

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06041

研究課題名(和文) リナロールを原因物質とするカンキツかいよう病圃場抵抗性のメカニズム解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of linalool mediated field resistance of citrus canker disease (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)

研究代表者

島田 武彦 (Shimada, Takehiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主席研究員

研究者番号：10355399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポンカンカンキツかいよう病抵抗性には、葉の油胞組織にあらかじめ高含有に蓄積される香り成分リナロールが抗菌物質として寄与することを明らかにした。葉のリナロール含有量と接種後のカンキツかいよう病原菌の生育数には負の相関がみられ、「はれひめ」とポンカンの集団を用いてQTL解析をおこなったところ、両者のQTLは第3染色体の同じ領域にマッピングされ、ポンカンと同程度以上の量でリナロールを葉に含有したカンキツ個体を選抜することにより、カンキツかいよう病抵抗性個体を効率的に獲得する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、温暖化の進行によりカンキツかいよう病の被害が深刻化し、抵抗性品種の開発が急務となっているが、ポンカンなどの圃場抵抗性育種素材のメカニズムは不明である。本研究により、ポンカンとヒュウガナツが示すカンキツかいよう病抵抗性に、葉の油胞組織にあらかじめ高含有に蓄積される香り成分リナロールが抗菌物質として寄与することが明らかとなった。ポンカンと同程度以上の量でリナロールを葉に含有したカンキツ個体を選抜することにより、カンキツかいよう病抵抗性個体を効率的に獲得することが期待され、カンキツかいよう病抵抗性育種の大幅な効率化に貢献する。

研究成果の概要(英文)：It was clarified that linalool, an aromatic component accumulated in high content in the oil sac of leaves, contributes to the resistance to Ponkan citrus canker disease as an antibacterial substance. A negative correlation was observed between the linalool content in leaves and the number of citrus canker pathogens grown after inoculation. When QTL analysis was performed using the population of "Harehime" and ponkan, the QTL of both was in the same region of chromosome 3. It was suggested that citrus canker-resistant individuals could be efficiently acquired by selecting citrus plants that were mapped to the same region of citrus and contained linalool in the leaves at a level equal to or higher than that of ponkan.

研究分野：ゲノム育種

キーワード：カンキツ かいよう病 香り成分 圃場抵抗性

1. 研究背景

カンキツかいよう病はカンキツ栽培園地で発生する主要病害であり、温暖化の進行により国内外において被害が年々深刻化していることから、抵抗性品種の開発が喫緊の課題となっている。カンキツかいよう病原菌の接種試験による発病程度を指標に、キンカンは無疫性、ポンカン、ハッサク、ユズ、ヒューガナツなどは強い抵抗性、ウンシュウミカンなどは中程度の抵抗性、スイートオレンジ、レモンなどは罹病性に分類されている（塩谷, 2010）。キンカンやポンカン等の抵抗性品種では真正抵抗性や圃場抵抗性等の防御機構を保持することが期待されているが、後代実生を用いた遺伝子解析では抵抗性に強く関与するゲノム領域を検出できず、カンキツかいよう病抵抗性品種の育種に結びつく遺伝学的な知見は得られていない。

近年、カンキツのゲノム研究や次世代シーケンス技術の進展により、キンカンの真正抵抗性のメカニズムの一端が明らかになりつつあり、カンキツかいよう病原菌の鞭毛細胞を構成するタンパク質のフランジェリンを認識する受容体の FLS2 遺伝子がキンカンに存在し、受容体からのシグナルにより免疫反応が引き起こされると提言されている（Shi et al, 2017）。一方、ポンカンにみられる圃場抵抗性メカニズムについては、申請者らが幅広い菌種に対して抗菌活性を持つリナロールが圃場抵抗性の原因物質である可能性を見出している（Shimada et al, 2014）。また、罹病性のオレンジにリナロール合成酵素遺伝子を導入してリナロールを高含有化した遺伝子組換え体は、カンキツかいよう病に強い抵抗性を示すことを明らかにしている（Shimada et al, 2016）。これらの結果から、葉に含まれるリナロール含有量の多少がカンキツかいよう病抵抗性の強度に関与していることが示唆される。カンキツかいよう病抵抗性品種の開発において、キンカンの真正抵抗性を生食用カンキツ品種に導入することは理想的であるが、キンカンに付随する不要形質を除去するため、数世代に渡る戻し交雑を行う必要がある。このため実用的な抵抗性品種の開発において、病原菌のレース変異に対して安定した抵抗性を示し、生食用品種として流通しているポンカン等が育種上の有効な抵抗性素材となる。しかし、圃場抵抗性の原因物質のリナロールの高含有化メカニズムについては不明であることから、その解明が新たな課題となっている。

本研究では、カンキツかいよう病の圃場抵抗性の原因物質であるリナロールの高含有化メカニズムを解明するために、リナロールの含有量が異なる圃場抵抗性品種のポンカンと罹病性品種の「はれひめ」の実生後代を用いて、リナロール高含有化に関わるゲノム領域をマッピングし、ゲノム領域の中から高含有化を制御する原因遺伝子を同定し、実用性の高い抵抗性品種の開発を可能とする新規知見を獲得する。また、カンキツかいよう病抵抗性に関わるゲノム領域を併せてマッピングし、リナロールの高含有化に関わるゲノム領域の遺伝子座との比較により、圃場抵抗性の原因物質がリナロールである新たな科学的根拠を獲得する。さらに、代表的な抵抗性品種と罹病性品種について、カンキツかいよう病原菌の接種後の増殖数の経時的変化を調査して抵抗性の種類（静的抵抗性、動的抵抗性）を分類し、ポンカン等にみられる圃場抵抗性はリナロールを原因物質とする静的抵抗性であることを立証する。

2. 研究目的

本研究ではカンキツ産業において重大な被害をもたらすカンキツかいよう病の抵抗性のうち、ポンカン等にみられる圃場抵抗性の原因物質であるリナロールの高含有化に関わる原因遺伝子を同定して抵抗性品種の開発に結びつく新規知見を獲得する。

3. 研究方法

(1) カンキツかいよう病原菌の接種後の増殖数とリナロール含有量の継時的変化の調査
キンカン、ポンカン、ヒューガナツ等の抵抗性品種と罹病性品種について病原菌接種後16日間の菌の増殖数やリナロール含有量の継時的変化を調査する。菌の増殖パターンやリナロール含有量の変動から抵抗性の種類（静的抵抗性、動的抵抗性）を分類し、リナロールを高含有化する品種が、静的抵抗性であることを明らかにする。

(2) カンキツかいよう病抵抗性とリナロールの高含有化に関わるゲノム領域のマッピング

ポンカンの実生後代を用いて GRAS-ID 法を用いて高密度遺伝子地図を作成し、関連遺伝子の遺伝子座、カンキツかいよう病抵抗性、リナロールの高含有化に関わるゲノム領域をマッピングし、その相関を明らかにする。

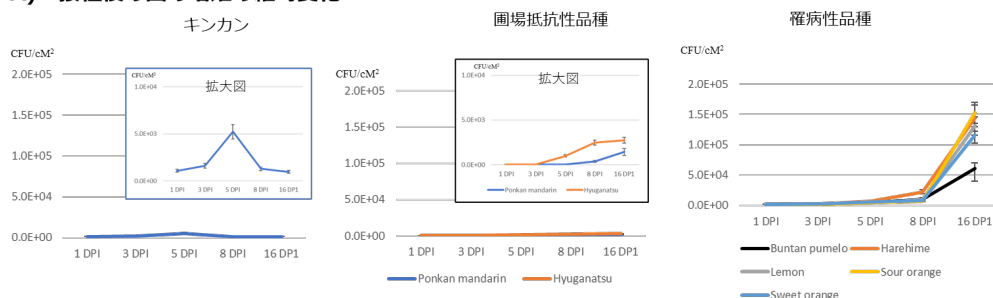
(3) リナロール高含有化に関わる遺伝子の同定

カンキツの公開ゲノム配列を基にリナロール含有量がマッピングされたゲノム領域中の予測遺伝子から、リナロールの生合成や代謝に関わる候補遺伝子を選抜する。また、リナロールの含有量が高いポンカン、含有量の低い「はれひめ」、及びその実生後代の葉における関連遺伝子の RNA-SEQ によるトランスクリプトーム解析を行い、高含有個体と低含有個体間で有意に発現変動する遺伝子を選抜する。選抜した2種類のリストの中で共通する遺伝子をリナロールの高含有化に関わる候補遺伝子とする。

4. 研究成果

(1) カンキツかいよう病原菌の接種後の増殖数とリナロール含有量の継時的変化の調査
リナロールを高含有化した遺伝子導入オレンジの葉では、接種後の病原菌の生育数が著しく抑制されることから、カンキツかいよう病原菌接種後の16日間の葉のリナロール含有量と病原菌の生育数の推移を調査した(図1)。カンキツかいよう病に罹病性のレモンやオレンジは、葉のリナロール含有量は極めて低く、接種16日目の病原菌の生育数が著しく増加した。一方、葉のリナロール含有量が高いポンカン、ヒューガナツでは、接種16日目の病原菌の生育が著しく抑制されていた。真性抵抗性のキンカンでは、接種後3日から5日に病原菌の生育数とリナロールの含有量が増加し、その後、接種前にレベルに戻っていた。ポンカンやヒューガナツでは、リナロール含有量は接種後に含有量が低下しその後、接種前のレベルに戻っていた。以上のより、真性抵抗性と圃場抵抗性では、病原菌の生育数とリナロール含有量の推移のパターンが異なり、圃場抵抗性では、予め葉に高含有に蓄積されたリナロールが病原菌の生育の抑制に関与したと考えられた。

A) 接種後の菌の増殖の経時変化



B) 接種後の葉のリナロールの含有量の経時変化

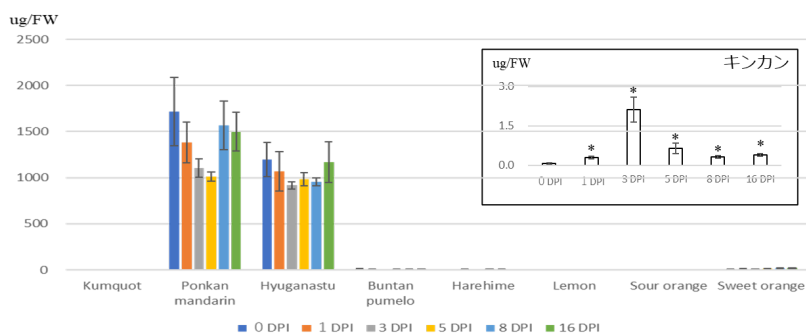


図 1. 代表的なカンキツの品種のかいよう病菌接種後の菌の生育数 (A) と葉のリナロール含有量 (B) の経時変化. 申真性抵抗性のキンカンでは病原菌の接種後、リナロールが一過的に増加するのに対し、圃場抵抗性の品種では葉のリナロール含有量が高く維持されている。

(2) カンキツかいよう病抵抗性とリナロールの高含有化に関わるゲノム領域のマッピング

罹病性の「はれひめ」と圃場抵抗性のポンカンの交雑実生を用いて、GRAS-Di 法を用いて遺伝子地図を作成し、リナロールの含有量とカンキツかいよう病原菌接種後の菌の生育数についてインターバルマッピング法による QTL 解析をおこなった。リナロールの含有量とカンキツかいよう病の生育数の QTL は、共に「はれひめ」の第 3 連鎖群のゲノム領域に検出されたが、他の「はれひめ」の連鎖群、およびポンカンみかん連鎖群では、LOD 値 > 2.0 の有意な QTL は検出されなかった。リナロール含有量については、GRAS-Di マーカー Sc0003_43919271 (HarS032 の 33.7 cM) と SC0003_44247520 (39.6 cM) の間で LOD 値 4.2 (寄与率 19.3%) の QTL ピークが検出された。検出された QTL は、葉のリナロール濃度の低下に関与していた。カンキツかいよう病の生育数については、Sc0003_44247520 (39.6 cM) と Sc0003_46041813R (48.1 cM) との間で LOD 値 3.14 (寄与率 14.6%) の QTL ピークが検出された。検出された QTL は、生育数の増加に関与していた。特に、リナロール濃度と Xcc 感受性 QTL は、「はれひめ」のゲノムの第 3 染色体上の同じ領域にマッピングされ、リナロールの含有量と菌数の抑制に相関があることが明らかとなった。

(3) リナロール高含有化に関わる遺伝子の同定

リナロール構成濃度が高い葉のサンプル（ポンカン、マッピング集団の HP1 と HP101）と低い葉のサンプル（「はれひめ」、マッピング集団の HP2 と HP134）から抽出した全 RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。2 倍以上の発現量の変化を持つ遺伝子をグループ間で比較した結果、リナロール含有量が高いグループで発現量が有意に異なる遺伝子数は 30 個、低いグループではと 60 個であった。これらは、LRR タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、アンキリン リピート タンパク質、セリン/スレオニン プロテイン キナーゼ、およびアスパルチル プロテアーゼ遺伝子はリスト内で重複していた。共通遺伝子のうち、TPL 結合ドメインタンパク質 (TPL) (Ciclev10018478m.g)、ERD ファミリータンパク質 (ERD) (Ciclev10024532m.g) 及びグルタミル tRNAGlu レダクターゼ (GluTR) (Ciclev10022509m.g) 遺伝子は重複しており、リナロール濃度と Xcc 感受性 QTL が検出されたゲノム領域に位置していた。カンキツかいよう病抵抗性品種（ポンカン、ヒューガナツ、「不知火」）および感受性品種（レモン、スイートオレンジ、「はれひめ」）を用いて、QTL 内の 3 種類の候補遺伝子とリナロールの生合成に関与する 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸シンターゼ (DXS)、1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸レダクターゼ (DXR)、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA シンターゼ (HMGS)、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA レダクターゼの転写レベルは、(HMGR)、GPP シンターゼ遺伝子、およびリナロール ネロリドール シンターゼ (CuSTS4) 遺伝子の発現量について qRT-PCR により調査した (図 2)。供試した遺伝子のうち、TPL、ERD、DXS および CuSTS4 の 4 種類の遺伝子の発現量が感受性品種よりも抵抗性品種で有意に高いことを示した ($P < 0.05$)。以上のことから、これらの遺伝子がリナロールの高含有化に関与する遺伝子の候補であると考えられた。

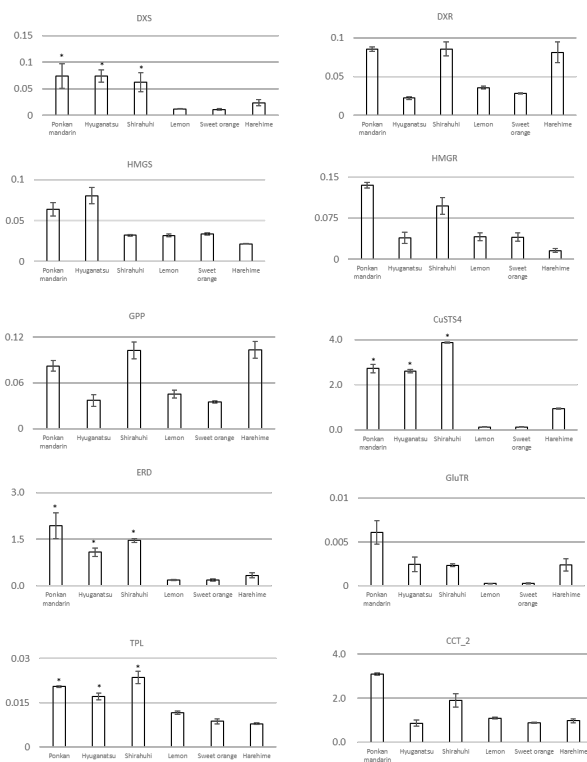


図 2. 定量 PCR による候補遺伝子の発現量の調査

(* : $P < 0.05$ で有意である)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takehiko Shimada, Tomoko Endo, Hiroshi Fujii, Ana Rodriguez, Terutaka Yoshioka, Leandro Pena, Mitsuo Omura	4. 巻 41
2. 論文標題 Biological and molecular characterization of linalool-mediated field resistance against <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> in citrus trees	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tree Physiology	6. 最初と最後の頁 2171-2188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------