

# 〔報告〕 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

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。その石室内の壁画は、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<sup>1,2)</sup>。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ちょう性のゲル状物質（バイオフィルム）が壁画部分に発生し<sup>3,4)</sup>、天井部に発生した小さな穴（ca. 10 mm diam）からエタノールを好氣的に酸化して酢酸を生成する酢酸菌（*Gluconacetobacter* 属細菌）が分離・培養・同定され<sup>3,5-8)</sup>、南壁の朱雀画面上では白い粒状でゲル状の物質が発生した<sup>5)</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、発生部位を物理的に取り除き、局所的に低濃度の次亜塩素酸で殺菌するなどの対策が取られてきた<sup>9)</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>9)</sup>など、人為的に制御された環境に適応した微生物群集の遷移が懸念された。そこで、石室内の定期的な微生物調査や分離した微生物の紫外線耐性といった生理学的性質の調査など、継続して調査が行われてきた<sup>10-12)</sup>。その後、キトラ古墳の石室は2013年12月までに、石室内の紫外線照射を終えて石室は埋め戻され、現在墳丘の整備が進められている。

本稿では、前報<sup>13)</sup>につづいて、石室埋戻し前の最後のキトラ古墳石室内微生物調査として、2012年9月に石室内から採取した試料について、パイロシーケンス法による細菌と菌類（本稿では菌類界 kingdom Fungi を指す総称として用いる：後述の参考文献<sup>18)</sup>参照）の群集構造解析を行ったのでその結果を報告する。なお、キトラ古墳石室内のこれまでの微生物調査の経緯と結果の概括については、木川らの報告<sup>2)</sup>に詳しいので、本報告とあわせて参照されたい。

## 2. 試料および実験方法

### 2-1. 試料の採取

2012年9月に、キトラ古墳石室内において8試料を採取した(表1)。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-30℃にて冷凍保管した。なお、試料採取

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

表1 2012年9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>2)</sup>

試料 No.	採取箇所	試料の状態
K12924-1	東壁中央すきま奥	黄土色ゲル状塊 (土壌)
K12924-2	天井石中央西側すきま奥	茶～黄土色ゲル状塊 (土壌)
K12924-3	天井石北側第2石中央付近クレーター	茶褐色ゲル状塊, 黒色鉱物様粒子
K12924-4	天井石中央付近西側クレーター	黒～茶褐色ゲル状塊
K12924-5	東壁中央表面 (K12924-1の右下)	薄い黄土色～褐色ゲル状塊, 黒色鉱物様粒子
K12924-6	西壁中央南側中央	黄土色ゲル状塊
K12924-7	西壁南側天井付近	茶～黄土色ゲル状塊 (土壌)
K12924-8	西壁南側床付近	薄い黄土色ゲル状塊, 黒色塊

地点図は木川らの報告<sup>2)</sup>と同一であるためここでは割愛した。

## 2-2. DNA 抽出, PCR 増幅, パイロシーケンス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 (日鉄住金環境株式会社 J-Bio21センター) 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 遺伝子の V1-V3可変領域と菌類のリボソーム遺伝子群のうち5.8S rRNA 遺伝子塩基配列とその前後にある内部転写スペーサー領域 (Internal Transcribed Spacer region, 以下単に ITS 領域と略記する) を標的とした PCR 増幅を行った。細菌16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅は, 27F プライマー (5'-GAGTTTGATC [A/C] TGGCTCAG-3')<sup>14)</sup> と 518R プライマー (5'-[A/T] TTACCGCGCTGCTGG-3')<sup>15)</sup> を使用し, 菌類 ITS 領域の PCR 増幅は, ITS5プライマー (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')<sup>16)</sup> と ITS4プライマー (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>16)</sup> を使用し, 94°C で5分間保持した後, 94°C で15秒間, 55°C で45秒間, 72°C で1分間を35サイクル後に, 72°C で8分間の反応条件で行った。得られた PCR 増幅産物は, 454 Life Sciences GS FLX Titanium system (Roche Applied Science) によるパイロシーケンシング解析を行った。得られた DNA 塩基配列を用いて, 公共のデータベース (GenBank/EMBL/DDBJ, Silva rRNA database [http://www.arb-silva.de/] および UNITE [http://unite.ut.ee/]) に照合 (相同性検索: BLAST 検索<sup>17)</sup>) し, 近縁種を予測した。なお, 試料からの DNA 抽出および精製は日鉄住金環境株式会社 J-Bio21センターに, PCR 増幅とパイロシーケンス解析は株式会社マクロジェン・ジャパン (東京) に委託した。なお, 菌類 (菌類界) の目レベル以上の高次分類体系については Hibbett ら<sup>18)</sup> に準拠した。

## 3. 結果と考察

供試した8試料の細菌16S rRNA 遺伝子を対象とした解析から, K12924-1, K12924-2, K12924-3, K12924-4, K12924-5, K12924-6, K12924-7, および K12924-8で, それぞれ6,637, 8,053, 7,185, 6,507, 5,799, 6,294, 8,222, および7,230配列 (reads) を解読した。各試料から得られた塩基配列を用いて相同性検索を行い, 分類群 (門) ごとの reads 数の存在割合を出現頻度とし図1に示した。すべての試料で共通して出現頻度が高かった分類群は, *Proteobacteria* 門 (出現頻度: 5.8-65.5%), 放線菌の *Actinobacteria* 門 (出現頻度: 20.9-82.5%) であった。また, *Bacteroidetes* 門は, 試料 K12924-8では出現頻度が1.3%と少なかったものの, その他の試料では共通して出現頻度が高かった (出現頻度: 8.0-35.8%)。先の

報文<sup>13)</sup>では、クローン解析法によるキトラ古墳石室内の細菌群集構造が報告されているが、調査した4試料で共通して *Actinobacteria* 門の出現頻度が高く（出現頻度：33.7-95.7%）、門レベルの分類群でみると今回得られた結果は先の報文結果<sup>13)</sup>を支持した。一方で、クローン解析ではすべての試料から検出されたクローンが6門に分類されたのに対して、パイロシーケンス解析では14門に分類された。これは試料数、試料採取地点、試料採取時期が異なること、用いたりバースプライマーが異なることが理由として挙げられるが、パイロシーケンス解析で解読された塩基配列数が多いため存在割合が少ない細菌系統群の分布がより高精度に解析されたことも考えられる。

菌類 ITS 領域を対象とした解析では、同8試料でそれぞれ、3,036, 3,246, 4,479, 5,079, 6,180, 5,557, 4,885, および5,653配列 (reads) を解読した。解読した配列をもとに相同性検索をかけ、分類群（綱）ごとの出現頻度を図2にまとめた。すべての試料で共通して出現頻度が高かった分類群は、Sordariomycetes 綱の菌類群であった（出現頻度：9.5-89.3%）。また、Eurotiomycetes 綱は、試料 K12924-8では出現頻度が少なかったが、その他の試料では共通して出現頻度が高かった（出現頻度：5.4-61.5%）。同様に、Leotiomycetes 綱は、試料 K12924-1は出現頻度が少なかったが、その他の試料では共通して出現頻度が高かった（出現頻度：8.1-63.2%）。Dothideomycetes 綱の菌類群は、試料 K12924-3と K12924-8を除くと、出現頻度が4.6-45.2%とやや高い分類群であった。

細菌と菌類のさらに詳細な分類群（属）での分布様式を図3と図4に示した。ここでは、各試料において出現頻度の高かった属を選抜して、各試料間での出現頻度を比較した。

各試料の結果について以下に要約する。

#### 1) 試料名：K12924-1（東壁中央すきま奥）

細菌の分布については、*Actinobacteria* 門の *Jiangella* 属（出現頻度20%）、*Streptomyces* 属（5%）と *Proteobacteria* 門のうち、*Alphaproteobacteria* 綱のグループである *Mesorhizobium* 属（12%）、*Sphingomonas* 属（9%）が多く検出された。菌類では、Dothideomycetes 綱の

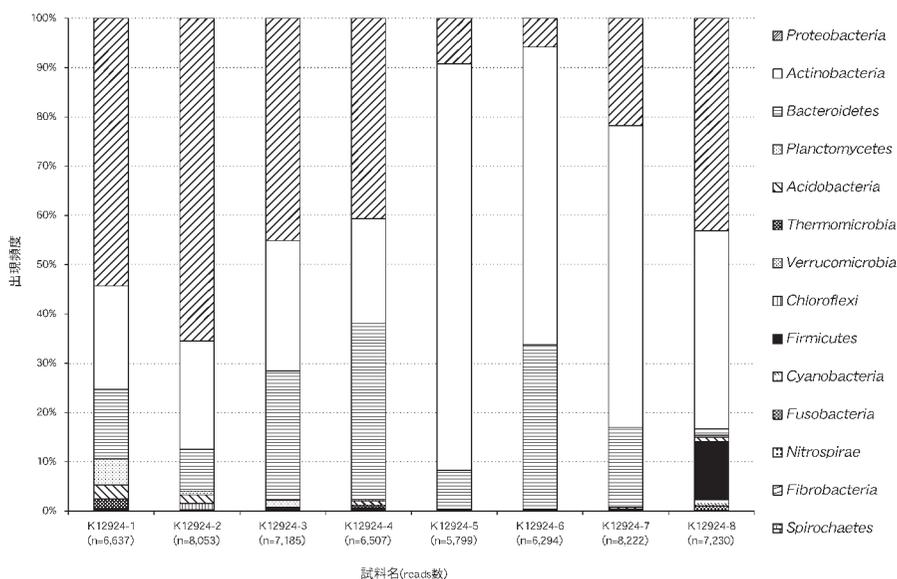


図1 キトラ古墳石室内から採取した試料のパイロシーケンス解析による細菌分類群（門）の出現頻度

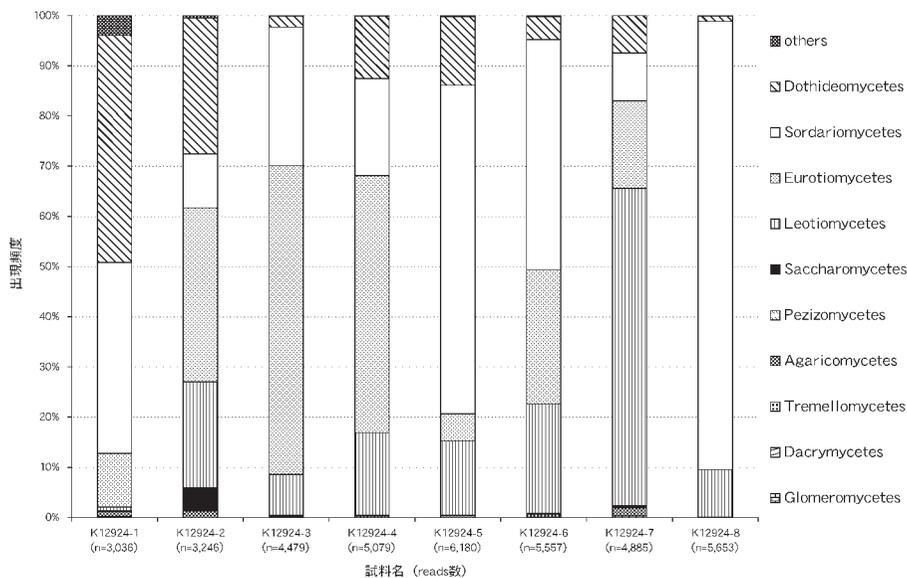


図2 キトラ古墳石室内から採取した試料のパイロシーケンス解析による菌類分類群(綱)の出現頻度

*Farlowiella* 属 (32%), Sordariomycetes 綱の *Mariannaea* 属 (36%), Eurotiomycetes 綱の *Exophiala* 属 (9%) が多く検出された。

2) 試料名: K12924-2 (天井石中央西側すきま奥)

細菌は, *Actinobacteria* 門の *Jiangella* 属 (出現頻度23%), *Alphaproteobacteria* 綱の *Sphingomonas* 属 (25%) と *Rhizobium* 属 (17%) が高頻度で検出された。菌類では, Leotiomyces 綱の *Thelebolus* 属 (21%), Eurotiomycetes 綱の *Exophiala* 属 (19%) と *Phialophora* 属 (17%) と *Penicillium* 属 (13%) が多く検出された。

3) 試料名: K12924-3 (天井石北側第2石中央付近クレーター)

細菌は, *Bacteroidetes* 門の *Olivibacter* 属 (23%), *Actinobacteria* 門の *Promicromonospora* 属 (21%) の出現頻度が高かった。菌類では, Eurotiomycetes 綱の *Exophiala* 属 (61%), Sordariomycetes 綱の *Beauveria* 属 (13%) と *Acremonium* 属 (*Sarocladium*-clade<sup>19</sup>) (13%) の出現頻度が高かった。

4) 試料名: K12924-4 (天井石中央付近西側クレーター)

細菌は, *Bacteroidetes* 門の *Chitinophaga* 属 (36%), *Actinobacteria* 門の *Promicromonospora* 属 (10%), *Alphaproteobacteria* 綱の *Inquilinus* 属 (9%) が高頻度で検出された。菌類では, Eurotiomycetes 綱の *Exophiala* 属 (47%), Sordariomycetes 綱の *Beauveria* 属 (18%), Leotiomyces 綱の *Thelebolus* 属 (13%) が高頻度で検出された。

5) 試料名: K12924-5 (東壁中央表面)

細菌は, *Actinobacteria* 門の *Promicromonospora* 属 (70%) と *Streptomyces* 属 (12%) の出現頻度が高かった。菌類では, Sordariomycetes 綱の *Acremonium* 属 (*Sarocladium*-clade) (59%), Eurotiomycetes 綱の *Phialophora* 属 (14%) の出現頻度が高かった。

6) 試料名: K12924-6 (西壁中央南側中央)

細菌は, *Actinobacteria* 門の *Streptomyces* 属 (43%) と *Promicromonospora* 属 (15%), *Bacteroidetes* 門の *Olivibacter* 属 (33%) が多く検出された。菌類では, Sordariomycetes 綱の

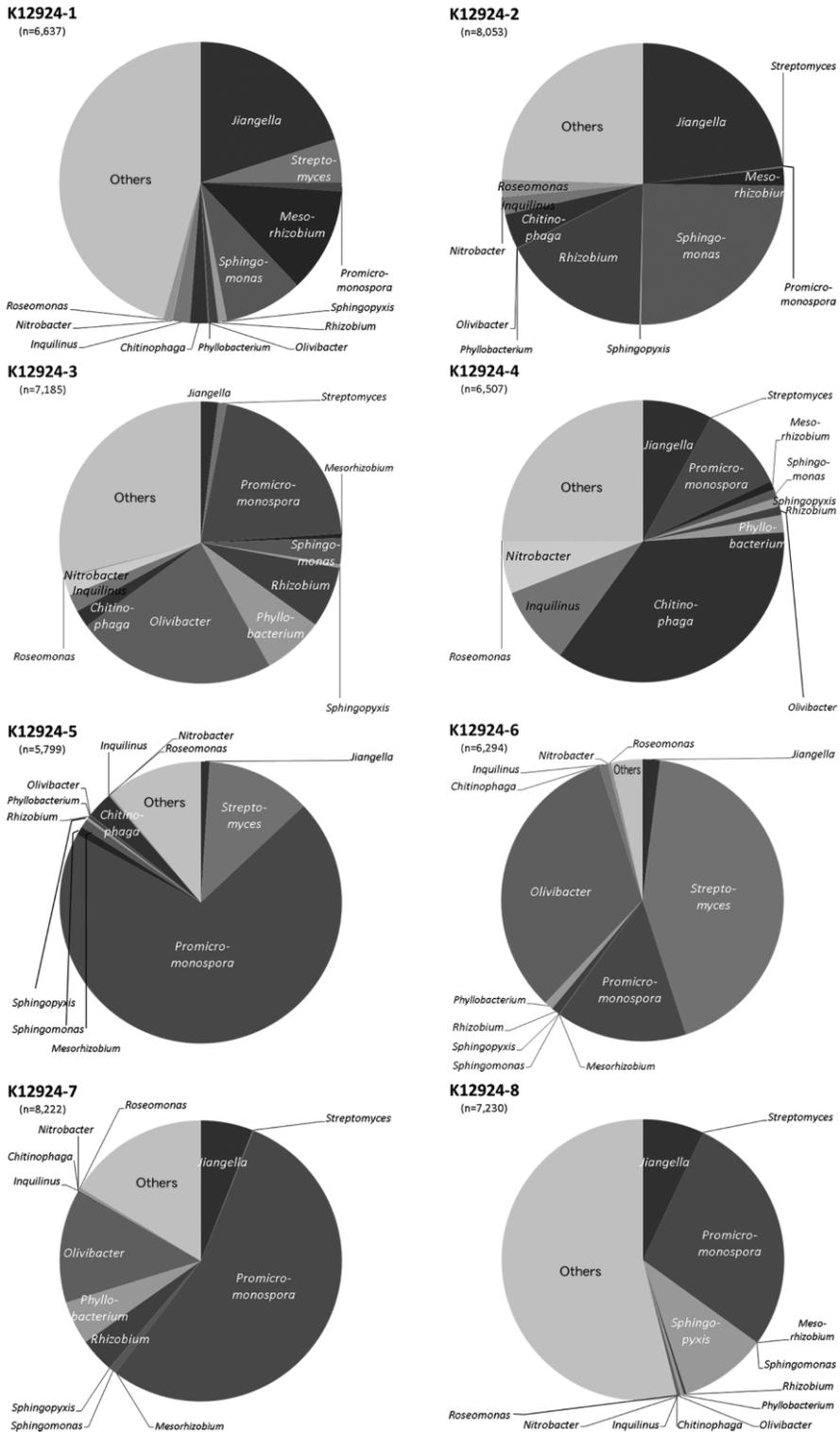


図3 キトラ古墳石室内から採取した各試料間における細菌属の構成比率の比較

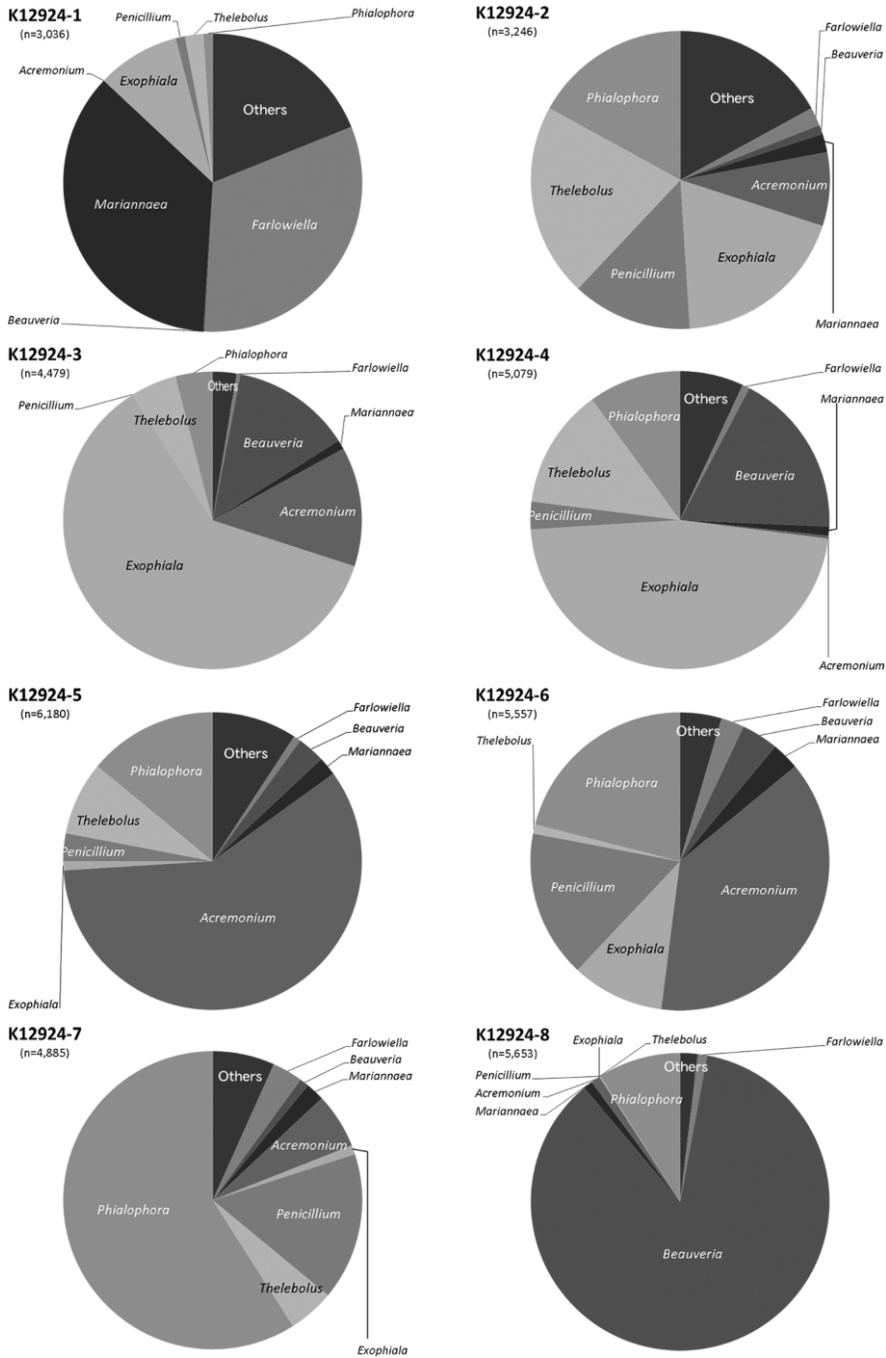


図4 キトラ古墳石室内から採取した各試料間における菌類属の構成比率の比較

*Acremonium* 属 (*Sarcocladium*-clade) (38%), Eurotiomycetes 綱の *Phialophora* 属 (21%) と *Penicillium* 属 (16%) が多く検出された。

7) 試料名: K12924-7 (西壁南側天井付近)

細菌は, *Actinobacteria* 門の *Promicromonospora* 属 (54%), *Bacteroidetes* 門の *Olivibacter* 属 (13%) が高頻度で検出された。菌類では, Eurotiomycetes 綱の *Phialophora* 属 (59%) と *Penicillium* 属 (16%) が高頻度で検出された。

8) 試料名: K12924-8 (西壁南側床付近)

細菌は, *Actinobacteria* 門の *Promicromonospora* 属 (28%) と *Jiangella* 属 (7%), *Alpha-proteobacteria* 綱の *Sphingopyxis* 属 (10%) が高い頻度で検出された。菌類では, Sordariomycetes 綱の *Beauveria* 属 (86%) が非常に高い頻度で検出された。

属レベルでみた細菌の群集構造解析結果では, *Actinobacteria* 門の *Promicromonospora* 属, *Jiangella* 属, *Streptomyces* 属は, いくつかの試料で高い出現頻度であった。2011年10月に採取された試料のクローン解析<sup>13)</sup>においても, *Promicromonospora* 属は K111013-1試料で出現頻度が95%, K111013-3試料で96%, K111013-6試料で26%であり, *Jiangella* 属は K111013-5試料で18%, K111013-6試料で26%であり, *Streptomyces* 属は, K111013-6試料で15%であり, 今回の結果と同様に高い出現頻度で検出された細菌群であった。石室内の紫外線照射条件下での目視観察では, 微生物の発生は抑制されていると判断されたことから, これらの放線菌群の絶対量が増えたのではなく, 存在する細菌群集における放線菌群の構成割合が高くなっていた(優占化)のではないかと考えられる。放線菌群の優占化と紫外線照射による石室内環境条件の変化の関連性については今後の検討すべき課題である。なお, 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<sup>7,8)</sup>, *Gluconacetobacter tumulicola* K8617-7-3b<sup>7)</sup> に近縁な配列は K12924-1試料 (0.2%), K12924-2試料 (0.02%), K12924-4試料 (0.1%), K12924-7試料 (1%) でわずかに検出されている。

菌類の群集構造解析結果では, これまでの培養法による解析で分離されている<sup>13)</sup>, *Exophiala* 属, *Phialophora* 属, *Acremonium* 属 (*Sarcocladium*-clade), *Penicillium* 属が高い出現頻度で検出された試料があった。一方で, *Farlowiella* 属, *Mariannaea* 属, *Thelebolus* 属, *Beauveria* 属といったこれまでの培養法では検出されていない菌類群が優占する試料もあった。なかでも, *Beauveria* 属はいくつかの試料に共通して見出された菌群であるが, 生態的には昆虫寄生性を示す種も含まれ, 石室内部での昆虫の死骸を基質として微生物バイオフィルムがスポット状に出現した可能性もある。

#### 4. おわりに

本報告では, 前報<sup>13)</sup>の非培養法によるキトラ古墳細菌調査につづいて, 同石室埋戻し前の最後の微生物調査として2012年9月に石室内から採取した試料の微生物群集構造についてパイロシーケンス法を用いた解析手法によって明らかにした。この目的としては, 2009年以降行われている間欠的紫外線照射によって微生物群集構造がどのように変化しているかをモニタリングするために実施しており, 従来の培養法に加えて前回 (2011年10月採取試料) と今回 (2012年9月) には非培養法による微生物群集構造解析を行った。主な結果として, 間欠的 UV 照射による微生物制御を実施する中で, 細菌の群集構造では放線菌群が優占種化する傾向が認められた。また, キトラ古墳の菌類の非培養法による解析は, 今回の試料で初めて行われたが, 多く検出された *Exophiala* 属や *Phialophora* 属は別の古墳の石材表面からも優占種として検出され

ている(佐藤ら, 未発表データ)。これらの菌類群が石材の劣化に及ぼす影響や公衆衛生に対する影響については今後検討していく必要がある。

冒頭で述べたように, キトラ古墳は2013年12月までに, 石室内の紫外線照射を終えて石室は埋め戻されており, 現在墳丘の整備が進められている。そのため今後は石室内の微生物調査を行うことが出来ないが, 今回までに得られた微生物群集構造解析結果は, 別の古墳内の微生物制御を考えていくうえでの基礎的な情報となることが期待される。

#### 参考文献

- 1) Ishizaki, T. and Kigawa, R. : Conservation of the mural paintings of the Takamastuzuka and Kitora tumuli in Japan. In: Lascaux and preservation issues in subterranean environments. (Coye, N., ed.). Foundation Maison der sciences des l'home, Paris: 261-274. [追加]
- 2) 木川りか, 喜友名朝彦, 立里臨, 佐藤嘉則, 佐野千絵, 杉山純多: キトラ古墳の微生物調査報告 (2012年~2013年) および2004年から2013年までの微生物調査結果概要, 保存科学, **54**, 83-109. (2015)
- 3) 木川りか, 間渕創, 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)
- 4) 「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)
- 5) 木川りか, 佐野千絵, 間渕創, 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)
- 6) 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)
- 7) Tazato, N., Nishijima, M., Handa, Y., Kigawa, R., Sano, C. 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 Evolutionary Microbiology, **62**, 2032-2038. (2012)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 木川りか, 佐野千絵, 喜友名朝彦, 立里臨, 杉山純多, 高島浩介, 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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: 非培養法によるキトラ古墳の細菌調査, 保存科学, **52**, 1-10. (2013)

- 14) Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. : 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, **173**, 697-703. (1991)
- 15) Lane, D.J., Pace, B., Olson, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. : Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 6955-6959. (1985)
- 16) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: a guide to methods and applications.* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds). Academic Press, New York, USA: 315-322.
- 17) Altschul, S.F., Madden, T.F., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. : Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402. (1997)
- 18) Hibbett, D.S. and 66 others: A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, **111**, 509-547. (2007)
- 19) Summerbell, R.C., Gueidan, C., Schroers, H.-J., de Hoog, G.S., Starink, M., Aricha Rosete, A., Guarro, J., Scott, J.A.: *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, **68**, 139-162. (2011)

キーワード：キトラ古墳 (Kitora Tumulus)；紫外線照射 (UV irradiation)；微生物劣化 (microbial deterioration)；パイロシーケンス解析 (Pyrosequencing)

## Pyrosequence Analysis for the Microbial Community in the Kitora Tumulus under Intermittent UV Irradiation

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

Almost all of the plaster walls and ceilings with polychrome mural paintings covering the interior of the stone chamber in the Kitora Tumulus were relocated in 2008, and all of the plaster without paintings were also relocated completely in 2010. Intermittent UV irradiation was applied to control microbes on the remaining plasters from 2009 to 2013. Although significant fungal growth on the plaster was suppressed effectively, continuous monitoring for the changes of the microbial communities under intermittent UV irradiation control inside the stone chamber is still necessary.

In the present study, pyrosequencing analysis was performed to monitor current microbial communities on the stone surface. From the result of bacterial community analysis, the genera *Jiangella*, *Promicromonospora* and *Streptomyces* in the phylum “*Actinobacteria*” were detected in high abundance in some samples. For fungal communities, the genus *Farlowiella* in the class Dothideomycetes, the genera *Mariannaea*, *Beauveria*, and *Acremonium* (*Sarocladium*-clade) in the class Sordariomycetes, the genus *Thelebolus* in the class Leotiomyces, and the genera *Phialophora* and *Exophiala* in the class Eurotiomycetes were detected predominantly.

Because the stone chamber of the Kitora Tumulus was buried in 2013, it will not be possible to collect more samples for microbial analysis. Basic information obtained from a series of microbiological surveys in the Kitora Tumulus under intermittent UV irradiation will be helpful for future development to conserve other stone chambers and mural paintings.

---

\*TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

\*\*TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd., Chiba Branch Office