

ポスト大腸菌はこれ！ ～シアノバクテリアの育種技術の開発～

東京農業大学 生命科学部 バイオサイエンス学科
教授 渡辺 智

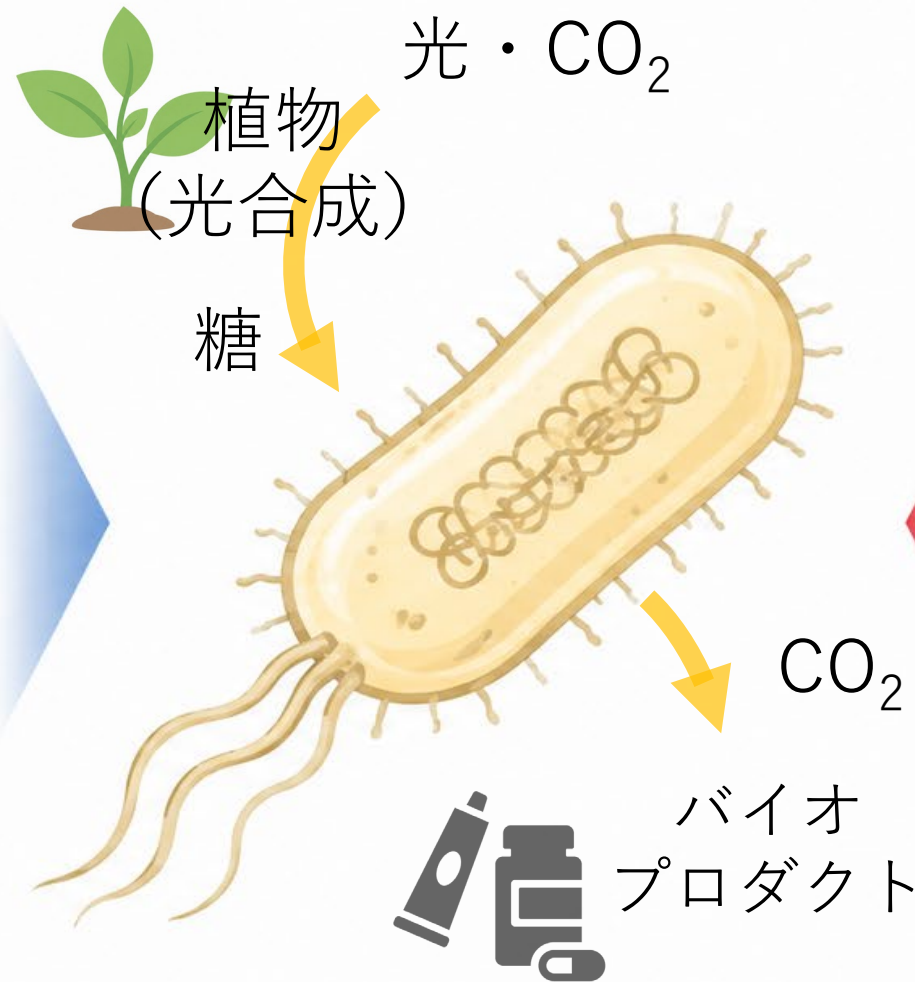
2026年7月7日

微生物工学の主役は大腸菌



大腸菌の強み

- 遺伝子工学の代表選手：
高発現ベクター、遺伝子
改変、増殖の速さ
- 産業利用実績が豊富
(例) 医薬品、酵素
組換えタンパク質



大腸菌の課題

- 有機炭素源が必須
： 培地コスト、
糖原料への依存
(食糧との競合)
- CO₂削減への要求
- 持続可能性の課題

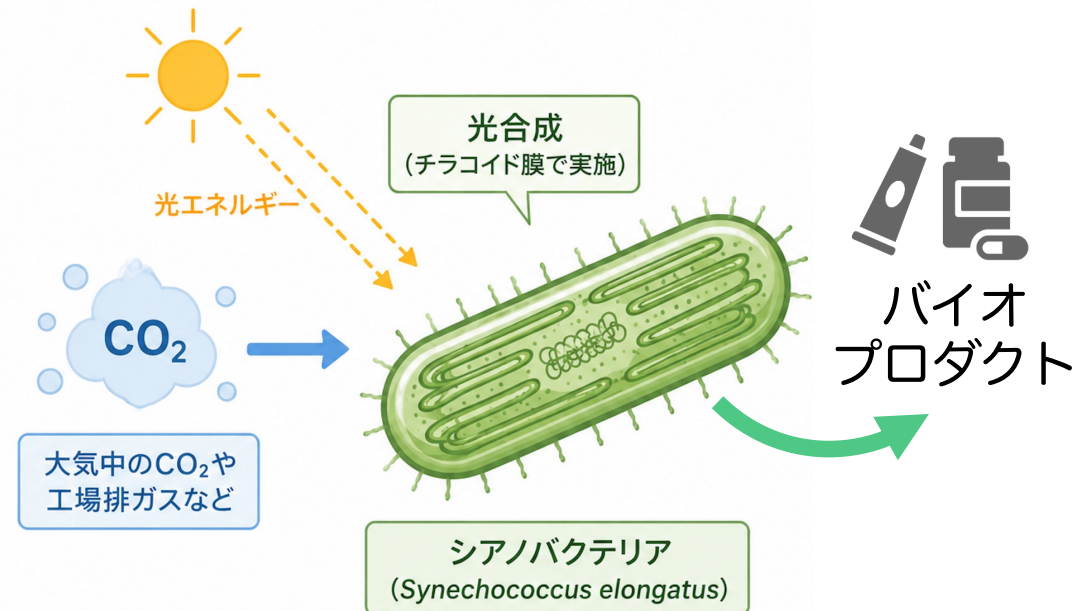
CO₂を直接利用できる微生物は？

ポスト大腸菌：シアノバクテリア

Synechococcus elongatus PCC 7942



- 光で育つ
- CO₂を直接利用
- 原核生物なので遺伝子工学がしやすい
- 植物の葉緑体と同様の細胞内環境



ポスト大腸菌：シアノバクテリア

Synechococcus elongatus PCC 7942



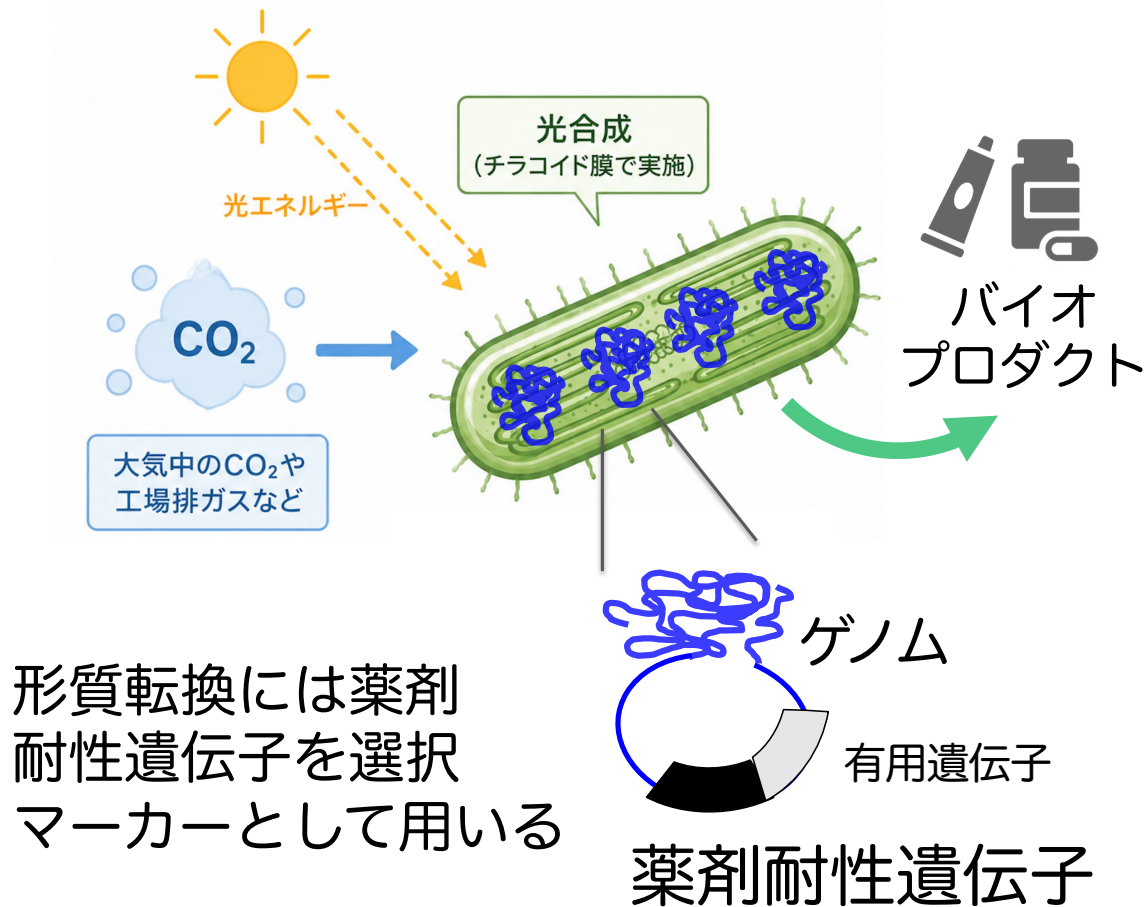
- 光で育つ
- CO₂を直接利用
- 原核生物なので遺伝子工学がしやすい
- 植物の葉緑体と同様の細胞内環境

シアノバクテリアの課題

- 遺伝子工学ツールが限られる
- 開放培養系での培養

- マーカーレス遺伝子導入法
- 捕食を回避できる変異の誘導法
- 高発現ベクター

新技術① マーカーレス遺伝子導入



光合成を活用する

- ▶ 環境に配慮したい
- ▶ (できれば) 開放系で培養したい

問題点

- 利用できる薬剤耐性マーカー遺伝子の制限 (スペクチノマイシン、クロラムフェニコール、カナマイシン、ゲンタマイシン)
- 薬剤耐性遺伝子の環境への流出

高温感受性変異株・抑圧変異株

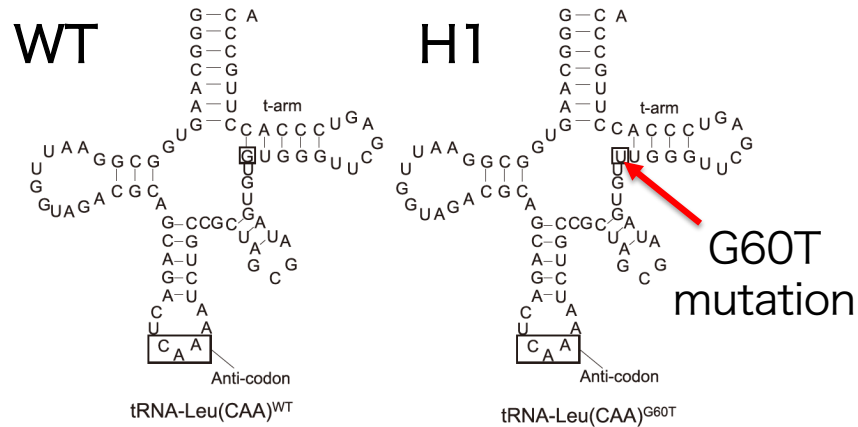
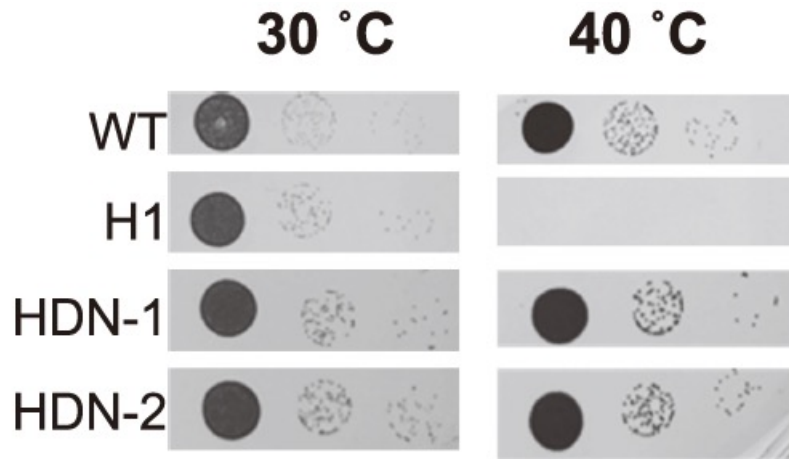
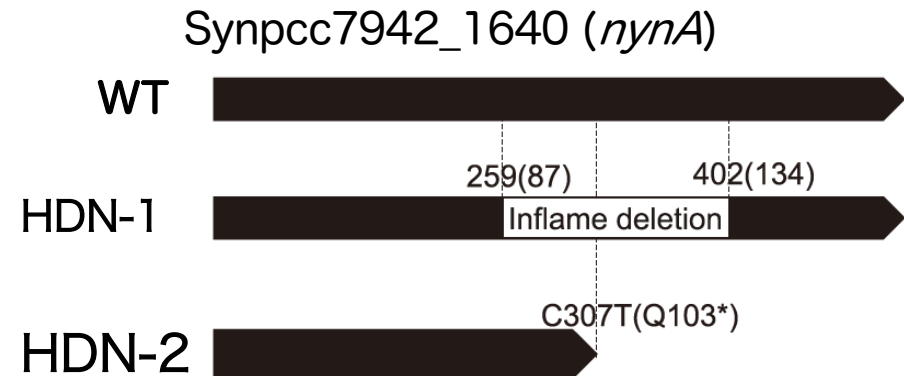


Fig. 2. Secondary structure of tRNA-Leu(CAA).



tRNA-Leu (CAA)^{G60T} 変異をもつシアノバクテリア (*Synechococcus* 7942) は高温 (40°C) 感受性を示す

高温感受性は *nynA* 遺伝子 (機能未同定エンド型 RNaseをコード) の欠損により抑圧される



Hasegawa, JGAM, 2023

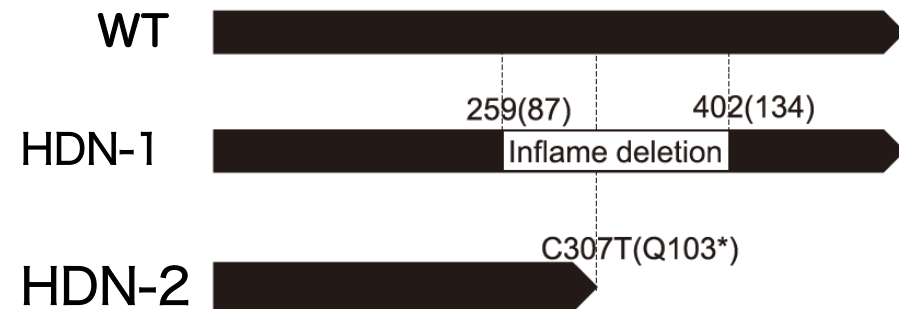
高温感受性変異株・抑圧変異株

nynA 遺伝子をマーカー
フリーの遺伝子導入に利用
できるのではないかな？

tRNA-Leu (CAA)^{G60T} 変異をもつシアノバクテリア
(*Synechococcus* 7942) は高温 (40°C) 感受性
を示す

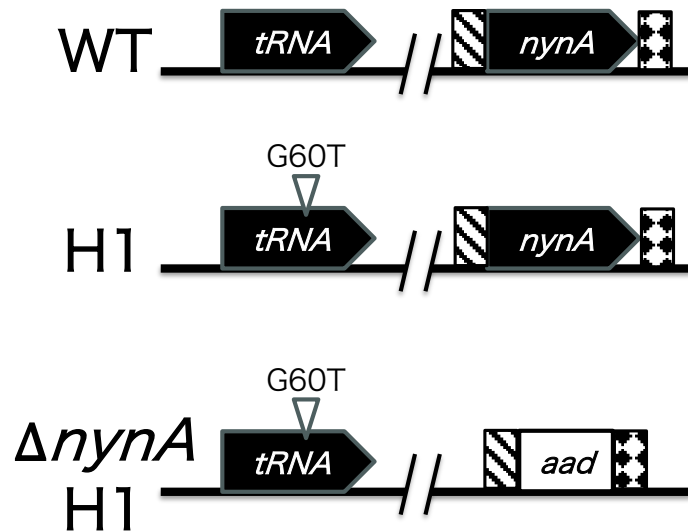
高温感受性は*nynA* 遺伝子 (機能未同定エンド型
RNaseをコード) の欠損により抑圧される

Synpcc7942_1640 (*nynA*)



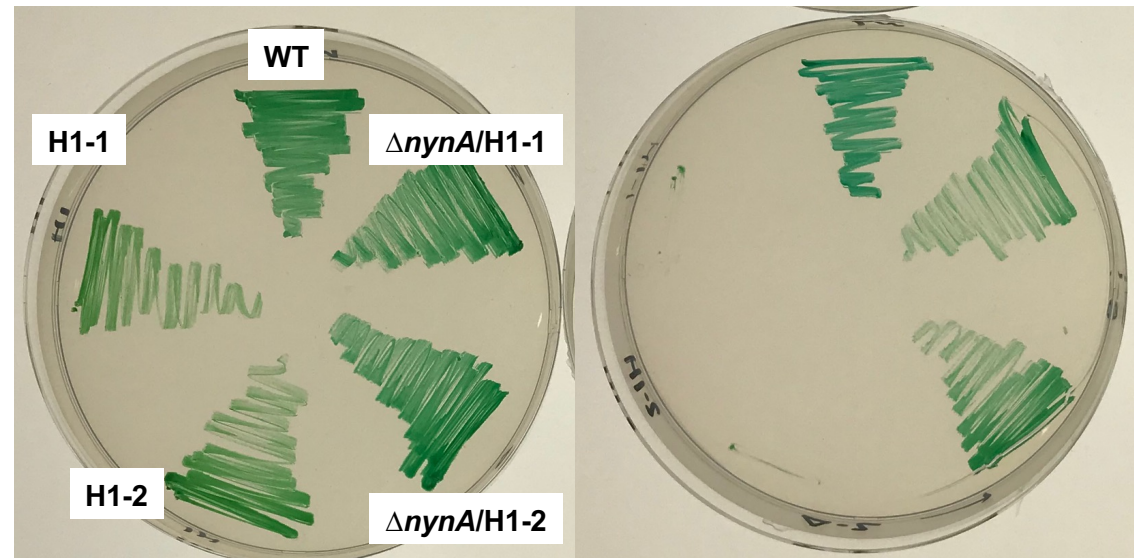
Hasegawa, JGAM, 2023

高温感受性と *nynA* 遺伝子破壊による抑圧



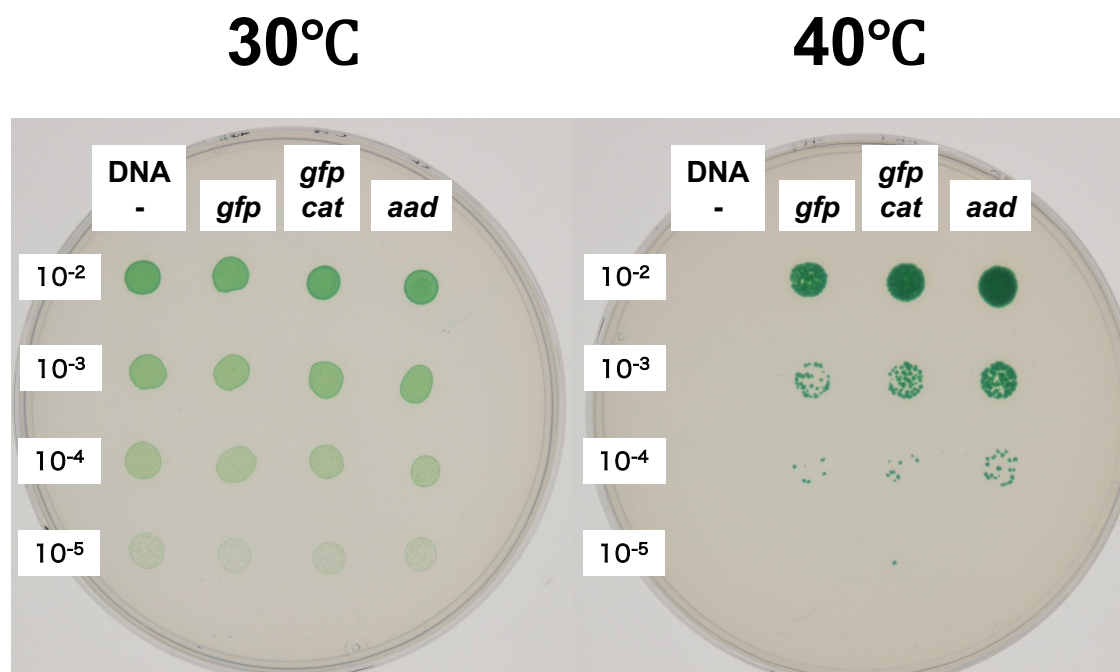
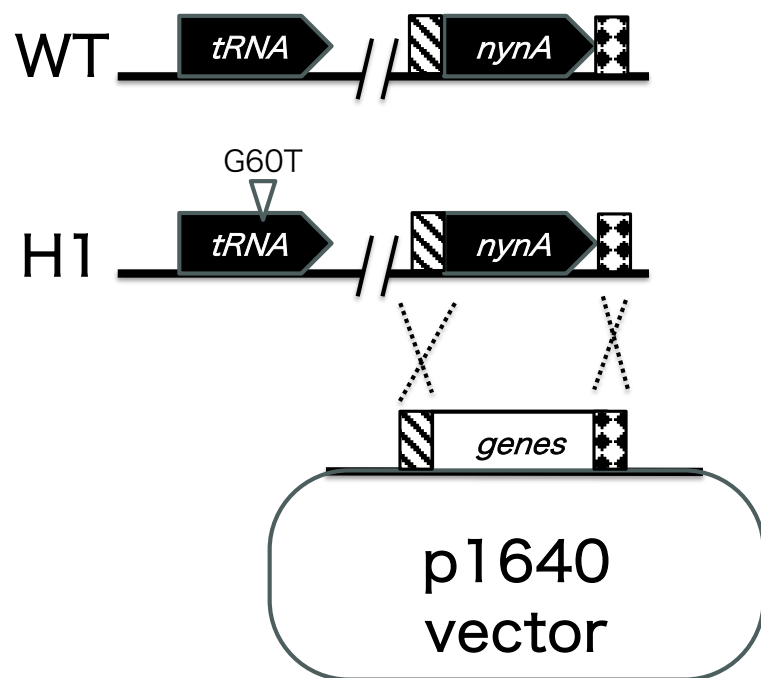
30°C

40°C



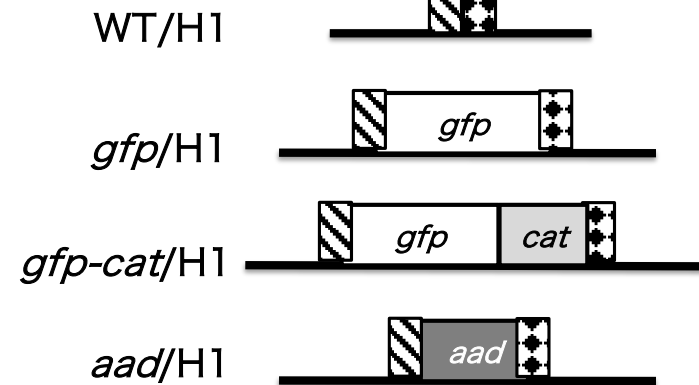
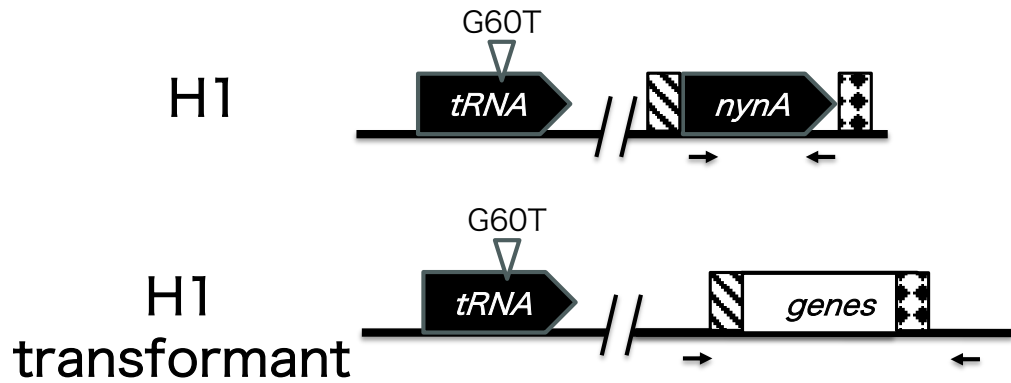
BG11 plate, 3 days

nynA 遺伝子を標的としたGFP導入

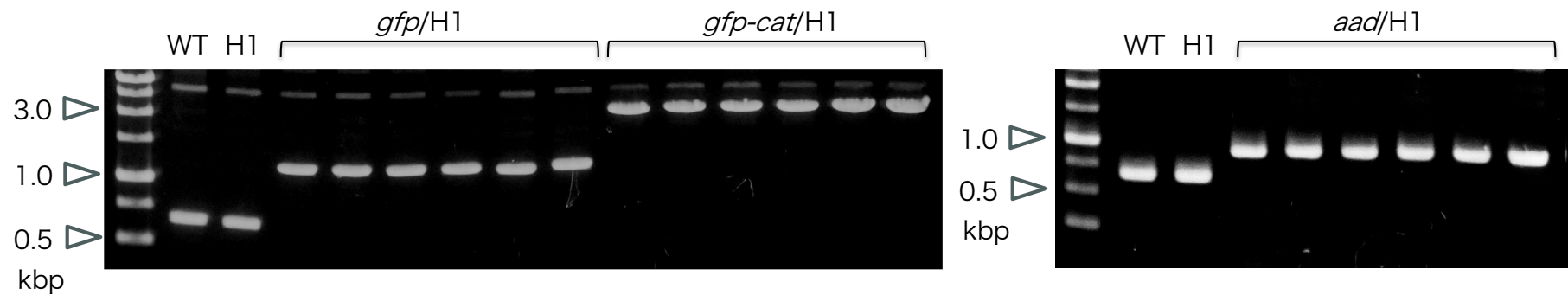


Transformants of H1 strain, BG11 plate, 7 days

nynA 遺伝子を標的としたGFP導入

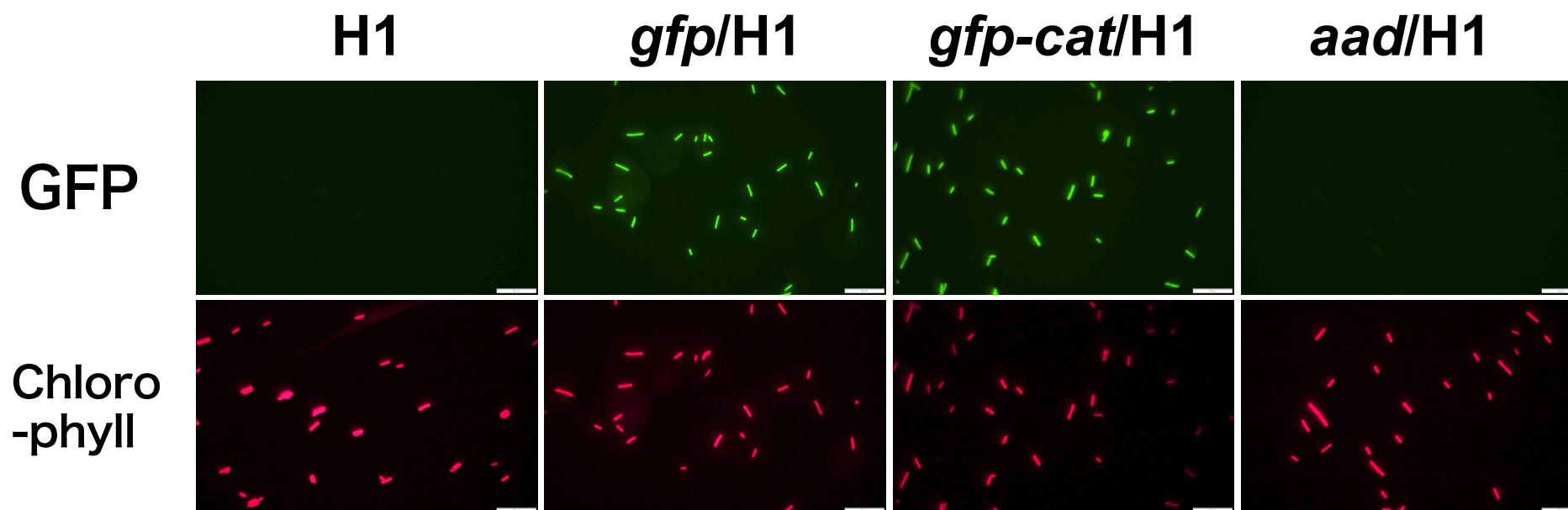


PCR analysis



nynA 遺伝子を標的としたGFP導入

Fluorescence microscopy



Bar: 20 μ m

nynA 遺伝子を標的としたCnsA導入

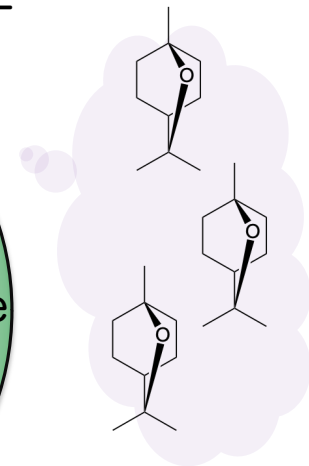
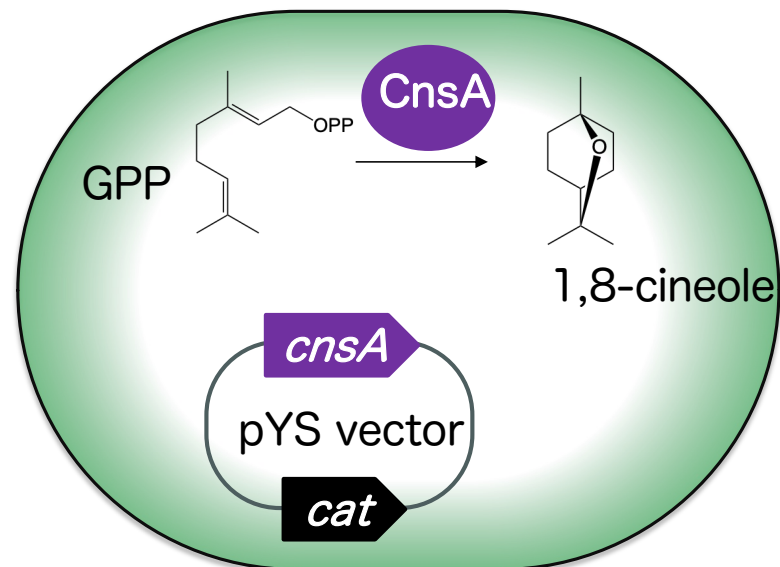
1,8-シネオール

ユーカリ由来の揮発性
テルペノイド（モノテ
ルペン）



シアノバクテリア

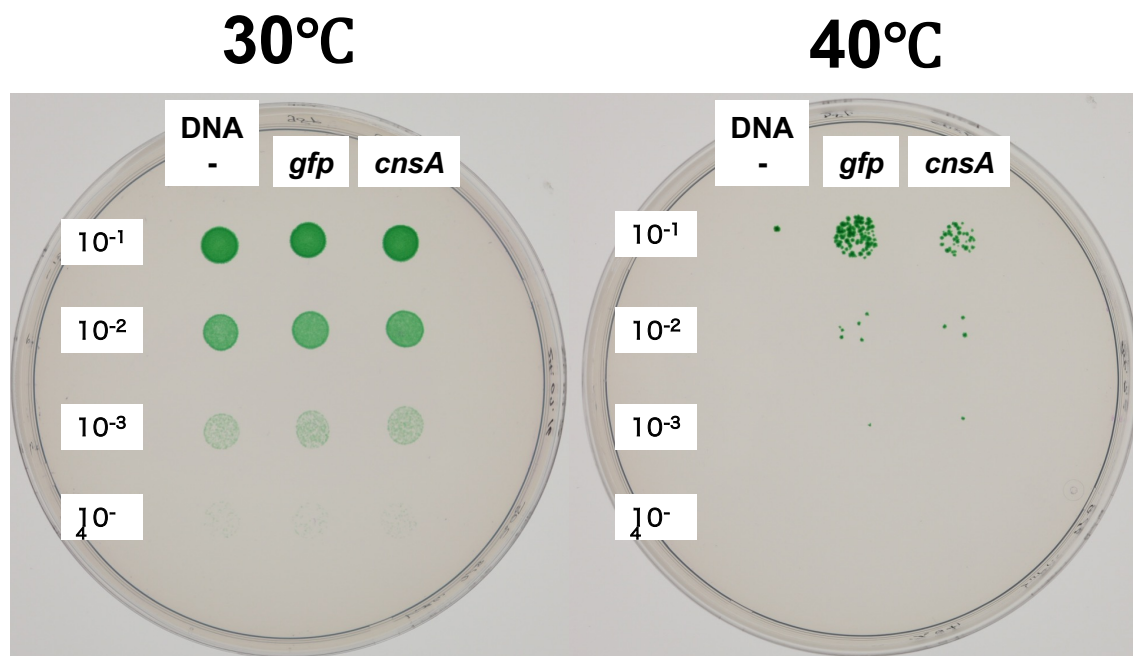
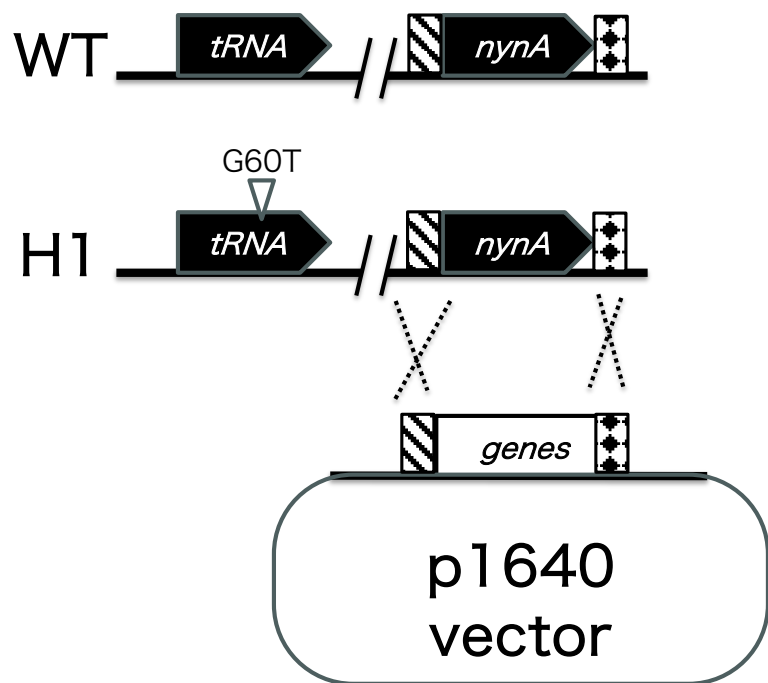
Synechococcus elongatus PCC 7942



200 $\mu\text{g/hr} \cdot \text{gFW}$ of production

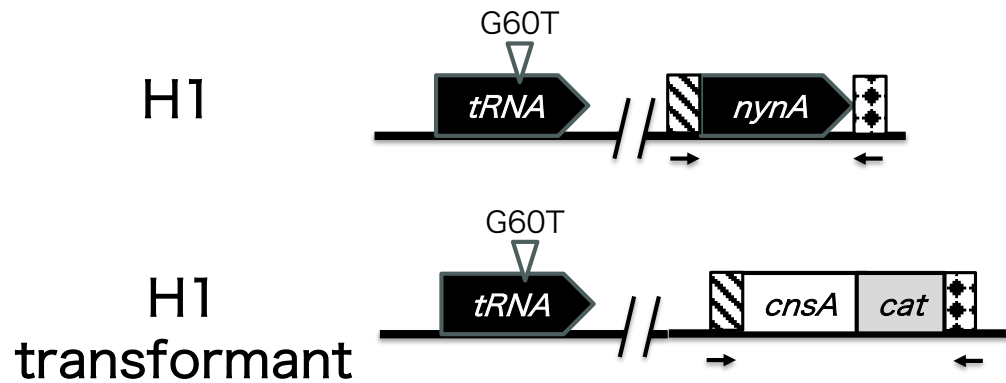
Sakamaki et al., BBB, 2023

nynA 遺伝子を標的としたCnsA導入

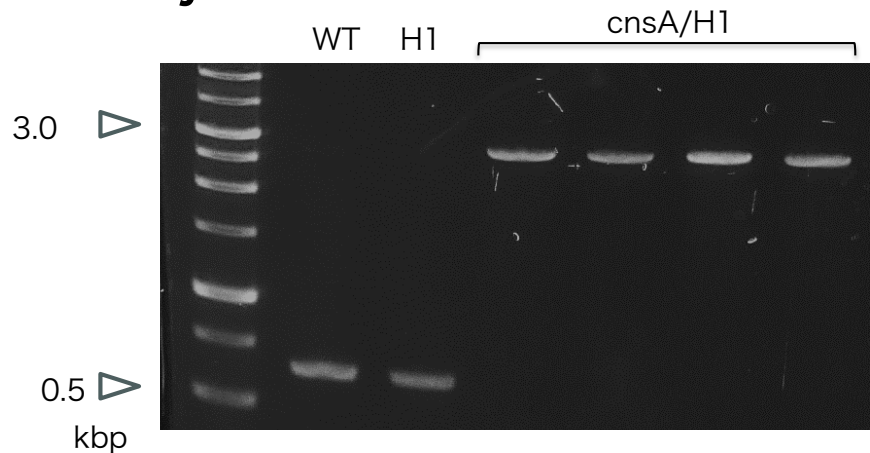


Transformants of H1 strain, BG11 plate, 7 days

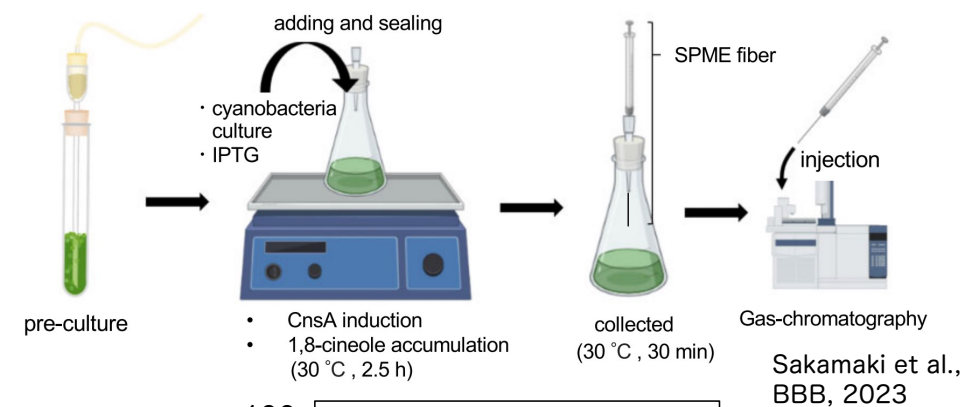
nynA 遺伝子を標的としたCnsA導入



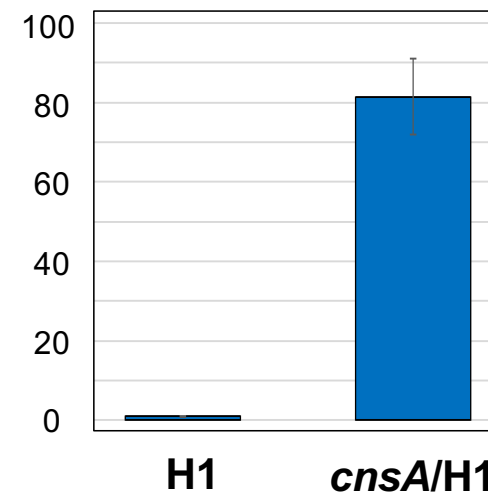
PCR analysis



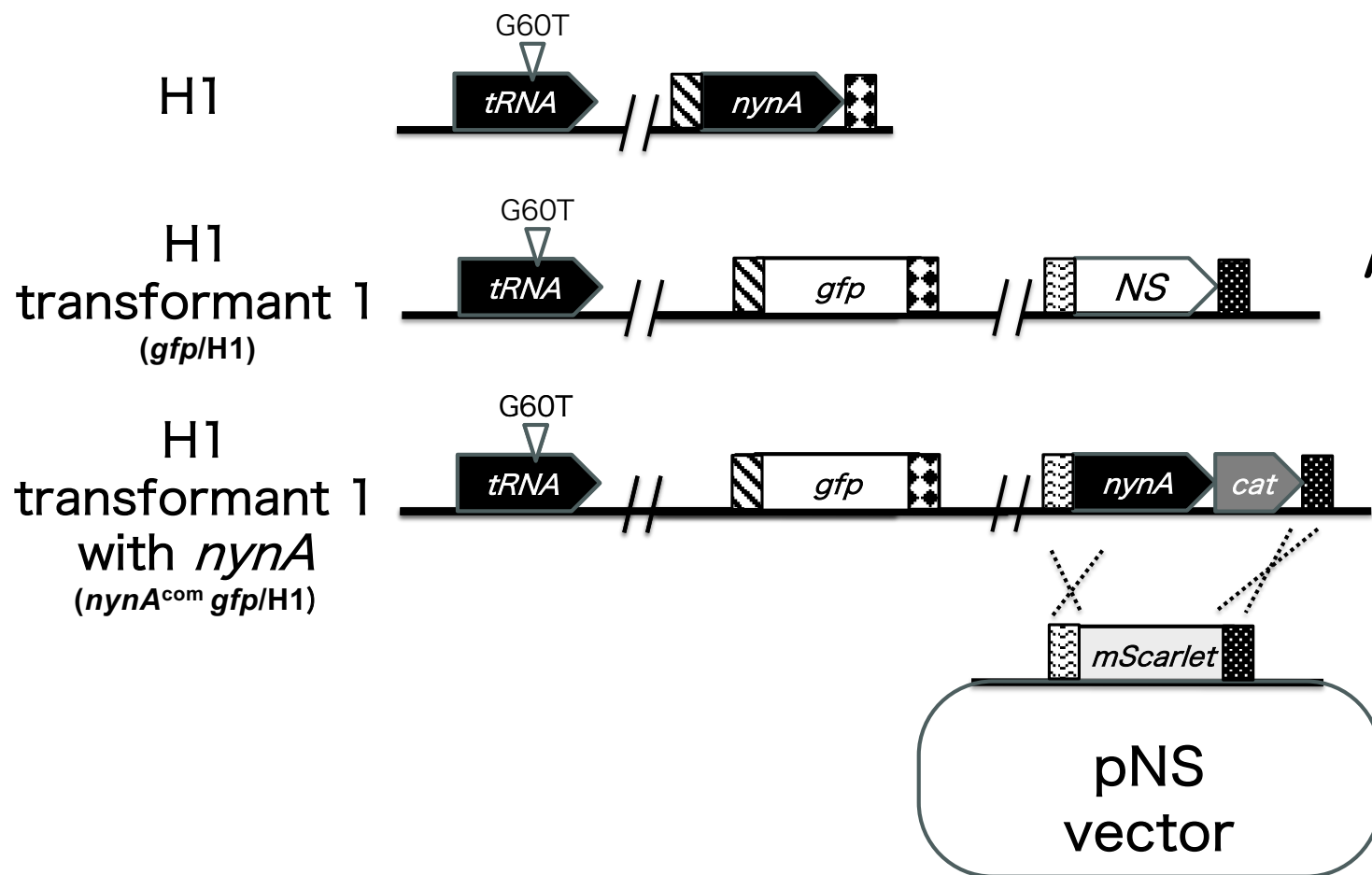
GC-Massによるシネオール生産量の解析



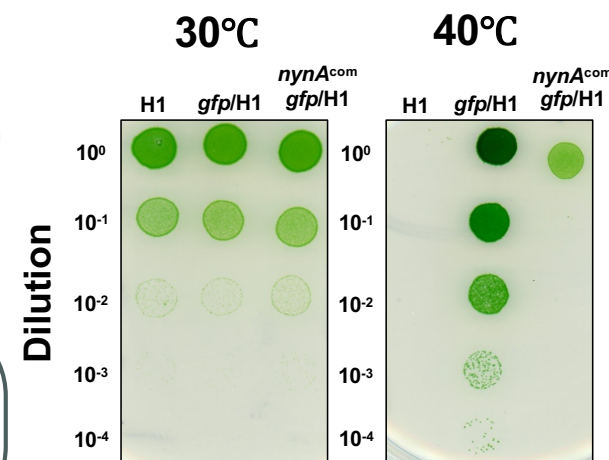
1,8-シネオール生産量
($\mu\text{g/g}$ WCW)



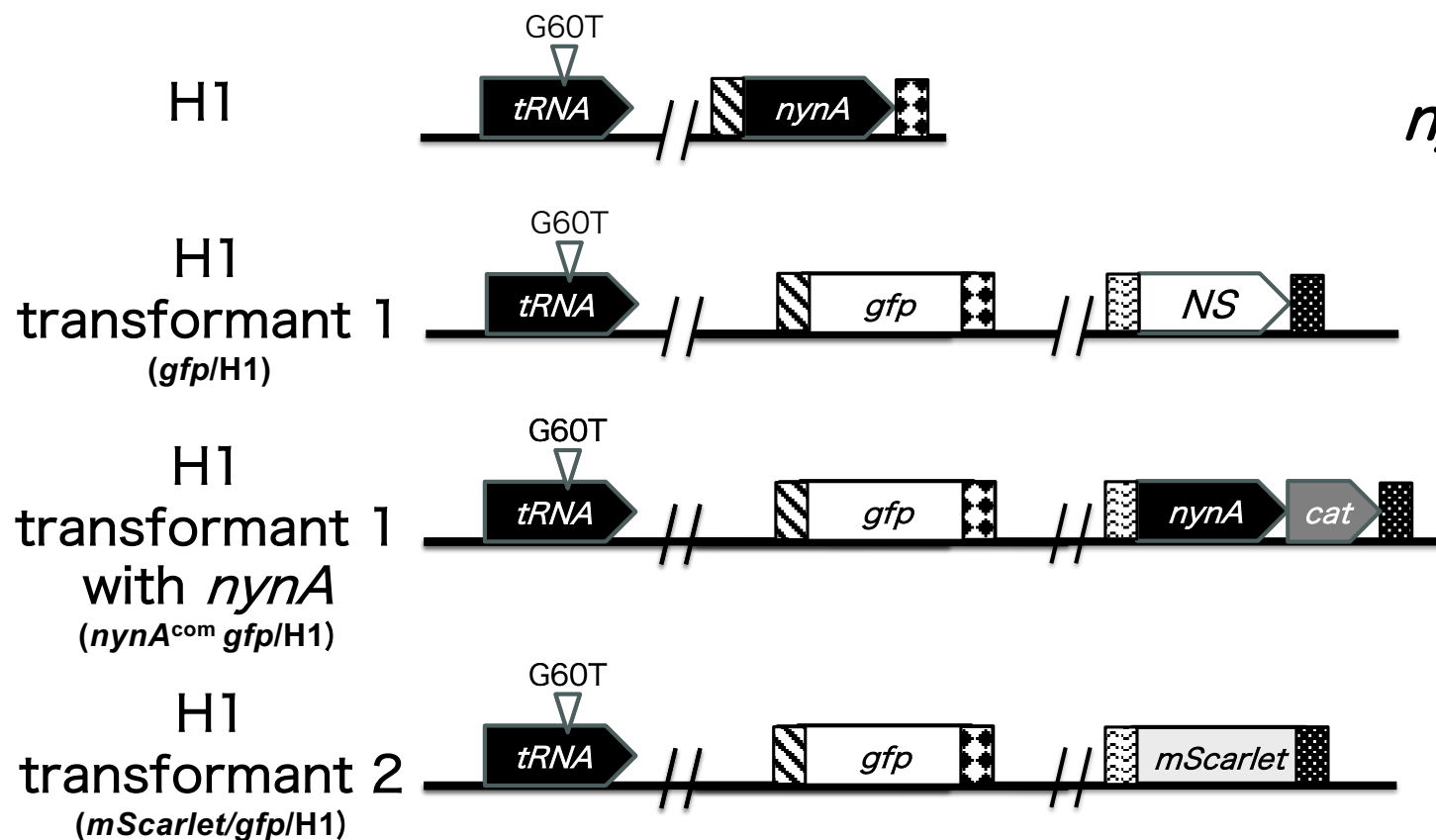
マーカーレス多重遺伝子導入



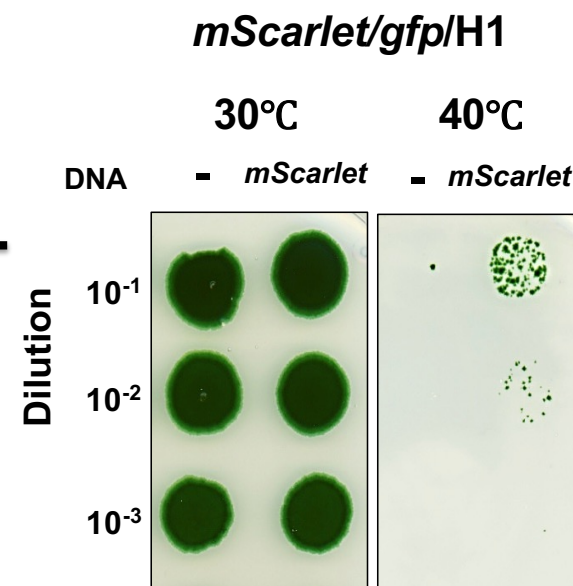
*nynA*の相補により再び
温度感受性を示した



マーカーレス多重遺伝子導入

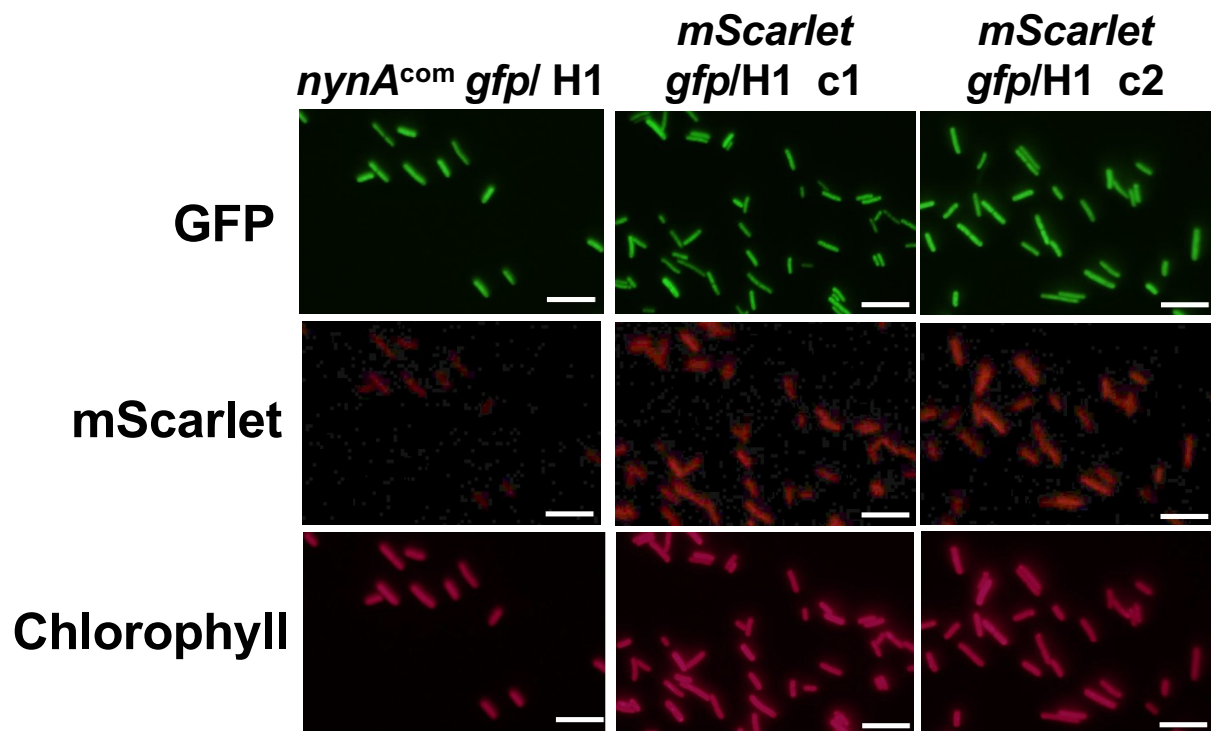


*nynA*の破壊により再び
高温耐性を示した

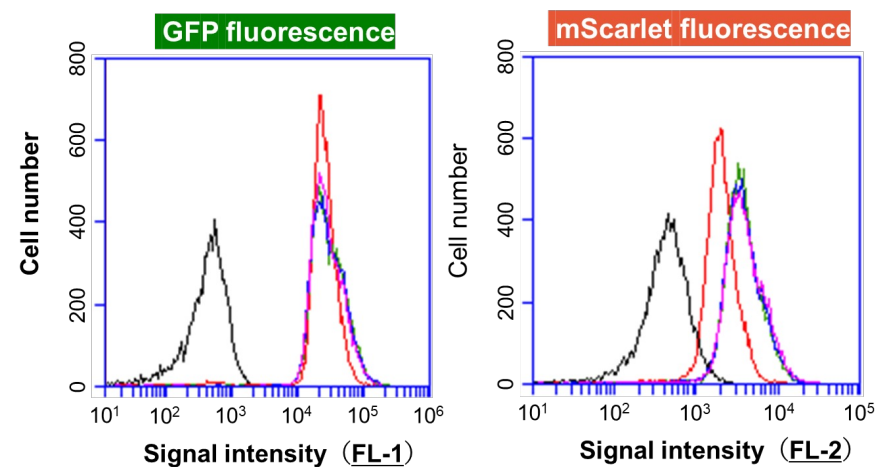


マーカーレス多重遺伝子導入

Fluorescence microscopy



Flowcytometry



Black: H1 strain, Red: *nynA^{com} gfp/H1* strain,
Green: *mScarlet gfp/H1 c1*, Blue: *c2*, Pink: *c3*

ポスト大腸菌：シアノバクテリア

Synechococcus elongatus PCC 7942



- 光で育つ
- CO₂を直接利用
- 原核生物なので遺伝子工学がしやすい
- 植物の葉緑体と同様の細胞内環境

シアノバクテリアの課題

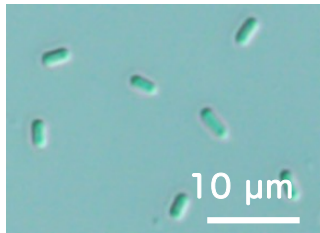
- 遺伝子工学ツールが限られる
- 開放培養系での培養

- マーカーレス遺伝子導入法
- 捕食を回避できる変異の誘導法
- 高発現ベクター

新技術② 生物間相互作用に基づいた育種法の確立

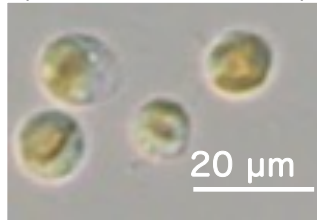
広島大学・兵庫県立大学との共同出願

Synechococcus 7942



+

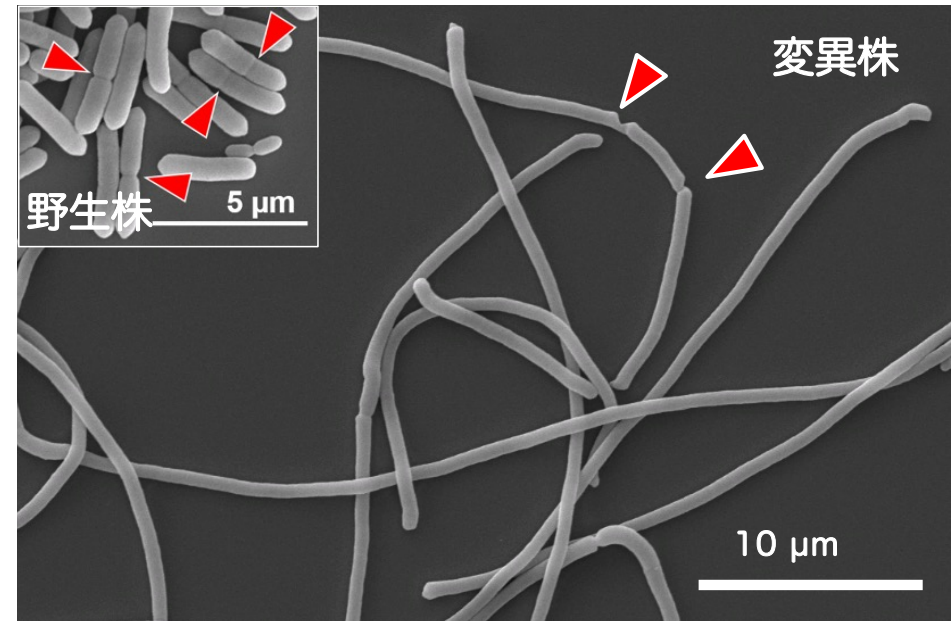
黄金色藻
(*P. marhamensis*)



捕食を回避

=>シアノバクテリアの解放系大量培養に活用

シアノバクテリアの形態の多様化のメカニズム解明

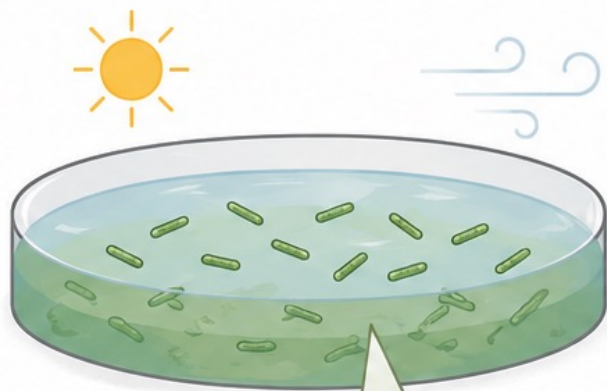


シアノバクテリア開放培養の課題 ～捕食によるポンドクラッシュ～

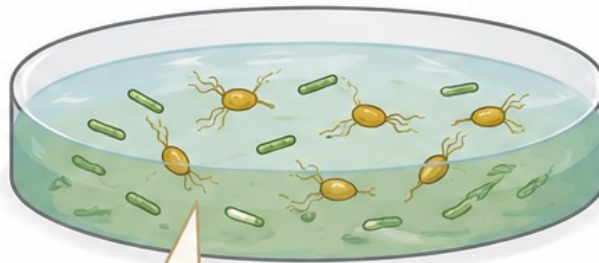
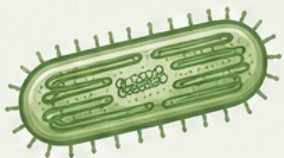
シアノバクテリアを
開放系（屋外）で培養

環境中から捕食者が侵入・増殖
（黄金色藻などの動物性微生物）

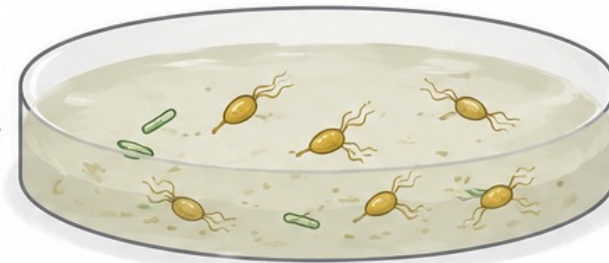
捕食によりシアノバクテリアが
急速に減少・消失（ポンドクラッシュ）



シアノバクテリア



黄金色藻などの捕食者
（動物性微生物）



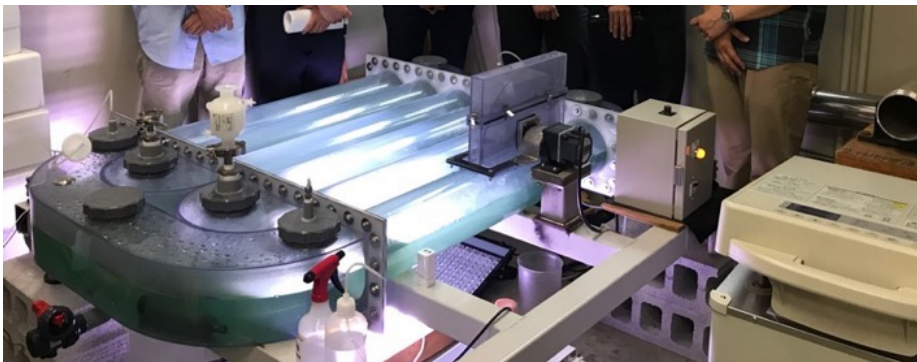
シアノバクテリアが消失し
培養ができなくなる



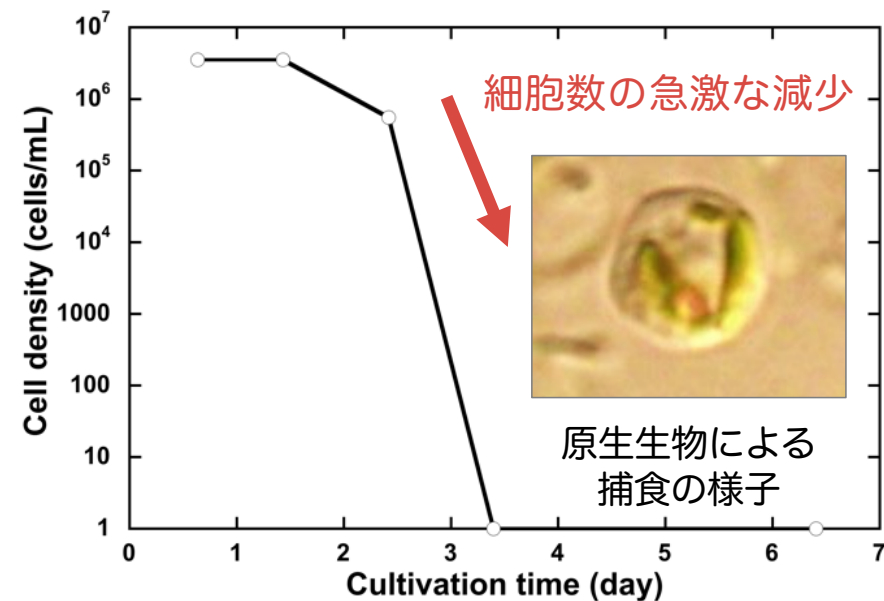
シアノバクテリア開放培養の課題 ～捕食によるポンドクラッシュ～

ALCAプロジェクト (2016-2023)

- 100 Lフォトバイオリアクターを用いて PCC 7942株を培養
- 大量培養における問題点と課題を抽出し 標準化プロトコルを作製



シアノバクテリア細胞数の推移



Toda et al., J Biosci Bioeng. 2024

→ 捕食されにくい株の育種

シアノバクテリア伸長変異株の出現

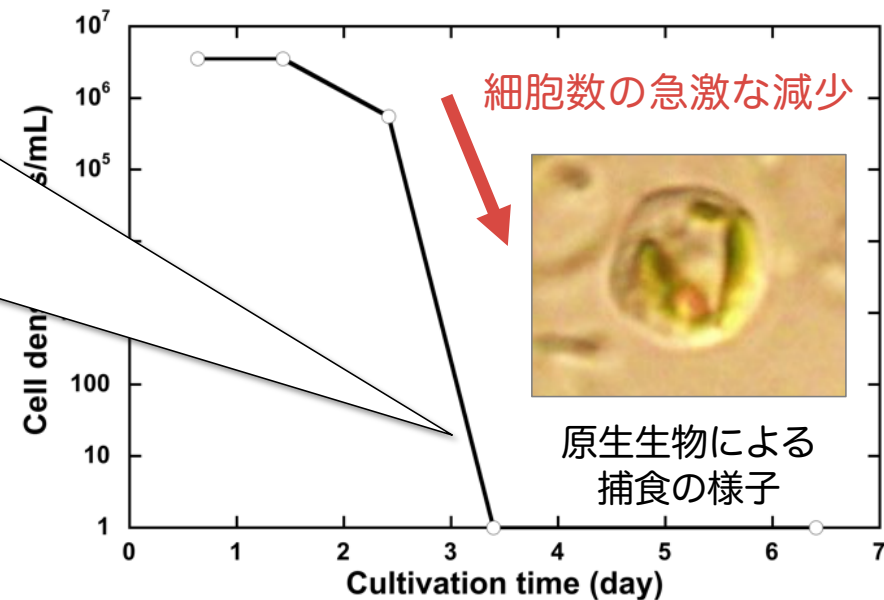
ポンドクラッシュ中に
形態が変化した株が出現



野生株

捕食を回避するために
変異の入った株が生き
残ったのではないか

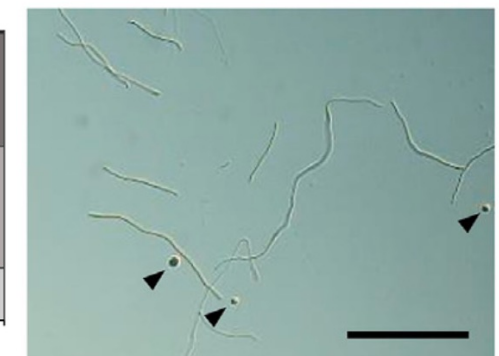
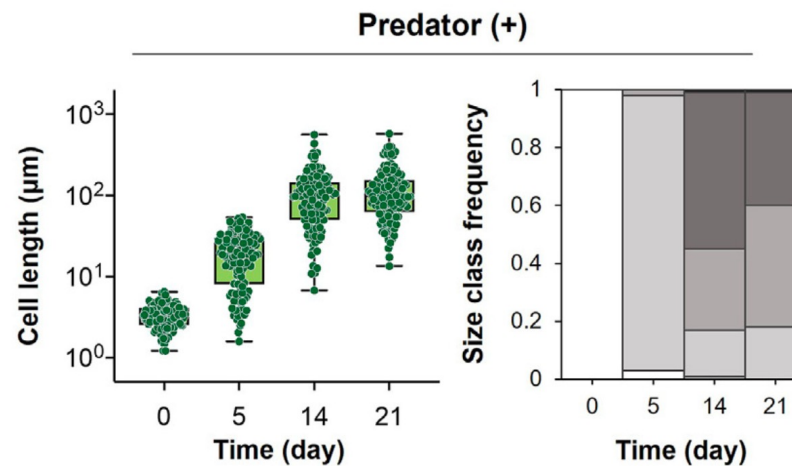
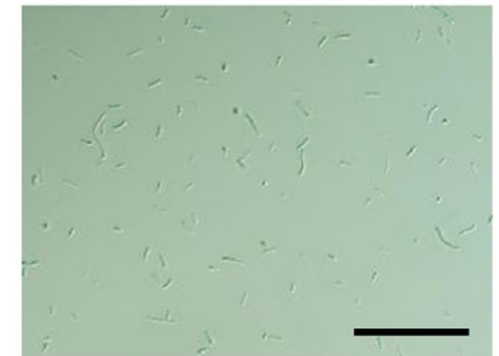
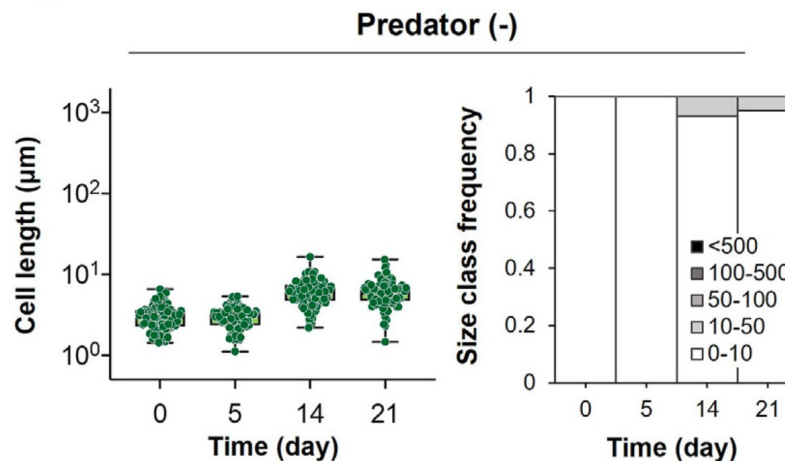
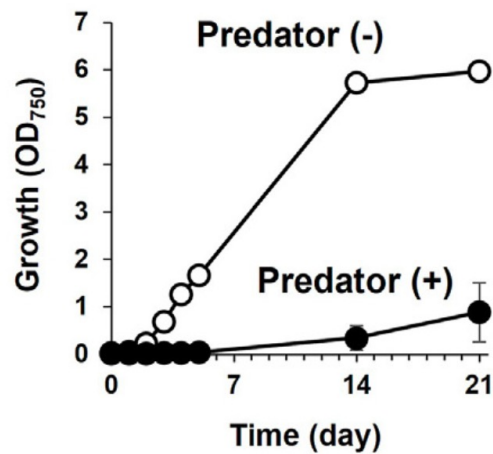
シアノバクテリア細胞数の推移



Toda et al., J Biosci Bioeng. 2024

→ 捕食されにくい株の育種

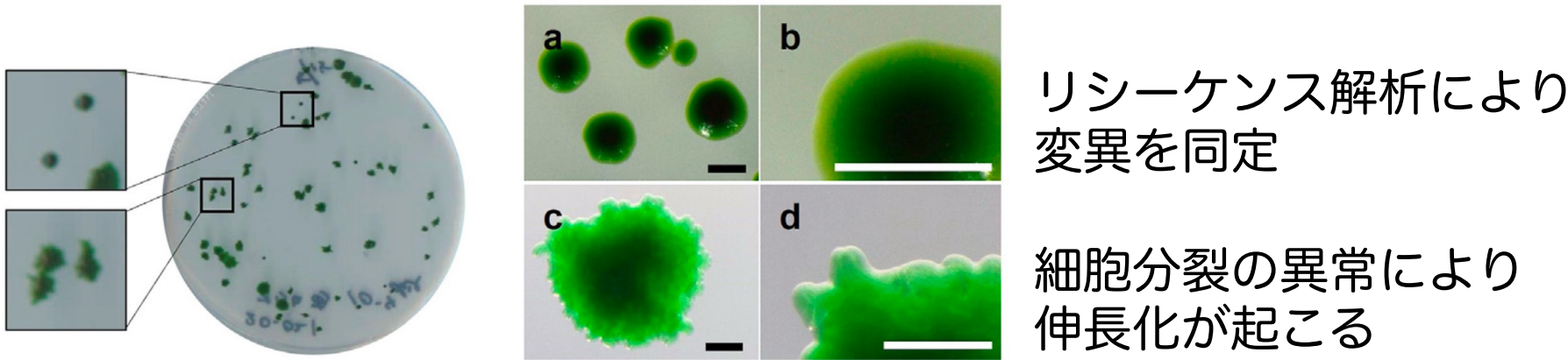
シアノバクテリア伸長現象の発見



捕食者と共培養することにより伸長化することを再現

Toda et al., J Biosci Bioeng. 2024

細胞分裂因子の変異により伸長する



Strain	Parental cyanobacteria	Gene product	Locus tag	Protein ID	Mutation type	Nucleotide change	Nucleotide position	Amino acid change
Syn-E4	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	—	—	—	SNV	G → C	114,287	—
Syn-E5	<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Ftn2	Synpcc7942_1943	ABB57973.1	SNV	A → C	2,016,660	Val460Gly
		Conserved hypothetical protein	Synpcc7942_0087	ABB56119.1	SNV	G → A	86,103	Gln125*
		Fructokinase	Synpcc7942_0116	ABB56148.1	SNV	T → G	114,836	Trp180Gly
		Group2 RNA polymerase sigma factor SigC	Synpcc7942_1849	ABB57879.1	Insertion	TA	1,917,205^ 1,917,206	Glu197fs
RH714-E16	<i>S. elongatus</i> RH714	FtsZ	Synpcc7942_2378	ABB58408.1	SNV	T → C	2,446,344	Phe320Leu
		Ftn2	Synpcc7942_1943	ABB57973.1	SNV	C → G	2,016,228	Arg604Pro

SNV, single-nucleotide variant.
^ indicates the space of nucleotide position. * indicates the stop codon.

ポスト大腸菌：シアノバクテリア

Synechococcus elongatus PCC 7942



- 光で育つ
- CO₂を直接利用
- 原核生物なので遺伝子工学がしやすい
- 植物の葉緑体と同様の細胞内環境

シアノバクテリアの課題

- 遺伝子工学ツールが限られる
- 開放培養系での培養

- マーカーレス遺伝子導入法
- 捕食を回避できる変異の誘導法
- 高発現ベクター

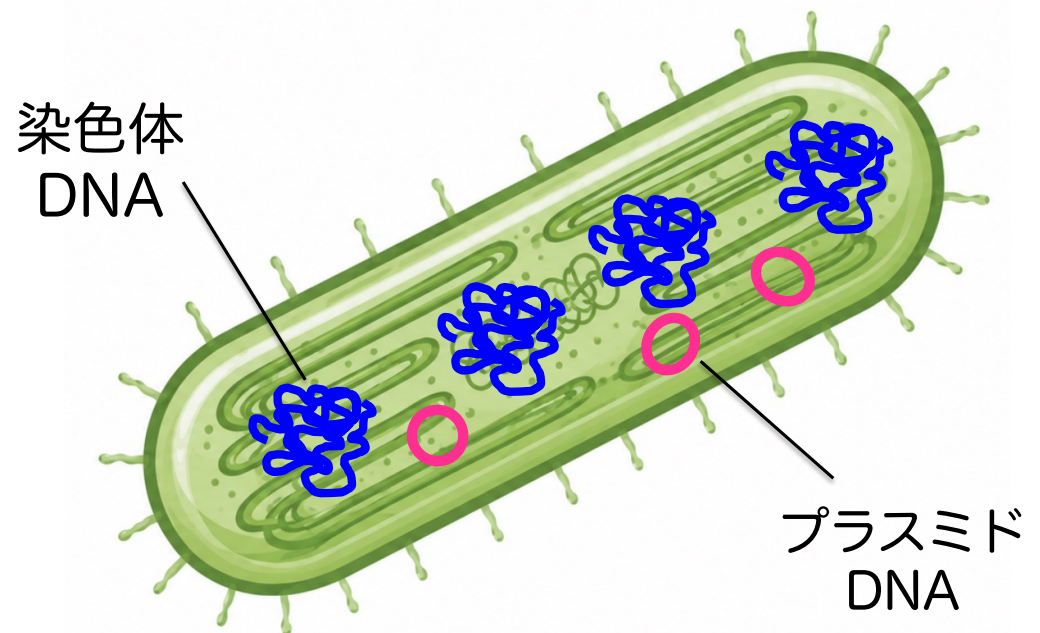
新技術③ 高発現ベクターの開発

複数コピー染色体での発現系

- 比較的 安定的に保持
- 染色体コピー数に応じて発現
- 組換えに依存
- 複数コピー染色体での組換え確認に時間を要する

プラスミドによる発現

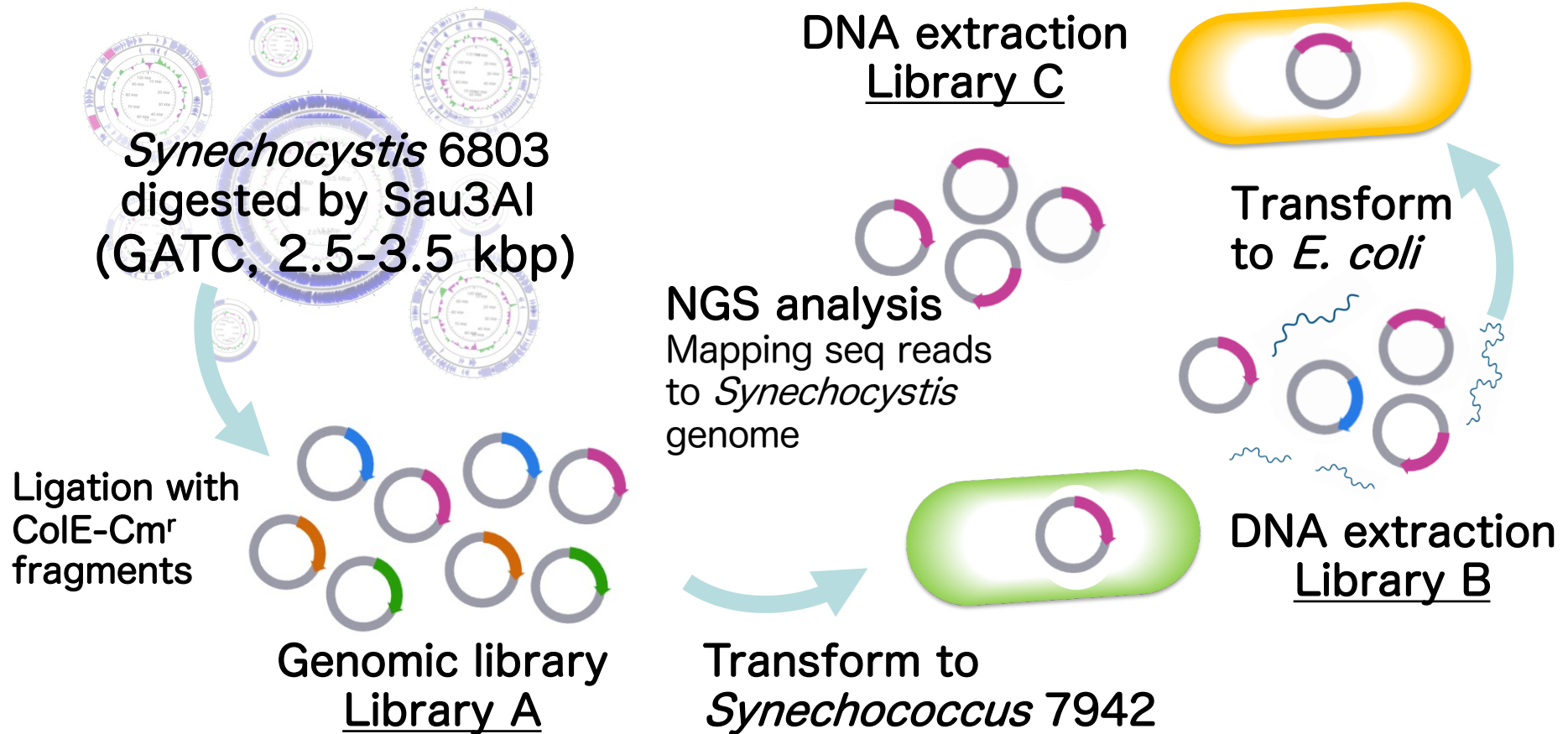
- 利用可能なプラスミドが限られる
- RSF1010プラスミド：さまざまな宿主で使えるがコピー数は少ない。



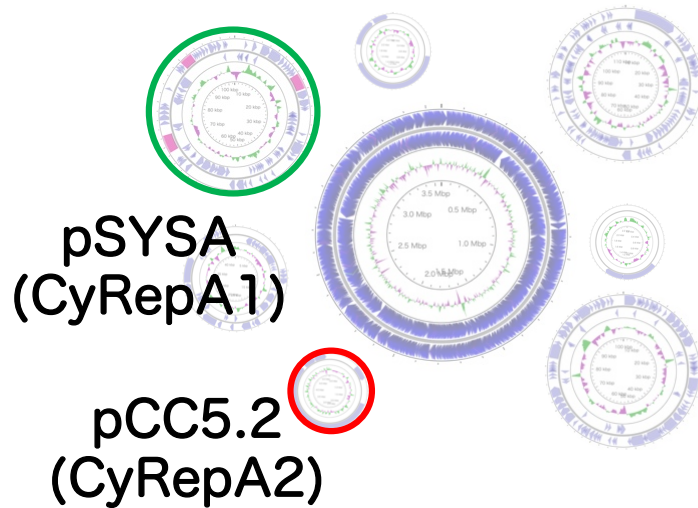
発現プラスミドを開発できれば
シアノバクテリアの遺伝子工学
を発展させることができる！

プラスミド複製因子のスクリーニング

ARseq: Autonomous Replication sequencing



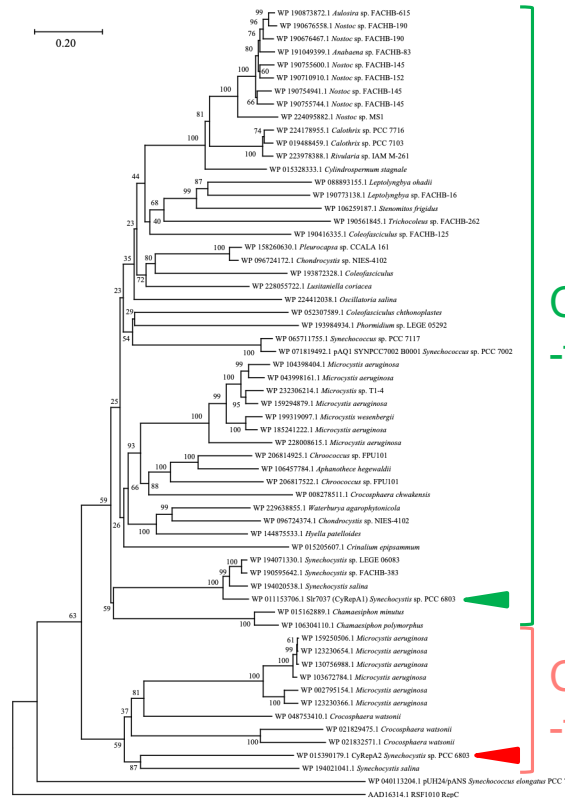
CyRepA (Cyanobacterial Replication protein A) の発見



シアノバクテリアに広く保存されている

DUF3854, DEXDc ドメイン
Primerse Helicase

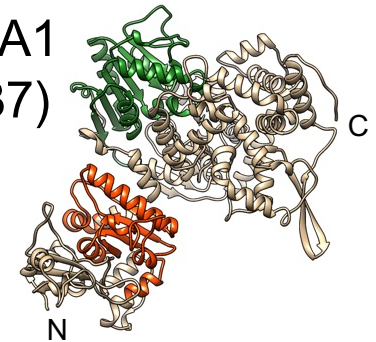
Sakamaki et al., Front Microbiol, 2023



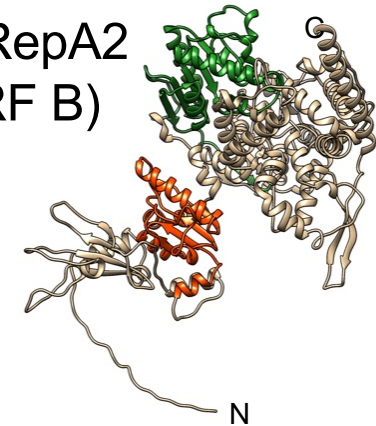
Synechococcales, *Oscillatoriothyriceae*, *Nostocaceae*,
Pleurocapsales, *Pseudanabaenales*, *Chroococcidiopsidales*

3D structure prediction

CyRepA1
(Slr7037)

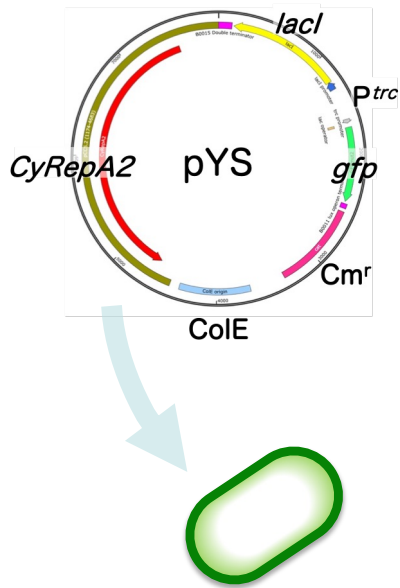


CyRepA2
(ORF B)



CyRepA2 を利用したベクター開発

ミニプラスミドを構築
シアノに導入・評価



NS
-GFP

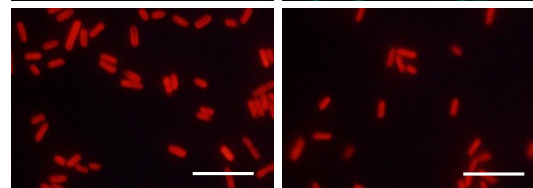
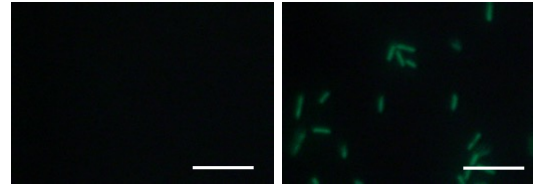
pYS1C
-GFP

IPTG

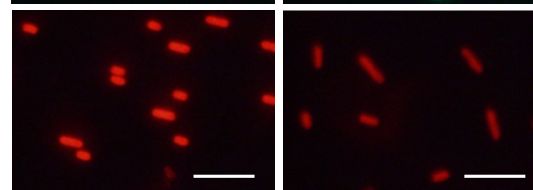
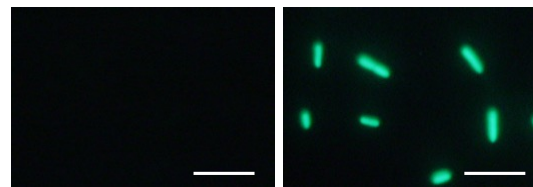
—

+

GFP

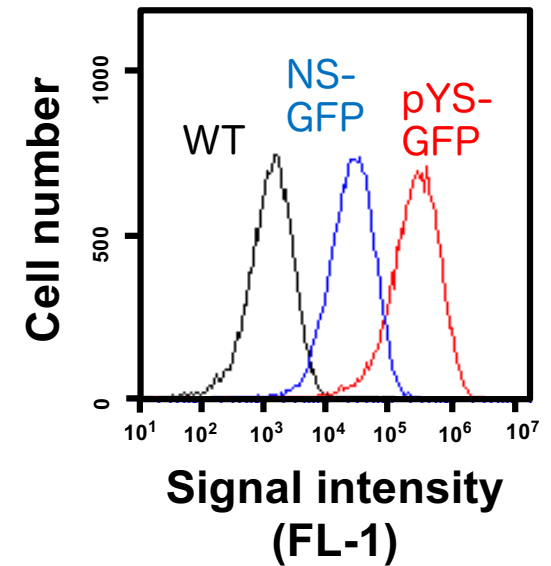


Chloro-
phyll



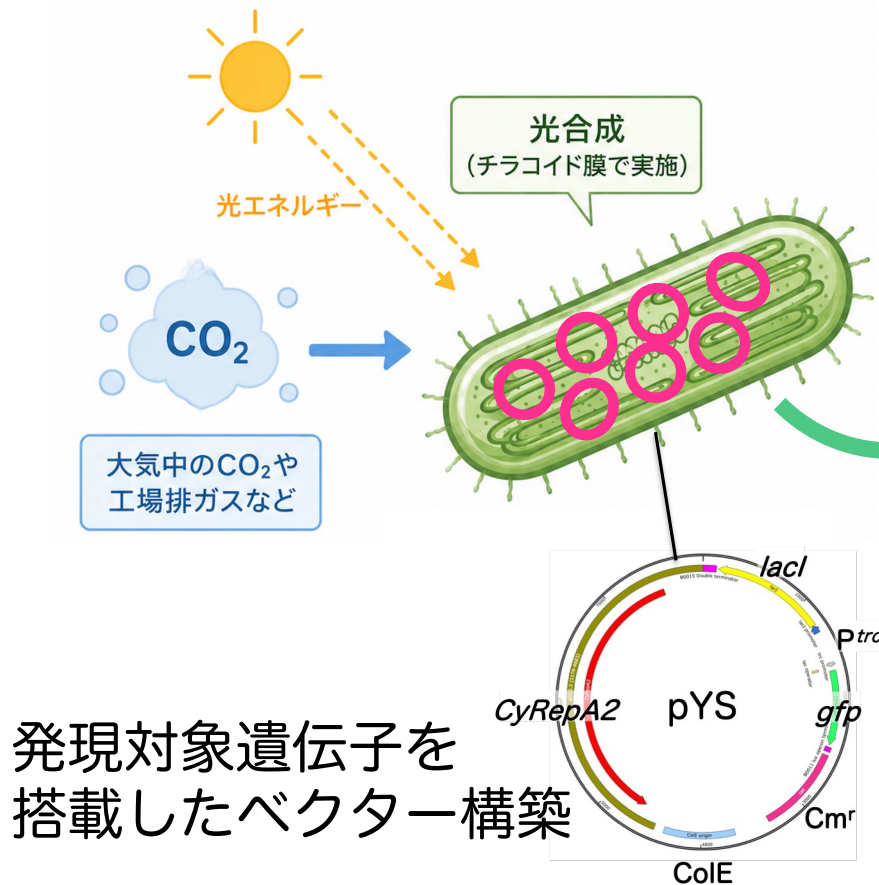
Chloro-
phyll

フローサイトメーターによる
GFP蛍光の比較



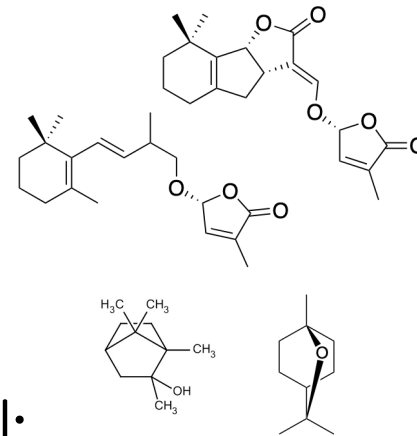
100コピー以上で維持される
染色体の発現系と比べ10倍の発現量
複数種のシアノバクテリアで利用可能

CyRepA2ベクター (pYS) の応用



応用例:

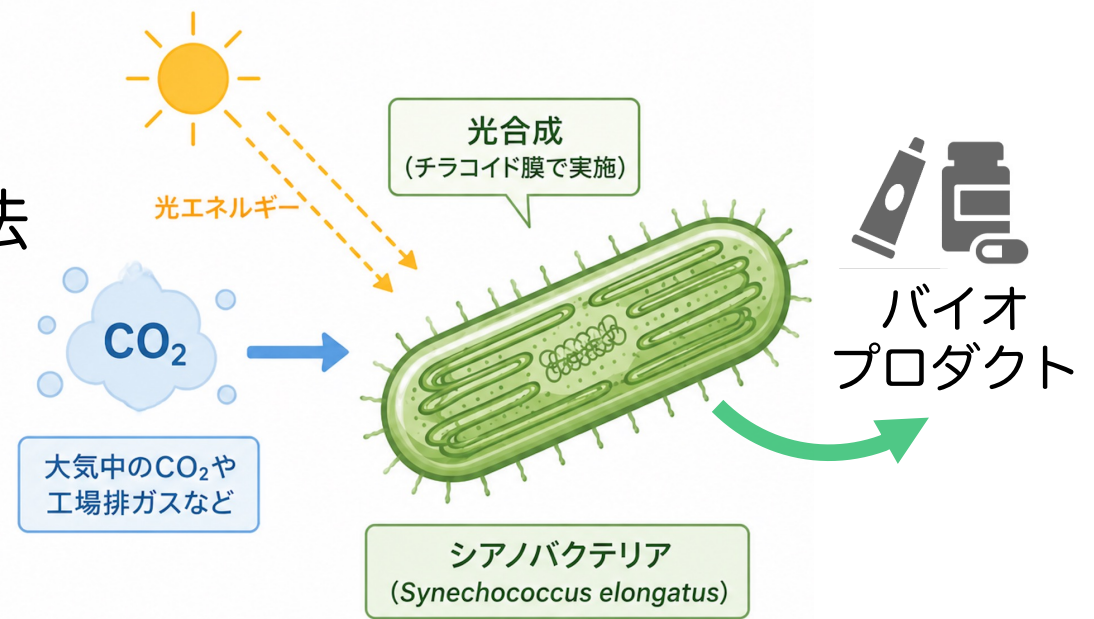
- 希少植物ホルモン (ストリゴラクトン)
特開2023-055465、特許7584778号
- 揮発性テルペノイド (シネオールなど)
Sakamaki, BBB, 2023, Dayarathne, Arch Microbiol. 2025
- 硫酸化多糖 (シネカン)
Maeda, Sci Rep. 2026



まとめ

シアノバクテリアを産業利用するための育種基盤技術を開発

- マーカーレス遺伝子導入法
- 捕食を回避できる変異の誘導法
- 高発現ベクター



新技術の特徴・従来技術との比較

シアノバクテリアを産業利用するための育種基盤技術を開発

	従来のシアノバクテリア育種	本技術
遺伝子改変	抗生物質マーカーが必要	マーカーレス導入が可能
変異株育種	UV・薬剤変異誘発が中心	捕食圧を利用した選抜
実用性	開放培養への適応が困難	捕食耐性株の取得が可能
発現系	発現量が低い・不安定	高発現ベクターを開発

想定される用途

シアノバクテリアを利用した**有用物質生産**
(テルペノイド、色素、香料、医療品原料など)

シアノバクテリアを利用した**バイオマス生産**
(飼料、肥料、バイオプラスチック、バイオ燃料など)

シアノバクテリアを利用した**環境浄化**
(窒素除去、リン酸除去、CO₂固定など)

実用化に向けた課題

技術的課題

マーカーリサイクリング
：迅速化、安定化

捕食耐性変異株の育種
：物質生産、大規模培養評価

プラスミドベクター
：発現量・安定性の向上

経済的課題

生産コストの低減
回収プロセスの効率化

カーボンニュートラル
低炭素化社会に貢献

PRポイント

CO₂を直接利用できること

独自の育種基盤技術であること

実用化を見据えた基盤技術であること

シアノバクテリア研究の経験・実績、
国内外の研究者との人的ネットワーク
東京農業大学：環境に興味を持つ教員・学生が集まる環境

本技術に関する知的財産権

- ・ 発明の名称：遺伝子導入方法およびその利用
 - ・ 出願番号：2026-064325（優先権基礎 2025-64888）
 - ・ 出願人：東京農業大学
 - ・ 発明者：渡辺智、大舘和真、坪井太郎
-
- ・ 発明の名称：藍藻の培養方法および藍藻の変異株のスクリーニング方法
 - ・ 出願番号：2022-140982（優先権基礎 2021-148599）
 - ・ 出願人：広島大学、兵庫県立大学、東京農業大学
 - ・ 発明者：廣田隆一、黒田章夫、菓子野康浩、菓子野名津子、渡辺 智

お問い合わせ先

東京農業大学

研究・産学官地域連携推進部 知財担当

TEL 03-5477-2532

FAX 03-5477-2634

e-mail chizai@nodai.ac.jp