

亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の 生育抑制と遺伝子発現量の変化

廣 瀬 侑太郎, 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*)

Inhibition of Growth of and Variations in Gene Expression in *Arabidopsis thaliana* Following Exposure to Selenite

Yutaro HIROSE, Masashi OTSUKA, Ryota HOSOMI,
Kenji FUKUNAGA, and Munehiro YOSHIDA
*Laboratory of Food and Nutritional Science, Faculty of Chemistry Materials and Bioengineering,
Kansai University*

Summary

This study evaluated the effects of exogenously supplemented selenite on the growth and variations in gene expression in *Arabidopsis thaliana*. After cultivation at 25°C for 14 days with 0, 1, 5, and 10 ppm selenite, we measured growth parameters, selenium contents, and comprehensively analyzed the expression of *A. thaliana* genes using a DNA microarray. Fresh weight was approximately 60% (w/w) lower following exposure to 5 ppm selenite. Selenium contents in leaves increased in a dependent manner on selenium exposure levels up to 10 ppm; the content of selenium in leaves exposed to 10 ppm was 23.2 µg/g fresh weight. A DNA microarray analysis was conducted and revealed that the expression of 2723 genes significantly differed between *A. thaliana* exposed to 1 ppm selenite and 0 ppm selenite. Gene ontology terms related to responses to heat, responses to a temperature stimulus, immune responses, and innate immune responses were enriched significantly more by 1 ppm selenite than by 0 ppm selenite. The expression levels of cystathionine beta-lyase, pyridoxal phosphate-dependent transferase superfamily protein, and cysteine desulfurase 2, which are involved in the metabolism of selenocompounds, were increased following the exposure to 10 ppm selenite. These results provide insights into the genetic and biochemical mechanisms underlying the effects of exogenously supplemented selenite on *A. thaliana*.

セレン (Se) は高等動物, および一部の細菌類においては, 酵素機能などを持つタンパク質中にセレノシステイン残基として存在しており, 生存に必須の微量元素である。一方, 植物においては, セレンを特異的に要求するタンパク質は発見されていない。植物はセレン化合物のもつ高い反応性を利用しておらず, 植物中に蓄積されるセレンの化学形態は, 植物が解毒を目的にセレンを反応性の低い形態に変換した結果と考えられる。そのため植物中には特殊な含セレンアミノ酸の生成が知られており, 意図的にセレンを強化した野菜類から Se-メチルセレノシステイン (多くのセレン強化野菜類), γ-グルタミル-Se-メチルセレノシステイン (ニンニク, ニラなどのγ-グルタミルペプチドを合成できる植物), セレノホモランチオニン (一部

のセレン強化野菜類) などが同定されている¹⁻⁴⁾。これらのような反応性が低いと考えられる植物中のセレン化合物の中に, 高い抗腫瘍活性のあるものが報告され, 様々なセレン強化食品やサプリメント素材として利用する試みが行われている⁵⁾。このような特殊なアミノ酸の生成は, 高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。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 Se-メチルセレノシステインとして蓄積され, 揮発性のジメチルセレナイドへと代謝され, 生体外へ排出される。シロイヌナズナにレンゲソウ由来のセレノシステインメチルトランスフェラーゼ遺伝子を過剰発現させることによって, セレン

*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

耐性が向上することが報告されている⁶⁾。また、シロイヌナズナの *sultr1; 2* ノックアウト変異体は、細胞内腔のセレン濃度を減少させ、野生株よりも高いセレン耐性をもつことが報告されている⁷⁾。このような遺伝子は、高濃度セレン曝露での植物体へのセレン毒性緩和に寄与していると考えられている^{8,9)}。

植物は自ら移動することはできないために、日照や気温、降雨、乾燥などの変動や化学物質の曝露など、常に環境変化に晒されており、常々適応することを余儀なくされている。このような環境変化に適応するために、植物は遺伝子の転写、翻訳、タンパク質の翻訳後修飾などの段階で調節を行っている。DNA マイクロアレイを用いた発現解析は、環境に対する生体の応答を遺伝子転写レベルで網羅的に解析できる有用な手法である。本研究では、高等植物が持つ基本的な遺伝子を備えたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に亜セレン酸を曝露させ、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析によって、亜セレン酸投与に伴い変化の生じる代謝系を検索した。

実験方法

1. 亜セレン酸曝露シロイヌナズナの調製

シロイヌナズナは野生株 (Columbia-0) を用いた。培地は 20 g/L スクロース、4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ (MS) 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、8 g/L アガーおよび亜セレン酸ナトリウム濃度 0, 1, 5, 10 ppm となるように調製した。必要に応じて培地を pH 5.7 に調整した。溶液をオートクレーブ滅菌 (121°C, 20 分間) し、植物組織培養用プラントポットに 40 mL ずつ分注した。滅菌種子を播種し、長日条件の光周期のもと、無菌的に 25°C で栽培した。2 週間培養後、1 粒の種子から得られた葉をすべて採取し重量を測定後、セレン含量を測定した。DNA マイクロアレイ用のサンプルは、開花段階まで培養したシロイヌナズナの茎頂部を RNA レーター (シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京) に浸漬し、分析まで -80°C 保存した。

2. セレン含量の測定

葉を秤量後、ケルダールフラスコに移し、濃硝酸 5 mL を加え、不溶物がなくなるまで加熱した。冷却後、過塩素酸 2 mL を加え、過塩素酸の白煙が生じるまで加熱灰化した。灰化した試料に超純水を加えて容量を 10 mL とし、0.45 μ m フィルターでろ過したものをセレン測定試料とした。試料溶液中のセレンの定量は、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) により行った。使用機種は ICPMS-8500 (島津製作所、京都)、分析質量数は 82、内部標準はロジウムとした。

3. RNA 抽出と DNA マイクロアレイ解析

開花期まで培養したシロイヌナズナ茎頂部から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた方法で総 RNA 抽出を行った。抽出した総 RNA は NanoDrop 1000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、神奈川) を使用し RNA 濃度を測定し、バイオアナライザー (Agilent Technologies, CA, USA) による品質検査を行った。総 RNA の純度 (A260/A280) が 1.9-2.1 以内およびバイオアナライザーの結果より RNA が分解していないことを確認したサンプルを DNA マイクロアレイ解析に供した。各 50 ng の総 RNA を用いて、Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent Technologies) により cDNA の合成、cRNA のラベルと増幅を行った。DNA チップは Arabidopsis オリゴ DNA マイクロアレイ Ver. 4.0 (Agilent Technologies) を使用した。Agilent 社推奨のプロトコルで、ハイブリダイゼーション、洗浄、Agilent Feature Extraction 10.7.3.1 (Agilent Technologies) を用いて各スポットを数値化した。正規化は GeneSpring (Agilent Technologies) にて 75 Percentile Shift 法で行った。実際の操作は北海道システムサイエンス株式会社 (札幌) に委託した。

4. マイクロアレイデータ解析

Ratio が 2 倍以上または 0.5 倍以下および Z-Score が -2 以下または +2 以上に変動している遺伝子を抽出した。発現変動遺伝子のアノテーション情報を利用して Gene Ontology (GO) の Biological Process に基づいて DAVID (<http://ni-aid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) の gene-annotation enrichment analysis¹⁰⁾ と Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)¹¹⁾ によって解析した。また Pathway 解析は DAVID において KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) を利用して行った。

5. 遊離アラニン量の測定

シロイヌナズナ葉凍結乾燥粉末 100 mg に 50% (v/v) エタノール 5 mL を加え、十分に攪拌した後、遠心分離して抽出液を調製し、分析用の試料とした。各抽出液 100 μ L にアミノ酸分析キットである EZ: faast™ (Phenomenex, CA, USA) を用いて誘導体化処理を行い、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) 用の試料を調製した。GC-MS の分析条件は以下のとおりである。機器、GCMS QP-2010 (島津製作所)；カラム、ZB-AAA GC column, 10 m \times 0.25 mm；キャリアガス、ヘリウム；流量、1.1 mL/min；気化温度、250°C；カラム温度、110°C-320°C (30°C/min 昇温)；分析時間、7 分；試料注入量、1 μ L；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。

6. 統計解析

葉重量およびセレン含量については、一元配置分散分

析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差について Tukey-Kramer の多重比較を用い p 値が 0.05 以下を有意差ありとした。また DNA マイクロアレイデータは、Benjamini p 値が 0.05 以下を有意差ありとした。

結果と考察

Table 1 に 2 週間培養したシロイヌナズナから採取した葉の重量とセレン含量を示した。亜セレン酸無添加と比較し、5 ppm 以上で有意に葉重量の減少が確認された。Zhang らは、シロイヌナズナ培養培地中の亜セレン酸濃度 20 μ M (約 3.5 ppm) またはセレン酸濃度 50 μ M で植物重量が約半分にまで生長が阻害されることを報告している¹²⁾。本実験において亜セレン酸 5 ppm の曝露では、無添加と比較し、葉新鮮重量が約 60% (w/w) 減少していたために、他の報告と同程度の生長阻害が起きていると考えられる。また培地中の亜セレン酸濃度 1 および 5 ppm では開花段階までの生育日数は亜セレン酸無添加と比較すると 7 日間、10 ppm では 14 日間延長し、亜セレン酸曝露によって明らかな生長阻害がみられた。また、開花段階到達時のシロイヌナズナ茎の長さは亜セレン酸曝露濃度に応じて段階的に短くなる傾向があり、特に 10 ppm では著しく短くなった (データ未掲載)。さらに、亜セレン酸曝露によって、葉に含まれるセレン含量は曝露濃度依存的に上昇し、培地中の亜セレン酸が取り込まれていると考えられる。

次に網羅的な遺伝子発現解析による代謝変動予測を行うため、シロイヌナズナ茎頂部より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。Table 2 に亜セレン酸無添加と比較した際、2, 5, 10 倍以上変動した遺伝子数を示した。亜セレン酸曝露 10 ppm では 1, 5 ppm と比較して、非常に多くの遺伝子の変動が見られた。発現量が 10 倍以上および 0.1 倍以下に変動しているものを抽出し、GO Biological Process のアノテーションに基づき Gene-Annotation Enrichment Analysis を行った。発現低下した遺伝子セットには、主に細胞周期、生長、細胞壁合成、花粉発育に関わる GO term が顕著に濃縮されていた (データ未掲載)。セレン曝露によるシロイヌナズナの生長阻害には、細胞壁の拡張、デンプンのターンオーバーや必須栄養素の減少が関与していると報告されている¹³⁾。そのため生長や細胞壁合成に関わる機能をもつ遺伝子の発現が抑えられた結果、生育阻害がみられたと考えられる。

亜セレン酸曝露 5 および 10 ppm では明らかな生育阻害がみられることから、遺伝子の発現変動が亜セレン酸曝露の影響、または生育阻害による二次的な影響であるかを判断することが出来ない。そのために GO および Pathway 解析では、明らかな生育阻害が見られず、葉に含まれるセレン含量が有意に増加していた亜セレン酸曝露 1 ppm と 0 ppm を比較した。Table 3 に亜セレン酸曝露 0 ppm と 1 ppm 間の発現変動遺伝子中に有意に濃縮された GO-term を示した。発現上昇した遺伝子セットには、defense response, innate immune response, response to organic

Table 1 Influence of 0, 1, 5, and 10 ppm selenite on fresh weights and selenium concentrations in *Arabidopsis thaliana* leaves

Selenite exposure level (ppm)	Fresh weight (mg)	Selenium concentration (μ g/g fresh weight)
0	687 \pm 18 ^a	0.20 \pm 0.02 ^d
1	608 \pm 94 ^a	5.11 \pm 0.01 ^c
5	279 \pm 114 ^b	16.99 \pm 0.12 ^b
10	35 \pm 3 ^c	23.21 \pm 0.91 ^a

Values represent means \pm SEM (n = 5).

Values in the same row not sharing a common letter were significantly different at p < 0.05 according to the Tukey-Kramer test.

Table 2 Influence of 1, 5, and 10 ppm selenite on a number of differentially expressed genes in *Arabidopsis thaliana*

Selenite exposure level (ppm)	2-fold change [*]		5-fold change [†]		10-fold change [‡]	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down
1	1006	1717	202	249	52	43
5	663	1499	146	233	57	73
10	7045	11343	2073	6502	868	4500

Versus samples not exposed to selenite.

^{*}Satisfies the following conditions: the ratio was changed by more than 2-fold and the Z-score was smaller than -2 or larger than +2.

[†]Satisfies the following conditions: the ratio was changed by more than 5-fold and the Z-score was smaller than -5 or larger than +5.

[‡]Satisfies the following conditions: the ratio was changed by more than 10-fold and the Z-score was smaller than -10 or larger than +10.

Table 3 Significantly enriched gene ontology (GO) terms found in differently expressed genes between 1 ppm and 0 ppm selenite

GO Term	Benjamini p value
Up-regulated	
immune responses	1.60E-03
innate immune responses	1.30E-03
responses to chitin	8.80E-04
defense responses	3.00E-03
secondary metabolic process	5.70E-03
responses to organic substances	7.80E-03
responses to a carbohydrate stimulus	7.90E-03
responses to bacteria	4.90E-02
Down-regulated	
responses to heat	1.20E-15
responses to a temperature stimulus	1.30E-08
external encapsulating structure organization	4.80E-08
responses to high light intensity	3.70E-07
cell wall organization	1.00E-06
sexual reproduction	8.30E-06
lipid storage	3.50E-05
responses to light intensity	1.90E-04
responses to hydrogen peroxide	7.50E-04
cell tip growth	2.00E-03
responses to reactive oxygen species	1.90E-03
pollen tube growth	3.10E-03
secondary cell wall biogenesis	4.30E-03
cellular component morphogenesis	7.20E-03
tube development	1.60E-02
pollen tube development	1.60E-02
unidimensional cell growth	1.70E-02
developmental growth involved in morphogenesis	1.70E-02
plant-type cell wall biogenesis	1.70E-02
pollen wall assembly	3.30E-02
cellular component assembly involved in morphogenesis	3.30E-02
cell wall biogenesis	4.10E-02
developmental cell growth	4.30E-02
responses to oxidative stress	4.40E-02
reproductive cellular processes	4.90E-02

GO, gene ontology.

substance などの GO term が顕著に濃縮されており、発現低下した遺伝子セットで濃縮された GO term においては、response to heat, response to temperature stimulus, response to high light intensity などストレス応答に関わる遺伝子が濃縮されていた。さらに2倍以上発現変動した遺伝子を DAVID の KEGG アノテーションを用い、発現変動遺伝子中に濃縮された KEGG Pathway を検討した。Table 4 に亜セレン酸曝露 0 ppm と 1 ppm 間の発現変動遺伝子中に濃縮された KEGG Pathway を示した。発現が上昇した Pathway として stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis, limonene and pinene degradation, phenylpropanoid biosynthesis などの代謝変動がみられた。一方、発現が低下した Pathway として phenylpropanoid biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism といったアミノ酸代謝において発現変動がみられた。

次に KEGG PATHWAY Database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) に収録されている Selenocompound metabolism に含まれる遺伝子を選抜し、各遺伝子の亜セレン酸無添加との発現変動倍率を Table 5 に示した。亜セレン酸曝露 1, 5 ppm においては2倍以上発現変動を示した遺伝子はみられなかった。亜セレン酸曝露 10 ppm において、セレノシステインをセレン化水素とアラニンに分解する cysteine desulfurase 2 (selenocysteine lyase) の遺伝子が含まれていた。しかし、selenocysteine lyase 発現の上昇がみられた亜セレン酸曝露 10 ppm において、葉に含まれる遊離アラニン濃度を測定したが、変化はみられなかった(データ未掲載)。Hoewyk らは、セレン酸を MS 培地中に 40 μ M 添加し 10 日間栽培したシロイヌナズナ組織の遊離アラニン濃度には変化が見られないことを報告している¹⁴⁾。これらのことより、selenocysteine lyase の発現上

昇は組織中の遊離アラニン濃度に大きな影響を与えないと考えられる。また亜セレン酸曝露 10 ppm において、セレノシスタチオンからのセレノホモシステイン合成に関わる cystathionine beta-lyase と pyridoxal phosphate-dependent transferases superfamily protein の発現上昇および

セレノホモシステインからのセレノメチオニン合成に関わる methionine synthase 2 の顕著な発現低下がみられた。このことから、亜セレン酸曝露 10 ppm 中に含まれる有機セレン化合物としてセレノホモシステインが含まれている可能性が考えられる。さらに亜セレン酸代謝に関連するグルタチオン合成系の glutathione S-transferase の発現が 2.1 倍上昇しており、亜セレン酸によるグルタチオンの消費と過剰に生成したセレノシステインに対応するための代謝充進が生じていると推定できる。またセレノプロテインとは異なり、タンパク質中にセレノシステインを含まないが、翻訳後にセレンがリガンドとして結合するセレン結合タンパク質¹⁵⁾の亜セレン酸無添加との発現変動倍率を Table 6 に示した。亜セレン酸曝露 1, 5 ppm においては 2 倍以上発現変動を示した遺伝子はみあたらなかった。一方、亜セレン酸曝露 10 ppm において、セレン結合タンパク質 2 および 3 の発現上昇がみられた。Agalou らはセレン結合タンパク質 1 の発現とセレン耐性に正の相関があることを報告している¹⁶⁾。そのため、亜セレン酸曝露 10 ppm 条件下ではセレン結合タンパク質発現上昇がセレンの毒性防御に一部関わっていると考えられる。

本研究ではもっとも活発に細胞分裂していると考えられる茎頂部を用いて、DNA マイクロアレイ解析に供した。そのために葉や根などの他の部位では異なる代謝変動を起

Table 4 Number of genes significantly changed* in a pathway analysis of DNA microarrays between 1 ppm and 0 ppm selenite

Pathway	Count
Up-regulated	
Stilbenoid, diarylheptanoid, and gingerol biosynthesis	9
Limonene and pinene degradation	9
Phenylpropanoid biosynthesis	9
Nitrogen metabolism	5
Phenylalanine metabolism	6
Methane metabolism	6
Glucosinolate biosynthesis	3
Down-regulated	
Phenylpropanoid biosynthesis	9
Alanine, aspartate, and glutamate metabolism	5
Pyruvate metabolism	6
Starch and sucrose metabolism	7
Pentose and glucuronate interconversions	4
Monoterpenoid biosynthesis	2

*Benjamini p value < 0.05.

Table 5 Influence of 1, 5, and 10 ppm selenite on the expression of genes related to selenocompound metabolism* in *Arabidopsis thaliana*

Locus	Gene name	Definition	Selenite exposure level		
			1 ppm	5 ppm	10 ppm
Fold change					
AT5G49810	MMT	methionine S-methyltransferase	0.77	1.05	1.20
AT3G55400	OVA1	methionyl-tRNA synthetase	1.09	1.00	1.70
AT4G13780		probable methionine-tRNA ligase	1.05	0.97	0.85
AT1G64660	MGL	methionine gamma-lyase	0.75	1.19	0.50
AT3G03780	MS2	methionine synthase 2	0.86	1.54	< 0.01
AT5G17920	ATMS1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	0.82	0.93	1.40
AT5G20980	MS3	methionine synthase 3	0.96	1.15	1.38
AT3G57050	CBL	cystathionine beta-lyase	1.10	1.00	1.88
AT1G33320		Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	1.56	1.05	2.03
AT3G01120	MTO1	cystathionine gamma-synthase	0.79	1.17	1.09
AT1G08490	CPNIFS	cysteine desulfurase 2	1.00	1.16	2.37
AT2G17420	NTRA	NADPH-dependent thioredoxin reductase A	0.69	0.84	0.86
AT1G19920	APS2	ATP sulfurylase 2	1.01	1.11	1.20

*KEGG pathway of "selenocompound metabolism (00450)".

Table 6 Influence of 1, 5, and 10 ppm selenite on the expression of selenium-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*

Locus	Gene name	Definition	Selenite exposure level		
			1 ppm	5 ppm	10 ppm
Fold change					
AT4G14030	SBP1	selenium-binding protein 1	0.97	0.98	1.50
AT4G14040	SBP2	selenium-binding protein 2	1.64	0.75	7.28
AT3G23800	SBP3	selenium-binding protein 3	1.02	0.96	2.18

こしている可能性がある。今後、発現変動のみられた遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって部位別に測定すること、また高速液体クロマトグラフ-ICP-MS を利用したスペシエーション分析によって有機セレン化合物の化学構造を明らかにする必要があると考える。

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。また研究結果の一部は、成果報告のために技苑第 142 号に記載している。

参考文献

- 1) Yoshida M, Sugihara S, Inoue Y, Chihara Y, Kondō 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.
- 2) 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 Biotechnol Biochem* 68: 193-199.
- 3) Casiot C, Szpunar J, Łobiński R, Potin-Gautier M (1999) Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS. *J Anal At Spectrom* 14: 645-650.
- 4) Ogra Y, Kitaguchi T, Ishiwata K, Suzuki N, Iwashita Y and Suzuki KT (2007) Identification of Selenohomolanthionine in Selenium-Enriched Japanese Pungent Radish. *J Anal At Spectrom* 22: 1390-1396.
- 5) 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.
- 6) Ellis DR, Sors TG, Brunk DG, Albrecht C, Orser C, Lahner B, Wood KV, Harris HH, Pickering IJ, Salt DE (2004) Production of *Se*-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biol* 28: 1.
- 7) Ohno M, Uraji M, Shimoishi Y, Mori IC, Nakamura Y, Murata Y (2012) Mechanisms of the selenium tolerance of the *Arabidopsis thaliana* knockout mutant of sulfate transporter *SULTR1;2*. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 993-998.
- 8) Van Huysen T, Abdel-Ghany S, Hale KL, LeDuc D, Terry N, Pilon-Smits EAH (2003) Overexpression of cystathionine- γ -synthase enhances selenium volatilisation in *Brassica juncea*. *Planta* 218: 71-78.
- 9) Pilon-Smits EAH, LeDuc DL (2009) Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 20: 207-212.
- 10) Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57.
- 11) Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R (2009) QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* 25: 3045-3046.
- 12) Zhang LH, Abdel-Ghany SE, Freeman JL, Ackley AR, Schiavon M and Pilon-Smits EAH (2006) Investigation of selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 128: 212-223.
- 13) Ribeiro DM, Silva Júnior DD, Cardoso FB, Martins AO, Silva WA, Nascimento VL, Araújo WL (2016) Growth inhibition by selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 39: 2235-2246.
- 14) Van Hoewyk D, Takahashi H, Inoue E, Hess A, Tamaoki M, Pilon-Smits EA (2008) Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 132: 236-253.
- 15) Song L, Zou H, Chang Y, Xu W, Wu L (2006) The cDNA cloning and mRNA expression of a potential selenium-binding protein gene in the scallop *Chlamys farreri*. *Dev Comp Immunol* 30: 265-273.
- 16) Agalou A, Roussis A, Spaink HP (2005) The *Arabidopsis* selenium binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium. *Funct Plant Biol* 32: 881-890.