

I.4.3 分子生物学的手法を用いた腐朽判定技術の開発

平成 14～17 年度
耐朽性能科，品種開発科

寒冷な北海道において，木造構造物を構成する部材の劣化は主として木材腐朽菌によって引き起こされている。腐朽被害の予防，あるいはその進行を最小限にとどめるためには部材における木材腐朽菌の発生・侵入を把握した上で早期に適切な対策を講じる必要がある。本研究は分子生物学的手法を用いて DNA レベルでナミダタケ等の木材腐朽菌を迅速に検出し，住宅を始めとした木造構造物の適切な維持管理による耐用年数の延長および部材の劣化診断に寄与することを目的としている。

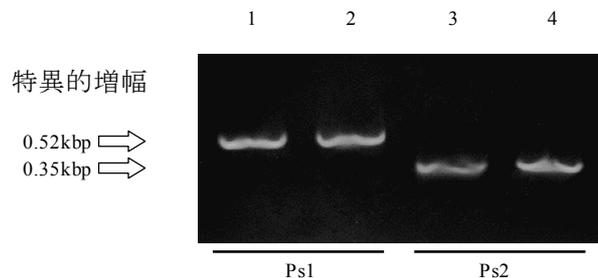
平成 14 年度は代表的な木材腐朽菌であるナミダタケとイドタケをモデルとして基本的な DNA 抽出条件を検討した。さらに，実験的に腐朽させた木材試験片から抽出した DNA に対して PCR 分析を試み，標的とした木材腐朽菌を検出可能であることを確認した。15 年度においては PCR 反応の特異性と増幅効率を向上させるため種々の項目について検討を行うとともに，実際の住宅部材に発生した木材腐朽菌の分析を行った。

1. PCR 適正条件の検討

通常 *Taq* ポリメラーゼによる反応と抗 *Taq* 抗体を結合させた *Taq* ポリメラーゼによるホットスタート反応を比較検討したが，同一条件下で両酵素による鋳型 DNA の増幅効率および特異性に顕著な差異は認められなかった。反応サイクル数については，未精製および精製済みの鋳型 DNA 試料ともに 40 を越えるサイクルを実行した場合には非特異的な増幅が増加しやすい傾向にあった。反応温度プログラムについてはアニーリング温度を段階的に変更させるステップダウンプログラムが非特異的な増幅を減少させる上で有効であることが確かめられた。アニーリングと伸長反応を同時に行うシャトルプログラムについては，用いるプライマーの種類によって増幅効率の減少が認められた。

2. 住宅部材に発生した木材腐朽菌の分析

腐朽被害を受けた住宅（旭川市）の実地調査を行い，床下の部材から菌糸および木材試料を採取した。それぞれの試料から DNA を抽出し，木材腐朽菌 DNA の PCR 増幅が可能であるか検討した。その結果，イドタケに特異的なプライマーを用いることによって土台の表面にまん延している菌糸からイドタケと一致する DNA 増幅が確認されたため，当該菌を DNA レベルでイドタケと同定することができた。床下部材の健全部と腐朽被害部から一定間隔で穿孔を行い採取した木材試料に関しては健全部試料において PCR による DNA 増幅は観察されなかった。それに対し腐朽被害部試料については，表面菌糸から抽出した鋳型同様に，イドタケに特異的なプライマーを用いた PCR によって DNA の増幅が観察された。また，住宅部材に発生した菌類，もしくは菌糸と疑われるものが付着した試料についての調査依頼を受け分析を行った結果，保存性の高い遺伝子領域（18S，28SrRNA）配列を標的とするプライマーによって菌類の rDNA の ITS 領域を増幅することが可能であり，その内の数件についてはナミダタケに特異的なプライマーを用いた PCR によって DNA の増幅が確認され，ナミダタケと同定された（第 1 図）。



第 1 図 住宅部材菌糸より抽出した DNA の PCR 増幅

凡例) 1,3 : ナミダタケ標準株 (NBRC8697), 2,4 : 住宅部材菌糸
注) Ps1,Ps2 : ナミダタケ特異的プライマー