

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 川口 航平
論文題目 接ぎ木の成立と穂木と台木の相互作用の機構解明

論文審査担当者

主 査 名古屋大学准教授 白武勝裕

委 員 名古屋大学教授 松本省吾

委 員 名古屋大学教授 近藤始彦

委 員 名古屋大学教授 榊原 均

委 員 名古屋大学准教授 野田口理孝

論文審査の結果の要旨

川口航平は、異なる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のオミクス解析から、用いる台木によって溢泌液中の物質が変化することを明らかにし、一部の物質の濃度が形質と相関があることを明らかにした。また、タバコとトマトの接ぎ木植物の接ぎ木接着部の経時的なオミクス解析から、接ぎ木接着部に蓄積する物質とその動態を明らかにし、一部の物質が接ぎ木の成立に関与することを明らかにした。以下にその要旨を記載する。

まず、台木から穂木に輸送される道管液中の無機イオンや植物ホルモンにより、各無機イオンの過剰症や欠乏症の回避、果実中の無機イオン濃度の制御、乾燥ストレスなどのストレス耐性の向上、矮化などの草勢の制御、収量増加など、穂木の形質が変化するという知見を基に、異なる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のオミクス解析を行い、接ぎ木植物の道管液中の物質の濃度から、特定の目的に応じて、接ぎ木植物の組み合わせを推定することを試みた。その結果、溢泌液中の K, P, Fe, Mg, Ca, Mn, B, Zn, Cu, Mo といった無機イオンの濃度が、用いる台木によって、大きく変化することを明らかにした。これらの知見は、各無機イオンの過剰症や欠乏症の回避や、果実中の無機イオン濃度を増加および減少させる接ぎ木植物の組み合わせの推定に利用できる可能性がある。また、溢泌液中のサイトカイニン (CK)、ジャスモン酸 (JA)、アブシジン酸 (ABA) の濃度も、用いる台木によって大きく異なることが明らかとなった。溢泌液中の JA と ABA 濃度が高かったトマト品種 'Micro-Tom' を台木としたトマトの接ぎ木植物では、溢泌液量の減少、果実収量の減少、果実糖度の増加、低温ストレス耐性の向上が確認されており、これらの形質は高糖度トマト栽培の際に乾燥ストレスを与えた時の形質と同様である。JA と ABA が乾燥ストレス耐性に関与するという知見から、'Micro-Tom' を台木としたトマトの接ぎ木植物では、葉の蒸散量と根の水分吸収量のバランスが崩れて接ぎ木植物が乾燥ストレスを感受し、道管液中の JA と ABA 濃度が増加した可能性が示唆され、接ぎ木植物の溢泌液中の ABA および JA 濃度が、接ぎ木植物の果実収量、果実糖度、低温ストレス耐性などの形質の指標となる可能性が示唆された。さらに、この研究では同じトマトの台木用品種を台木とし、トマトを穂木とした接ぎ木植物もしくはナスを穂木とした接ぎ木植物の溢泌液中の無機イオンと植物ホルモンを分析していたため、同一のトマト台木を用いたナスもしくはトマトの接ぎ木植物の溢泌液中の無機イオンと CK の分子種を確認した。その結果、同一のトマト台木用品種を台木とした場合でも、溢泌液中の無機イオンと CK の分子種は、トマトを穂木とした接ぎ木植物と、ナスを穂木とした接ぎ木植物で大きく異なっており、溢泌液中の無機イオン濃度および CK の分子種の割合は、同じトマトの台木用品種を台木とした場合、トマトを穂木とするとトマトのセルフ接ぎ木植物と類似する一方で、ナスを穂木とするとナスのセルフ接

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

ぎ植物と類似することが明らかとなった。以上の結果は、土壌から吸収されて、台木から穂木に道管を介して輸送される無機イオンや、台木で生合成され、輸送される CK の分子種を、穂木が制御していることを示しており、本研究により、穂木が台木の性質を大きく変化させる現象と、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した。

次に、接ぎ木接着部には師管液に含まれる物質が穂木の切断部に、道管液に含まれる物質が台木の切断部に蓄積することに加え、接ぎ木による茎の切断により、新たに生合成される物質が蓄積し、これらの物質が接ぎ木の成立に関与すると予想し、接ぎ木苗が商用的に利用されているトマトおよび接ぎ木を広範の植物種と成立させるタバコを用いて、接ぎ木接着部に蓄積する植物ホルモン、無機イオン、代謝物のオミクス解析に取り組んだ。

いつ、どのような植物ホルモンが、穂木と台木のどちらから接ぎ木接着部に供給されるかを理解するために、接ぎ木の穂木または台木を模したタバコの花茎（穂木ミミックおよび台木ミミック）の切断部の経時的なホルモノーム解析を行った。その結果、穂木ミミックと台木ミミックの切断部において、既に接ぎ木の成立に関与することが報告されているオーキシシンと GA に加え、CK, ABA, JA の蓄積時期と蓄積濃度が明らかとなった。さらに、各植物ホルモンの相互作用と蓄積時期から、複数の植物ホルモンが互いの生合成を制御してクロストークすることで、接ぎ木の成立に関与する可能性も示唆された。また、同科接ぎ木と異科接ぎ木の接ぎ木の成立過程のイベントの度合いやタイミングの違いを理解するために、タバコを穂木とし、トマトを台木とした同科接ぎ木 (*Nb/Sl*) と、シロイヌナズナを台木とした異科接ぎ木植物 (*Nb/At*) の接ぎ木接着部の経時的なホルモノーム解析を行った。その結果、*Nb/Sl* と *Nb/At* の接ぎ木接着部で IAA, JA, の蓄積パターンは類似したが、蓄積濃度は異なった一方で、ABA と N⁶- (Δ 2-isopentenyl) -adenine (iP) 型および *trans*-zeatin (tZ) 型 CK の蓄積パターンが大きく異なることを見出した。以上の情報は、接ぎ木の過程における植物ホルモンの作用の分子メカニズムや、科内接ぎ木と科間接ぎ木の分子メカニズムの違いを理解する上で重要であることが考えられる。また、サリチル酸 (SA) は穂木と台木ミミックの切断部では検出されなかったが、*Nb/Sl* と *Nb/At* の接ぎ木接着部で検出されたことから、SA は花茎の切断だけでは合成・蓄積されず、接ぎ木を行うことで生合成・蓄積することを示している。このことは、SA が接ぎ木の成立に関与する、あるいは接ぎ木の成立後に蓄積する植物ホルモンであることを示しており、SA が接ぎ木和合性のバイオマーカーとして利用できる可能性を示唆した。

また、トマトを材料とした接ぎ木接着部の経時的なイオノーム解析を行い、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、接ぎ木の成立過程で、

論文審査の結果の要旨

B, Fe, P, Ca, Cu, Mn が接ぎ木接着部に高蓄積することが示された。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により、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、根から接ぎ木接着部への Mn 輸送に関わる輸送体を明らかにするために、接ぎ木成立過程の根における Mn 輸送体遺伝子の発現解析を実施した。その結果、接ぎ木の成立過程で SIMTP, SIZIP, SINRAMP ファミリーの一部の遺伝子発現が増加していたことから、接ぎ木の成立過程において、これらの Mn 輸送体が土壌から根へ Mn の取り込や道管への Mn の積み込みに働くことで、接ぎ木の成立に関与することを示唆した。

さらに、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) が蓄積するという知見を基に、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 *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana 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 of トマトにおけるオルソログとして SIMYB14 を同定した。SIMYB14 の発現が、茎や葉の創傷に加え、*Pseudomonas syringae* の感染によって増加することや、JA および JA シグナル伝達経路の SIMYC2 によって増加するという報告から、SIMYB14 が PA 生合成に関与すると予想した。SIMYB14 の機能を解析するために、RNA interference (RNAi) による SIMYB14 発現抑制体を作成した。SIMYB14 の発現抑制が顕著に見られた SIMYB14 発現抑制体において、花や果実に形態異常が認められた。PA の蓄積と稔性に相関が見られる知見からも、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 発現抑制をセルフ接ぎ木しところ、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

論文審査の結果の要旨

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これらの遺伝子の発現が減少していることが示された。以上から、リグニンやスベリンは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ため、*SIMYB14* が PP および PA 生合成を介して、二次細胞壁の形成や強化を促進することで、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を示唆した。

以上の異なる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のオミクス解析から、用いる台木によって、溢泌液中の物質が変化することを明らかにし、溢泌液中の JA と ABA 濃度と果実収量、果実糖度、低温ストレス耐性に相関があることを明らかとし、溢泌液中の JA と ABA 濃度がこれらの形質の指標にできる可能性を示した。さらに、同一のトマト台木を用いたナスもしくはトマトの接ぎ木植物の溢泌液中の無機イオンと CK の分子種から、土壌から吸収されて、台木から穂木に道管を介して輸送される無機イオンや、台木で生合成され、輸送される CK の分子種を、穂木が制御していることを示しており、本研究から、穂木が台木の性質を大きく変化させる現象と、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。これらの研究成果は、接ぎ木植物の溢泌液中の物質の濃度が、接ぎ木植物の特定の形質の指標になるといった農業現場での応用として利用できる可能性に加え、地上部から地下部に輸送され、無機イオンの取り込みや CK の生合成と輸送を制御するシグナルが存在するといった基礎研究のシーズとなる可能性のある知見であると言える。

また、タバコとトマトの接ぎ木植物の接ぎ木接着部の経時的なオミクス解析から、接ぎ木接着部に蓄積する物質とその動態を明らかにし、Mn, *SIMYB14*, PA が接ぎ木の成立に関与することを明らかとした。これらの接ぎ木における更なる分子メカニズムの解明により、接ぎ木の成立を促進させるような接ぎ木促進剤の開発に繋がる可能性がある。さらに、この研究過程で、*SIMYB14* がトマトの PA 生合成に機能し、花器官の正常な形成に関与するといった新規の知見を得ている。これらの知見は、トマトにおいて、PA による病害虫抵抗性や花器官の形態形成の分子メカニズムの解明のための重要な知見である。

したがって、本委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。