

学位論文題名

Identification and characterization of supercooling-facilitating hydrolyzable tannins isolated from xylem tissues of *Cercidiphyllum japonicum*
(カツラ木部から単離した新規過冷却促進活性物質の加水分解性タンニンに関する研究)

学位論文内容の要旨

温帯以北や標高の高い地域に生息する植物は、冬季の気温が氷点下となる寒冷な季節を過ごす。このとき、多くの草本植物や木本植物の皮層柔細胞では、細胞外の水が凍結することに平衡して細胞が脱水することで、致命的な傷害をもたらす細胞内凍結の発生を防ぐ(細胞外凍結)。一方、木化した厚い細胞壁を有する樹木の木部柔細胞の多くは、細胞外の水が凍結してもほとんど脱水しないため、厳しい凍結温度下でも細胞内の水を過冷却状態に保つことで細胞内凍結を回避する(深過冷却)。木部柔細胞の深過冷却機構では、従来、木部柔細胞の原形質が細胞壁の構造特性によって細胞外氷晶から隔離されていることが重要とされていたが、近年、これに加えて細胞内で氷核形成阻害物質(過冷却促進物質、supercooling-facilitating substances: SCF物質)が過冷却の維持に関与する可能性を提唱している。広葉樹・針葉樹を含む複数の樹木の木部から得られたメタノール粗抽出液に含まれる細胞内成分が、水溶液の氷核形成温度(凍結温度)に与える影響をドロップレット凍結法にて調べたところ、いずれの樹種からも水溶液の過冷却を促進する効果が検出された。中でも最も高い過冷却促進効果を示したカツラ(*Cercidiphyllum japonicum*)木部の粗抽出液からSCF物質の単離とその構造解析をおこなった。その精製過程にて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画されたほぼ全ての画分で過冷却活性が検出され、等濃度あたり最も高い過冷却活性を示した画分から4種類のフラボノール配糖体が新規過冷却促進活性物質として同定された。

そこで本研究では、広く過冷却活性を示したシリカゲル画分のうち、未同定の活性ピークを対象に新たに過冷却促進活性物質の単離・同定を試みた。活性画分をセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーにて分離を繰り返すことで4種類のSCF物質を単離した。単離した4種の過冷却促進物質の構造を特定するために、UV スペクトル測定や質量分析、NMR スペクトル分析をおこなったところ、それぞれ 2,2',5-tri-*O*-galloyl- α , β -D-hamamelose (trigalloyl Ham : $C_{27}H_{24}O_{18}$)、1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose (trigalloyl Glc : $C_{27}H_{24}O_{18}$)、1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose (tetragalloyl Glc : $C_{34}H_{28}O_{22}$)、1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose (pentagalloyl Glc : $C_{41}H_{32}O_{26}$) と、いずれも加水分解性タンニンであることが明らかとなった。氷核細菌の一種である *Erwinia ananas* を氷核物質に用い、各試料濃度が 1 mg/mL での過冷却活性をドロップレット凍結法によって調べたところ、水溶液の INT₅₀ (試料の半数が凍結する温度で、凍結温度の指標) をそれぞれ

trigalloyl Ham は 2.3°C、trigalloyl Glc は 1.5°C、tetragalloyl Glc は 2.9°C、pentagalloyl Glc は 2.1°C 低下させることがわかり、既存のものとは比べて同程度かやや高い活性を示した。これらはいずれも 2 mM 以下の低濃度で得られたものであり、全てが新規の SCF 物質であった。したがって、カツラ木部組織にはフラボノール配糖体と加水分解性タンニンの少なくとも 2 つのタイプの SCF 物質がそれぞれ複数種類ずつ存在することが判明した。

次に、単離したこれらの加水分解性タンニンについて、いくつかの既存の氷核物質を含む水溶液における過冷却活性をドロップレット凍結法で調べたところ、*E. ananas* のみならず、ヨウ化銀 (AgI) や氷核細菌の *Xanthomonas campestris*、1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucinol) を含む水溶液でも過冷却活性を示すことが判明した。しかし、過冷却活性の程度は、SCF 物質の種類や濃度、氷核物質の種類によってもそれぞれ異なっており、*E. ananas* や AgI に比べて *X. campestris* や phloroglucinol 存在下での過冷却活性はいずれの化合物でも低い傾向であった。なかでも phloroglucinol を用いた場合、0.05 ならびに 0.1 mg/mL の tetragalloyl Glc と pentagalloyl Glc には過冷却活性とは逆の弱い氷核活性が検出されたが、これより高濃度では過冷却活性を示した。この傾向は、既存の SCF 物質を添加しない純水 (milliQ 水) を用いて過冷却活性を測定した場合でより顕著に見出された。同様の性質を示した研究例も報告されているが、本件も含め、この複雑な作用機構は現在も未解明である。また、空気中に浮遊する微小な塵芥や土壌成分などの未同定物質が氷核となりうるため、これらが混入する可能性を極力排除するために、直径 10 μm 以下のごく微小な液滴をエマルジョン法によって形成して過冷却能を調べたところ、純水の過冷却限度温度に近い -39°C 前後まで milliQ 水の微小液滴の過冷却を維持できたものの、いずれの加水分解性タンニンを添加しても -39°C よりも過冷却限度温度を下げる効果がみられなかった。このことから、4 種類の加水分解性タンニンは純水ではなく氷核物質が存在する条件下で過冷却を維持・促進することが示唆された。

さらに、木部における 4 種類の加水分解性タンニン含有量の季節変動を調べたところ、trigalloyl Ham と tetragalloyl Glc が 4 種類の総量の 90% 近くを占め、特に trigalloyl Ham の含有量が春夏よりも秋冬の方が高かったため、総量は夏季よりも冬季の方が高い傾向を示した。しかし、カツラ木部のフラボノール配糖体含量の季節変動や加水分解性タンニンの季節変動では木部柔細胞の深過冷却能の顕著な季節変動と十分な相関性が得られないため、これら以外の要因が深過冷却能の季節変動に関与する可能性も考えられた。

本研究では、深過冷却能を有するカツラ木部柔細胞の抽出液から新規の過冷却促進物質として 4 種類の加水分解性タンニンを同定した。これにより、樹木木部柔細胞では、複数種類の異なる性質を持つ化合物が深過冷却の維持に寄与していることが強く示唆された。また、これらの活性について種々の実験をおこなった結果、様々な氷核物質に対する過冷却促進活性を示したものの、濃度によっては氷核活性を示したことから、両者の複雑な相互作用による過冷却活性機構の存在が予想された。今後もこれらの過冷却促進物質の機能評価等を継続して基礎的知見を蓄積することにより、深過冷却する樹木の木部柔細胞に特徴的な水の凍結制御機構の解明やその有効利用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 荒 川 圭 太
副 査 特任教授 鍋 田 憲 助
副 査 教 授 山 田 敏 彦
(北方生物圏フィールド科学センター)
副 査 教 授 平 井 卓 郎
副 査 講 師 福 士 幸 治

学位論文題名

Identification and characterization of supercooling-facilitating hydrolyzable tannins isolated from xylem tissues of *Cercidiphyllum japonicum*

(カツラ木部から単離した新規過冷却促進活性物質の加水分解性タンニンに関する研究)

本論文は、5章からなり、図28、表4、引用文献66編からなる総頁90頁の英文論文である。この他に参考論文2編が添えられている。

樹木の木部柔細胞は厳しい凍結温度下でも脱水せず、細胞内の水を過冷却状態に保つことで細胞内凍結を回避する。この深過冷却機構に関する研究において、近年、カツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) 木部の粗抽出液から新規の氷核形成阻害物質 (過冷却促進物質、supercooling-facilitating substances: SCF物質) として4種類のフラボノイド配糖体を同定して細胞内にて過冷却の維持に関与することを示唆した。一方で、その精製過程において未同定の活性画分がいくつも存在したことから、複数のSCF物質の存在が考えられた。そこで本研究では、広く過冷却活性が分布したシリカゲルカラムクロマトグラフィーの画分のうち、未同定の活性ピークを対象に新たに過冷却促進活性物質の同定を試みた。

上記の未同定の活性画分を用い、セファデックスLH-20カラムクロマトグラフィーによる分離によって新たに4種類のSCF物質を単離した。これらの物質の構造解析を、UVスペクトル測定や質量分析、NMRスペクトル分析にておこなったところ、2,2',5-tri-*O*-galloyl- α,β -D-hamamelose (trigalloyl Ham)、1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose (trigalloyl Glc)、1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose (tetragalloyl Glc)、1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose (pentagalloyl Glc) といずれも加水分解性タンニンであり、全てが新規のSCF物質であった。氷核細菌の一種である *Erwinia ananas* を氷核物質に用い、1 mg/mL濃度でのSCF活性をドロップレット凍結法によって調べたところ、trigalloyl Ham、trigalloyl Glc、tetragalloyl Glc、pentagalloyl Glcは水溶液の凍結温度 (INT₅₀: 試料の半数が凍結する温度) をそれぞれ2.3、1.5、2.9、2.1°C低下させた。

次に、単離したこれらの加水分解性タンニンについて、既存の氷核物質を含む水溶液を用いて SCF 活性をドロップレット凍結法で調べたところ、*E. ananas* のみならず、ヨウ化銀 (AgI) や氷核細菌の一種の *Xanthomonas campestris*、1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucinol) を含む水溶液でも SCF 活性を示すことが判明した。しかし、SCF 活性の程度は、SCF 物質の種類や濃度、氷核物質の種類によっても異なり、*X. campestris* や phloroglucinol に比べて *E. ananas* や AgI 存在下での SCF 活性はいずれも高い傾向であった。さらに、phloroglucinol を用いた場合、ある濃度域の tetragalloyl Glc と pentagalloyl Glc では過冷却活性とは逆の弱い氷核活性が検出されたことから、SCF 物質と氷核物質との複雑な相互作用が予想された。また、空気中に浮遊する微小な塵芥なども氷核となりうるため、これらの混入を極力排除するため、直径 10 μm 以下の微小な油中水滴エマルジョンを形成して過冷却能を調べたところ、純水の過冷却限度温度に近い -39°C 前後まで milli-Q 水のエマルジョンは過冷却を維持できたが、いずれの加水分解性タンニン (終濃度: 1 mg/mL) も過冷却限度温度を -39°C よりも下げる効果はみられなかった。このことから、4 種類の加水分解性タンニンは氷核物質が存在する条件下で溶液の過冷却を維持・促進することが示唆された。さらに、木部における 4 種類の加水分解性タンニン含有量の季節変動を調べたところ、カツラ木部の深過冷却能と加水分解性タンニン含量との間で十分な相関性が得られなかったため、他の要因も深過冷却能の季節変動に関与する可能性も考えられた。

本研究では、樹木の木部抽出液から新規過冷却促進物質として 4 種類の加水分解性タンニンを同定し、これらが木部柔細胞内にて深過冷却の維持に関わる可能性を示唆した。今後もこれらと氷核物質由来の氷核形成との相互作用の研究等を継続することで、樹木の耐寒性や水の凍結制御機構の理解やその応用研究に対して有用な知見を提供できるものと考えられる。

よって、審査員一同は、王東暉が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。