ー研究（Original Article）ー

木質構造物に発生する木材腐朽菌を検出する種特異的プライマーの作製

東　智則，森　満範

Development of species-specific primers for detecting wood decay fungi causing damage to wooden structures

Tomonori AZUMA，Mitsunori MORI

We designed species-specific primers for 10 species of wood decay fungi causing wood rot damage in wooden structures for easy detection and identification of wood decay fungi by polymerase chain reaction (PCR). We checked the species specificity of the designed primers by PCR using the primers and DNA extracted from 29 species of wood decay fungi. As a result, we found that the designed primers detected only target species specifically.

Key words: wood decay fungi，wooden structure，PCR，species-specific primer，identification
木材腐朽菌，木質構造物，PCR，種特異的プライマー，同定

木質構造物に発生する 10 種の腐朽菌について，PCR 法による簡易な検出・同定に必要な種特異的プライマーを設計した。設計したプライマーと 29 種類の腐朽菌から単離した DNA を用いて PCR を行い，プライマーの種特異性を調べた。その結果，設計したプライマーは対象とする腐朽菌のみを特異的に検出することが確認された。

1.　はじめに

腐朽診断により木材腐朽の兆候を早期に発見し予防的な対処を行うことは木質構造物の長寿命化に効果的である。近年，腐朽菌を検出し，種を同定する方法として遺伝子解析技術を利用した手法が用いられている [1)]。筆者らはこれまでに主に住宅で発生する主要な 11 種の腐朽菌を対象に種特異的なプライマーを作製し，PCR 法により腐朽菌を検出・同定する技術の開発に取り組んできた [2,3)]。一方「公共建築物等における木材の利用の促進に関する法律」が施行されるなど，木材の利用を促進する動きが進む中，今後，外構材や土木用材への利用の拡大が期待できる。このような野外における木材の使用においては，そこに発生する腐朽菌の種類も住宅環境より多様化することが予想される。

本研究では，住宅や野外木質構造物に発生することが予想され，これまで種特異的プライマーの報告例が無い腐朽菌について，これらを種特異的に検出できるプライマーの設計，作製を目的とした。

2.　試験方法

2.1　供試菌株

本研究では，国内における建築用材や土木用材に発生する代表的な腐朽菌としてこれまでに報告されたものの中から [4-7)]，種特異的プライマーの報告例が無い腐朽菌を，（独）製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源開発部門（NBRC），（独）農業生物資源研究所 生物遺伝資源管理室から購入し，試験に用いた。さらに林産試験場等がこれまでに分離した株も用いた。本研究で用いた腐朽菌を**第 1 表**に示す。

2.2　rRNA 遺伝子領域の塩基配列の分析

種特異的プライマーを作製する DNA 領域は，前報 [3)] と同様リボソーム DNA（rDNA）の ITS（Internal Transcribed Spacer）領域を用いた。国際塩基配列データベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に rDNA 領域の塩基配列が登録されている供試菌については，その塩基配列を用いた。登録されていない供試菌については以下の方法で DNA を単離し，rDNA 領域の

第 1 表　供試菌
Table 1. Tested fungi.

種 Species	和名 Japanese name	菌種 Strain
Schizophyllum commune	スエヒロタケ	
Pycnoporus coccineus	ヒイロタケ	
Abortiporus biennis	ニクウチワタケ	腐朽材分離株 Isolate from decayed wood
Loweporus tephroporus	シイサルノコシカケ	腐朽材分離株 Isolate from decayed wood
Lenzites betulina	カイガラタケ	NBRC 8714
Gyrodontium versicolor	オガサワラハリヒラタケ	NBRC 9595
Rigidoporus vitreus	ニクイロアナタケモドキ	MAFF 420044
Junghuhnia nitida	ニクイロアナタケ	MAFF 420334
Irpex lacteus	ウスバタケ	NBRC 5367
Trichaptum abietinum	シハイタケ	MAFF 430463

凡例）NBRC：(独) 製品評価技術基盤機構　生物遺伝資源開発部門の菌株
MAFF：(独) 農業生物資源研究所の菌株
Legend）NBRC：Strain of National Institute of Technology and evaluation (NIE) Biological Resource Center.
MAFF：Strain of National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS).

塩基配列を決定した。

2.2.1　腐朽菌の培養

供試菌をポテトデキストロース寒天（PDA）培地（日水製薬株式会社）上で 26℃で培養し，蔓延した菌糸を 0.01 ～ 0.05g，培地から直接かき取り，抽出試料とした。

2.2.2　DNA 抽出

抽出試料を 1.5mL 容の微量遠心チューブに採り，0.15M NaCl，0.05M EDTA（pH8.0），1% SDS，100μg/mL のプロテナーゼ K を含む抽出溶液 750μL を加え，55℃で 1 時間緩やかに振とうしながら加温した後，氷上で 10 分間冷却した。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）750μL を加えて 1 分間転倒混和した後，遠心分離（12,000rpm，室温，5 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 1 分間転倒混和し，遠心分離（12,000rpm，室温，5 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，室温で 15 分間静置した後，遠心分離（14,000rpm，4℃，10 分間）を行った。1mL の 70% エタノールで洗浄後, 遠心分離（14,000rpm，4℃，5 分間）を行った。

沈殿した核酸を TE 緩衝液（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0）500μL に溶解した。この溶液に 10mg/mL の RNase を 5μL 加え（終濃度 100μg/mL），37℃で 30 分間，RNA の分解処理を行った。処理後，溶液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，先と同様に処理を行い，続いてクロロホルム / イソアミルアルコール混液（24:1，v/v）でも同様に処理した。新しいチューブに回収した水層に 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）を加え，2.5 倍量のエタノール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 1,000μL 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。

2.2.3　rDNA 領域の増幅

PCR 法により単離した DNA の rDNA 領域（18S および 28S rRNA 遺伝子間）を増幅した。プライマーにはユニバーサルプライマー（ITS-1, ITS-4）[8]，あるいは高等菌類に特異的なプライマー ITS1-F，担子菌に特異的なプライマー ITS4-B を用いた [9]。PCR 反応は 1 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼを含む，最終濃度を 10mM Tris-HCl（pH8.3），50mM KCl，1.5mM $MgCl_2$，0.2mM dNTPs に調製した 25μL の反応液中で実施し，鋳型として 20ng ～ 100ng の DNA を用いた。

増幅条件は①熱変性（95℃，45 秒），②アニーリ

ング（55℃，45 秒），③伸長反応（72℃，45 秒）を１サイクルとする反応を 30 サイクル，サーマルサイクラー（PC-818S，アステック株式会社）を用いて行った。なお，最初のサイクルの熱変性は 1 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 8μL を 1.6μL 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）にかけた。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。

2.2.4　rDNA 領域の塩基配列の決定

増幅した DNA は LaboPass PCR Purification Kit（Cosmo GENETECH Co., Ltd.）を用いてマニュアルに従い精製した。

精製した DNA10～40ng と 6.4 pmol のプライマーを混合し，TE で総量を 14 μ L に調整し，塩基配列の決定に供した。

2.3　種特異的プライマーの設計

得られた ITS 領域の塩基配列を，日本 DNA データバンク（DDBJ）上にある相同性検索プログラム BLAST を用いて相同性検索を行い，種特異的プライマーとして使用できる塩基配列の選択を行った。

2.4　作製したプライマーの種特異性の確認

作製したプライマーの種特異性を確認するため，第 2 表に示す腐朽菌から単離した DNA を用いて PCR を行い，対象とする腐朽菌の DNA 以外は増幅

第 2 表　プライマーの種特異性の確認に用いた腐朽菌
Table 2. List of fungi used for checking the specificity of the designed primers.

種 Species	和名 Japanese name	菌種 Strain	レーン番号 Lane No.
Stereum fustulosum	カタウロコタケ		1
Coniophora puteana	イドタケ	IFO 6275	2
Schizophyllum commune	スエヒロタケ		3
Trametes versicolor	カワラタケ	FFPRI 1030	4
Phanerochaete chrysosporium		IFO 31249	5
Lentinus lepideus	マツオウジ	NBRC 32948	6
Fomitopsis palustris	オオウズラタケ	FFPRI 0507	7
Pycnoporus coccineus	ヒイロタケ	FFPRI Ps1h	8
Abortiporus biennis	ニクウチワタケ	腐朽材分離株 Isolate from decayed wood	9
Gloeophyllum sepiarium	キカイガラタケ	NBRC 6267	10
Gloeophyllum trabeum	キチリメンタケ	NBRC 6509	11
Spongiporus sinuosus	ワタグサレタケ	NBRC 8685	12
Loweporus tephroporus	シイサルノコシカケ	腐朽材分離株 Isolate from decayed wood	13
Gloeophyllum striatum	ヒメキカイガラタケ	NBRC 30341	14
Irpex lacteus	ウスバタケ	NBRC 5367	15
Coriolus hirsutus	アラゲカワラタケ	NBRC 7038	16
Lenzites betulina	カイガラタケ	NBRC 8714	17
Gyrodontium versicolor	オガサワラハリヒラタケ	NBRC 9595	18
Rigidoporus vitreus	ニクイロアナタケモドキ	MAFF 420044	19
Antrodia xantha	チョークアナタケ	MAFF 420103	20
Phellinus gilvus	ネンドタケ	MAFF 420163	21
Gloeophyllum striatum	ヒロハノキカイガラタケ	MAFF 420178	22
Phellinus xeranticus	ダイダイタケ	MAFF 420198	23
Gloeophyllum abietinum	コゲイロカイガラタケ	MAFF 420330	24
Junghuhnia nitida	ニクイロアナタケ	MAFF 420334	25
Serpula himantioides	ナミダタケモドキ	MAFF 420671	26
Trichaptum abietinum	シハイタケ	MAFF 430463	27
Rigidoporus lineatus	スルメタケ	MAFF 430464	28
Serpula lacrymans	ナミダタケ	FFPRI 0739	29

凡例）IFO：（財）発酵研究所の菌株
FFPRI：(独) 森林総合研究所の菌株
Legend）IFO: Strain of Institute for Fermentation,Osaka.
FFPRI：Strain of Forestry and Forest Products Research Institute.

しないか確認を行った。Forward 側に種特異的プライマー，Reverse 側には ITS4 プライマーあるいは ITS4-B プライマーを用いた。

3. 結果と考察

BLAST を用いた相同性検索の結果，相同性の高い腐朽菌の塩基配列の中から配列の異なる領域を選び，種特異的プライマーの配列とした。さらにその配列を用いて相同性検索を行い，データベースに登録された腐朽菌の ITS 領域の中に完全に同じ配列は無いことを確認した。解析の結果，作製した種特異的プライマーの配列を**第 3 表**に示す。

作製したプライマーを用いて，第 2 表に示す腐朽菌の DNA と PCR 反応を行った結果を**第 1 図**に示す。ヒイロタケのプライマー（Pc）ではウスバタケの DNA（レーン 15）と，ニクイロアナタケのプライマー（Jn）ではマツオウジの DNA（レーン 6）と PCR を行った際に，かろうじて確認できるほどの極めて弱い非特異的バンドが認められた。そこでアニーリングの温度を 55℃から 60℃に上げたところ，第 1 図のように非特異的なバンドが完全に消えた。

ITS4-B プライマーを用いると 1000bp 以上の位置に非特異的なバンドが見られるケースも見られた。ヒロハノキカイガラタケ（レーン 22 ），ナミダタケモドキ（レーン 26 ），スルメタケ（レーン 28），ナミダタケ（レーン 29 ）において特にその傾向が強く認められた。しかし特異的なバンドは約 200 ～ 700bp の位置に出るので，分子量マーカーを同時に泳動し，増幅した DNA バンドのサイズを確認することで種特異的に増幅したバンドであるか否かを判断することが可能である。以上の結果から，今回作製したプライマーは対象となる腐朽菌を種特異的に検出することが可能であることが示された。

4. まとめ

木質構造物に発生する腐朽菌を早期に検出することを目的に，10 種の腐朽菌について種特異的に検出するプライマーを作製した。作製したプライマーの種特異性について，29 種の腐朽菌から単離した DNA を用いて PCR を行い調べたところ，各プライマーは対象とする腐朽菌のみを増幅したことから，種特異的であることが確認できた。

文　献

1）Moreth, U. and Schmidt, O.: *Holzforschung* 54, 1-8 (2000).

2）杉山智昭，森満範，宮内輝久，中谷誠，原田陽: 木材保存 29（3），98-104 (2003).

3）杉山智昭，森満範，東智則：林産試験場報 538, 1-5 (2009).

4）北島君三 : 林業試験場報告 28，1-74 (1938).

5）原口隆英 :“木材保存学入門”，（社）日本木材保存協会，東京，1992, p52.

6）井上嘉幸 :“木材保護化学”，内田老鶴圃新社，東京，1969, pp36-37.

7）青島清雄 :“日本木材学会生物劣化研究会資料”，pp1-8 (1979).

8）White, T. J.,Bruns, T.,Lee, S. and Taylor, J.: “PCR protocols” , Innis, M. A., Gelfand,D. H., Sninsky, J.,

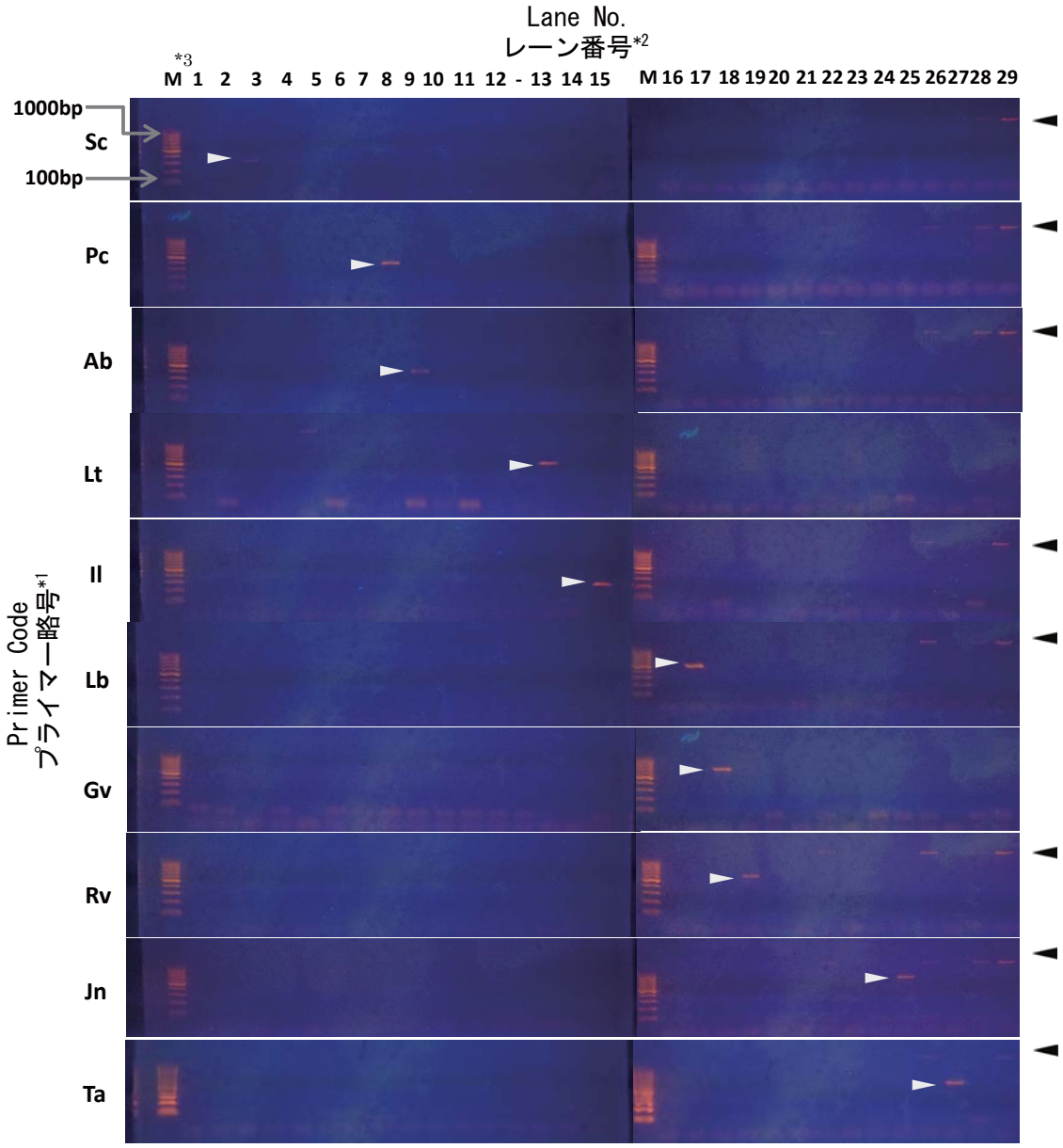
第 3 表　種特異的プライマー

Table 3. List of species-specific primers.

種 Species	プライマー配列（5'→3'） Primer sequence（5'→3'）	略号 Code	プライマー位置 Primer site	リバースプライマー Reverse primer
Schizophyllum commune	TTGACTTCGGTCTCGAGAG	Sc	ITS I	ITS-4
Pycnoporus coccineus	CACGTCCTTGTGATGCTGTG	Pc	ITS II	ITS4-B
Abortiporus biennis	ATGCCGGTGTTTTAATCAAC	Ab	ITS II	ITS4-B
Loweporus tephroporus	TCAGACGGTGTAGCGAGCCT	Lt	ITS I	ITS-4
Lenzites betulina	CTGCTGGCCTATGTACATTT	Lb	ITS I	ITS-4
Gyrodontium versicolor	ATGTGCACGCGCATCTGGCC	Gv	ITS I	ITS-4
Rigidoporus vitreus	ACATTCTGTTCATTCCATTC	Rv	ITS I	ITS-4
Junghuhnia nitida	GCACACCTCATTCAACCT	Jn	ITS II	ITS4-B
Irpex lacteus	CTTCGAACCGTCTCCTTGCC	Il	ITS II	ITS4-B
Trichaptum abietinum	CTGGGTTCTAAGACAGTCAAG	Ta	ITS I	ITS-4

White, T. J. eds., Academic Press, San Diego, 1990, pp.315-322.

9）Gardes,M. and Bruns T. D.:*Mol. Ecol.* 2, 113-118 (1993).



第 1 図　設計したプライマーの種特異性の確認

凡例）*1：第 3 表参照，*2：第 2 表参照，*3：分子量マーカー（100 － 1000bp），白い矢印の頭：種特異的なバンド，黒い矢印の頭：リバースプライマーに ITS4-B プライマーを使った際に出る非特異的バンド

Fig. 1. Check of the species-specificity of the designed primers.

Legend）*1：See Table 3., *2：See Table 2., *3：Molecular weight marker (100 － 1000bp) ,White arrowheads: Species-specific bands, Brack arrowheads: Non-specific bands that appeared when primer ITS4-B was used as the reverse primer.

－性能部　耐久・構造グループ－

（原稿受理：12.1.11）