

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) における亜セレン酸ナトリウム
およびセレノ-L-メチオニン曝露後の発現変動遺伝子の網羅的解析大塚 政志, 細見 亮太[†], 老川 典夫, 福永 健治, 吉田 宗弘

(関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科*)

(受付 2018年8月31日, 受理 2018年9月28日)

**Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to selenite
and seleno-L-methionine**

Masashi OTSUKA, Ryota HOSOMI, Tadao OIKAWA, Kenji FUKUNAGA, and Munehiro YOSHIDA

*Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering,
Kansai University***Summary**

The present study investigated the effects of exogenously supplemented selenite and seleno-L-methionine (SeM) on variations in gene expression in *Arabidopsis thaliana*. After cultivation at 25°C for 4 weeks with 1 ppm selenite and SeM, growth parameters and selenium contents were measured and the expression of *A. thaliana* genes was comprehensively analyzed using RNA-sequencing (RNA-seq) technology. The fresh weight of plants was approximately 60% lower following the exposure to 1.0 ppm of selenite and SeM. RNA-seq showed that gene ontology terms related to response to chitin, response to water deprivation, response to wounding, plant-type cell wall loosening, transcription, and DNA-templated were enriched between the selenite and SeM groups. Furthermore, plant hormone signal transduction, plant-pathogen interaction, glycine, serine and threonine metabolism, alpha-linolenic acid metabolism, beta-alanine metabolism, and ascorbate and aldarate metabolism were confirmed between the selenite and SeM groups by a pathway analysis. The expression levels of methionine gamma-lyase, which is involved in the metabolism of selenocompounds, significantly differed between the experimental groups. These results provide insights into the genetic and biochemical mechanisms underlying the effects of exogenously supplemented selenite and SeM on *A. thaliana*.

セレン (Se) は動物において、グルタチオンペルオキシダーゼなどの酵素に要求される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。藻類の緑藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)¹⁾、円石藻 (*Emiliania huxleyi*)²⁾ では、Se を要求するタンパク質の存在が示されている。一方、高等植物では Se は必須元素であるとは認められていないが、Se の存在が間接的に植物の成長を促すことが知られており、有用な元素と考えられている。これらのことから、高等植物は Se 化合物のもつ高い反応性を利用しておらず、植物に蓄積される Se 化合物は解毒を目的に変換した反応性の低い化学構造をしている。高 Se 曝露の植物では、動物には見られない特殊な含 Se アミノ酸の生成が知られており、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

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) などが報告されている³⁻⁶⁾。これらの含 Se アミノ酸の生成には、植物内で特異的な代謝系が誘導されることを示唆している。

モデル植物として用いられているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) への Se 曝露によって、発現量が変動する遺伝子の網羅的解析も試みられている。これまでに、セレン酸をシロイヌナズナに曝露すると、硫黄 (S) の取り込みおよび同化に関与する多くの遺伝子が発現上昇することが報告されている⁷⁾。また私たちが、シロイヌナズナに亜セレン酸ナトリウム (Selenite) を曝露すると、主に response to heat, response to temperature stimulus, response to high light intensity などストレス応答に関わ

*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

る遺伝子セットが変動することを、DNA マイクロアレイを用いた解析により報告している⁸⁾。しかし、シロイヌナズナに無機 Se 化合物であるセレン酸や Selenite を曝露し、発現変動遺伝子の網羅的解析は行われているが^{7,8)}、有機 Se 化合物曝露による影響に関する報告は見られない。私たちは、シロイヌナズナに曝露する無機および有機 Se 化合物の化学構造の違いによって、Se の蓄積する部位が異なることを報告している⁹⁾。そのため本研究では、前報⁹⁾において生長に大きな影響を与えた Selenite およびセレンメチオニン (SeM) を用いて、シロイヌナズナに曝露する Se 化合物の違いによって発現量が変動する遺伝子を取得するため、次世代シーケンサー (NGS) を用いた RNA-シーケンス (RNA-seq) 解析により評価を行った。

実験方法

1. Se 曝露シロイヌナズナの調製

シロイヌナズナ (*A. thaliana*) は野生株 (Columbia-0) を用いた。培地組成は、20 g/L スクロース、4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、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および 8 g/L アガーとした。この培地に Se 濃度が 1.0 ppm となるように Selenite および SeM を添加した (それぞれ、Selenite および SeM 群)。対照には、Se を含まない培地を用いた (None 群)。培地溶液をオートクレーブ滅菌後、90 mm 滅菌シャーレに移し、滅菌種子を 1 粒播種した。その後、長日条件の光周期 (16 時間明期、8 時間暗期) のもと、無菌的に 25°C で培養した。4 週間培養後、葉と根を分別採取し、その重量と Se 濃度を測定した。葉の一部は、RNAlater Tissue Storage Reagent (シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京) に浸漬して -80°C で保管した。

2. Se 含量の測定

葉および根を秤量後、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 10 mL にメスアップし、0.45 μm メンブレンフィルターでろ過した。試料溶液中の Se の定量は、誘導結合プラズマ質量分析計により行った。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 抽出および RNA-sequence 解析

RNAlater Tissue Storage Reagent に浸漬保管していた葉から RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて総 RNA 抽出を行った。抽出した総 RNA は NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を使用して RNA 濃度を測定し、バイオアナライザー (Agilent Technologies, California, USA) による品質検査を行った。次に TruSeq RNA Sample Prep Kit v2

(Illumina, California, USA) によりライブラリー調製を行い、NGS Hiseq 2500 (Illumina) で 100 bp のペアエンドリード解析を行った。

得られた配列データは、FastQC プログラム (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>) を用いてクオリティを評価し、trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) を用いて不要なデータを削除した。クオリティチェック後のデータに対して、tophat2 プログラム (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) を用いて、リードをゲノムにマッピングした。リファレンスゲノムは TAIR10 (<http://arabidopsis.org>) を用いた。マッピング後のデータから、HTSeq v0.6.1p1 プログラムを用いて、発現の見られた遺伝子のリード数をカウントした。カウントされた値に対して、DESeq プログラムを用いて、発現変動遺伝子を算出した ($p < 0.05$)。実際の操作は株式会社セルイノベーター (福岡) に委託した。

Gene Ontology (GO) 解析は、DAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) の gene-annotation enrichment analysis¹⁰⁾ と Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)¹¹⁾ によって実施した。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。

4. 統計解析

植物重量および Se 含量については、一元配置分散分析を用いて検定し、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。統計処理は GraphPad Prism for Mac, ver 6.0 (GraphPad Software, Inc., California, USA) を用いて解析した。また RNA-seq データについては、Benjamini p 値が GO 解析では 0.01 以下、Pathway 解析では 0.05 以下を有意差ありとした。

結果と考察

Fig. 1 に Se 曝露下で 4 週間培養したシロイヌナズナの重量および Se 含量を示した。植物体、葉および根の重量ともに、None 群と比較して、Selenite および SeM 群で有意な減少が見られた。Zhang らは、Se 無添加と比較して、培地中の Selenite 添加濃度 20 μM (約 3.5 ppm) でシロイヌナズナの植物体重量が 50% 程度になることを報告している¹²⁾。しかし、本研究および前報⁹⁾では、Selenite 1 ppm 曝露でシロイヌナズナの植物体重量が約 60% 減少しており、低濃度で生長への影響が見られた。この違いの要因として、Zhang らの報告¹²⁾では、本研究と異なり、ムラシゲ・スクーグ寒天培地の塩類を 2 分の 1 にしている。そのため私たちの研究とは、培地中の無機塩類濃度、特に植物体への Se 取り込みと競合する S 含量が異なるため、Zhang らの報告¹²⁾とは異なる結果が得られたと推測して

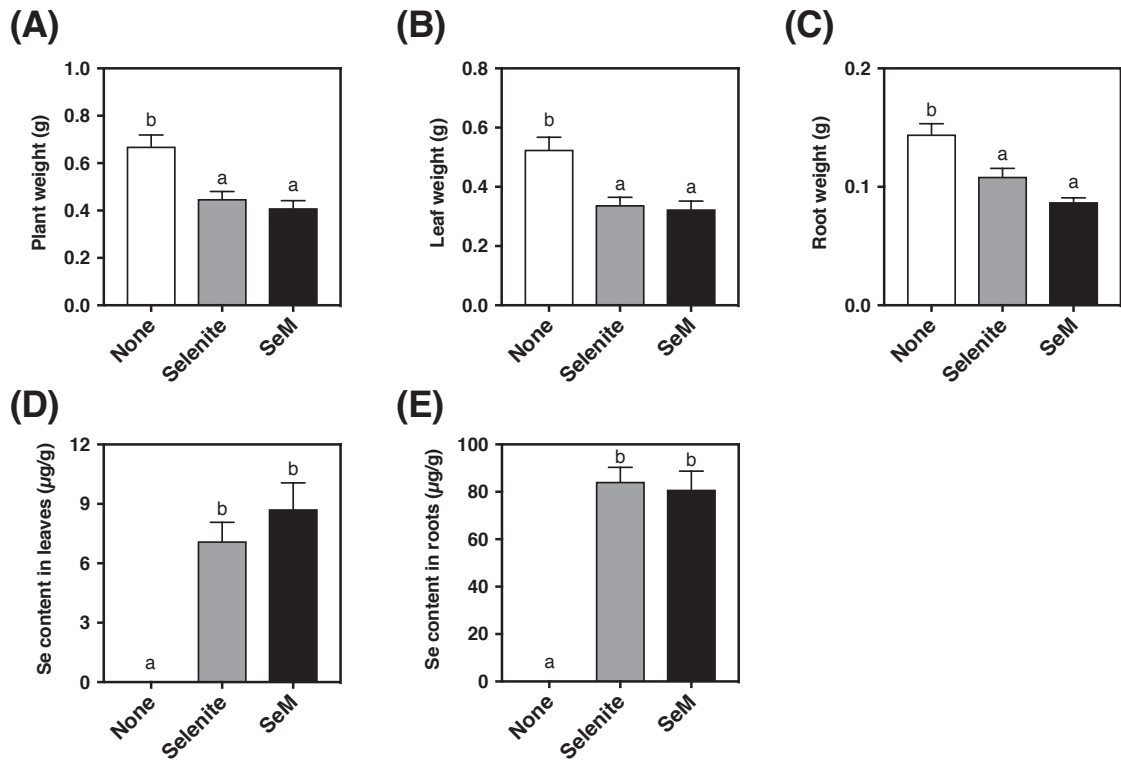


Fig. 1 Effects of selenite and seleno-L-methionine (SeM) on plant (A), leaf (B), and root (C) weights and Se contents in roots (D) and leaves (E) of *Arabidopsis thaliana*.

Data represent means \pm standard error of the means (SEM).

Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ according to Tukey's multiple comparisons test.

*Leaves and roots in the None group contained trace amounts of Se ($< 0.1 \mu\text{g/g}$).

Table 1 Influence of selenite and seleno-L-methionine (SeM) on a number of differentially expressed genes* in *Arabidopsis thaliana*

	None vs Selenite	None vs SeM	Selenite vs SeM
Up-regulated	496	464	315
Down-regulated	620	649	637

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

SeM, seleno-L-methionine.

いる。また私たちは、シロイヌナズナへの SeM 曝露は、Selenite 曝露と比較して、根の生長を抑制することを報告している⁹⁾。本研究においても、統計的な有意差は観察されなかったが、Selenite 曝露と比較して、SeM 曝露で根の重量の低下傾向が観察された ($p = 0.09$)。

次にシロイヌナズナの葉から総 RNA を抽出し、NGS を用いた RNA-seq 解析に供した。Table 1 に None, Selenite および SeM 群間で見られた発現変動遺伝子数を示した。None と Selenite 群間および None と SeM 群間で見られた発現変動遺伝子数は発現上昇および減少ともにはほぼ同等であった。一方、培地中の Se 添加濃度が同じである Selenite および SeM 群間では、発現減少した遺伝子数は他の 2 つの比較と比べて同等であったが、発現上昇した遺伝子数は他の 2 つの比較よりも少なかった。そのため、シロイヌナズナの葉の遺伝子発現は、培地に添加する Se によって大きく変動するが、添加する Se の化学構造の違いによっても変動すると考えられる。

各群間の発現変動遺伝子を用いて、GO Biological Process のアノテーションに基づき Gene-Annotation Enrichment Analysis を行った。Table 2 に各群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。None および Selenite 群間で有意に濃縮された GO term の上位 5 つは、plant-type cell wall loosening, cell wall organization, response to jasmonic acid, plant-type cell wall organization, iron ion homeostasis であった。これまでに私たちは、シロイヌナズナに Selenite を曝露 (1.0 ppm) すると、茎頂部において defense response, innate immune response, response to organic substance, response to heat, response to temperature stimulus, response to high light intensity などのストレス応答に関わる遺伝子が濃縮されることを報告している⁸⁾。本研究ではシロイヌナズナの葉を対象としており、以前の研究で見られた GO term は有意に濃縮されなかった。植物の分裂組織は高い塩ストレスや浸透圧ストレスがあると、分裂組織

Table 2 Significantly enriched gene ontology (GO) terms found in differently expressed genes

Go term	Benjamini p value
None vs Selenite	
plant-type cell wall loosening	3.E-06
cell wall organization	5.E-05
response to jasmonic acid	2.E-04
plant-type cell wall organization	1.E-04
iron ion homeostasis	2.E-04
response to iron ion	1.E-03
response to wounding	2.E-03
unidimensional cell growth	2.E-03
syncytium formation	3.E-03
response to gibberellin	4.E-03
oxidation-reduction process	4.E-03
response to karrikin	5.E-03
pectin catabolic process	8.E-03
plant-type cell wall modification involved in multidimensional cell growth	8.E-03
None vs SeM	
response to chitin	1.E-18
response to wounding	4.E-10
response to auxin	9.E-08
response to water deprivation	8.E-08
response to jasmonic acid	1.E-06
response to abscisic acid	5.E-06
response to cold	1.E-05
response to salicylic acid	6.E-05
plant-type cell wall loosening	3.E-04
defense response to insect	4.E-04
defense response	1.E-03
response to karrikin	1.E-03
ethylene-activated signaling pathway	1.E-03
syncytium formation	2.E-03
cell wall organization	2.E-03
unidimensional cell growth	3.E-03
vasculature development	6.E-03
transcription, DNA-templated	8.E-03
Selenite vs SeM	
response to chitin	3.E-23
response to water deprivation	4.E-09
response to wounding	7.E-09
plant-type cell wall loosening	7.E-08
transcription, DNA-templated	8.E-08
ethylene-activated signaling pathway	1.E-07
response to iron ion	7.E-07
response to auxin	7.E-07
iron ion homeostasis	1.E-06
regulation of transcription, DNA-templated	2.E-06
response to abscisic acid	5.E-06
response to oxidative stress	2.E-05
leaf senescence	2.E-05
syncytium formation	3.E-05
response to cold	8.E-05
plant-type cell wall modification involved in multidimensional cell growth	2.E-04
response to gibberellin	2.E-04
unidimensional cell growth	3.E-04
response to salicylic acid	3.E-04
plant-type cell wall organization	4.E-04
multicellular organism development	5.E-04
defense response to bacterium	8.E-04

(continued)

Table 2

Go term	Benjamini p value
response to hydrogen peroxide	1.E-03
vasculature development	1.E-03
auxin-activated signaling pathway	1.E-03
regulation of organ growth	2.E-03
cell wall organization	2.E-03
cold acclimation	3.E-03
response to bacterium	4.E-03

SeM, seleno-L-methionine.

の活性化が起こらないことが知られている。そのために Se 曝露によって植物の生長を妨げられないようにストレス応答に関わる遺伝子が濃縮されたと考えられる。None および SeM 群間で有意に濃縮された GO term の上位 5 つは、response to chitin, response to wounding, response to auxin, response to water deprivation, response to jasmonic acid であった。この結果は、None および Selenite 群間で見られた Go term とは異なるものが濃縮されていた。Selenite および SeM 群間で有意に濃縮された GO term の上位 5 つは、response to chitin, response to water deprivation, response to wounding, plant-type cell wall loosening, transcription, DNA-templated であった。そのため、シロイヌナズナに曝露する Se の化学構造の違いによって発現変動が見られる遺伝子の機能が異なり、Selenite 曝露では cell wall organization に属する遺伝子が濃縮され、一方 SeM 曝露では response to stimulus に属する遺伝子が濃縮されることがわかった。

発現変動遺伝子を 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、発現上昇および減少した KEGG Pathway を Table 3 に示した。これまでの私たちの研究において、シロイヌナズナに Selenite を曝露 (1.0 ppm) した茎頂部において、Se 無添加と比較して、発現が上昇した代表的な Pathway は stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis, limonene and pinene degradation, phenylpropanoid biosynthesis であり、一方、発現が低下した代表的な Pathway は phenylpropanoid biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism であった⁸⁾。None および Selenite 群間において、本研究と前報⁸⁾で共通して見られた Pathway は、発現上昇した Pathway では phenylpropanoid biosynthesis, 発現減少した Pathway では Pentose and glucuronate interconversions がそれぞれあげられた。このように、同じ実験条件でシロイヌナズナを培養しているにも関わらず、共通して見られる Pathway が少ない理由として、上述した GO 解析と同様に、RNA を抽出する部位が異なっていることが理由の 1 つとして考えられる。None および Selenite 群間、None および SeM 群間で共通して見られた Pathway は、Metabolic pathways, Starch and sucrose metabolism, Biosynthesis of secondary metabolites, Cyanoamino acid metabolism,

Plant hormone signal transduction, Pentose and glucuronate interconversions, Porphyrin and chlorophyll metabolism, Flavonoid biosynthesis, Diterpenoid biosynthesis であった。これらの Pathway は、培地に添加した Se の影響によって変化したと考えられる。さらに、培地中の Se 濃度が同等である Selenite および SeM 群間では、発現上昇した Pathway は Plant hormone signal transduction のみであった。発現上昇した Pathway が少ない理由は、この群間の発現変動遺伝子数が他の 2 つ群間よりも少なかったことが要因であると考えられる。一方、Selenite および SeM 群間で発現減少した Pathway は、Plant hormone signal transduction, Plant-pathogen interaction, Glycine, serine and threonine metabolism, alpha-Linolenic acid metabolism, beta-Alanine metabolism, Ascorbate and aldarate metabolism といったアミノ酸や脂肪酸代謝があげられた。

KEGG PATHWAY Database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) に収録されている Selenocompound metabolism に含まれる遺伝子と Selenium-binding protein (SBP) 遺伝子を選抜し、これらの遺伝子の各群間での発現変動倍率を Table 4 に示した。Selenocompound metabolism に含まれる遺伝子の中で有意な発現変動が見られたのは、メチオニンをメチルメルカプタンと α ケト酪酸、アンモニアに不可逆的に分解する methionine gamma-lyase のみであった。これまでに私たちが行った同植物への Selenite 曝露 (10 ppm) では、Se 無添加群と比較して、セレノシステインを Se とアラニンに分解する cysteine desulfurase 2 (selenocysteine lyase) と、Selenite 代謝に関連するグルタチオン合成系の glutathione S-transferase の有意な発現上昇が見られたが⁸⁾、本研究では曝露濃度が低かったためか、これらの遺伝子に変動は見られなかった。Agalou らはシロイヌナズナの SBP1 遺伝子の発現と Se 耐性能に正の相関があることを報告している¹³⁾。SBP は、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タンパク質である。しかし、各群間で SBP1, 2, 3 の発現変動に有意な変化は見られなかった。

本研究では、Selenite および SeM を培地中に添加して培養したシロイヌナズナの葉から総 RNA を抽出し、NGS を用いた RNA-seq 解析を実施した。RNA-Seq 解析はマイ

Table 3 Significantly impacted pathways in *Arabidopsis thaliana* as determined by a pathway analysis

	None vs Selenite	None vs SeM	Selenite vs SeM
Up-regulated			
Biosynthesis of secondary metabolites		Metabolic pathways	Plant hormone signal transduction
Starch and sucrose metabolism		Starch and sucrose metabolism	
Metabolic pathways		Biosynthesis of secondary metabolites	
Phenylpropanoid biosynthesis		Limonene and pinene degradation	
Peroxisome		Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	
Cyanoamino acid metabolism		Alanine, aspartate and glutamate metabolism	
Glycine, serine and threonine metabolism		Cyanoamino acid metabolism	
Down-regulated			
Pentose and glucuronate interconversions		Plant hormone signal transduction	Plant hormone signal transduction
Biosynthesis of secondary metabolites		Pentose and glucuronate interconversions	Plant-pathogen interaction
Linoleic acid metabolism		Plant-pathogen interaction	Glycine, serine and threonine metabolism
Porphyrin and chlorophyll metabolism		Nitrogen metabolism	alpha-Linolenic acid metabolism
Glycerophospholipid metabolism		Porphyrin and chlorophyll metabolism	beta-Alanine metabolism
Plant hormone signal transduction		Flavonoid biosynthesis	Ascorbate and aldarate metabolism
Metabolic pathways		Diterpenoid biosynthesis	
Flavonoid biosynthesis		Cysteine and methionine metabolism	
Diterpenoid biosynthesis			

Benjamini p value < 0.05.

Table 4 Influence of selenite and seleno-L-methionine (SeM) on the expression of genes related to selenocompound metabolism and selenium-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*

Locus	Gene name	Definition	None vs Selenite	None vs SeM	Selenite vs SeM
Selenocompound metabolism*			Fold change		
AT5G49810	MMT	methionine S-methyltransferase	1.22	1.32	1.07
AT3G55400	OVA1	methionyl-tRNA synthetase	0.78	0.89	1.13
AT4G13780		probable methionine-tRNA ligase	1.00	0.95	0.93
AT1G64660	MGL	methionine gamma-lyase	0.46 [†]	0.30 [†]	0.65 [†]
AT3G03780	MS2	methionine synthase 2	1.03	1.26	1.20
AT5G17920	ATMS1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--	0.68	0.78	1.14
AT5G20980	MS3	methionine synthase 3	0.81	0.90	1.10
AT3G57050	CBL	cystathionine beta-lyase	0.89	1.05	1.17
AT3G01120	MTO1	cystathionine gamma-synthase	1.22	1.28	1.04
AT1G08490	CPNIFS	cysteine desulfurase 2	1.14	1.21	1.05
AT2G17420	NTRA	NADPH-dependent thioredoxin reductase A	1.17	1.03	0.87
AT1G19920	APS2	ATP sulfurylase 2	0.90	1.02	1.12
Selenium-binding protein					
AT4G14030	SBP1	selenium-binding protein 1	1.17	1.02	0.86
AT4G14040	SBP2	selenium-binding protein 2	1.17	1.42	1.2
AT3G23800	SBP3	selenium-binding protein 3	N.D.	N.D.	N.D.

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

[†] p < 0.05

クオアレイに用いるプローブが必要ないため、マイクロアレイ解析では検出できない低発現の転写産物などを検出することができることを特徴としている。そのため、これまでに報告にあるマイクロアレイ解析^{8,12)}と異なり、より正確な網羅的解析結果が得られたと考えられる。RNA-seq解析の結果、培地に添加するSe濃度のみならず、添加するSeの化学構造の違いによっても発現変動が見られる遺伝子の機能やその遺伝子にアノテーションされているPathway情報が異なることがわかった。

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146号に記載している。

参考文献

- 1) Novoselov SV, Rao M, Onoshko NV, Zhi H, Kryukov GV, Xiang Y, Weeks DP, Hatfield DL, Gladyshev VN (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. EMBO J 21: 3681-3693.
- 2) Danbara A., Shiraiwa Y (1999) The Requirement of Selenium for the Growth of Marine Coccolithophorids, *Emiliania huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica* and *Helladosphaera* sp. (Prymnesiophyceae). Plant Cell Physiol 40: 762-766.
- 3) Yoshida M, Sugihara S, Inoue Y, Chihara Y, Kondô 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Ogra Y, Kitaguchi T, Ishiwata K, Suzuki N, Iwashita Y and Suzuki KT (2007) Identification of Selenohomo-lanthionine in Selenium-Enriched Japanese Pungent Radish. J Anal At Spectrom 22: 1390-1396.
- 7) 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.
- 8) 廣瀬侑太郎, 大塚政志, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘 (2016) 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, 微量栄養素研究 33 : 112-117.
- 9) 大塚政志, 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 老川典夫, 吉田宗弘 (2017) 無機および有機セレン化合物の曝露がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生長と遺伝子発現量に及ぼす影響, 微量栄養素研究 34 : 8-13.
- 10) W. Huang, BT. Sherman, RA. Lempicki (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 4: 44-57.
- 11) D. Binns, E. Dimmer, R. Huntley, D. Barrell, C. O'Donovan, R. 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) 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.