

# タバコ培養細胞およびシロイヌナズナの耐塩性に及ぼす不飽和脂肪酸の重要性

小林雄二\*・前田良之\*\*\*・坂田洋一\*\*・田中重雄\*\*・武長 宏\*\*\*

(平成 13 年 2 月 28 日受付/平成 13 年 4 月 19 日受理)

要約: 高等植物の耐塩性と不飽和脂肪酸との関係を明らかにするため, 脂肪酸の不飽和度の増加が植物の耐塩性に及ぼす影響について検討した。光独立栄養性タバコ緑色培養細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) の塩適応株は野生株に比べて C16:1 および C18:3 脂肪酸の含有率が高く, C16:0, C18:0, C18:2 脂肪酸の含有率が低かった。また, 脂肪酸の不飽和化酵素遺伝子が欠損したシロイヌナズナ変異株は, 発根時あるいは子葉の展開時において野生株に比べて耐塩性が減少していた。これらの結果から, 脂肪酸の不飽和度の増加がタバコ培養細胞およびシロイヌナズナの耐塩性に関与している可能性が示された。

キーワード: タバコ, シロイヌナズナ, 不飽和脂肪酸, 耐塩性

## 緒 言

土壌への塩類集積は, 作物の生産性の向上にとって大きな障害となっており, 植物に対して様々な影響を引き起こす。その影響の一つとして植物の脂肪酸の不飽和化が塩ストレスによって減少することが報告されている<sup>1,2)</sup>。また, 耐塩性の強いトウモロコシでは塩ストレスによって脂肪酸不飽和化酵素遺伝子  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*fad7* および *fad8*) の mRNA の蓄積量が増加すること<sup>3,4)</sup>, らん藻の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の欠損株は野生株に対して塩に対する感受性が高いことが示されている<sup>5)</sup>。これらの報告は脂肪酸の不飽和度の増加が植物の耐塩性に関与している可能性を示している。そこで, 本試験は 200 mM NaCl 存在下で光独立栄養的に生育可能なタバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)<sup>6)</sup> の脂肪酸組成, および 6 系統の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が欠損したシロイヌナズナ変異株の耐塩性を調査し, 植物培養細胞および植物体の耐塩性に及ぼす脂肪酸の不飽和度の影響を検討した。

## 材料および方法

### 1. 光独立栄養性タバコ培養細胞の生育条件

光独立栄養性タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) は糖源の供給を伴わずに生育可能な細胞株であり, 細胞株の培養は室田ら<sup>6)</sup>の方法に従った。すなわちショ糖を含まない改変 Linsmaier-Skoog 培地 (pH 5.7) にて二酸化炭素濃度 1~2% を維持し, 連続照明下 ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で往復振とう培養 (100 rpm) を行った。細胞株は野生株および 200 mM NaCl 存在下で生育可能な塩適応

株を用いた。なお, 塩適応株は, 200 mM NaCl 添加培地に継代培養を行った<sup>6)</sup>。

### 2. タバコ培養細胞の脂肪酸組成の分析

継代後 10 日目の野生株および塩適応株から Bligh and Dyer の方法<sup>7)</sup>に従って脂質を抽出し, 32°C, 窒素気流下にて脂質 1 mg を乾固後, 2.5% HCl-メタノール, 内部標準としてペンタデカン酸を加えて 85°C, 2.5 時間加熱した。冷却後, ヘキサンおよびヘキサン:水 (3:1 v/v) にて脂肪酸メチルエステルを抽出した。これを減圧下で濃縮後, ガスクロマトグラフ GC-9A (Shimadzu, Japan), Supelco-wax 10 [30 m, 0.53 mm, 1.00  $\mu\text{m}$  (Supelco, USA)] によって分析した<sup>7,8)</sup>。

### 3. シロイヌナズナ変異株の子葉展開率および発根率の測定

供試したシロイヌナズナ変異株の種子 (*Arabidopsis thaliana* sp. Columbia) は, *fad2-1* (Stock No. CS8041), *fad3-2* (Stock No. CS8034), *fad4-1* (Stock No. CS205), *fad5-1* (Stock No. CS206), *fad6-1* (Stock No. CS207), および *fad7-1*, *8-1* (Stock No. CS8036) であり, Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) より譲渡された。また, *fad4-1* および *fad5-1* は C16:0 から C16:1 へ, *fad2-1* は C18:1 から C18:2 へ, *fad3-2* および *fad7-1*, *8-1* は C18:2 から C18:3 へ, *fad6-1* は C16:1 から C16:2 へ, あるいは C18:1 から C18:2 へそれぞれ変換する不飽和化酵素遺伝子が欠損した変異株である<sup>9,10)</sup>。シロイヌナズナ変異株種子は, ロックワール上へ播種し 1/2 強度の MGRL 培地にて 23°C, 連続照明下 ( $50\sim70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で栽培を続け次世代の種子を得た<sup>11)</sup>。種子を 70% エタノール, 5% NaClO-0.05% Tween 20 で滅菌し滅菌水で 5 回洗

\* 東京農業大学農学研究科農芸化学専攻

\*\* 東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科

\*\*\* 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

Table 1 Fatty acid compositions in Wild type and NaCl-adapted cells of tobacco

Species	Fatty acid composition (mole %)*	
	Wild type	NaCl-adapted cells
C16 : 0	30.7±2.6 <sup>a***</sup>	26.5±1.4 <sup>b</sup>
C16 : 1	0.7±0.1 <sup>b</sup>	1.9±0.6 <sup>a</sup>
C18 : 0	7.0±2.4 <sup>a</sup>	2.7±0.4 <sup>b</sup>
C18 : 1	2.8±0.4	2.3±0.2
C18 : 2	33.2±1.4 <sup>a</sup>	30.4±0.7 <sup>b</sup>
C18 : 3	25.6±0.3 <sup>b</sup>	36.2±1.0 <sup>a</sup>
Unsaturation ratio **	1.7±0.1 <sup>b</sup>	2.4±0.2 <sup>a</sup>

\* Mean ± S.D.; standard deviation (S.D.) was derived from four independent experiments (n=4).

\*\* Ratio of (amount of unsaturated fatty acids) / (amount of saturated fatty acids).

\*\*\* Values in the same line with different superscript (a, b) are significantly different (P<0.05).

Table 2 Germination ratio (rooting) in seeds of *Arabidopsis thaliana* sp. Columbia

Species	Ratio of rooting (%)*				
	Concentrations of NaCl (mM)				
	0	50	100	150	200
Wild type	96±0	94±1	94±6	78±9	77±6 <sup>a**</sup>
<i>fad 2-1</i>	95±5	89±10	97±5	66±6	30±7 <sup>b</sup>
<i>fad 3-2</i>	97±3	94±6	93±9	90±4	43±8 <sup>b</sup>
<i>fad 4-1</i>	92±6	95±6	88±11	80±3	56±5 <sup>b</sup>
<i>fad 5-1</i>	83±8	82±11	82±13	72±7	58±5 <sup>b</sup>
<i>fad 6-1</i>	96±4	94±5	95±6	85±3	63±9 <sup>a</sup>
<i>fad 7-1,8-1</i>	95±4	90±6	92±7	89±10	48±7 <sup>b</sup>

\* Mean ± S.D.; standard deviation (S.D.) was derived from four independent experiments (n=4,100 seeds for each).

\*\* Values at 200mM with different superscript (a, b) are significantly different (P<0.05).

浄した後、4°C条件下で30分吸水させた。その後、種子をおよび0~200 mM NaClを添加した寒天培地 [MS salt, 3% sucrose, Gamborg's vitamin, 1.2% agar (Wako) (pH 5.7)] へ播種した<sup>12,13</sup>。暗所にて4°C、5日間の低温処理後、人工気象室にて23°C、連続照明下 (50~70 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) で14日間栽培し、発根率、および子葉展開率を測定した。

### 結果および考察

供試したタバコ培養細胞の野生株および塩適応株の脂肪酸組成を Table 1 に示す。野生株に比べて塩適応株の C16 : 1 および C18 : 3 脂肪酸の含有率は有意に高く、逆に C16 : 0, C18 : 0 および C18 : 2 脂肪酸の含有率は低い値を示した。また、脂肪酸の不飽和度を示す不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比は、野生株の 1.7 に比べて塩適応株で 2.4 と高い値を示し、脂肪酸の不飽和度の増加が塩適応株の耐塩性の強化に関与している可能性が認められた。

そこで、脂肪酸の不飽和度の増加と耐塩性の強化との関連が植物体においても認められるかを明らかにするために、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の欠損したシロイヌナズナの耐塩性を野生株と比較した (Table 2 および Table 3)。200 mM の NaCl 処理条件下で、野生株と比べて *fad2-1*, *fad3-2*, *fad4-1*, *fad5-1*, および *fad7-1*, *8-1* の発根率は有

意に低下した (Table 2)。また、子葉の展開率は、150 mM および 200 mM の NaCl 処理下で *fad2-1* のみ有意に低下した (Table 3)。

植物において脂肪酸の不飽和度の増加には、一連の脂肪酸不飽和化酵素が関与し、各酵素によって不飽和度が順次増加することが報告されている<sup>9,10</sup>。本試験の結果、200 mM の NaCl 処理条件下でのタバコ培養細胞の塩適応株において C16 : 0 含有率の減少と C16 : 1 含有率の増加および C18 : 2 含有率の減少と C18 : 3 含有率の増加が有意に示され、C16 : 0 から C16 : 1, および C18 : 2 から C18 : 3 へ変換する脂肪酸不飽和化酵素に関わる遺伝子の関与が示唆された。一方、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子欠損株を用いた結果から、シロイヌナズナの発根および子葉展開時の耐塩性にはそれぞれ C16 : 0 から C16 : 1, C18 : 1 から C18 : 2, C18 : 2 から C18 : 3, および C18 : 1 から C18 : 2 への不飽和度の増加が関与している可能性が示された。特にタバコ培養細胞においても認められた C16 : 0 から C16 : 1 および C18 : 2 から C18 : 3 への脂肪酸の不飽和度の増加は植物の耐塩性強化に強く関連しているものと判断できた。脂肪酸の不飽和度の増加と耐塩性との関連について、膜脂質内の不飽和脂肪酸は、物理化学的な膜の構造や原形質膜の ATPase 活性にも影響を与えること<sup>14,15</sup>、らん藻の脂肪

**Table 3** Germination ratio (cotyledon growth) in seeds of *Arabidopsis thaliana* sp. Columbia

Species	Ratio of cotyledon growth (%)*				
	Concentrations of NaCl (mM)				
	0	50	100	150	200
Wild type	96 ± 1	94 ± 1	81 ± 15	51 ± 9 <sup>a**</sup>	26 ± 8 <sup>a**</sup>
<i>fad 2-1</i>	95 ± 5	87 ± 11	63 ± 7	34 ± 9 <sup>b</sup>	6 ± 3 <sup>b</sup>
<i>fad 3-2</i>	97 ± 3	95 ± 6	85 ± 8	60 ± 6 <sup>a</sup>	22 ± 12 <sup>a</sup>
<i>fad 4-1</i>	92 ± 6	94 ± 7	83 ± 11	51 ± 4 <sup>a</sup>	28 ± 6 <sup>a</sup>
<i>fad 5-1</i>	85 ± 6	79 ± 6	65 ± 2	58 ± 11 <sup>a</sup>	37 ± 11 <sup>a</sup>
<i>fad 6-1</i>	97 ± 3	94 ± 5	90 ± 10	57 ± 9 <sup>a</sup>	20 ± 13 <sup>a</sup>
<i>fad 7-1,8-1</i>	94 ± 3	90 ± 7	92 ± 8	58 ± 6 <sup>a</sup>	24 ± 8 <sup>a</sup>

\* Mean ± S.D.; standard deviation (S.D.) was derived from four independent experiments (n=4,100 seeds for each).

\*\* Values in the same column with different superscript (a, b) are significantly different (P<0.05).

酸不飽和化酵素遺伝子の欠損株は、野生株に対して塩に対する感受性が高く、この感受性が原形質膜の Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 活性の減少によるものであるということが報告されている<sup>5)</sup>。本試験で認められた不飽和脂肪酸の増加は、塩に対する生体膜の構造の維持に関与しているものと思われ、今後、不飽和脂肪酸含有率の増加が認められる膜画分および脂質分子種を検討するとともに各膜画分におけるイオン輸送能についても検討することが必要である。

謝辞：研究を行うに際して光独立栄養性タバコ培養細胞を提供して頂いた東海大学教養学部 室田憲一博士、ならびにシロイヌナズナ変異体の種子を分与して頂いた Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) に対して深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) SIEGENTHALER, P.-A. and MURATA, N., 1998. Lipids in photosynthesis : structure, function and genetics, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 287-302.
- 2) WINTERMANS, J.F.G.M. and KUIPER, P.J.C., 1982. Biochemistry and metabolism of plant lipids, Elsevier Biomedical Press B.V., Amsterdam, 419-422.
- 3) NISHIUCHI, T. and IBA, K., 1998. Roles of Plastid ω-3 fatty acid desaturase in defense response of higher plants. *J. Plant Res.*, **111**, 481-486.
- 4) BERBERICH, T., HARADA, M., SUGAWARA, K., KODAMA, H., IBA, K. and KUSANO, T., 1998. Two maize genes encoding ω-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Mol. Biol.*, **36**, 297-306.
- 5) ALLAKHVERDIEV, S.I., NISHIYAMA, Y., SUZUKI, I., TASAKA, Y. and MURATA, N., 1999. Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the

tolerance of *Synechocystis* to salt stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5862-5867.

- 6) MURATA, K., OHSHITA, Y., WATANABE, A., ASO, S., SATO, F. and YAMADA, Y., 1994. Change related to tolerance in thylakoid membranes of photoautotrophically cultured green tobacco cells. *Plant Cell Physiol.*, **35**, 107-113.
- 7) BLIGH, E.G. and DYER, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- 8) GOMBOS, Z., WADA, H. and MURATA, N., 1991. Direct evaluation of effects of fatty-acid unsaturation on the thermal properties of photosynthetic activities, as studied by mutation and transformation of *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol.*, **32**, 205-211.
- 9) HARWOOD, J.L., 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1301**, 7-56.
- 10) SIEGENTHALER, P.-A. and MURATA, N., 1998. Lipids in photosynthesis : structure, function and genetics, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 263-285.
- 11) FUJIWARA, T., HIRAI, Y.M., CHINO, M., KOMEDA, Y. and NAITO, S., 1992. Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia. *Plant Physiol.*, **99**, 263-268.
- 12) MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- 13) WU, S.-K., DING, L. and ZHU, J.-K., 1996. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell*, **8**, 617-627.
- 14) WEBB, M.S. and GREEN, B.R., 1991. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1060**, 133-158.
- 15) YAMANISHI, H. and KASAMO, K. (1993) Modulation of the activity of purified tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase from lipids. *Plant Cell Physiol.*, **34**, 411-419.

# Importance of Unsaturated Fatty Acids on Salt Tolerance of NaCl-Adapted Tobacco Cell Cultures and *Arabidopsis Thaliana*

By

Yuji KOBAYASHI\*, Yoshiyuki MAEDA\*\*\*, Yoichi SAKATA\*\*, Shigeo TANAKA\*\*  
and Hiroshi TAKENAGA\*\*\*

(Received February 28, 2001/Accepted April 19, 2001)

**Summary** : A line of NaCl-adapted photoautotrophically cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) contained more unsaturated fatty acids than unadapted cells, suggesting that high levels of unsaturated fatty acids may cause the cells to be more resistant to salt stress. Mutants of *Arabidopsis thaliana*, lacking genes encoding fatty acid desaturases, were inferior to the wild type in susceptibility to salt stress during the germination period. These results suggest that the desaturation of fatty acids is responsible for the salt tolerance in tobacco cells and *A. thaliana*.

**Key Words** : Tobacco, *Arabidopsis thaliana*, unsaturated fatty acid, salt tolerance

---

\* Division of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

\*\* Laboratory of Plant Genetics, Department of Bioscience, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture

\*\*\* Laboratory of Plant Production Chemistry, Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture