

## 論文 (Original article)

# 木材の部位、保存期間、熱処理が木材からの DNA 抽出効率と DNA の質に及ぼす影響

吉田 和正<sup>1)\*</sup>・香川 聡<sup>2)</sup>・伊ヶ崎 知弘<sup>1)</sup>・西口 満<sup>1)</sup>・向井 譲<sup>3)</sup>

## Influence of the position in xylem, storage period and heat treatment on the efficiency of DNA extraction and on the quality of DNA from wood

YOSHIDA Kazumasa<sup>1)\*</sup>, KAGAWA Akira<sup>2)</sup>, IGASAKI Tomohiro<sup>1)</sup>,  
NISHIGUCHI Mitsuru<sup>1)</sup> and MUKAI Yuzuru<sup>3)</sup>

### Abstract

It is often difficult to identify species of wood based on morphological and anatomical characteristics. DNA analysis is an effective method for such identification, but it requires sufficient quantity and quality of DNA. We investigated how the position in xylem, storage period and heat treatment affect the efficiency of DNA extraction and the quality of DNA from wood. The efficiency of DNA extraction was higher for sapwood and for the outer parts of the xylem of species with an indistinguishable sapwood/heartwood boundary (ripenwood) than for heartwood and for the inner parts of the xylem of ripewood. A large portion of extracted DNA ranged in size from 250 to 2,000 base pairs. A chloroplast gene (*rbcL*), a mitochondrial gene (*coxI*) and a nuclear gene (rDNA) were detected in the DNA extracted from the sapwood of 3 species and from the outer parts of the xylem of 3 ripewood trees by polymerase chain reaction. Analysis of the sapwood of Kaya (*Torreya nucifera*) specimens that were stored in a xylarium for different periods showed that the efficiency of DNA extraction was higher and the detection of the genes was easier for the specimens with relatively short storage periods. In heat-treated sapwood of Guimatsu (*Larix gmelinii* var. *japonica*) and Mizunara (*Quercus crispula*), DNA became more degraded at treatment temperatures of 140°C and over. The detection of the genes was reproducible for the DNA from Guimatsu specimens heated up to 160°C, but it was inconsistent for specimens treated at 180°C. These results suggest that DNA used for the detection of genes can be extracted from the outer parts of the xylem of several tree species, and from sapwood heated to temperatures that are used in the manufacturing of plywood.

**Key words :** wood, DNA extraction, DNA analysis, polymerase chain reaction (PCR), species identification

### 要旨

樹種の同定は通常、花や葉などの形態に基づいて行われる。しかし、木材や木材製品から樹種の判定が必要となる場合がある。樹種判定に DNA 分析技術の適用が考えられるが、そのためには分析に使用可能な量と質の DNA を木材から得なければならない。そこで、木材の放射方向の部位の違い、保存期間、熱処理が DNA 抽出効率と遺伝子検出の難易に及ぼす影響を調べた。辺心材の区別が明瞭な 6 樹種では、辺材からの DNA 抽出効率は高い場合が多かったが、心材では低かった。辺心材の区別が不明瞭な 4 樹種では、外側の木部ほど効率よく DNA が抽出された。DNA の鎖長は主に 250 塩基対から 2,000 塩基対の範囲にあった。ポリメラーゼ連鎖反応法によって遺伝子の検出を試みたところ、3 樹種の辺材と、辺心材の区別が不明瞭な 3 樹種の外側の木部から得られた DNA で葉緑体遺伝子 (*rbcL*)、ミトコンドリア遺伝子 (*coxI*) および核遺伝子 (rDNA) が増幅できた。木材標本のカヤ辺材では、保存期間が短いほど DNA の抽出効率が高く、遺伝子の検出も容易であった。熱処理したグイマツとミズナラの辺材からの DNA は、140°C 以上の温度では低分子化が進んでいたが、160°C までの処理ではグイマツ辺材の DNA から安定して遺伝子が検出できた。したがって、合板の製造工程で加わる温度域の熱を受けても辺材からは DNA を得ることが可能であると考えられる。

**キーワード :** 木材、DNA 抽出、DNA 分析、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、樹種判定

原稿受付：平成 18 年 5 月 30 日 Received May 30, 2006 原稿受理：平成 18 年 7 月 25 日 Accepted July 25, 2006

\* 森林総合研究所生物工学研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里 1 Department of Molecular and Cell Biology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan, e-mail: ykazu@ffpri.affrc.go.jp

1) 森林総合研究所生物工学研究領域 Department of Molecular and Cell Biology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) 森林総合研究所木材特性研究領域 Department of Wood Properties, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

3) 岐阜大学応用生物科学部 Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

## 緒言

樹木を研究・利用するうえで樹種の同定は欠かすことができない。樹種の同定は通常、花や葉の形態、樹皮や冬芽の特徴、樹形などに基づいて行われる。しかし、木部から得られる情報だけで樹種の判定が必要となる場合がある。例えば、社寺や仏像等の文化財に使用されている木材および遺跡から出土した木材の樹種判定である。また、近年、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対処を要する問題となっており（佐藤，2002；岡本，2003；熱帯林行動ネットワーク，2004）、その対策として、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。アジア森林パートナーシップが提案した木材の合法性基準には「木材の識別とトレーサビリティ（追跡性）」があり（藤間，2005）、これを実効あるものと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。木材の樹種識別には細胞構造の差異を観察する組織学的手法と木材に含まれる特徴的な抽出成分を分析する化学的手法が用いられているが、これらの方法で種を識別することは多くの場合困難である（Wilson & White, 1986）。

近年、進展が著しい DNA 分析技術は、食品の原材料の判別（藤田，2003）や犯罪捜査での個人の識別、親子鑑定（福島，2003）などに利用されており、木材への適用も可能と考えられる。DNA 分析を行うためには木材試料から DNA を得る必要がある。現在までに、土埋木や沈木、伐採木、標本、木材製品等の木部から DNA を抽出し、含まれている遺伝子を検出した例が報告されている（De Filippis & Magel, 1998；Dumolin-Lapègue *et al.*, 1999；Ohyama *et al.*, 2001；Deguilloux *et al.*, 2002, 2004；Tani *et al.*, 2003；Reynolds & Williams, 2004；Asif & Cannon, 2005）。木材からの DNA の抽出効率と遺伝子検出の難易は、保存の状態や期間により

違いがあることが報告されているが（Deguilloux *et al.*, 2002）、木部の部位別の DNA 抽出効率等を異なる科の木材について同時に比較した研究はなく、長期にわたる保存や熱処理によってどう変わるかは不明であった。

そこで、本研究では木材や木材製品の樹種判定を想定し、木材の部位や保存期間、熱処理が DNA の抽出効率と DNA の質に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、様々な木材試料から DNA を抽出した。さらに、得られた DNA からの遺伝子検出の可否をポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction、PCR）法を用いて検討した。

## 実験方法

### 試料の調製

11 種の広葉樹および針葉樹を本研究に用いた（Table 1）。木材の部位別の DNA 抽出効率の検討には、幹の円盤より、樹皮から髄に達する楔状のブロックを切り出し、木部を放射方向に 4 分割した木片を用いた。辺材と心材の区別が明瞭な樹種では辺材と心材の境界で分けた後、心材を 3 等分した。辺材と心材の区別が不明瞭な樹種では木部を 4 等分した。保存期間の異なる試料として、森林総合研究所の木材標本室に 2 年、4 年および 23 年間（それぞれ、2002 年、2000 年、1981 年に採取）保管されていたカヤの辺材を使用した。熱処理には、グイマツ及びミズナラの楔状ブロックの木口面を外側から 1 cm の厚さで除き、さらに 2 mm の厚さで切り出した薄片を用いた。薄片は、60、100、140、160 および 180℃ に設定したファン循環式乾燥器（MOV-112S、三洋電機）で 5 分間加熱した後取り出した。

### DNA の抽出

各木材試料から、破砕機（マルチビーズショッカ

Table 1. 供試木材の由来  
Origin of wood sample

樹種 Species	採取年 Collection year	採取地 Collection site	試料の形状 Shape of specimens	標本番号 Specimen No. (TWTw)
ヤマグワ <i>Morus australis</i> Poir.	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 23 cm	21871
エゾヤマザクラ <i>Prunus sargentii</i> Rehder	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 29 cm	21795
ハクウンボク <i>Styrax obassia</i> Sieb. et Zucc.	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 29 cm	21840
ミズナラ <i>Quercus crispula</i> Blume	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 35 cm	21861
オノエヤナギ <i>Salix udensis</i> Trautv. et C.A.Mey.	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 24 cm	21803
オニグルミ <i>Juglans mandshurica</i> Maxim. var. <i>sieboldiana</i> (Maxim.) Makino	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 34 cm	21802
グイマツ <i>Larix gmelinii</i> Rupr. ex Kuzen. var. <i>japonica</i> (Maxim. ex Regel) Pilg.	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 32 cm	21814
チョウセンゴヨウ <i>Pinus koraiensis</i> Sieb. et Zucc.	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 34 cm	21832
モミ <i>Abies firma</i> Sieb. et Zucc.	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 19 cm	21864
イチョウ <i>Ginkgo biloba</i> L.	2004	札幌 Sapporo	円盤 Disk、直径 d 20 cm	21789
カヤ <i>Torreya nucifera</i> Sieb. et Zucc.	1981	秩父 Chichibu	ブロック Block	4332
カヤ <i>Torreya nucifera</i> Sieb. et Zucc.	2000	岡山 Okayama	円盤 Disk、直径 d 11 cm	18403
カヤ <i>Torreya nucifera</i> Sieb. et Zucc.	2002	対馬 Tsushima	円盤 Disk、直径 d 10 cm	19683

一、安井器械または Wig-L-Bug Model 30、International Crystal Laboratories、USA)、あるいは糸鋸を用いて木粉を調製した。DNA の抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) を使用し、マニュアルにしたがって行ったが、以下の点を改変した。

- 1) 乳鉢に入れた木粉 (約 1 g) にバッファー AP1 を加えて膨潤させた後、液体窒素を加えて凍結し、乳棒で磨砕した。
- 2) 木粉の破砕液から木粉と抽出液を分離する際に DNeasy Plant Maxi Kit (キアゲン) のシュレッターカラムを用いた。

#### DNA 濃度および鎖長の測定

DNA の濃度は、蛍光分光光度計 (F-3010、日立工機) を用い、測定バッファー (10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)、1 mM エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム、0.1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Hoechst33258(インビトロジェン)) 1 ml に 2  $\mu\text{l}$  の試料溶液を混和し、励起波長 352 nm、測定波長 455 nm にて測定した。標準物質として既知濃度の  $\lambda$  DNA を使用した。DNA の鎖長は、DNA (250 ng) を 0.7% アガロースゲルを用いた電気泳動で分離後、臭化エチジウムで染色し、DNA サイズマーカーと比較することにより測定した。

#### PCR

葉緑体 DNA に存在するリブロース -1,5- ニリン酸カルボキシラーゼ / オキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子 (*rbcL*)、ミトコンドリア DNA に存在するシトクロムオキシダーゼサブユニット 1 遺伝子 (*cox1*) および核 DNA に存在するリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の内部転写スパーサー 1 領域を検出対象とした。各遺伝子の検出に使用したプライマーの配列を Table 2 に示す。

rDNA の検出には以下の通り樹種により異なるプライマーの組み合わせを用いた。エゾヤマザクラ、ミズナラ、イチョウ、オノエナギおよびカヤ: rDNA-F1 と

rDNA-R1、ヤマグワおよびハクウンボク: rDNA-F2 と rDNA-R1、グイマツ: LAITS1B と rDNA-R2、チョウセンゴヨウ: ITS1N と rDNA-R3。

反応溶液は、12.5  $\mu\text{l}$  の GoTaq Green Master Mix 溶液 (プロメガ) に 0.5  $\mu\text{M}$  のプライマーおよび 50 ng の DNA を加え、滅菌水にて 25  $\mu\text{l}$  に調製した。PCR は、95°C・90 秒の変性に続き、95°C・30 秒、58°C・30 秒、72°C・1 分を 35 サイクルの条件で行い、反応終了後の溶液を 0.7% アガロースゲルでの電気泳動により分析した。

#### PCR 増幅 DNA の塩基配列解析

PCR で増幅された DNA は、Wizard SV gel and PCR clean-up system (プロメガ) を用いて精製した後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列をもとに公共の DNA データベースを検索し、最も相同性の高い遺伝子が由来した生物種と DNA を抽出した木材の樹種を比較した。

#### 結果および考察

木材からの DNA の抽出効率と DNA の質に及ぼす部位の影響

樹木では成長に伴って形成層から中心方向へ向かって木部の加齢が進み、木化や心材形成等の変化を生じる。合板等の木材製品が製造されるときに、木材の部位は考慮されない場合が多いので、製品には様々な部位が含まれる。そこで、木材の部位と DNA 抽出効率の関係を明らかにするため、広葉樹 6 種、針葉樹 4 種について木部を放射方向に 4 つに区分し、DNA を抽出した (Table 3)。DNA 抽出効率は辺材と心材の区別が明瞭な樹種 (ヤマグワ、エゾヤマザクラ、ミズナラ、オニグルミ、グイマツ、チョウセンゴヨウ) ではオニグルミを除いて辺材の方が高く、心材ではいずれの樹種も低かった。辺材の区別が不明瞭な樹種 (ハクウンボク、オノエナギ、イチョウ、モミ) では、外側の部位の方が内側より抽出効率が高い傾向が認められた。これらの傾向は本研

Table 2. PCR に用いたプライマーの配列  
Primer sequences used for the PCR

プライマー名 Primer name	配列 (5' - 3') Sequence (5' - 3' )	文献 Reference
rbcL-F	GGA CTTACCAGTCTTGATCG	本報告 This study
rbcL-R	TCACATGTACCTGCAGTAGC	本報告 This study
cox1-F	CGGTCTTCGGGTATCTAGGC	本報告 This study
cox1-R	TCCATCCAGCGTAAGCATCT	本報告 This study
rDNA-F1	GAACCTGCGGAAGGATCATTG	本報告 This study
rDNA-F2	CGTGATGGGGATAGATCATTGC	本報告 This study
LAITS1B	CCAAGGGCCTTGCATCAT	Gernandt & Liston, 1999
ITS1N	CGTAACAAGGTTTCCGTAGG	Wei & Wang, 2004
rDNA-R1	AGTCCCGCCTGACCTG	本報告 This study
rDNA-R2	CAGCGACAACAAGCAATGC	本報告 This study
rDNA-R3	TCCCTTGACCCAACCACC	本報告 This study



Table 3. 放射方向の部位の違いと DNA 抽出効率  
DNA extraction efficiency from different positions of xylem along the radial direction

樹種 Species		DNA 抽出効率 DNA extraction efficiency ( $\mu\text{g g}^{-1}$ wood)			
		部位 Position along the radial direction			
		外 (樹皮) 側 Outer side	←————→	内 (髄) 側 Inner side	
ヤマグワ	<i>Morus australis</i>	13.9	2.3	1.6	1.0
エゾヤマザクラ	<i>Prunus sargentii</i>	8.3	0.8	0.3	0.2
ハクウンボク	<i>Styrax obassia</i>	7.5	6.1	5.2	1.5
ミズナラ	<i>Quercus crispula</i>	7.1	0.8	0.4	0.3
オノエヤナギ	<i>Salix udensis</i>	1.5	0.5	0.2	0.3
オニグルミ	<i>Juglans mandshurica</i> var. <i>sieboldiana</i>	0.3	0.3	0.3	0.1
ゲイマツ	<i>Larix gmelinii</i> var. <i>japonica</i>	17.2	0.0	0.0	0.0
イチョウ	<i>Ginkgo biloba</i>	4.2	2.4	1.4	0.1
チョウセンゴヨウ	<i>Pinus koraiensis</i>	1.0	0.1	0.1	0.0
モミ	<i>Abies firma</i>	0.5	1.2	0.1	0.0

下線は心材の値を示す (ハクウンボクとイチョウについては変色材の値を示す)

Underlined values denote heartwood position (and discolored part for *Styrax obassia* and *Ginkgo biloba*).

究で試料とした樹種の中では広葉樹と針葉樹で共通していた。ハリエンジュ (*Robinia pseudoacacia*) の木部を放射方向に辺材を 3 部位、移行材 2 部位および心材を 2 部位に分けて DNA の収量を比較した研究においても、外側の辺材から内側の移行材に向けて収率は低下し、心材では辺材より低いことが示されている (De Filippis & Magel, 1998)。

抽出した DNA の鎖長を調べるために、アガロースゲル電気泳動を行った (Fig. 1)。通常、若い葉から抽出した DNA は 20,000 塩基対 (base pair, bp) 程度の鎖長があるが、木材からの DNA の鎖長は、主に 250 bp から 2,000 bp の範囲にあり、DNA は低分子化していることがわかった。沈木および標本の木部から抽出した DNA の鎖長は、それぞれ 125 bp から 23,000 bp、50 bp から 10,000 bp の範囲にあることが報告されており (Reynolds & Williams, 2004; Asif & Cannon, 2005)、木材から抽出した DNA は一般に低分子化しているといえる。

前述のように、辺心材の区別が明瞭な樹種では心材からの DNA 抽出効率は低く、また、不明瞭な樹種では中心部に近づくにしたがい木材からの DNA 抽出効率は低下した。その理由として、内側の木部ほど大部分を占める木部繊維や仮道管、道管の細胞が死滅してから時間が経過しており、DNA が分解・減少していること、さらに心材では二次代謝成分の細胞内腔への沈積が DNA の抽出を妨げていること等が考えられる。

抽出された DNA には、細胞核に存在する DNA だけでなく、葉緑体 DNA やミトコンドリア DNA が含まれている。細胞あたりのコピー数が多い葉緑体やミトコンドリア DNA の遺伝子は、核 DNA の大部分の遺伝子に比べ検出が容易である。また、葉緑体 DNA の遺伝子は植物の系統解析に多用されており (Soltis & Soltis,

1998)、ミトコンドリア DNA の遺伝子は動物種の判定に利用されている (藤田, 2003)。一方、核 DNA でも、同じ配列が繰り返されコピー数が多いリボソーム RNA 遺伝子は検出しやすく、系統解析や親子鑑定に用いられている。そこで、辺材と、辺心材の区別が不明瞭な木材で一定濃度 ( $1.4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) 以上の DNA が得られた部位について、葉緑体遺伝子 *rbcL*、ミトコンドリア遺伝子 *cox1* および核遺伝子 rDNA を PCR 法で増幅し、検出を試みた (Fig. 2)。その結果、辺心材の区別が明瞭な樹種の辺材では、*rbcL*、*cox1* および rDNA が検出された樹種 (ヤマグワ、エゾヤマザクラ、ゲイマツ) と、どの遺伝子も検出されない樹種 (ミズナラ、チョウセンゴヨウ) があつた。辺心材の区別が不明瞭な樹種 (イチョウ、ハクウンボク、オノエヤナギ) では、外側の部位からの DNA を用いた場合には各遺伝子とも検出されたが、内側の部位からの DNA ではどの遺伝子も増幅されなかった。PCR で遺伝子が検出された木材について、増幅された DNA の塩基配列を決定後、公共の DNA データベースを検索したところ、ヤマグワ、エゾヤマザクラ、ハクウンボクおよびオノエヤナギの *cox1* を除いた全ての遺伝子で、DNA を抽出した樹種あるいは同属の樹木の遺伝子と最も相同性が高かった。前述の 4 樹種の *cox1* については塩基配列が DNA データベースに登録されていなかったが、近縁の樹木の遺伝子と高い相同性があつた。したがって、PCR で検出された DNA は、それぞれの木材の DNA から増幅されたものであると判断された。

PCR 法によって遺伝子が検出できない樹種がある理由の一つに、PCR 阻害物質の存在が考えられる。ナラ (一種 (*Quercus petraea*) の辺材にはエラジタンニンが含まれ、抽出した DNA 溶液の着色と PCR の阻害の原因になっていることが指摘されている (Deguilloux et

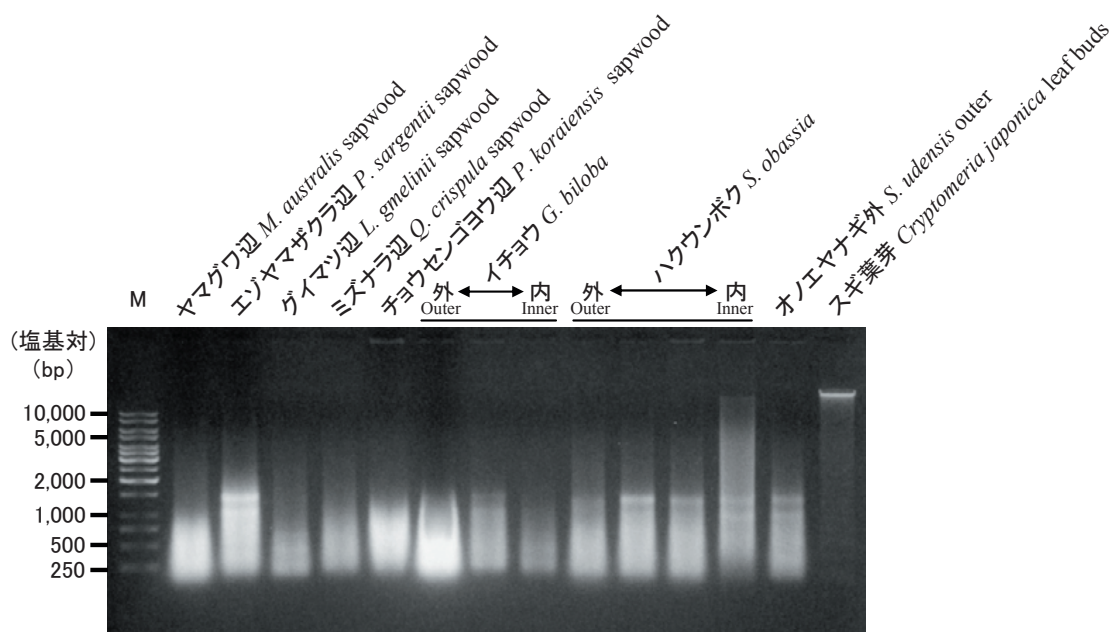


Fig. 1. 種々の木材から抽出された DNA

DNA extracted from various wood specimens

M : DNA サイズマーカー DNA size marker

辺 : 辺材 Sapwood

外 : 外側の木部 Outer part of xylem

内 : 内側の木部 Inner part of xylem

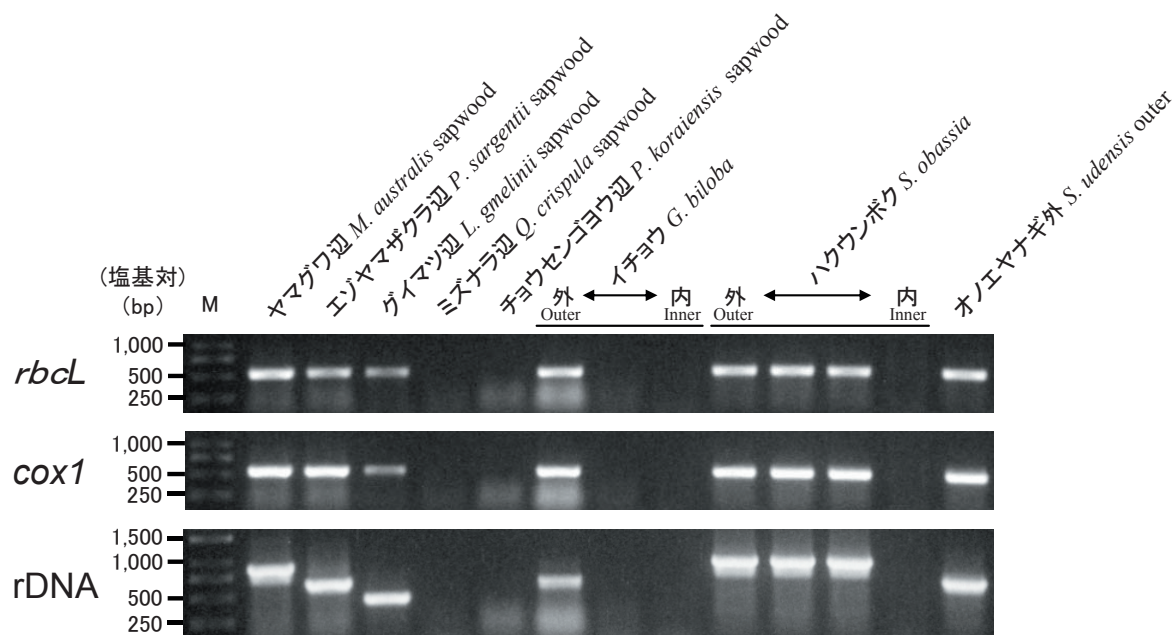


Fig. 2. 種々の木材 DNA からの遺伝子の検出

Detection of genes in DNA extracted from different positions of xylem

M : DNA サイズマーカー DNA size marker

辺 : 辺材 Sapwood

外 : 外側の木部 Outer part of xylem

内 : 内側の木部 Inner part of xylem

al., 2002)。そこで、木材の DNA から遺伝子が検出できなかったミズナラおよびチョウセンゴヨウの冬芽と針葉からそれぞれ DNA を調製し PCR を行ったところ、いずれの遺伝子も検出できた (Fig. 3)。DNA データベースの検索では、増幅された DNA の塩基配列は、チョウセンゴヨウの *rbcL* と *rDNA* はデータベースに登録のあったチョウセンゴヨウのものと、それ以外の登録のない遺伝子については同属あるいは近縁の樹木の遺伝子と高い相同性が認められた。これらの結果と、ミズナラおよびチョウセンゴヨウの辺材から得られた DNA が他の樹種の木材からの DNA と比べて低分子化しているわけではないこと (Fig. 1) から、ミズナラとチョウセンゴヨウの辺材からの DNA 溶液には木材に由来する PCR 阻害物質の混在が疑われる。また、イチチョウやハクウンボクにおいて、内側の木部由来の DNA で遺伝子が増幅されなかったことについては、木部形成後の時間の経過に伴う PCR 阻害物質の蓄積や、DNA の分解の進行が想定される。

以上の結果より、木材から DNA 分析に使用可能な葉緑体、ミトコンドリアおよび核の DNA を抽出できることがわかった。しかし、樹種および部位により DNA の抽出効率は大きく異なった。また、DNA が得られても遺伝子が検出できない場合があった。

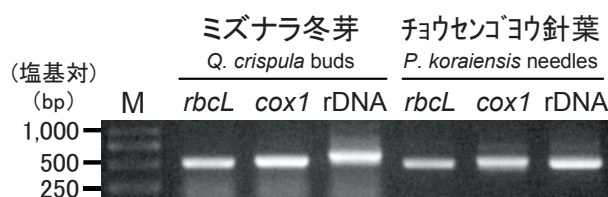


Fig. 3. ミズナラ冬芽およびチョウセンゴヨウ針葉 DNA からの遺伝子の検出  
Detection of genes in DNA extracted from *Quercus crispula* buds and *Pinus koraiensis* needles  
M : DNA サイズマーカー DNA size marker

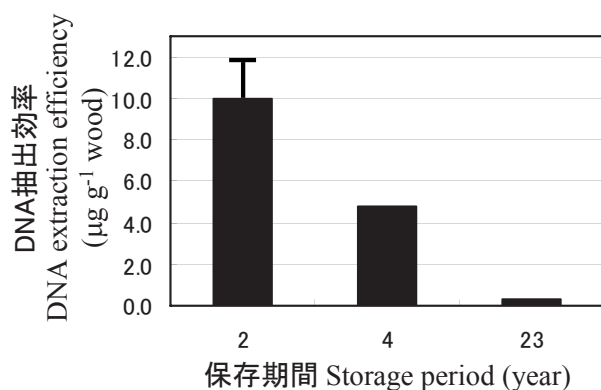


Fig. 4. 保存期間の異なるカヤ材からの DNA 抽出効率  
DNA extraction efficiency from *Torreya nucifera* wood specimens of different storage periods  
2 (n=3), 4 (n=1), 23 (n=2)

## 木材の保存期間の影響

木材は伐採された後、利用されるまでに貯蔵や流通過程で時間を経る。また、製造された木材製品の使用が長期にわたることがある。こうした伐採後の時間の長短が DNA の抽出効率に及ぼす影響を明らかにするため、保存期間の異なるカヤ材標本の辺材から DNA を抽出した。その結果、保存期間が短い標本ほど DNA の抽出効率が高かった (Fig. 4)。保存期間が 2 年の試料と比較すると、4 年で 1/2 に、23 年では 1/30 にまで DNA 抽出効率が低下した。古代の植物遺骸には還元糖とアミノ化合物が縮合してメイラード反応産物が生成し (Evershed et al., 1997)、DNA の抽出を阻害することが報告されている (Poinar et al., 1998)。メイラード反応産物は保存中の木材においても生じ、DNA の抽出効率を低下させることが示唆されている (Asif & Cannon, 2005)。長期間保存された標本からの DNA 抽出効率の低下には DNA の低分子化の進行のほかに、メイラード反応産物の生成が原因となっている可能性がある。

得られた DNA の鎖長は、250 bp 以下から 5000 bp の範囲にあったが、250 bp 付近のものが多かった (Fig. 5)。PCR 法により、遺伝子の増幅を試みたところ、保存期

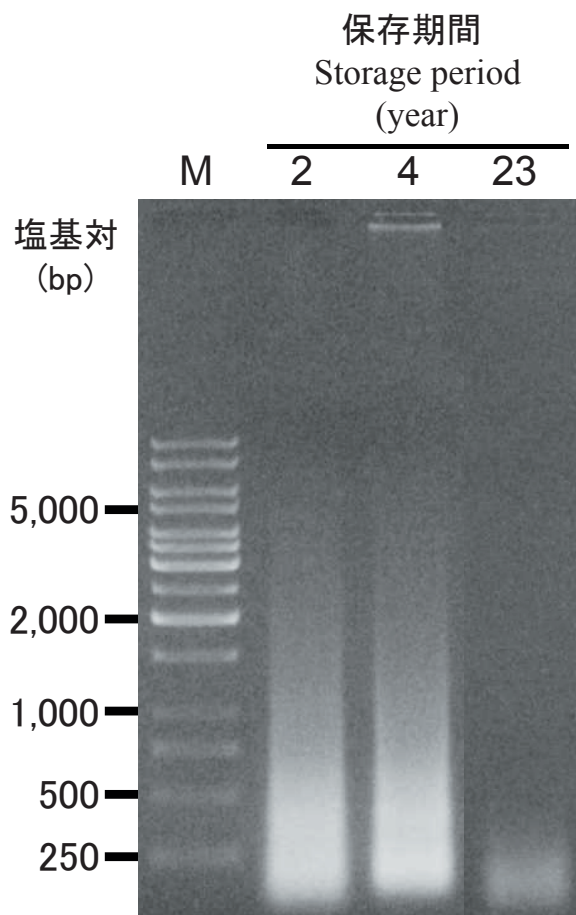


Fig. 5. 保存期間の異なるカヤ材から抽出された DNA  
DNA extracted from *Torreya nucifera* wood specimens of different storage periods  
M : DNA サイズマーカー DNA size marker



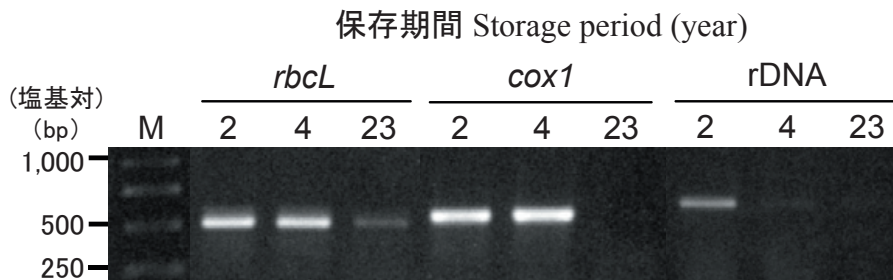


Fig. 6. 保存期間の異なるカヤ材 DNA からの遺伝子の検出  
Detection of genes in DNA extracted from *Torrey nucifera* wood specimens of different storage periods  
M: DNA サイズマーカー DNA size marker

間が2年の試料から得られたDNAでは *rbcL*、*cox1* および *rDNA* が検出できたが、保存年数が長くなるほど各遺伝子の増幅効率は低下した (Fig. 6)。PCR で増幅されたDNAは、塩基配列の決定とDNAデータベースの検索により、それらがカヤに由来することを確認した。

これらの結果から、木材の保存期間が長くなるほどDNAの抽出効率は低下し、DNA分析に適した質のDNAの取得が困難になると推測される。

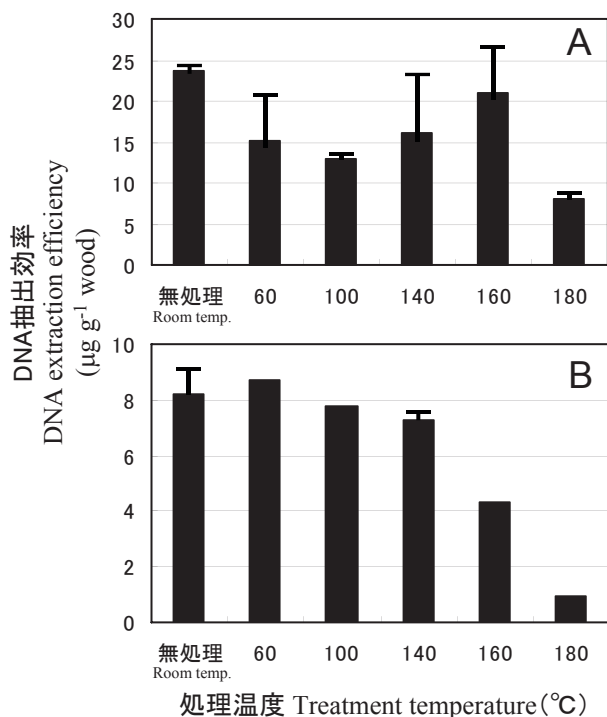


Fig. 7. 熱処理した木材からのDNA抽出効率  
DNA extraction efficiency from heat-treated wood specimens  
A: *グイマツ Larix gmelinii* Ver. *japonica* (n=2), B: ミズナラ *Quercus crispula*, 無処理 Room temp., 140 °C (n=2); 60, 100, 160, 180 °C (n=1)

#### 木材への熱処理の影響

伐採された木材は加工の前に人工乾燥される場合がある。また、合板や集成材の製造工程では素材の乾燥や接着のため熱が加えられる。そこで、加熱が木材からのDNA抽出効率に及ぼす影響を知るため、グイマツおよびミズナラの薄片を熱処理し、辺材からDNAを抽出した。これらの樹種は合板の製造に使われるものと同種(ミズナラ)あるいは近縁種(グイマツはカラマツと同属)であることから選定した(森林総合研究所, 2004)。グイマツ辺材からのDNA抽出効率は160 °Cまでの処理では明瞭な違いが認められなかったが、180 °Cでは低下した (Fig. 7A)。ミズナラにおいても、熱処理によるDNA抽出効率の低下が認められた (Fig. 7B)。抽出されたDNAの鎖長は、100 °C以下の処理では無処理の木材と顕著な違いはなかったが、140 °C以上では短くなり、DNAの低分子化が進んでいた (Fig. 8)。

それぞれの温度処理のグイマツ材から得られたDNAについて遺伝子の検出の可否を調べたところ、160 °Cまでの処理木材からは *rbcL*、*cox1* および *rDNA* のいずれもが検出されたが、180 °Cでは検出が不安定となった (Fig. 9)。これは熱処理によるDNAの分解・低分子化が進み、PCRによる遺伝子の増幅が困難になったためと考えられる。ワイン樽の製造にはナラ属の木材が使用され、製造過程で焼付けと呼ばれる熱処理が施される。樽の側板 (*Quercus robur*, *Q. petraea*) を試料とした研究では、焼付けされる前の板ではPCRで167 bpまでの長さの葉緑体DNAが増幅できたが、焼付け後の板では87 bp以下のものしか増幅できなかった (Deguilloux *et al.*, 2004)。我々の実験では約500 bpのDNAを増幅するプライマーを用いているが、より短いDNAならば180 °Cの処理でも安定して検出できる可能性がある。なお、PCRで増幅されたDNAは、塩基配列を決定後、DNAデータベースの検索により、それらがグイマツに由来することを確認した。

合板の製造工程において単板の乾燥は通常140 ~ 160 °Cで行われ、接着過程での加熱温度はそれより低い (森

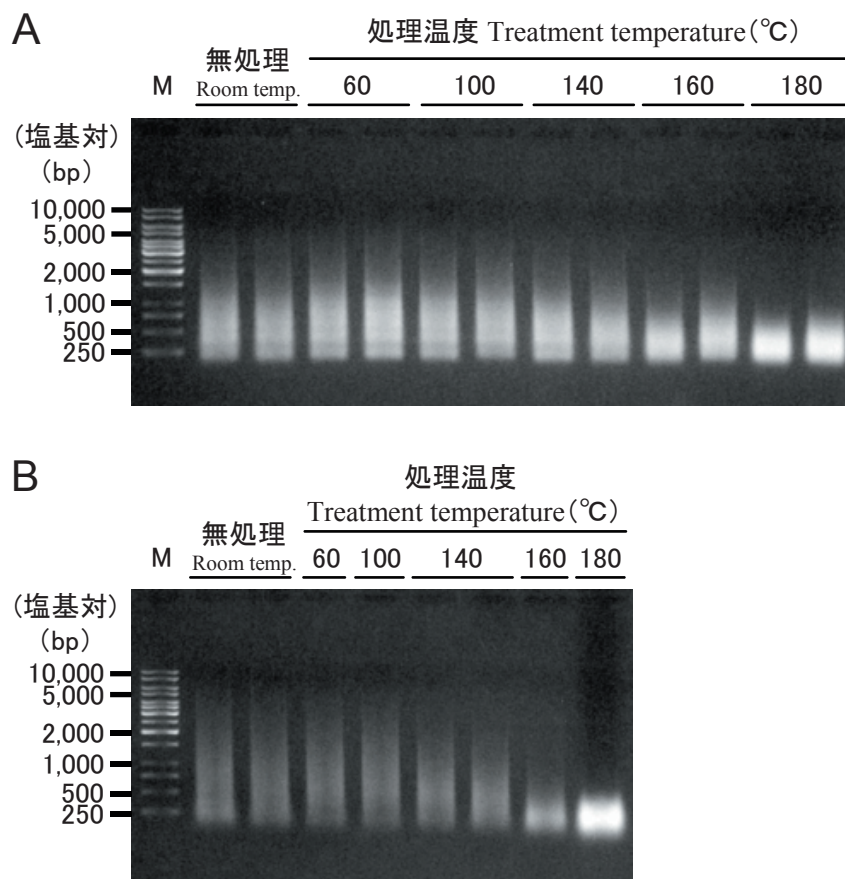


Fig. 8. 熱処理した木材から抽出された DNA  
DNA extracted from heat-treated wood specimens  
A: グイマツ *Larix gmelinii* var. *japonica*, B: ミズナラ *Quercus crispula*,  
M: DNA サイズマーカー DNA size marker

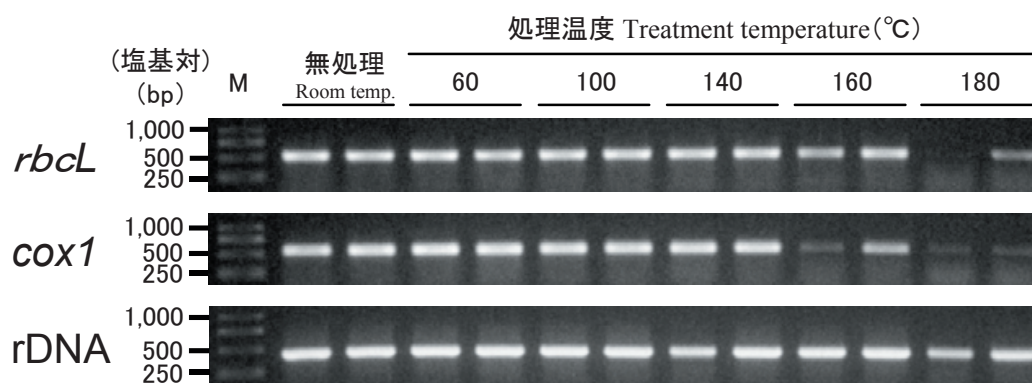


Fig. 9. 熱処理したグイマツ材 DNA からの遺伝子の検出  
Detection of genes in the DNA extracted from heat-treated *Larix gmelinii* var. *japonica* wood  
M: DNA サイズマーカー DNA size marker

林総合研究所, 2004)。したがって合板のように熱処理がなされた木材製品についても、辺材からは分析に使用可能な質の DNA の抽出が可能であると推察される。

## 結論

木材の放射方向の部位の違い、保存期間、熱処理が DNA の抽出効率と遺伝子の検出の難易に及ぼす影響を調べた。調査した 10 樹種のうち 8 種で、外側の木部



ほど DNA が効率よく抽出された。6 樹種の辺材および外側木部の DNA からは、PCR 法により葉緑体遺伝子 *rbcL*、ミトコンドリア遺伝子 *cox1* および核遺伝子 *rDNA* が増幅できた。木材標本室に保管されていたカヤ辺材では、保存期間が長くなるほど DNA の収率は低下し、遺伝子の検出が困難になった。熱処理したグイマツとミズナラの辺材では、加熱温度の上昇に伴って DNA の低分子化が進んだが、160℃までの熱処理ではグイマツの DNA から *rbcL*、*cox1* および *rDNA* が検出できた。

以上の結果から、多くの樹種の辺材または外側の木部、さらに合板の製造工程で加わる温度域・時間と同様の条件で熱処理された木材の辺材から、分析に使用可能な DNA が抽出できると考えられた。今後は、DNA が得られたにもかかわらず遺伝子が検出できない事例の原因の解明と、心材からの DNA の抽出法や遺伝子の検出法の検討を進めるとともに、本研究で得られた結果が、文化財の木材や違法伐採の対象となっている樹木の木材製品に適用できるかどうかを検証する必要がある。

#### 謝辞

木材試料を提供いただいた北海道大学北方生物圏フィールド科学センター耕地圏ステーション植物園および森林総合研究所木材標本室の木材標本の使用を助言いただいた藤井智之氏、能城修一氏、安部久氏にお礼申し上げます。木材から試験体を作製していただいた森林総合研究所加工技術研究領域木工室の皆様には感謝します。本研究は森林総合研究所交付金プロジェクト「南洋材の樹種識別及び産地特定の技術開発」(No. 200310) により行われた。

#### 引用文献

- Asif, M. J. and Cannon, C. H. (2005) DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*), *Plant Mol. Biol. Rep.*, **23**, 185-192.
- De Filippis, L. and Magel, E. (1998) Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in *Robinia* trees using RAPD-PCR, *Trees*, **12**, 377-384.
- Deguilloux, M.-F., Pemonge, M.-H. and Petit, R. J. (2002) Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **269**, 1039-1046.
- Deguilloux, M.-F., Pemonge, M. -H. and Petit, R. J. (2004) DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry, *Ann. For. Sci.*, **61**, 97-104.
- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M.-H., Gielly, L., Taberlet, P. and Petit, R. J. (1999) Amplification of oak DNA from ancient and modern wood, *Mol. Ecol.*, **8**, 2137-2140.
- Evershed, R. P., Bland, H. A., van Bergen, P. F., Carter J. F., Horton, M. C. and Rowley-Conwy, P. A. (1997) Volatile compounds in archaeological plant remains and the Maillard reaction during decay of organic matter, *Science*, **278**, 432-433.
- 藤田 哲 (2003) 食品のうそと真正評価—消費者と公正な業者を守るために、エヌ・ティー・エス, 393p.
- 福島弘文 (2003) DNA 鑑定のはなし—犯罪捜査から親子鑑定まで—, 裳華房, 129p.
- Gernandt, D. S. and Liston, A. (1999) Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae), *Am. J. Bot.*, **86**, 711-723.
- 熱帯林行動計画ネットワーク (2004) シンポジウム報告書・森林環境に配慮した木材調達の進め方・海外の森林伐採の現状と木材消費国ができること, 熱帯林行動計画ネットワーク, 50p.
- Ohyama, M., Baba, K. and Itoh, T. (2001) Wood identification of Japanese *Cyclobalanopsis* species (Fagaceae) based on DNA polymorphism of the intergenic spacer between *trnT* and *trnL* 5' exon, *J. Wood Sci.*, **47**, 81-86.
- 岡本幸江 (2003) 違法伐採のメカニズム—インドネシアの実態, 井上真 編, “アジアにおける森林の消失と保全”, 中央法規出版, 150-168.
- Poinar, H. N., Hofreiter, M., Spaulding, W. G., Martin, P. S., Stankiewicz, B. A., Bland, H., Evershed, R. P., Possnert, G. and Pääbo, S. (1998) Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*, *Science*, **281**, 402-406.
- Reynolds, M. M. and Williams, C. G. (2004) Extracting DNA from submerged pine wood, *Genome*, **47**, 994-997.
- 佐藤雄一 (2002) 違法伐採—インドネシアにおける問題化と分析—, 熱帯林業, **53**, 31-38.
- 森林総合研究所 (2004) 単板・合板, “木材工業ハンドブック” 改訂 4 版, 丸善, 373-436.
- Soltis, D. E. and Soltis, P. S. (1998) Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In Soltis, D. E., Soltis, P. S. and Doyle, J. J. (eds.) “*Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*”, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1-42.
- Tani, N., Tsumura, Y. and Sato, H. (2003) Nuclear gene sequences and DNA variation of *Cryptomeria japonica* samples from the postglacial period, *Mol. Ecol.*, **12**, 859-868.
- 藤間 剛 (2005) アジア森林パートナーシップ (AFP)

- における違法伐採対策のための合法性基準, 熱帯林業, **64**, 2-8.
- Wei, X.-X. and Wang, X.-Q. (2004) Evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene and divergence of *Larix* (Pinaceae), Mol. Phylogenet. Evol., **31**, 542-553.
- Wilson, K. and White, D. J. B. (1986) The identification of timbers. In Wilson, K. and White, D. J. B. "*The anatomy of wood: its diversity and variability*", Stobart & Son Ltd, London, 251-264.