

環境とバイオテクノロジー  
2020 年度採択研究者

2021 年度 年次報告書
------------------

木村 善一郎

呉工業高等専門学校 環境都市工学分野  
准教授

遺伝子を釣り針に任意環境微生物を特異的に獲得する

## § 1. 研究成果の概要

環境中の希少種の生理学的性質はほぼ未解明である。これは菌の性質を調べるためには分離株を得る必要があるが、希少種はその「単純な数の少なさ」に由来し分離が著しく困難である。環境中の複合微生物系を理解し、制御することは、究極的には構成する希少微生物群を含むすべての細菌群を分離し、その生理学的性質を調査、その各種微生物群による生命活動総体である生態系を再構成することに等しい。しかしながら前述のように希少種の多くは未分離である。大多数の希少種は 16Sr rRNA 遺伝子配列を対象とする菌叢解析による系統分類データが得られているのみに留まっている。

筆者はこの課題解決のために CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を複合微生物系に対して適用することで任意微生物を分離することを試みている。2021 年度は従前低かった変異体取得効率の向上を目指し、CRISPR/Cas9 との共役による取得効率向上について実績のある  $\lambda$  Red システムの導入を試みた。具体的には  $\lambda$  Red システムに関与する Gam, Exo, Bet 遺伝子を pCas9 プラスミドに追加で導入した。更に gRNA,  $\lambda$  Red システムの発現を従来の基質誘導型に変更した。この操作により Cas9 と gRNA をコードしたプラスミドを細胞に保持した状態で細胞を高濃度化可能となった。高濃度細胞を対象にドナーDNA を細胞導入することで、標的部位に設計通りの変異が導入された変異体取得効率の向上に成功した。本成果により、筆者が標榜する Genome Editing Based Microbes Isolation (GEBMI) の実環境試料への実装への目途が付いたと考えている。