

無機および有機セレン化合物の曝露がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生長と遺伝子発現量に及ぼす影響

大塚 政志, 廣瀬 侑太郎, 細見 亮太[†], 老川 典夫, 吉田 宗弘

(関西大学化学生命工学部生命・生物工学科*)

(受付 2017年9月1日, 受理 2017年9月27日)

Effect of the Inorganic and Organic Selenium Compounds on the Growth and Gene Expression of *Arabidopsis thaliana*

Masashi OTSUKA, Yutaro HIROSE, Ryota HOSOMI, Tadao OIKAWA, And Munehiro YOSHIDA

Faculty of Chemistry Materials and Bioengineering, Kansai University*

Summary

We evaluated the effect of inorganic and organic selenium compounds on the growth and gene expression of *Arabidopsis thaliana*. After the cultivation of *A. thaliana* at 25°C for 28 days with 0, 1, and 5 ppm inorganic (selenate and selenite) or organic (selenomethionine (SeMet), selenocystine (SeCystine), and *Se*-methylselenocysteine (MeSeCys)) selenium compounds, we measured the growth parameters, selenium content, and mRNA expression levels of the genes encoding the proteins involved in sulfur amino acid metabolism in the plant. Fresh weight of the plant was approximately 60% lower following an exposure to 1.0 ppm of the various selenium compounds. The selenium content was higher in the roots when exposed to SeMet while that was higher in the leaves when exposed to selenite. Exposure to organic selenium compounds corresponded to a significant decrease in the root weight, compared to that obtained with an exposure to inorganic selenium compounds. MeSeCys, at a level of 5.0 ppm, showed a weaker inhibition of growth compared to that recorded with any other selenium compound at that level. The weights of roots and leaves decreased depending on the selenium exposure levels up to 5.0 ppm. The expression levels of homocysteine S-methyltransferase 3 were increased following an exposure to 1.0 ppm selenate, SeMet, and SeCystine each. These results suggest that inorganic and organic selenium compounds show different effects on the growth parameters of *A. thaliana*.

セレン (Se) は高等動物, および一部の細菌類では, 酵素機能などを持つタンパク質中にセレノシステイン (SeCys) 残基として存在しており, 生存に必須の微量元素である。また Se がフリーラジカル消去酵素の一部であるために, 低用量の Se 投与はヒトの癌予防効果が報告されている¹⁾。Se の毒性は, 硫黄 (S) との化学的性質が似ているために, タンパク質および S 化合物中の S に Se が非特異的に置換されることに起因すると考えられている^{2,3)}。緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*⁴⁾, 円石藻 *Emiliania huxleyi*⁵⁾ では, Se を要求するタンパク質の存在が示されているが, 高等植物では, Se が必須であるという明確な報告はなされていない。そのため, 植物は Se 化合物のもつ高い反応性を利用しておらず, 蓄積される Se 化合物の化学形態は, 解毒を目的に変換した反応性の低い化合物と

考えられている。そのため植物では特殊な含 Se アミノ酸の生成が知られている⁶⁾。このような特殊なアミノ酸の生成は, 高 Se 曝露の植物において特異的な代謝系が誘導されることを示唆している。一方, シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) にレンゲソウ (*Astragalus sinicus*) 由来のセレノシステインメチルトランスフェラーゼ (SMT) 遺伝子を過剰発現させることによって, Se 耐性が向上することが報告されている⁷⁾。また, シロイヌナズナの硫酸イオントランスポーター (SULTR) 1;2 ノックアウト変異体は, 細胞内の Se 濃度を減少することで, 野生株よりも高い Se 耐性をもつことが報告されている⁸⁾。このような遺伝子は, 高濃度 Se 曝露での植物体への Se 毒性の緩和に寄与していると考えられている。私たちが, シロイヌナズナに亜セレン酸を曝露することによって引き

*所在地: 大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

† 連絡先 (Corresponding Author), Tel: 06-6368-1765, E-mail: hryotan@kansai-u.ac.jp

起こされる遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより解析し、主に response to heat, response to temperature stimulus, response to high light intensity などストレス応答に関わる遺伝子セットが変動していることを報告している⁹⁾。これまで、植物に無機 Se 化合物を曝露し、代謝変動の解析や植物体内の含 Se 化合物の構造決定は行われているが、有機 Se 化合物曝露による報告はない。シロイヌナズナ (*A. thaliana*) は、ゲノムが完全に配列決定されているために、利用可能な遺伝的ツールが多い。そのため、多くの研究者に利用されており、他の研究報告との比較を行いやすい。そこで本実験では、無機および有機 Se 化合物をシロイヌナズナに曝露し、生長、Se 含量および S 代謝関連遺伝子発現量を評価した。

実験方法

1. Se 曝露シロイヌナズナの調製

シロイヌナズナは野生株 (Columbia-0) を用いた。20 g/L スクロース, 4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類¹⁰⁾, 3 mg/L チアミン塩酸塩, 5 mg/L ニコチン酸, 5 mg/L ピリドキシン塩酸塩, 8 g/L アガーを含む培地に、無機 Se 化合物 (亜セレン酸ナトリウム・セレン酸ナトリウム) および有機 Se 化合物 (L-セレノメチオニン (SeMet)・L-セレノシスチン (SeCystine)・Se-メチルセレノ-L-システイン (MeSeCys)) を Se 濃度が 1.0, 2.5, 5.0 ppm となるように添加した。培地溶液をオートクレーブ滅菌後、90 mm 滅菌シャーレに移し、滅菌種子を 1 粒播種し、長日条件の光周期のもと、無菌的に 25°C で栽培した (CLE-305, 株式会社トミー精工, 東京)。4 週間培養後、1 粒の種子から得られた葉と根を分別してすべて採

Table 1 Sequences of the specific primers used for reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis

Gene name		5'→3' primer sequence	Locus
<i>APSI</i>	Forward	TGATCGTTTCAGGCTTTCGC	AT3G22890
	Reverse	TGGAAAGCAAACACCGCATC	
<i>CBL</i>	Forward	TGGTCCCCAAACAAAGCTTG	AT3G57050
	Reverse	TTGTCCACCAACACAAGAGC	
<i>CGS</i>	Forward	TTAACCCAAACGCTGCGTAC	AT3G01120.1
	Reverse	AAGCGGTCGAATTCTGTTGC	
<i>HMT1</i>	Forward	AGCTGGTCCTGATCTTCTTGC	AT3G25900
	Reverse	TCCAAAAGCTCAACGCAAGC	
<i>HMT2</i>	Forward	TTGCAGCATCAGTTGGTAGC	AT3G63250
	Reverse	TGCGGTGAAAATCCTTCAGC	
<i>HMT3</i>	Forward	TGTGCGAAAGTGGCAGATTC	AT3G22740.1
	Reverse	TTGGTTTGCGTGTCATCTGG	
<i>MMT</i>	Forward	TCAGTTTCGCTGCTTGGATG	AT5G49810
	Reverse	AGCGGCATATTTACAGTGC	
<i>MS3</i>	Forward	TGCTGCACAAAAGGTCGTTG	AT5G20980
	Reverse	AGCTGCATTTGTCACCCTTG	
<i>OVA1</i>	Forward	TTGCCCTGTCCATCAAATGC	AT3G55400
	Reverse	TACGAAGGCTGCACAAAACG	
<i>PAPS</i>	Forward	AAACACGAGGTGCTTTTGGC	AT5G03430
	Reverse	TGATCCTCAACAGTGCCAGAC	
<i>SULTR4;2</i>	Forward	ACATCGGCTCTCATTACTGGTG	AT3G12520.1
	Reverse	TTGCAACGCCAAGACCAAAC	
<i>UBQ2</i>	Forward	TACACTGCAAACGCCGTTTC	AT2G36170.1
	Reverse	TTGCCGGTTAGCGTTTTTCAC	

APSI, ATP sulfurylase 1; *CBL*, cystathionine beta-lyase; *CGS*, cystathionine gamma-synthase; *HMT*, homocysteine S-methyltransferase; *MMT*, methionine S-methyltransferase; *MS3*, methionine synthase; *OVA1*, methionine-tRNA ligase; *PAPS*, phosphoadenosine phosphosulfate reductase; *SULTR4;2*, sulfate transporter 4;2; *UBQ2*, ubiquitin extension protein 2.

取し、重量を測定した。葉の一部は、RNAlater Tissue Storage Reagent (シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京) に浸漬して -80°C で分析まで保管した。

2. 誘導結合プラズマ質量分析による Se 含量の測定

根および葉を秤量後、ケルダールフラスコに移し、濃硝酸 2 mL を加え、不溶物がなくなるまで加熱した。冷却後、過塩素酸 1 mL を加え、過塩素酸の白煙が生じるまで加熱灰化した。灰化した試料に超純水を加えて容量を 10 mL とし、 $0.45\ \mu\text{m}$ フィルターでろ過したものを Se 測定試料とした。試料溶液中の Se の定量は、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により行った。使用機種は ICPMS-2030 (株式会社島津製作所、京都)、分析質量数は 82、内部標準はロジウムとした。得られた根および葉の Se 濃度に根および葉の重量を乗じて、植物体の Se 含量を求めた。

3. リアルタイム PCR による遺伝子発現量の測定

各 Se 曝露濃度 1 ppm のシロイヌナズナの葉から TRIzol[®] Reagent (サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社、神奈川) を用いた方法で Total RNA 抽出を行った。抽出した Total RNA は Tray Cell[™] を使用し、RNA 濃度を測定した。調製した Total RNA を鋳型として GoScript[™] Reverse Transcription System (プロメガ株式会社、東京) を用いた逆転写反応により、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として ThermalCycler Dice[®] Real Time System Single 装置 (タカラバイオ株式会社、滋賀) と GoTaq[®] qPCR Master Mix (プロメガ株式会社) を用いたリアルタイム PCR により転写産物量の定量を行った。Se 代謝に関連する遺伝子に対応するプライマーの配列はウェブツールの Primer3plus (<http://primer3plus.com/>) を用いて作成した (Table 1)。それぞれの遺伝子発現量は、サイクル比較法を用いて検出された蛍光強度から ubiquitin extension protein 2 (*UBQ2*) の転写産物量に対する各遺伝子の相対的発現量として表した。

4. 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。植物体重量、葉重量、根重量および Se 含量については、一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差について Tukey の多重比較検定を用いた。また葉の遺伝子発現量については、一元配置分散分析を用いて検定し、各処理区と Se 無添加 (Blank) 群間との差について、Dunnett の多重比較検定を用いた。各群間との有意差は、p 値が 0.05 以下を有意差ありとした。統計処理は GraphPad Prism for Mac, ver 6.0 (GraphPad Software, Inc., California, USA) を用いて解析した。

結果と考察

Fig. 1 に 4 週間培養したシロイヌナズナから採取した、植物体 (A)、根 (B)、葉 (C) の重量、および根 (D)、葉 (E) 植物体 (F) の Se 含量を示した。植物体重量について Blank 群と比較すると、各 Se 化合物曝露群で有意な低下が確認された。根重量について Blank 群と比較すると、 Na_2SeO_4 、SeMet、SeCystine および MeSeCys 群で有意な低下が確認されたが、 Na_2SeO_3 1.0 ppm では有意な差はみられなかった。根重量の各 1.0 ppm 群について、有機 Se 化合物 (SeMet・SeCystine・MeSeCys) 曝露群は、無機 Se 化合物 (Na_2SeO_4 ・ Na_2SeO_3) 曝露群と比較し、根重量の有意な低下がみられた。このことから、1.0 ppm 曝露条件下では、有機 Se 化合物は無機 Se 化合物と比較して、根の生長を抑制すると考えられる。葉重量について Blank 群と比較すると、 Na_2SeO_4 、 Na_2SeO_3 、SeMet および SeCystine 群で有意な低下が確認されたが、MeSeCys 1.0 ppm 群では有意な差はみられなかった。MeSeCys 5.0 ppm 群の葉重量は、他の 5.0 ppm 曝露群と比較し、 Na_2SeO_4 群で 7.5 倍、 Na_2SeO_3 群で 2.6 倍、SeMet 群で 1614 倍、SeCystine 群で 11.7 倍高くなっていた。このことから 5.0 ppm 条件下では、MeSeCys は他の Se 化合物と比較して、葉の生長抑制が弱いことが示唆された。また植物体、根、葉重量について各 Se 化合物曝露群ともに、曝露濃度依存的な低下がみられた。Zhang^ら¹¹⁾ は、シロイヌナズナ培養培地中の Na_2SeO_3 濃度 3.5 ppm ($20\ \mu\text{M}$) または Na_2SeO_4 濃度 9.4 ppm ($50\ \mu\text{M}$) において、植物体重量が約 50% になることを報告している。そのため、 Na_2SeO_3 で生長阻害の影響が大きいと考えられている。しかし、本実験において Na_2SeO_4 および Na_2SeO_3 曝露群では、曝露濃度に関わらず同程度の植物体重量および根重量を示したことから、これまでの報告¹¹⁾ とは結果が一致していない。この要因として、この報告¹¹⁾ では、ムラシゲ・スクーグ寒天培地の塩類を 2 分の 1 にしている。そのため本実験では、培地中の無機塩類濃度、特に S 含量が異なるため、植物体への Se 取り込みと競合する S によって、これまでの報告¹¹⁾ とは異なる結果が得られたと推測している。今後、培地中の S 濃度を変化させ、再検証する必要があると考えられる。

根 Se 濃度について Blank 群と比較すると、SeMet 2.5 および 5.0 ppm と SeCystine 5.0 ppm 曝露群において有意な上昇がみられた。根 Se 濃度の各 5.0 ppm 群について、SeMet 曝露群は、無機 Se 化合物 (Na_2SeO_4 ・ Na_2SeO_3) 曝露群と比較し、有意な上昇がみられた。また、葉 Se 濃度について Blank 群と比較すると、 Na_2SeO_4 と MeSeCys 2.5 ppm および 5.0 ppm 群で有意な上昇がみられた。また根および葉 Se 濃度について各 Se 化合物曝露群ともに、曝露濃度依存的な上昇がみられた。このように SeMet 曝露は根、 Na_2SeO_4 曝露は葉に Se が蓄積されるといった、

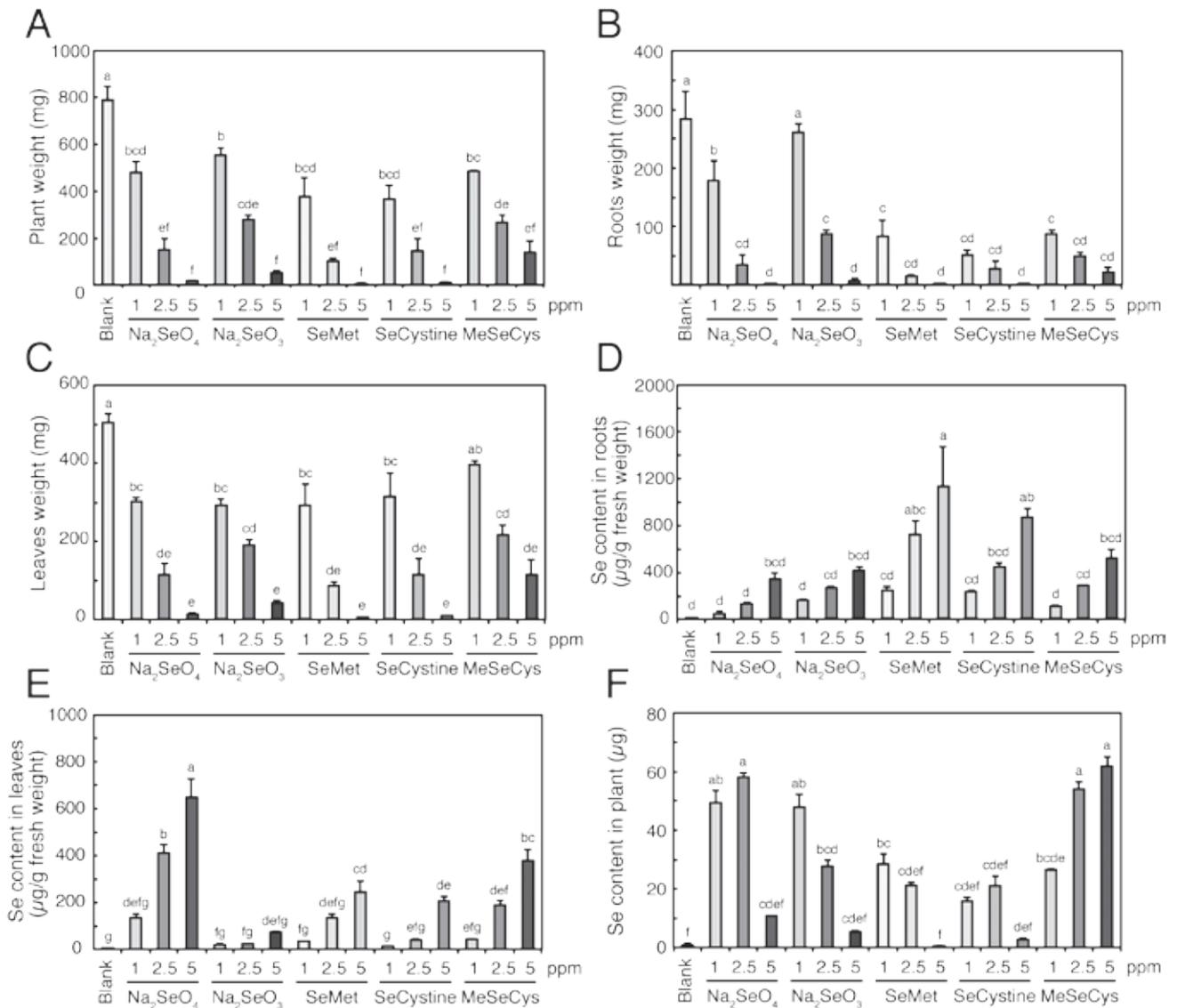


Fig. 1 Effects of the various selenium compounds on the weight of the plant (A), roots (B), and leaves (C), Se content in the roots (D), Se content in the leaves (E), and Se content in the plant (F) in *Arabidopsis thaliana*.

Data represent means ± standard error of the means (SEM) (n = 4).

Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ according to the Tukey's multiple comparisons test.

化合物の違いによって蓄積する部位の違いがみられた。このことから、SeMet 曝露による Se は根に留まり、Na₂SeO₄ 曝露による Se は根から葉へ移行しやすいと考えられる。

採取した根および葉重量に Se 濃度を乗じることで求めた植物体中の Se 量において、1.0 ppm 条件下では無機 Se 化合物である Na₂SeO₄、Na₂SeO₃ 曝露群で有機 Se 化合物よりも高くなる傾向にあった。一方、5.0 ppm 条件下では MeSeCys 曝露群で他の Se 化合物よりも有意に高くなった。MeSeCys は、SeCys の Se にメチル基が結合した化合物であり、セレン毒性に対する耐性の高い植物体内で合成されている化合物である⁷⁾。植物において、システインやメチオニンなどの含硫アミノ酸は培地から根に移行することが報告^{12,13)} されているため、MeSeCys がそのまま吸収されている可能性はある。そのため他の Se 化合物と

比べ、毒性が低いと考えられる MeSeCys は、5.0 ppm 条件下でも植物体に多くの Se を蓄積できたのではないかと推測している。一方、SeMet 5.0 ppm 曝露群では、根と葉の Se 濃度は高かったが、種子が芽生えた状態で生長が止まっており、根および葉の重量が著しく低いため、植物体に含まれる Se 量は低値を示した。

Fig. 2 に各 Se 化合物曝露 1.0 ppm の葉の S 代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を示した。植物中の S 取り込みに関わる *SULTR 4:2*、システイン・シスタチオニン・メチオニン代謝酵素である homocysteine S-methyltransferase (*HMT1*), *HMT2*, cystathionine beta-lyase, cystathionine gamma-synthase, methionine synthase-3 の発現量は試験群間で有意な差は確認されなかった。一方、*HMT3* 遺伝子は、Blank 群と比較し Na₂SeO₄ ($p = 0.08$), SeMet ($p = 0.12$) および SeCystine ($p = 0.09$) 曝露群で発現量の上昇傾向

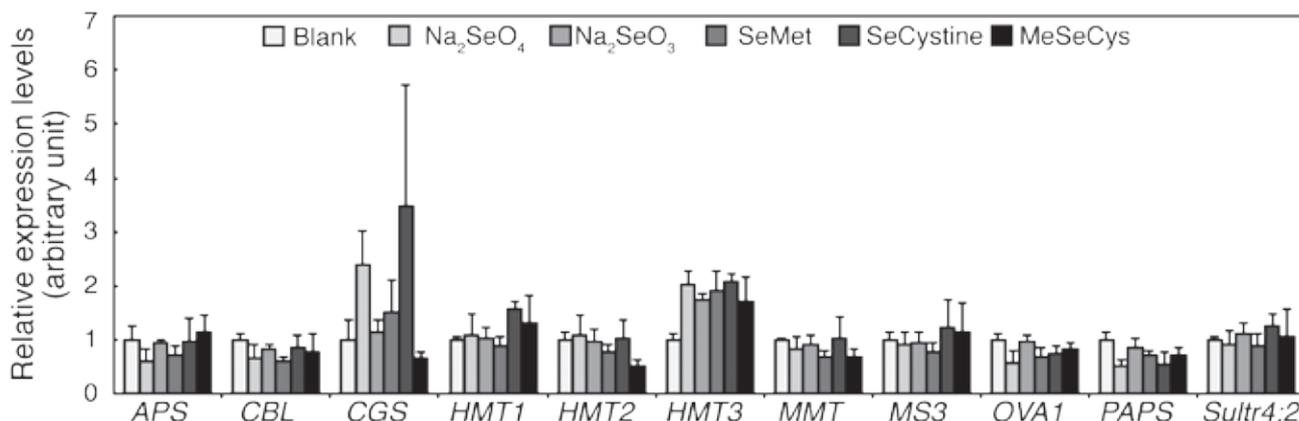


Fig. 2 Effects of the various selenium compounds (exposure level of 1.0 ppm) on the mRNA expression levels of genes encoding the proteins involved in the sulfur amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*.

Data represent means \pm standard error of the means (SEM) (n = 4).

The mRNA expression levels were determined by a real-time polymerase chain reaction analysis, using the *UBQ2* mRNA expression level for normalization. The mRNA expression levels of genes are shown relative to those determined from the blank (set at 1).

APSI, ATP sulfurylase 1; *CBL*, cystathionine beta-lyase; *CGS*, cystathionine gamma-synthase; *HMT*, homocysteine S-methyltransferase; *MMT*, methionine S-methyltransferase; *MS3*, methionine synthase; *OVA1*, methionine-tRNA ligase; *PAPS*, phosphoadenosine phosphosulfate reductase; *SULTR4;2*, sulfate transporter 4;2; *UBQ2*, ubiquitin extension protein 2.

がみられた。シロイヌナズナでは、MeSeCys合成に関わる *SMT* 遺伝子は見つかっていないが、シロイヌナズナの *HMT* family は *A. bisulcatus* において発現している *SMT* とタンパク質一次配列の相同性が高い。Ab-*SMT* は SeCys をメチル化し、非タンパク性アミノ酸である MeSeCys に変換し、SeCys から生合成される SeMet のタンパク質への取り込みを抑制し、Se 毒性に対する耐性獲得に関与していることが報告されている⁷⁾。シロイヌナズナの *HMT* family に属する *HMT1* および *HMT2* は、*SMT* 活性を示さないことが報告されているが¹⁴⁾、*HMT3* については未解明である。今後、Se 曝露によって発現の上昇傾向が観察される *At-HMT3* の *SMT* 活性の有無について解明されることが期待される。

謝 辞

本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（次世代ベンチトップ型シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究）の援助により実施したものである。また研究結果の一部は、成果報告のために技苑第 144 号に記載している。

参考文献

- 1) Combs Jr GF, Clark LC, Turnbull BW (1997) Reduction of cancer risk with oral supplement of selenium. *Biomed Environ Sci* 10: 227-234.
- 2) Stadtman TC (1990) Selenium biochemistry. *Annu Rev Biochem* 59: 111-127.
- 3) Anderson JW (1993) Sulfur nutrition and assimilation in higher plants—regulatory, agricultural and environmental aspects. in Selenium interactions in sulfur metabolism. ed. by De Kok LJ, SPB Academic Publishing, The Hague: pp. 49-60.
- 4) Novoselov SV, Rao M, Onoshko NV, Zhi H, Kryukov GV, Xiang Y, Weeks DP, Hatfield DL, Gladyshev VN (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 21: 3681-3693.
- 5) Danbara A., Shiraiwa Y (1999) The Requirement of Selenium for the Growth of Marine Coccolithophorids, *Emiliania huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica* and *Helladosphaera* sp. (Prymnesiophyceae). *Plant Cell Physiol* 40: 762-766.
- 6) Yoshida M, Sugihara S, Inoue Y, Chihara Y, Kondō M, Miyamoto S, Sukcharoen B (2005) Composition of chemical species of selenium contained in selenium-enriched shiitake mushroom and vegetables determined by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Nutr Sci Vitaminol* 51: 194-199.
- 7) Ellis DR, Sors TG, Brunk DG, Albrecht C, Orser C, Lahner B, Wood KV, Harris HH, Pickering IJ, Salt DE (2004) Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biol* 28: 1.
- 8) Ohno M, Uraji M, Shimoishi Y, Mori IC, Nakamura Y, Murata Y (2012) Mechanisms of the selenium tolerance of the *Arabidopsis thaliana* knockout mu-

- tant of sulfate transporter SULTR1;2. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 993-998.
- 9) 廣瀬侑太郎, 大塚政志, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘 (2016) 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生育抑制と遺伝子発現量の変化, *微量栄養素研究* 33 : 112-117.
 - 10) Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 437-497.
 - 11) Zhang LH, Abdel-Ghany SE, Freeman JL, Ackley AR, Schiavon M and Pilon-Smits EAH (2006) Investigation of selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 128: 212-223.
 - 12) Kostner B, Schup R, Schulze E-D, Rennenberg H (1998) Organic and inorganic sulfur transport in the xylem sap and the sulfur budget of *Picea abies* trees. *Tree Physiol* 18: 1-9.
 - 13) Sauheitl L, Glasera B, Weigelt A (2009) Uptake of intact amino acids by plants depends on soil amino acid concentrations. *Environ Exp Bot* 66: 145-152.
 - 14) Ranocha P, Bourgis F, Ziemak MJ, Rhodes D, Gage DA, Hanson AD (2000) Characterization and functional expression of cDNAs encoding methionine-sensitive and -insensitive homocysteine S-methyltransferases from *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 275: 15962-15968.