

機関番号：21301  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2017  
課題番号：26450082  
研究課題名(和文) セレンの農耕地生態系での動態と作物による吸収

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

研究代表者

木村 和彦 (Kimura, Kazuhiko)

宮城大学・食産業学群(部)・教授

研究者番号：10183302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物に必須元素であるセレンは土壤中で様々な形態で存在し、その形態によって植物による吸収が異なる。そこで、セレンの土壤中での存在形態を明らかにする目的で、セレンの形態別の分析を行った。無機態のセレンとしては、セレン酸、亜セレン酸、有機態のセレンとしては、セレノシステイン及びセレノメチオニンを対象とし、液体クロマトグラフィーで分離後に高感度なICP-MSでセレンを検出する方法で効率よく分析することができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Various selenium species in agricultural soil were investigated. As organic selenium, seleno-methionine and seleno-cysteine, and as inorganic selenium, selenite and selenate were analyzed. By using HPLC and ICP-MS, these selenium species were separated and detected efficiently. Chromatographic separation was performed by using anion exchange column. The potentially interfering ArAr<sup>+</sup> ions, which were formed in plasma, at selenium masses of 78 and 80 were reduced in intensity by using methane as a reactive cell gas in the dynamic reaction cell. The result showed that inorganic species and seleno-methionine and seleno-cysteine were found in soils. The soil applied with selenium containing yeast, organic selenium species were disappeared during cultivation and were thought to be transformed to selenite.

研究分野：土壤肥料学

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、グルタチオンペルオキシダーゼなどの酵素の構成要素であり、人間には必須元素である。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、日本では厚生労働省による摂取基準があり、日本食品標準成分表 2010 から新たに収載されるように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、植物では必須元素でないため欠乏症が発生しない。したがって、土壤肥料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、近年では飼料に有機態セレンを添加したものが給餌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。

ICP-MS は高感度な元素分析装置であり、微量金属元素の測定に使用される。最近では、ICP-MS の弱点であった分子イオン種による干渉の抑制ができるようになり、HPLC と組み合わせた形態別分析ができるようになってきている。この方法を用いて、セレンの形態別分析を行うことを検討した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、セレン酸、亜セレン酸、セレン含有アミノ酸(主として、セレノシステイン(実際にはセレノシスチンとして検出される)およびセレノメチオニン)などの形態に注目し、土壤中及び植物でのセレンの形態別分析方法を確立し、セレンの土壤中での形態変化と植物による吸収を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) セレンの検出：自然界ではセレンは微量であり、その検出法として高感度な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、<sup>80</sup>Se 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の一部がアルゴンの二原子イオンである <sup>40</sup>Ar<sup>40</sup>Ar となり、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、<sup>40</sup>Ar<sup>40</sup>Ar 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る。

セレンの検出 2：マイクロ波プラズマ発光分光分析装置(Microwave induced plasma atomic emission spectrometry, MP-AES)を用いた。また、無機セレンをチャンバー内で水素化物に変換しつつ装置に導入する、マルチモードサンプル導入装置(Multi-mode sample introduction system, MSIS)を使用した。

(2) セレンの形態別分析 1：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、セレン酸( $\text{SeO}_4^{2-}$ )および亜セレン酸( $\text{SeO}_3^{2-}$ )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)、セレノシスチン(シグマアルドリッチ)およびセレノメチオニン(和光純薬)を使用した。なお、セレノシステインは容易に酸化され、分析時にはセレノシスチンとして検出される。そこで、検出されたセレノシスチンはセレノシステインとして存在するものとして扱った。

セレンの形態別分析 2：有機と無機のセレンを簡易に別個に定量する目的で、水素化物発生装置では無機セレンのみが反応することを利用して測定を行った。すなわち、溶液を噴霧することで有機と無機のセレンの含量を測定し、水素化物発生装置を介し無機セレンのみを測定し、差し引きを有機のセレンとするものである。

(3) HPLC-ICP-MS の条件：陰イオン交換カラム (PRP-X100, Hamilton, 10 μm diameter particles, 4.1 mm i.d. × 250 mm length) を使用した。溶離液は 0.5mM クエン酸アンモニウム (pH 4.5) と 15mM クエン酸アンモニウム (pH 8.0) をグラジエント条件で混合後に 0.7 mL/min にて溶出を行った。なお、これまでのクエン酸アンモニウム緩衝液 5 mM (pH 5.0) をイソクラティック条件で用いた時に、最初に溶出するセレノシステインと亜セレン酸の分離が不十分な場合があり、その改善のためにグラジエント条件とした。なお、感度を上げるためにメタノールを 1% 体積濃度となるように添加した。注入量は 50 μL である。カラムから

ICP-MSへPEEKチューブで接続し、サイクロンチャンパ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、測定した質量数は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時間振とうした。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時間振とうした。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) 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。

(7) 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。

#### 4. 研究成果

(1) HPLCとICP-MSを組み合わせたセレンの形態別分析条件

標準品を用いてセレン濃度を各10 μg/Lとし分離のための条件を検討した。その結果、セレノシスチン(セレノシステイン)、セレノメチオニン、亜セレン酸、セレン酸の順に溶出した。分析に要した時間は12分である。従来の方法と比較して、亜セレン酸とセレノメチオニンの溶出順が逆転しているが、セレノメチオニンと亜セレン酸の保持時間の差が大きくなり分離は良好となった。

(2) MP-AESと水素化物発生装置を組み合わせたセレンの有機態、無機態別セレンの分析  
噴霧のみでのセレンの感度は低く、検出限界は約100ppbであった。一方、水素化物発生装置を組み合わせた場合は約1ppbとなった。実際上を考えると、測定溶液中のセレン濃度が100ppbとなるようなことはほとんどない。したがって、測定溶液を硝酸などで分解し全て無機セレンにした溶液を用意し、こ

の溶液を用いて水素化物発生装置とMP-AESを使用して測定したものを有機セレンと無機セレンの含量とすることが必要となる。しかし、測定にかかる時間を考慮するとこの方法は得策ではなく、この方法での実サンプルでの測定は行わなかった。

(3) 植物のセレンの形態別分析

植物中のセレンは、無機セレンとしてはセレン酸及び亜セレン酸として存在し、有機態セレンとしては主にセレノメチオニンとして存在していた。

セレノシステインは硫黄含有アミノ酸であるシステインの硫黄がセレンに置き換わったものである。植物の代謝では、セレノシステインとシステインは区別して代謝され、セレノシステインはタンパク質にはあまり取り込まれず、一方、セレノメチオニンとメチオニンはあまり区別されることなく代謝されるため、セレノメチオニンはタンパク質に取り込まれやすいと考えられている。

これらのことから、植物ではセレン酸あるいは亜セレン酸などの無機態セレンとして吸収し、セレノシステイン、セレノメチオニンへと代謝されるが、セレノシステインは速やかにセレノメチオニンに代謝されるため、セレノシステインよりもセレノメチオニンとしての存在が多くなるものと考えられた。

(4) 土壌中のセレンの形態別分析

NaOH溶液で土壌から抽出したセレンは、その形態はほとんどが亜セレン酸であり、セレン酸はほとんど検出されなかった。また、セレノシステインあるいはセレノメチオニンとしては検出されなかった。

このことは、土壌中では亜セレン酸が安定であることを示しており、植物に吸収される場合は亜セレン酸として吸収されることが考えられる。

さらに、セレンをセレン含有アミノ酸を主体としたセレン酵母として土壌に添加した場合でも、作付け後はNaOHで抽出した溶液にはセレン含有アミノ酸は検出されなかったことから、セレン含有アミノ酸は速やかに分解されて亜セレン酸として存在するか、腐植などに取り込まれたものと考えられる。

(5) まとめ

これまでセレンの形態別分析の方法として、HPLCで各種形態を分離後にICP-MSでセレンを検出する方法で行っていたが、形態別のセレンの定量性の改善とセレノシステインの分離が不十分であることを中心に分析方法の再検討を行った。セレンの定量性が悪い原因の一つは感度が低いことである。そこで、感度を向上させるためにICP-MSのリアクションガスの条件を変えた。その結果、感度は向上しセレンの定量性にも改善が見られた。また、セレノシステインの分離は、HPLCをイソクラティックからグラジエントに変更することで溶出時間が近く分離がやや不十分であった亜セレン酸の保持時間

を変えることで改善ができた。以上の改善をもとに、土壤中でのセレンの形態変化を解析したところ、NaOH可溶画分には亜セレン酸として存在するようになった。また、植物に集積したセレンとしては、主としてセレノメチオニンでありセレノシステインはそれに比べて低いことがわかった。無機態セレンと合わせて解析すると、土壌では有機態セレンはセレン酸あるいは亜セレン酸に分解するものと、微生物を介した代謝によりセレノメチオニンとして残るものが存在し、土壌中で形態を動的に変化しているものと考えられた。

#### (6) 今後の展望

HPLCとICP-MSを組み合わせた分析により、土壌および植物中でのセレンの重要な形態 - セレン酸、亜セレン酸、セレノシステイン(セレノシステイン)、セレノメチオニンについては、ほぼ分析できるようになった。しかし、以下の点が課題点としてあげられる。

測定に10分以上要するため、もっと速い方法が必要である。すでに、HPLCでは粒径の小さな粒子を用いたセミマイクロカラムを用いて高速に測定する方法が発表されている。また、HPLCではなくキャピラリー電気泳動装置(Capillary electrophoresis, CE)を用いることでも高速に測定できることが知られている。これらを用いることで、高速化が可能である。

二番目の問題として、溶出がセレノシステインよりも早い画分のセレンが植物に微量であるが認められ、未同定であった。ESIなどの質量分析装置を用いて同定する必要がある。また、植物種によっては特異的なセレン化合物があることが知られているが、このような物質については今の方法では無理があり、やはりESIなどの質量分析装置を用いた同定が必要がある。

三番目の問題として、硫黄化合物との関係を追求する必要がある。セレノシステインとセレノメチオニン、システイン、メチオニンとの相互関係が実際の栽培に関係してくる可能性があるためである。当初は、これらも含めた分析を行う計画を立てたが、硫黄の測定はICP-MSの条件をリアクションガスを変えるなどセレンとは全く違うものにしないと測定できないことが判明し、今回は測定を見送った。ICP-MSでの硫黄の測定が難しいこともあり、分離がHPLCでセレンと同じ条件で大丈夫であれば、異なる原理での検出を同時に行なうことが考えられる。たとえば、MP-AESなどの発光分析である。

四番目の問題として、今の方法では存在量の変化からセレンの形態変化を推定せざるをえない。この問題は、セレンは同位体が多くあるため、同位体希釈法などを用いることで解決が可能である。そのためにはICP-MSでの測定が有効な手段となる。

五番目の問題として、土壌中の形態を

NaOH可溶なものに限ったことである。土壌中のセレンは、無機態としてはセレン酸と亜セレン酸が主なものであることが知られている。しかし、有機の形態としてはたとえば、ヒューミンなどの腐植はNaOH可溶画分には出てこないため、不溶画分をさらに別の方法で抽出するなどの方法で追求する必要がある。

#### 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 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.myu.ac.jp/teacher/syokusan-teacher/kimurakz>

#### 6. 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし