

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22380048

研究課題名(和文) マメ科植物との共生窒素固定の成立に必要な根粒菌の細胞機能

研究課題名(英文) Functional analysis of rhizobial cells responsible for symbiotic nitrogen fixation with leguminous plants

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：根粒菌は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。本研究では、アルファルファ根粒菌を材料に用い、そのヒートショック応答と共生窒素固定に必須な役割を持つシグマ因子RpoH1の制御を受ける遺伝子の中から、機能未知遺伝子SMc00302(sufTと命名)が共生窒素固定に必須であることを見つけた。その解析の結果、SufTは、原核・真核両方に普遍的な補因子である鉄・硫黄クラスターの生合成効率を、細胞内鉄条件に応じて正に制御する因子であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Sinorhizobium meliloti is a root-nodule bacterium that establishes symbiosis with leguminous plants and performs nitrogen fixation. In this study, we analyzed the regulon of its sigma factor RpoH1, which is essential for heat shock response and effective symbiosis, and identified a member of the regulon, SMc00302 (designated later as sufT) to have an essential role in symbiosis. Functional analysis of this gene showed that SufT homologs are distributed widely over prokaryotes and eukaryotes and the rhizobial SufT operates to enhance the iron-sulfur cluster biogenesis in the cell under iron-limiting conditions.

研究分野：微生物学

キーワード：共生窒素固定

### 1. 研究開始当初の背景

(1)根粒菌は、マメ科植物に感染し共生窒素固定を営む土壤細菌の一群であり、*Azorhizobium*、*Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium*、*Sinorhizobium*等の属を含む。多くの場合、宿主の根毛表面に定着した後、根毛細胞の原形質膜陥入を契機に形成される“感染系”を経由して宿主根への侵入を果たす。同時に、宿主は根の皮層から根粒原基を形成する。感染系は根粒内部の標的細胞まで伸長し、その細胞がエンドサイトーシス様作用によって根粒菌を内部に取り込む。根粒菌は、そこで更に増殖し宿主細胞質の大部分を占めるに至った後、増殖を停止し、肥大化および(染色体の)多倍体化を含む細胞分化を行う(バクテロイド分化)。このように細胞内共生を確立した根粒菌バクテロイドが窒素固定を行う。この一連の過程に対しては、特異的に根毛の反応と根粒原基を誘導する根粒菌の遊離シグナル分子 Nod 因子や、窒素固定を支える根粒菌代謝系・膜輸送系や宿主代謝系との関係等々、多くの知見の蓄積がある。2000年以降の複数の根粒菌種でのゲノム解読は、根粒菌遺伝子の共生関連機能の新たな発見を加速している。にもかかわらず、多段階にわたる共生成立過程には機構未解明の部分が多い。

(2)広くグラム陰性細菌のペリプラズムに局在する低分子量グルカン(根粒菌の環状グルカン cyclic-(1,2)-glucan; 合成酵素 NdvAB)および細胞外に分泌される多糖(エキソ多糖 EPS)は、根粒菌に関して感染系形成開始および伸長にそれぞれ必須である(Kawaharada et al. 2008 他)。また、ミヤコグサ根粒菌 *M. loti* の *cep* 遺伝子の変異が感染系形成を完全に阻害することを示している(Kawaharada et al. 2007)。Cep 遺伝子産物は、機能不明ながら大腸菌の外膜タンパク質の高次構造に影響を及ぼすペリプラズムタンパク質 AsmA に微弱ながら相同性を有する。以上の因子に関する変異株は、いずれも既知 Nod 因子の合成能を保持する一方で、宿主から正常な共生相手と認識されていないような反応を引き出している。ただし、各因子は宿主が感知する分子構造(または分子パターン)そのものではないと考えられている。申請者は、*M. loti* の *cep* 変異と *ndvB* 変異のサブレッサー変異(Fix<sup>-</sup>に回復)をそれぞれ分離済みであり(一部は上記論文中)、それらの同定・解析は宿主侵入に必要な細胞性質の解明に役立つと期待される。

(3)感染系を経由して根粒細胞内に取り込まれた後、根粒菌がたどる増殖と細胞分化の過程を制御する機構は全く不明であるが、そもそも細胞周期の制御に関する研究が少ない。近縁 - プロテオバクテリアの非共生細菌 *Caulobacter crescentus* には、リン酸リレー系制御因子 CtrA を含むシグナル伝達経路の

細胞周期進行における必須な役割が明らかになっている。応募者は、*ctrA* 相同遺伝子がアルファルファ根粒菌 *S. meliloti* の生育に必須であることを実験的に確認し、根粒菌における同様の制御機構とその細胞内共生過程への関与を予想している。また、大腸菌のヒートショックシグマ因子<sup>32</sup>(*rpoH* 遺伝子産物)の相同因子が *S. meliloti* には2つ存在する(RpoH1, RpoH2)。*rpoH1* 変異株は、培地中でヒートショックタンパク質の合成誘導を失うのに加え、共生に際しては宿主細胞中でバクテロイド分化を経ずに死滅することを見つけている。これは、RpoH1 レギュロンが細胞内共生の維持に関与することを示す(Mitsui et al. 2004 他)。

### 2. 研究の目的

根粒菌に特徴的な共生遺伝子・病原性関連遺伝子の研究と比べ、細菌細胞の基本体制にかかわるような遺伝子、特に生育に必須な遺伝子の共生特異的な側面は、従来積極的な研究対象となつてこなかった。本研究は、前述のような新しい視点に立つことで、一連の共生成立過程のうち分子機構未解明な部分を解決することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)使用根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* 各株は、LB 培地、LB/MC 培地、または M9 最小培地等を用いて、25°C またはヒートショック処理に必要な温度(37°C 等)で培養した。宿主植物アルファルファは、ヤンセン培地(窒素源フリー)を用いて、殺菌したパーミキュライト上で 25°C で栽培し、根粒菌接種を行った。

(2)根粒菌の転写プロファイル解析には、特注の NimbleGen マイクロアレイ(Roche Diagnostics Japan に作製委託)を用いた。これは、各遺伝子につき4種類の60mer プローブを搭載している。根粒菌全 RNA からの cDNA 合成、Cy3 標識、ハイブリダイゼーション、画像取得、シグナル強度定量は標準プロトコルを用いた。アレイデータセットのノーマライゼーションには、Robust multiarray average 解析を行った。

(3)根粒菌ゲノム上の遺伝子破壊には、2種類の戦略を採った。第一の戦略は、薬剤耐性マーカー遺伝子を、相同組換えに基づくダブルクロスオーバーを経て、ゲノム上の標的部位に挿入する方法である。マーカー遺伝子 *aacC1*、*aphII*、*aadA* 等の両側にゲノム DNA 断片を連結し、それを自殺プラスミドベクター(pK18mob 等)にクローン化し、更に根粒菌細胞中に接合伝達させた後、適切な薬剤耐性を示すクローンを選抜した。第二の戦略は、プラスミドを、相同組換えに基づくシングルクロスオーバーを経て、ゲノム上の標的部位に挿入する方法である。標的遺伝子の内部

DNA断片を pK18mob 等にクローン化し、根粒菌細胞に接合伝達させた後、適切な薬剤耐性を示すクローンを選抜した。以上選抜した遺伝子破壊株候補については、その全 DNA を鋳型に用いた PCR を行い、目的の遺伝子破壊の有無を確認した。

(4) マーカーを含まない SMc00302 遺伝子の欠失変異株 SH05 株の作製には、SMc00302 遺伝子(ORF 長 381 bp)の上流 1,013 bp 断片(-975 ~ +38) (プライマー: 5'-GGAATTCACAACATCATCTTCACCAAGTCCT-3', 5'-CGGGATCCGGACGTTGACTTTTTCTGTGTTTG-3') および下流 966 bp 断片(+111 ~ +1,076) (プライマー: 5'-CGGGATCCAAAACCGTCTATGACCCGGAATAC-3', 5'-CCCAAGCTTGACTAGACACCTAGACGAAGACTCG-3') をそれぞれ PCR 増幅した(下線部分はそれぞれ *EcoRI*、*BamHI*、*BamHI*、*HindIII* 切断部位を示す)。この 2 断片を逐次 pK18mobsacB の *EcoRI*-*HindIII* 部位に挿入した(pSH05)。ここにクローン化されている配列は、根粒菌野生型の配列と比べて、SMc00302 内部(+39 ~ +110)の 72 塩基が欠失していることになる。pSH05 を HM42 株(SMc00302::*aacC1*)に接合伝達させ、Nm および Sm 耐性の接合伝達体を選抜した。このクローンを Sm のみを含む LB/MC 培地で培養し、それを 5% sucrose を含む LB/MC 培地に塗布した。そこから出現したコロニーを LB/MC containing Sm、LB/MC containing SmNm、LB/MC containing SmGm の 3 枚の平板培地にレプリカし、の培地でのみ生育するクローン(Nm および Gm に感受性)を選抜した。得られたクローンが、ゲノム中の SMc00302 遺伝子の内部を欠失していることを確認するため、全 DNA を鋳型に、プライマー (00302-10, 5'-GCAAGTTTTTCGCTTAGGGAGAC-3'; 00302-11, 5'-TAGGCTCCATCTCCTTCGTATC-3')を用いて PCR を行った。1021 株および欠失変異株(SH05 株)で期待されるサイズは、それぞれ 494 bp および約 422 bp である。

(5) 根粒菌の生育速度の測定には、M9 + 0.2% sucrose 平板培地に生育した各菌株のシングルコロニーを M9 + 0.2% sucrose 液体培地に加え、25°C で振とうした(前培養)。この培養液を新鮮な同培地に希釈した後、25°C で振とうを行い、OD<sub>660</sub> = 0.05 から 0.2 までの時期に経時的に OD<sub>660</sub> を測定し倍加時間を求めた。

(6) 細胞内酵素活性測定のための根粒菌細胞抽出液の調製には、M9 + 0.2% sucrose 平板培地に生育したシングルコロニーを M9 + 0.2% sucrose 液体培地に植え、25°C で OD<sub>660</sub> が 0.3~0.5 になるまで振とう培養した(前培養)。140 ml の M9 + 0.2% sucrose 培地に前培養液を 5 ml を加え 25°C で OD<sub>660</sub> = ~0.3 になるまで振とう培養した。培養液から細胞を

遠心分離し、50 mM Tris-Cl (pH 7.65) で洗った後、ドライアイスまたは液体窒素で凍結して-80°C で保存した。その細胞を、窒素(酸素濃度 5 ppm 以下)を流したグローブボックス中におき、脱気済みの 1.8 ml の 50 mM Tris-Cl (pH 7.65) (プロテアーゼインヒビター cOmplete, EDTA-free; Roche を添加)に懸濁し、コバリス(エムエス機器)を用いて密閉試験管中で超音波処理を加えた。それを遠心分離し、上清を細胞粗抽出液とした。そのタンパク質の濃度は、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて定量した。

(7) 酵素活性測定: 6-ホスホグルコン酸デヒドラーゼ活性は文献(Fraenkel & Horecker 1964)に基づき、窒素を流したグローブボックス中で操作を行った。アコニターゼ活性は、文献(Henson & Cleland 1967)に基づき、窒素を流したグローブボックス中で A<sub>240</sub> を 2 min 間測定することによって行った。リンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性は、文献(Kitto 1969)に基づき、A<sub>340</sub> を 3 min 間測定することによって行った。

(8) 根粒菌ゲノム再シーケンス解析には、Nextera DNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて根粒菌全 DNA のライブラリーを作製し、それをシーケンサー MiSeq (MiSeq control software 2.3.0.3; Illumina) で分析してリードデータを得た。次に、GenoFinisher の Short Read Manager (Ohtsubo et al. 2008) を用いて、リードデータ中に菌株特異的に存在するユニークな 21 bp の配列を検索した。

#### 4. 研究成果

(1) シグマ因子 RpoH1 に依存したヒートショック応答を示す根粒菌遺伝子群の変異解析

根粒菌 Rm1021 株(野生型)と HM9 株(*rpoH1**rpoH2* 変異株)を 25°C で培養した後 37°C 10 min 間のヒートショックを加え、双方の転写プロファイルを比較することによって、発現強度 3.0 倍以上の差を示す 41 遺伝子を選抜した。これらは推定 35 個のオペロンに分かれて存在しており、更にそのうち 26 個には RpoH1 プロモーターコンセンサス類似配列を見いだした。そこで、各オペロンの先頭遺伝子を中心に、網羅的に遺伝子破壊株を作製し、各々植物接種試験に供した。その結果、一つを除いた全ての破壊株(3 つの sHSP ホモログの三重変異株を含む)において、野生株接種の場合と同様の健全な共生窒素固定能が観察された。すなわち、GroESL、HtpG、HslUV 等のメジャーなシャペロン・プロテアーゼ遺伝子は、少なくとも単独の破壊では共生窒素固定に影響を及ぼさないと判定された。他方、唯一共生窒素固定能欠損を示したのは、機能未知遺伝子 SMc00302(後に *sufT* と命名)の破壊株であった。本遺伝子は、鉄・

硫黄クラスターの生合成システム Suf の各コンポーネントをコードする *sufBCDS* 遺伝子の下流に位置している。*sufT* 破壊株の表現型が、他の *suf* 遺伝子の発現等への影響を通じて起きているのではなく、*sufT* 破壊単独の影響によって生じていることは、相補試験およびマーカーレス変異株 (SH05 株: *sufT* 変異) の作製を通じて証明した。*sufD* 遺伝子の破壊は致死であったが、*sufT* は栄養培地上での生育に必須ではないことから、SufT の機能は鉄・硫黄クラスターの生合成システムの必須コンポーネントではないと判断された。

## (2) *sufT* 遺伝子の転写解析

マイクロアレイ解析結果の確認のために、ヒートショック条件下における *sufT* 遺伝子発現の定量 RT-PCR、および 5' RACE 解析を行った。その結果、RpoH1 依存的にヒートショック時に誘導される転写が *sufT* 翻訳開始点 92bp 上流 (*sufS* ORF 内部) を起点としていることが判明した。その更に上流には、RpoH1 プロモーターコンセンサス配列が存在した。次に、RpoH1 機能に依存しない高発現プロモーターである *groESL1* プロモーターを *sufT* 上流に連結し、HY658N 株 (*rpoH1* 変異株) に導入することによって、*rpoH1* 変異株の共生窒素固定能欠損が抑圧されるかどうかを調べた。その結果、*rpoH1* 変異株の表現型には変化はなく、すなわち、*sufT* 発現の RpoH1 による誘導は、必ずしも共生窒素固定における RpoH1 の必須性を説明するものではないと判断された。

## (3) 培地中での栄養増殖における SufT の役割の解析

SufT は DUF59 様配列を有している。DUF59 ファミリーは原核生物・真核生物を含め広く分布し、その分子機能は不明なものの、鉄・硫黄タンパク質の生合成と関連する役割が知られている。そこで、根粒菌の *sufT* 変異株には、共生窒素固定以外の広い影響が予想された。Rm1021 株と SH05 株の 25 °C での生育を比較すると、SH05 株の倍加時間は LB/MC 培地で 1.8 倍、M9 培地で 2.4 倍増加していた。また、プレート培地でのアッセイによると、高温 (39 °C) 感受性、酸性 pH 感受性 (pH 6.2)、鉄キレーター (250 μM dipyriddy) 感受性が SH05 株で増加するとともに、M9 培地での生育遅延が観察された。これらの点の一部では、*rpoH1* 変異株との違いも明らかであった。次に、細胞内の鉄・硫黄タンパク質の生合成への影響を調べるために、鉄・硫黄酵素として 6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (6-PGDH)、アコニターゼ、グルタミン酸合成酵素 (GltS) を取り上げ、Rm1021 株と SH05 株との間で活性を比較した。その結果、SH05 株の各酵素活性は、野生株の活性の 10%、45%、50% に低下していた。一方、比較のために測

定したリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (鉄・硫黄酵素ではない) では、SH05 株における活性低下は観察されなかった。以上より、*sufT* 変異は根粒菌の生育にも影響を与え、その影響は鉄・硫黄タンパク質の生合成の変化を通じて及ぼされていることが示唆された。

## (4) 細胞内鉄レベルの制御と SufT 機能との関連性

SH05 株を M9 液体培地を用いて植え継ぎを繰り返すことによって、M9 プレート培地上でのコロニー出現が早まるクローンを 3 個独立に選抜した。PCR によって、それらの株は *sufT* 欠失変異を維持していることを確認した。すなわち、*sufT* 変異による M9 培地での生育阻害が、第二の変異によって抑圧されていると判断し、その抑圧変異の探索を試みた。Rm1021 株、親株 (SH05 株) を含めた全ゲノム再シーケンス解析によって、抑圧変異株に特異的に存在する変異を同定することができた。そのうち、包括的鉄制御因子をコードする *rirA* 遺伝子については、抑圧変異株 3 株とも ORF 内に欠失変異が見つかったため、抑圧原因変異の候補であると考えた。そこで、改めて Rm1021 株において *rirA* 遺伝子破壊を行い、形質導入によってそれを SH05 株に移した後 (SH024 株: *sufT rirA* 二重変異)、その表現型を試験した。その結果、SH024 株は M9 培地中で SH05 株より早い増殖を示し、また、Rm1021 株と同レベルの 6-PGDH 活性およびアコニターゼ活性を示した。更に、SH024 株の植物接種は、Rm1021 株接種と同様の共生窒素固定を示した。すなわち、*sufT* 変異の表現型は、調べた範囲内では全て *rirA* 変異によって抑圧されることが判明した。

## (5) SufT 機能の共生窒素固定における重要性

SufT の機能が鉄・硫黄クラスター生合成に關与するものとして、その欠損の影響が共生窒素固定において著しい理由として、共生過程特異的に鉄・硫黄タンパク質の需要が高まること、および根粒菌と宿主植物との相互作用が細胞内の鉄・硫黄タンパク質の維持に不利な条件を生み出していることが考えられる。の側面は、ニトロゲナーゼが、普遍的な [4Fe-4S] クラスター以外に FeMo-co (7Fe, 9S, Mo を含む) P-cluster (8Fe, 7S を含む) を補因子として有し、それらが基本的な鉄・硫黄クラスターから合成されることにも現れている。の具体的な例は、根粒菌の感染に伴って宿主植物に形成される感染系内部、感染細胞、根粒老化組織等で顕著な活性酸素 (スーパーオキシド、過酸化水素) の発生が挙げられる。根粒菌細胞内の活性酸素の攻撃の主な標的が、脱水酵素の活性中心にある鉄・硫黄クラスターであることが注目される。

## (6) SufT 機能と包括的鉄制御との関連

細胞にとっての鉄は、必須栄養素である反面、Fenton 反応を通じたヒドロキシルラジカル生成の原因となるため、細胞内の鉄レベルは厳密な制御下にある。限られた鉄レベルは鉄・硫黄クラスター生合成に不利に働き、結果として SufT の機能の重要性が増すことになる。逆に、*rirA* 変異によって細胞内鉄レベルが上昇すると、必要な鉄・硫黄クラスター生合成に SufT 機能が不要となると考えられる。更に、SufT の作用は、SUF システムの中で鉄源供給に関する部分に働いていることが示唆される。

### 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)

#### [雑誌論文](計 23 件)

Borjigin, N., K. Furukawa, Y. Shimoda, S. Tabata, S. Sato, S. Eda, K. Minamisawa, and H. Mitsui. 2011. Identification of *Mesorhizobium loti* genes relevant to symbiosis by using signature-tagged mutants. *Microbes Environ.* 26:165-171 (査読有)  
<http://doi.org/10.1264/jsme2.ME10213>

Eda, S., H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2011. Involvement of the SmeAB multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:2855-2862 (査読有)  
DOI: 10.1128/AEM.02858-10

Kawaharada Y., H. Kiyota, S. Eda, K. Minamisawa, H. Mitsui. 2010. Identification of the *Mesorhizobium loti* gene responsible for glycerophosphorylation of periplasmic cyclic -1,2-glucans. *FEMS Microbiol Lett.* 302:131-137 (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01843.x>

#### [学会発表](計 8 件)

三井久幸：根粒菌の鉄・硫黄タンパク質生合成促進因子が植物相互作用に及ぼす影響、日本農芸化学会 2015 年度大会、平成 27 年 3 月 26-29 日、岡山大(岡山県岡山市)

三井久幸：根粒菌の鉄・硫黄タンパク質生合成促進因子が植物共生に果たす役割、第 9 回日本ゲノム微生物学会年会、平成 27 年 3 月 6-8 日、神戸大(兵庫県神戸市)

佐々木祥平、南澤究、三井久幸：根粒菌シグマ因子 RpoH1 の制御を受ける遺伝子が鉄イオウタンパク質生合成に果たす役割、日本農

芸化学会 2014 年度大会、平成 26 年 3 月 27-30 日、明治大(神奈川県川崎市)

佐々木祥平、門屋亨介、笠原康裕、南澤究、三井久幸：根粒菌シグマ因子 RpoH1 の制御を受ける機能未知遺伝子の鉄硫黄タンパク質生合成への関与、第 8 回日本ゲノム微生物学会年会、平成 26 年 3 月 7-9 日、東京農大(東京都世田谷区)

佐々木祥平、南澤究、三井久幸：Search for a key target of RpoH1, the sigma factor essential for an effective symbiosis, in *Sinorhizobium meliloti*. 18th International Congress on Nitrogen Fixation、平成 25 年 10 月 14-18 日、シーガイア(宮崎県宮崎市)

佐々木祥平、南澤究、三井久幸：根粒菌の共生窒素固定に必須なシグマ因子 RpoH1 レギュロン中の鍵となる遺伝子の探索、植物微生物研究会第 22 回研究交流会、平成 24 年 9 月 25-27 日、神戸大(兵庫県神戸市)

三井久幸：Search for a key target of the sigma factors RpoH1/RpoH2 during symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*, 10th European Nitrogen Fixation Conference、平成 24 年 9 月 2-5 日、ミュンヘン大(ミュンヘン、独)

三井久幸：共生窒素固定に重要な根粒菌シグマ因子 RpoH1/RpoH2 の解析、第 6 回日本ゲノム微生物学会年会、平成 24 年 3 月 10-12 日、立教大(東京都豊島区)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

三井 久幸 (MITSUI, Hisayuki)

東北大学・大学院生命科学研究所・准教授  
研究者番号：40261466