

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04615

研究課題名(和文) 樹木の越冬に学ぶ水の凍結制御機構

研究課題名(英文) Control of freezing of water at subzero temperatures in woody plant cells

研究代表者

荒川 圭太 (Arakawa, Keita)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00241381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗氷核ポリフェノールが有する氷核形成阻害活性(過冷却促進活性または抗氷核活性)の作用機構を解析するため、氷核細菌 *Erwinia ananas* の氷核タンパク質 *inaA* を活性評価系に利用することにした。*inaA* にヒスチジンタグを付した組換えタンパク質(His-*inaA*)を大腸菌で発現させ、その菌体の粗抽出液からHis-*inaA*をアフィニティ精製したところ、可溶性His-*inaA*画分でも氷核活性が検出された。さらに、この可溶性His-*inaA*画分に抗氷核ポリフェノールを添加すると氷核活性が抑制された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that existence of the ice nucleation substances (ice nucleators) such as silver iodide and ice nucleation bacteria promote freezing of supercooled water. Because these substances catalyze freezing of water, ice nucleation activity (INA) increases freezing temperature of the solution. On the other hand, recent studies showed that some polyphenols repressed INA of ice nucleators and depressed freezing temperature of the solution containing ice nucleators. Existence of these polyphenols (anti-INA polyphenols) maintained supercooling state of the solution. For study on the anti-INA process by anti-INA polyphenols, His-*inaA* was highly purified from the soluble fraction prepared from the crude extracts of *Escherichia coli* cells overexpressing His-*inaA* and soluble form of His-*inaA* was characterized. INA was detected in the soluble form of His-*inaA* and repressed by addition of some anti-INA polyphenols.

研究分野：樹木生理学

キーワード：氷核細菌 氷核タンパク質 ポリフェノール 氷核活性 氷核形成阻害活性 過冷却 *inaA*

1. 研究開始当初の背景

近年、我々の研究室では、越冬する植物は細胞内の水を決して凍らせないという性質に注目し、深過冷却によって越冬する樹木の木部組織から水溶液の凍結温度を低下させる凍結防御活性（氷核形成阻害活性、抗氷核活性または過冷却促進活性）を検出した。この活性物質（過冷却物質）の単離・同定を進めたところ、4種類のフラボノイド配糖体と4種類の加水分解性タンニンが得られた^{①,②}。これらの抗氷核ポリフェノールは、氷核形成を促して凍結を誘発する化合物（氷核物質）が水に混入する条件でのみ効果を発揮する。そのため、過冷却促進活性を測定する際には、氷核物質によって凍結が促進される条件を前提としている。この条件では、既知の氷核物質（ヨウ化銀や氷核細菌など）を超純水（MQ水）に添加して冷却することで、凍結温度の上昇が見られる。この水溶液にさらに抗氷核ポリフェノールを添加して冷却すると、氷核物質を添加した効果が抑制され、凍結温度が低下する。我々が見出した過冷却物質の中でも優れた活性を示すケンフェロール 7-O-グルコシド (K7G) を、氷核細菌を添加した MQ 水に対して終濃度で 0.5~1 mg/mL（数 mM）程度添加し、ドロップレット凍結法で過冷却促進活性を測定すると、凍結温度（INT₅₀: 100 個以上の 2 μL の微量な水滴の半数が凍結する温度）が 9°C 近くも低下した。他のフラボノイド配糖体や加水分解性タンニンの過冷却促進活性はおおよそ 2~4°C であったが、これでも既往のものに比べて高いものであった。また、このような抗氷核ポリフェノールは、凍結温度を低下させるほか、水溶液の過冷却状態をより安定的に維持する効果も見出された。そのため、これらの構造類似体について網羅的に活性検出を試み、ポリフェノールを中心に 40 種近くの過冷却物質を新たに見出した^{③,④,⑤}。その後、樹木の木部柔細胞での生理現象を参考にし、抗氷核ポリフェノールと氷核物質とがかかわる水の凍結制御機構を理解に努める必要があることを実感した。そのためには、抗氷核ポリフェノールと同様に重要な化合物である氷核物質も都合よく取り扱える物質であることが好ましいと考えるに至った。

2. 研究の目的

現時点で、凍結の引き金となる氷核の形成を過冷却物質が阻害して過冷却を維持するメカニズムの詳細は不明であるが、水の凍結を抑制する機能は学術的にも実用的にも非常に魅力的である。そこで我々は、抗氷核ポリフェノールが氷核物質に対してどのように作用するのかについて検証する。そのため、すでに氷核細菌 *Erwinia ananas* から単離した *inaA* 遺伝子から作出した組換え氷核タンパク質 (His-*inaA*) を利用して、抗氷核ポリフェノールが氷核活性を抑制することを再現できる実験系を構築し、これを利用して氷

核タンパク質自体の活性特性を調べると共に、抗氷核ポリフェノールが氷核活性を抑制する現象を分析し、水の凍結を制御する仕組みの理解に努めることとした。

3. 研究の方法

① 組換え *inaA* の調製

大腸菌株で発現させた各組換え *inaA* を単離・精製するため、組換え大腸菌の粗抽出物を 9,000×g 沈殿画分（封入体画分）、100,000×g 沈殿画分（膜画分）、100,000×g 上清画分（可溶性画分）の三つに分画し、氷核活性を測定した。さらなる解析には、アフィニティ精製した組換え *inaA* を用いることとした。高度に精製されたこの標品は活性測定など以降の解析に利用した。

② 樹皮の粗抽出物の調製

採取した樹皮を液体窒素中で粉砕し、抽出用緩衝液と 20 mg/mL ポリビニルピロリドン (PVPP) を加えて抽出した後、9,000×g で 10 分間の遠心分離をおこなって上清と沈殿を取り分けた。上清はさらに 15,000×g で 10 分間の遠心分離をおこなって上清 (15,000×g 上清画分) を得た。このときの沈殿 (9,000×g 沈殿画分) は新しい抽出用緩衝液を用いて 3 回洗浄した後、MQ 水を加えて懸濁したものを不溶性画分とした。続いて、この不溶性画分に対し 10 倍量の MQ 水を加えて振とうした後、遠心分離して上清を取り分けた。この操作を同一試料で 10 回繰り返す、それぞれで得られた上清を孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターで濾過し、濾液を洗浄液画分（洗浄液画分 1~10）とした。

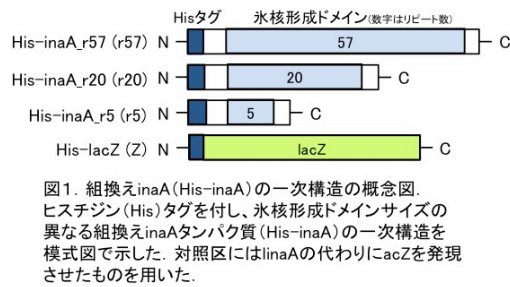
③ 凍結温度の測定による氷核活性評価

熱分析法によって冷却したサンプルが凍結する際の発熱を検知した。凍結が始まった温度を凍結温度とみなし、対照区と試験区の凍結温度の差をもとめ、氷核活性または氷核形成阻害活性として評価した。なお、氷核形成阻害活性の測定では、抗氷核ポリフェノール（エピガロカテキンガレート: EGCG ほか）などを用い、氷核細菌や組換え *inaA* の氷核活性をどの程度阻害するかを評価する。さらに、*inaA* に対するポリクローナル抗体（抗 *inaA* 抗体）を利用して氷核活性に対する影響を調べた。

4. 研究成果

本研究では、氷核物質による水溶液の凍結を抗氷核（過冷却促進）ポリフェノール類が阻害するメカニズムを調べるため、氷核物質と抗氷核ポリフェノール類との相互作用について検証することにした。そのため、氷核細菌 *Erwinia ananas* 由来の *inaA* 遺伝子にヒスチジンタグを付して大腸菌で発現させることで得られた組換え氷核タンパク質 His-*inaA* (図 1) をアフィニティ精製し、これを用いて過冷却促進ポリフェノールによ

る His-inaA の氷核活性阻害様式を調べた。また、植物の凍結挙動のメカニズム解明の一環として、植物由来の氷核活性物質についても分析を進めた。



(1) 組換え inaA と過冷却促進ポリフェノールの相互作用に関する研究

氷核細菌 *E. ananas* では inaA は菌体の外膜上に局在し、活性を有したままで可溶化することが難しいといわれていた。そこで組換えタンパク質という形で発現させた氷核タンパク質を菌体の粗抽出液から単離することにした。大腸菌を用いて組換え氷核タンパク質(His-inaA)を発現させたところ、組換え大腸菌株に氷核活性が付与された(図2)。

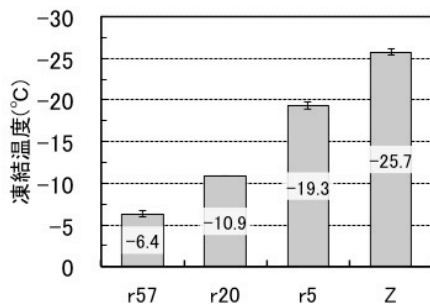


図2. His-inaAを発現させた大腸菌の氷核活性。各種His-inaAを発現させた大腸菌の懸濁液を用いて凍結温度を測定することで氷核活性を評価した。

この組換え大腸菌抽出物から活性を有したままで His-inaA を単離することを試みた。His-inaA を発現させた大腸菌の粗抽出液から可溶性画分、膜画分、封入体画分の3つに分画して活性測定をおこなったところ、いずれの画分からも氷核活性を検出できたので、いずれの画分にも活性を有した His-inaA が存在することが示唆された^⑥(図3)。

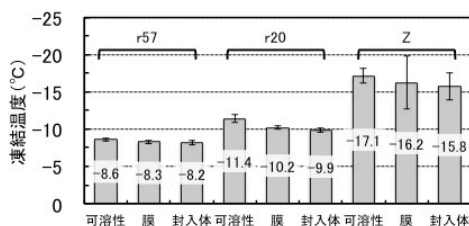


図3. His-inaAを発現させた組換え大腸菌から調製した各種画分の氷核活性。各種His-inaAを発現させた大腸菌の粗抽出液から可溶性画分、膜画分、封入体画分を調製し、各画分の凍結温度を測定することで氷核活性を比較した。

この可溶性画分の氷核活性は、抗氷核ポリフェノールを添加することで活性阻害を受けて凍結温度が上昇することが明らかになった(図4)。

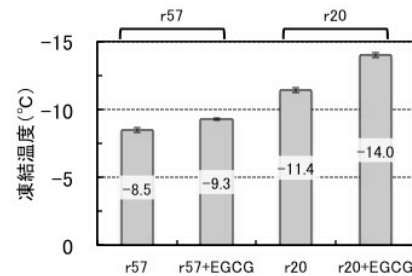


図4. 可溶性画分を用いて測定したエピガロカテキンガレート(EGCG)の氷核形成阻害活性。

さらに、氷核タンパク質の利用のしやすさを考慮して、可溶性画分に存在する His-inaA についてヒスチジンタグを利用してアフィニティ精製したところ、他のタンパク質の混入はあるものの、十分な氷核活性を示す画分が回収できた。この可溶性 His-inaA の氷核活性は過冷却促進ポリフェノールによって活性阻害を受けて凍結温度が上昇した。さらに抗 inaA 抗体を投与することによって氷核活性がほんのわずかながら活性低下を引き起こすことが明らかになった(Data not shown)。

上記の結果から、氷核物質として可溶性の His-inaA を用いることで、抗氷核ポリフェノールとの相互作用の有無を検証することが可能であることが示唆された。しかし、特異抗体による活性阻害の程度が低いため、氷核形成ドメインの重要性や抗氷核ポリフェノールとの相互作用について調べるためにはさらなる条件検討が必要であるため、引き続き検証を続けていく。

(2) 樹木の耐寒性機構に関する研究

氷核形成を阻害して過冷却を促進するポリフェノールは、樹木の木部柔細胞の越冬様式として知られている深過冷却機構に関与することが示唆されている。このようなポリフェノール成分の機能性を産業利用するための基盤整備のための研究として、緑葉の表面に付着する氷核細菌に対しても氷核形成阻害効果を発揮するのか否かについて検証した。すると、氷核細菌を塗布した緑葉リーフディスクを氷点下温度で冷却すると、緑葉の表面の氷核細菌の影響で緑葉の凍結が始まるところを、抗氷核ポリフェノールを緑葉表面に塗布・散布することによって緑葉の凍結が回避されることが実証された^⑦(図5)。さらに、これらのポリフェノール類がいろいろな植物に含有されていることを鑑み、様々な植物から粗抽出物を調製し、氷核細菌の氷核活性を抑制する効果の高いものを選抜し、それらを用いて同様の試験をおこなった。すると、緑葉表面上に塗布した氷核細菌に起因する凍結を抑制する効果に優れることが明らかとなった(図6)。

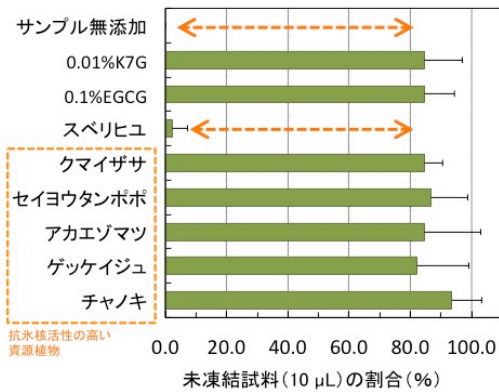


図5. 植物粗抽出物による氷核形成阻害効果の検証。
氷核細菌と粗抽出物を滴下した緑葉を-4℃で冷却したところ、いくつかの植物種由来の粗抽出物は、氷核細菌による緑葉の凍結を回避することが明らかになった。



図6. 緑葉粗抽出物による氷核形成阻害効果の検証。
氷核細菌と粗抽出物を噴霧したカイワレダイコンを-3℃で1時間冷却したところ、緑葉粗抽出物を噴霧したものは、氷核細菌による個体の凍結を回避する確率が向上した。

凍結抑制効果を発揮する機能成分の解析を進める一方で、凍結抵抗性が著しく高い樹木の樹皮から細胞外凍結を促進する氷核活性を検出することができた。樹皮の柔細胞では細胞外凍結という凍結挙動によって氷点下温度に適応している。寒冷地に生息する樹木の細胞外凍結能力は極めて優れていることが知られており、緩速冷却なら液体窒素温度までも生存できるものも存在する。この細胞外凍結では、最初に細胞外の水が凍結することで未凍結水を蓄える細胞内との間で水蒸気圧差が生じて、これが平衡化するまで細胞内部の水が細胞外へ移動するため、細胞は脱水される（凍結脱水）。この凍結挙動は草本植物でも広く観察されるものであるが、寒冷地の樹木樹皮の細胞の能力には遠く及ばず、凍結脱水による著しい収縮変形などによって細胞膜などが不可逆的な損傷を被る。今回、このような凍結挙動が観察される樹皮から抽出された成分から、細胞外の凍結を促すような氷核活性が検出された。この氷核活性は、ヨウ化銀や氷核細菌のように高い氷核活性ではなさそうではあるが、既知の植物由来の氷核成分であるシュウ酸カルシウムとは異なることが示唆された (Data not shown)。また、この活性成分が含まれる画分に対していくつかの処理を施し、氷核活性への影響を調べたところ、プロテアーゼやセルラーゼ処理に対して非感受性であった (Data not

shown)。このことから、氷核タンパク質である inaA と異なることが強く示唆された。このような樹皮由来の氷核活性成分の構造や機能に関する研究は、細胞外から水の凍結が始まる細胞外凍結を理解するための有力な手段となりうることを期待できるため、こちらも引き続き構造解析などをおこなっていききたい。

また、樹木の凍結挙動機構の基盤研究と並行し、凍結を促進する活性と凍結を抑制する活性の両者を実社会で有効利用する可能性についても検討をおこなっていききたい。引き続きこれらの抽出成分の機能性を評価するため、既知の氷核物質との構造や活性の比較はもとより、過冷却促進ポリフェノールによる活性阻害の有無、それらとの相互作用の有無などをさらに詳しく検証することは、結果的に水の凍結制御機構を理解する上で非常に有意義な知見が得られるものと思われる。植物における水の凍結を制御する仕組みを把握し、それを実社会に利用するということができるよう、今後も植物成分による水の凍結制御機構に関する研究を継続する必要がある。

<引用文献>

- ① Kasuga J, Hashidoko Y, Nishioka A, Yoshiba M, Arakawa K, Fujikawa S: Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant, Cell and Environment*, 31: 1335-1348 (2008)
- ② Wang D, Kasuga J, Kuwabara C, Endoh K, Fukushi Y, Fujikawa S, Arakawa K: Presence of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) hydrolyzable tannins in deep supercooling xylem parenchyma cells in *Cercidiphyllum japonicum*. *Planta*, 235: 747-759 (2012)
- ③ Kuwabara C, Wang D, Endoh K, Fukushi Y, Arakawa K, Fujikawa S: Analysis of supercooling activity of tannin-related polyphenols. *Cryobiology*, 67: 40-49 (2013)
- ④ Kuwabara C, Wang D, Kasuga J, Fukushi Y, Arakawa K, Koyama T, Inada T, Fujikawa S: Freezing activities of flavonoids in solutions containing different ice nucleators. *Cryobiology*, 64: 279-285 (2012)
- ⑤ Kuwabara C, Kasuga J, Wang D, Fukushi Y, Arakawa K, Koyama T, Inada T, Fujikawa S: Change of supercooling capability in solutions containing different kinds of ice nucleators by flavonol glycosides from deep supercooling xylem parenchyma cells in

trees. Cryobiology, 63: 157-163 (2011)

- ⑥ 出原信大, 宇梶慎子, 鈴木伸吾, 小高優子, 藤川清三, 荒川圭太: 過冷却促進(抗氷核)ポリフェノールによる組換え氷核タンパク質の氷核活性阻害. 低温生物工学会誌 63: 155-160 (2017)
- ⑦ Suzuki S, Fukuda S, Fukushi Y, Arakawa K: Screening of plant resources with anti-ice nucleation activity for frost damage prevention. Biosci Biotechnol Biochem 81: 2090-2097 (2017)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Suzuki S, Fukuda S, Fukushi Y, Arakawa K: Screening of plant resources with anti-ice nucleation activity for frost damage prevention. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 81: 2090-2097 (2017) (査読有)
DOI: 10.1080/09168451.2017.1373587
- ② 出原信大, 宇梶慎子, 鈴木伸吾, 小高優子, 藤川清三, 荒川圭太: 過冷却促進(抗氷核)ポリフェノールによる組換え氷核タンパク質の氷核活性阻害. 低温生物工学会誌 63: 155-160 (2017) (査読有)
DOI: 10.20585/cryobolcryotechnol.63.2_155
- ③ 鈴木伸吾, 福田怜, 福士幸治, 荒川圭太: 植物抽出物の過冷却促進活性の比較. 低温生物工学会誌, 63: 33-36 (2017) (査読有)
DOI:10.20585/cryobolcryotechnol.63.1_33

[学会発表] (計5件)

- ① 鉄穴口晃, 鈴木伸吾, 荒川圭太: カツラ樹皮から検出された氷核活性に関する基礎研究. 第68回日本木材学会大会(京都大会), 京都府立大学(京都府京都市)(2018年3月)
- ② 川村浩平, 嘉見大助, 鈴木伸吾, 田中大介, 遠藤圭太, 大槻祐香子, 藤川清三, 山岸祐介, 荒川圭太: 超低温保存後の交雑ポプラ茎頂の個体再生率向上への試み. 日本農芸化学会2018年度名古屋大会, 名城大学(愛知県名古屋市)(2018年3月)
- ③ 出原信大, 桑原慎子, 鈴木伸吾, 小高優子, 藤川清三, 荒川圭太: 過冷却促進(抗氷核)ポリフェノールによる組換え氷核タンパク質の氷核活性阻害. 第62回

低温生物工学会大会, 北海道大学(北海道札幌市)(2017年5月)

- ④ 出原信大, 桑原慎子, 鈴木伸吾, 藤川清三, 荒川圭太: 組換え氷核タンパク質の発現とその氷核活性について. 日本農芸化学会2017年度京都大会, 京都女子大学(京都府京都市)(2017年3月)
- ⑤ 鈴木伸吾, 福田怜, 福士幸治, 荒川圭太: ササ葉抽出物の氷核形成阻害活性を利用した霜害防止の試み. 日本農芸化学会2017年度京都大会, 京都女子大学(京都府京都市)(2017年3月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 圭太 (ARAKAWA, Keita)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 00241381

(2) 研究分担者

福士 幸治 (FUKUSHI, Yukiharu)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 60218906