HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍霜害防止に向けた資源植物の氷核形成阻害活性の利用［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	鈴木, 伸吾
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13583号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73909
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shingo_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　鈴　木　　伸　吾

学 位 論 文 題 名

凍霜害防止に向けた資源植物の氷核形成阻害活性の利用

冬季の樹木の木部柔細胞には、越冬するために細胞内部の水を－40℃以下まで長期安定的に過冷却状態を維持するものがある。このように過冷却状態を維持するためには、木部柔細胞内部の微量な水が細胞壁によって細胞外氷晶から隔離されていることが重要であるが、それと共に細胞内部の水が凍結しにくい状態であることが示された。その後、木部組織の抽出物には氷核細菌の氷核活性を抑制して水の凍結温度を数℃低下させる活性（氷核形成阻害活性）があることがわかり、抽出物から 4 種類のフラボノール配糖体と 4 種類の加水分解性タンニンが同定された。さらにこれらの構造類似体についても氷核形成阻害活性の有無を調べたところ、多数のポリフェノールから同活性が検出された。このような水の凍結抑制に関与する氷核形成阻害物質は非常に興味深い研究対象である。そこで本研究では、ポリフェノールなどが有する氷核形成阻害活性を農業的に利用することを目指すことにした。すなわち、氷核形成阻害活性によって農作物の凍結を回避して凍霜害を低減しようとする試みである。

凍害や霜害は農作物の生産性や商品価値を低下させる問題のひとつであり、野外では農作物表面や土壌などに分布する *Pseudomonas* 属や *Erwinia* 属の氷核細菌による凍結誘導が凍霜害の発生要因のひとつとして考えられている。そのため、氷核細菌による凍結誘導を、氷核形成阻害活性をもつポリフェノール及びそれらを含む資源植物抽出物によって抑制することで凍霜害の防止を試みることにした。この実験では最終的に野外での検証試験が必要となるが、その前段階として、実験室レベルで条件検討を行うことにした。ここでは野外試験用に活性画分を大量調製する必要性を考慮し、経済的かつ簡便な氷核形成阻害活性画分の調製方法の検討やその有効性の検証をおこなった。最初に、ドロップレット凍結法によって資源植物の粗抽出画分（抽出物）を用いて氷核形成阻害活性の高い植物抽出物をスクリーニングした。次に、農作物の緑葉切片を用いて、緑葉表面に分布する液滴であっても氷核形成阻害活性によって凍結を回避できるか否かを判断するためのリーフディスク凍結法を確立し、抽出物の氷核形成阻害活性による効果を検証した。さらに、植物個体を用いて氷核形成阻害活性による凍害抑制効果についても簡易的に検証した。また、凍霜害抑制効果の原因物質を特定するため、資源植物の抽出物に含まれている氷核形成阻害物質の同定を試みた。

最初に、氷核形成阻害活性画分を調製するために適した資源植物をスクリーニングするため、72 の植物組織（主に緑葉）から抽出溶媒（アセトン／水＝1／1）によって抽出物を調製し、ドロップレット凍結法によって氷核細菌 *E. ananas* に対する氷核形成阻害活性を測定してその値を比較した。氷核形成阻害活性は高いもので 3.2℃を示し、3℃以上の活性を有するものは 5 試料、2℃以上の活性を有するものは 15 試料であった。この結果を踏まえると、本研究で氷核形成阻害活性を検出できた植物種以外にも活性をもつ植物が多数存在する可能性が十分に考えられた。また、活性の高かった 11 試料について、*E. ananas* の代わりにヨウ化銀やフロログルシノールを氷核形

成物質として用いて活性測定したところ、10℃以上の活性を示すものがいくつか見出された。氷核形成阻害活性を有するポリフェノールでは、氷核形成物質の種類が変わると氷核形成阻害活性の強度が異なることが知られているため、*E. ananas* に対する活性が高いものであっても、その他の氷核形成物質に対しても同様に高い活性を示すとは限らない。そのため、野外試験のように氷核細菌以外にも様々な氷核形成物質が存在する可能性のある場合、いろいろな氷核形成物質に対して効果的な氷核形成阻害物質を選ぶか、様々な種類の氷核形成阻害物質の混合溶液を利用する方が効果を発揮しやすいため、*E. ananas* だけでなくヨウ化銀やフロログルシノールにも高い活性を示す資源植物の方が野外実験により適した材料候補と考えられる。

次に、氷核形成阻害活性による凍結抑制効果を利用して植物の凍霜害を抑制するには、植物表面上においてその効果を発揮する必要がある。しかし、植物個体を用いて試験する場合には、一度に多数の個体を取り扱うことが難しい上に、噴霧するための抽出物が大量に必要となる。そこで、いくつかの農作物（ヤマグワ、トウモロコシ、チャノキの緑葉、ダイコン子葉）から均質なリーフディスク（緑葉切片）を調製し、その緑葉表面に氷核形成物質の *E. ananas* や氷核形成阻害物質のエピガロカテキンガレートを含む液滴をのせて冷却するリーフディスク凍結法を確立した。この時、緑葉上に滴下した液滴が凍結すると緑葉切片も凍結して致死的な傷害を被ったが、エピガロカテキンガレートを含む液滴はほとんど凍結せず、凍結回避した液滴が乗ったまま緑葉切片は凍結傷害も回避していた。このことから、緑葉表面上の水がポリフェノールの氷核形成阻害活性によって凍結回避できれば、凍霜害も回避できる可能性が示唆された。

そこで、ドロップレット凍結法によるスクリーニングによって、クマイザサやゲッケイジュなの 5 試料まで絞り込んだ資源植物の抽出物をリーフディスク凍結法に供試して *E. ananas* に対する効果を調べたところ、いずれも凍結を回避することが明らかになり、緑葉の凍霜害を回避するためにこれらの抽出物を利用できる可能性が示唆された。そこで、未馴化の農作物（ダイコン実生、チャノキ苗）の鉢植えの緑葉に *E. ananas* を付着させた後、クマイザサ葉身抽出物を噴霧して鉢植えを一定時間だけ氷点下温度で処理したところ、凍結を回避できた部位や個体は傷害発生に至らなかった。このような鉢植えを用いた実験系でも、クマイザサ葉身抽出物には凍結抑制効果があり、それによって凍害が回避できることが示唆された。また、リーフディスク凍結法で効果を確認できたクマイザサ以外の資源植物抽出物でも、クマイザサと同様に凍害・霜害を回避できる可能性が十分に考えられた。そのため、次の段階では、野外で栽培している農作物に対して凍霜害が発生しそうなタイミングを見計らって、事前にこれらの抽出物を散布して氷核形成阻害活性による凍結抑制効果を検証する必要がある。それによってこれらの抽出物の野外使用の有効性を調べ、問題点の洗い出しやその解決策を講じるつもりである。

一方で、クマイザサ葉身抽出物中に存在する氷核形成阻害物質の同定も試みている。現時点での候補物質の構造を推測すると、過去に活性測定を行なったことがないフラボノイド配糖体の一種が候補物質として挙げられている。これも含め、氷核形成阻害活性を有するポリフェノールが、ヨウ化銀や *E. ananas* のような氷核形成物質の氷核活性をどのような仕組みで抑制するのかを明らかにするための研究を継続していくことも非常に重要な課題と考えている。