

機関番号：82620
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19200057
 研究課題名（和文） 高松塚古墳壁画劣化要因微生物の遺伝・表現形質等基礎データの総合的構築
 研究課題名（英文） Integrated construction of genotypic and phenotypic data of microorganisms relating to the cause of deterioration of the Takamatsuzuka Tumulus mural paintings
 研究代表者
 佐野 千絵（SANO CHIE）
 独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存修復科学センター・保存科学研究室長
 研究者番号：40215885

研究成果の概要（和文）：

微生物の侵入経路や劣化機構解明には古墳内の微生物環境全体を把握することが重要である。高松塚古墳壁画汚染微生物群について遺伝子塩基配列解析等による種レベルの同定を行った。主要な壁画汚染微生物はフザリウム属、トリコデルマ属、暗色系アクレモニウム属、ペニシリウム属であり、バイオフィームからはカビに加え酵母や細菌も分離した。得られた分離株およびそれらの塩基配列は微生物株保存機関または公共データベースに寄託し研究的に利用できるよう整えた。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to investigate the microbial diversity which was involved in the biodeterioration of murals in the Takamatsuzuka Tumulus. To elucidate the cause of biodeterioration, we carefully identified using an integrated analysis of phenotypic and genotypic characters. The major bacterial isolates were also identified at the generic level using the same methodology. As a result, the major fungal taxa relating to biodeterioration of murals were assignable to *Fusarium solani* species complex, some *Trichoderma* spp., *Acremonium* (sect. *Gliomastix*) *masseei* and *Penicillium paneum*. Some *Candida* and *Pichia* and bacterial species in addition to molds species were involved in the formation of biofilms on plaster walls. The selected isolates and their DNA sequences determined in this study were deposited in the public culture collection and public gene bank, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2008 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：文化財保存環境学

科研費の分科・細目：文化財科学・文化財科学

キーワード：微生物、バイオリソース、遺伝子、古墳壁画、漆喰、劣化

1. 研究開始当初の背景

高松塚古墳とキトラ古墳には、日本ではわずか2例しか発見されていない古墳を装飾する漆喰壁画があるが、高松塚古墳では微生物

物による劣化が進み 2007 年に解体された。微生物の侵入経路や劣化機構を学術的に解明することは重要であり、「漆喰と微生物」との関係について検討することが必要であ

った。

歴史的遺産の微生物による劣化研究はこれまで、形態分類に依存し属レベルまでの報告が多く、劣化要因微生物の詳細な検討ができず、一般的な微生物対策にとどまる処置しか行えなかった。加えて高松塚古墳内は外界と比較的隔離されており、漆喰というアルカリ性基質上での微生物繁殖という特殊な条件がそろっていることから、新規微生物の発見も推定された。

そのため本研究では、遺伝子塩基配列を基にした分子系統分類手法を採用し、遺伝・表現両形質を統合的に解析して種レベルの同定を行い、現地で当時採用された微生物劣化対策を受けて微生物相 (microbiota) がどのように変化していったか、微生物相の変遷について明らかにすることとした。

2. 研究の目的

高松塚古墳壁画等汚染微生物群を総合し、遺伝形質データ (特に遺伝子塩基配列) 解析による種レベルの同定を行い系統分類学的位置を明らかにし、微生物劣化対策立案の基礎資料を総合的に構築することを目的として、以下の4つの観点から行った。

- 1) 劣化要因微生物の遺伝子配列解析による種レベルでの同定
- 2) 分離株公開化のための調査研究
- 3) 劣化要因微生物の特性調査
- 4) 劣化要因微生物の栄養源に関する調査

3. 研究の方法

- 1) 劣化要因微生物の遺伝子配列解析による種レベルでの同定

高松塚古墳・キトラ古墳石室内の主要な優占菌類群の *Fuzarium* 属、*Trichoderma* 属、*Penicillium* 属、暗色系 *Acremonium* 属について、形態観察および遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析を行い、遺伝・表現両形質の統合的解析から種レベルの同定を行った。また、酵母・細菌のうち主要な分離株についても、同様の手法による種 (酵母) もしくは属 (細菌) レベルでの同定をおこなった。

また微生物の侵入経路について情報を得るため、平成 18 年度に行われた石室解体のための発掘調査に合わせて、培養法・形態観察の定法に加えて、細菌については非培養法である群集解析も行い、微生物相の解析を進めた。多数の分離株の同定であり、短期間に安全に、かつコンタミネーションなく取り扱うことは研究所内では困難であったため、高松塚・キトラ保存委員会委員の杉山純多東京大学名誉教授の指導の下、(株) テクノスルガ・ラボ NCIMB グループの研究者らが協力者として参加した。

- 2) 分離株公開化のための調査研究

いずれの微生物分離株についても、再試験

や公開試験への提供にそなえるための保存菌株作成は、文化庁予算あるいは文化庁受託事業で準備された。公開微生物株として寄託するために必要な生理特性試験や詳細同定については、本研究経費で行った。

- 3) 劣化要因微生物の特性調査

微生物が産生する代謝物の石材や漆喰への影響について検討するには、各古墳から分離された微生物の生物学的特徴 (バイオプロフィール) の調査が重要であると考え、分離・同定した微生物株に加え、微生物株保存機関から入手した公知の保存菌株を培養し、代謝物中の有機酸について HPLC で定量した。

- 4) 劣化要因微生物の栄養源に関する調査

発掘・解体作業の際に、石室を構成する石の目地に膠着剤として使われていた漆喰上に、おびただしいカビの発生がみられる箇所が多数認められた。そこで目地漆喰に栄養分としての有機物 (糖・脂肪酸・アミノ酸) がどの程度含まれているのかを GC-FID で定量した。

4. 研究成果

- 1) 劣化要因微生物の遺伝子塩基配列解析による種レベルでの同定

得られた分離株の解析は、石室内における時系列でみた菌類相 (mycobiota) の変遷および石室内とその周辺環境の試料採取箇所別 (壁石間、石室外、取合部、墳丘部) でまとめた。

2005 年の墳丘部の冷却開始以降、石室内の温度低下が進み、それ以前の優占菌類群の一つの *Trichoderma* 属が衰退し、代わって暗色系 *Acremonium* 属へと変化していた。西壁女子群像の“黒いしみ”など石室内環境から総計 32 株の暗色系アクレモニウム、*Acremonium* 属 *Gliomastix* 節に属する仲間が分離された。分離株の培養性状、形態学的特徴、ITS および 28S rDNA-D1/D2 領域の塩基配列に基づく分子系統解析の結果、高松塚古墳の分離株は同一分類群であり、*A. massei* と同一クラスターを形成した。これらの結果から高松塚古墳石室内の“黒いしみ”は *A. massei* によるものと明らかにした。

石室内における優占種の一つとして *Penicillium paneum* が分離・同定された。*Penicillium paneum* について、文化財の生物劣化に係わるはじめての分離報告例となった。

2005 年夏以降に石室内で発生した粘性ゲル状の物質 (バイオフィルム) からは、子嚢菌系酵母の 2 既知種 (*Pichia guilliermondii*, *P. membranifaciens*) および 2 新種 (*Candida takamatsuzukensis*, *Candida tumulicola*) を検出し、同定した。

土壌試料等から混合 DNA を抽出して

PCR-DGGE 法によって試料中に存在する微生物群集解析を行った。また培養法による細菌相 (bacteriobiota) の比較を試みた。16S rDNA 塩基配列解析に基づく系統解析ならびに主要な表現型形質の比較解析の結果、*Ochrobactrum* 属の結果、*Ochrobactrum* 属、*Bacillus* 属、*Stenotrophomonas* 属、*Actinobacteria* 綱などの細菌が分離株の優占種であった。PCR-DGGE による解析結果でも培養法の結果をほぼ支持し、上述の分類群が優占種として検出されたが、このほかに培養法では検出されなかった *Acidobacteria* 門、*Chloroflexus* 門などが認められた。

石室内の壁画劣化に関与する微生物の汚染経路には石室の入口の他に、石室周辺の土壌環境など、複数の侵入経路が存在する可能性が示唆された。

2) 分離株公開化のための調査研究

これまでに詳細同定を終えている微生物分離株について保存法の検討を行った上で、JCM, CBS, NBRC, TNS などの国内外の公的な微生物株保存機関やハーバリウムに基準株 (type strain) および基準標本 (type specimen) を含む総計 112 株を寄託した。順次公開されている。

3) 劣化要因微生物の特性調査

主要なカビとして分離された *Fusarium* 属、*Acremonium* 属、*Penicillium* 属、*Trichoderma* 属、*Phialocephala* 属の分離株を用いて、分離株の有機酸産生能試験を行った。高松塚古墳からの *Fusarium* 属分離株およびその近縁対照株で顕著な酢酸生成が認められた。次いで *Acremonium* 属 (*Gliomastix* 節) 分離株で比較的酢酸の生成が多く見られたが、*Penicillium* 属、*Trichoderma* 属などの分離株や保存株では酢酸の生成はほとんど認められなかった。このほか、酵母 *Pichia membranifaciens* で特に顕著な酢酸生成が認められ、*Ochrobactrum* 属細菌分離株などでも酢酸生成が確認された。これらの微生物による pH 低下を引き起こす可能性が示唆された。総有機酸量と液体培地の総有機酸量と液体培地の pH 低下量とは比較的相関が認められた。

4) 劣化要因微生物の栄養源に関する調査
石室目地で膠着剤として用いられた漆喰材料中の有機物について、糖・脂肪酸、アミノ酸の定量分析を進め、漆喰中には微生物が生育可能な栄養源が存在すること、西壁南寄りの目地などいくつかの場所で、有機物組成が他の目地とは異なっていることを明らかにした。また、ATP 発光量から微生物汚染度を把握し、場所による微生物汚染程度に多少の差があることを明確にした。また C, N, O 同位体比を指標として有機物の移動や原材料把握などの調査を進めた。

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) Molecular assessment of fungi in “black spots” that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp. nov. and *Acremonium felinum* comb. nov., (Tomohiko Kiyuna, Kwang-Deuk An, Rika Kigawa, Chie Sano, Sadatoshi Miura, Junta Sugiyama), Mycoscience, 52, pp.1-17(2011) 査読あり

2) 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, (佐野千絵・西島美由紀・喜友名朝彦・木川りか・杉山純多), 『保存科学』, 49 pp.209-220(2010) 査読あり

<http://www.tobunken.go.jp/~hozon/pdf/49/4921.pdf>

3) The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*, (Kwang-Deuk An, Tomohiko Kiyuna, Rika Kigawa, Chie Sano, Sadatoshi Miura, Junta Sugiyama), Antonie van Leeuwenhoek, 96, pp.579-592(2009) 査読あり

4) *Candida tumulicola* sp. nov. and *Candida takamatsuzukensis* sp. nov., novel yeast species assignable to the *Candida membranifaciens* clade, isolated from the stone chamber of the Takamatsuzuka tumulus, (Yuka Nagatsuka, Tomohiko Kiyuna, Rika Kigawa, Chie Sano, Sadatoshi Miura, Junta Sugiyama), International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, pp.186-194(2009) 査読あり

5) Mycobiota of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, focusing on the molecular phylogenetic diversity of *Fusarium* and *Trichoderma*, (Tomohiko Kiyuna, Kwang-Deuk An, Rika Kigawa, Chie Sano, Sadatoshi Miura, Junta Sugiyama), Mycoscience, 49, pp.298-311(2008) 査読あり

6) 高松塚古墳発掘・解体作業に伴う生物調査の概要について, (木川りか・杉山純多・高島浩介・間渕創・佐野千絵・三浦定俊), 『保存科学』, 47, pp.121-128 (2008) 査読あり

<http://www.tobunken.go.jp/~hozon/pdf/47/4712.pdf>

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) 高松塚古墳壁画やキトラ古墳壁画に危害をもたらすカビとは？, (杉山純多), 日本菌学会・日本防菌防黴学会合同シンポジウム「文化財の生物劣化を防ぐための菌類科学の挑戦」, 東京, 2010.11.27
- 2) Mycobiota in the stone chamber interior and its neighboring environment of the Takamatsuzuka Tumulus in Nara, Japan: Insight into biodeterioration of mural paintings and plaster walls, Junta Sugiyama, Tomohiko Kiyuna, Kwang-Deuk An, Yuka Nagatsuka, Rika Kigawa, and Chie Sano, 1 - 6 August 2010, The Biology of Fungi (IMC9) Edinburgh, UK
- 3) 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, (佐野千絵, 西島美由紀, 喜友名朝彦, 木川りか, 杉山純多), 日本文化財科学会, 吹田, 2010.6.24-25
- 4) 漆喰材料の水分特性の比較研究, (林美木子, 佐野千絵, 石崎武志), 日本文化財科学会, 吹田, 2010.6.24-25
- 5) 高松塚古墳石室内およびその周辺環境における菌類相と壁画の生物劣化との関わり, (喜友名朝彦), 安光得, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊, 杉山純多), 日本菌学会第54回大会, 東京, 2010.5.29-30
- 6) キトラ古墳石室内より分離された酢酸菌 2 新種および二、三の系統分類学的問題 (立里臨, 半田豊, 西島美由紀, 木川りか, 佐野千絵, 杉山純多) 第 19 回日本微生物系統分類研究会年次大会, 木更津, 2009.11.12-13
- 7) Surface condition of the murals of the Takamatsuzuka tumulus investigated by observation techniques, (Naoto Yoshida, Yosei Kozuma, Junko Fuirihata, Yoshikazu Tsujimoto, Yasuhiro Hayakawa, Chie Sano, Sadatoshi Miura, Takayasu Koezuka, Shigemasa Udagawa), 東アジア文化遺産保存学会第 1 回大会, 2009.10.17-19, 北京(中国)
- 8) 国宝高松塚古墳壁画の材料調査の変遷, (佐野千絵, 早川泰弘, 三浦定俊), 日本文化財科学会第 26 回大会 2009.7.11-12 名古屋
- 9) 国指定史跡「屋形古墳群」珍敷塚古墳保存施設内の温湿度環境, (佐野千絵, 三浦定俊), 文化財保存修復学会第 31 回大会, 09.6.13-14, 倉敷
- 10) 微生物繁殖状況モニタリングとしての室内大気分析の有効性 (佐野千絵・間淵創), 室内環境学会2008年度大会, 東京, 2008.12.1-2
- 11) 高松塚古墳の石室解体中に採取された試料の細菌群集解析 (西島美由紀, 富田順子, 中村葵, 下村謙悟, 立里臨, 半田豊, 喜友名朝彦, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊, 杉山

純多), 第24回日本微生物生態学会, 札幌, 2008.11.26-27.

12) 高松塚・キトラ両古墳石室内壁画面に発生した“黒いしみ”の正体 (喜友名朝彦, 安光得, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊, 杉山純多) 日本菌学会第52回大会, 三重, 2008.5.30-6.1.

13) 高松塚・キトラ古墳から分離した主要な *Penicillium* spp. の分子系統解析法の評価: 菌類 DNA バーコード化に向けて (安光得, 喜友名朝彦, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊, 杉山純多), 日本農芸化学会 2008 年度 (平成 20 年度) 大会, 名古屋, 2008.3.26-29 日

14) 高松塚古墳・キトラ古墳石室の微生物調査: 漆喰壁画の生物劣化にかかわる原因究明の一里塚 (杉山純多, 喜友名朝彦, 安光得, 小出知己, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊), 第 31 回文化財の保存と修復に関する国際研究集会, 東京, 2008.2.6

http://www.tobunken.go.jp/~hozon/publications/symp2008/int'l-symposium_2008_sugiyama.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 千絵 (SANO CHIE)

独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存修復科学センター・保存科学研究室長

研究者番号: 40215885

(2) 研究分担者

木川 りか (KIGAWA RIKI)

独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存修復科学センター・生物科学研究室長

研究者番号: 40261119

(3) 連携研究者 なし