

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15629

研究課題名（和文）サボテンの環境ストレス耐性機構に関する基盤的研究

研究課題名（英文）Fundamental research on environmental stress resistance mechanisms of cacti

研究代表者

堀部 貴紀（Horibe, Takanori）

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：30757943

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、サボテンの持つ未知の環境ストレス耐性機構を解明し、さらにその性質を利用した新規栽培法を確立することを目的としている。研究期間を通して、サボテンが複数の重金属（亜鉛・鉄・カドミウム）に対して非常に高い耐性を持つ超集積植物であることを明らかにした。またカドミウム耐性については、多肉質というサボテンの形態的な特徴が関与している可能性を示した。さらに、重金属耐性を利用して食用サボテンの機能性を高める栽培技術を開発した。本研究では、サボテンの環境耐性の解明と新規栽培技術の開発につながる有用な知見が得られたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サボテンが乾燥や高温といった環境ストレス耐性に加えて、多様な重金属に対しても非常に高い耐性を持つことを世界で初めて示すことができた。また、重金属耐性を活用してミネラルを高濃度に含む機能性食用サボテンの栽培技術を開発した。さらに、サボテンの乾燥地域での土壌重金属浄化（ファイトレメディエーション）に応用できる可能性がある。本研究では、植物科学の発展に加え、食料飼料生産や食品産業に貢献する有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the unknown environmental stress tolerance mechanism of cacti and to establish a new cultivation method using the characteristics. Through the research period, we clarified that cacti are hyperaccumulating plants with extremely high resistance to multiple heavy metals (zinc, iron, and cadmium). We also showed that cadmium tolerance may be related to the succulent morphological characteristics of cacti. In addition, we developed a cultivation technique that enhances the functionality of edible cacti by utilizing their resistance to heavy metals. In this study, we believe that we have obtained useful knowledge that will lead to the clarification of the environmental resistance of cacti and the development of new cultivation techniques.

研究分野：園芸学

キーワード：食用サボテン 環境ストレス耐性 水耕栽培 ファイトレメディエーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食用サボテンは、サボテン科のウチワサボテン(*Opuntia* 属および *Nopalea* 属)の茎節を可食部とし、機能性野菜や加工品原料、家畜飼料として世界の広い地域で利用されている。サボテンは発達した貯水組織を含む茎節、厚いクチクラ層、環境条件に応じて変化する可変的な CAM 型光合成などの形質を発現し、乾燥や高温など過酷な環境ストレス下でも高い生産性を展開している。地球温暖化や人口増加に対する対策が喫緊の課題である現在において、環境ストレス耐性と高い生産性を兼ね備えているサボテンは、健康的な食品や家畜飼料として、また特殊機能を解明するモデル植物として貴重である。

申請者はこれまでに食用サボテンの水耕栽培法を世界で初めて報告し、水耕栽培や植物工場での光環境制御が生産性や品質の向上に有効であることを明らかにした。また、サボテンが複数の重金属に対して高い耐性を持つことを報告した。さらに水耕栽培時において、水温 40℃以上や低 pH 条件下 (pH 2.5) でも問題なく生育できることも見出している。これらの耐性機能は一般的な多くの野菜では発現不可能であり、サボテンが獲得した驚異的な形質である。しかしながら、その発現を支える分子生物学的、生理学的、形態学的な知見は限られており、CAM 植物の延長線で議論されることが多い。サボテンが持つ高温や乾燥への耐性などの特徴的な形質の分子機構は、ゲノム情報の未整備や形質転換法が未確立であることなどから詳細な解析が困難となっている。こうした状況において、サボテンの形質転換法の確立や重金属耐性の評価は、未だ明らかとなっていない食用サボテンの多様な環境ストレス耐性機構の解明に有効であると考えた。さらに野菜や飼料としての応用面に関しても、サボテンが持つ特異機能は未開拓の生物資源になると考えた。

本研究課題の目的は、サボテンが有する未知の環境ストレス耐性機構を明らかにし、さらにそれを活用することである。こうした背景の中でサボテンを研究することは3つの意味をもつ。第一に、ミネラルなど栄養成分の基礎研究はサボテンの資源的価値を高める。第二に、乾燥、強光、急激な温度変化等の環境ストレスに対する耐性機構を代謝産物、生理学の視点で解明することは植物科学に新たな視点と知見をもたらす。第三に、水耕栽培や栽培環境条件が生育に与える影響を評価することは、生産効率や機能性の向上に資す。申請研究を基盤として、有機化学、調理科学等の研究者も含む組織的研究へと発展させることを目指す。

2. 研究の目的

本研究では、サボテンが有する未知の環境ストレス耐性機構を明らかにし、さらにそれを活用することを目的とした。そのため研究期間においては、(1)遺伝子組換え技術の確立、(2)環境ストレス耐性機構の解明、(3)生産性を高める栽培法の検討に取り組んだ。本研究の最終目標を下記のように設定した。

(1)遺伝子組換え技術の確立：遺伝子組換えは遺伝子機能解析などの基礎研究においては必須の技術の1つである。この技術の未確立がサボテンの基礎研究の広がりを阻んでいる大きな要因であることから、遺伝子組換え技術の確立と公開を目指す。

(2)環境ストレス耐性機構の解明：重金属を含む水耕液でサボテンを栽培し、生育への影響を評価する。さらに重金属蓄積部位を組織・細胞レベルで明らかにする。また重金属輸送体について、組織別に遺伝子発現レベルでの特徴を明らかにする。

(3)生産性を高める栽培法の検討：(2)の結果を踏まえ、高品質で機能性の高いサボテンを生産するために水耕栽培法を改良する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え技術の確立

形質転換には高発現プロモーター(CaMV 35S)の下流に Intron-GUS 遺伝子を接続したバイナリーベクターを持つアグロバクテリウムを使用した。植物断片にこのアグロバクテリウムを感染させると、細菌から Intron-GUS 遺伝子が移行した植物細胞でだけ GUS タンパク質が検出できる。サボテン茎切片に上記アグロバクテリウムを感染させ、感染させた植物断片から遺伝子導入個体を抗生物質耐性で選抜後、再分化させて組換え植物を作出する。また、カルスからの再分化を必要としないアグロインフィルトレーション法による形質転換も試みた。

(2) 環境ストレス耐性機構の解明

長さを揃えた葉状茎を、硝酸亜鉛(50、200 ppm)・キレート鉄(50、200 ppm)・硝酸カドミウム(1、15 ppm)を含む培養液にて10週間以上水耕栽培した。すべての処理において、ウチワサボテン茎節はクリップでL型アングルプラスチックバーに取り付けられ、水耕液で満たされた4.5Lの長方形のプラスチック容器内で水耕栽培された。使用した水耕液は、OATハウスA処方1単位を基本とし(EC 2.6 dS m⁻¹、pH 6.5)、そこにそれぞれの重金属を添加した。栽培試験は人工気象器内で行われ、植物体は明期14時間(25-30℃)・暗期10時間(15-20℃)の条件で保持された。光量子束密度はプラスチック容器の表面で160-180 mmol m⁻² s⁻¹であった。栽培期間中は娘茎節の発生数や生育速度を経時的に測定した。栽培期間終了後、各植物を娘茎節・親茎節・根などに分解し、各植物器官の新鮮重量(FW)と乾燥重(DW)を測定した。また収穫した各部位を乾燥させ湿式分解を行った後、原子吸光度計を用いて、植物体内に蓄積した重金属量を測定した。

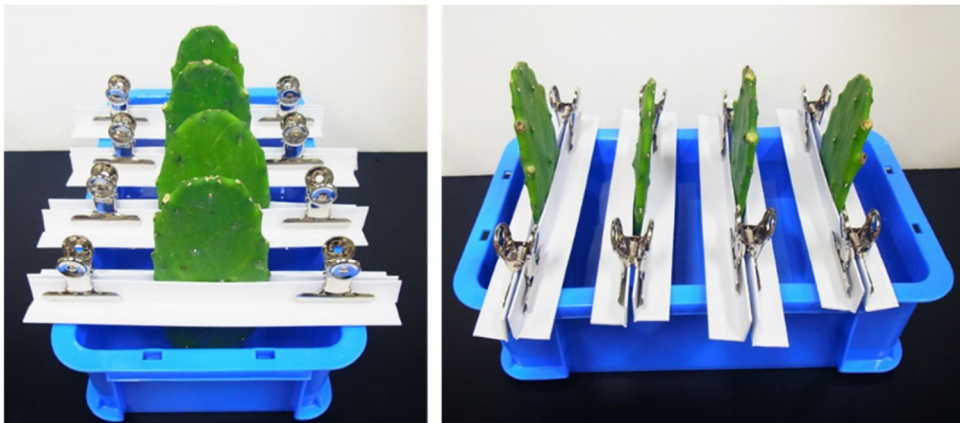


図1. 水耕栽培装置

(3) 生産性を高める栽培法の検討

生産性や機能性の向上を目的とし、水耕栽培の一種であるれき耕栽培(小石等での栽培)や、土壌の種類(水田土壌および砂質土壌)が食用サボテンの生育に与える影響を調査した。

市販のプラスチック容器(容量4.5L)内にて、市販の砂利を用いて茎節を固定した。液肥濃度(OATハウスA処方を1単位および3単位)、灌水頻度(月1~4回)、土の種類(砂質土壌、水田土壌)、重金属の有無(亜鉛および鉄)などを変化させ、娘茎節の発生や収量に与える影響を調べた。栽培期間終了後、各植物を娘茎節・親茎節・根などに分解し、各植

物器官の新鮮重量 (FW) と乾燥重 (DW) を測定した。また収穫した各部位を乾燥させ湿式分解を行った後、原子吸光度計を用いて、植物体内に蓄積した重金属量を測定した。なお、栽培試験は大学に設置されているガラス温室内にて実施した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子組換え技術の確立

ウチワサボテンのアグロバクテリウム法による形質転換手法を検討した。これまでの試験で、ウチハサボテンの滅菌・カルス化および再分化系を確立している。これらの培養系にアグロバクテリウム法を適用して形質転換体の作出を目指した。アグロバクテリウム法により茎切片からのカルス化は確認できたが、植物体の再分化および形質転換個体の確認はできなかった。検討した条件は、アグロバクテリウム菌株、共存培養期間、前培養や回復培養、刺座の適用、切断後の洗浄などである。

そこで次に、カルスからの再分化を必要としないアグロインフィルトレーション法による形質転換も試みた。その結果、接種後のいくつかの茎節から GUS タンパク質が検出され、形質転換に成功した。しかしながら形質転換効率は 1 ~ 2 % 程度と低く、現実的に使用できる技術といえる段階ではない。感染に使用するアグロバクテリウムの量、感染後の温度や光条件を細かく検討したが、大きく効率を改良することはできなかった。今後はパーティクルボンバードメント法など、遺伝子の直接導入法なども検討するのが適当と思われる。

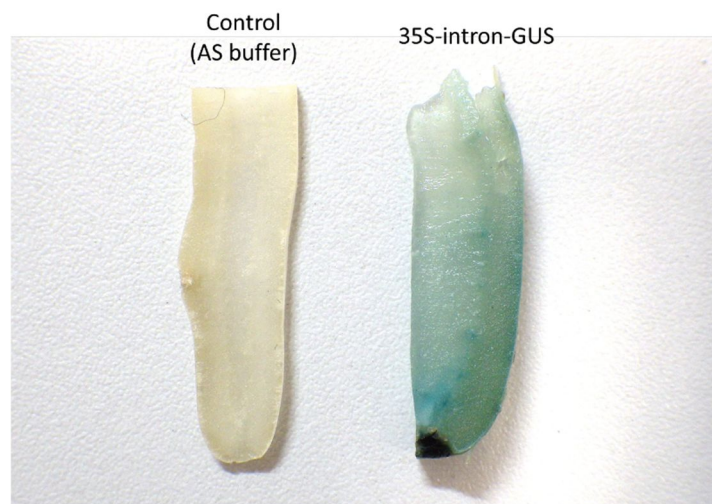


図 2. GUS染色の様子

(2) 環境ストレス耐性機構の解明

硝酸亜鉛(50、200 ppm)・キレート鉄(50、200 ppm)・硝酸カドミウム(1、15 ppm)の全ての処理区において、サボテンの成長と娘茎節の発生が確認された。しかしながら、処理する重金属の濃度が高くなると生育が阻害される傾向が観察された。次に茎節内の蓄積濃度を調査したところ、全ての重金属において、根における蓄積濃度が超集積植物(ハイパーアキュムレーター)の基準を上回っていた。特にカドミウムに関しては、植物体の全部位(茎および根)において蓄積濃度がこの基準を上回った。さらに、他の多くの植物と比較しても重金属処理による生育抑制が抑えられている事も明らかとなった。これらの結果は、サボテンは他の植物と比較しても非常に高い重金属耐性および蓄積能力を有していることが明らかとなった。さらに重金属の蓄積部位を詳細に調査したところ、カドミウムの大部分は維管束の外側領域(表皮近傍)に蓄積し、茎の大部分を占める貯水組織(皮層~髄)にはほとんど蓄積しないことが明らかとなった。亜鉛や鉄

は人体に必要なミネラル成分でもあり、これらを蓄積させる栽培技術は機能性や付加価値を高める栽培技術開発につながる。また、今回の試験で使用したカドミウム(15 ppm)は日本の土壤環境基準の 5000 倍の値である。これらはサボテンが高濃度の重金属に汚染された地域でも栽培が可能であることを示しており、重金属汚染土壤の浄化(ファイトレメディエーション)への応用可能性も示唆している。

また、サボテン茎節に含まれるシュウ酸カルシウム結晶と乾燥ストレスとの関連性についても調査した。水を十分に与えて生育させた個体と約 3 カ月の断水処理を行った個体とで、表皮組織に含まれるシュウ酸カルシウム結晶の直径と密度をデジタルマイクログラフで解析した。その結果、断水処理によりシュウ酸カルシウム結晶の直径が有意に小さくなった。シュウ酸カルシウム結晶は乾燥時(気孔閉鎖時)の二酸化炭素源となることがいくつかの植物で報告されており、サボテンにおいても同様の機能を有していることが示唆される。さらに、カドミウムの蓄積部位とシュウ酸カルシウム結晶の蓄積部位が部分的に重複していることが明らかとなった。遊離したシュウ酸は重金属とキレートを形成し重金属の無毒化に寄与している可能性があり、現在解析を進めている。

(3)生産性を高める栽培法の検討

本研究により、可食部 100 g あたりで鉄を約 5 mg、亜鉛を約 10 mg 含む食用サボテンの栽培に成功した。1 日の推奨摂取量は、鉄が約 1.5 mg、亜鉛が 8 mg である。これらの値は、他の植物性・動物性食品と比較しても非常に高い値である。

また、れき耕栽培や土壤の種類が生育や収量に与える影響も調査した。その結果、れき耕栽培では湛液型水耕栽培や従来の土耕栽培に比べて収量が増加した。れき耕栽培では肥料成分濃度の詳細な調節が可能であり、湛液型水耕に比べて省力的であるため、食用サボテンの新たな栽培技術として期待できる。次に土壤の種類が生育に与える影響を調査したところ、一般的にサボテン科の植物は排水性の高い土壤が栽培に適すると言われるが、本試験では予想とは砂質土壤よりも水田土壤で収量が増加した。以上の結果から、本研究で使用したサボテンは高い耐湿性を有している事が明らかとなり、また国内休耕田での栽培の可能性が示された。さらに水耕液に亜鉛や鉄を加えることで、れき耕栽培でもこれらの蓄積量を増加できることを明らかにした。



図 3. 栽培の様子 (れき耕栽培と土耕栽培)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takanori Horibe, Maho Makita.	4. 巻 27
2. 論文標題 Promotion of flower opening in cut rose cultivars by 1-naphthaleneacetic acid treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ornamental Horticulture	6. 最初と最後の頁 314-319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1590/2447-536X.v27i3.2347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saxe Houston J., Horibe Takanori, Balan Bipin, Butterfield Timothy S., Feinberg Noah G., Zabaneh Christopher M., Jacobson Aaron E., Dandekar Abhaya M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Two UGT84A Family Glycosyltransferases Regulate Phenol, Flavonoid, and Tannin Metabolism in Juglans regia (English Walnut)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 626483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.626483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 HORIBE Takanori	4. 巻 59
2. 論文標題 Cactus as Crop Plant Physiological Features, Uses and Cultivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environment Control in Biology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2525/ecb.59.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horibe Takanori	4. 巻 11
2. 論文標題 Use of Light Stimuli as a Postharvest Technology for Cut Flowers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 573490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.573490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Koji, Ueda Yoshihiro, Matsumoto Shogo, Horibe Takanori, Otagaki Shungo, Wang Li, Wang Guoliang, Hibrand-Saint Oyant Laurence, Foucher Fabrice, Linde Marcus, Debener Thomas	4. 巻 9
2. 論文標題 The identification of the Rosa S-locus provides new insights into the breeding and wild origins of continuous-flowering roses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hr/uhac155	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 HORIBE Takanori, TERANOBU Ryouta	4. 巻 60
2. 論文標題 Cadmium Hyperaccumulator Potential of the Edible Cactus Nopalea cochenillifera	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environment Control in Biology	6. 最初と最後の頁 205~212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2525/ecb.60.205	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horibe T.	4. 巻 1343
2. 論文標題 Iron biofortification of the edible cactus Nopalea cochenillifera grown under hydroponic conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 417~424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17660/actahortic.2022.1343.53	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Mamoru Tanaka, Hana Kozai, Ayaka Koida, Takanori Horibe
2. 発表標題 Impact of Nopalea cochenillifera on the intestinal environment and immune function in mice
3. 学会等名 22nd IUNS-International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉地憲一郎, 井上碧, 林和輝, 馬宮誠洋, 山口涼, 堀部貴紀
2. 発表標題 ウチワサボテンの重金属蓄積能力の評価とその利用
3. 学会等名 2022年度日本生物環境工学会東海・北信越支部合同支部大会「学生のための研究発表会」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 洞口由実子, 岡田かのん, 宮下勇人, 近藤海人, 堀部貴紀
2. 発表標題 サボテンが体内に蓄積するバイオミネラルの生理機能解明を目指した研究
3. 学会等名 2022年度日本生物環境工学会東海・北信越支部合同支部大会「学生のための研究発表会」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takanori Horibe
2. 発表標題 Iron Biofortification of the Edible Cactus <i>Nopalea cochenillifera</i> Grown Under Hydroponic Conditions
3. 学会等名 X International Congress on Cactus Pear and Cochineal (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香西はな, 恋田彩加, 堀部貴紀, 田中守
2. 発表標題 ウチワサボテン (<i>Nopalea cochenillifera</i>) がマウスの腸内環境および免疫機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第69回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 洞口由実子, 岡田かのん, 倉地憲一郎, 近藤海人, 堀部貴紀
2. 発表標題 サボテンは地球温暖化を緩和しうるのか? 茎節の炭素固定およびバイオミネラル合成特性の解析
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮下勇人, 井上碧, 林和輝, 馬宮誠洋, 山口涼, 堀部貴紀
2. 発表標題 生産性および機能性向上を目的とした食用ウチワサボテンのれき耕栽培技術の開発
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀部貴紀
2. 発表標題 サボテンに多量に含まれるシュウ酸カルシウム結晶の生理機能解明を目指した研究
3. 学会等名 令和4年度園芸学会東海支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 洞口由実子, 倉地憲一郎, 寺延亮太, 堀部貴紀
2. 発表標題 ウチワサボテンの重金属蓄積能力の解明とその活用を目指した研究
3. 学会等名 令和4年度園芸学会東海支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤良介, 安藤拓海, 吉田雄一郎, 鈴木孝征, 三田薫, 堀部貴紀, 柘植尚志, 高田 - 田中奈月, 前島正義.
2. 発表標題 サボテン液胞膜 H ⁺ -ピロホスファターゼの酵素学的特質と組織分布
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀部貴紀, 服部紗奈, 浦航大, 澤野翔稀, 服部美雪, 古川諒, 松本拓己.
2. 発表標題 ファイトレメディエーションへの利用を目指したウチワサボテンのカドミウム蓄積能力の評価
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部紗奈, 浦航大, 澤野翔稀, 服部美雪, 古川諒, 松本拓己, 堀部貴紀.
2. 発表標題 水耕栽培による食用サボテンの生産性および機能性の向上
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤史弥, 野村速斗, 林美里, 宮田侑佳, 堀部貴紀.
2. 発表標題 照射光の波長および強度調節によるバラ切り花の品質向上技術の検討
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田侑佳, 齊藤史弥, 野村速斗, 林美里, 堀部貴紀.
2. 発表標題 オーキシンの外部処理によるバラ切り花の開花速度調節
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香西はな, 田中 守, 大井琴未, 柴田りさ子, 久田英里, 堀部貴紀.
2. 発表標題 サボテンうどんの調製と官能評価
3. 学会等名 日本調理科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀部貴紀, 大石美菜子, 加茂愛海, 高瀬幹太, 林亮佑, 山中 萌音.
2. 発表標題 水耕栽培による食用サボテンの生産性およびミネラル含量の向上
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤良介, 佐藤心郎, 澤田有司, 平井優美, 榎元廣文, 朝比奈雅志, 堀部貴紀, 柘植尚志, 前島正義.
2. 発表標題 高い環境適応性をもつサボテンの代謝物の組成と組織内分布
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀部 貴紀, 大石 美菜子, 加茂 愛海, 高瀬 幹太, 林 亮佑, 山中 萌音.
2. 発表標題 ミネラルを高濃度に含有する食用サボテン生産の試み
3. 学会等名 日本生物環境工学会オンライン合同支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanori Horibe.
2. 発表標題 Edible cactus <i>Nopalea cochenillifera</i> is a hyperaccumulator of several heavy metals.
3. 学会等名 Webinar on Plant science (EST), (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanori Horibe.
2. 発表標題 Exogenous treatments with phytohormones affect petal growth and vase-life of several cut rose cultivars.
3. 学会等名 Webinar on Plant science (EST) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堀部 貴紀	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ベレ	5. 総ページ数 215
3. 書名 サボテンはすごい! 過酷な環境を生き抜く驚きのしくみ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------