

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850071

研究課題名(和文)根寄生雑草ストライガにおける宿主養水分収奪のためのアブシジン酸利用戦略の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of abscisic acid in the root parasitic weeds *Striga hermonthica* in assimilate uptake

研究代表者

上野 琴巳 (Kotomi, Ueno)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：40582028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：根寄生雑草ストライガ(*Striga hermonthica*)の養水分収奪メカニズムにおける植物ホルモン・アブシジン酸(ABA)の機能について解析した。ストライガは一般的な植物とは異なり、発芽と同時にABAを蓄積し始め、生育途中も高濃度を維持し続けていた。またストライガはABA応答性が低く、気孔が常に開口していた。一方で宿主植物はABAに反応して気孔を閉鎖する。以上より、ストライガはABAで間接的に宿主植物の気孔閉鎖を誘導し、蒸散流を自身の方に向けてすることで宿主からの養水分を収奪していると推測された。

研究成果の概要(英文)：A root parasitic weed *Striga hermonthica* is a major biotic constraint on cereal production in Sub-Saharan Africa. The role of a phytohormone abscisic acid (ABA) in the regulation of the parasitic association was investigated using rhizotron method. The concentration of ABA in *S. hermonthica* was significantly higher than that in sorghum. The ABA accumulation was observed after seed germination induced by strigolactone. Moreover, the seed germination was not inhibited by ABA. In *Striga*, stomatal conductance was negligibly changed by ABA application, which was higher compared to sorghum. Conversely, stomatal conductance of sorghum was reduced by *Striga* infection and ABA application. Germinated seeds of *S. hermonthica* exuded higher level of ABA although translocation of ABA to sorghum was limited. These results imply that *S. hermonthica* reduce stomatal conductance of the host plant by accumulated ABA indirectly and increase water and solutes transfer from that host to the parasite.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ストライガ アブシジン酸 根寄生雑草 ストリゴラクトン

1. 研究開始当初の背景

ストライガ (*Striga hermonthica*) は、ソルガムやイネ、トウモロコシなどのイネ科植物の根に寄生する根寄生雑草である。ストライガに寄生された宿主植物では生育が著しく阻害され、穀物の収量が激減することから、アフリカサハラ砂漠地帯では問題視されている雑草である。ストライガの種子は 0.2 mm 程度と砂のように細かく、また一個体あたり十萬粒ほどの種子を生産するため、一度ストライガの侵食を受けた農地からストライガを除去するのは困難である。そのためアフリカの農地では、こまめに引き抜いて取り除いていく他にストライガ駆除の有効的な手段はないとされている。

宿主植物の根に寄生したストライガは、どのように蒸散流を宿主から自身の方へ向けて水だけでなく養分を吸収しているのか。根寄生雑草特有の特徴であり謎でもあるその疑問の解明のために、以前からストライガの生態について調べられてきた。その過程で明らかになってきたのは、植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) が関与している可能性が高いということであった。

ABA は環境ストレス、特に低温や乾燥などのストレスに耐えるため必須とされる植物ホルモンである。乾燥条件下におかれた植物は ABA の作用で気孔を閉じ、蒸散を抑えることで体内の水分が失われないようにする。他にも成長抑制や果実の成熟、種子形成等に ABA は作用しており、通常の植物では内生量が厳密にコントロールされている。したがって乾燥条件下におかれた植物は一時的に内生 ABA 量を高めても、同時に代謝酵素も発現誘導して不活性化を進行させる。また外部から ABA を多量に投与しても次々に代謝されるため、体内に長時間高濃度で蓄積することは殆どない。

しかしながらフィールドにおける実験で、ストライガは宿主植物の約 10 倍量の ABA を蓄積していることが判明した (Inoue et al., 2013)。にも関わらず、ストライガは常に気孔開口度が高く蒸散が激しい。一方で、ストライガの宿主であるソルガムは、ストライガに寄生されると内生 ABA 量が約 2 倍になり、気孔開口度が小さく、蒸散が抑えられていた。つまり一般的な植物では、高濃度に ABA を蓄積されたとき気孔の閉鎖が誘導されて蒸散が抑えられるが、ストライガでは何らかの理由で ABA が機能せず、高濃度で蓄積されても気孔の閉鎖が起こらないということが見えてきた。またその異常な蓄積が、ストライガにとっては寄生関係を成立させるためには重要なファクターであるとも考えられた。

2. 研究の目的

ストライガにおける ABA の役割を明らかに

する。そこで以下の点に注目した。

(1) ストライガはどの時点から ABA を多量に蓄積するのか。

一般的な植物において、発芽前の種子は ABA 蓄積量が多く、吸水すると代謝が進み、発芽時には濃度が低下している。ストライガは吸水だけでなく発芽にストリゴラクトンを必要とするが、他の種子同様に ABA の変動に伴って発芽が誘導されるのか、もしその場合、発芽時には ABA 内生量が低下していることになるが、どの生育ステージから ABA の蓄積が見られるのか。ストライガの種子発芽からの細かい各生育ステージにおける ABA 蓄積量はこれまで確認されていなかった。また圃場である程度成長したストライガの ABA 含量しかこれまでは調べられてこなかった。そこで実験室レベルで ABA 内生量を測定すべく、ライゾトロンを用いた宿主-ストライガ寄生系及び栄養培地を用いたストライガの独立個体系を確立し、各生育ステージにおけるストライガの ABA 含量を測定する。また種子、吸水 (コンディショニング期間)、ストリゴラクトンによる発芽誘導後の ABA 含量も定量する。

(2) 多量に合成した ABA をどのように利用しているのか。

ABA は気孔閉鎖を誘導するホルモンであり、また、ストライガに寄生された宿主植物では ABA 含量が高まっていた。このことから、ストライガで生合成された ABA が物質移動の流れに逆らって宿主の方へ送り込まれている可能性が考えられた。実際に予備実験において重水素で標識された ABA をストライガに投与したところ、わずかながら宿主のソルガムから重水素標識体が検出された。しかし微量であったうえ再現性は確認されていない。そこで再度、ABA がストライガから宿主植物へ移動していることを、重水素標識体を用いて確認する。

(3) ストライガはなぜ ABA を多量に生合成できるのか。

通常の植物であれば、内生量が数十 ng/g FW 程度と一定で、何らかの理由で一時的に増えても代謝が活性化されて蓄積することはない。しかしストライガの場合は生合成に比べて代謝の機能が低い。その理由には ABA 受容体が機能していない、もしくは ABA シグナル伝達やフィードバックが機能していないということが考えられた。しかしストライガにおける ABA 関連の遺伝子は明らかにされていない。そこでまず、一般的な植物と相同性の高い ABA の受容体及びシグナル伝達に關与する転写因子の候補遺伝子、加えて ABA 生合成酵素、代謝酵素を探索する。ABA 受容体はシロイヌナズナの ABA 受容体遺伝子と配列を比較し、ABA 認識部位や立体構造に違いがあるのかを推測する。

3. 研究の方法

(1) ライゾトロン系におけるソルガムとストライガの栽培

ソルガム (*Sorghum bicolor*) の品種 Abu70 を種子発芽後 4-5 日水耕栽培し、プラスチックシャーレにロックウールを詰めて作成したライゾトロンに移植した。1-2 日後、合成ストリゴラクトンである GR24 で発芽させたストライガ種子を接種した。植物体は 28、16 時間明期の条件下で、40% Long-Ashton 水耕液を用いて生育させた。

(2) ストライガ種子の発芽

ストライガ種子の表面をエタノールで殺菌し、滅菌水でよく洗浄した後エップンドルフチューブ内で少量の水に沈め、28、暗所で培養した(コンディショニング)。8 日後、10 μM の GR24 を添加し、暗所、28 で培養し、種子を発芽させた。

ABA の定量においては、コンディショニング 0 日目と 5 日目、8 日目に GR24 処理した後 1 日置いたものと GR24 処理せず 1 日置いたものをサンプルとした。

(3) ABA の抽出

凍結乾燥もしくは凍結後粉碎した植物体を 80%メタノールに一晩以上浸漬した。LC-MS 分析による定量のため、内部標準である d_6 -ABA を抽出時に添加した (ABA 移動実験を除く)。抽出溶液を濃縮し、水溶液残渣を飽和食塩水で希釈後、水酸化カリウムでアルカリ性にし、ヘキサンで 3 回抽出して低極性物質を除去した。続いて水層に塩酸を加えて酸性にした後、酢酸エチルで 3 回抽出した。酢酸エチル層を減圧乾固し、残渣を 10%メタノールに懸濁し、15,000 rpm で 15 分遠心した。上清を 10%メタノールで平衡化した Oasis HLB カートリッジカラム (30 mg, 1 cc) にアプライした。カラムを 10%メタノール 1 mL で洗浄した後、0.1%ギ酸を含む 80%メタノール 1 mL で溶出した。溶出液を濃縮乾固し、メタノール 150 μL に溶解して 0.2 μm の PTFE フィルターで濾過した。

(4) ABA の定量

以下の条件で LC-MS 分析を行った。カラム: YMC-UltraHT Hydrosphere C₁₈, 100 \times 20 mm, 30 ; 移動相: 30% (0-2 分), 30%から 60%への直線グラジエント (2-12 分), 100% (12-16 分) メタノール (0.1%のギ酸を含む); 流速: 0.2 mL/min; 検出波長: 254 nm; 検出 MS 条件:ESI(ネガティブモード)MRM m/z 263 > 153, 269 > 159, 279 > 139。(3) で調製したサンプルを 5 μL インジェクションし、内部標準法に基づいて ABA を定量した。

(5) ABA の移動確認

ライゾトロンでソルガムに寄生させ生育させたストライガに 50 $\mu\text{g/mL}$ もしくは 500

$\mu\text{g/mL}$ d_6 -ABA 溶液 (0.5%エタノール) を塗布した。4, 8 及び 12 時間後にソルガムの地上部及び根を回収し、ABA を抽出後、LC-MS 分析を行った。

(6) 気孔コンダクタンスの測定

乾燥処理もしくは ABA 処理後のソルガム及びストライガの気孔コンダクタンスはポロメータ (AP4, Delta-T Devices) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 各生育ステージにおけるストライガの ABA 蓄積量

ストライガの種子及びコンディショニング中の種子において、ABA 含量は 100 ng/g FW 前後であり、吸水による ABA の減少は見られなかった。しかし GR24 を処理すると 700 ng/g FW まで ABA の蓄積量が増加した。この増加は、GR24 無処理区では観察されなかった。寄生成立後のストライガはそのまま高濃度の ABA 量を維持し、その量は寄生開始 1 週目から 4 週目まで変化することがなかった。ソルガムに寄生していないストライガの独立個体でも同程度の ABA を蓄積していた。また発芽直後のストライガ種子は、蓄積量の約 4 倍量の ABA を外部に分泌していた。これらの結果から、一般的な植物とは異なり、ストライガでは種子の吸水に伴い ABA が減少しないこと、逆に発芽後から高濃度の ABA を蓄積する植物であることが判明した。

(2) ストライガの ABA 感受性

コンディショニングしたストライガ種子に GR24 を処理するとともに外部から 30 μM の ABA を投与しても発芽は阻害されなかった。それに対し、同じく根寄生雑草であるヤセウツボ (*Orobanche minor*) 種子では、濃度依存的に ABA で発芽が抑制された。またライゾトロンでソルガムに寄生しているストライガに内生量を超える ABA を噴霧しても、蒸散量を示す気孔コンダクタンスの低下は起こらなかった。これらの結果は、ストライガの ABA 感受性が他の植物比べて格段に低いことを示している。

(3) ストライガの EST 解析

ストライガの EST 解析を行ったところ、主要な ABA 生合成酵素と代謝酵素の候補遺伝子をいくつか同定することができた。一方で、シグナル伝達因子では限られた因子しか同定できず、受容体の候補遺伝子は不明であった。

(4) ストライガから宿主への ABA の移動

d_6 -ABA をストライガに塗布してから 4 時間後には、ソルガムの地上部で d_6 -ABA が検出された。しかし処理個体全てで d_6 -ABA の移動が観察されたわけではなく、また検出量も極微量であったことから、ストライガから ABA が

移動している確証は得られなかった。

(5) ABA 及びストライガ接種によるソルガムの生育障害

ストライガを接種されたソルガムでは、接種後2日目から気孔コンダクタンスが低下し、接種後8日では有意に背丈が低下していた。このような生育抑制は、ソルガムを1 μM のABAを含む水耕液で栽培した時にも観察された。

(6) 考察

ストライガが宿主から養水分を収奪するメカニズムに関しては、以下のように考えられる。

ストライガは何らかの理由によりABAに対する応答が著しく低く、容易に蓄積することができる。ABA非感受性変異体がABAを高濃度で蓄積するという報告は未だないことから、単純にABAのシグナル伝達機構の一部が機能しなくなったというのではなく、ストライガは生存戦略のために意図的にABAを蓄積する機構を獲得したのかもしれない。複数の要因が重なってABAの蓄積が可能になったと仮定すると、その原因究明には更なる遺伝学的研究が必要と思われる。

ストライガに蓄積されたABAは、接合部を介して宿主の根を刺激する。直接ABAを宿主へ送り込まなくても、根の一部がABAを受容すると、その情報が地上部へ伝達される。土壤の乾燥による気孔の閉鎖は、根におけるABAの生合成やABAの移動に関与していないという報告(Holbrook et al., 2002)からも、ABAによる根の刺激が地上部の気孔コンダクタンスを低下させると考えても大きな矛盾はない。

宿主植物において気孔が閉鎖されると同時に、ストライガでは気孔の閉鎖が起こらないため、必然的に水分及び養分はストライガ側へ流れていく。

ストライガがABAを生存戦略の武器として利用するように進化したメカニズムは依然謎のままではあるが、本研究においてストライガがABAを間接的に用いて養水分の流れをコントロールし、寄生関係を成立させていることを明らかにすることができた。またこれまでの研究の多くはフィールドで行われていたが、この研究において実験室レベルで作成したライゾトロンの寄生系においてもフィールドと同様の結果が得られることが判明した。日本国内に生育していないストライガの研究は海外に限定されていたが、今後は適切な管理条件下のもと、日本においても積極的にストライガの研究が行われていくであろうことが期待できる。

<引用文献>

Inoue, T., Yamauchi, Y., Eltayeb, A.H., Samejima, H., Babiker, A.G.T., Sugimoto, Y. (2013) Gas exchange of root hemi-parasite *Striga hermonthica* and its host *Sorghum bicolor* under short-term soil water stress. *Biologia Plantarum* **53**, 773-777.

Holbrook, N.M., Shashidhar, V.R., James R.A., Munns, R. (2002) Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1503-1514.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3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先着の解析、日本農芸化学会2017年度大会、2017年3月19日、京都女子大学(京都市左京区)

井上知恵、鮫島啓彰、上野琴巳、Abdel Gabar Babiker、杉本幸裕、根寄生雑草ストライガの宿主からの同化産物の収奪にはアブシジン酸に対する気孔応答の異常が関与している、植物化学調節学会第50回大会、2015年10月23~25日、東京大学弥生講堂(東京都文京区)

藤岡 聖、井上知恵、鮫島啓彰、上野琴巳、水谷正治、杉本幸裕、アブシジン酸に対するストライガの発芽と気孔の応答、植物化学調節学会第50回大会、2015年10月23~25日、東京大学弥生講堂(東京都文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 琴巳 (UENO, Kotomi)
鳥取大学・農学部・講師
研究者番号：40582028

(2) 研究協力者

杉本 幸裕 (SUGIMOTO, Yukihiro)
神戸大学大学院・農学研究科・教授
研究者番号：10243411