



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular mechanism underlying the N ₂ O-reducing ability of Campylobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent
Author(s)	土屋, 地郎
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第16713号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16713
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99558
Type	doctoral thesis
File Information	Jiro_Tsuchiya_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：土 屋 地 郎

学 位 論 文 題 目

Molecular mechanism underlying the N_2O -reducing ability of *Campylobacter*
isolated from a deep-sea hydrothermal vent

(深海底熱水孔環境から分離された *Campylobacter* 綱細菌の N_2O 還元能を規定する分子機構)

亜酸化窒素(N_2O)は温室効果およびオゾン層破壊をもたらし、その大気中濃度は増加傾向にある。 N_2O の主たる発生要因は、微生物によるアンモニア酸化や脱窒などの窒素代謝である。脱窒は N_2O の生成反応である一方、その最終ステップは N_2O を分子状窒素へと還元する、唯一の生物学的な N_2O 消失反応として知られている。微生物による N_2O 還元は N_2O 還元酵素(NosZ)によって触媒され、これは従来分子系統学的に clade I と clade II に分類される。clade I 型 *nosZ* を保有する微生物に比べ、clade II 型 *nosZ* を保有する微生物は多様な環境に分布し、NosZ の N_2O への親和性が高いことから、環境中の N_2O 消失に貢献する微生物資源として着目されている。

沖縄トラフ深海底熱水孔環境から分離された *Nitrosophilus labii* HRV44^T 株は、clade II *nosZ* を有する好熱性の化学合成独立栄養細菌である。水素を電子供与体として N_2O を還元する能力を持ち、その活性は近縁種よりも最大 20 倍高く、高温かつ微酸性下という特異な条件下で N_2O と CO_2 を利用し増殖することから、二大温室効果ガスの同時除去を可能とする有望な海洋微生物資源である。これまでに、ゲノム情報に基づく解析から、 N_2O 還元酵素遺伝子群(*nos*)の構造や NosZ の一次構造について、近縁種のそれと比較を進めてきた。しかしながら、HRV44^T 株の高い N_2O 還元活性を可能とする要因を明らかにするには至っていない。そこで本研究では、トランスクリプトームの観点から、HRV44^T 株が示す高い N_2O 還元能を規定する分子機構を理解することを目的とした。

第 1 章では、HRV44^T 株の N_2O に対する遺伝子発現応答、および *nos* 遺伝子の転写制御機構を理解するために、 N_2O 非存在下から存在下への移行を伴う嫌気的な培養条件で時系列トランスクリプトーム解析を行なった。電子供与体を H_2 、受容体を 0.1% O_2 (v/v)とした培地で 24 時間培養後、気相部に N_2O を注加した。 N_2O 注加前後で経時的に RNA を抽出し、一分子 long-read RNA-Seq を行なった。その結果、HRV44^T 株の *nos* 遺伝子やその他の脱窒遺伝子は、 N_2O の有無に依らず嫌気条件下で恒常的に発現し、 N_2O 注加後には NosZ への電子伝達に参与する cytochrome *bc₁* complex や cytochrome *c* の遺伝子発現が上方制御されることを見いだした。また、因果推論を通じて、従来、*nosZ* 遺伝子の発現を正に制御すると報告されている Crp/Fnr superfamily の転写制御因子が、HRV44^T 株では、 N_2O 注加後に発現が下方制御され、*nosZ* 遺伝子の発現との間に有意な負の因果関係を示すことが推察された。以上より、HRV44^T 株は N_2O 還元下において *nos* 遺伝子の発現を上方制御するのではなく、

遺伝子発現レベルで NosZ への電子伝達を促進することにより、高い N₂O 還元活性を示すことが示唆された。さらに、Crp/Fnr 転写因子が *nosZ* の転写抑制因子として機能し、N₂O 還元活性の調節に寄与することを示唆した。

第 2 章では、HRV44^T 株と N₂O 還元活性が異なる近縁種 3 株を対象に、4 株に共通する N₂O への応答および HRV44^T 株に特有の応答を明らかにすることを目的とした。4 株全てが増殖可能な培養条件で培養したのち、気相部に N₂O を注加することで、N₂O 消費量、電子供与体(H₂)の消費量、N₂O 還元による細胞増殖、関連するトランスクリプトームを解析し、種間比較を行なった。その結果、HRV44^T 株は N₂O 以外の電子受容体の存在下でも、近縁種よりも高い N₂O 消費や H₂ 消費および細胞増殖を示した。このことから HRV44^T 株は、近縁種とは対照的に、複数の基質の存在下でも N₂O を呼吸基質として積極的に利用してエネルギーを生成できることが明らかとなった。N₂O 消費を示した近縁種とは異なり、HRV44^T 株では H₂ 酸化を触媒する H₂-uptake [NiFe] hydrogenase や Nos タンパク質の遺伝子発現は変動しなかったことから、H₂ と N₂O の消費量を象徴する遺伝子発現の種間差は確認されなかった。一方、N₂O 注加後には、N₂O 消費活性の高低に関わらず 4 株で共通して電子伝達タンパク質である cytochrome *c* の遺伝子発現が上方制御された。特に、HRV44^T 株では、N₂O 注加後の cytochrome *c* の総発現量が近縁種よりも 4~16 倍高いことを見いだした。第 1 章で、cytochrome *c* は HRV44^T 株の N₂O 還元における重要な中間電子伝達体である可能性が示されたことを踏まえ、H₂ 酸化が駆動する電子供与、および高発現 cytochrome *c* に起因する NosZ への高効率な電子伝達が、HRV44^T 株の高い N₂O 還元を規定する重要な要因であることを示唆した。

第 3 章では、第 1 章および第 2 章で見いだされた HRV44^T 株の N₂O 還元能を規定する新規な分子機構の実験的検証に向けて、HRV44^T 株の遺伝子操作系の基盤技術の確立を目指した。特に、ゲノム解析より HRV44^T 株は自然形質転換に必要な遺伝子セットを概ね揃えていることが明らかになったことから、自然形質転換能を有するか調べた。その結果、HRV44^T 株の約 300~2600 bp の標的遺伝子を自然形質転換によって抗生物質耐性遺伝子に置換できることを示した。特に HRV44^T 株では、組換え頻度は至適増殖温度に近い 50°C よりも増殖可能な温度帯の下限を下回る 37°C で高いことが示唆された。

以上、本研究では熱水孔由来の *Campylobacter* 綱細菌の N₂O に対する応答を、時系列および近縁種間のトランスクリプトーム解析によって明らかにし、HRV44^T 株の高い N₂O 還元能を規定する分子機構について新たな知見を得た。嫌気条件下における恒常的な *nos* 遺伝子の発現、Crp/Fnr 転写因子による転写制御、NosZ への高効率な電子伝達、が高い N₂O 還元活性を実現するために重要であることが示唆された。これらの特性によって、HRV44^T 株は深海底熱水孔環境において、N₂O を電子受容体として利用するスペシャリストとして、新たなニッチを獲得している可能性がある。今後は、逆遺伝学的手法の確立に加え、NosZ の酵素活性やその成熟プロセス、および電子伝達体の相互作用を明らかにすることで、HRV44^T 株の N₂O 還元能のさらなる理解、および環境浄化への応用に貢献できると期待される。