

高松塚・キトラ両古墳からの主要細菌分離株：
Bacillus・*Ochrobactrum* 両属分離株の分子系統学的位置

半田 豊・立里 臨・佐藤 嘉則・木川 りか・佐野 千絵・杉山 純多

独立行政法人国立文化財機構
東京文化財研究所

保存科学 第56号 別刷

平成28年度

〔報告〕 高松塚・キトラ両古墳からの主要細菌分離株： *Bacillus*・*Ochrobactrum* 両属分離株の 分子系統学的位置

半田 豊*¹・立里 臨*・佐藤 嘉則・木川 りか**・佐野 千絵・
杉山 純多***

1. はじめに

高松塚古墳およびキトラ古墳は、終末期古墳時代（7世紀末期から8世紀初期）の極彩色（多彩色）の壁画を有する古墳である。高松塚古墳壁画は、石室内の湿度がほぼ100%RHに近い高湿度環境にて現地保存されていたが、発見から30年以上を経過し、石材の脆弱化や生物劣化などのために、同環境下での現地保存が困難となり、古墳石室を解体して、石材とともに壁画を修理することが決定された¹⁾。2007年より、古墳石室の解体作業が行われ、石材と壁画は現在も仮設修理施設にて修理作業が続けられている。一方のキトラ古墳壁画は、発掘調査が行われて以降、相対湿度を高く保つ必要がある石室内環境において、バイオフィームなどによる壁画の微生物劣化が認められ、様々な対応策が取られてきた²⁾。2004年には、古墳石室はそのままに、漆喰壁画の漆喰部分のみを取り外すことが決定され、2010年には余白漆喰を含むすべての壁画の取り外しが終了した。2013年10月には石室は封印され、埋め戻しが行われた²⁾。壁画は修理が行われ、現在はキトラ古墳壁画体験学習館の「四神の館」内で保存・公開が行われている。

高松塚古墳とキトラ古墳については2004年より、それぞれの石室および壁画を取り巻く様々な環境中の微生物調査が行われてきた²⁻⁶⁾。対象とした微生物（カビ・酵母・細菌）のうち、細菌についても、培養法とそれに続く16S rRNA 遺伝子塩基配列（以下、16S rDNA）を用いた分類群推定による調査の結果、両古墳にはそれぞれ特徴的な分類群の存在が明らかとなった⁵⁾。特に、両古墳とも *Bacillus cereus* および *Bacillus simplex* に近縁な細菌が優占種として分離された⁵⁾。*Bacillus cereus* 近縁種（当初、*Bacillus* aff. *thuringiensis* と表記⁵⁾、以下 *B. cereus* group）は高松塚古墳では、解体以前の現地保存期間中の石室内の最も主要な分類群であり、解体中、解体後の石室内外環境からの主要分類群の一つでもある。もう一方の *Bacillus simplex* 近縁種（当初、*Bacillus* aff. *simplex* と表記⁵⁾、以下 *B. simplex* group）は、高松塚古墳の解体以前の現地保存期間中の石室内からは分離されていないが、石室解体中ならびに解体後の目地漆喰、石壁間などの試料からの主要な分類群であり、キトラ古墳石室内試料においても *Bacillus* 属での主要な分類群である。さらに、*Ochrobactrum* 属は、高松塚古墳の石室内外における主要な分類群の一つであるが、キトラ古墳からは分離されていない。

分離株の種同定に用いた16S rDNAによる解析は、細菌の種レベルの系統推定に有効な手法の一つである。しかし、16S rDNAでは極めて近縁な種の識別が難しいことから、生存、増殖のために必須のタンパク質合成に関わるハウスキーピング遺伝子と呼ばれるいくつかの遺伝子塩基配列を用いた解析も用いられている。両古墳の主要分離株として検出された *Bacillus* 属

*株式会社テクノスルガ・ラボ **九州国立博物館 ***株式会社テクノスルガ・ラボ 千葉分室

¹: 現 株式会社シーエーエフラボラトリーズ

および *Ochrobactrum* 属には病原細菌として知られる種も含まれる^{7,8)}。特に *Bacillus cereus* group の既知種には、セレウス菌や炭そ菌などの病原細菌が含まれるため⁷⁾、より詳細な同定の必要がある。よって、高松塚・キトラ両古墳から分離された主要細菌分類群である *Bacillus* 属の2グループおよび *Ochrobactrum* 属の各分離株について、ハウスキーピング遺伝子を用いて、詳細な帰属分類群の推定を行ったので、その結果について報告する。なお、その他の主要な細菌分離株については、すでに個別に発表されている⁹⁻¹⁴⁾。

2. 試料および方法

2-1. 供試菌株と解析領域遺伝子

解析に用いた高松塚・キトラ両古墳からの分離株を表1から表3に示した。16S rDNA の解析結果から、*B. cereus* group 分離株は28株(表1)、*B. simplex* group は36株(表2)、*Ochrobactrum* 属は17株(表3)であった。このなかからさらに、16S rDNA 塩基配列の相同性や分子系統解析などを基にハウスキーピング遺伝子の解析に供する菌株を選抜した(表1~3、DDBJ accession no.の *gyrB*、*groEL* に記載のある菌株を指す)。*Bacillus* 属は、DNA gyrase subunit B 遺伝子(以下、*gyrB*)を、*Ochrobactrum* 属は、*gyrB* 遺伝子および60-kDa heat shock protein GroEL 遺伝子(以下、*groEL*)を解析の対象とした。なお、試験に用いた分離株は理化学研究所バイオリソースセンター(Japan Collection of Microorganisms; JCM)に寄託し、決定した遺伝子塩基配列は国立遺伝学研究所 DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した。それぞれの登録番号は表中に示した。

2-2. 遺伝子塩基配列解析方法

ハウスキーピング遺伝子(*gyrB* および *groEL*)の塩基配列の決定と、16S rDNA およびハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析の基本操作は、Handa ら¹¹⁾に従った。各供試菌株は、普通寒天培地(CM3, Oxoid)にて、30°Cで24~48時間培養した。生育したコロニーを集菌し、コロニーからのDNAの抽出は、溶菌酵素アクロモペプチダーゼを用い、抽出DNAは、必要に応じてMarmurの方法¹⁵⁾に従い精製した。今回の解析の対象とする目的の遺伝子断片のPCR(Polymerase Chain Reaction)法による増幅と、塩基配列の解読のためのシーケンシングに用いたプライマーは、*Bacillus* 属分離株は、Goto ら¹⁶⁾および Yamamoto ら¹⁷⁾(*gyrB*)に、*Ochrobactrum* 属分離株は Huber ら¹⁸⁾(*gyrB* および *groEL*)に従った。使用した各プライマーの塩基配列については表4に示した。決定した *gyrB* および *groEL* の各塩基配列は、国際塩基配列データベース(DDBJ/ENA/GenBank)に対するBLAST(Basic Local Alignment Search Tool)を用いた相同性検索により、近縁と考えられる細菌種に由来する塩基配列の検索を行った¹⁹⁾。相同性検索による塩基配列の相同率の結果を基に、近縁と考えられる細菌種の基準株(type strain)に由来する塩基配列データを国際塩基配列データベースから取得し、分離株との塩基配列の差異に基づく類縁関係の比較のため、分子系統解析に供した。分子系統解析のための塩基配列の前処理として、MUSCL program²⁰⁾を用いて、取得した塩基配列の整列(多重アライメント)を行った。分子系統解析は、ソフトウェアMEGA ver. 6²¹⁾を用い、近隣結合法と木村の二変数法を組み合わせで行った。系統樹の各系統枝の信頼性のための統計検定は、ブートストラップ法²²⁾により解析し、その値(ブートストラップ値)は各系統枝の分岐点に示した。

表 1. 高松塚・キトラ両古墳から分離された *Bacillus cereus* group 分離株

Group / Isolate no.	Other designation	Isolation source (T, Takamatsuzuka Tumulus; K, Kitora Tumulus)	Sampling date	DDBJ accession no.	
				16S	<i>gyrB</i>
Group 1					
T5916-6b	JCM 28784	T: Viscous gels below the paintings of the group of women on the east wall inside the stone chamber	2005/9/16	LC150621	LC150718
Group 2					
T5916-8b	JCM 28785	T: Brownish substances around the paintings of the blue dragon on the east wall inside the stone chamber	2005/9/16	LC150622	LC150719
T6220-1-1b	JCM 28786	T: On the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/2/20	LC150623	—
T6517-1-1b	JCM 28791	T: Black spots on the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/5/17	LC150624	—
T6517-2-5b	JCM 28794	T: Black spots on the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/5/17	LC150625	—
T6713-1-1b	JCM 28796	T: Black spots on the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/7/13	LC150626	—
T61017-1-1b	JCM 28799	T: Black spots on the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/10/17	LC150627	—
T61017-5-1b	JCM 28801	T: Black spots on the west wall inside the stone chamber	2006/10/17	LC150628	—
T7405-4-1b	JCM 28804	T: Blackish substances on the top surface of north wall (during relocation of the stone chamber)	2007/4/5	LC150630	—
T7413-7-3b	JCM 28816	T: Black substances between north wall and east wall 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/13	LC150631	—
T7417-2-5b	JCM 28819	T: On the west side wall 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/17	LC150632	—
T7425-4-3b	JCM 28823	T: Black substances on the east side wall 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/25	LC150633	—
T7425-9-2b	JCM 28824	T: Black molds around the paintings of the group of women on the east wall 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/25	LC150634	—
T7425-12-1b	JCM 28825	T: Black molds around the paintings of the group of women on the west wall 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/25	LC150635	—
T7510-3-1b	JCM 28831	T: Blackish brown substances on the side surface of west wall stone 2 (during relocation of the stone chamber)	2007/5/10	LC150636	—
T7517-5-1b	JCM 28834	T: Blackish viscous substances on the east side wall 2 (during relocation of the stone chamber)	2007/5/17	LC150637	—
T81203-5-2b	JCM 28849	T: Soil (Hanchiku) in the southern area of the burial mound	2008/12/3	LC150643	—
T81203-9-2b	JCM 28851	T: Soil in the adjacent space	2008/12/3	LC150644	—
T81203-9-5b	JCM 28854	T: Soil in the adjacent space	2008/12/3	LC150645	—
K5916-1-2b	JCM 28855	K: Viscous gels on the south wall inside the stone chamber	2005/9/16	LC150646	—
K8626-1b	JCM 28865	K: Soil in burial mound	2008/6/26	LC150648	—
Group 3					
T7214-7-1b	JCM 28802	T: Grayish substances on the western area inside the adjacent space	2007/2/14	LC150629	LC150720
Group 4					
T8804-4-1b	JCM 28843	T: Clay soil around eastern area of the conservation facility	2008/8/4	LC150638	LC150721
Group 5					
T81027-1-2b	JCM 28844	T: Soil (Hanchiku) in the southeast area of the burial mound	2008/10/27	LC150639	LC150722
Group 6					
T81027-2-1b	JCM 28845	T: Soil around eastern area of the tumulus	2008/10/27	LC150640	LC150723
Group 7					
T81028-3b	JCM 28846	T: Soil around northern area of the tumulus	2008/10/28	LC150641	LC150724
Group 8					
T81119-2-1b	JCM 28847	T: Soil around western area of the conservation facility	2008/11/19	LC150642	LC150725
Group 9					
K6630-4-5b	JCM 28860	K: Viscous gels on the floor near the west wall inside the stone chamber	2006/6/30	LC150647	LC150733

16S rDNA によるグループ分けの結果と各グループに含まれる分離株番号を Group/Isolation no. に、各分離株の、理化学研究所バイオリソースセンター Japan Collection of Microorganisms (JCM) への寄託番号を Other designation に、分離源の情報を Isolation source に、決定した塩基配列の国立遺伝学研究所 DNA Data Bank of Japan (DDBJ) への寄託番号を DDBJ accession no. に示す。分離株番号が T から始まる分離株は高松塚古墳試料に由来し、K から始まる分離株はキトラ古墳試料に由来する。

表2. 高松塚・キトラ両古墳から分離された *Bacillus simplex* group 分離株

Group /Isolate no.	Other designation	Isolation source (T, Takamatsuzuka Tumulus; K, Kitora Tumulus)	Sampling date	DDBJ accession no.	
				16S	<i>gyrB</i>
Group 1					
T7405-4-2b	JCM 28805	T: Blackish substances on the top surface of north wall (during relocation of the stone chamber)	2007/4/5	LC150661	LC150726
T7410-2-1b	JCM 28810	T: Black substances behind the north wall (during relocation of the stone chamber)	2007/4/10	LC150664	—
T7413-5-2b	JCM 28812	T: Black substances between north wall and west wall 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/13	LC150666	—
T7413-6-2b	JCM 28814	T: A piece of plaster on the joint space between east wall 3 and north wall (during relocation of the stone chamber)	2007/4/13	LC150668	—
T7426-14-2b	JCM 28830	T: Black substances around the eastern area of the stone chamber exterior (during relocation of the stone chamber)	2007/4/26	LC150672	—
T7528-3-2b	JCM 28835	T: Between east wall 1 and ceiling stone 2 (during relocation of the stone chamber)	2007/5/28	LC150674	—
T7528-9-1b	JCM 28837	T: Black substances between ceiling stone 1 and 2 (during relocation of the stone chamber)	2007/5/28	LC150675	—
T7528-11-2b	JCM 28838	T: Black substances behind the east wall 1 (during relocation of the stone chamber)	2007/5/28	LC150676	—
T7611-4-3b	JCM 28840	T: Blackish viscous gels and plant roots on the east wall 1 (during relocation of the stone chamber)	2007/6/11	LC150678	—
T7821-16-3b	JCM 28841	T: Soil on the lateral side of floor 2 (during relocation of the stone chamber)	2007/8/21	LC150679	—
K101008-7-3b	JCM 28869	K: Clay soil on the stone of the south wall in the stone chamber	2010/10/8	LC150656	—
Group 2					
T7409-2-4b	JCM 28806	T: Soil and plaster behind the north wall (during relocation of the stone chamber)	2007/4/9	LC150662	LC150727
Group 3					
T7410-1-5b	JCM 28807	T: Plasters between north wall and ceiling stone (during relocation of the stone chamber)	2007/4/10	LC150663	LC150728
T7413-2-2b	JCM 28811	T: Black substances between north wall and west wall 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/13	LC150665	—
T7425-1-1b	JCM 28821	T: Black substances on the top surface of west wall stone 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/25	LC150669	—
T7426-12-1b	JCM 28828	T: Black spots on the western area of the stone chamber exterior (during relocation of the stone chamber)	2007/4/26	LC150670	—
T7426-12-2b	JCM 28829	T: Black spots on the western area of the stone chamber exterior (during relocation of the stone chamber)	2007/4/26	LC150671	—
T7510-3-2b	JCM 28832	T: Blackish brown substances on the side surface of west wall stone 2 (during relocation of the stone chamber)	2007/5/10	LC150673	—
T7822-2-1b	JCM 28842	T: Black spots on the floor 1 (during relocation of the stone chamber)	2007/8/22	LC150680	—
K8617-2-1b	JCM 28861	K: Brownish viscous gels on the east wall in the stone chamber	2008/6/17	LC150653	—
Group 4					
T7413-6-1b	JCM 28813	T: A piece of plaster on the joint space between east wall 3 and north wall (during relocation of the stone chamber)	2007/4/13	LC150667	LC150729
T7611-4-2b	JCM 28839	T: Blackish viscous gels and plant roots on the east wall 1 (during relocation of the stone chamber)	2007/6/11	LC150677	—
K6303-2-1b	JCM 28857	K: On the east wall inside the stone chamber	2006/3/3	LC150650	—
K6630-3-2b	JCM 28859	K: Black moldy spots on the ceiling stone inside the stone chamber	2006/6/30	LC150652	—
K8617-3-1b	JCM 28862	K: White particle on the east wall inside the stone chamber	2008/6/17	LC150654	—
K8617-7-2b	JCM 28864	K: Aqua substances on south area of the floor inside the stone chamber	2008/6/17	LC150658	—
K101008-6-1b	JCM 28868	K: Black spots on the stone of the west wall inside the stone chamber	2010/10/8	LC150655	—
Group 5					
T81119-2-3b	JCM 28848	T: Soil around western area of the conservation facility	2008/11/19	LC150681	LC150730
Group 6					
T81203-9-1b	JCM 28850	T: Soil in the adjacent space	2008/12/3	LC150682	LC150731
T81203-9-3b	JCM 28852	T: Soil in the adjacent space	2008/12/3	LC150683	—
T81203-9-4b	JCM 28853	T: Soil in the adjacent space	2008/12/3	LC150684	—
Group 7					
K6203-10-3b	JCM 28856	K: Viscous gels on the west wall inside the stone chamber	2006/2/3	LC150649	LC150732
K6303-9-1b	JCM 28858	K: On the floor inside the stone chamber	2006/3/3	LC150651	—
K8617-5-1b	JCM 28863	K: White particle on the west wall inside the stone chamber	2008/6/17	LC150657	—
Group 8					
K9703-3-1b	JCM 28866	K: Whitish viscous gels on the stone of the east wall inside the stone chamber	2009/7/3	LC150659	LC150734
K9703-10-1b	JCM 28867	K: Yellow viscous gels on the plaster of west wall inside the stone chamber	2009/7/3	LC150660	—

表1 脚注参照

表3. 高松塚古墳から分離された *Ochrobactrum* 属分離株

Group /Isolate no.	Other designation	Isolation source (T, Takamatsuzuka Tumulus)	Sampling date	DDBJ accession no.		
				16S	<i>gyrB</i>	<i>groEL</i>
Group 1						
T5916-1-1b	JCM 28783	T: Viscous gels below the paintings of the white tiger on the west wall in the stone chamber	2005/9/16	LC150685	LC150735	LC150738
T5916-7-1b	JCM 28782	T: Viscous gels below the paintings of the blue dragon on the east wall inside the stone chamber	2005/9/16	LC150686	LC150736	LC150739
Group 2						
T6220-2-3b	JCM 28787	T: Spots around the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/2/20	LC150687	LC150737	LC150740
T6220-4-3b	JCM 28788	T: Viscous gels below the paintings of the white tiger on the west wall inside the stone chamber	2006/2/20	LC150688	—	—
T6517-1-5b	JCM 28793	T: Black spots on the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/5/17	LC150689	—	—
T6517-3-3b	JCM 28795	T: Black spots around the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/5/17	LC150690	—	—
T6713-1-4b	JCM 28797	T: Black spots on the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/7/13	LC150691	—	—
T6713-9-3b	JCM 28798	T: Black molds around the paintings of the blue dragon on the east wall inside the stone chamber	2006/7/13	LC150692	—	—
T61017-1-4b	JCM 28800	T: Black spots on the paintings of the group of women on the west wall inside the stone chamber	2006/10/17	LC150693	—	—
T7405-3-2b*	JCM 28803	T: Blackish substances on the top surface of north wall (during relocation of the stone chamber)	2007/4/5	LC150694	—	—
T7410-1-7b	JCM 28809	T: Plasters between north wall and ceiling stone (during relocation of the stone chamber)	2007/4/10	LC150695	—	—
T7413-7-1b	JCM 28815	T: Black substances on the joint space between east wall 3 and north wall (during relocation of the stone chamber)	2007/4/13	LC150696	—	—
T7417-2-3b	JCM 28817	T: Side surface of west wall stone 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/17	LC150697	—	—
T7417-7-3b	JCM 28820	T: Spots around the paintings of the group of women on the west wall stone 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/17	LC150698	—	—
T7425-1-3b	JCM 28822	T: Black substances on the top surface of west wall stone 3 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/25	LC150699	—	—
T7426-6-2b	JCM 28826	T: Black substances on the south-lateral side of ceiling stone wall 2 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/26	LC150700	—	—
T7426-9-3b	JCM 28827	T: Brownish substances on the surface of ceiling stone wall 2 (during relocation of the stone chamber)	2007/4/26	LC150701	—	—

表1 脚注参照

* : 表中の分離株 (T7405-3-2b) は、16S rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列データ登録後に、死滅が確認された。

表4. 試験に用いたプライマー

プライマー名称	プライマーの配列 (5'→3'方向)	参考文献
<i>Bacillus gyrB</i> gene		
UP-1G	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNG GNGGNAARTTYGG	Goto <i>et al.</i> , 2003
UP-2r	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNA CRTCNGCRTCNGTCAT	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
UP-1S	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
UP-2Sr	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>Ochrobactrum gyrB</i> gene		
GyrB_f	GATGATGATCTTGTGRТАVCGCAG	Huber <i>et al.</i> , 2010
GyrB_r	CGAGGTCATCATGACCCAGCTTC	Huber <i>et al.</i> , 2010
GyrB_int_544_r	GACGCTGACCGCGATGACTG	Huber <i>et al.</i> , 2010
<i>Ochrobactrum groEL</i> gene		
GroEL_f	CGGCGAAGACCTGCTGATC	Huber <i>et al.</i> , 2010
GroEL_r	GCAACGATACCTTCTTCAACCG	Huber <i>et al.</i> , 2010

3. 結果および考察

3-1. *Bacillus cereus* group

3-1-1. 16S rDNA に基づく分子系統解析

高松塚およびキトラ両古墳から分離された *Bacillus cereus* group に含まれる28分離株は、16S rDNA の相同性から、9つのグループに分けられた(表1, Group 1からGroup 9.)。特にGroup 2には20株が含まれた(表1)。これらの各グループから選抜した1株の塩基配列に基づく分子系統解析の結果、*Bacillus cereus* group に含まれる分離株のうち8グループは、*B. cereus*, *B. thuringiensis* および *B. toyonensis* の3種とブートストラップ値66%の分岐の枝に含まれ、横枝が一切無く互いに同じ位置を示すことから、16S rDNA に基づく解析では、これらの分離株の種レベルでの同定は出来なかった(図1)。他方、Group 4の1株は、*B. pseudomycooides* とブートストラップ値61%の分岐の枝を形成し、互いに全く同一の分子系統学的位置を示したことから、本種への帰属が示唆された(図1)。

3-1-2. *gyrB* に基づく分子系統解析

16S rDNA による解析において、特に、*B. cereus*, *B. thuringiensis* および *B. toyonensis* の3種と同一の分子系統学的位置を示した8グループの分離株は、それぞれ異なる分子系統学的

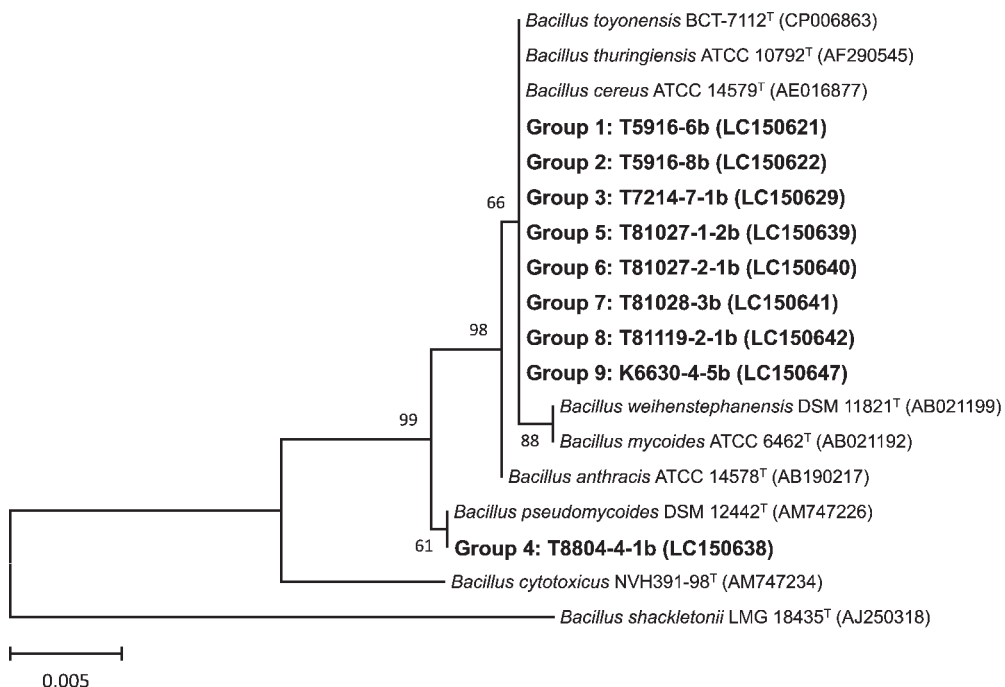


図1 *Bacillus cereus* group に含まれる高松塚およびキトラ両古墳分離株の16S rDNA に基づく分子系統樹

株番号の T は高松塚古墳分離株, K はキトラ古墳分離株を意味し, 各分岐点の数字はブートストラップ検定 (1,000回) の再現値 (ブートストラップ値, %)。左下のバーは1000塩基につき5塩基の違いを表す。

位置を示した(図2)。Group 1および5(T5916-6bおよびT81027-1-2b)は、*B. thuringiensis*と99%のブートストラップ値で支持されるクラスターを形成し、*B. thuringiensis*との*gyrB*の相同率は、それぞれ99.7%および98.9%であった。このことから、Group 1および5を*B. thuringiensis*と同定した(図2)。また、Group 2および3(T5916-8bおよびT7214-7-1b)は、互いに同一の分子系統学的位置を示し、*B. toyonensis*と100%のブートストラップ値で支持されるクラスターを形成し、*B. toyonensis*との*gyrB*の相同率は、ともに99.6%であった。よって、Group 2および3を*B. toyonensis*と同定した(図2)。さらに、Group 7(T81028-3b)は*B. cereus*と100%のブートストラップ値で支持されるクラスターを形成し、両者の相同率は99.5%であった。従って、Group 7を*B. cereus*と同定した(図2)。なお、Group 4(T8804-4-1b)は、16S rDNAの結果と同様に、*B. pseudomycooides*と100%のブートストラップ値で支持されるクラスターを形成し、両者の相同率は99.9%であった。よってGroup 4を*B. pseudomycooides*と同定した(図2)。

一方で、Group 6, 8および9(T81027-2-1b, T81119-2-1bおよびK6630-4-5b)は、100%のブートストラップ値で支持されるクラスターを形成し、*B. cereus* groupの既知種とは独立した分子系統学的位置を示した(図2)。また、これら3株の*gyrB*は互いに97.1%以上の相同率を示したが、他の既知種との相同率は96.1%以下であった。これら3株は*Bacillus*属の中でも*B. thuringiensis*および*B. toyonensis*に近縁な新規分類群であることも考えられ、今後より詳

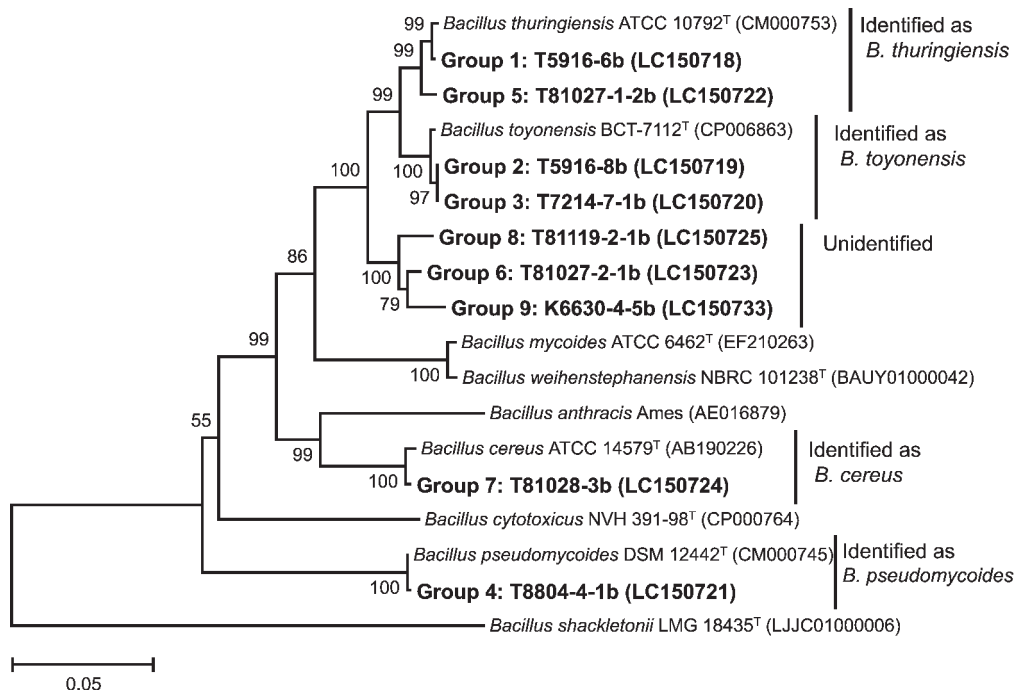


図2 *Bacillus cereus* groupに含まれる高松塚およびキトラ両古墳分離株の*gyrB*に基づく分子系統樹

株番号のTは高松塚古墳分離株、Kはキトラ古墳分離株を意味し、各分岐点の数字はブートストラップ検定(1,000回)の再現値(ブートストラップ値、%)、左下のバーは100塩基につき5塩基の違いを表す。

細な試験を行うことが必要であると考えられた。

以上のように、16S rDNA では同定が困難であった *Bacillus cereus* group に含まれる分離株の位置付けについて、*gyrB* を解析することでより詳細な同定が可能となった。

3-2. *Bacillus simplex* group

3-2-1. 16S rDNA に基づく分子系統解析

高松塚およびキトラ両古墳から分離された *Bacillus simplex* group に含まれる36分離株は、16S rDNA の塩基配列の比較から、8つのグループに分けられた(表2, Group 1からGroup 8)。多数の分離株が含まれるグループとして、Group 1(11株), Group 3(8株), Group 4(7株)が認められた(表2)。これら各グループから選抜した1株の塩基配列に基づく分子系統解析の結果、*Bacillus simplex* group に含まれる分離株のうち7グループは、既知種とは独立した分子系統学的位置を示した(図3)。また、このうちの6グループは、互いに同一の分子系統学的位置を示した。他方、Group 2 (T7409-2-4b) は、*B. simplex* と同一の分子系統学的位置を示し、同種への帰属が示唆された。

3-2-2. *gyrB* に基づく分子系統解析

16S rDNA で同一の分子系統学的位置を示した6つのグループのうちGroup 7および8 (K6203-10-3b および K9703-3-1b) は互いに同一の分子系統学的位置を示し、他の4つのグループはそれぞれ異なる分子系統学的位置を示した(図4)。しかし、これら6つのグループに、Group 2 (T7409-2-4b) を加えた7グループは、*B. simplex* を含む100%のブートストラップ値で支持されるクラスターを形成した。また、これら7グループと *B. simplex* との相関率は、

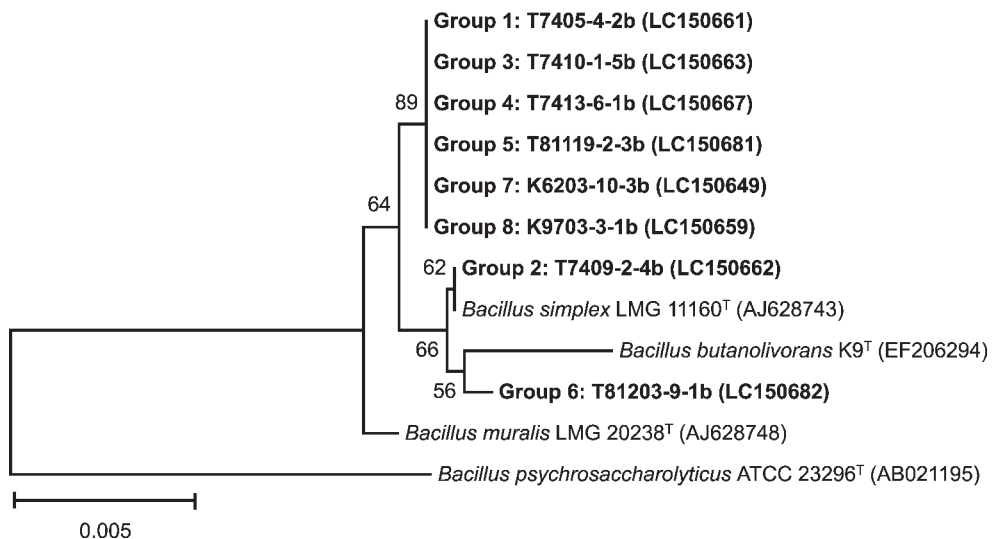


図3 *Bacillus simplex* group に含まれる高松塚およびキトラ両古墳分離株の16S rDNA に基づく分子系統樹

株番号の T は高松塚古墳分離株, K はキトラ古墳分離株を意味し、各分岐点の数字はブートストラップ検定 (1,000回) の再現値 (ブートストラップ値, %)、左下のバーは1000塩基につき5塩基の違いを表す。

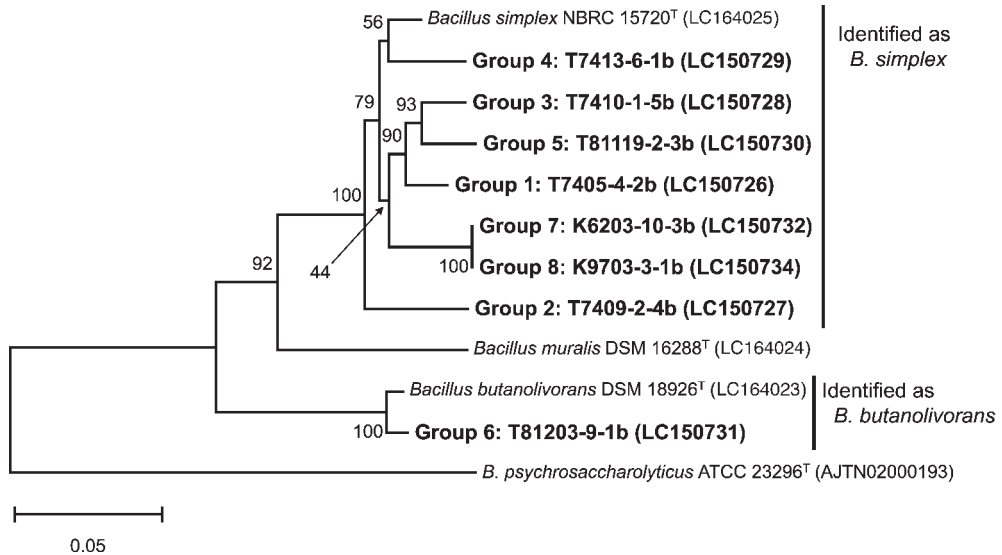


図4 *Bacillus simplex* groupに含まれる高松塚およびキトラ両古墳分離株の *gyrB* に基づく分子系統樹

株番号の T は高松塚古墳分離株, K はキトラ古墳分離株を意味し, 各分岐点の数字はブートストラップ検定 (1,000回) の再現値 (ブートストラップ値, %) , 左下のバーは100塩基につき5塩基の違いを表す。

94.9~96.4%の範囲であり, 他の既知種とは89%未満であった。以上の結果から, これら7つのグループに含まれる分離株を *B. simplex* と同定した (図4)。一方, 16S rDNA で *B. butanolivorans* とクラスターを形成した Group 6 (T81203-9-1) は, *gyrB* でも同様に *B. butanolivorans* と100%のブートストラップ値で支持されるクラスターを形成し, 両者の相同率は98.7%であった。このことから, Group 6(T81203-9-1)は *B. butanolivorans* と同定した(図4)。

3-3. *Ochrobactrum* 属

3-3-1. 16S rDNA に基づく分子系統解析

高松塚古墳の石室内外から分離された *Ochrobactrum* 属に含まれる17分離株は, 16S rDNA の相同率から, 2つのグループに分けられた (表3, Group 1および Group 2)。Group 1には2株が, Group 2には15株が含まれた (表3)。各グループから選抜した1株の塩基配列に基づく分子系統解析の結果, Group 1は *O. pecoris* に近縁であり, Group 2は *O. pituitosum* に近縁と考えられた (図5)。

3-3-2. *gyrB* および *groEL* に基づく分子系統解析

gyrB および *groEL* に基づく分子系統解析の結果, *Ochrobactrum* 属分離株のうち, Group 2(T6220-2-3b)は, *gyrB* および *groEL* に基づく分子系統解析において, とともに *O. pituitosum* と100%のブートストラップ値で支持されるクラスターを形成し (図6, 図7), *gyrB* は98.7%, *groEL* は99.6%の相同率であった。このことから, 高松塚古墳石室内外からの *Ochrobactrum* 属主要分離株である Group 2は, *O. pituitosum* と推定された。Group 1(T5916-1-1b)は, *gyrB* では *O. anthropi* とクラスターを形成したものの, 両者の間には系統的に大きく距離が認めら

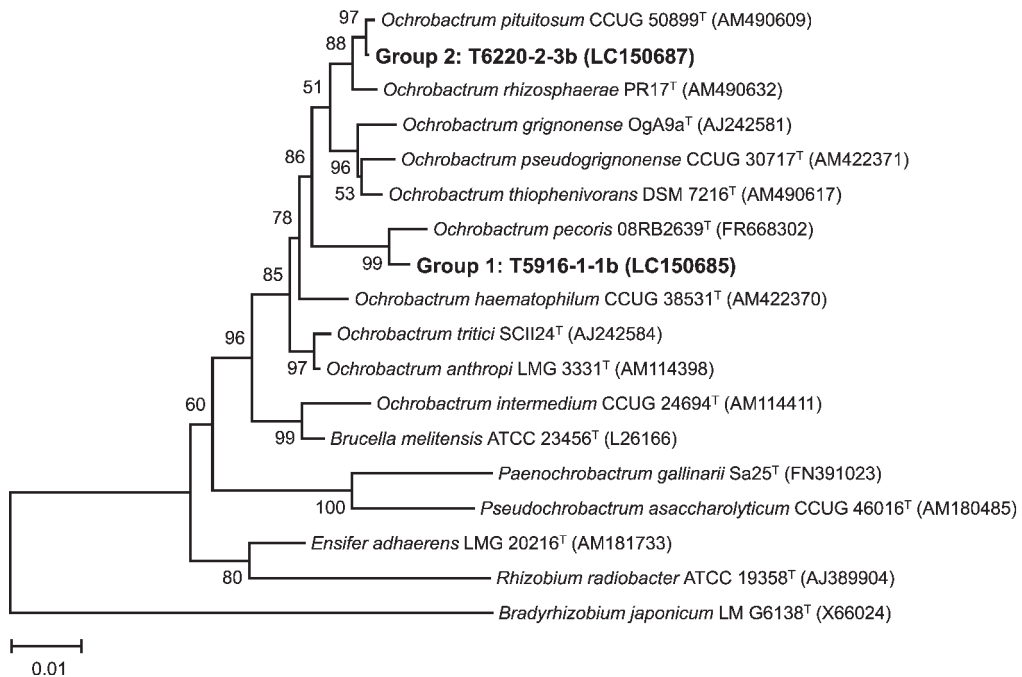


図5 *Ochrobactrum* 属に含まれる高松塚古墳分離株の16S rDNAに基づく分子系統樹
株番号の T は高松塚古墳分離株, K はキトラ古墳分離株を意味し, 各分岐点の数字はブートストラップ検定 (1,000回) の再現値 (ブートストラップ値, %), 左下のバーは100塩基につき1塩基の違いを表す。

れ(図6), *groEL* ではいずれの既知種とも異なり, 独立した分子系統学的位置を示した(図7)。

Ochrobactrum 属では, すべての既知種で共通のハウスキーピング遺伝子を用いた解析が行われているわけではなく, 種によって異なる。16S rDNA において, Group 1 (T5916-1-1b) は *O. pecoris* に最も近縁であったが, 本種は *gyrB* および *groEL* の解析がされておらず, 塩基配列の登録が無い²³⁾。したがって, *O. pecoris* の *gyrB* および *groEL* 遺伝子を解析して比較する必要があるものの, 現時点では, Group 1 (T5916-1-1b) は *Ochrobactrum* 属の新種を構成する可能性も示唆される。

4. おわりに

高松塚およびキトラ両古墳の主要細菌群である *Bacillus* 属の2つのグループおよび *Ochrobactrum* 属について, ハウスキーピング遺伝子を用いた解析を行い, より詳細な種レベルでの帰属分類群を推定することが出来た。このうち, *Bacillus* 属には, 感染症法およびカルタヘナ法に記載された細菌種で, バイオセーフティレベル1* (BSL1*, 日和見病原体) 以上に分類されている既知種として3種 (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*) が指定されており (日本細菌学会<http://jsbac.org/infectious_disease/bsl_level.pdf>に準拠), すべて *Bacillus cereus* group に含まれる。高松塚およびキトラ両古墳サンプルから分離された *Bacillus cereus* group に帰属する分離株のうち, *B. cereus* に帰属すると推定された分離株は Group 7のみであり, 分離源の試料も高松塚古墳の石室内ではなく, 古墳北側の土壌である (表1)。また, もうひとつの *Bacillus* 属分離株の主要グループである *B. simplex* group 分離株は, 今回の解析により, *B. simplex* および *B. butanolivorans* に帰属すると推定された。*Bacillus* 属分離

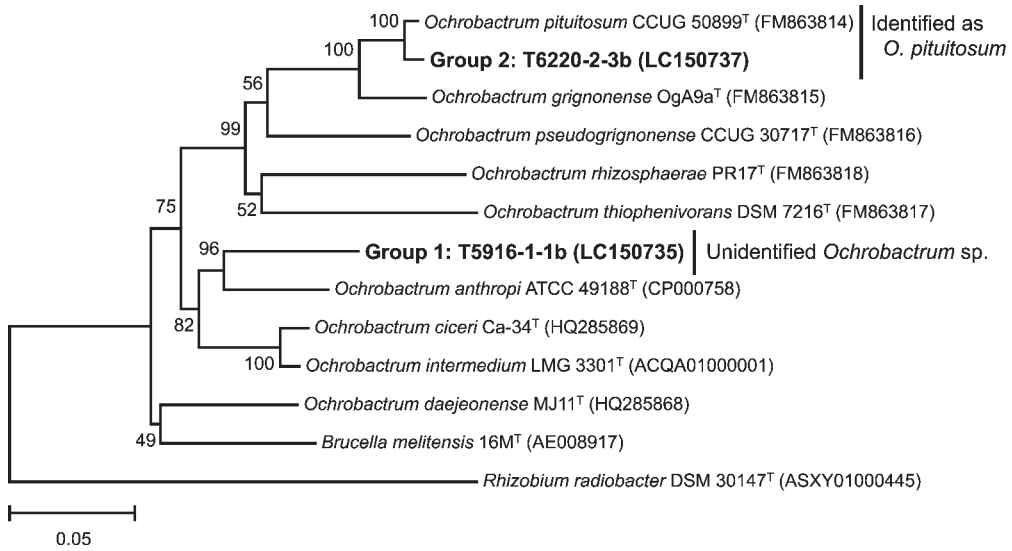


図6 *Ochrobactrum* 属に含まれる高松塚古墳分離株の *gyrB* に基づく分子系統樹
株番号の T は高松塚古墳分離株, K はキトラ古墳分離株を意味し, 各分岐点の数字はブートストラップ検定 (1,000回) の再現値 (ブートストラップ値, %), 左下のバーは100塩基につき 5 塩基の違いを表す。

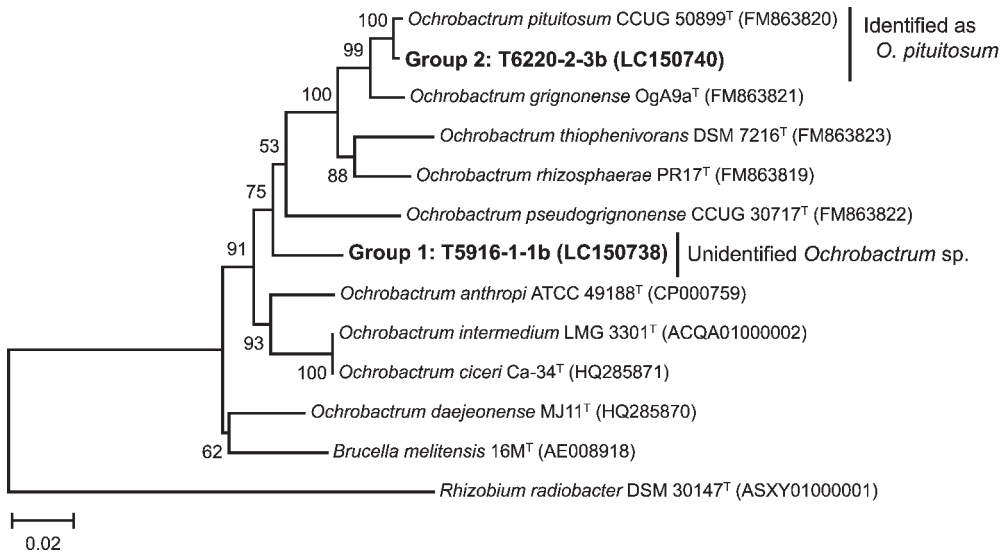


図7 *Ochrobactrum* 属に含まれる高松塚古墳分離株の *groEL* に基づく分子系統樹
株番号の T は高松塚古墳分離株, K はキトラ古墳分離株を意味し, 各分岐点の数字はブートストラップ検定 (1,000回) の再現値 (ブートストラップ値, %), 左下のバーは100塩基につき 2 塩基の違いを表す。

株のうち *B. toyonensis* T5916-8-1b および *B. simplex* K6203-10-3b については壁画が描かれる漆喰の主原料のひとつである炭酸カルシウムを溶解すると考えられる有機酸等の生成や, 壁画の剥落止めや強化処置等に用いられた高分子材料, 殺菌剤として用いられたエタノールあるいはイソプロパノールなどの有機溶媒の資化性についての試験が行われている²⁴⁻²⁶。両分離株

は顕著な炭酸カルシウムの溶解は示さなかったものの、酢酸の生成およびわずかな pH の低下が認められ²⁴⁾、高分子材料や 1% 程度に希釈された有機溶媒では生育することが確認されている^{25,26)}。これらのことから、分離株は石室内での漆喰の劣化や、保存・修復に用いられた資材の劣化等に関わっていた可能性が考えられる。

壁画からの *Bacillus* 属細菌としては、現時点では *B. decolorationis*²⁷⁾、*B. muralis*²⁸⁾、および *B. murimartini*²⁹⁾ の 3 種が記載されているが、このうち、*Bacillus simplex* group に含まれる *B. muralis* は、基準株を含む複数の株がドイツの“Lutheran church of Greene-Kreiansen”およびスペインの“Servilia tomb of the Roman necropolis of Carmona”の壁画から分離されている²⁸⁾。どちらの壁画も、高松塚、キトラ両古墳石室内のような湿潤な環境ではなく、乾燥した環境とされているが、これら近縁な細菌種が異なる環境下でどのように壁画の微生物劣化に関わるのか、非常に興味深い点であると同時に、他の古墳の微生物劣化を考える上での基礎情報となることが期待できる。

Ochrobactrum 属のうち、主要分離株の Group 2 は *O. pituitosum* に同定された。*Ochrobactrum* 属は、一般に土壌から分離され、植物との関係性(根粒菌、窒素固定)の報告があるが、その一方で、ヒト由来の種も認められる⁸⁾(ドイツでは、*O. anthropi* および *O. intermedium* は BSL2 に指定されている (http://www.baua.de/nr_15226/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf))。Group 2 が同定された *O. pituitosum* は、工業環境からの分離株であり、病原性に関する報告のない種である¹⁸⁾。一方で、本解析では未同定となった Group 1 の分離株は、病原菌とされる既知種とは分子系統的にも異なっていた。また、これらは 2005 年 9 月の高松塚古墳石室内の冷却直後しか分離されておらず、逆に Group 2 は 2005 年 9 月の試料からは分離されていない。同じ *Ochrobactrum* 属の種であっても、環境の変化が生息に影響を与えた可能性がある。*Ochrobactrum* 属分離株は粘稠性のコロニー形成が認められ、石室内で確認されたゲル状物質(バイオフィルム)を構成する主要な分類群のひとつであったことが報告されている³⁰⁾。さらに *O. pituitosum* T6220-2-3b は酢酸の生成と pH の低下²⁴⁾、1% のエタノールあるいはイソプロパノールの資化性²⁶⁾が認められており、漆喰の劣化に関与した可能性が示唆される。

培養法による微生物調査は、得られた分離株の特徴づけ(characterization)からその特性を知る上で重要な情報をもたらすと同時に、分離株を詳細に同定することにより、文献等の既知情報からその特性を類推することが可能となり、文化財の保存等に有益な情報等をもたらすものとする。

参考文献

- 1) 高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会：高松塚古墳壁画劣化原因調査報告書、p.106、文化庁(2010)
- 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) 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)
- 4) 木川りか、佐野千絵、三浦定俊：高松塚古墳の微生物調査の歴史と方法、保存科学、43、79-85(2004)
- 5) Sugiyama, J., Kiyuna, T., An, K.-D., Nagatsuka, Y., Handa, Y., Tazato, N., Hata-Tomita, J.,

- Nishijima, M., Koide, T., Yaguchi, Y., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S.: Microbiological survey of the stone chambers of Takamstuzuka and Kitora tumuli, Nara Prefecture, Japan: a milestone in elucidating the cause of biodeterioration of mural paintings. In: Study of Environmental Conditions Surrounding Cultural Properties and Their Protective Measures: Proceedings of The 31st International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property (ed. by Sano, C.), 51-73. National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo (2009)
- 6) 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)
- 7) Logan, N. A., De Vos, P.: Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The *Firmicutes* (ed. by Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.), 21-128. Springer, New York, (2009)
- 8) Kämpfer P., Wohlgemuth, S., and Scholz, H.: The Family Brucellaceae. In: The Prokaryotes — Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. 4th ed., (ed. by Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F.), pp. 155-178. Springer, Berlin/Heidelberg (2014)
- 9) 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, Nara, Japan, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, 2032-2038 (2012)
- 10) Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Tomita, J., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Gluconacetobacter tumulisoli* sp. nov., *Gluconacetobacter takamatsuzukensis* sp. nov. and *Gluconacetobacter aggeris* sp. nov., isolated from Takamatsuzuka Tumulus samples before and during the dismantling work in 2007, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 3981-3988 (2013)
- 11) Handa, Y., Tazato, N., Nagatsuka, Y., Koide, T., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Stenotrophomonas tumulicola* sp. nov., a major contaminant of the stone chamber interior in the Takamatsuzuka Tumulus, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66, 1119-1124 (2016)
- 12) Tazato, N., Handa, Y., Nishijima, M., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65, 4830-4838 (2015)
- 13) Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Umekawa, N., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Krasilnikoviella muralis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Promicromonosporaceae*, isolated from the Takamatsuzuka Tumulus stone chamber interior and reclassification of *Promicromonospora flava* as *Krasilnikoviella flava* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, in press; Published Ahead of Print: 26 October 2016, doi: 10.1099/ijsem.0.001618 (2016)
- 14) Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Umekawa, N., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: Characterisation of actinobacteria forming noteworthy colonies on mural painting of the stone chamber interior of ancient tumuli and proposal of *Microbacterium tumbae* sp. nov., Interna-

- tional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, (2016) (審査中)
- 15) Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *Journal of Molecular Biology*, 3, 208-218 (1961)
 - 16) Goto, K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai, H., Yokota, A.: *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1537-1544 (2003)
 - 17) Yamamoto, S., Harayama, S.: PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1104-1109 (1995).
 - 18) Huber, B., Scholz, H.C., Kämpfer, P., Falsen, E., Langer, S., Busse, H.J.: *Ochrobactrum pituitosum* sp. nov., isolated from an industrial environment, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 321-326 (2010)
 - 19) Altschul, S.F., Madden, T.L., 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)
 - 20) Edgar, R.C.: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, 32, 1792-1797 (2004)
 - 21) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S.: MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729 (2013)
 - 22) Felsenstein, J.: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 39, 783-791 (1985)
 - 23) Kämpfer, P., Huber, B., Busse, H.J., Scholz, H.C., Tomaso, H., Hotzel, H., Melzer, F.: *Ochrobactrum pecoris* sp. nov., isolated from farm animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2278-2283 (2011)
 - 24) 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)
 - 25) 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：キトラ古墳から分離された細菌や酵母の修復用高分子材料に対する資化性試験、*保存科学*、51、157-166 (2012)
 - 26) 木川りか、佐野千絵、喜友名朝彦、立里臨、杉山純多：高松塚古墳・キトラ古墳石室内の微生物分離株のアルコール系殺菌剤資化性試験、49、231-238 (2010)
 - 27) Heyrman, J., Balcaen, A., Rodriguez-Diaz, M., Logan, N.A., Swings, J., De Vos, P.: *Bacillus decolorationis* sp. nov., isolated from biodeteriorated parts of the mural paintings at the Servilia tomb (Roman necropolis of Carmona, Spain) and the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 459-463 (2003)
 - 28) Heyrman, J., Logan, N. A., Rodríguez-Díaz, M., Scheldeman, P., Lebbe, L., Swings, J., Heyndrickx, M., De Vos, P.: Study of mural painting isolates leading to the transfer of ‘*Bacillus maroccanus*’ and ‘*Bacillus carotarum*’ to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to ‘*Bacillus macroides*’ and description of *Bacillus muralis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 119-131 (2005)

29) Borchert, M.S., Nielsen, P., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U., Pape, T., Antranikian, G. Schäfer, T.: *Bacillus plakortidis* sp. nov. and *Bacillus murimartini* sp. nov., novel alkalitolerant members of rRNA group 6, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 2888-2893 (2007)

30) 高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会 第4回、資料2 (高松塚古墳壁画の生物劣化にかかわる微生物)、平成20年10月20日、文化庁

キーワード：高松塚古墳 (Takamatsuzuka Tumulus)；キトラ古墳 (Kitora Tumulus)；細菌 (bacteria)；分子系統 (molecular phylogeny)；ハウスキーピング遺伝子 (house-keeping gene)

Molecular Phylogenetic Placements of *Bacillus* and *Ochrobactrum* Isolates from the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli

Yutaka HANDA*¹, Nozomi TAZATO*, Yoshinori SATO,
Rika KIGAWA**, Chie SANO and Junta SUGIYAMA***

Molecular phylogenetic placements of the three major bacterial taxa, i.e., *Bacillus cereus* group (28 isolates), *Bacillus simplex* group (36 isolates), and *Ochrobactrum* spp. (17 isolates), isolated from various samples collected from the stone chamber interior or exterior environment of Takamatsuzuka Tumulus and Kitora Tumulus were conducted based on the sequences of housekeeping genes (i.e., *gyrB* for 17 *Bacillus* isolates, and *gyrB* and *groEL* for 3 *Ochrobactrum* isolates) in addition to 16S rRNA gene sequences (for all 64 *Bacillus* and 17 *Ochrobactrum* isolates). Molecular phylogenetic analyses revealed that almost all isolates belonging to both genera *Bacillus* and *Ochrobactrum* were assignable to known species (i.e., *Bacillus butanolivorans*, *B. cereus*, *B. pseudomycooides*, *B. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. toyoensis*, and *Ochrobactrum pituitosum*), and it was possible to infer whether these isolates were pathogenic or not. On the other hand, for the remaining *Bacillus* and *Ochrobactrum* isolates, which were not identified as known species, further study is necessary to identify accurately whether these are assignable to novel taxa or not.

*TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd. **Kyushu National Museum,

***TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd., Chiba Branch Office ¹ Present affiliation: CAF Laboratories Inc.