J025034

植物由来の過冷却促進物質の探索とその作用機序*

多田 幸生^{*1}, 相原宏次^{*2}, 瀧本 昭^{*1}, 大西 元^{*1}

Screening and Functions of Plant-derived Compounds having Supercooling-facilitating Activity

Yukio TADA^{*1}, Koji AIHARA, Akira TAKIMOTO and Hajime ONISHI^{*1} School of Mechanical Engineering, Kanazawa University
Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192 Japan

A method to enhancing supercooling is one of most promising techniques for cryopreservation. The object of this paper is screening of plant-derived compounds having supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) activity. In this study, ice nucleation catalyzed by ice-nucleation bacteria (*Xanthomonas campestris*) was tested for six kinds of plant-derived compounds by using micro-droplet freezing assay. Firstly, the supercooling-facilitating activity was depicted for oxyresveratrol and taxifolin. Secondly, the activity of compounds does not depend on the number of hydroxyl site. It was found the activity increased with decreasing the molecular weight of compound. Thirdly, one-dimensional growth experiments were carried out to observe the pattern formation of ice/solution interface growing from taxifolin solution. The column structure of primary arm was observed in the leading front. The results suggests taxifolin prevent the specific surface of ice crystal.

Key Words : Ice nucleation, Supercooling, Plant-derived compound, Freezing

1. 結 言

水溶液を氷点温度以下で長期に過冷却させることができれば、食品、生物試料、医療材料などを凍結損傷を受けることなく保存することができるため、過冷却促進物質が注目されている。従来の過冷却促進物質は過冷却活性が低く、過冷却促進技術として実用化されるには至っていない。しかし、近年、寒冷地に育成する樹木の木部柔細胞から高い過冷却活性を有するフラボノール配糖体が発見され、注目されている⁽¹⁾。また、ポリフェノール化合物のなかで、オリゴノールやタンニン酸が氷核活性を抑制する有望な過冷却促進物質であることも報告されている⁽²⁾。このように、過冷却促進物質の研究が活発になされているが、過冷却促進の機構については未解明な点が多く、様々な物質の過冷却促進効果の追究は重要である。

本研究では OH 基を有する 6 種類の植物由来物質について、過冷却促進の活性を実験的に追究すると共に、その促進機構について検討した。また、過冷却促進物質を添加した水溶液の一方向凍結実験を行い、氷結晶の形態形成と成長に及ぼす効果についても検討した。

2. マイクロドロップレット法による過冷却促進活性の測定

2・1 実験装置

過冷却活性の測定にはマイクロドロップレット法を用いた。測定装置を図 1 に示す。冷却面は厚さ 5mm の銅板とし、その上に供試液滴を並べてペルチェ素子で冷却する構造となっている。ペルチェ素子裏面にはジャケット型のヒートシンクが装着され、低温恒温槽で一定温度に維持した低温ブラインを循環させることで排熱を行う。ペルチェ素子はプログラム式温度コントローラを用いて PWM 駆動し、所定の速度で試料を冷却できる。銅板の

^{*1} 正員、金沢大学 理工研究域機械工学系 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

^{*2} キヤノン株式会社 (〒321-3293 栃木県宇都宮市清原工業団地 19-1)

E-mail: tada@se.kanazawa-u.ac.jp

温度は直径 2mm の白金抵抗測温体を用いて計測する。

2・2 実験方法

植物由来の供試試料として、表 1 に示すように、(S1)カスタラギン、(S2)ペンタガロイグルコース、(S3)プロシアニジン B3、(S4)プロシアニジンオクトマー、(S5)オキシレスベラトロール、(S6)タクシフォリンの 6 種類を用いた。また、比較のため、藤川らによって見出された 3 種類のフラボノール配糖体 (Q3G, K3G, K7G と表記) についても実験を行った。氷核活性物質として、氷核活性細菌である *Xanthomonas campestris* (和光純薬工業) を用いた。50mM リン酸緩衝液に 0.1wt% の氷核活性細菌、5wt% の DMSO、および 1mg/ml の過冷却促進物質を溶かしたものを実験試料液とした。銅板の表面をエタノールで洗浄し、6°C に予冷した銅板上に 2μl の供試溶液の液滴を 81 個配置し、0.18K/min の一定速度で冷却した。凍結の様相はデジタルカメラで 2.5min 毎に撮影・記録した。

Fig.1 Experimental apparatus

Table 1 Test sample of plant-derived compounds

No.	Substance	Molecular formula
Q3G	Quercetin-3-O-β-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
K3G	Kampferol-3-O-β-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
K7G	Kampferol-7-O-β-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
S1	Castalagin	C ₄₁ H ₂₆ O ₂₆
S2	Pentagalloylglucose	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆
S3	Procyanidin B3	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
S4	Procyanidin octamer	(C ₁₅ H ₁₀ O ₆) ₈
S5	Oxyresveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₄
S6	Taxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇

2・3 実験結果と考察

供試液滴の凍結の様相を図 2 に示す。液滴内の氷晶形成に伴って光の乱反射が起こり、凍結した液滴は輪郭がぼやけた画像として判別される。凍結した液滴の数を計測し、凍結確率 (=凍結した液滴数/全液滴数) を求めた結果を図 3 に示す。核生成は確率的な現象であるため、液滴の凍結開始温度、すなわち核生成温度は幅を持つことがわかる。そこで、過冷却促進の活性 (氷核活性の抑制効果) を (供試物質を含む全液滴の 50% が凍結した温度) - (コントロールの全液滴の 50% が凍結した温度) で定義し、各試料の値を求めた結果を図 4 に示す。いずれの供試試料も過冷却促進の活性を示していることがわかる。特に、S5 と S6 は他の物質と比べ、大きな過冷却活性を有する。これらの物質は抗酸化作用や抗菌活性を有し、氷核活性の抑制効果との関連性は興味深い。

過冷却促進機構について検討するため、水分子と水素結合を起こす OH 基の数と過冷却活性の関係を図 5 に示

Fig.2 Freezing behavior of micro-droplet (S6:Taxifolin)

Fig.3 Probability of ice nucleation

Fig. 4 Anti-ice nucleation activity

Fig. 5 Effect of number of OH site on anti-nucleation

Fig. 6 Effect of molecular weight of plant-derived compound on anti-ice nucleation activity

す。OH 基が少ないほうが過冷却促進の活性は大きくなるが、S2 などの例外もみられ、OH 基の数と過冷却活性に明確な関連性がみられない。一方、図 6 に示した過冷却活性と分子量の関係を見ると、S1 から S6 までは分子量が小さくなるにつれて過冷却促進の活性が向上する傾向が見られた。氷核面に生じる水素結合サイトを過冷却促進物質が塞ぐことで氷核成長を抑制しているとすれば、分子量が大きすぎると空間的な干渉により氷核面に水素結合できる数が抑制される可能性がある。このため過冷却促進の活性が向上するのではないかと推察される。

3. 氷結晶の成長に及ぼす過冷却促進物質の効果

3・1 実験装置および方法

過冷却促進物質を添加した場合の氷結晶の成長の様相を一方向成長観察法を用いて観察する。実験装置の概要を図 7 に示す。ペルチェ素子とヒーター加熱によりそれぞれ一定温度に維持された低温(T_L)および高温(T_H)の銅ブロックが顕微鏡ステージ上に設置されている。試料を載せたスライドガラスを銅ブロック上に設置し、直線温度勾配 $G=(T_H-T_L)/d$ を作る。スライドガラスを固定し、モータとマイクロメータを用いて二つの銅ブロックを一定速度 V で移動させることにより、一定の冷却速度 $R=(G \cdot V)$ が実現される。凍結の様相は顕微鏡に取り付けた CCD カメラにより撮影し、パソコンに録画する。供試溶液は、NaCl 水溶液、不凍タンパク質 AFP-III 水溶液、Taxifolin 水溶液の 3 種類とし、濃度 $C=0.2, 1.0\text{mg/ml}$ 、冷却速度 $R=0.6^\circ\text{C/min}$ の条件で実験を行った。

3・2 実験結果と考察

凍結界面の様相を図 8 に示す。AFP-III 水溶液の凍結界面はファセット面となり、プリズム面から成るジグザグのマッシュ域が成長する。つまり、AFP-III はプリズム面に吸着し、結晶成長を抑制する効果があると考えられ

る。Taxifolin は NaCl と AFP と異なり、結晶の 1 次アーム数が多く、アームの境界も直線状になっている。この結果から、Taxifolin は特定の結晶面の成長を抑制する作用があることが示唆される。また、結晶間に凍結しにくくなるスポットが形成される様子が観察された。この影響により 1 次アームの分岐が起こりやすく、その間隔が狭くなっている。

Fig.7 Experimental apparatus for one-directional freezing

Fig.8 Microscopic observation of leading front

4. 結 言

OH 基を有する 6 種類の植物由来物質について、氷核活性細菌 (*Xanthomonas campestris*) を供試した過冷却活性の測定を行い、以下の結論を得た。

- (1) Oxresveratrol と Taxifolin は比較的大きな過冷却促進の活性を示した。
 - (2) 本研究で用いた試料では、分子量が小さい方が過冷却促進の活性が高くなる傾向が見られた。
 - (3) Taxifolin 水溶液中では柱状の氷結晶が成長し、特定の面の成長を抑制する作用があると考えられる。
- 本研究を実施するにあたり、供試試料を提供していただいた星薬科大学学長 田中隆治氏に謝意を表します。

文 献

- (1) J.Kasuga, Y.Hashidoko, A.Nishioka, M.Yoshiba, K.Arakawa and S.Fujikawa, "Deep supercooling xylem parenchyma cells of Katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity", *Plant Cell and Environment*, Vol. 31, No. 9 (2008), pp. 1335-1348.
- (2) 稲田孝明, 小山寿恵, 桑原慎子, 荒川圭太, 藤川清三, "氷核活性を抑制するポリフェノール化合物の効果", 日本機械学会 2012 年度年次大会講演論文集, No.12-1(2012), J024031.