

平成22年 6月 9日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380103
 研究課題名（和文） マイクロマニピュレーション・直接PCR法を用いたDNA分析による木材の樹種識別
 研究課題名（英文） Wood identification by DNA analysis with micro-manipulation and direct PCR method.
 研究代表者 安部 久（ABE HISASHI）
 独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員
 研究者番号：80343812

研究成果の概要（和文）：木材や木材製品の樹種を種レベルで識別するために、長期間の保存や高温処理による木材中のDNAの劣化による影響を分析した。また、それらの結果をもとに木材のDNA分析に有効な超音波処理によるDNA抽出手法を開発した。さらに、その手法を用いて、東南アジア産木材で製造された合板用単板および製材からDNAを抽出し、データベースをもとに分析することによって木材の樹種を特定することに成功し、樹種や産地の確認のためにDNA分析手法の有効性を検証した。

研究成果の概要（英文）：We investigated effects of long-term storage and high temperature treatment of wood to the DNA degradation and developed a method for extracting DNA effectively by ultrasonic treatment from wood. We applied the method for DNA analysis to species-level identification of wood products of *Shorea* spp. The usefulness of DNA analysis for wood identification at species level is demonstrated in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

研究分野：木材組織学

科研費の分科・細目：林産科学・木質工学

キーワード：木材、樹種識別、核酸、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

近年、東南アジア地域やロシア等における違法伐採が、持続可能な森林経営を阻害し、生物の多様性を損なうものとして大きな問題となっている。この問題への対策の一つとして、合法性が確認された木材を利用することが推奨されている。木材の合法性基準には「木材の識別とトレーサビリティ」があり、これを実現するためには木材から樹種を識

別する技術が求められる。また、国内においても認証材の使用を進める動きがあり、木材の産地、樹種、品種、加工方法の表示が自主的に行われるようになってきた。

木材の樹種識別は、一般に顕微鏡を用いて木材を観察し、組織構造の特徴に基づいて行われる。しかし、組織観察では属レベルでの識別にとどまる場合が多く、種や品種といった、より詳細な識別は困難である。DNA分析

技術は食品の原材料の判別等に利用されており、木材への適用も可能であると考えられる。これまでに木材製品や標本の木部からDNAを抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction: PCR)法によって遺伝子を増幅した研究例はあるが、熱帯地域の樹種を対象としたものは僅かである。その理由は、熱帯産樹木の木材に含まれる抽出成分がPCRを阻害しDNAを増幅が難しいことにある。さらに、由来が明らかで同定が確かな熱帯産樹木の木材試料が少ないことが研究の障害になっている。東南アジア地域の天然林で最も多く伐採されているフタバガキ科樹木は、DNAさえ得られればDNA分析によって種や個体レベルの識別が可能であることが示されている。

一方、生きた細胞においてDNAは核や葉緑体、ミトコンドリアに局在していることから、木材においても細胞内の分布に偏りがあると考えられるが、組織や細胞のどの部分にDNAが残存しているかは明らかにされていない。そこで、木材細胞についてDNAが残存している部位を調べ、その部位を取り出してDNA増幅に用いることによってPCR阻害成分の影響を低減できる。

2. 研究の目的

以上のような背景のもとに、木材の樹種識別へのDNA分析の応用を目指し、本研究においては、(1)木材中に残存しているDNAについて、辺材、移行材、心材といった木材の部位による残存量の変化を明らかにするとともに、DNAを含む細胞小器官を可視化し、その分布を明らかにする。また、(2)DNAの残存量や残存部位の経年変化についての変化のパターンを示す。それらの結果をもとに、(3)より効率の良い木材からのDNA抽出方法を検討し、さらにそのPCRの条件を検討し、最終的には、東南アジア産木材の樹種識別に応用し、DNA分析による種レベルの識別を行う。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

研究用の試料としては、木材中のDNA分布とその可視化、およびその経年変化の実験には、スギ(*Cryptomeria japonica*)を用いた。新鮮な材としては伐採後すぐに材から円盤を切り出し、凍結後、 -80°C の冷凍庫に保管されたものを用いた。また、経年変化の分析用の試料としては、森林総合研究所に所蔵されている伐採後の経過年数が1, 11, 23, 40, 75年の木材標本を用いた。一方、熱帯産材としては、合板製造工場や製材所から、実際に原料として用いられているレッドメリランティ(*Shorea sect. Rubroshorea* spp.)の木材の提供を受けた。レッドメリランティは

わが国で最も多く利用されている東南アジア産材である。

(2) 方法

①DNA分析

スギについては、新鮮な試料は、辺材、白線帯、心材(白線帯と心材の境界から数えて1, 5, 10および13年輪部分)に分け、保管試料については辺材と心材に分けた後、DNA抽出キット(QIAGEN社DNeasy Plant Mini Kit)を使用してDNAを抽出した。DNA量は波長260nmでの吸光度から算出した。DNA抽出液から、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によって葉緑体DNAのrbcL遺伝子内の塩基番号187から713までの526bpの領域を増幅した。PCR酵素にExTaq HotStart Version (TaKaRa社)を、バッファーにAmpdirect(島津製作所)をそれぞれ使用した。PCRで増幅された産物の塩基配列を決定し、DNAデータベースの検索によって、スギに由来することを確認した。

レッドメリランティ材についても同様の方法でDNAを抽出した。PCRについては、葉緑体DNAのtrnL(UAA) intron(約585bp)、trnL(UAA)-trnF(GAA)(約517bp)、psbC-trnS(約414bp)、trnH(GUG)-psbA(約260bp)を増幅し、増幅されたDNAの塩基配列を決定し、森林総合研究所のShorea属DNAデータベース(<http://f5002.ffpri-108.affrc.go.jp/shorea>)で樹種の検索を行った。

定量PCR法により濃縮したスギ材各試料の残存DNA量の定量を行った。解析には、Step one システム(Applied Biosystems社)を使用した。解析領域は、rbcLの塩基番号555から636までの81領域とした。残存DNA量(Qty)を(1)式より算出した。

$$\text{Qty} = 10^{(\text{CT}-b)/m} \quad (1)$$

ここで、CTは目的遺伝子のCT値、bはQty=1のときのCT値、mは検量線の傾きを示す。

②顕微鏡観察

それぞれの試料から1)10 μm 厚の柁目切片、2)LR-White樹脂に包埋後、2 μm 厚の柁目切片を作製した。それぞれの切片を、DAPI染色(DNA検出)またはヨウ素-ヨウ化カリウム染色(デンプン検出)し、蛍光顕微鏡および光学顕微鏡で観察した。

③DNA抽出方法の検討

木材切片からDNAを含む組織を取り出して、PCRを行う方法を検討するため、(1)滑走式のマイクロームによる15 μm 厚の柁目面切片と(2)2 μm 厚のLR-White樹脂包埋した切片から、レーザーマイクロダイセクションシステム(LMD6000 MPP Leica社)を用いて、組織片を切り出し、PCRを行った。

さらにより簡便に、迅速に、コンタミネー

シジョンを軽減しながら木材から DNA を抽出するための方法として、木材切片の超音波発生装置による処理を検討した。木材から片刃カミソリを用いて切片を作成し、切片を水中または DNA 抽出キットの抽出溶液で、60°C で 1 時間処理した。得られた溶液からメッシュを用いて木材の残渣を除いた後、直接 PCR を行うか、または DNA 抽出キットで DNA を精製した後、PCR を行って、超音波処理の有効性を検証した。

4. 研究成果

(1) DNA の残存部位と経年変化

伐採直後の新鮮なスギ材からは紫外線吸光分析によって定量可能な量の DNA が抽出された。量は、辺材、白線帯、心材の順に多く、心材においては、心材形成後の経過年数による差はあまり見られなかった (表 1)。

表 1. 新鮮なスギからの DNA 抽出量

部位	DNA 抽出量 ($\mu\text{g} / \text{g dry wood}$)
辺材	14.42
白線帯	9.42
心材 1*	5.33
心材 5*	5.23
心材 10*	5.37
心材 13*	6.23

1 年以上保存された試料からは紫外線吸光測定で検出可能な量の DNA は、得られなかった。しかし、PCR によって、辺材においては伐採後 1, 11, 23 年経過した試料、心材においては 1, 11 年経過した試料からえられた DNA 溶液で、増幅が確認された。DNA シグナルは、辺材において心材より明瞭であった (図 1)。

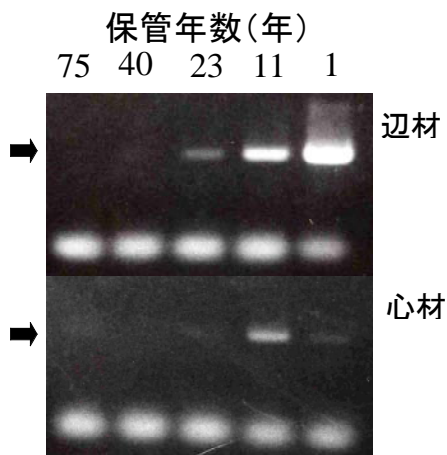


図 1 DNA 抽出量の経年変化

図 2 新鮮な木材辺材中の DNA

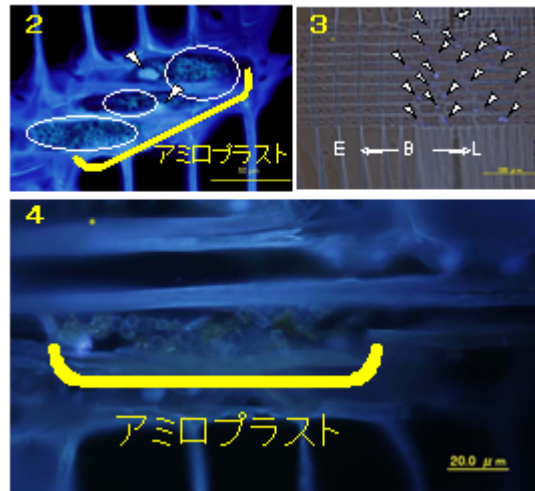


図 3 23 年保管された辺材中の DNA

図 4 23 年保管された心材中の DNA

伐採直後の木材では、辺材中の DNA は軸方向柔細胞、放射柔細胞の核、アミロプラスト等に局在していた (図 2)。保存期間が長くなるにつれ、DNA を含有する細胞数が減り、1983 年に伐採された木材において、DNA が晩材部に多く残存していることが確認された (図 3)。また、心材部においては、放射柔細胞中に DNA を含むアミロプラストが残存していることが確認された (図 4)。

スギ辺材において、定量 PCR 法を用いて DNA 量の変化を評価した結果、伐採後 23 年経過した木材においては、伐採後 1 年経過した木材の DNA 量の約 40% になっていた。一方、心材においては、PCR 増幅によって推定される DNA の残存量は、伐採後の年数の増加に伴って減少すると思われるものの、むしろ個々の試料ごとに異なっていた。

(2) DNA 抽出方法

新鮮な木材からはマイクロダイセクション法によって切片から放射柔細胞を含む組織片切り出し (図 5)、PCR によって DNA を増幅することができた。

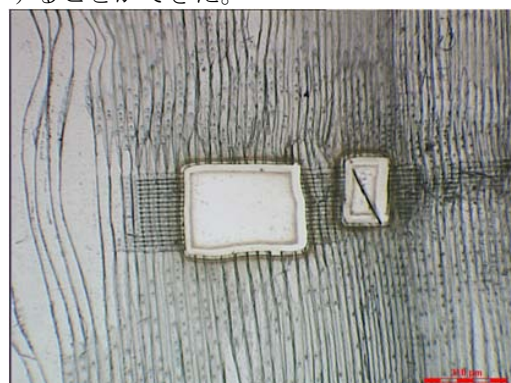


図 5 包埋した切片からの組織の切り出し

また、切片を超音波処理することによって細胞内容を直接抽出することができ (図 6)、抽出された内容物を含む溶液を DNA 抽

出キットを用いて精製した後、PCR を行ったところ、DNA を増幅することができた。

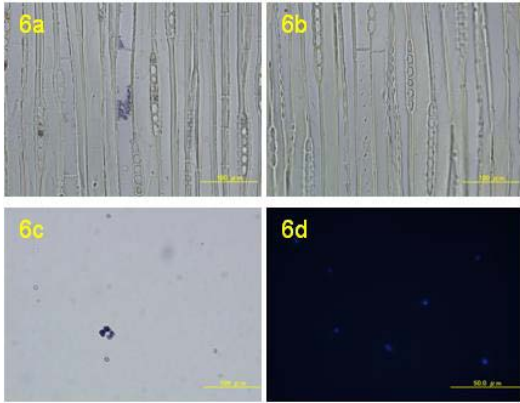


図6 超音波処理による細胞内容物の抽出
a: ヨウ素染色したスギ柾目切片
b: 超音波処理後の切片
c: 超音波処理により抽出されたアミロプラスト
d: DAPI により染色されるアミロプラスト

(3) DNA 分析の東南アジア産材の種レベルの樹種識別への応用

乾燥前のレッドメリヤス木材の合板用単板、および製材に対して、開発した切片から超音波処理によって DNA を含む組織を抽出する方法を用いて、DNA を抽出したところ、通常の木粉からの抽出と同様に PCR によって DNA の増幅が確認できた (図7)。また、それらの塩基配列を解析することで、試料となった合板用単板および製材の樹種を特定することができた。

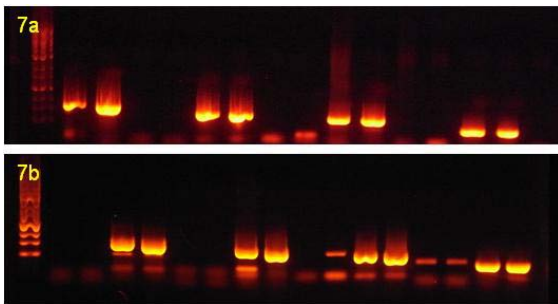
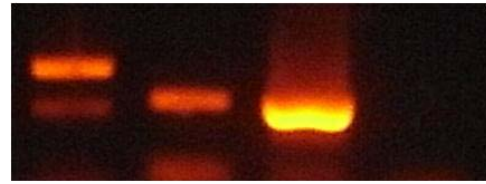


図7 a: 木粉から b: 切片から DNA 抽出を行った、PCR を行った電気泳動像

工場ラインで 200℃以上の高温での乾燥処理を受けた単板においては、著しく増幅効率が低下しており、通常の方法では PCR によって DNA を増幅できなかった。そこで、遠心乾燥機を用いて DNA を 10 倍以上に濃縮したのち、PCR を行ったところ、樹種識別に用いるための遺伝子領域のうち、trnH(GUG) -ps bA (約 260bp) で DNA を増幅することができた (図8)。また、Shorea 属木材から抽出し

た DNA が含まれる溶液について、PCR による増幅時にポリビニルピロリドンを追加したところ、DNA を増幅できるケースが増加し、DNA 増幅に対するポリビニルピロリドン添加の効果が示唆された。



辺材 心材 陽性反応 陰性反応

図8 乾燥後の合板用単板からの DNA の PCR を行った電気泳動像

このように、DNA のデータベースが構築されていれば、DNA 分析によって木材の樹種レベルで識別することが可能である。また、200℃の高温で処理された木材や、伐採後、数十年経過した木材では、DNA が劣化し、PCR によって増幅される可能性が低下することがわかった。しかしながら、そういった木材においても DNA を抽出する方法や PCR の条件を変えることによって、DNA による分析が可能で量と質の DNA を得ることができると示唆された。今後は、木材から DNA を抽出し、分析するためのさらに良い条件を検討していく必要がある。

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 8 件)

- ① Tsumura Y., Kado T., Yoshida K., Abe H., Ohtani M., Taguchi Y., Fukue Y., Tani N., Ueno S., Yoshimura K., Kamiya K., Harada K., Takeuchi Y., Diway B., Finkeldey R., Na'iem M., Indrioko S., Ng K.K.S., Muhammad N., Lee S.L.: Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products. J. Plant Res. DOI 10.1007/s10265-010-0348-z (2010) (査読あり)
- ② 庄田慎矢, 安部久, 能城修一, 徳澤啓一, 小林正史: 土器作り叩き板の考古民族植物学的研究. 考古学と自然科学 60: 39-55 (2010) (査読あり)
- ③ 安部久, 黒田克史, 張春花, 吉田和正, 渡辺宇外: 木材の中の DNA はどこに多く残っているのか? 平成 21 年度森林総合研究

所研究成果選集：52-53. (2009) (査読あり)

- ④ Kitin P., Beeckman H., Fujii T., Funada R., Noshiro S., Abe H.: What is disjunctive xylem parenchyma? A case study of the African tropical hardwood *Okoubaka aubrevillei* (SANTALACEAE). American J. Botany 96(8): 1-10 (2009) (査読あり)
- ⑤ Abe H., Fujii T.: Horizontal resin canals of *Shorea* spp.. J. Wood Sci. 56: 502 (2008) (査読あり)
- ⑥ Abe H., Fujii T.: Anatomical identification of wood of section Rubroshorea. Proceedings of the International Symposium on Development of Improved Methods to Identify Shorea Species Wood and Its Origin. 23-26 (2007) (査読なし)
- ⑦ Fujii T., Abe H., Kagawa A., Kato A., Yoshida K.: Trial identification of tree species and its origin of commercial veneer. Proceedings of the International Symposium on Development of Improved Methods to Identify Shorea Species Wood and Its Origin 45-49 (2007) (査読なし)
- ⑧ Abe H.: Tree species of timbers imported from Southeast Asia. Proceedings of the International Symposium on Development of Improved Methods to Identify Shorea Species Wood and Its Origin: 1-2 (2007) (査読なし)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 安部久、張春花、吉田和正、能城修一、津村義彦、藤井智之：木材の樹種識別への DNA 分析の応用. 第 121 回日本森林学会大会 2010 年 4 月 5 日、筑波大学 (つくば市)
- ② 岩井政則、渡辺宇外、安部久：伐採年や採取部位が異なる木材の残存 DNA 量の定量評価. 第 60 回日本木材学会 2010 年 3 月 17 日 宮崎市民プラザ (宮崎市)
- ③ 吉田和正、安部久、吉村研介、津村義彦、藤井智之 Shorea 属製材品および合板用単板の樹種識別. 第 60 回日本木材学会大会 2010 年 3 月 17 日 宮崎市民プラザ (宮崎市)
- ④ 安部久：木材中の DNA 分布の経年変化. TX テクノロジー・ショーケース in つくば 2010. 2010 年 1 月 21 日 筑波大学 (つくば市)
- ⑤ 安部久、香川聡、藤井智之、吉田和正：木材・木製品の樹種・産地表示と科学的検証の現状と今後. 日本分析化学会・表示分析技術研究懇談会 第 2 回講演会

2009 年 11 月 17 日 農林水産技術会議筑波事務所 (つくば市)

- ⑥ Abe H., Watanabe U., Yoshida K., Kuroda K., Zhang C., Lim S.C.: DNA distribution and its change in wood during some processes for the utilization. 7th Pacific Regional Wood Anatomy Conference 2009 年 8 月 3 日 (マレーシア クアラルンプール)
- ⑦ 安部久、吉田和正、張春花、黒田克史、渡辺宇外：スギ材中の DNA 分布の経年変化. 第 59 回日本木材学会大会 2009 年 3 月 15 日 松本大学 (松本市)
- ⑧ 吉田和正、安部久、加藤厚、津村義彦、藤井智之：組織観察・抽出性分析・DNA 分析による合板用単板の樹種推定. 第 58 回日本木材学会大会 2008 年 3 月 17 日 つくば国際会議場 (つくば市)
- ⑨ 安部久、藤井智之 Shorea 属 Rubroshorea 節 (Dipterocarpaceae: フタバガキ科) の木材の顕微鏡による識別拠点. 第 57 回日本木材学会大会 2007 年 8 月 10 日 安田女子大学 (広島市)
- ⑩ Fujii T., Abe H., Kagawa A., Kato A., Tsumura Y., Yoshida K., Yoshimaru H.: Development of improved methods to identify Shorea wood and its origin. IUFRO all division 5 Conference. 2007 年 10 月 29 日 (Taipei)

[図書] (計 1 件)

- ① Ogata K., Fujii T., Abe H., Baas P. Identification of the timbers of Southeast Asia and the Western Pacific. 海青社全 400 ページ. (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：木材の DNA を分析するための前処理方法

発明者：安部久、吉田和正、渡辺宇外

権利者：安部久、吉田和正、渡辺宇外

種類：

番号：特願 2008-249892

出願年月日：2008 年 9 月 29 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 久 (ABE HISASHI)

独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員

研究者番号：80343812

(2) 研究分担者

渡辺 宇外 (WATANABA UGAI)
千葉工業大学・工学部・准教授
研究者番号：70337707

(3)連携研究者

吉田 和正 (YOSHIDA KAZUMASA)
独立行政法人森林総合研究所・生物工学研
究領域・室長
研究者番号：50353909