

木材の腐朽環境に存在する担子菌類の モニタリング手法の開発と評価

和田 朋子

一目次-

第1章　序論	1
1.1 木材保存と木材腐朽菌のモニタリングの意義	2
1.2 木材腐朽と木材腐朽菌	3
1.2.1 木材の生物劣化	
1.2.2 木材腐朽菌の分解様式の違いによる分類	
1.2.3 菌類の分子系統分類と遺伝子配列を指標とした木材腐朽菌の分類	
1.3 木材腐朽菌の同定手法	11
1.4 本研究の目的	14
参考文献	16
第2章　非特異的 DNA 増幅と rDNA 断片の PCR 増幅を利用した 担子菌の同定	19
2.1 緒言	20
2.2 実験方法	24
2.2.1 指標菌培養木片からのサンプリング	
2.2.2 ベイトステーション中の木片からのサンプリング	
2.2.3 Phi29 DNA ポリメラーゼによるゲノムの非特異的増幅	
2.2.4 PCR による ITS 領域の増幅	
2.2.5 クローニング及び核酸配列のシーケンス	
2.2.6 塩基配列の解析と菌株同定	
2.3 結果	28
2.3.1 指標菌培養木片中に存在する担子菌種の同定	
2.3.2 ベイトステーションに設置した木片からの担子菌の検出と同定	
2.4 考察	36
参考文献	39

第3章 木材腐朽菌叢の定量的評価を目的とした DNA 増幅条件に関する評価	41
3.1 緒言	42
3.2 実験方法	43
3.2.1 供試菌ならびにサンプル調製	
3.2.2 Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた非特異的増幅	
3.2.3 PCR-RFLP 分析	
3.2.4 PCR 産物の融解曲線解析	
3.3 結果	47
3.3.1 非特異的増幅条件の最適化	
3.3.2 PCR-RFLP 解析	
3.3.3 PCR 増幅断片の融解曲線解析	
3.4 考察	53
参考文献	59
第4章 総括	61
参考文献	71
公表論文一覧	72
謝辞	73

Abbreviations

BLAST	basic local alignment search tool
GC	guanine–cytosine
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
ITS	internal transcribed spacer
NCBI	national canter for biotechnology information
PCR	polymerase chain reaction
PCR-RAPD	PCR-randomly amplified polymorphic DNA
PCR-RFLP	PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
rDNA	ribosomal DNA
T-RFLP	terminal-restriction fragment length polymorphism
Tm	melting temperature

第1章

序論

1.1 木材保存と木材腐朽菌のモニタリングの意義

森林資源である木材は、化石資源や鉱物資源などとは異なり、条件さえ整えば太陽エネルギーによってその生産量も増加させることが可能である。

また、木材は単位重量あたりの強度が著しく大きい¹⁾、加工や接合が容易である¹⁾、熱伝導率が小さい²⁾、防音・吸音^{2, 3)}、吸湿性⁴⁾がある、感触がよく情緒を豊かにする⁵⁾、におい、色彩および模様に特色がある^{3, 6)}など多様で優れた性質を持っている。そして、加工段階では、無公害かつ省エネルギー⁷⁾で、リサイクルも可能な材料である。このように木材は多様で優れた特性を有していることから、建築構造材料あるいは木材工業材料として広い範囲にわたって利用されている。他方、有機物質であるため生物劣化を受ける。木材の生物劣化のうちで最も被害の多いのが木材腐朽菌やシロアリによる生物劣化である⁸⁾。これらの劣化現象に対して科学的手法によって木材に耐久性を付与し、その耐用年数を延長させ、木材資源の持続的確保に寄与することが木材保存の目的である。

これらのうち、木材腐朽菌による木材の劣化は木質構造の強度低下や損壊の大きな原因のひとつになるとされている。木材中に棲息する木材腐朽菌をモニタリングし木質住宅や木製外構施設を維持管理することで、木質住宅や木製外構施設の耐用年数を延長することが可能となり、その結果、森林資源を守り、費用や労力を削減することができる。このように木材腐朽菌の動態をモニタリングすることは重要な課題と言えることから、本研究では新規の DNA 増幅法を導入し、この課題の克服を目指した。

1.2 木材腐朽と木材腐朽菌

1.2.1 木材の生物劣化

木材は種々の要因で劣化を受ける。劣化とは木材が使用される環境で長年にわたり様々な作用でその性能を低下させる現象で、木造住宅の劣化の主な要因には、風化、摩耗、昆虫(シロアリ等)による食害、微生物(木材腐朽菌等)による腐朽などがある⁹⁾。木材の生物劣化は一般的にシロアリによる蟻害と受け取られがちであるが、腐朽・蟻害を地震による被災度と比較した結果、腐朽被害は蟻害と同程度かそれ以上であると報告されている¹⁰⁾。腐朽を起こす各種の木材腐朽菌は木材組織を化学的に分解し、生育条件(栄養、水、空気(酸素)、温度、pH、光等)さえ整えば短期間に材深部まで被害が及びやすくなるため、木造住宅への被害は深刻なものであると言える。

1.2.2 木材腐朽菌の分解様式の違いによる分類

木材劣化に関する真菌類には担子菌類 (basidiomycetes)、子のう菌類 (ascomycetes)、不完全菌類 (deuteromycetes)、接合菌類 (zygomycetes)が挙げられる。これらの真菌類による木材劣化様式の種類のうち、最も著しい劣化を引き起こすものは木材腐朽菌と呼ばれ、担子菌類や子のう菌類、接合菌類が該当する。木材腐朽菌は腐朽した木材の外観から褐色腐朽(brown rot)、白色腐朽(white rot)、軟腐朽(soft rot)の3型に分けられ、それぞれの腐朽型を生じる菌は褐色腐朽菌、白色腐朽菌、軟腐朽菌と呼ばれ、褐色腐朽菌、白色腐朽菌は担子菌に分類される(Table 1.1)¹¹⁾。

軟腐朽は担子菌類が腐朽できないような高含水率の箇所で腐朽するため、建築材や木質材料など日常的に使用される木材に深刻な被害をもたらすものは褐色腐朽や白色腐朽である。以下に褐色腐朽および白色腐朽について詳細を記す。

Table 1.1. Classification of wood rotting fungi¹¹⁾.

types of decay	causative fungi
brown rot	basidiomycetes
white rot	basidiomycetes
soft rot	ascomycetes, deuteromycetes

<褐色腐朽>

木材の細胞壁は、細胞と細胞を接着している細胞間層、それに隣接する一次壁と二次壁、中空の内腔からなり、二次壁はセルロースフィブリルの配列を異にする外・中・内の三層で構成されている。これらはそれぞれ S₁、S₂、S₃ 層と呼ばれることがある。中層は最も厚く、二次壁の 75% を占める。褐色腐朽では、菌糸と直接接触しない木材細胞壁の二次壁中層が専ら分解されその後外層も分解されるが内層は最後まで残存し、菌糸から腐朽が離れて起こっているように見える。褐色腐朽を引き起こす褐色腐朽菌ではリグニンを分解する酵素を持っていないが、水酸化ラジカルを生成する低分子物質を分泌することによって、リグニンを変質させ、また結晶性のセルロースを分解し易くし多糖類を選択的に分解することができる。このように褐色腐朽菌はセルロースとヘミセルロースを選択的分解するため、リグニンが網目状に残る。褐色腐朽では細胞壁を構成するセルロースとヘミセルロースが分解、吸収され、リグニンがほとんど分解されずに残るため

に腐朽木材が褐色を呈する。激しい褐色腐朽を起こした木材は乾燥すると収縮し、縦横に亀裂が生じて脆くなり、そこから取り出した小片を指間で圧すと粉々になる¹²⁾。褐色腐朽菌は自然界では針葉樹を侵すものが多く、木造建築物にとって深刻な被害を生じるものも多い。主な種として、建築材の褐色腐朽を起こすイドタケ(*Coniophora puteana*)やナミダタケ(*Serpura lacrymans*)、オオウズラタケ(*Fomitopsis palustris*)、キカイガラタケ(*Gleophyllum sepiarium*)、土木用材の褐色腐朽を起こすマツオウジ(*Lentinus lepideus*)、イチョウタケ(*Paxillus panuoides*)などが知られている。

<白色腐朽>

白色腐朽では、白色腐朽菌がリグニン分解系によってリグニンを分解し、さらにセルロースおよびヘミセルロースから得た多糖類を分解・代謝しながら、細胞内腔に存在する菌糸と接触する二次壁内層から、全ての成分を浸食するようにして、二次壁中層、外層へと腐朽が進行していく。リグニン含有率の高い細胞間層も分解されるので、腐朽材は纖維状にはぐれ易くなる。白色腐朽では細胞壁を構成するセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンが分解、吸収され腐朽材が退色、または白っぽく見える。白色腐朽を引き起こす白色腐朽菌は木材を白色に腐朽する菌類の総称であり、ほとんどが担子菌類であるが、子嚢菌類に属するものもある。白色腐朽菌は褐色腐朽菌とは対照的に自然界では広葉樹を侵すものが多い。主な種として、建築材の白色腐朽を起こすホシゲタケ(*Asterostroma apalum*)、カワラタケ(*Trametes versicolor*)、ヒイロタケ(*Pycnoporus coccineus*)、カイガラタケ(*Lenzites betulina*)、スエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)等が知られている。

1.2.3 菌類の分子系統分類と遺伝子配列を指標とした木材腐朽菌の分類

微生物の分類は、従来、形態的特徴(コロニーの形状、細胞の形など)、生理・生化学性状(糖の資化性、生育温度・pH など)、化学分類学的性状(菌体脂肪酸組成、キノン組成など)の違いに基づいて行われてきた¹³⁾。また、現存する微生物個体のこれらの性状を調べて進化・分類を推察してきた。

1950 年代に誕生した分子生物学は菌の分類学にも影響を及ぼした。近年の遺伝学的分析手法の進展によって DNA やタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に基づく系統解析手法が開発され、進化や系統を時間のパラメーターを用いた系統樹で表し、これに基づいて分類がなされるようになってきている。菌類の分子系統の初期の研究は、担子菌類と鞭毛菌類について 5S rRNA 塩基配列と形態形質との比較解析を行い、情報高分子の有用性を初めて示した報告である^{14, 15)}。その後菌類の分子系統研究は、1980 年代後半からより詳細に系統解析が可能な rRNA 遺伝子の小サブユニット(18S)や大サブユニット(23S、 28S)へとシフトした。このようにして 1990 年代初頭から菌類の系統進化の研究は新しい時代に突入し「菌類分子系統分類学(Fungal molecular Systematics)」と呼ばれる新研究分野が誕生した¹⁶⁾。現在、系統解析を行う際に一般的に用いられている遺伝子には、木材腐朽菌が含まれる真菌類では 18S rRNA 遺伝子、 28S rRNA 遺伝子内のドメイン 1/ドメイン 2 領域および両遺伝子の間に存在する ITS 領域(Fig. 1.1)などがある。

リボソーム RNA(rRNA)は生命活動に不可欠なタンパク質の生産工場であるリボソームの主要な構成要素であり、その遺伝子は核ゲノム以外にミトコンドリアや葉緑体のようなオルガネラ中にも存在する。増殖中の高等真核細胞は細胞1世代ごとに 1000 万個のリボソームを作るので、各種の rRNA を 1000 万個ずつ合成する必要がある。細胞が十分量の rRNA を生産できるのは、

rRNA をコードする rRNA 遺伝子がたくさんあるためである。真核生物では、高度に保存された rRNA 遺伝子が染色体上に縦に多数並んでおり、各遺伝子(生物によって長さは異なるが 8000 ～13000 塩基対)の間にはスペーサーDNA がある¹⁷⁾。スペーサーDNA は転写されず、その長さや塩基配列は様々である。真核生物の核rRNA は一般に、RNA 合成酵素である RNA ポリメラーゼ I によって 18S rRNA (Small subunit: SSU) – 5.8S rRNA – 25～28S rRNA (Large subunit: LSU) が内部介在配列 ITS を介して繋がった一つの転写単位として合成された後、酵素によって ITS が切り出され、それぞれ成熟 RNA 分子となる¹⁸⁾。このように、3 種の rRNA が 1 本の一次転写産物に由来するので必ず等量できる(Fig. 1.2)。

rDNA 配列は保存性が高く、18S rRNA 遺伝子配列上にフォワードプライマー、28S rRNA 遺伝子配列上にリバースプライマーなど、担子菌や糸状菌に特異的なプライマーの作成が容易である一方で(Fig. 1.1)、それらの内部にある ITS 領域の DNA 配列は変異が起こり易く種によりその配列は異なるため、設計したプライマー対を用いて ITS 領域を PCR 増幅しシーケンサーにより ITS 領域の塩基配列を取得することが可能である。その後、ITS 領域の配列の相同性を既知の配列と比較することで担子菌類を同定することが可能となる。さらに配列が多様である ITS 領域は、担子菌類を同定するための RFLP パターンの作成や種や分類群に特異的なプライマーの作成に利用可能であることや、菌のゲノム中で多コピーであるため高感度で検出が可能である点ことなど担子菌類を同定するために有利な点を備えている¹⁹⁾。そのため、ITS 領域を用いた系統解析手法は現在最も一般的な手法である。このような理由から ITS 領域の塩基配列のデータベースは他の遺伝子配列に比べて充実しており、データベースとサンプルの ITS 領域の塩基配列を照らし合わせることで菌種を同定することが容易である。

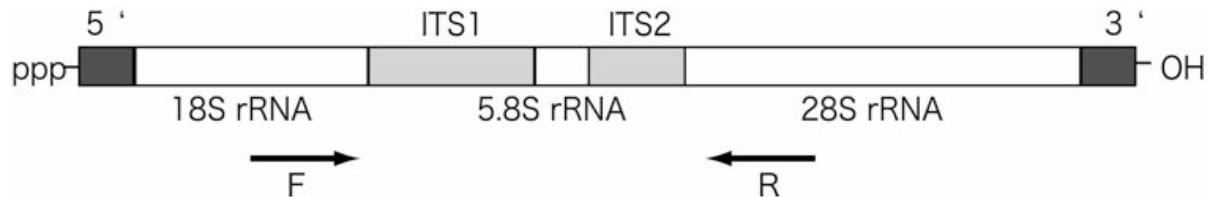


Fig. 1.3. Map of typical fungal ribosomal RNA (rRNA) genes showing the positions of variable regions (ITS), forward primer (F) and reverse (R) primer.

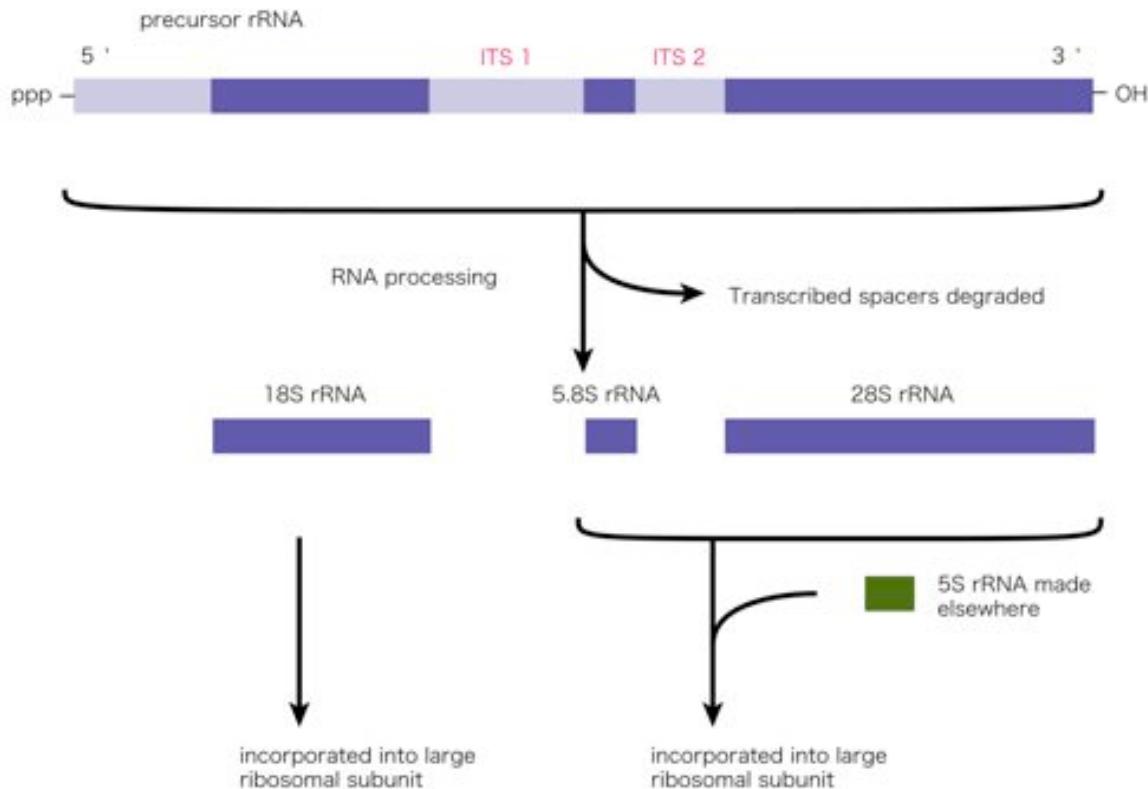


Fig. 1.4. The nucleolytic processing of a eukaryotic precursor rRNA molecule into three separate ribosomal RNAs. This figure has been modified from Alberts *et. al.*²⁰⁾.

菌類多様性研究の基礎である分類学は伝統的に形態学的形質に基づき行われてきており、現在でもその重要性は変わらない。この新しい研究分野の与えたインパクトは、形態学的形質・遺伝学的形質・生物学的形質・化学分類学的形質などの諸指標をさまざまな分子生物学的手法によつて比較し、それによって菌類の類縁や系統を客観的に評価できるようになったことである¹³⁾。

さらに、菌類分子系統分類学の進歩は、分類形質の評価にとどまらず、真の菌類の範囲、大き

な系統関係とおおよその分岐年代など、系統進化の問題を解決する重要な鍵となつた。

以上に述べたような近年の分子系統分類学の流れの中で、菌類の塩基配列や分類についての情報を蓄積・提供している公共のオンラインデータベースには、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) や、Tree of life Web Project (<http://www.tolweb.org/tree/>) などがある²¹⁾。

Genbank 内の塩基配列情報からの分類では菌界は1亜界、7門、10亜門、35綱、12亜綱、129目に分類されている。その中で木材腐朽菌は、菌界(the kingdom fungi)、ディカリア亜界(the subkingdom Dikarya)、担子菌門(the phyla basidiomycota)、ハラタケ亜門(the subphyla Agromycota)、ハラタケ綱(the class Agaricomycetes)に属する Agaricomycetidae 亜綱あるいは Agaricomycetes incertae sedis 分類群に分類される(Fig. 1. 3.)。incertae sedis はそれ以降の階層が不明である分類群とされている。

Agaricomycetidae 亜綱では、ハラタケ目(Agaricales)に白色腐朽菌、イグチ目(Bolerales)に褐色腐朽菌が分類されている。Agaricomycetidae 亜綱に分類される主要な住宅害菌には、白色腐朽菌ではスエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)、カイガラタケ (*Lenzites betulina*)、マイタケ (*Grifola frondosa*) 等、褐色腐朽菌ではイドタケ(*Coniophora puteana*)、ナミダタケ(*Serpula lacrymans*)、イチョウタケ(*Paxillus panuoides*)等がある。

Agaricomycetes incertae sedis 分類群では、コウヤクタケ目(Corticiales)、ベニタケ目(Russulales)に白色腐朽菌、キカイガラタケ目(Gloeophyllales)、タバコウロコタケ目(Hymenochaetales)に褐色腐朽菌、サルノコシカケ目(Polyporales)には両腐朽形態の菌が主要な住宅害菌として分類されている。Agaricomycetes incertae sedis 分類群に分類される白色腐朽

菌では、コウヤクタケ目では *Phanerochaete chrysosporium*、*Sistotrema brinkmannii*、*Phlebia livida* など、タバコウロコタケ目ではハリタケモドキ (*Resinicium bicolor*)、ベニタケ目ではヤマブシタケ (*Hericium erinaceum*) などが挙げられる。Agaricomycetes *incertae sedis* 分類群に分類される褐色腐朽菌では、キカイガラタケ目ではキカイガラタケ (*Gleophyllum sepiarium*、マツオウジ (*Lentinus lepideus*) が挙げられる。サルノコシカケ目では、白色腐朽菌としてはカワラタケ (*Trametes versicolor*)、ヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus*)、ホシゲタケ (*Asterostroma apalum*) 等があり、褐色腐朽菌ではオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*)、チョークアナタケ (*Antrodia xantha*)、ワタグサレタケ (*Antrodia sinuosa*) 等がある。

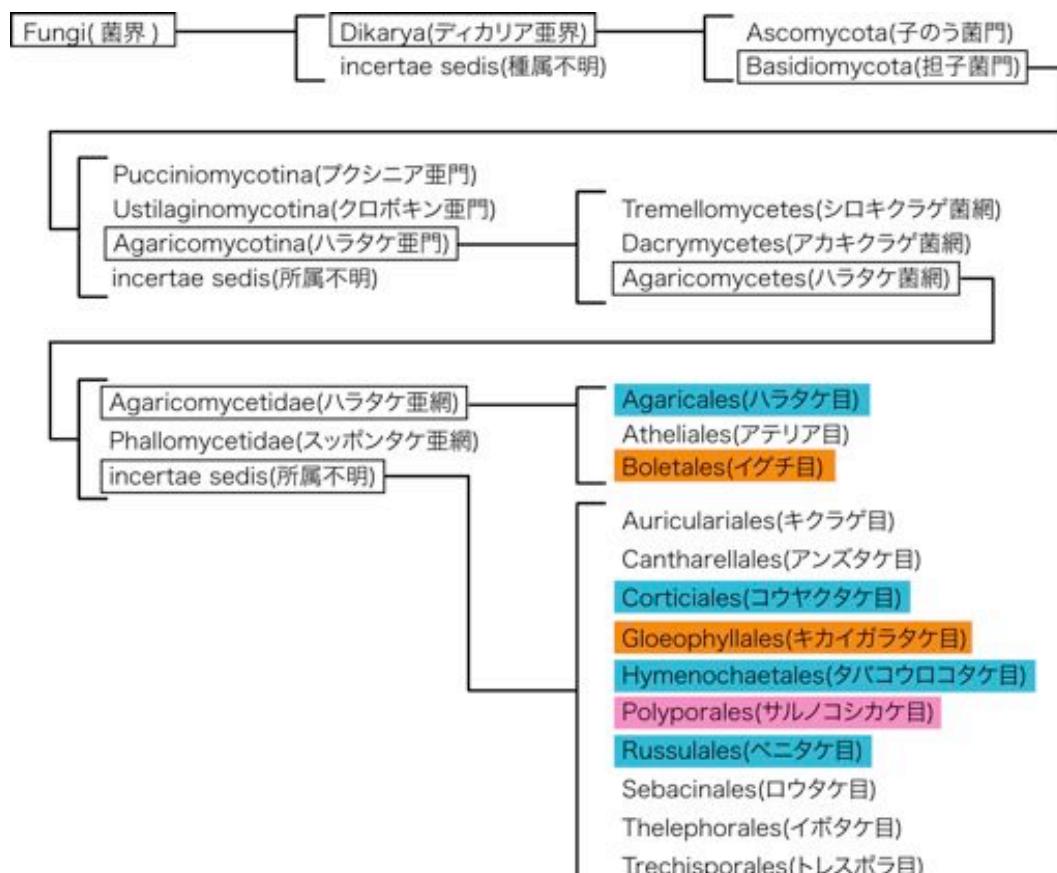


Fig. 1. 3. Taxonomic positions of major wood-rotting fungi in taxonomic order (Japanese name). White-rot fungi (blue), brown-rot (orange) and both of fungi (red frame) are classified as above.

1.3 木材腐朽菌の同定手法

現在、木材腐朽菌の検出には菌糸の形態的な特徴の比較観察に基づいた手法が主流になっている^{9, 22-24)}。しかしこれらの手法は、試験に費やす労力や時間が莫大にかかる、診断者に高い技能と経験が求められる、菌糸形態の観察では担子菌と子嚢菌の区別はできるものの菌種の同定はできないなどの問題点が挙げられる。また、これらの手法は培養を伴うため、培養の時点でスクリーニングされ実際に木材を腐朽している難培養の菌は検出されないという可能性がある²⁵⁾。従って、このように現行の生物劣化の検査・診断技術については未だ目視など感覚に依存する部分が大きく実際の腐朽状況を反映しているとは言い難く、客観的、高信頼性でかつ実用的な診断の技術や基準は確立されていないため、より信頼性の高い技術に基づいた劣化診断法の開発が望まれている^{26, 27)}。

近年菌類の同定を短時間で客観的に行うことができるとされている様々な新規技術が開発されている。木材腐朽菌の検出法として実用的に取り入れられつつある主な手法の一つ目に抗原抗体反応を用いた腐朽診断法が挙げられる^{28, 29)}。抗原抗体反応を利用した腐朽診断法は(株)エス・ディー・エス バイオテックで開発された。現在、家屋の腐朽診断キットを「ウッドチェックー(フマキラー社)」と言う商品名で販売している。これは木材腐朽菌由来の酵素を特異的に認識する抗体を作成し、Dot-Blot 法により判定をしている。この方法は比較的操作が簡易で、かつ小規模の施設でも実施可能な技術であるため、活用を検討できる。しかし抗原抗体反応を利用した腐朽診断法では担子菌の識別はできるが、種名を明らかにすることはできない。そのため、短時間で客観的に菌類の種名を明らかにするとされている遺伝子解析を利用した新規技術が取り入れられるようになった。

現在取り入れられている遺伝子解析を利用した主な手法の一つにPCR-RFLP法が挙げられる。PCR-RFLP法を用いた例として、Schmidtらがナミダタケ(*Serpula lacrymans*(Wulff) P.Karst.)と近縁種のナミダタケモドキ(*Serpula himantoides*(Fr.)P.Karst.)との変異を識別できる制限酵素を検討している³⁰⁾。他にもJasaravichら¹⁹⁾やGlenら³¹⁾がPCR-RFLP法を用いて木材腐朽菌の識別を行っている。日本では堀沢らが日本中のナミダタケをサンプリングし PCR-RFLP 法及び PCR-RAPD 法を用いて種内での変異を見ている³²⁾。RFLP 法は、PCR 産物の中に遺伝子変異部を認識する制限酵素が存在する場合、共通配列部位にプライマーを設定し、その内側、すなわち、PCR 産物内に多型性をもたせて増幅する。PCR 増幅産物を上記制限酵素で切断し、その断片の長さにより、多型の有無を判定する方法である。しかし、この手法は予測可能な種に対してのみ利用可能で、かつ単離した菌のみ種の同定が可能になるので複数種含まれる検体から種の同定を行うのは困難である。

一方、菌類の同定法として種に特異的なプライマーを用いた担子菌識別法も取り入れられている。特異的プライマーを用いた担子菌識別法は菌の単離を行うことなく標的のみの識別、検出が可能である³³⁾。またこれらの PCR 産物の塩基配列をデータベースと比較して種の類縁関係を検証することができる^{34, 35)}。

特異的プライマーの候補として挙げられるのは主にナミダタケ(*Serpula lacrymans*)とイドタケ(*Coniophora puteana*)がある。住宅を構成する部材の劣化は主にナミダタケ(*S. lacrymans*)、あるいはイドタケ(*C. puteana*)を中心とした木材腐朽菌によって引き起こされている例が多いとされており³⁶⁾、北海道林業試験場ではナミダタケに特異的なプライマーを用いたPCR分析を行うことで、ナミダタケを検出し、家屋腐朽を予測している。他にも杉山らがこれらの菌に特異的なプライマ

一を用いて標的のみの識別、検出を行っている³³⁾。さらにこれらの PCR 産物の塩基配列をデータベースと比較して種の類縁関係を検証するまで一連のプロセスとして報告している例も数多く報告されている。これらの手法を利用した実際の腐朽状況の報告がまとめられている報告の一例によるとドイツ北部の建築物は主にナミダタケ、イドタケにより腐朽被害を受けているということであった³⁷⁾。

しかし、これらの菌は培養後目視で判定して標的となった菌であり、培養の時点でスクリーニングされ実際に木材を腐朽している難培養の菌は検出されないという可能性が拭いきれない。それにもかかわらず、今日の PCR 法ではこれら目視で判定した特定の種のみ検出しているため実際の腐朽状況を反映しているとは言い難い。つまり現行の手法は菌の培養や単離をしたり、標的の種のみ検出しているため、実際の腐朽状況を反映していないのが現状である。また、腐朽材試料に対して直接 PCR 法を適用すると、多くの試料が必要であったり、夾雑物による PCR 阻害が起こる可能性もある。

そのため、実際に木材を腐朽している菌を同定する手法の確立はまだ発展段階だと言える。

1.4 本研究の目的

木材腐朽菌は木質構造の強度低下や損壊の大きな原因のひとつになるとされている。このことから、木質住宅や木製外構施設の維持管理のために木材腐朽菌の動態をモニタリングすることは重要な課題と言える。

木材腐朽菌の多くは担子菌に分類されることから、これまで木材腐朽菌のモニタリングは腐朽の疑われる箇所から担子菌を採取・培養し、その菌糸形態を観察することで評価を行ってきた。しかしながら、このような培養を介した手法は、時間と手間が必要とされるだけでなく、難培養性の菌は検出されない、さらに腐朽初期段階における菌の検出ができないなど多くの問題点がある。これに対して、PCR によって増幅された rDNA 断片の塩基配列解析から腐朽菌を同定する手法が最近開発された。本 PCR 法は菌を単離することなく同定できるという利点がある一方で、木材含有成分による PCR 阻害や、鑄型 DNA を得るために多量のサンプルが必要となる等の問題点が残されている。

そこで、本研究ではこれらの問題点を克服したモニタリング手法を確立するため、極微量のゲノム DNA を鑄型として非特異的な DNA 増幅を行う枯草菌ファージ Phi29 DNA ポリメラーゼに着目した。この Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的 DNA 増幅法とその後段に PCR による rDNA 断片の増幅を組み合わせることで、微量試料から担子菌類を同定することが可能となる手法を確立し、さらにその実地試験を行った。また、二種類の木材腐朽菌から抽出したゲノム DNA を混合したサンプルに対して、Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA の非特異的増幅および引き続ぐ PCR による ITS 領域の特異的増幅を行い、得られた PCR 産物に対して PCR-RFLP 法によって増幅条件における混合比の定量性を評価した。さらに腐朽材中の担子菌叢中における各菌の

存在比を定量評価するための DNA 増幅条件について検討した。

参考文献

- 1) 大熊幹章, 有馬孝禮, 川井秀一, 安藤直人, 神谷文夫, 古沢富志雄: "木材の利用・2
木材の工学", 日本木材学会編, 文永堂出版, 東京 (1991), pp.1-4
- 2) 浅野猪久夫, 大熊幹章, 岡野健: "木材と住宅", 学会出版センター, 東京(1982),
pp.54-55, 189.
- 3) 鈴木正治, 増田稔 他: "木質環境の科学", 山田正編, 海青社, 大津(1987), pp.103,
154.
- 4) 則元京: "内装材料の吸放湿性と湿度調節." 建築雑誌 99, 1225 (1984).
- 5) Karjalainen, E., Sarjala, T., Raitio, H.: "Promoting human health through forests: overview
and major challenges." Environ. health prevent. med. 15, 1-8 (2010).
- 6) 増田稔, 服部芳明, 大釜敏正, 宮崎良文 他: "木材科学講座5 環境 第2版", 高橋徹,
鈴木正治, 中尾哲也編, 海青社, 大津(2005), pp. 55-68, 79-84.
- 7) 中島史郎, 大熊幹章: "地球温暖化防止行動としての木材利用の促進—1990年ITEC発表
論文から.", 木材工業 46, 127-131 (1991).
- 8) 屋我嗣良, 河内進策, 今村祐嗣: "保存・耐久性", 屋我嗣良, 河内進策, 今村祐嗣 編,
海青社, 大津, 1997, pp.71.
- 9) 土居修一, 平野雅親, 藤井義久, 桃原郁夫, 森満範 他: "実務者のための住宅の腐朽・
虫害の診断マニュアル", (社)日本木材保存協会編, (社)日本木材保存協会, 東京, 2007,
pp.153-155.
- 10) 庄田洋子, 中村嘉明, 東実千代, 木村菜美: "兵庫県南部震災による木造軸組住宅の被
災調査" 木材保存 21, 178-186 (1995).
- 11) 原口隆英 他: "木材保存学.", (社)日本木材保存協会編, 文京出版, 大阪(1982), pp.
25.
- 12) 芝本武夫 他: "木材保存の知識", (社)日本木材保存協会編,(社)日本木材保存協会,
東京, 1989, pp.33.
- 13) 岩槻邦男, 馬渡峻輔 他: "菌類・細菌・ウィルスの多様性と系統", 杉山純多編, 裳華房,
東京, 2005, pp.37-42.
- 14) Walker, W. D., Doolittle, W. F.: "Nucleotide sequences of 5S ribosomal RNA from four
oomycete and chytrid water molds" Nucleic Acids Res. 10, 5717-5721 (1982).

- 15) Walker, W. D., Doolittle, W. F.: "Redividing the basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences" *Nature* 299, 723–724 (1982).
- 16) Bruns, T. D., White, T. J., Taylor, J. W.: "Fungal Molecular Systematics" *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22, 525–564 (1991).
- 17) Foe, V. E.: "Modulation of Ribosomal RNA Synthesis in *Oncopeltus fasciatus*: An Electron Microscopic Study of the Relationship between Changes in Chromatin Structure and Transcriptional Activity." *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 723–740 (1978).
- 18) 傳法 隆, Dian Hendrayanti, 市村輝宣: “核リボソームRNAの二次構造と分子系統学への利用”, 堀輝三・大野正夫・堀口健雄編, 日本藻類学会, 山形, 2002, pp.33–36.
- 19) Jasalavich, A.C., Ostrofsky, A., Jellison, J.: "Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA", *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4725–4734 (2000).
- 20) Alverts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.: "Molecular biology of the cell, third edition.", Schanck, D., Masson, S., Jeffcock, E., Anderson, M., Granum, S. eds., Garland publishing, 1994, pp.379.
- 21) David S Hibbett, Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E. et. al.: "A higher-level phylogenetic classification of the Fungi" *Mycol. Res.* 111, 509–547 (2007).
- 22) 布村昭夫: “ナミダタケによる建築物の被害とその防除”, *木材保存* 14, 19–30 (1979).
- 23) 神山幸弘: “ナミダタケによる被害の調査”, *木材保存* 21, 48–65 (1982).
- 24) 神山幸弘: “ナミダタケによる被害の調査Ⅱ”, *木材保存* 24, 41–50 (1983). (1983).
- 25) 鎌形洋一: “難培養性微生物の実態に迫る.” *化学と生物* 46, 600–607 (2008).
- 26) 須原弘登: “分子生物学的手法を利用した木材腐朽担子菌の検出および分類”, *木材保存* 30, 192–203 (2004).
- 27) 土居修一: “住宅の腐朽診断技術:現技術の限界と今後求められる技術”, 2003年度夏期日本木材学会生物劣化研究会, 東京, 2003.
- 28) Clausen, C.A.: " Immunological Detection of Wood Decay Fungi", *Internat. Biodeg.*, 39, 133–143 (1996).
- 29) 田中計実, 愛知後貴, 森岡健志: “抗原抗体反応を利用した腐朽診断法の開発”, (社)日本木材保存協会第20回記念年次大会発表論文集, 東京, 2004, p.22–27.

- 30) Schmidt, O., Moreth, U.: "Identification of the Dry Rot Fungus, *Serpula lacrymans*, and the Wild Merulius, *S.himantoides*, by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) " *Holzforschung* 53, 123–128 (1999).
- 31) Glen, M., Tommerup, I. C., Bougher, N. L., O'brien, P. A.: "Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus forests and plantations." *Mycol. Res.* 105, 138–149 (2001).
- 32) Horisawa, S., Sakuma, Y., Takata, K., Doi, S.: "Detection of intra- and interspecific variation of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by PCR-RFLP and RAPD analysis" *J. Wood Sci.* 50, 427–432 (2004).
- 33) 杉山智昭, 森満範, 宮内輝久, 中谷誠, 原田陽: "PCR法による木材腐朽菌の同定." *木材保存* 29, 98–104 (2003).
- 34) Moreth, U., Schmidt, O.: "Identification of Indoor Rot Fungi by Taxon-Specific Priming Polymerase Chain Reaction " *Holzforschung* 54, 1–8 (2000).
- 35) Moreth, U., Schmidt, O.: "Molecular Identity of Species and Isolates of Internal Pore Fungi *Antrodia* spp.and *Oligoporus placenta*" *Holzforschung* 57, 120–126 (2003).
- 36) Schmidt, O.: "Molecular Methods for the Characterization and Identification of the Dry Rot Fungus *Serpula lacrymans*" *Holzforschung* 54, 221–228 (2000).
- 37) Schmidt, O.: " Wood and Tree Fungi", Czeschlik, A. ed., Springer, Hamburg, 2006, pp.207–211.

第2章

非特異的 DNA 増幅と rDNA 断片の PCR 増幅を
利用した担子菌類の同定

2.1 緒言

第 1 章で述べた通り、木材腐朽菌は木材の強度劣化を引き起こすことから、木造住宅の維持管理を考えるときには劣化の原因となる腐朽菌の検出と同定が重要である。しかしながら、木造住宅環境において各木質部材に棲息している木材腐朽菌を系統的に調べた例はない。その原因として、腐朽初期段階では木材中に存在する菌体量が少なく、各木質部材の強度を損ねるこどなく十分量のサンプルを調製することが困難であることが挙げられる。

そこで本章では、これらの問題点を克服するため、Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的な DNA 増幅法に着目した。Phi29 DNA ポリメラーゼは枯草菌 (*Bacillus subtilis*) ファージ Phi29 由来の複製ポリメラーゼ¹⁾のこと、30°C の等温反応で核酸のみを増幅する特性を持つ。アデノウイルスやバクテリオファージ φ 29 における Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA 増幅の一連の反応機構 (Fig. 2.1) は 1994 年 Blanco らによって示された²⁾。まず、1 分子のターミナルプロテイン (terminal protein; TP) が直線状の DNA の 5'末端にプライミングする。次に二本鎖 DNA 結合性タンパク p6 (double-stranded DNA-binding protein p6; DBP p6) が二本鎖 DNA に結合することで構造変化を引き起こし、二本鎖を開裂させる。そこへ TP と Phi29 DNA ポリメラーゼの複合体の TP 部分が親鎖の 3'末端にプライミングすることで Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA 複製が開始される。伸長ステップでは始めに、DBP p6 を解離しながら、リーディング鎖を複製する。Phi29 DNA ポリメラーゼは伸長方向に二本鎖領域が存在する場合はその鎖を解離しながら相補鎖合成を行う鎖置換型 DNA 合成酵素であるため、引きはがされたラギング鎖には一本鎖 DNA 結合性タンパク p5 (single-stranded DNA-binding protein p5; SSB p5) が結合する。このようなリーディング鎖の伸長では、二本鎖 DNA の両端の 5'末端から一本鎖が解離する様子からアシンメトリック

クモードと言われる(Fig. 2.1 Type I)。リーディング鎖の伸長が終了すると Phi29 DNA ポリメラーゼは解離し、引き続き、ラギング鎖の3'末端に TP と Phi29 DNA ポリメラーゼの複合体の TP 部分が再度結合し、ラギング鎖の複製を行う。この際、SSB p5 を解離しながらラギング鎖を複製する。このようなラギング鎖の伸長では、二本鎖 DNA が平行に増幅される様子からシンメトリックモードと言われる(Fig. 2.1 Type II)。

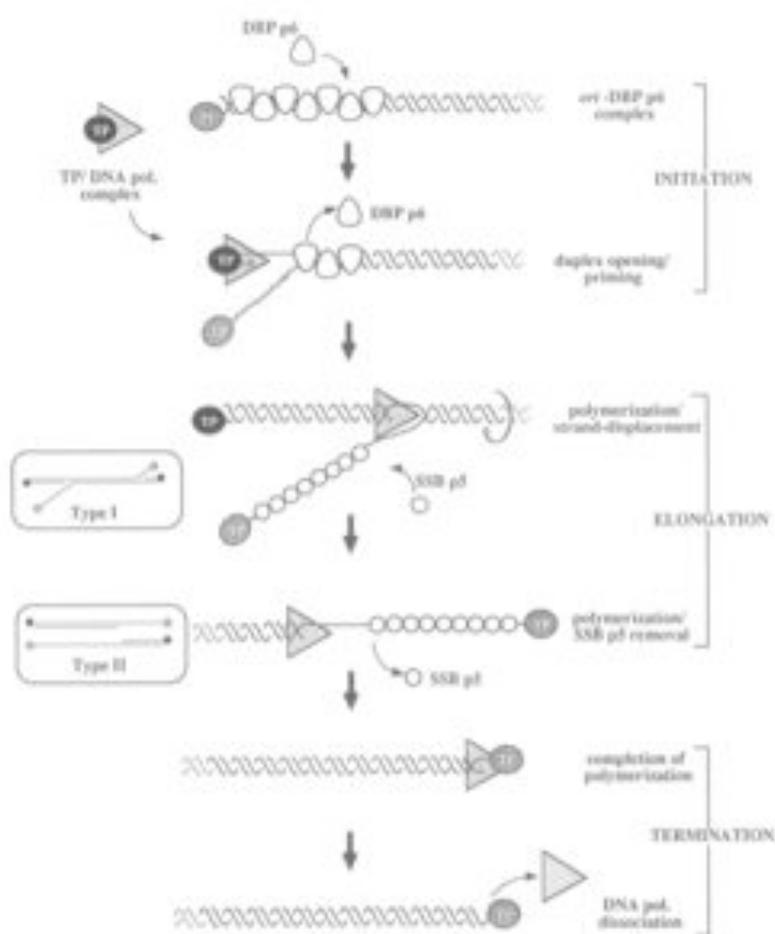


Fig. 2.1. Different stages and viral gene products involved in Phi29 DNA polymerase. (Blanco, L. et. al., 1994)²⁾

この Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA 増幅反応を利用して、合成反応系内で全ての生物の

ゲノムから DNA 増幅を可能にする手法が最近開発された^{3, 4)}。合成反応系内における反応機構は Fig. 2.2 に示した。合成反応系内では TP の代わりに 6 塩基のランダムヘキサマーをプライマーとして用いる。95°C の熱変性でゲノム DNA を一本鎖にした所へランダムヘキサマーをランダムプライミングさせる。この操作により、末端配列からではなくゲノム全体から非特異的に Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA 増幅を行う。

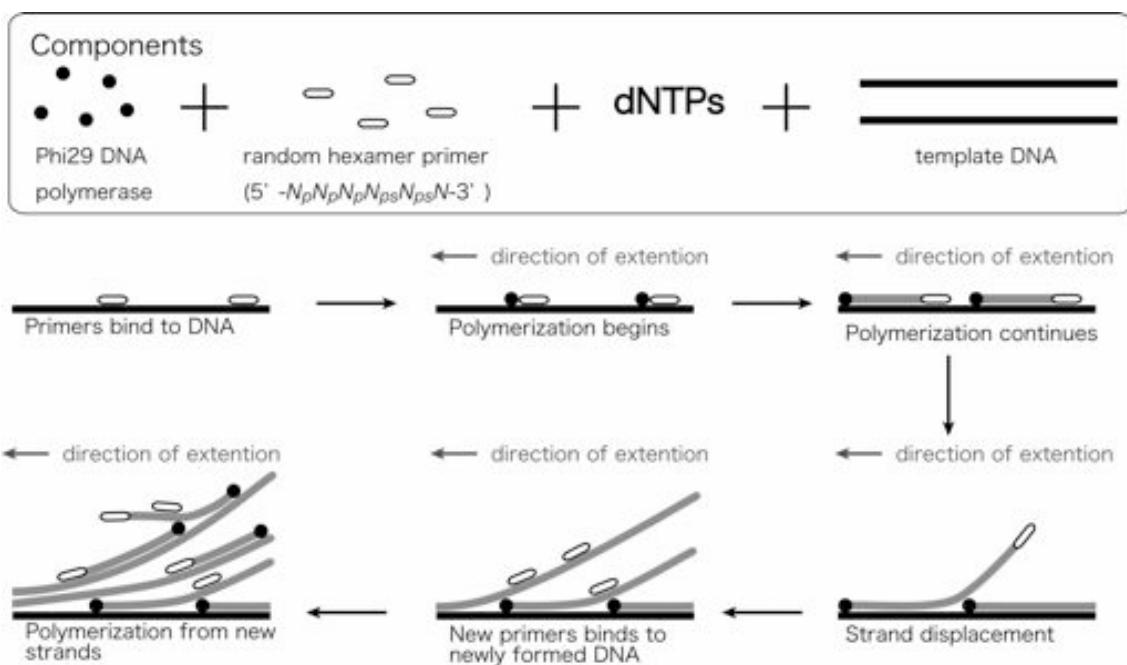


Fig. 2.2. In vitro DNA amplification process using Phi29 DNA polymerase.

Phi29 DNA ポリメラーゼは 70 kb 以上のハイプロセッシブな鎖置換能力を有し⁵⁾、3'-5' エキソヌクレアーゼ校正活性を有している⁶⁾ことから、DNA 増幅断片を長く正確に複製することが可能である。また、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた DNA の非特異的増幅法は簡便で、少量のゲノム DNA からの増幅ができる^{4, 5)}、バイアスが生じにくいと言った利点から PCR 増幅法を組み合わせた種同定⁷⁾やメタゲノム解析、出生前診断や法医学的な DNA 分析、貴重な生物の DNA 保存など

どの様々な目的に使用されている⁸⁾。

本章では、Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的な DNA 増幅と、rDNA 間に挟まれたスペーサー領域である ITS 領域の PCR による増幅を組み合わせることで、微量の胞子から菌株同定することならびに腐朽菌が存在する微量の木粉に本手法を適用することで、培養過程を経ずにそこに棲息する担子菌類を同定することを試みた。さらに、この手法を利用して木造住宅敷地内に埋設したベイトステーション中の木片に棲息する担子菌類の検出ならびに同定を試みた。

2.2 実験方法

2.2.1 指標菌培養木片からのサンプリング

指標菌として*Coniophora puteana*(イドタケ、NBRC 6275)、*Fomitopsis palustris*(オオウズラタケ、FFPRI 0507)および*Trametes versicolor*(カワラタケ、FFPRI 1030)を、ポテトデキストロース寒天培地(DAIGO、和光純薬工業(株))に接種後25°Cで培養し、菌がシャーレ上に蔓延したところで20 mm×10 mm×10 mmの*Cryptomeria japonica*(スギ)辺材木片をそれぞれ二つずつ菌糸上に設置した。1週間後、及び2週間後木片の一部を2.2 ml容マルチチビーズショッカー用ポリプロピレンチューブに採取し、マルチチビーズショッカー(MB601TNSU、安井器械(株))を用いて、液体窒素下、2,500 rpmで5 分間ステンレス製メタルコーンにより破碎した。得られた破碎木粉1 mgを1.5 ml容エッペンチューブに移し、1 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl緩衝液(TE, pH 8.0)40 μlを加えてDNAを抽出した。その後、小型遠心機(Ecan CFM-2100、旭テクノガラス(株))を用いて3,000 x g、5 秒間遠心することで木粉を沈殿させ、得られた上澄みをサンプル溶液とした。

2.2.2 ベイトステーション中の木片からのサンプリング

ベイトステーション用器具キープオフ™(スマキラー・トータルシステム(株))に *Populus tremula*(アスペン)木片(直径60 mm×長さ100 mm)を設置し、木造住宅(東京都町田市、築44年)の周囲 16 カ所に埋設した。設置から約1年後に木片を取り出し、目視による観察を行った。さらに、2.1と同様の方法で得られた木粉約0.1 mgに対して抗体法による腐朽診断(ウッドチェックー、スマキラー・トータルシステム(株)社製)⁹⁻¹⁰を行うとともに、2.1と同様にサンプル溶液を調製した。

2.2.3 Phi29 DNA ポリメラーゼによるゲノムの非特異的増幅

2.2.1及び2.2.2で得られたサンプル溶液中のゲノムDNAを、GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE ヘルスケア バイオサイエンス(株))を用いて非特異的に増幅した。サンプル溶液 1 μ l を 0.2 ml 容 PCR チューブに取り、同キット付属のランダムヘキサマーを含む 9 μ l の Sample buffer を混合した。そのチューブを 95°C、3 分間加温した後、4°Cで急冷した。次にキットに付属の 9 l の Reaction buffer と Phi29 DNA ポリメラーゼを含む 1 μ l の Enzyme mix を加え、温度 30°Cで 18 時間静置し、ゲノムDNA の増幅反応を行った。その後 65°C、10 分間の熱変性を行うことで反応を終了した。反応液 1 μ l を 1.0 %アガロースゲルで電気泳動した後、ゲルをエチジウムプロマイトで染色することにより、ゲノム DNA が増幅されていることを確認した。さらに Gene Spec I (7A0-0010、日立那珂インスツルメンツ(株))を用いて、反応液中のDNA量を 260 nm における吸光度(吸光係数:0.02 μ l $\text{ng}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)より定量した。

2.2.4 PCR による ITS 領域の増幅

2.2.3 で非特異的に増幅された DNA 溶液を鉄型として rDNA ITS 領域の増幅を行った。PCR に使用するプライマーは、Fig. 2.3 に示すように、保存性の高い領域である 18S、28S rDNA 遺伝子配列中の糸状菌特異的フォワードプライマー (ITS1-F; 5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAAAAGTCGT -3')¹¹⁾と担子菌特異的リバースプライマー (ITS4-B; 5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG -3')^{12, 13)}を選定した。PCR は 0.2 ml 容 PCR チューブに反応液が以下の組成(終濃度)になるように調製した: 5 μ M フォワードおよびリバースプライマー、10 mM Tris-HCl(pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs。そこ

に 2.3 で得られた 1 μ l の鋳型 DNA 溶液と 200 ユニットの DNA ポリメラーゼ KOD-Plus-(東洋紡績(株))を加え、最終容量が 25 μ l になるように調製した。PCR 増幅は、熱変性 94°C、30 秒、アニーリング 60°C、30 秒、伸長反応 68°C、1 分を 1 サイクルとする反応を 30 サイクルの条件で、サーマルサイクラー (iCycler、バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)) を用いて行った。その後、68°C で 1 分間伸長反応させた後 4°C で反応を止めた。PCR による DNA の増幅を確認するために、反応液 1 μ l をサンプリングし、2.0 %アガロースゲル上で電気泳動を行った。

2.2.5 クローニング及び核酸配列のシーケンス

2.2.4 で得られた増幅断片を、pCR® 4 Blunt-TOPO®ベクター (インビトロジエン(株)) にライゲーションし、*Escherichia coli* JM109 コンピテントセル (タカラバイオ(株)) を形質転換した。アンピシン (100 μ g/ml) を含む Luria-Bertani 寒天培地プレート上で一晩培養して得られた形質転換株に対応する白色コロニー 10 個を任意に選択し、50 μ l TE に懸濁した後、TempliPhi DNA Amplification Kit (GE ヘルスケア バイオサイエンス(株)) を用いてマニュアルに従ってプラスミド DNA の増幅を行った。増幅されたプラスミド DNA を鋳型に DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE ヘルスケア バイオサイエンス(株)) を用いてシーケンシング反応を行い、ITS 領域の塩基配列を DNA シーケンサー (SQ5500E、(株) 日立ハイテクノロジーズ) によって決定した。

2.2.6 塩基配列の解析と菌株同定

2.2.5 で得られた塩基配列を用いて、米国立医学図書館の生物工学情報センター (National

Center for Biotechnology Information、NCBI)の相同性検索アルゴリズム(Basic Local Alignment Search Tool using a nucleotide query, blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)による解析を行った。アライメント表示数(Max target sequences=10)以外の他の検索パラメータは、全てデフォルトで行った。

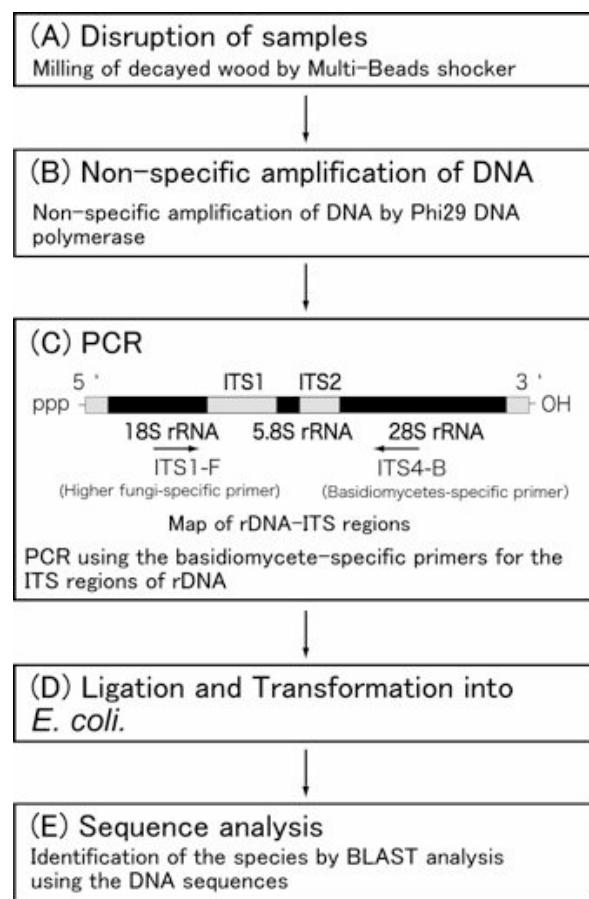


Fig. 2.3. Experimental scheme

2.3 結果

2.3.1 指標菌培養木片中に存在する担子菌種の同定

指標菌を接種した各木片を破碎、懸濁して得られたサンプル溶液 1 μ l 中に含まれるゲノム DNA を Phi29 DNA ポリメラーゼを用いて 18 時間増幅したところ、培養日数に関わりなく全てのサンプル溶液で DNA の増幅が観察された(Fig. 2.4)。分子量マーカーとの比較により、増幅された DNA の塩基配列長は 2×10^3 – 2×10^4 bp 程度であることを確認した。また、260 nm における吸光度測定により、18 時間の反応で約 50 ng/ μ l 以上の DNA が得られることを明らかにした。これに対して、Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅反応を行わなかったサンプル(0 h)では電気泳動上で明瞭なバンドを与える増幅は見られなかった。さらに、Fig. 2.5 に示したように、増幅された DNA を鋳型にして担子菌 rDNA の ITS 領域に特異的なプライマー対を用いて PCR を行った結果、ITS 領域に由来すると考えられる 600–700 bp 程度のバンドが検出できた。一方、Fig. 2.3 で示した Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅反応では、TE を入れたコントロールでも DNA の増幅が見られたが、Fig. 2.4 に示したように、鋳型に担子菌の rDNA の ITS 領域に特異的なプライマーを用いた PCR では、コントロールの増幅産物では ITS 領域に対応する DNA の増幅は認められなかった。

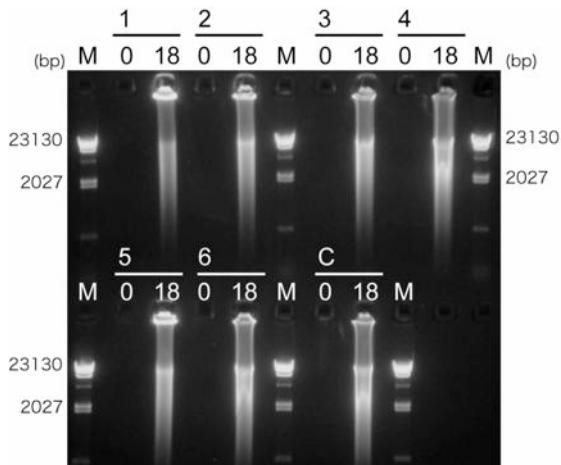


Fig. 2.4. Non-specific amplification of genomic DNA from wood blocks (1, 2: *Coniophora puteana*, 3, 4: *Trametes versicolor*, 5, 6: *Fomitopsis palustris* and C: no template control).

Odd-numbered: 1 week after inoculation and even-numbered wood block samples: 2 weeks after inoculation. Lane M: size maker (λ Hind III digest), 0: non-amplified and 18: amplified products.

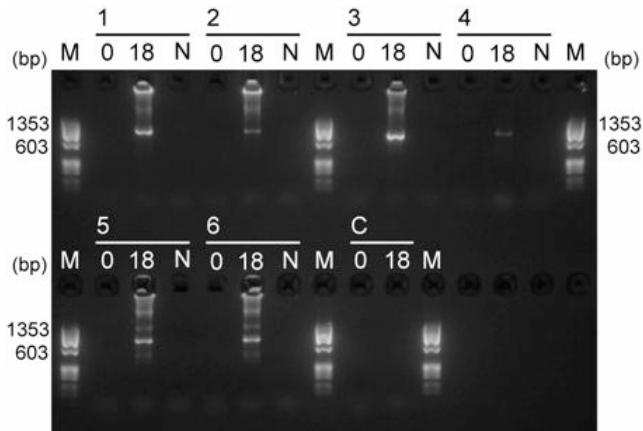


Fig. 2.5. PCR using the specific primers for the ITS regions of basidiomycetes rDNA and the DNA templates amplified by Phi29 DNA polymerase originated from wood blocks (1, 2: *Coniophora puteana*, 3, 4: *Trametes versicolor*, 5, 6: *Fomitopsis palustris* and C: no template control).

Odd-numbered: 1 week after inoculation and even-numbered wood block samples: 2 weeks after inoculation. PCR templates were obtained from solution before (0) and after (18) the amplification by Phi29 DNA polymerase and supernatant of milled wood blocks. Lane M is size marker (ϕ x 174 Hae III digest).

植菌後 1 週間(試料1、3、5)または 2 週間(試料 2、4、6)経過した木片からサンプル溶液を調製し、Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅および rDNA の ITS 領域を PCR で増幅して得られた塩基配列を Fig. 2.6.に示す。これらの塩基配列を用いて BLAST 検索を行ったところ、Table 2.1.に示すように試料 1 と 2 では *Coniophora puteana* (Accession no. AM293089, Taxonomy ID 80637) に対して 99–98 %、試料 3 と 4 では *Trametes versicolor* (Accession no. AY840588, Taxonomy ID 5325) に対して 99 %、試料 5 と 6 では *Fomitopsis* sp. IMER2 (Accession no. EU015881, Taxonomy ID 457565) に対して 100 %の相同性があるという結果になった。試料 3 と 4 では *Trametes* 属以外に *Phellinus igniarius*(キコブタケ)が候補としてあげられたが、この配列が *Trametes versicolor* の配列と極めて高い相同性を示すことが原因と考えられた。試料 5 と 6 の結果で複数の菌種が候補として挙げられたので、ClustalW を用いて相同性が高いとされた上位 10 種の ITS 領域を系統樹解析したところ、*Fomitopsis palustris* と *Fomitopsis pinicola* はそれぞれが属するグループに大きく分かれたが、試料 5 と 6 の配列は *Fomitopsis palustris* のクレードに含まれたことから、*Fomitopsis palustris* であると同定された。

(A) Sample 1,2 (*Coniophora puteana*)

ITS1

```

1 TCGATTCAAACCAAAATGAGAGGGAAGTTGTATAGTAGTGTGGCCCTGTGTCATGGAGGT 60
61 ATTGTGACGCTCGACTTCTTCTTCTCATTACACACTGTGAACCTGTGTTAGGGT 120
121 TGTCGCAAGAGACGCTCTATGTTCTATATACTCCATACTGTGTTAGAATGTAC 180
181 CTTTTGCTCTCGTCAAGAGACAAAAATAAAGCCTT 215

```

ITS2

```

1 TTAAATTCTCAACTCTCTTGTGATTTCTCAAAGGCAGGCTGGATCTGGAGGCCCTGCC 60
61 GGCTGTGAAGTCGGCTCTCTGTGAAAGCATGGTAAAGACGTATTGATGCTGCTGTAA 120
121 GGAGGTGTGCTGGCTCTGTAAATGGAGGTGGTATCAGGTGGCCCTTCGGTGTGATA 180
181 ATGATCACCGTGGCTAGCTGGCTATTAATGTCATGCTACTTGCTACTTTCCATTG 240
241 ACTTGGAAAAAAGCACTTGGACCATTTG 269

```

(B) Sample 3,4 (*Trametes versicolor*)

ITS1

```

1 AATTCTCAACTTATAAACTCTTGATCTATAAGCTGGACTTGGAGGCCCTGCTGGCCCT 60
61 TTGGTCGGCTCTCTTGAATGCAATTAGCTGATTCCTGACGGATGGCTCTCAGTGTG 120
121 ATAATTGTCACGCTGTGACCGTGAAGTGTGTTGGCGAGCTCTAACCGTCCATTAGGAC 180
181 AACTTTTAACAT 193

```

ITS2

```

1 AATTCTCAACTTATAAACTCTTGATCTATAAGCTGGACTTGGAGGCCCTGCTGGCCCT 60
61 TTGGTCGGCTCTCTTGAATGCAATTAGCTGATTCCTGACGGATGGCTCTCAGTGTG 120
121 ATAATTGTCACGCTGTGACCGTGAAGTGTGTTGGCGAGCTCTAACCGTCCATTAGGAC 180
181 AACTTTTAACAT 193

```

(C) Sample 5,6 (*Fomitopsis palustris*)

ITS1

```

1 ATGAATTGGAAAGGGGTTGTAGCTGGCGCTCTTGGGGCGCATGTGACGCCCTGA 60
61 TCACTATCCATCTCACACACCTGTGCACACACTGTAGGTTGGCTGTGATTGGAGCTTAC 120
121 AGCTTCATTTGACTTTGCTGGTTGGAGGCCCTCTATGTTATACAAACTACTTCA 180
181 GTTAAAGAATGACTCTTGCCTAACGCATTAAATA 219

```

ITS2

```

1 AATTCTCAACTCTATTGCTTGTGAATAGAGCTGGATTTGGAGGTTTATTGCTGGTA 60
61 TTGGATCGCTCTCTTGAATGCAATTAGCTGACCTTGGGATCAGCTATCGGTG 120
121 GATAATTGTCACGCCGTTGCACTGAAGCATATCAATGGCTGGCTCCAATCGCTT 180
181 TACTGGACAATGACTTTGACCT 202

```

Fig. 2.6. Sequences of ITS regions from basidiomycetes in wood blocks.

Table 2.1. BLAST analysis of ITS1–5.8S rDNA–ITS2 region amplified from wood blocks.

Sample	Homology ranking	Species	Sequence homology
1, 2	1–10	<i>Coniophora puteana</i>	640–641/642 (99 %)
3, 4	1–6	<i>Trametes versicolor</i>	534–533/535 (99 %)
	7	<i>Trametes</i> sp. GI 304 <i>Phellinus</i>	532/535 (99 %)
	8	<i>igniarius</i>	532/535 (99 %)
	9–10	<i>Trametes versicolor</i>	531–532/535 (99 %)
5, 6	1	<i>Fomitopsis</i> sp. IMER2	579/579 (100 %)
	2	<i>Fomitopsis palustris</i>	578/579 (99 %)
	3	<i>Fomitopsis</i> sp. FFI 143	573/579 (98 %)
	4–5	<i>Fomitopsis pinicola</i>	538–539/583 (92 %)
	6	Uncultured basidiomycete	537/584 (91 %)
	7	Unidentified basidiomycete	537/584 (91 %)
	8–10	<i>Fomitopsis pinicola</i>	537/584 (91 %)

2.3.2 ベイトステーションに設置した木片からの担子菌の検出と同定

Fig. 2.7.に示すように、木造住宅敷地内 16 カ所にアスペン材を設置したベイトステーションを埋設した。

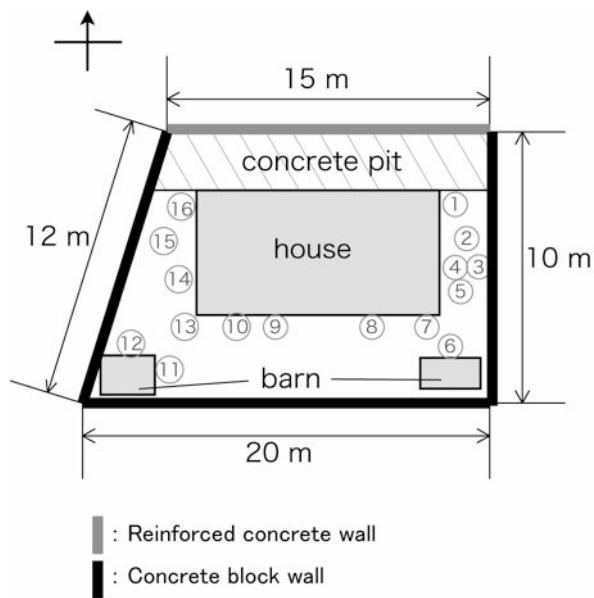


Fig. 2.7. Location of bait stations.

設置 1 年後に各ベイトステーションから木片を取り出し、目視および抗体法を用いて腐朽度合を比較したところ、Fig. 2.8.に示すように、両者における腐朽判定結果は良く一致したが、目視では腐朽が観察されない検体においても抗体法によっては陽性と判定される場合もあった。また、

2.3.1 と同様に、各ベイトステーション内の木片を破碎、懸濁して得られたサンプル溶液を調製し、これに対してゲノム DNA の非特異的増幅と PCR による ITS 領域の増幅を行った。それぞれの増幅過程で DNA の増幅を確認した(データ不掲載)。また、16 箇所に埋設した各ベイトステーションの木片から調製したサンプル溶液に対して増幅された DNA 断片をそれぞれ大腸菌中にクローニングし、各プレートから 10 クローンずつを採取し、その塩基配列の解析を試みた。ただし、設

置箇所3、4、5、7、8、9、16から得たサンプルについては生成したコロニー数が10コロニーに満たなかつたため、これについては全てのコロニーを採取し塩基配列の解析を試みた。その結果、合計 103 の検体について目的とする ITS 領域の塩基配列を取得することができた。さらに、BLAST 検索に供して相同性解析を行ったところ、92 検体についてはデータベース上に登録された配列と相同性を有していた。しかしながら、残りの 11 検体についてはデータベース上に配列情報が登録されていない未知配列であった(Table 2.2)。また、塩基配列の解析ができた 103 検体のうち 80 検体については、データベース上に種名あるいは属名が登録されている担子菌と 92–100 %の相同性で対応が取れた。このようにして、同定された 80 菌種は 10 属 17 種にも及んでいたことから、一軒の住宅敷地内でも環境の違いによって様々な菌が存在していることが確認された。また、ベイトステーションの設置場所に依存して、検出された菌種は大きく異なっていた。このうち、*Sistotrema brinkmannii*(21 検体)、*Polyporus tuberaster*(12 検体)、*Trametes hirsuta*(12 検体)、*Resinicium bicolor*(10 検体)、以上の4種の菌株が 103 検体中 55 検体と過半数を占めていた。また、*Trametes* 属としては、*Trametes hirsuta*(12 検体)、*Trametes maxima*(3 検体)、*Trametes versicolor*(3 検体)、*Trametes ochracea*(1 検体)、*Trametes* sp.(3 検体)と多数の種の存在が確認された。さらに、存在が確認された木材腐朽担子菌で褐色腐朽菌は *Coniophora puteana*のみで、それ以外は全て白色腐朽菌であった。なお、92 検体中 13 検体は、データベース上には相同性の高い配列情報は登録されているが、属種が未同定の菌(uncultured fungus)であることがわかつた。さらに、遺伝子解析に基づく菌株の同定結果と目視および抗体法による腐朽診断結果を比較したところ、*Trametes* 属および *Polyporus tuberaster* は主に目視および抗体法で腐朽が進行していたと判断された箇所から多く検出されたのに対して、*Sistotrema*

*brinkmannii*はベイトステーションの設置場所や腐朽度合に関わりなく検出された。

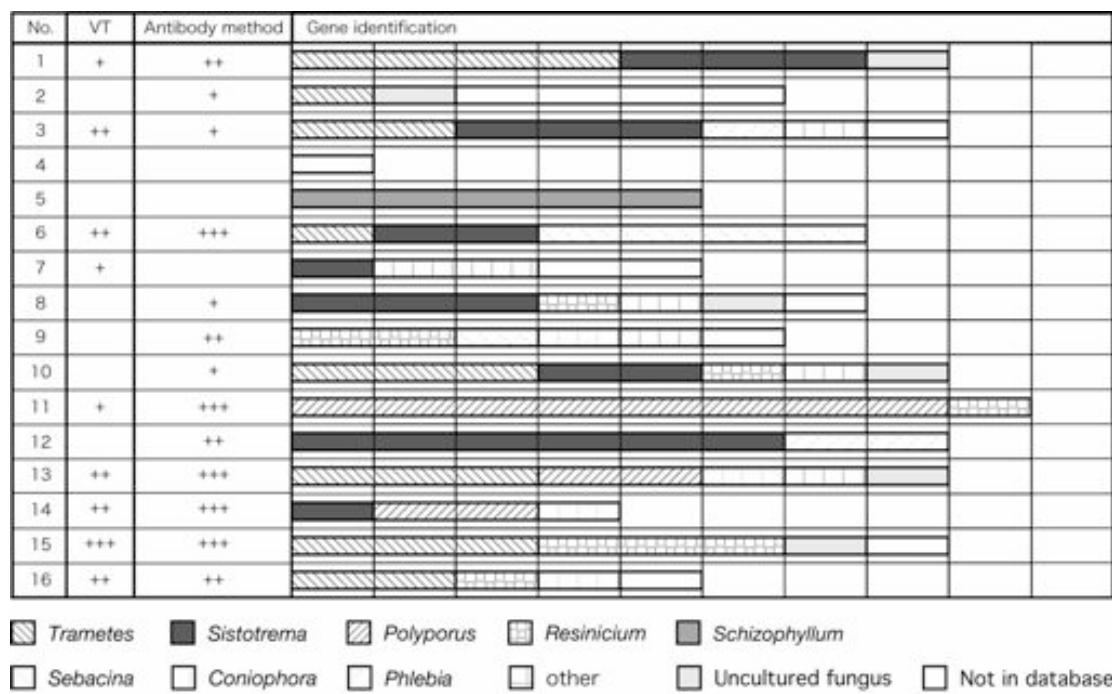


Fig. 2.8. Distribution of fungal genera identical from bait stations.

No: location number, VT: visual test

Table 2.2. List of identified basidiomycetes.

Specific name (Japanese name)	Population	Homology (%)	Recital
<i>Coniophora puteana</i> (イドタケ)	4	98-100	B. R.
<i>Cryptococcus saitoi</i>	1	100	
<i>Hericium erinaceum</i> (ヤマブシタケ)	1	94	W. R.
<i>Phanerochaete chrysorhiza</i> (ヒイロハリタケ)	1	96	W. R.
<i>Phanerochaete sordida</i> (ウスキイロカワタケ)	1	99	"
<i>Phlebia livida</i>	3	92-95	W. R.
<i>Polyporus tuberaster</i> (タマチョレイタケ)	12	94-95	W. R.
<i>Resinicium bicolor</i> (ハリタケモドキ)	10	93-95	W. R.
<i>Schizophyllum amplum</i>	2	95-99	W. R.
<i>Schizophyllum commune</i> (スエヒロタケ)	2	99	"
<i>Schizophyllum</i> sp.	1	99	"
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	21	99-100	"
<i>Trametes hirsuta</i> (アラゲカワラタケ)	12	94-96	W. R.
<i>Trametes maxima</i>	3	96	"
<i>Trametes ochracea</i>	1	98	"
<i>Trametes versicolor</i> (カワラタケ)	2	92-93	"
<i>Trametes</i> sp.	3	92-96	"
Basidiomycete sp.	1	95	
Mycorrhizal basidiomycete	1	99	
Salal root associated fungus UBCTRA	5	94-96	
Uncultured fungus	5	93-100	
not in database	11		
Total	103		

B. R.: brown rot fungi, W. R.: white rot fungi

2.4 考察

本研究では、PCR によって ITS 領域を増幅する前段階に Phi29 DNA ポリメラーゼとランダムヘキサマーを用いた非特異的なDNA 増幅行程を組み込み、少量のサンプル中に含まれる担子菌の検出と同定を試みた。

上述の手法に関しては、すでにアーバスキュラー菌根菌の胞子を試料として非特異的増幅法を用いて同定まで行った報告例はあるが¹⁴⁾、菌糸からの同定は報告例がない。実験 2.1 の指標菌を用いた実験では、Table 2.1.に示すように木片中からでも寒天培地に植菌したものと同一の菌株が同定できた。これは、寒天培地から木片へと菌糸が侵入し、木片を栄養源としながら成長している状態、つまり腐朽が進行し始めた状態の木片を試料とした同定が可能であることを示している。このように Phi29 DNA ポリメラーゼによるDNA の増幅を PCR の前段階に組み入れることで、PCR による増幅だけでは困難と考えられる約 1 mg 程度の木粉試料でも、その中に存在する木材腐朽菌の菌種同定を行うのに十分なDNA 量(50 ng/ μ l)を取得することが可能であった。

指標菌を用いた実験では、Table 2.1 に示すように試料 1 と 2 から得られた塩基配列は *Coniophora puteana* 由来の配列が多数ヒットしたのに対して、試料 3 と 4、および試料 5 と 6 では複数の菌種が候補として挙げられていた。また、*Fomitopsis palustris* を植菌した試料 5 と 6 から得た塩基配列データは、データベースに登録されている配列(Accesion no. DQ491404、*Taxonomy ID 186125*)に対しては 99 %の相同性であり、データベース上で種名の記載がない *Fomitopsis* sp. (ツガサルノコシカケ属) 菌に対しては 100 %の相同性を示した。以上の結果は、本手法を用いた菌種の同定には、信頼できる ITS 領域の塩基配列およびデータベースの充実が不可欠であることを示していた。

住宅周囲にベイトステーションを埋設し、そこに設置された木片に生息する担子菌の同定を試みたところ、目視および抗体法によって腐朽されていると診断された木片からは主に *Trametes* 属と *Polyporus tuberaster* が同定された。しかしながら、データベース上に Uncultured fungus として登録されている菌と相同性が高い 5 菌種も検出されたことから、本手法は腐朽材中に存在する難培養性担子菌の検出にも有効であることが示された。今回の実験では、*Sistotrema brinkmannii* や *Phlebia livilida* などが木片中に存在する主要な菌種として検出されたが、これらの菌種はこれまでに国内では報告された例は無い。また、*S. brinkmannii* および *P. livilida* の検出は目視、および抗体法で腐朽が進んでいると判定された結果とは必ずしも相関性は認められなかつた。実験に用いたアスペン材が輸入材であることを考え合わせると、これらの菌は木片中に設置以前から存在していた可能性も否定できない。その他に検出された主な菌種として *Trametes* 属、*Polyporus* 属、*Coniophora* 属、*Resinicium* 属が挙げられる。*Trametes* 属、*Polyporus* 属、*Coniophora* 属の検出は腐朽状態の進行と相関性が高く、*Resinicium* 属は南西側に偏って存在していた。Schmidt らの報告によると、ドイツ北部の建築物の約 60.9 % が *Serpula lacrymans*、約 8.0 % が *Coniophora puteana* により腐朽被害を受けているということであった¹⁵⁾。しかしながら、本実験で検出された褐色腐朽菌は *Coniophora puteana* だけであり、他のほとんどが白色腐朽菌に分類されている菌種であった(Fig. 2.9.)。本実験で検出された木材腐朽菌の分類学的位置はの通りであり、キカイガラタケ目以外の目に属する木材腐朽菌が検出され、その中でもコウヤクタケ目が多く検出された。その理由の一つとしては、褐色腐朽菌の多くは針葉樹を、白色腐朽菌の多くは広葉樹を腐朽することが知られており¹⁶⁾、設置した木片が広葉樹のアスペン材であったことが挙げられる。日本の住宅では部材として主に針葉樹材が使用されていることから¹⁷⁾、今後、針葉

樹材に本手法を適用した実験が必要と考えられる。

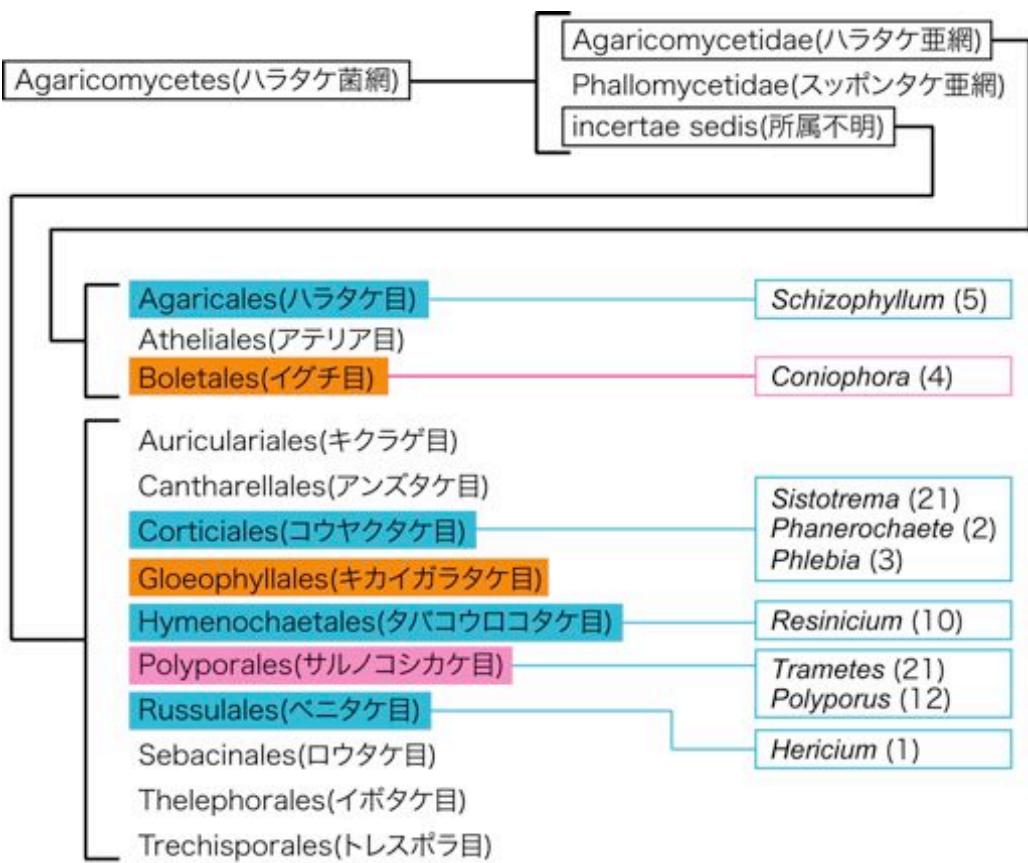


Fig. 2.9. Taxonomic positions of identified wood-rotting fungi from bait stations.

Figures in parenthesis indicate populations of fungi. White-rot fungi (blue), brown-rot (orange) and both of fungi (red frame) are classified.

本手法は微量の腐朽材試料から簡便かつ迅速に菌の種同定を行えることから、木質外構施設や木造住宅に棲息する木材腐朽菌のモニタリングならびにこれらの木質構造物の維持管理手法を考案していくための一助として利用できることが期待される。また、本手法を用いて保存処理木材から薬剤耐性菌を検出することや、木材腐朽菌生育の樹種特性に関するデータベース構築、さらに木材腐朽菌分布の地域環境マップ作成などを行っていくことも可能であると考えられる。

参考文献

- 1) Blanco, L., Salas, M.: "Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5325–5329 (1984).
- 2) Blanco, L., Lázaro, J. M., Vega, M. D., Bonnin, A., Salas, M: "Terminal protein-primed DNA amplification" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 12198–12202 (1994).
- 3) Blanco, L., Salas, M. (1985). Proc. Nati. Acad. Sci. 82, 6404–6408.
- 4) Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. and Sermon, K.: "Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification", Hum. Mutat. 27, 496–503 (2006).
- 5) Blanco, L., Salas, M.: "Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication" J. Biol. Chem., 264, 8935–8940 (1989).
- 6) Germendia, C., Bernad, A., Esteban, J. A., Blanco, L., Salas, M.: "The bacteriophage phi 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme" J. Biol. Chem., 267, 2594–2599 (1992).
- 7) Gadkar, V., Rillig, M. C.: "Application of Phi29 DNA polymerase mediated whole genome amplification on single spores of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi", FEMS Microbiol. Lett. 242, 65–71 (2005).
- 8) Lovmar, L., Syvänen A. C.: "Multiple displacement amplification to create a long-lasting source of DNA for genetic studies", Hum. Mutat. 242, 27, 603–614 (2006).
- 9) Clausen, C.A.: " Immunological Detection of Wood Decay Fungi", Internat. Biodeg., 39, 133–143 (1996).
- 10) 田中計実, 愛知後貴, 森岡健志: "抗原抗体反応を利用した腐朽診断法の開発", (社)日本木材保存協会第20回記念年次大会発表論文集, 東京, 2004, p.22–27.
- 11) White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J. W.: "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J., White, T.J. eds., Academic Press, San Diego, 1990, pp.315–324.
- 12) Gardes, M., Bruns, T. D.: "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts", Mol. Ecol. 2, 113–118 (1993).

- 13) Jasalavich, A.C., Ostrofsky, A., Jellison, J.: "Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA", *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4725–4734 (2000).
- 14) Gadkar, V., Rillig, M. C.: "Application of Phi29 DNA polymerase mediated whole genome amplification on single spores of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi", *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 65–71 (2005).
- 15) Schmidt, O.: "Wood and Tree Fungi", Czeschlik, A. ed., Springer, Hamburg, 2006, pp.207–211.
- 16) 鈴木利克 他: "木材保存学入門改訂2版", (社)日本木材保存協会編, (社)日本木材保存協会, 東京, 2001, pp.39–42.
- 17) 屋我嗣良, 河内進策, 今村祐嗣: "保存・耐久性", 屋我嗣良, 河内進策, 今村祐嗣編, 海青社, 大津, 1997, pp.71.

第3章

木材腐朽菌叢の定量的評価を目的とした DNA増幅条件に関する評価

3.1 緒言

第2章で示した研究の成果により、Phi29 DNAポリメラーゼによる非特異的DNA増幅を、rDNAの内部転写スペーサー、ITS領域のPCRによる増幅に組み合わせた手法を用いて、微量サンプルから培養過程を経ないで担子菌を同定できる手法を開発し、その手法を用いて家屋敷地に設置したベイトステーション内の腐朽木材片に棲息する木材腐朽菌の同定を行った結果、腐朽木材中には多種の担子菌が共存することを明らかにした¹⁾。

以上のことから、さらに木材中での各担子菌種の量比を求めることが、それぞれの菌の腐朽への関与を定量的に評価するためには重要であると考えた。そこで第3章では、そのための手法を開発することを目的に、二種類の木材腐朽菌、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium*、および褐色腐朽菌 *Postia placenta*からゲノムDNAを抽出し、その後、これらを混合したサンプルに対して、Phi29 DNAポリメラーゼによるDNAの非特異的増幅および引き続くPCRによるITS領域の特異的増幅を行った。得られたDNA産物に対してPCR-RFLP法によって増幅条件における混合比の定量性を評価した。さらに、リアルタイムPCR装置を用いて増幅産物の融解挙動を調べ、PCR-RFLPによって得られた結果を検証した。これらの結果に基づき、腐朽材中の担子菌叢中における各菌の存在比を定量評価するためのDNA増幅条件を設定することを試みた。

3.2 実験方法

3.2.1 供試菌ならびにサンプル調製

Phanerochaete chrysosporium NBRC 101254 株と *Postia placenta* NBRC 103933 株をポテトデキストロース寒天(日本製薬(株))プレート上で 26.5°C、1 週間培養した。両菌をそれぞれ接種したプレートを直径 1 cm の円形に切り出し、500 ml 容三角フラスコ内に調製された 30 ml のポテトデキストロース液体(Sigma-Aldrich)培地に加え 26.5°Cで 10 日間静地培養した。その後、ガラス纖維濾紙(ADVANTEC)を用いて水分を除去した後得られた菌糸を 50 ml 容ポリプロピレン製チューブに移し、チューブを液体窒素で凍結後-80°Cで保存した。

凍結した菌糸約 1 g を滅菌済の 2 ml 容ポリプロピレン製破碎チューブに移し、直径 6 mm、長さ 14 mm のステンレス製のメタルコーン(MC-0214R、安井器械(株))を入れたのち、マルチビーズショッカー(MB601TNSU、安井器械(株))を用いて、液体窒素下、2500 rpm で 8 分間破碎した。破碎後、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて、本キットのマニュアルに従って菌糸からDNAを 100 µl の 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液(TE, pH 8.0)に溶出した。溶出されたDNAはただちに Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅の鉄型として用いた。

3.2.2 Phi29 DNA ポリメラーゼをもちいた非特異的増幅

上述の方法で抽出した *Ph. chrysosporium* のゲノム DNA 溶液を 0.1~10 pg /µl になるように希釈した溶液 1 µl、10x reaction buffer 1 µl、100 mM S 化ランダムヘキサマー(5'-NpNpNpNpsNpsN-3'; Sigma-Genosys) 2 µl、超純水 2 µl を 0.2 ml 容 PCR チューブに加え、95°C、3 分間熱処理を行い、その後、ただちに氷上で冷却した。次に、25 mM dNTPs 1 µl、100

mM ジチレイトール 0.1 μ l、100 ユニット/ μ l Phi29 DNA ポリメラーゼ 1 μ l (RepliPHITM、EPICENTRE)、超純水 2.9 μ l を加えて全量を 10 μ l にした後、30°C、1~24 時間反応させた。その後、65°C で 10 分間処理して反応を終了させた。反応液 1 μ l を、GelRedTM (Biotinum)を添加した 1%アガロースゲル上で電気泳動した後 UV イルミネーター上で可視化することで DNA の増幅を確認した。また、反応液中の DNA 濃度を調べるために、反応液 1 μ l と PicoGreen[®]二本鎖 DNA 定量キット(Invitrogen)に付属の PicoGreen[®]二本鎖 DNA 定量試薬 1 μ l、TE 198 μ l を 96 ウェルプレートに分注し、蛍光マイクロプレートリーダー(Fluoroskan Ascent[®]、Thermo Fisher Scientific Inc.)で蛍光強度を測定した(励起 480 nm、蛍光 520 nm)。本キットに付属の濃度既知 Lambda DNA standard を用いて、DNA 濃度の検量線を作製した。各反応液とも同様の操作を 3 回行い、その平均値を定量値とした。

次に *Ph. chrysosporium* および *Po. placenta* のゲノム DNA を単独、または等量混合した溶液(1 pg / μ l)を、上述のように Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅反応を 30°C、7 時間または 18 時間行い、65°C、10 分間処理することで反応を終了させた。これらの反応液についても上述のように電気泳動によってDNAの増幅を確認した後、引き続くPCR-RFLP 分析および融解曲線解析の鋳型 DNA として用いた。

3.2.3 PCR-RFLP 分析

非特異的増幅を 7 時間または 18 時間行って得られた反応液 1 μ l、10 μ M ITS1-F フォワードプライマー²⁾(5' - CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA -3') 0.8 μ l、10 μ M ITS4-B リバースプライマー^{3, 4)} (5' - CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG -3') 0.8 μ l、10x PCR buffer 2.5 μ l、2 mM

dNTPs 2.5 μ l、1 U/ μ l DNA ポリメラーゼ KOD-Plus- Ver.2 (東洋紡績(株)) 0.5 μ l を加え、超純水によって最終容量が25 μ l になるよう反応液を調製した。その後、MyCyclerTMサーマルサイクラー (BIO-RAD) を用いて PCR を、94°C、2 分間を 1 サイクル、94°C、30 秒間／60°C、30 秒間／68°C、1 分間を 5~40 サイクル行った。得られた PCR 産物溶液 1 μ l を、GelRedTM (Biotinum) を添加した2.0 %アガロースゲル上で電気泳動した後、UV イルミネーター上で可視化することでDNA の増幅を確認した。また、PicoGreen[®]二本鎖DNA 定量キット(Invitrogen)を用いて上述の通り5 サイクル毎の PCR 産物溶液の DNA 濃度を測定した。

PCR を 20 サイクルおよび 35 サイクル行って得られた DNA 断片を pCR[®] 4 Blunt-TOPO vector (Invitrogen)にライゲーションした後、*Escherichia coli* (JM109 Competent cells、タカラバイオ(株)) を形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含む Luria-Bertani 寒天培地に形質転換体を塗布し、37°C で 16 時間培養した。得られたコロニー12 個を無作為に選抜し、各コロニーを 10 μ M T7 フォワードプライマー (5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3') 1 μ l、10 μ M T3 リバースプライマー (5'- ATTAACCCTCACTAAAGGGAA -3') 1 μ l、10x Ex Taq Buffer 2 μ l、2.5 mM dNTPs 1 μ l、5 ユニット/ μ l DNA ポリメラーゼ *TaKaRa Ex Taq*[®] (タカラバイオ(株)) 0.2 μ l を加え、超純水で 20 μ l になるように調製した反応液に懸濁させた。PCR は、94°C、5 分間を 1 サイクル、94°C、30 秒間／55°C、30 秒間／72°C、1 分間を 35 サイクル、MyCyclerTMサーマルサイクラー (BIO-RAD) を用いて行った。得られた PCR 増幅断片は上述のように 2 %のアガロースゲルを用いて電気泳動した後 DNA の増幅を確認した。次に、10 ユニット/ μ l *Hae* III (タカラバイオ(株)) 6 μ l、制限酵素に添付の 10 x M バッファー48 μ l を 1.5 ml 容チューブに加え、超純水で 384 μ l になるよう 48 サンプル分の制限酵素処理反応液を調製した。その後、調整後の制限酵素処理反応液を 8 μ l と

PCR 産物溶液 2 μ l を 0.2 ml 容 PCR チューブに加え、37°C で 4 時間制限酵素処理した。得られた制限酵素処理断片は上述のように 2 % のアガロースゲルを用いて電気泳動した後 DNA 断片パターンを確認した。

3.2.4 PCR 産物の融解曲線解析

10 μ M ITS1-F フォワードプライマー¹⁾(5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3') 6 μ l、10 μ M 担子菌 5.8S rDNA 特異的リバースプライマー(5'- CAACGGATCTCTGGCTCTCGCA -3') 6 μ l、Brilliant II Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene) 150 μ l、ROX™ リファレンス色素溶液 4.5 μ l を 1.5 ml 容チューブに加え、超純水で 240 μ l になるよう 12 サンプル分の反応液を調製した。その後、チューブから反応液を 20 μ l、*Ph. chrysosporium* および *Po. placenta* のゲノム DNA を単独、または等量混合した溶液(1 pg / μ l)を鉄型として 18 時間非特異的増幅を行って得られた産物を 1 ng/ μ l の濃度に調製した溶液 5 μ l を 0.2 ml 容 PCR チューブに加え、リアルタイム PCR 装置(Mx3000P Real-time QPCR System, Stratagene)を用いて 95°C、15 秒間を 1 サイクル、95°C、20 秒間／60°C、30 秒間を最大 45 サイクル反応させた。その後、PCR 産物を 60°C から 94°C まで 20 分間かけて昇温し、昇温過程における蛍光強度の変化をモニターした。リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェア MxPro 4.1 (Stratagene)を用いて融解曲線をプロットし、融解温度(Tm)を求めた。

3.3 結果

3.3.1 非特異的増幅条件の最適化

Ph. chrysosporium から抽出された DNA を Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅の鑄型として用いたところ、Fig.3.1 に示すように鑄型に用いた DNA の濃度が 0.01 pg/μl、0.1 pg/μl、0.5 pg/μl ではそれぞれ 3、7、12 時間の反応後に増幅が確認できた。その一方で、鑄型に用いた DNA 濃度が 1 pg/μl の時は反応 24 時間後も増幅が確認できなかった。

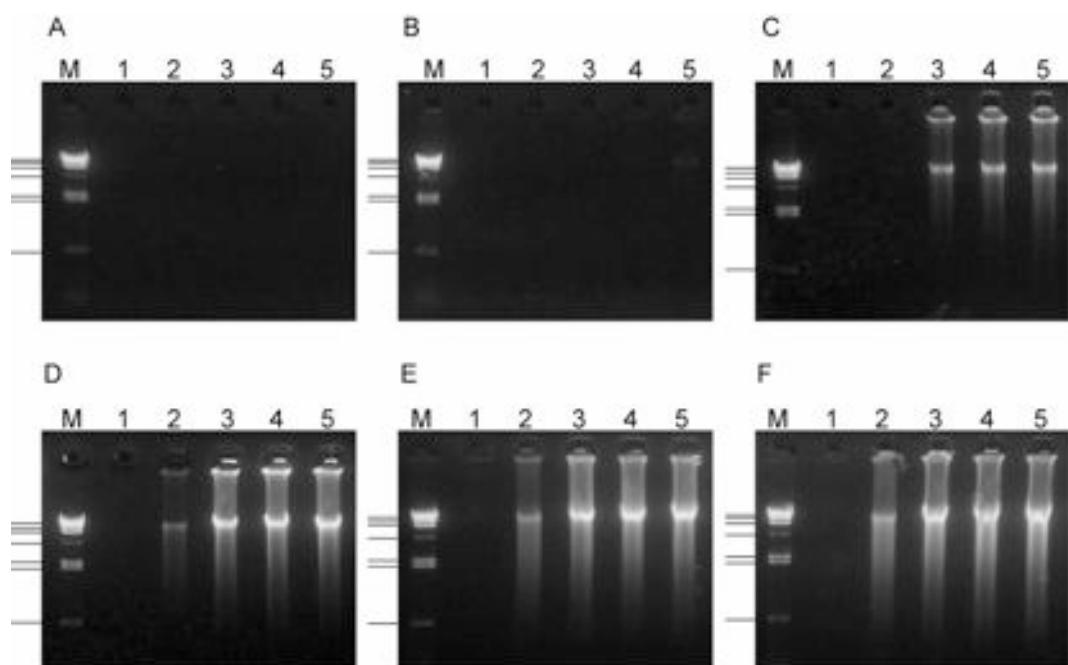


Fig. 3.1. Non-specific amplification of genomic DNA using Phi29 DNA polymerase.

Amplifications were performed for 1 (A), 3 (B), 7 (C), 12 (D), 18 (E), 24 (F) hours using genomic DNA from *Ph. chrysosporium*. Template DNA concentrations are 1 pg/μl (lane 1), 0.5 pg/μl (2), 0.1 pg/μl (3), 0.05 pg/μl (4), 0.01 pg/μl (5). Molecular size markers (lane M, λ -Hind III digest) give 80-ng bands of DNA with 23130-, 9416-, 6557-, 4361-, 2322-, 2027- and 564-bp.

次に、非特異的増幅反応中のDNA濃度を経時的に定量したところ、0.1 pg/μl以下では反応 6

～9時間で指数的増幅を示し、約10時間以降ではプラトーに達していた(Fig. 3.2)。鉄型に用いたDNAの濃度が0.1 pg/ μ l以下の場合、反応18時間後に得られるDNA濃度はほぼ一定であり、特に0.01 pg/ μ lでの鉄型DNAを用いた場合、添加されたDNAは18時間後に約10⁶倍の190 ng/ μ lにまで増幅された。一方、初期鉄型DNA濃度が0.1 pg/ μ lより高くなると増幅が抑制された。以上のことから、Phi29 DNAポリメラーゼによる増幅では鉄型DNAの濃度が低いほど増幅効率が良いことが確認された。

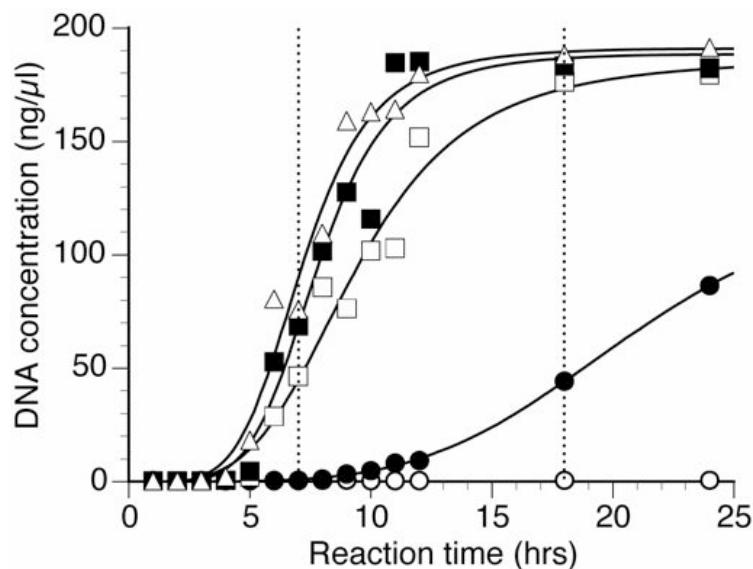


Fig. 3.2. Time course of DNA concentration during non-specific amplification by Phi29 DNA polymerase.

Concentrations of template DNA from *Ph. chrysosporium* are 0.01 (open triangle), 0.05 (filled square), 0.1 (open square), 0.5 (filled circle) and 1 pg/ μ l (open circle).

3.3.2 PCR-RFLP 解析

*Ph. chrysosporium*および*Po. placenta*から抽出したDNA溶液を等量混合した溶液を鉄型とし

て用いて、Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅を行ない、DNA が指数的に増幅される反応時間(7 時間)および増幅がプラトーに達する反応時間(18 時間)でそれぞれ反応を終了した。このようにして得られた各非特異的増幅産物を鋳型にして PCR 増幅を行い、5 サイクル毎の PCR 産物の DNA 濃度を定量した結果、反応 7 時間および 18 時間どちらの非特異的増幅産物を鋳型にした場合とも、15～25 サイクルの PCR で指数的増幅を示した。また、いずれの場合も、30 サイクルを超えると生成物量はほぼプラトーに達した(Fig. 3.3)。

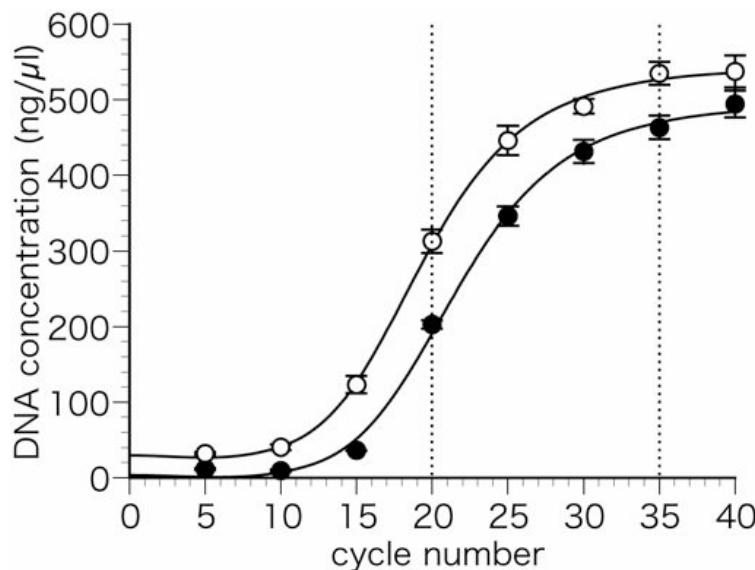


Fig. 3.3. DNA concentration vs. PCR cycles plot using mixed DNA from *Ph. chrysosporium* and *Po. placenta* as a template.

Non-specific amplification was performed for 7-hour (filled circle) and 18-hour (open circle) and 1 μl of each product were used as a template.

反応 7 時間または 18 時間行った非特異的増幅産物をそれぞれ鋳型として、PCR を 20 または 35 サイクル行って得られた計 4 種類に対して PCR-RFLP 解析を行った(Table 3.1)。その結果、非特異的増幅時間の違いに関わらず、PCR の指数的増幅段階で反応を止めたものではゲノム

の混合割合がほぼ反映されていたのに対して、Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅を 18 時間、および PCR を 35 サイクル行った場合は、*Ph. chrysosporium* の検出頻度が高く、鑄型に用いた DNA 溶液の混合割合が反映されていなかった。以上の結果から、PCR では増幅されやすい DNA が優先的に増え、サイクル数の増加に伴って検出頻度にバイアスが生じることが明らかとなった。

Table 3.1. Effect of non-specific amplification by Phi29 DNA polymerase and cycles of PCR on the RFLP analysis.

Non-specific amplification (hrs) ^{a)}	Number of colonies ^{b)}			
	20 cycles of PCR		35 cycles of PCR	
	<i>Ph. chrysosporium</i>	<i>Po. placenta</i>	<i>Ph. chrysosporium</i>	<i>Po. placenta</i>
7	7	5	5	7
18	7	5	11	1

a) DNAs extracted from *Ph. chrysosporium* and *Po. placenta* were equally mixed and was applied to non-specific amplification for 7 or 18 hours at 30 °C.

b) PCR products were digested by *Hae* III for 4 hours at 37°C and the DNA fragments were separated by electrophoresis.

3.3.3 PCR 増幅断片の融解曲線解析

まず、*Ph. chrysosporium* および *Po. placenta* のゲノム DNA を単独、または等量混合した溶液を用いて、Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅を 18 時間行い、得られた各非特異的増幅産物を鑄型として、リアルタイム PCR 装置によって ITS 領域を増幅した。各 PCR サイクルの増幅産物の蛍光強度を測定した結果、非特異的増幅産物を鑄型とした各サンプルは 23~28 サイクルの PCR で指数的増幅を示し、35 サイクルを超えると生成物量はほぼプラトーに達した(Fig. 50)

3.4)。

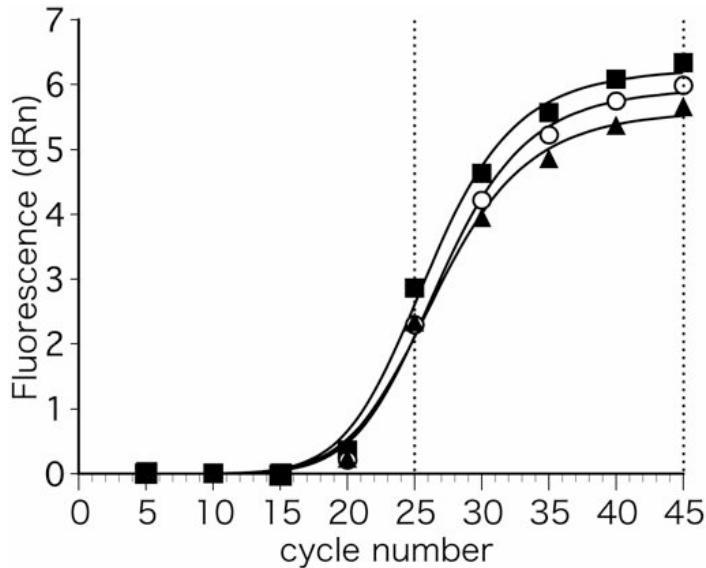


Fig. 3.4. Relative fluorescence intensity vs. PCR cycles monitored by real-time PCR apparatus. Fluorescence (dRn) is baseline subtracted fluorescence reading normalized to the reference dye. One microliter of DNA samples after non-specific amplification for 18-hour was used as a template of PCR. Mixing ratios of *Ph. chrysosporium* genome: *Po. placenta* genome are 1:0 (filled square), 0:1 (open circle), 1:1 (filled triangle).

次に、これらのPCR産物をそれぞれ融解曲線に供した。その結果、Fig. 5に示すようにPCRを25サイクル行ったサンプルに関しては、*Ph. chrysosporium*単独の場合は82.6°Cおよび84.9°C、*Po. placenta* 単独の場合は80.8°Cおよび83.5°Cにそれぞれ2つのTmを与えた。*Ph. chrysosporium*と*Po. placenta*由来のDNAを等量ずつ混合した場合、Tmは80.8°C、82.6°C、83.5°C、84.9°Cとなり、それぞれの菌から得たDNAを単独でPCR增幅させた場合のTmと一致した。一方、PCRを45サイクル行ったサンプルではそれぞれの高温側にTmがあるフラグメントが優先的に増幅されることが明らかとなった(Fig. 3.5D, F)。また、2つの菌から得られたDNAを

混合した場合は、 T_m が高い *Ph. chrysosporium* 由来のフラグメントが優先して増幅されていた (Fig. 3.5E)。

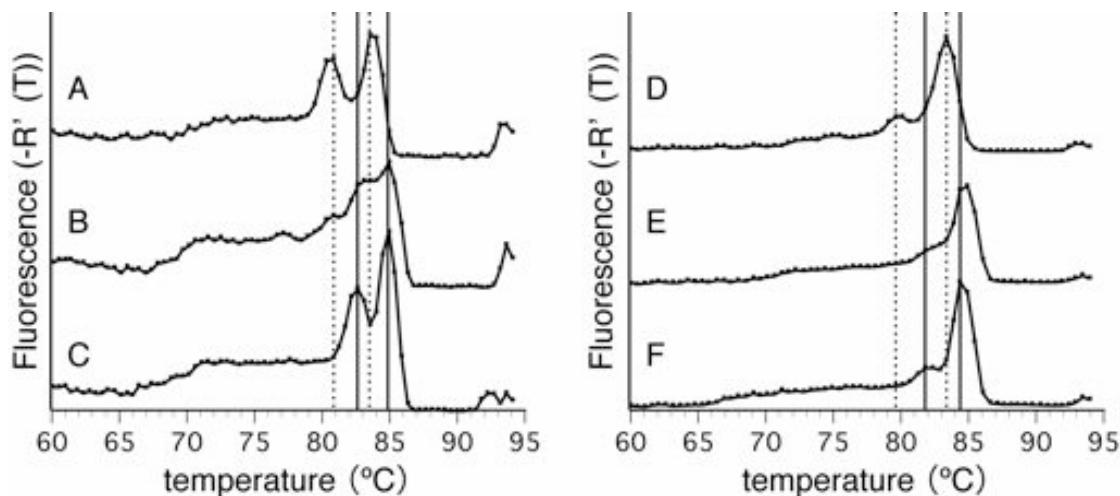


Fig. 3.5. Melting temperature analysis of amplified products obtained from 25-cycle (left column) and 45-cycle (right column) of PCR.

Fluorescence ($-R'(T)$) is differential value of R (raw fluorescent reading in arbitrary units) with respect to T (temperature). Mixing ratios of *Ph. chrysosporium*: *Po. placenta* are 0:1 (A, D), 1:1 (B, E) and 1:0 (C, F). Vertical lines indicate the melting temperature of PCR products originated from *Ph. chrysosporium* (filled) and *Po. placenta* (dotted).

3.4 考察

Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA の非特異的増幅では、0.1 pg/ μ l 程度のごく微量な DNA を鑄型として用いることが良好な増幅を得るために重要である。また、これによって増幅された DNA 産物は 100 ng/ μ l オーダーまで増幅され、PCR の鑄型として使用できることが明らかとなつた。

さらに、2 種の異なる担子菌由来の DNA を等量混合した試料を用いた増幅実験において、Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA の非特異的増幅では混合比はほぼ保たれるが、一方、PCR ではサイクル数の増加にともなってバイアスが生じることが示された。既往の研究において、競合 PCR 法を用いた場合、サイクル数の増加や初期鑄型濃度・増幅効率の違いで鑄型DNAの混合比にバイアスが生じることが報告されている^{5, 6)}。また、PCR-RFLP 法^{7, 8)}、PCR-RAPD 法^{8, 9)}、T-RFLP 法¹⁰⁾、DGGE 法¹¹⁾等を用いた同定法では、PCR のみによって標的となる DNA を増幅してきたことから、これらの結果の多くがバイアスを含む可能性が示唆された。

また、Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅では鑄型DNAの濃度が低いほど増幅効率が良いこと、および Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA の非特異的増幅ではバイアスが生じないことは理論的に説明ができる。まず、Fig. 3.6.を例としてその増幅産物の増加量について説明する。Fig. 3.6. の場合は一本鎖 DNA が 1 本あり、ここにランダムヘキサマープライマーが結合する。プライマーを起点に伸長が開始され、上流にランダムプライマーが結合しない状態で二本鎖 DNA の合成が終了したときに反応が停止する。つまり、Fig. 3.6.の場合にはプライマーが結合する箇所の数が 2 カ所で、酵素、プライマー、dNTPs が過剰量あると仮定すると最終収量は初期 DNA 量の 1.5

倍まで増幅されることになる。

Final DNA yield $A_n = (2^n - 1) / n \times A_1$
 n: number of DNA-bound primers

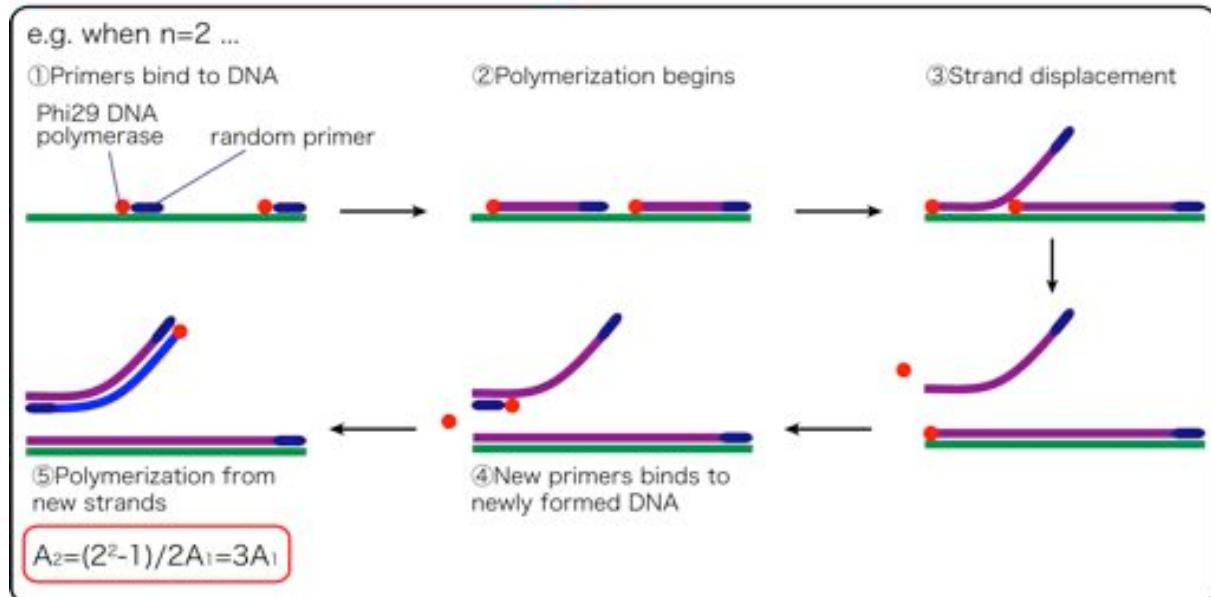


Fig. 3.6. Given that n is an number of DNA-bound primers, final DNA yield is $A_n = (2^n - 1) / n \times A_1$ under the assumption that the DNA polymerase, primer and dNTPs are over large quantity.

そこでプライミング頻度と最終収量について Fig. 3.7.に示す通り数式化した。初期に一本鎖DNAにプライマーが結合する箇所の数を n 、 $n=k$ のときの最終収量を A_k とおく。相補鎖にも同頻度でプライマーがランダムプライミングすると考えられるので、 $n=2$ のときの最終収量 A_2 は $3/2 A_1$ 、 A_3 は $7/3 A_1$ 、 A_4 は $15/4 A_1$ 、 A_5 は $31/5 A_1$ 、そして A_n は $(2^n - 1) / n \times A_1$ と表すことができる。

次に、異なる系内で、量が異なるゲノムをそれぞれ非特異的増幅した場合の最終収量について比較する (Fig. 3.8.)。プライマーは等量加えているため、鑄型 DNA 量が少ない方がより密にプライマーが結合し、さらに鎖置換反応により一本鎖になった DNA にもプライマーは結合する。その一方で、鑄型 DNA 量が多くなるほどプライマー間の距離が広く一本鎖 DNA が生じにくい条

件となるため、最終収量が大幅に減少する。例えば、鑄型 DNA 量が 100 倍異なるサンプルを、それ以外は同条件でそれぞれ非特異的増幅した場合、その最終収量は鑄型 DNA 量が少ない方では $\alpha(2^n-1)/n \times A_1$ 、鑄型 DNA 量が 100 倍では $10^4 \alpha(2^{n/100}-1)/n \times A_1$ となり、元の鑄型量が少ない方からの最終収量は 100 倍の鑄型量からの最終収量の約 $1/10^4 \times 2^{49500}$ 倍となる (Fig. 3.8.)。以上のことから Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅では鑄型 DNA の濃度が低いほど増幅効率が良いことが示唆される。

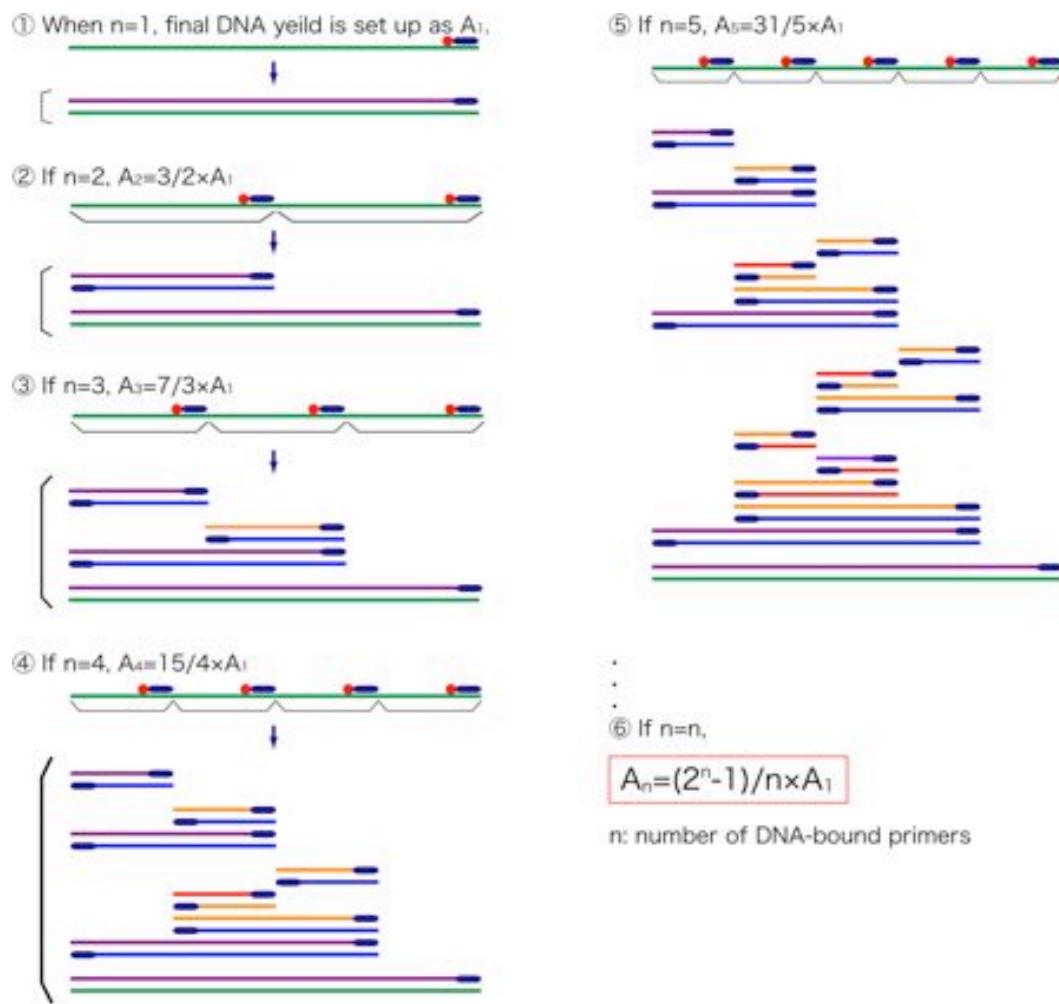


Fig. 3.7. A relation expression between final yields and priming frequency of random hexamer primer in non-specific amplification under the assumption that primers binding to complementary strands is occurred with equal frequency.

e.g. Genomic quantitative ratio is 1:100 in the different reaction solutions.

Assuming chromosome numbers are (1) α and (2) $10^2 \alpha$, n is 5×10^5 and DNA polymerase, primer, dNTPs are definite amounts.

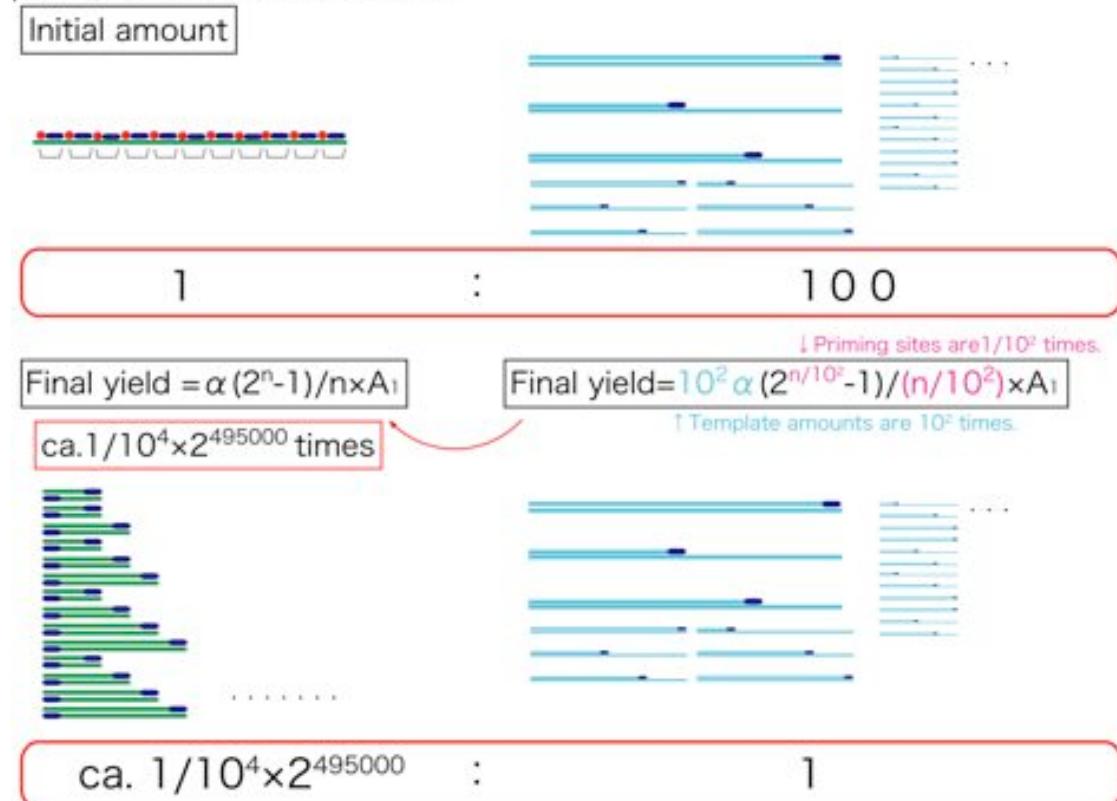
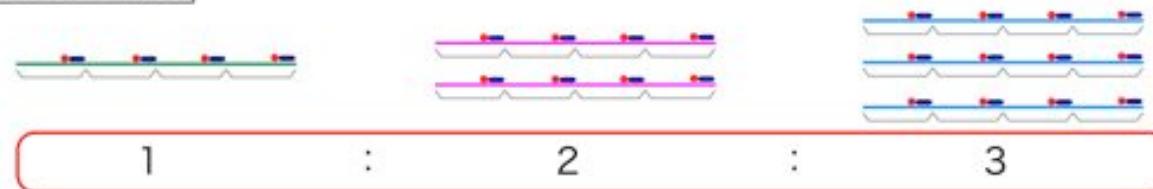


Fig. 3.8. Non-specific amplification when a genomic quantitative ratio changes in the different reaction solutions.

さらに、同じ系内に同程度の長さの複数種のゲノムが異なる存在比で存在する場合の最終収量について比較する(Fig. 3.9.)。例えば、3種類のゲノムが 1:2:3 の割合で存在するサンプルを Phi29 DNA ポリメラーゼによって非特異的に増幅したとき、Fig. 3.9.に示すようにランダムプライマーは各ゲノム DNA に同頻度でプライミングするため各菌の存在比を反映して増幅されると考えられる。

e.g. Genomes from 3 species (mixing ratio; 1:2:3) are in the same reaction solution

Initial ratio



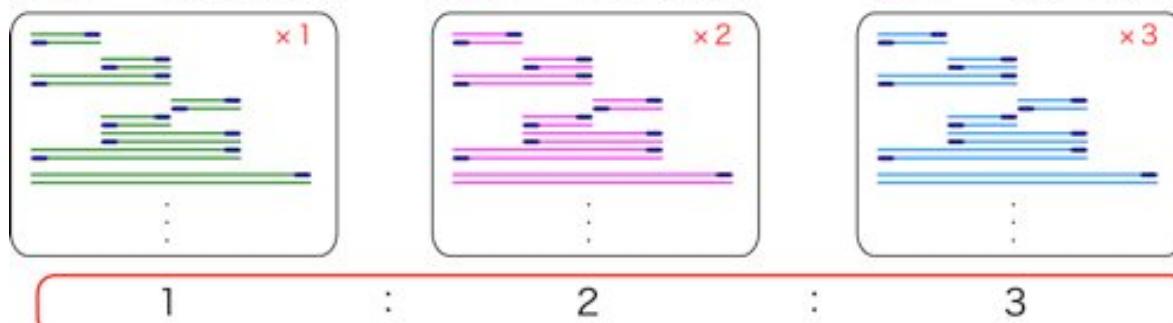
Final ratio

$$\text{Final DNA yield} = \alpha (2^n - 1) A_1 / n$$

$$\textcircled{1} 1 \times (2^{5 \times 10^5} - 1) / (5 \times 10^4) \times A_1$$

$$\textcircled{2} 2 \times (2^{5 \times 10^5} - 1) / (5 \times 10^4) \times A_1$$

$$\textcircled{3} 3 \times (2^{5 \times 10^5} - 1) / (5 \times 10^4) \times A_1$$



Assuming that normal fungal genome size is 3×10^7 bp and chromosome numbers (α) is 10, average base length per chromosome is $(3 \times 10^7) / 10 = 3 \times 10^6$. Therefore number of DNA-bound primers (n) is 5×10^5 if random hexamer primers are densely-bound to template DNA.

Fig. 3.9. Non-specific amplification when genomes from several species are present in varying proportions in the same reaction solution.

PCR のサイクル数が増加することによってバイアスが生じる原因を明らかにするために、リアルタイム PCR 装置を用いて融解曲線を解析した。増幅された二本鎖 DNA は蛍光を発しているが、融解温度(T_m)にまで昇温すると一本鎖に解離し蛍光強度が低下するため、融解曲線を解析することで増幅された二本鎖 DNA の熱解離特性が明らかとなる^{12, 13)}。この結果、PCR 増幅断片の融解曲線から T_m が高いものが優先して増幅されることを明らかにした。この理由については、リボゾーム DNA 遺伝子は縦に複数並んでいるため、PCR サイクル数が増加すると増幅断片を錆型とした増幅もされる可能性がある。伸長時間を考えると、シングルの PCR 増幅断片とタンデム

に繋がった PCR 増幅断片が存在すると考えられ、さらにプライマーと比較して増幅断片の方が高分子であり鋳型になりやすいので、PCR サイクル数の増加に従って増幅断片を鋳型とした増幅産物(T_m の高い方)が優先的に増幅される可能性が高い。その一方で、ITS1-FxITS1-RT-R1 プライマー対での増幅断片の長さはプライマー配列を含め P.c. は 294 b、P.p. は 295 b でそれほど違いはないため増幅断片の長さによってバイアスが生じる可能性は考えにくい。以上の結果から、PCR のサイクル数の増加によって T_m の高い断片が優先的に増幅されてくることが混合比にバイアスが生じる一因と思われた。

従来の PCR での最適な鋳型ゲノム DNA の終濃度は 1~20 ng/ μ l であるのに対して、本研究における Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅での最適な鋳型ゲノム DNA の終濃度は 0.01~0.1 pg/ μ l であり、さらに本研究では非特異的増幅反応後の溶液 10 μ l のうち 1 μ l を PCR の鋳型溶液として用いたことから PCR に必要とされる鋳型量を 1/10000 程度に減らすとともに、PCR 阻害物の持ち込み量、および増幅時のバイアスを引き起こすとされる PCR のサイクル数を減らすことができるという利点を持つことが示された。

以上の結果から、バイアスの生じにくい Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA の非特異的増幅をプラトーに達するまで行い、PCR による増幅では指数的増幅範囲内でサイクル数をできるだけ抑えることが、菌叢中の菌の存在比を反映させた結果を得るために重要であることを示した。

参考文献

- 1) 和田朋子, 加治佐平, 田中計実, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: “非特異的DNA增幅法を利用した腐朽木材中に存在する担子菌類の同定”, 木材保存 **35**, 57–65 (2009).
- 2) White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J. W.: “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J., White, T.J. eds., Academic Press, San Diego, 1990, pp.315–324.
- 3) Gardes, M., Bruns, T. D.: “ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts”, *Mol. Ecol.* **2**, 113–118 (1993).
- 4) Jasalavich, A.C., Ostrofsky, A., Jellison, J.: “Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA”, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4725–4734 (2000).
- 5) Raeymaekers, L.: “A commentary on the practical applications of competitive PCR”, *Genome Res.* **5**, 91–94 (1995).
- 6) Alvarez, M.J., Depino, A.M., Podhajcer, O.L., Pitossi, F.J.: “Bias in Estimations of DNA Content by Competitive Polymerase Chain Reaction”, *Anal. Biochem.* **287**, 87–94 (2000).
- 7) Gardes, M., Bruns, T. D.: “Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views”, *Can. J. Bot.* **74**, 1572–1583 (1996).
- 8) Horisawa, S., Sakuma, Y., Tanaka, K. and Doi, S.: “Detection of intra- and interspecific variation of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by PCR-RFLP and RAPD analysis”, *J. Wood Sci.* **50**, 427–432 (2004).
- 9) Simmon, K.E., Steadman, D.D., Durkin, S., Baldwin, A., Jeffrey, W.H., Sheridan, P., Horton, R., Shields, M.S.: “Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA”, *J. Microbiol. Metho.* **56**, 143–149 (2004).
- 10) Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J.: “Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA”, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4516–4522 (1997).
- 11) Muyzer, G., Waal, E. C. D., Uitterlinden, A. G.: “Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA”, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700

(1993).

- 12) López-Andreo, M., Garrido-Pertierra, A., Puyet, A.: “Evaluation of Post-Polymerase Chain Reaction Melting Temperature Analysis for Meat Species Identification in Mixed DNA Samples”, *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7973–7978 (2006).
- 13) Rasmussen, J. P., Saint, C. P., Monis, P. T.: “Use of DNA melting simulation software for *in silico* diagnostic assay design: targeting regions with complex melting curves and confirmation by real-time PCR using intercalating dyes”, *BMC Bioinformatics*, **8**, 107 (2007).

第4章

総括

木質住宅や木製外構施設の維持管理のために木材腐朽菌の動態をモニタリングすることは重要な課題であることから¹⁾、これまで木材腐朽菌のモニタリングは腐朽の疑われる箇所から担子菌を採取・培養し、その菌糸形態を観察することで評価を行ってきた²⁻⁵⁾。しかしながら、このような培養を介した手法は、時間と手間が必要とされるだけでなく、難培養性の菌は検出されない、さらに腐朽初期段階における菌の検出ができないなど多くの問題点があつた⁶⁾。これに対して、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)によって増幅されたリボゾームDNA(rDNA)断片の塩基配列解析から腐朽菌を同定する手法が最近開発された。本PCR法は菌を単離することなく同定できるという利点がある一方で、木材含有成分によるPCR阻害や、鑄型DNAを得るために多量のサンプルが必要となる等の問題点が残されている⁷⁾。

そこで、第2章ではこれらの問題点を克服するため、極微量のゲノムDNAを鑄型として非特異的なDNA増幅を行う枯草菌ファージPhi29 DNAポリメラーゼに着目した。この増幅法とその後段にPCRによるrDNA断片の増幅を組み合わせることで、微量試料から培養過程を経ずにそこに存在する担子菌類を同定し、さらに腐朽材中の担子菌叢中における各菌の存在比を定量評価するためのDNA増幅条件について検討した。

まず、本研究では、Phi29 DNAポリメラーゼによるDNAの増幅をPCRの前段階に組み入れることで、微量試料から担子菌類を同定することが可能となる手法を確立し、さらにその実地試験を行った。

はじめに、担子菌類の木材腐朽菌の菌糸、胞子ならびに木材腐朽菌を植菌後1週間経過した木片を破碎し得られた木粉試料約1 mgをPhi29 DNAポリメラーゼによる非特異的増幅に供し、その後担子菌rDNAに特異的なプライマーを用いたPCRを行うことによって、そこに存在する木材腐朽菌のrDNAの検出が可能であることを示した。さら

に、そのrDNAのInternal Transcribed Spacer (ITS)領域の塩基配列をBLAST検索に供することで菌株同定ができる事を示した⁸⁾。

さらに、上記の手法に対する実地試験として、木造住宅(築41年)の周囲16カ所に埋設したベイトステーション用器具キープオフ™中に設置後一年経過した木片から採取した微量木粉に適用した。各試験体から得たPCR増幅産物をプラスミドベクターにライゲーションし大腸菌へ形質転換した。その後、任意の10個の形質転換体について配列情報の取得を試みた。その結果、16箇所のベイトステーションから得た合計160検体中、103の検体についてはITS領域の塩基配列の解析ができた。このうち80検体については、データベース上に種名あるいは属名が登録されている担子菌あるいはその近縁種と92–100 %の相同意で同定された。残りの23検体は、データベース上に登録されていない配列、難培養性の菌、種属の明らかにされていない担子菌であった。同定された80検体の菌種は10属17種に及び、一軒の家屋敷地内でサンプリングをした、それぞれの腐朽木材中において様々な担子菌が存在していることが確認された⁸⁾。

第2章ではプラトーに達するまでPCR増幅を行っている。その一方で、第3章ではPCRサイクル数の増加に伴いバイアスが生じていることが示されたことから、Fig. 2.6. の菌の内訳はバイアスが生じている可能性が高い。しかしながら、*Trametes*属および*Polyporus tuberaster*は主に目視および抗体法で腐朽が進行していたと判断された箇所から多く検出されたという結果からこれらの菌は何らかの形で木材腐朽に関わっていると考えられる。

第2章では、腐朽木材中には多種の担子菌が存在することが示され、木材腐朽への各菌の関与などをモニタリングするためには菌叢中での各菌の量比を定量的に評価することが重要であることが考えた。そこで第3章では、二種類の木材腐朽菌から抽

出したゲノムDNAを混合したサンプルに対して、Phi29 DNAポリメラーゼによるDNAの非特異的増幅および引き続くPCRによるITS領域の特異的増幅を行い、得られたPCR産物に対してPCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)法によって増幅条件における混合比の定量性を評価した。さらに、リアルタイムPCR装置を用いて増幅産物の融解挙動を調べ、PCR-RFLPによって得られた結果を検証した。

まず、様々な濃度の木材腐朽菌ゲノム溶液を調製し、これを鋳型として、Phi29 DNAポリメラーゼを用いた非特異的DNA増幅法の条件を検討した。その結果、初期鋳型DNA濃度が1 pg/ μ l以下では反応初期から増幅が認められ、鋳型DNA濃度が低いほど増幅効率が良いことが示された。このことからPhi29 DNAポリメラーゼによるDNAの非特異的増幅を行うことで、0.1～1 pgというごく微量なDNAをPCRの鋳型として使用できるまで増幅可能であることが明らかとなった。

次に、同一濃度の2種の木材腐朽菌ゲノム溶液を1:1の比に混合し、Phi29 DNAポリメラーゼで増幅した後さらにPCR-RFLP解析に供した。その結果、非特異的DNA増幅時間に関わらずPCRの指数的増幅期ではゲノムの混合割合がほぼ反映されていたのに対して、PCRのプラト一期では混合割合が反映されておらずバイアスが生じていることが明らかとなった。このバイアスの発生原因について検証するため、リアルタイムPCRから得た増幅産物のTm値をPCRの指数的増幅期とプラト一期で比較した結果、サイクル数の増加に伴い、高温側にTmがあるピークが優先的に増幅することが明らかとなつた⁹⁾。

本研究の結果から、Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅と PCR 増幅を組み合わせることで、微量試料から培養過程を経ずに菌叢中に存在する担子菌類を同定ならびにその存在比を確認するモニタリング手法を以下の通り確立した。

<サンプル調製>

まず始めに、腐朽木材から得た微量木粉約 1 mg からの DNA の抽出をする。木片サンプルの一部を 2.2 ml 容マルチチビーズショッカー用ポリプロピレンチューブに採取し、マルチチビーズショッカー (MB601TNSU, 安井器械(株)) を用いて、液体窒素下、2,500 rpm で 5 分間ステンレス製メタルコーンにより破碎する。得られた破碎木粉約 1 mg を 1.5 ml 容エッペンチューブに移し、1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (TE, pH 8.0) 40 µl を加えてDNAを抽出する。その後、小型遠心機を用いて 3,000 x g、5 秒間遠心することで木粉を沈澱させ、得られた上澄みをサンプル溶液とする。

次に上記の手法により得られたサンプル溶液を 1/10 オーダーで逐次希釈した各試料液を調製する。サンプル溶液の希釈範囲は始めに原液、1/10、1/100 系列で行い、引き続く Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的增幅でどの希釈系列からも增幅が確認できない場合さらに希釈する。また、サンプル溶液のDNA濃度が既知の場合は、その濃度を 0.1～1 pg/µl に調製する。

<Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的增幅>

上述の方法にて得られた調製液を用いて、Phi29 ポリメラーゼにより DNA の非特異的增幅を 18 時間行う。各調製液 1 µl を、4 µl のサンプルバッファー (10x reaction buffer, 200 mM S 化ランダムヘキサマー 5'-NpNpNpNpsNpsN-3'; Sigma-Genosys) を含む 0.2 ml PCR チューブに分注する。DNA 溶液とサンプルバッファーの混合液は 95°C, 3 分で熱変性を行った後、氷上で冷却する。次にサンプル混合液を、5 µl の反応溶液 (25 mM dNTPs, 1 mM ジチレイトール, 100 units φ 29 DNA polymerase

(EPICENTRE))と混合し、非特異的増幅反応を30°Cで18時間行った後、65°C、10分で酵素を失活させて反応を終了する。各非特異的増幅反応液1μlを、GelRedTM(Biotinum)で染色した1%アガロースゲル上で電気泳動した後、UVイルミネーター上で可視化し、増幅を確認する。

<PCRによるITS領域の増幅>

Phi29 DNAポリメラーゼによる非特異的増幅段階で増幅が確認できたサンプルを用いて、さらにPCRによるITS領域の増幅を行う。PCRに使用するプライマーは糸状菌特異的フォワードプライマー(ITS1-F; 5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAAAAGTCGT-3')¹⁰⁾と担子菌特異的リバースプライマー(ITS4-B; 5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3')^{11, 12)}を用いる。PCRは0.2ml容PCRチューブに反応液が以下の組成(終濃度)になるように調製する: 5μMフォワードおよびリバースプライマー、10mM Tris-HCl(pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs。そこにPhi29 DNAポリメラーゼによる非特異的増幅産物溶液1μlとDNAポリメラーゼKOD-Plus-(東洋紡績(株))200ユニットを加え、最終容量が25μlになるように調製する。PCR増幅は、熱変性94°C、30秒、アニーリング60°C、30秒、伸長反応68°C、1分を1サイクルとする反応を20サイクルの条件で、サーマルサイクラー(iCycler, バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株))を用いて行う。その後、68°Cで1分間伸長反応させた後4°Cで反応を止める。反応液1μlを、GelRedTM(Biotinum)で染色した2%アガロースゲル上で電気泳動した後、UVイルミネーター上で可視化し、PCR増幅を確認する。

<PCR-RFLP 解析>

次に得られた PCR 産物に対して、PCR-RFLP 解析を行って試料中に存在する各担子菌の存在比を求める。得られた PCR 産物を、pCR® 4 Blunt-TOPO vector (Invitrogen)にライゲーション後、*Escherichia coli* (JM109 Competent cells, タカラバイオ(株))を形質転換する。形質転換体は 50 µg/ml アンピシリンを含む Luria-Bertani 寒天培地にまき、37°Cで一晩培養する。得られた形質転換体 12 コロニーを無作為に取得し直接 PCR に供する。PCR 反応組成は *TaKaRa Ex Taq®* (タカラバイオ(株))のマニュアルに従って、400 nM T7 フォワードプライマー (5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3')、400 nM T3 リバースプライマー (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGAA -3')、2 µl 10x Ex Taq Buffer、0.8 mM dNTPs、0.5 ユニットの DNA ポリメラーゼ *TaKaRa Ex Taq* を加え、最終容量が 20 µl になるよう反応液を調整する。PCR は、94°C、5 分の後、熱変性 94°C、30 秒、アニーリング 55°C、30 秒、伸長反応 72°C、1 分を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル、MyCycler™ サーマルサイクラー (BIO-RAD)を用いて行う。反応液 1 µl を、GelRed™ (Biotinum)で染色した 2 %アガロースゲル上で電気泳動し、PCR 増幅を確認する。その後、PCR 反応液 2 µl に 1 U の *Hae III* (タカラバイオ(株))および制限酵素に添付のバッファー 1 µl を添加して、最終的に 10 µl とし、37° C で 4 時間インキュベートする。得られた DNA 断片は 2 % のアガロースゲル上で分離し、UV イルミネーター上で可視化する。これにより菌叢中に存在する担子菌類の存在比を明らかにする。

<シーケンス解析>

PCR-RFLP のパターンに基づいて分類した各菌に対して、それぞれの菌種の同定

を ITS 領域の配列情報解析により行う。

まず、各菌に対応するコロニーを 50 μ l の TE に懸濁する。その懸濁液 1 μ l を用いて ITS 領域の PCR 増幅を行う。PCR に使用するプライマーは TOPO の配列に一致する T7 側フォワードプライマー (5'-GCCAGGGTTTCCAGTCACGACG -3') と T3 側リバースプライマー (5'-ACGCCAAGCTCAGAATTAAACCCTCAC -3') を用いる。PCR 反応組成は前述の非特異的 DNA 産物を鋳型とした ITS 領域の PCR 増幅と同様である。PCR の反応条件については、温度条件は同様であるがサイクル数は 30 サイクルとする。この、PCR 産物 1 μ l を、GelRedTM (Biotinum)で染色した 2 %アガロースゲル上で電気泳動した後、UV イルミネーター上で可視化することで増幅を確認する。増幅を確認後、PCR purification kit (Qiagen)を用いてプロトコルに従い PCR 産物を精製し、DNA 濃度を Gene Spec I(7A0-0010, 日立那珂インスツルメンツ(株))を用いて、反応液中の DNA 量を 260 nm における吸光度(吸光係数:0.02 μ l·ng⁻¹·cm⁻¹)より定量する。

上記によって精製された DNA 溶液を鋳型に、DTCS クイックスタートキット(Beckman Coulter)を用いて添付の説明書に従いシーケンス反応を行う。0.2 ml 容 PCR チューブ内で反応溶液中に、同キット付属のマスターミックス 8 μ l、T7 側フォワードプライマーあるいは T3 側リバースプライマー 3.2 pmol、DNA テンプレート 50 fmol を加え、最終量が 20 μ l になるように調製する。PCR は、熱変性 96°C, 20 秒, アニーリング 50°C, 20 秒, 伸長反応 72°C, 1 分を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル、MyCyclerTM サーマルサイクラー (BIO-RAD) を用いて行う。得られた PCR 反応産物は、illustra AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE Healthcare)の使用説明書に従ってカラム精製した後、精製した溶液を 96 穴サンプルプレートに移し真空乾燥する。その後、96 穴サ

ンプルプレートに DTCS クイックスタートキット(Beckman Coulter)添付のサンプルローディング溶液 40 µl とミネラルオイル一滴を加え、DNA sequencer CEQ 8800 (Beckman Coulter)を用いて同装置の説明書に従って塩基配列を取得する。

得られた塩基配列を用いて、米国立医学図書館の生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI) の相同性検索アルゴリズム (Basic Local Alignment Search Tool using a nucleotide query, blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による解析を行う。その際、検索パラメータは、全てデフォルトで行う。この結果から菌種の同定を行う。

以上に示した手法によって、微量サンプルからの培養過程を経ないで腐朽木材中に存在する担子菌類の同定やその存在比を明らかにするモニタリング手法として利用可能と考えられる。このように本研究はモニタリング手法を提案したが、今後現場で用いられるようにするために、実際の腐朽環境においてこの手法を適用すること、実際の腐朽に関与している木材腐朽菌や微生物を特定すること、PCR サイクル数以外にバイアスの生じる要因について追求し定量性が保たれる条件の最適化を行っていくこと、樹種特性によって菌叢がどのように変化するのかを経時的に追跡することなど今後も実施すべき様々な課題を含んでいる。

実際の環境中では、特定の菌の存在下で生育が可能な菌など数多くの微生物がお互いに複雑に影響し合いながら共存している。自然界の微生物のほとんどが培養困難で、さらに培養が可能な微生物は自然界の微生物資源プールのわずか 1%以下に過ぎない¹³⁾。木材腐朽菌は木材腐朽の鍵となることは確かだが、実際の木材腐朽環境中では複数種の木材腐朽菌と、バクテリア、その他の真菌などが協働して腐朽して

いると考えられる。そのため、今後は特定の菌のみをターゲットとするのではなく、難培養性の菌を含めた環境全体の微生物学的多様性の特徴について解析するモニタリング手法が台頭すると考えられる。本研究で確立した手法の流れから DNA が微量のサンプル中の全ての DNA を非特異的に増幅することに着眼して、さらにメタゲノム解析を手法の一部に取り入れてゆくことで、木材腐朽菌の同定および種の存在比の確認にとどまらず、腐朽木材中に存在する微生物叢の検出・動態解析研究、微生物多様性研究、遺伝子資源への利用といったことが今後の展望として望まれる。

本手法を用いて木造住宅の他に文化遺産、重要文化財などの木質構造物の動態モニタリングを行い、その都度的確なメンテナンスをして木質構造物の維持管理に繋げられる点で本研究が木材保存分野に貢献できると考えられる。

参考文献

- 1) 今村裕嗣, 川井秀一, 則元京, 平井卓郎: “建築に役立つ木材・木質材料学”, 今村裕嗣, 川井秀一, 則元京, 平井卓郎編, 東洋書店, 東京, 1997, pp.174-176.
- 2) 土居修一, 平野雅親, 藤井義久, 桃原郁夫, 森満範 他: “実務者のための住宅の腐朽・虫害の診断マニュアル”, (社)日本木材保存協会編, (社)日本木材保存協会, 東京, 2007, pp.153-155.
- 3) 布村昭夫: “ナミダタケによる建築物の被害とその防除”, 木材保存 **14**, 19-30 (1979).
- 4) 神山幸弘: “ナミダタケによる被害の調査”, 木材保存 **21**, 48-65 (1982).
- 5) 神山幸弘: “ナミダタケによる被害の調査Ⅱ”, 木材保存 **24**, 41-50 (1983). (1983).
- 6) 須原弘登: “分子生物学的手法を利用した木材腐朽担子菌の検出および分類”, 木材保存 **30**, 192-203 (2004).
- 7) 土居修一: “住宅の腐朽診断技術: 現技術の限界と今後求められる技術”, 2003年度夏期日本木材学会生物劣化研究会, 東京, 2003.
- 8) 和田朋子, 加治佐平, 田中計実, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: “非特異的DNA増幅法を利用した腐朽木材中に存在する担子菌類の同定”, 木材保存 **35**, 57-65 (2009).
- 9) 和田朋子, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩: “腐朽木材中における担子菌叢の定量的評価を目指したDNA増幅法”, 木材学会誌 投稿中.
- 10) White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J. W.: “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J., White, T.J. eds., Academic Press, San Diego, 1990, pp.315-324.11) Gardes, M., Bruns, T. D.: “ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts”, *Mol. Ecol.* **2**, 113-118 (1993).
- 12) Jasalavich, A.C., Ostrofsky, A., Jellison, J.: “Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA”, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4725-4734 (2000).
- 13) 鎌形洋一: “難培養性微生物の実態に迫る.” 化学と生物 **46**, 600-607

(2008).

公表論文一覧

非特異的 DNA 増幅法を利用した腐朽木材中に 存在する担子菌類の同定

Identification of basidiomycetes in decayed wood by a method using
non-specific amplification of DNA

和田 朋子^{*}、加治佐 幸^{*}、田中 針実^{*}、五十嵐生日子^{*}、較島 正浩^{*}
Tomoko WADA^{*}, Taira KAJISAWA^{*}, Keijiro TANAKA^{*}, Kiyohiko IKARASHI^{*}, Masahiro SAMEJIMA^{*}

* 1 東京大学大学院農学生命科学研究所
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

* 2 株式会社エス・ディー・エス バイオテック
SDS Biotech K. K.

Corresponding author : tmk_wada@asahi-net.or.jp

■ 研究論文 ■

非特異的 DNA 増幅法を利用した腐朽木材中に存在する担子菌類の同定

和田 朋子^{1*}、加治佐 平¹、田中 計実¹、五十嵐圭日子¹、鷲島 正浩²

Identification of basidiomycetes in decayed wood by a method using non-specific amplification of DNA

Tomoko WADA¹, Taisei KAJIYA¹, Keijitsu TANAKA¹,
Kiyohiko IGARASHI¹, Masahiro SAMEJIMA²

A combination of non-specific amplification of DNA by Phi29 DNA polymerase and polymerase chain reaction (PCR) using the specific primers for the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA) enables us sensitive detection of basidiomycetes in decayed wood and identification of their species by BLAST analysis of DNA sequence on database. This method was applied for detection and identification of basidiomycetes in wood blocks, which had been settled in bait stations around a site of house. As the results, DNA sequences of ITS region were obtained for 103 samples from 16 bait stations. The corresponding species of basidiomycete were identified for 80 samples, which distributes 17 species in 10 genera, suggesting a high diversity of fungal flora depending on micro-environment within a site of house.

Key words : basidiomycetes, wood rotting fungi, Phi29 DNA polymerase, Internal Transcribed Spacer region, PCR

Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的な DNA 増幅と、リボソーム DNA (rDNA) Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域に特異的なプライマーを用いたポリメラーゼ鍵反応 (PCR) を組み合わせ、得られた DNA 断片の塩基配列を BLAST 解析に供することにより、木片中に棲息する極微量の担子菌を検出および菌種同定することが可能となる。そこで、住宅敷地内に埋設したベイトステーション中の木片に対して本手法を適用し、生息する担子菌類の検出と菌種同定を試みた。その結果、16カ所のベイトステーションから合計103の異なる ITS 領域

* 1 東京大学大学院農学生命科学研究所 Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo
2 株式会社エス・ディー・エス バイオテック SDS Biotech K.K.

Corresponding author : tmk_wada@asahi-net.or.jp

塗基配列を取得することができた。さらに得られた配列を BLAST 解析に供することで、そのうちの80菌種を同定できたが、同定された菌種は10属17種に及んでいた。この結果から、一軒の住宅敷地内であっても、埋設した環境によって木片中には多種の担子菌が存在する事が明らかとなった。

1. 緒言

木材腐朽を引き起こす菌類の多くは担子菌に分類され、それらは腐朽後の材の色から褐色腐朽菌と白色腐朽菌に分類されている。褐色腐朽菌の多くは針葉樹を、白色腐朽菌の多くは広葉樹を腐朽することが知られている¹⁾。これら木材腐朽菌は木材の強度劣化を引き起こすことから、木造住宅の維持管理を考えるときには劣化の原因となる腐朽菌の検出と同定が重要であると考えられる²⁾。しかしながら、木造住宅環境において各木質部材に棲息している木材腐朽菌を系統的に調べた例はない。その原因として、腐朽初期段階では木材中に存在する菌体量が少なく、各木質部材の強度を損ねることなく十分量のサンプルを調製することが困難であることが挙げられる。

最近、Phylogenetic DNA ポリメラーゼによる非特異的な DNA 増幅と、rDNA 間に挟まれたスペーサー (Universal Transcribed Spacer : ITS) 領域の PCR による增幅を組み合わせることで、微量の孢子から菌株同定ができることが報告された³⁾。本研究では、図1に示すように腐朽菌が存在する微量の木粉に本手法を適用することで、培養過程を経ずにそこに棲息する担子菌類を同定するとともに、この手法を利用して木造住宅敷地内に埋設したペイントステーション中の木片に棲息する担子菌類の検出ならびに同定を試みた。

2. 実験方法

2.1 指標菌培養木片からのサンプリング

指標菌として *Cosmopora panama* (イドタケ, NBRC 6275), *Fomes annulus* (オオウズラタケ, FPPRI 0507) および *Trametes versicolor* (カカラタケ, FPPRI 1030) を、ボテトデキストロース寒天培地 (DAIKOO, 和光純薬工業㈱) に接種後 25°Cで培養し、菌がシャーレ上に蔓延したところで 20mm × 10mm × 10mm のスギ辺材木片をそれぞれ二つずつ菌糸上に設置した。1週間後、及び 2

週間後木片の一部を 2ml 容ポリプロピレンチューブに採取し、マルチビーズショッカー (MB 600TNSU, 安井器械㈱) を用いて、液体窒素下、2,500rpm で 5 分間ステンレス製メタルコーンにより破砕した。得られた破碎木粉 1mg を 1.5ml 容エッセンチューブに移し、1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 缓衝液 (TE, pH 8.0) 40μL を加えて DNA を抽出した。その後、小型遠心機 (Ecan CPM-2100, 遠テクノガラス㈱) を用いて 3,000 × g, 5 秒間遠心することで木粉を沈殿させ、得られた上澄みをサンプル溶液とした。

2.2 ペイントステーション中の木片からのサンプリング

ペイントステーション用器具キープオフTM (マキラー・トータルシステム㈱) にアスペン木片 (直径 60mm × 長さ 100mm) を設置し、木造住宅 (東京都田市、築44年) の周囲 16ヵ所に埋設した。設置から約 1 年後に木片を取り出し、目視による観察を行った。さらに、2.1 と同様の方法で得られた木粉約 0.1g に対して抗原法による腐朽診断 (ウッドチェックTM, マキラー・トータルシステム㈱社製)⁴⁾ を行うとともに、2.1 と同様にサンプル溶液を調製した。

2.3 Phylogenetic DNA ポリメラーゼによるゲノムの非特異的増幅

2.1 及び 2.2 で得られたサンプル溶液中のゲノム DNA を、GenomePhi DNA Amplification Kit (GE ヘルスケア・バイオサイエンス㈱) を用いて非特異的に増幅した。サンプル溶液 1 μL を 0.2 ml 容 PCR チューブに取り、同キット付属のランダムヘキサマーを含む 9 μL の Sample buffer を混合した。そのチューブを 95°C, 3 分間加温した後、4°C で急冷した。次にキットに付属の 9 μL の Reaction buffer と Phylogenetic DNA ポリメラーゼを含む 1 μL の Enzyme mix を加え、30°C で 18 時間静置し、ゲノム DNA の増幅反応を行った。その後 65°C, 10 分間の熱安定性を行うことで反応を終了した。反応液 1 μL を 1.0% アガロースゲルで電気泳動した後、ゲルを

エチジウムプロマイドで染色することにより、ゲノムDNAが増幅されていることを確認した。さらにGene Spec I (TAD-0010, 日立那珂インスツルメンツ㈱)を用いて、反応液中のDNA量を260nmにおける吸光度(吸光係数: 0.02 μ l·ng $^{-1}$ ·cm $^{-1}$)より定量した。

2.4 PCRによるITS領域の増幅

2.3で非特異的に増幅されたDNA溶液を templateとしてrDNA ITS領域の増幅を行った。PCRに使用するプライマーは、図1に示すように、保守性の高い領域であるITS1, 28S rDNA 遺伝子配列中の系統群特異的フォワードプライマー (ITS1-F; 5'-CTTGGTCATTTAGAOGGAAGTAAAAAGTGT-3')と相手菌特異的リバースプライマー (ITS4-B; 5'-CAGGAGACTTGATCACCGTCCAG-3')を選定した¹¹。PCRは0.2ml各PCRチューブに反応液が以下の組成(終濃度)になるように調製した: 5 μ M フォワードおよびリバースプライマー、10 μ M TE (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs。そこに2.3で得られた1 μ lの template DNA溶液と200ユニットのDNAポリメラーゼ KOD-Plus- (東洋紡織㈱)を加え、最終容量が25 μ lになるように調製した。PCR増幅は、熱変性94°C、30秒、アニーリング60°C、30秒、伸長反応68°C、1分を1サイクルとする反応を30サイクルの条件で、サーマルサイクル (iCycler, バイオ・ラッド ラボラトリーズ㈱) を用いて行った。その後、68°Cで1分間伸長反応させた後4°Cで反応を止めた。PCRによるDNAの増幅を確認するために、反応液1 μ lをサンプリングし、2.0%アガロースゲル上で電気泳動を行った。

2.5 クローニング及び塩基配列のシーケンス

2.4で得られた増幅断片を、pCR® 4 Blunt-TOPO®ベクター (インビトロジェン㈱) にライゲーションし、*Escherichia coli* JM109コンピテントセル (タカラバイオ㈱) を形質転換した。アンピシリン (100 μ g/ml) を含む Luria-Bertani 培地プレート上で一晩培養して得られた形質転換株に対応する白色コロニー10個を任意に選択し、50 μ l TEに懸濁した後、Template DNA Amplification Kit (GEヘルスケア バイオサイエンス㈱) を用いてマニュアルに従ってプラスミドDNAの増幅を行った。増幅されたプラスミドDNAを template



図1 実験スキーム
Fig. 1 Experimental scheme.

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GEヘルスケア バイオサイエンス㈱) を用いてシーケンシング反応を行い、ITS領域の塩基配列を DNA シーケンサー (SQ5500E, 業日立ハイテクノロジーズ) によって決定した。

2.6 塩基配列の解析と菌種同定

2.5で得られた塩基配列を用いて、米国立医学図書館の生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI) の相同性検索アルゴリズム (Basic Local Alignment Search Tool using a nucleotide query, Blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による解析を行った。アライメント表示数 (Max target sequences=10) 以外の他の検索パラメータは、全てデフォルトで行った。

3. 結果

3.1 指標菌培養木片中に存在する担子菌種の同定
指標菌を接種した各木片を破砕、懸濁して得られたサンプル溶液 $1\mu\text{l}$ 中に含まれるゲノムDNAをPh29 DNAポリメラーゼを用いて18時間増幅したところ、培養日数に関わりなく全てのサンプル溶液でDNAの増幅が観察された(図2)。分子量マーカーとの比較により、増幅されたDNAの塩基配列長は $2 \times 10^3 - 2 \times 10^4\text{ bp}$ 程度であることを確認した。また、260nmにおける吸光度測定により、18時間の反応で約50ng/ μl 以上のDNAが得られることを明らかにした。これに対して、Ph29 DNAポリメラーゼによる増幅反応を行わなかったサンプル(0h)では電気泳動上で明瞭なバンドを与える増幅は見られなかった。さらに、図3に示したように、増幅されたDNAを誘型にして担子菌rDNAのITS領域に特異的なプライマー対を用いてPCRを行った結果、ITS領域に由来すると考えられる600~700bp程度のバンドが検出できた。一方、図2で示したPh29 DNAポリ

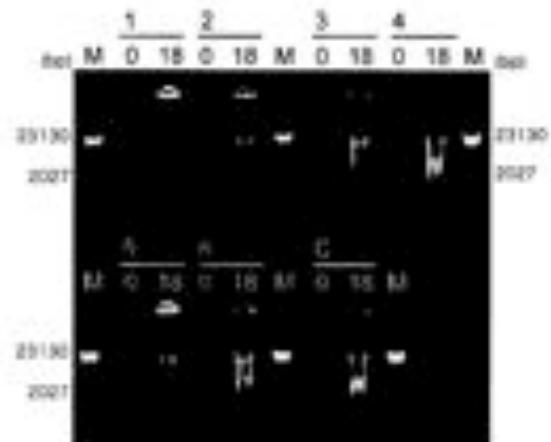


図2 木片中のゲノムの増幅

Fig. 2 Amplification of genomic DNA from wood blocks.

- 1, 2 : *Coscinophora paterna*
- 3, 4 : *Trametes versicolor*
- 5, 6 : *Fomes annulus palustris*
- C : Control
- M : Size marker ($\phi \times 174\text{ bp II digest}$)
- 0 : 増幅反応前 (non-amplified)
- 18 : 増幅反応後 (amplified)
- 奇数サンプル : 接種後一週間
- Odd-number : 1 week after inoculation
- 偶数サンプル : 接種後二週間
- Even-number : 2 weeks after inoculation

メラーゼによる増幅反応では、TBを入れたコントロールでもDNAの増幅が見られたが、図3に示したように、誘型に担子菌のrDNAのITS領域に特異的なプライマーを用いたPCRでは、コントロールの増幅産物ではITS領域に対応するDNAの増幅は認められなかった。

接種後1週間(試料1, 3, 5)または2週間(試料2, 4, 6)経過した木片からサンプル溶液を調製し、Ph29 DNAポリメラーゼによる増幅およびrDNAのITS領域をPCRで増幅して得られた塩基配列を図4に示す。これらの塩基配列を用いてBLAST検索を行ったところ、表1に示すように試料1と2では*Coscinophora paterna* (Accession no. AM293089, Taxonomy ID 80637) に対して99~98%、試料3と4では*Trametes versicolor* (Accession no. AY840588, Taxonomy ID 5325) に対して



図3 Ph29 DNAポリメラーゼによって増幅された木片中のDNAを誘型として担子菌rDNAのITS領域に特異的なプライマーを用いたPCR

Fig. 3 PCR using the specific primers for the ITS regions of basidiomycetes rDNA and the DNA templates amplified by Ph29 DNA polymerase.

- 1, 2 : *Coscinophora paterna*
- 3, 4 : *Trametes versicolor*
- 5, 6 : *Fomes annulus palustris*
- C : Control without template
- M : Size marker ($\phi \times 174\text{ bp II digest}$)
- 0 : 非特異的増幅反応前
- Templates before the amplification by Ph29 DNA polymerase
- 18 : 非特異的増幅反応後
- Templates amplified by Ph29 DNA polymerase
- N : 木片を粉砕してTBに懸濁した上澄み液
- Supernatant of milled wood blocks
- 奇数サンプル : 接種後一週間
- Odd-number : 1 week after inoculation
- 偶数サンプル : 接種後二週間
- Even-number : 2 weeks after inoculation

(A) Sample 1.2 (*Coniophora puteana*)

ITS1

1. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 48
 41. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 148
 61. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 168
 81. GGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 188

ITS2

1. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 48
 41. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 148
 61. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 168
 81. GGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 188

(B) Sample 3.4 (*Trametes versicolor*)

ITS1

1. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 48
 41. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 148
 61. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 168
 81. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 188

ITS2

1. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 48
 41. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 148
 61. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 168
 81. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 188

(C) Sample 5.6 (*Fomitopsis palustris*)

ITS1

1. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 48
 41. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 148
 61. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 168
 81. GGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 188

ITS2

1. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 48
 41. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 148
 61. ATGGTGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 168
 81. TGGATGAACTTAAAGAATTTGTTTGTGAACTTCATTTGTTTCAACCGT 188

図4 木片中の担子菌から得た ITS 領域塩基配列
Fig. 4 Sequences of ITS regions obtained from basidiomycetes in wood blocks.

99%。試料5と6では *Fomitopsis* sp. IMER2 (Accession no. EU015881, Taxonomy ID 457565) に対して100%の相同意があるという結果になった。試料3と4では *Trametes* 属以外に *Phellinus ignobilis* (キコブタケ) が候補として挙げられたが、この配

列が *Trametes versicolor* の配列と極めて高い相同意を示すことが原因と考えられた。試料5と6の結果で複数の菌種が候補として挙げられたので、ClustalW を用いて相同意が高いとされた上位10種の ITS 領域を系統樹解析したところ、*Fomitopsis palustris* と *Fomitopsis pinicola* はそれぞれが属するグループに大きく分かれたが、試料5と6の配列は *Fomitopsis palustris* のクレードに含まれたことから、*Fomitopsis palustris* であると同定された。

3.2 ベイトステーションに設置した木片からの担子菌の検出と同定

図5に示すように、木造住宅地内16カ所にアスペン材を設置したベイトステーションを埋設した。設置1年後に各ベイトステーションから木片を取り出し、目視および抗体法を用いて腐朽度合を比較したところ、図6に示すように、両者における腐朽判定結果は良く一致したが、目視では腐朽が観察されない機体においても抗体法によっては陽性と判定される場合もあった。また、3.1と同様に、各ベイトステーション内の木片を破碎し、懸濁して得られたサンプル溶液を調製し、これに対してゲノム DNA の非特異的増幅と PCR による ITS 領域の増幅を行った。それぞれの増幅過程で DNA の増幅を確認した (データ不掲載)。また、16箇所に埋設した各ベイトステーションの木片から調製したサンプル溶液に対して増幅された DNA 断片をそれぞれ大腸菌中にクローニングし、各プレートから10クローニングずつを採取し、その塩基

表1 各木片の ITS1-5.8S rDNA-ITS2の塩基配列の BLAST 解析結果

Table 1 BLAST analysis of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region amplified from wood blocks.

サンプル Sample	相同意スコア順位 Homology ranking	種名 Species	塩基配列の相同意 Sequence homology
1, 2	1-30	<i>Coniophora puteana</i>	640-641/642 (99%)
3, 4	1-6	<i>Trametes versicolor</i>	534-535/535 (99%)
	7	<i>Trametes</i> sp. GI 304	532/535 (99%)
	8	<i>Phellinus ignobilis</i>	532/535 (99%)
	9-10	<i>Trametes versicolor</i>	531-532/535 (99%)
5, 6	1	<i>Fomitopsis</i> sp. IMER2	529/529 (100%)
	2	<i>Fomitopsis palustris</i>	528/529 (99%)
	3	<i>Fomitopsis</i> sp. FPI 143	573/579 (98%)
	4-5	<i>Fomitopsis pinicola</i>	538-539/583 (92%)
	6	Uncultured basidiomycete	537/584 (91%)
	7	Unidentified basidiomycete	537/584 (91%)
	8-10	<i>Fomitopsis pinicola</i>	537/584 (91%)

(2008年6月9日現在)

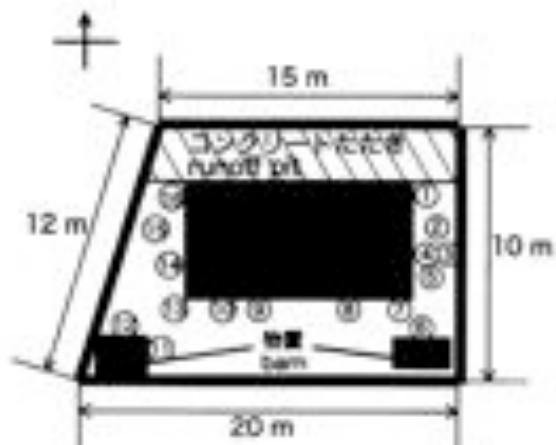


図5 ベイトステーション配置図
Fig. 5 Location of belt stations.

■: 万年版 Reinforced concrete wall
■: ブロック壁 Concrete block wall
図の番号: 設置箇所 number: location number

配列の解析を試みた。ただし、設置箇所3, 4, 5, 7, 8, 9, 16から得たサンプルについては生成したコロニー数が10コロニーに満たなかったため、これについては全てのコロニーを採取し塗基配列の解析を試みた。その結果、合計103の検体について目的とする ITS領域の塗基配列を取得す

ることができた。さらに、BLAST検索に供して相同意解析を行ったところ、92検体についてはデータベース上に登録された配列と相同意を有していた。しかしながら、残りの11検体についてはデータベース上に配列情報が登録されていない未知配列であった(表2)。また、塗基配列の解析ができた103検体のうち80検体については、データベース上に種名あるいは属名が登録されている担子菌と90-100%の相同意で対応が取れた。このようにして、同定された80菌種は10属17種にも及んでいたことから、一軒の住宅敷地内でも環境の違いによって様々な菌が存在していることが確認された。また、ベイトステーションの設置場所に依存して、検出された菌種は大きく異なっていた。このうち、*Sistotrema brinkmannii* (21検体), *Polyoporus tuberaster* (12検体), *Trametes hirsute* (12検体), *Resinicium bicolor* (10検体)、以上の4種の菌種が103検体中55検体と過半数を占めていた。また、*Trametes* 属としては、*Trametes hirsute* (12検体), *Trametes maxima* (3検体), *Trametes versicolor* (3検体), *Trametes ochracea* (1検体), *Trametes* sp. (3検体)と多種の種の存在が確認された。さらに、

No.	VT	Antibody method	Gene identification							
1	+	++	■	■	■	■	■	■	■	■
2		+	■	■	■	■	■	■	■	■
3	++	+	■	■	■	■	■	■	■	■
4			■	■	■	■	■	■	■	■
5			■	■	■	■	■	■	■	■
6	++	+++	■	■	■	■	■	■	■	■
7	+		■	■	■	■	■	■	■	■
8		+	■	■	■	■	■	■	■	■
9		++	■	■	■	■	■	■	■	■
10		+	■	■	■	■	■	■	■	■
11	+	+++	■	■	■	■	■	■	■	■
12		++	■	■	■	■	■	■	■	■
13	++	+++	■	■	■	■	■	■	■	■
14	++	+++	■	■	■	■	■	■	■	■
15	+++	+++	■	■	■	■	■	■	■	■
16	++	++	■	■	■	■	■	■	■	■

■: Trametes, ■: Sistotrema, □: Polyporus, □: Resinicium, ■: Schizophyllum
□: Coniochaete, □: Phlebia, □: other, □: Uncultured fungus, □: Not in database

図6 ベイトステーションから同定された担子菌の属の分布
Fig. 6 Distribution of fungal genera identified from belt stations.

No: 設置箇所 No: location
VT: 目視による腐朽診断 VT: visual test

表2 同定された担子菌のリスト
Table 2 List of identified basidiomycetes.

種名(和名) Specific name (Japanese name)	個体数 Population	相同意(%) Homology (%)	参考 Recital
<i>Cosmetophora patulana</i> (イドタケ)	4	98-100	B.R.
<i>Cryptoporus salicis</i>	1	100	
<i>Hericium erinaceum</i> (ヤマブシタケ)	1	94	W.R.
<i>Phanerochaete chrysorhiza</i> (ヒイロハリタケ)	1	96	W.R.
<i>Phanerochaete sordida</i> (ウスキイロカワタケ)	1	99	+
<i>Pleurotus levis</i>	3	92-95	W.R.
<i>Polyporus tuberaster</i> (タマヨレバタケ)	12	94-95	W.R.
<i>Rusticiella bicolor</i> (ハリタケモドキ)	10	93-95	W.R.
<i>Schizophyllum amplum</i>	2	95-99	W.R.
<i>Schizophyllum commune</i> (スエヒロタケ)	2	99	+
<i>Schizophyllum sp.</i>	1	99	+
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	21	99-100	+
<i>Trametes alniata</i> (アラガカワタケ)	12	94-96	W.R.
<i>Trametes maximana</i>	3	96	+
<i>Trametes ochracea</i>	1	98	+
<i>Trametes versicolor</i> (カラタケ)	2	92-93	+
<i>Trametes sp.</i>	3	92-96	+
Basidiomycete sp.	1	95	
Mycorrhizal basidiomycete	1	99	
Solid root associated fungus UBCTRA	5	94-96	
Uncultured fungus	5	93-100	
not in database	11		
合計 Total	103		

B.R.: 暗色腐朽菌 Brown rot fungi

W.R.: 白色腐朽菌 White rot fungi

存在が確認された木材腐朽担子菌で暗色腐朽菌は *Cosmetophora patulana* のみで、それ以外は全て白色腐朽菌であった。なお、92個体中13個体は、データベース上には相同意の高い配列情報は登録されているが、属種が未同定の菌 (uncultured fungus) であることがわかった。さらに、遺伝子解析に基づく菌株の同定結果と目視および抗体法による腐朽診断結果を比較したところ、*Trametes* 属および *Polyporus tuberaster* は主に目視および抗体法で腐朽が進行していたと判断された箇所から多く検出されたのに対し、*Sistotrema brinkmannii* はベイオステーションの設置場所や腐朽度合に関わりなく検出された。

4. 考察

近年、遺伝子解析技術を利用した木材腐朽菌の

種同定が可能となってきた。これまでに報告されている中では、PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 法が盛んに使われておらず、Schmidt ら¹⁴、Jasarevich ら¹⁵や Glew ら¹⁶がそれぞれ担子菌の識別を報告している。堀沢らは日本各地で *Serpula lacrymans* (ナミダタケ) をサンプリングし、PCR-RFLP 法及び randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 法を用いて種内での変異を観察している¹⁷。一方、rDNA の ITS 領域を PCR 法で増幅し、特定の菌や担子菌の検出や同定を行う手法に関してもいくつか報告されており、Grande¹⁸や Jasarevich ら¹⁹、Schmidt ら²⁰、杉山ら²¹は種に特異的なプライマーあるいは担子菌の rDNA の ITS 領域に特異的なプライマー対を用いて PCR を行うことによって菌種の同定が可能であることを報告している。しかしながら、いずれの

方法においても遺伝子解析を行う前段階として培養というスクリーニング行程を経ていることから、実際に木材中に生息している菌種を反映していない可能性がある。また、培養を経ずに直接PCRを行う場合でも、腐朽初期段階のように得られる菌体量（DNA量）が限られる場合は、多量の試料が必要となるだけでなく、PCRを阻害する夾雜物の存在も無視できない。そこで我々は Ph29 DNA ポリメラーゼによる増幅を組み合わせた手法に着目した。Ph29 DNA ポリメラーゼは枯草菌ファージ Phi29 由来の複製ポリメラーゼで、30°C の等温反応で核酸のみを増幅する特性を持ち、本ポリメラーゼを用いた DNA の非特異的増幅法は簡便であり、少量のゲノム DNA からの増幅ができるため¹⁴。近年出生前診断や法医学的な DNA 分析に用いられている。本研究では、PCR によって ITS 領域を増幅する前段階に Ph29 DNA ポリメラーゼとランダムヘキサマーを用いた非特異的な DNA 増幅行程を組み込み、少量のサンプル中に含まれる担子菌の検出と同定を試みた。

上述の手法に関しては、すでにアーバスキュラ菌根菌の胞子を試料として、非特異的増幅法を用いて同定まで行った報告例はあるが¹⁵。菌糸からの同定は報告例がない。実験2.1の指標菌を用いた実験では、図2、図3に示すように、木片中からでも寒天培地に植菌したものと同一の菌株が同定できた。これは、寒天培地から木片へと菌糸が侵入し、木片を栄養源としながら成長している状態。つまり腐朽が進行し始めた状態の木片を試料とした同定が可能であることを示している。このように Ph29 DNA ポリメラーゼによる DNA の増幅を PCR の前段階に組み入れることで、PCR による増幅だけでは困難と考えられる約 1 mg 程度の木粉試料でも、その中に存在する木材腐朽菌の菌種同定を行うのに十分な DNA 量 (50 ng/μl) を取得することが可能であった。

指標菌を用いた実験では、表1に示すように試料1と2から得られた塩基配列は *Coniophora puteana* 由来の配列が多数ヒットしたのに対して、試料3と4、および試料5と6では複数の菌種が候補として挙げられていた。また、*Fomitopsis palustris* を植菌した試料5と6から得た塩基配列データは、データベースに登録されている配

列 (Accession no. DQ4593404, Taxonomy ID 186125) に対しては99%の相同性であり、データベース上で種名の記載がない *Fomitopsis* sp. (ツガサルノコシカケ属) 菌に対しては100%の相同性を示した。以上の結果は、本手法を用いた菌種の同定には、信頼できる ITS 領域の塩基配列およびデータベースの充実が不可欠であることを示していた。

住宅周囲にペイトステーションを設置し、そこに設置された木片に生息する担子菌の同定を試みたところ、目視および抗体法によって腐朽されていると診断された木片からは主に *Trametes* 属と *Polyporus aderans* が同定された。しかしながら、データベース上に *Uncultured fungus* として登録されている菌と相同性が高い5菌種も検出されたことから、本手法は腐朽材中に存在する難培養性担子菌の検出にも有効であることが示された。今回の実験では、*Schizodon brinkmannii* や *Phlebia Nivalis* などが木片中に存在する主要な菌種として検出されたが、これらの菌種はこれまでに国内では報告された例は無い。また、*S. brinkmannii* および *P. Nivalis* の検出は目視、および抗体法で腐朽が進んでいると判定された結果とは必ずしも相関性は認められなかった。実験に用いたアスペン材が輸入材であることを考え合わせると、これらの菌は木片中に設置以前から存在していた可能性も否定できない。その他の検出された主な菌種として *Trametes* 属、*Polyporus* 属、*Coniophora* 属、*Resinicium* 属が挙げられる。*Trametes* 属、*Polyporus* 属、*Coniophora* 属の検出は腐朽状態の進行と相関性が高く、*Resinicium* 属は東西側に偏って存在していた。Schmidt らの報告によると、ドイツ北部の建築物の約60.9%が *Serpula lacrymans*、約8.0%が *Coniophora puteana* により腐朽被害を受けているということであった¹⁶。しかしながら、本実験で検出された褐色腐朽菌は *Coniophora puteana* だけであり、他のほとんどの白色腐朽菌に分類されている菌種であった。その理由の一つとしては、設置した木片が広葉樹のアスペン材であったことがあげられる。日本の住宅では部材として主に針葉樹材が使用されていることから、今後、針葉樹材に本手法を適用した実験が必要と考えられる。

本手法は微量の腐朽材試料から簡便かつ迅速に菌の種同定を行えることから、木質外構施設や木

造住宅に棲息する木材腐朽菌のモニタリングならびにこれらの木質構造物の維持管理手法を考慮していくための一助として利用できることが期待される。また、本手法を用いて保存処理木材から薬剤耐性菌を検出することや、木材腐朽菌生育の特徴に関するデータベース構築、さらに木材腐朽菌分布の地域環境マップ作成などをやっていくことも可能であると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、毎日本学術振興会の科学研究費補助金特別研究員奨励費（課題番号19-4815）の経費によって行った。関係各位に感謝致します。

引用文献

- 前木利克：“木材保存学入門改訂2版”。日本木材保存協会編、2001、pp.39-42。
- 今村裕嗣、川井秀一、田元京、平井卓郎編著：“建築に役立つ木材・木質材料学”，東洋書店、1997、pp.174-176。
- Gadkar, V. and Riling, M. C. : Application of Ph29 DNA polymerase mediated whole genome amplification on single spores of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, *FEMS Microbiology Letters*, **242**, 65-71 (2005).
- 田中計実、愛知俊貴、森岡健志：抗原抗体反応を利用した腐朽菌検査法の開発。毎日本材保存協会第20回記念年次大会発表論文集、22-27 (2004)。
- Claessen, C. A. : Immunological Detection of Wood Decay Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **39**, 133-143 (1996).
- 土居修一、平野雅義、藤井義久、桃原郁夫、森満範：“実務者のための住宅の腐朽・虫害の診断マニュアル”，毎日本材保存協会編、2007、pp.153-155。
- Gardes, M. and Bruns T. D. : ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Mol. Ecol.*, **2**, 113-118 (1993).
- Schmidt, O. and Moreth, U. : Identification of the Dry Rot Fungus, *Serpula lacrymans*, and the Wild Merulius, *S. himantoides*, by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). *Holzforschung*, **53**, 123-128 (1999).
- Jasulavich, A. C., Ostrofsky, A. and Jellison, J. : Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66** (11), 4725-4734 (2000).
- Glen, M., Tommervik, I. C., Neale L. B. and O'Brien, P. A. : Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus forests and plantations. *Mycol. Res.*, **105** (2), 138-149 (2001).
- Horisawa, S., Sakurai, Y., Tasaka, K. and Doi, S. : Detection of intra- and interspecific variation of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by PCR-RFLP and RAPD analysis. *J. Wood Sci.*, **50**, 427-432 (2004).
- 須原弘登：分子生物学的手法を利用した木材腐朽菌子嚢の検出および分類。木材保存、**30**、192-203 (2004)。
- Schmidt, O. : "Wood and Tree Fungi". Springer, Hamburg, 2006, pp.207-211.
- 杉山智昭、森満範、宮内輝久、中谷誠、原田陽：PCR法による木材腐朽菌の同定。木材保存、**29**、98-104 (2003)。
- Blanco, L., Bernad, A., Lazaro, J. M., Martin, G., Germendia, C., and Salas, M. : Highly efficient DNA synthesis by the phage G29 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **264** (15), 8905-8910 (1989).
- Spits, C., Le Caigne, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steentghem, A., Liebans, I. and Sermon, K. : Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Nan. Mater.*, **27**, 496-503 (2006).

(2008.9.9 受付)

(2008.12.1 受理)

2009年3月24日時点 木材保存誌 投稿中

「腐朽木材中における担子菌叢の定量的評価を目指したDNA増幅法」

(和田朋子, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩)

“A method of DNA amplification for the quantitative evaluation on basidiomycotal flora in decayed wood”

(Tomoko Wada^{*1}, Kiyohiko Igarashi^{*1} and Masahiro Samejima^{*1})

*1 東京大学大学院農学生命科学研究所 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

謝辞

東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻森林化学研究室の鮫島正浩教授には、5年間もの長い間本研究を進めるに当たって、研究方針の決定から結果に関する考察、学会での発表内容や論文作成の際のご指導に至るまで終始暖かく親身にご指導をして頂き、また様々な分野の研究者の方にお会いする機会など未熟な私のためにご尽力を承りました。心より深く感謝致します。

そして、実験を行うにあたり、斬新なアイディアで本研究を発展的な方向に導いて下さっただけではなく、論文の書き方、実験の進め方、研究者としての在り方など様々な面において助言を賜りました五十嵐圭日子准教授に心よりお礼申し上げます。また、寺田珠美助教には研究室生活を送るにあたって必要な試薬管理や会計等についてアドバイスを頂いたことやお世話になりましたこと大変感謝致します。

本実験を始めるにあたって実験のアドバイスから設備、器具の使用法まで付きつ切りで基本から優しく教えて下さった三菱レーヨン（株）の加治佐平博士に心より感謝致します。その他、森林化学研究室の先輩や同期、後輩の方々には研究面、生活面において様々なことを教えて頂き大変お世話になりました。

そして、（独）森林総合研究所の桃原郁夫博士には強制腐朽試験木片を御恵与頂いた他、今後の研究に結びつく内容についてご教授頂きましたこと、私の今後の進路を心配して頂いたこと等大変感謝致します。また進路等について様々なご尽力を承り大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。

また、東京農工大学の吉田誠准教授には本手法の確立に当たりまして有意義な討論をさせて頂きました。また、研究室の先輩として、相談を聞いて頂いたり研究者としての一つの道標を示して頂いたり心の励みとなっております。

今回のブラインド試験片、およびベイトステーションの抗体法による試験結果を快く御恵与頂きました（株）エス・ディー・エス バイオテックの田中計実氏に大変感謝致します。その他、木材保存分野の先生方や関係者の方々には推薦文を書いて頂いたこと、腐朽菌の同定や参加記の執筆など様々な機会を与えて下さいましたこと等大変感謝致します。

研究者を目指す私により良い環境で学べるようにと、森林化学研究室を紹介して下さいました、学部時代の恩師である千葉大学教育学部の鈴木彰教授にも深く感謝致します。

最後にいつでも私を励まし助け続けてくれた父母、姉妹、友人に深く感謝し、謝辞とさせて頂きます。