

亜セレン酸ナトリウムを曝露したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 中に存在する Se-(メチル)セレノ-L-システインの同定

森 武 栄 光, 大 塚 政 志, 細 見 亮 太[†], 福 永 健 治, 吉 田 宗 弘

(関西大学化学生命工学部栄養化学・食品化学研究室*)

(受付 2019年8月28日, 受理 2019年9月27日)

Identification of Se-(Methyl)Seleno-L-Cysteine Contained in Selenite-Exposed *Arabidopsis thaliana*

Eiko MORITAKE, Masashi OTSUKA, Ryota HOSOMI, Kenji FUKUNAGA, Munehiro YOSHIDA

Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University

Summary

Arabidopsis thaliana does not have an annotated selenocysteine methyltransferase gene, which functions to produce Se-methylselenocysteine (MeSeCys) from seleno-L-cysteine (SeCys). For this reason, it was thought that *A. thaliana* did not produce MeSeCys. In this study, we used high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to analyze selenite-exposed *A. thaliana*, where we observed the presence of MeSeCys in leaf and root tissue. Analysis by HPLC-ICP-MS detected MeSeCys in the leaf and root tissue of selenite exposed *A. thaliana*. After derivatization using a commercial amino acid analysis kit, GC analysis showed a compound with the same retention time as derivatized MeSeCys, which was eluted from leaf tissue derived from selenite exposed *A. thaliana*. Mass spectrum of this derivatized compound was almost coincident with that of derivatized MeSeCys. Thus, MeSeCys was identified in the selenite exposed *A. thaliana*. This suggests that a metabolic pathway for the creation of MeSeCys might be present in *A. thaliana*.

セレンはイオウの同族元素であり, 自然界には含硫アミノ酸のセレンアナログである含セレンアミノ酸が存在している。含セレンアミノ酸であるセレノ-L-システイン (SeCys) は, 動物においてグルタチオンペルオキシダーゼなどの酵素に含まれているため, セレンは生存に必須の微量元素である。一方, 高等植物では, セレンが必須であるという明確な報告はなされていないため, セレン化合物のもつ高い反応性を利用していないと考えられる。そのため, 植物内に蓄積されるセレン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。とくに, セレン高蓄積植物では, Se-(メチル)セレノ-L-システイン (MeSeCys) をはじめとする多様な含セレンアミノ酸が存在している^{1,2)}。このような含セレンアミノ酸の生成は, セレン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。これまでに植物内で生成される含セレンアミノ酸には, 抗がん活性などの生理機能を有することが報告されており³⁾, ヒトの健康に寄与する

ことが期待されている。そのため, セレン高蓄積植物に含まれるセレンの分子種を明らかにする試みが行われている^{4,5)}。われわれはこれまでに, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を組み合わせた分析系 (HPLC-ICP-MS) を用いて, 種々のセレン高蓄積植物を分析し, これらに含セレンアミノ酸である MeSeCys^{1,2)}, γ -グルタミル-Se-メチル-L-セレノシステイン (γ -GluMeSeCys)^{1,2)}, セレノ-L-メチオニン (SeMet)^{1,2)}, セレノホモランチオニン (SeHLan)⁶⁾ が存在することを示した。また, アミノ酸誘導体化キット (EZ:faastTM, Phenomenex, California, USA) の使用により, ガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS) を用いてセレン高蓄積野菜中の MeSeCys と高セレン酵母中の SeMet の同定に成功した⁶⁾。さらに, 液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) を用いて, 種々のセレン高蓄積植物中に MeSeCys, γ -GluMeSeCys, SeHLan が存在することを報告した⁷⁾。

*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

種々の高等植物の内、セレン高蓄積植物として知られるレンゲソウ (*Astragalus bisulcatus*) やブロッコリー (*Brassica oleracea*) では、セレンは MeSeCys として蓄積される。この MeSeCys への変換を触媒している酵素が selenocysteine methyltransferase (SMT) であり、セレンの毒性緩和に関与していると考えられている^{8,9)}。一方、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のゲノムは完全に解読されているが、SMT をコードする遺伝子は発見されていない¹⁰⁾。そのため、シロイヌナズナにレンゲソウ由来の SMT 遺伝子を過剰発現させることによって、セレン耐性が向上することが報告されている¹¹⁾。このようにシロイヌナズナでは、SMT 遺伝子を有しておらず、SeCys から MeSeCys に変換できないと考えられている。しかし、われわれは研究を進めている中で、HPLC-ICP-MS を用いた分析系でセレンを曝露したシロイヌナズナ中に MeSeCys と考えられるピークを確認していた。そこで今回、HPLC-ICP-MS および GC-MS を用いて、亜セレン酸ナトリウム (Selenite) を曝露したシロイヌナズナ内に MeSeCys の存在を検出したので報告する。

実験方法

1. 亜セレン酸ナトリウム曝露シロイヌナズナの調製

シロイヌナズナ (*A. thaliana*) は野生株 (Columbia-0) を用いた。培地組成は、20 g/L スクロース、46 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、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および 8 g/L アガーとした。この培地にセレン濃度が 1.0 ppm となるように Selenite を添加した。対照には、セレンを含まない培地を用いた。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 粒播種した。その後、長日条件の光周期 (16 時間明期、8 時間暗期) のもと、無菌的に 25°C で培養した。4 週間培養後、葉と根を分別採取し、分析まで -80°C で保管した。

2. 含セレン化合物の抽出

HPLC-ICP-MS 分析用の試料は、新鮮重量 100 mg の葉または根に、0.2 M HCl 溶液を加え、十分に破碎・攪拌し、遠心分離後の上清を用いた。

一方、GC-MS 分析用の試料は、採取した葉を凍結乾燥機 (FDU-1200, 東京理化学工業株式会社, 東京) を用いて凍結乾燥し、ミルにて粉碎した。次に、乾燥粉末 100 mg に 0.2 M HCl 溶液を加え、十分に攪拌した後、遠心分離し、上清を採取した。その後、液体窒素により凍結し、凍結乾燥を行った。そして、50% (v/v) エタノールで凍結乾燥後の試料を溶解し、0.2 μm シリンジフィルターでろ過したものをを用いた。

3. HPLC-ICP-MS による分析

分析用試料を HPLC-ICP-MS で分析し、含有される含セ

レン化合物の分子種を推定した。分析条件は、以下のとおりである。機器, Prominence イナート LC システム (株式会社島津製作所, 京都); カラム, Hamilton PRP-X100 (粒径 10 μm, 長さ 25 cm × 内径 4.1 mm, ジーエルサイエンス株式会社, 東京); 移動相, 5 mM クエン酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.2); 流速, 0.5 mL/min; カラム温度, 30°C; 検出器, ICP-MS2030 (株式会社島津製作所); 検出質量数, 82。

4. GC-MS による分析

分析用試料 100 μL に含まれるアミノ酸を EZ:faast™ を用いて誘導体化処理し、GC-MS による分析を行った。GC-MS の分析条件は以下のとおりである。機器, GCMS-QP2010 (株式会社島津製作所); カラム, Zebron ZB-AAA (Phenomenex); キャリアガス, ヘリウム; 流量, 1.1 mL/min; 気化室温度, 250°C; カラム温度, 110 ~ 320°C (30°C/min 昇温); 分析時間, 7 分; 試料注入量, 2 μL; イオン源温度, 240°C; スキャン範囲, 45 ~ 450 m/z; サンプリング速度, 3.5 scan/sec。

結果と考察

Fig. 1 に陰イオン交換カラムである Hamilton PRP-X100 を用いた分析系における、標準セレン化合物 (A)、シロイヌナズナの葉 (B) および根 (C) の分析結果を示した。標準 L-セレノシスチンは保持時間 6 分付近、標準 MeSeCys は保持時間 7.5 分付近、標準 Selenite は保持時間 11 分付近、標準 SeMet は保持時間 12.5 分付近、標準セレン酸ナトリウム (Selenate) は保持時間 33.5 分付近に溶出された。また、同じ系を用いて Selenite を曝露したシロイヌナズナの葉および根から調製した試料を分析したところ、Fig. 1B および 1C に示すように、保持時間 7.5 分に大きなピークを検出した。また、以前報告している逆相カラムの Develosil RP-AQUEOUS (野村化学株式会社, 愛知) による分析系¹⁾を用いた場合も同様に、標準 MeSeCys の保持時間と同じ大きなピークを検出した (data not shown)。このように標準 MeSeCys と同じ保持時間にピークが確認されることから、Selenite 曝露シロイヌナズナの葉および根には、MeSeCys が含まれていると考えられる。また、MeSeCys と考えられるピーク以外に、葉と根ではこれらに加えて Selenate と考えられるピークが見られた。さらに、葉では保持時間 15 分および 46 分、根では保持時間 28 分付近に未知化合物のピークが見られた。

EZ:faast™ を用いて誘導体化した MeSeCys および誘導体化処理した Selenite 曝露シロイヌナズナの葉のガスクロマトグラムを Fig. 2A および 2B に示した。Fig. 2A に示したように、標準 MeSeCys の誘導体由来するピークは保持時間 2.8 分にみられた。これに対して、Selenite 曝露

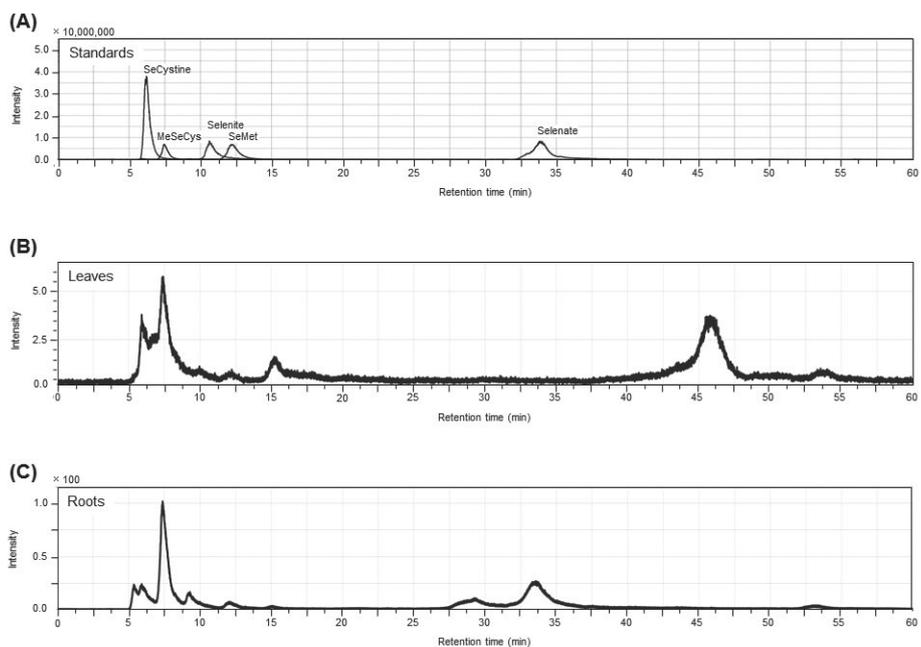


Fig. 1 HPLC-ICP-MS chromatograms of selenium standard mixture (A) and extracts from leaves (B) and roots (C) of selenite-exposed *Arabidopsis thaliana* MeSeCys, *Se*-methylselenocysteine; SeCystine, seleno-L-cystine; SeMet, seleno-L-methionine.

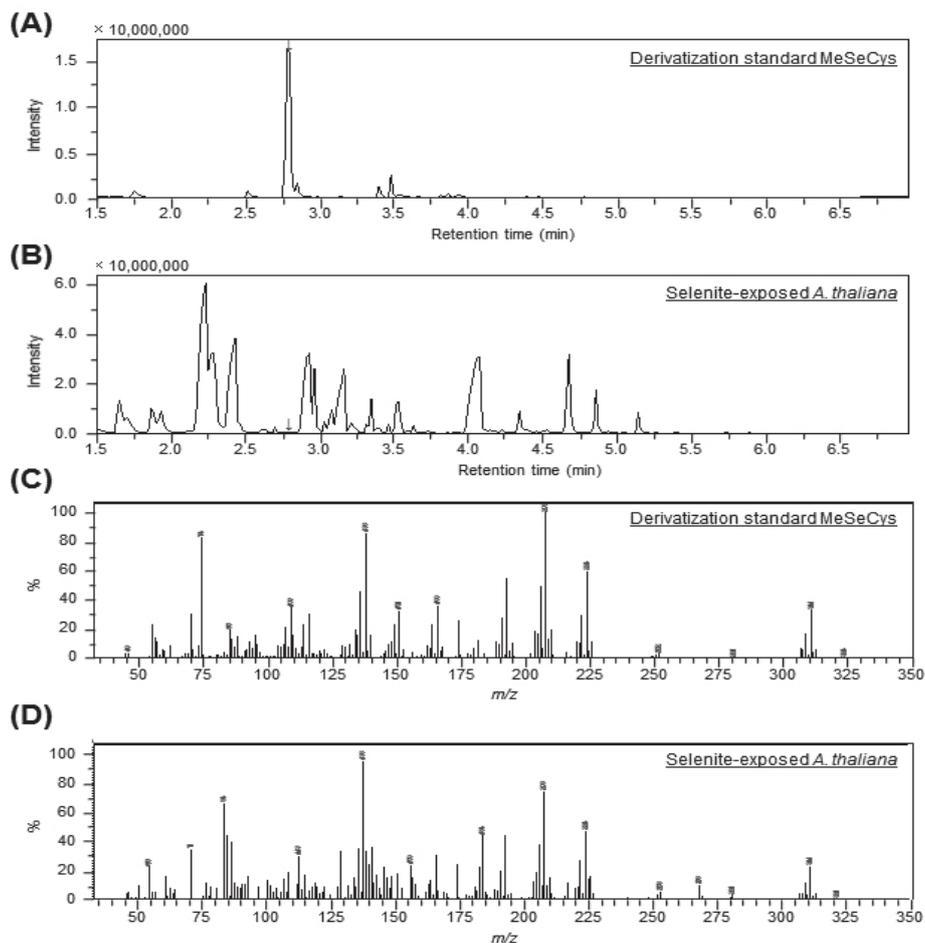


Fig. 2 Gas chromatograms of derivatized *Se*-methylselenocysteine (A) and extract from selenite-exposed *Arabidopsis thaliana* (B), and mass spectrums of derivatized *Se*-methylselenocysteine (C) and unknown compound contained in extract from selenite-exposed *A. thaliana* (D) MeSeCys, *Se*-methylselenocysteine.

シロイヌナズナの葉のクロマトグラムにも、Fig. 2Bのように、ピークは小さいが標準 MeSeCys の誘導体と同じ保持時間を示すピークが認められた。

天然には様々なセレンの安定同位体が存在し、 ^{78}Se 、 ^{80}Se 、 ^{82}Se の3つに着目すると、これらの存在比は2:4:1 (^{78}Se : ^{80}Se : ^{82}Se) に近似している。これは質量分析計において、 $m-2$ 、 m 、 $m+2$ m/z の比が2:4:1を示す分子イオンピークやフラグメントイオンピークが存在すれば、その化合物がセレンを含有する可能性が高いことを意味する。本実験で用いた EZ:faastTM による誘導体化では、アミノ酸のアミノ基がカルボキシプロピル化、カルボキシ基がプロピル化される。そのため、誘導体化後の分子量はもとのアミノ酸よりも128増加する。誘導体化した MeSeCys のマススペクトル結果を Fig. 2C、また Selenite 曝露シロイヌナズナの葉中に保持時間 2.8 分のピークのマススペクトル結果を Fig. 2D に示した。Fig. 2C および 2D の通り、誘導体化 MeSeCys ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{NSe}$) の分子イオンに由来する 309、311、313 m/z 、および誘導体からカルボキシプロピル基 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{COO}^-$) が1つとれたフラグメントイオンに由来する 222、224、226 m/z がいずれも約2:4:1の比で認められた。また、この2つ以外にも、 $m-2$ 、 m 、 $m+2$ m/z の比が約2:4:1となっているイオンピークがいくつか存在していた。一方、セレンを曝露していないシロイヌナズナの試料には、保持時間 2.8 分のピークはみられなかった。加えて、保持時間 2.8 分付近のマススペクトルにおいて、セレンの存在を示す分子イオンピークやフラグメントイオンピークはみあたらなかった (data not shown)。以上のことから、Selenite 曝露シロイヌナズナの葉の試料にみられた保持時間 2.8 分に存在するピークの化合物は、マススペクトル結果から誘導体化 MeSeCys であると考えられた。そのため、Selenite 曝露シロイヌナズナの葉中に MeSeCys の存在することを GC-MS を用いて証明することができたと考える。

本実験において、これまでシロイヌナズナでは生合成されないと考えられていた MeSeCys を、Selenite を曝露したシロイヌナズナの葉に存在することを HPLC-ICP-MS および GC-MS により検出した。このことから、シロイヌナズナにも MeSeCys の生合成経路が存在することが示唆された。これまでに、SeCys にメチル基を導入し MeSeCys に変換する酵素である SMT 遺伝子は、シロイヌナズナの全ゲノムが完全解読された後でも発見されていない¹⁰⁾。そのため、SMT 遺伝子以外の遺伝子が、同反応を触媒している可能性が考えられる。

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。

参考文献

- 1) Sugihara S, Kondo M, Chihara Y, Yuji M, Hattori H, Yoshida M (2004) Preparation of selenium-enriched sprouts and identification of their selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biosci Biotech Biochem* 68: 193-199.
- 2) Yoshida M, Sugihara S, Inoue Y, Chihara Y, Kondô 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.
- 3) Yoshida M, Okada T, Namikawa Y, Matsuzaki Y, Nishiyama T, Fukunaga K (2007) Evaluation of nutritional availability and anti-tumor activity of selenium contained in selenium-enriched Kaiware radish sprouts. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2198-2205.
- 4) Kubachka KM, Hanley T, Mantha M, Wilson RA, Falconer TM, Kassa Z, Oliveira A, Landero J, Caruso J (2017) Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation. *Food Chem* 218: 313-320.
- 5) 吉田宗弘 (2008) 植物に存在する含セレンアミノ酸の同定と生理機能. *化学と生物* 46: 564-570.
- 6) 塩川真人, 水谷泰輔, 吉田宗弘 (2008) 誘導体化とガスクロマトグラフィー-質量分析によるセレン強化食品中の含セレンアミノ酸の同定. *微量栄養素研究* 25: 147-151.
- 7) 水谷泰輔, 吉田宗弘 (2010) セレン蓄積植物に存在する含セレンアミノ酸の LC-MS による同定. *微量栄養素研究* 27: 88-91.
- 8) Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, Böck A (1999) A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J Biol Chem* 274: 5407-5414.
- 9) LeDuc DL, Tarun AS, Montes-Bayon M, Meija J, Malit MF, Wu CP, AbdelSamie M, Chiang CY, Tagmout A, deSouza M, Neuhierl B, Böck A, Caruso J, Terry N (2004) Overexpression of selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation. *Plant Physiol* 135: 377-383.
- 10) Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.

- 11) Ellis DR, Sors TG, Brunk DG, Albrecht C, Orser C, Lahner B, Wood KV, Harris HH, Pickering IJ, Salt DE (2004) Production of *S*-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biol* 28: 1.