

種特異的 PCR 法による木材腐朽菌の検出・同定

杉山 智昭, 森 満範^{*1}, 東 智則

PCR-based Identification of Decay Fungi Using Species-specific Primers

Tomoaki SUGIYAMA, Mitsunori MORI, Tomonori AZUMA

Species-specific PCR analysis was carried out for the detection and identification of 11 major species of decay fungi that produce considerable damage to wooden buildings in Japan. In this study, the variable internal transcribed spacer (ITS2) regions of nuclear ribosomal DNA (rDNA) were adopted for design of species-specific primers. The results showed that the species-specific primers efficiently amplified the DNA from target species, and no unspecific reaction was observed. The PCR system using these species-specific primers is thus concluded to be a useful tool for the detection and identification of the 11 species of decay fungi. Furthermore, the PCR system used in this study made possible amplification of a small amount of template DNA (1 fg-100pg).

Key words: decay fungi, gene, PCR, species-specific primer, identification
木材腐朽菌, 遺伝子, PCR, 種特異的プライマー, 同定

木造建築物に発生する代表的な木材腐朽菌 11 種を遺伝子レベルで検出・同定するため, 種特異的 PCR 法による分析を試みた。種間で変異が存在する rDNA (リボソーム DNA) のスペーサー領域 (Internal transcribed spacer 2, ITS2) の塩基配列情報をもとに種特異的プライマーを設計し, PCR 分析を行った。その結果, 各プライマーは対象となる種の DNA を選択的に増幅し, 本手法が木材腐朽菌 11 種の検出・同定に有効であることが示された。また, 今回検討した PCR 法の検出感度について調査を行った結果, 1fg (10⁻¹⁵g) の鋳型 DNA を用いた場合においても安定した増幅が確認された。

1. はじめに

木材腐朽菌による腐朽被害の拡大を防ぐためには, 部材に侵入した菌糸の分布状態を把握し, 適切な処置を行う必要がある¹⁾。しかし, 腐朽に対する検査・診断技術に関しては未だ目視, 触診など感覚に依存する部分が大きく, 腐朽被害がある程度進行した後でなければ木材腐朽菌の侵入を確認・判定することはできない²⁾。現在, 上述の状況を打開するため, 木材腐朽菌のタンパク質や遺伝子を指標とする検出技術の開発が国内外で検討されている³⁻⁸⁾。

著者らは既報⁶⁾において, 木造住宅に深刻な腐朽被害をもたらすナミダタケ (*Serpula lacrymans*) およびイドタケ (*Coniophora puteana*) を PCR (Polymerase chain reaction) 分析により遺伝子レベルで特異的に検出できることを確認した。しかし,

上記 2 種に対応する PCR プライマーの増幅効率の改善, 他の代表的な木材腐朽菌に対する検出法の確立についてはさらなる検討が必要である。そこで本研究では, PCR 分析の検出対象種を拡張し, それぞれの種について安定した検出法を構築するため, 木造建築物に発生する主要な木材腐朽菌 11 種^{1,9)} について種特異的なプライマーの設計を行い, 各プライマーの特異性および増幅効率について調査した。

また, 建築部材に侵入した木材腐朽菌を早期に見出すためには, 部材に存在する微量の菌糸を高精度で検出する必要がある。そこで本研究では, 木材腐朽菌の菌糸から抽出した DNA を段階的に希釈した試料を用いて PCR 分析を実施し, 今回検討した検出法の感度についても調査を行った。

2. 試験方法

2.1 種特異的 PCR 法による木材腐朽菌の同定

2.1.1 供試菌株

本研究において使用した木材腐朽菌を第1表に示す。供試菌として(独)製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源開発部門(NBRC)から購入した株、および林産試験場が住宅腐朽材から分離した株からなる11種(計23株)を分析に用いた。

2.1.2 DNA 抽出試料の調製

ポテトデキストロース寒天(PDA)培地(日水製薬(株))上で20~26°C, 7~20日間培養した各供試菌の菌糸を0.01~0.04g, 培地から直接かき取り, 抽出試料とした。

2.1.3 DNA 抽出法

抽出試料を1.5mL容の微量遠心チューブに採り, 0.15M NaCl, 0.1M EDTA (pH8.0), 1% SDS, 100 µg/mLのプロテナーゼKを含む抽出溶液

700 µLを加え, 緩やかに振とうしながら37°Cで2時間, 60°Cで30分間インキュベートした。これにフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液(25:24:1, v/v) 700 µLを加えて攪拌した後, 遠心分離(15,000rpm, 10分間)を行い水層を新しいチューブに回収した。回収した水層に対し, 等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液(24:1, v/v)を加えて攪拌し, 遠心分離(15,000rpm, 10分間)後, 水層を回収した。得られた水層に対して2.5倍量のエタノールを加え, 沈殿した核酸をTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 50 µLに溶解した。この溶液に10mg/mLのRNase(フナコシ(株)) 1 µLを加え, 37°Cで30分間インキュベートした。これに等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液を加え, 攪拌, 遠心分離(15,000rpm, 2分間)した後, 水層を新しいチューブに回収した。これに5M NaClを2 µL, エタノール125 µLを加えて転倒混和し, 室温で15分間静置した。溶液を遠心分離(15,000rpm, 10分間)しDNAを沈殿させた後, 上清を捨て70%エタノール500~1000 µLを加え洗浄した。再度, 遠心分離(15,000rpm, 2分間)を行い, 上清を捨て沈殿物を風乾後, TE緩衝液に溶解したものをDNA試料とした。

DNA試料の純度と濃度を分光光度計((株)日立U-2000A)を用いて測定した。試料のうち20ng~100ngのDNAをPCR反応の鋳型として用いた。また一部の試料についてはスピнкаラム(DNeasy Plant Kit, QIAGEN)を用いてDNAの精製を行った。

2.1.4 プライマーの設計

国際塩基配列データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)の検索を行い, 供試菌のrDNA領域の塩基配列情報を入手した。また, 一部の菌についてはrDNA領域(18Sおよび28S rRNA遺伝子間)のPCR増幅を行い, 得られたPCR増幅産物のDNA塩基配列をダイレクトシーケンシング(両鎖解析)によって決定した(シーケンサ: ABI 3730xI Applied Biosystems, Megabase1000 アマシャムバイオサイエンス)。得られたrDNAの塩基配

第1表 供試菌

Table 1. List of fungi tested.

種 Species	和名 Japanese name	略号 Code	菌株 Strain
<i>Antrodia sinuosa</i>	ワタグサレタケ	AS	NBRC 8685
<i>Antrodia xantha</i>	チョークアナタケ	AX	腐朽材分離株*
<i>Coniophora puteana</i>	イドタケ	CP1	NBRC 6275
		CP2	腐朽材分離株*
		CP3	腐朽材分離株*
<i>Fomitopsis palustris</i>	オオウズラタケ	FP	NBRC 30399
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	コゲイロカイガラタケ	GA1	腐朽材分離株*
		GA2	腐朽材分離株*
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	キカイガラタケ	GS	NBRC 6267
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	キチリメンタケ	GT1	NBRC 6509
		GT2	腐朽材分離株*
<i>Lentinus lepideus</i>	マツオウジ	LL	NBRC 32948
<i>Sistotrema brinkmannii</i>		SB1	腐朽材分離株*
		SB2	腐朽材分離株*
<i>Serpula lacrymans</i>	ナミダタケ	SL1	NBRC 8697
		SL2	腐朽材分離株*
		SL3	腐朽材分離株*
		SL4	腐朽材分離株*
		SL5	腐朽材分離株*
		SL6	腐朽材分離株*
		SL7	腐朽材分離株*
		SL8	腐朽材分離株*
<i>Trametes versicolor</i>	カワラタケ	TV	NBRC 30340

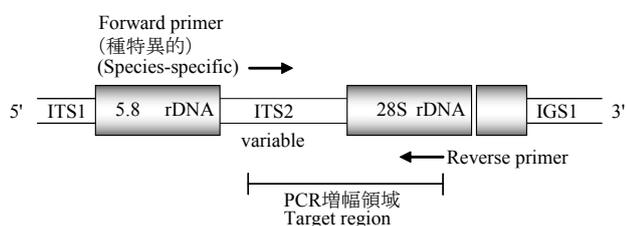
凡例) NBRC: (独)製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源開発部門
Legend) NBRC: National Institute of Technology and Evaluation (NIE) Biological Resource Center

*: Isolate from a damaged building.

列情報をもとに、種間で変異のあるスペーサー領域 (ITS2) から各供試菌が特異的に有する配列を探索し、Forward 側に種特異的プライマーを設計した (第 1 図, 第 2 表)。また種間で保存性の高い 28S rDNA 遺伝子領域に対して各供試菌に共通の Reverse 側プライマーを設計した (5'-CCTCACGGTACTTGTTCGCT-3')。

2.1.5 PCR 分析

PCR 反応は 1.25 ユニットの *Taq* DNA ポリメラーゼ (Takara Ex *Taq*, 宝酒造 (株)) を含む, 最終濃度を 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs に調製した 25 μ L の反応液中で実施し, 鋳型として 20 ~ 100ng の DNA を用いた。増幅は (1) 熱変性 (95°C, 30 秒), (2) アニールリング (55 ~ 65°C, 30 ~ 45 秒), (3) 伸長反応 (72°C, 30 ~ 45 秒) を 1 サイクルとする反応を 30 ~ 35 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 (株)) を用いて行っ



第 1 図 PCR 増幅領域および種特異的プライマー結合位置

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

注) 矢頭はプライマーの 3' 末端を示す

Note) The arrowheads represent the 3' end of each primer.

第 2 表 種特異的プライマー

Table 2. Primers designed for the amplification of species-specific regions.

種 Species	プライマー配列 (5' → 3') Primer sequence (5' → 3')	略号 Code
<i>Antrodia sinuosa</i>	CCGGCTTGTCATGAGTCTG	As.sp
<i>Antrodia xantha</i>	TGAAGCTCATACTTCGGT	Ax.sp
<i>Coniophora puteana</i>	AGCTGGCTATTAATGCTATG	Cp.sp
<i>Fomitopsis palustris</i>	CTTTGCGGATCAGCTATCG	Fp.sp
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	GGTTTTTGTGACCGTGGTG	Ga.sp
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	GTCTGTGAAGTGCTTGAA	Gs.sp
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	TGGAGGTATGCTGGCTTACT	Gt.sp
<i>Lentinus lepideus</i>	ACCGGTTTTTGTGTAAGT	LL.sp
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	CTAGATGCTTTAGTGTCATCTG	Sb.sp
<i>Serpula lacrymans</i>	TGCTGGTGGACTCTTGTTTC	SL.sp
<i>Trametes versicolor</i>	TCCTTGTGATCTATAAGCTTG	Tv.sp

た。なお, 最初のサイクルの熱変性は 2 分, 最後のサイクルの伸長反応は 5 分に延長して行った。

反応終了後, PCR 反応液 8 μ L を 1.6 μ L 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 ~ 3.0% アガロースゲルによる電気泳動 (泳動槽: Mupid-2, コスモバイオ, バッファー: TBE) にかけて。泳動終了後, UV トランスイルミネーター上でゲルを観察し DNA バンドの観察を行った。

2.2 検出感度の調査

2.2.1 供試菌株

供試菌としてナミダタケ *Serpula lacrymans* を用いた。

2.2.2 DNA 抽出試料の調製

2.1.2 の項を参照

2.2.3 DNA 抽出法

2.1.3 の項を参照

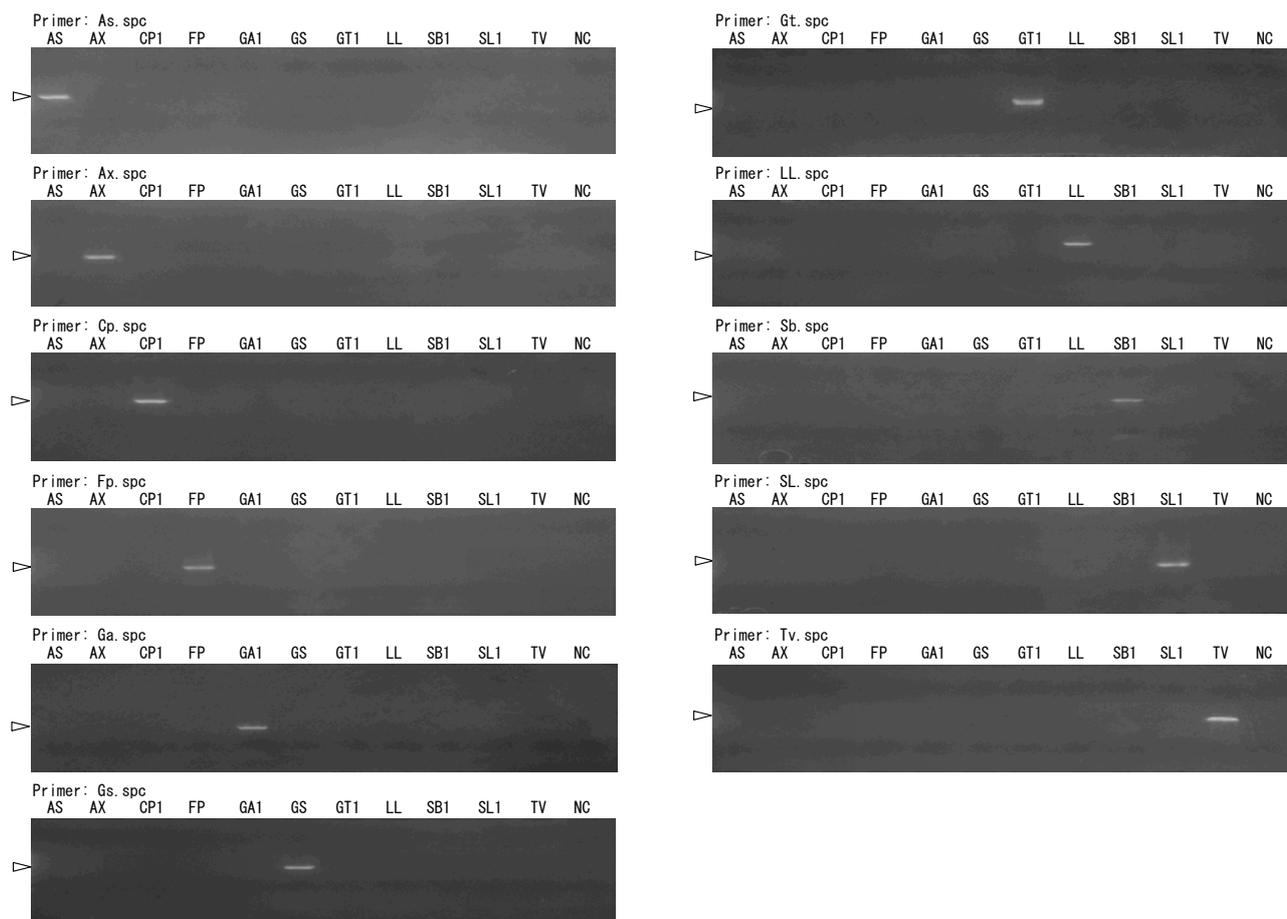
2.2.4 PCR 分析

鋳型となる DNA 量を 1fg ~ 100pg に調整し, 2.1.5 の項に準じて PCR 分析を行い, 検出感度を調査した。プライマーはナミダタケに特異的なプライマー (第 2 表) と 2.1.4 に示した Reverse 側プライマーのセット, ならびに担子菌 (木材腐朽菌) の DNA を特異的に増幅可能なプライマーのセット (ITS1-F, ITS4-B)¹⁰⁾ を供試した。

3. 結果および考察

3.1 種特異的 PCR 法による木材腐朽菌の同定

各供試菌の DNA を鋳型とし, 今回設計したプライマーを用いて PCR を行った結果を第 2 図に示す。電気泳動像より, 種特異的プライマーは対象となる菌種の DNA を増幅可能であることが確認された。増幅サイクル数を 30 回に設定した場合, 各プライマーは標的となる供試菌の DNA のみを選択的に増幅し, 他の供試菌の DNA に対する擬陽性反応は観察されなかった。一方, サイクル数を 35 回に増加して反応を行ったところチョークアナタケ, イドタケ, ナミダタケ, キカイガラタケにおいて微弱なエキストラバンドが観察される場合があった。したがって今回検討した PCR 検出法においては, サイクル数 30 回が適正と考えられた。



第 2 図 種特異的プライマーを用いた供試木材腐朽菌 DNA の PCR 増幅

Fig. 2. Amplified DNA fragments obtained by species-specific PCR.

凡例) AS, AX, CP1, FP, GA1, GS, GT1, LL, SB1, SL1, TV: 第 1 表参照, NC: ネガティブコントロール
 Legend) AS, AX, CP1, FP, GA1, GS, GT1, LL, SB1, SL1, TV: See Table 1. NC: Negative control

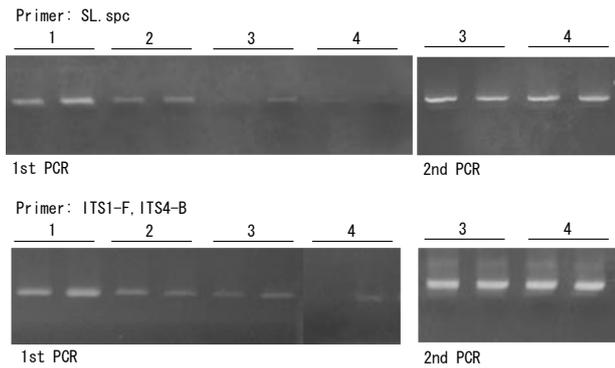
複数の株を用いたイドタケ (CP1 ~ CP3), コゲイロカイガラタケ (GA1, GA2), キチリメンタケ (GT1, GT2), *Sistotrema brinkmannii* (SB1, SB2), ナミダタケ (SL1 ~ SL8) については株の違いによる偽陰性および非特異的増幅は観察されず, 各菌種に対する特異的な増幅が確認された。

以上の結果から, 今回設計した種特異的プライマーを使用することで, 代表的な木材腐朽菌 11 種を PCR 法により同定可能であることが示された。

3.2 検出感度の調査

ナミダタケ菌糸より抽出された 1fg ~ 100pg の DNA を鋳型として PCR 分析を行った結果を第 3 図に示す。今回設計したナミダタケ特異的プライマー (SL.sp) と 28S rDNA 遺伝子を標的とするプライマーのセット (第 3 図上段), および担子菌特

異的なプライマー (ITS1-F, ITS4-B) のセット (第 3 図下段) とともに 1 回目の PCR (1st PCR) によって 1pg までの DNA を安定的に増幅できることが明らかとなった。しかし, 増幅の目安であるバンドの蛍光は鋳型 DNA 添加量の減少に伴って減少する傾向にあった。特に 1fg を鋳型とした場合についてはバンドの蛍光が極めて低いか, 観察できない例も確認された。しかし 1st PCR において得られた反応終了液, 0.5 μL を鋳型として 2 回目の PCR (2nd PCR) を行うことによって, 明瞭な DNA 増幅を確認することができた。以上の結果から, 本研究における PCR 検出システム (プライマー, 酵素, dNTPs 濃度, 塩組成, 反応プログラム) は 1fg の DNA を検出できる感度を有し, 建築部材に侵入した微量の菌糸を検出可能であることが示唆された。



第 3 図 PCR 法の検出感度

Fig. 3. Sensitivity of the PCR assay.

凡例 (Legend) : 1: 100pg *S. lacrymans* DNA, 2: 10pg *S. lacrymans* DNA, 3: 1pg *S. lacrymans* DNA, 4: 1fg *S. lacrymans* DNA

4. まとめ

木造建築物に発生する代表的な木材腐朽菌 11 種の検出・同定技術の開発を目指し、種特異的 PCR 法の有効性、および木材腐朽菌の DNA に対する PCR の検出感度について検討を行ったところ、以下の知見が得られた。

- 1) rDNA の ITS2 領域に対して種特異的プライマーを設計し PCR 分析を行ったところ、標的とした木材腐朽菌 11 種を選択的に検出・同定することが可能であった。
- 2) 種特異的 PCR においてサイクル数の増加は非特異的なエキストラバンドの生成を誘発するため、PCR 反応の際には適正なサイクル数 (30 回) を採用する必要があることが明らかとなった。
- 3) 本研究における PCR 検出系は 1fg までの木材腐朽菌 DNA を安定的に増幅可能であることが確認された。

本研究結果は、代表的な木材腐朽菌について種レベルでの安定した検出法を提供するものであり、広く担子菌 (木材腐朽菌) を特異的に検出する手

法¹⁰⁾との併用によって、より詳細な腐朽診断技術の開発に寄与するものと考えられる。

文 献

- 1) “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, 2007, pp.16, 98-100.
- 2) 澁谷浩一, 土居修一, 堀沢栄, 須原弘登, 森本桂: 2003 年度夏期日本木材学会劣化研究会講演要旨集, 高知市, 2003, pp.11-20.
- 3) Schmidt, O. and Kebernik: *Holzforschung* **43**, 195-198 (1989).
- 4) 鈴木利克, 檜垣宮都: 第 54 回日本木材学会大会研究発表要旨集, 札幌市, 2004, p.408.
- 5) Moreth, U. and Schmidt, O.: *Holzforschung* **54**, 1-8 (2000).
- 6) 杉山智昭, 森満範, 宮内輝久, 中谷誠, 原田陽: 木材保存 **29**, 98-104 (2003).
- 7) 和田朋子, 加治佐平, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 田中計実: 第 56 回日本木材学会大会研究発表要旨集, 秋田市, 2006, p.77.
- 8) 堀沢栄, 本田与一, 板倉修司, 土居修一: 第 56 回日本木材学会大会研究発表要旨集, 秋田市, 2006, p.125.
- 9) 高橋旨象: “きのこと木材”, 築地書館, 1989, pp.78-87.
- 10) Gardes, M. and Bruns, T. D.: *Molecular Ecology* **2**, 113-118 (1993).

— 性能部 耐朽性能科 —

— *1: 性能部 主任研究員 —

(原稿受理: 09.1.21)