

機関番号：14602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20300288

研究課題名（和文） 文化財汚染に関与する微生物生態系と揮発性分子の役割に関する  
保存科学的解析研究課題名（英文） Analytical studies on microbial volatile organic compounds  
(MVOCs) and their physiological role in the microbial communities participating  
in the degradation of cultural properties.

研究代表者 鈴木 孝仁 (SUZUKI TAKAHITO)

奈良女子大学・理学部・教授

研究者番号：60144135

研究成果の概要（和文）：

(1) 古墳文化財で報告されてきた、文化財汚染に関わる真菌5属（アスペルギルス属、ペニシリウム属、アクレモニウム属、フザリウム属、アウレオバシジウム属）および放線菌のあわせて23種について、揮発性有機化合物（MVOCs）を実験室内での培養の段階ごとに固相抽出（SPME）成分のガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）で分析し、フィンガープリントデータベースを構築した。さらに、新規に開発した先端計測機器であるイオン・モービリティ・スペクトログラフイ（IMS）検出器を用いて、イオン化したMVOCsを大気中で移動分析してピークとして分離・検出するのに成功し、MVOCsに関するIMSデータベースを新たに構築した。

(2) 古墳などで分離されたカビや放線菌の株、あるいは同等の標準的な株の培養に対して、トビムシが捕食行動あるいは忌避行動や誘因行動がみられるかどうかについてビデオカメラによる小動物の行動解析を中心に行った。その結果、ペニシリウムの摂食が観察され、クラドスポリウムに対して誘因行動がみられるなどの特徴が明らかとなった。

(3) フザリウム・ソラニの放出する MVOCs がアスペルギルス・フミガーツスとペニシリウム・パネウムの増殖を抑制し、胞子の成熟を早めることが同一シャーレ内での共培養による実験から判明した。その原因物質は GC/MS を用いた解析から、フザリウムの放出する 2-ペンタデカノンが胞子成熟因子であり、ベンズアルデヒドがアレロパシー因子であることが示唆され、それぞれの標準物質の気体を培養へ添加する実験によって、これらの示唆が裏付けられた。

(4) 奈良大学との共同研究で、大阪府柏原市にある史蹟高井田横穴の線刻壁画のある壁から我々が分離したカビを用いて、当地と同じ凝灰岩を用いた *in vitro* の生育試験を行った。滅菌蒸留水を用いた培養では栄養分を添加していないにもかかわらず、すべてのカビが生育し、一定の相対湿度以上では胞子形成も確認できた。

研究成果の概要（英文）：

(1) Some microorganisms and their communities play a role of deterioration on cultural heritage materials. Detection of their emergence at an earlier stage allows for reducing risks of the deterioration. Emission of MVOCs seems to be an effective candidate for an indicator of the occurrence of their growth. The MVOCs were collected by solid phase micro extraction (SPME) and analyzed by gas-chromatography/mass spectrometry (GC/MS) from the representative microorganisms relating the deterioration, including five fungal genera (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Fusarium* and *Aureobasidium*) and bacterial *Streptomyces*. We constructed the Finger Print Database (FPD) of MVOCs determined by GC/MS. We succeeded in developing an innovative apparatus detecting MVOCs based on the principle of ion mobility spectrometry. The FPD of MVOCs was also constructed by IMS.

(2) A species of springtail (Collembola) was isolated from soil and its behavior

on the flavor of several fungal species, described above, was analyzed using a video-camera. The springtail was found to feed on *Penicillium*. They did not show a significant feeding attraction or avoidance behavior against those fungi, either. However, obvious attractive one was found to the fungus *Cladosporium*.

(3) The co-culturing system was applied to allow free gas or volatile exchange between the colonies of two fungal species. The effects of *Fusarium solani* volatiles were found on growth and development of the other fungi *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium paneum*. Colonies of *F. solani* were incubated in the same growth chamber as colonies of either *A. fumigatus* or *P. paneum*. Analyzing MVOCs by GC/MS, 2-pentadecanone, emitted from *F. solani*, was suggested as an accelerator of conidiophore development in both *A. fumigatus* and *P. paneum*. However, benzaldehyde from *F. solani*, may be an allelochemical inhibitor of growth against both *A. fumigatus* and *P. paneum*.

(4) As a cooperative research with Prof. Nishiyama at Nara University, we obtained fungal isolates from the Takaida burial cave located at Kashiwara-shi, Osaka, Japan. Using these isolates, the occurrence of growth was investigated by simulation analysis on the process of their growth on the surface of tuff stones in the controlled environment. Fungal growth and the formation of conidia were found on these experiments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：文化財科学・文化財科学

キーワード：文化財、微生物汚染、真菌、微生物由来揮発性分子、トビムシ、GC/MS、IMS  
2-ペンタデカノン、ベンズアルデヒド

1. 研究開始当初の背景

国民の貴重な文化遺産である高松塚古墳やキトラ古墳、また各所で所蔵されている文化財では、カビをはじめとする微生物の汚染により、大きな損傷を受けてきた。これまでの微生物汚染に対する保存科学的対策には、微生物とさらにはそれらを餌とする小動物からなる微生物生態系のもつ多様な機能に対する十分な知識が不足していたことは否めない。

カビなどの微生物発生の初期段階は目視不可能であり、増殖を繰り返すことによって、菌の集団が集落をつくるようになり、初めて微生物の存在が目視できるようになる。カビ

の集落では菌糸体が形成され、多量の子孫を生み出すための胞子（分生子）がさらに菌糸上に形成されて、増殖が加速度的に進行する。さらに、カビを餌として好むダニなどの小動物が動き回ることによって、それらの身体に付着した胞子が移動し、あるいは不消化の胞子が小動物から排泄されたりして、カビの生育範囲が拡大する。そのため、文化財に悪影響を及ぼすカビの大量増殖をいったん許してしまうと、それを根絶することはもはや極めて困難となる。

カビをはじめとする微生物からは多様な二次代謝産物が放出される。分子量が200程度までのものは微生物由来の揮発性有機化

合物 (MVOC) と呼ばれる。

本申請研究では、文化財のおかれる環境下を想定して、そこでの小動物を含む微生物生態系がどのように営まれているのを明らかにするために、微生物がそれぞれの種ごとに特徴的に分泌する MVOC に注目する。そして個々の MVOC が、(1)微生物どうしの密度情報などの信号として使われ、微生物集落を維持・発展させるのに寄与しているのか (クオラム・センシング; 菌密度感知機能)、(2)あるいは他の微生物種に対して抗菌的にはたらいっているのか、さらには(3)自らを餌にしている小動物 (ダニやワラジムシ、トビムシなど) に対する忌避物質や誘因物質となっているのか、といった生理的機能の視点で MVOC の微生物生態系での役割を明らかにし、それらの知見に基づいた新たな防菌対策を含む保存科学的方法を開発することを研究目標とする。

## 2. 研究の目的

これまで高松塚古墳とキトラ古墳の石室内で分離されてきた微生物種は比較的限られており、真菌では土壌由来の 20 種類程度に限られている (佐野千絵 *et al.*, 及び木川りか *et al.*, 「古墳壁画の保存環境に関する研究」2006)。また、報告された小動物もダニ、ワラジムシなど限られた種類である。そこで、以下のような実験を行って、古墳内で営まれる微生物生態系のシミュレーションを行う。

- (1) 石室内で分離された微生物種と同等な株を用い、実験室でそれらが生活史の中のどの時期にどのような MVOC を発生しているのかを、ガスクロマトグラフィ (GC) および高速液体クロマトグラフィ (HPLC) によって明らかにする。
- (2) また 2 種類以上の微生物種を二員培養して、互いに増殖や胞子形成にどのような影響が現れるかを調べ、MVOC のどのような成分がこれらの影響を示す効果があるかどうかを明らかにする。
- (3) 小動物であるトビムシを用い、どの微生物種が餌として食されるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### ①文化財関連の微生物培養からの MVOC の分析

古墳石室などの文化財環境下で分離された微生物株やそれらと同等の株を用いて、実験室内のシャーレの寒天平板上、あるいはペニシリン瓶内で培養し、培養の段階ごとに MVOC を高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) およびガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で分析する。

### ②液体培養で分泌される低分子化合物の同定と生理的機能の解明

文化財関連微生物株について、培養液中に分泌される低分子化合物の同定も試みる。液体培養からの画分が促進効果を示すか、あるいは抑制効果を示すかどうかを、寒天平板培養で生物検定する

### ③文化財関連の微生物生態系に関わる微生物間および小動物との相互作用の解析

小動物のトビムシについて古墳などで分離されたカビや細菌の株、あるいは同等の標準的な株の培養に対して、平板培地上で捕食行動がみられるか、あるいは忌避行動や誘因行動がみられるかどうかについての検討を行う。解析に当たっては、ビデオカメラによる小動物の行動解析を中心に行う。

### ④壁画のカビ汚染のシミュレーションとして、凝灰岩上にカビが生育する条件を検討する。

①から④までの実験やシミュレーションの結果に基づき、文化財保全のための微生物生態系の MVOC の機能に基づいた制御方法を総括的にまとめあげ、文化財保存科学的方法として標準化を試みる。

## 4. 研究成果

①文化財関連の微生物培養からの MVOC の分析: 古墳文化財で報告されてきた文化財汚染に関わる真菌 5 属、および放線菌のあわせて 23 種について、揮発性有機化合物 (MVOCs) を実験室内での培養の段階ごとにガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で分析し、フィンガープリントデータベースを構築した。さらに、*Aspergillus fumigatus*、*A. nidulans*、*Fusarium solani*、*Penicillium paneum*、*P. glabrum* の 5 種に関しては、培養の日経過ごとに MVOCs を詳細に調べ上げた。その結果、2-エチル-1-ヘキサノール、3-オクタノン、2-ウンデカノン、1-オクテン-3-オールは多くのカビに共通して見られること、テルペノイドが種に特異的にみられることが判明した。とくにペニシリウムでは未同定のテルペノイドを含めて多くの種類が特徴的に認められた。これらの結果から、検出される MVOCs の組合せによってカビ種を同定できる可能性を示すことができた。

### ②液体培養で分泌される低分子化合物の同定と生理的機能の解明:

大学所蔵の正倉院御物のレプリカから分離されたペニシリウムには、赤色色素を分泌するものがあつた。分泌された色素による文化財汚染のリスクが示唆された。赤色色素を HPLC で主たるピークになるまで精製したも

のについて抗菌性を調べたところ、一般細菌とカビに抗菌性を示すことが判明した。

③文化財関連の微生物生態系に関わる微生物間相互作用と小動物との相互作用の解析：

キトラ古墳壁画壁に存在が報告されているヒメトビムシは、実験室での飼育が困難であることが判明したため、飼育の容易なシロトビムシを奈良女子大学構内から分離し、モデル小動物として、カビに対して摂食行動や誘因、もしくは忌避行動が見られるかどうかをビデオカメラによる継時的観察によって解析した。さらに誘引行動がカビの放出するMVOCsによるものなのかおづかを調べるため、Y字のステンレス容器に一定の流速でMVOCsを含む大気を流し、MVOCsを含まない対照との比較によって誘引行動を観察した。その結果、6時間までの観察時間内では、クラドスポリウムカビに対してのみ有意な ( $P < 0.001$ ) 誘引行動を示した。このカビは、シロトビムシの生育していた同一環境から分離されたものであることから、MVOCsを介した誘引行動を示すカビ種は、シロトビムシの生態的地位によって限定されていると示唆された。

④文化財関連の微生物間相互作用に関わる生理活性の原因物質に関する解析：

培養の日経過ごとにMVOCsを詳細に調べたカビ種のうち、*A. fumigatus*、*F. solani*、*P. paneum*の3種を用いて、互いの放出するMVOCsがどのような生理的作用を示すのかを調べた。

*F. solani*を貧栄養のツアペック・ドックス (Czpk) 培地上で生育させた場合には、2-Pentadecanoneが主ピークとなり、Benzaldehydeはほとんど検出されなくなった。一方、富栄養であるポテトデキストロース (PD) 培地上で生育させた場合には、Benzaldehydeが顕著なピークとなり、2-Pentadecanoneのピークは減少してむしろわずかに検出できるほどの成分となった。なお、未同定のピークXも現れた (図1)。

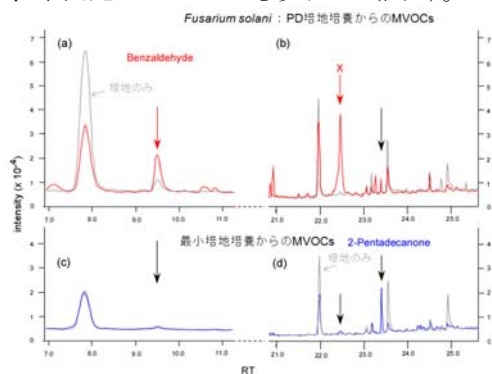


図1.

*F. solani*を35 mm径のCzpk培地で生育さ

せ、35 mm径シャーレに植えた*A. fumigatus* (NW176株)と気相を共有させて共培養したところ、*A. fumigatus*の増殖阻害(集落径の縮小)と分生子の早熟化(集落の中心部分で青色になる)が観察された。*A. fumigatus*の培養に対して*F. solani*のシャーレ数を6倍まで増加させる実験を行ったところ、*A. fumigatus*の増殖阻害はほとんど見られなくなり早熟化は強まった。

また、2-Pentadecanoneの標準物質を*A. fumigatus*、*P. paneum*、および*F. solani*のそれぞれの培養管内にVOCとして拡散させた実験では、*A. fumigatus*で孢子成熟化促進が観察され、*F. solani*では空中菌糸の形成が阻害された。一方、*P. paneum*にはとくに影響は見られなかった。Czpk培地のような貧栄養条件下では、2-Pentadecanoneは*F. solani*だけに放出がみられるMVOCであり、2次元的に成長が行われるこのカビの菌糸成長の段階から、空中菌糸を立ち上げて分生子形成という無性生殖過程に進む際の自己制御物質として機能している可能性が示唆された。

一方、富栄養条件にあるPD培地で生育させた場合には、*F. solani*のMVOCsには、未同定のXとBenzaldehydeが顕著なピークとして現れ、共培養実験の結果からは*F. solani*が*A. fumigatus*の増殖阻害を起こすことが観察された。Benzaldehydeは*F. solani*に放出がみられ、*A. fumigatus*と*P. paneum*では検出できないこと、Benzaldehydeの標準物質を*A. fumigatus*、*P. paneum*、および*F. solani*のそれぞれの培養管内にVOCとして拡散させた実験では、*P. paneum*に対しては孢子の発芽を抑制し、*P. paneum*、および*F. solani*に対しては孢子の発芽抑制と共に菌糸成長の抑制も観察された。もともと放出がみられる*F. solani*では、成長の自己抑制物質として機能している可能性が示唆される。PD培地で十分に生育させた*F. solani*と、孢子を植えた*F. solani*を同一のシャーレで気相を共有させて共培養したところ、孢子を植えた*F. solani*の培養で増殖が抑制されたことから、成長の自己抑制物質の存在が支持された。

なお、未同定Xに関しては、質量分析データベースを用いて検索しても、同定ができないため、その生理的役割を推定することは困難である。以上から、貧栄養条件下では2-Pentadecanoneを介して無性孢子形成の成熟を促進し、富栄養条件下ではBenzaldehydeを介して成長阻害を起こすことから、これらのMVOCsは他種のカビに対して他感作用を示すと言える。また、貧栄養状態では互いに共生

的 (mutualistic) でありながら、富栄養状態では一方が他方に他感的に抑制をかけるアレロパシーが見られたことから、カビ間のMVOCsを介した相互作用についての研究の必要性が示唆された。これらの成果は、国際微生物学連合 2011 会議 (IUMS、於札幌) で発表予定である。また、欧文誌に投稿中である。

⑤壁面のカビ汚染のシミュレーションとして、凝灰岩上にカビが生育する条件の検討：

平成 20 年 6 月に、我々は奈良大学西山研究質と共同で、古墳時代に造営された高井田横穴 (大阪府柏原市、国指定史跡) において微生物採取を行い、38 分離体 14 属のカビを同定した。そのうち線刻壁面を中心に広範囲で検出された *Penicillium* 属 2 種 (*P. citreonigrum*、*P. micynskii*) と *Trichoderma* 属 2 種 (*Trichoderma atroviride*、*Trichoderma virens*) を用いて、玉手山凝灰岩と大谷凝灰岩の 2 種類に、孢子懸濁液と滅菌蒸留水、あるいは Czpk 培地を凝灰岩片に滴下し、28°C で 7 日間培養した。任意の相対湿度を得るためには、グリセリン濃度を変えて凝灰岩片を入れたシャーレ内に加え、平衡化しておいた。滅菌蒸留水を用いた培養では栄養分を添加していないにもかかわらず、すべてのカビが生育し、孢子形成が確認できた。相対湿度をコントロールした試料では、*P. citreonigrum* は RH80% でも菌糸成長が認められたが、孢子形成は確認できなかった。*P. micynskii* は大谷凝灰岩上では RH80% でも孢子形成が確認できた。湿性カビとされる *Trichoderma* 属では *T. atroviride* が RH90% で大谷凝灰岩上でわずかに生育が認められたほかは生育はなく、2 属間の耐乾性には大きな差がみられた。これらの成果は、奈良大学との共同研究として、日本文化財科学会第 28 回大会で発表予定である。

⑥文化財保全のための微生物生態系の制御方法の総括と標準化の試み：

この 3 年間の科学研究の結果として、カビ生育の検出指標として、MVOCs が有効であることが判明した。現在、研究分担者の竹内孝江を中心にして、同定のためのソフトウエアを開発中である。また、GC/MS 機器はガスクロマトグラフィ用のヘリウムガスボンベと質量分析のための真空ポンプが必要なため、携帯可能で小型化することが困難である。そのため新規な先端計測・分析機器として IMS 機器を利用する試みも行った。カビ由来の MVOCs に対応するピークも得られており、この機器を文化財環境で応用する可能性を提示できた。MVOCs を介した微生物間相互作用が本研究で明らかにできたので、実際の

文化財環境下で微生物生態系がどのように維持されているかを知る足がかりが得られたと言える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Takae Takeuchi, Haruna Tanaka, Tomoko Kimura, Shouko Ichii, Masako Iwamatsu, Sachiyo Kaneko, Masato Kiuchi and Takahito Suzuki (2011). Characterization of the soil-derived fungi based on mass spectrometric analysis of their microbial volatile organic compounds. *Proceedings of the 8th international symposium on atomic level characterizations for new materials and devices* (2011), Seoul, republic of Korea. 査読有

② Joji Ohshita, Yosuke Hatanaka, Shigenori Matsui, Tomonobu Mizumo, Yoshihito Kunugi, Yoshihito Honsho, Akinori Saeki, Shu Seki, Julius Tibbelin, Henrik Ottosson and Takae Takeuchi (2010). Effects of the silicon core structures on the hole mobility of star-shaped oligothiophenes. *Dalton Trans.*, **39**, 9314-9320. 査読有

③ Suzuki, Takahito, Keita Kono, Shu-ichi Tawara, Takaji Fujimura, Takuya Ito, Kazuo Omi, Kaoru Ohbuchi, Yasuhiko Komatsu, Shuichi Sakaguchi and Teiji Kamihara (2010) "Unique profiles of changes in cell membrane fluidity during ethanol-induced yeast to pseudohypha transition in *Candida tropicalis*." *Journal of General and Applied Microbiology*, **56**, 321-329. 査読有

④ Michiko Tajiri, Takae Takeuchi and Yoshinao Wada (2009). Distinct Features of Matrix-Assisted 6  $\mu$ m Infrared Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Biomolecular Analysis, *Anal. Chem.*, **81**, 6750-6755. 査読有

⑤ Akinobu Naka, Yoshiaki Matsumoto, Tatsuya Itano, Kei Hasegawa, Tomoaki Shimamura, Joji Ohshita, Atsutaka Kunai, Takae Takeuchi and Mitsuo Ishikawa (2009).

Nanosized starlike molecules. Synthesis and optical properties of tris- and tetraakis[oligo(disilanyl)enebithienylene]dimethylsilyl]benzene, *J. Organomet. Chem.*, **694**, 346-352. 査読有

⑥ Sachiyo Kaneko, Haruna Tanaka, Tomoko Kimura, Takae Takeuchi, Masato Kiuchi, Shin-ichi Iwaguchi, Koji Yokoyama and Takahito Suzuki (2009). Microbial volatile organic compounds (MVOCs) and their presumed physiological role for growth regulation in the soil-derived fungal organisms. *In Papers of JSPS-IIAS Joint International Symposium on Conservation Technology for Cultural Heritage, held at the International Institute for Advanced Studies, Kyoto*, pp. 46-51. 査読無

[学会発表] (計 6 件)

① 金子幸代、田中春菜、竹内孝江、木内正人、岩口伸一、鈴木孝仁「カビの他感作用物質としての2-Pentadecanone」日本植物学会第74大会 (2010/9/9) 於中部大学

② 鈴木孝仁、宮水晶、上原梢、松井咲「乾燥固形物表面に生える好乾燥性カビ *Eurotium* のデジタル顕微鏡による解析」日本植物形態学会第22大会 (2010/9/8) 於中部大学

③ Takae Takeuchi, “Characterization of fungi using SPME-GC/MS of MVOCs emitted from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani* and *Penicillium paneum*.”、The 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. (2010/5/30), Salt Lake City, Colorado, USA.

④ Mamoru Okubo ほか7名, T. Suzuki (8番目) “Development of the portable mold-derived odor detecting system based on IMS technique for preventing the deterioration of the cultural properties.” The 18th International Conference on Mass Spectrometry (2009/9/2) Bremen, Germany

⑤ Iwaguchi Shin-Ichi, “Profile of microbial volatile organic compounds (MVOCs) in *Aspergillus fumigatus*.”

The 17th Congress of International Society for Human and Animal Mycology (2009/5/29) Tokyo.

⑥ Takahito Suzuki, “The occurrence of ploidy-shift may be due to aberration of chromosome 5 in *Candida albicans*” The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, (2009/5/29) Tokyo.

[図書] (計 2 件)

① 高等研報告書 1006 「文化財保全技術」研究代表者 志水隆一、財団法人高等研究所、分担執筆、116 頁 (2011)

② 「文化財保全技術」に関する先導的研究開発委員会活動終了報告書 (委員長 志水隆一)、独立行政法人日本学術振興会、分担執筆、81 頁 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：ナラノヤエザクラの花から分離した酵母、この酵母を用いた清酒の製造方法及びその他の飲食物の製造方法

発明者：鈴木孝仁、岩口伸一、松澤一幸、清水浩美、大橋正孝、都築正男

権利者：奈良県および国立大学法人奈良女子大学

種類：特許

番号：特願 2009-004951

出願年月日：平成 21 年 1 月 13 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木孝仁 (Suzuki Takahito)

奈良女子大学・理学部・教授

研究者番号：60144135

(2) 研究分担者

竹内孝江 (Takeuchi takae)

奈良女子大学・理学部・准教授

研究者番号：80201606

(3) 研究分担者

岩口伸一 (Iwaguchi shin-ichi)

奈良女子大学・理学部・教授

研究者番号：40263420