

## 論文の内容の要旨

生物材料科学 専攻  
平成 19 年度博士課程 進学

氏 名 和田 朋子  
指導教員名 鮫島 正浩

論文題目 木材の腐朽環境に存在する担子菌類のモニタリング手法の開発と評価

### **第 1 章 緒言**

木材腐朽菌は木質構造の強度低下や損壊の大きな原因のひとつになるとされている。このことから、木質住宅や木製外構施設の維持管理のために木材腐朽菌の動態をモニタリングすることは重要な課題と言える。木材腐朽菌の多くは担子菌に分類されることから、これまで木材腐朽菌のモニタリングは腐朽の疑われる箇所から担子菌を採取・培養し、その菌糸形態を観察することで評価を行ってきた。しかしながら、このような培養を介した手法は、時間と手間が必要とされるだけでなく、難培養性の菌は検出されない、さらに腐朽初期段階における菌の検出ができないなど多くの問題点がある。これに対して、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) によって増幅されたリボゾーム DNA (rDNA) 断片の塩基配列解析から腐朽菌を同定する手法が最近開発された。本 PCR 法は菌を単離することなく同定できるという利点がある一方で、木材含有成分による PCR 阻害や、鋳型 DNA を得るために多量のサンプルが必要となる等の問題点が残されている。

そこで、本研究ではこれらの問題点を克服するため、極微量のゲノム DNA を鋳型として非特異的な DNA 増幅を行う枯草菌ファージ Phi29 DNA ポリメラーゼに着目した。この増幅法とその後段に PCR による rDNA 断片の増幅を組み合わせること

で、微量試料から培養過程を経ずにそこに存在する担子菌類を同定し、さらに腐朽材中の担子菌叢中における各菌の存在比を定量評価するための DNA 増幅条件について検討した。

## **第2章 非特異的 DNA 増幅と rDNA 断片の PCR 増幅を利用した担子菌類の同定**

本章では、Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA の増幅を PCR の前段階に組み入れることで、微量試料から担子菌類を同定することが可能となる手法を確立し、さらにその実地試験を行った。

まず、担子菌類の木材腐朽菌の菌糸、孢子ならびに木材腐朽菌を植菌後 1 週間経過した木片を破碎し得られた木粉試料約 1 mg を Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅に供し、その後担子菌 rDNA に特異的なプライマーを用いた PCR を行うことによって、そこに存在する木材腐朽菌の rDNA の検出が可能であることを示した。さらに、その rDNA の Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の塩基配列を BLAST 検索に供することで菌株同定ができることを示した。

さらに、上記の手法に対する実地試験として、木造住宅（築 41 年）の周囲 16 カ所に埋設したベイトステーション用器具キープオフ<sup>TM</sup> 中に設置後一年経過した木片から採取した微量木粉に適用した。各試験体から得た PCR 増幅産物をプラスミドベクターにライゲーションし大腸菌へ形質転換した。その後、任意の 10 個の形質転換体について配列情報の取得を試みた。その結果、16 箇所のベイトステーションから得た合計 160 検体中、103 の検体については ITS 領域の塩基配列の解析ができた。このうち 80 検体については、データベース上に種名あるいは属名が登録されている担子菌あるいはその近縁種と 92-100 % の相同性で同定された。残りの 23 検体は、データベース上に登録されていない配列、難培養性の菌、種属の明らかにされていない担子菌であった。同定された 80 検体の菌種は 10 属 17 種に及び、一軒の家屋敷地内でサンプリングをした、それぞれの腐朽木材中において様々な担子菌が存在していることが確認された。

以上のことから、PCR 法では困難と考えられる約 1 mg の木粉試料からでも PCR 阻害を受けることなく、迅速・簡便に腐朽木材中に存在する担子菌を同定することが可能になった。さらに木材腐朽環境中には複数の担子菌が関与している可能性が示唆された。

## **第3章 木材腐朽菌叢の定量的評価を目的とした DNA 増幅条件に関する評価**

前章の結果から微量の腐朽木材から担子菌類の同定ができることを示した。その一方で、腐朽木材中には多種の担子菌が存在することが示され、木材腐朽への各菌の関与などをモニタリングするためには菌叢中での各菌の量比を定量的に評価することが重要であることが考えた。そこで本章では、二種類の木材腐朽菌か

ら抽出したゲノム DNA を混合したサンプルに対して、Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA の非特異的増幅および引き続く PCR による ITS 領域の特異的増幅を行い、得られた PCR 産物に対して PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法によって増幅条件における混合比の定量性を評価した。さらに、リアルタイム PCR 装置を用いて増幅産物の融解挙動を調べ、PCR-RFLP によって得られた結果を検証した。

まず、様々な濃度の木材腐朽菌ゲノム溶液を調製し、これを鋳型として、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた非特異的 DNA 増幅法の条件を検討した。その結果、初期鋳型 DNA 濃度が  $1 \text{ pg}/\mu\text{l}$  以下では反応初期から増幅が認められ、鋳型 DNA 濃度が低いほど増幅効率が良いことが示された。このことから Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA の非特異的増幅を行うことで、 $0.1\sim 1 \text{ pg}$  というごく微量な DNA を PCR の鋳型として使用できるまで増幅可能であることが明らかとなった。

次に、同一濃度の 2 種の木材腐朽菌ゲノム溶液を 1:1 の比に混合し、Phi29 DNA ポリメラーゼで増幅した後さらに PCR-RFLP 解析に供した。その結果、非特異的 DNA 増幅時間に関わらず PCR の指数的増幅期ではゲノムの混合割合がほぼ反映されていたのに対して、PCR のプラト一期では混合割合が反映されておらずバイアスが生じていることが明らかとなった。このバイアスの発生原因について検証するため、リアルタイム PCR から得た増幅産物の  $T_m$  値を PCR の指数的増幅期とプラト一期で比較した結果、サイクル数の増加に伴い、高温側に  $T_m$  があるピークが優先的に増幅することが明らかとなった。

#### **第 4 章 総括**

本研究の結果から、Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的増幅と PCR 増幅を組み合わせることで、微量試料から培養過程を経ずに菌叢中に存在する担子菌類を同定する手法について以下の通り確立した。腐朽木材から得た微量木粉から DNA を抽出する。これを 1/10 オーダーで逐次希釈した各試料液を調製する。得られた各試料液に対して、Phi29 ポリメラーゼにより DNA の非特異的増幅を 18 時間行う。その結果、DNA 増幅が確認できたサンプルを用いて、定められた条件下において PCR を 20 サイクル行う。得られた PCR 産物に対して、PCR-RFLP 解析を行って試料中に存在する各担子菌の存在比を求める。PCR-RFLP のパターンに基づいて分類した各菌に対して、それぞれの菌種の同定を ITS 領域の配列情報解析により行う。本研究により、腐朽木材中に存在する担子菌類について同定ならびにその存在比を確認するモニタリング手法を確立した。