

地球規模課題対応国際科学技術協力

(生物資源研究分野「生物資源の持続可能な生産・利用に資する研究」領域)

根寄生雑草克服によるスーダン乾燥地農業開発

(スーダン共和国)

平成 25 年度実施報告書

代表者:杉本 幸裕

国立大学法人神戸大学大学院農学研究科 教授

<平成 21 度採択>

1. プロジェクト全体の実施概要

- ・プロジェクトのねらい:根寄生雑草ストライガは、アフリカにおけるソルガムやミレットなどの主要作物の生産を阻害する最大の生物的要因である。本プロジェクトは、被害が最も大きい国の一つであるスーダンでストライガの防除研究に長年取り組んでいるスーダン科学技術大学(SUST)の研究者と協力して、新たな防除技術を開発するとともに伝統的知識・技術と融合することにより、有効なストライガ防除法の確立を目指す。
- ・プロジェクトの概要:化学物質に依存するストライガの発芽の特殊性に着目して、発芽を制御する薬剤や微生物を探索する。また、宿主作物とは異なるストライガ特異的な代謝に着目して、選択的な除草効果を有する薬剤を探索する。これらの新規技術の受容性や圃場での有効性を検討しつつ、ストライガに抵抗性を示す作物品種の選抜、適切な水分管理の検討、伝統的なストライガ防除法の体系化およびその改良等を通して、総合的なストライガ防除法の確立を目指す。併せて、現地のネットワークを活かして有効な防除法を普及する方策の確立を目指す。
- ・進捗状況:平成 25 年度には延べ 17 人の日本人研究者が 357 日間(うち 1 人 20 日間は科学研究費補助金)スーダンに滞在し、SUST の圃場、実験室でストライガ防除に関連した生理生化学、天然物化学および作物学実験を行うとともにスーダン側事業参加者に技術を伝達した。また、ガダーレフ州の農民学校(FFS)実施地域において栽培学実験および農業経営経済学的な視点からの調査を実施した。スーダンからは 1 人の技術職員を 90 日間招聘し、知識・技術の移転を図った。スーダン側ではローカルコンポーネントにより新たな建物が SUST 敷地内に建設された。内部が整備された後には分子生物学関連機材が従来のストライガ実験室から移転する予定である。
- ・プロジェクト成果:合成発芽刺激物質 T-010 製剤がストライガ防除に有効であることを確認した。萎凋したストライガ個体から単離した *Fusarium brachygibbosum* がストライガ防除に有効であることを確認した。ストライガの宿主からの養水分収奪に両者の気孔開度の違いが重要であることを見出した。ライゾトロン法により選抜したイネ品種のストライガ抵抗性を、栽培試験でも確認した。ストライガの発芽時に特異的に用いられる炭素源をプランテオースと同定した。ガダーレフ州のデモンストレーションファームで集水技術の有効性が検証された。中間レビュー時の要望に応じてスーダン人研究者に国際学会参加の機会を提供し、北米農村社会学会で農業経営経済学的調査の成果を発表した。
- ・今後の見通しについて:一部の利用率の低い装置について有効活用を図るべく、スーダン側研究者の努力を促すとともに日本側による支援を強化した。具体的には、日本に招聘した技術職員に GLC と HPLC の研修を行い、帰国直後および 3 か月後と 6 か月後に日本側研究者がスーダンを訪問し、現地の装置を使ってフォローアップを行った。また、ボールミルが微量サンプルの破碎に有効であることを体験させるとともに、DNA 抽出を経験させ、分子生物学関連機材の利用法を伝授した。これらにより、機材を効率的に活用する基盤ができた。FFS はガダーレフ州の農業研究者や普及員の協力により順調に運営されている。一連の活動を持続させるためにスーダン側で予算を確保することが重要であるとの認識を共有している。

2. 研究グループ別の実施内容

①研究のねらい

根寄生雑草ストライガはスーダンにおける農業生産を阻害する最大の生物的要因である。化学物質に依存するストライガの発芽の特殊性を利用して、発芽を制御する薬剤や微生物を探索する。また、宿主作物とは異なる

ストライガ特異的な代謝に着目して、選択的な除草効果を有する薬剤を探索する。得られた知見の有効性を検証するべく、スーダンで実証試験を行う。さらに、ストライガに抵抗性を示すイネやソルガムの品種を選抜するとともに、養水分収奪機構の理解に基づく適正な栽培管理および発芽刺激物質生産性に基づく輪作体系の改良を通して、ストライガの被害を容認できる程度に抑える栽培学的方法を確立する。技術の受容性や農業経営のあり方をFFSを通して調査し、ストライガの被害を軽減できる農業の実践につなげる。これらを推進するために個別課題1～8を実施している。

課題1 新規自殺発芽誘導物質の開発

課題2 ストライガ防除微生物の探索

課題3 選択的除草剤の探索

課題4 宿主養水分収奪機構の解析

課題5 イネ・ソルガムの環境適応性の検討とストライガ抵抗性評価

課題6 抵抗性／耐性作物の選抜と新規輪作体系の考案

課題7 新技術受容性と生産者・消費者の嗜好の調査

課題8 ストライガ対処法の共有に向けた農民学校の実施

②研究実施方法

課題1 天然より新規発芽誘導物質を探索し、単離構造決定を進めている。天然物をリードとして、構造を簡略化した発芽誘導物質をデザイン・合成し、活性を評価している。顕著な活性を有する化合物を製剤化しポット試験・圃場試験を実施し有効性を確認している。スーダン側技術職員を日本に招聘して、GLC と HPLC をはじめとするクロマトグラフィーの原理と基本的な操作法を伝達し、同職員の帰国直後および3か月後と6か月後にストライガ実験室を訪ねフォローアップ研修を実施することで、スーダンでも発芽刺激物質探索が実施できるよう支援している。

課題2 萎凋したストライガ個体から単離した *Fusarium* 属菌のうち、室内試験でストライガ発芽抑制効を確認した菌株を用いてポット試験を行い、菌によるストライガ発芽抑制効果を野外条件下でも確認した。日本側の協力によりDNA分析を行い、最も有効な菌株を種のレベルまで同定した。原因物質の解明を目指し、微生物を培養した培地からの候補物質の抽出、単離、精製方法の検討を開始した。コンポストからも細菌を単離し、ストライガ防除とソルガム生育促進効果を持つ菌株の同定を目指している。

課題3 発芽時に特異的な代謝産物を標的とした寄生雑草の防除法の開発を目指し、エネルギー源として代謝される特徴的な三糖をプランテオースと同定した。この糖の代謝経路を解析し、ノジリマイシンが阻害する酵素反応の同定を行った。また、EST ライブラリーの情報を用いて、発芽時に発現している糖加水分解酵素遺伝子について、クローニングおよび当該遺伝子の大腸菌での発現を行なうことでその機能を解析し、この酵素が発芽時に細胞壁に含まれる多糖の分解に関わるβ-マンノシダーゼであることを明らかにした。

課題4 ポット試験を行い、異なる土壤水分条件で栽培したストライガとソルガムの上位完全展開葉の光化学系IIの活性と光合成速度、呼吸速度、蒸散速度、気孔コンダクタンス、気孔開度・密度、内生アブシジン酸(ABA)濃度を調べた。また、ABAを葉面散布し、ソルガムとストライガの外生ABAに対する気孔反応の差異を調査した。ストライガのインビトロ独立個体のABA濃度が高いことを見出し、寄生戦略におけるABAの重要性の検証を始めた。ソルガムとストライガの間の同化産物の転流を¹³CO₂を使って調べている。また、スーダン側でも植物の生理状態を把握できるよう、測定装置の使い方を伝授した。

課題5 ライトロン法を用いた1次スクリーニングにおいて高いストライガ抵抗性を示した陸稲品種について、

スーダンの栽培環境下での生育およびストライガ抵抗性を調査するためのポットおよび圃場試験を行った。ポット試験では土壌中のストライガ種子密度を増加し、より厳しい条件でストライガ抵抗性を評価した。また由来の異なるストライガ種子を用いて陸稲品種のストライガ抵抗性の安定性を調査した。圃場試験では品種、施肥量、灌水頻度を組み合わせたストライガ対策を検討した。対象を世界のイネコアコレクションに広げたさらなるスクリーニングが進行中である。ストライガ抵抗性の新たな遺伝資源としてソルガム野生種を収集した。

課題6 大学内圃場での輪作試験において、ゴマの前作が後作のソルガム栽培時にストライガ抑制効果を持つことを確認した。今年度から、ガダーレフの農家圃場において、ゴマ-ソルガムの輪作試験を開始した。ソルガム、ササゲ、イネ、コムギ、ゴマ、ワタの植物体の乾燥物(残渣)がストライガの発芽に及ぼす影響についてサンドイッチ法により調査している。ササゲについては、残渣がストライガ発芽を促進する2品種を選抜し、両品種がスーダンでも生育可能であることも圃場試験で確認した。ポットおよび圃場を用いてササゲとソルガムを混作し、ストライガ抑制効果を観察している。

課題7 FFS および展示圃場が実施されているガダーレフ州内において、ソルガムの生産を行っている男性及び女性の小規模農業者を対象に新技術の導入に関するアンケート調査および聞き取り調査を行い、その結果の分析を行った。

課題8 ガダーレフ州において、熱心な担当普及員がいる5つの地域内で、ストライガ被害が発生していて、農民の目に触れやすい道路沿いの圃場を選択し、農民学校および展示圃場を運営した。FFSの開催場所であるガダーレフ州の農業省普及局、農民連盟、農業研究機構(Agricultural Research Corporation、ARC)支所等の関係機関に対する聞き取り調査を行い、小規模農業者が新技術を習得するための条件整備に関する意見交換を継続した。とくに、新技術の受容力が高いと考えられる女性農業者の経営環境の実態および新規技術の受容のための条件の把握を行うとともに、FFSにおけるカリキュラムのあり方に関する意見交換を行った。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

課題1 構造を簡略化しつつも高い発芽刺激活性を有する類縁体の合成を進めている。ポット試験の結果を受け、さらなる評価を行うために合成発芽刺激物質を実験室レベルとしては多量に合成し製剤化するなど、概ね当初計画通りに進捗している。ヒマワリの根分泌物から新規な発芽刺激物質を単離し、構造を推定するに至った。現在、推定構造の妥当性の検証を進めている。

課題2 ストライガの発芽を抑制する菌を単離した。培養方法および土壌への混入方法を確立し、土壌への微生物混入によるストライガ発芽抑制の有用性についてポット試験で検証をした。日本側の支援を受けてDNAの塩基配列に基づいて上述の菌の同定に成功した。これを契機に分子生物学関連技術の修得も進んでいる。新たな有用微生物の探索のため、堆肥から22株の細菌を単離し、調査を進めている。微生物の生産する活性物質の探索が遅れている以外は、計画に沿って進捗している。活性物質の探索のため、培地からの候補物質の抽出、単離、精製方法を検討している。

課題3 発芽時にエネルギー源として代謝される寄生雑草に特徴的な三糖をプランテオースと決定した。その代謝経路中でノジリマイシンが阻害する酵素反応を明らかにした。この酵素反応が明らかになったことで、その阻害剤の探索を進めることが可能となった。ESTライブラリーの情報に基づき、発芽中に発現している糖加水分解酵素遺伝子の全長cDNAをクローニングし大腸菌で発現させた結果、この酵素が発芽時に細胞壁に含まれる多糖を分解する β -マンノシダーゼであることを明らかにした。このように代謝阻害剤探索の

基盤が着々と構築されている。

課題4 異なる土壌水分条件下でストライガとソルガムの呼吸速度、光合成速度、蒸散速度、気孔コンダクタンス、気孔開度を測定し、ストライガはソルガムに比べて土壌乾燥条件および外生 ABA に対して気孔が閉鎖しにくく、蒸散速度を高く維持していることを確認した。さらに、土壌乾燥条件下では宿主ソルガムの光合成速度が低下したにもかかわらず、宿主ソルガムからストライガへの同化産物の転流は低下しなかった。このことから、土壌乾燥条件下での深刻なストライガによる被害を軽減させるために、水分管理による防除が合理的であることの裏付けを得た。計画に準じてストライガ防除に有効な水分条件の検討を進める。

課題5 ライトロン、ポット、圃場のいずれにおいても安定したストライガ抵抗性を示すイネ品種を複数確認し、その中から、スーダンでの陸稲栽培で 3 t ha^{-1} 以上の収量を得られる多収性品種を見出すなど、概ね、当初の計画通り進捗している。本年度は、選抜した品種について、由来の異なるストライガや土壌中の種子密度に対する抵抗性の安定性について知見を得た。肥培管理を組み合わせた総合的なストライガ防除方法の検討を開始した。スーダン東部でソルガム野生種 90 系統を採取した。

課題6 ライトロン法、サンドイッチ法、水耕栽培法といったインビトロでの評価技術を習得し、ストライガの寄生成立を抑制するゴマ品種、植物体乾燥粉末が高いストライガ発芽活性を持つソルガム品種やササゲ品種の選抜が終了した。スーダンでの輪作に組み入れられる可能性があるミレットやコムギについては、ポット試験でストライガへの感受性の評価を継続している。大学内の試験圃場での輪作試験で、ヒマワリおよびゴマ栽培によるストライガ発芽抑制効果の高さを確認した。本年度は、ガダーレフ州の農家圃場でのゴマソルガム輪作の実証試験を開始した。両作物とも順調に生育し、最終年度にソルガム連作区とゴマソルガム輪作区を比較する準備が整った。概ね計画通りに進行しており、選抜した作物・品種のストライガ発芽抑制効果の再現性を確認し、最終年度には新規輪作体系の公開を目指す。

課題7 FFS を実施しているガダーレフ州において、男性及び女性の小規模農業者を対象としたアンケート調査および聞き取り調査の結果から、とくに女性農業者における新技術導入の可能生と受容性が高いことが明らかとなった。ただし、小規模農家がストライガの発生要因（大規模な家畜の給餌のための圃場間移動やトラクター作業によるストライガ種子の伝播、除草作業の粗放化等）に関する情報や知識を習得しても、その要因を取り除くために発生する機会費用 Opportunity Cost（家畜商への収穫後のソルガムの茎葉の販売中止、トラクターロータリーの泥落とし作業、除草作業強化のための農外労働の縮小、等）が高いことが、発生要因の除去を困難にしていることも明らかとなった。

課題8 FFS の運営およびカリキュラムに関して、ガダーレフ州の関係機関（農業省普及局、農民連盟、ARC）と意見を交換を行い、安定生産につながる技術の受容促進に向けてのカリキュラムの設計に関する検討を行った。普及員は展示圃場を利用して、播種技術と除草技術に関する FFS を開催した。事業の持続性についての意識が高まり、本年度もスーダン人研究者が FFS 運営に関わる助成金をスーダン政府から獲得し、全額交付を受けた点でも順調に進捗している。加えて、本年度は農民学校に理解を示した 2 つの銀行（Bank of Sudan および Sudanese Agricultural Bank）からも助成金を獲得した。

④カウンターパートへの技術移転の状況（日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む）

日本側からスーダン側に設備、消耗品とともに導入されたライトロン法は多くの研究者に取り入れられスーダン側の研究の様相を一変させた。スーダン側の要望に応じて、日本側技術職員が現地で指導したことにより、スーダン側技術職員や学生の技術が大いに向上した。ライトロンの活用により、従来、ポット試験により出芽したストライガ個体を計数することが中心であった宿主植物のストライガ感受性に関する評価が、寄生初期の根系

での相互作用の観察に基づくようになり、さらなる理解を目指して細胞構造学的な解析へと発展しつつある。また、現地および日本での研修を通して、分子生物学的手法の基礎がスーダン側研究者に伝授された。光合成蒸散測定装置、ポロメーター、葉面積計等が導入されたことにより、ストライガに寄生された宿主植物およびストライガの生理生態学的解析も進められている。日本から移転された無菌操作技術により、スーダンでストライガのカルスや独立個体の作成が可能になった。これらの材料から代謝物や mRNA が抽出されメタボローム解析や EST 解析に用いられるなど、日本側研究者による利用も加速している。技術や手法だけでなく、現地で学術講演を行うことで、ストライガ防除に関する体系的な知識の共有も進められている。遅れ気味であった GLC と HPLC の利用促進にも注力し、平成 25 年度には JICA 研修コースに参加した技術職員に取り扱いを指導した。さらに、帰国直後および 3 か月と 6 か月後に日本人研究者が訪問し、ストライガ実験室でフォローアップ研修を実施した。

ガダーレフ州政府および ARC ガダーレフ支所との協力体制により、日本人研究者が常駐していないガダーレフ州に設置された展示圃場での栽培学的調査および FFS が円滑に進められている。展示圃場への訪問者や FFS への参加者への調査を通して、課題 7 に関わる日本側とスーダン側研究者の共同研究が進行している。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

ササゲが生産する *Striga gesnerioides* 種子の発芽を誘導する物質 alectrol の真の構造を明らかにした。同種子が発芽刺激物質に対してきわめて厳格な立体構造要求性を有することを示し、要求性を満足しない物質によって発芽が阻害されるという、ストライガの発芽阻害に関する世界初の知見を得た。この知見を発展させて、発芽阻害活性を指標とした新規なストライゴラクトン類縁体の開発を進めている。また、高度なストライガ抵抗性を示すイネ品種を発見した。抵抗性機構の解明に向けて、分子遺伝学的な手法の導入を検討している。さらに、ストライガ独立個体を確立して分析し、寄生戦略における ABA の重要性を示唆する結果を得た。これにより、ストライガ防除を目指した新たな研究の方向性が見出された。ガダーレフ州政府は農業問題だけでなく保健衛生をはじめとする他の農村社会的問題の解決にも FFS を活用することを構想しており、多面的な発展が期待される。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 4 件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、国際 12 件)

③ 論文詳細情報

12. Inoue, T., Yamauchi, Y., Eltyeb, A. A., Samejima, H., Babiker, A. G. E., Sugimoto, Y.: Photosynthetic capacity and stomatal response of root hemi-parasite *Striga hermonthica* and sorghum under short-term soil water stress, *Biologia Plantarum*, 57 (4), 773-777, 2013 Dec.

11. Motonami, N., Ueno, K., Nakashima, H., Nomura, S., Mizutani, M., Takikawa, H., Sugimoto, Y.: Bioconversion of 5-deoxystrigol to sorgomol by the sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Phytochemistry*, 93, 41-48, 2013 Sep.

10. Nomura, S., Nakashima, H., Mizutani, M., Takikawa, H., Sugimoto, Y.: Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga gesnerioides* seeds, *Plant Cell Reports*, 32 (6),

829-838, 2013 Jun.

9. Tanaka, M., Sugimoto, Y., Kuse, M., Takikawa, H.: Synthesis of 7-oxo-5-deoxystrigol, a 7-oxygenated strigolactone analog, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **77** (4), 832-835, 2013 Apr.

(前年度まで)

8. Sawada, R., Yamauchi, Y., Sugimoto, Y.: Germination response of *Striga hermonthica* and *Orobanche minor* seeds pre-treated with the synthetic strigolactone GR24, *Recent Res. Devel. Phytochem.*, **10**, 1-12, 2012 Dec.

7. Ueno, K., Nomura, S., Uemura, K., Mizutani, M., Takikawa, H. and Sugimoto, Y.: *Ent-2'-epi-Orobanchol* and Its Acetate, as Germination Stimulants for *Strigatesnerioides* Seeds, Isolated from Cowpea and Red Clover, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 10485-90, 2011 Sep.

6. Ueno, K., Fujiwara, M., Nomura, S., Mizutani, M., Sasaki, M., Takikawa, H., Sugimoto, Y.: Structural requirements of strigolactones for germination induction of *Striga gesnerioides*, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 9226-31, 2011 Aug.

5. Kitahara, S., Tashiro, T., Sugimoto, Y., Sasaki, M., Takikawa, H.: First synthesis of (±)-sorgomol, the germination stimulant for root parasitic weeds isolated from *Sorghum bicolor*. *Tetrahedron Letters*, **52**, 724-726, 2011 Jan.

4. Ueda, H., Sugimoto, Y.: Vestitol as a chemical barrier against intrusion of the parasitic plant *Striga hermonthica* into *Lotus japonicus* roots. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 1662-1667, 2010 Aug.

3. Takikawa, H., Imaishi, H., Tanaka, A., Jikumaru, S., Fujiwara, M., Sasaki, M.: Synthesis of optically active strigolactones: Enzymatic resolution and asymmetric hydroxylation. *Tetrahedron: Asymmetry*, **21**, 1166-1168, 2010 May.

2. Takikawa, H., Jikumaru, K., Sugimoto, Y., Xie, X., Yoneyama, K., Sasaki, M.: Synthetic disproof of the structure proposed for solanacol, the germination stimulant for seeds of root parasitic weeds. *Tetrahedron Letters*, **50**, 4549-4951, 2009 May.

1. Jumtee, K., Okazawa, A., Harada, K., Fukusaki, E., Takano, M., Kobayashi, A.: Comprehensive metabolic profiling of *phyAphyBphyC* triple mutants to reveal their associated metabolic phenotype in rice leaves. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108**, 151-159, 2009 Aug.

(2) 特許出願

① 本年度特許出願内訳(国内 0 件、国際 0 件、特許出願した発明数 0 件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 2 件、国際 2 件)

2. 杉本幸裕、滝川浩郷、佐々木満:根寄生植物発芽阻害剤及びそれを用いる根寄生植物の防除方法、特許出願 2012-061700 , PCT/JP2013/54683 (国際出願日:2013 年 2 月 25 日)

1. 杉本幸裕、滝川浩郷、佐々木満:根寄生植物発芽調節剤及びそれを用いる根寄生植物の防除方法、特許出願 2011-111819 , PCT/JP2012/60817 (国際出願日:2012 年 4 月 23 日)

4. プロジェクト実施体制

ストライガ防除法の開発と防除に資する知見の集約と普及

①研究者グループリーダー名：杉本 幸裕（神戸大学・教授）

②研究項目

課題1 新規自殺発芽誘導物質の開発

課題2 ストライガ防除微生物の探索

課題3 選択的除草剤の探索

課題4 宿主養水分収奪機構の解析

課題5 イネ・ソルガムの環境適応性の検討とストライガ抵抗性評価

課題6 抵抗性／耐性作物の選抜と新規輪作体系の考案

課題7 新技術受容性と生産者・消費者の嗜好の調査

課題8 ストライガ対処法の共有に向けた農民学校の実施

以上