

平成 25 年度 修士論文

環境中における腐朽材中の
真菌類群集構造解析

Analysis of fungal community structure in decayed wood
in the natural environment

高知工科大学大学院

工学研究科 基盤工学専攻

物質・環境システム工学コース

1155008 濱口航大

指導教員 堀澤栄 准教授

1. 概要

自然環境では、複数の菌種の共同作業により木材腐朽が進行していくものと考えられる。しかしながら、木材腐朽を菌群の観点から解明しようとした研究はまだ少ない。近年では担子菌類の検出・同定における分子生物学的手法が著しく発達し、なかでも DNA を用いる方法は簡便かつ高感度で検出可能である。腐朽材から生菌株が得られた場合の DNA 塩基配列に基づく担子菌類の同定では、種の同定に用いる遺伝子配列を PCR 法で増幅した後、配列を調べることで種を推定できる。そこで本研究では、環境中における腐朽材に生育する腐朽菌の DNA を検出し、材中に形成された群集構造を明らかにすることを目的とした。

高知工科大学構内より採取したカツラ *Cercidiphyllum japonicum* (長さ約 100 cm、径約 12 cm) の腐朽材を供試木とした。この腐朽材を、チェーンソーを用いて元口から約 15 cm の間隔で厚さ 3 cm の円盤を採取し、さらにカッティングミル MF10.1 (IKA, Germany) により 0.5 mm 以下に粉碎して木紛にした。この木紛 (約 1 g) から Isoplant II (ニッポンジーン, 東京) を用いてゲノム DNA を抽出した。その後、抽出した DNA を鋳型とし、リボソームをコードする遺伝子 (rDNA) の ITS 領域 (ITS I、ITS II および 5.8S) を遺伝子マーカーとして、それぞれユニバーサルプライマーを用いて PR 増幅させた。増幅させた DNA 断片群が複数の種に由来するか検討するため、ITS 領域を PCR-RFLP (制限酵素断片長多型) に供し、ITS I および ITS II 領域の 2 箇所の領域について qPCR による融解曲線解析を行った。なお、PCR-RFLP の制限酵素には *Mbo*I, *Msp*I および *Alu*I を用いた。一方で、PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) により腐朽材中の真菌類の群集構造を可視化した。さらにクローンライブラリ解析により菌群を構成している木材腐朽菌を同定し、同時にクローン数の割合から腐朽菌種の構成比を表現することを試みた。腐朽材の木紛から抽出したゲノム DNA から得られた ITS 領域の PCR 産物に対して各解析を行った。融解曲線解析では、腐朽材の各部位で複数の T_m 値が検出された。また、PCR-RFLP では各制限酵素において、腐朽材の各部位でのバンドパターンが異なることが示された。これらのことから試料 (PCR 産物) 中に、配列の異なる DNA 断片が混在していることを示唆している。さらに PCR-DGGE では腐朽材中の菌相を可視化することで腐朽材の元口から末口にかけて優占種が変化していく様子が明らかとなった。そして、クローンライブラリ解析においても元口付近 (試料部位①) ではヒイロタケの菌糸が優占し、末口にすすむにつれヒイロタケ以外の菌種が侵入していることが明らかとなった。また、切り口から離れた試料部位②や③でヒイロタケ以外のスエヒロタケやアワビタケに相同性の高い配列が検出された。以上より、環境中の木材に含まれる菌群の DNA を分析することにより、木材を腐朽させる菌群の構成を明らかにできることが示された。