

平成 31 年 4 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05248

研究課題名(和文) 稲作に対する根寄生雑草ストライガの脅威の検証と抵抗性・耐性機構の解明

研究課題名(英文) Tolerance and resistance to *Striga hermonthica* in rice

研究代表者

杉本 幸裕 (Sugimoto, Yukihiro)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：10243411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：根寄生雑草ストライガは主要なイネ科作物を宿主とし、アフリカでは農業生産を阻害する最も深刻な生物的要因である。イネが我が国にとって重要な作物であることから、本研究ではイネに対するストライガの脅威を検証することを目的とした。世界のイネコアコレクションを用いて、様々なイネ品種のストライガ感受性の違いを評価した。また、ストライガと宿主の気孔開度の違いが養水分収奪に関わっていると考えられたため、ストライガの独立個体を作成しアブシジン酸生産能力と感受性を調べた。さらに、ストライガ植物体に自身の種子に対する発芽刺激活性を認めたので、活性物質の追及にも取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界のイネコアコレクション67品種の間には発芽刺激物質生産性および侵入抵抗性に大きな違いが認められた。このことから、高いストライガ抵抗性を示すイネ品種の選抜が可能であると考えられた。宿主に依存せずに生育する独立個体の作出に成功したことにより、ストライガ独自の代謝能力を調べることが可能となった。その結果、アブシジン酸を大量に生産すること、および、自らの種子発芽を誘導する物質を生産していることが明らかとなった。ストライガが地上に現れる前から宿主植物に影響を与えるbewitching effectを説明できる興味深い知見として、幼苗からABAが分泌されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Striga hermonthica is a noxious root parasitic weed which attacks economically important Poaceous plants. Striga-infected plants display wilting and chlorosis even before Striga emerges above the ground, a phenomenon known as bewitching effect. The present investigation was undertaken to examine tolerance and resistance to Striga in rice. Screening of selected rice varieties revealed large varietal differences in terms of germination inducing activity of root exudates and resistance to haustorial penetration into the host roots, thus suggesting the feasibility of selection of rice varieties invulnerable to Striga. An unknown germination stimulant and abscisic acid (ABA) were detected in host-free Striga plants. Striga seedlings exuded a considerable amount of ABA, which could contribute to the bewitching effect. The need for exogenous stimulant to induce Striga germination and the presence of endogenous stimulant in Striga plants are intriguing and worth further investigations.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ストライガ 根寄生雑草 イネ

## 1. 研究開始当初の背景

根寄生雑草ストライガ (*Striga hermonthica*) はアフリカ、中東、南アジアを中心に分布している。ソルガム、ミレット、トウモロコシ等の主要なイネ科作物を宿主とし、アフリカでは病原菌、害虫、鳥を上回り農業生産を阻害する最大の生物的要因となっている。イネがストライガに寄生されることはすでに知られていた。NERICA 品種の発芽刺激物質生産性の差異、NERICA 品種のストライガ感受性の差異、および、農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターが分譲している NIPPONBARE - KASALATH の組換え自殖系統を利用したストライガ感受性の QTL 解析等が報告されているものの知見は断片的で、稲作に対するストライガの脅威に関する包括的な調査や防除を意識した研究は見当たらなかった。

## 2. 研究の目的

イネは我が国にとって最も重要な作物の一つである。地球温暖化に伴い我が国の環境はストライガの成育に適しつつあり、モノとヒトの移動の加速により外来生物の侵入阻止が難しくなる中、ストライガが我が国の稲作の隘路となることが懸念される。本研究では、ストライガの被害が深刻なスーダンで先導的な役割を果たしている研究機関および研究者との協力体制を活かし、稲作に対するストライガの脅威を検証するとともに、被害を軽減するための方策の開発につながる抵抗性・耐性機構の解明に取り組むこととした。

## 3. 研究の方法

### 3-1 世界のイネコアコレクションを用いたストライガ抵抗性の評価

世界のイネコアコレクション (WRC) は、イネの多様性研究に資するために選抜された品種セットである。WRC は、世界各地から収集した約 3 万 7 千点のイネ品種から来歴情報に基づいて絞り込んだ 332 品種を、ゲノムワイド RFLP 多型調査の結果を用いたクラスター分析で 67 グループに分類し、各グループから 1 品種ずつ選んだ 67 品種に NIPPONBARE と KASALATH を加えた 69 品種から成る。この 67 品種は、上述の 332 品種で見つかった 554 の対立遺伝子の 91% にあたる 505 の対立遺伝子を保持している。また、WRC に含まれる品種の原産国は 19 か国に上る。このような多様なイネ品種のストライガに対する応答を調査することは、稲作に対するストライガの脅威を把握する一助となる。

#### 3-1-1 プレアタッチメント抵抗性評価

発芽刺激活性評価：ストライガ種子は宿主根から分泌される化学シグナル(ストライゴラクトン：SL と総称される化学物質)を認識して初めて発芽するため、宿主植物からの SL の分泌が少ない、あるいは、宿主植物が分泌する SL の発芽刺激活性が低いことは、ストライガ抵抗性メカニズムの一つである。これは発芽したストライガの幼根が宿主根に接触する前に働くメカニズムであることから、プレアタッチメント抵抗性と呼ばれる。WRC69 品種を、50 ml コニカルチューブで 40% Long Ashton 水耕液を与えながら 28 日間栽培し、29、30 日目は水道水で栽培した。31 日目に根滲出物を含む水耕液に蒸留水を加えて 50 ml としてから、10 ml をサンプルとして 15 ml コニカルチューブに回収し、2 ml の酢酸エチルを加えよく攪拌した。3500 rpm で 5 分間遠心分離し、酢酸エチル層 40  $\mu$ l を、ガラスシャーレ上に置いた直径 8 mm のガラス繊維ろ紙ディスクに含ませ、30 分間放置し酢酸エチルを揮発させた。このディスク上にストライガ種子約 50 粒を載せた新たなディスクを重ね、滅菌水 40  $\mu$ l を与えた。30°C で 24 時間培養後、ストライガ種子の発芽率を測定した。ストライガ種子の発芽を誘導しにくいイネ品種ほど、プレアタッチメント抵抗性が高いと判断した。

#### 3-1-2 ポストアタッチメント抵抗性評価

根系の観察が可能なライゾトロン(プラスチック製のシャーレにロックウールを詰め、その上にガラス繊維濾紙を敷いた培養器)上のイネ根系に発芽したストライガを接種し、寄生率を観察することで、WRC69 品種のストライガに対するポストアタッチメント抵抗性を評価した。WRC69 品種をライゾトロン上で栽培し、発芽後 20 日目のイネ根系に、合成 SL アナログである GR24 で発芽誘導したストライガ種子 30 粒を接種した。接種後 21 日目にストライガの生育を観察した。接種したストライガが寄生成立に至る割合が小さいイネをポストアタッチメント抵抗性が高い品種と判断した。

#### 3-1-3 感受性の昂進と抵抗性の崩壊

プレアタッチメントおよびポストアタッチメント感受性評価に基づき、ストライガ感受性、抵

抗性品種を選抜し、スーダンの圃場での栽培を計画した。種子の輸入に関してスーダンの検疫当局に問い合わせたが、高額な費用のかかる ISTA 国際種子証明書の発行を輸入許可条件に加えられたり、輸入条件の曖昧な点（防除対象とする病害虫の学名が不正確、病害虫防除のために求められている具体的な対策が不明確など）を確認する度に別の新たな条件を提示されたりし、輸入をあきらめざるを得ない状況となった。

### 3 - 2 ストライガによるアブシジン酸 (ABA) の生産と分泌

ストライガの気孔が乾燥にตอบสนองせず常に開度を保っているという現象を追求している中で、ストライガ個体の ABA 含量が宿主植物よりも高いことを見出した。分析結果からは、宿主から供給される ABA がストライガに蓄積しているのか、ストライガ自身が高い ABA 合成能力を有するのかは判断できなかった。また、後者の場合、ABA がストライガから宿主に供給されるのであれば、宿主の ABA 代謝不活性化能力がストライガ寄生に対する耐性と関係があると期待された。これらを検証するために以下の実験を行った。

#### 3-2-1 ストライガ種子に含まれる ABA

ストライガの種子発芽に伴う ABA 量の変化を測定した。ストライガの乾燥種子を φ90 mm のろ紙上に播種し、湿潤条件下 30°C 暗所で 7 日間インキュベート（コンディショニング処理）した。その後、GR24 処理によってストライガ種子の発芽を誘導した。GR24 処理 3~24 時間後まで種子発芽の様子を観察した。ストライガの乾燥種子、コンディショニング中の種子および GR24 処理後の種子を凍結粉碎し、そのメタノール抽出物を調製した。またコンディショニング処理を行ったろ紙及び種子表面の洗浄液を回収し、液-液抽出により酢酸エチル抽出物を調製した。それぞれの抽出物に含まれる ABA 量を LC-MS/MS を用いて定量した。

#### 3-2-2 ストライガ独立培養個体に含まれる ABA

ストライガを栄養培地で生育させた個体（独立培養個体）を作出し、栄養成長期のストライガの ABA 生合成能について検証した。表面を塩素系洗剤で滅菌したストライガの乾燥種子に対して、無菌的にコンディショニングおよび発芽処理を行った。発芽種子をスクロースが添加された栄養培地へ移植し、宿主に依存しないストライガ個体（独立培養個体）を作出した。培地を取り除いた独立培養個体を明所下に静置することで、独立培養個体の乾燥負荷試験を行った。また一部の独立培養個体はβカロテンの生合成阻害剤であるフルリドンを混合した培地で7日間生育させた。それぞれの独立培養個体のメタノール抽出液に含まれる ABA を LC-MS/MS を用いて定量した。

#### 3-2-3 ストライガから宿主への ABA の輸送

ライゾトロン上のソルガムの根系に対して 3-1-2 のようにストライガ種子を接種し、ストライガの寄生個体を生育させた。接種後 31 日目にストライガとソルガムの根系をそれぞれ回収し、メタノール抽出物に含まれる ABA およびその代謝物であるファゼイン酸 (PA) を LC-MS/MS によって分析した。ストライガから宿主への結合部位を介した ABA の輸送について検証するため、<sup>13</sup>C ラベル化培養根を用いたトレーサー実験を行った。ストライガの独立培養個体の根端をスクロースを含む液体培地へ移植し、根組織培養系（培養根）を確立した。<sup>13</sup>C<sub>12</sub> スクロースを含む液体培地で培養することで、内生化合物がすべて <sup>13</sup>C でラベルされた培養根（<sup>13</sup>C-培養根）を作出した。<sup>13</sup>C-培養根の吸器形成を化学的に誘導し、ライゾトロン上で生育させたソルガムの根系へ寄生させた。寄生確立を確認した後にソルガムの根系を回収し、そのメタノール抽出物中に含まれる <sup>13</sup>C<sub>15</sub>-ABA を LC-MS/MS によって分析した。

### 3 - 3 ストライガの生産するストライガ種子発芽刺激物質

3-2-2 のように作成したストライガ独立個体の酢酸エチル抽出物に、ストライガ種子に対する発芽刺激活性を見出した。ストライガが SL 生産能を有するかどうかは明らかにされていない一方、植物が分泌するストライガの発芽刺激物質は SL 以外には知られていない。そこで、ストライガが生産する発芽刺激活性物質の化学的知見を得ることとした。

#### 3-3-1 ストライガ幼苗の発芽刺激活性

無菌条件下でコンディショニングしたストライガ種子をエチレンガスで発芽誘導した。発芽種子を 1/2 MS 固形培地に移し、1 週間おきに新たな 1/2 MS 固形培地に植え継いだ。3 週齢からは明所に移し替えた。4 週齢の個体を材料に、酢酸エチル抽出物を調製し発芽刺激活性を測定した。

### 3-3-2 ストライガ幼苗における SL 生合成遺伝子の発現量解析

3-3-1 のように作出した 2~4 週齢のストライガ幼苗から Total RNA を抽出し、一本鎖 cDNA を合成した。qRT-PCR により、SL 生合成候補遺伝子 *ShD27*, *ShCCD7*, *ShCCD8*, *ShMAX1* の相対発現量を比較した。

### 3-3-3 宿主に寄生したストライガ個体に含まれる発芽刺激活性物質の精製

ストライガ幼苗を成分検索の材料として十分量供給することは困難である。一方、寄生した個体では宿主から供給される SL が発芽刺激活性物質精製の妨げとなる。そこで、SL 生合成能を欠失したイネ *d* 変異体 (*d10* および *d17*) を宿主として、ライゾトロンあるいはスーダンでポット栽培して得たストライガ個体を材料に、発芽刺激活性に基づいて、溶媒分画、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC により活性物質を精製した。

## 4. 研究成果

### 4-1 世界のイネコアコレクションにおけるストライガ感受性の多様性

イネの根滲出物を与えた際のストライガ種子の発芽率およびイネ根系に接種したストライガの寄生率は、それぞれ、イネ品種間で 0.04~81.0% および 1.3~60.7% と大きな差異が認められた。すなわち、イネのストライガに対するプレアタッチメント抵抗性およびポストアタッチメント抵抗性には幅広い品種間差が存在することから、稲作に対するストライガの脅威は品種によって異なることが明らかになった。両抵抗性を組み合わせて図 1 に示した。WRC69 品種は、両抵抗性がともに高い 27 品種 (グループ I)、これらと同等のポストアタッチメント抵抗性を示すがプレアタッチメント抵抗性が中程度の 12 品種 (グループ II)、プレアタッチメント抵抗性が低い 4 品種 (グループ III)、ポストアタッチメント抵抗性が低い 13 品種 (グループ IV)、両抵抗性が低い 13 品種 (グループ V) に分類できた。グループ I は Anjana Dhan, ARC 11094, Badari Dhan, Bei Khe, Bleiyo, Chin Galay, Dahonggu, Davao 1, Deng Pao Zhai, IR 58, Jaguary, Jinguoyin, Keiboba, Kemasin, Khao Nam Jen, Khao Nok, Ma sho, Naba, Nipponbare, Padi Kuning, Puluik Arang, Rambhog, Ratul, Shoni, Shuusoushu, Tadukan, Vandaran からなり、グループ II には Asu, Kaluheenati, Khau Tan Chiem, Milyang 23, Nepal 555, Phulba, Pinulupot 1, Qingyu, Radin Goi Sesat, Ryou Suisan Koumai, Surjamukhi, Tupa 121-3 が含まれた。これらの品種はストライガ抵抗性品種であると期待される。

輸入手続きが困難をきわめたため実施には至らなかったが、抵抗性候補イネ品種について、ストライガ被害が広がるサブサハラアフリカ地域における環境適応性や収量性の評価が待たれる。また、WRC に含まれる品種は 67 グループのいずれかを代表する品種であることから、対象グループの調査を進めることで、より抵抗性が高いイネ品種を選抜することが期待される。

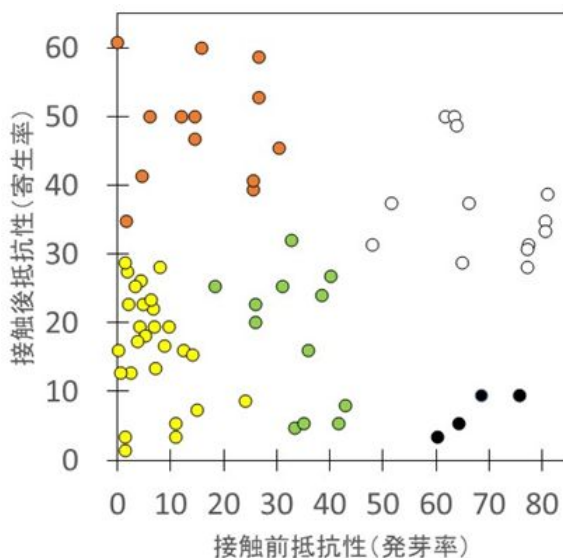


図1. 世界のイネコアコレクション 69 品種のプレアタッチメント抵抗性およびポストアタッチメント抵抗性  
黄色 グループ I、緑色 グループ II、黒色 グループ III、  
橙色 グループ IV、白色 グループ V

### 4-2 ストライガによる ABA の生産と分泌

ストライガの乾燥種子および湿潤条件下、30°C 暗所で 7 日間インキュベート (コンディショニング処理) した種子で ABA の蓄積量に変化はなかった。一方で GR24 処理によって発芽を誘導すると ABA 量が約 10 倍まで増加した。さらに種子発芽を行ったる紙の洗浄液から種子抽出液の約 4 倍量の ABA が検出された。またストライガ種子における ABA 蓄積量及び分泌量は幼根の出現に伴って増加した。以上の結果から、ストライガの種子は発芽に伴い ABA を生産し分泌することが明らかになった (図 2)。栄養成長期のストライガの ABA 生合成能についても検証を行った。検証に際してスクロースを含む栄養培地を用いることで宿主に依存しないストライガ独立培養個体を作成した。独立培養個体の抽出液を分析したところ、宿主植物に寄生したストライガ個体に匹敵する量の ABA が検出された。独立培養個体から培地を取り除き乾燥ストレスを



与えた結果、ABA 蓄積量の増加が認められた（図 3）。ABA の前駆物質である  $\beta$ -カロテンの生合成を阻害するフルリドンを含む培地で生育した独立培養個体では ABA 蓄積量が著しく低下した。以上の結果からストライガは宿主に依存せず内生の  $\beta$ -カロテンから ABA を生産すること、乾燥にตอบสนองし ABA 生合成を活性化させることが明らかになった。

ライゾトロン上のソルガムの根系に含まれる ABA 量はストライガの寄生によって増加した。またストライガの根系はソルガムと比較して約 100 倍高い濃度の ABA を蓄積していた。これらの結果からストライガの生産する ABA が根の結合部を介して宿主へ移動していることが示唆された。そこでストライガの生産する ABA の宿主へ移動について検証を行った。 $^{13}\text{C}$ -培養根の抽出物から ABA と保持時間が一致するピークが検出され、質量フラグメントパターンからこの信号が  $^{13}\text{C}_{15}$ -ABA に由来する事が示唆された。これによりストライガの培養根に含まれる ABA をラベル化に成功した。しかし  $^{13}\text{C}$ -培養根を寄生させたソルガムからは  $^{13}\text{C}_{15}$ -ABA に由来する信号を検出することはできなかった。

以上の結果から、ストライガは自身で ABA を生産していることが明らかになった。またストライガの寄生は宿主体内の ABA 量を増加させたことから、ABA が宿主の生長阻害因子として機能している可能性が示唆された。ストライガ幼苗が ABA を分泌していることを見出したのは最終年度であり、それまでの実験でストライガから宿主への ABA の輸送を確認できなかったため、当初計画していた、宿主の抵抗性と ABA 代謝不活性化能力との関係を調べるまでに研究を展開できなかった。

#### 4 - 3 ストライガが生産する種子発芽刺激物質

ストライガ幼苗および独立培養個体抽出物に発芽刺激活性が認められた。また、ライゾトロンで寄生させた場合、野生型イネ、*d10*、*d17* いずれを宿主としても寄生したストライガ個体の抽出液にも発芽刺激活性が認められた。*d10*、*d17* を宿主とした場合、宿主にも活性が認められたが、それぞれ、寄生したストライガの方が高い活性を示した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗精製した結果、いずれの植物材料から調製した抽出物でも、主な活性は SL 溶出画分に回収された。さらに SL 画分を HPLC で分離し溶出液の活性を評価した結果、野生型イネに含まれる主な発芽刺激活性はオロバンコール溶出画分とそれよりも高極性の画分に溶出された。変異体イネでは、オロバンコール溶出画分の活性が著しく低下したが、もう一方の画分には顕著な活性が認められた。この高極性画分に溶出される活性成分を追求するため、スーダンで *d17* を宿主としてポット栽培を行いストライガ個体を得た。その抽出物を同様に分画した結果、栽培したストライガ個体でも同様に高極性画分に活性が検出された。この画分を LC-MS 分析したが、有意な分子量情報は得られなかった。

本研究により、ストライガが独自で生産し、かつ、宿主にも含まれていると考えられる発芽刺激物質の存在が示唆された。SL 生合成遺伝子の発現解析からは、活性物質が SL か否かを判断できる明確な知見は得られなかった。しかし、宿主由来の発芽刺激物質の影響を受けることなく精製を進められることから、SL 欠損変異体イネを宿主として得られるストライガ個体を材料として、ストライガが生産するストライガ種子発芽刺激物質の探索が可能であることが示された。

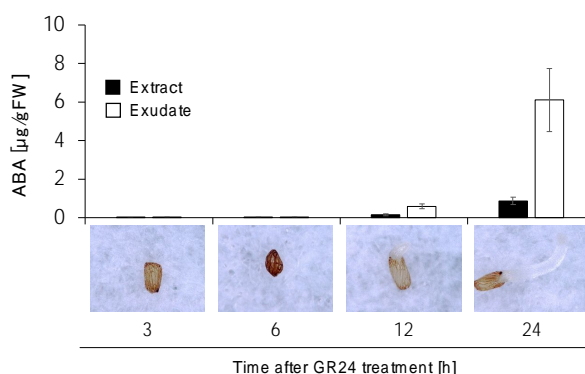


図 2 . 発芽に伴うストライガ種子の ABA 蓄積および分泌

我が国にとって重要な作物であるイネに対するストライガの脅威を検証するという目的で本研究を企図した。ストライガ抵抗性に大きな品種間差が認められたことは、抵抗性イネ品種の選抜あるいは育種が可能であることを意味している。抵抗性に ABA 代謝不活性化能力が関与しているかどうかは明らかにできなかったが、ストライガの幼苗から ABA が分泌されるという事実は、ストライガが地上に現れる前から宿主植物に影響を与える、bewitching effects を説明できる知見として興味深い発見である。刺激物質にตอบสนองして発芽するという特性を考えると、ストライガが自身の種子発芽を刺激する活性物質を生産することは驚きであった。SL 欠損変異体イネを宿主として得られるストライガ個体を材料として活性成分の追求が可能であることを見出した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Samejima, H., Mustafa A.E.L., Babiker, A.G.T., Sugimoto, Y.: Identification of *Striga hermonthica* resistant upland rice varieties in Sudan and their resistance phenotypes, *Frontiers in Plant Science*, 2016. DOI:10.3389/fpls.2016.00634

Hijiri Fujioka, Hiroaki Samejima, Hideyuki Suzuki, Masaharu Mizutani, Masanori Okamoto, Yukihiro Sugimoto: Aberrant protein phosphatase 2C leads to ABA insensitivity and high transpiration in parasitic *Striga*, *Nature Plants* 5 (3), 258-262, 2019. DOI: 10.1038/s41477-019-0362-7

Hijiri Fujioka, Hiroaki Samejima, Masaharu Mizutani, Masanori Okamoto, Yukihiro Sugimoto: How dose *Striga hermonthica* bewitch its hosts, *Plant Signaling & Behavior*, 2019. DOI: 10.1080/15592324.2019.1605810

〔学会発表〕(計5件)

藤岡聖、井上知恵、鮫島啓彰、水谷正治、杉本幸裕：アブシジン酸に着目した根寄生雑草ストライガの寄生戦略の解析、日本農芸化学会(2017 Mar)

Hijiri Fujioka, Hiroaki Samejima, Tomoe Inoue, Masaharu Mizutani, Yukihiro Sugimoto: Stomatal closure and germination in *Striga hermonthica* are not sensitive to abscisic acid. 14th World Conference on Parasitic Plant, Asilomar, 2017 July

鮫島啓彰、杉本幸裕：コアコレクションとライゾトロン法を用いたイネ品種のストライガ接触後抵抗性の評価、日本作物学会(2018 Mar)

藤岡聖、鮫島啓彰、鈴木秀幸、水谷正治、岡本昌憲、杉本幸裕：根寄生植物ストライガは機能変異を起こしたProtein Phosphatase 2CによってABA非感受性と高蒸散を示す、植物生理学会(2019 Mar)

鮫島啓彰、杉本幸裕：接触前および接触後抵抗性に基づく世界のイネコアコレクションのストライガ抵抗性、日本作物学会(2019 Mar)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ <http://www.edu.kobe-u.ac.jp/ans-phytochem/lab2013/toplab.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山内 靖雄

ローマ字氏名：Yamauchi Yasuo

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院農学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：90283978

(2)研究協力者 なし