

学 位 論 文 題 名

Ionomics study of *Lotus japonicus*

(ミヤコグサのイオノミクス研究)

学位論文内容の要旨

Legume is second important crop in world agriculture, enhances the protein content and the nutritional status of staple food in addition to the cereal-based diets. Unfortunately, the functional genomics studies of legume on nutrition and other trace elements have not kept pace with those of cereals. Hence, with the concept of ionome, which is defined as the mineral nutrition and trace elements composition of an organism, *Lotus japonicus*, a good genetic tool for legume study, was applied to investigate element uptake and translocation in plants, and the gene networks that control plant nutrient and other trace elements partitioning.

The ionome of *L. japonicus* was determined on 17 elements in plant tissues, including essential and non-essential elements: B, Al, Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Mo, Cd, Cs and Pb. Three independent experiments were carried out to elucidate the interrelationship between elements, and the connections between legume genome and ionome. At first, the elemental composition in plant tissues were detected by growing *L. japonicus* in standard nutrition solution with additions of As, Al, Ni, Cd, Mo, Cs, Pb, and Sr in different levels (Experiment 1); secondly, the ion-profile of *L. japonicus* 45 natural accessions was investigated to depict plant ionome change following natural plant genome variation (Experiment 2); and then an ionomics screening by using the 1,924 EMS-mutagenized lines were undertaken to identify the mutants with altered elemental profile (Experiment 3).

The element portioning among leaves, stems and roots was revealed in *L. japonicus* from the Experiment 1. Large amounts of B and Ca accumulated in plant leaves, while Fe, Na, Ni, As and Cd tended to be mainly remained in roots, and Mo was the only element to accumulate in stems. The elemental compositions within plants were severely disturbed by the treatment with toxic elements, following with obvious growth retardation. Competition between element pairs in the same periodic group (K and Cs; Ca and Sr) did not observed in

any part of plant. Interestingly, divalent trace elements Fe, Cu and Zn accumulation were induced by Cd and Ni addition; a common mechanism is suggested for those heavy metal detoxification in *L. japonicus*. According to the effects of As, Al, Ni, Cd, Mo, Cs, Pb, and Sr to plant growth, a modified nutrition solution with subtoxic level on plant growth of those elements was designed for further investigation of natural accessions and mutants' ion-profile.

The ionome of 45 natural accessions grown in the modified nutrition solution were analyzed in Experiment 2. The results of principal-component analysis of element concentration in plant shoots revealed intriguing relationships between elements. Some elements showed highly positive correlation between each other, and can be classified into three groups: Fe and As group, Mg and Ni group, and Ca and Mn group. The concentrations of the elements belonging to the same group were found to be generally co-increased or decreased in most of the natural accessions. In addition, Fe and As showed a strong negative correlation to Cs and K. This experiment gained new understanding of the element interrelationship in plants, elements differed in chemical properties may be closely linked in uptake or translocation systems.

Next, approximately 2,000 mutagenized M2 plants of *L. japonicus* were cultivated in a novel low-cost high-throughput system and their elemental profiles were detected by ICP-MS in the Experiment 3. After triple check of their element concentrations in shoots, thirty-one mutants at M3 generation were identified with altered elemental profiles. Surprisingly, the overview of element affected in the identified mutants revealed that the number of genes regulating essential elements is not larger than that controlling non-essential elements. Furthermore, based on the elemental profile of identified mutants, we speculate that the transport of Mg and Ni, even P and Co are co-regulated by many genes in *L. japonicus*. Several mutants with interesting altered ion profile are considered as useful mutants for further gene isolation, such as mutant 1-14 with decreased Mn, mutant 8-18 with decreased Mg and Ni, mutant 3-8 with increased Mg and Ni and obvious phenotype, mutant 4-22 with extremely decreased Mo, and mutant 4-20 with increased Na, K and Cs.

Ionomics study of *L. japonicus* offers detailed information of element partitioning and interactions in legume, and is proved to be a powerful functional genomics tool to dig out the genes related to ion uptake and translocation in this study. The thesis may open the new insight into the gene networks that influence the acquisition and distribution of multiple elements in plants, especially for legume.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 崎 満

副 査 教 授 松 井 博 和

副 査 准教授 江 澤 辰 広

副 査 助 教 渡 部 敏 裕

副 査 チーム長 信 濃 卓 郎 (北海道農業研究

センター)

学 位 論 文 題 名

Ionomics study of *Lotus japonicus*

(ミヤコグサのイオノミクス研究)

本論文は英文 135 頁、図 12、表 10、5 章からなり、参考論文 1 編が付されている。マメ類は世界の農業において最も重要な作物の一つであり、タンパク源としても重要である。しかしながら、マメ科植物における養分元素あるいは他の微量元素動態に関する機能性遺伝子研究は立ち後れている。そこで、生物に含まれる無機元素を網羅的に測定することを意味するイオノームをマメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) に適用し、植物体内における養分元素と他の微量元素の吸収、輸送ならびに分配を調査し、それらをコントロールする遺伝子ネットワークを明らかにするために以下の実験を行った。

ミヤコグサにおけるイオノミクス研究として植物体に含まれる以下の必須および非必須元素を ICP-MS により分析した： B、Al、Na、Mg、K、Ca、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、As、Sr、Mo、Cd、Cs および Pb。元素間の相互作用ならびにマメ科植物におけるゲノムとイオノームの結びつきを明らかにするために三つの独立した実験を行った。最初の実験では、標準的な組成の培養液に様々なレベルの有害元素 (As、Al、Ni、Cd、Mo、Cs、Pb、Sr) を添加し、植物体に含まれる元素組成を調査した (実験 1)。次に、自然生態系におけるゲノム変異によるイオノームの変化を示すために、45 のミヤコグサ生態型における元素プロファイルを調査した (実験 2)。最後に、異なる元素組成を持つ変異体を獲得するため、EMS 処理を行った 1,924 のミヤコグサ変異株をイオノームに基づいてスクリーニングを行った (実験 3)。

実験1の結果より、葉、茎および根における元素の分配が示された。Fe、Na、Ni、As、Cdは主に根に集積し、BとCaは葉に集積した。唯一Moは茎に多く集積する元素であった。植物体内の元素組成は有害元素の添加により大きく変動し、明白な生育阻害がみられた。周期律表において同じ族に属する元素同士の吸収競合は植物体のどの部位でも認められなかった（KとCs、CaとSr）。興味深いことに、二価の微量元素であるFe、CuおよびZnの集積はCdおよびNiによって促進された。このことはミヤコグサにおける重金属無毒化において共通の機構が存在することを示唆する。本実験におけるAs、Al、Ni、Cd、Mo、Cs、PbおよびSrの影響から、これらの元素が毒性を示さないレベルを設計し、以後の実験における水耕溶液に用いた。

実験2では45の生態型を毒性レベル以下の有害元素を含む培養液で生育させ、元素組成を調べた。植物体地上部の元素含有率の値を用いて主成分分析を行ったところ、元素間の興味深い関係が示唆された。いくつかの元素はお互いに高い相関を示し、それらは大きく分けて三つのグループに分類された：Fe・Asグループ、Mg・Niグループ、Ca・Mnグループ。同じグループに属する元素は概して多くの生態型で共に増加／減少する傾向が認められた。さらに、FeとAsはCsとKに対して強い負の相関を示した。

実験3では、約2,000のミヤコグサM2変異株を水耕栽培し、元素組成を調査した。結果を三度検証し、元素プロファイルの異なるM3世代の31変異株を得た。驚いたことに、必須元素の吸収／輸送を制御する遺伝子の数は非必須元素を制御するものより必ずしも多くないことが示唆された。さらに、得られた変異株の元素プロファイルに基づき、MgとNi、さらにそれにくわえてPとCoの輸送が多くの遺伝子によって共制御されていることが予想された。Mn含有率の低い1-14、MgおよびNi含有率の低い8-18、MgおよびNi含有率の高い3-8、極度にMo含有率の低い4-22、あるいはNa、K、Cs含有率の高い4-20といった変異株は今後の遺伝子分離に有用であると考えられた。

本研究の結果から、マメ科モデル植物であるミヤコグサにおける詳細な元素分配と元素間相互関係に関する新しい情報が得られた。さらに、植物の元素吸収あるいは輸送のシステムにおける元素間相互関係に関する新しい知見を提供し、植物の元素集積メカニズムに関与する複雑な遺伝子ネットワークを解析する上でイオノームが極めて有効な手段となりうることを示した。本研究によって得られた知見は、まだ十分な情報の少ないマメ科植物での養分吸収特性や非必須元素の吸収に関する新規かつ重要な情報を提供するものである。よって審査員一同は、陳 正が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。