

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05699

研究課題名（和文）氷点下における樹木細胞壁の役割

研究課題名（英文）Roles of Cell Walls of Trees at Subzero Temperatures

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：越冬する陸上植物では、気温が低下すると細胞外の水の凍結が始まる。本研究では、カツラの樹皮組織から水の凍結を促す活性（氷核活性）を検出し、その活性物質が細胞壁画分に由来することが示唆された。さらに、細胞壁画分から抽出された活性成分の性質について調べたところ、既知の植物由来の氷核物質であるシュウ酸カルシウム1水和物や氷核細菌由来の氷核タンパク質などとは異なり、細胞壁多糖類である可能性が示唆された。この結果は、環境因子に依存しなくても、樹木は自発的に細胞外凍結を起こせる仕組みがあるということを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気温の低下にともなって、越冬する植物の水がどのような挙動を示すのかについて調べることは、植物の越冬戦略を理解する上でとても重要である。本研究では、環境に由来する氷核物質によって植物の外表面から細胞間隙などのアポプラストの水へと凍結が伝播される以外に、樹皮の細胞壁成分が有する氷核活性によってアポプラストの水が凍結し始める可能性も考えられた。このことは、冬季特有の細胞壁の機能とみなすことができる。さらに、氷核物質と、氷核物質による水の凍結を抑制する活性（抗氷核活性）を有するポリフェノールを利用して、水の凍結を制御する技術が開発できるようになると、応用研究としても非常に興味深い。

研究成果の概要（英文）：In overwintering land plants, freezing of extracellular water begins when ambient temperature drops. In this study, ice-nucleating activity, which promote the freezing of water, were detected in cell wall fraction derived from the bark tissue of Katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*). Further characterization of the ice nucleation substances extracted from the cell wall fraction suggested that it may be a cell wall polysaccharide unlike ice nucleation proteins existing in ice nucleation bacteria and plant-derived ice nucleation substance such as calcium oxalate monohydrate. This result implies that trees have a possible mechanism by which extracellular freezing can occur without depending on environmental factors.

研究分野：樹木生理学

キーワード：細胞外凍結 氷核活性 樹皮 越冬 落葉広葉樹

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然条件下で生じる緩やかな気温低下によって植物が氷点下温度まで冷却されると、通常、細胞外(アポプラスト)の水から凍結が始まる。細胞内部に比べて細胞外の方が水分の凝固点が高いという理由だけでなく、凍結を促す氷核物質の存在もその理由の1つと考えられる。例えば、環境由来の氷核物質の場合、大気中に舞う土壌微粒子やその成分が氷核物質となって凍結が誘発されたり、氷核細菌やその死骸が有する氷核タンパク質によって凍結が誘発されたりする。また、植物由来の氷核物質として、シラカンバなどの花粉から水で遊離してくる多糖類と考えられる成分やレンギョウ属から得られたシュウ酸カルシウム 1 水和物から氷核活性が検出されているが、これらの植物由来の氷核物質の存在様式などの詳細は十分に明らかにされておらず、その知見はかなり限定的であった。

多くの草本植物では、樹木の樹皮の柔細胞のように、細胞外の水が凍結することによって細胞の脱水を引き起こされる(凍結脱水)。このような細胞の挙動は細胞外凍結と呼ばれ、凍結温度が低下するにつれて凍結脱水の程度が大きくなって収縮変形が進み、細胞への負荷も大きくなる。このような多くの植物細胞が示す細胞外凍結はアポプラストの水が凍結することから始まる現象であるため、植物細胞の越冬機構を理解するには、植物由来の氷核物質の解析は興味深い。

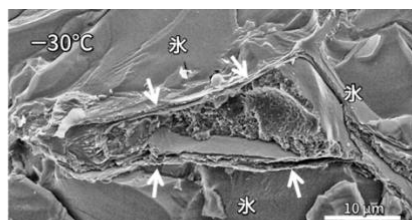


図1. 細胞外凍結したカラマツ樹皮の柔細胞の様子。緩速冷却して-30°Cまで細胞外凍結したカラマツ樹皮の柔細胞をcryo-SEM画像で観察した。著しく脱水収縮しているが、融解後も生存している。(矢印は細胞の輪郭の位置を示す)

### 2. 研究の目的

近年、申請者がカツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) の樹皮の細胞壁抽出物から検出した氷核活性は、非タンパク質成分で、シュウ酸カルシウム 1 水和物とも異なるものであった。そのため、カツラの樹皮由来の氷核活性の原因物質を特定し、氷点下温度での凍結を促す細胞壁成分の機能を精査し、この氷核物質の細胞外凍結への貢献度や関連性を検証することを目的とした。なかでも、細胞外氷晶が形成・蓄積される細胞間隙や細胞壁のようなアポプラスト領域に関して、樹木の越冬機構に果たす生理的な役割やその重要性について注目して検証を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 氷核物質の単離

冬季のカツラ樹皮から細胞壁画分を抽出し、その画分から抽出して得られた活性画分を限外濾過フィルターで簡易的にサイズ分画するなどして、氷核活性画分を分画して回収した。この活性成分を構造解析するために、スケールアップして単離も試みた。

#### (2) 氷核物質の構造解析

回収した氷核活性画分を用いて、プロテアーゼやセルラーゼなどの分解酵素処理や加熱処理、酸やアルカリ処理などの前処理を施し、氷核活性への影響について調べた。それらの結果をもとに、氷核物質の構成成分を予想し、二次元 NMR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) などを利用して構造解析をおこなった。

#### (3) 氷核物質の諸性質の解析

得られた氷核活性画分を用い、氷核活性に関する諸性質について調べた。例えば、活性物質の濃度依存性のように活性成分自体の性質を調べる実験のほか、樹皮と木部から活性画分を調製して両者の活性を比較したり、樹皮における氷核活性の季節変動の有無を調べたり、カツラ以外の樹種から調製した細胞壁画分などで活性測定をおこなって氷核活性の組織分布や樹種間分布を調べるなどして、樹体での氷核活性の存在様式などについて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 氷核活性の検出と氷核物質の調製

既知の氷核物質の構造や性質に関する知見を参照しながら、冬季のカツラ樹皮から抽出した細胞壁画分を用いて活性成分の分画を進めた。細胞壁から水で抽出された活性画分を用いて、熱処理や酸処理、分解酵素処理などに対する感受性について調べたところ、既知の氷核物質であるシュウ酸カルシウム 1 水和物や氷核タンパク質とは性質が異なることが示唆された。また、精製過程で得られた各画分の氷核活性を測定すると、試料を 10,000 倍に希釈しても十分に高い氷核活性が検出された(表1)。これらのこと

表1. 各画分の氷核活性の比較。

画分名	凍結開始温度 (°C)
超純水(対照区)	-27.3
水抽出画分	-12.0
低分子画分	-22.3
高分子画分	-12.1
熱可溶性画分	-12.2
酵素分解物画分	-21.3

氷核活性は、試験区の凍結開始温度の中央値で表した。各画分を10,000倍希釈して2 μLを分取したものを熱分析の試料に用いた。(n=20, 3反復)

から、精製過程で得られた各画分には氷核物質が存在するものと判断された。

## (2) 氷核物質の構造解析

上記の結果をもとに、いくつかの前処理をおこなったり、限外濾過フィルターを用いて簡易的にサイズ分画を併用したりすることで、活性成分の精製をおこなった。さらに、前項(1)で知り得た活性成分の性質をもとに二次元 NMR 解析 (1H-13C HSQC) などで構造解析を進めたところ、いくつかの糖あるいはその誘導体が存在することが示された(図2)。また、構成糖分析などの解析をおこなうことで、活性成分が多糖類であることが示唆された。

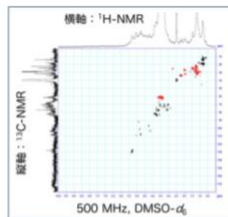


図2. カツラ樹皮から抽出した氷核物質の構造解析結果. 活性画分を<sup>1</sup>H-NMRと<sup>13</sup>C-NMRによる二次元NMRで分析した。

## (3) 氷核物質の諸性質の解析

得られた氷核物質について性質を調べ、樹皮の細胞壁画分で検出された氷核物質の存在様式や氷核物質の活性に関わる特徴などを明らかにすることを目指した。

### ① 氷核物質の季節変化

夏から冬にかけてカツラの枝を採取し、樹皮と木部を分離してそれぞれ凍結抵抗性試験に供試すると共に、示差熱分析をおこなって枝や樹皮、木部の凍結開始温度を測定した。また、樹皮や木部の組織から細胞壁を含む粗抽出画分(細胞壁画分)を調製して氷核活性を測定し、枝や組織が凍結を開始する温度との関係性について調べることにした。これらの実験結果を比べてみると、木部よりも樹皮の方が凍結しやすい傾向にあることがわかった。また、樹皮の凍結開始温度の方がわずかに季節変化する傾向がみられたが、この傾向については複数シーズンにわたって検証する必要があると思われる。

### ② 氷核活性の組織間分布・樹種間分布

さらに、これらの事象が他樹種でも見出されるのか否かを調べるため、カツラ以外の落葉広葉樹の複数樹種についても同様の実験をおこなった。カツラ以外の樹種で氷核活性が得られても、活性物質がカツラで同定されたものと同じであるとは限らないため、あくまでもカツラ樹皮の細胞壁画分から氷核物質を単離した方法に則って、他の落葉広葉樹種からも活性画分を調製し、活性の程度を比較することにした。すると、他の落葉広葉樹種でも、カツラと同様に、樹皮組織の方が木部組織よりも先に凍結を開始するものの方が多くみられた。また、これらの数樹種の枝から調製した樹皮と木部の組織から細胞壁画分を用いて氷核活性を比較すると、木部よりも樹皮からの粗抽出物画分の方が高い氷核活性が検出された。これらのことから、カツラ以外の落葉広葉樹種でも、深過冷却する木部と比べて細胞外凍結する樹皮の方が細胞壁画分における氷核活性は高い傾向にあることが示唆された。そのため、樹皮のアポプラスト領域に分布する水は、細胞壁の構成成分が有する氷核活性の存在によって、気温低下の際には凍結しやすい条件下におかれているものと予想された。

### ③ 氷核物質の機能比較

カツラ樹皮の細胞壁画分から得られた氷核物質の活性について、既存の氷核物質の活性と比較を試みた。ただし、カツラ樹皮の細胞壁由来の氷核物質は、既知の氷核物質であるシュウ酸カルシウム 1 水和物や氷核細菌由来の氷核タンパク質とは異なる成分であるだけでなく、先行研究と本研究とでは活性測定条件が異なることもあり、構造や活性の比較によって見出された違いを評価するには慎重を期する必要がある。なぜなら、活性測定に用いた液量や冷却速度が異なるだけで、試料の凍結開始温度(すなわち氷核活性の評価)に影響するからである。その前提でもって活性値を比べてみると、カツラ樹皮の細胞壁由来の氷核物質は、細菌由来の氷核タンパク質よりも少し活性が低いという可能性が考えられた。

次に、いくつかの落葉広葉樹の枝を冬に採取し、プログラムフリーザーを用いて枝を緩速冷却して凍結させた後、枝の切断面における細胞外氷晶の分布を観察したところ、多くの樹種で、樹皮の細胞間隙の方に目立った氷晶の蓄積が観察された(図3)。これにより、氷核活性が検出された樹皮組織では、細胞間隙に細胞外氷晶が多く蓄積する傾向にあることが示された。

これらの研究結果から、カツラ樹皮の細胞壁画分で検出された氷核物質は、樹皮の細胞間隙で蓄積される細胞外氷晶の形成に関与する可能性が考えられた。今後も、樹皮で検出されたこの氷核物質の構造や機能の解析を継続し、アポプラストでの細胞外氷晶の形成に関する知見を蓄積し、樹木の越冬機構の理解に努めたい。

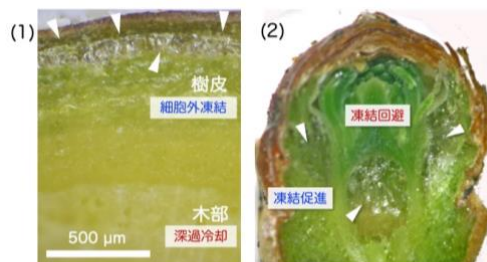


図3. -30°Cまで緩速凍結した樹木組織の凍結挙動.  
(1) 12月のキハダ枝内部での氷晶形成の様子(木口面).  
(2) カラマツ冬芽の器官外凍結の様子.芽鱗などの細胞間隙に氷晶が蓄積していた. 白矢尻: 細胞外氷晶.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 荒川圭太, 福土幸治, 藤川清三, 工藤尚美, 鈴木伸吾, 高橋淳, 後藤高秋, 中澤佑哉	4. 巻 69
2. 論文標題 植物粗抽出液の抗氷核活性（過冷却促進活性）による凍結傷害軽減の試み	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20585/cryobolcryotechnol.69.1_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 古賀泰雅, 筒井路実, 山岸祐介, 荒川圭太	4. 巻 68
2. 論文標題 樹木の冬芽が示す凍結挙動と氷核活性の関連性について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 59-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20585/cryobolcryotechnol.68.2_59	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 古賀泰雅, 鉄穴口晃, 鈴木伸吾, 重富顕吾, 荒川圭太	4. 巻 67
2. 論文標題 カツラ樹皮由来の氷核活性物質に関する研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 141-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20585/cryobolcryotechnol.67.2_141	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 齋藤拓哉, 米岡宏喜, 花岡創, 遠藤圭太, 木下剛志, 鈴木伸吾, 荒川圭太
2. 発表標題 ブナ種子の乾燥耐性機構に関する研究
3. 学会等名 第68回低温生物工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 筒井路実, 古賀泰雅, 重富顕吾, 鈴木伸吾, 佐野雄三, 荒川圭太
2. 発表標題 樹木細胞の凍結挙動と氷核活性との関連性について
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 筒井路実, 古賀泰雅, 荒川圭太
2. 発表標題 樹皮に含まれる氷核物質の解析
3. 学会等名 日本木材学会北海道支部 令和5年度(第55回)研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古賀泰雅, 筒井路実, 荒川圭太
2. 発表標題 広葉樹の師部と木部で検出された氷核活性と凍結挙動について
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会(福岡大会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古賀泰雅, 筒井路実, 山岸祐介, 荒川圭太
2. 発表標題 樹木の冬芽が示す凍結挙動と氷核活性の関連性について
3. 学会等名 第67回低温生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅鷗ほのか、稲永路子、荒川圭太
2. 発表標題 低温馴化によるキハダの可溶性糖の組成変化
3. 学会等名 第67回低温生物工学会大会(セミナー及び年会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Honoka ASAJIMA, Michiko INANAGA, Keita ARAKAWA
2. 発表標題 Soluble sugar accumulation in Phellodendron amurense during seasonal cold acclimation
3. 学会等名 25th SNU-HU JOINT SYMPOSIUM SATELLITE SESSION (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒川圭太
2. 発表標題 樹木細胞の凍結挙動とその関連成分について
3. 学会等名 日本木材学会 組織と材質研究会 冬季シンポジウム「樹木の越冬メカニズム」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古賀泰雅, 鉄穴口晃, 鈴木伸吾, 重富顕吾, 荒川圭太
2. 発表標題 カツラ樹皮由来の氷核活性物質に関する研究
3. 学会等名 第66回低温生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀泰雅, 鉄穴口晃, 鈴木伸吾, 重富顕吾, 荒川圭太
2. 発表標題 カツラ樹皮に検出された氷核活性の性質
3. 学会等名 日本木材学会北海道支部 第53回支部研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taiga KOGA, Akira KANNAGUCHI, Shingo SUZUKI, Kengo SHIGETOMI, Keita ARAKAWA
2. 発表標題 Ice Nucleation Activity Detected in Bark of <i>Cercidiphyllum japonicum</i>
3. 学会等名 12th International Plant Cold Hardiness Seminar (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	重富 顕吾  (Shigetomi Kengo)  (20547202)	北海道大学・農学研究院・講師   (10101)	
研究 分担者	鈴木 伸吾  (Suzuki Shingo)  (70847839)	北海道大学・歯学研究院・技術職員   (10101)	

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
---------	---------