

博士論文

分子生物学的手法を用いた担子菌による  
木造文化財の劣化評価に関する研究

Deterioration Analysis of Wooden Cultural Properties Damaged  
by Basidiomycete using Molecular Biological Approaches

東京芸術大学大学院美術研究科 文化財保存学専攻  
保存科学領域（文化財測定学）

1315943

杉山 智昭

Tomoaki, SUGIYAMA

## 論文目次

### 第1章 序論 . . . . . 1

#### 1.1 研究背景

#### 1.2 真菌類による木材生物劣化の特徴

#### 1.3 担子菌の特異的検出

#### 1.4 担子菌の活性モニタリング

#### 1.5 研究目的

#### 1.6 論文構成

#### 参考文献

### 第2章 木造文化財に発生する担子菌の高感度検出 . . . . . 11

#### 2.1 緒言

#### 2.2 試験方法

##### 2.2.1 種特異的 PCR 法による担子菌の同定

###### 2.2.1.1 供試菌株

###### 2.2.1.2 DNA 抽出試料の調製

###### 2.2.1.3 DNA 抽出法

###### 2.2.1.4 プライマーの設計

###### 2.2.1.5 PCR 分析

##### 2.2.2 PCR 法の検出感度評価

## 2.2.3 LAMP 法による担子菌の検出

### 2.2.3.1 供試菌株

### 2.2.3.2 プライマーの設計

### 2.2.3.3 LAMP 分析

## 2.2.4 LAMP 法の検出感度評価

### 2.2.4.1 供試菌株

## 2.3 結果および考察

### 2.3.1 種特異的 PCR 法による担子菌の同定

### 2.3.2 PCR 法の検出感度評価

### 2.3.3 LAMP 法による担子菌の検出

### 2.3.4 LAMP 法の検出感度評価

## 参考文献

## 第 3 章 担子菌の生理活性モニタリング・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35

### 3.1 緒言

### 3.2 試験方法

#### 3.2.1 供試菌株

#### 3.2.2 核酸抽出用試料の調製

#### 3.2.3 核酸 (RNA/DNA) 抽出法

#### 3.2.4 RT-LAMP 分析

#### 3.2.5 LAMP 分析

### 3.3 結果および考察

## 参考文献

#### 4.1 緒言

#### 4.2 試験方法

##### 4.2.1 供試菌株

##### 4.2.2 核酸抽出用試料の調製

###### 4.2.2.1 木材共存試料

###### 4.2.2.2 木材保存剤共存試料

##### 4.2.3 核酸抽出法

###### 4.2.3.1 木材共存試料

###### 4.2.3.2 木材保存剤共存試料

##### 4.2.4 PCR・LAMP・RT-LAMP 分析

###### 4.2.4.1 菌糸・木粉混合試料

###### 4.2.4.2 腐朽初期木材モデル試料

###### 4.2.4.3 木材保存剤共存試料

#### 4.3 結果および考察

##### 4.3.1 木材抽出成分の影響評価

###### 4.3.1.1 菌糸・木粉混合試料の PCR 分析

###### 4.3.1.2 腐朽初期木材モデル試料の PCR、LAMP、RT-LAMP 分析

##### 4.3.2 木材防腐剤の影響評価

###### 4.3.2.1 反応系への木材保存剤直接添加による影響評価

###### 4.3.2.2 木材保存剤共存試料の PCR、LAMP 分析

#### 参考文献

## 第5章 歴史的木造建築物の分子生物学的手法による調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 57

### 5.1 緒言

### 5.2 旧開拓使工業局庁舎における担子菌検出調査

#### 5.2.1 調査方法

##### 5.2.1.1 木材サンプルの収集

##### 5.2.1.2 木材サンプルの劣化診断

##### 5.2.1.3 供試試料の調製

##### 5.2.1.4 木材組織の観察

#### 5.2.2 遺伝子分析による担子菌の検出

##### 5.2.2.1 DNA の抽出

##### 5.2.2.2 PCR 分析

#### 5.2.3 結果および考察

##### 5.2.3.1 木材サンプルの収集と劣化診断

##### 5.2.3.2 光学顕微鏡による木材組織の観察

##### 5.2.3.3 走査型電子顕微鏡による木材組織の観察

##### 5.2.3.4 遺伝子分析による担子菌の検出

##### 5.2.3.5 遺伝子を指標とする担子菌検出法の実地調査における有効性

### 5.3 当麻神社大山祇宮における担子菌の生理活性モニタリング調査

#### 5.3.1 調査方法

##### 5.3.1.1 木材サンプルの収集

##### 5.3.1.2 供試試料の調製

5.3.1.3 核酸抽出法

5.3.1.4 遺伝子分析による担子菌の検出

5.3.1.5 RT-LAMP 法による担子菌の生理活性モニタリング

5.3.1.6 LAMP 分析

5.3.2 結果および考察

5.3.2.1 LAMP 法による侵入担子菌の検出およびPCR ダイレクトシーケンスによる同定

5.3.2.2 RT-LAMP 法による腐朽木部の経時的モニタリング

参考文献

第6章 総括・・91

6.1 本研究の目的

6.2 本研究の結果

6.2.1 木造文化財に発生する担子菌の高感度検出

6.2.2 担子菌の生理活性モニタリング

6.2.3 阻害要因が担子菌の検出および活性モニタリングに及ぼす影響の評価

6.2.4 歴史的木造建築物の分子生物学的手法による調査

6.3 本研究の保存科学的意義

謝辞

関連研究業績

## 第1章 序論

### 1.1 研究背景

森林資源に恵まれた日本には多数の歴史的木造建築物が現存している。また、博物館等をはじめとした文化財公開施設には、先史時代の埋蔵文化財から現代芸術作品にいたるまで、木材で構成される様々な資料が収蔵されており、展示・教育・研究等に広く活用されている。しかし、日本では大半の地域が高温多湿な時期を経験するとともに、台風や津波などによる水損被害も受けるため、これらの木造文化財は潜在的かつ継続的に虫や菌類による生物劣化の危険にさらされている。

木造文化財に発生する生物劣化を防止・抑制するためには、劣化を引き起こす生物の侵入・活動を初期に把握し、被害が拡大する前に適切な処置を施す必要がある。文化財の生物劣化のうち、獣害や虫害に関しては徹底した日常点検の実施により、加害開始の兆候を比較的初期の段階で捕捉することが可能である。それに対し、菌類や細菌類などの微生物によってもたらされる被害については、1) 初期段階において、外部由来の汚染物質や塩類の付着、光による退色など非生物的な現象と判別がつきにくいこと、2) 微生物による生物劣化を疑った場合、菌の分離培養を行った上で、形態・生理化学的特徴による同定作業が要求されるが、作業に時間、費用（設備を含め）、労力がかかること、3) 分離培養が成功した場合においても、形態や生理活性などが類似している微生物の場合、確実な指標に乏しく、同定は熟練者にとっても容易でないことなどによって、その初期侵入や活動状況の把握に大きな困難がともなう<sup>1,2)</sup>。

木材試験体を用いた強制腐朽試験の結果により、担子菌類による生物劣化に関しては、

菌糸侵入後の初期段階で木材試験体の曲げ強度が急速に低下することが報告されている<sup>3,4)</sup>。  
なかでも Richard(1954)は *Poria monticola*、*Polyporus abietinus*、*Lenzites trabea*、  
*Trametes versicolor* を供試菌とした場合、木材試験体の質量減少率が 1%であっても、  
強度の減少が 50%にまで達する事例を報告している<sup>5)</sup>。

特に冷涼な気候の北方圏において、木造建築物の生物劣化の主体は昆虫（シロアリ）で  
はなく菌類によるものである。日本国内では、特にナミダタケ（*Serpula lacrymans*）に  
よる住宅を中心とした木造建築物に対する被害が 1978 年から 1979 年にかけて札幌市を  
中心に顕在化し、100 件以上の被害事例を数える事態に及んでいる。本種については神山  
（1982、1983）や土居（1988）により、実地調査をとおした詳細な報告<sup>6-8)</sup>が行われてき  
たが、これらの事例においても当該種による侵入を確認できたのは、特徴的な子実体や  
菌糸束の発生を確認し、部材の強度が大幅に低下した劣化進行後期の状況においてである。  
さらにナミダタケについては土壌中の水分を菌糸の特殊な集合形態である根状菌糸束に  
よって含水率の低い部材へ供給し、乾腐朽（Dry rot）を引き起こす<sup>9)</sup>ため、部材への菌糸  
侵入後の対処が遅れると木造建築物の大規模な劣化につながる危険性がある。

したがって貴重な木造文化財を予防的保存<sup>10)</sup>（Preventive conservation）の概念に沿って  
良好な状態で保存していくためには、担子菌による初期の劣化を精密評価・モニタリング  
するための技術開発と併せて、使用する技術の費用対効果、汎用性を考慮した上で実用的  
な評価システムを構築することが求められている。しかし、腐朽に対する検査・診断技術  
に関しては未だ目視、触診など感覚に依存する部分が大きく、腐朽被害がある程度進行  
した後でなければ担子菌の侵入を確認・判定できないのが現状である。

## 1.2 真菌類による木材生物劣化の特徴

真菌類による木材劣化様式には、褐色腐朽、白色腐朽、軟腐朽、辺材変色および表面汚染が存在している<sup>11)</sup>。Table 1.1 に各木材劣化様式と劣化に關与する菌類を示す。Table 1.1 のとおり、木材の劣化には担子菌類 (Basidiomycetes)、子のう菌類 (Ascomycetes)、不完全菌類 (Deuteromycetes)、接合菌類 (Zygomycetes) が關与しているが、木材組織を顕著に分解するのは褐色腐朽菌 (Brown-rot fungi)、白色腐朽菌 (White-rot fungi)、軟腐朽菌 (Soft-rot fungi) に属する担子菌類、子のう菌類および不完全菌類で、これらは木材腐朽菌と呼ばれている<sup>11)</sup>。このうち、軟腐朽菌については、水中など木材が高含水率になる特殊な環境で分解を進めるため、文化財に使用されている木材にとって、大きな劣化要因となり得る木材腐朽菌は褐色腐朽菌と白色腐朽菌に分類される担子菌類である。特に褐色腐朽菌は木材主要成分のうちリグニンを残し、木材細胞壁の骨格を形成しているセルロースとヘミセルロースを選択的に分解する。また褐色腐朽の過程では腐朽が開始した初期段階において、セルロースの急激な重合度低下が発生し、木材組織の脆弱化が急速に進むことが報告されている<sup>3,4,12,13)</sup>。白色腐朽菌については、木材主要成分のセルロース、

Table 1.1 木材を劣化させる菌類

名 称	木材劣化様式	關与する真菌類
褐色腐朽菌	褐色腐朽	担子菌類
白色腐朽菌	白色腐朽	担子菌類
軟腐朽菌	軟腐朽	子のう菌類, 不完全菌類
変色菌	辺材変色	子のう菌類, 不完全菌類
表面汚染菌	表面汚染	接合菌類, 子のう菌類, 不完全菌類

へミセルロース、リグニン全てを分解する。また、褐色腐朽菌とは異なり、腐朽の進行期間を通じてセルロースの重合度が選択的に低下しないことが特徴とされる<sup>12,13)</sup>。

### 1.3 担子菌の特異的検出

現在、担子菌の検出やその先の同定については、まず形態形質や生理学的な特徴の比較・観察に基づいて行われるのが主流となっている。しかし、特徴的な子実体が確認されない限り、これらの手法は菌の培養や単離に時間がかかるとともに、種間の形態や生理活性などが類似している場合や種内変異がある場合、その判別は困難をきわめる。一方、木造の建築物や博物館資料に観察された菌糸様物質が担子菌であるか否かを判定するような、種同定までを必要としない状況下においては、担子菌に特有な二次菌糸のクランプ構造の存在を指標に判断を下すことも可能であるが、一次菌糸にはクランプ構造がなく、二次菌糸においてもクランプ構造自体を形成しない担子菌も存在するため注意を要する<sup>14)</sup>(Fig. 1.1)。

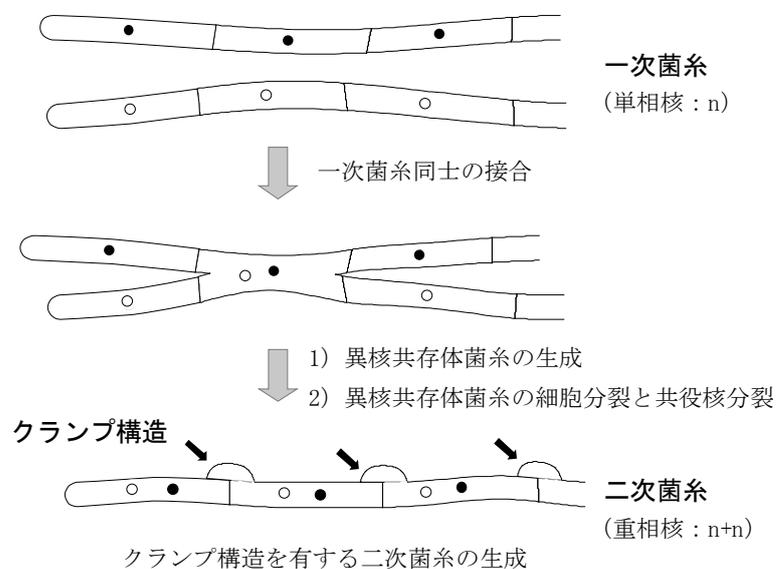


Fig. 1.1 担子菌二次菌糸のクランプ構造

また、難培養性の菌については、分離培養時点で検査対象として抜け落ちる可能性が高い。このように環境や成長過程、種によって変化する形質を用いて、確実な指標となる比較形質に乏しい担子菌の検出、同定作業を行う際には、観察者の主観によって誤った結果が導かれる危険性を排除することができない。したがって感覚に依存する部分の大きい従来法の代替となる、より客観的かつ信頼性の高い担子菌検出技術の開発が求められている。

一方、近年においては、菌類の検出、同定に DNA やタンパク質のアミノ酸配列などの生体高分子を指標とした分子生物学的な手法が用いられるようになってきている<sup>15-19)</sup>。分子生物学的手法の利点としては菌類の同定を短時間で行うことができることに加え、観察者の主観や恣意性を排除した客観的な検出・同定が可能であることがあげられる。例として、和田ら(2010)が報告した Phi29DNA ポリメラーゼによる非特異的 DNA 増幅と PCR (Polymerase Chain Reaction) による rDNA (Ribosomal DNA) の ITS (Internal transcribed spacer) 領域の特異的増幅を組み合わせた手法は、腐朽材で活動中の担子菌叢全体の様相について、良質な基礎データを提供するものである<sup>20)</sup>。このような研究結果や国際ゲノムデータベース (GenBank、DDBJ 等) から得られる DNA 情報をもとに、木造文化財を実際に取り扱う中小規模施設でも実施可能な費用対効果、汎用性、簡便性に優れた信頼性の高い担子菌の特異的検出システムの構築について検討することは、今後の木造文化財の保存を長期的に考えていく上で重要である。

#### 1.4 担子菌の活性モニタリング

木造文化財を担子菌による腐朽から守るためには、対象となった文化財における担子菌の生理活性を把握し、その活動をコントロールすることが求められる。活性のモニタリング手法の候補として、ATP 発光を利用した微生物の測定法は簡便であり、食品・医療・衛生分野を中心として実績はあるが<sup>21,22)</sup>、標的菌以外の生物細胞や薬剤等の共存、コンタミネーションによって結果に影響を受けることが報告されている<sup>23)</sup>。一方、遺伝子発現解析を利用した測定法に関しては従来のノーザンブロット解析や Real-time PCR によるアプローチに加えて、近年、マイクロアレイを使用したトランスクリプトーム解析、質量分析計を用いるプロテオーム解析等の手法が発達してきている。これらの手法については、担子菌の活性状態に関する包括的なデータ収集を可能とするが、高額設備を要し、ランニングコストも大きい木造文化財保存のモニタリング手法としては費用対効果の点から、現時点では現実的な選択肢となりえない。したがって、木造文化財を実際に取り扱う中小規模施設においても導入・運用可能な担子菌の活性モニタリング手法の開発が望まれている。

Table 1.2 担子菌活性モニタリング手法間の比較概略

モニタリング手法	分析作業時間 (試料調整を含む)	精度	分析コスト	設備投資
ATP測定	++	-	++	++
ノーザンブロット解析	-	+	-	+
Real-time PCR解析	+	+	-	-
トランスクリプトーム解析	-	++	-	-
プロテオーム解析	-	++	-	-

凡例) ++: 優位性が高い +: 優位性がある -: 優位性がない

## 1.5 研究目的

本研究では、木造文化財に発生する担子菌による生物劣化を防止・抑制するため、PCR 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、RT (Reverse transcription) -LAMP 法などの汎用的な分子生物学的手法を用いて木材中に侵入した担子菌を初期段階で検出し、その生理活性の捕捉を比較的簡易に可能とする技術開発について検討した。また、構築した担子菌の検出および生理活性モニタリングシステムの安定性を評価するため、試料への含有が想定される木材抽出成分や木材保存剤が分析に及ぼす影響について調査した。さらに、歴史的木造建築物の現況調査に伴って得られた試料を対象として分析を試み、分子生物学的手法を用いた木造文化財の担子菌による劣化評価システムの実地での有効性について検証した。

## 1.6 論文構成

本稿の第 1 章では、木造文化財の長期的保存を考慮する上で本研究が必要とされる背景、担子菌による木材劣化の特徴、担子菌の検出と生理活性をモニタリングするための現行技術がかかえる課題について概説するとともに、本研究の位置づけ及び目的について述べた。

第 2 章では、木造建築物に発生する代表的な担子菌 11 種について rDNA の ITS 領域に対して種特異的プライマーを設計し、PCR 法を用いた分析を試み、担子菌の高感度検出について基礎調査を実施した結果について述べる。さらに、等温条件において標的遺伝子の正確な増幅を短時間で可能とする LAMP 法を用いて、より簡易かつ迅速な担子菌検出系の構築に向けて実施した検討結果についても述べる。

第3章では、木造文化財の予防的保存に向けた担子菌の生理活性モニタリングを行うため、RT-LAMP法を用いて、18S rRNA 遺伝子からの cDNA の合成とその増幅を試み、活動初期および活動停滞（停止）期における担子菌の遺伝子発現解析が比較的簡易に実施可能であるかにつき、検討を行う。

第4章では、分析対象となる試料への含有が想定される木材抽出成分や木材保存剤が核酸増幅反応に与える影響を確認するため、木材の共存下、あるいは木材保存剤を含む試料から核酸を抽出し、PCR 反応および LAMP 反応による増幅を試み、分析法の安定性について検証する。

第5章では、第2章から第4章で検討・検証を行った技術的基礎をもとに、屋外の歴史的木造建築物2棟（旧開拓使工業局庁舎、当麻神社大山祇宮）から採取した試料に対して、実際に PCR 法、LAMP 法、RT-LAMP 法による分析を実施した結果について述べる。さらに、rDNA ITS 領域の塩基配列解析を実施し、部材に侵入している担子菌の種同定を試みた結果についても述べる。

第6章では、本研究の成果を総括し、分子生物学的手法を用いた木造文化財の担子菌による劣化評価の文化財保存科学上の意義について述べる。

## 参考文献

- 1) 日本木材学会生物劣化研究会：日本木材学会生物劣化研究会講演要旨集,11-25 (2003).
- 2) 須原弘登：「分子生物学的手法を利用した木材腐朽担子菌の検出及び分類」, 木材保存 30(5), 192-203 (2004).
- 3) E. B. Cowling: Chemical modification of wood during microbial deterioration, Holz und Organismen 1, 91-102 suppl. material und organismen (1965).
- 4) Wazny, J. : Study on the effect of *Merulius lacrymans* (Wulf.)Fr. and *Coniophora cerebella* Pers. on the mechanical properties of wood, Holz Roh Werkst. 16, 285-288 (1958).
- 5) Richards, D. B. : Physical Changes in Decaying Wood, Journal of Forestry 52, 60-265 (1954).
- 6) 神山幸弘：「ナミダタケによる被害の調査」, 木材保存 21, 48-65 (1982).
- 7) 神山幸弘：「ナミダタケによる被害の調査Ⅱ」, 木材保存 24, 41-50 (1983).
- 8) 土居修一：「ナミダタケによる木造建築物の腐朽に関する研究」, 林産試験場研究報告 78, 1-80 (1988).
- 9) 布村昭夫：「ナミダタケによる建築物の被害とその防除」, 木材保存 14, 19-30 (1979).
- 10) 三浦定俊, 佐野千絵, 木川りか：「文化財保存環境学」, 朝倉書店 (2004).
- 11) 社団法人 日本木材保存協会：「木材保存学入門 改訂版」, 55-62 ,63-67 (2001).
- 12) (社)日本しろあり対策協会：「しろあり及び腐朽防除施工の基礎知識 (防除施工士受験用テキスト)」, 45 (2003).
- 13) 今村祐嗣, 高橋旨像：「木材および木質材料の破壊過程と破面形態の研究」, 昭和 61 年度文部科学省科学研究費 (総合研究 A) 研究成果報告書, 75 (1987).

- 14) 社団法人 日本木材保存協会：「実務者のための住宅の腐朽・虫害の診断マニュアル」,  
4-5 (2004).
- 15) Jellison, J., Goodell, B. : Immunological detection of decay in wood, *Nucl. Wood Sci. Technol.* 22, 293-297 (1988).
- 16) 杉山智昭, 森満範, 東智則：「種特異的 PCR 法による木材腐朽菌の検出・同定」,  
林産試験場報 538, 1-5 (2009).
- 17) Sugiyama, T., Kobayashi, Y., Azuma, T. : Molecular inspection of the cultural wooden heritage by loop - mediated isothermal amplification analysis: Abstracts of International Symposium on Conservation of Cultural Heritage in East Asia, Beijing, China (2009).
- 18) 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), 98-104 (2003).
- 19) Moreath, U. and Schmidt, O. : Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction, *Holzforschung* 54, 1-8 (2000).
- 20) 和田朋子, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩：「担子菌菌叢の定量的評価を目指した DNA 増幅条件」,  
木材保存 36(5), 200-207 (2010).
- 21) 服部憲晃：「バイオルミネッセンス法による微生物汚染度測定」, *食品工業* 41(22),  
33-39 (1988).
- 22) 佐藤葉子, 一ノ渡学, 奥西淳二：「ATP 迅速測定法を用いた感染制御における有用性」,  
*日本手術医学会誌* 34(4), 381-382 (2013).
- 23) 間渕創, 木川りか, 佐野千絵：「文化財公開施設等における ATP 拭き取り検査の活用について」,  
*保存科学* 49, 1-11 (2010).

## 第2章 木造文化財に発生する担子菌の高感度検出

### 2.1 緒言

第1章で概説したとおり、生物の設計図であるゲノム情報（DNA、RNA：一部のウイルス）およびその転写産物（mRNA）、翻訳産物（ペプチド、タンパク質）を指標とする分子生物学的手法は、従来の形態学・生理学的形質に依存する手法と比較し、より客観的な情報に基づいた担子菌の検出を可能とする。特にPCR（Polymerase Chain Reaction）法、ICAN（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）法<sup>1)</sup>、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法<sup>2)</sup>などDNA増幅反応を利用した手法については、標的とする特定配列のDNA領域のみを短時間で大量に増幅させることができるため、担子菌の高感度検出系を構築する上で有効なツールとなりうる。現在、担子菌の種内変異や菌叢解析、特異的検出についてPCR-RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）法、RAPD（Randomly Amplified Polymorphic DNA）法、PCR-DGGE（Denaturing gradient gel electrophoresis）法、種特異的PCR法などによる遺伝子レベルからの調査が行われ、基礎的知見が蓄積しつつある<sup>3,7)</sup>。このように、担子菌に関する分子生物学の進展にともない、担子菌の高感度検出に関する技術的な選択肢は広がりつつあるが、実地での普及を目指すためには、木造文化財を実際に取り扱っている中小規模施設でも大きな初期投資を要さず実施可能な汎用性と簡便性をあわせもつ検出システムの選択・構築が必要となる。特に、種によって腐朽の様式や進行速度、周辺環境との相互作用等が大きく異なる担子菌類<sup>8,9)</sup>に関しては、適切な対処法を策定する上で、木造文化財に発生頻度が高い種について、同定可能な体制を整備することが望ましい。

PCR をベースとした技術の中で、PCR-RFLP 法については、PCR 増幅産物の制限酵素処理を要するため、各種制限酵素の経費がかかり、操作も煩雑となる。また RAPD 法については、プライマーの最適化が困難であるとともに、鋳型となる DNA の純度が低い場合、再現性に問題があることも指摘されている<sup>5)</sup>。PCR-DGGE 法については、複数の菌種を同時に検出可能な優れた手法であるが、変性剤濃度勾配ゲルの作成が煩雑で技術を要すること、DNA シーケンサーによる機器解析が必要でトータルコストが高いことが課題である。また、近縁種や株の識別などにおいて、細菌類で知見が蓄積しつつあるマルチローカス遺伝子解析 (MLSA) なども担子菌の検出に有効な手段と考えられるが、分析・機器導入コストの問題を解決する必要がある。これらの手法に対して、種特異的 PCR 法は、各生物種が特異的に有するゲノム DNA 配列を標的として増幅反応条件を設定し、その条件が確立した後は、サーマルサイクラー等の汎用的な機器を用いて、比較的簡易な操作により、対象生物の検出作業を行うことができる。

一方、ICAN 法、LAMP 法については PCR ベースの手法と異なり、等温条件で DNA 増幅反応が進むため、サーマルサイクラーを必要としない、より簡易な検出系を構築することも可能となる。ICAN 法と LAMP 法の比較においては ICAN 法が鎖置換型 DNA 合成酵素とリボヌクレアーゼの 2 種類の酵素を使用するのに対して、LAMP 法では鎖置換型 DNA 合成酵素のみで反応が進行する。また、ゲノム DNA 配列に対する標的領域が ICAN 法では 2 ヶ所であるのに対し、LAMP 法では 6 ヶ所となっているため、特異的検出を行う上では、LAMP 法がより安定した結果を示すものと考えられる。

そこで本章では、信頼性と汎用性に優れた担子菌の高感度検出法の確立を目指し、日本

の木造建築物に発生する主要な木材腐朽菌 11 種<sup>8,9)</sup> について種特異的 PCR 法による種レベルでの検出を試みた。また、北方圏で発生頻度の高い、ナミダタケ (*Serpula lacrymans*) およびイドタケ (*Coniophora puteana*) をモデルとして、LAMP 法を用いた担子菌類をより簡易に検出するための技術開発についても検討した。

## 2.2 試験方法

### 2.2.1 種特異的 PCR 法による担子菌の同定

#### 2.2.1.1 供試菌株

本研究項目において使用した日本の木造建築物に発生する主要な担子菌を Table 2.1 に示す。供試菌として (独) 製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源開発部門 (NBRC) から購入した株、および木造建築物の腐朽材から分離した株からなる 11 種 (計 23 株) を分析に用いた。

#### 2.2.1.2 DNA 抽出用試料の調製

ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地 (日水製薬 (株)) 上で 20~26°C、7~20 日間培養した各供試菌の菌糸を 0.01~0.04g、培地から直接かき取り、抽出用試料とした。

#### 2.2.1.3 DNA 抽出法

抽出用試料を 1.5 mL 容の微量遠心チューブに採り、0.15 mol/L NaCl、0.1 mol/L EDTA (pH8.0)、1 % SDS、100 µg/mL のプロテナーゼ K を含む抽出溶液 700 µL を加え、緩やかに振とうしながら 37 °C で 2 時間、60 °C で 30 分間インキュベートした。これにフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液 (25 : 24 : 1、v/v) 700 µL を加えて攪拌し

Table 2.1 供試菌

種	和名	略号	菌株
<i>Antrodia sinuosa</i>	ワタグサレダケ	AS	NBRC 8685
<i>Antrodia xantha</i>	チョークアナタケ	AX	腐朽材分離株
<i>Coniophora puteana</i>	イドタケ	CP1	NBRC 6275
		CP2	腐朽材分離株
		CP3	腐朽材分離株
<i>Fomitopsis palustris</i>	オオウズラタケ	FP	NBRC 30399
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	コゲイロカイガラタケ	GA1	腐朽材分離株
		GA2	腐朽材分離株
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	キカイガラタケ	GS	NBRC 6267
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	キチリメンタケ	GT1	NBRC 6509
		GT2	腐朽材分離株
<i>Lentinus lepideus</i>	マツオウジ	LL	NBRC 32948
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	—	SB1	腐朽材分離株
		SB2	腐朽材分離株
<i>Serpula lacrymans</i>	ナミダタケ	SL1	NBRC 8697
		SL2	腐朽材分離株
		SL3	腐朽材分離株
		SL4	腐朽材分離株
		SL5	腐朽材分離株
		SL6	腐朽材分離株
		SL7	腐朽材分離株
		SL8	腐朽材分離株
<i>Trametes versicolor</i>	カワラタケ	TV	NBRC 30340

凡例) NBRC : (独) 製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源開発部門

た後、遠心分離（15,000 rpm、10 分間：himac-CR15D、(株) 日立）を行い水層を新しいチューブに回収した。回収した水層に対し、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液（24 : 1, v/v）を加えて攪拌し、遠心分離（15,000 rpm、10 分間：himac-CR15D、(株) 日立）後、水層を回収した。得られた水層に対して 2.5 倍量のエタノールを加え、沈殿した核酸を TE 緩衝液（10 mmol/L Tris( Tris(hydroxymethyl)aminomethane)-HCl、1 mmol/L EDTA、pH8.0）50  $\mu$ L に溶解した。この溶液に 10 mg/mL の RNase（フナコシ (株)）1  $\mu$ L を加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。これに等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液を加え、攪拌、遠心分離（15,000 rpm、2 分間：himac-CR15D、(株) 日立）した後、水層を新しいチューブに回収した。これに 5 mol/L NaCl を 2  $\mu$ L、エタノール 125  $\mu$ L を加えて転倒混和し、室温で 15 分間静置した。溶液を遠心分離（15,000 rpm、10 分間： himac-CR15D、(株) 日立）し DNA を沈殿させた後、上清を捨て 70 %エタノール 500~1000  $\mu$ L を加え洗浄した。再度、遠心分離（15,000 rpm、2 分間：himac-CR15D、(株) 日立）を行い、上清を捨て沈殿物を風乾後、TE 緩衝液に溶解したものを DNA 試料とした。

DNA 試料の純度と濃度を分光光度計（U-2000A、(株) 日立）を用いて測定した。試料のうち 20 ng~100 ng の DNA を PCR の鋳型として用いた。また一部の試料についてはスピンカラム（DNeasy Plant Kit、QIAGEN）を用いて DNA の精製を行った。

#### 2.2.1.4 プライマーの設計

国際塩基配列データベース（DDBJ/EMBL/GenBank）の検索を行い、ゲノム内で直列反復構造を有する rDNA 領域について供試菌の塩基配列情報を入手した。また、一部の菌に

については rDNA 領域 (18S および 28S rRNA 遺伝子間) の PCR 増幅を行い、得られた PCR 増幅産物の DNA 塩基配列をダイレクトシーケンス (両鎖解析) によって決定した (シーケンサー : ABI 3730xI Applied Biosystems, Megabase1000 アマシャムバイオサイエンス)。得られた rDNA の塩基配列情報をもとに、種間で変異のあるスペーサー領域 (ITS2) から各供試菌が特異的に有する配列を探索し、Forward 側に種特異的プライマーを設計した (Fig. 2.1, Table 2.2)。また種間で保存性の高い 28S rRNA 遺伝子領域に対して

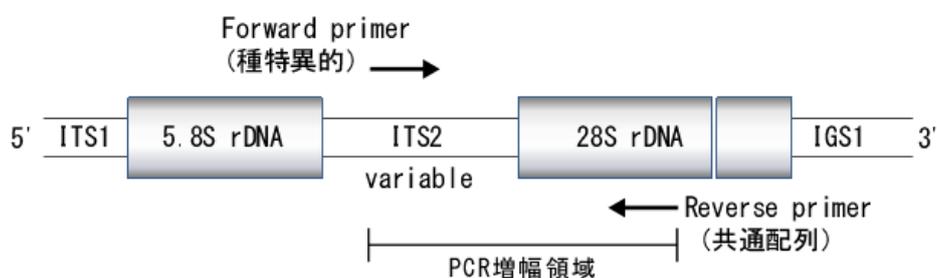


Fig. 2.1 PCR 増幅領域および種特異的プライマー結合位置

Table 2.2 種特異的プライマー

種	プライマー配列 (5' → 3')	略号
<i>Antrodia sinuosa</i>	CCGGCTTGTCATGAGTCTG	As. spc
<i>Antrodia xantha</i>	TGAAGCTCATACACTTCGGT	Ax. spc
<i>Coniophora puteana</i>	AGCTGGCTATTAATGTCTATG	Cp. spc
<i>Fomitopsis palustris</i>	CTTTGCGGATCAGCTATCG	Fp. spc
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	GGTTTTTGTGACCGTGGTG	Ga. spc
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	GTCTGTGAAGTGCTTCAA	Gs. spc
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	TGGAGGTATGCTGGCTTACT	Gt. spc
<i>Lentinus lepideus</i>	ACCCGGTTTTTTGTAACT	LL. spc
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	CTAGATGCTTTAGTGTCATCTG	Sb. spc
<i>Serpula lacrymans</i>	TGCTGGTGGACTCTTGTTT	SL. spc
<i>Trametes versicolor</i>	TCCTTGTGATCTATAAGCTTG	Tv. spc

各供試菌に共通の Reverse 側プライマー（以下：28S-R）を設計した（5'- CCTCACGGTACTTGTTCGCT -3'）。各プライマーの設計においては、標的となる担子菌種のゲノム DNA へ対する特異性を担保しつつ、効率的な増幅を達成するため、プライマーダイマー、ヘアピンループを形成する可能性のある相補的配列の繰り返しを避けるとともに、GC 含量を 40~60%内、Tm 値（Melting temperature：融解温度）を 55℃~65℃に設定した。

#### 2.2.1.5 PCR 分析

PCR 反応は 1.25 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ（Takara Ex Taq、宝酒造（株））を含む、最終濃度を 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol/L dNTPs（Deoxynucleotide triphosphates）に調製した 25 μL の反応液中で実施し、鋳型として 50 ng の DNA を用いた。増幅は（1）熱変性（95 °C、30 秒）、（2）アニーリング（55~65 °C、30~45 秒）、（3）伸長反応（72 °C、30~45 秒）を 1 サイクルとする反応を 30~35 サイクル、サーマルサイクラー（DNA REACTOR XE-2000、日本テクノサービス（株））を用いて行った。なお、最初のサイクルの熱変性は 2 分、最後のサイクルの伸長反応は 5 分に延長して行った。

反応終了後、PCR 反応液 8 μL を 1.6 μL のローディングバッファーと混合し、エチジウムブロミドを加えた 1.5~3.0 %アガロースゲルによる電気泳動（泳動槽：Mupid-2、コスモバイオ、バッファー：TBE）にかけた。泳動終了後、UV トランスイルミネーター上でゲルを観察し DNA バンドの観察を行った。なお、各分析には鋳型 DNA 溶液の代わりに滅菌蒸留水を用いたものをネガティブコントロールとして加えた。

## 2.2.2 PCR法の検出感度評価

ナミダタケ (*Serpula lacrymans* NBRC 8697 株) より抽出した DNA を 1 fg~100 pg に調整し、2.2.1.5 の項に準じて PCR 分析を行い、検出感度を調査した。プライマーはナミダタケに特異的なプライマー (Table 2.2) と 2.2.1.4 に示した Reverse 側プライマーのセット、ならびに担子菌の DNA を特異的に増幅可能なプライマーのセット (ITS1-F, ITS4-B) <sup>10)</sup> を用いた。

## 2.2.3 LAMP法による担子菌の検出

### 2.2.3.1 供試菌株

本研究項目においては、Table 2.3 に示すナミダタケ (*Serpula lacrymans*) およびイドタケ (*Coniophora puteana*) を供試菌として用いた。

Table 2.3 供試菌株

種	菌株	採集地	/ 年
<i>Serpula lacrymans</i>	HFPRI 0201	Asahikawa	/ 2002
<i>Serpula lacrymans</i>	HFPRI 0202	Asahikawa	/ 2002
<i>Serpula lacrymans</i>	HFPRI 0203	Ebetsu	/ 2002
<i>Serpula lacrymans</i>	HFPRI 0204	Ebetsu	/ 2002
<i>Serpula lacrymans</i>	HFPRI 0301	Asahikawa	/ 2003
<i>Serpula lacrymans</i>	HFPRI 0302	Asahikawa	/ 2003
<i>Serpula lacrymans</i>	NBRC 8697	-	/ -
<i>Coniophora puteana</i>	NBRC 6275	-	/ -

凡例) HFPRI : 北海道立林産試験場 NBRC : Table 2.1参照

### 2.2.3.2 プライマーの設計

国際塩基配列データベースから、供試菌の rDNA 領域の塩基配列情報を入手し、ナミダタケあるいはイドタケに特異的な DNA 配列を標的に含むよう、5.8S rDNA 遺伝子と ITS2 間にまたがる 6 領域を標的とする 4 個のプライマーセットを PrimerExplorerV3 ソフトウェア (株式会社富士通システムズ・イースト) を用いて設計した (Fig. 2.2、Table 2.4)。

また、広く担子菌類を検出するため、担子菌種間で保存性の高い 18S rRNA 遺伝子領域に対しても同様にプライマーセットを設計した (Table 2.4)。

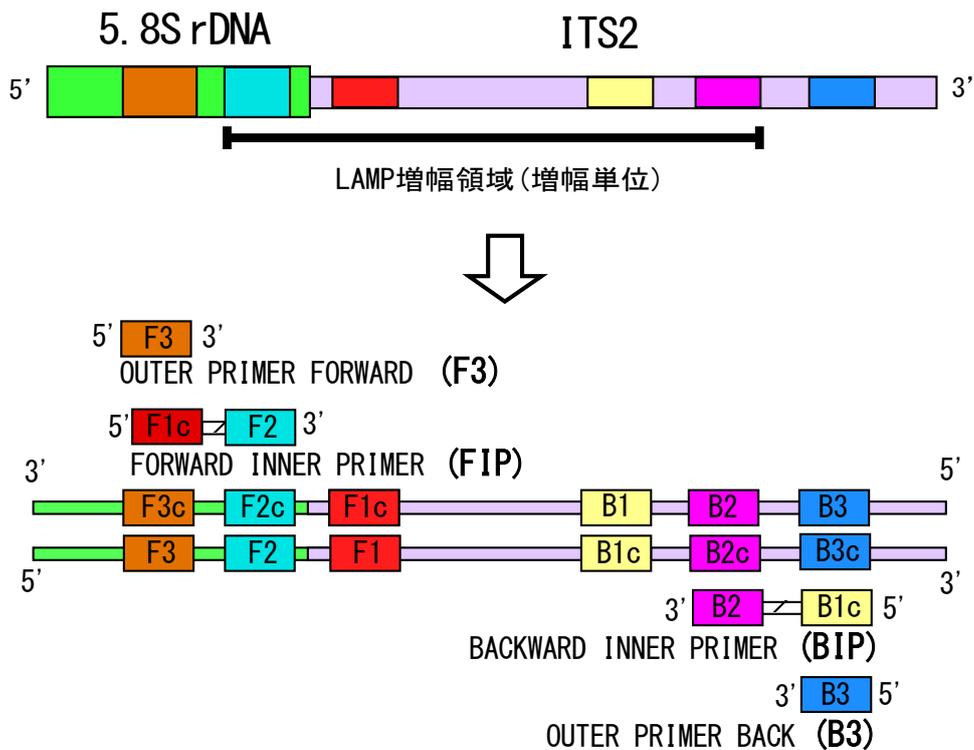


Fig. 2.2. LAMP 増幅領域およびプライマー結合位置 (LSL. spc, LCp. spc)

Table 2.4 供試プライマーセット

種/グループ	プライマー配列 (5' →3')	略号
<i>Serpula lacrymans</i>	F3 : CGCTCCTTGGTATTCCGAG FIP: CCCCACAATCCAAGCCCACA- ATGAGCATGCCTGTTTGAGTGT BIP: GCAAAGGTTGATGTGCGAAC- CACTGCACGTCAGACACGATG B3 : CGACTGTAAGCACAGGAACA	L SL. spc
<i>Coniophora puteana</i>	F3 : ACCTTGCGCTCCTTGGTAT FIP: TCCAAGATCCAAGCTCGCCT- TTGCATGCCTGTTTGAGTGTCA BIP: AAGTCGGCTCCTCTGAAAA- GCACTCCATTACAGAGGCCAGC B3 : GAAAGGCCGACCTGATACC	L Cp. spc
Basidiomycetes	F3 : CGAATCGCATGGCCTTGT FIP: CCGTTGAAACCATGGTAGGC- CTCCGGCGATGCTTCATTCA BIP: GTTCGATTCCGGAGAGGGA- GCGTAATTTGCGCGCCTGCT B3 : ATTGTCACTACCTCCCCGT	L18S. spc

### 2.2.3.3 LAMP 分析

LAMP 反応はキット (Loopamp DNA 増幅試薬キット LMP204、栄研化学 (株)) のプロトコルに従い、Bst DNA ポリメラーゼ、5 pmol の F3, B3 プライマー、40 pmol の FIP、BIP プライマーを含む、最終濃度を 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.8)、10 mmol/L KCl、8 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、1.4 mmol/L dNTPs に調製した 25 μL の反応液中で実施し、鋳型として 50 ng の DNA を用いた。増幅はサーマルサイクラー (DNAREACTOR XE-2000、日本テクノサービス (株)) を用いて、63 °C 等温での伸長反応を、45~60 分間行った。反応終了後、

反応産物を電気泳動し DNA 増幅の有無を確認した。さらに、蛍光インターカレーター（エチジウムブロミド）を加えた反応溶液の紫外線照射下での蛍光発生、および DNA 増幅反応の副産物として生じるピロリン酸マグネシウムによる反応溶液の濁度上昇を観察した。

## 2.2.4 LAMP 法の検出感度評価

### 2.2.4.1 供試菌株

供試菌としてナミダタケ (*Serpula lacrymans* NBRC 8697 株) およびイドタケ (*Coniophora puteana* NBRC 6275 株) を選択し、抽出した DNA を 1 fg~1000 pg に調整し、2.2.3.2 および 2.2.3.3 の項に準じて LAMP 分析を行い、検出感度を調査した。

## 2.3 結果および考察

### 2.3.1 種特異的 PCR 法による担子菌の同定

各供試菌の DNA を鋳型とし、今回設計したプライマーを用いて PCR を行った結果を Fig. 2.3、Fig. 2.4、Fig. 2.5 に示す。電気泳動像より、種特異的プライマーは対象となる菌種の DNA を増幅可能であることが確認された。また、増幅サイクル数を 30 回に設定した場合、各プライマーは標的となる供試菌の DNA のみを選択的に増幅し、他の供試菌の DNA に対する擬陽性増幅反応は観察されなかった。一方、サイクル数を 35 回に増加して反応を行ったところチョークアナタケ、イドタケ、ナミダタケ、キカイガラタケにおいて微弱なエキストラバンドが観察される場合があった。したがって今回検討した PCR 検出法

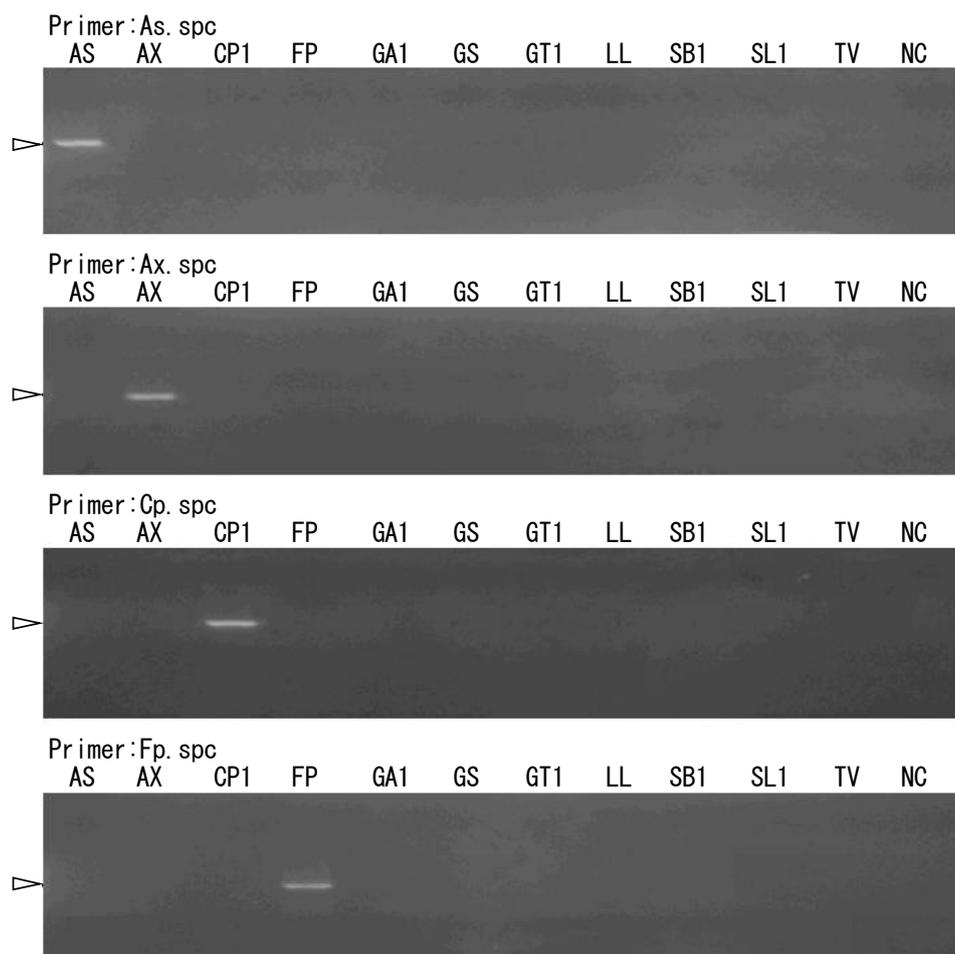


Fig. 2.3 種特異的プライマーを用いた供試菌 DNA の PCR 増幅  
 凡例) AS, AX, CP1, FP, GA1, GS, GT1, LL, SB1, SL1, TV : Table 2.1 参照,  
 NC : コントロール (鋳型 DNA なし)

においては、採用したアニーリング温度下でサイクル数 30 回が適正と考えられた。

複数の株を用いたイドタケ (CP1~CP3)、コゲイロカイガラタケ (GA1, GA2)、キチリメンタケ (GT1, GT2)、*Sistotrema brinkmannii* (SB1, SB2)、ナミダタケ (SL1~SL8) については株の違いによる偽陰性および非特異的増幅は観察されず、各菌種に対する特異的な増幅が確認された。以上の結果から、今回設計した種特異的プライマーを使用することで、代表的な担子菌 11 種を PCR 法により検出・同定可能であることが示された。

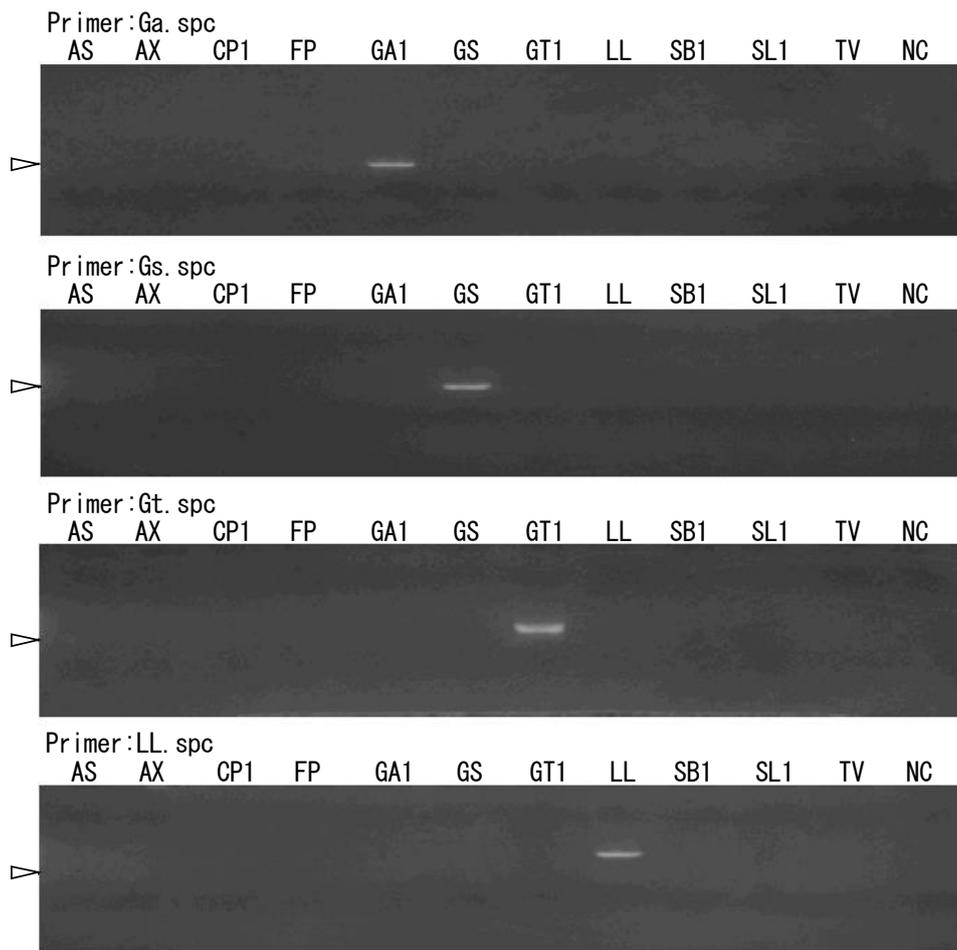


Fig. 2.4 種特異的プライマーを用いた供試菌 DNA の PCR 増幅  
 凡例) AS, AX, CP1, FP, GA1, GS, GT1, LL, SB1, SL1, TV : Table 2.1 参照,  
 NC : コントロール (鋳型 DNA なし)

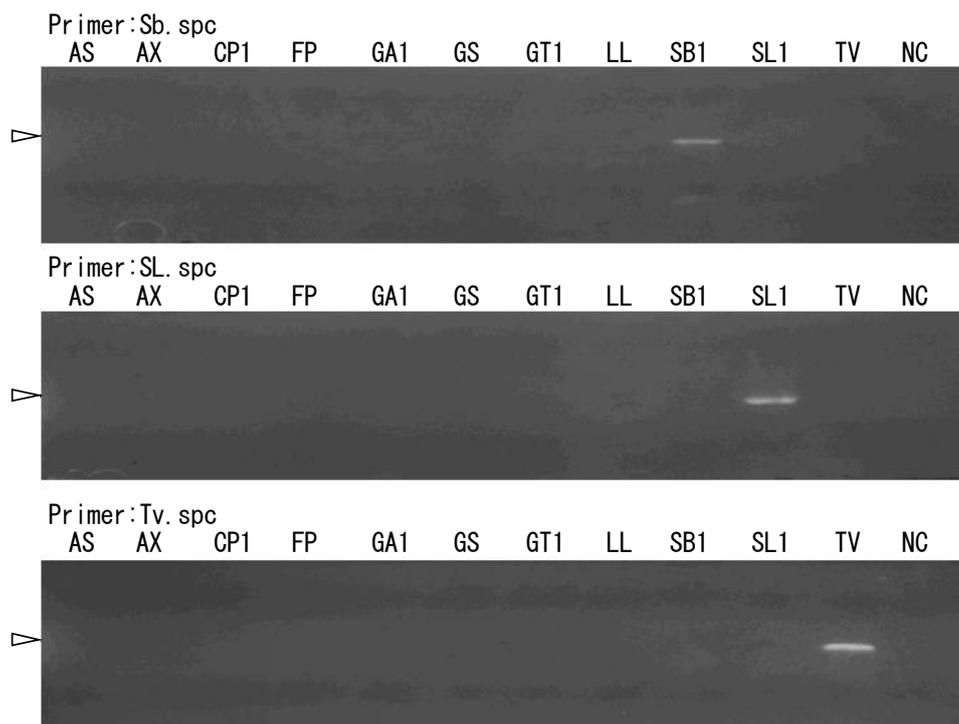


Fig. 2.5 種特異的プライマーを用いた供試菌 DNA の PCR 増幅  
 凡例) AS, AX, CP1, FP, GA1, GS, GT1, LL, SB1, SL1, TV : Table 2.1 参照,  
 NC : コントロール (鋳型 DNA なし)

### 2.3.2 PCR法の検出感度評価

PCR法の検出感度について検証するため、ナミダタケ菌糸より抽出された1 fg~100 pgのDNAを鋳型のモデルとしてPCR分析を行った結果をFig. 2.6に示す。今回設計したナミダタケ特異的プライマー (SL.spc) と28S rRNA遺伝子を標的とするプライマーのセット (Fig. 2.6 上段)、および担子菌特異的なプライマー (ITS1-F, ITS4-B) のセット (Fig. 2.6 下段) を使用してPCR分析を実施したところ、それぞれの条件において、鋳型DNAの増幅を確認することができた。しかし、増幅の目安であるバンドの蛍光は鋳型DNA添加量の減少に伴って減少する傾向にあった。特に1 fgを鋳型とした場合についてはバンドの蛍光が極めて低いか、観察できない例も確認された。それに対し、1 pgを鋳型として用いた条件では、100 pg、10 pg添加条件と比較し、蛍光の強度は低くなるものの、再現性を伴った明瞭な増幅を認めることができた。

以上の結果から、本研究におけるPCR条件 (プライマー配列、酵素・dNTPs濃度、塩組成、反応プログラム) については、1 pgの供試菌DNAを安定して検出可能であることが明らかとなった。この数値は、既報<sup>11)</sup>に基づきナミダタケのゲノムサイズを42.8Mbp (塩基対) とすると、理論上21個相当の一次菌糸細胞 (二次菌糸細胞: 10個相当) を検出可能な感度となる。したがって、本研究結果は目視や触診などに依存してきた従来の手法では解決が困難であった木造文化財の部材に侵入した微量の菌糸を検出し、初期対応を実施する上で、PCR分析の有効性を強く示唆するものである。また、本PCRシステムで示された検出感度は、設計されたプライマーの安定性、反応条件などとともにゲノム内でコピー数の多いrDNAを標的領域に選定したことにより得られたものと考えられる。

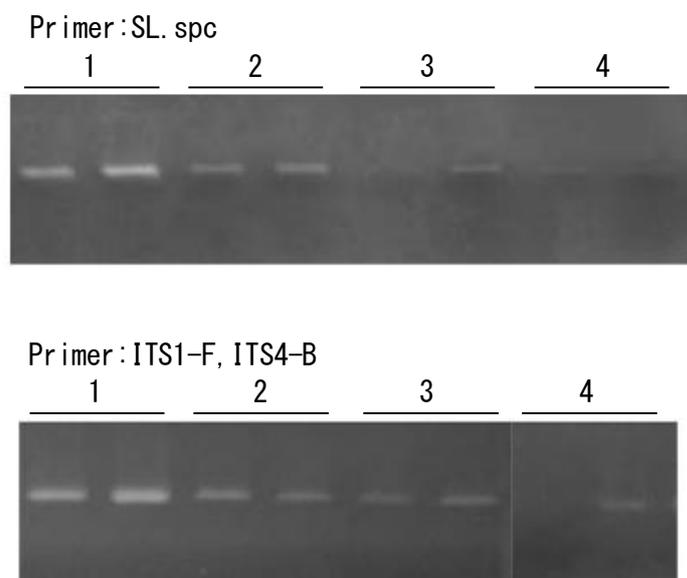


Fig 2.6 PCR 法の検出感度

凡例) 1: 100 pg *S. lacrymans* DNA,  
 2: 10 pg *S. lacrymans* DNA,  
 3: 1 pg *S. lacrymans* DNA,  
 4: 1 fg *S. lacrymans* DNA

### 2.3.3 LAMP 法による担子菌の検出

各供試菌の菌糸より抽出された DNA を鋳型として、今回設計したプライマーセットを用いて LAMP 分析を行った結果を Fig. 2.7 および Fig. 2.8 に示す。反応終了後の増幅産物の電気泳動像から、LSL.spc プライマーセットを用いた LAMP 分析はナミダタケ供試菌株の DNA を特異的に増幅可能であることが確認された (Fig. 2.7)。また、LCp.spc プライマーセットを用いた LAMP 分析においては、イダタケの DNA のみが特異的に増幅されることが明らかとなった (Fig. 2.7)。本結果から、標的となる供試菌のゲノム配列に対して選択的結合能力を有するプライマーセットを設計することで、2.3.1 で示された PCR 分析同様、

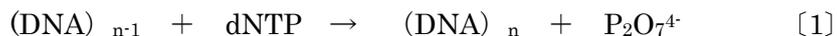
LAMP 分析によっても種特異的な担子菌検出システムが構築可能であることが示された。

さらに、担子菌類間で保存性の高い 18S rDNA 領域を標的とする L18S.spc プライマーセットを用いた LAMP 分析を行ったところ、ナミダタケおよびイドタケ両種の DNA 増幅がともに観察された (Fig. 2.8)。上記の結果は、担子菌類を種レベル以上の高次分類群として包括的に検出するためのシステム構築において、L18S.spc プライマーセットを用いた LAMP 分析が応用可能であることを示唆する。

一方、担子菌を検出するシステムの構築において、分析操作および使用機器の簡略化は木造文化財を実際に取り扱っている中小規模施設での利用・普及を考慮する上で重要な検討項目となる。LAMP 法による DNA 増幅に関しては、PCR 法と同様に標的領域の増幅が達成されたか否かをゲル電気泳動で確認することも可能であるが (Fig. 2.7、Fig. 2.8)、蛍光インターカレーターを加えた反応溶液の紫外線照射下での蛍光発生あるいは DNA 増幅反応の副産物として生じるピロリン酸マグネシウムによる反応溶液の濁度上昇の観察によっても確認が可能である (Fig. 2.9)。このような確認方法が可能であるのは、PCR 法が標的 DNA 領域の増幅を①2 本鎖 DNA の 1 本鎖への熱変性、②プライマーのアニーリング、③DNA 合成伸長反応という温度を変更制御した異なる 3 ステップを 1 サイクルとして行い、その中で DNA 合成伸長反応のステップにおいてのみ DNA 鎖の合成が進むのに対し、LAMP 法では等温条件下 (本研究では 63 °C) で動的平衡状態にある 2 本鎖 DNA に対して①プライマーセットのアニーリングと DNA 合成伸長反応が同時進行する、1 ステップ・1 サイクルの DNA 鎖合成 (鎖置換型合成) を行うため、より効率的に DNA 増幅産物が得られ、反応液中に蓄積していくことによるものである<sup>12)</sup>。また、PCR 法では増幅サイクル数を適正回数以上に増やしても反応副産物であるピロリン酸による合成反応阻害や生成した

DNA 鎖同士の再会合によるプライマーのアニーリング阻害等が生じ、標的領域由来の産物はそれ以上増加せず、非特異的反応が表出してくるが、LAMP 法では鎖置換型合成を利用するため DNA 増幅に阻害がかかりにくく、目視観察を可能とするまで DNA 増幅産物が蓄積することが既報に報告されている<sup>12)</sup>。

本研究において、電気泳動を用いずに直接マイクロチューブ内で担子菌 DNA の増幅を確認するため、反応溶液にエチジウムブロミドを加えマイクロチューブごと紫外線ランプ下で観察した結果、標的 DNA が存在する条件のみで蛍光が認められた (Fig. 2.10)。また、ピロリン酸マグネシウムの観察についても標的 DNA の存在下においてのみ反応溶液の濁度上昇が観察された (Fig. 2.10)。特に標的 DNA の増幅にともなって、以下の反応で生成されるピロリン酸マグネシウムを指標とする検出系<sup>13)</sup>は、人体への有害性が指摘されているエチジウムブロミドや紫外線照射用の機器を必要としない、より簡便な手法として、利用価値が高いものと考えられる。



以上の結果から、LAMP 分析は増幅反応から検出までを含めた過程が 60 分以内に終了する、より簡易かつ迅速な担子菌検出系として応用可能であることが示された。さらに LAMP 分析においては、PCR 分析とは異なり、一定温度 (60~65 °C) で反応系を保温することのみで反応が進行するため、サーマルサイクラーが必須機器ではなく、汎用品の保温機能付きウォーターバスやアルミブロックなどで代用可能となる。したがって、LAMP 分析は大きな初期投資を要さず導入可能な分子生物学的担子菌検出技術の一つとして、有用性が高いものと考えられる。

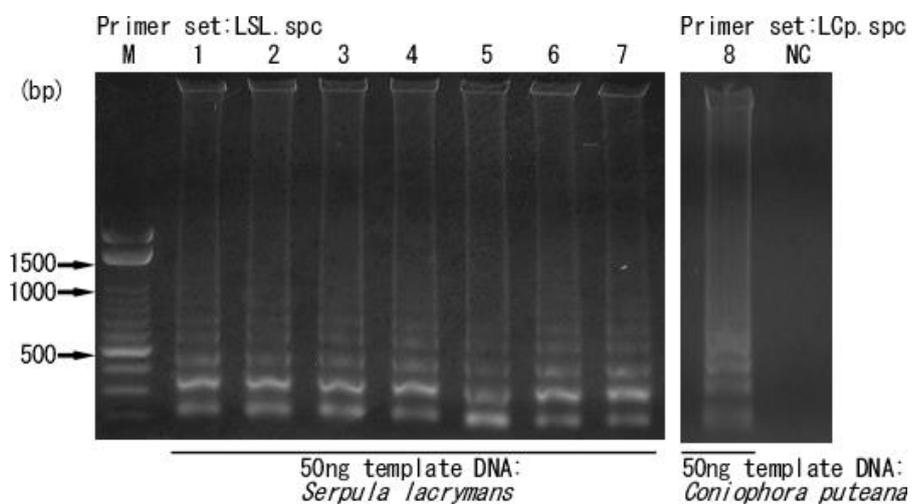


Fig. 2.7 種特異的プライマーセットを用いた供試菌 DNA の LAMP 増幅  
凡例) M: Marker, 1: HFPRI 0201, 2: HFPRI 0202, 3: HFPRI 0203,  
4: HFPRI 0204, 5: HFPRI 0301, 6: HFPRI 0302, 7: NBRC 8697,  
8: NBRC6275: Table 2.1 参照, NC : コントロール (鋳型 DNA なし)

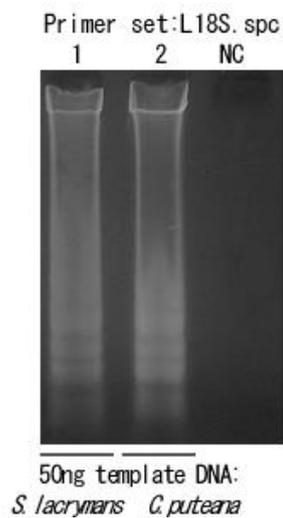


Fig. 2.8 担子菌 18SrDNA 特異的プライマーセットを用いた供試菌 DNA  
の LAMP 増幅  
凡例) 1: NBRC 8697, 2: NBRC6275: Table 2.3 参照,  
NC : コントロール (鋳型 DNA なし)

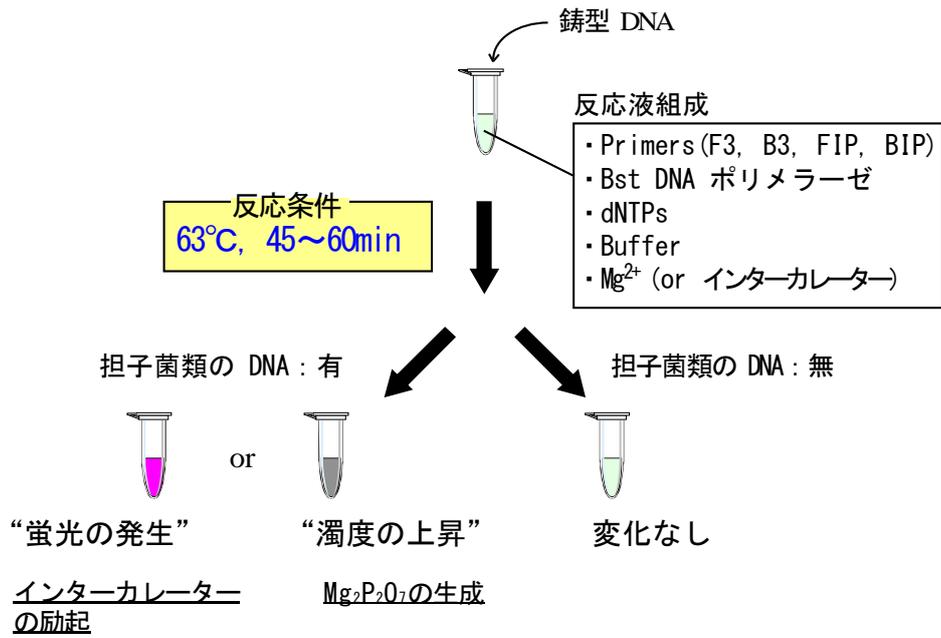


Fig 2.9 LAMP 法を用いた担子菌類の迅速・簡易検出系の構築

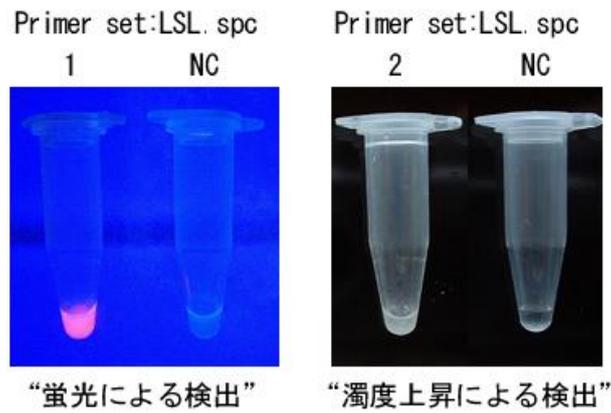


Fig 2.10 LAMP 法による担子菌類の迅速・簡易検出例 (*S. lacrymans*)

凡例) 1,2: 1ng *S. lacrymans* (NBRC8697) DNA,

NC: コントロール (鑄型 DNA なし)

#### 2.3.4 LAMP 法の検出感度評価

LAMP 法の検出感度について検証するため、ナミダタケおよびイドタケ菌糸より抽出された 1 fg、1 pg、10 pg、100 pg、1000 pg の DNA を鋳型のモデルとして LAMP 分析を行った結果、本研究で設計した種特異的プライマーセット (LSL.spc、LCp.spc) および担子菌の 18S rDNA 領域を標的とするプライマーセット (L18S.spc) を用いたすべての反応において 1 pg の供試菌 DNA を増幅可能なことが確認された (Fig. 2.11)。また、2.3.2 における PCR 分析では鋳型添加量が減少するのに伴って、増幅の目安であるバンドの蛍光も減少する傾向にあったが、LAMP 分析では 1 pg と 1000 pg の鋳型添加量の間で蛍光強度に顕著な差異は認められなかった (Fig. 2.11 左)。この結果は、LAMP 法の特徴である鎖置換型合成による効率的な DNA 増幅能力に起因し、極少量の鋳型が迅速に増幅され反応溶液中の dNTP の枯渇にいたるまで増幅が進行したことによるものと推測される。一方、1 fg を鋳型として用いた条件では、増幅が確認されない事例も存在し、PCR 分析と同様に各プライマーセットとも再現性を伴った結果を得ることができなかった。以上の結果から、本研究における LAMP システム (プライマーセット配列、酵素・dNTPs 濃度、塩組成、反応温度) についても PCR 分析同様、1 pg までの供試菌 DNA を安定して検出可能であることが明らかとなった。本研究結果は予防的保存の原則に基づく精密な木造文化財の劣化評価を行う上で、PCR 分析とともに LAMP 分析による担子菌類検出技術が有用であることを強く示唆するものと考えられる。

一方、LAMP 法は①PCR のように長鎖 DNA を増幅することができない (PCR : 40,000 bp (塩基対)<sup>14)</sup>、LAMP : 200 bp 程度)、②プライマーを設計する上で、T<sub>m</sub> 値

の設定可能範囲が狭い (60~65 °C) : 設計可能な DNA 領域に制限がかかる、③既知の配列の検索は可能だが未知の配列の調査 (PCR ダイレクトシーケンスなど) はできない、などの欠点を有する。しかし、木造文化財に侵入している担子菌類の分布を迅速かつ包括的に捕捉する上で LAMP 分析はその簡便性において利用価値が高く、以降の調査において担子菌種の同定や菌叢解析が要求されるような場合には PCR 分析をはじめとした他の分子生物学的手法と組み合わせた運用を行うことで、より効果的な担子菌類の検出および木造文化財の劣化評価が可能となるものと考えられる。

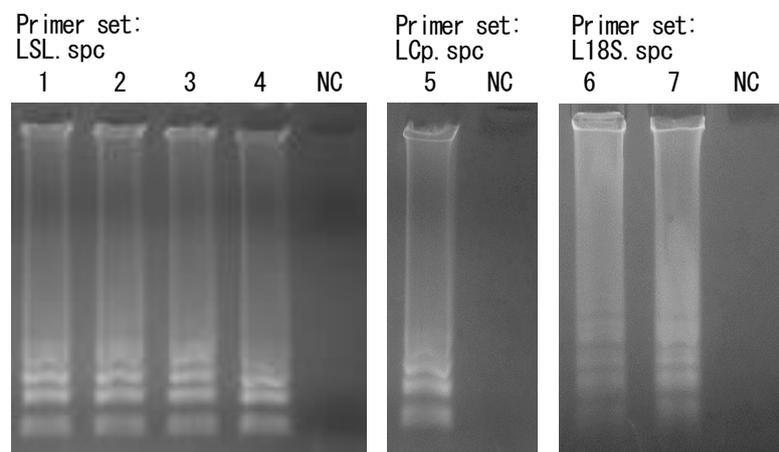


Fig 2.11 LAMP 法の検出感度

凡例) 1: 1 pg *S. lacrymans* DNA, 2: 10 pg *S. lacrymans* DNA,  
 3: 100 pg *S. lacrymans* DNA, 4: 1000 pg *S. lacrymans* DNA  
 5: 1 pg *C. puteana* DNA, 6: 1 pg *S. lacrymans* DNA,  
 7: 1 pg *C. puteana* DNA, NC: コントロール (鋳型 DNA なし)

## 参考文献

- 1) Uemori T., Mukai H., Takeda O., Moriyama M., Sato Y., Hokazono S., Takatsu N., Asada K. and Kato I. : Investigation of the Molecular Mechanism of ICAN, a Novel Gene Amplification Method. *Journal of Biochemistry*, 142(2), 283-292 (2007).
- 2) Nagamine, K., T. Hase and T. Notomi: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers, *Molecular and Cellular Probes*, 16, 223-229 (2002).
- 3) Jasalavich, A. C., Ostrofsky, A., Jellison, J.: Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4725-4734 (2000).
- 4) Horisawa, S., Sakuma, Y., Takata, K., Doi, S. :Detection of intra- and interspecific variation of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by PCR-RFLP and RAPD analysis, *J. Wood Sci.*, 50, 427-432 (2004).
- 5) Schmidt, O. and Moreath, U. : Characterization of indoor rot fungi by RAPD analysis, *Holzforschung* 52, 229-233 (1998).
- 6) 和田朋子, 中田裕治, 吉田誠, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 堀沢栄, 土居修一, 桃原郁夫 : 「腐朽した土台材中に存在する菌類の菌叢解析」, *木材保存* 39(6), 280-290 (2013).
- 7) Moreath, U. and Schmidt, O. : Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction, *Holzforschung* 54, 1-8 (2000).
- 8) 林 康夫 : “文化財の虫菌害”, 45, 32-34 (2003).

- 9) 高橋旨象：“きのこと木材”，築地書館，78-87 (1989).
- 10) Gardes, M. and Bruns, T. D.: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Molecular Ecology* 2, 113-118 (1993).
- 11) Eastwood D.C., Floudas D, Binder M, Majcherczyk A, Schneider P, Aerts A, Asiegbu F.O., Baker S.E., Barry K, Bendiksby M, Blumentritt M, Coutinho P.M., Cullen D, de Vries R.P., Gathman A, Goodell B, Henrissat B, Ihrmark K, Kauserud H, Kohler A, LaButti K, Lapidus A, Lavin J.L., Lee Y.H., Lindquist E, Lilly W, Lucas S, Morin E, Murat C, Oguiza J.A., Park J, Pisabarro A.G., Riley R, Rosling A, Salamov A, Schmidt O, Schmutz J, Skrede I, Stenlid J, Wiebenga A, Xie X, Kües U, Hibbett D.S., Hoffmeister D, Högberg N, Martin F, Grigoriev I.V., Watkinson S.C.: The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi, *Science* 333(6043), 762-765 (2011).
- 12) 納富継宣, 長谷哲：「新規遺伝子増幅法（LAMP 法）の原理と応用」, 月刊バイオインダストリー18 (2), 15-23 (2001).
- 13) Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T.: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 150-154 (2001).
- 14) タカラバイオ株式会社：“Takara PrimeSTAR® GXL 説明書”，7, [http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/r050a\\_j.pdf](http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/r050a_j.pdf) (2017.8.27).

## 第3章 担子菌の生理活性モニタリング

### 3.1 緒言

木材に発生する担子菌について、その分布状態と生理活性を精密かつ客観的に把握する技術の確立は木造文化財の予防的保存体制を実現する上で不可欠である。このうち、担子菌の精密な分布状態の捕捉に関しては、第2章においてPCR (Polymerase Chain Reaction) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を用いた遺伝子分析により、信頼性と汎用性に優れた担子菌の高感度検出システムの構築が可能であることが示されている。しかし、担子菌の検出システムのみでは、現時点で木材中に侵入している担子菌の活動がどのような状態にあるのかを評価し、今後の腐朽進行に関する予測情報を得ることができない。そのため、担子菌検出システムを補完する担子菌の生理活性モニタリングシステムの確立が求められている。

そこで本章では、RT (Reverse transcription) -LAMP 法による担子菌 18S rRNA 遺伝子の発現解析を試み、担子菌の生理活性モニタリング技術として本手法が利用可能であるか検討した。

### 3.2 試験方法

#### 3.2.1 供試菌株

供試菌としてナミダタケ (*Serpula lacrymans* NBRC 8697 株) およびイドタケ (*Coniophora puteana* NBRC 6275 株) を用いた。

### 3.2.2 核酸抽出用試料の調製

各供試菌を7~14日間、ポテトデキストロース寒天（PDA）培地で培養し、十分発達したコロニーの菌糸を外径8mmのコルクボーラーで培地ごと打ち抜いたものを活動中の担子菌モデルと位置づけ、核酸抽出用試料とした。併せて、上記の培地を暗所にて10ヶ月間乾燥させたものを活動停止担子菌モデルとし、同様に核酸の抽出を実施した（Fig. 3.1）。

### 3.2.3 核酸（RNA/DNA）抽出法

核酸抽出用試料より抽出キット（ISOGEN、株式会社ニッポンジーン）を使用し、AGPC（Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform）法<sup>1)</sup>によりトータルRNAを抽出した。

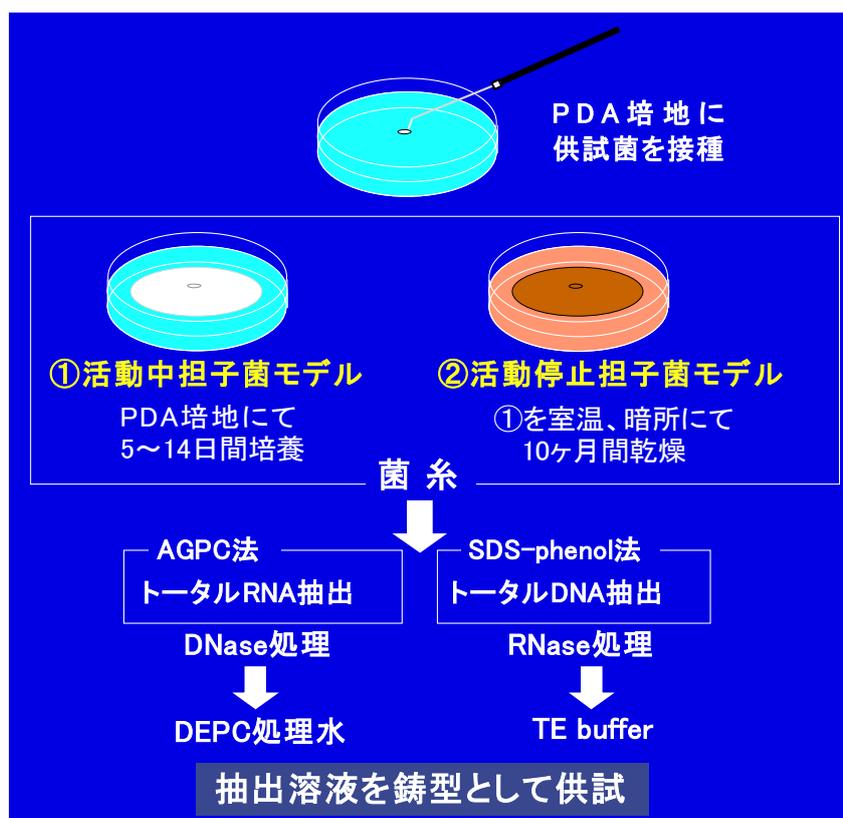


Fig. 3.1 核酸抽出用試料と核酸（RNA/DNA）の抽出

抽出したトータル RNA を DNase で処理した後、DEPC (Diethylpyrocarbonate) 処理水に溶解したものを RNA 試料とした。トータル DNA の抽出は 2 章と同様、SDS-phenol 法によって行い TE 緩衝液 (10 mmol/L Tris( Tris(hydroxymethyl)aminomethane)-HCl、1 mmol/L EDTA, pH8.0) に溶解したものを DNA 試料とした(2.2.1.3 の項を参照)。

### 3. 2. 4 RT-LAMP 分析

RT-LAMP 反応はキット (LoopampRNA 増幅試薬キット(RT-LAMP) LMP244、栄研化学 (株)) のプロトコルに従い、AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 逆転写酵素、Bst (Bacillus stearothermophilus) DNA ポリメラーゼ、5 pmol の F3、B3 プライマー、40 pmol の FIP、BIP プライマーを含む、最終濃度を 20 mmol/L Tris-HCl(pH8.8)、10 mmol/L KCl、8 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、1.4 mmol/L dNTPs に調製した 25 μL の反応液中で実施し、鋳型としてトータル RNA 抽出溶液 5 μL を用いた。なお、プライマーセット (F3、FIP、BIP、 B3) については担子菌の 18S rRNA 遺伝子を標的として設計した L18S.spc プライマーセットを使用した(2.2.3.2 の項を参照)。

増幅はサーマルサイクラー (DNA REACTOR XE-2000、日本テクノサービス (株)) を用いて、63 °C 等温での伸長反応を 60 分間行った。反応終了後、反応産物を電気泳動し cDNA (Complementary DNA) 増幅の有無を確認するとともに、cDNA 増幅反応の副産物として生じるピロリン酸マグネシウムによる反応溶液の濁度上昇を観察した。

### 3. 2. 5 LAMP 分析

LAMP 反応はキット (Loopamp DNA 増幅試薬キット LMP204、栄研化学 (株)) のプロトコルに従って実施した。反応終了後、反応産物を電気泳動し DNA 増幅の有無を確認するとともに、DNA 増幅反応の副産物として生じるピロリン酸マグネシウムによる反応溶液の濁度上昇を観察した (2.2.3.3 の項を参照)。

### 3.3 結果および考察

供試菌の活動中担子菌モデルおよび活動停止担子菌モデルより抽出操作を行った RNA 溶液を鋳型として、担子菌の 18S rRNA 遺伝子領域を標的とする L18S.spc プライマーセットを使用し、RT-LAMP 反応を行い、その反応産物を電気泳動した結果、供試菌 2 種の活動中担子菌モデルより抽出した鋳型から cDNA の増幅が確認された。それに対し、活動停止担子菌モデルより抽出した鋳型を RT-LAMP 反応に供した場合、2 種とも cDNA の増幅は認められなかった (Fig. 3.2)。

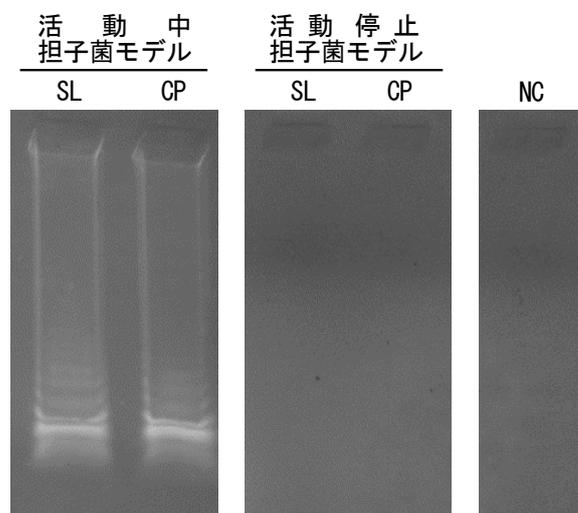


Fig. 3.2 標的遺伝子(18S rDNA) cDNA の RT-LAMP 増幅

凡例) SL: NBRC 8697, CP: NBRC6275

NC: コントロール (鋳型 DNA なし)

また、ピロリン酸マグネシウムによる反応溶液の濁度上昇を観察した結果、電気泳動と同様、活動中担子菌モデルより抽出した鋳型を用いた場合にのみ、cDNA の増幅に伴う反応溶液の濁度上昇が観察された (Fig. 3.3)。

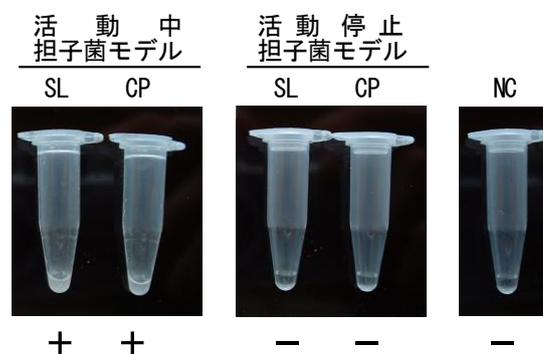


Fig. 3.3 濁度観察による標的 cDNA の増幅確認

凡例) SL:NBRC 8697, CP:NBRC6275, NC: コントロール (鋳型 DNA なし),  
 + : 濁度上昇あり, - : 濁度上昇なし

一方、供試菌の活動中担子菌モデルおよび活動停止担子菌モデルより抽出された DNA を鋳型として同じく L18S.spc プライマーセットを使用し、LAMP 反応を行った結果、供試菌 2 種の活動中担子菌モデル、活動停止担子菌モデルより抽出した鋳型のいずれからでも遺伝子増幅に伴う反応液の濁度上昇が観察された (Fig. 3.4)。

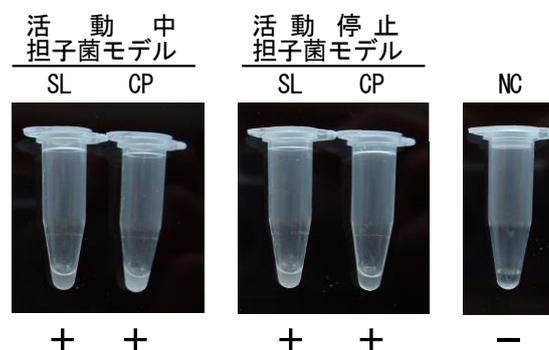


Fig. 3.4 濁度観察による標的ゲノム DNA (18S rDNA) の増幅確認

凡例) SL:NBRC 8697, CP:NBRC6275, NC: コントロール (鋳型 DNA なし),  
 + : 濁度上昇あり, - : 濁度上昇なし

LAMP 法によるゲノム DNA の分析については Fig. 3.4 で示されるように、現時点において活動停止中の遺伝子、死菌の遺伝子についても標的 DNA 配列が残存している限り増幅が行われるが、RNA (cDNA) 分析では実際に生体内で発現している遺伝子を選択的に調査することが可能である。したがって本章で得られた結果は、担子菌の生理活性を把握する上で、生物の RNA を分析対象とする RT-LAMP 法の有効性を強く示唆するものである。

担子菌による劣化を受けた木造文化財の保存修復については、① 腐朽が進行している部材における担子菌の正確な侵入範囲の特定を行った後、② 環境改善や薬剤処理、部材交換を行う適切な範囲を決定し、③ ②で決定した方針に基づく処置 (処理) の実施、④ 部材に適切な処置 (処理) が施されたか否かの確認という手順を経ることが望ましい。RT-LAMP 法による担子菌の生理活性調査は、特に④の段階において、これまで得ることができなかった客観的な判断基準を遺伝子発現解析という形で提供することが可能である。したがって、担子菌による木材劣化に対する処置 (処理) の効果をフィードバックし、より効果の高い処置 (処理) 法を発展させる上で、RT-LAMP 法による担子菌の生理活性調査は重要性の高い技術として位置付けることができる。

また、RT-LAMP 法は高額な機器を要さず分析操作も比較的簡便であるため、中小規模施設においても導入・運用可能な担子菌の活性モニタリング手法として、木造文化財の保存管理体制の普及・整備に大きく寄与することが期待される。

## 参考文献

- 1) Chomczynski P, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1), 156-159 (1987).
- 2) (社)日本木材保存協会:「実務者のための住宅の腐朽・虫害の診断マニュアル」, 108-109, 155(2007).

## 第4章 共存物質が木材腐朽菌の検出および 活性モニタリングに及ぼす影響の評価

### 4.1 緒言

第2章、第3章では担子菌の特異的高感度検出および担子菌の生理活性モニタリングを行う上でPCR (Polymerase Chain Reaction) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、RT (Reverse transcription) -LAMP 法の有効性が明らかとなった。しかし、核酸増幅反応を利用したこれらの技術については、分析試料に含有される種々の物質によって、標的配列の増幅反応が阻害される例も報告されている<sup>1,2)</sup>。そこで、本章では実際の試料分析の際、担子菌の菌糸以外に反応系への持ち込みが想定される木材成分および木材保存剤成分の核酸増幅反応に及ぼす影響について検証した。

### 4.2 試験方法

#### 4.2.1 供試菌株

供試菌としてナミダタケ (*Serpula lacrymans* NBRC 8697 株) およびイドタケ (*Coniophora puteana* NBRC 6275 株) を用いた。

#### 4.2.2 核酸抽出用試料の調製

##### 4.2.2.1 木材共存試料

###### a) 菌糸・木粉混合試料

容積 300 ml の三角フラスコに 75 mL の液体培地(麦芽エキス 0.38 g、ペプトン 0.19 g、グルコース 0.94 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.11 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.08 g を含む) を調製し、ナミダタケおよびイドタケを接種した。20 °C で 60 日間、振とう培養した後、菌糸を蒸留水で洗浄し、ろ紙を用いて菌糸から余分な水分を取り除いた。その後、菌糸を凍結乾燥し、乳鉢にて

パウダー状に調製したものを菌糸試料とした。木粉資料に関しては、抽出成分が辺材と比較し多く含有されている心材<sup>3,4)</sup>を用いて調製した。各供試菌の菌糸試料に対してベイツガ (*Tsuga heterophylla*) の気乾心材木粉 (粒径 0.5 mm 以下) を重量比で 10 倍、100 倍、1,000 倍、5,000 倍および 10,000 倍の割合で加えたものを菌糸・木粉混合試料とした。またエゾマツ (*Picea jezoensis*)、トドマツ (*Abies sachalinensis*) およびカラマツ (*Larix kaempferi*) の気乾心材木粉については重量比 10,000 倍の菌糸・木粉混合試料を抽出用試料として調製した (Table 4.1)。

Table 4.1 菌糸・木粉混合試料

樹種	略号	心材木粉/凍結乾燥菌糸 (w/w)
ベイツガ	T1	10
<i>Tsuga heterophylla</i>	T2	100
	T3	200
	T4	500
	T5	1,000
	T6	1,500
	T7	2,000
	T8	5,000
	T9	10,000
エゾマツ <i>Picea jezoensis</i>	P	10,000
トドマツ <i>Abies sachalinensis</i>	A	10,000
カラマツ <i>Larix kaempferi</i>	L	10,000

#### b) 腐朽初期木材モデル試料

容積 500 mL の広口培養瓶に PDA (ポテトデキストロース寒天) 培地を 100 mL 分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌を行った。この培養瓶内の培地に供試菌を接種し、コロニー

が培地表面に広がるまで 20 °C の条件下で培養した。次に培養瓶内の培地上にエチレンオキシドガスで滅菌したエゾマツ心材 (20 (T) × 20 (R) × 10mm (L)) を 2 個ずつプラスチックネットを介して載せ、20 °C で 7 日間、供試菌に曝露した後、木材を取り出して表面に付着している菌糸を除去し、質量減少率を次式により算出した。

$$\text{質量減少率 (\%)} = \frac{\text{供試菌曝露前の木材恒量 (60°C)} - \text{供試菌曝露後の木材恒量 (60°C)}}{\text{供試菌曝露前の木材恒量 (60°C)}} \times 100$$

供試菌への 7 日間の曝露後、有意な質量減少が観察されなかった (質量減少率 : 0 %) 木材を選び、腐朽初期モデル木材試料とした (Fig. 4.1)。

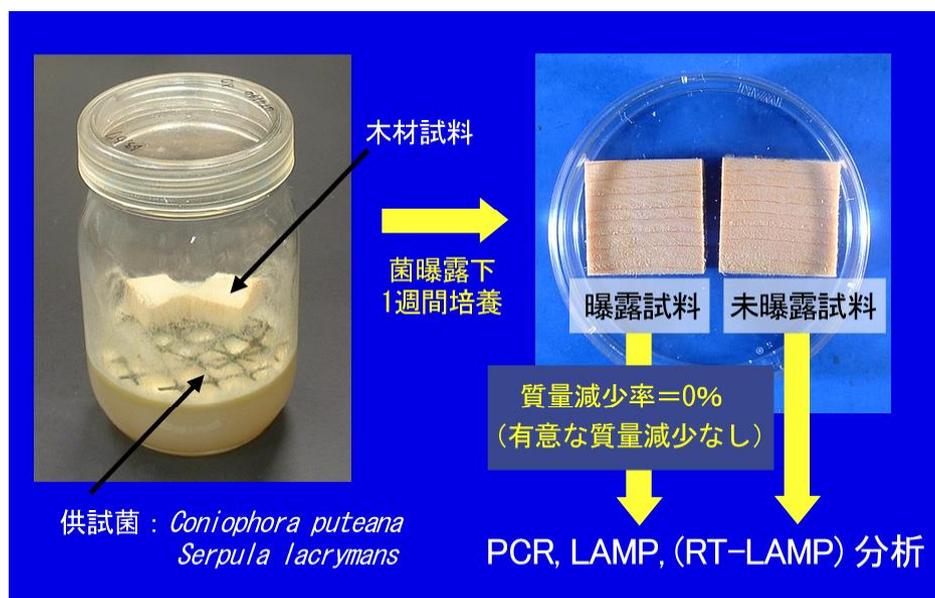


Fig. 4.1 腐朽初期木材モデル試料の調製

#### 4.2.2.2 木材保存剤共存試料

木材保存剤の ACQ (銅・アルキルアンモニウム化合物)、CCA (クロム・銅・ひ素化合物)、クレオソート油をそれぞれ減圧注入したエゾマツ辺材 (20 (T) × 20 (R) × 3 mm (L) ) と供試菌を接種した後、20 °C で培養し、コロニーが表面上に広がった PDA 平板培地の上に 14~60 日間曝露した無処理のエゾマツ辺材 (20 (T) × 20 (R) × 3mm(L) ) を製作した。PDA 平板培地上で供試菌に曝露したエゾマツ辺材については、4.2.2.1 で示した式により質量減少率を算出し、有意な質量減少が観察されなかった木材および質量減少率が約 30% に達している木材を選び以降の試料調製に供した。

次に各木材保存剤を減圧注入したエゾマツ辺材と上記の供試菌曝露後の質量減少率が 0% と 30% となった無処理のエゾマツ辺材をそれぞれ細断した。細断後、両方の木片を一定割合で混合し、各薬剤について日本農林規格 (JAS) に定められた性能区分における K4 相当 (屋外で風雨に直接晒される部材用) 以上の薬剤量が含まれるように調製したものを木材保存剤共存試料とした (Fig. 4.2、Table 4.5)。

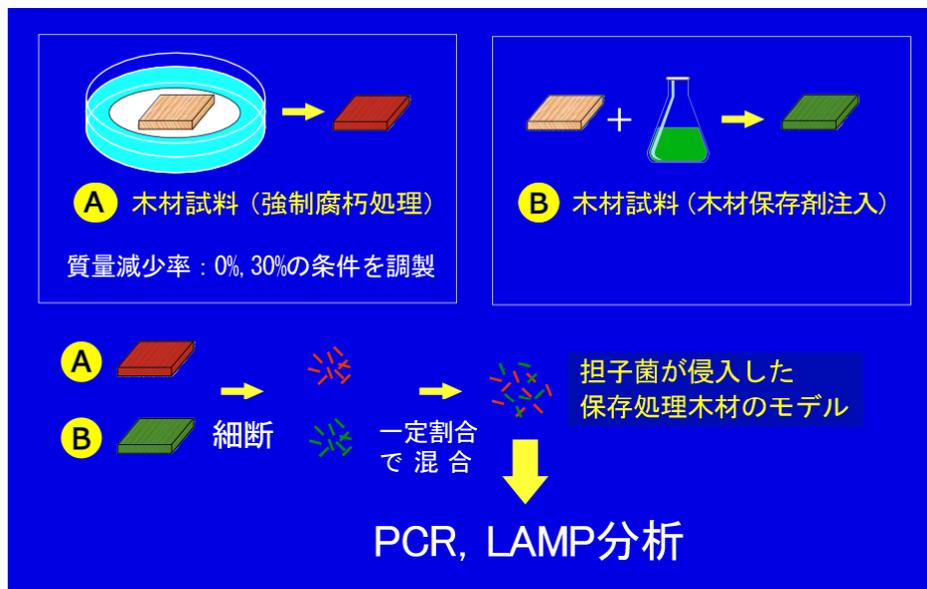


Fig. 4.2 木材保存剤共存試料の調製

### 4.2.3 核酸抽出法

#### 4.2.3.1 木材共存試料

##### a) 菌糸・木粉混合試料

抽出用試料を 0.15 mol/L NaCl、0.1 mol/L EDTA (pH8.0)、1 % SDS、100 µg/ml のプロテナーゼ K を含む抽出バッファーに入れ、55 °C で 1 時間ゆるやかに振とうしながら加温した。続いて等量のクロロホルム：イソアミルアルコール混液(体積比 24:1)を加えて十分攪拌した後、遠心分離 (15,000 rpm、10 分間：himac CR7B3、(株) 日立) を行い水層を回収した。同操作をさらに 2 回繰り返した後、得られた水層に対して 2 倍量のエタノールを加えて -20°C で 30 分間静置した。これを遠心分離 (15,000 rpm、10 分間：himac CR7B3、(株) 日立) して沈殿物を 70%エタノールで洗浄した後、再度遠心分離 (15,000 rpm、10 分間：himac CR7B3、(株) 日立) し、沈殿物を風乾して 50 µL の TE 緩衝液 (10 mmol/L Tris( Tris(hydroxymethyl)aminomethane)-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) に溶解したものを滅菌蒸留水で 50~100 倍希釈して PCR に用いる鋳型とした。

##### b) 腐朽初期木材モデル試料

供試菌への 7 日間の曝露後、有意な質量減少が観察されなかった木材試験体を滅菌した切り出し刀とメスを用いて細断、混合したものを抽出用試料とした。抽出用試料のうち 0.05g を用いて 2.2.1.3 および 3.2.3 の項に準じて核酸抽出を行った。

#### 4.2.3.2 木材保存剤共存試料

強制腐朽処理を行った木材試料と木材保存剤注入した木材試料を細断、混合した木材保存剤共存試料のうち、0.05g を用いて 2.2.1.3 の項に準じて核酸抽出を行った。

### 4.2.4 PCR・LAMP・RT-LAMP 分析

#### 4.2.4.1 菌糸・木粉混合試料

菌糸・木粉混合試料については菌糸に対する木材の混合比が大きく、大量の木材由来の DNA 存在下での増幅反応が想定される。したがって、本項目では、木材共存試料からの分子生物学的手法による高感度検出の可否を検証するための第一段階として、目的以外の DNA の存在下でも標的 DNA の検出能力が高い nested PCR を試みた。18S、5.8S、28S rRNA をコードする保存性の高い遺伝子領域を含む rDNA (Ribosomal DNA) の ITS (Internal transcribed spacer) 領域 (Fig. 4.3) をプライマー ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')・ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いて PCR により増幅した後、その増幅産物を鋳型として ITS1 と種特異的なプライマー SLs-R (5'-AATGTTGTCTTGCGACAACG-3' : ナミダタケ)、CPs-R (5'-AGTAGCAAGTAAGGCATAGA-3' : イドタケ) を用いて、再び PCR 増幅を行い種の同定を行った。プライマーの配列は White ら<sup>5)</sup>および Moreth ら<sup>6)</sup>に従った。Table 4.2 にシーケンスデータから予測される DNA 増幅産物のサイズを示す。

PCR は 0.5  $\mu$ L の鋳型 DNA 溶液と 1.25 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ (Takara Ex Taq、宝酒造株式会社) を含む、最終濃度を 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.3)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol/L dNTPs に調製した 25  $\mu$ L の反応液に等量ミネラルオイルを重層し反応を行った。なお、nested PCR に関しては、最初の PCR で得られた増幅産物 0.5  $\mu$ L をそのまま新たな鋳型 DNA 溶液として用いた。

増幅にはステップダウンサイクル<sup>7)</sup>を採用し、①熱変性 (95 °C、30 秒)、②アニーリング (75~55 °C、30 秒)、③伸長反応 (72 °C、30 秒) を 1 サイクルとする反応を 32 サイクル、サーマルサイクラー (DNA REACTOR XE-2000、日本テクノサービス株式会社) を用いて行った。なお、アニーリング温度は反応開始後の 4 サイクルでは 75 °C、続くサイクルでは

70 °Cから 55 °Cまで 3 サイクルごとに 5 °Cずつ下降させ (70 °C×3、65 °C×3、60 °C×3、55 °C×19 サイクル)、最初のサイクルの熱変性は 1 分 30 秒、最後のサイクルの伸長反応は 5 分 30 秒に延長して行った。

反応終了後、PCR 増幅産物 8 μL を 1.6 μL のローディングバッファーと混合し、エチジウムブロミドを加えた 1.5 %アガロースゲルで電気泳動し、DNA バンドの観察を行った。

#### 4.2.4.2 腐朽初期木材モデル試料

PCR 分析：2.2.1.5 の項を参照、

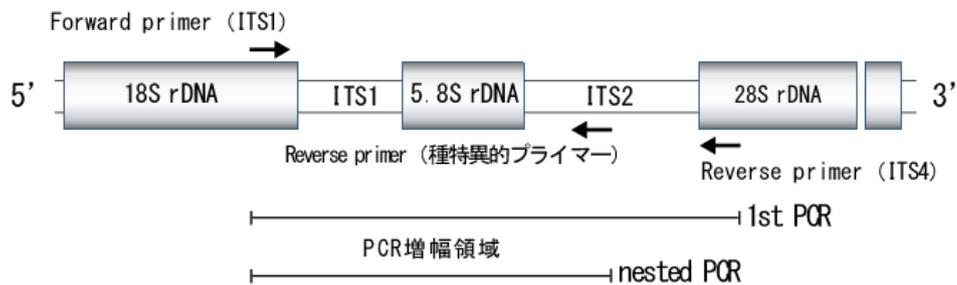


Fig. 4.3 PCR 増幅領域およびプライマー 結合位置

Table 4.2 PCR 増幅産物のサイズ<sup>4,5)</sup>

種	プライマー対	予測される増幅DNA断片長 (bp)
ナミダタケ <i>Serpula lacrymans</i>	ITS1・ITS4	655 (1st PCR)
	ITS1・SLs-R	588 (nested PCR)
イドタケ <i>Coniofora puteana</i>	ITS1・ITS4	727 (1st PCR)
	ITS1・CPs-R	633 (nested PCR)

LAMP 分析：2.2.3.3 の項を参照

RT-LAMP 分析：3.2.4 の項を参照

RT-LAMP 分析による遺伝子発現解析については非加熱の試料が要求されるため、

供試菌への7日間の曝露後、有意な質量減少が観察されなかった（質量減少率：0%）  
木材と対として同一の培養瓶内に曝露されていた木材を選び質量減少率測定を行わない  
ままトータル RNA の抽出を行った。

#### 4.2.4.3 木材保存剤共存試料

PCR 分析：2.2.1.5 の項を参照、

LAMP 分析：2.2.3.3 の項を参照

### 4.3 結果および考察

#### 4.3.1 木材抽出成分の影響評価

##### 4.3.1.1 菌糸・木粉混合試料の PCR 分析

ナミダタケ菌糸と心材木粉を混合した試料から抽出した DNA サンプルを鋳型として ITS 領域（ITS1・ITS4、0.65 kbp（base pair：塩基対）<sup>4)</sup>）を増幅し、電気泳動を行った結果を Fig.4.4 に示す。ベイツガを混合した場合、菌糸試料に対する混合比が大きくなるに従い ITS 領域のバンド発現が弱くなる傾向が認められたが、10,000 倍においても木材を混合しない条件（Positive control：PC）と同様に増幅が確認された。また、エゾマツ、トドマツおよびカラマツを用いた条件においても 10,000 倍の混合条件でバンドを検出することが可能であった。

ITS 領域の増幅が確認された PCR 産物を鋳型として行った nested PCR では、ナミダタケに特異的な DNA のバンド（ITS1・SLs-R、0.58 kbp<sup>5)</sup>）がベイツガの全ての条件で確認された（Fig.4.5）。また、エゾマツ、トドマツおよびカラマツについても 10,000 倍の混合条件でバンドを検出することが可能であった。イドタケに関しても全ての混合条件において ITS 領域（ITS1・ITS4、0.72 kbp<sup>5)</sup>）の増幅が確認され、nested PCR により

イドタケに特異的な DNA のバンド (ITS1・CPs-R、0.63 kbp<sup>5)</sup>) が観察された (Fig.4.6)。

以上の結果より、大量の木材組織、木材由来成分の存在下においても PCR 法により微量な担子菌類を安定して検出可能であることが明らかとなった。

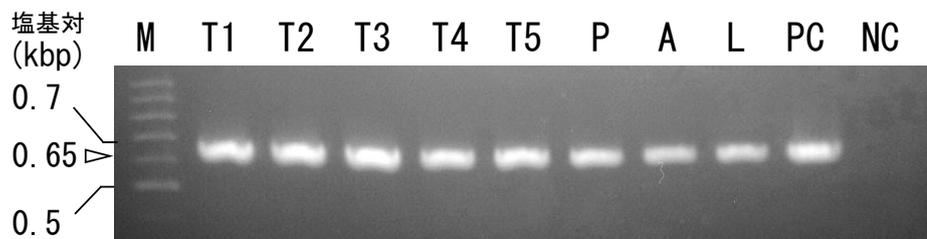


Fig. 4.4 ナミダタケ菌糸と心材木粉の混合条件におけるPCR増幅産物(プライマー対: ITS1・ITS4)  
 凡例) M: サイズマーカー, T1~T5: ベイツガ, P: エゾマツ, A: トドマツ, L: カラマツ,  
 PC: コントロール (鋳型DNAのみ), NC: コントロール (鋳型DNAなし)  
 注: 混合重量比 (心材木粉/凍結乾燥菌糸(w/w))  
 T1: ×10, T2: ×100, T3: ×1,000, T4: ×5,000, T5, P, A, L: ×10,000

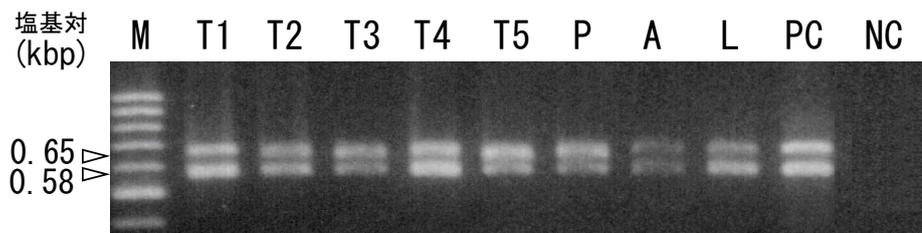


Fig. 4.5 ナミダタケ菌糸と心材木粉の混合条件におけるPCR増幅産物(プライマー対: ITS1・SLs-R)  
 凡例) 凡例, 注1: Fig.4.4参照  
 注2: 0.65kbp (塩基対) のバンドはnested PCRにおいて確認される1st PCR増幅産物

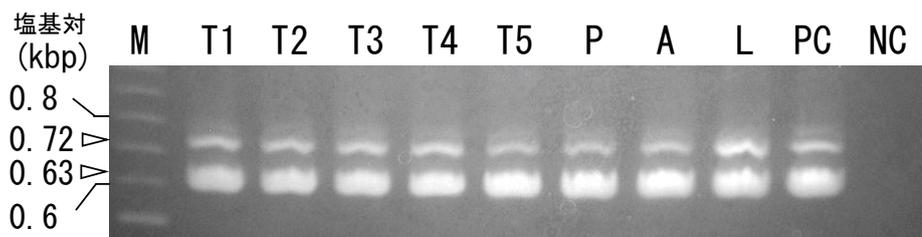


Fig. 4.6 イドタケ菌糸と心材木粉の混合条件におけるPCR増幅産物(プライマー対: ITS1・CPs-R)  
 凡例) 凡例, 注1: Fig.4.4参照  
 注2: 0.72kbp (塩基対) のバンドはnested PCRにおいて確認される1st PCR増幅産物

#### 4.3.1.2 腐朽初期木材モデル試料の PCR、LAMP、RT-LAMP 分析

腐朽初期木材モデル試料から抽出した DNA およびトータル RNA を鋳型として PCR、LAMP、RT-LAMP 反応を実施した結果を Fig. 4.7 および Table 4.3 に示す。PCR 分析、LAMP 分析に関しては、担子菌特異的プライマー (2.2.2、2.2.3.2 の項参照)、種特異的プライマー (2.2.1.4、2.2.3.2 の項参照) を使用することによって、質量減少が認められない木材試料の全てから供試菌由来の DNA 増幅が得られた。RT-LAMP 分析についても外見上、未曝露のコントロール木材と判別がつかない全ての木材試料から担子菌特異的プライマー (2.2.3.2 の項参照) を用いることで、担子菌 18S rRNA 遺伝子の発現を確認することができた。これらの結果は本研究で検討した担子菌を標的とする核酸増幅反応システムが、絶対量が少ない担子菌の DNA、RNA を木材から安定的に増幅可能であることを示すとともに、木材抽出成分による阻害作用は実用上、大きな問題とはならないことを示唆するものである。

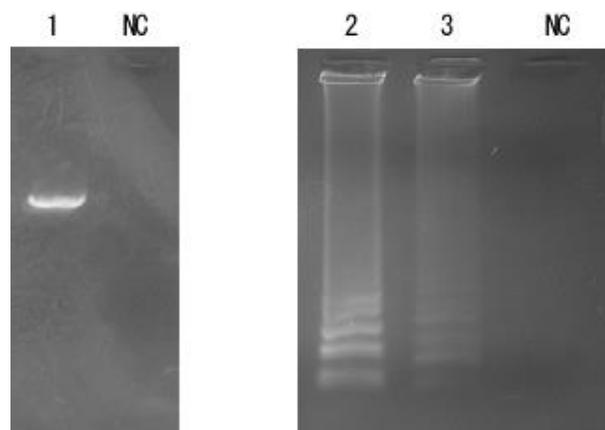


Fig. 4.7 質量減少が認められない腐朽初期木材モデル試料からの DNA (cDNA) 増幅 (ex. *C. puteana* infected specimen)

凡例 ) 1: DNA amplification by PCR, 2: DNA amplification by LAMP,  
3: cDNA amplification by RT-LAMP, NC: コントロール (鋳型DNAなし)

Table 4.3 質量減少が認められない腐朽初期木材モデル試料からの DNA (cDNA) 増幅

分析法	プライマー	種	試験体の 質量減少率(%)	DNA(cDNA) 増幅の有無
PCR	ITS1F- ITS4B*	<i>Serpula lacrymans</i>	0	+
		<i>Coniophora puteana</i>	0	+
	SL. spc**	<i>Serpula lacrymans</i>	0	+
		<i>Coniophora puteana</i>	0	+
LAMP	L18S. spc*	<i>Serpula lacrymans</i>	0	+
		<i>Coniophora puteana</i>	0	+
	LSL. spc**	<i>Serpula lacrymans</i>	0	+
		<i>Coniophora puteana</i>	0	+
RT-LAMP	L18S. spc*	<i>Serpula lacrymans</i>	-	+
		<i>Coniophora puteana</i>	-	+

凡例) \*: 担子菌特異的プライマー(セット), \*\*: 種特異的プライマー(セット)

#### 4.3.2 木材保存剤成分の影響評価

##### 4.3.2.1 反応系への木材保存剤直接添加による影響評価

木材保存剤が核酸増幅反応に与える影響を確認するため、PCR および LAMP 反応液に供試木材保存剤を直接添加し分析を行った結果、添加量の増加にともない鋳型 DNA の増幅阻害が観察された(Fig. 4.8, Fig. 4.9, Fig. 4.10)。

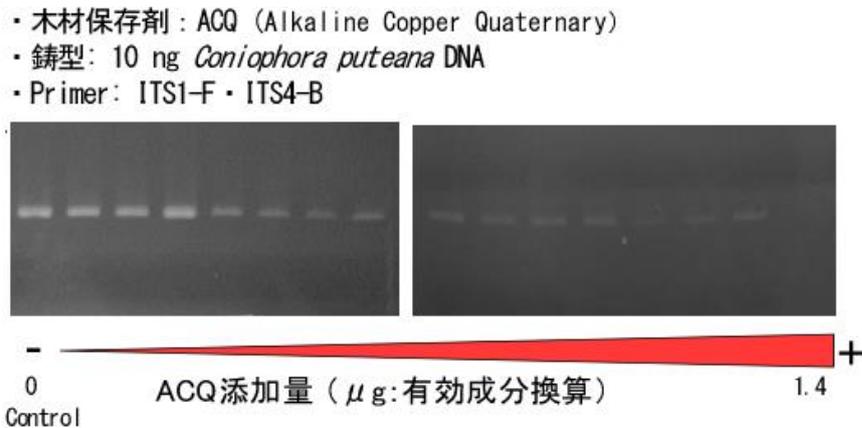


Fig. 4.8 反応溶液への木材保存剤の添加が PCR 増幅に及ぼす影響例

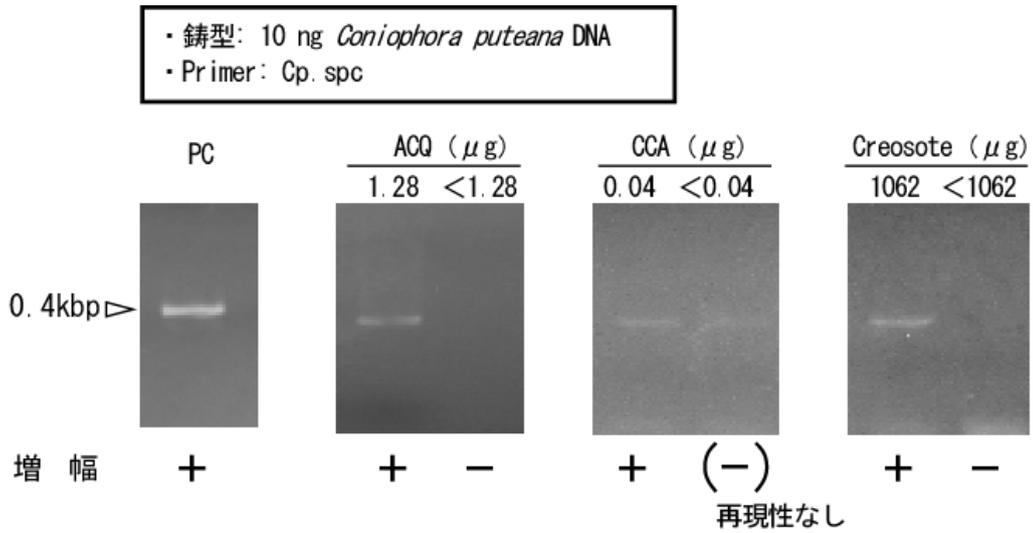


Fig. 4.9 PCR 増幅反応を許容する反応液中の木材保存剤量

凡例) ACQ : Alkaline Copper Quaternary, CCA : Chromated Copper Arsenate,

PC : コントロール (薬剤なし・強制腐朽処理試料のみ)

注) μg : 有効成分換算

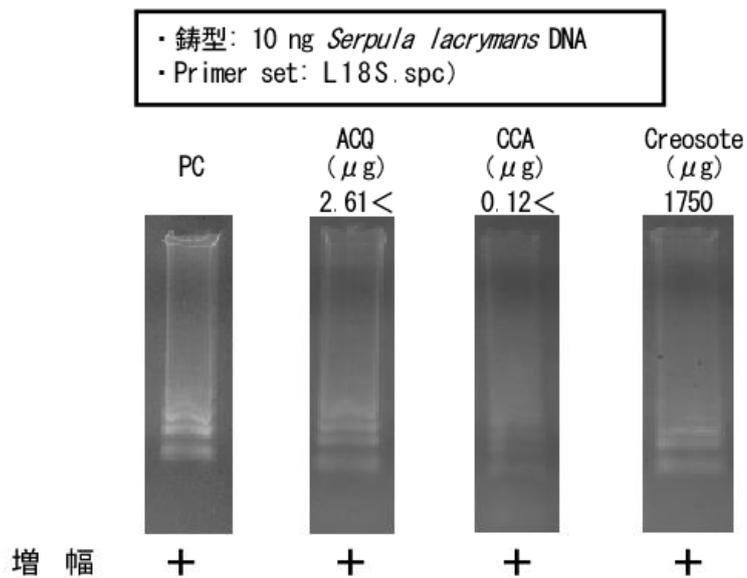


Fig. 4.10 LAMP 増幅反応を許容する反応液中の木材保存剤量例

凡例) ,注) : Fig. 4.9 参照

また、供試した木材保存剤間での添加量あたりの阻害作用の強度については、CCA > ACQ > クレオソート油の順であることが明らかとなった (Table 4.4)。さらに、核酸増幅手法間で比較した場合、LAMP 法よりも PCR 法においてより大きな反応阻害効果が確認された (Table 4.4)。

Table 4.4 PCR および LAMP 増幅反応を許容する反応液中の木材保存剤量

分析法	プライマー	種	最大許容量*		
			ACQ****	CCA*****	Creosote
PCR	ITS1F – ITS4B**	<i>Serpula lacrymans</i>	1.09	0.04	1041
		<i>Coniophora puteana</i>	1.14	0.04	1022
	SL. spc***	<i>Serpula lacrymans</i>	1.20	0.04	1060
	Cp. spc***	<i>Coniophora puteana</i>	1.28	0.04	1062
LAMP	L18S. spc**	<i>Serpula lacrymans</i>	2.61	0.12	1750
		<i>Coniophora puteana</i>	2.09	0.16	1532
	LSL. spc***	<i>Serpula lacrymans</i>	2.53	0.12	1511
	LCp. spc***	<i>Coniophora puteana</i>	2.46	0.10	1566

凡例 \* : 有効成分換算(μg), \*\* : 担子菌特異的プライマー(セット), \*\*\* : 種特異的プライマー(セット),  
\*\*\*\*ACQ : Alkaline Copper Quaternary, \*\*\*\*\*CCA : Chromated Copper Arsenate

#### 4.3.2.2 木材保存剤共存試料の PCR、LAMP 分析

日本農林規格 K4 相当以上の木材保存剤を含む試料から抽出した木材腐朽菌 DNA を鋳型として PCR 反応、LAMP 反応を行った結果、全ての試料から標的領域の増幅が確認された (Table 4.5)。

本研究において調製した木材保存剤共存試料には、反応系への木材保存剤の直接添加試験で明らかとなった PCR および LAMP 反応を完全に阻害する分量の木材保存剤が計算上、

含まれている。したがって、本検証試験で木材保存剤共存試料の全てより DNA 増幅が得られたことは、今回採用した核酸の抽出法により、最終的な鋳型 DNA 溶液に持ち込まれる木材保存剤量が反応阻害濃度以下に低減されたためと考えられる。

以上の結果から、本研究で構築した PCR 法、LAMP 法を用いた分析システムは木材中に含まれる木材保存剤の存在下においても、標的とした担子菌を安定して検出可能であることが明らかとなった。

Table 4.5 保存処理木材モデル試料からの供試菌 DNA 増幅

DNA抽出用試料	薬剤吸収量 (kg/m <sup>3</sup> )	試験体の質量 減少率 (%)	DNA 増幅の有無	
			PCR	LAMP
ACQ処理木材 (JAS*K4)	5.2 >	0 **	+	+
		30	+	+
CCA処理木材 (JAS*K4)	1.5 >	0**	+	+
		30	+	+
クレオソート処理木材 (JAS*K5)	170 >	0 **	+	+
		30	+	+
無処理(初期)腐朽木材	—	0 **	+	+
		30	+	+
無処理木材	—	0***	—	—

凡例) \* : 日本農林規格 (JAS K4, K5 屋外仕様基準 : 1996, 2006, 2013) ,

\*\* : 質量減少が認められない腐朽初期保存処理木材モデル試料,

\*\*\* : 菌糸未曝露のコントロール試験体

## 参考文献

- 1) Willson, I. G. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3741-3751 (1997).
- 2) Nishimura, K., Shimada, K., Iwasawa, H., Naganuma, T. and Uzaka, Y. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(7), 1563-1566 (2002).
- 3) E.スヨストローム、近藤民雄監訳：“木材化学”，88-89 (1983).
- 4) 近藤民雄：「心材形成の化学」，*化学と生物* 13 (11) 691-697 (1975).
- 5) White, T. J., T. Buruns, S. Lee and J. Taylor : *PCR protocols*. Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, White, T. J. Academic Press, San Diego, 315-322 (1990).
- 6) Moreath, U. and Schmidt, O. : Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction, *Holzforschung* 54, 1-8 (2000).
- 7) 川上文清，北林雅夫，黒坂敏弘，小松原秀介：“細胞工学 別冊 改訂 PCR Tips”，真木寿治 監修，秀潤社，1997，pp.190-193

## 第5章 歴史的木造建築物の分子生物学的手法による調査

### 5.1 緒言

北海道のような寒冷地における木造建築物の優位性の一つとして、レンガや石造の建築物に観察されるような凍上現象<sup>1)</sup>による物理的劣化の影響が小さいということが挙げられる。その反面、結露の発生等による部材への水分供給により生物劣化（担子菌による腐朽）が発生しやすい環境にあるため、木造建築物の保存対策としては、劣化が拡大する前に担子菌の部材への侵入・活動を的確に把握し、適切な処置を施すことが重要となる<sup>2)</sup>。しかし、序論で述べたとおり、近年の技術革新にともない菌類のゲノムや遺伝子発現等に関わる調査研究が飛躍的に進み、迅速かつ客観的な担子菌のモニタリングを可能とする技術ベースが形成されつつあるのに対して、実際の木造建築物の保存現場における応用・普及については大きな進展が見られないのが現状である。このような状況下、木造建築物の劣化調査の際には、いまだに目視や触診による主観的な判断基準に依存せざるを得ない状況が継続している。特に屋外で展示・保存されている木造建築物については、施設内で展示・保存されている木造文化財と比較し、環境からの激しい物理的・生物的劣化要因にさらされる傾向にある。したがって、施設内の木造文化財と比較して、屋外に設置されている木造建築物には比較的短い周期での定期的な修理・修復が行われることとなる。現在、文化財の修理・修復に関しては、可能な限りオリジナルの部材を失わない形で実施する手法が主流となっているが、すでに劣化が大きく進行している対象については、オリジナル部材の大幅な損失を許容せざるを得ない。一方、現在では年輪年代測定や放射性同位体の測定などの科学的な手法によって建築部材からも考古学的に有用な情報が得られるようになっている

ため<sup>3)</sup>、部材の安易な交換は文化財に隠されている貴重な「情報」を失うことにつながる。

このような損失を避けるためにも、屋外の厳しい環境にさらされている木造建築物の保存にあたっては、予防的保存原則に沿った管理体制の整備が強く求められる。

本研究全体の骨子は、多数の技術的選択肢の内から、木造文化財を実際に取り扱う中小規模施設においても目的に応じて実施可能な汎用性と簡便性、コストパフォーマンスを兼ね備えた担子菌類の高感度検出・モニタリングシステムを構築することである。そこで、本章では、第2章から第4章で得られた結果をふまえ、実際の歴史的木造建築物2棟（旧開拓使工業局庁舎、当麻神社大山祇宮）より採取した木材試料を用いて分子生物学的手法による担子菌の検出・モニタリング調査を実施し、その技術的実用性について検討した。

## 5.2 旧開拓使工業局庁舎における担子菌検出調査

旧開拓使工業局庁舎は明治政府による北海道開拓政策のもと、土木・建築・工業分野の振興を担当した開拓使工業局が明治10（1877）年に建設した木造建築である（Fig. 5.1）。当該庁舎は道内における著名な洋風木造建築である国指定重要文化財の旧札幌農学校演武場（明治11（1878）年竣工）、豊平館（明治13（1880）年竣工）に先立つ歴史を有するとともに、明治6（1873）年に建設された開拓使札幌本庁舎が明治12（1879）年に焼失した後は、開拓使時代に建設・使用された事務所建築として現存する唯一の遺構となっている<sup>4)</sup>。また、建築技術面からは、ペンキ塗りの下見板、シングル葺きの寄棟屋根、フード付きの上げ下げ窓、玄関ポーチの破風飾りなど、建築デザインのパターンブックに則った19世紀後半におけるアメリカ建築の特徴がよく残されている<sup>5,6)</sup>。したがって当該庁舎は



Fig. 5.1 旧開拓使工業局庁舎（1877年創建）

貴重な文化財として、北海道の開拓史および日本の近代建築史を研究する上で高く評価されている。

当該庁舎は明治 15（1882）年の開拓使廃止後、将校集会所や民間団体の事務所、校舎などとして使用された後、昭和 54（1979）年からは道立野幌森林公園内にある「北海道開拓の村」に移築、屋外展示されている。当建築に関しては移築 12 年後の平成 3（1991）年に初回のメンテナンス工事が計画され、外壁下見板の補修、外壁下地補修、防水工事、内部壁の張り替え、創建時色彩の復元などが実施された<sup>4)</sup>(Fig. 5.2, Fig. 5.3)。その後、18 年が経過し建物に広範な劣化が確認されるようになったため、平成 21（2009）年には

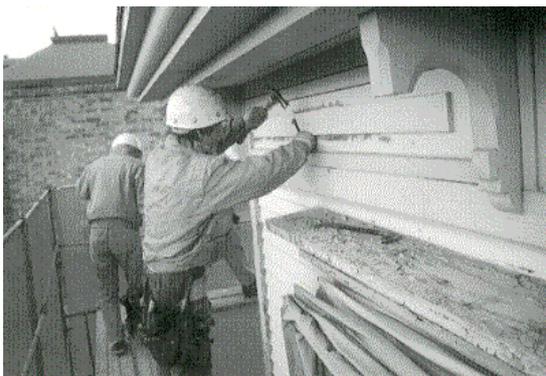


Fig. 5.2 第1回目のメンテナンス工事例<sup>4)</sup>  
(外壁下見板の補修:1991年)



Fig. 5.3 第1回目のメンテナンス工事例<sup>4)</sup>  
(窓まわりの防水シーリング:1991年)



Fig. 5.4 第2回目のメンテナンス工事例  
(オリジナル隅柱部材の切断交換:2009年)



Fig. 5.5 第2回目のメンテナンス工事例  
(窓枠部材、下見板の交換:2009年)

木部の交換を含めた比較的大規模な 2 回目のメンテナンス工事が実施され、腐朽部位が新しい木材に交換されている (Fig. 5.4, Fig. 5.5)。

本調査では平成 21 (2009) 年度に実施された 2 回目の補修工事に伴い、腐朽部位を含んだ部材をサンプルとして収集し、木材組織の観察、PCR 法を用いた遺伝子分析による担子菌の検出を行い、木造文化財の保存修復における分子生物学的手法の実用性について検証した。

## 5.2.1 調査方法

### 5.2.1.1 木材サンプルの収集

補修工事（工期：2009年8月13日から10月26日）における木部解体作業の際に確認された、明瞭な腐朽被害部位を有する部材をその周辺の健全部位とともに収集し、観察・分析用の木材サンプルとした。木材サンプルについては、収集した直後に観察・分析を実施した。

### 5.2.1.2 木材サンプルの劣化診断

収集した木材サンプルについて、従来法（目視、打診、触診）<sup>7)</sup>による劣化部位の診断を行い、腐朽部位と健全部位の判定を行った。

### 5.2.1.3 供試試料の調製

木材サンプルの一部をメスにより切り出したもの（窓台）、あるいは木材サンプルを直径6 mmの木工用ドリルで穿孔し得られた切削物（隅柱）を木材組織観察および遺伝子分析に供した。なお、ドリル穿孔については試料間でのコンタミネーションを避けるため、1回の穿孔ごとにドリルビットを交換した。

### 5.2.1.4 木材組織の観察

#### a) 光学顕微鏡による観察

供試試料からプレパラートを作成し、光学顕微鏡(BH-2 オリンパス光学工業株式会社)を使用して木材組織の観察を行った。

#### b) 走査型電子顕微鏡による観察

供試試料を50%アセトンで洗浄した後、液化炭酸ガスによる臨界点乾燥(JCPD-5

日本電子株式会社) にかけた。乾燥試料を直径 10 mm の真鍮製ステージに載せ、イオンスパッタリング装置 (JFC-1100E 日本電子株式会社) を用いて、表面に金蒸着を施した (条件: 10 mA、3 分間)。蒸着処理した試料を走査型電子顕微鏡 (JSM-5200 日本電子株式会社、以下 SEM) によって観察した (加速電圧 15 kv)。

## 5.2.2 遺伝子分析による担子菌の検出

### 5.2.2.1 DNA の抽出

本章において DNA の抽出は前章までの SDS-フェノール法と比較し、劇薬のフェノールを使用せず、かつ同等純度の核酸抽出が可能であった Murray の CTAB 法<sup>9)</sup>を改変して行った。供試試料 0.05~0.1 g を 2 mL 容の微量遠心チューブに採り、600  $\mu$ L の 2 $\times$ CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 液 (100 mmol/L Tris (Tris (hydroxymethyl) aminomethane) HCl (pH8.0)、1.4 mol/L NaCl、20 mmol/L EDTA、2% CTAB、0.2%  $\beta$ -メルカプトエタノール) を加え、65  $^{\circ}$ C で 1~2 時間 インキュベートした。この液に等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24: 1, v/v) を加えて攪拌した後、遠心分離 (14,000 rpm、15 分間: himac-CR15D, (株) 日立) を行い、水層を新しい微量遠心チューブに回収した。回収した水層に対し、等量の冷却したイソプロピルアルコールを加えて攪拌した後、10 分間静置し核酸を沈殿させた。この液を遠心分離 (14,000 rpm、10 分間: himac-CR15D, (株) 日立) した後、上清を捨て 70% エタノール 1000  $\mu$ L を加えて沈殿を洗浄した。再度、遠心分離 (14,000 rpm、2 分間: himac-CR15D, (株) 日立) を行い、上澄みを捨て、沈殿物を TE 緩衝液 (10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、pH8.0) 50  $\mu$ L に溶解した。この溶液をスピンカラム (DNeasy Plant Kit, QIAGEN) を用いて精製し、DNA 試料として用いた。

#### 5.2.2.2 PCR 分析

供試試料（木材）中に含まれる少量の担子菌を検出するため、ゲノム内でコピー数が多い rDNA 領域（18S および 28S rRNA 遺伝子間）を PCR 増幅の標的として選択した。プライマーにはユニバーサルプライマー（ITS1、ITS4）<sup>9)</sup>と比較し、担子菌のゲノム DNA に対してより特異性の高い ITS1-F（5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3' : Foward 側）、および ITS4-B（5'- CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG -3' : Reverse 側）のセット<sup>10)</sup>を用いた。

PCR 反応は 1.25 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ (Takara Ex Taq、宝酒造株式会社)、0.5 mol/L のプライマー (Foward、Reverse) を含む、最終濃度を 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol/L dNTPs に調製した 25  $\mu$ L の溶液中で実施し、鋳型として 1  $\mu$ L の DNA 試料溶液を用いた。

増幅は(1)熱変性 (90 °C、30 秒)、(2)アニーリング (55 °C、30 秒)、(3)伸長反応 (72 °C、30 秒)を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル、サーマルサイクラー (Gene Atlas、ASTECC 株式会社) を用いて行った。なお、最初のサイクルの熱変性は 2 分間、最後のサイクルの伸長反応は 5 分間に延長して行った。

PCR 終了後の反応液 8  $\mu$ L を 1.6  $\mu$ L のローディングバッファーと混合し、エチジウムブロミドを加えた 1.5 %アガロースゲルによる電気泳動（電気泳動装置 : Mupid-2、コスモバイオ株式会社、バッファー : TBE）にかけた。泳動終了後、UV トランスイルミネーター上でゲルに紫外線を照射し、担子菌に由来する DNA バンドの確認を行った。さらに、得られた増幅産物のうち、明瞭なシングルバンドが得られたものについてはその増幅産物を鋳型と

して、ITS1-F と ITS4-B プライマーを用いた PCR ダイレクトシーケンス (ABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer、AB 社) を実施し、rDNA の ITS 領域について塩基配列を決定した (両鎖解析)。決定された塩基配列データに対し NCBI (National Center of Biotechnology Information) の BLAST (Basic Alignment Search Tool) プログラムを用いて相同性検索を行った。次に GenBank に登録されているデータより相同性の高い担子菌種の塩基配列を抽出し、本研究で得られた塩基配列データに対して CLUSTAL W プログラムを使用して MSA (Multiple Sequence Alignment) を実施した。

### 5.2.3 結果および考察

#### 5.2.3.1 木材サンプルの収集と劣化診断

本研究においては 5.2.1.1 の基準に則り、明確な腐朽部位と健全部位が含まれる南西面の隅柱と西面の窓枠下の部材 (以下、窓台) から木材サンプルを収集した (Fig. 5.6)。収集部位の外観を Fig. 5.7 および Fig. 5.8 に示す。

収集した木材サンプルについて、目視、打診、触診による劣化部位の診断を行った結果、典型的な褐色腐朽菌による劣化 (褐色腐朽) が確認された。特に隅柱の下部と窓台の上部においては、材色の褐変、弾力性の欠如とともに、縦横に発生した大きな亀裂による木材組織の崩壊が観察された (Fig. 5.9、Fig. 5.10)。

一般的に、担子菌は含水率が繊維飽和点 (25~35 %、平均 28 %) 以上に達している木材に対して腐朽活動を開始する<sup>7)</sup> (*Serpula lacrymans* など一部の乾腐菌を除く)。当該建築において隅柱下部と窓台上部は、壁からの張り出し構造 (隅柱: 胴蛇腹、窓台: 窓枠) に

近接しているため、降雨や雪による水分が滞留しやすい構造となっている。今回、上記部位で大きな腐朽が認められたのは、外部より供給された水分が張り出し構造によって滞留し、木材の含水率が上昇したことに起因するものと考えられる。劣化診断を実施した木材サンプルについては、健全部位と劣化部位に識別した。その中で既にメンテナンスが不可能な状態となっている組織崩壊部を除外した劣化部位（以下、腐朽部位）と健全部位を以降の観察・分析に供した。

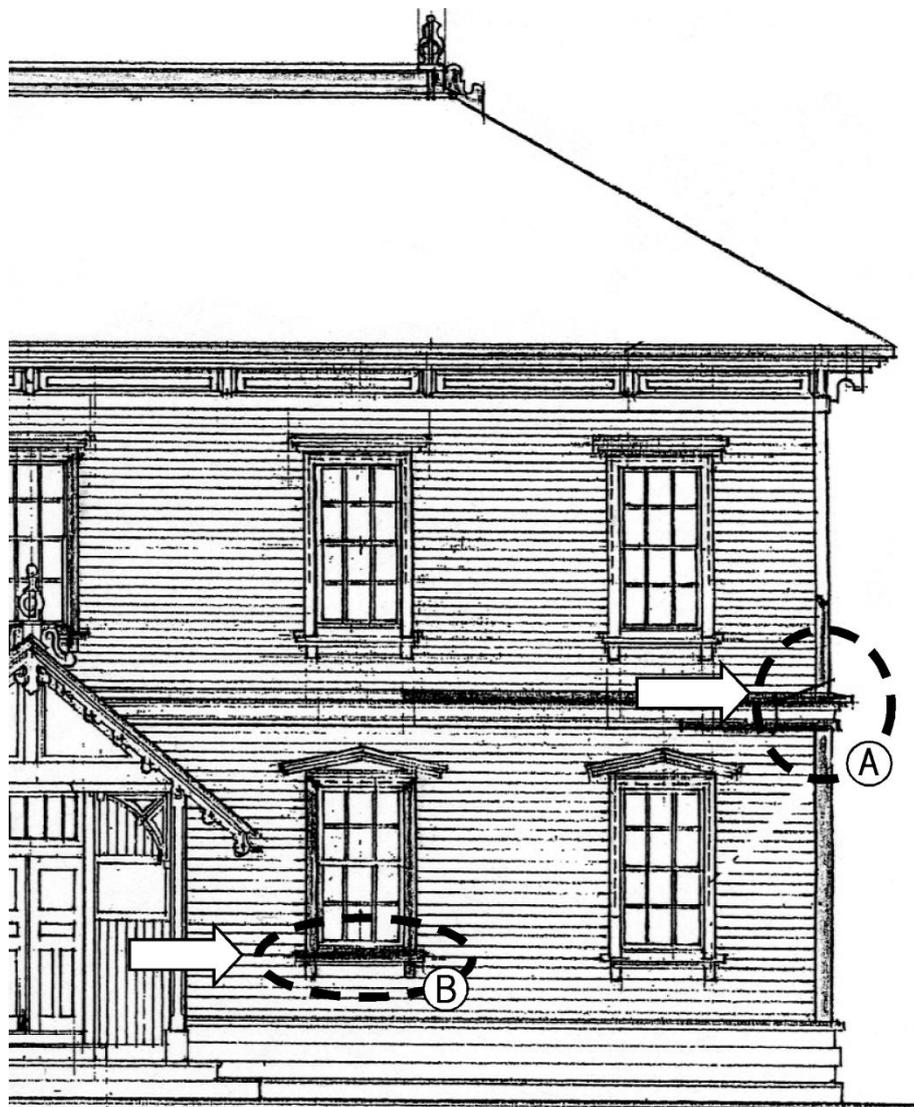


Fig. 5.6 木材サンプル収集部位<sup>4)</sup>

凡例) A: 隅柱, B: 窓台



Fig. 5.7 木材サンプル収集部位（隔柱）



Fig. 5.8 木材サンプル収集部位（窓台）

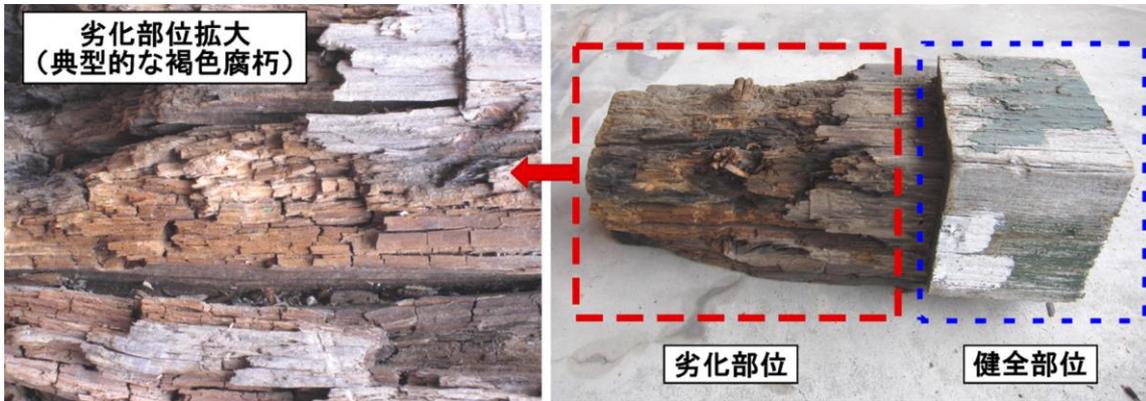


Fig. 5.9 目視・打診・触診による木材サンプルの劣化診断（隔柱）

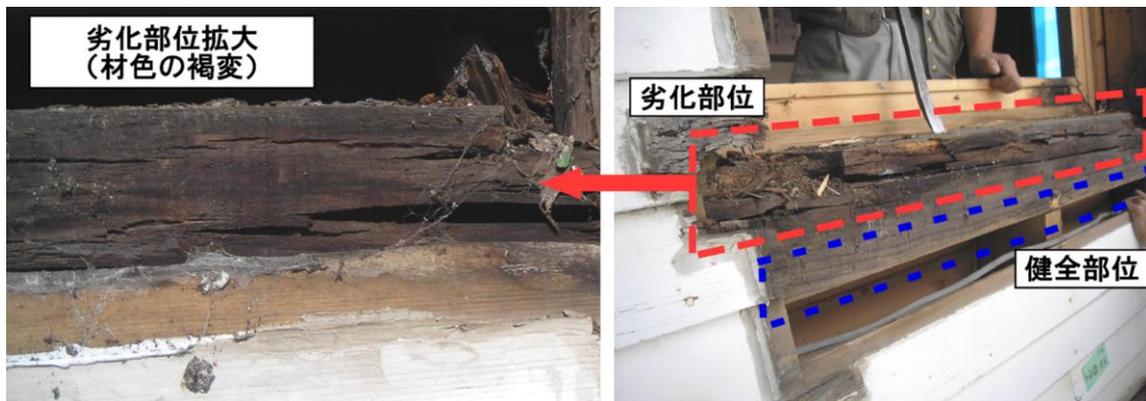


Fig. 5.10 目視・打診・触診による木材サンプルの劣化診断（窓台）

### 5.2.3.2 光学顕微鏡による木材組織の観察

光学顕微鏡を用いて木材組織を観察した結果、隅柱、窓台の腐朽部位から得られた試料については担子菌特有のクランプ（かすがい連結）を有する菌糸が広範に認められた（Fig. 5.11、Fig. 5.12）。また、目視・打診・触診によって明確な劣化が認められなかった健全部位から得られた試料の一部についても、組織内に侵入している担子菌の菌糸が確認された（Fig. 5.13、Fig. 5.14）。

一般的に腐朽の初期状態においては、木材の外観に大きな変化が認められないため、健全な部位と腐朽部位を判別することは困難とされている。今回の結果は既報<sup>2)</sup>と同様、担子菌による生物劣化部位の把握に対する従来の劣化診断法（目視・打診・触診）の限界を支持するものであった。

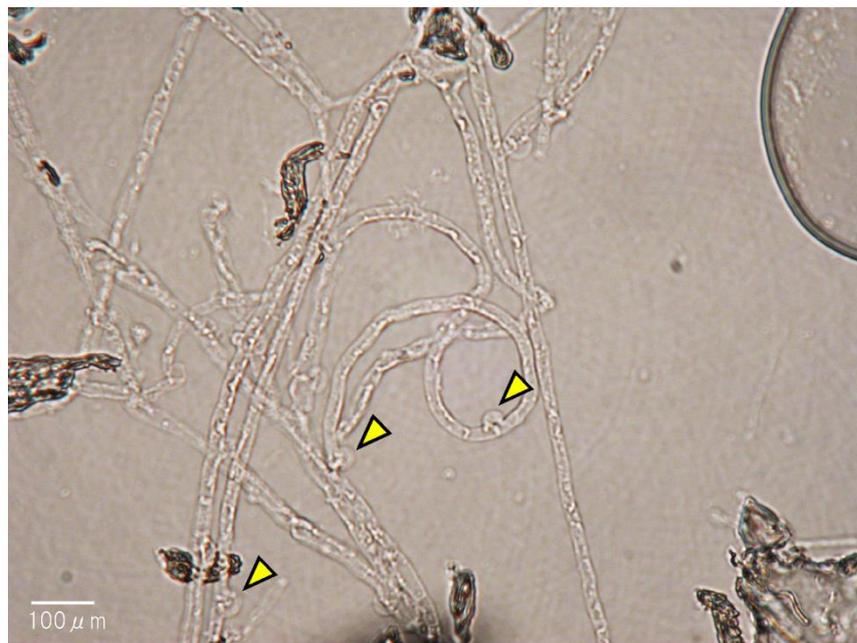


Fig. 5.11 劣化部位の光学顕微鏡観察画像（隅柱）  
注）矢頭：担子菌のクランプ

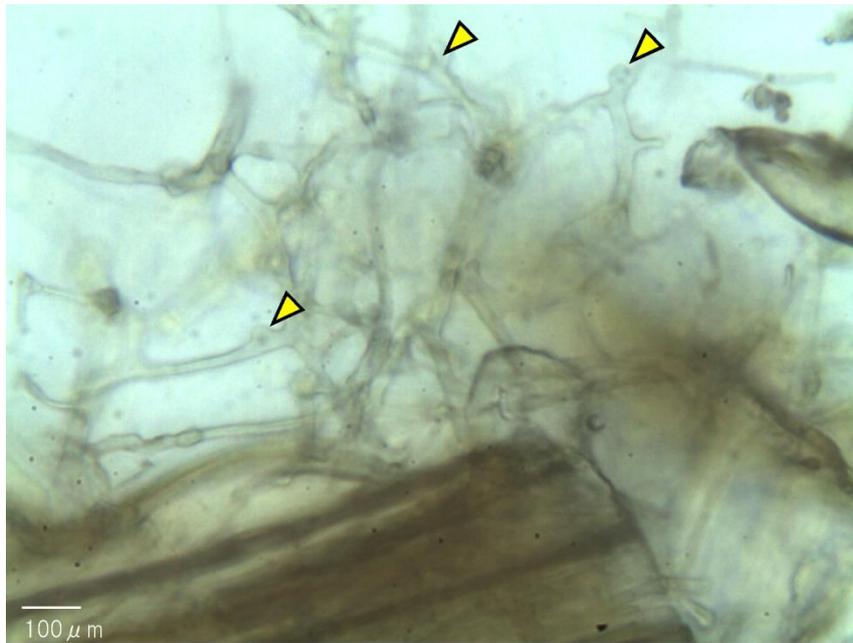


Fig. 5.12 劣化部位の光学顕微鏡観察画像（窓台）  
注）矢頭：担子菌のクランプ

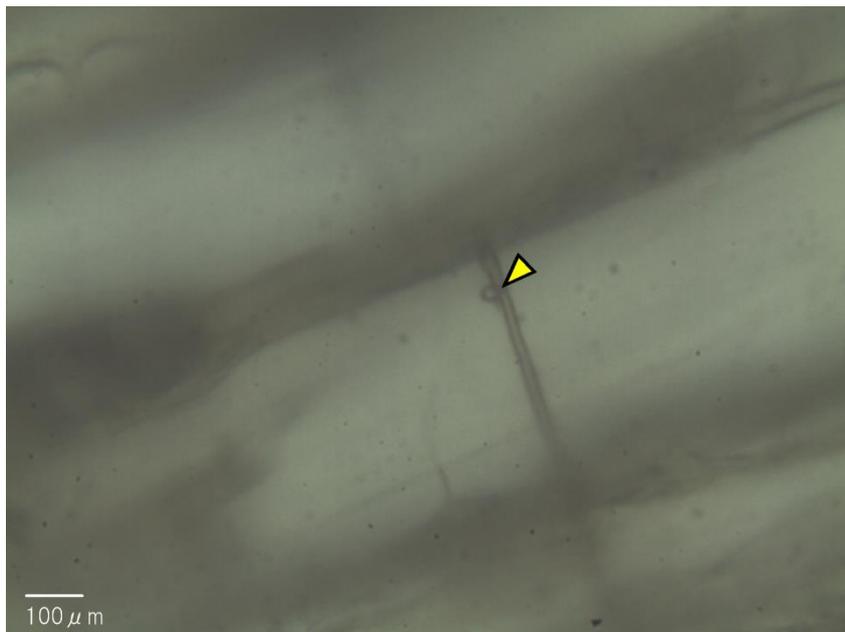


Fig. 5.13 健全部位（目視・打診・触診による）の光学顕微鏡観察画像（隅柱）  
注）矢頭：担子菌のクランプ

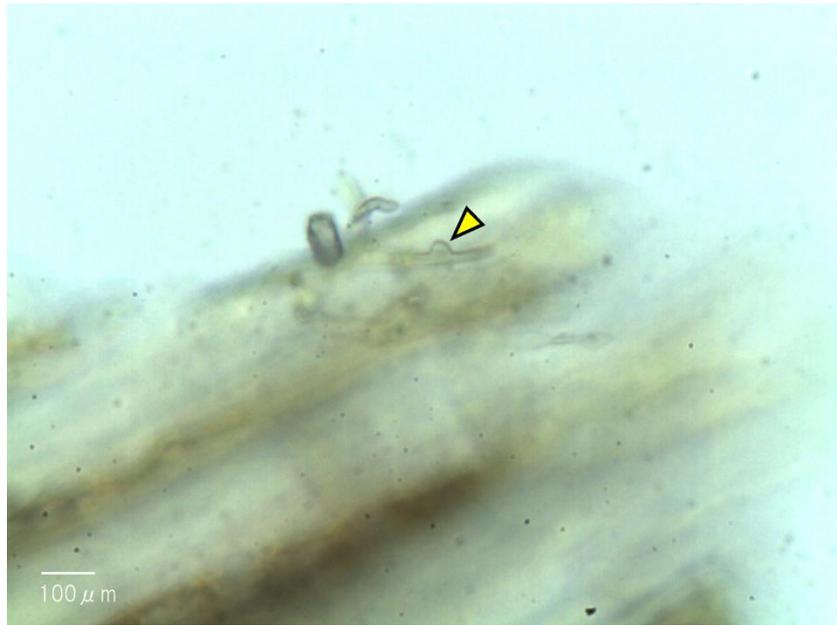


Fig. 5.14 健全部位（目視・打診・触診による）の光学顕微鏡観察画像（窓台）  
注）矢頭：担子菌のクランプ

### 5.2.3.3 走査型電子顕微鏡（SEM）による木材組織の観察

隅柱、窓台の腐朽部位から得られた試料の SEM 観察像を Fig. 5.15 および Fig. 5.16 に示す。腐朽部位に関しては、木材組織内に高密度で蔓延する菌糸がすべての試料において観察された。また、光学顕微鏡観察によって担子菌の菌糸が観察された、目視・打診・触診によつては明確な劣化が認められなかった健全部位の試料についても、菌糸の侵入を確認することができた（Fig. 5.17、Fig. 5.18）。さらに SEM による組織観察の結果、健全部位のうち光学顕微鏡観察で菌糸が確認されなかった供試試料の一部についても明瞭な菌糸の侵入が生じていることが明らかとなった（Fig. 5.19、Fig. 5.20）。

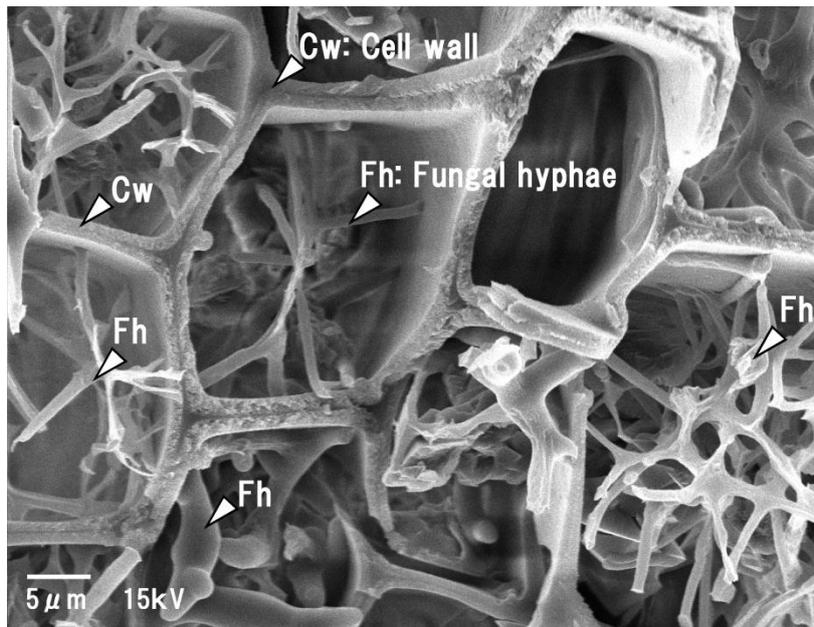


Fig. 5.15 劣化部位の SEM 観察画像（隅柱）  
凡例) Fh : 菌糸 Cw : 木材細胞壁

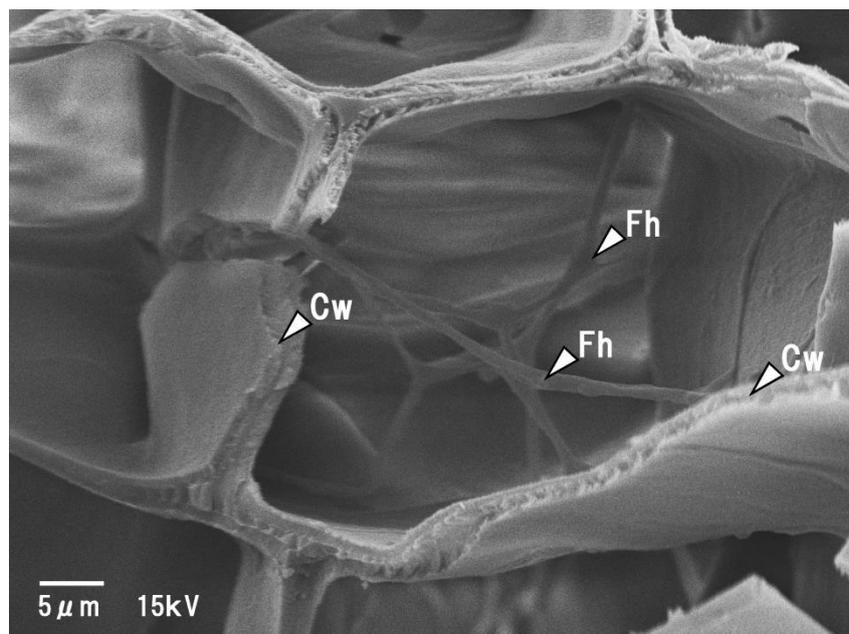


Fig. 5.16 劣化部位の SEM 観察画像（窓台）  
凡例) Fh : 菌糸 Cw : 木材細胞壁

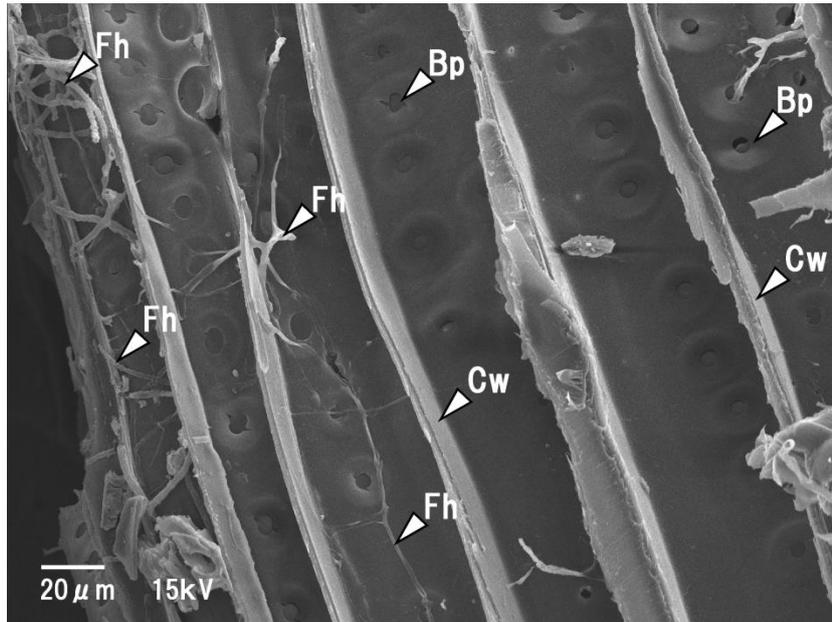


Fig. 5.17 健全部位（目視・打診・触診による）のSEM観察画像（隅柱）  
 凡例）Fh：菌糸 Cw：木材細胞壁 Bp：有縁壁孔

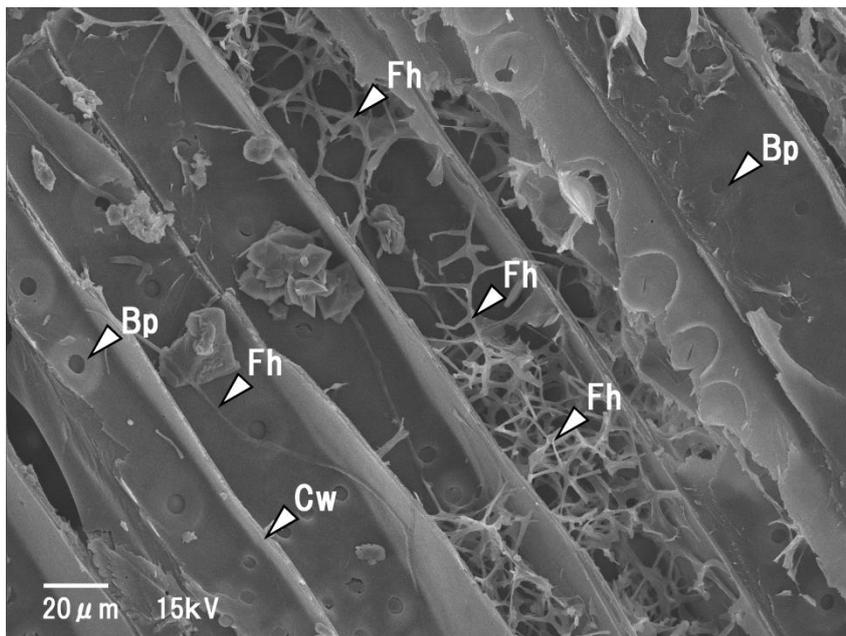


Fig. 5.18 健全部位（目視・打診・触診による）のSEM観察画像（窓台）  
 凡例）Fh：菌糸 Cw：木材細胞壁 Bp：有縁壁孔

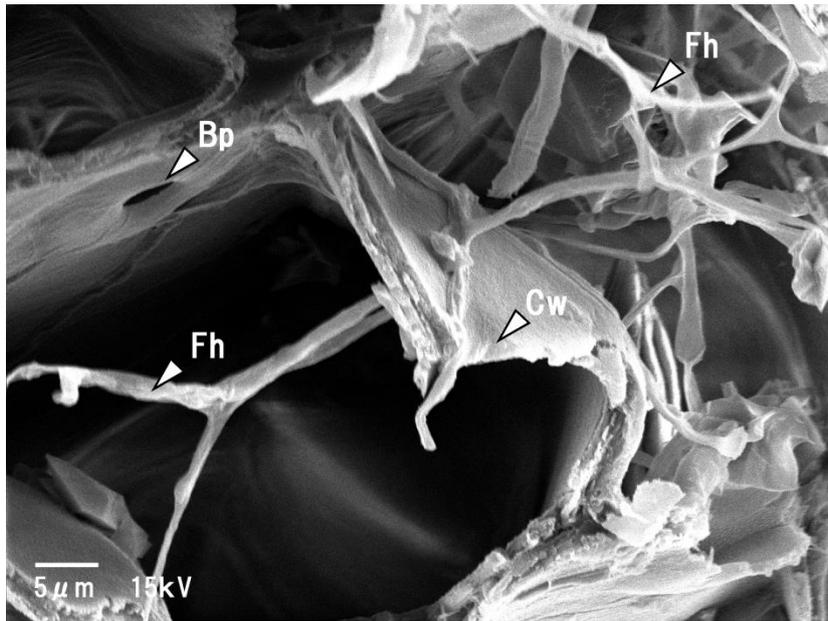


Fig. 5.19 健全部位 (光学顕微鏡観察による) のSEM 観察画像 (隅柱)  
 凡例) Fh : 菌糸 Cw : 木材細胞壁 Bp : 有縁壁孔

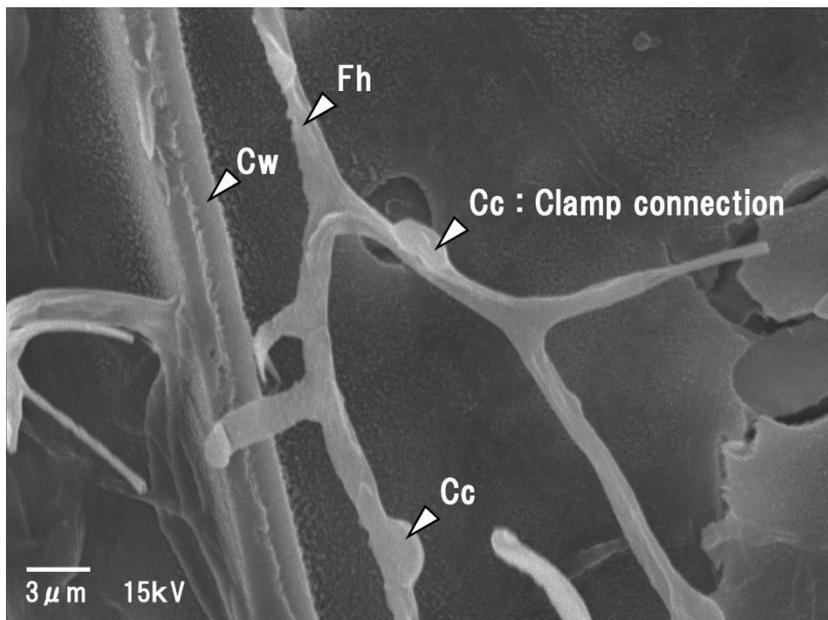


Fig. 5.20 健全部位 (光学顕微鏡観察による) のSEM 観察画像 (窓台)  
 凡例) Fh : 菌糸 Cc : クランプ Cw : 木材細胞壁

#### 5.2.3.4 遺伝子分析による担子菌の検出

腐朽部位と健全部位から抽出した DNA を鋳型とし、担子菌に特異性の高いプライマーを用いて PCR を行った結果の例を Fig. 5.21、Fig. 5.22 および Fig. 5.23 に示す。本研究においては、従来法（目視、打診、触診）によって腐朽部位と診断された試料より抽出した鋳型のすべてから、担子菌由来と考えられる明瞭なバンドが PCR 反応によって増幅された。また、従来法では明確な劣化が認められないが、光学顕微鏡や SEM による観察で菌糸の侵入が観察される試料についても同様に担子菌特異的プライマーによって DNA の増幅が確認された (Fig. 5.21)。さらに従来法、光学顕微鏡・SEM 観察によって明確な劣化や菌糸の侵入が把握できなかった健全部位試料の一部についても、担子菌特異的プライマーによって増幅が確認されることが明らかとなった (Fig. 5.22、Fig. 5.23)。なお、今回の分析においてはプライマーダイマーなどの影響による偽陽性バンドの発生は認められていない。上記の結果より、従来法、光学顕微鏡・SEM 観察と比較し、PCR を応用した遺伝子分析が担子菌の高感度検出にとって有効な手段となりうることが明らかとなった。

また、今回の遺伝子分析においては、異なる試料採取箇所からサイズの異なる PCR 増幅産物が得られた。この結果は今回供試した木材サンプルに対して複数種の担子菌が侵入していることを示唆するものと考えられる。

明瞭なシングルバンドとして得られた PCR 増幅産物について、ITS1-F と ITS4-B プライマーを用いてダイレクトシーケンスを実施し、rDNA の ITS 領域について塩基配列を決定した結果、最終的に 4 パターンの塩基配列情報が得られた。これらの塩基配列情報を

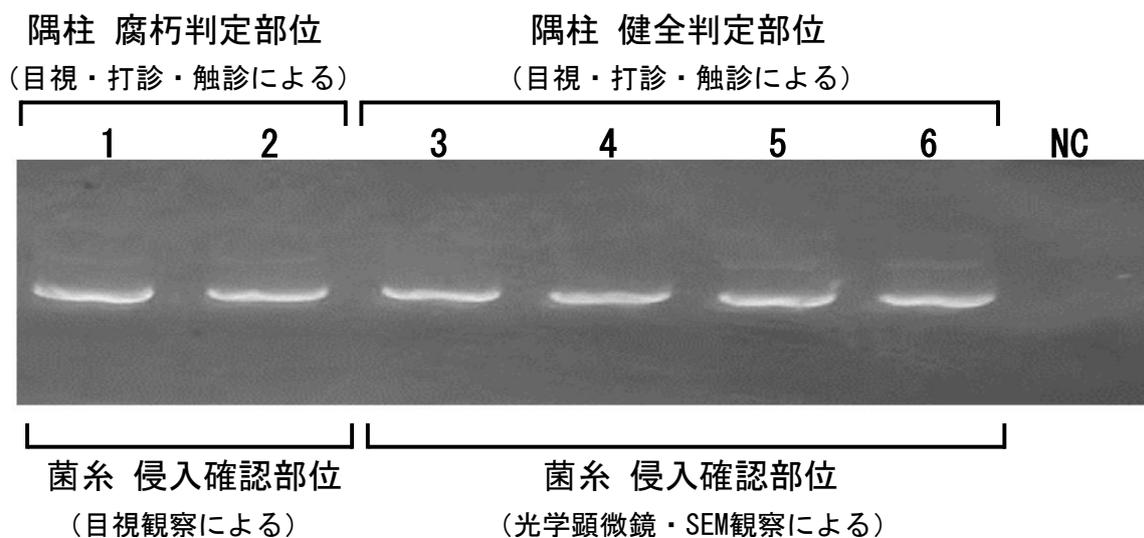


Fig. 5.21 腐朽部位と健全部位（目視・打診・触診による）からの担子菌検出例（隅柱）  
 凡例) 1～2：腐朽部位 3～6：健全部位 NC：コントロール（鋳型 DNA なし）

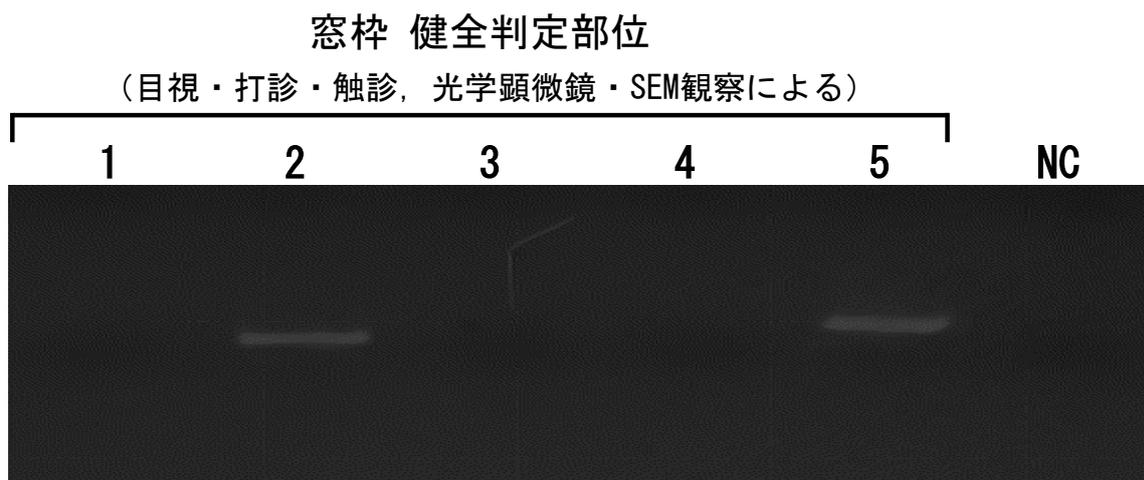


Fig. 5.22 健全部位（目視・打診・触診, 光学顕微鏡・SEM 観察による）からの担子菌検出例（窓台）  
 凡例) 1～5：健全部位 NC：コントロール（鋳型 DNA なし）

## 隅柱 健全判定部位

(目視・打診・触診, 光学顕微鏡・SEM観察による)

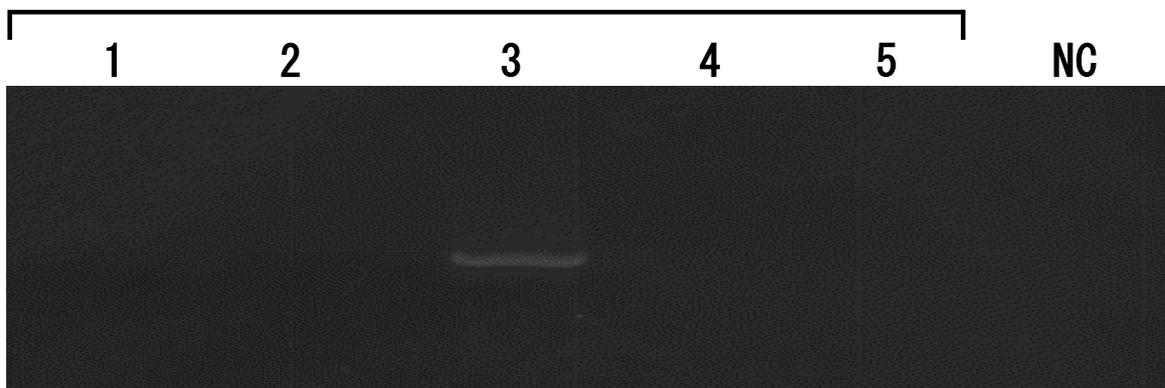


Fig. 5.23 健全部位 (目視・打診・触診, 光学顕微鏡・SEM 観察による) からの担子菌検出例 (隅柱)

凡例) 1~5: 健全部位 NC: コントロール (鋳型 DNA なし)

用いて GenBank に登録されている国際 DNA データベースに対し相同性検索を実施し、相同性の高い配列について MSA (Multiple Sequence Alignment) を行った結果を Table 5.1 に示す。

今回実施した配列解析の結果、窓台から採取された試料については A 配列 (領域全長: 626bp)、B 配列 (領域全長: 633bp)、および C 配列 (領域全長: 727bp) の合計 3 種類の塩基配列情報が得られたため、窓台には少なくとも 3 種類の担子菌が侵入していることが明らかとなった。各配列について相同性検索を行い、配列情報を抽出した上 MSA を実施した結果、A 配列については *Gloeophyllum trabeum* (ACCESSION No.: JF682771, AJ420949, GQ337913) と高い相同性が示された。DNA 塩基配列解析による生物種の同定については Peterson ら<sup>11)</sup>、Sugita ら<sup>12-14)</sup>により塩基配列の相同性に基づく同定基準が提案されている。その中で Sugita らは ITS 領域の相同性をゲノムの絶対的同定基準である

染色体 DNA-DNA 交雑実験に基づく DNA 相同値と比較した結果、同一種内の変種以上の関係において ITS 領域の相同性は約 99%以上であり、別種はそれ未満であることを報告している。今回得られた A 配列は *Gloeophyllum trabeum* の配列と保存性の高い 5.8S rRNA 遺伝子領域では 100 %完全一致し、変異性の高い ITS1 領域、ITS2 領域においても 99~100%の相同性を有している（調査領域全体の相同性：99~100%）。従って上記の基準を適用することにより、窓台に侵入している A 配列を有する担子菌は *Gloeophyllum trabeum* である可能性が高いと考えられる。B 配列については *Sistotrema brinkmannii* (ACCESSION No. : DQ093737, AF506473, AY089729) の塩基配列と 5.8S rRNA 遺伝子領域で 100%、ITS1 領域および ITS2 領域で 99~100%の相同性を有する（調査領域全体の相同性：99%）ことにより、窓台に侵入している菌種の一つは本種である可能性が高い。また、C 配列に関しては *Coniophora puteana* (ACCESSION No. : AB592334, AY736025, GU187521) の塩基配列と 5.8S rRNA 遺伝子領域で 100%、ITS1 領域および ITS2 領域で 99~100%の相同性が得られた（調査領域全体の相同性：99%）。

隅柱から採取された試料については、全て同一の D 配列情報（領域全長：667bp）が得られた。相同性検索と MSA を実施した結果、得られた塩基配列は *Fibroporia gossypium* (ACCESSION No. : HM590881, GU991576, HM590880) と高い相同性を有し、保存性の高い 5.8S rRNA 遺伝子領域において HM590880 とトランスバージョン型の点突然変異が 1 箇所確認されたものの、領域の相同性は 99~100 %、変異性の高い ITS1 領域で 99 %、さらに ITS2 領域においては 100 %一致することが示された。従って隅柱に侵入している担子菌については *Fibroporia gossypium* である可能性が高いと考えられる。さらに隅柱

Table 5.1 塩基配列の相同性解析

採取 部材	配列 記号	比較 担子菌種	ITS1		5.8SrRNA		ITS2		全領域	
			サイズ(bp)	相同性(%)	サイズ(bp)	相同性(%)	サイズ(bp)	相同性(%)	サイズ(bp)	相同性(%)
	A	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	210	99~100	157	100	259	100	626	99~100
窓台	B	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	198	99~100	157	100	278	99~100	633	99
	C	<i>Coniophora puteana</i>	244	99~100	158	100	325	99~100	727	99
隅柱	D	<i>Fibroporia gossypium</i>	233	99	157	99~100	277	100	667	99

注) *Gloeophyllum trabeum* : ACCESSION No.JF682771, AJ420949, GQ337913  
*Sistotrema brinkmannii* : ACCESSION No.DQ093737, AF506473, AY089729  
*Coniophora puteana* : ACCESSION No.AB592334, AY736025, GU187521  
*Fibroporia gossypium* : ACCESSION No.HM590881, GU991576, HM590880

腐朽部位の表面に付着している菌糸試料より抽出した DNA について調査を行ったところ、隅柱本体から採取された試料と同一の塩基配列情報 (D 配列) が得られ、調査時において当該部材の腐朽劣化には *Fibroporia gossypium* と推測される種が支配的に関与しているものと考えられる。

本研究の結果、窓台の部材については *Gloeophyllum trabeum*、*Sistotrema brinkmannii*、*Coniophora puteana* の 3 種と推測される褐色腐朽菌の侵入が確認された。*Gloeophyllum trabeum* は和名でキチリメンタケと称され、木造建築物に発生する代表的な木材腐朽菌の 1 種である<sup>2,7)</sup>。本種は過去の調査において旭川市や札幌市内の木造神社建築・住宅において棟木、野地板、窓枠、柱などの部材に激しい腐朽を引き起こすことが報告されている<sup>15,16)</sup>。また杉山は同報告において *Gloeophyllum trabeum* が優占種として腐朽部材広範に

確認される状況下で *Sistotrema brinkmannii* が同一部材より検出されることを示した<sup>15)</sup>が、本研究においても近接した同一の部材より上記 2 種と推測される担子菌が同時に確認される結果が得られた。これらの結果は *Gloeophyllum trabeum* と *Sistotrema brinkmannii* の 2 種が腐朽という木材の分解過程において何らかの相互関係を有している可能性を示唆するもので、本研究のような遺伝子を指標とした担子菌の同定は今後、このような現象を解明する上での有効なアプローチとなるものと考えられる。さらに今回、窓台の部材からは、北方圏において *Serpula lacrymans* (ナミダタケ) とともに住宅の土台、梁、柱（特に床下の部材）などに大きな腐朽被害を及ぼす担子菌として広く知られている *Coniophora puteana* (イドタケ) と推測される種が検出された。木造建築の保存管理上、重要な制御対象である本種<sup>17)</sup>の検出は、その移入経路、拡大・分散傾向の有無を把握し、今後の保存計画を策定する上で重要な情報を提供するものである。

隅柱の部材については褐色腐朽菌の 1 種である *Fibroporia gossypium* と推測される種の侵入が確認された。本種はヨーロッパなどで発生が認められているが<sup>18)</sup>、日本ではこれまでに報告されていない種である。本研究において、*Fibroporia gossypium* と推測される種が激しい腐朽が観察された部材から単一で検出されたことは、北海道の木造建築物の保存にとって有益な知見であり、今後、本種の分布、腐朽開始条件（温度、湿度、木材含水率、酸素濃度、pH など）、生理学的性質、他種との相互関係、*Serpula lacrymans* に認められるような土壌とのかかわりの有無、薬剤への耐性などについて詳細な調査の実施が求められる。本研究で示されたように実地調査によって新たな担子菌種が確認された場合、当該種に対する種特異的プライマーの設計、データベース化は将来的な歴史的木造建築物保存対策

の策定に大きく寄与するツール、情報となるものと考えられる。

また、本研究において窓台と隅柱で異なる菌叢（種）が認められたことは、屋外における木造文化財の腐朽による劣化過程に複数の木材腐朽菌が複合的に関与していることを実際に示すものである。この現象は各部材の構成（樹種、塗装・薬剤処理の有無など）や設置されている環境の履歴（温度・湿度の変動パターンなど）と密接な関係があるものと推測される。従って各部材に発生する菌叢の継続的なモニタリングは、実施したメンテナンスによる改善効果およびその持続性を確認する上で有益な情報を提供するものと考えられる。

#### 5.2.3.5 遺伝子を指標とする担子菌検出法の実地調査における有効性

木材の腐朽様式は褐色腐朽菌による褐色腐朽、白色腐朽菌による白色腐朽、軟腐朽菌による軟腐朽に大別される。この中で今回、当該庁舎の部材に被害をおよぼしている褐色腐朽菌については、白色腐朽菌、軟腐朽菌と比較し、建築部材として使用されることが多い針葉樹材を特に劣化する傾向があるため<sup>7)</sup>、木造建築物の維持管理上、重要な制御対象生物として位置づけられている。また、他の二者と異なり、木材の主要成分のうちでリグニン分解能をほとんど有さず、木材組織の骨格であるセルロースやヘミセルロースなどの多糖類を選択的に分解するため、侵入後の初期段階において部材に急速な強度低下を引き起こすことが指摘されている<sup>19-22)</sup>。

したがって、歴史的木造建築物において褐色腐朽菌によってもたらされる急速かつ甚大な腐朽被害をコントロールするためには、木材組織の強度が失われる以前にその侵入範囲を正確に把握し対処しなくてはならない。

本研究結果では目視、触診、打診で把握できない菌糸の侵入を光学顕微鏡・SEM 観察によってある程度捕捉可能であることが明らかとなった。しかし、光学顕微鏡観察では検出感度の問題に加えて、プレパラートの作成、検鏡に手間を要すること、SEM 観察では検出感度は高いが試料調製、検鏡までに時間を要すること、高額な設備を用意する必要があることなどの課題を抱えている。さらに木材組織の観察においては、試料の全平面をあまねく検鏡対象とすることができないため、検鏡試料の作成法、あるいは観察手順によっては、菌糸が侵入している組織に対して偽陰性（健全）の判定を下す過誤を完全に排除することができない。特に偽陰性判定は木材組織に対して菌糸がわずかにしか存在していない侵入初期段階において発生しやすいことが予測される。

これに対して、PCR を用いた分子生物学的な手法は、試料中に含まれている担子菌の微量なゲノム DNA（理論的には 1 分子から）を化学的に抽出し、特異的かつ、指数関数的に増幅することを可能としている。

しかし、DNA 抽出法が異なる PCR 反応においては、抽出元となる試料に含まれている様々な夾雑物が鋳型 DNA の増幅を阻害する事例も報告されている<sup>23)</sup>。それを受け、本研究では第 4 章において木材成分が PCR 反応におよぼす影響を評価するため、*Serpula lacrymans*、*Coniophora puteana* の凍結乾燥菌糸にベイツガ (*Tsuga heterophylla*)、エゾマツ (*Picea jezoensis*)、トドマツ (*Abies sachalinensis*)、カラマツ (*Larix kaempferi*) から調製した気乾心材木粉を菌糸の 10,000 倍の重量比で加え、混合した試料から鋳型 DNA を抽出し、PCR 反応を行った結果、供試菌の DNA が増幅されることを実験的に明らかにした。本調査においても、菌糸が高密度で蔓延している腐朽部位のみではなく、

光学顕微鏡・SEM 観察で健全とされた部位の一部からも担子菌の DNA が増幅され、木材の主成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニン、抽出成分等の夾雑物あるいは担子菌の代謝によるこれらの変性物質による影響を受けず、木材組織内に侵入した極少量の担子菌 DNA を PCR によって安定的に増幅できることが確認された。本調査で採用した分子生物学的手法は、分析時間が短い（全行程 3~4 時間程度）、多検体を一度に取り扱うことが可能、大がかりな設備を要しない、などの利点を有しており、木材組織中に侵入した担子菌を精密に把握するための技術として理想的な条件を備えているものと考えられる。

歴史的木造建築物の部材表面になんらかの異常が発生した場合、それが表面汚染菌や変色菌など、担子菌以外によるものであれば腐朽による強度低下が生じることはない。それに対し発生した異常が担子菌に起因する場合には、発見時点で木材に顕著な劣化が観察されないとしても、以後、急激に部材の強度低下が進行する危険性を常に抱えていることになる。そのため、既に劣化が生じている部材の調査にとどまらず、部材に発生した微生物、あるいは微生物様物質が担子菌であるか否かの判断を予防的に行うことは、過不足のない適切な保存修復を計画する上で重要である。

光学顕微鏡や SEM による観察（形態観察）では菌糸におけるクランプの有無を指標として担子菌とそれ以外の菌を区別することができる。しかし、担子菌の一次菌糸にはクランプが観察されないことに加え、二次菌糸がクランプを持たない種も存在していることから、菌糸の観察結果は絶対的な基準とはなりえない。それに対し、担子菌特異的なプライマーを用いた PCR 分析による担子菌の判定は遺伝子情報を指標とするため、対象が担子菌であるか否かについて明快な解答を提供することが可能である。さらに、DNA 塩基配列の

解析をとおして、担子菌を種レベルで同定することによって、対象となる木造文化財に侵入している担子菌の菌叢やその遷移等について、より詳細な情報を得ることも可能となる。

このように、歴史的木造建築物の生物劣化リスク管理を客観的な情報に基づいて適正に実施していく上で、分子生物学的手法の応用範囲は広く、本調査結果は、歴史的木造建築物に侵入した微量の菌糸を正確に把握し、適切な保存処置を実施する上で、分子生物学的手法の有効性を強く示唆するものと考えられる。

### 5.3 当麻神社大山祇宮における担子菌の生理活性モニタリング調査

当麻神社大山祇宮は明治 26（1893）年、屯田兵第六中隊の杉村清之助が福島県から移住の際、郷里の相馬郡大須村の山神社より大山津見神、木花咲耶姫神の分霊を受け自邸にて奉斎したことに始まる。その後、昭和 5（1930）年に当麻町中央一区（現：当麻町指定文化財 旧当麻神社跡丘陵地）に社殿を移し、昭和 12（1937）年には腐朽による劣化が進んだため、社殿が新築された。続いて昭和 32（1957）年に当麻神社本殿が当麻町柏ヶ丘に移転した 1 年後には、当該社殿も同地に移築され現在に至っている<sup>24)</sup>。特に二手先千鳥唐破風造り様式で製作された木造の社殿は北海道における希少な例であり、地域にのこされた文化財として、昭和初期の神社建築史を研究する上でも高く評価されている。



Fig. 5.24 覆屋内の当麻神社大山祇宮（1937 年竣工）

また、当該社殿は部材各所に顕著な腐朽が確認されたため、平成 18（2006）年に覆屋内に移送・安置されている（Fig. 5.24）。

本研究では平成 18（2006）年度に実施された社殿の劣化調査に伴い、屋根野地板の腐朽部材をサンプルとして収集し、LAMP 法を用いた遺伝子分析による担子菌の検出および RT-LAMP 法を用いた生理活性モニタリング調査を行い、その実用性について検証した。

### 5.3.1 調査方法

#### 5.3.1.1 木材サンプルの収集

目視およびドライバー刺突による触診により確認された屋根野地板の腐朽部位を収集し分析用の木材サンプルとした（Fig. 5.25）。サンプリングは 2006 年 5 月および同年 11 月の 2 回に分けて実施し、同一部材の同一領域から木材を収集した。木材サンプルについては、



Fig. 5.25 木材サンプル収集部位（屋根野地板）

収集した直後に観察・分析を実施した。

#### 5.3.1.2 供試試料の調製

木材サンプルの一部をメスにより切り出し細断・混合したもののうち、0.05～0.1 g を核酸抽出用試料として遺伝子分析に供した。

#### 5.3.1.3 核酸 (RNA/DNA) 抽出法

3.2.3 の項を参照

#### 5.3.1.4 遺伝子分析による担子菌の検出

5.2.2 の項を参照

#### 5.3.1.5 RT-LAMP 法による担子菌の生理活性モニタリング

RT-LAMP 分析については 3.2.4 の項に準じて実施し、増幅反応時間に関しては 1 回目の調査時では 60 分間、2 回目の調査時においては 60 分間および 120 分間行った。

#### 5.3.1.6 LAMP 分析

2.2.3.5 の項を参照

### 5.3.2 結果および考察

#### 5.3.2.1 LAMP 法による侵入担子菌の検出および PCR ダイレクトシーケンスによる同定

腐朽木材試料より抽出された DNA を鋳型として、担子菌の 18S rRNA 遺伝子領域を標的とする L18S.spc プライマーセットを用いた LAMP 反応を行い、その反応産物を電気泳動した結果、担子菌由来の DNA の増幅が確認された (Fig. 5.26 左図: レーン 1)。

さらに、担子菌のゲノム DNA に対して特異性の高い ITS1-F (Forward 側) および ITS4-B (Reverse 側) のプライマーセット<sup>10)</sup>を用いて PCR 反応を実施し、得られた増幅産物を

鋳型としてダイレクトシーケンスを行い、rDNA の ITS 領域について塩基配列を決定した結果、領域全長が 626bp の塩基配列情報が得られた。この塩基配列情報は旧開拓使工業局庁舎の腐朽した窓台に侵入していた担子菌の配列（5.2.3.4 の項を参照）と完全一致したため、当該社殿の野地板に侵入している担子菌はキチリメンタケ (*Gloeophyllum trabeum*) である可能性が高いことが示された。

#### 5.3.2.2 RT-LAMP 法による腐朽木部の経時的生理活性モニタリング

腐朽木材試料より抽出した RNA 溶液を鋳型として、担子菌の 18S rRNA 遺伝子領域を標的とする L18S.spc プライマーセットを使用し、RT-LAMP 反応を行い、その反応産物を電気泳動した結果を Fig. 5.26 に示す。

屋外に曝露されていた状態から当該社殿が覆屋内に設置された直後の 1 回目の調査では、*Gloeophyllum trabeum* の 18S rRNA 遺伝子について cDNA の明瞭な増幅が確認されたため、調査時点で本種が活性を保った状態で木部に存在していることが明らかとなった。

覆屋内に設置されてより 6 か月後に行われた 2 回目の調査では cDNA の増幅が LAMP 法によるゲノム DNA の増幅とともに消失していることが明らかとなった (Fig. 5.26 右図：レーン 3、4)。この結果は、社殿が覆屋によって保護され、降雨による屋根への水分の直接供給が遮断されたことにより *Gloeophyllum trabeum* の活動が抑えられたことに起因するものと考えられる。さらに増幅反応を 60 分間から 120 分間に延長して分析を試みたところ、ゲノム DNA および cDNA の微弱な増幅を確認することができた (Fig. 5.26 右図：レーン 5、6)。この結果は木部において生理活性が顕著に低下しているものの、木部には未だ活動が可能な状態で *Gloeophyllum trabeum* が存在していることを示唆するものである。

本研究結果は第3章で提示された担子菌による木材劣化に対する処置（処理）の効果をフィードバックし、将来的に過不足のない適切な保存管理（処理）を継続していく上でRT-LAMP法による担子菌の生理活性モニタリングの有効性を強く示すものと考えられる。

特に担子菌による劣化を受けた木造文化財の保存修復においては、環境改善、薬剤処理、部材交換などの選択肢から、より文化財にとって負荷の少ない方法を選び出すことが何よりも重要である。この要求に対し従来、統一的、客観的な判断基準を設定することは困難であり、経験則や主観に基づいたその場での現場対応を許容せざるえない状況にあった。

PCR法、LAMP法、RT-LAMP法など汎用性が高く比較的操作简单な分子生物学的手法の導入は上記の現場状況を大きく改善する上で高い効果が期待されるため、その普及は今後の木造文化財保存修復の動向に大きな影響を与えるものと考えられる。

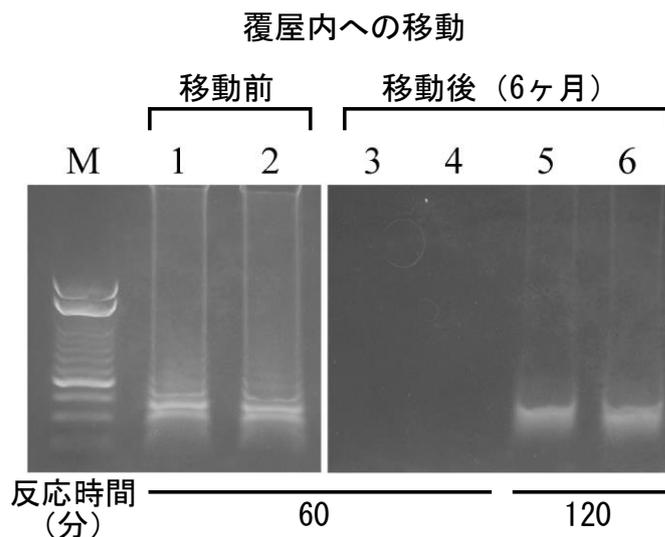


Fig. 5.26 LAMP法およびRT-LAMP法による担子菌DNAおよびcDNA（18S rRNA遺伝子）の検出

凡例) 1,3,5 : LAMP法によるDNA増幅反応

2,4,6 : RT-LAMP法によるcDNA増幅反応

## 参考文献

- 1) 石崎武志, 高見雄三 : 「北海道開拓の村の歴史的建造物の壁面劣化調査」, 日本文化財科学会第 19 回大会研究発表要旨集, 108-109 (2002).
- 2) (社)日本木材保存協会 : 「実務者のための住宅の腐朽・虫害の診断マニュアル」, 12-13, 108-109, 155(2007).
- 3) 中村俊夫, 光谷拓実 : 「文化財科学の事典」, 株式会社朝倉書店, 5 章, 356-363, 386-389(2003).
- 4) 北海道開拓記念館 : 「旧開拓使工業局庁舎復元修理工事報告書」, 1-99(1992).
- 5) Dallas, F. : Meiji Revisited, The Sites of Victorian Japan, 53-54 (1995).
- 6) 米山勇, 伊藤隆之 : 「日本近代建築大全 東日本編」, 株式会社講談社, 150(2010).
- 7) (社)日本木材保存協会 : 「木材保存学入門 改訂版」, 65-68, 77-79(2001).
- 8) Murray M. G., Thompson W. F. : Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucl. Acid. Res 8, 4321-4325(1980).
- 9) White, T. J. , T. Buruns, S. Lee and J. Taylor : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, White, T. J. (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 315-322 (1990).
- 10) Gardes, M. and Bruns, T. D. : ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts, Molecular Ecology 2, 113-118(1993).

- 11) Peterson, S. W., Kurtzman, C. P. : Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts, *System Appl. Microbiol.* 14, 124-129(1991).
- 12) Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R., Shinoda, T. : Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequence of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification, *J. Clin. Microbiol.* 37, 1985-1993(1999).
- 13) Sugita, T., Nishikawa, A. : Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis, *J. Med. Mycol.* 45, 55-58(2004).
- 14) Sugita, T., Ikeda, R., Shinoda, T. : Diversity among strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* as revealed by a sequence analysis of multiple genes and a chemotype analysis of capsular polysaccharide, *Microbiol. Immunol.* 45, 757-768(2001).
- 15) 杉山智昭 : 「北海道における木造住宅の腐朽実態調査」, 林産試験場だより 2, 6-8 (2009) .
- 16) 北海道立林産試験場, 北海道立北方建築総合研究所, 北海道大学 : 平成 19 年度重点領域特別研究報告書「既存木造住宅の生物劣化診断法の開発」, 15-38(2008).
- 17) 青島清雄, 林 康夫 : 「日本産 Coniophora 属」, 日本菌学会会報 8 (2), 84-85 (1967).
- 18) Kim, S. Y., Park, S. Y., Jung, H. S. : Phylogenetic classification of *Antrodia* and related genera based on ribosomal RNA Internal Transcribed Spaces sequences, *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(3), 475-481 (2001).

- 19) E. B. Cowling : Chemical modification of wood during microbial deterioration ,Holz und Organismen 1, 91-102 suppl. material und organismen (1965).
- 20) (社)日本しろあり対策協会 : 「しろあり及び腐朽防除施工の基礎知識 (防除施工士受験用テキスト)」, 45(2003).
- 21) 今村祐嗣, 高橋旨像 : 「木材および木質材料の破壊過程と破面形態の研究」, 昭和 61 年度文部科学省科学研究費 (総合研究 A) 研究成果報告書, 75(1987).
- 22) Wazny, J. : Study on the effect of *Merulius lacrymans*(Wulf.)Fr. and *Coniophora cerebella* Pers. on the mechanical properties of wood, Holz Roh Werkst. 16, 285-288(1958).
- 23) Wilson, G. I. : Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, Applied and Environmental Microbiology, 3741-3751(1997).
- 24) 当麻神社編 : 「当麻神社史」, 当麻神社御鎮座九十年奉賛会, 41-42(1985).

## 第6章 総括

### 6.1 本研究の目的

本研究では、木造文化財に発生する担子菌による生物劣化を防止・抑制するため、汎用的な分子生物学的手法を用いて木材中に侵入した担子菌を初期段階で検出し、その生理活性の捕捉を比較的簡易に可能とする技術開発について検討した。また、構築した担子菌の検出および生理活性モニタリングシステムの安定性を評価するため、試料への含有が想定される木材抽出成分や木材保存剤が分析に及ぼす影響について調査した。さらに、歴史的木造建築物の現況調査に伴って得られた試料を対象として分析を試み、分子生物学的手法を用いた木造文化財の担子菌による劣化評価システムの実地での有効性について検証した。

### 6.2 本研究の結果

#### 6.2.1 木造文化財に発生する担子菌の高感度検出

木造建築物に発生する代表的な担子菌 11 種について rDNA の ITS2 領域に対して種特異的プライマーを設計し、PCR 法を用いた分析を試みた結果、代表的な担子菌 11 種を特異的に検出・同定可能であることが示された。また、本研究における PCR システムは 1 pg の供試菌 DNA を検出可能であり、目視や触診などに依存してきた従来手法では解決が困難であった木造文化財の部材に侵入した微量の菌糸を検出し、初期対応を実施する上で有効な技術であることが示された。

等温条件において標的遺伝子の正確な増幅を短時間で可能とする LAMP 法を用いて、より簡易かつ迅速な担子菌検出系の構築に向けて検討した結果、担子菌のゲノム配列に対して

選択的結合能力を有するプライマーセットを設計することにより、種特異的検出システムおよび担子菌類の包括的検出システムを構築可能であることが示された。本研究における LAMP システムは 1 pg の供試菌 DNA を安定して検出可能であることが示され、木造文化財の精密な劣化評価を行う上で、PCR 分析とともに LAMP 分析による担子菌類検出技術が有用であることが明らかとなった。

### 6.2.2 担子菌の生理活性モニタリング

木造文化財の予防的保存に向けた担子菌の生理活性モニタリングを行うため、RT-LAMP 法を用いた遺伝子発現解析により、18S rRNA からの cDNA 合成とその増幅を試みた結果、活動期および活動停滞（停止）期における担子菌の遺伝子発現を簡易に把握することが可能であった。

### 6.2.3 共存物質が担子菌の検出および活性モニタリングに及ぼす影響の評価

木材成分が PCR 反応におよぼす影響を評価するため、*Serpula lacrymans*、*Coniophora puteana* の凍結乾燥菌糸にベイツガ (*Tsuga heterophylla*)、エゾマツ (*Picea jezoensis*)、トドマツ (*Abies sachalinensis*)、カラマツ (*Larix kaempferi*) から調製した気乾心材木粉を菌糸の 10,000 倍の重量比で加え、混合した試料から鋳型 DNA を抽出し、PCR 反応を行った結果、供試菌 DNA の特異的増幅が実験的に可能であることが明らかとなった。

木材保存剤による影響に関しては、添加量の増加にともない鋳型 DNA の増幅阻害が観察され、LAMP 法よりも PCR 法においてより大きな阻害効果が認められた。しかし

木材保存剤による阻害作用は鋳型となる DNA の抽出過程によって除去され、実際の分析には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

#### 6.2.4 歴史的木造建築物の分子生物学的手法による調査

屋外の歴史的木造建築物 2 棟から採取した試料に対して、実際に分子生物学的手法による分析を実施した結果、旧開拓使工業局庁舎からは明確な腐朽が認められた部位に加えて、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いた組織観察で健全と判断された部位の一部についても、PCR 分析によって担子菌の DNA の存在が確認された。

当麻神社大山祇宮社殿の調査においては、腐朽被害を受けた木造建築物の同一領域部材から、環境改善工事の直後（1 回目）とその 6 ヶ月後（2 回目）に試料のサンプリングを行い、RT-LAMP 法による担子菌の生理活性モニタリングを実施した。その結果、cDNA 増幅が 1 回目と比較し、2 回目の試料については、大幅に低下していることが明らかとなった。2 棟の歴史的木造建築物に関する各種調査結果より、PCR 法、LAMP 法、RT-LAMP 法など汎用性が高く比較的操作が簡易な分子生物学的手法の導入は、木造文化財の予防的保存管理体制を確立する上で有用なツールとなることが強く示唆された。

#### 6.3 本研究の保存科学的意義

本研究は、木造文化財を予防的保存の概念に沿って良好な状態で保存していくため、木造文化財を実際に取り扱う中小規模施設でも実施可能な費用対効果、汎用性、簡便性に優れた信頼性の高い担子菌の特異的検出システム、生理活性モニタリングシステムの構築

について検討したものである。その結果、比較的簡易な分子生物学的手法が目視や触診による主観的な判断に依存せざるを得ない木造文化財の腐朽調査の現状に対し、新たに統一的、客観的な判断基準を提供可能であり、担子菌類によってもたらされる甚大な腐朽被害を初期段階で抑止する上で有効であることが示された。したがって本研究は潜在的な腐朽リスクを有する植物体由来の素材からなる木造文化財を長期にわたって保存管理していくという要求に保存科学的見地から応じるものとして、その意義は大きい。また、担子菌類による腐朽被害を温湿度・風量測定などの環境調査と現場の状況・体制に応じた分子生物学的アプローチによって調査し、その情報を統合・データベース化し現場で共有化を図っていくことは、これからの実地における木造文化財の適切な保存修復計画を策定する上で重要と考えられる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導いただきました東京芸術大学大学院美術研究科 文化財保存学専攻 稲葉政満教授、桐野文良教授および塚田全彦准教授に深く感謝致します。また、本論文をまとめるにあたり、ご指導いただきました東京芸術大学大学院美術研究科 佐藤嘉則准教授、分析試料のご提供をいただきました上川郡当麻町 当麻神社関係者の皆様に深く御礼申し上げます。最後に、本研究を遂行するにあたり、御助言、御協力いただきました東京芸術大学大学院保存科学研究室の皆様にご心より感謝いたします。

## 関連研究業績

### 【論文等】

- 1) 杉山智昭, 小林幸雄, 小林孝二:「分子生物学的手法を用いた歴史的木造建築物の生物劣化調査(その2) — DNA塩基配列解析による木材腐朽菌の同定について —」, 北海道開拓記念館研究紀要 40, 21-31 (2012) .
- 2) T. Sugiyama“Decay inspection of historical wooden architectures by genetic analysis”, Proceedings of International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property 2012, 125-133 (2012) .
- 3) 杉山智昭, 小林幸雄, 小林孝二:「分子生物学的手法を用いた歴史的木造建築物の生物劣化調査(その1) —生物劣化部位の精密な把握について—」, 北海道開拓記念館研究紀要 39, 1-12 (2011) .
- 4) 杉山智昭, 森満範, 東智則:「種特異的 PCR法による木材腐朽菌の検出・同定」, 林産

試験場報 538, 1-5 (2009).

- 5) 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, 98-104 (2003) .
- 6) 杉山智昭, 森満範, 宮内輝久, 佐藤真由美, 中谷誠, 原田陽: 「分子生物学的手法による  
木材腐朽菌の同定」, 林産試験場報 17(2), 6-11 (2003).

#### 【その他報告文】

- 1) 杉山智昭: 「サハリン州ノグリキに残された木造建築群の現状と保存について」, 『北方  
地域の人と環境の関係史 2010-12 報告書』, 27-38 (2013) .
- 2) 杉山智昭, 小林幸雄, 小林孝二: 「博物館資料の保存 一木をのこす」, 北海道開拓記念館  
第 158 回テーマ展 解説冊子, 1-29 (2012) .
- 3) 杉山智昭: 「DNA で木材腐朽菌を割り出す 一住宅メンテナンスの新たなアプローチ」,  
林産試験場だより, 6-8 (2003) .

#### 【学会発表】

- 1) T. Sugiyama “Deterioration and degradation diagnosis for the preventive  
conservation of historical wooden buildings in a cold region”, 2015 International  
Symposium on Conservation of Cultural Heritage in East Asia, Nara (2015) .
- 2) 杉山智昭: 「寒冷地における歴史的木造建築物の保存にむけて 一旧開拓使工業局庁舎を  
例に」, 東北芸術工科大学文化財保存修復研究センター専門家会議 『積雪寒冷地域に

おける屋外展示の諸問題と対策』, 札幌市 (2015) .

- 3) 杉山智昭, 小林幸雄, 小林孝二: 「分子生物学的手法による歴史的木造建築物の生物劣化調査」, 文化財保存修復学会第 32 回大会, 岐阜市 (2010) .
- 4) 杉山智昭, 小林幸雄: 「遺伝子発現解析による糸状菌のモニタリング」, 日本文化財科学会第 27 回大会, 吹田市 (2010) .
- 5) 杉山智昭, 小林幸雄, 小林孝二: 「北海道における歴史的木造建築物の生物劣化調査」, 第 60 回日本木材学会大会, 宮崎市 (2010) .
- 6) T. Sugiyama, Y. Kobayashi, T. Azuma “Molecular inspection of the cultural wooden heritage by loop - mediated isothermal amplification analysis”, 2009 International Symposium on Conservation of Cultural Heritage in East Asia, Beijing (2009) .
- 7) 杉山智昭, 森 満範, 宮内輝久, 玉井 裕 「保存処理木材に侵入した木材腐朽菌の分子生物学的検出」, 第 56 回日本木材学会大会, 秋田市 (2006) .
- 8) 杉山智昭, 森 満範, 宮内輝久 「RT-LAMP 法を用いた木材腐朽菌の RNA 分析」, 第 55 回日本木材学会大会, 京都市 (2005) .
- 9) 杉山智昭, 森 満範, 宮内輝久 「LAMP 法を用いたナミダタケの簡易検出」, 第 54 回日本木材学会大会, 札幌市 (2004) .
- 10) T. Sugiyama, M. Mori, T. Miyauchi “Rapid detection of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) analysis”, International Conference Biodeterioration and Indoor Climate, Copenhagen (2004) .
- 11) 杉山智昭, 森満範, 宮内輝久, 佐藤真由美, 中谷誠, 原田陽: 「住宅部材に発生した

木材腐朽菌の分子生物学的同定」, 第 53 回日本木材学会大会, 福岡市 (2003) .

12) 杉山智昭, 森満範, 宮内輝久, 佐藤真由美, 中谷誠, 原田陽: 「PCR 法による家屋腐朽菌の同定」, 平成 14 年度 日本木材学会北海道支部研究発表会 (2002) .

13) T. Sugiyama , M. Nakaya, M. Mori, T. Miyauchi, A. Harada, M. Sato “Direct detection and identification of decay fungi using specifically primed PCR analysis”, 8th International Fungal Biology Conference, Mexico (2002) .

#### 【その他発表】

1) 杉山智昭: 「歴史的木造建築物の分子生物学的手法による劣化調査」, 第 17 回東京芸術大学保存科学研究室研究発表会 (2017) .

2) 杉山智昭: 「木材保存剤共存下における木材腐朽菌の分子生物学的モニタリングについて」, 第 16 回東京芸術大学保存科学研究室研究発表会 (2016) .

3) 杉山智昭: 「予防的保存概念にもとづく木材腐朽菌の生理活性モニタリング」, 第 15 回東京芸術大学保存科学研究室研究発表会 (2015) .