化した酵素遺伝子であると考えられる。

2.2 低辛味類似物質カプシノイドの生合成に関与する酵素シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD)

辛味を呈さないカプシノイドの生合成経路についても明らかにされている。カプサイシノイドがバニルアミンと脂肪酸が結合したものである対して、カプシノイドはバニルアルコールと脂肪酸が結合したものである。カプシノイドは前述のように、*VAMT*が機能欠損した‘CH-19甘’から同定された。また、辛味の低い系統ではカプサイシノイドとカプシノイドの総量に占めるカプシノイドの割合が高いことも報告されている¹⁴⁾。これらのことから、バニリンを基質とした2つの反応経路が同時に動いており、*VAMT*活性が高い系統ではバニルアミン合成経路が優位に、*VAMT*活性が低いもしくは失っている系統ではバニルアルコール合成経路が優位になると考えられた。このバニルアルコール合成を担う酵素の候補として、cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)が同定されている²¹⁾。CADは植物全般において、細胞壁の成分であるリグニン合成経路で、バニリンとよく似た構造のコニフェリルアルデヒドをコニフェリルアルコールに還元する酵素として知られている。胎座・隔壁の抽出液を用いた活性測定において、CAD特異的阻害剤である *N*-(*O*-hydroxyphenyl) sulfinamoyltertbutyl acetate (OHPAS)、または、金属プロテアーゼ阻害剤である EDTA により、それぞれ濃度依存的にバニルアルコールの合成が抑制された。qPCR 分析によると、*VAMT*は、これまでに調べたすべてのトウガラシ系統において、緑色果実の胎座・隔壁で転写レベルが高く、成熟した赤色果実では転写レベルが非常に低い。カプサイシノイドは主に緑色果実で合成されるため *VAMT* 転写産物の蓄積時期はカプサイシノイド合成の時期とよく一致する。しかし、*CAD*は胎座・隔壁のみならず果皮や種子など多くの組織で発現しており、緑色果実よりも赤色果実で発現レベルが高く、カプシノイドの蓄積組織および蓄積時期と矛盾していた。前述のように、*CAD*の主な機能は、植物体