

難培養性の微生物の検出について 非培養法 (PCR-DGGE 解析) による細菌群集解析結果

東京大学名誉教授、テクノスルガ・ラボ

杉山 純多

東京文化財研究所 木川 りか・佐野 千絵

1. 群集解析に用いた試料の採取地点

2006 年～2008 年で採取された高松塚古墳解体試料のうち、量的に十分解析可能な試料 (総試料数 109 点) を PCR-DGGE 解析にもちいた。内訳は古墳壁画面など石室内試料 4 点 (2006 年度採取分)、壁石間試料 (側壁間、側壁と床石間、床石間、床石と天井石間など)、石室外試料 (畦、側壁と畦間、床面など)、取合部試料などを含む発掘過程の試料 (2007 年度採取分) 計 91 点・墳丘部試料 (2006 年および 2008 年度採取分) 計 14 点となる。高松塚古墳解体試料を石室内試料、石室外試料、壁石間試料、取合部試料、墳丘部試料の 5 つのカテゴリーに分け、このうち石室内試料、石室外試料、壁石間試料、取合部試料の 4 つの各カテゴリーから PCR-DGGE 解析試料を選択した。図 1 に、高松塚古墳試料採取地点および高松塚古墳石室展開模式図を示し、番号の付いた箇所は、PCR-DGGE 解析に用いた試料の採取地点を示す。図 2 は、墳丘部で用いた試料の採取地点を示す。

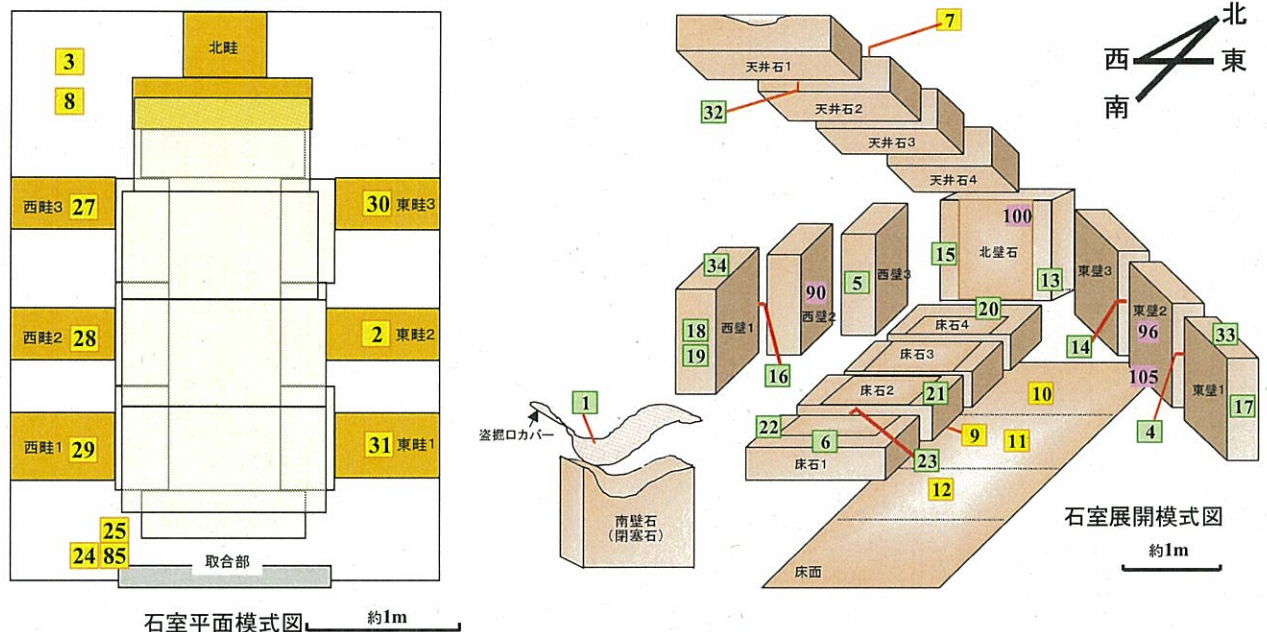
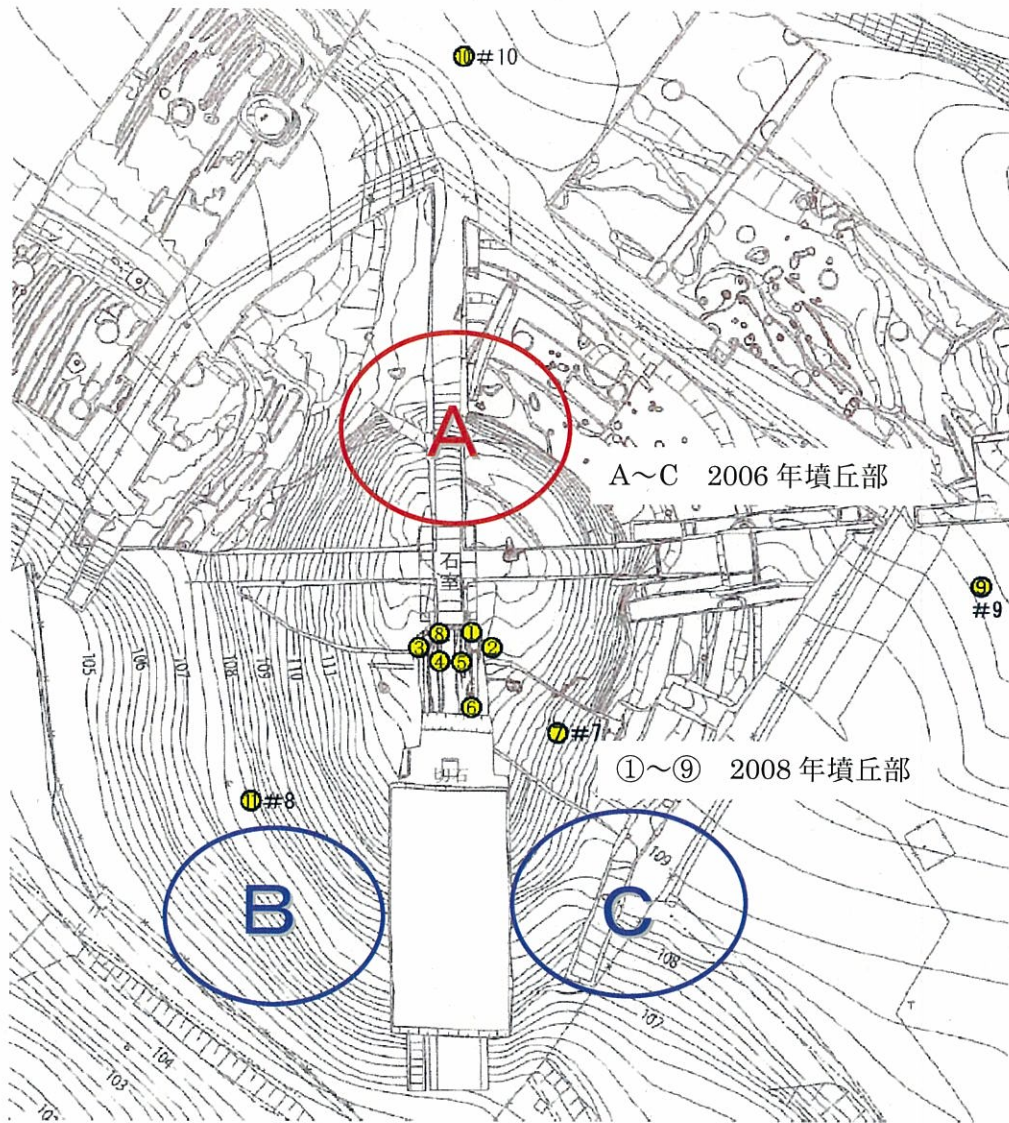


図 1. 高松塚古墳採取地点および高松塚古墳石室展開模式図



図版：高松塚古墳の調査—H16年度発掘調査報告—2006 奈良文化財研究所 p.20 より抜粋

墳丘部鳥瞰図

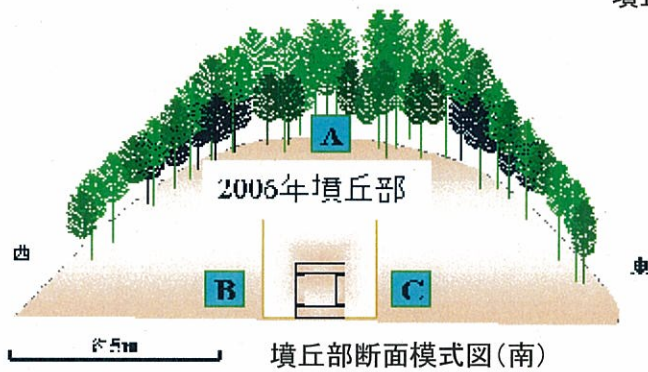


図2. 高松塚古墳採取地点（古墳墳丘部）

2. 一般細菌を対象とした PCR-DGGE 解析および塩基配列解析による結果

図3に石室内、壁石間、石室外、取合部試料における PCR-DGGE 解析結果を示す。図3における3種類の矢印は、それぞれ *Ochrobactrum* 属、*Stenotrophomonas* 属、*Bordetella* 属が検出されたバンドを示す。石室内試料の PCR-DGGE バンドパターンは、壁石間、石室外、取合部試料よりも、バンド数が比較的少ないことから、石室内試料の細菌叢は特定の優占種で構成されていると推察された。バンドの塩基配列解析より石室内試料からは *Ochrobactrum* 属、*Stenotrophomonas* 属、*Bordetella* 属が検出された。これらの細菌種は、高松塚古墳石室解体試料からも検出されており、さらに、16S rDNA V3 領域における配列は培養法とも一致したことから、石室内において優占種であると考えられた。

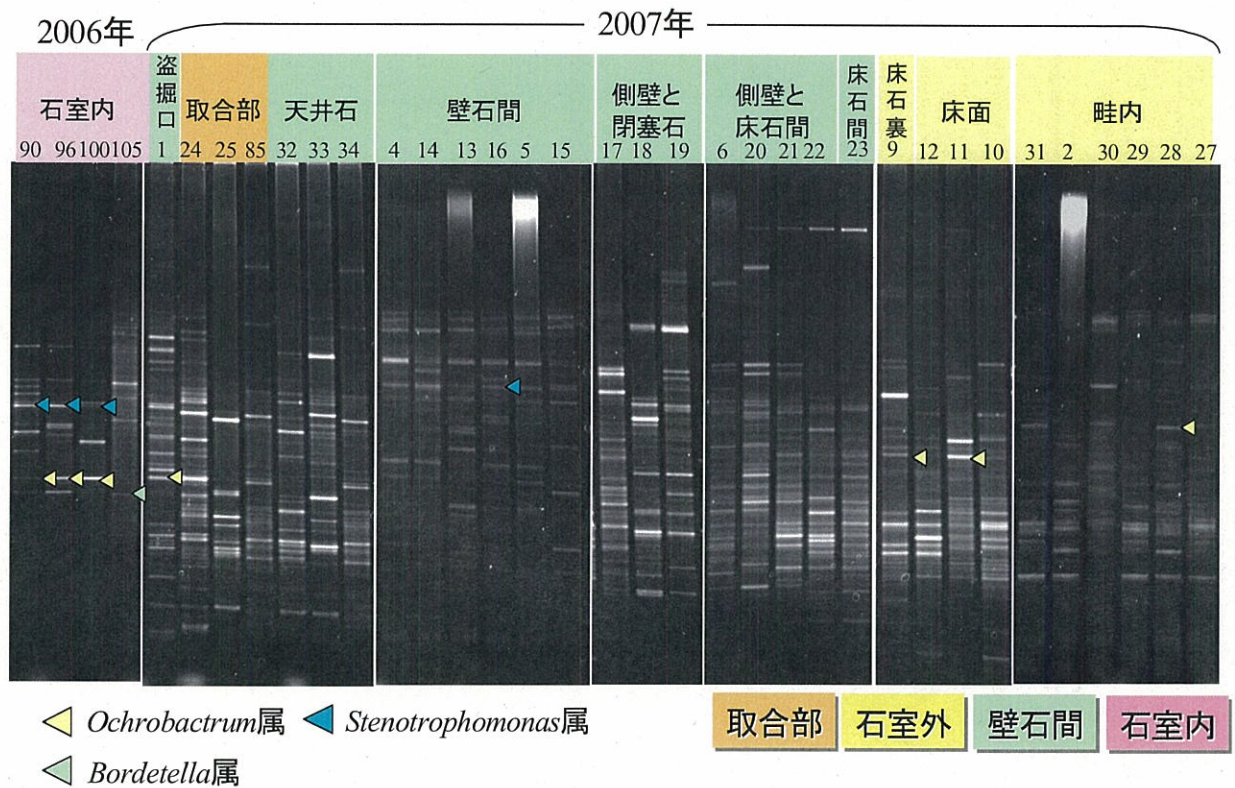


図3. 石室内、壁石間、石室外、取合部試料における PCR-DGGE 解析結果

3. 高松塚古墳試料からの酢酸菌の検出
PCR-DGGE 解析による酢酸菌の検出

酢酸菌 (*Gluconacetobacter* 属細菌)には窒素固定能を有する菌種も知られており、菌が生成する酢酸などの有機酸が炭酸カルシウムを主成分とする漆喰を溶解する可能性が考慮され、高松塚古墳の壁画の劣化原因菌となり得ることが考えられる。

高松塚古墳試料の PCR-DGGE 解析の結果、8 点の試料 (表黒字) から *Gluconacetobacter* 属細菌に近縁な配列が検出された。また、まだ配列は得られていないものの、これらの 8 点の試料に加えて PCR-DGGE 解析の結果より *Gluconacetobacter* 属細菌と推定されるバンドとほぼ同じ位置にバンドが検出された試料 2 点を表、青字に示す。石室内の試料 (全部で 4 試料) からは、酢酸菌由来のバンドは検出されなかったが、墳丘部および石室外・壁石間試料における主に西側付近の試料から *Gluconacetobacter* 属細菌が検出された。

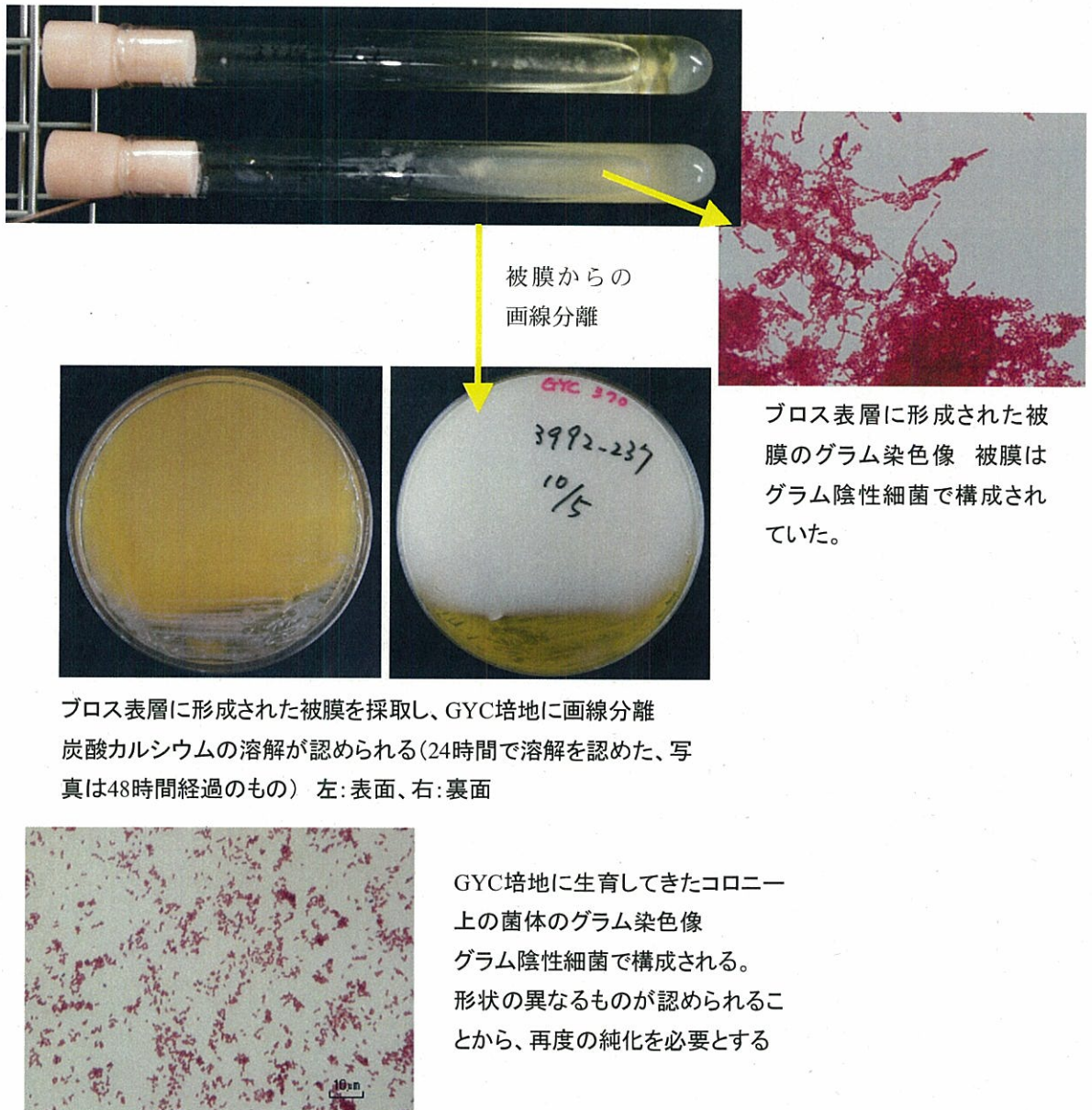
一方、PCR-DGGE 解析より *Gluconacetobacter* 属細菌が検出されたあるいは同じ位置にバンドが検出された試料について、分離・培養法により *Gluconacetobacter* 属細菌の分離を試みた。この結果を表に示す。表に示す各分離株については、塩基配列解析 (16S rDNA, 全長) を行った。

表 酢酸菌由来配列が検出された高松塚古墳試料

試料番号	試料採取箇所	菌膜形成	主要微生物	酢酸菌分離株
T7417-20	高松塚古墳 北壁石 西壁 (3石) との石材間 隙間の黒色物質 070417 #14	+++ (濁り-汚白色)	グラム陰性桿菌	T7417-20-1a
T7528-15	高松塚古墳 側壁と天井石間 西1-天1 西壁石1 南小口 天井石1との接合面 漆	—	—	—
T7530-19	高松塚古墳 側壁と天井石間 南-天1 閉塞石上面 土	+ (濁り-白色)	グラム陰性桿菌 酵母	T7530-19-1a
T7601-2	高松塚古墳 側壁と畦間 西2-西2畦 西2背面 石の境目の黒い部分の土	—	—	—
T7622-7	高松塚古墳 側壁と床石間 東1-床 2/1 床石立ち上がり部分 粘性あり 東壁石1吊り上げ後の床面	+++ (濁り-白色)	グラム陰性桿菌 グラム陰性球菌	T7622-7-1a
T611xx-1	ひさし上 粘土下 あり穴くもの巣周辺 土壌	+++ (濁り-白色)	グラム陰性桿菌 糸状細菌	T611xx-1-1a ~T611xx-4a (4株分離)
T61213-20	石室外 西側 左側面 (墳丘部発掘作業現場)	+++ (濁り-白色)	グラム陰性桿菌	T61213-20-1a
T61213-21	石室外 西側 左側面 (墳丘部発掘作業現場)	+++ (濁り-白色)	グラム陰性桿菌	T61213-21-1a
T61213-24	石室外 東側 右奥 側面 手前 マット裏面の根 (墳丘部発掘作業現場)	—	—	—
T6203-4	高松塚 ⑥ 竹藪 5cm (2006.02.03)	+++ (濁り-白色)	グラム陰性桿菌 糸状細菌	T6203-4-1a

青文字は DGGE で酢酸菌配列バンドとほぼ同位置にバンドのあった試料
菌株番号末尾 a は酢酸菌分離株を示す。

T7417-20-1a 分離株についてのグラム染色写真、GYC 培地上での炭酸カルシウム溶解性を図4に示す。また分離株の 16S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹を図9に示す。この結果、分離株 T7417-20-1a は、*Gluconacetobacter* 属細菌であることが判明した。



被膜からの
画線分離

ブロス表層に形成された被膜のグラム染色像 被膜はグラム陰性細菌で構成されていた。

ブロス表層に形成された被膜を採取し、GYC培地に画線分離
炭酸カルシウムの溶解が認められる(24時間で溶解を認めた、写真は48時間経過のもの) 左:表面、右:裏面

GYC培地に生育してきたコロニー上の菌体のグラム染色像
グラム陰性細菌で構成される。
形状の異なるものが認められることから、再度の純化を必要とする

以上の方法で、高松塚古墳試料より、10株を分離した。

図4. 高松塚古墳試料 T7417-20 から酢酸菌の分離

4. 高松塚古墳解体試料における硫黄酸化細菌の検出試験

高松塚古墳壁画劣化要因の一つとして汚染微生物が生成した酸が考えられる。特に、硫黄酸化細菌は、硫酸を生成し石材などにダメージを与えることが知られている。そこで、硫黄酸化細菌を対象とした分離・培養法を用い、高松塚古墳石室内外の試料に硫黄酸化細菌が存在するかどうかを検討する。また、硫黄酸化細菌は培養法では検出されにくいことも予想されるため、培養法に加えて石室内外の試料抽出 DNA を用い、硫黄酸化細菌特異プライマーPCR によって検出した。両手法による検出対象としての硫黄酸化細菌は、硫黄酸化および鉄の酸化能があることも知られている *Acidithiobacillus* 属細菌とする。高松塚古墳解体試料（石室内、壁石間、石室外、取合部）について特異プライマーPCR（20 試料）および分離・培養法（8 試料）による硫黄酸化細菌の検出試験を行った。

1) 特異プライマーPCR による硫黄酸化細菌の検出

各試料中に含まれる混合 DNA を鋳型として硫黄酸化細菌 (*Acidithiobacillus* 属細菌) の 16S rDNA 配列を対象とした特異プライマーPCR を実施した。*Acidithiobacillus thiooxidans* JCM3867 株を陽性対照とした。結果の評価については、PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動を行い、目的サイズの増幅断片長 (280bp) が得られているかどうかを確認した。増幅産物が得られた場合については、増幅産物の塩基配列解析を実施し、決定された配列を用いて BLAST 相同性検索を行い配列がどのような菌種に由来するものであるかを確認した。

特異プライマーPCR の結果、高松塚古墳石室解体試料 3 点 (側壁間、小口面、床石間) から *Acidithiobacillus thiooxidans* および *Acidithiobacillus ferrooxidans* の 16S rDNA (280bp) に近縁な菌種が検出された。このことから、これらの高松塚古墳石室解体試料 3 点には、硫黄酸化細菌である *Acidithiobacillus* 属細菌が存在することが示された。しかしながら、これら 3 点の試料における DGGE 解析の結果では、*Acidithiobacillus* 属細菌が検出されず、さらに次項に記す分離・培養法においても *Acidithiobacillus* 属細菌が認められなかったことから、*Acidithiobacillus* 属細菌は存在しても、存在量としては少なく、これらの試料における優占種ではないと考えられた。

2) 分離・培養法による硫黄酸化細菌の検出

特異プライマーPCR による硫黄酸化細菌の検出試験で陽性となった試料および陰性となった試料 (合計 8 試料) をもちいて分離・培養による硫黄酸化細菌の検出試験を行った。分離・培養による硫黄酸化細菌の検出試験を行うに当たり、菌株保存機関から分譲を受けた *Acidithiobacillus thiooxidans* を高松塚古墳試料のひとつに添加したものを陽性対照とした。また、培養法については、菌株保存機関で用いられている培地、培養法に準拠した。培養物中に *Acidithiobacillus* 属細菌が含まれるかどうかの判定は、元素硫黄が酸化されることにより生成した硫黄酸化物の沈殿が認められるものを陽性とした。また、硫黄酸化細菌が生育した場合に、培養液が酸性になることから、培養後の培養液中の pH を測定し、pH による硫黄酸化細菌の生育評価も併せて行った。培養法の結果、陽性対照では、硫黄酸化物の沈殿が認められたが、高松塚試料をもちいた 8 試料については、硫黄酸化物の沈殿が認められなかった。さらに、培養後の pH を測定した結果、*Acidithiobacillus* 属細菌が含まれる陽性対照のみ pH の低下が認められたが、このほかのいずれの試料についても、pH の低下が認められなかった。以上のことから、試験した高松塚古墳 8 試料については、硫黄酸化細菌の存在する可能性は低いと判断された。