

平成 23 年度修士論文

木材腐朽菌同定のために DNA バーコードとして
核の rDNA の ITS 領域および D1/D2 領域の 2 ヶ所
を使用

Use of ITS region and D1/D2 domain of nuclear rDNA as a two-locus DNA
barcode for identification of wood rot fungi.

高知工科大学工学 工学研究科 基盤工学専攻

物質・環境システム工学コース

1 1 4 5 0 1 5 前田昌人

1 概要

木材腐朽菌を含む担子菌類の種の同定は、主に子実体の形態情報を中心に顕微鏡的形態、生理的性質、生育環境などの条件似合わせて判断する。しかし、子実体形態は変異が大きく、その他の情報では特徴に乏しく、結果として種の同定が困難である場合がある。誤りやすい担子菌類の同定において、遺伝子診断が有効であり、担子菌類の遺伝子診断には十分なデータベースと迅速簡便な手法が必要である。また、木材腐朽菌の種の判定に関わる遺伝子情報は、それぞれの生物群によって使用されている遺伝子マーカーが異なる。担子菌において、蓄積量が豊富な遺伝子マーカーは、リボソーム DNA の非コード領域である ITS 領域である。DNA バーコードとは、生物種に特有な DNA 配列のことで、生物の組織の一部が採取できれば種を同定することができる。生物分類学の網羅的な学術データベースとして役割が期待されるほか、病虫害の特定や農水産物の品種判定などにも活用されている。

本研究では、木材腐朽菌を識別するための DNA バーコードの候補として、ITS 領域と、ITS 領域に次いで汎用されている D1/D2 領域の塩基多様性および種の判定についての特性を比較する。さらに D1/D2 領域の配列から木材腐朽菌を PCR で検出するためのプライマーの開発を試みた。リボソームの大サブユニットの 28SrRNA にある D1/D2 領域は、約 600bp 程度の適度な長さがあり、コード領域として塩基配列の変位が蓄積される。ITS 領域が種内から種間の識別、分類に用いられるのに対し、D1/D2 領域は種レベルから科レベルまでの分類に適用される。

供試菌は木材住宅中に頻出する木材腐朽菌を中心に 23 種 55 株の担子菌を用いた。ユニバーサルプライマーを用いて D1/D2 領域を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。供試菌の配列とデータベース上の配列を用いたアライメントの結果から、近隣結合 (Neighbor Joining : NJ) 法で系統樹を作成した。

木材腐朽菌のみを検出するプライマーを開発するために、供試菌の他に生物情報データベース (DB) より取得した配列情報を用いて、D1/D2 領域の中で木材腐朽菌に共通な配列を選出した。さらに木材中に頻出する子実体の菌の配列と木材腐朽菌の共通配列を比較し、木材腐朽菌検出プライマーを採択した。試作したプライマーを用いた PCR を行い、木材腐朽菌に対する特異性を調べた。

供試菌の D1/D2 領域の塩基配列決定し、DB の情報と照合したところ、全ての供試菌株の種名と配列情報が一致していることが明らかとなった。したがって、D1/D2 領域でも木材腐朽菌の種の同定は可能であると考えられる。木材腐朽菌においても D1/D2 領域は ITS 領域よりも種内変異が少なく、遺伝子情報の保存性が高いことが系統樹より確認ができた。木材腐朽菌検出のために開発したプライマーを用いた PCR は、供試菌のうち木材腐朽菌のみを検出し、子実体の菌を検出しないことを確認した。したがって、開発したプライマーの木材腐朽菌に対する特異性が示された。