

〔報文〕 三内丸山遺跡「子どもの墓」土遺構で発生したキノコの同定と真菌叢解析

轟 丈瑠・長尾 理伶*・西澤 智康*、**・佐藤 嘉則・石崎 武志***

1. はじめに

青森県青森市に所在する三内丸山遺跡は、縄文時代前期から中期にかけて営まれた大規模集落跡である。1992年に県営野球場建設のために行われた調査で大規模集落が発見された。その後、1994年以降に大型建物跡なども確認され、遺跡の保存と活用が進められてきた。2000年に国の特別史跡に指定され、2021年には北海道と青森、岩手、秋田の3県に点在する17遺跡が「北海道・北東北の縄文遺跡群」として世界文化遺産に登録され、三内丸山遺跡はそれを構成する重要遺跡のひとつとして通年で現地公開が行われている。遺跡は発掘時の状態を保持した「北盛土・南盛土」や復元された「掘立柱建物」などが公開され、遺跡周辺では当時も存在した落葉広葉樹（クリ、クルミ、ヤマナラシなど）の植生が整備され、縄文時代の生活空間を来訪者が直接的に体感できる展示手法がとられている。

その一方で、発掘後の土遺構を保護設備のもとで露出展示する方式は、周辺環境の影響を受けやすいという保存上の脆弱性が伴う。三内丸山遺跡では、生物劣化に関する複数の事例が報告されており、北盛土や南盛土では真菌類（カビ）の発生、「大人の墓」では藻類の繁茂が確認されている。その中でも「子どもの墓」では、遺構表面に担子菌類の子実体（キノコ）が断続的に発生する問題が生じている（図1）。覆屋内に設置されたタイムラプスカメラによる2017年から2023年までに行われた画像解析では、キノコが遺構の北東側から南西側へ広がる様子が観察されている¹⁾。キノコの発生は、遺構表面を隆起させることによる物理的な損傷を招き、保存の観点から看過できない問題であるため、キノコの発生要因を解明し、キノコの発生を抑制する環境管理手法を提案することが求められている。

一般に、キノコを含む真菌類の対策として薬剤処理が行われる場合があるが、屋外環境やそれに近い環境においては薬剤に耐性を持つ微生物の増加や微生物生態系の人為的攪乱を招く懸念がある^{2,3,4)}ことから、そのような環境で薬剤の使用を行う場合は慎重に議論を行い、二次的な被害を想定した上で実施する必要がある。子どもの墓では、定期清掃時にキノコを手作業で除去する対応がとられているが、再発防止に向けた根本的対策を講じるためにも、キノコの発生機序や条件など生態に関する基礎的な情報を得ることが重要である。

そこで本研究では、三内丸山遺跡の子どもの墓土遺構で発生したキノコの形成菌種を明らかにするとともに、遺構土壌の理化学性分析と真菌叢解析を通して、キノコ形成菌種を含めた微生物生態系を把握し、キノコの発生機序制御について考察することを目的とした。

2. 材料と方法

2-1. キノコ形成菌種の同定

2023年7月と同年8月に子どもの墓の土遺構表面で確認されたキノコを採取した。キノコは目

*茨城大学大学院農学研究科、**茨城大学グリーンバイオテクノロジー研究センター、***東北芸術工科大学

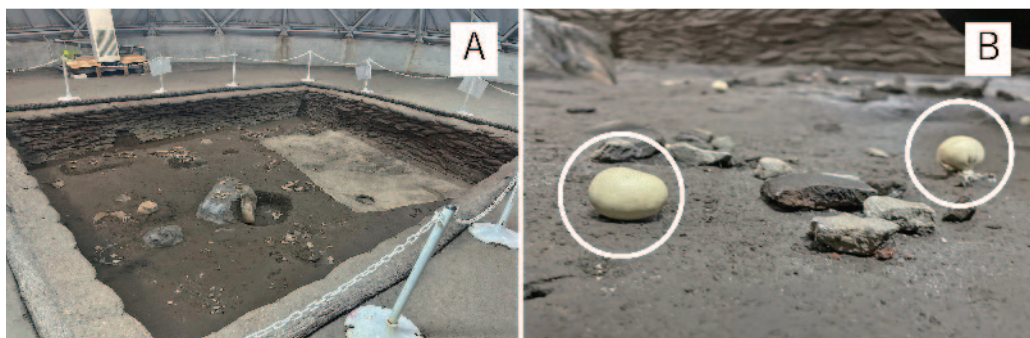


図1 子どもの墓の露出展示 (A) と遺構で発生したキノコ (B)

視観察において外部形態が同一と考えられるものを3つ採取し(キノコ①、キノコ②、キノコ③)、50 mL容滅菌チューブに入れて低温下で持ち帰った。

キノコ①は外部形態と内部にある胞子の形態観察に供した。まずメスでキノコを半分に切断し、切断面と内部を実体顕微鏡で観察した。続いて、内部の胞子をピンセットで少量とり、スライドガラス上に移した後、ラクトフェノールコットンブルー溶液で染色した。染色後、カバーガラスで軽く圧着させ、光学顕微鏡 (BX53、DP72、Olympus) で胞子の形態観察を行った。

キノコ②とキノコ③は、DNA塩基配列情報に基づく種の同定を行う試験に供した。まず0.5% (v/v) Tween80を含む生理食塩水を用いて、キノコの表面の付着物を除去し、滅菌水で洗浄した。その後、滅菌したメスを用いてキノコを切断し、内部の胞子を採取してDNA抽出に供した。DNA抽出はISOPLANT II (ニッポンジーン) を用い、キットの標準プロトコルを一部改変して行った。具体的には、Wash Bufferに2-Mercaptoethanol (2-ME) を終濃度0.5% (v/v) になるよう加えたもの1 mLを回収した胞子に添加し、ボルテックスで混合した。続いて18,000×g、4℃で10分間遠心分離を行い、上清を除去した。得られた沈殿物に2-MEを終濃度1% (v/v) になるよう加えたSolution Iを300 μL添加し、ボルテックスで混合後、Solution IIを150 μL加え、再度混合した。これを55℃のヒートブロックで1時間インキュベートした。インキュベート後、Solution III-Aを100 μL、Solution III-Bを120 μL添加し、ボルテックスで10秒以上混合した後、氷上に1時間静置した。続いて18,000×g、4℃で15分遠心分離を行い、上層を新しい1.5 mLチューブに移した。これ以降の操作はキットの標準プロトコルに従って行った。最終的に、30 μLのTE (pH 8.0) に溶解し、DNA溶液とした。

得られたDNA溶液を用いて担子菌類のInternal Transcribed Spacer (ITS) 領域の部分塩基配列を標的としたプライマーセット (Forward: ITS1F、Reverse: ITS1B)⁵⁾を用いたPCR増幅を行った。PCRの反応液は、抽出DNA溶液: 1 μL、10 pmol/μLの各プライマー: 1 μL、EmeraldAmp[®] PCR Master Mix (タカラバイオ): 25 μLに滅菌MilliQ水を加えて最終量50 μLに調製した。PCR増幅は、Thermal Cycler Dice TP350 (タカラバイオ) を用い、98℃、3分間で初期変性後、98℃で10秒間、54℃で30秒間、72℃で1分間のサイクルを32回行い、最後に72℃で7分間保持する条件で行った。PCR増幅産物は1.5%アガロースゲル電気泳動で確認した。

増幅が認められたPCR産物はポリエチレングリコール沈殿法 (3M酢酸ナトリウム、40% PEG、MgCl₂添加) の常法に従って精製し、滅菌MilliQ水10 μLに溶解した。シーケンシング反応はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、ABI3130xl (Applied Biosystems) によりキャピラリー電気泳動で解析した。決定した塩基配

列については、NCBI BLAST プログラム (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて同源性検索を行い、得られた相同配列を含めて MEGA11 Version 11.0.1⁶⁾ に実装されている CLUSTAL W により多重配列アライメントを実施した。進化距離の推定には Kimura's two-parameter モデルにガンマ分布および不変サイトを考慮したモデル (K2+G+I) を適用し、最尤法により系統樹を構築した。系統樹の信頼性は、ブートストラップ解析を1000回反復して評価した。

2-2. 遺構土壌の採取と理化学性分析

子どもの墓の遺構内における土壌試料の採取は、三内丸山遺跡センター保存活用課を通じて許可を得て2022年7月に実施した。タイムラプスカメラ画像解析¹⁾から2019年から2021年の間にキノコの発生が確認された2地点を選び、それぞれ K1、K2とした (図2)。両地点でコアサンプラー (内径1.7 cm) を用いて、埋蔵資料が無いことを確認しながら慎重に表層から深さ24 cm までの遺構土壌を採取した。採取した土壌試料は、低温で持ち帰り、土遺構の深度ごとに分析するため、表層から2 cm ごとに土壌試料を12の深度区分に分画して各種の試験に供した。なお、本研究で採取した土壌試料の各深度区分の分析は、いずれも1回の実施とした。

全炭素 (TC)・全窒素量 (TN) は、K1および K2の各深度区分から採取した土壌試料約15 mg を風乾後、CHN コーダー (MT-6、J-SCIENCE) を用いて常法に従い測定した。

土壌 pH (H₂O) の測定は、各深度区分の土壌試料に対し、乾燥重量と水重量が1:2.5となるように蒸留水を加え、バイオシェイカー (BR-43FL、TAITEC) を用いて120 rpm で1時間振とうした。その後、ボルテックスで1分間混和し、卓上 pH 計 (LAQUA、HORIBA) を用いて測定した。

2-3. 遺構土壌の微生物性分析

K1および K2の各深度区分の土壌試料について、真菌類の菌体量 (バイオマス) の指標として、真菌類の細胞膜形成に必要な物質であるエルゴステロールを測定した。測定手法は先行研究の方法^{7,8)}を参考に行った。具体的には15 mL 容滅菌チューブにあらかじめオートクレーブ滅菌した2種類のガラスビーズ (As One、粒径177-250 μm および粒径710-990 μm) をそれぞれ1 g 入れ、土壌試料2 g と HPLC グレードのメタノール3 mL を加えた。バイオシェイカー

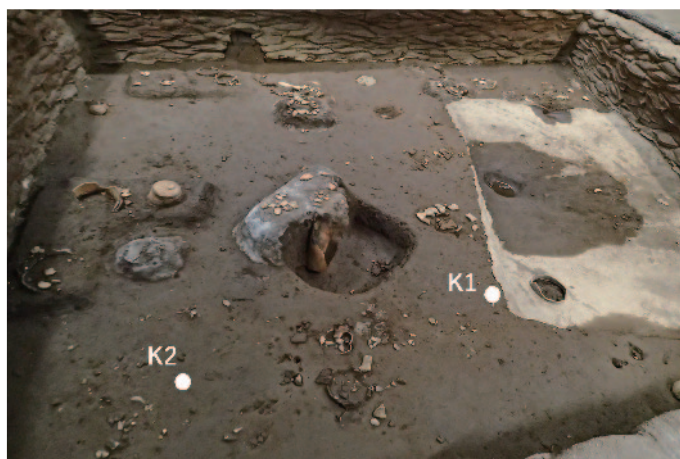


図2 遺構土壌の試料採取地点

(BR-43FL, TAITEC) を用いて300 rpm で1時間水平振とうし、エルゴステロールを抽出した。抽出液は15分間静置し、沈殿を除いた上清約1 mL を新しい1.5 mL チューブに回収し、8000 × *g*、10分間、4℃で遠心分離を行った。得られた上清を孔径0.20 μm PTFE フィルター (Advanced Microdevices) を用いてろ過し、逆相 HPLC によりエルゴステロール濃度を測定した。HPLC 分析条件は以下の通りとした：ポンプ：LC-10ADvp (Shimadzu)、検出器：SPD-20A (Shimadzu)、カラム：ZORBAX ODS (4.6 mm ID.×150 mm, Tosho)、移動相：メタノール (HPLC グレード)、流速：1 mL/min、検出波長：282 nm。

次に、K1およびK2の各地点における土壌試料の深度区分のうち、0-2 cm (表層)、12-14 cm (中間層)、22-24 cm (下層) の3試料について、次世代シーケンスによる真菌叢解析を行った。

DNA の抽出には、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 (日鉄環境) を用いた。真菌 ITS 領域の PCR 増幅にはプライマーセット ITS1F-ITS2^{5,9)} を使用し、得られた PCR 産物の濃度調整後、Illumina MiSeq (イルミナ) にて PCR 産物の両側から約250塩基ずつペアエンド解析を行って塩基配列情報を得た。得られた配列データは、QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) パイプライン¹⁰⁾ を用いてデータ解析を行った。概要として、得られた配列データに対して品質評価とキメラ配列の除去を行い、一定の基準を満たした配列のみを抽出した。次に、これらの配列群を類似度97%以上でクラスタとしてまとめ、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 (OTU; Operation Taxonomic Unit; 操作的分類単位) 配列とした。代表 OTU 配列は UNITE (<https://unite.ut.ee/>) の真菌 ITS 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。なお、DNA 抽出および次世代シーケンス解析は日鉄環境株式会社に委託して実施した。

3. 結果

3-1. キノコ形成菌種の同定

形態観察の結果、キノコ①は長直径約3.5 cm、短直径約2 cm の類球形で、基部に根状菌糸束を有する。表皮は黄褐色を呈し、表層には浅い亀裂が散在していた。内部の基本体は暗色で、粉状の孢子塊を示した (図3)。また、光学顕微鏡観察の結果、胞子は球形で、直径10-14 μm を示し、表面には明瞭な網目状の隆起構造が認められた (図4)。これは、外生菌根菌の既知種



図3 キノコ試料の外部形態と断面構造

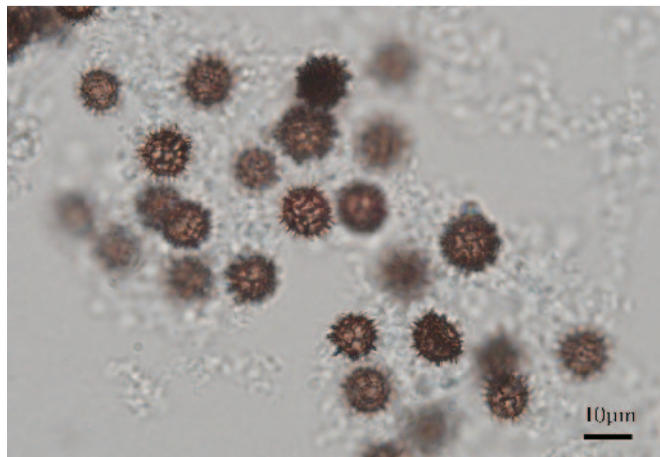


図4 キノコ試料から採取した胞子の光学顕微鏡像

ハマニセシヨウロ *Scleroderma bovista* の形態的特徴¹¹⁾と一致した。

キノコ②、③から抽出した DNA の ITS 領域配列に基づいた系統解析の結果、当該配列はいずれも *S. bovista* の参照配列群と同一クレード内に位置し、*S. bovista* と近縁であることが示された (図5)。

以上の結果から、子どもの墓の土遺構表面から採取したキノコは *S. bovista* であると同定した。

3-2. 遺構土壌の理化学性分析

K1およびK2の各深度区分における土壌の理化学性分析の結果を表1に示す。全炭素量 (TC) は、K1では、深さ22-24 cm で減少がみられたものの、深さ18-20 cm で最大 (53.8 g/kg) となり、K2でも、深さ18-20 cm で最大値 (38.92 g/kg) を示し、両地点とも深度が増すにつれ増加傾向を示した。全窒素量 (TN) はいずれの地点も深度区分による顕著な差異は認められず、K1地点では1.61-2.20 g/kg、K2地点では1.47-2.10 g/kg の数値を示した。C/N 比は、中間層から下層で高くなる傾向がみられた。つまり K1では深さ12 cm 以深で C/N が20以上となり、深さ22-24 cm では13.20に減少した。K2では、深さ14 cm 以深で C/N 比が20を超える値を示し、22-24 cm では18.45であった。土壌 pH (H₂O) は両地点とも深度が増すにつれ若干上昇し、K1地点では5.34から5.92へ、K2地点では5.44から6.01へと推移した。

3-3. 遺構土壌の微生物性分析

両地点の各深度区分における土壌のエルゴステロール量を図6に示す。K1、K2ともに表層から下層に向けて、エルゴステロール量が減少した。これは、遺構土壌では表層において真菌類のバイオマスが大きく、下層に向かうほど小さいことを示す。

次世代シーケンス解析により、遺構土壌試料それぞれで96,121~127,990リードの有効な配列データが得られた。代表 OTU 配列について系統分類を推定し、各試料の総リード数に対する分類群ごとの割合を相対存在量として算出したところ、主要な門レベルの分類群は Ascomycota 門および Basidiomycota 門であった (図7)。さらに種レベルの真菌叢を表2に示す。*S. bovista* に近縁の配列は K1、K2両地点のいずれの試料にも存在し、その相対存在量は、

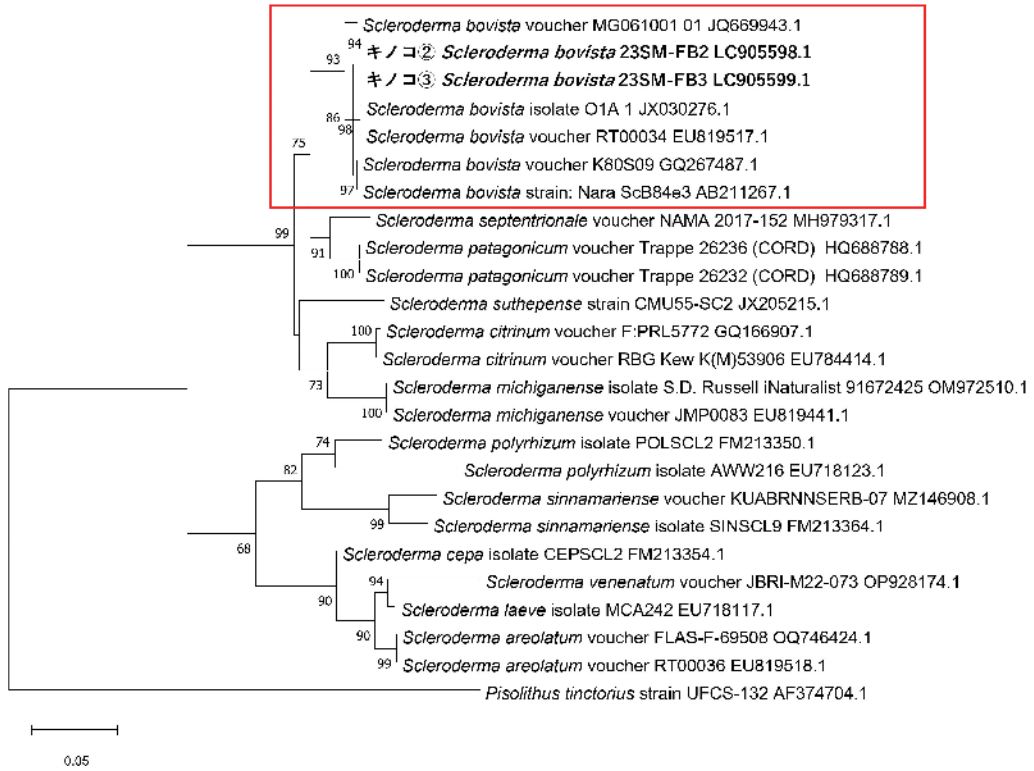


図5 *Scleroderma* 属の既知近縁種およびキノコ試料の ITS 領域塩基配列に基づく分子系統樹（分岐にはブートストラップ検定の数値を記し、左下0.05で示したスケールバーは1塩基置換あたりの枝長を表す）

K1では表層（0-2 cm）で2.5%、中間層（12-14 cm）で16.5%、下層（22-24 cm）で23.9%と深度が増すにつれ増加した。K2では高い相対存在量を示し、表層で32.5%、中間層で92.0%、下層で96.4%に達し、中間層および下層では大部分が *S. bovista* に近縁の配列が占めた。

K1の表層では *S. bovista* に近縁の配列よりも *Pseudeurotium hygrophilum* に近縁の配列の相対存在量が67.3%と高かった。そして、中間層では *Nectria ramulariae*（29.3%）および未分類の Nectriaceae 科（19.5%）に近縁の配列の相対存在量が高かった。下層では *S. bovista* に加え、未分類の Nectriaceae 科に近縁の配列（28.3%）の相対存在量が高かった。K2では表層では *P. hygrophilum* に近縁の配列（40.8%）も検出されたが、中間層および下層では *S. bovista* に近縁の配列以外はほとんど検出されなかった。

4. 考察とまとめ

4-1. キノコ形成菌種の生態的特徴

子どもの墓で発生するキノコは、形態および分子系統解析の両面から、*Scleroderma bovista*（ハマニセシヨウロ）と同定した。*S. bovista* は、担子菌門 Sclerodermataceae 科に属し、マツ科、ヤナギ科、カバノキ科などの樹木と共生する外生菌根菌として報告されている^{12,13,14}。外生菌根菌とは、宿主となる樹木の根に外生菌根を形成して共生する菌類で、樹木から供給される光合成産物を利用し、樹木の窒素・リンなどの栄養吸収を助ける役割を担う¹⁵。

表1 K1およびK2の各深度区分における土壌の理化学性分析結果

深さ(cm)	K1				K2			
	TC(g/kg)	TN(g/kg)	C/N	pH(H ₂ O)	TC(g/kg)	TN(g/kg)	C/N	pH(H ₂ O)
0-2	28.46	1.76	16.19	5.45	29.89	2.03	14.74	5.44
2-4	27.96	1.88	14.85	5.34	32.27	1.87	17.29	5.61
4-6	24.66	1.61	15.33	5.37	25.32	2.10	12.08	5.70
6-8	28.95	1.89	15.33	5.45	27.06	1.77	15.33	5.78
8-10	28.80	1.97	14.61	5.56	28.26	1.94	14.59	5.84
10-12	32.49	1.83	17.75	5.67	33.09	1.92	17.23	5.83
12-14	41.49	2.00	20.71	5.81	28.70	1.74	16.53	5.86
14-16	40.03	1.79	22.43	5.86	32.58	1.47	22.23	5.96
16-18	45.85	2.07	22.19	5.91	34.35	1.57	21.88	5.94
18-20	53.80	2.20	24.46	5.91	38.92	1.67	23.24	5.98
20-22	40.25	1.99	20.18	5.90	37.50	1.69	22.19	5.98
22-24	23.18	1.76	13.20	5.92	36.53	1.98	18.45	6.01

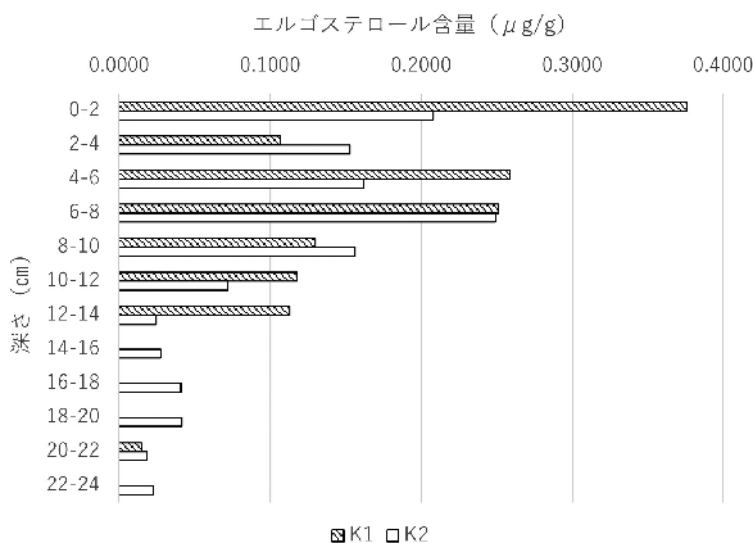


図6 K1およびK2の各深度区分の土壌エルゴステロール含量

また、生息環境について *Scleroderma* 属のキノコは、攪乱地や未熟な土壌で発生することが報告されている¹⁶⁾。さらに、別の既往研究では、攪乱後の遷移初期段階の環境において、*S. bovista* のキノコが、宿主樹木が存在する植生パッチの周辺部あるいは外側の葉や枝などの枯死物（リター）がなく土壌中の有機物が極めて少ない場所で発生することを報告している¹⁷⁾。子どもの墓の土遺構において観察された *S. bovista* のキノコの発生状況も、地上植生が無く有機物供給が制限される遺構土壌であり、既報の生態的特徴と一致した。

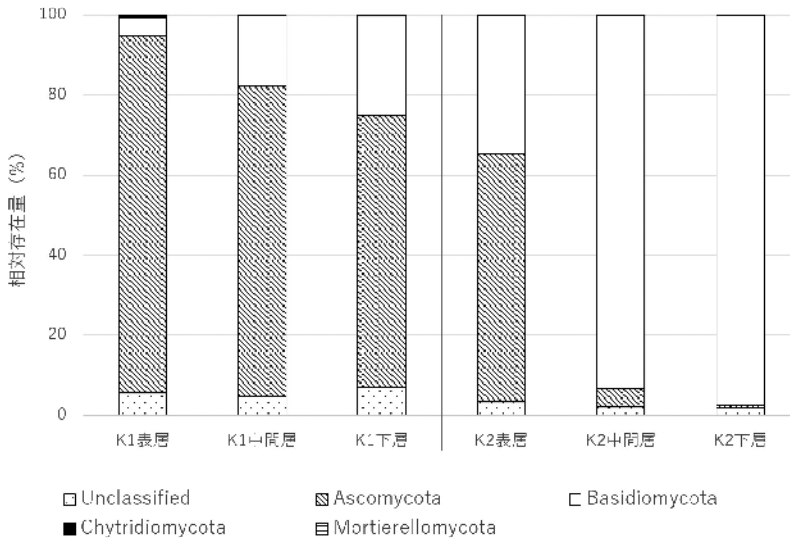


図7 K1およびK2の3つの深度区分における門レベルの真菌叢

表2 K1およびK2の3つの深度区分における主要な真菌種の相対存在量

分類階級			相対存在量* (%)					
科	属	種	K1			<2		
			表層	中間層	下層	表層	中間層	下層
Sclerotiummataceae	Sclerotium	<i>Sclerotium bovista</i>	2.5	18.5	23.9	32.5	92.0	96.4
Pseudeurotiaceae	Pseudeurotium	<i>Pseudeurotium hygrophilum</i>	67.3	3.8	12.1	40.8	0.2	0.1
Nectriaceae	Nectria	<i>Nectria ramulariae</i>	4.7	29.3	1.7	11.6	3.3	<0.05
Nectriaceae	Unclassified	Nectriaceae	1.5	19.5	28.3	0.2	0.1	0.2
Hypocreaceae	Hypocrea	<i>Hypocrea atroviridis</i>	0.4	1.1	2.5	0.2	<0.05	<0.05
Incertae sedis	Tetracladium	<i>Tetracladium</i> sp.	2.3	0.2	n.s.	<0.05	n.d.	n.d.
Incertae sedis	Mycofalcella	<i>Mycofalcella calcarata</i>	1.5	5.3	0.7	0.1	<0.05	<0.05

* 各試料で相対存在量が2.0%以上の分類群を抽出し、高低を色の濃淡で示した。
n.d.は配列が検出されなかったことを示す。

4-2. 子どもの墓遺構土壌の理化学性と真菌叢

遺構土壌の理化学性分析では、C/N比が中間層以深で20を超える値を示し、全窒素量に対して全炭素量が相対的に多い状態であった。また、pH (H₂O) は全層を通じて弱酸性を示し、下層よりも表層でやや低い値を示した。そして、微生物性分析の結果から、真菌類バイオマスの指標となるエルゴステロール含量が下層になるにつれ減少していた。一般に土壌中の真菌類は好気性であるため、酸素の供給が制限される下層では表層に比べ生育が制限されると考えられる。さらに、下層ではC/N比が高いことから、炭素は窒素に対して過剰であり、有機物が微生物にとって利用されにくい状態で存在している可能性がある。このような環境要因により、表層に比べ下層の真菌類のバイオマスが低いと推察される。

一方、次世代シーケンス解析の結果、*S. bovista*に近縁な配列はK1、K2両地点の表層、中間層、下層に存在し、その相対存在量は下層に向かって増加した。特にK2では、中間層以深において、*S. bovista*が優占していると考えられる。このことは、外生菌根菌である*S. bovista*が、真菌類の生育が制限される下層環境においても、樹木根からの光合成産物の供給に依存し、生息している状況を反映しているものと推察される。さらに、遺構土壌には地上植生が存在し

ないため、腐生性真菌類の発達は一般的な森林土壌などに比べて全体として抑制されていると考えられる。このような環境では、外生菌根菌である *S. bovista* が相対的に優占しやすい可能性がある。

K1、K2両地点の表層では、*P. hygrophilum* に近縁の配列の相対存在量が高かった。*P. hygrophilum* は、高層湿原の泥炭質土壌や工場排水など湿潤環境からの分離が報告されている子囊菌類である¹⁸⁾。また、K1の中間層および下層では Nectriaceae 科に近縁な配列の相対存在量が高く、同科には土壌性の腐生菌、植物病原菌、菌類や昆虫に寄生する菌類が含まれる¹⁹⁾。*P. hygrophilum* や Nectriaceae 科の真菌類は表層の有機物を利用して生育していると考えられるが *S. bovista* のキノコ形成に間接的に関与しているのか、あるいは遺構の生物劣化に関わるのかについては現時点では不明であり、今後の検討課題である。

4-3. キノコの発生機序と制御

S. bovista の生態学的な特徴から、遺構面でのキノコの発生機序を次のように考察した。子どもの墓の近傍にはヤナギやヤマナラシが生育しており、これらは外生菌根菌と共生する樹種である。これらの樹木の根と *S. bovista* が外生菌根を形成し、遺構土壌にまで菌糸を伸長させ、遺構面で断続的にキノコを形成していたのではないかと考えた (図8)。もしそうであれば、本種のキノコ発生は、樹木の管理と密接に関わることになり、遺構表面に薬剤処理を行うなどの処置は効果が期待できない。むしろ、遺構面での本種のキノコの発生抑制には、遺構周辺の樹木管理というアプローチが有効だと考えられる。樹木管理の手法としては、周辺樹木の伐採や移植、外生菌根を形成しない樹種への転換などが挙げられる。また、樹皮の剥離や枝打ち、切り戻しなどにより樹勢を弱め、光合成産物の外生菌根への転流を抑制することも菌根性のキノコの発生を減少させることに繋がるという報告²⁰⁾もある。ただし、樹木管理を実施する場合

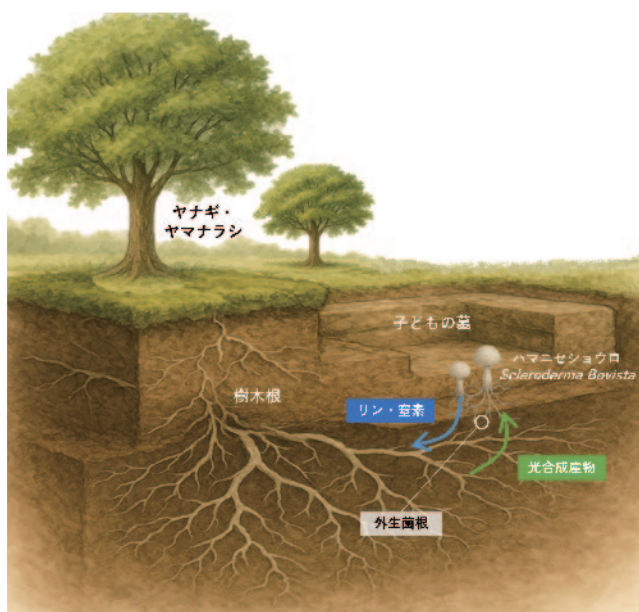


図8 *Scleroderma bovista* と樹木の共生関係を仮定した子どもの墓遺構土壌におけるキノコ発生の概念図

でも、*S. bovista* の発生抑制効果のみならず、遺構土壌の微生物生態系にどのような影響が及ぶかについて現時点では予測は困難であるため、処置前後の遺構の状態について継続したモニタリングを行い、微生物叢の推移についても調査を継続することが重要である。

本研究では *S. bovista* の生態学的情報をもとに考察を行ったが、実際に周辺樹木との間で菌根共生が成立しているかについて、直接的には確認できていない。周辺樹木の根部で菌根構造の観察や、根圏土壌における *S. bovista* の分子生物学的手法による特異的検出などによって実際に本種と周辺樹木が共生関係にあるのか、どの樹種が主要な宿主となっているか、宿主樹木を中心にして *S. bovista* の分布範囲はどの程度か、などさらなる研究を行う必要がある。

これまでの研究では、土遺構で起こる真菌類の被害では腐生菌によるものが多く、周辺樹木が遺構内部のキノコの形成に影響する可能性については十分に検討されてこなかった。本研究で得られた知見は、外生菌根菌のキノコ形成に伴う遺構面の損傷を防ぐための根本的な解決策の一つとして周辺の樹木を管理するという新たな視点を示すものである。遺構の露出展示においては、生物劣化への対応が普遍的な課題であるが、「樹木管理」に伴うキノコの形成抑制という視点は、生態学的な視点に基づく新たな保存管理手法として、古墳なども含めた他の遺跡の保存にも応用可能な知見を提供することが期待される。そのためにも今後、子どもの墓近傍の樹木と外生菌根菌の共生関係を明らかにし、それが遺構に与える影響について包括的に調査研究を進めていく必要がある。

謝辞

本稿をまとめるにあたり、三内丸山遺跡センターの関係者には現地調査をはじめ、関連情報の提供など多大なるご協力を賜りました。分子生物学の実験に際し、片山葉子博士に有益なご助言を賜りました。本研究は JSPS 科研費23K22014 「三内丸山遺跡の土遺構の保存に関する総合的研究」(研究代表者：石崎武志) の助成を受けたものです。以上、ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 長尾理伶：貧栄養な土遺構に着生した微生物群集の分子生態学的解析、茨城大学大学院修士論文 (2024)
- 2) Martin-Sanchez, P. M., Nováková, A., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. : Two new species of the genus *Ochroconis*, *O. lascauxensis* and *O. anomala* isolated from black stains in Lascaux Cave, France, *Fungal Biology*, 116(5), 574-589 (2012)
- 3) Villa F, Gulotta D, Toniolo L, Borruso L, Cattò C, Cappitelli F. : Aesthetic alteration of marble surfaces caused by biofilm formation: effects of chemical cleaning, *Coatings*, 10, 122 (2020)
- 4) 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)
- 5) Gardes, M., Bruns, T. D. : ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Molecular ecology*, 2(2), 113-118 (1993)
- 6) Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. : MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11, *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027 (2021)
- 7) Zhaorigetu, Komatsuzaki, M., Sato, Y., and Ohta, H. : Relationships between fungal biomass and nitrous oxide emission in upland rice soils under no tillage and cover cropping systems, *Microbes*

- and environments, 23(3), 201-208 (2008)
- 8) 梅津亜史：土壤管理が亜酸化窒素発生に及ぼす影響に関する研究、茨城大学大学院修士論文 (2009)
 - 9) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322 (1990)
 - 10) Caporaso, J. G. , Kuczynski, J. , Stombaugh, J. , Bittinger, K. , Bushman, F. D. , Costello, E. K. , Fierer, N. , Gonzalez Peña, A. , Goodrich, J. K., Gordon, J. I., 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., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R.: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, Nat Methods, 7(5), 335-336 (2010)
 - 11) 吉見昭一：日本産ニセシヨウロ属、日本菌学会会報、43、3-18 (2002)
 - 12) Campi, M. G., Maubet, Y. E., Britos, L. : Mycorrhizal fungi associated with plantations of *Pinus taeda* L. from the National University of Asunción, Paraguay, Mycosphere, 6(4), 486-492 (2015)
 - 13) Nara, K., Nakaya, H., Hogetsu, T. : Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji, New Phytologist, 158(1), 193-206 (2003)
 - 14) Cheng, Y., Sun, S., Lou, H., Dong, Y., He, H., Mei, Q., Liu, J. : The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bovista* improves growth of hazelnut seedlings and plays a role in auxin signaling and transport, Frontiers in Microbiology, 15, 1431120 (2024)
 - 15) Smith, S. E., Read, D. J. : Mycorrhizal Symbiosis (3rd ed.), Academic Press, (2008)
 - 16) Ingleby, K., Last, F. T., Mason, P. A. : VERTICAL DISTRIBUTION AND TEMPERATURE RELATIONS OF SHEATHING MYCORRHIZAS OF BETULA SPP. GROWING ON COAL SPOIL, Forest Ecology and Management, 12, 279-285 (1985)
 - 17) 奈良一秀：富士山火山荒原における外生菌根菌の一次遷移系列と外生菌根共生による植生遷移促進機能、東京大学農学系研究科博士論文 (2003)
 - 18) Sogonov, M. V., Schroers, H. J., Gams, W., Dijksterhuis, J., Summerbell, R. C. : The hyphomycete *Teberdinia hygrophila* gen. nov., sp. nov. and related anamorphs of *Pseudeurotium* species, Mycologia, 97(3), 695-709 (2005)
 - 19) Lombard, L., Van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. : Generic concepts in Nectriaceae, Studies in Mycology, 80(1), 189-245 (2015)
 - 20) Högborg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A. F., Ekblad, A., Högborg, M. N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M., Read, D. J. : Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration, Nature, 41(6839), 789-792 (2001)

キーワード：三内丸山遺跡 (Sannai Maruyama Site)；土遺構 (earthen archaeological feature)；外生菌根菌 (ectomycorrhizal fungi)；ハマニセシヨウロ (*Scleroderma bovista*)

Identification of a Mushroom and Analysis of the Fungal Community in Soil at the “Burial Jars for Children” at the Sannai-Maruyama Site

TODOROKI Takeru, NAGAO Rirei*, NISHIZAWA Tomoyasu*.*.*,
SATO Yoshinori and ISHIZAKI Takeshi*.*.*

The intermittent emergence of basidiomycete mushrooms on the earthen archaeological feature of the “Burial Jars for Children” at the Sannai-Maruyama site has presented a conservation challenge. The objective of this study is to identify the mushroom species, to characterize the physicochemical and mycological properties of the associated soil, and to investigate the mechanisms underlying the emergence of the mushrooms.

Morphological and molecular analyses identified the mushrooms as *Scleroderma bovista*, an ectomycorrhizal species. Soil samples were collected at 2 cm intervals down to a depth of 24 cm. Below a depth of 12 cm, the ratio of total carbon-to-total nitrogen exceeded 20, indicating that the nitrogen content of the soil organic matter is low. Ergosterol content, an indicator of fungal biomass, decreased with depth, suggesting restricted fungal growth in deeper soil where oxygen availability and nutrient conditions are less favorable.

Additionally, fungal ITS-based meta-amplicon sequencing detected *S. bovista* sequences at all depths with relative abundance increasing toward the deepest samples, indicating that *S. bovista* persists in deeper soil by relying on organic inputs supplied by the roots of host trees rather than on soil organic matter. This reliance may give *S. bovista* a relative advantage under conditions where saprotrophic fungi are suppressed. These findings suggest that surrounding vegetation may influence mushroom emergence, and that vegetation management could be considered as a possible mitigation measure.

*Graduate School of Agriculture, Ibaraki University

*.*Green-Bio Technology Research Center, Ibaraki University

..*Tohoku University of Art and Design