

## 25

助成番号 0025

## 円石藻におけるセレン要求性の解析と異常増殖の制御

助成研究者：白岩 善博 (筑波大学 生物科学系)  
 共同研究者：岩本 浩二 (筑波大学 生物科学系)  
 小幡 年弘 (筑波大学大学院生命環境科学科)

円石藻はハプト植物門に属する海洋性微細藻であり、細胞表面に炭酸カルシウムを主成分とする円石(コッコリス)とよばれる構造物を保持しており、有機バイオマスと同時に無機バイオマス(円石)の海洋における莫大な生産者でもある。外洋性の円石藻種は高緯度海域で大規模なブルームを形成するなど、地球炭素循環に対し大きな寄与がある。一方、日本沿岸域では、円石藻のブルームによる海水の白濁化が起り、赤潮(red tide)に対して白潮(white water)と呼ばれる被害があり、功罪両面から、円石藻の増殖制御に関する知見が求められている。植物プランクトンブルームは、種限定的、海域限定的かつ期間限定的に発生するが、その原因は依然不明である。最近、我々は、円石藻の増殖にセレンが必須であることを見出し、それを基に自然界における特定の微量元素の供給や濃度変化により海洋植物プランクトンブルームの発生と消滅の調節が行われる可能性を示唆した。本研究は、セレンの細胞内生理機能を解析することによって円石藻の増殖促進因子としてのセレンの役割を解析することを目的とした。

円石藻による細胞内へのセレンの吸収および濃縮を調べるため、セレン欠乏状態の細胞に<sup>75</sup>Se-亜セレン酸を3.2 nM添加した。そのとき、細胞内に取り込まれた<sup>75</sup>Se放射活性および培地中に残存する放射活性の経時変化を測定した。その結果、セレン添加後24時間で添加したセレン量の80%、48時間目には約90%のセレンが細胞に吸収され、培地より除去された。48時間後における培地中のセレン濃度は0.4 nMであり、その時の細胞体積から、細胞内セレン濃度は8.6 μMに達し、円石藻は約3000倍にセレンを濃縮した。さらに、円石藻のセレン取り込み特性を調べるために、基質として、<sup>75</sup>Seラベルの亜セレン酸を、0.09、0.4、1.0、2.0および4.0 μM与えた。その結果、いずれの濃度でも生育速度は高く、濃度依存的な変化は認められなかった。一方、細胞内へのセレンの取り込みは濃度依存的に増大した。これらの結果は、細胞増殖に必要とする以上のセレンが細胞内に取り込まれ、蓄積することを示しており、この活性がセレン濃縮の原因と考えられる。

次に、<sup>75</sup>Se-亜セレン酸を含む培地で培養した*E. huxleyi*のタンパク質についてSDS-PAGE解析を行ったところ、<sup>75</sup>Seにより強くラベルされる分子量約29 kDaのタンパク質が検出された。このタンパク質のセレン/イオウ含量比を評価するために、<sup>75</sup>Se<sup>35</sup>S-ダブルラベル検出法を開発した。本タンパク質のセレン/イオウ比は他のタンパク質に比べて明らかに高かったことから、セレンを特異的に含むセレノプロテインであることを証明した。更に、そのタンパク質の分子特性を解析のため、<sup>75</sup>Se-ラベルを指標とし、陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーやSDS-PAGEにより、当該セレノプロテインの部分精製に成功した。



## 25

助成番号 0025

## 円石藻におけるセレン要求性の解析と異常増殖の制御

助成研究者：白岩 善博 (筑波大学 生物科学系)

共同研究者：岩本 浩二 (筑波大学 生物科学系)

小幡 年弘 (筑波大学大学院生命環境科学科)

## 1. 研究目的

円石藻はハプト植物門に属する海洋性微細藻であり、細胞表面に炭酸カルシウムを主成分とする円石(コッコリス)とよばれる構造物を保持している。外洋性の円石藻種は北大西洋やベーリング海では大規模なブルームを形成するなど、有機バイオマスと同時に無機バイオマス(円石)の莫大な生産者であることから、地球炭素循環に対する大きな影響がある。一方、日本近海においては、相模湾等の沿岸域での、円石藻のブルームによる海水の白濁化が起こり、赤潮(red tide)に対して白潮(white water)と呼ばれ沿岸漁業に悪影響を及ぼすとの報告がある。したがって、功罪両面から、海洋における円石藻の増殖制御に関する知見が求められている。しかし、円石藻は培養が困難であり、その生理生化学的な研究は少ない。このような状況の中で、最近、我々は、円石藻の増殖にセレンの供給が必須であることを見出し、それを基に自然界における特定の微量元素の供給や濃度変化により海洋植物プランクトンブルームの発生と消滅の調節が行われる可能性を示唆した。植物プランクトンブルームは、種限定的であるのみならず、海域限定的かつ期間限定的に発生する。本研究は、特定微量元素の海水中濃度のモニターによるブルーム発生の予測や特定微量元素の施肥による特定植物プランクトンの増殖制御の可能性に繋がるものとして注目される。

円石藻に関していえば、海洋中のセレン濃度の上昇が円石藻ブルーム発生のトリガーとなる可能性も考えられる。しかしながら、セレンの細胞内における生理機能や摂取機構は不明であり、その要求性の生理学的根拠は不明のままである。また、円石藻では、動物における主要なセレン酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ活性が検出されないことから、セレン要求性の原因やその生理学的役割については全く不明の状態にある。上述のように、セレンは円石藻の増殖をコントロールする因子と考えられるため、セレンの摂取機構、およびその生理機構の解明は、細胞生理学的に意義深く、海洋学的、地球科学的、及び環境学的に重要な意味を持つ。そこで、本研究では、円石藻の代表種 *Emiliania huxleyi*、および日本の沿岸域でゲフィロカプサ赤潮(白潮)を引き起こす *Gephyrocapsa oceanica* におけるセレンの摂取機構に関する知見の集積を行うとともに、セレン要求性の原因、及びその生理機能を明らかにし、セレンと増殖制御の関連を明らかにすることを目的とした。また、本研究は将来的には海洋におけるセレンの濃度分布と白潮発生の関係をフィールドワークを通して明らかにし、白潮発生の予測および防止につなげることを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 円石藻の基本培養

円石藻 *Emiliania huxleyi* は ESM 培地を用い、 $70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ （白色蛍光灯）で 16 時間明期 8 時間暗期の交代照明下で通気培養した。実験用培地は、人工海水 Marine Art SF（千寿製薬、大阪）をベースとして ESM 添加培地により栄養塩を強化した。維持培養で得られた細胞を遠心分離し、その沈殿を  $1 \text{ g liter}^{-1}$  (8.3 mM) Tris を添加した人工海水 Marine Art SF (pH 8.2) に懸濁し、3 日間の培養を行い微量養分を枯渇させた。その後、10 ml の培地が入った L 字管（タイテック、東京）に約 1 ml の前培養細胞懸濁液を加え、種々の養分条件下で培養実験を行った。温度を  $25^{\circ}\text{C}$ 、光強度を  $70\text{-}100 \mu\text{mole m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$  とし、16 時間明期/8 時間暗期を周期的に与えた。生育速度は濁度 ( $\text{OD}_{750}$ )、および細胞数の変化より求めた。なお、*Emiliania huxleyi* は連続光下でも生育でき、総培養時間に対するその生育速度は明暗周期条件下よりも高いが、明期時間（光照射時間）当りではその生育速度は低く、暗条件の賦与が長期培養には重要である（白岩、未発表）。一方、セレン欠乏実験においては、*Emiliania huxleyi* を 500 ml 容のガラス製扁平培養瓶中で、両面から連続光照射（光強度  $105 \mu\text{mole m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ）を行い、空気を  $100 \text{ ml min}^{-1}$  の速度でバブリングすることにより培養した。

### 2.2 セレンの吸収および細胞内濃縮活性の測定

培地内のセレン濃度を変化させたときの増殖速度および生体内への吸収速度と濃縮率を測定した。細胞量は細胞数、濁度 ( $\text{OD}_{750}$ ) およびクロロフィル量により測定した。細胞により取り込まれるセレン量を放射性ラベルの亜セレン酸 ( $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ ) を用いて測定した。静置培養において  $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$  を与え、一定時間後に細胞を収穫し、ウルトラフリー（ミリポア）を用いて細胞画分と培地画分を分離し、各々の画分における放射活性を測定し、増殖に伴う  $^{75}\text{Se}$  の細胞内蓄積量と培地からの除去量を測定した。

### 2.3 $^{75}\text{Se}^{35}\text{S}$ ダブルラベル法の開発

$^{75}\text{Se}$  で特異的にラベルされるタンパク質を見い出すため、Se のアナログである  $^{35}\text{S}$  ( $^{35}\text{S O}_4^{2-}$ ) を同時に与えて特異的な物質をラベルし、 $^{75}\text{Se}$  のみ、 $^{75}\text{Se}$  および  $^{35}\text{S}$  の双方、および  $^{35}\text{S}$  のみでラベルされた各々の物質を検出する方法を、BAS5000 を用いて開発した。

### 2.4 セレン含有タンパク質のサブユニットの同定

$^{75}\text{Se}^{35}\text{S}$  を含む培地で培養した細胞の抽出液の電気泳動を行い、BAS5000 イメージングプレート (IP) を用いたラジオイムノグラムにより、放射活性を持つタンパク質のバンドを検出した。 $^{75}\text{Se}^{35}\text{S}$  でダブルラベルされたバンドについては、我々が開発した  $^{75}\text{Se}$  単独検出法を用いてセレン含有タンパク質を同定するとともに、そのタンパク質の分子量を推定した。このラベル試料を、精製におけるマーカーとして利用し、大量の非放射性的のサンプルと混合し、セレン含有タンパク質を精製した。

## 2.5 セレン含有タンパク質の精製

セレン含有タンパク質の精製は疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過法を適宜組み合わせ、ファルマシア社の FPLC 及び SMART システムを用いた。得られた精製タンパク質試料を用いて、定法により  $^{75}\text{Se}$ -ラベルタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定した。

## 3. 結果

### 3.1 $^{75}\text{Se}/^{35}\text{S}$ -ダブルラベル試料の解析法の開発

#### 3.1.1 実験の原理と概要

セレン(Se)は硫黄(S)と同族の元素であり、物理化学的性質が類似している。そのため生体内ではタンパク質中のシステインおよびメチオニンの硫黄と置換してセレノシステインおよびセレノメチオニンとして存在する<sup>1)</sup>。与えられたセレンの生体内での挙動は硫黄のそれと類似しており、相互置換される場合が多い。

ここでは $\gamma$ 線放出核種である  $^{75}\text{Se}$  (E:0.136MeV (58.3%), 0.265MeV(58.5%), 0.280MeV(24.8%), 0.401MeV(11.4%)) と $\beta$ 線放出核種である  $^{35}\text{S}$  ( $E_{\text{max}}$ :0.167MeV) によるダブルラベル実験及びイメージングプレート (IP) 上での両核種の分別法を開発した。本法は $\gamma$ 線と $\beta$ 線の物質透過力と飛程の差を利用し、試料と IP の間に適当な遮蔽材を挟んで露光を行うことで $\gamma$ 線のみを検出し、遮蔽材をセットしない場合に検出される $\beta$ 及び $\gamma$ 両核種によるラベル物質の定量的検出の比較から、各々の核種でラベルされた物質を検索する方法である (Fig. 1)。

今回開発した方法の概略は以下のとおりである。

(1)  $^{35}\text{S}$  ( $\beta$ 線放出核種), および  $^{75}\text{Se}$  ( $\gamma$ 線放出核種) の双方を同時, または一定の時間的経過を経て与える。RI ラベルされた生体試料より抽出したタンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) で分離後, それらのタンパク質をプロットング膜に転写し, 固定乾燥する。その膜を試料としてユニバーサル型 (UR 型) の IP にコンタクトさせ, 密着露光させる ( $^{75}\text{Se}$  および  $^{35}\text{S}$  全ラベルバンドの検出)。

(2) 同じ試料と IP の間に $\beta$ 線を完全に遮蔽する薄い遮蔽材を挟み込み, 再び密着露光させる ( $^{75}\text{Se}$ -ラベルバンドの検出)。標準ラベル試料を作成して本目的に最適な遮蔽材を選択する実験を行った結果, ラミネートフィルム (厚さ 25  $\mu\text{m}$ , 密度 23  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , アスカ, 東京) が最適であることを見出した。ラミネートフィルムは制動放射線が発生しにくいので拡散が少なく, 物質密度が高いため高い遮蔽効率を示したと考えられる。

(3) 各々の IP を BAS-5000 を用いて各々の RI ポジティブバンドを検出し, 各々の PSL 値を測定する。

(4) IP 検出画像を重ね合わせるなどのデータ解析を行う。以上の操作によりダブルラベル物質を含む  $^{35}\text{S}$  および  $^{75}\text{Se}$  の各 RI ラベル物質を検索する。

### 3.1.2 $^{75}\text{Se}/^{35}\text{S}$ -ダブルラベル法によるセレン含有タンパク質の検出

まず、シングルラベル法によるラベルタンパク質の検索を行った。 $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_3$ のみを含む培地で培養した細胞と、 $^{35}\text{S}$ -メチオニン/システイン ( $^{35}\text{S}$ -Met/Cys, Pro-mix L- $^{35}\text{S}$ ] *in vitro* cell labeling mix, Amersham-Pharmacia) カクテルのみを含む培地で培養した細胞のそれぞれについて細胞から超音波破碎によりタンパク質を抽出し、細胞抽出液とした。抽出液に対して SDS-PAGE を行い、ゲルを乾燥後、 $^{75}\text{Se}$  を含む試料は 15 時間、 $^{35}\text{S}$  を含む試料は 20 時間、各々遮蔽材を挟まずに露光した (Fig. 2)。タンパク質染色剤 (CBB) により検出されるバンドのうち  $^{75}\text{Se}$  でラベルされたバンドは 28.9 および 25.4kDa の二本であり (Fig. 2A),  $^{35}\text{S}$  ラベルタンパク質は多数検出されたが 28.9 および 25.4kDa タンパク質のラベルは他と比べ弱いものであった (Fig. 2B)。これより、この 28.9 および 25.4kDa のタンパク質が、特に  $^{75}\text{Se}$  によってラベルされたセレノプロテインであると判定した。

次に、 $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_3$  および  $^{35}\text{S}$ -Met/Cys の両方を含む培地で培養した細胞について同様の取り込み実験およびダブルラベル検出法による解析を行った。まず、 $^{75}\text{Se}$  もしくは  $^{35}\text{S}$  によるシングルラベルバンドおよび  $^{75}\text{Se}/^{35}\text{S}$  ダブルラベルバンドを検出するために遮蔽材を用いずに 20 時間露光した (S レーン, Fig. 3A)。次に、 $\beta$ 線の完全遮蔽のためにラミネートフィルムを乾燥ゲルと IP の間に挟み、40 時間露光した (Se レーン, Fig. 3A)。このとき、別の  $^{35}\text{S}$  ラベル試料を用いて同様に露光し、 $^{35}\text{S}$  の  $\beta$ 線が検出されないことを確かめた。PSL 解析結果を Fig. 3B に示す。 $^{75}\text{Se}$  のみを検出したときに強くラベルされる 2 種 (28.9 および 25.4kDa) のタンパク質 ( $^{75}\text{Se}$ , Fig. 3B) は、 $^{35}\text{S}$  と  $^{75}\text{Se}$  を同時に検出した場合 ( $^{35}\text{S}$ , Fig. 3B) に比べ、他のタンパク質より僅かしかラベルされていない。セレンの取り込みが非特異的なものであるならば他のタンパク質にも  $^{75}\text{Se}$  のラベルが見られるはずなので、これら 2 種のタンパク質へのセレンの取り込みがセレンに特異的であることが確認された。

### 3.2 円石藻によるセレンの吸収と細胞内蓄積

円石藻による細胞内へのセレン濃縮について調べるため、セレン欠乏状態の細胞に  $^{75}\text{Se}$ -垂セレン酸を 3.2 nM 添加した。そのとき、細胞内に取り込まれた  $^{75}\text{Se}$  放射活性および培地中に残存する放射活性の経時変化を測定した (Fig. 4)。その結果、セレン添加後 24 時間で添加したセレン量の 80%、48 時間目には約 90%のセレンが細胞に吸収され、培地より除去された。48 時間後における培地中のセレン濃度は 0.4 nM であり、その時の細胞体積から、細胞には 8.6  $\mu\text{M}$  のセレンが存在することが推定され、円石藻が約 3000 倍にセレンを濃縮したと考えられる。

円石藻のセレン取り込み特性を調べるために、培地中のセレン濃度を変化させ、円石藻の生育と細胞内への取り込み活性を調べた。基質としては、 $^{75}\text{Se}$  ラベルの垂セレン酸を、0.09, 0.4, 1.0, 2.0 および 4.0  $\mu\text{M}$  与えた。その結果、0.09 $\mu\text{M}$  において 25 時間以降の生育速度が僅かに低下した以外は、いずれの濃度でも生育速度に変化は認められなかった (Fig. 5A)。一方、細胞内へのセレ

シの取り込みは与えた濃度範囲では濃度依存的であった (Fig. 5B)。これらの結果は、細胞増殖に必要とする以上のセレンが細胞内に取り込まれ、蓄積することを示しており、Fig. 4 の結果を強く支持するものである。

#### 4. 考察

##### 4.1 セレンの円石藻の増殖に対する影響と吸収されるセレンの化学形

円石藻の培養に適する培地として、自然海水あるいは人工海水に微量元素として ESM もしくは K 添加培地を培添加したものが適することを既に見い出している<sup>2)・3)</sup>。これらの微量元素による養分補強が無い場合、自然海水においても *Emiliania huxleyi* の生育は殆ど見られなかったが、これは実験室培養における細胞濃度が海洋における藻濃度より高いことに起因すると考えられる。ただし、自然海水の場合、ESM 添加培地においては本来加えるべき土壌抽出液を加える必要はなく、海水中のセレン濃度で十分であった。また、自然海水に代えて人工海水 (Marine Art SF, 千寿製薬) を用いた場合、ESM 中の土壌抽出液は、10 nM のセレンで代替できることを明らかとなっている。円石藻が利用する有効な化学形としては  $\text{SeO}_3^{2-}$  (+4 価) および  $\text{SeO}_2$  (+4 価) であり、 $\text{SeO}_4^{2-}$  (+6 価) では同じ効果を得るのに 100 倍程度の高濃度を必要とした。このセレンの化学形の違いによる効果は、*Gephyrocapsa oceanica* および *Helladosphaera* sp. 等、他属の円石藻においてもほぼ同様に見られた<sup>2)</sup>。セレン欠乏条件下においては、円石藻の生育が完全に停止することから、セレンは円石藻の生育に必須であるものと結論づけられる。

自然海水培地においてセレンの添加が必須でない理由は、海水中には  $\text{SeO}_3^{2-}$  および  $\text{SeO}_4^{2-}$  として  $0.1 \mu\text{g liter}^{-1}$  (1.27 nM) 存在することによると考えられる<sup>4)・5)</sup>。この濃度は円石藻の生育に対する至適濃度の 1/10 であるが、この濃度での円石藻の生育速度は至適濃度におけるその 90% 程度の生育を与える濃度である。ESM に含まれる微量元素中、鉄およびマンガンの自然海水中の含有量はそれぞれ  $2 \mu\text{g liter}^{-1}$  及び  $0.02\text{-}0.1 \mu\text{g liter}^{-1}$  と非常に低く<sup>3)</sup>、生育の制限要因となっており、例えば鉄の富化は藻の生育を促進する<sup>6)</sup>。したがって、海洋における円石藻の生育がセレンによりどの程度制限されているかは不明であるが、細胞の増殖過程において枯渇し易い元素と考えられ、環境中の濃度変動がそれを必須とする生物の生育に大きく影響する可能性は大きいと考えられる。セレンはセレノメチオニンやセレノシステインといったセレン含有アミノ酸を含む酵素において必須である。特にグルタチオンペルオキシダーゼはセレン酵素として良く知られている<sup>7)</sup>。しかし、円石藻 *Emiliania huxleyi* のグルタチオンペルオキシダーゼ活性は非常に低い値であり、十分な生理的機能を有するものか不明である。したがって、円石藻におけるセレンの生理的重要性等の生理機能に関する研究の進展が期待される。

##### 4.2 藻類におけるセレンの生理機能

陸上植物の生育には特殊な種を除き、その生育にセレン必須性を示さないことが一般的に知られている。一方、藻類におけるセレンの生理作用については研究例が少なく、不明の点が多い。

太平洋におけるセレン，栄養塩および有効酸素消費量の垂直分布の比較から，セレンの有無が海洋における基礎生産，すなわち藻類の増殖に密接に関連していることが示されている<sup>9)</sup>。さらに，渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* による赤潮の発生海域におけるセレン濃度，藻体数およびクロロフィル量の垂直分布の季節変化から，セレンの摂取が赤潮発生に大きく関与することが明らかとなり<sup>9)</sup>，藻類の増殖制御に対するセレンの有効性および必要性が強く示唆されている。実際，人工培地を用いた培養において，培地中にセレンを添加することにより，褐藻 *Fucus spiralis*，紅藻 *Goniotrichum alsidii*，ハプト藻 *Chrysochromulina* spp.，プラシノ藻 *Platymonas subcordiformis*，緑藻 *Dunaliella primolecta* および珪藻 *Thalassiosira pseudonana* の増殖促進や必須性が示され，海産藻類の生理作用にセレンが重要な機能を果たしていることが示された<sup>9)</sup>。

円石藻の培地には，従来，不特定の微量元素等を富化するために，土壤抽出液が添加されてきた。この土壤抽出液を添加せずに円石藻を培養すると，増殖は認められなかった。この時，亜セレン酸を添加すると正常な細胞増殖が回復したが，非添加培地のままでは細胞は死滅した。この結果は，セレンが必須元素として機能していることを示すと共に，従来，培地成分として必須であった土壤抽出液を亜セレン酸塩の添加（至適濃度 10 nM）で代替できることを示している。セレン欠乏細胞では，その欠乏の進行と共に呼吸活性の増大が認められた。一方，光合成活性は影響を受けなかったため，呼吸の増大によりみかけの光合成速度は低下した。この呼吸の増大は，セレンの添加による増殖の回復と共に正常値に復帰した<sup>2), 3)</sup>。しかし，その呼吸促進のメカニズムは依然不明である。

円石藻を放射活性を持つ<sup>75</sup>Se-亜セレン酸添加下で培養し，その細胞抽出液を SDS 電気泳動で分析した。その結果，セレンは分子量 29kDa と 25kDa のタンパク質に特異的に取り込まれ，それらのセレノプロテインの合成とその機能が円石藻におけるセレンの必須性の原因となっているものと推測される。また，円石藻 *E. huxleyi* の場合，glutathione peroxidase 活性は非常に低く，生理的機能を有しているとは考えにくい。したがって，glutathione peroxidase 以外の未知のセレノプロテインにセレン必須性の原因を求める必要がある。今後，これらのタンパク質の単離，同定を行うことで，セレンの新たな生理機能の解明がなされるものと期待される。

## 5. 参考文献

- 1) 江崎信芳，田中英彦，左右田健次：セレンウム，活性酸素（浅田浩二編），pp.365-371，共立出版，東京（1988）
- 2) Danbara, A., Y. Shiraiwa: The Requirement of Selenium for the Growth of Marine Coccolithophorides, *Emiliania huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica* and *Helladosphaera* sp. (Prymnesiophyceae), *Plant Cell Physiol.*, **40**, 762-766 (1999)
- 3) 檀原明子，白岩善博：円石藻 *Emiliania huxleyi* のセレン要求性と生育培地の選択，日本海水学会誌，**53**，467-484 (1999)
- 4) 中口譲，青野辰雄，平木敬三：セレン，月刊海洋号外，**8**，48-56 (1995)



- 5) Raymont, J. E. G., *Plankton and productivity in the Oceans*, 2nd ed. Vol. 1-*Phytoplankton*, Pergamon Press, Oxford, p. 489 (1980)
- 6) Coale, K. H., K. S. Johnson, S. E. Fitzwater, R. M. Gordon, S. Tanner, F. P. Chavez, L. Ferioli, C. Sakamoto, P. Rogers, F. Millero, P. Steinberg, P. Nightingale, D. W. P. Cooper, Cochlan, M. R. Landry, J. Constantinou, G. Rollwagen, A. Trasvina and R. Kudela, *Nature*, **383**, 495-501 (1996)
- 7) Boisson, F., M. Gnassia-Barelli and M. Romeo, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 487-493 (1995)
- 8) Aono, T., Y. Nakaguchi, K. Hiraki: Vertical profiles of dissolved selenium in the North Pacific, *Geochem. J.*, **25**, 45-55 (1991)
- 9) Price, N. M., Thompson, P. A. and Harrison, P. J.: Selenium: an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology*, **23**, 1-9 (1987)

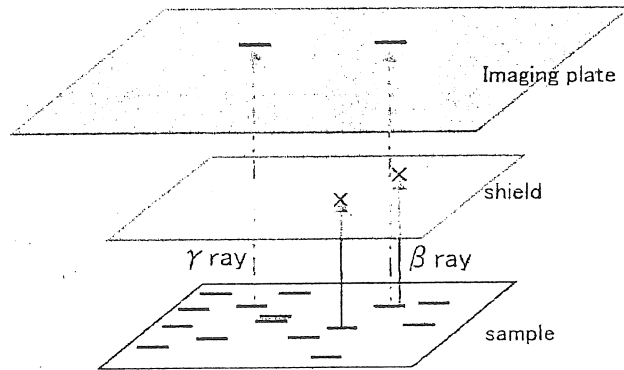


Fig. 1 Principles of the detection of  $^{75}\text{Se}$ - and  $^{35}\text{S}$ -labeled substances on SDS-PAGE using the Imaging Plate.

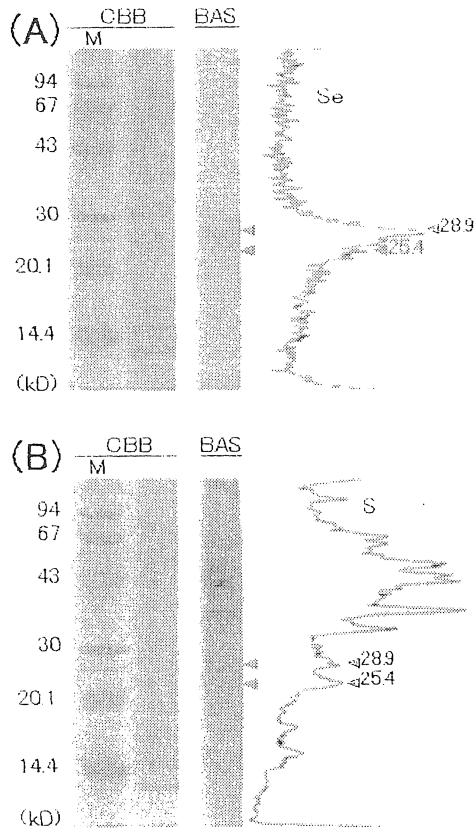


Fig. 2 Radioluminographs of SDS-PAGE of  $^{75}\text{Se}$ - or  $^{35}\text{S}$ -single-labeled proteins in the coccolithophorid, *Emiliana huxleyi*. (A), proteins labeled with  $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ ; (B), proteins labeled with  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ ; CBB, coomassie brilliant blue staining; BAS, radioluminography detected and visualized by BAS5000; Graphs, patterns of PSL-values calculated by Fiji film Science Lab 98 Image Gauge.

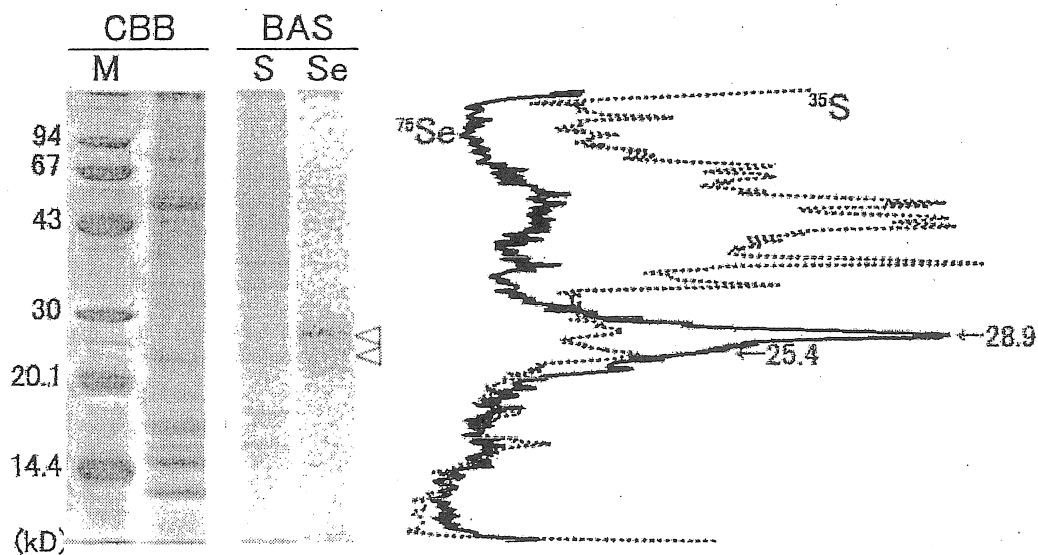


Fig. 3 Detection of  $^{75}\text{Se}$ -specifically-labeled proteins in the presence of various proteins labeled with  $^{75}\text{Se}$  and/or  $^{35}\text{S}$  in the coccolithophorid, *Emiliana huxleyi* on SDS-PAGE. (A), SDS-PAGE pattern. M, molecular markers; S, detection of  $^{35}\text{S}$  (Even  $^{75}\text{Se}$ -specifically-labeled proteins were present,  $^{75}\text{Se}$  could hardly be detected because of its low specific activity.); Se, detection of  $^{75}\text{Se}$ ; (B), patterns of PSL-values, proportionally corresponding to radioactivity, calculated by Fiji film Science Lab 98 Image Gauge.

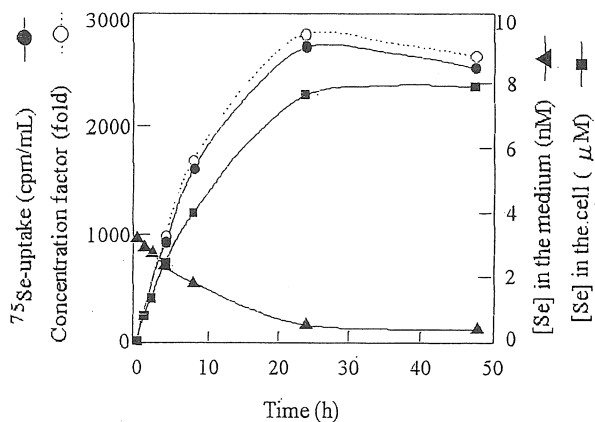


Fig. 4 Time course of  $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ -uptake by *Emiliana huxleyi* and the intra- and extra-cellular concentration of Se

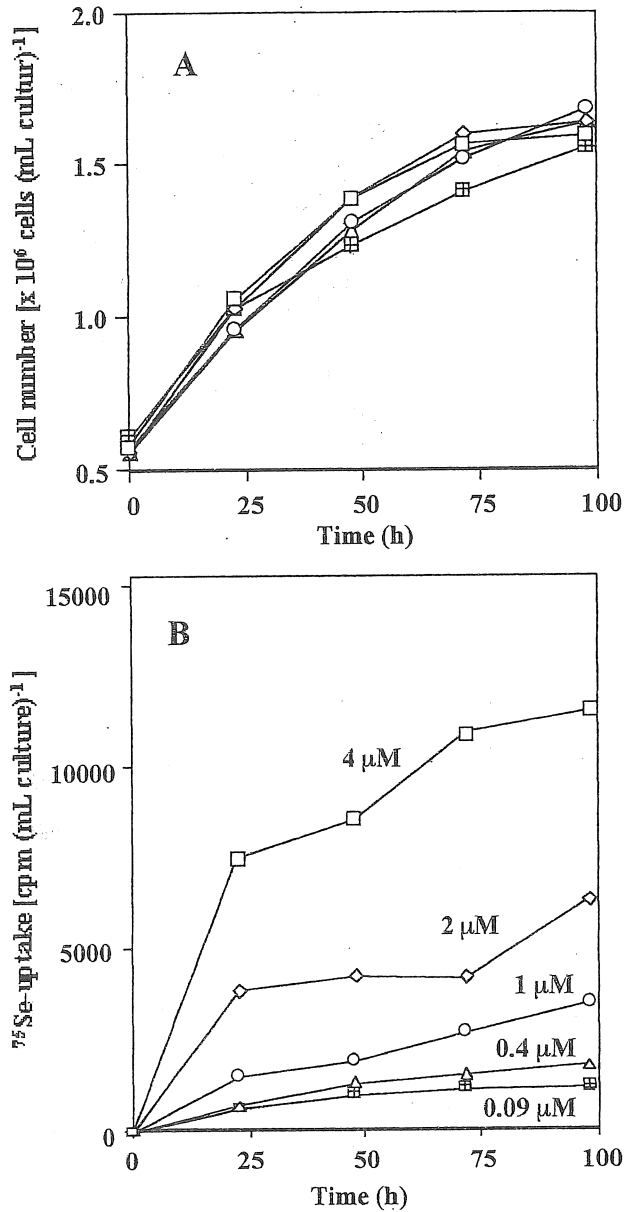


Fig. 5 Growth curves of *Emiliana huxleyi* (A) and the time courses of  $^{75}\text{Se}$ -uptake by cells at various concentrations of  $^{75}\text{Se}$ -labeled selenite ions.

**Analysis of the requirement of selenium by coccolithophorids and its implication  
for the control of a coccolithophorid bloom formation in the ocean**

Yoshihiro SHIRAIWA, Koji Iwamoto and Toshihiro Obata  
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

Unicellular calcifying algae, coccolithophorids, fix inorganic carbon mainly by two reactions, namely photosynthesis and intracellular calcification. The calcification reaction produces calcium carbonate crystals known as coccoliths, which are excreted and placed to cover the cell surface. The algae are known to form huge blooms in the ocean and is consequently expected to affect the air-sea interchange of CO<sub>2</sub>. The growth of the algae and the production of coccoliths are affected by the status of nutrients, such as nitrogen and phosphorus. In addition to such major nutrients, microelements were also shown to affect the growth of coccolithophorids. Phytoplankton bloom appears as species-specific, area-specific and season-specific events. It is still unknown how such specificity is selected. We found that the addition of selenium is necessary for the rapid growth of coccolithophorids. The evidence suggests that such trace elements may be very effective to stimulate the growth of a certain selected phytoplankton in the ocean. In this study, we focused on studying on uptake and concentration of selenium by coccolithophorids and on identifying protein(s) which are specifically labeled with a radioactive selenium (<sup>75</sup>Se).

When 3.2 nM <sup>75</sup>Se-selenite was added to the culture after the depletion of selenium, the intracellular concentration of selenium was increased to 8.6 μM. The concentration factor was 3000. The remaining selenite in the medium was 0.4 nM, suggesting that 80% of selenite ions in the medium were incorporated into cells. Uptake of selenite increased proportionally to the concentration of selenite in the medium, namely 0.09, 0.4, 1.0, 2.0 and 4.0 μM, and did not saturate even at 4 μM which is 400 times higher than that of the optimum concentration for growth. This evidence shows the presence of intracellular pool of selenium.

Intracellular Se-requiring proteins were identified. Since Se is an analogue of S, To distinguish specific Se-labeling from non-specific-labeling, a new method, named the double-label-method, was developed using radioactive <sup>75</sup>Se and <sup>35</sup>S in this study. Using the method, a novel selenoprotein with a molecular mass of 29 kDa on SDS-PAGE was found and the protein was purified partially. The protein is expected to be a key factor for the regulation of coccolithophorid growth.