

環境ストレスによる伝統薬用植物サボテン類の健康機能性向上

橋口 晶子

筑波大学医学医療系

概要 中米・地中海地域で日常的な食品として利用されているウチワサボテンは、乾燥・半乾燥地への侵略的外来種となるほどの高いストレス適応能があることから気候変動下の新規作物として可能性がある。また、血糖値抑制やインスリン値調節等の健康増進効果を持つことから地域資源を活用した高付加価値化素材として有望である。本研究ではウチワサボテン *Nopalea cochenillifera* を題材として、自然環境中の塩によるストレスが存在する条件下での栽培を行って植物の環境ストレス応答と食品としての健康増進効果に及ぼす影響の評価を行った。

葉状茎の生長はさまざまな塩処理条件下 (NaCl 500 mM; MgCl₂ 20 mM; Na₂SeO₂ 50 mg/kg; Zn(NO₃)₂ 200 ppm) で異なる反応を示し、特に NaCl 処理が成長に大きな負の影響をもたらした。葉状茎自体のストレス応答、葉状茎を取り巻く環境(土壌微生物)、葉状茎抽出物が動物培養細胞にもたらす影響をそれぞれ解析したところ、葉状茎のストレス応答を包括的に把握することを目的としたプロテオーム解析結果において Isoflavone reductase homolog P3 が変動していたことから、環境ストレス条件下で生体防御のために二次代謝が変化することが食品としての機能性に影響を及ぼすと考えられた。抗酸化能が上がることを期待されるため葉状茎抽出物の DPPH ラジカル消去能を測定したが、塩処理による DPPH ラジカル消去能の差は見られなかった。ACE 活性阻害能はすべての塩処理条件で高くなっていた。塩処理により存在量が上昇した因子の中に ACE に結合しうる構造を持つタンパク質が含まれると考えられた。

培養細胞を用いたアッセイでは、葉状茎抽出物の培地への添加はヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y の生残には影響がなかった一方で細胞の形態に変化を及ぼした。この形態変化は葉状茎がどのような塩処理条件下で栽培されたかによって異なっていた。培養細胞の形態変化は塩処理によって影響を受ける複数の指標のうちの特定の指標と関連するような状況ではなかったものの、栽培条件を最適に制御することにより植物の持つ健康増進効果を期待した以上に高めることのできる可能性を示すものと考えられる。

1. 研究目的

農業・食料生産分野での気候変動リスクが顕在化し、作物の栽培適地の減少が見込まれる中、耕作不適地で生息してきた在来作物が環境ストレス耐性遺伝子の単離源として注目されている。中米・地中海地域で日常的な食品として利用されているウチワサボテン類は乾燥・半乾燥地への侵略的外来種となるほどの高いストレス適応能があることから、気候変動下の新規作物として可能性がある。一方高齢化の国際的動向を踏まえて食を通じた健康増進についての関心が高まっており、生活習慣病を防ぐ地中海食のような風土に根差した食物の重要性が再認識されて

いる。ウチワサボテン類は血糖値抑制やインスリン値調節等の健康増進効果を持つことから地域資源を活用した高付加価値化素材として有望である。

蔬菜類は栄養や健康の観点から付加価値の高い作物である。これらの作物がもつ地域特性に根差した環境ストレス応答機構を利用し、健康増進効果が高まる栽培法を通じて新規価値創出を行えば食糧生産の安定化につながると考えられる。しかしながらウチワサボテン類においては環境ストレス応答機構や有用二次代謝物の蓄積に関する生理学的解析は十分になされてこなかった。有用二次代謝物の蓄積の面では、塩ストレスによってアミノ酸の一

種プロリンが蓄積されることが明らかになっているものの、有用二次代謝物の生合成が促進されるストレス強度や処理期間は明らかになっていない¹⁾。研究を難しくしていた背景としては、ウチワサボテン類が多量の多糖類を含むことで生体物質の抽出が困難であったことが挙げられる。筆者らはタンパク質抽出方法を最適化してプロテオーム解析を行い、250 mM の NaCl の処理条件下で栽培されたウチワサボテンの一種 *Opuntia ficus-indica* では、光合成モードが C3 代謝から CAM 代謝へと切り替わることを明らかにしたとともにストレス応答性の有用二次代謝物の生産を変動させることを示した²⁾。

本研究では、ウチワサボテン類の健康増進効果を増進させる塩ストレス強度や処理期間を見出し効果の本体物質を特定するため、塩ストレスが存在する条件下での栽培を行って植物の生理応答を解析した。さらに培養細胞を用いたバイオアッセイを通じて生理活性効果の検証を行った。

2. 研究方法

2.1 植物材料

ウチワサボテンの起源地であるメキシコで広く利用されている *Nopalea cochenillifera* は有限会社後藤サボテンより購入した。葉状茎の新芽を 2021 年 5 月に外植体とし、軽石、赤玉土、赤玉土の混合土を入れたポット(100 mL)に植え付け自然環境で維持した。発根後は 1 週間に 1 度灌水した。植え付け後 4 週目から灌水の塩濃度を以下に示す範囲とした条件で 1 週間に 1 度処理し、12 週間栽培した(処理 1 NaCl 500 mM; 処理 2 MgCl₂ 20 mM; 処理 3 Na₂SeO₂ 50 mg/kg; 処理 4 Zn(NO₃)₂ 200 ppm)。

2.2 植物生理応答の解析

葉状茎の厚さと幅および根の長さを測定後、葉状茎組織を採取しタンパク質を抽出した²⁾。100 µg のタンパク質を還元アルキル化後トリプシンおよびリシルエンドペプチダーゼ処理し、Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific)を用いて質量分析を行った。ディファレンシャル解析は Proteome discoverer(version 2.4)ソフトウェアによって行い有意差の検定には t 検定を用いた。

2.3 土壌細菌叢の解析

栽培ポットから採取した 3 g の土壌試料を 27 mL の 15 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)中に浸漬した。希釈した土壌溶液(100 mL)を 2 種類の寒天培地に接種した。真菌培

養には OGYE, 放線菌・細菌培養には PTYG の 2 種類の寒天培地を用いた。25°C の暗所で 3 日間または 7 日間培養した後、形成されたコロニーを計数した。70%エタノールで表面を拭いた後の PTYG 培地上のコロニー数を放線菌の数とした³⁾。土壌サンプルから DNA を抽出し、株式会社生物技研によるアンプリコンシーケンス解析を行った。

2.4 葉状茎抽出物の抗酸化能および ACE 活性阻害能の測定

葉状茎組織を凍結乾燥・破砕し、0.5 g の試料をメタノール:エタノール 1:1 の抽出液 10 mL に浸漬し 4°C の暗所で 2 日間振盪した。遠心後の上清を 0.22 µm フィルターで濾過し減圧乾燥機で乾燥して得られた乾燥物を DMSO に溶解し DPPH Antioxidant Assay Kit(Dojindo)を用いて抗酸化能の測定を行った。次に葉状茎組織からタンパク質を抽出して PBS に溶解した。3% w/v になるようにパピンを添加して 45°C で 2 時間酵素切断し ACE Kit-WST (Dojindo)を用いてアンジオテンシン I 変換酵素(ACE)の阻害能を測定した。

2.5 バイオアッセイ

ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y は 15%牛胎児血清を添加した DMEM/F12 培地で培養した。細胞死を誘導する高濃度デキサメタゾンで処理した場合の細胞の生残率を指標とし、葉状茎組織のメタノール:エタノール抽出物を含む培地で 48 時間培養した場合に細胞死が抑制されるかを MTT アッセイにより確認した。マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 は 10%牛胎児血清を添加した DMEM 培地で培養した。抽出物を含む培地で 24 時間培養した後に LPS(400 ng/mL)で 4 時間処理した場合に炎症性メディエーター *il-6* の産生が抑制されるかをリアルタイム PCR により確認した。その後形態変化を観察した。

3. 研究結果

3.1 各種塩ストレスによる *N.cochenillifera* の生長変化

塩ストレスの各段階における変化を理解するために成長に関するパラメータを経時的に測定した。葉状茎の厚さは初期には全条件で増加したが、処理 1 および処理 3 では 2 回目の冠水以降減少した。処理 2 および処理 4 処理で未処理の対照と類似した推移がみられ、処理機関後半に生長が鈍化した(Fig. 1)。葉状茎の幅は処理 2 において減少傾向が見られた(Fig. 1)。12 週間にわたる塩処理終了時点での根の長さはすべての処理で短くなり、特に

NaCl 処理においてストレスを与えずに栽培した対照群に比して著しく短く生長阻害が観察された (Fig. 1)。

3. 2 各種塩ストレスによる土壌細菌叢の変化

真菌数, 細菌数, 放線菌数は処理間でばらつきが見られた (Fig. 2)。処理 4 において黒色のコロニーが見られたことが特徴的であったが, アンプリコンシーケンス解析による菌種の比較では処理間で有意な差は認められなかった。

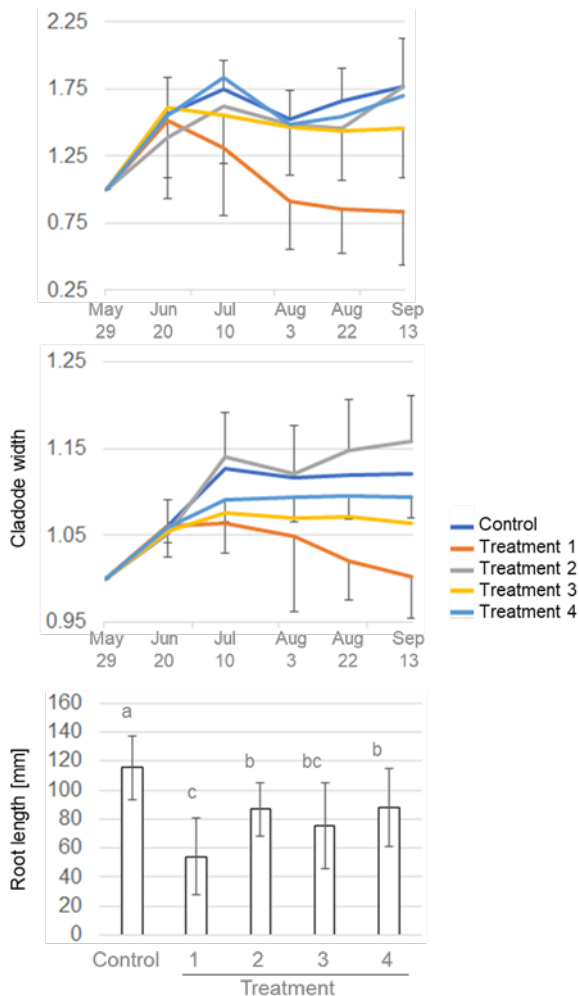


Figure 1 Morphological characteristics of cladode under salt stress.

Young cladode cuttings were collected from plants and planted. Starting from the fourth week after planting, salt stress was induced by placing the pots on a plastic container filled with water containing each salt until the water rose from the bottom slits to the surface of the pot soil once every week. Samples subjected to salt stress were prepared from five different plantlets as biological replicates for measuring thickness and width. Root length was measured at the end of each treatment period using seven to eight plantlets. Data are shown as the mean of ratio compared to the beginning of the treatment \pm SD for thickness and width and mean \pm SD for root length. Different letter indicates statistically significant differences ($p < 0.05$).

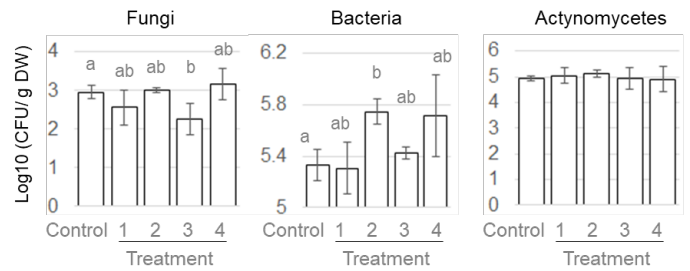


Figure 2 Rhizosphere microbial population.

Rhizosphere microbes of cladodes under salt stress were cultivated by OGYE plate cultivation for fungi and PTYG plate cultivation for bacteria including actinomycetes. Calculated colony-forming units of fungi, actinomycetes, and bacteria were shown. Data are shown as the mean \pm SD. Three plantlets were used for each treatment. (* $p < 0.05$)

3. 3 各種塩ストレスによる *N. cochenillifera* の生理的变化

葉状茎由来のタンパク質のプロテオーム解析を行い Gene Ontology (GO) に基づく機能分類によるプロファイリングを行った。Fig. 3 は各処理において存在量がストレスを与えずに栽培した対照群に比して有意に変動していた因子の機能別のエンリッチメント解析の結果である。異なる色はそれぞれ別の生物学的機能を示している。生物プロセス, 細胞構成要素, 分子機能のいずれの区分においても, 処理 1 と処理 4, 処理 2 と処理 3 が互いに類似したエンリッチメントパターンを示した (Fig. 3A)。フラボノイドなどの二次代謝物質の生合成にかかる因子群に着目すると, 処理 4 において Isoflavone reductase homolog P3 の存在量が減少していた (Fig. 3B)。

3. 4 各種塩ストレスによる葉状茎抽出物の抗酸化能および ACE 活性阻害能の測定

葉状茎のメタノール:エタノール抽出物における抗酸化能を DPPH ラジカル消去を指標に測定した。その結果, 処理 (処理 3 と処理 4) の異なるサンプルに由来する抽出物間での有意差はみられたものの, ストレスを与えずに栽培した対照群サンプルに由来する抽出物に比してはどの処理も有意差が見出されなかった (Fig. 4)。一方葉状茎タンパク質由来ペプチドのパパイン分解物を用いて ACE の活性阻害能を測定したところ, ストレスを与えずに栽培した対照群サンプルに由来するペプチドの IC₅₀ が約 0.011 であったのに対して他の処理を施した処理群サンプルに由来するペプチドでの値は 0.006 から 0.008 程度であり, す

すべての塩処理条件において対照群よりも ACE 活性阻害能が強くなっていることが観察された (Fig. 4)。

3.5 各種塩ストレスによる葉状茎抽出物が培養細胞に及ぼす生理活性効果の変化

SH-SY5Y 細胞または RAW264.7 細胞に葉状茎のメタノール:エタノール抽出物を最高濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で含む培地で培養したところ、生残および炎症性メディエーターの産生には影響がないことが確認された。そこで SH-

SY5Y 細胞を用いて形態の変化を観察した結果、葉状茎のメタノール:エタノール抽出物を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加した 48 時間後には、抽出物を添加せずに培養した細胞を基準とした場合、ストレスを与えずに栽培した対照群サンプルに由来する抽出物を添加して培養した細胞に細胞塊が形成された。このような細胞塊は処理 2 におけるサンプルに由来する抽出物を添加した場合にも観察された (Fig. 5)。

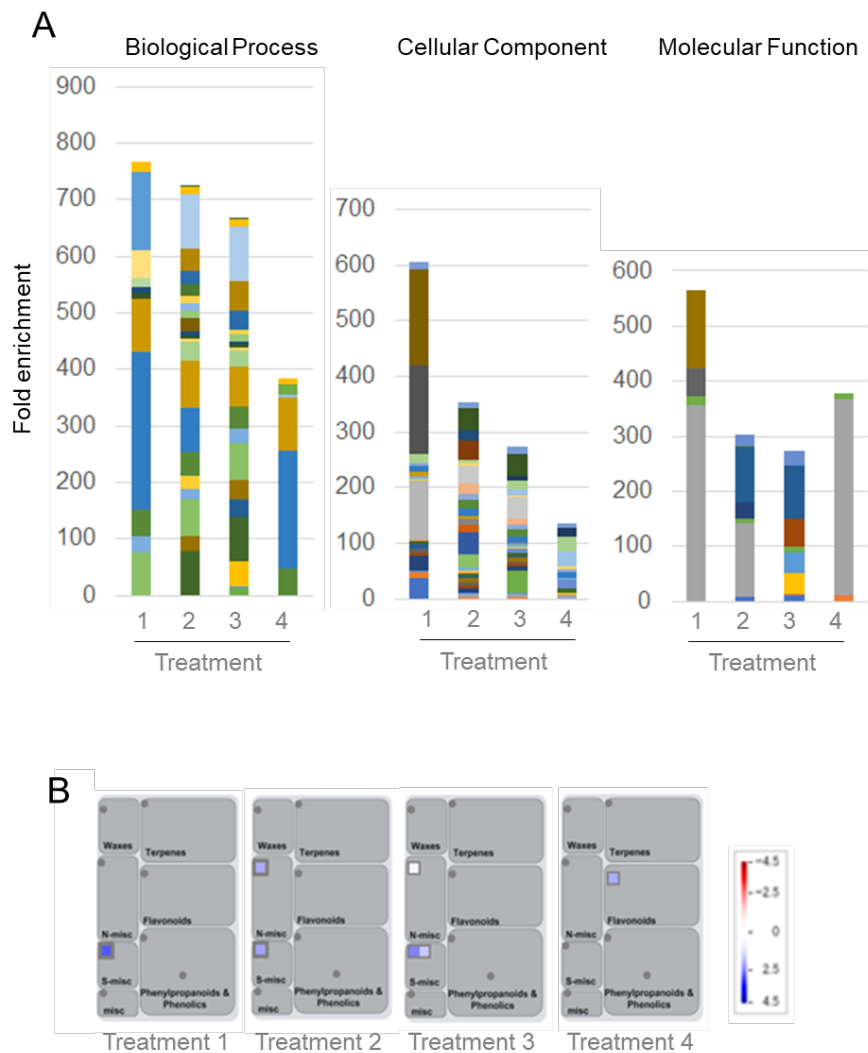


Figure 3 Functional categorization of proteins affected by salt stress.

(A) GO-based enrichment analysis of significantly changed. Results were screened using a p-value of 0.05 with false discovery rate (<0.01). Categories were shown in terms of biological process, molecular function, cellular component. Different color indicates different functional categories.

(B) Secondary metabolic pathways of salt-responsive proteins identified in each treatment. Differentially accumulated proteins were mapped to known metabolic pathways using MapMan software. Color indicates decreased proteins with color tone.

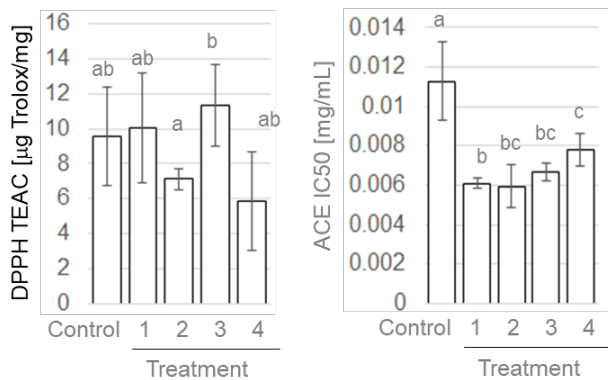


Figure 4 Antioxidant activity and ACE inhibitory activity of cladode extract measured, using crude extract from each salt treatment.

Young cladode cuttings were collected from plants and planted. Different letter indicates statistically significant differences ($p < 0.05$).

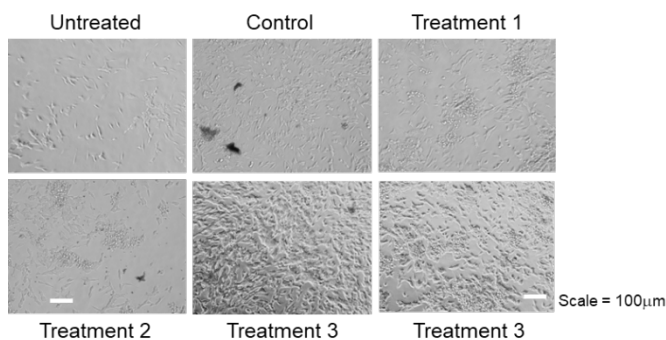


Figure 5 Morphological change of SHSY-5Y cells cultured in medium containing cladode extract (100 mg/mL) from each salt treatment.

4. 考察

本研究では自然環境中の塩がウチワサボテン *N. cochenillifera* の環境ストレス応答と健康増進効果に及ぼす影響の評価を行った。葉状茎の生長はさまざまな塩処理条件下で異なる反応を示し、特に NaCl 処理が成長に大きな負の影響をもたらすことが明らかになった。葉状茎自体のストレス応答、葉状茎を取り巻く環境(土壌微生物)、葉状茎抽出物が動物培養細胞にもたらす影響をそれぞれ解析した結果、葉状茎プロテオームでは二次代謝に関与する因子が変動することならびにその変動パターンは処理間で異なることが明らかになった(**Fig. 3B**)。MgCl₂ 処理により変動した Isoflavone reductase homolog P3 はダイズにおいて茎疫病への抵抗性を増すことが知られる因子

である⁴⁾。環境ストレス条件下で生体防御のためにフラボノイド生合成をはじめとした二次代謝が変化することが食品としての機能性に影響を及ぼすと考えられた。

植物が乾燥や塩などの環境ストレスを受けると酸化ストレスからの保護のため活性化酸素の消去が行われる⁵⁾。アスコルビン酸やグルタチオンなどが蓄積され抗酸化能が上がることを期待されるため葉状茎抽出物の DPPH ラジカル消去能を測定したが、栽培条件間で DPPH ラジカル消去能の差は見られなかった(**Fig. 4**)。抗酸化能は再現性良く測定することが困難な指標の一つであるため、葉状茎の個体差を踏まえてより詳細な検討が望まれる。ACE 活性阻害能は 4 種類の塩処理条件すべてで高くなっていった(**Fig. 4**)。各種塩処理により存在量が上昇した因子の中に ACE に結合しうる構造を持つタンパク質が含まれると考えられるため、影響を受けたタンパク質とその生物学的機能(**Fig. 3A**)の精査を行い、機能性を持つペプチドの同定と併せて検討していく必要がある。ACE は血管収縮機能を持つことが広く知られており、最近では ACE2 が新型コロナウイルス(ARS-CoV-2)の宿主細胞内への侵入に重要な役割を果たすことが明らかになった⁶⁾。栽培条件により ACE 活性阻害能を高めることができれば、食を通じた新たな健康増進手段の提供につながることも付加価値を高めて低利用資源を高度活用していくことにもなる。

ウチワサボテン類の健康機能性の面では食後高血糖の抑制効果や肥満防止効果が知られている⁷⁾。認知機能向上に有用であるという報告もある⁸⁾。本研究における培養細胞を用いたアッセイでは、*N. cochenillifera* の葉状茎抽出物の培地への添加はヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y の生残には影響がなかった一方で細胞の形態に変化を及ぼした(**Fig. 5**)。高齢化の進展に伴って認知機能の維持に寄与する食生活の重要性が増していることを踏まえると興味深いデータであるといえる。さらに、この細胞応答は葉状茎がどのような塩処理条件下で栽培されたかによって異なっていた(**Fig. 5**)。培養細胞の形態変化は、葉状茎を取り巻く環境、ストレス応答、抽出物の生化学的性質を含む塩処理によって影響を受ける複数の指標のうち特定の指標と相関するような状況ではなかったものの、栽培条件を最適に制御することにより植物の持つ健康増

進効果を期待した以上に高めることのできる可能性を示すものと考えられる。

5. 今後の課題

近年遺伝子型と多様な環境や管理方法との相互作用 ($G \times E \times M$ と呼ばれる)の重要性が認識され、環境条件が作物の品質に及ぼす影響を明らかにする試みが行われている。低利用の作物として東南アジア原産の希少ショウガ科を例にとると、降雨量、栄養分、土壌 pH が収量に、温度、植え付けと収穫の時期が二次代謝産物の蓄積の面で品質に影響を与えることが明らかになってきている⁹⁾。本研究ではさまざまな塩がウチワサボテン *Nopalea cochenillifera* の環境ストレス応答と健康増進効果に及ぼす影響の評価を行い、栽培条件によって抗酸化能や ACE 活性阻害能などの健康価値に関わる品質が変化することを示した。塩処理の効果を評価する指標として複数の生物学的事象のレイヤーを扱ったが、作物の付加価値を高める処理条件の確定と効果の本体物質の特定にむけてさらに詳細な条件で検討する必要がある。具体的には代謝物変化と細胞応答の詳細に関するデータを加えた相関解析を展開することで $G \times E \times M$ に関する理解を増進することが可能になると考えられる。

5. 文献

1. Silva-Ortega CO, Ochoa-Alfaro AE, Reyes-Agüero JA, Aguado-Santacruz GA, Jiménez-Bremont JF. Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol Biochem* 2008 46: 82-92.
2. Hashiguchi A, Yamaguchi H, Hitachi K, Watanabe KN. An optimized protein extraction method for gel-free proteomic analysis of *Opuntia ficus-indica*. *Plants (Basel)* 2021 10: 115.
3. Ko SS, Liu YC, Chung MC, Shih MC, Mohammadmehdi Habibi, Oguchi T, Watanabe KN, Yeh KW. Environmental biosafety assessment on transgenic *Oncidium orchid* modified by RNA interference of Phytoene Synthase genes. *Plant Biotechnol (Tokyo)* 2019 36:181-185.
4. Cheng Q, Li N, Dong L, Zhang D, Fan S, Jiang L, Wang X, Xu P, Zhang S. Overexpression of soybean osoflavone reductase (GmlFR) enhances resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Front Plant Sci.* 2015 6: 1024.
5. Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 2004 161:1189-1202.
6. Liu C, Zhou Q, Li Y, Garner LV, Watkins SP, Carter LJ, Smoot J, Gregg AC, Daniels AD, Jervey S, Albaiu D. Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases. *ACS Central Science* 2020, 6: 315-331.
7. Magaña-Cerino JM, Guzmán YJ, Soto-Luna IC, Betanzos-Cabrera G, Gurrola-Díaz CM. Cladodes from *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae) attenuate postprandial glycaemia without markedly influencing α -glucosidase activity. *Nat Prod Res* 2022 36: 1105-1108.
8. Han EH, Lim MK, Kee S, Lee SH, Yun SM, YU H-J, Ryu S-H, Lim Y-H. Efficacy of ethanolic extract of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* stems for improving cognitive function in elderly subjects 55-85 years of age: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Med Food* 2020 23: 1146-1154.
9. Pojanagaroon, S. Standardization of appropriate Krachai-Dam *Kaempferia parviflora* Wall.ex Baker rhizomes's qualities for honey Krachai-Dam wine production (Thesis). 2007 Chiang Mai University, Chiang Mai.

Evaluation of Nutraceutical Properties of Cacti under Salinity Stress

Akiko Hashiguchi

Faculty of Medicine, University of Tsukuba

Summary

Opuntia spp., which is grown as vegetable crops in America, Africa, and the Mediterranean region, has become an important alternative crop in the context of climate change, due to its high water-use efficiency and heat/drought tolerance. It is also promising as a high value-added novel crop because of its health-promoting effects such as suppression of blood glucose elevation and insulin level regulation. In this study, the effect of salinity stress treatment on plant physiological response and health-promoting effects as food was evaluated. Growth of *Nopalea cochenillifera* cladodes was affected differently under four salt treatments for 12 weeks, with NaCl (500 mM) treatment in particular having a significant negative effect. The stress response of the cladodes, the rhizosphere microbial population, and the effects of cladode extracts on cultured animal cells were analyzed, and the results of proteome analysis showed that the abundance of Isoflavone reductase homolog P3 was altered in the cladodes. Changes in secondary metabolism for plant defense against the stress might affect their functionality as food. The DPPH radical scavenging capacity of the extract was measured as antioxidant capacity was expected to increase, but enhancement was not observed by the treatments; the ACE activity inhibitory capacity of the extract from all salt treatment conditions was higher compared to control extract derived from condition without stress. It was suggested that the abundance of proteins that can bind to ACE was increased by the treatments. In assays using cultured cells, cladode extract had no effect on the survival of SH-SY5Y neuroblastoma cells, but altered cell morphology. This morphological change varied among the treatments under which cladodes were grown, indicating that health-promoting effects of *N. cochenillifera* cladodes can be enhanced by controlling the cultivation conditions optimally.