

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780164

研究課題名（和文）

分子生物学的アプローチによる木材腐朽部に存在する微生物の群集構造解析

研究課題名（英文）

Molecular biological analysis of microbial community in decayed wood

研究代表者

吉田 誠（YOSHIDA MAKOTO）

東京農工大学・大学院農学研究院・特任准教授

研究者番号：30447510

研究成果の概要（和文）：リボソーム DNA の介在配列である ITS を対象とした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法を用いて、腐朽在中に存在する菌類を検出する技術を開発した。本手法で解析した結果、腐朽在中には多様な糸状菌類が存在していることが明らかとなった。さらに、FISH 法により菌糸の可視化が可能かどうかを検討したところ、DNA プローブを用いた際には腐朽菌の検出が困難であったが、ペプチド核酸(PNA)プローブを用いた場合には腐朽菌を可視化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Detection method of fungi existing in decayed wood was developed in the present study. Fungal community in decayed wood was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis following amplification of fungal ITS region by PCR. The analysis suggested the existence of various fungi in decayed wood. Moreover, visualization of mycelium by FISH was examined. As a result, FISH with DNA probe targeting ITS region of fungi was failed, while the analysis with PNA probe successfully visualized the mycelia of wood rotting fungi.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	2,600,000	780,000	3,380,000
平成22年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：木質科学

キーワード：木材腐朽, 菌類

1. 研究開始当初の背景

我が国の住宅の寿命は通常約20～30年であり、これは欧米と比較して極めて短い。一棟の住宅を建て替える為には、大量の資源が消費され、膨大な量の廃棄物が生じる。したがって、住宅を長寿命化することは、資源問題や廃棄物問題の解決、温暖化ガスの削減に大きく寄与するものである。また、住宅が長寿命化されれば、複数世代で住宅にかかるコストを削減できることから、個人の経済的負

担の面でも大きなメリットがある。このような背景を受け、近年、「長寿命住宅社会」実現への機運が高まっている。

我が国では、木造住宅が家屋の中心である。木材は、適切な条件で適切に利用すれば極めて長い耐用年数を示す。その反面、火災による消失、物理的損傷、シロアリなどの小動物による食害や、微生物による腐朽などによって急激な劣化を受ける。特に、微生物による腐朽は、家屋の強度低下や表面汚染により住

宅の商品価値を著しく低下させるにも関わらず、腐朽初期にその兆候を発見することが困難であることから、木材の利用上、最も注意を必要とする劣化の一つである。一般に木材腐朽菌という用語は、木材の腐朽能力を持つ真菌類を指すものであるが、多くの場合、木材に腐朽を生じる担子菌類に対して用いられてきた。というのも、古くから、自然界や家屋において観察される腐朽の主要な原因菌は担子菌類だったからである。一方、子囊菌類および不完全菌類などの軟腐朽菌は、担子菌類が腐朽できないような高含水率の木材を劣化させるが、建築材料における被害の例は少ないことから、それほど重要視されてこなかった。ところが近年、我が国の家屋は従来の軸組工法から、密封型木造住宅が主流となりつつあり、その結果、結露などにより局所的に含水率の高い部位を生じる住宅が年々増加している。このことから、近年の木造住宅の腐朽には子囊菌類が及ぼす影響の拡大が懸念されており、従来考えられてきた木材腐朽原因菌の分布様式に変化が生じていると予想される。自然界における腐朽菌の分布様式を知るためには、菌類の検出、同定技術が不可欠であるが、従来の形態学的観察では、培養過程での菌叢変化や、異菌種間で明確な形態的差異が見られない場合があるなどの問題点がある。また、近年、ゲノム上のリボソームDNA間の介在配列(ITS)領域を用いたDNAレベルでの解析法が注目されているが、多様な菌種からなる腐朽中の菌叢を調査するためには、大量のクローンの塩基配列を確認するなどの多大な労力を要することから、効率的な菌の同定技術の開発が望まれている。

2. 研究の目的

上記のような背景を受け、本研究では、以下の3点を目的とした。

- (1) 腐朽材中に存在する担子菌および子囊菌をDNAレベルで簡便に検出、同定する技術を開発すること

ITS領域のPCRおよびその増幅産物の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)による木材腐朽菌の検出、同定技術を確立することを目的とした。ITS領域は、生物の属種により保存性が高いことから、それらを比較することで、菌の分類・同定が可能である。DGGE法は、土壌中や糞便中の微生物叢のプロファイリングに用いられてきた技術であり、様々な環境サンプルにおける微生物叢の差異を電気泳動パターンで比較することが可能な優れた方法である。本研究課題では、担子菌のみならず子囊菌をも調査の対象とし、それぞれに特異的なITSプライマーの作製およびDGGE法の最適化を行うことを目的とし

た。

- (2) 実際の木造家屋をサンプルとして、各腐朽部位に存在する担子菌および子囊菌の検出、同定を行うこと

(1)において開発された技術に基づき、実際の現場における腐朽材中の担子菌類および子囊菌類の検出および同定を行うことを目的とした。

- (3) 各腐朽部位に対して、FISH法に基づく顕微鏡観察を行うこと

(2)で得られた腐朽菌のDNA情報に基づき作製したプローブを利用し、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)を行うことを目的とした。これにより、腐朽材中の担子菌および子囊菌をそれぞれ特異的に検出し、それぞれの菌糸がどのように腐朽材中に存在しているかが明らかになると考えた。

3. 研究の方法

目的(1)の実験方法

本研究で使用した糸状菌は、表1に示した。これらの糸状菌をYMG寒天培地(酵母抽出物0.4%; 麦芽抽出物1%; D-グルコース0.4%; 寒天1.5%)上で、菌糸が培地上に蔓延するまで培養した。菌糸を培地ごとくり抜き、その小片(直径約7mm)を2つ10mlのYMG液体培地に接種した。担子菌類は14日間、子囊菌類は3日間、26.5°Cで静置培養した後、菌糸を回収し、即座に液体窒素で凍結させた。凍結菌体からDNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)を用いて、ゲノムDNAを抽出した。

得られたゲノムDNAを用いて以下の通りPCRを行った。PCRの反応組成として1×Ex Taq buffer(タカラバイオ(株))250μMのdNTP mixture(タカラバイオ(株)), 0.5μMのプライマー対(ITS1-F-DGGE, 5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'; ITS2, 5'-GCTGCGTTCTCATCGATGC-3'), 0.5UのEx Taq DNA polymerase hot start version(タカラバイオ(株))を含む20μlの反応系で行った。この反応液を95°Cで5分間静置した後、95°C・30秒、60°C・30秒、72°C・30秒の三段階の加熱条件を30回繰り返し、次いで72°Cで5分間静置後、4°Cで冷却した。上記のようにして得られたPCR産物を2%アガロースゲル中で電気泳動し、エチジウムブロマイドにより染色した。得られたバンドをゲルから切り出し、QIA quick gel extraction kit(Qiagen)を用いてDNA断片を精製した。このDNA断片を3130 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いたダイレクトシーケンス解析に供した。

PCR産物はDGGE解析に供した。DGGE解析は、変性剤(100%変性剤は40%ホルムアミド

と 7M 尿素の混合液) を 20-70% の直線濃度勾配として含む 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。PCR 産物 5 μ l と等量の 2 \times DGGE loading buffer (ニッポンジーン(株)) を混合し、これをサンプルとした。電気泳動は 0.5 \times TAE を用いて、60 $^{\circ}$ C、15 時間行った。その際の電圧は 75V とし、ゲルのサイズは 180mm \times 200mm \times 0.5mm とした。電気泳動後、SYBR[®] Green I (タカラバイオ(株)) で染色し、PCR 産物を検出した。各 DNA 断片をゲルから切り出し、E. Z. N. A. Poly-Gel DNA Extraction Kit (Omega Bio-Tek) を用いて DNA 断片を精製した。この DNA 断片を 3130 Genetic Analyzer を用いたダイレクトシーケンス解析に供した。ダイレクトシーケンスにより解析できなかった断片は、pCR 4-TOPO vector (インビトロジェン(株)) に挿入し、3130 Genetic Analyzer を用いて解析した。

表 1 研究に用いた真菌類

	菌種
1	<i>Coprinopsis cinerea</i>
2	<i>Coriolus versicolor</i>
3	<i>Irpex lacteus</i>
4	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
5	<i>Pycnoporus coccineus</i>
6	<i>Xylobolus frustulatus</i>
7	<i>Coniophora puteana</i>
8	<i>Fomitopsis palustris</i>
9	<i>Gloeophyllum trabeum</i>
10	<i>Serpula lacrymans</i>
11	<i>Aspergillus oryzae</i>
12	<i>Chaetomium globosum</i>
13	<i>Penicillium chrysogenum</i>
14	<i>Trichoderma reesei</i>
15	<i>Emericella nidulans</i> var. <i>nidulans</i>

目的 (2) の実験方法

腐朽材サンプルとして、株式会社園部木材店 (新潟県新発田市) よりウッドデッキの階段 (新潟県北蒲原郡, 米松, 2008 年 9 月 9 日採取), ウッドデッキの床板 (新潟県新発田市, 赤松, 2008 年 9 月 9 日採取), 屋外に放置されていた丸太 (新潟県新発田市, 赤松, 2008 年 9 月 9 日採取) の 3 種類の屋外サンプル及び、ナギ産業株式会社 (東京都文京区) より押入の壁の合板 (埼玉県蓮田市, 2008 年 3 月入手), 根太 (埼玉県蓮田市, 2008 年 3 月入手), 和室の床板 (埼玉県蓮田市, 2008 年 3 月入手) の 3 種の屋内サンプルを用いた。

腐朽サンプルから小片 (約 20mm \times 20mm \times 20mm) を切り出し、液体窒素で凍結させた後、凍結状態のままサンプルミル (TI-100, 平工製作所(株)) で 1 分間粉碎した。この粉末 1-2 g からゲノム DNA を抽出した。異なる手法による DNA 抽出効率の差異を評価するため、DNA 抽出キットとして、DNeasy Plant Mini Kit および FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いた。得られたゲノム DNA のうち 6.7ng を鋳型にして、GenomiPhi DNA Amplification Kit (GEヘルスケア バイオサイエンス) を用いてマニュアルに従い、非特異的な DNA の増幅を行った。この反応物を 1% アガロースゲル中で電気泳動し、増幅を確認した。

得られた PCR 産物は (1) で記述したものと同様に DGGE 解析に供した。得られた配列情報を用いて、米国国立衛生研究所医学図書館の生物工学情報センター (NCBI) が提供する相同性検索ウェブサイト

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) において、BLASTN 検索を行った。アルゴリズムは megablast を用い、パラメーターは全てデフォルト設定で行った。

目的 (3) の実験方法

寒天培地上に生育させた菌糸をピンセットでゆっくり取り出し、4% の *p*-ホルムアルデヒドを含んだ PBS Buffer (pH7.4) を 500 μ L 加え、20 $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。その後、PBS で 2 回洗浄した。この菌糸を 100mM NaCl, 0.5% SDS, 25mM Tris-HCl 溶液 25 μ L に浸漬した後、240 nM の PNA プローブ (真菌類の ITS 領域に作成した) 25 μ L を添加し、暗室で 54 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートした。反応後、TE Buffer で 3 回洗浄し、DAPI で 1 時間染色した後、滅菌水で 2 回洗浄した。この菌糸を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

目的 (1) の研究成果

YMG 培地で培養した糸状菌から抽出したゲノム DNA を鋳型にして PCR を行い、各糸状菌の ITS 領域を増幅した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、エチジウムブロマイドにより染色したところ、全てのサンプルにおいて分子量約 400 bp 付近に主要な 1 本のバンドが観察された (図 1)。本バンドをゲルから切り出し、シーケンス解析に供した後、得られた塩基配列情報を用いて相同性検索を行うことで、増幅産物が各糸状菌の ITS 領域をコードする遺伝子断片であることを確認した。この結果は、本研究で用いたプライマーが広範囲の糸状菌由来の ITS 領域を増幅可能なものであることを示唆している。

本 PCR 産物を DGGE 解析に供したところ、それぞれの糸状菌由来のバンドの移動度が

異なることが明らかとなった (図 2)。このことは、各糸状菌の ITS 領域断片が DGGE により分離可能であることを示唆している。また、興味深いことに一つの糸状菌の PCR 産物に対して数本の増幅産物が観察された。それぞれのバンドをゲルから精製し、シーケンス解析に供したところ、各バンドの塩基配列の差異は数塩基程度とごくわずかであった (データ未掲載)。ITS 領域は、ゲノム上に極めて多コピーとして存在しており、塩基配列に多型が存在していることが知られている。したがって、本実験の結果は、各糸状菌の ITS 領域の多型を反映しているものと考えられる。いずれにしても、同一菌種内で複数のバンドが観察されることは、1 本のバンドのみが観察される場合と比較し、ITS 領域由来のバンドが他の菌種由来のものと同様に分離できる可能性を高められることから、菌叢解析を行う場合には利点となると予想される。

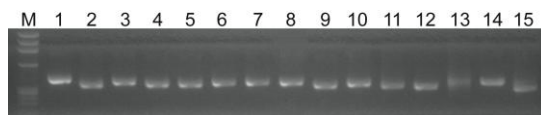


図 1 糸状菌から抽出した DNA の ITS 領域増幅産物のアガロースゲル電気泳動
M: 分子量マーカー
1-15: 表 1 に示した糸状菌

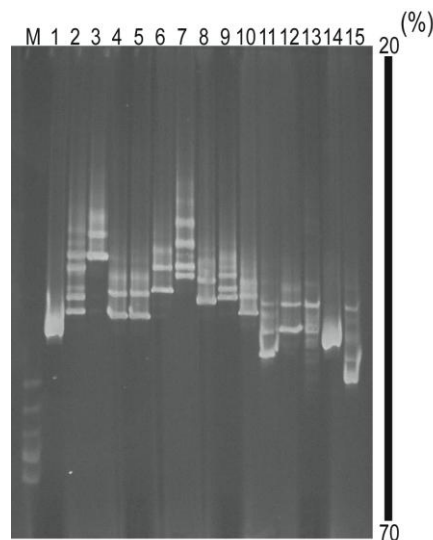


図 2 糸状菌から抽出した DNA の ITS 領域増幅産物の DGGE 解析
M: 分子量マーカー
1-15: 表 1 に示した糸状菌

目的 (2) の研究成果

DNA の抽出効率の差異を調査するため、上記 6 つの腐朽サンプルから DNeasy Plant Mini

Kit および FastDNA® SPIN Kit for Soil を用いてゲノム DNA を抽出した。その結果、いずれの手法の間にも抽出効率に差異は観察されなかった。そこで、我々は DNeasy Plant Mini Kit を用いて得られたゲノム DNA を以後の実験に用いた。抽出したゲノム DNA から大量の DNA を調整するため、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いて DNA の非特異的増幅を行い、得られた DNA を以後の PCR 反応の鋳型とした。

PCR の増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析した結果、全てのサンプルにおいて約 400 bp 付近に主要なバンドが観察された (図 3)。この断片のサイズは図 1 で観察されたものと同様であったことから、本研究で用いたプライマーは腐朽材中の真菌類の ITS 領域を増幅可能であったと予想される。ウッドデッキの床板と 3 つの屋内サンプルにおいては複数のバンドが確認されたことから、これらのサンプルには複数の真菌類が存在していることが示唆された。これら腐朽サンプル由来のバンドをダイレクトシーケンス解析に供した結果、いずれのバンドにおいても配列を決定することができなかった。これはおそらく 1 つのバンド中に異なる配列を持つ DNA 断片が混在しているからではないかと思われる。

DGGE 解析においては、アガロースゲル電気泳動の場合と比較して多数のバンドが確認された (図 4)。注目すべきこととして、アガロースゲル電気泳動上で 1 本のバンドのみが観察されたウッドデッキの階段と丸太サンプルにおいても複数のバンドが確認された。各バンドの DNA 断片をシーケンス解析に供した後、相同性検索を行った結果、全てのサンプルが真菌類の ITS 配列と相同性を示したが、ほとんどのサンプルでデータベース上の塩基配列と 95% 以下の相同性しか示さなかった。したがって、これらの菌類は既知の糸状菌の類縁種ではあることは明らかとなったが、種の特定には至らなかった。同様の問題点は、多くの研究で報告されており、今後、より正確な腐朽菌類の同定を可能にするためには腐朽菌の ITS 領域の塩基配列データベースの拡充が不可欠であると思われる。

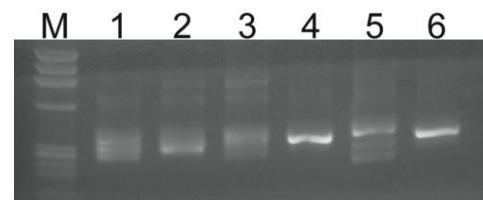


図 3 腐朽材から抽出した DNA の ITS 領域増幅産物のアガロースゲル電気泳動
M: 分子量マーカー
1: 押入の合板 2: 根太 3: 床板
4: ウッドデッキの階段
5: ウッドデッキの床板 6: 丸太

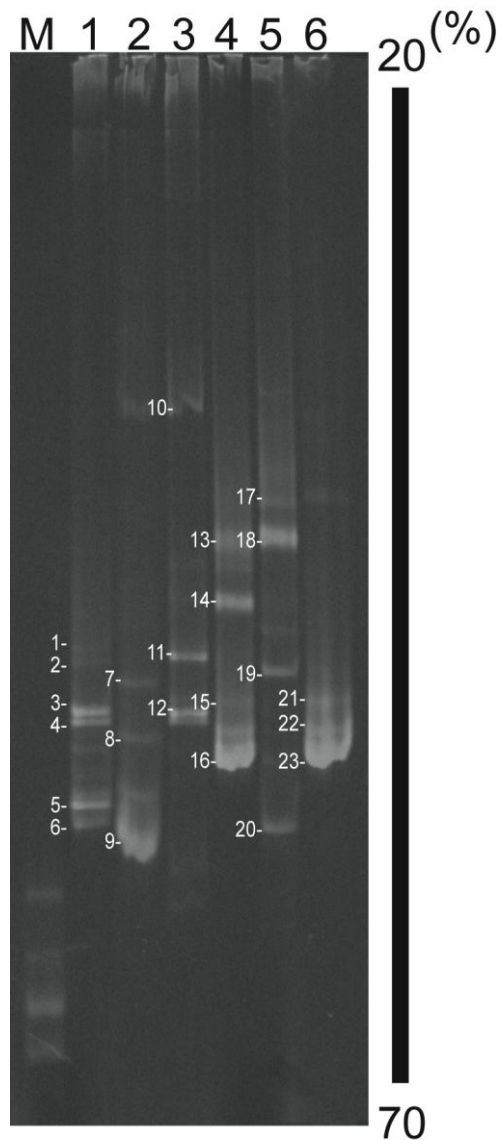


図4 腐朽材から抽出した DNA の ITS 領域増幅産物の DGGE 解析
 M: 分子量マーカー
 1: 押入の合板 2: 根太 3: 床板
 4: ウッドデッキの階段
 5: ウッドデッキの床板 6: 丸太

目的 (3) の研究成果

FISH 法を用いて腐朽菌の検出するための技術開発を試みた。FISH 法に用いた標的遺伝子は、コピー数が多く検出感度の観点から優位性を持つという理由から、ITS 領域を選択した。白色腐朽菌のモデル菌であるカワラタケを用いて FISH 法による菌糸の可視化条件を検討した結果、DNA プローブを用いた際に

は菌由来のシグナルを検出することができなかった。カワラタケの他に、褐色腐朽菌のモデル菌であるオオウズラタケに対しても同様の条件検討を行ったが、カワラタケ同様に検出することができなかった。そこで、真菌類の FISH 解析に有用である事が知られているペプチド核酸 (PNA) をプローブとして用い、FISH 解析を行ったところ、腐朽菌を可視化することに成功した (図 5)。一般に DNA プローブを用いた FISH 解析では、腐朽菌細胞壁の可溶化工程が必要であると考えられているが、PNA プローブを用いた際には可溶化工程をすることなく腐朽菌を可視化することが可能であった事から、腐朽菌の FISH 解析に極めて有用であると考えられた。

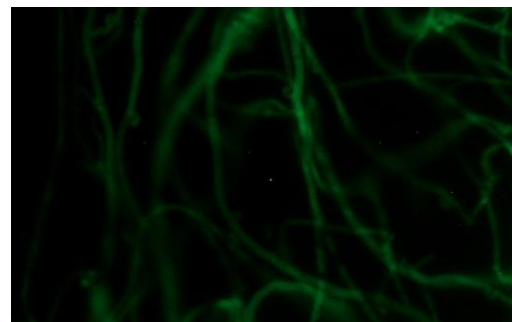


図5 PNA プローブを用いたカワラタケの可視化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) 中田 裕治, 久住 朝子, 半 智史, 片山 葉子, 船田 良, 福田 清春, 吉田 誠: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法を利用した腐朽木材中に存在する真菌類の菌叢解析. 木材保存. 査読有. 36 巻. 3 号. 100-110 (2010)
- (2) 中田裕治, 吉田 誠, 船田 良, 福田清春: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法を用いた木材腐朽菌の検出法の最適化. 木材保存協会第 26 回年次大会論文集. 査読無. 46-47 (2010)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 中田裕治, 永石憲道, 福田清春, 吉田 誠: サクラの樹幹における真菌類の局在様式の調査. 第 61 回日本木材学会大会. 2011 年 3 月 20 日. 京

- 都大学（京都）。
- (2) 堀友宣, 中田裕治, 福田清春, 吉田誠: 糖質加水分解酵素ファミリー7に属する酵素遺伝子の腐朽材からの検出. 第61回日本木材学会大会. 2011年3月20日. 京都大学(京都).
- (3) 中田裕治, 吉田誠, 船田良, 福田清春: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法を用いた木材腐朽菌の検出法の最適化. 日本木材保存協会第26回年次大会. 2010年5月25日. メルパルク東京（東京都）。

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 誠 (YOSHIDA MAKOTO)
東京農工大学・大学院農学研究院・特任准教授
研究者番号：30447510

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし