

接ぎ木の成立と穂木と台木の相互作用の機構解明

川口 航平

博論の要約

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、接ぎ木植物において、台木から穂木に流れる物質を分析するために、異なるトマト台木を用いたトマトの接ぎ木植物と、異なるトマトまたはナスを台木としたナスの接ぎ木植物の無機イオンおよび植物ホルモンの網羅解析を実施した。その結果、台木の種類によって、接ぎ木植物の道管液中の無機イオンおよび植物ホルモン濃度が大きく異なることが明らかとなった。これらの情報は、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、特定の目的に応じた接ぎ木植物の組み合わせを推定することに利用できる可能性がある。また、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と、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サイトカイニン（CK）の分子種を確認した。その結果、溢泌液中の無機イオンとCKの分子種は、同じトマトの台木用品種を台木とした場合でも、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

で大きく異なっていた。さらに、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ぎ木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。

第三章では、接ぎ木接着部に蓄積する植物ホルモンの動態とその接ぎ木へ作用を理解するために、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）の切断部のホルモーム解析を行った。その結果、穂木ミミックと台木ミミックの切断部における異なる植物ホルモンの変動が明らかとなった。穂木ミミックの切断部においては、切断直後にジャスモン酸 (JA) レベルが上昇することに加え、根へのオーキシン輸送が阻害されることで、インドール-3-酢酸 (IAA) レベルが上昇した。この IAA レベルの上昇により、IAA1 や ANAC071 などのオーキシン応答性転写因子を介して、接ぎ木接着部の髄組織の細胞分裂を促進される可能性がある。また、この IAA レベルの上昇が、ジベレリン (GA) の生合成を正に制御する一方、JA の生合成を負に制御している可能性も示唆された。さらに、切断後 24 時間以降には、IAA アミノ酸付加酵素 GH3 により、増加した IAA が不活性型のインドール-3-アセチルアスパラギン酸 (IAA_{sp}) へと代謝されることから、オーキシンによる CK 生合成の抑制が解除され、CK レベルが上昇すること可能性も示唆された。一方、台木ミミックの切断部においては、切断直後に、JA レベルが上昇する一方で、茎頂からのオーキシンの供給が無くなることで、IAA レベルが低下した。この IAA レベルの低下により、オーキシンによる CK 生合成の抑制が起きず、CK レベルが増加すると予想された。アブシジン酸 (ABA) は、台木ミミックと穂木ミミックの切断部の両方に蓄積したが、台木ミミックと比較して穂木ミミックの切断部での蓄積が高かった。本研究では、穂木

と台木の切断部において、細胞分裂や細胞肥大、カルス形成、維管束形成を制御するこれらの植物ホルモンの変動が明らかとなった。さらに、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相違点を理解するために、タバコを穂木とし、トマトを台木とした同科接ぎ木 (*Nb/SI*) と、シロイヌナズナを台木とした異科接ぎ木植物 (*Nb/At*) の接ぎ木接着部に蓄積する植物ホルモンの網羅的な分析を行った。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。*Nb/SI* と *Nb/At* の接ぎ木接着部において、接ぎ木直後に IAA レベルが上昇し、これは穂木の切断部における根へのオーキシン輸送の阻害により起きたと考えられ、*Nb/SI* と *Nb/At* の接ぎ木の両方の接ぎ木成立過程で、オーキシン応答性転写因子を介した接ぎ木成立過程が存在する可能性が示唆された。ABA 濃度は、*Nb/SI* と比較して、*Nb/At* の接ぎ木接着部における接ぎ木後 24 時間に高い傾向であった。これは、台木の水分供給量の違いによって穂木のタバコで生合成される ABA 量が異なる可能性や *Nb/At* では道管の再接続が部分的であり、師管の再接続が起きないため、穂木のタバコで生合成される ABA が接ぎ木接着部に、蓄積し続けた結果だと考えられ、同科接ぎ木と異科接ぎ木の違いを反映していると考えられた。N6-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine (iP) 型および *trans*-zeatin (tZ) 型 CK の蓄積パターンは、同科接ぎ木と異科接ぎ木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考えられた。以上の情報は、接ぎ木の成立に関与する植物ホルモンの分子メカニズムの解明や同科接ぎ木と異科接ぎ木の分子メカニズムの違い、さらにタバコ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だと考えられる。

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/SI* と *Nb/At* の接ぎ木接着部で検出された。この結果は、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が示され、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が示唆された。

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、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。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 の取り込めや道管への 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が示唆された。Mn はオーキシンの不活化や一次および二次細胞壁の構成要素であるヘミセルロース、ペクチンなどの多糖、アラビノガラクトナンタンパク質などの糖タンパク質、フェノール化合物のリグニンの生合成に関与するため、これらを介して接ぎ木の成立に関与する可能性も考えられた。

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の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。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、その一部が実際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。