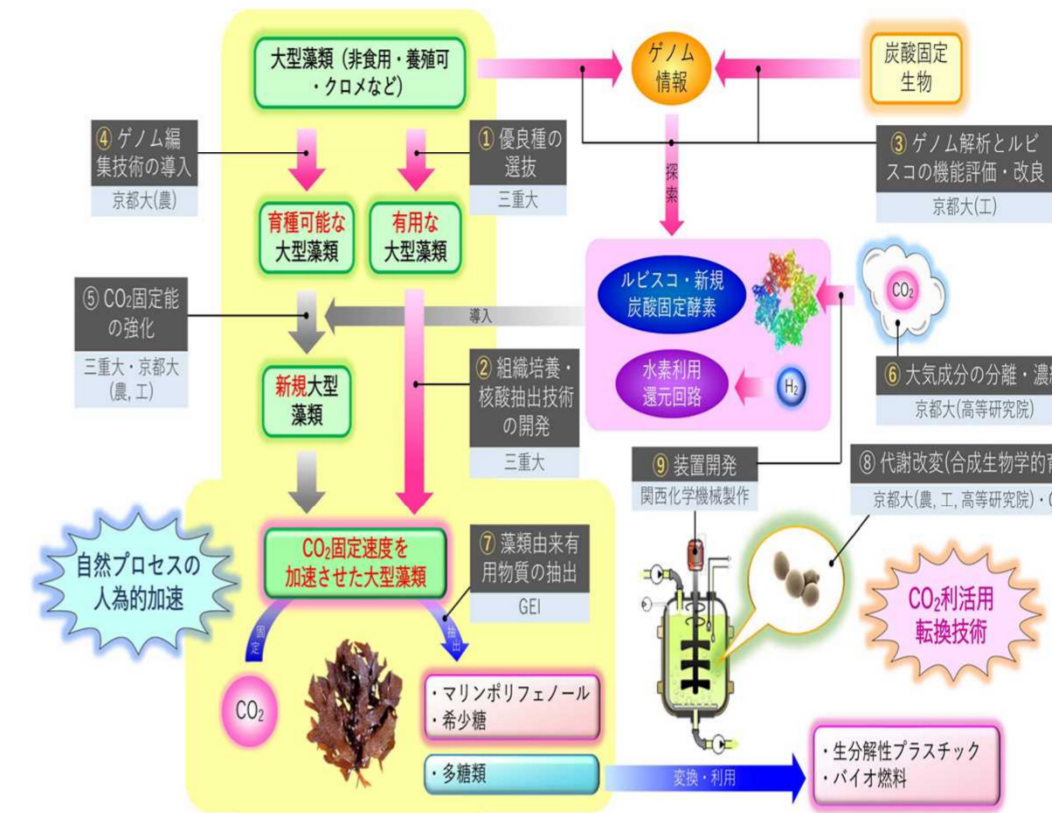




実施体制、実施期間 (2022-2024)



ホンダワラ科褐藻類の調査とETR (光合成) 測定

調査地点で確認したホンダワラ科褐藻類

鳥羽市	鳥羽市広畑地区において優占種
トゲモク	鳥羽市広畑地区、菅島塩浜において優占種
アカモク	鳥羽市広畑地区、菅島塩浜において優占種
福岡市・福津市	
ヤナギモク	
エンドウモク	
タマハハキモク	勝馬海岸にて優占種。
シヨロモク	
アキヨレモク	
ナラサモ	
フシジモク	
アカモク	同時期の鳥羽市の藻体ほど大きくなく、群落も作らない
ウミトラノオ	
ヤツマタモク	

ETR測定結果 (μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)

アカモク 平均	7.9
最大	10.0
最小	5.1
トゲモク 平均	6.6
最大	9.1
最小	4.7
ワカメ平均	3.0
最大	3.1
最小	2.8
アキヨレモク	5.7
ヤツマタモク	8.3
ヤナギモク	6.0
タマハハキモク	10.9
ナラサモ	10.4
シヨロモク	7.0
フシジモク	11.1
エンドウモク	5.4

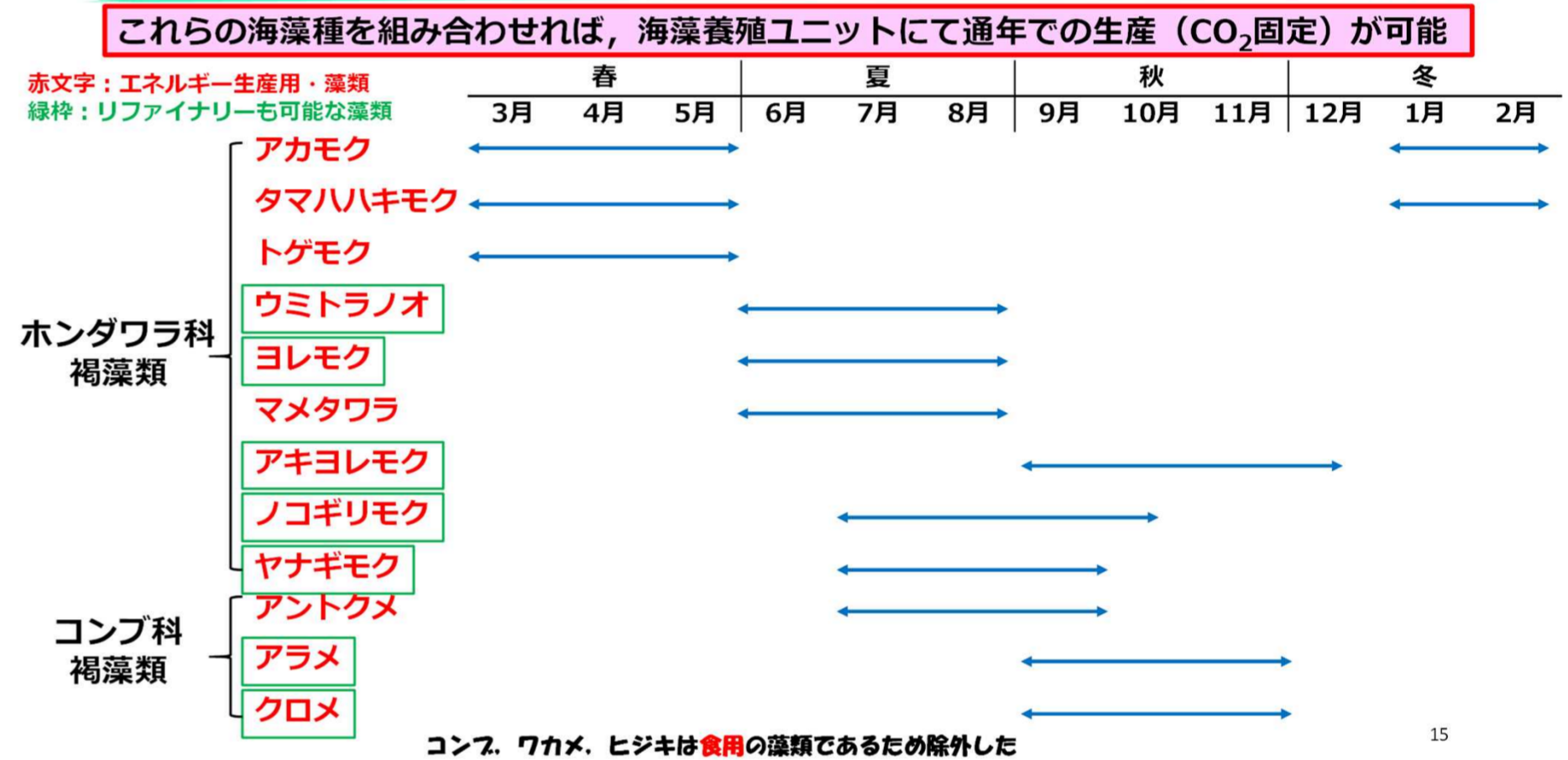
優占ホンダワラ科褐藻類3種の生長について調査を行った

アカモク (管島)	3月17日	5月1日	
平均	101 cm	425 cm	
最大	-	452 cm	
最小	-	391 cm	
トゲモク (管島)	3月17日	5月1日	
平均	44 cm	87 cm	
最大	-	95 cm	
最小	-	84 cm	
タマハハキモク	3月22日	4月19日	5月17日
平均	120 cm	418 cm	338 cm
最大	-	450 cm	440 cm
最小	-	360 cm	232 cm

4月中旬にかけて伸張することが分かった

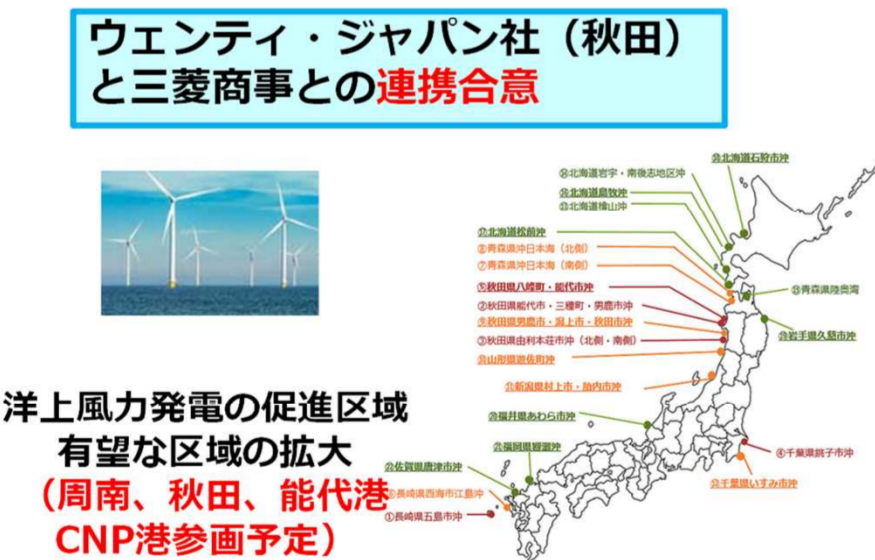
ETRの値は、ホンダワラ科褐藻類は、コンブ科より高い値を示す傾向にあった!

主な大型藻類の通年生産可能



社会実装のイメージ-大型藻類の藻場拡大-洋上風力発電や海上空港との共役

洋上風力発電施設と連携した海藻養殖場の造成



海上公共施設の整備と連携した海藻養殖場の造成



四日市港内での大型藻類養殖の実証試験の場



番号: A-7-2J

PJ: 機能改良による高速CO<sub>2</sub>固定大型藻類の創出とその利活用技術の開発

テーマ名: CO<sub>2</sub>固定速度の加速に向けたCO<sub>2</sub>固定関連酵素群の探索と機能評価

担当機関名: 京都大学大学院工学研究科

問合せ先: 跡見 晴幸 (atomi.haruyuki.8r@kyoto-u.ac.jp)

### 目標

大型藻類由来CO<sub>2</sub>固定代謝関連酵素の機能評価と微生物由来高機能Rubiscoの探索と機能評価を行い、有用酵素の同定を目指す。

③-1. 大型藻類由来炭素固定代謝関連酵素の機能評価  
対象とする酵素

- Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)
- Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)
- Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)

③-2. 微生物由来高機能Rubiscoの探索と機能評価

高機能Rubisco遺伝子を得るために、炭素源として炭酸塩のみを含む無機塩培地にH<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>を低流速で導入する条件下で化学独立栄養微生物のスクリーニングを行う。

### 進捗状況のまとめ

③-1. 大型藻類由来炭素固定代謝関連酵素の機能評価

○PEPCK  
5種の精製した組換え型酵素について、基礎的な反応速度論的解析を終え、種々の生物のPEPCKとのパラメータの比較により大型藻類PEPCKの特性を明らかにした。

○PEPC  
5種の遺伝子を発現し、2種について十分量の可溶性タンパク質が得られ精製を進めている。精製後にPEPCKと同様な酵素学的解析を行う。

○Rubisco  
組換え型酵素の可溶性タンパク質を得て、粗精製画分のRubisco活性を検出した。

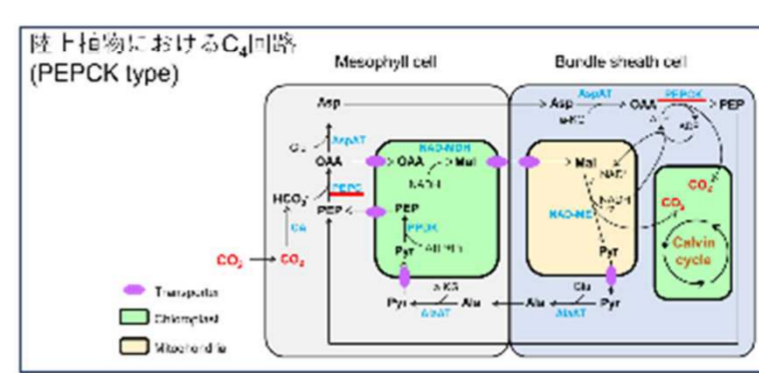
③-2. 微生物由来高機能Rubiscoの探索と機能評価

8種の試料から化学独立栄養生育を示す微生物を得て、単離を試みている。単離に成功した株から順次ゲノム解析に着手している。

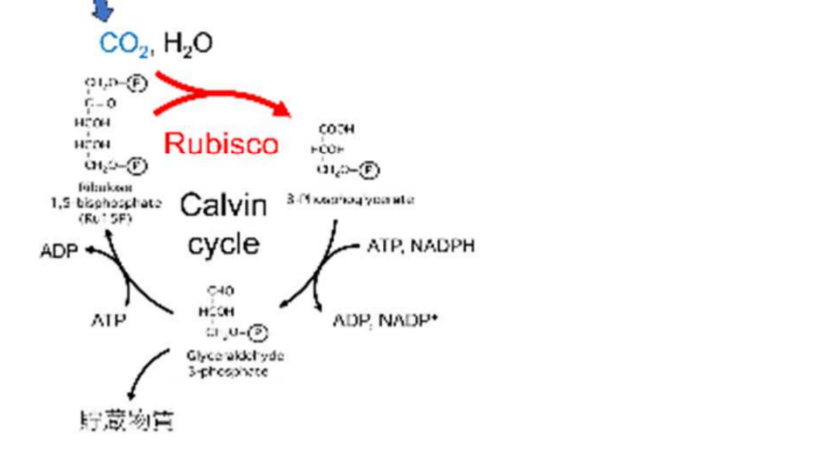
### 背景 植物・藻類のCO<sub>2</sub>濃縮機構

一般に、RubiscoのCO<sub>2</sub>固定活性を高めるためRubiscoへ高濃度のCO<sub>2</sub>を供給する機構 (CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanisms, CCMs) が存在する

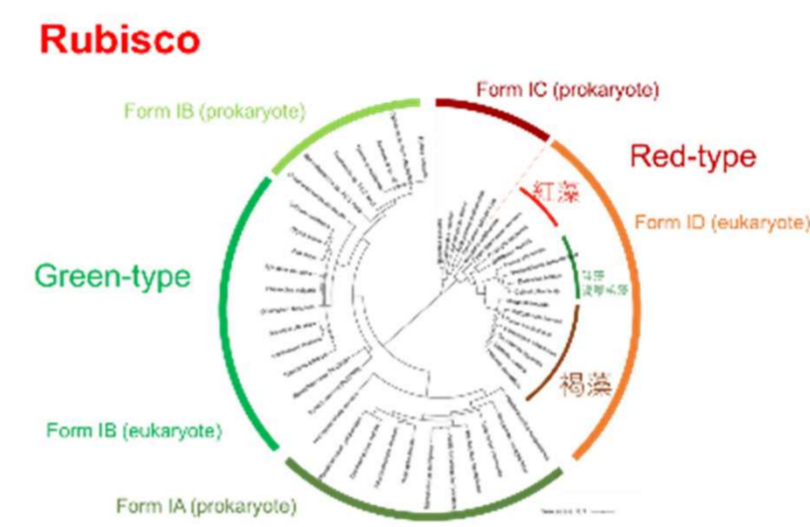
水生では炭酸の大部分はHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>として存在するため、CO<sub>2</sub>への変換も重要な役割



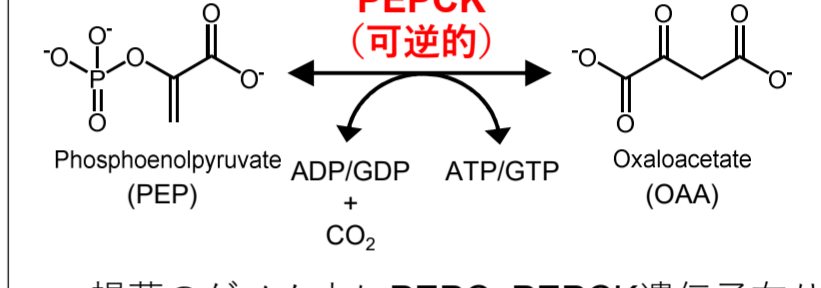
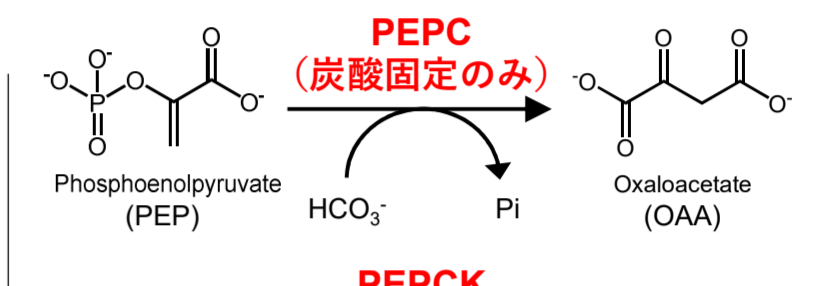
例  
・HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の能動的輸送  
・Carbonic anhydraseによるCO<sub>2</sub>への変換  
・C<sub>4</sub>回路のようなCO<sub>2</sub>供給代謝経路



### 大型藻類のCO<sub>2</sub>固定遺伝子



Form ID Rubiscoは高いCO<sub>2</sub>選択性 (S<sub>C/O</sub>) が知られているものの、褐藻由来精製Rubiscoを対象とした解析例はなかった



・褐藻のゲノム上にPEPC, PEPCK遺伝子有り

・褐藻抽出液から高い活性を示すのはPEPCK

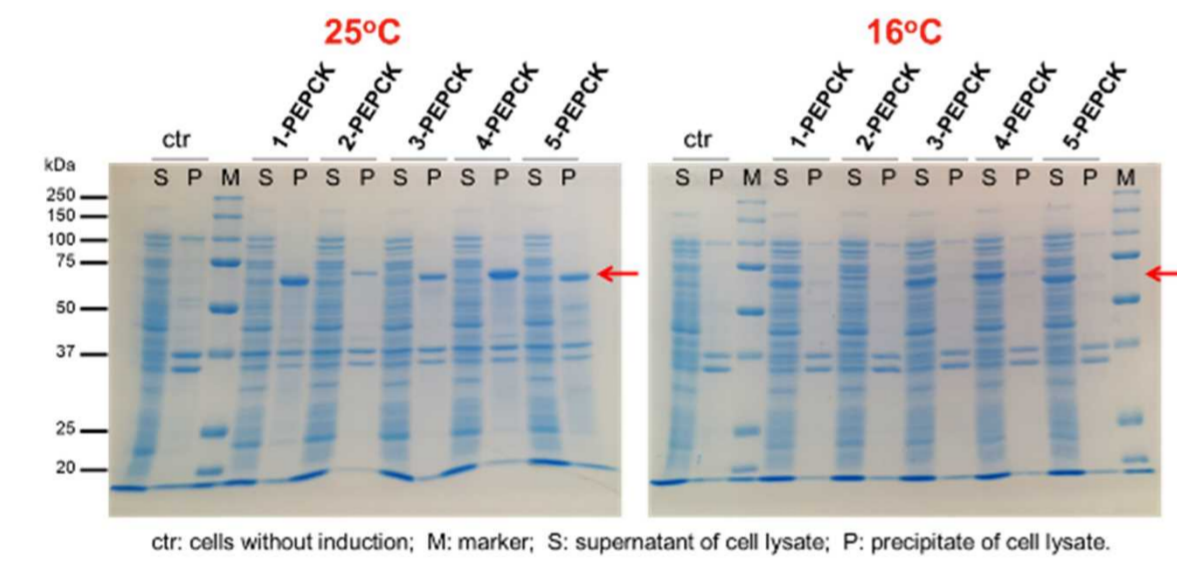
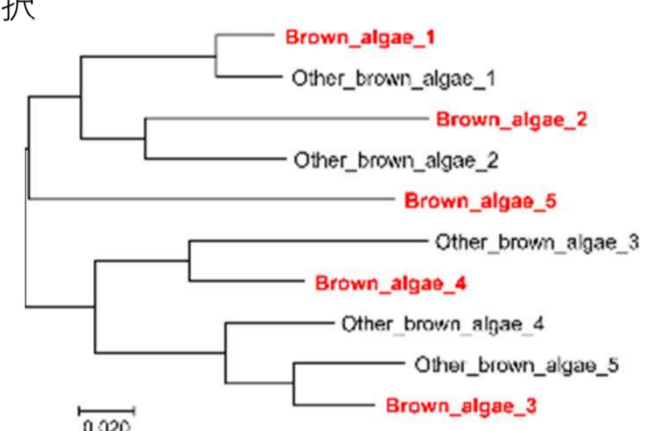
→ C<sub>4</sub>回路のようなCO<sub>2</sub>濃縮機構が存在?

### PEPCK

#### 褐藻由来PEPCK遺伝子の発現

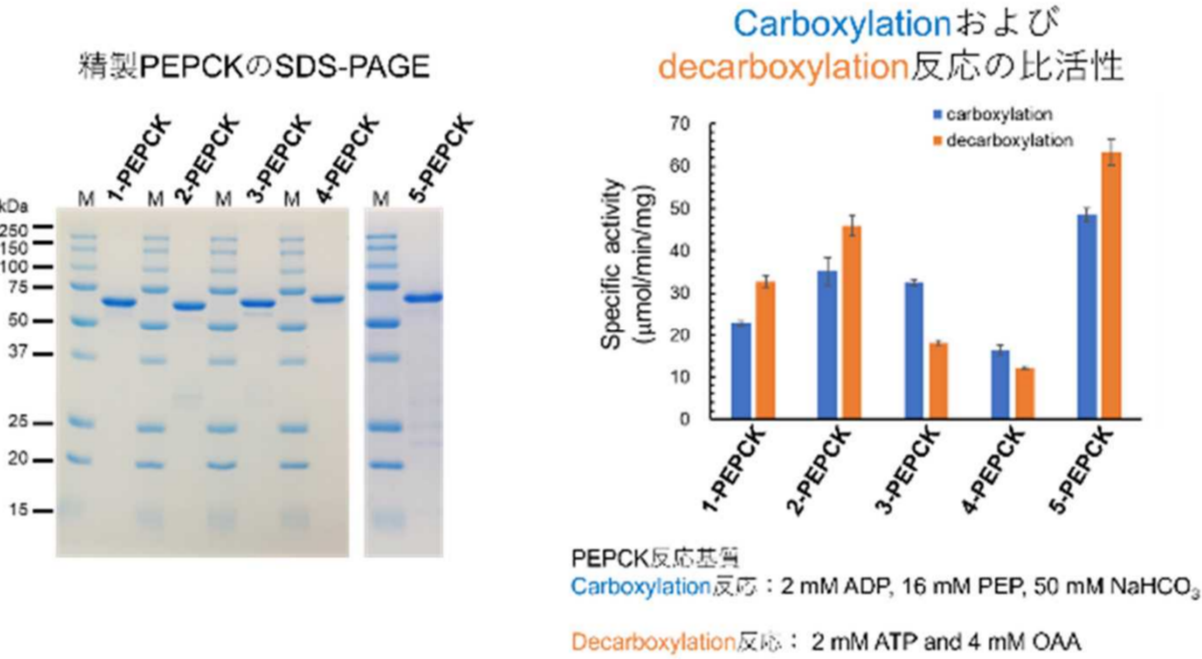
系統樹の分布をもとに5種を選択

- Brown\_algae\_1 (1-PEPCK)
- Brown\_algae\_2 (2-PEPCK)
- Brown\_algae\_3 (3-PEPCK)
- Brown\_algae\_4 (4-PEPCK)
- Brown\_algae\_5 (5-PEPCK)



16°CでPEPCK発現大腸菌を培養することにより5種の可溶性PEPCKを取得

#### 褐藻由来PEPCKの精製と比活性の検出



#### 褐藻由来PEPCKと既知の精製PEPCKとの比活性の比較

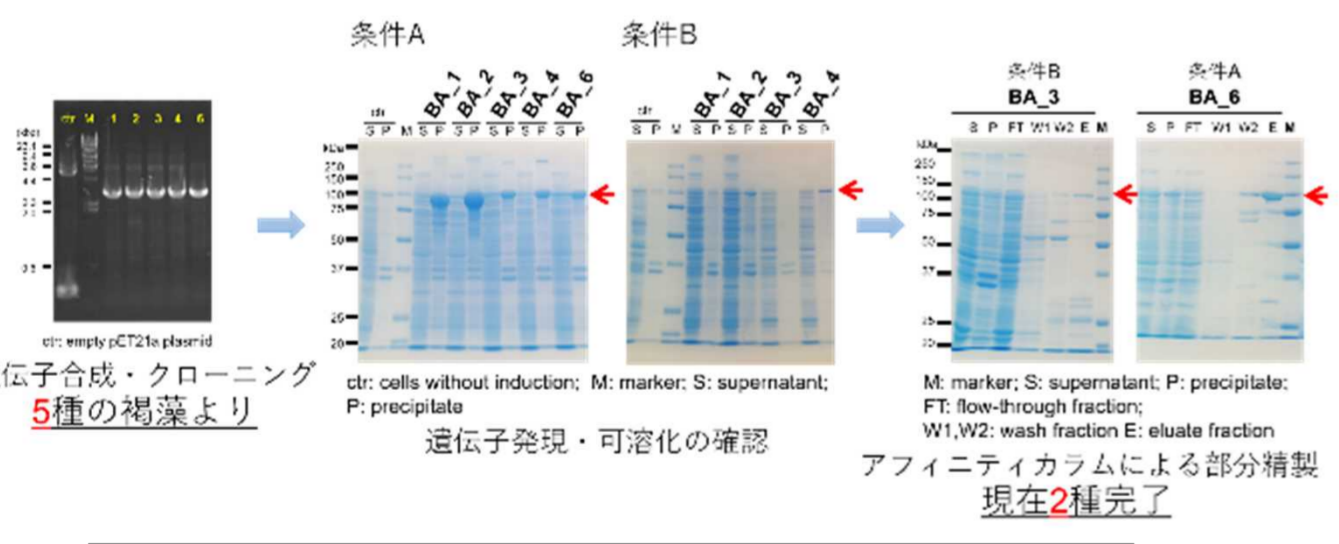
Organism	Carboxylation V <sub>max</sub> or specific activity (mmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	Decarboxylation V <sub>max</sub> or specific activity (mmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	
			C3植物, ATP-type
C3植物, ATP-type	<i>Oryza sativa</i> (rice)	-	10
C3植物, ATP-type	<i>Cucumis sativus</i> (cucumber)	48	-
C4植物, ATP-type	<i>Sorghum bicolor</i> (sorghum)	-	20
C4植物, ATP-type	<i>Zea mays</i> (maize)	-	23
C4植物, ATP-type	<i>Megathyrus maximum</i>	41.6	51
CAM植物, ATP-type	<i>Ananas comosus</i> (pineapple)	8.1	17
緑藻, ATP-type	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6.0	9.6
珪藻, ATP-type	<i>Skeletonema costatum</i>	0.037	-
珪藻, ATP-type	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.041	-
酵母, ATP-type	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16.3	20
バクテリア, ATP-type	<i>Escherichia coli</i>	3	26
褐藻, ATP-type	<i>Ascophyllum nodosum</i>	33.03	-
褐藻, ATP-type	Brown_algae_1	23.6	32.7
褐藻, ATP-type	Brown_algae_2	39.2	45.9
褐藻, ATP-type	Brown_algae_3	34.3	18.0
褐藻, ATP-type	Brown_algae_4	17.8	12.2
褐藻, ATP-type	Brown_algae_5	61.6	75.8
ヒト, GTP-type	<i>Homo sapiens</i>	43.8	39.4
バクテリア, GTP-type	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4.7	22.5
アーキア, GTP-type	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	76.9	44.4
アメーバ, PP-type	<i>Entamoeba histolytica</i>	34	-

本研究の測定値

褐藻PEPCKは既知PEPCKと比較して最高レベルの活性を有している

### PEPC and Rubisco

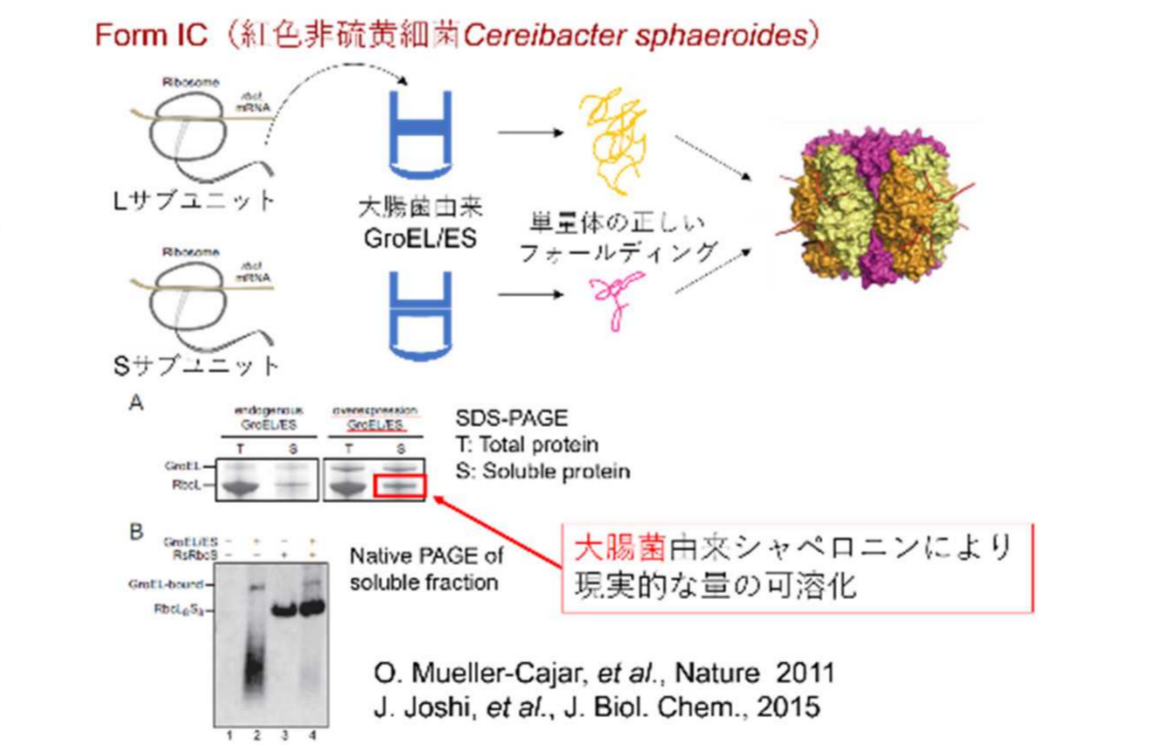
#### 褐藻由来PEPC解析の進捗



さらに精製を進める  
PEPC活性を評価し、酵素学的特性を明らかにする

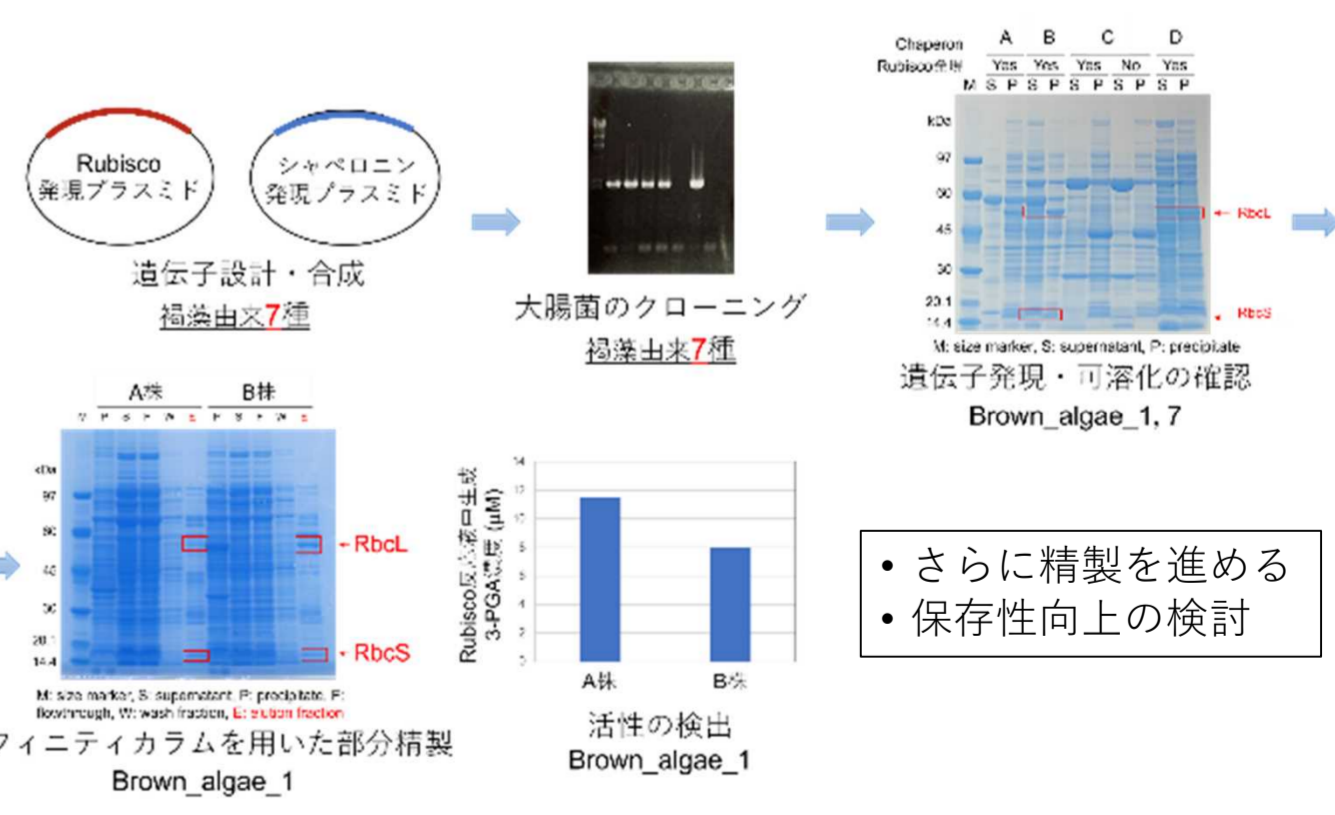
#### 褐藻由来Rubiscoの大腸菌における発現戦略

褐藻Rubisco (Form ID) と近縁のForm IC Rubiscoの発現戦略を参考にした



大腸菌由来シャペロンにより現実的な量の可溶化

#### 褐藻由来Rubisco解析の進捗

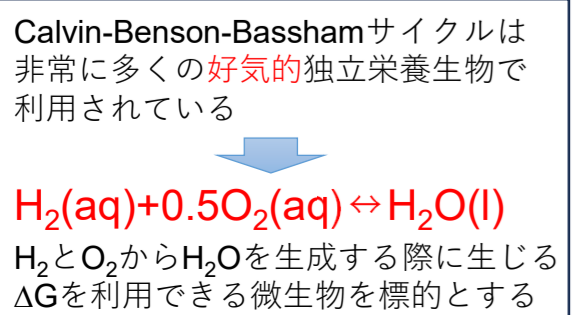


さらに精製を進める  
保存性向上の検討

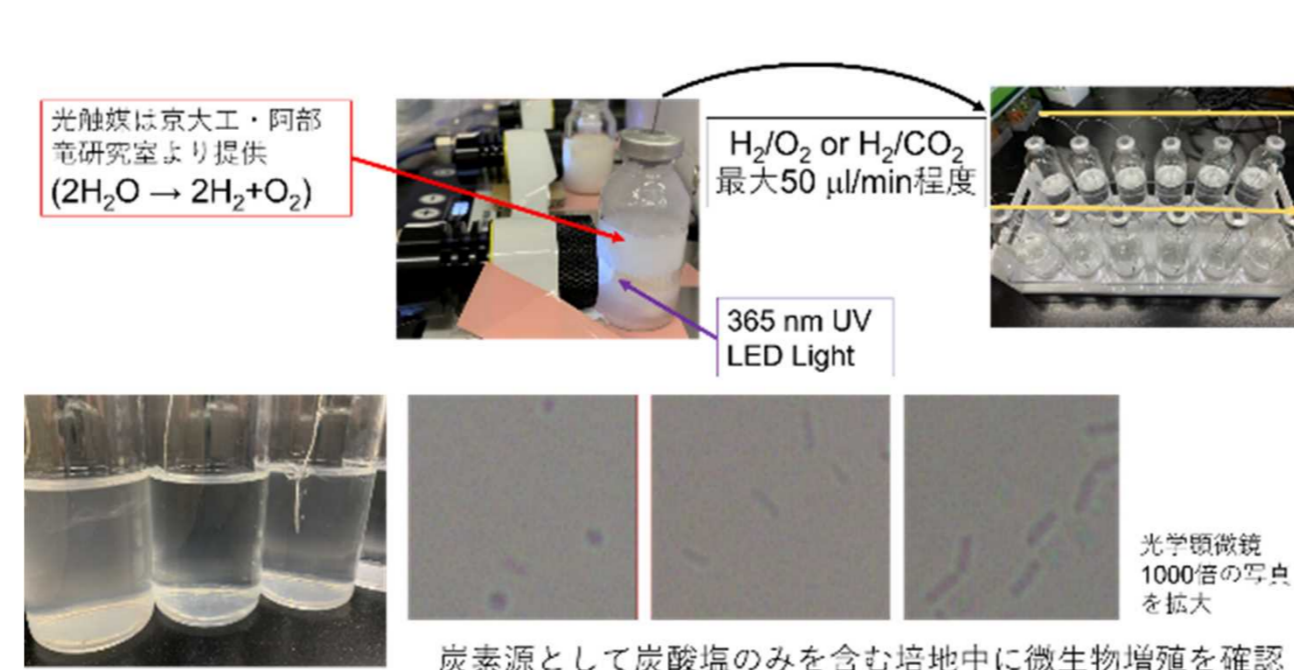
### 化学独立栄養培養

#### 微生物由来高機能Rubiscoの取得

環境中の土壌・水を採取し、化学合成独立栄養条件下において良好な生育を示す微生物を取得し、Rubiscoを始めとした高機能なCO<sub>2</sub>固定酵素の同定を目指す



#### H<sub>2</sub>の酸化をエネルギー源とした化学独立栄養微生物の探索



#### 得られた水素酸化細菌の16S rDNA配列解析

- 各サンプルのメジャーな配列
- No. 2 *Hydrogenophaga sp.* と99%以上一致
- No.12 *Cupriavidus necator* と99%以上一致
- No.13 *Cupriavidus necator* と99%以上一致 (No.12と一致)
- No.16 *Acinetobacter tjernbergiae* と100%一致
- No.17 *Acinetobacter oleivorans* と100%一致
- No.18 *Acinetobacter johnsonii* と99%以上一致
- No.19, 20は数種の配列が混在しており解析不能

現在上記8サンプルからCO<sub>2</sub>固定微生物の増殖に成功  
単離・ゲノム解析進行中

番号: A-7-3J

PJ: 機能改良による高速CO<sub>2</sub>固定大型藻類の創出とその利活用技術の開発

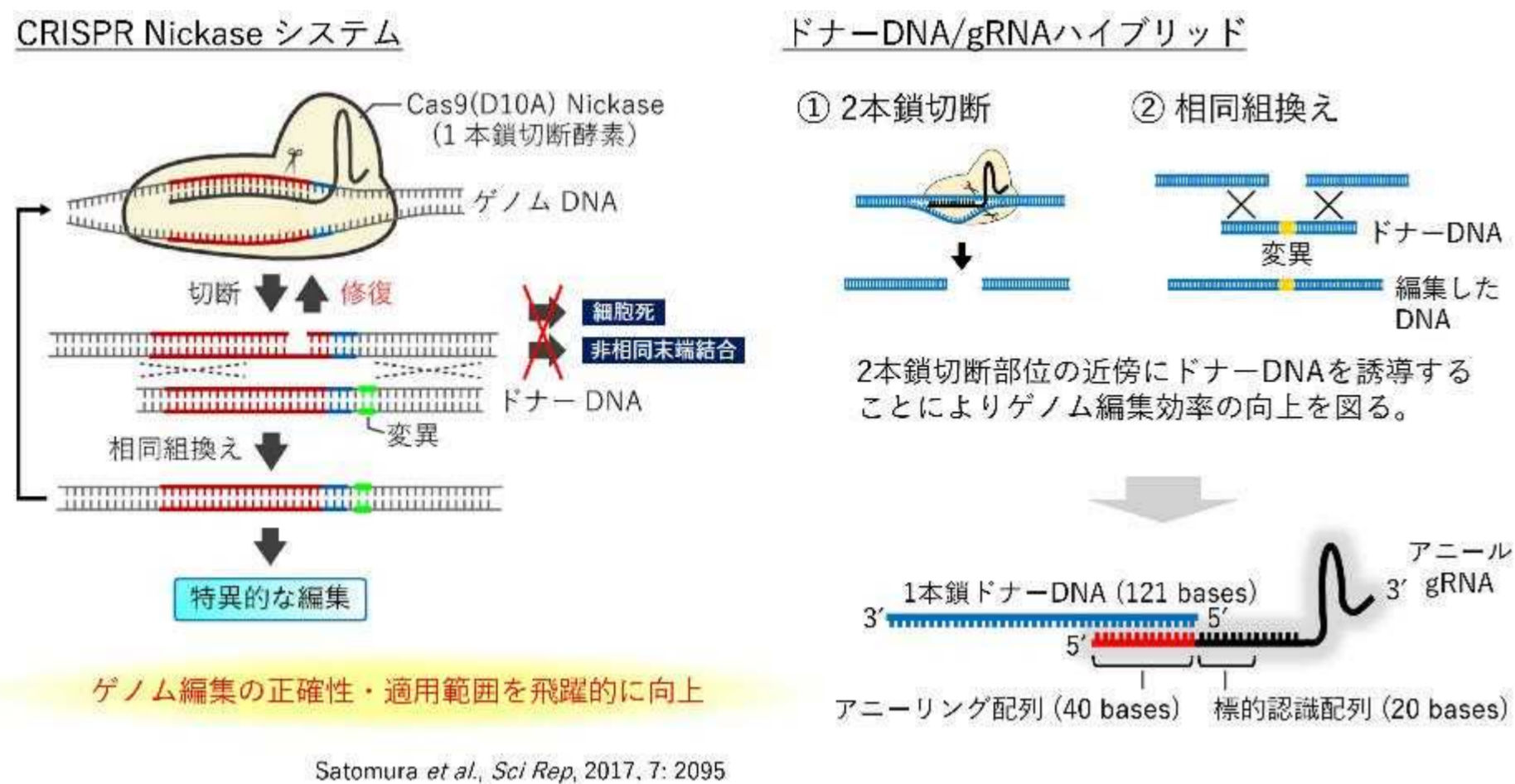
テーマ名: 大型藻類の育種を加速させるゲノム編集技術の確立

担当機関名: 京都工芸繊維大学、京都大学高等研究院

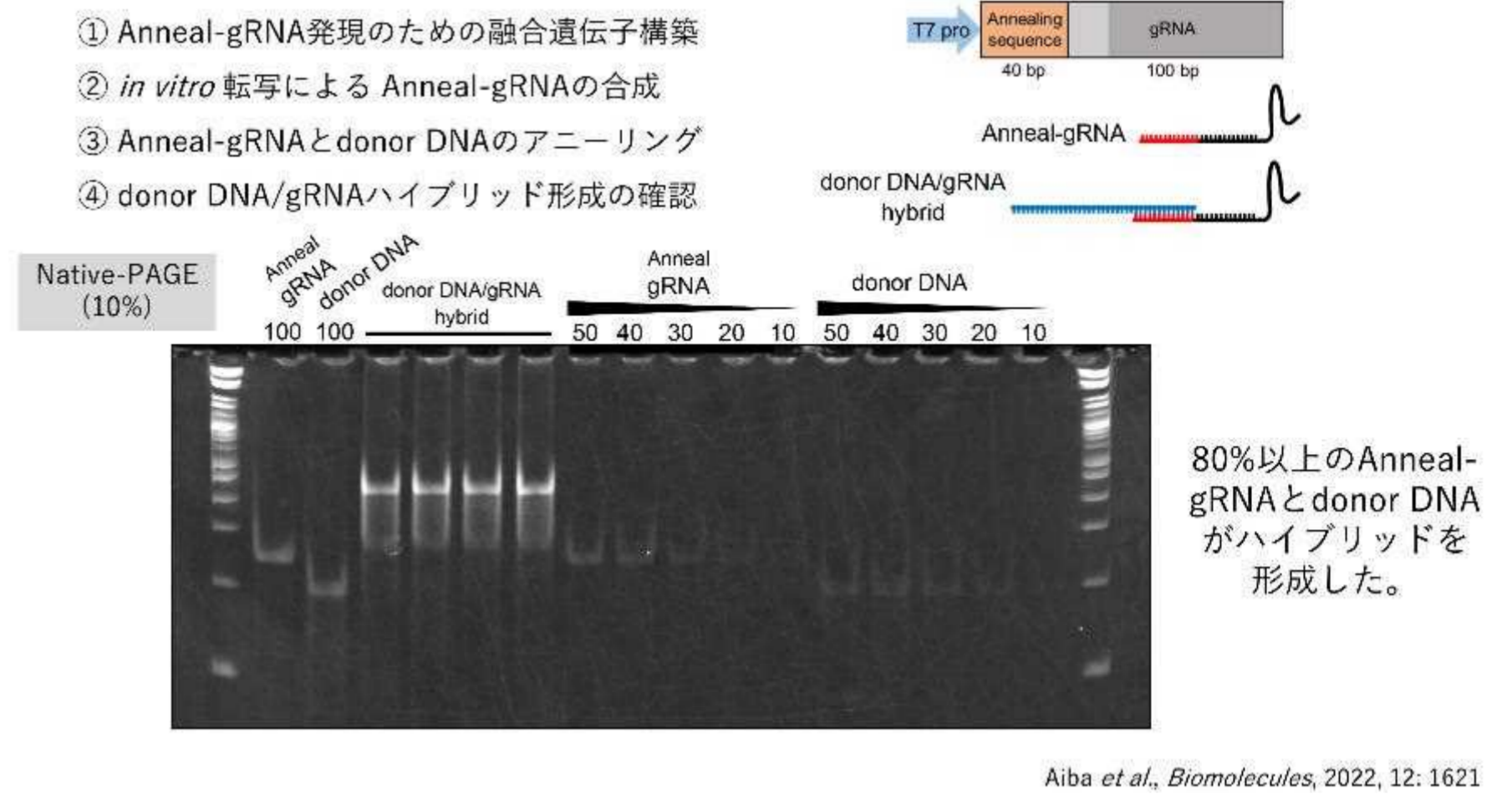
問合せ先: 黒田浩一 (kuroda@kit.ac.jp)



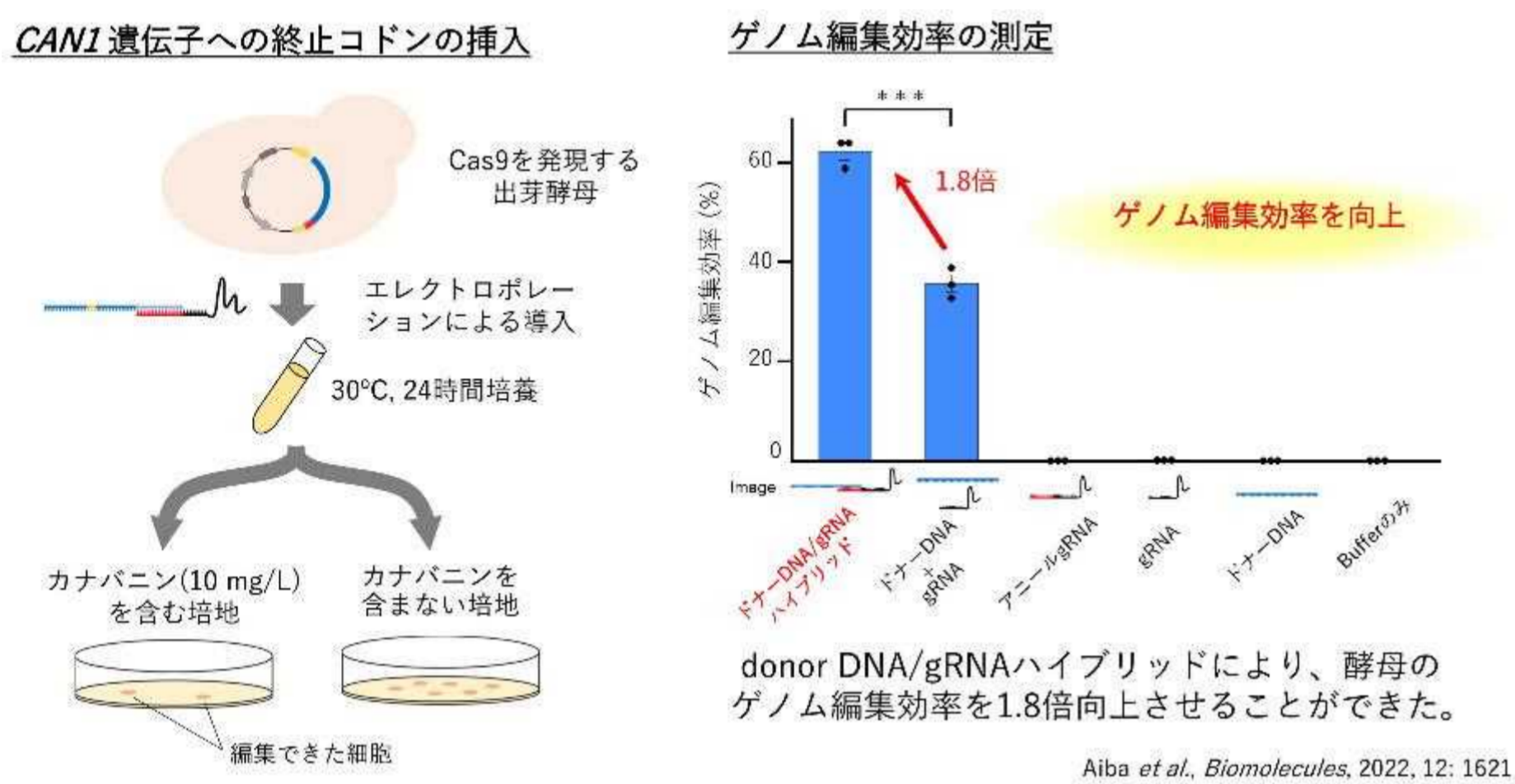
### ① CRISPR/Cas9 systemにおけるゲノム編集効率向上戦略



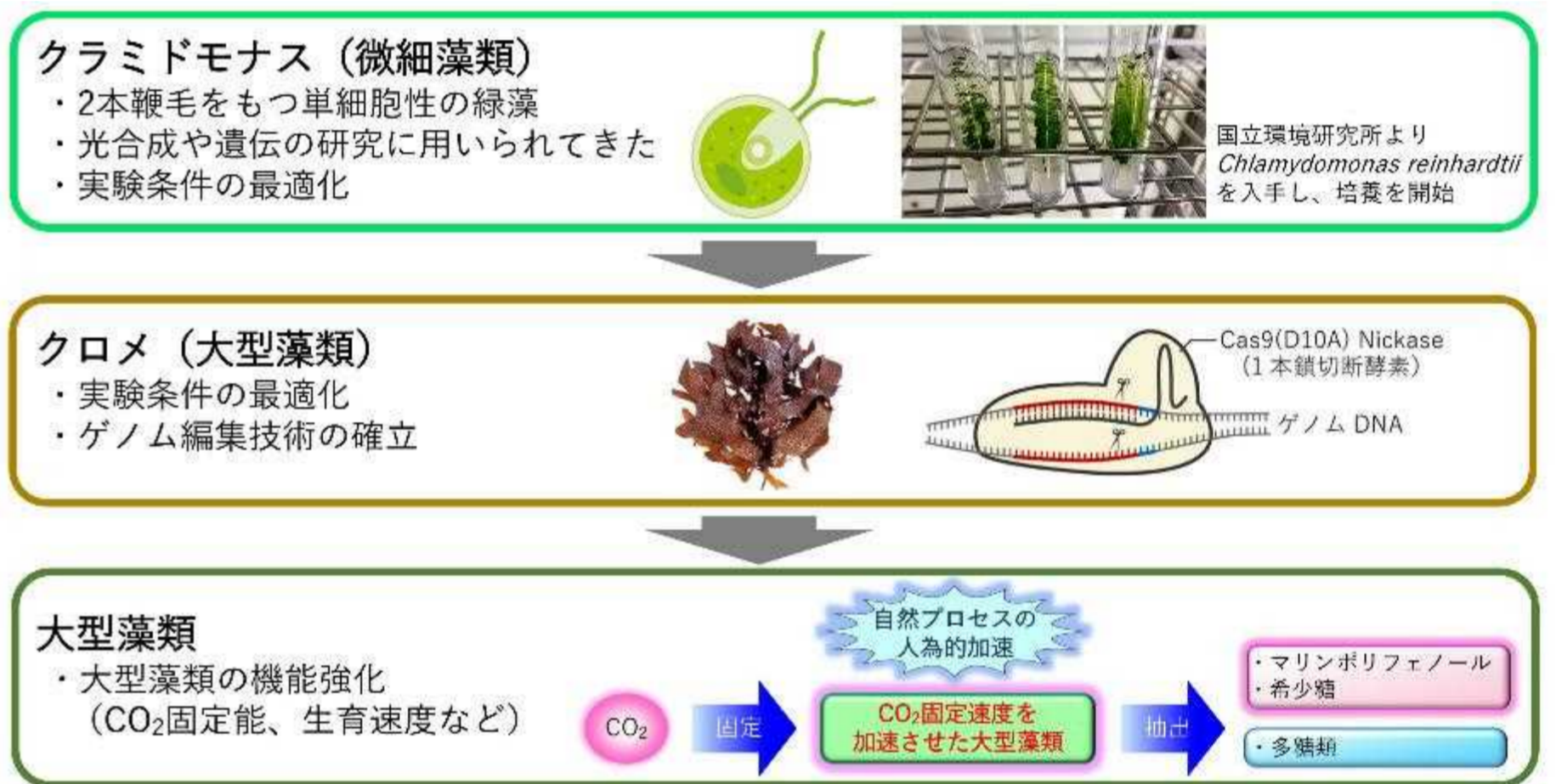
### ② ドナーDNA/gRNAハイブリッドの調製



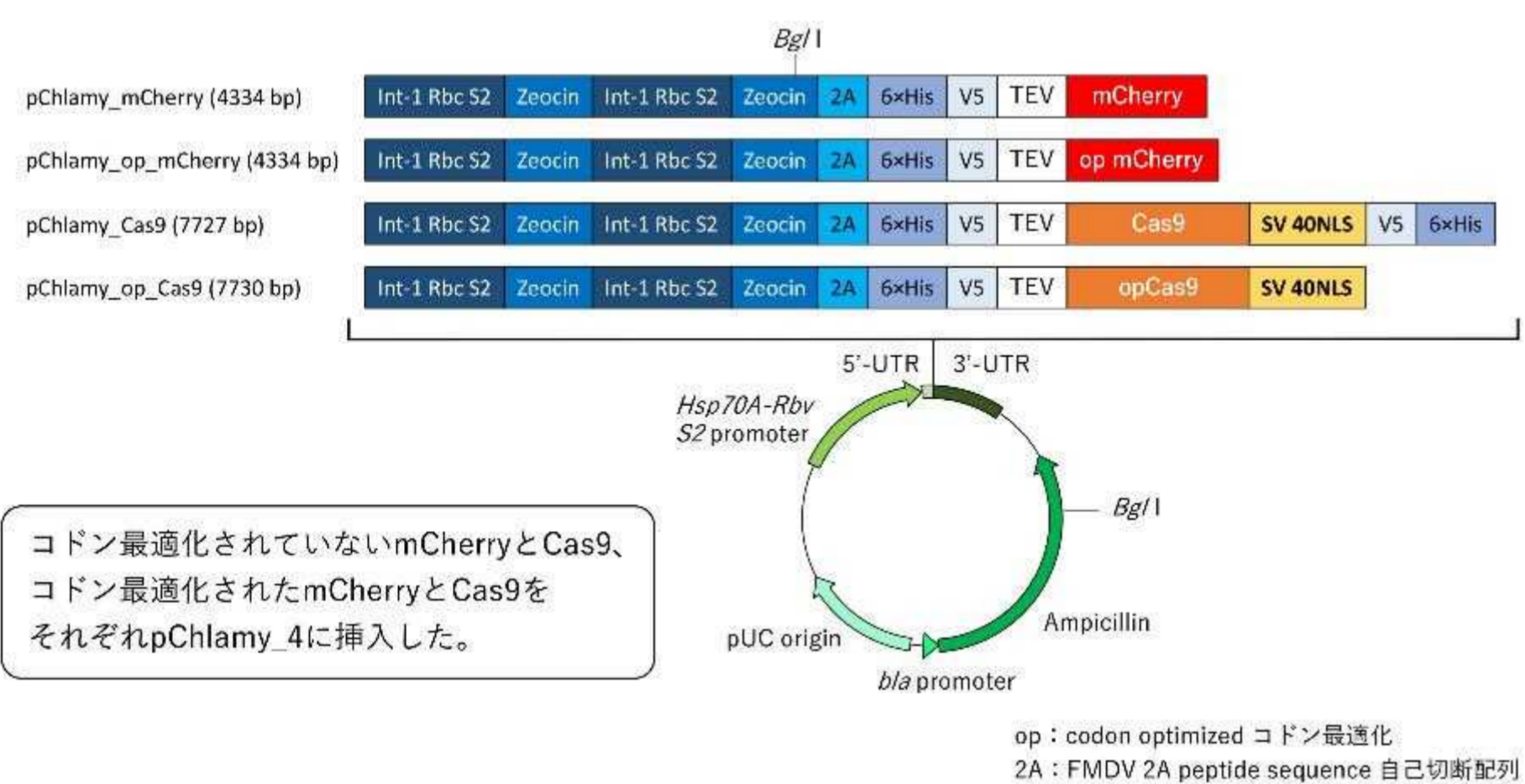
### ③ ドナーDNA/gRNAハイブリッドによるゲノム編集効率の向上



### ④ 藻類でのゲノム編集



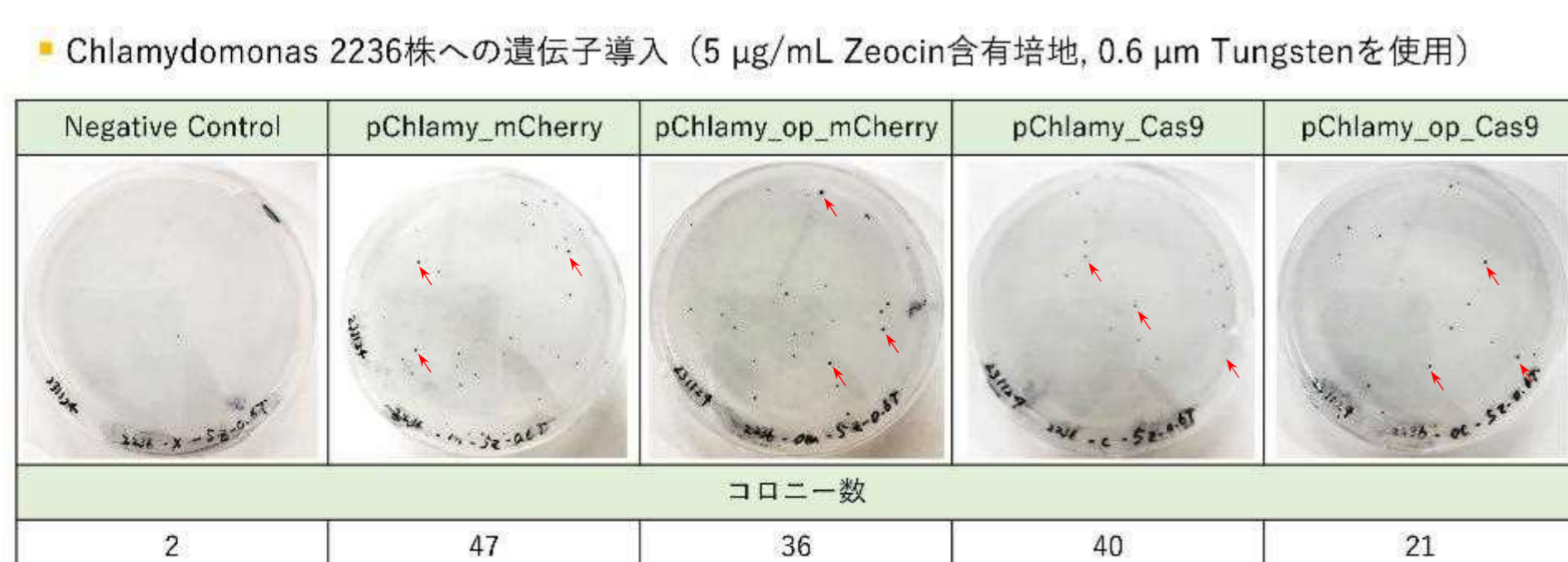
### ⑤ 発現プラスミドの構築



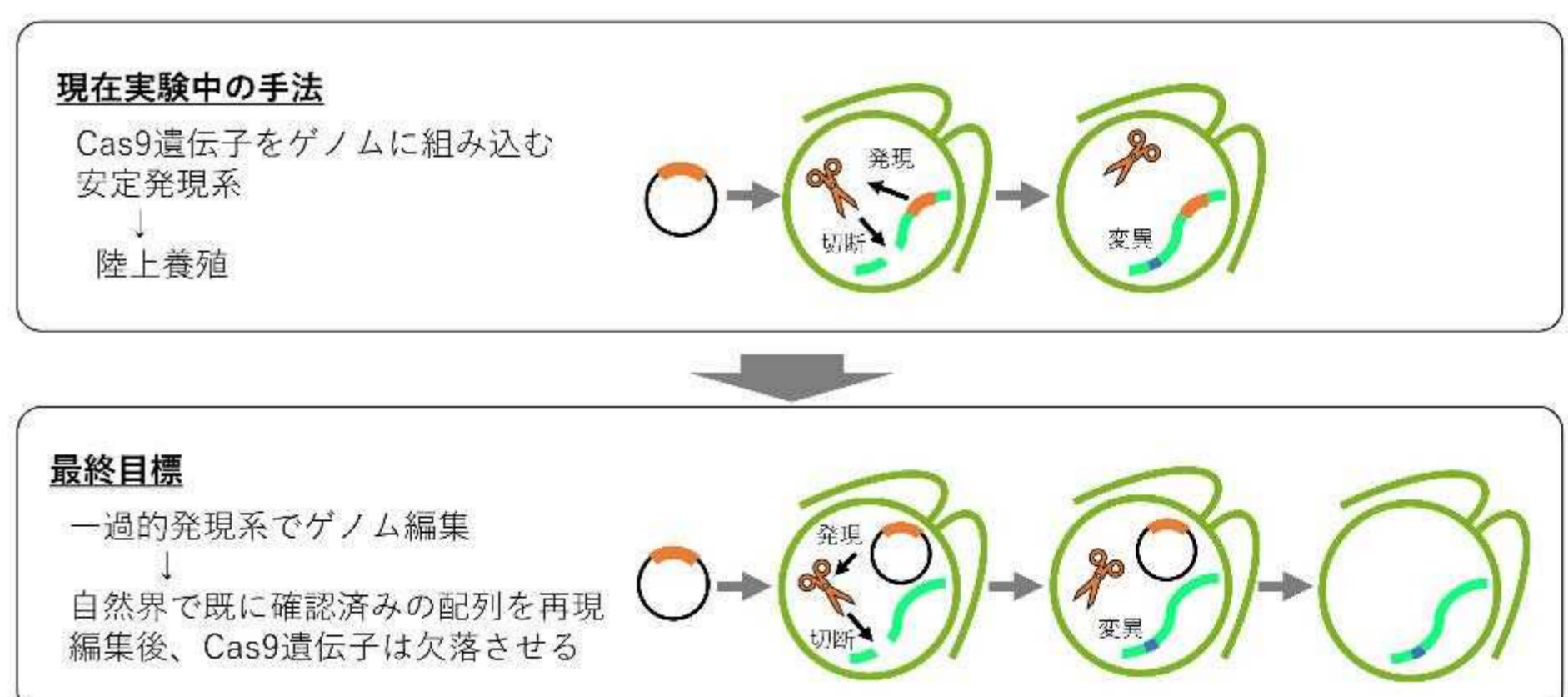
### ⑥ クラミドモナスへの遺伝子導入



### ⑦ パーティクルガン法の結果



### ⑧ 発現系と編集内容について



番号: A-7-4J

PJ: 機能改良による高速CO<sub>2</sub>固定大型藻類の創出とその利活用技術の開発

テーマ名: 大型藻類の育種と機能強化、完全利用を加速させる基盤技術の開発

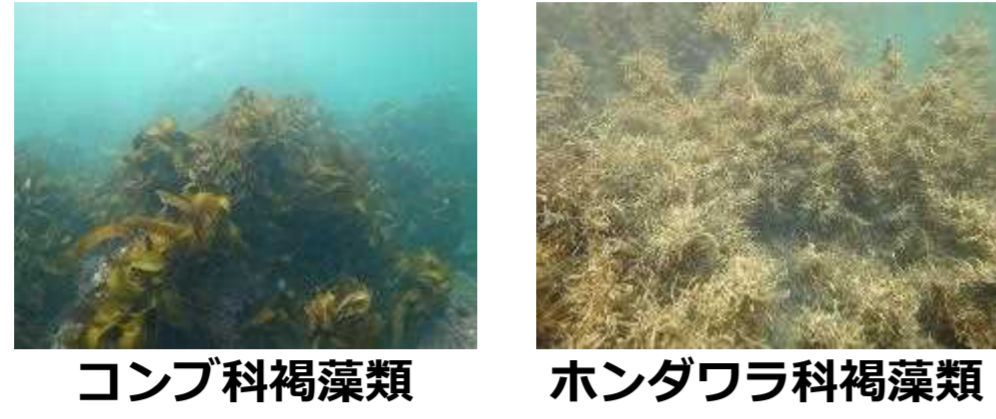
担当機関名: 三重大学 大学院生物資源学研究所

問合せ先: 柴田 敏行 (shibata@bio.mie-u.ac.jp), 三宅 英雄, 田中 礼士, 山本 康介, 奥山 哲也



## CO<sub>2</sub>吸収・固定に優れた大型藻類の選抜, その組織培養と種苗生産技術の開発

### 研究の目的



コンブ科褐藻類      ホンダワラ科褐藻類

有用大型藻類を選抜し, それらの種苗生産技術を開発する

### ETRを指標とした有用大型藻類の選抜

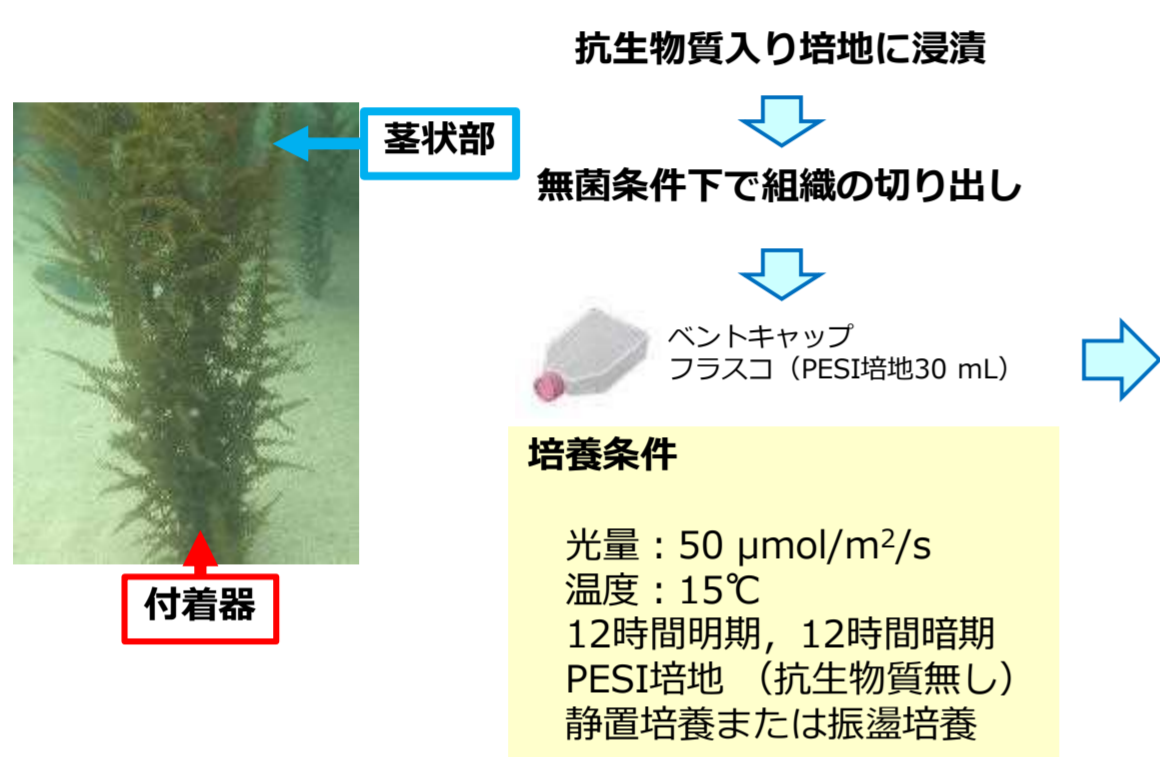
ETR*	( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
アカモク	7.9
トゲモク	6.6
<b>ワカメ</b>	<b>3.0</b>
アキヨレモク	5.7
ヤツマトモク	8.3
ヤナギモク	6.0
タマノハキモク	10.9
ナラサモ	10.4
ジョロモク	7.0
フシスジモク	11.1
エンドウモク	5.4

\*ETR

光合成の最上流から下流への電子伝達の速度  
→ CO<sub>2</sub>吸収・固定能と相関があるとされる

代表的な大型藻類であるワカメのETRと比較を行った  
→ 光合成活性に優れた有用藻種としてホンダワラ科褐藻類を選抜した

### 組織培養技術の開発



培養条件の最適化により, 50%以上の再生率を達成  
→ 組織培養による種苗生産は可能

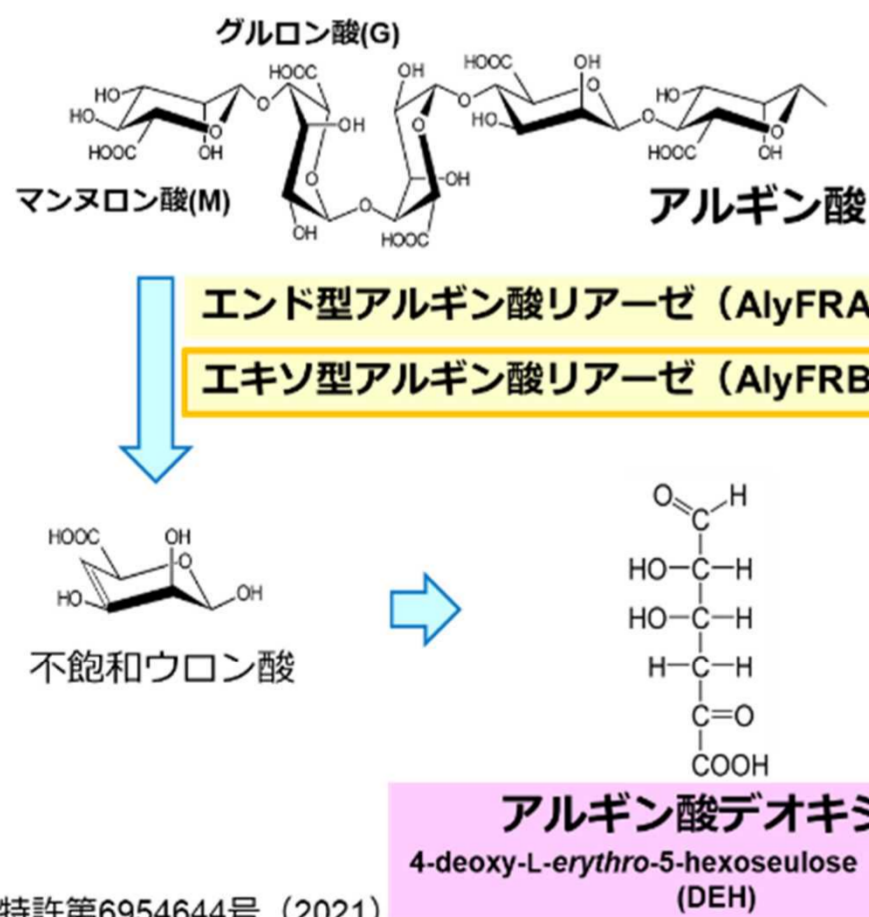
### 受精卵の採取と室内培養による幼体の生産



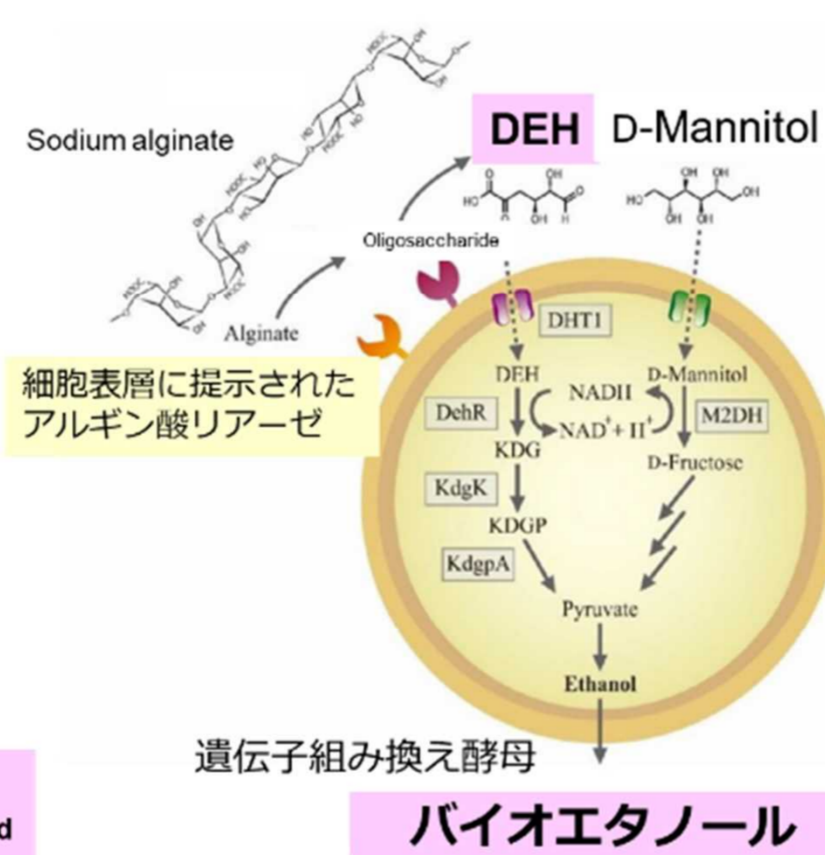
培養条件の最適化により, アカモクについて室内培養 (閉鎖系) での種苗生産技術を開発出来た

## 微生物前処理法を組み合わせたカスケード型物質生産プロセスの開発

### これまでの取り組み



特許第6954644号 (2021)  
Tanaka Y. et al., *Molecules*, 27, 3308, (2022)



遺伝子組み換え酵母      バイオエタノール

### 研究の課題

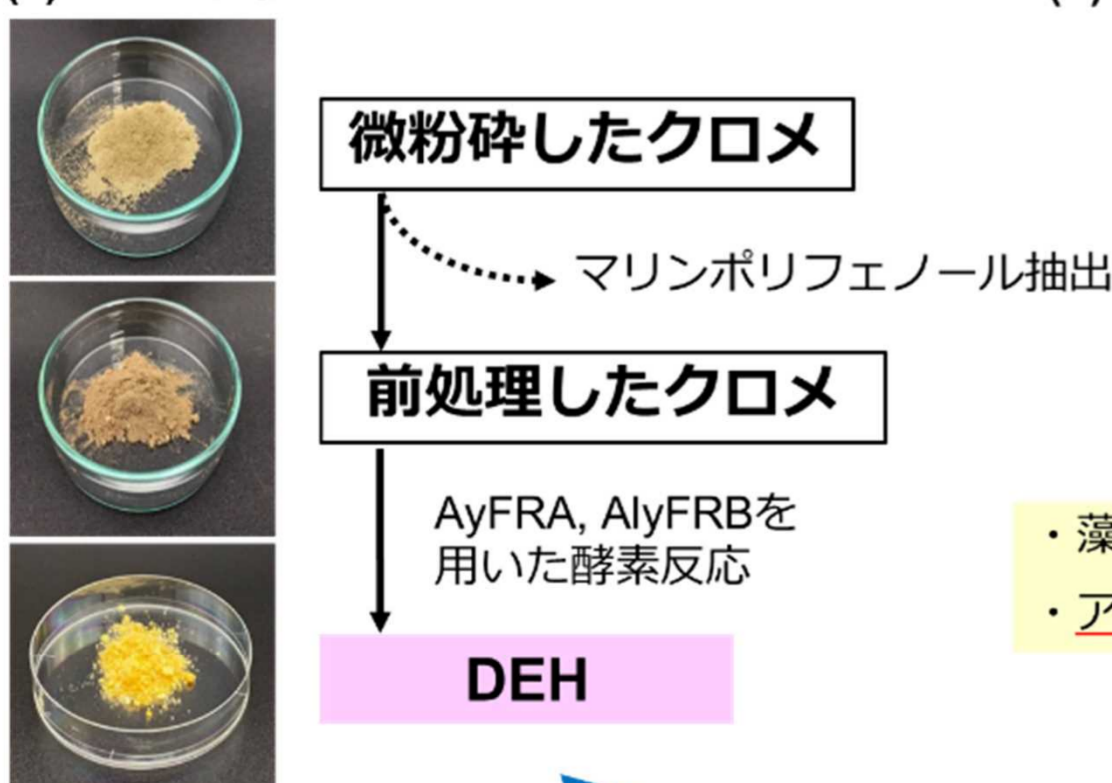
- ✓ 褐藻類には, フロロタンニン類や様々な糖質が含まれている
- ✓ フロロタンニン類は, タンパク質との結合能や抗菌性を持つため除去することが好ましい
- ✓ 藻体内で, アルギン酸は不溶性のゲル状態で存在する  
→ アルギン酸Naとして可溶化することで酵素反応において有利  
その一方で, アルギン酸Naは濃度を上げると高い粘性を示すため, 培養液や反応溶液の取り扱いが難しくなる

### 研究の成果

### 研究の目的

- ✓ 前処理としてポリフェノールを除去したクロメ粉末の調製
- ✓ クロメ粉末 (アルギン酸含有) からのDEHの直接生産
- ✓ 微生物前処理工程に最適な海藻分解細菌の選抜

#### (a) DEHの直接生産



クロメに含まれているアルギン酸に対して最大63.3%の収率でDEHへの変換を達成

#### (b) 微生物前処理工程に最適な海藻分解細菌



本菌株を微生物前処理工程の最適株として選抜

- ✓ 不溶性のアルギン酸からのDEHの直接生産を達成
- ✓ アルギン酸を可溶化するための多くの工程の削減 (酸・アルカリ不使用)
- ✓ 微生物前処理のための最適な海藻分解細菌の獲得

番号: A-7-5J

PJ: 機能改良による高速CO<sub>2</sub>固定大型藻類の創出とその利活用技術の開発

テーマ名: 大型藻類のカスケード生産プロセスの一環としてのエタノール発酵の実用化

担当機関名: Green Earth Institute 株式会社

問合せ先: keisuke.yamamoto@gei.co.jp

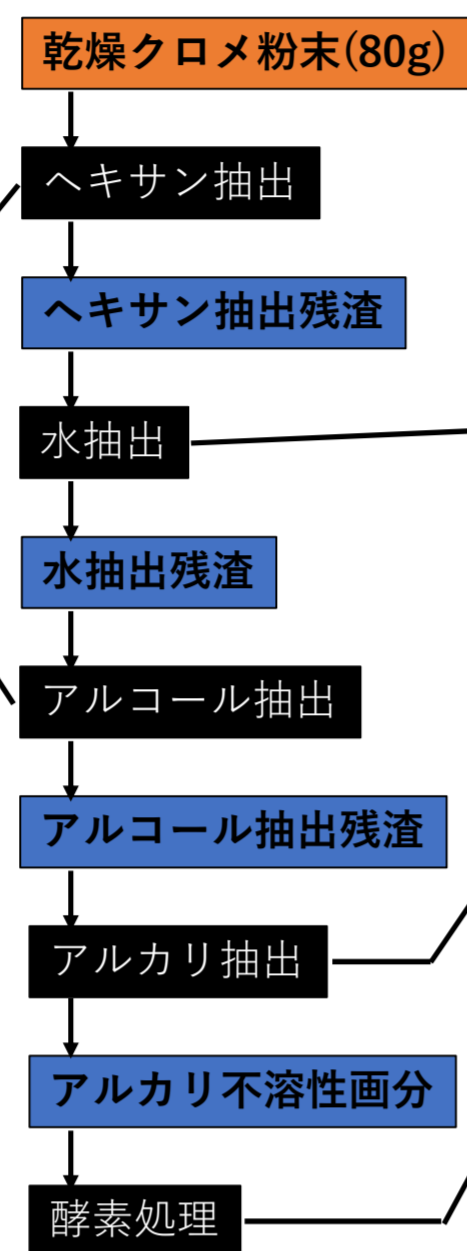
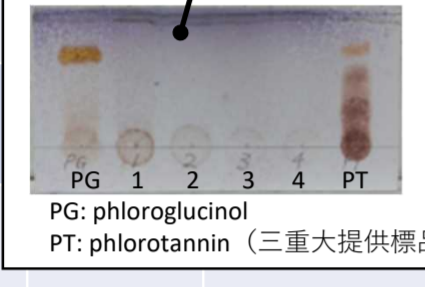


## 大型藻類からの有用成分取得を志向したカスケード型生産プロセス\*へのエタノール発酵の適用

\*NEDO先導研究プログラム「大型海藻類の完全利用に向けた基盤技術の開発」

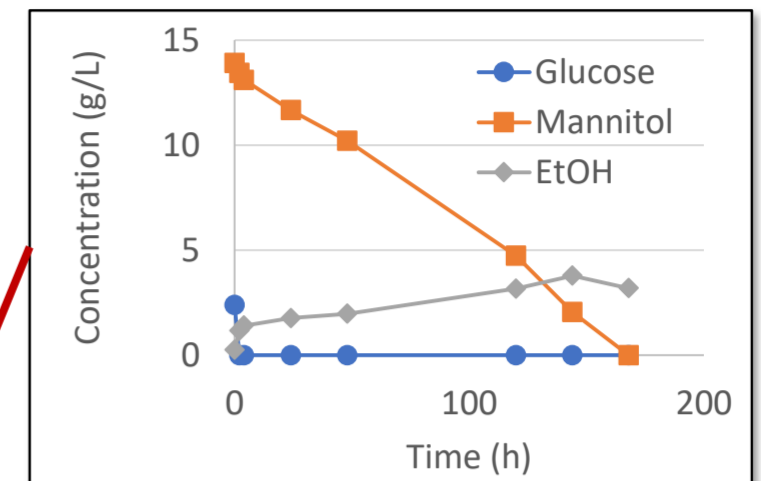
エタノール発酵に未利用な有用成分の各分画ごとの測定重量 (g)

	海藻油	マリンポリフェノール
ヘキサン抽出物	0.73	
水抽出物		
アルコール水抽出物		Detected on TLC
アルコール除去洗浄水		
アルカリ水抽出物		
アルカリ除去洗浄水		
酵素処理液		
合計	0.73	
回収率	0.91%	



エタノール発酵に利用可能な成分の各分画ごとの測定重量 (g)

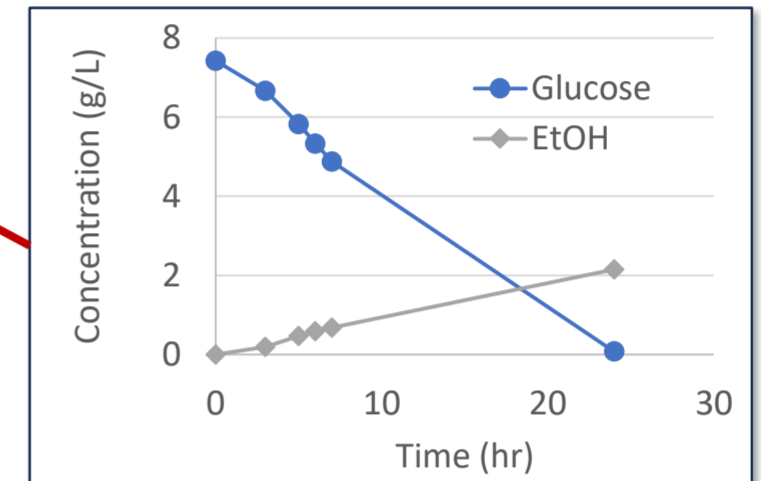
	マンニトール	ラミナリン	アルギン酸	グルコース
ヘキサン抽出物				
水抽出物	13.1	3.14	10.1	
アルコール水抽出物				
アルコール除去洗浄水			1.48	
アルカリ水抽出物			13.4	
アルカリ除去洗浄水			0.43	
酵素処理液				3.13 (2.82)*
合計	13.1	3.14	25.4	2.82*
回収率	16.4%	3.93%	31.8%	3.53%*



【糖化条件】  
37°C, pH 4.5  
酵素: CTec3 約10% (対炭素源重量)  
【発酵条件】  
35°C, pH 6.0  
菌株: AM1株  
菌体濃度: OD<sub>600</sub>= 25

・中和時に発泡・沈殿形成  
・AM1株によるエタノール発酵の進行は確認されず→試薬実験にて、アルギン酸単独ではエタノール発酵が進行しないことが確認された

【中和】  
6M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を使用  
【発酵条件】  
同上



【糖化条件】  
50°C, pH 4.5  
酵素: CTec3 約10% (対乾燥重量)  
【発酵条件】  
35°C, pH制御無し (6.2->4.2)  
菌株: Summit/AB Biotek  
菌体濃度: 0.5 g/L (OD<sub>600</sub>= 1.4)

\*セルロースとして

- 「水抽出物」のうち一部を糖化酵素処理後、アーミング酵母AM1株を用いてエタノール発酵を実施し、エタノール生産を確認。「水抽出物」画分全量を使用した場合を想定すると、約4g (対乾燥クロメ重量収率約5%) のエタノールが取得されると概算
- 「アルカリ不溶性画分」の一部を酵素糖化 (CTec3/Novozymes) してエタノール酵母 (Summit Ethanol Dry Yeast/AB Biotek) を用いたエタノール発酵を実施し、エタノール生産を確認。「アルカリ不溶性画分」全量を使用した場合を想定すると、約0.9g (対乾燥クロメ重量収率約1%) のエタノールが取得される計算

## 大型藻類からのエタノール生産を志向したカスケード型生産プロセスの改良

乾燥クロメ粉末

特許申請予定のため非公表

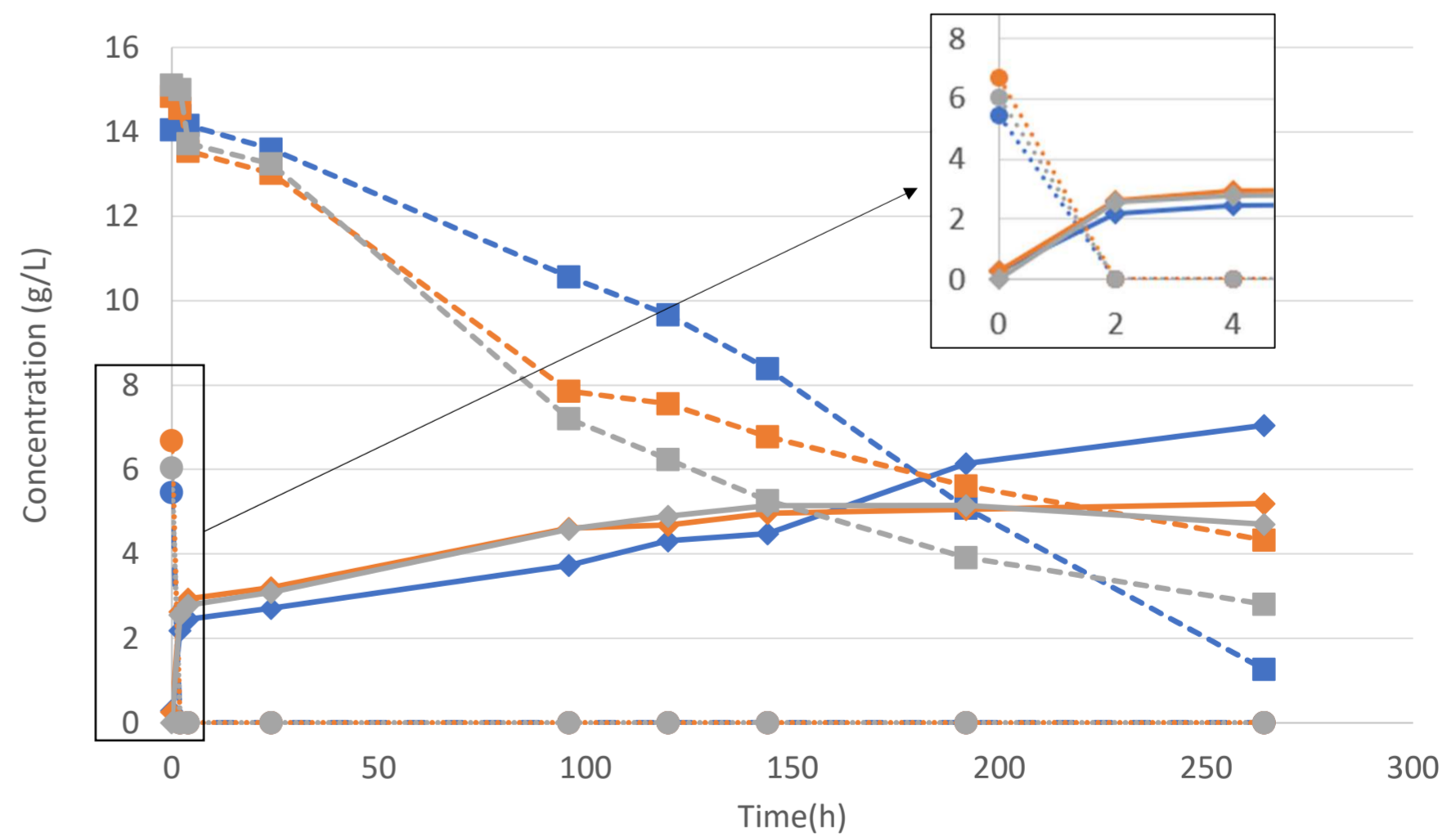
特許申請予定のため非公表

	Test1	Test2	Test3
EtOH最大到達濃度*	7.05 g/L (264h)	5.19 g/L (264 h)	5.15 (192h)
収率	8.5%	6.2%	6.2%

→ エタノール (右グラフ)

→ マリンポリフェノール

PG: phloroglucinol  
PT: phlorotannin (三重大提供標品)

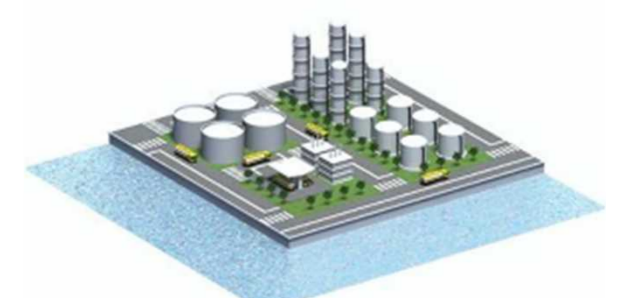


- アーミング酵母AM1株によるエタノール発酵により対乾燥クロメ粉末重量として5% (2023年度目標) を超えるエタノール生産が確認された
- TLC分析により、発酵後残渣からマリンポリフェノールを抽出することが可能であることを示唆する結果が得られた

## 大型藻類からのエタノール生産実用化に向けた今後の検討事項

- 水揚げされた海藻をエタノール発酵の原料にするまでの前処理方法の検討
- エタノール発酵の各種パラメタの更なる改善 (収率、濃度、速度)
- 海藻発酵液からのエタノール精製の検討
- 海藻発酵残渣の処理方法 (有価物抽出などを含む) の検討
- スケールアップの検討 (前処理、発酵、精製、廃棄物処理)
- 実験結果を踏まえた事業計画の策定と事業体制の構築

事業化イメージ例: 湾岸・海上マリンバイオリファイナリーコンビナート



番号: A-7-6J

PJ: 機能改良による高速CO<sub>2</sub>固定大型藻類の創出とその利活用技術の開発

テーマ名: 大型藻類のCO<sub>2</sub>固定加速のための装置開発

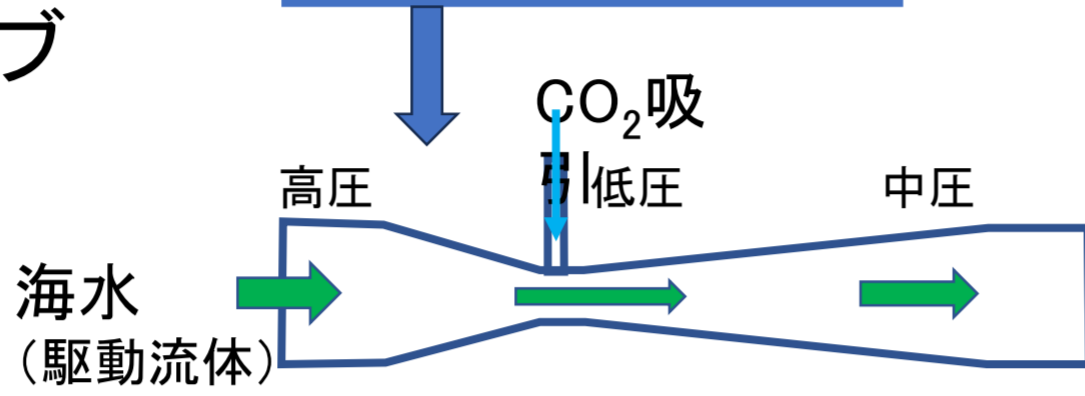
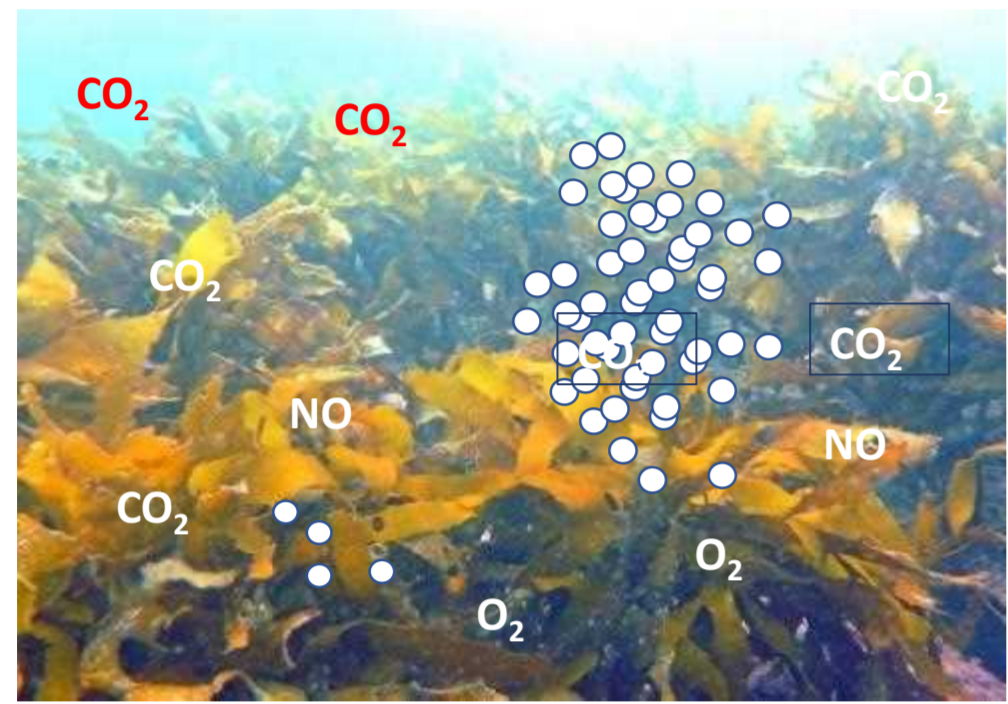
担当機関名: 関西化学機械製作株式会社 (KCE)

問合せ先: 大嶋 寛 (ooshima@kce.co.jp)

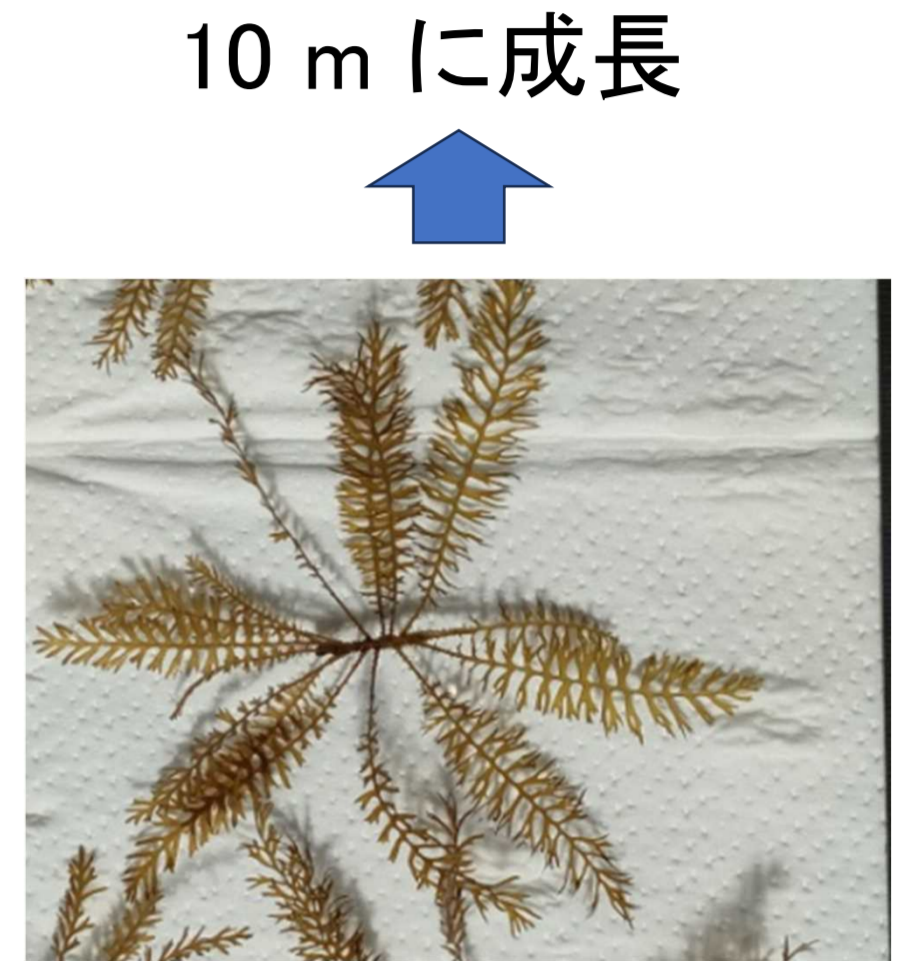


目的: (1) 海洋藻場および陸上養殖藻場にCO<sub>2</sub>ファインバブルを供給し、大型藻類の生長を加速させることを目的として、それに適したファインバブル供給システムを開発する。  
(2) 藻場の環境改善を図る。

実験1: 大型藻類としてアカモク(学名 *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh) を選び、その幼胚から成長した幼体の成長に及ぼすCO<sub>2</sub>ファインバブルの影響について検討した。なお、ファインバブル発生機構としては、**ベンチュリー管型**を採用した。



アカモクの成長

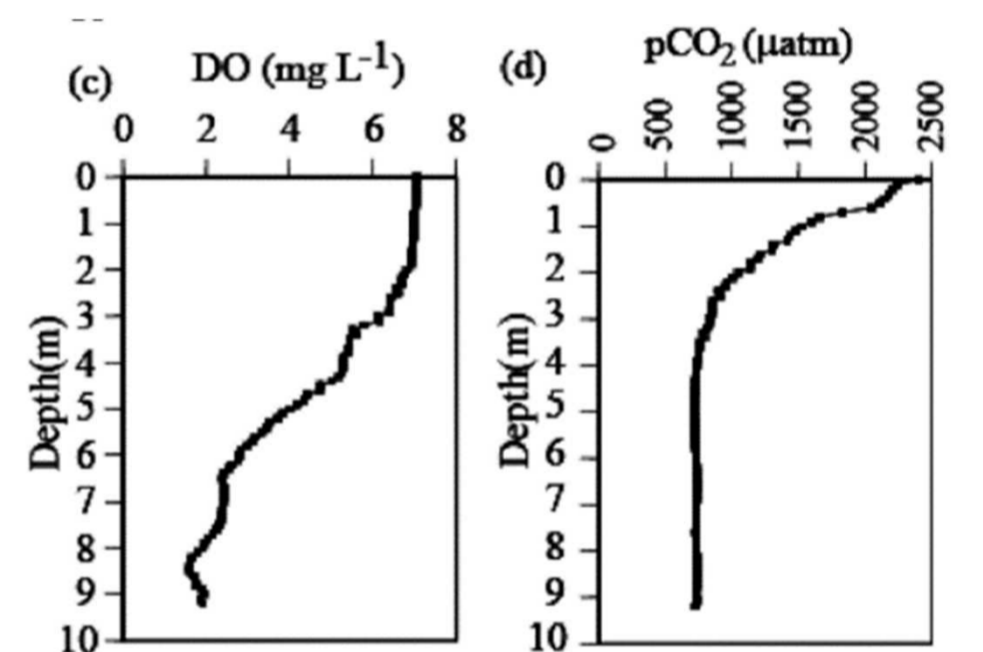


幼胚 → 幼体 → 成長した幼体

結果 (目標 1) アカモク幼体を小型水槽で培養したときの成長比較

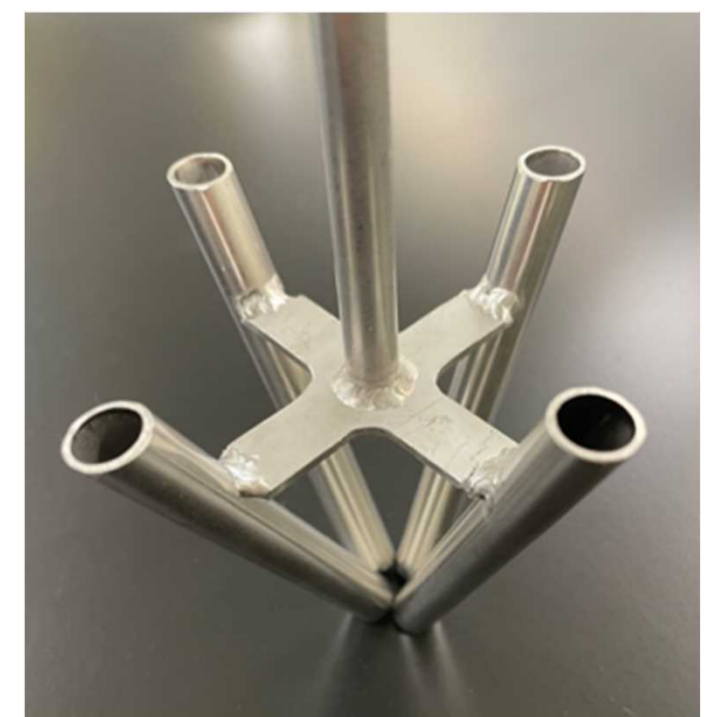
(目標 2) 藻場の環境改善 (海水の縦循環)

培養日数	0 d	15 d	27 d
供給ガス			
CO <sub>2</sub>			
空気			

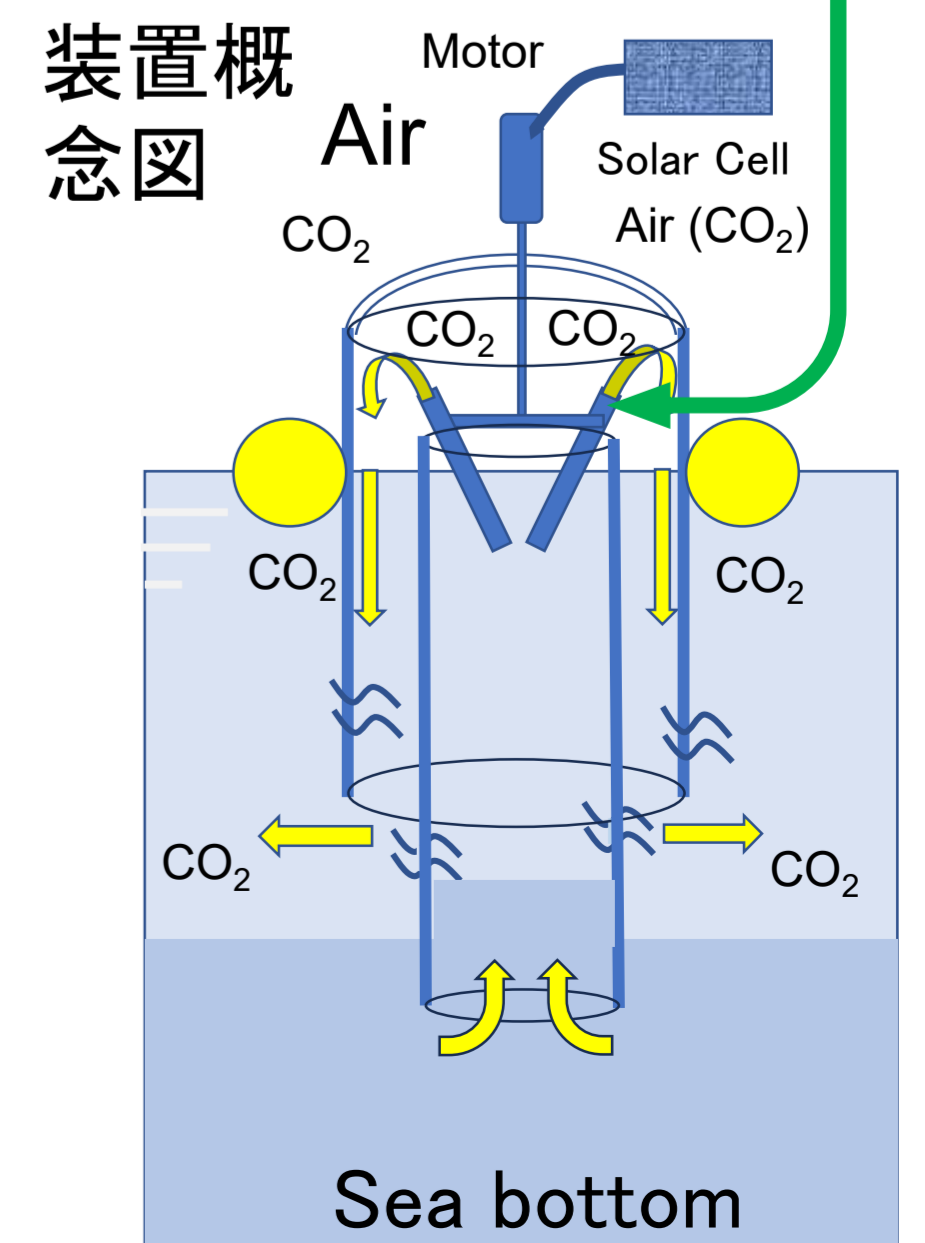


西宮 2014.11.10 (藤井智康, 日本水文学会誌, 47巻(2), 107-118 (2017))

pCO<sub>2</sub>, DOの深さ分布例



WW-mixer<sup>TR</sup> (KCE)



培養液分析	供給ガス	pH <sub>av</sub> (9:00)	CO <sub>2</sub> <sub>av</sub> , ppm (9:00)	O <sub>2</sub> <sub>av</sub> , ppm (9:00)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>total av</sub> , ppm (9:00)
測定期間		0 - 48 d	0 - 48 d	19 - 48 d	0 - 48 d
CO <sub>2</sub>		(7.49)	13.2* (4.53)**	(4.77)	195.8 (182.4)
Air		(7.93)	(1.41)	(4.79)	(150.4)

\* 1日の最大値  
\*\* 1日の最小値