

# カラーピーマン果実の着色促進に関する研究

吉田千恵

目次	
緒言	…1
第I章 カラーピーマン果実の着色を促進する要因の解明	…4
第1節 収穫後のカラーピーマン果実の着色に対する温度の影響	…4
1. 背景および目的	
2. 材料	
3. 方法	
4. 結果および考察	
第2節 収穫後のカラーピーマン果実の着色に対する植物ホルモンの影響	…9
1. 背景および目的	
2. 方法	
3. 結果および考察	
第3節 収穫後のカラーピーマン果実の着色に対する光照射の影響	…14
1. 背景および目的	
2. 方法	
3. 結果および考察	
第4節 収穫後のカラーピーマン果実に対する光質の異なる光照射に伴う カロテノイド生合成関連遺伝子の発現変化	…19
1. 背景および目的	
2. 材料および方法	
3. 結果および考察	
第II章 催色期のカラーピーマン果実に対する効率的な光照射追熟方法の検討	…30
第1節 異なる光強度による光照射処理が果実の着色とカロテノイド含量に およぼす影響	…30
1. 背景および目的	
2. 材料	
3. 方法	
4. 結果および考察	
第2節 異なる温度条件下での光照射処理が果実の着色とカロテノイド含量に およぼす影響	…36
1. 背景および目的	
2. 方法	
3. 結果および考察	
第3節 光照射後の暗黒処理が果実の着色およびカロテノイド含有量に およぼす影響	…39
1. 背景および目的	
2. 方法	
3. 結果および考察	

第4節 光照射および暗黒処理中の温度が果実の重量減少率におよぼす影響	…43
1. 背景および目的	
2. 方法	
3. 結果および考察	
摘要	…46
引用文献	…48
発表原著論文	…51
参考文献	…51
謝辞	…52

## 略語一覽

E	Ethylene
MeJA	Methyl jasmonate
NBD	2,5-norbornadiene
<i>Psy</i>	Phytoene synthase gene
<i>Pds</i>	Phytoene desaturase gene
<i>Zds</i>	ζ-carotene desaturase gene
<i>LcyB</i>	Lycopene β-cyclase gene
<i>CrtZ-2</i>	Lycopene β-cyclase gene
<i>Ze</i>	β-carotene hydroxylase gene
<i>Ccs</i>	Capsanthin synthase gene
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

## 緒言

カラーピーマンは 1993 年の輸入解禁以降に日本国内に導入された輸入先行型の野菜である。それまでの日本では、ピーマン果実は未熟なうちに収穫した緑色果が主流であったが、赤、黄、オレンジ色などのカラーピーマンの到来により、食卓に彩りを添える食品としてだけでなく、おいしさや栄養価の高い食品として広く食べられるようになった。財務省貿易統計によると 2000 年以降にカラーピーマン（パプリカ）の輸入量が増加し、2015 年の年間輸入量は約 39,600 t となっている。カラフルな色以外にも小果系、中果系、大果系などの大きさの違いや、ベル型、くさび型などの形の違いなど様々な品種があり、日本国内でも施設園芸の普及とともに作付けが広がっており、現在の国産カラーピーマンの生産量は年間 5,000～10,000 t 前後と推定されている。

宮城県におけるカラーピーマンの出荷量は、2004 年から徐々に増加し始め、2006 年、2009 年に大規模園芸施設でパプリカの生産が開始されたことで飛躍的に増加した。2010 年産では 404 t（出荷量 387 t）で茨城県の 569 t に次いで全国 2 位となり、翌 2011 年には生産量 1200 t/年程度を見込む国内最大の産地なることが期待されていたが、東日本大震災により、栽培施設が大きな被害を受け 2011 年の生産量は大きく減少することとなった。しかし、懸命な復旧への取り組みや、東日本大震災生産対策交付金等の国庫補助事業の活用により、2012 年度には復旧が完了し、2012 年産の生産量は 932 t（出荷量 916 t）と全国 1 位（全国シェア 24%）の産地となった。2016 年にも新たな大規模園芸施設が建設され、宮城県におけるカラーピーマンの生産量のさらなる増加が見込まれている。

日本国内でのカラーピーマンの主な作型は 2 つに大別され、西南暖地を中心に秋から春先までを収穫期間とする栽培と、山間地や東北地方など夏の冷涼な気候を生かした夏秋栽培がある。宮城県におけるカラーピーマンの栽培は後者の小規模なパイプハウスを用いた夏秋どり栽培が主流であったが、2006 年以降の大規模園芸施設の増加にともない、夏秋どり作型と促成作型を組み合わせて周年を通した出荷を行う大規模経営体も増えてきている。カラーピーマンの夏秋どり作型では、6 月か

ら 11 月下旬まで収穫が行われるが、栽培終盤の晩秋には、温度低下や日照不足が影響し、大きく肥大した果実の多くが、着色の遅延などで出荷できず、収量が伸び悩んでいる。それらのうちの若干は、緑色カラーピーマンとして市場に出回っているが、単価も低く、需要も少ない。これらの果実が着色して出荷できるようになると、生産量の増大に繋がることが期待される。

カラーピーマンの果実中に含まれる色素成分は、未熟なうちはクロロフィル、ルテイン、 $\beta$ -カロテン、ビオラキサンチン、ネオキサンチンなどの成分であるが (Hornero-Mendez ら, 2000 ; 今堀, 2007), 果実が生育し、熟するとともにカプサンチン, カプソルビン, ゼアキサンチン, ククルビタキサンチン,  $\beta$ -カロテン,  $\beta$ -クリプトキサンチン, カプサンチン-5,6-エポキシドなどに変化する (合田ら, 1996 ; Hornero-Mendez ら, 2000 ; 渡辺, 2003). このうち、カプサンチンがカラーピーマンの主要な赤色色素として知られている (Minguez-Mosquera と Hornero-Mendez, 1993).

一方、同じナス科のトマトにおける果実の着色のメカニズムについては多くが明らかにされており、成熟中に 10 倍以上に増加するカロテノイド含量のうち、そのほとんどがリコペン含量の増加によるものであることが知られている (Fraser ら, 1994). そして、トマトの成熟には温度をはじめ、エチレンやジャスモン酸などの植物ホルモンが作用することが知られている (浜渦ら, 1994). また、成熟にともないカロテノイド含量が増加するカキ果実においては、カロテノイドの蓄積には生育中の温度と光が関与することが明らかになっており (中條, 1982), カンキツ果実においては、エチレンがクロロフィルの脱緑とカロテノイドの集積に作用することから、果皮色を良好にする技術として、エチレン処理が利用されている (Matsumoto ら, 2009) .

このように、成熟にともないカロテノイド含量が増加する果実の着色過程は品目によって異なっており、特に、カラーピーマン果実の着色メカニズムについては、未解明な部分が多く、着色促進に関わる要因についても明らかにされていない。

そこで、本研究では、カラーピーマンの着色促進に関わる要因について明らかに

するために、第Ⅰ章では、収穫後のカラーピーマン果実の着色に対する温度、植物ホルモンおよび光照射の影響について試験を行った。第Ⅱ章では、生産現場で活用する場合を想定し、催色期のカラーピーマン果実に対する効率的な光照射追熟方法の検討を行った。

## 第 I 章 カラーピーマン果実の着色を促進する要因の解明

### 第1節 収穫後のカラーピーマン果実の着色に対する温度の影響

#### 1. 背景および目的

国内におけるカラーピーマンの栽培では、収量の波が大きいために安定生産が難しいとされる。気象条件などの環境要因による着果の減少や着果負担による生理落下だけでなく、夏季には、収穫遅れによる過熟果の発生や、晩秋以降には、低温による生育停滞や果実の着色遅延などが原因としてあげられる。特に、栽培終盤の晩秋以降の着色不良果実は、十分に肥大している果実であるにもかかわらず出荷を断念することになるため、果実の着色を促進することができれば、多数の果実が出荷できる可能性がある。

カラーピーマン果実の着色に関する知見は、温度処理の効果についていくつかの報告があるが（河野，2002；元木ら，2001），処理する果実のステージによって効果が安定しない。そこで、カラーピーマン果実に対する温度と着色の関係を整理するために催色期の果実に統一して試験を行った。

#### 2. 材料

宮城県農業・園芸総合研究所（宮城県名取市）内にある広さ約 330 m<sup>2</sup>、軒高 210 cm の鉄骨ハウス内で標準的な養液条件で栽培したカラーピーマン赤色品種‘スペシャル’（ENZA）の果実を試験に用いた。開花後、概ね 50 日に達して、果実表面全体の 5%程度が着色し始めた催色期の果実を収穫し、試験に用いた。

耕種概要は、2009 年 1 月 20 日に播種し、10.5 cm のポリエチレン製ポットに鉢上げし、育苗した苗を 2009 年 3 月 23 日にヤシがら培地を使用した養液栽培システムに定植した。栽植条件は畝間 180 cm，株間 20 cm，2 本仕立てとした。培養液は大塚 A 処方を用い EC1.2~2.0 dS・m<sup>-1</sup>の濃度で株当たり 100~400 mL を 1 日 3~5 回給液した。特段の病害虫の問題も無く、順調に生育した。なお、試験に用いた果実の収穫時期は、2009 年 10 月~2010 年 1 月にかけての低温期であり、ハウス内は、

暖房機の設定温度を 12°C に設定して加温し、日中は 25°C 以上で換気した。

### 3. 方法

試験に用いた果実の収穫ステージは、果実表面全体の 5% 程度が着色し始めた催色期に統一した。処理温度は、低温から高温域まで、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C および 35°C の 6 水準を設定し、暗所で 7 日間静置した (BIOTRON LPH200, NK system)。果実の乾燥を防ぐために果実をポリエチレン袋 (大きさ 260×380 mm, 厚さ 0.03 mm) に折り込み包装して温度処理を行った。袋の折り込み面積は袋の半分程度とし、フィルムが重なる折り込み部は下面となるよう設置した。1~2 日間隔で袋から取り出し、果実の着色状況を確認した後、再包装した。各処理区 3~6 果を供試した。

処理後の果実の色合いを評価するために、クロロフィル含量とパプリカ色素の色価を以下の手順で測定した。果実内部の種子と胎座を取り除き、隔壁を残した果皮をミキサー (IFM-800, 岩谷産業) で粉碎し、3.0 g をはかり取り、10 倍量の抽出溶媒 (アセトン : ヘキサン = 4 : 6) を加えて、1 分間ホモジナイズし (PTIO-35, POLYTRON), その上清を定量に用いた。クロロフィル含量は、永田と山下 (1992) の方法を参考にマッキニー法 (改良法) を用いて定量した。着色度合いについては、同抽出液の上澄みの極大吸収波長である 472 nm における吸光度を測定し (U-2000 Spectrophotometer, HITACHI), 食品添加物公定書 (第 8 版) に示されている色価測定法により色価 ( $E^{10\%}_{1\text{cm}}$ ) を算出した。

$$\text{色価} = [(10 \times A \times F) / \text{試料の採取量 (g)}]$$

ただし、A は 472 nm における吸光度、F は  $1 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  を基準にした希釈倍率である。

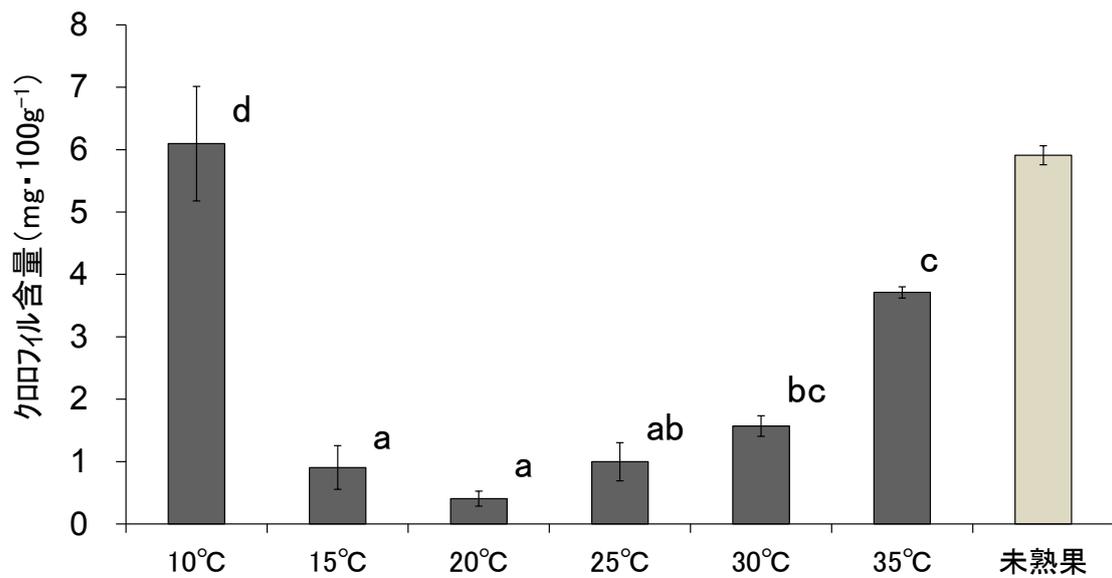
### 4. 結果および考察

果実の着色に対する温度の影響は、クロロフィルの減少が 20°C を中心に促進され、10°C の低温で抑制された (第 1 図)。また、30°C 以上の高温でもクロロフィル

の減少が抑制される傾向がみられ、35°Cでは、未熟果の50%以上のクロロフィルが残存した(第1図)。一方、赤色色素の合成を反映する色価の増加はクロロフィル量の減少とは逆に、20°C付近で高くなり、10°Cの低温および30°C以上の高温では、20°Cの50%程度になった(第2図)。30°C以上の高温では赤色色素と残存クロロフィルの緑色が混在し暗赤色の果実となった。クロロフィルの減少と色価(赤色色素の合成)の増加の両面から、着色が進みやすい温度域は15~25°Cであることが示された(第1, 2図)。特に20~25°Cでは色価の増加が多い傾向がみられたことから(第2図)、果実の着色を促進する処理温度の範囲として望ましいと判断された。しかし、暗黒下での温度処理だけでは色価の増加は小さく、樹上完熟果の色価の半分以下であった(第2図)。処理区の最も着色が進んだ20°Cでも色価10程度で(第2図)、薄赤色となった。

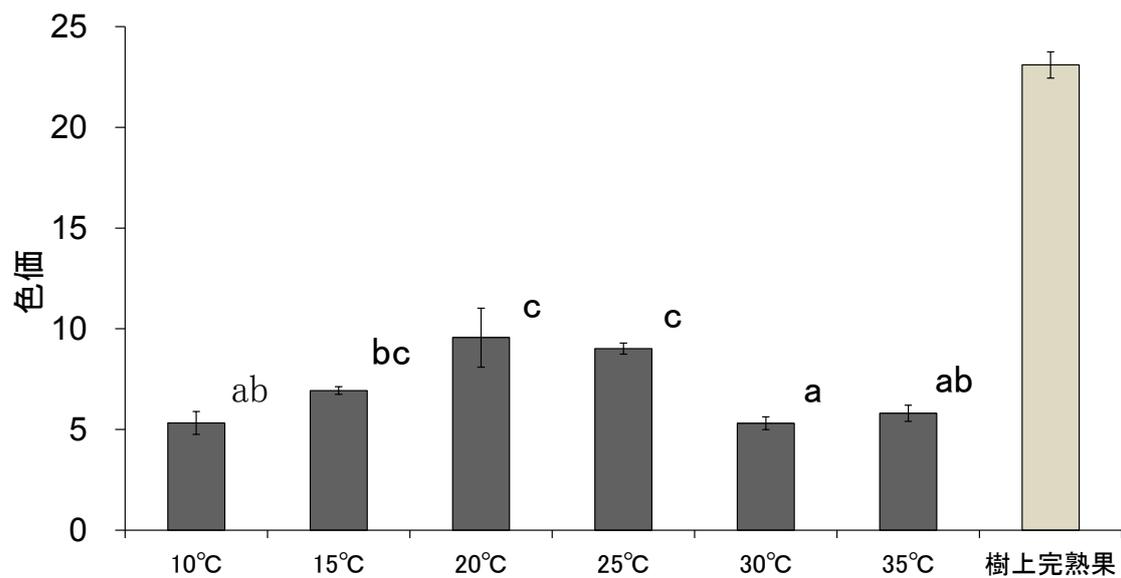
元木ら(2001)によると盛夏期(7~9月)の果実について、緑熟期に収穫した果実を10°Cの保冷庫に貯蔵した場合には着色しないか、薄い着色に留まるとしている。本試験においても10°Cではカラーピーマン果実の着色は進まなかった。河野(2002)は、23°Cが最も着色に効果的な温度であると指摘している。本試験でも着色が進んだ温度域は20~25°Cの範囲であり、河野の報告とほぼ同様の結果となった。

また、低温の10°Cでは果実のクロロフィル含量の減少や着色が進まなかったが、30°C以上の高温でもクロロフィル含量の減少や色価の増加がともに抑制された。特に35°Cでは果実全体にクロロフィルが残存し、暗赤色となった。夏季の果実には色むらが発生しやすいといわれており、果実に緑色部分が残っている場合に収穫を遅らせると、着色部分が過熟になるなどの問題があった。本試験の結果から、夏季の着色むらは高温によるものと推察され、このような場合には、早期に収穫して20~25°Cで追熟させることにより、色むらを軽減できる可能性が示された。



第1図 カラーピーマン果実のクロロフィル含量に対する温度の影響

図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準で有意差があることを示す.  
 図中の縦線は標準誤差を示す. (n = 3~6)



第2図 カラーピーマン果実の色価に対する温度の影響

図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準で有意差があることを示す.  
 図中の縦線は標準誤差を示す. (n = 3~6)

## 第2節 収穫後のカラーピーマン果実の着色に対する植物ホルモンの影響

### 1. 背景および目的

カラーピーマン果実の着色過程には、クロロフィル含量の減少とカロテノイド含量の増加の2つの機構が関与している。Terai ら (2003) は光学顕微鏡観察で、カラーピーマン果実の成熟に伴って、組織のクロロフィル内部にカロテノイドとみられる赤色の色素が発現し、最終的に細胞内の有色体が赤色色素で占められるのを構造の変化からも確認している。さらに、それらを電子顕微鏡で観察し、成熟に伴いグラナやストロマチラコイドの量が減り、有色体内部の構造が管状や繊維状に変化することを報告しており、着色が進むにつれて、クロロフィルが減少し、様々なカロテノイドが生成されているとされる (Terai ら, 2003)。

成熟にともなってカロテノイドが増加する果実であるトマトの成熟にはエチレンやジャスモン酸などの植物ホルモンが作用することが知られており (浜渦ら, 1994), カンキツ果実においてもエチレンがクロロフィルの脱緑とカロテノイドの集積に作用することから、果皮色を良好にする技術として、エチレン処理が利用されている (Matsumoto ら, 2009)。カラーピーマンも成熟に伴い、カロテノイドが増加することから (Deli ら, 2001), 果実の成熟に関与する植物ホルモンの影響を調査した。

### 2. 方法

植物ホルモンの処理は、1 L の密閉容器に催色期に収穫した果実を入れ、エチレン 100 ppm 処理区、ジャスモン酸メチル 200 ppm 処理区、エチレン 100 ppm とジャスモン酸メチル 200 ppm 同時処理区、またはエチレンの作用阻害剤 (Sisler と Yang, 1984) であるノルボルナジエン (2,5-norbornadiene) 2,000 ppm 処理区を設けて、20°C, 暗所で7日間静置した (BIOTRON LPH200, NK system)。なお、1~2日間隔で果実の着色状況を確認し、容器をドラフト内で開口し換気を行ってから、それぞれの濃度になるよう植物ホルモンなどを再度充填した。各処理区 3~6 果を試験し、1 果実ごと測定した。

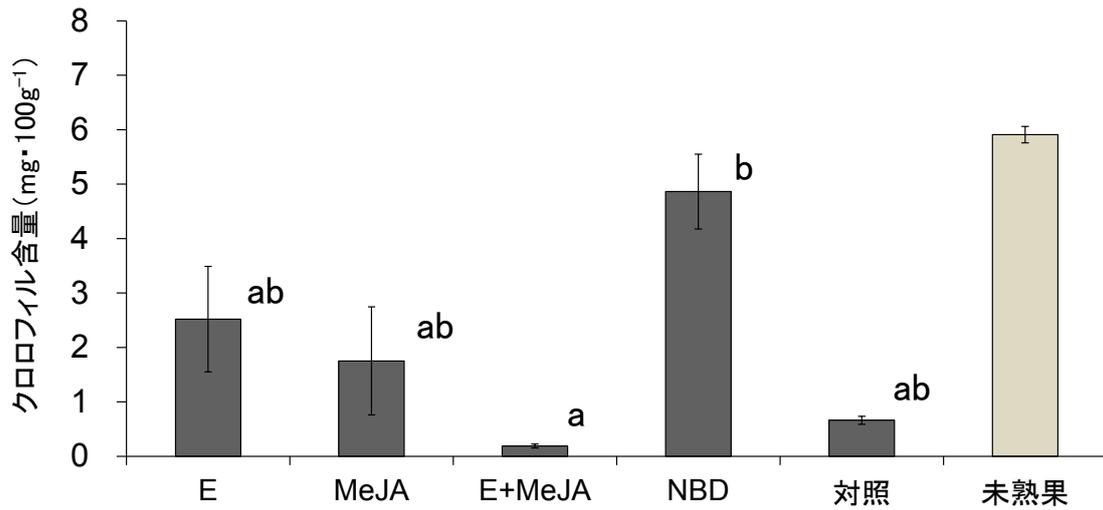
### 3. 結果および考察

カラーピーマン果実のクロロフィル含量に対しては、いずれの植物ホルモン処理区でも対照区と有意差がみられなかったが、エチレンの作用阻害剤であるノルボルナジエン処理を行った場合には、エチレンとジャスモン酸メチルを同時に処理した場合よりもクロロフィルの減少が抑えられる傾向がみられた（第3図）。一方、カラーピーマン果実の色価に対しては、エチレンとジャスモン酸メチルを同時に処理した場合に、エチレン単独処理よりも色価が増加する傾向がみられたが、ジャスモン酸メチルを単独処理した場合やノルボルナジエン処理を行った場合の色価には有意差がみられなかった（第4図）。また、最も色価が増加したエチレンおよびジャスモン酸メチルを同時処理した区でも色価は13程度で、樹上完熟果実の50%程度にとどまり（第4図）、薄赤色の着色となった。

クロロフィル含量の減少については、カンキツ果実およびブロッコリ小花でエチレンやジャスモン酸メチルの関与について報告がある（Matsumoto ら, 2009 ; Watanabe ら, 2000）。Watanabe ら(2000)によると、ブロッコリ小花ではジャスモン酸メチル処理がエチレン生成を誘導することによって、クロロフィル含量の減少などの老化の促進に関わっているとしている。カラーピーマン果実ではエチレンやジャスモン酸メチル処理による、クロロフィルの減少はみられなかったが、果柄部の黄化や軟化など老化促進による品質への悪影響がみられた。

カラーピーマン果実におけるカロテノイドの生合成は無色のカロテノイドであるフィトエンからリコペンを経て $\beta$ -カロテンへと進み、さらにゼアキサントチンを経て赤色色素であるカプサンチンが合成される（Bouvier ら, 1998）。 $\beta$ -カロテンまではトマトやカンキツなどの植物における代表的なカロテノイドの生合成経路と同様であると報告されている（Liu ら, 2012 ; Matsumoto ら, 2009）。本試験の結果から、エチレンとジャスモン酸メチルの同時処理によりカラーピーマンの果実の色価がやや増加し、着色促進される傾向がみられたが、着色程度は薄赤色で可販果レベルの着色には至らなかった。リコペンもしくは $\beta$ -カロテンまでの経路は温度処理やホルモン処理である程度促進されるが、それ以降の水酸化、エポキシ化、ケト

化の経路や、基質の供給などで別の制御を受けている可能性が考えられ、カラーピーマンではトマトとは異なる独自のカロテノイドの生合成制御により着色が進む可能性があると考えられた。

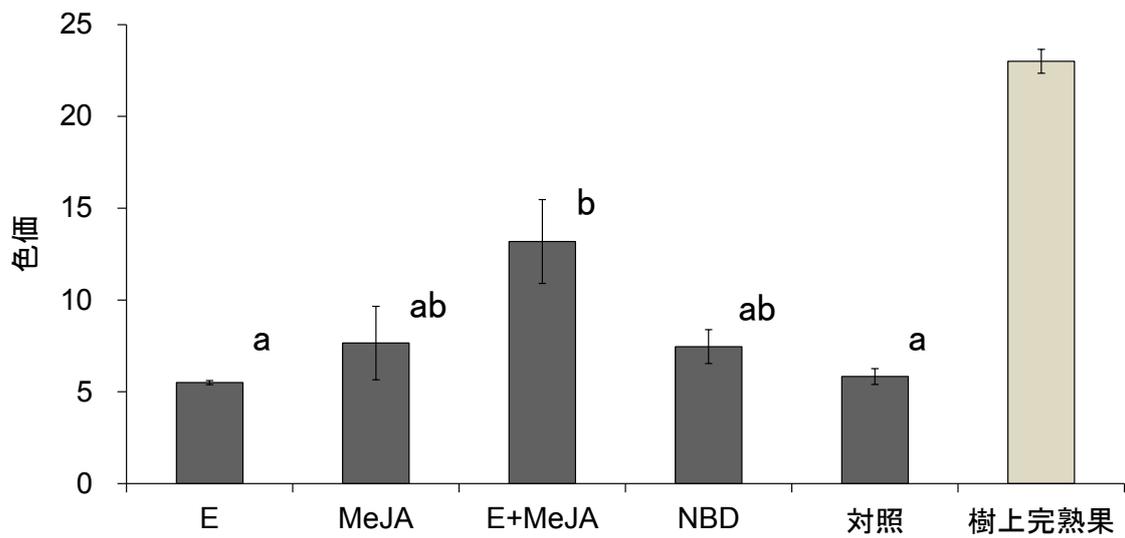


第3図 カラーピーマン果実のクロロフィル含量に対する植物ホルモンの影響

E;エチレン100 ppm, MeJA;ジャスモン酸メチル200 ppm, E+MeJA;エチレン100 ppm+ジャスモン酸メチル200 ppm, NBD;ノルボルナジエン2,000 ppm を処理し, 20°C, 暗所で7日間静置した.

図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準で有意差があることを示す.

図中の縦線は標準誤差を示す. (n = 3~6)



第4図 カラーピーマン果実の色値に対する植物ホルモンの影響

E;エチレン100 ppm, MeJA;ジヤスモン酸メチル200 ppm, E+MeJA;エチレン100 ppm+ジヤスモン酸メチル200 ppm, NBD;ノルボルナジエン2,000 ppm を処理し, 20°C, 暗所で7日間静置した.

図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準で有意差があることを示す.

図中の縦線は標準誤差を示す. (n = 3~6)

### 第3節 収穫後のカラーピーマン果実の着色に対する光照射の影響

#### 1. 背景および目的

成熟にともないカロテノイド含量が増加するカキ果実では、生育中の温度と積算日射量が果実のカロテノイド量に関与するとされる（中條, 1982）。また、トマト果実では温度をはじめ、エチレンやジャスモン酸などの植物ホルモンが作用するとともに、光もカロテノイド代謝に影響するとの報告もある（Bramley, 2002）。カラーピーマンにおいても、カロテノイド含量は光量などの生育中の環境に影響を受け（Russo と Howard, 2002）、果実の成熟期間中に太陽光が当たっていた果実の方が、光を遮っていたものよりもカロテノイド含量が高いという報告もある（Lopez ら, 1986）。そこで、催色期のカラーピーマン果実に光を照射し、着色に与える影響について調査した。

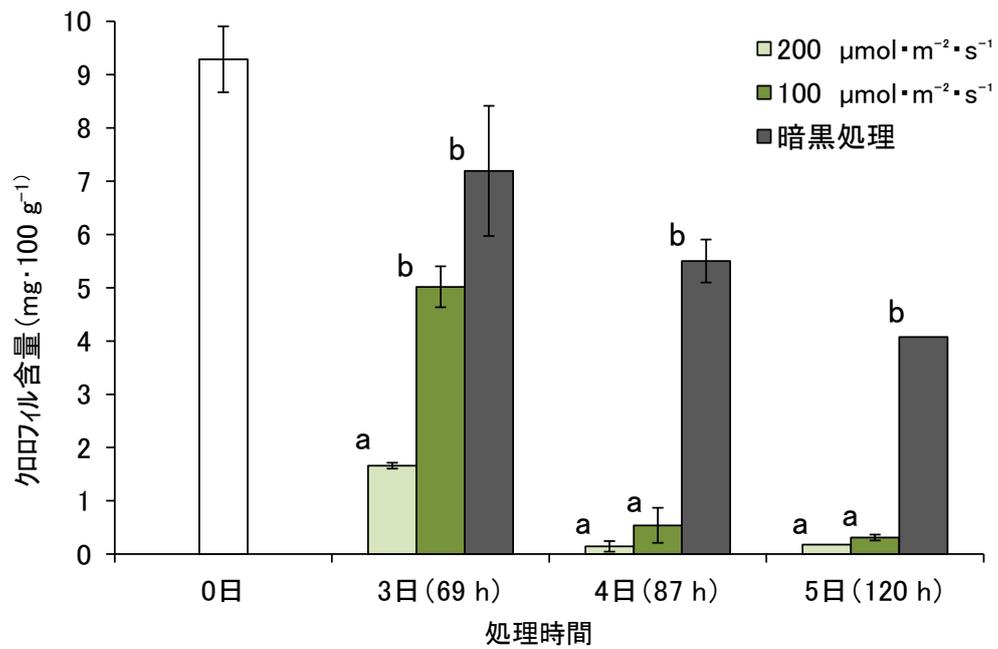
#### 2. 方法

温度は 20°C一定とし、光源には昼白色の蛍光灯を下面以外の 5 方面から連続照射し（上面 Panasonic FL15SS・ENW4 本、側面（扉側） Panasonic FL20SS・ENW4 本、側面 Panasonic FL40SS・ENW4 本）、20°Cで 3 日（69 時間）、4 日（87 時間）および 5 日間（120 時間）処理を行った（BIOTRON LPH200, NK system）。なお、果実の乾燥を防ぐために温度処理と同様に果実をポリエチレン袋（大きさ 260×380 mm、厚さ 0.03 mm）に果実が重ならないように 3~4 個ずつ折り込み包装して処理を行った。袋の面積の半分程度の折り込み部は下面になるように設置した。1~2 日間隔で袋から取り出し、果実の着色状況を確認した後、果実の重なりが生じないように反転して再包装した。各処理区 3 果ずつ供試し、1 果実ごと測定した。蛍光灯を照射しない区（暗黒処理区）、蛍光灯の半数（各面 2 本ずつ）を照射する区（光量子束密度約  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ）、および全部の蛍光灯を照射する区（光量子束密度約  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ）の 3 水準とした。

#### 3. 結果および考察

果実の着色に対する光照射の影響は、照射した光量子束密度が高く照射時間が増加するほど、クロロフィルの分解が促進され（第5図）、果実の色価も増加した（第6図）。照射した光量子束密度が約  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  では4日（87 h）で色価が30を超え（第6図）、果実全体が濃赤色に着色した。約  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  では5日（120 h）でクロロフィルがわずかに点在している果実があったが、着色程度は色価が20を超え可販果レベルに達した（第6図）。暗黒処理区では、5日間（120 h）でも色価は5程度で（第6図）、その着色程度は薄赤色で、クロロフィルも残存しており、色むらが目立つ果実となった。20°Cで約  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の光量子束密度で照射した場合には3~4日で、約  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  では、5日程度で色価が25まで上昇し、果実全体が着色した。暗黒下での温度処理や植物ホルモン処理とは異なり、光照射を行った場合には、色価が20を超え、出荷可能なレベルにまで着色した（第7図）。

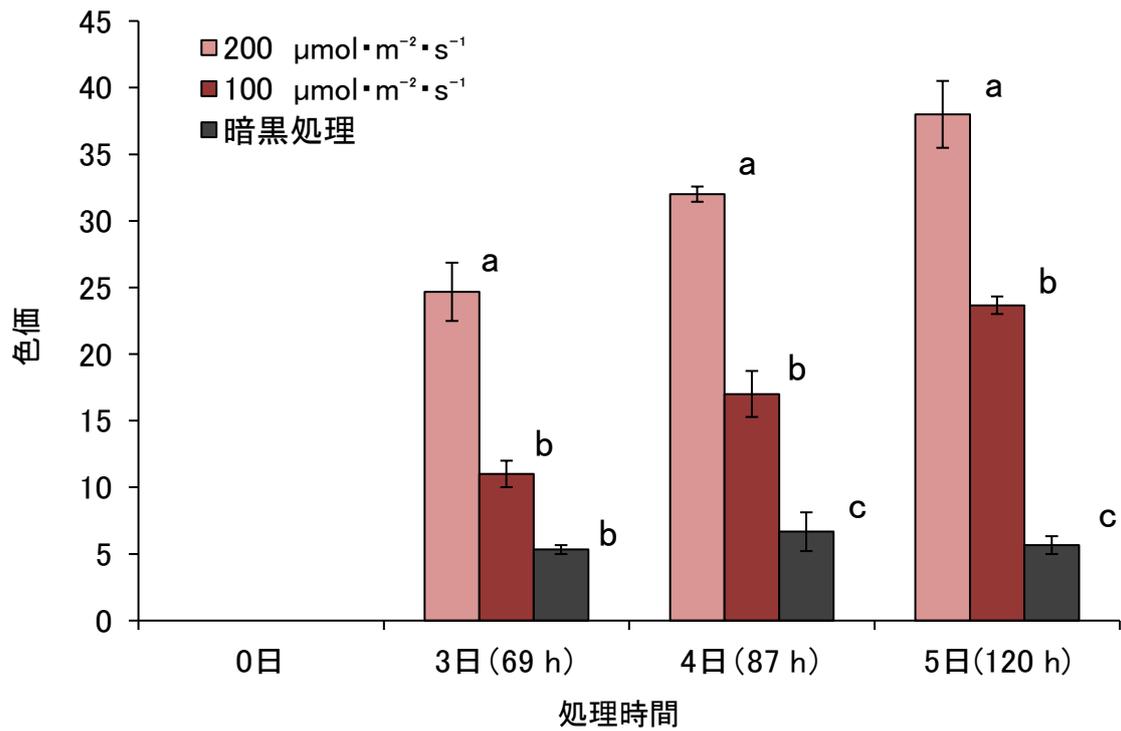
催色期のカラーピーマン果実の着色は、照射した光量子束密度が高く、照射時間が長いほど促進された。植物におけるカロテノイドの役割としては、強光ストレス等によって発生する活性酸素の消去に役立ち、光化学系IIの修復阻害を防ぐことが知られている（Nishiyamaら、2006；2011）。また、カラーピーマン果実の外皮に活性酸素種を接種したところ、カロテノイド合成に関わる遺伝子発現が誘導される、という報告もある（Bouvierら、1998）。これらのことから、光強度が高い光を連続照射することで受ける強光ストレスが、カロテノイド合成の要因の一つであると考えられた。



第5図 カラーピーマン果実のクロロフィル含量に対する光強度と光照射処理時間の影響

図中の異なる英小文字間にはTukey法により1%水準で有意差があることを示す。

図中の縦線は標準誤差を示す。(n=3)



第6図 カラーピーマン果実の色価に対する光強度と光照射処理時間の影響  
 図中の異なる英小文字間にはTukey法により1%水準で有意差があることを示す。  
 図中の縦線は標準誤差を示す。(n = 3)

試験区

照射光量子束密度 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )



第7図 光照射前と光照射5日後の着色の変化

## 第4節 収穫後のカラーピーマン果実に対する光質の異なる光照射に伴うカロテノイド生合成関連遺伝子の発現変化

### 1. 背景および目的

前節で催色期のカラーピーマン果実の着色は、光照射によって促進されたことから、着色に光が大きく関与していることが示された。永田ら（2015）は、催色期のカラーピーマン果実に対して、蛍光灯の光を照射することで、カロテノイド合成に関わる *Phytone synthase* 遺伝子 (*Psy*) と *Capsanthin synthase* 遺伝子 (*Ccs*) の発現が増加し、果実のカロテノイド含量も増加することを報告している。また、カラシナやアラビドプシスでは、フィトクロムにより *Psy* の遺伝子発現が制御されていることが示されている（Linting ら, 1997）。前節では、光源として昼白色の蛍光灯を使用した。カラーピーマン果実の着色には、特定の波長域の光源が効果的に作用する可能性もある。そこで、異なる光質の照射処理が果実の着色へ与える影響について、カラーピーマンの主な赤色色素であるカプサンチンまでのカロテノイドの生合成経路（第8図）に関わる7つの遺伝子の発現変化について調査を行った。

### 2. 材料および方法

宮城県栗原市の大型栽培施設で2014年10月から2015年10月の期間に栽培されたカラーピーマン（品種「サッポロ」）果実を供試した。果実の極一部が着色し始めた催色期の果実（着色程度5%以下）を収穫し、栽培期間中の光の影響をリセットするために、果実をポリエチレン袋（大きさ260×380 mm, 厚さ0.03 mm）に入れて、5°Cの冷暗所で1日静置したものをを用いた。インキュベータ（BIOTRON LPH200, NK system）の温度を20°C一定とし、果実をポリエチレン袋（大きさ260×380 mm, 厚さ0.03 mm）に1個ずつ折り込み包装して処理を行った。袋の面積の半分程度の折り込み部は下面になるように設置した。

光源には、NK system 3in1LED 照明ユニット[(株)日本医科器械製作所]を用い、赤色光（660 nm）および青色光（445 nm）をそれぞれの光量子束密度がポリエチレン袋を1枚介した状態で  $50 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  となるように光源の設置高さを調整し、

果実の上部 1 方面から照射した。光源に用いた LED ライトの波長分布を第 9 図に示した。照射後 1 日後, 3 日後, 5 日後に, 光照射部の果肉を約 2.5 g コルクボーラーでくりぬき, 液体窒素で凍結し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。後日,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存していたサンプルを液体窒素で充填しながら 0.1 g の石英砂を加えて乳鉢で磨砕し, 1 g を秤り取り, RNA 抽出に用いた。

RNAの抽出は, Suzuki ら (2004) の方法を若干改良した方法 (Suzuki ら, 2007) で行った。まず, 50 ml容のファルコンチューブに5.0 mLのRNA抽出バッファー [100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 0.2 M NaCl, pH8.0]を入れ, 3 mlの PCI (Phenol:chloroform:isoamylalchol 25:24:1)を加えたのち, 3% (v/v)となるように 2-mercaptoethanol を加え,  $60^{\circ}\text{C}$ のインキュベータ中で加温した。液体窒素を乳鉢と乳棒に満たし, 液体窒素がなくなるまで冷却した。乳鉢から液体窒素が蒸発したあと, さらに液体窒素を乳鉢に加え, その液体窒素が3分目程度になったときに0.1 g の石英砂と凍結サンプルを入れて, 同時に冷却しておいた乳棒で凍結サンプルを砕いた。サンプルが融解しないように適宜液体窒素を加え, サンプルが細かい粉末になるまで磨砕した。液体窒素で冷却しておいたスパーテルを用いて,  $60^{\circ}\text{C}$ に加温した抽出バッファーに粉末に磨砕したサンプルを移すと同時にボルテックスで懸濁した。その後, バッファーに移した粉末の重量を秤量した。この懸濁液を15 mL容のファルコンチューブに移し替え, 遠心分離(3,000 rpm, 5 min,  $20^{\circ}\text{C}$ )した。吸水剤みずぶとりくん (アトー) を0.4 g入れたカラムに上清を4 mL入れ, 5分間静置した後, 1,500 rpm,  $20^{\circ}\text{C}$ , 5分間遠心し, 得られた濾液600  $\mu\text{l}$ を2 ml容エッペンドルフチューブに分注し, 等量のphenol mixture [35% (w/v) guanidium thiocyanate, 10% (v/v) 2 M sodium acetate (pH 4.0) を含む水飽和フェノール] を加えて, 遠心分離(12,000 rpm, 2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ )した。上清を新しい2 ml容エッペンドルフチューブに移し, CIA [chloroform : isoamylalchol = 24 : 1] を300  $\mu\text{L}$ 加え, 15秒間手で激しく攪拌した後, 遠心分離 (12,000  $\times g$ , 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) を行った。ここから先の操作はRNase freeで行った。1.5 ml容エッペンドルフチューブに300  $\mu\text{L}$ イソプロパノールと300  $\mu\text{L}$ の塩溶液 [1.2 M NaCl, 0.8 M trisodium citrate] を分注しておき, 得られた上清600  $\mu\text{l}$ を加えて攪拌

し、室温で10分間インキュベートした。その後、遠心分離 (15,000 ×g, 15 min, 4°C) し、上清を取り除いてRNAペレットを得た。250 μLの75%エタノールを加え、エッペンドルフチューブの壁面とペレットを洗浄し、上清を完全に取り除いた。100 μLのRNase free水を加えて混和し、RNAを完全に溶解させてRNA溶液を得た。

得られたRNA溶液の濃度は、TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)] を10倍希釈したものを96 μLブラックマスクセルに分注し、RNA溶液を4 μl加えて、ピペッティングによってよく混和させ、分光光度計 (UV-1600; Shimazu, Kyoto, Japan) で200-320 nmの吸光度スペクトルを測定した。RNA溶液のRNA濃度はランベルト・ベールの法則により導かれた以下の式から計算した。

$$\text{RNA濃度 } (\mu\text{L}/\mu\text{g}) = 0.04 \times 25 (\text{希釈倍率}) \times (\text{A260}-\text{A320})$$

なお、A320 は不溶物によるバックグラウンドの値である。A260/A280, A260/A230の値を溶液中のタンパク質および糖類混入の指標とし、A260/A280の値が1.8以上、A260/A230の値が1.8-2.4の試料をRNAの純度が高い試料として以降の解析に用いた。

DNase処理はDNA-free™ Kit (Ambion) を用いて行った。1.5 mL容エッペンドルフチューブにtotal RNA 2 μg分の液量を採り、RNase free水を加えて全量を25 μLとした。2.5 μLの10 × DNase1 bufferを加えてよく混和した後、2 μlのrDNase1を加え穏やかに混和し、サーマルサイクラー(Takara PCR Thermal Cycler Dice® mini; TaKaRa) で37°Cで30分間インキュベートした。インキュベート後、5 μLのDNase Inactivation Reagentを加え、適宜ボルテックスで攪拌しつつ室温で2分間インキュベートし、DNaseを完全に失活させた。その後、遠心分離 (10,000 × g, 2 min, 室温) し、上清25 μLを新しい1.5 mL容エッペンドルフチューブに移し、-30°Cにて保存した。

single strand cDNAの合成はPrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real time) (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて行った。1サンプルあたり、4 μL の5 × PrimeScript® Buffer (for Real Time), 1 μL のPrimeScript® RT Enzyme Mix I, 1 μLのOligo dT, 1 μLのRandom 6 mers (100 μM), 9 μLのRNase free 水を混合しmaster mixtureとした。master mixtureは氷上で一時的に保存した。そして、0.2 mL容のRNase free のPCRチューブ

にDNase処理後のRNA溶液 4  $\mu$ Lを分注し, master mixture 16  $\mu$ Lを加え5回ピペッティングすることで反応液を調製した. この反応液はRT反応の進行を防ぐためすべて4°C以下で静置した. 次に, 反応液をサーマルサイクラー(Takara PCR Thermal Cycler Dice® mini; TaKaRa)によって37°Cで15分, 続いて85°Cで5秒間反応させ, 逆転写および酵素の失活を行った. その後, このRT産物20  $\mu$ LにEasy Dilution (TaKaRa)を20  $\mu$ L, RNase free 水60  $\mu$ Lを加えた後, 1.5 mLチューブに分注してmRNAの定量まで-30°Cで保存した.

リアルタイム PCR は StepOne ® Real Time PCR System (Applied Biosystems) で行った. まず 1 サンプルあたり 5  $\mu$ L の Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 各 0.9  $\mu$ L の Forward および reverse primer (10  $\mu$ M), 1.2  $\mu$ L の MilliQ 水を混和しプレミックスとした. このプレミックスを 8  $\mu$ L ずつ MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates (Applied Biosystems) のウェルに分注した. ここに 2  $\mu$ L のサンプル cDNA 溶液 (RT 反応により得られたもの) を加え, すべてのサンプルをウェルに入れ終えたのち, プレートに MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film (Applied Biosystems) でシールした. 次に, テーブルトップ遠心機 (5220; KUBOTA) にて遠心 (10,000  $\times$ g, 1 min, 室温) をして, ウェルの底に反応液を集めてから, リアルタイム PCR に供した. PCR は, SYBR Green を用いて 3 反復で行い, 各遺伝子の発現を調べた.

カロテノイド生合成関連遺伝子は, 永田ら (2015) の方法と同様に *C. annuum* の phytoene synthase (*Psy* : X68017), phytoene desaturase (*Pds* : X68058),  $\zeta$ -carotene desaturase (*Zds* : X89897), lycopene  $\beta$ -cyclase (*LcyB* : X86221),  $\beta$ -carotene hydroxylase (*CrtZ-2* : Y09225), zeaxanthin epoxidase (*Ze* : X91491) および capsanthin/capsorubin synthase (*Ccs* : X77289) のプライマーを用いた (表 1). 18s rRNA をノーマライザとして用いて各遺伝子の相対的発現量を補正した. 標準曲線は反応が最も高いサンプルを段階希釈し作成した. 各遺伝子ともに 0 日目の発現量を 1 として, 各処理区の発現量の比較を行った. 統計解析は, 0 日目の発現量に対する各処理区の発現量について Dunnett 法による多重比較を行った.

反応はFast Modeとして、他の設定はデフォルトとし、定量方法はStandard Curve Methodで行った。

また、以下にPCRの条件を示した。

PCRの反応条件 (GeneAmp® High Fidelity PCR System)

1 cycle 94°C : 2分

94°C : 15秒

55°C : 30秒

72°C : 45秒

30 cycles

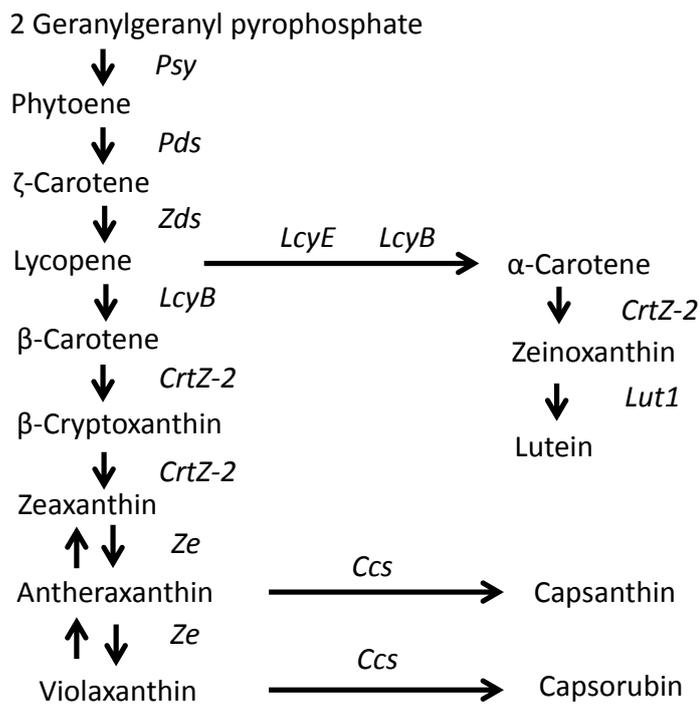
1 cycle 72°C : 7分

1 cycle 10°C : ∞

### 3. 結果および考察

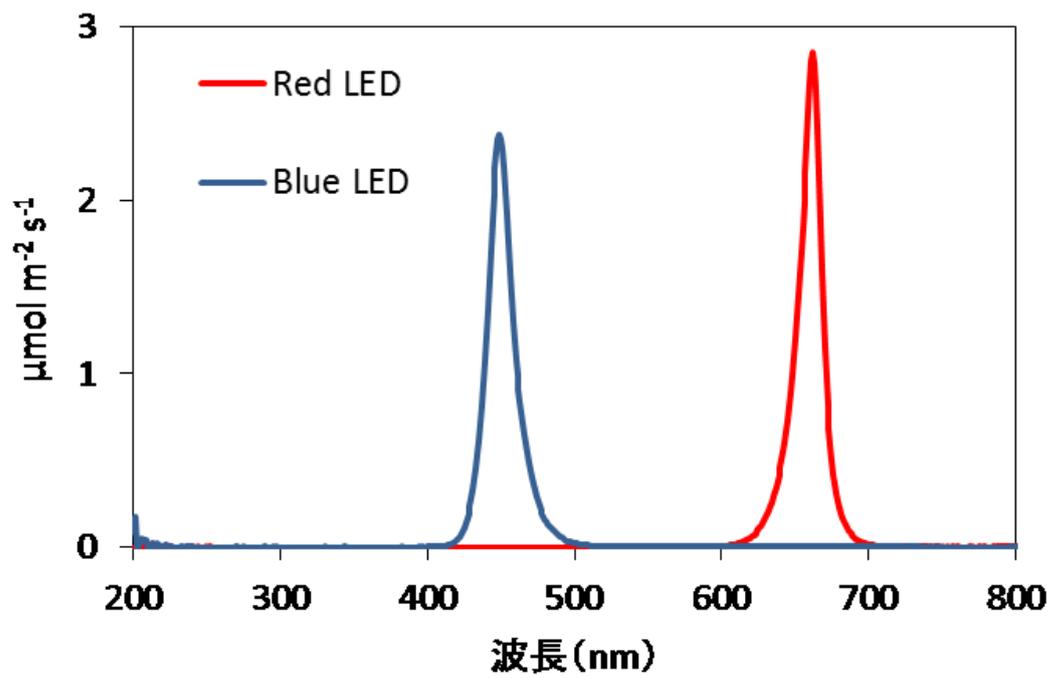
異なる光質の光照射処理を行ったところ、赤色光(660 nm)および青色光(445 nm)のいずれの波長においても光照射処理で着色が促進され、カロテノイド生合成関連遺伝子の発現誘導がみられた(第10図)。特に、*Psy*と*Ccs*の発現量が増加しており、蛍光灯の光を照射した場合の永田ら(2015)の報告と同様の結果となった(第10図)。特に、光エネルギーの高い青色光の照射処理3日目で*Psy*の発現が多くなり、*Ccs*や他のカロテノイド生合成関連遺伝子の発現誘導も青色光の照射処理区でやや高い傾向がみられた(第10図)。前節では、光強度依存的にカラーピーマン果実の着色が促進されることが示されており、光強度が高い光を連続照射することで受ける強光ストレスによる反応であることを反映した結果となった。一方、異なる光質の光照射処理後の着色程度を第11図に示した。赤色光で着色のそろいがよい傾向であったが、特定波長の光照射による着色促進効果は確認されなかった(第11図)。アラビドプシスでは、複数の*Psy*が確認されており、そのうちフィトクロムにより*Psy*の遺伝子発現が制御されている報告もある(Lintingら, 1997)。カラーピーマン果実の*Psy*の遺伝子も複数存在することも考えられ、強光ストレス以外の反応も着色促進に関与している可能性も考えられる。そのため、収穫後の催色期

のカラーピーマン果実に対して，光照射で着色促進させる場合には，多波長の光を照射でき，入手が容易である蛍光灯の利用がよいと思われた．



第8図 カラーピーマン果実(*Capsicum annuum* L.) のカロテノイド生成経路

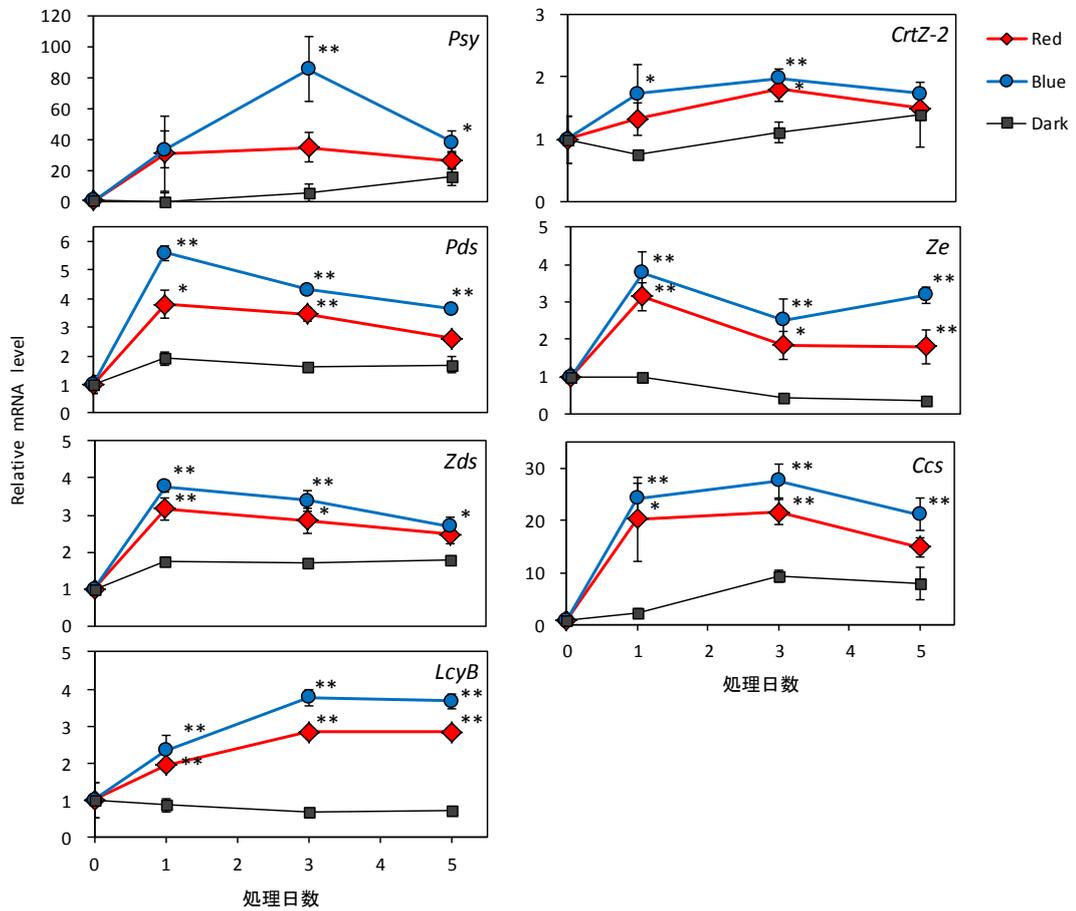
*Psy* : Phytoene synthase, *Pds* : Phytoene desaturase, *Zds* : ζ-carotene desaturase,  
*LcyB* : Lycopene β-cyclase, *LcyE* : Lycopene ε-cyclase, *CrtZ-2* : β-carotene hydroxylase, *Ze* : Zeaxanthin epoxidase,  
*Vde* : Violaxanthin de-epoxidase, *Ccs* : Capsanthin/capsorubin synthase, *Lut1* : Carotene ε-monoxygenase.



第9図 光源に用いたLEDライトの波長分布

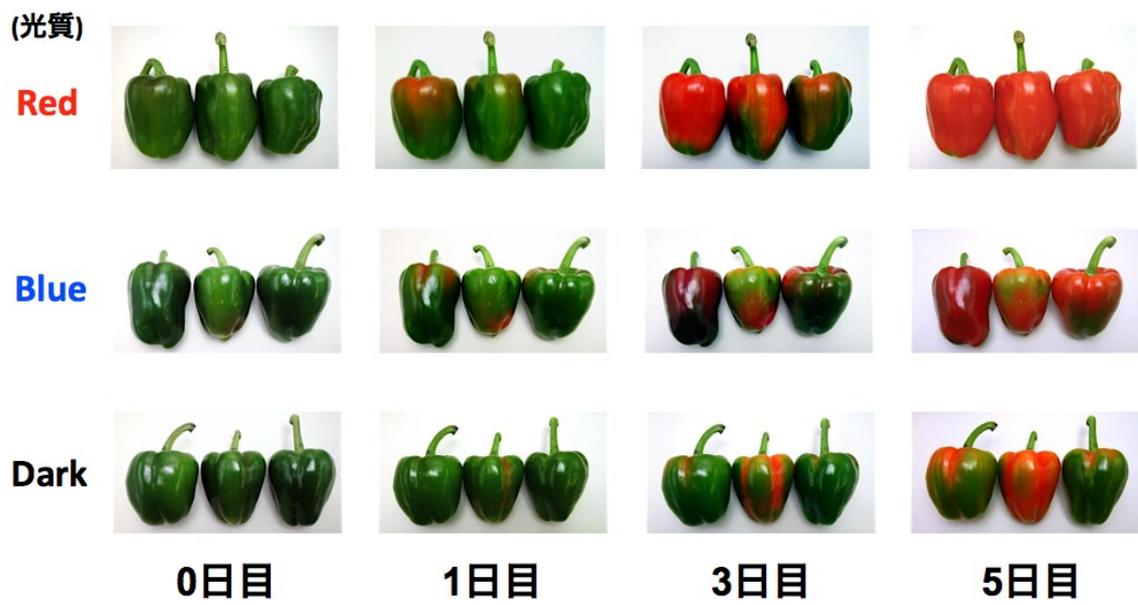
第1表 リアルタイムPCRに供したプライマー

Name	Accession number	Left primer (5' to 3')	Right primer (5' to 3')
<i>Psy</i>	X68017	GCAGGTCTATCCGACGAAGA	GAAGATTCTCCATTTATCGGTCA
<i>Pds</i>	X68058	GCTGGTGACTACACGAAACAGA	TCCTGATAAGACAGCACCTTCC
<i>Zds</i>	X89897	AGAGGGTCCGCTGGATT	GTCACTAACCGGTTGACAAA
<i>LcyB</i>	X86221	CCCCGGGTATCAAGTAGCTTA	ACATCAAAGGGTGCTCTTC
<i>CrtZ-2</i>	Y09225	CGAGCTGAACGATATTTTTGC	ATGGTTGAAACCGAATGAAAA
<i>Ze</i>	X91491	GCAGTGGTATGCATTTACAAT	CCTTTTTACCGTTTGGAGCA
<i>Ccs</i>	X77289	AGTGCACTGTCCCCTTGGT	TAATTCAAAGGCTCTCTATTGCTAGAT
18S	AF206999	AATTGTTGGTCTTCAACGAGGAA	AAAGGCAGGGACGTAGCAA



第10図 異なる波長の光照射が催色期のカラーピーマン果実のカロテノイド合成関連遺伝子発現へおよぼす影響

\*, \*\*: Dunnettの多重検定で5%水準, 1%水準で有意差があることを示す.



第11図 異なる波長の光照射が催色期のカラーピーマン果実の着色へおよぼす影響

## 第II章 催色期のカラーピーマン果実に対する効率的な光照射追熟方法の検討

### 第1節 異なる光強度による光照射処理が果実の着色とカロテノイド含量におよぼす影響

#### 1. 背景および目的

第I章では、催色期のカラーピーマン果実に  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  程度の光照射を5日間行うことで着色を促進できることを明らかとした。さらに、特定の波長による着色促進効果がみられなかったことから、使用する光源は入手が容易な蛍光灯でよいことを示した。

宮城県農業・園芸総合研究所付近（宮城県名取市）における標準的な半促成作型での栽培終了時には全収量の約2割の未熟果実が残る（データ略）。その残果の7割が催色期の果実であることから、光照射を用いた着色処理によって総収量の約14%分が新たに出荷可能になるものと期待される。

そこで、生産現場での光照射による着色技術の導入を想定し、収穫後のカラーピーマンの着色を促進させるために必要な光強度、温度、さらにそれらを組合せた条件について調査し、効率的に着色させる技術の検討を行った。

#### 2. 材料

宮城県栗原市にある農業生産法人の園芸施設で、養液栽培したカラーピーマン赤色品種‘スペシャル’（ENZA）の果実を試験に用いた。果実の極一部（5%以内）が着色しはじめた催色期の果実（おおよそ開花後50日程度）を収穫し、試験に用いた。なお、試験に用いた果実は、2012年および2013年の10月から翌年3月までの低温期に収穫した。

#### 3. 方法

第I章と同様に、カラーピーマン果実に対して、インキュベータ内（BIOTRON LPH200, NK system）で  $20^{\circ}\text{C}$  の温度条件で、光照射および暗黒処理を行った。処理

する果実の収穫ステージは、第 I 章と同様に催色期（果実表面が 5%程度着色したもの）に統一した。光照射は、光量子束密度が  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、および  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の光を連続照射した。なお、前章で特定の波長の光照射による着色促進効果が確認されなかったことから、光源には昼白色の蛍光灯を用いた。下面以外の 5 方面から連続照射した（上面 Panasonic FL15SS・ENW 4 本、側面（扉側） Panasonic FL20SS・ENW4 本、側面 Panasonic FL40SS・ENW4 本）。また、対照として暗黒処理区を設けた。光照射、暗黒処理を行う際は、果実の乾燥を防ぐために果実をポリエチレン袋（大きさ  $260\times 380 \text{ mm}$ 、厚さ  $0.03 \text{ mm}$ ）に折り込み包装した。袋の折り込み面積は袋の半分程度とし、フィルムが重なる折り込み部は下面となるよう設置した。1~2 日間隔で袋から取り出し、果実の着色状況を確認した後、再包装した。

各処理における果実の着色具合を評価するために、色彩色差計 (CR-200, KONICA MINOLTA) を用いて、a 値（値が大きいほど赤みが増す）の値を求めた。1 果実につき、上、中、下部の各 4 箇所、合わせて 12 箇所を測定し、その平均値を調査値とした。各処理区は 1 反復あたり 3 果実を供試し、3 反復の調査をした。

果実のカロテノイド類の分析は、フォトダイオードアレー検出器付き HPLC（ポンプ：L-2130, 日立, 検出器：L-2455, 日立）を用い、絶対検量線法によって行った。はじめに、試料 2 g をアセトン/ヘキサン混合溶液（アセトン/ヘキサン = 4/6）中でホモジナイズした後、この遠心上清を濃縮乾固した。次にこの抽出物を上記のアセトン/ヘキサン混合溶液 2 mL に定溶し HPLC 分析に供した。各分析対象化合物の同定は、標準品と保持時間および UV/VIS 吸収を比較することにより行ない、化合物の濃度は、化合物ごとに波長を定め、検出されたピークの面積を用いて、検量線により求めた。以下、分析対象化合物と定量に用いた波長を示す。 $\beta$ -カロテン (452 nm),  $\beta$ -クリプトキサンチン (452 nm), ゼアキサンチン (452 nm), ビオラキサンチン (439 nm), カプサンチン (474 nm)。HPLC 分析条件は以下のとおり、分析カラム: YMC Carotenoid, 4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, 移動相 A: メタノール, 移動相 B: メタノール/*tert*-ブチルメチルエーテル/水 = 8/90/3, グラジエント条件（移動相 A に

対する移動相 B の割合, %) : 1% (0分) -10% (10分) -30% (20分) -100% (30分-35分) -1% (40-45分), フォトダイオードアレー検出範囲: 200-600 nm, 流速 1.0 mL/min. 各処理区は 1 反復あたり 3 果実を供試し, 3 反復の調査をした.

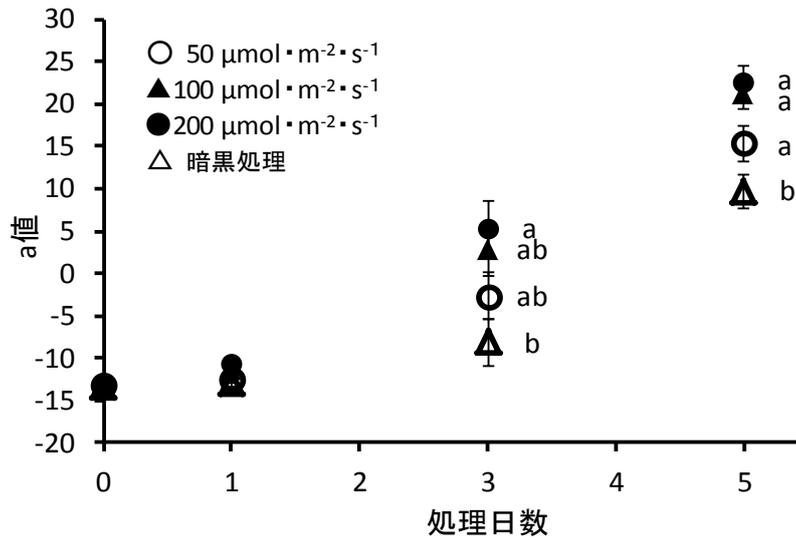
#### 4. 結果および考察

催色期のカラーピーマン果実に対し, 20°Cの温度条件で,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , および  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の異なる強度の光を連続して 5 日間照射した. また, それら果実と光照射処理をしない区 (暗黒処理区) の果実の果皮色 (a 値) を調査した. その結果, 暗黒処理区に比べ,  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の光を照射した区では, 照射後 3 日目で a 値に有意な差が生じ, 照射 5 日目では  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の光を照射した区と暗黒処理区で a 値に有意な差が確認された (第 12 図). このことから,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  以上の光照射によって果皮の着色が促進されることが確認された. また,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の強度の光を 5 日間光照射した果実と樹上完熟果を比較すると, 果皮色に差があることも確認された (第 2 表).

次に, 各処理果実のカロテノイド含有量を調査した (第 2 表). その結果,  $\beta$ -カロテン, ビオラキサンチン, カプサンチンに関しては,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の光照射をした果実で, 5%以下着色果や暗黒処理区よりも有意に含有量が増加していた. 特に果実中の含有量が多い  $\beta$ -カロテンおよびカプサンチンの傾向からも, カラーピーマンは光照射により果実内のカロテノイド含有量が増加し, 着色が促進されていることが示された. また, 光強度が  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  よりも高い  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の光を照射した方が  $\beta$ -カロテンやカプサンチンの含有量が多く, 樹上完熟果の含有量とも有意な差はみられない結果となった.

収穫した催色期のカラーピーマンに  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の光を照射した結果, 着色促進効果が確認された (第 12 図). また, カロテノイド含量では, 果実に照射する光量子束密度が高い方が処理 5 日後の果実内に含まれるカプサンチンや  $\beta$ -カロテン含量等が増加した (第 2 表). 栽培中のカラーピ

ーマンにおいても、カロテノイド含量は果実の成熟期間中に太陽光が当たっていた果実の方が、光を遮っていたものよりもカロテノイド含量が高いという同様の報告もある (Lopez ら, 1986). 本試験の結果からも、カラーピーマン果実の着色は、光強度依存的に促進されることが示された.



第12図 異なる光強度による光照射処理が果皮のa値におよぼす影響

光照射は20°Cで催色期の果実に対して行った

図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準の有意差があることを示す (n=3)

第2表 光照射処理や暗黒処理がカラーピーマンの各カロテノイド含量におよぼす影響

処理区	果皮色	カロテノイド含量 (mg/kg)				
	a値	β-カロテン	β-クリプトキサンチン	ゼアキサントキサンチン	ビオラキサントキサンチン	カプサンチン
50μ molm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	15.9b	2.5c	0.7c	3.77a	N.D.	4.7bc
100μ molm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	20.9b	7.6b	1.1bc	2.25b	1.3a	9.8a
200μ molm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	24.8ab	17.8a	2.2a	3.34a	1.5a	9.2ab
暗黒処理	9.3c	1.4c	0.7bc	3.43a	0.8b	3.4c
催色期の果実	-13.3d	1.3c	N.D.	5.1a	0.6b	0.5c
樹上完熟果	30.2a	11.8ab	1.3b	2.4b	0.4b	13.3a

光照射は20°Cで催色期の果実に対して5日間行った。

催色期の果実と樹上完熟果はサンプリング後すぐに分析した。

図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準で有意差があることを示す。(n = 3)

N.D.は否検出を示す。

## 第2節 異なる温度条件下での光照射処理が果実の着色とカロテノイド含量におよぼす影響

### 1. 背景および目的

第 I 章において、光を照射していない場合のカラーピーマン果実の着色には 10°C以上の温度が必要であり、20°C~25°Cが効果的な温度域であることを示した。さらに前節において、50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 以上の光照射によって果実の着色が促進されることを確認した。そこで、効率的な光照射追熟方法の検討を行うためには光を照射した場合の効果的な温度域を確かめる必要がある。そこで、異なる温度条件下での光照射処理が果実の着色とカロテノイド含量におよぼす影響を調査した。

### 2. 方法

カラーピーマン果実に対して、第 1 節で用いたインキュベート内で様々な処理温度で光照射を 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で行い、温度の影響を調査した。処理温度は、10°C、15°C、20°C、25°C、および 30°Cの 5 水準を設定した。第 1 節と同様に処理中の果実は乾燥を防ぐためにポリエチレン袋で折りこみ包装した。また、照射後の着色およびカロテノイド含量の調査は第 1 節と同様の方法で評価した。各処理区は 1 反復あたり 3 果実を供試し、3 反復の調査をした。

### 3. 結果および考察

光照射は 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の強度で行い、処理中の温度をそれぞれ 10°C、15°C、20°C、25°Cおよび 30°Cに設定し、果実の着色および $\beta$ カロテン、カプサンチンの含有量に及ぼす影響を調査した。その結果、25°Cで光照射処理した時の a 値が他条件に比べて高く、20°Cで光照射処理した区とは有意な差がみられなかったものの、15°C、30°Cで光照射処理した区とは有意な差が確認された（第 3 表）。カロテノイド含有量を調査したところ、カプサンチンが 20°C、25°Cで有意に高くなることが明らかとなった。また、30°Cの条件では $\beta$ -カロテン含量が 20°Cや 25°Cで処理した果実より高く、30°Cで処理した果実の外観が橙色に近い色となった要因であると考

えられた。

光照射中の着色が強く促進される温度条件は、20°C~25°Cであった（第3表）。15°Cの温度条件でも着色は確認されたが、催色期の果実を可販果レベルの着色とするためには、7日程度の処理が求められる。また、30°Cで処理した場合は、βカロテン含量が高まり橙色に着色する果実が多い結果となったが、トマトでも30°C以上の高温ではリコペン含量が低くなるとともにβカロテン含量が高まることが報告されている（Hamauzuら, 1998）。第I章で、カラーピーマン果実の着色には10°C以上の温度が必要であり、20°C~25°Cが効果的な温度域であるとされており、光を照射した場合でも同様の結果となった。

第3表 光照射時の温度条件がカラーピーマンの着色とカロテノイド含量におよぼす影響

処理区	果皮色	カロテノイド含量(mg/kg)	
	a値	β -カロテン	カプサンチン
10°C	-7.3c	1.2c	1.1d
15°C	12.2b	5.4b	7.2c
20°C	20.9ab	7.6b	9.8b
25°C	28.8a	5.9b	15.6a
30°C	15.4b	11.5a	7.3c

光照射処理は各処理温度で、催色期の果実に対して $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光強度で5日間行った。図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準で有意差があることを示す。(n = 3)

### 第3節 光照射後の暗黒処理が果実の着色およびカロテノイド含有量におよぼす影響

#### 1. 背景および目的

これまでに光照射処理によりカラーピーマン果実の着色が促進されること、そして、処理の最適な温度帯を示してきた。一方で、50%以上の着色ステージの果実では、暗黒条件下であっても温度が20°C程度に保持されていれば、着色が進むことも確認されている（河野，2002）。そこで、光照射処理によってどの程度まで着色を進めれば、暗黒条件でも可販できる着色果となるかを明らかにすることを目的として試験を行った。

#### 2. 方法

第1節と同様の方法で、20°C、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の強度で光照射を行い、目視で判断した異なる着色具合（30%、50%、70%、90%）に達した時点で暗黒処理に移行した場合に、着色が継続されるかを調査した。また、15°C、20°Cおよび25°Cで同様の処理を行った場合についても調査した。光照射中の果実の処理方法、照射後の着色およびカロテノイド含量の調査は第1節と同様の方法で行った。各処理区は1反復あたり3果実を供試し、3反復の調査をした。

#### 3. 結果および考察

20°Cで100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光照射によってそれぞれ30%、50%、70%、90%の着色割合まで着色させた果実を20°Cの暗黒条件に移し、a値の推移を調査した結果、50%以上着色した果実は、20°Cの暗黒条件でも着色が進み続け、3~4日程度で可販レベルの着色具合となった（第4表）。30%程度着色した果実も暗黒条件でも着色は進んだが、暗黒処理4日後でa値が20で、全体的に薄赤色の果実となった。

次に、15°C、20°C、25°Cの異なる温度条件で100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光照射をそれぞれ3~5日間行い、50%程度着色させた後、それぞれ同じ温度で暗黒処理を4日

間行った結果、いずれの果実も a 値が 25 を超え、可販果レベルの果実の色合いになったと判断した（第 5 表）。また、25℃処理時のカプサンチン含有量が、15℃、20℃処理に比べ有意に高い結果となり、色合いも鮮やかであった。

光照射で着色促進させる技術をより効率的に生産現場に導入するためには光照射のための場所の確保や照射時間の短縮化が求められる。第 4 表の結果より、光照射で 50%以上着色させることができれば、暗黒条件でも温度を 20℃に保持することで、4 日程で可販果となることが示された。着色に適した温度を管理できれば、光照射で着色を誘導させた後、暗黒条件下でも数日間はカプサンチン等のカロテノイドが合成され、着色も促進されるものと考えられた。

第4表 光照射で着色した果実の暗黒下(20°C)での果皮色の変化

暗黒処理開始時の着色割合 <sup>z</sup>	2~4日間光照射後に暗黒処理した果実の果皮色 (a値)				
	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
30%	4.0c	11.7c	14.0b	16.4b	20.3b
50%	10.4b	20.0b	23.5a	24.7a	26.1a
70%	19.2a	22.4b	25.8a	28.1a	28.4a
90%	25.6a	29.0a	29.3a	30.1a	29.4a

<sup>z</sup> 催色期の果実に対し、20°Cで100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の強度で光照射し、着色させた割合。  
 図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準で有意差があることを示す。(n = 3)

第5表 光照射後の暗黒処理により着色させた果実の果皮色とカプサンチン含量

処理区			果皮色	カロテノイド含量 (mg·kg <sup>-1</sup> )	
光照射 (日数)	暗黒処理 (日)	温度 (°C)	a値	β -カロテン	カプサンチン
5	4	15	25.9	3.3 a	6.4 b
3	4	20	26.1	4.8 a	6.0 b
3	4	25	30.2	2.4 a	10.3 a

光照射は各処理温度で、100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>の光強度で催色期の果実に対して行い、50%程度着色させた後に暗黒処理した。

図中の異なる英小文字間にはTukey法により5%水準で有意差があることを示す。(n = 3)

## 第4節 光照射および暗黒処理中の温度が果実の重量減少率におよぼす影響

### 1. 背景および目的

処理中の果実を包むビニール袋内を観察すると、光照射中の温度が高くなるにつれ、水滴が多く発生し、光照射処理に比べ、暗黒処理時は、水滴が少ないという現象が確認された。水滴の量は果実からの水分蒸散の量に比例すると考えられ、蒸散が多く果実重量が減少すると、品質低下の原因となる。そのため、品質保持の観点からも着色処理方法の検討が必要であることから、処理中の果実重量減少率の推移を調査し、処理の温度や光照射処理と暗黒処理の組合せの中で、効果的な処理方法の検討を行った。

### 2. 方法

第1～3節で有効と考えられた処理を行った後、重量減少率（果実をサンプリングした直後に測定した重量に対して減少した重量の割合）を調査した。各処理区は1反復あたり3果実を供試し、3反復の調査をした。

### 3. 結果および考察

可販果レベルの色合いの目安である果皮のa値が25を超えるためには、光を照射し続けた場合、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の光照射を15°Cでは7日間、20°Cでは6日間、25°Cでは4日間照射する必要があるため（データ略）、それら果実と光照射と暗黒処理を組み合わせた果実の比較を行った（第6表）。まず、15°Cで7日間連続光照射し続けて着色させた場合は、2.5%の果実重量の減少となり、5日間の光照射と4日間の暗黒処理を行った結果、1.5%の果実重量の減少となった。20°Cで6日間連続光照射して着色させた場合は、2.3%の果実重量の減少であった。20°Cで3日間の光照射と4日間の暗黒処理を組み合わせた場合は、1.7%の果実重量の減少となった。また、25°Cで連続光照射して着色させた場合は、4日で4.6%の果実重量の減少となった。一方、25°Cで光照射と暗黒処理を組み合わせた場合、3日間の光照射後に暗黒処理を4日間した結果、3.2%の果実重量の減少となった。これら

の結果より、温度条件によって果実重量の減少率で有意差が確認された。また、光照射処理と暗黒処理を組み合わせた場合の方が果実重量の減少率が低いことが確認された。

第1節から第3節の結果より、光照射による着色促進を行うのに適した温度域は、15℃から25℃であるが、処理後の果実重量を調査すると、25℃では蒸散量が多くなる（第6表）。25℃で光照射することで催色期の果実は3日～4日程度で可販レベルの着色となるが、果実重量が平均で3%以上減少してしまい、軟化した果実も確認された。本試験では、インキュベータを用いたため、安定した温度条件での処理が可能であったが、生産現場で光照射を行う場合には、光源からの発熱の影響などにより、処理場を25℃に設定しても果実近辺の温度が25℃を超えてしまうことも考えられる。そのため、本技術を生産現場で用いる際は、15℃～20℃の温度設定で光照射を行うことが望ましいと考えられた。

収穫後のカラーピーマンに光照射して着色を促進させる技術によって、主に晩秋期に発生する未熟果の出荷が可能となる。平成26年に宮城県名取市の当研究所内の小規模パイプハウスで、夏秋作型で栽培したカラーピーマンの可販収量に対し、栽培終了時に発生した催色期のカラーピーマンの割合は、平均で14%であった（1区当たり5株、3反復で調査した）。このうち、約90%の果実は光照射によって可販できる果実となったため、全体としては12.6%程度可販収量が増加した。今後増加すると考えられる大規模園芸施設においては、膨大な量の催色期のカラーピーマンが栽培終了時に発生するため、光照射する場所や設備に関する検討や、本研究で見出したような光照射方法の効率化は必須であると考えられる。引き続き、着色に必要な最低限の光量や着色に効果的な光波長に関する研究を続けていく必要がある。

第6表 異なる温度条件下における処理方法の違いが  
果実重量減少率におよぼす影響

温度(°C)	処理区		重量減少率(%)
	処理方法		
	光照射(日)	暗黒処理	
15	7	無	2.5
	5	有	1.5
20	6	無	2.3
	3	有	1.7
25	4	無	4.6
	3	有	3.2
分散分析	処理温度		**
	暗黒処理の有無		*
	相互作用		ns

光照射は $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光強度で催色期の果実に対して行った。  
暗黒処理有りのものは、光照射後に同じ温度で4日間暗黒下に保管した。  
重量減少率は逆正弦変換後、二元配置の分散分析により各要因で、  
\*\*は1%、\*は5%水準で有意差あり、nsは有意差無しを示す。(n = 3)

## 摘要

### 第 I 章

催色期のカラーピーマン果実の着色促進について、温度、植物ホルモンおよび光照射の影響について調査を行った。その結果、処理温度は 20~25°C 程度が適温であったが、温度だけでは着色促進効果は少なく、薄赤色の果実となった。また、10°C の低温と 30°C 以上の高温でクロロフィルの減少が抑制され、30°C 以上の高温ではクロロフィルの緑色と色素の赤色が混在する黒っぽい暗赤色の果実となった。植物ホルモン処理は、エチレンとジャスモン酸メチルの単独処理では着色促進効果がみられなかったが、両方を同時に処理すると色価が増加する傾向がみられた。しかし、その場合でも色価の増加は少なく、薄赤色となり、これらの植物ホルモン処理による追熟効果は期待できなかった。一方、20°C で蛍光灯を用いて光照射を行ったところ、照射時間および照射強度が高まるほど、色価量が増加し着色促進効果が認められた。また、光質の異なる赤色光および青色光の光照射処理においても、同様に光強度依存的に着色し、カロテノイド生合成経路の主要な遺伝子である *Psy* および *Ces* の発現誘導が見られた。これらのことから、カラーピーマンの着色には、温度とともに光条件が大きく関与することが明らかとなった。

### 第 II 章

催色期のカラーピーマン果実に光照射することで、着色が促進されることから、効率的な着色促進方法の検討を行った。光強度に関しては、50~200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の強度では着色速度に差が確認されなかったが、光強度が高い方が赤色カラーピーマンの着色に関わるカロテノイド含量が高い傾向が確認され、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  程度の光強度が最適と判断された。光照射処理中の温度に関しては、15°C~25°C が適当と考えられた。しかし、25°C での処理では果実の蒸散量が増え、萎れの発生がみられたことから、15°C~20°C での処理が適当と考えられた。また、光照射によって 50% 以上着色した果実は、その後暗黒下に移動しても 15°C 以上の温度で継続着色することが確認され、光照射時間が短縮できると考えられた。20°C の条件であれば催

色期の果実に対して3日間の光照射、4日間の暗黒処理で可販可能な着色具合となり、光照射時間を2日間ほど短縮することができることから、処理の効率化の可能性が示された。

## 引用文献

- Bouvier, F., R. A. Backhaus and B. Camara. 1998. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 273:30651-30659.
- Bramely, P.M.2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp.Bot.* 53: 2107-2013.
- Deli, J., P. Molnar, Z. Matus and G. Toth. 2001. Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rebrum*) during ripening: biosynthesis of carotenoids in red paprika. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1517-1523.
- Fraser, P. D., M. R. Truesdale, C. R. Bird, W. Schuch and P. M. Bramley. 1994. Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant J.* 105 (1) : 405-413.
- 合田幸広・中西俊元・坂元史歩・佐藤恭子・米谷民雄・山田隆. 1996. HPLC による市販パプリカ（トウガラシ）色素中の色素成分の分析. *食衛誌.* 37: 20-28.
- 浜渦康範・宮本裕子・茶珍和雄. 1994. 収穫後のトマト果実におけるカロチノイド色素の消長に及ぼす高温の影響. *園学雑.* 63(3) : 635-684.
- Hamauzu, Y., K. Chachin, Y. Ueda. 1998. Effect of postharvest storage temperature on the conversion of <sup>14</sup>C-mevalonic acid to carotenes in tomato fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 549-555.
- Hornero-Mendez, D., R. G.-L. de Guevara and M. I. Mnguez-Mosquera. 2000. Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *J. Agric.Food Chem.* 48: 3857-3864.
- 今堀義洋. 2007. 果実・野菜の成熟および老化とアスコルビン酸ーグルタチオンサイクル. *園学研.* 6:169-175.
- 河野靖司. 2002. パプリカ類の追熟方法. 特許公開 2002-238450.
- Liu,L., J. Wei, M. Zhang, L. Zhang, C. Li and Q. Wang. 2012. Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruits by jasmonates. *J. Exp. Bot.* 63:

5751-5761.

- Linting, J. von, R. Welsch, M. Bonk, G. Giuliano, A. Batschauer and H. Kleinig. 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.* 12: 625-634.
- Lopez. M., M. E. Candela and F. Sabater. 1986. Carotenoids from *Capsicum annuum* fruits: Influence of spectral quality of radiation. *Biol. Plant.* 28: 100-104.
- Lucille. A and G. Don. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Botany.* 53: 2039-2055
- Matsumoto, H., Y. Ikoma, M. Kato, N. Nakajima and Y. Hasegawa. 2009. Effect of postharvest temperature and ethylene on carotenoid accumulation in the flavedo and juice sacs of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 57: 4724-4732.
- Minguez-Mosquera, M. I. and D. Hornero-Mendez. 1993. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reverse-phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1616-1620.
- 元木 悟・湯本悦子・小澤智美・小松和彦・塚田元尚. 2001. いわゆる完熟型ピーマン（カラーピーマン）の特性について. *園学雑.* 70（別1）：242
- 永田雅靖・山下市二. 1992. トマト果実に含まれるクロロフィル，カロテノイドの同時，簡便定量法. *日本食品工業学会誌*, 39:925-928.
- 中條利明. 1982. 富有カキ果実の発育ならびに品質におよぼす温度条件に関する研究. *香川大農学紀要.* 37. 1-63.
- Nishiyama.Y, I.S.Allakhverdiev and N.Murata. 2011. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol. Plant.* 142: 35-46
- Nishiyama.Y, I.S.Allakhverdiev and N.Murata. 2006. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et*

Biophysica Acta. 1757: 742-749

農 林 水 産 省 .2010. 地 域 特 産 野 菜 生 産 状 況 調 査 .

〈[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan\\_yasai/](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_yasai/)〉 .

Russo.V and L.Howard. 2002. Carotenoids in pungent and non-pungent peppers at various developmental stages grown in the field and glasshouse. J.Sci.Food.Agric. 82: 615-624.

Sisler, E.C. and S.F.Yang. 1984. Anti-ethylene effects of cis-2-butene and cyclic olefins. Phytochemistry 23: 2765-2768.

Suzuki, Y., Kawazu, T. and Koyama, H. 2004. RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of Arabidopsis thaliana. BioTechniques 37: 542-544.

Suzuki,Y., Ohkubo,M., Hatakeyama,H., Ohashi,K., Yoshizawa,R., Kojima,S., et al. 2007. Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with the ‘sense’. rbcS gene. Plant Cell Physiol. 48:626-637.

食 品 添 加 物 公 定 書 ( 第 8 版 ) 一 般 試 験 法 .p21-22.

〈[http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoushokuhin/syokuten/dl/8e01.pdf](http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuten/dl/8e01.pdf)〉 .

Terai,H., T. Nagatomo and Y. Suzuki. 2003. Plastid morphogenesis during ripening in sweet pepper fruit. Journal of Electron Microscopy Technology for Medicine and Biology. 17: 93-100.

渡辺慶一. 2003. ピーマン果実の色素組成および着色に及ぼす生長調節物質の影響. 園学雑. 72 (別1) : 240

Watanabe, K., T. Kamo, F. Nishikawa and H. Hyodo. 2000. Effect of methyl jasmonate on senescence of broccoli florets. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69: 605-610.

## 発表原著論文

### 第 I 章

吉田千恵・高橋正明・岩崎泰永・古野伸典・松永啓・永田雅靖. 2014. 催色期に収穫したカラーピーマン果実の着色促進に関する要因について. 園学研. 13 : 155-160.

### 第 II 章

Masaaki Takahashi, Chie Yoshida and Toshikazu Komoda. 2017. Establishing an Efficient Fruit Ripening Method for Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) through Light Irradiation and Dark Processing. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 2017/06/10 doi: 10.2503/hortj.OKD-076.

## 参考文献

永田雅靖・吉田千恵・松永啓. 2015. 収穫したカラーピーマン果実に対する光照射に伴うカロテノイド生合成関連遺伝子の発現変化. 園学研. 14 : 391-396.

## 謝辞

博士論文をまとめるにあたり、ご指導いただきました東北大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 植物機能科学講座 植物栄養生理学分野 教授 牧野周 博士, 同准教授 石田宏幸 博士, 前同助教 鈴木雄二 博士に深く感謝いたします。菅野圭一 博士をはじめ植物栄養生理学研究室の皆様にも深く感謝いたします。

本論文のご校閲を賜り多くのご助言を下された同講座 植物細胞生化学分野 准教授 早川俊彦 博士ならびに資源生物科学専攻 植物生産科学講座 園芸学 分野 教授 金山喜則 博士に厚く感謝いたします。

本研究の実施にあたりご助言、ご協力いただきました農業・園芸総合研究所 高橋正明 博士, 東北大学大学院生命科学研究所 生態システム生命科学専攻 環境遺伝生態学講座 准教授 日出間純 博士, 宮城大学 食産業学部 准教授 菰田俊一 博士, 農研機構 野菜花き研究部門 野菜生産システム研究領域 生産工学ユニット 岩崎泰永 博士, 野菜育種・ゲノム研究領域 ナス科ユニット 松永啓氏に深く感謝いたします。

本試験の実施にあたって材料を提供していただきました株式会社ベジ・ドリーム 栗原の社員の皆様にも深く感謝いたします。また、研究期間中のほ場管理や実験補助に尽力いただいた農業・園芸総合研究所の職員および臨時職員の方々に厚く感謝いたします。