

新型コロナウイルスだけではない！ —PCRを活用した研究・技術開発—

利用部 森 満範

■はじめに

新型コロナウイルス感染の脅威が世界を席卷し、各方面に甚大な被害や影響を与えています。日本においても、2020年の年明け早々に最初の感染者が確認されました。以降、感染者数が増加し、非常事態宣言が出されるなど、私たちの生活や仕事のあり方も見直さざるを得ない状況になってきています。

新型コロナウイルスの感染の有無を調べるために、「PCR (Polymerase Chain Reaction, ポリメラーゼ連鎖反応)」という検査が行われ、その検査数は約224万件に上ります(2020年9月17日時点)り。大半の方はこのPCRを用いた検査方法に馴染みがないと思いますが、既に様々な分野で汎用的に使われている手法で、林産試験場における研究にも利用されてきました。

ここでは、DNA (デオキシリボ核酸, deoxyribonucleic acid) を対象としたPCRの概要と、この手法を用いた林産試験場での研究事例についてご紹介したいと思います。

■PCRとは

生物は、細胞内にあるDNAに刻まれた遺伝情報に基づいてタンパク質を合成し、生命を維持しています。生物の種類や個体によって、特徴的なDNA配列の部位を持っているので、この違いを利用して生物の種類や個体を見分けることが可能となります。しかし、試料から取り出したDNAが微量だと、検出することができない場合があります。そこで、何らかの方法で目的のDNAを増やす必要があります。その一つがPCRで、特定のDNA配列を酵素反応で増やす方法です²⁾。

■PCRの原理

PCRの概略は既に本誌³⁾で紹介しましたが、本稿でもその原理を簡単に説明したいと思います。

ジェームズ・ワトソンとフランシス・クリックによって、DNAは二重らせん構造であることが提唱されました(1953年)。すなわち、二本の紐状(鎖状)のポリヌクレオチドという物質が結合しているのです。PCRの手順は、まずこの二本鎖から成る

DNAを加温することにより、二本鎖を一本ずつに分離させます。次に、人工的に合成したDNAの断片(プライマー)や酵素などを加えて温度を下げることにより、一本ずつに別れたそれぞれの鎖にプライマーを結合させます。再び温度を上げると、プライマーが結合した部位を起点に新たな二本鎖が複製されます。二本鎖を加温して一本鎖にし、それにプライマーを結合させて新たに二本鎖を作る、という操作を繰り返すことにより、DNAは増えていくのです(図1)。

プライマーは、あらかじめ対象とする生物種や個体に特有のDNA配列を有する部位を調べて設計されるので、対象物以外のDNAには結合しません。したがって、このPCRにより対象としている生物種や個体の有無を調べることができるのです。

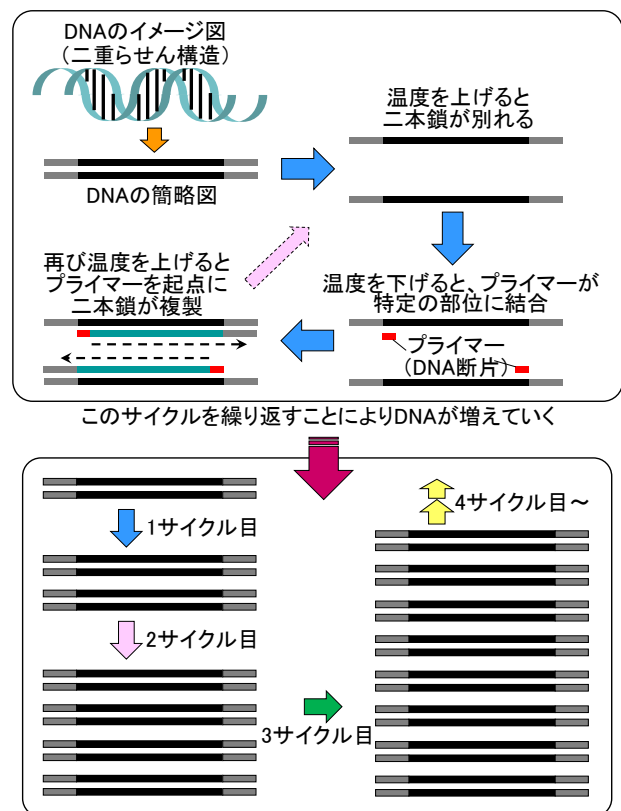


図1 PCR反応の流れ

作図の一部は、高知工科大学 堀澤栄教授の協力を得ました。

■食用きのこの品種判別⁴⁾

人間と同じように、例えば同じシイタケでも個体によって特徴や性質が異なる場合があります、味や大きさが異なったり、子実体（きのこ）を作るまでの時間が異なったりします。品質の良い、あるいは新しい特徴や性質を有するシイタケを作出するために、野生のシイタケを採取したり、複数のシイタケの個体株を掛け合わせたりして栽培し、選抜します。

一般的なきのこ栽培の流れとPCRを用いた品種判別を図2に示します。そのきのこがどのような性質・特徴を持っているのかを調べるには、菌糸（きのこの身体の一部）を培養・栽培し、最終的にきのこを作って、色、形、大きさなどの形態的な特徴や、きのこを作るまでの時間、きのこの発生量などで判断します。通常、きのこを作るまでの時間、すなわちそのきのこの形態的特徴や性質を知るためには数ヶ月程度を要しますが、PCRを用いると菌糸の段階で短時間に品種判別することが可能となります。さらに、各株の特徴・性質とDNA配列との関係を調べることで、菌糸の段階で特徴・性質や近縁関係なども把握することができようになります。

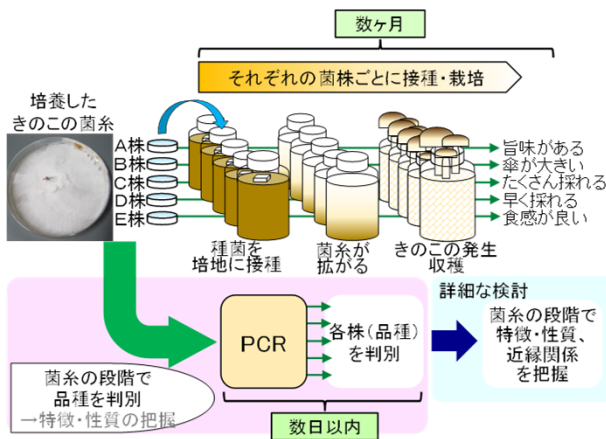


図2 一般的なきのこ栽培の流れとPCRを用いた品種判別

■胞子をあまり作らない食用きのこの開発⁵⁻⁷⁾

きのこは、傘の裏側から胞子を放散して仲間を増やしていきます。特に北海道で多く生産されているタモギタケは、他のきのこに比べて傘が十分に成熟した段階で収穫されるため、胞子の放散量が多く、生産現場での汚染や作業者の健康への影響が危惧されていたことから、その対策が求められていました。

そこで林産試験場では、タモギタケの菌糸から取り出した細胞に太陽光と同程度の紫外線を照射して変異を起こさせ、胞子の放散量が少ない、新しい性質のタモギタケを開発しました。しかし、紫外線を照射した細胞全てが望み通りの変異を起こし、胞子の放散量が少ないきのこばかりが作出されるわけではありません。そのために、紫外線照射した細胞をそれぞれ培養して菌糸を発生させ、さらに培養してきのこを作らせた段階で胞子の放散量を確認する必要がありますが、それまでには数ヶ月を要します。そこで、胞子放散量が少ないタモギタケのDNAのみに結合するプライマーを設計してPCR反応を行った結果、胞子放散量の少ないタモギタケを菌糸の状態ですぐに選別することができました（図3）。

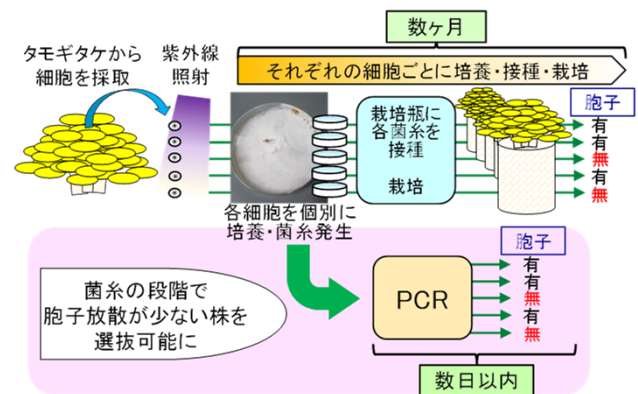


図3 PCRを用いた胞子放散量の少ないタモギタケの選別

■マツタケを探す・見分ける⁸⁾

林産試験場では、マツタケを山で人工的に発生させる研究も行っています。マツタケは、樹木の根と共生しながら、普段は土の中で「シロ」という菌糸の塊の状態ですべて生活しています。シロは同心円状に広がってある程度成長した後、気温や湿度などの環境条件が整った時に、シロからきのこ（マツタケ）が発生し、地面から現れます。この研究では、まず土中に潜んでいるマツタケ（菌糸）をPCRで検出できることを確認しました。今後、マツタケ（菌糸）を共生させて育てた苗を山に植えた後、マツタケ菌糸が土の中で成長してシロを形成しているのか、それがどの程度広がっているのかを調べる際にPCRを用いる予定です（図4）。また、同じマツタケでも、遺伝的な系統によって性質が異なりますが、PCRによりそれらの違いを判別することも可能となります。

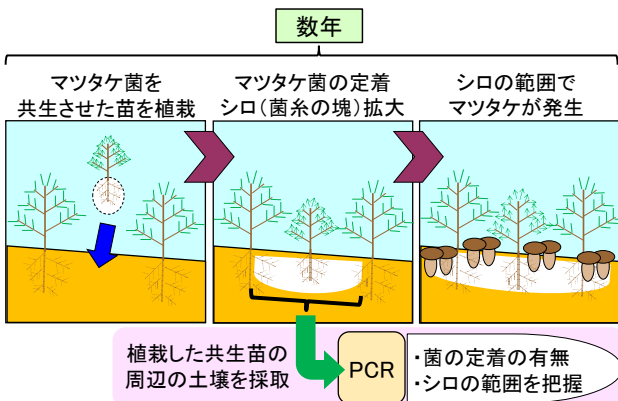


図4 PCRを用いたマツタケ菌の定着およびシロの範囲の確認

■木材を腐らせるきのこの特定^{3,9-11)}

住宅では、床下、壁の中、雨漏りの影響を受ける箇所などで木材が腐る（腐朽する）ことが多く、通常の生活をしている中では見つけづらい所で発生する場合があります。そのため、異常に気がついた時には腐朽が進行しているケースが散見されます（写真1-2）。腐朽を未然に防ぐためには、水漏れや床下の湿度環境など、日常的に水分の管理に注意を払うとともに、定期的に点検を行うことが重要です。万が一、腐朽が発生した場合は早期に対策をとれば被害も軽減されます。



写真1 畳で隠れた部分に発生した腐朽事例

木材の腐朽は、一部のカビを除き、主に担子菌類（きのこの仲間、以下、腐朽菌）によって引き起こされます。食用きのこと同様に、腐朽菌は菌糸という形で成長しながら木材を腐らせます。したがって、住宅で使用されている木材に菌類が発生した場合、それが腐朽菌かどうかを判別することで、その後の対策に繋げることができます。



写真2 床下で腐朽菌が蔓延した事例

菌類を見つけた場合、木材が劣化していたら腐朽していると判断できます。しかし、木材に劣化が見られない部位で菌類を見つけた場合、その菌類が「腐朽菌なのかどうか」を肉眼で判断するのは困難をきわめます（写真3）。また、菌類がいなくても、木材の色が変わっていたり水分を多く含んでいたりすると、腐朽菌が木材に潜んでいることも考えられます。そのような時は、その菌類や異常部位に対して精密な診断が必要になります。その方法の一つとしてPCRを検討しました。



写真3 床下で発生した菌類

林産試験場の研究では、まず腐朽菌の種類に特異的なDNA配列を含んだプライマーを作製しました。住宅の腐朽が発生した箇所から採取した菌糸や、腐朽菌が内部に潜んでいる可能性がある木材片に対し、作製したプライマーを用いてPCRを行うことにより、腐朽菌の種類を同定することが出来ました(図5)。また、この手法を応用し、野外で発生する腐朽菌についても同定できる技術を開発しました。

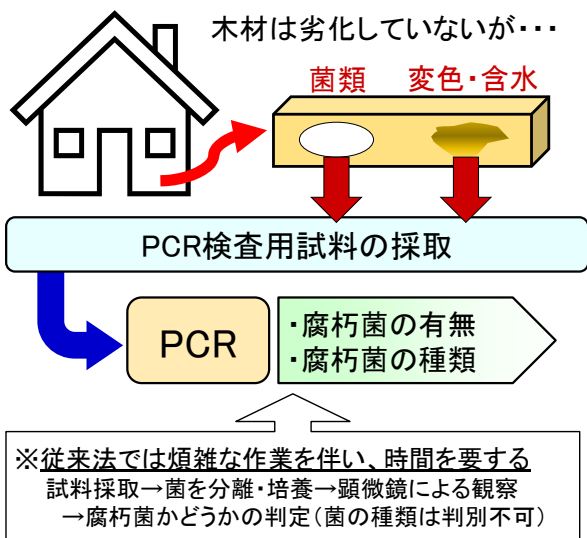


図5 腐朽の疑いのある木製住宅部材のPCR検査

■おわりに

PCRの概要と、それを利用した林産試験場の取り組みについてご紹介しました。多くの読者に理解を深めていただくよう、なるべく簡潔な表現に努めたので、学術的には正確ではないところもありますが、ご容赦ください。

前述の通り、PCRは目的とする生物種の微量のDNAを増やして、その有無や特徴・性質を調べるための有効な技術です。しかし、大半の研究や技術開発において、PCRは目的ではなく手段の一つであり、最終的な目標はPCRで得られた情報により、新たな技術開発や技術展開を図ることにあります。新型コ

ロウイルス感染についても、PCR検査の結果を踏まえ、医療体制の整備やワクチン・治療薬の開発など、早急に対策が講じられ、再び通常の生活が送れるようになることを切に願います。

■参考文献

- 1) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症について >国内の発生状況など、<https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/kokunainohasseijoukyou.html> (2020年9月19日参照)。
- 2) “ここまでできるPCR最新活用マニュアル”，佐々木博己編，株式会社羊土社，東京，p.10 (2005)。
- 3) 森 満範：遺伝子を用いた木材腐朽菌の検出，林産試だより2010年1月号 pp.4-6 (2010)。
- 4) 生産技術科，森主任林業専門技術員：III.2.7 針葉樹おが粉の利用に適した道産品種の育成，林産試験場報，17 (4)，p.45 (2003)。
- 5) 米山彰造，宜寿次盛生，佐藤真由美，原田 陽，村口 元，奥田康仁，松本晃幸：紫外線照射によるタモギタケの孢子欠損性変異の誘発，日本きのこ学会誌，23(1)，pp.20-25 (2015)。
- 6) 米山彰造，安東夏都美，東 智則，佐藤真由美，牛島秀爾，松本晃幸：タモギタケ孢子欠損性変異体に関する遺伝学および細胞学的解析，日本菌学会会報，58(2)，pp.41-50 (2017)。
- 7) 米山彰造：生産者と消費者の要望に応える道産タモギタケ新品種「えぞの霞晴れ33号」，林産試だより2019年12月号，pp.1-3 (2019)。
- 8) 宜寿次盛生：DNAで土壌中のマツタケ菌を探す，林産試だより2014年3月号 pp.4-5 (2014)。
- 9) 杉山智昭，森 満範，宮内輝久，中谷 誠，原田陽：PCR法による木材腐朽菌の同定，木材保存，29(3)，pp.98-104 (2003)。
- 10) 森 満範：木造住宅における腐朽診断の現状と腐朽菌検出技術の動向，木材工業，63(4)，pp.158-163 (2008)。
- 11) 東 智則：野外木質構造物で発生している腐朽菌をDNAで調べる，林産試だより2013年2月号 pp.1-2 (2013)。