

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14667

研究課題名(和文)植物の凍霜害防止のための新戦略

研究課題名(英文)New strategy for prevention of frost damage to plants

研究代表者

福士 幸治 (FUKUSHI, YUKIHARU)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：60218906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：65種類の植物葉の粗抽出を従来のドロップレット凍結法で試験した結果、植物葉抽出物に氷核形成阻害物質(過冷却促進活性)が広く認められ、特に、アカエゾマツ、レッドマスタード、クマイザサ、パッコヤナギ、ゲッケイジュ、スタチ、アカジソ、チャノキ、セイヨウタンポポ葉の活性が強かった。特に活性が強かった植物葉粗抽出物を、新たに開発したリーフディスク凍結試験法に供試した結果、植物葉上でも凍結を押さえる作用が認められた。従って、本法を用いて未利用の植物葉から新規な過冷却促進物質が期待される。現在、植物葉抽出物を用いた茶園の防霜に関する共同研究について協議中である。

研究成果の概要(英文)：The crude extracts of plant leaves (65 species) were examined in this research revealed that they showed various levels of anti-ice nucleation activity (supercooling activity). In particular, the leaf extracts of *Picea glehnii*, *Brassica juncea* (red mustard), *Sasa senanensis*, *Salix bakko*, *Laurus nobilis*, *Citrus sudachi*, *Perilla frutescens*, *Camellia sinensis*, and *Taraxacum officinale* showed relatively high anti-ice nucleation activity by droplet freezing assays. Anti-ice nucleation effects were clearly shown on leaves by using our new leaf-disc freezing assay system. Application of plant extracts in a tea plantation is in consultation.

研究分野：農学

キーワード：凍霜害防止 氷核形成細菌 氷核形成阻害物質 過冷却促進物質 ドロップレット凍結法 リーフディスク凍結試験法 ササ チャノキ

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでに耐寒性の強い樹木のカツラ木部組織から氷核形成細菌の氷核活性を阻害する物質を単離・報告した。これらは氷核形成阻害物質（または過冷却促進物質）と呼ばれ、フラボノール配糖体や加水分解性タンニン等であった。フラボノール配糖体等は一般に抗酸化物質として知られ様々な植物に含まれているため、広く草木葉にも氷核細菌の氷核活性を阻害する成分が含まれていると考えた。さらに、各種植物葉の粗抽出物の中に強い氷核形成阻害活性が認められた場合、それらを作物の凍霜害防止に利用できると予想した。

2. 研究の目的

様々な植物葉の粗抽出物を用い、氷核細菌による氷核形成に対する阻害活性を既存のドロップレット凍結法により比較する。さらに、実験室内の *in vitro* 系としてリーフディスク凍結試験法を確立し、植物葉上での凍結抑制効果を測定する。氷核形成阻害活性の強い粗抽出物について、その活性本体を単離同定するとともに、粗抽出物を用いた圃場試験を行う。

3. 研究の方法

1) 供試材料

6~9月に北海道大学周辺に生育する65種の植物から葉または葉状の組織を採取した。

2) 試験用抽出液の調製

採取した葉を液体窒素中で破砕し、試料の10倍量の抽出溶媒（アセトン：水=1:1）を加えて攪拌し、濾液を乾固した。抽出物を生鮮重0.20g相当/mL（0.20gFW/mL）の濃度になるように水によく懸濁させてから、遠心分離（15000×g、10分間）して得られた上清を用意した。

3) ドロップレット凍結法（図1）

溶液の凍結温度は Kuwabara et al. (2011) の方法に準じてドロップレット凍結法により測定した。各種試験液（葉抽出物濃度0.10gFW/mL、氷核細菌濃度2.0mg/mL、リン酸カリウム緩衝液50mM）2μLをミネラルオイルでコートした銅板上にのせて、0℃に設定したエチレングリコールバスにセットし、0.2℃/minの速度で冷却した。0.5℃毎に凍結した液滴を計数した。銅板上には植物抽出液を入れないコントロール溶液を毎回の試験で必ずのせるようにした。一回の試験にはコントロール溶液と各植物抽出液を含む溶液（試験溶液）をそれぞれ同数（20液滴以上）のせ、5回以上試験を行った。それぞれの試験で半数の液滴が凍結する温度（FT₅₀）を計算し、コントロール溶液と試験溶液との温度差の平均値と標準偏差を計算した。試験溶液のFT₅₀がコントロール溶液より低い場合、その温度差を正の数で示して氷核形成阻害活性とした。

<参考文献> Kuwabara C et. al, *Cryobiology*,

63, 157-63 (2011)

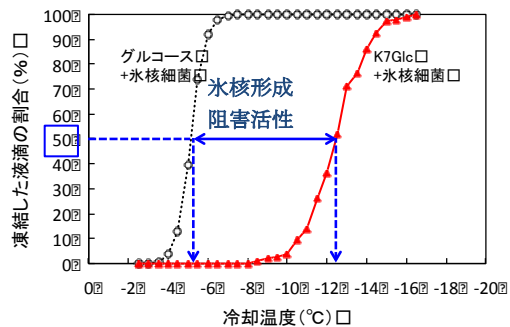


図1. ドロップレット凍結法による氷核形成阻害活性の測定方法

4) リーフディスク凍結試験法（図2）

4-1) リーフディスク試験に用いた葉は以下のものを使用前に純水で表面を洗い流して乾燥させてから使用した。ダイコン子葉はパーミキュライト上に播種して、23℃で2日間暗所にて発芽させてから3日間、16時間日長（70μmol/m²/s）で生育させたものの子葉を使用した。ヤマグワ葉は7~9月に野外に生育する成木から葉を採取し、ハトメ抜きを用いて15mm径のリーフディスクを作製した。トウモロコシ葉は25~35℃温室（自然日長、自然光量）で播種後約3か月生育させたものの葉を採取し、10.5mm径のリーフディスクを作製した。茶葉は挿し木苗を15~30℃（自然日長、自然光量）で6か月以上生育させたものの成熟葉を採取し、9mm径のリーフディスクを作製した。

4-2) ポリスチレン製シャーレに両面テープと張り、その上に作成したリーフディスクを他のリーフディスクと等間隔になる様に10枚ずつ並べた。その上に、各種試験液（葉抽出物濃度0.10gFW/mL、氷核細菌濃度1.0mg/mL、リン酸カリウム緩衝液50mM）を10μLのせた。ポジティブコントロールとして、葉抽出物の代わりに、1.0mg/mL濃度のエピガロカテキンガレート（EGCG）もしくは0.10mg/mL濃度のケンフェロール7-O-グルコシドを加えた試験液を用いた。また、リン酸カリウム緩衝液のみの試験液も用意した。一度の試験につき9枚のシャーレを使用した。目的温度で処理して、凍結したものの割合を求めた。目的温度毎に少なくとも5反復おこなった。

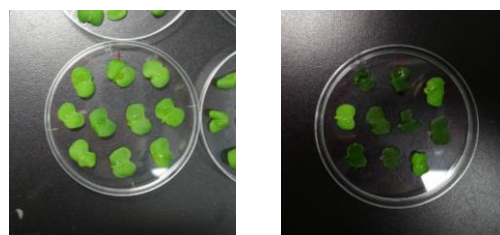


図2. 液滴をのせたカイレダイコン子葉と低温処理後のカイレダイコン子葉。液滴が凍結し、凍結した葉は傷害を受けて濃緑色に変化する

4. 研究成果

1) ドロップレット凍結法の結果

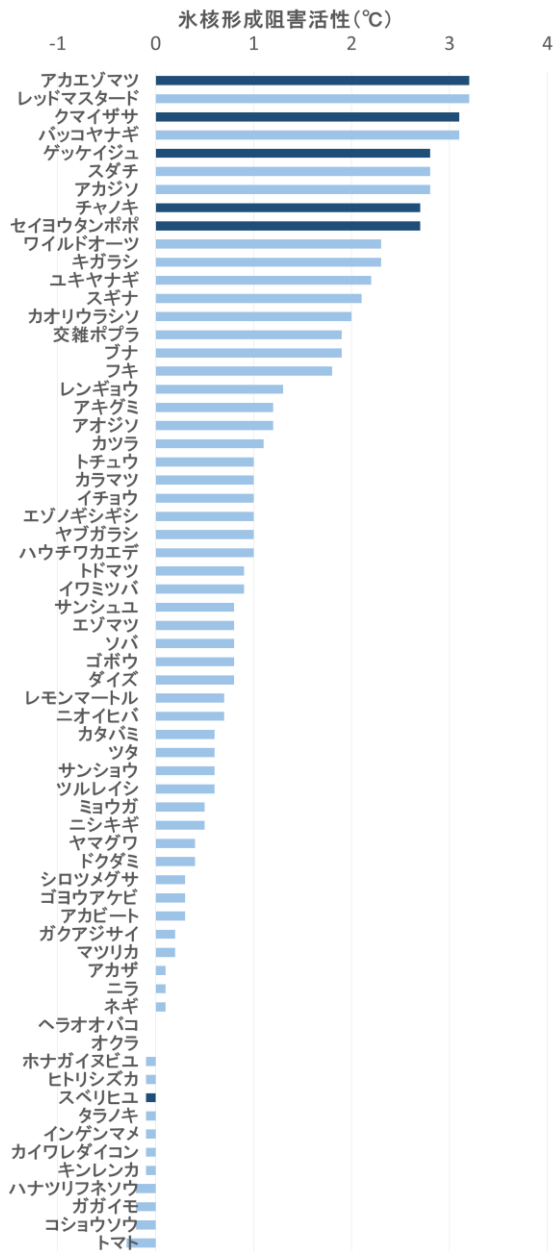


図 3. 各種植物葉抽出物の氷核形成阻害活性

65 種の植物葉の抽出物のうち、氷核細菌に対する高い阻害活性を持つもの（ドロップレット凍結法で氷核形成阻害活性が 2℃以上）が 14 種類あった（図 3）。

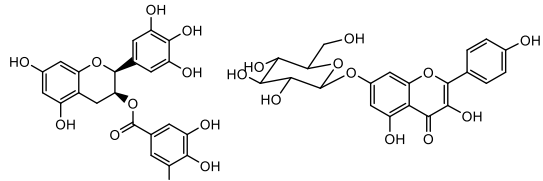
樹木ではアカエゾマツ、バッコヤナギ、ゲッケイジュ、スダチ、チャノキの葉、それ以外ではクマイザサ、アカジソ、レッドマスタード、セイヨウタンポポの葉の抽出物に強い氷核形成阻害活性が見出された。一方、スベリヒユ、カイワレダイコン、トマト、コショウソウなどでは、対照（氷核形成細菌を含む溶液）よりも高い温度で凍結した。

植物の氷核活性成分としてシュウ酸カルシウムが報告されている（石川ら、2014）。

比較的高温で凍結した植物葉の粗抽出物

中に氷核活性物質の有無を今後検討する。〈参考資料〉特開 2014-55273（農業生物資源研究所）。

2) リーフディスク凍結試験法の結果



EGCG : epigallocatechin gallate

K7G: kaempferol 7-*O*- β -D-glucopyranoside

氷核形成阻害物質 EGCG、K7G を本実験でポジティブコントロールとして、また、スベリヒユ葉抽出物をネガティブコントロールとして使用した。

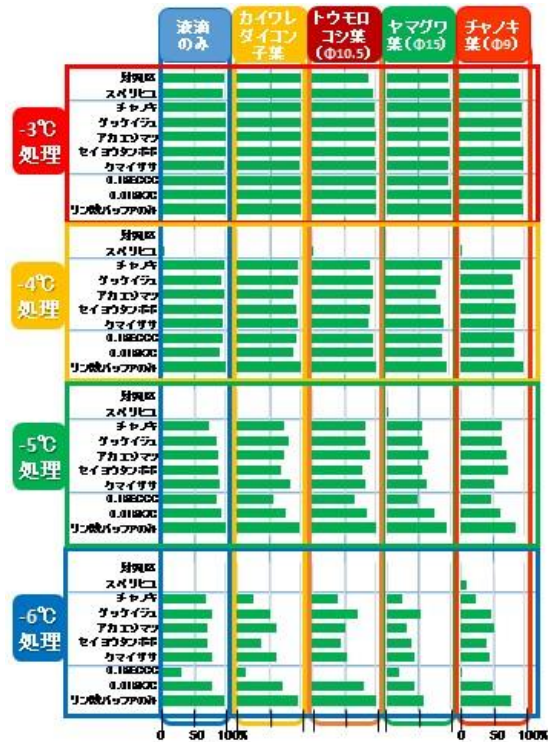


図 4. リーフディスク凍結試験での未凍結液滴の割合。(植物葉抽出物の凍結抑制効果の検証)

一定温度（-3、-4、-5、-6℃）の庫内に 3 時間静置した。その後、凍結個数を計数して、未凍結のもの割合を計算し、棒グラフで図 2 に示した（1 試験 1 試料あたり 9 枚使用し、同一温度の処理は 5 反復行った）。

活性が比較的高かった抽出物のうち 5 種（アカエゾマツ、クマイザサ、セイヨウタン

ポポ)を選択して、リーフディスク凍結試験を行ったところ、対照区に比べて凍結を抑制でき、葉への凍結傷害を抑制することができた(図4)。

植物種により程度は異なるが、植物の葉抽出物は氷核形成を効果的に阻害できるものがあることが分かった。またこれらの抽出物は植物葉上においても効果を発揮し、結果的に植物葉の凍結を抑制できた。このことから、氷核細菌に対して阻害活性のある植物抽出物は植物に散布することなどで霜害などの凍結傷害の防止に利用できると予想した。

また、カイワレダイコンの幼苗を使用した予備試験を行い、幼苗の凍結が抑えられることを確認した。現在、鹿児島県枕崎市にある農研機構果樹茶業研究部門の茶育種グループと「茶に対する防霜技術の開発」の共同研究を進めるべく、話し合いを進めている。

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 1 件)

①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、**63**(1), 33-36 (2017)

[学会発表] (計 2 件)

①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、2016/06/25、低温生物工学会 (埼玉県比企郡鳩山町石坂)

②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物質を利用した霜害防止の試み、2017/3/20、日本農芸化学会 (京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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: 2566086

(2) 研究分担者

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

実山 実 (Jitsuyama, Yutaka)

北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号: 90322841