

# Ionomics study of stress response in *Lotus japonicus*

(ミヤコグサにおけるストレス反応のイオノミクス研究)

## 学位論文内容の要旨

Plant ionome comprises the mineral nutrients and trace elements of a plant and is a dynamic network of elements which is controlled by the physiological, biochemical and genetical processes in plant. The expression of genes, however, is largely environmentally dependent. Thus, there must be a connection between plant ionome and environmental parameters. Revealing the linkages between the ionome and environmental parameters may help in developing strategies for better nutrient management and to combat environmental problem such as global warming, contaminated soil, etc. Being a principal environmental factor, temperature, both shoot-zone and root-zone, influences all aspects of the growth and development of plants. Hence, temperature was chosen in this study as an environmental factor to investigate its effect the ion profile of *L. japonicas*. Another objective of this study was to confirm and characterize some potential cesium (Cs) mutants screened earlier.

In the first experiment, *L. japonicus* plants were grown in hydroponics at two different shoot-zone temperatures (SZT) (22°C and 25°C) with the addition of several non-essential elements in the culture solution. After four weeks of cultivation, plants were harvested and 21 mineral elements were analyzed. Most elements, except phosphorus (P) and cobalt (Co), were higher at 25°C SZT in shoots while number elements [potassium (K), Co, Cs, sodium (Na) and nickel (Ni)] were higher in roots at 22°C SZT. SZT, even as low as 3°C, may partially change the ionome of *L. japonicas*. The alteration of ion profile may be contributed mainly by increased transpiration rate and/or by enhanced metabolic activity in plant. Again, the study complemented the existing P-deficient ionomic model, suggesting that the overall nutrient status may help to determine the external environmental condition.

To investigate the ionomic response of root-zone temperature (RZT) acclimatized *L. japonicas* seedlings were exposed to three RZTs: 15, 20 and 25°C for one week. Then plants were harvested and mineral elements were analyzed. In shoots, the highest concentrations of all elements, except for Ni, were at 25°C RZT. At lower RZTs, the reductions in concentrations were more evident especially for trace elements and heavy metals. Except for magnesium (Mg), the highest root concentrations were at 15°C RZT for all essential elements. Unlike

other non-essential elements, the highest cadmium (Cd) and Co concentrations in roots were at 25°C RZT. Ni in shoots and manganese (Mn), Co and Cd in roots were negatively correlated with most other elements (either, essential or non-essential) in each respective organ.

Cs is a non-essential element and toxic to both plant and animals. It occurs in the environment mainly through waste disposal from nuclear power plants and nuclear explosions. Cs uptake by plant is one of the main routes of entry into the food chain. Phytoremediation and regulation of Cs entry into plant systems are two main approaches to cope with this problem. To develop these technologies, Cs mutants may help find appropriated transporter genes. For the mutant selection and characterization experiment five candidate Cs mutants of *L. japonicus* obtained from a separate mutant screening project were selected. Out of these five, four were confirmed as Cs mutant through selection protocol involving cultivation at Cs stress condition. Based on the results, we selected 2-3 line as a low Cs mutant; and 3-18, 8-15 and 4-6 lines as high Cs mutants. The four mutant lines were forwarded for further characterization. In mutant characterization step we produced the shoot ion profile for the four mutant lines based on the concentration of 21 elements and compared the correlation between ions at each mutant. Beside Cs, there were alterations in other elements in each mutant. For example 2-3 line showed enhanced chromium (Cr) uptake in shoot. Mutant showed significant decrease in Al but increased strontium (Sr) concentrations. In 8-15 mutant line, there was a significant increase in Mo but decrease in Cd and As. Mutant 4-6 showed enhanced Sr uptake. Each mutant showed distinctive set of ion interaction.

In conclusion, this thesis showed that temperature, especially at root-zone, altered the ionome of *L. japonicas*. Root-zone temperature also influenced the interconnection among different elements, which varied with the plant part and also under different growing conditions. This suggested that environmental parameters (such as temperature) should be considered carefully in ionomic studies, since ionomic signatures change with particular growing conditions. Again, the selected Cs mutants may provide necessary genetic material to combat the problem of Cs contamination by developing Cs hyper-accumulators or Cs safe crops. Hence, we can say that ionomics is an efficient tool to understand various stress parameters, especially in plants, which not only eliminate the knowledge gap but also improve the understanding of plants mineral nutrition for better nutrient management especially under diverse environmental conditions.

# 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 客員教授 信 濃 卓 郎

副 査 助 教 渡 部 敏 裕

## 学 位 論 文 題 名

### Ionomics study of stress response in *Lotus japonicus*

(ミヤコグサにおけるストレス反応のイオノミクス研究)

本論文は英文 114 頁、図 22、表 15、6 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

植物イオノームは植物中の必須養分元素および非必須元素の集合体を意味し、生理的、生化学的および遺伝的なプロセスに制御される元素間の動的ネットワークを反映している。一方、遺伝子の発現は生育環境に大きく依存することから、植物イオノームと環境パラメータの間には強い関係があることが予想される。この両者の関係を解明することは、作物栽培における肥培管理や、温暖化や土壌汚染といった環境問題への対応において大きな助けとなる。特に重要な環境因子として、温度が植物生育のあらゆる面に対して影響を及ぼしうることから、本研究では、まず温度変化がミヤコグサのイオノームプロファイルに与える影響を調査した。さらに本研究は、有害元素であるセシウム (Cs) の吸収に変異をもつことが予想されるミヤコグサ変異株の特性解析を行うことも目的とした。

最初の実験では、ミヤコグサの根部の温度を一定 (23°C) とし、異なる気温処理 (22°C および 25°C) を地上部に行い、必須および非必須元素を含む培養液で栽培した。4 週間の栽培の後、植物体をサンプリングし、21 元素の含有率を測定した。リン (P) およびコバルト (Co) を除くほとんどの元素は気温を 25°C にすることで高い地上部含有率を示し、一方根部ではカリウム (K)、Co、Cs、ナトリウム (Na) およびニッケル (Ni) が気温 22°C において高い含有率を示した。わずか 3°C の気温の違いがミヤコグサのイオノームプロファイルに影響を与えたが、これは主に植物の蒸散と代謝活性に対する影響によると推察された。

次に、根圏温度の変動に対してミヤコグサがどのようなイオノーム応答を示すのかを調査するため、3 レベルの根圏温度(15、20、25℃)を設定し、一週間処理を行った。処理後、植物体を採取し、元素含有率を測定した。その結果、測定した元素のうちNiを除く全ての元素は根圏温度 25℃で地上部の含有率が最も高く、低い根圏温度では、特に微量元素や重金属元素で地上部含有率の低下が著しかった。マグネシウム(Mg)を除く全ての必須元素は根圏温度 15℃で根における含有率が最も高かった。他の非必須元素と異なり、カドミウム(Cd)と Co の根における含有率は根圏温度 25℃で最も高かった。地上部におけるNiと根部におけるマンガン(Mn)、Co、および Cd の含有率は他の元素(必須および非必須)の含有率と負の相関を示した。

Cs は植物および動物にとって必須ではなく、むしろ毒性を示す元素である。Cs は主に原子力発電所や核兵器の廃棄物から環境中に放出される。食物連鎖への Cs の侵入は植物の Cs 吸収が主体であることから、この問題を解決する二つの手段として、ファイトレメディエーションと植物の Cs 吸収抑制があげられる。Cs 集積変異株を利用することは、Cs の吸収・集積に関わるトランスポーターなどの遺伝子を見つけ出し、これらの技術を発展させることの助けとなる。そこで、以前の実験で Cs 集積変異株の候補として得られた 5 株のミヤコグサの変異の確認と特性解析を行った。Cs ストレスの実験等の結果から、5 株のうち4株がCs集積変異株として確認され、そのうちの一つ(2-3)は低Cs変異株であり、残りの三株(3-18、8-15、4-6)は高Cs変異株であった。これら4つの変異株を以後の実験に用いた。21 元素の含有率をもとにこれら変異株の地上部イオノームプロファイルを作成し、それぞれの変異株におけるイオン種間の相関を調べたところ、Cs 以外の元素にも変動が認められた。例えば、2-3 は地上部におけるクロム(Cr)含有率が高く、3-18 では Al 含有率の低下とストロンチウム(Sr)含有率の上昇が認められた。8-15 では、Mo 含有率の上昇とCdおよびAs含有率の低下を示し、4-6ではSr吸収の増進が確認された。各変異株では特徴的なイオン種間の相関が存在した。

以上のように、本研究は僅かな温度の変化が植物体内のイオンバランスを大きく変動させることを初めて明らかにした。本研究によって得られた知見は地球温暖化による今後の気温変動が作物生産におよぼす影響を考察する上でも非常に重要なものである。また、有害元素の吸収能が異なる変異株を選抜し、その特性解析を行ったことは、植物の有害元素集積を制御するための一助となる。よって審査員一同は、クアジル クアジ フォルハドが博士(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。