

■原 著■

ピーマン果実の成熟に伴う色素変化と有色体の超微形態形成

吉田正幸¹ 早津 学^{1,2} 鈴木季直^{1,2,3}

Pigment Changes and Ultrastructural Morphogenesis of Chromoplasts during Fruit Ripening of Pimentos

Masayuki Yoshida¹, Manabu Hayatsu^{1,2}, and Suechika Suzuki^{1,2,3}

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The correlative change of pigments with chromoplast morphogenesis in the pericarp of yellow and red pimentos during fruit ripening was examined by pigment spectrophotometry and electronmicroscopy. The metamorphosis of plastids, chloroplasts to chromoplasts, occurred with the decrease of chlorophyll contents and the appearance of newly synthesized carotenoids, chloroxanthin in yellow pimentos and possibly capsanthin and/or capsorubin in red pimentos. As ripening proceeded, in plastids, plastoglobuli increased in both number and size, in contrast with the degradation of grana-stack and the fragmentation of stromal thylakoids. The plastids of yellow-ripe fruit pericarps contained exclusively plastoglobuli of various sizes at the center of stroma, indicating G (globular)-type chromoplasts, while the plastids of red-ripe fruit pericarps included a few enlarged plastoglobuli and electron-dense inclusions of various configurations, which possibly transformed from plastoglobuli to finally form needle-shaped carotenoid crystalloids. They were determined as an intermediate-type between G-type and F (filament)-type chromoplasts, and it was reconfirmed that, during chromoplast maturation, needle-shaped carotenoid crystalloids are formed by the elongation of enlarged plastoglobuli, concomitant with the increase of carotenoid contents.

Keywords: fruit ripening of pimentos, chlorophyll, carotenoid, pericarp plastid, chromoplast morphogenesis

序論

多くの果実は成熟に伴い果色が変化する。この色変化の原因は主に果皮細胞内の色素成分変化によるものであり、その色素成分変化には色素体の微細構造変化が伴うと考えられている¹⁻³⁾。成熟に伴う果皮の色素成分変化および色素体の微細構造変化については、トマト *Lycopersicon esculentum* Mill.^{4,5)} やトウガラシ *Capsicum annuum* L. var. *annuum*⁶⁻⁸⁾ などで研究されており、近年では、成熟に伴うクロフィル分解や各種カロチノイド合成の分子調節機構も明らかにされつつある⁹⁾。

有色体に含まれるカロチノイドは、ストロマ中で顆粒、繊維状結晶様体、針状または平板状の結晶などの形をなし、これらの特徴を示す有色体はそれぞ

れGタイプ(globular type)、Fタイプ(filament type)、Cタイプ(crystalline type)として区別されている¹⁾。特に、トウガラシでは、黄色成熟果実にはGタイプの有色体、赤色成熟果実にはFタイプの有色体が含まれることが知られており⁶⁻⁸⁾、また、赤色果までの成熟段階で黄色を含む多様な色変化を示す五色トウガラシでは色素成分の変化に伴いGタイプの有色体はFタイプの有色体に変化することが報告されている⁸⁾。シシトウガラシの栽培変種であるピーマンの果実にも成熟すると果皮が黄色になるものと赤色になるものがある。本研究では、ピーマンの黄色系果実と赤色系果実の成熟過程をそれぞれ3段階に分け、成熟に伴う色素成分変化および色素体の微細構



図 1. 成熟中のピーマン果実. A. 黄色系ピーマン. 果色は黄緑色から成熟期の黄色へと変化しつつある. B. 赤色系ピーマン. 成熟中の果実で、緑色部と赤色部の境界に橙色部が見られる.

造変化を観察し、既知のトウガラシ果皮有色体に関する知見と比較検討した。

クロロフィルの抽出と定量

各段階の果皮と緑葉から摘出した試料の湿重量(0.1～0.5 g)を測定して乳鉢に入れ、摩砕液酸性化防止のための炭酸カルシウム(0.1 g)と石英砂を加え、適時90%アセトンを0.5 ml ずつ加えながら摩砕した。摩砕液を遠心管(IWAKI2325-015/15 ml)に移し、遠心機(TOMY LT-015)を使い850 gで10分間遠心した。上清を遠心管からメスフラスコに回収し、遠心管に残った沈殿にはさらに90%アセトンを加え、懸濁し、再度遠心した。この操作を二度繰り返し、回収した上清(抽出液)の全量をメスフラスコで測定した。

分光光度計(JASCO-V630)を用い、波長400～700 nm (0.5 nm step)の範囲で抽出液の吸光度を測定した。測定された吸光度のうち、663、645、630 nmの値を用い、SCOR-UNESCO(1966)¹⁰⁾により、湿重

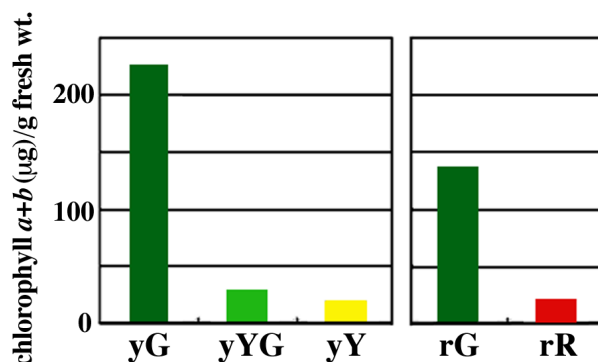


図 2. ピーマン果皮のクロロフィル量. 黄色系(yG, yYG, yY)および赤色系(rG, rR)の両方で、成熟に伴いクロロフィル量は激減している. yG:黄色系緑色期, yYG:黄色系黄緑色期, yY:黄色系黄色期, rG:赤色系緑色期, rR:赤色系赤色期.

量1 gあたりの各クロロフィル量を計算した。

カロチノイドの抽出と定性

各段階の果皮と緑葉から摘出した試料の湿重量(0.1～0.5 g)を測定して乳鉢に入れ、摩砕液酸性化防止のための炭酸カルシウム(0.1 g)と石英砂を加え、適時イソプロパノールを0.5 ml ずつ加えながら摩砕した。摩砕液を、クロロフィル抽出と同じ方法で遠心したが、沈殿の再摩砕ではイソプロパノールの代わりにヘキサン(～3 ml)を用いた。ヘキサンによる摩砕と遠心を二度繰り返し、イソプロパノールとヘキサンによる遠心の上清を同一遠心管内に集め、蒸留水を加えて二層に分離させたものを更に850 gで3分間遠心した。遠心後、上層のヘキサン液を別の遠心管に移し、再度蒸留水を加えた後、上層を別の遠心管に移した。この操作を二度行ない、イソプロパノールを完全に除去し、ヘキサンの抽出液に硫酸ナ

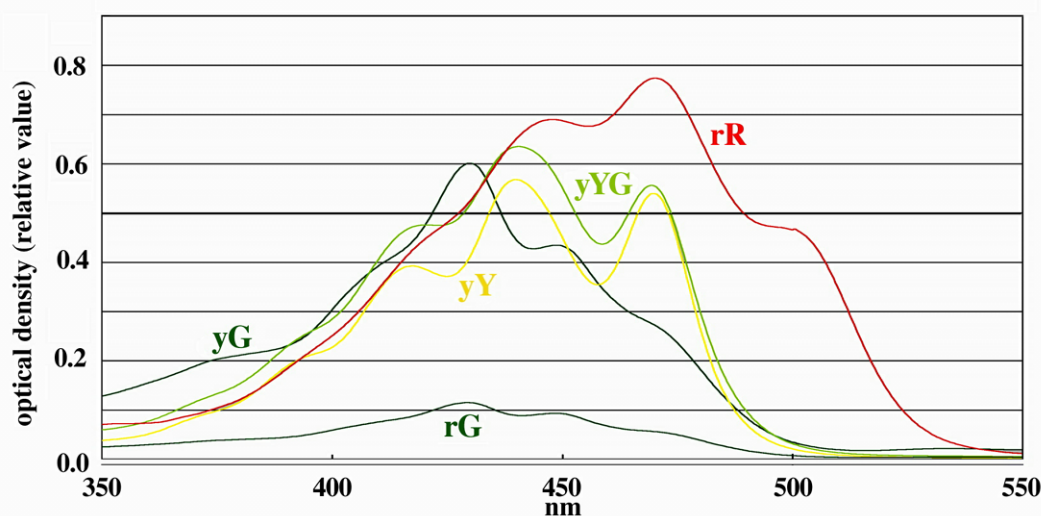


図 3. ピーマン果皮カロチノイドの吸光スペクトル. 各段階のピーマン果実の果皮領域から、ヘキサンでカロチノイドを抽出し、抽出液の吸光度を測定した. yG:黄色系の緑色果実, yYG:黄色系の黄緑色果実, yY:黄色系の黄色果実, rG:赤色系の緑色果実, rR:赤色系の赤色果実.

トリウムを加え、850 gで3分間遠心し、抽出液から水を除去した。

分光光度計(JASCO-V630)を用い、ヘキサンのブランク測定後、波長 250~700 nm (0.5 nm step)の範囲で抽出液の吸光度を測定し、吸光スペクトルのピーク波長に基づく定性¹¹⁾を試みた。

微細構造観察法

成熟各段階の果実の果皮および緑葉から摘出した組織片を 6%グルタルアルデヒド(GA)溶液と 2%四酸化オスミウム(OsO₄)溶液で二重固定し、アセトン系列で脱水した後、樹脂(Quetol 812)に包埋し、40℃で24時間、60℃で24時間加熱して樹脂を重合させた。包埋試料からウルトラミクロトーム(Reichert Ultracut-N)で厚さ 70 nm の超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(JEOL JEM2000EX)で観察した。

結果

果実の成熟に伴う色素変化

黄色系のピーマンでは、緑色の若い果実は成熟に伴い徐々に黄緑色に変化し、完熟時には鮮やかな黄色になる。果色で分けられた3段階のクロロフィル量は、緑色(yG)期では 225.4 µg/g wet.wt.、黄緑色(yYG)期では 30.1 µg/g wet.wt.、黄色(yY)期では 15.4 µg/g wet.wt.であった(図 2)。果色に黄色が認められるようになると共に果皮のクロロフィル量は激減した。赤色系のピーマンでは、クロロフィル量は、緑色果実で 136.6 µg/g wet.wt.であったが、赤色果実では極端に減少しており、14.9 µg/g wet.wt.であった(図 2)。一方、緑色果実のクロロフィル量との比較のために測定された緑葉では、黄色系で 1999.5 µg/g wet.wt.、赤色系で 1584.9 µg/g wet.wt.であり、緑色果皮のおよそ 10 倍量のクロロフィルが含まれていた。

図 3 は、黄色系および赤色系ピーマンの成熟各段階の果皮に含まれるカロチノイドの吸光スペクトル(λ 350-550 nm)を示している。波長 350 から 550 nm の領域におけるスペクトルピークは、黄色系ピーマンの緑色果実では 412、430、449、470 nm であり、最大吸収ピークは 430 nm であった。一方、黄緑色および黄色の果実ではピークは 416、440、470 nm で、440 nm の最大吸収ピーク波長は前段階の緑色果実のそれとは異なっていた。また、最大吸収ピークに続く第二の大きなピークの波長は 470 nm であったが、同波長における緑色果実でのピークと比べると極めて顕著に増大していた。このピーク変化は、果色の黄色化に伴う新たなカロチノイド色素の

合成増加を示唆した。赤色系ピーマンの緑色果実のスペクトルピークは 412、430、449、470 nm で、緑色果実におけるピークと一致していた。一方、赤色果実の吸収スペクトルは、最大吸収波長を 470 nm とする三つのピーク、447、470、500 nm からなり、そのスペクトルパターンは他のものとは著しく異なっており、果実の成熟に伴い、赤色系のカロチノイドが合成されていることを示した。

果実の成熟に伴う果皮色素体の微細構造変化

ピーマン果実の緑色果皮色素体と比較するために、成長緑葉に含まれる色素体の微細構造を観察した(図 4A)。色素体はレンズ状または長楕円体の形状を示し、ストロマ中に多数のストロマチラコイドと良く発達したグラナ、および好オスミウム性のプラスト顆粒やデンプン粒を含む典型的な葉緑体であった(図 4A)。これに対し、黄色系緑色果実の果皮に含まれる色素体は同様の形状と内部構造を示したが、内膜系の発達程度は低く、グラナを構成するチラコイドの重なり数は 1/2 以下であり、両者のクロロフィル量の違いが反映されていた(図 4B)。黄緑色果実の色素体は厚さが増加してレンズ状から膨らんだ楕円体の形状に変化しており、内部のグラナチラコイドの重なりは緑色果実のそれよりやや減少していた(図 4C)。また、プラスト顆粒の数は著しく増加し、一部の顆粒では直径の増加が認められた。一方、この段階では、色素体内に殆どデンプン粒は見られなかった。成熟した黄色果実の果皮では、色素体の形状はおおよそ球状であった。内部の微細構造は典型的な G タイプの有色体¹⁾の特徴を示しており、グラナは消失し、チラコイドは包膜の内側で併走するか、もしくは少数の断片的チラコイドがストロマ内に無秩序に分散分布していた(図 4D)。ストロマ中央部は、増大した多数のプラスト顆粒で占められており、成熟以前の段階で見られた顆粒の電子密度が常に高く一定であったのに対し、低電子密度の顆粒も数多く含まれていた。また、一部の顆粒は押し潰されて、切片像でその断面が楕円や菱形のような形状に変化していた。

赤色系緑色果実の果皮に含まれる色素体の形状と内部構造は、黄色系緑色果実のそれと同じであった(図 5A)。橙色果実の果皮色素体は球に近い形を示し、ストロマ内には数枚のチラコイドからなる痕跡的グラナと少数の断片化したチラコイドが観察された。一方、プラスト顆粒は、黄色系成熟果実果皮の色素体での特徴に良く似ており、ストロマ全体に分散分布していた(図 5B)。成熟した赤色果実では、果皮色素体はほぼ球状であり、内部の微細構造は G タイプ

と F タイプ有色体¹⁾の両方の特徴を示していた。内膜系は完全に消失し、数と大きさは著しく増加したプラスト顆粒がストロマ中央部の殆どを占めており(図 5C)、球状のプラスト顆粒とともにオタマジャクシ形、紡錘形および繊維状の高電子密度構造が観察

された。これらの構造の高倍率観察は、オタマジャクシ形と紡錘形の構造が、それぞれ、球状プラスト顆粒の一ヶ所またはその反対側との二ヶ所から突出して伸長したものであり、繊維状構造はその突出伸長が著しく進んだものであることを示唆した(図 5D)。

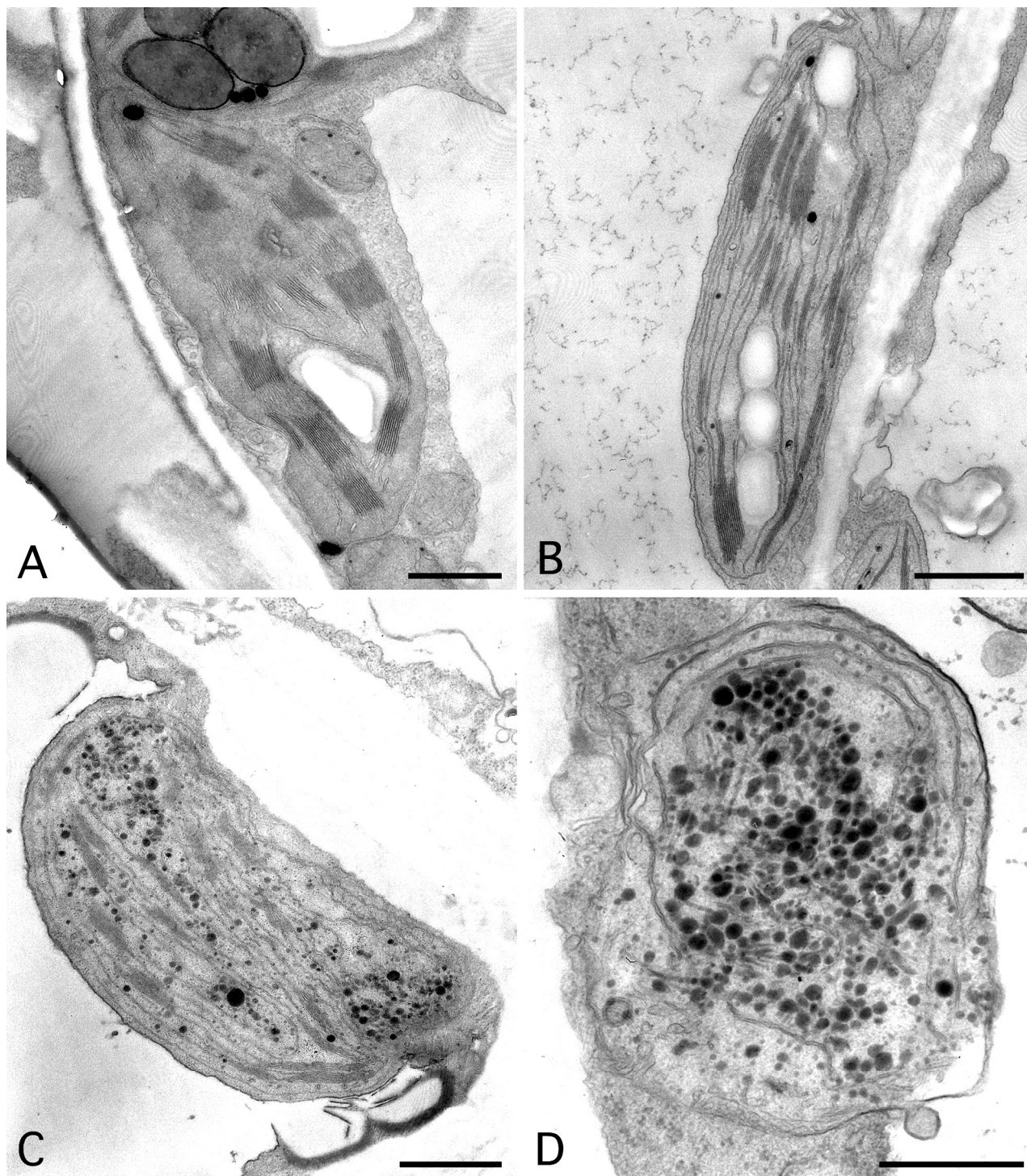


図 4. ピーマン葉の色素体および黄色系果実の成熟に伴う果皮色素体. A. 葉の色素体. 多数の良く発達したグラナ, ストロマチラコイド, デンプン粒, プラスト顆粒を含む成熟葉緑体. B. 緑色果実の果皮色素体. グラナ, インターグラナチラコイド, デンプン粒, プラスト顆粒を含む葉緑体. C. 黄緑色果実の果皮色素体. ストロマチラコイドの数は多いが、グラナを構成するチラコイドの数は少ない. 多数のプラスト顆粒および少数の増大したプラスト顆粒を含む. D. 成熟した黄色果実の果皮色素体. グラナは含まず、包膜の内側に併走するチラコイドが顕著. ストロマ中央部に大きさが様々な多数のプラスト顆粒を含む黄色有色体. スケール: 1 μm .

討論

黄色系および赤色系の若い緑色果実のクロロフィル量は、成長緑葉に含まれる量よりはるかに少量であった。しかし、果皮色素体の微細構造観察は、かなり良く発達したグラナとインターグラナチラコイ

ドの存在と、しばしばデンプン粒が色素体内に含まれることを示した。また、緑葉の退化葉緑体や有色体では多数のプラスト顆粒が見られることが知られているが^{8, 12, 13)}、緑色果皮の色素体内のプラスト顆粒の数は少なく、緑色果皮の色素体はかなりの光合

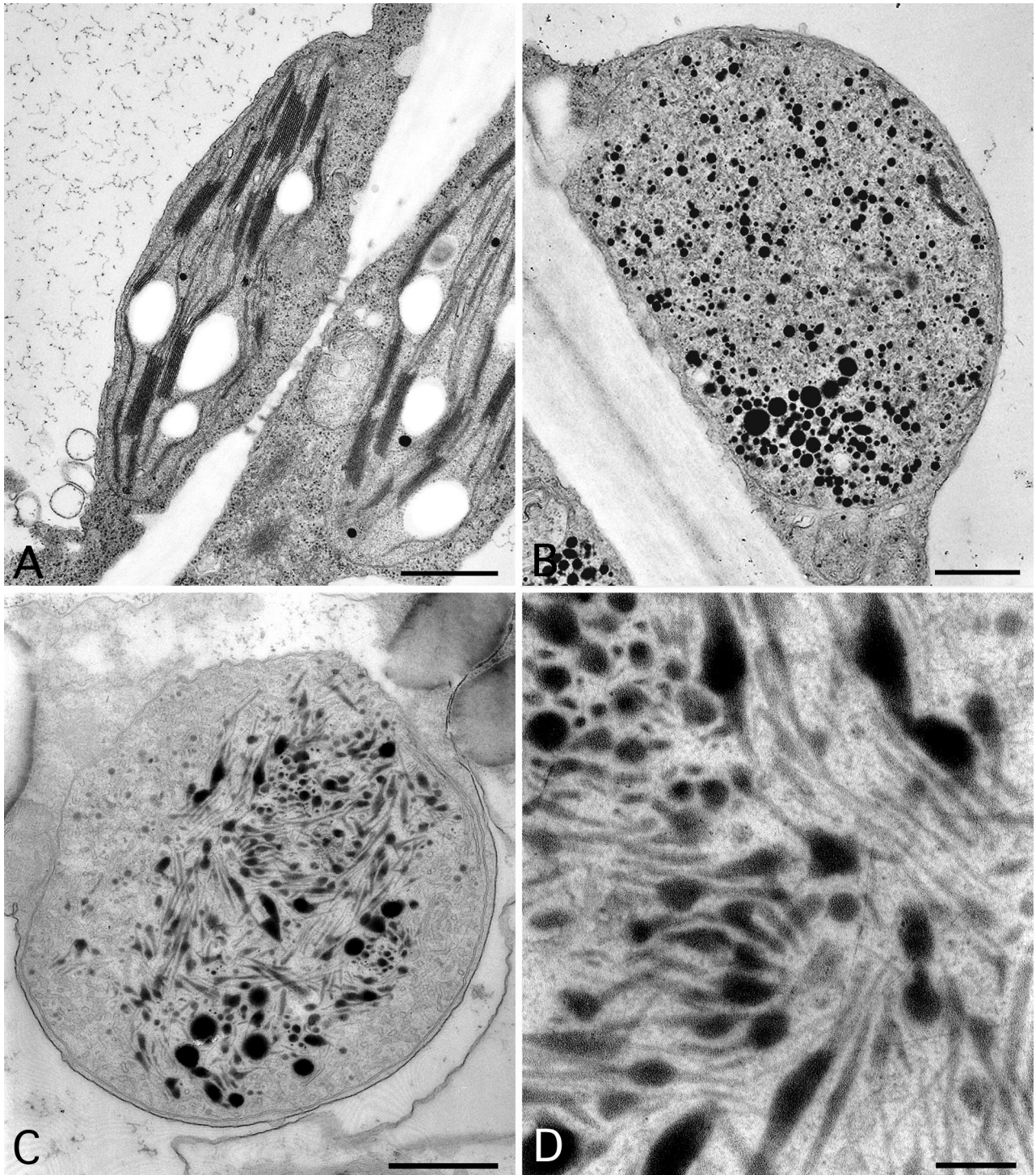


図 5. ピーマンの赤色系果実の成熟に伴う果皮色素体. A. 緑色果実の果皮色素体. グラナ, ストロマチラコイド, プラスト顆粒を含む葉緑体. B. 橙色果実の果皮色素体. 断片化した少数のチラコイドと大小様々なプラスト顆粒を含む. C. 成熟した赤色果実の果皮色素体. 内膜系チラコイドは殆ど含まず, ストロマ中央部に大小様々な多数のプラスト顆粒を含む. プラスト顆粒針状化への様々な変形段階を示す赤色有色体. D. 赤色有色体のプラスト顆粒とその変形. 球形, オタマジャクシ形, 紡錘形, 繊維状構造が認められる. スケール: 1 μm (A-C), 0.2 μm (D).

成活性を持つ若い葉緑体と考えられる。果実の成長に伴い果色が緑から黄色あるいは赤色に変化し始めるとともにクロロフィル量は減少し、色素体内ではグラナ・インターグラナチラコイドの三次元構造の構築崩壊が認められた。グラナ・インターグラナチラコイドの三次元構築はクロロフィルのチラコイド膜内局在によって補償されており¹⁴⁾、内膜系の崩壊は有色体形成開始に伴うクロロフィル分解の結果と考えられる。

黄色系と赤色系の若い緑色果実の果皮からそれぞれ抽出された色素の吸光スペクトルは一致しており、4つのスペクトルピークが確認された。既知のヘキササン溶媒中における各種カロチノイドの吸光スペクトルピーク¹¹⁾との比較検討によりカロチノイドの同定を試みたが、既知のカロチノイドでピークの波長が全て一致するものはなかった。しかし、黄色系の黄緑色および黄色果実から抽出された色素の3つの吸光スペクトルピークの波長はニューロスポリネと完全に、クロロキサンチン(417、440、470 nm)とほぼ一致¹¹⁾していた。同様に、赤色系成熟果実の果皮から抽出された色素の吸光スペクトルピークの比較では、これに近似のカロチノイドにはリコピン(446、472、505 nm)、リコキサンチン(444、472.5、503 nm)、カプソルビン(444、474、506 nm)、カプサンチン(-、474.5、504 nm)などが該当した。各種トウガラシ果実の主要なカロチノイドとしてカプサンチンとカプソルビンが報告されている^{8,15)}ことから赤色果実果皮のカロチノイドはこれらの両者またはいずれかに近いカロチノイドである可能性が高い。

微細構造観察の結果は、黄色系成熟果実の果皮に含まれる色素体がGタイプの有色体¹⁾であり、同時に五色トウガラシの果実に見られるYタイプの有色体⁸⁾と一致することを示した。一方、赤色系成熟果実の果皮に含まれる色素体は増大したプラスト顆粒とその変形と見られる多様な形状の構造を含んでいた。五色トウガラシやシシトウガラシの完熟赤色果実の果皮有色体(Rタイプの有色体)ではプラスト顆粒の殆どが繊維状結晶様体に変化しているが、成熟に伴い果色が黄色から赤色へと変化する五色トウガラシの赤色化の初期には同様の構造が観察されており⁸⁾、赤色系ピーマン果実果皮の色素体はYとRの中間タイプの有色体と考えられる。シシトウガラシの赤色果に含まれるカロチノイドの35%はカプサンチンであり¹⁵⁾、五色トウガラシではプラスト顆粒の繊維状結晶様体への変形にカプサンチンやカプソルビン

の合成と増加が必要であることが示唆されている⁸⁾。ピーマンの赤色系成熟果実の果皮に含まれる色素体が、トウガラシ類のYとRの中間タイプの有色体であったことは、色素の吸光スペクトルがカプサンチンやカプソルビンのそれと微妙に異なっていることと関係していると思われる。より正確なカロチノイドの定性を行うことが今後の課題である。

文献

- 1) Frey-Wyssling A and Kreutzer E (1958) The submicroscopic development of chromoplasts in the fruit of *Capsicum annum* L. *J. Ultrastruct. Res.* 1:397-411.
- 2) Kirk JTO and Tilney-Bassett RAE (1967) *The Plastids*. Freeman WH and Co., London.
- 3) 鈴木季直 (1977) 葉緑体の退化と有色体. *光合成器官の細胞生物学*. 石田政弘, 植田勝巳 遠山 益編, 共立出版, 東京. pp. 116-137.
- 4) Harris WM and Spurr AR (1969) Chromoplasts of tomato fruits. I. Ultrastructure of low-pigment and high-beta mutants. *Am. J. Bot.* 56:369-379.
- 5) Harris WM and Spurr AR (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am. J. Bot.* 56:380-389.
- 6) Spurr AR and Harris WM (1968) Ultrastructure of chloroplasts and chromoplasts in *Capsicum annum*. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening. *Am. J. Bot.* 55:1210-1224.
- 7) Spurr AR (1971) Morphological changes in ripening fruit. *Hortiscience* 5:33-35.
- 8) Suzuki S (1974) Ultrastructural development of plastid in cherry pepper during fruit ripening. *Bot. Mag. Tokyo* 87:165-178.
- 9) Bovier F and Camara B (2006) The role of plastids in ripening fruits. In: *The Structure and Function of Plastids*. Wise RR and Hooper JK, eds., Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 419-432.
- 10) SCOR-UNESCO WG (1966) Determination of photosynthetic pigment in sea water. *Monogr. Oceanogr. Methol.* 1: 9-18.
- 11) Davies BH (1965) Analysis of carotenoid pigments. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin TW, ed., Academic Press, London. pp.489-532.
- 12) Hudak J (1981) Plastid senescence, 1. Changes of chloroplast structure during natural senescence in cotyledons of *Sinapis alba* L.. *Phytosynthetica* 15:174-178.
- 13) Biswal WC, Biswal B and Raval MK (2003) *Chloroplast Biogenesis. From Proplastid to Genontoplast.*, Kluwer Academic Publishers, London.
- 14) Weier TE and Benson AA (1967) The molecular organization of chloroplast membrane. *Amer. J. Bot.* 54:389-402.
- 15) Curl AL (1962) The carotenoids of red bell pepper. *J. Agric. Food Chem.* 10:504-509.