

「バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業」

事業原簿【公開】

担当部	国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 新エネルギー部
-----	--

—目次—

概 要	i
プロジェクト用語集	iv
1. 事業の位置付け・必要性について	1-1
1. 事業の背景・目的・位置づけ	1-1
2. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	1-3
2.1 NEDO が関与することの意義	1-3
2.2 実施の効果（費用対効果）	1-4
2. 研究開発マネジメントについて	2-1
1. 事業の目標	2-1
2. 事業の計画内容	2-1
2.1 研究開発の内容	2-1
2.2 研究開発の実施体制	2-5
2.3 研究開発の運営管理	2-6
2.4 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性	2-8
3. 情勢変化への対応	2-9
4. 評価に関する事項	2-9
3. 研究開発成果について	3-1
1. 事業全体の成果	3-1
2. 研究開発項目毎の成果	3-2
2.1 ゲノム育種及び高効率林業によるバイオマス増産に関する研究開発	3-2
2.1.1 研究開発の概要	3-2
2.1.2 研究開発の目標設定	3-3
2.1.3 目標と成果	3-3
2.1.4 知的財産権等の取得及び成果の普及	3-42
2.2 可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発	3-43
2.2.1 研究開発の概要	3-43
2.2.2 研究開発の目標設定	3-48
2.2.3 目標と成果	3-50
2.2.4 知的財産権等の取得及び成果の普及	3-66
2.3 バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発	3-67
2.3.1 研究開発の概要	3-67
2.3.2 研究開発の目標設定	3-69
2.3.3 目標と成果	3-69
2.3.4 知的財産権等の取得及び成果の普及	3-108
2.4 有用微生物を用いた発酵の生産技術開発	3-109

2.4.1 研究開発の概要	3-109
2.4.2 研究開発の目標設定	3-109
2.4.3 目標と成果	3-110
2.4.4 知的財産権等の取得及び成果の普及	3-135
4. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて	4-1
1. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて	4-1
2. 研究開発項目毎の事業化の見通し	4-2
2.1 ゲノム育種及び高効率林業によるバイオマス増産に関する研究開発	4-2
2.1.1 成果の事業化に向けた戦略	4-2
2.1.2 成果の事業化に向けた具体的取組	4-3
2.1.3 波及効果	4-3
2.2 可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発	4-5
2.2.1 成果の事業化に向けた戦略	4-5
2.2.2 成果の事業化に向けた具体的取組	4-5
2.2.3 波及効果	4-6
2.3 バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発	4-8
2.3.1 成果の事業化に向けた戦略	4-8
2.3.2 成果の事業化に向けた具体的取組	4-9
2.3.3 波及効果	4-10
2.4 有用微生物を用いた発酵の生産技術開発	4-11
2.4.1 成果の事業化に向けた戦略	4-11
2.4.2 成果の事業化に向けた具体的取組	4-13
2.4.3 波及効果	4-15

(添付資料)

- ・ プロジェクト基本計画
- ・ 特許論文等リスト

概要

		最終更新日	2017年7月19日			
プロジェクト名	バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業			プロジェクト番号	P13011	
担当推進部/ PMまたは担当者	新エネルギー部 PM 矢野貴久（平成26年PM制度発足～現在） 担当者氏名 荒巻聡（平成27年4月～現在） 松永悦子（平成26年10月～現在） 内田和道（開始～平成27年3月） 林芳弘（開始～平成26年9月）					
0. 事業の概要	<p>食料と競合しないセルロース系エタノールについて、2020年頃の実用化・事業化を目指し、ガソリン価格、海外エタノール価格に競合可能な製造コストでのバイオエタノール製造に資する有用要素技術を確立することを目標とした。要素技術として、バイオマス資源の生産技術、有用糖化酵素の生産技術、有用微生物を用いた発酵生産技術の開発に取り組んだ。</p> <p>バイオマス資源の増産については、マーカー育種、土壌評価技術及びバイオマス評価システムを開発し、1.8倍のバイオマス増産を見込める技術開発に成功した。酵素生産技術については、対象原料と方法の異なる2つのチームにおいて性能アップと製造コスト削減に取り組み、10円/L-EtOHの生産コストとなる技術開発に成功した。さらに組換え酵素生産菌対応の数m³規模のパイロット設備におけるF/Sも実施した。発酵生産技術の開発においては、糖化発酵率0.80～0.85=糖化率×発酵（エタノール変換）率となる高機能な組換え酵母菌の開発に成功した。さらに組換え菌対応の2m³規模の同時糖化発酵パイロット設備を設計・設置し、複数の原料を使用したエタノール生産にこれらの酵母菌を適用し、目標レベル（糖化発酵率0.765、エタノール濃度5w/v%）以上でのエタノール生産の実証に成功した。</p>					
1. 事業の位置 付け・必要性 について	<p>環境負荷が少ない石油代替エネルギーの普及に向けた、新たな技術の開発及びコスト低減・性能向上のための戦略的取り組みが要求されている。バイオマスエネルギーは、カーボンニュートラルとして扱われているため、地球温暖化対策の一手段として重要である。一方、供給安定性の確保、食料との競合や森林破壊等の生態系を含めた問題、化石燃料との価格競争性・価格安定性といった経済面での課題、LCA（ライフサイクルアセスメント）上の温室効果ガス削減効果・エネルギー収支等の定量化等の課題を克服していくことが重要である。</p> <p>国内においては、2010年の「エネルギー基本計画」で掲げられた、2020年には全国のガソリンの3%相当以上をバイオ燃料にする目標（約180万kL）に向け、バイオエタノール製造が検討されている。そのための施策として2010年11月には「エネルギー供給構造高度化法」に基づく非化石エネルギー源の資料に関する石油精製業者の判断の基準（平成22年経済産業省告示第242号）として、2017年におけるガソリン対比GHG排出量削減率50%以上のバイオエタノール利用目標量（原油換算）50万kLが定められた。</p> <p>以上のことから、食料と競合しないセルロース系エタノールの実用化に資する技術開発が必要であると判断されるが、技術的なハードルと資金面から企業のみでは実施が困難であった。</p>					
2. 研究開発マネジメントについて						
事業の目標	<p>本事業では、前NEDO事業の「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発事業」で優れた成果が得られた有用糖化酵素によるバイオマス前処理物の糖化能力の向上、及び有用微生物によるエタノール発酵生産能力向上の開発を行うと共に、スケールアップ技術によるパイロットスケールでの生産技術開発を行い、2020年の商用機スケールでの実用化に適用可能な生産技術を確立する。またバイオマス原料についても、植栽技術の改良による更なる収量アップを目指し、実用化を促進する。事業実施にあたっては、開発される要素技術が実証プラントへ適用されバイオエタノールの実用化に着実に資することを念頭におき、事業を実施する。</p>					
事業の計画内容	主な実施事項	H25fy	H26fy	H27fy	H28fy	
	バイオマス資源の生産技術開発	○	○	○	○	
	有用糖化酵素の生産技術開発	○	○	○	○	
	有用微生物を用いた発酵の生産技術開発	○	○	○	○	

事業費推移 (会計・勘定別に NEDO が負担した実績額を記載) (単位:百万円)	会計・勘定	H25fy	H26fy	H27fy	H28fy	総額
	一般会計	0	0	0	0	0
	特別会計 (需給)	475	1981	1580	1102	5138
	総 NEDO 負担額	475	1981	1580	1102	5138
	(委託)	475	1981	1580	1102	5138
開発体制	経産省担当原課	経済産業省 資源エネルギー庁 省エネルギー・新エネルギー部 新エネルギー課				
	プロジェクトリーダー	なし (チームごとに研究開発責任者を設置)				
	プロジェクトマネージャー	NEDO新エネルギー部 矢野貴久				
	委託先 (助成事業の場合「助成先」とするなど適宜変更) (組合が委託先に含まれる場合は、その参加企業数及び参加企業名も記載)	【バイオマス資源の生産技術開発】 日本製紙(株)、東京農工大学、千葉大学 【有用糖化酵素の生産技術開発】 ① (株) Biomaterial in Tokyo、信州大学、(国研) 森林総合研究所 ② 花王(株)、長岡技術科学大学、(一財) バイオインダストリー協会 【有用微生物を用いた発酵の生産技術開発】 日揮(株)、崇城大学、(一財) バイオインダストリー協会、 (国研) 産業技術総合研究所				
情勢変化への対応	特になし					
評価に関する事項	事前評価	平成24年度実施 担当部 新エネルギー部				
	中間評価	中間評価は実施せずステージゲート方式(NEDO内)とした				
	事後評価	平成29年度 事後評価実施				
3. 研究開発成果について	<p>各テーマにおいて最も重要なコスト削減に関する目標はすべて達成することができ、予定通り2020年の実用化・事業化に向けて利用される予定。以下、個別に記載。</p> <p>【バイオマス資源の生産技術開発】 「ゲノム育種及び高効率林業によるバイオマス増産に関する研究開発(日本製紙(株)、東京農工大学、千葉大学)」 バイオマス増産を目的として、1.8倍の収量アップ(マーカー育種技術により1.4倍×土壌評価技術により1.3倍)を目標とした。マーカー育種技術についてはDNAマーカー解析の形質予測式の相関係数を0.7に高め、選抜育種により収量が1.4倍となる3系統を得た。土壌評価技術として年6000haを迅速に分析できる土壌センシング技術、回帰モデル及び評価システムを開発し、目標どおり土壌選定により1.3倍の成長量が見込める技術を開発した。また、地上3Dレーザースキャナによる高精度なバイオマス評価システムの開発において、現行の4倍の効率を目標とし、UAVを利用した3D情報からバイオマス量を測定するソフトウェアの開発により、この目標を達成した。</p> <p>【有用糖化酵素の生産技術開発】 ①「可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発(株)Biomaterial in Tokyo、信州大学、森林総合研究所)」 炭素源として可溶性糖のみを原料として生産できる特殊なセルラーゼ生産菌(トリコデルマ・リーセイ M2-1)をベース酵素として選定し、これに不足するBGLなどの酵素を酵母に異種発現させて添加しバイオマス原料の糖化を行う系を用いて、パルプ分解酵素生産技術の開発に取り組んだ。本ベース酵素は糖化中のバイオマス糖液を酵素生産の原料とする事で酵素生産コストを削減できる事も特徴である。ベース酵素、添加酵素のいずれについても、培地のコスト削減と培養方法の検討によりコスト削減と酵素活性の上昇に成功し、目標とした酵素変動費10円/L-EtOH以下(5~6円/Kg-発酵性糖)を達成した。また、ベース酵素については2kLまでの</p>					

	<p>スケールアップに成功した。添加酵素について、BGL の改良による高性能化、ソホロース合成酵素の導入には成功したが、ソホロースによる酵素生産誘導技術については時間的な制約から未確認であり、継続して検討を行っている。また、単糖までの糖化率についてはやや低い事が懸念されるが、添加酵素量の最適化により達成見込みである。</p> <p>②「バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発」 (花王(株)、長岡技術科学大学、バイオインダストリー協会)</p> <p>糖化の困難なバガス(サトウキビの抽出残渣)を原料として80%の糖化率を示す酵素を10円/L-EtOH以下のコストで生産できる酵素生産技術の開発に取り組んだ。酵素の性能としてはアルカリ処理バガスについて当初8mg/g-生成糖必要であった酵素使用量について2.5mg/g-生成糖を目標とし、各種遺伝子の探索と実用菌株への遺伝子組換えにより高機能化を図り、2.3mg/g-生成糖を達成する性能の高い菌の獲得に成功した。酵素タンパクの生産性については、当初17g/Lの生産性に対し25g/Lを目標とし、変異育種と遺伝子組換えにより工業生産菌を開発し、より低コストの培養条件において30g/L以上を達成した。さらに3KLパイロットスケールでのF/Sの実施により、目標通り10円/L-EtOH以下のコストでオンサイト酵素生産できる技術の開発に成功した。さらに、46kLまでスケールアップし、酵素生産性と性能に問題の無い事を確認した。</p> <p>【有用微生物を用いた発酵の生産技術開発】 「有用微生物を用いた発酵生産技術の開発(日揮(株)、崇城大学、産業技術総合研究所、バイオインダストリー協会)」</p> <p>C5C6同時糖化発酵のプロセスに適した組換え酵母菌の開発、パイロット試験設備の設置と実証、商用機スケールでの実用化に適用可能なプロセスデザインパッケージの作成に取り組んだ。目標値としては実バイオマス(バガス・ユーカリ)の前処理物を原料とし、エタノール5w/v%以上の濃度で、糖化発酵率0.765以上=糖化率0.85X発酵(エタノール変換)率0.90以上を設定した。酵母菌の開発においては各種有用形質に係る遺伝子の獲得と実装により、複数の実バイオマスを原料としたラボスケールでの実験において、エタノール濃度5~6w/v%、糖化発酵率0.80~0.85=糖化率X発酵率となる高機能な組換え酵母菌の開発に成功した。この時の最高推定エタノール変換効率は0.95と世界最高レベルを達成している。これらの組換え酵母菌を用いて2m3パイロット設備での実証試験を実施し、3種類の前処理原料について目標値である糖化発酵率0.765以上を達成した。さらに実施に適用可能なスラリーハンドリング技術を確立し、プロセスデザインパッケージを完成させた。</p>	
	投稿論文	「査読付き」17件、「その他」2件
	特許	「出願済」12件
	その他の外部発表 (プレス発表等)	「研究発表・講演」149件 「新聞・雑誌への掲載」3件
4. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて	<p>各テーマにおいて最も重要なコスト削減に関する目標は達成できたので、予定通り2020年の実用化・事業化に向けて利用する予定である。</p> <p>日本製紙(株)は本年度中にも自社の事業植林への本成果の適用を開始する。2020年には選抜した苗の事業植林を開始する予定である。</p> <p>(株)Biomaterial in Tokyoは平行して実施中のNEDO事業「セルロース系エタノール生産システム総合実証事業への適用を開始し、2020年頃のエタノール生産事業化へのオンサイト酵素生産を見込んでいる。</p> <p>花王(株)はサンプル提供を開始しており、今後の事業性判断・評価を経て、アジアでのオンサイト生産による酵素提供事業を目指している。</p> <p>日揮(株)はプラント受注、糖製造事業者との共同事業化を目指して、より経済的な事業モデル(廃糖蜜+バガス糖液を原料としたエタノール製造事業)を検討中である。</p>	
5. 基本計画に関する事項	作成時期	2013年8月 作成
	変更履歴	バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業については変更なし

プロジェクト用語集

	用語	定義
A	align, align 率	align とは順番を認識して並べるという意味で、align 率とは、この場合、写真の順番を自動で認識し、並べることを意味している。
	Aspergillus aculeatus	糖化力に優れた多種のセルラーゼ・ヘミセルラーゼを分泌する特長を有している糸状菌。
B	BGL	ベータグルコシダーゼの略称。セロビオースなどの β -1,4-グルコシド結合をエキソ型に加水分解し、グルコースを遊離させる。
	BHU	Biomass Hydrolysis Unit の略。Novozymes 社のセルラーゼ酵素のカタログに使われている酵素活性の単位。
C	C5 糖 (ペントース、五炭糖)	炭素原子 5 個を持つ単糖の総称。分子式 $C_5H_{10}O_5$ 、構造式 $C_5(H_2O)_5$ 。天然には、D-、L-アラビノース、D-リボース、D-キシロース、D-リブロース、D-、L-キシルロースなどがあり、多糖体、配糖体、リン酸エステルなどの形で生体内に存在する。アルコール発酵に用いられる酵母サッカロマイセス・セレビシエはキシロースなどのペントースを代謝できないため、ペントース代謝系酵素の遺伝子を導入することによりペントース発酵酵母を育種する研究開発が進められている。
	C6 糖 (ヘキソース、六炭糖)	炭素原子 6 個を持つ単糖の総称。分子式 $C_6H_{12}O_6$ 、構造式 $C_6(H_2O)_6$ 。天然には、D-、L-ガラクトース、D-グルコース、D-マンノース、D-フルクトースなどがあり、多くは二糖類、多糖類、配糖体の形でバイオマス中に存在する。生物が炭素源・エネルギー源として最もよく利用する物質の一つである。ガラクトースを除き、酵母により発酵されやすい。
	C5C6 yeast	C5 糖と C6 糖の両方を資化可能な酵母を指す造語。
	CBH	セロビオヒドロラーゼの略称。セルロースに含まれるグルコースの β -1,4 結合をエキソ型に加水分解し、セロビオースを遊離させる。セルロースの結晶部に対して高い分解活性を持つことから、バイオマスの分解する上で特に重要な酵素と考えられている。
	CBHI	GH ファミリー7 に属する還元末端からセルロースを分解する酵素。また、ここでは GH ファミリー7 に属する CBH を CBHI と呼ぶ。
	CBHII	GH6 に属するエキソ型の糖加水分解酵素。セルロース鎖を非還元末端側から加水分解しセロビオースを遊離させる。
	CEC	塩基置換容量
	C/N 比	炭素率
	COS10	原形質膜に存在するタンパク質の、代謝回転に関わるエンドソームタンパク Cos10 をコードする遺伝子である。Cos10 はユビキチン化されていないカーゴタンパク質に、ユビキチンをトランスに提供する。
	CSL (コーンスティープリカー)	トウモロコシからのデンプン製造工程にて、亜硫酸水にトウモロコシを浸漬するプロセスにおける浸漬液。微生物発酵の培地などによく用いられる。
D	DDR2	出芽酵母が有する遺伝子。本遺伝子がコードするタンパク質の機能は未知である。
	DCM	Digital Canopy Model の略称で、地形 (標高) の影響がない、樹冠の高さだけのデジタル図。
	DNA マーカー	DNA 配列の違いを目印 (マーカー) にしたもの。
	DNS 法	還元糖の定量法のひとつ。還元糖によるニトロ基のアミノ基への還元反応を利用する比色定量法。
	DSM	Digital Surface Model の略称で、樹木の一番高い部分のデジタル

	DTM	Digital Terrain Model の略称で、地形図、地面を表すデジタル図
E	EG	エンドグルカナーゼの略称。セルロースに含まれるグルコースの β -1,4結合をエンド型に加水分解し、セロオリゴ糖などを遊離させる。セルロースの非結晶部に対して高い分解活性を持つ。
	EGI	<i>Trichoderma reesei</i> が有する EG の中でも GH ファミリー7 に属する酵素。また、ここでは GH ファミリー7 に属する EG を EGI と呼ぶ。
	EGII	<i>Trichoderma reesei</i> が有する EG の中でも GH ファミリー5 に属する酵素。また、ここでは GH ファミリー5 に属する EG を EGII と呼ぶ。
F	FPase	濾紙分解活性=FPase 総セルラーゼ活性の測定方法。1時間に50mgの濾紙から2mgのグルコースを遊離する希釈酵素を調製し、その希釈倍率より酵素活性を算出する。方法の詳細は、National Renewable Energy Laboratory (NREL) による「Measurement of Cellulase Activities, Laboratory Analytical Procedure (LAP)」に準じて行った。
	fps1 Δ	グリセロールやキシリトールの細胞内外輸送を行うタンパクのひとつ Fps1 が欠失している。細胞内へのキシリトール輸送は、このプロジェクトで明らかとなった。グリセロールやキシリトールの細胞外への排出が抑えられるので、エタノール生産で生じる副産物の軽減に役立つ。
G	G1	グルコース
	G2	セロビオース
	GAL2	ガラクトース透過酵素をコードする遺伝子。ガラクトース、グルコース、キシロース、キシリトールなどの輸送を行う。このプロジェクトで、キシリトールの細胞内外輸送が明らかとなった。
	GAL80	ガラクトース代謝を行う遺伝子を負に制御するタンパクをコードする遺伝子。GAL80 遺伝子が欠損すると、キシロース代謝が向上する。
	GDH1	NAD ⁺ 依存のグルタミン酸脱水素酵素をコードする遺伝子。グルタミン酸から α -ケトグルタル酸とNH ₄ ができる反応を行う。このときに、細胞質に補酵素NADPHができる。逆反応も起こる。Gdh1を欠損させると、その反応はGdh2で起こる。
	GDH2	NAD ⁺ 依存のグルタミン酸脱水素酵素をコードする遺伝子。NH ₄ とミトコンドリアからできた α -ケトグルタル酸から、グルタミン酸ができる酵素反応が起こると、細胞質に補酵素NAD ⁺ が生じる。
	GILSP	優良工業製造規範のことを指す。Good Industrial Large-Scale Practiceの略。既に確認された宿主・ベクターと挿入DNAを掲載した2つのリストから組み合わせで構成された遺伝子組換え微生物は、医薬品等分野、鉱工業分野において、特殊な培養条件下以外では増殖が制限されること、病原性がないこと等のため最小限の拡散防止措置を執ることにより使用等を行うことが、厚生労働省、経済産業省によって認められている。
	gpd1 Δ gpd2 Δ	NAD ⁺ 依存グリセロール3-リン酸脱水素酵素が欠失した変異。グリセロールの蓄積が激減する。キシロース代謝が向上するとともに、グルコース存在下でもキシロース代謝が顕著に起こるので、発酵時間の短縮に役立つ。
	GPT2	細胞膜合成に必要なグリセロール3-リン酸/ジヒドロキシアセトンリン酸 sn-1 アシル転移酵素をコードする遺伝子である。gpd1 Δ gpd2 Δ と高発現型 GPT2 を組み合わせると高効率発酵に役立つ。
GRE3	出芽酵母内在性の非特異的アルドース還元酵素をコードする遺伝子。キシロースからキシリトールへの反応を触媒する。	
H	HEX1-22	ビルビン酸キナーゼの変異の一つ。この変異があると、キシロース代謝時でも酵素活性が維持されるので、キシロース代謝が向上する。
	HOR7	出芽酵母が有する遺伝子。本遺伝子がコードするタンパク質の機能は未知である。
	HSP12	出芽酵母が有する低分子の熱ショックタンパク質をコードする遺伝子。

	HSP26	低分子の熱ショックタンパクをコードする遺伝子
K	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	高温（最大で 48°C 程度）でエタノール発酵や増殖が可能な耐熱性酵母であり、 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> と同様に広範囲の糖を資化できるという特長を有する。ただし、キシロースは資化できるが、キシロースを基質としてエタノールを生産することができない。
L	LBKP	広葉樹晒クラフトパルプ。化学パルプの一種。水酸化ナトリウムと流化ナトリウムの混合液中で加圧・加熱し脱リグニンさせたもの。本事業内ではユーカリ由来の LBKP を指す。
	Lowry 法	タンパク質の定量分析法の一つ。ビウレット反応とアミノ酸側鎖の酸化反応を組み合わせたもの。
	LUKP	広葉樹未晒クラフトパルプ。
M	MTH1	グルコースセンシング シグナル伝達経路の負の制御タンパク。細胞外のグルコース濃度が高くなると、細胞内にその情報が伝わり、MTH1 遺伝子産物 (Mth1) が不活性になり、ヘキソース輸送タンパクが生産される。MTH1-32 変異では、Mth1 が不活性にならないので、細胞内のグルコース濃度が低くなり、カタボライト抑制が解除され、遺伝子発現が多面的に変化し、影響が多く現れる。その例として、キシロース代謝が向上する、高濃度キシロース培地で増殖する 等々がある。
	MAI	Mean Annual Increment の略で単位面積当たりの年平均成長量のこと。単位は m3/ha/年。
	MF	精密濾過 (MicroFiltration)。孔の大きさが概ね 50 ナノメートルから 10 マイクロメートル (=10,000 ナノメートル) の膜を用いた濾過を指す。培養液からの菌体の除去や、粒子の除去などに用いられる。
	mrad	距離に応じたビーム径の広がりを示す単位で、距離に mrad を掛け合わせることで、センサから離れた場所でのビーム径を計算できる。距離に応じてビーム径が広がるようであれば、mrad が大きくなり、得られるデータ量が少なくなる。距離が遠くてもビーム径が小さい方が、遠くにある物をより詳細に把握することができる。
N	NAD、NADP	NAD : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide) NADP : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 全ての真核生物と多くの古細菌、真正細菌で用いられる電子伝達体のこと。さまざまな脱水素酵素の補酵素として機能し、酸化型 (NAD+) および還元型 (NADH) の 2 つの状態を取り得る。どちらの補酵素が利用されるかは酸化還元酵素の種類によって決まっている場合が多い。
	NBAP	針葉樹晒ソーダパルプ。化学パルプの一種。水酸化ナトリウム溶液中で加圧・加熱し脱リグニンさせたもの。
	NBKP	Needle Bleached Kraft Pulp。針葉樹晒クラフトパルプ。
	NDE1	NADH 脱水素酵素をコードする遺伝子で、ミトコンドリア膜にある Nde1 は、細胞質側を向いている。反応が起こると、細胞質に NAD+ ができる。
	NDE2	NADH 脱水素酵素をコードする遺伝子で、ミトコンドリア膜にある Nde2 は、細胞質側を向いている。反応が起こると、細胞質に NAD+ ができる。
	NREL (アメリカ)	National Renewable Energy Laboratory の略。バイオエタノール等再生可能エネルギー関連の研究開発を行うアメリカの国立研究所
	NUAP	針葉樹未晒ソーダパルプ。
O	OD600	600nm の波長で測定されたサンプルの光学密度を示す略語。液体中の細菌や細胞の濃度を推定する一般的な方法。
	PASC	phosphoric acid swollen cellulose の略。アビセルなどのセルロースを濃リン酸に溶かし、この溶液を水に加えることにより作製。セロビオヒドロラーゼの基質として用いられる。

P	PCR 法	DNA を増幅するための手法で、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction) の略。
	PGK1	3-ホスホグリセリン酸キナーゼをコードする遺伝子。グルコースからピルビン酸までの代謝経路のひとつの反応を行う。この遺伝子のプロモーターは、エタノール発酵時にも働く。そのため、発酵時に必要な遺伝子の発現を、このプロモーターで行う例が多い。
	p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 分解活性	β -D-グルコピラノシド結合を加水分解する酵素の活性測定法。pNPG の加水分解で生じる pNP の色調変化を 405nm の波長で測定。
	PPP	Pentose Phosphate Pathway。ペントースリン酸経路。グルコースの代謝経路の一つで、グルコース-6-リン酸を経由し、デオキシリボースやリボースといった核酸の合成に至る代謝経路。出芽酵母では、代謝されたキシロースはキシロース-5-リン酸を経由して、ペントースリン酸経路を通り、解糖系に戻ってエタノールに至るため、キシロースに由来するエタノール生産において重要な代謝経路。
	PSA 法	圧カスウィング吸着法 (Pressure Swing Adsorption) 。吸着剤としてゼオライトを充填した 2 本の吸着塔 (A 塔、B 塔) からなり、A 塔では常圧あるいは加圧で、かつ、エタノールが蒸気で存在できるように沸点以上の温度条件のもと、含水エタノール蒸気を供給することで水蒸気をゼオライトに選択的に吸着させ、A 塔の出口から無水エタノールを流出させる。一方、B 塔では吸着時の温度を維持したまま、減圧条件として A 塔流出の無水エタノール蒸気の一部を導入することで、ゼオライトに吸着された水を脱着させてゼオライトを再生する。バルブを切り替えることで、吸着・脱着操作を A 塔と B 塔で交互に行うことにより、連続的に無水エタノールを得ることができる。
R	Radial Basis Functions	ニューラルネットワークの分野で使われている方法。分類を自動で行う際の境界を確定する際に使う。
	RNA-seq	RNA シーケンス解析。mRNA 等の RNA の塩基配列を次世代シーケンサーによって解読する。これによって、遺伝子の発現量の定量だけでなく、新規転写産物や転写産物のスプライシングに関する情報などが得られる解析手法。
	RMSE	Room Mean Square Error の略で、精度評価指標であり、ある一つの変数が他の変数からどの程度離れているかを示している。誤差値としても用いられている。
	RNA シーケンス	遺伝子発現している mRNA などの配列を全てシーケンスし、発現量を数値化することで、発現変動のある遺伝子を同定する手法。
	rrBLUP 法	SNP データから、形質データを予測するために、各 SNP の効果を算出するための統計モデルで、ridge regression Best Linear Unbiased Prediction:リッジ回帰最良予測推定量の略語。
S	Saturation mutagenesis	遺伝子配列中の 1 つまたは複数の予め決定された標的位置で可能なすべての変異を含む変異体の導入
	SCT1	細胞膜合成に必要なグリセロール 3-リン酸/ジヒドロキシアセトンリン酸 sn-1 アシル転移酵素をコードする遺伝子である。gpd1 Δ gpd2 Δ と高発現型 SCT1 を組み合わせると高効率発酵に役立つ。
	<i>Scheffersomyces stipites</i>	以前は、 <i>Pichia stipites</i> と呼ばれていた微生物。2010 年に現在の学名に変更された。エタノール発酵を触媒する微生物の代表格である <i>Saccharomyces cerevisiae</i> は、キシロースについては基質としての利用性がない。一方、 <i>Scheffersomyces stipites</i> は、 <i>Pichia segobiensis</i> 、 <i>Candida shehatae</i> 、 <i>Pachysolen tannophilus</i> などと並び、キシロースをエタノールに発酵する微生物群として知られている。なお、これらの株は、主に甲虫類の後腸などから単離されている。
	SNP	DNA 配列中にある一塩基だけが違って多様性(多型)が生じていることがあり、これを SNP (Single Nucleotide Polymorphism : 一塩基多型) と呼ぶ。
	SNPchip	塩基の違いを検出する DNA 断片がチップ上に高密度に敷き詰められており、一度にたくさんの SNP のジェノタイピングを行うことのできるチップ。

	Sre1 (SREBP)	コレステロール代謝を制御する転写因子転写因子 SREBP (sterol regulatory element-binding protein)
	SSR	DNA 配列中に、2~4 塩基程度の短い塩基配列が繰り返された配列のことで、simple sequence repeat (単純反復配列) の略語。
	Structure from Motion	写真測定の 3 次元化をする手法を自動化した手法。特に、写真画像だけから 3 次元データにすることができる手法。
	SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation (同時糖化発酵を参照)。
	SSCF	Simultaneous Saccharification and Co-fermentation (同時糖化並行複発酵を参照)。
T	TDH1	出芽酵母が複数有するグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素をコードする遺伝子の一つ。
	TDH3	グリセロール 3-リン酸脱水素酵素をコードする遺伝子。グルコースからピルビン酸までの代謝経路のひとつの反応を行う。この遺伝子のプロモーターは、エタノール発酵時に働く。そのため、発酵時に必要な遺伝子の発現を、このプロモーターで行う例が多い。
	<i>Trichoderma reesei</i>	糸状菌の一種であり、細胞外にセルラーゼを高濃度に分泌する。
W	Watershed 法	デジタル図の凹凸形状から、各凸部が占める場所を把握するアルゴリズム。デジタル図をひっくり返し、その中に水を流し込んでその範囲を特定するように解析することから付けられた解析方法。
X	XYL1	キシロースからキシリトールへの反応を行う、補酵素 NADPH もしくは NADH 依存のキシロース還元酵素をコードする遺伝子である。 <i>Sheffersomyces stipitis</i> の XYL1 を <i>Saccharomyces cerevisiae</i> に組換えて、発現させる例が多い。
	XYL2	キシリトールからキシロースへの反応を行う、補酵素 NAD ⁺ 依存のキシリトール脱水素酵素をコードする遺伝子である。 <i>Sheffersomyces stipitis</i> の XYL2 を <i>Saccharomyces cerevisiae</i> に組換えて、発現させる例が多い。
	XKS1	キシロースからキシロース 5-リン酸への反応を行うキシロキナーゼをコードする遺伝子。 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> が持つ XKS1 の発現は弱いので、TDH3 プロモーター (TDH3p) や PGK1p で XKS1 を発現させる例が多い。

ア	アクセサリ酵素	α -L-アラビノフラノシダーゼ、フェルロイルエステラーゼ、アセチルキシランエステラーゼ等の側鎖加水分解酵素。
	アセチル基	一価の基 CH_3CO -をいう。酢酸から誘導されるアシル基。
	アセチルキシランエステラーゼ	ヘミセルロースであるキシラン及びキシロオリゴ糖の脱アセチル化を触媒する酵素。キシランの効率的分解には必要とされる。
	アレリズム試験	突然変異が同じ遺伝子変異かどうかを調べる遺伝学的な解析方法。
	アラビノース	五炭糖及びアルドースに分類される糖の一種。キシロース主鎖に α 1,3 結合したアラビノキシランの構成成分。
	アルカリ処理	バイオマスに対して苛性ソーダ (NaOH) を用いて行われるアルカリ処理は、リグノセルロースの酵素糖化前処理としてよく用いられる
イ	イオンビーム育種	炭素イオンやアルゴンイオン、鉄イオンを加速することで得られる重イオンビームを変異原として、生体に照射し突然変異を誘導することで変異体を取得する育種方法。イオンビームで誘発される突然変異は、(1)変異の誘発率が高く、選抜の省力化が可能、(2)変異のスペクトルが広く、従来法では得られなかった新規突然変異体の取得が可能、(3)目的外の付随変異が少なく、ワンポイント改良が可能という特長がある。
	異種発現	ある生物の遺伝子を別の生物で発現させること。
	インバース PCR	DNA の基地配列領域の両端に隣接する未知の塩基配列を PCR 法を用い増幅して取得する方法。
	インベントリー	森林管理簿、森林簿とも呼ばれており、管理している森の詳細な情報が記載されている記録簿。
エ	エキソ・キシラナーゼ	キシランをキシロオリゴ糖、キシロビオース、最終的にはキシロースにまで分解する反応系を触媒する酵素。ヘミセルロース鎖を端から順に分解する。
	エタノール	エタノール (ethanol) はアルコールの一つ。「エチルアルコール」 (ethyl alcohol) や、酒類の主成分であるため「酒精」とも呼ばれる。アルコール類の中で、最も身近に使われる物質の 1 つである。揮発性が強く、殺菌・消毒のほか、自動車燃料でも用いられる。
	エタノール発酵	グルコース、フルクトース、ショ糖などの糖を分解して、エタノールと二酸化炭素を生成し、エネルギーを得る代謝プロセスであり、酸素を必要としない嫌氣的反応。
	エネルギー作物	エネルギーの原料となる栽培植物。
	エラープローン PCR	PCR 法を用いた変異導入法の 1 つ。DNA 増幅時に、複製の正確性を低下させることで、塩基の変異を導入する。PCR 法で増幅される DNA の全域に対して任意の部位に変異が導入することが可能。
	エンド・キシラナーゼ	キシランをキシロオリゴ糖、キシロビオース、最終的にはキシロースにまで分解する反応系を触媒する酵素。ヘミセルロース鎖を内部から分解する。
	エンドソーム	一重の生体膜からなる小胞で、細胞内への取り込みや細胞表面にある生体分子の振り分けなどを行う。
	オ	オートクレーブ
オーバーラップ率		移動しながら、連続撮影をした際、隣り合う画像との重複度
オンサイト (酵素生産)		バイオエタノールプラントの付帯設備として、酵素生産設備を隣接させ酵素を製剤化しないまま糖化反応に用いるプロセスにおける酵素生産方法
オフサイト (酵素生産)		バイオエタノールプラントの付帯設備でなく、専用施設にて酵素を生産、製剤化を行う酵素生産方法
温室効果ガス		大気圏にあって、地表から放射された赤外線の一部を吸収することにより温室効果を

		もたらす気体の総称。対流圏オゾン、二酸化炭素、メタンなどが該当する。近年、大気中の濃度を増しているものもあり、地球温暖化の主な原因とされている。
カ	回転翼	飛行媒体の翼が回転をすることで飛行する飛行媒体のこと。
	回帰モデル	ある二つの変数の関係を表す式のうち、統計的手法によって推計された式を回帰式、あるいは回帰モデルと言う。
	画角	写真が撮影できる範囲。カメラに搭載されている画像センサの大きさによって撮影できる範囲が決められている。
	拡散反射スペクトル	平坦でないか、ざらざらした表面からの光の反射であり、入射光が様々な角度で反射する乱反射と同義語。
	画像間マッチング	2つの画像から、どの場所が重複しているかを自動的に把握し、画像をペアとして認識する手法。
	可溶性糖質	水に溶ける性質を持つ糖質。具体的にはグルコース、キシロースなどの単糖及びセロビオース、キシロビオース、ソホロースなどの二糖類を指す。セロオリゴ糖は重合度が高くなると不溶性になる。
	枯れ上がり	樹木が成長するに従って、密度が高く植えられていると、林内に光が十分に届かなく、葉や枝が枯れること。成長に伴ってその高さが高くなるため、「枯れ上がる」と表現される。樹高が高い樹木の下の方の枝で生じることが多い。
	カーゴ(タンパク)	膜輸送で運ばれるタンパク
キ	キシラン	β -1,4 結合のキシロース単位からなる鎖状分子。木材ヘミセルロースの主要構成成分の一種。
	キシラナーゼ	キシランに含まれるキシロース間の β -1, 4 結合をエンド型に加水分解する酵素。XYN とも記載される。
	キシリトール脱水素酵素	キシリトールからキシロースへの反応を行う酵素で、反応には補酵素 NAD^+ が必要である。キシリトールを脱水素してキシロースに変換する反応を触媒する酵素。通常のエタノール発酵用酵母はこの酵素を持っていない。
	キシロキナーゼ	キシロースからキシロース 5-リン酸への反応を行う酵素。 キシロースをリン酸化してキシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する酵素。これにより糖がペントースリン酸経路に導入され、最終的にエタノールに変換される。通常のエタノール発酵用酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> はこの酵素を持っているが、活性が低い。
	キシロースイソメラーゼ	キシロースからキシロースへの反応を触媒する酵素
	キシロース還元酵素	キシロースからキシリトールへの反応を行う酵素で、反応には補酵素 $NADPH$ または $NADH$ を必要とする。キシロースを還元してキシリトールに変換する反応を触媒する酵素。通常のエタノール発酵用酵母はこの酵素を持っていない。
	近赤外分光分析法 (NIRS)	近赤外領域(Near Infrared Spectroscopy)と言われる 800~2500nm の光を測定対象物に照射し、その吸収された波長に統計手法を駆使することで他成分を同時に測定する手法。
ク	クローン	同一の遺伝子を持つ生物のことで、ユーカリにおいては、挿し木増殖により、同一の遺伝子をもったクローンを作成し、植林している。
ケ	決定係数	独立変数(説明変数)が従属変数(被説明変数)のどれくらいを説明できるかを表す値であり、寄与率と呼ばれることもある。標本値から求めた回帰モデル(回帰式)のあてはまりの良さの尺度として利用される。
	結晶性セルロース	繊維性植物から得られた α -セルロースを酸で部分的に解重合して精製した物質。
	ゲノム	生物を創り出すのに必要な一セットの DNA。酵母菌を創り出すに必要な染色体 DNA を酵母菌ゲノムという。接合型が異なる一倍体酵母菌が、遺伝学の研究では良く用いられる。それぞれ染色体を 16 本持っており、その 16 本の DNA がゲノム DNA である。

	ゲノム育種	ゲノム（遺伝子）情報を利用して生産性に優れた個体を育種（品種改良）する方法。
コ	酵素カクテル	2種類以上の酵素液（酵素生産菌の培養液）を混ぜ合わせて調製する酵素液のこと。
	固定翼	飛行媒体の翼が回転をせずに、固定している飛行媒体のこと。
	固定費	資本設備を一定としたとき、売り上げや生産量の変化に関わりなく生じる（一定の）費用のこと。人件費、減価償却費などをさす。
	コドン使用頻度	各生物種のコドンがタンパク質に使われる頻度。アミノ酸をコードするコドンは複数存在しており、各生物種にコドンが使用される頻度が異なっている。
	コーンストーバー	トウモロコシの茎葉穂軸部。アメリカでは第2世代バイオエタノールの原料として用いられている。
	コーンステーパー リカー（CSL）	Corn Steep Liquor。コーンスターチの製造方法であるウェットミリング法の副産物の一つ。CSLは古くから発酵工業や医薬品工業で微生物の培地材料として用いられている。
サ	酸素移動容量係数	発酵槽の酸素供給の性能評価の指標として扱われる値。発酵槽の形式や規模が異なっても酸素移動速度が等しければ同一の培養成績を得られると考えられている。
	酸素制限自然発酵 （OLNF）	エタノール発酵を高い収率で行うためには、酸素を少なくし、酵母菌の呼吸を抑える必要がある。そのために用いる発酵法の一つ。サンプリング孔と発酵で生じる二酸化炭素（CO ₂ ）を捕捉する孔を持つ発酵槽を用いる。サンプリング時に、空気が発酵槽に流入しないために、捕捉したCO ₂ が発酵槽に戻るよう工夫している。このプロジェクトで考えた発酵のひとつである。特に、グルコースからの高効率エタノール発酵に向いている。
	酸素濃度調整自然発酵 （OCNF）	キシロースから細胞の増殖とエタノール発酵を行うには、ミトコンドリアの働き、すなわち、酸素が少し必要であり、グルコースからの発酵よりもキシロースからの発酵には、必要な酸素量が多い。そこで、グルコースとキシロースを同時にエタノール発酵させるには、酸素濃度を調整した発酵槽が必要である。酸素制限自然発酵で用いる発酵槽よりも、空気層部分を少し増やした発酵槽を用いる。このプロジェクトで考えた発酵のひとつである。特に、グルコースとキシロースからの同時高効率エタノール発酵に向いている。
シ	糸状菌（＝カビ）	糸状菌類とは、糸状の菌糸で生活する微生物で、一般的に「カビ」と呼ばれている生物のこと。単細胞性で生活する酵母や肉眼で見えるほどの大きな繁殖器官を作るキノコとともに真菌類に属する。菌類界のうちで、酵母またはキノコと言われるもの以外のものを包含する。
	次世代シーケンサー	数千万から数億本のDNA断片の塩基配列を同時並行的に決定することができるDNAシーケンサー。ゲノム再解読による多型（変異）解析、新規ゲノムの解読、トランスクリプトーム（網羅的遺伝子発現）解析などに利用されている。
	ジャーファーマンター	微生物の大量培養に用いる装置。温度、pH、溶存酸素、通気量、攪拌速度、内圧など培養に必要な条件を制御することができる。
	樹冠、樹冠体積	樹冠とは、樹木の枝や葉が覆っている部位、樹冠体積とは、その囲まれた部分の体積を示す。
	主座標分析	主座標分析は、高次元のデータを2次元や3次元に落として視覚化するときに使われる統計解析手法。
	樹木位置図	樹木の配置図。森林を管理する際に、密度や植栽パターンを検討するために用いる。
	人工プロモーター	プロモーターはその生物に固有の塩基配列であるが、天然には存在しないデザインされた転写活性を持つ塩基配列。
ス	水蒸気爆砕	バイオマスなどの材料を、高圧蒸気下（1Mpa-3Mpa程度）に所定時間置いた後に、一瞬で減圧する方法。
	スケールアップ	バイオプロセスにおいて、実験室で得られた結果を工業生産規模に移すため、実規模生産を目標に行うスケールサイズを向上させていくこと

	スラリー	液体中に固形分が混ざっている混合物。
セ	精英樹	成長性や木材の特性などに特に優れ植林事業用に適した育種された樹木
	生産誘導	セルラーゼなどの微生物が分泌する酵素の大部分は特定の物質が周囲に存在するときにだけ生産される。この現象を酵素の誘導と呼び、誘導を引き起こす物質を誘導物質と呼ぶ。生産誘導とは誘導物質により酵素の生産を誘導すること。
	生成物阻害	生成物によって反応の進行が疎外される現象
	精密林業	精密に成長量を測ることで、林業が対象とする植物の生育条件を研究する分野
	精密農業	精密に成長量を測ることで、農業が対象とする植物の生育条件を研究する分野
	絶乾バイオマス	温度 105°C の乾燥機内において一定質量（恒量）になるまで乾燥したバイオマス。
	セルラーゼ	セルロース分解酵素。複数の酵素（セロビオヒドロラーゼ（CBHI, CBHII）、エンドグルカナーゼ（EGI, EGII）、β-グルコシダーゼ（BGL）、キシラナーゼ、キシロシダーゼなど）から成る。
	セルロース	セルロース（cellulose）とは、分子式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ で表される炭水化物（多糖類）。植物細胞の細胞壁および繊維の主成分で、天然の植物質の 1/3 を占め、地球上で最も多く存在する炭水化物である。繊維素とも呼ばれる。自然状態においてはヘミセルロースやリグニンと結合して存在するが、綿はそのほとんどがセルロースである。
	セルロース系エタノール	バイオマスからセルロースを分離し、セルロースを酵素を用いて糖分に分解し、微生物によって変換されたエタノール
	セロオリゴ糖	セルロースの分解によって得られるオリゴ糖。グルコースが β 1-4 結合で数個結合したものの。
セロビオース	グルコース 2 分子が β 1-4 結合で結合した二糖。セルロースのセルラーゼによる加水分解で生じる。β-グルコシダーゼの基質であり、β-グルコシダーゼによって加水分解されグルコースを生じる。	
ソ	早生樹	乾燥地や養分の少ない場所でも成長が早く、経済的価値が高い樹種のこと。熱帯アジアでは、ユーカリ類、アカシア類がこれに当る。また日本では、ポプラ、ヤナギがこれに当る。
	ソホロース	グルコース 2 分子が β 1-2 結合で結合した二糖。セルラーゼ生産の誘導物質として知られている。
タ	脱リグニン	木材からセルロースを効率的に取り出すための前処理方法。多くのリグニンを取り除く蒸解工程と、残存する数%のリグニンを除去する漂白工程がある。
	第 2 世代バイオエタノール	直接競合しない非可食部バイオマスを原料として生産したバイオエタノールの名称。
ト	糖化	糖化とは、セルロースやデンプン等の多糖類を分解し少糖類・単糖類にすること。ここでは主に、バイオマス中に含まれるセルロースやキシランをグルコースやキシロースまで分解することを指す。
	同時糖化発酵	糖化と発酵を同時に行うこと。生産速度の向上により、初期コスト削減につながる。
	同時糖化並行複発酵	同時糖化発酵において、C5 糖、および C6 糖を発酵すること。
	トランスクリプトーム解析	転写活性を特徴づけ、関連するターゲット遺伝子や転写産物のサブセットにフォーカスし、数千もの遺伝子を一度にプロファイリングする方法。
	トレーニング集団	予測モデルを作成する際に利用するデータを取得するための集団のことで、トレーニング集団の遺伝子データと、成長性などの形質データをもとに、予測モデルを作成する。
ニ	2 : 2 分離	接合型の異なる一倍体酵母菌の掛け合わせから得られる二倍体は、4 個の孢子からなる子囊をつくる。遺伝子型が 1 カ所 異なれば、4 個の子囊孢子の性質は、2 : 2 のメンデル分離をする。逆に、ある掛け合わせで、2 : 2 のメンデル分離をする性質があれば、対立遺伝子は一つであることが分かる。

	二次元電気泳動	2段階の電気泳動によりタンパク質を二次元に分離する手法。一次元目は等電点電気泳動によりタンパク質を分離し、2次元目は SDS-PAGE により分離する。
ハ	バイオエタノール	サトウキビやトウモロコシなどのバイオマスを発酵させ、蒸留して生産されるエタノールのこと。バイオマスエタノールという語は、エネルギー源としての再生可能性やカーボンニュートラル性を念頭において使われる。品確法(揮発油などの品質の確保等に関する法律)で3%までガソリンと混合(E3と表記)することが可能。
	バイオマス	バイオマス (biomass) とは生態学で、特定の時点においてある空間に存在する生物 (bio-) の量を、物質の量 (mass) として表現したものである。通常、質量あるいはエネルギー量で数値化する。日本語では生物体量、生物量の語が用いられる。植物生態学などの場合には現存量 (standing crop) の語が使われることも多い。転じて生物由来の資源を指すこともある。
	バイオ燃料	生物体の持つエネルギーを利用したアルコール燃料、その他合成ガスのこと。石油のような枯渇性資源を代替しうる非枯渇性資源として注目されている他、二酸化炭素 (CO ₂) の総排出量が増えない (カーボンニュートラル) と言われていることから、主に自動車や航空機を動かす石油燃料の代替物として注目されている。
	バイオ燃料技術革新計画	2007年11月に経済産業省と農林水産省が連携して、石油業界や自動車業界など国内大手16社及び大学等・独立行政法人の研究機関で設置した「バイオ燃料技術革新協議会」が策定した、具体的な目標、技術開発、ロードマップ等のこと。
	バガス	サトウキビ搾汁後の残渣。主に紙の原料やボイラー燃料、建築資材、家畜飼料などに用いられる。
	爆砕処理/装置	バイオマスと飽和蒸気のある温度圧力で一定時間保持した後に圧力を解放する前処理方法、およびその前処理方法を行える装置。水蒸気とセルロース、ヘミセルロースが反応し加水分解が行われ、リグニンも一部分解する。圧力解放時には水蒸気の膨張による破砕効果もある。
	発現カセット	任意の遺伝子にプロモーターとターミネーターを連結した DNA 断片のこと。遺伝子の上流に分泌シグナル配列を含むこともある。
	発酵	狭義には、酵母などの微生物が嫌気条件下でエネルギーを得るために有機化合物を酸化して、アルコール、有機酸、二酸化炭素などを生成する過程。広義には、微生物を利用して、食品を製造すること、有機化合物を工業的に製造すること。
	発酵性糖	酵母により発酵される糖。本事業ではグルコースとキシロースのみを指す。
	発酵阻害物質	エタノール発酵を阻害する物質のこと。代表的な阻害物質として、ペントースやヘキソース由来のフラン類 (フルフラール、5-ヒドロキシ-2-フルアルデヒドなど)、リグニン由来のフェノール類 (バニリン、4-ヒドロキシベンズアルデヒド、シリングアルデヒドなど)、ヘミセルロース由来の酢酸などがある。
ヒ	微結晶セルロース	α -セルロースを酸で部分的に解重合して精製したもの。
	ピクセル	コンピュータ上で画像データを扱う際の色調や階調といった色情報を持つ最小単位のこと。
フ	フェノール硫酸法	硫酸でフルフラールやフルフラール誘導体にしてフェノールと反応させ比色定量するものですから、糖の種類によらず同じ波長で精度よく分析できる
	プロテアーゼ	タンパク質やペプチド中のペプチド結合を加水分解する酵素の総称。
	プロテオーム解析	タンパク質の発現を網羅的に調べる実験手法のこと。二次元電気泳動によりタンパク質を分離し、質量分析によりタンパク質を特定し、発現量を調べる。
	プロモーター	DNA から RNA を合成する転写反応を開始するために用いられる塩基配列。ゲノム上では、タンパク質等をコードする遺伝子領域の上流に位置する。狭義のプロモーター (コアプロモーター) は基本転写因子が結合する塩基配列を意味する。広義では、さまざまな状況に応じて、発現レベルを調達する他の転写因子が結合する配列を含んだ塩基配列を指す。原核生物と真核生物ではプロモーターの構成要素は大きく異なる。真核生物のプロモーターは、転写する遺伝子によってクラス1~3に分類される。一

		一般的にタンパク質をコードする遺伝子を転写するのはクラス2のプロモーターである。
	プロモーター領域	DNA から RNA の合成の開始に関与する遺伝子上流領域を指す。
	分光放射計	測定対象物からの光（電磁波）の分光放射エネルギーを測定するための計測器。
	分泌シグナル	細胞質内で合成されたタンパク質の輸送及び局在化を指示するペプチド配列。組換えタンパク質の発現系において、目的タンパク質を効率的に細胞外に分泌生産するために目的タンパク質の N 末端側に付加する。
	分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	子囊菌類に属する単細胞真核生物。 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 等の一般的な酵母が「出芽」と呼ばれる細胞増殖を行うのに対して、動植物と同様の「分裂」方式によってその細胞数を増やす。すでに遺伝的解析がよく進んだ酵母でもあり、その分裂の様子等が高等生物と類似していることから、細胞分裂のモデルとして分子遺伝学、細胞生物学の分野で盛んに研究用に用いられている。ゲノムの塩基配列は、2002年に6つめの真核生物としてほぼ完全に解読され、 <i>S. pombe</i> を宿主とする発現系はすでに確立されている（ASPEX、旭硝子株式会社）。
へ	ヘミセルラーゼ	陸上植物細胞の細胞壁を構成する多糖類のうちセルロースとペクチン以外の多糖であるヘミセルロースを分解する酵素群の総称。分解位置や基質特異性により、エンドキシラーナーゼ、β-キシロシダーゼ、アラビノフラノシダーゼ、グルクロニダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、マンナーゼ、β-マンノシダーゼ、フェルラ酸エステラーゼなど、多くの酵素タンパク質が存在する。
	ヘミセルロース	植物細胞壁中に含まれるセルロース以外の多糖混合物。複数種の糖からなるヘテロ多糖のこと。キシロースやアラビノースのようなペントース、およびマンノース、グルコース、ガラクトースといったヘキソースも含まれる。主要構成要素はキシランとガラクトマンナンである。イネ科植物ではキシランにフェルラ酸がエステル結合しており、このフェルラ酸を介して、リグニンと結合しているため、強固なマトリックスを形成している。
	ペントース	キシロース、アラビノースなど炭素原子5個を持つ単糖の総称
	変異育種	何らかの変異導入により作成した変異株を、望ましい遺伝子型の個体や系統を基準に選抜し、育種する方法
	変異導入	塩基配列やアミノ酸配列を現状とは異なる配列に置き換えること。タンパク質の機能解析や機能改良に用いられる。
	変異原	放射線や紫外線、天然および合成化学物質など、生物の遺伝情報（DNAあるいは染色体）に損傷を与え突然変異を起こす作用を有する物質または物理的作用をいう。
	変動費	原材料費、売上原価、販売手数料など、生産量・販売量の変動にともなって変化する費用。
ホ	ボクセル法	3次元での箱形状をボクセルと呼んでおり、箱状の3次元構造物に変換する手法。
	圃場	作物を栽培する田畑のこと。
	ホロセルロース	木材やわらなどセルロースを含む物質から、炭水化物以外の物質を除いた残りをいい、セルロースとヘミセルロースを合わせたものである。
	ホロセルロース糖化率	本事業における酵素評価方法の一つ。 以下の式で算出する。 糖化率 (w/w%) $100 \times \frac{\text{遊離した発酵性単糖総量 (g)}}{\text{ホロセルロース (g)} \times 1.1 \text{ (単糖換算係数)}}$ LBKP ホロセルロース含有量：98.6 w/w% 発酵性単糖：グルコース、キシロース
マ	毎木調査	樹木を測定するために、現地で調査場所を設けて、その中をすべて測定する調査手法

	前処理	セルロース、ヘミセルロースは、天然バイオマス中ではリグノセルロースとして存在しており、そのままでは酵素分解を受けにくいいため、基質の比表面積を上げる、またヘミセルロースやリグニンを変性、除去することによりセルロース繊維と酵素の接触性を高める様々な処理法のこと。 物理的処理として、機械的粉碎（ボールミル）、高温高圧（蒸煮、爆砕）、マイクロ波等の照射がある。化学的処理として、硫酸等の酸処理、苛性ソーダ等のアルカリ処理、メタノール等の有機溶媒処理がある。生物的処理として、白色腐朽菌などリグニン分解微生物処理がある。
ミ	実生林	種子から苗を作成して植栽した試験林。
	密度係数	物体の密度であり、体積と掛け合わせることで、重さに変換できる係数（定数）。
ム	無人航空機	人が飛行機に搭乗し、操縦する飛行媒体ではなく、リモートコントローラーで操縦する飛行媒体
ユ	優性変異	遺伝学的用語。変異型と野生型の遺伝子を持つ二倍体が、変異型の性質を示せば、変異型は野生型に対し優性と定義する。変異型の遺伝子から機能するタンパクが生産され、その性質が現れることが分かる。
	ユビキチン	低分子のタンパクで、他のタンパクの修飾に用いられる。
ヨ	容積重	単位体積当たりの重さのこと。密度と同義。
ラ	ラビリンチュラ	従属栄養性の海洋性真核微生物で、科のレベルで 2 つの分類群が認識されており、ラビリンチュラ科に属するラビリンチュリッド (Labyrinthulids) と、ヤブレッツボカビ科に属するスラウストキトリッド (Thraustochytrids) に大別される。高度に脂質を蓄積するものや、オメガ 3 脂肪酸を生産するものがいくつも知られており、機能性脂質生産やバイオ燃料生産への応用が検討されている。
	ランダム変異(導入法)	酵素等をコードする特定の遺伝子 DNA 領域に対して、ランダムに変異を導入し、変異体を作製する方法。
リ	リグニン	フェニルプロパンを構成単位とする不規則な高分子物質。あらゆる高等植物に含まれ、物理的、化学的に植物を強固なものとしている。植物種によって構成単位は異なる。構造は複雑な網目状であり、植物体ではその中にセルロース繊維が埋め込まれている。さらにヘミセルロースも絡み合い、植物細胞壁を強固なものにしている。パルプ繊維とリグニンは鉄筋コンクリートになぞらえて説明すると、鉄筋がパルプ繊維でコンクリートに相当するのがリグニンである。およその含量は針葉樹で 30%、広葉樹や草本類では 20%前後である。
	リッパー	巨大な爪で地面や岩盤を砕く装備
	リモートセンシング	ある対象物を、直接計測せず間接的に測る手法や技術
	流加糖液	流加培地のうち、含有物が糖のみの培地。
	流加培養法	微生物の培養法の一つ。培養槽で液体培養する際に、培養中にある特定の基質（栄養源、培地成分）を供給するが、ブロス（菌体と培養液）は培養終了時まで抜きとらないような培養法。

1. 事業の位置付け・必要性について

1. 事業の背景・目的・位置づけ

〔背景〕

2005年2月に発効した京都議定書及び2008年4月に制定されたエネルギーイノベーションプログラム、環境安心イノベーションプログラムの対応として、環境負荷が少ない石油代替エネルギーの普及に向けた、新たな技術の開発及びコスト低減・性能向上のための戦略的取り組みが要求されている。

バイオマスエネルギーは、カーボンニュートラルとして扱われているため、地球温暖化対策の一手段として重要である。一方、供給安定性の確保、食料との競合や森林破壊等の生態系を含めた問題、化石燃料との価格競争性・価格安定性といった経済面での課題、LCA（ライフサイクルアセスメント）上の温室効果ガス削減効果・エネルギー収支等の定量化等の課題を克服していくことが重要である。

このような中で、2012年までに京都議定書の目標達成に貢献すべく取り組むことに加え、2030年度、更には2050年に向けた長期的視野に立ち、国内の知見・技術を結集して、バイオマスエネルギー分野における革新的・新規技術の研究開発、開発技術の適用性拡大、コストの低減、利用・生産システム性能の向上等を行い、世界における優位性を確保することが重要となっている。このためには、従来技術の延長にない技術革新をも目指した継続的な研究・技術開発が必要不可欠である。

以上のことから、バイオエタノール等のバイオ燃料の生産に関する研究開発は、エネルギーセキュリティの向上及び地球温暖化の防止の観点から、再生可能エネルギーの一つとして取り組むべき重要課題である。

〔研究開発の目的〕

① 政策的な重要性

経済産業省は、2008年に「Cool Earth エネルギー革新技术計画」の中で“2050年までに世界全体の温室効果ガス（GHG）排出量を現状に比して半減する”という長期目標を掲げ、我が国として重点的に取り組むべきエネルギー革新技术開発として「バイオマスからの輸送用代替燃料製造」を選定している。また、バイオ燃料技術革新協議会では「バイオ燃料技術革新計画」において具体的な生産モデルや技術開発の方向性を技術ロードマップとしてまとめた。2016年11月にはパリ協定も発効し、世界規模での二酸化炭素削減の機運は益々高まっており、我が国の政策においてもバイオマス利用の促進はこれまで以上に重要となる見込みである。

② 我が国の状況

国内においては、2010年の「エネルギー基本計画」で掲げられた、2020年には全国のガソリンの3%相当以上をバイオ燃料にする目標（約180万kL）に向け、バイオエタノール製造が検討されている。そのための施策として2010年11月には「エネルギー供給構造高度化法」に基づく非化石エネルギー源の資料に関する石油精製業者の判断の基準（平成22年経済産業省告示第242号）として、2017年におけるガソリン対比GHG排出量削減率50%以上のバイオエタノール利用目標量（原油換算）を50万kLと定めた。2015年の実績は、41万kLで、定めた義務量38万kLを超えている。農水省の補助事業が終了した事もあり、現時点ではバイオエタノール使用量のほとんどがブラジルからの輸入で、第一世代エタノール由来である。2018年以降の導入量については、

「バイオ燃料の今後の導入のあり方検討委員会」において議論がなされている最中であり、安定供給の観点からも第二世代バイオエタノールの技術開発の促進が求められている。

③ 世界の取り組み状況

米国及びブラジルにおいてトウモロコシやサトウキビなど可食バイオマスを原料として大規模な商用生産が行われている。一方、本事業で取り組む食糧と競合する可能性の低いセルロース系バイオマスを原料とするエタノール製造については、米国において基盤研究から実証研究まで行われ、技術的困難さから何度か下方修正されてきたが、現時点で商用化がようやく現実のものとなりつつある。

米国では2010年に米国環境省（EPA）が、再生可能燃料基準を見直し「RFS2」を発表し、2022年にはガソリン対比 GHG 削減率 60%以上のセルロース系バイオエタノールとして 160 億ガロン（≒ 6,060 万 kL）の導入目標を作成した。この政策実現のため、米国エネルギー省（DOE）、米国農務省（USDA）が共同議長として「バイオマス研究開発委員会」を立ち上げ具体的な「バイオ燃料アクションプラン」を指導し、2015年以降商業プラントを建設し、目標達成を目指している。本事業開始時には、パイロットベースで、2,3機（生産規模：1万kL/年以下）が動いているのみであったが、2015年にはコーンストーバー等を原料に DuPont 社が 11 万 kL/年規模、POET 社が 9 万 5000 kL/年規模で、第二世代エタノール商用生産を実施中である。

欧州では2009年に制定した「RED」において、2020年には、GHG 削減率 60%以上の輸送用燃料を導入し運輸部門の再生可能エネルギーの割合を 10%以上にする目標を作成した。各国はバイオディーゼル導入中心の計画であるが、バイオエタノールについても総量として 7,306ktoe（≒150 万 kL のエタノール）の導入量を作成した。この政策実現のため、「バイオエネルギー産業イニシアティブ」（EIBI）において製造技術開発の方向性 2015 年までの実証プラントの取組みが取りまとめられている。イタリアでは Beta Renewables 社が 7 万 6000 kL/年で藁や Giant reed などを原料にバイオエタノール生産を行っている。

また、ブラジルにおいて GranBio 社がバガス等を原料に 8 万 2000 kL/年規模での生産を開始している。

したがって、本事業の実施フェーズは、国内の事業化戦略、海外の政策及び開発動向にも整合しており、適正である。

④ 本事業のねらい

本事業を実施することにより、2020年に（ガソリン対比）CO₂ 削減率 50%以上を達成する生産プロセスで、国内外のバイオエタノールと競合可能な製造コストでのバイオエタノール製造の実用化に資する有用要素生産技術を確立する。

〔本事業の位置づけ〕

NEDOでは、セルロース系エタノール製造に関する研究開発は、「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発事業」で基盤研究を、また、「セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業」では実証研究をそれぞれ行い、実用化に取り組んできた。「バイオマスエネルギー等高効

率転換技術開発事業」では中長期的視野も見据えてバイオマスからのエネルギー転換効率の向上を目指し「転換要素技術開発」と「先導技術研究開発」という形で2004年度～2012年度で行った。これまでの技術開発により、バイオマス(原料)から前処理工程、糖化工程、発酵工程及び濃縮・脱水工程の各基盤技術は世界のトップクラスに到達しつつある。特にラボスケールで優れた糖化酵素が得られ、改良した有用微生物を用いた高効率なエタノール発酵生産をすることができた。本事業では、より優れた糖化酵素、有用微生物によるエタノール発酵生産能力向上の開発を行い、生産規模においても、ラボスケールからパイロットスケールに大きくした場合でも、効率的に生産できる要素技術を確認し、2020年の実機スケールでの実用化に適用する。なお、本事業と並行して実施が始まっている「セルロース系エタノール生産システム総合開発実証」に資する技術である事も重要である。

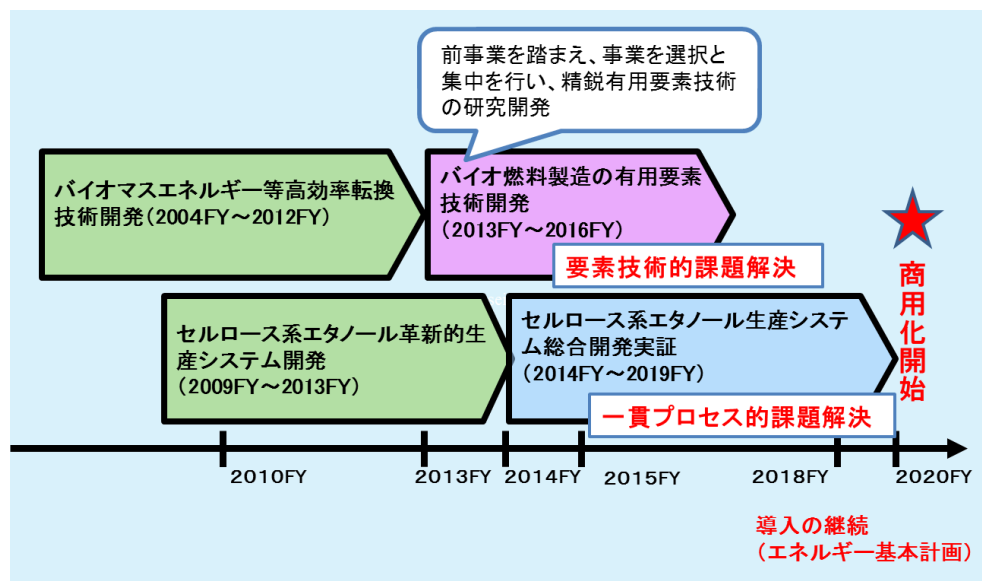


図 1-1 NEDO におけるバイオエタノール生産関連の事業

2. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

2.1 NEDO が関与することの意義

日本のエネルギー利用の23%は運輸部門が占め(図 1.2.1-1)、燃料についてはそのほとんどが液体燃料である。再生可能エネルギーの中でバイオマスだけが液体燃料を直接製造することが可能である。ただし、液体バイオ燃料製造において、砂糖、トウモロコシ、パーム油が食糧と競合する問題が生じている。そこで、エタノールを、木質系や農業残渣系など食品として食べられない部分や、エネルギー用途に栽培した植物から得ることにより、食糧と競合しない原料からエタノールを製造することが課題となっている。

そのため NEDO では、今までバイオマスの利点を最大活用した液体燃料化(ガソリン代替、ジェット燃料代替)の製造に注力しており、政策面で見ても世界的にニーズは増加している。中期計画において、ガソリン代替のバイオエタノールは2020年という実用化目標があるが、大量導入のためにはまだ技術的課題が多く、今後もバイオ燃料を大量導入するための技術開発を推進することとしている。バイオマスの利用の中でも食料と競合せず大量に製造可能なセルロース系エタノールの開発は、コスト要求に技術的に対応困難であるため、諸外国においても事業化が遅れているのが現状である。このような技術開発、実証研究等の取り組みは研究開発のリスクの高さ

に加えて、実用化に至るまでに多額の投資が必要であるため、企業単独では実施困難であり、NEDO の関与が必要不可欠である。

我が国独自の有用糖化酵素、エタノール発酵を行う有用微生物の開発とその能力を最大限に発揮する糖化・発酵生産技術の確立が、我が国のバイオエタノール生産のみならずバイオリファイナリー発展に向けた国際競争力強化につなげるためにも、本事業は実施すべきと考えられる。

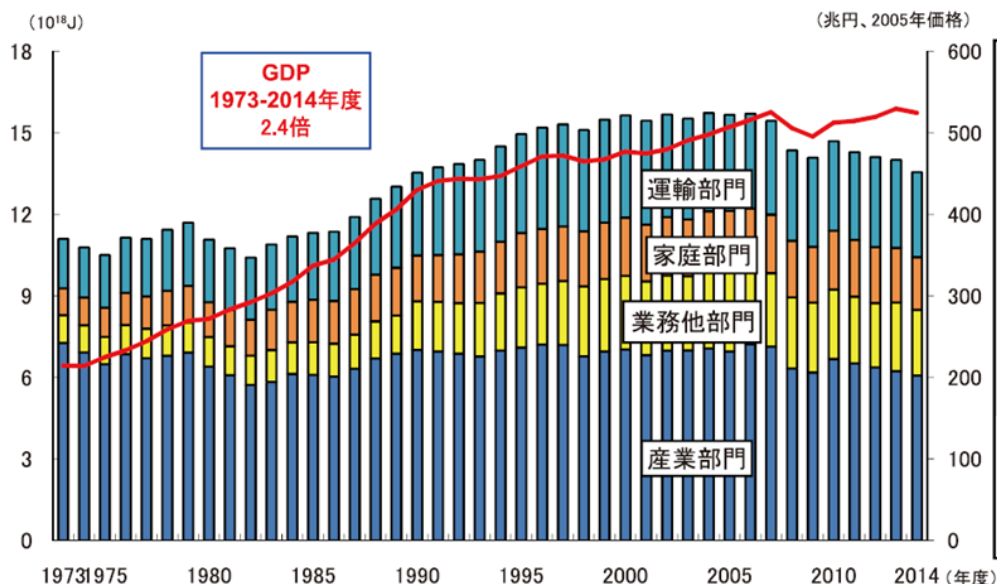


図 2.1-1 最終エネルギー消費と実質 GDP の推移（出典：エネルギー白書 2016）

2.2 実施の効果（費用対効果）

〔セルロース系エタノール生産による二酸化炭素削減効果〕

本事業の目的を達成することにより、2020年にはガソリン対比50%以上のGHG削減率のバイオエタノール製造設備について、20万 kL/Y規模での実用化に利用され、本事業費のCO2排出削減効果として、十分な費用対効果があると判断している。また2020年以降更に製造設備が設置されれば、試算以上のアウトカムが期待できると考える。試算は、本事業で得られるバイオエタノールをガソリンに代替した時のCO2削減量と本事業の投資額より算出した。

＜2020年に期待されるCO2削減効果試算＞

$$(\text{エタノール生産量}) \times (\text{バイオエタノールによるGHG排出削減量}) \times (\text{エタノール発熱量}) \\ = 20(\text{万 kL}) \times 40.9(\text{gCO}_2\text{eq/MJ}) \times 21.2(\text{MJ/L}) = \underline{17.3\text{万 tCO}_2\text{eq}}$$

＜事業としての費用対効果＞

$$(\text{総事業費}) \div (\text{CO}_2\text{削減期待量}) \\ = 51.4(\text{億円}) \div 17.3\text{万}(\text{tCO}_2\text{eq}) \doteq \underline{29,700\text{円/tCO}_2\text{eq}}$$

〔その他の効果〕

本事業の実用化・事業化後には、海外社有林におけるバイオマス増産、酵素事業の展開によるセルロース系バイオマスの利用促進、プラント受注や事業展開等において日本企業の海外展開を支援するものであり、波及効果も含めて世界規模での二酸化炭素削減に寄与するものである。

2. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

〔研究開発の目標〕

① 過去の取り組みとその評価

バイオエタノール製造技術開発については、バイオ燃料技術革新計画(2008年3月バイオ燃料技術革新協議会)の技術革新ケースとして、製造コスト40円/L、CO₂削減率50%以上(対ガソリン)の技術を持って、2020年に年産10~20万kL規模での実用化を実現すべく取り組んできている。

NEDOでは、中長期的視野も見据えてバイオマスからのエネルギー転換効率の向上を目指した技術開発として「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発事業」を「転換要素技術開発」と「先導技術研究開発」という形で2004年度~2012年度で行った。これまでの技術開発により、バイオマス(原料)から前処理工程、糖化工程、発酵工程及び濃縮・脱水工程の各基盤技術は世界のトップレベルである。特に、有用糖化酵素、有用微生物を用いたエタノール発酵生産、バイオ燃料用のバイオマス原料の改良については、主にラボスケールで優れた成果が得られた。

② 本事業の目標

本事業では、高効率事業で優れた成果が得られた有用糖化酵素によるバイオマス前処理物の糖化能力の向上、及び有用微生物によるエタノール発酵生産能力向上の開発を行うと共に、スケールアップ技術によるパイロットスケールでの生産技術開発を行い、2020年の商用機スケールでの実用化に適用可能な生産技術を確立する。またバイオマス原料についても、植栽技術の改良による更なる収量アップを目指し、実用化を促進する。

事業実施にあたっては、開発される要素技術が実証プラントへ適用されバイオエタノールの実用化に着実に資することを念頭におき、事業を実施する。

③ 全体としてのアウトカム目標

ガソリン対比GHG排出削減率50%以上のバイオエタノールについては、2017年には約84万kLの使用が義務化されており、2020年には約180万kLの使用目標が掲げられている。現在は、ブラジルからの輸入のみである。

本事業終了後において、2020年には(ガソリン対比)CO₂削減率50%以上を達成する生産プロセスで、国内外のバイオエタノールと競合可能なコストでのバイオエタノール製造の実用化に資する有用要素生産技術を確立することを目標とする。この技術を用いた実用化により、2020年に10万~20万kL/年規模以下の製造設備により生産されたバイオエタノールの海外からの開発輸入や現地販売が図られ、CO₂削減量の試算として、20万kL/年規模のバイオエタノール生産によるガソリンに代替した時に17.3万tCO₂eq/年になり、地球温暖化対策にも貢献できる。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

目標を達成するために、以下の有用糖化酵素、有用微生物を用いた高収率なエタノール生産、原料のバイオマス資源の確保に関する研究開発について実施する。

〔研究開発の必要性〕

経済産業省は、2008年に「バイオ燃料技術革新計画」において具体的な生産モデルや技術開発の方向性を技術ロードマップとしてまとめ、その上で2010年6月に「エネルギー基本計画」を改定し、2020年までに全国のガソリンの3%相当以上のバイオエタノールを導入するとしている。

平成24年度まで実施した「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発事業」において、有用糖化酵素、有用微生物を用いたエタノール発酵生産技術及びバイオ燃料用のバイオマス原料の確保について技術開発が行われ、バイオエタノールの生産に関する優れた成果が得られた。これらの成果は、主にラボスケールで得られた基盤的な技術であり、バイオマスからのエタノール生産に確実に適用されるためには、例えば、糖化酵素のセルロース系バイオマスを分解する能力アップや微生物によるエタノールの生産能力の向上等が必要である。

〔研究開発の具体的内容〕

セルロース系バイオマス（原料）から前処理→糖化→発酵→濃縮・脱水の各工程を経てバイオ燃料（エタノール）を製造する方法において、糖化工程での有用糖化酵素、発酵工程での有用微生物を用いた高収率なエタノール生産、原料のバイオマス資源の確保に関するパイロットスケールに相当する生産技術開発を行う。これらの技術開発により、2020年にセルロース系バイオマスからの一貫生産プロセスでエタノール生産する実用化に資する技術を確立する。

1. 有用糖化酵素の生産技術開発

- ・遺伝子操作等により、革新的糖化酵素生産菌を造成し、糖化能力がアップした高活性の酵素を開発する。
- ・革新的糖化酵素生産菌をパイロットスケール（数 m^3 以上）で、安価で最適な培養条件を検討して酵素生産技術を開発し、2020年の商用機スケール（数百 m^3 以上）での実用化に資する技術を確立する。

2. 有用微生物を用いた発酵生産技術開発

- ・微生物を遺伝子操作等により、糖化性、耐熱性、耐酸性などの多機能を有する微生物（酵母・細菌）を育種し、糖化同時発酵による高効率エタノール発酵生産を行う。
- ・多機能微生物をパイロットスケール（数 m^3 以上）で、最適な培養条件を検討してエタノール発酵生産技術を開発し、2020年の商用機スケール（数百 m^3 以上）での実用化に資する技術を確立する。

3. バイオマス原料の生産技術開発

- ・海外の植林地（ブラジル等）のユーカリ等をターゲットにして、高バイオ燃料用生産性樹木の評価・選定技術、成長促進剤などの利用による植栽技術などにより収量アップを図り、2020年の実用化に資する技術を確立する。

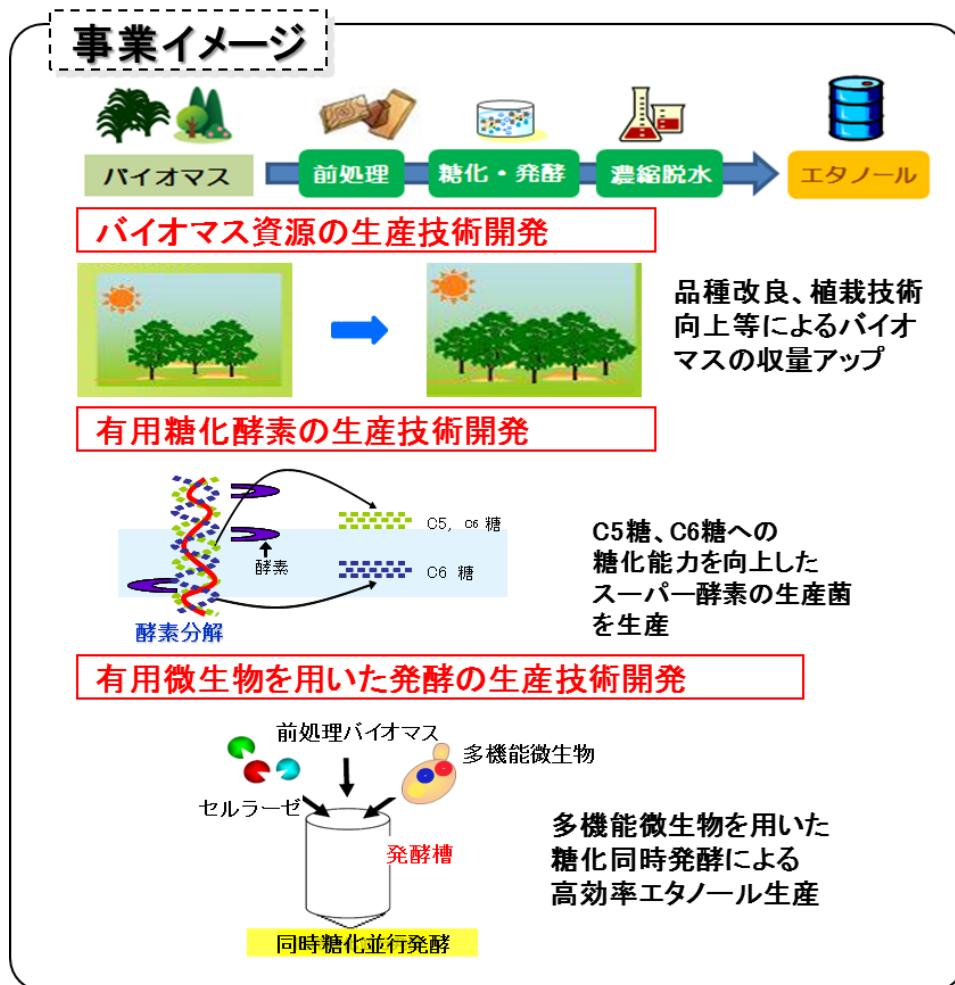


図 2.1-1 事業イメージ

それぞれのテーマの概要は以下のとおりである。また、各テーマの詳細な研究内容は「3.2 研究開発項目毎の成果」において説明する。

【バイオマス原料の生産技術開発】

[テーマ名・実施者]

- ①ゲノム育種及び高効率林業によるバイオマス増産に関する研究開発
(日本製紙(株)、東京農工大学、千葉大学)

[研究開発概要]

- ・ブラジルの植林地においてバイオ燃料用に適した形質に關与する DNA マーカーを取得し、育種へ応用してクローンを選抜する。
- ・トラクタ搭載型土壤センサ試作機を開発し、土壤マップを作製する。
- ・3D レーザーと UAV (ドローン) を利用した高精度な大面積バイオマス評価システムを開発する。

[目標]

- ・DNA マーカーより各形質を予測する推定式で $R=0.7$ 以上を目指す。
- ・セルロース増加量が 1.4 倍以上となる優良クローンを 3 系統以上選抜する。
- ・年 6000ha の効率で土壤センシング可能な運用方法と土壤マップ作成技術を確立し、1.3 倍以上の成長量を得るシステムを構築する。

- ・数 ha 規模のバイオマス量測定において、現行と比較して効率が 4 倍となる作業方法を確立する。

【有用糖化酵素の生産技術開発】

[テーマ名・実施者]

②可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発

((株)Biomaterial in Tokyo、信州大学、森林総合研究所)

[研究開発概要]

- ・木質系バイオマス由来パルプを糖化するために最適な成分酵素を探索する。
- ・可溶性糖質源によるベース酵素の生産性を向上させ、不足する酵素および補助因子を分裂酵母に異種発現させる。これらの酵素生産変動費を低下させる技術開発を行う。
- ・ラボスケールでの検討結果を 2k L までスケールアップし、オンサイト酵素カクテル生産設備基本フロー及び生産技術を確立する。

[目標]

- ・グルコース抑制解除株をベース酵素とした時に不足する成分酵素を明らかにし、LBKP 糖化に最適な成分酵素組成への指針を示す。
- ・グルコース抑制解除株をベース酵素とした時に不足する酵素及び補助因子を分裂酵母に異種発現させる。
- ・30 L 培養における酵素をカクテル化し、5 円/Kg-発酵性糖以下の酵素変動費となるオンサイト酵素カクテル生産技術を開発する。
- ・ベース酵素の培養スケールを 2k L までスケールアップし、酵素カクテルとして 6 円/Kg-発酵性糖以下の酵素変動費となる生産設備基本フロー及び生産技術を確立する。

[テーマ名・実施者]

③バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発

(花王(株)、長岡技術科学大学、バイオインダストリー協会)

[研究開発概要]

- ・セルロース、ヘミセルロースを糖化するために、バイオマスに応じた高機能な成分酵素遺伝子进行评估・選抜する。
- ・得られた遺伝子を工業用の生産菌に実装して高機能化し、さらに生産性の増強と安価に生産するための技術を開発する。
- ・事業化に必要な大量培養条件の検討を行い、数 m^3 規模のパイロット設備でのデータをもとに F/S を実施する。さらに数 $10m^3$ スケールでの試作を行う。

[目標]

- ・アルカリ処理バガスに対して、2.5mg/g - 生成糖を達成する高機能な酵素を創製する。
- ・酵素生産性 25g/L 以上の高生産性を示す菌株を創製する。
- ・ $3m^3$ 培養試作に基づく F/S を実施し、10 円/L-EtOH 以下を達成する酵素生産技術を開発する。

【有用微生物を用いた発酵の生産技術開発】

[テーマ名・実施者]

④有用微生物を用いた発酵生産技術の開発

(日揮(株)、崇城大学、産業技術総合研究所、バイオインダストリー協会)

[研究開発概要]

- ・ C5 糖と C6 糖を同時に発酵することが可能で、高い発酵性能、耐熱性、発酵阻害物耐性を合わせ持った酵母菌を遺伝子組換えの手法で作製する。
- ・ 同時糖化発酵プロセスを開発するために大型商用機に適用可能な高濃度スラリーハンドリング技術を確立する。遺伝子組換え対応の 2m³パイロット設備を設計・建設する。
- ・ 開発した酵母株を用いて 2m³パイロット設備での同時糖化発酵試験を実施し、これらのデータをもとに商業装置のプロセスデザインパッケージを完成させる。

[目標]

- ・ 高効率キシロース代謝、高温発酵、阻害物質体制に資する有用遺伝子および酵素情報を取得し、同時糖化併行複発酵に特化した実用生産酵母株を開発する。
- ・ 上記酵母を用いて 2m³パイロット設備での同時糖化発酵試験を実施し、エタノール生産濃度 5w/v%以上にて 1ton-dry の前処理バイオマスから 380 L以上（ホロセルロース含有量 70%の場合）のエタノールを生産する技術を開発する。即ち糖化発酵率（SSCF 効率）として 0.765=糖化率 0.85 × 発酵率（エタノール変換効率）0.90 を目指す。
- ・ 2m³パイロット試験装置、ならびに 20 w/v%スラリー濃度を達成できるスラリーハンドリング試験装置での試験データを基に、商業装置のプロセスデザインパッケージを完成させる。

2.2 研究開発の実施体制

本事業における研究開発体制を図 2.2-1 に示す。バイオマス資源の生産技術開発 1 テーマ、有用糖化酵素の生産技術開発 2 テーマ、有用微生物を用いた発酵の生産技術開発 1 テーマからなっている。各テーマともに、事業化ポテンシャルの高い民間企業を代表機関として研究開発責任者もお願いし、官学の優れた技術を保有する研究機関が共同実施先となる実施体制である。さらに専門性を必要とする個別の課題については、追加して再委託先、共同実施先として参加する体制とした。

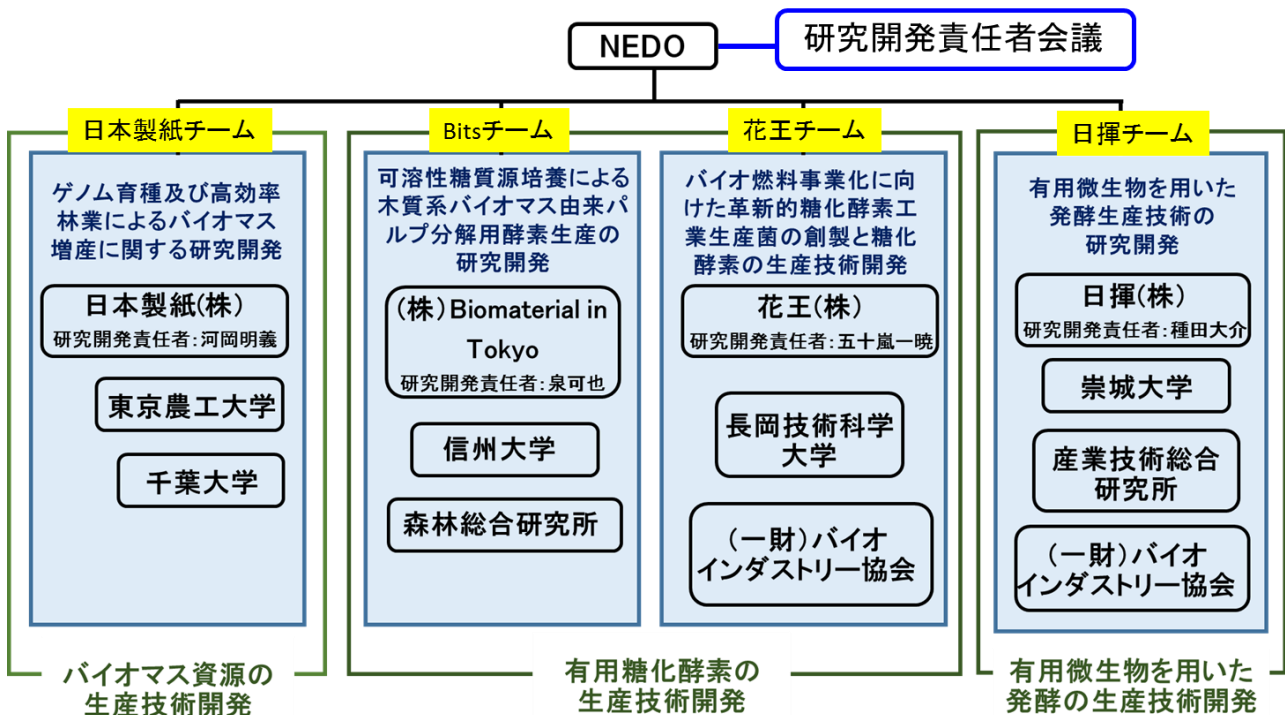


図 2.2-1 研究開発の実施体制

2.3 研究開発の運営管理

本事業においては、事業の立ち上げ段階から現在に至るまで適宜適切な運営管理に努めてきた。具体的な運営管理について、以下に説明する。

2.3.1 研究開発責任者会議

本事業は、研究テーマ（チーム）毎に研究開発責任者を置き、NEDO が事務局となって研究開発責任者会議を開催することで、研究開発の運営管理を行った。

各研究チームが本事業を通じて開発する要素技術を活用し、研究開発責任者が所属する企業が事業化に向けた検討を、より効率よく・確実なものにするために、本事業期間中の各研究チーム間の連携（既存原料、試料、技術の活用）や、他事業（セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業等）との連携について、研究開発責任者会議で方向性・ルールを議論・確認し、NEDO から各委託事業者へ指示した。

「秘密保持に関する覚書」を締結した上で、春季と秋季の年 2 回開催し、春季は各研究チームから前年度の研究実績を報告し、各研究開発責任者の経験・共通認識に基づき、研究加速のために研究チーム間での協力・連携が考えられる項目があれば、その取組み推進を行うこととした。秋季開催の会議においては、各研究チームから当年までの研究成果をベースにした事業化計画の最新情報を報告してもらい、2020 年事業化に向けた進捗について、NEDO 及び研究チーム間の情報共有・コメントを受け、必要に応じて取組みの加速を行う事とした。

実施の効果は、「2.4 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性」のとおり。

表 2.3.1-1 研究開発責任者会議の実施状況

開催日	議事内容	備考（NEDO からの報告等）
2014 年 5 月 28 日	本会議の運営方法確認および研究開発の概要報告、チーム間の連携検討	秘密保持契約の扱い
2014 年 11 月 25 日	事業化計画に基づいた取組みの報告	海外動向調査報告 契約延長ヒアリング説明
2015 年 5 月 29 日	研究進捗状況報告	成果報告会に関する説明
2015 年 11 月 13 日	原料の入手経路と量の確保 スケールアップの課題と対策 事業化計画に基づいた取組みの進捗	今後の事業運営に関する確認について
2016 年 6 月 3 日	研究進捗状況および最終年度の実施計画	ブラジルの第 2 世代バイオエタノールの動向
2016 年 12 月 2 日	研究進捗状況と事業化の方向性	国内のバイオエタノール製造動向について 事業終了に向けた成果報告および事後評価

2.3.2 研究推進委員会

本事業では各チームが推進委員会を開催し、外部有識者からの意見を事業に反映している。推進委員会は各テーマの実施者が事務局となり、NEDO 新エネルギー部からはオブザーバーとして参加している。表 2.3.2-2 から表 2.3.2-5 に各チームの推進委員を示す。

表 2.3.2-2 日本製紙チームの推進委員

氏名		所属・役職
新名 惇彦	委員長	国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 前副学長
宮崎 毅	副委員長	財団法人 日本水土総合研究所 前理事長
近藤 禎二	委員	独立行政法人 森林総合研究所林木育種センター 前育種部長

※敬称略

表 2.3.2-3 Bits チームの推進委員

氏名		所属・役職
五十嵐 泰夫	委員長	東京大学 名誉教授 中華人民共和国 西南大学資源環境学院 生物エネルギー・生物修復研究センター センター長
岩崎 誠	副委員長	MIP コンサルタント事務所 代表 元製紙会社 研究所長 代理
大野 真美	委員	JX 日鉱日石エネルギー株式会社 中央技術研究所 技術戦略室 R&D 企画グループ 担当マネージャー
東田 英毅	委員	東田技術士事務所 代表 株式会社ちとせ研究所 研究開発部 主任研究員 東京工業大学 情報生命博士教育院 産業界若手メンター特任准教授

※敬称略 委員長を除いて五十音順

表 2.3.2-4 花王チームの推進委員

氏名		所属・役職
前 一廣	委員	京都大学大学院 工学研究科 化学工学専攻 教授
小林 哲夫	委員	名古屋大学大学院 生命農学研究科 応用微生物学 教授
伊藤 進	委員	元 北海道大学教授

※敬称略

表 2.3.2-5 日揮チームの推進委員

氏名		所属・役職
飯塚 堯介	委員長	東京家政大学・教授（東京大学・名誉教授）
塚越 規弘	副委員長	名古屋大学・名誉教授
斉木 隆	委員	元(社)アルコール協会研究開発部長

※敬称略

2.3.3 ステージゲート方式審査

本事業の研究実施期間は4年間（平成25年12月18日～平成29年2月28日の実質3年2ヶ月程度）であり、最初に2年間（実質1年3ヶ月分）の契約を締結した。実施計画書に平成26年度末までの目標を記載し、これに対する達成状況についてヒアリングおよびNEDO内部でのステージゲート方式審査を実施して期間延長の可否を判断した。その結果、4チームすべてについて、事業の進捗に大きな問題が無いことから実施期間を延長することとした。

また、その時点での課題を整理して、新たに仕様書を作成し、事業終了に向けての平成28年度までの目標を設定した。各チームの目標については既に記載のとおりである。

指摘事項とまでは言えないが、日揮チームの研究設備規模について、実機と比較して小さいことが懸念として挙げられたが、この時点では組換え対応の設備を設置する予算からも計画は妥当と判断した。しかしその後の検討で、非組換えの系で大容量ポンプを使用した試験項目を追加することとした（試験設備は日揮が自社負担で用意）。

2.4 研究開発成果の実用化・事業化に向けたマネジメントの妥当性

本事業は要素技術の開発であり、事業化については他事業との連携も視野に入れて2020年の実用化を想定している。また、本事業で得られた成果およびノウハウを「セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業」に活用し、大規模なエタノール生産システムの開発に繋げることを予定している。(株)Biomaterial in Tokyoは、自社でこの事業に参画し、本事業の成果を活用する。さらに日揮(株)が再委託先として参画し、本事業で得た酵素使用量低減技術やプラント設計のノウハウ等を提供する。花王チームの酵素はサンプルとして各種事業者提供を始めており、NEDO主催の展示会等での発表に興味を持っていただいた機関への紹介を実施した。

また、研究責任者会議における情報共有や課題のとりまとめを通じ、以下のチーム間連携を実施した。

- ・日本製紙(株)の関連会社よりユーカリパルプの小ロットでの販売（特別の便宜）を、日揮チームへ行った。
- ・Bitsチームが生産した酵素カクテルを日揮チームに2回提供し、ユーカリパルプの糖化試験に使用した。
- ・花王チームが生産した酵素（中間開発品）を日揮チームに10回以上提供し、バガスの糖化試験およびパイロットスケールでのエタノール生産に使用した。

知財については、各チームともに企業は1社であり、研究開発責任機関として知財運営委員会を運営した。本会議にNEDOは参加していないが、特許出願や学会発表についての審議結果等の連

絡を受け、この委員会が明確に機能していることを確認した。また、チーム内で研究機関が単独出願した特許を企業に移転するなど、NEDO 事業を通して事業化を見据えた特許戦略に取り組んでいる。

1. 情勢変化への対応

事業期間中に大きな情勢変化はなかったため、目的・目標等の変更は実施していない。

2. 評価に関する事項

事前評価は、内部評価により実施した。また平成 25 年 2 月 14 日から平成 25 年 2 月 25 日の間で、NEDO ポストにより本事業の基本計画案についてパブリックコメントの募集を行った。その結果、2 件のコメントがあったが、1 件は既に別の事業で取り組んでいる技術開発の提案であり、もう 1 件は基礎研究の提案であったため、その旨を回答した上で、基本計画には反映していない。

3. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

本事業の目標は2020年に（ガソリン対比）CO2削減率50%以上を達成する生産プロセスで、国内外のバイオエタノールと競合可能な製造コストでのバイオエタノール製造の実用化に資する有用要素生産技術を確立することである。各研究開発テーマにおいて、そのためのベンチマークとしてチームごとに最終年度の目標を設定し、研究開発に取り組んできた。その結果、最も重要なコスト削減に関する目標はすべて達成することができた（表1-1）。達成度に記載した数は、達成した目標の数であり、テーマによって目標の数が異なっている。未達の目標については時間的な問題であったが、継続して検討中である。

詳細については、後述する。

表1-1 プロジェクト全体の成果まとめ

研究開発テーマ	目標	成果	達成度
ゲノム育種及び高効率林業によるバイオマス増産に関する研究開発	バイオマス生産性が 1.8倍 となる技術開発	マーカー育種で1.4倍、土壌選定技術で1.3倍となり、 1.8倍 の増産を達成	○x3
可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発	酵素生産の低コスト化（ 10円 ／L-EtOH）	安価な培地でより高活性にすることで 10円 を達成、2kLまでスケールアップ	○x7 △x1
バイオ燃料製造に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発	酵素生産の低コスト化（ 10円 ／L-EtOH） F/Sの実施	酵素の性能向上と生産性向上。数m ³ でF/Sにより 10円 を達成。 46m³ までスケールアップ	◎x1 ○x2 特に生産性が大
有用微生物を用いた発酵生産技術の開発	高機能酵母開発、パイロットスケールで実証（糖化発酵率 0.765 ）	各種バガスの発酵に適した最高の酵母（糖化発酵率 0.80~0.85 ）を開発 2m ³ パイロットで複数の原料で目標値を大幅にクリア	◎x1 ○x3 各種原料に適した酵母開発

◎ 大きく上回って達成、○達成、△一部達成（事後）、×未達

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 ゲノム育種及び高効率林業によるバイオマス増産に関する研究開発

2.1.1 研究開発の概要

本プロジェクトでは、ブラジル北部アマパ州に日本製紙グループが保有するユーカリ植林地にて、植林木の単位面積あたりのセルロース量を飛躍的に増大させるバイオマス増産技術・測定技術の開発を行った。これを実現するために、①バイオ燃料用に適した形質に関する DNA マーカーの獲得と育種への応用、②土壌センシング技術を用いた大面積土壌評価システムの開発、③地上 3D レーザースキャナによる高精度な大面積バイオマス評価システムの開発、の 3 課題を実施した（図 2.1.1-1）。

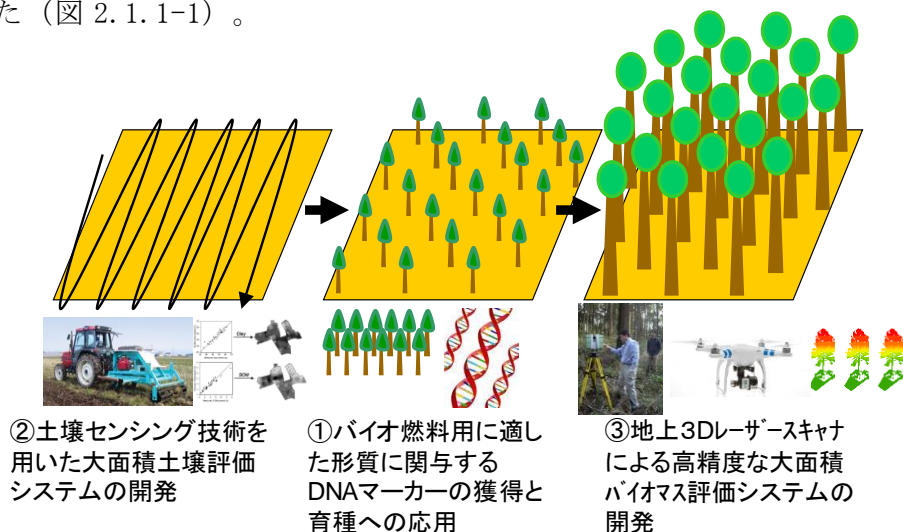


図 2.1.1-1 研究開発の概要イメージ

本研究開発の体制は、以下の実施体制で進めた（図 2.1.1-2）。

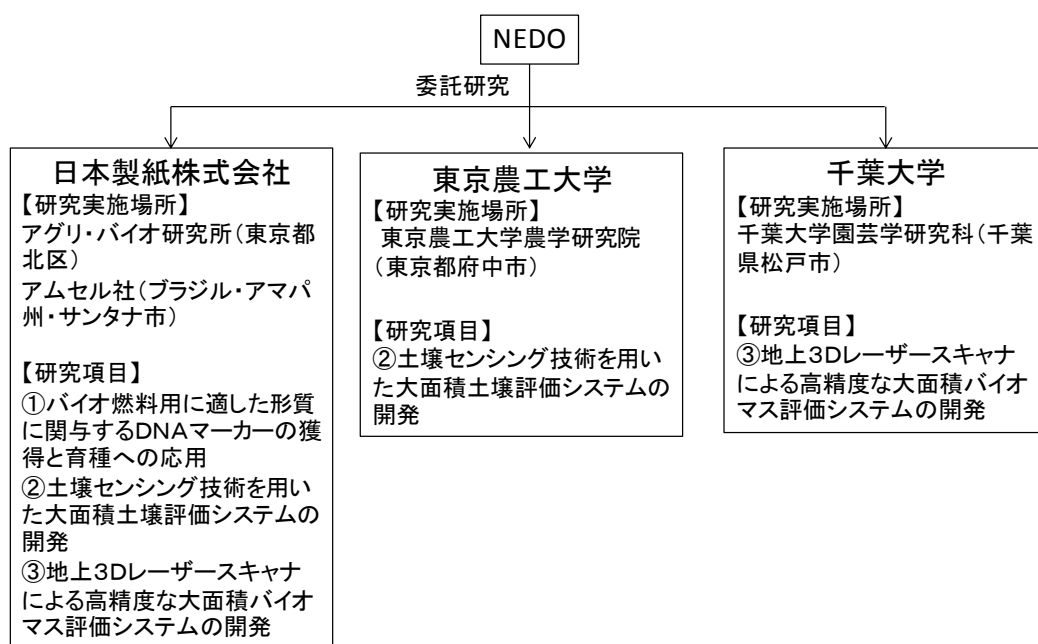


図 2.1.1-2 研究開発体制図

また、本研究開発の具体的内容は以下の通りである。

①バイオ燃料用に適した形質に関する DNA マーカーの獲得と育種への応用

- ・単位面積あたりのセルロース蓄積量が高いバイオ燃料用優良クローンを選抜するための、DNA マーカーによる形質予測式を作成する。
- ・ブラジル北部のユーカリ植林地を利用し、実生林植栽地から優良木を選抜する工程において DNA マーカー技術を利用する。
- ・プロジェクト期間中を通じ、RNA シーケンスによる効果の強いマーカーの獲得をする。

②土壌センシング技術を用いた大面積土壌評価システムの開発

- ・ブラジル植林地で実用可能な設計仕様のトラクタ搭載型の光学スペクトル検出機材（土壌センサ）を作製する。
- ・作製した土壌センサを試験運用し、効率的な運用方法と土壌マップ作製可能な回帰モデルを確立する。
- ・土壌評価により植栽木の成長量を予測するシステムを開発する。

③地上 3D レーザースキャナによる高精度な大面積バイオマス評価システムの開発

- ・3D レーザースキャナ（3DLS）を用いて、高精度に単幹木のバイオマス量を計算する自動毎木調査プログラムを開発する。
- ・無人航空機（UAV）を使用した植林地撮影法を確立し、広域な植林地を評価する方法及びプログラムを開発する。

2.1.2 研究開発の目標設定

ブラジル北部アマパ州に日本製紙グループが保有するユーカリ植林地を用い、バイオエタノールの原料に適した植林木のバイオマス増産技術を開発する。実用化時点（2020 年）において 2012 年度実績値と比較し、実際に植林地に植栽する優良クローン木の推定バイオマス量をセルロース増加量換算で 1.8 倍以上に増加させることを目指した。これを実現するために、平成 28 年度末（2017 年 3 月）までに、土台となる技術開発を終えることを目指した。

具体的には、DNA マーカー育種及び地上 3D レーザースキャナによる優良クローン選抜の効率化により、2017 年 3 月までに推定セルロース増加量が既存クローンの 1.4 倍以上の優良クローン候補を 3 系統以上選抜する。さらに、土壌センシング技術による施業面の最適化により、植栽地におけるセルロース増加量が 1.3 倍以上（同一クローンの比較）を目指す。両者を組み合わせ、セルロース増加量が 1.8 倍以上（ $1.4 \times 1.3 = 1.8$ ）となる技術開発を達成することを目標とした。

2.1.3 目標と成果

(1) バイオ燃料用に適した形質に関する DNA マーカーの獲得と育種への応用

（担当：日本製紙）

a) 研究概要（課題と目標）

日本製紙グループが保有するアムセル社ブラジル北部のユーカリ植林地では、精英樹クローンの植林を実施しており、選抜育種により優良なクローンを確保している。精英樹選抜では、20 万粒の種子から、実生林試験、クローン適性試験（100 本程度／系統）、試験植林

(500本/系統)と3段階の選抜で事業用植林クローンとなるのは1~2系統/年であり、選抜に要する期間は12~14年である。DNAマーカーによる選抜は、DNA情報で選抜する為、実生林試験とクローン適性試験を省略して、いきなり試験植林を行うことで、大幅に選抜期間を短縮できる可能性がある。

本プロジェクトにおけるバイオ燃料用植林では、個体全体としてセルロース量が多く、伐期に単位面積あたりのセルロース蓄積量が最大となるバイオ燃料用優良クローンを選抜することを目指した。ブラジル北部のユーカリ植林地を利用し、実生林植栽地(次世代用の選抜母集団を植栽した試験地)から優良木を選抜する工程においてDNAマーカー技術を利用することを課題とした。また、プロジェクト期間中を通じ、RNAシーケンスによる効果の強いDNAマーカーの獲得を課題とした。

目標として、マーカー遺伝子型から各形質を予測する推定式($R=0.7$ 以上)を確立する事、セルロース増加量が平成24年実績比で1.4倍以上となる優良クローンを3系統以上選抜することとした。

b) 研究成果

b-1) DNAマーカーによる形質予測式の作成

1) DNAマーカーとSNPchip

DNAマーカーとは、ゲノムDNA上の位置が特定された、特別な塩基配列を持つDNA領域のことである。樹木の個体間には、DNAの塩基配列に少しずつ違いがあり、この違いを目印(マーカー)にすると、木質特性などの有用形質を間接的に選抜することができる。DNAマーカーの代表的なものは、SNP(一塩基多型)とSSR(単純反復配列)だが、本PJでは主にSNPに着目し、研究を進めた。SNPに着目した背景として、ユーカリSNPの解析プロジェクト(ブラジル農生公社(EMBRAPA)が提唱: Euchip60Kプロジェクト)で、ブラジルの植林会社と研究機関が品種・資金を持ち寄りSNPchipを作成していて、利用が可能であることからである。本SNPchipは、ブラジルのユーカリ13品種240本から、60,000個のSNPを選択しており汎用性が高い。本PJで作成したDNAマーカーによる予測式は、本SNPchip(Euchip60k)より得られたSNP情報を用いて解析を行った。

2) 形質予測式(プロトタイプ)の作成

ユーカリ植林木約1000個体の実生林の集団の形質とDNA情報を獲得し、形質予測式(プロトタイプ)の作成を試みた。

・形質予測式作成のためのトレーニング集団

ブラジル北部アムセル社植林地の2010年植栽(3.5年生)の実生林試験地(2箇所:試験地A、B、写真2.1.3-1、図2.1.3-1)から母親のみ判明している50家系918個体(試験地A:466個体、試験地B:452個体)を選定した。構成している樹種は、*Eucalyptus urophylla*、*E. grandis*、*E. pellita*などである。



写真 2.1.3-1 トレーニング集団の実生林
2010年植栽地（2013年6月）

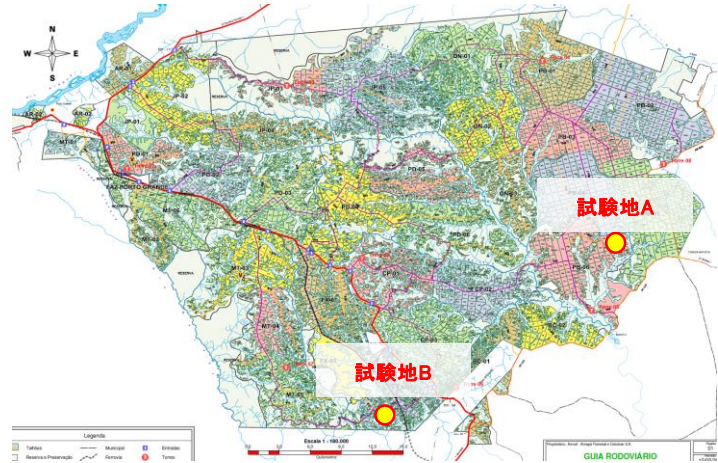


図 2.1.3-1 トレーニング集団の植栽地

・ トレーニング集団の形質解析

918 個体の材積については、現地で樹高（TH）と胸高直径（DBH）を測定し、材積計算式により算出した。 α セルロース含量（%）と容積重（ kg/m^3 ）については、現地で、ドリルによるダストを採取し、木粉化して近赤外分光法で、算出した。

材積は平均 0.16 m^3 で、最小値が 0.07 m^3 で最大値が 0.41 m^3 であった（図 2.1.3-2）。また、容積重は平均が $490 \text{ kg}/\text{m}^3$ で、最小値が $330 \text{ kg}/\text{m}^3$ で最大値が $677 \text{ kg}/\text{m}^3$ であった（図 2.1.3-3）。 α セルロース含量については、平均値が 50.3%であり、最小値が 37.7%であり、最大値が 59.8%であった（図 2.1.3-4）。DNA マーカーによる形質予測式を作成するに、十分多様性のあるトレーニング集団であることが確認された。

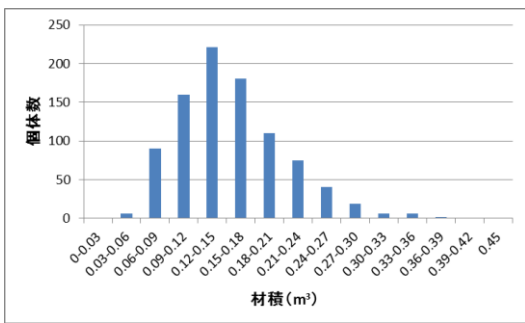


図 2.1.3-2 トレーニング集団の材積分布

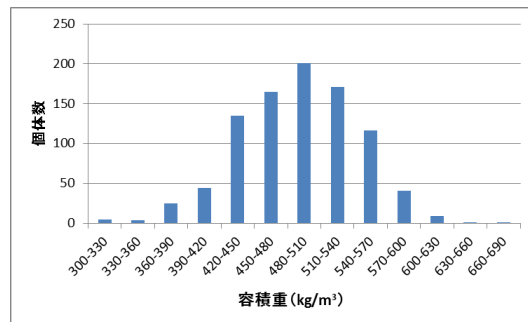


図 2.1.3-3 トレーニング集団の容積重分布

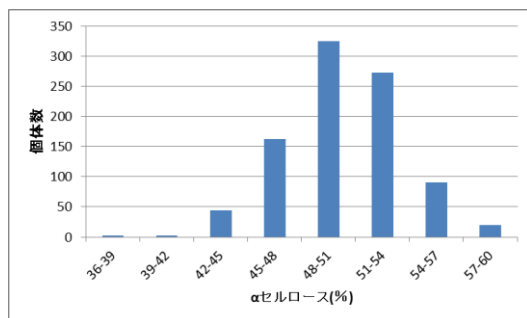


図 2.1.3-4 トレーニング集団のαセルロース分布

・トレーニング集団の DNA 解析

現地にて、トレーニング集団の葉サンプルを採取した。採取した葉より DNA 抽出し (Hereditas 社 (伯) に外注)、SNPChip (Euchip60K) を用いてトレーニング集団 (918 個体) の SNP ジェノタイピングデータ (47,000 個の SNP 情報) を得た (Geneseek 社 (米) に外注、図 2.1.3-5)。さらに、本集団でのコールレート 90% の SNP (32,698 個) を抽出した。

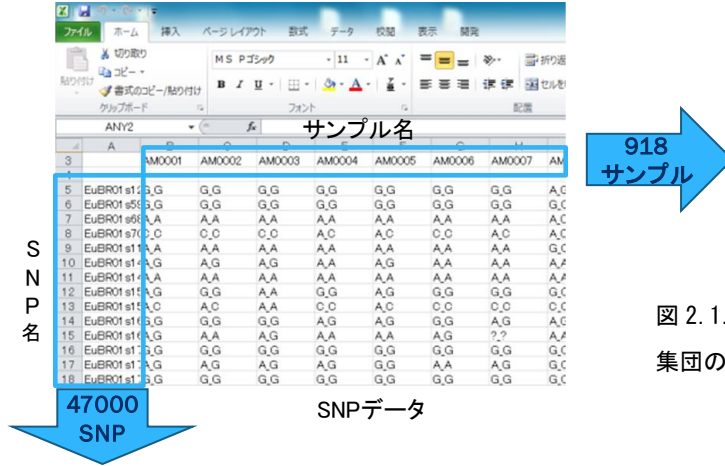


図 2.1.3-5 トレーニング 集団の SNP 情報 (例)

・解析ソフト R による SNP 解析

918 個体中、90% の 826 個体をトレーニングサンプルに、残りの 10% の 92 個体をテストサンプルとして、ランダムに抽出し、SNP と計測した形質 (材積、容積重、 α セルロース含量) との関連性を統計解析処理ソフト R を用いて解析した。解析手法として、集団遺伝学で確立している R の公開プログラム rrBLUP 法を用いた。

基本式は図 2.1.3-6 と図 2.1.3-7 に示す。

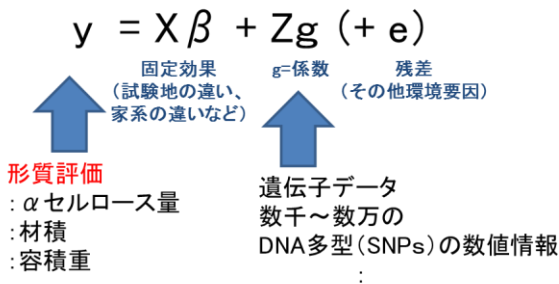


図 2.1.3-6 rrBLUP 法による SNP 解析モデル式

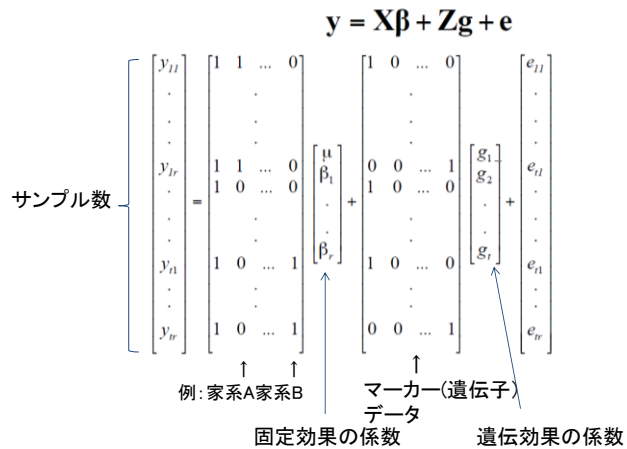


図 2.1.3-7 rrBLUP 法による SNP 解析モデル式 (詳細)

モデル式 ($y=X\beta+Zg (+e)$) のうち、固定効果 $X\beta$ の因子を特定しない μ (平均) とし、SNP 情報のみで形質を予測する式 ($y=\mu+Zg (+e)$) を作成した。その結果、相関係数が材積、容積重、 α セルロースとともに低い値となった (表 2.1.3-1)。そこで、固定効果 $X\beta$ に家系情報を加えることで、大幅に相関係数が上昇した (表 2.1.3-1)。さらに、分集団構造を追加することで、最終的に形質予測式の相関係数は、0.6 程度まで上昇した。本予測式を、プロトタイプの形質予測式とした。

表 2.1.3-1 プロトタイプの形質予測式の予測精度

	相関関係		
	材積	容積重	α セルロース
$y = \mu + Zg (+e)$: SNP情報のみ	0.092	0.295	0.142
$y = X\beta + Zg (+e)$: 家系情報あり	0.473	0.582	0.505
プロトタイプ	0.695	0.532	0.596

3) 形質予測式の構築（精度の改良の取組み）

プロトタイプの形質予測式は母親のみ判明している 50 家系 918 個体から作成した物で、より形質予測式の精度を上昇させるには、父母が判明している集団を用いることが有効である。父母が判明している 686 個体の集団を用いて新たな形質予測式の作成を試みた。



写真 2.1.3-2 父母が判明しているトレーニング集団の植栽地（葉のサンプリング作業）

・形質予測式作成のためのトレーニング集団

ブラジル北部アムセル社植林地の 2013 年植栽の実生林試験地から

父母が判明している 43 家系 686 個体を選定した（写真 2.1.3-2）。構成している樹種は、*E. urophylla*、*E. grandis*、*E. pellita* などである。

・トレーニング集団の形質解析

686 個体の材積については、現地で樹高（TH）と胸高直径（DBH）を測定し、材積計算式により算出した。 α セルロース含量（%）と容積重（ kg/m^3 ）については、現地で、ドリルによるダストを採取し、木粉化して近赤外分光法で、算出した。

材積は平均 0.073 m^3 で、最小値が 0.002 m^3 で最大値が 0.287 m^3 であった。また、容積重は平均が $508 \text{ kg}/\text{m}^3$ で、最小値が $366 \text{ kg}/\text{m}^3$ で最大値が $639 \text{ kg}/\text{m}^3$ であった。 α セルロース含量については、平均値が 51.3% であり、最小値が 34.3% であり、最大値が 63.8% であった（図 2.1.3-8, 9, 10）。DNA マーカーによる形質予測式を作成するに、十分多様性のあるトレーニング集団であることが確認された。

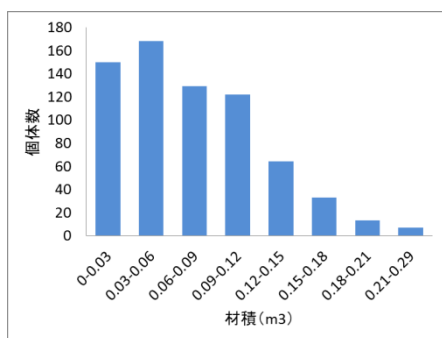


図 2.1.3-8 トレーニング集団（父母判明）の材積分布

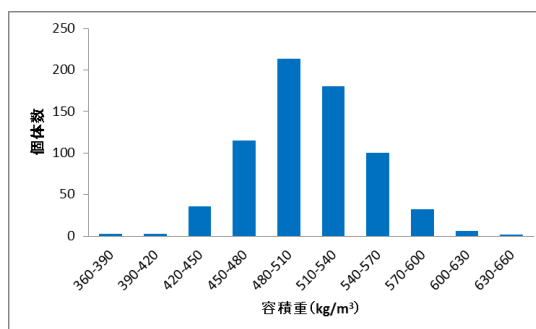


図 2.1.3-9 トレーニング集団（父母判明）の容積重の分布

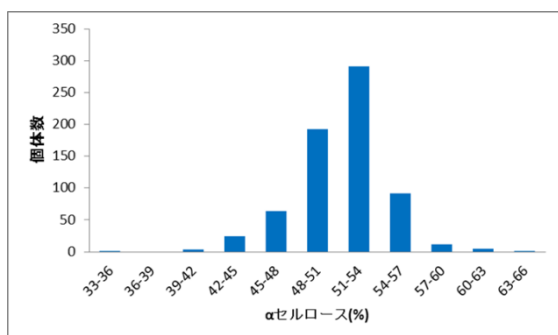


図 2.1.3-10 トレーニング集団（父母判明）の α セルロース含量の分布

・トレーニング集団のマーカーによる形質予測式の作成

現地にて、トレーニング集団の葉サンプルを採取した。採取した葉より DNA 抽出し (Hereditas 社 (伯) に外注)、SNPChip (Euchip60K) を用いてトレーニング集団 (686 個体) の SNP ジェノタイピングデータ (47,000 個の SNP 情報) を得た (Geneseek 社 (米) に外注)。さらに、本集団でのアレルの多型が確認された SNP (21,608 個) を抽出した。

686 個体中、90%の 617 個体をトレーニングサンプルに、残りの 10%の 69 個体をテストサンプルとして、ランダムに抽出し、SNP と計測した形質 (材積、容積重、 α セルロース含量) との関連性を統計解析処理ソフト R を用いて解析した。解析手法は rrBLUP 法を用いた。

その結果、新たな形質予測式の相関係数は材積で 0.564、容積重で 0.556、 α セルロースで 0.425 となった (表 2.1.3-2)。これは、プロトタイプの形質予測式で SNP 情報のみで作成した予測式の相関係数より大幅に上昇した。

表 2.1.3-2 新たな形質予測式 (父母判明) の形質予測式の予測精度

トレーニング集団	相関係数		
	材積	容積重	α セルロース
686個体(43家系)	0.564	0.556	0.425
材積(高:5家系+低:5家系、160個体)	0.672	0.566	0.587
容積重(高:5家系+低:5家系、160個体)	0.405	0.743	0.382
α セルロース含量(高:5家系+低:5家系、160個体)	0.623	0.735	0.620
α セルロース含量(高:5家系+低:5家系、141個体)	0.733	0.719	0.711

・形質予測式の更なる精度向上への検討

両親が判明しているトレーニング集団 (43 家系 : 686 個体) を用いて作成した新たな形質予測式の精度を向上させるため、トレーニング集団の家系を絞ることで、相関係数が上昇できるか検討した。材積、容積重、 α セルロース含量で、それぞれ値が高い 5 家系と低い 5 家系 (160 個体) に絞り込み、形質予測式を作成した。その結果 (表 2.1.3-3)、材積で家系を絞った場合、材積の相関係数が、0.564 から 0.672 に大きく上昇した。一方、容積重と α セルロース含量の相関係数も上昇した。容積重で家系を絞った場合、容積重の相関係数が 0.556 から 0.743 に上昇したが、材積、 α セルロース含量の相関係数は低下した。 α セルロース含量で系統を絞った場合、材積、容積重、 α セルロース含量のすべてで、相関係数が大きく上昇した。 α セルロース含量に差がある家系群 (160 個体) に絞った形質予測式の精度が高かったため、この式のさらなる精度向上を目指すことにした。

さらに、予測精度を向上させるため、160 個体からアウトライヤー (外れ値) となる合計 19 サンプルを除去し、141 個体で形質予測式を作成した。その結果、各形質 (材積、容積重、 α セルロース含量) の予測値と実測値の相関係数はすべて 0.7 を超える結果となった (表 2.1.3-3)。本 PJ の目標である相関係数 0.7 以上の DNA マーカーによる形質予測式を作成できた。

表 2.1.3-3 家系数の絞り込みと外れ値の除外による形質予測式の相関係数の上昇

	相関係数		
	材積	容積重	α セルロース
プロトタイプ918個体: SNP情報のみ	0.092	0.295	0.142
686個体(43家系): SNP情報のみ	0.564	0.556	0.425

b-2) DNA マーカー形質予測式による精英樹候補木の選抜

1) 精英樹候補木の選抜

ブラジル実生林選抜木 244 個体からプロトタイプの形質予測式を用いて、ブラジル実生林選抜木 244 個体から精英樹候補木を選抜した (2015 年度)。

・DNA抽出とSNP解析

2.6年生木244個体から葉サンプルを採取した(2014年度)。採取した葉よりDNA抽出し(Hereditas社(伯)に外注)、SNPChip(Euchip60K)を用いてのSNPジェノタイピングデータ(60,000個のSNP情報)を得た(Geneseek社(米)に外注)。60,000個のSNPデータから、形質予測式(プロトタイプ)で使用した32,698個のSNPを抽出し、244サンプルのSNPを、形質ごとに(+1、0、-1)に変換した。それぞれの形質の予測式(プロトタイプ)にSNPデータを代入し、形質ごとにランキングを作成した。

・精英樹候補木の選抜

244個体について、形質予測式から各形質(材積、容積重、 α セルロース含量)を算出した。材積からは、1haあたり1年間の平均年成長量MAI(Mean Annual Increment: $m^3/ha/年$)の予測値を算出した。さらに、面積当たりセルロース生産量(MAI \times 容積重 \times α セルロース量)を算出し、上位15系統を選抜した。さらに、残りの系統から、面積当たりの重量ベースの材生産量(MAI \times 容積重)を算出し、上位16系統を選抜した。即ち、合計31系統の優良候補クローン(精英樹候補木)を選抜した(表2.1.3-4,5)。

表 2.1.3-4 セルロース生産量で選抜した上位15系統

ランキング	個体名	「MAI \times 容積重 \times α セルロース量」 予測値(BDT/ha/yr)
1	72	9.9
2	73	9.7
3	74	9.6
4	75	9.5
5	76	9.5
6	77	9.4
7	78	9.1
8	79	9.1
9	80	9.1
10	81	9.0
11	82	8.9
12	83	8.9
13	84	8.9
14	85	8.9
15	86	8.9
-	-	-
事業用クローン		7.9

表 2.1.3-5 バイオマス生産量で選抜した上位16系統

ランキング	個体名	「MAI \times 容積重」 予測値 (BDT/ha/yr)
1	103	19.7
2	105	19.0
3	109	18.9
4	106	18.9
5	104	18.0
6	102	17.9
7	110	17.7
8	100	17.0
9	98	16.7
10	107	15.9
11	112	15.8
12	113	15.6
13	99	14.6
14	101	14.1
15	111	13.9
16	108	13.2
事業用クローン		15.7

2) 精英樹候補木の増殖

・精英樹候補木の苗化

選抜した 31 系統について、伐倒して 3~4 か月で切り株から萌芽枝を確保した。萌芽枝から調整した挿し穂をポットに挿し付けた。31 系統中で個体番号 86 を除く、30 系統で発根苗を得た (図 2.1.3-11、写真 2.1.3-3)。

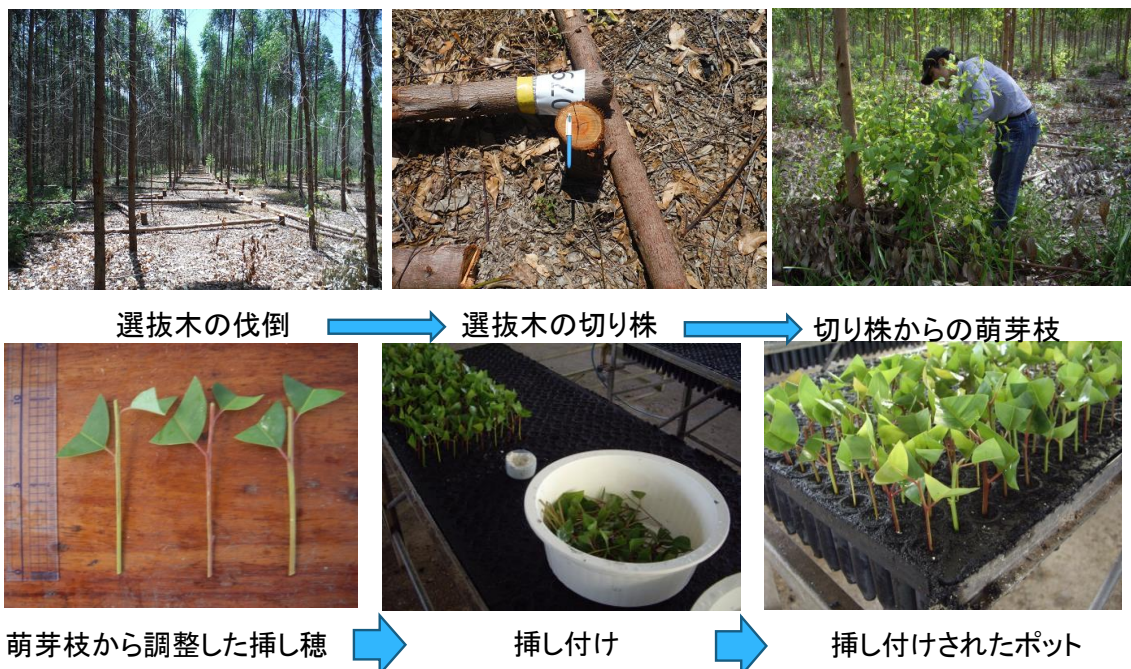


図 2.1.3-11 精英樹候補木の増殖スキーム



写真 2.1.3-3 苗化した精英樹候補木



3) 精英樹候補木の植栽

苗化した精英樹候補個体 30 系統の内、植栽予定時期 (2016 年 2~4 月) までに植栽試験が可能な規模に増殖できたのは 25 系統であった (表 2.1.3-6、7)。植栽試験地は 4 か所植栽したが、そのうち最も植栽期間が長い E464 (植栽期間 9.6 ヶ月) を、評価の対象とした。表 2.1.3-8 に示すように各系統を植栽した。植栽方法は、同じ樹種が隣り合わないようなアルゴリズムに元づいて植栽した。

表 2.1.3-6 重量ベースセルロース生産量によるランキングと増殖・植栽

(○：植栽試験を行った個体)

ランキング	個体名	増殖・植栽
1	72	○
2	73	○
3	74	○
4	75	○
5	76	○
6	77	○
7	78	○
8	79	○
9	80	○
10	81	○
11	82	○
12	83	○
13	84	○
14	85	○
15	86	-

表 2.1.3-7 材重量によるランキングと増殖・植栽

(○：植栽試験を行った個体)

ランキング	個体名	増殖・植栽
1	103	○
2	105	○
3	109	○
4	106	○
5	104	-
6	102	-
7	110	○
8	100	○
9	98	○
10	107	-
11	112	-
12	113	○
13	99	○
14	101	○
15	111	-
16	108	○

表 2.1.3-8 精英樹候補木（マーカー選抜木）の植栽情報

試験番号	植栽日	測定日	植栽期間(月)	植栽されているマーカー選抜木のNo
E464	2016/2/2	2016/11/17	9.6	73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80

4) 精英樹候補木の評価

ブラジル北部では、選抜木の評価には3年以上の生育が望ましいが、本PJの期間に制限があるため、初期成長（植栽期間は9.6ヵ月）で評価することとした。

・E464 植栽試験地の精英樹候補木の成長性評価

植栽後9.6ヶ月目の精英樹候補木の成長量（樹高）を調査した（2016年11月17日測定）。その結果、精英樹候補木（8クローン）のうち6クローン（クローンNo. 73, 74, 76, 78, 79, 80）で、選抜事業用クローンより樹高が大きかった（図2.1.3-12）。さらに、アムセル社の代表的な事業用クローンのユーカリ成長予測式を用いて、植栽期間6年目（伐期）の推定樹高を算出し（図2.1.3-13）、推定樹高から、単位面積当たりの年成長量（MAI）を算出した（図2.1.3-14）。その結果、DNAマーカー選抜木の3クローン（No. 78, 79, 80）のMAIが事業用クローンの1.4倍以上であった。

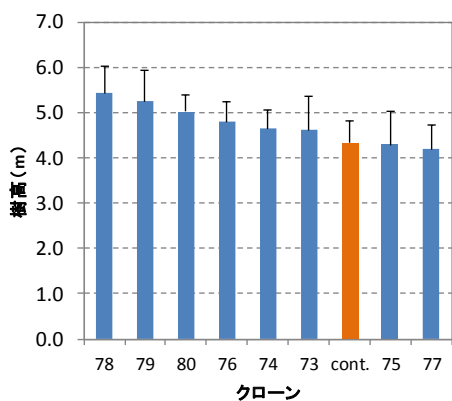


図 2.1.3-12 精英樹候補木の樹高
 植栽地：E464、植栽期間：9.6 カ月
 測定：n=20、cont.：事業用クローン

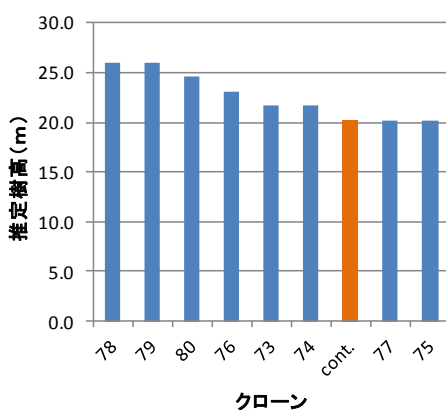


図 2.1.3-13 精英樹候補木の 6 年目の推定樹高

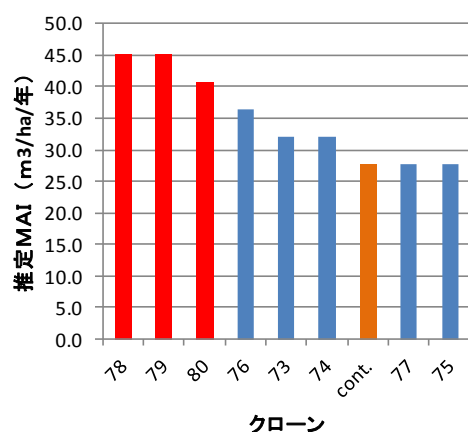


図 2.1.3-14 精英樹候補木の 6 年目の推定 MAI

・E464 植栽試験地の精英樹候補木のセルロース生産性の評価

樹高測定から予測される MAI が事業用クローンの 1.4 倍以上の 3 クローン (No. 78, 79, 80) について、単位面積当たりの α セルロース生産量を算出した。具体的には、マーカーから推定される単位体積当たりの α セルロース含量 (容積重 \times α セルロース量) と樹高測定から予測される MAI から算出した。その結果、単位面積当たりの α セルロース生産量は、事業用クローンと比較し、クローン No. 78 で 1.68 倍、79 で 1.67 倍、80 で 1.48 倍となった (表 2.1.3-9)。

表 2.1.3-9 精英樹候補木のセルロース生産量 (事業用クローンとの比較)

個体名	マーカー予測値		樹高測定からの予測値		対コントロール比
	「MAI \times 容積重 \times α セルロース量」 (BDT/ha/yr)	「容積重 \times α セルロース量」 (kg/m ³)	MAI(m ³ /ha/yr)	「MAI \times 容積重 \times α セルロース量」 (BDT/ha/yr)	
78	9.1	273.0	45.2	12.33	1.68
79	9.1	271.7	45.2	12.27	1.67
80	9.1	266.7	40.8	10.88	1.48
事業用クローン	7.9	264.6	27.7	7.33	—

5) 精英樹候補木の評価と選抜のまとめ

モデル式 (プロトタイプ) を用いて選抜した精英樹候補木の 31 系統の内、30 系統を苗化、23 系統 1663 個体を 4 試験地に植栽した (2016 年 2~4 月)。植栽個体の樹高を各クローンにつき 20 個体測定した (2016 年 11 月)。

植栽時期が長い試験地 (E464) で、樹高から推定 MAI を算出したところ、推定 MAI で事業用クローンの 1.4 倍以上になるクローンが 3 系統確認できた。さらに、推定セルロース生産量を算出したところ、1.48~1.68 倍となった。植栽期間が短い 3 試験地では、まだ樹高は 2~3 メートル程度であったが、樹高でコントロールの 1.4 倍となる個体が複数認められ、さらに優良クローン候補 2 系統存在することが確認できた。

b-3) 新規 DNA マーカーの獲得

α セルロース含量や容積重に影響を与える遺伝子を発現レベルで明らかにし、その遺伝子領域にマーカーとして利用可能な配列を解析することを試みた。

1) α セルロースに関連する遺伝子とマーカー候補の解析

形質予測式（プロトタイプ）のトレーニング集団 918 系統の内、 α セルロース含有量が 42.4～59.0%の 18 系統（図 2.1.3-15）について、RNA-Seq 法による網羅的な遺伝子発現解析を実施した。

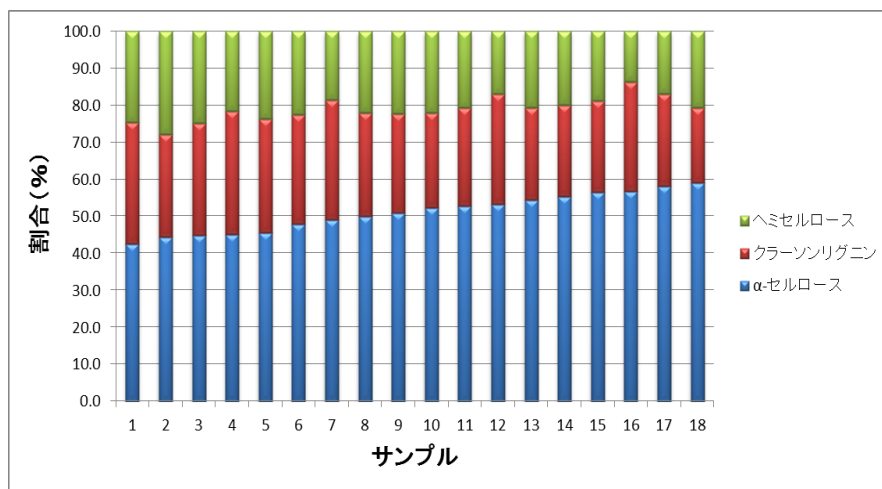


図 2.1.3-15 α セルロース含量が異なる 18 系統の木材分析結果

トレーニング集団の植栽地の 18 系統から形成層を採取し、採取したサンプルを RNA later (QIAGEN 社製) に浸漬し、日本に輸送した。それらサンプルから、Illumina Tru-Seq kit (Illumina) のプロトコールに従って、18 系統に対応する mRNA-seq ライブラリーを作成した。mRNA-seq ライブラリーを次世代シーケンサー (MiSeq、Illumina 社) で、DNA 配列を解析した。DNA 配列のデータと発現量については、CLC Genomics Workbench を用いて解析した。その結果、発現量が α セルロース含量と相関 ($R=0.3$ 以上) が認められる遺伝子を 10 種選定し、そのうち 3 種についてはセルロース合成に関与する遺伝子 (CESA7、CESA4、CESA8) であった (表 2.1.3-10)。遺伝子の配列を解析したところ CESA4 遺伝子の中に複数の SSR 配列が認められた (図 2.1.3-16)。これら SSR 配列はセルロース含量に対するマーカーとして利用できる可能性がある。

表 2.1.3-10 α セルロースと発現の相関関係が認められた遺伝子

遺伝子名	Feature ID	α セルロース含量との相関関係(r)	
MAPR3	membrane-associated progesterone binding protein 3	Eucgr.K00245	0.60
GLP10	germin-like protein 10	Eucgr.A00990	0.51
VRN1	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	Eucgr.G01517	0.47
CESA7	Cellulose synthase family protein	Eucgr.C00246	0.47
CYP98A3	cytochrome P450, family 98, subfamily A, polypeptide 3	Eucgr.A02190	0.43
MYB103	myb domain protein 103	Eucgr.D01819	0.41
GPT	UDP-glcnac-adolichol phosphate glcnac-1-p-transferase	Eucgr.A02296	0.40
BLH6	BEL1-like homeodomain 6	Eucgr.G01703	0.35
CESA4	cellulose synthase A4	Eucgr.A01324	0.32
CESA8	cellulose synthase family protein	Eucgr.D00476	0.30

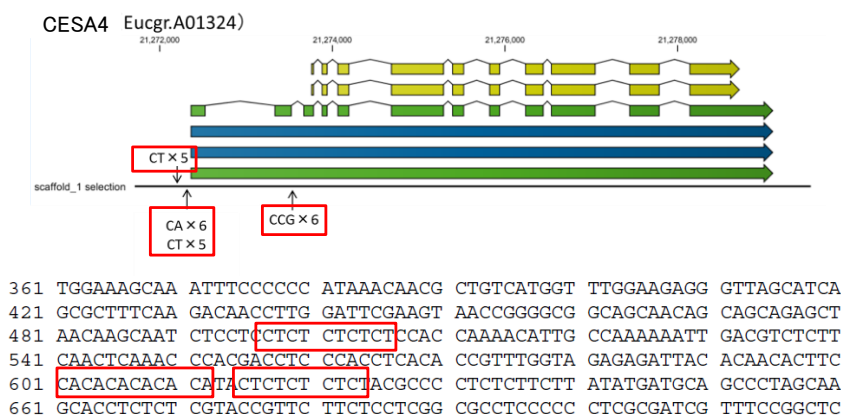


図 2. 1. 3-16 CESA4 (セルロース合成遺伝子) 上の SSR マーカー

2) 容積重に関連する遺伝子とマーカー候補の解析

ブラジリアムセル社には、高容積重 (557kg/m³) の事業用クローンが存在する。実生林試験地に植栽されている本高容積重クローンの子孫 112 系統 (2.8 年生) について、容積重と胸高直径を調査した。容積重はピロディン法で測定した。その結果、系統ごとに容積重は 378~609kg/m³ と大きくばらつくことが分かった (図 2. 1. 3-17)。

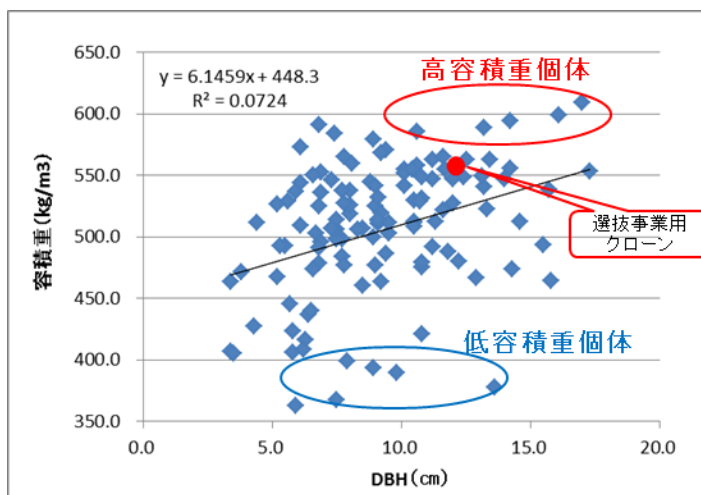


図 2. 1. 3-17 高容積重系統の子孫の容積重の分布

これら 112 系統中、高容積重 5 系統 (570~609 kg/m³) と低容積重 5 系統 (378~409kg/m³) を選定した。選定した合計 10 系統について、形成層を採取して RNA を抽出し、次世代シーケンサーでの RNA-seq 法による網羅的遺伝子発現解析を実施した。得られた遺伝子発現量 (RPKM) と容積重の相関関係を調査した。容積重との相関が高い (r=0.79 以上) 25 種の遺伝子を選定した。選定した遺伝子の中には、3 種の XTH (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase) など細胞壁合成に関与する遺伝子が 7 種類含まれていた。

選定した 25 種の遺伝子について、高容積重 5 系統と低容積重 5 系統において、プロモーター領域を PCR 法で増幅を試みたところ、20 種類の遺伝子で増幅できた。高容積重 5 系統と低容積重 5 系統において増幅したプロモーター領域のシーケンス解析を行った。その結果、それぞれの遺伝子のプロモーター領域において、多くの SNP が存在することが判明した。そのうち、容積重と関連の有りそうな SNP が 11 種の遺伝子で確認された (表 2. 1. 3-11)。例えば、容積重と最も発現の相関が高かった ATDAD1 遺伝子 (細胞死抑制タンパク質) では、146 個の SNP が確認され、その内

19 個の SNP で容積重が高い個体と低い個体間で差異があり、関係性がある有用 SNP と推測された (図 2.1.3-18)。

表 2.1.3-11 容積重と発現の相関関係が認められた遺伝子と解析結果

遺伝子名	容積重との相関	遺伝子機能	シーケンス	SNP解析	総SNP数	有用SNP数
ATDAD1	0.94	Defender against death (DAD family) protein: 細胞死抑制タンパク	○	○	146	19
XTH28	0.93	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 28: 細胞壁構築	○	○	224	0
	0.92	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein: 二次細胞壁合成促進	○	○	47	0
	0.92	Rhamnogalacturonate lyase family protein: ペクチン関連	○	○	110	0
	0.92	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein: DNA結合タンパク	○	○	179	10
XYL4	0.90	beta-D-xylosidase 4: 細胞壁関連酵素	×	×	×	×
ICK2	0.90	KIP-related protein 2: 細胞周期調整: サイクリン依存性キナーゼ阻害	○	○	235	28
XTH9	0.89	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9: 細胞壁構築	○	○	134	15
	0.89	Galactosyltransferase family protein: 細胞壁合成関連	×	×	×	×
	0.89	Phototropic-responsive NPH3 family protein: 屈光性応答NPH3ファミリータンパク質	○	○	80	3
FUM1	0.89	fumarase 1: TCAサイクルの構成要素: フマラーゼ	○	○	179	23
SK1	0.88	shikimate kinase 1: シキミ酸経路に関与経路下流にあるポリフェノールは細胞壁に結合	○	○	161	0
	0.88	Ribosomal protein L32e: リボソームタンパク質 L32e	○	○	202	17
MYB4	0.87	myb domain protein 4	○	○	176	0
	0.86	ATPase, V0/A0 complex, subunit C/D: ATPアーゼ、V0/A0錯体、サブユニット C/D	×	×	×	×
HAM3	0.85	GRAS family transcription factor	○	○	134	0
GRF3	0.84	general regulatory factor 3: 成長調節因子3	○	○	160	7
BGAL3	0.82	beta-galactosidase 3: 細胞壁関連酵素	○	○	83	0
XTH23	0.82	xyloglucan endotransglucosylase 6: 細胞壁構築	○	○	111	1
GUX3	0.82	plant glycogenin-like starch initiation protein 2	×	×	×	×
WLIM1	0.82	GATA type zinc finger transcription factor family protein	○	○	112	0
G6PD4	0.81	glucose-6-phosphate dehydrogenase 4	○	○	104	15
F3H	0.81	flavanone 3-hydroxylase: フラバノン-3-ヒドロキシナーゼ: フラボノイド生合成関係	○	○	182	0
FSD2	0.80	Fe superoxide dismutase 2	×	×	×	×
AGP18	0.79	arabinogalactan protein 18: 多糖上に結合するタンパク	○	○	103	1

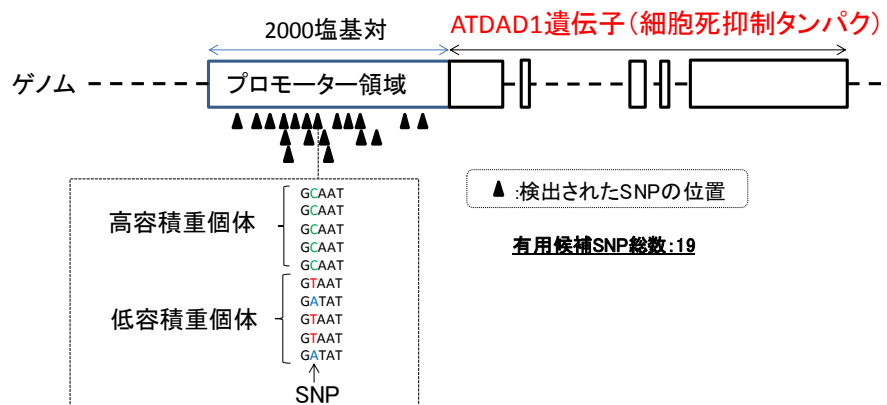


図 2.1.3-18 ATDAD1 遺伝子における有用 SNP の例とその位置

3) 新規 DNA マーカーの獲得のまとめ

αセルロースや容積重と発現相関性のある遺伝子候補を特定した。また、関連する DNA マーカーを合計 11 個の遺伝子プロモーター領域で特定し、目標の新規マーカー5 個以上の獲得を達成した。

b-4) まとめ

- ・ユーカリ植林木約 918 個体の実生林の集団の形質と DNA 情報を獲得し、形質予測式 (プロトタイプ、R=0.6 程度) を構築した (2014~2015 年度)。
- ・父母の明確な 686 個体を用いて統計解析し、系統等の条件を設定することで、目標の R=0.7 とする形質予測式を作成した (2016 年度)。
- ・実生林選抜木 244 個体の DNA 情報から、作成した予測式 (プロトタイプ) を用いて、31 個体の優良候補系統を選抜し (2015 年度)、各系統の植栽試験 (9 ヶ月) を行って樹高を測定した。事

業用クローンと比較して、1.2～1.3 倍の樹高の大きいクローン 3 系統を確認した。選抜 3 系統の 6 年後の単位面積当たりの α セルロース推定生産量は、PJ の目標である事業用クローンの 1.4 倍を超えた（2016 年度）。

・ α セルロースや容積重と発現相関性のある遺伝子候補を特定し、関連する DNA マーカーを合計 11 個の遺伝子プロモーター領域で特定し、目標の新規マーカー 5 個以上の獲得を達成した。

(2) 土壌センシング技術を用いた大面積土壌評価システムの開発

(担当：東京農工大学, 日本製紙)

a) 研究概要（課題と目標）

農業同様に林業においても、面積当たりの生産性は気候・気象条件と土壌の物理・化学・生物及び圃場の地理特性と運用可能な技術体系に大きく依存している。農作物用の圃場でも土地のバラツキの問題があるが、産業用の植林地は一般に面積がさらに広大であるため土地のバラツキの影響も大きい。通常、植林地の土壌を評価するには、数十ヘクタール (ha) ごとに土壌の採取地点を決めてサンプリングし、ラボに持ち帰って分析するが、これには多大な時間と労力がかかる。特に広大な面積を対象にする場合、費用面から十分な測定密度や測定頻度が確保できず、精度のよい調査は困難である。

仮に、植林地に苗を植栽する前の段階で、土壌情報を詳細に記載した土壌マップのような情報があれば、その土地に最適なクローンを選んだり、土地毎に施肥量を変更し、或いは、植栽密度を変更したり、土壌条件が一定以下であれば植栽しないというような様々な施業条件の判断が可能になる。しかしながら、広大な面積を扱う産業植林地において、サンプリングした土壌のラボ分析結果をもとに詳細な土壌マップを作成する手法は、費用面から現実的でない。

本研究では、ユーカリ植林地において、数十 ha ごとに土壌を採取し、ラボに持ち帰って分析する現行の土壌調査に代わる方法として、トラクタに牽引させる構造を持つ光学スペクトル検出機材（土壌センサ）を用いた大面積土壌評価システムの開発を課題とした。目標としては、植林地で年間 6,000 ha/年の効率で土壌評価を可能とする仕様の土壌センサを設計製作し、その設計仕様を満たしている事を検証すること。また、ブラジル植林地の土壌評価を行い、土壌評価と植栽木の成長性から成長量を予測するシステムを開発すること。さらに、そのシステムを用いて作成した土壌マップの活用により、通常植栽と比較して 1.3 倍以上の成長量を得られる植栽運用システムを構築することを目標とした。

b) 研究成果

b-1) 土壌センサの仕様調査

大面積土壌評価システムの基礎データとなる土壌情報を効率的かつ迅速に収集し、土壌マップとして可視化する土壌センシング技術の一つにトラクタ搭載型土壌センシング装置がある。現行品は、畑作や水田を想定した構造を有し、かつ日本の土性を想定しており、ブラジルなどの土性で運用することは想定されていない。本研究ではまず、供試圃場であるブラジル・アマパ州のアムセル社管理植林地（アムセル植林地）の土性や、土壌分析方法を調べ、現地 に即した土壌センシング条件をまとめることとした。

2014 年 3 月にブラジルへ渡航しアムセル植林地を調査した結果、アムセル植林地の土性は粘土含量が 50 %を超え、乾燥すると固く締まる特徴を有しており、深さによって土性も異なることがわかった（写真 2.1.3-4）。詳細な土壌評価を行う場合、写真 III-2-1-6 の様な立坑を掘って土壌サンプルを収集しており、作業効率が悪く、労働負荷も高いことがわかった。また、年間に実施

できるサンプリング数も限られ、林班間や林班内を詳細に理解することが困難な状況であった。地拵えはリン肥料散布と同時に行われ、作業機（写真 2.1.3-7）がブルドーザに搭載され、土壌も固く締まっていることからリッパー（写真 2.1.3-8）の構造は重圧であった。土壌深度についてアムセル社と打合せした結果、施肥時のリッパーの土壌深さが 0.2 m 程度であること、また光ファイバーの寸法限度が 0.3 m 以内であることから、トラクタ搭載型土壌センシング装置による測定深度は 0.2 m に設定した。また、固く締まった土壌で高速走行を想定し、フレーム構造の改良による重量増を補う目的で、ダブルタイヤ化による接地圧の低減対策も仕様に加えることとした。チゼル前方にはビームナイフを装着し、礫やユーカリ木の根などの残渣によるチゼル破損を軽減する機能を追加し、トラクタ搭載型土壌センシング装置単体で保管場所などの移動も可能なキャスターを設けることとした（図 2.1.3-19）。



写真 2.1.3-4 深さによる土壌の違い



写真 2.1.3-5 詳細な土壌調査状況



写真 2.1.3-6 ブルドーザ搭載型施肥機

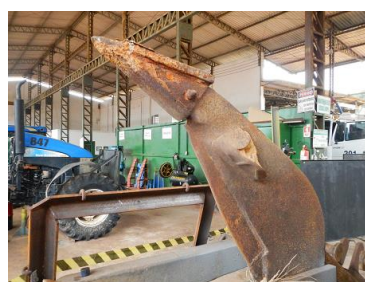
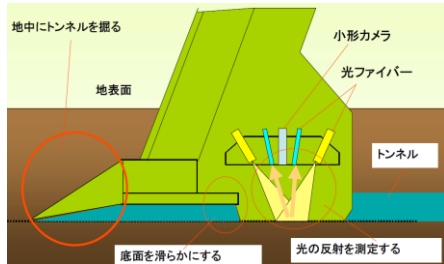
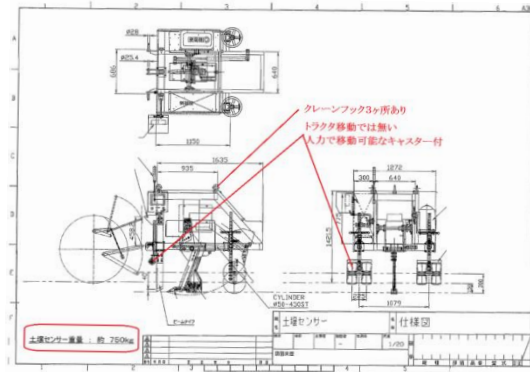


写真 2.1.3-7 施肥機のリッパー部

b-2) トラクタ搭載型土壌センサの作製

上記仕様を満たすトラクタ搭載型土壌センシング装置の試作機（SAS2600）を 2014 年 7 月に発注し、2015 年 3 月に完成した（図 2.1.3-19）。SAS2600 は、測定したい土壌深さにチゼルを貫入し、トラクタで牽引しながらリアルタイムで GPS 信号と可視・近赤外スペクトルを測定する装置である。測定したスペクトルは、土壌成分毎の検量線によって予測値を算出し、GPS データによりマップ化が可能となる（図 2.1.3-19）。土壌成分の推定には、土壌成分毎に回帰モデルの推定が必要である。回帰モデルの推定は、SAS2600 で拡散反射スペクトルを測定した土壌の土壌サンプルを収集し、土壌分析を行うことで得られる分析値を目的変数、拡散反射スペクトルを従属変数として多変量解析により回帰モデルを推定する。

本研究では、日本で土壌分析が可能な pH と置換酸度、電気伝導率、CEC、リン酸吸収係数、アンモニア態窒素、熱水抽出性窒素、硝酸態窒素、全窒素、有効態リン酸、加里、苦土、石灰、石灰・苦土比、苦土・加里比、塩基飽和度、石灰飽和度、C/N 比、ホウ素、マンガン、銅、亜鉛、全炭素、含水比、有機物含有量および乾燥密度の 26 項目を回帰モデル推定の対象とした。



- ・トラクタに牽引させる構造を持つ光学スペクトル基材
- ・可視近赤外領域のセンサを土壌中に埋設しながら牽引し、土壌のスペクトルデータを得る。
- ・スペクトルデータからリアルタイムで土壌成分データを得ることができる。

図 2. 1. 3-19 トラクタ搭載型土壌センシング装置 (SAS2600) の原理と仕様図

b-3) ブラジルの土壌分析とアムセル植林地土壌の特徴

アムセル植林地視察の結果、日本とブラジルの土壌分析方法や分析値の単位が異なる土壌分析項目があることがわかった。そこで、アムセル植林地から土壌を採取し、同サンプルをブラジルと日本でそれぞれ土壌分析を行い、分析値間の比較検証を行うものとした。2015年11月にアムセル植林地から輸入禁止品である土壌試料100点を横浜植物防疫所に輸入許可申請を行い、許可（農林水産省指令27横植第748号）を得て輸入した。農工大では有機物含有量を分析し、輸入禁止品の保管場所変更許可を得てから、農産化学研究所へ保管場所を移して含水比を除く25項目（C/N比は算出）の土壌分析を行い、ブラジルの土壌分析方法と分析装置および単位の違いや、分析値間の関係を把握した。含水比についてはブラジルで測定し、日本では乾燥土を輸入しているので分析の対象外である。土壌分析25項目中で分析値間の比較対象とした分析項目は、14項目（pHと有効態リン酸、塩基飽和度（CEC）、交換性石灰、苦土・石灰・苦土比、マンガン、ホウ素、亜鉛、銅、加里、苦土・加里比、塩基飽和度および全炭素）であり、その内の7項目（pHと有効態リン酸、苦土、加里、苦土・加里比、塩基飽和度および全炭素）は、相関係数 >0.7 の「高い相関あり」であった（表2.1.3-12）。この「高い相関あり」で推定される7項目の回帰モデルは、バイアス補正等により相互利用できる可能性が示唆された。アムセル植林地の土壌は、 $\text{pH}=4.3$ 、重埴土（S:SL:CL=35:5.1:59.9、国際学会法）、仮比重=1.09の灰色低地土であった（図2.1.3-20）。ブラジルと日本では、土壌分析項目によって分析方法や分析装置および単位（リン酸の場合は、日本（mg/100g）、ブラジル（mg/dm³））も異なり、推定した回帰モデルの互換性や土壌分析方法の共通化が今後の課題である。

表 2. 1. 3-12 ブラジルと日本の土壌分析値間の相関 (試料数 100)

	pH	有効態リン酸 mg/100g	CEC me/100g	石灰 mg/100g	苦土 mg/100g	加里 mg/100g	日本 苦土・加里比	石灰・苦土比	塩基飽和度	マンガン ppm	ホウ素 ppm	亜鉛 ppm	銅 ppm	全炭素 %
pH (CaCl)	0.76	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pH (SMP)	0.71	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
有効態リン酸 (mg/dm ³)	—	0.98	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CEC (mmolc/dm ³)	—	—	0.47	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
石灰 (mmolc/dm ³)	—	—	—	0.69	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
苦土 (mmolc/dm ³)	—	—	—	—	0.76	—	—	—	—	—	—	—	—	—
加里 (mmolc/dm ³)	—	—	—	—	—	0.97	—	—	—	—	—	—	—	—
ブラジル 苦土・加里比	—	—	—	—	—	—	0.74	—	—	—	—	—	—	—
石灰・苦土比	—	—	—	—	—	—	—	0.33	—	—	—	—	—	—
塩基飽和度 (%)	—	—	—	—	—	—	—	—	0.75	—	—	—	—	—
マンガン (mg/dm ³)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.26	—	—	—	—
ホウ素 (mg/dm ³)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—	—	—
亜鉛 (mg/dm ³)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.14	—	—
銅 (mg/dm ³)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-0.04	—
全炭素 (mg/dm ³)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.92

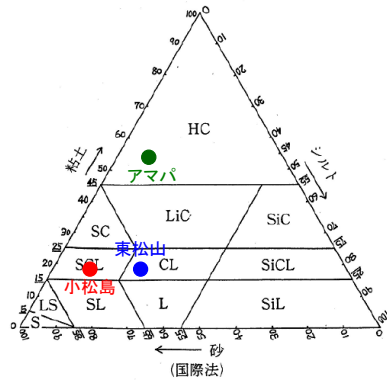


図 2. 1. 3-20 アムセル植林地と国内実証試験区の土性

土壌の種類	基準値	(範囲)	備考
黒ボク土及び多湿黒ボク土	0.65	(0.5~0.8)	腐植が多いほど軽い。 細粒質では粘土が多いほど重く、粗粒質では砂が多いほど重い。
黒ボクグライ土	0.6	(0.5~0.7)	
褐色森林土及び灰色台地土	0.8	(0.8~0.9)	
褐色低地土	0.8	(0.7~0.9)	
灰色低地土	0.9	(0.7~1.1)	
グライ土	0.85	(0.7~1.0)	

b-4) 実証試験案と計画変更

アムセル植林地で、年 6,000 ha の観測目標を達成するための SAS2600 の運用方法として時速 4 km、深さ 0.2 m を設定した。慣行では時速 2 km、深さ 0.15 m の実績があり、観測速度が 2 倍であることから、作業効率は慣行の 2 倍である。SAS2600 を活用することで、アムセル社の数十 ha に 1 点のサンプリングサイズから 0.06 ha に 1 点のサンプリングサイズも可能とした。想定する観測方法は、1 林班 60 ha (1,000 m×600 m) を短辺 120 m 間隔で 4 ライン走行し、1 日 1 林班、年 100 日稼働で目標を達成するものである。

2015 年 3 月に完成した試作機 SAS2600 をアムセル植林地へ輸出する準備を同年 4 月から行ったが、9 月にブラジルから一次輸出の不許可が通達された。NEDO と相談し、輸出はせずに国内で試作した SAS2600 の実証試験を行う計画へ変更した。しかし、アムセル植林地で土壌センシング技術を用いた大面積土壌評価システムの開発と実証試験を実施する必要があり、SAS2600 とスペクトル波長帯域に同等性がある携帯型分光放射計 (FieldSpec、ASD 社) (写真 2. 1. 3-8) を選定し、FieldSpec を用いて年 6,000 ha の観測目標を達成する計画とした。SAS2600 では、0.06 ha に 1 点のサンプリングサイズを目標としたが、FieldSpec では 1 ha に 1 点のサンプリングサイズを想定した。



写真 2.1.3-8 携帯型分光放射計 (FieldSpec)

b-5) 国内圃場における実証試験 (土壌データの収集)

SAS2600 の実証試験対象区は、徳島県小松島のユウカリ苗圃跡地と埼玉県東松山市の茶畑跡の畑作地に決定し、2015 年 12 月と 2016 年 5 月にそれぞれ実施した。また、農工大保有の FieldSpec を使用して拡散反射スペクトルデータ収集を同時に実施した。ローカル (供試圃場向け) 回帰モデル推定用土壌試料は各 100 試料、全 200 試料を収集し、26 項目の土壌分析を実施した。小松島の土性は pH=6.6、砂質埴壌土 (S:SL:CL=73.7:9.2:17.1)、仮比重 1.07 の灰色低地土であり、東松山は pH=4.7、埴壌土 (S:SL:CL=60.9:22.1:17.0)、仮比重 0.72 の黒ボクグライ土であった (図 III-2-1-22)。アムセル植林地と比較すると、pH は東松山、仮比重は小松島と同程度であるが、粘土含量は 3.5 倍であった。200 試料 26 項目の土壌分析結果と拡散反射スペクトルデータから、ローカル回帰モデル推定を SAS2600 と FieldSpec について行った。これにより、SAS2600 と FieldSpec の比較を可能とし、将来的に SAS2600 をアムセル植林地での運用可能性判断も可能とした。FieldSpec による土壌の拡散反射スペクトル測定においては、SAS2600 の測定部の構造と同等とするために、拡散反射スペクトル測定治具を作成・使用した。土壌分析は、農工大で含水比と有機物含有量を測定し、住化分析センターで加里や石灰、苦土を分析、C/N 比は算出した。その他の 20 項目は農産化学研究所で土壌分析を実施した。

b-6) 国内圃場における実証試験 (スペクトルデータの解析)

SAS2600 と FieldSpec で収集した拡散反射スペクトルデータは、吸光度へ変換し、Savitzky-Golay 法 2 次微分にて前処理を行い、分析値を目的変数、拡散反射スペクトルデータを説明変数として、多変量解析の一つである PLS 回帰分析 (Partial Least Squares: 部分的最小二乗法) にて 26 項目の回帰モデルを推定した。26 項目の SAS2600 用ローカル回帰モデル推定結果は、ホウ素が 0.89、その他の 25 項目は 0.9 以上の決定係数 (R^2) を得た (表 2.1.3-13)。得られた SAS2600 用ローカル回帰モデルを用いて東松山市の供試圃場の予測値土壌マップを作製した結果を図 2.1.3-21 に示した。SAS2600 用ローカル回帰モデル推定精度は、アウトライヤーを複数除外したことにより、分析値範囲よりもローカル回帰モデル推定に使用された分析値範囲が狭くなっている項目がある。これに該当する項目のローカル回帰モデル推定精度は、推定に使用された分析値範囲以内に対する推定精度である。よって、分析値範囲全域を対象としたい場合は、回帰モデル解析用データベースに該当するデータ (分析値と拡散反射スペクトル) を追加し、再解析で得られたローカル回帰モデルにその分析値が含まれている必要がある。推定した回帰モデルを土壌診断に適用する場合は、各項目の土壌診断基準値よりも広い範囲のデータベースで回帰モデルが推定されている必要があり、効率的に土壌診断用の回帰モデル推定用データベースを構築することが今後の課題である。

表 2.1.3-13 SAS2600 用ローカル回帰モデル推定結果

項目	単位	試料数	要因数	R^2_{Cal}	RMSE _{Cal}	Range _{Cal}	Range _{分析値}
pH	—	200/200	4	0.94	0.240	→	4.3 - 7.1
置換酸度	—	180/200	5	0.90	0.718	0.25 - 7.12	0.25 - 9.37
電気伝導率	mS/cm ³	167/200	2	0.90	0.007	0.03 - 0.09	0.02 - 0.13
CEC	me/100g	187/200	2	0.90	1.535	8.49 - 24.79	8.23 - 26.03
リン酸吸収係数	—	200/200	3	0.97	166.947	→	219 - 2690
アンモニア態窒素	mg/100g	121/200	7	0.91	0.115	0.484 - 2.352	0.211 - 2.648
熱水抽出性窒素	mg/100g	134/200	6	0.90	0.276	1.88 - 5.63	1.79 - 7.66
硝酸態窒素	mg/100g	168/200	2	0.90	0.402	0.099 - 3.896	0.099 - 16.43
全窒素	%	193/200	3	0.91	0.029	→	0.053 - 0.373
有効態リン酸	mg/100g	155/200	3	0.90	2.750	0.53 - 26.70	0.53 - 62.57
加里	mg/100g	149/200	1	0.90	1.967	5.20 - 24.31	5.2 - 41.38
石灰	mg/100g	200/200	3	0.90	42.854	→	6.07 - 436.84
苦土	mg/100g	200/200	3	0.95	7.789	→	0.88 - 88.43
石灰/苦土比	当量比	157/200	2	0.90	0.668	2.13 - 9.27	2.12 - 18.84
苦土/加里比	当量比	200/200	1	0.91	3.233	→	0.1 - 31.49
塩基飽和度	%	150/200	1	0.98	7.120	2.9 - 139.47	2.37 - 139.47
石灰飽和度	%	200/200	3	0.96	8.605	→	1.06 - 104.2
C/N比	—	158/200	8	0.90	0.380	10.102 - 15.34	9.12 - 15.83
ホウ素	ppm	100/200	7	0.89	0.055	0.59 - 1.41	0.46 - 1.74
マンガン	ppm	153/200	7	0.90	12.289	56.59 - 218.76	54.56 - 555.55
銅	ppm	193/200	2	0.91	0.973	0.31 - 9.95	0.31 - 23.55
亜鉛	ppm	140/200	10	0.90	0.880	3.58 - 17.1	3.58 - 102.85
全炭素	%	199/200	3	0.91	0.439	→	0.693 - 5.38
含水比	%	200/200	4	0.90	6.045	→	13.56 - 77.23
有機物含有量	%	200/200	2	0.95	1.398	→	5.21 - 22.34
乾燥密度	g/cm ³	200/200	3	0.95	0.039	→	0.66 - 1.17

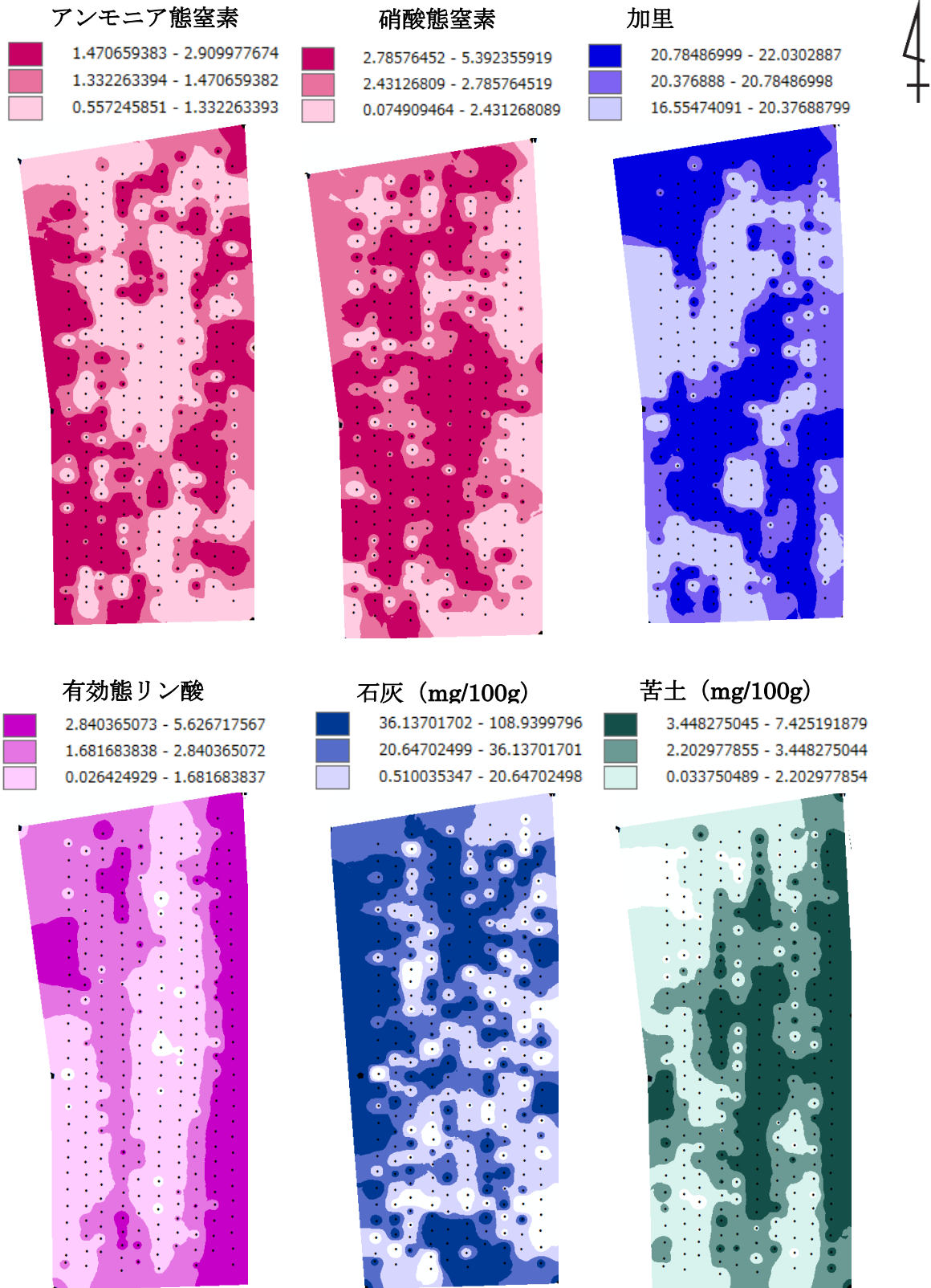


図 2.1.3-21 SAS2600 による東松山市供試圃場の予測値土壌マップの例

b-7) アムセル植林地での FieldSpec 実証試験とトラクタ搭載型土壤センシング装置との比較

2016年1月にアムセル社が導入したFieldSpecを使用して、2016年2月よりアムセル社植林地にて湿潤土壌（生土壌）59試料を採取し、生土壌の土壤拡散反射スペクトルデータを取得した。生土壌59試料は、乾燥炉法（105℃、24h）で含水比を測定した後、2mm篩通しを行った。同一サンプルを用いてトラクタ搭載型土壤センシング装置にてスペクトル測定を実施するため、2016年5月にブラジルから乾燥土59試料を輸入するために横浜防疫所に輸入禁止品の輸入許可申請を行い、許可（農林水産省指令27横植第1510号）を得て輸入した。

FieldSpec（農工大保有品）とSAS2600を用いて、輸入乾燥土59試料の拡散反射スペクトルデータを拡散反射スペクトル測定治具で測定した。輸入乾燥土59試料の有機物含有量を農工大で測定し、住化分析センターで石灰と加里、苦土を分析し、C/N比は算出した。その他の21項目は農産化学研究所にて実施した。得られた土壤データと各スペクトルデータを用いて、FieldSpecの生土壌と乾燥土用のローカル回帰モデル推定とSAS2600の乾燥土用ローカル回帰モデル推定を行った。生土壌は26項目、乾燥土は25項目（含水比除く）のローカル回帰モデル推定を行った（表2.1.3-14）。

表 2.1.3-14 SAS2600 と FieldSpec のローカル回帰モデル推定結果比較

項目	解析波長帯域:400~2450nm, 1nm間隔						解析波長帯域:500~1600nm, 5nm間隔						Range分析値
	FieldSpec(生土壌)			FieldSpec(乾燥土)			SAS2600(乾燥土)			FieldSpec(乾燥土)			
	PC	R ² _{Cal}	RMSE _{Cal}	PC	R ² _{Cal}	RMSE _{Cal}	PC	R ² _{Cal}	RMSE _{Cal}	PC	R ² _{Cal}	RMSE _{Cal}	
pH	1	0.33	0.12	7	0.70	0.08	5	0.60	0.09	1	0.37	0.12	3.8-4.8
CEC	3	0.68	0.91	7	0.88	0.55	9	0.87	0.69	13	0.89	0.52	3.3-10.6
置換酸度	8	0.78	0.92	6	0.79	0.88	5	0.73	1.02	13	0.89	0.64	3.0-13.5
電気伝導率	9	0.80	0.00	7	0.86	0.01	6	0.80	0.01	7	0.72	0.01	0.029-0.099
リン酸吸収係数	13	0.88	28.84	8	0.81	35.39	9	0.84	32.23	9	0.70	44.80	280-554
アンモニア態窒素	2	0.45	0.27	6	0.71	0.20	9	0.76	0.18	8	0.63	0.22	0.98-2.49
熱水抽出性窒素	6	0.79	0.76	7	0.90	0.81	5	0.80	0.72	6	0.77	0.78	2.1-9.9
硝酸態窒素	1	0.09	0.03	1	0.07	0.03	1	0.03	0.03	1	0.03	0.03	0.0-0.17
全窒素	3	0.59	0.02	8	0.86	0.01	9	0.85	0.01	3	0.58	0.02	0.04-0.15
有効態リン酸	1	0.16	0.10	7	0.52	0.17	7	0.54	0.17	4	0.28	0.21	0.45-1.65
加里	5	0.54	0.88	5	0.52	0.89	4	0.39	1.01	4	0.50	0.91	1.52-7.87
石灰	1	0.15	6.88	1	0.08	7.14	1	0.03	7.36	1	0.13	6.97	4.9-50.7
苦土	5	0.66	1.73	4	0.56	1.99	3	0.39	2.34	2	0.43	2.25	0.93-12.5
石灰/苦土比	2	0.51	0.74	2	0.42	0.81	4	0.42	0.80	3	0.51	0.74	1.08-6.11
苦土/加里比	8	0.60	1.06	2	0.19	1.51	2	0.13	0.03	3	0.30	1.40	1.15-8.77
塩基飽和度	1	0.13	5.12	1	0.06	5.33	1	0.05	5.35	1	0.07	0.53	5.9-39.0
石灰飽和度	1	0.11	3.71	1	0.02	3.90	1	0.02	0.00	1	0.04	3.85	2.9-28.1
銅	1	0.21	0.06	1	0.23	0.05	1	0.23	0.16	1	0.21	0.06	0.095-0.35
亜鉛	5	0.48	0.19	4	0.57	0.18	4	0.41	0.20	5	0.47	0.19	0.26-1.84
ホウ素	2	0.43	0.34	4	0.51	0.32	4	0.50	0.32	4	0.54	0.30	0.6-3.0
マンガン	6	0.33	0.27	5	0.47	0.24	4	0.27	0.28	1	0.08	0.32	0.01-2.04
有機物含有量	13	0.90	0.60	7	0.80	0.85	8	0.80	0.85	13	0.78	0.88	8.2-16.9
全炭素	6	0.79	0.26	7	0.91	0.17	8	0.86	0.21	7	0.91	0.17	0.73-3.16
C/N比	4	0.68	0.95	4	0.66	0.53	8	0.77	0.81	7	0.69	0.93	14.9-21.3
乾燥密度	3	0.49	0.04	8	0.78	0.02	9	0.80	0.02	3	0.42	0.04	0.98-1.18
含水比	7	0.64	2.65	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17.9-36.3

アムセル社植林地 59 試料のローカル回帰モデル推定精度（生土壌）は 0.11~0.90 の R² であり、国内実証試験区では 0.89 以上の R² であることから、推定精度が低い項目が存在した。この要因は、アムセル社植林地 59 試料の各項目のデータベースは、国内実証試験区よりも分析値のばらつきが少なく、試料数も少ないことから、アウトライヤー除外数が少ないことに起因するものと推察される。アムセル社と農工大の FieldSpec および SAS2600 で同じ試料の拡散反射スペクトルデータを取得していることから、25 項目のローカル回帰モデル決定係数間の相関関係を確認した結果、アムセル社（生土壌）と農工大（乾燥土）の FieldSpec 間の相関係数は 0.76 であり、農工大 FieldSpec と SAS2600 の決定係数間の相関係数は 0.9 を超え、スペクトルのピーク波形や位相も類

似していることを確認した（図 2.1.3-22）。これらの結果から、SAS2600 は、FieldSpec と同等のローカル回帰モデル推定精度がブラジルで運用しても得られる可能性を示した。

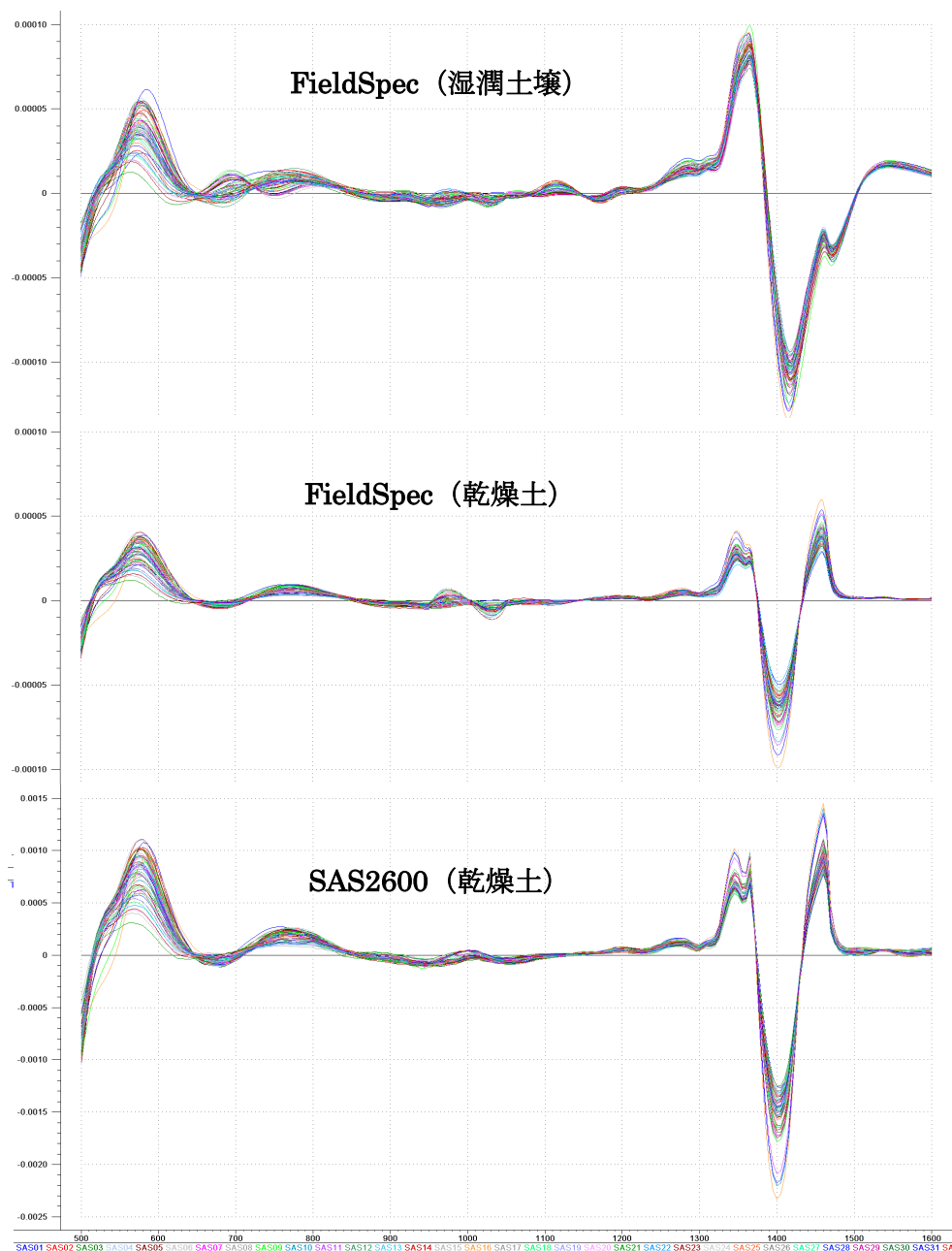


図 2.1.3-22 アムセル植林地土壌の FieldSpec（湿潤土壌と乾燥土）と SAS2600（乾燥土）スペクトル波形

b-8) 成長量予測システムの作製

アムセル植林地において、植林木の成長量予測システムを作製するために、植林木の成長量に寄与する土壌成分について調査を行った。対象試験地は、アムセル社にて成長量調査が実施されている調査プロット 40 地点とした。また、クローンによる成長性の違いによる影響を避けるため、対象地点における植栽木は同一クローンであることを確認した。成長量データは、各調査プロット 400 m² のサークル内に植栽されている植林木（約 40 本）の胸高直径と樹高より年平均成長量（MAI）を算出し、それらの平均値を各地点の生産性の値とした（図 2.1.3-23）。測定 40 地点の成長量結果を表 2.1.3-15 に示す。MAI が 8.4～46.8 と幅のある結果が得られた。成長量の高い

場所から低い場所まで幅のある結果が得られ、汎用性のある推定式の作製が可能であると考えられた。

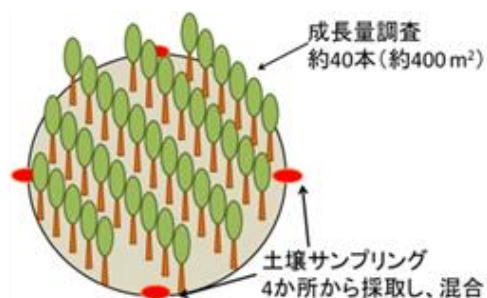


図 2.1.3-23 対象試験地のイメージ

表 2.1.3-15 成長量調査結果

	胸高直径 (cm)	樹高 (m)	MAI m ³ /ha/y
平均	13.9	21.1	29.3
標準偏差	1.7	3.1	10.3
最大値	16.8	25.8	46.8
最小値	9.8	13.7	8.4
変動係数	0.12	0.15	0.35

土壌サンプリングは、各成長量調査地点の東西南北4か所の畝間より行い、混合したものを測定地点の土壌サンプルとした。その際の土壌の深さは0-20 cmとした。含水比についてはアムセル社にて測定を行った。その他 27 項目については、ブラジルの分析機関 IBRA 社にて分析を行った。

測定地点 40 地点の土壌分析結果を表 2.1.3-16 に示す。今回の測定地点は、平均 pH が 3.85 と酸性土壌であり、粘土含有量が多く重植土であることが確認された。また、ほとんどの項目で変動係数が高く (pH を除く)、バラつきのある分析結果が得られた。また、成長量 (MAI) との相関係数を確認したところ、カリウムで緩やかな相関が確認された。一方、単一項目のみで MAI との強い相関は見られなかった。

表 2.1.3-16 土壌分析結果

	含水比 (%)	pH	有機物含有量 (g/dm ³)	全炭素 (g/dm ³)	P含有量 (mg/dm ³)	K含有量 (mmol/dm ³)	Ca含有量 (mmol/dm ³)	Mg含有量 (mmol/dm ³)	Na含有量 (mmol/dm ³)	Al含有量 (mmol/dm ³)
平均	25.3	3.85	26.3	15.2	4.75	0.35	3.35	1.90	0.22	12.72
標準偏差	5.4	0.11	8.6	5.0	2.34	0.23	2.28	1.26	0.10	3.81
最大値	36.4	4.20	60.8	35.3	19.0	1.40	13.6	6.29	0.76	27.2
最小値	13.2	3.55	11.8	6.9	0.97	0.10	2.10	0.50	0.07	3.74
変動係数	0.21	0.03	0.33	0.33	0.49	0.65	0.68	0.66	0.45	0.30
相関係数 (MAI)	-0.17	0.04	-0.13	-0.13	-0.20	-0.46	0.09	-0.18	-0.24	0.12

	H含有量 (mmol/dm ³)	アルミニウム飽和度 (%)	酸度 (mmol/dm ³)	交換性塩基総量 (mmol/dm ³)	塩基置換容量 (mmol/dm ³)	塩基飽和度 (%)	S含有量 (mg/dm ³)	B含有量 (mg/dm ³)	Cu含有量 (mg/dm ³)	Fe含有量 (mg/dm ³)
平均	54.9	69.1	67.6	5.81	73.43	8.36	22.69	0.29	0.08	69.5
標準偏差	20.1	14.3	22.8	3.37	23.39	5.11	9.31	0.07	0.08	35.5
最大値	143.7	89.6	164.5	17.1	176.2	32.1	52.3	0.54	0.75	234.4
最小値	21.8	20.6	31.2	2.87	35.64	2.93	9.38	0.13	0.05	16.8
変動係数	0.37	0.21	0.34	0.58	0.32	0.61	0.41	0.24	0.91	0.51
相関係数 (MAI)	-0.03	0.05	0.00	0.00	0.00	0.05	-0.31	0.19	-0.01	0.31

	Mn含有量 (mg/dm ³)	Zn含有量 (mg/dm ³)	全窒素 (ppm)	アンモニア態窒素 (ppm)	Cl含有量 (ppm)	粘土 (%)	シルト (%)	砂 (%)
平均	0.59	0.11	1284	379	0.02	49.1	18.2	32.7
標準偏差	0.89	0.07	705	196	0.01	14.1	3.5	15.2
最大値	9.74	0.55	7357	1094	0.03	75.4	27.7	68.4
最小値	0.12	0.05	369	90	0.01	16.3	8.9	6.7
変動係数	1.51	0.67	0.55	0.52	0.37	0.29	0.19	0.46
相関係数 (MAI)	0.18	0.04	-0.27	0.04	-0.34	-0.12	-0.17	0.14

植林木の成長量と土壌成分は複雑に関係していると考え、多変量解析による成長量予測を検討した。多変量解析ソフト「The Unscrambler X」を用いて、目的変数を成長量 (MAI)、説明変数を各土壌成分と地形情報 (標高、傾斜角) とし、PLS 回帰分析を行った。説明変数の選定には、単相関の高い項目を順次増加させて確認する増加法を採用した。その結果、推定精度 (決定係数 R²) が高かった項目を表 2.1.3-17 に示す。カリウム、硫黄、鉄、粘土含有量の 4 項目を説明変数に使用した回帰モデルにおいて、決定係数が最も高い結果が得られた (図 2.1.3-24)。

表 2.1.3-17 PLS 回帰分析結果

K含有量	S含有量	Fe含有量	粘土含有量	含水率	砂含有量	決定係数 (R ²)
○	○	○	○			0.54
○	○		○			0.40
○	○				○	0.38
○	○			○		0.32
○			○	○		0.24

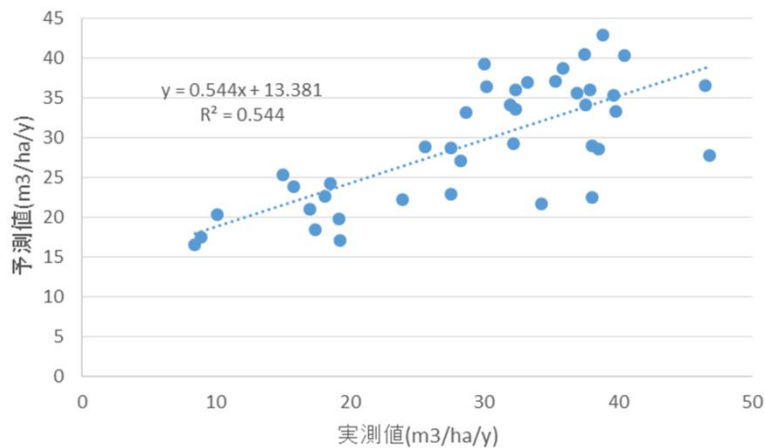


図 2.1.3-24 成長量の推定精度 (K、S、Fe、粘土含有量を項目に使用)

上記 4 項目について、アムセル植林地 111 地点から採取した FieldSpec によるスペクトルデータと土壌分析値より FieldSpec によるローカル回帰モデル推定を行った。ローカル回帰モデル推定は、2 通りの波長領域を用いてスペクトルデータを吸光度へ変換し、Savitzky-Golay 法 2 次微分にて前処理を行い、分析値と目的変数、スペクトルデータを説明変数として、PLS 回帰分析を適用した。FieldSpec (湿潤土壌) のローカル回帰モデル推定精度を表 2.1.3-18 にまとめた。作製したローカル回帰モデルは、Kuang らの文献を参考に、精度指標 (決定係数: R^2) と誤差の指標 (RPD: 標準偏差/二乗平均平方根誤差) を元に判定を行った (表 2.1.3-19)。カリウム、粘土については、波長領域に関わらず精度の高い回帰モデルが作製できた。一方、硫黄については、波長領域を 500-1600nm に絞ることにより、精度の高い回帰モデルの作製が可能であった。鉄については高いか低いかの区別は可能であるが、精度は低かった (表 2.1.3-18)。

表 2.1.3-18 FieldSpec によるローカル回帰モデルの推定精度

500~1600nm						
	N	R^2_{Cal}	RPD_{Cal}	判定	範囲(分析値)	
					最大値	最小値
K (mmol/dm ³)	67	0.97	6.25	A	0.47	0.10
S (mg/dm ³)	87	0.89	3.20	A	52.3	0.16
粘土 (g/kg)	60	0.90	3.57	A	754	89
Fe (mg/dm ³)	111	0.60	1.60	D	234.4	0.1

350~2500nm						
	N	R^2_{Cal}	RPD_{Cal}	判定	範囲(分析値)	
					最大値	最小値
K (mmol/dm ³)	64	0.94	4.14	A	0.54	0.10
S (mg/dm ³)	89	0.78	2.17	C	52.3	0.16
粘土 (g/kg)	85	0.91	3.38	A	754	89
Fe (mg/dm ³)	111	0.48	1.39	E	234.4	0.1

表 2.1.3-19 推定精度の指標

R^2	RPD	C.A.	定量的予測値として
>0.9	>3.0	A	信頼できる
0.82 - 0.9	2.5-3.0	B	使用可能
0.66 - 0.81	2.0-2.4	C	おおよその予測可能
0.5 - 0.65	1.5-1.9	D	高いか低いかの区別可能
<0.5	<1.5	E	不可能

(Kuang et al.2012)

b-9) 対象試験地の土壌マップの作製

対象試験地は、アムセル植林地において、高低差があり、成長性にバラつきが期待される場所を選定した (図 2.1.3-25, 26)。対象試験地より ha 当たり 1 地点のスペクトルデータを採取し、

FieldSpec のローカル回帰モデルを用いて、アムセル社対象試験地の土壤マップの作製を行った（図 2.1.3-27, 28）。マップ作製には、地理情報解析ソフト ArcGIS を使用した。



図 2.1.3-25 対象試験地 A (約 30ha)



図 2.1.3-26 対象試験地 B (約 35ha)

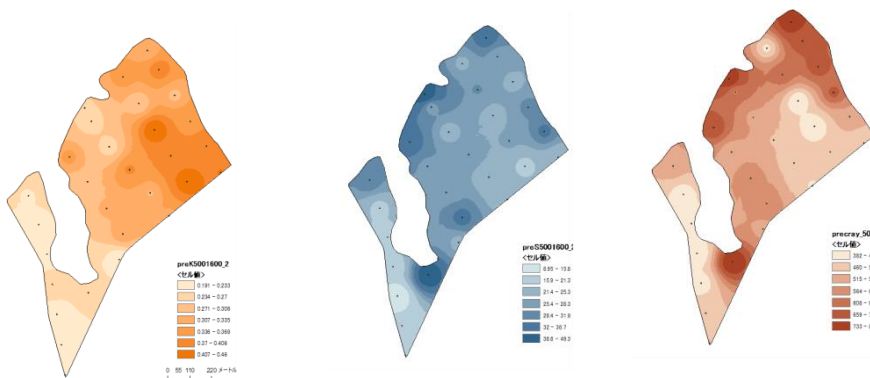


図 2.1.3-27 試験地 A (左：カリウムマップ、中央：硫黄マップ、右：粘土マップ)

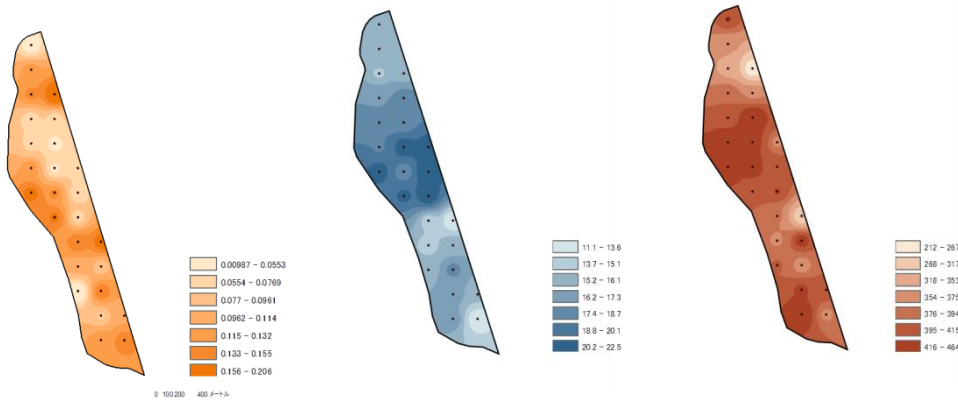


図 2.1.3-28 試験地 B (左：カリウムマップ、中央：硫黄マップ、右：粘土マップ)

b-10) 対象試験地の成長量予測

対象試験地 A 約 30ha において、成長量予測システムによる生産量の推定を行った。対象試験地 A の 30 地点からスペクトルデータを採取し、そのスペクトルデータから FieldSpec のローカル回帰モデルを用いてカリウム、硫黄、粘土含有量の推定値を算出した。それら推定値を成長量予測の回帰モデルに導入し、各測定地点の成長量を推定し、地理情報解析ソフト ArcGIS を使用してマッピングを行った（図 2.1.3-29）。

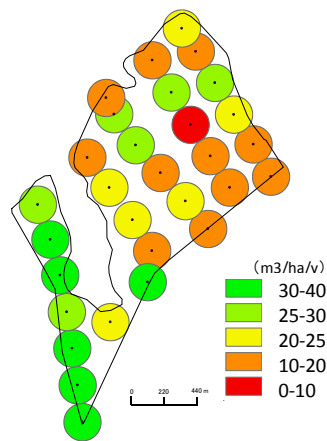


図 2.1.3-29 成長量予測（スペクトル由来）

b-11) 対象試験地における成長量予測の検証

成長量予測の検証を行うために、対象試験地 A において植栽試験を行った。2016 年 6 月中旬に植栽を行い、10 月末時点の成長量（樹高）の計測を行った（写真 2.1.3-9）。樹高の計測は、土壌測定地点の周囲 9 本の植林木の樹高を測定し、平均値を測定地点の樹高とした。その後、過去の試験データより成長量曲線を用いて、6 年目の成長量（MAI）を算出し、5 段階にクラス分けしたのち、マッピングを行った（図 2.1.3-30）。土壌から推定した成長量（スペクトル由来）と実測樹高から算出した成長量を比較したところ、成長量クラスが一致または 1 違いであった数は全 30 地点中 17 地点であり、約 6 割の精度と考えられた。



写真 2.1.3-9 樹高測定の様子（左：良好地、右：不良地）

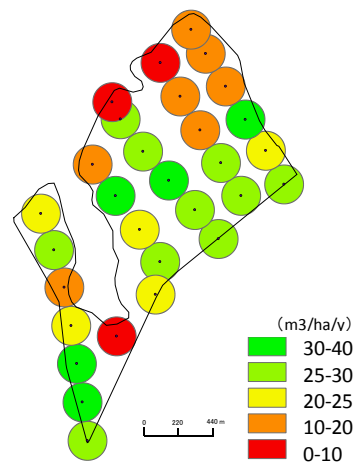


図 2.1.3-30 成長量予測（樹高由来）

b-12) 植栽運用システムのシミュレーション

既存の植栽方法では、土壌評価、土地評価を行わない為、成長量の低い土地においても植栽することが想定されている。一方、本プロジェクトにて開発した成長量予測システムを活用し、不良地には植栽せず、良好地のみを使用する植栽運用システムを用いることで、成長量がどの程度向上するか確認を行った（図 2.1.3-31）。

スペクトルから予測した結果を用いて良好地（MAI30 以上）を選択し、樹高由来の成長量結果にて、既存植栽方法（土壌評価をしない場合である全面植栽）と成長量（MAI）を比較したところ、成長量は 1.3 倍となることが確認できた。

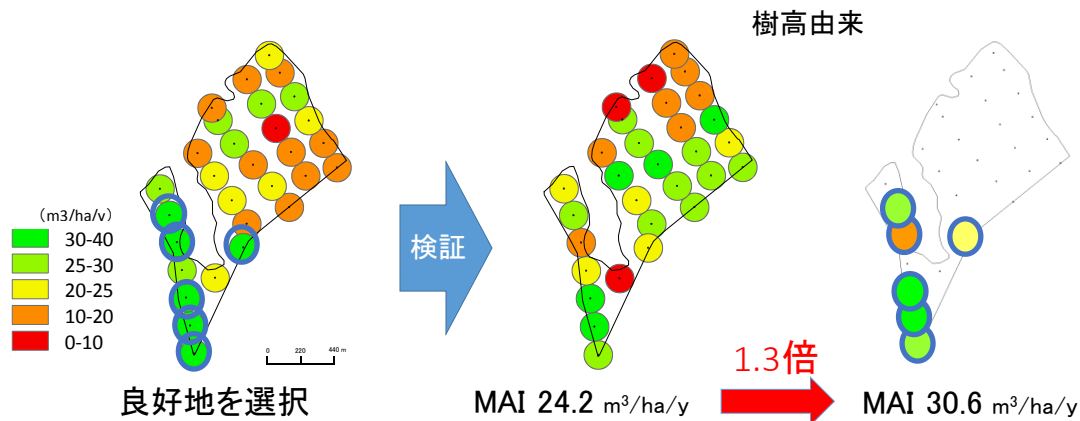


図 2.1.3-31 植栽運用システムのシミュレーション

b-13) まとめ

試作したトラクタ搭載型土壌センシング装置（SAS2600）は、国内実証試験における時速 4 km での走行による拡散反射スペクトル測定が可能であり、26 項目のローカル回帰モデル推定精度は 0.89 以上の決定係数を得た。目標とした年間 6,000 ha の効率による土壌センシングが可能な仕様であることを国内圃場で検証できた。

アムセル植林地での FieldSpec 運用実証試験では、26 項目のローカル回帰モデル推定精度が 0.11~0.90 の決定係数であった。国内実証試験の 200 データによるローカル回帰モデル推定精度よりもアムセル植林地 59 データによるローカル回帰モデル推定精度が低かった。考えられる要因は、各項目の分析値レンジ幅が国内実証試験の方が広く、かつ取得データ数が約 4 倍であり、ローカル回帰モデル推定時のアウト라이어除外数もその分多くできたことと推察される。SAS2600 は FieldSpec（乾燥土）と高い相関 ($R=0.9$)（回帰モデル決定係数間）があり、FieldSpec の湿潤土壌と乾燥土間でも相関がある ($R=0.76$)（回帰モデル決定係数間）ことが確認されたことから、アムセル植林地でも SAS2600 の運用の可能性が示唆された。よって、SAS2600 はアムセル植林地における大面積土壌評価システムの土壌観測装置としての運用に期待される。また、FieldSpec を用いたアムセル植林地の大面積土壌評価システムとしての運用も可能であることを確認した。土壌観測作業性や観測分解能を SAS2600 と FieldSpec で比較すると SAS2600 の方が大面積土壌評価システムの土壌観測装置としての有用性は高い。

アムセル植林地において、各土壌と既存ブラジル植林木の成長量との関係を調査した結果、カリウム、硫黄、粘土含有量が植林木の成長量に寄与していることが示唆された。また、これら項目について、FieldSpec にて回帰モデルを作製したところ、 $R^2=0.54$ となる回帰モデルが得られた。成長量予測システムを用いて、植栽後の成長性を事前に予測することで、最適な植栽運用が可能となった。成長量不良地を除き、良好地のみ植栽する植栽地の選択により、全面植栽する場合（通常植栽）と比較して、1.3 倍以上の成長量を得られる運用システムを構築した。

(3) 地上 3D レーザースキャナによる高精度な大面積バイオマス評価システムの開発

（担当：千葉大学, 日本製紙）

a) 研究概要（課題と目標）

バイオマス資源量を効率良く増産させるには、広大な面積の林地の効率的なモニタリングが必要だが、大面積林地のバイオマス資源量を正確に把握することは容易ではない。全面積全個体を測定するのは現実的でないため、通常は対象林地の中にいくつかの標本地を策定し、その中に生育する個体のみ測定を行い、その結果から対象林地全体のバイオマス資源量推定を行う。例えば、本プロジェクトの試験地であるブラジルのアムセル社では、約 50,000ha の植林地を対象に、5ha

もしくは10ha毎に400m²（半径11.3m）の円形プロットを設置し、プロット内の樹木すべてを計測している（図2.1.3-32）。更に材積を正確に測る際には、対象木を伐倒し、幹の形状をすべて測っているが、これらの作業には多大な労力が必要である。そこで、最新のリモートセンシング技術を用いて、森林の3次元データを取得し、そのデータを解析することで大面積のバイオマスをより効率的かつ高精度にモニタリングする技術手法の開発を課題とした。開発目標を「広範囲をより詳細に」とし、「広範囲」では無人航空機（Unmanned Aerial Vehicle、以下、UAVと記載）、「詳細」では地上3Dレーザースキャナ（以下、地上レーザと記載）という2つの最新技術を導入した。具体的な目標として、地上レーザでは、従来の調査法と比較して4倍以上の効率化および誤差3.5%以下（対伐倒調査結果）の精度となる評価システムの開発、解析部分のソフトウェア化と設定した。また、これまで定量的な評価が難しかった直立した単幹木以外の樹形（2年生未満の若齢木など）の評価システムの開発も検討することとした。一方、UAVでは30ha/日以上の高効率成長量評価システムの構築とソフトウェア化とした。



図 2.1.3-32 従来のバイオマス測定の現地調査手法

b) 研究成果

b-1) 地上レーザによる単木材積測定システムの開発

1) 機器選定

まず、様々な地上レーザセンサーの価格やスペックを比較し、本研究に最適なスペックの機材を入手した。本研究では可搬性に優れ、データ取得効率に優れている Leica 社製 Scan Station P20 という機種を導入し、3次元データを取得することとした（図2.1.3-33）。

Laser sensor	Leica Scan Station P20
レーザー波長	808 nm / 656 nm
mrاد	0.2 mrad
最大距離	120 m
垂直角	135° (+90° /-45°)



図 2.1.3-33 本研究で用いた地上レーザーセンサー（Leica Scan Station P20、右図）と現場作業の様子（左図）

2) 測定手法の検討

ユーカリ植林地で、地上レーザーによる 3 次元データを取得するために、様々なセンサー設置方法を検討した。適切なレーザー設置方法として、3 箇所所で三角形となるようにセンサーを置く方法が、様々な設置実験を試行した上で最適であることがわかった。

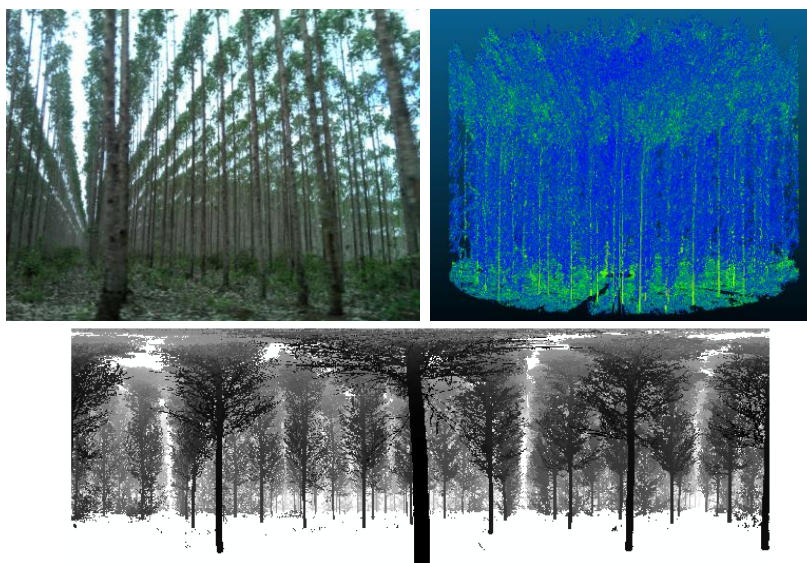


図 2.1.3-34 地上レーザーによって取得される 3 次元データ
(左上：植林地の状況、右上：3 次元点群データ、下：360 度の展開図)

地上レーザーによって取得されるデータは、3 次元に散らばる点群データであり（図 2.1.3-34）、この点群データから樹木の形状を把握するために、様々な解析を行わなければならない。まず初めに、地面からの高さを正確に計測するために、図 2.1.3-34 の 3 次元空間での点の散らばりから地面情報だけを抽出し、地形図を作成した（図 2.1.3-35）。地形図を自動で作成する手法としては、まず 0.25m のグリッドを xy 平面に作成し、各グリッド内で z 軸の高さが最小になる点だけを集め、初期地形図である Digital Terrain Model (DTM) を作成する。作成された初期地形図には、枝や幹部の一部（小さい凸部のノイズ）が混在するため、小さい凸部を取り除き、地面だけを連続的に滑らかな表面になるように独自のアルゴリズムを適用した（図 2.1.3-35）。さらに、0.25m の各グリッドで z 軸の高さが最大になる点だけを集め、Digital Surface Model (DSM) も作

成した。DSM から DTM を引くことで、樹冠の高さだけを表す表面である Digital Canopy Model (DCM) を作成した。地形図は半径 25m の範囲で作成できたため、半径 25m 以内のすべての樹木を対象に樹木計測ができるようになった。

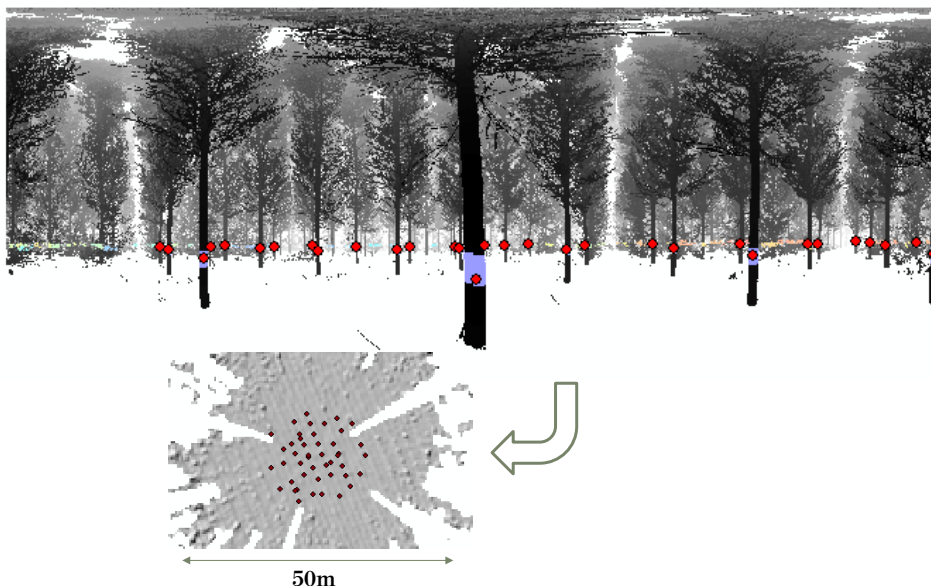


図 2.1.3-35 360 度パノラマ展開図 (上)、地形図 (左下、灰色背景) と
自動で把握できた樹木位置図 (左下、点データ)

樹木だけの 3 次元データから水平面に 360 度に展開したパノラマ図を作成し、その 360 度の図を使用して単木単位での樹木抽出を行った。パノラマ図から胸高直径の場所で樹木を自動で判別し、その場所を自動でラベル付けを行い、樹木位置図を作成した。その結果を地形図の上で点として表示できるようにした (図 2.1.3-35)。その正確性を複数のプロットで検証したところ、95% 以上の正確性で樹木を自動で判別できていることがわかった。

樹木の位置図だけではなく、樹冠部を含む 3 次元データを自動で抽出できなければならないため、作成された DCM に Watershed 法という手法を適用することで、樹木樹冠部の凹凸部を自動で色分けして単木範囲での樹冠部を自動で判別できるようにした (図 2.1.3-36)。その結果、樹木の位置図ばかりでなく、樹冠部分も含めた樹木個体の 3 次元データを容易に抽出できるようになった。

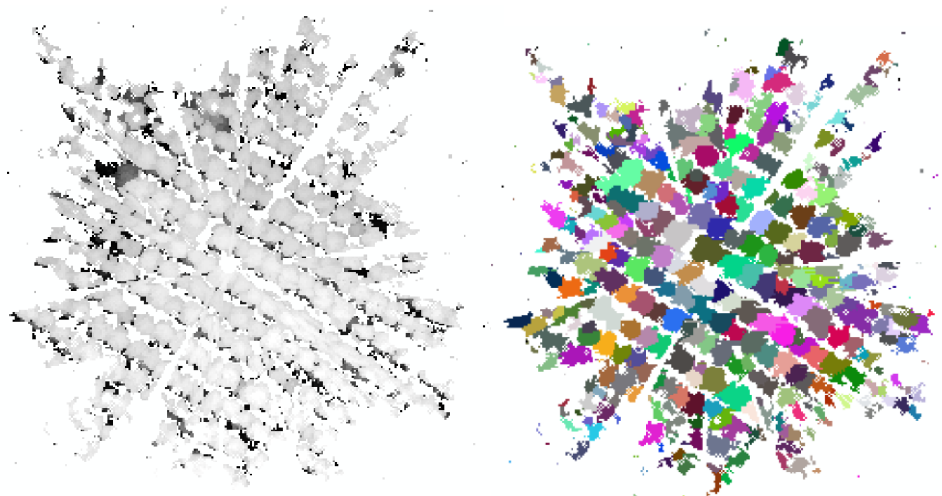


図 2.1.3-36 地上レーザーによって作成された DCM (左図) に
Watershed 法を適用して判別した単木単位での樹冠判別結果 (右図)

3) 実証試験

レーザーによる計測の正確性を実証するために、2種類のクローンを対象に、地上レーザーによる3次元データからの推定結果と伐倒によって人が幹部を計測した結果を比較した。対象木は各齢級（4段階の齢級）で3個体ずつとした。伐倒での測定では、地面から頂部まで1m毎に幹直径を計測した。1m毎の幹部形状を円錐台とし、上方断面積と下方断面積からその囲まれた体積を計算した。3次元データでの計測では、樹冠内部の細かい幹は計測せず、計測ができなくなった高さから樹高までは円錐を当てはめてデータを補完した。樹高に対して8割の高さの位置まで幹形状が3次元データから幹として判別できた。地上レーザーの精度検証のために、伐倒試験で得た材積を真値として、従来の材積調査手法である樹高と胸高直径から推定した推定値と、今回レーザーによってコンピュータ上で計測した結果から得られた値と比較し、誤差の平均である Root Mean Square Error (RMSE) で結果を検証した（表 2.1.3-20, 表 2.1.3-21）。

実験の結果、従来の材積測定では、伐倒したデータと比較したところ7.3%、7.4%の誤差が生じていたが、レーザーによる3次元データからの解析では、0.2%、2.8%まで誤差を下げる事ができた。この結果、レーザーを用いることで誤差3.5%以内で材積を推定できることが示された。

高精度の一因として、本研究に用いた独自のアルゴリズムがある。これまでの幹断面計測は、円による推定、もしくはメッシュで内挿する方法が用いられてきた。しかし、不定形の幹形状に対して、円といった定型の幾何学的形状を当てはめる手法には限界があった。また、メッシュで内挿する方法は、不定形の形状を計測できるが、データが欠損した幹形状はできない。一方で本研究に用いた独自のアルゴリズムはニューラルネットワークで用いられる Radial Basis Functions という式を採用しており、不定形の幹断面形状を表すデータに対して特異な多項式を作成する。その多項式を用いることで、どんな幹形状でも推定することができる。この方法により、幹部のデータが一部欠損したデータに対しても、外周を容易に推定することができ、さらには、不定形の幹形状に対しては、その形状にフィットする形状を推定することができるため、従来は不可能であった正確な幹形状の計測が行えるようになった（図 2.1.3-37）。

表 2.1.3-20 地上レーザーによる材積精度検証

	事業用クローンA					原因	
	実測材積	推定材積	誤差	レーザー	誤差		
2.5	0.053	0.049	-7.5	0.043	-18.3	風による影響	
	0.054	0.049	-9.3	0.056	4.9		
	0.056	0.05	-10.7	0.056	-0.2		
3.4	0.102	0.095	-6.9	0.107	5.2		
	0.087	0.087	0.0	0.087	0.8		
	0.102	0.095	-6.9	0.102	-0.1		
4.7	0.125	0.123	-1.6	0.124	-2.2		
	0.154	0.162	5.2	0.147	-1.8		
	0.15	0.147	-2.0	0.143	-4.3		
5.3	0.186	0.175	-5.9	0.185	-0.3		
	0.188	0.174	-7.4	0.150	-20.6		風による影響
	0.174	0.183	5.2	0.176	0.9		
	平均		7.5	平均	2.8	誤差3.5%以内	

↑ 誤差が大きいのは平均誤差を計算する際に除外

表 2.1.3-21 地上レーザーによる材積精度検証

	事業用クローンB					原因
	実測材積	推定材積	誤差	レーザー	誤差	
2.5	0.067	0.065	-3.0	0.067	0.1	
	0.066	0.063	-4.5	0.068	3.3	
	0.064	0.059	-7.8	0.063	-0.9	
3.4	0.108	0.103	-4.6	0.107	-0.9	
	0.109	0.100	-8.3	0.111	1.5	
	0.104	0.104	0.0	0.106	1.8	
4.7	0.162	0.164	1.2	0.163	0.7	
	0.162	0.171	5.6	0.163	0.8	
	0.183	0.175	-4.4	0.165	-9.8	風による影響
5.3	0.274	0.286	4.4	0.276	0.7	
	0.209	0.221	5.7	0.207	-0.9	
	0.226	0.269	19.0	0.235	4.0	
	平均		7.3	平均	0.2	

↑ 誤差が大きいのは平均誤差を計算する際に除外

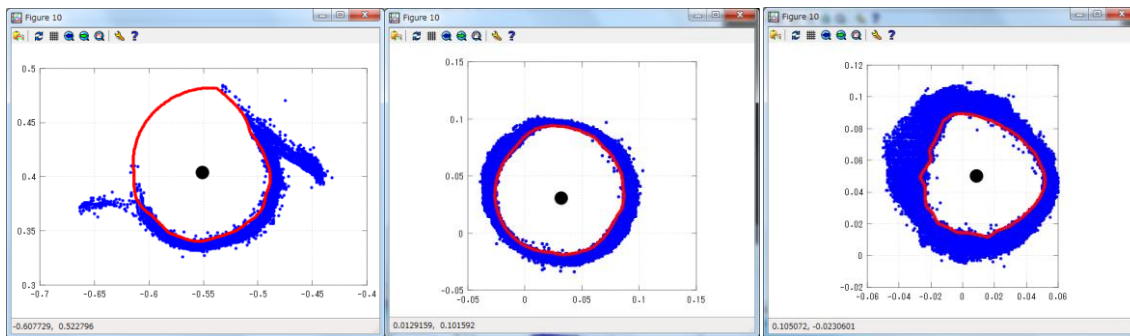


図 2.1.3-37 本研究の手法（赤線）による正確な幹断面形状の推定（左図：データが欠損している状態での幹断面形状の推定結果、中央図：円に近い幹断面形状での正確な推定、右図：少し変形している幹断面形状の正確な指定結果

3次元データを用いた解析の唯一の欠点は、風の影響である。風によって木が揺れると、その影響で3次元データを正確に取得できなくなる。風が吹いた時に取得した3次元データによる解析結果の誤差は大きく、最大で20%もの誤差が生じてしまう（表2.1.3-20, 21）。本研究の成果として、風の影響がないプロットでレーザーの性能を評価する必要があったため、風の影響があった対象木は誤差評価の対象木から除いた。大きな誤差値の原因がデータ取得時の環境条件であるため、解析手法自体が問題であった訳ではなく、材積を3次元データによる解析から正確に計測できる手法が確立できたと言える。

また作業効率も試算した。従来調査は、10haに1カ所の割合で現地調査を行っている。1カ所の面積は400m²（半径11.3m）で、それを2人で1時間かけて調査している。一方、地上レーザーでは3カ所設置して調査できる範囲を半径25mまで広げることができた。また、1カ所に必要な時間は2人で約30分であった。これらの結果より、地上レーザーを導入することで従来法と比較し、4.9倍（面積ベース）×2倍（人工ベース）9.8倍以上の現場作業効率が実現できた。一方で、地上レーザーでは取得された3次元データをオフィスにて解析する必要があるが、本プロジェクトで開発したソフトを用いれば、樹木計測がほぼ自動で行えるため、その解析時間はこの作業効率の計算には入れていない。

4) 若齢木の測定

植栽後2年生未満の若齢木について、地上レーザーを用いて材積が評価できるか検討した。従来の材積調査で扱う材積式は、樹齢が2年生以上を対象にしか作成されていない。そのため、過去の2年生未満の若齢木の成長量測定データから新たに材積式を作成した。その式で求めた材積値を真値とし（表2.1.3-22）、若齢木の成長量評価のための3次元データ解析手法を確立した。地上レーザーによる3次元データ解析は、幹の形状を取得して直接その材積（幹の体積）を推定してきたが、樹齢が1年に満たない個体は、葉が覆っているため地上レーザーによる計測でも幹と葉を区別することが難しい（図2.1.3-38）。細い幹が把握できるほど細かく3次元データを取得することが難しいため、本プロジェクトで開発した手法をそのまま適用することはできない。そこで、新たな解析手法として「ボクセル法」を用いた。ボクセル法とは、3次元空間にボクセル（立方体）をグリッド状に派生させ、各立方体の中にレーザーの点が1点でもあれば、その立方体を残すという3次元箱状データへ変換する手法である。本研究では10cmのサイズのボクセルを用いて解析を行った。樹木個体全体をボクセル化した後、そのボクセル数を把握し、2次式を当てはめることで、材積との関係を把握した。その結果、ボクセル数から若齢木の材積推定をする高い相関関係（ $R^2 = 0.97$ ）の推定式を作成することができた（図2.1.3-39）。

表2.1.3-22 幼齢木の材積値とボクセル数

樹齢	材積 (m ³ /ha)	ボクセル数
0.9	8.87	1200
3.3	51.79	2567
5	99.63	3058
6	205.70	3954
6.1	141.29	3170



樹高 5~6 m

図2.1.3-38 幼齢木の3次元データ計測

（左図中心木：従来のクローンをを用いた対象実験木、右図中心木：選抜クローンをを用いた実験木）

その式を用いて、DNAマーカー形質予測式を用いて選抜したクローン（若齢木）の成長量評価を検証した。選抜個体（精英樹78）と現事業用クローン（Control）について地上レーザーによる測定を行い、初期成長の違いを評価した。結果、選抜個体が現事業用クローンに対して2.3倍の成長量があることがわかった（図2.1.3-40）。以上より、従来法では材積計測の難しい若齢木の成長量評価を3次元データから測定する手法を確立できた。

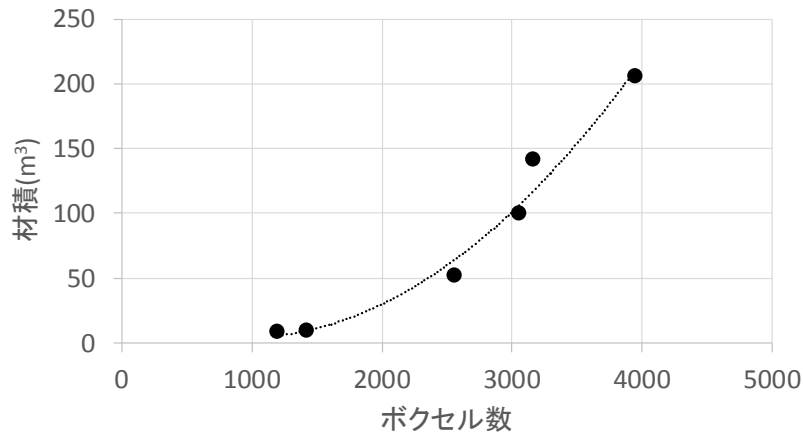


図 2.1.3-39 ボクセルを用いた幼齢木に対する材積推定結果

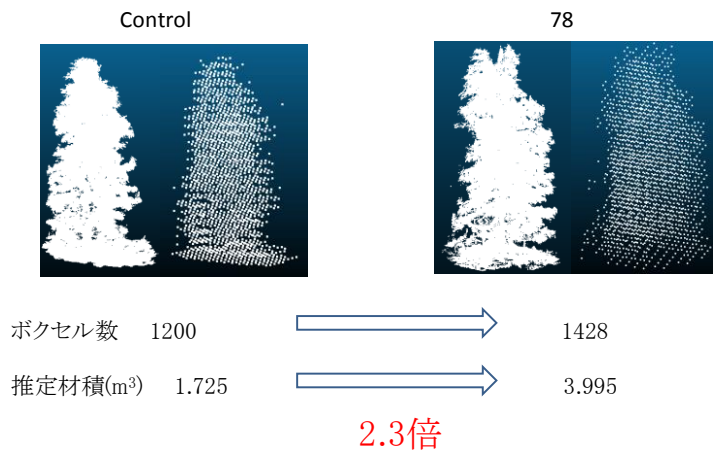


図 2.1.3-40 精英樹クローン 78 が Control (どちらも 0.9 年生) に対して成長量が 1.4 倍以上あるかどうかを検証した結果

b-2) 無人航空機による大面積評価システムの開発

1) 機器選定

UAV には固定翼、回転翼など様々なタイプがあり、値段も異なる。本プロジェクトでは、DJI 社の回転翼機である Phantom2 を使用した。回転翼機を選定した理由は、固定翼機と異なり、無操作時はその場に滞空（ホバリング）可能なため操作が容易であること、垂直な離着陸が可能なため比較的狭い場所から飛ばせることが挙げられる。更に回転翼機の中でも、必要十分な性能を有しながら、本体価格が 10 万円以下と安価であることから、Phantom2 を選定した。UAV に搭載するデジタルカメラは Nikon 社製 CoolPix A を選定した（写真 2.1.3-10）。CoolPix A を用いた理由は、様々なデジタルカメラを比較検討した結果、一眼並みの 1,616 万画素の画質で撮影ができ、単焦点で重さが 299g と軽量であり、Phantom2 に搭載できる許容量に適していたためである。



写真 2.1.3-10 本研究に用いた Phantom 2 と装着したカメラ

2) 空撮写真からの3次元データ取得方法

UAVにより取得された空撮画像から Structure from Motion (SfM) という技術を用い、3次元データに変換し、解析を行った。SfMとは、ステレオの2枚の画像から同じ場所を特定し、撮影したカメラの詳細な位置情報(2つのカメラの距離)から、カメラの焦点距離を用いて画像上での位置での視差を計算し、3次元の場所を正確に特定する写真測量技術である。空撮では、1秒毎のインターバル撮影に設定し、画像間のオーバーラップを確保しながら空撮を行うことで、多数のステレオ画像をデータ取得でき、各ステレオ画像に対して、SfM処理によりデータを3次元データとして変換した(図2.1.3-41)。本研究によるSfM処理は市販のソフトである Photoscan Professional (Agisoft社製)を用いて行った。



図 2.1.3-41 3次元データ変換(左図: UAVによる空撮によって取得された連続撮影写真、右図: 30ha以上の対象地をPhotoscan Professionalによって変換後の3次元データ)

3) 無人航空機の飛行条件および撮影条件の検討

UAVによって作成できる3次元データは、様々な条件(撮影時の飛行高度、写真のオーバーラップ率など)で異なる形状の3次元データが作成される。そのため、事前に検証実験を行い、最適な飛行高度と飛行速度を把握した。対象とした植林地は樹高20mの場所とし、様々な飛行高度と飛行速度により、写真間のオーバーラップ率を計算した(図2.1.3-42、43)。さらにPhotoscan Professionalのソフトを用いて、様々な条件でSfM処理を行い、その結果も比較し、最適な飛行高度、飛行速度を検討した(表2.1.3-23)。検証するために、特にオーバーラップ率やalign率という指標に注目した。align率とは、Photoscan Professionalのソフトが画像間マッチングを自動で行った成功率であり、align率が高いほど画像マッチングが正確に行えたことを示す。align率が高いと、作成された3次元データがより正確な形状になる。また、align率に影響を及ぼす隣接画像は、飛行方向前後で隣り合う画像と隣の飛行航路で画像の左右に位置する画像である4方向での隣接画像が3次元化に影響を及ぼしている。この予備実験の前提条件は、シャッターインターバルを1秒に固定し、隣り合う飛行コース間の距離を30mと設定した。また、用いたカメラはNikon社製CoolPix Aとした。用いたカメラの焦点距離18.5mmの単焦点であるため、長辺45.7度で、短辺31.1度の長方形範囲がカメラの画角であった。図2.1.3-42より3つの異なる飛行高度(50m、75m、100m)で撮影したカメラ位置が青色点で表示されている。表2.1.3-23より地面標高と樹木の樹冠表面部について作成されたデータに対するオーバーラップ率の検証を行った。その結果、地面も樹冠表面も飛行速度が上がると、オーバーラップ率が下がった。データ取得の成功率を重視し、飛行高度100mで80%のオーバーラップ率になる飛行速度を検討したところ、地面でも樹冠表面でも速度が秒速8m以下の時が最適であったため、本研究では飛行高度100mで秒速8mを採用し、統一してUAVによるデータ取得を行うこととした。高度100mを秒速8m

でデータを取得した場合は、一回のデータ計測できる範囲が 30ha 以上であるため、本研究のデータ取得効率の目標である 30ha 以上の植林地でのデータ取得は達成できる。

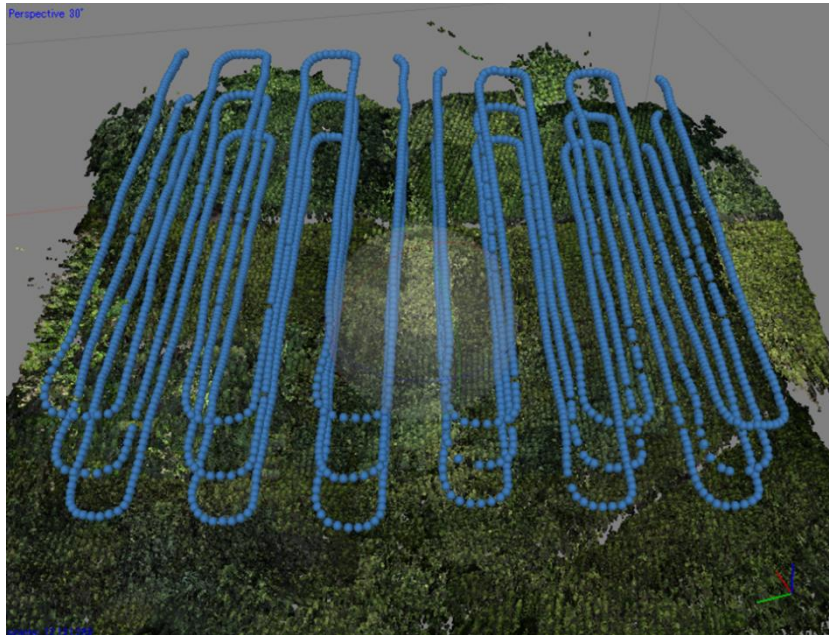


図 2. 1. 3-42 同じ対象地を飛行高度 50m, 75m, 100m と 3 段階にしてデータを取得した様子 (图中青色点は空撮したカメラの位置)

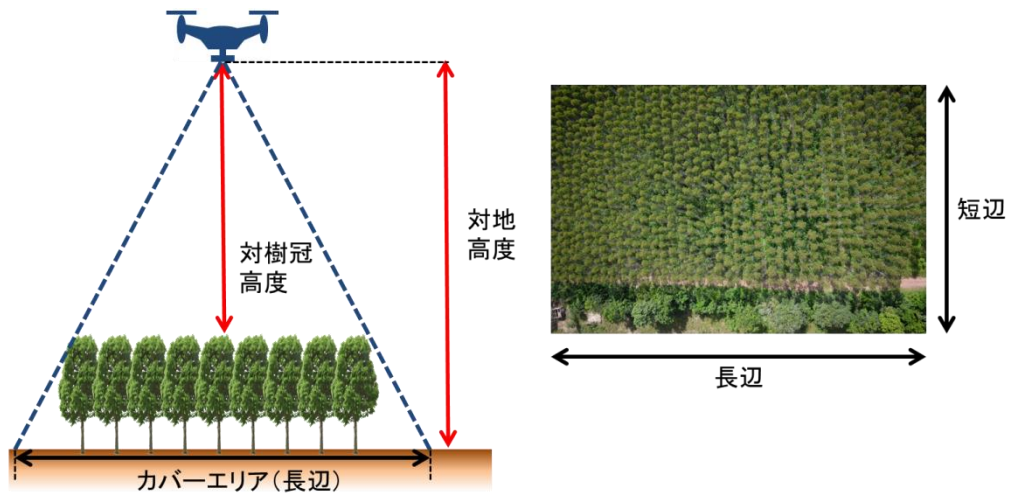


図 2. 1. 3-43 飛行高度とカバーエリア (撮影範囲) のイメージ図 (左) と実際の空撮写真 (右)

表 2.1.3-23 様々な飛行高度で撮影したデータによる詳細な解析

(黄色のセルは目標オーバーラップ 80%、サイドラップ 30%以上を示す)

		単位:m				
飛行高度		対地	50	75	100	
		対樹冠	30	55	80	
カバーエリア	地面	長辺	42.14	63.21	84.28	
		短辺	27.83	41.74	55.65	
	樹冠高	長辺	25.28	46.35	67.42	
		短辺	16.70	30.61	44.52	
align成功率			7%	16%	95%	
オーバーラップ	地面	1	96%	98%	98%	
		2	93%	95%	96%	
		3	89%	93%	95%	
		4	86%	90%	93%	
		5	82%	88%	91%	
		6	78%	86%	89%	
		7	75%	83%	87%	
		8	71%	81%	86%	
		9	68%	78%	84%	
		10	64%	76%	82%	
		11	60%	74%	80%	
		12	57%	71%	78%	
		13	53%	69%	77%	
		14	50%	66%	75%	
		15	46%	64%	73%	
	樹冠高	飛行速度	1	94%	97%	98%
			2	88%	93%	96%
			3	82%	90%	93%
			4	76%	87%	91%
			5	70%	84%	89%
			6	64%	80%	87%
			7	58%	77%	84%
			8	52%	74%	82%
			9	46%	71%	80%
			10	40%	67%	78%
			11	34%	64%	75%
			12	28%	61%	73%
			13	22%	58%	71%
			14	16%	54%	69%
			15	10%	51%	66%
サイドラップ	地面		29%	53%	64%	
	樹冠高		-19%	35%	56%	

4) 3次元画像からの材積推定方法の検討

3次元データから蓄積量を推定する方法は空中写真測量の時代から検討されており、大きく2通りの手法が考えられている(図2.1.3-44)。1つは単木の樹高と樹冠直径もしくは樹冠体積から単木材積を推定し、積算する方法である(以下、単木法と記載)。もう1つは樹冠と地面に挟まれた空間の体積が材積と相関が高いことを利用し、3次元モデルから求めた対象域の空間体積からその場所の蓄積量を推定する方法である(以下、空間体積法と記載)。単木法は個体ごとの大きさがわかるため、用材用途など径級が重要な森林に適しているが、3次元モデルから単木の樹頂点および樹冠面積を抽出する必要がある。空間体積法は単木情報の抽出が必要ないため解析は比較的容易であり、木質チップ用途のように単木の大きさが不要な森林の調査に適している。本検討では、空間体積法を用いた材積推定法を試験した。

UAV由来3Dモデル

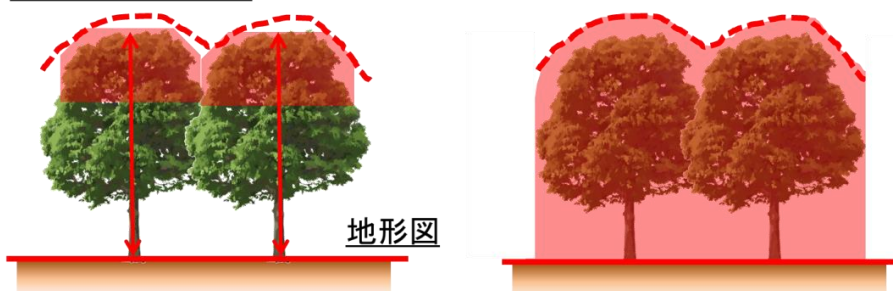


図 2.1.3-44 単木法(左図)と空間体積法(右図)のイメージ

5) 実証試験

UAVによって取得された3次元データから広域で材積を推定する手法を確立するために、UAVで取得された広域データから、従来の材積調査法で調査を行っている場所に対し、材積推定を行った。研究対象としたプロットはアムセル社有林の4区画15プロット(図2.1.3-45)で、UAVによる計測は、飛行高度100m、飛行速度8m/秒でデータ取得を行った。飛行高度や速度一定にするため、DJI社により提供されているオートパイロットを使用し、事前に飛行計画を作成し、その設定した飛行高度や飛行速度に応じてUAVが飛行するようにした。対象プロットを選定する際は、様々な材積のレンジがあるように全対象地からサンプリング調査地を抽出した(図2.1.3-46)。

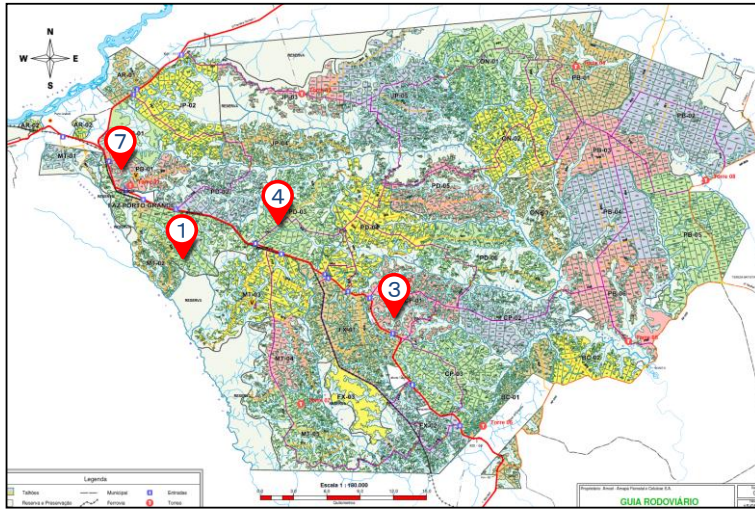


図 2.1.3-45 UAVによる材積検証実験を行った試験地の場所(背景は対象地での林班図、4地区15プロットを設定)

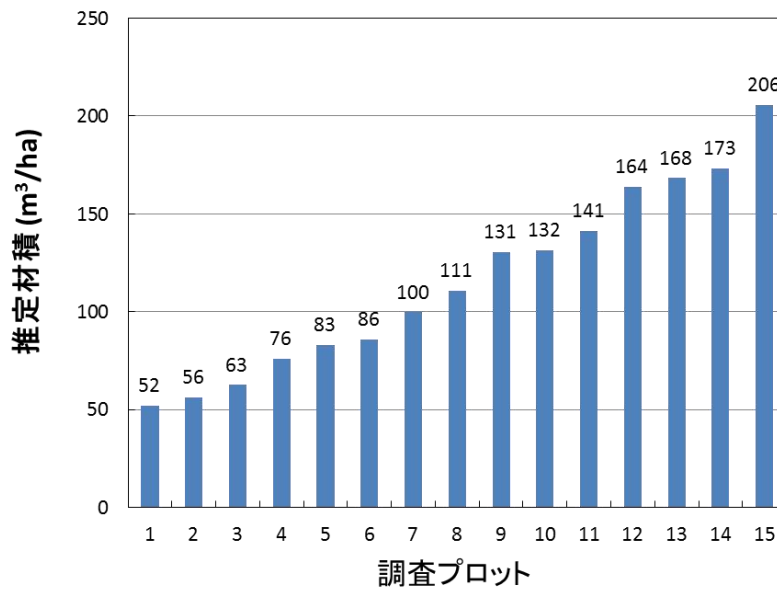


図 2.1.3-46 検証実験に用いたプロットの材積分布の様子(左図:現地計測の様子、右図:実験に用いたサイトの材積分布)

材積調査法の正確性を検証するために、15プロットのうち6プロットで、3個体ずつ伐倒調査を行った。その結果、今回の調査プロットでは材積調査法でも伐倒調査結果と非常に近い結果が確認された(図2.1.3-47)。

UAV によって広域で取得された空撮画像から、Photoscan Professional (Agisoft 社製) を用い、データを 3 次元に変換した。

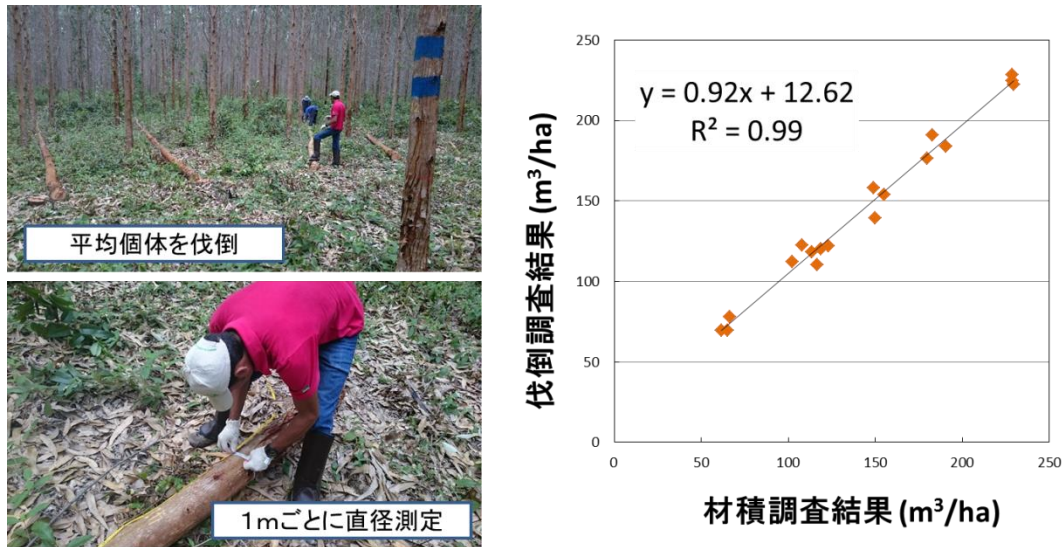


図 2.1.3-47 材積式の正確性を検証するための伐倒試験結果（左図：伐倒試験の様子、右図：検証結果）

UAV によって作成された 3 次元データから空間体積法を用いて材積推定を試みた。15 プロット (400m²/プロット) について、UAV によって作成した樹冠の 3 次元データと地形図に挟まれた空間の体積を、地理情報解析ソフトウェア ArcGIS (ESRI 社製) を用いて算出した。そうして算出された空間体積と樹高と胸高直径から推定した材積の総和との関係と比較したところ、高い相関関係 ($R^2 = 0.78$) を得ることができた (図 2.1.3-48)。これらのことから、UAV を用いた 3 次元データを用いて、材積推定を行うことができた。

この空間体積から材積を推定する一連の解析作業について、誰でも簡単に操作できるように、ソフトウェア化を行った (図 2.1.3-49)。

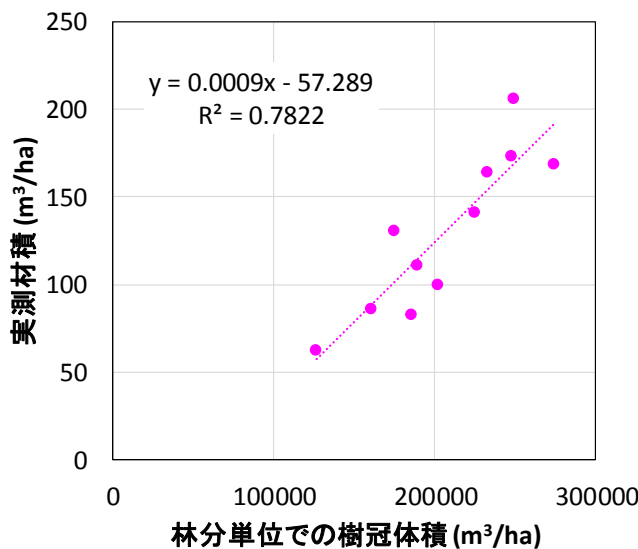


図 2.1.3-48 林分単位での樹冠体積を用いた実測の材積との検証結果

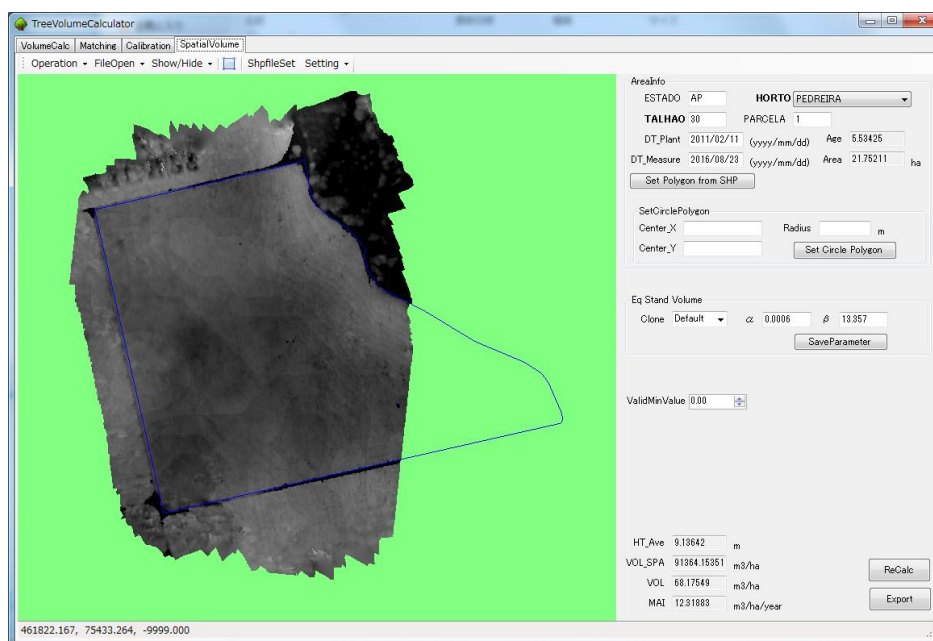


図 2.1.3-49 作成したソフトウェアの解析画面

b-3) まとめ

本研究の技術開発のおかげで、地上レーザーによる詳細な3次元データから、樹木単体の材積の高精度な評価や初期成長量の評価が可能となった。また、広域スケールでも無人航空機を用いた材積評価ができるシステムを構築した。これらの技術を用いることで、これまでよりも早急にバイオマス成長量の評価が正確にできるようになった。本プロジェクトを通して、3次元データを用いて大面積林地管理を容易にできるようになったことは、新規性や独創性が極めて高いと言える。今後、本研究対象地で継続的にモニタリングを行い、最終的に人による材積調査や維持管理から、無人航空機による全自動モニタリングシステムへと変換することも検討している。また同時に、多大な労力を要していた伐倒調査の代わりに地上レーザーを活用した3次元データからの樹木評価も行えるため、これまでよりも飛躍的に作業効率が向上した高効率林業が実現できるようになったと言える。

2.1.4 知的財産権等の取得及び成果の普及

特許、論文、対外発表等の状況を以下に示す。

年度	特許出願	論文		その他外部発表 (プレス発表等)
		査読付き	その他	
平成25年度	0件	0件	0件	0件
平成26年度	0件	0件	0件	1件
平成27年度	0件	0件	0件	3件
平成28年度	0件	0件	0件	1件
平成29年度	1件	0件	0件	2件
合計	1件	0件	0件	7件

2.2 可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発

2.2.1 研究開発の概要

第二世代バイオエタノール製造設備を建設するためには、目標とするエタノール生産量を賄うだけのバイオマスの確保、要素技術の技術マッチング、製品の供給先の確保など様々な課題を抱えている。バイオマス（原料）の前処理工程、糖化工程、発酵工程及び濃縮・脱水工程の各基盤技術で得られた成果を実用化につなげるためには、各要素工程における基盤技術を改良した上で、パイロットスケールにスケールアップした生産技術を確立し、実用化に向けた課題の改善を図っていく必要がある。本事業ではバイオエタノール製造プラント内で酵素を製造する（オンサイト酵素生産）プロセスを前提に、優れた酵素の開発、及び酵素の大量生産技術の開発を実施した。2020年の商用機スケールでの実用化に適用可能で効率的な酵素生産技術を確立し、バイオマスの効率的な利用技術の向上を図った。

オンサイト酵素生産菌として、グルコース存在下でも高いセルラーゼ生産能力も持つ変異株 *T. reesei* M2-1 を選択した。本菌はグルコース存在下であってもセルラーゼを安定生産することが可能であり、可溶性糖質であるセロビオースでセルラーゼ生産誘導が可能である。また、可溶性糖質のみで生産誘導できるため、一般的な *T. reesei* の培養で懸念される残存固形原料への吸着による酵素回収率低下も解消される。さらに、生産する成分酵素組成が培養時の可溶性糖質源組成に対応して変化するため、多様なバイオマスに対応することが可能な菌株である。ただし、本菌の生産するセルラーゼの欠点として、1分子のセロビオースを2分子のグルコースに加水分解する反応を触媒する β -グルコシダーゼ活性が弱いことが知られており、エタノール発酵性酵母などがセロビオースを利用できない場合は、本菌の生産する酵素のみではバイオマスの糖化は不十分である。そこで本菌の生産する酵素をベース酵素とする酵素カクテルによる木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素の最適化を図った。最適化するために必要な不足酵素の生産には *T. reesei* 由来セルラーゼ成分酵素や *Aspergillus aculeatus* の β -グルコシダーゼの発現実績を有する分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を酵素生産菌として選択した（図 2.2.1-1、図 2.2.1-2）。

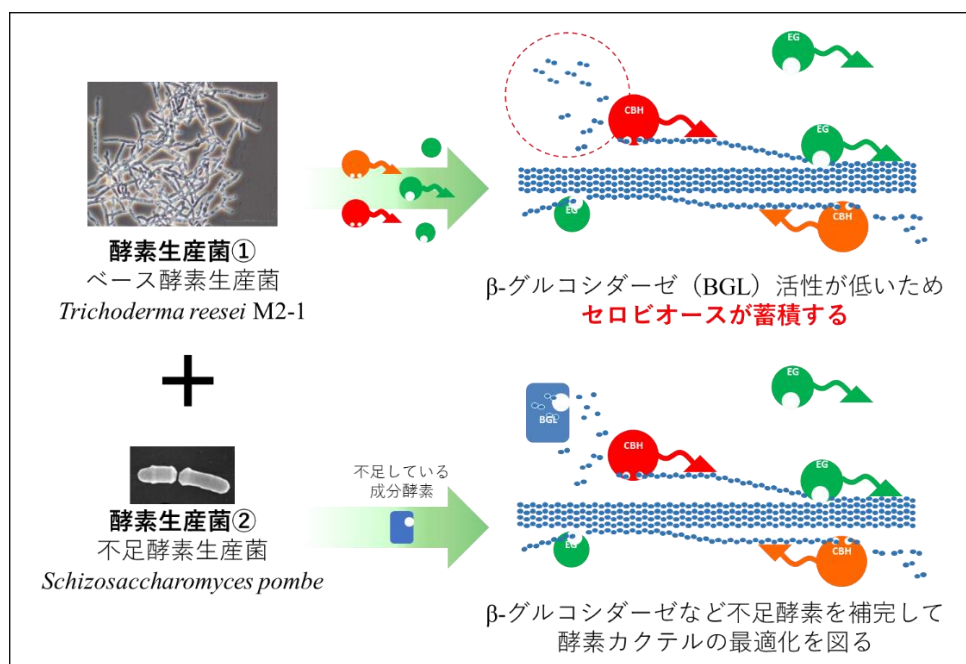


図 2.2.1-1 本事業における酵素生産菌

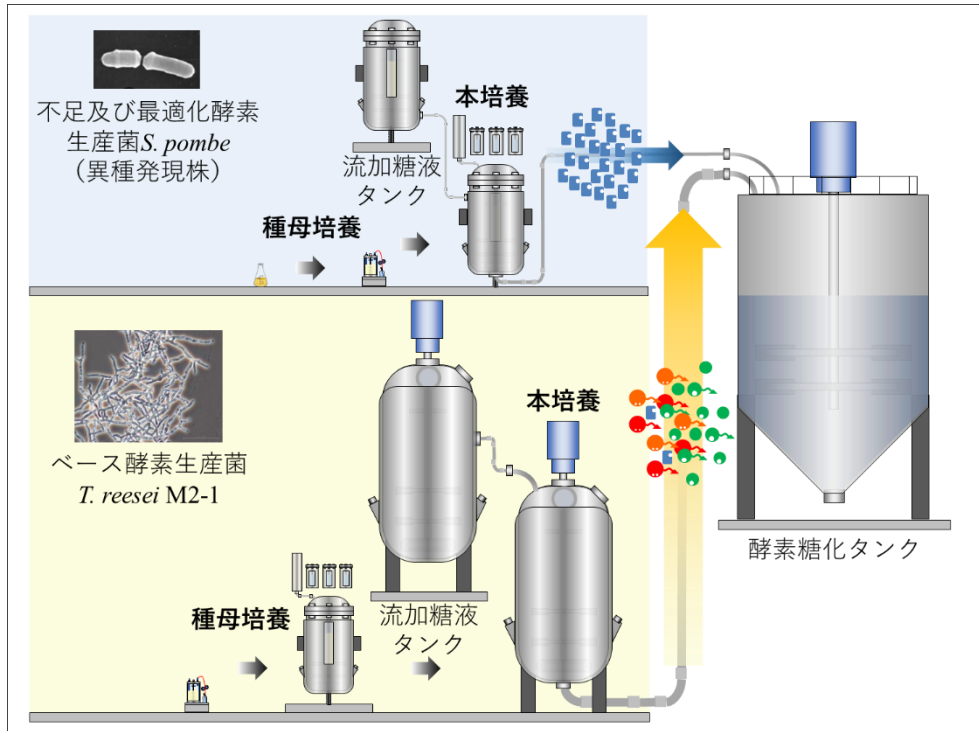


図 2. 2. 1-2 オンサイト酵素カクテル生産設備基本フロー

ベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 のセルラーゼ生産誘導炭素源であるセロビオースはグルコースやキシロースと比較して非常に高価な炭素源であり、培養基材中のセロビオースはベース酵素製造コストの多くを占める。この問題を解決するためにベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 の生産するセルラーゼの β -グルコシダーゼ活性が低いことを利用し、基質バイオマスに本菌のセルラーゼを反応させ、構成糖由来の糖とセロビオースを含む糖液の製造方法の開発にも取り組みベース酵素製造コストの削減を図った (図 2. 2. 1-3)。

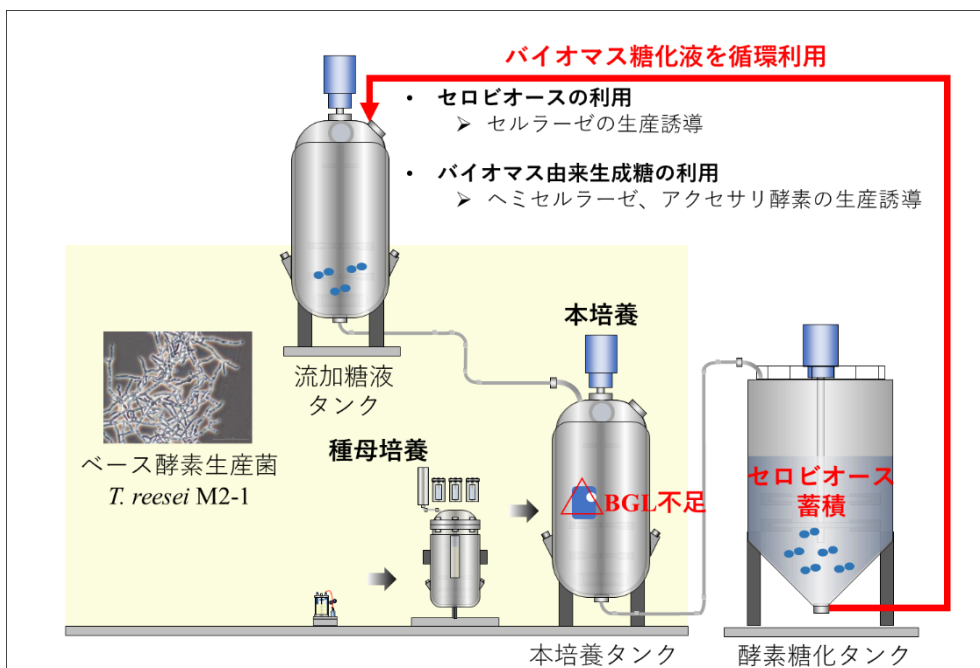


図 2. 2. 1-3 ベース酵素製造プロセス① (安価なセロビオース含有糖液の製造及び利用)

また、別アプローチとして *T. reesei* におけるセルラーゼの生産誘導効果が著しく高いとされるソホロースの酵素による合成にも着手し、ソホロースによるベース酵素の製造方法の開発にも取り組んだ。ソホロース (2-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranose) はセロビオースと比較しても非常に高価な炭素源であり、安価な製造コストを目指すためには購入するソホロースを使用することはできない。そこで我々は、*T. reesei* の持つ数種類の β-グルコシダーゼのうちソホロース合成能を持つ β-グルコシダーゼを見出し、上述の *S. pombe* に異種発現させ、ソホロースを含む糖液を安価に製造する方法の開発に取り組んだ (図 2. 2. 1-4)。

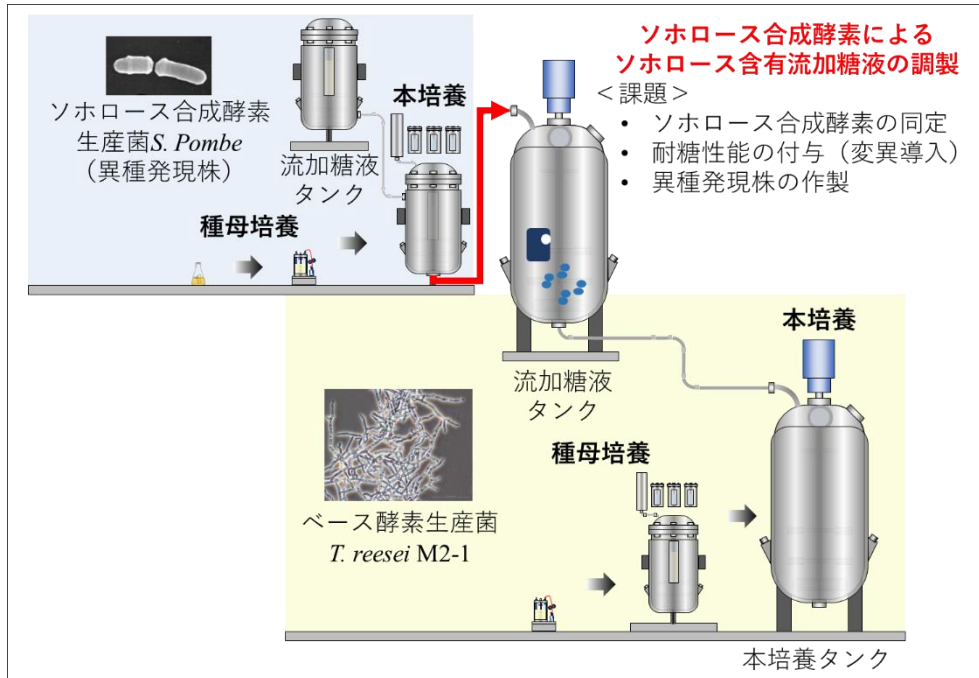


図 2. 2. 1-4 ベース酵素製造プロセス② (ソホロースの酵素合成及び利用)

バイオマスの糖組成には多様性があり、バイオマスによって必要な成分酵素組成が異なるのは自明である。つまり、基質であるバイオマスを選定しなければセルラーゼ酵素の目標の成分酵素組成は定められず、酵素開発の方向性を決めるためにはバイオマスの選定から始まると言っても過言ではない。本研究開発で使用するベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 は炭素源として使用する糖の組成を変えることで高いセルラーゼ活性を維持したまま成分酵素組成が変わることが報告されている。さらに、バイオマス糖化液の循環利用プロセスを採用することで、将来的にどのバイオマスが原料になろうとも、原料の糖化に最適な成分酵素を誘導生産することが可能であり、本研究開発成果は汎用性が高い成果であると考えられる。本事業では研究開発を加速させるために、基質を広葉樹晒クラフトパルプ (LBKP) に限定し、LBKP の酵素糖化に特化した酵素開発を行った。

我々は、1) LBKP の糖化に最適なセルラーゼの成分酵素の組成を明らかにし、2) 不足する酵素を補完し、3) 可溶性糖質源培養による大規模生産技術を確認することを目標とした。具体的には、第 2 世代バイオエタノール商業化設備における使用酵素変動費について、6 円/kg-発酵性糖 (= 10 円/L-エタノール*)以下のオンサイト酵素生産技術の確立を目指した。

*エタノール発酵効率を 1kg 発酵性糖から 0.459kg-エタノール (=0.582L-エタノール) とした場合の換算値 (エタノール発酵効率 90%)

具体的には以下の技術開発項目を設けた。

1. 木質系バイオマス由来パルプに最適な成分酵素の探索・評価

Trichoderma reesei PC-3-7、及び炭素源として使用する糖の組成を変えることで、高いセルラーゼ活性を維持したまま成分酵素組成が変わることが報告されている *T. reesei* M2-1 を用いて、LBKP の糖化に重要な酵素及び糖化補助因子の成分組成を検討する。

2. 酵素生産力及び酵素性能の改良

ベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 のセルラーゼ中に不足していることが予測される β -グルコシダーゼ及びセロビオヒドロラーゼ II、及びグルコース及びセロビオースなどの可溶性糖質源による *T. reesei* M2-1 生産粗酵素液中に不足する酵素を分裂酵母 *S. pombe* に異種発現させる。各酵素遺伝子を *S. pombe* 発現用にコドン使用頻度の最適化を実施した上で、酵素タンパク質生産性を向上させる。また、*S. pombe* に導入する酵素遺伝子に、酵素の耐熱性、グルコース耐性を付加すべく変異を導入する事により、酵素性能の改良検討を行う。結果としてラボスケール (30L 容ジャー) による *S. pombe* 及び *T. reesei* M2-1 の流加培養法において、5 円/kg-発酵性糖 (=8.6 円/L-エタノール*) 以下の酵素変動費を達成するオンサイト酵素カクテル生産設備基本フロー及び生産技術を検討する。

*エタノール発酵効率を 1kg 発酵性糖から 0.459kg-エタノール (=0.582L-エタノール) とした場合の換算値 (エタノール発酵効率 90%)

3. 可溶性糖質源培養による大規模酵素生産の技術開発

ラボスケールにおける検討結果をベースに、*T. reesei* M2-1 培養スケールを 2 kL までスケールアップし、6 円/kg-発酵性糖以下の酵素変動費を達成するオンサイト酵素カクテル生産設備基本フロー及び生産技術を確立する。また、大規模オンサイト酵素生産技術としての設備対応について、本開発酵素に対して本事業内外のバイオエタノール糖化・発酵プロセス (研究開発 or 商業) 事業者の評価を受ける等、遺伝子組換え菌の使用に対する規制内容を含めて国内外の政策・企業対応など調査を行い、適正な生産技術の確立を目指す。

本研究開発は以下の実施体制で進めた。

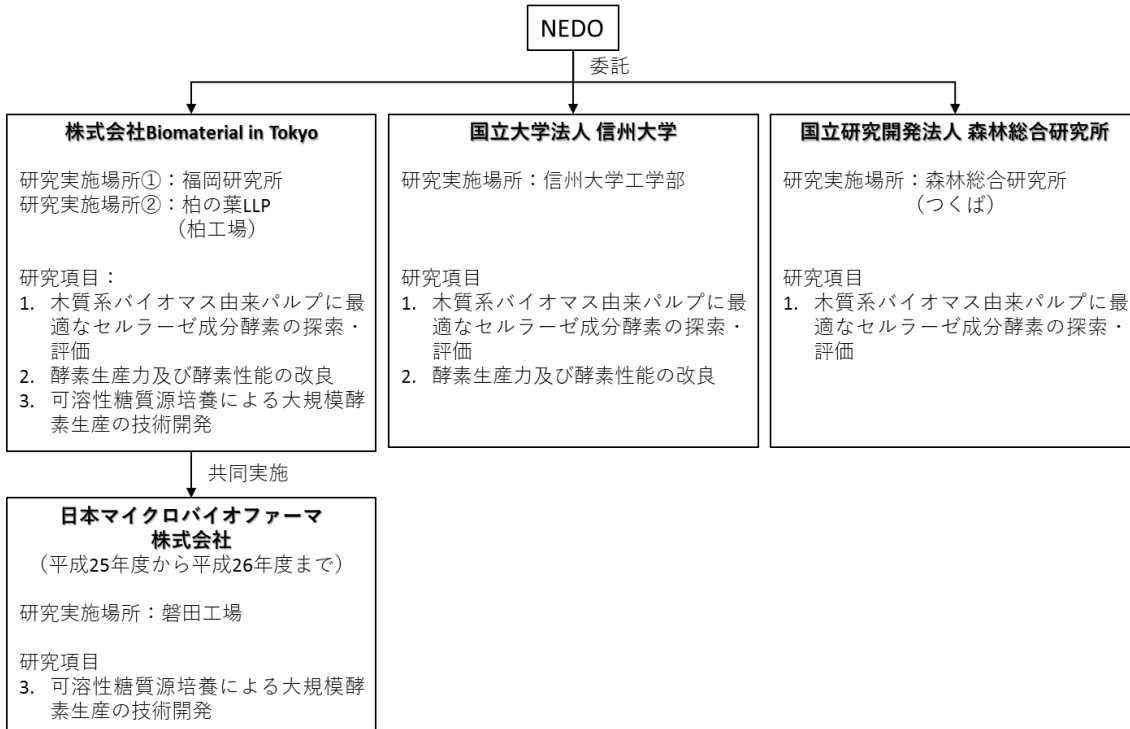


図 2. 2. 1-1 体制と役割分担

また、本事業の研究開発スケジュールを図 2. 2. 1-2 に示した。

事業項目	平成25年度				平成26年度				平成27年度				平成28年度			
	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期	第1 四半 期	第2 四半 期	第3 四半 期	第4 四半 期
1. 木質系バイオマス由来パルプに最適なセルラーゼ成分酵素の探索・評価 1-1. 最適セルラーゼ成分酵素及び補助因子の探索・評価 (BITS、信州大学、森林総研)																
2. 酵素生産力及び酵素性能の改良 2-1. 成分酵素の異種発現及び過剰発現 (BITS、信州大学) 2-2. 変異導入による酵素機能改変 (BITS、信州大学)																
3. 可溶性糖質源培養による大規模酵素生産の技術開発 3-1. パイロットおよび実機スケール生産タンクによる流加培養法・繰り返し発酵生産の検討 (BITS、MBJ (平成25年度から平成26年度まで))																
4. 推進委員会の開催				●		●		●					●	●		●

図 2. 2. 1-2 開発スケジュール

2.2.2 研究開発の目標設定

セルロース系バイオマスを原料とするバイオエタノール製造はすでに実証段階に入っており、既存技術の組み合わせによる事業性評価がなされているが、原料コスト、設備コストに次いで、糖化酵素コストがバイオエタノール製造コスト高騰要因となっており、安価で高活性な糖化酵素の生産技術開発が望まれている。糖化酵素コストの高騰理由としては、メーカー市販のセルラーゼ酵素の調達価格が高いことが第一に挙げられ、調達価格には使用場所までの輸送運搬コストが含まれることも一因である。市販のセルラーゼ酵素のタンパク質濃度は非常に高いが、それでも酵素液中の主成分は水であることは言うまでもなく、酵素を使用する立場としては無駄な成分が多い。一方で、輸送運搬費を削減するためにスケールメリットの出る取引量で酵素液を調達した場合、酵素液の保存管理コストが発生する。通常、酵素糖化工程では市販のセルラーゼ酵素は薄められた状態で使用しており、オンサイト生産したセルラーゼ酵素であれば、高濃度の酵素タンパク質溶液である必要はない。これらの背景により、バイオエタノール製造の為にセルラーゼ酵素において、輸送運搬コストを考慮しなくてよいオンサイト生産プロセスは、生産する酵素の活性当たりの製造コストが市販酵素の活性当たりの調達及び保管コストを下回ることを条件として、十分に経済性のあるプロセスである。市場原理により市販のセルラーゼ酵素の価格は今後変動することが予測されるが、現状の市販のセルラーゼ酵素の流通価格は高く、上記の条件は実現不可能な条件ではないと判断したため、オンサイト酵素生産技術開発に取り組んだ。

本事業「可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発」では、候補原料として木質系バイオマスに的を絞った酵素開発を開始したが、さらに研究開発を加速させるために木質系バイオマスのうち、広葉樹晒クラフトパルプ (LBKP) を原料 (酵素基質) とする酵素開発を実施した。本事業で使用したベース酵素生産菌 *Trichoderma reesei* M2-1 の最大の特徴はグルコース存在下であってもセルラーゼを安定生産することが可能であり、可溶性糖質であるセロビオースでセルラーゼ生産誘導が可能であるという点であるが、可溶性糖質の組成を変えることで“ある程度”成分酵素組成が最適化されたベース酵素を容易に誘導生産できるという特徴も備えている。つまり、ある程度最適化されたベース酵素に対して、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の発現系を用いた成分酵素の異種発現技術により生産される成分酵素を添加することで、“ある程度最適化”から“最適化”へ容易にチューニングできる。そのため、酵素基質を LBKP から別のバイオマスに変更したとしても同様の開発手順で各バイオマスに対する最適化酵素カクテルを調製可能である。我々の酵素生産戦略は2種類の生産菌による酵素製造プロセスであるため、設備コストが高騰することが懸念されるが、*S. pombe* の生産する成分酵素の添加量を抑え、カクテルに占める割合を 20 v/v%以下にすることで添加酵素生産設備規模を最大限縮小することを目指し、成分酵素生産技術開発に取り組んだ。

全体目標として、現時点の第2世代バイオエタノール商用化設備における使用酵素変動費調査結果として6円/kg-発酵性糖 (=10円/L-エタノール*) 以下のオンサイト酵素生産技術を確立することを目指して研究を進めた。

*エタノール発酵効率を1kg 発酵性糖から0.459kg-エタノール (=0.582L-エタノール) とした場合の換算値 (エタノール発酵効率90%)

そのための個別目標として、以下を目指した。

1 木質系バイオマス由来パルプに最適なセルラーゼ成分酵素の探索・評価（森林総合研究所、信州大学、株式会社 Biomaterial in Tokyo）

- 1.1 木質系バイオマスを炭素源としたときに、特徴的・最適なセルラーゼ酵素・糖化補助因子の成分組成を明らかにする。
- 1.2 木質系バイオマス由来パルプの最適酵素糖化において、*T. reesei* M2-1 生産酵素に不足する酵素について、その成分と必要な成分比率を明確にした酵素情報をレポート化する。

2 酵素生産力及び酵素性能の改良（信州大学、株式会社 Biomaterial in Tokyo）

- 2.1 不足酵素成分について、*S. pombe* の異種発現株を作製する。
- 2.2 生産する酵素の熱安定性、グルコース耐性、エタノール耐性について、天然型の酵素活性が MAX の 50%になる条件でも、酵素活性 80%を得ることができる変異導入酵素を取得する。
- 2.3 セルラーゼ生産の誘導炭素源となるソホロースを合成する酵素について、*S. pombe* の異種発現株を作製し、酵素生産菌培養コスト削減について、ソホロースの添加効果 MAX の培養生産技術を確立する。
- 2.4 *S. pombe* の異種発現株に対する培養条件の検討又は株の改良により、酵素生産性として 11.5 g/L を目指す。
- 2.5 30L において、5 円/kg-発酵性糖以下の酵素変動費を達成するオンサイト酵素生産カクテル生産設備基本フロー及び生産技術を確立する。

3 可溶性糖質源培養による大規模酵素生産の技術開発（株式会社 Biomaterial in Tokyo）

- 3.1 30L 容において、5L 容での酵素活性の 80%以上の活性を維持し、酵素生産コストを 80%以下に削減する。
- 3.2 2kL において、30L におけるオンサイト酵素カクテル生産技術を適用し、6 円/kg-発酵性糖以下の大規模オンサイト酵素カクテル生産技術を検証する。

2.2.3 目標と成果

1 木質系バイオマス由来パルプに最適なセルラーゼ成分酵素の探索・評価（森林総合研究所、株式会社 Biomaterial in Tokyo）

<目的>

一般的に *T. reesei* でセルラーゼを生産するための誘導炭素源にはセルロースやバイオマス前処理物などの固形物を使用する。セルロースを誘導炭素源とした場合にはセルロースを分解するための成分酵素を分泌し、バイオマス前処理物を誘導炭素源とした場合にはバイオマス前処理物を分解するための成分酵素を分泌する。つまり、木質系バイオマス由来パルプを誘導炭素源として *T. reesei* を培養することで得られる粗酵素液を調べることで、木質系バイオマス由来パルプを分解するために必要で特徴的な成分酵素を明らかにすることが可能である。本事業におけるベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 は、グルコースやセロビオースなどの可溶性糖質源のみでセルラーゼを生産することが可能な菌であるが、可溶性糖の組成を変えることでセルラーゼ生産性を維持したままへミセルラーゼの活性量を調節することが可能である。

そこで、我々は木質系バイオマスを LBKP に絞り込み、LBKP の糖化に必要な成分酵素を可溶性糖質源の組成を変化させることで、最適化させることを目的とした。

<個別目標>

- 1.1 木質系バイオマスを炭素源としたときに、特徴的・最適なセルラーゼ酵素・糖化補助因子の成分組成を明らかにする。
- 1.2 木質系バイオマス由来パルプの最適酵素糖化において、*T. reesei* M2-1 生産酵素に不足する酵素について、その成分と必要な成分比率を明確にした酵素情報をレポート化する。

<役割分担>

- ・ 各種培養液の製造及び供給（株式会社 Biomaterial in Tokyo）
- ・ 粗酵素液の解析（森林総合研究所）

<検討内容（方法と結果）>

木質系バイオマスを誘導炭素源とする *T. reesei* PC-3-7 株 (*T. reesei* M2-1 の親株) の粗酵素液と、可溶性糖質を誘導炭素源とするベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 株の粗酵素液をプロテオーム解析により比較し、活性が弱いことが知られている β -グルコシダーゼ以外で *T. reesei* M2-1 ベース酵素液中に不足する成分酵素を探索・評価した。

T. reesei M2-1 株は培養時に使用する可溶性糖の組成を変化させることで生産する成分酵素組成を変化させるため、セロビオース (G2) とグルコース (G1) のみを炭素源として調製した粗酵素液 (G2+G1)、LBKP の構成糖であるグルコース、キシロース及びセロビオースを炭素源として調製した粗酵素液 (G2+G1+Xy1)、LBKP 糖化液を炭素源として調製した粗酵素液 (糖化液+G1) を比較対象とし、LBKP を炭素源として調製した粗酵素液 (パルプ培養) と比較して生産量が少なくなっている成分酵素を探索した (図 2.2.3-1)。

解析の結果、セロビオースとグルコースのみを炭素源として調製した粗酵素液 (G2+G1) は、他のキシロースを含む糖液 (G2+G1+Xy1、糖化液+G1) 及び LBKP で調製した粗酵素液 (パルプ培養) と比較してキシラン分解系酵素群 (β -キシロシダーゼ、エキソ-キシラナーゼ、エンド-キシラナーゼ、アセチルキシランエステラーゼ) の割合が低いことが明らかになり、キシロースを

含む糖液で調製した粗酵素液（G2+G1+Xyl、糖化液+G1）にはLBKPを用いて調製した粗酵素液と比較して同等程度のキシラン分解系酵素群が生産されていることを明らかにした。つまり、キシラン分解系酵素群の触媒する酵素反応の最終産物であるキシロースによって、キシラン分解系酵素群が生産誘導されていることを明らかにし、かつ、図 2. 2. 1-3 で示したプロセスで製造されるセロビオース含有 LBKP 糖化液を使用することで、LBKP 分解に適した成分酵素組成のベース酵素を生産できることを明らかにした。

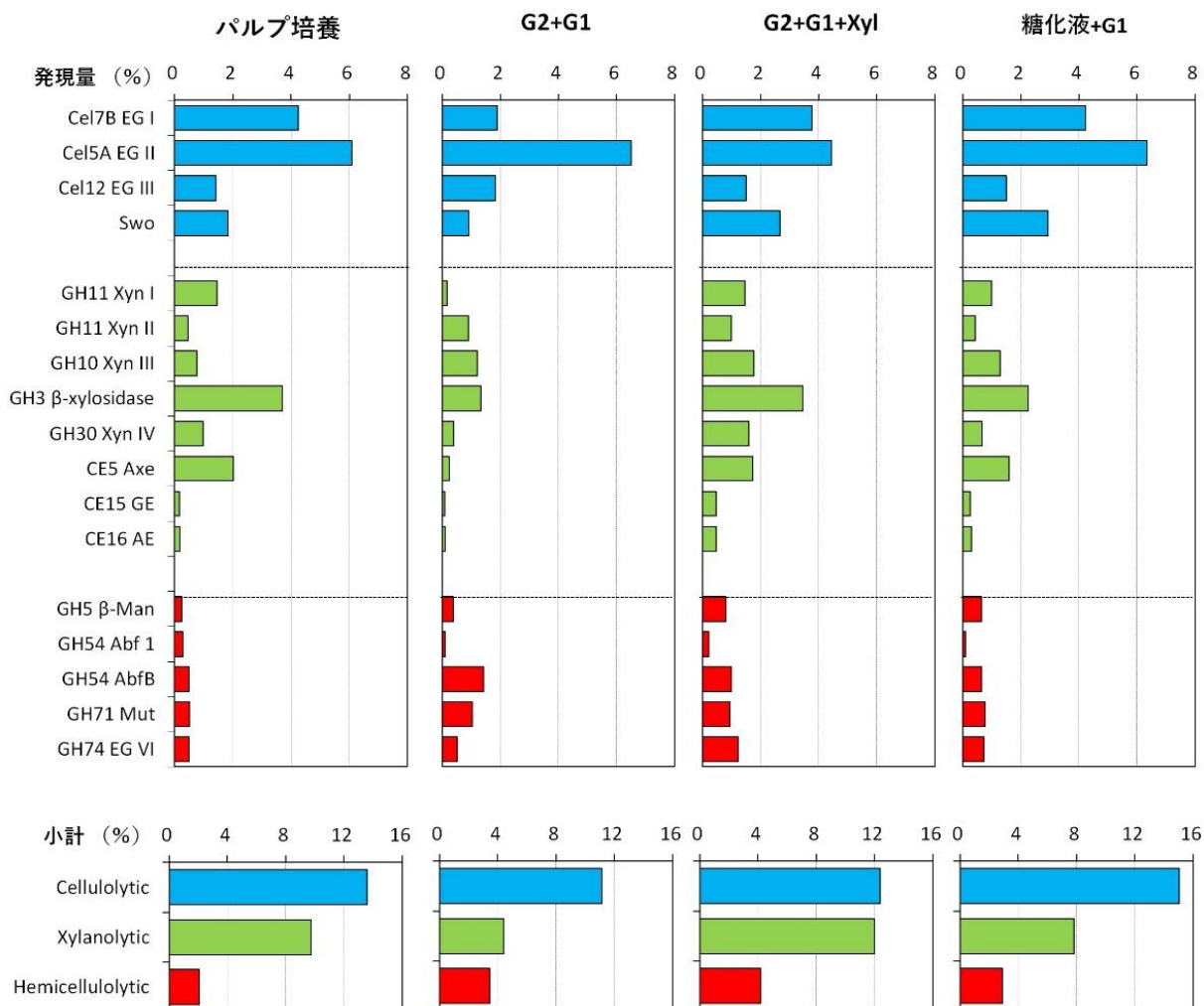


図 2. 2. 3-1 流加糖液中の炭素源組成が培養上清中の酵素組成に及ぼす影響

流加糖液中の可溶性糖質源であるキシロースの含有量は、キシロースを用いた調整糖液である場合は自在に調整可能であるが、図 2. 2. 1-3 で示すプロセスで調製する場合は LBKP の仕込み量や酵素使用量など様々な要因で変動する。そこで我々は流加糖液中のキシロースの必要量を明らかにするため、表 2. 2. 3-1 に示した炭素源組成からなる流加糖液により培養した *T. reesei* M2-1 培養上清を用いて LBKP 糖化試験を行った。*T. reesei* M2-1 のセルラーゼには β-グルコシダーゼ活性が低いことは自明であるため、LBKP 糖化試験は β-グルコシダーゼを添加して実施した。

表 2. 2. 3-1
流加糖液中の炭素源組成 (w/v%)

	G2	G1	Xyl
パルプ培養	LBKP逐次添加		
Xyl=0 (G2+G1)	5.0	45.0	0.0
Xyl=5	5.0	44.5	0.5
Xyl=10	5.0	44.0	1.0
Xyl=15	5.0	43.5	1.5
Xyl=20 (G2+G1+Xyl)	5.0	43.0	2.0

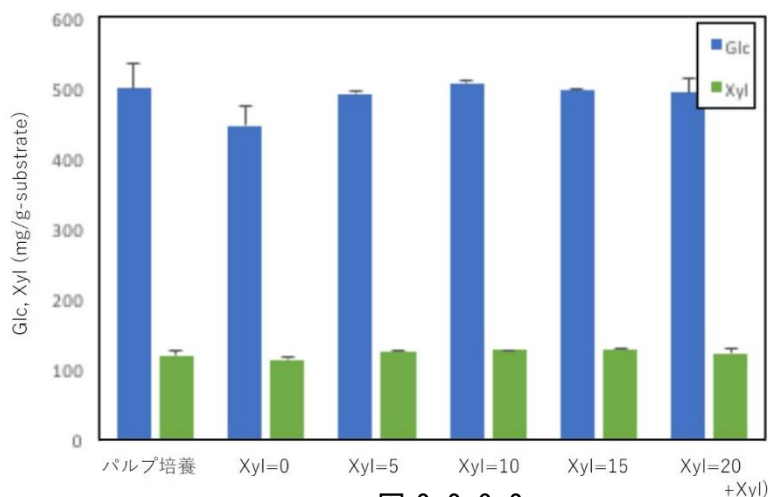


図 2. 2. 3-2

流加糖液中のキシロース濃度が
LBKP 糖化活性に及ぼす影響

検討の結果、流加糖液中のキシロース濃度が 0.5 w/v%以上で LBKP の糖化性が向上することが明らかになり LBKP を分解するために必要なキシラン分解系酵素群を生産誘導する為の流加糖液中のキシロースの閾値を明らかにした (図 2. 2. 3-2)。この結果を受け、全糖濃度 50 w/v%中に 0.5 w/v%以上のキシロースを含有する糖液を使用することで LBKP の糖化に必要なキシラン分解系酵素群を誘導できることを明らかにした。

研究開発項目	目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
1 木質系バイオマス由来パルプに最適な成分酵素の探索	1-1 1-2 <i>T. reesei</i> M 2-1 生産酵素 (ベース酵素) に不足する成分酵素を明らかにし、LBKP 糖化に最適な成分酵素組成への指針を示す。	LBKP 糖化にはキシラン分解系酵素群が必要であることを明らかにした。さらにキシロースによりキシラン分解系酵素の誘導生産が容易に行えることを明らかにし、LBKP を糖化するために必要なキシラン分解系酵素を生産誘導するために必要な流加糖液中のキシロース濃度の閾値を明らかにした。これによりバイオマス糖化液の循環利用プロセスで LBKP 糖化に必要なキシラン分解系酵素を誘導生産できることを明らかにした。	○	

2 酵素生産力及び酵素性能の改良

<目的>

ベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 は培養時の可溶性糖質源組成により高いセルラーゼ生産性を維持したままヘミセルラーゼの活性量を調節することが可能であり、この特徴を活かし、培養時の可溶性糖質源組成の調製で成分酵素組成をある程度最適化させることは可能であるが、可溶性糖質源による誘導だけでは十分な酵素量が誘導されず、基質糖化に最適化するためには更なる不足成分酵素の追加が必要な可能性もある。さらに、*T. reesei* M2-1 の生産するセルラーゼは β -グルコシダーゼ活性が低いことや、糖化反応中にセロビオヒドロラーゼ II の活性が低下することなどが知られており、それらの酵素を補完及び添加することで LBKP 糖化に対して最適化されると考えられる。これらの背景を受け、本項目ではキシラン分解系酵素群の中心酵素であるキシ

ラーゼ、そもそも活性が低いことが知られている β -グルコシダーゼ、反応中に活性が低下することが報告されているセロビオヒドロラーゼの異種発現株を作製し、生産酵素のベース酵素への補完及び添加効果を検証することを目的とした（個別目標 2.1）。また、反応中の活性低下が報告されているセロビオヒドロラーゼ II に関しては、耐熱性などを高める目的で変異導入による改良を実施し、添加効果の向上を図った（個別目標 2.2）。補完及び添加酵素については少量添加で高効率であることが生産設備規模を考える上でも望ましい。そこで、添加効果の期待される酵素については培養条件や株の改良により酵素生産性を上げ、酵素カクテルにおける *S. pombe* 生産酵素の割合を下げることを目的とした（個別目標 2.4）。

一方で、誘導効果の著しいソホロースを利用することでベース酵素製造コストを削減するベース酵素製造プロセスの開発にも取り組んだ（図 2.2.1-4）。*T. reesei* の持つ β -グルコシダーゼのうち、ソホロース合成能を持つ β -グルコシダーゼを特定し、流加糖液中で合成反応が進行するように酵素に変異を導入し（個別目標 2.2）、*S. pombe* に異種発現させ、流加糖液中で酵素反応によるソホロースの合成を行い、ソホロース含有糖液によるベース酵素製造を図った（個別目標 2.3）。

<個別目標>

- 2.1 不足酵素成分について、*S. pombe* の異種発現株を作製する。（信州大学、株式会社 Biomaterial in Tokyo）
- 2.2 生産する酵素の熱安定性、グルコース耐性、エタノール耐性について、天然型の酵素活性が MAX の 50%になる条件でも、酵素活性 80%を得ることができる変異導入酵素を取得する。（信州大学）
- 2.3 セルラーゼ生産の誘導炭素源となるソホロースを合成する酵素について、*S. pombe* の異種発現株を作製し（信州大学）、酵素生産菌培養コスト削減について、ソホロースの添加効果 MAX の培養生産技術を確立する。（信州大学、株式会社 Biomaterial in Tokyo）
- 2.4 *S. pombe* の異種発現株に対する培養条件の検討又は株の改良により、酵素生産性として 11.5 g/L を目指す。（株式会社 Biomaterial in Tokyo）
- 2.5 30L において、5 円/kg-発酵性糖以下の酵素変動費を達成するオンサイト酵素生産カクテル生産設備基本フロー及び生産技術を確立する。（株式会社 Biomaterial in Tokyo）

<検討内容（方法と結果）>

2-1 不足酵素成分について、*S. pombe* の異種発現株を作製する。（信州大学：セロビオヒドロラーゼ II (CBHII)、株式会社 Biomaterial in Tokyo： β -グルコシダーゼ、キシラナーゼ）

T. reesei M2-1 によって製造するベース酵素中の成分酵素のうち、活性が弱いことが知られている β -グルコシダーゼ、酵素反応中に活性低下が示唆されているセロビオヒドロラーゼ II (CBHII)、セロビオース (G2) 及びグルコース (G1) による生産誘導では十分に生産できない可能性のある成分酵素を分裂酵母 *Shizosaccharomyces pombe* に異種発現させ成分酵素を生産した。

具体的には各酵素遺伝子を *S. pombe* 発現用にコドン使用頻度を最適化し、酵素タンパク質生産性を向上させ、*S. pombe* による異種発現を実施した。

得られた各酵素遺伝子挿入形質転換体のフラスコ及びジャーファーメンター培養上清の酵素活性を測定し、目的の活性を確認した。後述する変異株及び複数発現カセット挿入株を含む一覧を表 2.2.3-2 に示す。

表 2.2.3-2 *S. pombe* による成分酵素の異種発現一覧 (酵素機能評価の為の別宿主による異種発現も含む)

酵素	由来生物	糖質関連酵素ファミリー	遺伝子	実施機関	変異導入	発現宿主			識別名	
						<i>S. pombe</i>	挿入発現カセット数	その他		
β-Glucosidase	<i>Aspergillus aculeatus</i>	GH3	bgl1 (cel3A)	Bits		○	1		AaBGL1	
				Bits		○	2		AaBGL1_C2	
				Bits		○	3		AaBGL1_C3	
	<i>Trichoderma reesei</i>	GH1	cel1A	信州大学					○	TrCel1A
				信州大学	○	○	1		○	二重変異 TrCel1IA
				信州大学	○				○	三重変異 TrCel1IA
xylanase	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	GH10		信州大学				○	PesXYN10	
	<i>Trichoderma reesei</i>	GH11		信州大学				○	TrXYNI	
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	GH11		信州大学				○	PesXYN11	
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> DC-4145	GH11	xynA	Bits			○	1		TIXYN
				Bits		○	2		TIXYN_C2	
				Bits		○	3		TIXYN_C3	
Bits					○	4		TIXYN_C4		
Bits					○	5		TIXYN_C5		
<i>Trichoderma reesei</i>	GH11	xyn2	Bits		○	1		TrXYN		
<i>Paenibacillus</i> sp. DG-22	GH11	xynA	Bits		○	1		PspXYN		
β-xylosidase	<i>Humicola insolens</i> Y1	GH3	xyl3A	Bits		○	1		HiXYL	
	<i>Trichoderma reesei</i>	GH3	bxII	Bits		○	1		TrXYL	
	<i>Aspergillus niger</i>	GH3	xlnD	Bits		○	1		AnXYL	
	<i>Geobacillus</i> sp. Strain W SUCF1	GH39	xyl39A	Bits		○	1		GspXYL	
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	GH43	xyl43	Bits		○	1		TIXYL	
	<i>Talaromyces emersonii</i>	CE1	axe1	Bits		○	1		TeAXE	
Acetylglucuronidase	<i>Irpex lacteus</i>	CE1		信州大学				○	IrpAXE	
	<i>Trichoderma viride</i>	GH6 with CBM1	cel6A	Bits		○	1		TvCBHII	
				信州大学		○	1		○	TrCBHII
				信州大学	○			○	InsPP TrCBHII	
	<i>Trichoderma reesei</i>	GH6 with CBM1	cel6A	信州大学	○	○	1		○	PNP TrCBHII
	信州大学	○			○			○	InsPP/PNP TrCBHII	
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	GH6 with CBM1		信州大学					○	PesCel6A	
<i>Irpex lacteus</i>	GH6 with CBM1		信州大学					○	IrpCel6A	
Mannanase	<i>Trichoderma reesei</i>	GH5 with CBM1	man5A	Bits		○	1		TrMAN	
				信州大学		○	1		AaMAN	
	<i>Aspergillus aculeatus</i>	GH5	man1	Bits		○	2		AaMAN_C2	
L-Arabinofuranosidase	<i>Bacillus circulans</i> NT 6.7	GH26	man26	Bits		○	1		BcMAN	
				信州大学		○	1		ApABF	
α-Galactosidase	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC	GH51	abfB	Bits		○	1		MvGAL	
4-O-methyl-glucuronoyl methyltransferase	<i>Mortierella vinacea</i>	GH27	agal	Bits		○	1			
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	CE15		信州大学				○	PesGE	

2-2 生産する酵素の熱安定性、グルコース耐性、エタノール耐性について、天然型の酵素活性が MAX の 50%になる条件でも、酵素活性 80%を得ることができる変異導入酵素を取得する。(信州大学)

図 2.2.1-2 に示すオンサイト酵素カクテル生産設備基本フローにおける添加酵素の候補であるセロビオヒドロラーゼ II (CBHII) と、図 2.2.1-4 に示すベース酵素製造プロセス② (ソホロースの酵素合成及び利用) におけるソホロース合成酵素である β-グルコシダーゼ (Cel1A) について、野生型酵素では CBHII は添加効果が低く、Cel1A では流加糖液中でソホロースを合成することができないと考えられたため、変異導入酵素の取得を目的とした。

Trichoderma reesei 由来セロビオヒドロラーゼ II (TrCBH II) は糖化反応中の安定性が低いことが知られている。そこで、耐熱性・熱的安定性を高める目的で変異導入による変異体酵素の作製を試みた。また、*Trichoderma reesei* 由来 Cel1A はセルラーゼ誘導に参与する β-グルコシダーゼ (BGL) であるが、強いグルコース阻害を受け ($K_i = 50$ mM)、熱および pH 安定性も本菌由来の他の BGL に比較して低い。これらの性質を改善できれば、Cel1A を用いてソホロースを合成する上で有利となる。そこで、熱安定性と Glc 耐性を高める目的で変異導入による変異体酵素の作製を試みた。

<セロビオヒドロラーゼ II (CBHII) >

高温糸状菌に分類され、高い熱安定性を有していることが報告されている *Chaetomium thermophilum* と *Humicola insolens* に由来する CBH II (CtCel6A, HiCel6A) のアミノ酸配列およびその立体構造を比較することで TrCBH II への変異導入箇所を探索した。その結果、安定性に寄与することが示唆されているループ構造内のプロリン (Pro) が CtCel6A, HiCel6A と比較し TrCBH II において少ないことが分かった。そこで TrCBH II の Ans185 と Tyr186 の間に 2 つの Pro を挿入する変異体 (InsPP 変異体) と Gly344 および Ala346 をそれぞれ Pro に置換する変異体 (PNP 変異体), その両方に変異を導入する変異体 (InsPP/PNP 変異体) を作製した (図 2.2.3-3)。

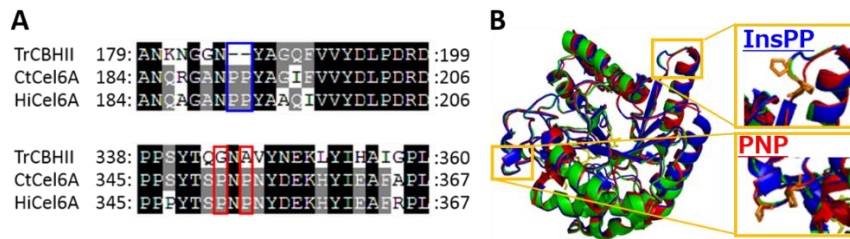


図 2.2.3-3 TrCBH II, CtCel6A, HiCel6A のアライメント (A) および立体構造比較 (B)

(A) 上段: InsPP 変異体における変異箇所、下段: PNP 変異体における変異箇所

(B) 赤, TrCBH II (PDB ID: 1CB2); 青, CtCel6A (4A05); 緑, HiCel6A (1BVW)

各変異体の温度安定性を評価した結果、PNP 変異体及び InsPP/PNP 変異体酵素は野生型や InsPP 変異体と比べ、長時間安定であり、野生型の酵素活性が MAX の 50%になる条件でも、酵素活性 80%を得ることができる変異導入酵素の取得に成功した。(図 2.2.3-4)。

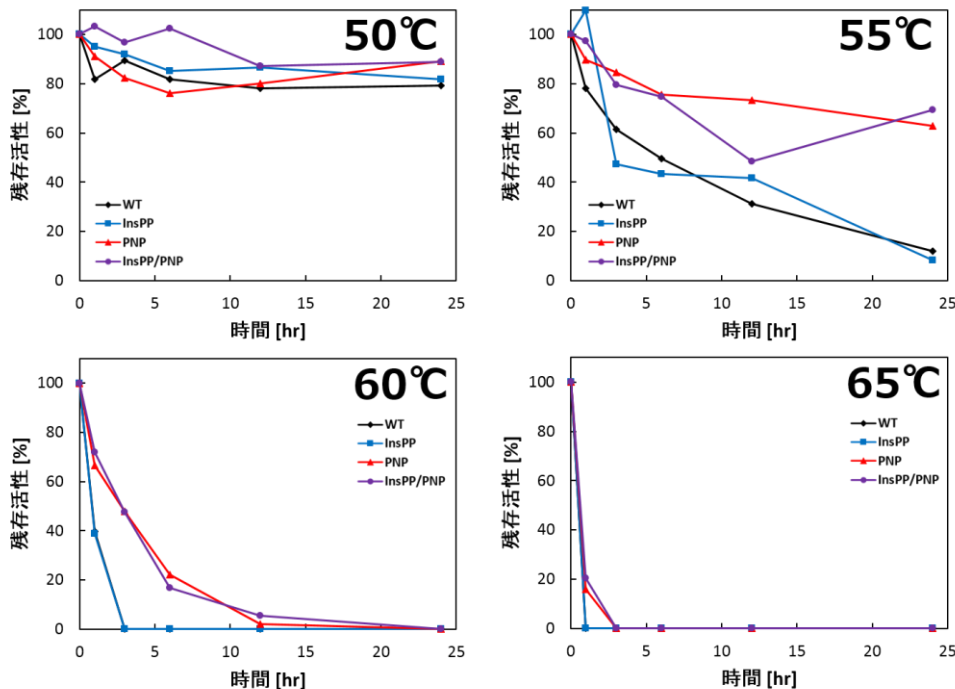


図 2.2.3-4 TrCBH II 変異体の 50°C, 55°C, 60°C, 65°C 条件における温度安定性評価

黒, 野生型 TrCBH II (WT); 青, InsPP 変異体; 赤, PNP 変異体; 紫, InsPP/PNP 変異体

<ソホロース合成酵素 (BGL, Cel1A) >

Cel1A と同じ GH1 に属する *Humicola insolens* の BGL (HiBGL) は、高い熱安定性と Glc 耐性を示し、かつ低濃度の Glc 存在下において活性化することが報告されている。HiBGL は W168、L173 および F348 が Glc と結合している構造が明らかにされており、これらアミノ酸残基が Glc 感受性に起因すると予想し、Cel1A に HiBGL 型のアミノ酸変異を導入することで酵素化学的性質の改良を試みた。これらのアミノ酸残基の位置関係を図 2.2.3-5 に示す。

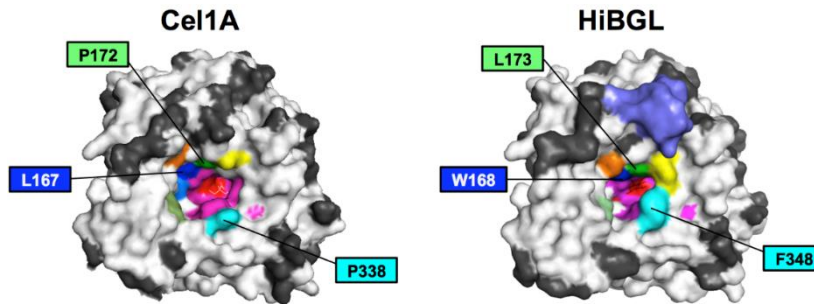


図 2.2.3-5 Cel1A と HiBGL の立体構造の比較
 図中に示した Cel1A の 3 種類のアミノ酸を HiBGL と同じものに変化させた。

3 種類のアミノ酸残基全てを変異させた三重変異酵素 (L167W/P172L/P338F) や単一変異酵素 (L167W または P172L) よりも、二重変異酵素 (L167W/P172L) が優れた Glc 感受性を示した。二重変異酵素 (変異型 Cel1A) は、HiBGL と同じように 50 mM Glc において 1.8 倍の活性化を示し、IC₅₀ (50%阻害濃度) 値も約 600 mM まで増加した。加えて、Glc 非存在下で *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (pNPG) に対する比活性を 2.4 倍まで増加させることに成功した (図 2.2.3-6)。さらに、変異型 Cel1A は、pH および熱安定性が飛躍的に向上した (図 2.2.3-7)。

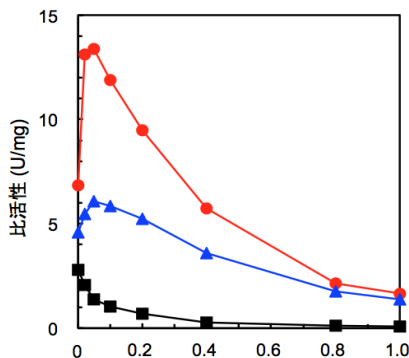


図 2.2.3-6 変異型 Cel1A の Glc 存在下での加水分解活性
 各濃度の Glc 存在下で pNPG 分解活性を測定した。

黒, Cel1A ;
 青, 三重変異酵素 ;
 赤, 変異型 Cel1A (二重変異酵素)

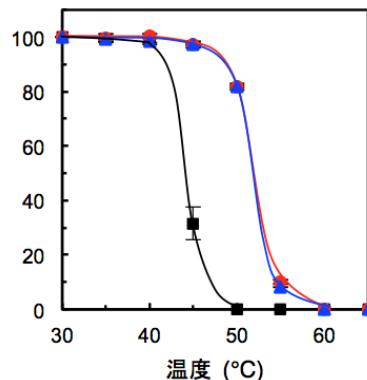
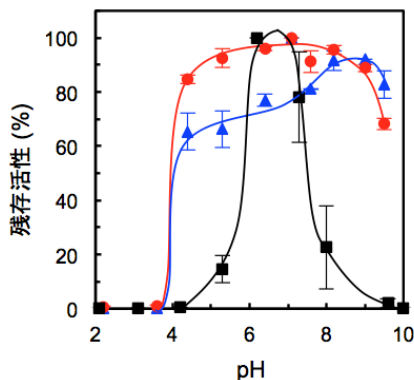


図 2.2.3-7 変異型 Cel1A の
 pH (左) および熱安定性 (右)
 各濃度の Glc 存在下で pNPG 分解活性を測定した。

黒, Cel1A ;
 青, 三重変異酵素 ;
 赤, 変異型 Cel1A (二重変異酵素)

2.3 セルラーゼ生産の誘導炭素源となるソホロースを合成する酵素について、*S. pombe* の異種発現株を作製し（信州大学）、酵素生産菌培養コスト削減について、ソホロースの添加効果 MAX の培養生産技術を確立する。（信州大学、株式会社 Biomaterial in Tokyo）

T. reesei が生産するセルラーゼはソホロース (2-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose) によって統括的に誘導生産され、誘導効果はセロビオースの 2,800 倍であることが知られている。ソホロースは高価な炭素源であるが、酵素反応によって安価に調製することが可能であればベース酵素生産コストの削減が期待できる。そこで我々は、図 2.2.1-4 に示すベース酵素製造プロセス②（ソホロースの酵素合成及び利用）の可能性について検討した。

ソホロース合成酵素について、1) ソホロース合成酵素の特定、2) 変異導入による酵素機能の改良（開発項目 2-2 で既述）、3) ソホロース合成酵素生産 *S. pombe* の作製、4) ソホロース合成酵素によるソホロース含有流加糖液の調製 5) ソホロース含有流加糖液によるベース酵素生産の検討開発項目を設けベース酵素製造プロセス②を検証した。

ソホロースは、セルロースの分解物であるセロビオース (G2) を基質として、 β -グルコシダーゼ (BGL) の糖転移反応によって合成されることが示唆されている。そこで、異種発現候補遺伝子を選定するために、*T. reesei* が有する全 BGL の酵素化学的性質を調査し、ソホロース合成に関与する BGL の特定を行った。

ゲノムデータベースの情報に基づき、本菌には 10 種類の BGL 推定遺伝子が存在することがわかった。これらのうち、GH (Glycoside hydrolase family) 1 に属す酵素は 2 種類 (Cel1A および Cel1B)、GH3 に属す酵素は 8 種類 (Cel3A、Cel3B、Cel3C、Cel3D、Cel3E、Cel3F、Cel3G、Cel3H) 存在した。GH1 BGL は大腸菌を宿主として、また GH3 BGL は麹菌を宿主として発現系を構築した。大部分の組換え BGL は、*p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG) および G2 を加水分解したが、Cel3H はタンパク質の発現は確認できたものの、pNPG と G2 に対する分解活性は存在せず、BGL ではないと判断した。以降の実験では、Cel3H 以外の 9 種類の BGL について精製を行い、調査を進めた。各 BGL の酵素化学的性質を表 2.2.3-3 に示す。

表 2.2.3-3 *T. reesei* 由来 BGL の酵素化学的性質

BGL	Protein ID ^a	分子量	至適 pH	比活性 (unit/mg) ^b	
				pNPG1	G2
Cel3A	76672	88,000	4.5	41 ± 1.70	17 ± 0.31
Cel3B	121735	108,000	3.5	36 ± 1.20	33 ± 3.60
Cel3E	76227	104,000	5.0	6.5 ± 0.08	8.6 ± 0.14
Cel3C	82227	100,000	6.0	110 ± 5.10	0.32 ± 0.03
Cel3D	46816	90,000	6.0	35 ± 1.60	0.06 ± 0.01
Cel3F	104797	130,000	4.0	12 ± 1.60	1.3 ± 0.07
Cel3G	47268	120,000	4.5	29 ± 1.70	0.79 ± 0.04
Cel1B	22197	58,000	5.5	0.48 ± 0.22	0.14 ± 0.06
Cel1A	120749	55,000	6.5	2.9 ± 0.71	25 ± 0.85

^a *T. reesei* genome database v.2.0 における ID。^b 1.25 mM pNPG1 または G2, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) および適当量の BGL からなる反応液 (0.4 mL) を 30°C で反応させた。酵素活性 1 unit は、1 分間に 1 μ mol の基質を分解する酵素量とした。

これら9種類の酵素について、10% G2を基質として反応を行い、各酵素の糖転移能力を変換率（消費したG2に占める糖転移性生物の割合）で示した（図2.2.3-8）。図に示す4種類のBGL（Cel3A、Cel3B、Cel3EおよびCel1A）において糖転移生成物が確認された。その中でも、特にCel1Aにおいては反応72時間で約10%の変換率でソホロースが合成されることが明らかとなった。すなわち、1gのG2から約50mgのソホロースが合成された。糖転移反応を起こすBGLに共通する特徴は、いずれも基質G2に対する比活性がpNPGよりも高いことや、合成された二糖類に対する分解活性は他の二糖類の値よりも低く、二次的な加水分解を受けにくいことであった。

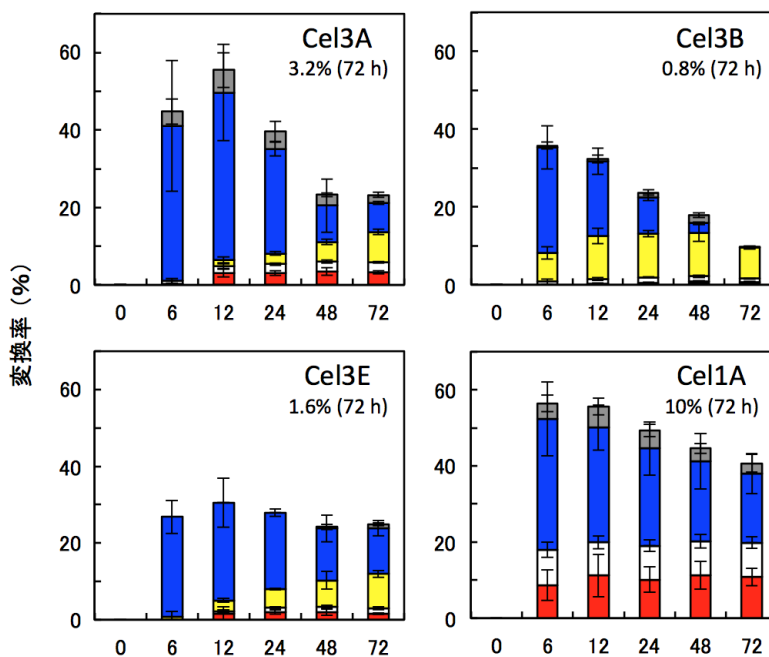


図 2.2.3-8 BGL による糖転移生成物の継時的変化

灰色, G4; 青, G3; 黄色, ゲンチオビオース; 白, ラミナリビオース; 赤, ソロホース

以上の結果を受け、10種のBGLのうちCel1Aをソホロース合成酵素と特定し、当該酵素遺伝子に変異を導入し変異型Cel1Aを獲得した（検討内容2-2で既述）。ソホロース合成能力を調査した結果、変異型Cel1Aでは野生型Cel1Aと比較して、等量のソホロースを合成するための酵素使用量を1/32にまで削減することが可能となった。

結論として、変異導入により野生型酵素のソホロース合成能力を保持しつつ、比活性や安定性を大幅に向上させたソホロース合成酵素（Cel1A）を作出することに成功した。続いて、変異型Cel1Aの分裂酵母*S. pombe*による異種発現を実施し、形質転換体を取得した。当該酵素によるLBKP糖化液（グルコース、セロビオース、セロオリゴ糖、キシロース含有糖液）に対するソホロース合成能を確認し、調製した糖液中には*T. reesei*に対しての誘導最適濃度とされる1mMの約40倍の濃度のソホロースが合成されていることを確認した。

しかし、ソホロース合成酵素の特定及び異種発現の達成が事業最終年度末であったため、事業目標であるソホロースの添加効果MAXのベース酵素生産菌*T. reesei* M2-1培養生産技術を確立するには至らなかった。現在、当該酵素により調製するソホロース含有LBKP糖化液によるベース酵素生産菌*T. reesei* M2-1の培養検討を実施している。

2.4 *S. pombe* の異種発現株に対する培養条件の検討又は株の改良により、酵素生産性として 11.5 g/L を目指す。(株式会社 Biomaterial in Tokyo)

分裂酵母 *S. pombe* 培養条件検討は、 β -グルコシダーゼ (AaBGL1) 生産株 (挿入発現カセット数 1) を用いて実施した。フィードフォワード法による流加培養法によって酵素生産を実施し、培養プロセスはフリーズストック→第一種母培養 (フラスコ)、第二種母培養 (ジャーファーメンター)、本培養 (ジャーファーメンター) の 3 段培養とした。培養基材の価格調査及び培養検討による改良により培養にかかるコストは事業開始時と比較して 45%以下に削減し、流加演算式の最適化を含む培養条件の改良により培養液当たりの活性は事業開始時の 2~3 倍程度に上昇した (図 2.2.3-9)。

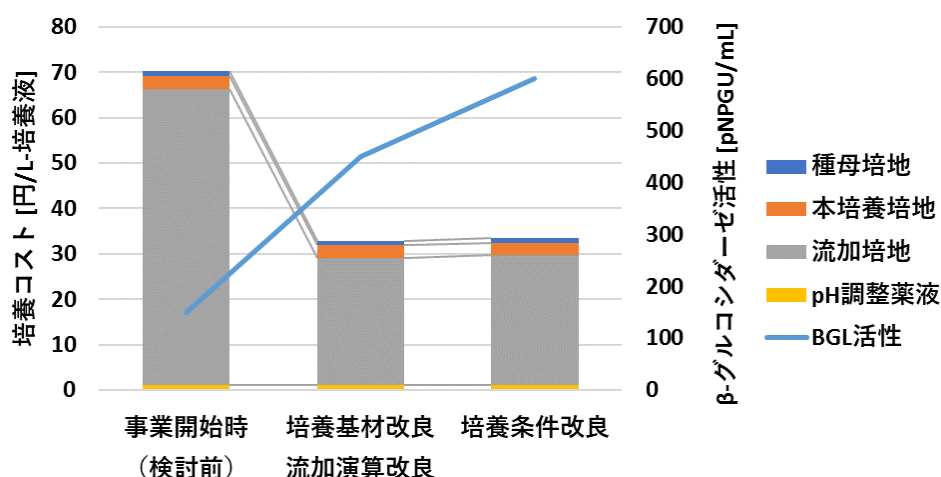


図 2.2.3-9 酵素変動費及び BGL 活性推移
(培養検討株 : AaBGL1 生産 *S. pombe* (挿入発現カセット数 : 1))

培養条件の検討と並行して酵素生産株の改良も進んでおり、挿入発現カセットのマルチ化により親株 (挿入発現カセット数 1) の 3 倍の生産性を示す株の取得に成功した (図 2.2.3-10)。培養基材にコーンステープリカーを使用したため、Lowry 法による正確な酵素タンパク質量は定量出来なかったが、培養方法の最適化と生産株の改良を合わせて 6 倍以上の生産性向上を達成した。これにより 2.6 で示すカクテル中の *S. pombe* 生産酵素の割合は 20v/v%にまで削減され、酵素カクテル製造コスト削減及び製造設備の縮小に貢献した。

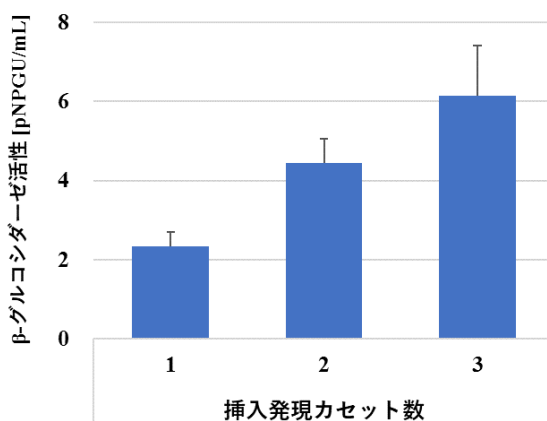


図 2.2.3-10 β -グルコシダーゼ生産株の発現カセット挿入数と培養上清の活性

2.5 30Lにおいて、5円/kg-発酵性糖以下の酵素変動費を達成するオンサイト酵素生産カクテル生産設備基本フロー及び生産技術を確立する。(株式会社Biomaterial in Tokyo)

S. pombe で異種発現及び生産する成分酵素のうち、セロビオース (G2) とグルコース (G1) のみでは誘導生産ができないキシラナーゼは、ベース酵素生産条件 (LBKP 糖化液の循環利用など) により容易に誘導可能であることが明らかになった。また、糖化反応中の安定性が低いために反応途中の添加により糖化性の向上が期待されるセロビオヒドロラーゼ II (CBHII) は *S. pombe* における生産量が低く、有効な添加効果を示すためには酵素液の濃縮が必要であり現時点では使用できる水準ではない。一方、 β -グルコシダーゼは *S. pombe* における生産性も高く、少量添加することにより FPase 及び基質分解能が向上することが明らかになった。これらの背景を受け、LBKP 糖化液を用いてキシラン分解系酵素を誘導生産したベース酵素と β -グルコシダーゼの酵素カクテルを調製し、LBKP の糖化試験を実施し酵素変動費を評価した。酵素液はともに 30L-ジャーファーメンターによる培養で調製した。

本項目で評価するベース酵素は図 2.2.1-3 の製造プロセス (LBKP 糖化液循環利用) で製造されたベース酵素であり、LBKP 糖化液を利用することで製造コストが 21.4 円/L-培養液まで削減されている。一方で、 β -グルコシダーゼは挿入発現カセット数 1 の生産株の培養検討により製造コストが 33.4 円/L-培養液まで削減されており、挿入カセット数のマルチ化により生産性が 3 倍程度に増加した生産株の取得に成功した。挿入発現カセット数 1 の生産株の 30L ジャー培養の培養上清の活性値は 600 pNPGU/mL 程度であるが、生産性向上株を用いることで 1,800 pNPGU/mL 程度の活性が期待できる。今回は 1,000 pNPGU/mL の β -グルコシダーゼ酵素液を調製し、ベース酵素との酵素カクテルの調製に利用した。

目標値は事業全体の目標である酵素変動費 6 円/kg-発酵性糖 (10 円/L-エタノール*) より低い 5 円/kg-発酵性糖 (8.6 円/L-エタノール*) とした。酵素液カクテルの混合比はカクテルの FPase 活性値を指標にし、各混合比の活性当たりの酵素製造コストを比較し、ベース酵素:*S. pombe* 生産 β -グルコシダーゼの存在比が 79.2 : 20.8 となるような酵素カクテルを調製した。酵素カクテルの製造コストは存在比から酵素カクテル 1 リットル当たり 23.9 円となった。

基質濃度や攪拌条件などの酵素使用条件は酵素を評価するうえで非常に重要な要因である。今回は基質濃度実用化時の基質濃度を 5~20 w/v%と想定し、カクテル酵素の評価を実施した。また、攪拌条件はタンクにおける攪拌翼による攪拌を想定しているが、30L タンクにおける攪拌翼による攪拌条件とボトルにおける旋回式振盪による攪拌条件で LBKP 糖化効率に変化がないことが確認できたため、今回の試験は旋回式振盪による攪拌を行った。

*エタノール発酵効率を 1kg 発酵性糖から 0.459kg-エタノール (=0.582L-エタノール) とした場合の換算値 (エタノール発酵効率 90%)

本項目では酵素変動費 5 円/kg-発酵性糖を目標としたため、酵素カクテル使用量は、酵素カクテル 1 リットル当たり 23.9 円とし、LBKP (基質) 1kg あたり 5 円以下 (2.5 円、3.1 円、4.7 円/kg-LBKP) となるように設定した (図 2.2.3-11)。LBKP から加水分解し遊離される糖のうちグルコース及びキシロースを発酵性糖とした。具体的には、糖化反応後のサンプル中のグルコース及びキシロース量を定量して反応に供した酵素のコスト (円) と発酵性糖の量 (kg) から酵素変動費 (円/kg-発酵性糖) を算出した。

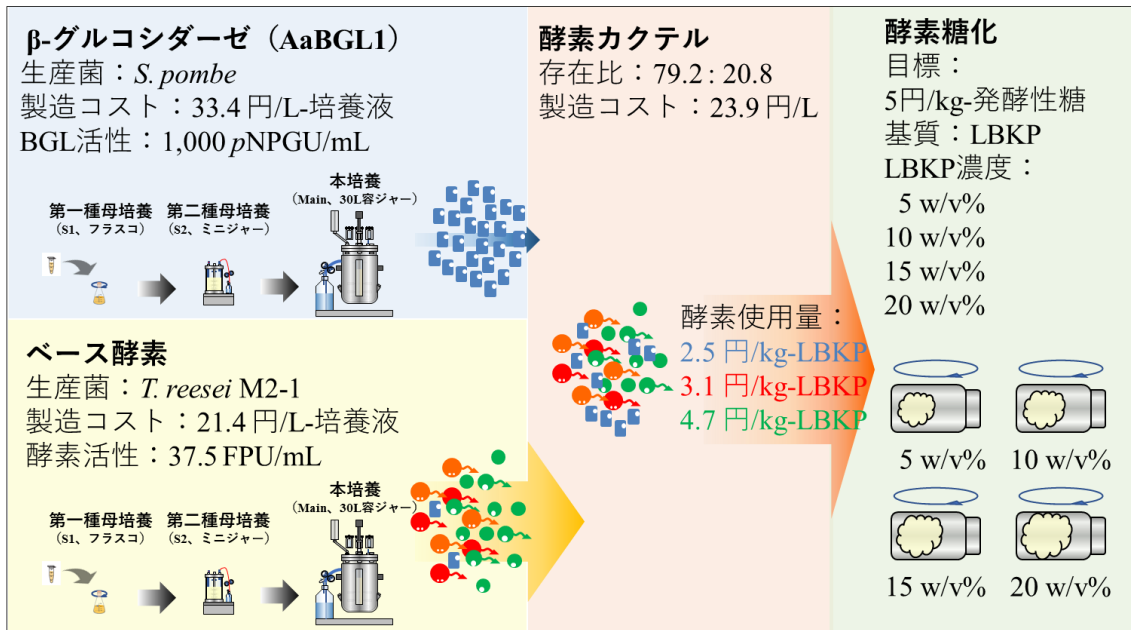


図 2. 2. 3-11 酵素カクテルによる糖化試験

検討の結果、酵素使用量 2.5 円/kg-LBKP、3.1 円/kg-LBKP の条件で何点か 5 円/kg-発酵性糖以下の酵素変動費を達成する条件を確認した(図 2. 2. 3-12)。現在、ミニジャーにおける培養検討により製造コストは維持したままベース酵素の培養液当たりの酵素活性は 40 FPU/mL 以上まで増加している。さらに培養に使用する LBKP 糖化液の原料 LBKP を廃棄 LBKP などの安価なものに代替することでベース酵素の製造コストを抑えることは可能であり、酵素変動費を 5 円/kg 発酵性糖以下に削減することは可能である。さらに、β-グルコシダーゼ生産株の生産性も向上しており、今回は 1,000 pNPGU/mL で実施したが、上述の通りフラスコスケールでは 3 倍まで酵素活性量が上昇していることを確認しており、1,800 pNPGU/mL の酵素液を調製できる可能性であり、酵素変動費の削減に寄与するものと考えている。

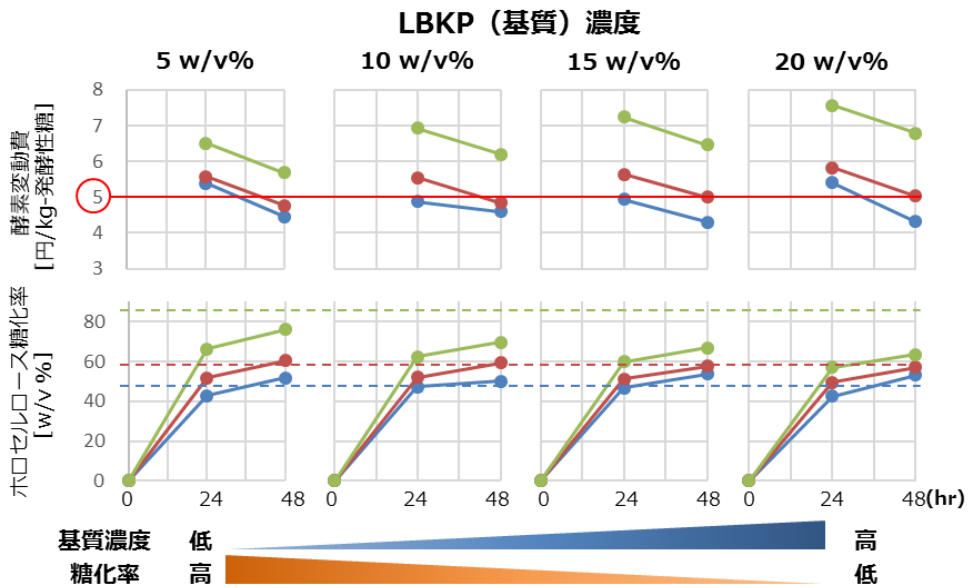


図 2. 2. 3-12 酵素カクテルによる LBKP 糖化試験結果
 青, 2.5 円/kg-LBKP ; 赤, 3.1 円/kg-LBKP ; 緑, 4.7 円/kg-LBKP、
 破線はそれぞれ 5 円/kg-発酵性糖到達ライン

一方で、実用化を視野に入れた場合は5円/kg-発酵性糖（8.6円/L-エタノール*）以下を達成した条件のホロセルロース糖化率が十分であるとは言い難い。ただし、フェノール硫酸法及びDNS法により全糖及び還元糖を測定した結果、単糖の総和と測定値に乖離があり、多くのLBKPはセロオリゴ糖程度にまで分解されていることが示唆され、実際に反応終了時には固形物残渣はほとんど残っていないことを確認している。つまり、5円/kg-発酵性糖（8.6円/L-エタノール*）の酵素変動費をさらに削減し、かつ、ホロセルロース糖化率も増加させるためには、遊離したセロオリゴ糖をグルコースにまで分解する成分酵素（ β -グルコシダーゼ）の割合を高めるなどの酵素カクテルのチューニングが必要であると考えている。

*エタノール発酵効率を1kg発酵性糖から0.459kg-エタノール（=0.582L-エタノール）とした場合の換算値（エタノール発酵効率90%）

研究開発項目	目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
2 酵素生産力及び酵素性能の改良	2-1 不足する成分酵素について <i>S. pombe</i> 異種発現株を作製する。	β -グルコシダーゼ、キシラナーゼ、セロビオヒドロラーゼII（CBH II）発現株を作製した。	○	
	2-2 変異導入酵素を取得する。	セロビオヒドロラーゼII（CBH II）、ソホロース合成酵素（CellA）について変異導入により酵素性能を改良した。	○	
	2-3 ソホロース合成酵素について異種発現株を作製し、ソホロース添加効果M AXの培養生産技術を確立する。	ソホロース合成酵素の特定に成功し、変異導入によりソホロース合成能の向上を確認した。 <i>S. pombe</i> による発現株の取得に成功し、LBKP糖化液中でのソホロース合成を確認できたが、セルラーゼ生産誘導技術は確立していない。	△	当該酵素により調製するソホロース含有LBKP糖化液によるベース酵素生産菌 <i>T. reesei</i> M 2-1の培養検討を実施する。 (見込み時期：平成29年8月頃)
	2-4 酵素生産性の向上で11.5g-タンパク質/Lを目指す。 (Low ry法、事業開始時の5.75倍)	挿入カセット数1のBGL生産株について培養方法の最適化により事業開始時の2~3倍の生産性を達成した。また、株の改良により事業開始当時の3倍の生産性を示す挿入カセット数3のBGL生産株を取得した。併せて6倍以上の生産性向上を達成した。	○	
	2-5 30L ジャースケールで生産した酵素のカクテルを用いて、5円/kg-発酵性糖以下の酵素変動費を達成する。	LBKP糖化液の循環利用で調製したベース酵素と β -グルコシダーゼで調製した酵素カクテルを用いて、パルプ濃度5~20w/v%の条件で5円/kg-発酵性糖以下の酵素変動費を達成した。	○	

3 可溶性糖質源培養による大規模酵素生産の技術開発

<目的>

ミニジャースケールで検討した流加培養方法によるベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 及び成分酵素生産菌 *S. pombe* の培養規模を商用化設備規模に拡大することを目的とした。*S. pombe* の培養は *Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ生産 *S. pombe* (挿入発現カセット数 1) を用いた。*S. pombe* における流加培養法は定流量ではなく、流加速度を 2 次関数的に変動させる特殊な流加を行っているためスケールアップできる規模は設備仕様に依存したため、本事業期間内には 30L 容ジャーフェーマンターを最大スケールとした。

<個別目標>

- 3.1 30L 容において、5L 容での酵素活性の 80%以上の活性を維持し、酵素生産コストを 80%以下に削減する。(株式会社 Biomaterial in Tokyo)
- 3.2 2kL において、30L におけるオンサイト酵素カクテル生産技術を適用し、6 円/kg-発酵性糖以下の大規模オンサイト酵素カクテル生産技術を検証する。(株式会社 Biomaterial in Tokyo)

<検討内容(方法と結果)>

ベース酵素生産 *T. reesei* M2-1 培養及び β -グルコシダーゼ生産 *S. pombe* 培養のスケールアップを実施した。ミニジャーによる基本培養条件の検討を得て、同条件で 30L 容ジャーフェーマンターへのスケールアップを実施した。培養フローは 3 段培養とした(図 2.2.3-12)。

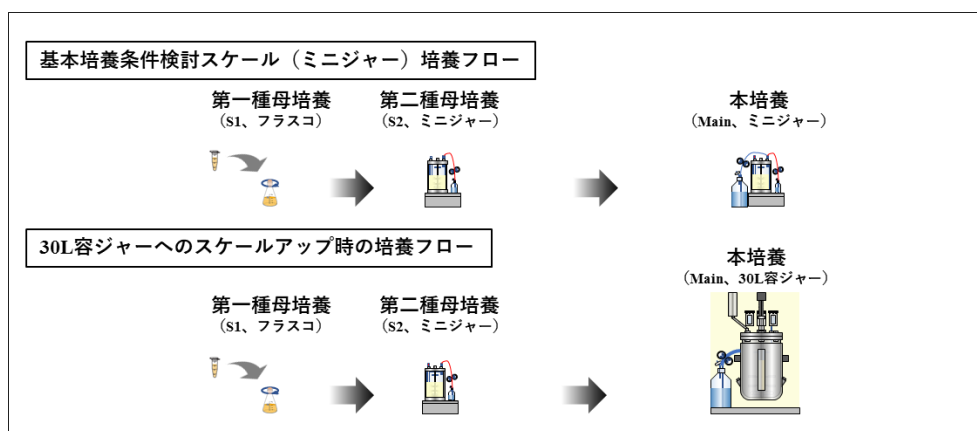


図 2.2.3-12 30L-ジャーフェーマンターによる培養フロー

培養検討の結果、ベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1、 β -グルコシダーゼ生産 *S. pombe* ともに培養終了後の培養液当たりの酵素活性はミニジャー検討時以上の活性を示した。生産コストは培養基材の検討などによりそれぞれ事業開始時の 15%、45%以下に削減した(図 2.2.3-13)。 β -グルコシダーゼ生産 *S. pombe* については現時点で発現カセットを 3 つ挿入した形質転換体を取得しており、フラスコ培養上清の活性は挿入カセット数に比例して上昇することも確認している。早急にジャーフェーマンターによる培養試験を実施し、培養液当たりの酵素活性値がどこまで上昇するかを確認したい。

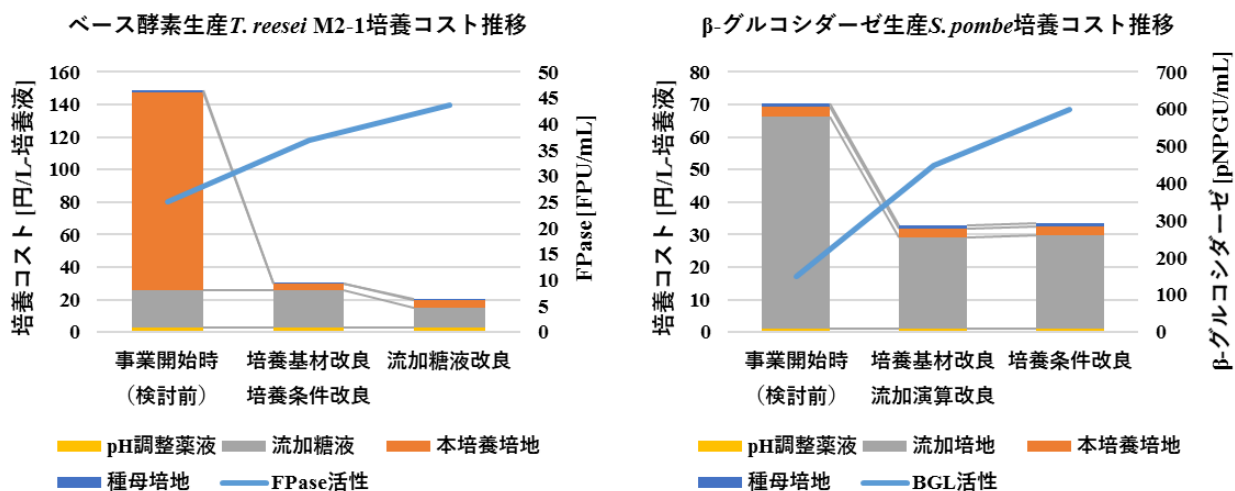


図 2. 2. 3-13 培養（酵素生産）コスト推移

（左、ベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1；右、 β -グルコシダーゼ生産菌（図 2. 2. 3-9））

事業後半にベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 の培養規模を最大で 2kL 容タンクにスケールアップした。第三種母培養（S3）を介した培養フローで培養検討を実施した（図 2. 2. 3-14）。スケールアップ時の攪拌回転数の設定は、スケールアップ前のスケールにおいて排ガス分析法により酸素移動容量係数 K_{La} を計測し、同様の K_{La} となるように設定した。

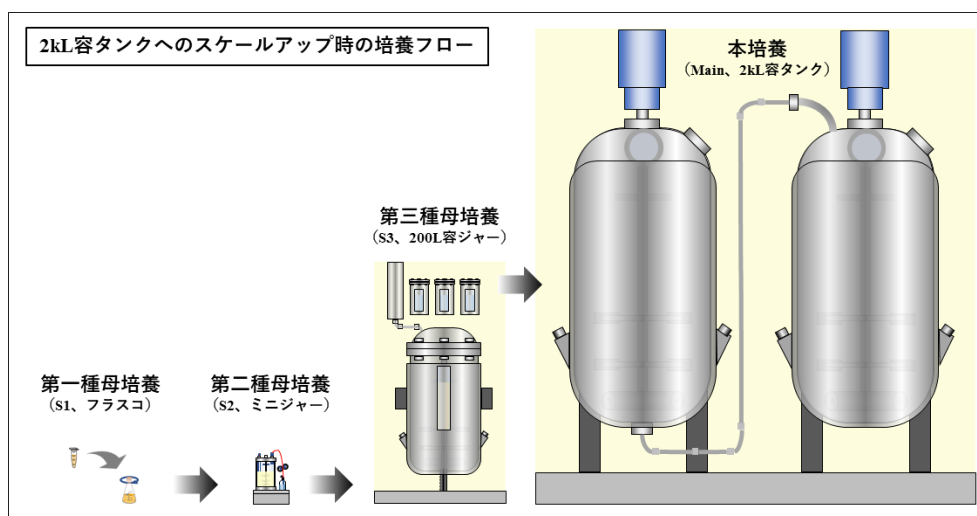


図 2. 2. 3-14 2kL-タンクによる培養フロー

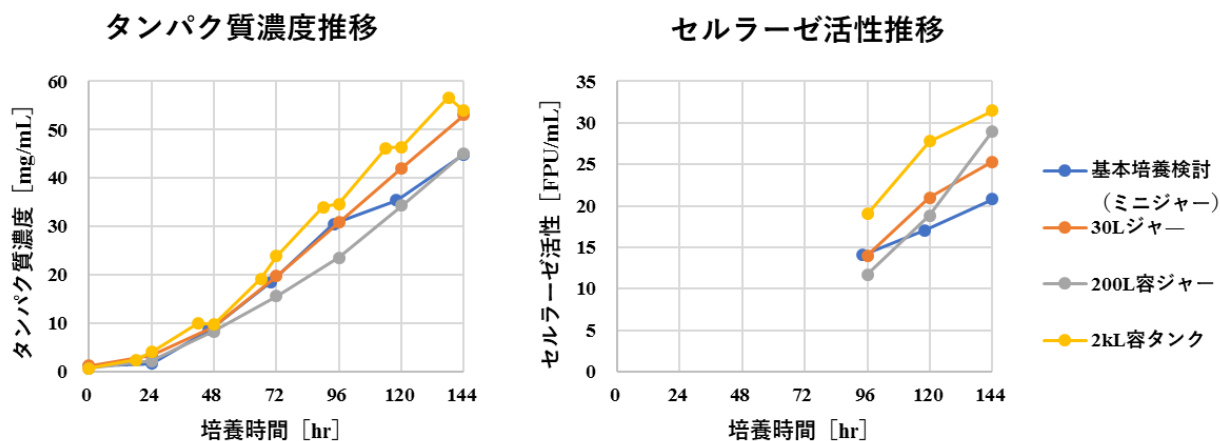


図 2.2.3-15 各培養スケールの培養結果

培養検討の結果、タンパク質濃度推移、培養液当たりのセルラーゼ活性推移ともにスケール間に大きな差異はなく、スケールに応じて高い値を推移した（図 2.2.3-15）。30L スケールの培養液では LBKP の糖化試験によって 5～6 円/kg 発酵性糖（8.6～10 円/L-エタノール*）以下の酵素変動費を達成する酵素の使用条件を見出している。2kL スケールで調製した培養液は培養液当たりの活性値が 30L スケール時と比較して高いため 5～6 円/kg 発酵性糖（8.6～10 円/L-エタノール*）以下の酵素変動費を達成することが可能である。基本培養検討によって、CSL 含有本培養培地で、LBKP 糖化液にグルコースを加糖して調製するバイオマス糖液を用いた流加培養法が最も効率的にセルラーゼ酵素生産することを明らかにしているが、2kL 容タンクスケールに必要な LBKP 糖化液の調製が事業期間内では困難なため実施することができなかった。

本検討によって、可溶性糖質源によるベース酵素生産菌 *T. reesei* M2-1 流加培養法は、容易にスケールアップできることを示した。オンサイト酵素生産技術として完成した技術とするために、培養実績の蓄積、培養日数の短縮を目指した流加糖液濃度の検討及び流加速度の検討を引き続き実施していく予定である。

*エタノール発酵効率を 1kg 発酵性糖から 0.459kg-エタノール (=0.582L-エタノール) とした場合の換算値（エタノール発酵効率 90%）

研究開発項目	目標	成果	達成度	今後の課題と解決方針
3 可溶性糖質源による大規模酵素生産の技術開発	3-1 5L 容から 30L 容へのスケールアップ	ベース酵素生産菌 <i>T. reesei</i> M 2-1 及びベータグルコシダーゼ生産 <i>S. pom be</i> について、5L 容の酵素活性を 100% 維持したまま 30L 容へのスケールアップに成功した。また、培養基材の調査・検討により酵素生産コストはそれぞれ事業開始時の 15%、45% 以下に削減した。	○	
	3-2 2kL スケールで製造した酵素を用いて 6 円/kg-発酵性糖以下の酵素変動費を達成する。	2kL スケールにおいて、実験室規模での酵素生産と同じ培養時間で同程度以上のタンパク質濃度、セルラーゼ活性濃度を有する酵素液を生産することに成功し、LBKP 原料で 6 円/kg 発酵性糖 (=10 円/L エタノール) 以下の酵素変動費を達成した。	○	

2.2.4 知的財産権等の取得及び成果の普及

特許、論文、対外発表などの状況を以下に示す。

年度	区分	特許出願	論文		その他の外部発表 (プレス発表など)
			査読付き	その他	
	H 25FY	0 件	0 件	0 件	0 件
	H 26FY	0 件	1 件	0 件	2 件
	H 27FY	1 件	2 件	1 件	9 件
	H 28FY	0 件	0 件	1 件	10 件
	合計	1 件	3 件	2 件	21 件

2.3 バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発

2.3.1 研究開発の概要

本プロジェクトは、2008年に決定された「バイオ燃料技術革新計画」の技術革新ケースのベンチマークを指標として、バイオエタノール生産事業に酵素生産/糖化プロセスをオンサイトで導入出来る技術を開発することを目的とした。2020年までに、デンプン/糖質系バイオエタノールと競合可能なセルロース系バイオマス为原料とするエタノール生産の酵素糖化プロセスを商用機スケールで可能とするため、糖化能力 2.5mg/g-生成糖以下を持ち、酵素コスト 10 円/L-EtOH で酵素を提供できるプロセス技術パッケージの開発を行った。

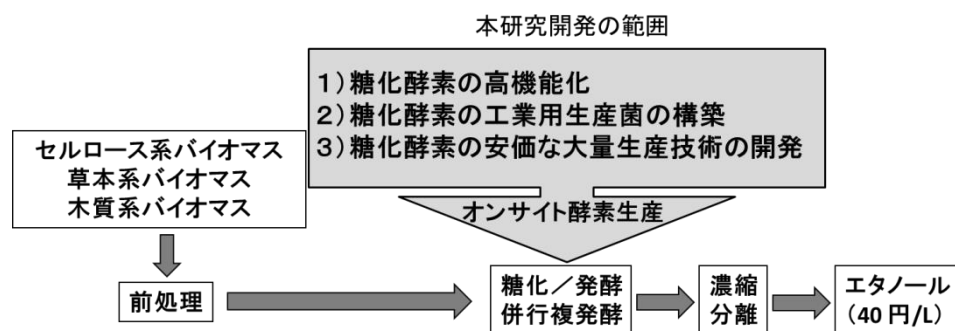


図 2.3.1-1 セルロース系バイオマスからのエタノール生産プロセスにおける本研究開発の位置づけ

本事業は、目標達成のため、1) 糖化酵素の高機能化、2) 糖化酵素の工業用生産菌の構築、3) 糖化酵素の安価な大量生産技術の開発、の3つの研究開発内容（図 2.3.1-1）を以下の体制（図 2.3.1-2）で実施した。

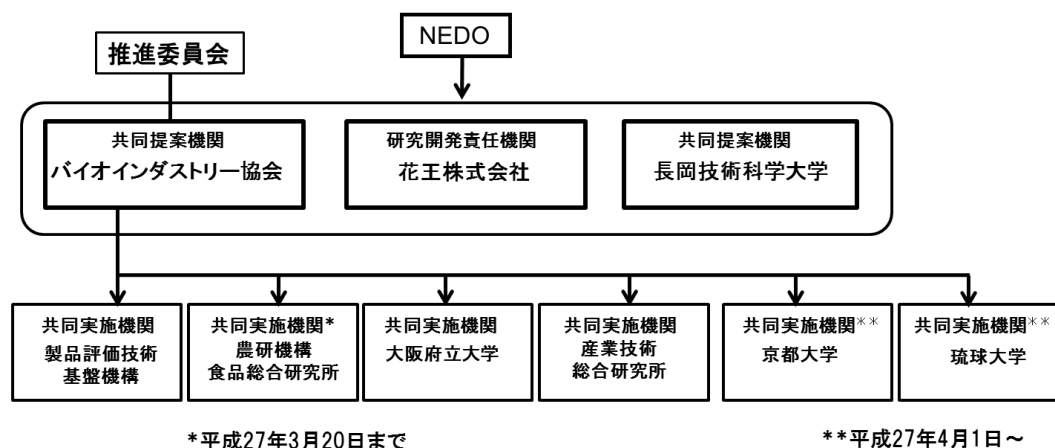


図 2.3.1-2 研究体制

各研究開発内容は、以下に示すとおりである。

1) 糖化酵素の高機能化

目標とする酵素使用量低減を達成するため、抜本的な高機能化を目指し、a) 成分酵素の強化、b) 糖化における課題の克服、c) 前処理バイオマスに応じた最適糖化酵素（カスタム糖化酵素）の構築技術、の3つの研究開発課題に取り組む。

特に、成分酵素の強化は、NEDO 基盤研究で見出された第一世代高機能糖化酵素を構成する主要な成分酵素（CBHI、CBHII、XYN、BGL 等）の解決すべき課題（表 2.3.1-1）を解消し強化を行うことを目的とする。

表 2.3.1-1 糖化酵素の解決すべき課題

NEDO 基盤研究で明らかにした解決すべき課題	想定される解決手段
生成物阻害 <ul style="list-style-type: none"> ・ 高濃度糖化時における阻害回避 ・ CBHI のグルコース耐性向上 ・ BGL1 のグルコース耐性向上 	新規成分酵素探索（製品評価技術基盤機構（NITE））、既存成分酵素の改質（産業技術総合研究所、長岡技術科学大学、大阪府立大学）および糖化解析からの対応策立案（JBA、花王）
酵素の失活／消失 <ul style="list-style-type: none"> ・ CBHII 凝集沈降性の改善 ・ XYN の安定化 ・ BGL1 の特異的切断回避 ・ リグニン吸着抑制 	新規成分酵素探索（NITE）既存成分酵素改質（産業技術総合研究所、長岡技術科学大学、大阪府立大学）
難分解性ヘミセルロース <ul style="list-style-type: none"> ・ ヘミセルロース分解に必要な成分酵素の選定 ・ 高機能ヘミセルラーゼの獲得 	糖化解析および新規成分酵素探索（食総研*、琉球大学**、JBA、NITE、大阪府立大学）
非生産的、非特異的吸着 <ul style="list-style-type: none"> ・ リグニンへの非特異的吸着 ・ セルロースへの非生産的吸着 	糖化解析からの対応策立案（JBA、京都大学***）および既存成分酵素改質（産業技術総合研究所、長岡技術科学大学）
前処理副生物阻害 <ul style="list-style-type: none"> ・ リグニン分解物による阻害 ・ 酢酸・ギ酸などによる阻害 	糖化解析からの対応策立案（JBA）および既存成分酵素改質（産業技術総合研究所、長岡技術科学大学）

*平成 27 年 3 月 20 日まで **平成 27 年 4 月 1 日から平成 28 年 3 月 31 日まで

***平成 27 年 4 月 1 日から 基本（無印）全委託期間

2) 糖化酵素の工業用生産菌の構築

これまでの研究（2008-2013 年度 NEDO 新エネルギー技術開発/バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発（先導技術開発） 酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究）で構築した第一世代高機能糖化酵素生産菌 JN 株に、1) で得られた高機能遺伝子を導入することにより、第二世代高機能糖化酵素生産菌を構築し、糖化酵素の高機能化を目指す。

また、糖化酵素コスト低減のため、糖化酵素生産性の増強、および安価な炭素源への適用（生産性の低下の克服）に取り組み、最終的には、第二世代高機能化酵素生産菌と工業用生産菌の組換え技術を統合させ、革新的糖化酵素工業生産菌の創製を行う。

3) 糖化酵素の安価な大量生産技術の開発

糖化酵素生産の事業化（第二世代バイオエタノール生産事業プロセスへの組み込み）では、数百 m³ の発酵槽での酵素生産が想定される。そこで、革新的糖化酵素工業生産菌の大量生産技術に必要な基本的生産技術を検討のうえ、スケールアップ検討および大量生産技術をパイロットスケール（数 m³）および実機相当（数 10 m³）をモデルに酵素サンプルの試作を含めて事業化検討用の種々データを取得しプロセス技術パッケージの確立とフィージビリティスタディ（F/S）を行う。

2.3.2 研究開発の目標設定

2000年代に入り、バイオマス資源からの燃料、特にバイオマスエタノールを生産する動きが世界的に広がったため、糖化酵素（セルラーゼ）を用いたセルロース系バイオマスを糖化する酵素糖化法の研究開発が世界中で活発化した。アメリカにおいて、エネルギー省を中心にバイオエタノール生産技術への開発支援が大規模に行われると、Novozymes 社や Genencor 社等は糖化酵素の高機能化、低価格化に積極的に取り組んでいる。特に、Novozymes 社は、第二世代バイオエタノール生産事業化を目指す世界中の企業と連携して糖化酵素開発を進めていることが知られている。

酵素生産コスト 10 円/L-EtOH を達成するためには、酵素の生産能力の向上に伴う固定費、原料費の削減による酵素生産性を向上のみでは達成できず、酵素自身の性能を向上し、酵素使用量を大幅に削減する必要がある。

そこで本研究の目標を以下に設定した。

研究開発内容項目	目標
1) 酵素の高機能化	アルカリ処理バガスに対し、2.5 mg/g-生成糖となる酵素
2) 工業用生産菌株の構築	25 g/L 以上の酵素生産性を示す菌株の構築
3) 安価な大量生産技術の開発	パイロット建設と商用機スケールでの培養及び酵素コスト 10 円/L-EtOH の技術開発

2.3.3 目標と成果

2.3.3.1 糖化酵素の高機能化

(1) 成分酵素の強化の探索

主な成果は以下の表に示す

探索酵素		
CBH II	安定性向上、糖化率向上	NITE
キシラナーゼ	糖化率向上	NITE
ヘミセルラーゼ	糖化率向上	大阪府大
キシラナーゼ	糖化率向上	琉球大
キシラナーゼ	糖化率向上	花王

以下、事業化に向け、有用な主な成果を具体的に述べる

(1) -1 CBH II 凝集沈降性の改善（製品評価技術基盤機構）

a) 目的

2008年～2013年に行われたNEDOプロジェクト「酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究」において、*T. reesei*由来CBH II（以下、*Tr*-CBH II）がバイオマス糖化反応の進行に伴って反応系から消失することが明らかとなった。そこで、糖化反応時の50℃での攪拌ストレスが消失の原因と推定し、凝集沈降耐性をもつCBHIIを探索した。

b) 方法と結果

ライブラリ株の培養上清からCBH IIを精製し凝集沈降耐性評価を行った結果、凝集・消失を回避するCBH IIを1株取得した。その遺伝子をクローニングして新規CBH IIを精製し、アルカリ処理バガスを基質に糖化評価を行った。△CBH2酵素への新規CBHII酵素の添加効果を確認した。その結果、新規CBH IIは*Tr*-CBH IIに比べて糖化率が向上した（図2.3.3.1(1)-1）。

以上の結果から、Y75 CBH IIは有用酵素である可能性が示された。

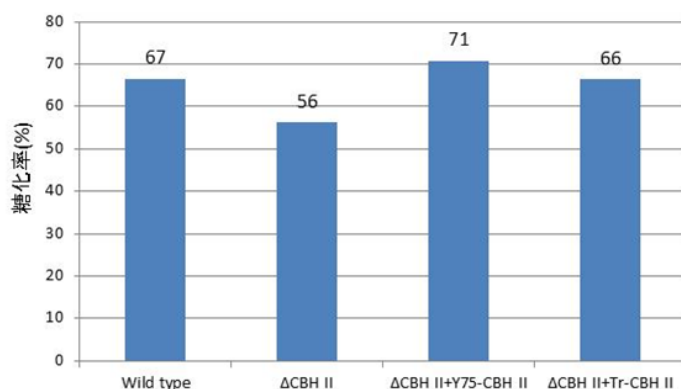


図 2.3.3.1 (1)-1 新規CBH IIの評価

△CBH2と*A. a*-BGLに評価酵素(0.5 mg/g-BM)Y75-CBH II、コントロールとして

*A. oryzae*発現*Tr*-CBH IIを添加

アルカリ処理バガス(5%スラリー、72hr、50℃)を基質として糖化評価

(1) -2 高機能ヘミセルラーゼの獲得 (NITE)

a) 目的

糖化酵素の基質である前処理バイオマスは、植物バイオマスを前処理することによって調製されるが、植物細胞壁の緻密な構成の履歴として微量なヘミセルロースやリグニンが主成分である結晶性セルロース表層に絡み付くように残存する。そのため、酵素製剤に含まれるヘミセルラーゼの性能がセルラーゼ分解効率に影響する。そこで、高機能性・高安定性な成分キシラナーゼを天然糸状菌から探索することとした。

b) 方法と結果

各酵素のセルラーゼとのカクテル化による糖化活性測定を行ったところ、新規キシラナーゼが高い糖化促進効果を示した。その遺伝子をクローニングし、新規キシラナーゼを精製後、アルカリ処理バガスを基質に糖化評価を行った。△XYN3酵素への新規キシラナーゼ酵素の添加効果を評価した結果、糖化率上昇が確認された（図2.3.3.1(1)-2）。

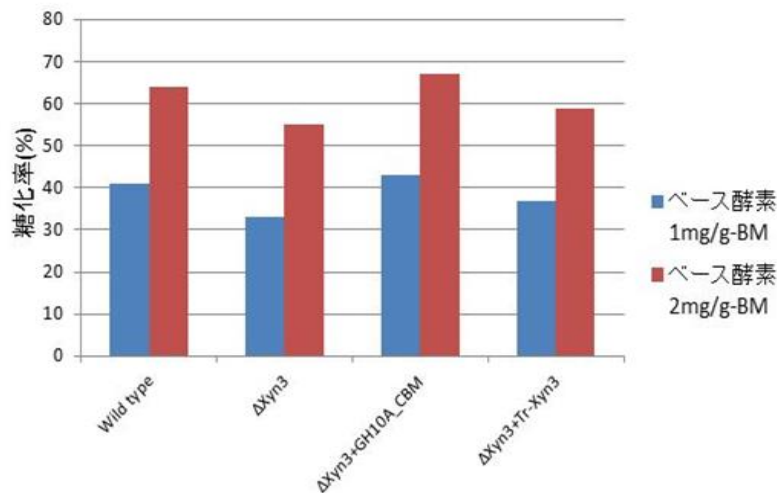


図 2.3.3.1 (1)-2 新規キシラナーゼ (NITE) 糖化評価

ΔXyn3 (1.0 もしくは 2.0 mg/g-BM) に *A. a*-BGL (0.1 もしくは 0.2 mg/g-BM) と新規キシラナーゼ (NITE) (0.5 もしくは 1.0 mg/g-BM)、コントロールとして *T. reesei* 由来 Xyn3 を添加 B40 アルカリ処理バガス (5%スラリー、72hr、50°C)

(1) -3 *Aspergillus* 属へミセルラーゼ遺伝子の獲得 (大阪府立大学)

a) 目的

これまでの検討で、難分解性へミセルロースがセルラーゼのセルロース領域への接近を妨げていることが分解効率の低下や頭打ち現象の原因である可能性が指摘されたことから、難分解性へミセルロースの分解を促進する可能性が高いと考えられるへミセルラーゼ遺伝子を *A. aculeatus* を中心とした *Aspergillus* 属のゲノムデータベースを探索、クローン化し、さらに、糸状菌を宿主として発現、精製しそれらの評価を行う試料を大量に調製することを中心に実施した。

b) 方法と結果

A. aculeatus のゲノム配列から絞り込んだターゲットに対して、すべての遺伝子をクローン化し発現を試みた結果、形質転換体の培養液中に活性が検出されたのは、GH43i, GH43l, GH54a, GH62a の 4 種のみであった。これらの酵素のアルカリ処理バガスを基質としたときの市販バイオマス糖化酵素 (Cellic CTec2) に対する添加効果を調べた (図 2.3.3.1 (1)-3)。その結果、GH54a, GH62a アラビノースの生成量が多くアラビノース側鎖を有するオリゴ糖に効果的に作用すると思われる。グルコースとキシロースの遊離量も測定したところ、GH54a で Cellic CTec2 単独で作用させたときよりも若干増加した。

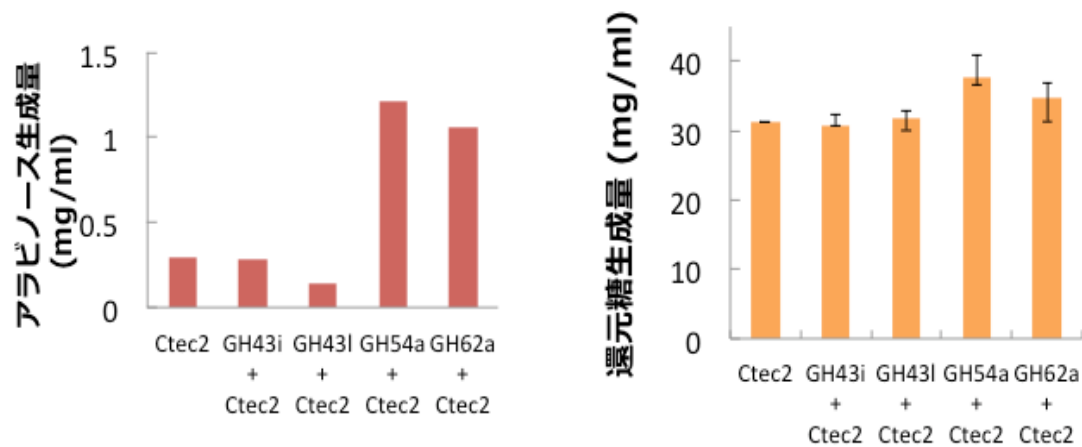


図 2.3.3.1 (1)-3 スクリーニング酵素の評価

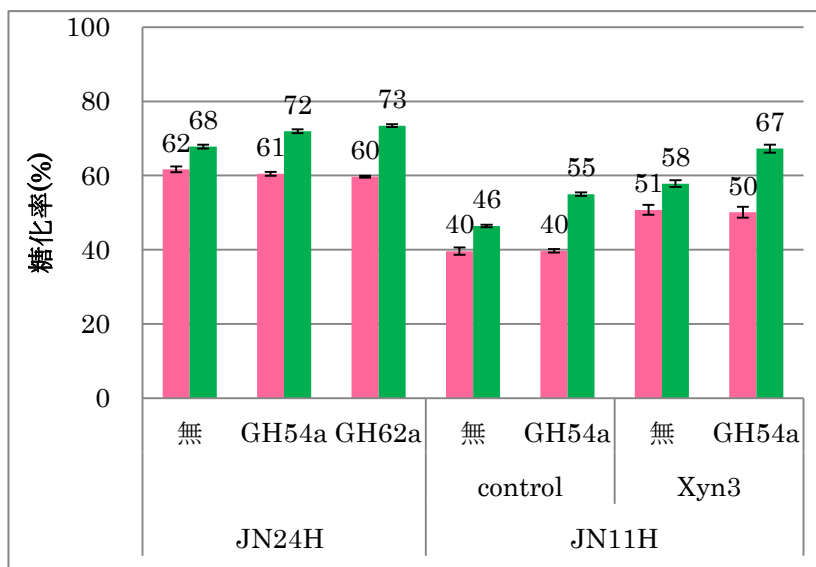


図 2.3.3.1 (1)-4 GH54, GH62a の評価

また、アルカリ処理バガス 5%スラリーを基質とし、JN24H、または JN11H(95%) + xylanase(5%)、3mg/g-BM に GH54a 或いは GH62 を 0.1mg/g-BM 添加の条件下で添加効果を評価したところ、いずれもキシロースの遊離量を増加させる効果が認められた (図 2.3.3.1 (1)-4)。

(1) -4 新規糖化酵素の探索 (花王)

a) 目的

更なる高糖化性酵素の創出を目指し、保存菌株ライブラリーを用いて添加効果を示す新規酵素の探索を行うこととした。

b) 方法と結果

保存菌株から得られた酵素溶液はタンパク質量を定量後、JN11 由来酵素に対して 5%の添加量となるように混合してアルカリ処理バガスの糖化へと利用した。その結果、スクリーニング株由来酵素溶液を JN11 由来酵素に添加した際に顕著に糖化性が向上することが明らかとなった。

そこで、スクリーニング株由来酵素溶液からスクリーニング、同定を行った結果、有効成分は、GH10 に属するキシラナーゼであり、セルロース結合モジュールを持つことが明らかとなった。以下、本キシラナーゼを F1364 と名付けた。

精製により得られた F1364 を用いバイオマスの糖化検討を行った。その結果、F1364 は JN11 の 2.5%分を添加するだけでも糖化性を大きく向上させることが明らかとなった。

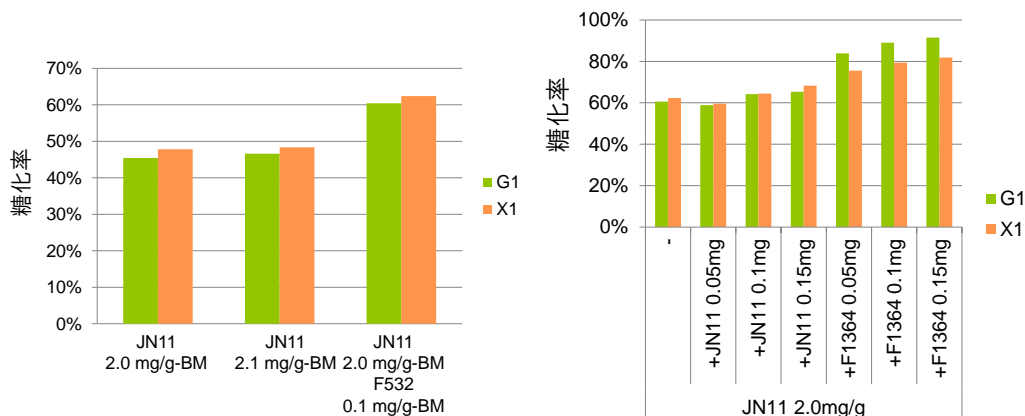


図 2.3.3.1 (1)-5 新規キシラナーゼの添加効果
アルカリ処理バグスを用いた糖化評価を示す。
JN11 (2 mg/g-BM) に対して 0.05~0.15 mg/g-BM の JN11 または F1364 を添加。

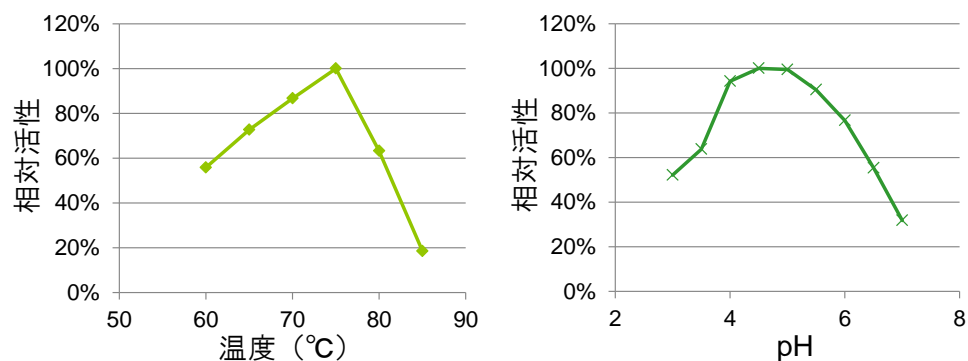


図 2.3.3.1 (1)-6 新規キシラナーゼの至適温度および至適 pH

続いて、F1364 の精製酵素を用い、至適温度 (図 3) 、至適 pH (図 4) を検証した。その結果、F1364 の至適温度は 75°C、至適 pH は 4.5~5.0 付近であることが明らかとなった。以上から、F1364 は酸性高温条件にて最も高活性を示す、バイオマス糖化に適した酵素であることが確認された。

(2) 成分酵素の強化の改変

主な成果は以下の表に示す。

改変酵素		
BGL	安定性向上、糖化残渣非吸着、非活性向上	大阪府大
キシラナーゼ	耐熱性向上	産総研
CBH I	生成物阻害回避	産総研
CBH II	安定性向上	産総研

(2) -1 キシラナーゼ Xyn III の熱安定性の強化(産業技術総合研究所)

a) 目的

Trichoderma reesei が生産するキシラナーゼ Xyn III はバイオマスの酵素糖化に重要であるが、熱安定性が低いという弱点があった。そこで、本酵素の熱安定性の向上した変異体の開発を行った。

b) 方法と結果

Xyn III 遺伝子をサブクローニング後、エラープローン PCR によってランダム変異を導入し、熱安定性の向上した変異 Xyn III のスクリーニングを行った。その結果、熱安定性の向上した変異酵素（第一世代耐熱性 Xyn III）を取得した。第一世代耐熱性 Xyn III に対して、さらにエラープローン PCR によってランダム変異を導入し、さらに熱安定性の向上した変異酵素（第二世代耐熱性 Xyn III）の取得に成功した。

第二世代耐熱性 Xyn III は、4つのアミノ酸残基に変異が入っていたが、そのうち、熱安定性に重要な変異は2つで残りの2つの変異は熱安定性の向上には寄与していなかった。そこで、熱安定性の向上に関与しない2つの変異箇所を野生型に戻すことによって、酵素性能の向上した新たな変異体（第三世代耐熱性 Xyn III）を取得することができた。

次に、第三世代耐熱性 Xyn III の熱安定性の向上に寄与する2つのアミノ酸残基に対して、Saturation mutagenesis を行った結果、第三世代耐熱性 Xyn III よりもさらに熱安定性の向上した変異酵素（第四世代耐熱性 Xyn III）の取得に成功した。

これまでに得られた熱安定性の向上した変異 Xyn III を精製酵素を用いて、熱安定性試験を行った結果、野生型酵素は 55°C で 30 分間熱処理を行うことで大部分が失活してしまうのに対し、第四世代耐熱性 Xyn III は 60°C で 30 分間熱処理を行っても約 50%の活性を保持していた（図 2.3.3.1 (2)-1）。

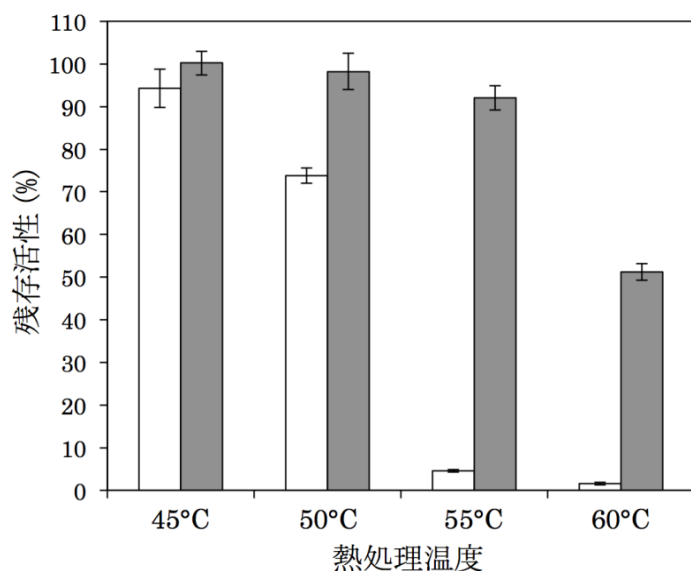


図 2.3.3.1 (2)-1 野生型 Xyn III と第四世代耐熱性 Xyn III 熱安定性評価

野生型 Xyn III (白) と第四世代耐熱性 Xyn III (灰色)

各温度で 30 分間処理した後の残存活性（熱処理をしていない各酵素の活性を 100%とした時）を示した。

(2)-2 CBH I の生成物阻害耐性の強化(産業技術総合研究所)

a) 目的

T. reesei が生産する CBH I は最も重要なセルラーゼの一つであり、結晶性セルロースを分解するために必須な酵素である。本酵素はその反応生成物であるセロビースや糖化産物に含まれるグルコースによって活性が阻害されていること(生成物阻害)が知られている。この生成物阻害はバイオマスの酵素糖化の主要なボトルネックであるため、その克服を目指して生成物阻害耐性の向上した CBH I の開発を行った。

b) 方法と結果

CBH I の基質認識に重要なサブサイトを構成している 7 つのアミノ酸残基に Saturation mutagenesis を行い、合計 133 種類の変異酵素を発現させるためのプラスミドベクターを構築した。この 133 種類のプラスミドベクターを用いて、変異 CBH I を発現、精製し生成物阻害耐性を調べた。その結果、グルコースに対して耐性が向上した変異酵素の取得に成功した(図 2.3.3.1 (2)-2)。しかし、この生成物阻害耐性が向上した変異酵素は比活性の低下も見られた。

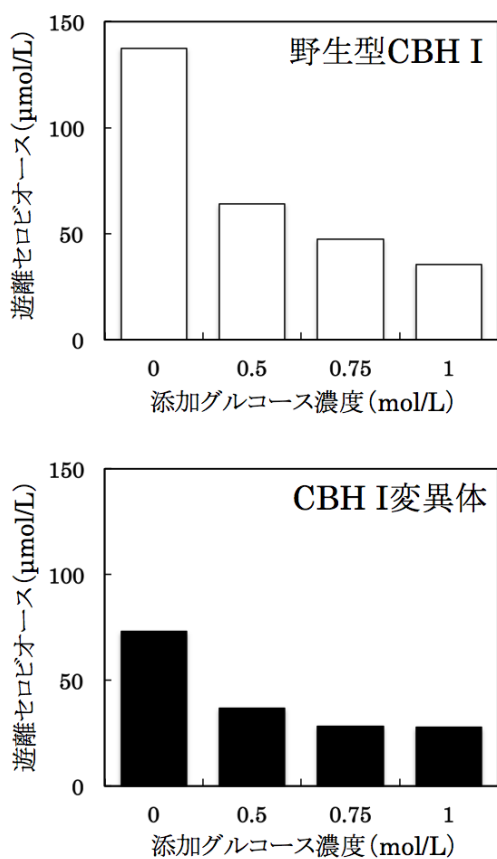


図 2.3.3.1 (2)-2 CBH I 変異体の生成物阻害耐性

生成物阻害耐性試験はリン酸膨潤セルロースまたはアントラニル酸で誘導体化したリン酸膨潤セルロースを基質として用いた。阻害剤としてグルコースを使用。

(2)-3 *A. aculeatus* BGL1 の生産時に起こる特異的切断回避(大阪府立大学)

a) 目的

A. aculeatus BGL1 を *T. reesei* で生産させたときプロテアーゼにより限定分解され 2 つのペプチド断片になることが明らかとなっている。このとき両ペプチドは非共有結合によって分離

することなくネイティブ酵素と同程度の活性を保持しているが安定性が低下することが指摘されている。したがってこの切断が起こる原因を明らかにするとともに回避する方法を開発することを目的とする。

b) 方法と結果

BGL1 は *A. aculeatus* においても同様に 2 つのペプチドに限定分解されることが明らかにされており、その切断部位も決定されている。そこで、変異導入によって安定性の向上を検討した。その結果、切断回避可能な変異体の取得に成功した。

(2)-4 *A. aculeatus* BGL1 の糖化残渣への吸着回避 (大阪府立大学)

a) 目的

A. aculeatus BGL1 は糖化残渣に吸着することが分かっており、これは糖化に貢献する自由度の高い酵素分子が少なくなることを意味する。また、糖化酵素生産の時に誘導基質および栄養源として安価な前処理バイオマスを用いたとき酵素の回収効率が低下する原因となる。したがって、この吸着機構を明らかにするとともに回避する方法を開発することを目的とする。

b) 方法と結果

キシラナーゼの糖化残渣への吸着に関与しているアミノ酸について、変異を導入し残渣への吸着を検討した。その結果、野生型酵素を発現させた *A. oryzae* の培養液中の活性の 10% 以上を示したものは、11 種であった。これら 11 種類の精製酵素を用いて吸着試験を行ったところ、変異酵素のうち 3 種が吸着の緩和を示した (データ非提示)。これらの変異酵素は、比活性をはじめとする酵素の性能は野生型と変わらないことを確認した。

(2)-5 グルコース阻害を低減した変異 *A. aculeatus* BGL1 の作製 (大阪府立大学)

a) 目的

A. aculeatus BGL1 は生産物であるグルコースによって活性が阻害されることが分かっている。そのため、バイオマス糖化の最終段階である単糖の生成に時間がかかるだけでなく、バイオマス糖化の初期段階に重要な働きを持つセロビオヒドロラーゼに阻害を示すセロビオースが蓄積されることによって、糖化反応全体に影響を及ぼすことが考えられる。これらのことから、ランダム変異、部位指定変異によりグルコースによる阻害が低減した変異 BGL1 を作製することを目的とする。

b) 方法と結果

プラス側サブサイト近傍に位置する 15 アミノ酸を標的として飽和変異を導入し、グルコース非存在下での活性に対するグルコース存在下での活性を野生型のものと比較し、グルコース存在下での活性が上昇した変異株を選択した。

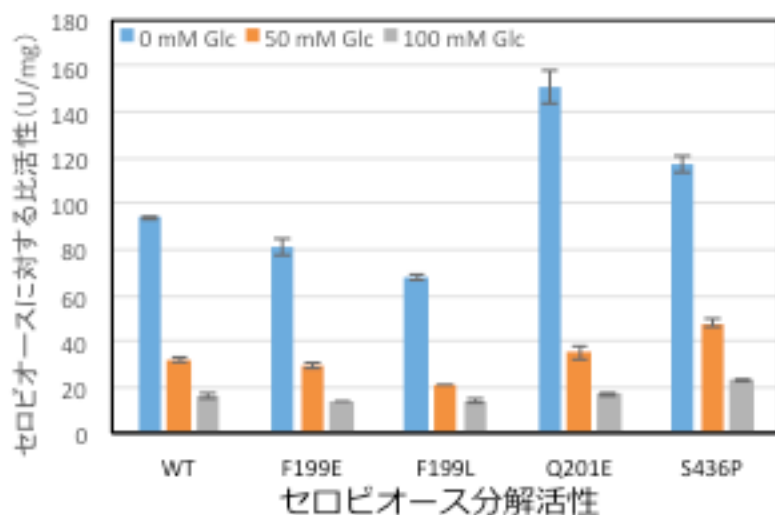


図 2.3.3.1 (2)-3 各変異酵素のセロピオース分解活性

その結果、セロピオースに対する活性が上昇した変異酵素 (Q201E, S436P) を得た。Q201E はセロピオースおよびセロオリゴ糖に対する活性 (k_{cat}/K_m) が大きく上昇し, S436P についてはセロピオースに対する活性が野生型よりも少し上昇し, さらにグルコース存在下のセロピオース分解活性が野生型よりも上昇することがわかった (図 2.3.3.1 (2) -3)。

総括

JN 系糖化酵素の欠点を克服すべく、CBH I についてはグルコース阻害回避、CBH II については凝集性の改良、XYN III については安定性向上、高機能ヘミセルラーゼの探索、BGL の分解性回避等の諸課題について取り組んだ。ここで取り組んだ課題の中で、新たに取得された F1364 キシラナーゼが高性能であることが判明した。

3) 糖化における課題の克服

これまでに、糖化時に使用する酵素量を低減していった際に、ある量以下で糖化反応が停止してしまう現象 (「頭打ち現象」) を見出した。このことから、基質バイオマス糖化における基質と糖化酵素の各種成分酵素間における非生産的及び非特異的吸着現象が最大の要因ではないかと推測した。そこで、本プロジェクトにおいて、糖化酵素の更なる高機能化や高効率糖化法開発を目指す上で、バイオマス基質の構成成分である、セルロース、ヘミセルロース、リグニンと成分酵素間のインターアクションの解析による非生産的および非特異的吸着現象の解明を目指すこととした。具体的には、基質となるサトウキビバガスの各構成成分の分布、セルロース、リグニンの構造・性質を調べ、これら各成分と酵素間での吸着挙動を解析することにした。

バイオマス基質からの高効率糖化を目指す上でもう一つの障害として生成物阻害が知られている。今回の基質であるバガスと JN 系糖化酵素の組合せにおいて、糖化反応で生成するグルコースやキシロースでどの程度の阻害現象が見られるか検証する。

また、エタノール生産性向上を目指す上からは高濃度糖化の技術開発は重要と考えられることからこの課題についても基礎的な検討を行うこととした。

(3) -1 非生産的及び非特異的吸着現象の解析 (JBA、京都大学)

(3) -1-1 バガス原料の違いと酵素糖化

a) 目的

糖化酵素の性能を評価するにあたり、評価時の天然物基質の品質安定性は重要である。そこで、入手先の異なるバガス原料からアルカリ前処理物を作製し、原料の違いが酵素糖化に与える影響を調べた。

b) 方法と結果

バガス原料としてベトナム産 2 種と沖縄産 1 種を入手し、これらについて 1%苛性ソーダ溶液中で原料仕込み濃度 10%(w/v)、120℃、10 分間加熱処理した。処理物をろ過、水洗し得られた固形物をアルカリ処理バガスとした。NREL 法に従ってバイオマスの組成分析を行った。また、それらアルカリ処理バガスを、酵素 Cellic CTec2 (Novozymes 社) (6mg/g-BM), JN13 (3mg/g-BM) で糖化(5% (w/v) スラリー、72hr、50℃)し、原料組成と糖化性の違いを比較した。また、これら各前処理バガスから可能な限りリグニンとヘミセルロースを除去したバガスセルロースを調製し、これらについて物性評価、糖化を行い、原料の違いによる差を比較検討した。

原料の違いにより、アルカリ処理バガスの組成は異なっていた (表 2.3.3.1 (3)-1)。特に、沖縄産バガスの場合、ベトナム産に比べヘミセルロース含量が高いという違いが見られた。これらの 3 種のアルカリ処理バガス B40, B56, B67 に対する 2 種の糖化酵素による糖化率に差が見られた (図 2.3.3.1 (3)-1)。

表 2.3.3.1 (3)-1 バガス原料とアルカリ前処理物のバイオマス組成 (%)

	サンプル名	由来	セルロース	ヘミセル	ホロセル	リグニン	灰分
バガス原料	a	ベトナム産	39	17	56	24	6.8
	b	沖縄産	38	24	62	21	2.2
	c	ベトナム産	42	18	60	29	5.6
アルカリ前処理物	B40	バガス原料 a	63	18	81	7.6	4.0
	B56	バガス原料 b	51	28	79	7.8	2.2
	B67	バガス原料 C	57	17	74	5.9	6.6

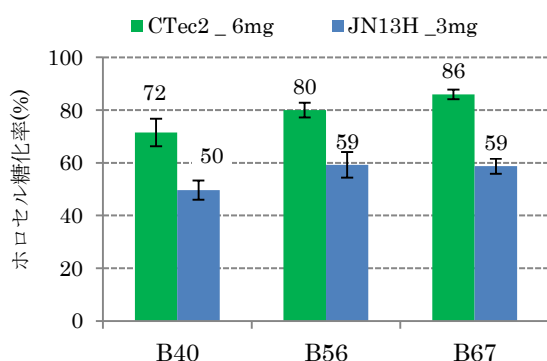


図 2.3.3.1 (3)-1 原料の異なるアルカリ処理バガスの糖化率

(3) -1-2 バガスセルロースを基質とする酵素糖化

a) 目的

本研究では、アルカリ処理、希硫酸処理、水熱処理の各種バガス前処理物からリグニン、ヘミセルロース成分を除いたバガスセルロースを調製し、これらに対する各種糖化酵素の糖化能を調べ、各種前処理物の場合と比較することで、リグニン、ヘミセルロースの糖化に与える影響について調べた。

b) 方法と結果

前項記載のアルカリ処理バガス(B40)、希硫酸処理バガス(B41)、水熱処理バガス(B42)を、まず Wise 処理(10wt% 亜塩素酸ナトリウム、5% 酢酸存在下、室温で2時間反応)することで、可能な限りリグニンを取り除いた。次いで、Cellic HTec (Novozymes 社へミセルラーゼ) (30mg/g-BM) で処理し、セルロース含量率を高めたバガスセルロースを調製した。バガスセルロースとその原料である前処理物に、糖化酵素 JN24 及び JN24H を作用させ糖化反応(5% (w/v) スラリー、50℃、72hr)を行い、80%糖化に必要な酵素量を求めた。

その結果、アルカリ処理バガスセルロースの場合でアルカリ処理前処理物に対し、1/3 の値となった(表 2.3.3.1 (3)-2)。この結果より、バガスセルロースは前処理物に比べかなり糖化され易い状態となっていることが分かった。

表 2.3.3.1 (3)-2 80%糖化に必要な酵素量

基質	酵素	80%糖化に必要な酵素量 (mg/g-BM)		相対値 ※
		バガス前処理物	バガスセルロース	
アルカリ処理バガス B40	JN24	3.4	1.1	0.32
	JN24H	3.5	1.3	0.37
希硫酸処理バガス B41	JN24	6.3	2.2	0.35
	JN24H	8.7	2.6	0.30
水熱処理バガス B42	JN24	5.9	3.6	0.61
	JN24H	8.7	4.3	0.49

※相対値は前処理物を1とした時のバガスセルロースの酵素量の値を示す

(3) -1-3 バガスの糖化「頭打ち現象」

a) 目的

バガスセルロースのサンプルを用いて、この基質とバガス前処理物とを基質とした糖化反応のパターンを比較し、「頭打ち現象」の観察を行った。

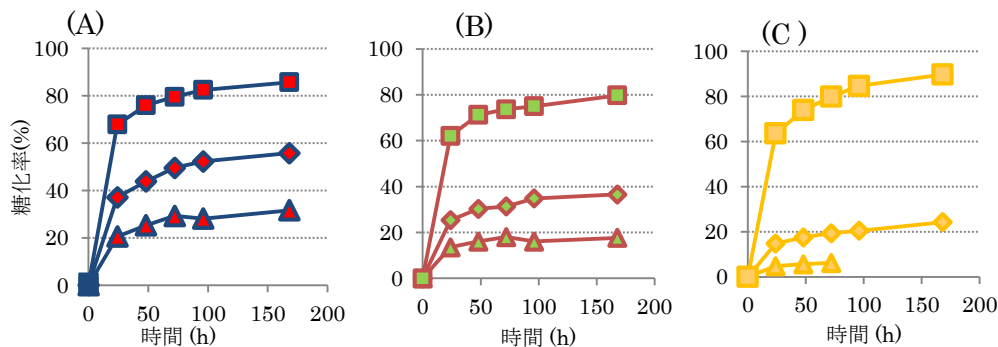


図 2.3.3.1 (3)-2 バガス前処理物の「頭打ち現象」

(A) アルカリ処理 (B) 希硫酸処理 (C) 水熱処理

■ : JN24H 10mg/g-biomass, ◆ : JN24H 3mg/g-biomass, ▲ : JN24H 1mg/g-biomass

b) 方法

アルカリ処理、希硫酸処理、水熱処理の3種類のバガス前処理物(B40, B41, B42)とこれらから調製したバガスセルロース(B40 α 3, B41 α 3, B42 α 3)を基質とし、JN24Hの使用量を1, 3, 5, 10mg/g-BMと変えて糖化(5% (w/v) スラリー、50°C、72hr)した際の糖化パターンを比較した。その結果、低使用量(特に1mg)の場合に明確な頭打ち現象が見られた(図2.3.3.1(3)-2)。また、同様に、各種バガスセルロースを酵素糖化したところ、前処理物と比べ、低使用量(特に1mg)の場合の反応停止状態(頭打ち)が前処理物の場合に比べ不明瞭で、頭打ち状態は弱いものと思われた。この結果より、バガス前処理物で見られる明確な頭打ち現象にはリグニン・ヘミセルロースの存在が関与している可能性が示唆された。

(3) -1-4 バガス酵素糖化残渣表面の微細構造および化学成分分布

a) 目的

バガス(サトウキビの搾取後の残渣)糖化残渣の細胞壁表面に存在する成分(セルロース、ヘミセルロース、リグニン)の分布を明らかにし、前処理の違いによる細胞壁の糖化状況および糖化残渣表面に露出した細胞壁成分の違いを解析することを目的とした。

b) 方法と結果

各前処理試料について組織観察を行ったところ、前処理をしてもおもに維管束鞘繊維においてリグニンが溶脱しにくく、酵素糖化が進まない要因になっていると考えられた。アルカリ処理では他の前処理に比べて細胞壁の脱リグニンが進行していた。そのため、カルコフルオール染色で強い傾向を発するようになり、セルロースの表出度が高くなることが判明した。このことより、バガス試料においては、アルカリ前処理が高効率糖化に適した前処理であると示唆された。

(3) -1-5 サトウキビにおけるアルカリ前処理後の放冷条件の効果

a) 目的

アルカリ前処理は、木質化したバイオマスの酵素糖化における前処理の一つであり、とりわけイネ科植物のリグニンをよく溶脱させセルロースの表出度が高くなるため、酵素糖化効率が向上する。本研究では、組織構造が明瞭なサトウキビ稈の切片を用いて、アルカリ前処理後の放冷条件による表面成分分布の違いと前処理後の放冷による糖化率の違いについて解析し、アルカリ前処理後の放冷条件による糖化効率の向上を目指した。

b) 方法と結果

LM11を用いたキシラン標識を用いて、アルカリ前処理後にオートクレーブ内で放冷した場合とオートクレーブから取り出し室温もしくは氷上で放冷した場合を観察した。その結果、アルカリ前処理後の放冷によって、細胞壁からのキシランの溶出が徐々に進行するが、室温もしくは氷上で放冷すると一度溶出したキシランが試料表面に再吸着していた。また、カルコフルオール染色の結果より、細胞壁のセルロースは放冷とともに徐々に表出度が高くなるが、室温もしくは氷上で放冷すると低くなることが分かった。

このことから、溶出したキシランが試料表面に再吸着することで細胞壁表面のセルロースが覆われているためと考えられる。

前処理試料に対して、およびJNK26(2, 3, 3, 2(3)-1参照)で糖化反応を行った。その結果、市販酵素に比べて、JNK26の方が再吸着したキシランの糖化能が高く、糖化率に影響を及ぼさなかった可能性が示された。

以上より、アルカリ前処理後の放冷条件によって、セルロースとキシランの表出度合いが異な

ること、キシランの再吸着の有無で糖化効率が異なることが明らかとなった。

(3) -1-6 品種の異なるサトウキビの組織構造と糖化率の違い

a) 目的

沖縄に植栽されている代表的な品種について、品種間の組織構造の違いおよびアルカリ前処理の効果の違いを検討した。また、品種間の糖化率の違いについて組織学的観察より検討した。

b) 結果

サトウキビはどの品種でも、サンプルの高さなどサンプリング部位によってその構成成分は大きく異なることが明らかとなった。

どの品種でもアルカリ前処理により、二次壁で脱リグニンが進行していた。また、稈の内側に比べて表皮側でリグニンが高濃度で残存していることが判明した。基本組織柔細胞の細胞壁および維管束鞘繊維の二次壁内側ではリグニンが溶脱していたが、維管束鞘繊維の二次壁外側と細胞間層にリグニンが高濃度で残存していた。

どの品種でも JNK25 (2.3.3.2 (1)-3 参照) で高糖化率を示した。特に糖化率の高かった種 (Ni22) では、アルカリ前処理後にフィブリル間に空隙が観察され、前処理によって生じる空隙が多いほど表面積が大きく、糖化率が高くなると考えられた。以上より、品種を選ぶことで、高効率糖化につなげられると考えられる。

(3) -1-7 サトウキビ酵素糖化残渣表面の微細構造および化学成分分布

a) 目的

組織構造が明瞭なサトウキビの切片を用いて、糖化残渣表面に残存する細胞壁成分 (セルロース、ヘミセルロース、リグニン) の分布を明らかにした。今回は、アルカリ前処理後に低濃度および高濃度酵素糖化した際の、サトウキビの部位別の糖化状況、細胞壁の分解状況および糖化残渣表面に露出した細胞壁成分の違いを解析することにより、頭打ち現象の原因を分析した。

b) 方法と結果

低濃度および高濃度で糖化したいずれの残渣でも、糖化が頭打ちになった糖化残渣には、表皮もしくは表皮側の維管束が多く含まれていた。これは、アルカリ前処理をしてもリグニンが高濃度で残存している部位である。また、維管束鞘繊維の一部の細胞壁はPAS反応に強く呈色し、偏光顕微鏡下では複屈折性も観察された。これらは、糖化残渣に多糖類やセルロースが分解されずに残存していることを示している。低濃度酵素で糖化した残渣の細胞壁表面では、特に維管束鞘繊維の細胞表面にセルロースが多く残存しており、キシランの残存も観察された。また、高濃度酵素糖化した残渣の細胞壁表面では、キシランが残存していたが、セルロースはわずかに残存しているだけであった。以上の結果は、アルカリ前処理でも溶脱しなかったリグニンや未分解のキシランが糖化の進行を妨げている可能性が考えられた。また、酵素が少量の場合、細胞壁表面上のセルロース分解がされないことより、酵素のセルロース糖化能を更に上げていく必要がある。

(3) -1-8 サトウキビ切片糖化中の各成分酵素の局在観察

a) 目的

自然界で生産されるセルラーゼは様々な酵素が混合したカクテルであり、お互いの相乗効果により効率的にセルロース、ヘミセルロースを分解している。しかしその分解中の挙動 (どの酵素がサトウキビ組織のどの部分から分解していくのか、吸脱着の様子) は良く分かっていない。より高効率な酵素を開発するため、各成分酵素の挙動を明らかにすることが目的である。

b) 方法と結果

成分酵素 (CBH I, CBH II, EG I, EG II, AaBGL1, F1364, XYN III, CBM 欠損 F1364) を Alexa Fluor546 labeling kit (A10237, Invitrogen) または Alexa Fluor488 labeling kit (A10235, Invitrogen) を用いてラベル化した。

30 μ m 厚のサトウキビの横断面切片をスライドグラス上に載せ、各成分酵素を *T. reesei* 由来のセルラーゼカクテルに近い組成になるように混合し、そのうち 1 成分を蛍光ラベル化酵素とした酵素液を滴下し糖化反応を行いながら撮影を行った。

各酵素について得られた顕微鏡画像から、糖化時間による輝度変化をピクセルごとにデータ化した。このデータを元に、輝度変化を k-means 法により 8 つのクラスターにまとめ、その各クラスターの中央値を特徴変化曲線として導出し、対応する画像上の位置をマッピングして可視化した。

酵素の挙動を大きく分けると、挙動の異なる 4 つのグループに分類され、それぞれの酵素の機能が推測された。

(3) -1-9 サトウキビ及びバガスのリグノセルロース性状分析

a) 目的

サトウキビ茎の切片の顕微鏡観察から、表皮付近及び髄の維管束ではアルカリ処理によりリグニンが除かれ難く、また、酵素糖化され難いことが明らかとなっている。一方、サトウキビ茎の切片と蛍光ラベル化酵素を用いた検討から、特に糖化過程の後期において、表皮付近及び髄の維管束への酵素の吸着が示唆されている。

これらの結果から、バガスは、サトウキビ植物体の中でも糖化しにくい組織を多く含んでいると考えられる。

そこで、リグノセルロースの性状解析から性状と酵素糖化阻害との関係性を検討した。

b) 結果

バガスとサトウキビ植物体を用いた検討から、バガスのリグノセルロース組成・構造は、サトウキビ植物体節間の表皮付近及び髄の維管束のそれらと比較的似ていることが明らかとなった (図 2.3.3.1 (3)-3)。

バガス、サトウキビ植物体節間の表皮付近及び髄の維管束では、リグニン (特に G 型リグニン) が多く、非晶性グルカンが少なく、またアラビノース側鎖の少ないキシランに富んでいることが示唆されたことから、そのような構造が酵素糖化を阻害する要因なのかもしれない。

また、各種前処理を施したバガスの解析から、前処理方法により、リグニンの含量及び構造が大きく異なることが明らかとなった。JBA による検討では、アルカリ処理を施したバガスは、他の前処理バガスと比べて酵素糖化率が高かったことから、リグニンの除去 (図 2.3.3.1 (3)-4 (A)) がバガスの酵素糖化性向上に大きく寄与することが示された。しかしながら、アルカリ処理後においても、G 核を主体とする高分子のリグニンポリマーの残存が示唆された (図 2.3.3.1 (3)-5)。

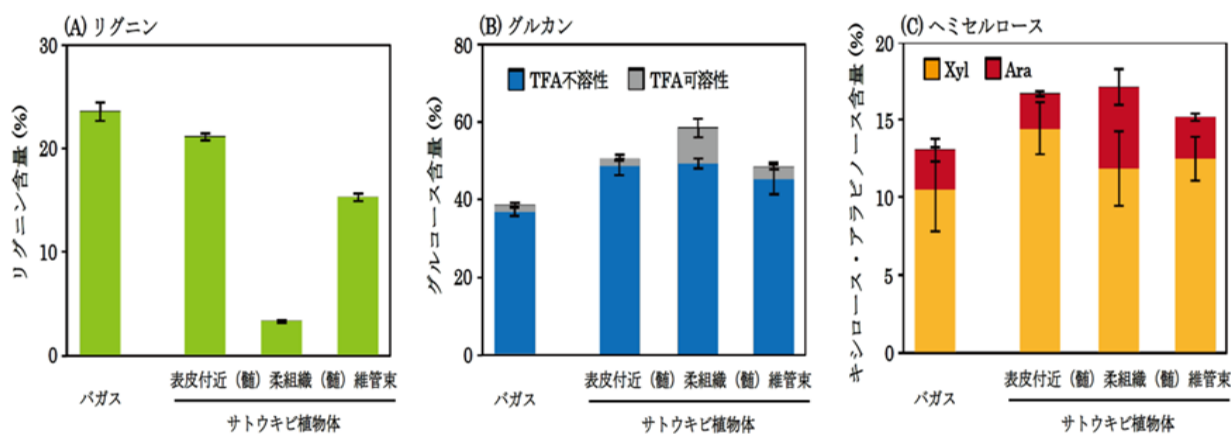


図 2.3.3.1 (3)-3 サトウキビ植物体の部位による組成解析

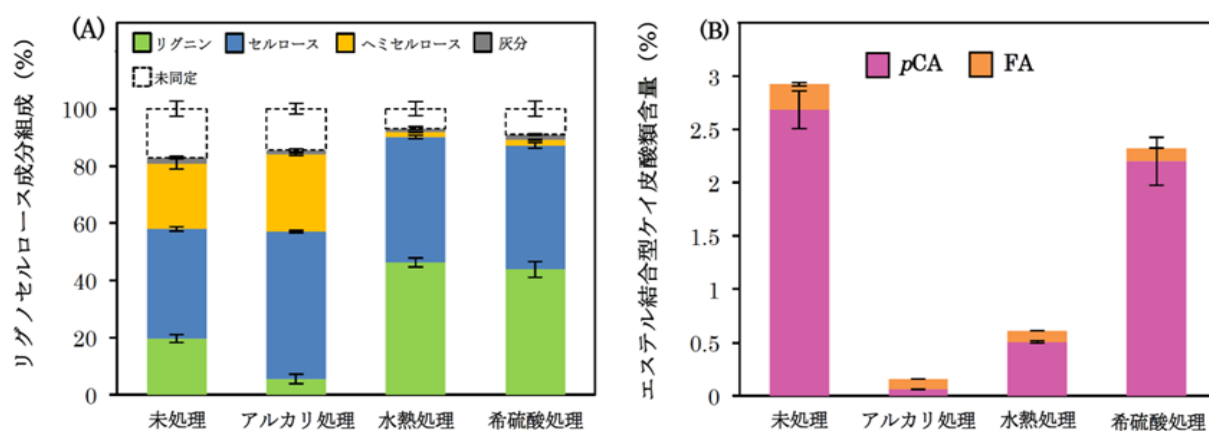


図 2.3.3.1 (3)-4 サトウキビバガスの前処理の違いによる組成変化

したがって、アルカリ処理バガスのさらなる酵素糖化性改善のためには、G型リグニンに対する非特異的酵素吸着の抑制などが必要となるかもしれない。一方で、水熱処理バガスと希硫酸処理バガスはリグノセルロースの成分組成が似ており（図 2.3.3.1 (3)-4 (A)）、また JBA での検討によると、酵素高濃度での糖化率は水熱>希硫酸であった。水熱処理バガスと希硫酸処理バガスでは、酸縮合などのリグニンの構造変化が起きており、しかもその構造変化の程度は水熱>希硫酸であった（図 2.3.3.1 (3)-5）。

JBA によるリグニンモデル試料を用いた実験から、リグニン添加による酵素糖化阻害の程度は、希硫酸処理バガスリグニン>水熱処理バガスリグニン>アルカリ処理バガスリグニンであることが示され、希硫酸処理バガスのリグニンが非特異的酵素吸着を介して糖化阻害に寄与することが示唆された。水熱処理バガスと希硫酸処理バガスにおけるリグニンの構造の違いが、非特異的酵素吸着を介して、酵素糖化率の差に影響するのかもしれない。このことを検証するためには、より多くの検体を用いて、リグニンの構造と酵素糖化性、酵素吸着性の相関解析をすることが必要であると考えられる。

以上、本研究から、バガスのリグノセルロースの基本的性状と、各種前処理及び酵素糖化によるリグニンの組成・構造変化が明らかになった。本研究の成果は、バガスのリグノセルロース性状と酵素糖化阻害の関係を明らかにし、酵素糖化プロセスを効率化するために有用な基礎知見となると期待される。

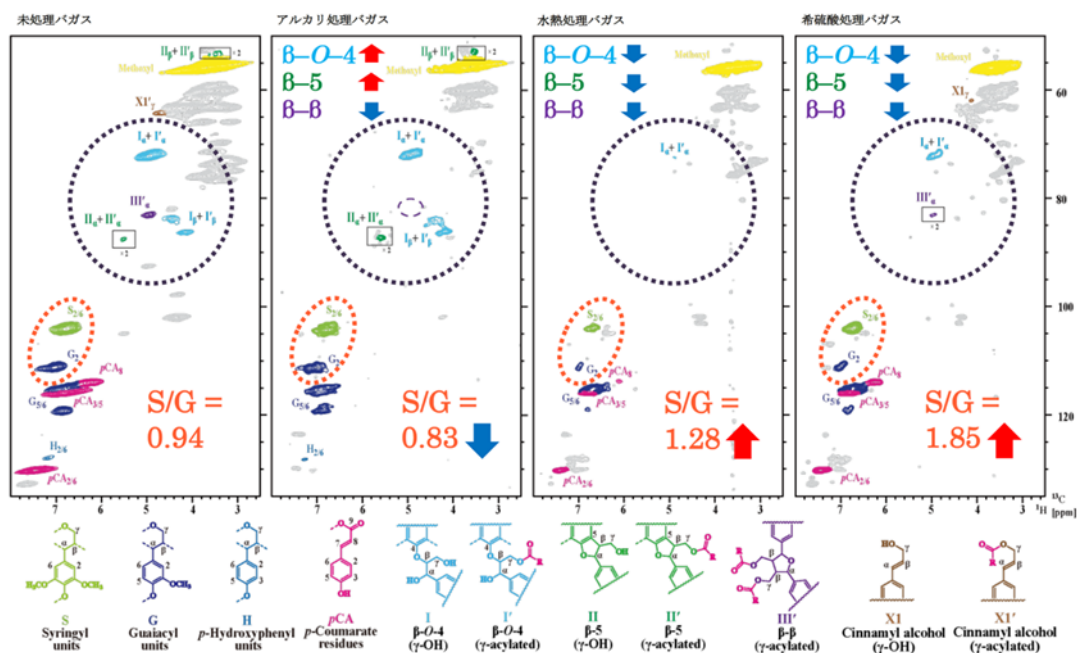


図 2.3.3.1 (3)-5 2D HSQC-NMR 分析によるバガス未処理物と各種前処理物のリグニンの構造比較
サトウキビバガス未処理物及び前処理物の 2D HSQC-NMR スペクトル

総括

バガスという原料の品質が変動することに十分留意せねばならないことが判明した。これまで、バイオマスの各種前処理物について糖化され易さ等を比較解析した研究は多いが、前処理物からセルロース画分を調製し、これに対する糖化について解析した研究はあまりない。ここで示した 3 種の前処理法により得られたセルロースの物性解析データは貴重である。これまでリグニンが糖化を阻害していることは種々指摘されてきたことであるが、リグニンとヘミセルロースを除去すれば糖化に必要な酵素量が最大で 1/3 まで削減できることが示されたことの意義は大きいものと思われる。

以上の研究より、バガス目処理物の酵素糖化機構を解析する上で重要な「頭打ち現象」の主要な要因としては、サトウキビの表皮部分に多く存在するリグニンが糖化を阻害し、酵素量を増やしても糖化しきれないためと言える。また、このリグニンにおいては、アルカリ処理、希硫酸処理、水熱処理でリグニンの含量および、構造が大きく異なることから、その酵素吸着挙動の差が各前処理バガスの糖化率の違いに影響するといえる。これについては、G 核リグニンに対する酵素の非特異的吸着の抑制が必要となる。

また、比較的リグニン残量の少ないアルカリ処理バガスにおいても、完全に糖化がしない要因として、前処理時のキシランの再吸着が糖化を妨げる要因となっている可能性が示唆された。また、F1364 の表面にキシランが再吸着した基質への効果の高さも確認された。

各前処理物の酵素糖化挙動の違いを議論する上で、セルロースの構造も重要な要因であることが分かった。セルロースの前処理による、構造（特に、結晶性、表面の新水面の割合、分散性等）の違いが各酵素成分の糖化性能に影響を与えることが分かった。特に、比較的分散性が高く、新水面が多いアルカリ処理セルロースは酵素のアクセシビリティが高く糖化し易い構造と言える。

また、各成分酵素のセルロースへの吸着挙動を比較した結果から、F1364 は基本組織柔細胞への吸着時間が早く、キシラン分解能が高いため、他のセルラーゼがセルロースを分解しやすくなる

と予測される。これは、前述のキシラン再吸着した基質への効果の高さとも矛盾しない結果であった。

(3) -2 前処理バイオマスに応じた最適糖化酵素（カスタム酵素）の構築技術（JBA）

本プロジェクトで基質として用いたバガスに対し、最も糖化効率の高い糖化酵素を創製する為には、この基質に対して最適化したカスタム酵素を設計する必要だと考えた。このコンセプトの妥当性を検証する為、基質としてアルカリ処理バガスを用いて、セルラーゼ系、ヘミセルラーゼ系の各種成分酵素の特性解析とカスタム化の為の基本検討を行った。

1) 各種キシラーナーゼの性能評価

a) 目的

高性能なキシラーナーゼを見出すべく、*T. reesei* PC-3-7 株由来キシラーナーゼ、*A. aculeatus* 由来各種キシラーナーゼ、本プロジェクトで同定したヘミセルラーゼ F1364 について、精製標品を用いた酵素活性と、バイオマス糖化における糖化性能を比較した。

b) 結果

キシラーナーゼ活性測定の結果、XYN I、XYN II、*A. aculeatus* の GH11 で高い比活性が得られた（図 2.3.3.1 (3)-6 左）。逆に、XYN III、*A. aculeatus* GH10、F1364 の比活性は低い結果となった。これに対し、バイオマス糖化の結果からは、F1364 が最も高いヘミセルロース糖化率を与えた（図 2.3.3.1 (3)-6 右）。

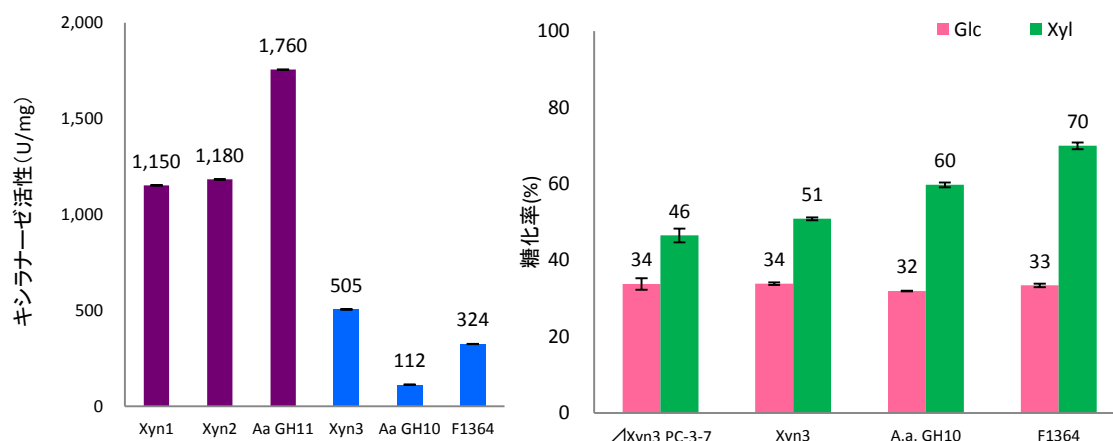


図 2.3.3.1 (3)-6 ヘミセルラーゼの評価

キシラーナーゼ活性測定（左）、ヘミセルロース糖化率の比較（右）

2) 各種成分酵素によるアルカリ処理バガス糖化の最適比率の検討

a) 目的

バイオマスを効率的に糖化する為には、原料や前処理ごとに異なる組成や性質を把握し、それぞれに合った最適な成分酵素の種類と量比を決定する事が重要である。アルカリ処理バガスに含まれるセルロースとヘミセルロースを、共に効率よく糖化するための最適比率を求め、糖化において主要な機能を果たすと思われる、CBH I、CBH II、EG I、XYN III の 4 酵素に着目し、それら成分酵素の最適比率を検証した。

b) 方法と結果

各種成分酵素 CBH I、CBH II、EG I、EG II、EG IV、XYN III、BXL、BGL1 を用いて、各種の比率で組み合わせた Mix 酵素 (3mg/g-BM) を配合し、アルカリ処理バガス (ロット No. B40) を基質とし、糖化反応 (5% (w/v) , 50°C、72hr) を行った。組合せは以下の通り。

表 2.3.3.1 (3) -3 成分酵素の組合せ比率 (CBH I、CBH II、EG I 添加比率の組み合わせ)

成分酵素添加割合(%)							
CBH I	CBH II	EG I	EG II	EG IV	AaBGL1	XYN	BXL
45	15	15	5	5	3	10	2
15	45	15					
15	15	45					
15	30	30					
30	15	30					
30	30	15					
5	35	35					
35	5	35					
35	35	5					
25	25	25					

表 2.3.3.1 (3) -4 成分酵素の組合せ比率 (成分酵素 1 種ごとに添加比率を変化)

成分酵素	CBH1	CBH2	EG1	EG2	EG4	AaBGL	BXL	Xyn3
Max添加比率(%)	35	20	15	5	5	5	5	10
CBH1	0	20	15	5	5	5	5	10
	5							
	10							
	15							
	20							
	25							
	30							
35								
CBH2	35	0	15	5	5	5	5	10
		5						
		10						
		15						
		20						
EG1	35	20	0	5	5	5	5	10
			5					
			10					
			15					
Xyn3	35	20	15	5	5	5	5	0
								5
								10

CBH I、CBH II、EG I の合計比率を 75% とし、各成分酵素の比率を変化させて糖化させた結果、CBH I の比率を 5% まで低下させると明らかなセルロース糖化率の低下が認められ、次いで、EG I の比率を 5% まで低下させるとやや糖化率の低下が見られた (図 2.3.3.1 (3) -7)。しかしながら、この結果を概括すると、これら 3 種の成分酵素の比率変動がセルロース糖化に与える影響は意外と小さいことが判明した。また、これらの組み合わせで種々比率を変えても糖率は JN13H を超える事は無かった。

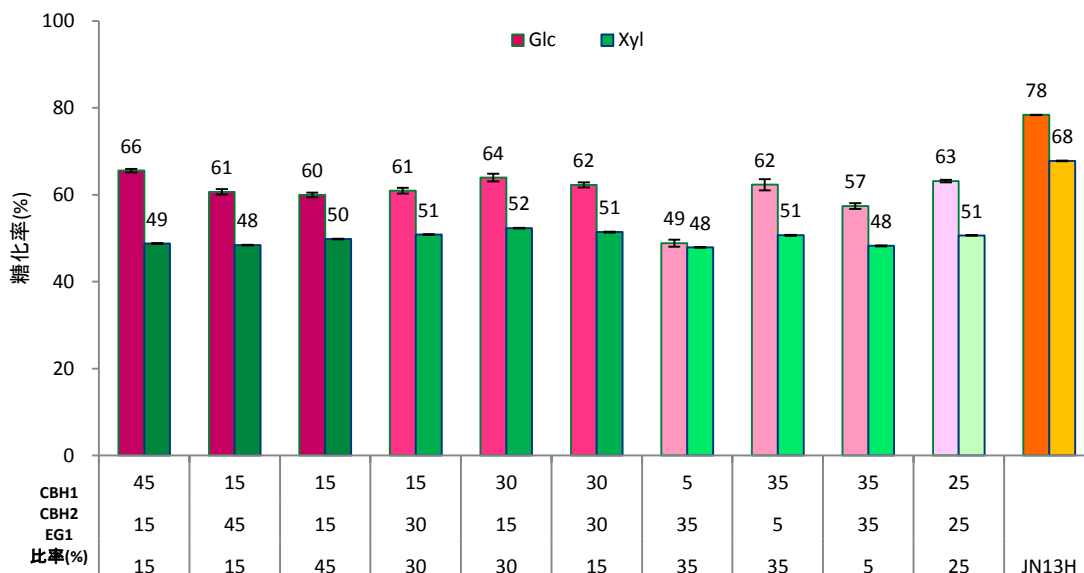


図 2.3.3.1 (3) -7 アルカリ処理バガスに対する成分酵素比率検討

成分酵素 1 種ごとに比率を変化させた結果、CBH I は 20%、CBH II は 10%、EG I は 10%、XYN III は 5%程度存在すれば、セルロースまたはヘミセルロース糖化率が一定の値になった (図 2.3.3.1 (3) -7)。

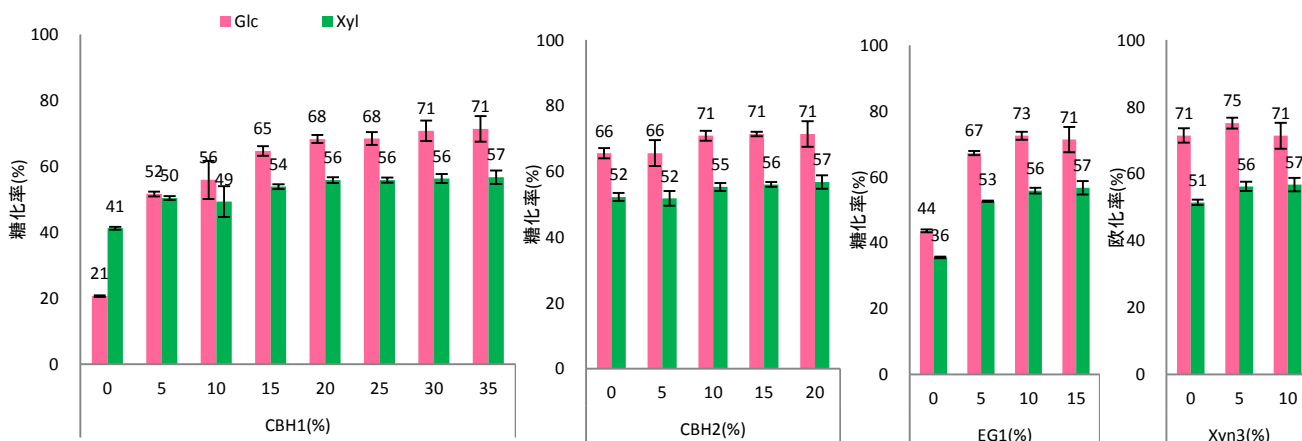


図 2.3.3.1 (3) -8 アルカリ処理バガスに対する成分酵素比率検討

総括

基質に対応させたカスタム酵素構築が可能かどうかを検証する目的で種々の検討を行った。結果的に各種ヘミセルラーゼの性能比較において、F1364 がバイオマス基質に対し非常に高活性であることを確認できた。セルロース糖化に関係する主成分である CBH I、CBH II、EG 1 の 3 種について大幅に比率を変化させても、糖化率は大きく変動しないという結果は、これら成分相互間での補償効果のようなものが存在する可能性を示唆しており、バイオマス糖化の機構が複雑であることを示唆していた。

2.3.3.2 工業用生産菌株の構築

(1) 第二世代高機能糖化酵素生産菌の構築

研究開発課題1で得られた高機能遺伝子を、基盤研究で構築した第一世代高機能糖化酵素生産菌 JN 株に導入することにより、第二世代高機能糖化酵素生産菌を構築し、糖化酵素の更なる高機能化を図る。

(1) -1 高機能成分酵素発現プロモーターの開発と選択（長岡技大）

a) 目的

高機能酵素発現株の開発には、本PJで得られた高機能成分酵素を、必要量発現させる必要がある。そのため、6種類の野生型プロモーターcbh1、cbh2、egl1、egl3、xyn3 および bgl1 ならびに xyn3 プロモーターを利用した人工プロモーターを構築した。改変プロモーターは、キシラン系基質で誘導されない xyn3 プロモーターを改変し、セルロース誘導能の強化と本来 xyn3 プロモーターが持たないキシロース誘導能の付与に成功した。

そこで、高機能成分酵素発現用にプロモーター改良を目的とし、人工プロモーターの特性（セルロース系誘導能・キシロース誘導能付加）を強化した人工プロモーターのバリエーションの構築・評価を実施した。

b) 方法と結果

人工プロモーターの機能は、GUS レポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイによって評価した。その結果、誘導性並びに誘導強度が向上した新規人工プロモーターの取得に成功した。

(1) -2 新規キシラナーゼ酵素生産菌株の構築と評価（花王）

a) 目的

2.3.3.1 (1) -4にて、JN11 株由来酵素に対して新規キシラナーゼ F1364 を添加した際にバイオマス糖化性を大きく向上することを見出した。そこで、本キシラナーゼを JN11 株に導入し、作製した株が生産する糖化酵素の性能を評価することとした。

b) 結果

JN11 株に対して、xyn2 プロモーターに F1364 の ORF を接続した遺伝子を形質転換し、得られた株を JNK25 株と名付けた。JNK25 株を培養することで、酵素液を調製した。得られた酵素液を用い、糖化性評価を行った結果を図 2.3.3.2 (1) -1 に示した。JNK25 株由来酵素は、JN11 株由来酵素と比較し、非常に高い糖化性を示した。

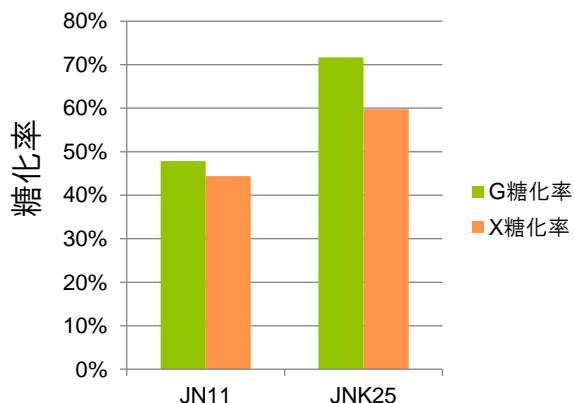


図 2.3.3.2 (1) -1 JNK25 株由来酵素のアルカリ処理バガス糖化率

(1) -3 JN13 への遺伝子導入箇所の特特定と生産性向上因子の獲得 (花王)

a) 目的

JN13 株は、親株である PC-3-7 株よりも生産性を示すが、同様の遺伝子構成を持った他の株では生産性が低下する傾向が確認されている。そこで、JN13 株においては非相同組換えにより遺伝子が導入されることで生産性が向上していると考え、遺伝子の導入箇所の特特定を行うこととした。

b) 方法と結果

インバーズ PCR 法により JN13 株への組換え遺伝子挿入箇所の配列情報を解析した結果、図 2.3.3.2 (1) -2 に示すように、組換えた DNA 断片 (*Peg11-aabg11-amdS*) はある特定の遺伝子 (以下遺伝子 A) の構造遺伝子内に挿入されており、遺伝子 A がコードするタンパク質は正常に機能しない状態となっていることが明らかとなった。

JN13 株の高生産性に遺伝子 A の破壊に関わることを検証するため、組換えにより PC-3-7 Δ 遺伝子 A 株、PCD-10 Δ 遺伝子 A 株、および PC-3-7 Δ 遺伝子 A::*Peg1-aabg11-amdS* 株を作製した。得られた株はジャーファーマンターにより培養し、得られた培養上清のタンパク質量を定量した。PCD-10 株は、PC-3-7 株の生産性向上変異株である。

PC-3-7 株、PC-3-7 Δ 遺伝子 A 株、PCD-10 株、PCD-10 Δ 遺伝子 A 株に関しては、炭素源としてセオラスを 10%用いて培養を行った。この際のタンパク質生産挙動を図 2.3.3.2 (1) -3 に示した。PC-3-7 株と比較し、PC-3-7 Δ 遺伝子 A 株は非常に高い生産性を示した。また PCD-10 Δ 遺伝子 A 株も PCD-10 株よりも高い生産性が確認された。このことから、遺伝子 A の破壊が直接的に高生産性に寄与していることが示された。

JN13 株は BGL が高生産されるにも関わらず生産性が向上していることから、生産性向上と同時に、カタボライト抑制がかかりにくくなっている可能性が示唆された。そこで、グルコース存在状態におけるタンパク質生産能を比較することを目的に、グルコースを含む培地での生産性を評価した。PC-3-7 株、PC-3-7 Δ 遺伝子 A 株、PCD-10 株、PCD-10 Δ 遺伝子 A 株を用い、炭素源としてセオラス 10%、グルコースを 2.5%用いて培養を行った。この際のタンパク質生産挙動を図 2.3.3.2 (1) -4 に示した。図 2.3.3.2 (1) -3 のグルコースがない条件と比較し、PC-3-7 株、PCD-10 株ともにタンパク質生産量が低下し、生産速度が遅くなる傾向が確認された。これに対し、遺伝子 A 破壊株においてはグルコースが存在しても生産性、生産速度はほとんど低下しないことが明らかとなった。以上から、遺伝子 A を破壊することで、グルコース存在下においてもタンパク質生産が抑制されにくくなることが示唆された。以上から、JN13 株は *aabg11* を高発現させているにもかかわらず、遺伝子 A の破壊によりカタボライト抑制がかかりにくいいため、高生産性を示すことが示唆された。

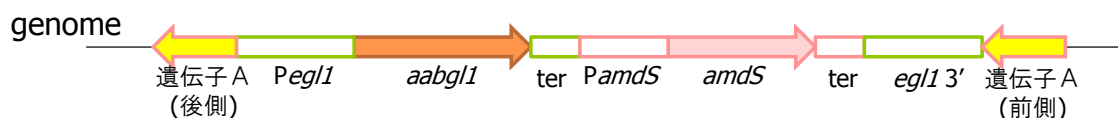


図 2.3.3.2 (1) -2 遺伝子 A の破壊コンストラクション

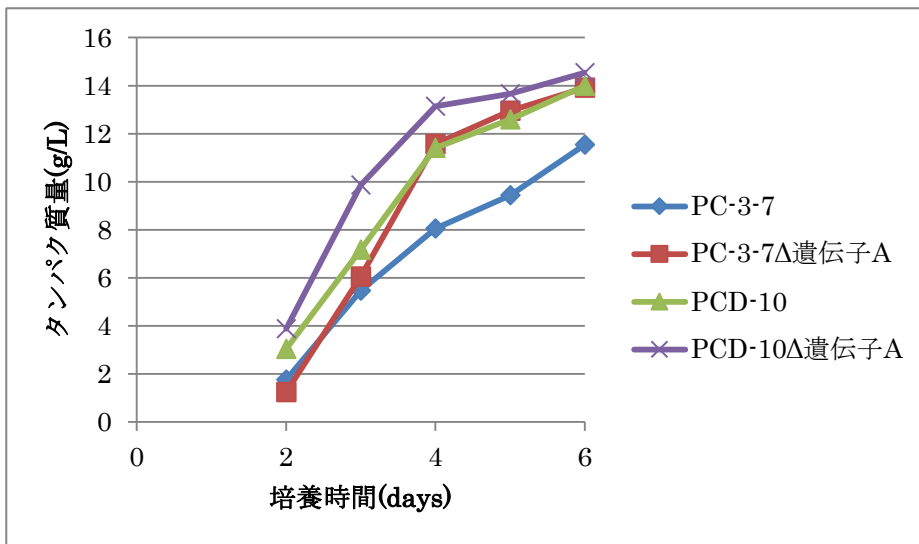


図 2.3.3.2 (1) -3 遺伝子 A 破壊株の培養評価

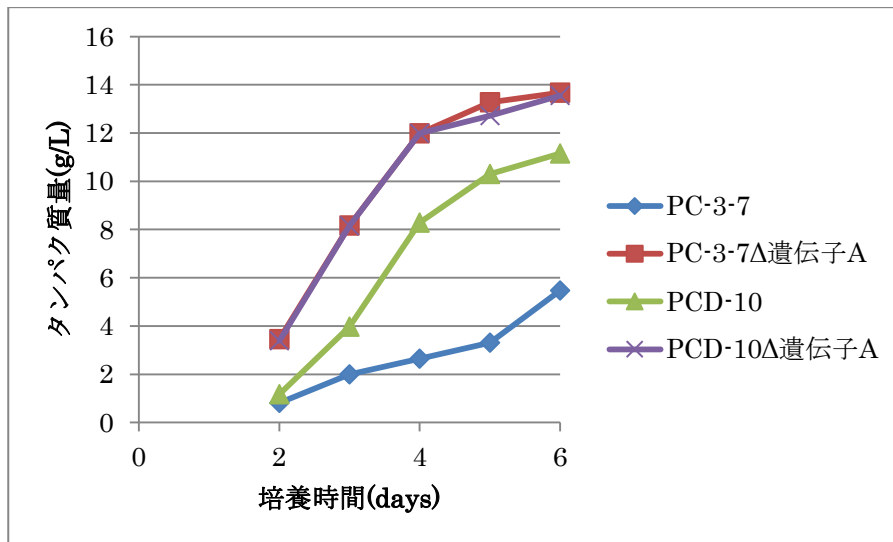


図 2.3.3.2 (1) -4 遺伝子 A 破壊株のグルコース添加時の培養評価

(1) -4 生産性向上因子を利用した JNP13 の改良(長岡技大、JBA)

1) 目的

(1) -3 で示したとおり、JN13 株の生産性の高さは、JN13 株作成時に遺伝子 A が欠損していることが原因であった。また、PC-3-7 株の遺伝子 A 破壊株は親株である PC-3-7 株と比べて生産性の向上が認められたことにより遺伝子 A 破壊は有効な向上因子としてその有効性が確認された。

PCD-10 株は PC-3-7 株の生産性向上変異株であり、糖化能の向上を目的に Aabg11 導入により JNP13 株を作製したが、その生産性は宿主とした PC-3-7 株同等であった。そこで、JNP13 株を用いて遺伝子 A を破壊することで生産性の向上を目指した。

2) 方法と結果

JNP13 遺伝子 A 破壊株を作成し、培養評価をした結果、親株 JNP13 株よりも生産性を向上させることに成功した。これにより遺伝子 A は生産性を向上させる因子として工業的酵素生産菌株導入因子として決定した。

(1) -5 転写調節因子利用による生産性増強（長岡技大、JBA）

a) 目的

糸状菌のセルラーゼ生産には、糖質加水分解酵素誘導制御因子、グルコース抑制に関与する炭素源異化抑制因子および環境 pH に応答した遺伝子発現制御因子が関わりと考えられる。また、分泌生産されたセルラーゼの品質や安定性には、細胞外プロテアーゼが関与する。そこで本項目では、（表 2.3.3.2 (1) -1）に示した転写調節因子の遺伝子を破壊した PC-3-7 株や JN13 株を評価することで、タンパク質生産性増強や品質向上に寄与する転写調節因子を探索した。

表 2.3.3.2 (1) -1 ターゲット転写調節因子

Protein ID	タンパク質名	機能	予想される変異の影響
120117	CREI	炭素源異化抑制	セルラーゼ生産増加
—	CRE II, III, IV	CREI の脱ユビキチン化等	セルラーゼ生産増加
75418	ACEI	セルラーゼ誘導条件下での制御	セルラーゼ生産増加
122879	XRPII	キシラナーゼ生産制御	キシラナーゼ生産増加
120698	PACC	pH応答	高pHでの酵素増産
70560	PALB	pH応答	高pHでの酵素増産
105255	PRTT	細胞外プロテアーゼ生産	酵素増産・安定性の向上

b) 方法と結果

ターゲット転写調節因子の中でも特に CRE I および CRE II の遺伝子破壊は、生産性増強に寄与する可能性が高かった。*T. reesei* CRE I と CRE II を含む CRE 遺伝子群の破壊による転写源異化抑制の解除とタンパク質生産性の向上が期待された。

ΔCre1 株をジャー培養にて評価したその結果、10%アビセルを炭素源にした条件下で、JN13Δcre1 のタンパク質生産速度が JN13 よりも向上し、最大生産生産量は約 20%向上していたが、10%アビセルと 2%キシランを炭素源とした条件下では、ほとんど変化がなかった（図 2.3.3.2 (1) -5）。

JN13 株で cre1 破壊が有用であったことから、JNP13 でも cre1 破壊株を構築した。JNP13Δcre1 株は、10%アビセルを炭素源とした条件と 10%アビセル+2%キシランを炭素源とした条件で、ジャー培養でのタンパク質生産速度がそれぞれ最大約 3 倍と 2 倍向上し、最終タンパク質生産量はそれぞれ約 50%と約 3%向上していた（図 2.3.3.2 (1) -6）。さらに生育能も改善しており、cre1 破壊は JNP13 系の生産性向上に大きな寄与を果たすことを明らかにした。

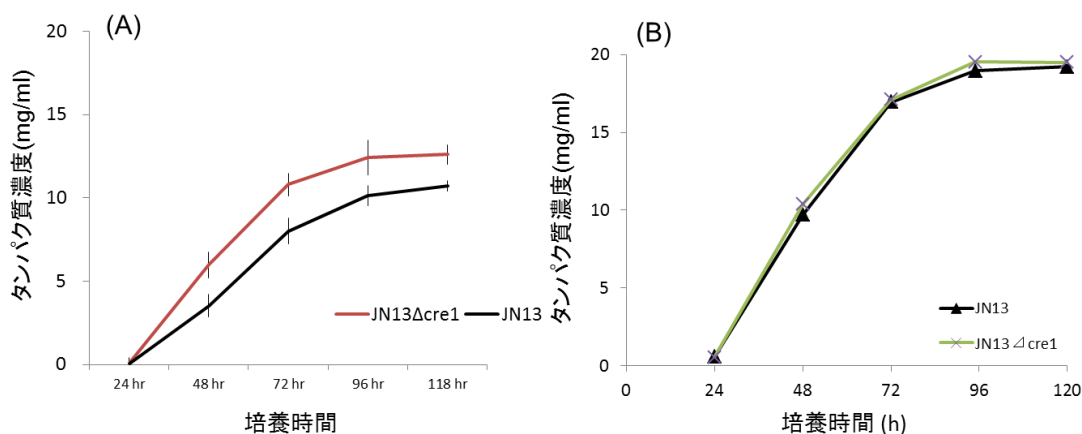


図 2.3.3.2 (1) -5 JN13 $\Delta cre1$ のジャー培養評価
10% アビセル評価 (A)、10% アビセル+2%キシラン評価 (B)

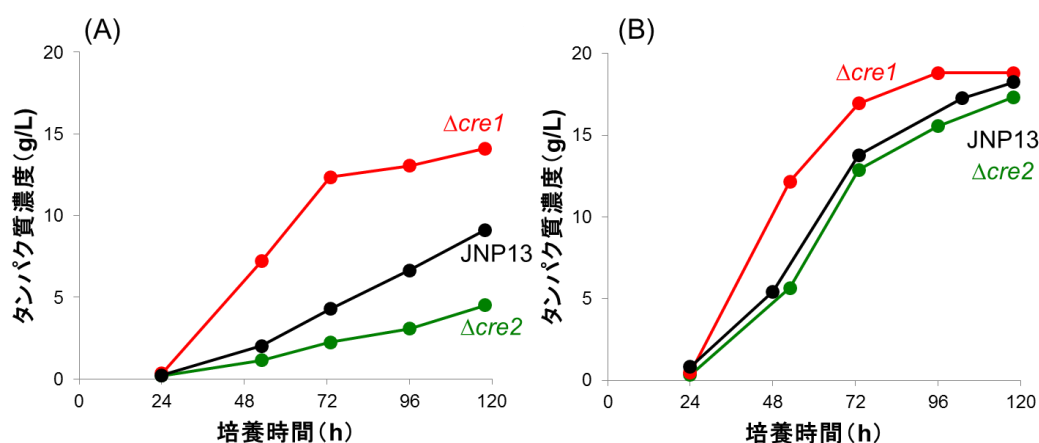


図 2.3.3.2 (1) -6 JNP13 $\Delta cre1$ および JNP13 $\Delta cre2$ のジャー培養評価
10%アビセル培養評価 (A)、10%アビセル+2%キシラン評価 (B)

(1) -6 酵素高生産株創製のための変異育種 (花王)

a) 目的

酵素高生産宿主の創製において、宿主におけるタンパク質高生産能は必須である。トリコデルマにおけるセルラーゼ生産において、酵素生産性向上の障害となる原因の一つとしてカタボライト制御があげられる。そこで、イオンビーム照射を変異原としたカタボライト制御解除もしくは軽減株の取得を目指した変異育種を行った。

工業用酵素生産株の候補株のうち、酵素生産能が一番高かった PCD-10 株に対して、イオンビーム照射を変異原とした変異育種を行った結果、グルコースとセルロースパウダーを含む

評価用寒天培地において、親株に対して優位にハロ (透明帯) を形成するカタボライト制御解除もしくは低減株の候補株を 3 株取得した。

そこで、ジャーフェーマンターを用いたグルコース高濃度 (2.5-10%) 培地での培養評価を行った。その結果、親株のセルラーゼ生産性が 70% 以上低下する 10% グルコース含有培地での培養条件においても、93G3 株は、20% 程度の生産性低下でセルラーゼ生産が可能であることが分かった。培養時のグルコース濃度を経時的に測定すると親株に比べて、急速にグルコース濃度の低下が観察されており、グルコース消費能が向上していると考えられた。

また、ジャーファーマンターを用いた生産性評価において、タンパク質生産性が20%向上していた。このとき、変異株の生産した酵素の組成に大きな変化は見られなかった。培養トレンドからは、93G3 変異株は、生育最高点への到達時間が親株と比べて8時間ほど早まっており、増殖も約30%向上していた。

このことから工業用生産菌培養評価による出発菌株を取得した変異株 93G3 とすることとした。

(1) -8 93G3 株のゲノム解析と変異遺伝子評価 (花王)

a) 目的

変異株 93G3 に対しゲノム解析を行い、高生産性・高グルコース耐性はどのような遺伝子の変異に起因するのか検証を行った。本検証によって酵素生産における新たな知見を獲得するとともに、これまで育種を進めてきた JN シリーズへの本変異株の形質反映を目指した。

b) 結果

PCD-10 を参照配列とし、93G3 株との差異を抽出した結果、大領域欠損を含め構造遺伝子領域には11か所の変異が確認された。

その中で Protein ID : 22774 に着目した。本遺伝子は機能未知遺伝子であるが、BLAST 解析によりアノテーションの付与を行ったところ、*N. crassa* や *Fusarium oxysporum f. sp.* の *sre1* (sterol regulatory element binding protein 1) と高い相同性を示し、Reilly ら (Reilly et.al., 2015 Biotechnol Biofuels 8:121.) も ID : 22774 遺伝子は *T. reesei* における *sre1* 遺伝子であると報告していた。SRE1 (SREBP1) はヒトにおいては脂質代謝制御の中心的な役割を担う転写因子であるが、菌類においては低酸素応答や病原性への関与について知られているものの、未だ機能は明確に知られていない。そこで、親株 PCD-10 に対し相同組換えによる本遺伝子の破壊検討を実施した。

続いて *sre1* 遺伝子の破壊が生産性・グルコース耐性にも寄与するのか Jar 培養評価を行った。炭素源として10%アビセルと、10%アビセル+5%グルコースの条件で培養を行った。図 2.3.3.2

(1) -7 に酵素生産性を示す。

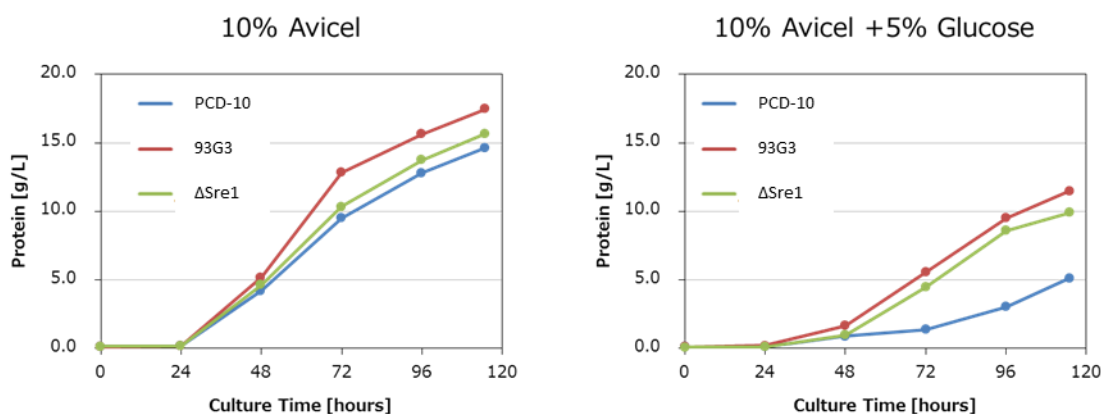


図 2.3.3.2 (1) -7 ΔSre1 株のアビセルおよびアビセル+グルコース培養評価

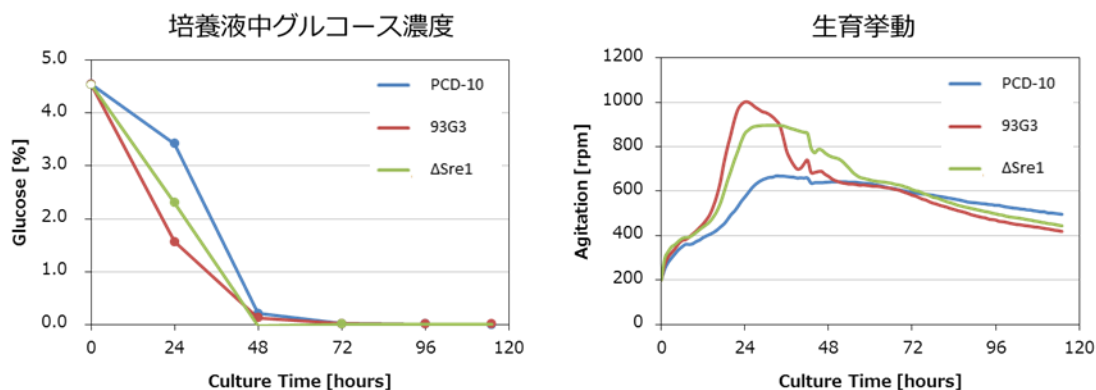


図 2.3.3.2 (1) -8 ΔSre1 株のアビセル+グルコース培養時の培養液中グルコース濃度変化と生育挙動

アビセルのみの条件において、PCD-10 ΔSre1 株の生産性は 93G3 株に及ばなかったが、親株 PCD-10 と比較して若干の生産性向上が見られた。よって、93G3 株の高生産性には、Sre1 遺伝子以外の変異が関与している可能性が示唆された。

一方、グルコース添加条件においては明確な生産性の差が確認され、親株 PCD-10 株ではカタボライト抑制により顕著な生産性低下が見られた。

93G3 株は、親株 PCD-10 と比較してグルコースの消費が速いという特徴を持つが、PCD-10 ΔSre1 株もグルコースの消費速度は増加していた。また、生育の挙動も 93G3 株に近づき、菌体量の増加も確認することができた。(図 2.3.3.2 (1) -8)。このことから、高グルコース耐性は Sre1 遺伝子への変異であることが確認された。

(2) 安価な炭素源への適用

(2) -1 炭素源の探索 (花王)

a) 目的

一般的に糖化酵素生産にはアビセルなどの微結晶性セルロースやキシランが炭素源として有効であることが知られている。しかし、アビセルやキシランは高価であり、糖化酵素実生産には安価炭素源による培養系の構築が課題となっている。そこで炭素源のコスト低減を目指し、高価なアビセルから安価炭素源への置き換えを検討した。NBKP (needle bleached kraft pulp: 針葉樹晒クラフトパルプ) および LBKP (leaf bleached kraft pulp: 広葉樹晒クラフトパルプ) の 17 種類の安価パルプを入手し、酵素生産性を評価した。

b) 方法と結果

糖化酵素生産菌株として JN24 株を用い、17 種類のパルプについて酵素生産性を検討した。その際、パルプをシュレッター処理したものを 1.5% 仕込んだ。また対照としてモデル炭素源であるアビセルを使用した。ミニジャーにて 5 日間培養を行い、酵素生産性を測定した結果、NBKP-5、LBKP-1、-3、-5 の 4 種類のパルプにおいてアビセルと同等以上の生産性が示された。上記 4 種類のパルプについては粉碎品を調製し、酵素高生産条件である 10% 仕込みで酵素生産評価を行った 8% アビセル・2% キシラン (以下、アビセル・キシランとする) を対照として用いた。ジャーにて 4 日間培養を行い、酵素生産性を測定した結果、アビセル・キシランの生産性に対し、LBKP-1 は若干生産性が低かったものの、その他 3 種のパルプはアビセル・キシランとほぼ同等の生産性を示した。これらの結果から、安価パルプ数種について、アビセルやキシランなどの高価な炭素源と置き換えできることが明らかとなった (図 2.3.3.2 (2) -1)。酵素生産培養のスケールアップ検討には、入手性を踏まえて LBKP-3 を使用した。

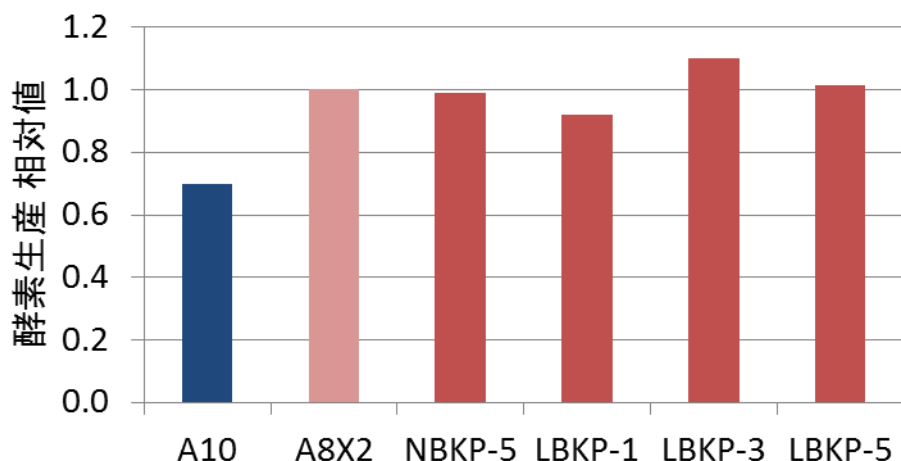


図 2.3.3.2 (2) -1 粉砕パルプを炭素源とした酵素生産性評価

10%パルプ粉砕品を炭素源として培養を行い、酵素生産評価を行った。また8%アビセル・2%キシラン (A8X2) を対照とした。ジャーファーメンターにて 28°Cで 4 日間培養し、上清から糖化酵素を得た。A10 は 10%アビセルを示す。

(3) 革新的糖化酵素工業生産菌の創製

(3) -1 技術統合株 JNK26 株の構築(花王)

1) 目的

F1364 キシラナーゼを発現させた JNK25 株が生産する糖化酵素は、高い糖化性を示した。更なる高糖化性酵素生産株の構築を目指し、F1364 キシラナーゼの最適な発現量の把握と、それに合わせた菌株開発を行うこととした。

b) 結果と考察

F1364 キシラナーゼの精製酵素を用い、JN11 株由来酵素に対しての最適な F1364 配合量を検証した。その結果を図 3-4-1-1 に示した。F1364 を全酵素量に対して 2.5%~25%配合した際に高い糖化率を示すことが明らかとなり、特に 5%~25%程度の配合量が最適であることが確認された (図 2.3.3.2 (3) -1)。JNK25 に含まれる F1364 の推定量は 5%よりも少ないことから、より F1364 を高発現する株の構築が必要であることが示唆された。

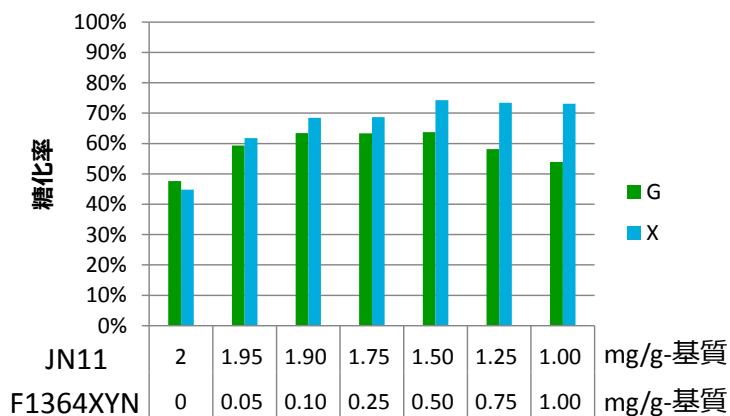


図 2.3.3.2 (3) -1 F1364 キシラナーゼの最適添加量の検討

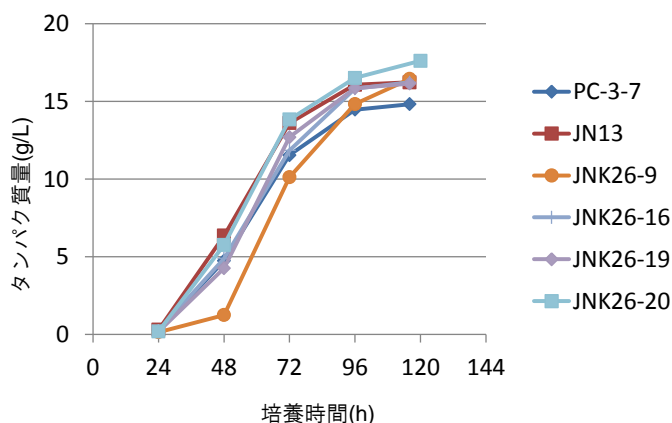


図 2.3.3.2 (3) -2 F1364 導入株、JNK26 株の酵素生産性評価

F1364 高発現株の構築を行った。親株には酵素生産性を考慮し JN13 株を用い、人工プロモーターに F1364 の ORF を接続した遺伝子を形質転換した。形質転換体は複数株取得し、JNK26-9, 16, 19, 20 の 4 株を選抜した。

選抜した株に関してはジャーファーマンターを用いて酵素生産性評価を行った。その結果を図 2.3.3.2 (3) -2 に示した。JNK26-9 は培養に遅れが、JNK26-16 は低生産性が確認された。これに対し、JNK26-19 では JN13 株と同等の生産性が、JNK26-20 では高生産性が確認された。JNK26-19, 20 の 2 株に関して、酵素組成解析を行った。その結果、JNK26-19 では F1364 が約 15%、JNK26-20 では約 30%含有されていることが確認された。JNK26-19 に関しては F1364 の含有量が適当な範囲に収まっており高糖化性が期待される株として選抜した。以下、JNK26-19 株を用いて更なる検討へと進めることとした。

(3) -2 革新的糖化酵素工業生産菌候補株 JN30 の構築 (長岡技大、JBA)

a) 目的

各研究課題において酵素の生産性向上因子、糖化性能向上因子を評価し、JN13 または JNK26 をベースに各因子の評価を行ってきた。これら因子の中で向上因子と認められた因子については高機能糖化酵素生産菌構築に利用し、工業用に適した菌株の造成を目指す。

b) 方法と結果

研究開発 2.3.3.2 (1)-6 にて生産性の向上が認められた JN13 $\Delta creI$ 株を用いて、研究開発 2.3.3.2 (1)-8 で生産性向上が認められた *sreI* の破壊および糖化能力を向上させるキシラナーゼ F1364 を人工プロモーターを用いて導入した。得られた株は 1% Avicel + 0.2% Xylan 培地を用いフラスコ培養後、タンパク質生産性および活性を指標にスクリーニングを行い、JN13 $\Delta creI \Delta sreI$ + F1364 (JN30) 株を得た。

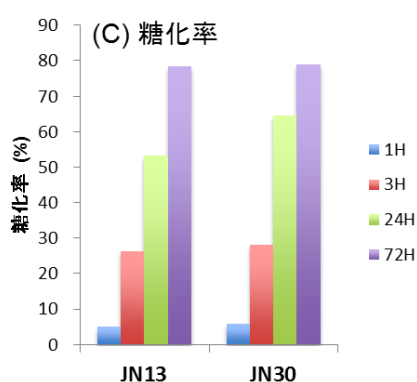
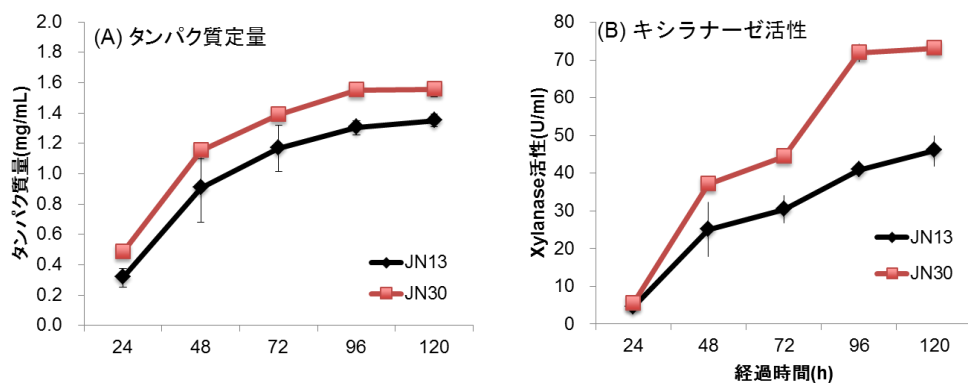


図 2.3.3.2 (3) -3 JN13 株および JN30 株の評価

1% Avicel フラスコ培養上清のタンパク質定量 (A)、キシラナーゼ活性 (B)、糖化率 (C)

糖化評価は酵素 2mg/g バイオマス、アルカリバガス（ロット No. B67）、5%スラリーを用い、50℃で行い、1 時間 (1H)、3 時間 (3H)、24 時間 (24H)、72 時間 (72H) 反応サンプルについて還元糖量を測定

JN30株をフラスコ培養にて評価した結果、親株であるJN13株と比較して生産性が10 % 増加し (図2.3.3.2 (3) -3A)、キシラナーゼ活性が1.6 倍に向上した (図2.3.3.2 (3) -3B)。また、アルカリバガスを用いた糖化評価においては糖化24時間反応にてJN13と比較し糖化率を約20 % 向上させることに成功した (2.3.3.2 (3) -3C)。

JN13株を出発菌株にこれまで造成したJN13 $\Delta cre1$ 株、JN13 $\Delta cre1 \Delta sre1$ 株、JN30株についてJBAにて10% Avicelジャー培養評価を行った結果、JN13 $\Delta cre1$ 株の生産性はJN13 株に比較して約20 % の向上が認められた。さらに、*sre1* を破壊したJN13 $\Delta cre1 \Delta sre1$ 株およびF1364 を導入したJN30 株へと改変に伴いその生産性を向上させることに成功した。

(3) -3 革新的糖化酵素工業生産菌候補株 FV21 の構築と生産性評価 (花王)

a) 目的

酵素高生産化のため変異育種により、PC-3-7 株から PCD-10 株、さらに高生産・高グルコース耐性の 93G3 株が取得された。JNK25 株、JNK26 株のように新規キシラナーゼ F1364 を組換えることで顕著に糖化性が向上することが明らかとなり、AaBGL 及び F1364 の導入が糖化性能向上において重要であることが示されてきた。しかし JNK25 株、JNK26 株の生産する酵素は高い糖化性能を持つ一方、宿主としての酵素生産性が低いという課題があった。

そこで現状の菌株・酵素技術を統合し、F/S を実施する際のプロトタイプ菌株として高生産・高糖化活性の酵素生産宿主開発を行った。

b) 結果と考察

SDS-PAGE により AaBGL 及び F1364 の発現が確認された株に関し、250 mL 容ジャーフェーマターを用いた生産性評価を実施した。93G3 系列では 2 日目時点での生産性は高い傾向があり、特に FV21 では生産量が高かった。FV21 株のように酵素生産の初速が速いこと、すなわち培養

フェーズが速いことは優位点となる。1%植菌時は10%植菌時と比較して酵素生産開始の遅れが課題であるが、93G3-FV21株ではその影響を減少させることができ、全体の培養期間の短縮に繋がる可能性が考えられた。

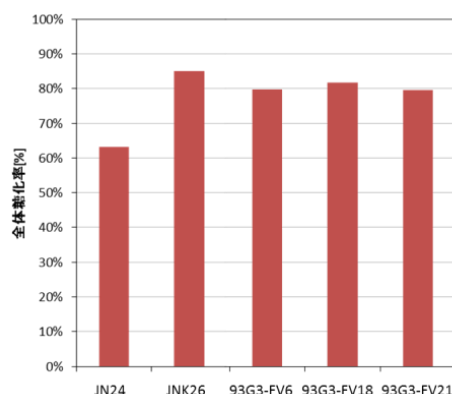


図 2.3.3.2 (3) -4 プロトタイプ菌株の糖化性評価

続いて JN24 株及び JNK26 株と、今回構築した生産性の上位 3 株の糖化性評価を実施した。F1364 未導入の JN24 株と比較し F1364 導入株 (JNK26 株、93G3-FV6, 18, 21 株) は高い糖化性を示した。93G3 系列の株は JNK26 株と比較し同程度の高い数値を示した (図 2.3.3.2 (3) -4)。

FV21 株と、JN 株をベースとした菌株の生産性比較を工業化用モデル培地で行うことで実生産への適応性を評価した。

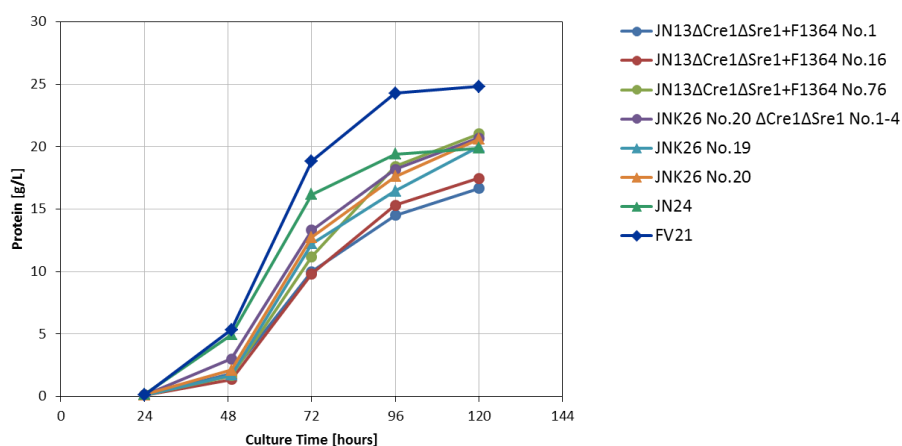


図 2.3.3.2 (3) -5 工業化用モデル培地を用いた生産性評価 (2L 容ジャーフェーマンター)

モデル基質における培養評価では FV21 株と JN24 株に大きな生産性の差はなかったが、安価工業化培地においては顕著な生産性の差が確認され、FV21 株が他の株を大きく上回ることが分かった。

以上のことから FV21 株の生産性に優位性が確認された。そこで、FV21 株を用いてスケールアップ検討を行うこととした。

(3) -4 パイロット候補株の糖化性能評価 (JBA)

a) 目的

パイロット候補として高生産培養された JN30、JNK26 No. 19、FV21 の培養上清の糖化率を算出し、高生産培養に適した株を選出した。また、成分酵素を添加し糖化反応を行うことによって、其々の株が発現する酵素の不足を明らかにした。また、それらの糖化反応液を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分析し、残存するオリゴ糖から不足成分酵素を解明した。

b) 方法と結果

アルカリ処理バガス (ロット No. B67) 5wt%を用いて、パイロット候補の工業用生産酵素 (JN30、JNK26 No. 19、FV21) 2.0 mg/g-BM を用いて糖化評価を行った。其々の工業用生産酵素には、AaBGL1 または BXL が 0、2.5、5、7.5、10% (0.05、0.1、0.15、0.2mg/g-BM) が追加で添加され、生成する単糖やオリゴ糖は酵素電極または陰イオン交換クロマトグラフィー (Dionex ICS-3000) によって分析された。

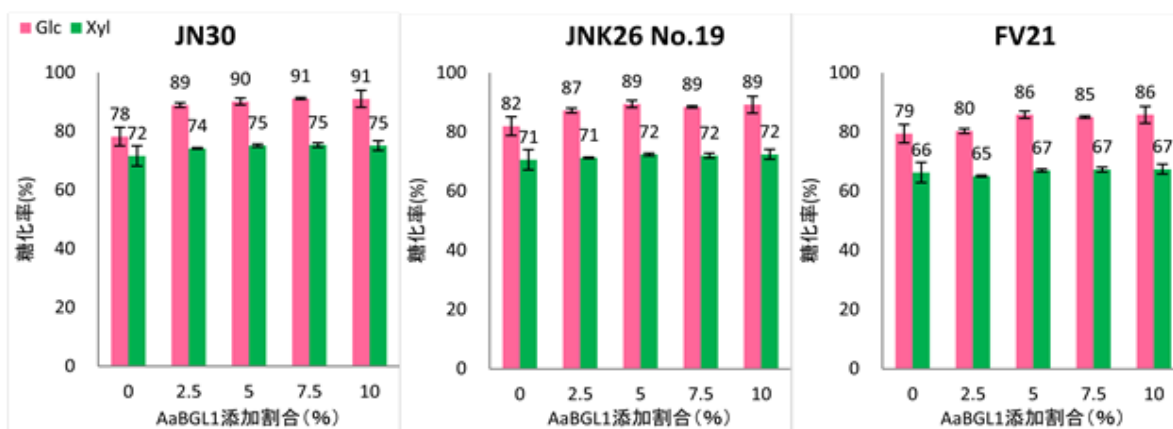


図 2.3.3.2 (3) -6 パイロット候補株 糖化率の比較と AaBGL1 の添加効果
JN30 (左)、JNK26 No.19 (中央)、FV21 (右)

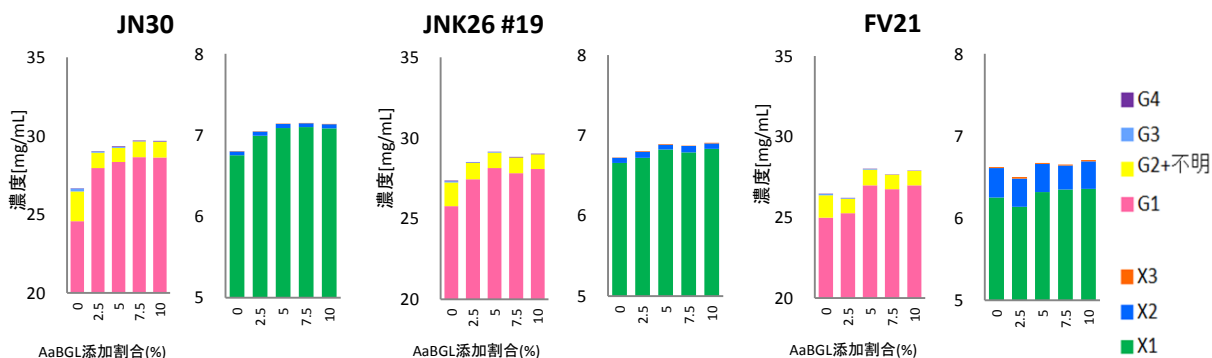


図 2.3.3.2 (3) -7 パイロット候補株 残存糖の種類と量

3つのパイロット候補株のうち、JNK26 No. 19 が最も高い糖化率を示した (図 2.3.3.2 (3) -6)。また、AaBGL1 を添加した結果、JN30、JNK26 No. 19、FV21 のいずれにおいても 5% でグルコース糖化率が飽和状態となった。一方、BXL の添加に対しては、JN30 では 5%、JNK26 No. 19 では 10% でキシロース糖化率が飽和状態に達したが、FV21 では 10% 添加時まで、添加 BXL 濃度に応じてキシロース糖化率が上昇し続けた (図 2.3.3.2 (3) -7)。これらの結果より、其々のパ

イロット候補株によって生産される酵素は、AaBL1、BXL のいずれも増量により性能向上する事が示唆された。糖化率向上の為には、更なる AaBGL1、BXL の発現強化が求められた。

(3) -5 変異 AaBGL 導入株の構築と評価 (花王)

a) 目的

前項までに高機能酵素の高生産株として FV21 株を構築したが、更なる糖化性能の向上を目指して JBA において増強すべき成分酵素の解析を実施したところ、BGL 及び BXL が不足していることが示唆された ((3)-4)。FV21 株の AaBGL は、ジャーフェーマンターで酵素生産を行った際に培養後半で一部分解してしまうことが明らかとなってきた。また、このような AaBGL の分解が、フラスコ培養で作製した酵素と比較してジャーフェーマンターで作製した酵素の糖化活性が低下する一因であると推察され、分解されにくい AaBGL の発現強化が有効であると考えられた。そこで、(2)-3、(2)-4、(2)-5 で改良した高機能型 AaBGL を組み込んだ菌株の構築を実施し糖化性能の向上を目指した。

b) 方法と結果

野生型の AaBGL を持つ FV21 株に対し相同組換えを行うことにより、変異を導入した AaBGL へと置換した株を作製した。本 AaBGL はジャーフェーマンターを用いた培養でも大きな分解が見られなかったことから、ジャー培養作製酵素における糖化性の低下を抑えられる可能性が予想された。

(3) -6 パイロット候補株 BGL、BXL 強化株の評価 (JBA)

a) 目的

パイロット候補株の糖化性能評価において、そのいずれの酵素において AaBGL1 や BXL の増量が性能向上を示した。そこで、本検討では、FV21 を元に AaBGL1 または BXL の発現強化株や、AaBGL1 の変異体の導入によって得られた、変異 AaBGL1 の発現 (強化) 株によって得られた酵素を用いた糖化評価を行った (表 2.3.3.2 (3) -1)。

b) 方法と結果

アルカリ処理バガス (B67) 5wt%にて糖化評価を行った。

表 2.3.3.2 (3) -1 AaBGL1・BXL 強化株リスト

宿主株	改変	フラスコ培養	ジャー培養
FV21		No.1	No.5
FV21改良株1	(変異体BGL強化)	No.2	No.6
FV21改良株2	(変異体BGL強化)	No.3	No.7
FV21改良株3	(変異体BGL強化)	No.4	No.8
FV21改良株4	(BGL強化)	No.9	No.15
FV21改良株5	(BGL強化)	No.10	No.16
FV21改良株6	(変異体BGL強化)	No.11	No.17
FV21改良株7	(変異体BGL強化)	No.12	No.18
FV21改良株8	(BXL強化)	No.13	No.19
FV21改良株9	(BXL強化)	No.14	No.20

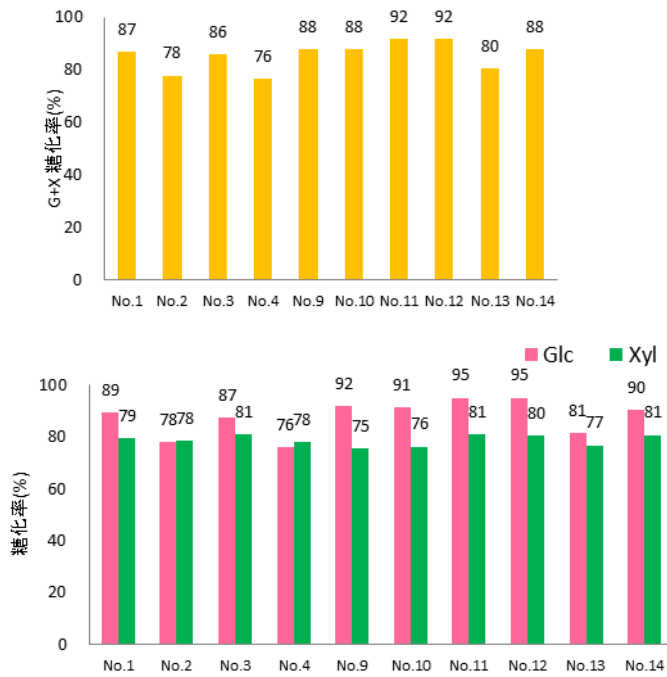


図 2.3.3.2 (3) -8 FV21 の AaBGL1、BXL 強化株酵素 (Flask 培養) による糖化反応の評価

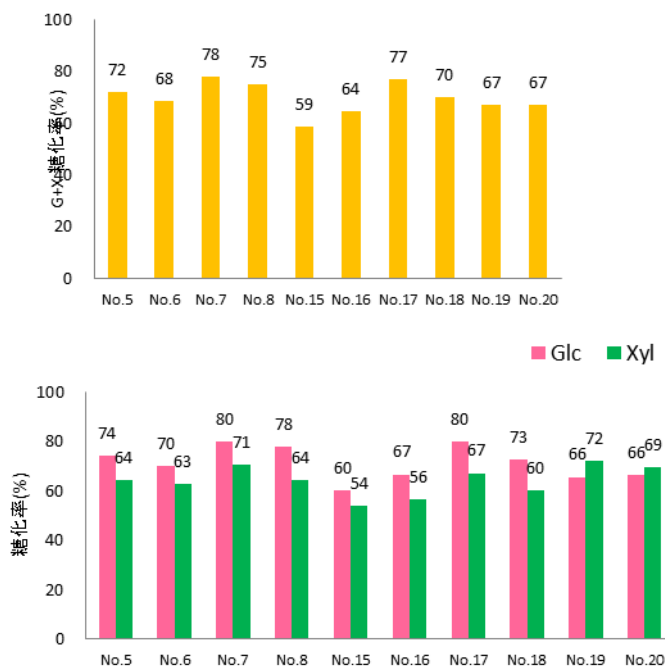


図 2.3.3.2 (3) -9 FV21 の AaBGL1、BXL 強化株酵素 (Jar 培養) による糖化反応の評価

FV21AaBGL 強化株においては、フラスコ培養の株 6 株、BXL 強化株では 1 株でホロセルロース糖化率が 80%を超えた。一方で、ジャー培養での酵素による糖化では、2 株で WT の FV21 を超えたが、いずれも 80%には至らなかった。これは、培養条件の違いによって糖化効率が大きく変動する為であるが、株の潜在能力としての能力は非常に高い為、株開発としては大きな成果を上げることができた。

(3) -7 1g 生成糖あたりに必要な酵素量の算出 (JBA)

a) 目的

成果目標「酵素使用量 2.5mg/g-生成糖」に対する、現在の菌株の性能評価を行う。

b) 方法と結果

アルカリ処理バガスを使用し、糖化を行い、ホロセルロースの80%を糖化するのに必要な酵素量を算出する。その値より、各酵素の1g生成糖あたりに必要な酵素量を求める。JN13(F), 市販酵素 Cellic CTec2 を比較とする。また、前述で BGL, BXL の添加効果が見られた株に関しては、BGL, BXL を添加した条件でも評価する。

評価した株と結果は表 2.3.3.2 (3) -1 の通り。なお、JN30BGL 強化株に関しては、2mg/g-biomass で糖化した値から算出した 1g 生成糖あたりに必要な酵素量を求めた。

これより、FV21 No.1, FV21BGL 強化株 No.3 において、成果目標「酵素使用量 2.5mg/g-生成糖」を達成しうる結果となった。

表 2.3.3.2 (3) -1 FV21 BGL/BXL 強化株の 1g 生成糖あたりに必要な酵素量評価

酵素	培養方法	80%糖化に 必要な酵素量	1g 生成糖あた りの酵素量	スリー 濃度
		mg/g-biomass	mg/g-sugar	%
FV21 No.1 (WT)	フラスコ	1.7	2.3 ~ 2.6	5%
FV21 No.3	フラスコ	1.8	2.4 ~ 2.7	5%
FV21 No.11	フラスコ	1.8	2.7	5%
FV21 No.12	フラスコ	1.9	2.9	5%
FV21 No.14	フラスコ	2.1	3.1	5%
FV21 No.7	Jar	2.1	2.9 ~ 3.3	5%
FV21 No.17	Jar	2.1	3.1	5%
FV21 No.20	Jar	2.6	3.9	5%
FV21 No.20 +BGL	Jar	2.5	3.8	5%
JNK26(F) +BGL,BXL7.5%	フラスコ	1.8	2.8	5%
JNK26(F) +BGL,BXL7.5%	フラスコ	2	3.1	10%
JNK26(F)	フラスコ	2.3	3.5	10%
JN13	フラスコ	5.3	8.1	10%
市販酵素		6.8	10.4	10%

表 2.3.3.2 (3) -2 JN30 BGL 強化株の 1g 生成糖あたりに必要な酵素量評価

酵素	培養方法	酵素添加量	糖化率	生成糖	1g 生成糖あたり の酵素量	スリー 濃度
		mg/g-bm	%	mg	mg/g-sugar	%
JN30	フラスコ	2	81.4	69.6	2.9	5.0
#40	フラスコ	2	82.0	70.2	2.9	5.0
#73	フラスコ	2	82.6	70.7	2.8	5.0
#117	フラスコ	2	79.7	68.2	2.9	5.0
#153	フラスコ	2	79.8	68.3	2.9	5.0

2.3.3.3 糖化酵素の安価な大量生産技術の開発

(1) 基礎的生産条件の検討

(1) -1 培養モニタリング・解析法の一元化 (JBA)

a) 目的

培養条件を検討するにあたり、生産される酵素量に加え、菌体の状態や培地環境をモニターする方法が必要となる。本項においては培養モニター法として、基本となる温度、pH、溶存酸素濃度の他、排気中 CO₂、および O₂、生細胞量、培地中セルロース残量の定量法などを加えたモニター法構築を行い、条件検討により変動するファクターを観測することを目的とした。

b) 方法と結果

以下標準培養条件において 2 L スケールジャーファメンタを用いたセルラーゼ生産菌の培養試験を行った。各時間に採取した培養上清について Bradford 法による蛋白質定量を行い、培養液中の酵素蓄積濃度のパターンを作成した。ABER 電極モニターの評価については 3% Glucose を添加した培養を行い、培地中の静電容量と各採取時間における乾燥菌体重量との相関を調査した。さらに排気モニターの CO₂ 積算による排出炭素量計算値、および培養上清、上清中蛋白質をアセトン沈殿した沈殿物、残渣の炭素含有率を CNH 元素分析した算出値により、投入炭素源に対する炭素分配率を算出した。また、yatalase 処理により菌体、微結晶セルロースそれぞれについて消化試験を行い、培養液における残存セルロース定量法の検討試験を行った。

O₂ 測定にジルコニア固体電解質方式、CO₂ 測定に非分散赤外線吸収方式を採用した Biott 社製ガス分析装置を導入した。また生細胞量のモニター法として、培地中の静電容量を計測する ABER 社製電極を導入した。添加した Glucose を消費しきるまでの培地中静電容量と乾燥菌体重量との間に $R^2 = 0.993$ と良好な相関関係が確認でき本電極の有用性が確認できた。

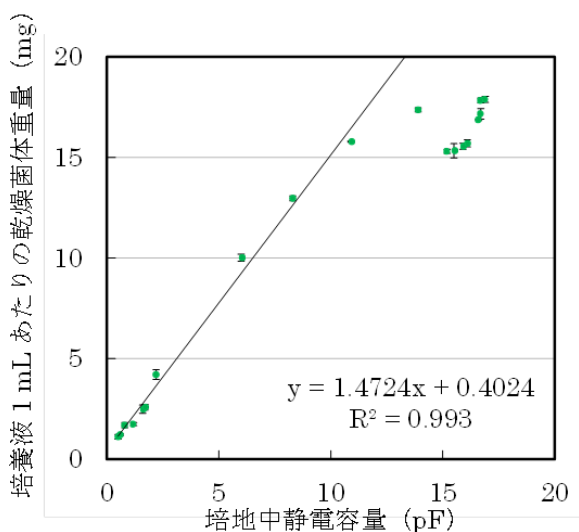


図 2.3.3.3(1)-1 ABER 電極による培地中静電容量と乾燥菌体重量との関係

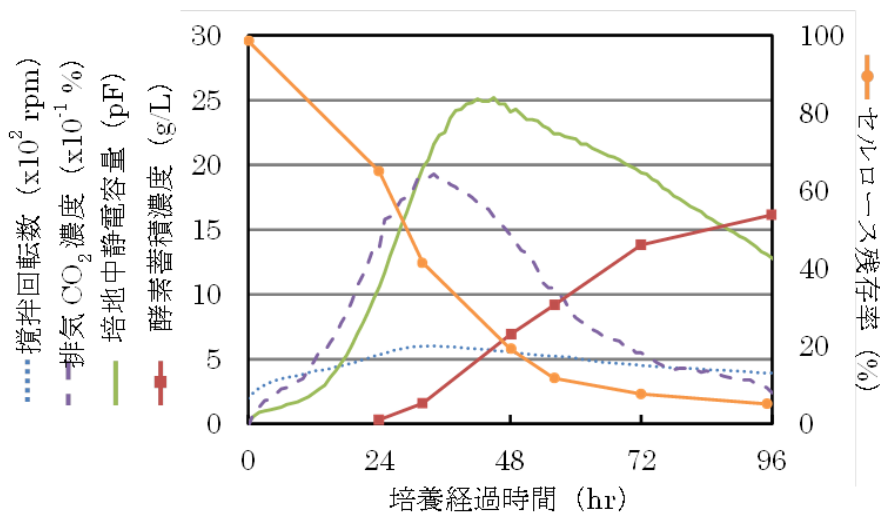


図 2.3.3.3 (1) -2 各種モニター法により得られた標準培養における培養パターン

また、10%炭素源を添加した標準培養における炭素の分配率はCO₂排出、蛋白質、菌体等残渣、上清中その他にそれぞれ52%、32%、13%、5%の比率で分配された。

yatalase 処理による培養残渣消化試験の結果、菌体は1.6%、微結晶セルロースは98.5%残存しており、2%未満の誤差範囲で精度よくセルロース定量することが可能となった。

以上より標準的な培養系における呼吸、生育パターンが得られた。本標準パターンを基準として、酵素生産性の高い培養におけるモニター値の変動を観測することにより、酵素生産性検討における指針を得ることが可能となった。

(2) 糖化酵素の大量生産技術 (花王)

年間10~20万 kL のエタノールの工業生産を想定した場合、糖化酵素の製造はコスト面から当然オンサイト生産が有利と考えられる。そこで、基盤研究においてオンサイト生産を前提に、年間10万 kL エタノール製造を想定し、一定の条件を仮定した上で製造設備の基本構想設計を検討した。

また、これらの検討により得られたデータを基に、数10kLでの試作を実施し、生産性の確認及びスケールアップに必要なパラメーターを取得するとともに、酵素サンプルを作製する。得られた酵素サンプルは、本事業内外のセルロース系エタノール発酵を目指した企業等へ提供し、評価結果より酵素性能等の課題を明確にするるとともに、製造原価試算へ役立てた。

(2) -1 ラボレベルでのスケールアップ検討

a) 目的

コスト低減に向けて、高価なアビセルから安価炭素源への置き換えを検討した結果、アビセルと代替可能なパルプを見出した。一方で、パルプを炭素源としたバッチ培養では、パルプの枯渇が生産律速の1つの要因であることが推測された。そこで、生産性向上を目的とし、パルプの流加培養を検討した。またパルプ流加培養のスケールアップ検証を目的として30L ジャーを用いたベンチスケールでの培養を検討した。

b) 方法と結果

前述に準じてジャーフェーマンターにて培養を行った。なお、糖化酵素生産菌株は JN24、培地炭素源は LBKP-3 パルプを用いた。パルプを用いたバッチ培養において、酵素生産の頭打ちが

見られた (図 2.3.3.3 (2) -1)。その要因の1つとしてパルプ炭素源の不足が考えられた。酵素生産はパルプの使用量に相関することから (図 IV-2-1-2)、仕込んだパルプの量に比例して酵素生産性が向上することが推測された。つまりパルプ仕込み量を増やすことで酵素生産の増加も見込めると考えられた。しかし、パルプは嵩高で培養開始時に高濃度仕込むことが困難である。そこで、培養の途中でパルプを流加することにした。250ml ジャーにて培養3日目から1日毎に少量のパルプを流加したところ、バッチ培養と同等の酵素生産速度であったものの、生産期間の延長効果により生産性は約1.5倍向上した (図 2.3.3.3 (2) -2)。また同様の条件にて30L ジャーでのパルプ流加培養を行った。結果、30L ジャーでも同様に酵素生産が向上し、ベンチスケールでパルプ流加培養が可能であることを示すことができた (図 2.3.3.3 (2) -3)。これらの結果から、バッチ培養での培養後期の酵素生産の律速因子はパルプ炭素源の不足であることの裏付けと同時に、律速因子としての炭素源に着目することが酵素生産の更なる改善につながることを示唆した。また流加培養系ではパルプの流加に伴い呼吸活動が高まり、菌体のエネルギー代謝、維持代謝活動の効率化が酵素生産の延長化に結びついたと考えられた。

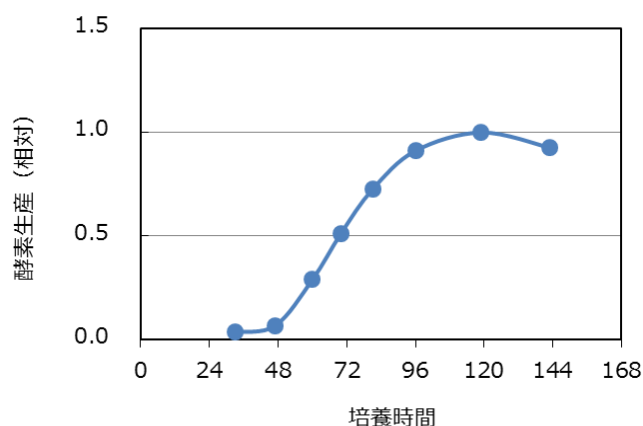


図 2.3.3.3 (2) -1 バッチ培養による酵素生産

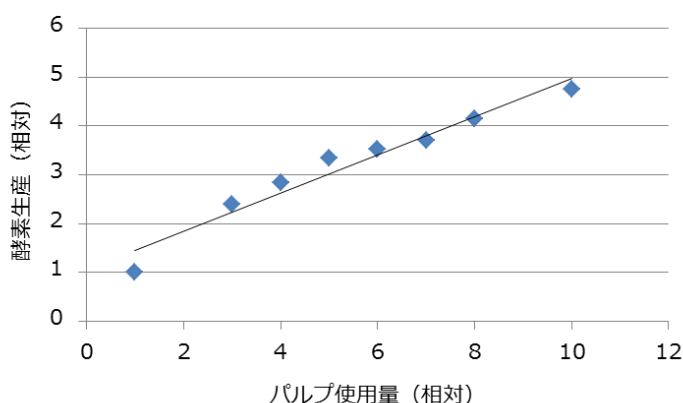


図 2.3.3.3 (2) -2 パルプ使用量と酵素生産

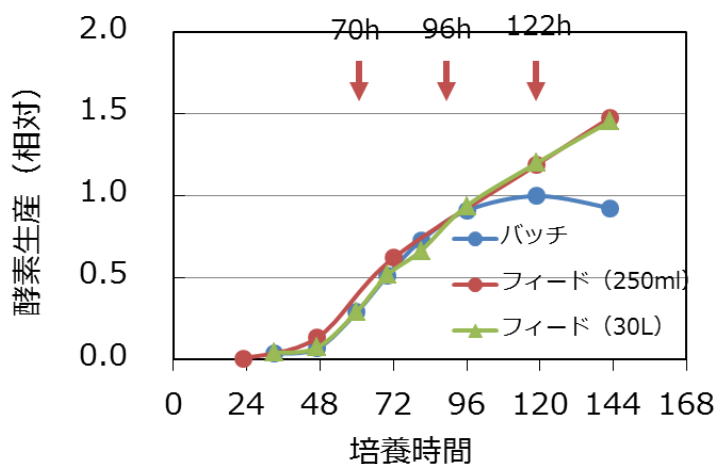


図 2.3.3.3 (2) -3 パルプの流加による酵素生産

(2) -2 培養工程のスケールアップ検討

3kL 培養槽を用いてパイロットスケールへのスケールアップ検討を行った。本培養槽は、BSL1 および GILSP レベルの遺伝子組換え菌を培養可能な封じ込め仕様を備えた設備として弊社敷地内に建設した。pH、DO（溶存酸素濃度）、排気ガス組成等各種分析能、ならびに各種制御ソフトを有し、付帯設備としてシード培養槽や pH 制御槽、消泡剤槽、流加槽等が付帯されている。ラボ 30L 培養槽にて呼吸量、溶存酸素濃度、発酵熱、攪拌によるせん断の影響等のエンジニアリングデータを取得し 3kL 培養の運転条件を決定した。培養の結果、ほぼ想定通りの培養挙動を示し、顕微鏡にて観察された菌糸の様子もラボと同様であった。発泡についてはラボ検討では槽サイズが小さく定量化し難かったが、パイロットスケールにて定量的に評価することで、実機相当スケールへのエンジニアリングデータとして蓄積することができた。

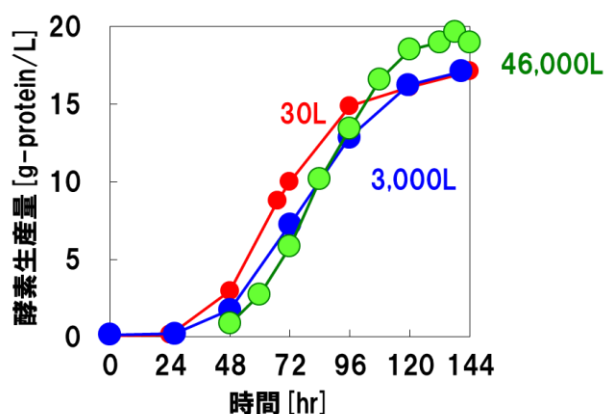


図 2.3.3.3 (2) -4 各培養スケールでの酵素生産挙動

続いて実機相当スケールへのスケールアップ検討を行った。社内には適当なスケールの培養槽を有していなかったことから、46kL の培養槽を有する委託業者にてスケールアップテストを実施した。ラボ及びパイロット培養にて得られたデータを元に培養条件を設定し、ほぼ想定通りの培養挙動を得た。懸念された発泡についても、消泡剤の滴下により想定した程度の泡高さを

にて抑制することが可能であった。培養中の酵素濃度の経時変化を図 2.3.3.3 (2) -4 に示す。なお得られた酵素はラボと同等の酵素の組成比であり、また糖化性能もラボと同等のものが得られたことから、数十 kL まで良好にスケールアップできたものとする。

(2) -3 セルラーゼ製造コスト試算

前述のスケールアップ検討により得られた情報を元にセルラーゼの製造コストの試算を行った。エタノール 10~20 万 kL の製造に必要な酵素量として 400~800t/Y の酵素を製造すると仮定した。立地はアジア圏の A 国とし、建設地はバイオエタノール製造企業から供与されるものと仮定し土地代は含まないこととした。オンサイトケース（酵素生産設備をバイオエタノールプラントに隣接させ、酵素を未精製のまま糖化反応に用いるプロセス）（図 2.3.3.3 (2) -5 緑点線）にて 400t/Y の生産を行うケースを想定して試算を行った。

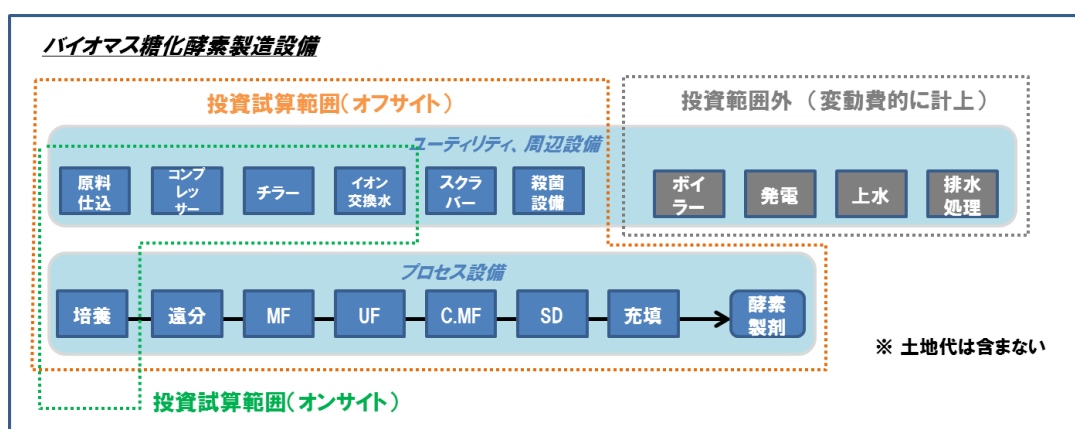


図 2.3.3.3 (2) -5 バイオマス糖化酵素設備と投資額試算の範囲

(2) -3-1 設備費

培養に用いる微生物は GILSP とし、遺伝子組換え微生物の封じ込めが可能な培養設備とした。発酵槽については培養液物性、呼吸量、発酵熱、培養活性、培養期間、原料の消長、その他培養挙動等を元に槽サイズをはじめ酸素供給に必要な通気攪拌装置並びに動力、冷却方法や各種装置の能力等を決定した。具体的には、たとえば主培養槽は工業的に建設された実績のある規模として 200~300kL スケールを複数基設置することとした。また、シード培養槽や原料フィード槽、pH 調整槽、消泡剤槽等も考慮した。

ユーティリティー設備としては、空気供給用のコンプレッサー、発酵熱の除熱、イオン交換水製造設備を設置することとした。また排気系のスクラバーや、発酵後の遺伝子組換え微生物を殺菌するための設備も設置することとした。一方で蒸気発生用ボイラー、発電機、上水設備、排水設備は新設せず、バイオエタノール製造企業から供給を受けることとし、変動費的にコストに加算することとした。

上記の条件のもと、A 国におけるロケーションファクターを加味し、エンジニアリングメーカーにて設備建設にかかる投資額を試算した。なおすべての建屋は試算に含まれており、コスト試算する上での償却年数は 10 年とした。

(2) -3-2 人件費ほか固定費

A国における人件費をマネージャー、エンジニア、オペレーター等に分類し算出した。補助部門費やその他経費についてはエンジニアリングメーカーの情報並びに弊社内実績から仮定した。

(2) -3-3 変動費

原料費については国内外の価格調査データを元に試算した。ユーティリティ費についてはエンジニアリングメーカーの情報並びに弊社内実績から仮定した。

(2) -3-4 試算結果

図 2.3.3.3 (2) -5 に試算結果を示す。オンサイトケースについて詳細に試算を行ったところ、目標であるコストを達成可能な試算を得ることができた。

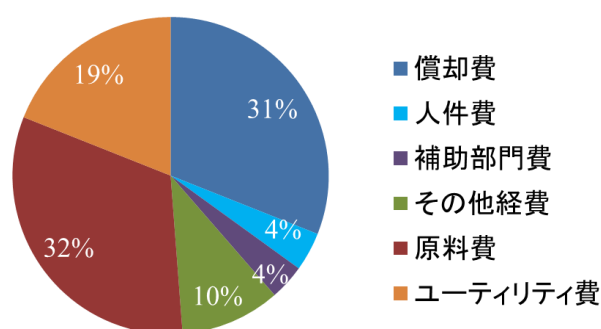


図 2.3.3.3 (2)-5 バイオマス糖化酵素製造先負原価の内訳

2.3.4 知的財産権等の取得及び成果の普及

本事業における年度ごとの特許、論文、対外発表の状況を表 2.3.4-1 に示した。特に、本事業の成果、活動をアピールするために外部発表を数多く実施した。

表 2.3.4-1 年度ごとの特許、論文、対外発表の状況

区分 年度	特許出願	論文・専門誌・図書		その他外部発表	
		査読付き	その他	学会発表・講演	新聞・雑誌等への掲載
H25FY	0件	0件	0件	0件	0件
H26FY	1件	3件	0件	22件	1件
H27FY	4件	4件	0件	41件	0件
H28FY	0件	4件	0件	19件	0件
合計	5件	11件	0件	82件	1件

2.4 有用微生物を用いた発酵の生産技術開発

2.4.1 研究開発の概要

本事業は、バイオマスからのエタノール生産工程の糖化発酵工程における要素技術である酵母の性能向上と同時糖化並行複発酵（SSCF: Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation）プロセスの開発を行い、2020年の商用機スケールでの実用化に適用可能な糖化発酵生産技術を確立することを目的とする。本目的を達成するために、主たる研究開発課題を、C5C6糖同時発酵微生物の開発、SSCFプロセスの開発、及び商業化を目指したプロセスデザインパッケージの作成とし、研究開発を進めた。C5C6糖同時発酵微生物の開発では、高効率なC5C6糖同時発酵能、耐熱性、及び発酵阻害物耐性を有し、かつ高エタノール生産濃度、高収率を達成する発酵微生物の開発を、またSSCFプロセスの開発では、パイロットスケールでのSSCFプロセス確立に向けて開発研究を行い、これらの結果を基にプロセスデザインパッケージの作成を行った。

C5C6糖同時発酵微生物の開発に関しては、エタノール変換効率及び生産性向上のために、高効率キシロース代謝、高温発酵、阻害物質耐性の3つを要素技術と位置づけ開発を進めた。また一方で、開発した多数の遺伝子組換え酵母株のエタノール発酵性能を評価するための高効率スクリーニング系を構築した。開発した有用要素（キシロース代謝、高温発酵、阻害物耐性）を組み合わせて産業用酵母 *S. cerevisiae* IR-2 に実装することにより、3種の前処理バイオマス、アルカリ処理バガス、希硫酸浸漬爆砕処理バガス、脱アセチル希硫酸処理バガス、それぞれのSSCFに特化した酵母株の開発に成功した。

SSCFプロセスの開発では、本開発の最終目標である、「バガスまたはユーカリを用いて、2 m³パイロット試験装置における同時糖化発酵において、エタノール濃度 5 w/v %、1 ton-dry の前処理バイオマスから 380 L 以上のエタノールを生産（ホロセルロース含率 70%の場合）」を達成するために、本研究開発で開発したSSCFに特化した酵母株を用いて、同時糖化発酵プロセスの条件検討、ベンチスケールを経たパイロットスケールへのスケールアップを進めた。その結果、ユーカリ、若しくはバガスを原料とした2 m³パイロット装置によるSSCF試験において、最終目標の達成に至った。また、高濃度バイオマススラリーのハンドリングノウハウの取得、及び大型商業機の設計データ採取を目的に、20 m³反応槽と大型商業装置規模のスラリーポンプから成る実証スケール試験装置を建設した。本装置を用いた糖化試験により、実証規模におけるスラリーハンドリングノウハウを確立するとともに、各種設計データを取得した。

プロセスデザインパッケージの作成では、上述の全ての結果を基に、大型商業機の設計指針をまとめ、プロセスデザインパッケージを作成し、大型商業機の概念設計を行い、SSCFプロセスの経済性を評価した。

2.4.2 研究開発の目標設定

本事業では、2020年の商用機スケールでの実用化に適用可能で効率的な糖化発酵生産技術の確立を目的とした。そこで本事業においては、2008～2012年に実施されたNEDO「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発」／「加速的先導技術開発」／「酵素糖化・効率的発酵に資する基盤技術研究」で得られた成果を更に発展させ、2020年の商業化における最終目標である「エタノール生産濃度 5 w/v% 以上、エタノール発酵収率 95%以上」に資する目標値として、「2 m³のパイロットスケールにおいてエタノール生産濃度 5 w/v% 以上、1 ton-dry の前処理バイオマスから 380 L 以上のエタノール生産収率（ホロセルロース含有量 70%の場合）」を設定し、研究開発を行った。

2.4.3 目標と成果

(1) C5C6 糖同時発酵微生物の開発（産業技術総合研究所、崇城大学、バイオインダストリー協会）

本プロジェクトにおける当該研究開発項目のミッションは、2 m³パイロットスケール SSCF 試験において NEDO 目標値を達成可能な、高エタノール収率、生産性を兼ね備えた遺伝子組換え出芽酵母（実用生産菌）を開発することである。そこで、エタノール収率及び生産性向上に必要な有用要素技術として、1. 高効率キシロース代謝能の付与、2. 高温発酵、3. 発酵阻害物質耐性の3つの有用要素技術の開発を行うと同時に、これらの有用要素技術を産総研が単離した産業用酵母 IR-2 に組み合わせて実装し、ラボスケール SSCF により、菌株のエタノール発酵性能を評価することで、各種前処理バイオマスに最適かつ高いエタノール発酵性能を有する実用生産菌を開発した

（図 2.4.3-1）。その結果、異なる3種の前処理バイオマス全てに対して、NEDO 目標を大幅に超えるエタノール発酵性能を有する実用生産株の開発に成功した。本プロジェクトの成果として開発された実用生産菌株は、今後、世界が目指すべきセルロース系バイオマスエタノール生産に用いられる C5C6 同時発酵実用生産菌株のベンチマークになると期待される。



図 2.4.3-1 有用要素技術の組み合わせ実装と評価

(1)-1 高効率キシロース代謝、耐熱性、阻害物質耐性を付与した遺伝子組換え酵母の開発 （要素技術の開発と検証）

(1)-1-1 キシロースイソメラーゼと高機能変異体の取得

a. 背景と目的

出芽酵母のキシロース資化性向上のため、発現が確認されている8種類の XI のキシロース代謝性能を同一プラットフォームで評価することによって、産業用酵母 IR-2 において最も優れた発酵性能を示す XI 遺伝子を選抜した。さらに、選抜した XI 遺伝子に進化分子工学的手法によるランダム変異を導入することによって、よりキシロース資化性の高い変異型 XI 遺伝子の取得を試みた。

b. 材料と方法

b-1 最適な XI 遺伝子を選抜と発酵試験による評価

既知の8種類の XI 遺伝子を人工合成し、出芽酵母 HSP12 プロモーターにより発現するプラスミドを保有する形質転換体を取得した（表 2.4.3-1）。キシロース培地上でのコロニーサイズを指

標に評価を行った。また、サトウキビバガスをモデルとする疑似糖化液（10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、85 g/L グルコース及び 35 g/L キシロース）に OD_{A600} =約 20 となるように植菌し、30℃にて発酵試験を行い、HPLC により成分分析を行い、キシロース資化性能、エタノール発酵性能を評価した。

b-2 進化分子工学的的手法による高効率 XI 変異体の取得

最も優れた増殖・発酵性能を示した CpXI 遺伝子に対して、進化分子工学的的手法を用いて、プラスミド上でランダム変異を導入した遺伝子ライブラリーを構築した。これらの変異遺伝子導入株を、野生型の CpXI では生育できないキシロース 80 g/L を含む YPX 固体培地上でスクリーニングを行った。また、b-1 と同様に、キシロース資化性能、エタノール発酵性能を評価した。高いキシロース資化性能を示した株よりプラスミドを再調製し、DNA シーケンシングによって、XI 遺伝子に含まれる変異を同定した。

表 2.4.3-1 XI 遺伝子

由来微生物	本研究で付与した遺伝子 ID
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	<i>BcXI</i>
<i>Prevotella ruminicola</i> strain TC2-24	<i>PrXI</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 17	<i>RfXI</i>
<i>Orpinomyces</i> sp. ukk1	<i>OspXI</i>
<i>Piromyces</i> sp. E2	<i>PspXI</i>
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg (<i>Lachnoclostridium phytofermentans</i>)	<i>CpXI</i>
<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	<i>CcXI</i>
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	<i>SrXI</i>

c. 得られた成果と意義

OspXI 遺伝子および *CpXI* 遺伝子を導入した株が、他の XI 遺伝子を導入した株と比較して優れた生育速度を示した。エタノール発酵試験の結果、*CpXI* 遺伝子導入株は 72 時間以内に 25 g/L のキシロースを消費することができ、8 種の中でもっとも高いエタノール発酵性能を示した。変異ライブラリーのスクリーニングの結果、良好な生育を示したクローンの中から、2 種類の新規アミノ酸変異 (M-2 及び M-20) を見出した。さらに、M-2/M-20 二重変異体は、単一変異体よりさらに性能が向上し、72 時間以内に、サトウキビバガスをモデルとするグルコース 85 g/L、キシロース 35 g/L を含む疑似糖化液において、72 時間以内に 35 g/L のキシロースをすべて消費し、約 53 g/L のエタノールを生産（変換効率=約 87%）できる性能があることが明らかになった（図 2.4.3-2）。これまで、ラボスケールでキシロース代謝可能な酵母の開発は行われてきたが、その多くは低濃度のキシロースを代謝できるが、高濃度のキシロースを一定速度かつ効率よく資化できる例は少ない。これらの変異体は、独自に取得した新規のアミノ酸変異で国内・国際特許出願を行った。本項目で得られた成果は、高効率キシロース代謝に必要な不可欠な有用要素技術の一つとして、後述する実用生産菌の開発においても使用した。

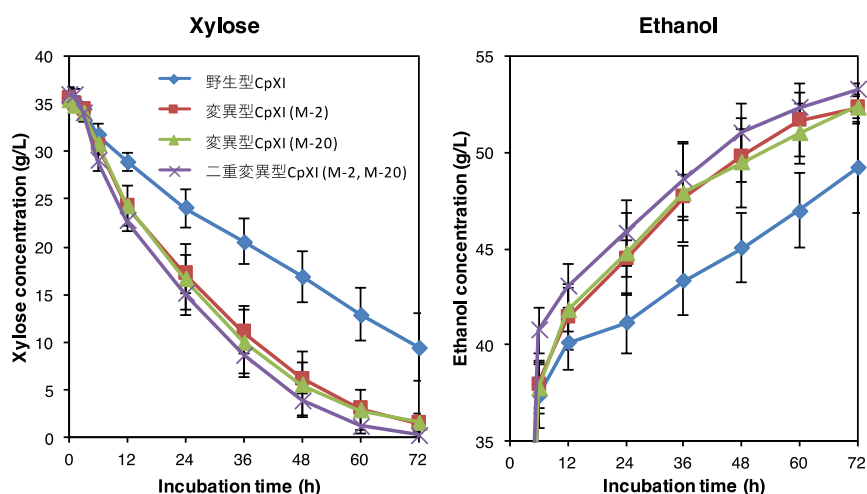


図 2.4.3-2 野生型 *CpXI* 遺伝子導入株と変異型 *CpXI* 遺伝子導入株の発酵試験結果
野生型 *CpXI* 株、変異型 *CpXI* (M-2)、変異型 *CpXI* (M-20)、および二重変異型 *CpXI* (M-2, M-20) を擬似糖化液 (YPD_X; グルコース 85 g/L、キシロース 35 g/L) を用いた発酵試験の結果を示す (自然発酵法、30 °C)。左はキシロースの消費、右は生産エタノールを示す。

(1)-1-2 SSCF に適したプロモーターの探索

a. 背景と目的

SSCF における高効率キシロース代謝を実現するためには、XI 遺伝子等のキシロース代謝遺伝子を必要とときに必要な量発現させなければならない。すなわち、SSCF に適したプロモーターが必要となる。そこで、各種糖化液 (擬似糖化液、アルカリ処理バガス糖化液、および希硫酸浸漬爆砕処理バガス糖化液) を用いた自然発酵法で、次世代シーケンシング技術を用いて、経時的かつ網羅的に遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行うことで、グルコース消費後のキシロース代謝フェーズにおいて、高い発現量を示す遺伝子及びそのプロモーターを探索した。

b. 材料と方法

変異型 *CpXI* (M-2) 遺伝子を *HSP12* プロモーターで発現制御する XI 発現ユニットを SS29 株のゲノム中に導入した A25 株を用いて、擬似糖化液 (YPD_X)、アルカリ処理バガス糖化液、希硫酸浸漬爆砕処理バガス糖化液に酵母エキス、ペプトンを添加したものを培地として用いて、自然発酵法 (植菌量 OD₆₀₀ = 15、30 °C) によるエタノール発酵試験を行うと同時に、発酵過程においてサンプリングを行った菌体より RNA を調製し、次世代シーケンシングシステム IonProton System を用いて、遺伝子発現解析を行った。

c. 得られた成果と意義

各糖化液において、グルコース代謝時 (培養開始 3 時間)、キシロース代謝時 (24 時間) の各転写産物の相対含量の比較を行った結果、キシロースを資化している時間帯において 2 倍以上発現量の増加が観察された遺伝子は 545 遺伝子あった。これらの遺伝子のうち、mRNA の相対含量が高い遺伝子を選抜した結果、*DDR2*、*HSP26*、*HOR7* 及び *TDH1* を見出した。特に、*HSP26* は出芽酵母の内在性プロモーターの中では、最も早くキシロースを消費、エタノールを生産することができる、SSCF プロセスに適したプロモーターである (図 2.4.3-3)。

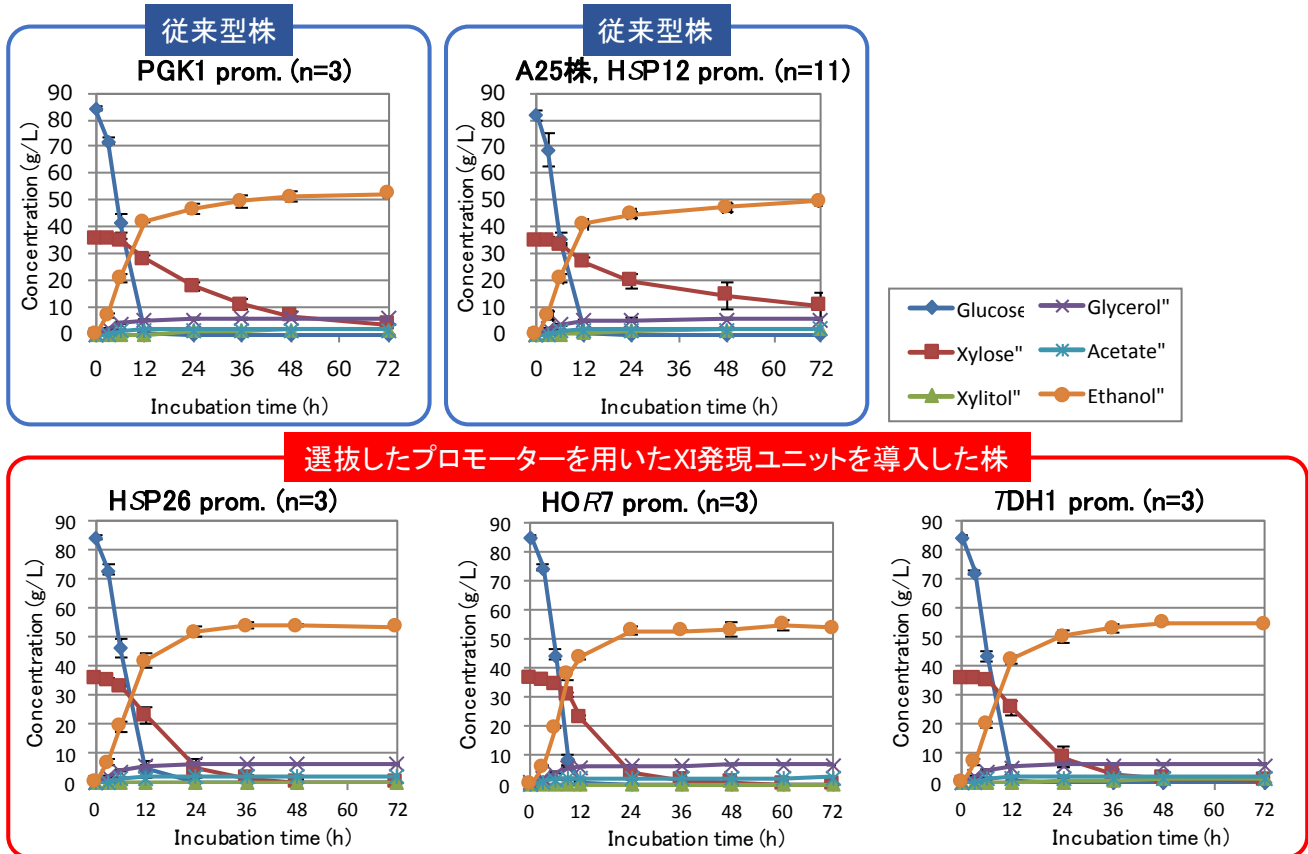


図 2.4.3-3 選抜したプロモーターを用いた XI 発現ユニット導入株の発酵試験結果

選抜した遺伝子 (*HSP26*、*HOR7*および *TDH1*) 由来プロモーター、ターミネーターを利用した変異型 *CpXI* (M-2) 遺伝子発現ユニットを導入した株を用いて、擬似糖化液 (YPD₈₅X₃₅) を用いた自然発酵条件での発酵試験結果を示す。グラフは、培地中のグルコース(◆)、キシロース (■)、キシリトール (▲)、グリセロール (×)、酢酸 (*)、エタノール (●) の濃度 (g/L) を示す。

これらの遺伝子のプロモーターは、グルコースとキシロースを同時に含み、高温で行う SSCF プロセスにおいて、高い遺伝子発現が期待できる内在性プロモーターである。通常の好気培養条件の対数増殖期では、解糖系遺伝子の発現が高いことはよく知られており、出芽酵母における外来遺伝子発現には *PGK1* や *TDH3* といった遺伝子プロモーターを利用することが多い。しかし、これらのプロモーターはエタノール発酵、とくにキシロースを代謝する時期に発現が必要な XI 遺伝子や PPP 遺伝子等キシロース代謝遺伝子に適しているとは言えない。本研究項目で得られた 4 つの遺伝子 (プロモーター) のうち、*DDR2*、*HOR7*、*TDH1* は少なくとも C5C6 エタノール発酵酵母を開発している他のグループが使用した例があるが、*HSP26* を使用した例はこれまで知られておらず、本研究開発の独自の成果である。

(1)-1-3 SSCF に適したストレス応答人工プロモーターの開発

a. 背景と目的

本研究項目では、独自の設計原理に基づく人工プロモーターの開発というアプローチによって、SSCF プロセスにおいて高い遺伝子発現が期待されるプロモーター配列のデザインを行い、その塩基配列をプロモーターとして用いて XI 等のエタノール発酵プロセスにおける遺伝子発現に有効かどうかを検証した。

b. 材料と方法

Zid & O' Shea (2014)らによれば、糖の枯渇した条件においては、HSP26をはじめとする様々なストレス応答タンパク質遺伝子の遺伝子発現が高いことを報告している。また、その中で、単に mRNA の量だけではなく、核内から細胞質への移行及びリボソーム占有率が高いことが、このような状況下でのタンパク質発現には重要であることを示唆している。エタノール発酵、特に、グルコースを消費した後のキシロースを消費する時期には、カタボライト抑制が解除され、代替の糖源として、キシロース代謝を開始し、エタノール発酵を継続するが、酵母の細胞内では依然グルコース枯渇と同じにあると推察される。また、SSCF プロセスでは高温発酵 (36~38 °C) が求められる。すなわち、SSCF プロセスによるエタノール発酵は相当なストレス状態にあると考えられる。そこで、これらのストレス条件下で高い遺伝子発現が可能なプロモーターとして、ストレス応答タンパク質遺伝子のプロモーター中に含まれる Cis-element を解析し、それらを独自のデザインに基づいて配置した新規ストレス応答人工プロモーター pSynSR480 を開発した。このプロモーターを用いて、XI 変異体を発現させた株を構築し、バガスを糖化した際に得られる液をモデルとする、疑似糖化液 YPDX 培地 (グルコース 85 g/L、キシロース 35 g/L) を用いた高温自然発酵法 (植菌量 $OD_{A600} = 3$, 38 °C) によりエタノール発酵性能を評価した。

c. 得られた成果と意義

独自のストレス応答人工プロモーター pSynSR480 により XI を発現する B6 株 (KEF206) は、従来型プロモーター PGK を用いた B5 株 (KEF205) に比べて高いキシロース消費、エタノール生産が可能であるという成果を得た (図 2.4.3-4)。38 °C という高温条件下では、従来型の PGK1 プロモーターに比べて、高いキシロース資化性を示し、36 時間のうちに 35 g/L のキシロースをすべて消費した。キシロース代謝に必要な遺伝子は複数あるため、同じプロモーターを用いて染色体導入する場合、同一の比較的長い配列が染色体上に存在することによって、不慮のループアウトを引き起こす可能性がある。これを回避するためにも、実用生産株では、同じ発現特性を持っていても、異なる塩基配列のプロモーターの利用が望ましい。内在性プロモーターに加えて、酵母ゲノム中に存在しないストレス応答人工プロモーターの利用は、実用生産菌の開発において遺伝子組換えの多様性をもたらすことができる。本成果は、国内特許出願を行い、また日本生物工学会 (2016 年度) においてトピックス賞に選出された。

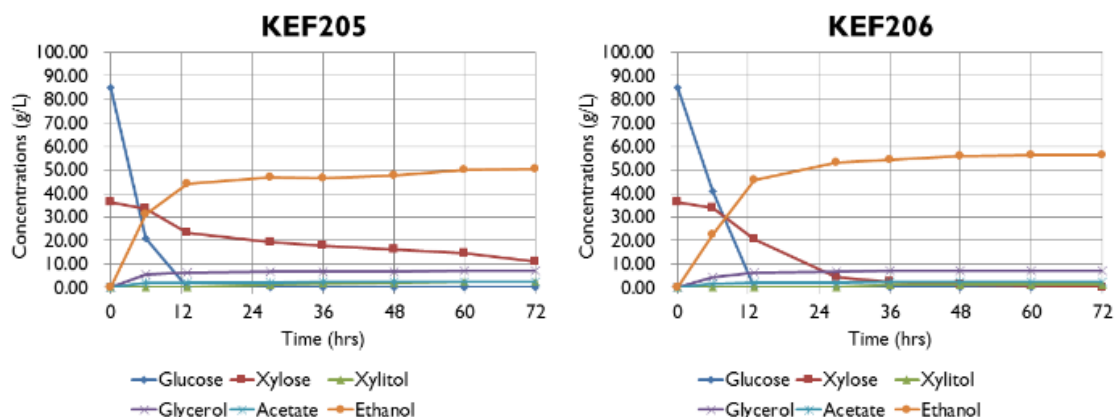


図 2.4.3-4 疑似糖化液 YPDX を用いたエタノール発酵試験

pSynSR480v1 により XI 遺伝子を発現する B6 (KEF206) 株のキシロース代謝速度、エタノール生産速度は、pPGK1 により XI 遺伝子を発現する B5 (KEF205) 株に比べて発酵開始 12 時間以後に顕著に向上していた。

(1)-1-4 ペントースリン酸経路の最適化

a. 背景と目的

ペントースリン酸経路(PPP)は、XR-XDH-XKS あるいは XI-XKS によって代謝されたキシロースを、さらにエタノール発酵経路へとつなげるキシロース代謝の一つである。SSCF プロセスでは、より高い温度でエタノール発酵を行うため、PPP の様なキシロース代謝系の酵素も高温で効率的に作用するものを利用することが望ましい。そこで、本研究項目では、*S. cerevisiae* より高温で生育可能な耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来の PPP 遺伝子に着目し、単独あるいは複数の異なる組み合わせで PPP 遺伝子を強制発現する株を作成し、高温条件下かつキシロースのみを炭素源とする培地 (YPX) 及び実際のバイオマス組成に近いグルコースとキシロースの両方を含む、疑似糖化液 (YPDX)、さらに、実バイオマスを基質として用いたラボスケール SSCF プロセスによるエタノール発酵試験を行い、最適な PPP 遺伝子の組み合わせについて検討を行った。

b. 材料と方法

CpXI を導入した出芽酵母 IR-2 (haploid) 株を親株とし、*S. cerevisiae* 及び耐熱性酵母 *K. marxianus* 由来 PPP 遺伝子を異なる組み合わせで導入した株を作成した。作成した株について、疑似糖化液 YPDX 培地 (グルコース 85 g/L、キシロース 35 g/L) を用いて発酵試験を行った (初期植菌量 $OD_{A600} = 3$ 、36 °C)。

c. 得られた成果と意義

KmRKI1 と *ScTKL1* の 2 種の PPP 遺伝子発現を向上させた株が最も優れたキシロース資化、エタノール生産をもたらすことを明らかにした (図 2.4.3-5)。これまでにも、PPP 遺伝子の発現を向上させることで、キシロース代謝が向上するという数多くの研究が存在するが、実用化条件 (グルコース、キシロースの両方を高濃度で含む、高温発酵条件) ではほとんど検討されてこなかった。実際に、キシロースからのエタノール生産に効果があるとして知られている *TAL1* の高発現は、低濃度のキシロースを単一炭素源の場合では効果が認められたが、グルコースとキシロースを両方含む培地では効果が認められないか、あるいはむしろ低下するという結果となった。また、XI をキシロース代謝遺伝子と用いた場合と、従来よく研究されてきた XR-XDH をキシロース代謝遺伝子として用いた場合とで、PPP 遺伝子発現の最適化方法が異なるという結果が得られた。本研究項目の成果は、SSCF プロセスに特化した実用生産菌の開発という点で、世界に類を見ず、かつ *K. marxianus* 由来 PPP 遺伝子の出芽酵母での利用は世界初の試みである。

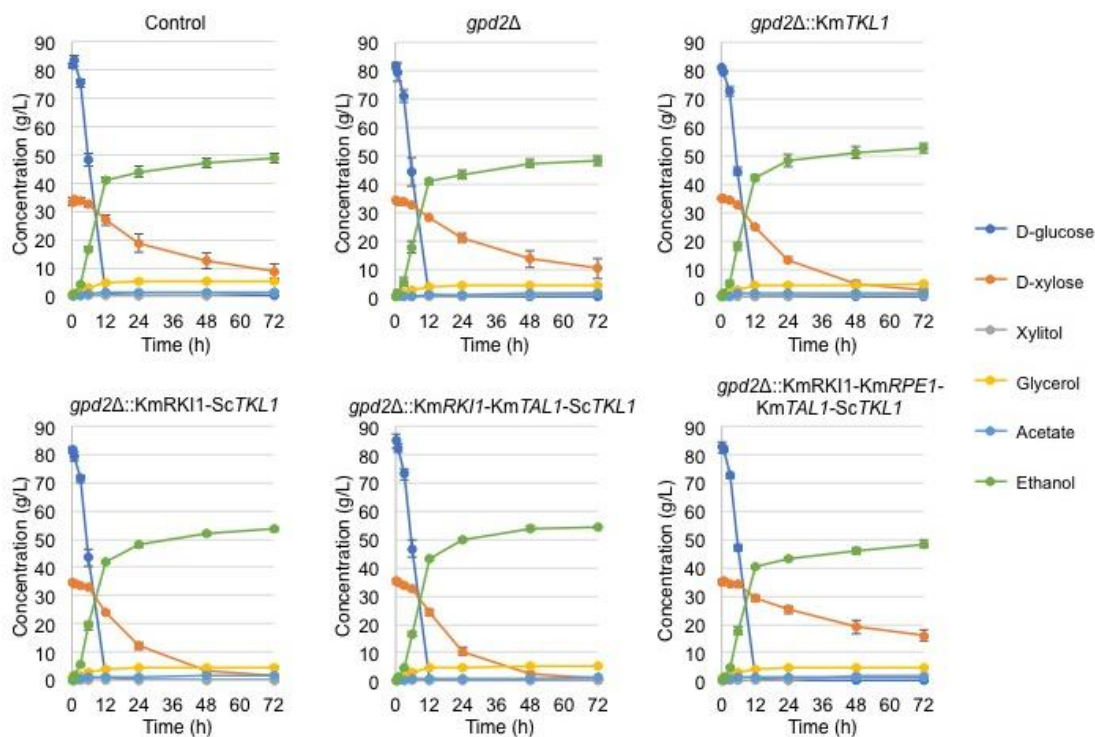


図 2.4.3-5 XI を用いた PPP 強化株における YPDX による発酵試験

(1)-1-5 結語

上記では、本研究開発項目で開発した多数の要素技術のうち、特筆すべき4点についてのみ記載した。この他に、高温条件下で阻害物質耐性を有する変異体の取得、高温耐性酵母 *K. marxianus* のキシロース代謝能の向上、耐熱性酵母の遺伝子を利用したエタノール発酵酵母の耐熱化、キシロース代謝向上変異株の作成と責任遺伝子候補の同定、高温発酵耐性変異体の作成と責任遺伝子変異候補の同定、発酵阻害物質耐性変異体の作成と責任遺伝子変異の同定をはじめとする、高効率キシロース代謝、高温発酵、阻害物質耐性に関する個別の有用要素技術の開発に関して優れた成果が得られた。

(1)-2 高効率キシロース代謝、耐熱性、阻害物質耐性を付与した遺伝子組換え酵母の開発（要素技術の組み合わせ実装による実用生産株の開発）

(1)-2-1 背景と目的

これまでの研究開発により見出された高効率キシロース代謝、高温発酵、阻害物質耐性に関する有用要素技術を可能な限り組み合わせた株を構築し、各前処理バイオマス（アルカリ処理バガス、希硫酸浸漬爆砕処理バガス、脱アセチル希硫酸処理バガス）に対して、最も優れたエタノール発酵性能を有する実用生産株を選抜し、SSCF プロセス開発チームへ提供した。本研究開発項目では、多数の株を効率よく評価するため2段階スクリーニングを行うことにした。まず、菌株を開発した各実施機関がフラスコを用いた高精度・多検体ラボスケール SSCF により JBA に提供する菌株の絞り込みを行い（プレ評価）、次に JBA が標準化されたミニジャーファーマンタを用いた SSCF 統一評価法による評価を行った。参画機関から JBA に提供するにあたり、先入観を与えないために、JBA には菌株コード（A, B, C と番号）のみを伝達し、遺伝型やプレ評価の結果を示すことなく、公正な第三者評価を行った。

(1)-2-2 材料と方法

a. 評価項目

SSCF の評価項目として、(1) SSCF 効率、(2) 推定糖化率、(3) 推定変換効率の 3 項目を用いた (表 2.4.3-2)。

b. 原料バイオマス

2 m³ パイロット試験で使用するものと同等の原料バイオマスから各種前処理を行ったバイオマス (アルカリ処理バガス、希硫酸浸漬爆砕処理バガス、脱アセチル希硫酸処理バガス) を使用した (表 2.4.3-3, 4, 5)。プロジェクトの最終目標値が、1 トンの前処理バイオマスから 380 L というプロセスの効率と、生産エタノール濃度 50 g/L 以上であるため、少なくとも、一定量以上のバイオマスを投入する必要がある。そのため、ラボスケール評価では、バイオマスロットや組成によって多少の変動はあるが、NEDO 目標値の前提に基づいて、また、異なるバイオマスロットで、同じ SSCF 効率であったときに生産エタノール量が大きく変動しないように、フラスコに投入するバイオマス量を一定になるよう SSCF のセットアップ条件を統一にした。

c. 糖化酵素

市販酵素、及び本事業にて開発された糖化酵素 (花王株式会社) を使用した。

d. 発酵温度

36 °C~38 °Cにて行った。

e. 植菌量

前培養液の 1/10 vol. (ODA600 = 3~4)、あるいはよりシビアな条件として 1/20 vol. とした (ODA600 = 1.5~2)。

f. pH

フラスコでは pH を連続的に一定に保つことは困難であることから、SSCF 開始時に、パイロット試験装置条件と同じ初期 pH に調整した後、発酵中は成り行きとすることとした。

表 2.4.3-2 SSCF 評価 3 項目

評価項目	値	意味	NEDO 目標値
SSCF 効率	0-1	SSCF プロセス全体の効率。SSCF プロセス全体の投入バイオマスあたりのエタノール発酵性能を示す指標。NEDO 目標値の一つ「1 トン前処理バイオマスから 380 L のエタノールを生産」は、SSCF 効率 0.765 以上に相当する。HPLC によって測定されたエタノール濃度から算出される。	0.765 以上
推定糖化率	0-1	SSCF プロセスにおいて、投入したバイオマスに由来するセルロース・ヘミセルロースから糖化酵素によって生産される単糖の割合。SSCF プロセスでは、糖化率を直接測定することはできない。そのため、投入したバイオマスに含まれる糖と発酵溶液中に残存する単糖、副産物、生産物の炭素マテリアルバランスから求められる。測定していない、あるいはできない副産物や、細胞体を構成する炭素、細胞内に滞留している中間代謝物等は測定できないため、この数値は最低値である。NEDO 目標値を達成するためには、推定糖化率は 0.85 以上であることが必要であるが、酵素コスト（経済性）も考慮する必要がある。	0.85 以上
推定変換効率	0-1	菌株に固有のエタノール変換効率。エタノール収率 (g-EtOH/g-Sugars) と同義。菌株のエタノール収率の理論エタノール収率 (グルコース、キシロースともに 0.51) に対する比率で、これが実用生産菌の性能になる。 推定変換効率 = SSCF 効率 / 推定糖化率 で与えられる。 2 m ³ パイロット試験装置では、スケールアップによる安全率を考慮しなければならないので、NEDO 目標値は 0.9 以上であるが、ラボスケールでは 0.9 では足りないということになる。また、中間代謝産物の滞留や副産物をゼロにすることは非現実的であるため、上限は 1 よりも小さいことに留意すべき。	0.90 以上

表 2.4.3-3 アルカリ処理バガスのバイオマス組成分析 (一例)

ロット	709				
水分率	固形分率	グルカン	キシラン	リグニン・残さ	ホロセルロース率
w/v%	w/v%	w/w%	w/w%	w/w%	w/w%
72.2	27.8	53.5	18.6	36.0	72.1

表 2.4.3-4 希硫酸浸漬爆砕処理バガスのバイオマス組成分析（一例）

ロット	2043					
水分率	固形分率	グルカン	キシラン	その他	ホロセルロース率	
w/w%	w/w%	w/w%	w/w%	w/w%	w/w%	
71.3	28.7	51.0	0.7	38.3	51.7	
濾液の成分濃度						
Glucose	Xylose	HMF	Furfural	Acetic acid	Formic acid	Levulinic acid
g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
12.0	40.2	0.88	1.99	8.42	0.31	0.26

表 2.4.3-5 脱アセチル希硫酸処理バガスのバイオマス組成分析（一例）

ロット	160518-4					
水分率	固形分率	グルカン	キシラン	その他	ホロセルロース率	
w/w%	w/w%	w/w%	w/w%	w/w%	w/w%	
63.4	36.7	42.8	2.4	33.90	45.2	
濾液の成分濃度						
Glucose	Xylose	HMF	Furfural	Acetic acid	Formic acid	Lactate
g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
1.12	30	0.11	0.03	N.D.	0.02	0.05

(1)-2-3 得られた成果と意義

有用要素技術を異なる組み合わせで実装した実用生産菌株を、3種の前処理バイオマス（アルカリ処理バガス、希硫酸浸漬爆砕処理バガス、脱アセチル希硫酸処理バガス）を用いたラボスケール SSCF により評価を行い、各前処理バイオマスに最適な菌株の選抜を行った。その結果、以下に示すように、3種すべての前処理バイオマスに対して、NEDO 目標値を大幅に超える性能を有する菌株の開発・選抜に成功した。なお、選抜された実用生産株（上位2種）のラボスケール SSCF におけるエタノール発酵の結果は表 2.4.3-6 にまとめて示した。

a. アルカリ処理バガス

アルカリ処理バガスに最適な菌株として、B22 株（B16 のホモ二倍体）及び B16 株を選出した。ラボスケール SSCF 試験において、最も高い変換効率を示した B22 株は、エタノール濃度 60.2 ± 1.14 g/L、SSCF 効率 0.851 ± 0.017 、推定糖化率 0.896 ± 0.016 、エタノール変換効率 0.950 ± 0.007 であった（72 時間）。これは、NEDO 目標値の 380L を大幅に超える 422 L を生産できる性能に相当する。38 °C の高温発酵、実バイオマスからの SSCF プロセスによるエタノール生産において、95 % の変換効率でエタノールに変換できる性能を持つ酵母は他に類を見ない世界最

高レベルであると言える。なお、発酵 24 時間で、B22/B16 株ともに、50 g/L を超えるエタノールを生産することができるため、エタノール生産性は 2.0 g/L/h を超える。

b. 希硫酸浸漬爆砕処理バガス

希硫酸浸漬爆砕処理バガスに最適な株として、C12 株及び C13 株を選出した。ラボスケール SSCF 試験において、最も高い変換効率を示した C13 株は、エタノール濃度 58.7 ± 0.20 g/L、SSCF 効率 0.862 ± 0.003 、推定糖化率 0.950 ± 0.003 、エタノール変換効率 0.907 ± 0.006 であった（発酵 48 時間）。これは、目標値の 380 L を大幅に超える 426 L を生産できる性能に相当する。38 °C の高温発酵、実バイオマスからの SSCF プロセスによるエタノール生産において、さらに、80 mM を超える酢酸、10 mM を超えるフルフラール等高濃度の発酵阻害物質が存在する中で、90 % を超える変換効率でエタノールに変換できる性能を持つ酵母は他に類を見ない、世界最高レベルであると言える。希硫酸浸漬爆砕処理バガスは、糖化性能が高いため、96 時間まで発酵時間を伸ばしても糖化率はほとんど変わらず、エタノール生産量も 1 g/L 程度しか増えない。そのため、本前処理バイオマスは、プロセスの短縮が可能な優れた前処理法であると考えられる。その代わり、酵母は前処理バイオマスに含まれる高濃度発酵阻害物質に対する耐性を有する必要がある。なお、アルカリ処理バガスでは最高性能を示した B16 及び B22 は、希硫酸浸漬爆砕処理バガスでは、キシロースはおろかグルコースですらまともにまったく発酵できない株であった。このように、前処理バガスの種類によって最適な株は異なることは事前に想定されることであった。そこで、我々が採った戦略は、セルロース系バイオエタノール生産事業者が利用する様々な原料バイオマス、前処理方法に最適な株が選択できるように、異なる遺伝型の実用生産菌を多数用意するという戦略であり、それが功を奏した。なお、発酵 24 時間で、C12/C13 株ともに、50 g/L を超えるエタノールを生産することができるため、エタノール生産性は 2.0 g/L/h を超える。

c. 脱アセチル希硫酸処理バガス

脱アセチル希硫酸処理バガスに最適な株として、B22 株及び C15 株を選出した。ラボスケール SSCF 試験において、最も高い変換効率を示した B22 株は、エタノール濃度 56.2 ± 0.53 g/L、SSCF 効率 0.809 ± 0.008 、推定糖化率 0.863 ± 0.008 、エタノール変換効率 0.937 ± 0.003 であった（48 時間）。これは、目標値の 380 L を超える 402 L を生産できる性能に相当する。38 °C の高温発酵、実バイオマスからの SSCF プロセスによるエタノール生産において、93 % を超える変換効率でエタノールに変換できる性能を持つ酵母は他に類を見ない、世界最高レベルであると言える。本基質は、これまでの基質より含まれる水分量が多かったため、投入する総糖量を合わせるために、スラリー濃度を約 22 w/v% まで上げる必要があった。そのため、本基質は他 2 つの基質に比べてやや糖化が難しく、いずれのサンプルにおいても発酵 48 時間（糖化 72 時間）時点における糖化率は 85 % ~ 88 % と低かった。エタノール変換効率が約 93% と高いにもかかわらず、SSCF 効率が 80% 程度と低いのはそのためである。酵素糖化がもっと進めば、より高いエタノールを生産できると思われる。実際、発酵 96 時間（糖化 120 時間）では、エタノール濃度は 61.3 g/L まで上昇し、推定糖化率 0.965 に達した。推定変換効率は 0.931 と変わらなかった。SSCF 効率は 0.890 であった。これは、目標値の 380 L を大幅に超える 442 L を生産できる性能に相当する。より高性能な糖化酵素を用いるか、若しくは酵素使用量を増やすことにより、発酵 48 時間でも、より高いエタノール収率・生産性が得られるポテンシャル性能を B22/C15 株は有していることを示している。脱アセチル希硫酸処理バガスと希硫酸浸漬爆砕処理バガスとの差異は、脱アセチル希硫酸処理バガスには酢酸が含まれない（検出されない）こと、その他の既知発酵阻害物質濃度も相対的に低

いことが挙げられる（表 2.4.3-5）。すなわち、酵素糖化は難しいが発酵は比較的容易な前処理バイオマスと分類できるだろう。なお、発酵 24 時間で、B22/C15 株ともに、50 g/L を超えるエタノールを生産することができるため、エタノール生産性は 2.0g/l/h を超える。

表 2.4.3-6 選抜された株のプレ評価結果

前処理方法	アルカリ処理		希硫酸浸漬爆砕処理		脱アセチル希硫酸処理	
	菌株	B22	B16	C12	C13	C15
同時糖化発酵時間 (初期糖化時間)	72 時間 (0 時間)		48 時間 (24 時間)		48 時間 (24 時間)	
グルコース (g/L)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
キシロース (g/L)	0.71	N. D.	4.89	4.41	0.38	0.57
グリセロール (g/L)	4.54	4.49	2.84	3.05	5.83	4.98
キシリトール (g/L)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
酢酸 (g/L) *1	0.54	0.97	2.00	2.04	1.28	0.96
エタノール (g/L) (NEDO 目標値)	60.2 (55.1)	59.5 (55.1)	58.5 (52.7)	58.7 (52.7)	56.7 (52.1)	56.2 (52.1)
SSCF 効率	0.851	0.840	0.859	0.862	0.818	0.809
推定糖化率	0.896	0.880	0.948	0.950	0.882	0.863
推定変換効率	0.950	0.950	0.906	0.907	0.928	0.937

N. D. 未検出

*1 希硫酸浸漬爆砕処理及び脱アセチル希硫酸処理前処理の場合、前処理によって生成された有機酸を含む

(1)-2-4 結語

本研究開発項目では、3 種の前処理バイオマスに最適な実用生産菌の開発に成功した。セルロース系エタノール実用生産菌及びその性能は、生産事業者にとって秘匿すべきものであり、基本的には門外不出である（一部、市販されている C5C6 酵母は存在するが事業者に対してライセンス供与するもの）。したがって、同一プラットフォームで比較・検証することはできない。ラボスケール SSCF の結果は、論文として発表されているものも少数あるが、バイオマス種、前処理方法、バイオマス組成や糖化・発酵条件が異なるため、これも単純に比較することはできない。しかし、絶対値として 0.95 という変換効率（アルカリバガス）は、もはや上限値といってもよいほど高い性能である。これは、民間企業における R&D を意識した、個々の優れた有用要素技術の開発、その効果の見極め、複数の要素を組み合わせ、そして正確な評価を行う（次項）研究開発を進め、菌株開発チーム内だけでなく、プロセス開発チームとも緊密に連携した結果、より高い性能を持った製品を短期間で作り上げることに成功した。

(1)-3 各種遺伝子組換え酵母の統一評価

(1)-3-1 背景と目的

本プロジェクトでは、2 m³パイロット試験装置において設定された目標達成に向け、崇城大と産総研は高いエタノール発酵性能を有する実用生産菌の育種を行ってきた。様々な組み合わせにより有用要素技術を実装した株の性能を正確に評価するためには、各菌株を標準化・正規化され

た評価法の下で評価を行う必要がある。そのため、JBA では、プロセス開発チームと協働し、発酵条件の検討を行うとともに、ミニジャーファーメンタを用いた最少量スケールで評価系を構築し、提供された菌株の性能評価を行った。

(1)-3-2 材料と方法

SSCF には、試験数を最大にするため、最少量のスケールで安定かつ正確で統一された評価系として、250 mL ジャーファーメンター (BME-250 mL、BME-25NCS : エイブル社製) を用いた。前培養は、YPD 培地、フラスコ (30 °C) による一般的な回転振とう培養装置を用いて 24 時間行った。SSCF 条件は、上記(1)-2-2 とほぼ同じ条件を用いて行った。発酵 120 時間の発酵溶液に含まれるエタノール、残存グルコース・キシロース、副生成物としてキシリトール、グリセロール、酢酸、乳酸等を、HPLC を用いたイオンクロマトグラフィーにより定量した。

この統一評価は、菌株の開発と並行して行う必要があった。そのため、一定期間の間に開発された菌株のうち、最も優れたものをまず選出し、それを次の期に開発された菌株を評価する際や前処理バイオマスのロットが変更になった場合のコントロールとした。

(1)-3-3 得られた成果と意義

a. アルカリ処理バガス

アルカリ処理バガスに最適な株として、B16 及び B22 株が選出された。B16 株は、最大エタノール濃度 63.9 g/L、最大 SSCF 効率は 0.877 であった。糖化されたキシロースをほぼ全て消費しており、残存キシロースは 0.7 g/L であった。これらの株は本評価においても目標 SSCF 効率 0.765 以上、エタノール濃度 50 g/L 以上を達成した (表 2.4.3-7)。

b. 希硫酸浸漬爆砕処理バガス

希硫酸浸漬爆砕処理バガスに最適な株として、B20 及び C8 株が選出された。B20 株は最大エタノール濃度 53.4 g/L、最大 SSCF 効率は 0.777 であった。糖化されたキシロースをほぼ全て消費しており、残存キシロースは 1.1 g/L であった。エタノール濃度及び SSCF 効率が低い理由は、プレ評価に比べて酵素使用量が少なく、糖化率が低いことによる。また、アルカリ処理バガスで最優良であった B16/B22 株は、やはり酸浸漬爆砕処理バガスではエタノール発酵が極端に低く、希硫酸浸漬爆砕処理バガスには不向きであった。少なくとも B20 株は本評価においても目標 0.765 以上、エタノール濃度 50 g/L 以上を達成した (表 2.4.3-7)。

c. 脱アセチル希硫酸処理バガス

脱アセチル希硫酸処理バガスに最適な株として、C15 及び C13 株が選出された。C15 株は、最大エタノール濃度 51.9 g/L、最大 SSCF 効率 0.811 であった。糖化されたキシロースをほぼ全て消費しており、残存キシロースは 0.1 g/L であった。これらの株は本評価においても目標 0.765 以上、エタノール濃度 50 g/L 以上を達成した (表 2.4.3-7)。

(1)-3-4 結語

本統一評価の結果、プレ評価とほぼ同等の結果が得られた。プレ評価及び統一評価の結果をまとめて、3 種の前処理バイオマス (アルカリ処理、希硫酸浸漬爆砕処理、脱アセチル希硫酸処理) に対し、選抜された株とそのエタノール発酵性能について、プロセス開発チームへ報告した。本研究開発項目は、プロセス開発チームが、限られた回数しか行うことができない 2 m³パイロット

試験装置で使用する菌株を選定する際に必要な実用生産菌の基礎データを収集するとともに、菌株を開発した実施機関が行った SSCF だけでなく、第三者である JBA が標準化された方法により評価を行うことで、その株の持つエタノール発酵性能を証明した。その結果、各前処理バイオマスに最適な実用生産菌の選定に成功し、プロジェクトの最終目標達成に貢献した。

表 2.4.3-7 選抜された株の統一評価結果

前処理方法	アルカリ処理		希硫酸浸漬爆砕処理		脱アセチル希硫酸処理	
	B16	B22	B20	C8	C15	C13
菌 株	B16	B22	B20	C8	C15	C13
エタノール (g/L)	63.9	63.3	53.4	52.1	51.9	51.3
グルコース (g/L)	N. D.	0.2	0.6	2.6	N. D.	N. D.
キシロース (g/L)	0.7	1.0	1.1	6.2	0.1	0.1
キシリトール (g/L)	0.9	1.0	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
グリセロール (g/L)	4.4	4.0	1.9	1.8	4.7	6.3
乳酸 (g/L) *1	0.8	0.7	5.6	2.3	0.9	0.9
酢酸 (g/L) *1	0.9	0.3	2.5	5.8	1.6	2.2
SSCF 効率	0.877	0.868	0.777	0.758	0.811	0.802

N. D. 未検出

*1 希硫酸浸漬爆砕処理及び脱アセチル希硫酸処理前処理の場合、前処理によって生成された有機酸を含む

(2) 同時糖化並行複発酵プロセスの開発

(2)-1 同時糖化発酵の最適操作条件確立と性能向上技術開発 (日揮)

パイロットスケールにおける SSCF 運転条件の決定を目的として、酵素濃度、窒素源種類、窒素源濃度、植菌量などの SSCF 基本条件を検討した。原料には、各前処理を施したユーカリ、およびバガスを用いた。ユーカリはパルプ処理物、バガスは、アルカリ処理、希硫酸処理、および脱アセチル希硫酸処理を施したものを用意した(図 2.4.3-6)。

各前処理バイオマスにおいて、酵素濃度、窒素源種類、窒素源濃度、植菌量などの SSCF 基本条件を検討し、5 %以上のエタノールを生成する SSCF 条件を見出した。また、酵素の基質への非特異的吸着を抑制する添加剤の効果は、ほぼ全てのバイオマスにおいて認められた。これらの結果をもって、ベンチスケールへのスケールアップを進めることとした。

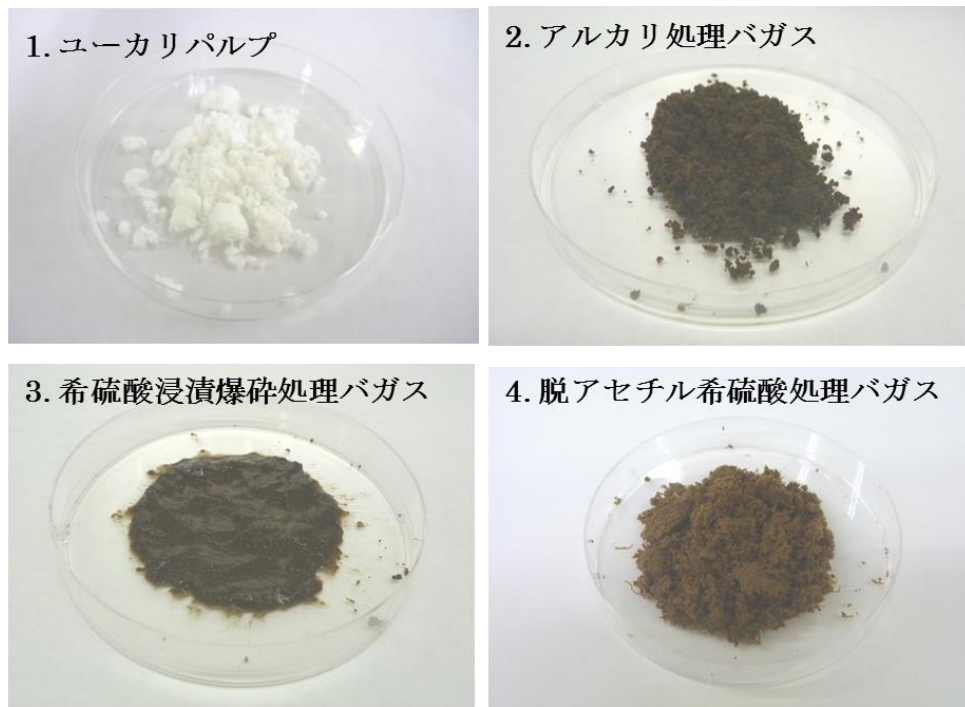


図 2.4.3-6 各前処理バイオマス

1. ユーカリパルプ：ブラジル産のユーカリのパルプ化処理物。
2. アルカリ処理バガス：ベトナム産バガスペレットを、1 % NaOH 溶液中で、140 °C 処理した。さらにろ過、中和、水を用いて数回洗浄した。
3. 希硫酸浸漬爆砕処理バガス：ベトナム産バガスを 0.5 % 硫酸に浸漬後、水蒸気爆砕装置にて、180 °C、10 分処理した。
4. 脱アセチル希硫酸処理バガス（米国再生エネルギー研究所に外注）：アメリカ産バガスを 0.4 % NaOH、80 °C 下において 2 時間処理し、固液分離後サンプルを洗浄後、0.75 % 希硫酸に 2 時間浸漬し、NREL Horizontal Reactor にて、170 °C、10 分処理した。

(2)-2 ベンチスケール試験（日揮）

本研究開発では、パイロットスケールにおける SSCF プロセスの確立を目標としている。その前段階として、30 L スケール、及び 200 L スケールの SSCF 試験装置(図 2.4.3-7)を用いて、開発した遺伝子組換え酵母を用いた SSCF 試験を行い、フラスコスケールからのスケールアップの影響を評価するとともに、2 m³パイロットの試験装置設計のためのデータを取得した。

30 L、および 200 L の SSCF 試験装置を用いて、ユーカリパルプ、アルカリ処理バガス、および希硫酸浸漬爆砕処理バガスを用いて同時糖化発酵試験を行った結果、全ての前処理バイオマスにおいて、前処理後ホロセルロース含有率から計算されるプロジェクト目標収率を上回る結果が得られた(表 2.4.3-8, 図 2.4.3-8)。しかし、全ての基質において、フラスコスケールと比較し、エタノール濃度、および収率が約 10%程度低い傾向が認められた。特に目立った副生成物は無いため、酵母による発酵が問題とは考えにくく、スケールアップによって何らかの要因で低下している可能性が考えられた。



図 2.4.3-7 SSCF ベンチスケール装置
(左:200 L SSCF 装置、右:30 L SSCF 装置)

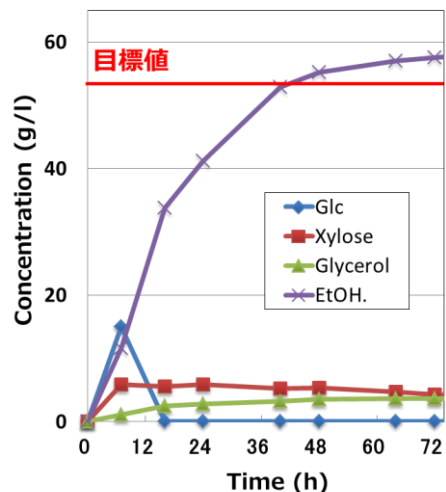


図 2.4.3-8 200 L 装置でのユーカリパルプ SSCF 結果

表 2.4.3-8 ベンチスケール試験装置を用いた SSCF 試験結果のまとめ

基質	供試菌株	装置スケール	ホロセルロース含有率 (%)	仕込濃度 (w/v%)	*目標エタノール濃度 (g/l)	生成エタノール濃度 (g/l)
ユーカリパルプ	<i>S. cerevisiae</i> A25	30 L	84	15	54	59
ユーカリパルプ	<i>S. cerevisiae</i> A25	200 L	84	14	53	58
ユーカリパルプ	<i>S. cerevisiae</i> B22	30 L	84	17	62	67
アルカリ処理バガス	<i>S. cerevisiae</i> B4	30 L	70	17	52	53
希硫酸浸漬爆砕処理バガス	<i>S. cerevisiae</i> B4	30 L	52	22	50	51

* 基質濃度 (w/v%) × ホロセルロース含有率 × 1.1 (加水分解分子量増加係数) × 0.51 (エタノール理論収率) × 0.765 (糖化発酵目標収率)

(2)-3 スラリーハンドリング試験 (日揮)

本研究開発の目標値であるエタノール濃度 5 w/v %を達成するためには、原料となる前処理バイオマスを高濃度に仕込む必要があるため、原料の種類によっては、SSCF 槽内が 20 w/v %以上の高濃度スラリー系となる。さらに SSCF は、糖化、発酵の進行に伴ってバイオマスの性状 (粘度や粒子径) が変化する複雑な系となる。また一方で、商業装置は 1000 立米超となり、その混合、攪拌が容易でないことは想像し易い。

そこで本研究では、商業装置に対応可能な攪拌混合方法としてスラリーポンプによる循環混合を選択し、本攪拌方法による商業装置設計データ取得と高濃度スラリーのハンドリング技術確立を目的として、スラリーのポンプ輸送特性、熱交換特性、反応槽内の温度制御特性などの物理化学的データや、ポンプ攪拌の酵素反応への影響等の生物学的データなどのスラリーポンプ性能を評価できる実験装置 (写真 1, 2, 3) を製作し、試験を行った。

まず最大流速 30 m³/h のスラリーポンプを備えた 2 m³ スラリーハンドリング装置を製作し、前処理バガスのポンプ循環攪拌テストを行った。しかし、10 w/v %程度の仕込濃度に達すると流量が低下し、出力を増大しても流量が維持できない状況となった。そこで、より循環流量の高い最

大流量 120 m³/h のポンプを搭載した 1 m³ スラリーハンドリング試験装置を製作し、前処理を施したバガスを用いて試験を行った。ポンプ容量と配管径の増大によって、最大 25 w/v % 程度まで仕込が可能であることが認められ、ポンプ循環による高濃度バイオマススラリーのハンドリングの目途がたった。

さらに、商業機クラスの最大 240 m³/h のポンプを備えた、20 m³ 実証スケールのスラリーハンドリング装置(図 2.4.3-9) を建設し、商業装置設計のためのデータの採取を行った。本装置を用いて、仕込量、循環流量を変えて、酵素反応に与える影響や種々の物理化学データを取得した。商業機スケールのポンプ攪拌においても、酵素反応は維持された。商業規模のポンプを用いた実証スケール装置における高濃度バイオマススラリーのハンドリング技術を確立した。



図 2.4.3-9 20 m³ スラリーハンドリング装置写真と概略図 (日揮技術研究所設置)

(2)-4 酵素のリグニンへの非生産的吸着抑制剤に関わる開発（再委託：沼津高専）

リグニンを含むバイオマスの SSCF、及び糖化反応における一つの技術的課題として、酵素セルラーゼが基質（ホロセルロース）では無く、リグニンへ非生産的に吸着し、添加した酵素が無駄になってしまう、酵素の非生産的吸着現象が知られている（図 2.4.3-10）。バイオマスからのエタノール製造の変動費において酵素コストは大きな割合を占めるために、本課題の解決はプロセス競争力の点で重要な課題となる。これまでに、非生産的吸着を抑制するタンパク質 (BSA: 牛血清アルブミン等) や界面活性剤 (Tween 80, ポリエチレングリコール等) の添加が有効であることが知られているが、本研究では、より低コストな非生産的吸着抑制剤の探索を行なった。

その結果、ゼラチンネットと工業用ゼラチンの添加によって酵素使用量を削減できることが示された。また、安価かつ大量に入手可能な穀物発酵残渣 (DDGS: Dried Distiller's Grains with Solubles)、および馬鈴薯でん粉工場廃水中タンパク質などについても、加水分解処理を施すことによって、酵素使用量を削減できる非生産的吸着抑制剤として利用可能であることを見出した（図 2.4.3-11）。

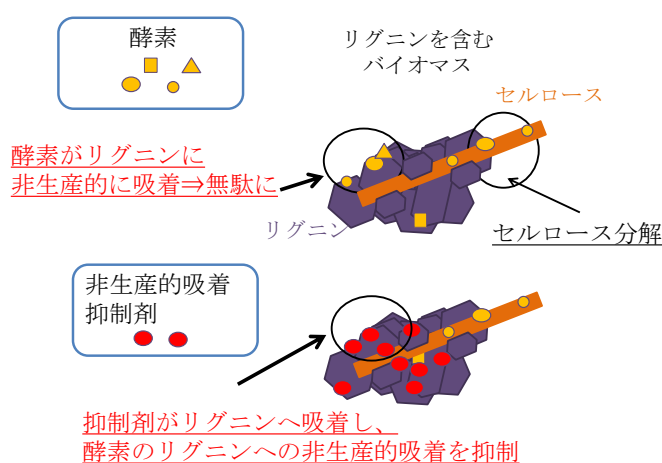


図 2.4.3-10 酵素のリグニンへの非生産的吸着メカニズムと非生産的吸着抑制剤

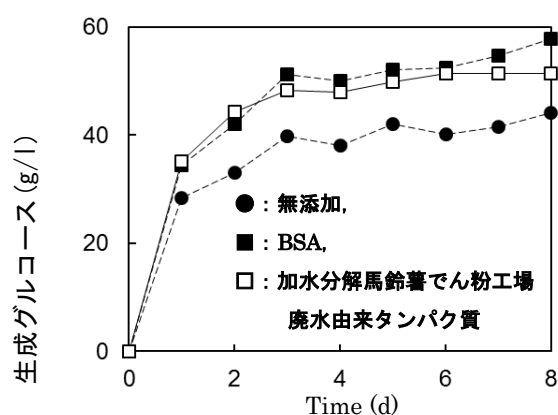


図 2.4.3-11 バガス糖化反応における加水分解馬鈴薯でん粉工場廃水由来タンパク質添加効果

(2)-5 前処理バイオマスの構造や性状に関わる検討（再委託：京都大学）

本研究では、SSCF における酵素使用量削減に向けた方策の検討として、酵素成分である CBH I、CBH II、EG I を蛍光色素で標識し、酵素糖化におけるバイオマス表面での酵素分布を顕微鏡観察することにより、前処理バイオマスへの酵素吸着挙動解析を行った（図 2.4.3-12）。対象となるバイオマスとしては、サトウキビバガス、およびユーカリを使用した。

セルラーゼの構成成分である、CBH I、CBH II、EG I はバイオマスのセルラーゼの露出した部位に多く結合し、リグニンによってその結合が抑制されることが認められた。また BSA の添加は糖化率を上昇させ、セルラーゼのセルロースへの結合の安定化に寄与している可能性が示唆された。これら結果より、セルラーゼ反応向上には、セルロースを露出させ、セルラーゼが結合しやすい状態にすることが最重要であると考えられた。セルラーゼの結合を抑制するリグニンの除去が最も適切であるが、より小さな破片になるようなバイオマスの前処理条件を検討することで、表面積が大きくなるために糖化速度および糖化率の上昇が見込まれる。

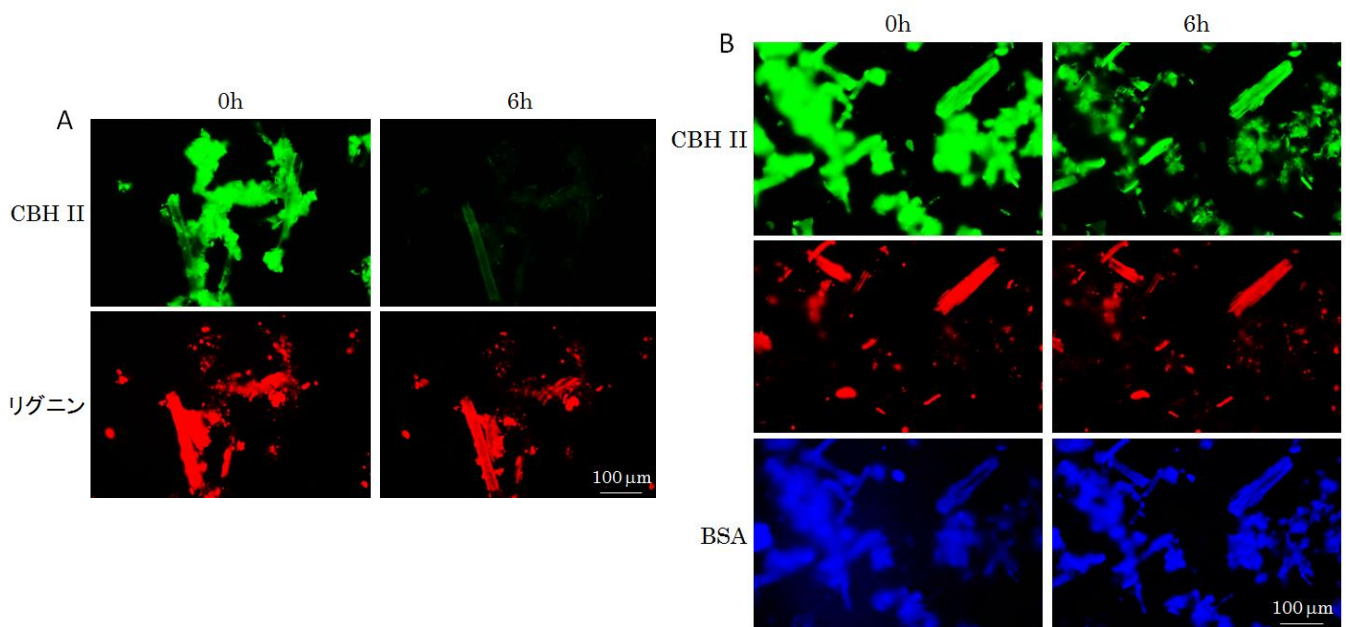


図 2.4.3-12 BSA 添加による CBH II の局在の変化
A) BSA 非存在下、B) 1% BSA 存在下

(2)-6 同時糖化発酵プロセス実用化に必要となる廃液処理技術の検討（再委託：北九州市立大）

非食糧系バイオマス由来のエタノール製造プロセスから排出される有機性廃液には、生物分解性の異なる様々な成分が含まれていることから、単純な BOD や COD を基準とした一義的な設計手法によって廃水処理システムを精度良く検討することは極めて難しい。また、エネルギー回収が期待される嫌気性処理システムにおいては、発酵細菌、水素生成性酢酸生成細菌、水素資化性メタン生成古細菌、酢酸資化性メタン生成古細菌や硫酸塩還元細菌を始めとする代謝機構が全く異なる多種の微生物が各成分の分解反応に関わっている。従って、効率的な廃水処理システムの構成や個々の処理モジュールの運転条件を設定するためには、廃液に含まれる各成分の生物分解特性を整理することが欠かせない。そこで本検討では、当該廃液の嫌気的分解パターンを動力学に基づいて実験的に把握し、廃水処理システムの概念設計を可能とする生物反応モデルを構築することにした。これにより、仮想的な生物処理プロセスをプロセスシミュレータ上に設定し、処理水質のみならず、メタン生成の度合いからエネルギー回収性も評価できるようになる。また、工場のエタノール生産工程では多量の水が消費されるため、その使用量次第で工場の立地が制限される懸念がある。そこで、生物処理水を工場内でリサイクルすることを想定し、生物処理水に含まれる非生物分解性の溶解性有機物を除去する後処理プロセスも検討した。

これらをもとに、セルロース系エタノール生産プロセスから排出される廃液の中で最も処理に手間がかかる水蒸気爆砕廃液について効率的な廃液処理システムのフロー案を作成した(図 2.4.3-13, 14, 15)。水蒸気爆砕処理バガスの廃液処理プロセスとして、嫌気性処理による生物分解性成分のメタン生成と R0 膜と減圧蒸留による非生物分解性成分の濃縮を組み合わせたシステムを提案する(図 2.4.3-13)。本廃液処理システムは、好気性処理(図 2.4.3-14)、若しくは R0 膜処理を行わないケース(図 2.4.3-15)と比較して、水蒸気爆砕廃液が有する熱エネルギーの 39%を回収可能であり、処理の過程で工業用水も回収できる特長がある(表 2.4.3-9)。

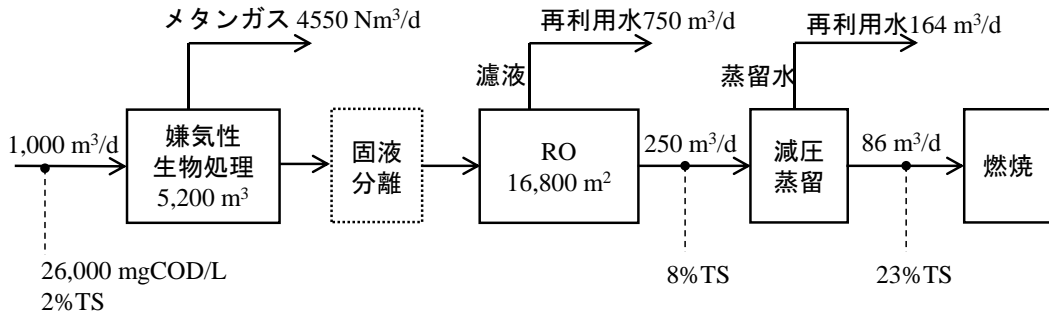


図 2.4.3-13 廃水処理フロー① (提案フロー)

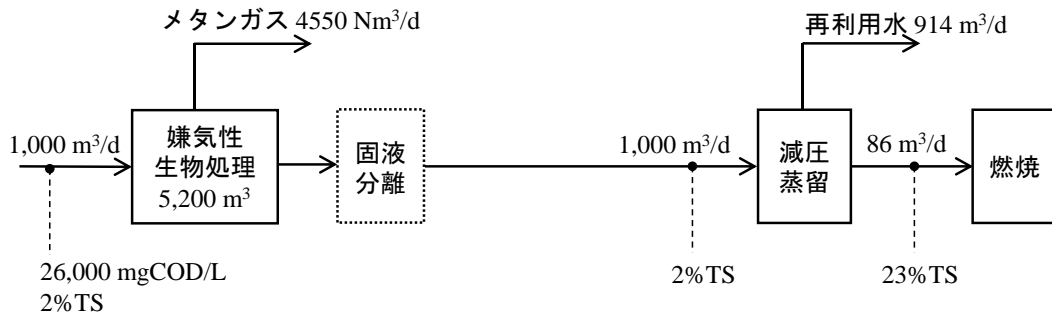


図 2.4.3-14 廃水処理フロー② (対象その 1)

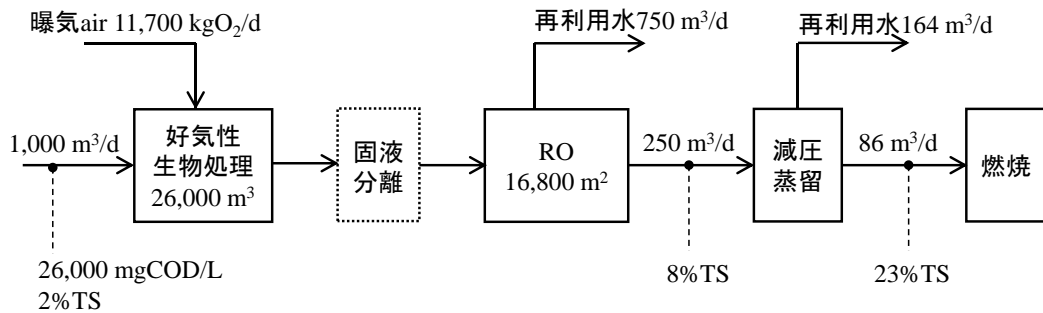


図 2.4.3-15 廃水処理フロー③ (対照その 2)

表 2.4.3-9 水蒸気爆砕廃液処理システムのエネルギー収支 (×10⁶ kJ/d)

	プロセス	フロー①(提案)	フロー②(対照 1)	フロー③(対照 2)
消費エネルギー	嫌気性生物処理	0.38	0.38	-
	好気性生物処理	-	-	10
	RO 膜処理	26	-	26
	減圧蒸留処理	12	69	12
獲得エネルギー	嫌気性生物処理	180	180	-
エネルギー収支		+ 142	+ 110	-48

(2)-7パイロットプラント試験（日揮・産総研）

バイオマスから前処理工程、糖化工程、発酵工程及び濃縮・脱水工程の各基盤技術で得られた成果を実用化につなげるためには、各要素工程における基盤技術を改良した上で、パイロットスケールで生産技術を確立し、実用化に向けた課題の改善を図っていく必要がある。このような背景の下、2020年の商業化における目標としての「エタノール生産濃度 5 w/v% 以上、エタノール発酵収率 95%以上」に資する目標として、本研究開発では、

「2 m³のパイロットスケールで、エタノール生産濃度 5 w/v% 以上、1 ton-dry の前処理バイオマスから 380L 以上のエタノール生産（ホロセルロース含有量 70%において）」を達成するための検討を行ってきた。

プロジェクト開始当初(2013-14年度)は、ベンチスケール SSCF 装置の試験結果、およびスラリーハンドリング装置を用いたスラリー特性の実験結果を基に、2 m³パイロット SSCF 装置の設計を進めるとともに、パイロット試験に用いるための前処理バイオマスを調達した。2015年度に 2 m³パイロットプラントの建設を行い、2016年度の建設完了後(図 2.4.3-16)、本事業で開発された遺伝子組換え酵母を用いて、目標を達成するべくパイロットスケールでの SSCF 試験を行った。

ユーカリパルプ、アルカリ処理バガス、および脱アセチル希硫酸処理バガスを基質とし、本事業にて開発した組換え酵母を用いて、2 m³のパイロットスケールにおける同時糖化発酵試験を行った。全ての基質において、本研究開発の目標値である、エタノール生産濃度 5 w/v% 以上、1 ton-dry の前処理バイオマスから 380L 以上のエタノール生産収率（ホロセルロース含有量 70%の場合）を達成した(表 2.4.3-10、図 2.4.3-17)。

また本開発では、SSCF に用いる菌体量を重視した。SSCF の際、多量の培養菌体を必要とするプロセスは、前培養コストの増加、および菌体濃縮プロセスが必要になるなど、実用的では無い。本開発で得られた株は、低植菌濃度（OD_{600nm}=1~3 程度）においても目標値を達成することが可能であり、本観点からも実用性が高いといえる。一方で、開発した株は全て遺伝子組換え株であるため、遺伝子組換え体使用に対するガイドラインが存在する国で本株を用いた事業を行う際には、それに沿った運用面、設備面での対応が必要となる。



図 2.4.3-16 2 m³パイロット同時糖化発酵装置（産総研 中国センター設置）

左： 装置上部、右： 装置下部

表 2.4.3-10 2 m³パイロット試験装置を用いた同時糖化発酵試験結果のまとめ

基質バイオマス	供試菌株	時間(h)	ホロセル ロース 含率(%)	仕込濃度 (w/v%)	目標 エタノール 濃度(g/L)*	生成 エタノール 濃度(g/L)
ユーカリパルプ	<i>S. cerevisiae</i> B4	72	84	15	54	60
アルカリ処理バガス	<i>S. cerevisiae</i> B4	72	72	20	62	65
アルカリ処理バガス	<i>S. cerevisiae</i> B22	72	72	20	62	67
脱アセチル希硫酸爆砕バガス	<i>S. cerevisiae</i> B22	72	55	22	52	52
脱アセチル希硫酸爆砕バガス	<i>S. cerevisiae</i> C15	54	55	22	52	58

* 基質濃度(w/v)×ホロセルロース含有率×1.1 (加水分解分子量増加係数) ×0.51(エタノール理論収率)×0.765(糖化発酵目標収率)

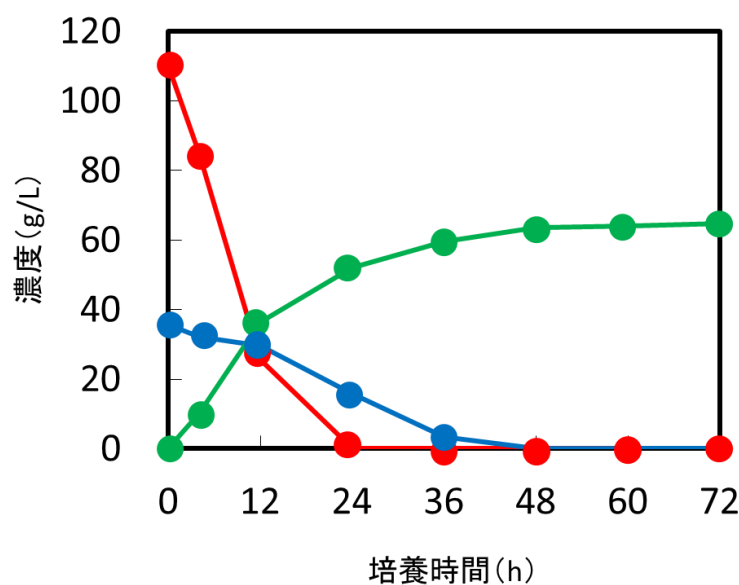


図 2.4.3-17 2m³同時糖化発酵装置を用いたアルカリ処理バガスの同時糖化発酵試験
仕込: 800 L、基質: アルカリ処理バガス、20 w/v %
酵素: JN24 (花王), 酵素粉体添加量: 11.8 kg
酵母: *S. cerevisiae* B4 株, 初期 OD_{600nm}: 3, 窒素源: 2 % CSL
pH: 5, 温度: 35°C, 攪拌速度: 120 rpm

(3) プロセスデザインパッケージの作成（日揮）

本事業では、同時糖化並行複発酵を用いたセルロース系エタノール製造プロセスにおける、前処理バイオマス調整工程、同時糖化並行複発酵工程、固液分離工程のプラントコストとオペレーションコストを試算した。セルロース系エタノールの製造プロセスは、前処理工程、調整工程、同時糖化発酵工程、固液分離工程、蒸留・脱水工程が変換プロセスの工程となる。さらには、ユーティリティープロセス（バイオマスボイラーや発電装置）、廃液処理プロセス、原料バイオマスの貯蔵設備、エタノールの貯蔵・払出設備等も必要になる。ユーティリティープロセスと廃液処理プロセスは、エタノール製造プラントを独立して建設するか、あるいは既存プラントに併設して建設し、ユーティリティープロセスや廃液処理プロセスを共用するか否かで、全体の設備費や運転費は大きく変わる。また、前処理方法によって、同時糖化発酵の性能のみならず、調製工程の方法や廃液処理コストも大きく変わる。商業化に向けては、様々な要因を考慮したプラント設計と経済性評価が重要である。

今回の試算は前処理に希硫酸爆砕法を使用し、製糖工場に併設し、ユーティリティー、廃液処理を共有することを前提とした。試算の範囲である調整工程、同時糖化発酵工程、固液分離工程の基本フローおよび装置構成は図 2.4.3-18 のプロセスフロー図に示す通りである。このフローを元に、本研究で得られた実験結果より得られた操作因子を用いてマテリアルバランスの計算プログラムを作成し、エタノール生産量が約 10 万 kL となる原料処理量でプラントの概算を行った。稼働時間はメンテナンスのための年間休止時間を 6 週間とし 322 日とした。試算により得られたプラントデータを表 2.4.3-11 にまとめる。

表 2.4.3-11 プラントデータ

原料処理量	1200	ton-dry/day
計算結果		
エタノール生産量 (99.95%)	261	ton/day
	326	kL/day
エタノール収率	272	L/dry-ton biomass
リグニンケーキ発生量 (固形分率 60%)	634	wet-ton/day

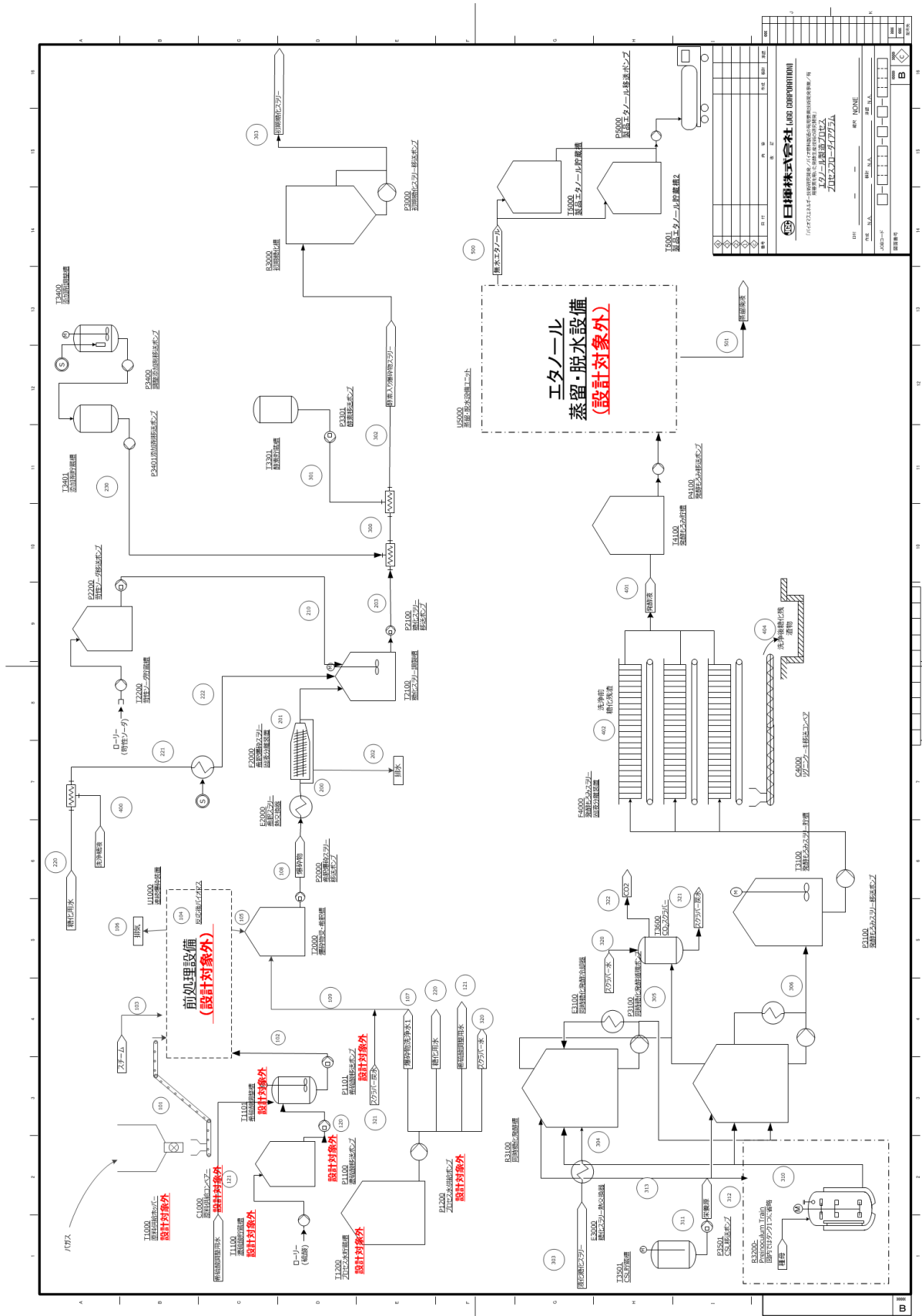


図 2.4.3-18 プロセスフロー図

算出されたマテリアルバランス、およびその他の操作因子より、各装置、および周辺装置の設計・概算を行った結果、上記工程のプラントコストは表 2.4.3-12 の通りとなった。為替レートは 1 USD = 111 JPY、1 EUR = 120 JPY とした。全体のプラントコストと機器費の比率である Lang factor はアメリカの国立再生可能エネルギー研究所 (NREL) のが行った経済性検討にて算出された 3.1 を使用した。変動費については、原料価格を\$ 10/dry-ton と仮定し、酵素コストは NEDO 有用要素技術開発で得られた成果を用い、その他の薬剤等を加えて算出した (表 2.4.3-13)。スチームや電力などのユーティリティーに関してはボイラー燃料となるリグニンケーキの譲渡により無償と仮定している。

表 2.4.3-12 概算プラントコスト

セクション	機器費 (USD)
調整工程	9,060,887
同時糖化発酵工程	14,023,408
固液分離工程	3,935,275
機器費合計	27,019,570
総プラントコスト (Lang Factor =3.1)	83,760,668

表 2.4.3-13 変動費算出

項目	使用量	ユニットコスト	年間コスト	エタノールコスト
原料	386 dry-kT/yr	10 \$/dry-ton	3.9 MM\$/yr	0.037 \$/L-EtOH
98%硫酸	6 kT/yr	180 \$/ton	1.1 MM\$/yr	0.010 \$/L-EtOH
48%苛性ソーダ	25 kT/yr	387 \$/ton	9.8 MM\$/yr	0.093 \$/L-EtOH
酵素				0.090 \$/L-EtOH
ゼラチン	3 kT/yr	2,000 \$/ton	6.1 MM\$/yr	0.058 \$/L-EtOH
CSL	22 kT/yr	56 \$/ton	1.2 MM\$/yr	0.012 \$/L-EtOH
前培養用グルコース	13 kT/yr	573 \$/ton	7.4 MM\$/yr	0.071 \$/L-EtOH
水	2,828 kT/yr	0.22 \$/ton	0.6 MM\$/yr	0.006 \$/L-EtOH
廃液処理用苛性	2,831 kT/yr	1.00 \$/ton	2.8 MM\$/yr	0.027 \$/L-EtOH
廃 Ash 発生量	10 kT/yr	30.00 \$/ton	0.3 MM\$/yr	0.003 \$/L-EtOH
			合計	0.407 \$/L-EtOH

また、本研究で採用した SSCF プロセスと、通常の糖化と発酵が独立したプロセス (SHF プロセス: Separated Hydrolysis and Fermentation) との経済性の比較検討を行った (表 2.4.3-14)。その結果、SSCF プロセスの方が設備費と変動費が共に低く抑えられる結果が得られた。設備費は、全体的な反応時間が 1 日短くなっていること、変動費に関しては SSCF により収率が向上していることに起因している。

表 2.4.3-14 SSF と SHF のコスト比較

	SSF	SHF
エタノール生成効率 (SSF 効率)	81%	76%
エタノール OPEX (\$/L EtOH)	0.41	0.44
Capex 算出		
初期糖化槽基数	5	5
初期糖化後反応槽基数	10	15
最高エタノール生成速度 (g/(L・hr))	2.0	5.3
初期糖化後反応槽循環ポンプ台数	10	20
発酵槽熱交換器基数	10	10
発酵槽熱交換器伝熱面積	850	1100
糖化・発酵工程総機器費 (MM USD)	14.2	16.0

(4) 結語

同時糖化併行複発酵の要素技術として、高効率キシロース代謝、高温発酵、阻害物質耐性に資する有用遺伝子、酵素情報を取得した。得られた要素技術を実用酵母に実装し、各前処理バイオマスの同時糖化併行複発酵に最適な株の開発に成功した。

開発した実装株を用い、2 m³ パイロットスケール同時糖化発酵にて、各種バイオマスにおける目標エタノール濃度、エタノール収率を達成した。一方で、20 m³ デモスケールにおいて、同時糖化並行複発酵スラリーのスラリーハンドリング技術を確立した。

また、得られた結果を基に、同時糖化併行複発酵のプロセスデザインパッケージを作成した。

2.4.4 知的財産権等の取得及び成果の普及

本事業においては、成果をアピールするべく、外部発表に多く取り組んだ。下記表に、各年度における特許出願、論文、学会発表・講演数を下記の表に示す。

表. 各年度における特許出願、論文、学会発表・講演数

年度	特許出願	論文 (査読付き)	学会発表・講演
H25FY	0	0	1
H26FY	2	0	4
H27FY	1	0	17
H28FY	2	3	18

4. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて

1. 成果の実用化・事業化に向けた取組及び見通しについて

第一世代に比べても GHG 排出を削減できるセルロース系エタノールの需要は今後高まると予想される。これまで主にコストの問題で事業化が困難であったが、本事業による成果により、日本企業が有する要素技術を利用したセルロース系エタノール生産の事業化が近づいたと言える。各テーマともに目標のコスト低減に成功しており、予定通り 2020 年の実用化・事業化に向けて取組む。本事業は要素技術開発であるため、実用化・事業化は個別テーマごとに研究開発責任機関であった 1 企業がチームを代表して担うことになる。

日本製紙株式会社は、現時点ではエタノール生産について直接かかわる予定は無いが、得られた 3 つの成果について、すべて本年度中にも自社植林事業へ展開する予定である。株式会社 Biomaterial in Tokyo (bits) は NEDO 事業である「セルロース系エタノール生産システム総合実証事業(セル総)」に参加中であり、本事業で開発した酵素生産技術を国内でのエタノール生産実証に使用する予定である。花王株式会社は、既にサンプル提供を開始しており、今後事業性評価・判断を経て、アジアでのオンサイト生産によるエタノール生産事業者への酵素販売を目指している。日揮株式会社は、プラントの受注、製糖事業者との共同事業化(廃糖蜜+バガス糖液を原料としたエタノール製造)を目指している。各テーマにおける今後の具体的取組予定を図 1.1 に示す。

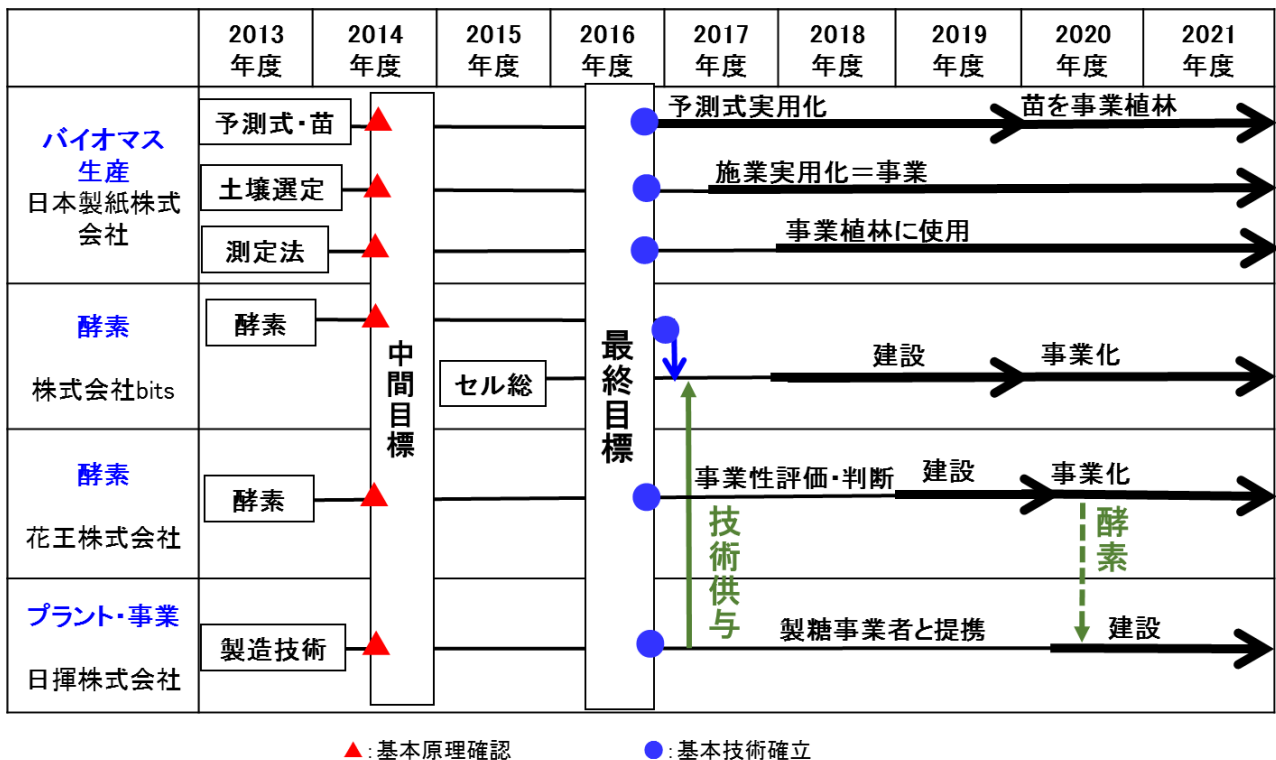


図 1.1 実用化・事業化に向けた具体的取組

2. 研究開発項目毎の事業化の見通し

2.1 ゲノム育種及び高効率林業によるバイオマス増産に関する研究開発

2.1.1 成果の事業化に向けた戦略

本プロジェクトの研究成果は、事業用クローンと比較し、単位面積当たりのバイオマス生産量が1.4倍のユーカリクローンを3系統選抜した。さらに、土壌センシングによる単位面積当たりのバイオマス生産量が1.3倍の最適な施業システムを開発した。両項目を合わせて単位面積当たりのバイオマス生産量が1.8倍となる技術を開発した。これにより、エタノールを製造するための原材料費（立木費、伐採費、輸送費、切削費）は約46%減ずることになり、ユーカリチップ原材料費10円/kgから5.6円/kgとなり約4.4円/kgのコスト削減が可能となる。

林野庁委託事業の（独）森林総合研究所からの「木質バイオマスの大規模利用技術の開発」に関する平成24年度成果報告書によると、木材である原料（スギ切削チップ）の使用規模を250t/日、年間330日の製造で、エタノール収率を0.22kL/tとした場合のエタノール製造コストは98円/L（固定費抜き）で、原材料費が占めるコストは60.5%であると報告されている。スギチップ（14円/kg）をユーカリチップ（10円/kg）に単純に置き換え得るとした場合、エタノール製造コストに占める原材料費は54%となり、エタノール製造コストは約84円/Lとなる。本プロジェクトの成果により、ユーカリチップ費を5.6円/kgまでに削減できたと仮定すると、エタノール1Lを製造するコストについては、原材料費は約25.5円/L、エタノール製造コストは約64円/Lとなり、20円（約24%）のコストダウンとなる。なお、固定費を含むエタノール製造コストでは、246円/Lが226円/Lに削減され、約8%のコスト削減となる（表2.1.1-1, 2.1.1-2）。エタノール製造へ実用化のためには、さらなるコストダウンが必須であるが、原材料面からのコストダウンのアプローチとしては、大きな成果があった。

表 2.1.1-1 ユーカリによるエタノール製造コスト（技術開発前）

ユーカリチップ	250 t
エタノール収率	0.22 kL/t
日産	55 L/日
稼働日	330 日/年
ユーカリチップ費用	10 円/kg
エタノール1Lに必要なユーカリチップ量	4.5 kg/L
エタノール生産（固定費抜き）に占める原材料費	54.0 %
エタノール生産コスト（固定費抜き）	84 円/L
エタノール生産コスト（固定費あり）	246 円/L

表 2.1.1-2 ユーカリによるエタノール製造コスト（技術開発後）

ユーカリチップ	250 t
エタノール収率	0.22 kL/t
日産	55 L/日
稼働日	330 日/年
ユーカリチップ費用	5.6 円/kg
エタノール1Lに必要なユーカリチップ量	4.5 kg/L
エタノール生産（固定費抜き）に占める原材料費	39.7 %
エタノール生産コスト（固定費抜き）	64 円/L
エタノール生産コスト（固定費あり）	226 円/L

本プロジェクト提案時は、日本製紙グループが保有するブラジル北部（アマパ州）の植林地に隣接して、パルプ製造設備を建設することを検討していた。また、事業性の判断の上で、2020年にそれに付帯する設備としてエタノール製造プラント（1万kL/年 規模）を設置することを検

討していた。しかし、当初見込みと異なりパルプ市況が厳しい環境にあり、パルプ工場設備の設置の目途が立っていないのが現状である。そのため、エタノール製造設備を建設する状況となっていない。また、原油価格がプロジェクト開始時（2013年）に97.9\$/バレル（WTI原油先物価格）であったのが2017年現在では51.9\$/バレルとなっており、バイオエタノールの競争力は低下している。

事業化には、原油価格の上昇や、政府によるバイオエタノールの高価買取り等の政策が具体化する等、セルロース系エタノールを製造するにコスト的に環境が熟した時に、事業化を検討することとなる。

2.1.2 成果の事業化に向けた具体的取組

本プロジェクトでは以下の3つの技術を開発しているが、林地におけるバイオマス増産のために具体的に有効活用される予定である。

①DNA マーカーによる形質予測式

プロトタイプのマーカー予測式（ R =約0.6）を用いて、単位面積当たりの推定 α セルロース生産量が1.4倍以上のクローンを3系統選抜できた。実証期間（生育期間9ヵ月）が短かったため、今後の生育調査（実証には3年）が必要であるが、マーカー選抜の優位性が示唆される結果となった。さらに高精度の予測式（ R =0.7）も開発できた。パルプやエネルギー用のバイオマスを得るためには今後も優良な育種クローンをいかに効率よく獲得するかが重要であり、本PJで開発した形質予測式は、有効に活用できる可能性が高い。今後もブラジル植林地でマーカー予測式による優良クローン選抜を進めて、技術の実証と並行して、バイオマス増産に役立てたい。推定 α セルロース生産量が1.4倍以上のクローン3系統については今後2年の生育試験を経て、有効性の確実性が確認されたら、2020年には準事業用植林（1～2万本）、2024年には事業植林（10万本以上）となる可能性がある。

②土壌センシング技術

計画変更でブラジルでの土壌センシングは土壌センサ（SAS2600）から携帯型分光放射計となったが、国内でのSAS2600と携帯型分光放射計（FieldSpec）の試験により、ブラジルにSAS2600を持ち込むことができれば、年間6,000haの効率でセンシングできることが示唆された。なお、SAS2600に比べて労力や測定時間が必要となるが、携帯型分光放射計においても土壌評価と土壌マップ作成は可能であり、来年度からブラジルの土壌評価に導入することを検討する。精密林業を実施する為、今後も、土壌センシング技術の改良を行い、実用化を進めていく。

③大面積バイオマス評価システム

UAVによる大面積バイオマス評価システムは、効率的に林地の生育量を測定でき、しかも、特別な知識と技術を必要としなくても扱える汎用的なソフトウェアとなっているため、本年度にも、ブラジル等の林地への導入を検討する。

2.1.3 波及効果

①DNA マーカーによる形質予測式

本PJでは、高精度なマーカー予測式を作成する技術・ノウハウを得ることができ、ブラジル林地で応用可能なことを示した。当社は、ブラジル以外に、チリ、オーストラリアなどに植林地を保有しているが、本技術は、普遍性が高いため、応用可能である。

②土壌センシング技術

本研究は、林業用途を想定したが、ブラジルやアメリカ、カナダ、中国、欧州などの大規模農地における SAS2600 の高速走行観測への応用に期待される。本成果により、平成 29 年 4 月から中国東北部の稲作経験のない寒冷地域において、モデル水田を新たに設け、品種特性、気象・気候特性、土壌特性、および肥培・水管理技術に関する極限地稲作技術モデルに関する共同研究を締結した。土壌特性評価に於いては、本試作機をベースとした中国東北部向けのトラクタ搭載型土壌センシング装置の導入を計画している。

③大面積バイオマス評価システム

UAV による大面積バイオマス評価システムは、効率的に林地の生育量を測定でき、しかも、特別な知識と技術がなくても扱える汎用的なソフトウェアも同時に開発できたことから、ブラジルでの実利用可能な技術を確立できた。また、汎用性が高いため、ソフトウェアの外販も検討しており、大手ソフトウェア会社と外販契約及びにソフトウェアの商品化に向けて協議を行う予定である。

本研究では「大面積」を「詳細」にデータ取得を行うことを目指し、そのためのデータ取得方法を確立し、解析技術の開発を行ってきた。精密林業として、林業分野においても精密でデータが取得できるようになったことは大きな成果である。こうした成果物はバイオマス産業に関連する製紙会社、林業会社に最適なモニタリングツールとして利用価値が高いソフトを提供できることは間違いないが、それ以外の分野でも利用価値があると考えられる。

森林資源が把握できていない地域は世界的に多くあり、そのような場所でデータ整備を行うことで、森林への投資場所を容易に把握できるツールとして利用できると考えられる。世界的に炭素市場取引が確立し、国内外の炭素排出量が多い企業が、その炭素量を軽減するためにも植林活動や海外林地での保全活動に投資する動きがある。そのような状況で、どの場所の森林に投資がされれば、より投資に対する費用対効果があるかの判断材料として、本研究による 3 次元取得方法や解析方法が有効活用できると考えられる。本研究で開発された手法により、より正確性の高い森林域における炭素蓄積量を示す根拠データが提供できれば、投資としての資金を投入する信頼性も高くなると考えられる。炭素市場で取引される炭素クレジットでの一番の問題は、その信頼性であり、本研究による手法で信頼性が高まれば、クレジットによる取引が世界的にも広く認められるようになると考えられる。

また、森林はエネルギー資源であるため、バイオマス燃料として伐採可能量を事前に把握するために、本研究で開発した解析技術が活用できると考えられる。例えば、近年国内では、地域がエネルギー産業と共同で、火力発電の燃料として地域の森林からバイオマス燃料を提供する動きが高まりつつある。国内の森林資源は伐採がされていないため、蓄積量が戦後最大になっており、利用の促進が必要とされている。しかし、森林のエネルギー資源として利用する際は、伐採許容量が問題となる。事前に森林資源を適切に把握することなく、伐採が進めば、地域からの森林資源を持続的に維持できなくなる。適切な資源量を把握するための正確な根拠資料が現状はないため、その根拠資料を作成するツールとして本技術が活用できると考えられる。

このように本プロジェクトでは主にモニタリングに特化して技術開発を行ってきたが、モニタリングだけではなく、森林を計測できる技術は多岐にわたって活用ができ、技術提供できる範囲は広い。今後本プロジェクトの成果である開発されたソフトウェアを普及するために、様々な分野で適用し、成果を産業界に貢献できるように努めたい。

2.2 可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発

2.2.1 成果の事業化に向けた戦略

本成果の事業化は、オンサイト酵素生産プロセスを導入した第二世代バイオエタノール商用化設備においてエタノールを製造し、ガソリン代替燃料としてバイオマス燃料供給有限責任事業組合（Japan Biofuels Supply LLP, JBSL）に提供することを指す。

ただし、オンサイト酵素生産技術を商用化設備に導入するためには、実証テストで取得又は解析されたスケールアップデータ一式を基に、事業化プラントが設計・建設されなければならない。最低限でも事業化スケールへの技術移管において、スペックが保証された技術でなければならない。本委託事業の成果である酵素生産技術は、市販の培養基材を用いる場合においては非常に安定した生産技術であり、スケールアップ時のスペックが保証された技術である。しかし、本事業で得た安価な糖を利用する酵素生産プロセスは、エタノール製造プロセスから一部糖液を循環利用させることを特徴としており、エタノール製造プロセス全体と技術マッチングが可能であるかを検証しなければならない。

そこで、我々は本成果で得られるオンサイト酵素カクテルについての事業性評価を受けるために「セルロース系エタノール総合実証事業」において、引き続き「可溶性糖質源培養によるオンサイト酵素生産技術」のプロセスへの適応を検証している。また、ベース酵素生産時の誘導物質兼炭素源のセロビオースについて、現状では市販のLBKP（単価 100 円/kg 程度）を用いて安価に製造するプロセスを第一案としてとらえているが、紙パルプ工場内で発生する廃棄 LBKP などの利用により更なる酵素製造コスト削減が見込まれることから、廃棄 LBKP などの安価な炭素源の調査を継続する。

2.2.2 成果の事業化に向けた具体的取組

第2世代バイオエタノール商用化を実現させるための課題は以下が挙げられる。

課題①原料バイオマスの確保（プラント建設候補地及び原料収集）

第二世代バイオエタノール製造事業は原料が支配的であり、生産量を担保する量の原料バイオマスの確保が非常に重要である。年間生産 1 万 kL-エタノール規模のプラントを想定した場合、絶乾バイオマス中のホロセルロース含量が 50%程度のバイオマス原料の場合、少なくとも絶乾重量 4 万トン以上の原料を確保しなければならない。しかし、国内バイオマスは、広く、浅く存在していることを特徴とするため、プラントの規模にもよるが、単一のバイオマス原料を、エタノール製造コストを圧迫しないコストで収集することは非常に難しい。また、プラントの建設地によって、バイオマスの収集運搬コストに大きく影響するため、安価に収集可能なバイオマスは建設地によって変動する。

解決に向けた取り組み

これらの背景を踏まえ、現在プラント候補地を数か所選定し、候補地にエタノール製造コストを圧迫しないコストで収集可能なバイオマス原料の調査を実施している。

課題②プラント建設費

また、エタノール製造コストの内訳のうち、設備の償却コストが大半を占めており、市場競争力のある価格でエタノールを製造するためには、プラントの建設コストを十分に削減する必要がある。特に、電気、蒸気、用水、排水処理設備などのユーティリティー設備をいかに削減するか、又は周辺設備と共有できるかが非常に重要である。そのためにはプラント建設地を慎重に選定し

なければならない。また、主要設備に関しても遊休設備の買取りを視野に入れ、調査・交渉をする必要がある。

解決に向けた取り組み

これらの背景を踏まえ、現在、ユーティリティー設備の共有又は使用が可能な建設候補地を選定しており、主要設備に関しても国内の遊休設備の買取り交渉を実施している。

課題③糖化発酵

上述の通り、国内バイオマスは、広く、浅く存在していることを特徴とするため、1万kL程度のエタノール製造プラントであっても単一のバイオマス原料のみをエタノール製造コストを圧迫しないコストで収集することは非常に難しい。そのため、バイオマス原料は複数種類の原料になることが現実的であり、製造プロセスはそれらの原料バイオマスすべてに対応できるプロセスでなければならない。本事業ではLBKPを原料とし、LBKPの酵素分解に最適な成分酵素組成の酵素製造に取り組んだ。LBKP糖化液を炭素源として使用することで成分酵素組成の最適化を図り、酵素変動費8.6～10円/L-エタノール*程度の酵素製造条件及び使用条件を見出した。今後は、構成糖組成の異なる多様な候補バイオマスの最適酵素を製造するために、候補バイオマスの糖化液を炭素源として最適化酵素の製造に取り組まなければならない。

解決に向けた取り組み

現在、「セルロース系エタノール総合実証事業」において、LBKPと比較してキシラン含量の多い原料やマンナン含量の多い原料に対する糖化酵素の最適化に取り組んでおり、培地中の誘導物質兼炭素源によるキシラン分解酵素の生産誘導、マンナン分解酵素の生産誘導に成功している。原料の調査及び収集は事業化時まで継続して実施するため、候補原料バイオマスに対する酵素の最適化は継続して実施していく。どのバイオマスに対しても10円/L-エタノール*以下の酵素変動費となる酵素製造方法及び使用条件を見出すことを目指している。

*エタノール発酵効率を1kg発酵性糖から0.459kg-エタノール(=0.582L-エタノール)とした場合の換算値(エタノール発酵効率90%)

2.2.3波及効果

本事業で開発された技術はバイオマス由来の糖(液)を製造する産業技術であり、バイオエタノール事業にのみ応用される技術ではない。さらに、多様なバイオマスに対応可能な技術であるため、原料を限定することなく技術の転用が可能である。つまり、本技術により、国内に広く浅く存在する多様なバイオマスを、バイオエタノールを含むバイオリファイナリーの原料として扱うことができるようになり、国内の未利用のバイオマスの有効利用につながることを期待される。

また、本技術を応用することにより、バイオマス由来の糖を利用したバイオジェット燃料の製造も可能となる。現在、国内では光合成を利用する独立栄養生物を利用したバイオジェット燃料製造の技術開発が盛んにおこなわれているが、海洋生物ラビリンチュラのように、従属栄養生物で、かつバイオマス由来の糖(グルコース、キシロース)を効率的に脂肪酸へと変換する生物も知られている。ラビリンチュラ類の生産する脂肪酸は、バイオジェット燃料規格Annex2の原料として認められており、本事業で開発されたバイオマス由来の糖(グルコース、キシロースなど)を原料として脂肪酸を合成することも明らかになっている。現在盛んにおこなわれている独立栄養生物によるバイオジェット燃料製造では、培養時の細胞密度が非常に低く、体内に油脂を蓄積した菌体の回収に多大なエネルギーを必要するため、価格競争力のあるバイオジェット燃料を製造するためには製造工程の飛躍的技術革新が必要である。一方、ラビリンチュラ類はタンク培養による高密度培養方法が確立されており、最大の課題は安価な炭素源の確保であったが、本事業

で開発された技術により安価なバイオマス由来糖（液）を利用できるため、最大の課題は克服された。

今後はバイオマスのバイオリファイナリー原料としての利用価値が高まるだけでなく、バイオマスを原料とする従属栄養生物によるバイオジェット燃料製造の研究開発が加速することにつながると期待している。

2.3 バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発

2.3.1 成果の事業化に向けた戦略

石化系燃料に加え、第1世代に比べても GHG 排出を削減できるセルロース系エタノールの需要が高まると予想される。伸長率は2014年でピークを迎えたものの、グローバルで2016年には143 Million USDの市場がある。さらに、2022年には1200 Million USDに達すると予想される。

(Global Cellulosic Ethanol Market Research Report 2016 QYR Chemical & Material Research Center)

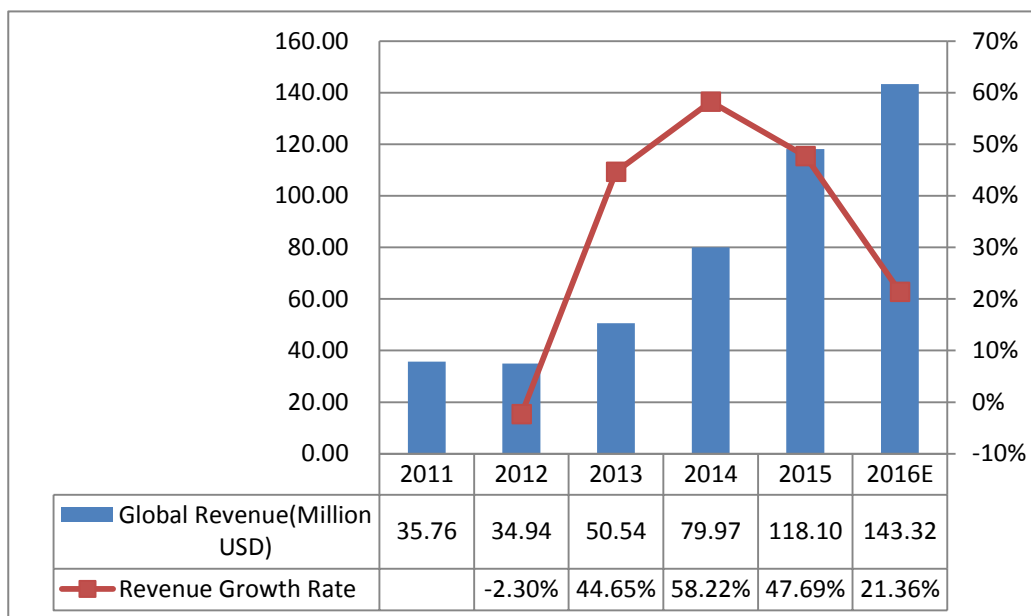


図 2.3.1-1 世界のセルロース系エタノール収益と成長率 (2011-2016)

Global Cellulosic Ethanol Market Research Report 2016 QYR Chemical & Material Research Center

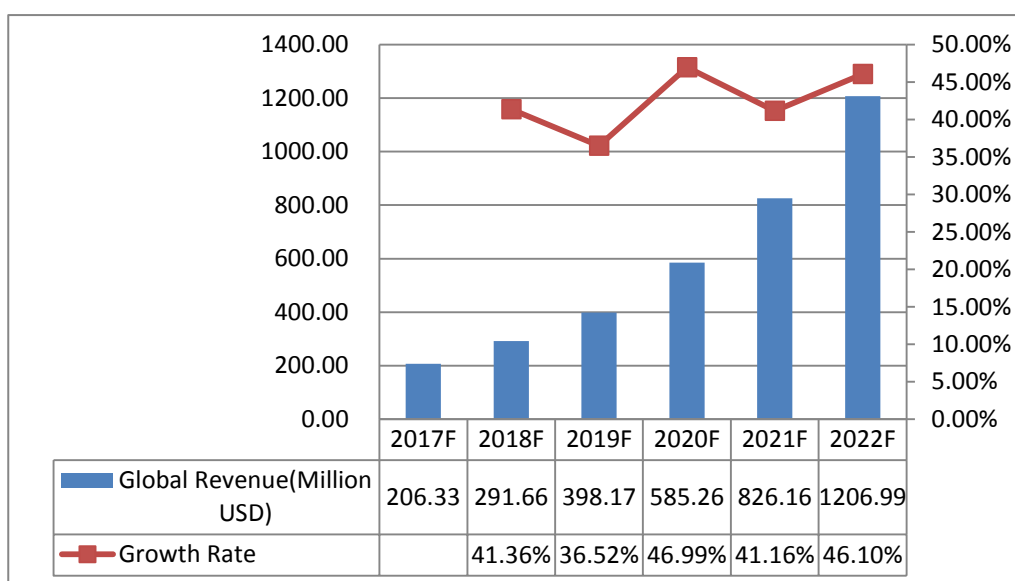


図 2.3.1-2 今後5年間の世界のセルロース系エタノールの予想収益と予想成長率 (2017-2022) Global

Cellulosic Ethanol Market Research Report 2016 QYR Chemical & Material Research Center

伸長率が伸び悩んでいるのは、依然としてコストが1Gエタノールに比べ高く、その内訳は原料及び酵素コストが高いことが要因である。

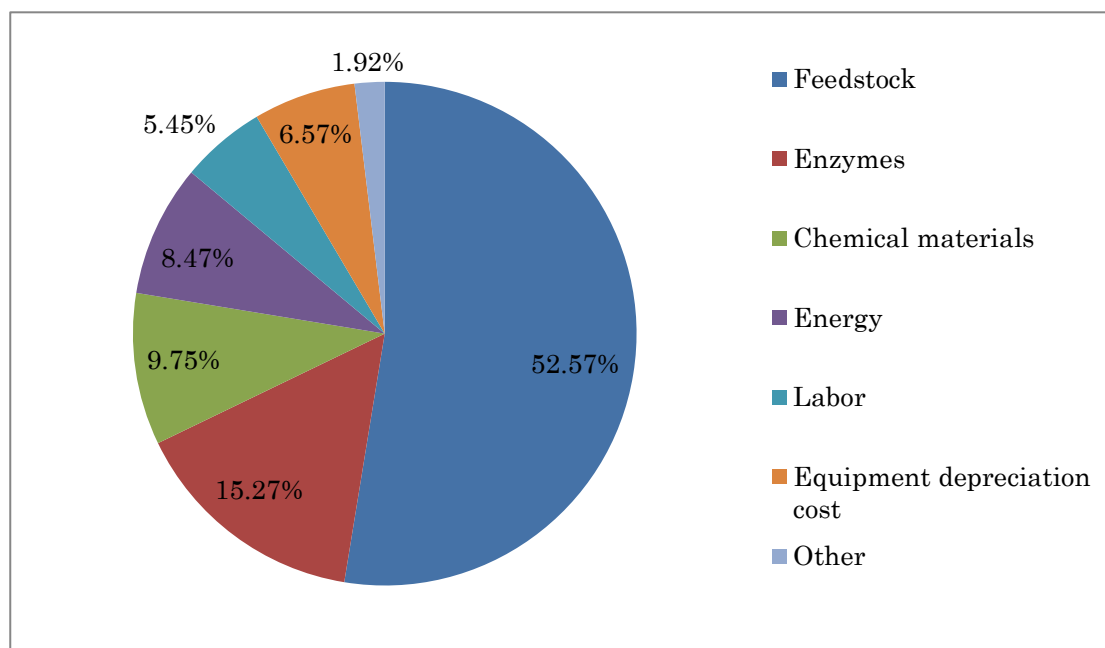


図 2.3.1-3 2015年時点のセルロースエタノールの製造原価構造

Global Cellulosic Ethanol Market Research Report 2016 QYR Chemical & Material Research Center

アメリカで先行している第2世代エタノールの主原料はコーンストーバーであり、一方ブラジルでは、サトウキビバガスが主原料である。バガスは、製糖会社拠点中あるいは隣接した設備でエタノール生産を実施することにより、輸送費がかからず、今後主流の原料となると思われる。サトウキビ生産国1位は、ブラジルだが、2位はインドであり、タイ、フィリピン等東南アジアにも多く存在する原料である。

本事業の検討から、バガスが入手可能な地域に酵素供給を行うことがビジネスとして実現の可能性が高いと考えられた。

2.3.2 成果の事業化に向けた具体的取組

本事業で製造した酵素を、バイオマス糖化・エタノール生産を目指した複数法人へサンプル品を供給し、良好との評価を得ている。

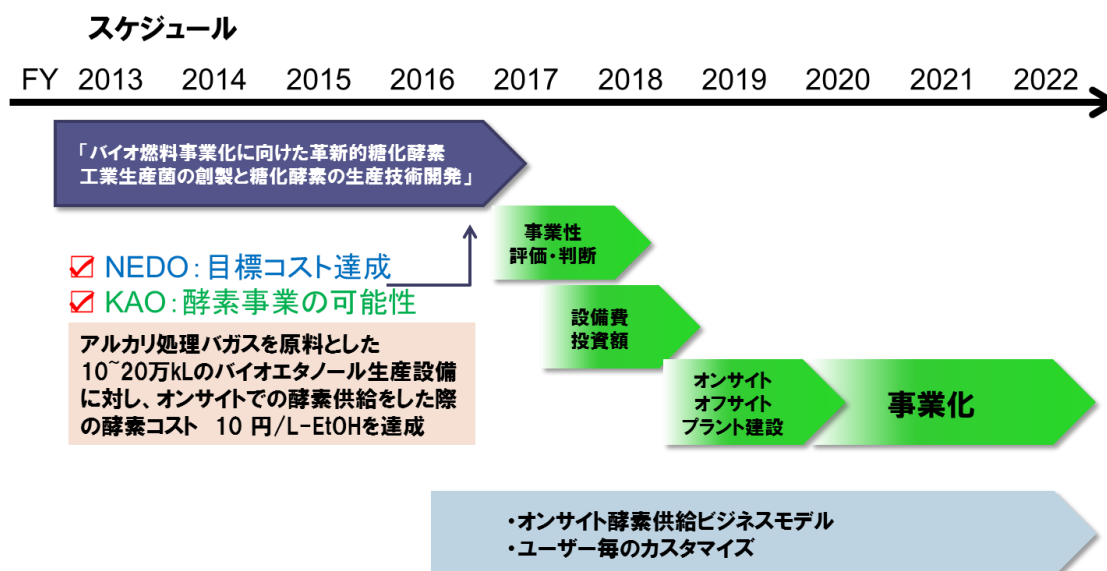
このような成果により、本事業で開発した酵素は十分な性能を有し、オンサイト生産供給のビジネスを展開することにより、安価に提供できる可能性が見えてきた。今後、2020年をめどにオンサイト生産、または、酵素外販事業の可能性を検討したいと考えている。

今後、事業化を検討するにあたりいくつかの課題を下に列挙する。

①酵素性能の向上：今回、アルカリ処理バガスに対して酵素の性能向上を実施した。今後酵素ユーザーの原料、例えば、EFB、コーンストーバー、エリアンサスの前処理物に対して、酵素カスタマイズが必要と思われる。

②酵素生産性の向上：さらなる生産性を向上させることにより、安価なバイオマス糖化酵素の提供を実現する。

上記課題に関して、酵素生産性に関してはNEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発／高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」に参画し、各種バイオマスへの酵素カスタマイズに関してはNEDO「エネルギー・環境新技術先導プログラム／地域バイオマスからの化成品マルチ生産システム開発」に参画しその可能性を検証する。



2.3.3 波及効果

本事業で得た知見は、バイオエタノール生産以外に、バイオマスからの高付加価値ケミカル生産（バイオマスリファイナリー）への利用が考えられる。本事業では10~20万kLのエタノールへ酵素提供する条件にて試算を実施したが、ケミカルでは、リグニンや糖から高付加価値ケミカルを生産するコンパクトな設備にて採算がとれる技術の開発が必要となると思われる。そのためには、今後も酵素の高機能化、各種バイオマスに合わせた酵素カスタマイズ、さらには生産性の向上も重要な課題となる。

2.4 有用微生物を用いた発酵の生産技術開発

2.4.1 成果の事業化に向けた戦略

(1) CAPEX に関する考察

セルロース系エタノールを普及させるためには、安価なエタノールの製造が必要になる。セルロース系エタノール製造コストは、CAPEX（設備費寄与分）と OPEX（運転費寄与分）から構成される。CAPEX は、セルロース系エタノール製造プラントの設備費で決まる値となるが、その設備費の内訳を図 2.4.1-1 に示す。この図から、セルロース系エタノール製造プラントの設備費は、約 50 %がバイオマスを変換するプロセスのコスト、約 50 %がボイラー・発電プロセスと廃液処理プロセスとなる。従って、CAPEX を低減するためには、変換プロセスだけではなく、ボイラー・発電プロセスと廃液処理プロセスのコスト削減が重要になる。しかし、ボイラー・発電・廃液処理の技術は、ほぼ完成された技術であり、これらコストを技術革新によって大きく低減させることは難しい。そのため、これらコストの寄与分を少なくするためには、エタノール製造プラントを大型化し、1 Lのエタノール製造に占めるこれらコストの影響を小さくすることが必要になる。しかし、エタノール製造プラントを大型化すると、必要となるバイオマス原料の量が大きくなり、より遠方からもバイオマスを持って来ることになるため、収集・運搬費用が増大する。また、事業化を考えた場合、大型プラントになるほど初期投資額が増大し、事業化の立ち上げが難しくなる。

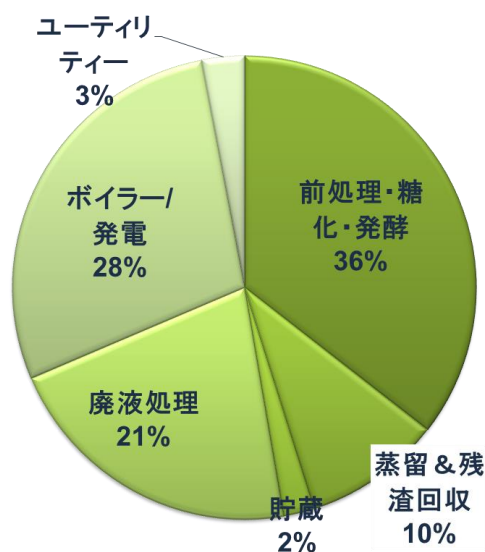


図 2.4.1-1 セルロース系エタノールのプラントコスト内訳

出典：NREL Technical Report May 2011（TP-5100-47764）

バイオマス原料：コーンストーバ、エタノール製造量：23 万 kL/年

(2) OPEX に関する考察

OPEX（運転費寄与分）を決定する主たる要因は、酵素コストと原料コストになる。酵素コストは、酵素単価×必要酵素量となるため、酵素の製造コストや酵素活性の他、変換プロセスの性能によって決まる。一方、原料コストは、原料そのものの価値に基づく金額と、収集・運搬・貯蔵費用から成る。我々は、変換プロセスの開発に取り組んだが、主にバガスを原料として研究開発を進めた。サトウキビの絞りかすであるバガスは、製糖工場から発生する。他のバイオマス、例

えば、間伐材・イナワラ・コーンストーバ等は、現在は収集・運搬システムが確立していないため、それらをエタノールの原料として利用する場合は、収集・運搬システムを構築する必要がある。一方、バガスは、サトウキビが製糖工場に運ばれ、そこで糖液が搾汁された後のかすであるため、バガスは収集・運搬システムが構築されたバイオマスとなる。言い換えると、収集・運搬費用が不要なバイオマスとなる。製糖工場では、発生するバガスの約 40 %は、製糖工場の運転に必要な熱と電気を作るために消費されるが、約 60 %は余剰となる。従って我々は、バガスは、最も実用化に適したバイオマス原料であると判断した。

(3) 実用化に向けたセルロース系エタノール製造プロセス

上述の考察から、我々は、実用化に最も適したセルロース系エタノール製造プラントとして、製糖工場とセルロース系エタノール製造プラントをコラボさせたモデルを検討した。そのコラボモデルのブロックフロー図を図 2.4.1-2 に示す。製糖工場では砂糖を作る際に、廃糖蜜が副生成物として発生する。廃糖蜜はサトウキビの搾汁液に含まれる塩などの不純物を含んだ濃度 60～70 %の糖液である。多くの製糖工場では、この廃糖蜜を原料としてエタノールを製造している。図 2.4.1-2 に示した我々が提案するコラボプラントでは、製糖工場から発生する余剰バガスを原料に糖液を製造する。一方、製糖工場では、廃糖蜜からエタノールを製造するため、バガスから作った糖液と廃糖蜜を混合し、その混合糖液からエタノールを製造する。この方式を採用する事により、次の利点を得ることが可能となる。

1) 発酵プロセス・廃液処理プロセス・ボイラー発電プロセスを共用することでコスト削減が可能となる。従来の廃糖蜜だけを原料として用いてきたプロセスと比較し、バガスの糖化液を利用する事でエタノール製造量が増加する、そのため、設備の規模が大きくなり CAPEX の削減が可能となる。このコラボプロセスではバガスを利用してエタノールを作るため、原料となるサトウキビの増産や遠距離からの収集・運搬も不要となる。

2) バガスから糖液を作る変換プロセスにおける必要酵素量を削減できる。バガスだけからエタノールを作る場合、適性エタノール濃度となる約 5%のエタノールを作ろうとすると、バガスの酵素糖化反応時に、20 %以上の高濃度スラリー条件下でバガスを糖化する必要が生じる。酵素糖化実験の結果、糖化反応時のスラリー濃度が高くなるほど、また、製造する糖液濃度あるいはエタノール濃度が高くなるほど、必要酵素量が急激に増大する事が分かっている。一方、廃糖蜜だけを原料として用いてエタノールを製造する場合、廃糖蜜の糖濃度が 60～70 %であるため、廃糖蜜を水で希釈し、糖濃度を約 20 %に下げて発酵操作を行っている。従って、廃糖蜜とバガスの糖液を混合するプロセスの場合、バガスから作る糖液濃度が低くても、エタノール製造に適した糖液を調整する事が可能となり、必要酵素量を削減できる。上述したプロセスは、バガスから糖液を製造し、それを廃糖蜜と混合し（バガスから作った糖液で廃糖蜜を希釈して）糖液を調製し、発酵に利用するプロセスとしたが、バガススラリーと廃糖蜜を事前に混合し、そのスラリーに対して同時糖化発酵を行うプロセスも考えられる。尚、ビーカサイズ実験で、バガススラリーと廃糖蜜を混合させた系での同時糖化発酵を行い問題の無いことを確認している。

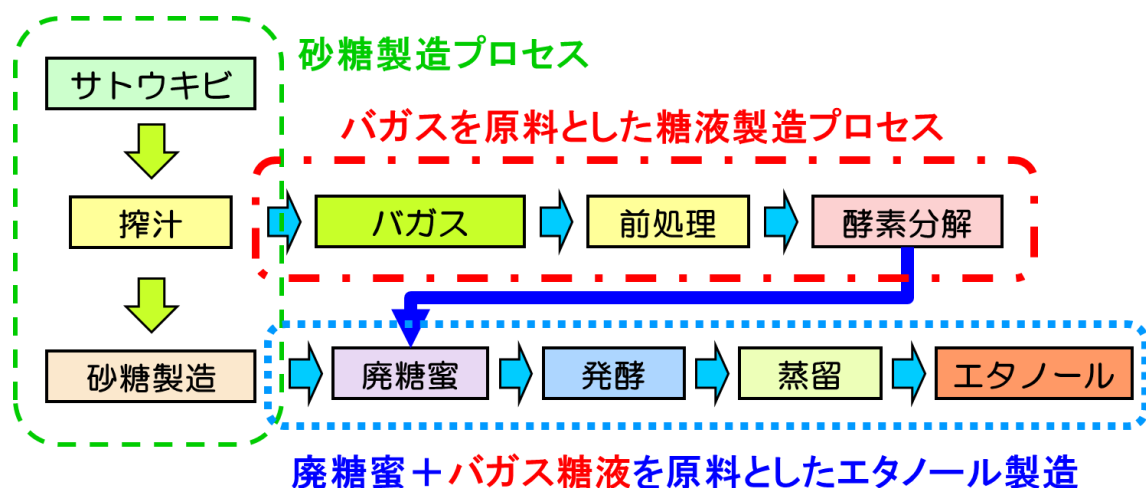


図 2.4.1-2 製糖工場とセルロース系エタノールプロセスとのコラボプロセス

2.4.2 成果の事業化に向けた具体的取組

製糖工場とセルロース系エタノールプラントをコラボする場合、既存の製糖工場の横にバガスの酵素分解プロセスを併設する事は、プラント全体の物質や熱収支を考えると難しい。製糖工場とセルロース系エタノールプロセスとのコラボプラントを最適化するためには、製糖工場を新設する際に、コラボプロセスを採用することが望ましい。図 2.4.1-3 に世界の製糖工場の基数とサトウキビ処理量を示す。この図より、製糖工場数は南アジア地域が最も多く約 700 基と成っている。一方サトウキビ処理量では、中南米が最も多く、次いで南アジアとなっている。即ち、南アジア地域には規模の小さい製糖工場が多数存在している事が分かる。尚この南アジアの製糖工場は、そのほとんどがインドにある製糖工場となる。今後、これら既存の小規模な製糖工場は、プラント建て替え時期になった場合、集約されて大型製糖工場への建て替えが進むと考えられる。さらには、表-1 に示すように、世界では新規製糖工場の建設も進んでいる。表 2.4.1-1 に示される様に、アフリカ地域で新規製糖工場が多く建設されており、これは、この地域がサトウキビの生育に適する地域であることに加え、生活レベルが向上し砂糖需用が伸びていると考えられる。統計データによると、世界の平均砂糖消費量は約 20 kg/人、先進国では 40~50 kg/人に対し、開発途上国では約 10 kg/人となっている。従って、アフリカ地域に限らず、世界の開発途上国の生活レベルの向上にともない、世界の砂糖需要は 500 万 ton/年規模で増加すると予想されている。その市場は巨大であり（500 万 ton の製糖工場建設費は 1 兆円規模）、製糖工場とセルロース系エタノールプロセスとのコラボプラントが、将来の製糖工場の標準仕様となる様、実用化を目指して行く必要がある。

現在 2020 年の事業化に向けて、東南アジアのある既存製糖企業が事業の拡大を検討しており、その企業と協力し、将来の製糖事業の目指す姿を検討している。また、製糖プラントや廃糖蜜エタノールプラントを得意としている海外のエンジニアリング企業と、セルロース系エタノールプロセスの協業検討を進めている。

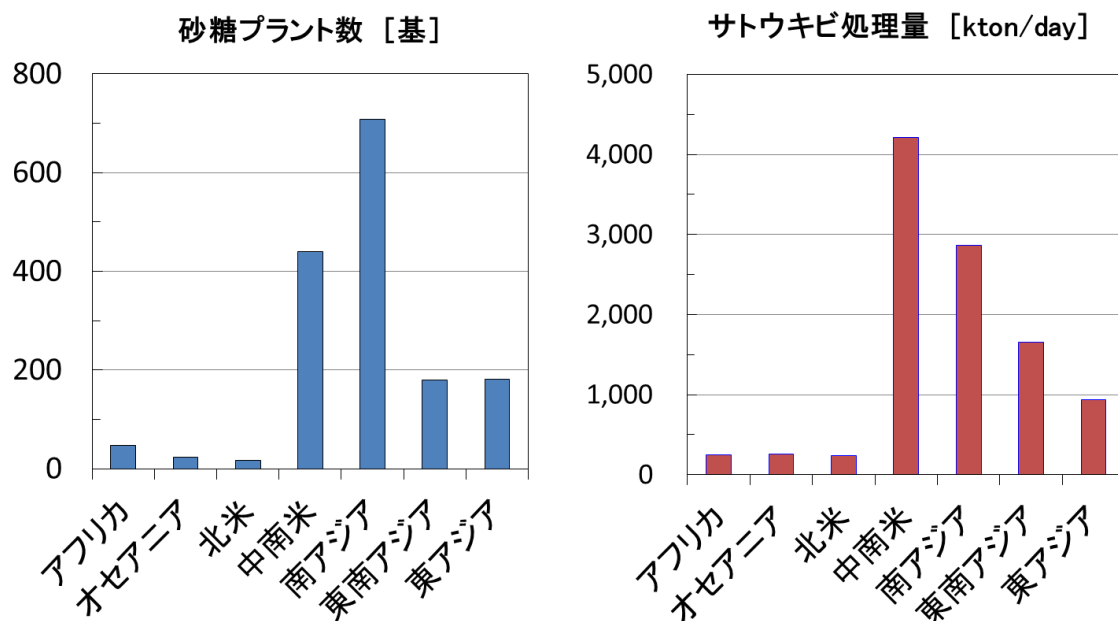


図 2.4.1-3 世界の製糖プラント数とサトウキビ処理量

表 2.4.1-1 最近のサトウキビプラントの建設状況

建設中・プロジェクト段階サトウキビプラント Top 10				
Ranking	国名	Total 処理量 t/day	プラント数 基	既存プラント数
1	ナイジェリア	83,800	11	1
2	タンザニア	58,500	7	6
3	オーストラリア	42,000	2	24
4	ブラジル	41,500	3	278
5	インドネシア	36,500	5	68
6	モザンビーク	32,500	3	4
7	ケニヤ	27,000	7	12
8	インド	22,250	5	611
9	ベネズエラ	20,000	2	18
10	タイ	18,000	1	50

2.4.3 波及効果

近年、バイオマス由来の糖やエタノールを原料とし、種々の化成品を製造するバイオリファイナリーに関して、技術開発や実用化を目指す動きが積極的に進められている。これら化成品は、グリーンケミカル製品や、機能性化学品としての付加価値が期待されている。特にバイオエタノール由来のエチレン、及びモノエチレングリコールは、石油由来品と比較し製造コストは高いものの、環境保全の観点からポリエチレンやPET製造原料として市場に広まりつつある。現在は、可食バイオマスが原料の主流であるが、今後は食糧原料と競合しないセルロース系エタノールや糖へシフトすることが予想される。さらに近年、バイオエコノミーという新規パラダイムが提唱されており、現在の市場は24億ユーロと言われている（Environmental Development 15 (2015) p3-34）。その中でも非食糧系バイオマスの利用技術開発は重要とされており、本研究開発成果の波及が期待される分野である。

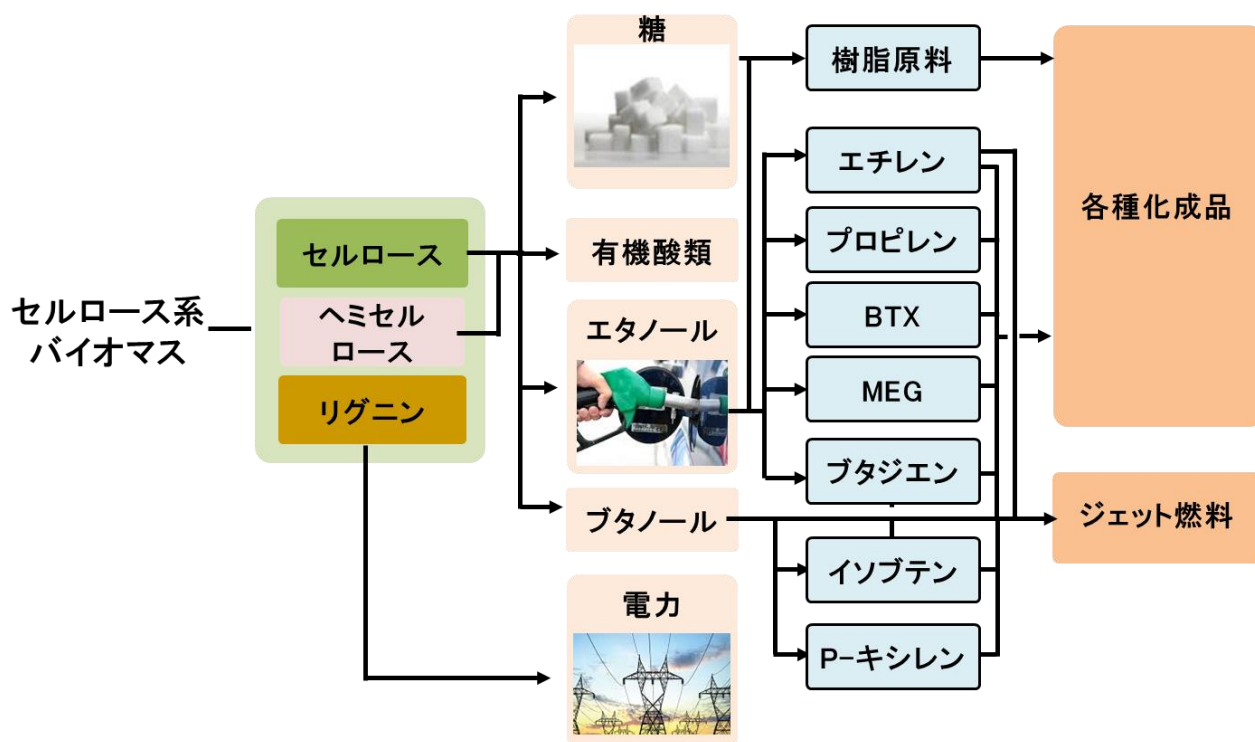


図 2.4.1-4 セルロース系バイオマスからの有用物質製造体系

P10010

P13011

P14025

「バイオマスエネルギー技術研究開発」基本計画

新エネルギー部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

2005年2月に発効した京都議定書及び2008年4月に制定されたエネルギーイノベーションプログラム、環境安心イノベーションプログラムの対応として、環境負荷が少ない石油代替エネルギーの普及に向けた、新たな技術の開発及びコスト低減・性能向上のための戦略的取り組みが要求されている。

バイオマスエネルギーは、カーボンニュートラルとして扱われているため、地球温暖化対策の一手段として重要である。一方、供給安定性の確保、食料との競合や森林破壊等の生態系を含めた問題、化石燃料との価格競争性・価格安定性といった経済面での課題、LCA（ライフサイクルアセスメント）上の温室効果ガス削減効果・エネルギー収支等の定量化等の課題を今後克服していくことが重要である。

このような中で、2012年までに京都議定書の目標達成に貢献すべく取り組むことに加え、2030年度、更には2050年に向けた長期的視野に立ち、国内の知見・技術を結集して、バイオマスエネルギー分野における革新的・新規技術の研究開発、開発技術の適用性拡大、コストの低減、利用・生産システム性能の向上等を行い、世界における優位性を確保することが重要となっている。このためには、従来技術の延長にない技術革新をも目指した継続的な研究・技術開発が必要不可欠である。

本研究開発では、バイオマスエネルギーの更なる使用促進・普及に向け、これを実現するための技術開発を行うことを目的とする。

(2) 研究開発の目標

本研究開発は、2010年度以降の更なる二酸化炭素等の温室効果ガス排出量削減に向けて、新技術の開発、開発技術の拡大、性能の向上及びコストの削減を図り、2005年3月総合資源エネルギー調査会需給部会の2030年のエネルギー需給展望(答申)にある2030年度目標値の達成に資する。

なお、個々の研究開発項目の目標は別紙「研究開発計画」に定める。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ①バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発(制度)〔委託事業、共同研究事業(負担率: 1/2、2/3)〕
- ②セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業〔委託事業〕
- ③戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業〔委託事業、共同研究事業(助成率: 2/3)〕
- ④バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業〔委託事業、共同研究事業(助成率: 2/3)〕
- ⑤セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業〔委託事業、助成事業(助成率: 2/3もしくは1/2)〕

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

本研究開発は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO」という。)が、単独ないし複数の原則本邦の企業、大学等の研究機関(原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない)から公募によって研究開発実施者を選定し実施する。

NEDOは、研究開発に参加する各研究開発グループの有する研究開発ポテンシャルを検討し、これを最大限活用することにより効率的な研究開発を図る観点から、委託先決定後に必要に応じて研究開発責任者(プロジェクトリーダー)を指名し、その下に効果的な研究を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及び研究開発実施者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて外部有識者による技術検討委員会を設置し、開発内容について審議し、その意見を運営管理に反映させる。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は研究開発項目ごとに以下のとおりとする。

- ① バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発
本研究開発の期間は、平成16年度から平成24年度までの9年間とする。
- ② セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業
本研究開発の期間は、平成21年度から平成25年度までの5年間とする。
- ③ 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業
本研究開発の期間は、平成22年度から平成28年度までの7年間とする。
- ④ バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業
本研究開発の期間は、平成25年度から平成28年度までの4年間とする。
- ⑤セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業
本研究開発の期間は、平成26年度から平成31年度までの6年間とする。

4. 評価に関する事項

評価の実施時期や方法は、研究開発項目毎に別紙「研究開発計画」に記載する。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取扱いについて

①成果の普及

本研究開発で得られた研究成果についてはNEDO、委託先とも普及に努めるものとする。

②知的財産権の帰属

本研究開発で得られた研究開発の成果に関わる知的財産権については、「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させることとする。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

① バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発

「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1号ロ」

② セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業

「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1号ロ」

③ 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業

「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1号ロ」

④ バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業

「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1号ロ」

⑤セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業

「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1号ロ、第3号、第9号」

6. 基本計画の改定履歴

(1) 平成22年3月、「新エネルギー技術研究開発／バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発」

「E3地域流通スタンダードモデル創成事業」「セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業」「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業」を統合して新たに制定。

(2) 平成23年3月31日、「E3地域流通スタンダードモデル創成事業」が経済産業省の直執行事業となることを受けて削除、また(別紙)「研究開発計画」のうちの研究開発項目①「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発」の2. 研究開発の具体的内容における公募の実施について、「また、平成22年度に実施した加速的先導技術の技術委員会での評価結果を受けて、実施中の研究開発テーマにおいて一部強化が必要な技術について委託先を追加するため、平成23年度に公募を実施する。」を追加により改定。

(3) 平成25年8月26日、研究開発項目④「バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業」の追

加により改定。

- (4) 平成27年2月2日、研究開発項目⑤「セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業」の追加により改定。
- (5) 平成27年12月1日 研究開発項目⑤「セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業」の中間評価時期及び研究開発の運営管理方法の変更により改定。

(別紙) [研究開発計画]

研究開発項目①「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発」

(イ) バイオマスエネルギー先導技術研究開発

1. 研究開発の必要性

現在のバイオマス転換エネルギーは化石燃料に比べてコスト競争力に乏しく、導入普及のネックとなっている。バイオマス社会の実現に向けて、中長期的視野に立ったエネルギー転換効率のさらなる向上を目指した、新規で革新的な超高効率エネルギー転換技術及び付加価値が高く採算性を有したエネルギー形態に転換する技術の可能性探索が必要である。

また、平成16年度「バイオマスエネルギーテクノロジー・ロードマップ策定に関する調査」においてバイオマスエネルギー利用導入・普及拡大のための課題として

①バイオマスエネルギー地域システム化実験事業の必要性

②バイオマスエネルギー先導技術研究開発事業の必要性

が示され、特に②の先導的な研究に関しては2030年の実用化を見据えたバイオマスエネルギー利用技術のシーズを探索し、中長期的視点から革新的なバイオマス先導技術研究の必要性が指摘された。

さらに、バイオマス・ニッポン総合戦略推進会議「国産バイオ燃料の生産拡大工程表（平成19年2月策定）」において、ガソリンの卸売価格等と競合できる価格でバイオ燃料を生産する必要性が提唱され、原料別、段階的に100円/Lの製造コストの目安が示された。

また、次世代自動車・燃料に関する懇談会「次世代自動車・燃料イニシアティブとりまとめ（平成19年5月策定）」において、上述の「国産バイオ燃料の生産拡大工程表」との整合性を図りつつ、経済的かつ多量にセルロース系バイオマスからバイオ燃料等を効率的に生産する画期的な技術革新の実現についての具体的な議論を進める必要性が提唱された。ここでは、技術革新ケースのベンチマークとして40円/Lの製造コストの目安が示された。また、燃料に限らず、化成品原料への転換も併せて行う総合利用（リファイナリー）の視点の重要性についても提唱された。

これらの状況に鑑みると、バイオマスのエネルギー転換、利用技術等の分野において2015～2030年頃の実用化を目指した新規な革新的技術を発掘、支援し、日本独自の代替エネルギーの確立を探索・推進するために本事業が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

バイオマスを気体・液体・固体燃料、電気等のエネルギーに転換する技術に関連した2015～2030年頃の実用化を目指した先導的な研究開発及び将来の革新的なブレイクスルーにつながる基礎研究のテーマを公募し、委託により実施する。

なお、2015～2020年頃の実用化を目指し、特にセルロース系バイオマスからバイオ燃料等を効率的に生産する画期的な技術（以下、加速的先導技術という）について、重点的に実施する。

個別テーマの開発期間は2年間（加速的先導技術は最大3年間）を基本とし、NEDOに設置する技術委員会で継続に関して高い評価が得られたテーマについては、最大8年間実施することを可能とする。

公募は平成17年度から平成21年度まで実施する。また、平成22年度に実施した加速的先

導技術の技術委員会での評価結果を受けて、実施中の研究開発テーマにおいて一部強化が必要な技術について委託先を追加するため、平成23年度に公募を実施する。

3. 達成目標

実施テーマごとに、従来の技術に比べて画期的に優れた効率、低コスト化、省エネ性等の技術水準を見込めることを基礎的データの取得・分析により確認する。

なお、個別研究開発テーマの開発目標及び実施内容の詳細については、採択テーマ決定後にNEDOと委託先の間で協議の上決定し、別途「研究開発テーマ一覧」に定める。

4. 評価の時期及び方法

NEDOは、政策的観点から見た制度の意義、目標達成度、将来の産業への波及効果、効果的な制度運営等の観点から、制度評価を制度評価指針に基づき、原則、内部評価により毎年度実施する。(事後評価を含む)ただし、制度立上げの初年度、翌年度に公募を実施しない年度においては制度評価を実施しないこととする。また、評価結果を踏まえ、必要に応じて制度の拡充・縮小・中止等の見直しを迅速に行う。

個別テーマについては、2年度(加速的先導技術は最大3年度)を単位としてNEDOに設置する技術委員会で評価を行い、その結果を踏まえて継続の可否を判断する。

また、NEDOに設置する技術委員会で実用化研究への移行が適切であるとの評価が得られたテーマについては、(ロ)バイオマスエネルギー転換要素技術開発に移行して実施することとする。

(ロ) バイオマスエネルギー転換要素技術開発

1. 研究開発の必要性

平成14年度「新エネルギー等導入促進基礎調査」“バイオマスエネルギー開発・利用戦略に関する調査研究”により、コア技術だけでなくエネルギー転換システムの構成要素である「原料の前処理技術、生成燃料の利用技術等」にも多くの開発要素があることが明らかになった。さらに、平成13年度から平成17年度にかけて実施した、11テーマの研究開発内容を補完する要素技術の必要性が明らかになり、本技術開発を行うことにより、2010年の新エネルギー導入目標の達成に向けてバイオマスエネルギー転換事業の普及を促進させることが期待される。

さらに、バイオマス・ニッポン総合戦略推進会議「国産バイオ燃料の生産拡大工程表(平成19年2月策定)」において、ガソリンの卸売価格等と競合できる価格でバイオ燃料を生産する必要性が提唱され、原料別、段階的に100円/Lの製造コストの目安が示されるとともに、次世代自動車・燃料に関する懇談会「次世代自動車・燃料イニシアティブとりまとめ(平成19年5月策定)」において、上述の「国産バイオ燃料の生産拡大工程表」との整合性を図りつつ、経済的かつ多量にセルロース系バイオマスからバイオ燃料等を効率的に生産する画期的な技術革新の実現についての具体的な議論を進める必要性が提唱され、技術革新ケースのベンチマークとして40円/Lの製造コストの目安が示された。また、燃料に限らず、化成品原料への転換も併せて行う総合利用(リファイナリー)の視点の重要性についても提唱された。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 2010年の新エネルギー導入目標の達成に向けた研究開発(平成18年度で公募終了)

バイオマスを気体・液体・固体燃料、電気等のエネルギーに転換する技術に関連した、下記に示す要素技術の研究開発をNEDOとの共同研究により実施する。

①高効率化要素技術

②高品質化要素技術

③小型化・低コスト化要素技術

④その他、現在進めている「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発」に比して差別化されたエネルギー転換の基幹技術

- ・共同研究におけるNEDOの負担割合は、共同研究先が企業等の法人単独の場合は2分の1とし、企業等の法人が大学等の公的研究機関と連携して行う場合は3分の2とする。
- ・個別テーマの開発期間は最長3年間とする。
- ・公募は平成16年度から平成18年度まで実施する。

(2) 2015年ごろの実用化を目指したバイオ燃料等生産に係わる要素技術開発

セルロース系バイオマスからバイオ燃料等を経済的かつ多量に生産・利用する上でボトルネックとなっている要素技術のうち、既存技術の組み合わせ等によって解決を図ることが可能な実用化研究をNEDOとの共同研究により実施する。

- ・NEDOの負担割合は3分の2とする。
- ・個別テーマの開発期間は最長3年間とする。
- ・公募は平成20年度から平成21年度まで実施する。
- ・NEDOに設置する技術委員会で、バイオマスエネルギー先導技術研究開発から、実用化研究への移行が適切であるとの評価が得られたテーマについても実施する。

3. 達成目標

- ・提案された要素技術を用いることにより、従来の技術に比して有意な差(エネルギー損失の解消等)をもって高い効率を達成する。
- ・2010年の導入目標につながる技術にあつては、従来の技術水準に対する優位性(コスト、性能等)を達成する。
- ・2015年の実用化を目指した技術にあつては、セルロース系バイオマスからバイオ燃料等の製造・利用コスト及び投入エネルギーの低減について、従来の技術水準に対する優位性を達成する。

なお、個別研究開発テーマの開発目標及び実施内容の詳細については、採択テーマ決定後にNEDOと共同研究者との間で協議の上決定し、別途「研究開発テーマ一覧」に定める。

4. 評価の時期及び方法

NEDOは、政策的観点から見た制度の意義、目標達成度、将来の産業への波及効果、効果的な制度運営等の観点から、制度評価を制度評価指針に基づき、原則、内部評価により毎年度実施する。(事後評価を含む)ただし、制度立上げの初年度、翌年度に公募を実施しない年度においては制度評価を実施しないこととする。また、評価結果を踏まえ、必要に応じて制度の拡充・縮小・中止等の見直しを迅速に行う。

研究開発項目②「セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業」

〔研究開発の目的〕

バイオ燃料は、カーボンニュートラルとして扱われているため、地球温暖化対策の一手段として重要である。一方、供給安定性の確保、食料との競合や森林破壊等の生態系を含めた問題、化石燃料との価格競争性・価格安定性といった経済面での課題、LCA（ライフサイクルアセスメント）上の温室効果ガス削減効果・エネルギー収支等の定量化といった課題を今後克服していくことが重要である。このような背景から、2008年3月に経済産業省は農林水産省と連携し、産業界及び大学・公的研究機関の協力を得た上で、2015年に向けた具体的な目標、技術開発、ロードマップ等を内容とする「バイオ燃料技術革新計画」を策定した。

本研究開発は、「バイオ燃料技術革新計画」における技術革新ケース（2015～2020年においてバイオエタノール製造コスト40円/L、年産10～20万kL規模、CO₂削減率5割以上（対ガソリン）、化石エネルギー収支^{*1}以上）の実現に向けて、食料と競合しない草本系又は木質系バイオマス原料からのバイオエタノール生産について、大規模安定供給が可能なセルロース系目的生産バイオマス^{*2}の栽培からエタノール製造プロセスまでの一貫生産システムを構築し、研究開発を実施することにより環境負荷・経済性等を評価することを目的とする。また、バイオ燃料の持続可能性の検討については、G8各国を中心に、各種国際的なフォーラムでの検討が進められている状況である。こうした動向を十分に踏まえ、我が国におけるバイオ燃料の持続可能な導入のあり方について検討することも目的とする。

本技術の確立により、2015～2020年において事業ベースで数十万kL規模単位でのバイオエタノール生産が開始され、2020年から2030年にかけては事業の普及に伴い相当量のバイオエタノールが生産されることが期待される。これにより、「長期エネルギー需給見通し」（2008年5月 総合資源エネルギー調査会・需給部会）における2030年のバイオマス熱利用最大導入ケース423万kL、新・国家エネルギー戦略（2006年5月）における運輸部門の石油依存度を2030年までに8割程度にまで削減する目標の達成に資する。

*1 化石エネルギー収支 = (生産されたエネルギー量 : MJ) / (ライフサイクルで投入された化石エネルギー量 : MJ)

*2 食料と競合せず、大規模安定供給が可能で、バイオエタノール生産に特化した目的で栽培するセルロース系バイオマスを示す。従って、食料に供される作物（イネ、サトウキビ等）や副生的に発生するバイオマス（稲ワラ、麦ワラ、バガス、間伐材、林地残材等）を除く。

〔研究開発の目標〕

技術革新ケース（2015～2020年においてバイオエタノール製造コスト40円/L、年産10～20万kL規模、CO₂削減率5割以上（対ガソリン）、化石エネルギー収支2以上）の実現に向けて、2011年度（平成23年度）までにセルロース系目的生産バイオマスの生産システムに関する基礎的知見（生産性、栽培環境及び条件、収集・運搬効率等）を得ると共に、エタノール製造プラントを構築する。また、バイオ燃料の持続可能性について、総合的な調査を行い、基準、評価指針、評価方法等に関する具体的検討事項を選定する。また、選定した事項について基準、評価指針、評価方法等の検討を行う。

2013年度（平成25年度）までにセルロース系目的生産バイオマスの栽培からエタノール製造までの一貫生産システムについて、基盤技術を確立する。また、バイオ燃料の持続可能

性について、基準、評価指標、評価方法等を取りまとめる。更に、本事業において開発したバイオエタノール一貫生産システムのLCA評価(温室効果ガス排出削減効果、エネルギー収支)及び社会・環境影響評価も行う。

[研究開発の内容]

上記目標を達成するために、以下の研究開発について実施する。

[委託事業]

- イ) バイオエタノール一貫生産システムに関する研究開発
- ロ) バイオ燃料の持続可能性に関する研究

イ) 「バイオエタノール一貫生産システムに関する研究開発」

1. 研究開発の必要性

2015～2020年においてバイオエタノール製造コスト40円/L、年産10～20万kL、CO₂削減率5割以上(対ガソリン)、化石エネルギー収支2以上を実現するためには、セルロース系目的生産バイオマスの栽培、収集・運搬から前処理～糖化～発酵～濃縮・脱水～廃液処理に至るエタノール製造プロセスを一貫した革新的な生産システムを開発し、環境負荷・経済性等も評価することが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) セルロース系目的生産バイオマスに関する研究開発

多収量草本系植物(エリアンサス、ミスカンサス、ソルガム、ススキ、ネピアグラス、スイッチグラス等)及び早生樹(ヤナギ、ポプラ、ユーカリ、アカシア等)のセルロース系目的生産バイオマスについて、実用化段階において食料生産に適さない土地で栽培することを前提に、植物種選定、栽培地検討、栽培条件の最適化、大量栽培技術の開発・栽培、育種(遺伝子組み換え技術は除く)を行うとともに、低コストで、かつ、エネルギー効率に優れた収集・運搬技術を確立し、バイオマス生産システムの開発を行う。

(2) エタノール製造システムの開発

前処理～糖化～発酵～濃縮・脱水～廃液処理に至るエタノール製造プロセスの設計、実験プラント(ベンチスケール以上の規模)の建設、運転及びデータの収集を行い、最適化した上でバイオエタノール生産システムを開発する。

(3) 一貫生産システムの最適化及び評価

セルロース系目的生産バイオマスの栽培からエタノール製造プロセスまでの一貫生産システムについて、総合的なシステムの最適化を行い、環境負荷・経済性等について評価する。

3. 達成目標

(1) 中間目標(平成23年度)

セルロース系目的生産バイオマスの植物種選定、栽培地検討、大量栽培技術の開発及び収集・運搬技術の開発を行いバイオマス生産システムに関する基礎的知見(生産性、栽培環境及び条件、収集・運搬効率等)を得る。また、技術革新ケースにおける開発ベンチマーク(2015年)*を踏まえた上で、エタノール製造プラントを構築する。

(2) 最終目標(平成25年度)

セルロース系目的生産バイオマスの栽培からエタノール製造プロセスまでを一貫したバイオエタノール生産システムについて、基盤技術を確立する。なお、本事業で確立した基盤技術の達成度合いは、技術革新ケースにおける開発ベンチマーク(2015年)*を参照しつつ評価する。

※「バイオ燃料技術革新計画」の技術革新ケースにおける開発ベンチマーク(2015年)

		開発ベンチマーク（2015年）
原料	乾物収量	草本系：50 t / ha・年、木質系17 t / ha・年
製造	一貫プロセスとして	エネルギー使用量6 MJ / kg バイオマス以内（バイオマスで自立）、 エタノール収率0.3 L / kg バイオマス以上、エネルギー回収率35%以上
	前処理	酵素糖化効率80%以上となる前処理
	酵素糖化	酵素使用量1 mg / g 生成糖以下、酵素コスト4円 / L エタノール以下、糖収量500 g / kg バイオマス以上
	エタノール発酵	エタノール収率95%以上
	濃縮脱水	エネルギー使用量2.5 MJ / L エタノール以下（10%エタノール水溶液→無水エタノール分離回収）
	廃液処理	エネルギー回収分を除いた処理コスト5円 / L エタノール以下

ロ)「バイオ燃料の持続可能性に関する研究」

1. 研究開発の必要性

バイオ燃料の利用や開発は食料との競合問題、森林破壊等の環境問題を引き起こす可能性があり、こうした影響を引き起こすことなく持続可能な利用や開発を図ることが重要である。また、バイオ燃料の持続可能性の検討については、G8各国を中心に、各種国際的なフォーラムでの検討が進められている状況である。

そのため、本事業においても、単なる生産技術の確立だけに留まらず、こうした国際的な動向を十分に踏まえ、我が国におけるバイオ燃料の持続可能性について検討する必要がある。

2. 研究開発の具体的内容

バイオ燃料の持続可能性の評価及び国際標準化等に資するため、バイオ燃料の持続可能性について、国内外の関係機関（政府機関、研究機関等）や国際的枠組み（GBEP^{*3}、ERIA^{*4}、ISO等）における取り組みや議論の動向を総合的に調査し、基準、評価指標、評価方法等について検討し、とりまとめる。

また、本事業において開発したバイオエタノール一貫生産システムについて、LCA評価（温室効果ガス排出削減効果、エネルギー収支）及び社会・環境影響評価を行う。

***3 国際バイオエネルギー・パートナーシップ（Global Bioenergy Partnership）**

2005年のG8サミットにおいて、バイオ燃料の持続的発展を図ることを目的として立ち上げることに合意し、設立された枠組み。

***4 東アジア・ASEAN 経済研究センター（Economic Research Institute for ASEAN and East Asia）**

東アジアサミットにおいて、政策提言等を行うことを目的に設立された国際研究機関。バイオ燃料についても、持続可能性・環境評価方法の検討が進められる予定。

3. 達成目標

(1) 中間目標（平成23年度）

バイオ燃料の持続可能性について、国内外の動向を総合的に調査、解析、整理した上で、基準、評価指標、評価方法等に関して具体的に検討が必要な事項を選定する。また、選定した事項について基準、評価指針、評価方法等の検討を行う。

(2) 最終目標（平成25年度）

バイオ燃料の持続可能性について、国内外の動向調査を継続するとともに、基準、評価指標、評価方法等について、とりまとめる。

また、本事業において開発したバイオエタノール一貫生産システムについて、LCA評価

(温室効果ガス排出削減効果、エネルギー収支) 及び社会・環境影響評価を行う。

[評価に関する事項]

NEDOは、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成23年度に、事後評価を平成26年度に実施する。また、必要に応じて、適宜自主中間評価を実施する。中間評価及び自主中間評価の結果を踏まえ必要に応じてプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。評価の時期については、研究開発に係る技術動向、政策動向や進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

[その他]

バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発と密接な連携を図る。必要に応じて、外部有識者の評価等を経た上で、優秀な研究開発案件の取り込みについても検討する。

研究開発項目③「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業」

[研究開発の目的]

①政策的な重要性

本プロジェクトの先導研究フェーズにおいては、「Cool Earth-エネルギー革新技術計画」（平成20年3月経済産業省）ロードマップにおいて2030年頃の実用化を目標とする技術として位置づけられている、B T L（Biomass to Liquid）、微細藻類由来バイオ燃料製造技術等の次世代バイオマス利用技術について研究開発を実施する。

また、平成21年8月28日施行の「エネルギー供給事業者による非化石エネルギー源の利用及び化石エネルギー原料の有効な利用の促進に関する法律」により、電気以外の部門（ガス、燃料部門）への一定量の非化石エネルギーの導入が新たに義務付けられる予定であり、バイオマス利用へのニーズが増大することが見込まれる。本プロジェクトの実用化開発フェーズにおいては、ガス、燃料部門におけるバイオマス利用の早期拡大に向け、現在は大規模な原料調達が可能である等の特殊な条件でしか普及していないメタン発酵、ガス化技術等の大幅な導入、ランニングコストの削減に関する研究開発を実施する。

②我が国の状況

我が国は、木質、廃棄物系バイオマスエネルギーの導入に関しては、着実に進んでいるものの、バイオマスのエネルギー利用は、化石エネルギー消費量の削減、GHG排出量の削減、エネルギーセキュリティの確保、また地域社会の活性化と発展、廃棄物量の削減と有効利用の観点からも、今後一層の導入普及を図ることが必要である。

③世界の取り組み状況

B T Lに関しては、欧州・米国で既に商用プラントの建設も開始されている。また、微細藻類由来バイオ燃料製造技術に関しては、石油価格の乱高下やGHG削減の要請の増大という社会的な状況の変化と、バイオテクノロジーの技術革新の大幅な進展によってこの技術が見直され、2007年頃から米国を中心として、大規模プロジェクトが始動している。

④本事業のねらい

本プロジェクトにより、バイオマス原料に応じた最適なバイオ燃料製造プロセスが選択できるようになり、ガソリン代替、軽油代替等、出口のオプションが多様化される。その結果、ビジネスとして実用化可能なバイオマス利用技術の幅が広がり、バイオマスエネルギー導入量の拡大に寄与する。

[研究開発の目標]

①過去の取り組みとその評価

平成13年度から実施している「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発」事業の中で、2010年頃の実用化を目指すバイオマス資源のエネルギー転換に関する要素技術の開発を目的とする「バイオマスエネルギー転換要素技術開発」、2015～2030年頃に実用化が期待されるバイオマス利活用、エネルギー転換に係わる幅広い革新的シーズ技術の探索・育成を目的とする「バイオマスエネルギー先導技術研究開発」事業を実施している。さらに、「バイオマスエネルギー先導技術研究開発」事業の中において、「バイオ燃料技術革新計画」の技術革新ケースの達成をめざし、2015～2020年にバイオエタノール製造コスト40円/Lを目指す取り組みとして、「加速的先導技術開発」プログラムを開始している。

また、平成21年度から「セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業」を開始し、セルロース系目的生産バイオマスの栽培からエタノール製造までの、革新的な技術を用

いた一貫生産システムに関する研究開発を行っている。

②本事業の目標

本事業では、先導研究フェーズ(次世代技術開発)、実用化開発フェーズ(実用化技術開発)の二つの研究開発を実施する。

○次世代技術開発

市場でのコスト競争力のあるバイオマス由来液体燃料製造技術の開発とすることを目標とする。

○実用化技術開発

ビジネスベースに乗る技術レベルまで設備導入コスト及びランニングコストを低減できる技術を確立することを目標とする。

尚、個別の研究開発テーマの開発目標及び実施内容の詳細については、採択テーマ決定後にNEDOと実施者との間で協議の上決定し、別途実施計画書に記載するものとする。

③事業以外に必要とされる取り組み

本事業とは別に、NEDOは、バイオマスに係る技術開発、国際標準化や規制見直しに資する研究等を行い、バイオマスの普及・促進に資する活動を総合的に実施している。

④全体としてのアウトカム目標

これらの取り組みにより、2030年までに輸送用バイオ燃料の石油依存度を80%に引き下げる目標達成(新・国家エネルギー戦略 2006年5月経済産業省)に寄与することが期待される。

[研究開発の内容]

上記目標を達成するために、以下の研究開発を実施する。

[委託事業、(共同研究事業(NEDO負担率：2/3))]

(イ)「次世代技術開発」

バイオマスを気体、液体、固体燃料、電気等のエネルギーに転換する技術に関連した2030年の実用化を目指した次世代の研究開発及び将来の革新的なブレイクスルーにつながる基礎研究を実施する。

特に、BTL、微細藻類等のバイオ燃料製造技術開発を実施する。

本研究開発項目は、(1)実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、産学官の複数事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する事業、又は(2)試験・評価方法、基準・プラットフォームの提案等、国民経済的には大きな便益がありながらも、民間企業の研究開発投資に見合うものが見込めない「公共財の研究開発」事業であり、原則、委託事業として実施する。ただし、(1)については、上記以外のもの^(※1)は、共同研究事業(NEDO負担率：2/3)として実施する。

※1 民間企業単独、民間企業のみでの連携等、産学官連携とならないもの。

[共同研究事業(NEDO負担率：2/3)]

(ロ)実用化技術開発

バイオマスを気体、液体、固体燃料、電気等のエネルギーに転換する技術に関連した下記に示す実用化の研究開発を実施する。

- ① 高効率化技術
- ② 高品質化技術
- ③ 小型化・低コスト化技術

また、導入普及の実現のためには、収集運搬技術、バイオマス利活用技術、需要の創成等のトータルシステムの研究開発も必要に応じて実施する。

本研究開発項目は共同研究事業（NEDO負担率：2／3）として実施する。

尚、上記研究開発を効果的かつ効率的に実施するために、バイオマス関連技術に関する国内外の技術レベルの把握、技術的課題の明確化等に必要な各種検討を適宜実施する。

〔研究開発の実施方式〕

（１） 研究開発の実施体制

本研究開発は、NEDOが単独ないし複数の原則本邦の企業、大学等（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点から国外企業との連携が必要な場合はこの限りでない。）から公募によって研究開発実施者（又は研究開発グループ）を選定した後、委託または共同研究により実施する。

（２） 研究開発の運営管理

研究開発の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発事業の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて設置される技術検討委員会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させること等を行う。

プロジェクトへの参加者は、これらのNEDOのマネジメントに従い、我が国におけるバイオマスエネルギー導入量拡大のために必要な取り組みに協力するものとする。

〔評価に関する事項〕

NEDOは、政策的観点から見た制度の意義、目標達成度、将来の産業への波及効果、効果的な制度運営等の観点から、制度評価を制度評価指針に基づき、原則、内部評価により毎年度実施する（事後評価を含む）。ただし、制度立ち上げの初年度、翌年度に公募を実施しない年度においては制度評価を実施しないこととする。

また、制度評価結果を踏まえ、必要に応じて制度の拡充・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、本制度に係る技術動向、政策動向や本制度の進捗状況等に応じて、適宜見直すものとする。

次世代技術開発の個別テーマについては、NEDOに設置する技術委員会で2年度を単位として評価を行い、その結果を踏まえて継続の可否を判断する。

研究開発項目④「バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業」

[研究開発の目的]

①政策的な重要性

バイオエタノール等のバイオ燃料は、エネルギーセキュリティの向上及び地球温暖化の防止の観点から、再生可能エネルギーの一つとして取り組むべき重要課題である。

経済産業省は、2008年に「Cool Earth エネルギー革新技術計画」の中で“2050年までに世界全体の温室効果ガス(GHG)排出量を現状に比して半減する”という長期目標を掲げ、我が国として重点的に取り組むべきエネルギー革新技術開発として「バイオマスからの輸送用代替燃料製造」を選定している。また、バイオ燃料技術革新協議会では「バイオ燃料技術革新計画」において具体的な生産モデルや技術開発の方向性を技術ロードマップとしてまとめた。当該ロードマップ等を踏まえ、2010年6月に「エネルギー基本計画」が改定され、2020年までに全国のガソリンの3%相当以上のバイオエタノールを導入するとしている。

②我が国の状況

国内においては、2010年の「エネルギー基本計画」で掲げられた、2020年には全国のガソリンの3%相当以上をバイオ燃料にする目標(約180万kL)に向け、バイオエタノール製造が検討されている。現在NEDOでは、セルロース系エタノール製造に関する研究開発は、バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発事業では基盤研究を、また、セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業では実証研究をそれぞれ行い、実用化に取り組んでいる状況である。

③世界の取り組み状況

米国及びブラジルにおいてトウモロコシやサトウキビなど可食バイオマスを原料として大規模な商用生産が行われている。一方、本事業で取り組む予定の食糧と競合する可能性の低いセルロース系バイオマスを原料とするエタノール製造については、米国において基盤研究から実証研究まで行われ、実用化に取り組んでいる状況である。

④本事業のねらい

本事業を実施することにより、2020年に(ガソリン対比)CO₂削減率50%以上を達成する生産プロセスで、国内外のバイオエタノールと競合可能な製造コスト(2008年のバイオ燃料革新技術計画では40円/L)でのバイオエタノール製造の実用化に資する有用要素生産技術を確立する。

[研究開発の目標]

①過去の取り組みとその評価

バイオエタノール製造技術開発については、バイオ燃料技術革新計画(2008年3月 バイオ燃料技術革新協議会)の技術革新ケースとして、製造コスト40円/L、CO₂削減率50%以上(対ガソリン)の技術を持って、2020年に年産10~20万kL規模での実用化を実現すべく取り組んできている。

NEDOでは、中長期的視野も見据えてバイオマスからのエネルギー転換効率の向上を目指した技術開発として【バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発事業】を「転換要素技術開発」と「先導技術研究開発」という形で2004年度~2012年度で行ってきている。これまでの技術開発により、バイオマス(原料)から前処理工程、糖化工程、発酵工程及び濃縮・脱

水工程の各基盤技術は世界のトップレベルである。特に、有用糖化酵素、有用微生物を用いたエタノール発酵生産、バイオ燃料用のバイオマス原料の改良については、主にラボスケールで優れた成果が得られている。

②本事業の目標

本事業では、高効率事業で優れた成果が得られた有用糖化酵素によるバイオマス前処理物の糖化能力の向上、及び有用微生物によるエタノール発酵生産能力向上の開発を行うと共に、スケールアップ技術によるパイロットスケールでの生産技術開発を行い、2020年の商用機スケールでの実用化に適用可能な生産技術を確立する。またバイオマス原料についても、植栽技術の改良による更なる収量アップ、塩害地や乾燥地での耐性或糖化効率向上に対応した機能を強化した植物創成技術の開発を行い、実用化を促進する。

事業実施にあたっては、開発される要素技術が実証プラントへ適用されバイオエタノールの実用化に着実に資することを念頭におき、事業を実施する。

③アウトカム達成目標についての取り組み（事業以外に必要とされる取り組み）

本事業で開発された要素技術を実証プラントへ組み込み、実証研究事業においてその性能を検証する。

④全体としてのアウトカム目標

ガソリン対比GHG排出削減率50%以上のバイオエタノールについては、2017年には約84万kLの使用が義務化されており、2020年には約180万kLの使用目標が掲げられている。現在は、ブラジルからの輸入のみである。

本事業終了後において、2020年には（ガソリン対比）CO₂削減率50%以上を達成する生産プロセスで、国内外のバイオエタノールと競合可能なコストでのバイオエタノール製造の実用化に資する有用要素生産技術を確立することを目標とする。この技術を用いた実用化により、2020年に10万～20万kL/年規模以下の製造設備により生産されたバイオエタノールの海外からの開発輸入や現地販売が図られ、CO₂削減量の試算として、20万kL/年規模のバイオエタノール生産によるガソリンに代替した時に17.3万tCO₂eq/年になり、地球温暖化対策にも貢献できる。

[研究開発の内容]

上記目標を達成するために、以下の有用糖化酵素、有用微生物を用いた高収率なエタノール生産、原料のバイオマス資源の確保に関する研究開発について実施する。

1. 研究開発の必要性

経済産業省は、2008年に「バイオ燃料技術革新計画」において具体的な生産モデルや技術開発の方向性を技術ロードマップとしてまとめ、その上で2010年6月に「エネルギー基本計画」を改定し、2020年までに全国のガソリンの3%相当以上のバイオエタノールを導入するとしている。

平成24年度まで実施した「バイオマスイネルギー等高効率転換技術開発事業」において、有用糖化酵素、有用微生物を用いたエタノール発酵生産技術及びバイオ燃料用のバイオマス原料の確保について技術開発が行われ、バイオエタノールの生産に関する優れた成果が得られた。

これらの成果は、主にラボスケールで得られた基盤的な技術であり、バイオマスからのエタノール生産に確実に適用されるためには、例えば、糖化酵素のセルロース系バイオマスを分解する能力アップや微生物によるエタノールの生産能力の向上等が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

セルロース系バイオマス（原料）から前処理→糖化→発酵→濃縮・脱水の各工程を経てバイオ燃料（エタノール）を製造する方法において、糖化工程での有用糖化酵素、発酵工程での有用微生物を用いた高収率なエタノール生産、原料のバイオマス資源の確保に関するパイロットスケールに相当する生産技術開発を行う。これらの技術開発により、2020年にセルロース系バイオマスからの一貫生産プロセスでエタノール生産する実用化に資する技術を確立する。

① 有用糖化酵素の生産技術開発

- ・遺伝子操作等により、革新的糖化酵素生産菌を造成し、糖化能力がアップした高活性の酵素を開発する。
- ・革新的糖化酵素生産菌をパイロットスケール（数m³以上）で、安価で最適な培養条件を検討して酵素生産技術を開発し、2020年の商用機スケール（数百m³以上）での実用化に資する技術を確立する。

② 有用微生物を用いた発酵生産技術開発

- ・微生物を遺伝子操作等により、糖化性、耐熱性、耐酸性などの多機能を有する微生物（酵母・細菌）を育種し、糖化同時発酵による高効率エタノール発酵生産を行う。
- ・多機能微生物をパイロットスケール（数m³以上）で、最適な培養条件を検討してエタノール発酵生産技術を開発し、2020年の商用機スケール（数百m³以上）での実用化に資する技術を確立する。

③ バイオマス原料の生産技術開発

- ・海外の植林地（ブラジル等）のユーカリ等をターゲットにして、高バイオ燃料用生産性樹木の評価・選定技術、成長促進剤などの利用による植栽技術などにより収量アップを図り、2020年の実用化に資する技術を確立する。
- ・ユーカリ、エリアンサス等は、遺伝子操作による更なる育種を行い、前処理・糖化されやすい、あるいは不良地耐性等の機能を強化し、特定網室、圃場試験または野外試験を行い、実用化を目指す。

なお、本研究開発は、実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、産学官の複数事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施するものであり、原則、委託として実施する。ただし、上記以外の民間企業単独、民間企業のみでの連携、大学等の単独等、産学官連携とならないものは、共同研究事業（NEDO負担率：2/3）として実施する。

3. 達成目標

有用糖化酵素については、1 mg/g-生成糖以下の酵素活性を持ち、4 円/L-エタノールの酵素コストを達成する。有用微生物を用いた高収率なエタノール生産技術開発については、エタノール生成濃度 5% (w/v) 以上で、エタノール収率 95%以上の生産技術を確立する。バイオマス資源の生産技術開発についてはユーカリ等の木質原料については、改良前の 1.2 倍以上収量をアップする。また、ユーカリ、エリアンサス等については、糖化されやすい機能等を有する育種技術を開発する。これらの技術により、2020年にセルロース系バイオマスからの一貫生産プロセスで

のエタノール生産において、(ガソリン対比)CO2削減率 50%以上で、国内外のバイオエタノールと競合可能な製造コスト(2008年のバイオ燃料革新技術計画では 40 円/L)での実用化に資する有用要素技術を確立する。実施テーマごとに、従来の技術に比べて画期的に優れた効率、低コスト化、省エネ性等の技術水準を見込めることを基礎的データの取得・分析により確認する。

[研究開発の実施方式]

(3) 研究開発の実施体制

本研究開発は、NEDOが、単独ないし複数の原則本邦の企業、大学等の研究機関(原則、本邦の企業等で日本国内に研究開発拠点を有していること。なお、国外の企業等(大学、研究機関を含む)の特別の研究開発能力、研究施設等の活用または国際標準獲得の観点から国外企業等との連携が必要な部分を、国外企業等との連携により実施することができる。)から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託(または、共同研究)して実施する。

(4) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及び研究開発実施者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて設置される技術検討委員会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、プロジェクトの進捗について報告を受けること等により進捗の確認及び管理を行うものとする。

[研究開発の実施期間]

平成25年度から平成28年度までの4年間とする。

[評価に関する事項]

NEDOは、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成29年度に実施する。また、事業期間内必要に応じて外部有識者等による研究開発の評価を実施し、プロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。

[その他の重要事項]

(1) 研究開発成果の取扱い

①成果の普及

得られた研究成果により、バイオマス原料からのバイオエタノール一貫生産技術の実用化の普及にNEDO、実施者ともに努めるものとする。これにより、国内におけるバイオエタノールの普及市場創出効果と温室効果ガス排出削減効果を図ることができる。

②知的財産権の帰属

委託研究開発及び共同研究の成果に関わる知的財産権については、「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させることとする。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、国内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本プロジェクトは、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第 15 条第 1 号に基づき実施する。

研究開発項目⑤「セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業」

1. 研究開発の必要性

2014年に改定された「エネルギー基本計画」においてバイオ燃料は、引き続き、導入を継続することとしており、NEDOの第3期中期計画においても、食糧供給に影響しない第2世代バイオ燃料であるセルロース系エタノールについては、2020年頃の実用化・事業化を目指すこととしている。国産技術により生産されたエタノールが普及することで、石油製品供給の一端を担える選択肢を確保することができ、エネルギーセキュリティ向上効果を得ることができる。しかし、セルロース系エタノールの大量生産のためには、まだ技術的課題が多く、当該技術の実用化・事業化に向け、今後も製造技術の開発、実証開発を推進する必要がある。

NEDOでは、2009～2013年度に実施した「セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業」(以下、「セル革事業」と略記。)において、パイロットスケールの一貫生産プラントを建設して試験を行い、事業終了時の技術目標はほぼ達成した。しかし、セルロース系エタノールの実用化・事業化には、一貫生産システムとしての性能向上、スケールアップ技術の確立などが必要であり、現有技術だけでの実用化は難しいのが現状である。

セル革事業のうち「早生樹からのメカノケミカルパルピング前処理によるエタノール一貫生産システムの開発」(以下、「木質系」と略記)では原料・前処理工程に優れた成果を、「セルロース系目的生産バイオマスの栽培から低環境負荷前処理技術に基づくエタノール製造プロセスまでの低コスト一貫生産システムの開発」(以下、「草本系」と略記)では糖化発酵工程に優れた成果を得ている。セルロース系エタノールの実用化のためには、セル革事業の木質系と草本系のそれぞれで得られた特長を組み合わせ一貫生産プロセスとしての性能向上を図るとともに、プロセスのスケールアップ技術を確立し、大規模なプレ商用実証プラント(年産1万kL規模)による最終的な技術実証事業が必要と考えられる。

2. 研究開発の具体的内容

2017年度までに、セル革事業で得られた木質系と草本系の成果を一本化した、各工程要素技術の最適組合せ検討を実施するとともに、国内外の優良技術を調査・検討する。これらと市場見通しを踏まえ、事業性評価(コスト評価、GHG削減効果、エネルギー収支評価)を実施し、有識者の意見を参考にしつつ、実証事業継続の可否を判断する。評価の結果、以後の研究を中止する場合もある。

事業性評価の結果、実証事業を継続することとなれば、プレ商用実証プラントによる技術実証を行う。

具体的には、下記の内容に取り組む。

(1) 要素技術の最適組合せ検討〔委託〕

(i) 国内外の優良技術の調査・検討

国内外のセルロース系エタノール生産技術の最新の技術動向を調査し、各工程要素技術における技術評価とコスト試算を実施する。

(ii) 最適組合せの検証

セル革事業で得られた要素技術を中心に、キー技術となる前処理技術、糖化発酵技術(糖化酵素選定、発酵微生物選定)の組合せ検討をラボ試験レベル(実験室レベルでの小

規模な試験)で実施し、早期に実用可能かつ性能的に有望な技術の組合せを選定する。選定した組合せについてパイロットスケールで原料～糖化～発酵に至るプロセスの事業性を検証する。

(iii) 一貫生産プロセス開発・事業性評価(FS)の実施

(ii)の検証結果より、有望な要素技術を選定し、商用プラントのプロセスと運転条件を決定し、原料収集からエタノール出荷までの総合的なシステムのコスト、GHG削減効果、エネルギー収支の評価を行う。この評価結果と(i)の検討結果および市場見通しを踏まえ、年産数万～20万kL規模の商用化を想定した事業性評価を実施し、NEDOは、継続の可否を判断する。

なお、本研究開発項目(i～iii)は、産学官の複数の事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する基盤的技術の開発にかかる事業であり、委託事業として、実施する。

(2) プレ商用実証プラントによる実証〔助成：NEDO負担率2/3もしくは1/2〕

FSの結果、実証事業の継続が妥当と判断された場合、年産1万kL規模のプレ商用実証プラントを建設し、実証運転を行う。得られた運転データを基に、商用化を想定した最終的な事業性評価を実施する。

〔研究開発の実施方式〕

(1) 研究開発の実施体制

本研究開発は、NEDOが、単独ないし複数の原則本邦の企業、大学等の研究機関(原則、本邦の企業等で日本国内に研究開発拠点を有していること。なお、国外の企業等(大学、研究機関を含む)の特別の研究開発能力、研究施設等の活用または国際標準獲得の観点から国外企業等との連携が必要な部分を、国外企業等との連携により実施することができる。)から公募によって研究開発実施者を選定し、研究体制を構築する。2.(1)の要素技術の最適組合せ検討は委託により実施し、2.(2)のプレ商用実証プラントによる実証は助成により実施する。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及び研究開発実施者と密接な関係を維持しつつ、本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、外部有識者で構成する技術検討委員会を組織し、定期的に技術的評価および助言を受け、研究開発の運営管理を行う。

〔研究開発の実施期間〕

本研究開発の期間は、2014年度から2019年度までの6年間とする。なお、個別研究開発テーマの開発目標及び実施内容の詳細については、採択テーマ決定後にNEDOと研究開発実施者の間で協議の上決定する。また、経済産業省で検討されているエネルギー供給構造高度化法の告示改正に関する動向を踏まえ、2016年度以降に「プレ商用実証プラントによる実証」の実施期間を必要に応じて見なおす。

[評価に関する事項]

NEDOは、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を2017年度に、事後評価を2020年度に実施する。また、事業期間内必要に応じて外部有識者等による研究開発の評価を実施し、プロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

[その他の重要事項]

(1) 研究開発成果の取扱い

①成果の普及

得られた研究成果により、バイオマス原料からのバイオエタノール一貫生産システムの実用化の普及にNEDO、実施者ともに努めるものとする。これにより、国産技術によるエタノール生産が普及することで、石油製品供給の一端を担える選択肢を確保することができ、エネルギーセキュリティー向上効果と、温暖化ガス削減効果（年間ガソリン比17.3万tCO₂削減）を得ることができる。また、国内におけるバイオエタノールの普及市場創出効果（20万kLで年間120億円に相当する生産：価格60円/L想定時）を図ることができる。

②知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については、「国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させることとする。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、国内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本プロジェクトは、下記の国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法に基づき実施する。

国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1号ロ、第3号、第9号

3. 達成目標

以下を達成目標とする。

- ① ガソリン比GHG削減効果50%、化石エネルギー収支2以上の一貫生産プロセスの最適化
- ② プレ商用実証プラントの建設と年産1万kLの運転の実証
- ③ ガソリン価格を見据えつつ海外エタノール価格と競合できるバイオエタノール生産コストの実現

【中間目標（2017年度）】

商用プラントを想定して①を達成し、プレ商用実証プラントの設計・建設に進むに値するFS結果を得ることを目標とする。FS実施時に、商用化に資するコスト目標を事業目標として事業者側が設定し、その目標の妥当性を外部有識者により審議し、妥当であるとの評価を得る。

【最終目標（2019年度）】

商用化に向け、プレ商用実証プラントを建設し、プレ商用実証プラントでの実証運転にて、①、②、③を達成する。

以上

**添付資料
特許論文等リスト**

日本製紙チーム

a) 知的財産権

(出願済特許等リスト)

出願日	受付番号	出願に係る特許等の標題	出願人
平成 29 年 4 月 17 日	特願 2017-081592	植林地の選抜方法	日本製紙 (株)

b) 研究発表・講演

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
平成 26 年 11 月 27 日	Natural resources green technology and sustainable development	Increasing Biomass Energy Production From Fast-Growing Tropical Plantation Forest	加藤 顕
平成 27 年 6 月 8-12 日	IUFRO Tree Biotechnology Conference	Genomic Selection of Eucalyptus elite trees in northern Brazil by SNPs analysis	福田 雄二郎
平成 27 年 6 月 8-12 日	IUFRO Tree Biotechnology Conference	Transcript level analysis of secondary cell wall formation in Eucalyptus urophiella x E.grandis.	新屋 智崇
平成 28 年 1 月 22 日	NC-CARP 産学連携コンソーシアム (東京大学)	日本製紙の植物バイオ関連技術	河岡 明義
平成 28 年 6 月 23 日	第 83 回紙パルプ技術発表会	Transcript level analysis involved in wood basic density of Eucalyptus	中浜 克彦
平成 29 年 3 月 28 日	第 128 回日本森林学会、(鹿児島県 かがしま県民交流センター)	無人航空機と地上レーザーによる大規模森林モニタリング	加藤 顕
平成 29 年 6 月 22 日	第 84 回 紙パルプ研究発表会	UAV によるバイオマス量の測定技術	陶山 健一郎

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
論文投稿中	Frontier in Plant Science	RNA-seq analysis of hybrid Eucalyptus with contrasting wood basic density reveals the contribution of lignocellulose-related genes to high wood basic density	中浜 克彦

c) プレスリリース・新聞雑誌への掲載

発表年月日	発表媒体	タイトル	発表者
平成 29 年 6 月 1 日	日本製紙株式会社ホームページ	バイオマス生産量を 1.8 倍以上にできる精密林業技術を開発 -土壌センシング、DNA マーカー育種とリモートセンシングの 3 技術を活用-	日本製紙 (NEDO と共同)
平成 29 年 6 月 5 日	日経産業新聞	木材生産を 8 割増やす技術 日本製紙、海外植林に活用	
平成 29 年 6 月 5 日	化学工業日報	バイオマス生産 1.8 倍超 日本製紙など 適地植林、選抜育種で	

Bits チーム

研究発表・講演

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2016年9月14日	日本応用糖質科学会 平成28年度大会	セルラーゼとヘミセルラーゼを同時生産する <i>Trichoderma reesei</i> 変異株の作出	山根三奈、野崎功一、天野良彦
2016年9月14日	日本応用糖質科学会 平成28年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> が生産する Cel1A の発現時期と省長	山鳥哲矢、郭博洋、天野良彦、野崎功一
2016年9月14日	日本応用糖質科学会 平成28年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> におけるソホロース合成酵素遺伝子破壊株のセルラーゼ生産能力	郭博洋、畠中理志、中島将博、中井博之、天野良彦、野崎功一
2016年9月14日	日本応用糖質科学会 平成28年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> が生産する Swollenin の反応機構の解析	野崎功一、石井哲郎、天野良彦
2016年9月14日	日本応用糖質科学会 平成28年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> におけるセロビオースヒドロラーゼ II 発現量の調節	三國和希、藤野尚人、天野良彦、野崎功一
2016年9月14日	日本応用糖質科学会 平成28年度大会	<i>Irpex lacteus</i> NK-1 株および <i>Pestalotiopsis</i> sp. AN-7 株由来 GH6 遺伝子のクローニングと異種発現酵素の機能解析	藤野尚人、水野正浩、野崎功一、天野良彦
2016年7月8日	セルラーゼ研究会 第30回大会	<i>Trichoderma reesei</i> における変異型 Cel1A の過剰発現とセルラーゼ生産に及ぼす影響	水谷江里、天野良彦、野崎功一
2016年7月8日	セルラーゼ研究会 第30回大会	<i>Trichoderma reesei</i> におけるセルラーゼ誘導型ヘミセルラーゼ生産株の作製	山根三奈、天野良彦、野崎功一
2016年7月8日	セルラーゼ研究会 第30回大会	変異型 Cel1A のグルコース活性化機構の解明	郭博洋、天野良彦、野崎功一
2016年7月8日	セルラーゼ研究会 第30回大会	白色腐朽菌 <i>Irpex lacteus</i> NK-1 株のトランスクリプトーム解析とその応用	藤野尚人、野崎功一、水野正浩、天野良彦
2016年3月29日	日本農芸化学会 2016年度大会	海洋性子囊菌由来 4-O-methyl glucuronoyl esterase の精製及び新規エステル基質の合成	高相晃、水野正浩、大川浩作、天野良彦
2016年3月	第66回日本木材学会大会研究発表要旨集 P28-P-04	プロテオーム解析による糖化酵素成分の安定性の比較	渋谷源、野尻昌信
2015年11月14日	7 th International Symposium on High-Tech Fiber Engineering for Young Researcher, 蘇州 (中国)	Cloning of a glucuronoyl esterase from <i>Pestalotiopsis</i> sp. AN-7 for effective hydrolysis of plant cell wall	Sangho Koh, Masahiro Mizuno, Yoshihiko Amano
2015年9月18日	応用糖質科学シンポジウム	<i>Trichoderma reesei</i> におけるセルラーゼ誘導・生産メカニズムの解明 -β-グルコシダーゼの役割について	野崎功一、郭博洋、畠中理志、Peter Biely、天野良彦

		-	
2015年9月16日	日本応用糖質科学会 2015年度大会	変異導入による β -グルコシダーゼのグルコース耐性およびグルコース活性化の獲得	郭 博洋, 寺嶋春日, 天野良彦, 野崎功一
2015年9月16日	日本応用糖質科学会 2015年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> 由来各種セルラーゼに対するセルロース酸化酵素の添加効果	宮入啓介, 天野良彦, 野崎功一
2015年9月16日	日本応用糖質科学会 2015年度大会	CBMを欠損させたセルラーゼによる高濃度基質の分解性	沼田雅之, 天野良彦, 野崎功一
2015年9月16日	日本応用糖質科学会 2015年度大会	部位特異的変異導入による <i>Trichoderma reesei</i> 由来 Cellobiohydrolase I (CBH II) の機能改変	藤野尚人, 水野正浩, 野崎功一, 天野良彦
2015年7月17日	第29回セルラーゼ研究会	白色腐朽菌 <i>Irpex lacteus</i> NK-1株のトランスクリプトーム解析	藤野尚人, 野崎功一, 水野正浩, 天野良彦
2015年3月27日	日本農芸化学会 2015年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> に存在するソホロース合成能をもつ β -glucosidase の特定と解析	郭 博洋, 野崎功一, 水野正浩, 天野良彦
2015年3月27日	日本農芸化学会 2015年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> における2種類の β -glucosidase 遺伝子破壊株の作製とセルラーゼ生産における影響	畠中理志, 野崎功一, 郭 博洋, 水野正浩, 天野良彦

文献

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2017年2月20日	応用糖質科学, 7(1), 2-9 (2017)	植物細胞壁構成成分の水熱処理技術の開発と抽出成分の酵素分解,	天野良彦
2016年5月20日	応用糖質科学, 6(2), 96-102 (2016)	<i>Trichoderma reesei</i> におけるセルラーゼ誘導・生産メカニズムの解明,	野崎功一, 郭博洋, 畠中理志, Peter Biely, 天野良彦
2016年1月16日	Appl Microbiol Biotechnol, DOI:10.1007/s00253-016-7342-x (2016)	Comparison of catalytic properties of multiple β -glucosidases of <i>Trichoderma reesei</i>	B Guo, N Sato, P Biely, Y Amano, K Nozaki
2016年1月5日	PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0147301 (2016)	Improvements in glucose sensibility and stability of <i>Trichoderma reesei</i> β -glucosidase using site-directed mutagenesis.	B Guo, Y Amano, K Nozaki
2015年1月3日	Biosci. Biotechnol. Biochem., 79(5), 738-746 (2015).	Extra tyrosine in the carbohydrate-binding module of <i>Irpex lacteus</i> Xyn10B enhances its cellulose-binding ability.	H. Nishijima, K. Nozaki, M. Mizuno, T. Arai, Y. Amano

特許

野崎功一, 天野良彦, 水野正浩, 特願 2016-094291, 「セルロース系バイオマス分解酵素の製造方法」

その他の公表

受賞

2016年9月15日 天野良彦：日本応用糖質科学会 学会賞

「植物細胞壁構成成分の水熱処理技術の開発と抽出成分の酵素分解」

2016年9月15日 水野正浩：日本応用糖質科学会 奨励賞

「セルロースの高次構造改変とその酵素分解性の評価」

2016年7月8日 郭博洋、天野良彦、野崎功一

第30回セルラーゼ研究会 ポスター賞

「変異型 Cel1A のグルコース活性化機構の解明」

2015年7月17日 藤野尚人, 野崎功一, 水野正浩, 天野良彦

第29回セルラーゼ研究会 ポスター賞

「白色腐朽菌 *Irpex lacteus* NK-1 株のトランスクリプトーム解析」

花王チーム

研究発表・講演（口頭発表を含む）

学会発表			
発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2014年3月25日	12th European Conference on Fungal Genetics	Functional analysis of ClbR and ClbR2 control linf the cellulosic biomass degradationenzyme gene expression in <i>Aspergillus aculeatus</i>	Shuji Tani, Emi Kunitake, Ayano Kawamura, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi
2014年3月28日	日本農芸化学会 2014年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> b-キシロシダーゼ (BXL I) の酵素化学的性質	岡田宏文、山下景子、○藤川浩樹、小松光子、二階堂満、戸谷一英
2014年3月28日	日本農芸化学会 2014年度大会	白色腐朽菌 <i>Phlebia cf. lindtneri</i> のパイオマス糖化酵素群の解析	島村 麻美子、安 善榮、小口 晃央、稲葉 重樹、○紙野 圭
2014年3月28日	日本農芸化学会 2014年度大会	線虫補食で知られるオルビリア目のヘミセルラーゼ群の解析	島村麻美子、西嶋桂子、安宅花子、金子哲、佐々木和美、紙野圭
2014年3月29日	日本農芸化学会 2014年度大会	放線菌 <i>Streptomyces turgidiscabies</i> 由来のグルクロノキシラン特異的な GH30 キシラナーゼの解析	前原智子、紙野圭、金子哲
2014年3月29日	日本農芸化学会 2014年度大会	<i>Trichoderma reesei</i> における pH 依存的セルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産制御機構の解析	平沢大樹、塩屋幸樹、志田洋介、小笠原渉
2014年3月29日	日本農芸化学会 2014年度大会	<i>Aspergillus aculeatus</i> セルロース誘導初期の遺伝子発現を瀬御する因子の同定と機能	遊亀翔太、國武絵美、谷修治、炭谷順一、川口剛司
2014年3月29日	日本農芸化学会 2014年度大会	<i>Aspergillus aculeatus</i> セロビオース応答因子 ClbR とそのパラログ因子 ClbR2 の作用機序解析	川村彩乃、國武絵美、谷修治、炭谷順一、川口剛司
2014年3月29日	日本農芸化学会 2014年度大会	糸状菌 cellobiose response regulator (CclbR) パラログの機能解析	藤原麻友美、谷修治、炭谷順一、川口剛司
2014年7月11日	第28回セルラーゼ研究会	<i>Aspergillus aculeatus</i> 由来 β -glucosidase 1 のグルコース阻害が緩和された変異酵素の取得	田中清貴、馬場祐太郎、谷修治、炭谷順一、川口剛司
2014年7月11日	第28回セルラーゼ研究会	<i>Aspergillus aculeatus</i> 由来 β -glucosidase 1 の変異導入によるセロビオースに対する触媒能の向上	馬場祐太郎、谷 修治、炭谷順一、川口剛司
2014年7月11日	第28回セルラーゼ研究会	<i>Trichoderma reesei</i> における pH 依存的セルラーゼ生産制御の解析	平沢 大樹、塩屋 幸樹、志田 洋介、小笠原 渉
2014年7月11日	第28回セルラーゼ研究会	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> の新規転写調節因子の網羅的探索	会田 宏樹、塩屋 幸樹、志田 洋介、小笠原 渉

2014年7月11日	第28回セルラーゼ研究会	枯草菌を用いた新規バイオマス糖化酵素の探索	柴田望、児玉武子、五十嵐一暁、劉生浩、山本貴子、尾崎克也、萩原浩
2014年9月10日	平成26年度日本生物工学会大会	<i>Aspergillus aculeatus</i> 由来 β -glucosidase 1 の変異導入によるセロビオースに対する触媒効率の向上	馬場祐太郎、谷修治、炭谷順一、川口剛司
2014年11月15日	第14回糸状菌分子生物学コンファレンス	<i>Aspergillus aculeatus</i> における dipeptidyl peptidase 4 の機能解析	遊亀翔太、國武絵美、谷修治、炭谷順一、川口剛司
2014年11月19日	MIE BIOFORUM 2014	Diverse regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi - with a central focus on <i>Aspergillus</i>	Shuji Tani, Emi Kunitake, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi
2014年11月19日	MIE BIOFORUM 2014	Biochemical and mutational analysis of β -glucosidase 1 from <i>Aspergillus aculeatus</i> for molecular basis in cellobiose hydrolysis	Yutarou Baba, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi
2014年11月20日	MIE BIOFORUM 2014	Effect of pH on cellulase production of <i>Trichoderma reesei</i> mutant strains,	Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara
2014年11月20日	MIE BIOFORUM 2014	Transcriptional mechanism of <i>Trichoderma reesei</i> aspartic protease TrAsP	Koki Shioya, Masahiro Yuki, Haruna Sato, Yosuke Shidam Wataru Ogasawara
2015年3月27日	2015年日本農芸化学会大会	<i>Aspergillus aculeatus</i> dipeptidyl peptidase IV のストレス応答に関する解析	遊亀翔太、國武絵美、谷修治、炭谷順一、川口剛司
2015年3月27日	2015年日本農芸化学会大会	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> における pH 応答転写調節因子 PacC の機能解析	平沢大樹、会田宏樹、塩屋幸樹、志田洋介、小笠原渉
2015年5月14日	日本顕微鏡学会第71回学術講演会(ポスター発表)	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> のキチン合成酵素の解析	志田洋介、田原伸悟、藤原南帆、生頼義久、多持隆一郎、岡田仁、大隅正子、小笠原渉
2015年5月28日	第82回バイオマス利用研究会(招待講演)	セルロース高分解性糸状菌の形態学的解析	小笠原渉
2015年6月13日	第11回 IIRS セミナー	セルロース性バイオマスの酵素糖化を加速する革新的酵素の開発	炭谷順一、谷修治、川口剛司
2015年7月4日	平成27年度農芸化学会関西支部例会第490回講演会(招待講演)	今、Fungi(カビ)をオミックスから見つけることについて	小笠原渉

2015年7月17日	第29回セルラーゼ研究会	<i>Aspergillus aculeatus</i> 由来 β -glucosidase 1 のセロピオースに対する反応性の向上	馬場 祐太郎, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司
2015年7月17日	第29回セルラーゼ研究会	<i>Trichoderma reesei</i> における転写調節因子 ManR/CirB の機能解析	会田 宏樹, 平沢 大樹, 塩屋 幸樹, 志田 洋介, 小笠原 渉
2015年7月17日	第29回セルラーゼ研究会	<i>Trichoderma reesei</i> における炭素源異化抑制関連タンパク質の機能解析	高橋 圭太郎, 会田 宏樹, 平沢 大樹, 志田 洋介, 小笠原 渉
2015年7月17日	第29回セルラーゼ研究会	<i>Trichoderma reesei</i> における新規 pH 依存的セルラーゼ生産制御因子の解析	平沢 大樹, 塩屋 幸樹, 志田 洋介, 小笠原 渉
2015年7月17日	第29回セルラーゼ研究会	<i>Trichoderma reesei</i> におけるセルロース応答性推定トランセプター-Crt1 のシグナル伝達経路の解析	吉澤 和将, 谷口 大樹, 古川 隆紀, 志田 洋介, 小笠原 渉
2015年7月17日	第29回セルラーゼ研究会	FIB-SEM を用いた糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> の菌体内部解析	藤原 南帆, 志田 洋介, 小笠原 渉, 森川 晃成, 多持 隆一郎, 南郷 脩史, 岡田 仁, 大隅 正子
2015年9月9日	日本微生物資源学会第22回大会微生物資源シンポジウム	糸状菌におけるセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子群の多様な制御機構	谷修治, 炭谷順一, 川口剛司
2015年9月9日	日本微生物資源学会第22回大会微生物資源シンポジウム	<i>Aspergillus aculeatus</i> 由来 β -glucosidase 1 のセロピオースに対する触媒効率の向上	馬場 祐太郎, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司
2015年9月9日	日本微生物資源学会第22回大会微生物資源シンポジウム	<i>Aspergillus aculeatus</i> セルロース資化能欠損株の表現型解析	片山 椋平, 遊亀 翔太, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司
2015年9月16日	日本応用糖質科学会平成27年度大会	キノコやカビの酵素探索からの或る考察	紙野 圭
2015年10月26日	平成27年度日本生物工学会大会	進化分子工学による <i>Trichoderma reesei</i> 由来キシラナーゼ III (XynIII) の耐熱化	矢追克郎, 松沢 智彦
2015年10月26日	平成27年度日本生物工学会大会	<i>Aspergillus aculeatus</i> 由来 β -glucosidase 1 のグルコース阻害を緩和した変異酵素の作製	田中 清貴, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司
2015年10月26日	平成27年度日本生物工学会大会	トリコデルマ由来キシラナーゼ XynIII の耐熱化	松沢 智彦, 矢追 克郎
2015年10月26日	平成27年度日本生物工学会大会	<i>Trichoderma reesei</i> におけるセルラーゼ生産制御因子の網羅的探索,	平沢 大樹, 会田 宏樹, 志田 洋介, 小笠原 渉
2015年11月19日	第15回糸状菌分子生物学コンファレンス	<i>Aspergillus aculeatus</i> セルロース資化能欠損株の表現型解析	片山 椋平, 遊亀 翔太, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司

2015年11月19日	第15回糸状菌分子生物学コンファレンス	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> における BGLII の生理学的役割	中村 彩奈, 高橋 真智子, 松沢 智彦, 志田 洋介, 矢追 克郎, 小笠原 渉
2015年11月19日	第15回糸状菌分子生物学コンファレンス	Transcriptional regulation mechanism of Trichodermapepsin in <i>Trichoderma reesei</i> , Daranagama, N.D	Aita, H., Hirasawa, H., Shioya, K., Sato, H., Suzuki, Y., Shida, Y., and Ogasawara, W.
2015年11月20日	日本顕微鏡学会 2015年研究会	セルラーゼ生産糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> 、その表現型	志田 洋介
2016年1月13日	微生物研究の新展開～生物プロセス研究部門の挑戦	トリコデルマ由来キシラナーゼ III の高機能化	矢追 克郎, 松沢 智彦
2016年1月20日	第11回バイオマス科学会議	<i>Trichoderma reesei</i> 由来キシラナーゼ III の機能改変	矢追 克郎, 松沢 智彦
2016年1月20日	第11回バイオマス科学会議	A novel avenue of protease producing mechanism in <i>Trichoderma reesei</i> , Daranagama, N	Hirasawa, H., Shioya, K., Sato, H., Suzuki, Y., Shida, Y., and Ogasawara, W
2016年1月20日	第11回バイオマス科学会議	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> における窒素源応答転写調節因子の解析	平沢 大樹, 鈴木 裕貴, 志田 洋介, 小笠原 渉
2016年3月4日	第10回日本ゲノム微生物学会年会	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> における比較ゲノム解析を用いた新規セルラーゼ生産制御因子の同定,	平沢 大樹, 会田 宏樹, 志田 洋介, 森 一樹, 田代 康介, 久原 哲, 小笠原 渉
2016年3月27日	第66回日本木材学会大会	サトウキビ酵素糖化残渣表面の微細構造および化学成分分布	児嶋美穂, 栗野達也, 吉永新, 高部圭司, 三橋麻子, 小林良則
2016年3月27日	第66回日本木材学会大会	大型イネ科バイオマス植物エリアンサス及びサトウキビのアルカリ処理前・後におけるリグノセルロース性状解析	宮本 託志, 山村 正臣, 飛松 裕基, 鈴木 史朗, 児嶋美穂, 高部 圭司, 梅澤 俊明
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発(その1) <i>Trichoderma reesei</i> 糖化酵素におけるセルラーゼ成分比とバイオマス糖化効率の関係	白井 晴奈, 志田 洋介, 小笠原 渉, 森川 康, 小林 良則
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発 <i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7 株の生産する成分酵素組成比率の検討	千葉 史子, 白井 晴奈, 坂井 可南子, 志田 洋介, 小笠原 渉, 森川 康, 小林 良則

2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発(その3)バイオマス由来セルロースの構造解析および酵素糖化機構の解析	三橋 麻子、今井 牧子、杉山 淳司、志田 洋介、小笠原 渉、森川 康、小林 良則
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発(その4) <i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7 株由来高機能糖化酵素生産菌株の培養条件検討	小林 良則、古川 麻記子、永岡 幸一郎、山口 桂右、志田 洋介、小笠原 渉、森川 康
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	<i>Aspergillus aculeatus</i> 由来 β -glucosidase 1 のセロオリゴ糖に対する反応性が高い変異酵素の取得	田中 清貴、馬場 祐太郎、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	トリコデルマ由来キシラナーゼ III の高機能化	矢追 克郎、松沢 智彦、金子 哲
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> における窒素源応答転写調節因子の解析	平沢 大樹、志田 洋介、小笠原 渉
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	<i>Trichoderma reesei</i> における BGLII の生理学的役割	中村 彩奈、高橋 真智子、松沢 智彦、志田 洋介、矢追 克郎、小笠原 渉
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> におけるキチン合成酵素の機能	藤原 南帆、田原 伸悟、志田 洋介、岡田 仁、大隅 正子、小笠原 渉
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> におけるセロビオース応答性セルラーゼ転写活性化因子の機能解析	高橋 圭太郎、会田 宏樹、平沢 大樹、塩屋 幸樹、志田 洋介、小笠原 渉
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	主要な好熱性糸状菌類の菌体外酵素生産と培養特性	島村 麻美子、Juliano de Oliveira Porciurcula、安宅花子、西嶋桂子、紙野 圭
2016年3月27日	2016年度日本農芸化学会大会	<i>Trichoderma</i> 属菌株の菌体外酵素生産多様性	Juliano de Oliveira Porciurcula、島村 麻美子、稲葉 重樹、鶴海 泰久、紙野 圭
2016年7月8日	セルラーゼ研究会第30回大会	バガス前処理物及び糖化残渣のリグノセルロース性状解析	宮本託志、山村正臣、飛松裕基、鈴木史朗、高田理江、(JBA) 三橋麻子、小林良則、梅澤俊明
2017年3月17日	日本農芸化学会 2017年度京都大会	各種前処理を施したサトウキビバガスのリグニン構造と酵素糖化効率の比較解析	宮本託志、(JBA) 三橋麻子、(京大生存研) 山村正臣、飛松裕基、鈴木史朗、高田理江、(JBA) 小林良則

2017年3月17日	第67回日本木材学会大会	サトウキビにおけるアルカリ前処理後の放冷条件による表面成分分布の変化と糖化率の違い	児嶋美穂、栗野達也、吉永新、高部圭司、(JBA) 三橋麻子、小林良則
2017年3月17日	第67回日本木材学会大会	サトウキビ切片分解過程における各主要酵素の経時的局在変化	今井牧子、今井友也、杉山淳司 (バイオインダストリー協会) 小林良則、三橋麻子
2017年1月18日	日本エネルギー学会 第12回バイオマス科学会議	セルロース系バイオマス糖化に資する新規酵素の探索と機能改変	矢追克郎、松沢智彦、渡邊真宏
2016年10月12日	BioJapan 2016	バイオマス有効活用を目指した高機能酵素創製	矢追克郎
2016年5月26日(木)	産総研 新技術説明会	セルロース系バイオマスの活用技術	矢追克郎
2016年9月4日	The Fifth International Conference on Cofactors and Active Enzyme Molecule 2016	Thermophilic fungal secretomes and a lactonase in Thielavia sp.	島村麻美子、Jumpathong J.、西嶋桂子、紙野 圭
2016年11月15日	LPMO Symposium	More light to biomass saccharification	紙野 圭
2017年3月17日	日本農芸化学会	糸状菌由来の酵素遺伝子は大腸菌でどの程度発現するのか?	前田 秀可、島村 麻美子、紙野 圭
2016年7月8~9日	セルラーゼ研究会第30回大会	バガス前処理物及び糖化残渣のリグノセルロース性状解析	宮本託志、山村正臣、飛松裕基、鈴木史朗、高田理江、(JBA) 三橋麻子、小林良則、梅澤俊明
2016年9月20~22日	日本土壌肥料学会 2016年度佐賀大会	大型イネ科バイオマス植物エリアサスのリグノセルロース性状解析	宮本託志、林晃大、山村正臣、飛松裕基、鈴木史朗、児嶋美穂、高部圭司、梅澤俊明
2016年10月2~4日	平成28年度新学術「植物細胞壁機能」領域若手ワークショップ/第10回細胞壁ネットワーク定例研究会	大型イネ科バイオマス植物の細胞壁構造解析ーエリアンサス、ソルガム、サトウキビの比較ー	宮本託志、林晃大、山村正臣、飛松裕基、鈴木史朗、児嶋美穂、高部圭司、梅澤俊明
2016年10月27~28日	第61回リグニン討論会	大型イネ科バイオマス植物のリグノセルロース性状比較解析	宮本託志、林晃大、山村正臣、飛松裕基、鈴木史朗、高田理江、児嶋美穂、高部圭司、梅澤俊明

2017年3月17～20日	日本農芸化学会 2017年度京都大会	各種前処理を施したサトウキビバガスのリグニン構造と酵素糖化効率の比較解析	宮本託志、(JBA) 三橋麻子、(京大生存研) 山村正臣、飛松裕基、鈴木史朗、高田理江、(JBA) 小林良則、(京大生存研・京大グローバル生存基盤) 梅澤俊明
2017年3月17日～20日	第67回日本木材学会大会(福岡大会)	サトウキビにおけるアルカリ前処理後の放冷条件による表面成分分布の変化と糖化率の違い	児嶋美穂、栗野達也、吉永新、高部圭司、(JBA) 三橋麻子、小林良則
2017年3月17日～20日	第67回日本木材学会大会(福岡大会)	サトウキビバガスセルロースの酵素糖化による形態・表面構造の変化	今井牧子、杉山淳司
2017年3月17日～20日	第67回日本木材学会大会(福岡大会)	サトウキビ切片分解過程における各主要酵素の経時的局在変化	今井牧子、今井友也、杉山淳司 (バイオインダストリー協会) 小林良則、三橋麻子
2017年3月2日～3月6日	JST-JICA の SATREPS プロジェクト関連のミーティング Indonesian Institute of Sciences 訪問	A study of lignocellulose characteristics of gramineous species	宮本託志
2017年14日～15日	韓国木材工学会年次大会	Time-laps observation of the degradation with fluorescence labeled enzymes on the thin section from the stem of sugarcane	Makiko IMAI(1) Tomoya IMAI,(1) Asako MIHASHI(2), Yoshinori KOBAYASHI(2), Junji SUGIYAMA(1)(1)

論文

発表媒体	発表タイトル	発表者
Biosci. Biotechnol. Biochem. 2015 Mar; 79(3):488-495	Effects of clbR overexpression on enzyme production in <i>Aspergillus aculeatus</i> vary depending on the cellulosic biomass-degrading enzyme species	Kunitake, E., Kawamura, A, Tani, S., Takenaka, S., Ogasawara, W., Sumitani, J., and Kawaguchi, T.
AMB Express 2015 Jan; 5(1):3	Characterization of <i>Aspergillus aculeatus</i> β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with <i>Trichoderma</i> cellulase system	Baba, Y., Sumitani, J., Tani, S., and Kawaguchi, T
Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014 Jun; 98(11):4829-4837	Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi.	Tani, S., Kawaguchi, T., and Kobayashi, T

Enzyme. Microb. Technol. 2016 Jan; 82:89-95	A high performance <i>Trichoderma reesei</i> strain that reveals the importance of XylanaseIII in cellulosic biomass conversion	Nakazawa, H., Kawai, T., Ida, N., Shida, Y., Shioya, K., Kobayashi, Y., Okada, H., Tani, S., Sumitani, J., Kawaguchi, T., Morikawa, Y., and Ogasawara, W.
Plant Morphology 2015; in press	Ultrastructure of the cellulolytic fungus <i>Trichoderma reesei</i> .	Shida, Y., Morikawa, A., Tamochi, R., Nango, N., Okada, H., Osumi, M., and Ogasawara, W
J. Biosci. Bioeng., 2016 Jan; 121(1):27-35	Heterologously expressed <i>Aspergillus aculeatus</i> β -glucosidase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> is a cost-effective alternative to commercial supplementation of β -glucosidase in industrial ethanol production using <i>Trichoderma reesei</i> cellulases	Treebupachatsakul, T., Nakazawa, H., Shinbo, H., Fujikawa, H., Nagaiwa, A., Ochiai, N., Kawaguchi, T., Nikaido, M., Totani, K., Shioya, K., Shida, Y., Morikawa, Y., Ogasawara, W., and Okada, H.
J. Biosci. Bioeng., 2015 Dec; 120(6):657-665	Utilization of recombinant <i>Trichoderma reesei</i> expressing <i>Aspergillus aculeatus</i> β -glucosidase I (JN11) for a more economical production of ethanol from lignocellulosic biomass,	Treebupachatsakul, T., Shioya, K., Nakazawa, H., Kawaguchi, T., Morikawa, Y., Shida, Y., Ogasawara, W., and Okada, H
Biotechnol Biofuels, 2015 Dec; 8:230.	The impact of a single-nucleotide mutation of <i>bgl2</i> on cellulase induction in a <i>Trichoderma reesei</i> mutant	Shida, Y., Yamaguchi, K., Nitta, M., Nakamura A., Takahashi, M., Kidokoro, S., Mori, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Matsuzawa, T., Yaoi, K., Sakamoto, Y., Tanaka, N., Morikawa, Y., and Ogasawara
Microb. Resour. Syst. 31, 179-183 (2015)	Obstacles found in investigation of fungal & mushroom enzymes	Kamino K
	A comparative study of biomass properties of <i>Erianthus</i> and sugarcane: alkali-delignification and enzymatic saccharification	Takuji Miyamoto, Masaomi Yamamura, Yuki Tobimatsu, Shiro Suzuki, Miho Kojima, Keiji Takabe, Asako Mihashi, Yoshinori Kobayashi, Toshiaki Umezawa
Applied Microbiology and Biotechnology 2016年、100卷18号、8043-8051	Improvement of thermostability and activity of <i>Trichoderma reesei</i> endo-xylanase Xyn III on insoluble substrates.	松沢智彦、金子 哲、矢追克郎
Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. 100, 10495-10507	Site-saturation mutagenesis for β -glucosidase 1 from <i>Aspergillus aculeatus</i> to accelerate the saccharification of alkaline-pretreated bagasse	Baba Y, Sumitani J, Tanaka K, Tani S, Kawaguchi T.
Bioresource Technology	A comparative study of biomass properties of <i>Erianthus</i> and sugarcane: alkali-delignification and enzymatic saccharification	Takuji Miyamoto, Masaomi Yamamura, Yuki Tobimatsu, Shiro Suzuki, Miho Kojima, Keiji Takabe, Asako Mihashi, Yoshinori Kobayashi, Toshiaki Umezawa

特許等

特許			
受付日	発明番号	発明の名称	出願人
平成 26 年 7 月 4 日	特開 2016-015894	β -グルコシダーゼ	大阪府立大学
平成 27 年 4 月 28 日	特願 2015-092216	耐熱性を有するキシラナーゼ	産業技術総合研究所
平成 27 年 4 月 14 日	特開 2017-012006	新規キシラナーゼ	花王株式会社
平成 27 年 7 月 6 日	特開 2017-029013	糸状菌変異株及びその利用	花王株式会社
平成 27 年 10 月 23 日	特願 2016-152134	糸状菌変異株及びその利用	花王株式会社・長岡技術科学大学

日揮チーム

平成 25 年度

研究発表（学会発表）1 件

発表者	所属	発表タイトル	発表媒体	発表年月日
藤森一浩 ² , 佐原健彦 ² , 扇谷悟 ² , 鎌形洋一 ² , 富高正貴 ¹ , 長島正明 ¹ , 田口久貴 ¹ , 赤松隆 ¹	1 崇城大, 2 産総研	キシロース資化向上に関わる <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HEX1 遺伝子の特定	日本農芸化学会 2014 年度大会	2014 年 3 月 28 日

平成 26 年度

研究発表（学会発表）4 件

発表者	所属	発表タイトル	発表媒体	発表年月日
Taneda D, Okino S, Ikeo M,	JGC Corporation	Synergism between enzymes during hydrolysis of cellulose	36 th Symposium on Biotechnology for Fuels and chemicals	2014 年 4 月 29 日
鈴木俊宏, 星野保, 松鹿昭則	産総研	耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMB1 株のキシロース代謝時のメタボローム解析	第 66 回日本生物工学会大会	2014 年 9 月 9 日
谷龍典 ¹ , 田口久貴 ¹ , 藤森一浩 ² , 佐原健彦 ² , 扇谷悟 ² , 鎌形洋一 ² , 赤松隆 ¹	1 崇城大, 2 産総研	キシリトール資化性を導く変異型 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 株の分離とその特徴づけ	日本農芸化学会 2015 年度大会	2015 年 3 月 27 日
矢野伸一, 滝村修, 星野保	産総研	<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMB1 株の高温での同時糖化発酵特性	日本農芸化学会 2015 年度大会	2015 年 3 月 28 日

特許 2 件

出願者	出願番号	国内外	出願日	状態	名称	発明者
日揮株式会社	PCT/JP2015/056323	PCT	2015 年 1 月 30 日	出願	Method for producing sugar containing glucose as main component	種田大介
日揮株式会社	PCT/JP2015/056323	PCT	2015 年 3 月 4 日	出願	糖類の製造方法, エタノールの製造方法	沖野祥平, 池應真実, 種田大介(日揮)

平成 27 年度

研究発表（学会発表）17 件

発表者	所属	発表タイトル	発表媒体	発表年月日
鈴木俊宏, 星野保, 松鹿昭則	産総研	<i>Kluyveromyces marxianus</i> のキシロース代謝遺伝子の単離と評価	第 48 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会	2015 年 9 月 1 日

池應真実, 沖野祥平, 小黒秀一, 種田大介	日揮	爆砕バガスの糖化反応モデル式の確立	化学工学会第47回秋季大会	2015年9月9日
種田大介, 池應真実, 沖野祥平	日揮	セルロース系エタノール製造技術の開発	化学工学会第47回秋季大会	2015年9月9日
Ngo VA, Liu B, Terashima M, Yasui H	The University of Kitakyushu	Anaerobic Biodegradation of the Steam Explosion Wastewater from Sugar Cane Bagasse for Bioethanol Processing	Proc. of 6th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition	2015年9月20日
田口久貴, 赤松隆	崇城大	グルコース・キシロース同時発酵を行う <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 株の遺伝子構造	第67回日本生物工学会大会	2015年10月26日
藤森一浩, 清家泰介, 小林洋介, 佐原健彦, 森田直樹, 扇谷悟, 田口久隆, 赤松隆, 鎌形洋一	産総研	第二世代バイオマスエタノール生産基盤技術の構築: 実用酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IR-2 由来 isogenic 系統の確立	第67回日本生物工学会大会	2015年10月26日
小林洋介, 藤森一浩, 佐原健彦, 扇谷悟, 鎌形洋一	産総研	セルロース由来バイオマスエタノール生産実用酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IR-2 におけるペントースリン酸経路の最適化	第67回日本生物工学会大会	2015年10月26日
松鹿昭則, 鈴木俊宏, 星野保	産総研	<i>Kluyveromyces marxianus</i> 由来キシロース代謝遺伝子の過剰発現による高温条件下でのキシロース発酵	第67回日本生物工学会大会	2015年10月26日
沖野祥平 ¹ , 池應真実 ¹ , 赤松隆 ² , 種田大介 ¹	1日揮, 2崇城大	実用的な同時糖化併行複発酵プロセスの開発	第67回日本生物工学会大会	2015年10月28日
藤森一浩	産総研	C5C6糖同時発酵微生物の開発	産業技術総合研究所生物プロセス研究部門ワークショップ	2016年1月13日
清家泰介, 藤森一浩, 佐原健彦, 小林洋介, 扇谷悟, 鎌形洋一	産総研	出芽酵母への高効率なキシロース資化能付与に資するキシロースイソメラーゼの開発	日本農芸化学会2016年度大会	2016年3月28日
田口久貴, 赤松隆	崇城大	キシロース資化性を示す組換え酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるキシリトール低蓄積を導く遺伝背景	日本農芸化学会2016年度大会	2016年3月28日
田口久貴, 赤松隆	崇城大	Fps1のキシロース資化性を示す組換え酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の発酵に及ぼす効果	日本農芸化学会2016年度大会	2016年3月28日
藤森一浩, 清家泰介, 小林洋介, 佐原健彦, 扇谷悟, 鎌形洋一	崇城大	セルロース系エタノール生産のためのC5C6発酵酵母の開発: Xylose isomerase 遺伝子の改良と同時糖化発酵プロセスにおける発酵性能	日本農芸化学会2016年度大会	2016年3月28日

小林洋介, 藤森一浩, 佐原健彦, 蒲池沙織, 松鹿昭則, 星野保, 扇谷悟, 鎌形洋一	産総研	セルロース系バイオエタノール生産 実用酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IR-2 におけるペントースリン酸経路の最適化と耐熱化	日本農芸化学会 2016年度大会	2016年3月28日
豊澤佳子, 沖野祥平, 池應真実, 種田大介	日揮	爆砕バガス糖化におけるセルラーゼ構成酵素の基質への吸脱着挙動解析	日本農芸化学会 2016年度大会	2016年3月28日
沖野祥平, 池應真実, 種田大介	日揮	C5C6 発酵菌を用いたパイロットスケールにおける同時糖化併行複発酵	日本農芸化学会 2016年度大会	2016年3月28日

特許 1 件

出願者	出願番号	国内外	出願日	状態	名称	発明者
(国研) 産業技術総合研究所	特願 2016-62838	国内	2016年3月25日	出願	変異型キシロース代謝酵素とその利用	清家泰介, 藤森一浩, 佐原健彦, 小林洋介, 扇谷悟, 鎌形洋一

平成 28 年度

研究発表 (学会発表) 18 件

発表者	所属	発表タイトル	発表媒体	発表年月日
Ngo VA, Liu B, Terashima M, Yasui H	The University of Kitakyushu	Anaerobic Treatment of the Steam Explosion Wastewater from Bioethanol Processing using Sugar Cane Bagasse	The Water and Environment Technology Conference 2016 (WET2016)	2016年8月26日
種田大介, 池應真実, 沖野祥平	日揮	セルロース系糖液・エタノール製造技術開発	化学工学会第48回秋季大会	2016年9月8日
鈴木俊宏, 星野保, 松鹿昭則	産総研	Metabolite analysis using <i>Kluyveromyces marxianus</i> during xylose fermentation	第14回酵母国際会議 (ICY14)	2016年9月12-13日
豊澤佳子, 沖野祥平, 池應真実, 種田大介	日揮	バイオマス糖化時におけるセルラーゼ各酵素の吸着脱離挙動に及ぼすリゾチーム添加の影響	日本応用糖質科学会平成28年度大会	2016年9月14日
鈴木俊宏, 星野保, 松鹿昭則	産総研	<i>Kluyveromyces marxianus</i> におけるキシリトール脱水素酵素の補酵素特異性改変による効果	第68回日本生物工学会大会	2016年9月28日
谷龍典, 田口久貴, 赤松隆	崇城大	キシリトール資化性を導く変異型 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 菌株を用いた発酵解析	第68回日本生物工学会(2016)	2016年9月28日

谷龍典, 田口久貴, 赤松隆	崇城大	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> のキシリトールトランスポーターの特定	第 23 回 九州支部 飯塚大会 (2016)	2016 年 12 月 3 日
宮崎聰, 田口久貴 赤松隆	崇城大	C6C5 糖からのエタノール生産に及ぼす変異型 PGK1 発現プロモーター	第 23 回 九州支部 飯塚大会 (2016)	2016 年 12 月 3 日
藤森一浩	産総研	効率的なセルロース系バイオエタノール生産酵母の開発	BioJapan 2016	2016 年 10 月 12 日 - 14 日
扇谷悟	産総研	産総研におけるバイオマスの効率的利用のための研究	BioJapan 2016	2016 年 10 月 12 日 - 14 日
Fujimori KE	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	Development of genetically engineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain for simultaneous saccharification and co-fermentation of lignocellulosic biomass.	14 th International Congress on Yeasts/ICY2016	13 Sep 2016
Kobayashi Y	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	Genetic improvement of xylose metabolism by enhancing the pentose phosphate pathway in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IR-2 in ethanol production at higher temperature	14 th International Congress on Yeasts/ICY2016)	13 Sep 2016
藤森一浩, 小林洋介, 佐原健彦, 扇谷悟, 鎌形洋一	産総研	人工プロモーターを用いたセルロース系バイオエタノール生産に資する遺伝子組換え酵母の開発	第 68 回日本生物工学会	2016 年 9 月 28 日
小林洋介, 藤森一浩, 佐原健彦, 鈴木俊宏, 蒲池沙織, 松鹿昭則, 星野保, 扇谷悟, 鎌形洋一	産総研	ペントースリン酸経路遺伝子発現の最適化による C5C6 糖同時発酵酵母の ethanol 生産性の向上	第 68 回日本生物工学会	2016 年 9 月 28 日
佐原 健彦, 清家 泰介, 小林 洋介, 扇谷 悟, 鎌形 洋一, 藤森 一浩	産総研	エタノール発酵プロセスに適したプロモーターの利用によるキシロース代謝能の向	第 39 回日本分子生物学会年会	2016 年 11 月 30 日
藤森一浩	産総研	高効率セルロース系エタノール生産に適した遺伝子組換え出芽酵母のデザイン	日本農芸化学会 2017 年度京都大会	2017 年 3 月 18 日
小林洋介	産総研	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IR-2 ペントースリン酸経路改良株を用いた同時糖化併行複発酵によるエタノール生産	日本農芸化学会 2017 年度京都大会	2017 年 3 月 18 日
田島寛隆	京都大	バイオマスの市販セルラーゼによる糖化と酵素局在の観察	第 67 回日本木材学会大会	2017 年 3 月 17 日

研究発表（論文発表）3件

発表者	所属	タイトル	発表誌名, ページ番号	査読	発表年月
Tani T ¹ , Taguchi H ¹ , Fujimori KE ² , Sahara T ² , Ohgiya S ² , Kamagata Y ² , Akamatsu T. ¹	1 Sojo University, 2 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	Isolation and characterization of xylitol-assimilating mutants of recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	J Biosci Bioeng 122, 446-55	有	8 Apr 2016
Liu B, Ngo VA, Terashima M, Yasui H	The University of Kitakyushu	Anaerobic Kinetic model for Treating Steam-explosion Wastewater of Sugarcane Bagasse in Bioethanol Processing	Bioresource Technology 234, 253–263	有	5 Mar 2017
Toyosawa Y, Ikeo M, Taneda D, Okino S.	JGC Corporation	Quantitative analysis of adsorption and desorption behavior of individual cellulase components during the hydrolysis of lignocellulosic biomass with the addition of lysozyme	Bioresource Technology 234, 150–157	有	28 Feb 2017

特許 2件

出願者	出願番号	国内外	出願日	状態	名称	発明者
(国研) 産業技術総合研究所	特願 2016-217841	国内	2016年11月8日	出願	新規高温耐性付与遺伝子とその利用法	松鹿昭則, 鈴木俊宏, 蒲池沙織, 星野保
(国研) 産業技術総合研究所	特願 2016-164104	国内	2016年8月24日	出願	ストレス応答プロモーター	藤森一浩, 小林洋介, 佐原健彦, 扇谷悟, 鎌形洋一