

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07654

研究課題名(和文) 普遍的な鉄硫黄クラスター生合成と根粒菌独自に進化した共生窒素固定との接点を解く

研究課題名(英文) Characterization of RpoH1 and its regulated genes involved in iron-sulfur protein metabolism and effective symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*

研究代表者

三井 久幸 (Mitsui, Hisayuki)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：40261466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：根粒菌は様々な環境で最も繁栄している細菌分類群アルファプロテオバクテリアの好例である。本研究では、根粒菌のストレス応答転写因子RpoH1によって発現制御される機能不明遺伝子sufTが、細胞内の限られた鉄濃度条件下で、必要レベルの鉄硫黄クラスターを生合成し、さらに正常に共生窒素固定を行うのを支えていることを見出した。また、RpoH1の機能調節についても、大腸菌RpoHの場合と異なる機構を有することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要な環境細菌のグループであるアルファプロテオバクテリアに共通した特性は十分には理解されていない。本研究で、生物進化上最古のコファクターである鉄硫黄クラスターの生合成機構と、高度に進化した根粒菌・マメ科植物間の共生機構とが結びついたことは、アルファプロテオバクテリアの多様化と環境適応の基盤の理解を進めるとともに、地球環境の主要な構成要素としての微生物相の理解とその機能の応用の基礎となる。

研究成果の概要(英文)：This study showed that the heat shock sigma factor RpoH1-regulated gene, sufT, balances iron limitation in the cell to maintain iron-sulfur protein levels and to establish effective symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. The paradox that iron-sulfur proteins should be synthesized under iron limitation in the cells is universal to all living organisms. This study demonstrates that the regulatory circuit involving RpoH1 and SufT underlies this paradox, leading to understanding the mechanisms for adaptation of alpha-proteobacteria to diverse conditions on the earth.

研究分野：微生物分子遺伝学

キーワード：アルファプロテオバクテリア 鉄硫黄タンパク質 シグマ因子 根粒菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アルファプロテオバクテリアは地球上の様々な環境に適応し最も繁栄している細菌グループである。根粒菌は、そのグループの顕著な例として、マメ科植物種に根粒形成を誘導し、その細胞内に感染して窒素固定を行う性質を獲得した一群である。その進化には、ニトロゲナーゼ遺伝子や根粒形成誘導遺伝子等を含むゲノミックアイランドないしメガプラスミドの水平伝播が寄与しており、それらの遺伝子機能の理解は大いに進んでいる。しかし、共生成立機構全体を見ると、今なお不明な点が多い。

(2) アルファルファ根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* のシグマ因子 RpoH1 は、ヒートショック応答の制御と共生窒素固定系成立の両方に必須な役割を持つが、その活性の制御機構は不明である。

(3) ヒートショック条件下でのトランスクリプトーム解析によって、シグマ因子 RpoH1 レギュロンの内容が明らかになりつつある。その一つが、鉄硫黄クラスター生合成遺伝子群 *suf* に隣接して位置する機能不明遺伝子 SMc00302 である。しかも、この遺伝子の欠失変異株は共生窒素固定能欠損表現型を示す。鉄硫黄クラスターとは、生命誕生の初期から存在するタンパク質コファクターであり、生物に普遍的に電子伝達・触媒機能・環境センサー等の様々な機能を担っている。その生合成は、原核生物と真核生物両方で保存されている ISC システムまたは SUF システムによってなされるが、分子機構に不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

(1) 根粒菌の進化の基盤には、先祖アルファプロテオバクテリアから受け継ぐ、環境への適応機構の独自性があると考えた。本研究では、*S. meliloti* のヒートショック応答の制御機構の中心的因子であるシグマ因子 RpoH1 に焦点を当て、その活性の調節機構と制御下にある遺伝子の機能を追求した。

(2) RpoH1 レギュロンの中で特に SMc00302 に焦点を当て、*S. meliloti* の鉄硫黄タンパク質生合成と共生窒素固定の各々における役割を解明することを目指した。

(3) 前述の方針により、ストレス応答機構と鉄硫黄タンパク質生合成機構についての根粒菌の独自性を見出し、また、それが共生窒素固定能にいかに関与しているか明らかにすることによって、アルファプロテオバクテリアの繁栄の分子基盤の理解に資することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞内 RpoH1 タンパク質レベルの定量は、特異的な抗体を調製し、それを用いたウェスタンブロッティング解析により行った。

(2) 鉄硫黄酵素として、6-ホスホグルコン酸脱水酵素 (6-PGDH)、アコニターゼ、グルタミン酸合成酵素 (GltS) および非鉄硫黄酵素のコントロールとしてリンゴ酸脱水酵素を取り上げ、それぞれ細胞内活性を定量した。6-PGDH 活性は、6-PG から変換されるピルビン酸を乳酸デヒドロゲナーゼと NADH を用いて定量することで求めた。アコニターゼ活性は、イソクエン酸から生じる *cis*-アコニット酸を定量することで求めた。GltS 活性は、2-オキシグルタル酸とグルタミン存在下での NADPH 酸化速度を定量することで求めた。リンゴ酸脱水酵素活性は、オキサロ酢酸存在下での NADH 酸化速度を定量することで求めた。以上の測定は、グローブボックス内を用いた窒素気流中で実施した。

(3) *Sinorhizobium meliloti* ゲノムのリシーケンス解析のためには、各株の全 DNA から Nextera DNA sample preparation kit (Illumina 社) を用いてショットガンライブラリーを作製し、MiSeq システム (Illumina 社) によって 250 bp 長のペアエンドリードを得た。ソフトウェア ShortReadManager を用いて、21 nt のウィンドウで各リードの塩基配列と参照配列 *S. meliloti* 1021 ゲノム塩基配列 (RefSeq accession numbers NC\_003037, NC\_003047, and NC\_003078) を比較し、着目する株にのみ存在する塩基配列の領域を同定した。

### 4. 研究成果

(1) ヒートショックに伴う *Sinorhizobium meliloti* シグマ因子 RpoH1 の発現変動の解析

*S. meliloti* の培養温度を 25 °C から 37 °C に上昇させた後のシグマ因子 RpoH1 および RpoH2 の細胞内濃度を定量した。ヒートショック応答の中心的制御因子である RpoH1 タンパク質は、温度の変化にかかわらず一定の高レベルを維持していることが判明した (図 1)。この結果は、ヒートショック応答の誘導が、既に存在する RpoH1 タンパク質の活性段階での変化が担っていることを意味する。ガンマプロテオバクテリアの大腸菌の RpoH が、ヒートショックに伴い細胞内レベルを顕著に増加させることと対照的である。他方、RpoH2 タンパク質は、25 °C の際の検出限界以下のレベルから上昇することが判明した。

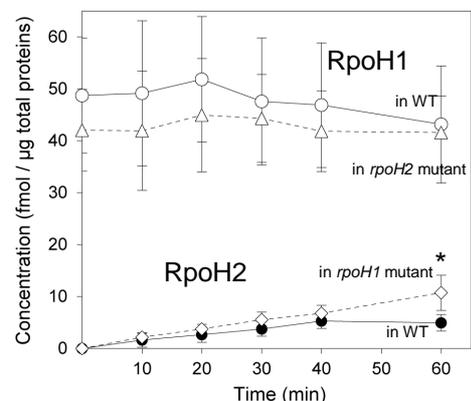


図 1 *Sinorhizobium meliloti* 細胞内 RpoH1 および RpoH2 タンパク質レベルの変化

(2) *Sinorhizobium meliloti* の SMc00302 遺伝子の配列解析

SMc00302 の欠失変異株は、共生窒素固定能欠損表現型を示す。この遺伝子の推定アミノ酸配列は、原核生物と真核生物

SMc00302_Sm	29	LSDDIITAAALKTVYDPEIFADIFELGLTYKLDI---EDDRMVKIDMTLTA	74
TM0487_Tm	7	TKEVDVNLNALKNVIDFELG-LDVVSLGLVYDIQL---DDQNNVKVLMFMTT	52
PaaD_Ec	11	QVHEITWALLSQIPDPEIFVLTITDLCMVNRVTVQ---MGEQ-WVIGFTPTTY	56
FAM96B_Hs	42	DAREIFDLIRSLINDPEIF-LTLEELNVVEQVRVQVSDPESTVAVAFTPTI	90
HCF101_At	79	SEKDVLLKALSQITDPPDFG-TDIVSCGFVKDLGIN--EALGEVSRFLELTT	125
SMc00302_Sm	75	PACPVVAGEM-PGWVENAVGTVEGVSGVSVSMFDFPWTTPDRMSEEAQVAL	123
TM0487_Tm	53	EMCPLAGMI-LSDAEFAKKLEGNNVVELFDFPWTPERMSPEIREKE	101
PaaD_Ec	57	SCCPATEHL-IGATREAMTT-NGFTFVQVVLQLDPAWTTDWMFDPARER	104
FAM96B_Hs	91	PICSMATLIGLSIKVKLLRSLPQRFKMDVHTTPGTHASEHAVNKQLADKE	140
HCF101_At	126	PACPVKDMF-ENKANVVAALPWVKKVNVVMTSAQD--AKPIFAGQLPFG	172

の両方に分布する機能不明ドメイン DUF59 と類似していた(図2)。比較として、ゲノム上で SMc00302 の上流に位置する *sufD* 遺伝子の欠失変異は致死となることを示した。すなわち、SMc00302 は SUF システム自体に必須ではなく、あったとしても補助的な役割と分かった。なお、大腸菌の SUF システムには DUF59 をコードする遺伝子は含まれていないことから、当遺伝子の役割はアルファプロテオバクテリアとガンマプロテオバクテリアとの重要な違いに関係すると言える。

図2 *Sinorhizobium meliloti* の SMc00302 遺伝子産物と他生物 DUF59 ファミリータンパク質のアミノ酸配列の比較。Sm, *S. meliloti*; Tm, *Thermotoga maritima*; Ec, *E. coli*; Hs, *Homo sapiens*; At, *Arabidopsis thaliana*

(3) SMc00302 遺伝子の欠失変異株の表現型

SMc00302 欠失変異株は、共生窒素固定能欠損以外に、野生株と比較して、培地上での生育低下(表1)、わずかに高い高温感受性・酸性感受性、および鉄キレーターに対する高い感受性を示した。さらに、SMc00302 欠失変異株と野生株の間で、3種類の鉄硫黄酵素(6-PGDH、アコニターゼ、GltS)の細胞内活性を比較した。その結果、いずれの活性も変異株で低下していた(表1)。コントロールとして、鉄硫黄クラスターを含まないリンゴ酸脱水素酵素は、変異株での活性低下はなく、逆に増加していた。以上、SMc00302 欠失変異は鉄硫黄タンパク質の細胞内レベルに影響を及ぼすことが示されたことから、当遺伝子を *sufT* と名付けることとした。

表1 SMc00302 (*sufT*) 遺伝子の欠失が *Sinorhizobium meliloti* の表現型に及ぼす影響

Strain	Doubling time (h)		Activity (U mg <sup>-1</sup> of total protein)			
	LB/MC medium	M9/sucrose medium	6-Phosphogluconate dehydratase	Aconitase	Glutamate synthase	Malate dehydrogenase
Rm1021 (wild type)	3.2±0.5	6.2±0.2	102±12	64±10	12.9±1.1	149±19
SHO5 ( <i>ΔsufT</i> )	5.7±0.4	14.9±0.4	10±10	29±11	6.5±2.2	239±39
SHO23 ( <i>ΔrirA</i> )	n.d.	9.5±0.8	80±6	106±16'	n.d.	n.d.
SHO24 ( <i>ΔrirA ΔsufT</i> )	n.d.	8.6±0.8	92±28	109±9	n.d.	n.d.

(4) *sufT* 欠失変異の表現型をサプレスする第二の変異の同定

*sufT* 欠失変異株を最小培地中で植え継ぐことによって、生育速度が早まったサプレッサー変異株3株を分離した。それぞれ全ゲノムのリシーケンス解析に供し、親株には存在しない変異を同定した(表2)。その中で、根粒菌の細胞内鉄レベルを感知する転写リプレッサーをコードする *rirA* 遺伝子に共通して欠失変異が見出された。

表2 *sufT* 欠失変異の生育低下がサプレスされた変異株のゲノムから検出された変異

Strain	Change in nucleotide sequence		Deduced change in amino-acid sequence
	Locus (relevant gene length and product)	Position <sup>a</sup>	
SHO8	SMb20281 (1,071 nt.; ATP-binding protein of spermidine/putrescine ABC transporter)	A884G	D295G
	SMb21269 (2,091 nt.; ATP-binding protein of ABC transporter)	G2047A	E683K
	SMc00785 ( <i>rirA</i> ) (465 nt.; Fe-responsive transcriptional repressor)	Δ(G311 C312)	Frame shift
SHO9	Upstream region of SMc02033	T(-105)C	-
	Upstream region of SMa0773 ( <i>noeA</i> )	IS <i>Rml</i> (-5) <sup>b</sup>	-
	SMc00785 ( <i>rirA</i> )	ΔC76	Frame shift
SHO16	Upstream region of SMa0773 ( <i>noeA</i> )	IS <i>Rml</i> (-5) <sup>b</sup>	-
	SMa2414 ( <i>rhtA</i> ) (2,241 nt.; rhizobactin transporter)	A1060G	S354G
	SMc00785 ( <i>rirA</i> )	ΔT6	Frame shift

あらためて *Sinorhizobium meliloti* ゲノム上で *rirA* 欠失変異を分離し、*sufT* 欠失との二重変異株を作製した。二重変異株の最小培地中での生育速度は *sufT* 欠失変異株より増加し、野生株との中間的な生育速度を示した(表1)。6-PGDH とアコニターゼ各活性は、野生株と同等レベルとなった(表1)。さらに、二重変異株は野生株と同様の共生窒素固定能を示した(図3)。*sufT rirA* 二重変異株に対して、さらに野生型 *rirA* 遺伝子を導入すると、再び共生窒素固定能

欠損となった。すなわち、*sufT* 欠失変異の表現型は、鉄制御因子である *RirA* の欠損によってサプレスされることが証明された。

過剰な鉄は活性酸素の発生の原因となるため、根粒菌を含む多くの生物において、細胞内の鉄レベルを制限する制御系が存在する。*SufT* は、鉄の利用が制限されている状況で、SUF システムに作用して、必要な鉄硫黄タンパク質の生合成を可能とする役割を果たしていると考えられる。



図3 *RirA* の欠損が *sufT* 欠失変異の共生表現型に及ぼす影響。次の変異株をアルファルファに接種: 左, *sufT* single mutant; 中, *sufT rirA* double mutant; 右, *rirA* single mutant

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

Masayuki Sugawara, Satoko Takahashi, Yosuke Umehara, Hiroya Iwano, Hirohito Tsurumaru, Haruka Odake, Yuta Suzuki, Hitoshi Kondo, Yuki Konno, Takeo Yamakawa, Shusei Sato, Hisayuki Mitsui, Kiwamu Minamisawa (2018). Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with *Rj2*-soybeans via effector-triggered immunity. *Nature Communications* 9:3139 査読有

DOI: 10.1038/s41467-018-05663-x

Hisayuki Mitsui, Kiwamu Minamisawa (2017). Expression of two RpoH sigma factors in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbes and Environments* 32:394-397 査読有

DOI: 10.1264/j sme2.ME17087

Sánchez C, Mitsui H, Minamisawa K (2017). Regulation of nitrous oxide reductase genes by NasT-mediated transcription antitermination in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Environ Microbiol Rep* 9:389-396 査読有

DOI: 10.1111/1758-2229.12543

Shohei Sasaki, Kiwamu Minamisawa, Hisayuki Mitsui (2016). A *Sinorhizobium meliloti* RpoH-regulated gene is involved in iron-sulfur protein metabolism and effective plant symbiosis under intrinsic iron limitation. *Journal of Bacteriology* 198:2297-2306 査読有

DOI: 10.1128/JB00287-16

### 〔学会発表〕(計2件)

佐々木 祥平, 南澤 究, 三井 久幸: 根粒菌の鉄硫黄タンパク質生合成関連遺伝子の機能解析. 植物微生物研究会第28回研究交流会.(2018年9月19日-21日, 鳥取)

佐々木 祥平, 南澤 究, 三井 久幸: 根粒菌の鉄・硫黄クラスター生合成関連因子 *SufT* が植物共生を含む複雑な生活スタイルに果たす役割. 環境微生物系学会合同大会2017.(2017年8月29日-31日, 仙台)