

〔報告〕 高松塚・キトラ両古墳の *Penicillium* 属分離株の 分子系統学的帰属および *Penicillium* sp. 2の 分類学的記載と生物劣化問題へのかかわり

喜友名 朝彦*・安 光得*¹・佐藤 嘉則・木川 りか²・
佐野 千絵・杉山 純多**³

1. はじめに

高松塚古墳・キトラ古墳（奈良県明日香村，7世紀末～8世紀初頭の築造）の石室（石槨）内の漆喰上に描かれた多彩色壁画は戦後考古学史上最大の発見の一つである。両古墳とも特別史跡に，前者の壁画は国宝に指定されている。これら古墳壁画は大略温度14-20°C，高湿度（約100% RH），貧栄養，暗黒環境下の狭い石室内に約1300年もの間，その場所にあったと思われる。しかし，発掘以降菌類を主とする微生物などによる壁画・漆喰壁の生物劣化がたびたび深刻な問題を引き起こし，その帰結として前者石室は2007年解体され，壁画は石材ごと明日香村内の仮設修理施設に搬送され，修理が進められている^{1, 2)}。一方，後者石室内漆喰は発見当初から石材壁面からの剥離が検出されていたこともあり，2009年末までに余白漆喰を含むすべての壁画・漆喰面が取り外され，石室外で保存修理処置が行われた³⁾。2016年9月から，修理された壁画は明日香村所在の文化庁キトラ古墳壁画保存管理施設（キトラ古墳壁画体験学習館の「四神の館」）内で保存管理され，期間限定で順次公開されている。

両古墳石室内でカビやバイオフィルムによる攪乱がたびたび起こった当時，微生物劣化原因調査研究には保存対策への的確な情報提供に加え，保存科学並びに汚染微生物の迅速分析法・モニタリング法の基盤確立に向けてその先駆的役割が期待されていた。特に菌類等による生物劣化（生物被害）は深刻で，早急な対応が必要とされていた。そこで我々は2004年から2013年にかけて，両古墳壁画の菌類を含む微生物による汚染状況の正確な把握と発生原因，またそれらが壁画に及ぼす影響を究明することを主目的として，石室内とその周辺環境の菌類相ならびに広く微生物相の調査，主要汚染微生物の検出・正体解明および主要分離株の生物学的特性（有機酸生成能，炭酸カルシウム溶解能など）の研究をおこなってきた³⁻⁶⁾。

菌類についてみると，これまで，両古墳石室内外からは子囊菌類の *Penicillium* 属（アオカビ属）が優占的に多く分離されてきた⁵⁻⁷⁾。*Penicillium* 属には現在，約354種が認められており⁸⁾，生態学的にも文化財等の生物劣化に関わる研究を含め，世界中の様々な環境から報告・研究例があり，産業的にも有用な種類が多く含まれている⁹⁻¹³⁾。従来，菌類分類学において，いわゆる高等菌類と呼ばれる子囊菌類と担子菌類はテレオモルフ（有性時代）とアナモルフ（無性時代）の両方を備えた多型的生活環を持ち，両モルフに対して別々の学名を付けて実用的に区別されてきた（二重命名法 dual nomenclature と呼ばれている）¹⁴⁾。また，テレオモルフが不明で，アナモルフのみしか知られていない高等菌類も非常に多く，*Penicillium* 属カビの多くも生活環

*株式会社テクノスルガ・ラボ **株式会社テクノスルガ・ラボ 千葉分室

¹: 現 株式会社マクロジェン・ジャパン ²: 現 九州国立博物館 ³: 現 国立科学博物館

において有性生殖を営むことなく（あるいは知られていない）無性生殖のみを営むアナモルフ菌類だが、一部の種にはテレオモルフとして *Eupenicillium* 属または *Talaromyces* 属の存在が知られている¹¹⁾。先の国際藻類・菌類・植物命名規約の改正（メルボルン規約）に伴い、第59条が定める二重命名法を廃棄して「1菌類1学名」（“One Fungus = One Name (1F = 1N)”）とする統一命名法を適用することになった^{14, 15)}。すなわち、*Eupenicillium* 属の種は全てアナモルフの *Penicillium* 属に統合され、*Talaromyces* 属とテレオモルフが不明な *Penicillium* 属 *Biverticillium* 亜属の種は全て、*Talaromyces* 属に再分類された^{16, 17)}。両古墳で分離された *Penicillium* 属分離株は培養上、全て同属の形態的特徴を備える無性時代のみ確認されている。しかし、有性時代は確認されていないが、*Talaromyces* 属に再分類された種が一部含まれている。たとえば、後述の *Penicillium minioluteum* はアナモルフのみ知られているが、現在、当該種の属名としては *Talaromyces* 属が適用され、*P. minioluteum* は異名の扱いとされている¹⁷⁾。

両古墳の菌類相調査・研究において、特に最優占種であった *Penicillium* sp. 1分離株については既に形態学的・分子系統学的アプローチによって *Penicillium paneum* として同定し、原著論文として発表した¹⁸⁾。しかし、両古墳石室内外からの *Penicillium* 属分離株の全体像および分子系統学的位置については未整理のままであった。そこで、本調査・研究では、両古墳石室内外からの *Penicillium* 属 (*Talaromyces* 属含む) 分離株のうち、既に理化学研究所バイオリソースセンター（つくば市高野台）の JCM (Japan Collection of Microorganisms) に寄託済の分離株の DNA 塩基配列情報を用いて、その分子系統学的位置を明らかにするとともに、*P. paneum* に次いで、両古墳から多く分離された未同定 *Penicillium* sp. 2⁶⁾ について詳細同定を行い、その分類学的記載および若干の生物劣化問題とのかかわりについて報告することを目的とした。

2. 試料および方法

2-1. 供試菌株

これまでの調査・研究において、高松塚古墳（2004年5月～2009年2月）の石室内外から総計1410株の菌類分離株が得られ、その中、*Penicillium* 属 (*Talaromyces* 属含む) 443株が分離され、選抜した61菌株が JCM に寄託済である。また、キトラ古墳（2004年6月～2013年2月）の石室内外から総計1092株の菌類分離株が得られた。そのうち、*Penicillium* 属/*Talaromyces* 属 258株が分離され、選抜した50菌株が JCM に寄託済である（表1）。本研究の *Penicillium* 属分離株の分子系統学的研究では、JCM に寄託済みの計111菌株の *Penicillium* 属/*Talaromyces* 属分離株の DNA 塩基配列データを解析に用いた。なお、本研究で使用した DNA 塩基配列情報は既に、国立遺伝学研究所 DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に寄託、公開済である。本研究に用いた高松塚・キトラ両古墳からの *Penicillium* 属/*Talaromyces* 属の分離株情報を表1に示した。

また、*Penicillium paneum* に次いで優占種であった *Penicillium* sp. 2の詳細同定を行うために高松塚・キトラ両古墳からの選抜11菌株を分析に供した（表1）。

なお、両古墳の分離株のサンプル（試料）は採取位置に応じて、次の3カテゴリー⁶⁾に分けた。すなわち、両古墳石室内の試料は「石室内 (Stone chamber interior)」, 高松塚古墳の石室解体時の壁石間から採取された試料は「壁石間 (Joint space of the stone walls)」, 両古墳の石室の周辺環境・隣接環境（取合部, 前室, 小前室など）および墳丘部から採取された試料は「石室外 (Stone chamber exterior) / 墳丘部 (Mound)」と表記した。また、各遺伝子の分子系

表 1. 高松塚・キトラ両古墳石室内外から分離された *Penicillium* 属/ *Talaromyces* 属の分子系統解析供試菌株一覧*1

登録名	JCM 番号	分離株番号*2	分子系統解析に よる再同定	GenBankアクセッション番号			分離源
				LSU-D1/D2	ITS	β -tubulin	
<i>Penicillium paneum</i> *3	15985	T4519-5-5	<i>Penicillium paneum</i>	AB479290	AB479322	AB479337	高松塚古墳 石室内床面 白色コロニー
<i>Penicillium paneum</i> *3	15986	T4906-11-8	<i>Penicillium paneum</i>	AB479291	AB479323	AB479338	高松塚古墳 石室内壁面 上のワラジムシ成体 1 個体
<i>Penicillium paneum</i>	28007	T5916-2-1	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133772	—	高松塚古墳 石室内西壁 白虎 後肢下 ゲル状
<i>Penicillium paneum</i>	28103	T5916-4-1	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133795	—	高松塚古墳 石室内西壁 女子群像 左の人物下 数 cm ベタベタ状
<i>Penicillium paneum</i> *3	15987	T5916-6-1	<i>Penicillium paneum</i>	AB479294	AB479326	AB479341	高松塚古墳 石室内東壁 女子群像下ゲル状
<i>Penicillium paneum</i>	28043	T61213-12-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC133912	—	—	高松塚古墳 石室内北壁 天井寄り右上ゲル
<i>Penicillium paneum</i>	28105	T6517-11-2	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133797	—	高松塚古墳 石室内西壁 女子 額の黒色部分①
<i>Penicillium paneum</i> *3	15988	T6517-1-2	<i>Penicillium paneum</i>	AB479295	AB479327	AB479342	高松塚古墳 石室内西壁 女子額の黒色部分 No. ①
<i>Penicillium paneum</i>	28106	T6517-12-3	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133798	—	高松塚古墳 取合部 左西 側下方 黒色部分
<i>Penicillium paneum</i>	28021	T6517-14-2	<i>Penicillium paneum</i>	LC133910	LC133775	—	高松塚古墳 取合部 右東 側 黒色部分
<i>Penicillium paneum</i>	28111	T6517-5-2	<i>Penicillium paneum</i>	LC133953	—	—	高松塚古墳 石室内西壁 中央部 黒色部分No.⑤
<i>Penicillium paneum</i>	28018	T6517-9-1	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133774	—	高松塚古墳 石室内東壁 右女子足元下 ゲル状部 分 No.⑨
<i>Penicillium paneum</i> *3	15989	T7214-8-1	<i>Penicillium paneum</i>	AB479296	AB479328	AB479343	高松塚古墳 取合部 西左 側くぼみの中 黒色
<i>Penicillium paneum</i>	28052	T7320-1-3	<i>Penicillium paneum</i>	LC133916	—	—	高松塚古墳 147次 5ALI 取合部南西隅崩落土除去 後 墓道理土断面
<i>Penicillium paneum</i>	28053	T7417-11-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC133917	LC133777	—	高松塚古墳 北壁石 壁面 西側下方 黒シミ#5
<i>Penicillium paneum</i>	28056	T7425-3-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC133918	LC133780	—	高松塚古墳 西壁石3上小 口面 黒色物質3 (中央 ピット状の複数の穴につ まっていたもの)
<i>Penicillium paneum</i> *3	15990	T7425-4-1	<i>Penicillium paneum</i>	AB479298	AB479330	AB479345	高松塚古墳 東壁石 3上 小口面 黒色物質 1
<i>Penicillium paneum</i>	28107	T7507-3-1	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133799	—	高松塚古墳 西 3 壁面 女 子群像(真中:左3女子) 左頭部後方 黒色
<i>Penicillium paneum</i> *3	15991	T7510-5-1	<i>Penicillium paneum</i>	AB479299	AB479331	AB479346	高松塚古墳 西壁石 2 北 側小口面 下方中央付近 表面が黒褐色~灰褐色の 漆喰片(塊)
<i>Penicillium paneum</i>	28057	T7511-5-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC133919	—	—	高松塚古墳 西 3 石 壁面 底辺部左側
<i>Penicillium paneum</i> *3	15992	T7521-8A-4	<i>Penicillium paneum</i>	AB479300	AB479332	AB479347	高松塚古墳 盗掘口プラ スチックカバー 下部 石 室側
<i>Penicillium paneum</i> *3	15993	T7528-21-1	<i>Penicillium paneum</i>	AB479301	AB479333	AB479348	高松塚古墳 天井石 2 壁 面南側中ほど

<i>Penicillium paneum</i>	28108	T7528-5-1	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133800	—	高松塚古墳 西壁石2上端 天井石2との接合面
<i>Penicillium paneum</i>	28060	T7530-4-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC133921	—	—	高松塚古墳 東壁石1上端 天井石1との接合面 漆喰黒粘
<i>Penicillium paneum</i>	28065	T7615-5-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC133925	—	—	高松塚古墳 東壁石1南小口 中央部下部 茶色と黒の混合 ネバネバ
<i>Penicillium paneum</i>	28157	T7822-2-3	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC145302	—	高松塚古墳 床石1下 東隅 黒色部
<i>Penicillium paneum</i>	28089	T81203-9-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC133948	—	—	高松塚古墳 西8 凝灰岩 取合部の壁 擬土を外したところ 下から4番目のブロック
<i>Penicillium paneum</i>	28094	TBT-24(m)	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133786	—	高松塚古墳 石室内
<i>Penicillium paneum</i> * ³	15994	K5916-7-1	<i>Penicillium paneum</i>	AB479303	AB479335	AB479350	キトラ古墳 石室内北壁 玄武下 濃緑ゲル状
<i>Penicillium paneum</i>	28488	K6120-3-3	<i>Penicillium paneum</i>	LC134179	—	—	キトラ古墳 石室内 土壌 東壁北寄 天井石すきまからの流入土
<i>Penicillium paneum</i> * ³	15995	K6203-2-1	<i>Penicillium paneum</i>	AB479304	AB479336	AB479351	キトラ古墳 石室内東壁 漆喰の穴(上方, 小さい穴)の中の黒色粘性のある物質
<i>Penicillium paneum</i>	28489	K6203-4-1	<i>Penicillium paneum</i>	—	LC133870	—	キトラ古墳 石室内天井 南寄り漆喰が剥がれているきわに下がっている黒く粘性のある物質
<i>Penicillium paneum</i>	28398	K7323-1-9	<i>Penicillium paneum</i>	LC134090	—	—	キトラ古墳 石室内北壁 酵母様コロニー
<i>Penicillium paneum</i>	28400	K8617-1-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC134092	LC133840	—	キトラ古墳 石室内天井 石 北東側隅付近茶ゲル
<i>Penicillium paneum</i>	28410	K8617-5-8	<i>Penicillium paneum</i>	LC134102	LC133844	—	キトラ古墳 石室内西壁 中央付近 白い粒状
<i>Penicillium paneum</i>	28412	K8617-6-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC134104	LC133845	—	キトラ古墳 石室内南壁 朱雀取外し跡付近石材上の赤色
<i>Penicillium paneum</i>	28508	K8617-7-2	<i>Penicillium commune</i>	LC134198	LC133873	—	キトラ古墳 石室内床面 南側 水色
<i>Penicillium paneum</i>	28592	K9703-7-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC134279	—	—	キトラ古墳 石室内北壁 漆喰の黒い穴の中心 黒色ゲル
<i>Penicillium paneum</i>	28541	K9925-1-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC134231	—	—	キトラ古墳 石室内西壁 漆喰上(北側中央)黄色ゲル(粒状)
<i>Penicillium paneum</i>	28552	K101008-4-12	<i>Penicillium paneum</i>	LC134242	—	—	キトラ古墳 石室内天井 中央部 石材間隙間物質
<i>Penicillium paneum</i>	28372	K111013-1-2	<i>Penicillium paneum</i>	LC134074	LC133829	—	キトラ古墳 石室内西壁 中央部 黒緑
<i>Penicillium paneum</i>	28457	K111013-4-2	<i>Penicillium paneum</i>	LC134149	—	—	キトラ古墳 石室内天井 南側
<i>Penicillium paneum</i>	28593	K12924-1-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC134280	LC133898	—	キトラ古墳 石室内東壁 中央すきま奥 黄土色ゲル
<i>Penicillium paneum</i>	28570	K12924-7-4	<i>Penicillium paneum</i>	LC134259	—	—	キトラ古墳 石室内西壁 南側天井付近 茶~黄土色ゲル状
<i>Penicillium paneum</i>	28594	K13218-3-1	<i>Penicillium paneum</i>	LC134281	—	—	キトラ古墳石室入口盗掘口天井側 石接地面テープ/ウレタン/スポンジ

<i>Penicillium</i> sp.	28499	K8617-3-1	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>	LC134189	—	—	キトラ古墳 石室内東壁中央上部付近 白粒状
<i>Penicillium</i> sp.	28504	K8617-5-12	<i>Penicillium glabrum</i> complex	LC134194	—	—	キトラ古墳 石室内西壁中央付近 白い粒状
<i>Penicillium</i> sp.	28509	K8617-7-3	<i>Penicillium glabrum</i> complex	LC134199	LC133874	—	キトラ古墳 石室内床面南側 水色
<i>Penicillium</i> sp.	28511	K8626-1	<i>Penicillium brasilianum</i>	LC134201	LC133875	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Penicillium</i> sp.	28512	K8626-2	<i>Penicillium skrjabinii</i>	LC134202	—	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Penicillium</i> sp.	28513	K8626-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>angulare</i>	LC134203	—	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Penicillium</i> sp.	28514	K8626-4	<i>Penicillium oxalicum</i>	LC134204	LC133876	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Penicillium</i> sp.	28517	K8626-7	<i>Penicillium charlesii</i>	LC134207	LC133879	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Penicillium</i> sp.	28427	K8626-9	<i>Penicillium glabrum</i> complex	LC134119	LC133853	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Penicillium</i> sp.	28364	K9925-2-2	<i>Penicillium citrinum</i>	LC134068	—	—	キトラ古墳 石室内東壁石の上 黄色粒状塊
<i>Penicillium</i> sp.	28365	K9925-4-2	<i>Penicillium</i> sp.	LC134069	—	—	キトラ古墳 石室内北壁漆喰の黒い穴の中心 黒色ゲル
<i>Penicillium</i> sp.	28556	K111013-1-4	<i>Penicillium</i> sp.	LC134246	—	—	キトラ古墳 石室内西壁中央部 黒緑
<i>Penicillium</i> sp.	28564	K12924-2-8	<i>Penicillium</i> cf. <i>digitatum</i>	LC134253	—	—	キトラ古墳 石室内 天井石中央西側すきま奥 茶～黄土色ゲル状塊
<i>Penicillium</i> sp.	28476	K12924-5-4	<i>Penicillium citrinum</i>	LC134168	LC133869	—	キトラ古墳 石室内 東壁中央表面 薄い黄土色～褐色ゲル状塊
<i>Penicillium</i> sp.	28479	K13218-3-2	<i>Penicillium corylophilum</i> / <i>cinerascens</i>	LC134171	—	—	キトラ古墳石室入口盗掘口天井側石接地面テープ/ウレタン/スポンジ
<i>Penicillium</i> sp.	28574	K13218-3-3	<i>Penicillium</i> sp.	LC134263	—	—	キトラ古墳石室入口盗掘口天井側 石接地面テープ/ウレタン/スポンジ
<i>Penicillium</i> sp.	28575	K13218-3-4	<i>Penicillium</i> cf. <i>olsonii</i>	LC134264	—	—	キトラ古墳石室入口盗掘口天井側 石接地面テープ/ウレタン/スポンジ
<i>Penicillium</i> sp.	28578	K13218-4-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>miczynskii</i>	LC134267	—	—	キトラ古墳石室入口盗掘口東側 ステンレス板 朱雀側 ウレタン-すず箔表面一部が黒褐色に着色
<i>Penicillium</i> sp.	28583	K13218-7-13	<i>Penicillium corylophilum</i> / <i>cinerascens</i>	LC134272	—	—	キトラ古墳石室入口盗掘口天井石上左側 平らな面上の黒いカビ
<i>Penicillium</i> sp.	28327	TBK-2(m)	<i>Penicillium</i> cf. <i>piscarium</i>	—	LC133815	—	キトラ古墳 石室内西壁 白いカビ 2004.3.17.
<i>Penicillium</i> sp.	28380	TBK-4(m)	<i>Penicillium</i> cf. <i>piscarium</i>	—	LC133835	—	キトラ古墳 白い塊 2004.3.18.
<i>Penicillium</i> sp.	28322	TBK-7(m)	<i>Penicillium corylophilum</i> / <i>cinerascens</i>	—	LC133810	—	キトラ古墳 小前室 2003.9.11.
<i>Penicillium</i> sp.	28381	TBK-10(m)	<i>Penicillium</i> cf. <i>piscarium</i>	—	LC133836	—	キトラ古墳 2004.10.4. 奈良文化財研究所の保管中(脱酸素封入)の十二支片状に発生したカビのひとつ

<i>Penicillium</i> sp.	28376	TBK-15(m)	<i>Penicillium brevicompactum / kongii</i>	—	LC133831	—	キトラ古墳 2004.2.2-3 石室内の空中浮遊菌
<i>Penicillium</i> sp.	28377	TBK-16(m)	<i>Penicillium</i> cf. <i>multicolor</i>	—	LC133832	—	キトラ古墳 2004.2.2-3 石室内の空中浮遊菌
<i>Penicillium</i> sp.	28378	TBK-17(m)	<i>Penicillium</i> cf. <i>sumatrense</i>	—	LC133833	—	キトラ古墳 2004.2.2-3 石室内の空中浮遊菌
<i>Talaromyces minioluteus</i>	28002	T4519-9-4s	<i>Talaromyces minioluteus</i>	—	LC133769	—	高松塚古墳 石室内東壁
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28737	T4906-7-3	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195229	LC195241	LC195253	高松塚古墳 石室内壁面 青龍わき 黒色コロニー
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28741	T61213-17-2	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195230	LC195242	LC195254	高松塚古墳 石室内東壁 中央部付近の床上 土
<i>Talaromyces minioluteus</i>	28133	T7510-1-5	<i>Talaromyces minioluteus</i>	—	LC145293	—	高松塚古墳 147次 5ALI 西側石3 南小口上半 漆喰 (西3-2石間)
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28748	T7521-8B-2	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195231	LC195243	LC195255	高松塚古墳 盗掘口プラスチックカバー 下部 石室側
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28751	T7521-8F-1	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195232	LC195244	LC195256	高松塚古墳 盗掘口プラスチックカバー 下部 石室側
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28752	T7521-8H-1	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195233	LC195245	LC195257	高松塚古墳 盗掘口プラスチックカバー 下部 取合部側
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28756	T7530-16-2	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195234	LC195246	LC195258	高松塚古墳 西壁石1 南目地 漆喰天場 黒色粘性 漆喰土壌片
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28757	T7615-5-2	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195235	LC195247	LC195259	高松塚古墳 東壁石1 南小口 中央部下部 茶色と黒の混合 ネバネバ
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28762	T81203-3-2	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195236	LC195248	LC195260	高松塚古墳 東側 墳丘土 オリジナル 白色版築土 取合部凝灰岩の裏
<i>Talaromyces minioluteus</i>	28193	TBT-9(m)	<i>Talaromyces minioluteus</i>	—	LC133806	—	高松塚古墳 石室内青龍北
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28767	K8626-8	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195237	LC195249	LC195261	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28773	K101008-7-6	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195238	LC195250	LC195262	キトラ古墳 石室内南壁 上部 天井近い石の上
<i>Talaromyces minioluteus</i> *4	28780	K13218-4-4	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC195239	LC195251	LC195263	キトラ古墳石室入口盗掘口東側ステンレス板 朱雀側ウレタン-すず箔
<i>Talaromyces minioluteus</i>	28523	K8626-17	<i>Talaromyces minioluteus</i>	LC134213	LC133882	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Talaromyces</i> sp.	28515	K8626-5	<i>Talaromyces</i> cf. <i>purpurogenus</i>	LC134205	LC133877	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル
<i>Talaromyces</i> sp.	28518	K8626-10	<i>Talaromyces</i> cf. <i>purpurogenus</i>	LC134208	LC133880	—	キトラ古墳 墳丘部表層の土壌サンプル

*1: 理化学研究所 (理研) バイオリソースセンター微生物材料開発室 (BRC-JCM) 「文化庁より移管した高松塚古墳・キトラ古墳壁画劣化原因調査にかかわる微生物分離株 (<http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/strain-takamatsuzuka-kitora/>) リストから *Penicillium* 属および *Talaromyces* 属分離株データを抜粋し、一部改変

*2: 分離株番号の T および TBT は高松塚古墳からの分離株, K および TBK はキトラ古墳からの分離株を示す

*3: An et al.¹⁸⁾ で発表済データ

*4: 本研究で新たに塩基配列データを取得し、登録した分離株

統樹 (図1~図3) には, 各分離株番号の後にそれぞれマークを付与してカテゴリーが分かるようにした。

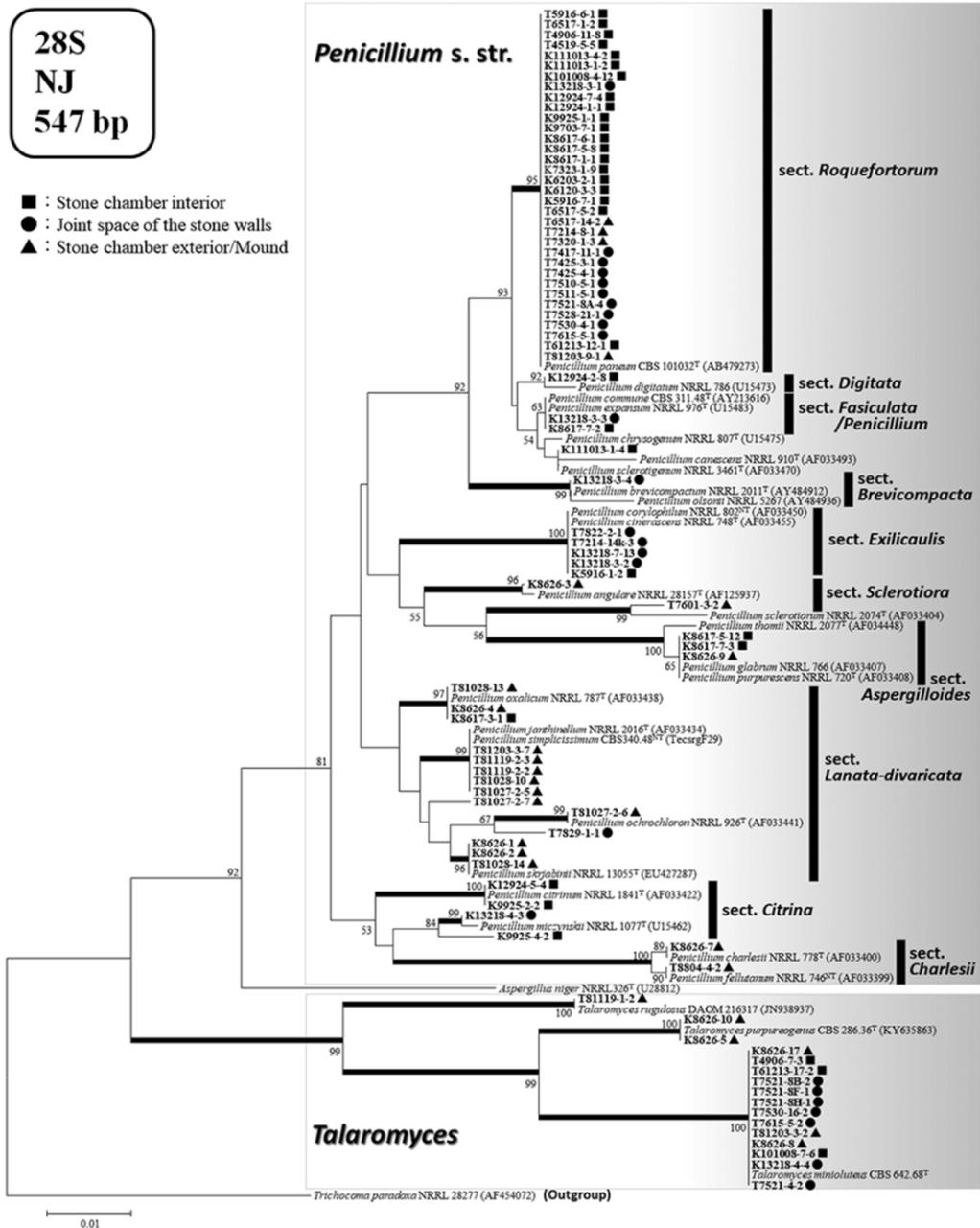


図1 高松塚およびキトラ両古墳からの *Penicillium* 属/ *Talaromyces* 属分離株の28S rDNA-D1/D2 (LSU) に基づく分子系統樹

株番号のTは高松塚古墳分離株, Kはキトラ古墳分離株, 右肩付^{T/N}は当該種のタイプ/ネオタイプ由来株を意味する。各分岐点の数字はブートストラップ検定 (1,000回) の再現値を示す (ブートストラップ値を%, 50%以上の枝のみに表示)。太線は95%以上の枝を示す。左下のバーは100塩基につき1塩基の違いを表す。右側のバーは Houbraken & Samson¹⁵⁾ に基づく *Penicillium* 属の下位分類階級「節 section (sect.)」を示す。

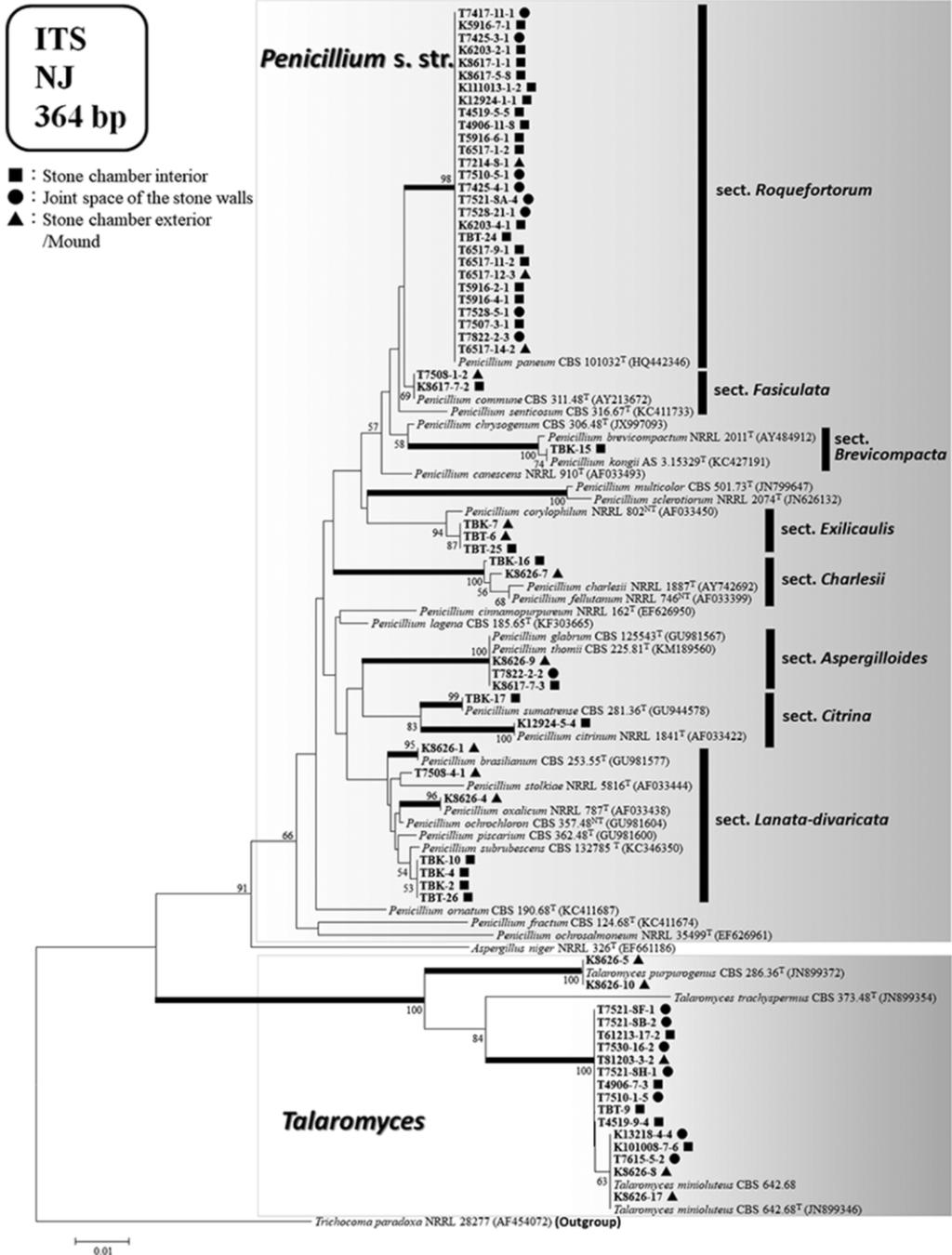


図2 高松塚およびキトラ両古墳からの *Penicillium* 属/ *Talaromyces* 属分離株の ITS 領域に基づく分子系統樹

株番号の T は高松塚古墳分離株, K はキトラ古墳分離株, 右肩付^{T/NT} は当該種のタイプ/ネオタイプ由来株を意味する。各分岐点の数字はブートストラップ検定 (1,000回) の再現値を示す (ブートストラップ値を%, 50%以上の枝のみに表示)。太線は95%以上の枝を示す。左下のバーは100塩基につき1塩基の違いを表す。右側のバーは Houbraken & Samson¹⁵⁾に基づく *Penicillium* 属の下位分類階級「節 section (sect.)」を示す。

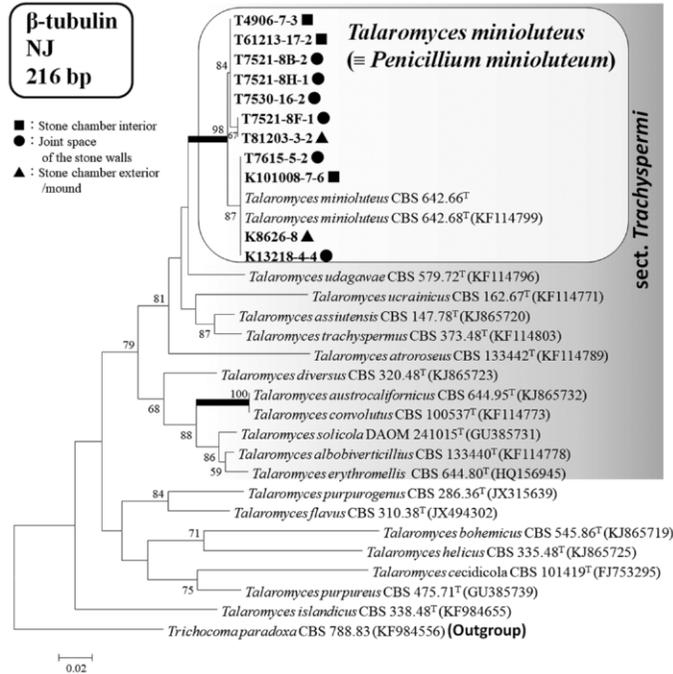


図3 高松塚およびキトラ両古墳からの *Penicillium* sp. 2分離株の β -tubulin 遺伝子に基づく分子系統樹

株番号のTは高松塚古墳分離株，Kはキトラ古墳分離株，右肩付^Tはその種のタイプ由来株を意味する。各分岐点の数字はブートストラップ検定（1,000回）の再現値を示す（ブートストラップ値を%で，50%以上の枝のみに表示）。太線は95%以上の枝を示す。左下のバーは100塩基につき2塩基の違いを表す。

2-2. 遺伝子塩基配列解析

両古墳からの *Penicillium* 属/*Talaromyces* 属分離株のうち，JCM に菌株が寄託され，その塩基配列が国際塩基配列データベース（DDBJ/ENA/NCBI）に登録・公開されているものについて分子系統的解析を行った。対象菌株の各種遺伝子のDNA塩基配列データを上述の国際塩基配列データベースからダウンロードして解析に用いた（表1）。対象とした遺伝子領域と配列数は，核大サブユニット・リボソームRNAのD1/D2領域（nLSU rRNA，LSUと略記）の85塩基配列，およびリボソームRNAのITS1-5.8S-ITS2領域（ITSと略記）の66塩基配列である。さらに，これらの塩基配列を用いて近縁種推定を目的として国際塩基配列データベースに対してBLAST¹⁹⁾による相同性検索を行った。ダウンロードした個々の菌株由来の塩基配列と高い相同性を示した *Penicillium* 属/*Talaromyces* 属分類群の塩基配列についてもデータベースからダウンロードして，分子系統解析に用いた。なお，この際には *Penicillium* 属/*Talaromyces* 属分類群のタイプ由来株（ex-type strain）の塩基配列を中心に収集し，分子系統解析用のデータセットとした。ダウンロードした各菌株および既知近縁種の塩基配列をBioEdit ver. 7.0.5.3²⁰⁾を用いてアライメントを作成し，目視で確認したのちMEGA ver.6.0²¹⁾を用いて近隣結合（Neighbor-Joining；NJと略記）法で分子系統樹を構築し，系統解析した。

2-3. *Penicillium* sp. 2の詳細同定

2-3-1. 培養性状, 形態観察および有機酸生成試験

両古墳から得られた *Penicillium* sp. 2分離株の中から分離源等と考慮に入れて選抜した11菌株について既報^{11, 22, 23)}に従い, 培養性状および形態観察を行った。分離株の肉眼的特徴のための培地は Czapek yeast extract agar (CYA^{11, 22)}), Malt extract agar (MEA^{11, 22)}), 25% glycerol nitrate agar (G25N^{11, 22)}), Yeast extract sucrose agar (YES¹³⁾), Potato-dextrose agar (PDA; Becton Dickinson, USA) を使用した。さらに, 炭酸カルシウム溶解能を調べるために *Gluconobacter oxydans* medium (GYC; DSMZ Medium105) を用いた²⁴⁾。コロニー色調は Kornerup and Wanscher²⁵⁾ に基づいて記載した。また, ラクトフェノール液 (マウント液)²⁶⁾ を用いて MEA 培地上のコロニーからプレパラートを作製し, ノマルスキー型微分干渉顕微鏡 BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) を使って形態学的特徴の観察を行った。同画像撮影にはニコン顕微鏡デジタルカメラ (DS-Fi2-L3, Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。比較対象として *Talaromyces minioluteus* (\equiv *Penicillium minioluteum*) のネオタイプ由来株 CBS 642.68^{NT} を Westerdijk (旧名 CBS-KNAW) Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, The Netherlands) より入手して試験に用いた。

また, 選抜した高松塚分離株 T7530-16-2について, 既報²⁷⁾に従い, 有機酸(クエン酸, 酒石酸, リンゴ酸, コハク酸, 乳酸, フマル酸, ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, iso-酪酸, n-酪酸, iso-吉草酸, n-吉草酸) の生成能試験を行った。

2-3-2. 遺伝子塩基配列解析

両古墳から得られた *Penicillium* sp. 2分離株の中から分離源等を考慮に入れて選抜した11菌株について既報^{18, 23)}に従い, LSU, ITS およびタンパク質をコーディングする β -tubulin 遺伝子の塩基配列を決定し, NJ 法で分子系統樹を構築し, 系統解析した。

3. 結果および考察

3-1. 高松塚・キトラ両古墳の *Penicillium* 属/*Talaromyces* 属分離株の分子系統学的位置

現在, *Penicillium* 属は分子系統学的に狭義 (sensu stricto, s. str. と略記) の *Penicillium* 属として, 約354種が認められており, これらの種は種と属の間の分類階級 (ランク) を使って, 2つの亜属 (subgenus) と25の節 (section, sect. と略記) に再分類されている¹⁶⁾。高松塚・キトラ両古墳から分離された *Penicillium* 属/*Talaromyces* 属の85菌株の LSU および66菌株の ITS 領域の各遺伝子 (表1) を用いた分子系統解析の結果, LSU 領域では *Penicillium* 属内で10の節, ITS 領域で8つの節に属するなど, 分子系統学的に属内で多様性が高いことが明らかになった (図1, 図2)。その結果, 未記載種や隠蔽種 (cryptic species) の存在も示唆された。各遺伝子に基づいた分子系統解析によって, 両古墳分離株の帰属を再同定した結果を併せて表1に記した。しかし, 本研究において, 全分離株を分子系統学的に種レベルの再同定ができたわけではなく, 分離株の培養性状・形態学的特徴に加えて LSU および ITS 領域以外他遺伝子を用いた更なる分子系統学的研究が必要と考えられた。

Penicillium 属の種はこれまで壁画等の文化財の生物劣化に関与する菌類として世界中から報告されている^{10, 28-32)}。本研究において, 種によっては分離源に特異性がある傾向が認められた。例えば, *P. brevicompactum* / *kongii* および *P. citrinum* はキトラ古墳石室内壁画面からのみ, *P. simplicissimum* / *janthinellum* は高松塚古墳墳丘部土壌からのみ分離されている (表

1)。これらの種を含め、両古墳から分離されている *Penicillium* 属の種と共通した種類がアルタミラ洞窟からも報告されている³²⁾。これらの種が古墳の生物劣化との関わりについては更なる研究が必要だと考えられた。一方で、*P. pnaeum* は両古墳石室内外から広く分離されているが(表1)、国内外の文化財等の生物劣化の研究報告ではいまだ報告例はなく、注目に値する種だと考えられた^{6, 18)}。

また、各遺伝子の分子系統解析結果において、既知種との塩基配列の相同性が90%以下と低い分離株が7株(T7508-4-1, T7601-3-2, T81119-1-2, T7829-1-1, K9925-4-2, K111013-1-4, K13218-3-3)認められており、これらの分離株は未記載種の可能性も示唆され、分類学的に更なる検討が必要と考えられた。

3-2. *Penicillium* sp. 2の詳細同定

両古墳からの *Penicillium* sp. 2分離株について培養性状、形態的特徴および分子系統の表現・遺伝両性質データを統合的に解析した。その結果、当該分離株は分子系統上(LSU, 図1; ITS, 図2; β -tubulin 遺伝子, 図3), *Talaromyces minioluteus* (= *Penicillium minioluteum*) クレードに帰属することが分かった。さらに、それら分離株の培養および形態学的特徴(図4)も同種の記載文^{11, 23)}とほぼ一致していたことから、旧分類体系の *Penicillium* 属 *Biverticillium* 亜属に属し、現分類体系の *Talaromyces* 属 *Trachyspermi* 節の1種 *Talaromyces minioluteus* (= *Penicillium minioluteum*) と同定した。分類学的特徴などをまとめた記載文を以下に表記する。なお、記載文は、寄託した分離株の菌株データ(表1)が英語表記で公開されていること(JCM On-line Catalogue of Strains, http://jcm.brc.riken.jp/en/catalogue_e, また、外国人読者にも配慮して、英語で表記した。

Talaromyces minioluteus (Dierckx) Samson & al., Stud. Mycol. 71: 176. 2011. MycoBank MB560657 (Fig. 4)

= *Penicillium minioluteum* Dierckx, Ann. Soc. Sci. Bruxelles 25: 87. 1901; Frisvad & al., Persoonia 14: 199. 1990.

= *Penicillium gaditanum* C. Ramírez & A.T. Martínez, Mycopathologia 74: 165. 1981.

= *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* Thom, Mycologia 7: 142. 1915.

= *Penicillium samsonii* Quintan., Mycopathologia 91: 69. 1985.

Cultural characteristics: Colonies on CYA reaching 17–18 mm diam in 1 wk at 25 °C in the dark, velvety, dull green (27E4–27E6), and producing brownish red soluble pigments; exudates absent; reverse brown (6E8); no growth at 37 °C. Colonies on MEA reaching 21–22 mm diam in 1 wk at 25 °C in the dark, velvety, yellowish green (6C8–6D8), and lacking soluble pigments; exudates absent; reverse yellowish green (6C8–6D8). Colonies on YES reaching 22–24 mm diam in 1 wk at 25 °C in the dark, velvety, greyish white (2C8–2D8), and lacking soluble pigments; exudates absent; reverse brown (6E8). Colonies on PDA reaching 22–26 mm diam in 1 wk at 25 °C in the dark, velvety, yellowish green (6C8–6D8), and lacking soluble pigments; exudates absent; reverse yellowish brown (4C8–6D8). Colonies on GYC in 4 wk at 25 °C in the dark, velvety, yellowish green (5C8–5D8), and lacking soluble pigments; exudates absent; CaCO₃ solubilization seen in reverse.

Micromorphology: Conidiophores bearing terminal biverticillate penicilli; stipes smooth

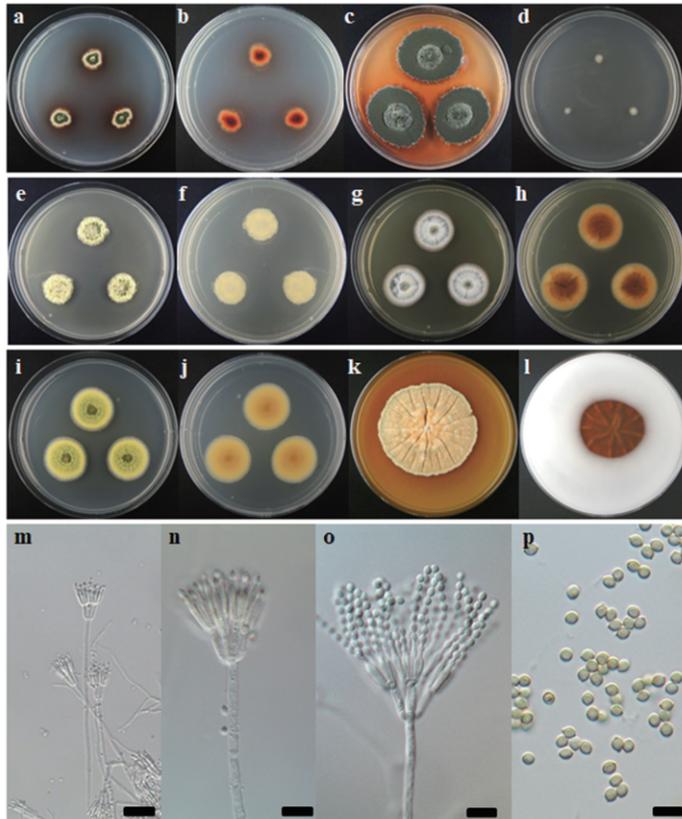


図4 *Penicillium* sp. 2分離株（本研究で、*Talaromyces minioluteus* と同定）の培養性状および形態
 a-l: 分離株 T7615-5-2。m-p: 分離株 T4906-7-3。a: CYA, b: CYA 裏面, c: CYA, d: G25N,
 e: MEA, f: MEA 裏面, g: YES, h: YES 裏面, i: PDA, j: PDA 裏面, k: GYC, l: GYC 裏面,
 m-o 分生子柄, p: 分生子。培養条件は25℃, 1週間 (c: 3週間, k, l: 4週間): 使用培地の略記
 は本文2-3-1参照。スケールバーは, m, o: 10μm, p: 5μm。

walled, 60-250 × 2-3 μm; metulae in whorls of three to five, divergent, 10-20 × 2-3.5 μm; phialides acerose, three to five per metula, 10-17 × 2-3 μm; conidia smooth, ellipsoidal, 2.5-4 × 1.5-2.5 μm. Ascomata (Cleistothecia) and synnemata not observed.

Molecular phylogenetic placement: See Fig. 1 (LSU), Fig. 2 (ITS), and Fig. 3 (β-tubulin).

Isolates and reference strain examined: T4906-7-3, T61213-17-2, T7521-8B-2, T7521-8F-1, T7521-8H-1, T7530-16-2, T7615-5-2, T81203-3-2, K8626-8, K101008-7-6, and K13218-4-4 (for the respective strain data, see Table 1), and *T. minioluteus* ex-neotype strain CBS 642.68^{NT} (substrate and origin, unknown).

海外の研究報告において、*Talaromyces minioluteus* (≡ *Penicillium minioluteum*) は世界中に分布し、主に土壌菌類として知られ、湿気のある環境下で急速な生物劣化を引き起こすことが報告されている^{11, 22)}。これまで世界中から、土壌、洞窟内土壌、植物体、木材片、貯蔵食品、綿生地、肥料、人体、航空機燃料タンクなど様々な基質から分離報告例がある^{11, 22, 23)}。しかし、本研究のように文化財の生物劣化に関係したバイオフィームや石材等の基質からの報告は初めてとなる。また、本種はこれまで日本国内からの報告例はなく³³⁾、日本新産として菌類目

録に加えらるる。

3-3. *Penicillium* 属分離株の二、三の生物学的特性

菌類による壁画等の文化財の劣化には菌糸成長による物理的破壊と酵素や酸の産生および色素生成による化学的破壊が知られている^{10, 29)}。両古墳から分離された菌類分離株には菌糸成長による生物劣化は共通していたと考えられるが、*Penicillium* 属分類株の中でも特徴的だと考えられた酸および色素産生について以下に、言及する。

Penicillium 属の種はクエン酸や酢酸、グルコン酸などの様々な有機酸を産生することが文献的に知られている^{11, 34)}。両古墳石室内の優占種であった *Penicillium paneum* の高松塚古墳分離株 T5916-6-1はギ酸、酢酸、乳酸、リンゴ酸、コハク酸の有機酸を産生することが明らかになっている(佐野他, 未発表)。また、*Penicillium* sp. 2(本研究で、*Talaromyces minioluteus* と同定) 高松塚古墳分離株 T7530-16-2について、有機酸生成能試験を行った結果、リンゴ酸 0.005 mg/mL, ギ酸0.008 mg/mLが検出され、わずかであるが当分離株がリンゴ酸とギ酸を生成することが明らかになった。また、*T. minioluteus* (≡ *P. minioluteum*) は *P. paneum* と異なり、高松塚古墳の石室内および壁画面よりも石室解体時の壁石間、盗掘口プラスチックカバーおよび取合部を含む石室外の試料から多く分離されている(表1)。GYC平板の培養観察において、*T. minioluteus* (≡ *P. minioluteum*) T7530-16-2は顕著な炭酸カルシウム溶解能が認められた(図4)。この溶解能は同じく両古墳からの *Kendrickiella phycomyces*²⁴⁾ や *Sagenomella striatispora*³⁵⁾ に匹敵していた。このことから、有機酸生成能(リンゴ酸とギ酸)とGYC平板の炭酸カルシウム溶解能は *T. minioluteus* (≡ *P. minioluteum*) が石室を構成している凝灰岩切石の劣化に少なからず関与していた可能性が示唆された。

また、*T. minioluteus* (≡ *P. minioluteum*) の培養性状の観察において、顕著な赤色系の可溶性色素産生が認められた(図4)。*Talaromyces* 属の中でも *T. purpurogenus*, *T. atroseus*, *T. albobiverticillius* および *T. minioluteus* は食品工場で着色料に利用されるような *Azaphilone* 系赤色色素を産生することが知られている^{23, 36)}。両古墳サンプル由来の *T. minioluteus* 分離株の色素産生能は両古墳の石材等の変色劣化に関わっていた可能性が示唆された。さらに、両古墳からの *Penicillium* 属/*Talaromyces* 属分離株の分生子の塊は青緑色に着色していたことから、壁画等の染みの一因となっていた可能性が考えられる。

4. まとめ

高松塚・キトラ両古墳から分離された *Penicillium* 属85菌株のLSUおよび66菌株のITS領域の各遺伝子を用いた分子系統解析の結果、LSU領域では *Penicillium* 属内で10の節、ITS領域で8つの節に属するなど、分子系統学的に属内で多様性が高いことが明らかになった。その中に未記載種や隠蔽種が存在する可能性が示唆された。これらの種については形態学的特徴を含め、さらなる研究が必要である。

Penicillium paneum (当初 *Penicillium* sp. 1と同定)に次いで、両古墳からの優占種であった *Penicillium* sp. 2分離株は形態学的・分子系統学的解析により、*Talaromyces minioluteus* Samson & al. (≡ *Penicillium minioluteum* Dierckx) と同定した。*T. minioluteus* 分離株はリンゴ酸とギ酸の有機酸生成および顕著な炭酸カルシウム溶解能が認められ、石室を構成している石材(凝灰岩切石)の劣化に少なからず関与していた可能性が示唆された。本研究において、*T. minioluteus* の基質として文化財の生物劣化に関係したバイオフィームや石材等は初めての報告となり、また、日本新産種としても記録される。

謝 辞

本研究は、JSPS 科研費・基盤研究 (A) 課題番号 19200057 (平成19年度～22年度) 「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 (研究代表者: 佐野千絵)」の助成を受けて遂行した。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 木川りか、杉山純多、高鳥浩介、間淵 創、佐野千絵、三浦定俊: 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、保存科学、47、121-128 (2008)
- 2) 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、106 pp., 文化庁、東京 (2010)
- 3) 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)
- 4) Kigawa, R., Sano, C., Ishizaki, T., Miura, S., Sugiyama J.: Biological issues in the conservation of mural paintings of Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan. *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.), pp. 43-50, National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo, Tokyo (2009)
- 5) Sugiyama, J., Kiyuna, T., An, K.-D., Nagatsuka, Y., Handa, Y., Tazato, N., Hata, J., Nishijima, M., Koide, T., Yaguchi, Y., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S.: Microbiological survey of the stone chambers of Takamatsuzuka 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.), pp. 51-73, National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo, Tokyo (2009)
- 6) Sugiyama, J., Kiyuna, T., Nishijima, M., An, K.-D., Nagatsuka, Y., Tazato, N., Handa, Y., Hata-Tomita, 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)
- 7) Kiyuna, T., An, K.-D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: Mycobiota of the Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan, focusing on the molecular phylogenetic diversity of *Fusarium* and *Trichoderma*, *Mycoscience*, 49, 298-311 (2008)
- 8) Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A.: Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, *Studies in Mycology*, 78, 343-371 (2014)
- 9) Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.-H.: *Compendium of Soil Fungi*, 2nd Edition, 672 pp., IHW-Verlag, Eching (2007)
- 10) Garg, K.L., Jain, K.K., Mishra, A.K.: Role of fungi in the deterioration of wall paintings,

- Science of the Total Environment, 167, 255-271 (1995)
- 11) Pitt J.I.: The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*, 634 pp., Academic Press, London (1979)
 - 12) 佐野千絵：文化財への微生物被害と調査手法—保存科学1号～45号、保存科学、46、255-268 (2007)
 - 13) Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B.: Food and Indoor Fungi, 390 pp., CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht (2010)
 - 14) 岡田 元：第18回国際植物学会議 (IBC2011, Melbourne) で採択されたアナモルフ菌類および多型的生活環をもつ菌類の統一命名法、日本菌学会会報、52、82-97 (2011)
 - 15) 青木孝之、岡田 元：第19回国際植物科学会議 (IBC 2017, Shenzhen) で採択された国際藻類・菌類・植物命名規約 (ICN; 深圳規約)、日本菌学会会報、58、59-66 (2017)
 - 16) Houbraken, J., Samson, R.A.: Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families, Studies in Mycology, 70, 1-51 (2011)
 - 17) Samson, R.A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spiereburg, H., Seifert, K.A., Peterson, S.W., Varga, J., Frisvad, J.C.: Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*, Studies in Mycology, 70, 159-183 (2011)
 - 18) An, K.-D., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*, Antonie van Leeuwenhoek, 96, 579-592 (2009)
 - 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) Hall, T.A.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98 (1999)
 - 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) Pitt, J.I.: A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species, 3rd. Edition, 197 pp., Food Science Australia, North Ryde (2000)
 - 23) Yilmaz, N., Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A.: Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*, Studies in Mycology, 78, 175-341 (2014)
 - 24) Kiyuna, T., An, K.-D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: Bristle-like fungal colonizers on the stone walls of the Kitora and Takamatsuzuka Tumuli are identified as *Kendrickiella phycomyces*, Mycoscience, 53, 446-459 (2012)
 - 25) Kornerup, A., Wanscher, J.H.: Methuen Handbook of Colour, 3rd Edition, 252 pp., Eyre Methuen, London (1978)
 - 26) Gams, W., van der Aa, H.A., van der Plaats-Niterink, A.J., Samson, S.A., Stalpers, J.A.: CBS Course of Mycology, 3rd Edition, 136 pp., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht (1987)
 - 27) 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)

- 28) Nugari, M.P., Realini, M., Roccardi, A.: Contamination of mural paintings by indoor airborne fungal spores, *Aerobiologia*, 9, 131-139 (1993)
- 29) Karbowska-Berent, J.: Microbiodeterioration of mural paintings, A review. *In: Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of Works of Art* (eds. By Koestler, R.J., Koestler, V.H., Charola, A.E., Nieto-Fernandez, F.E.), pp. 267-301, The Metropolitan Museum of Art, New York (2003)
- 30) 佐野千絵：文化財への微生物被害と調査手法—保存科学1号～45号、保存科学、46、255-268 (2007)
- 31) Bastian, F., Jurado, V., Nováková, A., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C.: The microbiology of Lascaux cave, *Microbiology*, 156, 644-652 (2010)
- 32) Novakova, A., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C.: Are fungi a real threat for the conservation of Altamira Cave?, *In: The Conservation of Subterranean Cultural Heritage* (ed. by Saiz-Jimenez, C.), pp. 223-228, CRC Press, Leiden (2014)
- 33) 勝本謙：日本産菌類集覧、1177 pp., 日本菌学会関東支部、東京 (2010)
- 34) Sterflinger, K.: Fungi as geologic agents, *Geomicrobiology Journal*, 17, 97-124 (2000)
- 35) Kiyuna, T., An, K.-D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: Noteworthy anamorphic fungi, *Cephalotrichum verrucisporum*, *Sagenomella striatispora*, and *Sagenomella griseoviridis*, isolated from biodeteriorated samples in the Takamatsuzuka and Kitōra Tumuli, Nara, Japan, *Mycoscience*, 58, 320-327 (2017)
- 36) Frisvad, J.C., Yilmaz, N., Thrane, U., Rasmussen, K.B., Houbraeken, J., Samson, R.A.: *Talaromyces atroroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments, *PLoS ONE* 8, e84102 (2013)

キーワード：高松塚古墳 (Takamatsuzuka Tumulus)；キトラ古墳 (Kitōra Tamulus)；分子系統解析 (molecular phylogenetic analysis)；アオカビ属 (*Penicillium*)；タラロミケス属 (*Talaromyces*)；有機酸 (Organic acids)

Molecular Phylogenetic Assignment of *Penicillium* Isolates and Taxonomic Characterization of *Penicillium* sp. 2 Isolates from the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli, and Their Implications for Biodeterioration Problems

Tomohiko KIYUNA*, Kwang-Deuk An ^{*1}, Yoshinori SATO, Rika KIGAWA²,
Chie SANNO, and Junta SUGIYAMA^{**3}

Molecular phylogenetic analyses based on nrLSU and ITS sequences of 85 and 66 *Penicillium*/*Talaromyces* isolates from the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli revealed that these isolates were divergent in the genus *Penicillium*. Novel lineages, which are considered undescribed or cryptic species, were detected. Therefore, further studies clarifying the identity of these isolates are warranted. Using an integrated analysis of phenotypic and genotypic characters, *Penicillium* sp. 2 isolates from both tumuli were identified as *Talaromyces minioluteus* Samson & al. (\equiv *Penicillium minioluteum* Dierckx). Its brief description is provided herein. The relationship between the physicochemical characteristics of these isolates and their substrates (isolation sources) is briefly described; these include dissolution of calcium carbonate (CaCO₃) on GYC (*Gluconobacter oxydans* medium; Leibniz Institute DSMZ Medium No. 105) agar plates and reddish soluble pigmentation on each agar plate. These characteristics may be related to the biodeterioration of plaster and rock substrates of both tumuli. This is the first study reporting *T. minioluteus* related to biodeteriorated cultural properties and a new addition to the fungal inventory of Japan.

*TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd. **TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd., Chiba Branch Office

¹Present affiliation: Macrogen Japan Corp. ²Present affiliation: Kyushu National Museum

³Present affiliation: National Museum of Nature and Science