



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13583
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73925
Type	doctoral thesis
File Information	Shingo_Suzuki.pdf



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

北海道大学 大学院農学院
共生基盤学専攻 博士後期課程

鈴木 伸 吾

目次

第1章 緒論	1
1.1 水の凍結	1
1.2 水をより高い温度で凍結させる氷核形成物質	1
1.3 氷核形成物質の氷核活性を抑える氷核形成阻害物質（過冷却促進物質）	3
1.4 霜害の一因となる氷核細菌	4
1.5 研究の目的	4
第2章 植物抽出物からの氷核形成阻害活性の検出	11
2.1 緒言	11
2.2 試料・方法	13
2.2.1 植物試料ならびに抽出物の調製	13
2.2.2 抽出液の調製	13
2.2.3 氷核形成物質の調製	13
2.2.4 リン酸カリウム緩衝液の調製	14
2.2.5 ドロップレット凍結法	14
2.3 結果	16
2.3.1 植物組織から得られる抽出物量	16
2.3.2 植物抽出液の浸透濃度	16
2.3.3 植物抽出物の氷核形成阻害活性	16
2.4 考察	18
2.4.1 植物組織から 50%アセトンで抽出される抽出物の量	18
2.4.2 植物抽出液の浸透濃度	18
2.4.3 ドロップレット凍結法における植物抽出物の氷核形成阻害活性の検出	19
第3章 葉の凍結を抑制する植物抽出物と凍結抑制効果を定量化するリーフディスク凍結法	51
3.1 緒言	51
3.2 方法	52
3.2.1 プレート凍結法およびリーフディスク凍結法	52
3.2.2 ポット苗を用いたクマイザサ抽出物の凍結抑制効果の検証試験	55
3.3 結果	57
3.3.1 シャーレ上、葉切片上における氷核細菌存在下の液滴の凍結	57
3.3.2 氷点下温度における植物抽出物の凍結抑制効果	58
3.3.3 ポット苗におけるクマイザサ抽出物の凍結抑制効果	59
3.4 考察	61

3.4.1 氷核細菌が存在するシャーレ上、緑葉上での液滴の凍結.....	61
3.4.2 シャーレ上、葉切片上における葉抽出物の凍結抑制効果.....	63
3.4.3 クマイザサ葉身抽出液の噴霧による植物実生の凍結抑制効果	65
第4章 クマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害物質の分離	89
4.1 緒言	89
4.2 試料および方法	90
4.2.1 クマイザサ葉身抽出物中の氷核形成阻害活性を有する化合物の分画	90
4.2.2 フラボノイド配糖体の氷核形成阻害活性の測定	91
4.3 結果	92
4.3.1 クマイザサ葉身抽出物の分画および画分の氷核形成阻害活性	92
4.3.2 フラボノイド配糖体の氷核形成阻害活性	93
4.4 考察	94
4.4.1 クマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害活性を有する化合物	94
4.4.2 フラボノイド配糖体の構造と氷核細菌に対する氷核形成阻害活性	94
第5章 本研究のまとめ	105
5.1 様々な資源植物がもつ氷核形成阻害活性.....	105
5.2 様々な表面上での水の凍結の測定に適用できるリーフディスク凍結法	106
5.3 資源植物成分の凍霜害防止や水の凍結防止への利用の展望.....	106
謝辞.....	109
引用文献	110

第 1 章 緒論

1.1 水の凍結

1 気圧では純粋な水の平衡凝固点は 0°C であり、同時に平衡融点も同じ温度になる。平衡凝固点、平衡融点では水（液相）と氷（固相）が共存している状態である。このような氷水の状態では、冷却をしていけば徐々に全体が凍結していく（固体になっていく）ことになる。しかしながら、完全に液相だけの水を冷却していくと、 0°C で凍結は開始せずに 0°C より低温で凍結し始める。この平衡凝固点より低温まで液相の状態が続いていることを過冷却という。過冷却状態は準安定状態であり、ごく微量の水では氷核が生じなければこの状態が約 -40°C まで続くことが知られている(Langham and Mason 1958)。この温度で水はいたるところで有効な氷核（有効核）を形成して、均質核生成によってすぐに凍結する。有効核は水（液相）中の分子の無秩序密度揺動によって発生しうる(Turnbull and Fisher 1949)。無秩序密度揺動によって分子の集まりができ、その大きさと寿命によってその集まりが有効核になるかどうかが決まる。有効核が必ずできる温度が均質核生成温度である。

通常は均質核生成温度まで水が過冷却状態を保つことはほとんどなく、水に混入している異物や水が接している容器などの表面形状などの影響によって均質核生成温度よりも高い温度で氷核が生じて凍結が始まる。これを不均質核生成といい、日常生活のように特別な操作をせずに水を冷却すると、不均質核生成によって水が凍結する。一方、エマルション法により数十 μm 以下の微小な液滴を調製することで異物の混入を抑えて水を冷却すると、液滴が過冷却限度温度の -40°C 近くまで過冷却を維持することを観察できる。このようにして特別に条件設定することで均質核生成は再現される。

1.2 水をより高い温度で凍結させる氷核形成物質

前述したように、水にわずかな異物が混入するだけで、その凍結温度が大きく上昇する。このように水の凍結温度を上昇させる効果（氷核活性）がある物質は氷核形成物質と呼ばれている。氷核形成物質については古くは気象学の分野で研究がなされており、過飽和した水蒸気中で水や氷の核を生成させるために氷の構造とよく似た性質をもつ（格子定数が近い）ヨウ化銀 (AgI) が使われ、約 -4°C で氷核の形成が開始された（氷核形成物質を使用しない条件であると、 -20°C で氷核が形成される）(Vonnegut 1947)。他にも鉱物である kaolinite や dickite、anauxite、halloysite、illite は -10°C 前後で氷核を形成することが示されている(Mason 1960)。さらに、ヨウ化銀沈殿を調製するときヨウ化銅 (CuI_2) を 3 割程度共に沈殿させたもののほうが、ヨウ化銀単独の場合よ

りも 1°C 程度凍結温度が上昇して -0.5~-1°C で氷核が形成されること(Passarelli Jr et al. 1973)やヨウ化銀 (AgI) と臭化銀 (AgBr) を共沈殿させたものでも同様に凍結温度が約 1°C 上昇して -1~-1.5°C で凍結すること(Vonnegut and Chessin 1971)が報告されている。

また、有機化合物でも氷核活性をもつものが知られている。コレステロールやテストステロンなどのステロイド類(Head 1961, 1962a; Fukuta and Mason 1963)や α -フェナジン(Head 1962b)、メタアルデヒド(Fukuta 1963)、 α -テルピネノールやヨウ化させた α -ピネンなどのテルペン類(Rosinski and Parungo 1966)、メチオニンやロイシン、イソロイシン、アスパラギン酸などのアミノ酸(Power 1962; Barthakur and Maybank 1963; Parungo and Lodge Jr. 1967)がマイナス数°C で氷核を形成できる能力がある氷核形成物質として報告されている。最近では、シナレンギョウ (*Forsythia viridissima*) 由来のシュウ酸カルシウム・1 水和物に高い氷核活性 (高い温度で氷核形成できる能力) があること(石川ら 2012)や、オウシュウシラカンバ (*Betula pendula*) やヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris*) などの花粉に含まれる多糖類と推定される高分子化合物に氷核活性があることが報告されている(Pummer et al. 2012; Dreischmeier et al. 2017)。このような植物由来の氷核形成物質そのものについてはあまり報告がないが、植物における氷核の形成 (凍結) については採取した組織を冷却していくと、ものによってはマイナス数°C で凍結による発熱がみられることは、よく観測されている(Quamme et al. 1973; Kader and Proebsting 1992; Carter et al. 1999; Ishikawa et al. 2015a)。植物が凍結する場合、通常アポプラストの水から凍結が始まる。また植物自身も氷核形成物質だけでなく、付着した氷核細菌あるいは霜や雪などの氷によっても引き起こされる可能性がある。そのため、洗浄や殺菌処理を行ってから凍結温度 (氷核形成温度) を測定して、植物自身も持っている氷核活性を検出しているものもある(Ashworth and Davis 1984; 石川 2014)。一方で植物由来の氷核形成物質と比べて、土壌や大気中、植物表面などに分布して水の氷核形成 (凍結) をマイナス数°C で引き起こす氷核細菌由来の氷核形成物質についてはよく研究されている。氷核細菌には *Pseudomonas*、*Erwinia*、*Xanthomonas* 属のものが知られており、いずれもマイナス数°C で凍結を引き起こす(Maki et al. 1974; Lindow et al. 1976; Schnell 1976; Kim et al. 1987)。これらの氷核活性は *inaW*、*inaZ*、*inaA*、*inaX* などと名付けられた氷核タンパク質によるものである。これらの氷核タンパク質のアミノ酸配列は互いによく似ており、アミノ酸 16 残基からなるモチーフが約 60~70 回繰り返される特徴的な構造をもっている(Green and Warren 1985; Warren et al. 1986; Abe et al. 1989; Zhao and Orser 1990)。この繰り返しモチーフによる立体構造が氷核形成に関わる活性ドメインとして認識されている(Garnham et al. 2011; Davies 2014)。

1.3 氷核形成物質の氷核活性を抑える氷核形成阻害物質（過冷却促進物質）

前述したように、通常、水が均質核生成温度まで過冷却状態を保つことはほぼ皆無である。水の中に幾ばくかの塵などが混入してしまうことは避けられず、それらが氷核形成物質として作用して、均質核生成温度よりも高い氷点下温度で水の過冷却状態が破れて凍結にいたる。このような不均質核生成を起こす氷核形成物質が存在する条件下で凍結温度を数°C 低下させる活性物質が近年発見されてきた。このような物質は氷核形成阻害物質もしくは過冷却促進物質と呼ばれており、古くは 1980 年代に、植物種子抽出物や合成高分子において水の不均質核生成（凍結）を阻害する活性が見いだされた (Caple et al 1983a; 1983b)。その後、凍霜害に關与する氷核細菌の氷核活性を阻害するフェニルプロパノイド類やテルペン類の化合物がいくつか見出された (Kawahara and Obata 1996; Kawahara et al. 2000)。さらに、冬季の樹木の木部柔細胞では、越冬するために細胞内部の水を約 -40°C 以下まで長期安定的に過冷却状態を維持する能力を有することから、そのメカニズムとして木部柔細胞内部の微量な水が、細胞壁特性によって細胞外氷晶から隔離されていることのほかに、細胞内部の水自体が凍結しにくい状態であることが示唆された (Kasuga et al. 2006)。その後、樹木の木部組織の抽出物が氷核細菌の氷核活性を阻害する氷核形成阻害活性をもっていることがわかり、その活性は 4 つのフラボノイド配糖体や 4 つの加水分解性タンニンによるものであると同定された (Kasuga et al. 2008; Wang et al. 2012)。

これらの化合物は氷核細菌に限らず、ヨウ化銀やフロログルシノールといった氷核形成物質が存在する水溶液の凍結温度を数°C 低下させる氷核形成阻害活性を示した。また、これらと構造が類似した化合物についても活性が測定され、活性をもつ物質がいくつも見出された (Kasuga et al. 2010; Kuwabara et al. 2012; Kuwabara et al. 2014)。そのほかにも、不凍タンパク質 (Parody-Morreale et al. 1988; Duman 2002) や界面活性剤 (Kuwabara et al. 2014; Inada et al. 2017)、合成高分子 (Caple et al. 1983a; Holt 2003)、ペプチド (Tagawa et al. 2018) やプリン塩基 (Tagawa and Kawahara 2017) に分類される化合物にも氷核形成阻害活性があることが報告されている。不凍タンパク質は氷核形成阻害物質とは異なり、氷点下温度で微細な氷（氷核）の成長を抑制して氷核を成長させない活性（氷核の成長を抑えられる温度範囲を熱ヒステリシスという）や凍結した溶液中にある多数の氷晶が大きくなることを防ぐ再結晶化阻害活性を有するタンパク質のことである。そのため、元々もっている機能は氷核形成阻害物質とは異なるが、一部の不凍タンパク質は氷核形成阻害活性ももっていることが知られている (Parody-Morreale et al. 1988; Wilson and Leader 1995; Duman 2002; Holt 2003; Tomalty and Walker 2014; Bredow et al. 2017)。

今までに氷核形成阻害活性が測定された主なもののリストを Table 1-1a~1d に示し

た（氷核形成阻害活性の算出方法については 2.2.5 のドロップレット凍結法の項目を参照のこと）。これをみると氷核細菌 *Erwinia ananas* に対して強い氷核形成阻害活性があるものであっても、必ずしも他の氷核形成物質に対しても強い活性があるというわけではないことがわかる。そのため、単独で氷核形成阻害物質が作用するよりも複数の物質が存在する方が、複数もしくは未同定な氷核形成物質に対して効果的に作用することが考えられる。したがって、氷核形成阻害活性を利用して凍結を抑制する場合には、氷核形成阻害物質が複数存在するようなものを使用する方がより効果的な効果が得られる可能性が考えられる。

1.4 霜害の一因となる氷核細菌

霜害は農作物の生産性や商品価値を低下させる問題の一つであり、霜害発生の調査や霜害対策は農作物を中心によく行われている。しかしながら、実際に霜害がどのような状態の植物にどのような状況で発生するかを把握することは、霜害が発生する時間や場所が定まっていなかったために難しく、したがって農作物がどのようなメカニズムで霜害を受けるのかを野外で実証、再現することも難しい。そのため、植物個体を装置内で冷却することで霜害を人為的に発生させて、霜害の植物に対する影響が調べられてきた。このような研究では、冷凍庫で植物を冷却することも行われているが、野外での霜害が発生する条件のように、風がなく放射冷却によって冷えることに類似させるために、庫内で放射冷却により植物個体を冷却する装置が作製されて実験が行われてきた(羽生ら 1978; Marcellos 1981; 山中ら 1982; Fuller and Le Grice 1998)。

カラヤマグワ (*Morus alba*) の葉では、乾いていると -5°C 以下の温度で葉自体が凍結し始めるが、水を噴霧しておくると -3°C 程度で多くの緑葉が凍結してしまうことが報告されており(北浦 1967)、葉に結露があるか否かが葉の凍結温度を左右する一因となっていると考えられた。また、植物の表面に *Pseudomonas* や *Erwinia* などの氷核細菌が存在していることは既に知られているが(Lindow et al. 1976, 1978a; Lindow 1982)、近年では *Sphingomonas* の一種も氷核細菌である可能性も示唆されている(Waturangi and Tjhen 2009)。そしてこれらの氷核細菌が霜害を引き起こす一因となっていることが示唆されている(Yankofsky et al. 1981; Lindow et al. 1982; Hirano et al. 1985; Goto et al. 1989; Cambours et al. 2005)。一方、チャノキの芽では氷核細菌は存在するが、チャノキ (*Camellia sinensis*) の霜害では氷核細菌が及ぼす影響は無視できる程度のものとする報告もある(Goto et al. 1993)。

1.5 研究の目的

ポリフェノール類は一般的に抗酸化活性や抗菌活性を有することが知られているが、その一部には氷核形成阻害活性という耐寒性・越冬性に関わりうる新しい機能が見出された(Kasuga et al. 2008; Wang et al. 2012)。そこで、植物が蓄積する氷核形成阻害物質による凍結防止効果を農作物の凍霜害抑制・防止のために利用できるのではないかと考えた。テルペン類やフラボノイド類などが氷核形成阻害物質として同定された際には、特許においてその用途の一つとして凍霜害防止に使用できる可能性についても言及されている。しかしながら、実際に植物由来の氷核形成阻害物質を適用した例は見あたらない。また、精製した化合物は単価が高く、凍霜害の防止のためには大量に用意する必要があるため、精製された化合物を使用することは現実的ではない。そこで本研究では、氷核形成阻害活性の高い粗抽出物を選抜し、その中から農作物の凍霜害防止のための野外試験に利用できそうなものをさらに試験的に選抜して候補となる植物材料を絞り込み、その効果を検証した。本論文の構成はこの研究の流れに沿って構成した。

第2章では、氷核形成阻害活性の高い粗抽出物が得られる資源植物を選抜した結果を紹介する。本章では、簡単な抽出操作で氷核形成阻害活性を回収でき、高い活性画分を有する植物材料のスクリーニングを、従来法であるドロップレット凍結法を利用して行った。そのため、容易に入手できそうな植物材料を無作為に選び、抽出が容易な緑葉を実験材料に用いることを基本方針とした。その結果、氷核形成阻害活性の調製に適した資源植物を特定した。

第3章では、前章で選抜した植物材料から調製してきた抽出物を用い、氷核形成阻害活性を有するものが植物の葉の上でもその効果（凍結抑制効果）を発揮できるかどうかを確かめた結果を示す。なぜなら水の凍結は水が接している表面の形状にも影響を受けるためである。これを確かめる方法として、既知の方法では適当なものが見あたらなかったため、病原菌の感染の試験などによく用いられているリーフディスク法と、氷核形成阻害活性を測定するときによく用いる従来法であるドロップレット凍結法を参考にしてリーフディスク凍結法を考案して、葉の上でも効果があるかどうかを確かめた。さらに、野外試験の候補材料の一つとしてクマイザサ (*Sasa senanensis*) の葉身を取り上げ、その抽出物を用いて野外実験を模した実験系で試験を行った。農作物の苗に対してクマイザサ葉身抽出物を散布してその凍結抑制効果を調べ、これらの実験方法や植物材料が野外での凍霜害の抑制に利用できるものであるかどうかを検証した。

第4章では、クマイザサ葉身抽出物から検出された氷核形成阻害活性がどのような化合物に由来するものであるかを明らかにするため、活性物質の同定を行う工程を記した。クマイザサ葉身抽出物に蓄積されている氷核形成阻害物質の単離・同定を試みると共に、フラボノイド類の構造と氷核形成阻害活性の有無との相関性を考察した。

第5章ではこれらの結果を総括した。これらの実験を通じて、未利用の資源植物の利用方法の一つとして凍霜害を防止するなどの水の凍結を制御するような利用につい

て提唱すると共に、同じような物質を含む資源植物も同様の目的で利用できる可能性があることを提示できるのではないかと考えについて述べた。

Table 1-1a. List of anti-ice nucleation substances: proteins, polysaccharide, and surfactants.

Substance	Experimental condition			Anti-ice		Reference
	Concentration	Ice nucleator	Volume of droplets (μL)	Cooling rate (°C/min)	nucleation activity (°C)	
Antifreeze protein						
<i>Dendroides canadensis</i>	Not shown	Protein ice nucleator	1	1.0	1.7	Duman (2002)
	Not shown	<i>Pseudomonas syringae</i>	1	1.0	1.2	
<i>Dissostichus mawsoni</i>	0.1 ~ 1% (w/w)	None (airborne ice nucleators)	100	0.6	0.3~4.9	Holt (2003)
<i>Macrozoarces americanus</i>	0.1 ~ 0.5% (w/w)	None (airborne ice nucleators)	100	0.6	0.7~1.5	
<i>Lolium perenne</i>	1~2 mg/mL	<i>Pseudomonas syringae</i>	2	0.2	1.0~1.9	Tomalty and Walker (2014)
<i>Brachypodium distachyon</i>	1 mg/mL	<i>Pseudomonas syringae</i>	2	0.2	1.3~2.3	Bredow et al. (2017)
Antifreeze glycoprotein						
<i>Dissostichus mawsoni</i>	1 mg/mL	<i>Erwinia herbicola</i>	1	Not shown	1.0	Parody-Morreale et al. (1988)
	10 mg/mL	<i>Hemideina maori</i> hemolymph	3	Not shown	2.5	Wilson and Leader (1995)
55-kDa protein (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> KINI-1)	10 μg/mL	<i>Erwinia uredovora</i> KUIN-3	10	1.0	2.2	Kawahara et al. (1996)
130-kDa polysaccharide (<i>Bacillus thuringiensis</i> YY529)	50 μg/mL	<i>Pantoea ananas</i> KUIN-3	10	1.0	2.3	Yamashita et al. (2002)
	50 μg/mL	<i>Xanthomonas translucens</i> IFO 13558	10	1.0	1.0	
	50 μg/mL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KUIN-1	10	1.0	0.3	
	50 μg/mL	Silver iodide	10	1.0	4.2	
	50 μg/mL	Metaldehyde	10	1.0	0.1	
	50 μg/mL	Fluoren-9-one	10	1.0	1.1	
	50 μg/mL	Phenazine	10	1.0	1.0	
	50 μg/mL	None (airborne ice nucleators)	10	1.0	0.0	
Surfactant						
Hexadecyltrimethylammonium bromide	0.1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	0.6	Kuwabara et al. (2014)
	0.1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	11.8	
	0.1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	0.3	
	0.1 mg/mL	Silver iodide	6.5×10 ⁻⁸ ~8.2×10 ⁻⁶	4	21.1	Inada et al. (2017)
Triton X-100	0.1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	0.1	Kuwabara et al. (2014)
	0.1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	6.9	
	0.1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	-0.9	
	0.1 mg/mL	Silver iodide	6.5×10 ⁻⁸ ~8.2×10 ⁻⁶	4	19.2	Inada et al. (2017)
Sodium cholate	0.1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	0.1	Kuwabara et al. (2014)
	0.1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	4.3	
	0.1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	2.2	
	0.1 mg/mL	Silver iodide	6.5×10 ⁻⁸ ~8.2×10 ⁻⁶	4	4.0	Inada et al. (2017)
Myristyl sulfobetaine	0.1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	-0.1	Kuwabara et al. (2014)
	0.1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	10.3	
	0.1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	-1.3	
	0.1 mg/mL	Silver iodide	6.5×10 ⁻⁸ ~8.2×10 ⁻⁶	4	1.9	Inada et al. (2017)

Anti-ice nucleation activity (°C) was expressed as the difference between freezing temperature of 50% of sample droplets and that of 50% of control droplets.

Table 1-1b. List of anti-ice nucleation substances: phenylpropanoids, terpenoids, peptides, and purine bases.

Substance	Experimental condition			Volume of droplets (μL)	Cooling rate (°C/min)	Anti-ice nucleation activity (°C)	Reference
	Concentration	Ice nucleator					
Phenylpropanoid							
Eugenol	1 mg/mL	<i>Erwinia uredovora</i> KUIN-3	10	1.0	1.9	Kawahara and Obata (1996)	
α-Methoxyphenol	1 mg/mL	<i>Erwinia uredovora</i> KUIN-3	10	1.0	0.2		
2-Allylphenol	1 mg/mL	<i>Erwinia uredovora</i> KUIN-3	10	1.0	2.5		
4-Allylanisole	1 mg/mL	<i>Erwinia uredovora</i> KUIN-3	10	1.0	1.2		
Caffeic acid	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	1.8		Kawahara et al. (2017)
Chlorogenic acid	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	1.1		
Coumaric acid	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	2.4		
Ferulic acid	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	3.4		
Quinic acid	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	2.0		
Terpenoid							
Hinokitiol	10 mM	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KUIN-1	10	1.0	2.1	Kawahara et al. (2000)	
Hinokitin	10 mM	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KUIN-1	10	1.0	1.1		
α-Pinene	10 mM	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KUIN-1	10	1.0	1.1		
α-Terpinene	10 mM	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KUIN-1	10	1.0	0.4		
Limonene	10 mM	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KUIN-1	10	1.0	1.6		
Peptide							
Trimer of tyrosine	2.0 mM	Silver iodide	10	1.0	10.1	Tagawa et al. (2018)	
Trimer of phenylalanine	2.0 mM	Silver iodide	10	1.0	0.3	河原 (2017a)	
Trimer of serine	2.0 mM	Silver iodide	10	1.0	0.4		
Trimer of threonine	2.0 mM	Silver iodide	10	1.0	-0.3		
Purine base							
Caffeine	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	0.7	Tagawa and Kawahara (2017)	
Theobromine	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	0.7		
Theophylline	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	3.8		
Uric acid	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	2.0		
Hypoxanthine	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	1.4		
Xanthine	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	1.1		
Guanine	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	1.9		
Adenine	0.1~1.0 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	1.7~9.2	河原 (2017b)	

Table 1-1c. List of anti-ice nucleation substances: flavonoids and hydrolysable tannins.

Substance	Experimental condition			Cooling rate (°C/min)	Anti-ice nucleation activity (°C)	Reference	
	Concentration	Ice nucleator	Volume of droplets (μL)				
Flavonoid							
Quercetin 3- <i>O</i> -β-D-glucoside	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	2.8	Kasuga et al. (2008)	
Kaempferol 7- <i>O</i> -β-D-glucoside	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	9.0		
8-Methoxy kaempferol 3- <i>O</i> -β-D-glucoside	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	3.4		
Kaempferol 3- <i>O</i> -β-D-glucoside	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	4.0		
Quercetin 7- <i>O</i> -β-D-glucoside	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	8.9		
Quercetin 3- <i>O</i> -β-D-galactoside	1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	3.2	Kuwabara et al. (2012)	
	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	0.6		
	1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	-0.6	Kasuga et al. (2010)	
	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	7.6		
	1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	4.8		
	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	2.1		
	1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	3.2		
	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	3.7		
Kaempferol 3- <i>O</i> -robinoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	2.4	Kuwabara et al. (2013)	
	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	2.2		
	1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	-6.7		
	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	3.3		
(-)-Epicatechin gallate	1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	4.0		
	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	1.7		
	1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	2.3		
	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	3.3		
(-)-Epigallocatechin gallate	1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	3.6		
	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	0.5		
	1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	2.3		
	Hydrolyzable tannin						
2,2',5-Tri- <i>O</i> -galloyl-α,β-D-hamamelose	1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	2.3		Wang et al. (2012)
	1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	4.5		
	1,2,6-Tri- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucopyranose	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	0.2	Kuwabara et al. (2013)
		1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	4.3	
1,2,3,6-Tetra- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucopyranose		1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	1.5	Wang et al. (2012)
		1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	3.3	
	1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucopyranose	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	0.2	Kuwabara et al. (2013)
		1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	5.1	
1,2,3,6-Tetra- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucopyranose		1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	2.9	Wang et al. (2012)
		1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	3.7	
	1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucopyranose	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	1.0	Kuwabara et al. (2013)
		1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	4.3	
1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucopyranose		1 mg/mL	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	2.1	Wang et al. (2012)
		1 mg/mL	Silver iodide	2	0.2	3.1	
	1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucopyranose	1 mg/mL	Phloroglucinol	2	0.2	6.8	Kuwabara et al. (2013)
		1 mg/mL	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	1.3	

Table 1-1d. List of anti-ice nucleation substances: polymers and crude extracts.

Substance	Experimental condition		Volume of droplets (μL)	Cooling rate (°C/min)	Anti-ice	Reference
	Concentration	Ice nucleator			nucleation activity (°C)	
Synthetic polymer						
Polyvinyl alcohol	0.5 ~ 1% (w/w)	<i>Pseudomonas syringae</i>	100	0.6	1.4	Holt (2003)
	0.1 ~ 1% (w/w)	None (airborne ice nucleators)	100	0.6	2.3~4.6	
	0.1% (w/w)	<i>Pseudomonas syringae</i>	1	2.0	0.8	Wowk and Fahy (2002)
	0.01~1.0 mg/mL	Siver iodide	6.5×10 ⁻⁸ ~8.2×10 ⁻⁶	0.4	10.5~15.8	
Polyglycerol	0.001 ~ 1% (w/w)	<i>Pseudomonas syringae</i>	1	2.0	1.2~6.6	Wowk and Fahy (2002)
Polyvinylpyrrolidone	0.01~1.0 mg/mL	Siver iodide	6.5×10 ⁻⁸ ~8.2×10 ⁻⁶	0.4	5.8~12.8	Inada et al. (2012)
Polyethylene glycol	0.01~1.0 mg/mL	Siver iodide	6.5×10 ⁻⁸ ~8.2×10 ⁻⁶	0.4	9.1~10.8	Caple et al. (1983a)
Methyl methacrylate, n-Vinylpyrrolidone copolymer	10 mg/mL	Siver iodide	Not shown	Not shown	2.7	
Seed extract						
<i>Simmondsida chinensis</i>	0.05 g FW/mL	Silver iodide	10	1.0	4.0	Caple et al. (1983b)
<i>Prunus persica</i>	0.05 g FW/mL	Silver iodide	10	1.0	2.6	
<i>Prunus america</i>	0.05 g FW/mL	Silver iodide	10	1.0	4.2	Kawahara and Obata (1996)
Supernatant liquid surrounding germinating pea (<i>Pisum sativum</i>) seeds	0.025 g FW/mL	Silver iodide	10	1.0	8.1	
Spice extract						
Red pepper	10 mg/mL	<i>Erwinia uredovora</i> KUIN-3	10	1.0	2.4	Kawahara and Obata (1996)
Clove	10 mg/mL	<i>Erwinia uredovora</i> KUIN-3	10	1.0	10.8	
Xylem crude extract						
<i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	100 mOsmol/kg	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	1.0	Kasuga et al. (2007)
<i>Castanea crenata</i>	100 mOsmol/kg	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	1.2	
<i>Fagus crenata</i>	100 mOsmol/kg	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	1.3	
<i>Morus bombycis</i>	100 mOsmol/kg	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	0.3	
<i>Sorbus commixta</i>	100 mOsmol/kg	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	1.0	
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	100 mOsmol/kg	<i>Erwinia ananas</i>	2	0.2	1.9	
	100 mOsmol/kg	<i>Pseudomonas syringae</i> NBRC3310	2	0.2	0.7	
	100 mOsmol/kg	<i>Xanthomonas campestris</i>	2	0.2	1.3	
	100 mOsmol/kg	Silver iodide	2	0.2	1.8	
	100 mOsmol/kg	None (airborne ice nucleators)	2	0.2	1.7	
Food refuse extract						
Coffee bean	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	1.5	Kawahara et al. (2017)
Red bean	0.1 mg/mL	Silver iodide	10	1.0	1.2	

第2章 植物抽出物からの氷核形成阻害活性の検出

2.1 緒言

第1章で紹介したように、自然界には様々な氷核形成物質が存在している。一方で、氷核形成物質に作用して氷核の形成を遅らせる（凍結を抑制する）氷核形成阻害物質（過冷却促進物質）が近年続々と報告されている（Table 1-1a～1d）。これらの中には植物、細菌、魚などの生物由来だけではなく、合成高分子なども含まれている。しかし、様々な氷核形成阻害物質の構造とその活性との相関性に関して明確な指針が得られていないため、現時点では、氷核形成阻害活性の有無や強弱を構造式から推定することはできず、活性測定した結果から初めて活性の有無がわかるという状況である。また、フラボノイド配糖体や、テルペン類などのポリフェノール類に限定すれば、これらの化合物は一般に植物に含まれている二次代謝産物であるため、今までに報告があった植物に限らず、さらに多くの植物において氷核形成阻害活性や新たにリストに加えることができるような化合物が検出される可能性は十分にある。

一方、古くから研究が行われてきた氷核形成物質の氷核形成温度の測定には、溶液を薄いガラスで挟んだものを冷却し、ガラス板の間で薄く引き伸ばされた水の層が凍結する様子を顕微鏡で観察して凍結温度を測定する方法や、Vali (1971)が報告したように多くの微小な液滴を冷却していき、それらの液滴が温度依存的に凍結していく過程を調べていくドロップレット凍結法（droplet freezing assay）が使用されている。なかでも、ドロップレット凍結法は、これまでに多くの研究で用いられているものである。しかし、活性測定の条件設定は実施者によって少しずつ異なっていることが多く見られる。例えば、冷却速度や液量、使用する氷核形成物質の種類などの条件は少しずつ異なっていることがあるため、得られた結果についても単純に比較することが難しい。

このような水の凍結を抑制する効果のある化合物（氷核形成阻害物質）を産業的に利用することは非常に魅力的である。凍結を避けたい事象は日常生活に多く存在し、様々な屋外機器の凍結や着氷、路面の凍結や窓ガラスの凍結、低温保存する食品の凍結、農産物の凍霜害などがある。このような事案に対して氷核形成阻害活性をもつ物質がどの程度効果を発揮するか、どのように応用目的で利用できるのかについての検証は、基礎研究と同じく非常に興味深い問題である。そのため、氷核形成阻害活性を農産物の凍霜害防止に役立てるため、いくつかの実験を行うことにした。凍霜害防止のような野外での適用の際には、大量かつ安価に活性物質を調達する必要がある、その方法が簡便であることが望ましい。そのため、資源植物から活性成分を調製して利用するという方針とした。

さらに、植物の粗抽出画分には様々な種類のポリフェノール類が様々な濃度で含まれ

ていることが予想される。そのため、抽出する材料が変われば活性の程度が異なることが考えられる。また、凍結を防止する必要があるような寒くなる時期でなくても、活性をもつ物質となるような二次代謝産物を多く含む材料であったり、これらの物質を多く蓄積する季節に採取したりしたものであれば、抽出画分の氷核形成阻害活性が高くなることは十分にありうる。

そこで本章では、氷核形成阻害活性を農作物の凍霜害防止に利用できる可能性のある資源植物を見つけるために、まず植物の葉組織などから得た抽出物のうち氷核形成阻害活性の高いものをスクリーニングすることにした。最終的に凍霜害防止に利用することを目指しているため、できるだけ簡単に用意でき、かつ大量に抽出物を得られるような方法となるようにした。複雑な抽出方法や分離操作を行わずに得られる抽出物を調製して、少量の試料で凍結温度を測定できるドロップレット凍結法によって抽出物の氷核形成阻害活性の検出と比較を行った。

2.2 試料・方法

2.2.1 植物試料ならびに抽出物の調製

2015 年 6 月から 9 月にかけて、北海道大学構内に生育するもしくは温室(自然日長、20~30°C)で生育させた 72 試料[木本植物葉 23 試料(19 科)、草本植物葉 43 試料(23 科)、植物の葉以外の組織 6 試料(木本植物由来 4 試料、草本植物由来 2 試料)]を採取し、抽出物の調製に供試するまで-80°Cに設定した冷凍庫で保存した(Table 2-1a, 1b)。

保存していた約 2 g の葉を液体窒素中で細かく粉砕して三角フラスコに移し、そこに約 20 mL の抽出溶媒[アセトン/水=1/1 (50%アセトン水溶液)]を加えてよく攪拌し、暗所・室温の条件下で一昼夜静置した。この混合溶液をセライトろ過して残渣を除いた後、ろ液に含まれるアセトンを 30°C でロータリーエバポレーターを使用して除去した。続いて凍結乾燥をおこなって乾固し、粉末の抽出物を得た。これらは実験に供試するまで 4°C の冷蔵庫で保存した。葉の 50%アセトン水溶液抽出物の含有率(%)は得られた抽出物の重量を抽出に使用した葉の生鮮重量で除算することにより算出した。

2.2.2 抽出液の調製

前項で調製した粉末の抽出物を、水 1 mL に対して葉 0.20 g (生重量)から得られる抽出物が含まれる濃度(0.20 g FW/mL)となるように計りとして超音波洗浄機を使用して水によく懸濁し、約 10 分間攪拌した。その後、15,000×g で 10 分間の遠心分離(20°C)を行って上清を回収し、これを抽出液とした。抽出液は活性測定に供試するまで 4°C で保存した。抽出液の浸透濃度は 0.20 g FW/mL の濃度で蒸気圧法オズモメーター(5520, Wescor Inc.)を使用して測定した。

2.2.3 氷核形成物質の調製

氷核形成細菌である *Erwinia ananas* TM2(MAFF811106)は Kuwabara et al. (2012)の方法で培養した菌体を用いた。具体的には以下の通りである。

300 mL 容の三角フラスコに 60 mL の滅菌した LB 液体培地を用意した。これに *E. ananas* のグリセロールストックを少量植菌し、25°C の暗条件で一昼夜(約 16 時間)200rpm で旋回培養した。次に、1 L 三角フラスコに 300 mL の滅菌した LB 液体培地を用意し、これに上述の一昼夜培養した培養液を 10 mL 加えて 15°C の暗条件で 3 日間、200rpm で旋回培養した。この培養液を 9,000×g で 5 分間の遠心分離(20°C)をおこなって沈殿物(菌体)を得た。この菌体に容器容量の 8 割程度の純水を加えて弱く懸

濁し、9000×g で 5 分間の遠心分離 (20°C) をおこなって上清を除去した。この操作を 2 回繰り返し、菌体沈殿物に混入する塩類などの培地成分をできるだけ除去した。得られた菌体は液体窒素で凍結させ、一昼夜凍結乾燥に供して乾燥した粉末の *E. ananas* 菌体を得た。この乾燥菌体を氷核物質として用いる場合には、10 mg/mL となるように水で懸濁した後、活性を安定させるために 4°C に設定した冷蔵庫で 2 日間保存したものを以降の試験に供試することにした。

フロログルシノール (P0249, 東京化成工業) は 0.48 M となるように水に溶解させたものを調製して実験に供試した。

ヨウ化銀は、使用直前に 20 mM ヨウ化カリウム水溶液 (164-03972, 和光純薬) と 20 mM 硝酸銀水溶液 (31019-04, ナカライテスク) を混合し、ヨウ化銀濃度 10 mM の均一なヨウ化銀懸濁液を調製して実験に供試した。

2.2.4 リン酸カリウム緩衝液の調製

後述の試験で使用するリン酸カリウム緩衝液は以下のように調製した。リン酸水素二カリウム (28727-95, ナカライテスク) とリン酸二水素カリウム (28721-55, ナカライテスク) のそれぞれ 1.0 M 水溶液を調製した。1.0 M リン酸水素二カリウム水溶液に 1.0 M リン酸二水素カリウム水溶液を少しずつ加えて pH7.0 にして、1.0 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) を調製した。

2.2.5 ドロップレット凍結法

溶液の凍結温度の測定は Vali (1971) によるドロップレット凍結法を改変した方法である Kuwabara et al. (2011) の方法に準じて行った。

この試験に使用する溶液 (試験溶液) は、2.2.2 で記した 0.20 g FW/mL に揃えた各種植物由来の抽出液と、2.2.3 で記した氷核物質である 10 mg/mL *E. ananas* 懸濁液、2.2.4 で記した 1.0 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)、超純水 (ミリ Q 水) を混合して調製した。なお、試験溶液中の各成分の終濃度は、植物抽出液が 0.10 g FW/mL、*E. ananas* 懸濁液が 2.0 mg/mL、リン酸カリウム緩衝液が 50 mM となるようにした。

銅製の箱船 (12×10 cm の銅板) に 10 個×12 列のくぼみを等間隔につけたものを用意し、くぼみが付いた部分をミネラルオイル (23306-84, ナカライテスク) で覆った。1 つのくぼみ部分につき 2 µL の試験液をのせて、0°C に設定したエチレングリコールバス (FP40, Julabo Labortechnik) にセットし、0.2°C/min の速度で冷却した (Fig. 2-1)。そして、0.5°C 冷却される毎に凍結した液滴を計数した。液滴の凍結は液滴が濁ることを目視により確認して判断した。なお、銅板上には植物抽出物を入れないコント

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、少なくとも 5 回以上試験を行った。

これによって得られた結果（各溶液について記録した 0.5°C 毎の凍結割合）をもとに、温度低下によりどの程度凍結するかを示す折れ線グラフ（凍結曲線）を作成し、半数（50%）の液滴が凍結する温度（ FT_{50} ）をもとめた。そして、コントロール溶液の FT_{50} 値から試験溶液の FT_{50} 値を差し引いた値の平均値と標準偏差を算出し、氷核形成阻害活性（過冷却促進活性）とみなした。試験溶液の FT_{50} がコントロール溶液のものより低い場合、すなわち抽出物の添加によって氷核活性が抑制されて凍結温度が低下した場合はその温度差（すなわち氷核形成阻害活性）は正の値で示され、値が大きいほど高い氷核形成阻害活性を示すことになる。一方、試験溶液の FT_{50} がコントロール溶液より高い場合、すなわち抽出物の添加によって凍結が促進して凍結温度が上昇した場合は氷核形成阻害活性が負の値で示される。

また、氷核細菌 *E. ananas* 以外の氷核形成物質に対する氷核形成阻害活性を調べる際には、*E. ananas* 存在下で比較的高い氷核形成阻害活性を有していたアカエゾマツ、レッドマスタード、クマイザサ、バッコヤナギ、ゲッケイジュ、スダチ、アカジソ、チャノキ、セイヨウタンポポ、ワイルドオーツ、キガラシの植物抽出物を使用して、*E. ananas* 懸濁液の代わりに、 0.12 M フロログルシノールもしくは 2.5 mM ヨウ化銀（いずれも終濃度）を加えて活性測定をおこなった。

さらに、抽出液の氷核形成阻害活性の効果を調べるため、同じ試料において複数回測定した結果をあわせて凍結曲線を作成して図に示した。さらにこの凍結曲線から最初の液滴が凍結した温度（ FT_1 ）および 25%、50%、75%、100% の液滴が凍結した温度（ FT_{25} , FT_{50} , FT_{75} , FT_{100} ）と氷核形成阻害活性を推定、計算した。推定方法は、求めたい FT 値に最も近い温度の前後の測定温度における凍結個数から比例計算して推定した。

2.3 結果

2.3.1 植物組織から得られる抽出物量

72 試料 [木本植物葉 23 試料 (19 科)、草本植物葉 43 試料 (23 科)、葉以外の組織 6 試料 (木本植物由来 4 試料、草本植物由来 2 試料)] の植物組織粉末から 50%アセトン水溶液にて抽出を行い、抽出液を乾固して 50%アセトン抽出物を得た。その結果、生鮮試料から得られた抽出物の割合は以下 (Table 2-1a, 1b) のようになった。草本植物由来の組織では、得られた抽出物の割合は 2%強から 9%弱まで分布しており、抽出物割合が 2%~7%の試料が多くみられた。抽出物割合が 7%を超えるものは 4 試料と少なく、9%を超えるものはなかった (Fig. 2-2A)。木本植物由来の組織では、得られた抽出物の割合は 8%弱から 16%強であり、8%から 14%のあたりに分布しているものが多かった (Fig. 2-2B)。抽出物の割合が 10%以上となった植物組織は 22 試料あり全て木本植物由来の試料であった。

2.3.2 植物抽出液の浸透濃度

得られた抽出液の上清の浸透濃度 (オスモル濃度) によっては、凝固点降下による凍結温度の低下がみられる。そのため、この上清の凝固点降下度を推定するために浸透濃度を測定した。その結果、濃度が 0.20 g FW/mLの全ての植物抽出液 (上清) は浸透濃度が 200 mOsmol/kgを超えることがなかった (Table 2-2a, 2b)。

2.3.3 植物抽出物の氷核形成阻害活性

ドロップレット凍結法によって氷核形成物質の *E. ananas* を添加した試料の凍結温度を測定し、FT₅₀ を求めた。その際、抽出液を含まないコントロール溶液の FT₅₀ の平均値は $-4.7 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (n = 70) であった。次に 72 の植物抽出物の FT₅₀ をもとめ、氷核形成阻害活性を測定したところ、3°C以上の氷核形成阻害活性をもつものから、ほとんど活性をもたないものまで様々であった (Table 2-3a~3c)。特に、アカエゾマツ葉と樹皮、レッドマスタード葉、クマイザサ葉身、バッコヤナギ葉、ゲッケイジュ葉、スダチ葉、アカジソ葉、チャノキ葉、セイヨウタンポポ葉の 10 の植物抽出物は 2.5°C以上の氷核形成阻害活性を示した。氷核形成阻害活性が 1.5~2.5°Cの植物抽出物は 8 試料 (木本植物葉 3 試料、草本植物葉 5 試料)、1.0~1.5°Cの植物抽出物は 10 試料 (木本植物葉 7 試料、草本植物葉 3 試料) であった。氷核形成阻害活性が 1.0°Cより低いものは 44 試料あり、内訳は木本植物葉 11 試料、草本植物葉 31 試料、バッコヤナギおよびアカエゾマツ木部であった。26 の木本植物葉の抽出物では氷核形成阻害活性が 3.0°Cよ

り高いものが 2 試料 (8%)、2.0°Cより高いものが 6 試料 (23%)、1.0°Cより高いものが 11 試料 (42%)、1.0°C以下のものが 15 試料 (58%) であった (Fig. 2-3A)。39 の草本植物葉の抽出物では氷核形成阻害活性が 3.0°Cより高いものが 2 試料 (5%)、2.0°Cより高いものが 7 試料 (18%)、1.0°Cより高いものが 10 試料 (26%)、1.0°C以下であったものが 29 試料 (74%) であった (Fig. 2-3B)。

Fig. 2-4A~4Qに示したように、それぞれの抽出物の凍結曲線を比べてみると、氷核形成阻害活性を少しでも有するものではおおむねFT₁の低下がみられた。しかしながら、氷核形成阻害活性が高くなるにつれてFT₁が低くなるという傾向はみられなかった。氷核形成阻害活性が高い抽出物ほど凍結曲線の傾きが緩やかになり、FT₁ からFT₁₀₀ の温度差が大きくなる傾向がみられた。氷核形成阻害活性をある程度有する抽出物の場合、同じ凍結頻度に達する凍結温度についてコントロールと試料とを比較すると、FT₁ からFT₅₀ ではコントロールとの温度差が次第に大きくなり、FT₅₀ を超えるとコントロールとの温度差はあまり広がらない傾向がみられた。

また、氷核形成物質 *E. ananas* に対して比較的氷核形成阻害活性が高かった 11 の植物葉抽出物について、氷核形成物質をヨウ化銀 (AgI) またはフロログルシノールに変え、同様にドロップレット凍結法によって凍結温度を測定し、氷核形成阻害活性をもとめた。その際、抽出液を含まないコントロール溶液のFT₅₀ の平均値はヨウ化銀とフロログルシノールそれぞれ $-3.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (n = 10)、 $-7.4 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ (n = 10) であった。

ヨウ化銀を氷核形成物質とした場合では、氷核形成阻害活性が低いものでも 6.5°Cの活性を示し、最大で 10.6°Cの活性を示した (Table 2-4)。

フロログルシノールを氷核形成物質とした場合では、バッコヤナギやアカエゾマツ葉抽出物は 10°C以上の氷核形成阻害活性を示した。チャノキやクマイザサ、ゲッケイジュ葉抽出物は 7~8°C程度の氷核形成阻害活性を示したが、これら以外の葉抽出物はほとんど氷核形成阻害活性を示さないか、小さな値しか示さなかった (Table 2-5)。

2.4 考察

2.4.1 植物組織から 50%アセトンで抽出される抽出物の量

2.3.1 の結果 (Table 2-1a, 1b, Fig. 2-2) のとおり、生鮮植物葉などから 50%アセトン水溶液 (アセトン/水=1/1) で抽出される抽出物の量の分布をみると、木本植物の葉組織から得られる抽出物量 (7~17%) の方が草本植物の葉組織から得られる抽出物量 (2~9%) より多いところに分布することになった。同じ葉といえども、採取した夏季の葉では木本植物の方が草本植物のものより厚く硬くなっていることが多いためであると考えることもできる。

草本植物に分類した中にクマイザサがある。クマイザサの葉身は越冬し 2~3 年生育し、ササは英語では **woody dwarf bamboo** と呼ばれ、木本のような形態であるかのような表現で表されている。今回採取したクマイザサ葉身は 2 年目のもので、他のイネ科植物の特徴と同様にかかなり硬く丈夫な葉身となっていた。しかしながら、得られた抽出物量の割合は 5.86%と草本植物の中では中程度、木本植物と比較するとかなり低い。同じイネ科のワイルドオーツの抽出物量の割合は 7.86%で、草本植物の中では 2 番目に多く、木本植物のうちで割合が少ないものと同程度である。そのため、一概に種の分類や葉の硬さなどの様子から、氷核形成阻害物質を多く含む活性画分が効率よく抽出される材料か否かが分かるわけではないが、一つの指標にはなりうると考えられた。

木本植物葉では、常緑性のものと落葉性のもののどちらも試料として供試したが、得られた抽出物量の割合に関して明確な違いがあるわけではなかった。また、アカエゾマツとバッコヤナギでは、葉の他にも樹皮と木部組織を試料として供試してみたところ、樹皮は 10%強、木部は 1~3%の抽出割合であった。木部を材料として用いたときの収量の低さについては、おそらく木部組織中では生きている細胞 (柔細胞) の占有率が 10~20%以下と少ないことが大きく影響していると考えられた。したがって、単に活性画分を効率よく得ようとするのが目的であれば、緑葉のように柔細胞の占有率が高く組織の物理的強度が低い組織を材料に選ぶことが、結果的に活性画分の抽出効率を高めることに繋がるものと考えられた。

2.4.2 植物抽出液の浸透濃度

2.3.2 の結果 (Table 2-2a, 2b) の結果の通り、植物葉抽出物の濃度 0.20 g FW/mL で浸透濃度が 200 mOsmol/kg を超えるものはなかった。溶液中の溶質濃度が高くなると浸透濃度が高くなり、凝固点降下による融点の低下がみられる。グルコースや塩化ナトリウム、尿素などの溶質を使用した実験結果によると、凝固点降下度の 2 倍程度の温度幅で水溶液が過冷却しうることが予想されている (MacKenzie 1977; Chaoenrein and

Reid 1989; Wilson et al. 2003)。これに則って考えると、調製した植物抽出液の浸透濃度が 100 mOsmol/kg であっても最大で 0.5°C 程度しか過冷却の限度温度が低下しない（すなわち凍結温度を低下させない）ことが予想された。そのため、実験に使用する抽出液の溶質濃度（浸透濃度）による凍結温度への影響は小さいものと考えられた。

2.4.3 ドロップレット凍結法における植物抽出物の氷核形成阻害活性の検出

2.2.5 のドロップレット凍結法の説明箇所、植物抽出物を入れていない（氷核形成物質と緩衝液のみ）コントロール溶液と植物抽出物を入れた溶液の凍結温度の差を氷核形成阻害活性と定義している。氷核形成阻害活性や抗氷核活性として表される単語は、英語で anti-ice nucleation activity のことである。Kawahara and Obata (1996)や Kawahara et al. (2000); Holt (2003)、Holt (2003) などの論文では inhibitor for ice nucleation activity という文言を使用しているが、同じ意味である。また氷核形成阻害活性は「氷核活性を阻害・抑制する」ことで、結果的に水溶液の過冷却の維持につながるため、過冷却促進活性—supercooling-facilitating activity や supercooling-promoting activity—としても表現されている(Kasuga et al. 2007; Kasuga et al. 2010; Kuwabara et al. 2011; Wang et al. 2012; Kuwabara et al. 2013)。

Vali (1971) によりドロップレット凍結法が報告されてから、本法は溶液の凍結温度を測定するためにしばしば用いられている標準的な実験方法である。本研究でもこのドロップレット凍結法を採用し、本研究の目的に見合うように条件を設定して活性測定に用いた。例えば、本実験系では、氷核形成を促す物質（氷核形成物質）として、標準的に使用した（１）植物表面や土壌などの環境中に存在し、高い氷核活性を示す氷核タンパク質を有する氷核細菌の一種である *E. ananas* 菌体のほか、（２）大気中に拡散させて人為的に降雨・降雪を誘導する目的（人工降雨）などで使用されるヨウ化銀 (AgI) や（３）Kuwabara et al. (2011) などで使用された比較的簡単な構造の有機化合物で水に溶けやすく扱いやすいフロログルシノール (benzene-1,3,5-triol) というタイプの異なる３種類の氷核形成物質を利用して、水溶液の凍結を促す条件を予め設定している。それを前提条件として、これに植物の抽出物を添加することによって、氷核形成物質に対して何らかの作用をすることで氷核活性が阻害・抑制され、その結果として凍結温度が低下するという現象を検出するという実験系である。

E. ananas を氷核形成物質として使用した結果を 2.3.3 (Table 2-3a~3c) で述べた。この氷核形成阻害活性の標準偏差をみると、6 試料を除き 0.5°C 以下、測定した全 72 試料においても 0.9°C 以下となっていた。そのため、本研究で用いた方法であるドロップレット凍結法での測定された *E. ananas* を氷核形成物質として半数凍結温度 (FT₅₀) が -4~-8°C 程度の場合、氷核形成阻害活性は 0.5°C 程度の誤差が生じる可

能性が十分にあると考えられる。また、本研究で用いたドロップレット凍結法では、冷却温度が 0.5°C 低下する毎に凍結した液滴の個数を計数しているため、測定する毎に 0.5°C 程度の活性の差は容易に生じる可能性がある。そのため、*E. ananas* を氷核形成物質として使用した場合には、氷核形成阻害活性の平均値が少なくとも 1.0°C 以上の活性があった 20 試料近くの試料を活性有りとし、1.0°C 以下となるような試料をわずかに活性があるかほとんど活性がないものと判断するのが妥当と考えた。

同様に考えると、ヨウ化銀を使用して測定した結果 (Table 2-4) をみると、今回測定した試料では FT₅₀ が -11~-15°C であり、ヨウ化銀の場合はこの範囲では 2°C 程度の誤差が生じる可能性があると考えられる。今回使用した 11 の植物葉抽出物は、いずれもヨウ化銀に対して 2°C より高い氷核形成阻害活性を示していた。そのため、11 の植物葉抽出物はヨウ化銀に対して高い氷核形成阻害活性を有していることが分かった。

続いてフロログルシノールを使用した場合 (Table 2-5) では、氷核形成阻害活性がかなり低い、もしくはほとんどないと考えられたアカジソ、セイヨウタンポポ、ワイルドオーツの抽出物を除き、他の 8 試料は氷核形成阻害活性の平均値が 2°C 以上であった。しかしながらレッドマスタードやスダチ、キガラシは平均値に対して標準偏差が大きな値を示したため、活性を有しているか否かを明確に判断することは難しい状況である。残りのアカエゾマツ、クマイザサ、バッコヤナギ、ゲッケイジュ、チャノキの各抽出物については、フロログルシノールに対して氷核形成阻害活性を有していると判断できる。ほぼ同様の氷核形成物質を使用し、ほぼ同じ活性測定ならびに活性評価 (計算) 方法が行われている Kuwabara et al. (2012) (フラボノイド類) や Kuwabara et al. (2013) (タンニン類) の結果と比較すると、今回得られた結果と同程度の氷核形成阻害活性を示す (すなわち同程度の凍結温度を示す) 試料は概ね同程度の標準偏差を示していた。そのため、本研究で用いた実験系では Table 2-3a~3c, 2-4, 2-5 でみられる程度のばらつきが十分生じうるものと考えられた。

実験に供した草本植物葉抽出物の氷核形成阻害活性の分布 (Fig. 2-3A) と木本植物葉抽出物の活性分布 (Fig. 2-3B) を比較した。すると、氷核形成阻害活性が 1.0°C 以下のところに分布する植物抽出物が木本植物葉由来のものに比べて明らかに草本植物葉由来のものの方が多かった。氷核形成阻害活性が 1.0°C より大きいところに分布するものは、草本植物葉由来のもので 10 試料、木本植物葉由来のもので 11 試料とほぼ同数である。氷核形成阻害活性が 1.0°C より大きいところに分布するものだけを比較すると草本、木本どちらもその分布に大きな違いはないように見える。この試験に供試した植物抽出物の数 (草本植物葉抽出物 39 試料、木本植物葉抽出物 26 試料) を加味すると、どの植物葉に活性があるか検証する場合、木本植物から葉を採取する方が活性の高いものを引き当てる可能性が若干高いと考えられる。

本研究のように、氷核形成阻害活性を指標にしてスクリーニングする目的で多種の植

物から簡単に抽出した画分（粗抽出物）を用いて活性比較した事例はほとんどみられない。文献検索する限り、6 試料の木本植物の木部組織抽出物の氷核細菌（*E. ananas*）に対する氷核形成阻害活性を測定した結果(Kasuga et al. 2007)や 16 試料の野菜・果実、10 試料の香辛料の抽出物の氷核細菌（*E. uredovora*）に対する活性を測定した結果(Kawahara and Obata 1996)が報告されているくらいであった。その中ではクローブ（丁子; *Syzygium aromaticum*）のエタノール抽出物が終濃度 10 mg/mL で 10.8°C もの氷核形成阻害活性を示しており、同時に測定されている他の植物種と比べてもかなり高い活性であった。本研究の結果（Table 2-3a~3c）と比べてもかなり高い活性値といえる。この活性測定条件はドロップレット凍結法による測定結果なので十分に参考になるものであるが、著者らの実験条件とはサンプル容量や測定回数などの条件が異なるため、単純に活性値を比較して強弱を結論づけることは避けるべきだと考えている。また、本実験では様々な植物種で広く氷核形成阻害活性の選抜を行っており、その活性の強度は特定の植物種に限られたものではないことがわかる。前述したように、これらのポリフェノール類は植物の二次代謝産物であり、組成や蓄積量に違いはあるものの、これらの化合物は広く植物に分布する。そのため、未だ活性測定されていない多くの植物の中には高い活性を有するものが存在する可能性は十分に考えられる。また、本研究では、夏季の生鮮試料を採取して粗抽出物の氷核形成阻害活性を測定したものであるため、採取時期や生育状態の違いによって氷核形成阻害活性のある成分の含有量が変化することが十分にありうる。また、今までに報告されている植物由来の氷核形成阻害物質は、テルペン類(Kawahara et al. 2000)、フェニルプロパノイド類(Kawahara and Obata 1996)、フラボノイド配糖体(Kasuga et al. 2008; Kasuga et al. 2010; Kuwabara et al. 2011; Kuwabara et al. 2012)、タンニン類(Wang et al. 2012; Kuwabara et al. 2013)がある。これらの化合物の植物体内での蓄積過程を考えると、一年生植物や落葉する植物の葉を採取する場合は、春先の開芽直後のような若い時期よりも、夏から初秋のように成熟し老化する前の時期のものの方が資源量が多くて向いているのではないかと考えられる。その一方で、タンニンやフラボノイドを多く蓄積する傾向にある植物種の存在やそれらが誘導される条件も知られているため、まだまだ候補植物が見出される可能性が高い。しかしながら Table 2-3a~3c で示した結果は、氷核形成阻害活性の供給源となる資源植物や新規活性物質を見つけだすための材料を選ぶために非常に有用な指針を提供しうるものであることには違いない。

氷核形成阻害活性を測定した65の緑葉試料のうち、エゾマツとアカエゾマツ、キガラシとレッドマスタードのように近縁種であっても活性に高低があり、生育環境や成熟度合いなどが抽出成分濃度や組成に影響し、活性に影響する可能性が考えられた。今回測定したなかで氷核形成阻害活性が比較的高かった植物種に含まれる化合物について、今までに活性が検出された化合物とその植物に含まれるポリフェノールとを照

らし合わせると、次のような化合物に氷核形成阻害活性があることが期待される。例えば、アカエゾマツではisorhapontinやpiceidなどのスチルベン配糖体(Shibutani et al. 2004)、ゲッケイジュはkaempferol 3-*O*- α -L-(3'',4''-di-*E*-*p*-coumaroyl)-rhamnosideなどのフラボノール配糖体に*p*-クマル酸が結合した化合物やフラボノール配糖体、カテキン類などが含まれていることが報告されている(Fiolini et al. 1998)。クマイザサではluteolin 6-*C*-glucosideやluteolin 7-*O*-glucoside、apigenin 6-*C*-dipentose、tricin 7-*O*-hexosideなどのフラボン配糖体(松田ら 2008; Matsuta et al. 2009)、チャノキでは(-)-epigallocatechin gallate (EGCG) を筆頭にカテキン類が多量に含まれていることが知られており、特にEGCGなどのカテキン類は氷核形成阻害活性があることが知られている(Kuwabara et al. 2013)。今回測定したシソ類であるアカジソ（葉の両面が赤）、カオリウラシソ（葉表面が緑、葉裏が赤）、アオジソ（両面が緑）に含まれるフラボノイド類には、アントシアニンであるshisoninやフラボン配糖体であるapigenin 7-*O*-caffeoylglucoside, luteolin 7-*O*-glucuronide, scutellarein 7-*O*-glucuronideなどがあり、フラボノイド類は葉が緑のシソより葉が赤いシソが数倍の含有量であることが報告されている(Meng et al. 2009)。これは今回測定して得られた氷核形成阻害活性の高低と一致する。セイヨウタンポポではケルセチンやルテオリンの配糖体、キナ酸、テルペン類を含有している(Kisiel and Barszcz 2000; Schütz et al. 2005)。レッドマスタードやキガラシと同種の *Brassica juncea* では、多種のケンフェロール配糖体、sinapoylglucosideなどのシナピン酸とグルコースのエステルが検出されており(Harbaum et al. 2008)、既に知られている氷核形成物質と比較すると、これらの物質が候補となりうる。

Table 2-1a. Yield (%) of the 50% aqueous acetone extracts from herbaceous plant leaves.

科名	Scientific name	和名	Yield of extract (%)
スベリヒユ科	<i>Portulaca oleracea</i>	スベリヒユ	2.10
アブラナ科	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i>	ダイコン	2.39
ドクダミ科	<i>Houttuynia cordata</i>	ドクダミ	2.83
アカザ科	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	アカビート	2.85
ヒガンバナ科	<i>Allium tuberosum</i>	ニラ	2.95
ショウガ科	<i>Zingiber mioga</i>	ミョウガ	3.01
キク科	<i>Taraxacum officinale</i>	セイヨウタンポポ	3.36
ツリフネソウ科	<i>Impatiens balfourii</i>	ハナツリフネソウ	3.37
アブラナ科	<i>Lepidium sativum</i>	コショウソウ	3.39
シソ科	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>viridis</i>	アオジソ	3.71
トクサ科	<i>Equisetum arvense</i>	スギナ	3.74
ヒガンバナ科	<i>Allium fistulosum</i>	ネギ	3.90
タデ科	<i>Rumex obtusifolius</i>	エゾノギンギシ	4.10
シソ科	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>purpurea</i>	アカジソ	4.20
オオバコ科	<i>Plantago lanceolata</i>	ヘラオオバコ	4.53
アオイ科	<i>Abelmoschus esculentus</i>	オクラ	4.58
タデ科	<i>Fagopyrum esculentum</i>	ソバ	4.66
アブラナ科	<i>Brassica juncea</i> sp.	キガラシ	4.93
アブラナ科	<i>Brassica juncea</i> sp. (red mustard)	レッドマスタード	5.04
ヒユ科	<i>Amaranthus viridis</i>	ホナガイヌビユ	5.15
ナス科	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	5.23
カタバミ科	<i>Oxalis comiculata</i>	カタバミ	5.44
マメ科	<i>Trifolium repens</i>	シロツメグサ	5.57
ウリ科	<i>Momordica charantia</i> var. <i>pavel</i>	ツルレイシ	5.62
シソ科	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>rosea</i>	カオリウラシソ	5.69
キク科	<i>Arctium lappa</i>	ゴボウ	5.71
イネ科	<i>Sasa senanensis</i>	クマイザサ	5.86
マメ科	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	6.07
ヒユ科	<i>Chenopodium album</i> var. <i>centrorubrum</i>	アカザ	6.07
ガガイモ科	<i>Metaplexis japonica</i>	ガガイモ	6.26
セリ科	<i>Aegopodium podagraria</i>	イワミツバ	6.32
ノウゼンハレン科	<i>Tropaeolum majus</i>	キンレンカ	6.35
センリョウ科	<i>Chloranthus japonicus</i>	ヒトリシズカ	6.64
ブドウ科	<i>Cayratia japonica</i>	ヤブガラシ	6.73
マメ科	<i>Glycine max</i> cv. <i>wasemidori</i>	ダイズ	7.29
イネ科	<i>Chasmanthium latifolium</i>	ワイルドオーツ	7.67
キク科	<i>Petasites japonicus</i>	フキ	8.79

Table 2-1b. Yield (%) of the 50% aqueous acetone extracts from woody plant leaves and other plant materials.

科名	Scientific name	和名	Yield of extract (%)
アジサイ科	<i>Hydrangea macrophylla</i> f. <i>normalis</i>	ガクアジサイ	5.93
ブドウ科	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	ツタ	6.53
クワ科	<i>Morus bombycis</i>	ヤマグワ	7.80
グミ科	<i>Elaeagnus umbellata</i>	アキグミ	8.17
ミカン科	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	サンショウ	8.43
ウコギ科	<i>Aralia elata</i>	タラノキ	8.82
ミカン科	<i>Citrus sudachi</i>	スダチ	9.09
ヒノキ科	<i>Thuja occidentalis</i>	ニオイヒバ	9.10
ニシキギ科	<i>Euonymus alatus</i>	ニシキギ	9.35
ミズキ科	<i>Cornus officinalis</i>	サンシュユ	10.0
ヤナギ科	<i>Populus tremula</i> × <i>alba</i>	交雑ポプラ	10.1
モクセイ科	<i>Jasminum sambac</i>	マツリカ	10.3
クスノキ科	<i>Laurus nobilis</i>	ゲッケイジュ	10.6
ヤナギ科	<i>Salix bakko</i>	バッコヤナギ	10.9
マツ科	<i>Lalix kaempferi</i>	カラマツ	10.9
イチョウ科	<i>Ginkgo biloba</i>	イチョウ	11.1
アケビ科	<i>Akebia</i> × <i>pentaphylla</i>	ゴヨウアケビ	11.1
トチュウ科	<i>Eucanmia ulmoides</i>	トチュウ	11.6
ブナ科	<i>Fagus crenata</i>	ブナ	11.6
フトモモ科	<i>Backhousia citriodora</i>	レモンマートル	11.9
マツ科	<i>Picea glehnii</i>	アカエゾマツ	12.4
マツ科	<i>Abies sachalinensis</i>	トドマツ	12.8
モクセイ科	<i>Forsythia suspensa</i>	レンギョウ	13.0
カエデ科	<i>Acer japonicum</i>	ハウチワカエデ	13.4
カツラ科	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	カツラ	13.5
マツ科	<i>Picea jezoensis</i>	エゾマツ	13.7
ツバキ科	<i>Camellia sinensis</i>	チャノキ	14.0
バラ科	<i>Spiraea thunbergii</i>	ユキヤナギ	16.1
マツ科	<i>Picea glehnii</i> (xylem)	アカエゾマツ(木部)	1.02
ヤナギ科	<i>Salix bakko</i> (xylem)	バッコヤナギ(木部)	3.00
イネ科	<i>Zea mays</i> (lemma)	トウモロコシ(穎)	6.29
イネ科	<i>Zea mays</i> (corn silk)	トウモロコシ(絹糸)	6.72
ヤナギ科	<i>Salix bakko</i> (bark)	バッコヤナギ(樹皮)	11.2
マツ科	<i>Picea glehnii</i> (bark)	アカエゾマツ(樹皮)	12.5
カエデ科	<i>Acer japonicum</i> (autumn leaves)	ハウチワカエデ(紅葉)	20.7

Table 2-2a. Osmolality of extracts of herbaceous plant leaves at a concentration of 0.20 g FW/mL.

科名	Scientific name	和名	Osmolarity (mOsmol/kg)
スベリヒユ科	<i>Portulaca oleracea</i>	スベリヒユ	56
アブラナ科	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i>	ダイコン	49
ドクダミ科	<i>Houttuynia cordata</i>	ドクダミ	48
アカザ科	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	アカビート	69
ヒガンバナ科	<i>Allium tuberosum</i>	ニラ	64
ショウガ科	<i>Zingiber mioga</i>	ミョウガ	41
キク科	<i>Taraxacum officinale</i>	セイヨウタンポポ	79
ツリフネソウ科	<i>Impatiens balfourii</i>	ハナツリフネソウ	51
アブラナ科	<i>Lepidium sativum</i>	コショウソウ	59
シソ科	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>viridis</i>	アオジソ	53
トクサ科	<i>Equisetum arvense</i>	スギナ	43
ヒガンバナ科	<i>Allium fistulosum</i>	ネギ	69
タデ科	<i>Rumex obtusifolius</i>	エゾノギンギン	51
シソ科	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>purpurea</i>	アカジソ	56
オオバコ科	<i>Plantago lanceolata</i>	ヘラオオバコ	66
アオイ科	<i>Abelmoschus esculentus</i>	オクラ	83
タデ科	<i>Fagopyrum esculentum</i>	ソバ	61
アブラナ科	<i>Brassica juncea</i> spp.	キガラシ	79
アブラナ科	<i>Brassica juncea</i> (red mustard)	レッドマスタード	75
ヒユ科	<i>Amaranthus viridis</i>	ホナガイヌビユ	48
ナス科	<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	77
カタバミ科	<i>Oxalis comiculata</i>	カタバミ	75
マメ科	<i>Trifolium repens</i>	シロツメグサ	64
ウリ科	<i>Momordica charantia</i> var. <i>pavel</i>	ツルレイシ	63
シソ科	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>rosea</i>	カオリウラシソ	60
キク科	<i>Arctium lappa</i>	ゴボウ	80
イネ科	<i>Sasa senanensis</i>	クマイザサ	84
マメ科	<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	74
ヒユ科	<i>Chenopodium album</i> var. <i>centrorubrum</i>	アカザ	85
ガガイモ科	<i>Metaplexis japonica</i>	ガガイモ	88
セリ科	<i>Aegopodium podagraria</i>	イワミツバ	67
ノウゼンハレン科	<i>Tropaeolum majus</i>	キンレンカ	101
センリョウ科	<i>Chloranthus japonicus</i>	ヒトリシズカ	72
ブドウ科	<i>Cayratia japonica</i>	ヤブガラシ	60
マメ科	<i>Glycine max</i> cv. <i>wasemidori</i>	ダイズ	85
イネ科	<i>Chasmanthium latifolium</i>	ワイルドオーツ	94
キク科	<i>Petasites japonicus</i>	フキ	89

Table 2-2b. Osmolality of extracts of woody plant leaves and other plant materials at a concentration of 0.20 g FW/mL.

科名	Scientific name	和名	Osmolarity (mOsmol/kg)
アジサイ科	<i>Hydrangea macrophylla</i> f. <i>normalis</i>	ガクアジサイ	75
ブドウ科	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	ツタ	54
クワ科	<i>Morus bombycis</i>	ヤマグワ	91
グミ科	<i>Elaeagnus umbellata</i>	アキグミ	70
ミカン科	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	サンショウ	72
ウコギ科	<i>Aralia elata</i>	タラノキ	68
ミカン科	<i>Citrus sudachi</i>	スダチ	95
ヒノキ科	<i>Thuja occidentalis</i>	ニオイヒバ	55
ニシキギ科	<i>Euonymus alatus</i>	ニシキギ	87
ミズキ科	<i>Cornus officinalis</i>	サンシュユ	69
ヤナギ科	<i>Populus tremula</i> × <i>alba</i>	交雑ポプラ	87
モクセイ科	<i>Jasminum sambac</i>	マツリカ	88
クスノキ科	<i>Laurus nobilis</i>	ゲッケイジュ	97
ヤナギ科	<i>Salix bakko</i>	バッコヤナギ	91
マツ科	<i>Lalix kaempferi</i>	カラマツ	95
イチョウ科	<i>Ginkgo biloba</i>	イチョウ	104
アケビ科	<i>Akebia</i> × <i>pentaphylla</i>	ゴヨウアケビ	81
トチュウ科	<i>Eucanmia ulmoides</i>	トチュウ	102
ブナ科	<i>Fagus crenata</i>	ブナ	63
フトモモ科	<i>Backhousia citriodora</i>	レモンマートル	97
マツ科	<i>Picea glehnii</i>	アカエゾマツ	79
マツ科	<i>Abies sachalinensis</i>	トドマツ	86
モクセイ科	<i>Forsythia suspensa</i>	レンギョウ	63
カエデ科	<i>Acer japonicum</i>	ハウチワカエデ	79
カツラ科	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	カツラ	94
マツ科	<i>Picea jezoensis</i>	エゾマツ	90
ツバキ科	<i>Camellia sinensis</i>	チャノキ	110
バラ科	<i>Spiraea thunbergii</i>	ユキヤナギ	114
マツ科	<i>Picea glehnii</i> (xylem)	アカエゾマツ(木部)	33
ヤナギ科	<i>Salix bakko</i> (xylem)	バッコヤナギ(木部)	52
イネ科	<i>Zea mays</i> (lemma)	トウモロコシ(穎)	76
イネ科	<i>Zea mays</i> (corn silk)	トウモロコシ(絹糸)	92
ヤナギ科	<i>Salix bakko</i> (bark)	バッコヤナギ(樹皮)	63
マツ科	<i>Picea glehnii</i> (bark)	アカエゾマツ(樹皮)	67
カエデ科	<i>Acer japonicum</i> (autumn leaves)	ハウチワカエデ(紅葉)	88

Table 2-3a. Anti-ice nucleation activities (°C) of plant extracts in the presence of *E. ananas* as an ice nucleator.

Scientific name	和名	Anti-ice nucleation activity (°C)
<i>Picea glehnii</i>	アカエゾマツ	3.2 ± 0.3
<i>Brassica juncea</i>	レッドマスタード	3.2 ± 0.3
<i>Sasa senanensis</i>	クマイザサ	3.1 ± 0.4
<i>Salix bakko</i>	バッコヤナギ	3.1 ± 0.1
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>purpurea</i>	アカジソ	2.8 ± 0.2
<i>Laurus nobilis</i>	ゲッケイジュ	2.8 ± 0.6
<i>Citrus sudachi</i>	スダチ	2.8 ± 0.5
<i>Taraxacum officinale</i>	セイヨウタンポポ	2.7 ± 0.4
<i>Camellia sinensis</i>	チャノキ	2.7 ± 0.6
<i>Chasmanthium latifolium</i>	ワイルドオーツ	2.3 ± 0.5
<i>Brassica juncea</i> spp.	キガラシ	2.3 ± 0.4
<i>Spiraea thunbergii</i>	ユキヤナギ	2.2 ± 0.8
<i>Equisetum arvense</i>	スギナ	2.1 ± 0.6
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>rosea</i>	カオリウラシソ	2.0 ± 0.2
<i>Populus tremula</i> × <i>alba</i>	交雑ポプラ	1.9 ± 0.5
<i>Fagus crenata</i>	ブナ	1.9 ± 0.4
<i>Petasites japonicus</i>	フキ	1.8 ± 0.7
<i>Forsythia suspensa</i>	レンギョウ	1.3 ± 0.4
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>viridis</i>	アオジソ	1.2 ± 0.2
<i>Elaeagnus umbellata</i>	アキグミ	1.2 ± 0.4
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	カツラ	1.1 ± 0.3
<i>Rumex obtusifolius</i>	エゾノギンギシ	1.0 ± 0.4
<i>Lalix kaempferi</i>	カラマツ	1.0 ± 0.2
<i>Ginkgo biloba</i>	イチョウ	1.0 ± 0.4
<i>Eucanmia ulmoides</i>	トチュウ	1.0 ± 0.2
<i>Cayratia japonica</i>	ヤブガラシ	1.0 ± 0.4
<i>Acer japonicum</i>	ハウチワカエデ	1.0 ± 0.2

Anti-ice nucleation activities of plant extracts were measured by droplet freezing assay at a concentration of 0.10 g FW/mL in the presence of 2.0 mg/mL *E. ananas* as an ice nucleator.

Table 2-3b. (continued).

Scientific name	和名	Anti-ice nucleation activity (°C)
<i>Aegopodium podagraria</i>	イワミツバ	0.9 ± 0.4
<i>Abies sachalinensis</i>	トドマツ	0.9 ± 0.2
<i>Picea jezoensis</i>	エゾマツ	0.8 ± 0.4
<i>Glycine max</i>	ダイズ	0.8 ± 0.3
<i>Fagopyrum esculentum</i>	ソバ	0.8 ± 0.4
<i>Cornus officinalis</i>	サンシュユ	0.8 ± 0.2
<i>Arctium lappa</i>	ゴボウ	0.8 ± 0.3
<i>Thuja occidentalis</i>	ニオイヒバ	0.7 ± 0.5
<i>Backhousia citriodora</i>	レモンマートル	0.7 ± 0.3
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	サンショウ	0.6 ± 0.3
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	ツタ	0.6 ± 0.3
<i>Oxalis comiculata</i>	カタバミ	0.6 ± 0.2
<i>Momordica charantia</i> var. <i>pavel</i>	ツルレイシ	0.6 ± 0.5
<i>Zingiber mioga</i>	ミョウガ	0.5 ± 0.1
<i>Euonymus alatus</i>	ニシキギ	0.5 ± 0.3
<i>Morus bombycis</i>	ヤマグワ	0.4 ± 0.2
<i>Houttuynia cordata</i>	ドクダミ	0.4 ± 0.5
<i>Trifolium repens</i>	シロツメグサ	0.3 ± 0.3
<i>Beta vulgaris vulgaris</i>	アカビート	0.3 ± 0.2
<i>Akebia</i> × <i>pentaphylla</i>	ゴヨウアケビ	0.3 ± 0.4
<i>Jasminum sambac</i>	マツリカ	0.2 ± 0.3
<i>Hydrangea macrophylla</i> f. <i>normalis</i>	ガクアジサイ	0.2 ± 0.3
<i>Chenopodium album</i> var. <i>centrorubrum</i>	アカザ	0.1 ± 0.4
<i>Allium tuberosum</i>	ニラ	0.1 ± 0.2
<i>Allium fistulosum</i>	ネギ	0.1 ± 0.2
<i>Plantago lanceolata</i>	ヘラオオバコ	0.0 ± 0.3
<i>Abelmoschus esculentus</i>	オクラ	0.0 ± 0.9

Table 2-3c. (continued).

Scientific name	和名	Anti-ice nucleation activity (°C)
<i>Tropaeolum majus</i>	キンレンカ	-0.1 ± 0.2
<i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i>	ダイコン	-0.1 ± 0.1
<i>Portulaca oleracea</i>	スベリヒユ	-0.1 ± 0.5
<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	-0.1 ± 0.4
<i>Chloranthus japonicus</i>	ヒトリシズカ	-0.1 ± 0.5
<i>Aralia elata</i>	タラノキ	-0.1 ± 0.2
<i>Amaranthus viridis</i>	ホナガイヌビユ	-0.1 ± 0.4
<i>Metaplexis japonica</i>	ガガイモ	-0.2 ± 0.3
<i>Lepidium sativum</i>	コショウソウ	-0.2 ± 0.1
<i>Impatiens balfourii</i>	ハナツリフネソウ	-0.2 ± 0.4
<i>Solanum lycopersicum</i>	トマト	-0.3 ± 0.5
<i>Picea glehnii</i> (bark)	アカエゾマツ(樹皮)	3.0 ± 0.4
<i>Acer japonicum</i> (autumn leaves)	ハウチワカエデ(紅葉)	1.4 ± 0.3
<i>Salix bakko</i> (bark)	バッコヤナギ(樹皮)	1.3 ± 0.5
<i>Zea mays</i> (lemma)	トウモロコシ(穎)	1.2 ± 0.5
<i>Picea glehnii</i> (xylem)	アカエゾマツ(木部)	1.0 ± 0.1
<i>Salix bakko</i> (xylem)	バッコヤナギ(木部)	0.9 ± 0.3
<i>Zea mays</i> (corn silk)	トウモロコシ(絹糸)	0.5 ± 0.7

Table 2-4. Anti-ice nucleation activities (°C) of plant leaf extracts in the presence of silver iodide or phloroglucinol as an ice nucleator.

Scientific name	和名	Ice nucleator	
		Silver iodide	Phloroglucinol
<i>Picea glehnii</i>	アカエゾマツ	8.8 ± 0.9	10.3 ± 1.8
<i>Brassica juncea</i> sp. (red mustard)	レッドマスタード	8.0 ± 1.2	2.7 ± 1.8
<i>Sasa senanensis</i>	クマイザサ	10.4 ± 0.6	7.3 ± 1.6
<i>Salix bakko</i>	バツコヤナギ	10.0 ± 1.0	11.6 ± 6.3
<i>Laurus nobilis</i>	ゲッケイジュ	9.1 ± 0.7	7.3 ± 3.0
<i>Citrus sudachi</i>	スダチ	8.4 ± 0.8	2.5 ± 2.2
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> f. <i>purpurea</i>	アカジソ	7.3 ± 1.5	-0.3 ± 0.4
<i>Camellia sinensis</i>	チャノキ	10.5 ± 1.5	8.3 ± 1.5
<i>Taraxacum officinale</i>	セイヨウタンポポ	6.5 ± 0.9	0.6 ± 1.0
<i>Chasmanthium latifolium</i>	ワイルドオーツ	7.0 ± 1.4	1.3 ± 0.6
<i>Brassica juncea</i> sp.	キガラシ	10.6 ± 1.2	3.6 ± 3.4

Anti-ice nucleation activities of plant leaf extracts were measured by droplet freezing assay at a concentration of 0.10 g FW/mL in the presence of 2.5 mM silver iodide (AgI) or 0.12 M phloroglucinol as an ice nucleator.

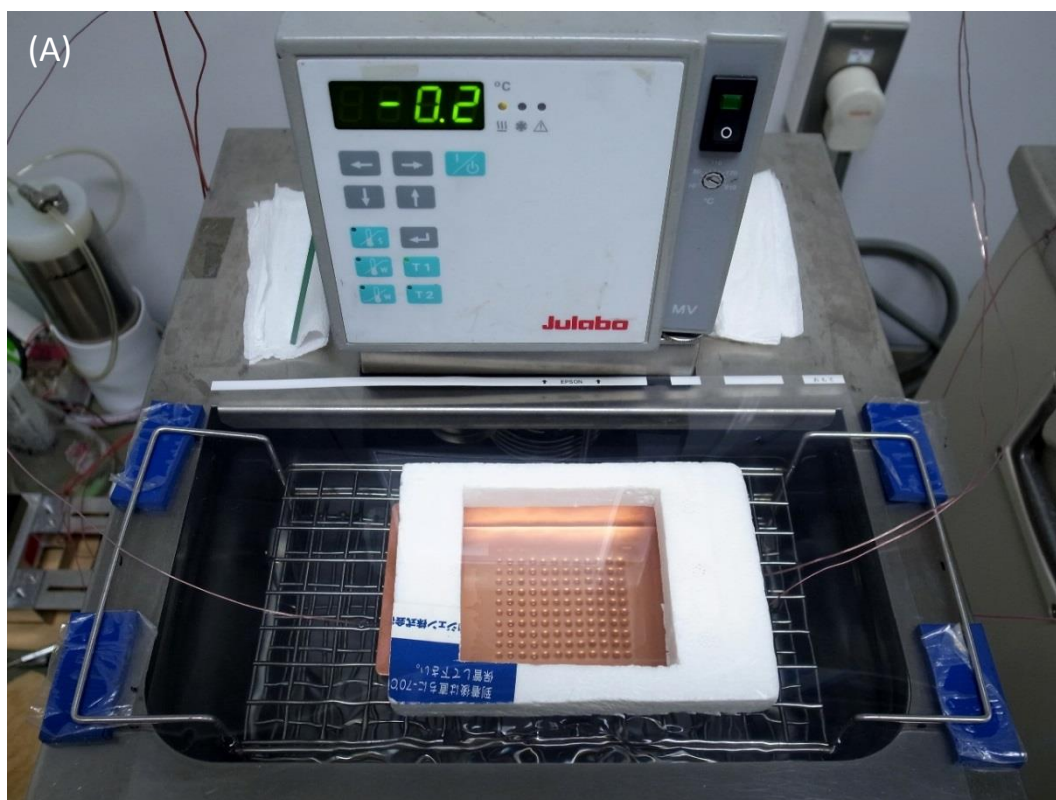


Fig. 2-1. The droplet freezing assay system (A) and copper plate used in this assay (B). Mineral oil was pasted on the surface of the dimples on the copper and sample droplets (2 μ L) were loaded on the dimples. This copper plate was cooled by programmable freezer and number of frozen droplets were counted. Freezing temperature of 50% of samples was determined as FT₅₀.

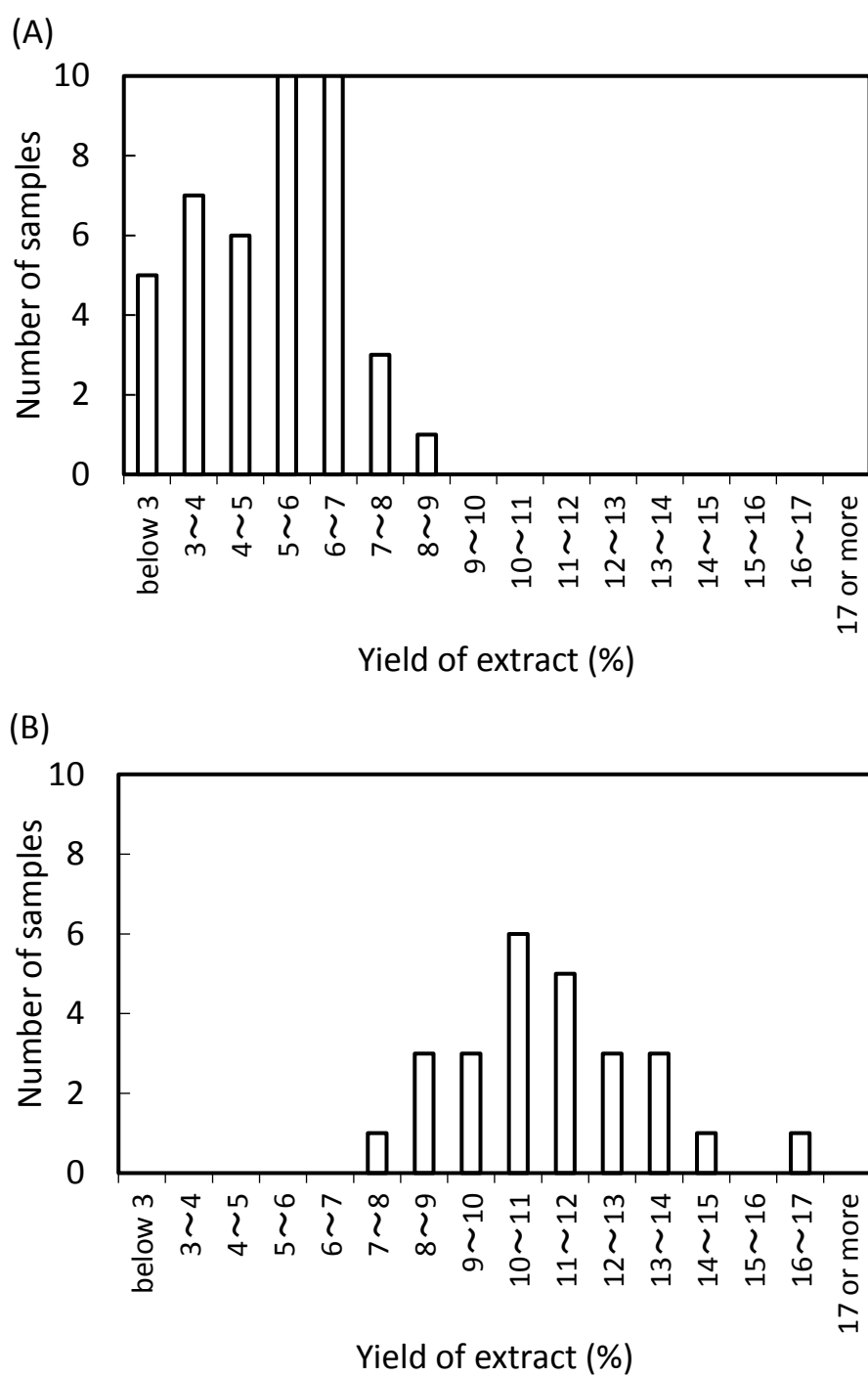


Fig. 2-2. Histogram of the yield (%) of the extract from fresh plant leaves by using 50% aqueous acetone. (A) Herbaceous plant leaf extracts. (B) Woody plant leaf extracts.

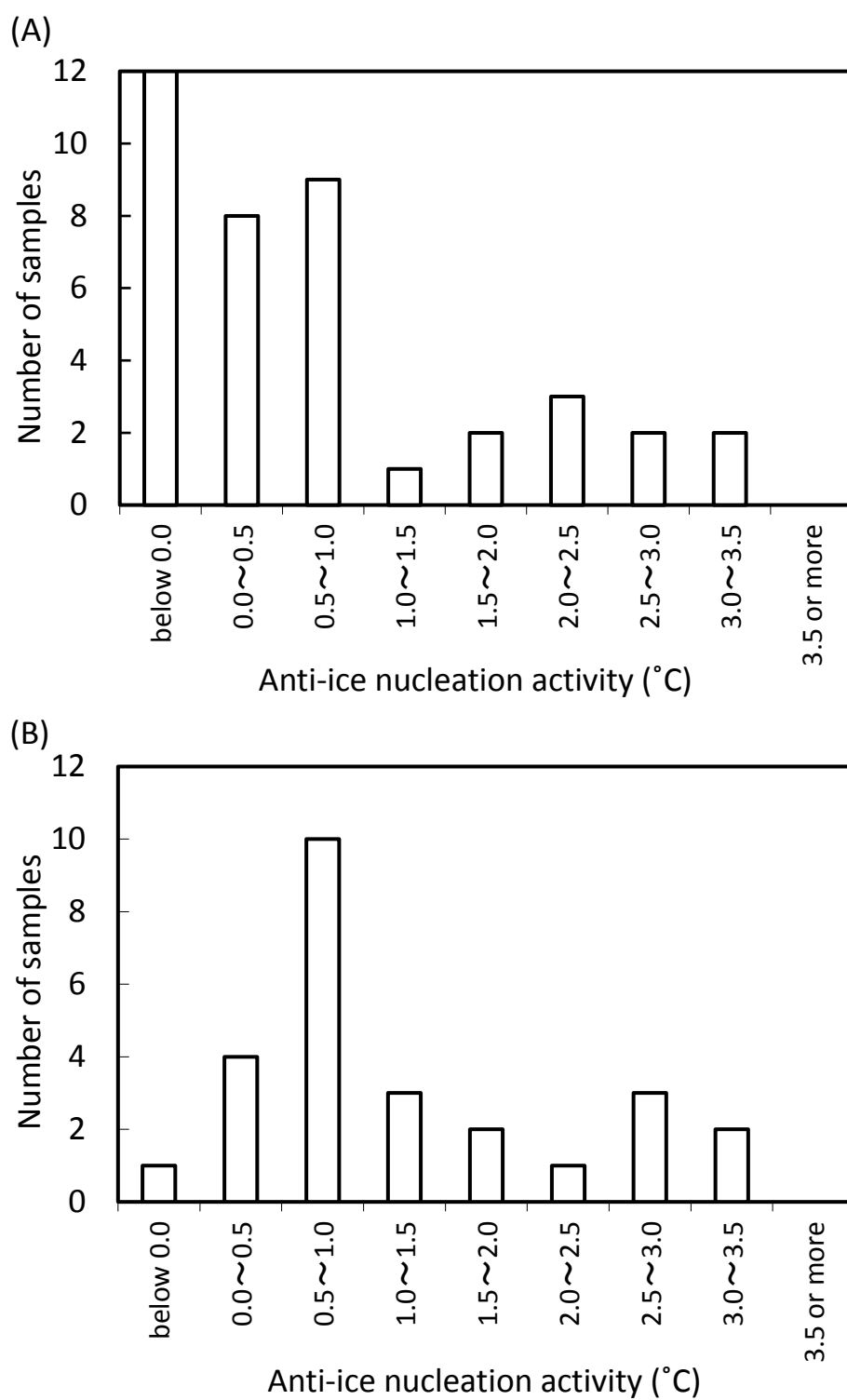
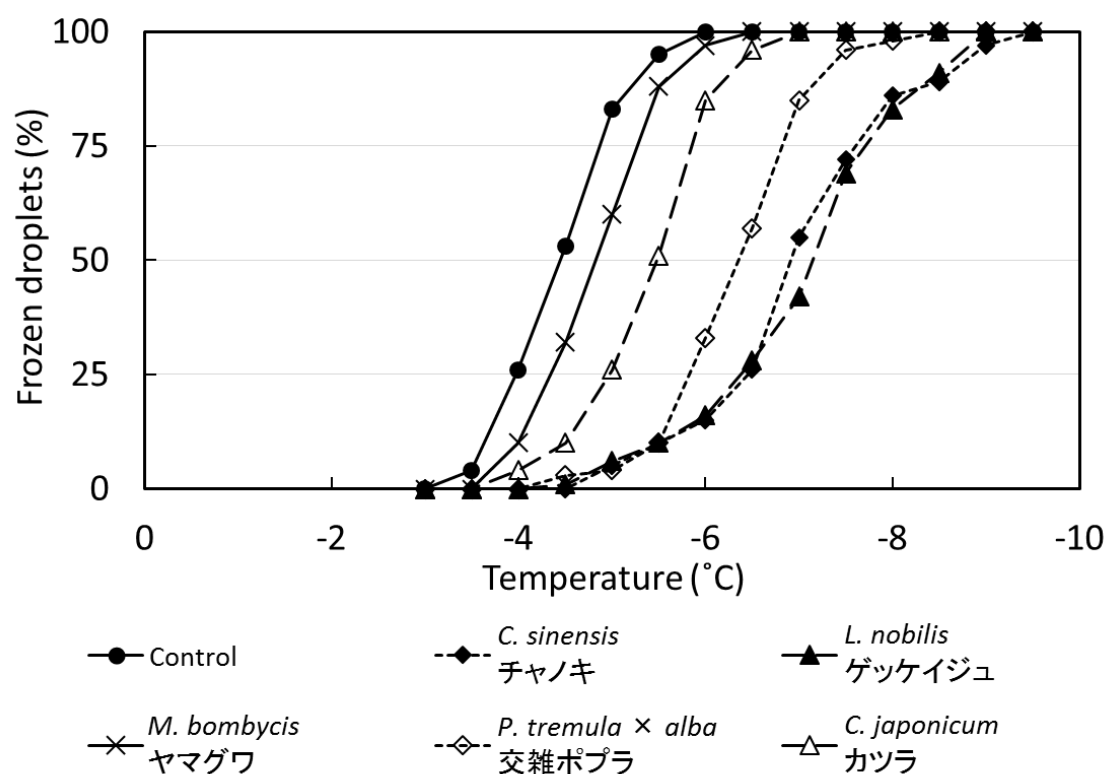
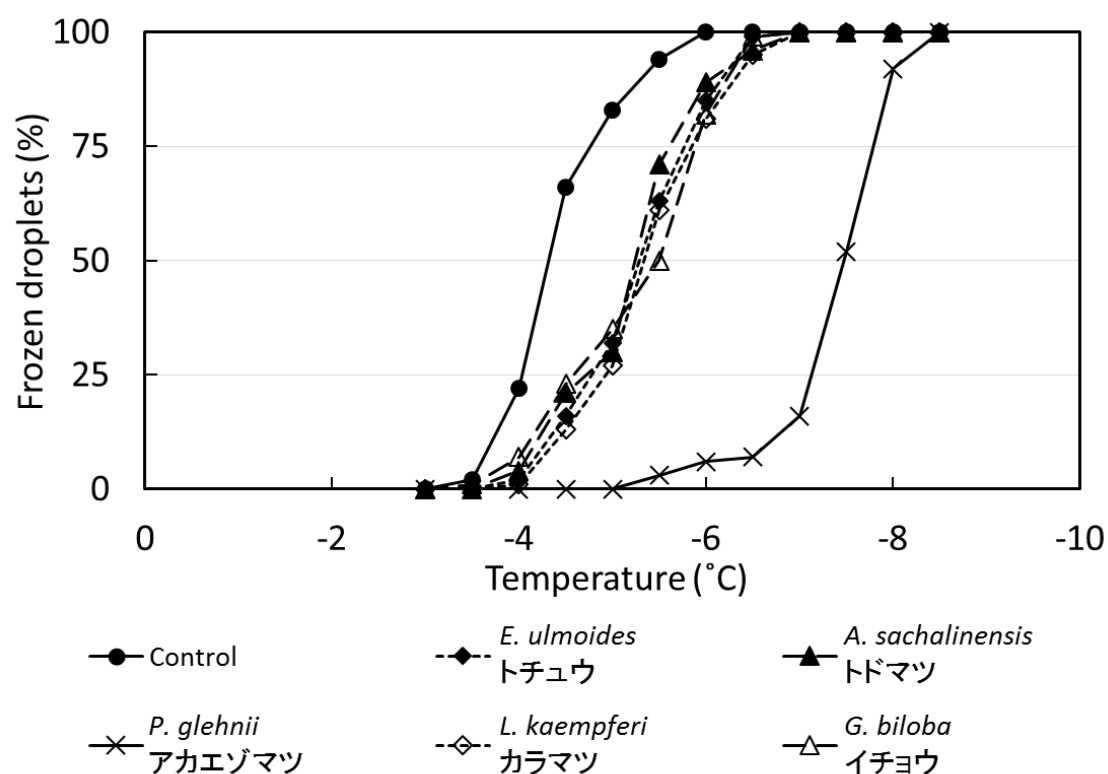


Fig. 2-3. Histogram of the anti-ice nucleation activities (°C) of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay with the ice nucleator *E. ananas*. (A) Herbaceous plant leaf extracts. (B) Woody plant leaf extracts.



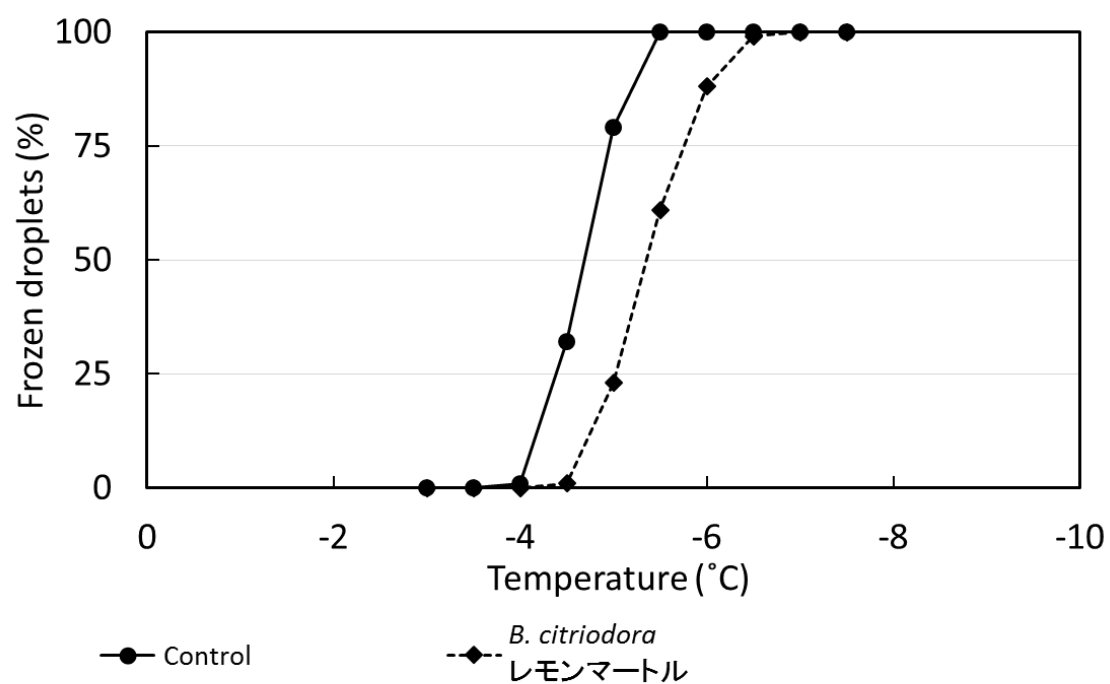
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.1	-4.0	-4.4	-4.9	-6.0	0.0
<i>C. sinensis</i>	-4.6	-6.5	-6.9	-7.6	-9.5	2.5
<i>L. nobilis</i>	-4.5	-6.4	-7.1	-7.7	-9.0	2.7
<i>M. bombycis</i>	-3.6	-4.3	-4.8	-5.3	-6.5	0.4
<i>P. tremula</i> × <i>alba</i>	-4.2	-5.8	-6.4	-6.8	-8.5	1.9
<i>C. japonicum</i>	-3.6	-5.0	-5.5	-5.9	-7.0	1.0

Fig. 2-4A. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Freezing temperature of the first (FT₁), 25% (FT₂₅), 50% (FT₅₀), 75% (FT₇₅) and 100% (FT₁₀₀) droplets, and anti-ice nucleation activity of each extract was estimated by these freezing curves. Anti-ice nucleation activity (°C) was expressed as the difference between freezing temperature of 50% of sample droplets and that of 50% of control droplets. Filled circle, control; filled diamond, *C. sinensis*; filled triangle, *L. nobilis*; x-mark, *M. bombycis*; open diamond, *P. tremula* × *alba*; open triangle, *C. japonicum*.



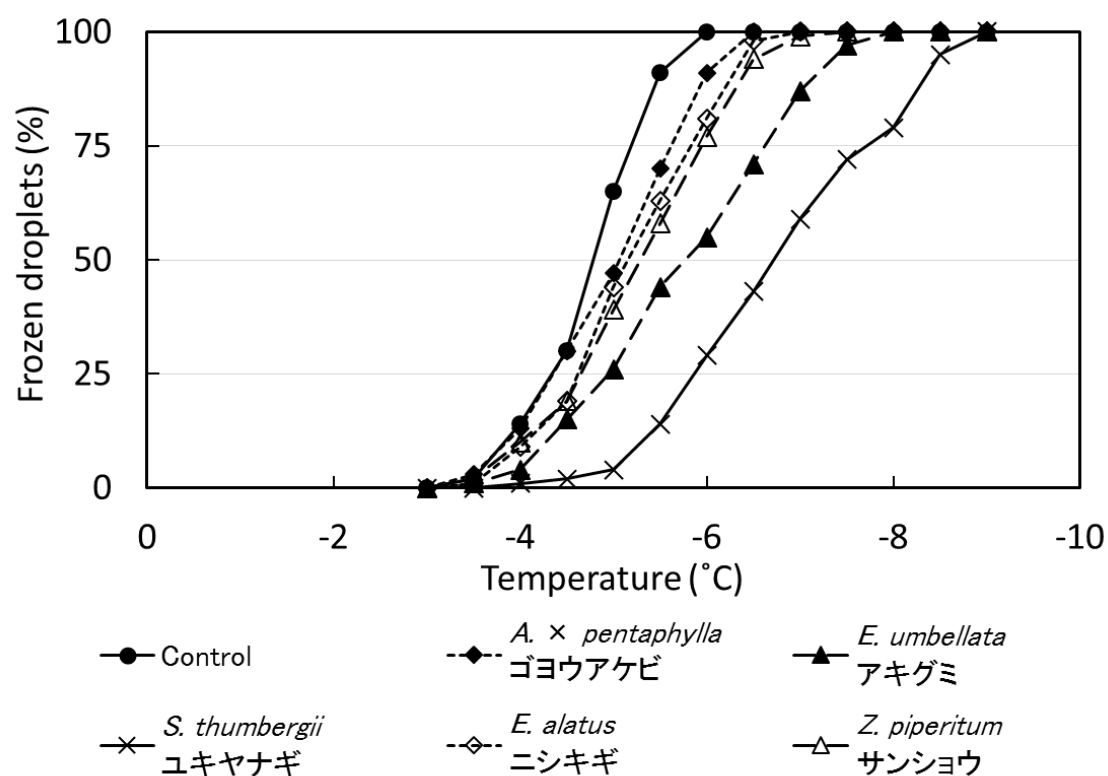
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.3	-4.1	-4.3	-4.8	-6.0	0.0
<i>E. ulmoides</i>	-3.8	-4.8	-5.3	-5.8	-7.0	1.0
<i>A. sachalinensis</i>	-3.6	-4.7	-5.2	-5.6	-7.0	0.9
<i>P. glehnii</i>	-5.2	-7.1	-7.5	-7.8	-8.5	3.2
<i>L. kaempferi</i>	-4.0	-4.9	-5.3	-5.9	-7.0	1.0
<i>G. biloba</i>	-3.5	-4.6	-5.5	-5.9	-7.0	1.2

Fig. 2-4B. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *E. ulmoides*; filled triangle, *A. sachalinensis*; x-mark, *P. glehnii*; open diamond, *L. kaempferi*; open triangle, *G. biloba*.



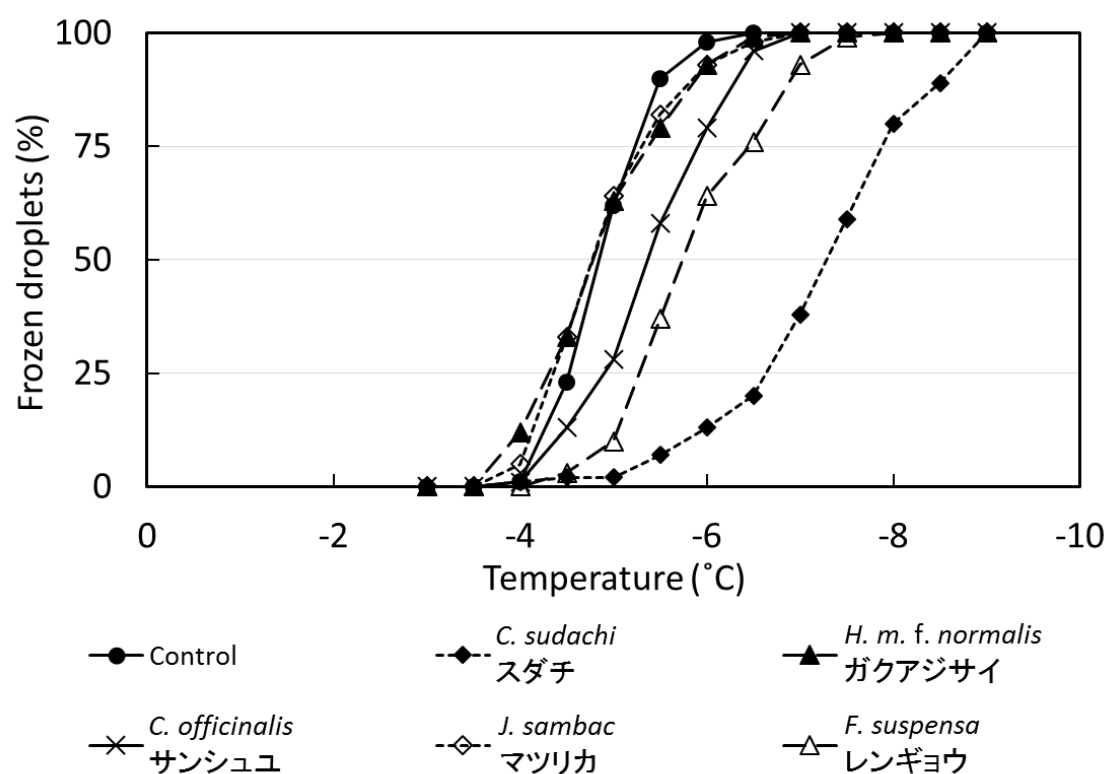
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.5	-4.0	-4.4	-4.8	-5.5	0.0
<i>B. citriodora</i>	-4.0	-4.6	-5.0	-5.5	-7.0	0.6

Fig. 2-4C. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *B. citriodora*.



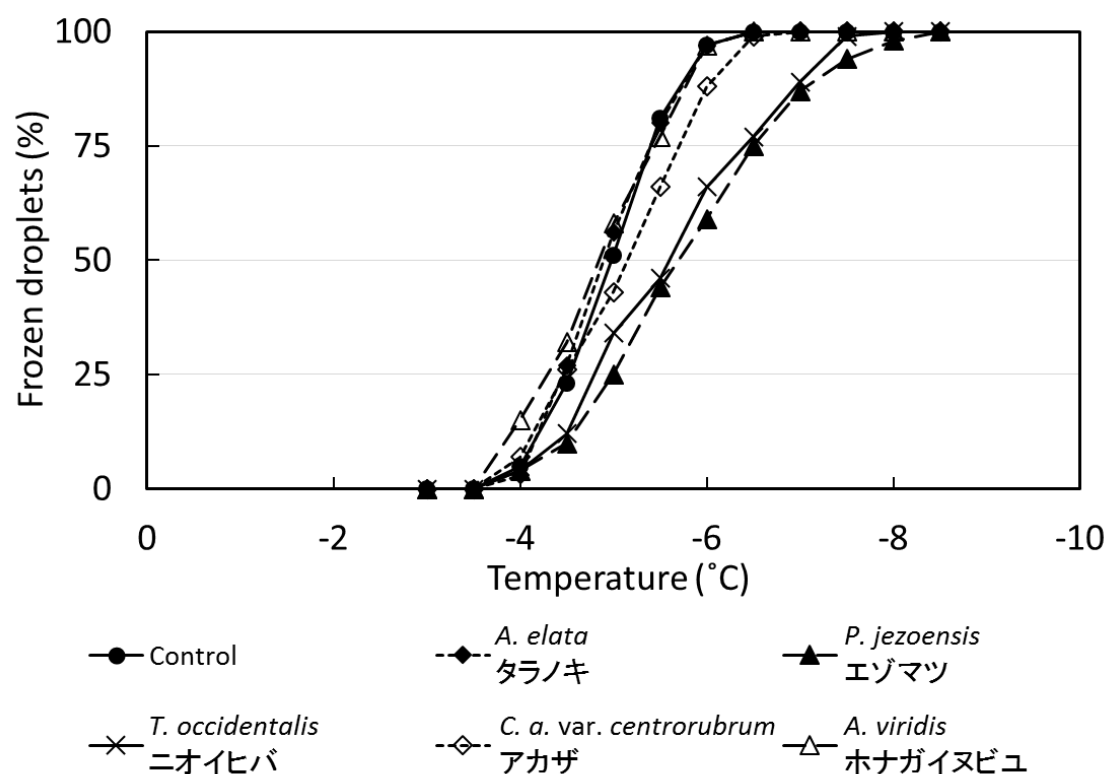
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.3	-4.3	-4.8	-5.2	-6.0	0.0
<i>A. × pentaphylla</i>	-3.2	-4.4	-5.1	-5.6	-6.5	0.3
<i>E. umbellata</i>	-3.5	-5.0	-5.8	-6.6	-8.0	1.0
<i>S. thumbergii</i>	-4.0	-5.9	-6.7	-7.7	-9.0	1.9
<i>E. alatus</i>	-3.5	-4.6	-5.2	-5.8	-7.0	0.4
<i>Z. piperitum</i>	-3.3	-4.7	-5.3	-5.9	-7.5	0.5

Fig. 2-4D. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *A. × pentaphylla*; filled triangle, *E. umbellata*; x-mark, *S. thumbergii*; open diamond, *E. alatus*; open triangle, *Z. piperitum*.



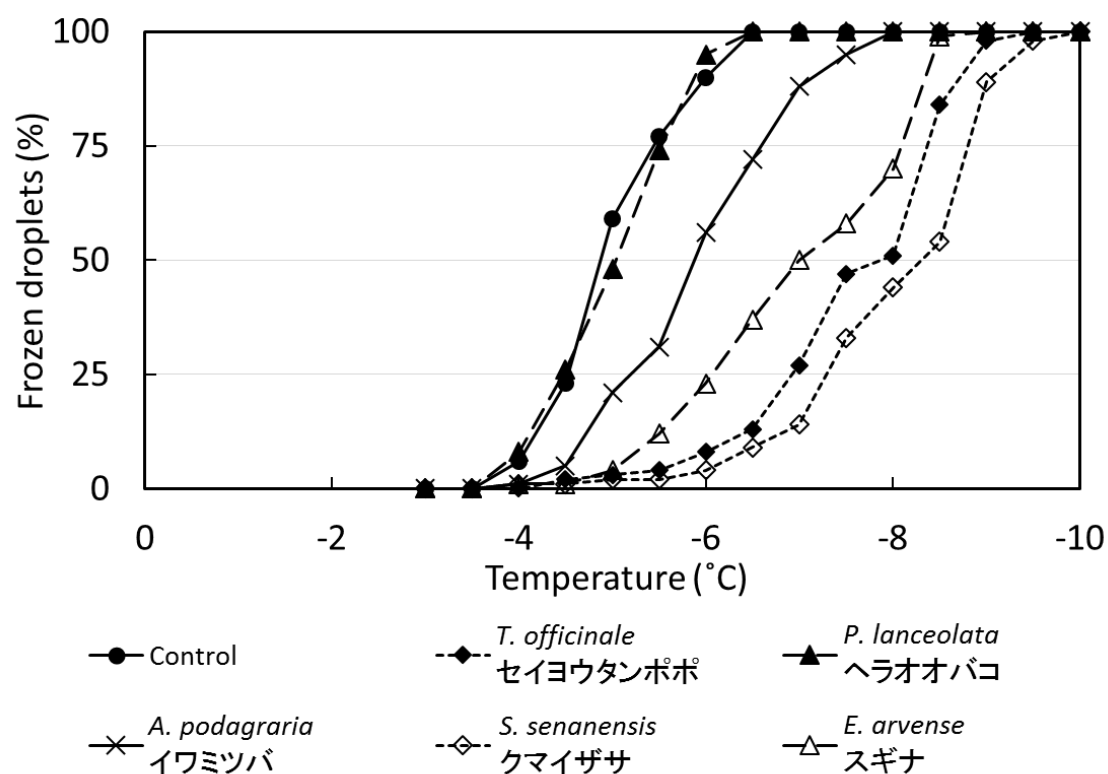
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-4.0	-4.5	-4.8	-5.2	-6.5	0.0
<i>C. sudachi</i>	-4.0	-6.6	-7.3	-7.9	-9.0	2.4
<i>H. m. f. normalis</i>	-3.5	-4.3	-4.8	-5.4	-7.0	-0.1
<i>C. officinalis</i>	-4.0	-4.9	-5.4	-5.9	-7.0	0.5
<i>J. sambac</i>	-3.6	-4.4	-4.8	-5.3	-7.0	-0.1
<i>F. suspensa</i>	-4.2	-5.3	-5.7	-6.5	-8.0	0.9

Fig. 2-4E. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *C. sudachi*; filled triangle, *H. m. f. normalis*; x-mark, *C. officinalis*; open diamond, *J. sambac*; open triangle, *F. suspensa*.



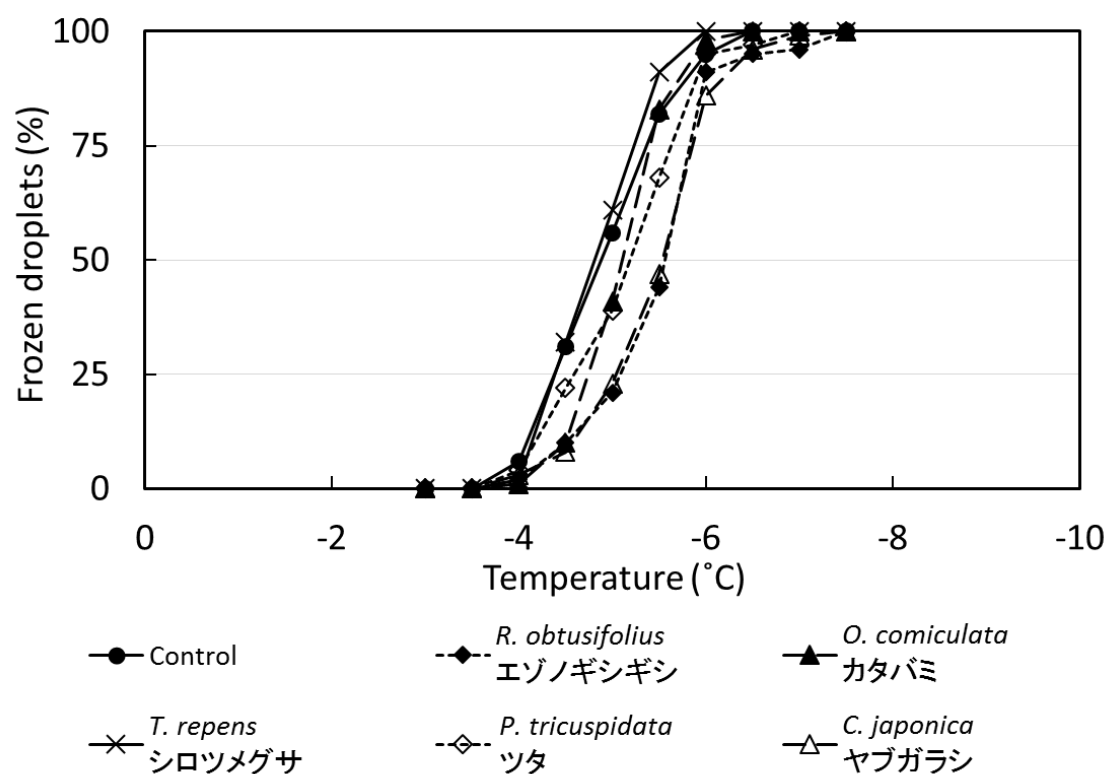
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.6	-4.5	-5.0	-5.4	-6.5	0.0
<i>A. elata</i>	-3.7	-4.5	-4.9	-5.4	-6.5	-0.1
<i>P. jezoensis</i>	-3.6	-5.0	-5.7	-6.5	-8.5	0.7
<i>T. occidentalis</i>	-3.6	-4.8	-5.6	-6.4	-8.0	0.6
<i>C. a. var. centrorubrum</i>	-3.6	-4.5	-5.2	-5.7	-7.0	0.2
<i>A. viridis</i>	-3.5	-4.3	-4.8	-5.4	-6.5	-0.1

Fig. 2-4F. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *A. elata*; filled triangle, *P. jezoensis*; x-mark, *T. occidentalis*; open diamond, *C. a. var. centrorubrum*; open triangle, *A. viridis*.



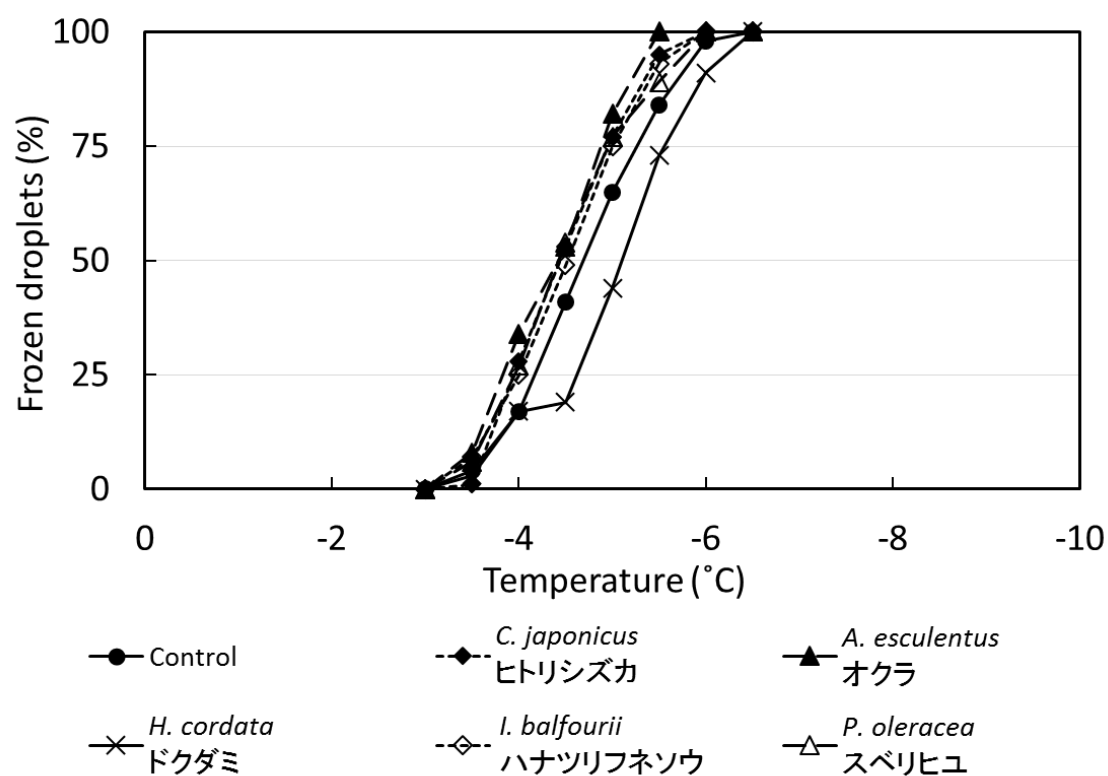
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.6	-4.5	-4.9	-5.4	-6.5	0.0
<i>T. officinale</i>	-4.3	-6.9	-7.9	-8.4	-9.5	3.0
<i>P. lanceolata</i>	-3.6	-4.5	-5.0	-5.5	-6.5	0.2
<i>A. podagraria</i>	-4.0	-5.2	-5.9	-6.6	-8.0	1.0
<i>S. senanensis</i>	-4.0	-7.3	-8.3	-8.8	-10.0	3.4
<i>E. arvense</i>	-4.0	-6.1	-7.0	-8.1	-9.0	2.1

Fig. 2-4G. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *T. officinale*; filled triangle, *P. lanceolata*; x-mark, *A. podagraria*; open diamond, *S. senanensis*; open triangle, *E. arvense*.



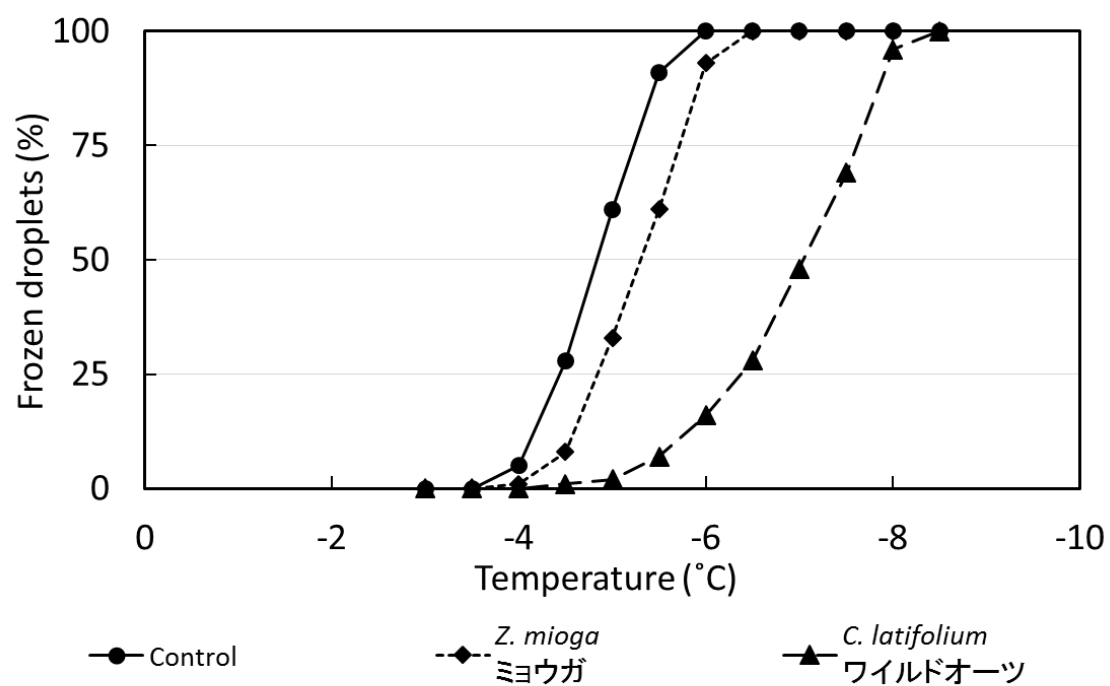
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.6	-4.4	-4.9	-5.4	-6.5	0.0
<i>R. obtusifolius</i>	-3.8	-5.1	-5.6	-5.8	-7.5	0.7
<i>O. comiculata</i>	-4.0	-4.7	-5.1	-5.4	-6.5	0.2
<i>T. repens</i>	-3.8	-4.4	-4.8	-5.2	-6.0	-0.1
<i>P. tricuspidata</i>	-3.6	-4.6	-5.2	-5.6	-7.0	0.3
<i>C. japonica</i>	-3.7	-5.0	-5.5	-5.9	-7.5	0.7

Fig. 2-4H. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *R. obtusifolius*; filled triangle, *O. comiculata*; x-mark, *T. repens*; open diamond, *P. tricuspidata*; open triangle, *C. japonica*.



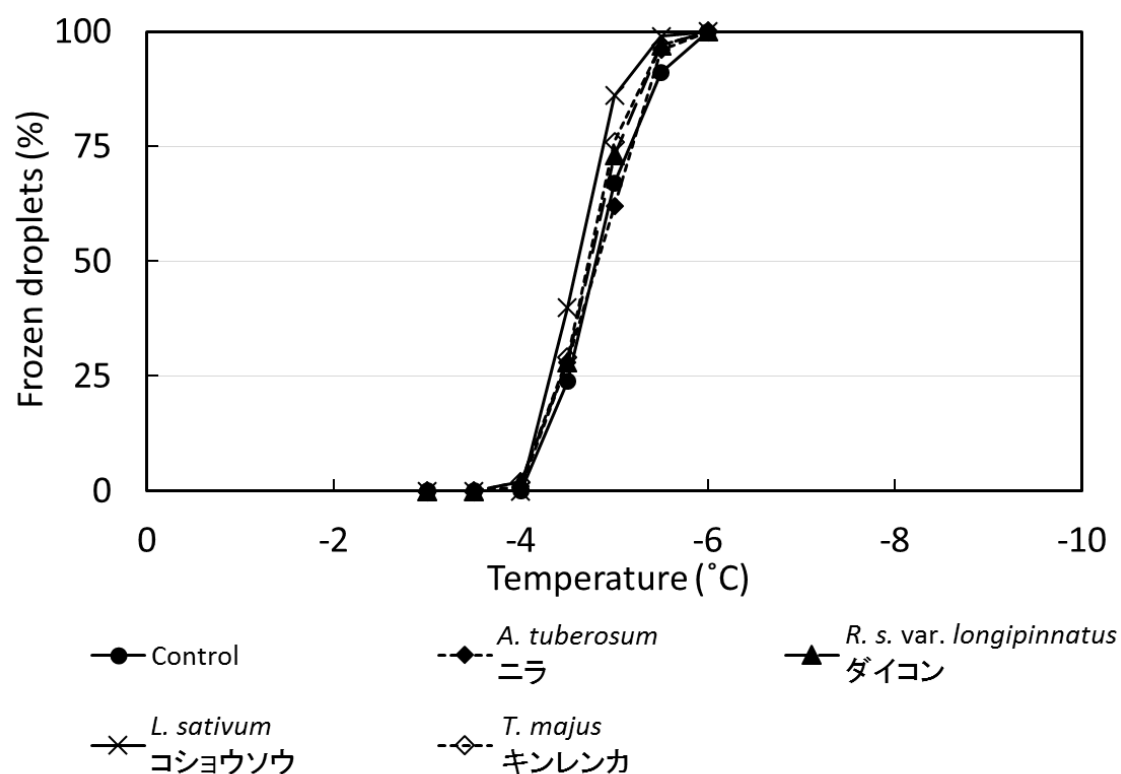
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.1	-4.2	-4.7	-5.3	-6.5	0.0
<i>C. japonicus</i>	-3.5	-3.9	-4.4	-5.0	-6.0	-0.2
<i>A. esculentus</i>	-3.1	-3.8	-4.4	-4.9	-5.5	-0.3
<i>H. cordata</i>	-3.2	-4.6	-5.1	-5.6	-6.5	0.4
<i>I. balfourii</i>	-3.1	-4.0	-4.5	-5.0	-6.0	-0.2
<i>P. oleracea</i>	-3.1	-4.0	-4.4	-5.0	-6.0	-0.3

Fig. 2-4I. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *C. japonicus*; filled triangle, *A. esculentus*; x-mark, *H. cordata*; open diamond, *I. balfourii*; open triangle, *P. oleracea*.



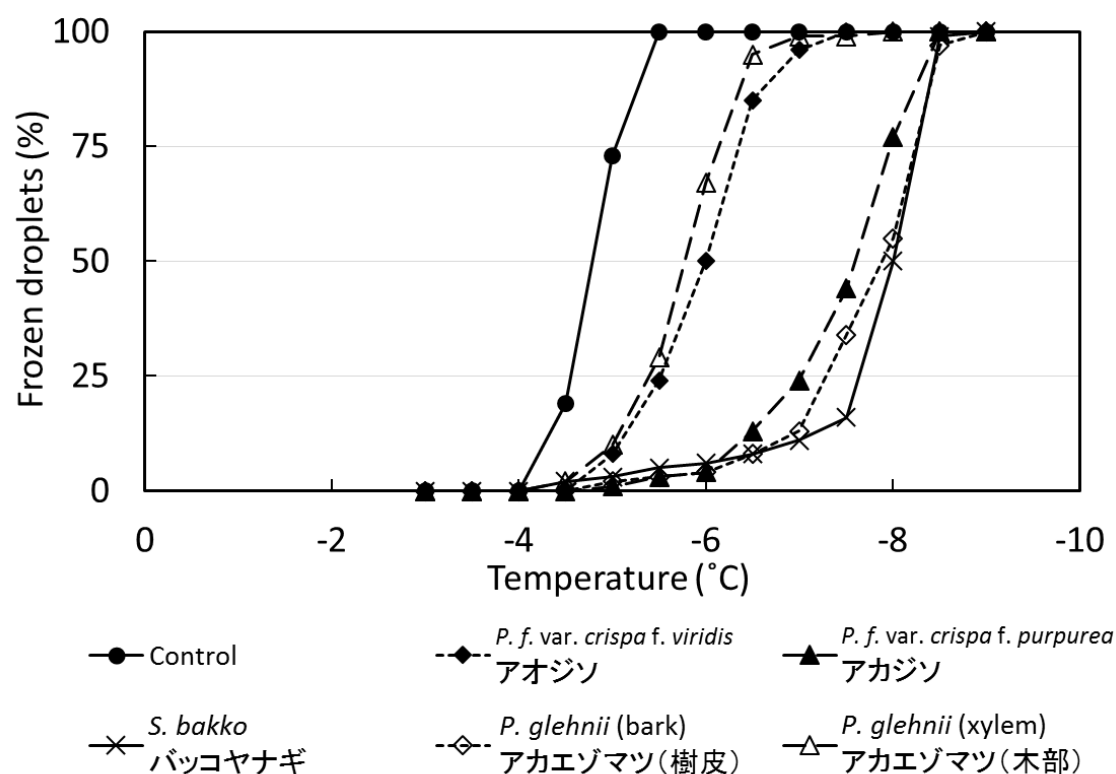
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.6	-4.4	-4.8	-5.2	-6.0	0.0
<i>Z. mioga</i>	-4.0	-4.8	-5.3	-5.7	-6.5	0.5
<i>C. latifolium</i>	-5.0	-6.4	-7.0	-7.6	-8.5	2.2

Fig. 2-4J. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *Z. mioga*; filled triangle, *C. latifolium*.



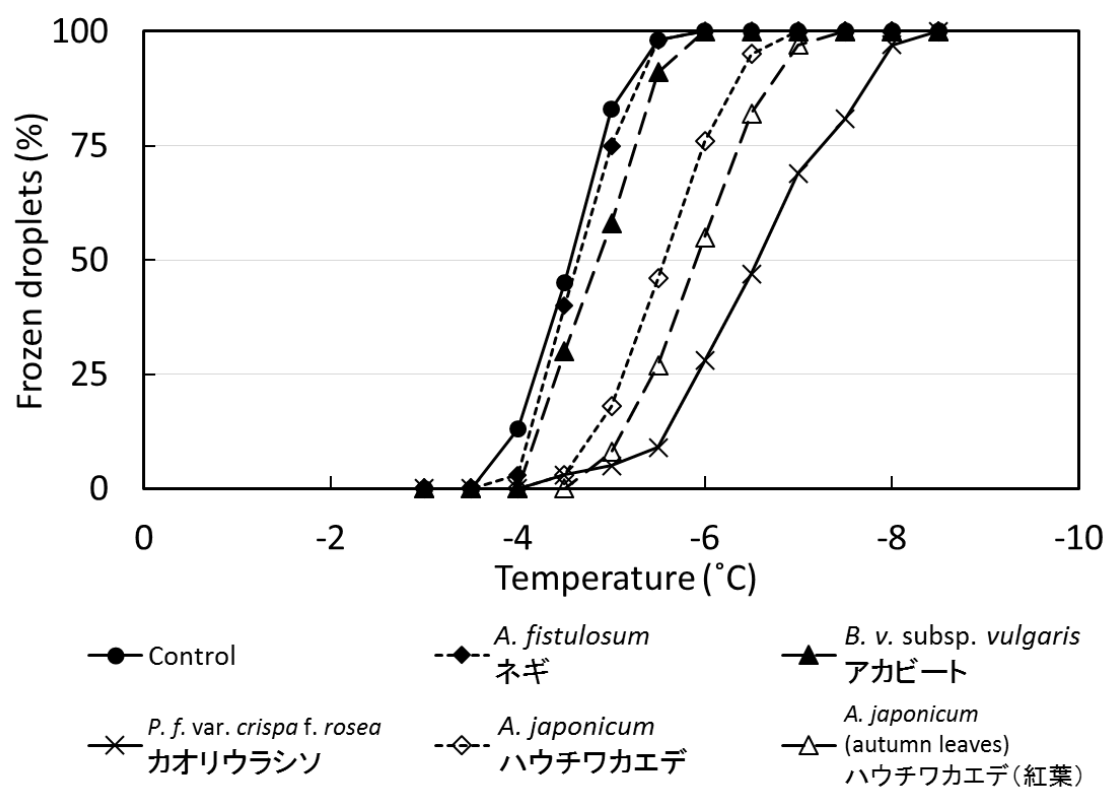
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-4.0	-4.5	-4.8	-5.2	-6.0	0.0
<i>A. tuberosum</i>	-4.0	-4.4	-4.8	-5.2	-6.0	0.0
<i>R. s. var. longipinnatus</i>	-3.8	-4.4	-4.7	-5.0	-6.0	-0.1
<i>L. sativum</i>	-4.0	-4.3	-4.6	-4.9	-6.0	-0.2
<i>T. majus</i>	-3.8	-4.4	-4.7	-5.0	-6.0	-0.1

Fig. 2-4K. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *A. tuberosum*; filled triangle, *R. s. var. longipinnatus*; x-mark, *L. sativum*; open diamond, *T. majus*.



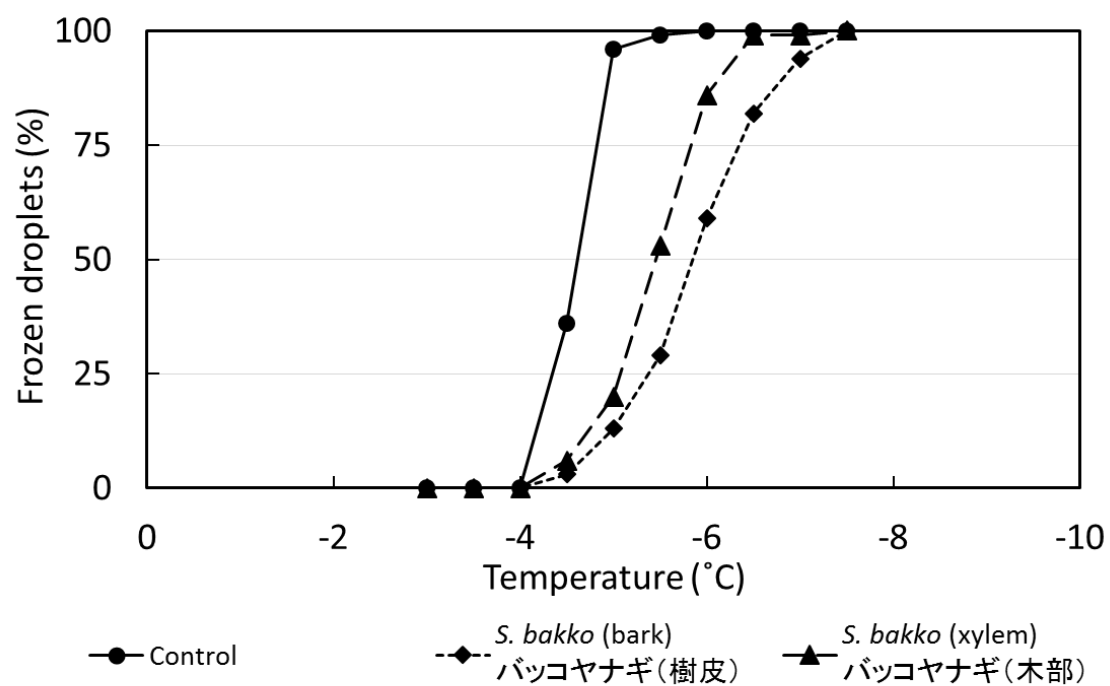
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-4.0	-4.6	-4.8	-5.0	-5.5	0.0
<i>P. f. var. crispa f. viridis</i>	-4.6	-5.5	-6.0	-6.4	-7.5	1.2
<i>P. f. var. crispa f. purpurea</i>	-5.0	-7.0	-7.6	-8.0	-8.5	2.8
<i>S. bakko</i>	-4.3	-7.6	-8.0	-8.3	-9.0	3.2
<i>P. glehnii</i> (bark)	-4.8	-7.3	-7.9	-8.2	-9.0	3.1
<i>P. glehnii</i> (xylem)	-4.3	-5.4	-5.8	-6.1	-7.5	1.0

Fig. 2-4L. Freezing curves of plant extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *P. f. var. crispa f. viridis*; filled triangle, *P. f. var. crispa f. purpurea*; x-mark, *S. bakko*; open diamond, *P. glehnii* (bark); open triangle, *P. glehnii* (xylem).



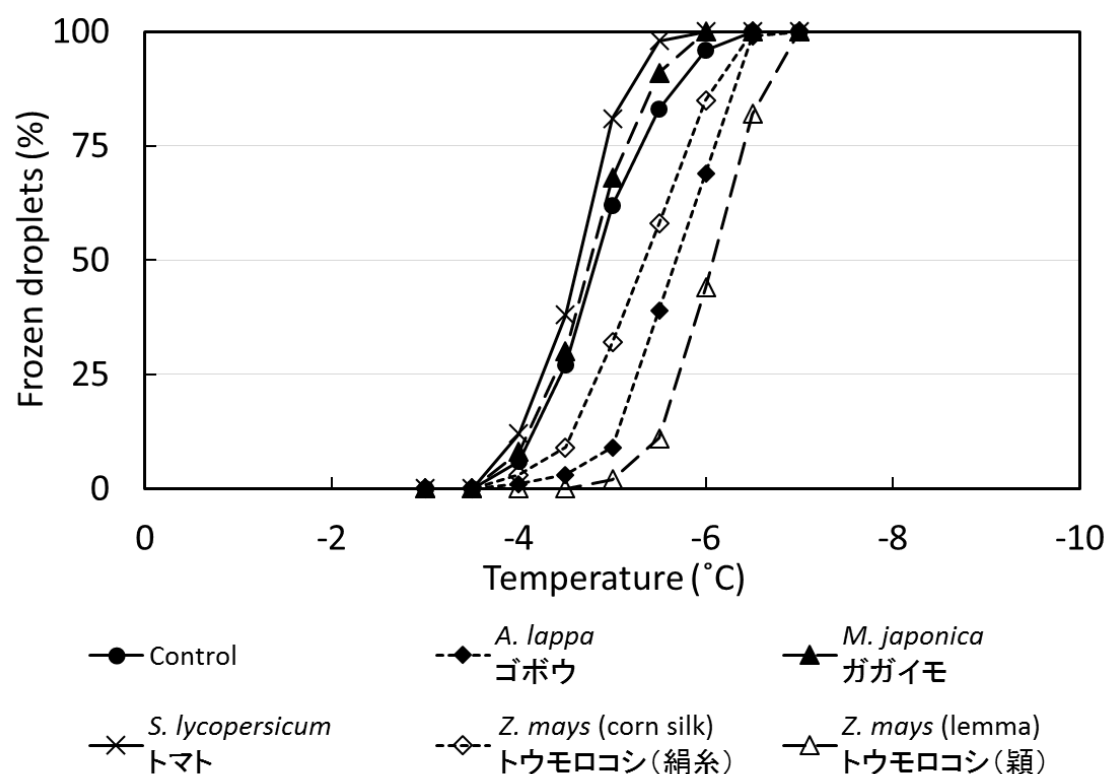
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.5	-4.2	-4.6	-4.9	-6.0	0.0
<i>A. fistulosum</i>	-3.7	-4.3	-4.6	-5.0	-6.0	0.1
<i>B. v. subsp. vulgaris</i>	-4.0	-4.4	-4.9	-5.3	-6.0	0.3
<i>P. f. var. crispa f. rosea</i>	-4.2	-5.9	-6.6	-7.3	-8.5	2.0
<i>A. japonicum</i>	-4.2	-5.1	-5.6	-6.0	-7.0	1.0
<i>A. japonicum</i> (autumn leaves)	-4.6	-5.4	-5.9	-6.4	-7.5	1.3

Fig. 2-4M. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *A. fistulosum*; filled triangle, *B. v. subsp. vulgaris*; x-mark, *P. f. var. crispa f. rosea*; open diamond, *A. japonicum*; open triangle, *A. japonicum* (autumn leaves).



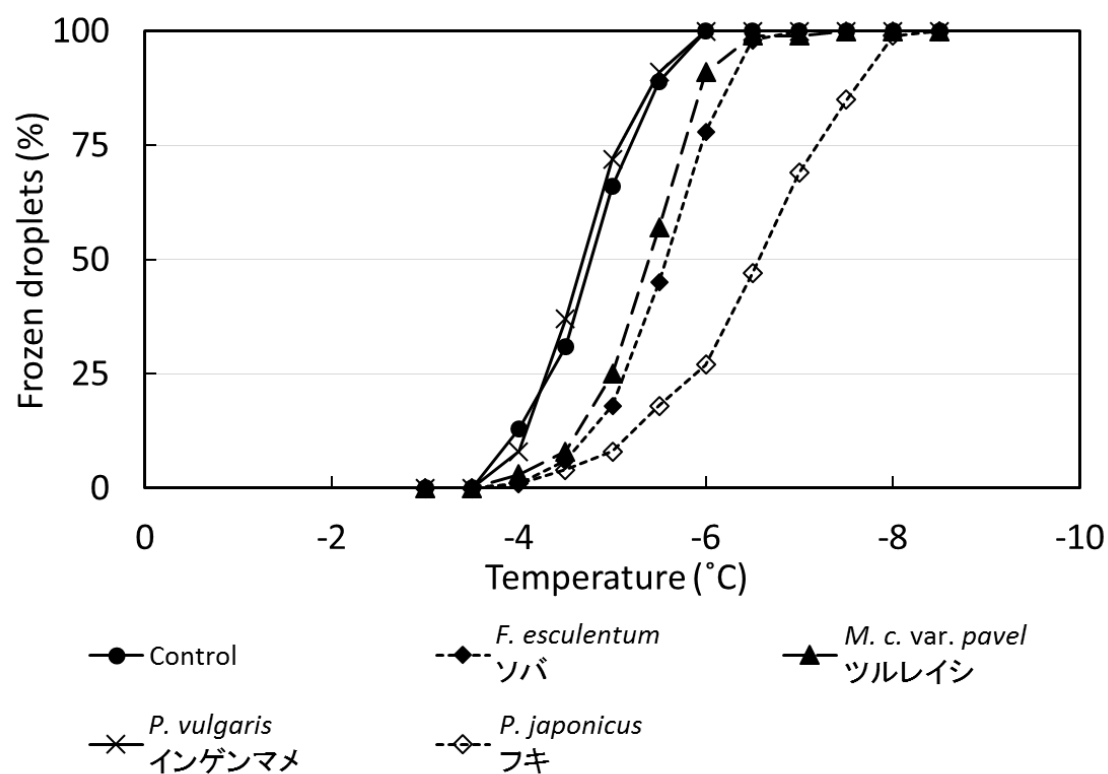
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-4.0	-4.3	-4.6	-4.8	-6.0	0.0
<i>S. bakko</i> (bark)	-4.2	-5.4	-5.9	-6.3	-7.5	1.2
<i>S. bakko</i> (xylem)	-4.1	-5.1	-5.5	-5.8	-7.5	0.8

Fig. 2-4N. Freezing curves of plant extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *S. bakko* (bark); filled triangle, *S. bakko* (xylem).



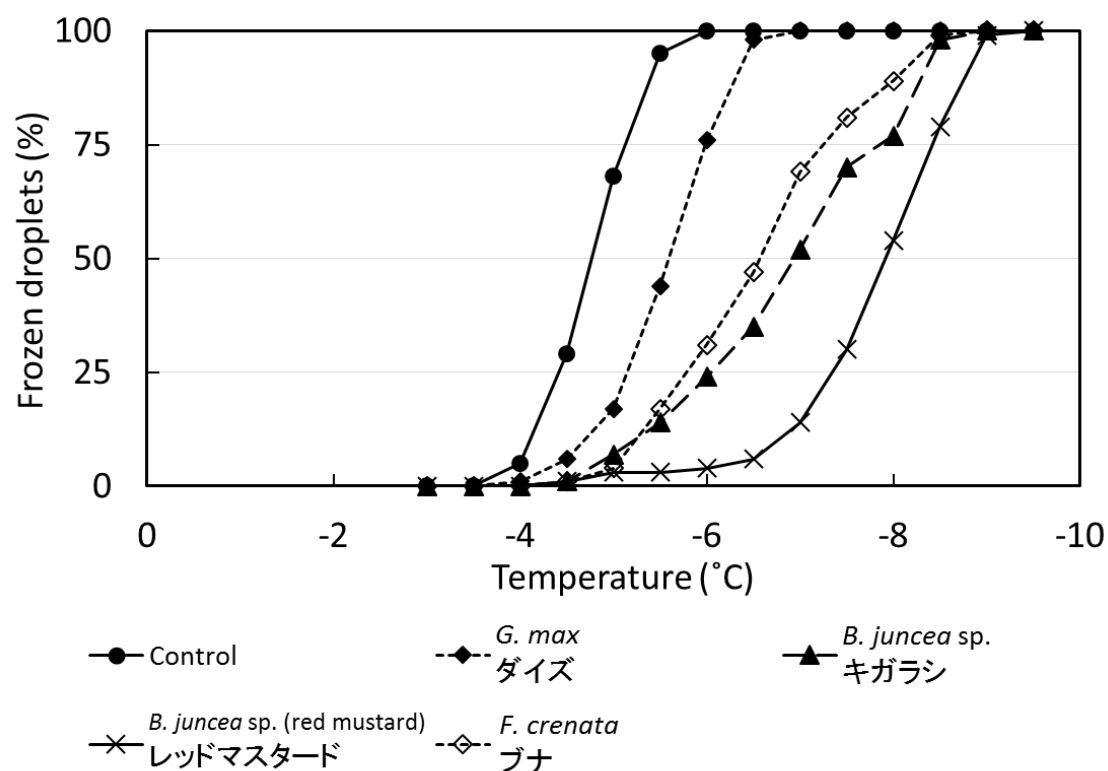
	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.6	-4.5	-4.8	-5.3	-6.5	0.0
<i>A. lappa</i>	-4.0	-5.3	-5.7	-6.1	-7.0	0.9
<i>M. japonica</i>	-3.6	-4.4	-4.8	-5.2	-6.0	-0.1
<i>S. lycopersicum</i>	-3.5	-4.3	-4.6	-4.9	-6.0	-0.2
<i>Z. mays</i> (corn silk)	-3.7	-4.8	-5.3	-5.8	-6.5	0.5
<i>Z. mays</i> (lemma)	-4.8	-5.7	-6.1	-6.4	-7.0	1.3

Fig. 2-40. Freezing curves of plant extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *A. lappa*; filled triangle, *M. japonica*; x-mark, *S. lycopersicum*; open diamond, *Z. mays* (corn silk); open triangle, *Z. mays* (lemma).



	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.5	-4.3	-4.8	-5.2	-6.0	0.0
<i>F. esculentum</i>	-4.0	-5.1	-5.6	-6.0	-7.0	0.8
<i>M. c. var. pavel</i>	-3.7	-5.0	-5.4	-5.8	-7.5	0.6
<i>P. vulgaris</i>	-3.6	-4.3	-4.7	-5.1	-6.0	-0.1
<i>P. japonicus</i>	-4.0	-5.9	-6.6	-7.2	-8.5	1.8

Fig. 2-4P. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *F. esculentum*; filled triangle, *M. c. var. pavel*; x-mark, *P. vulgaris*; open diamond, *P. japonicus*.



	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.6	-4.4	-4.8	-5.1	-6.0	0.0
<i>G. max</i>	-4.0	-5.1	-5.6	-6.0	-7.0	0.8
<i>B. juncea</i> sp.	-4.5	-6.0	-6.9	-7.9	-9.0	2.2
<i>B. juncea</i> sp.(red mustard)	-4.5	-7.3	-7.9	-8.4	-9.5	3.1
<i>F. crenata</i>	-4.5	-5.8	-6.6	-7.3	-9.0	1.8

Fig. 2-4Q. Freezing curves of plant leaf extracts determined by droplet freezing assay in the presence of the ice nucleator *E. ananas*. Filled circle, control; filled diamond, *G. max*; filled triangle, *B. juncea* sp.; x-mark, *B. juncea* sp. (red mustard); open diamond, *F. crenata*.

第3章 葉の凍結を抑制する植物抽出物と凍結抑制効果を定量化するリーフディスク凍結法

3.1 緒言

第2章では、既存のドロップレット凍結法を使用して、さまざまな植物の葉組織などの抽出物から氷核形成阻害活性を検出した。すべての試料を試験に供したわけではないが、氷核細菌だけでなくヨウ化銀やフロログルシノールを氷核形成物質とした場合でも、いくつかの植物葉の抽出物は数°C 以上の十分な氷核形成阻害活性を有していた。このように複数の氷核形成物質に対して効果がある化合物がいくつかあることは知られている(Yamashita et al. 2002; Kuwabara et al. 2012; Kuwabara et al. 2013; Kuwabara et al. 2014)。例えば、ある化合物が特定の氷核形成物質にしか効果を示さない場合であっても、抽出物画分であれば複数の氷核形成阻害物質が含まれている可能性が高いため、他の氷核形成物質に対しても何らかの氷核形成阻害効果が期待できる。

本研究では、最終的には植物抽出物の氷核形成阻害活性を利用して凍霜害を抑制、防止することを目的としている。そのため、植物の葉の上でも氷核形成阻害活性によって凍結温度を下げ、加えて葉を凍結させないことができるかどうかを調べる必要があると考えた。植物の凍霜害について試験を行うときには従来はポットなどに植えた植物個体に試験溶液を噴霧するなどしてから低温処理する方法で凍霜害（凍結）を抑制する効果があるかどうかを調べている(井上 1995; Francko et al. 2011)。この方法では、実際に植物個体が凍霜害をうける状況に近づけて試験できる一方で、繰り返し試験や多種の試料を一度に試験するには多大な労力を要する。そのため多数の試料を一度に試験して抽出物の葉上における凍結抑制効果を検証できる方法がないか考えた結果、病原菌の接種試験などによく用いられているリーフディスク法を利用することでこれらの問題を解決できるものと考えた。

そこで本研究では、小さい葉切片を多数用意して一度に多種の試料を試験して、その効果を調べるができるか否かを検証した。さらに、従来法である植物の苗を使用して、抽出物による凍結抑制効果についても検証した。

3.2 方法

3.2.1 プレート凍結法およびリーフディスク凍結法

液滴が一定の氷点下温度で接している表面の違いによって凍結しやすさが変化するかどうかを調べるため、ポリスチレン製シャーレ（直径 90 mm, 厚さ 15 mm）（エコペトリ, 36-3406, 三商）の底面上に直接液滴を滴下して凍結頻度を測定する方法と、リーフディスクを用いて葉面上に液滴を滴下して凍結頻度を測定する方法を考案・試行した。それぞれプレート凍結法、リーフディスク凍結法と名付けて試験を実行することを計画した。これらの方法で氷核形成阻害活性によって凍結抑制効果を検出するための条件を検討し、また植物抽出物の凍結抑制効果を調べる。

（1）試験溶液の調製

2.2.5 のドロップレット凍結法と同様に、氷核形成物質として氷核細菌（*E. ananas*）を用いて試験溶液を調製した。なお、本法の有効性の検証や実験条件を確立するために、最初は、既に *E. ananas* に対して氷核形成阻害活性を示すことが報告されている(-)-epigallocatechin gallate (EGCG) (Kuwabara et al. 2013) と kaempferol 7-*O*- β -glucoside (K7G) (Kasuga et al. 2008, Kuwabara et al. 2011) をポジティブコントロールとして用いて試験をおこなった。

試験溶液として、終濃度で 1.0 mg/mL の *E. ananas*、50 mM のリン酸カリウム緩衝液のほか、1.0 mg/mL の EGCG (サンフェノン EGCG, 太陽化学) もしくは 0.10 mg/mL の K7G (1378S, EXTRASYNTHES) を用いた。なお、この試験溶液の調製に用いた EGCG ストック水溶液、K7G ストック懸濁液の原液の濃度はそれぞれ 2.0 mg/mL、0.20 mg/mL とした。また、コントロール溶液として、EGCG や K7G を加えないで氷核細菌とリン酸カリウム緩衝液のみを含む溶液と、EGCG や K7G と氷核細菌を加えずリン酸カリウム緩衝液のみの溶液を用意した。

なお後述のプレート凍結法では、第 2 章で比較的高い氷核形成阻害活性を有することが明らかになったアカエゾマツ、レッドマスタード、クマイザサ、バッコヤナギ、ゲッケイジュ、スダチ、アカジソ、チャノキ、セイヨウタンポポ、ワイルドオーツ、キガラシ抽出物とネガティブコントロールとして活性がほとんどなかったスベリヒユ、ヤマグラサ抽出物を用いた。また、リーフディスク凍結法で使用した葉抽出物は、アカエゾマツ、クマイザサ、ゲッケイジュ、チャノキ、セイヨウタンポポを、またネガティブコントロールとしてスベリヒユ抽出物を用いた。植物抽出物は 2.2.2 の方法で調製し、終濃度 0.10 g FW/mL で使用した。

（2）プレート凍結法

前項の要領で調製したこれらの試験溶液をポリスチレン製シャーレ上に 10 μL ずつ等間隔に滴下した。1 枚のシャーレ内に滴下するそれぞれの試験溶液の数が必ず同数になるようにした。一度の試験につき 9 枚のシャーレを使用した。0°C に設定したプログラムフリーザー [超低温フリーザー (MDF-C8V1, Panasonic) 庫内にデジタル調節計 (ES100P, オムロン) で制御されたヒーターを設置したもの] に入れ、シャーレ間の温度差を小さくするための段ボール製の蓋をかぶせた後に 0°C 設定で 30 分間保持してから、9 枚のシャーレ底面が目的温度 (−3、−4、−5、−6°C) $\pm 0.3^\circ\text{C}$ になるまで 0.2°C/min の速度で冷却した。その後、目的温度で 3 時間保持してから凍結した液滴を計数して、凍結した液滴の割合を求めた。目的温度毎に少なくとも 5 反復おこなった。

次に、EGCG や K7G を用いてリーフディスク凍結法の実験条件を設定した後、EGCG や K7G の代わりに各種植物抽出物を用いて、抽出物中の氷核形成阻害活性の有効性を検証した。この各種試験溶液を前述の試験と同様にシャーレ底面上に 10 μL ずつ 1 枚のシャーレにつき同数ずつのせた。同様に 0°C 設定で 30 分間保持した後、9 枚のシャーレ底面が目的温度 (−3、−4、−5、−6°C) $\pm 0.3^\circ\text{C}$ になるまで 0.2°C/min の速度で冷却した。目的温度で 3 時間保持した後、液滴を爪楊枝などでつついて液滴が固まっていれば凍結したと判断して、凍結した液滴の割合を求めた。なお、本実験では目的温度毎に少なくとも 5 反復おこなった。

(3) リーフディスク凍結法

緑葉の性状によって試料溶液の凍結が影響を受ける可能性が考えられるため、発芽率や成長速度が比較的揃ったものや、同じ発達段階の緑葉を揃えやすい植物材料を数種類選んで供試することにした。

・ヤマグワ葉： 野外（北海道大学構内）で生育する成木から、7～9 月にかけて緑葉を採取し、よく洗浄してからハトメ抜きを用いて 15 mm 径のリーフディスクを作製した。

・ダイコン子葉： カイワレダイコン用のダイコン種子をバーミキュライト上に播種し、十分量の水を与えて 23°C で 2 日間暗所において発芽させた後、16 時間日長（70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）で 5 日間生育させた実生から子葉を採取して実験に供試した。

・トウモロコシ葉： トウモロコシは 20～30°C（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、10.5 mm 径のリーフディスクを作製した。

・チャノキ葉： チャノキはさえみどり挿し木苗を 15～30°C（自然日長、自然光量）で 5 か月以上生育させたものの成熟葉を採取し、9 mm 径のリーフディスクを作製した。

ダイコン子葉を除いて、いずれのリーフディスクも切り口から過度に乾燥することを

防ぐためにリーフディスクを作製し、ただちに純水に浸した。必要数のリーフディスクを作製した後、ペーパータオルで表面の水分を十分に除去してから実験に供試することにした。ダイコン子葉は洗浄せずにそのまま使用した。ポリスチレン製シャーレ（直径 90 mm, 厚さ 15 mm）に両面テープを 3 列貼り、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接触しないようにシャーレ内に並べた。

前項のプレート凍結法と同様の要領で、氷核形成物質として氷核細菌（*E. ananas*）を用いて前項と同じ試験溶液を調製した。はじめに、氷核細菌（*E. ananas*）に対して EGCG と K7G をポジティブコントロールとして試験をおこなった。次に、各種植物葉抽出物を用いて試験をおこなった。試験溶液を各リーフディスク上に 10 μ L 滴下した。1 枚のシャーレ内に滴下するそれぞれの試料溶液の数が必ず同数になるようにした。一度の試験につき 9 枚のシャーレを使用した。0°C に設定したプログラムフリーザーに入れ、シャーレ間の温度差を小さくするための段ボール製の蓋をかぶせた後に 0°C で 30 分間保持してから、9 枚のシャーレ底面が目的温度（-3、-4、-5、-6°C） $\pm 0.3^\circ\text{C}$ になるまで 0.2°C/min の速度で冷却した。その後、目的温度で 3 時間保持してから凍結した液滴を計数して、凍結した液滴の割合を求めた。目的温度毎に少なくとも 5 反復おこなった。

試験後の葉切片について細胞がどれだけ生存しているかどうかを確かめるために、処理温度ごとに凍結したものと凍結しなかったものの一部を無作為に選択して、電解質漏出法によって細胞生存率を測定した。電解質漏出法では水に溶解した電解質濃度に起因する電気伝導度を測定するため、葉の細胞由来のもの以外の電解質をできるだけ除く必要がある。低温処理後の切片に付着している試験溶液の電解質を除くために純水の流水で数秒間洗浄してから、試験管に入れて 1 mL の純水を加えた。

生存率 100% と 0% の対照区として、葉切片上にコントロールの試験溶液を滴下して室温で 3 時間静置したものと -80°C の冷凍庫で 3 時間置いた葉切片を同様に流水で洗浄したものを用意した。

試験管を斜めに傾けた状態で 3 時間、室温の暗所で緩く振とうしてから水溶液の電気伝導度を導電率計（B173, 堀場製作所）測定した。測定後、沸騰水中で 10 分間加熱してから再度 2 時間振とうして電気伝導度を測定した。これは Arora et al. (1992) の方法を改変したものであり、以下の計算式で細胞生存率を計算した。

$$\text{生存率(\%)} = 100 - \frac{S-C}{F-C} \times 100$$

$$S = \frac{\text{低温処理した試料の水溶液の電気伝導率}}{\text{低温処理した試料の熱処理後の水溶液の電気伝導率}}$$

$$F = \frac{-80^\circ\text{Cで凍結後融解処理した試料の水溶液の電気伝導率}}{-80^\circ\text{Cで凍結後融解処理した試料の熱処理後の水溶液の電気伝導率}}$$

$$C = \frac{\text{凍結処理していない試料の水溶液の電気伝導率}}{\text{凍結処理していない試料の熱処理後の水溶液の電気伝導率}}$$

3.2.2 ポット苗を用いたクマイザサ抽出物の凍結抑制効果の検証試験

この試験では、ポット苗の葉に付着させた氷核細菌 (*E. ananas*) によって誘発される凍結に対して、氷核形成阻害活性をもつ抽出物の散布がどの程度有効であるかを評価した。

試験に利用するポット苗にはダイコン実生とチャノキ苗を用いた。ダイコン実生は 50 mL 容のプラスチック製の容器 (マルエム ミニカップ) に 40 mL 程度バーミキュライトを入れてからカイワレダイコン種子を 3 粒播種して、その上に容器一杯までバーミキュライトを入れた。十分量の水を注いでから 23°C の暗所で 2 日間発芽させた後、16 時間日長 (70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) で 5 日間生育させたものを試験に用いた。チャノキ苗はさえみどり挿し木苗を 20~30°C (自然日長、自然光量) で 6 か月以上生育させたものを用いた。

ダイコン実生を用いた試験では、純水を噴霧したもの、0.10 g FW/mL クマイザサ抽出物を噴霧したもの、葉に氷核細菌を付着させてから純水を噴霧したもの、葉に氷核細菌を付着させてからクマイザサ抽出物を噴霧したものの 4 種類を用意した。チャノキ苗を用いた試験では、葉に氷核細菌を付着させてから純水を噴霧したもの、葉に氷核細菌を付着させてからクマイザサ抽出物を噴霧したものの 2 種類を用意した。葉に氷核細菌を付着させる場合は 2.2.3 の方法で調製した *E. ananas* 懸濁液を 1.0 mg/mL に純水で希釈してから 1 枚の葉につき 2 μL の液滴を 1 滴のせて室温下で乾燥させて定着させた。氷核細菌を付着させない場合においては、純水の液滴 (2 μL) を 1 枚の葉につき 1 滴のせて同様に乾燥させた。その後、純水もしくはクマイザサ抽出液をガラス製噴霧器 (82-1201, 三商) で苗全体にかかるようにまんべんなく噴霧して、直ちに 0°C に予冷したプログラムフリーザー内に設置した。この際に土壌が 0°C 以下になり凍結することを防止するために、発泡スチロール製の箱の内壁に沿って動作温度を 0°C とした水道管凍結防止用ヒーターを配置した Fig. 3-1 のような装置に設置した。また、ヒーターを動作させずに実験を行い、低温処理による土壌の凍結が植物体にどのような結果に影響を与えるのかについて検証することにした。なお、土壌の凍結は、爪楊枝などを突き刺して土壌の硬化の有無で判断した。また直接、循環用ファンの風があたり局所的に温度が低下することを防ぐために、設置した苗全体を覆う段ボール箱をかぶせた。0°C で 30 分間予冷してから、目的温度 (葉の付近の温度が -3、-4°C) $\pm 0.5^\circ\text{C}$ で 3 時間もしくは 16 時間処理した (チャノキ苗を用いた試験では、-3°C、3 時間処理のみ実施した)。温度および相対湿度は照度 UV レコーダ (TR-74Ui-H, ティアンドデイ) で葉面付近にお

いて測定、記録した。処理後、ダイコン実生は凍結して、萎れている個体数、チャノキ苗は 23℃ 前後の室温で 1 昼夜おいた後に褐変や枯死している葉数を計数し、凍結していない個体（ダイコン実生）または葉（チャノキ）の割合を計算した。

3.3 結果

3.3.1 シャーレ上、葉切片上における氷核細菌存在下の液滴の凍結

プレート凍結法ならびにリーフディスク凍結法では、ドロップレット凍結法によって氷核細菌 *E. ananas* に対して高い氷核形成阻害活性を示すことが報告されている EGCG（濃度 1 mg/mL における氷核形成阻害活性 3.2°C, Kuwabara et al. 2013）と K7G（濃度 0.1 mg/mL における氷核形成阻害活性 5.7°C, Kuwabara et al. 2011）を使用して、シャーレ底面上と葉切片表面における液滴の凍結の凍結過程を把握して冷却条件を確定することにした。

最初に、リーフディスク凍結試験に用いた葉の凍結耐性（耐凍性）について検証した結果を述べる。いずれの葉も低温馴化しておらず、氷核細菌の有無にかかわらず載せた液滴が凍結していた葉は、その全てが融解後に生存率が大きく低下していた。しかし液滴が凍結していなかった葉では生存率の低下はほとんどみられなかった（Fig. 3-2）。したがって、液滴の凍結の有無によって葉の生存の可否が判断できることを意味する。

プレート凍結法では、-4°C でコントロール（*E. ananas* とリン酸カリウム緩衝液のみ）の試験区の液滴が全て凍結し、リン酸カリウム緩衝液のみの試験区は -6°C でもほとんど凍結しなかった。EGCG や K7G を含む試験区は -5°C までは 80% 以上凍結しなかったが、-6°C で EGCG の試験区は約 70%、K7G の試験区は約 20% が凍結した（Fig. 3-3A）。

ヤマグワリーフディスク上では、コントロールの試験区は -4°C で全て凍結し、リン酸カリウム緩衝液のみの試験区は -6°C で約 40% が凍結した。EGCG や K7G を含む試験区は処理温度の低下と共に凍結する割合が増加してそれぞれ約 80%、約 60% が凍結した（Fig. 3-3B）。

カイワレダイコン子葉上では、コントロールの試験区は -4°C で全て凍結し、リン酸カリウム緩衝液のみの試験区は -6°C でもほとんど凍結しなかった。EGCG を含む試験区は温度低下と共に凍結割合が増加して -6°C では約 85% が凍結した。K7G を含む試験区は -6°C で約 30% が凍結した（Fig. 3-3C）。

トウモロコシリーフディスク上では、コントロールの試験区は -4°C で全て凍結し、リン酸カリウム緩衝液のみの試験区は -6°C でもほとんど凍結しなかった。EGCG を含む試験区は温度低下と共に凍結割合が増加して -6°C では全てが凍結した。K7G を含む試験区は -6°C で約 20% が凍結した（Fig. 3-3D）。

チャノキリーフディスク上では、コントロールの試験区は -4°C で全て凍結し、リン酸カリウム緩衝液のみの試験区は -6°C で約 20% が凍結した。EGCG や K7G を含む試験区は処理温度の低下と共に凍結する割合が増加してそれぞれ約 100%、約 50% が凍結した（Fig. 3-3E）。

これらの結果 (Fig. 3-3A~3E) を俯瞰的にみると、シャーレ底面上と 4 種の葉表面上のいずれの表面上においても試験を行った条件では、 -3°C 処理ではほとんど凍結せず、 -4°C 処理でコントロールの試験区がほぼ全て凍結した。また処理温度が低下するにつれて凍結する割合が徐々に増加した。

3.3.2 氷点下温度における植物抽出物の凍結抑制効果

-3°C の処理では、植物抽出物を入れていないコントロール (*E. ananas* とリン酸カリウム緩衝液のみ) を含め、全ての試験区でほとんど凍結しなかった (Fig. 3-4A~4E) が、トウモロコシリーフディスク上ではコントロールの液滴に約 10% の凍結がみられた。

-4°C の処理では、植物抽出液を入れていないコントロールは全て凍結し、ネガティブコントロールとして用いたスベリヒユ葉抽出物を含む試験区はほぼ全てが凍結した。また、シャーレ底面上で試験してネガティブコントロールとして用いたヤマグワ葉抽出物を含む試験区は約 90% が凍結した。一方で、第 2 章で氷核細菌 *E. ananas* に対して高い氷核形成阻害活性をもつことが確認された 11 の植物抽出物を含む試験区は多くても約 20% しか凍結しなかった。 (Fig. 3-4A~4E)。

シャーレ底面上 (プレート凍結法) の液滴は -5°C では、第 2 章で高い氷核形成阻害活性をもつ 11 の植物抽出物を含む試験区は多くても 50% ほどしか凍結せず、ゲッケイジュ、アカエゾマツ、セイヨウタンポポ、クマイザサ、レッドマスタード葉抽出物は 80% 以上、チャノキ、ワイルドオーツ、スダチ、アカジソ葉抽出物は 70% 以上が凍結しなかった。 -6°C では、 -5°C 処理と比べると全体的に凍結した液滴は多かったが、アカジソ (約 80% 凍結)、キガラシ (約 60% 凍結) 抽出物を除き、50% 以上が凍結しなかった。チャノキ、バッコヤナギ葉抽出物は 60% 以上、ゲッケイジュ、アカエゾマツ、セイヨウタンポポ、クマイザサ、ワイルドオーツ、スダチ葉抽出物は 70% 以上が凍結しなかった (Fig. 3-4A)。

ヤマグワリーフディスク上の場合、 -5°C では用いた 5 つの葉抽出物を含む試験区はいずれも 50% 以上凍結しなかった。 -6°C ではゲッケイジュ葉抽出物が約 50%、セイヨウタンポポ葉、クマイザサ葉身抽出物は約 60%、アカエゾマツ抽出物は約 70%、チャノキ抽出物は約 80% 凍結した (Fig. 3-4B)。

ダイコン子葉上の場合、 -5°C ではチャノキ、アカエゾマツ、セイヨウタンポポ抽出物を含む試験区は約 30%、ゲッケイジュ、クマイザサ抽出物では約 20% が凍結した。 -6°C ではアカエゾマツ、クマイザサ抽出物が約 40%、ゲッケイジュ抽出物が約 50%、セイヨウタンポポ抽出物は約 60%、チャノキ抽出物は約 70% が凍結した (Fig. 3-3C)。

トウモロコシリーフディスク上の場合、 -5°C では 5 つの抽出物いずれも約 80% 以上

凍結しなかった。 -6°C ではゲッケイジュ抽出物は約 30%、クマイザサ抽出物は約 40%、アカエゾマツ抽出物は約 50%、チャノキ、セイヨウタンポポ抽出物は約 60%が凍結した (Fig. 3-4D)。

チャノキリーフディスク上の場合、 -5°C ではクマイザサ抽出物を含む試験区は約 50%、チャノキ、ゲッケイジュ葉抽出物は約 40%以上、アカエゾマツ、セイヨウタンポポ抽出物は約 30%が凍結した。 -6°C ではアカエゾマツ、ゲッケイジュ抽出物が約 50%、セイヨウタンポポ、クマイザサ抽出物は約 60%、チャノキ抽出物は約 80%が凍結した (Fig. 3-4E)。

3.3.3 ポット苗におけるクマイザサ抽出物の凍結抑制効果

第 2 章でドロップレット凍結法により氷核細菌 *E. ananas* の存在下で比較的高い氷核形成阻害活性を示した植物葉抽出物のうち、さらにプレート凍結法、リーフディスク凍結法でも $-3\sim-6^{\circ}\text{C}$ の比較的高い氷点下温度で高い凍結抑制効果を示したもののうち、比較的容易に採取でき多量の抽出物が得られるクマイザサ葉身抽出物を選択して、人工気象器内で生育させたダイコン実生および温室内で生育させたチャノキ苗を用いて試験を行った。

ダイコン実生を用いて -3°C で 3 時間処理を行った場合、氷核細菌を子葉に付着させなかった実生は純水 (Fig. 3-5A で *E. ananas*, “-”; Leaf extract, “-”)、クマイザサ抽出液 (*E. ananas*, “-”; Leaf extract, “+”) のどちらを噴霧したものでも 5%前後 (1、2 個体) 凍結したのみでほぼ全ての実生が凍結しなかった。子葉表面に氷核細菌を付着させて純水を噴霧した実生 (*E. ananas*, “+”; Leaf extract, “-”) はおよそ 75%が凍結し、クマイザサ抽出液を噴霧した実生 (*E. ananas*, “+”; Leaf extract, “+”) は約 10%凍結した (Fig. 3-5A)。

-3°C で 16 時間処理を行った場合では、氷核細菌を付着させなかった実生は 3 時間処理を行った場合と同様にほとんど凍結しなかった。氷核細菌を付着させてから純水を噴霧した実生 (Fig. 3-5B で *E. ananas*, “+”; Leaf extract, “-”) は 75%が凍結し、クマイザサ抽出液を噴霧した実生 (*E. ananas*, “+”; Leaf extract, “+”) は 10%凍結した (Fig. 3-5B)。

-4°C で 3 時間処理を行った場合では、氷核細菌を付着させなかった実生は純水、クマイザサ抽出液のいずれを噴霧しても凍結しなかった。氷核細菌を付着させてから純水を噴霧した実生 (Fig. 3-5C で *E. ananas*, “+”; Leaf extract, “-”) は約 90%が凍結し、クマイザサ抽出液を噴霧した実生 (*E. ananas*, “+”; Leaf extract, “+”) は約 20%凍結した (Fig. 3-5C)。

-4°C で 16 時間処理を行った場合では、氷核細菌を付着させなかった実生は純水、

クマイザサ抽出液のいずれを噴霧してもほとんど凍結しなかった。氷核細菌を付着させてから純水を噴霧した実生 (Fig. 3-5D で *E. ananas*, “+”; Leaf extract, “-”) は約 80% が凍結し、クマイザサ抽出液を噴霧した実生 (*E. ananas*, “+”; Leaf extract, “+”) は約 20% 凍結した (Fig. 3-5C)。

葉表面に氷核細菌を付着させたチャノキ苗を用いて -3°C で 3 時間処理を行った場合では、純水を噴霧したチャノキ苗は平均して約半数の葉が凍結し、クマイザサ抽出液を噴霧した苗は平均して約 15% の葉が凍結した (Fig. 3-6)。

ダイコン実生では、凍結した個体は融解するとすぐに萎れて、凍結していない個体とは明らかに状態が異なっていた (Fig. 3-7A)。またチャノキ苗では凍結した葉は褐変や脱落がみられた (Fig. 3-7B)。

本試験では氷点下温度で処理する際に、土壌の凍結を防ぐためにヒーターを使用しているが、ヒーターを使用しなかった場合に土壌が凍結するかどうか、また土壌の凍結が植物個体の凍結に影響を及ぼすかどうか、という点について検証した。 -4°C で 3 時間処理した場合、氷核細菌を子葉に付着させなかった実生で純水 (*E. ananas*, “-”; Leaf extract, “-”) もしくはクマイザサ抽出液 (*E. ananas*, “-”; Leaf extract, “+”) を噴霧した実生は約 30% が凍結した。子葉表面に氷核細菌を付着させて純水を噴霧した実生 (*E. ananas*, “+”; Leaf extract, “-”) は約 70% が凍結し、クマイザサ抽出液を噴霧した実生 (*E. ananas*, “+”; Leaf extract, “+”) は約 50% が凍結した (Fig. 3-8)。また、凍結した実生が植わっている土壌 (水分を含んだバーミキュライト) は凍結しており、実生が 3 個体とも凍結しなかったポットでは土壌の凍結はみられなかった。 -4°C で 16 時間処理した場合は氷核細菌の付着の有無、噴霧した溶液の違いにかかわらず、全ての実生が凍結し、土壌も全て凍結していた。

3.4 考察

3.4.1 氷核細菌が存在するシャーレ上、緑葉上での液滴の凍結

ポリスチレン製シャーレ底面上に直接もしくはシャーレ内に配置した緑葉切片上に滴下した液滴の凍結の有無を調べるという試験方法は、野外散布実験の前段階で緑葉への有効性を簡易的に確認するために新しく考案したものである。特に、葉切片を用いて試験する方法はリーフディスク凍結法と名付け、氷点下温度での葉の凍結や組織表面にある水分の凍結を定量的に測定できる生物検定法として考案した。この試験方法で氷核形成阻害活性があるとされている化合物の氷核形成阻害活性による凍結抑制効果を検出できるか否かを確かめるために、氷核細菌 (*E. ananas*) に対して氷核形成阻害活性を示すことが報告されている EGCG (Kuwabara et al. 2013) と K7G (Kasuga et al. 2010; Kuwabara et al. 2011) をコントロールとして用いて試験を行った。

今回、リーフディスク凍結法で使用した低温馴化していない葉は、凍結によって致死的な傷害を被ることが明らかになった (Fig. 3-2)。このことは、使用する葉切片が生存するためには、短時間の温度の低下よりも凍結すること自体を避けなければならないことを意味する。したがって、氷核細菌によって促される凍結を氷核形成阻害活性によって阻害することで葉の凍結傷害を回避することが可能か否か判断するために、リーフディスク凍結法を利用して簡便に評価することは理にかなったものとみなすことができる。

シャーレ底面上に 1 滴あたり 10 μ L 滴下したプレート凍結法、4 種類の葉切片上に 10 μ L 滴下したリーフディスク凍結法のどちらにおいても -3°C ではコントロール (氷核細菌とリン酸緩衝液を含む溶液) はほとんど凍結せず -4°C では全て凍結することから、この溶液の 10 μ L の液滴は $-3\sim-4^{\circ}\text{C}$ の間の温度で凍結することがわかる (Fig. 3-2A~E)。第 2 章のドロップレット凍結法における凍結温度 (半数凍結温度) は氷核細菌の濃度が 2 倍 (2.0 mg/mL) であるにもかかわらず -4.7°C である。これは液量の違い [10 μ L (本試験) と 2 μ L (ドロップレット凍結法)] や液滴が接している容器の材質や表面形状が影響していると考えられる。実際にアフリカの高山に生育するキキョウ科の *Lobelia telekii* の花序の組織液 (氷核活性を有する) の凍結温度を 1、10、100、1000 μ L の容量で測定した結果、それぞれ -7.0 、 -4.8 、 -4.6 、 -4.1°C となることが報告されている (Zachariassen and Hammel 1988)。また、水が接する容器表面の状態をより疎水性にすると凍結温度が下がることも報告されている (Heneghan et al. 2004)。液滴が接する容器表面はドロップレット凍結法では試料は銅板に塗られたミネラルオイルや銅板と接するが、本試験のプレート凍結法ではポリスチレンであり、リーフディスク凍結法では植物葉表面である。そのため、本試験でド

ロップレット凍結法と比べて凍結温度が上昇したのは、液量が増えたことに加え、液滴が異なる物質の表面に接していることに起因するものであると考えられる。

次に、1.0 mg/mL EGCG を添加した場合では、いずれの表面上においても処理温度が低下するにつれて凍結する割合が増加しており (Fig. 3-3A~3E)、予想に反しない結果であるといえる。液滴を載せる 5 種類の表面上での温度低下に伴う凍結割合の増加を比較してみると、 -4°C 処理では凍結割合にそれほど差はみられないが、 -5°C 処理ではシャーレ底面上では 15% ほどしか凍結していないにもかかわらず (Fig. 3-3A)、ヤマグワやチャノキ葉上では約半数 (Fig. 3-3B, 3E)、ダイコン子葉上では約 40% (Fig. 3-3C)、トウモロコシ葉上では約 35% が凍結していた (Fig. 3-3D)。4 種類の葉表面上のほうが明らかに凍結しやすいことがわかる。これは、シャーレ表面よりも葉の表面のほうが汚染されていること (氷核となりうるものが存在する可能性) や、表面形状が平滑でないこと起因するものであると考えられる。また、いずれの表面上においても -5°C から -6°C の間で凍結割合が大きく増加することから、氷核細菌存在下ではこの温度帯が EGCG の氷核形成を阻害する効果の限度であると考えられ、コントロールとの凍結温度 ($-3\sim-4^{\circ}\text{C}$) の差は約 2°C である。同様に、0.1 mg/mL K7G を添加した場合について考えると、EGCG 添加時と同様に温度が低下するにつれて凍結割合が増加している。しかしながら、温度低下による凍結割合の増加は EGCG 添加時より緩やかであり、K7G の方が凍結を抑制する効果が高いと考えられる。ドロップレット凍結法で EGCG は濃度 1 mg/mL で 3.2°C の氷核形成阻害活性を (Kuwabara et al. 2013)、0.1 mg/mL K7G が 5.7°C の氷核形成阻害活性を有している (Kuwabara et al. 2011) ことにも矛盾していない結果といえる。しかしながら、氷核形成阻害活性が高い K7G であってもヤマグワやチャノキ葉上では -6°C で 50% 以上凍結しており、ダイコン子葉やトウモロコシ葉上と比較すると凍結しやすいことが分かる。このようなことから容量や液滴の接している表面の違いにより氷核形成阻害物質の効果が左右されることが示唆される。また、液量による氷核形成阻害活性値の変化については、0.5 mM ヨウ化銀を氷核形成物質として測定された例がある。1 mg/mL の α -oligoglucosyl quercetin 3-*O*- β -glucoside (三栄源エフ・エフ・アイ) や EGCG (太陽化学)、茶カテキン (原料屋ドットコム)、タンニン酸 (和光純薬工業)、オリゴノール (アミノアップ) を氷核形成阻害物質として氷核形成阻害活性を 2 μL と 1 mL の容量で測定した結果、それぞれ活性は、 5.8°C と 3.0°C 、 2.9°C と 1.4°C 、 8.5°C と 7.3°C 、 4.8°C と 4.1°C 、 4.7°C と 4.7°C となり、液量が増えることによって氷核形成阻害活性値が減少する傾向にある (Fujikawa et al. 2018)。

氷核細菌を入れずに 50 mM リン酸カリウム緩衝液のみを添加した液滴の温度低下による凍結割合に着目すると、シャーレ底面上やダイコン子葉上、トウモロコシ葉上では -6°C まで冷却してもほとんど凍結しないにもかかわらず、ヤマグワ、チャノキ

葉上では -6°C でそれぞれ約40%、約20%が凍結した。これは前述の液滴が接している表面の状態が異なることに起因すると考えられるが、ドロップレット凍結法で50 mM リン酸カリウム緩衝液の凍結温度が -23°C 前後であり(Kuwabara et al. 2011; Kuwabara et al. 2012; Kuwabara et al. 2013)、ヤマグワとチャノキ葉を使用したときのみ凍結温度がこれほど上昇するのは表面形状だけではなく、葉の表面に -10°C 以上の比較的高い氷点下温度で氷核形成物質となりうるものが存在する可能性も考える必要があるかもしれない。

以上の結果から、プレート凍結法やリーフディスク凍結法はドロップレット凍結法とともに氷核形成阻害活性を検出するために有用であると考えられる。プレート凍結法は、低温処理前の蒸発による液量の変化の影響を少なくするために液量がドロップレット凍結法の5倍(10 μL)となっており、試料を多く調製する必要がある。しかし、容器が汎用の使い捨てシャーレであることや冷却方式が空冷式であるため、操作中に槽液が混入するなどの危険がある液冷式(ドロップレット凍結法)より操作が容易である。プレート凍結法やリーフディスク凍結法は活性を有するか否かをスクリーニングする方法としてかなり有用であると考えられる。またリーフディスク凍結法は氷点下温度における水の凍結を葉切片上の液滴だけでなく、葉以外の試料に付着している水や、試料に含まれている水の凍結を測定する生物検定法として使用できるものと考えられる。

3.4.2 シャーレ上、葉切片上における葉抽出物の凍結抑制効果

プレート凍結法やリーフディスク凍結法は氷核細菌入りの液滴に氷核形成阻害物質を添加することで液滴の凍結を抑制できることを測定する方法として使用できることが分かった。ここでは第2章で氷核形成阻害活性を 3°C 前後有していることが確認された植物葉抽出物について、その凍結抑制効果をプレート凍結法やリーフディスク凍結法で検証した。

プレート凍結法ではドロップレット凍結法において氷核細菌 *E. ananas* に対して 3°C 前後の氷核形成阻害活性を示したアカエゾマツ、レッドマスタード、クマイザサ、バッコヤナギ、ゲッケイジュ、スダチ、アカジソ、チャノキ、セイヨウタンポポ、ワイルドオーツ、キガラシの11の葉抽出物とネガティブコントロールとして氷核形成阻害活性をほとんど示さなかったスベリヒユ、ヤマグワの2つの葉抽出物を用いて実験を行った。前項の結果と同様に -3°C ではいずれの試験区でもほとんど凍結しなかった。 -4°C で処理するとネガティブコントロールはいずれも約90%が凍結したが、氷核形成阻害活性を有する11の葉抽出物は90%以上が凍結せず (Fig. 3-4A)、ドロップレット凍結法で検出できる活性の有無と相関がみられた。 -5°C 、 -6°C の処

理でもほぼ同様の結果が得られたが、キガラシやレッドマスタード、アカジソ抽出物は他の8つの抽出物よりも凍結しやすい傾向がみられた。また、11の葉抽出物の -6°C での未凍結割合と1.0 mg/mL EGCGの未凍結割合（約30%）や0.10 mg/mL K7Gの未凍結割合（約80%）（Fig. 3-3A）と比較すると、葉抽出物は一定の氷点下温度での凍結抑制効果は氷核形成阻害活性のある化合物と同等程度はもつことが分かった。

4種類の葉切片を用いたリーフディスク凍結法ではシャーレ内の底面積の制約上、使用する植物葉抽出液はドロップレット凍結法で氷核形成阻害活性を有していた5試料とネガティブコントロール1試料のみを用いている。4種類のいずれの葉を用いても、プレート凍結法やEGCGやK7Gを添加した場合に得られた結果（温度低下に伴い凍結割合が増加する）と同様の結果が得られた。ヤマグワ葉やチャノキ葉を用いたものの方がダイコン子葉やトウモロコシ葉を用いたものより凍結割合が高くなる傾向にあることも同様であり、葉の表面形状や汚れ（氷核物質となりうるもの）の付着が影響しているものと考えられる。

今回試験に供した4種類の葉切片（リーフディスク）の凍結は、液滴の凍結による植氷ものであると考えている。実際に、作製した葉切片（リーフディスク）（各種90枚）をシャーレ内に並べて液滴を滴下せずに -6°C で3時間処理しても全く凍結しなかった。そのため、本研究で使用した葉はマイナス数 $^{\circ}\text{C}$ の比較的高い氷点下温度では、組織表面の水が凍結して、その氷が走ることにより葉が凍結するものとも考えられる。野外では植物個体全体が冷却されるため、葉以外の組織が先に凍結して氷が走る可能性も考えられる。初冬のレンゲツツジ（*Rhododendron japonicum*）の外側の芽鱗、内側の芽鱗、小花、樹皮、木部、髓を水に入れて氷核活性（凍結温度）を測定するとそれぞれ -5.7°C 、 -6.4°C 、 -15.0°C 、 -6.2°C 、 -12.3°C 、 -12.4°C となり、組織によって凍結する温度が大きくこと異なることが報告されているため（Ishikawa et al. 2015b）、凍結温度の高い組織から凍結し始めることも十分に考えられる。またシナレンギョウ（*Forsythia viridissima*）やレンギョウ（*F. suspensa*）などのレンギョウ属の枝切片を少量の水を入れてその水の凍結温度を測定すると、高いもので -2.5°C （石川ら 2012）、ブルーベリー品種の *Vaccinium corymbosum* cv. Weymouthや *V. ashei* cv. Woodardの枝ではそれぞれ -2.2°C 、 -1.7°C で凍結することが報告されている（Kishimoto et al. 2014）。また、ミネズオウ（*Loiseleuria procumbens*）の枝を徐々に冷却していくと -1°C 付近で一部の葉が凍結を開始し、枝全体が凍結していく様子が観察されている（Kuprian et al. 2014）。そのため、リーフディスク凍結法で設定する程度の氷点下温度で葉自身が凍結する可能性がある、葉上の液滴が凍結して葉が凍結したのか、葉自身が凍結したのか判断できない可能性があるため、リーフディスク凍結法で使用する際には液滴がない状態で葉が凍結する温度を知っておく必要がある。ま

た、実際に生育する植物では葉以外の組織が存在するため、本研究の目的の一つである凍霜害の防止に使用するには植物個体を用いて試験をする必要がある。

本研究では氷点下温度での植物の水の凍結を観測、定量化しようとリーフディスク凍結法を考案し、適切な条件を検討した。今までにチャノキ葉にチャ赤焼病をもたらす細菌の接種と同時に氷核細菌 (*Xanthomonas campestris*) を接種したか否かの違いによって、氷点下温度処理をおこなったチャノキ葉に発生する病斑の大きさがどの程度異なるかを試験すると、氷核細菌を接種することで葉が凍結して凍害をうけて、病斑が拡大するという報告がある(Tomihama et al. 2006)。しかし、リーフディスクなどの葉切片を用いて葉表面上の水が凍結するかどうかについて試験されている報告は見あたらない。野外に生育する植物表面には氷核細菌が存在し、これが低温時に凍霜害を与えることが示唆されており(Lindow et al. 1976, 1978b, 1982)、氷核細菌による凍霜害を防止する方法について研究されてきている。この研究で行われている室内実験では植物の実生などの小さい個体を使用したような試験法がよく使用されており、ポットやプランターに植えた植物の実生などに散布して低温処理する方法が行われている。これに比べてリーフディスク凍結法は少ない試料で一度に多種の試料の比較を行うことができる点で有利であると考えている。一方で実際に凍霜害防止のために使用するには室内実験では最終的に苗などのインタクトな植物を用いて、最終的に野外で長期間費やして試験を行うようにして、段階的に試験の規模が大きくなっていく必要がある。そのため、凍霜害防止研究の始めに凍霜害防止に利用できそうな多種の試料を一度に比較できるリーフディスク凍結法によるスクリーニングは有効であると考えている。

3.4.3 クマイザサ葉身抽出液の噴霧による植物実生の凍結抑制効果

ポット苗に噴霧する葉抽出液にはリーフディスク凍結法による試験で凍結抑制効果が確認された 5 試料（アカエゾマツ、チャノキ、ゲッケイジュ、セイヨウタンポポ、クマイザサ）の葉抽出物のうち、群生しており大量の試料を比較的容易に採取でき、資源量も豊富であるクマイザサ葉身抽出液をポット苗に噴霧して、凍結傷害を抑制できるか否かを調べることにした。

ダイコン実生を用いた試験での試験区はダイコン実生に純水を噴霧したもの、クマイザサ葉身抽出液を噴霧したもの、氷核細菌を付着させてから純水もしくはクマイザサ葉身抽出液を噴霧したものの 4 試験区を設定した。氷核細菌を付着させてなかった試験区はそもそも純水もしくはクマイザサ葉身抽出液で濡れるだけで凍結するかどうかを確かめるために設定した。

ダイコン実生を用いて -3°C で3時間処理した場合では、氷核細菌 (*E. ananas*) を付着させることで凍結が誘導された。氷核細菌を付着させて純水を噴霧した個体は75%の個体が凍結したが、クマイザサ葉身抽出液を噴霧すると65%の個体の凍結が防止され (Fig. 3-5A)、クマイザサ葉身抽出液が凍結を抑制していることが示唆された。また、16時間処理した場合でも3時間処理した場合とほとんど凍結割合は変わらず (Fig. 3-5B)、クマイザサ葉身抽出液が凍結を抑制できることが示唆された。

-4°C で処理した場合では、氷核細菌を付着させてクマイザサ抽出液を噴霧した試験区は3時間、16時間どちらの処理においても約20%の個体が凍結し、 -3°C で処理した場合と比べて凍結割合が増加して温度低下により若干凍結しやすくなる傾向が見られた。リーフディスク凍結法でダイコン子葉を用いた場合のコントロールの試験区の凍結温度 ($-3\sim-4^{\circ}\text{C}$) であるが実生を用いた場合では -3°C の処理でも氷核細菌を付着させて純水を噴霧した試験区はかなりの割合で凍結していることから、 1°C 程度凍結温度が上昇しているように見える。リーフディスク凍結法での凍結の傾向

(Fig. 3-3C) を考慮すると、ダイコン実生にクマイザサ抽出液を噴霧すれば -5°C の処理でも半数程度は凍結しないことが予想される。

また土壌が凍結しないようにヒーターで加温する必要性を検証するための実験を行ったところ、ヒーターを入れなかった結果 (Fig. 3-8) と 0°C 設定のヒーターを入れた結果 (Fig. 3-5C, D) が明らかに異なっていた。したがって、ヒーターを入れない場合、土壌の凍結がきっかけとなって、植物個体の凍結する可能性が十分に考えられた。しかし、植物個体が先に凍結して土壌が植氷されて凍結した可能性も考えられるため、さらなる検証が必要である。いずれにせよ、数時間以上氷点下温度で処理する場合はヒーターで土壌を加温していないと土壌と共に植物が凍結する可能性があるため、試験溶液を散布した影響を正確な結果が得られないと思われる。

3時間から16時間に処理時間を延長して、凍結割合が増加しなかった (Fig. 3-5A と 5B、3-5C と 5D) 理由として、庫内の相対湿度の低下が考えられる。試料を入れた後の庫内の相対湿度を測定すると、徐々に相対湿度が低下することが分かった (Fig. 3-9)。温度低下に伴って相対湿度が上昇しないことで実生表面に結露が発生せず、葉面上が乾燥してしまい、処理時間を長くしても実生の凍結割合が大きくなるような差が生じなかったと考えられる。このようなことを解消するためには、凍霜害が実際に発生するときに起こる放射冷却を再現する必要がある。放射冷却によって冷却を行う装置を作製して冷却試験を行った研究(羽生ら 1978; Marcellos 1981; Fuller and Le Grice 1998)もあるが、装置の作製に多大な労力がかかる点や装置が大きい (底面約1 m 四方、高さ1~2 m) 点、汎用性がない点が課題である。

チャノキ苗を用いた試験は -3°C 、3時間の処理のみしか行っていないが、クマイザサ葉身抽出液を噴霧することで凍結を抑制できた。しかしながら、純水を噴霧した場

合の葉の凍結割合は約 50%、クマイザサ抽出液を噴霧した場合は約 15%であり、ダイコン実生で試験をした場合ほど差が大きくなかった。処理後のチャノキ苗は 1 個体全体が凍結することではなく、個体内で凍結している葉としていない葉があった。同様に、処理後に室温で 1 日ほど置くと個体内で変色したり脱落したりする葉がある一方で変色や脱落しない葉もあったため(Fig. 3-7B)、個体ではなく葉の凍結割合を求めた。個体の一部が凍結した理由として、あるところで生じた氷から凍結が伝播するための時間がかかり、伝播する前に処理時間が終わってしまった可能性が考えられる。数種の葉や茎での凍結の伝播速度について Hacker and Neuner (2007)がまとめており、1 秒間に遅いもので 0.2 cm、速いもので約 5 cm 伝播すると報告されていることから、植物種や条件によって凍結の伝播速度が速くも遅くもなりうる。また、Gusta et al. (2004)はベタインやプロリン、スクロース、トレハロースを含む水溶液 (0.1~0.7 M) を浸したろ紙における凍結の伝播速度を測定している。より高濃度、より高い氷点下温度ほど伝播速度が遅くなることが示されており、 -2.5°C では 0.3 M の溶質が含まれている水溶液の凍結伝播速度はなにも含まれていない水の 10 分の 1 程度 (毎秒約 0.1 cm) まで落ちる。チャノキ苗の組織の溶質濃度を測定してはいないが、チャノキの葉から抽出して調製した溶液の浸透濃度 (0.10 g FW/mL で 110 mOsmol/kg, Table 2-2b) から考えると、葉の組織の溶質濃度は数百 mM はあると見積もることができるため、凍結の伝播速度も遅くなることで凍結が伝播する前に処理時間が終わって温度が上がった可能性も考えられる。また芽などの一部の組織ではあるが、凍結の伝播を妨げる組織をもつ高山植物や越冬中の植物が存在することも知られている(Hacker et al. 2011; Pramsöhler and Neuner 2013; Kuprian et al. 2014)。生育中のチャノキでこのような機構が存在するかどうかは不明であるが、凍結が全体に伝播しない一つの可能性として考えられる。

これまでに、作物に散布して凍霜害を抑制、防止する効果を確認する試験を行った報告がいくつかある。ブドウ、ジャガイモ、レモンの苗に市販されている鉱物の一種の kaolin を疎水性にした粉末やアクリルポリマーを植物表面に散布することで水分の付着を防止して、10~30%凍霜害を抑制できること(Fuller et al. 2003)やゼオライトやモンモリロナイトの多孔質粉末を散布することで、凍結する可能性のある水を吸収することで、リンゴの果実や葉の凍霜害を抑制することができるという報告がある(山田 and 山田 2009)。また、数%のポリエチレングリコール水溶液を噴霧することにより凝固点降下による凍結回避と考えられる作用でヤシやユリなどの葉が死んでしまう温度を数 $^{\circ}\text{C}$ 下げることができること(Francko et al. 2011)や、作用機序は不明であるが、氷核細菌を感染させたハウレンソウやコマツナ苗に 0.1~0.01%キトサン水溶液を噴霧することで最大で約 70%の凍害発生を抑制できるような報告もある(井上 1995)。いずれの場合においても単一の物質 (化合物) であり、本研究のように様々な化合物

を含んでいることが予想される植物組織からの粗抽出物を用いておらず、その物質（化合物）を使用すれば報告と同様の効果が得られることが期待できる。しかしながら、多種の化合物を含むものであるほうがよいという考え方もできる。一般には凍霜害には氷核細菌が影響を及ぼしていると考えられているが、チャノキでは氷核細菌は存在するが凍霜害への影響は無視できる程度のものであり、植物由来の氷核形成物質が重要な意味をもっているという報告もある(Goto et al. 1993)。そのため凍霜害防止には氷核細菌だけでなく、植物由来の氷核形成物質など様々な氷核形成物質に対応できる可能性がある植物抽出物のような複数の化合物を含んでいるものを使用することにも十分利点があると考えられる。

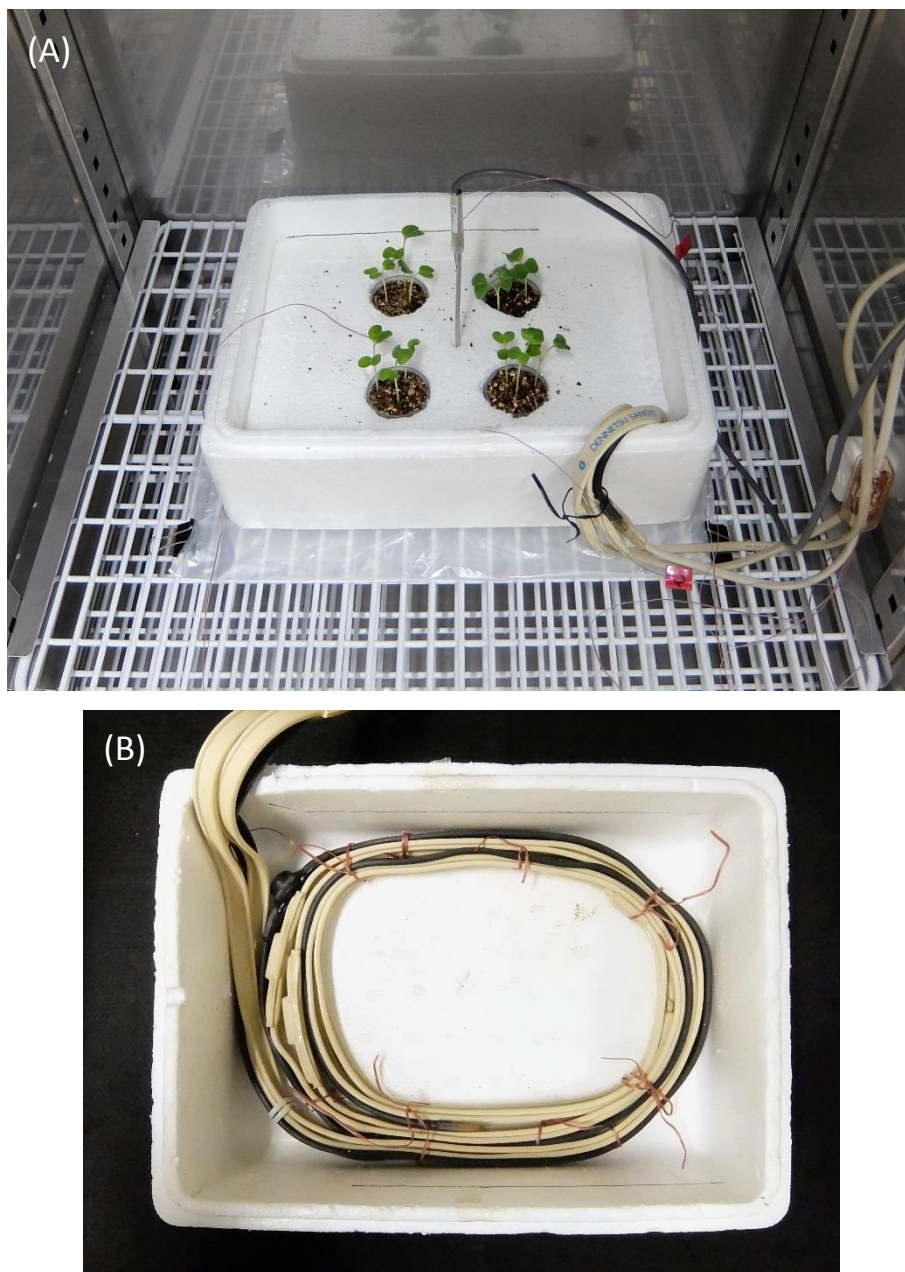


Fig. 3-1. Cooling system of the seedlings in the containers. Effects of the anti-ice nucleation activities of the plant extracts on the seedlings were studied by using programmable freezer (A). The heaters (heating tapes) were placed in the bottom of foamed polystyrene box (30×21 cm) to prevent soil from being frozen in the cooling process (B).

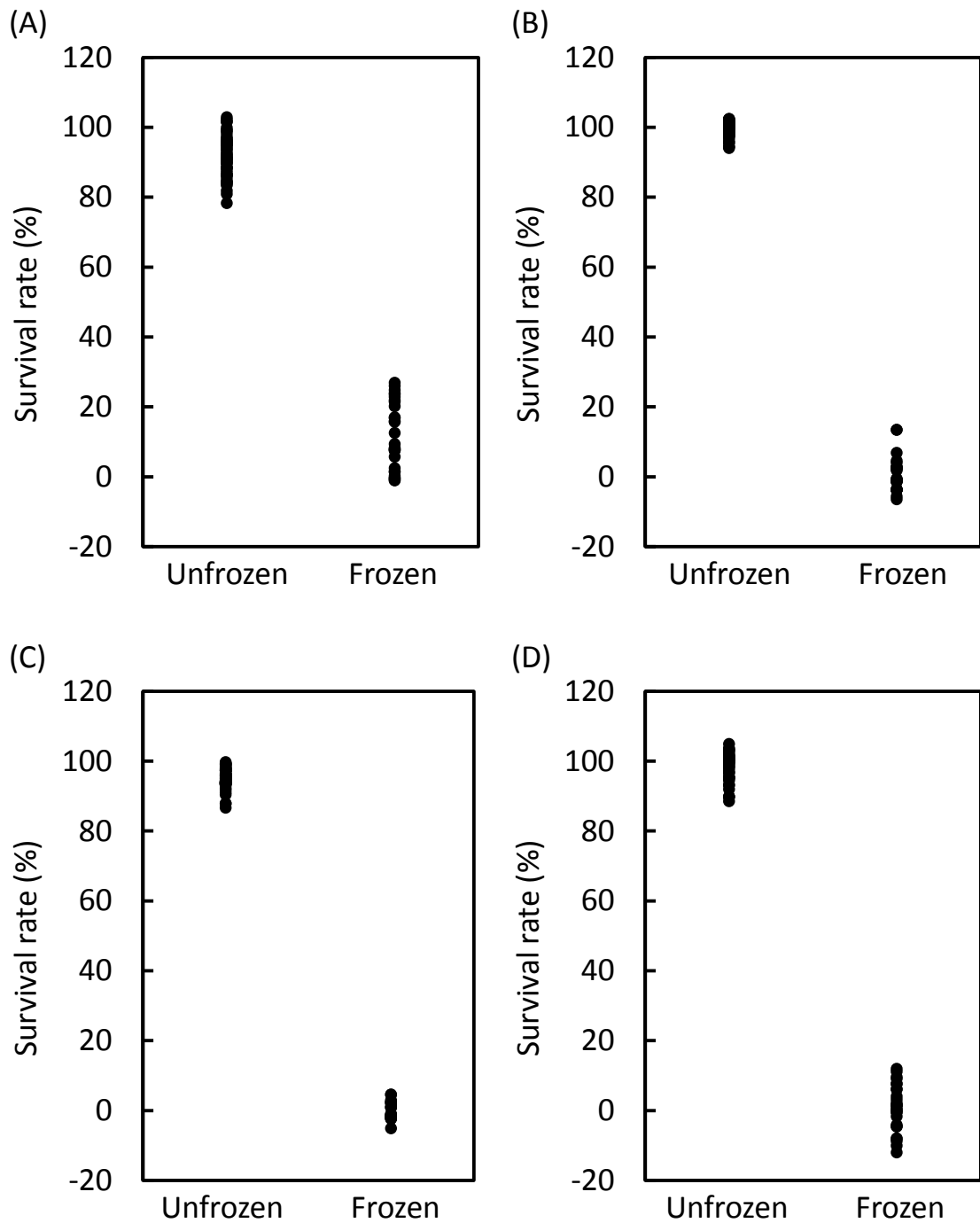


Fig. 3-2. Survival rates of unfrozen and frozen leaf segments after leaf disk freezing assay. Survival rate of leaf segments after leaf disk freezing assay was measured by electrolyte leakage method. (A) Mulberry leaf disk [n = 51 (unfrozen), n = 30 (frozen)]. (B) Radish cotyledon [n = 47 (unfrozen), n = 30 (frozen)]. (C) Maize leaf disk [n = 52 (unfrozen), n = 28 (frozen)]. (D) Tea leaf disk [n = 42 (unfrozen), n = 28 (frozen)].

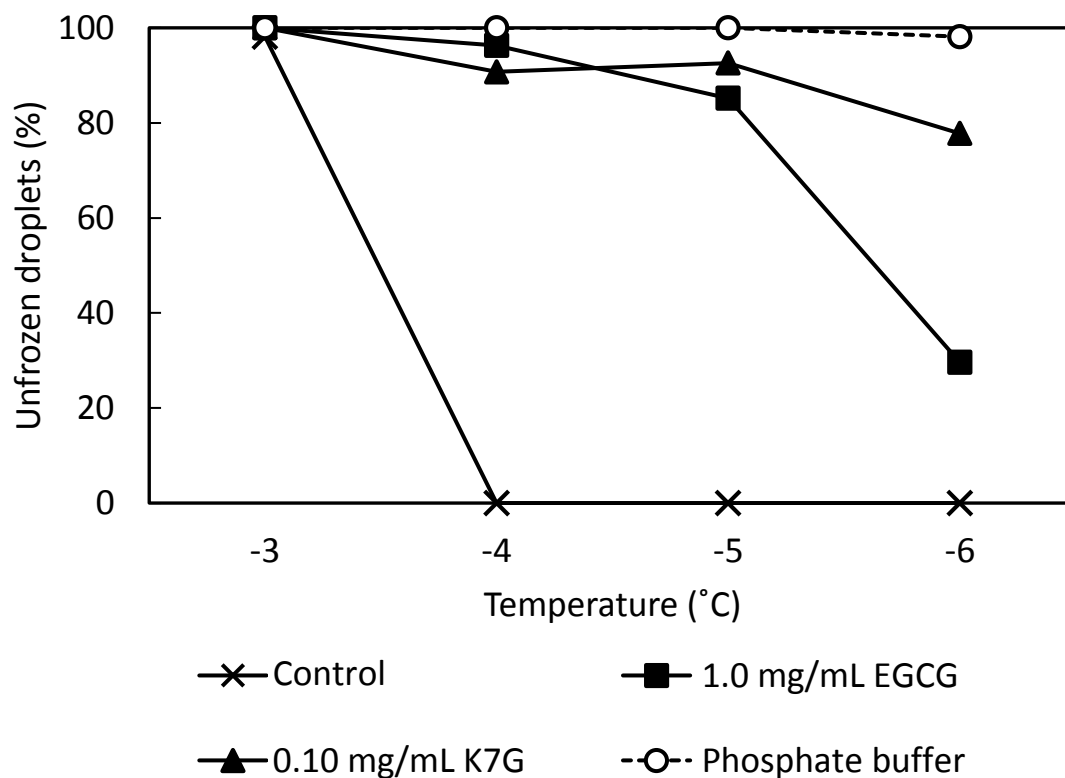


Fig. 3-3A. Freezing curves of aqueous droplets with anti-ice nucleation polyphenols on the bottom surface of polystyrene dishes. Sample droplets on polystyrene dishes were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and polyphenols ("1.0 mg/mL EGCG" or "0.10 mg/mL K7G"). Control droplets (10 μ L) contained phosphate buffer in the presence ("Control") or absence ("Phosphate buffer") of 1.0 mg/mL *E. ananas*. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the mean value of unfrozen droplets was calculated.

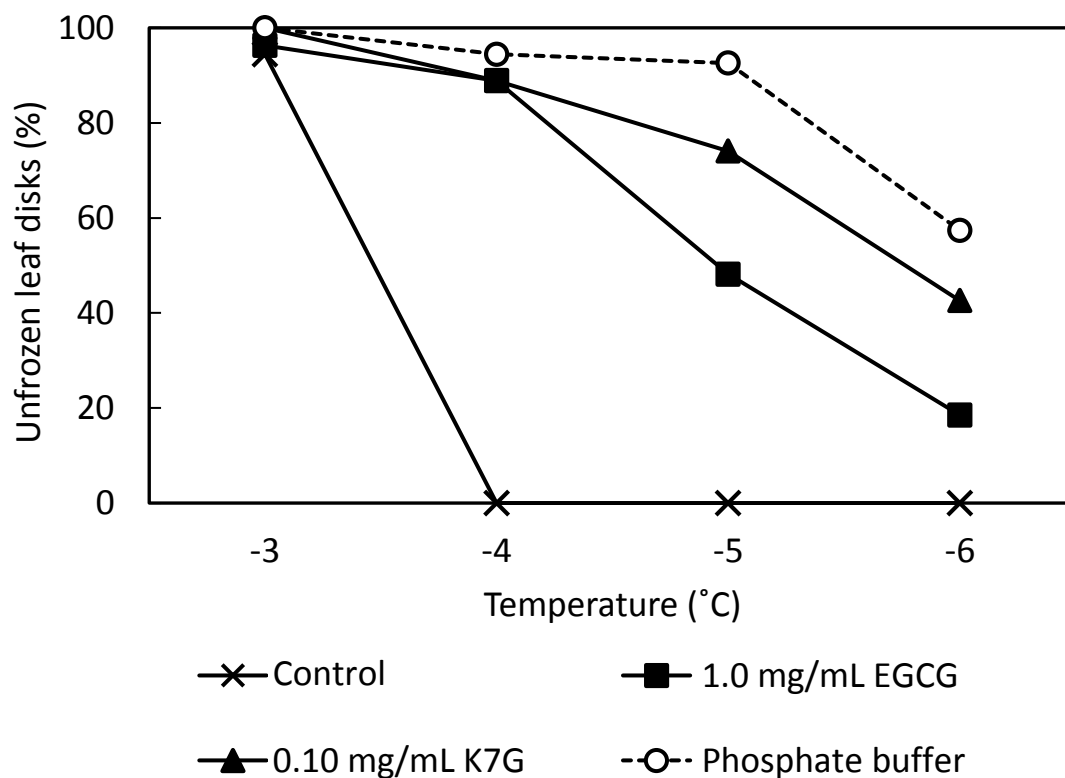


Fig. 3-3B. Freezing curves of aqueous droplets with anti-ice nucleation polyphenols on mulberry leaf disks. Sample droplets on polystyrene dishes were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and polyphenols ("1.0 mg/mL EGCG" or "0.10 mg/mL K7G"). Control droplets (10 μ L) contained phosphate buffer in the presence ("Control") or absence ("Phosphate buffer") of 1.0 mg/mL *E. ananas*. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the mean value of unfrozen leaf disks was calculated.

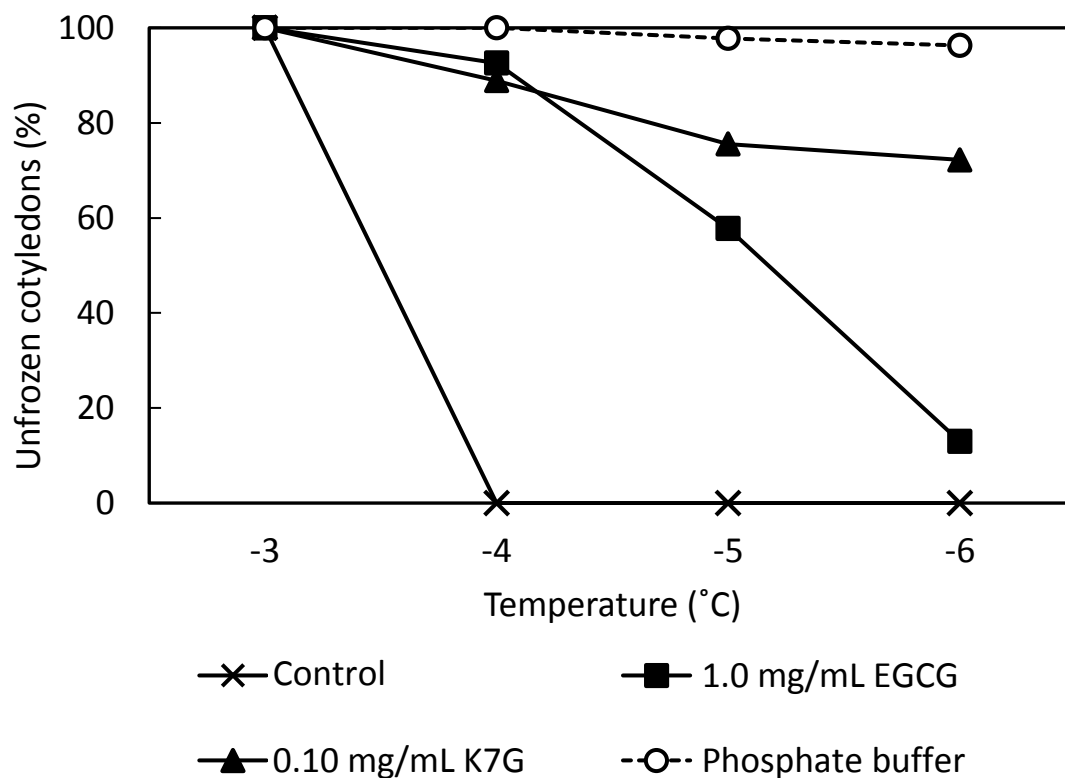


Fig. 3-3C. Freezing curves of aqueous droplets with anti-ice nucleation polyphenols on radish cotyledons. Sample droplets on polystyrene dishes were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and polyphenols ("1.0 mg/mL EGCG" or "0.10 mg/mL K7G"). Control droplets (10 μ L) contained phosphate buffer in the presence ("Control") or absence ("Phosphate buffer") of 1.0 mg/mL *E. ananas*. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the mean value of unfrozen cotyledons was calculated.

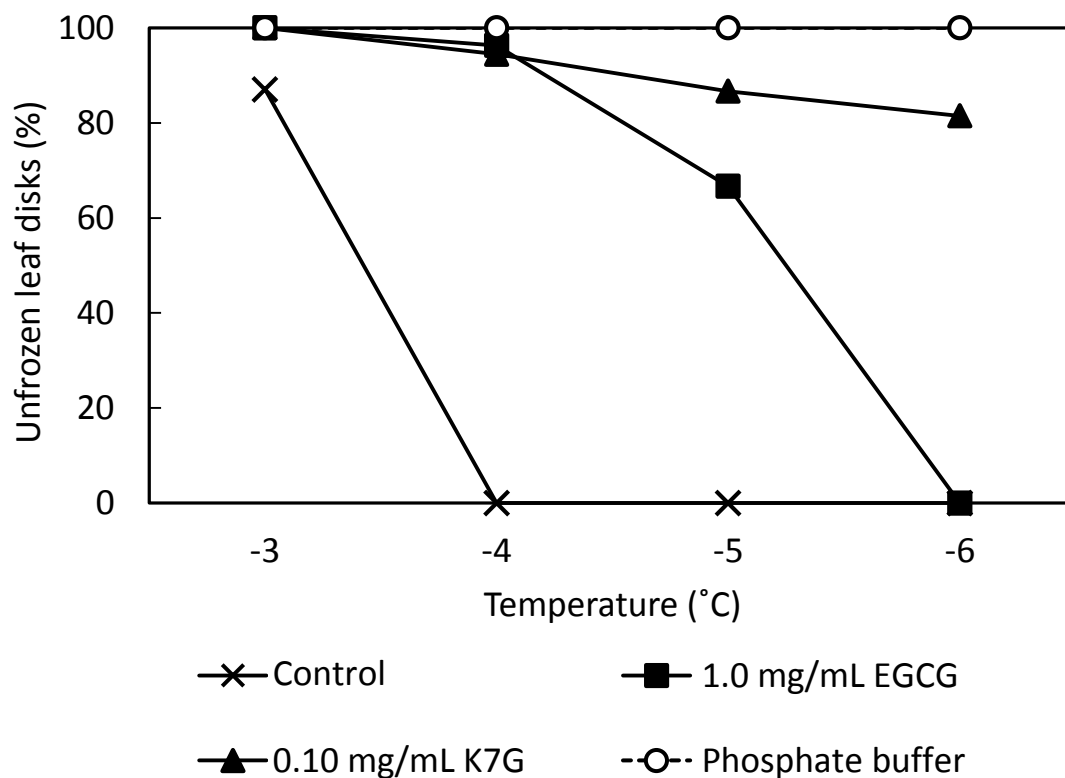


Fig. 3-3D. Freezing curves of aqueous droplets with anti-ice nucleation polyphenols on maize leaf disks. Sample droplets on polystyrene dishes were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and polyphenols ("1.0 mg/mL EGCG" or "0.10 mg/mL K7G"). Control droplets (10 μ L) contained phosphate buffer in the presence ("Control") or absence ("Phosphate buffer") of 1.0 mg/mL *E. ananas*. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the mean value of unfrozen leaf disks was calculated.

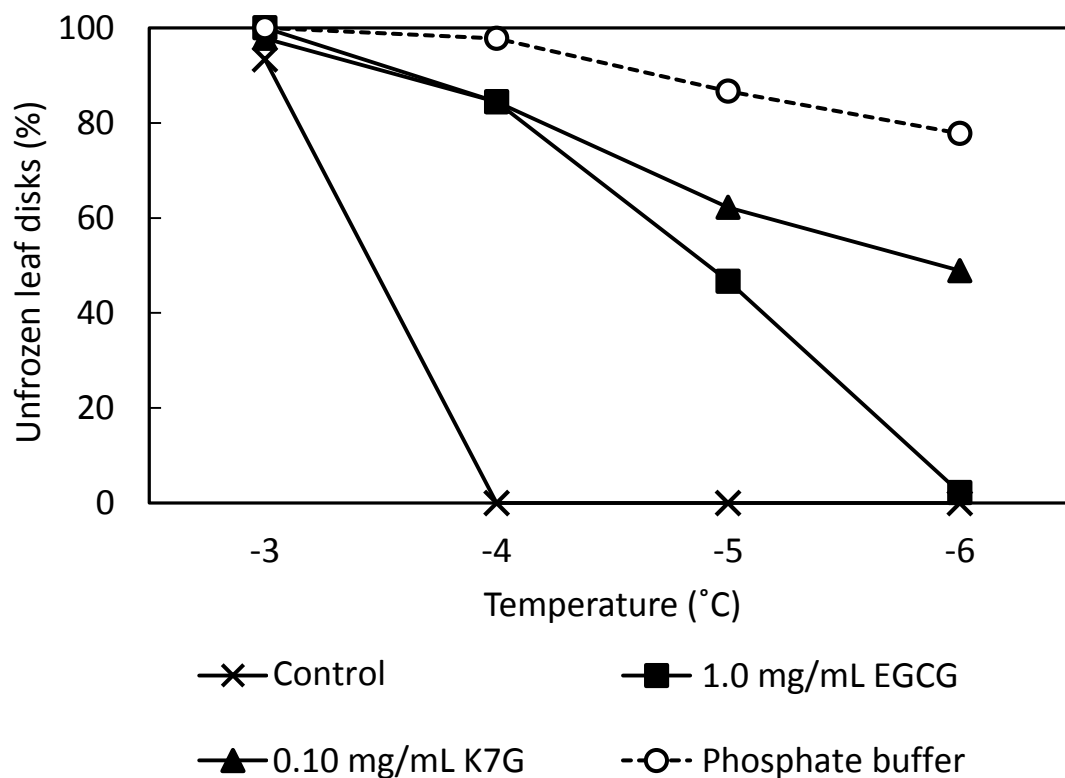


Fig. 3-3E. Freezing curves of aqueous droplets with anti-ice nucleation polyphenols on tea leaf disks. Sample droplets on polystyrene dishes were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and polyphenols ("1.0 mg/mL EGCG" or "0.10 mg/mL K7G"). Control droplets (10 μ L) contained phosphate buffer in the presence ("Control") or absence ("Phosphate buffer") of 1.0 mg/mL *E. ananas*. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the mean value of unfrozen leaf disks was calculated.

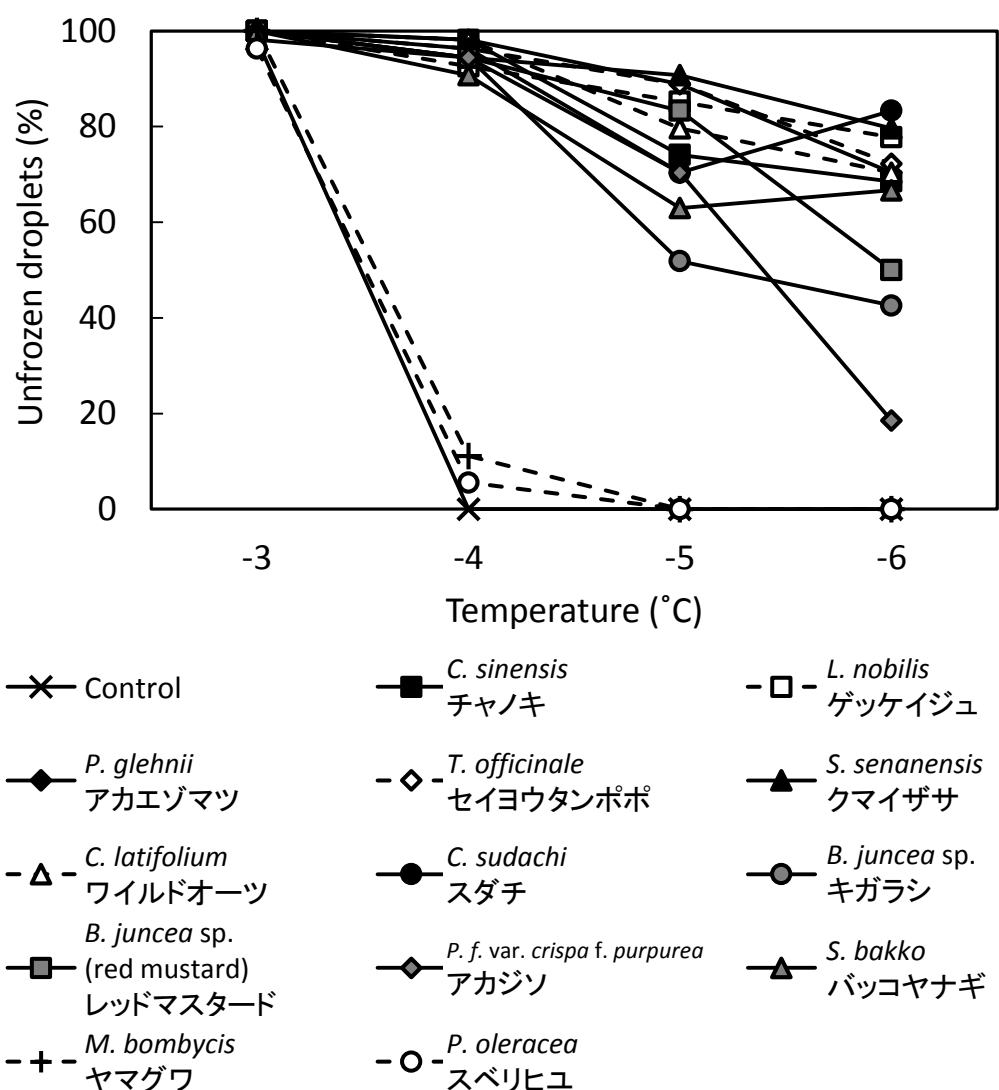


Fig. 3-4A. Anti-ice nucleation effects of leaf extracts on cooling of aqueous droplets on the bottom surface of polystyrene dishes at subzero temperatures. Sample droplets on polystyrene dishes were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and 0.10 g FW/mL leaf extracts. Control droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas* and phosphate buffer. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the percentage of unfrozen droplets was calculated.

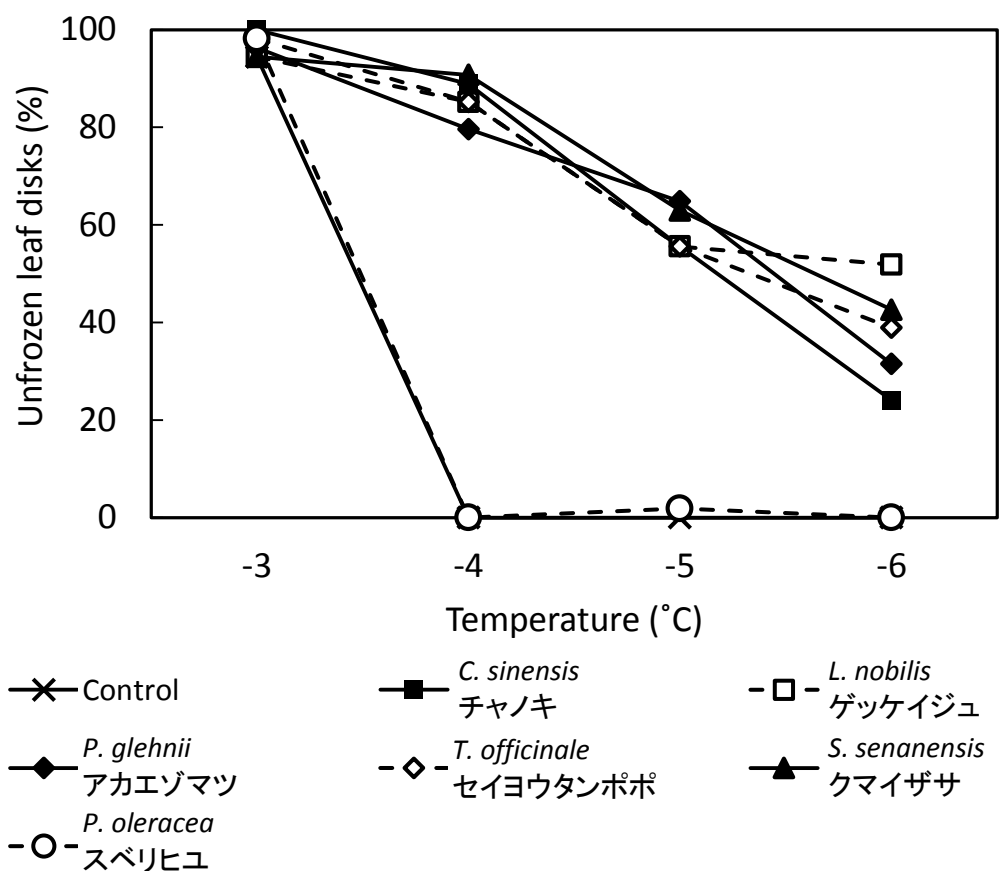


Fig. 3-4B. Anti-ice nucleation effects of leaf extracts on cooling of aqueous droplets on mulberry leaf disks at subzero temperatures. Sample droplets on mulberry leaf disks were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and 0.10 g FW/mL leaf extracts. Control droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas* and phosphate buffer. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the percentage of unfrozen leaf disks was calculated.

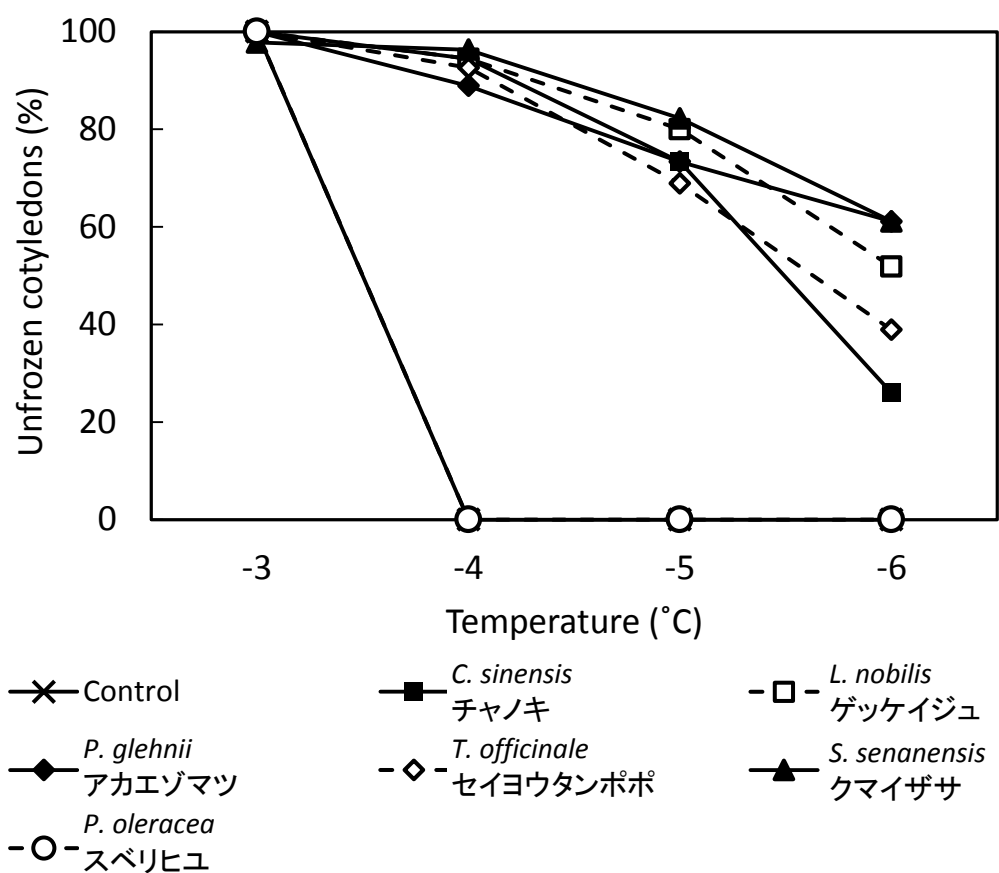


Fig. 3-4C. Anti-ice nucleation effects of leaf extracts on cooling of aqueous droplets on radish cotyledons at subzero temperatures. Sample droplets on radish cotyledons were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and 0.10 g FW/mL leaf extracts. Control droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas* and phosphate buffer. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the percentage of unfrozen cotyledons was calculated.

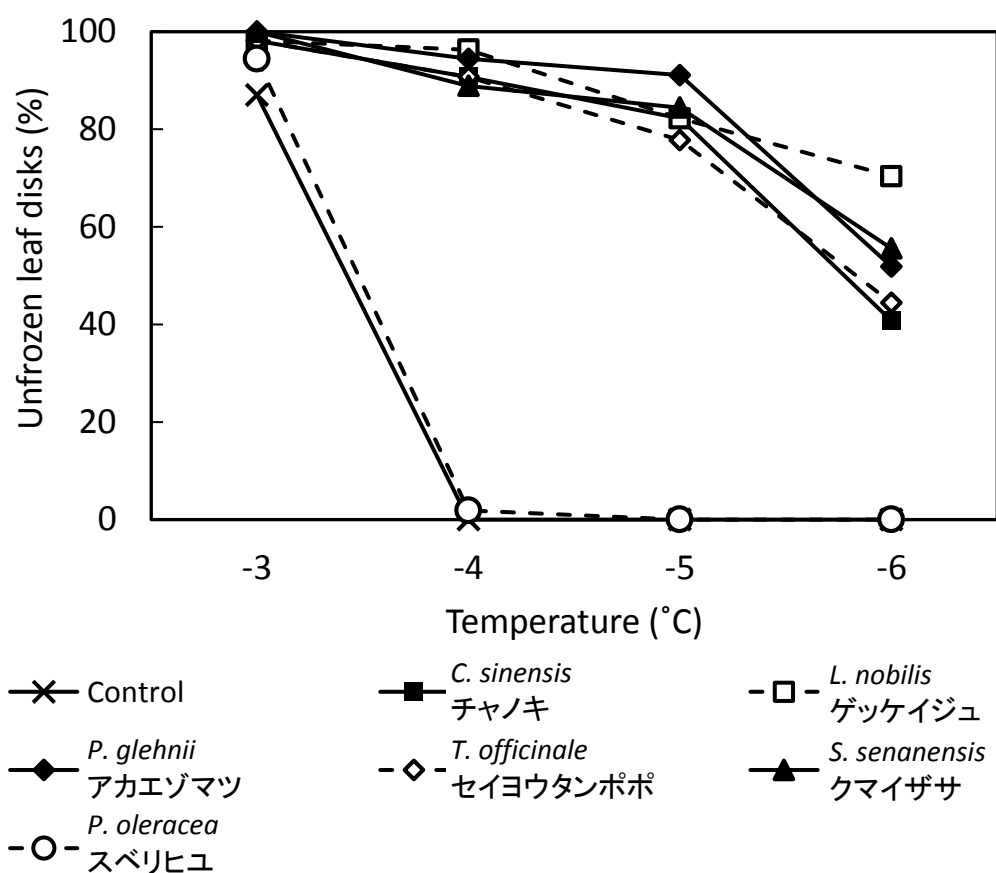


Fig. 3-4D. Anti-ice nucleation effects of leaf extracts on cooling of aqueous droplets on maize leaf disks at subzero temperatures. Sample droplets on maize leaf disks were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and 0.10 g FW/mL leaf extracts. Control droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas* and phosphate buffer. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the percentage of unfrozen leaf disks was calculated.

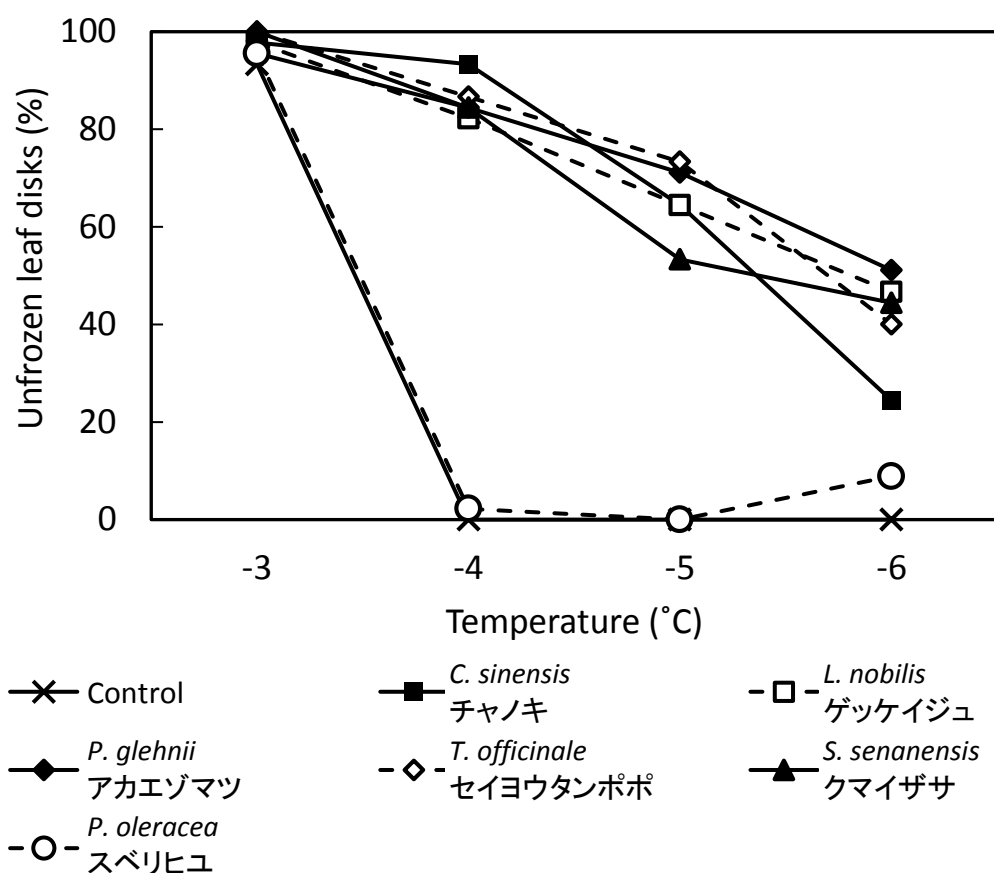


Fig. 3-4E. Anti-ice nucleation effects of leaf extracts on cooling of aqueous droplets on tea leaf disks at subzero temperatures. Sample droplets on tea leaf disks were cooled at a rate of 0.2 °C/min to designated temperature and kept at the temperature for 3 hours. Number of frozen samples were counted after cooling. Sample droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas*, phosphate buffer and 0.10 g FW/mL leaf extracts. Control droplets (10 μ L) contained 1.0 mg/mL *E. ananas* and phosphate buffer. The assay was repeated at least five times at each temperature, and the percentage of unfrozen leaf disks was calculated.

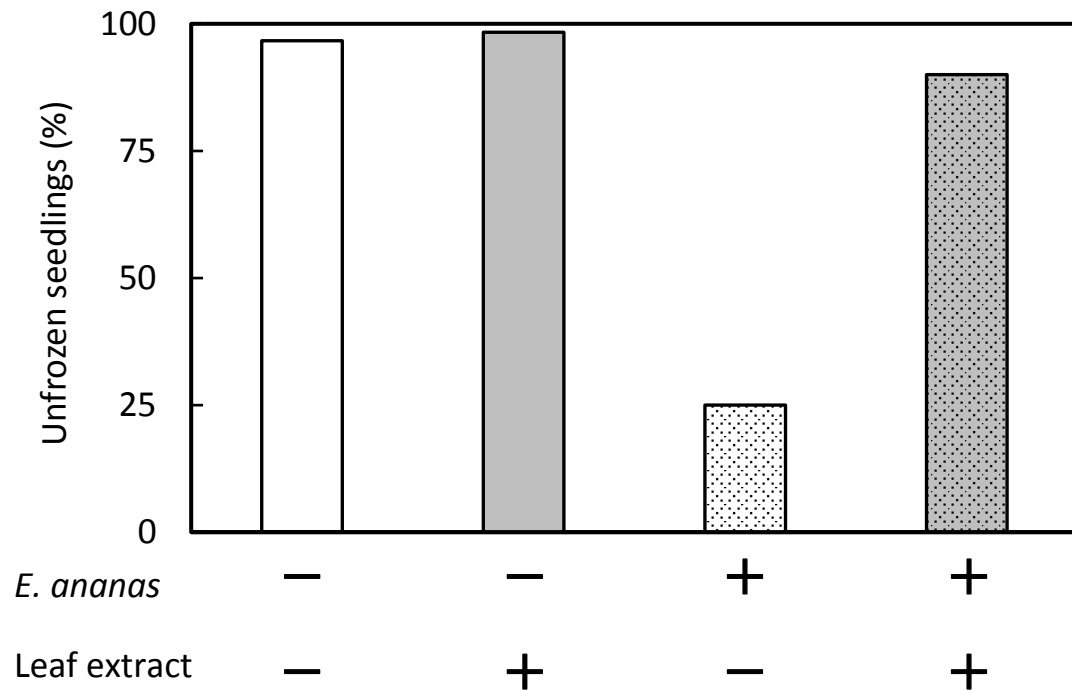


Fig. 3-5A. Anti-ice nucleation effect of *S. senanensis* leaf blade extract on cooling of aqueous droplets on radish seedlings. After radish seedlings with (+) or without (–) application of *E. ananas* (2 µg) on surface of cotyledons were sprayed with (+) or without (–) the extracts of *S. senanensis* leaf blade (0.10 g FW/mL), the seedlings were cooled at –3°C for 3 hours and the percentage of unfrozen seedlings was calculated. The assay was repeated twenty times, and three individuals were used at once (n = 60).

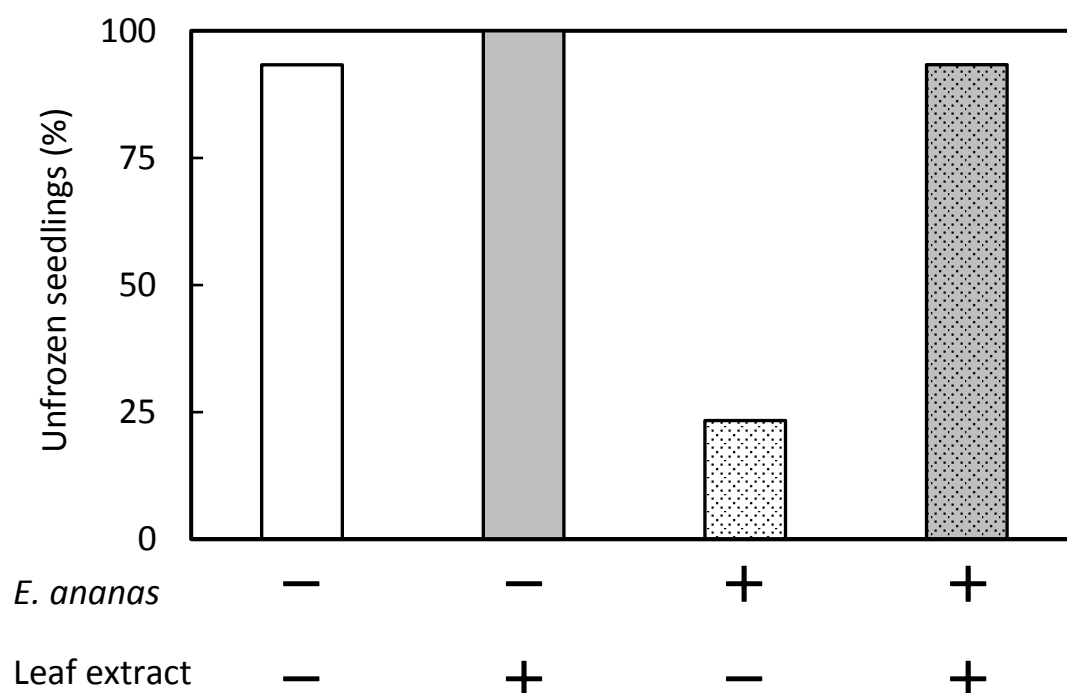


Fig. 3-5B. Anti-ice nucleation effect of *S. senanensis* leaf blade extract on cooling of aqueous droplets on radish seedlings. After radish seedlings with (+) or without (-) application of *E. ananas* (2 μ g) on surface of cotyledons were sprayed with (+) or without (-) the extracts of *S. senanensis* leaf blade (0.10 g FW/mL), the seedlings were cooled at -3°C for 16 hours and the percentage of unfrozen seedlings was calculated. The assay was repeated twenty times, and three individuals were used at once (n = 60).

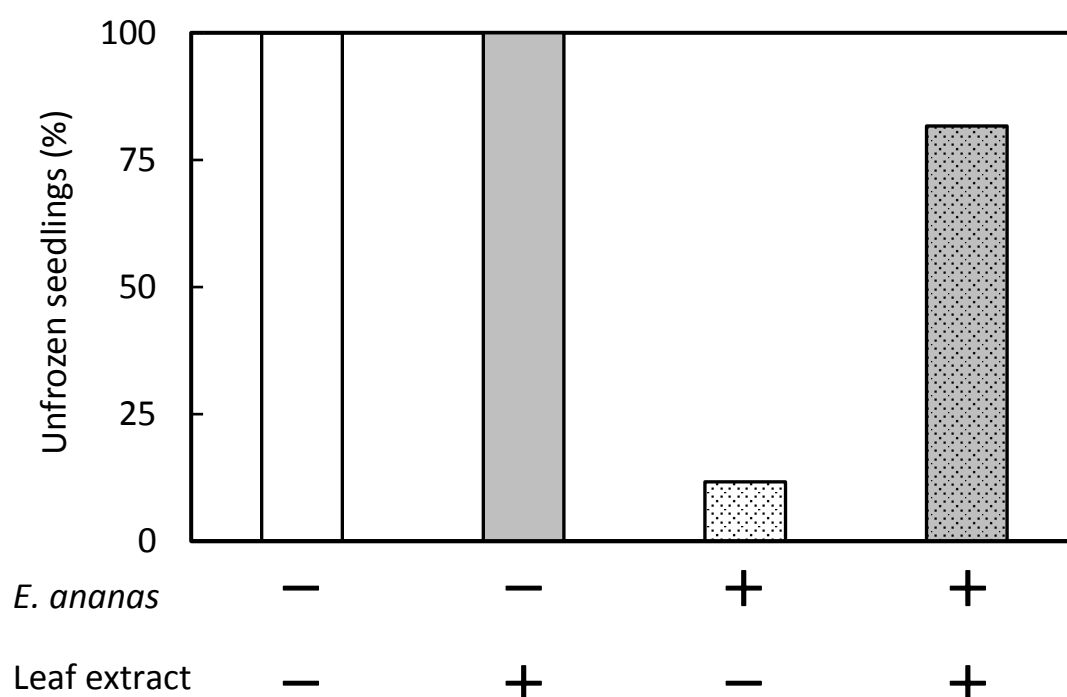


Fig. 3-5C. Anti-ice nucleation effect of *S. senanensis* leaf blade extract on cooling of aqueous droplets on radish seedlings. After radish seedlings with (+) or without (–) application of *E. ananas* (2 µg) on surface of cotyledons were sprayed with (+) or without (–) the extracts of *S. senanensis* leaf blade (0.10 g FW/mL), the seedlings were cooled at –4°C for 3 hours and the percentage of unfrozen seedlings was calculated. The assay was repeated twenty times, and three individuals were used at once (n = 60).

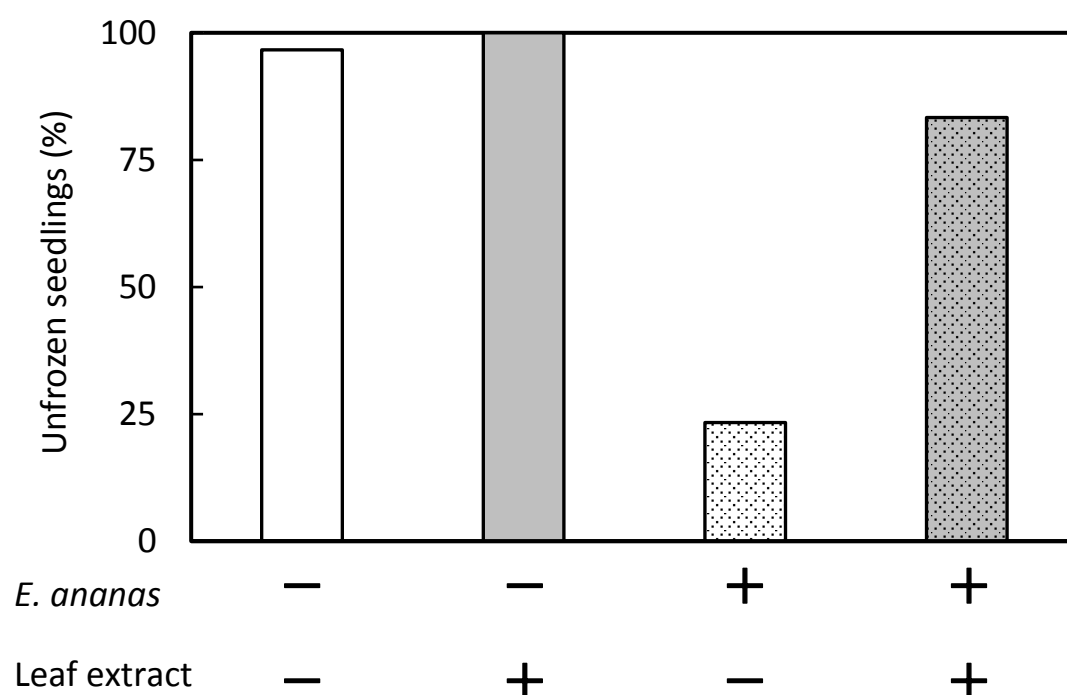


Fig. 3-5D. Anti-ice nucleation effect of *S. senanensis* leaf blade extract on cooling of aqueous droplets on radish seedlings. After radish seedlings with (+) or without (-) application of *E. ananas* (2 μ g) on surface of cotyledons were sprayed with (+) or without (-) the extracts of *S. senanensis* leaf blade (0.10 g FW/mL), the seedlings were cooled at -4°C for 16 hours and the percentage of unfrozen seedlings was calculated. The assay was repeated twenty times, and three individuals were used at once (n = 60).

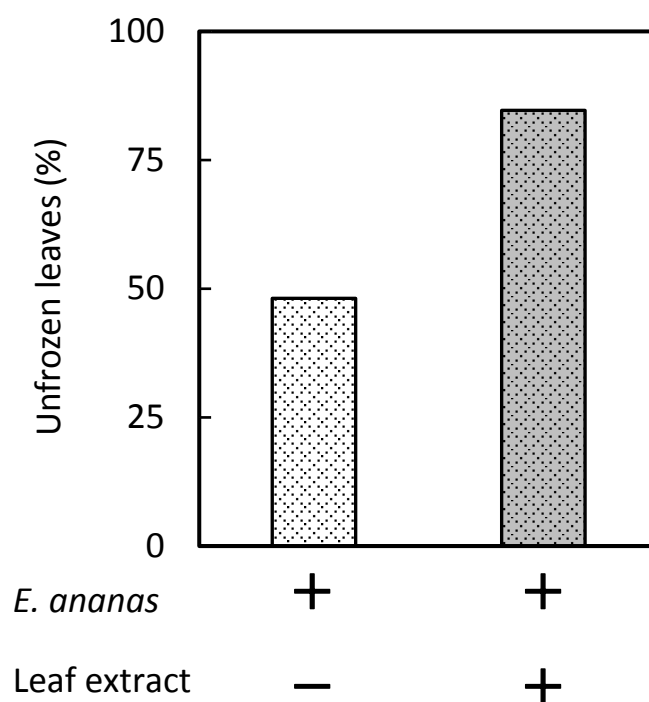


Fig. 3-6. Anti-ice nucleation effect of *S. senanensis* leaf blade extract on cooling of aqueous droplets on tea seedlings. After radish seedlings with (+) application of *E. ananas* (2 μ g) on surface of cotyledons were sprayed with (+) or without (-) the extracts of *S. senanensis* leaf blade (0.10 g FW/mL), the seedlings were cooled at -3°C for 3 hours and the percentage of unfrozen seedlings was calculated. The assay was repeated five times, and 249 and 246 leaves in total were used in samples with (+) and without (-) leaf extracts, respectively.

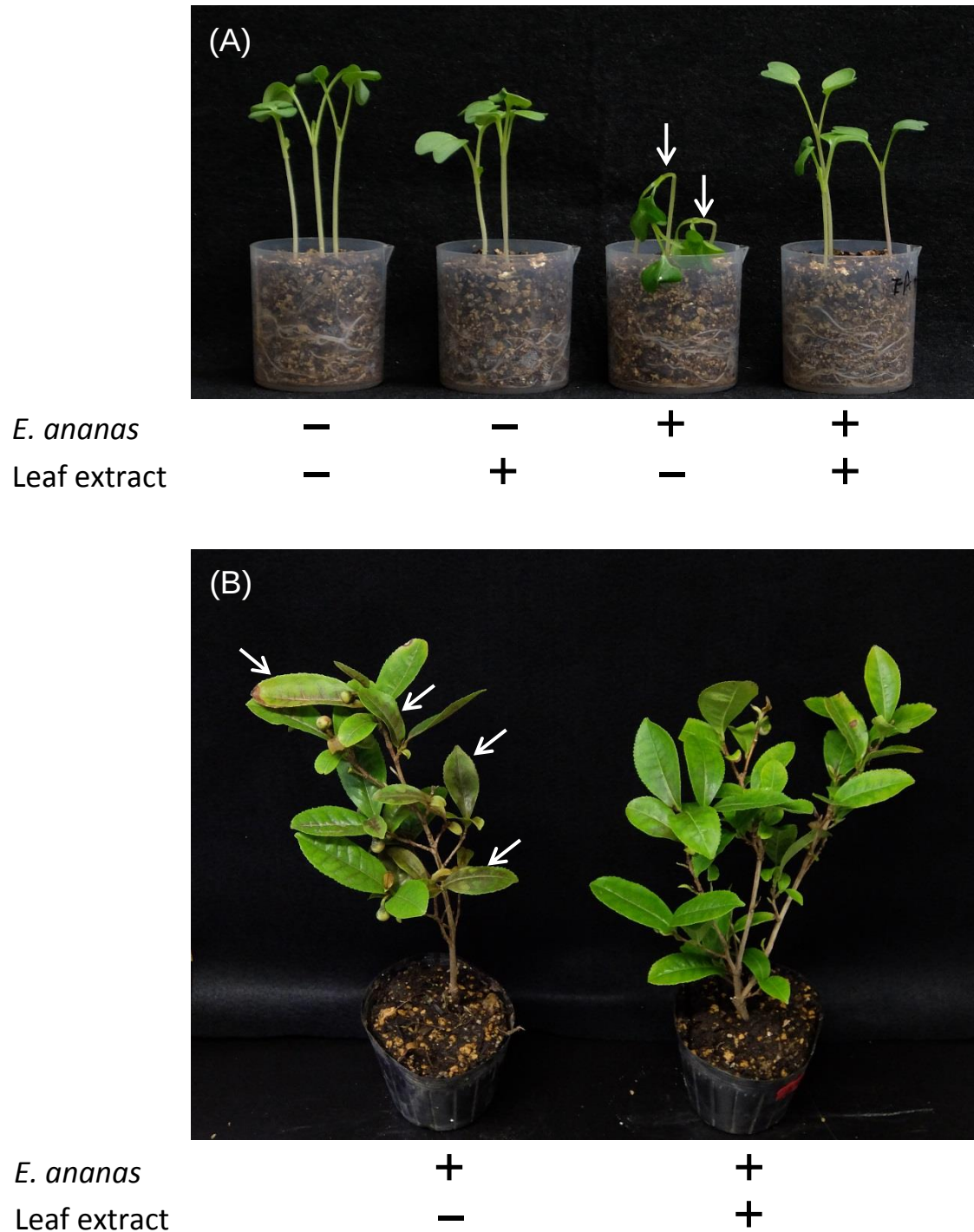


Fig. 3-7. Seedlings in the regrowth period after freezing. After seedlings with (+) or without (-) application of *E. ananas* (2 μ g) on surface of leaves were sprayed with (+) or without (-) the extract of *S. senanensis* leaf blade (0.10 g FW/mL), the seedlings were cooled at -3°C for 3 hours. (A) Radish seedlings just after thawing. (B) Tea seedling regrown for 2 days at room temperature. Arrows indicate damaged tissues.

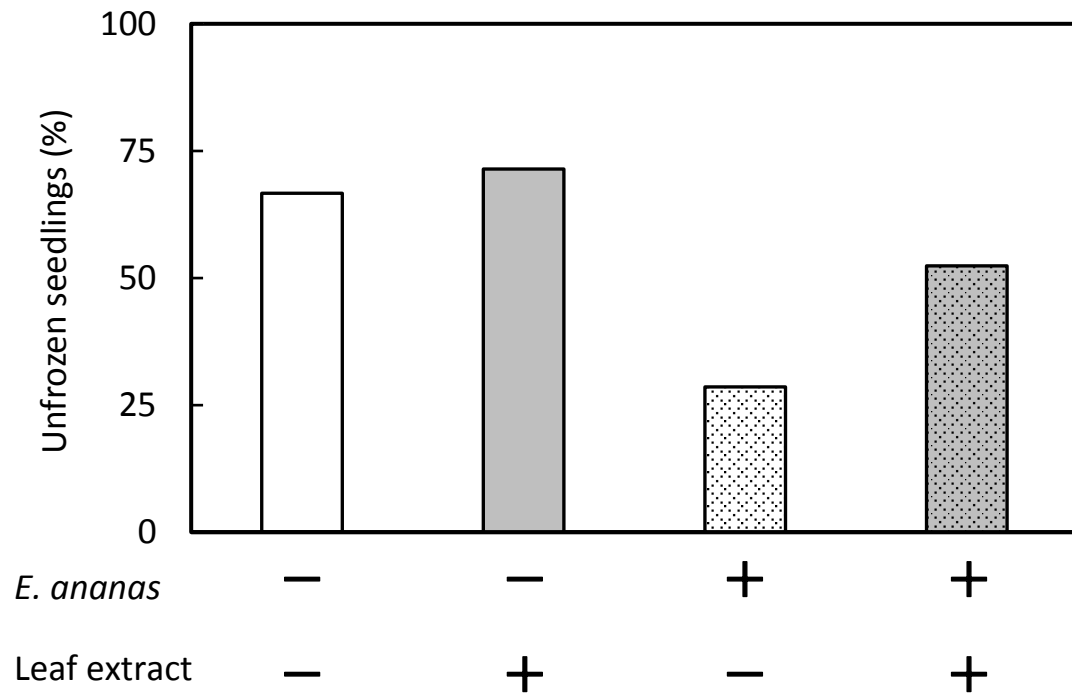


Fig. 3-8. Effect of the soil heater preventing soil freezing. After radish seedlings with (+) or without (-) application of *E. ananas* (2 μ g) on surface of cotyledons were sprayed with (+) or without (-) the extracts of *S. senanensis* leaf blade (0.10 g FW/mL), the seedlings were cooled at -4°C for 3 hours and the percentage of unfrozen seedlings was calculated. In this assay, the soil heater preventing soil freezing was not used to confirm the effect of soil freezing on plant freezing. The assay was repeated seven times, and three individuals were used at once ($n = 21$).

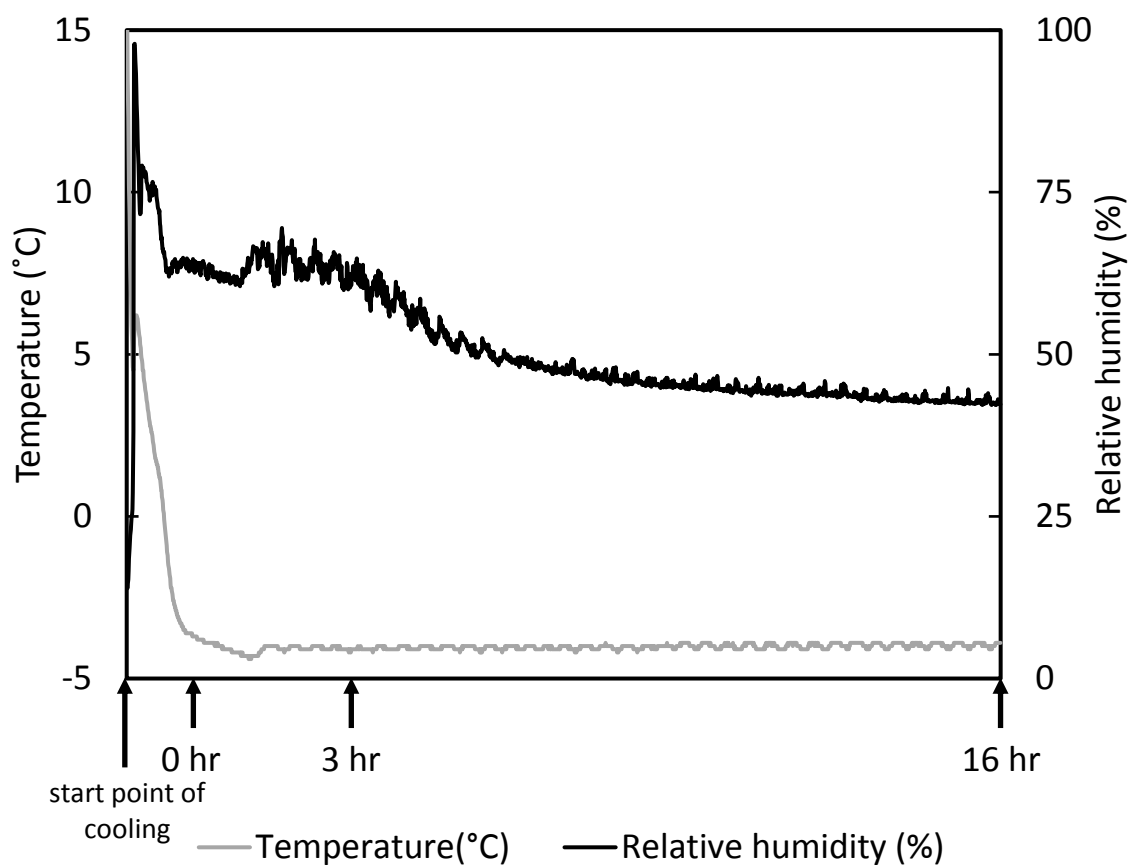


Fig. 3-9. Temporal change of the temperature and relative humidity of -4°C freezing assay using radish seedlings. The temperature (gray line) and relative humidity (solid line) were measured at leaf surface height.

第4章 クマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害物質の分離

4.1 緒言

第2章では、70以上の植物の葉組織から調製した抽出物の試料溶液を用い、氷核細菌共存下での氷核形成阻害活性を指標にスクリーニングすることによって、試料溶液の凍結温度を約2~3°C低下させる活性を有する植物が十数種も見出された。また、これまで報告されてきた研究では、樹木のカツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) の木部組織からはフラボノール配糖体(Kasuga et al. 2008)や加水分解性タンニン(Wang et al. 2012)が、香辛料からはフェニルプロパノイド類(オイゲノール)(Kawahara and Obata 1996)が、タイワンヒノキ (*Chamaecyparis taiwanensis*) からはテルペン類(ヒノキチオール)(Kawahara et al. 2000)が、氷核細菌存在下で氷核形成阻害活性を示す化合物としてそれぞれ分離・同定されている。植物由来以外では、細菌由来の多糖類やタンパク質、魚類由来の不凍タンパク質、合成高分子などが報告されている(Kawahara et al. 1996; Duman 2002; Wowk and Fahy 2002; Yamashita et al. 2002; Holt 2003; Inada et al. 2017)。第2章において、氷核形成阻害活性を検出した抽出物はいずれも抽出操作で50%アセトン水溶液を使用している。そのため、これらの抽出物中に回収される化合物の中には植物由来の多糖類やタンパク質の混入はほとんどないと考えられる。おそらく、既報で見出されているものと同様に、フラボノイド類やタンニン類、フェニルプロパノイド類、テルペン類などのように比較的高極性の有機溶媒に溶解しやすく水にも溶解するような物質によって氷核形成阻害活性が検出された可能性が考えられる。

そこで本章では、今までに調べられていない材料で、かつ抽出物での氷核形成阻害活性が比較的高いものを実験材料に用いて活性物質を分離・同定することを計画した。なかでもクマイザサは、国内の森林林床に多量に蓄積するバイオマス資源の一つとして知られており、食料ではないため利用可能な資源が多いと考えられる。クマイザサ抽出物の氷核形成阻害活性を凍霜害防止へ利用する効果の有無を調べるだけであれば、その活性成分に関する研究は必ずしも必要ではないかもしれない。しかし、その抽出物に含まれる活性成分の特定は学術的にも応用研究的にも興味深いものである。活性成分を同定してその活性の特性を明らかにできれば、今後の研究に有益な指針を提供できるはずである。例えば、もしも今までに検証したことのないポリフェノールであれば、その結果は構造と活性の相関の考察に利用できる。また、それが非常に効果的な成分であれば、その成分を指標にして植物資源をスクリーニングすることも可能であるし、農作物の凍霜害防止だけでなく、食品などの凍結防止などへ利用するための選択肢を増やすことができるかもしれない。そのため、時間のある限り、クマイザサ葉身抽出物に含まれている氷核形成阻害物質の分離・同定を試みた。

4.2 試料および方法

4.2.1 クマイザサ葉身抽出物中の氷核形成阻害活性を有する化合物の分画

2016 年 8 月に採取したクマイザサ葉身 100 g (生鮮重量) を液体窒素中で数 mm 四方以下に破碎し、試料の 5 倍量 500 mL のメタノールを加えてよく攪拌し、適宜攪拌しながら一晩静置した。その後セライトろ過を行い、ろ液を 30°C でロータリーエバポレーターを使用して乾固した。回収した溶媒を一度抽出済みのクマイザサ葉身粉末に入れて再度抽出、ろ過、乾固の操作を行った。2 回の抽出で得られた抽出物をあわせて、これを固相/液相分配で分画した。抽出物に対して 10 倍量の *n*-ヘキサン/酢酸エチル=2/1 を加えて攪拌した後、上清を回収する操作を 2 回繰り返した。次に、この沈殿に酢酸エチルを用いて同様に抽出を行なって上清を回収した後、最後にメタノールを使用して抽出を行って上清を回収した。

次に、それぞれ得られた上清画分を用いて氷核形成阻害活性を測定し、活性の高かった画分を順相カラムクロマトグラフィー (担体: Wakosil C-200, 和光純薬工業) に供して分画した。溶離液として最初にクロロホルム/メタノール= 4/1 を用いて溶出した後、カラム容量と等倍量のメタノールを用いてさらに物質を溶出させた。なお、この条件で溶出されてくる物質はフラボノール配糖体と予想されるため、氷核形成阻害活性をもつ quercetin 3-*O*-β-glucoside と kaempferol 7-*O*-β-glucoside を標品として薄層クロマトグラフィー (プレート: シリカゲル 60 F₂₅₄, Merck) にかき、そこでの移動度を参考にして溶離液の組成を決定した。

順相カラムクロマトグラフィーでは約 50 mL ずつ分取した後、その一部を用いて薄層クロマトグラフィー (溶離液: クロロホルム/メタノール=3/1) に供して各画分の成分を確認した。上記で用いた 2 種類のフラボノール配糖体の移動度よりも大きい移動度を示した画分 (Fraction a)、同程度の移動度を示した画分 (Fraction b)、それ以下の移動度を示した画分 (メタノール溶出画分を含む) (Fraction c) の 3 つに分画した。

その後、さらに氷核形成阻害活性の高かった画分をサイズ排除クロマトグラフィー [担体: Sephadex LH-20, GE healthcare (φ10×250 mm)] に供して分画を行った。溶離液にはメタノール/水=40/60 を用い、流速 1.0 mL/min で分離を行なった。それぞれ 2.5 mL ずつ分取し、350 nm における吸光度が十分に下がるまで分取を続けた。分取が終了した後、各画分について分光光度計 (ultrospec 3300pro, Amersham Biosciences) を用いて 200~500 nm の吸収スペクトルを測定し、330~350 nm に吸収ピークがみられた画分 (Fraction III) (20 mL)、その前後の画分 (Fraction II および IV) (各 12.5 mL)、これら以外の画分 (Fraction I および V) (37.5 mL と 92.5 mL) の計 5 つの画分にわけることにした。

そして、これらの中から氷核形成阻害活性の高かった画分を逆相 HPLC [カラム：Wakopak Wakosil-II 5C18 HG (φ4.6×250 mm) (和光純薬)] に供して分画を行なった。ここではフォトダイオードアレイ検出器 (L-7455, 日立ハイテクノロジーズ) で 200～500 nm の吸収スペクトルを測定しながら、分析および分画をした。流速は 0.75 mL/min とし、溶離液には、0～30 分はメタノール/水=40/60 を、30～40 分はメタノール/水=40/60 からメタノール/水=100/0 への直線濃度勾配を、40～45 分はメタノール/水=100/0 を、45～50 分はメタノール/水=40/60 をそれぞれ用い、溶出してきたピークごとに分取した。得られたピーク画分の中から氷核形成阻害活性が検出されたものを質量分析 (ESI-MS) (Exactive, Thermo Scientific) に供して分子量を測定し、文献情報を参照してその構造を推定した。

氷核形成阻害活性は 2.2.5 のドロップレット凍結法により測定し、使用した氷核形成物質は氷核細菌 *E. ananas*、抽出物や分画した画分の濃度は 0.1 g FW/mL として 2.2.5 とすべて同じ条件となるように換算して測定結果をまとめた。

4.2.2 フラボノイド配糖体の氷核形成阻害活性の測定

購入して氷核形成阻害活性を測定した以下の 6 種類のフラボノイド配糖体は今までに多くの種類の活性が測定されてきたフラボノール配糖体とは異なる構造 (アグリコン) を持つことで活性に影響が生じるかどうかを検証するために選択した。luteolin 7-*O*-β-glucoside (1126S, EXTRASYNTHESE)、luteolin 6-*C*-β-glucoside (02187, SIGMA-ALDRICH)、daidzein 7-*O*-β-glucoside (1371S, EXTRASYNTHESE)、daidzein 8-*C*-β-glucoside (P1886, 東京化成工業)、naringenin 7-*O*-β-neohesperidoside hydrate (N0073, 東京化成工業)、hesperetin 3-*O*-β-rutinoside (H0049, 東京化成工業) を購入し (Table 4-1)、ドロップレット凍結法により氷核細菌 *E. ananas* に対する氷核形成阻害活性を測定した。フラボノイド配糖体の濃度は終濃度 1.0 mg/mL [0.10%(w/v)] とし、2.2.5 のドロップレット凍結法と同じ条件で氷核形成阻害活性を測定して既報のフラボノイドとの構造と活性 (Table 4-1, Fig. 4-1) の有無を比較した。luteolin 7-*O*-β-glucoside のみ終濃度 0.10、0.010 mg/mL でも氷核形成阻害活性の測定を行った。

4.3 結果

4.3.1 クマイザサ葉身抽出物の分画および画分の氷核形成阻害活性

夏季のクマイザサ葉身 100 g を 5 倍量のメタノールで抽出すると、4.01 g の抽出物が得られた。その氷核形成阻害活性は 3.6°C であった（氷核細菌濃度 2.0 mg/mL、抽出物濃度 0.10 g FW/mL としてドロップレット凍結法で測定）。この抽出物を固相／液相抽出によって分画した。10 倍量のヘキサン／酢酸エチル=2/1 で 2 回抽出操作を行ったところ、0.79 g のヘキサン－酢酸エチル可溶性画分を得て、その氷核形成阻害活性は 0.4°C であった。次にヘキサン／酢酸エチル=2/1 に不溶である画分を酢酸エチルで抽出したところ、0.03 g の酢酸エチル可溶性画分を得て、活性は 0.0°C であった。続いて、酢酸エチルにも不溶である画分をメタノールで抽出すると、2.66 g のメタノール可溶性画分を得て、その活性は 3.3°C であった。またメタノールにも不溶である画分（メタノール不溶性画分）は 0.30 g であり、その活性は 0.8°C であった（Fig. 4-2）。

氷核形成阻害活性が高かったメタノール可溶性画分を順相シリカゲルクロマトグラフィーで分画を行った。既に氷核形成阻害活性があることが報告されている *quercetin 3-O-β-glucoside* と、*kaempferol 7-O-β-glucoside* (Kasuga et al. 2008) の 2 つのフラボノール配糖体の移動度を参考にして、フラボノール配糖体の移動度付近（Fraction b）とその前後（Fraction a, c）の 3 つの画分に分画した。Fraction a は 0.10 g 得られ、活性は -0.5°C、Fraction b は 0.33 g 得られ、活性は 2.7°C、Fraction c は 0.41 g 得られ、活性は 1.7°C であった（Fig. 4-2）。

続いて、順相カラムクロマトグラフィーの Fraction b の大部分をサイズ排除クロマトグラフィーで分画した。Fraction I～V の活性はそれぞれ 0.1、0.1、1.2、2.9、-0.1°C であった（Fig. 4-2）。

さらに、Fraction IV を逆相 HPLC で分析すると Fig. 4-3 のようなクロマトグラムが得られた。Fraction IV の一部を Fig. 4-3 で示したように Fraction 1～6 に分取して、活性を測定した。Fraction 1～6 の活性は 0.0、-0.1、0.1、2.3、-0.1、0.2°C であった（Fig. 4-2）。ピーク面積が大きかった Fraction 2 および 4 のそれぞれのピークの 200～500 nm における吸収スペクトルを調べると、210 nm と 350 nm 付近で吸光度が大きくなっていた（Fig. 4-4）。Fraction 2 と 4 を ESI-MS に供したところ、どちらも $[M-H]^- = 491.12$ 、 $[M+Na]^+ = 515.12$ の親イオンピークを得た（Fig. 4-5A, 5B）。精密質量分析では Fraction 2 と 4 でそれぞれ $[M-H]^- = 491.12026$ と 491.12057 を得て、 $C_{23}H_{23}O_{12}$ ($M = 491.11950$) との誤差はそれぞれ 1.55、2.18 ppm であった。このことから、Fraction 2 および 6 に含まれる化合物の分子式はどちらも $C_{23}H_{24}O_{12}$ であると予想された。

4.3.2 フラボノイド配糖体の氷核形成阻害活性

氷核形成阻害活性を測定した 6 種類のフラボノイド配糖体のうち、luteolin 7-*O*- β -glucoside のみ、 $3.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ の比較的高い氷核形成阻害活性を有していた。10 分の 1、100 分の 1 濃度の 0.10、0.010 mg/mL においてもそれぞれ 2.6 ± 0.3 、 $2.1 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の活性を有していた (Table 4-1, Fig. 4-7)。他の 5 種類のフラボノイド配糖体の活性は約 0°C で、ほとんど活性を有していなかった (Table 4-1)。

4.4 考察

4.4.1 クマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害活性を有する化合物

Fraction 2 および 4 のそれぞれのピークの 200～500 nm における吸収スペクトルは 210 nm と 350 nm 付近で吸光度が大きくなっており (Fig. 4-5)、典型的なフラボノイドの吸光曲線であると思われた。質量分析により分子式はどちらも $C_{23}H_{24}O_{12}$ であると予想されたことから、フラボノイドのアグリコン部分に単糖が 1 つ結合しているものであると考えられた。クマイザサに含まれるフラボノイド配糖体には luteolin 6-*C*- α -arabinoside、luteolin 7-*O*- β -glucoside、luteolin 6-*C*- β -glucoside、tricin 7-*O*-hexoside、apigenin 6-*C*-dipentose が報告されている(松田ら 2008; Matsuta et al. 2009)。これらの化合物の分子量から考えると、質量分析で得られた $C_{23}H_{24}O_{12}$ を満たすものは tricin 7-*O*-hexoside であると考えられた。ササ属では、tricin 7-*O*-hexoside である tricin 7-*O*- β -glucoside がスズタケ (*Sasa borealis*) に乾重量あたり 45ppm 含まれているという報告がある(Park et al. 2007)。Tricin 7-*O*-hexoside と同じ分子量である tricin 5-*O*- β -glucoside や tricin 4'-*O*- β -glucoside がチシマザサ (*S. kurilensis* var. *gigantea*) にそれぞれ生鮮重量あたり 0.68、0.047 ppm 得られており(Hasegawa et al. 2008)、tricin 5-*O*- β -glucoside はチマキザサ (*S. paniculata*) では 170 ppm も含まれている報告がある(Tanaka et al. 1998)。本研究では Fraction 2 と 4 は同じ分子量であり、どちらもフラボノイドであることを考慮すると、クマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害活性物質は tricin 7-*O*- β -glucoside か tricin 5-*O*- β -glucoside、tricin 4'-*O*- β -glucoside (Fig. 4-6) のいずれかである可能性が高いことが示唆された。第 2 章や第 3 章で使用したクマイザサ葉身抽出物にはこれらのうちいずれかが含まれており、氷核形成阻害活性や凍結抑制効果を示していたと考えられる。

4.4.2 フラボノイド配糖体の構造と氷核細菌に対する氷核形成阻害活性

今までに、様々なフラボノイドの氷核形成阻害活性が測定されてきている(Kasuga et al. 2008; Kasuga et al. 2010; Kuwabara et al. 2012; Kuwabara et al. 2013)。そこで本研究では、今までに活性測定されていなかったフラボン配糖体、フラバノン配糖体、イソフラボン配糖体(それぞれ 2 種類ずつ)について活性測定を試みた。そのうち氷核形成阻害活性を有していたのはフラボン配糖体である luteolin 7-*O*- β -glucoside のみであった。フラボノール配糖体では、アグリコン部分の構造とアグリコンに結合する糖の種類と位置が氷核形成阻害活性を示すために重要であると示唆されている(Kasuga et al. 2010)。そこで、本研究で測定した 6 種類のフラボノイド配糖体と今までに測定されてきたフラボノイド配糖体について、それらの *E. ananas* に対する氷核形成阻害活性

の測定結果をもとに、構造と活性との関連性について考察することにした。そのため、とくに、活性を有するためにはアグリコン部分にどのような構造が必要であるか、アグリコンにはどのような種類の糖がどの位置に結合したらよいか、に注目することにした (Table 4-1)。

まず、フラボノイドの 3 位に糖が *O*-glycoside の形で結合しているものをみると、糖部分がガラクトースかグルコースであるものは活性を有することが多かった。例外的に syringetin 3-*O*-β-galactoside は活性がなかった。ラムノースやルチノース [α -L-Rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranose] が結合したものは kaempferol 3-*O*-β-rutinoside (氷核形成阻害活性 : 1.7°C) を除きほとんど活性がなかった (Table 4)。そのため活性を有するには 3 位に糖が *O*-glycoside の形で結合している場合は、糖がガラクトースもしくはグルコースであると良いと示唆されるが、これに当てはまらない場合もあることが考えられる。

次にフラボノイドの 7 位に糖が *O*-glycoside の形で結合しているものをみると、フラボン、フラボノールではグルコースが結合しているものは、程度に差があるものの活性が検出されている。一方、アグリコン部分がイソフラボン (ダイゼイン) であると活性は全くみられなかった。そのため、7-*O*-glucoside の場合に活性を有するためには、B 環の結合位置が 2 位である必要があると考えられる。付加する糖がガラクトースの場合、B 環の 3' と 4' 位にヒドロキシル基が 2 つあるケルセチンだと活性を有するが、B 環の 4' 位にヒドロキシル基が 1 つあるケンフェロールや、B 環の 2' と 4' 位にヒドロキシル基が 2 つあるモリンでは活性がほとんどみられていない (Table 4-1)。そのため、ガラクトースが付加する場合には、B 環にあるヒドロキシル基の結合位置と数が活性の有無に影響を与えている可能性が考えられる。

また、今回は 2 種類の *C*-glucoside についても活性を測定したが、いずれも活性が検出されず、*C*-glucoside の活性との関係性についてはよく解らなかった。

本研究では、クマイザサ葉身抽出物に含まれる氷核形成阻害物質の特定を試み、候補物質を挙げることができた。最終的に活性物質を特定するには、より多量の抽出物と NMR などによる分析が必要となる。今後も、時間が許す限りこの活性成分の分離や分析を継続していく所存である。

Table 4-1. Relationship between the anti-ice nucleation activities in the presence of *E. ananas* and their structural features of various flavonoids.

Classification	Substances	Concentration (mg/mL)	Anti-ice nucleation activity (°C)	Position												Reference
				2	3	4	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	
Flavonol	kaempferol 7- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	9.0	B ring	OH	=O	OH	H	O-Glc	H	H	H	OH	H	H	Kasuga et al. 2008
Flavonol	quercetin 7- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	8.9	B ring	OH	=O	OH	H	O-Glc	H	H	OH	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavonol	quercetin 3- <i>O</i> - β -galactoside	1.0	7.6	B ring	O-Gal	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavonol	α -oligoglucosyl quercetin 3- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	4.1	B ring	O-(Glc) ₁₋₈	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavonol	kaempferol 3- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	4.0	B ring	O-Glc	=O	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	Kasuga et al. 2008
Flavonol	kaempferol 3- <i>O</i> - β -rhamnoside	1.0	3.7	B ring	O-Rob	=O	OH	H	O-Rha	H	H	H	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavonol	8-methoxy kaempferol 3- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	3.4	B ring	O-Glc	=O	OH	H	OH	OCH ₃	H	OH	OH	H	H	Kasuga et al. 2008
Flavan 3-ol	(-)-epicatechin gallate	1.0	3.3	B ring	O-galloyl	H ₂	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2013
Flavan 3-ol	(-)-epigallocatechin gallate	1.0	3.3	B ring	O-galloyl	H ₂	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	Kuwabara et al. 2013
Flavan 3-ol	(-)-gallocatechin gallate	1.0	3.2	B ring	O-galloyl	H ₂	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	Kuwabara et al. 2013
Flavonol	quercetin 4'- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	3.1	B ring	OH	=O	OH	H	OH	H	H	OH	O-Glc	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavone	luteolin 7- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	3.0	B ring	H	=O	OH	H	O-Glc	H	H	OH	OH	H	H	this study
Flavonol	quercetin 3- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	2.8	B ring	O-Glc	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kasuga et al. 2008
Flavonol	quercetin 7- <i>O</i> - β -galactoside	1.0	2.2	B ring	OH	=O	OH	H	O-Gal	H	H	OH	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavone	apigenin 7- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	2.1	B ring	H	=O	OH	H	O-Glc	H	H	H	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavonol	kaempferol 3- <i>O</i> - β -rutinoside	1.0	1.7	B ring	O-Rut	=O	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavonol	quercetin 3'- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	1.4	B ring	OH	=O	OH	H	OH	H	H	O-Glc	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavonol	myricetin 3- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	1.3	B ring	O-Glc	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	Kasuga et al. 2010
Anthocyanidin	pelargonidin 3- <i>O</i> - β -glucoside chloride	1.0	1.3	B ring	O-Glc	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavan 3-ol	(+)-catechin	1.0	0.9	B ring	OH	H ₂	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2013
Flavan 3-ol	(-)-epigallocatechin	1.0	0.8	B ring	OH	H ₂	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	Kuwabara et al. 2013
Flavan 3-ol	(-)-epicatechin	1.0	0.7	B ring	OH	H ₂	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2013
Flavonol	kaempferol 7- <i>O</i> - β -galactoside	1.0	0.4	B ring	OH	=O	OH	H	O-Gal	H	H	H	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavonol	quercetin 3- <i>O</i> - β -rhamnoside	1.0	0.4	B ring	O-Rha	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavonol	quercetin 5- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	0.4	B ring	OH	=O	O-Glc	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavan 3-ol	(+)-catechin gallate	1.0	0.4	B ring	O-galloyl	H ₂	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2013
Flavonol	quercetaetin 7- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	0.3	B ring	OH	=O	OH	OH	O-Glc	H	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavonol	myricetin 3- <i>O</i> - α -rhamnoside	1.0	0.3	B ring	O-Rha	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	Kasuga et al. 2010
Flavonol	syringetin 3- <i>O</i> - β -galactoside	1.0	0.3	B ring	O-Gal	=O	OH	H	OH	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Kuwabara et al. 2012
Flavonol	quercetin 3- <i>O</i> -(6"-acetyl)- β -galactoside	1.0	0.3	B ring	O-acetyl Gal	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavonol	kaempferol 7- <i>O</i> - β -neohesperidoside	1.0	0.2	B ring	OH	=O	OH	H	O-Neo	H	H	H	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavanone	naringenin 7- <i>O</i> - β -neohesperidoside hydrate	1.0	0.2	B ring	H ₂	=O	OH	H	O-Neo	H	H	H	OH	H	H	this study
Flavonol	quercetin 3- <i>O</i> - β -rutinoside	1.0	0.1	B ring	O-Rut	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kasuga et al. 2010
Flavonol	gossypetin 8- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	0.1	B ring	OH	=O	OH	H	OH	O-Glc	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavonol	morin 7- <i>O</i> - β -galactoside (triethylamine salt, 1:1)	0.5	0.1	B ring	OH	=O	OH	H	O-Gal	H	OH	H	OH	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavanonol	ampelopsin 3-gallate	1.0	0.1	B ring	O-galloyl	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	Kuwabara et al. 2013
Isoflavone	daidzein 7- <i>O</i> - β -glucoside	1.0	0.1	H	B ring	=O	H	H	O-Glc	H	H	H	OH	H	H	this study
Isoflavone	daidzein 8- <i>C</i> - β -glucoside	1.0	0.1	H	B ring	=O	H	H	OH	Glc	H	H	OH	H	H	this study
Flavanone	hesperetin 3- <i>O</i> - β -rutinoside	1.0	0.1	B ring	H ₂	=O	OH	H	O-Rut	H	H	OH	OCH ₃	H	H	this study
Flavone	luteolin 6- <i>C</i> - β -glucoside	1.0	0.0	B ring	H	=O	OH	Glc	OH	H	H	OH	OH	H	H	this study
Flavonol	quercetin 3, 4'-di- <i>O</i> -glucoside	1.0	-0.1	B ring	O-Glc	=O	OH	H	OH	H	H	OH	O-Glc	H	H	Kuwabara et al. 2012
Flavonol	quercetin 3-gallate	1.0	-0.2	B ring	O-galloyl	=O	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Kuwabara et al. 2013

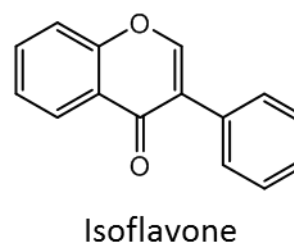
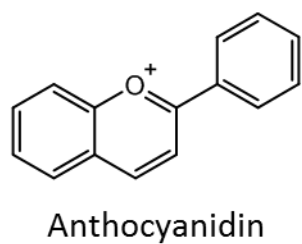
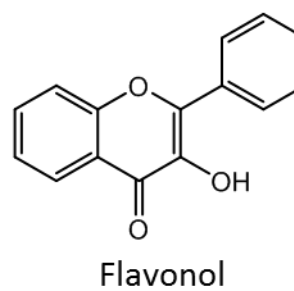
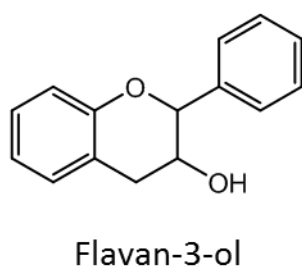
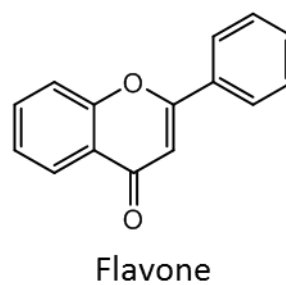
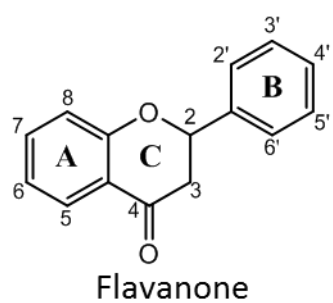


Fig. 4-1. Structures of basic skeletons of flavonoids in Table 4-1. Anti-ice nucleation activities of various flavonoids were measured by droplet freezing assay in the presence of *E. ananas*. Position numbers and ring names of flavonoids were marked in the flavanone skeleton.

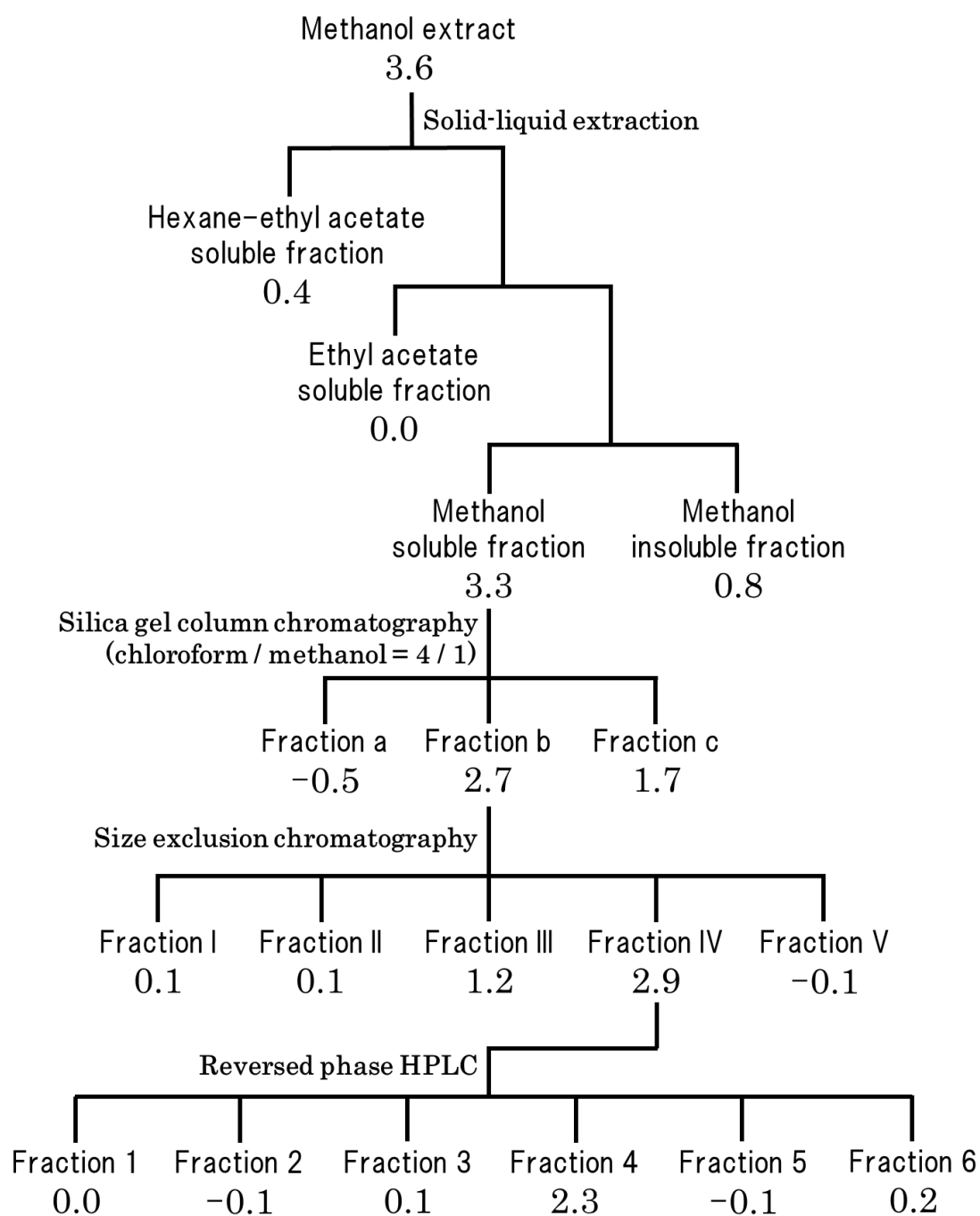


Fig. 4-2. Process for fractionation of anti-ice nucleation substances of *S. senanensis* leaf blade. The numerical numbers of each fractions indicate anti-ice nucleation activities (°C) at 0.10 g FW/mL measured by droplet freezing assay in the presence of 2.0 mg/mL *E. ananas*.

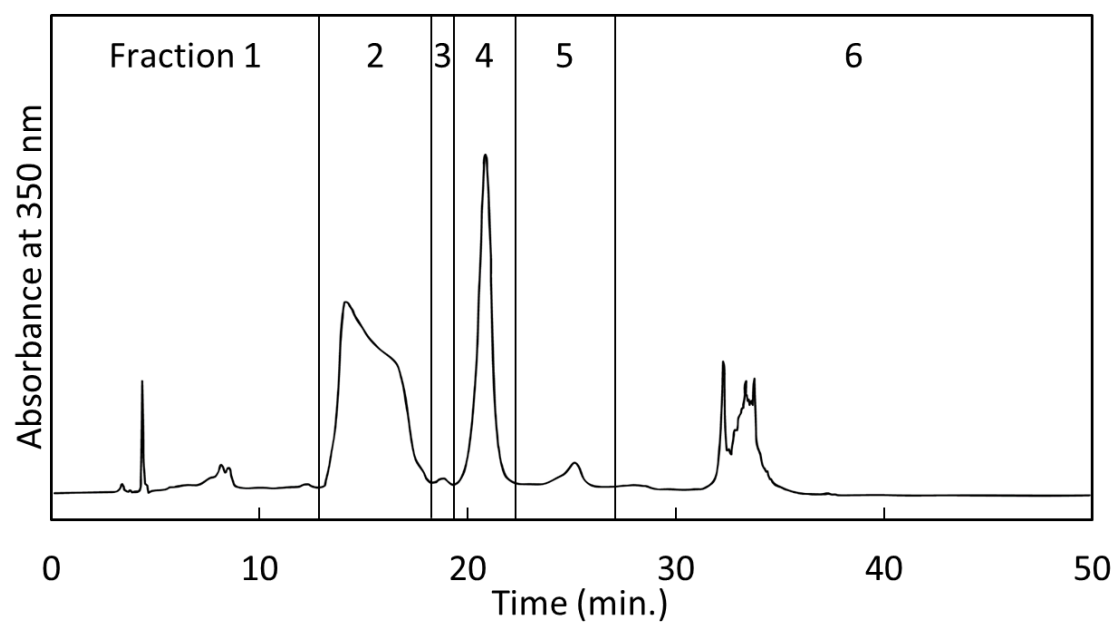


Fig. 4-3. Reversed phase HPLC chromatograph of fraction IV separated by size exclusion chromatography. Fraction IV was separated into six peak fractions (Fractions 1-6).

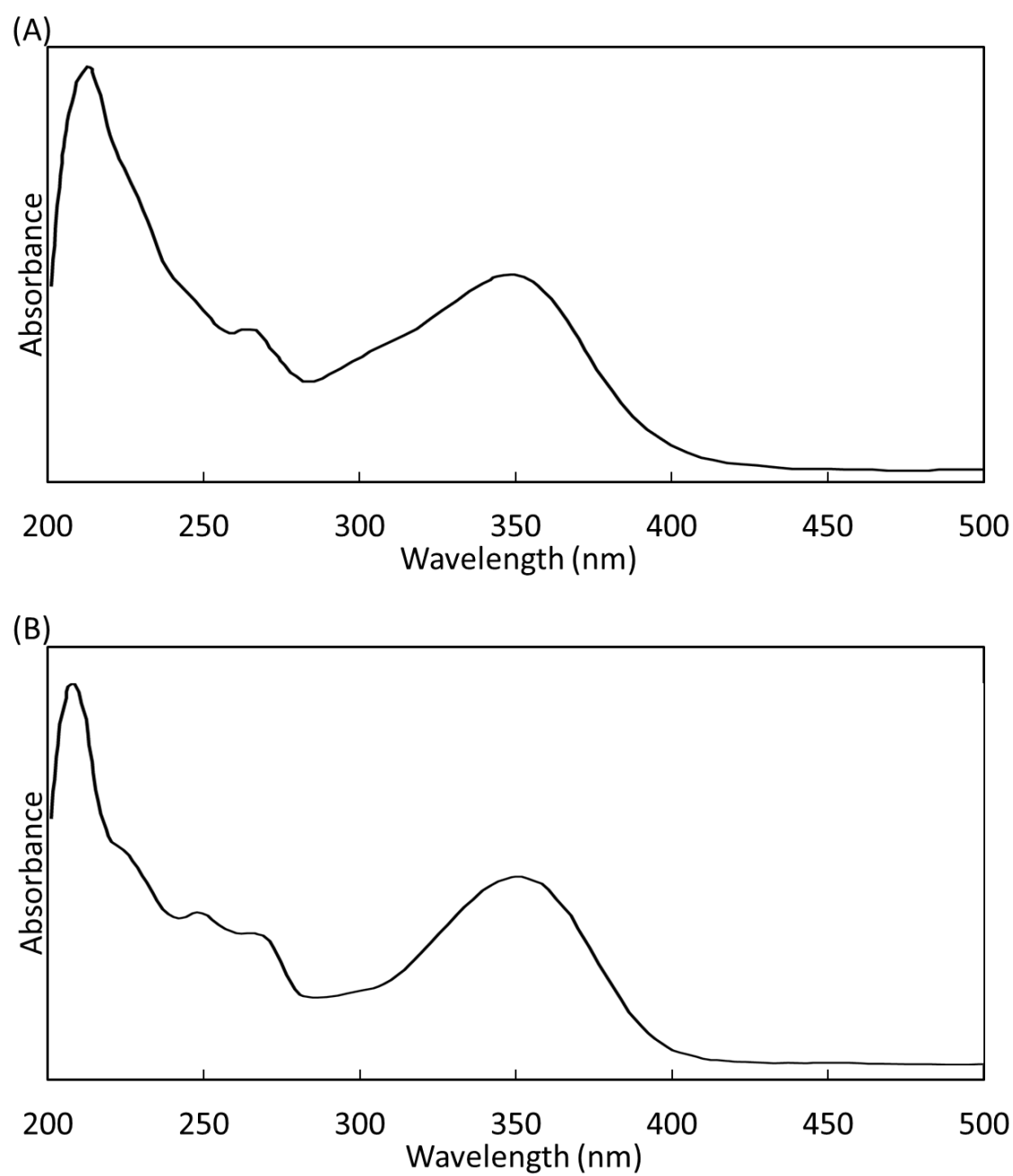


Fig. 4-5. Absorption spectra of Fractions 2 (A) and 4 (B). The spectra were measured by photodiode array detector during the separation by reverse phase HPLC.

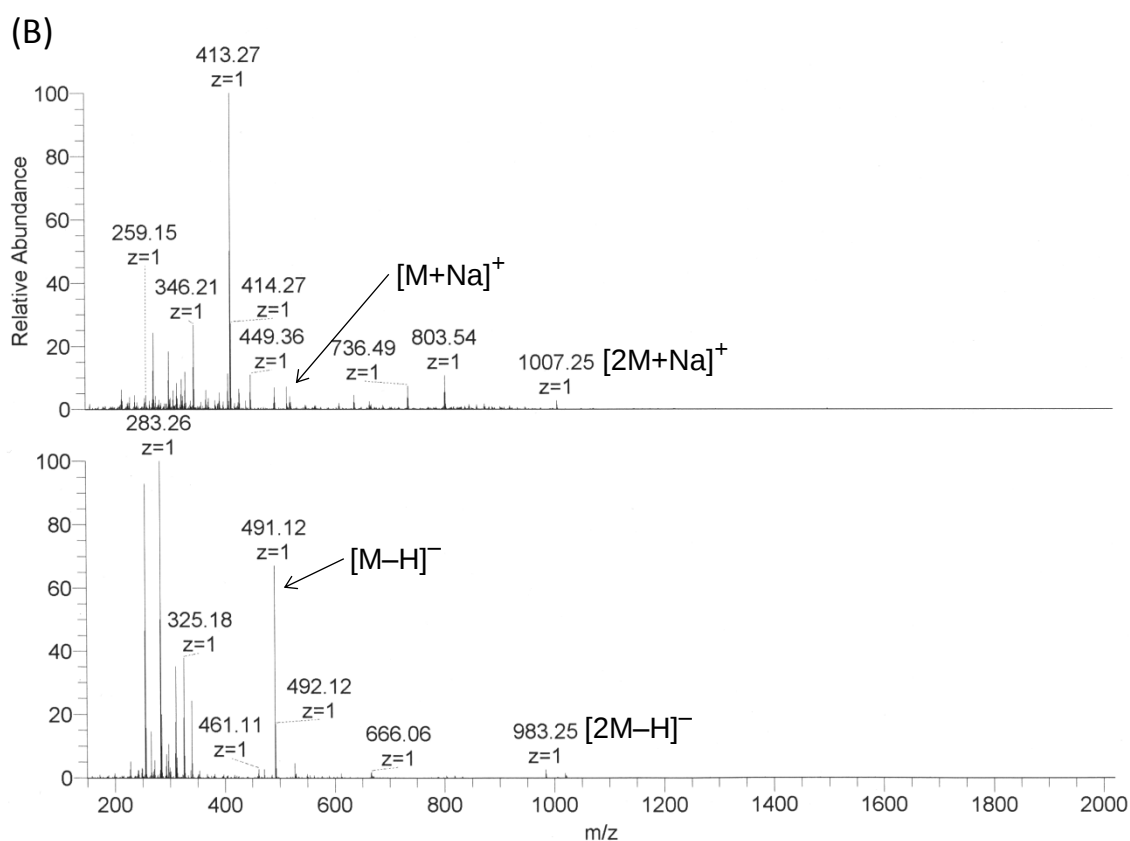
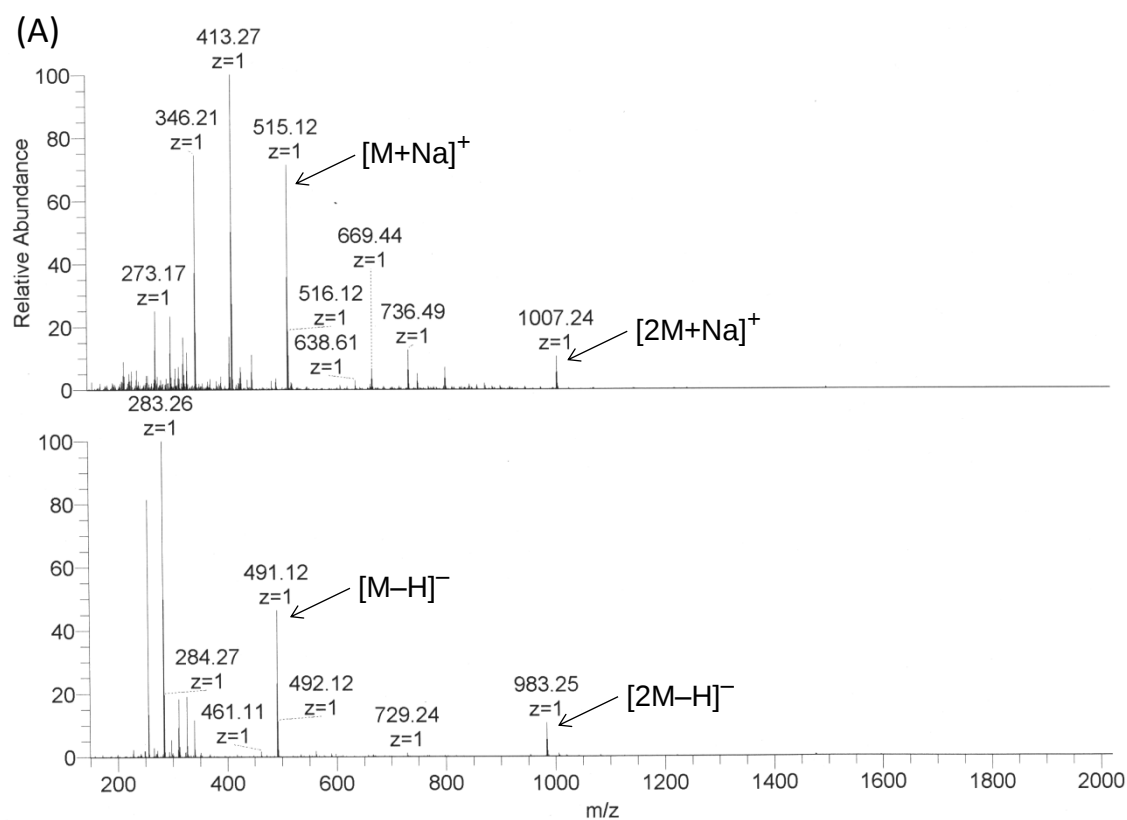


Figure legend and Fig. 4-5C are written in next page.

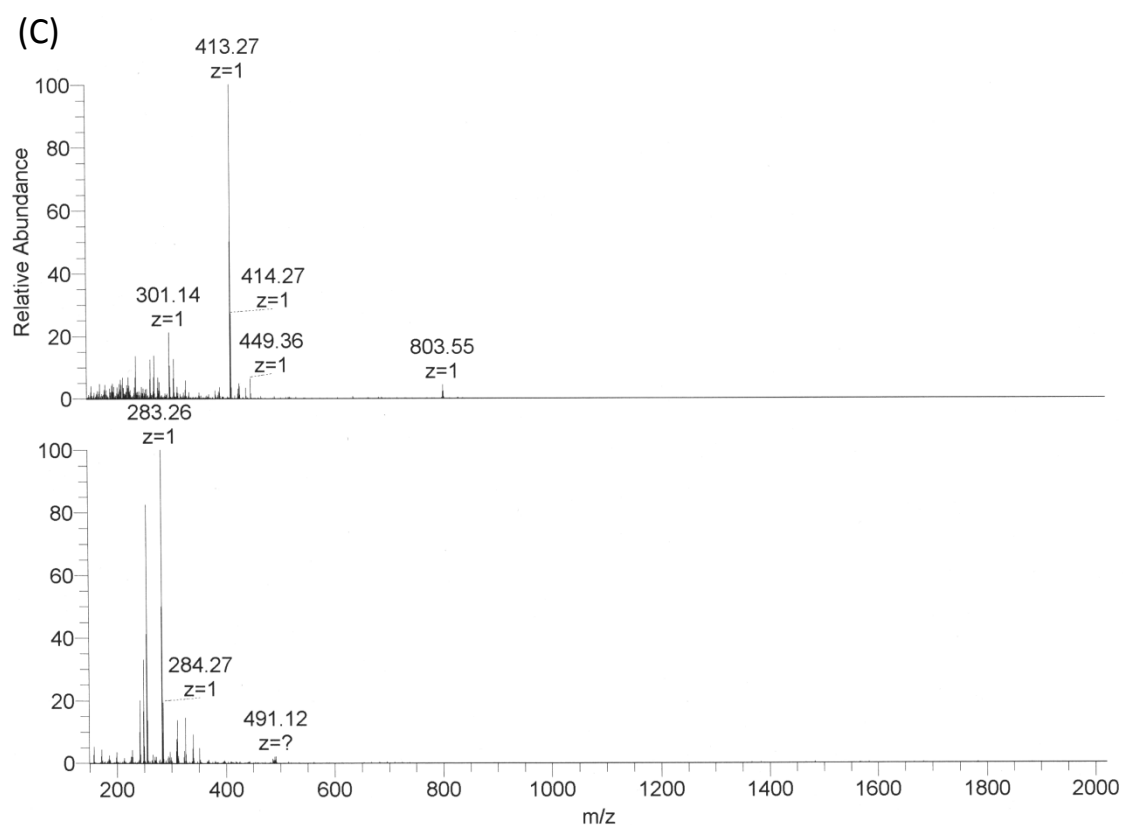


Fig. 4-5. Mass spectra of Fractions 2 and 4 separated by reversed phase HPLC. (A) Fraction 2, (B) Fraction 4, (C) back ground spectrum. Upper spectrum of each panel is positive ion mode spectrum, and lower one is negative ion mode spectrum.

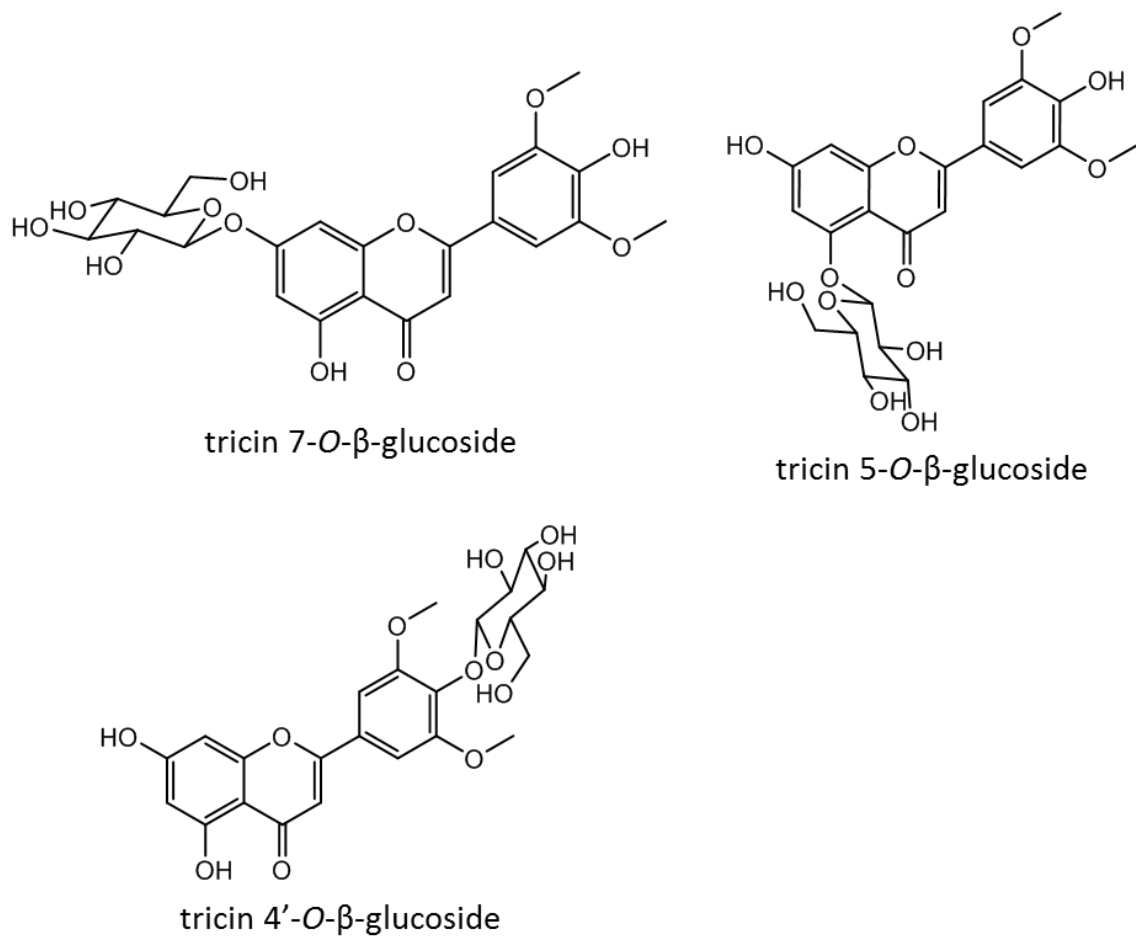
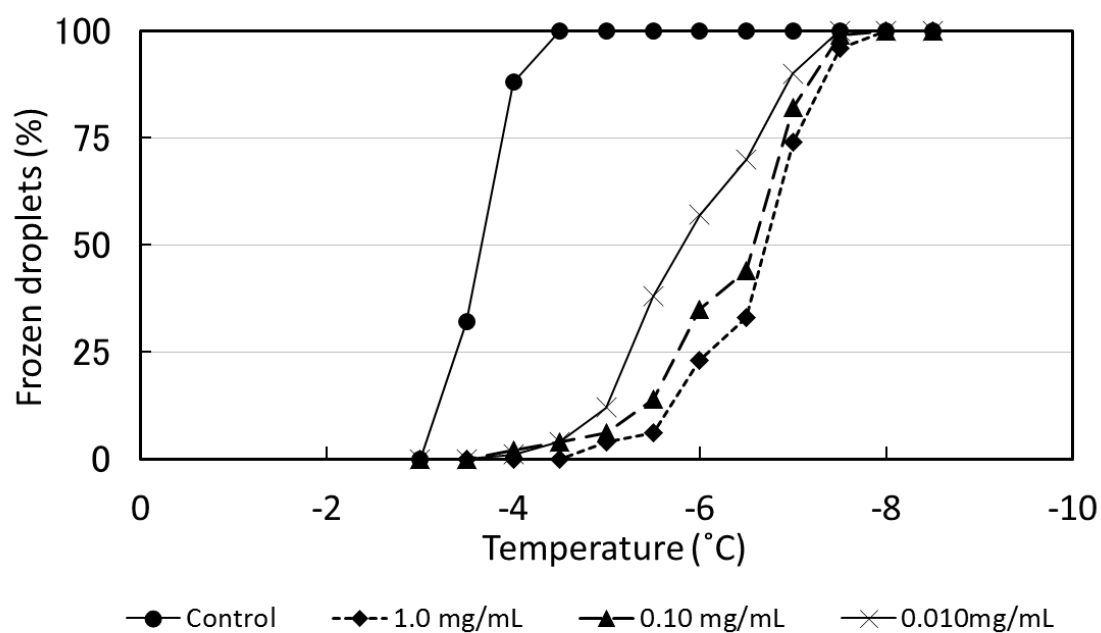


Fig. 4-6. Chemical structures of tricin *O*-glucoside.



	FT ₁	FT ₂₅	FT ₅₀	FT ₇₅	FT ₁₀₀	Anti-ice nucleation activity (°C)
Control	-3.0	-3.4	-3.7	-3.9	-4.5	0.0
1.0 mg/mL	-4.6	-6.1	-6.7	-7.0	-8.0	3.0
0.10 mg/mL	-3.8	-5.8	-6.6	-6.9	-8.0	2.9
0.010 mg/mL	-4.0	-5.3	-5.8	-6.6	-7.5	2.2

Fig. 4-7. Freezing curves of luteolin 7-*O*- β -glucoside in the presence of *E. ananas*. Freezing curves of luteolin 7-*O*- β -glucoside were measured by droplet freezing assay at the concentrations of 1.0 mg/mL (solid diamond), 0.10 mg/mL (solid triangle) and 0.010 mg/mL (x-mark).

第5章 本研究のまとめ

本研究では、植物が蓄積するポリフェノール類などが不均質核生成を抑制する活性（氷核形成阻害活性）を有することを利用して農作物の凍霜害を抑制、防止する技術開発を試みることを目的とした。そのためには凍霜害防止効果を検証する野外試験が必要となるため、その前段階として、実験室レベルでの綿密な条件検討から始めることにした。なかでも大量調製を視野に入れた、経済的かつ簡便な氷核形成阻害活性画分の調製とその有効性の検証について注目して実験をおこなった。そのため、第2章では、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材料をスクリーニングし、第3章では、農作物の緑葉切片や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を実験室レベルで検証した。また、第4章では、第2章でスクリーニングして高い氷核形成阻害活性を有することが明らかとなった資源植物のうち、実用する際に多量に試料を用意できる可能性が高いクマイザサに含まれている氷核形成阻害物質の同定を試みた。以下に本研究について総括する。

5.1 様々な資源植物がもつ氷核形成阻害活性

第2章では、72の植物組織（主に緑葉）から50%アセトン水溶液抽出物を調製し、氷核細菌 *E. ananas* に対する氷核形成阻害活性を測定・比較した。その活性値は *E. ananas* を氷核形成物質とした場合は最高で 3.2°C であり、今までに活性が測定された化合物や抽出物と比べても低い値ではなかった。3°C 以上の氷核形成阻害活性を有するものは5試料、2°C 以上の活性を有するものは14試料もあった（Table 2-3a~3c）。このことを勘案すると、本研究で活性を検出できた植物以外にも氷核形成阻害活性をもつ植物が多数存在する可能性は十分に考えられる。また、活性の高い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°C 以上の活性を示すものがいくつかあった（Table 2-4, 2-5）。ただし、使用する氷核形成物質に応じて氷核形成阻害活性の程度は異なるので、活性測定条件が少しでも異なる場合には単純な活性比較は注意を要する。ドロップレット凍結法でこれらと同程度の活性値が報告されている化合物は、hexadecyltrimethylammonium bromide などの界面活性剤のいくつか(Kuwabara et al. 2014)とチロシン3量体(河原 2017a)、アデニン(河原 2017b)があるが、これよりも高い活性を示す化合物や活性がほとんど無い化合物も多数ある。本研究で測定した11の植物葉抽出物はいずれもヨウ化銀に対しては数°C 以上の活性を示しており（Table 2-4）、ヨウ化銀に対しては様々な物質を含む未精製の粗抽出物の方がヨウ化銀の氷核活性を阻害できる可能性が高いことが示唆される。

今までに複数の氷核形成物質に対して氷核形成阻害活性をもつ化合物は報告されているが、本研究では 50%アセトン水溶液で得られた植物抽出物が複数の氷核形成物質に対して氷核形成阻害活性があることが分かった。氷核形成阻害活性を利用する場合には利用方法によるが、単離・精製せずとも抽出物の段階で水の凍結を防止するために利用できるものであると考えられる。

5.2 様々な表面上での水の凍結の測定に適用できるリーフディスク凍結法

氷核形成阻害活性による凍結抑制効果で植物の凍霜害を防止・抑制するには、植物体表面上においてその効果を発揮する必要がある。第 3 章で既に述べたが、その効果を確かめる方法として、従来は作物のポット苗などの植物個体を使用して試験したいものを噴霧したりして植物に付着させてから、冷却する方法がとられている(Lindow et al. 1983; Watanabe et al. 1988; 井上 1995)。この方法では冷却する機器の大きさによるが、一度に多数の試験体（植物個体）を使って様々な試験溶液を噴霧して比較することが難しく、加えて少なくとも数十もの植物個体を用意する必要があり、多大な労力や場所（装置やスペース）もかかる。そこで、本研究では多数の植物個体を用意しなくても、均質な緑葉切片を使って試験溶液の凍結抑制効果を効率的に試験できる実験系として、リーフディスク（葉切片）に氷核形成物質と氷核形成阻害物質を混合した試験溶液の液滴をのせて冷却するリーフディスク凍結法を構築した。リーフディスク凍結法は 1 枚のシャーレ内に 10 枚程度のリーフディスクを並べられるので、植物個体を使用する方法に比べて省スペースで一度に多数の試験溶液の効果を比較して簡易的にスクリーニングできるメリットがある。また、リーフディスク凍結法と命名するものの、実験の用途によっては緑葉表面だけでなく、他の部位（樹皮など）やプラスチックプレート表面、金属表面などでも代替が可能であり、表面形状や物性の違いによる水の凍結への影響を調べることも可能と考えている。

なお、このリーフディスク凍結法は、植物体（農作物）の表面において水の凍結抑制効果が発揮できるか否かを判断するための簡易的な方法として有用と考えおり、この方法によってスクリーニングされた抽出物を用いて植物個体に噴霧して効果を検証する試験を行うというように、段階的に実験を進めていくことができる。

5.3 資源植物成分の凍霜害防止や水の凍結防止への利用の展望

本研究において使用した 72 の植物抽出物のうちのいくつかは（特に高いとは言えないが）*E. ananas* に対して十分な氷核形成阻害活性を有していることが分かった。また、リーフディスク凍結法で試験しても、これらの抽出物は緑葉表面上でも凍結抑制効果が

あり、凍害が抑制されることも示されたため、次は植物個体（鉢植え）を使用した実験を行うことにした。未馴化の農作物（カイワレダイコン実生、チャノキ苗）の鉢植えの緑葉に *E. ananas* を噴霧して乾燥させた後、クマイザサ葉身の 50%アセトン水溶液抽出物を噴霧して鉢植えを冷却し、処理後の鉢植えの状態を比較したところ、抽出物を噴霧することで凍結が抑制され、凍結傷害が抑制された。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よって凍害が回避できることが示唆された。

本研究では野外散布試験をするための条件検討を行ってきた。すなわち、高い氷核形成阻害活性を示す資源植物の抽出物を用いることで、農作物の凍結防止・凍霜害抑制に役立てる可能性を示唆した。そこで次の段階では、野外で生育している農作物に対して凍霜害が発生しそうなときにこれらの抽出物を施用して効果を検証する試験を行う必要がある。野外試験では、降霜がある時間や場所が不確実であるため、施用できる機会がかなり限定される。また、本研究で使った植物抽出物は水溶性であるため降雨などによって流亡してしまう可能性がある。しかも、クマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害物質や既に知られている氷核形成阻害物質であるフラボノイド類やタンニン類は抗酸化物質でもあるため、野外条件でどのくらい活性を保持できるかについても不明である。また水の凍結は液量の増加や振動などの物理的な刺激、異物の存在などによって影響されることも容易に想像できる(Fujikawa et al. 2018)。そのため、野外で噴霧した場合には十分な凍結抑制効果が発揮できるかどうかは、非常に興味深い課題である。

また、水の凍結防止や抑制について考えれば、植物（農作物）の凍霜害防止だけでなく、機器の凍結や着氷防止、食料品の凍結防止や氷点下温度での保存などに利用できる可能性がある。本研究で見いだされたような氷核形成阻害活性がどの程度効果を発揮するか、どのように応用目的で利用できるのかについて検証することは、基礎研究と同じく非常に興味深い問題である。このような凍結防止に適用するには氷核形成阻害物質を使用することによる凍結の防止や抑制の影響だけでなく、使用することで農作物の品質や植物体に与える影響や散布するものの価格、散布する頻度などを個々の事例ごとに評価する必要がある、研究できる余地は大きい。

本研究の第 4 章では、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を試み、活性物質が特定されつつある状況である。それと同時に、*E. ananas* を氷核形成物質とした場合のフラボノイド類の氷核形成阻害活性について、その構造と活性との相関性についても考察した（第 4 章, Table 4-1）。このような多種の類似した構造の化合物における氷核形成阻害活性に関する知見を蓄積し、活性と構造との相関性についてしっかり考察すれば、氷核形成阻害活性に優れた理想的な化合物を設計して合成することも可能になるかもしれない。

最後に、本研究で使った氷核形成阻害活性をもつ資源植物の抽出物を利用して凍霜害防止の可能性を検証することを考える。例えばチャノキの緑葉に含まれるカテキン類

のいくつかは氷核形成阻害活性を示すため(Kuwabara et al. 2013)、凍霜害が発生するような茶園での利用を提案する。茶園であれば、新芽の凍霜害を防止するために必要な活性画分を抽出するための原料として、芽を摘む前の整枝作業で発生する整枝残渣を利用することが可能である。抽出のための原料を試験地の近くで安価でかつ簡便に用意できれば、経済的かつ効率よく凍霜害防止に利用できる技術になるものと考えている。また、温帯や亜寒帯に生育する樹木はその分布の制限要因が春の降霜であるという説もあり(Sakai and Larcher 1987)、凍霜害を防止、緩和すれば樹木の生育地だけでなく農作物の生産地を広げることも可能になるかもしれない。そのため氷核形成阻害活性を有する成分についてさらなる研究が望まれる。

謝辞

本論文の研究の実行、および本論文の作成に際し、北海道大学大学院農学研究院准教授 荒川圭太博士にはさまざまな的確な意見を頂き、また終始丁寧に指導をしていただき、感謝の念に堪えません。また、同研究院教授 佐野雄三博士には本論文の作成やゼミなどでの的確なご助言やご意見をいただき、深く感謝いたします。同研究院教授 松浦英幸博士には本論文の作成、参考論文の投稿においてご助言やご意見をいただき、深く感謝いたします。同研究院准教授 福士幸治博士には、本論文や参考論文の作成におけるご助言、ご意見だけでなく、試料提供や実験手法の構築、氷核形成阻害物質の分離や同定において多大なるご支援をいただき、深く深謝いたします。

同研究院助教 山岸祐介博士にはゼミでの貴重なご意見を賜り、また博士論文を執筆する上での心構えなど様々な面で気にかけて頂き、深く感謝いたします。また、同研究院博士研究員 桑原慎子博士には実験手法の教授や実験手法の構築に際し、多大なるご指導をいただき、深く感謝いたします。

また、私が所属している樹木生物学研究室の研究員や学生の皆さまには実験や研究室生活において多岐にわたるご協力を頂き、感謝の意を表します。

最後に、本研究の一部は札幌農学同窓会大学院学生研究助成の研究費支給により行われました。深く感謝いたします。

引用文献

Abe K, Watabe S, Emori Y, Watanabe M, Arai S. (1989). An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: Sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity. *FEBS Letters*, **258**: 297-300.

Arora R, Wisniewski ME, Scorza R. (1992). Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) *Plant Physiology*, **99**: 1562-1568.

Ashworth EN, Davis GA. (1984). Ice nucleation within peach trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **109**: 198-201.

Barthakur N, Maybank J. (1963). Anomalous behaviour of some amino-acids as ice nucleators. *Nature*, **200**: 866-868.

Bredow M, Tomalty HE, Smith L, Walker VK. (2017). Ice and anti-nucleating activities of an ice-binding protein from the annual grass, *Brachypodium distachyon*. *Plant, Cell and Environment*, **41**: 983-992.

Cambours M, Nejad P, Granhall U, Ramstedt M. (2005). Frost-related dieback of willows. Comparison of epiphytically and endophytically isolated bacteria from different *Salix* clones, with emphasis on ice nucleation activity, pathogenic properties and seasonal variation. *Biomass and Bioenergy*, **28**: 15-27.

Caple G, Allegretto E, Culbertson LB, Layton RG. (1983b). Polymeric inhibition of ice nuclei active sites. *Cryo-Letters*, **4**: 51-58.

Caple G, Layton RG, McCurdy SN. (1983a). Biogenic effects in heterogeneous ice nucleation. *Cryo-Letters*, **4**: 59-64.

Carter J, Brennan R, Wisniewski M. (1999). Low-temperature tolerance of blackcurrant flowers. *HortScience*, **34**: 855-859.

Chaoenrein S, Reid DS. (1989). The use of DSC to study the kinetics of heterogeneous and homogeneous nucleation of ice in aqueous systems. *Thermochimica Acta*, **156**: 373-381.

Davies PL. (2014). Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends in biochemical sciences*, **39**: 548-555.

Dreischmeier K, Budke C, Wiehemeier L, Kottke T, Koop T. (2017). Boreal pollen contain ice-nucleating as well as ice-binding 'antifreeze' polysaccharides. *Scientific Reports*, **7**: 41890.

Duman JG. (2002). The inhibition of ice nucleators by insect antifreeze proteins in enhanced by glycerol and citrate. *Journal of Comparative Physiology B*, **172**: 163-168.

Fiolini C, David B, Fourasté I, Vercauteren J. (1998). Acylated kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves. *Phytochemistry*, **47**: 821-824.

Francko DA, Wilson KG, Li QQ, Equiza MA. (2011). A topical spray to enhance plant resistance to cold injury and mortality. *HortTechnology*, **21**: 109-118.

Fujikawa S, Kuwabara C, Kasuga J, Arakawa K. (2018). Supercooling-promoting (anti-ice nucleation) substances. In M. Iwaya-Inoue, M. Sakurai, & M. Uemura (Eds.), *Survival strategies in extreme cold and desiccation: Adaptation mechanisms and their applications* (pp. 289-319): Springer.

Fukuta N. (1963). Ice nucleation by metaldehyde. *Nature*, **199**: 475-476.

Fukuta N, Mason BJ. (1963). Epitaxial growth of ice on organic crystals. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **24**: 715-718.

Fuller M, Le Grice P. (1998). A chamber for the simulation of radiation freezing of plants. *Annals of Applied Biology*, **133**: 111-121.

Fuller MP, Hamed F, Wisniewski M, Glenn DM. (2003). Protection of plants from frost using hydrophobic particle film and acrylic polymer. *Annals of Applied Biology*, **143**: 93-97.

Garnham CP, Campbell RL, Walker VK, Davies PL. (2011). Novel dimeric β -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. *BMC structural biology*, **11**: 36.

Goto M, Goto T, Inaba T. (1989). Identification of ice nucleation-active bacteria

isolated from frost-damaged vegetable leaves. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **55**: 330-335.

Goto M, Komaba M, Horikawa T, Nakamura N. (1993). The role of ice nucleation-active bacteria on frost damage of tea plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **59**: 535-543.

Green RL, Warren GJ. (1985). Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature*, **317**: 645-648.

Gusta L, Wisniewski M, Nesbitt N, Gusta M. (2004). The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiology*, **135**: 1642-1653.

Hacker J, Ladinig U, Wagner J, Neuner G. (2011). Inflorescences of alpine cushion plants freeze autonomously and may survive subzero temperatures by supercooling. *Plant Science*, **180**: 149-156.

Hacker J, Neuner G. (2007). Ice propagation in plants visualized at the tissue level by infrared differential thermal analysis (IDTA). *Tree Physiology*, **27**: 1661-1670.

羽生 寿郎, 山中 捷一郎, 西山 司, 中山 敬一. (1978). 霜害研究用の放射型霜実験装置について. *農業気象*, **34**: 7-12.

Harbaum B, Hubbermann EM, Zhu Z, Schwarz K. (2008). Impact of fermentation on phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) and chinese leaf mustard (*Brassica juncea* Coss). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 148-157.

Hasegawa T, Tanaka A, Hosoda A, Takano F, Ohta T. (2008). Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*. *Phytochemistry*, **69**: 1419-1424.

Head RB. (1961). Steroids as ice nucleators. *Nature*, **191**: 1058-1059.

Head RB. (1962a). Ice nucleation by some cyclic compounds. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **23**: 1371-1378.

Head RB. (1962b). Ice nucleation by α -phenazine. *Nature*, **196**: 736-738.

Heneghan A, Moore H, Lee T, Haymet A. (2004). Statistics of heterogeneous nucleation of supercooled aqueous solutions in a self-assembled monolayer-coated container. *Chemical Physics Letters*, **385**: 441-445.

Hirano SS, Baker LS, Upper CD. (1985). Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury. *Plant Physiology*, **77**: 259-265.

Holt C. (2003). The effect of antifreeze proteins and poly(vinyl alcohol) on the nucleation of ice: A preliminary study. *CryoLetters*, **24**: 323-330.

Inada T, Koyama T, Goto F, Seto T. (2012). Inactivation of ice nucleating activity of silver iodide by antifreeze proteins and synthetic polymers. *The Journal of Physical Chemistry B*, **116**: 5364-5371.

Inada T, Koyama T, Tomita H, Fuse T, Kuwabara C, Arakawa K, Fujikawa S. (2017). Anti-ice nucleating activity of surfactants against silver iodide in water-in-oil emulsions. *The Journal of Physical Chemistry B*, **121**: 6580-6587.

井上 義雄. 出願人: 第一製網株式会社. (1995). 霜害防止剤. 出願番号: 特願平 5-346061.

石川 雅也. (2014). 植物組織の氷核活性の検索. *低温生物工学会誌*, **60**: 79-88.

Ishikawa M, Ishikawa M, Toyomasu T, Aoki T, Price WS. (2015b). Ice nucleation activity in various tissues of *Rhododendron* flower buds: their relevance to extraorgan freezing. *Frontiers of Plant Science*, **6**: 149.

石川 雅也, 野村 孝之, 槌谷 明日香. 出願人: 独立行政法人農業生物資源研究所. (2012). シュウ酸カルシウムを含む氷核活性剤. 出願番号: 特願 2012-202489.

Ishikawa M, Oda A, Fukami R, Kuriyama A. (2015a). Factors contributing to deep supercooling capability and cold survival in dwarf bamboo (*Sasa senanensis*) leaf blades. *Frontiers in Plant Science*, **5**: 791.

Kader AS, Proebsting EL. (1992). Freezing behavior of *Prunus*, subgenus *Padus*, flower buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **117**: 955-960.

Kasuga J, Fukushi Y, Kuwabara C, Wang D, Nishioka A, Fujikawa E, Arakawa K,

Fujikawa S. (2010). Analysis of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) activity of flavonol glycosides. *Cryobiology*, **60**: 240-243.

Kasuga J, Hashidoko Y, Nishioka A, Yoshiba M, Arakawa K, Fujikawa S. (2008). 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.

Kasuga J, Mizuno K, Arakawa K, Fujikawa S. (2007). Anti-ice nucleation activity in xylem extracts from trees that contain deep supercooling xylem parenchyma cells. *Cryobiology*, **55**: 305-314.

Kasuga J, Mizuno K, Miyaji N, Arakawa K, Fujikawa S. (2006). Role of intracellular contents to facilitate supercooling capability in beech (*Fagus crenata*) xylem parenchyma cells. *CryoLetters*, **27**: 305-310.

河原 秀久. 出願人: 学校法人 関西大学. (2017a). 抗氷核活性剤. 出願番号: 特願 2017-516618.

河原 秀久. 出願人: 学校法人 関西大学. (2017b). 抗氷核活性剤. 出願番号: 特願 2017-512559.

Kawahara H, Masuda K, Obata H. (2000). Identification of a compound in *Chamaecyparis taiwanensis* inhibiting the ice-nucleation activity of *Pseudomonas fluorescens* KUIN-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**: 2651-2656.

Kawahara H, Nagae I, Obata H. (1996). Purification and characterization of a new anti-nucleating protein isolated from *Acinetobacter calcoaceticus* KINI-1. *Biocontrol Science*, **1**: 11-17.

Kawahara H, Obata H. (1996). Identification of compound in spices inhibiting the ice-nucleating activity of *Erwinia uredovora* KUIN-3. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, **24**: 95-100.

Kawahara H, Tagawa E, Watanabe C, Hamada J, Hamada S. (2017). Characterization of anti-ice nucleation activity of the extract from coffee refuse. *Biocontrol Science*, **22**: 205-211.

Kim HK, Orser C, Lindow SE, Sands DC. (1987). *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. *Plant Disease*, **71**: 994-997.

Kishimoto T, Sekozawa Y, Yamazaki H, Murakawa H, Kuchitsu K, Ishikawa M. (2014). Seasonal changes in ice nucleation activity in blueberry stems and effects of cold treatments in vitro. *Environmental and Experimental Botany*, **106**: 13-23.

Kisiel W, Barszcz B. (2000). Further sesquiterpenoids and phenolics from *Taraxacum officinale*. *Fitoterapia*, **71**: 269-273.

北浦 澄. (1967). 晩霜による桑の凍結および被害に関する研究. 蚕糸試験場報告, **22**: 207-328.

Kuprian E, Briceno V, Wagner J, Neuner G. (2014). Ice barriers promote supercooling and prevent frost injury in reproductive buds, flowers and fruits of alpine dwarf shrubs throughout the summer. *Environmental and Experimental Botany*, **106**: 4-12.

Kuwabara C, Kasuga J, Wang D, Fukushi Y, Arakawa K, Koyama T, Inada T, Fujikawa S. (2011). Change of supercooling capability in solutions containing different kinds of ice nucleators by flavonol glycosides from deep supercooling xylem parenchyma cells in trees. *Cryobiology*, **63**: 157-163.

Kuwabara C, Terauchi R, Tochigi H, Takaoka H, Arakawa K, Fujikawa S. (2014). Analysis of supercooling activities of surfactants. *Cryobiology*, **69**: 10-16.

Kuwabara C, Wang D, Endoh K, Fukushi Y, Arakawa K, Fujikawa S. (2013). Analysis of supercooling activity of tannin-related polyphenols. *Cryobiology*, **67**: 40-49.

Kuwabara C, Wang D, Kasuga J, Fukushi Y, Arakawa K, Koyama T, Inada T, Fujikawa S. (2012). Freezing activities of flavonoids in solutions containing different ice nucleators. *Cryobiology*, **64**: 279-285.

Langham EJ, Mason BJ. (1958). The heterogeneous and homogeneous nucleation of supercooled water. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, **247**: 493-504.

Lindow S, Arny D, Upper C. (1976). Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature*, **262**: 282-284.

Lindow S, Arny D, Upper C. (1978a). Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**: 831-838.

Lindow S, Arny D, Upper C. (1978b). *Erwinia herbicola*: A bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. *Phytopathology*, **68**: 523-527.

Lindow S, Arny D, Upper C. (1982). Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. *Plant Physiology*, **70**: 1084-1089.

Lindow SE. (1982). Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. In P. H. Li & A. Sakai (Eds.), *Plant cold hardiness and freezing stress: Mechanisms and crop implications* (Vol. 2, pp. 395-416): Academic Press.

Lindow SE, Arny DC, Upper CD. (1983). Biological control of frost injury: An isolate of *Erwinia herbicola* antagonistic to ice nucleation active bacteria. *Phytopathology*, **73**: 1097-1102.

MacKenzie AP. (1977). Non-equilibrium freezing behavior of aqueous systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, **278**: 167-189.

Maki LR, Galyan EL, Chang-Chien M, Caldwell DR. (1974). Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology*, **28**: 456-459.

Marcellos H. (1981). A plant freezing chamber with radiative and convective energy exchange *Journal of Agricultural Engineering Research*, **26**: 403-408.

Mason BJ. (1960). Ice-nucleating properties of clay minerals and stony meteorites. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, **86**: 552-556.

Matsuta T, Yamazaki M, Nishizawa M, Tomizuka N, Suzuki T. (2008). Differences of flavonoid contents in between new leaf and old leaf of kumai sasa (*Sasa senanensis* Rehder). *The Boreal Forest Society*, **56**: 137-139 (in Japanese).

Matsuta T, Yamazaki M, Yajima A, Tomiduka N, Nishizawa M. (2009). Flavonoids

in *Sasa senanensis* and their antioxidative activities. *Food Preservation Science*, **35**: 11-16.

Meng L, Lozano YF, Gaydou EM, Li B. (2009). Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. *Molecules*, **14**: 133-140.

Park H-S, Lim JH, Kim HJ, Choi HJ, Lee I-S. (2007). Antioxidant Flavone Glycosides from the Leaves of *Sasa borealis*. *Archives of Pharmacal Research*, **30**: 161-166.

Parody-Morreale A, Murphy KP, Cera ED, Fall R, DeVries AL, Gill SJ. (1988). Inhibition of bacterial ice nucleators by fish antifreeze glycoproteins. *Nature*, **333**: 782-783.

Parungo FP, Lodge Jr. JP. (1967). Amino acids as ice nucleators. *Journal of the Atmospheric Sciences*, **24**: 274-277.

Passarelli Jr R, Chessin H, Vonnegut B. (1973). Ice nucleation by solid solutions of silver-copper iodide. *Science*, **181**: 549-551.

Power RF. (1962). Some amino-acids as ice nucleators. *Nature*, **194**: 1170-1171.

Pramsohler M, Neuner G. (2013). Dehydration and osmotic adjustment in apple stem tissue during winter as it relates to the frost resistance of buds. *Tree Physiology*, **33**: 807-816.

Pummer BG, Bauer H, Bernardi J, Bleicher S, Grothe H. (2012). Suspendable macromolecules are responsible for ice nucleation activity of birch and conifer pollen. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **12**: 2541-2550.

Quamme H, Weiser CJ, Stushnoff C. (1973). The mechanism of freezing injury in xylem of winter apple twigs. *Plant Physiology*, **51**: 273-277.

Rosinski J, Parungo F. (1966). Terpene-iodine compounds as ice nuclei. *Journal of Applied Meteorology*, **5**: 119-123.

Sakai A, Larcher W. (1987). *Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Schütz K, Kammerer DR, Carle R, Schieber A. (2005). Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**: 179-186.

Schnell R. (1976). Bacteria acting as natural ice nucleants at temperatures approaching -1°C. *Bulletin of the American Meteorological Society*, **57**: 1356-1357.

Shibutani S, Samejima M, Doi S. (2004). Effects of stilbenes from bark of *Picea glehnii* (Sieb. et Zucc) and their related compounds against feeding behaviour of *Reticulitermes speratus* (Kolbe). *Journal of Wood Science*, **50**: 439-444.

Tagawa E, Kawahara H. (2017). Anti-ice nucleation activities of adenine and poly-A nucleotides. *Biocontrol Science*, **22**: 233-237.

Tagawa E, Ura M, Nakatsuka E, Hirano Y, Kawahara H. (2018). Anti-ice nucleation activities of tyrosine peptide. *Biocontrol Science*, **23**: 81-83.

田中 信壽, 和田 浩志, 渕野 裕之, 井上 猛, 安田 大輔, 神田 秀一郎, 清川 千晶, 芦田 憲昭, 鈴木 崇史, 山崎 浩平, 袴塚 高志. (1998). タケ・ササ類の成分研究. 薬学雑誌, **118**: 332-337.

Tomalty HE, Walker VK. (2014). Perturbation of bacterial ice nucleation activity by a grass antifreeze protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **452**: 636-641.

Tomihama T, Nishi Y, Arai K. (2006). The effect of ice nucleation-active *Xanthomonas campestris* on the occurrence of bacterial shoot blight disease of tea caused by *Pseudomonas syringae* pv. *theae*. *Japanese Journal of Phytopathology*, **72**: 14-21.

Turnbull D, Fisher JC. (1949). Rate of nucleation in condensed systems. *The Journal of Chemical Physics*, **17**: 71-73.

Vali G. (1971). Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. *Journal of Atmospheric Sciences*, **28**: 402-409.

Vonnegut B. (1947). The nucleation of ice formation by silver iodide. *Journal of Applied Physics*, **18**: 593.

Vonnegut B, Chessin H. (1971). Ice nucleation by coprecipitated silver iodide and silver bromide. *Science*, **174**: 945-946.

Wang D, Kasuga J, Kuwabara C, Endoh K, Fukushi Y, Fujikawa S, Arakawa K. (2012). Presence of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) hydrolyzable tannins in deep supercooling xylem parenchyma cells in *Cercidiphyllum japonicum*. *Planta*, **235**: 747-759.

Warren G, Corotto L, Wolber P. (1986). Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Research*, **14**: 8047-8060.

Watanabe M, Makino T, Okada K, Hara M, Watabe S, Arai S. (1988). Alkylbenzyltrimethylammonium salts as inhibitors for the ice nucleating activity of *Erwinia ananas*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**: 201-206.

Waturangi DE, Tjhen A. (2009). Isolation, characterization, and genetic diversity of ice nucleation active bacteria on various plants. *HAYATI Journal of Biosciences*, **16**: 54-58.

Wilson PW, Heneghan AF, Haymet ADJ. (2003). Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. *Cryobiology*, **46**: 88-98.

Wilson PW, Leader JP. (1995). Stabilization of supercooled fluids by thermal hysteresis proteins. *Biophysical Journal*, **68**: 2098-2107.

Wowk B, Fahy GM. (2002). Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. *Cryobiology*, **44**: 14-23.

山田 靖史, 山田 拓史. 出願人: ロイヤルインダストリーズ株式会社. (2009). 果樹の凍霜害の予防及び／又は軽減方法. 出願番号: 特願 2009-53535.

山中 捷一郎, 羽生 寿郎, 西山 司, 中山 敬一. (1982). 作物の霜害と環境条件 第 1 報 ダイズ苗の霜害と凍結温度との関係. *農業気象*, **38**: 23-28.

Yamashita Y, Kawahara H, Obata H. (2002). Identification of a novel anti-ice-nucleating polysaccharide from *Bacillus thuringiensis* YY529. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **66**: 948-954.

Yankofsky SA, Levin Z, Moshe A. (1981). Association with citrus of ice-nucleation bacteria and their possible role as causative agents of frost damage. *Current Microbiology*, **5**: 213-217.

Zachariassen K, Hammel H. (1988). The effect of ice-nucleating agent on ice-nucleating activity. *Cryobiology*, **25**: 143-147.

Zhao J, Orser CS. (1990). Conserved repetition in the ice nucleation gene inaX from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Molecular Genetics and Genomics*, **223**: 163-166.