

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 接ぎ木の成立および穂木と台木の相互作用の機構解明

氏名 川口 航平

論文内容の要旨

接ぎ木は、異なる2種類以上の植物の組織を接着して、新しいキメラ植物を形成する農業技術であり、国内外を問わず、多くの作物の栽培に用いられている。しかしながら、台木が穂木の形質を変化させる現象や接ぎ木の成立メカニズムに関しては未解明な点が多い。そこで、本研究では、穂木と台木の相互作用の機構解明のために、様々な台木を用いたトマトとナスの接ぎ木植物の道管液を主体とする溢泌液中の無機イオンと植物ホルモンの網羅解析を実施した。また、接ぎ木の成立メカニズムの機構解明のために、接ぎ木接着部のマルチオミクス解析に取り組み、接ぎ木接着部に蓄積した物質の接ぎ木における機能解析を試みた。

第二章では、様々なトマトを台木として用いたトマトの接ぎ木植物と、様々なトマトまたはナスを台木として用いたナスの接ぎ木植物の無機イオン濃度および植物ホルモンの網羅解析を実施し、台木から穂木に輸送される物質を理解することを試みた。その結果、溢泌液中の無機イオンと植物ホルモンの濃度は、台木の種類によって大きく異なることが明らかとなった。また、‘Micro-Tom’を台木としたトマトの接ぎ木植物では、果実サイズと収量が減少し、果実糖度が増加するが、セルフ接ぎ木植物と比較して、この接ぎ木植物の溢泌液中のアブシジン酸(ABA)およびジャスモン酸(JA)濃度は高かった。そのため、接ぎ木植物の溢泌液中のABAとJA濃度の測定により、接ぎ木植物の果実の糖度や収量などを予測できる可能性が示唆された。他の無機イオンや植物ホルモンについても、溢泌液中の濃度と穂木の形質に相関関係があるといった知見から、これらの接ぎ木植物の溢泌液中に含まれる物質の情報は、ストレス耐性の導入、果実品質の向上、草勢の制御など、特定の目的に応じた接ぎ木植物の組み合わせを推定できる可能性がある。さらに、溢泌液中の無機イオン濃度やサイトカイニン(CK)の分子種は、穂木によって制御されていることも示され、地上部の特性に合

わせて、根での無機イオンの取り込みや CK の生合成および輸送が行われる現象と、それを引き起こす穂木から台木に流れるシグナルの存在が示唆された。

第三章では、タバコ属植物の *Nicotiana benthamiana* を材料として、穂木と台木の切断部にそれぞれ蓄積する植物ホルモンの網羅解析を実施し、接ぎ木接着部に蓄積する植物ホルモンが、穂木と台木のどちらに由来し、どのように機能するかを理解することを試みた。その結果、接ぎ木植物の穂木と台木の切断部に、様々な植物ホルモンが、様々なタイミングで蓄積することが示され、それらがクロストークしながら、細胞分裂や細胞肥大、カルス形成、維管束形成を制御し、接ぎ木の成立に関与している可能性が示唆された。また、*N. benthamiana* が広範の植物種と接ぎ木を成立させる特性を利用し、同科接ぎ木植物 (*Nb/SI* : *N. benthamiana* とトマトの接ぎ木植物) と異科接ぎ木植物 (*Nb/At* : *N. benthamiana* とシロイヌナズナの接ぎ木植物) の接ぎ木接着部の植物ホルモンの網羅的な解析を行うことで、同科接ぎ木と異科接ぎ木の接ぎ木成立過程の共通点と相違点を理解することを試みた。その結果、*Nb/SI* と *Nb/At* の接ぎ木接着部で、多くの植物ホルモンの蓄積パターンは類似していたが、蓄積濃度は異なることが明らかになった。また、N6-(Δ 2-isopentenyl) -adenine (iP) 型および *trans*-zeatin (tZ) 型 CK の蓄積パターンは、同科接ぎ木植物と異科接ぎ木植物の接ぎ木接着部において、大きく異なることが見出され、この蓄積パターンの違いが同科接ぎ木と異科接ぎ木の成立の違いを示している可能性がある。以上の情報は、接ぎ木の成立に関与する植物ホルモンの役割の解明や同科接ぎ木と異科接ぎ木のメカニズムの違い、タバコ属植物が広範の植物種と接ぎ木を成立させる現象の解明に重要な知見であることが考えられる。

第四章では、トマトを材料として、接ぎ木接着部に蓄積する無機イオンの網羅解析を実施し、接ぎ木の成立に関与する無機イオンの探索を試みた。その結果、B, Fe, P, Ca, Cu, Mn が、接ぎ木の成立過程の接ぎ木接着部で高蓄積することが示された。B, Ca は細胞壁の架橋に関与し、Fe, P, Cu, Mn は様々な酵素の補因子として機能するため、これらの無機イオンが接ぎ木の接着部において、細胞壁の架橋や代謝物の生合成を制御することで、接ぎ木の成立に関与する可能性が示唆された。また、接ぎ木成立過程の接ぎ木接着部への蓄積が最も顕著で、先行研究から創傷部の細胞間結合に関与することが報告されている Mn に着目し、Mn 欠乏条件で栽培したトマトを接ぎ木試験することで、Mn が接ぎ木の成立に関与するかを調査した。その結果、接ぎ木後に Mn を欠乏させて栽培した場合、接ぎ木の成功率が著しく減少したことから、接ぎ木後に台木の根から接ぎ木接着部に輸送される Mn が接ぎ木の成立に関与することが示された。さらに、接ぎ木接着部への Mn の蓄積には、根の Mn 輸送体に関与すると予想し、根において Mn 輸送体遺伝子の発現解析を実施した。その結果、Metal tolerance protein (MTP), Zinc regulated transporter/Iron-regulated transporter-related protein (ZIP), Natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) ファミリーの一部の遺伝子の発現が接ぎ木の成立過程で上昇していた。これらの結果から、接ぎ木の成立には、接ぎ木後にこれらの Mn 輸送体が Mn を接ぎ木接着部に輸送することが必要である可

能性が示唆された。

第五章では、様々な草本植物の創傷茎および接ぎ木接着部にフェノールアミド (PA) が蓄積する知見を基に、トマトにおいて、接ぎ木の成立における PA の機能の解明を試みた。まず、ナス科植物である *Niconiana attenuata*, *Niconiana tabacum*, ジャガイモの既知の PA 生合成のマスターレギュレーターから、トマトにおけるオルソログとして *SIMYB14* を同定した。*SIMYB14* の機能を解析するために、RNAi による *SIMYB14* の発現抑制体 (*SIMYB14* 発現抑制体) を作出した。*SIMYB14* の発現抑制が顕著に見られた *SIMYB14* 発現抑制体においては、花や果実の形態異常が認められた。PA の蓄積と稔性には相関があるといった知見からも、*SIMYB14* は PA 生合成を介して、正常な花器官の形成に働くことが示唆された。*SIMYB14* 発現抑制体の創傷茎では、Wild type (WT) と比較して、PA の基質となるフェニルプロパノイド (PP) 生合成関連遺伝子の発現が低く、多くの PP および PA の蓄積量が有意に減少していた。これらの結果は、*SIMYB14* が PP および PA 生合成のマスターレギュレーターとして機能することを示している。接ぎ木における PA の機能を解明するために、*SIMYB14* 発現抑制体を接ぎ木しところ、接ぎ木接着部の PP および PA の蓄積量の減少が確認され、接ぎ木接着力と接ぎ木成功率の低下が確認された。接ぎ木接着部の形態観察と穂木の成長から、接ぎ木接着力と接ぎ木成功率の低下は、接ぎ木接着部の組織癒合と維管束形成の抑制によることが示唆された。また、接ぎ木接着部の RNA-seq 解析を行い、WT と比較して *SIMYB14* 発現抑制体で発現が有意に減少した Differentially expressed genes (DEG) について、GO enrichment 解析を行った結果、「extracellular region」, 「cell wall」, 「peroxidase activity」, 「lignin biosynthetic process」などの GO タームが有意にエンリッチされた。これらの GO タームの遺伝子を確認したところ、PP および PA を基質として、リグニンおよびスベリンの生合成に関わるペルオキシダーゼをコードする遺伝子が含まれており、WT と比較して、*SIMYB14* 発現抑制体の接ぎ木接着部では、これらの遺伝子の発現が減少していることが示された。リグニンやスベリンは PP および PA から生合成され、二次細胞壁の形成や強化を介して、創傷部の組織癒合や維管束形成に関与する。そのため、*SIMYB14* が PP および PA 生合成を介して、リグニンやスベリンの生合成を促進することで、二次細胞壁の形成や強化を促進し、接ぎ木接着部の組織癒合や維管束形成を介して、接ぎ木の成立に関与する可能性が示唆された。

本研究において、接ぎ木接着部には、様々な植物ホルモン・無機イオン・二次代謝物が蓄積することが明らかとなり、その一部が実施に接ぎ木の成立に関与することが示唆された。これらの接ぎ木の成立に関与する物質の分子メカニズムを基にした技術開発により、接ぎ木の成立を促進する接ぎ木促進剤の開発が期待される。