

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08120

研究課題名(和文) 環境浄化をめざした植物におけるセレン・テルルの代謝および集積機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of metabolism and accumulation mechanism of selenium and tellurium in plants for phytoremediation

研究代表者

武田 徹 (TAKEDA, Toru)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：00247967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：セレン(Se)およびテルル(Te)は、元素材料としての重要性が認められているが、環境中に存在するこれら元素の無機酸化物は極めて毒性が高い。本研究は、植物を用いた環境中からのSe・Te無機酸化物の回収と元素態Se・Te合成系の解明を目的とした。ブロッコリーおよびソルガムは、SeおよびTeの無機酸化物を吸収し、根、茎、および葉の各組織で、グルタチオンレダクターゼと数種類のNADH依存還元酵素の作用により、元素態SeおよびTeに代謝することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SeおよびTeは、産業的にも安定供給が必要とされる元素であるが、いずれも専用鉱がない。それゆえ、国内での精錬SeおよびTeの確保は達成されつつあるが、いずれも異種鉱物に頼る供給形態であるため、環境中に排出されたSeおよびTe無機酸化物の有効な回収技術が必要とされている。また、東日本大震災に引き続き起こった原子力発電所の事故に伴い環境中に放出された膨大な量のTe放射性同位元素(^{132}Te)はヨウ素へ壊変することから、生体・環境影響を考える上で、本元素の回収は緊急の課題である。本研究で得られた結果をさらに発展させていくことにより、以上の課題の解決が可能になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although selenium (Se) and tellurium (Te) have been recognized as important as elemental materials, inorganic oxides of these elements present in the environment are extremely toxic. This study aimed at recovery of Se and Te inorganic oxide from environment using plants and elucidation of elemental Se and Te synthesis in the cells. It was suggested that broccoli and sorghum absorb the inorganic oxides of Se and Te and metabolize them to elemental Se and Te by glutathione reductase and several NADH-dependent reductases.

研究分野：植物栄養学

キーワード：セレン テルル 環境浄化 グルタチオンレダクターゼ グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

様 式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ヒトや動物にとってセレン（Se）は必須微量元素であり、主にグルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシンレダクターゼなどのセレンタンパク質の活性中心にセレノシステインとして存在している。これらセレンタンパク質は、レドックス制御において重要な役割を担っているために、Se 欠乏は種々の障害をもたらす。一方、植物にはセレンタンパク質は存在せず、その合成系に関わる遺伝子も存在しない。むしろ、植物にとって Se は有毒因子、あるいは、硫黄化合物の機能を阻害する因子と考えるのが主だった認識であった。また、Se と同族のテルル（Te）は、動物および植物にとって有毒であり、特に植物における集積・代謝系についてはほとんど明らかになっていない。

ところで、Se および Te は材料要素として用途が広く、産業的にも安定供給が必要とされる元素であるが、いずれも専用鉱がない。そのため、国内での精錬 Se および Te の確保は達成されつつあるが、いずれも異種鉱物に頼る供給形態である。また、環境中に存在するこれら元素の無機酸化物（セレン酸、テルル酸、亜セレン酸、および亜テルル酸）は極めて毒性が高く、生物や生態系に負の影響をもたらす。このような状況下、生物による Se および Te の環境からの安全かつ効率的な浄化・回収技術が注目されてきているが、微生物による Se および Te 回収技術の可能性は最近報告されているものの、微生物よりも自然界における生育・管理が容易な植物を用いた例はほとんど報告されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は植物における Se および Te の代謝系、特に還元同化系を明らかにし、Se および Te 汚染環境の修復と、これら元素資源の回収のための研究基盤を確立することを目的とした。さらに、いまだ不明な点が多く残されている植物における Se および Te の生理機能について、タンパク質機能に及ぼす Se の影響と、Te により発現量に変化するタンパク質を解析することにより、これら両元素の植物細胞内における新奇生理機能の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 亜セレン酸および亜テルル酸還元系の解明

亜テルル酸存在下で栽培したブロッコリースプラウトから抽出した粗タンパク質画分に、フェレドキシンを電子供与体とする亜硫酸還元活性はほとんど検出されないが、NADH を電子供与体とする亜テルル酸還元活性が存在し、また、このタンパク質画分は *in vitro* で亜テルル酸塩をテルル微粒子に変換した。このことは、吸収した亜テルル酸が硫黄同化経路では無く、特有の還元系により元素態テルルにまで還元されることを示唆している。そこで、ブロッコリーおよび先行研究で亜セレン酸・亜テルル酸を効率的に吸収することが分かっているソルガムにおける亜セレン酸・亜テルル酸還元酵素の同定を試みた。具体的には、Native-PAGE 後の活性染色により、亜セレン酸・亜テルル酸還元を示したタンパク質の同定を質量分析の手法を用いて試みた。

(2) Se・Te の新奇生理機能の解明

Se を必須微量元素としない植物においても、適量を適切な条件で付与することにより、Se が植物細胞内において有用性を示すことが明らかになっている。本研究代表者らも、シロイヌナズナへの極微量（1.0 μM ）のセレン酸ナトリウム付与は、播種後 17 日目までの実生の生育を有意に増加させることを明らかにしている。その主な要因は、解糖系酵素の 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）の Se による活性化と、それに伴う ATP 生成量および呼吸活性の有意な増加であった。この結果を踏まえ、Se による NAD-GAPDH の活性化機構を Se 蓄積植物のブロッコリーを用いて検討した。また、これまでまったく明らかになっていない植物における Te の生理機能の解明は、シロイヌナズナを用いて Te 特異的に発現するタンパク質を二次元電気泳動法により解析することで試みた。

4. 研究成果

(1) 亜セレン酸および亜テルル酸還元系の解明

液体化成肥料を含むバーミキュライトにソルガムおよびブロッコリー種子を播種し、明期 14 時間（100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$: 24 $^{\circ}\text{C}$ ）／暗期 10 時間（20 $^{\circ}\text{C}$ ）の条件下、人工気象機で 7 日間栽培した。その後、50% ムラシゲ・スクーグ混合塩類と 100 μM 以下の亜セレン酸（Se[IV]）あるいは亜テルル酸（Te[IV]）を含む水耕液に移植し、人工気象機で 7 日間栽培したものを実験に用いた。Se[IV] および Te[IV] 還元酵素の活性は、分光学的測定および活性染色により評価した。

Se[IV] あるいは Te[IV] 存在下で 7 日間栽培したソルガムおよびブロッコリーの根・地上部において、Se[IV] あるいは Te[IV] がそれぞれ検出された。ソルガムの Se[IV] および Te[IV] の吸収率は、根ではそれぞれ 3~6% および 6~20% であり、ブロッコリーの Se[IV] および Te[IV] の吸収率は、根ではそれぞれ 3~6% および 4~18% であった。さらに、セレン酸およびテルル酸を添加したこれら植物において、根・地上部に Se[IV] と Te[IV] が検出された。以上のことから、これら植物による Se・Te 汚染土壌の浄化と Se および Te などレアメタル資源回収の可能性が示唆された。Se[IV] あるいは Te[IV] の存在の有無に関わらず、ソルガムおよびブロッコリーの根・地上部に Se[IV] および Te[IV] にそれぞれ特異的な還元活性が分光学的測定および活性染

色により検出された。活性染色の結果より、ソルガム地上部および根の複数種類の亜セレン酸・亜テルル酸還元酵素のうち2種類がグルタチオンレダクターゼと一致し、2から3種類がカタラーゼと一致することが判明した。また、ブロッコリー地上部および根の複数種類の亜セレン酸・亜テルル酸還元酵素のうち2から3種類がグルタチオンレダクターゼと一致し、カタラーゼと一致するタンパク質は根でのみ1種類存在することが明らかになった(図1)。今後、植物における亜セレン酸および亜テルル酸還元酵素を *in vivo* あるいは *in vitro* で活用することで、効率的な Se および Te 化合物吸収と、Se および Te ナノ粒子合成系の開発が可能になるものと考ええる。

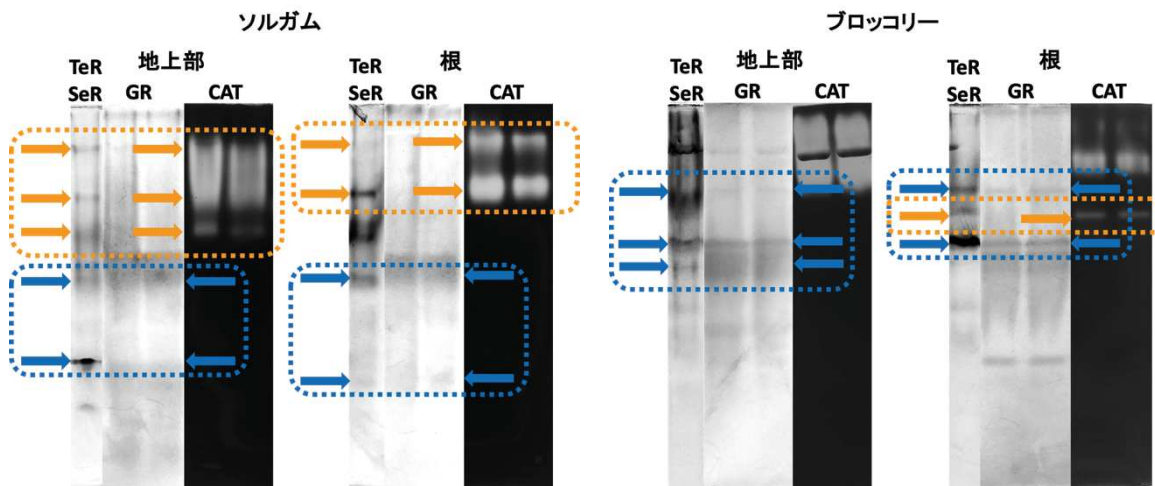


図1. 活性染色による亜セレン酸、亜テルル酸還元酵素(SeR、TeR)およびグルタチオンレダクターゼ(GR)、カタラーゼ(CAT)の比較

(2) Se・Te の新奇生理機能の解明

①ブロッコリーにおける Se の新奇生理機能の解明

3.0~500 μM セレン酸ナトリウム存在下でブロッコリースプラウトを栽培した。播種後9日目の茎の長さや植物体の新鮮重量を測定したところ、茎の長さは3.0~100 μM セレン酸ナトリウム添加群で、新鮮重量は3.0~20 μM セレン酸ナトリウム添加群で有意に増加していた(図2)。これら植物体における NAD-GAPDH 活性を測定したところ、100 μM セレン酸ナトリウム添加群の葉および茎において有意な増加が認められた(図3)。グルタチオン合成阻害剤の処理により、グルタチオン量を20%にまで減少させたグルタチオン制限株に Se を添加にしても、NAD-GAPDH の活性化は認められなかった。このことから、ブロッコリーにおける Se による NAD-GAPDH の活性化にはグルタチオンが関与していることが明らかになった。コントロール群と100 μM セレン酸ナトリウム添加群より

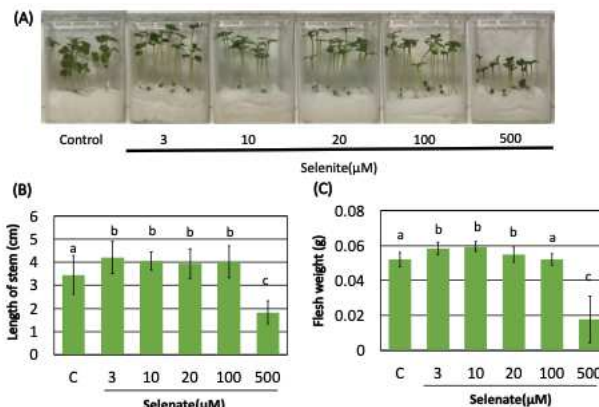


図2. ブロッコリースプラウトの生育に及ぼす Se の影響
(A) 写真、(B) 新鮮重量、(C) 茎の長さ

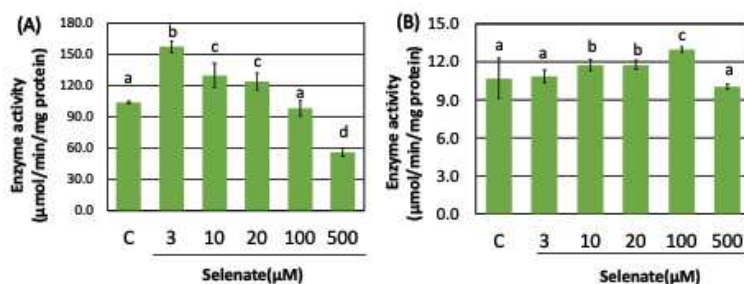


図3. ブロッコリースプラウトのNAD-GAPDH活性に及ぼす Se の影響
(A) 葉、(B) 茎

それぞれ NAD-GAPDH を電気泳動的に単一になるまで精製した。精製酵素の比活性を比較したところ、粗酵素液中の活性と同様に、Se 添加群の NAD-GAPDH の活性はコントロール群のものに比べて1.27倍増加していた。また、コントロール群より精製した NAD-GAPDH をグルタチオン存在下で Se 処理すると、有

意な活性化が認められた。したがって、NAD-GAPDH のグルタチオンを介した Se による活性化は、ヒトや動物におけるセレンタンパク質への Se の翻訳時取り込み機構と異なり、翻訳後に Se が取り込まれることにより生じていることが示唆された。現在、質量分析の手法を用いて、NAD-GAPDH における Se 取り込み部位の同定を行っている。

②シロイヌナズナにおけるテルル酸応答機構の解明

50%ムラシゲスクグ混合塩類と 1.0~100 μM テルル酸ナトリウムを含む培地に、シロイヌナズナを播種し、明期 14 時間(100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$: 24 $^{\circ}$ C)/暗期 10 時間:20 $^{\circ}$ C)で 11 日間栽培した。Te 添加群のすべての植物に、Te は添加濃度依存的に取り込まれていた。1.0 μM テルル酸ナトリウム添加群の新鮮重量および乾燥重量はコントロール群のものと比べて、1.22 倍および 1.20 倍に増加していた。クロロフィル量、およびアントシアニン量から、Te 添加群の抗酸化力の増加が推測されたので、1.0 μM テルル酸ナトリウム添加群のパラコート依存の酸化的障害に対する感受性をコントロール植物と比較した。その結果、コントロール植物が明確な酸化的障害、すなわち、有意な過酸化脂質量の増加とクロロフィル量の減少が認められるパラコート処理条件下 (0.1 μM パラコート噴霧、24 時間連続強光照射条件) で、Te 添加群はパラコート耐性を示した。二次元電気泳動法により、Te 依存的に発現量が増加したタンパク質を解析した結果、ミトコンドリア型ヒートショックタンパク質 (分子量 26500 Da、pI6.82) およびカルボキシルトランスフェラーゼ β サブユニット (分子量 33042 Da、pI6.96) の発現量が有意に増加していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 17 件)

- 1) 渡部 翔太、田中 里奈、新 晶帆、中條 滉叡、武田 徹 「環境浄化を目指した植物における亜テルル酸特異的還元系の解明」 日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年 3 月 26 日、東京農業大学、東京都。
- 2) 高貝 俊生、高山 せい花、小竹 未季子、廣瀬 啓自、米田 大輝、武田 徹 「植物における翻訳後セレン取り込みによる NAD 依存 GAPDH の活性化機構」 日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年 3 月 26 日、東京農業大学、東京都。
- 3) 高貝 俊生、廣瀬 啓自、米田 大輝、武田 徹 「ブロッコリースプラウトの生育に及ぼすセレン施肥の影響」 2018 年度日本土壌肥料学会関西支部大会、2018 年 12 月 6 日、松江テルサ、島根県。
- 4) 高貝 俊生、高山 せい花、武田 徹 「植物由来タンパク質の翻訳後調節によるセレン取り込みおよび機能向上」 日本毒性学会メタルバイオサイエンス研究会 2018、2018 年 11 月 16 日、仙台市戦災復興記念館、宮城県。
- 5) Toru Takeda, Toshiki Takagai, Keiji Hirose, Mikiko Kotake, and Seika Takayama “Post-translational activation of NAD-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by specific incorporation of selenium via glutathione in plant.” The 7th International Selenium Conference Se2018, 2018 年 10 月 1 - 5 日, Otsu.
- 6) 武田 徹、高貝 俊生、渡部 翔太、中條 滉叡、新 晶帆、田中 里奈 「ソルガムにおける亜セレン酸および亜テルル酸取り込みと還元系」 第 4 回日本セレン研究会、2018 年 7 月 21 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県。
- 7) 高貝 俊生、廣瀬 啓自、高山 せい花、小竹 未季子、武田 徹 「翻訳後セレン修飾によるブロッコリー由来 NAD-GAPDH の活性化機構の解明」 第 4 回日本セレン研究会、2018 年 7 月 21 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県。
- 8) 武田 徹、高貝 俊生、渡部 翔太、中條 滉叡、新 晶帆、田中 里奈 「ソルガムにおける亜セレン酸および亜テルル酸還元系の解明」 第 29 回日本微量元素学会、2018 年 7 月 7 日、名古屋大学医学部、愛知県。
- 9) 高貝 俊生、廣瀬 啓自、小竹 未季子、高山 せい花、武田 徹 「セレン化によるブロッコリー由来 NAD-GAPDH の活性化機構の解明」 第 29 回日本微量元素学会、2018 年 7 月 7 日、名古屋大学医学部、愛知県。
- 10) 渡部 翔太、中條 滉叡、武田 徹 「ソルガムにおける亜テルル酸吸収と特異的還元系の解析」 日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学、愛知県。
- 11) 高貝 俊生、武田 徹 「セレン蓄積植物における NAD 依存 GAPDH のセレンによる活性化機構」 日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学、愛知県。
- 12) 武田 徹 「光合成生物におけるセレンの生理機能の多様性 (シンポジウム)」 第 28 回日本微量元素学会、2017 年 7 月 29 日、東北大学、宮城県。
- 13) 武田 徹、大津 真太郎、高貝 俊生、渡部 翔太 「ソルガムにおける亜テルル酸依存酸化的障害」 第 28 回日本微量元素学会、2017 年 7 月 29 日、東北大学、宮城県。
- 14) 高貝 俊生、中條 滉叡、渡部 翔太、武田 徹 「ソルガムにおける亜テルル酸還元系」

- 第 28 回日本微量元素学会、2017 年 7 月 29 日、東北大学、宮城県.
- 15) 武田 徹 「植物におけるセレン・テルルの生理的意義について」 第 3 回日本セレン研究会、2017 年 5 月 27 日、北里大学、東京都。
- 16) 武田 徹、中馬 康輔 「セレン蓄積植物ブロッコリースプラウトにおける亜テルル酸還元系」 日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学、京都府。
- 17) 武田 徹 「セレン非蓄積および蓄積植物のグルコシノレート代謝に及ぼすセレンの影響」 第 27 回日本微量元素学会、2016 年 7 月 30 日、京都大学、京都府。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）