

機関番号： 34419
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008 ~ 2010
 課題番号： 20580066
 研究課題名 (和文) シロイヌナズナにおけるセレンの新規生理機能とセレン調節因子の解析
 研究課題名 (英文) Novel physiological function of selenium and selenium-dependent regulatory factor in *Arabidopsis thaliana*.
 研究代表者
 武田 徹 (TAKEDA TORU)
 近畿大学・農学部・講師
 研究者番号： 00247967

研究成果の概要 (和文)： セレン (Se) はヒトや動物にとって生きていくために必須の微量栄養素であるが、植物は Se を根から吸収するものの、それらを細胞内で積極的に利用できないと考えられていた。しかし本研究において、極微量の Se は実生段階の植物にとって、生育を促進するなどの効果を示すことが明らかになった。その Se の効果を詳しく調べたところ、解糖系というエネルギーを生成する代謝系に関わるいくつかの酵素が、Se により活性化されることが判明した。

研究成果の概要 (英文)： Selenium (Se) has been recognized as an essential trace element for animal and human because it is an integral part of the enzyme glutathione peroxidase, a seleno enzyme that prevents oxidative damage to cells. In contrast, higher plants do not require Se, and the question of whether Se is an essential element to plants remains controversial. Previous reports suggest that trace amounts of Se may serve a role in antioxidative mechanisms and partially reduce the adverse effects of cadmium on the growth. The aim of this work was to investigate novel physiological function of Se and Se-dependent regulatory factor in *Arabidopsis thaliana* seedlings. The influence of Se (sodium selenate) supplementation in the range of 0.1–100 μM on the biomass of *Arabidopsis* plants was studied 18 days after sowing. A significant decrease in the shoot fresh weight of *Arabidopsis* seedlings was noted at greater than 50 μM . However, the fresh weight of the seedlings grown in the medium with 0.5–5 μM Se significantly increased over that of seedlings grown without Se. There was significant effect of Se supplementation on the ATP content and respiration, as compared with control plants. In *Arabidopsis* seedlings grown in the medium with 1 μM Se, NAD dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and triosephosphate isomerase activities were 1.5-fold higher than those in seedlings grown without Se.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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： シロイヌナズナ、プロテオーム、微量元素、セレン、NAD 依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト、動物および一部の微生物における

必須微量元素のセレン (Se) の生理生化学的有効性は、Se 代謝過程で生成するセレノシス

テイン (SeCys) を 21 番目のアミノ酸として活性中心に有するグルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシニンレダクターゼなどの含 Se タンパク質の抗酸化機能およびレドックス調節機構から説明される。しかし、高等植物を含めた光合成生物には SeCys を有する含 Se タンパク質は存在しない。したがって、光合成生物にとって Se は、その代謝過程で生成する種々の中間体の毒性あるいは硫黄栄養を妨げるに有害因子と考えるのが主だった認識であった。

(2) これまでの植物における Se の研究は、Se 耐性機構および Se 耐性に関与する遺伝子の探索など、Se 高蓄積植物を用いて主に展開されてきた。しかし、一部の植物において、Se が抗酸化能の上昇や重金属の解毒に関与している可能性が示唆された。さらに、申請者は緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii* C9) に Se 依存性のグルタチオンペルオキシダーゼが存在すること、そして、Se によりグルタチオン合成系が活性化される事を明らかにした。

2. 研究の目的

以上の本研究に関する背景をふまえ、以下の点について検討を行っていく。

(1) Se 非蓄積種のシロイヌナズナの生育および収量に及ぼす Se 栄養の影響。

(2) シロイヌナズナへの Se 栄養付与が解糖および呼吸系に及ぼす影響。: (1) でシロイヌナズナの生育に最も適した Se 濃度が明らかになったら、その濃度で生育させた植物を用いて、NAD 依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (NAD-GAPDH) やその他の解糖に関与する酵素活性を詳細に調べる。また、呼吸活性および ATP 量なども、Se 付与植物とコントロール植物とで比較検討する。

(3) シロイヌナズナにおける Se 栄養により発現量に変動する遺伝子およびタンパク質の解析。: Se 栄養により変動する遺伝子およびタンパク質をプロテオミクスの手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの生育に及ぼす Se 栄養の影響

① Se は硫黄と同族であり化学的性質が類似しているため、Se の植物への取り込みとその後の同化経路が硫黄取り込みおよび硫黄同化と同じであることがすでに明らかになっている。そこで、硫黄栄養が制限されている MS 培地と、制限されていない MS 培地に 0.05 ~ 50 μM セレン酸ナトリウムを添加して、播

種後 10~20 日目まで経時的にシュートと根の新鮮重量を測定する。

② ①のそれぞれの試料について、取り込まれている Se 量を 2,3-ジアミノナフタレンを用いた蛍光法により測定する。

(2) シロイヌナズナの解糖系ならびに呼吸系に及ぼす Se 栄養の影響

① (1) でシロイヌナズナ実生の生育に最も適した Se 濃度が明らかになったら、その植物における解糖系酵素の活性を測定する。具体的には、トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI)、NAD-GAPDH、フルクトースビスアルドラーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、ピルビン酸キナーゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの活性をシュートと根で測定する。

② ①の植物の呼吸活性を酸素電極を用いて測定する。

③ ①の植物の ATP 量を Stanley と McCarthy の方法 (Rapid Methods in Microbiology; edited by P.E.Stanley, B.J.McCarthy, and R.Smither, Oxford, 1989) を改変したものを用いて測定する。

(3) シロイヌナズナ解糖系酵素の Se による発現調節機構の解明

① これまでの準備状況から、(2)①より、いくつかの解糖系酵素が Se により活性化あるいは誘導されることが推測される。そこで、それら酵素の Se による発現調節機構について、まず、特異抗体を用いて、タンパク質レベルの変動を検討する。次に、RT-PCR により、転写レベルでの変動について検討する。
② Se により活性化された酵素を、Se 存在下および非存在下で生育させたシロイヌナズナ実生より精製し、精製酵素における Se 結合の有無、あるいは Se 結合部位を MALDI-TOF/MS、Q-TOF/MS およびプロテインシーケンサーを用いて明らかにする。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの生育に及ぼす Se 栄養の影響

シロイヌナズナへの Se の取り込みが硫黄栄養により阻害されないように、MS 培地中の硫酸塩濃度を 50%にした。その培地におけるシロイヌナズナの生育は、播種後 20 日目まで通常の MS 培地で生育させたものと有意な差を示さなかった。そこで、この硫黄栄養制限培地に、0.5~50 μM セレン酸ナトリウムを付与し、播種後 17 日目におけるシュートの新鮮重量を比較した。その結果、50 μM セレン酸ナトリウムを含む培地では、シロイヌナズナ実生の生育は顕著に阻害されたが、0.5 ~ 5 μM セレン酸ナトリウムを含む培地では、有意にシュートの新鮮重量が増加していた

(図 1A)。これらシュートにおける Se 取り込み量を測定し、Se 取り込み量と新鮮重量との相関関係について調べた。その結果、図 1C に示すように、取り込み量が 100 nmol/g 新鮮重量を超えると、新鮮重量の減少との相関が認められ、逆に、100 nmol/g 新鮮重量までの極微量の Se 取り込みは、新鮮重量の増加と相関が認められた。以上の結果より、Se 非蓄積種のシロイヌナズナにおいても、極微量の Se は生育促進に積極的に機能することが推測された。

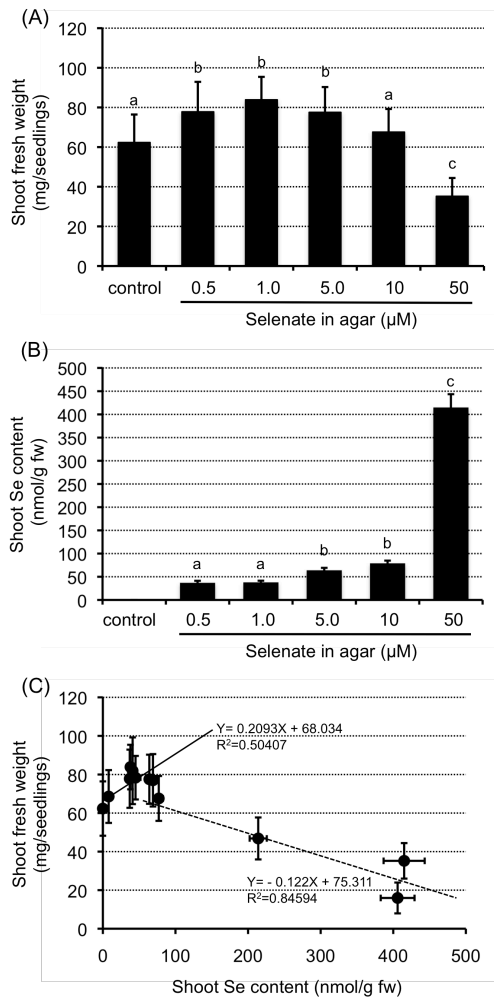


図1. シロイヌナズナ実生(播種後17日目)の生育に及ぼすSe栄養の影響

(2) シロイヌナズナの解糖系ならびに呼吸系に及ぼす Se 栄養の影響

(1)で認められた極微量の Se 栄養による実生段階での生育促進の機構を明らかにするために、最も生育促進の傾向が安定していた 1 μM セレン酸ナトリウムを含む硫黄制限培地で播種後 17 日目まで生育させた植物における解糖系酵素の活性をコントロールと比較した。その結果、TPI および NAD-GAPDH 活性がコントロール植物と比較して 1.38 ± 0.22 および 1.41 ± 0.18 倍増加していた (図 2)。そ

他の解糖系酵素活性は有意に変化していなかった。そこで次に、これら植物における呼吸活性および ATP 量を測定したところ、いずれも、1 μM セレン酸ナトリウムを付与して生育させた植物において、有意な増加が認められた (図 3)。以上より、極微量の Se 栄養で認められたシロイヌナズナ実生の生育促進効果は、一部の解糖系酵素の活性化と、それに伴うミトコンドリア機能の上昇によるものであることが考えられた。

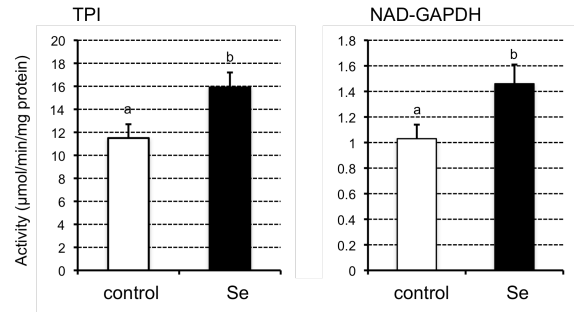


図2. TPIおよびNAD-GAPDH活性に及ぼすSeの影響

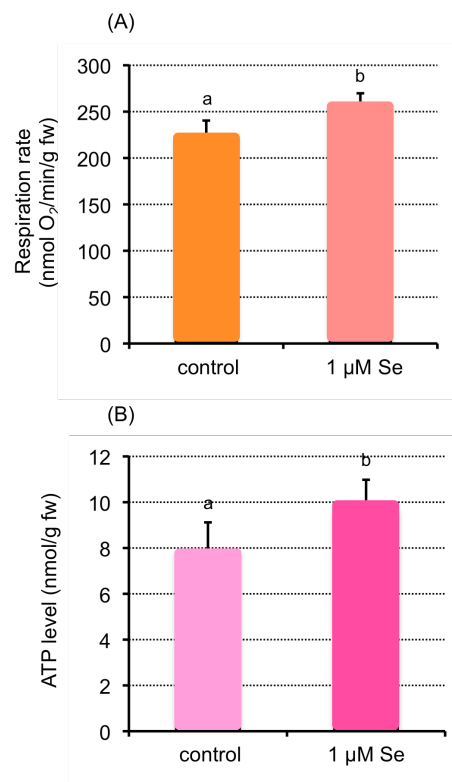


図3. 呼吸活性およびATP量に及ぼすSeの影響

(3) シロイヌナズナ解糖系酵素の Se による発現調節機構の解明

① NAD-GAPDH の Se による発現調節
Se 付与培地で播種後 17 日目まで認められた NAD-GAPDH 活性の増加について、特異抗体

を用いたウエスタンブロッティングの結果より、酵素タンパク質の活性化によることが明らかになった。Se 存在下あるいは非存在下で播種後 17 日目まで生育させた植物体より、それぞれ NAD-GAPDH を精製した。精製酵素の比活性も、Se 付与培地で生育させた植物体から精製した酵素において 1.42 倍増加していた。それぞれの精製酵素をトリブシンによりペプチド断片にまで消化し、得られた断片の質量を MALDI-TOF/MS および Q-TOF/MS/MS により解析した。その結果、基質のグリセルアルデヒド-3-リン酸が結合する触媒部位に相当する 155 番目のシステイン残基 (155-Cys) を含むペプチド断片の質量が、Se により活性化された NAD-GAPDH において 126 増加していることが判明した。さらに、Se の結合部位を詳しく解析するために、ProteinLynx による de novo sequencing を試みた。Se を含まない培地で生育させた植物体から精製した酵素のペプチド断片では、155-Cys を含む断片のアミノ酸配列は完全に一致していた。一方、Se により活性化された精製酵素のペプチド断片では、155-Cys 以外のアミノ酸配列は一致していたが、155-Cys でのみ質量の増加が認められた (図 4)。

動物細胞における酵素タンパク質への Se の翻訳後取り込みが GSH を介して生じることは、ロダネース (Ogasawara et al. 2001) や NAD-GAPDH (Lacourciere et al. 2002) で報告されている。この事実をふまえ、シロイヌナズナにおける NAD-GAPDH への Se の翻訳後取り込みに関する GSH の影響について検討した。シロイヌナズナを Se に加えて GSH 合成阻害剤であるブチオニンスルホキシミン (BSO) を含む培地で生育させた。その結果、BSO により細胞内 GSH 量が約 20% まで低下したシロイヌナズナでは、Se による NAD-GAPDH の活性化はシュートおよび根の両方において認められなかった (図 5)。また、BSO と Se を含む培地で生育させた植物体から精製した酵素を消化し、質量分析を試みたところ、155-Cys を含むペプチド断片の質量に変動は認められなかった。以上のことから、シロイヌナズナにおける NAD-GAPDH への Se の翻訳後取り込みには、GSH が関与していることが明らかになった。

② TPI の Se による発現調節

Se 付与培地で播種後 17 日目で認められた TPI 活性の増加について、特異抗体を用いたウエスタンブロッティング、二次元電気泳動および RT-PCR の結果より、転写後調節によることが明らかになった。Se による TPI 活性ならびにタンパク質の増加は、硫黄栄養が十分な条件、すなわち、Se 存在下でも Se 取り込み量が制限された条件では、認められなかった。

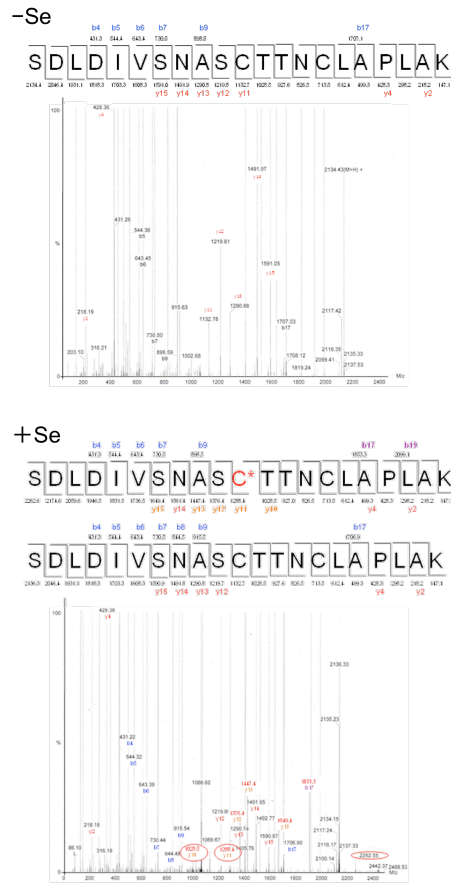


図4. 155-Cysを含むペプチド断片のde novo sequencing

(4) カラミダイコンおよびブロッコリーの解糖系に及ぼす Se 栄養の影響

シロイヌナズナで認められた極微量の Se 栄養による解糖系ならびに呼吸系の活性化が他の植物でも認められるかどうかについて検討するために、Se 強化スプラウトなどで動物臨床実験に用いられることの多いカラミダイコンおよびブロッコリーの解糖系に及ぼす Se 栄養の影響について調べた。その結果、播種後 10 日目のカラミダイコン実生に取り込まれた Se 量は、新鮮重量と正の相関を示すことが明らかになった。また、Se の取り込みや有意な新鮮重量の増加が認められた播種後 10 日目の Se 強化カラミダイコン実

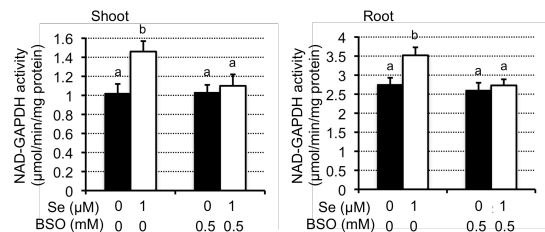


図5. BSOによりGSH量が低下した植物体におけるSeによるNAD-GAPDHの活性化

生において、NAD-GAPDH および TPI 活性の 1.44~1.51 倍の増加と、呼吸活性、ATP 量および葉緑体型カルビン回路酵素（フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、NADP-GAPDH、ホスホリブロキナーゼ）の活性の有意な増加も認められた。

以上、Se 蓄積種および非蓄積種に限らず、植物において微量の Se が種々の代謝系にポジティブに作用することが明らかになった。その詳細なメカニズムが今後解明されることにより、環境中の Se 循環における植物の有効利用や、健康増進のための新規機能性食品の開発が可能になるものと考えられる。

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 7 件）

- ① 武田 徹、中水 元樹、津田 晋路 セレンによるシロイヌナズナ細胞質型トリオースリン酸イソメラーゼの調節、2011 年日本農芸化学会大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学（*本大会は震災により中止。但し、全講演の発表は大会規程に基づき完了済み。）
- ② 武田 徹 光合成生物におけるセレン化酵素の存在と生理的意義、微量元素学会 2010 年度大会、2010 年 7 月 4 日、京都大学
- ③ Toru Takeda Beneficial effects of selenium as a micronutrient in *Arabidopsis* seedlings. 2010Se 国際会議、2010 年 6 月 2 日、京都大学
- ④ 武田 徹、村田 朋久、福井 由記 カラミダイコンの細胞質局在性 NAD 依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼに及ぼすセレンの影響、2010 年日本農芸化学会大会、2010 年 3 月 28 日、東京大学
- ⑤ 武田 徹、福井 由記、村田 朋久 NAD 依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼのセレン酸塩による翻訳後チオール基修飾、日本植物学会 2009 年度大会、2009 年 9 月 19 日、山形大学
- ⑥ 武田 徹 シロイヌナズナにおける微量セレン栄養の有効性、微量元素学会 2009 年度大会、2009 年 7 月 3 日、京王プラザホテル（東京）
- ⑦ 武田 徹、石川 美穂、浦 恵利香 シロイヌナズナにおけるグルタチオンを介した NADH 依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼへのセレンの取り込み、2009 年日本農芸化学会大会、2009 年 3 月

28 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 徹 (TAKEDA TORU)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：00247967