

虎塚古墳壁画から落下した微小剥落片の微生物叢解析

松野美由樹・片山葉子・犬塚将英・稻田健一・矢島國雄・佐藤嘉則

I はじめに

虎塚古墳は、茨城県ひたちなか市に所在する7世紀前葉に築造された前方後円墳で、後円部にある横穴式石室内に彩色壁画を有した装飾古墳である。壁画は石室の石材と類似性の高い白土による下地層の上から赤色顔料である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・韁・楯などの武器、武具といった文様が描かれている^{1,2}。

壁画は毎年春と秋に一般公開がされており、それに伴い公開の前後に石室内の定期点検と科学的な調査が実施されている。虎塚古墳壁画では、目視で確認できるような顕著な微生物被害は現在のところ発生していない。目視で確認できるような微生物劣化が起きていないという事実には、そこに何らかの微生物制御に関する理由があると推測される。一方で、長い期間を経て顕在化するような潜在的な微生物劣化については虎塚古墳壁画においても存在する可能性がある。近年では虎塚古墳壁画の赤色顔料が薄くなっているように見られるということが報告されており²、目視では分からず微生物劣化が関与している可能性も否定できないことから、これらについても検討していく必要がある。

これまで多くの場合において、壁画上で顕著な微生物劣化が認められた際にその原因を調査する目的で微生物劣化についての研究が行われてきた。文化財は非破壊・非接触が原則であるため、明確な被害が起きていない状態の壁画を調査対象にすることは保存上望ましくないということが理由だと考えられる。そのため、虎塚古墳壁画における微生物生態系については未だ十分な学術的知見が得られていない状況にある。古墳壁画の現地保存を考える上で、石室内や壁画上の微生物叢がどのようなものが望ましいのかという知見は非常に重要だと考えられる。また、虎塚古墳壁画の微生物叢を解析することは、代謝様式から推定される劣化リスクを評価するという予防的な視点においても先駆的であり、重要なことだと考えられる。そこで本研究では、石室内にて自然落下した壁画の微小剥落片を用いて細菌と真菌を対象とした微生物叢解析を行うことにより、そこに形成されている微生物叢の様態を明らかにすることを目的とした。

II 供試試料

虎塚古墳石室の床面には約21cm×30cmのポリカーボネート製の平板が16枚設置されており、定期点検の際に平板上に落下した微小剥落片を回収し、落下物の重量、種類、落下

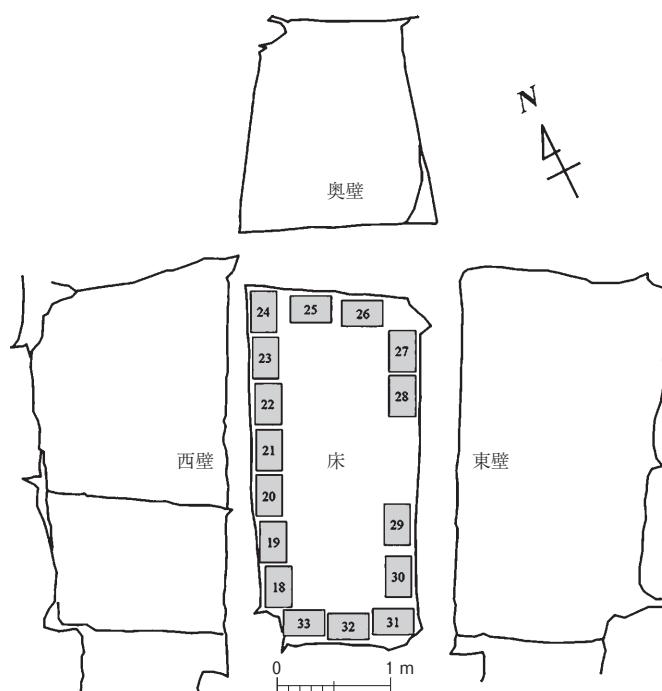


図1 石室内に置かれたポリカーボネート板の配置図

箇所の分布などの調査を実施している²。本研究で用いた試料は、2019年11月18日に行われた定期点検の際に採取したものである。平板上にある落下物から壁画の剥落片と思われる白色下地や赤色顔料を目視によって選抜し、滅菌済みの綿棒を用いて滅菌チューブ(2mL, Watson, Japan)に回収した。回収後は、保冷剤を入れた断熱バッグで10°C以下に保ったまま東京文化財研究所に運び、分析に供するまで4°Cで冷蔵保存した。

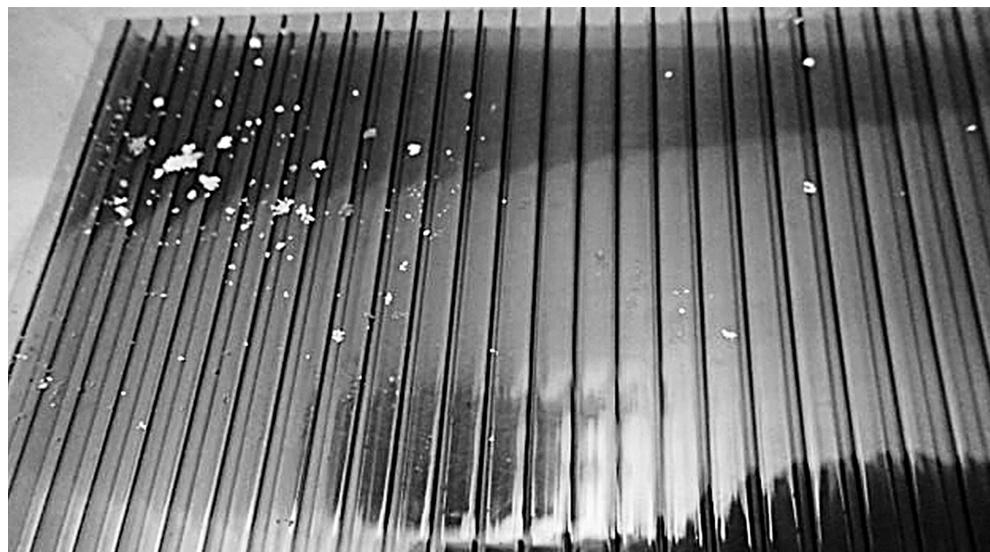


図2 ポリカーボネート板上の微小剥落片

III 方 法

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、日本）を用いて行った。抽出したDNAを用いて、蛍光消光プライマーを用いたリアルタイムPCR（Polymerase Chain Reaction）法³による細菌16S rRNA遺伝子のコピー数と真菌18S rRNA遺伝子のコピー数を確認した。次に、細菌16S rRNA遺伝子の超可変領域（V4領域、約254塩基配列）と真菌ITS（Internal transcribed spacer）領域を対象としたPCR增幅を行った。得られたPCR增幅産物は精製後、PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen、USA) で濃度を測定した。測定結果を元に濃度を調製し、MiSeq (Illumina, USA) にてシーケンス解析を行った。PCR增幅とシーケンス解析に用いたプライマーは、細菌16S rRNA遺伝子V4領域がU515Fおよび926R、真菌ITS領域がITS1FおよびITS2である（表1）。PCR增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、16S rRNA遺伝子については約410塩基の塩基配列情報を得た。なお、真菌ITS領域の塩基配列長は種によって異なるため、得られる塩基配列長は不定である。得られた配列データのクオリティと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。フィルタリング後の配列データについて、相同性97%以上の類似性の高い配列データを1つのグループのクラスタとしてまとめた。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（Operation Taxonomic Unit; 操作的分類単位）配列とし、その代表配列を用いて以降の解析を実施した。

各代表のOTU配列について、Silva Living Tree (<https://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>) の16S rRNA遺伝子データベースおよびUNITE (<https://unite.ut.ee/>) の真菌ITS領域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。また、補完的にアメリカ国立衛生研究所医学図書館の国立生物工学情報センター（NCBI）が提供するBLASTプログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) も用いて相同性検索を行うことで近縁種を推定した。

表1 PCR增幅および次世代シーケンス解析に用いたプライマー

	Primer name	Sequenc (5'→3')	Base	Reference (s)
細菌	U515F	GTG (C/T) CAGC (A/C) GCCGCGGTA	18	4,5
	926R	CCG (C/T) CAATTC (A/C) TTT (A/G) AGTT	19	6
真菌	ITS1F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	22	7
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	20	8

IV 結果と考察

DNA抽出には、13.5mgの試料を用いて行った。これは先行研究において次世代シーケンス解析が可能であった試料量⁹を参考にした。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真菌の18S rRNA遺伝子のコピー数の結果を表2に示す。抽出DNA原液中に含まれる細菌と真菌の対象遺伝子のコピー数はそれぞれ 2.9×10^5 、 2.2×10^4 copies/ μL -DNA原液であった。

佐藤ら（2020）の先行研究では、抽出DNA原液中に含まれる細菌と真菌の対象遺伝子のコピー数を比較すると、供試した5つの試料で共通して細菌のコピー数が真菌のコピー数に対して 10^3 から 10^4 倍多いという結果¹⁰を報告していたが、今回の試料では10倍であり、先行研究と比較してその差は小さかった。対象とした各遺伝子のコピー数は種によって異なるため、単純にコピー数だけで存在比を比較することはできないが、こうした調査結果を蓄積していくことで壁画面における微生物量の傾向が見えてくると考えられる。壁面表面での細菌と真菌のバイオマスの違いは壁面上での目視での真菌の有無と大きく関わる可能性があるため、今後両者を定量的に評価することが課題である。

細菌16S rRNA遺伝子V4領域を標的とした次世代シーケンス解析を行った結果、41,777配列を取得した。これらの配列データのうち相同性97%以上のものを1つのOTUにまとめ、その代表配列を用いてBLAST相同性検索を行い、近縁種を推定した。解析結果を表3に示す。

代表配列は9つの門に分布しており、特にProteobacteria門（37.8%）が優占した。次いでAcidobacteria門（15.0%）、Planctomycete門（14.3%）、Firmicutes門（12.6%）、Actinobacteria門（11.9%）が多く検出された。他にもChloroflexi門（2.8%）、Bacteroidetes門（2.7%）、*Candidatus Melaidabacteria*門（1.0%）、Gemmatimonadetes門（0.1%）が検出された。

洞窟における細菌叢に関して、Zhou et al. (2007) が非培養法による菌叢解析を行った複数の研究を比較している¹¹。それによると、多くの洞窟壁面においてProteobacteria門が最も優占し、続いてAcidobacteria門とActinobacteria門、Firmicutes門が多く検出されて

表2 rRNA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/ μL -DNA原液)	
細菌	真菌	
TR25	2.9×10^5	2.2×10^4

*細菌は16S rRNA遺伝子、真菌は18S rRNA遺伝子を対象とした

いることが明らかになっている¹¹。これは今回得られた解析結果と類似しており、虎塚古墳壁画の細菌叢と洞窟壁面の細菌叢が近いということが伺える。

種レベルで見ると、Proteobacteria門のAlphaproteobacteria綱に属する配列が最も優占し、その中でも特に*Nordella oligomobilis* (12.4%) に近縁な配列の出現頻度が高かった。本種はフランスのマルセイユ病院にある貯水槽の水からアメーバ共培養法を用いて分離されたグラム陰性菌であり、自由生活型アメーバに捕食された後、アメーバ細胞内で増殖することが知られている¹²。佐藤ら (2020) の先行研究¹⁰でも、本種と同様なアメーバ共培養法から分離された*Reyranella massiliensis*が多く検出されており、その共通点が生態学的に非常に興味深い。*R. massiliensis*は、*N. oligomobilis*と同様に、自由生活型アメーバに捕食された後、アメーバ細胞内で増殖することが報告されており、生態学的な特徴が類似する菌群が壁画面での優占種として存在していたのではないかと考えられる。自由生活型アメーバを利用して増殖できる能力を持ったものが優占するという事は逆に言うと、その他の微生物はアメーバの捕食によって生体量を減少させていたのではないかと類推することができる。つまり、壁画面においてアメーバの捕食による選択圧が大きいためこのような性質を持つ菌種が多く存在しているのではないかと考えた。虎塚古墳の石室内は相対湿度がほぼ100%の環境であり、羨道部や石室床面には土壌も存在するため、自由生活型のアメーバにあっても生存しやすい環境ではないかと考えられる。

本研究では壁画面に形成される微生物叢のみに焦点をあてたが、土壌動物を含めた石室全体の生物群集に視点を広げなければ、良好な壁画の状態を正確に捉えることができないのではないかと考えられた。今後は微生物叢解析に加えて、石室内の土壌動物の生体量の調査なども必要である。

また、真菌ITS領域を標的とした次世代シーケンス解析を行った結果、134,576配列を取得した。これらの配列データのうち相同意97%以上のものは1つのOTUにまとめ、その代表配列を用いたBLAST相同性検索を行い、近縁種を推定した。解析結果を表4に示す。

代表配列は4つの門に分布しており、特にAscomycota門が優占していた (76.7%)。そのほかZygomycota門 (20.9%)、Basidiomycota門 (0.2%)、Mucoromycota門 (0.2%) が検出された。

Ascomycota門で最も出現頻度が高かったのは、Sordariomycetes綱に属する*Leptobacillium leptobactrum*に近縁な配列だった (52.9%)。*L. leptobactrum*はポーランドの朽木から分離された菌種であり、土壌、昆虫、他の菌類からの分離報告例が知られている¹³。本種の最適増殖温度は18-21°Cで、30°Cでは生育しない¹³。また、本種は西アルプスの蛇紋岩表面からも分離されており、石材表面で石材の風化作用を促進することが報告されている¹⁴。

次に出現頻度が高かったのは、Eurotiomycetes綱に属する*Exophiala angulospora*に近

表3 次世代シーケンス解析による微小剥落片の細菌叢

分類		属	種	出現頻度 ^a (%)
Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium vulgare</i>	10.0
		<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium hollardicum</i>	0.1
		<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i>	0.1
		<i>Pedomicrobium</i>	<i>Pedomicrobium australicum</i>	0.1
		<i>Pedomicrobium</i>	<i>Pedomicrobium austroafricanum</i>	0.1
	Phyllobacteriaceae	<i>Arsenociticia</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	0.1
		<i>Phyllobacterium</i>	<i>Phyllobacterium myxococcacearum</i>	0.1
		<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium silmarinense</i>	0.3
		<i>Lahrens</i>	<i>Lahrens wissensvitis</i>	0.3
		<i>Starkeya</i>	<i>Starkeya</i>	0.1
Alphaproteobacteria	Rhizobacteraceae	<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer autharcensis</i>	0.4
		<i>Kustia</i>	<i>Kustia granata</i>	0.1
		<i>Methyloterrula</i>	<i>Methyloterrula stellata</i>	0.3
		<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium retinaceae</i>	0.1
		<i>Rosea</i>	<i>Rosea adriyi</i>	0.1
	Rhodospirillaceae	<i>Nordelia</i>	<i>Nordelia oligonobilis</i>	12.4
		<i>Pseudorhodobacter</i>	<i>Pseudorhodobacter stinusversicoli</i>	0.2
		<i>Shermanniella</i>	<i>Shermanniella rosa</i>	0.1
		<i>Elisera</i>	<i>Elisera cyanobacteriorum</i>	0.1
		<i>Dugesiella</i>	<i>Dugesiella mobilis</i>	0.1
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Kravatella</i>	<i>Kravatella traminifoli</i>	1.0
		<i>Reynella</i>	<i>Reynella soli</i>	0.1
		<i>Acidithiobaculum</i>	<i>Acidithiobaculum foliolumquatile</i>	0.1
		<i>Arboreococcus</i>	<i>Arboreococcus bini</i>	1.8
		<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas korensis</i>	0.5
	Sphingomonadales	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas jaspsi</i>	0.3
		<i>Sphingopyxis</i>	<i>Sphingopyxis panterae</i>	0.1
		<i>Amaricoccus</i>	<i>Amaricoccus panterae</i>	0.1
		<i>Astrobaacter</i>	<i>Astrobaacter amaricoccus</i>	0.1
		<i>Austobacter</i>	<i>Austobacter aquatilis</i>	0.1
Rhodobacterales	Sphingomonadaceae	<i>Arbutobacter</i>	<i>Arbutobacter pauciholophilus</i>	0.1
		<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus variegatus</i>	0.1
		<i>Cabelleria</i>	<i>Cabelleria mediterranea</i>	0.9
		<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium thermophilum</i>	0.2
		<i>Variovorax</i>	<i>Variovorax gummigenes</i>	0.1
	Caulobacterales	<i>Fishbacter</i>	<i>Fishbacter</i>	0.1
		<i>Sulfitobacter</i>	<i>Sulfitobacter</i>	0.2
		<i>Nereisba</i>	<i>Nereisba persephone</i>	0.2
		<i>Pinacegrimonas</i>	<i>Pinacegrimonas persicia</i>	0.5
		<i>Pseudobacter</i>	<i>Pseudobacter</i>	1.4
Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Thiobacillus</i>	<i>Thiobacillus sulfidiphilus</i>	0.5
		<i>Thiuronium</i>	<i>Thiuronium lanzenii</i>	0.2
		<i>Pectinibacter</i>	<i>Pectinibacter aquaticus</i>	0.1
		<i>Thiobacillus</i>	<i>Thiobacillus</i>	0.1
		<i>Sinobacteraceae</i>	<i>Sinobacteraceae</i>	0.2
	Xanthomonadales	<i>Pinacegrimonas</i>	<i>Pinacegrimonas</i>	0.5
		<i>Thiobacillus</i>	<i>Thiobacillus</i>	0.1
		<i>Thiuronium</i>	<i>Thiuronium lanzenii</i>	0.2
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.1
		<i>Methylotoccus</i>	<i>Methylotoccus capsulatus</i>	0.1
Proteobacteria	Thiotrichales	<i>Beggiatoa</i>	<i>Beggiatoa alba</i>	0.2
		<i>Pseudothiomyces</i>	<i>Pseudothiomyces</i>	0.1
		<i>Haliangium</i>	<i>Haliangium</i>	0.1
		<i>Haliangium</i>	<i>Haliangium</i>	0.1
		<i>Kofleria</i>	<i>Kofleria</i>	0.1
	Xanthomonadales	<i>Cladophores</i>	<i>Cladophores</i>	0.2
		<i>Racenitopsis</i>	<i>Racenitopsis</i>	0.2
		<i>Phascolomyces</i>	<i>Phascolomyces</i>	0.1
		<i>Phascolomyces</i>	<i>Phascolomyces</i>	0.1
		<i>Sandaracinus</i>	<i>Sandaracinus</i>	0.1
Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	<i>Pelobacter</i>	<i>Pelobacter acetyligenicus</i>	0.4
		<i>Pelobacter</i>	<i>Pelobacter carbinolicus</i>	0.1
		<i>Desulfuromonadaceae</i>	<i>Desulfuromonadaceae</i>	0.1
		<i>Desulfuromonadaceae</i>	<i>Desulfuromonadaceae</i>	0.1
		<i>Desulfuromonadaceae</i>	<i>Desulfuromonadaceae</i>	0.1
	Myxococcales	<i>Myxococcus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	0.1
		<i>Myxococcus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	0.1
		<i>Myxococcus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	0.1
		<i>Myxococcus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	0.1
		<i>Myxococcus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	0.1

属			分類階級	出現頻度* (%)
Bacteroidetes				
Chitinophagia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	<i>Geobacter</i>	0.2
		Syntrophobacteraceae	<i>Desulfomamillales</i>	0.1
		Syntrophobacteraceae	<i>Desulfovibrionales</i>	0.1
	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrionales</i>	0.1
		Chitinophagaceae	<i>Desulfonatromonadaceae</i>	0.4
		Chitinophagaceae	<i>Arribacter</i>	0.5
		Chitinophagaceae	<i>Chitinophaga</i>	0.1
		Chitinophagaceae	<i>Chitinophagaceae</i>	0.1
		Chitinophagaceae	<i>Flaminibacter</i>	0.3
		Chitinophagaceae	<i>Flaminibacter solitarius</i>	0.3
Bacilli	Cytophagia	Cytophagales	<i>Flaminibacter</i>	0.1
		Sphingobacteriales	<i>Turbacilla</i>	0.2
	Sphingobacteria		<i>Turbacilla borealis</i>	0.2
Firmicutes	Bacilli		<i>Terrimonas</i>	1.0
			<i>Chryseolinea</i>	0.2
			<i>Chryseolinea thermeus</i>	0.2
			<i>Otakamunegia</i>	0.2
			<i>Otakamunegia koreensis</i>	0.2
			<i>Mucilaginibacter</i>	0.1
			<i>Pantothilus</i>	0.1
			<i>Pantothilus frigidus</i>	0.2
			<i>Pantothilus</i>	0.2
			<i>Pantothilus kuroense</i>	0.1
			<i>Pantothilus</i>	0.1
			<i>Cohnella</i>	0.3
			<i>Bacillus</i>	0.3
			<i>Bacillus</i>	0.2
			<i>Bacillus myoides</i>	0.2
			<i>Salinibacter</i>	0.1
			<i>Thermococcus</i>	0.1
			<i>Thermococcus combescii</i>	0.1
			<i>Desulfotilacium intricatum</i>	0.1
			<i>Pirellula</i>	0.5
			<i>Blastobacterilla</i>	0.2
			<i>Blastobacterilla</i>	0.2
			<i>Bathyphilella</i>	6.6
			<i>Thermatilida</i>	0.4
			<i>Gemmata</i>	1.5
			<i>Gemmata obscuritans</i>	1.5
			<i>Fimbriblobus</i>	2.3
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	3.0
			<i>Limnoglobius</i>	0.3
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.1
			<i>Tubidisharra</i>	0.7
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Limnoglobius</i>	0.2
			<i>Zavarzinella</i>	0.2
			<i>Brennerella</i>	0.1
			<i>Gimesia</i>	0.6
			<i>Rubinibacter</i>	0.

縁な配列だった (16.9%)。*Exophiala*属は日和見病原体として知られており、海産魚または淡水魚からの分離報告例が多く存在する^{15,16,17}。また、少数ではあるものの高松塚古墳やキトラ古墳の石室からも分離されている^{18,19}。本種は高松塚古墳の北壁の黒色部分から検出された*Exophiala angulospora* JCM 28745と高い相同性 (100%) を示しているため、同種が存在している可能性が高いと考えられる。高松塚古墳、キトラ古墳、虎塚古墳は地理的隔離もあるが、同属の種が見つかったことから土壤中にある石室内のような環境を好む真菌類ではないかと考えられた。先述の通り*E. angulospora*は土壤環境からの分離報告例が少なく石材表面への影響は不明であることから、本種の生理学的な諸性質について調査を行う必要がある。

また、*Exophiala*属についてはもう一つの興味深い知見がある。虎塚古墳の保存公開施設内に石室の扉石（南壁、閉塞石）が石室手前の観察室に置かれ保存・公開されている。この扉石には、石室内壁画の保存管理と大きく異なり、2011年まで春と秋の年2回の一般公開後に微生物抑制のための処置として防黴剤が散布されてきた²⁰。しかし、2011年11月の点検時に扉石の下部を中心に粘性のある黒色のバイオフィルムが確認され、目視で明確に分かれる顕著な微生物劣化を受けていた²⁰。クローンライブラリ解析によって、この黒色のバイオフィルムを構成する微生物が*Exophiala* sp. LX M8-6株に近縁の真菌の大発生によるものではないかと報告されている²⁰。

さらに、この*Exophiala* sp. LX M8-6株はもともとフランスのラスコー洞窟にて確認された黒色コロニーから分離された菌株である²¹。ラスコー洞窟壁画では、1960年頃に「緑の病気」として知られる藻類の大発生が壁画上で起こった²¹。これは鑑賞のための人工光が洞窟内に供給されたことで、未発見のままであれば暗い洞窟内では本来存在し得なかった藻類の大発生が引き起こったことに起因する。そして、緑の病気によってラスコー洞窟は1963年に閉鎖されることになった。その後、専門家による窟内環境や微生物のモニタリング調査が行われてきたが、1999年に設備の老朽化に伴って空調機器が新調された翌年に真菌*Fusarium solani*の大規模な発生が起こった²¹。その後3年間の防黴剤の散布が行われていたが、防黴剤の処理から4か月後から真菌のコロニーである黒変部が出現し始めて、2007年になると黒変部が拡大し、それが最も顕著な微生物劣化となった²¹。この黒変部から分離されたのが先述の*Exophiala* sp. LX M8-6株である。

薬剤散布が行われてきた虎塚古墳の扉石とラスコー洞窟での薬剤処理後に顕在化した黒色コロニーで共通して、顕著な微生物劣化を引き起こしていた原因が*Exophiala* sp. LX M8-6株であったことは、古墳環境で常在菌として存在する*Exophiala*属が何らかの理由で増加すると、目視で顕著な微生物劣化として認識できるような状態へと繋がるのかもしれない。それが薬剤散布によって引き起こされている可能性があるため、*Exophiala*属の壁

表4 次世代シーケンス解析による微小剥落片の真菌叢

分類階級						出現頻度* (%)
門	綱	目	科	属	種	
Mucoromycota	Mortierellomycetes	Mortierellales	Mortierellaceae	<i>Linnemannia</i>	<i>Linnemannia amoeboides</i>	0.2
Basidiomycota	Agaricomycetes	Thelephorales	Thelephoraceae	<i>Tomentella</i>	<i>Tomentella longisterigmata</i>	0.2
Zygomycota	Incertae sedis	Mortierellales	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>	<i>Mortierella fatshederae</i>	20.9
				<i>Minimelanolocus</i>	<i>Minimelanolocus curvatus</i>	5.0
	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Exophiala</i>	<i>Exophiala angulospora</i>	16.9
					<i>Exophiala equina</i>	1.0
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Cordycipitaceae	<i>Lecanicillium</i>	<i>Lecanicillium coprophilum</i>	0.2
				<i>Leptobacillium</i>	<i>Leptobacillium leptobactrum</i>	52.9
		Bionectriaceae		<i>Lasionectriopsis</i>	<i>Acremonium pteridi</i>	0.5
	Pezizomycetes	Xylariales	Beltraniaceae	<i>Beltrania</i>	<i>Beltrania pseudorhombica</i>	0.1
				<i>Tarzetta</i>	<i>Tarzetta melitensis</i>	0.1

*出現頻度0.1%以上のOTUを選択し、出現頻度の高低を色の濃淡で示した

画表面における常在菌としての生態学的な役割と薬剤耐性について今後の検討していく必要がある。

V まとめ

本研究では、虎塚古墳壁画から自然落下した微小剥落片に形成されている微生物叢の様態を明らかにすることを目的とし、細菌と真菌を対象とした次世代シーケンス解析を実施した。また、大量の遺伝子情報を得て微小剥落片に存在する微生物群を網羅的に把握することを試みた。その結果、細菌叢ではProteobacteria門のAlphaproteobacteria綱に属する配列が最も多く存在し、その中でも特に*Nordella oligomobilis*に近縁な配列の出現頻度が高いという結果を得た。本種はアメーバ細胞内で増殖することが報告されており、生態学的な特徴が類似する菌群が壁画面での優占種として存在していたのではないかと考えられる。自由生活型アメーバを利用して増殖できる能力を持ったものが優占するという事は逆に言うと、他の微生物はアメーバの捕食によって生体量を減少させていたのではないかと類推される。

また、真菌叢ではAscomycota門Sordariomycetes綱に属する*Leptobacillium leptobactrum*に近縁な配列が最も多く存在した。*L. leptobactrum*は西アルプスの蛇紋岩表面から分離されており、石材の風化作用を促進することが報告されていることから、潜在的な微生物劣化のリスクが高い微生物ではないかと考えられる。

次に出現頻度が高かったのは、*Exophiala angulospora*に近縁な配列だった。*E. angulospora*は高松塚古墳、キトラ古墳から検出されているが、土壤環境からの分離報告例が少なく石材表面への影響は不明であることから、本種の生理学的な諸性質について調査を行う必要があると考えられる。

虎塚古墳の石室内では、様々な生物が限られたエネルギー源を巡り複雑に競合している結果として、特定の生物種が卓越しない状態で現地保存されているのではないかと考えている。つまり、見かけ上真菌等が発生していない状態の壁画というのは微生物が全く存在していない状態を指すのではなく、存在はあるが微生物が目視で確認できない状態であり、かつ微生物に起因する物理・化学的な劣化が認識できない程度の量と構成種であるのではないかと考えている。この状態は、人為的攪乱の少ない安定的な環境において長い年月をかけて形成され、微生物叢が極相のような状態に到達し、微生物のバイオマスや群集構造の変化が極めて少ない平衡状態になっているのではないかと推察している。また、微生物叢だけでなく、土壌動物も含めた食物連鎖によって動的な平衡が保たれているものではないかと考えられる。薬剤が及ぼす負の影響には、微生物叢の大きな変化のみならず、より影響を受けやすいと考えられる土壌動物の死滅も関わっているのかもしれない。このような推察を裏付けていくためにも、本研究で得られた微生物叢の情報を用いて、それぞれの生理生化学的特性を推定し、あるいは実験的に確認して石室内の複雑な生物間相互作用を明らかにしていく研究が必要である。また、石室内での細菌や真菌の存在量の調査、さらには石室内に存在する土壌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。今後、石室内の生物群集と物質循環の機序解明に向けた研究が展開され、古墳壁画の現地保存を考えるうえで基礎的な情報が蓄積されていくことに期待する。

註

- 1 勝田市史編さん委員会編 1978 『勝田市史：別編 I 虎塚壁画古墳』
- 2 矢島國雄編 2014 『虎塚古墳の保存科学的研究』 科学研究費補助金研究成果報告書
- 3 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(6), e34. (2001)
- 4 Takai K., Sako Y: A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments, *FEMS Microbiology Ecology*, 28(2), 177-188. (1999)
- 5 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(4), 327-338. (1999)
- 6 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)
- 7 Gardes M, Bruns T: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2 (2), 113-118. (1993)
- 8 White T, Bruns T, Lee S, Taylor J: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR-protocols a guide to methods and applications*. Edited by:

- Innis MA, Gelfand DH, Sninski JJ, White TJ. San Diego: Academic press, 315–322. (1990)
- 9 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. 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, *Nature Methods*, 7, 335-336. (2010)
- 10 佐藤嘉則・松野美由樹・犬塚将英・稻田健一・矢島國雄 2020 「虎塚古墳の壁画剥落片の微生物群集構造解析」『保存科学』 59 pp. 9-21
- 11 JunPei Zhou, YingQi Gu, ChangSong Zou, and MingHe Mo: Phylogenetic Diversity of Bacteria in an Earth-Cave in Guizhou Province, Southwest of China, *The Journal of Microbiology*, vol. 45, No. 2, 105–112. (2007)
- 12 Bernard la Scola, Lina Barrassi ,Didier Raoult : A novel alpha-Proteobacterium, *Nordella oligomobilis* gen. nov., sp. nov., isolated by using amoebal co-cultures, *Research in Microbiology*, 155 (1), 47–51. (2004)
- 13 Rasoul Zare, Walter Gams: More white verticillium-like anamorphs with erect conidiophores, *Mycological Progress*, 15, 993–1030. (2016)
- 14 Stefania Daghino, Francesco Turci, Maura Tomatis, Mariangela Girlanda, Bice Fubini, Silvia Perotto: Weathering of chrysotile asbestos by the serpentine rock-inhabiting fungus *Verticillium leptobactrum*, *FEMS Microbiol Ecol*, 69, 132–141. (2009)
- 15 Mona Cecilie Gjessing, Marie Davey, Agnar Kvellestad, Trude Vrålstad: *Exophiala angulospora* causes systemic inflammation in Atlantic cod *Gadus morhua*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 96, 209–219. (2011)
- 16 Marcia Saraiva, Max J. Beckmann, Sara Pflaum, Marianne Pearson, Daniel Carcajona, James W. Treasurer, Pieter van Westcorresponding: *Exophiala angulospora* infection in hatchery - reared lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) broodstock, *J Fish Dis*, 42, 335–343. (2019)
- 17 David P Overy, David Groman, Jan Giles, Stephanie Duffy, Mellisa Rommens, Gerald Johnson: *Exophiala angulospora* Causes Systemic Mycosis in Atlantic Halibut: a Case Report, 27, (1), 12-9. (2015)
- 18 文化庁・独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所編 2019 『国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策事業報告書 2 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
- 19 Sugiyama, J., Kiyuna, T., Nishijima, M., An, K. D., Nagatsuka, Y., Tazato, N., Handa, Y., HataTomita, 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)
- 20 佐藤嘉則・木川りか・犬塚将英・森井順之・矢島國雄 2018 「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 pp.67-76
- 21 Lefevre, M, La "maladie verte" de Lascaux, *Studies in Conservation*, 19, 126–156. (1974)

挿図出典

図1：筆者作成

図2：筆者撮影