

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 年度～平成 2010 年度

課題番号：20380099

研究課題名（和文）樹木木部柔細胞の過冷却促進物質の網羅的構造同定と大量獲得法の検討

研究課題名（英文）Comprehensive analysis to determine chemical structures in supercooling-promoting substances from xylem parenchyma cells of trees and considerations to obtain much volume of supercooling-promoting substances for their applications

研究代表者

藤川 清三（FUJIKAWA SEIZO）

北海道大学・名誉教授

研究者番号：50091492

研究成果の概要（和文）：寒冷環境において -40°C まで凍らない樹木木部柔細胞から、過冷却を促進する物質（氷核形成阻害物質）の探索を行い、数種類のフラボノール配糖体および数種類の加水分解型タンニンと同定した。この知見に基づき、類似の化学構造を持つ数十種類のフラボノイド配糖体、および数十種類の加水分解型・縮合型タンニンが過冷却活性を持つことを解明した。これらのうち、大量に獲得できる化合物を用い、過冷却促進新素材としての応用を検討した。

研究成果の概要（英文）：From xylem parenchyma cells in trees that can supercool to -40C during winter, we identified a several kinds of flavonol glycosides and hydrolysable tannins. Based on such results, we could also identified more than 50 kinds of flavonol and tannin-related compounds that promoted supercooling of water. We also tried to use these supercooling-promoting substances as novel materials that inhibit freezing of water.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：環境農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：抽出成分、微量成分、木部柔細胞

1. 研究開始当初の背景

これまでの我々の研究により、ほとんどの樹木の木部柔細胞内の水は氷点下温度でも凍らず、過冷却により液体状態を保って越冬することを明らかにしている。さらに、木部柔細胞内の水分の過冷却には、水の過冷却を促進する何らかの過冷却促進（氷核形成阻

害）物質が関与することを明らかにしてきた。木部柔細胞にこのような過冷却促進物質が存在するということは新知見であった。また、これまでに、水の凍結に関与する物質として、凍結開始温度を高める（水を凍らせやすくする）氷核形成物質の存在、および氷晶の成長を阻害する不凍蛋白質などの存在は広く知

られていたが、氷核形成を阻害し、水を凍らせなくする（過冷却促進）物質の存在についてはほとんど知られていなかった。

2. 研究の目的

木部柔細胞の過冷却のメカニズムを解明するため、過冷却により越冬する樹木の木部柔細胞から可能な限り多種類の過冷却促進（氷核形成阻害）物質を同定する。これと共に、過冷却促進物質の産業的応用のため、上記同定化合物の化学構造に基づき、類似化合物から、過冷却促進活性を持つ、より多様な物質を解明する。併せて、過冷却活性の高い物質を大量に獲得して、様々な分野への新素材としての応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 過冷却する木部柔細胞を持つカツラを主材料として用いた。

(2) カツラ木部をメタノールで抽出した。抽出物を液-液分離により水画分と酢酸エチル画分に分けた。より高い過冷却活性を示した酢酸エチル画分をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィにより20画分に分けた。20画分すべてが過冷却活性を示したため、すべての画分をHPLCにより分離し、過冷却活性のあるピークを得た。

(3) HPLCピークを質量分析、NMRにより解析し過冷却促進化合物の同定をした。

(4) 同定された木部柔細胞からの化合物と類似の構造の化合物を購入、または有機合成により大量に獲得して過冷却活性の有無を解析した。

(5) 過冷却活性の測定には、ドロップレット凍結法による2μLの水滴、エマルジョン法による直径10μの微小水滴、および強振動下でエペンドルフチューブに入れた1ccの水を用いた。

(6) 種々の水溶液を過冷却させる物質を見つけるため、水溶液には様々なタイプの氷核形成物質を混入させて過冷却活性の変化を調べた。

(7) 過冷却促進物質の応用として、ラット心臓の過冷却保存、ラズベリーなどの植物茎頂の凍結保存などへの応用を行った。

4. 研究成果

(1) 樹木木部柔細胞からの過冷却促進物質の同定：カツラの木部柔細胞から先に同定した4種類のフラボノール配糖体、ケンフェロール-3-グルコース、8-メトキシケンフェロール-3-グルコース、ケンフェロール-3-グルコース、ケルセチン-3-グルコースに加え、新たな過冷却促進加水分解型タンニンと同定した。これらは、2、3、6-トリ-ガロイル-ハマメロース、1、2、3、6-テトラ-ガロイル-グルコース、1、2、6-トリ-ガロイル-

グルコース、1、2、3、4、6-ペンタ-ガロイル-グルコースであった。

(2) 類似の過冷却促進化合物の同定：樹木木部柔細胞から同定したフラボノール配糖体と類似の化合物の過冷却活性を測定した。これらの過冷却活性はドロップレット凍結法により、2μLの水滴を0.2°C/分で冷却して測定した。

この結果、氷核形成細菌の蛋白質を含む水に対して以下の化合物が過冷却活性を示した。これらは、ケルセチン-3-(6-アセチル)-グルコース、α-G-ルチン、酵素処理イソクエルシトリン、ケンフェロール-3-ロビノース-7-ラムノース、アピゲニン-7-グルコース、ミリセチン-3-ラムノース、ミリセチン-3-グルコース、ケルセチン-7-ガラクトース、ケルセチン-3-ルチノース、ケルセチン-3-ラムノース、ケルセチン-3-ガラクトース、ケルセチン-4'-グルコース、ケルセチン-3'-グルコース、ケルセチン-7-グルコース、ケルセチン-5-グルコース、ケンフェロール-7-ガラクトース、ケンフェロール-3-ルチノースであった。

また、樹木木部柔細胞から同定したタンニンと類似の化合物の過冷却活性を測定した。氷核形成細菌の蛋白質を含む水に対して以下の加水分解型タンニン、縮合型タンニンモノマー、さらにこれらを含む植物から抽出した粗タンニンが過冷却活性を示した。これらは、1-メチル-2, 3, 4, 6-テトラ-ガロイル-グルコース、ミオ-イノシトール-パーガレイト、五倍子タンニン、茶カテキン、柿タンニン、栗タンニン、ケブラチョタンニン、ライチ果実由来ポリフェノール、ブドウ種子由来ポリフェノール、カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、ガロカテキンガレイト、エピカテキンガレイト、エピガロカテキンガレイトであった。

(3) 種々氷核形成物質を含む水溶液への過冷却活性の測定：上記のように、氷核細菌由来の蛋白質を含む水溶液への過冷却活性に加え、上記化合物が、ヨウ化銀、フロログシノールなどの異なった氷核形成物質を含む水溶液に対する過冷却活性を測定した。その結果、上記化合物のほとんどすべてはこれらの氷核形成物質を含む水溶液も過冷却させることを明らかにした。

一方、意図的に氷核形成物質を添加しない蒸留水についての過冷却活性の測定は予期しない結果をしめした。蒸留水には操作中に意図しないで空気中の異物が混入し、これらが氷核となる。このような蒸留水にたいして過冷却活性を示した化合物は以下のとおりである。フラボノール配糖体としては（一部フラボノイド配糖体を含む）ケルセチン-3-グルコース、ケルセチン-3-ガラクトース、

ケルセチン-3-ルチノース、ミリセチン-3-グルコース、酵素処理イソクエルシトリン、 α -G-ルチンのみであった。また、タンニンとしては、2, 3, 6-トリ-ガロイル-ハマメロース、1, 2, 3, 6-テトラ-ガロイル-グルコース、1, 2, 6-トリ-ガロイル-グルコース、1, 2, 3, 4, 6-ペンタ-ガロイル-グルコース、五倍子タンニン、ライチ果実由来ポリフェノール、ガロカテキンガラレート、エピカテキンガラレート、エピガロカテキンガラレートのみであった。

これに対して、(2)で示した残りの化合物はすべて、蒸留水の凍結を促進する氷核形成物質として機能した。これらは全く予期しない結果であり、過冷却促進剤と氷核形成物質間の複雑な相互作用の存在を示唆した。

(4)均質核形成への影響：(3)の結果を受け、過冷却促進物質が水自体による氷核形成(均質核形成)に関与するのか、水中に存在する何らかの氷核形成物質に作用して、これらの氷核がもたらす凍結(不均質核形成)に影響を与えるのかを検討した。エマルジョン法により全く異物を含まない蒸留水の凍結(均質核形成)に対する上記過冷却促進物質の効果を検討した。エマルジョン法により蒸留水は-38°Cで均質核形成により凍結する。異物の混入した蒸留水に対して過冷却活性を示した(4)で示した化合物についての検討は、これらの化合物はいずれも均質核形成には全く影響をもたらさないことを示した。すなわち、過冷却促進物質を添加しても凍結温度は-38°Cと変わらなかった。唯一、ケンフェロール-7-グルコースは、エマルジョン法でも氷核形成物質として機能した。

(5)種々判定方法による過冷却活性の測定：ドロップレット凍結法による2 μ Lの水滴、エマルジョン法による直径10 μ 以下のマイクロ水滴による過冷却活性の測定に加え、エペンドルフ試験管に入れた1ccの水溶液を氷点下温度で強振動することにより過冷却活性がどのようになるかテストした。過冷却促進物質を加えない蒸留水は-5°Cでは短時間ですべて凍結した。このようなテストでも-5°C以下で過冷却を保ったのは、 α -G-ルチン、酵素処理イソクエルシトリン、ケルセチン-3-ガラクトース、五倍子タンニン、茶カテキン、ライチ果実由来ポリフェノール、エピガロカテキンガラレートであった。

これらの結果は、過冷却活性の判定法の違いにより活性の評価は大きく異なることを示した。過冷却を促進する有用物質の今後の選択のためには、大容量の水溶液を、強振動下で長期間、過冷却させる物質を選択する必要がある。

(6)過冷却促進物質の応用：過冷却促進物質の応用として、過冷却による生鮮材料の低温保存への応用、凍結制御剤として生物の凍

結保存への応用を始めとして、将来的には、石油系冷却剤の代替品としての応用、結露防止表面コーティング素材としての応用、雲への散布による降雨・降雪調整剤としての応用、過冷却促進化合物を大量に作成する遺伝子導入により氷点下温度でも凍らず成長する植物の作成など多様な応用の可能性を持つ。

現状の過冷却促進物質の応用は、ラットの心臓を-5°Cで一晩過冷却させることに成功している。ただし、過冷却は可能なものの、ラット心臓細胞は低温自体に非常に弱いことが判明し、このような材料には併せて低温傷害を克服させる何らかの処理の必要性が明らかになった。

凍結制御剤として過冷却促進物質の添加は、これまで用いられていた凍害防止剤の濃度を低下させることにより、高い保存成績が得られることが植物の茎頂を用いた実験で明らかにされた。今後、動物細胞・組織の凍結保存への応用を検討している。

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16件)

- ① Shimada S, Motomura N, Kinoshita O, Saito A, Kasuga J, Matsusaka Y, Kawabata J, Kuwabara C, Fujikawa S and Ono M: Successful introduction of novel supercoolant, kaempferol-7-O-beta-D- glucopyranoside (KF7G), to sub-zero non-freezing rat heart preservation. *Low Temperature Medicine*, 査読有, 36, (2010), 20-24.
- ② Kasuga J, Fukushi Y, Kuwabara C, Wang D, Nishioka A, Fujikawa E, Arakawa K and Fujikawa S: Analysis of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) activity of flavonol glycosides. *Cryobiology*, 60, 査読有, (2010) 240-243.
- ③ Ukaji N, Kuwabara C, Kanno Y, Seo M, Takezawa D, Arakawa K and Fujikawa S: Endoplasmic localized-small heat shock protein that accumulates in mulberry tree (*Morus bombycis koids*.) during seasonal cold acclimation is responsive to abscisic acid. *Tree Physiology*, 査読有, 30, (2010) 502-513.
- ④ Endoh K, Kasuga J, Arakawa K and Fujikawa S: Cryo-scanning electron microscopic study on freezing

behaviors of tissue cells in dormant buds of larch (*Larix kaempferi*). *Cryobiology* (査読有), 59, (2009), 214-222.

- ⑤ Fujikawa S, Kasuga J, Takata N and Arakawa K: Factors related to change of deep supercooling capability in xylem parenchyma cells of trees. In "Plant Cold Hardiness; From the Laboratory to the Field", Gusta LV, Wisniewski ME, Tanino K (eds), CABI Press, (査読有), (2009), pp 29-42.
- ⑥ 56) 藤川清三、春日純、荒川圭太: 樹木の凍結抵抗性 -凍らない水-, 低温生物工学会誌 (査読有), 55, 37-41 (2009)
- ⑦ Kami D, Kasuga J, Arakawa K and Fujikawa S: Improved cryopreservation by diluted vitrification solution with supercooling-facilitating flavonol glycoside. *Cryobiology* (査読有), 57, (2008), 242-245.
- ⑧ Kasuga J, Hashidoko Y, Nishioka A, Yoshiba M, Arakawa K and 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* (査読有), 31, (2008), 1335-1348.
- ⑨ 藤川清三、春日純: 過冷却促進物質、検査と技術 (査読無)、36, (2008), 546-549.

[学会発表] (計 43 件)

- ① 藤川清三: 水を凍らせづらくする物質 - 過冷却促進 (氷核形成阻害) 物質 -, 伝熱学会北海道支部会、2010年12月10日、北海道大学工学部・札幌
- ② 藤川清三: 樹木の寒冷環境適応機構とその産業的応用の可能性、岩手大学 CRC セミナー、2010年11月17日、岩手大学・盛岡
- ③ Fujikawa S: Unfrozen water in trees, Special Seminar at School of Life Science in Lanzhou University, 2010年5月21日、中国・蘭州大学
- ④ Fujikawa S: Application of anti-ice nucleation substances from deep supercooling xylem parenchyma cells in

trees in order to regulate freezing condition for cryopreservation, 1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, 2009年4月7日、アレンベルグ城・ベルギー

- ⑤ 藤川清三: 深過冷却する樹木細胞中の過冷却促進 (氷核形成阻害) 物質、日本冷凍空調学会セミナー、2009年1月16日、きゅりあん・品川区
- ⑥ 藤川清三: 樹木の凍結抵抗性 -凍らない水-, 低温生物工学会セミナー、2008年6月13日、石川県立大学・石川県

[図書] (計 0 件)

[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・福土幸治・荒川圭太

権利者: 北海道大学・アミノアップ化学

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/054892

出願年月日: 23年3月3日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 1 件)

名称: Supercooling-promoting agent

発明者: 藤川清三・春日純・橋床泰之・福土

幸治・荒川圭太

権利者: 北海道大学・オリンパス

種類: 特許

番号: PCT/JP2007/063784

取得年月日: 2009年8月1日

国内外の別: 国外

[その他]

アウトリーチ活動

① 藤川清三: 樹木の中の凍らない水、市民公開農学特別講座 2009年11月27日、北海道大学農学部・札幌

② 藤川清三: 樹の中の凍らない水。何故?、九大・北大フロンティアセミナー、2009年10月20日、東京コンファレンスステーション・東京

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤川 清三 (FUJIKAWA SEIZO)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：50091492

(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・講師

研究者番号：60218906

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

(3)連携研究者

無し