

平成21年 5月12日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19880002  
 研究課題名（和文） 樹木木部柔細胞の深過冷却機構におけるフラボノイドの機能評価  
 研究課題名（英文） Characterization of supercooling-promoting flavonoids in xylem parenchyma cells of boreal trees  
 研究代表者  
 春日 純 (KASUGA JUN)  
 北海道大学・大学院農学研究院・博士研究員  
 研究者番号：40451421

研究成果の概要：カツラという樹木の木部組織には水の過冷却を促進するフラボノイドが存在する。本研究によって、このフラボノイドの木部組織における局在性と量的な季節変化が明らかになった。また、フラボノイドの過冷却促進効果はアグリコンと糖鎖の組み合わせにより大きく変化することを明らかにした。さらに、カツラ由来の cDNA ライブラリの調製など、フラボノイドの蓄積量を改変した形質転換樹木の作出の準備を進めた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林産科学・木質工学

キーワード：樹木、凍結適応、木部柔細胞、フラボノイド、過冷却促進

## 1. 研究開始当初の背景

樹木の木部柔細胞は、凍結温度に対して深過冷却という適応機構を示す。これまで、この深過冷却機構は、厚い二次壁からなる細胞壁の特殊な構造特性により、細胞内の水分が脱水や植氷といった細胞外の氷の影響から隔離された小さな液滴として存在することのみによって成り立っていると考えられてきた。しかし、近年、我々は、木部柔細胞の細胞内成分も深過冷却機構に深く関与することを強く示す結果を得た。また、冬季に木部柔細胞の過冷却能力が $-40^{\circ}\text{C}$ にも達するカツラの木部組織から4種の過冷却促進成分を

単離することに成功し、構造解析によって、それらがケルセチン-3-O- $\beta$ -グルコシド (Q3G)、ケンフェロール-7-O- $\beta$ -グルコシド (K7G)、8-メトキシケンフェロール-3-O- $\beta$ -グルコシド (8MK3G)、ケンフェロール-3-O- $\beta$ -グルコシド (K3G) という、いずれもある種のフラボノイドの配糖体であると同定した。しかしながら、本研究開始時点において、この過冷却促進成分が実際に深過冷却機構に関与するの否かも含め、その機能に関する知見は全く得られていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、樹木の木部柔細胞において、フラボノイドが深過冷却機構に果たす役割を解明することを目的とした。そのために、カツラの木部組織における過冷却促進フラボノイドの局在部位を明らかにすると共に、季節的な低温馴化過程におけるカツラ木部組織中のフラボノイド含量と木部柔細胞の過冷却能力の変化との関係性の解明を試みた。また、様々な構造を持つフラボノイドについて、過冷却促進効果を調べることで、フラボノイドの化学構造と過冷却促進効果との関連性について検討を行った。さらに、過冷却促進フラボノイド含量を改変した樹木の作出のため、カツラ由来の過冷却促進フラボノイドの合成酵素遺伝子の単離を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 木部組織におけるフラボノイドの局在性：フラボン及びフラボノールを特異的に染色する DPBA 試薬を用いて冬季に採取したカツラの木部組織の柢目面切片を染色し、蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) で観察した。

(2) 木部柔細胞の過冷却能力と木部におけるフラボノイド含量の季節変化：月毎に屋外のカツラ成立木から4~6年生の枝を採取し、木部柔細胞の過冷却能力を示差熱分析で調べると共に、木部組織に含まれる4種の過冷却促進フラボノイド量を高速液体クロマトグラフィーにより定量した。

(3) フラボノイドの化学構造と過冷却促進効果：購入した、もしくは譲渡された十数種類のフラボノイドの配糖体について、ドロップレットフリージングアッセイにより、それぞれの過冷却促進効果を測定した。

(4) 過冷却促進フラボノイドの合成に関与する酵素遺伝子の単離：カツラの枝由来のcDNAライブラリを作製し、カルコンシンターゼとフラボノールシンターゼについて、別種の植物由来の既知の酵素のアミノ酸配列を基に設計したディジェネレートプライマーを用いて、PCR法によりカツラ由来のライブラリからこれらの酵素の遺伝子断片の増幅を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 木部組織におけるフラボノイドの局在性：冬季に採取した新鮮なカツラの木部組織を DPBA 試薬で処理したところ、木部柔細胞の細胞質からフラボンもしくはフラボノールによる強い蛍光が観察された (図1)。後

述のとおり、フラボン及びフラボノールの配糖体が高い過冷却促進効果を示すことから、この蛍光は過冷却促進成分の分布を示すと思われる。この結果は、木部柔細胞は細胞内にフラボノイドを蓄積することで、致命的な細胞内凍結を防いでいる可能性を強く示している。

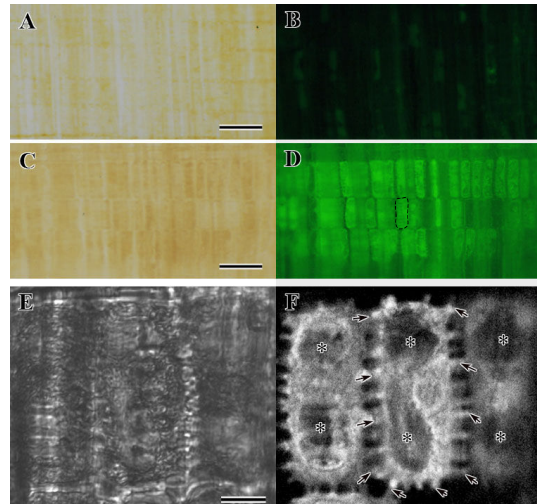


図1 カツラ木部組織における過冷却促進成分の局在性. A-D: 蛍光顕微鏡で観察した未処理 (A, B) 及び DPBA 染色 (C, D) した木部組織の透過像 (A, C) と蛍光像 (B, D). E, F: CLSM で観察した DPBA 染色した木部組織の透過像 (E) と蛍光像 (F). 矢印: 壁孔内の細胞質; \*: 液胞.

(2) 木部柔細胞の過冷却能力と木部におけるフラボノイド含量の季節変化：カツラの木部柔細胞の過冷却能力は、夏季には $-25^{\circ}\text{C}$ 程度、冬季には $-40^{\circ}\text{C}$ 程度と季節的に大きく変化した。一方、木部組織における過冷却促進フラボノイドの蓄積量は、明瞭な季節変化を示さなかった (図2)。この結果から、木部柔細胞の凍結抵抗性の季節変化は、過冷却促進成分の蓄積量ではなく、他の何らかの要因により制御されていることが示唆された。カツラの木部柔細胞が夏季に示す $-25^{\circ}\text{C}$ という過冷却温度は、日常生活で見られるマイナス

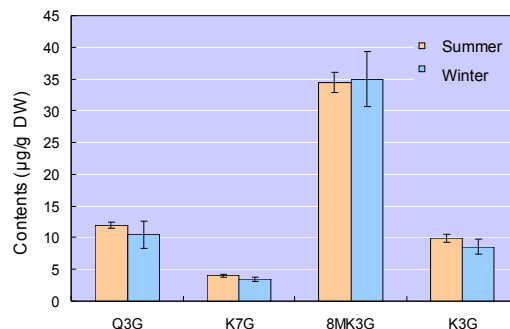


図2 夏と冬に採取したカツラの木部組織における各過冷却促進フラボノイド含量.

数度から十数度といった過冷却に比べて十分低い。そのため、フラボノイドは季節を問わず木部柔細胞の過冷却を促進していると考えられる。

(3) フラボノイドの化学構造と過冷却促進効果：アグリコンの種類や糖残基の結合様式の異なるいくつかのフラボノイドについて過冷却促進効果を調べることで、フラボノイドの過冷却促進効果はアグリコンの構造及び糖残基の種類に強く影響を受けることを明らかにした。アグリコンとしては特に、アピゲニンなどのフラボンとケンフェロール、ケルセチンといったフラボノールの配糖体が高い効果を示した。また、同じケルセチンの配糖体であっても、7-O-グルコシドと3-O-ガラクトシドは高い過冷却促進効果を示すのに対し、7-O-ガラクトシドと3-O-グルコシドは、過冷却促進効果がさほど高くないというように、糖残基の種類と結合部位の組み合わせにより活性が複雑に変化することを明らかにした。現在までのところ、カツラ木部から単離されたケンフェロール-7-O-グルコシドが最も高い過冷却促進効果を示している。樹木がこのような高い効果を持つ成分を木部に蓄積しているという事実は大変興味深い。

(4) 過冷却促進フラボノイドの合成に関与する酵素遺伝子の単離：木部柔細胞の過冷却能力が著しく向上する秋季の木部組織からRNAを抽出し、cDNAライブラリを作製した。また、前述したようにカツラの木部組織ではフラボノイドの蓄積量の季節変化が見られなかったことから、木部組織における過冷却促進フラボノイドが主に春季から夏季にかけての木部形成期に蓄積されている可能性も考え、この時期の木部・師部・形成層を含む枝由来のライブラリもあわせて作製した。カルコンシンターゼ、フラボノールシンターゼについては、保存領域を基にディジェネレートプライマーを設計し、PCRにより上記ライブラリからDNA断片の増幅を試みた。しかしながら、予想される分子サイズの断片を得ることはできなかった。今後、新たにプライマーを設計する、もしくは他の植物の相同遺伝子をプローブとしてスクリーニングを行なうなど、何らかの工夫が必要であると考えられる。

(5) 全体を通して：本研究では、季節的な木部柔細胞の過冷却能力の変化と4種の過冷却促進フラボノイド含量との間に、相関性を見出すことはできなかった。しかしながら、この結果は、必ずしもこれらのフラボノイドが深過冷却機構に関与しないことを示すものではない。フラボノイドが深過冷却機構に関

与するか否かを解明するためには、今後、分子育種学的手法により、フラボノイド含量を改変した形質転換樹木を作製する必要があると考えると考えられる。現在、本申請研究中で調製したcDNAライブラリから、フラボノイド合成関連酵素遺伝子の単離を再び試みている。

本研究で対象とした過冷却促進フラボノイドについて、外部の研究機関との共同研究として、動物の臓器の低温保存や植物組織の超低温保存などにおける応用を目指した研究が進められている。これまでに、この過冷却促進フラボノイドがクランベリーやサンザシといった低木果樹の超低温保存効率を著しく向上させる結果を得た。フラボノイドの化学構造と過冷却促進効果との関連性など、本研究で得られた知見は、今後、これらの応用研究においても有意義な情報を提供することが期待できる。

## 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 4件)

- ① DAISUKE KAMI, JUN KASUGA, KEITA ARAKAWA, SEIZO FUJIKAWA, Improved cryo-preservation by diluted vitrification solution with supercooling-facilitating flavonol glycoside, *Cryobiology*, 57, 242-245, 2008、査読有
- ② JUN KASUGA, YASUYUKI HASHIDOKO, ATSUSHI NISHIOKA, MEGUMI YOSHIBA, KEITA ARAKAWA, SEIZO FUJIKAWA, 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、査読有
- ③ 藤川 清三、春日 純、過冷却促進物質、検査と技術、36, 546-549, 2008、査読無
- ④ JUN KASUGA, KAORU MIZUNO, KEITA ARAKAWA, SEIZO FUJIKAWA, Anti-ice nucleation activity in xylem extracts from trees that contain deep supercooling xylem parenchyma cells, *Cryobiology*, 55, 305-314, 2007、査読有

[学会発表] (計 5件)

- ① 春日 純、可溶性糖の添加によるブナ木部柔細胞の過冷却能力の変化、第59回日本木材学会大会、2009年3月14日、松本
- ② 春日 純、北方落葉広葉樹の凍結適応機構

の解明—木部柔細胞に蓄積する過冷却促進成分の探索—、第 53 回日本植物学会北海道支部大会、2008 年 9 月 19 日、札幌

- ③ JUN KASUGA、Purification and identification of anti-ice nucleation substances in deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*)、Plant Biology 2008 (2008 年度米国植物生物学会年会)、2008 年 6 月 28-30 日、メリダ (メキシコ)
- ④ 春日 純、カツラ木部柔細胞の深過冷却機構における過冷却促進フラボノイドの役割、第 58 回日本木材学会大会、2008 年 3 月 18 日、つくば
- ⑤ JUN KASUGA、Identification and characterization of anti-ice nucleation substances in deep supercooling xylem parenchyma cells of *Cercidiphyllum japonicum*、8<sup>th</sup> International Plant Cold Hardiness Seminar (第 8 回国際低温適応会議)、2007 年 8 月 8 日、サスカチューン (カナダ)

[図書] (計 1 件)

- ① SEIZO FUJIKAWA、JUN KASUGA、NAOKI TAKATA、KEITA ARAKAWA、CAB International、Plant Cold Hardiness: From the Laboratory to the Field (eds L Gusta、M Wisniewski、K Tanino)、Chapter 4: Factors Related to Change of Deep Supercooling Capability in Xylem Parenchyma Cells of Trees、印刷中、2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：過冷却促進剤

発明者：藤川清三、春日純、橋床泰之、荒川圭太、福士幸治

権利者：北海道大学、オリンパス株式会社、藤川清三、春日純、橋床泰之、荒川圭太、福士幸治

種類：特許権

番号：PCT/JP2007/063784

出願年月日：2007 年 7 月 11 日

国内外の別：国際出願

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/woosci/woobio>

/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春日 純 (KASUGA JUN)

北海道大学・大学院農学研究院・博士研究員

研究者番号：40451421