

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580093

研究課題名(和文) 飼料に添加されたセレンの農耕地生態系での動態と野菜による吸収

研究課題名(英文) Dynamics of selenium in agricultural ecosystem

研究代表者

木村 和彦 (Kimura, Kazuhiko)

宮城大学・食産業学部・教授

研究者番号：10183302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：農耕地でのセレンの動態を調べるため、有機態セレンとしてセレノシステインおよびセレノメチオニンを含むセレン酵母を使用し、無機態セレンとして使用した亜セレン酸を比較した。これらを土壤に添加し、植物への吸収および植物・土壤でのセレンの形態別分析を行った。その結果、有機セレンは土壤中で無機化してから植物に吸収されることが明らかになった。一方、無機セレンは亜セレン酸のまま存在し、植物に吸収された。セレンは植物内では亜セレン酸、セレン酸、あるいはセレノメチオニンの形態で存在していた。このことは、亜セレン酸で吸収された後に、セレン酸さらにはセレノメチオニンに変化したことを意味している。

研究成果の概要(英文)：Dynamics of selenium in agricultural ecosystem were investigated. As organic selenium, seleno-methionine and seleno-cysteine containing yeast were used. As inorganic selenium, selenite were used. These selenium compounds were applied to soil and Komatsuna were grown.

Selenite applied Komatsuna contained seleno-methionine, selenite and selenate, and selenium in soil was mostly selenite. This shows selenite do not change in soil and after absorption by plant, selenate and seleno-methionine was formed.

On the other hand, selenium in yeast applied soil was mostly selenite, and no seleno-methionine and seleno-cysteine were found after harvest. Komatsuna contained the same selenium compound as selenite applied Komatsuna. These facts may show seleno-cysteine and seleno-methionine were disappeared due to mineralization and existed as selenite.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・(植物栄養学・土壌学)

キーワード：セレン 農耕地 セレノシステイン セレノメチオニン セレン酸 亜セレン酸

1. 研究開始当初の背景

セレンは動物には必須元素であり、必要量の範囲は狭く欠乏症および過剰症が出やすい元素である。最近その代謝経路と免疫機構が精力的に研究されている。また、日本では厚労省による摂取基準があり、次の六訂日本食品標準成分表に新たに収載予定となった健康上極めて重要な元素である。

我が国では土壤中のセレン含量が低く農産物中の濃度は低レベルにあるが、植物では非必須元素であるため欠乏症が発生しない。したがって、土壤肥料学的に問題になることは少なく、農耕地でのセレンの動態は充分解明されていなかった。しかし、我が国の牧草のセレン含量は牛で欠乏症が発生する 0.05 ppm を下回るものが大半で、家畜でのセレン欠乏がおきやすく、近年では給餌時にセレンを添加あるいは注射で投与される例が増えている。従って、動物排泄物に由来する堆肥を通じて農地に投入されるセレンが増えてくるものと考えられる。

これまでの農地でのセレンの研究は、可給態のセレンあるいは無機態のセレンが中心であった。しかしながら、堆肥など有機物には有機態のセレンが存在することが予想される。従って、有機態のセレンも加味した農地でのセレンの動態把握が重要である。

また、セレンの毒性はその形態によって異なることが知られている。無機セレンは有機セレンよりも毒性が強い。従って、植物に含まれるセレンの形態も重要になる。そのような観点でセレン吸収を農耕地土壌生態系で調べた例は少ない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、飼料に添加されたセレンが農耕地に新たに投入されることを想定し、セレンの有機態あるいは無機態セレンの形態に着目して動態を解明し、さらに野菜による吸収を明らかにすることを目的として研究を行うものである。

3. 研究の方法

(1) セレンの検出：セレンの濃度は微量であり、その検出法として誘導結合プラズマ質量分析法(Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)を採用した。この方法は質量分析法の一つであり、⁸⁰Se を直接検出するため高感度に検出できる。ICP-MS によるセレン検出の問題点は、プラズマを作るためのアルゴンガスに由来するアルゴンの二原子イオンである ⁴⁰Ar⁴⁰Ar が質量数 80 のセレンに干渉することである。しかし、メタンガスを質量分析装置に導入し、事前に ⁴⁰Ar⁴⁰Ar とメタンを反応させることにより干渉を防ぐ技術(Reaction cell)を用い、高感度に測定することができた。

(2) セレンの形態別分析：有機態のセレンとしては、硫黄含有アミノ酸の硫黄がセレンに置き換わったものに着目した。具体的には、

セレノシステインおよびセレノメチオニンの2つを想定した。また、無機態のセレンとしては、およびセレン酸(SeO_4^{2-})および亜セレン酸(SeO_3^{2-})の2つを想定した。

これら4つのセレンを形態別に分離する方法として、HPLC-ICP-MS法を採用した。この方法では、液体クロマトグラフィーを使用してセレンを主に陰イオン交換の原理により分離し、分離後に直接ICP-MSで測定を行った。セレンの標準品として、セレン酸ナトリウムおよび亜セレン酸ナトリウム(和光純薬)、メチルセレノシステインおよびセレノメチオニン(シグマアルドリッチ)を使用した。

(3) HPLC-ICP-MSの条件：陰イオン交換カラム(PPR-X100, Hamilton)を使用し、溶離液にpHを5.2に調整したクエン酸アンモニウム緩衝液5 mmol/Lを使用し、感度を上げるためにメタノールを2%体積濃度となるように添加した。注入量は100 μL である。カラムからICP-MSへPEEKチューブで接続し、サイクロンチャンバーに噴霧してプラズマに導入した。ICP-MSは四重極タイプ(ELAN-DRCe, PerkinElmer)を使用し、メタンガスを0.6 mL/minでセルに流してアルゴン二分子イオンによる干渉を抑制した。なお、モニターした質量は80である。

(4) 土壌からのSeの抽出：土壌0.2 gに0.1 M NaOHを10 mL加えて4時間しんとした。遠心分離で分離し、上澄みをメンブランフィルター(0.45 μm)で濾過して分析に供した。

(5) 植物からのSeの抽出：植物の乾燥粉碎試料0.2 gにプロテアーゼ20 mgと超純水を10 mL加え、37°Cで4時間しんとした。遠心分離で分離し、上澄みをメンブランフィルター(0.45 μm)で濾過して分析に供した。

(6) 使用した有機セレン：セレン酵母を用いた。これは、植物のSeの抽出と同様の方法で抽出し分析を行った結果、セレノメチオニンが85%、セレノシステインが15%含まれていた。なお、無機態のセレンは形態別分析のヒストグラムでは明瞭なピークが見られず、ほとんどが有機セレンであると判断した。

(7) 植物中の全セレン含量の測定：植物の全セレン含量は植物の粉碎試料を0.5 gをとり、硝酸-過酸化水素で分解を行い、105°Cで乾固後に2%硝酸に再溶解した。なお、その際、内部標準として10 ppbとなるようにInを添加した。この溶液をICP-MSで定量を行った。

(8) 植物中のセレンの形態別の割り付け：実試料ではピークの位置はほぼ標準品と同じであったため、リテンションタイムからセレンの形態を判断することができた。しかし、形態別分析時のベースラインがブロードな変動を示した。夾雑物による影響が考えられた。そこで計算時は、ソフトによるベースライン処理を行った。また、感度が低い場合にノイズがあり、その際は積分範囲の指定を手

動で行った。このようにして得られた対象としたピークの積分値の合計と求める物質のピークの積分値の比を求めた。溶液中のセレン濃度を別途求め、前者とのかけ算により溶液中の対象物質の濃度とした。

(9) 栽培試験：宮城大学圃場の土壌を用い、1/5000aワグネルポットに3kgの土壌を充填した。施肥は液肥で通常の栽培試験の通り行った。セレンの添加は、亜セレン酸、セレン酵母で行い、添加量はそれぞれの形態のセレンに対して0.1 mg/kg, 1.0 mg/kgとした。なお、無添加のコントロールを設けた。

使用した作物は、コマツナ、ほうれん草、コネギの3種である。植物は約二ヶ月ポットで栽培し、乾燥・粉碎後に実験に供した。

土壌は、栽培終了後に乾燥し分析に供した。

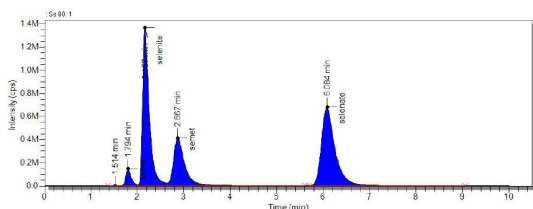
4. 研究成果

(1) 植物によるセレンの吸収：栽培後の植物中のセレン含量は、0.1 ppm 区ではコントロールよりやや高いものの有意な差はない場合もあった。しかし、1.0 ppm 区ではどの植物でもコントロールの数倍から10倍程度の濃度を示した。また、亜セレン酸と有機セレンの吸収の差は植物によってあるいは濃度によって順位に異なり、植物種によってややレスポンスが違うことが明らかであった。なお、植物中のセレン濃度はどの植物でも0.2-3%程度であった。

また、セレンの吸収量をセレン濃度と乾物重から求め、コントロール区の吸収量を差し引いた値を見かけの吸収量とし、セレン添加量に対する割合で吸収割合としたところ、コマツナで0.5%-0.9%と最も高く、次いでコネギが0.2%-0.7%で、ほうれん草が0.09%-0.15%と最も低かった。この吸収率の違いは、セレン濃度があまり変わらずに、乾物重がほうれん草で生育の良かったコマツナの1/3程度だったことが反映したものと考えられる。

(2) セレンの吸収による他の元素吸収への影響：生育はどの区でもほぼ同様であり生育への影響はほとんどなかった。また、Mg, Ca, Kの濃度を調べたが、殆ど差は認められなかった。

(3) HPLC-ICP-MSによる形態別分析：標準品のクロマトグラムを示す。



ほぼ7分で溶出が完了し、4つのピークが明瞭に分離している。それぞれのピークは、
保持時間 1.79分 セレノシステイン

保持時間 2.16分 亜セレン酸
保持時間 2.87分 セレノメチオニン
保持時間 6.08分 セレン酸

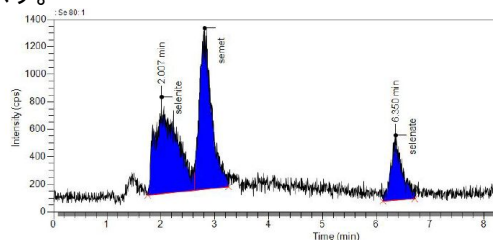
であった。

なお、それぞれのピーク面積はセレン含量にほぼ比例していた。従って、面積比から各物質の割合を求めることができると判断した。

(4) 使用した有機セレンの形態別のセレン分析：使用した有機セレンは市販されているセレン酵母（メディエンス社）である。セレノシステインとセレノメチオニンによるとみられる大きなピークが2つみられた。バックグラウンドがややブロードであり、亜セレン酸とみられるピークも少しあったが、定量的に面積をもとめることはできなかった。なお、セレン酸のピークは認められなかった。

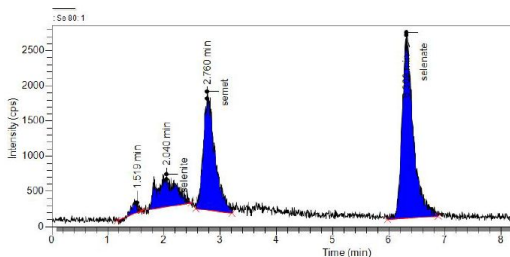
セレノメチオニンとセレノシステインと考えると存在割合は、15%と85%であると判断した。

(5) 植物のセレンの形態別分析：コマツナのコントロールのクロマトグラムを以下に示す。



セレノシステインとみられる小さなピークが2分前にあるが、うまくピークを分離できなかった。しかし、亜セレン酸、セレノメチオニン、セレン酸の3つは分離ができ、その割合はそれぞれ43%、42%、15%であった。

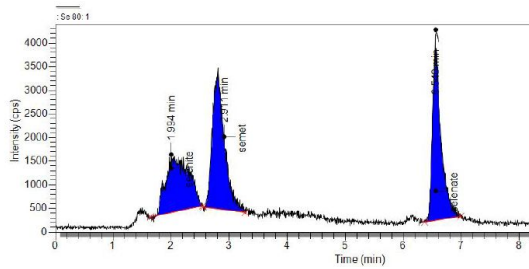
すなわち、6割は無機セレンとして存在し、4割がセレノメチオニンとして存在していた。



亜セレン酸 1.0ppm 添加区のクロマトグラムを示す。

ピークとしては、コントロールとほぼ同じであるが、亜セレン酸、セレノメチオニン、セレン酸の割合はそれぞれ15%、34%、51%であった。亜セレン酸で土壌に添加したが、植物体内ではむしろ亜セレン酸よりもセレン酸の割合が増加したことが判明した。

次にセレン酵母 1.0ppm 添加区のクロマトグラムを示す。

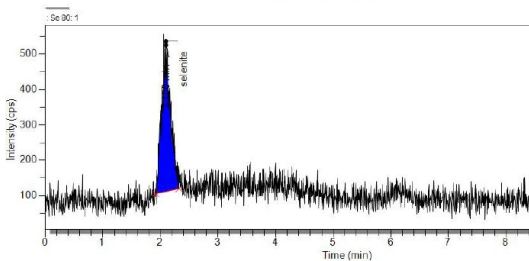


ピークとしては、亜セレン酸、セレノメチオニン、セレン酸の割合はそれぞれ 32%、37%、31%であった。亜セレン酸の割合が増えていることがわかる。

セレンは、亜セレン酸あるいは有機セレンの形態で加えたが、亜セレン酸添加区で亜セレンだけの上昇はみられなかった。したがって、土壌中でセレン酸に変化してから吸収されたか、亜セレン酸で吸収されて後植物体内でセレン酸に変化したと考えられる。

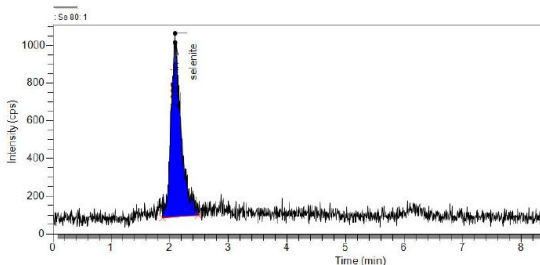
有機セレンとしては、セレノメチオニンとセレノシステインを主な構成成分とするものを添加した。植物ではセレノメチオニンが多いが、亜セレン酸あるいはセレン酸の割合も多い。従って、土壌中で有機セレンが分解し、亜セレン酸あるいはセレン酸となって吸収された可能性がある。

(6) 土壌中のセレンの形態別分析：コントロール区のクロマトグラムを下に示す。

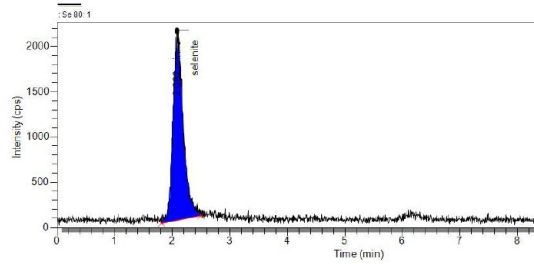


ピークは亜セレン酸が殆どであり、セレン酸のピークはブロードで定量には至らなかった。従って、今回した土壌中ではセレン酸はなく、殆どが亜セレン酸であると判断した。

以下は亜セレン酸 1.0ppm 区のクロマトグラムである。



やはり亜セレン酸のピークが殆どであり、ピーク面積もコントロールの6倍となった。セレン酸のピークがほとんどなかったことから、土壌中で亜セレン酸からセレン酸に変化することはなく、無機セレンでは亜セレン酸で比較的安定に存在していることがわかった。



上にはセレン酵母 1.0 ppm 添加区の土壌のクロマトグラムを示した。やはり無機セレンとしては、亜セレン酸が殆どであり、セレン酸と見られるピークはあったが定量できるほどの存在量ではなかった。

この時の亜セレン酸の存在量は、面積からすると量的には添加した割には少ないため、NaOH で抽出できない形態、例えばタンパクなどの形態のままである可能性もある。

なお、データは示さなかったが、セレンの 0.1 ppm 添加の亜セレン酸添加区および有機セレン添加区では、セレン酸としてもピークが認められており、添加量により形態別の分布は多少異なるとみられた。

(7) まとめ

以上の結果をまとめると、以下のようになる。

まず、亜セレン酸の形態で土壌に添加された場合は、土壌中での形態変化はほとんどなく、亜セレン酸として存在し、その形態で植物に吸収されることである。そして、植物体内中で、セレノメチオニンに代謝され、あるいはセレン酸に変化して存在したと考えられる。

有機態のセレンが土壌に添加された場合は、分解により亜セレン酸となるが、セレン酸としてはほとんど存在せず、亜セレン酸として主に植物に吸収されると考えられた。

(8) 課題

HPLC-ICP-MS による形態別分析は、手法として確立されているものであるが、実試料に適用した場合は、まだノイズが大きいため濃度が低い場合の定量の信頼性が低い。この点を改善する必要がある。前処理の方法を工夫して濃度を高めるか、あるいは ICP-MS の感度を高めるかの方法が考えられる。この点については、さらに検討を行う必要がある。また、安定性にやや難があり、ピークの面積から直接定量的に各物質の量を定量することは困難であった。今後さらに検討したい。

形態別分析については、他の方法とも組合せ、その定量性あるいは形態についてより詳細に検討する必要があると考えられる。特に、植物ではタンパク態を想定して、プロテアーゼによりアミノ酸に分解する手法を行ったが、タンパク態以外の糖と結合したもの、あるいはより複雑な形態のセレンが報告されており、今後はそのようなことも考慮に入れた

解析が必要になると考えられる。また、土壌については、NaOHにより主に無機態のセレンを抽出する方法で行ったが、土壌中の有機物中にもセレン化合物として存在することも報告されており、土壌中の有機セレンも含めて検討する必要がある。

また、有機のセレンでは今回はセレノシステインとメチルセレノシステインの区別が厳密にできなかった。標品が入手困難なためである。両者とのイオンにはならないため、今回の陰イオン交換の原理ではうまく分離できないと考えられる。逆相分離など他の分離モードでの検討が必要であろう。

なお、当初はジメチルセレンなどガス態のセレンを含めて測定する計画であったが、その点については十分に検討することができなかった。ガス態のセレン濃度が低いことに対応した手法の開発が不十分であったことによる。今後、改めて検討を行う必要がある。

木村 和彦 (KIMURA, Kazuhiko)
宮城大学・食産業学部・教授
研究者番号：10183302

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

木村和彦, 無機セレンのセレン含有アミノ酸の形態別分析, 日本土壤肥料学会東北支部会, 平成 25 年 7 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者