

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450050

研究課題名(和文)カンキツかいよう病の圃場抵抗性に関わる香気性成分の同定と代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of aroma component related to the field resistance against citrus canker (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) and elucidation for its metabolic regulation in citrus

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・果樹茶業研究部門カンキツ研究領域・ユニット長

研究者番号：10355399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：リナロールはカンキツかいよう病に抗菌活性を示し、カンキツかいよう病に圃場抵抗性を持つポンカンの果実や葉で多く蓄積されている。ウンシュウミカンでは3種類のリナロール合成遺伝子がゲノム中に存在し、傷害や病原菌の処理でその発現が増大する。リナロールを導入した遺伝子組換えオレンジの葉ではカンキツかいよう病菌の増殖が抑制され、病害抵抗性遺伝子等の発現が高いことから、リナロールがカンキツの非宿主特異的抵抗性の誘導に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Linalool had anti-bacterial activity against citrus canker (Xcc) and is highly accumulated in the leaves and mature fruits of Ponkan mandarin with the field resistance to Xcc. Satsuma mandarin had 3 linalool synthase genes in the genome and their transcription increased in response to wounding and the attacks of bacterial and fungi. Transgenic orange leaves harboring transgene of linalool synthase suppressed the growth of Xcc and accumulated high transcripts of pathogen related genes, indicating that linalool might be involved in the induction of non-host resistance in citrus.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：リナロール カンキツ かいよう病 抵抗性 遺伝子組換え体

1. 研究開始当初の背景

カンキツかいよう病は世界のカンキツ栽培地で広く発生する主要病害であり、果実にコルク化した円形の病斑が形成されるため、罹病すると商品価値が大きく低下する。近年、国内のカンキツ園地では、消費者の多様なニーズに応えるため、カンキツかいよう病に比較的強いウンシュウミカンに代わって、カンキツかいよう病に弱いオレンジ類を育種親系統に持つ中晩柑類の導入が進んでいる。今後の温暖化の進行によりカンキツかいよう病被害の深刻化が懸念されるため、栽培労力と生産コストの削減、並びに農薬散布削減による環境負荷低減に向けて、カンキツかいよう病抵抗性を持つ新品種の開発が期待されている。カンキツかいよう病の抵抗性に関する研究は種や品種の抵抗性が調査され、キンカンが免疫性で、ポンカン、ハッサク、ユズ、日向夏等では強い抵抗性を、ウンシュウミカン、カラタチが中程度の抵抗性を示し、スイートオレンジ、レモン、甘夏等はカンキツかいよう病に対して極めて弱いことが明らかとなっている。抵抗性のメカニズムについては、キンカンは免疫性を持ち、ハッサクやポンカン等は圃場抵抗性を持つことが報告されているが、そのメカニズムは不明である。カンキツ類の果皮に多種多様に含有される香気性成分はモノテルペンやセスキテルペン類で、これらの中には抗菌活性、害虫の誘引や忌避に効果を持つものがあり、特にリモネン、リナロール、ゲルマクレン等は、強い抗菌活性を持ち抗菌スペクトルが広いことが知られている。また、カンキツ類の香気性成分がフザリウム腐敗病、立枯れ病、黒腐病、緑カビ病等の病原菌の生育を抑制する効果があると報告されている(Dicke et al. 1990、Caccioni et al. 1998、Chutia et al. 2009)。また、香気性成分を改変した遺伝子組換えオレンジは、リナロール等の鎖状テルペンやジャスモン酸の前駆体の-オキソ-フィトジエ

ン酸が多く含有され、カンキツかいよう病や緑カビ病に対して強い抵抗性を示すことが報告されている(Rodriguez et al. 2011、Rodriguez et al. 2014)。以上のように特定の香気性成分がカンキツの病害抵抗性に關与している可能性が示唆される結果が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、カンキツかいよう病に抗菌活性を持つ香気性成分を同定して、抵抗性の強度が異なるカンキツの代表的な品種間でその含有量を比較することにより、カンキツかいよう病抵抗性と関連性の高い香気性成分を明らかにする。同定した香気性成分を合成する遺伝子を単離して、病原菌に対する遺伝子の発現誘導性等を明らかにするとともに、遺伝子組換え体を作成して香気性成分の含有量とカンキツかいよう病抵抗性の強度との相関を明らかにする。さらに、病害抵抗性の異なるポンカンと「西之香」の交配実生集団の遺伝子地図を作成して、連鎖解析によりリナロールの高含有化に関わる領域を推定するとともに、カンキツかいよう病抵抗性との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

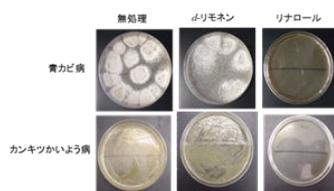
- (1)カンキツかいよう病に抗菌活性を持つ香気性成分を同定するために、香気性成分の標品を用いて、病原菌に対する抗菌活性を調査する。カンキツかいよう病抵抗性の強度が異なる6品種を用いて抗菌活性を持つ香気性成分の中から病害抵抗性に關与する香気性成分を同定する。さらに、リナロールを合成する遺伝子を単離して、カンキツかいよう病や緑カビ病などの病原菌処理に対する応答性を明らかにする。
- (2) リナロールを合成する合成酵素遺伝子をアグロバクテリウム法によりオレンジに導入し、目的成分の増加とカンキツかいよう病抵抗性の強度との相関について調

査する。

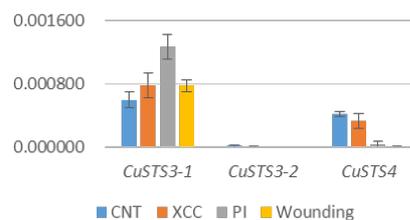
- (3) カンキツかいよう病に対して抵抗性の強度が異なるポンカンと「西之香」の交配実生集団を用いて、カンキツかいよう病抵抗性の評価と香気性成分の含有量を調査し、リナロールの高含有化に関わる制御領域と抵抗性との相関を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) カンキツの果皮に含まれる 18 種類の香気性成分の標品を用いて、カンキツかいよう病と緑カビ病に対する抗菌活性を調査した結果、リナロール、シトラール、ネオリドールなどの鎖状テルペン類がこれらの病原菌に対して抗菌活性を示すことを明らかにした(第 1 図)。これらの抗菌活性を示す香気性成分についてカンキツかいよう病抵抗性の強度が異なるポンカン、ウンシュウミカン、オレンジ、ブンタンなど代表的な 6 品種のカンキツ類について葉や果実における含有量を調査した結果、抵抗性を持つポンカンの葉や成熟果実でリナロールが高含有されることが明らかとなった。ウンシュウミカンではリナロールの合成に関わる 3 種類の遺伝子が存在し、単離した *CuSTS3-1* と *CuSTS3-2* はモノテルペン合成酵素遺伝子、*CuSTS4* はセスキテルペン合成酵素遺伝子と高い相同性を示し、これらの遺伝子由来のタンパク質はいずれも基質のゲラニルピロリン酸を基質としてリナロールを生成し、*CuSTS4* 由来のタンパク質はファルネシルピロリン酸を基質として、ネオリドールも生成することを明らかにした。ウンシュウミカンではリナロール合成酵素遺伝子は、葉、花、幼果実や成熟果実の果皮で発現し、*CuSTS3-1* と *CuSTS4* はかいよう病、緑カビ病の菌の接種や傷害処理により、果実や葉で発現が増加することを明らかにし(第 2 図)、リナロールが病害抵抗性に関与する可能性が示唆された。



第1図.リナロールの抗菌活性



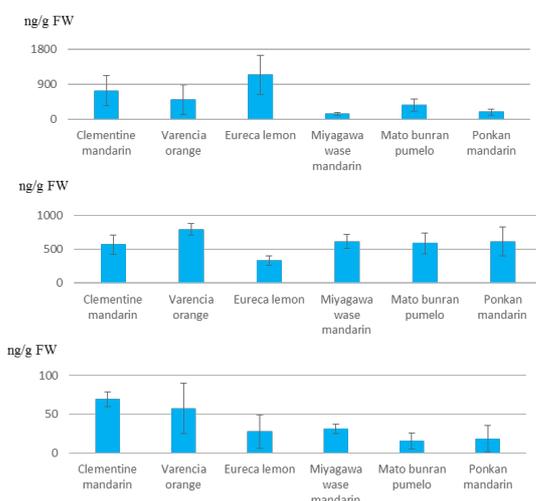
第2図.リナロール合成酵素遺伝子の病原菌処理に対する応答性

- (2) *CuSTS3-1* をセンス方向に導入した遺伝子組み換えオレンジを作成し、遺伝子組換え体における病害抵抗性の強度について調査した。遺伝子組換えオレンジと野生型のオレンジの葉からリーフディスクを作成し、カンキツかいよう病原菌を負傷接種して 5 日後の増殖率を定量 PCR で調査した結果、リナロールを高含有している遺伝子組換え体のリーフディスクでは病原菌の増殖が著しく抑制されていることが明らかとなった(第 3 図)。リーフディスクに病害抵抗性を誘導する植物ホルモンのサリチル酸とジャスモン酸、リナロールを処理したところ、無処理区に比べて病原菌の増加が抑制され、リナロールを高含有化した遺伝子組換えオレンジと類似した結果が得られた。これらのリーフディスクについて、感染特異的タンパク質(PR)をコードする病原抵抗性遺伝子の発現を調査した結果、リナロール含有量が高い遺伝子組換えオレンジでは PR 遺伝子の発現量が高いことが明らかとなり、サリチル酸、ジャスモン酸、リナロールを処理したリーフディスクでも同様の結果が得られた。以上の結果からリナロールは抗菌活性の役割を果たすだけでなく、PR 遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。また、代表的な

カンキツ 6 品種についてカンキツかいよう病原菌接種後のサリチル酸、ジャスモン酸、アブシジン酸を調査した結果、カンキツかいよう病に罹病性を示すレモンではサリチル酸が他のカンキツ類よりも多く誘導されることが明らかとなった(第 4 図)。カンキツかいよう病抵抗性を示すリモネンを抑制した遺伝子組換えオレンジでは、カンキツかいよう病原菌を接種した際にジャスモン酸が蓄積されるのに対し、非組換え体ではサリチル酸が蓄積されることが報告されている (Rodriguez et al. 2014)。これらの結果からカンキツにおいても病害抵抗性の誘導に関わる植物ホルモンの拮抗作用が存在し、葉でリナロールが高含有されることにより非宿主特異的抵抗性の誘導が有利に働く可能性が示唆された。



第3図.リナロールを高含有化した遺伝子組換えオレンジ



第4図.代表的なカンキツ6品種のサリチル酸(上)、ジャスモン酸(中)、アブシジン酸(下)のかいよう病菌処理1時間後の葉における含有量

(3)カンキツかいよう病の抵抗性品種のポンカンと罹病性品種の「西之香」の実生集団 81 系統を用いて、リナロールの高

含有化に関わる遺伝子座の調査を行った。実生集団の葉のリナロール含有量を調査したところポンカンと同程度のリナロールを含有する実生個体は 1 個体しか獲得できなかった。384 個の一塩基多型 (SNP) マーカーを搭載したイルミナ社製のゴールデンゲートアレイを用いて、ポンカン、「西之香」及び 81 個の実生個体の遺伝子型をタイピングした結果、両親間で多型を示す 174 個の SNP マーカーが得られた。これらの SNP マーカーをもとに Join MAP により、連鎖解析を行ったところ、17 種類の連鎖群が得られた。これらの連鎖群に対してリナロール含有量を制御する遺伝領域の推定を試みたが、連鎖地図の飽和度が低く検出には至らなかった。また、カンキツかいよう病の抵抗性の評価についても実生集団の生育が不良のため検定には至らなかった。リナロールの代謝に関わるメバロン酸代謝遺伝子、非メバロン酸代謝遺伝子、及びリナロール合成酵素遺伝子の葉における発現量を両親間で比較した結果、ほとんどの遺伝子の発現量がポンカンで高いことからリナロールの高含有化に関わる領域は単一あるいは少数である可能性が考えられた。本解析で供試した実生集団はリナロールを高含有化した個体が少なかったことから、最適な実生集団を用いてリナロールの高含有化に関わる遺伝領域を決定し、カンキツかいよう病抵抗性との相関を明らかにする予定である。

<引用文献>

Rodriguez A. 他, Terpene down-regulation in orange reveals the role of fruit aromas in mediating interactions with insect herbivores and pathogens, Plant Physiol., 156, 2011, 793-802

Rodriguez A. 他、Terpene down-regulation triggers defense responses in transgenic orange leading to resistance against fungal pathogens、Plant Physiol.、164、2014、321-339

Chutia M. 他、Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India.. LWT-Food. Sci.Tech. 42、2009、777-780

Dicke M. 他、Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control、J. Chem. Ecol. 16、1990、3091-3118

Caccioni D. 他、Relationship between volatile components of Citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*、International Journal of Food Microbiol. 43、1998、73-79

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

SHIMADA Takehiko、ENDO Tomoko、他、Characterization of three linalool synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. and analysis of linalool-mediated resistance against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Penicillium italicum* in citrus leaves and fruits、Plant Science、229、2014、154-166、DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.09.008. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

島田武彦、カンキツ香気性成分遺伝子群の構造解析と代謝改変、園芸学研究 2015 年 3 月 28 日、千葉大学西千葉キャンパス(千葉県千葉市)

〔図書〕(計 1 件)

島田武彦、静岡県経済農業協同組会連合会みかん園芸部、柑橘、カンキツの香りで病気を防ぐ、68、2016、8-10

〔その他〕

ホームページ等

https://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/fruit/2014/fruit14_s14.html

6 . 研究組織

(1)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・果樹茶業研究部門カンキツ研究領域・ユニット長

研究者番号: 10355399

(2)研究分担者

遠藤 朋子 (ENDO, Tomoko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門カンキツ研究領域・上級研究員

研究者番号: 50355400