

石人山古墳装飾石棺表面に形成した着生生物群集の構造解析

佐藤 嘉則・西澤 智康・小沼 奈那美・犬塚 将英・森井 順之・
木川 りか・朽津 信明

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

〔報文〕 石人山古墳装飾石棺表面に形成した 着生生物群集の構造解析

佐藤 嘉則・西澤 智康*・小沼 奈那美*・犬塚 将英・森井 順之・
木川 りか**・朽津 信明

1. はじめに

福岡県広川町に所在する国指定史跡・石人山古墳は、5世紀前半に築造された前方後円墳であり、後円部中心に横口式家形石棺と前方部と後円部の境には武装石人が置かれた古墳である¹⁾。阿蘇溶結凝灰岩で作られた石棺の棺蓋表面や横口部には、直弧文や同心円文などの彫刻文様が浮彫されている。石棺には、鉄筋コンクリート製の保護覆屋が設けられており、西側に鉄格子の扉と東側の側壁上部に小窓を有している。石棺は常時公開されており、西側から鉄格子の扉を通して石棺を自由に見学することができるが、西側が大きく開口しているために、ここから日射や風雨の影響が石棺に及んでいると考えられる。朽津ら(2015)は、石棺の西側で顕著な風化が認められ、浮彫の凹凸が一部で不明瞭になっていること、加えて石棺西側面の広範囲にわたって緑色の着生生物が分布しており、この部分の文様の認識が最良でない状態になっていることを保存と活用上の課題として指摘している²⁾(図1)。

石棺の西側面の顕著な風化については、過去の保存履歴も含めて慎重に議論していく必要があるため、西側が大きく開口している現在の保護覆屋に原因を帰結することは不適切と考えられる。その一方で、石棺西側面の緑色の着生生物については、近年になって顕著になってきた問題であること、東側では緑色の着生生物が認められないことから、保存管理上の工夫によって改善できる余地があると考えられる。朽津らは過去に撮影された石棺の写真と状態記録の調査から、現覆屋の完成した1964年以降、2003年に至るまでは、石棺西側面が顕著に緑色の着生生物で覆われた状況はなく、2005年4月になり、僅かに西側下部の一部でその存在が認められ、その後急速に分布が拡大し、2009年頃には現在と大差がない範囲にまで分布が拡大したことを報告している³⁾。つまり、西側面が大きく開口した現覆屋の構造上の問題によって直接的に引き起こされたのではなく、その周辺環境の変化によって緑色の着生生物の繁茂が引き起こされたと推定することができる。緑色の着生生物が、近年急速に拡大した理由について、2004年9月に台風の影響で覆屋西側にある後円部の樹木の枝が折れる被害が起き、墳丘保護および見学者への安全上の配慮から、同年11月にこの樹木について大規模な剪定が行われたという記録がある⁴⁾。剪定によって、これまで樹葉が遮断していた太陽光が石棺の西側面に到達するようになったため、光合成によってエネルギーを得ることができる緑色生物が石棺表面において生育を開始したと推定される。

本研究では、分子生物学的手法を用いて、石人山古墳の装飾石棺の表面に生育した緑色の着生生物群集について、藻類、菌類、細菌類のそれぞれの遺伝子配列を標的にした群集構造解析を行い、その構成生物種を明らかにすることを目的とした。構成生物種の同定によって、例えば、藻類の生態や生育に必要な因子(光量、水分、栄養塩類など)、あるいは藻類への窒素供給

*茨城大学

**九州国立博物館

など共存する微生物群の機能を推測することで、緑色の着生生物群集が生育した原因や今後の生物制御対策を講じるための基礎的な情報になることが期待される。

2. 試料および実験方法

2-1. 試料の採取

2013年7月26日に石人山古墳の石棺の西側面から5箇所(試料番号①, ③, ④, ⑥, ⑩), 東側面から2箇所(試料番号⑧, ⑨)の計7箇所から試料を採取した(図2)。試料採取には、滅菌綿棒(BD BBL™ CultureSwab™ EZ, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を用い、石棺表面を傷つけないように採取箇所に綿球を付着させて数回優しく擦り、綿球に付着した生物試料を回収した。回収後は低温(0-10℃)で輸送した。DNA抽出のための試料は、輸送後から分析に供するまでの間-30℃で冷凍保存した。

2-2. DNA抽出

DNA抽出は、滅菌綿棒で採取した試料を、少量の滅菌生理食塩水に分散させ、遠心分離機で沈殿物を回収した後、DNA抽出キット(ISOPLANT DNA extraction kit, ニッポンジーン)を用いて、常法に従い抽出した。抽出したDNAは、2%(w/v)のアガロースゲル(ノベルサイエンス)で電気泳動を行い、核酸染色剤(GelRed Nucleic Acid Stain, Biotium)でDNAを染色した後に、UV照射下で確認した。

2-3. 藻類・菌類・細菌の群集構造解析

藻類は原核生物の藍藻類や、真核生物で単細胞生物の珪藻、黄緑藻、渦鞭毛藻など、あるいは多細胞生物である紅藻、褐藻、緑藻などの総称であり、分類学的には幅広い生物群である。本研究では、藍藻類と一部の藻類が持つ葉緑体がそれぞれ独自の16SリボソームRNA(rRNA)遺伝子を有していることを利用して、藍藻類と葉緑体に特異的な16S rRNA遺伝子を増幅するプライマーセット³⁾を用いて藻類の群集構造解析を試みた。菌類については、菌類の



図1 石人山古墳の横口式家形石棺

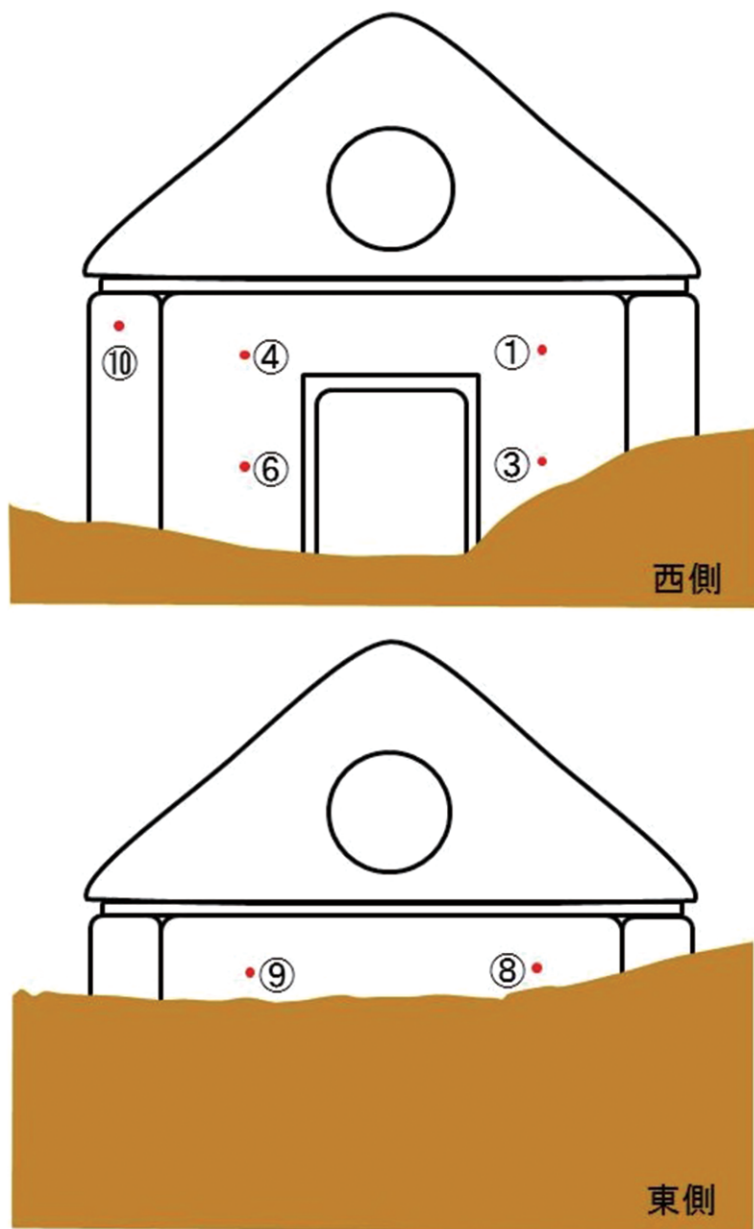


図2 石棺表面の試料採取箇所

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 ITS 領域と略記) を標的とした解析を行った。細菌は、16S rRNA 遺伝子の V1-V3 可変領域を含む領域を標的として解析を行った。

PCR 酵素は、Tks GflexDNA polymerase (タカラバイオ株式会社) または Mighty Amp DNA polymerase (タカラバイオ株式会社) を用い、それぞれの試料から抽出した DNA を鋳型として、以下の条件で行った。

①藻類

プライマーセット：

CYA359F プライマー (5'- GS Junior Titanium adapter - TCAG - sample specific barcode - GGGGAAT [C/T] TTCCGCAATGGG -3')³⁾

CYA781R プライマー (5'- GS Junior Titanium adapter - TCAG - sample specific barcode - GACTAC [A/T] GGGGTATCTAATCCC [A/T] TT -3')³⁾

反応条件：

96°Cで2分間保持した後、98°Cで10秒間、60°Cで1分間、68°Cで1分間を25サイクル後に、68°Cで8分間保持

②菌類

プライマーセット：

ITS5プライマー (5'- GS Junior Titanium adapter - TCAG - sample specific barcode - GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGG -3')⁴⁾

ITS4プライマー (5'- GS Junior Titanium adapter - TCAG - sample specific barcode - TCCTCCGCTTATTGATATGC -3')⁴⁾

反応条件：

96°Cで2分間保持した後、98°Cで30秒間、50°Cで1分間、68°Cで1分間を30サイクル後に、68°Cで8分間保持

③細菌

プライマーセット：

27F プライマー (5'- GS Junior Titanium adapter - TCAG - sample specific barcode - GAGTTTGATC [A/C] TGGCTCAG -3')⁵⁾

518R プライマー (5'- GS Junior Titanium adapter - TCAG - sample specific barcode - [A/T] TTACCGCGGCTGCTGG -3')⁶⁾

反応条件：

96°Cで2分間保持した後、98°Cで10秒間、55°Cで30秒間、68°Cで1分間を30サイクル後に、68°Cで8分間保持

得られたPCR増幅産物を用いて、次世代シーケンサーGS Junior Titanium (ロシュ・ライフサイエンス)によるパイロシーケンシング解析(中外テクノス株式会社)を行った。決定した塩基配列は試料ごとのバーコード配列によって仕分け、配列の相同性が97%以上の条件で一致することを指標にクラスタリング解析を行い、OTU (Operational Taxonomic Unit: 操作的分類単位)に分類した。各OTUから、代表となる塩基配列を選び、公共のデータベース (GenBank/EMBL/DDBJ, あるいはUNITE [http://unite.ut.ee/])に照合(相同性検索: BLAST 検索⁷⁾)し、近縁種を予測した。

3. 結果

3-1. 次世代シーケンスによる遺伝子配列解析

各試料の次世代シーケンサーによる遺伝子配列解析数とOTU数を表1に示した。藻類を標的とした16S rRNA 遺伝子解析では、石棺西側面からの試料: ①, ③, ④, ⑥, ⑩と東側面か

らの試料：⑧の6試料でそれぞれ、163, 2,835, 9,639, 4,464, 693, 1,775配列 (reads) を解読した。試料⑨については、PCRによる増幅産物を得ることが出来なかった。OTUは、配列の相同性が97%以上の条件で分類し、全遺伝子データ数 (read数) に対する出現頻度が5%以上の数をOTU数として表した。試料⑨を除く同試料(石棺西側面からの試料：①, ③, ④, ⑥, ⑩と東側面からの試料：⑧)のOTU数はそれぞれ、1, 3, 1, 2, 1, 1であった。また、菌類のITS領域を対象とした解析では、石棺西側面からの試料：①, ③, ⑥, ⑩と東側面からの試料：⑨の5試料で塩基配列を解読し、それぞれ、1,714 reads (4 OTUs), 4,790 reads (3 OTUs), 2,931 reads (3 OTUs), 2,996 reads (2 OTUs), 77 reads (2 OTUs) であった。なお、試料④, ⑧についてはPCRによる増幅産物を得ることが出来なかった。細菌の16S rRNA遺伝子は、石棺西側面からの試料：①, ③, ④, ⑥, ⑩と東側面からの試料：⑨の6試料で解析結果が得られ、それぞれ、5,695 reads (3 OTUs), 9,790 reads (3 OTUs), 661 reads (5 OTUs), 4,828 reads (6 OTUs), 5,581 reads (3 OTUs), 2,209 reads (5 OTUs) であった。なお、試料⑧からはPCRの増幅産物が得られなかった。それぞれのOTUから代表塩基配列を無作為に1つ選抜して、公共のデータベースと相同性検索(BLAST検索)し、近縁種を予測した。

3-2. 藻類の群集構造解析

藻類を対象に解析を行った結果では、石棺の西側面の試料①で解析した全遺伝子配列 (reads) のほとんどが1つのOTU (1-S1) にクラスタリングされ、そのOTUに含まれる塩基配列の出現頻度は96.9%であった。1-S1の代表塩基配列を用いて相同性解析を行うと、Cyanobacteria門 (藍藻, 藍色細菌) に分類される *Tolypothrix distorta* SAG 93.79の塩基配列と最も近縁であった (相同性96%)。石棺の西側面の試料③では3つのOTU (3-S1, 3-S2, 3-S3) の出現頻度が高く、それぞれ35.7%, 28.9%, 16.7%であった。各OTUの代表配列を用いて相同性解析を行うと、3-S1と3-S2は *Singulisphaera rosea* S26^T (Planctomycetes門) と *Edaphobacter aggregans* DSM19364^T (Acidobacteria門) に近縁であった。本研究では、藍藻と葉緑体が有する独自の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーを用いたが、一部の細菌の増幅が認められたことからプライマーの設計には改良の余地があることが明らかとなった。3-S3は、Cyanobacteria門に分類される *Halospirulina* sp. EF17株の塩基配列に近縁であった (相同性96%)。石棺の西側面の試料④は、解読した塩基配列の99.7%が単一のOTU (4-S1) に集約され、相同性検索

表1 次世代シーケンサーによる各試料の遺伝子配列解析数とOTU数

採取部位	試料番号	藻類		菌類		細菌	
		遺伝子配列解析数 (read数)	OTU数*1	遺伝子配列解析数 (read数)	OTU数	遺伝子配列解析数 (read数)	OTU数
石棺西側	①	163	2	1,714	11	5,695	6
	③	2,835	11	4,790	5	9,790	8
	④	9,639	1	N. A.*2	N. A.	661	11
	⑥	4,464	2	2,931	9	4,828	10
	⑩	693	1	2,996	5	5,581	8
石棺東側	⑧	1,775	1	N. A.	N. A.	15	9
	⑨	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	2,209	15

*1 OTU (Operational Taxonomic Unit: 操作的分類単位) 数は、配列の相同性が97%以上の条件で分類し、全遺伝子データ数 (read数) に対する出現頻度が1%以上の数を示す。

*2 N.A. (No data available) は、PCRによる増幅産物が得られなかった試料を示す。

の結果、試料③でも検出された *Cyanobacteria* 門に分類される *Halospirulina* sp. EF17株の塩基配列に近縁であった(相同性99%)。石棺の西側面の試料⑥は、2つの OTU (6-S1, 6-S2) に分類されたが(出現頻度はそれぞれ、59.7%と40.0%)、両者とも近縁の塩基配列は同一であり、Bacillariophyta 門(珪藻植物門)に属する *Haslea nipkowii* の葉緑体の16S rRNA 遺伝子配列に近かった(相同性97-99%)。石棺の西側面の試料⑩は、1つの OTU (10-S1) に分類され(出現頻度97.8%)、相同性検索の結果、Rhodophyta 門(紅藻植物門)に属する *Cyanidium* sp. Sybil cave の葉緑体の塩基配列と近縁であった(相同性97%)。試料⑩は採取した生物量が多く、DNA 抽出に用いた余剰分があったため、光学顕微鏡下で藻類の形態観察を行った。その結果、単細胞性で球形をした細胞で直径は数から数10 μm 、細胞内部に扁平する布状の葉緑体を有するという *Cyanidium* 属の形態的特徴に極めて類似した藻類が観察されたことから、確かに本属の藻類が分布していると考えられた(図3)。

石棺の東側面の試料⑧は、ほぼすべての配列が1つの OTU に分類され(出現頻度99.9%)、もっとも近縁の配列は、試料①と同じ *Tolypothrix distorta* SAG 93.79であった(相同性99%)。

3-3. 菌類の群集構造解析

同一試料で菌類を対象に解析を行った結果を表3にまとめた。石棺の西側面の試料①では、4つの OTU に分類され(1-K1, 出現頻度35.4%; 1-K2, 出現頻度23.9%; 1-K3, 出現頻度12.0%; 1-K4, 出現頻度9.2%)、相同性解析の結果、1-K1は Eurotiomycetes 綱の *Penicillium simplicissimum* ATT193 (相同性97%)、1-K2は Sordariomycetes 綱の *Mariannaea elegans* var. *punicea* NBRC33105(相同性100%)、1-K3は Sordariomycetes 綱の *Trichoderma virens* VRU-Tv177(相同性97%)、1-K4は、Saccharomycetes 綱の *Galactomyces geotrichum* LMA-70(相同性97%)に近縁であった。試料③は、3つの OTU に分類され(3-K1, 出現頻度54.3%; 3-K2, 出現頻度29.1%; 3-K3, 出現頻度6.0%)、相同性解析の結果、3-K1は Sordariomycetes 綱に属する *Mariannaea elegans* var. *punicea* NBRC33105 (相同性96%)、3-K2は Sordariomycetes 綱に属する *Trichoderma virens* VRU-Tv177 (相同性100%)、3-K3は綱レベルの分

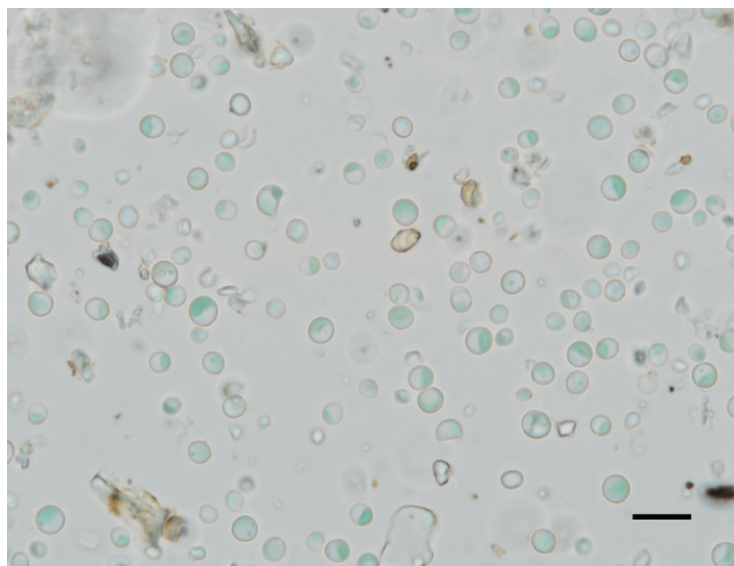


図3 試料⑩の光学顕微鏡による藻類の形態写真。スケールバーは10 μm を示す。

表2 各試料における藻類の群集構造解析結果

OTU	近縁種 [分類群 (門)]	アクセショ ン番号	相同性 (%)	試料毎の出現頻度 (%)						
				①	③	④	⑥	⑩	⑧	⑨
1-S1	<i>Tolypothrix distorta</i> SAG 93.79 (Cyanobacteria)	GQ287651	96	96.9	—	—	—	—	—	—
3-S3	<i>Halospirulina</i> sp. EF17 (Cyanobacteria)	JX912466	96	—	16.7	—	—	—	—	—
4-S1	<i>Halospirulina</i> sp. EF17 (Cyanobacteria)	JX912466	99	—	—	99.7	—	—	—	—
6-S1	<i>Haslea nipkowii</i> (chloroplast) (Bacillariophyta)	AF514850	99	—	—	—	59.7	—	—	—
6-S2	<i>Haslea nipkowii</i> (chloroplast) (Bacillariophyta)	AF514850	97	—	—	—	40.0	—	—	—
10-S1	<i>Cyanidium</i> sp. Sybil cave (chloroplast) (Rhodophyta)	AY391360	97	—	—	—	—	97.8	—	—
8-S1	<i>Tolypothrix distorta</i> SAG 93.79 (Cyanobacteria)	GQ287651	99	—	—	—	—	—	99.9	—
3-S1*1	<i>Singulisphaera rosea</i> S26 ^T (Planctomycetes)	FN391026	92	—	35.7	—	—	—	—	—
3-S2	<i>Edaphobacter aggregans</i> DSM 19364 ^T (Acidobacteria)	DQ528761	98	—	28.9	—	—	—	—	—

*1 二重線以下の OTU は藻類に含まれない分類群

類群が不明の *Acremonium psammosporum* H28 (相同性87%) に最も近縁であった。試料⑥は、3つの OTU に分類され(6-K1, 出現頻度44.3%; 6-K2, 出現頻度29.2%; 6-K3, 出現頻度6.0%), 相同性解析の結果、6-K1は Dothideomycetes 綱の *Devriesia strelitzicola* X1045 (相同性90%), 6-K2は Sordariomycetes 綱の *Simplicillium lanosoniveum* 02502 (相同性97%), 6-K3は Sordariomycetes 綱の *Hypomyces* sp. N1S1-938 (相同性97%) に近縁であった。試料⑩は、2つの OTU に分類され(10-K1, 出現頻度66.0%; 10-K2, 出現頻度23.0%), 相同性解析の結果、10-K1は Eurotiomycetes 綱の *Penicillium janthinellum* GZU-BCECD8 (相同性90%), 10-K2は Eurotiomycetes 綱の *Phialosimplex caninus* UAMH11502 (相同性89%) に最も近縁であった。石棺の東側面の試料⑨は、2つの OTU に分類され (9-K1, 出現頻度90.9%; 9-K2, 出現頻度6.5%), 9-K1は Dothideomycetes 綱の *Neodevriesia lagerstroemiae* CPC14403 (相同性86%), 9-K2は綱レベルの分類群が不明の *Engyodontium album* A87G (相同性96%) に最も近縁であるという相同性検索結果が得られた。

3-4. 細菌の群集構造解析

各試料における細菌の群集構造解析結果は表4に記載した。試料①では、3つの OTU に分類され(1-B1, 出現頻度69.9%; 1-B2, 出現頻度16.0%; 1-B3, 出現頻度6.5%), 相同性解析の結果、1-B1は Actinobacteria 門の *Arthrobacter russicus* A1-3 (相同性99%), 1-B2は Proteobacteria 門の *Sphingomonas leidy* MECA_19.1.3 (相同性100%), 1-B3は Actinobacteria 門の *Streptomyces ferralitis* CR3-AC4 (相同性99%) に近縁であった。試料③は、3つの OTU に分類され(3-B1, 出現頻度58.9%; 3-B2, 出現頻度12.9%; 3-B3, 出現頻度7.9%), 相同性解析の結果、3-B1は Proteobacteria 門の *Sphingomonas oligoaromativorans* IMER-A1-28 (相同性99%), 3-B2は Acidobacteria 門の *Edaphobacter modestus* Jbg-1 (相同性99%), 3-B3は Proteobacteria 門の *Acidisoma tundrae* WM1 (相同性97%) に近縁であった。試料④では、5つの OTU に分類され (4-B1, 出現頻度26.5%; 4-B2, 出現頻度24.2%; 4-B3, 出現頻度

表3 各試料における菌類の群集構造解析結果

OTU	近縁種 [分類群 (綱)]	アクセショ ン番号	相同性 (%)	試料毎の出現頻度 (%)						
				①	③	④	⑥	⑩	⑧	⑨
1-K1	<i>Penicillium simplicissimum</i> ATT193 (Eurotiomycetes)	HQ607882	97	35.4	—	—	—	—	—	—
1-K2	<i>Mariannaea elegans</i> var. <i>punica</i> NBRC33105 (Sordariomycetes)	AB111493	100	23.9	—	—	—	—	—	—
1-K3	<i>Trichoderma virens</i> VRU-Tv177 (Sordariomycetes)	KJ000307	97	12.0	—	—	—	—	—	—
1-K4	<i>Galactomyces geotrichum</i> LMA-70 (Saccharomycetes)	JQ668740	97	9.2	—	—	—	—	—	—
3-K1	<i>Mariannaea elegans</i> var. <i>punica</i> NBRC33105 (Sordariomycetes)	AB111493	96	—	54.3	—	—	—	—	—
3-K2	<i>Trichoderma virens</i> VRU-Tv177 (Sordariomycetes)	KJ000307	100	—	29.1	—	—	—	—	—
3-K3	<i>Acremonium psammosporem</i> H28 (mitosporic Ascomycota)	GU566287	87	—	6.0	—	—	—	—	—
6-K1	<i>Devriesia strelitzicola</i> X1045 (Dothideomycetes)	GU214635	90	—	—	—	44.3	—	—	—
6-K2	<i>Simplicillium lanosoniveum</i> 02502 (Sordariomycetes)	KT878334	97	—	—	—	29.2	—	—	—
6-K3	<i>Hypomyces</i> sp. N1S1-938 (Sordariomycetes)	KU059879	97	—	—	—	6.0	—	—	—
10-K1	<i>Penicillium janthinellum</i> GZU-BCECD8 (Eurotiomycetes)	GU565141	90	—	—	—	—	66.0	—	—
10-K2	<i>Phialosimplex caninus</i> UAMH11502 (Eurotiomycetes)	JX218036	89	—	—	—	—	23.0	—	—
9-K1	<i>Neodevriesia lagerstroemiae</i> CPC14403 (Dothideomycetes)	GU214634	86	—	—	—	—	—	—	90.9
9-K2	<i>Engyodontium album</i> A87G (mitosporic Ascomycota)	JQ781846	96	—	—	—	—	—	—	6.5

15.7%；4-B4，出現頻度8.3%；4-B5，出現頻度5.0%），相同性解析の結果，4-B1は *Proteobacteria* 門の *Moraxella osloensis* SR-11（相同性99%），4-B2は *Proteobacteria* 門の *Acinetobacter johnsonii* XBB1（相同性99%），4-B3は *Proteobacteria* 門の *Acinetobacter lwofii* BT 90（相同性99%），4-B4は *Proteobacteria* 門の *Brevundimonas vesicularis* KMDH12（相同性99%），4-B5は *Deinococcus-Thermus* 門の *Deinococcus ficus* 47F（相同性96%）に近縁であった。試料⑥では，6つのOTUに分類され（6-B1，出現頻度27.3%；6-B2，出現頻度16.5%；6-B3，出現頻度12.0%；6-B4，出現頻度11.2%；6-B5，出現頻度10.1%；6-B6，出現頻度5.1%），相同性解析の結果，6-B1は *Proteobacteria* 門の *Sphingomonas leidy* MECA_19.1.3（相同性99%），6-B2は *Actinobacteria* 門の *Flexivirga alba* ST13（相同性100%），6-B3は *Actinobacteria* 門の *Actinocatenispora thailandica* TT2-10（相同性99%），6-B4は *Actinobacteria* 門の *Glaciibacter superstes* AHU1791（相同性96%），6-B5は *Actinobacteria* 門の *Pseudonocardia seranimata* YIM 63233（相同性99%），6-B6は *Actinobacteria* 門の *Streptomyces cyaneus* 2552（相同性97%）に近縁であった。試料⑩は，3つのOTUに分類され（10-B1，出現頻度52.2%；10-B2，出現頻度27.3%；10-B3，出現頻度7.3%），相同性解析の結果，10-B1は *Proteobacteria* 門の *Sphingomonas leidy* MECA_19.1.3（相同性99%），10-B2は *Actinobacteria* 門の *Arthrobacter russicus* A1-3（相同性98%），10-B3は *Proteobacteria* 門の *Brevundimonas vesicularis* KMDH12（相同性100%）に近縁であった。試料⑨は，5つの

表4 各試料における細菌の群集構造解析結果

OTU	近縁種 [分類群 (門)]	アクセショ ン番号	相同性 (%)	試料毎の出現頻度 (%)						
				①	③	④	⑥	⑩	⑧	⑨
1-B1	<i>Arthrobacter russicus</i> A1-3 (Actinobacteria)	NR_024783	99	69.9	—	—	—	—	—	—
1-B2	<i>Sphingomonas leidyi</i> MECA_19.1.3 (Proteobacteria)	KT720196	100	16.0	—	—	—	—	—	—
1-B3	<i>Streptomyces ferralitis</i> CR3-AC4 (Actinobacteria)	FM998833	99	6.5	—	—	—	—	—	—
3-B1	<i>Sphingomonas oligoaromativorans</i> IMER-A1-28 (Proteobacteria)	NR_133865	99	—	58.9	—	—	—	—	—
3-B2	<i>Edaphobacter modestus</i> Jbg-1 (Acidobacteria)	NR_115813	99	—	12.9	—	—	—	—	—
3-B3	<i>Acidisoma tundrae</i> WM1 (Proteobacteria)	NR_042705	97	—	7.9	—	—	—	—	—
4-B1	<i>Moraxella osloensis</i> SR-11 (Proteobacteria)	KX082883	99	—	—	26.5	—	—	—	—
4-B2	<i>Acinetobacter johnsonii</i> XBB1 (Proteobacteria)	CP010350	99	—	—	24.2	—	—	—	—
4-B3	<i>Acinetobacter lwoffii</i> BT 90 (Proteobacteria)	KJ848594	99	—	—	15.7	—	—	—	—
4-B4	<i>Brevundimonas vesicularis</i> KMDH12 (Proteobacteria)	KU844054	99	—	—	8.3	—	—	—	—
4-B5	<i>Deinococcus ficus</i> 47F (Deinococcus-Thermus)	JQ804839	96	—	—	5.0	—	—	—	—
6-B1	<i>Sphingomonas leidyi</i> MECA_19.1.3 (Proteobacteria)	KT720196	99	—	—	—	27.3	—	—	—
6-B2	<i>Flexivirga alba</i> ST13 (Actinobacteria)	NR_113034	100	—	—	—	16.5	—	—	—
6-B3	<i>Actinocatenispora thailandica</i> TT2-10 (Actinobacteria)	NR_040967	99	—	—	—	12.0	—	—	—
6-B4	<i>Glaciibacter superstes</i> AHU1791 (Actinobacteria)	NR_041679	96	—	—	—	11.2	—	—	—
6-B5	<i>Pseudonocardia seranimata</i> YIM 63233 (Actinobacteria)	NR_108393	99	—	—	—	10.1	—	—	—
6-B6	<i>Streptomyces cyaneus</i> 2552 (Actinobacteria)	JN180203	97	—	—	—	5.1	—	—	—
10-B1	<i>Sphingomonas leidyi</i> MECA_19.1.3 (Proteobacteria)	KT720196	99	—	—	—	—	52.2	—	—
10-B2	<i>Arthrobacter russicus</i> A1-3 (Actinobacteria)	NR_024783	98	—	—	—	—	27.3	—	—
10-B3	<i>Brevundimonas vesicularis</i> KMDH12 (Proteobacteria)	KU844054	100	—	—	—	—	7.3	—	—
9-B1	<i>Methylobacterium tarhaniae</i> N4211 (Proteobacteria)	NR_109649	98	—	—	—	—	—	—	18.7
9-B2	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> CI-02 (Proteobacteria)	KC178576	99	—	—	—	—	—	—	17.2
9-B3	<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> NBRC14978 (Proteobacteria)	NR_113716	97	—	—	—	—	—	—	14.8
9-B4	<i>Burkholderia terrae</i> A9 (Proteobacteria)	KF958499	98	—	—	—	—	—	—	10.1
9-B5	<i>Deinococcus aquaticus</i> SBB08 (Deinococcus-Thermus)	KP790023	99	—	—	—	—	—	—	8.5

OTUに分類され(9-B1, 出現頻度18.7%; 9-B2, 出現頻度17.2%; 9-B3, 出現頻度14.8%; 9-B4, 出現頻度10.1%; 9-B5, 出現頻度8.5%), 相同性解析の結果, 9-B1は *Proteobacteria* 門の *Methylobacterium tarhaniae* N4211 (相同性98%), 9-B2は *Proteobacteria* 門の *Acinetobacter haemolyticus* CI-02(相同性99%), 9-B3は *Proteobacteria* 門の *Hydrogenophilus thermoluteolus* NBRC14978 (相同性97%), 9-B4は *Proteobacteria* 門の *Burkholderia terrae* A9 (相同性98%), 9-B5は *Deinococcus-Thermus* 門の *Deinococcus aquaticus* SBB08 (相同性99%) に近縁であった。

4. 考察

本研究では, 石人山古墳の石棺表面において, 近年になって急速に拡大した緑色の着生生物が線刻の鑑賞の妨げになりつつあることを広義の生物劣化と捉え, その原因の探求を行うことを目的とした。まずは基礎的な情報となる緑色の生物群集構造を, 分子生物学的手法を用いて解析することとし, 藻類および菌類と共存する菌類, 細菌の群集を対象とした構造解析を行った。

藻類では, *Tolythrix distorta* に近縁の配列や *Halospirulina* 属に近縁の遺伝子配列が検出された。*Tolythrix* 属は酸素発生型の光合成を行う藍藻で, 細胞が列に並んで糸状体を形成し, 窒素固定のためのヘテロシストを分化することが知られており, いくつかの種は, 水中以外でも湿った砂, 岩石, 樹皮や砂岩や石灰岩の壁など気生生息域での分離が報告されている⁸⁾。また, *Halospirulina* 属は耐塩性を有する藍藻で, 日射が強く高濃度の塩分を含む環境から分離されており, 3-13%かそれ以上の塩分を含む培地での増殖が可能であり, 温度も少なくとも38°Cでの増殖が可能とされている⁹⁾。実際に石人山古墳の石棺表面から分離した藻類を用いて, 耐塩性や窒素固定能などの生理学的な試験を行わなければ結論は得られないものの, 近縁種の生理学的な情報からは窒素源が限られ日射や乾燥・塩類によるストレスが大きいと考えられる石棺表面で生育に有利な能力を持った藻類が発育しているのではないかと推論することができる。これは, 石棺表面での藻類の制御を検討するうえで有益な情報である。また, 試料⑩では, 紅藻植物門に属する *Cyanidium* 属の葉緑体の塩基配列と近縁な配列も検出された。*Cyanidium* 属は, 単細胞性で直径2-5 μ mの球形をしており, 強固な細胞壁で覆われた細胞内に1つの葉緑体を有する。日本ではイデユコゴメ(属)と呼ばれ, 酸性温泉などに生育し, 45°C, pH1-4といった極限環境で生育する光合成独立栄養生物として知られている¹⁰⁾。石棺表面にこのような特異な生育環境を好む原始紅藻が生育することは大変興味深い。分離培養も含めてさらに調査を行う必要があると考えられる。*Cyanidium* 属と先述の *Halospirulina* 属は, 両者ともに高温での増殖が可能であることが報告されており^{9,10)}, 高温耐性能も石棺表面での生存に必要な共通の条件であることが示唆された。

石棺の東側(試料⑧)は, 直射日光が直達しない場所であり, 目視観察で確認できる緑色生物は認められないが, 藻類の繁茂が旺盛な西側面と同一の *Tolythrix distorta* に近縁の藍藻が検出された。このことは, 藻類が可視化できるほど発育はしていないものの, 非常にわずかに分布しており, 増殖にとって良い環境条件となれば, 東側面においても緑色生物の発生が起り得る状態であることを示唆している。

本研究で石人山古墳の石棺表面から検出された藻類の近縁種の生理学的な特徴から高温, 乾燥, 高塩濃度, 低pH, 貧栄養(窒素源)などが環境のストレスとして存在し, それに耐性を有する種が選択的に発育したのではないかと推論された。これらの藻類を制御するための対策として仮に遮光を行い, それによって石棺に供給される光量を減じた場合には, 現在存在してい

藻類は制御されるかもしれないが、高温や乾燥といった環境ストレスも緩和される可能性があるため、その環境に適した別の種類の藻類の繁茂を促進することも想定される。遮光を行う際には、それがあらゆる藻類の光合成の補償点以下の光量にまで減らす必要がある。加えて、藻類の生育を止めた後には死滅した藻類のバイオマスが栄養源となり、菌類や細菌の増殖が起こることが予測される。藻類の制御とその後の別の生物群集の変化までモニタリングを継続しながら対策を講じていくことが重要であると考えられる。

本調査では、同一試料採取地点において、藻類と共存する菌類と細菌の群集構造解析も行ったが、これは現段階の菌類・細菌の群集構造を基にして、何らかの保存対策を講じた際に、これらの微生物がどのような挙動をするかといった比較解析のための基礎データとすることを目的とした。菌類の群集構造解析では、*Mariannaea elegans* var. *punicea* NBRC33105と *Trichoderma virens* VRU-Tv177に近縁の配列は、試料①と試料③の異なる地点から共通して高頻度で検出された。細菌では、*Arthrobacter russicus* (試料①, 試料⑩), *Sphingomonas leidyi* (試料①, 試料⑥, 試料⑩), *Brevundimonas vesicularis* (試料④, 試料⑩) が異なる地点でも共通して検出されたが、同じ試料の組み合わせで、藻類あるいは菌類の優占種が一致してはいないため、共存する藻類や菌類とは別の因子で優占種の組み合わせが決まっている可能性がある(図4)。細菌については、藻類に窒素源を供給し、藻類から光合成産物を貰うような窒素固定能を有する種の存在について調査することも目的に含めたが、検出された細菌種には、窒素固定菌として既知の種が見いだされなかった。共存する細菌によって窒素源が供給されないのであれば、試料⑥で優占した珪藻植物門に属する *Haslea* 属や試料⑩で優占した紅藻植物門に属する *Cyanidium* 属など窒素固定能を有しない藻類が石材表面でどのようにして窒素源を獲得したかなど今後明らかにしていくことが課題である。本結果からは藻類と共存する菌類や細菌の生態学的な役割を明らかにすることは難しかったが、今後、藻類を制御した際に、これらの菌群がどのような挙動を示すかによって、逆に共存する菌類や細菌の生態学的な役割が浮き彫りになることも考えられる。



図4 石棺西側表面の試料採取地点において最も多く検出された藻類・菌類・細菌の既知種

本研究では、分子生物学的な手法によって石棺表面の生物群集構造を明らかにしたが、石棺周辺の温湿度、石材にあたる日射、石材の含水率の変化によって群集構造が大きく変化していくと考えられる。あるいは、年変動や季節変動、樹木の生長によって周辺環境も変化していくため、自然の状態においても群集構造は異なっていくことが予想される。こうした変化も視野に入れて、継続した調査を実施しながら生物制御方法の検討を進めていく必要がある。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、福岡県教育庁の吉田東明氏、広川町教育委員会の尾崎源太郎氏、奈良文化財研究所の脇谷草一郎博士、東京藝術大学の日高翠氏には、現地調査を始め多大なるご協力をいただきました。また、元中外テクノス株式会社の中村孝道博士には、分析に関するご助言等いただきました。本研究は JSPS 科研費15K01140「環境制御による古墳に繁茂する緑色生物の軽減法に関する研究（研究代表者：朽津信明）」の助成を受けたものです。以上、ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 福岡縣：史蹟名勝天然記念物調査報告書 第八輯 史蹟之部（1933）
- 2) 朽津信明、森井順之、犬塚将英、佐藤嘉則、日高翠、木川りか、尾崎源太郎、岡田健：文化財保存修復学会第37回大会研究発表講演要旨集（2015）
- 3) Nubel, U., Garcia-Pichel, F., and Muyzer, G.: PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3327-3332 (1997)
- 4) White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J.: 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 (1990)
- 5) Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, **173**, 697-703 (1991)
- 6) Lane, D.J., Pace, B., Olson, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., and 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)
- 7) Altschul, S.F., Madden, T.F., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402 (1997)
- 8) Komarek, J. and Watanabe, M.: Morphology and taxonomy of the genus *Coleodesmium* (Cyanophyceae/Cyanobacteria), *In*: Cryptogams of the Himalayas Central and Eastern Nepal vol. 2, (Watanabe, M. and Malla, S.B., eds), National Science Museum, 1-22 (1990)
- 9) Nübel, U., Garcia-Pichel, F., and Muyzer, G.: The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 1265-1277 (2000)
- 10) Ott, F.D. and Seckbach, J.: A review on the taxonomic position of the algal genus *Cyanidium* Geitler 1933 and its ecological cohorts *Galdieria* Merola in Merola et al. 1981 and *Cyanidiosch-*

yzon De Luca, Taddei and Varano 1978, *In*: Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae: *Cyanidium caldarium* (*Rhodophyta*) and Related Cells Developments in Hydrobiology Volume 91. (Seckbach, J., eds), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 113-132 (1972)

キーワード：石人山古墳 (Sekijinsan Tumulus)；石棺 (stone coffin)；表面付着微生物 (surface colonized microorganisms)；藻類 (algae)；菌類 (fungi)；細菌 (bacteria)

Molecular Analysis of the Epiphytic Microbial Community Formed on Surfaces of Decorative Stone Sarcophagus at Sekijinsan Tumulus

Yoshinori SATO, Tomoyasu NISHIZAWA*, Nanami KONUMA*, Masahide INUZUKA, Masayuki MORII, Rika KIGAWA**, and Nobuaki KUCHITSU

Sekijinsan Tumulus in Hirokawa, Fukuoka prefecture is a keyhole-shaped burial mound with a decorated stone sarcophagus that was built in the first half of the 5th century. Recently, green epiphytic organisms have spread widely on the western side of the sarcophagus surface, preventing preservation and exhibition to the public. The aim of the present study was to analyze the epiphytic microbial community by using molecular techniques to determine the algal, fungal and bacterial community structures on the sarcophagus surface.

The algal gene sequences closely related to those of nitrogen-fixing *Tolypothrix distorta* and salt-tolerant *Halospirulina* were detected. The environmental factors of limited nitrogen source, solar radiation, and dry and salty conditions were considered to have contributed to the ability of these algae to grow on the sarcophagus surface. Moreover, algal gene sequences closely related to that of *Cyanidium* were detected. The genus *Cyanidium* is a red algal extremophile which typically grows in acidic hot springs. It is known that organisms related to such an evolutionarily old red alga are able to grow on the stone sarcophagus surface. In fungal community structure analysis, sequences closely related to *Mariannaea elegans* and *Trichoderma virens* were commonly and frequently observed. In bacterial community structure analysis, *Arthrobacter ruscicus*, *Sphingomonas leidyi* and *Brevundimonas vesicularis* were commonly detected.

In the present study, by using a molecular biology approach, the community structures of microorganisms on the stone sarcophagus surface were clarified. However, these community structures are expected to change even under natural conditions, depending on the surrounding environment that is influenced by annual and seasonal fluctuations or the growth of trees. With these changes, it is important to conduct ongoing surveys while continuing studies on biological control methods.

*Ibaraki University

**Kyushu National Museum