

ダイコン発芽実生の低温シフト処理による 脂質組成の変動

小嶋 道之¹・母坪 研巳¹・木下 幹朗¹
大西 正男¹・伊藤 精亮¹

(受理：1990年11月30日)

Changes of lipid compositions in radish seedlings
subjected to low temperatures

Michiyuki KOJIMA¹, Kenmi HOTSUBO¹, Mikio KINOSHITA¹
Masao OHNISHI¹ and Seisuke ITO¹

摘 要

ダイコン発芽実生を低温処理した時のグリセロ脂質とスフィンゴ脂質の組成および分子種の変化を調査した。生育温度の異なる実生の脂質クラスを比較したところ、セレブロシド(CMH)/リン脂質値は25°Cで0.18, 3°Cで0.10であった。ホスファチジルエタノールアミン(PE)とホスファチジルコリン(PC)の分子種は低温処理で明らかに変動を示したが、ホスファチジルグリセロール(PG)のそれはほとんど変化が認められなかった。すなわち、低温処理によりPCのリノレオイルリノレン(18:2/18:3)、ジリノレン(18:2/18:2)分子種が増大し、パルミトイルリノレン(16:0/18:3)とジパルミチン(16:0/16:0)分子種が減少した。PEでは18:2/18:3とパルミトイルリノレン(16:0/18:2)分子種が増大し、16:0/18:3分子種が減少した。しかし、PGの主要分子種は16:0/18:3で、両者ともに約60%を占めていた。CMH含量は低温処理で3.2%から1.5%に減少した。また、低温処理によりCMHの構成脂肪酸は2-ヒドロキシペヘン酸(22h:0)、2-ヒドロキシリグノセリン酸(24h:0)、2-ヒドロキシパルミチン酸(16h:0)および2-ヒドロキシネルボン酸(24h:1)が若干増大し、構成スフィンゴイドは4-ヒドロキシ-8-シススフィンゲニン(t18:1^{8c})が増大した。主要なセレブロシド分子種はt18:1⁸-24h:0-Glc, t18:1⁸-22h:0-Glc, d18:1⁸-16h:0-Glcおよびt18:1⁸-16h:0-Glcであった。

キーワード：ダイコン実生, 低温処理, グリセロリン脂質, セレブロシド, 分子種

緒 言

植物の環境に対する応答は、いろいろな形で認められ、数多くの研究が行なわれている¹⁻⁴⁾。中でも生育温度、特に低温における膜脂質の変動についてはテトラ

ヒメナ⁵⁻⁷⁾やラン藻^{8,9)}および耐塩性藻類、*Dunaliella*¹⁰⁻¹²⁾などの単細胞植物を用いてさかんに研究され、グリセロ脂質の脂肪酸組成およびジアシルグリセロール残基の分子種レベルでの応答が明らかにされている。また、高等植物においても低温処理した時

¹ 帯広畜産大学生物資源化学科

² Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro Hokkaido 080, Japan.

の膜脂質の変動についてのいくつかの報告がある¹³⁻¹⁵⁾が、スフィンゴ脂質を調査した報告はごく限られている^{16,17)}。生体膜の主要構成成分は脂質とタンパク質であり、両者によって膜機能の多様性が存在しているが、膜の低温傷害は主に高融点性脂質が低温により相分離することに起因している¹⁸⁾。相転移温度を規定する脂質として飽和型のホスファチジルグリセロール (PG) やスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) およびセレブロシド (CMH) があるが、著者らは植物 CMH の熱特性を調査して、構成ヒドロキシ酸の鎖長と相転移温度との間に正の相関のあることを明らかにした¹⁹⁾。また、低温耐性植物であるコムギやライ麦の葉の CMH には、これまでに調べた低温感受性植物の中には認められていない n-9 系列の不飽和ヒドロキシ酸含有分子種が存在し、同じ鎖長の飽和ヒドロキシ酸から成る分子種の相転移温度よりも著しく低いことを明らかにした¹⁹⁾。吉田らは、他のオルガネラに比べて細胞膜や液胞膜に CMH が多く認められること²⁰⁾、および両膜の相転移温度は CMH 含量にかなり影響を受けることを報告している²¹⁾。本研究では、低温耐性植物であるダイコン茎葉の CMH およびその関連化合物の構造上の特徴、およびダイコン発芽体実生を低温シフトした時の膜脂質、特にグリセリン脂質と CMH の変動を明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. ダイコン茎葉のスフィンゴ脂質の分別および分析
市販のハイブリッドラディッシュ (耐病総太り大根) の種子を 7 日間室温で水耕栽培して茎葉の全長が 7~10 cm のものを材料とした。茎葉 (100 g) は熱イソプロパノール 150 ml でホモジナイズして酸素失活した後、抽出液をプフナーのロートで分別し、残渣は再びクロロホルム-メタノール混液 (2:1, v/v), (1:2, v/v) および (1:9, v/v) 各 150 ml で順次ホモジナイズを行ない抽出液を得た。全抽出液は濃縮後、クロロホルム-メタノール-水 (30:60:8, v/v) で溶解して、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーに供し、同溶媒 1.0 l で中性脂質画分および 0.8 M 酢酸ナトリウムを含む同溶媒 1.5 l で酸性脂質画分を溶出した。中性脂質画分は 0.4 N メタノール性水酸化カリウムで 4 時間弱アルカリ処理を行ない、透析後内容物を濃縮乾固した。得られた試料はクロロホルムに溶解後ケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルムで遊

離の脂肪酸を溶出除去し、メタノールでスフィンゴ脂質を溶出させた。メタノール溶出画分は展開溶媒にクロロホルム-メタノール (95:12, v/v) を用いたケイ酸 TLC に供し、Rf 0.85~0.40 (セラミド画分), Rf 0.40~原点 (セレブロシド画分) および原点 (オリゴグリコシルセラミド画分, Oligo-GCM) をかき取り抽出した。セラミド画分およびセレブロシド画分は再ケイ酸 TLC を行ない精製した²²⁾。また、酸性脂質画分は透析により酢酸ナトリウムを除いた後、濃縮して中性脂質画分と同条件で弱アルカリ処理を行なった。得られたアルカリ安定な酸性脂質画分は無水ピリジン:無水酢酸 (1:1, v/v) でアセチル化した後、ケイ酸カラムクロマトグラフィーに供してクロロホルム-メタノールのステップワイズ方式による溶出を行ない、各溶出画分の構成スフィンゴイドの有無により酸性スフィンゴ脂質 (Acid-GCM) を検索した。分別したセラミド、セレブロシド、Oligo-GCM および Acid-GCM は常法に従って分解後、構成成分を調べた²²⁾。また、セラミドとセレブロシドの分子種組成はトリメチルシリル誘導体として GC-MS で分析した。GC-MS はコンピューター付日立 RMU-6MG, Diasolid ZT (3 mm×1 m) のガラスカラムを用い、セラミドは 300°C 恒温および 200°C から 260°C まで 3°C/min の昇温条件で、セレブロシドは 330°C 恒温および 250°C から 300°C まで 5°C/min の昇温条件で分析した。他のすべての条件は、前報と同様にして行なった²³⁾。また、セレブロシドは溶離液にメタノール-水 (25:1, v/v) を用い、逆相 HPLC (ERC-ODS カラム) に供して分子種分析を行なった¹⁹⁾。各ピークの同定は分取後メタノリシスを行ない構成成分を調べて行なった。

2. ダイコン茎葉の低温処理時の膜脂質分析

生育温度と膜脂質組成との関係进行调查する目的で、ダイコン茎葉を 25°C で 3 日間水耕栽培により発芽生育させ、一方はそのまま 25°C で 3 日間 (NCT), もう一方は 2~3°C の冷蔵ケースに移し 3 日間低温処理 (CT) を行なった。生存率は CT を再び 25°C に移し 3 日間生育を続けて傷害を受けているものと受けていないものの比から求めた。NCT と CT の茎葉より Folch 法により全脂質 (TL) を抽出し、得られた TL はケイ酸カラムクロマトグラフィーに供して中性脂質、糖脂質およびリン脂質に分別した。主要な膜脂質の含量はクロロホルム-メタノール-水 (65:16:2, v/v) および (65:25:4, v/v) を用いたケイ酸 TLC で各脂質クラスに分

離して50%硫酸を噴霧して加熱後、各スポットをデンシトメーターで測定する方法と、TLCで分離してかき取り抽出を行ない、メタノリシスで得られた脂肪酸メチルエステル（ヘプタデカン酸（17:0）を内部標準）をGLCで定量する方法を組合わせて測定した。全ステロール組成はTLをエタノール性KOHでケン化した後、エーテル可溶部をメタノリシスして得られたステロールをGLCで調べた²⁴⁾。CMHの構成成分の組成は先と同様にして行なった。また、主要リン脂質の分子種組成はジニトロベンゾイル誘導体として逆相HPLC法で求めた²⁵⁾。

結果および考察

1. ダイコン茎葉のスフィンゴ脂質の特徴

室温で7日間、水耕栽培して得られた葉（21.2g）、莖（45.1g）および根（4.3g）の全脂質含量は、それぞれ355mg（1.6%）、51mg（0.1%）および34mg（0.8%）であった。以前の研究でトウモロコシ各部位に含まれるセラブロシドの構成成分を比較したところ、葉および莖のセラブロシド組成は類似を示した²⁶⁾ので、本実験では葉と莖から得られた抽出液よりスフィンゴ脂質を調製して以下の実験に用いた。

1-1 スフィンゴ脂質の組成

ダイコン茎葉のセラミド、セラブロシド、Oligo-GCMおよびAcid-GCMの構成脂肪酸組成をTable 1に示した。セラミドの主要な構成脂肪酸は2-ヒドロキシリグノセリン酸（24h:0）、2-ヒドロキリベヘン酸（22h:0）およびリグノセリン酸（24:0）であり、セラブロシドのそれは24h:0、2-ヒドロキシパルミチン酸（16h:0）、2-ヒドロキシネルボン酸（24h:1^{5c}）であった。すなわち、セラミドとセラブロシドの主要な構成脂肪酸組成は異なっており、特にセラブロシドでは24:0の割合が低く、16h:0や24h:1の割合が高かった。また、Oligo-GCMとAcid-GCMの主要構成脂肪酸は50%以上が24h:0で、続いて22h:0であった。4種のスフィンゴ脂質画分の構成スフィンゴイドをTable 1に示したが、4種ともに主要なものは4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン（t18:1⁸）であった。Acid-GCMの構成スフィンゴイドは大部分がトリヒドロキシスフィンゴイドであり、セラブロシドやOligo-GCMの構成スフィンゴイドパターンよりもセラミドのそれに似ていた。セラブロシドおよびOligo-GCMの構成糖はグルコースのみであったが、Acid-GCMのそれはアラビノース、マ

ンノース、ガラクトース、グルクロン酸、N-アセチルグルコサミンおよびイノシトールが認められた。しかし、Oligo-GCMやAcid-GCMの糖鎖間の結合については今回は微量であったため分析できなかった。

1-2 セラミドおよびセラブロシドの分子種

セラミドの分子種組成を調べる目的でクロロホルム-メタノール（95:12, v/v）を展開溶媒とするケイ酸TLCに供して2つの画分に分別した。Rf 0.60~0.75の構成成分を調べたところ、構成脂肪酸は大部分が直鎖脂肪酸で、主要成分として24:0（40%）、パルミチン酸（16:

Table 1. Composition of fatty acids and sphingoids in sphingolipids from radish leaf and stem (%)

Constituent	Ceramide	Cerebroside	Oligo-GCM*	Acid-GCM**
Fatty acid***				
16:0	3.0	3.1	—	—
22:0	2.5	0.4	—	—
24:0	13.2	1.2	—	—
26:0	4.3	0.9	—	—
16h:0	2.5	22.9	13.0	—
20h:0	0.6	1.1	3.0	—
22h:0	13.1	12.1	11.7	13.1
23h:0	3.3	1.8	2.9	3.1
24h:0	32.6	22.4	57.2	77.4
24h:1	5.0	22.3	1.4	1.7
25h:0	1.7	1.5	3.7	2.4
26h:0	6.8	3.9	7.0	2.2
Others	4.8	6.4	0.1	<0.1
Sphingoid				
4-Hydroxy-sphinganine	21.1	6.8	5.9	24.2
4-Hydroxy-8-sphinganine	75.1	56.7	67.8	73.8
Sphinganine	0.6	8.3	22.1	0.3
8-Sphinganine	0.3	27.8	3.3	0.3
Othes	2.9	0.4	0.9	1.5

*Oligo-GCM show the fraction of oligoglycosyl-ceramide.

**Acid-GCM show the fraction of acid glycosyl-ceramide.

***Fatty acids are abbreviated as number of carbon atoms: number of double bonds, and h shows 2-hydroxy fatty acid.

0, 17%) およびベヘン酸 (22:0, 10%) が認められ、主要スフィンゴイドは4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン (t18:1⁸) であった。また、Rf 0.35~0.55の構成成分を調べたところ、2-ヒドロキシ脂肪酸が主要で、特に 24h:0 (69%) および 22h:0 (16%) が認められ、構成スフィンゴイドは Rf 0.60~0.75 の場合と同様 t18:1⁸ が主要成分であった。Fig. 1 にはセラミド全体および2つの画分の TMS 誘導体の GLC パターンを示したが、主要分子種は N-2'-ヒドロキシリグノセロイル-4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン (ピーク6) および N-2'-ヒドロキシベヘニル-4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン (ピーク4) であった。また、直鎖脂肪酸含有分子種の主要種は N-2'-リグノセロイル-4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン (ピーク5) であった。

セラプロシドをホウ酸含有ケイ酸 TLC に供して2つの画分に分別後、それぞれの構成成分を調べた。すると Rf 値の高い画分 (A, Rf 0.35~0.50) の主要な脂肪酸は 16h:0 (54%), 24h:0 (25%) および 22h:0 (12%), 構成スフィンゴイドは大部分が 8-スフィンゲニン (d18:

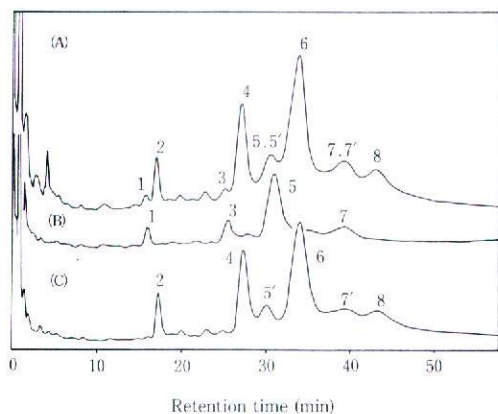


Fig. 1. Gas-liquid chromatograms of ceramide from radish leafy stems. Trimethylsilyl ether derivatives of total ceramide(A), subfraction(Rf 0.60-0.75 on TLC) of ceramide(B) and subfraction(Rf 0.35-0.55 on TLC) of ceramide(C) were analyzed by GLC and GC-MS(RMU-6MG) with a computer data system (Hitachi 002B-8DK). A glass column (0.3×100 cm) was packed with Diasolid ZT. Column temperature was 300°C. The energy level of the ion source was 20 eV and the ionizing current 80 μA.

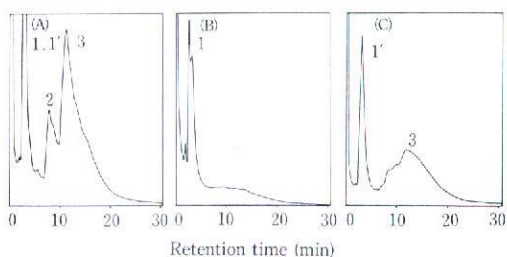


Fig. 2. Gas-liquid chromatograms of cerebroside from radish leafy stems. Trimethylsilyl ether derivatives of total cerebroside(A), subfraction(Rf 0.35-0.50 on 1% borax TLC) of cerebroside(B) and subfraction (Rf 0.20-0.35 on 1% borax TLC) of cerebroside(C) were analyzed by GLC and GC-MS under the same conditions as described in Fig. 1, except that the column temperature was 330°C.

1⁸) であり、Rf 値の低い画分 (B, Rf 0.20~0.35) の主要な脂肪酸は 24h:0 (32%), 24h:1 (29%) および 16:0 (19%), 構成スフィンゴイドは主に t18:1⁸ であった。

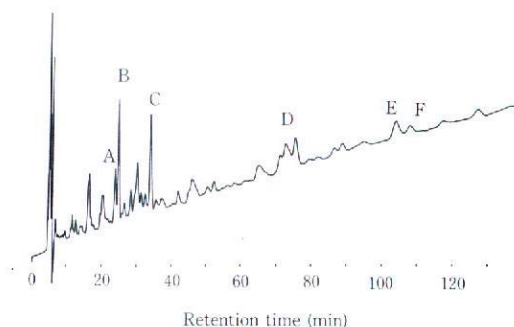


Fig. 3. HPLC separation of molecular species in cerebroside from radish leafy stems. Intact cerebroside was dissolved in 20 μl of mobile phase, injected, and chromatographed on a reverse phase column(ERC-ODS-2121, Erma Co.) at a flow rate of 1.0 ml/min. The solvent mixtures were MeOH-H₂O (25:1, v/v), and column temperature was 40°C. Detection was by a differential refractometer. The major molecular species of CMH were found to be t18:1^{8c}-16h:0-Glc(A), t18:1^{8c}-16h:0-Glc(B), d18:1^{8c}-16h:0-Glc(C), t18:1^{8c}-24h:1-Glc(containing t18:1^{8c}-22h:0-Glc)(D), t18:1^{8c} 24h:0 Glc(E) and t18:1^{8c}-24h:0-Glc(F).

また、全セレブロシドおよびホウ酸含有 TLC の 2 つの画分 (A と B) の TMS 誘導体を GLC に供した結果を Fig. 2 に示した。主に 3 ピークが認められ、ピーク 1 は 1-O-β-グルコシル-N-2'-ヒドロキシパルミトイル-8-スフィンゲニン (d18:1^s-16h:0-Glc), ピーク 1' は 1-O-β-グルコシル-N-2'-ヒドロキシパルミトイル-4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン (t18:1^s-16h:0-Glc), ピーク 3 は 1-O-β-グルコシル-N-2'-ヒドロキシリグノセロイル-4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン (t18:1^s-24h:0-Glc) であることが GC-MS の結果、および先の報告との比較²³⁾ から明らかとなった。また、CMH を逆相 HPLC に供したところ、少なくとも 20 以上のピークが認められ (Fig. 3), 完全に全分子種を分別同定することはできなかったが、主要分子種は t18:1^s-24h:0-Glc (ピーク E と F), d18:1^s-16h:0-Glc (ピーク C), t18:1-16h:0-Glc (ピーク A と B) および 1-O-β-グルコシル-N-2'-ヒドロキシネルボンイル-4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン (t18:1^s-24h:1-Glc, ピーク D) であることを明らかにした。

2. ダイコン茎葉の低温処理時の膜脂質の変化

25°C で 3 日間生育後、2~3°C に低温シフトして 3 日間生育したもの (CT) の生存率は 100% であり、ダイコン茎葉は著しく低温に強いことが示された。NCT と CT の全脂質含量は前者が 0.7%, 後者が 2.1% で低温処理により全脂質含量の増大が示された。また、CT の方がセレブロシドとステロール脂質の割合が低く、グリセロリン脂質の割合が高かった (Table 2)。すなわち、膜脂質の主要構成成分であるグリセロリン脂質に対するセレブロシドおよびステロール脂質の割合は、NCT に比べ CT で低いことが示された。しかし、グリセロ糖脂質の割合は両者において著しい違いは認められなかった。この傾向は低温処理したライ麦実生の細胞膜

Table 2. Lipid composition of NCT and CT radish seedlings (%)

Lipid class	NCT	CT
Cerebroside	6	4
Sterol lipid	18	13
Glycerophospholipid	33	39
Glyceroglycolipid	43	44
Cerebroside/Phospholipid	0.18	0.10
Sterol lipid/Phospholipid	0.55	0.33

Table 3. Compositions of cerebrosidcs from NCT and CT radish seedlings (%)

Constituent	NCT	CT
Sphingoid*		
d18: 2 ^{4t,8t}	2.8	3.2
d18: 2 ^{4t,8c}	2.7	3.5
d18: 1 st	14.8	13.3
d18: 1 ^{sc}	1.8	1.8
t18: 1 st	42.0	41.6
t18: 1 ^{sc}	22.8	31.0
Othes	13.1	5.6
8-cis/8 trans	0.46	0.62
2-Hydroxy acid**		
16h: 0	20.4	16.4
22h: 0	19.3	25.7
22h: 1	2.2	4.1
24h: 0	32.1	26.9
24h: 1	11.8	13.1
26h: 0	4.3	2.1
26h: 1	3.8	5.1
Others	6.1	6.6
Σ Uns. /Σ Sat.	0.22	0.30

*d and t show dihydroxy- and trihydroxy- sphingoids, respectively. Sphingoids are abbreviated as number of carbon atoms: number of double bonds.

**Abbreviations are the same in Table 1.

の脂質の特徴と同様であった¹⁶⁾。今回はダイコン茎葉全体を用いて調査したので、どのオルガネラ膜の脂質が低温時に顕著に応答しているのかは不明であり、今後の課題の 1 つである。

Table 3 に NCT と CT のセレブロシドの構成成分の組成を示した。主要な構成スフィンゴイドは両者で同様であり、4-ヒドロキシ-トランス-8-スフィンゲニン (t18:1^s), 4-ヒドロキシ-シス-8-スフィンゲニン (t18:1^{sc}) およびトランス-8-スフィンゲニン (d18:1st) であったが、組成割合は両者で若干異なり、CT でシス型の割合が若干高かった。また、構成脂肪酸の大部分は 2-ヒドロキシ酸であり、NCT と CT とともに主要なものは 24h:0, 22h:0 および 16h:0 であった。また、低温耐性植物

の特徴として認められる不飽和ヒドロキシ酸も認められたが、低温処理によるその割合は Lynch らがライ麦実生で報告した¹⁶⁾ほど顕著な変動は認められなかった。また、低温処理によるセレプロシドの構成糖の変化はまったく認められず、両者ともにグルコースであった。すなわち、低温処理によりセレプロシドの構成成分、シス型スフィンゴイド(主に t18:1^{6c})および不飽和ヒドロキシ脂肪酸(22h:1, 24h:1 および 26h:1)の若干の増大が認められ、低温時にセレプロシドの構成成分が変化することが示された。また、今回は生育途中の実生を低温シフトしたが、発芽温度や生育ステージの違いにより CMH の構成成分が変化することも考えられ、今後の検討課題である。

NCT と CT の全ステロール組成を GLC で調査したところ、シトステロールとカンベステロールが主要であり、NCT と CT ともに約 3.7:1.0 で、2 種のステロールで全体の 90% 以上を占めていた。リン脂質に対するステロール含量は NCT と CT で異なっており、CT で低い値を示した (Table 2) が、低温処理によるステロール組成の変動は認められなかった。

NCT および CT の主要なグリセロリン脂質とグリセロ糖脂質の構成脂肪酸組成を Table 4 に示した。中性リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルコリン (PC) の脂肪酸組成は類似しており、パルミチン酸 (16:0)、リノール酸 (18:2) およびリノレン酸 (18:3) の 3 者が主要であったが、飽和脂肪酸に対する不飽和脂肪酸の割合は CT の PE で 3.3%、PC で 5.0% を示し、NCT のそれらよりも若干高い値を示した。また、酸性リン脂質のホスファチジルグリセロール (PG) の構成脂肪酸の中で飽和脂肪

酸 (16:0, 18:0 および 3-トランス-ヘキサデセン酸, 16:1^{3a}) の占める割合は、NCT および CT ともに 58~59% であり、村田説による低温耐性植物の PG の飽和脂肪酸の含量と一致した²⁹⁾。PG の構成脂肪酸の不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸の値は 0.7 で、中性リン脂質のそれに比べて小さく低温処理による応答もほとんど認められなかった。また、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) およびジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) の構成脂肪酸は、ともに 18:3 の割合が高く、不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸の値は中性リン脂質のそれに比べ数倍高かった。しかし、葉緑体のもう一つの糖脂質、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) の構成脂肪酸は 16:0 が 30% 以上認められ、PE や PC の脂肪酸の組成割合と類似していた。また、SQDG の不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸の値は PG のそれに比べて 2 倍以上高く、PE や PC のそれに類似していたが、低温処理時の応答は PG と同様ほとんど認められなかった。

主要リン脂質、PE、PC および PG の 1, 2-ジアシルグリセロール (DG) 残基の分子種組成を Table 5 に示した。中性リン脂質である PE と PC の主要分子種は共通してパルミトイルリノレン (16:0/18:3)、パルミトイルリノレン (16:0/18:2) およびリノレオイルリノレン (18:2/18:3) であったが、両脂質クラスともに低温処理により 18:2/18:3 の増大および 16:0/18:3 の減少が認められ、アシル鎖の不飽和結合数の和が 3 以上の分子種と 4 以下の分子種の比は NCT よりも CT の方が高い値を示した。しかし、酸性リン脂質である PG の 1, 2-DG 残基の分子種は NCT と CT で

Table 4. Fatty acid compositions of glyceropholipids and glyceroglycolipids from NCT and CT radish seedlings (%)

Fatty acid	PE		PC		PG		MGDG		DGDG		SQDG	
	NCT	CT	NCT	CT	NCT	CT	NCT	CT	NCT	CT	NCT	CT
16:0	29.4	21.6	29.9	13.7	52.2	51.1	5.0	7.7	15.7	17.0	30.6	32.5
16:1	—	—	—	—	2.5	2.8	—	—	—	—	—	—
18:0	2.9	1.9	2.9	2.9	4.2	4.3	1.4	2.3	2.4	2.3	2.8	3.5
18:1	9.8	8.1	9.9	18.0	7.6	8.7	2.6	3.6	5.2	5.5	6.2	6.6
18:2	23.8	31.5	28.7	31.5	10.4	12.0	10.5	5.6	15.3	17.9	8.6	5.9
18:3	25.0	27.6	25.3	28.0	19.2	18.6	78.9	74.3	59.0	54.8	43.2	41.3
Others	4.6	9.3	3.3	5.9	3.9	2.5	1.6	6.5	2.4	2.5	8.6	10.2
Σ Uns./Σ Sat.	2.10	3.26	2.05	5.02	0.70	0.72	14.4	8.35	4.52	4.18	1.99	1.78

Table 5. Molecular species compositions of PE, PC and PG from NCT and CT radish seedlings (%)

Molecular* species	Double bound	PE		PC		PG	
		NCT	CT	NCT	CT	NCT	CT
18: 3/18: 3	6	4.5	5.9	5.1	6.8	2.5	2.5
18: 2/18: 3	5	11.0	14.9	12.0	16.4	1.6	1.7
18: 2/18: 2	4	9.2	9.5	5.8	10.3	4.0	1.6
18: 1/18: 3	4	7.3	7.7	11.1	11.0	1.6	1.4
16: 1/18: 3	4	—	—	—	—	1.6	1.4
16: 0/18: 3	3	27.0	20.9	16.1	10.7	58.9	61.8
18: 0/18: 3	3	3.5	2.2	3.8	1.9	1.1	0.1
18: 1/18: 2	3	6.5	7.1	11.2	13.1	1.3	0.3
16: 0/18: 2	2	21.8	23.6	14.4	14.0	19.8	20.8
18: 0/18: 2	2	3.1	2.8	8.8	7.9	6.2	5.9
16: 0/18: 1	1	3.1	2.8	8.8	7.9	6.2	5.9
16: 0/16: 1	1	—	—	—	—	0.1	0.5
16: 0/16: 0	0	6.1	5.4	11.7	7.9	2.8	3.5
>Double bound 3		0.47	0.61	0.52	0.80	0.11	0.08
<Double bound 4							

*The positional isomerism of fatty acids in diacylglycerol moieties is not regard.

著しい違いは認められず、両者の主要分子種は16:0/18:3と16:0/18:2であった。

以上の結果から、低温耐性植物であるダイコン茎葉を低温処理すると、新鮮重に対する脂質含量が増大し、特定の脂質クラスの構成成分（脂肪酸もしくはスフィンゴイド）の不飽和化が起るとともに、リン脂質に対するCMHの含量や、ステロールの含量が変化することが明らかとなった。

引用文献

- 1) LEVITT, J.: In "Responses of plants to environmental stress", Academic press, New York, 1972.
- 2) WOOLHOUSE, H.: In "Phytochemical physiogeny", J. B. Harborne, ed., Academic press, London, 1970, pp. 207-232.
- 3) SWAIN, T.: In "Biochemical evolution in plants", Comprehensive Biochemistry, 29A, 1974, pp. 125-302.
- 4) HARBORNE, J. B. (高橋英一, 深海浩訳), ハルボーン, 化学生態学, 文永堂, 1980, pp. 1-33.
- 5) WATANABE, T., FUKUSHIMA, H., KASAI, R. and NOZAWA, Y.: Biochim. Biophys. Acta, **665**, 66 (1981).
- 6) KAMEYAMA, Y., YOSHIDA, S. and NOZAWA, Y.: Biochim. Biophys. Acta, **793**, 28 and 34 (1984).
- 7) DICKENS, B. F. and THOMPSON, G. A. Jr.: Biochemistry, **21**, 3604, 3612 and 3618 (1982).
- 8) ONO, T. and MURATA, N.: Plant Physiol., **67**, 182 (1981).
- 9) ONO, T. and MURATA, N.: Plant Physiol., **69**, 125 (1982).
- 10) LYNCH, D. V. and THOMPSON, G. A. Jr.: Plant Physiol., **69**, 1369 (1982).
- 11) LYNCH, D. V. and THOMPSON, G. A. Jr.: Plant Physiol., **74**, 193 and 198 (1984).
- 12) NORMAN, H. A. and THOMPSON, G. A. Jr.: Arch. Biochem. Biophys., **242**(1), 157 and 168 (1985).
- 13) WILLIAMS, J. P., KHAN, M. U., MITCHELL, K. and JOHNSON, G.: Plant Physiol., **87**, 904 (1988).
- 14) NORDBY, H. E. and YELENOSKY, G.: Plant Physiol., **70**, 132 (1982).
- 15) HUNER, N. P. A., KROL, M., WILLIAMS, J. P., MAISSAN, E., LOW, P. S., ROBERTS, D. and THOMPSON, J. E.: Plant Physiol., **84**, 12 (1987).
- 16) LYNCH, D. V. and STEPONKUS, P. L.: Plant

- Physiol., **83**, 761(1987).
- 17) 吉田静夫, 鷺尾健司: 環境科学総合研究所年報, **7**, 45(1987).
 - 18) LYONS, J. M.: Ann. Rev. Plant Physiol., **24**, 445 (1973).
 - 19) OHNISHI, M., IMAI, H., KOJIMA, M., YOSHIDA, S., MURATA, N., FUJINO, Y. and ITO, S.: Proc. ISF-JOCS World Congress, 1989, pp. 930-935.
 - 20) YOSHIDA, S. and UEMURA, M.: Plant Physiol., **82**, 807(1986).
 - 21) YOSHIDA, S., WASHIO, K., KENRICH, J. and ORR, G.: Plant Cell Physiol., **29**(8), 1411(1988).
 - 22) 山田晃弘編著: 植物脂質代謝実験法, 学会出版センター, 1989, pp. 42-56.
 - 23) OHNISHI, M. and FUJINO, Y.: Lipids, **17**, 803 (1982).
 - 24) KOJIMA, M., OHNISHI, M., ITO, S. and FUJINO, Y.: Lipids, **24**(10), 849(1989).
 - 25) 小嶋道之, 大西正男, 間野康男, 佐々木茂文, 伊藤精亮, 藤野安彦: 油化学, **8**, 619(1989).
 - 26) 大西正男, 伊藤精亮, 藤野安彦: 油化学, **8**, 647(1989).
 - 27) MURATA, N., SATO, N., TAKAHASHI, N. and HAMAZAKI, Y.: Plant Cell Physiol., **23**(6), 1071 (1982).

Summary

The changes of the compositions and the molecular species of glycerolipids and sphingolipids when the radish seedlings were subjected to low temperatures were studied. When the lipid classes in radish seedlings were compared at different growing temperatures, the cerebroside (CMH)/phospholipids values in radishes were 0.18 at 25°C and 0.10 at 3°C. The molecular species of phosphatidylethanolamine(PE) and phosphatidylcholine(PC) prepared from the radish seedlings were changed remarkably following cold treatment, while those of phosphatidylglycerol(PG) did not show any remarkable change after the cold treatment. It was shown that linoleoyl-linolenin(18:2/18:3) and dilinolein(18:2/18:2) species increased, palmitoyl-linolenin(16:0/18:3) and dipalmitin(16:0/16:0)

species decreased in the molecular species of PC, and 18:2/18:3 and palmitoyl-linolenin(16:0/18:2) species increased, 16:0/18:3 species decreased in PE. The major species 16:0/18:3 of PG amounted to about 60%, about the same proportion to seedlings grown at 25°C. CMH in radish seedlings decreased from 3.2 to 1.5% of the total lipids following cold treatment. In addition, the relative proportions of associated hydroxy fatty acids, including 2-hydroxylignoceric acid(24h:0), 2-hydroxybehenic acid(22h:0), 2-hydroxypalmitic acid(16h:0), 2-hydroxynerbonic acid(24h:1), and those of associated sphingoids, including 4-hydroxy-8-cis-sphinganine(t18:1^{8c}), changed with the lowering of temperature. The major molecular species of CMH in radishes was found to be 1-O-β-glucosyl-N-2'-hydroxylignoceroyl-4-hydroxy-8-sphinganine, 1-O-β-glucosyl-N-2'-hydroxybehenyl-4-hydroxy-8-sphinganine, 1-O-β-glucosyl-N-2'-hydroxypalmitoyl-8-sphinganine and 1-O-β-glucosyl-N-2'-hydroxypalmitoyl-4-hydroxy-8-sphinganine.