

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

誌名	京大農場報告 = Bulletin of the Experimental Farm, Kyoto University
ISSN	09150838
著者名	前田,智 米田,祥二 細川,宗孝 林,孝洋 渡辺,達夫 矢澤,進
発行元	京都大学農学部附属農場
巻/号	15号
掲載ページ	p. 5-10
発行年月	2006年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



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

前田 智¹・米田祥二¹・細川宗孝¹・林 孝洋¹・渡辺達夫²・矢澤 進¹

(¹京都大学大学院農学研究科, ²静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)

Changes of Novel Capsaicinoid Like Substance, Capsinoid Content and Morphological Change of the Placenta Tissue during 'CH-19 Sweet' (*Capsicum annuum* L.) Fruit Development, and the Influence of Fruit Storage Conditions on Capsinoid Content

Satoshi Maeda¹, Hirotsugu Yoneda¹, Munetaka Hosokawa¹,
Takahiro Hayashi¹, Tatsuo Watanabe², Susumu Yazawa¹

(¹Graduate school of Agriculture, Kyoto University; ²Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka)

Summary

Changes of the content capsinoids, novel capsaicinoid like substances contained in 'CH-19 Sweet' during fruit development were investigated. Capsinoid content increased rapidly from 20 days after anthesis to 30 days, thereafter decreasing rapidly. Capsinoid was formed in placenta tissue with morphological change of epidermal cells of the placenta. The morphological change in 'CH-19 Sweet' placenta tissue was almost similar to that of hot peppers.

Capsinoid content in the fruit stored at 28°C decreased near to zero by 8 days after harvest. Capsinoid content did not decrease during 16 days when the fruit was preserved at 3°C.

緒 言

トウガラシ果実の辛味の主成分はカプサイシノイドで、その主要なものはカプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシン、ホモカプサイシン、ホモジヒドロカプサイシンの5種類である。Bennett・Kirby(1968)、Leete・Louden(1968)、Suzukiら(1981)、Fujiwakeら(1982a)、Fujiwakeら(1982b)の結果を総合するとトウガラシ果実におけるカプサイシンの生合成は第2図のようにまとめられる。フェニルアラニンからフェニルプロパノイドを経て生成されたバニルアミンと、バリン、ロイシン、イソロイシンから生成された分枝脂肪酸および数種類のイソ型脂肪酸からアシル-CoAの形となったものが脱水縮合反応によりカプサイシンが生成される。

カプサイシノイドはヒトに対して発汗作用、熱産生の促進、胃液分泌促進、免疫賦活作用などの生理作用がある(Kawadaら, 1986; 間宮ら, 1993; Abdel-Salamら, 1997)が、カプサイシノイドは激しい辛味を呈するので、利用する際に量的な制限が問題となる。

'CH-19甘' (*Capsicum annuum* L.) は1979年にタイより導入した辛味品種 'CH-19' から分離固定された甘味品種である(矢澤ら, 1989, 第1図)。「CH-19甘」の果実はほとんど辛みがないが、摂食するとヒトによっては発熱・発汗が促される(Yazawaら, 1998; Ohnukiら, 2001, Ohnukiら, 2001)。矢澤ら(1989)は「CH-19甘」果実からの抽出物を、カプサイシノイドの分析と同じ条件で薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開すると、カプサイシノイドとは異なる位置に2つのスポットがあらわれることを認め、これら未同定の物質に対してCLS-A, CLS-Bという名称を与えた。Kobataら(1998)がCLS-A, CLS-Bの化学構造について検討した結果、CLS-Aはバニルアルコールであり、CLS-Bは第2図に示すようにカプサイシンに類似した新規物質であることを明らかにした。この物質はカプシエイトと命名された。第2図に現在考えられているカプシエイトの生合成経路を示した(渡辺ら, 未発表)。「CH-19甘」果実からカプシエイトの同族体であるジヒドロカプシエイトおよびノルジヒドロカプシエイトも見いだされ、同族体の総称をカプシノイドと

命名した (Kobataら, 1999), Kobataら (2002) はカプシノイドはバニリルアルコールと脂肪酸である8-メチルノナン酸をリパーゼと反応させることにより, 人工合成できることを報告している. 常温ではカプサイシンが結晶であるのに対し, カプシエイトはペースト状である. また, カプシノイドはアセトンを除く極性溶媒中では不安定であることが報告されている (Sutohら, 2001).

カプシノイドはカプサイノイドと同様, ヒトを含む動物に対して脂肪代謝促進, 体熱産生作用 (Ohnukiら, 2001a, 2001b), 抗酸化作用 (Rosaら, 2002), 脱共役タンパク質の発現向上作用 (Masudaら, 2003) などを持つことが明らかになった. カプシノイドは辛味がほとんどなく, 有益な生理活性を有しているため, 食品や薬品での利用が期待されている.

現在, カプシノイドを多量に含む 'CH-19甘' の果実生産は実用化段階に入りつつある. 本実験は, このような点を背景に果実の収穫適期・収穫後貯蔵のための基礎的知見を得るために行われたものである.

材料および方法

'CH-19甘' のカプシノイド含量が低いA系統と含量が高いB系統の2系統を供試した. 1999年度は2月下旬にA系統を, 2000年度は3月上旬にB系統をそれぞれ播種した. 両年度とも播種後約3か月日の幼苗を培養土を詰めた15Lのプラスチック鉢に定植し, ビニールハウス内で栽培した. 施肥および栽培管理はトウガラシにおける慣行法に従った.

果実発育に伴うカプシノイド含量の変化を明らかにするため, 1999年7月上旬に開花した 'CH-19甘' のA系統について, 開花後7, 10, 20, 30, 40, 60日目の果実を, また, 第4図に示したような果色段階の果実を収穫し, カプシノイド含量を次の方法で測定した. 凍結乾燥した果実をミキサー (Suppliter製, T-351) で粉碎した後, 乾燥重で0.2g秤量し, 分析用試料とした. 分析用試料にアセトン4 mLを加えよく攪拌し, アセトンの抽出液を別の容器に分取した. さらに残さにアセトン1 mLを加えよく攪拌し, アセトンの抽出液をとり, はじめのアセトンの抽出液とあわせた. この操作を再度繰り返した. 次に残さに酢酸エチル1 mLを加えよく攪拌し, 酢酸エチルの抽出液をとり, はじめのアセトンの抽出液とあわせた. 36°Cに設定したコンセントレーター (TAITEC VC-960) で溶媒を除去し乾固した. 乾固

した試料に酢酸エチル2 mLを加え12時間程度放置し, 乾固試料を酢酸エチルに溶解させた. この酢酸エチル溶液をSep-Pak Plus (Waters) で濾過した後, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (Hitachi L-7420) でカプシノイドを分離し, その濃度を求めた. HPLCでの展開条件は試料10 μ Lを注入し, 室温 (20~25°C) で移動相をメタノール/水 (70/30, v/v) とし, 流速を1 ml/minとした. 使用カラムは μ Bondapak C₁₈カラム (10 μ m, 3.9×150mm, Waters) とし, UV280nmで検出・定量した. 'CH-19甘' 果実に含まれるカプシノイドの大部分はカプシエイトとジヒドロカプシエイトであるため (Kobataら, 1999), 本実験ではカプシエイトおよびジヒドロカプシエイトについて定量した. リパーゼ法で人工合成したカプシエイト (Kobataら, 2002) を用いて検量線を作成し, 試料中のカプシノイド濃度から, 果実中のカプシノイド含量を求めた. なおHPLCのこの展開条件でのカプシエイトおよびジヒドロカプシエイトの保持時間はそれぞれ11.0分, 17.4分であった.

カプシノイドが生成される胎座組織の観察については開花後7, 10, 20, 30日目のA系統の果実を用いた. 果実収穫後, 胎座組織を切り出し, FAA溶液 (100% エタノール: 蒸留水: ホルマリン: 酢酸=12:6:1:1 (v/v)) で固定した. 固定した胎座は脱気後24時間流水で洗浄し, オート・ティッシュ・プロセッサ (ROTEX, 盟和商事) でレジン (Technovit7100原液20ml+Hardner I 1g) で置換した後, 組織を包埋用レジン (Technovit7100: Hardner II =15:1 (v/v)) で固めた. レジンブロックを回転式マイクロトームで5 μ mの厚さの切片を作製し, トルイジンブルーで5分間染色した後, 光学顕微鏡で観察した. トルイジンブルーは塩基性色素であり, 細胞内のあらゆる好塩基性, つまり酸性構成要素を染色する.

2000年10月上旬にB系統の開花後30日前後の果実を供試し, 収穫後果実のカプシノイド含量の経時変化を調査した. 貯蔵条件は以下のようにして行った. 蒸留水で湿らせた3~4枚の濾紙を直径9cmのシャーレに敷き, 果実を4個ずつ入れ, 3, 22, 28°Cに設定した恒温器内で暗黒貯蔵した. 貯蔵後0, 2, 8, 16日目の果実内のカプシノイド濃度を上記と同様の方法で求めた.

結果および考察

1. 果実発育に伴うカプシノイド含量の変化と胎座組織の形態変化

開花後7日目の果実ではカプシノイドは検出されなかった。開花後10日目の果実ではカプシノイド含量は $163 \mu\text{g/gDW}$ であった。開花後20から30日目にかけて急激に増加し、30日目には $418 \mu\text{g/gDW}$ と最高となり、その後急激に減少し40日目には $109 \mu\text{g/gDW}$ となった。開花後60日目まで植物体上にあった果実ではさらに減少し、約 $50 \mu\text{g/gDW}$ であった(第3図)。このような結果は、*C. annuum* L.の辛味品種の果実内カプサイシノイドが、開花後10日目には認められなかった点や、開花後40日目に至ってもカプサイシノイド含量が減少しない点(Iwaiら, 1979; 矢澤ら, 1989; Estradaら, 1997)が異なっている。果実内のカプシノイドは開花後30日後に急激に減少することから、カプシノイドを利用するための'CH-19甘'果実生産においては、果実収穫適期は開花後30日目前後であると判断される。しかし、開花後日数が同じであっても生育温度が異なれば、果実発育段階も異なることになる。そこで果色とカプシノイド含量との関連について調べた結果を第4図に示した。段階1では果実は小さく、果実内カプシノイド含量はわずかであった。段階2では果実内カプシノイド含量が急激に増加し、約 $4000 \mu\text{g/gDW}$ となり、段階3ではさらに高くなり約 $5000 \mu\text{g/gDW}$ となった。果皮が赤色に変化した段階になると果実内カプシノイド含量は約 $500 \mu\text{g/gDW}$ となった。段階5、段階6では果実内にカプシノイドはほとんど含まれていなかった(第4図)。果実内カプシノイド含量は果皮が濃緑色のもので最も高いが、赤色になると激減することが明らかとなった。これらの結果から、収穫期の決定には果色を指標とするのが実際的であると考えられる。

トウガラシの辛味成分であるカプサイシノイドは胎座組織の表皮細胞で合成される(太田, 1962; Suzukiら, 1980)。表皮細胞で合成されたカプサイシノイドは、水にほとんど溶けないため細胞外に放出されて、表皮細胞とクチクラ層の間に蓄積する。カプサイシノイドと同様、'CH-19甘'で生成されるカプシノイドも胎座組織の表皮細胞で合成される(佐々木ら, 1990)。そのため'CH-19甘'果実におけるカプシノイド生成に伴う組織学的な観察を行った。開花後7日目の胎座表皮細胞は小さく、トルイジンブルーによる染色程度

もわずかであった(第5A図)。開花後10日目表皮細胞および表皮細胞に接する柔細胞は丸みを帯び肥大し、細胞間隙が大きくなり、表皮細胞はトルイジンブルーによる染色程度が強くなりカプシノイドの放出がわずかに観察された(第5B図)。開花後20日目、表皮細胞の核が明瞭になり、細胞自体は細長く、表皮細胞間からカプシノイドが細胞外に放出されているのがはっきりと観察された(第5C図)。開花後30日目、表皮細胞に間隙が観察され、表皮細胞自体も一段と細長くかつ非常に密になり、カプシノイドの蓄積部分がさらに大きくなった(第5D図)。開花後30日目では表皮細胞の至る所でカプシノイドが確認され、特に表皮細胞が細長く、また非常に密になった部分にカプシノイドが蓄積していた。このような胎座組織における表皮細胞の肥大やトルイジンブルーによる強い染色性といった特性はカプサイシノイドを生成する辛味品種トウガラシで見だされているが、甘味品種ではこのような形態の変化する胎座表皮細胞は確認されていない(佐々木ら, 1990)。辛味品種の胎座表皮細胞と形態的に違いのない表皮細胞が'CH-19甘'の果実で認められた。これらのことからトウガラシ'CH-19甘'果実の胎座組織のカプシノイド生成に伴う形態変化は、辛味品種と似ているが、辛味品種より早い時期に表皮細胞および表皮細胞に接した柔細胞の形態が変化し、開花後10日目にはカプシノイドの細胞外放出が認められた。

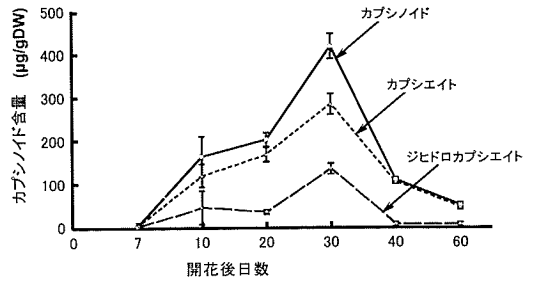
2. 収穫後果実のカプシノイド含量

開花後30日前後の収穫直後の果実内カプシノイド含量は $1426 \mu\text{g/gDW}$ であった。3℃貯蔵では、貯蔵16日目にはカプシノイド含量が $1145 \mu\text{g/gDW}$ まで減少した。22℃貯蔵では、貯蔵8日目のカプシノイド含量は $924 \mu\text{g/gDW}$ であった。貯蔵16日目には $327 \mu\text{g/gDW}$ まで減少した。28℃貯蔵では、貯蔵8日目のカプシノイド含量は $26 \mu\text{g/gDW}$ とわずかであった(第6図)。これらの結果から、収穫後果実におけるカプシノイド含量の減少には、貯蔵温度が強く影響することが明らかになった。

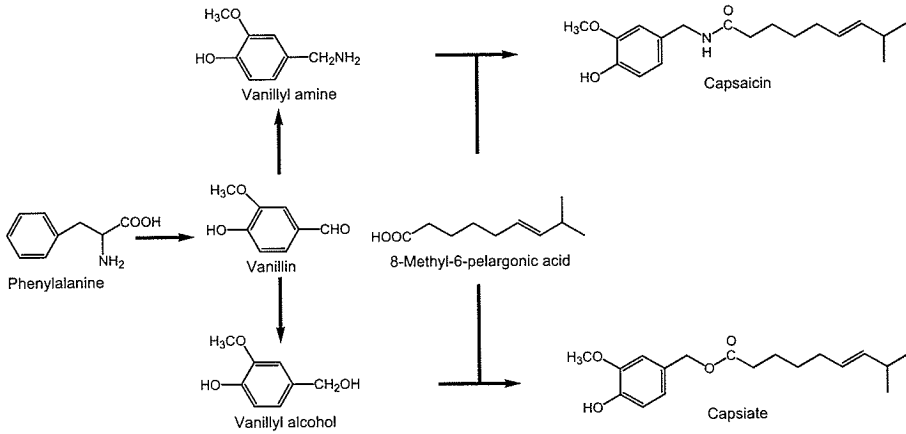
以上の結果から、カプシノイドを生産する目的での'CH-19甘'果実は開花後30日前後に収穫することが望ましいと考えられた。しかし、生育温度など果実の発育環境によって果実の発育の早さが異なるので、果実の発育状態から開花後日数を判断することはできない。より簡易的な果実収穫の基準が必要となる。果皮色による発育ステージ別の果実内カプシノイド含量を



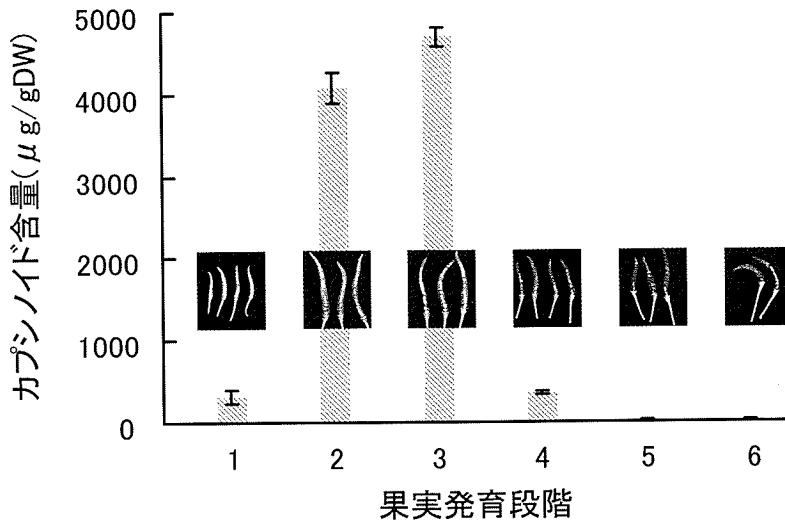
第1図. 'CH-19甘' 果実の着果状態 (収穫期).



第3図. 'CH-19甘' の果実発育に伴うカプシノイド含量の変化
図中のバーは標準誤差 (n=3 ~ 5).

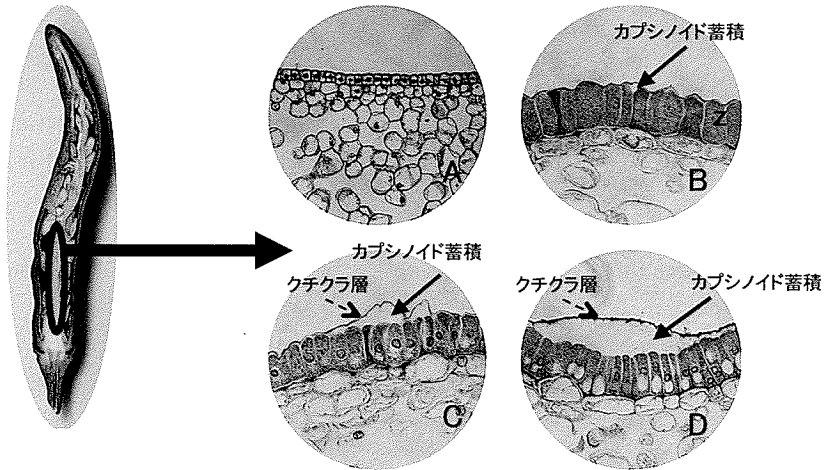


第2図. カプサイシンおよびカプシエイトの生合成経路.

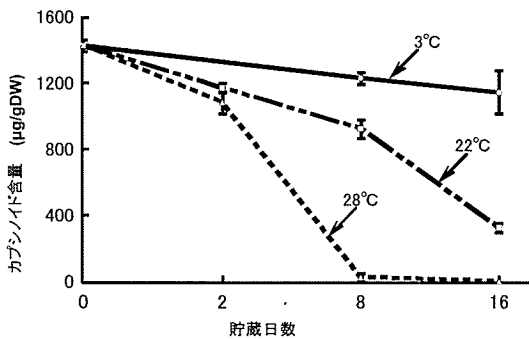


第4図. 果実発育段階別の 'CH-19甘' B 系統の果実内カプシノイド含量の変化
図中のバーは標準誤差 (n=3 ~ 5).
段階 1- 果皮色淡緑色；段階 2- 緑色；段階 3- 濃緑色；段階 4- 淡赤色；
段階 5- 赤色で果皮の一部にしわ有り；段階 6- 赤色で果皮全体にしわ有り

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



第5図. 'CH-19 甘' の果実発育に伴う胎座組織の変化. (×200)
A: 開花後7日目; B: 10日目; C: 20日目; D: 30日目.



第6図. 貯蔵期間・温度が'CH-19 甘' 果実内カプシノイド含量の変化に及ぼす影響. 図中のバーは標準誤差 (n=3~5).

測定すると、果皮が濃緑色のものでカプシノイド含量は最大となり、赤色果実ではカプシノイドは大きく減少する(第4図)。

気温が高い時期に収穫した場合には収穫後ただちに果実を低温で貯蔵する必要がある(第6図)。

摘 要

トウガラシ 'CH-19 甘' 果実に含まれる新規物質カプシノイド含量の果実発育に伴う変化について調査した。カプシノイド含量は開花後20日目から30日目にかけて急増し、その後急激に減少した。カプシノイド生成は胎座組織の表皮細胞やその近傍細胞の形態変化を伴い、その形態変化は辛味品種の胎座組織のそれとほとんど同じであった。

収穫後果実のカプシノイド含量は貯蔵温度が28°C

では8日目にはほとんどなくなったが、3°Cではその含量は貯蔵後16日目にもほとんど変わらなかった。

引用文献

- Abdel-Salam, O., J. Szolcsanyi and G. Mozsik. 1997. Capsaicin and the stomach. A review of experimental and clinical data. *J. Physiology* (Paris). 91:151-171.
- Bennett, D. J. and G. W. Kirby. 1968. Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J. Chem. Soc. (C)*: 442-447.
- Fujiwake, H., T. Suzuki and K. Iwai. 1982a. Capsaicinoid formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. *Agric. Biol. Chem.* 46:2591-2592.
- Fujiwake, H., T. Suzuki and K. Iwai. 1982b. Intracellular distributions of enzymes and intermediates involved in biosynthesis of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruits. *Agric. Biol. Chem.* 46:2685-2689.
- Iwai, K., T. Suzuki and H. Fujiwake. 1979. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Agric. Biol. Chem.* 43:2493-2498.
- Kawada, T., T. Watanabe, T. Takaishi, T. Tanaka and K. Iwai. 1986. Capsaicin-induced

- β -adrenergic aciton on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 183:250-256.
- Kobata, K., K. Todo, S. Yazawa, K. Iwai and T. Watanabe. 1998. Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 46 : 1695-1697.
- Kobata, K., K. Sutoh, T. Todo, S. Yazawa, K. Iwai and T. Watanabe. 1999. Nordehydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum*. *J. Nat. Prod.* 62 : 335-336.
- Kobata, K., M. Kawaguchi and T. Watanabe. 2002. Enzymatic synthesis of a capsinoid by the acylation of vanillyl alcohol with fatty acid derivatives catalyzed by lipases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:319-327.
- Leete, E. and M. C. L. Louden. 1968. Biosynthesis of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J. Amer. Chem. Soc.* 90:6837-6841.
- 間宮紳一郎・国松己歳・尾崎康彦・馬 暁静・佐々木 實. 1993. 唐辛子含有摂取によるヒト末梢血好中球機能亢進. *生化学* 65:691.
- Masuda, Y., S. Haramizu, K. Oki, K. Ohnuki, T. Watanabe, S. Yazawa, T. Kawada, S. Hashizume and T. Fushiki. 2003. Upregulation of uncoupling proteins by oral administration of capsiate, a nonpungent capsaicin analog. *J. Appl. Physiol.* 95:2408-2415.
- 太田泰雄. 1962. トウガラシの辛味に関する生理学的ならびに遺伝学的研究IV. トウガラシ果実内におけるCapsaicin分泌器官, 貯蔵器と辛味の分布. *育学雑*. 12:179-183.
- Ohnuki, K., S. Niwa., S. Maeda, N. Inoue, S. Yazawa and T. Fushiki. 2001a. CH-19 Sweet, a nonpungent cultivar of red pepper, increased body temperature and oxygen consumption in humans. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 65: 2033-2036.
- Ohnuki, K., S. Haramizu, T. Watanabe, S. Yazawa and T. Fushiki. 2001b. CH-19 sweet, nonpungent cultivar of red pepper, increased body temperature in mice with vanilloid receptors stimulation by capsiate. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 47:295-298.
- Rosa, A, M. Deiana, V. Casu, S. Paccagnini, G. Appendino, M. Ballero and M. A. Dessi. 2002. Antioxidant activity of capsinoids. *J. Agric. Food Chem.* 50:7396-7401.
- 佐々木貴生・矢澤 進・並木隆和. 1990. トウガラシの甘味及び辛味品種の胎座表皮組織細胞の形態比較. *園学雑*. 59(別2):248-249.
- Sutoh, K., K. Kobata and T. Watanabe. 2001. Stability of capsinoid in various solvents. *J. Agric. Food Chem.* 49:4026-4030.
- Suzuki, T., H. Fujiwake and K. Iwai. 1980. Interacellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol.* 21 : 839-853.
- Suzuki, T., T. Kawada and K. Iwai. 1981. Biosynthesis of acyl Moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant Cell Physiol.* 22:23-32.
- Yazawa, S. S. Niwa, T. Watanabe and T. Fushiki. 1998. Biosynthesis of capsaicinoid-like substances in capsicum fruits and their physical activities in the human body. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67(Suppl.1):296.
- 矢澤 進・末留 昇・岡本佳奈・並木隆和. 1989. 'CH-19甘'を片親としたトウガラシ (*Capsicum annuum* L.) の雑種におけるカプサイシノイドならびにカプサイシノイド様物質の含量. *園学雑*. 58:601-607.