

接木技術革新による放棄土壌の再活用プロジェクト

研究代表者

野田口理孝 名古屋大学生物機能開発利用研究センター

共同研究者

山口隆正 名古屋大学全学技術センター



本研究の成果によって作出された、キクの根の上にタバコ属植物を挟んでトマトを接木した苗。

β -1,4-グルカナーゼの働きによって、接木された植物の細胞同士が互いに強く接着する。

将来は、ストレス土壌の上でも農作物を栽培できる技術として利用が期待される。

1. 研究の背景と達成目標

急増する人口を支えるため、食の確保は緊急を要する課題である。しかし、土壌衰退により食糧生産の源泉である耕作地の約40%が失われ、現在もその拡張を止められずにいる。本研究では、放棄土壌の問題を解決し、食を持続的に供給することを可能とする手段を、古典的な接木技術を革新することで提供することを目指した。具体的には、タバコ属植物を活用した独自の異科接木法を更に開発・適用して、ストレス土壌に強い植物の根に農作物を接木して栽培する技術の確立を目指した。さらに、新たな価値を生む接木苗を量産するための接木補助部材である接木マイクロチップの素材・構造の最適化を行い、接木苗生産の省力化・低コスト化・高効率化・高精度化を実現するためのシステム構築に取り組んだ。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ タバコ属植物の異科接木を標的にその分子メカニズムを分子生物学的手法により紐解き、その稀少な接木接着能力の原因となる鍵分子として β -1,4-グルカナーゼを同定した。研究成果は、Science誌に掲載され、その成果はNature 姉妹誌にも紹介され、世界の注目を集めた。
- ・ 同定した鍵分子を利用して、接木の接着力を向上させることができた。遺伝子発現を植物体の中で高める分子生物学的手法で、一般的な同科接木や異科接木で苗の性能を高めることができた。さらに、人工的に合成した β -1,4-グルカナーゼを接木部位に投与することでも、接木の接着力を向上させ、接木苗の成長を高めることができた。研究成果は、Plant Biotechnology誌に掲載された。
- ・ 上記の原理究明を受けて、ストレス土壌に頑強で、陸上で最も繁殖するキク科植物のキクの根の上にタバコ属植物を中間台木として挟んでトマトを接木し、トマトの果実を実らせることに成功した。日本経済新聞、朝日新聞、毎日新聞等で記事が掲載され、NHK 視点・論点で報道された。
- ・ 接木苗の量産のための接木マイクロチップについては、内部構造を改良し、量産するチップの仕様設計を行い、作製したチップの性能評価を経て、開発を完了させた。2020年12月より、理化学研究機器を扱うバイオメディカルサイエンス社より販売が開始された。
- ・ Science誌が主催する一般講演会 Science Caféで成果発表を依頼され、将来の持続可能な社会における植物の重要性と、植物資源を守り、かつ経済利用するための研究と開発の重要性を発表し、強い反響を得た。日経サイエンス、Newspicks、リケラボ等の雑誌やメディアでも取り上げられた。
- ・ 植物科学の分野の国際会議では招待講演を依頼され、ドイツのマックス・プランク研究所や欧米の大学機関との共同研究も開始した。世界の植物科学研究者に成果を共有し、今後の研究展開について意見を交わすとともに、接木技術の普及もはじまっている。
- ・ 接木の専門家として、園芸科学分野では最もランクの高いNature 姉妹誌のHorticulture ResearchとMolecular Horticultureのエディターを務めることとなった。
- ・ 名古屋大学発ベンチャーのグランドグリーン株式会社では、トマト接木苗の生産を効率化する接木カセットが開発・販売された。本研究で生まれた新技術についても順に利用展開を進めるべく研究

開発が開始された。研究成果を経済的に利用して行くべく、次点の開発がはじまったところである。

3. 研究成果

異科接木成立のメカニズム

農作物生産において、接木は2種類の植物をつなげることにより、土壌の特性にフィットした地下部の根と果実形質が良質で収量性の良い地上部を組み合わせることのできる2000年以上の歴史を持つ農業技術である。様々な農作物で接木は活用されているが、技術的に大きな制約が存在する。それは、一般に接木は近縁な植物の間でしか成立しないことである。遠縁な

植物同士を接木しても、接合部の組織は接着せず、穂木は枯れてしまう。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。しかし我々は、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）。本研究では、この現象の背景にある分子メカニズムを明らかにすることを目的に分子生物学的な解析を行い、接木を成立させる分子機構を明らかにすることで、接木の制約を打破し、様々な植物資源を利用することのできる接木技術に発展させることを目指して研究を行った。

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（図2）。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。

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



図1 同科接木と異科接木
各写真の上の表記は穂木/台木の組み合わせを示し、矢印は接木した部位を示す。

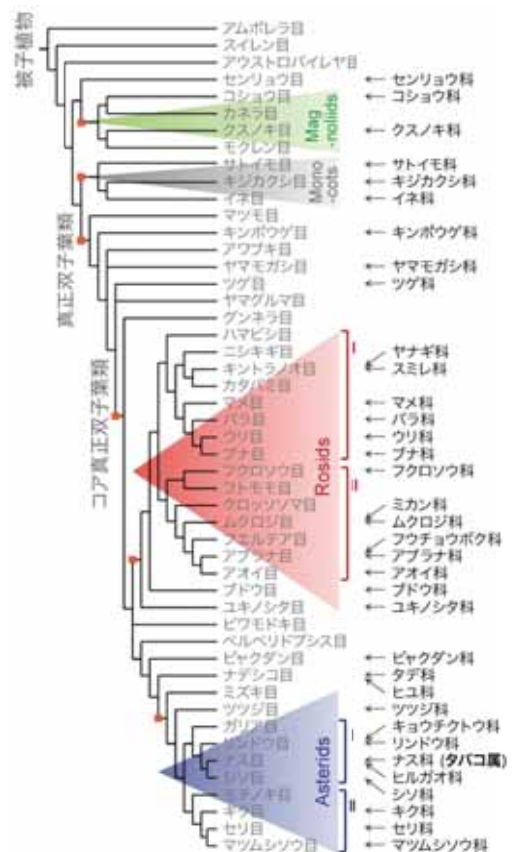


図2 タバコ属植物が成立させた異科接木

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 β -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。 β -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3)。この遺伝子の発現を一過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 β -1,4-グルカナーゼを同定することができた。



図3 β -1,4-グルカナーゼの立体構造予測

従来と同科接木への展開

ここまでタバコ属植物の異科接木の研究を行ってきたが、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、 β -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 β -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、 β -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、 β -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。 β -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、 β -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、今後は市販化に向けた開発を展開したい。

最後に、異科接木能力を示すタバコ属植物を利用して、目標とするストレス土壌の上で育つ農作物の苗を作出すべく、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。この手法により、本来接木不親和である2種の植物について、タバコ属植物を介して間接的に接木することが可能となると考えた。ストレス土壌に頑強でかつ陸上で最も繁殖するキク科植物を台木として、その上に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、接木してから3ヶ月後にトマトの果実を結実させることに成功した(最初の図)。以上、本研究の成果のポテンシャルを示すことができた。

寄生植物による寄生

異科接木に関連する研究として、寄生植物に注目した研究を行った。接木が人為的な植物の接合であるのに対し、寄生植物による寄生は植物が自然界で自発的に行う接合である。寄生植物が宿主とする植物の範囲は非常に広く、例えばストライガは、単子葉植物の穀物であるトウモロコシに寄生し、アフリカでは甚大な農業被害をもたらしている。自然界には遠縁な植物であっても組織をつなげる能力が獲得されていたことから、異科接木との共通原理を探れると考えた。

寄生植物であるコシオガマを宿主植物のシロイヌナズナに接木して



図4 寄生植物の寄生と異科接木

みたところ、異科接木が可能であることが分かった（図4）。そこで、寄生部位と異科接木した際の接木部位の遺伝子発現解析を行い、さらに両者の結果を比較してみると、なんと両者に共通する発現パターンを示す遺伝子群の中に β -1,4-グルカナーゼが含まれていることが明らかとなった。コシオガマにおいて β -1,4-グルカナーゼの発現を抑制すると、寄生に失敗するようになり、植物の寄生にも β -1,4-グルカナーゼの働きが重要であることが分かった。このように今回の発見では、接木という人為的な農業技術の分子メカニズムが明らかになっただけでなく、自然界の現象の理解も進んだ。

接木マイクロチップの改良開発

近年、野菜品目の栽培に接木は広く活用されている。果樹栽培においては新品種開発を除けば、接木した樹木は数十年利用できることが多く、それほど高頻度に接木を実施する必要はない。しかし、野菜類の接木苗生産は毎年実施する必要があり、生産する苗数も多いため、膨大な生産コストは商品価格に上乗せされ、農業者や消費者の負担となる。そのため接木苗生産の効率化は接木苗の普及、安定供給にとって重要な課題である。しかし、農作物は個体ごとに形状やサイズのばらつきが大きく、機械化の妨げとなっており、接木苗生産の多くは未だ人の手作業に依る部分が多い。本研究では、植物の成長様式に照らし合わせた構造を、微細加工技術（Micro Electro Mechanical Systems）によって設計し、接木を簡単に行える補助部材となる接木マイクロチップを開発した（図5）。接木チップは、可変性のシリコン樹脂で成形されており、一つのチップ上で、種子の発芽、植物の成長、接木までの一連のプロセスを完了することができる。マイクロ通路には、マイクロピラーが対をなして配置され、このマイクロピラーを押し広げながら茎は伸長する。この茎の貫通には、種子が発芽してから、発芽した茎がスムーズにマイクロ通路に侵入すること、マイクロピラーが硬すぎず、茎がマイクロ通路内を伸長できることが重要であった。本研究では接木チップの側面構造とマイクロピラーの形状、サイズ、および配置を改良し、70%程度の茎の貫通率を達成できた。この接木マイクロチップを使用して、茎の直径が1mmに満たない小さな植物であっても、誰でも接木苗が生産可能となった。

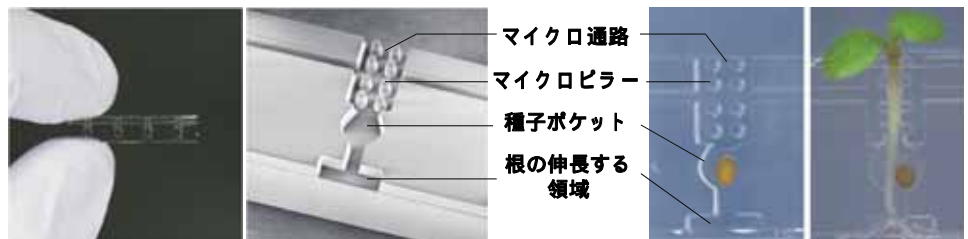


図5 接木チップ

本技術は、植物の基本的な成長様式に照らし合わせて作られたため、サイズを変更して設計することで様々な農作物に適用可能である。名古屋大学発ベンチャーのグランドグリーン株式会社では、本技術を発展させて、トマトの接木苗生産に合わせた「接木カセット」が開発された（図6）。実際の生産現場に即した技術開発がなされ、固化培土で生育したトマト苗を効率よく接木できる手のひらサイズの接木部材である。苗の大きさのばらつきは接木カセット側で吸収するように設計されており、これまでに様々なトマト品種に用いることができています。接木装置を接木カセットと併用して使えば、1時間に1200接木苗を生産できる。接木装置は、他にも開発されているが、いずれも植物を装置が直に扱うタイプであり、規格に合わない植物は接木できないという課題があった。一方、接木カセットを扱う接木装置の場合は、装置が直に扱うのは規格の定まった接木カセットであり、植物は直に扱うことはない。このように、接木マイクロチップの開発はさらに展開することができ、農業利用へ着実に繋げていきたい。



図6 接木カセット
トマトの苗をセットした様子。

4. 今後の展開

接木の分子メカニズムの研究は、はじまったばかりである。遠縁な植物をつなぐ異科接木は、つながり方が不完全で植物への負荷も大きいため、植物がどのようにその困難を乗り越えようとするかを知る上では、とても興味深い研究対象である。β-1,4-グルカナーゼの発見は氷山の一角にすぎず、今後さらなる発見につなげたい。植物の免疫機構、細胞増殖、組織の分化といった、植物科学にとっての重要な命題が接木の現象には含まれている。今回の研究で取得した一連の解析データは、そうした将来の植物科学研究に有効であることは間違いない。さらに、接木という私たち人類が植物資源を利用する方法を科学を背景に発展させ改良することで、植物の活用と共栄が進むよう、基礎から応用までの視点で研究を進展させたい。接木技術を科学により革新し、地上部においては良質な作物形質を持ち経済性の高い栽培品種を生産しつつ、地下部においては土壌病害やストレス土壌に耐性を持つ根を活用することのできる接木苗を創出することで、世界の食糧供給を助け、豊かで頑強な生物多様性を保全するという両輪を実現し、将来の持続可能な農業を目指す。

5. 発表実績

論文

- Tsutsui H, Kawakatsu Y and Notaguchi M. **2021**. A silicone micrografting chip in *Arabidopsis thaliana*. *Bio-protocol*. In press.
- Okayasu K, Aoki K, Kurotani K and Notaguchi M. **2021**. Tissue adhesion between distant plant species in parasitism and grafting. *Communications Integrative Biology*. 14: 21-23.
- Kawakatsu Y, Sawai Y, Kurotani K, Shiratake K and Notaguchi M. **2020**. An in vitro grafting method to quantify mechanical forces of adhering tissues. *Plant Biotechnology*. 37: 1-8.
- Notaguchi M*, Kurotani K, Sato Y, Tabata R, Kawakatsu Y, Okayasu K, Sawai Y, Okada R, Asahina M, Ichihashi Y, Shirasu K, Suzuki T, Niwa M and Higashiyama T. **2020**. Cell-cell adhesion in plant grafting is facilitated by β-1,4-glucanases. *Science*. 369: 698-702. (*Corresponding author)
- Kurotani K, Wakatake T, Ichihashi Y, Okayasu K, Sawai Y, Ogawa S, Suzuki T, Shirasu K and Notaguchi M. **2020**. Host-parasite tissue adhesion by a secreted type of β-1,4-glucanase in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Communications Biology*. 3: 407.
- Tsutsui H, Yanagisawa N, Kawakatsu Y, Ikematsu S, Sawai Y, Tabata R, Arata H, Higashiyama T and Notaguchi M. **2020**. Micrografting device for testing systemic signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 103: 918-929.
- Toju H, Okayasu K and Notaguchi M. **2019**. Leaf-associated microbiomes of grafted tomato plants. *Scientific Reports*. 9: 1787.
- Okayasu K and Notaguchi M. **2019**. Efficient establishment of interfamily heterograft of *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana*. *Phloem: Methods and Protocols*. Springer. Chapter 31.

概説論文

- 黒谷賢一, 野田口 理孝. 糖鎖の加水分解酵素が植物をつなぐ. **2021**. *Glycoforum*. 24 (1): A2.
- 黒谷賢一, 野田口理孝. 接ぎ木の成立メカニズムの解明と異科接木の農業利用. **2021**. バイオサイエンスとインダストリー (*B&I*). **79(1): 16-19**.