

ビフェニル/PCB 分解菌 *Pseudomonas putida* KF715 株のゲノムの不安定さに
関わる遺伝子群の機能解析

(Characterization of the genes affect to genomic plasticity of *Pseudomonas putida* KF715)

二宮優予

(環境微生物学研究室)

【目的】本研究室所有にはビフェニル分解菌が複数存在している。我々はこれらビフェニル分解菌を KF 株と命名し、ビフェニル/PCB 分解能、分解遺伝子群を中心に長年研究を行ってきた。一方で、*Pseudomonas putida* KF715 株は他菌株に高効率に自身の bph 遺伝子群を転移する能力を有していることが知られていたが、そのメカニズムについては不明なままであった。近年行われた KF 株のゲノム解析の結果、比較ゲノム解析が可能となり、KF 株が有する bph 遺伝子群の特徴が明らかとなった。特に KF715 株はゲノム中に integrase や IS、retro element をコードする遺伝子群が他の *P. putida* 細菌に比べ顕著に多く存在し、これら遺伝子群が KF715 株の bph 遺伝子群をはじめとするゲノムの不安定さに関わっていることが強く示唆された。そこで本研究では、KF715 株の bph 遺伝子群の近傍に存在する上記遺伝子群について機能解析を行い、KF715 株、ひいてはウィルス等を含む水平伝播する遺伝子について知見を得ることを目的とした。

【方法及び結果】相同組換えによる integrase 破壊株の構築を試みた。その結果、破壊用ベクター、KF715 株への導入はできたが、ダブルクロスオーバー株の取得ができず、破壊株を構築することができなかった。破壊用 DNA 断片は、内部配列を欠失させたのみで抗生物質耐性遺伝子等の選択マーカーを挿入しておらず、選択培地による破壊株の選択が困難であったためであると考察される。一方、シュードモナス属に対し CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムの導入成功例が上がったことにより、同シュードモナス属の KF715 株に導入し、遺伝子破壊株を構築し、野生株との表現型の比較を行う。現段階では KF715 株の ICE**bph-sal** 上流にある integrase に対し鋳型 RNA をコードする pACRISPR と Cas9 タンパク質をコードする pCasPA の導入が出来ており、KF715 株に各種ベクターを導入している段階である。