

〔報文〕 虎塚古墳の壁画剥落片の微生物群集構造解析

佐藤 嘉則・松野 美由樹*・犬塚 将英・稲田 健一**・
矢島 國雄***

1. はじめに

虎塚古墳は茨城県ひたちなか市（旧勝田市）中根にある前方後円墳である。古墳後円部には凝灰岩切石で組まれた横穴式石室を有している。石室内には床を含めた全壁面に白色下地層（白土）が塗られ、奥壁と東・西壁には白色下地層の上に赤色顔料（ベンガラ）で三角連続文・円文・渦文などの幾何学文様と大刀・槍・靱・楯などの武器、武具などの文様が描かれた壁画を有する装飾古墳である¹⁾。昭和48（1973）年に発掘調査が行われ、翌年の昭和49（1974）年に国の史跡に指定されている。その後、昭和52（1977）年に虎塚古墳壁画保存の基本方針が制定され、そこでは「保存にあたっては公開を前提とすること」と定められており、公開を前提とした保存施設設置の基本構想が策定され、昭和55（1980）年に墳丘内に公開保存施設が建てられた^{2,3)}。公開保存管理施設は、横穴式石室の開口部に設けられており、ペアガラス入りのエアタイトサッシの観察窓とその外部にステンレス製の扉の2重扉によって石室と空間を隔てたところに観察室を設け、屋外の入口部に向かって前室、前々室の合計3室からなる。各空間の室境はステンレス製の扉によって区切られている。前々室、前室および観察室の入口付近はコンクリート製の床面であるが、観察室の中央から奥は埋没する墓道の敷石を保護するために施設内に粘土系土質材料が敷かれている。公開保存管理施設竣工後の石室内の温湿度は、温度15℃～18℃、相対湿度ほぼ100%を維持し、観察室の温湿度は、一般公開等の開放期間を除いて温度12～20℃、相対湿度90～100%で推移している⁴⁾。一般公開は基本的には毎年春秋の2回、石室内環境と屋外環境の間で、著しい温度差が無いと想定される時期に行われている。

観察室においては、近年、壁面や扉石においてカビの発生が問題となり、微生物被害対策の検討が重ねられてきた^{5,6)}。しかし、石室内の壁画面では、一般公開後の定期点検においてもこれまでに顕著なカビ発生は認められておらず、生物被害の観点からは良好な状態で現地保存と公開が行われている古墳壁画であると言える。

これまで国内では、古墳の壁画面に形成された微生物群集が調査される時、顕著なカビの発生やバイオフィルムの形成が認められた際に、その部位を採集して行われてきた⁷⁾。なぜなら、調査結果を通して微生物被害が起こった原因の究明が主目的とされたからである。そのため、顕著なカビ被害やバイオフィルムの形成が認められていない壁画面（本報ではこれを便宜的に「健全な壁画面」と呼ぶ）ではどのような微生物群集構造が形成されているかについては未だ十分な学術的知見が無い状況にある。

微生物劣化が起きていない「健全な壁画面」というのは、微生物が全く存在していないのではなく、存在はするが微生物群集が目視で確認できない状態、あるいは微生物に起因する物理化学的な劣化が認識できない微生物の存在量と構成種であると推定している。つまり、「健全な壁画面」とは、安定的な環境において長い年月をかけて形成された微生物群集が極相に到達

*東京藝術大学大学院 **ひたちなか市生活・文化・スポーツ公社 ***明治大学

し、外部から侵入してくる新たな微生物群を制御し、特定の微生物種の卓越を制御している状態であり、それが見かけ上、顕著な生物劣化が起きていると認識できない動的平衡状態であると推察している。この考えに至る興味深い研究例として、アルタミラ洞窟での曝露岩石のコロニー形成試験⁸⁾がある。この試験の概要は、試験用石材片を滅菌処理した後、アルタミラ洞窟内で曝露して表面に出現してくる微生物群集を観察するというものである。結果は、2か月後から目に見えるカビの発生があり、3か月後には多くの石材片で菌糸が表面を覆ったり裏面から垂れ下がったりするほどの生育を見せたが、同じ地点にある洞窟内石材表面ではカビの生育は確認されなかった⁸⁾。洞窟内石材表面では細菌が主体の微生物群集が形成されていることがすでに先行研究⁹⁾で示されており、存在が可視化できないこれら土着の細菌群集が、カビのコロニー形成を制御しているのではないかと考察している⁸⁾。

そこで本研究では、虎塚古墳から得られた極微小な壁画剥落片に形成されている細菌とカビの両者を対象とした微生物群集構造解析を通して、「健全な壁画面」に形成される微生物群集がどのような様態であるか明らかにすることを目的とした。

2. 壁画剥落片の表面に形成された微生物群集構造解析

2-1. 試料の採取

虎塚古墳石室内では約21 cm × 30 cm のポリカーボネート (PC) 製の平板 (以下、PC 板と省略する) を石室内床面に敷いて、壁画面からの落下物を回収し、落下物の重量、種類、落下箇所の分布の調査⁴⁾を一般公開後の定期点検時に実施している。PC 板は、石室内床面の16箇所に設置し18番から33番までの番号を割り振っている (図1)。

本研究では、落下物の中で目視によって壁画の剥落片 (白色下地や赤色顔料を含む試料) と確認できるものを分取し解析試料とした。試料採取は、平成28 (2016) 年11月8日の秋季一般公開後の石室内点検時に行った。このとき交換されたPC板は、同年4月13日の石室点検時に設置され、約7か月間石室内に置かれていたものである。PC板上の壁画剥落片をあらかじめ滅菌したスパチュラを用いて、滅菌済みのループスクリーキャップチューブ (2 mL 容, ワトソン社製) に回収し、保冷剤入りの断熱容器で10 °C 以下に保ち、実験室に持ち帰った。実験室では、遺伝子 (DNA) 抽出に供するまでの間、-30 °C にて冷凍保存した。

2-2. 試料からの DNA 抽出と定量 PCR

DNA 抽出は、塩化ベンジルによって細胞壁を破壊し、界面活性剤の存在下で可溶化してDNAを抽出するキット (ISOPLANT II, ニッポン・ジーン) を用いて常法に従って行った。抽出したDNA溶液を用いて、カビと細菌それぞれを標的とした定量PCR法 (Q-primer-PCR法¹⁰⁾) を行い、抽出したDNAに含まれる対象遺伝子のコピー数を算出した。カビと細菌の定量PCRに用いたプライマーを表1に示す。

2-3. クローン解析と次世代シーケンス解析

細菌の群集構造解析では、分類学的多様性の特徴付けを行う際に広く使われる16S リボソームRNA (rRNA) 遺伝子を対象とした。16S rRNA 遺伝子の約1,500塩基の配列には9つの超可変領域と、その間に存在する保存配列領域で構成されており、数多くの細菌種で既にその全長配列が決定されているため、塩基配列データベースとの照合によって近縁種を類推することが出来るようになっている。本研究では、16S rRNA 遺伝子の超可変領域 (V4領域, 約254塩基配列) を対象とした次世代シーケンス解析を行った。次世代シーケンス解析は従来のシーケ

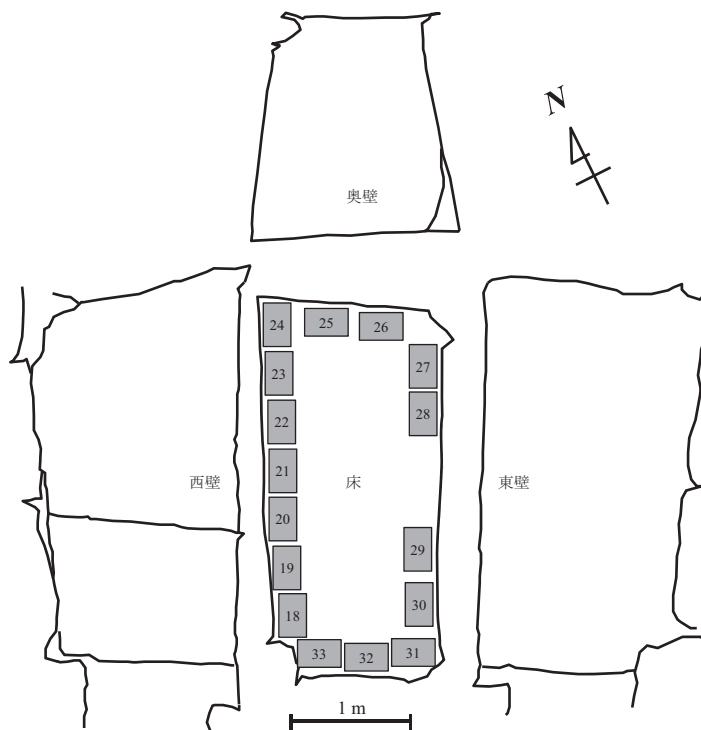


図1 石室内に置かれたポリカーボネート板の配置図

表1 遺伝子解析に用いたプライマー

名称	用途	塩基長 (mer)	塩基配列 (5' → 3')	参考文献
nu-SSU-0817-5		24	TTAGCATGGAATAAT(A/G)(A/G)AATAGGA	11
nu-SSU-1536-3	定量 PCR	20	ATTGCAATGC(C/T)CTATCCCA	11
カビ nu-SSU-1196-3		20	TCTGGACCTGGTGAGTTCC	11
ITS1F	クローンライブラリ	16	GTAACAAGGT(C/T)TCCGT	12
ITS1R		15	CGTTCTTCATCGATG	12
Bac1055YF		16	ATGG(C/T)TGTCGTCAGCT	13
Bac1392R	定量 PCR	15	ACGGGCGGTGTGTAC	13
細菌 Bac1115Probe		15	CAACGAGCGCAACCC	13
U515F	次世代シーケンス	18	GTG(C/T)CAGC(A/C)GCCGCGGTA	14, 15
926R		19	CCG(C/T)CAATTC(A/C)TTT(A/G)AGTT	16

ンス解析（キャピラリーシーケンサー）と比較して解析可能な遺伝子数が飛躍的に向上した機器であり、本研究では MiSeq システム（イルミナ社）で行った。表1に示したプライマーを用いて PCR 増幅を行い、増幅産物の濃度を調製した後、MiSeq にて次世代シーケンス解析を行った。PCR 増幅産物の両側から約250塩基ずつ解析（ペアエンド解析）を行い、2つの配列解析データの末端をオーバーラップさせて、約410塩基の塩基配列情報を得る方法で行った。得られた塩基配列データは、QIIME（Quantitative Insights Into Microbial Ecology）パイプライン¹⁷⁾を用いて以下のデータ解析を行った。

1) 塩基配列のチェック：得られた配列データのクオリティ、キメラをチェックし、基準を満

たした配列データのみをフィルタリングした。

2) OTU (Operation Taxonomic Unit : 操作的分類単位) の選定, 代表配列の決定 : フィルタリング後の配列データについて, 類似性の高い配列データ (相同性97%以上) を1つのグループのクラスタ (OTU) としてまとめた。各クラスタ配列の中で最も出現頻度の高い配列を代表 OTU 配列とし, その代表配列を用いて相同性検索と群集構造解析を行った。

3) 相同性検索, 群集構造解析 : 各代表の OTU 配列について, Silva の Living Tree (<http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>) の16S rRNA 遺伝子データベースに対する相同性検索を行い, 系統分類を推定した。

一方, カビの群集構造解析では, 次世代シーケンス解析が困難な DNA 量であったため, クローンライブラリ解析を採用した。本解析は, 抽出した DNA 溶液に含まれている複数種のカビ DNA の標的遺伝子を PCR 増幅によって増幅し, それを DNA ベクターに組み込んで大腸菌に形質転換させることによって, それぞれの DNA 断片を分けて解析する方法である。DNA 断片を組み込んだ大腸菌のクローンを各試料でそれぞれ96クローンを選抜し, 目的とする DNA 断片の塩基配列を決定した。決定した DNA 塩基配列は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, クローン毎に近縁な微生物種を予測した。なお, クローンライブラリ解析および系統解析は既報¹⁸⁾に従って行ったため, 詳細はそちらを参照されたい。

3. 結果と考察

3-1. 採取試料と定量 PCR 解析

今回の調査では, 4つの PC 板 (番号23, 番号26, 番号27, 番号30) 上で比較的多くの落下物が認められたため, そこから試料の採取を行った。試料採取では, PC 板上の落下物のうち, 目視で白色下地と赤色顔料と確認されたものを採取した。番号26の PC 板では赤色顔料と白色下地が分かれて存在していたため, 赤色顔料を T26R 試料, 白色下地を T26W として分取した。その他の PC 板上では赤色顔料と白色下地が混在していたため, 白色下地と赤色顔料の混成落下物として採取し, PC 板の番号と試料の類別に基づき合計で5試料とした (T23, T26R, T26W, T27, T30)。各試料の湿重量は2.0から17.5 mgであった (表2)。

DNA 抽出は, 試料が微量であったことからそれぞれ採取試料の全量を用いて行った。抽出した DNA 原液に含まれる細菌の16S rRNA 遺伝子のコピー数とカビの18S rRNA 遺伝子のコピー数の結果を表3に示す。抽出 DNA 原液中に含まれる細菌とカビの対象遺伝子のコピー数を比較すると, 5つの試料で共通してカビのコピー数が細菌に対して少ないことが明らかとなった。

表2 虎塚古墳壁画の微小剥落片試料

PC 板番号	試料名	湿重量 (mg)	試料類別*
23	T23	17.5	白色下地と赤色顔料の混成落下物
26	T26R	3.5	赤色顔料のみの落下物
26	T26W	2.0	白色下地のみの落下物
27	T27	3.2	白色下地と赤色顔料の混成落下物
30	T30	3.1	白色下地と赤色顔料の混成落下物

*落下物は目視によって類別した

表3 細菌とカビのリボソーム RNA 遺伝子のコピー数

試料名	DNA 原液中の対象遺伝子* コピー数 (copies/ μ L-DNA 原液)	
	細菌	カビ
T23	3.4×10^5	3.8×10^1
T26R	1.3×10^5	5.1×10^2
T26W	1.7×10^4	2.0×10^1
T27	1.3×10^5	3.5×10^2
T30	1.7×10^4	2.5×10^1

*細菌は16S rRNA 遺伝子, カビは18S rRNA 遺伝子を対象とした

対象とした遺伝子のコピー数は細菌とカビによって元々の数が異なるため、単純にコピー数だけで存在比を結論付けることは出来ないものの、虎塚古墳壁画の剥落片ではカビの存在量が極めて少ないことが示唆される結果となった。虎塚古墳の壁画表面ではこれまで目視で観察されるような顕著なカビの発生は認められておらず、今回の定量 PCR の結果はこうした状況を反映している可能性がある。

3-2. 細菌の次世代シーケンス解析

細菌の次世代シーケンス解析では、T23試料で154,492リード（配列データ数）、T26R 試料で149,282リード、T26W 試料で56,727リード、T27試料で137,760リード、T30試料で68,018リードを決定した。これらの配列群を、類似性の高い配列（相同性97%以上）をひとつのOUT（操作的分類単位）としてグループ化し、各グループの代表配列について相同性検索を行い、門レベルの分類群に属する配列数を出現頻度（%）として表した（図2）。

全試料に共通して出現頻度が高かった分類群は、*Proteobacteria* 門（出現頻度27.9%-50.9%）、*Bacteroidetes* 門（8.8%-46.9%）、*Planctomycetes* 門（3.2%-15.1%）、*Acidobacteria* 門（2.2%-3.7%）であった。T23試料を除くと、上記の分類群に加えて、*Actionobacteria* 門、*Chloroflexi* 門の出現頻度が高かった。T26R 試料は、他の試料と比べて *Firmicutes* 門（29.2%）の出現頻度が高いという結果となった。T26R 試料は、壁画剥落片で赤色顔料のみを採取した試料であり、赤色顔料では *Firmicutes* 門が優占することが示唆された。

次に、5つの試料から得た全配列群のなかで、出現頻度が0.2%以上の OTU を選択し、属レベルまで系統解析を行った結果を表4に示した。全試料で共通して最も出現頻度が高かった *Proteobacteria* 門では、特に *Alphaproteobacteria* 綱に属する配列が多く、その中でも *Reyranella* 属の出現頻度が最も高かった。OUT の代表配列（420 bp）と近縁であった既知種 *Reyranella massiliensis* 521株（EF394922）との相同性は98%であった。*Reyranella massiliensis* に関する知見としては、本種の基準株は自由生活型のアメーバ（*Acanthamoeba polyphaga*）との共培養系から分離された種であり、アメーバに捕食された後、アメーバ細胞内で増殖し、細胞変質効果を示すことが確認されている¹⁹⁾。虎塚古墳壁画表面では、細菌の生存にとってアメーバの捕食による選択圧が大きく、それ故に本種が多く存在しているのではないかと考察した。壁画表面でのアメーバの存在は、これまでに調査されたことが無いため、アメーバと壁画上の細菌との関係については今後の検討課題である。

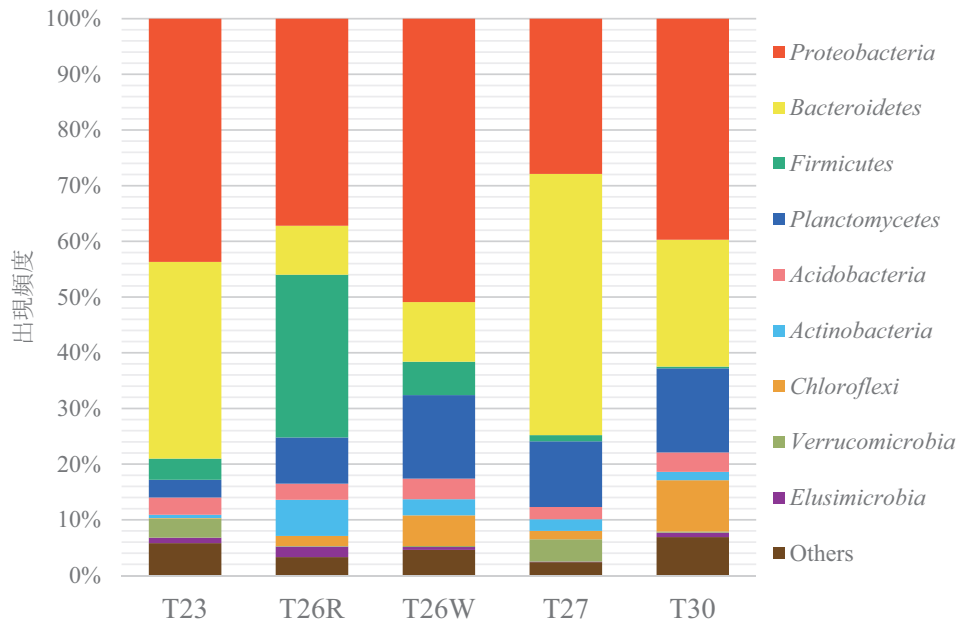


図2 微小剥落片の門レベルの細菌群集構造

次に出現頻度の高かった OTU は、*Alphaproteobacteria* 網の *Hyphomicrobium* 属に近縁のものであった。*Hyphomicrobium* 属は、通性のメタン酸化細菌で、硝酸イオンを呼吸系の電子受容体として利用し、窒素ガスに変換する脱窒（嫌気呼吸）を行い、メタノールやギ酸を資化することが知られている²⁰⁾。虎塚古墳の石室内では、容器に入れたパラホルムアルデヒドを定期点検時に交換設置をしており、ここから生じるホルムアルデヒドあるいはギ酸が *Hyphomicrobium* 属の栄養源となっている可能性もある。しかし、脱窒が起こっていた場合、硝酸などの窒素源の消失が壁画面での微生物抑制に寄与している可能性もあるため、パラホルムアルデヒドの設置の是非については今後慎重に議論を進める必要がある。

Bacteroidetes 門では、特に *Chitinophagaceae* 科に属する配列の出現頻度が高かった。*Chitinophagaceae* 科の菌群はキチンを資化する種が多く存在することから、カビの菌糸の構成成分のひとつであるキチンの分解が起こっていることも推察され、定量 PCR でカビの存在量が少ないことと関連がある可能性もある。培養法によって分離株を得ることで、カビの制御に関する生理学的諸性質を解析することが可能となるため、今後は培養法についても検討を進める必要がある。

Chitinophagaceae 科の中で最も出現頻度の高かった属は、*Chryseolinea* 属であり、*Chryseolinea serpens* RYG^T株が最も近縁な配列（92-99%）であった。この種は、メタン酸化細菌の集積培養系から共存菌として分離された種であり²¹⁾、興味深いことに虎塚古墳の観察室にある扉石（閉塞石）の表面の暗色粘性物質中のクローンライブラリ解析でも出現率が最も高かった種である⁶⁾。この共通性は虎塚古墳の石材表面で特異的なものか、あるいは他の装飾古墳でも普遍的なものかについては今後明らかにしていく必要がある。

Chryseolinea 属と同様に、観察室にある扉石の暗色粘性物質から検出された細菌種と共通して出現頻度の高い種は、*Proteobacteria* 門の *Dongia* 属、*Sphingomonas* 属、*Sphingopyxis* 属、

表4 微小剥落片の細菌群集構造

分類階級					出現頻度* (%)					
門	綱	目	科	属	T23	T26R	T26 W	T27	T30	Total
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Unclassified		<i>Reyvanella</i>	3.8	10.9	16.3	3.6	9.9	7.6
		Rhizobiales	Hypnomicromonadaceae	<i>Hyphomicrobium</i>	0.4	3.2	4.8	1.3	2.0	2.0
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	1.3	0.5	0.4	1.0	4.7	1.3
		Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Dongia</i>	4.4	0	0	0	0	1.2
		Rhizobiales	Methylocystaceae	Unclassified	0.1	2.0	2.0	0.4	1.9	1.1
		Rhizobiales	Xanthobacteraceae	<i>Labrys</i>	0	1.7	2.7	0.4	1.2	1.0
		Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Unclassified	2.9	0.1	0.2	0.2	0.2	0.9
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingopyxis</i>	0.1	0	0	3.2	0	0.8
		Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Unclassified	2.0	0.2	0.6	0.3	0.6	0.8
		Parvularculales	Parvularculaceae	<i>Parvularcula</i>	1.8	0	0	0	0	0.5
		Unclassified		<i>Rhizomicrobium</i>	1.0	0	0	0.6	0	0.4
		Rhizobiales	Xanthobacteraceae	<i>Starkeya</i>	0.3	0.3	0.2	0.6	0.1	0.4
		Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Azospirillum</i>	1.2	0	0	0	0	0.3
		Rhizobiales	Hypnomicromonadaceae	<i>Pedomicrobium</i>	0.5	0.3	0.3	0.1	0.6	0.3
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Roseomonas</i>	0.6	0.2	0.5	0.1	0.3	0.3
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Unclassified	0.1	0.2	0.3	0.6	0.1	0.3
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	0	0	0	0.7	0.1	0.2
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Caulobacter</i>	0.6	0	0	0	0	0.2
		Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Unclassified	0.4	0	0	0.2	0	0.2
		Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Inquilinus</i>	0.1	0.1	0	0.3	0.3	0.2
Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Sulfuritalea</i>	2.7	0	0	0	0	0.8	
	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Variovorax</i>	0.6	0.2	0	0	0	0.2	
Gammaproteobacteria	Unclassified		<i>Povalibacter</i>	2.2	0.4	0.6	0.3	0.1	0.9	
	Lysobacteriales	Lysobacteraceae	<i>Pseudoxanthomonas</i>	2.4	0	0	0.5	0	0.8	
	Nevskiales	Nevskiaceae	Unclassified	0	0.3	0.6	0.1	2.7	0.5	
	Lysobacteriales	Lysobacteraceae	<i>Lysobacter</i>	1.2	0	0	0	0.9	0.4	
	Lysobacteriales	Lysobacteraceae	<i>Panacagrimonas</i>	0.1	0.3	0.5	0.6	0.5	0.4	
	Unclassified		<i>Caedibacter</i>	0.2	0.1	0.9	0.3	0	0.2	
Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	<i>Vampirovibrio</i>	0	0.7	0.8	0.6	1.1	0.5	
	Myxococcales		Unclassified	0	0.4	0.5	0.1	0.5	0.3	
	Myxococcales	Haliangiaceae	<i>Haliangium</i>	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	
	Myxococcales	Polyangiaceae	Unclassified	0.1	0.2	0.5	0	0.3	0.2	
Bacteroidetes	Cytophagia	Unclassified	<i>Chryseolinea</i>	7.3	4.7	6.4	5.4	14.3	6.9	
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	16.5	0	0.1	2.8	6.4	6.0	
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	0	0	0	20.6	0	5.0	
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	0.6	0	0	10.2	0	2.7	
	Cytophagia	Unclassified	<i>Ohtaekwangia</i>	6.5	1.5	1.4	0.9	0.5	2.6	
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	3.6	0	0.4	0.0	0.1	1.0	
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	0	0	0	3.4	0	0.8	
	Cytophagia	Flammeovirgaceae	<i>Marinoscillum</i>	0	0.2	2.4	0.8	1.4	0.7	
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	0	0	0	2.5	0	0.6	
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	0	2.3	0	0	0	0.6	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	0	5.8	5.5	0.9	0.2	8.4	
	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	0.4	2.7	2.7	0.8	7.8	2.2	
	Phycisphaerae	Tepidisphaerales	Tepidisphaeraceae	0.1	0.4	0.1	7.9	0.1	2.1	
	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	0.2	2.5	5.5	0.9	3.3	1.8	
	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	0.9	1.1	1.7	0.6	1.9	1.1	
	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	0	0.7	4.4	0.3	0.7	0.8	
	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	0.2	0	0	0.8	0	0.3	
	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	0.1	0.3	0.1	0.1	0.6	0.2	
	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	0.6	0	0.1	0	0.1	0.2	
	Unclassified		<i>Bryobacter</i>	0.7	2.0	2.1	1.9	1.2	1.5	
Unclassified		<i>Paludibaculum</i>	2.0	0.9	1.5	0.2	2.1	1.3		
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Promicromonosporaceae	0	3.3	0.2	0.4	0.1	1.0	
	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	0	0.9	0	1.1	0	0.5	
	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	0	1.3	1.2	0	0	0.5	
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	0	1.7	5.0	1.4	8.4	2.3	
	Opitutae	Opitutales	Opitutaceae	2.1	0	0.1	0.3	0.2	0.7	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	0	0	0	1.5	0	0.4	
	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	0.4	0	0	0.5	0	0.2	
	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	0.1	0	0	0.8	0	0.2	
	Unclassified		<i>Terrimicrobium</i>	0.1	0	0	0.7	0.0	0.2	
	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	0.7	0	0	0	0	0.2	
Elusimicrobia	Unclassified		<i>Aridibacter</i>	1.0	0.6	0.2	0	0.5	0.5	

* 全試料での出現頻度が0.2%以上のOUTのみを選択し、出現頻度の高低を色の濃淡で示した

表5 微小剥落片のカビ群集構造

分類階級					出現頻度* (%)								
門	綱	目	科	属	T24	T27R	T27W	T27	T30	Total			
Mucoromycota		Mortierellales	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>	0	3.3	0	0	0	0.6			
		Thelephorales	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i>	72.9	0	0	0	0	14.8			
Basidiomycota	Agaricomycetes	Sebacinales	Sebacinaceae	<i>Sebacina</i>	2.1	0	0	0	0	0.4			
		Agaricales	Psathyrellaceae	<i>Psathyrella</i>	0	0	0	0	2.1	0.4			
Ascomycota		Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Exophiala</i>	11.5	28.6	94.7	62.1	91.7	57.8			
		Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	1.0	0	0	0	0	0.2		
					<i>Penicillium</i>	0	2.2	0	14.7	2.1	3.8		
					Cordycipitaceae	<i>Isaria</i>	6.3	16.5	0	0	0	4.4	
						<i>Simplicillium</i>	3.1	47.2	0	6.3	0	11.0	
				Hypocreales		<i>Lecanicillium</i>	0	0	0	1.1	0	0.2	
						Clavicipitaceae	<i>Pochonia</i>	0	0	0	8.4	0	1.7
						Nectriaceae	<i>Ilyonectria</i>	0	0	0	2.1	0	0.4
						Clavicipitaceae	<i>Metapochonia</i>	0	0	0	0	1.0	0.2
				Ophiostomatale	Ophiostomataceae	<i>Sporothrix</i>	0	0	0	2.1	0	0.4	
						Didymellaceae	<i>Paraboeremia</i>	1.0	0	0	0	0	0.2
				Dothideomycete	Pleosporales	Periconiaceae	<i>Periconia</i>	2.1	0	5.3	0	1.0	1.7
						Leotiomycetes	Myxotrichaceae	<i>Oidiodendron</i>	0	2.2	0	0	2.1
		Helotiales	Hyaloscyphaceae	<i>Lachnum</i>	0	0	0	3.2	0	0.6			

* 色の濃淡は出現頻度の高低を示す

Pseudoxanthomonas 属などであった。これらの種の生態学的な役割についても、分離培養によって検討が進められることが望まれる。

赤色顔料のみの試料である T26R 試料と白色下地のみの試料である T26W 試料を比較すると、T26R 試料で *Firmicutes* 門に属する OTU がより多く存在する傾向にあった。*Firmicutes* 門に分類される塩基配列についてより詳細な分類群まで解析をすると、*Paenibacillus* 属に近縁の塩基配列の出現頻度が高いことが明らかとなった。本属の菌群については鉄還元に関わる種も含まれるが、分離源も代謝様式も多様であり、生態学的な考察をすることは困難である。今後、*Paenibacillus* 属の分離培養を試み、分離株の生理生化学的な性質を調べることで、赤色顔料との関係に明らかにしていく必要がある。

3-3. カビのクローンライブラリ解析

カビの群集構造解析では次世代シーケンス解析よりも得られる情報量が少ないクローンライブラリ解析を採用した。この理由として定量 PCR の結果で示したようにカビの存在量が少なく、次世代シーケンス解析が可能な十分量の PCR 産物を得られなかったことにある。クローンライブラリ解析では全試料で解析が成功し、それぞれ T23試料は96クローン、T26R 試料は91クローン、T26W 試料は94クローン、T27試料は95クローン、T30試料は96クローンを得ることが出来た。

全試料で共通して高い頻度で検出されたものは *Exophiala* 属に近縁の塩基配列であった (表5)。全試料のクローン総数 ($n = 472$) に対する出現頻度は57.8%であり、特に T27W 試料と T30試料で90%を上回った。*Exophiala* 属は少数ではあるが高松塚古墳とキトラ古墳の石室内からも分離されており^{22,23)}、キトラ古墳石室で採取されたバイオフィルムのパイロシーケンス解析においても多く検出され²⁴⁾、古墳などの石材表面を生息環境として好む性質にあることが示唆される。*Exophiala* 属に近縁な塩基配列を種レベルまで調べると、すべてのクローンが *Exophiala* sp. T61213-9-3株 (LC145305) と高い相同性 (99.2-100%) を示した。従って、*Exophiala* sp. T61213-9-3株に近縁なほぼ単一種が虎塚古墳の剥落壁画表面に存在していたと考えられる。T61213-9-3株は、高松塚古墳石室の天井石の黒色部分から分離された菌株であ

る。

Exophiala 属に関しては、虎塚古墳の扉石の暗色粘性物質からも多く検出されており、扉石表面では、*Exophiala* sp. LX M8-6株に近縁の配列であったことを報告している⁶⁾。LX M8-6株はフランス・ラスコー洞窟の雄牛の間の壁画面に出現していた黒変部位から採取された試料から分離された菌株である²⁵⁾。ラスコー洞窟では2001年に *Fusarium solani* の大規模な発生を受け、その後3年間の防黴剤の散布が行われていたが、最初の投薬から4か月後から黒変部位が出現し始めて、2007年になると黒変部位が拡大し、最も大きな微生物被害となったため、2008年から黒変部位の殺菌のため再び防黴剤散布が行われた。それでも黒変部位の制御が出来ず、物理的な除去方法が行われている²⁴⁾。本研究で検出された配列は、*Exophiala* sp. T61213-9-3と相同性が高いが、高松塚古墳壁画、キトラ古墳壁画、ラスコー洞窟壁画、そして虎塚古墳壁画と共通して存在するカビとして、*Exophiala* 属がどのような生態学的特徴を持つか今後さらなる調査が必要である。

T23試料で特異的に検出された *Tomentella* 属に近縁なクローン（出現頻度72.9%、相同性92.2~98.8%）は、一般的に植物根に共生する外生菌根菌のグループとして知られている。虎塚古墳の石室内には、墳丘上に植えられたサツキに混生するナリヒラダケやオキナダケの根茎の侵入が遺伝子解析によって特定されており⁶⁾、こうした植物根と共生関係にある外生菌根菌が壁画剥落片に部位特異的に検出された可能性がある。植物根の侵入によって、壁画の剥落が引き起こされる可能性もあるため、壁画片の剥落と外生菌根菌の検出には関連があることも想定される。T23試料でのみ本属に近縁なクローンが検出されたことから、石室内に置かれたPC板の位置と植物根の侵入場所との関係について調べていく必要がある。

カビのクローンライブラリ解析では上述したような菌群の存在が推定されたが、定量PCRの結果から、壁画剥落片では細菌に対してカビの存在量は非常に少ないと考えられる。

4. おわりに

顕著な微生物劣化が認められていない虎塚古墳壁画の表面に存在する微生物群集構造解析を解析することで、「健全な壁画面」に形成される微生物群集とはどのような様態であるかを明らかにすることは、古墳壁画の現地保存を考えるうえでの基礎的な情報になると考えた。しかし、壁画面は非破壊・非接触が原則であるため、本研究では壁画の微小剥落片を試料に用いて解析を行い、剥落前の壁画面の状態を推察することとした。実際には、ごく微量の試料の解析結果であることや石室内のPC板上で長期間置かれている際に起こった微生物群集の変化も想定されることから、壁画上での状態とは大きく異なることも考えられる。このため、今後も継続して同様の解析を行い、結果を蓄積していくことで傾向を掴んでいく必要がある。

本研究において、特筆すべき知見は、抽出したDNAに含まれる細菌とカビの存在量を比較するとカビの存在量が有意に少ないという結果である。相対湿度が年間ほぼ100%で推移する虎塚古墳石室内では、光が届かないため光合成生物が生存できず従属栄養性のカビと細菌が埋蔵環境中の限られた栄養源を競合するなかで、細菌の存在量が卓越している状態であり、目視で確認できるカビの発生がこれまで認められなかったことと関連するのではないかと考えられる。細菌と比べてカビの遺伝子コピー数が少ないという結果は、カビの絶対量を示す結果ではないため、定量的な測定方法によって壁画剥落片の重量当たりの微生物量を測定することが必要である。これについては今後の検討課題である。

石室内に存在するダニやトビムシなどの土壌動物は、カビの生育にとって阻害的に働いてい

る可能性もある。また、細菌の群集構造解析では、アメーバの捕食圧に対抗できると考えられる *Reyranella massiliensis* の出現頻度が高かったが、この結果は、*Reyranella massiliensis* 以外の細菌がアメーバなどの原生生物の捕食圧によって、生体量の増加が制御されていることを想起させる。石室内では、様々な生物が限られたエネルギーを巡り複雑に競合している結果として、特定の生物種を卓越させない「健全な壁画」の状態で現地保存されているのではないかと考えられる。このような考察を裏付けていくためにも、微小剥落片から細菌とカビの分離を試み、それぞれの相互作用を明らかにしていく研究に加え、石室内での細菌やカビの存在量の調査、さらには石室内に存在する土壤動物も含めた生物群集との相互作用を明らかにしていく基礎的研究を継続する必要がある。石室内の生物群集と物質循環の機序を解明することは、古墳壁画の現地保存を考えるうえで重要な知見になると考えられる。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、現地調査等で多大なるご協力を賜りましたひたちなか市教育委員会の千葉美恵子氏、照沼沙保里氏に深く感謝申し上げます。有益なご助言を賜りました東京文化財研究所の片山葉子客員研究員に深く感謝申し上げます。本研究は、JSPS 科研費 16K01186「虎塚古墳壁画の材質と保存環境に関する研究」(研究代表者：犬塚将英)の助成を受けたものです。以上、記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 勝田市史：別編 I 虎塚古墳、勝田市 (1978)
- 2) 史跡虎塚古墳保存整備報告書、勝田市教育委員会 (1981)
- 3) 史跡 虎塚古墳、勝田市教育委員会 (1985)
- 4) 矢島國雄編、科学研究費補助金研究成果報告書『虎塚古墳の保存科学的研究』(2014)
- 5) 佐藤嘉則、犬塚将英、森井順之、矢島國雄、木川りか：虎塚古墳公開保存施設の管理方法変更による微生物汚染状況の推移、保存科学、54、121-131 (2015)
- 6) 佐藤嘉則、木川りか、犬塚将英、森井順之、矢島國雄：虎塚古墳石室の扉石表面に形成したバイオフィルムの微生物群集構造解析とその制御、保存科学、57、67-76 (2018)
- 7) Sugiyama, J., Kiyuna, T., Nishijima, M., An, K. D., Nagatsuka, Y., Tazato, N., Handa, Y., Hata-Tomita, J., Sato, Y., Kigawa, R., Sano, C.: Polyphasic insights into the microbiomes of the Takamatsuzuka Tumulus and Kitora Tumulus, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 63, 63-113 (2017)
- 8) Jurado, V., Fernández-Cortes, A., Cuezva, S., Laiz, L., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C.: The fungal colonization of rock art caves. *Naturwissenschaften*, 96, 1027-1034 (2009)
- 9) Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., Cañaveras, J.C.: Microbial communities and associated mineral fabrics in Altamira Cave, Spain, *International Journal of Speleology*, 38, 83-92 (2009)
- 10) Kurata, S., Kanagawa T., Yamada K., Torimura M., Yokomaku T., Kamagata Y., Kurane R.: Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer, *Nucleic Acids Research*, 29, E34 (2001)
- 11) Borneman, J., Hartin, R.T.: Primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4356-4360 (2000)

- 12) The Japanese Pharmacopoeia 15th edition: Rapid Identification of Microorganisms Based on Molecular Biological Method, The MHLW Ministerial Notification No.285, 1741-1742 (2006)
- 13) Ritalahti, K.M., Amos, B. K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S.S., Löffler F.E.: Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2765-2774 (2006)
- 14) Takai K., Sako Y.: A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments, *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 177-188 (1999)
- 15) Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D.: Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 327-338 (1999)
- 16) Lane, D.J.: 16S/23S rRNA sequencing. *In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, 115-175 (1991)
- 17) Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.L., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenkov, T., Zaneveld, J., Knightcorresponding, R.: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nature Methods*, 7, 335-336 (2010)
- 18) Sato, Y., Ohta, H., Yamagishi, T., Guo, Y., Nishizawa, T., Rahman, M.H., Kuroda, H., Kato, T., Saito, M., Yoshinaga, I., Inubushi, K., Suwa, Y.: Detection of anammox activity and 16S rRNA genes in ravine paddy field soil, *Microbes and Environments*, 27, 316-319 (2012)
- 19) Pignier, I., Raoult, D., Scola, B.L.: Isolation and characterization of *Reyranella massiliensis* gen. nov., sp. nov. from freshwater samples by using an amoeba co-culture procedure, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2151-2154 (2011)
- 20) Martineau, C., Villeneuve, C., Mauffrey, F., Villemur, R.: *Hyphomicrobium nitratorans* sp. nov., isolated from the biofilm of a methanol-fed denitrification system treating seawater at Montreal Biodome, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3777-3781 (2013)
- 21) Kim, J.J., Alkawally, M., Brady, A.L., Rijpstra, W.I.C., Sinninghe Damsté, J.S., Dunfield, P.F.: *Chryseolinea serpens* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum *Bacteroidetes* isolated from soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 654-660 (2013)
- 22) Sugiyama, J., Kiyuna, T., Nishijima, M., An, K.D., Nagatsuka, Y., Tazato, N., Handa, Y., Hata-Tomita, J., Sato, Y., Kigawa, R., Sano, C.: Polyphasic insights into the microbiomes of the Takamatsuzuka Tumulus and Kitora Tumulus, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 63, 63-113 (2017)
- 23) 文化庁・東京文化財研究所編、特別史跡高松塚古墳生物調査報告—高松塚古墳石室解体事業にともなう生物調査—、同成社 (2019)
- 24) 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：パイロシーケンス法によるキトラ古墳石室内の微生物群集構造解析、*保存科学*、54、111-120 (2015)
- 25) Martin-Sanchez, P.M., Nováková, A., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C.: Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: The case of the Lascaux Cave in France, *Environmental Science & Technology*, 46, 3762-3770 (2012)

キーワード：虎塚古墳 (Torazuka Tumulus)；壁画 (wall paintings)；微生物群集構造解析 (micro-

bial community analysis); 次世代シーケンス解析 (next-generation sequencing); クローンライブラリ解析 (clone library analysis)

Analyses of Microbial Community on the Small Pieces of Wall Paintings in the Torazuka Tumulus

SATO Yoshinori, MATSUNO Miyuki^{*}, INUZUKA Masahide,
INADA Kenichi^{**} and YAJIMA Kunio^{***}

The present research conducted microbial community analysis on small fragments collected from the Torazuka Tumulus to clarify the structure of microbial communities on wall paintings without biodeterioration by using molecular biological methods.

As a result of quantitative PCR using the DNA solution extracted from the small pieces of wall paintings, the number of fungal 18S rRNA genes within all samples were less than that of bacterial 16S rRNA genes.

The results from the next-generation sequencing of viruses have shown that the following phyla have appeared frequently in all samples: *Proteobacteria* (relative abundance 27.9%-50.9%), *Bacteroidetes* (8.8%-46.9%), *Planctomycetes* (3.2%-15.1%) and *Acidobacteria* (2.2%-3.7%). Genus *Reyranella* in phylum *Proteobacteria* and genus *Chryseolinea* in phylum *Bacteroidetes* have shown the highest relative abundance within all samples.

Results from the clone library analysis have shown that the genus *Exophiala* had the highest relative abundance within all samples. As *Exophiala* has also been isolated from the Takamatsuzuka Tumulus, Kitora Tumulus, and Lascaux cave, it was suggested that stone surfaces such as burial mounds are favorable habitats for *Exophiala*.

In the future, it is necessary to clarify the interaction between the bacteria and fungi from small fragments using the culturing methods. Furthermore, basic research such as the abundance of bacteria and fungi in stone chambers, and their interaction with biological communities, including soil animals, is needed. These studies are expected to provide important knowledge to understand local conservation methods for wall paintings in the Torazuka Tumulus.

^{*}Tokyo University of the Arts, ^{**}Culture, and Sports Public Corporation, ^{***}Meiji University