

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0040

研究課題名(和文) 接木技術の高度化による多様性回復とモノカルチャーの共実現

研究課題名(英文) Concurrent achievement of monoculture and soil biodiversity by grafting

研究代表者

野田口 理孝 (Notaguchi, Michitaka)

名古屋大学・高等研究院(生)・准教授

研究者番号：00647927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物は私たち人間を含む地球上の生命を支える存在です。その植物を活用する技術の一つである接ぎ木(接木)は、二千年以上も前から農業で使われてきました。接木は、二種類の植物を一つにつなげて育てる技術で、病気に強い植物の根の上に農作物を接木することで、農作物を病気から守る方法として使われます。農薬の使用量を減らし、土壤生態系を保ち、環境負荷にも頑強な農業が可能です。しかし、接木は近縁な仲間の間でしか行うことができませんでした。本研究では、タバコ属植物が遠縁な植物でも接木できることを発見し、さらにその能力は植物が本来持っている細胞壁を溶かす酵素によることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異科接木技術に関しては、生物学的な研究によって現象の理解を徹底して進めており、これまでに鍵となる分子の同定にも成功した。科学的な知見を、技術の改善につなげる技術開発では、接着力を高める効果も認められており、今後は実用に向けた技術改良が期待される。接木は、農作物の性能を“直ちに”向上させる技術であり、その組み合わせ次第で現代社会が直面する様々な農業上の課題に対応可能なポテンシャルを持つ。また、植物科学の観点でも、接木は植物免疫や植物の再生といった現象に深く関係しており、本研究で得られたデータから今後の研究で重要な知見が一挙に広がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Plant grafting is generally performed between closely related species. Recently, we have discovered that *Nicotiana* species of Solanaceae show the ability to graft with distantly related plant species beyond the family. Graft adhesion with diverse angiosperms by *Nicotiana* species was probably facilitated by the secretion of a subclade of b-1,4-glucanases. The capability of interfamilial grafting was also found in the model Orobanchaceae hemiparasitic plant, *Phtheirospermum japonicum*, which naturally invades to the tissues of host plants of different families. Transcriptome analysis indicated that the same clade of b-1,4-glucanase plays an important role in plant parasitism. Thus, the tissue adhesion between distant plant species occurs both naturally and artificially.

研究分野：植物科学、農学

キーワード：接木 トランスクリプトーム解析 接木関連遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

農作物生産におけるモノカルチャーの拡大は農業産業化に貢献した一方、その弊害として生物多様性の喪失、土壌衰退、ひいては地球規模の環境破壊の増大を招いた。世界人口急増という目下の課題の元、モノカルチャーの包有する排弱性・環境リスクには注意が向けられるものの、生産者にとって利便性の高いシステムであり、直ちに停止することは事実上困難である。そこで、モノカルチャーを排除せず受け入れつつも、生物多様性を担保する新しい栽培システムとして「接木」という古典的な農業手法に着目した。

接木は、二つの植物を一つに接ぐことでそれぞれの有用形質を共に発揮させる手法であり、古くから農学・園芸的に重要な技術である。接木は地上部をなす植物(穂木)と地下部の根をなす植物(台木)からなり、地上部に栽培品種を、地下部に土壌病害や土壌ストレスに耐性を持つ品種を使うことで、農作物を健全に栽培することができる。しかし、接木には技術的に強い制限があり、接木する植物の組み合わせによっては接木が成立しない接木不和合と呼ばれる現象がある。この制限を解消することができれば、従来の接木法は拡張され、様々な農産物を接木により自由に組み合わせ活用できる。即ち、食用部になる地上部に単一の栽培品種を、地下部に台木として多様な品種や多様な植物種を混合して用いることができ、一種類の農作物を栽培するモノカルチャーを実施しつつ、地下部では土壌生態系の多様性を維持する頑強な栽培システムを実現できる。本研究では、研究代表者が最近開発した異科接木法について、植物科学を基盤にさらに発展させることを目指した。

## 2. 研究の目的

タバコ属植物をはじめとする一部植物が発揮することのできる異科接木能力について、本研究では分子生物学的にその原理を解明することで、生物工学的に接着性を向上させる技術を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 異科接木の分子生物学的解析

タバコ属の異科接木について、接木成立までの時系列を追った解析を行った。

- ・組織レベルの形態学的解析により、細胞増殖、細胞接着、再組織化の時期を特定した。
- ・接木の分子機構解明のため、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム、ホルモノーム解析を行い、各オミクス解析で統計的に有意な分子イベントを抽出した。

### (2) タバコ属の特殊性発揮を説明する遺伝子の探索

統合オミクス解析による情報をもとに、接木の鍵遺伝子を絞り込んだ。

- ・各オミクス解析について、主成分分析により接木イベントの全体像を把握した。
- ・クラスター解析により、形態学的解析で特定した細胞増殖、細胞接着、再組織化の各時期に特徴的に変動する分子群をスクリーニングした。
- ・遺伝子オンロジーエンリッチメント解析により、各分子群の内部構成を生物学的プロセス、細胞の構成要素および分子機能として識別した。
- ・オミクスデータ間の比較解析により、相互信頼性を確認し、現象理解を深めた。

### (3) 同定した遺伝子(群)を機能発現する形質転換体の作出

絞り込んだ遺伝子(群)を高レベルで発現誘導できる形質転換体を作成した。

- ・試験遺伝子を形質転換ベクターへ導入した。複数の遺伝子を同時に、一過的に、高レベルで発現誘導することが可能な発現誘導ベクターを使用した。発現誘導は、GFP 蛍光により可視的に確認した。
- ・モデル植物シロイヌナズナと、異科接木能力を発揮するタバコ属を対象の植物とした。
- ・遺伝子発現の影響を、組織/細胞形態学的に調べ、オミクス解析により分子生物学的にも調べた。解析結果は既得データと比較して、試験遺伝子の影響範囲を評価した。

### (4) 接着性に関する機能評価

作出した形質転換体を以下の複数の接木評価系で試験し、接着性向上を評価した。

- ・インビトロ接木評価系として、茎を数 mm 厚に切断した切断茎二つを接合して接着を評価した。
- ・マイクロ接木評価系として、発芽して直ぐの芽生えを用いた接木を行い、接木の効率を評価した。

#### 4. 研究成果

これまでに、分類上の「科」が異なる植物の接木(異科接木)は、不可能であると考えられてきたが、これまでの常識を覆して異科接木を成立させる植物、タバコ属植物を発見した(図1)。

はじめに、タバコ属植物の異科接木能力が、どのくらい遠縁な植物まで発揮されるのかを調べた。7種のタバコ属植物を穂木として42種類の科の84種類の植物と接木試験を実施したところ、実に38科73種の植物との接木の成立を確認した。このことから、タバコ属植物は、被子植物であれば広範囲に接木できる驚くべき潜在能力があることが明らかとなった。

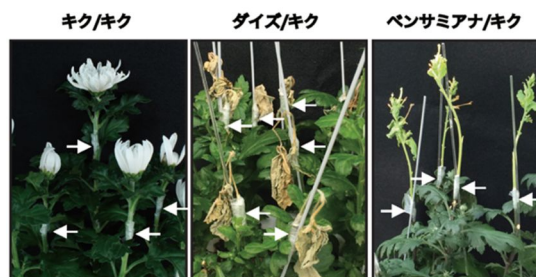


図1 同科接木と異科接木

上の表記は穂木/台木の組み合わせを示し、矢印は接木した部位を示す。

*Nicotiana benthamiana* (以下ベンサミアナと表記する)を主な実験材料とし、接木してから接木部位がどのようにつながっていくかを形態学的に観察したところ、接木して3日目頃には細胞増殖が開始し、その後2週間ほどかけて徐々に組織が分化して少しずつつながる様子が観察された。

さらに、透過型電子顕微鏡で接木境界部の細胞を観察したところ、境界部の細胞壁が部分的に著しく消化されていて、接木された両者の植物の細胞が互いに密着している様子が観察された。接木が成立しない他の植物の異科接木の場合には、接木の際に傷ついた細胞の細胞壁が接木境界部に折り重なるように残り、細胞の接着を遮っていることも観察され、これらの観察から接木の成立には細胞壁の消化による両者の細胞の接着が重要であることが示唆された。

そこで、次に分子レベルで現象を理解すべく、ベンサミアナとシロイヌナズナの接木サンプルの時系列トランスクリプトーム解析を、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析により実施した。顕微鏡観察では、接木後3日目までに2つの植物の細胞同士の癒合が起こっていることから、接木後1日目、3日目、7日目と発現が上昇傾向を示す遺伝子の抽出を行ったところ189遺伝子が該当した。絞り込んだ遺伝子群のうち、細胞壁の主成分であるセルロースの消化に関与することが推察される-1,4-グルカナーゼに注目してさらなる実験を行うことにした。-1,4-グルカナーゼは細胞外に分泌され、細胞壁形成に関与することが示唆される酵素タンパク質であり、セルラーゼとも呼ばれる(図2)。この遺伝子の発現を一時的に抑制したベンサミアナをシロイヌナズナに異科接木すると、対象区に比べて接木の成功率が低下した。また、CRISPR-CAS9を用いて当該遺伝子を破壊したベンサミアナを作出し、ベンサミアナ同士で接木した場合にも、野生型同士に比べて接木の成功率の低下することが示された。以上より、異科接木の成立の鍵となる分子として-1,4-グルカナーゼを同定することができた。

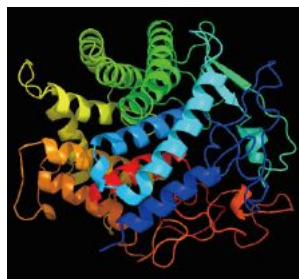


図2 -1,4-グルカナーゼの立体構造予測

#### 従来の同科接木への展開

ここまでタバコ属植物の異科接木の解析を行ってきたが、見出された分子メカニズムの一般性を問うため、他の植物の接木についても遺伝子発現解析を行った。ダイズ、アサガオ、そしてシロイヌナズナの同科接木を行い、-1,4-グルカナーゼの発現パターンを経時的に調べた結果、接木が成立する際にはタバコ属植物と同様に-1,4-グルカナーゼの発現上昇が認められることが分かった。同時に、これらの植物を異科接木した場合についても調べたところ、-1,4-グルカナーゼの発現は一時的には上昇するものの直ぐに下降して維持されず、そのためにこれらタ

バコ属植物以外の植物は異科接木を成立させることができないことも推察された。

このように、植物に共通する接木の鍵分子が見つかったため、接木の技術改良を目的に、  
-1,4-グルカナーゼの働きを高めた植物を作出し、接木への効果を調べた。 -1,4-グルカナーゼ  
の働きを高めたベンサミアナとシロイヌナズナを用意して試験した結果、接木の接着力が向上  
し、さらに接木後の植物の成長が高まることが認められた。さらに実際の利用を想定して、  
-1,4-グルカナーゼを接木部位に外的に投与して効果を調べたところ、外から与えても接木の接  
着力は高まった。このように技術の実用性を示すことができ、今後は実際の農業における利用に  
ついては検討したい。

最後に、天然の植物資源の上で農作物を栽培すべく、タバコ属植物を中間台木として用いる異  
科接木法に挑戦した。陸上で最も繁殖するキク科植物を台木として、タバコ属植物を中間台木と  
してトマトを接木した。接木は安定し、接木3ヶ月後にトマト果実を結実させることに成功した  
(図3)。以上、本研究の成果のポテンシャルを示すことができた。

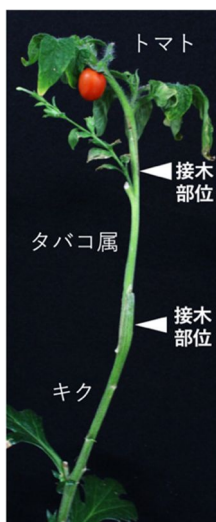


図3 異科接木で結実させたトマト

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroki Tsutsui, Naoki Yanagisawa, Yaichi Kawakatsu, Shuka Ikematsu, Yu Sawai, Ryo Tabata, Hideyuki Arata, Tetsuya Higashiyama, Michitaka Notaguchi	4. 巻 1
2. 論文標題 Micrografting device for testing systemic signaling in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.14768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okayasu Koji, Aoki Koh, Kurotani Ken-Ichi, Notaguchi Michitaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Tissue adhesion between distant plant species in parasitism and grafting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19420889.2021.1877016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawakatsu Yaichi, Sawai Yu, Kurotani Ken-ichi, Shiratake Katsuhiko, Notaguchi Michitaka	4. 巻 37
2. 論文標題 An in vitro grafting method to quantify mechanical forces of adhering tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 451 ~ 458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.20.0925a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Notaguchi Michitaka, Kurotani Ken-ichi, Sato Yoshikatsu, Tabata Ryo, Kawakatsu Yaichi, Okayasu Koji, Sawai Yu, Okada Ryo, Asahina Masashi, Ichihashi Yasunori, Shirasu Ken, Suzuki Takamasa, Niwa Masaki, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 369
2. 論文標題 Cell-cell adhesion in plant grafting is facilitated by $\alpha$ -1,4-glucanases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 698 ~ 702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abc3710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurotani Ken-ichi, Wakatake Takanori, Ichihashi Yasunori, Okayasu Koji, Sawai Yu, Ogawa Satoshi, Suzuki Takamasa, Shirasu Ken, Notaguchi Michitaka	4. 巻 3
2. 論文標題 Host-parasite tissue adhesion by a secreted type of $\alpha$ -1,4-glucanase in the parasitic plant <i>Phtheirospermum japonicum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.03.29.014886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honma Yujiro, Adhikari Prakash Babu, Kuwata Keiko, Kagenishi Tomoko, Yokawa Ken, Notaguchi Michitaka, Kurotani Kenichi, Toda Erika, Bessho-Uehara Kanako, Liu Xiaoyan, Zhu Shaowei, Wu Xiaoyan, Kasahara Ryushiro D.	4. 巻 3
2. 論文標題 High-quality sugar production by osgcs1 rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01329-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinozaki Daiki, Notaguchi Michitaka, Yoshimoto Kohki	4. 巻 15
2. 論文標題 Importance of non-systemic leaf autophagy for suppression of zinc starvation induced-chlorosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1746042 ~ 1746042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1746042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiratake Katsuhiko, Notaguchi Michitaka, Makino Haruko, Sawai Yu, Borghi Lorenzo	4. 巻 60
2. 論文標題 Petunia PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 1 Is a Strigolactone Short-Distance Transporter with Long-Distance Outcomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1722 ~ 1733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toju Hirokazu, Okayasu Koji, Notaguchi Michitaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Leaf-associated microbiomes of grafted tomato plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38344-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Michitaka Notaguchi
2. 発表標題 RNAs as systemic signals in plants and its potential application
3. 学会等名 International Symposium on the Future Direction of Plant Science by Young Researchers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田口理孝
2. 発表標題 異科接木の分子機構と技術開発
3. 学会等名 種生物学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田口理孝、田畑亮、岡安浩次、澤井優、鈴木孝征、黒谷賢一
2. 発表標題 接木技術の再考 ストレス土壌の活用を目指して
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michitaka Notaguchi
2. 発表標題 Application for overcoming interfamily grafting and grafting microchip
3. 学会等名 International Symposium on Vegetable Grafting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michitaka Notaguchi
2. 発表標題 Nicotiana interfamily grafting and grafting microchip
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Horticultural Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田口理孝
2. 発表標題 非自己でもつながる接木法とその未来
3. 学会等名 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト・シンポジウム「環境および非自己応答機構から読み解く植物の巧みな生存戦略」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yaichi Kawakatsu, Hiroki Tsutsui, Ryo Tabata, Hirokazu Toju, Michitaka Notaguchi
2. 発表標題 Development of a micro-grafting chip for Arabidopsis and its application aiming to control nutrition and symbiosis with microbiota
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conference on Plant Cell and Development Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Michitaka Notaguchi, Kenichi Kurotani, Ryo Tabata
2. 発表標題 Study on the mechanism of Nicotiana interfamily grafting
3. 学会等名 Plant Vascular Biology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川勝弥一, 筒井大貴, 柳沢直樹, 澤井優, 池松朱夏, 新田英之, 東山哲也, 野田口理孝
2. 発表標題 シロイヌナズナ接ぎ木チップの開発
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Notaguchi M
2. 発表標題 Molecular mechanisms of Nicotiana interfamily grafting
3. 学会等名 Plant and Animal Genome XXVII Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Notaguchi M
2. 発表標題 Advances on plant grafting
3. 学会等名 5th International Horticulture Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Notaguchi M, Kurotani K, Okayasu K, Sawai Y, Tsutsui H, Okada R, Niwa M, Sato Y, Higashiyama T
2. 発表標題 Interfamily grafting using a plant genus Nicotiana
3. 学会等名 International Plant Molecular Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田口理孝
2. 発表標題 接ぎ木能力の高いタバコ属植物
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田口理孝, 岡安浩次, 澤井 優, 鈴木孝征, 黒谷賢一
2. 発表標題 接ぎ木はいかにして接着するのか? 分子機構の解明と農業への応用に向けた取り組み
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田口理孝, 田畑亮, 岡安浩次, 澤井優, 鈴木孝征, 黒谷賢一
2. 発表標題 タバコ属の異科接木における特徴的な遺伝子発現の同定
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Liesche, Johannes (Ed.)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 473
3. 書名 Phloem: Methods and Protocols	

1. 著者名 野田口理孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 月刊「アグリバイオ」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hort/notaguchi/">https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hort/notaguchi/</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------