

カツラで検出された氷核活性に関する研究

共生基盤学専攻 バイオマス転換学講座 資源植物創成学 鉄穴口 晃

1. 緒言

耐寒性の高い樹木において、皮層や形成層の細胞は、細胞外凍結という組織特異的な凍結挙動を示して氷点下温度に適応している。この細胞外凍結は、細胞内よりも溶質濃度の低い細胞外の水の凍結から始まるが、溶質濃度以外にも着生氷核細菌等に起因する外因的な氷核形成を促す活性（氷核活性）や植物の内在的な氷核活性が凍結に影響を及ぼしている可能性が考えられている。細菌由来の氷核活性は広く研究されている一方、植物由来の氷核活性に関する研究は数少なく、シュウ酸カルシウムがその一例として挙げられる。以前の研究で、カツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) 樹皮の不溶性画分から高い氷核活性が検出されたことを報告した。そこで本研究では、樹木に存在する氷核活性物質の存在を明らかにするため、カツラ樹皮から2種類の画分を調製し、両画分から氷核活性の検出を試みるとともに、各画分に存在する氷核活性物質の性質について調べた。

2. 方法

カツラ樹皮 (2016年12月採取) を液体窒素中で磨砕し、抽出緩衝液 [50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0), 0.5 M sorbitol, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM $K_2S_2O_5$] と 20 mg/mL ポリビニルポリピロリドン (PVPP) を加えて抽出した後、9,000xg, 10分で遠心分離して沈殿を得、新しい抽出緩衝液で十分洗浄後、Milli-Q水 (MQ水) を加えて懸濁したものを不溶性画分とした。続いて、この不溶性画分に対し10倍量のMQ水を加えて振とうした後、遠心分離して上清を取り分けた。この操作を同一試料について数回繰り返して得られた上清を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過し、ろ液を洗浄液画分とした。氷核活性の評価は、試料の凍結温度を測定し、これが対照区 (不溶性画分: 20 mg/mL PVPP 懸濁液, 洗浄液画分: MQ水) よりも有意に高い場合に活性があるとみなした。凍結温度の測定は、測定試料を2 μL ずつ分注して4°Cから0.2°C/minの速度で冷却し、試料の凍結時に生じる潜熱の放出を検出して、その発熱開始温度を各試料の凍結温度とみなした。また、カツラ樹皮に存在する氷核活性物質の性質を調べるため、両画分の凍結温度に対する様々な処理の影響の有無を調べた。

3. 結果と考察

カツラ樹皮から調製した2種類の画分の凍結温度を調べたところ、不溶性画分は約-8°C、洗浄液画分は約-11°Cであった。対照区の凍結温度はそれぞれ-18.5°Cと-24.5°Cであったので、両画分は対照区よりも10°C以上も高い温度で凍結した。そのため、両画分とも氷核活性の存在が考えられた。次に、各画分の氷核活性物質の性質を調べたところ、不溶性画分は熱感受性であり、洗浄液画分は熱耐性であった。また、両画分とも22°Cでの1 M水酸化ナトリウム処理や10 M硫酸処理で活性が低下した。さらに洗浄液画分では、22°Cでの1 M塩酸処理では影響を受けなかったが、80°Cでの塩酸処理では活性が低下した。次に両画分についてプロテアーゼ処理、セルラーゼ処理、ペクチナーゼ処理を行ったところ、両画分ともすべての処理で氷核活性の変化はみられなかったため、両画分の氷核活性にタンパク質やセルロース、ペクチンが関与している可能性が小さいことが示唆された。また、限外濾過により、洗浄液画分の氷核活性は分子量30万~100万の画分に高く維持されることが分かった。現在、硫酸処理や加熱条件下酸処理の影響を受ける多糖類が氷核活性に関与している可能性を考え、洗浄液画分において構成成分の分析を検討している。