

## 〔報文〕 非培養法によるキトラ古墳の細菌調査

佐藤 嘉則・木川 りか・喜友名 朝彦\*・立里 臨\*・西島 美由紀\*・  
杉山 純多\*<sup>2</sup>

### 1. はじめに

キトラ古墳は、奈良県高市郡明日香村の南西部に位置する二段築成の円墳であり、国の特別史跡に指定されている。石室内の壁画は、2004年の石室の発掘調査後から取り外しが決定され、2008年には側壁の絵画部分や天井の星宿図の取り外し作業が完了し、2010年には、余白漆喰についてもほぼ取り外しが終了した。取り外された壁画については現在、空調管理のされた施設内で保存修復作業が行われている。

壁画が石室内にあった間は、相対湿度を高く保つ必要がある石室環境下において、壁画の微生物劣化が認められ、対応策が取られてきた。例えば、2005年からは多種類の細菌、糸状菌や酵母などの菌類が混在するような粘糊性のゲル状物質（バイオフィルム）が壁画部分に発生し<sup>1,2</sup>、天井部に発生した穴からアルコールを資化して酢酸を生成する細菌群である酢酸菌が分離され<sup>1,3-5</sup>、南壁の朱雀の絵の上に白い粒状でゲル状の物質が発生した<sup>3</sup>ことが報告されている。壁画を取り外した石室では、2009年以降、間欠的に紫外線を照射することで微生物発生を抑制する処置が実施されており、微生物発生が認められた際には、発生部位を丁寧に物理的に取り除き、局所的に殺菌するなどの対策が取られている<sup>6</sup>。これにより石室内で大きな微生物被害が起こることはなくなってきたが、一方で、紫外線に耐性があると考えられる黒色の小型菌核(bulbil)をつくる担子菌系アナモルフ菌類 *Burgoa* 属が目視で観察される<sup>6</sup>など、環境制御下に適応した微生物群集の遷移も懸念されている。そのため、石室内の定期的な微生物調査や分離した微生物の生理学的性質の調査など、現在でも継続して調査研究が行われている<sup>7,8,9</sup>。

本稿では、2011年の石室内部の微生物調査時に採取した試料について、培養に因らない遺伝子(DNA)解析に基づく方法で細菌を対象とした群集構造解析(非培養法)を行ったのでその結果を報告する。これまで調査されてきた培養法は、採取した試料をいくつかの培地に接種して、発育した菌群について解析する方法であった。しかし、一般的に培養可能な微生物は微生物群集全体の数パーセントといわれている現状において、培養法で得られる情報は限定的となる。これに対して、今回用いた非培養法は試料に含まれる微生物細胞から直接DNAを抽出し、DNAの塩基配列情報をもとに微生物種を特定する方法であるため、培養できない微生物群の情報を得ることが可能となり、より実態に近い微生物群集構造を明らかに出来る利点がある。その一方で非培養法では、例えば、分離菌株の紫外線(UV)耐性試験などといった分離株の生理生態学的性質からの情報を得ることが出来ない欠点がある。このため、両手法から得られた結果を総合的に考察することが望ましい。同一試料の培養法の結果や分離株の諸性質については、木川らによって報告されている<sup>8,9</sup>ので、本報告とあわせて参照されたい。

\* (株)テクノスルガ・ラボ    \*<sup>2</sup> (株)テクノスルガ・ラボ千葉分室

## 2. 試料および実験方法

### 2-1. 試料の採取

2011年10月にキトラ古墳石室内において、6試料を採取し<sup>8)</sup>、そのうち4試料(表1)について非培養法による群集構造解析の試験に供した。なお、試料は滅菌綿棒で回収し、低温(約4℃)で持ち帰り、分析に供するまで-20℃にて冷凍保管した。

表1 2011年10月にキトラ古墳石室内から採取された微生物分析用試料一覧<sup>8)</sup>

試料 No.	採取箇所	試料の状態
K111013-1	キトラ古墳石室内西壁中央部111013 (黒緑)	黄土褐色ゲル状と土壌
K111013-3	キトラ古墳石室内西壁南側下部111013	黄土色～黄土褐色ゲル状と土壌
K111013-5	キトラ古墳石室内東壁中央上部111013 (天井付近)	茶褐色～黒褐色ゲル状と黒粒、針状体
K111013-6	キトラ古墳石室内天井北側中央部111013	白～白黄土色, 小塊(漆喰様, 土壌様物質) 散在

### 2-2. DNA 抽出, PCR 反応, 塩基配列解析および系統解析

試料からのDNA抽出および精製はExtrap Soil DNA Kit Plus Ver.2 (日鉄環境エンジニアリング)を用いて行った。精製DNA溶液のDNA濃度は、PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen)を用いて測定した。この精製DNAを鋳型とし、細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたPCR増幅を行った。PCR増幅は、27fプライマー<sup>10)</sup> (5'-AGAGTTTGATC [A/C] TGGCTCAG-3')とBac1392Rプライマー<sup>11)</sup> (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3')を使用して、95℃で30秒間保持した後、32サイクルを95℃で15秒間、50℃で20秒間、72℃で50秒間の反応条件で行った。なお、PCRサイクル数は32サイクルとしたが、これは予め蛍光消光プライマーを用いたリアルタイムPCR法<sup>12)</sup>で、PCR産物の増幅過程のモニタリングを行い、PCRバイアスやアーティファクトの生成が低減されるサイクル数として決定した。PCRバイアスはPCR反応後期に、増幅に偏りが生じ、増幅産物構成比が、元の鋳型の構成比からずれる現象であり、アーティファクトはPCR反応後期に、サンプル中に本来存在しなかったDNA配列が生成される現象であるが、いずれも後に続くクローン解析の出現頻度やクローン解析の精度に影響を及ぼすため、このような操作を追加した。

次に、上記で得られたPCR増幅産物をクローニングし、各96クロンのシーケンス解析を実施した。シーケンス解析用プライマーは27fプライマーを使用した。得られたDNA配列を公共のデータベースと照合して相同性検索(BLAST検索)を行い<sup>13)</sup>、クローン毎に近縁な種を予測した。なお、クローン解析および系統解析は先の報告に記載されているので、詳細はそちらを参照されたい<sup>14)</sup>。

## 3. 結果と考察

供試した4試料のクローン解析結果について分類群の門レベルの分布を図1に示した。4試料で共通して放線菌のグループ(“Actinobacteria”門)の出現頻度が高い傾向にあった。放線菌の中では特に*Promicromonospora*属に近縁なクローンが多く検出されたが、これについては

後述する。また、K111013-5（東壁中央上部：天井付近）とK111013-6（天井北側中央部）試料では、放線菌のグループに次いで“*Proteobacteria*”門が多く検出された。各試料の属および種レベルの分布を表2-5に示した。各試料の結果について以下に要約する。

1) 試料名：K111013-1（西壁中央部：黒緑）

試料K111013-1では、93クローンで塩基配列情報を得た（表2）。BLAST 検索により特定された近縁細菌の種類は7種類であった。そのうち放線菌のグループである *Promicromonospora* 属に近縁なクローン（クローン数：89，相同性：93.2～99.2%）が高頻度に検出された（表2）。

2) 試料名：K111013-3（西壁南側下部）

試料K111013-3では、94クローンで塩基配列情報を得た（表3）。BLAST 検索により特定された近縁細菌の種類は8種類だった。*Promicromonospora* 属に近縁なクローン（クローン数：90，相同性：98.6～99.7%）が試料K111013-1と同様に高頻度に検出された。

3) 試料名：K111013-5（東壁中央上部：天井付近）

試料K111013-5では、89クローンで塩基配列情報を得た（表4）。BLAST 検索により特定された近縁細菌の種類は32種類だった。そのうち放線菌のグループである *Jiangella* 属に近縁なクローン（クローン数：16，相同性：98.4～99.3%）や“*Firmicutes*”門に属するグラム陽性菌の *Caloramator* 属に近縁なクローン（クローン数：16，相同性：80.6～81.0%）等が高頻度に検出された。試料K111013-5の放線菌に由来するクローンの割合は38%であり、この試料においても放線菌群が優占種として存在するものと考えられるが試料K111013-1や試料K111013-3で多く検出された *Promicromonospora* 属に近縁なクローンは5クローンであった。キトラ古墳壁画の漆喰の劣化に影響を及ぼしていたと考えられている、*Gluconacetobacter tumulicola*

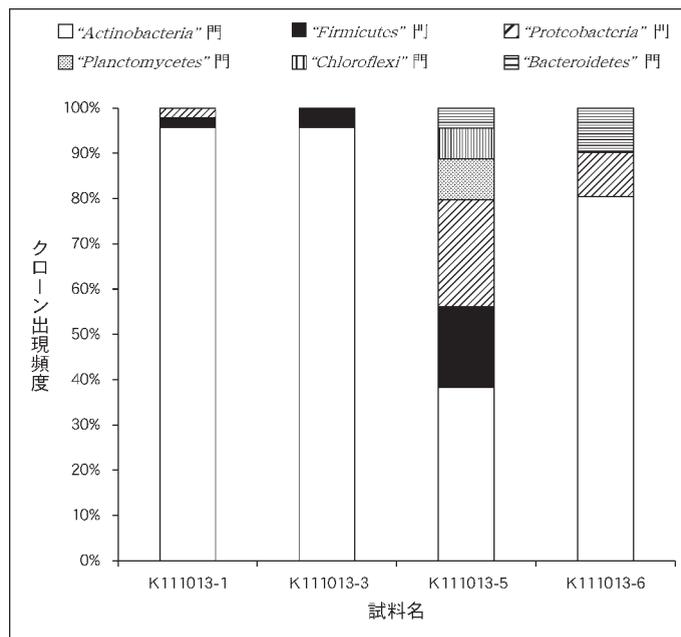


図1 キトラ古墳石室内から採取した4試料のクローン解析結果：細菌の門レベルの分類群による出現頻度

K8617-7-3bに近縁なクローンが1つ検出されている<sup>15)</sup>。しかし、培養法の結果では、*Gluconacetobacter* 属細菌は分離されてこなかった<sup>8)</sup>ため、存在している細菌数は非常に僅かであるかまたは、かつて優占種として存在していたときのDNAに由来し、生きている状態で分布している可能性は低いと考えられる。

4) 試料名：K111013-6 (天井北側中央部)

試料K111013-6では、92クローンで塩基配列情報を得た(表5)。BLAST 検索により特定された近縁細菌の種類は20種類だった。*Jiangella* 属に近縁なクローン(クローン数：24, 相同性：95.7~99.2%) や *Promicromonospora* 属に近縁なクローン (クローン数：23, 相同性：98.7~99.7%) 等が高頻度に検出された。

試料K111013-1とK111013-3は検出された細菌種数が少なく、主要な細菌種は放線菌のグループである *Promicromonospora* 属であり、その出現頻度は約95%であった。一方、試料K111013-5とK111013-6では比較的多く細菌種が検出されたが、木川ら<sup>8)</sup>による分離の結果では、試料K111013-5からは分離株(種)数が少なく、加えて放線菌が検出されておらず、今回の非培養法とは異なる結果を示した。K111013-6試料の主要な細菌種である *Jiangella* 属と *Promicromonospora* 属はいずれも放線菌のグループであり、2菌種のクローンの出現頻度をあわせると約50%となった。以上の結果から、石室内環境のいくつかの箇所において放線菌のグループが多く分布している状況であると考えられる。放線菌についてはこれまでも石室内から分離され<sup>8)</sup>、そのうちいくつかは *Promicromonospora* 属に該当する放線菌が確認されている

表2 K111013-1試料(西壁中央部：黒緑)のクローン解析結果

近縁微生物の分類情報とクローン数				近縁種との 相同性	アクセッション 番号
属	クローン 数	種	クローン 数		
<i>Promicromonospora</i>	89	<i>Promicromonospora</i> sp. YIM 48839	77	98.9-99.2%	EU860978
		<i>Promicromonospora sukumoe</i>	11	98.4-99.2%	AB023353
		<i>Promicromonospora kroppenstedtii</i>	1	93.2%	NR_042622
<i>Pseudomonas</i>	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	100.0%	JQ267797
<i>Sphingomonas</i>	1	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	1	98.3%	NR_043962
<i>Sporanaerobacter</i>	1	<i>Sporanaerobacter</i> sp. C5BEL	1	99.7%	HQ534365
<i>Paenibacillus</i>	1	<i>Paenibacillus</i> sp. KAR72	1	95.6%	EF451701

表3 K111013-3試料(西壁南側下部)のクローン解析結果

近縁微生物の分類情報とクローン数				近縁種との 相同性	アクセッション 番号
属	クローン 数	種	クローン 数		
<i>Promicromonospora</i>	90	<i>Promicromonospora</i> sp. YIM 48839	58	98.9-99.2%	EU860978
		<i>Promicromonospora</i> sp. Junggar12	23	99.0-99.7%	HQ711467
		<i>Promicromonospora sukumoe</i>	6	98.9-99.1%	AB023353
		<i>Promicromonospora</i> sp. YIM C653	2	99.0-99.4%	EU135639
		<i>Promicromonospora</i> sp. YIM 65700	1	98.6%	GU367141
<i>Bacillus</i>	2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2	99.8-100%	JQ004415
<i>Cohnella</i>	1	<i>Cohnella</i> sp. QMKC-1	1	98.6%	JN571338
<i>Clostridium</i>	1	<i>Clostridium</i> sp. MK11	1	96.0%	AB275140

表4 K111013-5試料（東壁中央上部：天井付近）のクローン解析結果

近縁微生物の分類情報とクローン数				近縁種との 相同性	アクセッション 番号
属	クローン 数	種	クローン 数		
<i>Jiangella</i>	16	<i>Jiangella ginsengisoli</i>	15	98.4-99.2%	AB271058
		<i>Jiangella</i> sp. 15-Je-017	1	99.3%	FN645214
<i>Streptomyces</i>	9	<i>Streptomyces</i> sp. AL2	9	97.6-98.2%	EU714249
<i>Promicromonospora</i>	5	<i>Promicromonospora</i> sp. Junggar12	3	99.2-99.7%	HQ711467
		<i>Promicromonospora</i> sp. D8	2	99.8%	EU863844
<i>Mycobacterium</i>	2	<i>Mycobacterium</i> sp. IP20010664	1	98.3%	AY163338
		<i>Mycobacterium</i> sp. Ellin142	1	98.6%	AF408984
<i>Catellatospora</i>	2	<i>Catellatospora citrea</i>	2	99.0%	NR_041763
<i>Beijerinckia</i>	8	<i>Beijerinckia indica</i>	8	98.5-98.7%	CP001016
<i>Xanthobacter</i>	1	<i>Xanthobacter</i> sp. IMCC1720	1	99.5%	DQ664202
<i>Starkeya</i>	1	<i>Starkeya</i> sp. T-2	1	98.3%	JN606070
<i>Methylopila</i>	1	<i>Methylopila</i> sp. LYBFD3-16A2	1	94.8%	HM447243
<i>Bosea</i>	1	<i>Bosea</i> sp. R-45681	1	99.5%	FR774992
<i>Sphingomonas</i>	3	<i>Sphingomonas</i> sp. Dd16	1	98.7%	HQ449390
		<i>Sphingomonas</i> sp. AKB-2008-HV10	1	98.4%	AM989048
		<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	1	98.7%	NR_043962
<i>Roseococcus</i>	1	<i>Roseococcus</i> sp. LW5	1	95.1%	FM956480
<i>Gluconacetobacter</i>	1	<i>Gluconacetobacter tumulicola</i> K8617-7-3b	1	99.8%	AB627119
<i>Fodinicurvata</i>	1	<i>Fodinicurvata fenggangensis</i>	1	91.0%	NR_044596
<i>Subaequarebacter</i>	1	<i>Subaequarebacter tamlense</i>	1	91.7%	AM293856
<i>Stenotrophomonas</i>	1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. D2-1	1	100.0%	HQ731042

(未発表データ)。また、壁画面取り外し作業が行われている2006年の試料からも *Promicromonospora* 属細菌が2株分離されている(未発表データ)。しかし、特にUV照射以前の石室内では放線菌の分離頻度は“*Proteobacteria*”門の細菌ほど高くなかったことから、これまであまり注目されてこなかった。今回の試験において放線菌、特に *Promicromonospora* 属が優占種として存在することが示唆されたことから、決定された分離菌株の配列および、今回クローニングにより得られた配列を含めて系統樹を作成した(図2)。さらに、木川ら<sup>8)</sup>による分離の結果で得られた分離株について16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定し、これらについても、この系統樹に含めてその分子系統的位置を検討した。この図において、*Promicromonospora* 属分離株と *Promicromonospora* 属クローン配列は大きく7つのグループに分けられた。グループ1はUV照射前の石室内試料およびUV照射開始直後の石室内試料から分離されており、16S rRNA 遺伝子系統解析の結果からは *P. sukumoe* と同種と考えられる。グループ2はグループ1および *P. sukumoe* と同種かまたは非常に近縁な別種と考えられ、試料K111013-1の89クローン、K-111013-3の65クローン、およびK111013-6の19クローンが含まれる。また、木川らの「放線菌1」と記した分離株K111013-1-1b および本報告で用いたクローン解析の対象試料ではないが、K111013-4<sup>8)</sup>の分離株もこのグループ2に含まれた。このことから、「放線菌1」は *Promicromonospora* 属細菌であり、試料K111013-5を除く3つの試料の最優占種であると考えられた。また、グループ7についても、試料K111013-6からの分離株および3つの試料からの26クローンが同一のクラスターを形成したことからグループ2に次ぐ優占種であると考えられた。以上のことから、2009年3月のUV照射開始および石室内の湿度状態などの環境変化によ

表5 K111013-6試料（天井北側中央部）のクローン解析結果

近縁微生物の分類情報とクローン数				近縁種との 相同性	アクセッション 番号
属	クローン 数	種	クローン 数		
<i>Jiangella</i>	24	<i>Jiangella ginsengisoli</i>	24	95.7-99.2%	AB271058
<i>Pseudonocardia</i>	6	<i>Pseudonocardia</i> sp. YIM 48807	6	99.5-99.7%	EU860992
<i>Promicromonospora</i>	23	<i>Promicromonospora</i> sp. YIM 48839	15	98.7-99.0%	EU860978
		<i>Promicromonospora</i> sp. D8	3	99.4-99.7%	EU863844
		<i>Promicromonospora sukumoe</i>	2	98.7%	AB023353
		<i>Promicromonospora</i> sp. YIM 61490	1	99.2%	FJ615285
		<i>Promicromonospora</i> sp. YIM 61486	1	99.2%	FJ615284
		<i>Promicromonospora</i> sp. Junggar12	1	99.7%	HQ711467
<i>Isoptricola</i>	2	<i>Isoptricola halotolerans</i>	2	93.9-94.6%	AB489222
<i>Streptomyces</i>	14	<i>Streptomyces</i> sp. AL2	14	97.9-98.2%	EU714249
<i>Nocardioides</i>	5	<i>Nocardioides fulvus</i>	5	99.4-100%	AF005016
<i>Olivibacter</i>	9	<i>Olivibacter</i> sp. LC224	9	99.0-99.4%	JQ014469
<i>Sphingomonas</i>	5	<i>Sphingomonas</i> sp. JQ1-11	2	98.9-99.0%	DQ132883
		<i>Sphingomonas suberificiens</i>	1	98.6%	AY521009
		<i>Sphingomonas</i> sp. AKB-2008-HV10	1	98.6%	AM989048
		<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	1	99.7%	NR_043962
<i>Rhizobium</i>	1	<i>Rhizobium</i> sp. KZ7-5	1	100.0%	JQ041733
<i>Agrobacterium</i>	1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1	100.0%	JN628031
<i>Ancylobacter</i>	1	<i>Ancylobacter abiegnus</i>	1	100.0%	GU247895
<i>Brevundimonas</i>	1	<i>Brevundimonas</i> sp. R2A 10-7	1	99.7%	EF486314

り、石室内優占菌群に変化があり、*Promicromonospora* 属細菌が優占種として入れ替わった可能性が考えられる。一方、木川らの報告では、分離株の紫外線に対する耐性能が評価されている<sup>9)</sup>。それによると、「放線菌1」は $10^5$  cfu/mLの菌液を塗抹した平板培地に強度0.009-0.013 mW/cm<sup>2</sup>の紫外線照射下で30秒間曝露しても数コロニー生存し、供試した他の細菌群よりやや耐性がある<sup>7)</sup>ものの、高い耐性能を有してはいないと考えられる。なお、木川ら<sup>8)</sup>は、石室内部の紫外線照射においても、微生物が存在していることについて、「UV照射によっても微生物を完全に死滅させることは困難で、UVの影響が及ばない壁面上の僅かな隙間や影の下で微生物が生きながらえている」、と考えている。従って、「放線菌1」のUV耐性能の高さと生残についてはもう少し詳細な調査が必要といえる。特に放線菌の優占種化が、紫外線照射環境下に適応した微生物群集の遷移であるかを評価するためには、今後継続して微生物群集をモニタリングし、さらに分離株の性状解析を継続する必要があると考えられる。

#### 4. まとめ

本報告では、キトラ古墳石室内における微生物群集について非培養法を用いた解析手法によって明らかにした。これは2009年以降行われている間欠的紫外線照射による微生物発生の抑制方法によって微生物群集がどのような挙動を示しているかをモニタリングする目的で実施しており、従来の培養法に加えて非培養法による知見を得るために行ったものである。非培養法としてクローン解析を行ったところ、4試料で、放線菌のグループ（“*Actinobacteria*”門）の出現頻度が高い傾向にあった。放線菌のなかでも*Promicromonospora* 属に近縁なクローンの出現頻度が高かった。同一試料での培養法による解析<sup>8)</sup>においても、「放線菌1」とした*Promicro-*

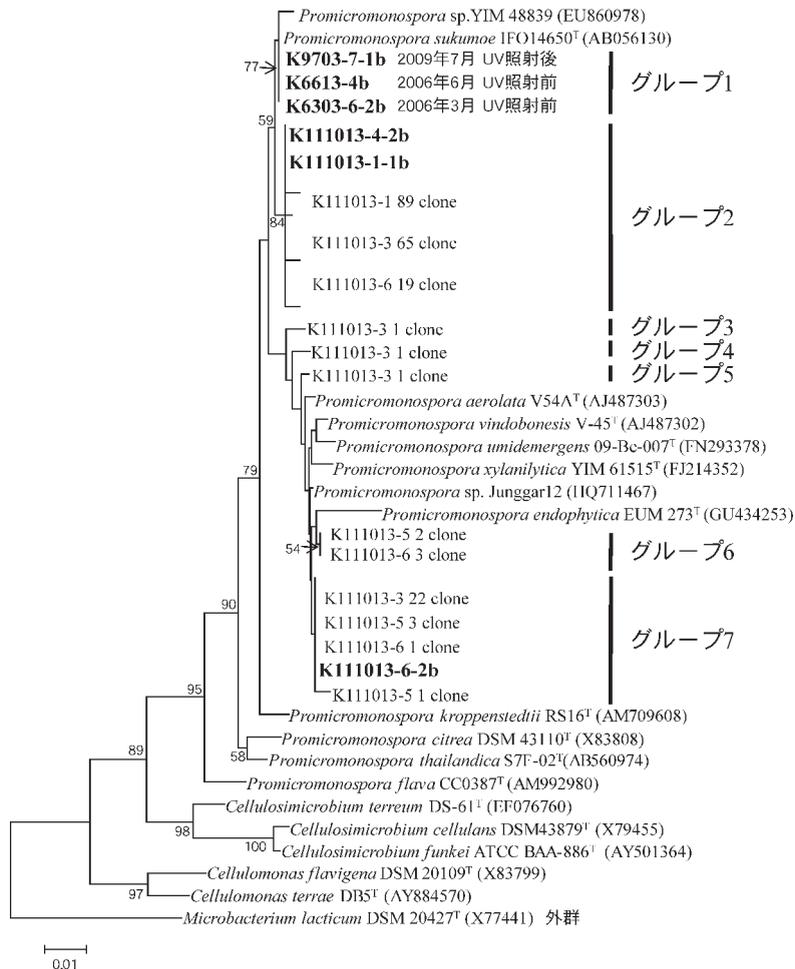


図2 *Promicromonospora* 属分離株およびクローンの16S rRNA 遺伝子部分塩基配列 (569塩基) の近隣結合法による分子系統樹。

各系統枝の数字はブーツストラップ値(1000回のリサンプリングの値を%で示し, 50%以上を表示), <sup>T</sup>は基準株を示す。左下のスケールは0.01塩基置換を意味する。太字は分離株, クローンは, 各試料からのクローン数として表示した。

*monospora* 属細菌が多く分離されていることから, 本解析で認められた放線菌のグループである *Promicromonospora* 属に近縁なクローンは, 2011年の石室内部微生物調査時における最優占細菌種である可能性が高い。これまであまり多く分離・検出されてこなかった, このような放線菌群の優占種化についてはUV照射などの石室内環境条件の変化が影響していることも考えられる。今後, 分離株の分類学的性質や紫外線への耐性能についてさらに検討する必要がある。

#### 参考文献

- 1) 木川りか, 間瀬創, 佐野千絵, 三浦定俊: キトラ古墳における菌類等生物調査報告(2), 保存

- 科学, **45**, 93-105 (2006)
- 2) 「特別史跡キトラ古墳の保存・活用等に関する調査研究委員会」(第9回)資料6, キトラ古墳の微生物等の状況について, 文化庁 (2006)
  - 3) 木川りか, 佐野千絵, 間瀬創, 三浦定俊: キトラ古墳における菌類等生物調査報告(3), 保存科学, **46**, 227-233 (2007)
  - 4) 佐野千絵・西島美由紀・喜友名朝彦・木川りか・杉山純多: 高松塚古墳石室内より分離された主要な微生物のギ酸・酢酸生成能, 保存科学, **49**, 209-219 (2010)
  - 5) Kigawa, R., Sano, C., Nishijima, M., Tazato, N., Kiyuna, T., Hayakawa, N., Kawanobe, W., Udagawa, S., Tateishi, T. and Sugiyama, J.: Investigation of acetic acid bacteria isolated from the Kitora tumulus in Japan and their involvement in the deterioration of the plaster of the mural paintings. *Studies in Conservation*, **58**, 30-40 (2013)
  - 6) 木川りか, 佐野千絵, 喜友名朝彦, 立里臨, 杉山純多, 高鳥浩介, 久米田裕子, 森井順之, 早川典子, 川野邊渉: キトラ古墳の微生物調査結果と微生物対策について (2009), 保存科学, **49**, 253-264 (2010)
  - 7) 木川りか, 佐野千絵, 喜友名朝彦, 立里臨, 杉山純多, 早川典子, 川野邊渉: キトラ古墳の微生物調査報告 (2010), 保存科学, **50**, 191-195 (2011)
  - 8) 木川りか, 佐藤嘉則, 喜友名朝彦, 立里臨, 杉山純多, 早川典子, 川野邊渉: キトラ古墳の微生物調査報告 (2011), 保存科学, **51**, 167-171 (2012)
  - 9) 木川りか, 喜友名朝彦, 立里臨, 佐藤嘉則, 杉山純多: キトラ古墳から分離された微生物の紫外線 (UV) 照射試験結果について, 保存科学, **52**, 91-105 (2013)
  - 10) Marchesi, JR., Sato, T., Weightman, AJ., Martin, TA., Fry, JC., Hiom, SJ. and William, GW.: Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 795-799 (1998)
  - 11) Ritalahti, KM., Amos, BK., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, SS. and Löffler, FE.: Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 2765-2774 (2006)
  - 12) Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaku, T., Kamagata, Y. and Kurane, R.: Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY<sup>®</sup> FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Research*, **29**, e34 (2001)
  - 13) Altschul, SF., Madden, TF., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang Z., Miller, W. and Lipman, DJ.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402 (1997)
  - 14) Sato, Y., Ohta, H., Yamagishi, T., Guo, Y., Nishizawa, T., Rahman, MH., Kuroda, H., Kato, T., Saito, M., Yoshinaga, I., Inubushi, K. and Suwa, Y.: Detection of Anammox activity and 16S rRNA genes in ravine paddy field soil, *Microbes and Environments*, **27**, 316-319 (2012)
  - 15) Tazato, N., Nishijima, M., Handa, Y., Kigawa, R., Sano, C. and Sugiyama, J.: *Gluconacetobacter tumulicola* sp. nov. and *Gluconacetobacter asukensis* sp. nov., isolated from the stone chamber interior of the Kitora Tumulus, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **62**, 2032-2038 (2012)

キーワード：キトラ古墳 (Kitora Tumulus)；微生物劣化 (microbial deterioration)  
；紫外線照射 (UV irradiation)；細菌 (bacteria)；クローン解析 (clone analysis)

## Culture-Independent Analysis of the Bacterial Community in Kitora Tumulus under Intermittent UV Irradiation

Yoshinori SATO, Rika KIGAWA, Tomohiko KIYUNA\*,  
Nozomi TAZATO\*, Miyuki NISHIJIMA\* and Junta SUGIYAMA\*<sup>2</sup>

The plaster walls and ceilings with polychrome mural paintings covering the interior of the stone chamber in the Kitora Tumulus had been seriously affected by microbial deterioration. Moreover, some parts of the mural paintings drawn on the thin plaster layers had become detached from the stone surface. For these reasons, it was decided to relocate the mural paintings and restore them in an air-conditioned facility. Almost all of the plaster with paintings on the walls and ceilings was relocated in 2008, and relocation of almost all of the plaster without paintings was also completed in 2010. Intermittent UV irradiation has been applied to control microbes on the remaining plaster since 2009. Although significant fungal growth on the plaster was suppressed effectively, dark colored fungi such as a black anamorphic basidiomycetous fungus *Burgoa* sp. were observed at some points on the walls and ceilings. In the present study, culture-independent, molecular based analysis was performed to monitor current bacterial colonization on the stone surface of walls and ceilings under intermittent UV irradiation.

From the result of clone analysis, it was found that many sequences of clones prepared from four samples collected from the stone surface of walls and ceilings in October 2011 were related with the genus *Promicromonospora* in the phylum “*Actinobacteria*”. Kigawa et. al. reported last year that actinobacteria were isolated as one of the major species from these same samples.

To assess the changes of the microbial community under intermittent UV irradiation control in the stone chamber, continuous microbial monitoring and identification with phylogenetic characterization of isolates are still necessary.

---

\*TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

\*<sup>2</sup>TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd., Chiba Branch Office