

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5240974号
(P5240974)

(45) 発行日 平成25年7月17日 (2013. 7. 17)

(24) 登録日 平成25年4月12日 (2013. 4. 12)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A

請求項の数 7 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2006-343720 (P2006-343720)	(73) 特許権者	000183428
(22) 出願日	平成18年12月21日 (2006. 12. 21)		住友林業株式会社
(65) 公開番号	特開2008-154465 (P2008-154465A)		東京都千代田区大手町一丁目3番2号
(43) 公開日	平成20年7月10日 (2008. 7. 10)	(74) 代理人	110000855
審査請求日	平成21年11月9日 (2009. 11. 9)		特許業務法人浅村特許事務所
前置審査		(72) 発明者	石尾 将吾
			東京都千代田区丸の内一丁目8番1号 住友林業株式会社内
		(72) 発明者	中村 健太郎
			東京都千代田区丸の内一丁目8番1号 住友林業株式会社内
		審査官	野村 英雄
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 木材製品の管理方法およびプライマーセット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

木材製品の D N A 個体識別をマイクロサテライト領域に基いて行うことにより、その木材製品の原材料となった木の出所を同定してその履歴を管理する木材製品の管理方法であって、前記木材製品の原材料となった木の苗を同定してその履歴を管理することを含む、管理方法であって、前記原材料が樹齢 5 0 年までのヒノキ、樹齢 3 0 年までのスギ、樹齢 1 5 年までのラジアータ、樹齢 1 2 年までのランドウ、樹齢 1 0 年までのメリナ、または樹齢 7 年までのファルカタである、管理方法。

【請求項 2】

木材製品の原材料となった木の苗を同定して苗の植えられた林地を同定してその履歴を管理する請求項 1 に記載の管理方法。

【請求項 3】

木材製品が丸太、合板、L V L、ブロックボードまたはパーティクルボードである請求項 1 または 2 に記載の管理方法。

【請求項 4】

木材製品の原材料が針葉樹または広葉樹である請求項 1 から 3 のいずれかに記載の管理方法。

【請求項 5】

木材製品が高温処理して得られたものである請求項 1 から 4 のいずれかに記載の管理方法。

10

20

【請求項 6】

木材製品の DNA 個体識別を、マイクロサテライト領域を増幅するためのプライマーセットを用いて PCR 法により増幅し、増幅された DNA の塩基長の相違により行う、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の管理方法。

【請求項 7】

マイクロサテライト領域を増幅するためのプライマーセットであって、以下の 21 種類から選ばれるプライマーセットを用い、木材製品の原材料がヒノキ、スギ、ラジアータ、ランドウ、メリナまたはファルカタである、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の管理方法：

配列番号 1 または 2 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 3 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

10

配列番号 4 または 5 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 6 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 7 または 8 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 9 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 10 または 11 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 12 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 13 または 14 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 15 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 16 または 17 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 18 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

20

配列番号 19 または 20 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 21 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 22 または 23 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 24 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 25 または 26 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 27 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 28 または 29 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 30 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 31 または 32 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 33 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

30

配列番号 34 または 35 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 36 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 37 または 38 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 39 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 40 または 41 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 42 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 43 または 44 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 45 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 46 または 47 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 48 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

40

配列番号 49 または 50 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 51 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 52 または 53 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 54 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 55 または 56 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 57 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；

配列番号 58 または 59 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 60 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット；および

配列番号 61 または 62 で示される塩基配列からなるプライマーと、配列番号 63 で示される塩基配列からなるプライマーとからなるプライマーセット。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、木材製品の管理方法およびプライマーセットに関する。更に詳細には、木材製品のDNA個体識別をマイクロサテライト領域に基いて行うことにより、その木材製品の原材料となった木の出所を同定しその履歴を管理する木材製品の管理方法、およびマイクロサテライト領域をPCR法により増幅するために用いることができるプライマーセットに関する。

【背景技術】

10

【0002】

木材製品の原材料として天然林や人工林から大量の木が伐り出されているが、生物多様性の保護の観点から天然林の伐採は避けるべきである。また地球温暖化の観点からも、植林と伐採のサイクルを繰り返す持続的な管理がなされた人工林の構築が望まれている。21世紀は環境の時代と呼ばれ、無秩序に伐採された天然林産の木材よりも、持続的な管理のなされた人工林産の木材の方が消費者に受け入れられ易い状況であると考えられる。しかし、これまで製品まで加工された木材の履歴を厳密に明らかにする方法はなかった。

苗から丸太、製品までの履歴をたどる場合には以下の方法が考えられる。林地において伐採する際、植栽時の記録を参照して丸太にペンキや焼印、ICチップなどの方法で個体を識別する印を付け、林地から工場までの過程で適宜、記録をつける。工場ではその記録を引き継ぎ、加工後の製品に対して印刷、シール、焼印、ICチップなどの方法で印を付ける。しかし合板や机、椅子などの複数の木材からなる製品の場合、部位ごとに印を付けることは現実的とはいえない。また故意や過失による印の付け間違いや、丸太の樹皮の脱落などにより印が失われてしまう可能性は否定できない。

20

【0003】

このように従来技術では、履歴の正確性という点で満足とは言えず、製品に産地や個体の情報が付いていても必ずしもその製品の情報とは言えない為、消費者はそのデータを公表している企業を信頼するしかないというのが実情である。従って人工林産の木材または認証材と謳っても訴求力があるとはいえない。

非特許文献1に記載のように、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)分析によるDNA個体識別法を使ったスギ丸太のクローン識別が試みられているが、伐採後1ヶ月以内で樹皮が付いたものに限定されており、加工後の木材製品の識別には至っていない。

30

【非特許文献1】2005年、木材の育種「特別号」、27-29頁、「スギ流通丸太を対象としたクローン識別の試み」

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の課題は、木材製品の個体識別を行うことによって原材料の履歴を消費者に開示し、訴求力のある木材製品の管理方法を提供することにある。更には、このような木材製品の管理方法に用いることができるマイクロサテライト領域をPCR法により増幅するためのプライマーセットを提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは前記状況にかんがみ、丸太や加工後の木材製品の個体識別法について鋭意研究を重ねた結果、樹木の苗または立木の葉からDNA抽出して遺伝型、具体的には、マイクロサテライト領域を把握しておき、伐採後の丸太や加工後の木材製品からDNA抽出して遺伝型、すなわち、マイクロサテライト領域を比較することによって個体識別を行い、木材製品の出所、履歴を同定して管理できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

50

すなわち、本発明は、木材製品のDNA個体識別をマイクロサテライト領域に基いて行うことにより、その木材製品の原材料となった木の出所を同定してその履歴を管理する木材製品の管理方法に関する。

更に、本発明は、マイクロサテライト領域を増幅するためのプライマーセットであって、以下の21種類から選ばれるプライマーセットに関する：

配列番号1または2で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号3で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号4または5で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号6で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

10

配列番号7または8で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号9で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号10または11で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号12で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号13または14で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号15で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

20

配列番号16または17で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号18で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号19または20で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号21で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号22または23で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号24で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号25または26で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号27で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

30

配列番号28または29で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号30で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号31または32で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号33で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号34または35で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号36で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

40

配列番号37または38で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号39で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号40または41で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号42で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号43または44で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号45で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

50

配列番号 4 6 または 4 7 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 4 8 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号 4 9 または 5 0 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 5 1 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号 5 2 または 5 3 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 5 4 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号 5 5 または 5 6 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 5 7 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

10

配列番号 5 8 または 5 9 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 6 0 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；および

配列番号 6 1 または 6 2 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 6 3 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット。

【発明の効果】

【0007】

20

以下に詳細に説明するように、本発明の木材製品の原材料の出所、履歴を管理する方法は、植物個体の固有の生物学的情報を用いてその出所、履歴を同定し管理するために、従来起こりえた詐称や過失による表示間違いを完全になくことができ、消費者がその木材製品の原材料となった木材が天然林由来なのか、あるいは人工林（認証林を含む）由来なのか選択して購入することが出来る。その結果として、人工林産由来の木材が優先的に利用され、天然林の違法伐採が減少することによって生物多様性が守られる。

また、本発明によれば、丸太はもとより、合板や L V L、ブロックボードといった加工された木材製品においても個体識別が可能である。ヒノキを例にすれば、約 8 0 年生の木の樹皮から 5 0 年前までの組織から個体識別が可能である。

また合板、L V L、ブロックボードなどの製造時において 2 3 0 ℃まで加熱して製造されたものであっても製造時の熱により識別不能とはなりえない。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明木材製品の管理方法においては、木材製品の D N A 個体識別をマイクロサテライト領域に基いて行い、その木材製品の原材料となった木の出所を同定してその履歴を管理する。

マイクロサテライト領域は、植物のゲノム中に存在する、シトシンとアデニン、チミンとグアニンなどの数塩基からなるモチーフの繰り返し配列であり、高頻度で広く分布することが知られた D N A 領域である。マイクロサテライト領域を増幅するように設計された P C R マーカーの多くは、多型性が抜きん出て高くしかも共優性であることから、精密な遺伝子解析に適しており、近年、育種学、集団遺伝学などの分野に重用されている。従って、木材製品から D N A を抽出し、その D N A を鋳型とし、マイクロサテライト領域を含むマイクロサテライトマーカーを P C R によって増幅し、増幅されたマイクロサテライトマーカーの塩基長によって木材製品の個体識別が可能となる。

40

マイクロサテライトマーカーは、植物のゲノム中に存在するマイクロサテライト領域に隣接する両端の塩基配列を、dual-suppression-PCR法（練春蘭ら、日林誌 8 6（2），1 9 1－1 9 8，2 0 0 4；Chunlan Lian et al., Journal of Plant Research, 1 1 4, 3 8 1－3 8 6, 2 0 0 1；Chunlan Lian et al., Molecular Ecology Notes 2, 2 1 1－2 1 3, 2 0 0 2）により特定することができる。この

50

ようにして特定されたマイクロサテライトマーカーにより、PCRによって増幅するためのプライマーセットを設計することができる。

【0009】

以後の実施例1の表1に記載されているように、本発明により、クマツヅラ科グメリナ属グメリナ (*Gmelina arborea* Roxb.)、パンヤ科パンヤノキ属ランドウ (*Ceiba pentandra*) およびマツ科マツ属ラジアータパイン (*Pinus radiata*) のマイクロサテライト領域を同定、識別するためのプライマーセットが新たに見出された。具体的には、グメリナ用プライマーセットとしては、以下のものが挙げられる。

配列番号1または2で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号3で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

10

配列番号4または5で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号6で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号7または8で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号9で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号10または11で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号12で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

20

配列番号13または14で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号15で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号16または17で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号18で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号19または20で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号21で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；および

30

配列番号22または23で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号24で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット。

【0010】

ランドウ用プライマーセットとしては、以下のものが挙げられる。

配列番号25または26で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号27で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号28または29で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号30で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

40

配列番号31または32で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号33で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号34または35で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号36で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号37または38で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号39で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

50

配列番号 40 または 41 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 42 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；および

配列番号 43 または 44 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 45 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット。

【0011】

ラジアパタイン用プライマーセットとしては、以下のものが挙げられる。

配列番号 46 または 47 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 48 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号 49 または 50 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 51 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号 52 または 53 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 54 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号 55 または 56 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 57 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；

配列番号 58 または 59 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 60 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット；および

配列番号 61 または 62 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体と、配列番号 63 で示される塩基配列を有するプライマーまたはその変異体とからなるプライマーセット。

【0012】

上記のプライマーセットにおいて、変異体とは、それぞれのプライマーの各配列番号に示す塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列を有し同様にプライマーとしての機能を有するものを指す。ここでいうストリンジェントな条件でハイブリダイズするとは、PCR法による増幅における、2本鎖DNAの変性後のアニーリングの工程で、アニーリングと同様の条件下で、各配列番号に示す塩基配列に相補的な塩基配列とハイブリダイズすることを指す。このようなアニーリングと同様の条件としては、例えば、通常のPCR反応用緩衝液中で、dNTP (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) およびDNAポリメラーゼと混合し、混合物を、例えば43℃から68℃の温度で反応させる条件が挙げられる。より具体的には、以後の実施例1において採用されるPCRにおけるアニーリング条件が挙げられる。また、同様にプライマーとしての機能を有するとは、PCRによる、同一個体からのゲノムDNAの増幅において、プライマーとして使用した場合に、同様に、マイクロサテライト領域を増幅できることを指す。

【0013】

本発明においては、上記のプライマーセット以外にも、既に公知のプライマーセットを使用できることは言うまでもない。このような公知のプライマーセットとしては、例えば、以後に記載する実施例1の表2に示されているように、スギ科スギ属 (*Cryptomeria japonica*) スギ用のプライマーセット (Moriguchi Y., Iwata H., Ujino-Ihara T., Yoshimura K., Taira H., Tsumura Y. (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. Theor. Appl. Genet. 106:751-758) ヒノキ科ヒノキ属 (*Chamaecypa*

10

20

30

40

50

ris obtusa) ヒノキ用のプライマーセット (Nakao Y., Iwata H., Matsumoto Y., Tsumura Y., Tomaru N. (2001) Highly polymorphic microsatellite markers in Chamaecyparis obtusa. Can. J. For. Res. 31: 2248-2251) を挙げることができる。また、特開 2006-141368 号公報の記載されるモルッカネム用のプライマーセットを挙げることができる。

【0014】

上記したプライマーセットを用いて、木材製品から抽出した DNA を鋳型とし、マイクロサテライト領域を含むマイクロサテライトマーカを PCR によって増幅し、増幅されたマイクロサテライトマーカの塩基長によって木材製品の個体識別ができる。木材製品からの DNA 抽出は、CTAB 法や SDS 法などの定法により行うことができる、また、PCR 反応後の増幅した DNA の断片長の解析は、DNA シークエンサーを用いたキャピラリー電気泳動や、ガラス板を用いたポリアクリルアミド電気泳動、マススペクトル法等によって行うことが出来る。キャピラリー電気泳動の場合には、プライマーの片側を蛍光標識して蛍光検出器で検出すればよく、ガラス板を用いたポリアクリルアミド電気泳動の場合には、エチジウムブロマイドや銀染色等の定法を用いて検出することが出来る。

【0015】

以上に詳述したようにして、木材製品の DNA 個体識別をマイクロサテライト領域に基いて行うことにより、その木材製品の原材料となった木の出所を同定してその履歴を管理することができる。ここで、例えば、当該木材製品の原材料となった木の苗や葉などから DNA を抽出して、上記した方法により、そのマイクロサテライト領域を予め同定しておき、この同定データと、木材製品からの DNA から同定したマイクロサテライト領域を照合することにより、木材製品の原材料となった木の出所を同定し管理することができる。このようにすれば、木材製品の原材料となった木の苗を同定して苗の植えられた林地を同定してその履歴を管理することもできる。

本発明では、木材製品としては、特に制限されず、いずれの木材製品も対象とすることができる。木材製品としては、例えば、丸太、合板、LVL (単板積層材)、ブロックボード、パーティクルボードなどが挙げられる。

また、木材製品の原材料としては、針葉樹または広葉樹が好ましいものとして挙げられ、具体的には、グメリナ種、ランドウ種、ラジアータパイン種、モルッカネム種に属する植物、ヒノキ、スギなどが挙げられる。

【0016】

本発明の方法においては、木材製品の原材料が樹齢 80 年までの針葉樹や広葉樹の樹木の場合でも、その出所を同定することができる。より具体的には、例えば、以後の実施例 1 に示されているように、木材製品の原材料が樹齢 40 年までのヒノキの場合に、その出所を同定し管理することができる。また、例えば、樹齢 30 年までのスギ、樹齢 15 年までのラジアータ、樹齢 12 年までのランドウ、樹齢 10 年までのメリナ、樹齢 7 年までのファルカタの場合にも、その出所を同定して管理することができる。

更には、本発明の方法では、以後の実施例 1 において明らかにされているように、木材製品が、例えば、230℃程度に高温処理して得られたものでも、その出所を同定して管理することができる。

【0017】

以下に、本発明を実施例に基づいて説明する。本発明は以下の実施例によってなんら限定されるものではなく、本発明の属する技術分野における通常の変更を加えて実施することが出来ることは言うまでもない。

実施例 1

1、個体識別用 DNA マーカー (マイクロサテライトマーカー) の作製

グメリナ (Gmelina arborea)、ランドウ (Ceiba pentandra)、ラジアータパイン (Pinus radiata) のゲノム中に存在するマイクロサテライト領域に隣接する両端の塩基配列を、dual-suppression-

10

20

30

40

50

PCR 法（練春蘭ら、日林誌 86（2），191-198，2004；Chunlian Lian et al., Journal of Plant Research, 114, 381-386, 2001；Chunlian Lian et al., Molecular Ecology Notes 2, 211-213, 2002）に従って特定し、その塩基配列を基にプライマーセットを設計した。プライマー配列については表 1 に示した。これらのセットは、それぞれグメリナ種、ランドウ種、ラジアータパイン種に属する植物のゲノム中のマイクロサテライト領域を PCR により増幅するためのプライマーセットとなるものである。

【0018】

【表 1】

名称	フォワードプライマー1	フォワードプライマー2	リバースプライマー
GA-1	GAGCAAATTAACAACTGCATCTC 配列番号 1	TGAATTGTGTCTGTGATCTTC 配列番号 2	ACTCGTCCCGTGGAGTAGTG 配列番号 3
GA-2	ATCTAGTTGGAAAAGGAAAGCCGC 配列番号 4	ACTCGCAGCGTCGAAAATG 配列番号 5	TAAGAAGCGGTGAGCTTGTG 配列番号 6
GA-3	GTTAATTGTGCGAAAGCGATATTG 配列番号 7	ATATTGTGAACCTAATACGAAC 配列番号 8	TTCATTGTCTCCCGATTTC 配列番号 9
GA-4	GATGGTGTGAATTGATTGGTAAGTG 配列番号 10	GGAGTTTCCAATGCTCTG 配列番号 11	GAAATTTGCAGCCGTGTG 配列番号 12
GA-5	GTGGTCCCTGTCTCCTGAAG 配列番号 13	TCCTGAAGTGAGAGATTGAAAGA G 配列番号 14	GACCACAGTGCCTATTTCAG 配列番号 15
GA-6	GCCGTTTTGTTCGGATTTAG 配列番号 16	GGATTTTAGTATTGCACGCTG 配列番号 17	TTTGAATCTTTGAAGGCTAATG 配列番号 18
GA-7	GTTCAAGGCTAATTATTGTGTGTAG 配列番号 19	GAAGTATGCATTAGAGCTTCG 配列番号 20	AACGTCTGAATCCGTGTTTC 配列番号 21
GA-8	TAGTTTGGCGTGGGAGAGAG 配列番号 22	TTTTTCGTTTTCCGGTGTG 配列番号 23	AGATGATGCACAGGTAGGC 配列番号 24
CP-1	TCGCAAGGCTTACCTAAATTC 配列番号 25	CATCCATCAGTATCATATACAAC CTCA配列番号 26	AGCCGTACGATTGTATGTC 配列番号 27
CP-2	TTGCTGATCTGCTCTGCTTC 配列番号 28	CTGGACAAAAGAAACCGAGAA 配列番号 29	CCCTCACTCATGTGGCATTG 配列番号 30
CP-3	AACCCTCCATTTTTGTTGG 配列番号 31	TGACATCCAGATTGGTCTTTG 配列番号 32	TTGAAGGTAGGCCACAGAGG 配列番号 33
CP-4	GGCCACACCTTGATAAACAG 配列番号 34	GGATACGTGGCTTTTCGATG 配列番号 35	CCAAAGTTCCACTCCAACCA 配列番号 36
CP-5	CCATGGCAATTGATCGACTA 配列番号 37	ATCGTACGTGGGATTGAGG 配列番号 38	GGATTGGTGCTGATTCTC 配列番号 39
CP-6	CATTTTCGTCCATAGCTGCTG 配列番号 40	TGCTATGAGCTGTTTCATGC 配列番号 41	GGTGTACGCCTTGCTGAATC 配列番号 42
CP-7	CTCTTCATTTTCGTCCACAGC 配列番号 43	CCAAAAATGAATTGGGCTTG 配列番号 44	GAGCGATATCCTACGGGATG 配列番号 45
PR-1	CGATGCCATATGCACAGAAC 配列番号 46	GTCCATGCGATACACGATTG 配列番号 47	TATATCGGGTTCGGCTATCG 配列番号 48
PR-2	GCCACAAAATGTGTCTAATCCA 配列番号 49	GTCATGTCTATTTAGTTGTTGAG CA配列番号 50	AAACATGCGTAGACCCAACA 配列番号 51
PR-3	TTGGTTGGCAGCTCCTTATC 配列番号 52	ACTAGGGATGACGGGACCAG 配列番号 53	TCCTGGGTTAGCATAGATTAGATG 配列番号 54
PR-4	CAAAAGGTTTTATTCTTGTGC 配列番号 55	GCACACTAATCTTTCGCTCTG 配列番号 56	CCGAAAGGGCCAGTAGTGA 配列番号 57
PR-5	CCCTATGAGTGACATCAGCG 配列番号 58	TTTAAAGGTATTACAGACTCATG TGC配列番号 59	CGATCCATTGCTTCAATAACG 配列番号 60
PR-6	TGACTCAACATTACCAACAAAGTG 配列番号 61	TTTCAATTGTTATTTGATGGTCA TG配列番号 62	TGACCATCAAAGTATTCTAATTCAG 配列番号 63

表 1 中、GA はグメリナ (*Gmelina arborea*) を、CP はランドウ (*Ce*

10

20

30

40

50

i b a p e n t a n d r a) を、R P はラジアータパイン (P i n u s r a d i a t a) を示す。

【0019】

2、木材からのDNA抽出

ヒノキの板、スギ合板、加熱プレスしたグメリナの単板、ランドウのブロックボード、ラジアータパインのLVL（単板積層材）をそれぞれヤスリで削り、粉末とした。粉末0.5gに対して4mlのCTAB溶液（2W/V% 臭化セチルトリメチルアンモニウム、1.4M 塩化ナトリウム、20mM EDTA、100mM Tris-HCl（pH 8.0）、0.5V/V% 2-メルカプトエタノール）を加え、65℃で1時間加温した。ついで、等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）混液を添加し、ゆっ

10

くくりと混和してから遠心（15,000rpm、5min、18℃）して上清を回収し、この上清に等量のイソプロピルアルコールを加えて混和し、-30℃で10分間静置することによりDNAおよびRNAの混合物を析出させた。析出させた混合物は再び遠心（15,000rpm、7min、4℃）してペレットとして分離し、これをTE緩衝液（1mM EDTA（pH 8.0）、10mM Tris-HCl（pH 8.0））0.1mlに溶解して10mg/mlのリボヌクレアーゼ（和光純薬（株）製）1μlを加え、37℃で30分間加温してRNAを分解させた後、等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）混液を添加し、ゆっくくりと混和してから遠心（15,000rpm、5min、18℃）して上清を回収し、この上清に2倍量の100%エタノールと、1/10倍量の3M酢酸ナトリウムを加えて混和し、-30℃で10分間静置することによりD

20

NAを析出させた。析出させた混合物は再び遠心（15,000rpm、7min、4℃）して得られたペレットに100μlのTE緩衝液を加えて溶解し、以後の操作に供した。

【0020】

3. PCR反応によるマイクロサテライト領域の増幅

抽出したDNAを鋳型として、表1または表2に示すプライマーセットを用いて、QIAGEN Multiplex PCR Kit（（株）キアゲン製）によりPCR反応を行った。即ち、1μlのDNA溶液に、2×QIAGEN Multiplex PCR Master Mixを5μl、2μMの表1に示すフォワードプライマー1か2のいずれか1μlと、あるいは表2のフォワードプライマーの1μlと、2μMの蛍光標識

30

された表1または表2に示すリバースプライマーを1μl加え、滅菌蒸留水で全液量を10μlとした。これを以下の条件で反応した。

【0021】

ステップ1：95℃	15分	1サイクル
ステップ2：94℃	30秒→57℃	90秒→72℃
	60秒	40サイクル
ステップ3：60℃	30分	1サイクル

【0022】

PCR産物は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems（株）製）を用いて解析した。

【0023】

【表 2】

名称	フォワードプライマー	リバースプライマー
Cjgssr30	TCAACATGCTACTATCAACACT 配列番号 6 4	TGGTGGGAGAGACCTAGA 配列番号 6 5
Cjgssr140	GGGAAGAGGGAAAGAGTTCAT 配列番号 6 6	GGACTGGGAGAGAGGTGAG 配列番号 6 7
Cjgssr175	ACCCTTTGAATTATTCCTTGAG 配列番号 6 8	AGCGGAAAAAACTACATCAGA 配列番号 6 9
Cjgssr193	CTATCTAGTTCACTGCCAATTC 配列番号 7 0	ATGGAGAGTAGCAGAGAAGTT 配列番号 7 1
Co31	AACAAATAGGCACCCAATTC 配列番号 7 2	GATGGTGAGATGAGGGAGG 配列番号 7 3
Co66	CTAGGAGCCAATCTAAGACTTCTC 配列番号 7 4	TGACAATGAAATCCTACAAGACC 配列番号 7 5
Co67	CTCAAATAACTACCCAAACACTC 配列番号 7 6	TCCAATGCCTTACAAAGC 配列番号 7 7
Co69	TATATTGGCTCAAGGTGGGT 配列番号 7 8	AATCTGAGAGCTGCAAGGAA 配列番号 7 9

10

表 2 中、C j g はスギ (*Cryptomeria japonica*)、C o はヒノキ (*Chamaecyparis obtuse*) を示す。それぞれ Moriguchi Y., Iwata H., Ujino-Ihara T., Yoshimura k., Taira H., Tsumura Y. (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. Theor. Appl. Genet. 106:751-758 および Nakao Y., Iwata H., Matsumoto Y., Tsumura Y., Tomaru N. (2001) Highly polymorphic microsatellite markers in *Chamaecyparis obtusa*. Can. J. For. Res. 31:2248-2251 を参考にした。

20

【0024】

4. 結果

(1) 解析結果のいくつかの例を図に示す。図 1 は実験に用いたヒノキの木材の断面を示す模式図である。図 1 に示すように、約 40 年生のヒノキ板をサンプルとし、中心から樹皮に向かって 10 年ごとに、40-1、40-2、40-3 および 40-4 に示す幅の断面上からそれぞれサンプルを採取し、DNA を抽出して、配列番号 7 2 および 7 3 のプライマーセットを用いて PCR 増幅し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems (株) 製) を用いて解析した結果を、それぞれ図 3 から図 6 に示した。また、図 2 に示すように、約 80 年生のヒノキ板をサンプルとし、中心から樹皮に向かって 10 年ごとに、80-1、80-2、80-3、80-4、80-5、80-6、80-7 および 80-8 に示す幅の断面上からそれぞれサンプルを採取し、DNA を抽出して、プライマーセットを用いて PCR 増幅し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems (株) 製) を用いて解析した結果を、それぞれ図 7 から図 14 に示した。図 7 から 11 および図 13 は、配列番号 7 2 および 7 3 のプライマーセットを用いた場合の結果を示し、図 12 は、配列番号 7 4 および 7 5 のプライマーセットを用いた場合の結果を示し、図 14 は、配列番号 7 8 および 7 9 のプライマーセットを用いた場合の結果を示す。

30

40

これらの図から得られるヒノキの個体識別の結果を表 3 にまとめて示す。表 3 中、○は識別可能、×は識別不能を意味する。

50

【0025】

【表3】

40-1	40-2	40-3	40-4				
○	○	○	○				
80-1	80-2	80-3	80-4	80-5	80-6	80-7	80-8
×	×	×	○	○	○	○	○

【0026】

表3から明らかなように、樹齢約40年のヒノキの場合には、個体識別可能であり、また樹齢約80年のヒノキでも、その樹皮から約50年前の組織までは、個体識別可能である。

10

【0027】

(2) 図15に示すように、130℃、180℃および230℃でそれぞれ加熱プレスしたグメリナ板の内側および表面からサンプルを採取し、それらのサンプルからDNAを抽出して、プライマーセットを用いてPCR増幅し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems (株) 製) を用いて解析した結果を、図16から図21に示した。図16は、130℃で加熱プレスしたグメリナ板の内側からのサンプルを用い、配列番号8および配列番号9をプライマーセットとして用いた場合の結果を、図17は、130℃で加熱プレスしたグメリナ板の表面からのサンプルを用い、配列番号19および配列番号21をプライマーセットとして用いた場合の結果を、図18は、180℃で加熱プレスしたグメリナ板の内側からのサンプルを用い、配列番号19および配列番号21をプライマーセットとして用いた場合の結果を、図19は、180℃で加熱プレスしたグメリナ板の表面からのサンプルを用い、配列番号19および配列番号21をプライマーセットとして用いた場合の結果を、図20は、230℃で加熱プレスしたグメリナ板の内側からのサンプルを用い、配列番号19および配列番号21をプライマーセットとして用いた場合の結果を、図21は、230℃で加熱プレスしたグメリナ板の表面のサンプルを用い、配列番号23および配列番号24をプライマーセットとして用いた場合の結果を示す。

20

これらの図から得られるグメリナの個体識別の結果を表4にまとめて示す。表3中、○は識別可能、×は識別不能を意味する。

30

【0028】

【表4】

	130度	180度	230度
表面	○	○	○
内側	○	○	○

【0029】

表4から明らかなように、130℃、180℃および230℃でそれぞれ加熱プレスしたグメリナ板の内側および表面からサンプルした場合に、いずれのサンプルを用いた場合にも、個体識別可能である。

40

【0030】

(3) ランドウ ブロックボードのサンプルについて、配列番号35および配列番号36のプライマーセットを用いて解析した結果を図22に、ラジャータイパインLVLのサンプルについて、配列番号46および配列番号48のプライマーセットを用いて解析した結果を図23に、スギ合板のサンプルについて、配列番号70および71をプライマーセットを用いて解析した結果を図24に示す。

これらの図から明らかなように、いずれのサンプルについても、個体識別可能である。

【図面の簡単な説明】

50

【0031】

【図1】図1は、実施例1で用いた約40年生のヒノキの木材の断面を示す模図である。

【図2】図2は、実施例1で用いた約80年生のヒノキの木材の断面を示す模図である。

【図3】図3は、図1の40-1に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図4】図4は、図1の40-2に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図5】図5は、図1の40-3に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図6】図6は、図1の40-4に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

10

【図7】図7は、図2の80-1に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図8】図8は、図2の80-2に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図9】図9は、図2の80-3に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図10】図10は、図2の80-4に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図11】図11は、図2の80-5に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

20

【図12】図12は、図2の80-6に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図13】図13は、図2の80-7に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図14】図14は、図2の80-8に示す幅の断面上からのサンプルについての解析結果を示す。

【図15】図15は、加熱プレスしたグメリナ板の内側および表面からのサンプル採取の模式図である。

【図16】図16は、130℃で加熱プレスしたグメリナ板の内側からのサンプルについての解析結果を示す。

30

【図17】図17は、130℃で加熱プレスしたグメリナ板の表面からのサンプルについての解析結果を示す。

【図18】図18は、180℃で加熱プレスしたグメリナ板の内側からのサンプルについての解析結果を示す。

【図19】図19は、180℃で加熱プレスしたグメリナ板の表面からのサンプルについての解析結果を示す。

【図20】図20は、230℃で加熱プレスしたグメリナ板の内側からのサンプルについての解析結果を示す。

【図21】図21は、230℃で加熱プレスしたグメリナ板の表面のサンプルについての解析結果を示す。

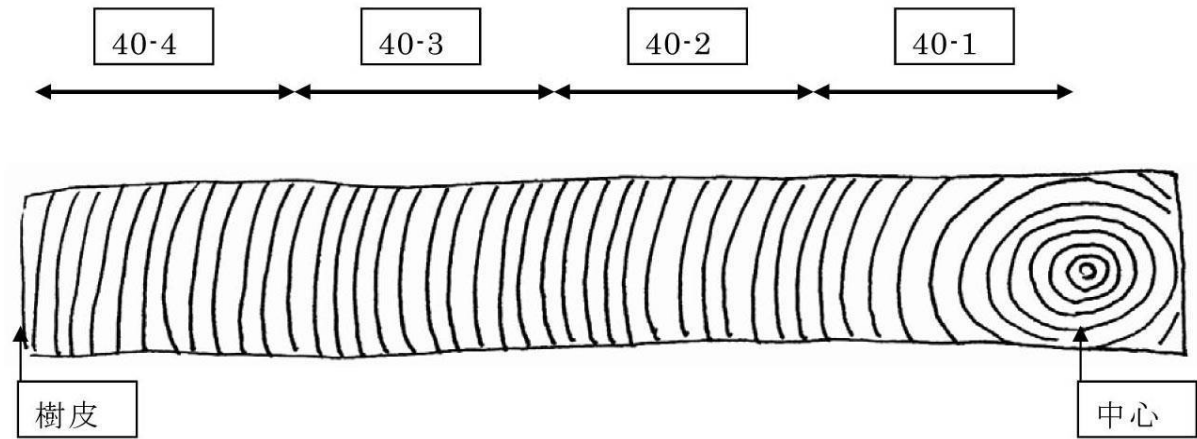
40

【図22】図22は、ランドウ ブロックボードのサンプルについての解析結果を示す。

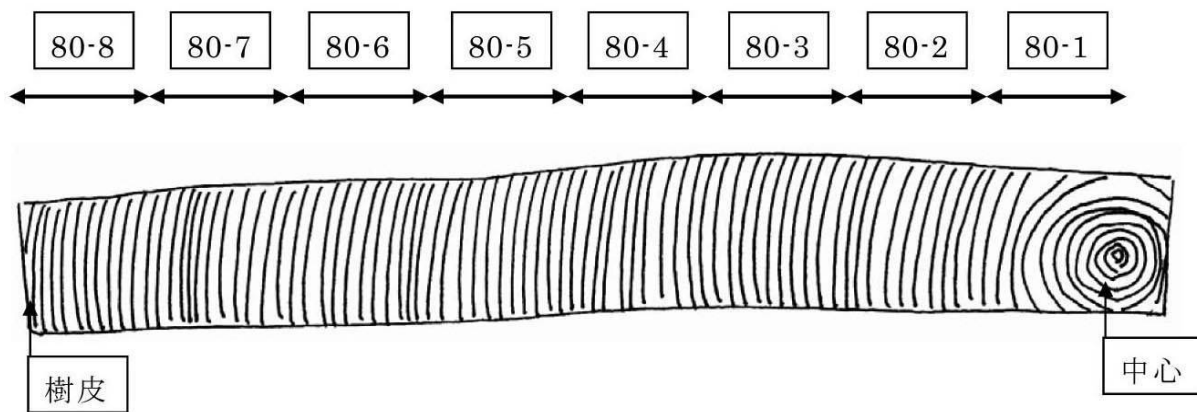
【図23】図23は、ラジャータイパイン LVL のサンプルについての解析結果を示す。

【図24】図24は、スギ合板のサンプルについての解析結果を示す。

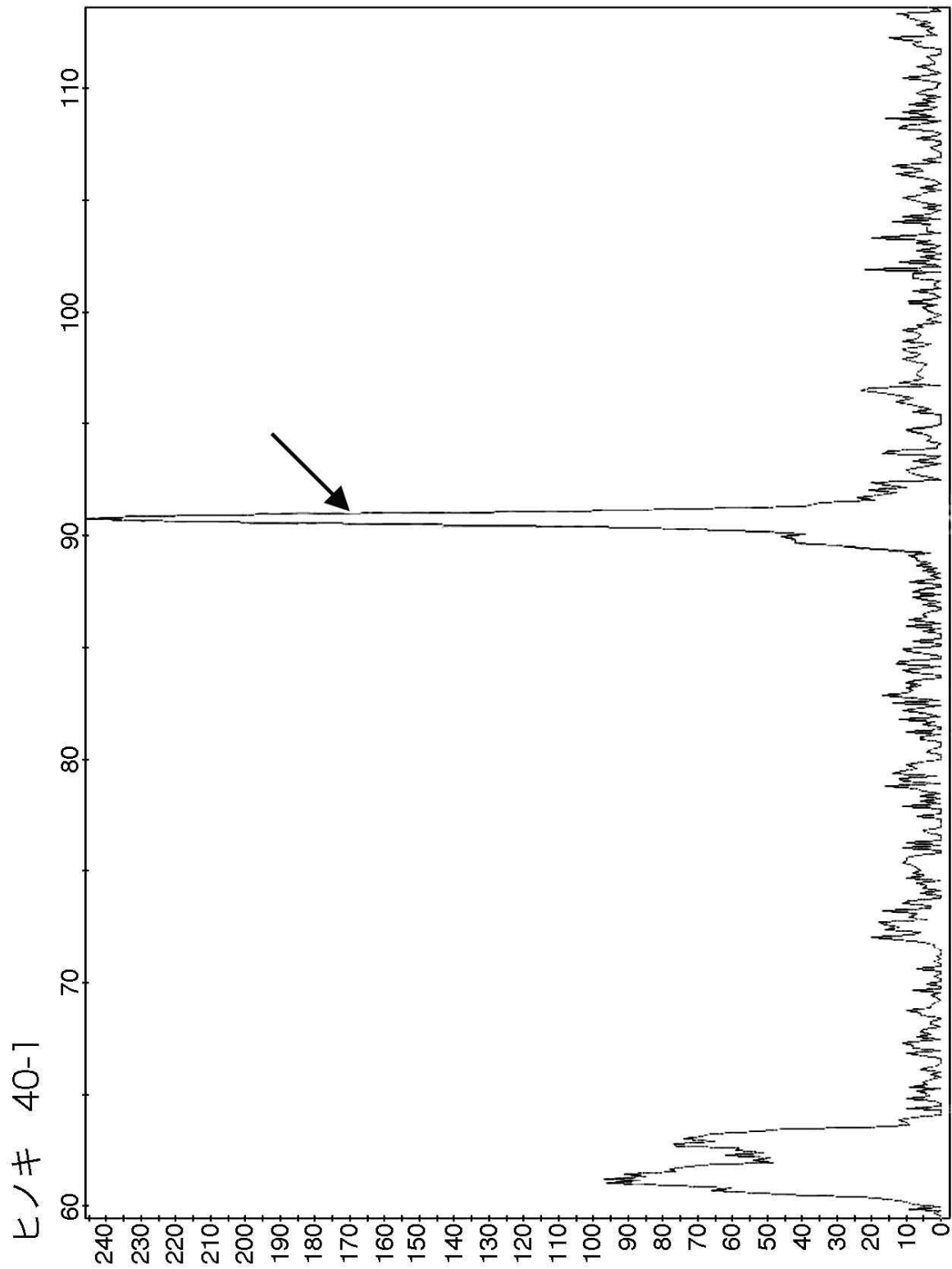
【図 1】



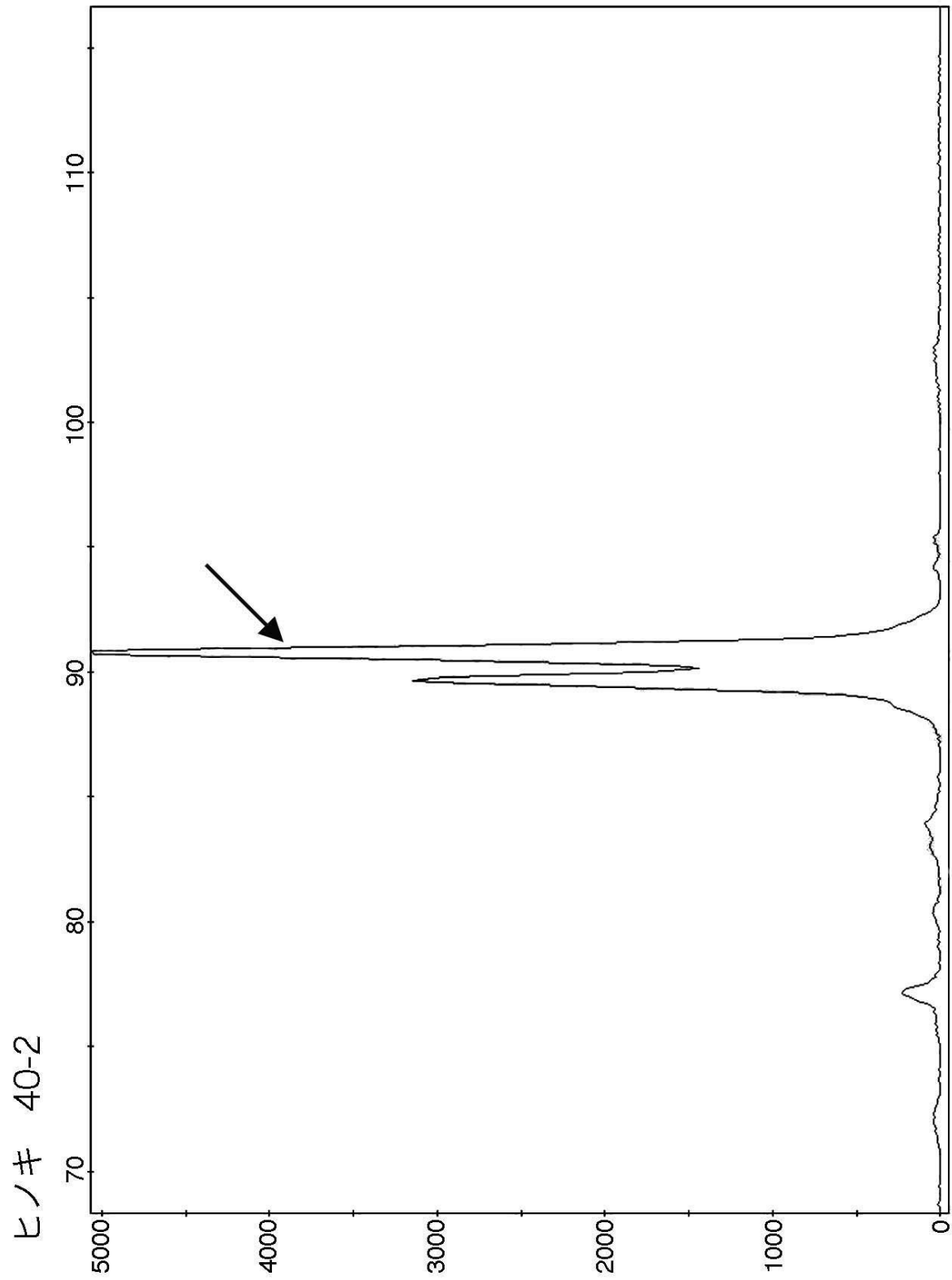
【図 2】



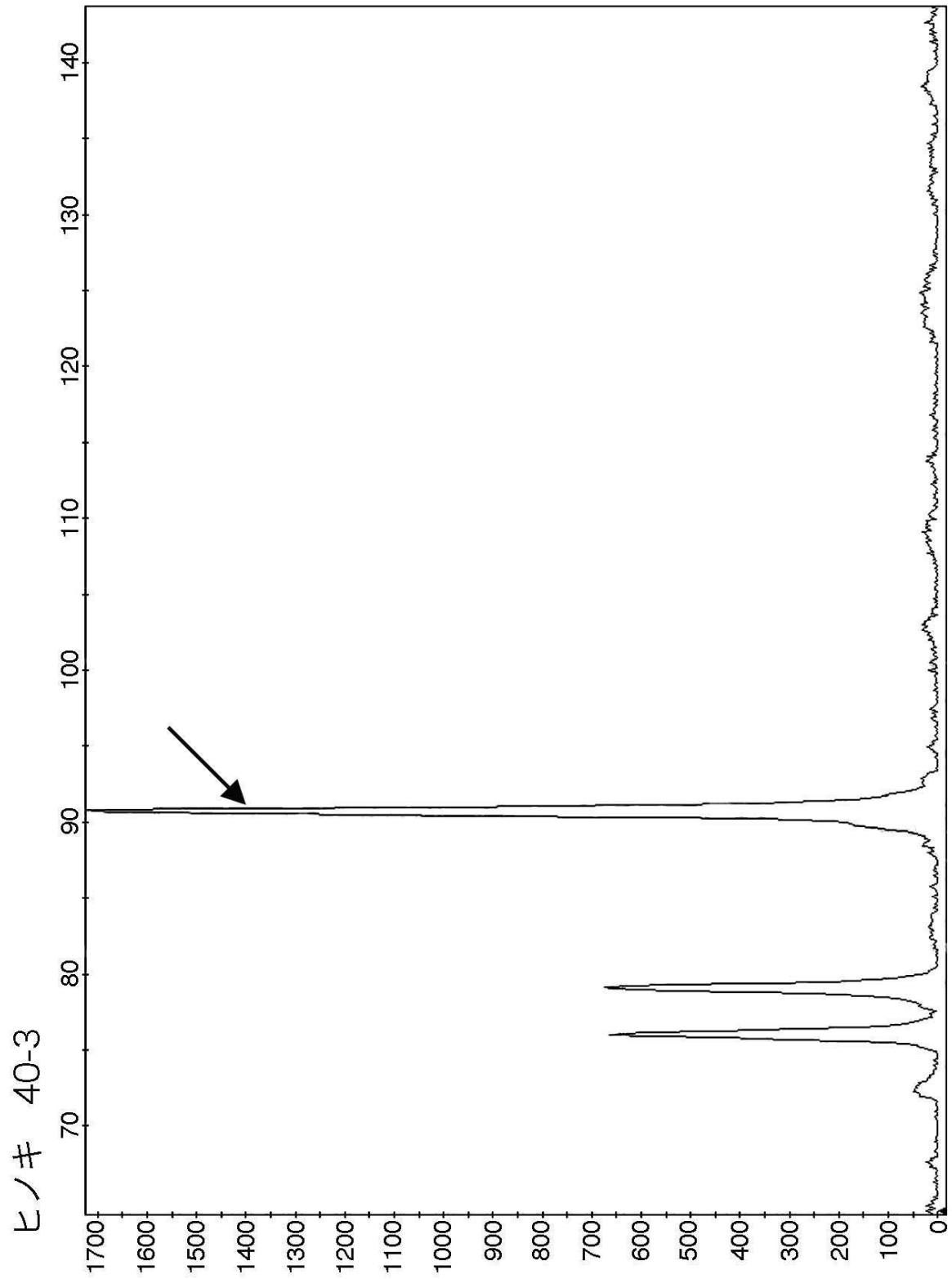
【図 3】



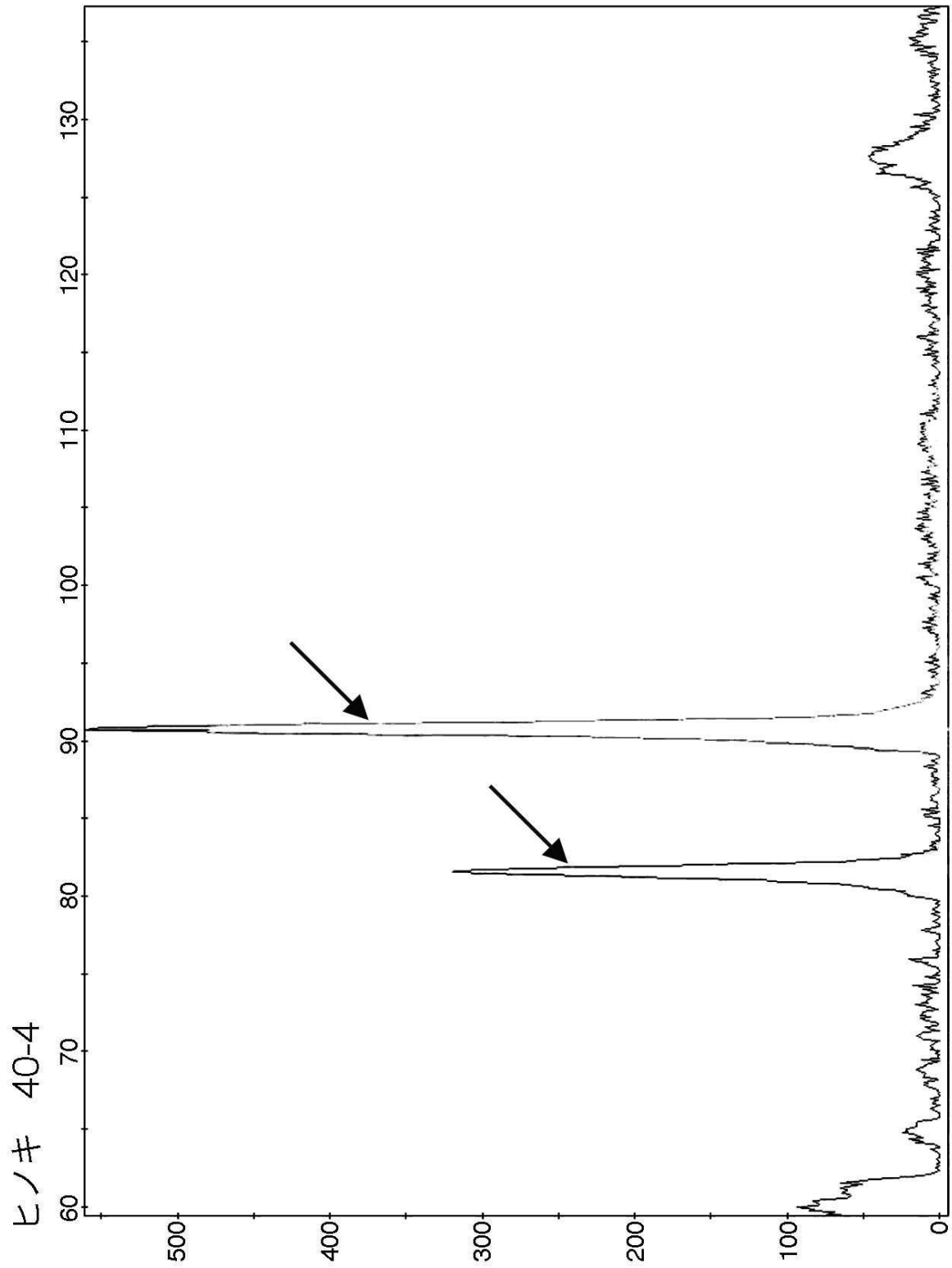
【図 4】



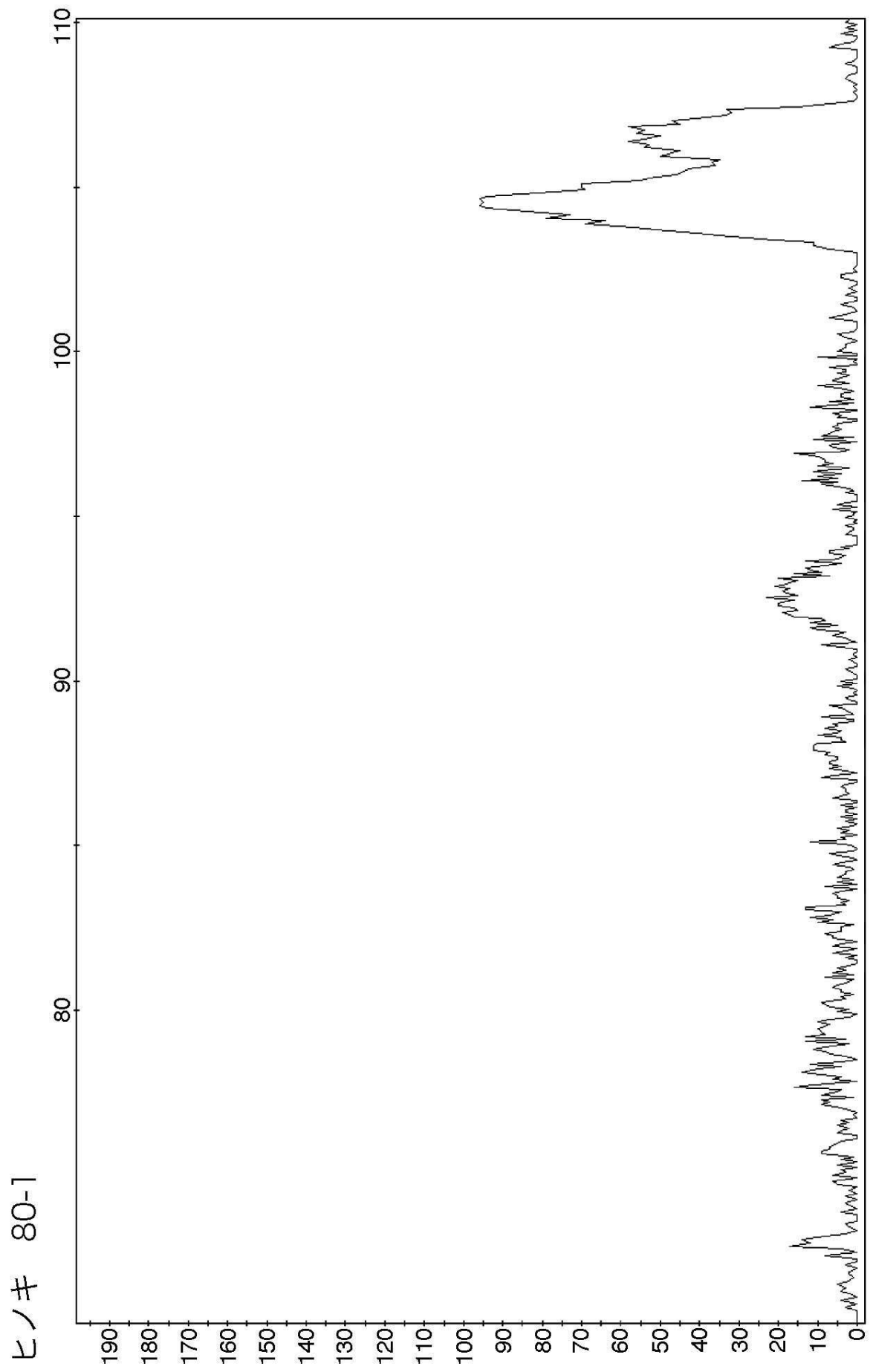
【図 5】



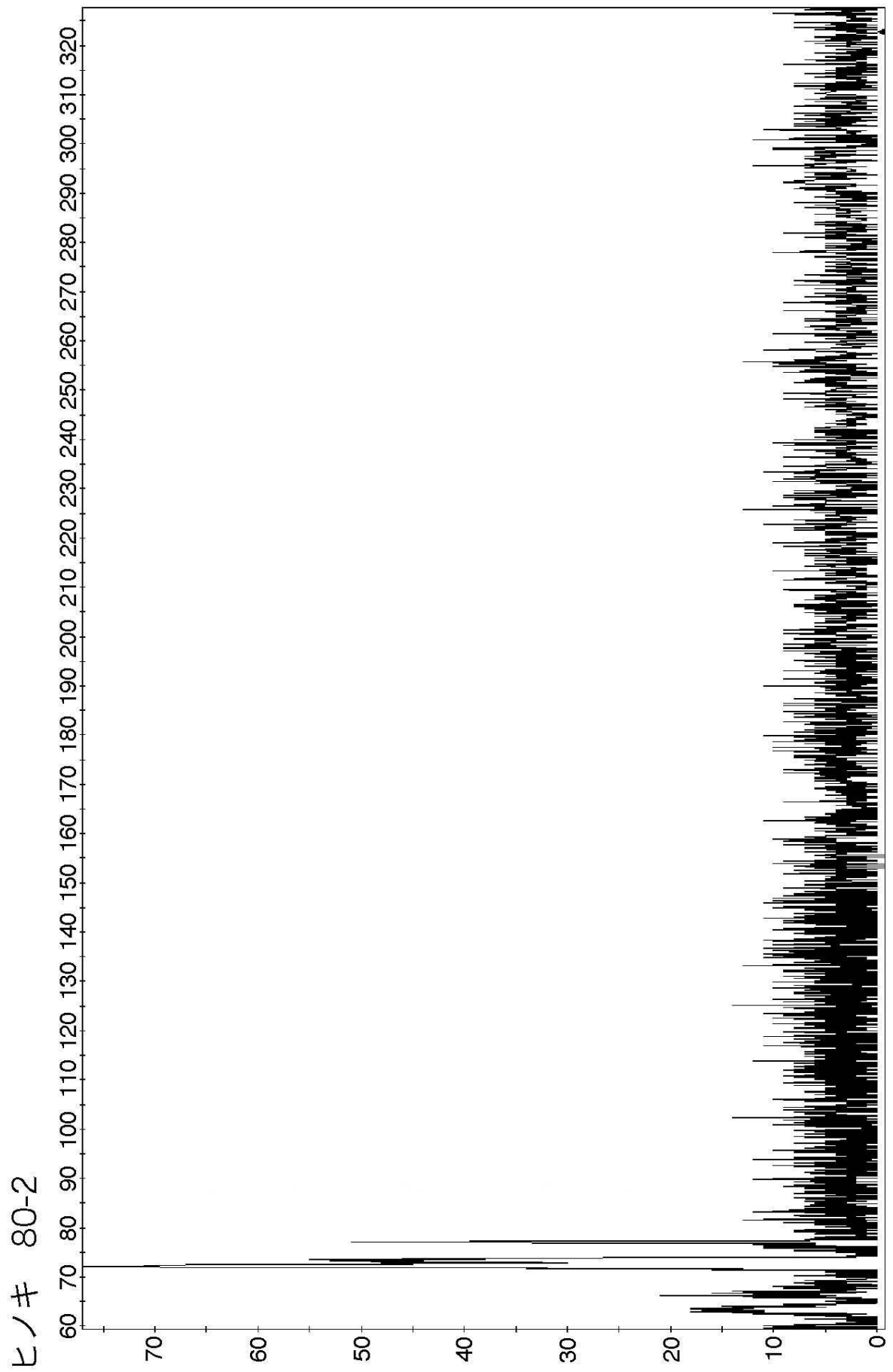
【図 6】



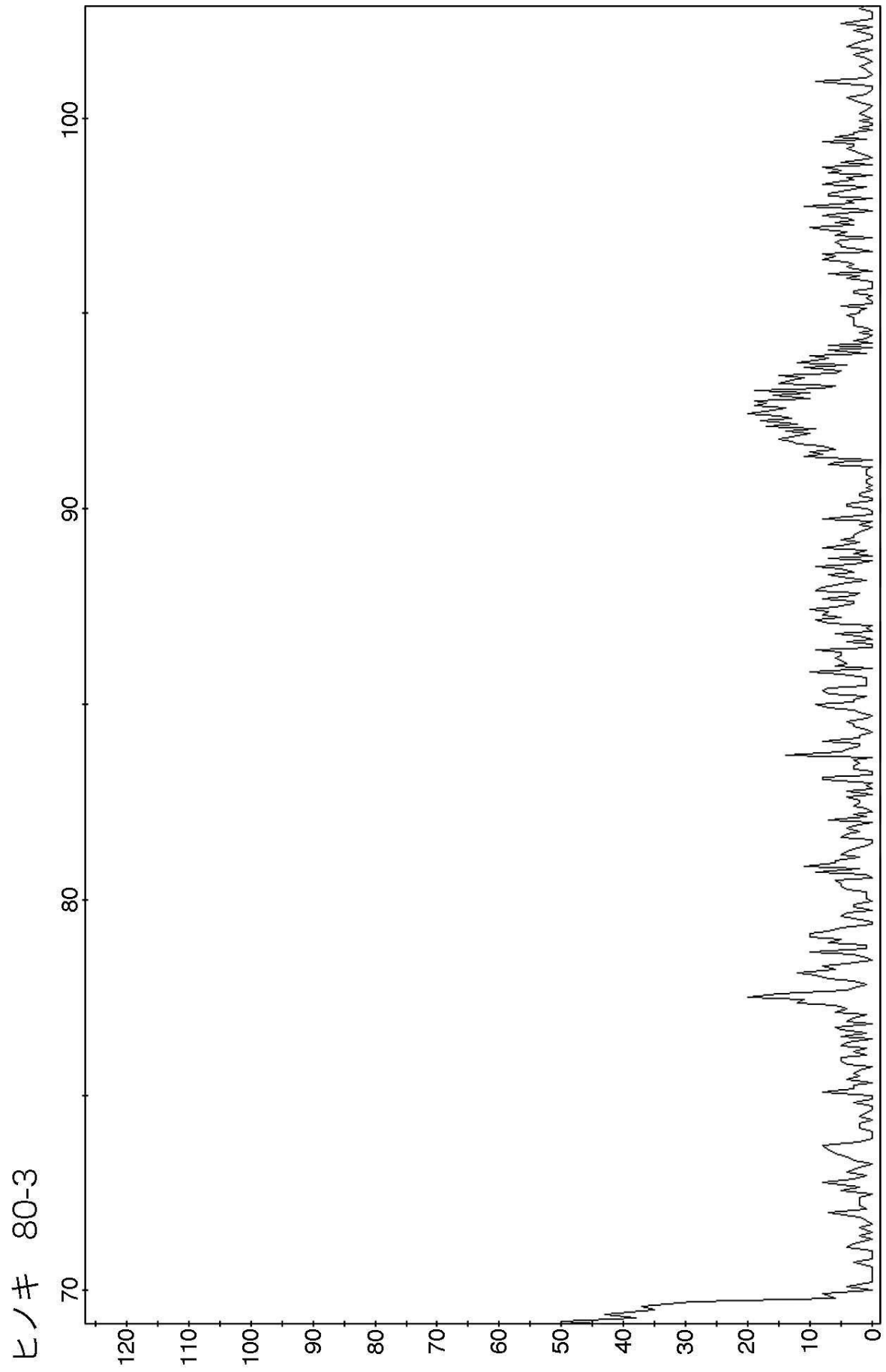
【図 7】



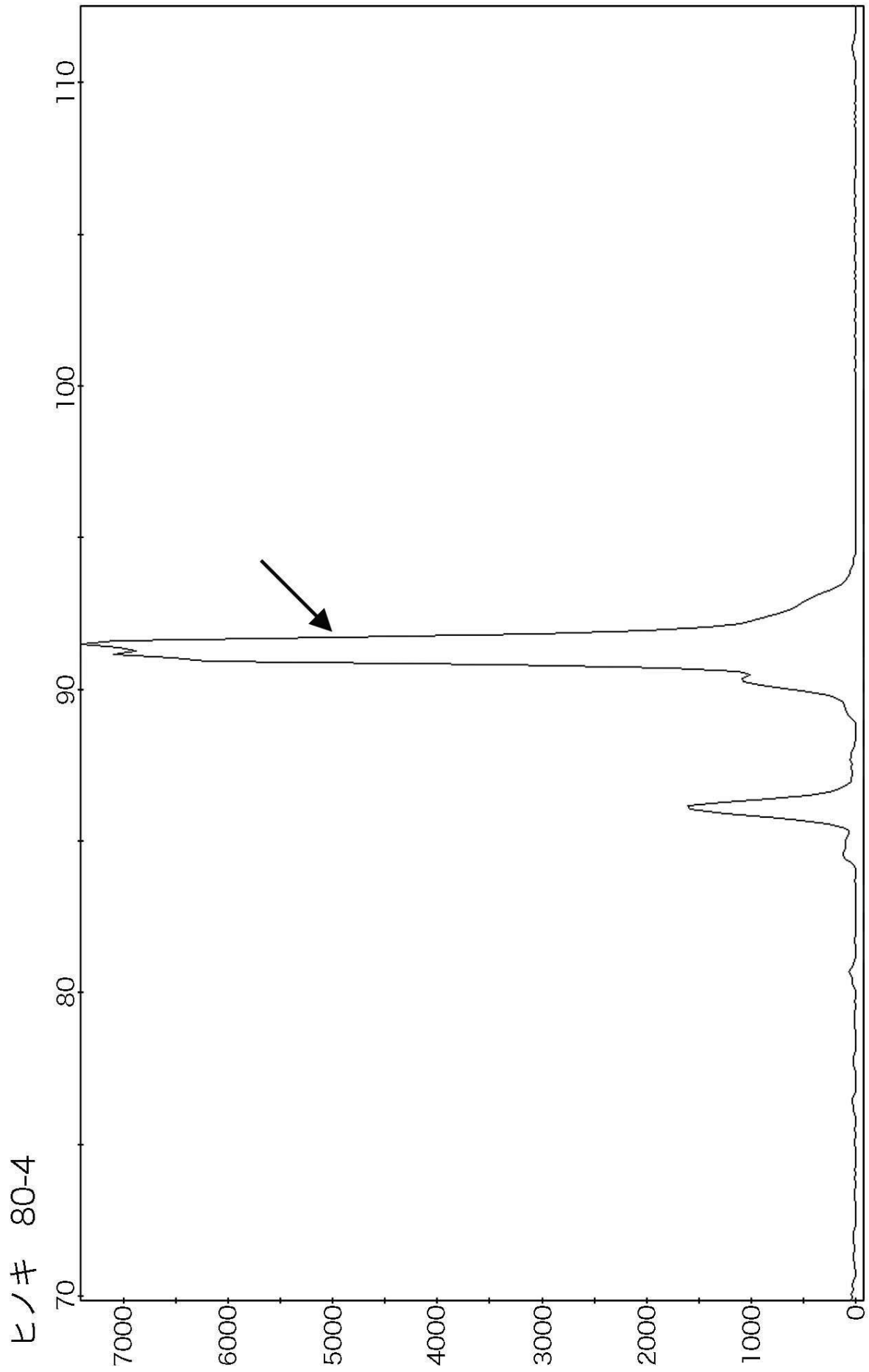
【図 8】



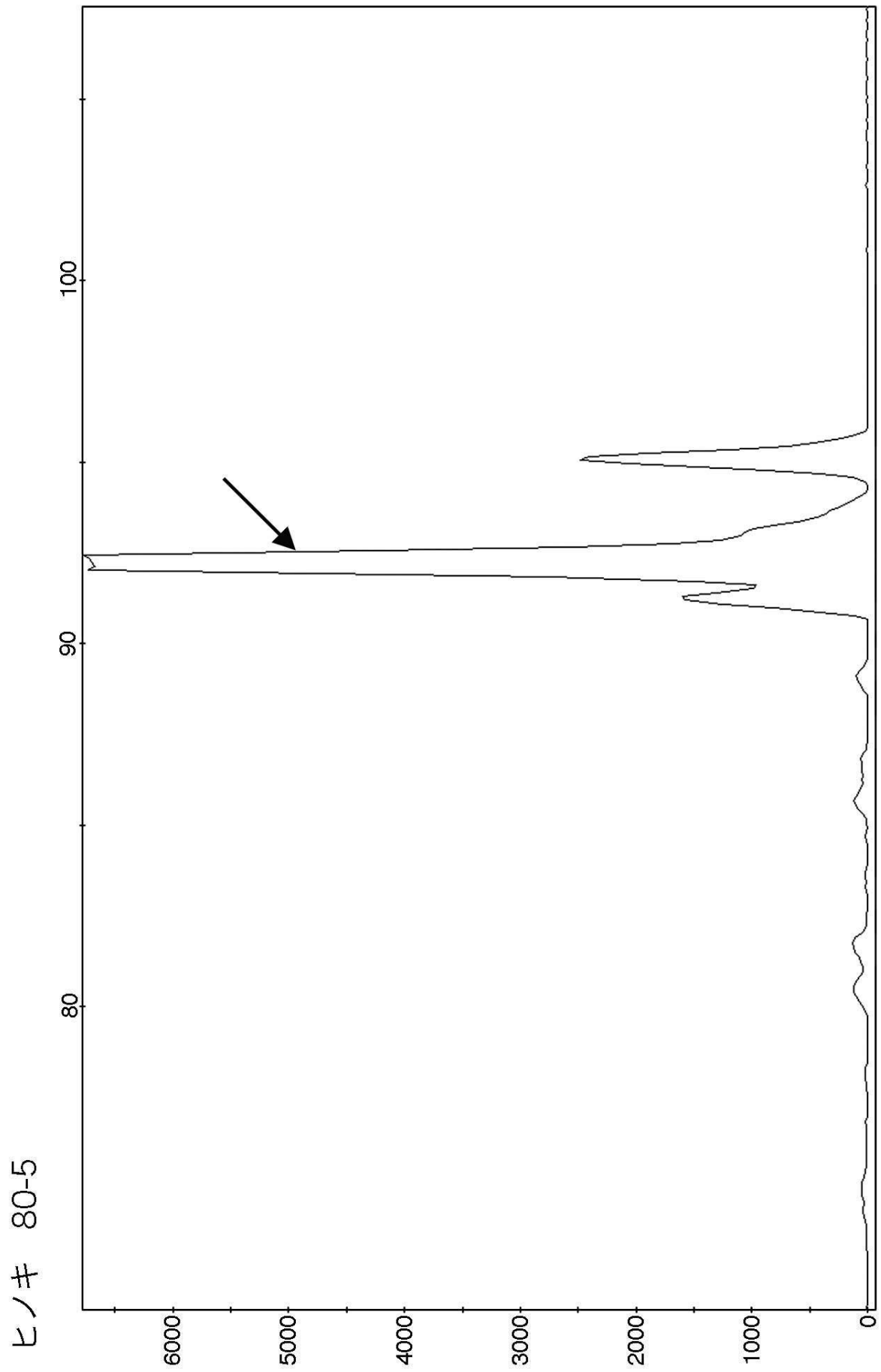
【図 9】



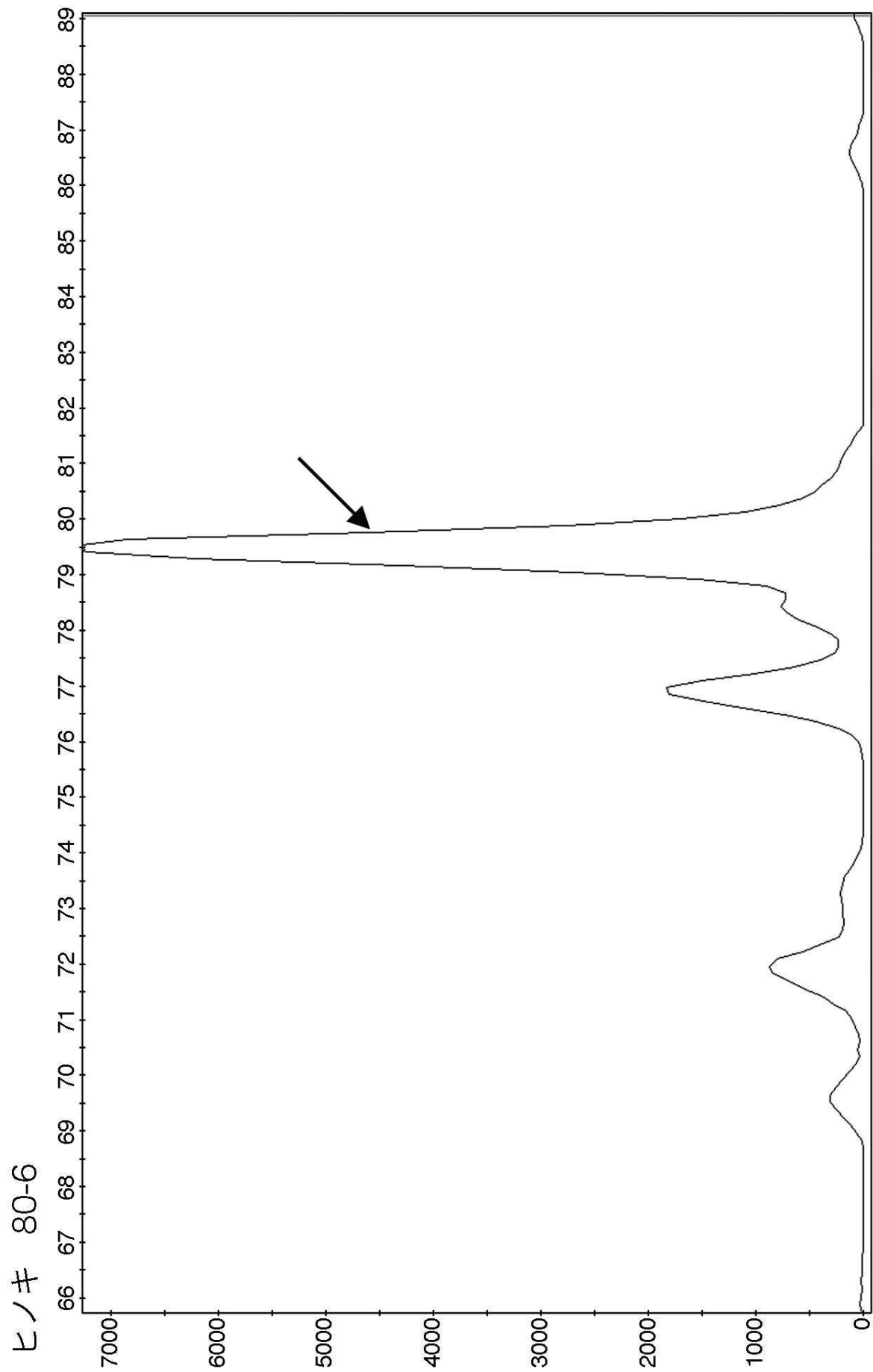
【図10】



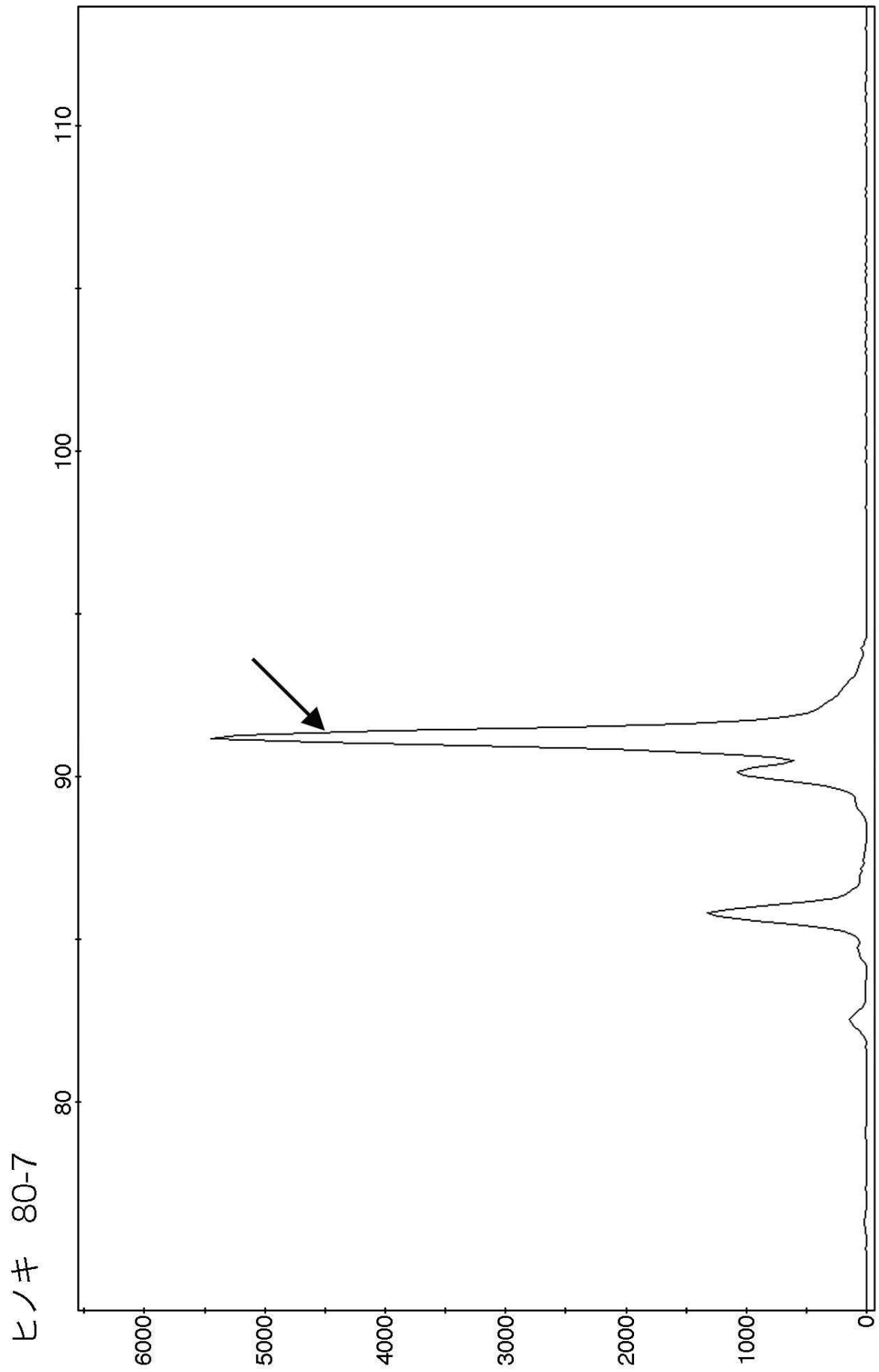
【図 11】



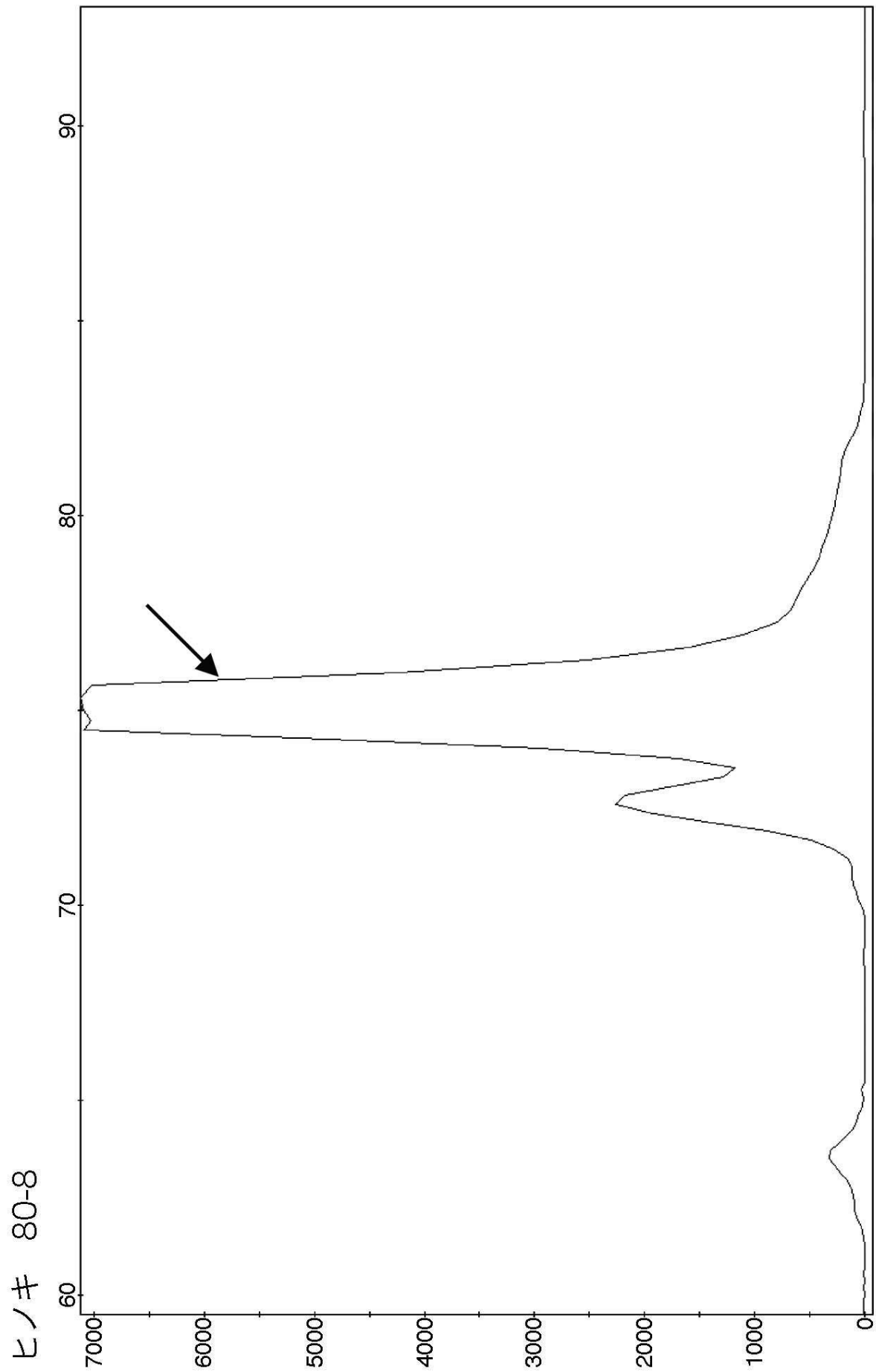
【図 1 2】



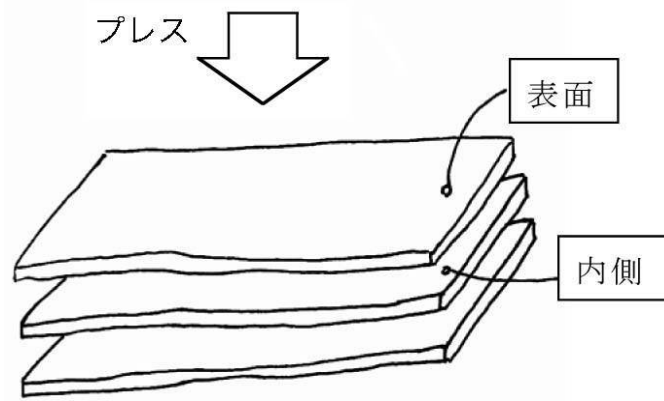
【図 13】



【図 14】

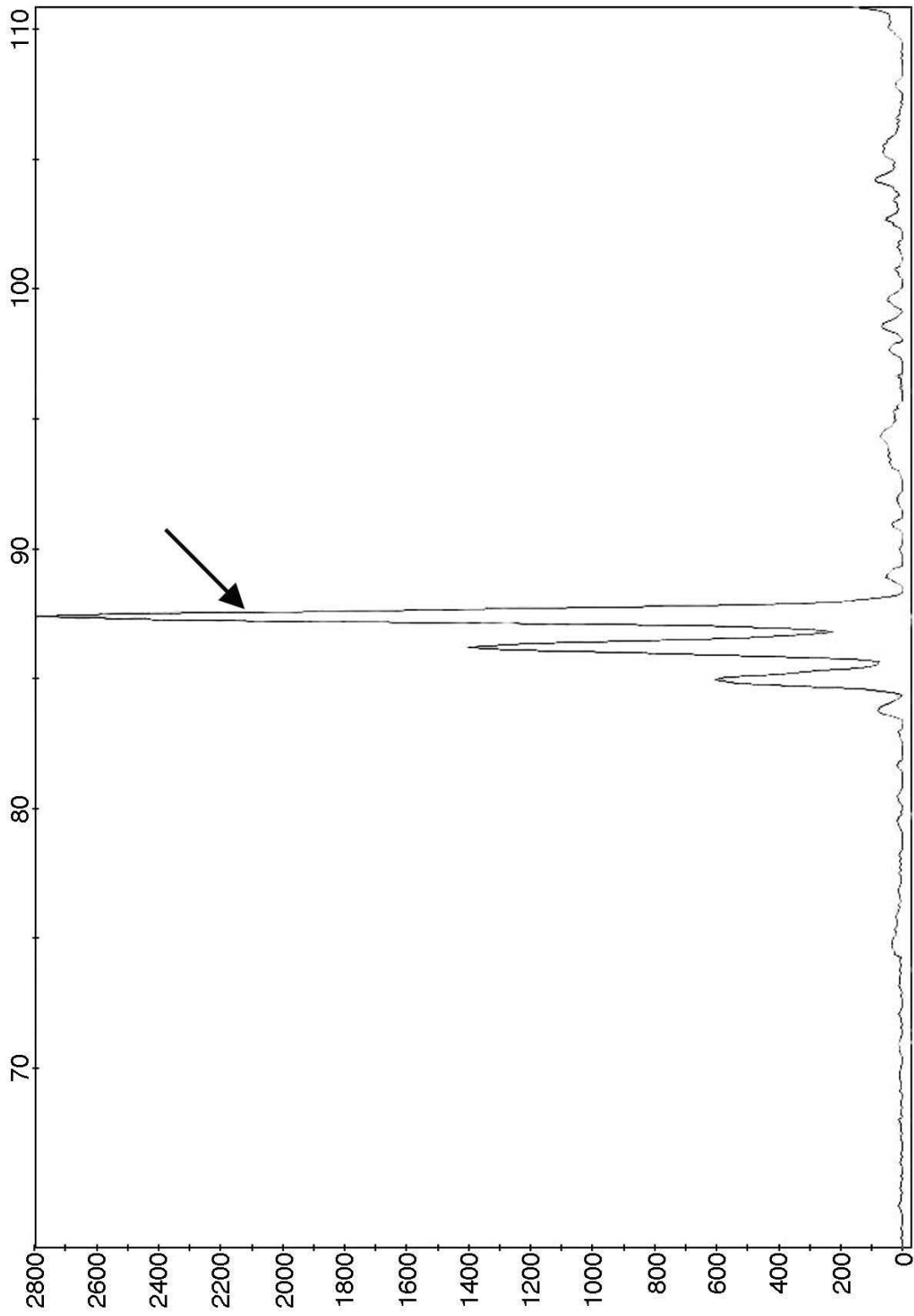


【図 15】



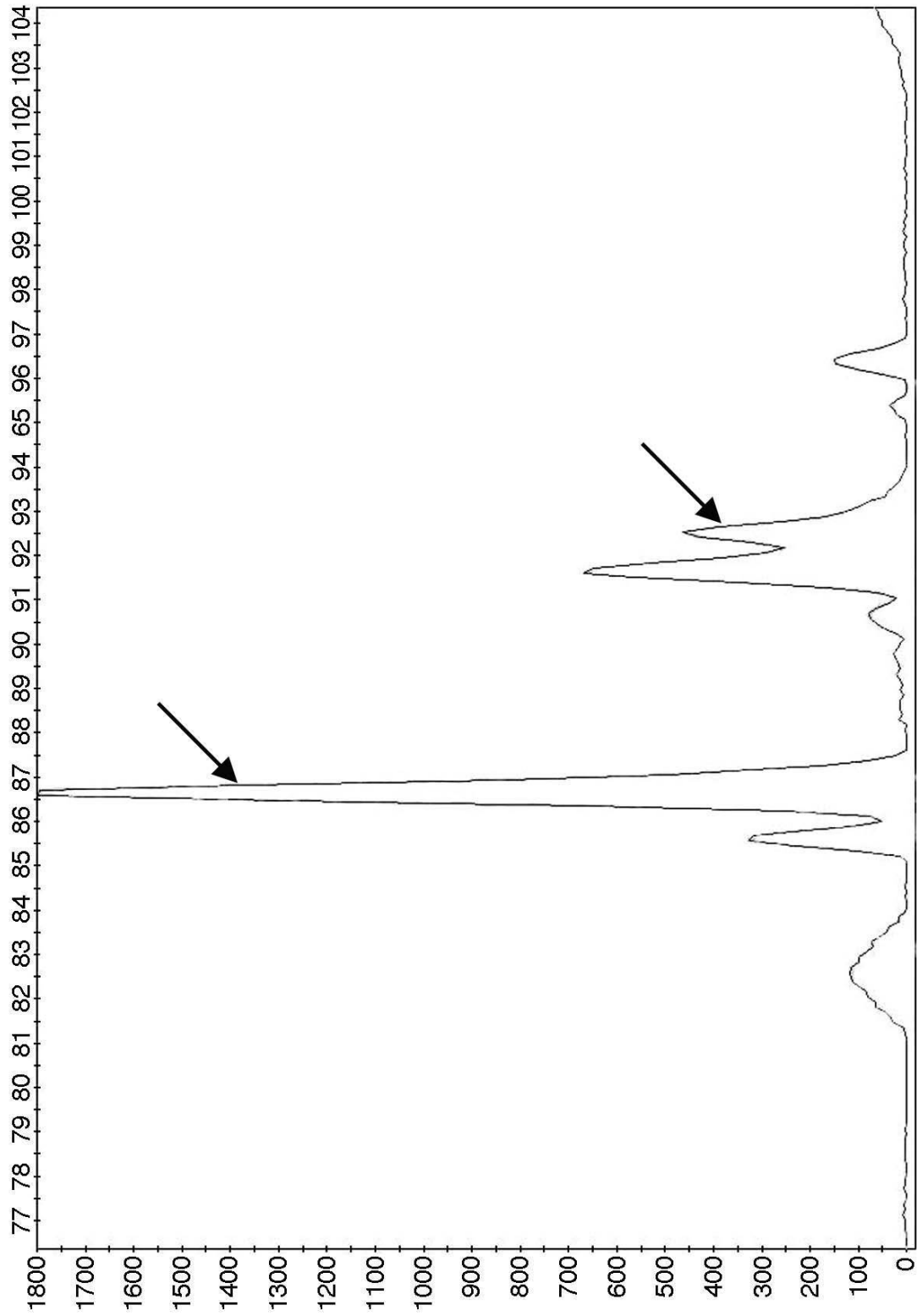
【図 16】

ゲメリナ130度で加熱（内側）



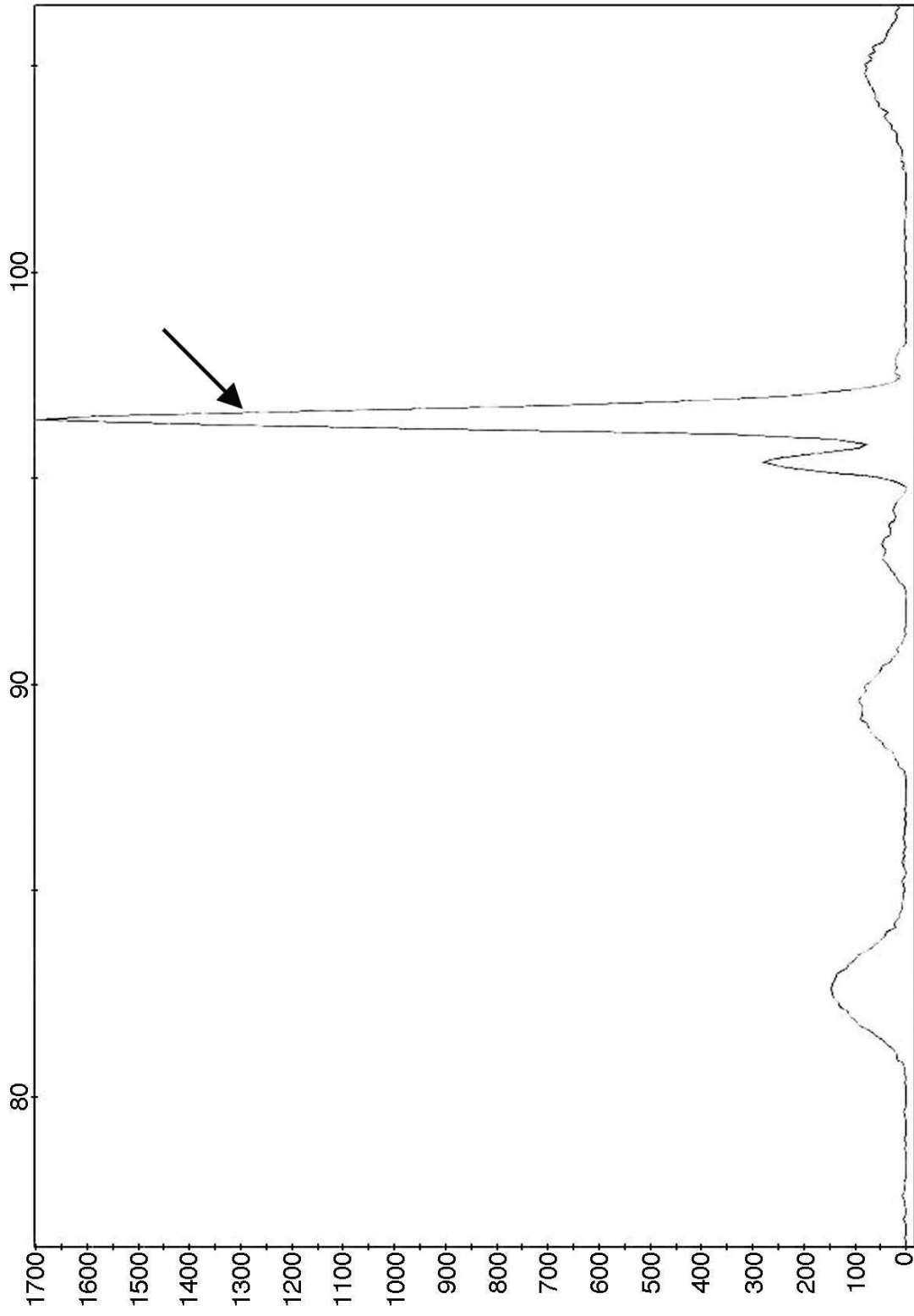
【図 17】

ゲメリナ130度で加熱 (表面)

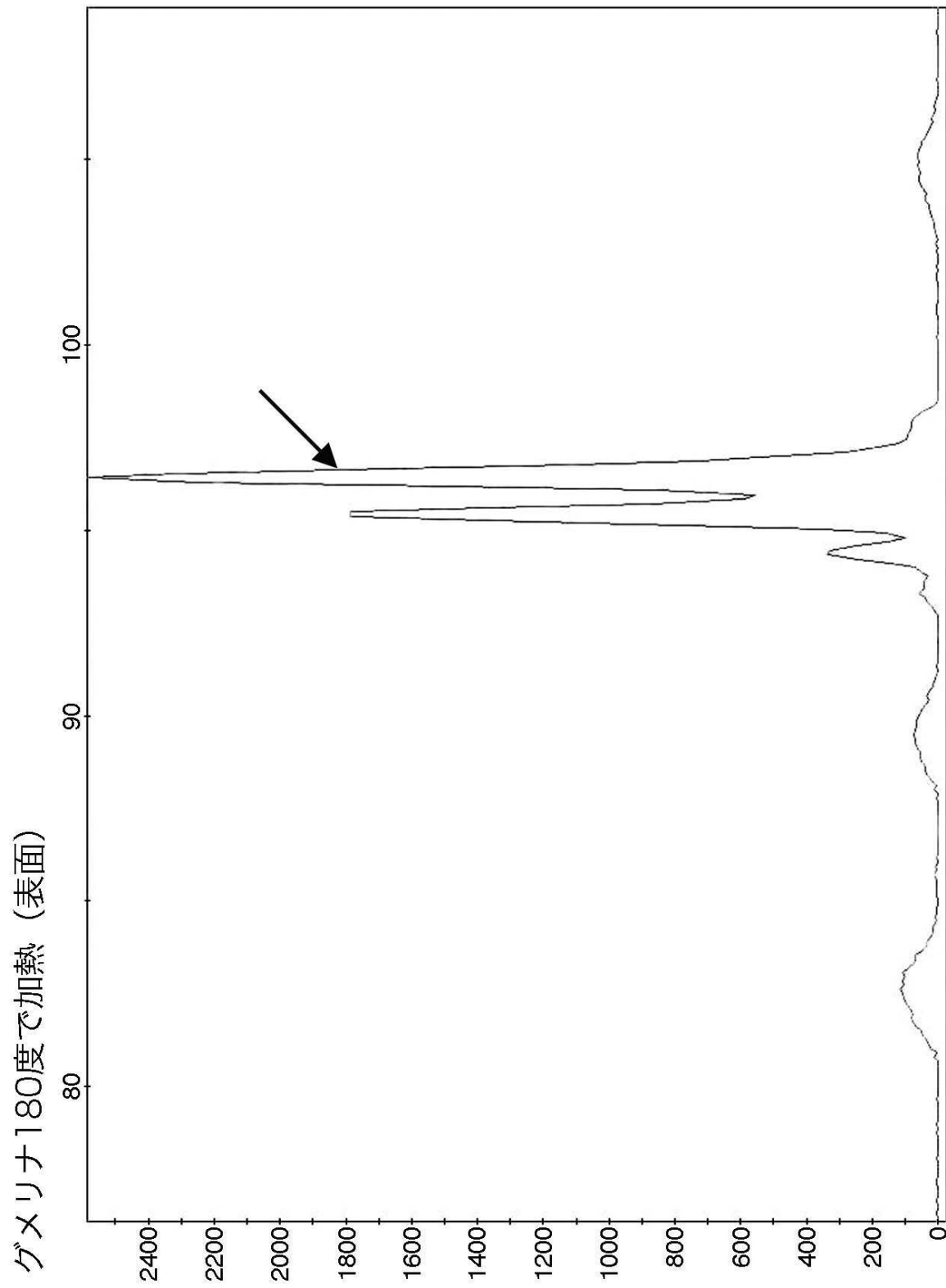


【図 18】

ゲメリナ180度で加熱（内側）

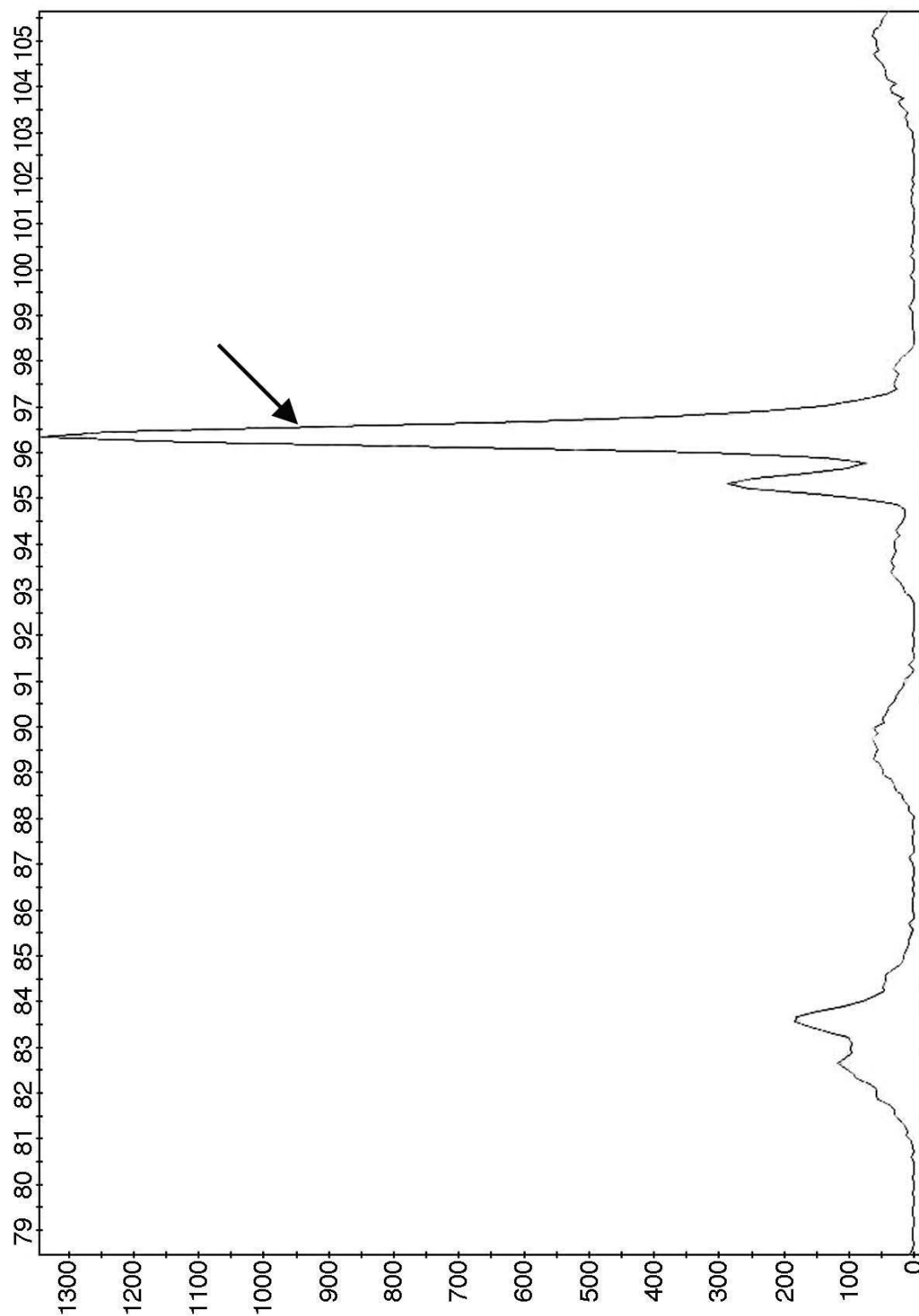


【図 19】

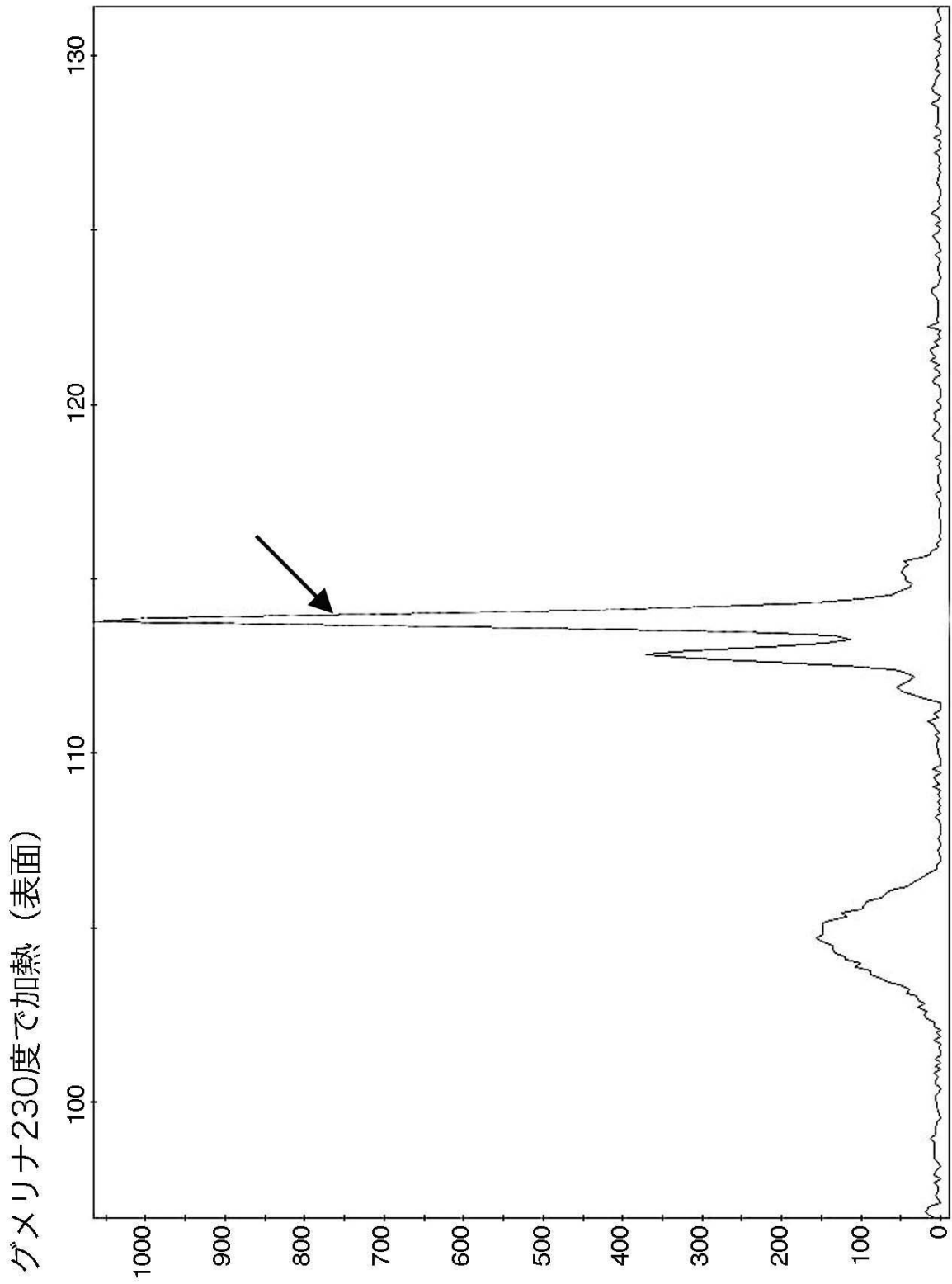


【図 20】

ゲメリナ230度で加熱（内側）

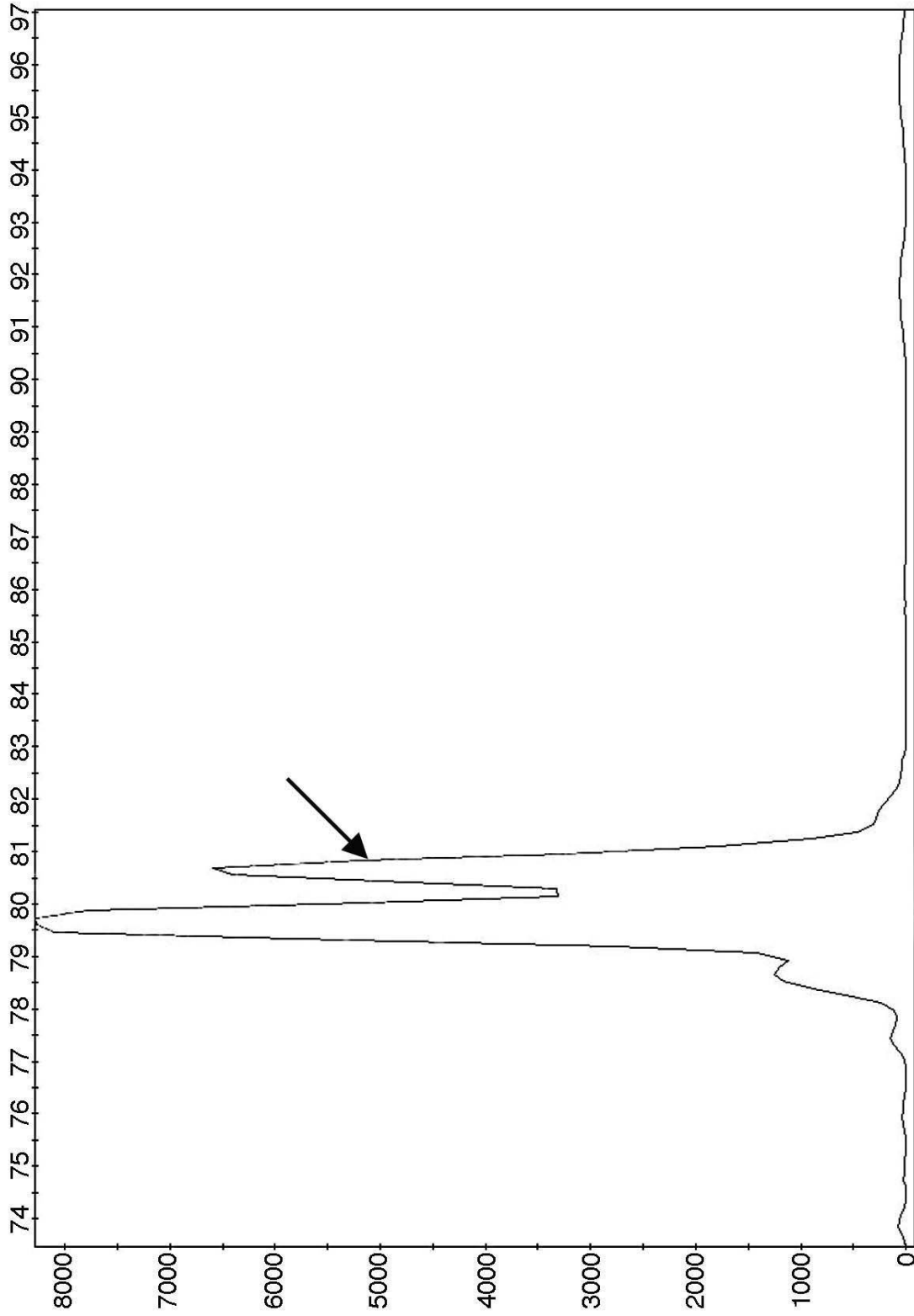


【図 2 1】



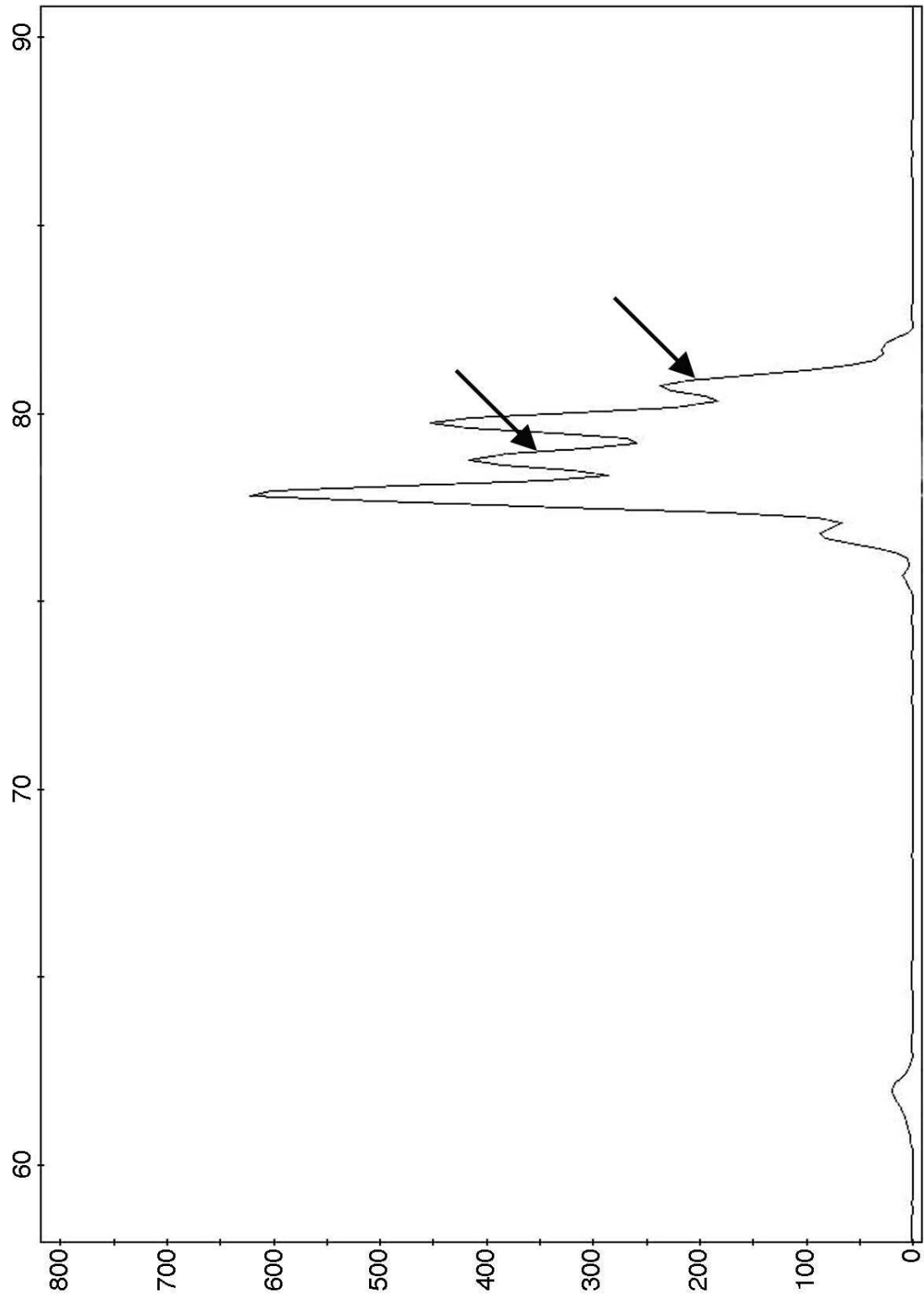
【図 22】

ランドウ ブロックボードの個体識別の結果

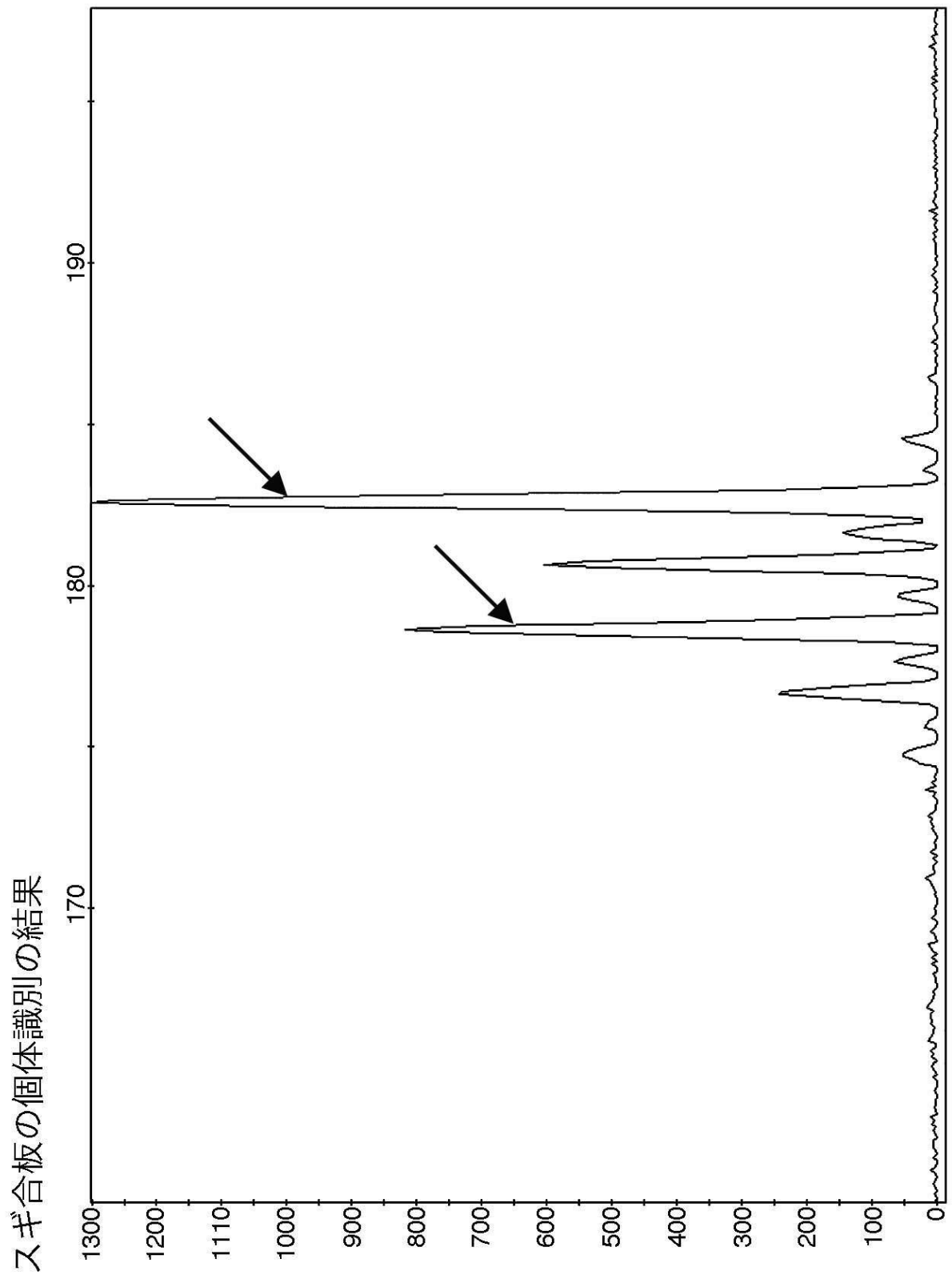


【図 23】

ラジアーターパイソンの個体識別の結果



【図 2 4】



【配列表】

0005240974000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2005-527206 (JP, A)
特開2006-141368 (JP, A)
特開2002-253271 (JP, A)
特開平10-262667 (JP, A)
特開平06-277063 (JP, A)
CIPRIANI, G. et al., THEOR. APPL. GENET., 2002年, Vol.104, P.223-228
三樹陽一郎, 「スギ流通丸太を対象としたクローン識別の試み」, 材木の育種, 2005年 2月25日, 特別号, P.27-29
MORIGUCHI, Y. et al., "Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D.Don.", THEOR. APPL. GENET., 2003年, Vol.106, P.751-758
BERUBE, Y. et al., "Isolation, characterization, and cross-species utility of microsatellites in yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*).", GENOME, 2003年, Vol.46, P.353-361
津田吉晃、他1名, 材木の育種, 2003年, 特別号, P.17-19
井鷲裕司, 「第3章 マイクロサテライトマーカーで探る樹木の更新過程」, 森の分子生態学～遺伝子が語る森林のすがた～, 2001年 2月28日, 初版, P.59-84, 口絵2
日林誌, 2004年, Vol.86, No.2, P.191-198
JOURNAL OF PLANT RESEARCH, 2001年, Vol.114, P.381-385
DEGUILLLOUX, M.F. et al., "Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools.", MOLECULAR ECOLOGY, 2003年 6月, Vol.12, No.6, P.1629-1636

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

PubMed

Science Direct

WPI