

# 野外木質構造物で発生している腐朽菌を DNA で調べる

性能部 耐久・構造グループ 東 智則

## ■ はじめに

木質構造物を長持ちさせるためには、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が重要です。これまで林産試験場では腐朽を早期発見するため、主に住宅で使われている木材を腐朽させる腐朽菌について、DNA\* (デオキシリボ核酸, Deoxyribonucleic acid) を用いて検出、同定する方法を確立してきました。

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されます。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ます。

そこで野外木質構造物に発生することが予想される腐朽菌についても、DNA を用いて検出、同定する方法を確立することを目的に、研究を行いました。また、実際に野外の木質構造物から腐朽材、腐朽菌を採取し、この方法を用いてどのような腐朽菌が発生しているか調べました。

\*DNA : 遺伝子の本体。アデニン、グアニン、シトシン、チミンの 4 種の塩基から構成され、二重らせん構造をしている。

## ■ DNA 分析による腐朽菌の検出と同定

DNA を利用して腐朽菌を検出し同定する手法では PCR (ポリメラーゼ連鎖反応, Polymerase Chain Reaction) という方法を用います。これは DNA を合成する酵素と、「プライマー」と呼ばれる短い人工合成 DNA の断片を用いて、ごく少量のサンプル DNA から目的とする DNA 領域を大量に増幅する技術です。

腐朽菌の DNA の中には、腐朽菌の種によって特異的な塩基配列をもつ領域があります。この領域の塩基配列を利用してプライマーを作製し (種特異的プライマー)、PCR を行うことで、対象とする生物種の DNA だけを増幅することができます。この方法を用いることにより、腐朽が疑われる木材から DNA を抽出し、種特異的プライマーを用いて PCR を行い、DNA が増幅さ

れるかどうかを調べることにより、その木材中に腐朽菌が存在するか、その腐朽菌の種類が何であるかを特定することができます。PCR 法の詳細については参考資料<sup>1)</sup>をご覧ください。

## ■ 腐朽菌の種特異的プライマー

これまでに林産試験場では、主に住宅で発生する主要な腐朽菌を対象に、11 種類の種特異的なプライマーを作製しました (表 1 左)。しかし今後、野外の木質構造物の腐朽診断を行うことを考えた場合、発生する腐朽菌の種類も多様化すると考えられるため、種特異的なプライマーも増やす必要があります。そこで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、種特異的プライマーの報告例が無い腐朽菌について新たに 10 種類のプライマーを作製しました (表 1 右)。

作製したプライマーの種特異性を確認するために、表 1 に示したものを含む 29 種類の腐朽菌から抽出した DNA を用いて PCR を行い、作製したプライマーが対象とする腐朽菌の DNA 以外は増幅しないか確認しました。

写真 1 には、レーン番号 8 の腐朽菌に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、作製したプライマーの種特異性を確認した一例を示しました。8 レーンの白矢印で示したバンドが種特異的に増幅した DNA バンドです。一部の腐朽菌において分子量が 1000bp 以上の位

表 1 種特異的プライマーを作成した腐朽菌

既に種特異的プライマーが作製されている腐朽菌	今回新たに種特異的プライマーを作製した腐朽菌
イダタケ	スエヒロタケ
カワラタケ	ヒイロタケ
チョークアナタケ	ニクウチワタケ
マツオウジ	シイサルノコシカケ
オオウズラタケ	カイガラタケ
ワタグサレタケ	オガサワラハリヒラタケ
キカイガラタケ	ニクイロアナタケモドキ
キチリメンタケ	ニクイロアナタケ
コゲイロカイガラタケ	ウスバタケ
ナミダタケ	シハイタケ
ナミダタケモドキ	



写真1 設計したプライマーの種特異性の確認

M: 分子量マーカー (100-1000bp), 1-29: 腐朽菌, 白矢印: 種特異的バンド, 黒矢印: 非特異的バンド

置に非特異的な DNA のバンドが見られるケースもありましたが (写真1 黒矢印), 特異的なバンドは約 200 ~ 700bp の位置に出るようにプライマーを設計しているので, 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どうか判断することができます。

試験の結果から, 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ました。

#### ■ 野外木質構造物に発生した腐朽菌の検出・同定

主に旭川市内の公園遊具・施設等の野外木質構造物の腐朽部位から腐朽材, 子実体を採取し (写真2), 表1に示した腐朽菌の種特異的プライマーを用いたPCR法により, 腐朽菌の検出, 同定を試みました。PCR法で同定できなかった試料については塩基配列を解析し, 同定を試みました。

試験の結果, 表2に示す腐朽菌を同定することができました。また種の特定には至りませんでした。解析した塩基配列が *Phlebia* 属の菌と97%, *Sistotremastrum* 属の菌と93%, *Postia* 属の二つの菌 (*Postia caesia*, *Postia subcaesia*) と97%の相同性を示す腐朽菌が認められました。



写真2 採取した腐朽材, 子実体の一例

表2 同定された腐朽菌

	種名 (属名)	件数
PCR法	キカイガラタケ	8
	キチリメンタケ	1
	ワタグサレタケ	2
	ニクウチワタケ	1
	スエヒロタケ	1
DNA配列解析	ケニクアミタケ	1
	<i>Postia placenta</i>	1
	<i>Postia stipitica</i>	1

#### ■ おわりに

主に野外の木質構造物で発生すると思われる10種の腐朽菌について, 種特異的なプライマーを作製することができました。もちろん自然界にはもっと多くの種類の腐朽菌が存在します。腐朽菌を検出し, その種類を調べる方法も, 今回紹介した方法以外に様々な方法があり, それぞれ一長一短があります。状況に応じて適切な方法を選択することが重要であると思います。

どのような種類の腐朽菌がどのような環境下で発生し, それぞれの菌が木材の腐朽にどのようにどの程度関与しているのか, 詳細について明らかにされていないことはたくさんあります。今後, 腐朽菌を検出・同定する方法が活用されることで木材の腐朽がより深く解析され, 木材保存技術の向上につながることを期待されます。

#### 参考資料

- 1) 森満範: 林産試だより 2010年1月号 4-6.