

分子生物学的手法による木材腐朽菌の同定

杉山 智昭
佐藤真由美

森 満範
中谷 誠^{*1}

宮内 輝久
原田 陽^{*2}

Genetic Identification of Decay Fungi using Polymerase Chain Reaction Analysis

Tomoaki SUGIYAMA
Mayumi SATOH

Mitsunori MORI
Makoto NAKAYA

Teruhisa MIYAUCHI
Akira HARADA

Specifically primed polymerase chain reaction(PCR)analysis was carried out for the detection and identification of *Serpula lacrymans*, which is the predominant dry rot fungus in Hokkaido. In this study, internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal DNA (rDNA) were adopted for analysis. Although a relatively rapid and simple procedure of DNA extraction was conducted to obtain PCR templates, target regions were successfully amplified in all strains investigated. Furthermore, PCR in this procedure allowed amplification of DNA templates of the fungi tested, which were extracted from mixture of freeze-dried mycelium and coniferous heartwood powders(*Tsuga heterophylla*, *Picea jezoensis*, *Abies sachalinensis*), and from pieces of decayed wood. The results suggested that this technique has the possibility of accurate detection and identification of the fungi in wood materials.

Key words : decay fungi, PCR, rDNA, identification, *Serpula lacrymans*
木材腐朽菌, PCR, リボソームDNA, 同定, ナミダタケ

北海道において住宅に被害を与える代表的な木材腐朽菌であるナミダタケをDNAレベルで検出・同定するために種特異的領域の増幅を行うPCR分析を試みた。分析のターゲットとしてrDNAのITS領域を選定した。鋳型DNAの抽出にあたり、プロテナーゼKを用いた比較的迅速かつ簡易な手法を採用したが、標的となるDNA領域は全ての供試菌において良好に増幅された。心材木粉(ベイツガ, エゾマツ, トドマツ)と凍結乾燥菌系の夾雑条件およびナミダタケによって腐朽した木材から抽出した鋳型DNAについてもナミダタケに特異的な領域の増幅が確認された。以上の結果から、比較的簡易なDNA抽出法とPCR分析を用いることにより腐朽木材に存在するナミダタケを迅速にDNAレベルで検出・同定できることが示された。

1. はじめに
北海道では、住宅を構成する部材の劣化は主にナミ

ダタケ (*Serpula lacrymans*) あるいはイドタケ (*Coniophora puteana*) を中心とした木材腐朽菌によっ

て引き起こされる¹⁻⁴。住宅をはじめとした構造物において、木材腐朽菌による被害が進行すると、部材の強度が低下し、構造上の安全性が著しく損なわれる。したがって木材腐朽菌による被害を最小限にとどめるためには、木材腐朽菌の発生を早期に発見し対策を講じる必要がある⁵。

住宅部材に菌類が発生した場合、それが木材腐朽菌以外であれば腐朽が生じる可能性はない。それに対し、発生した菌類が木材腐朽菌であった場合には、発見時点で木材に顕著な腐朽が観察されないとしても、以後、急激に腐朽が進行する危険性を常に有していることになる。そのため、発生した菌類が木材腐朽菌であるか否かの判断を行うことは実際の対策を考える上で重要である。

現在、木材腐朽菌の同定は形態および生理的特徴の比較・観察に基づいて行われるのが主流となっている。しかし、特徴的な子実体が確認されない限り、これらの手法は菌の培養や単離に時間がかかり、種間の形態および生理的特徴などが類似している場合や種内変異がある場合にその判別は困難を極める。

近年、菌類の同定にDNAやタンパク質のアミノ酸配列などの生体高分子を指標とした分子生物学的手法が用いられるようになってきた^{6,7}。分子生物学的手法の利点としては菌類の同定を短時間で行うことができることに加え、観察者の主観や恣意性を排除した客観的な同定が可能であることが挙げられる。

そこで本研究では、北方圏において住宅に被害を与える代表的な木材腐朽菌であるナミダタケをDNAレベルで迅速かつ比較的簡易に同定することを目的として、諸条件において抽出した本種のDNAに対しポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いた分析を試み、その有効性について検討を行った。

なお、本研究の一部は平成14年度日本木材学会北海道支部研究発表会(2002年10月、札幌市)および第8回国際菌類生物学会(IFBC:2002年12月、メキシコ、グアナファト市)で発表した。

2. 試験方法

2.1 供試菌株

本研究ではナミダタケ標準菌2菌株(S1, S2株)と、腐朽住宅から分離したナミダタケと推定される9菌株

第1表 供試菌株

Table 1. List of fungi strains tested.

種名 Species	菌株 Strain	略号 Abbr.
1. <i>Serpula lacrymans</i>	FFPRI 0739	S1
2. "	IFO 8697	S2
3. 未同定株 Unknown	HFPRI 7702	S3
4. "	HFPRI 7806	S4
5. "	HFPRI 8102	S5
6. "	HFPRI 8204	S6
7. "	HFPRI 8205	S7
8. "	HFPRI 8605	S8
9. "	HFPRI 8607	S9
10. "	HFPRI 8705	S10
11. "	HFPRI 0201	S11

凡例) FFPRI: 森林総合研究所, IFO: (財)発酵研究所,
HFPRI: 北海道立林産試験場

Legend) FFPRI: Forestry and Forest Products Research Institute;
IFO: Institute for Fermentation, Osaka;
HFPRI: Hokkaido Forest Products Research Institute

(S3 ~ S11 株)について分析を行った(第1表)。これらの菌系を分析に用いたが、S11株についてはその分離源となった子実体についても分析を行った。

2.2 DNAの抽出

2.2.1 菌系からの抽出

液体培地(麦芽エキス0.38g, ペプトン0.19g, グルコース0.94g, KH_2PO_4 0.11g, $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08gを75mlの蒸留水に溶解)で20, 60日間振とう培養したナミダタケS1株の菌系を凍結乾燥し乳鉢にて粉碎したもの、およびポテトデキストロース寒天(PDA)培地上で20, 7 ~ 20日間培養した各供試菌の菌系を培地から直接かき取ったものを抽出試料として用いた。

抽出はプロテナーゼKを用いた一般的なSDS-フェノール法(以下、pK法)を適用した⁸)。抽出試料0.04gを0.15M NaCl, 0.1M EDTA (pH8.0), 1% SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ のプロテナーゼKを含む10mlの抽出バッファーに入れ、37 で2時間ゆるやかに振とうしながら加温した。続いて60 で30分間加温し、氷水中で10分間冷却した後、等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール混液(体積比25:24:1)を加え十分にかくはんした。15,000rpmで10分間遠心分離を行った後、水層を別容器に移し等量のクロロホルム:イソアミルアルコール混液(体積比24:1)を加えてかくはんし、再び15,000rpmで5分間遠心分離を行い水層を別容器に移し、2倍量のエタノールを加えて-20 で24時間静置した。これを15,000rpmで10分間遠心分離し、沈殿物を70%エタノールで洗浄した後

15,000rpmで2分間遠心分離し、沈殿物を風乾して1mlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)に溶解したものをPCRの鋳型とした。

また、PDA培地上で培養した各供試菌については、前記pK法に加え、より簡易かつ迅速な以下の2つの方法を試みた。

ボイル法: 菌糸0.02gを3mlのTE緩衝液に投入してホモジナイズした後、12,000rpmで4分間遠心分離を行った。その上清を100の沸騰水中で1分間加温した後、滅菌蒸留水で100倍希釈しPCRの鋳型とした。
簡易pK法: pK法で用いたものと同組成の抽出バッファー500μlが入った1.5mlのマイクロチューブに菌糸0.02gを加え55で1時間加温した後、等量のクロロホルム:イソアミルアルコール混液(体積比24:1)を加えて十分かくはんした後、12,000rpmで10分間遠心分離を行った。上清を回収し滅菌蒸留水で100倍希釈したものをPCRの鋳型とした。

2.2.2 子実体からの抽出

S11株の子実体を滅菌蒸留水で洗浄し、ろ紙を用いて余分な水分を取り除いた後に0.02gを切り取り、簡易pK法によりDNAの抽出を行った。

2.2.3 凍結乾燥菌糸と心材木粉の混合物からの抽出

PCR法によって腐朽材中の木材腐朽菌をより迅速に同定するためには、腐朽材から木材腐朽菌を単離・培養することなく、直接腐朽材からDNAを抽出して分析を行う必要がある。そこで、木材との共存下でPCR法による同定が可能であるかを確認するため、S1株の凍結乾燥菌糸を用い、ベイツガおよびエゾマツ、トドマツ材の気乾心材木粉(ウィレイミルにて0.5mm以下に粉碎)を凍結乾燥菌糸に対する重量比で10~10,000倍の割合で混合した夾雑条件で抽出を行った。その混

第2表 心材木粉の混合重量比

Table 2. Mixture ratio of heartwood powder and mycelium weight.

樹種 Species	略号 Code	心材木粉/凍結乾燥菌糸(w/w) Heartwood powder/mycelium
ベイツガ <i>Tsuga heterophylla</i>	B1	10
	B2	100
	B3	200
	B4	500
	B5	1,000
	B6	1,500
	B7	2,000
	B8	5,000
	B9	10,000
エゾマツ <i>Picea jezoensis</i>	E1	10,000
トドマツ <i>Abies sachalinensis</i>	T1	10,000

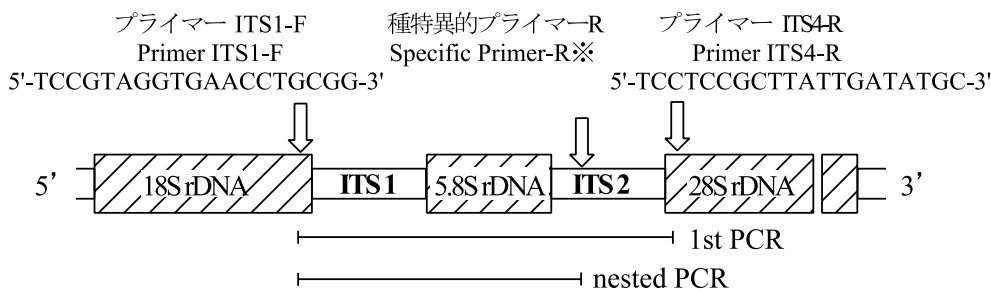
合比率を第2表に示す。抽出方法は簡易pK法を抽出バッファーのスケール(0.5~90ml)および加温時間を変えて(55, 1時間加温後, 37, 15時間加温)用いた。

2.2.4 腐朽木材からの抽出

エチレンオキサイドガスで滅菌したトドマツ辺材および心材板(1(T)×20(R)×40mm(L))をプラスチックネット上にのせ、S1株をまん延させたPDA培地上に設置し、60日間腐朽させた後、板を取り出し、表面に付着している菌糸を削り取った。板材から0.01gの木片を切り取り、簡易pK法により抽出を行ってPCRの鋳型を調製した。

2.3 PCR分析

18S, 5.8S, 28SrRNAをコードする保存性の高い遺伝子領域を含むリボソームDNA(rDNA)のInternal transcribed spacer(ITS)領域(第1図)をプライマーITS1-F(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')・ITS4-R(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')を用いてPCR



第1図 PCR増幅領域およびプライマー結合位置

Fig. 1. Target regions and the binding sites of primers.

Specific Primer-R: 5'-AATGTTGTCTTGCGACAACG-3'

第3表 PCR増幅産物のサイズ

Table 3. Size of amplified DNA fragments.

プライマー対 Primer pair	増幅 DNA 断片(bp) Size of DNA fragments(bp)
ITS1-F・ITS4-R	655 (1st PCR)
ITS1-F・SLs-R	588 (nested PCR)

により増幅した後、その増幅産物を鋳型としてITS1-Fと種特異的なプライマー SLs-R (5'-AATGTTGTCTT GCGACAACG-3')を用いて、再びPCR増幅を行い種の同定を行った (nestedPCR)。プライマーの配列はWhiteら⁹⁾およびMorethら⁷⁾に従った。第3表にシーケンスデータから予測されるDNA増幅産物(断片)のサイズを示す。

PCRは0.5 μlの鋳型DNA溶液と1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ (Takara Ex Taq, 宝酒造株式会社)を含み、最終濃度を10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPsに調製した25 μlの反応液に等量の実験用オイルを重層し反応させた。

増幅条件は 熱変性(95), 1分間 アニーリング(55), 1分間 伸長反応(72), 1分間を1サイクルとする反応を32サイクル、サーマルサイクラー (DNA REACTOR XE-2000, 日本テクノサービス)を用いて行った。なお、最初のサイクルの熱変性および最後のサイクルの伸長反応は5分間に延長して反応させた。

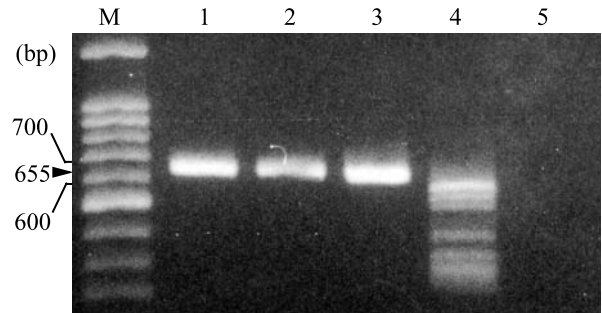
反応終了後、PCR増幅産物8 μlを1.6 μlのローディングバッファーと混合し、エチジウムブロマイドを加えた1.5%アガロースゲルで電気泳動(泳動槽:Mupid-2, コスモバイオ, バッファー:0.5 × TBE)した後、UVトランスイルミネーター上でDNAバンドの観察を行った。

3. 結果および考察

3.1 抽出方法の比較

S1株を用い、pK法、簡易pK法およびボイル法により抽出されたDNAサンプルを鋳型としてITS領域(プライマー ITS1-F・ITS4-R使用)をそれぞれPCRにより増幅し、電気泳動を行った結果を第2図に示す。

標準的なpK法を用いて菌糸から抽出された鋳型DNAについては凍結乾燥による粉末化の有無に関わら



第2図 PCR増幅におよぼす各抽出法の影響(S1)

凡例) M: サイズマーカー, 1: pK法(凍結乾燥サンプル) 2: pK(菌糸サンプル) 3: 簡易pK法(菌糸サンプル) 4: ボイル法(菌糸サンプル) 5: ネガティブコントロール

Fig. 2. Effect of different extraction methods on PCR amplification(S1).

Legend) M: Size marker; 1: SDS-Phenol (freeze-dried mycelium); 2: SDS-Phenol (mycelium); 3: Simplified SDS-Chloroform (mycelium); 4: Boiling (mycelium); 5: Negative control

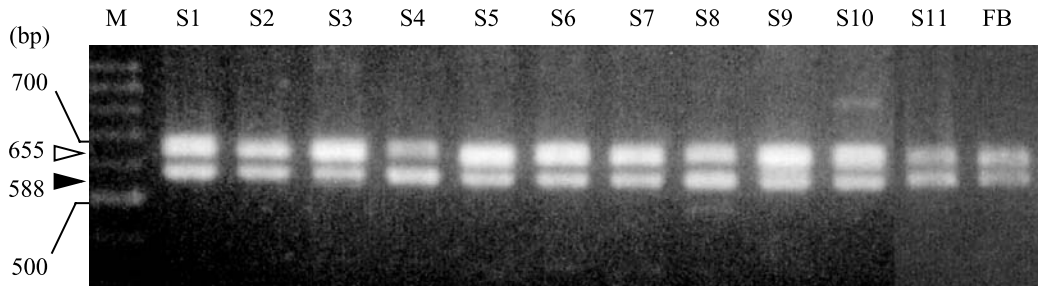
ず、ターゲットであるITS領域は良好に増幅され、シーケンスから予測されるサイズと一致するDNAバンド(655bp)がそれぞれ観察された。また、簡易pK法を用いた場合においてもpK法と同様にナミダタケに特異的な655bpのDNAバンドが観察された。

標準的な手順に従ったpK法ではDNAの抽出に通常1~2日程度を要するが、今回検討を行った簡易pK法では行程を2時間程度に短縮できることから、この抽出法は迅速な分析に寄与する手段となりうる。

一方、ボイル法ではDNAが全く増幅されなかったり、非特異的バンドが現れる場合があり、再現性のある安定した結果が得られなかった。PCRの増幅効率および特異性に影響を与える要因としては、反応液の組成、プライマーの設計、温度プログラム、鋳型DNAの精製度などが挙げられる。今回、同一の反応条件において簡易pK法で得られた鋳型DNAには良好な増幅が見られることから、ボイル法での結果については鋳型DNAの精製度の関与が示唆される。しかし詳細な原因の解明については今後のさらなる検討を要する。

3.2 PCR分析によるナミダタケの同定

第1表に示した供試菌株について、菌糸から簡易pK法によって抽出した鋳型DNAを用いてITS領域を増幅した後、種特異的なプライマーを用いてnested PCRを行った結果を第3図に示す。nested PCRによって、全ての供試菌株についてナミダタケに特異的なDNA断片(588bp)の増幅が確認された。S1, S2の標準菌



第3図 菌糸および子実体より増幅されたDNA断片

凡例) M: サイズマーカー, S1, S2 ナミダタケ S1, S2株, S3 ~ S11: 腐朽住宅からの分離株 S3 ~ S11株, FB: 子実体 (S11株)

Fig. 3. Amplified DNA fragments obtained from the mycelium and fruit-body.

Legend) M: Size marker; S1, S2: *Serpula lacrymans* S1, S2; S3 ~ S11: Strain from damaged timber S3 ~ S11; FB: Fruit-body (sample from S11)

株と同じDNA断片の増幅が観察されたことにより、腐朽住宅から分離したナミダタケと推定される9菌株 (S3 ~ S11株) についても本研究においてDNAレベルでナミダタケと同定することができた。

また、分離した菌糸体に限らず、子実体 (S11) を直接分析した場合においても菌糸体と同一の特異的増幅が確認された。この結果は環境・成長段階などの外的要因により大きく変動する表現型と比較して、外的要因の影響を受けない遺伝子型を指標とする分子生物学的同定技術の利点を裏付けるものと考えられる。

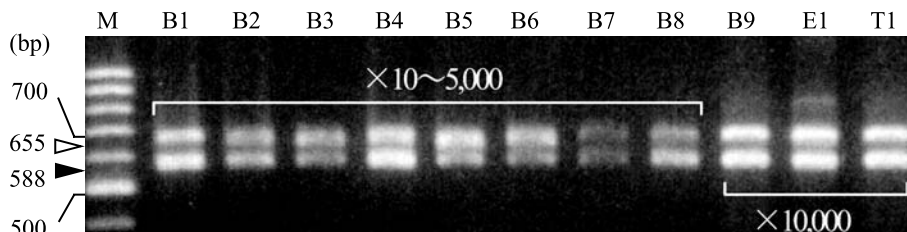
3.3 腐朽木材からのナミダタケの同定

第2表に示したベイツガ心材木粉混合条件については、最初に行ったPCRにおいて、心材木粉の重量比が大きいものに関してはITS領域 (ITS1-F・ITS4-R, 655bp) のバンドが薄くなる傾向が認められたが、10,000倍条件においても増幅が確認された。第4図に示すように、続くnested PCRではナミダタケに特異的なDNAのバンド (ITS1-F・SLs-R, 588bp) が全ての

条件で確認された。また、エゾマツ、トドマツの心材を用いた条件においても10,000倍の混合条件でバンドを検出することが可能であり、今回用いた樹種間で差は認められなかった。

第5図に実験的に腐朽させたトドマツ辺材および心材板より抽出した鋳型DNAをPCRにかけて得られた増幅産物の電気泳動像を示す。この図に示されるように、辺材あるいは心材より抽出した鋳型のいずれにおいても、菌糸および子実体、もしくは菌糸と心材木粉の混合試料から抽出された鋳型同様、ナミダタケに特異的なDNAの増幅が確認された。

木材には主成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンの他に多様な糖類や抽出成分が含まれている¹⁰⁾ ため、木材夾雑条件下で抽出を行った場合にはこれらの成分がPCR反応を阻害することが考えられる¹¹⁾。しかし、今回試みた簡易pK法を用いることによって、腐朽木材からPCR分析によりナミダタケを検出・同定できることが確認された。

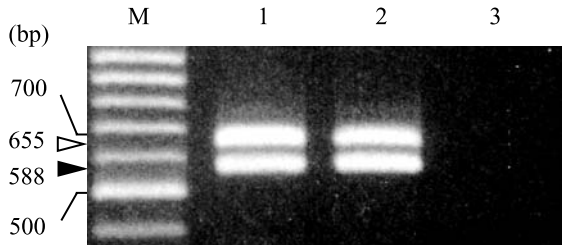


第4図 心材木粉混合条件におけるPCR増幅産物

凡例) M: サイズマーカー, B1 ~ B9: ベイツガ (x10 ~ 10,000), E1: エゾマツ x 10,000, T1: トドマツ x 10,000

Fig. 4. Amplified DNA fragments obtained from the mixture of heartwood powder and mycelium.

Legend) M: Size marker; B1 ~ B9: *Tsuga heterophylla* (x10 ~ 10,000); E1: *Picea jezoensis* x 10,000; T1: *Abies sachalinensis* x 10,000



第5図 腐朽木材試料からのPCR増幅産物(S1株/トドマツ)

凡例) M: サイズマーカー, 1: 腐朽辺材, 2: 腐朽心材, 3: ネガティブコントロール

Fig. 5. Amplified DNA fragments obtained from the decayed wood (S1/*A.sachalinensis*).

Legend) M: Size marker; 1: Sapwood; 2: Heartwood; 3: Negative control

以上の結果より, 比較的簡易なDNA抽出法とPCR分析を用いることで, 木材が夾雑した条件下のナミダタケをDNAレベルで直接検出・同定することが可能であることが示された。今後は本研究結果をもとに, 実際の住宅における腐朽部材からの木材腐朽菌の同定など, PCR法の有効性についてさらに検討を行う予定である。

謝 辞

今回の研究にあたり腐朽現場より採取した子実体の提供をいただいた株式会社キャッツの長谷川聖氏, 松原一貴氏ならびにシントーファイン株式会社の桜井誠氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 布村昭夫: 木材保存, **14**, 19-30(1979)
- 2) 土居修一ほか: 木材学会誌, **28**, 179-183(1982)
- 3) 神山幸弘: 木材保存, **21**, 48-65(1982)
- 4) 神山幸弘: 木材保存, **24**, 41-50(1983)
- 5) (財)日本住宅・木材技術センター: “森林資源有効活用促進調査事業報告書(木造住宅のメンテナンスマニュアル作成に関する調査)”, 159-161(2002)
- 6) Claudia A.J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4725-4734(2000)
- 7) Moreth U. and Schmidt O.: *Holzforschung*, **54**, 1-8(2000)
- 8) 武田理ほか: “細胞工学 別冊 改訂PCR Tips”, 真木寿治 監修, 秀潤社, 18-20(1997)
- 9) White T.J. et al.: PCR protocols. Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, White T.J. Academic Press San Diego. 315-322(1990)
- 10) 中野準三ほか: “木材化学”, ユニ出版社, 5-7(1983)
- 11) Nishimura K. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1563-1566(2002)

- 性能部 耐朽性能科 -
- *1: きのこ部 品種開発科 -
- *2: きのこ部 生産技術科 -

(原稿受理: 02.12.27)