

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750104

研究課題名(和文) プロテオミクス技術を用いた文化財中の膠原料のアミノ酸配列情報解析

研究課題名(英文) Amino acid sequencing of animal glues remained in cultural properties by proteomic techniques

研究代表者

河原 一樹 (KAWAHARA, KAZUKI)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60585058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膠は接着剤として古くから文化財に利用されてきた素材の一つである。従って、膠の原料動物種が明らかになれば、古代の動物利用や技術に関する知見が得られる可能性がある。しかしながら、数百年から数千年の間に生じるタンパク質分解や不純物混入のため、古代の試料から正確な情報を抽出することは難しい。本研究では、ナノ液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法を適用することで古代の試料に残存する膠を特定することが可能であることを見出した。本法により、約4400年前にエジプトで製作された壁画や約1800年前のローマ期エジプトで製作された三連祭壇画などからウシ由来膠を検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Animal glue, mainly constituted of collagen, is one of the oldest materials used as the adhesive and binder of cultural properties. Identifying its animal origin therefore has potential importance in the studies concerning the animal use in ancient culture and technology. However, the possible degradation undergoing for hundreds and thousands of years in protein molecules as well as overwhelmingly large number of contaminants originated from keratins and microbial proteins made it very difficult to obtain precise information of archaeological interest. In this research project, I employed nano-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and revealed that the methodology has proved effective to identify animal glues in archaeological materials even if they are heavily degraded. The peptides derived from collagens were successfully identified in archaeological specimens including Egyptian wall paintings (2,400 B.C.) and Egyptian Romano portraits (180-200 A.D.).

研究分野：蛋白質科学

キーワード：考古学 膠 コラーゲン プロテオミクス 質量分析

1. 研究開始当初の背景

哺乳類中のタンパク質重量の約 30% を占めているコラーゲンは、骨や皮膚、腱などの主成分として各組織に必要な弾性と強度を与えるだけでなく、膠と呼ばれる接着剤として古代エジプトより絵画・壁画などに利用されるほか、アジアにおいては、仏像や木造建築物、そして古代から近世に至るまで利用されている唯一の筆記用具である墨の固着剤として使用されるなど、文化財の原料としても極めて類をみない素材である。

これまでに行った文献調査から、膠の原料となった動物種は実に多岐にわたっており、古代中国では、6世紀北魏の『齊民要術』に、牛、水牛、豚、ロバ、馬、ラクダ、ラバが挙げられている。前漢の『列女伝』には、河魚の浮き袋の記載があるほか、宋代の『墨譜法式』には、鹿膠の記載も発見できる。一方、日本では、平安中期の『和名抄』、『延喜式』に牛皮の記載が確認されており、西洋では古くから絵画の固着剤として兎膠が使用されている(宮路淳子他、*考古学と自然科学*、2013年)。さらに、同じ動物種においても、骨や皮、そして魚の場合には浮き袋などコラーゲンを抽出する部位も様々であることがわかってきている。これらの知見から、幅広い製品・年代・地域に渡る膠の研究によって、アジアだけでなくヨーロッパも含めた世界的な視点での交流史や動物利用の実態、そして様々な文化財の材質、製造技法の一端を探ることが出来る可能性がある。

しかしながら、化石や骨、そして氷河中から発見された毛皮など、タンパク質の保存環境として恵まれている場合の解析例はあるものの (Schweitzer, M. H. et al. *Science* 2009 ;

Hollemeier, C. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008) 展示などを経た文化財や土壌中からの発掘品である考古学資料は、環境中の不純物などにより極めて汚染されているため、ガスクロマトグラフィー/質量分析法や FT-IR 法などの従来の手法では有機成分の同定は可能であっても、原料となった動物種の特定を含む膠の正確な同定は難しい。さらに、貴重な文化財は出来る限り非破壊もしくは極微量分析が求められる技術的難しさもある。本研究で提案する生体内の極微量タンパク質に対して分析が可能であるプロテオミクス技術は、膠に由来するペプチドのアミノ酸配列を直接決定出来るため、上記の困難を克服し文化財中の膠についてより詳細な情報を得る新規な研究手法になり得る。

2. 研究の目的

本研究では、不純物を含む微量試料のタンパク質分析も可能である液体クロマトグラフィー/質量分析を基盤としたプロテオミクス技術により、従来の手法では不可能であった高度に汚染された遺跡からの発掘品を含む文化財中の膠のアミノ酸配列レベルでの同定を行い、それらの原料動物、製造法、経年劣化に伴う化学変化などの情報を解読する新規の文化財研究手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究で提案する手法による高度に汚染された文化財試料からの膠の同定法の概念図を図1に示す(図中では、ウシ由来膠を同定する例を示している)。

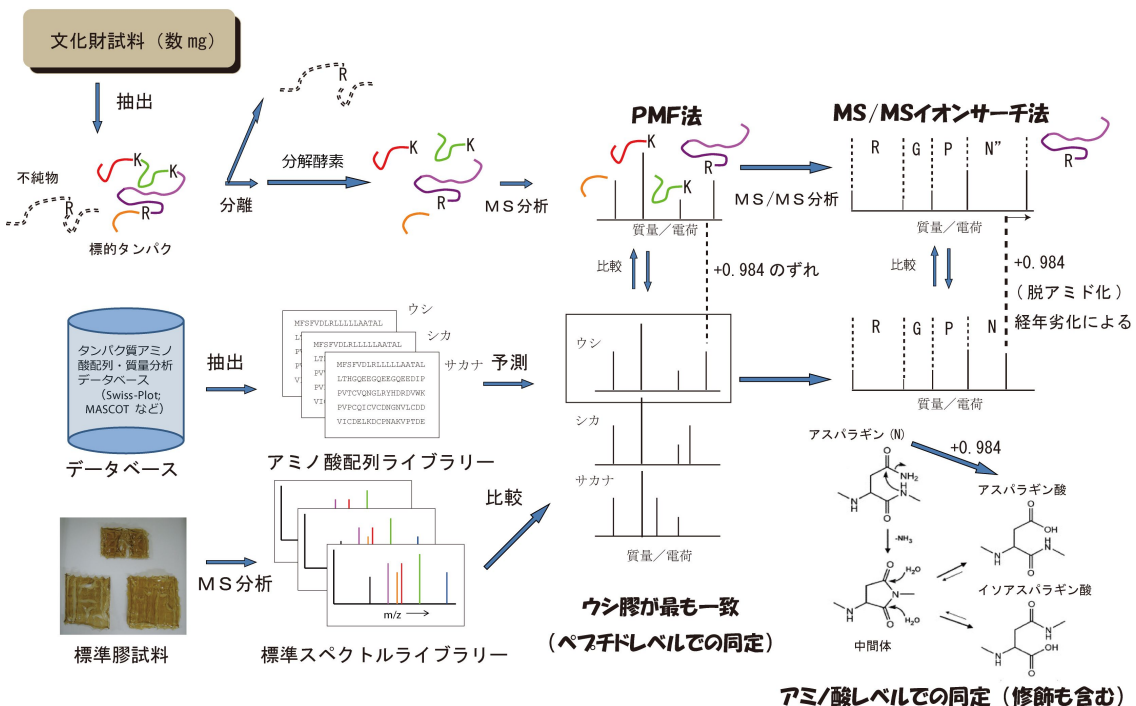


図1. 質量分析を基盤としたプロテオミクス技術による文化財中の膠の同定法の概念図

先ず、対象となる文化財から試料を極微量採取する（実際的には、発掘作業や資料の運搬・整理作業の際に不可避に生じるわずかの損傷や落下片の利用が望ましい）。抽出には、重炭酸アンモニウムなどの緩衝溶液を用いる。抽出後、各種の分離法で不純物を分離し、特定の amino 酸で分解する酵素（図中では、K 又は R で分解するトリプシン）でペプチド断片にした後、特に不純物の混入が想定される場合にはナノ液体クロマトグラフィー（ナノ LC）でさらに分離してから質量分析を実施し、質量（MS）スペクトルを得る。

得られる MS スペクトルを既存の amino 酸配列データベースを利用し予測された MS スペクトル、又は独自に調製し測定した標準膠 MS スペクトルと比較し、試料中のコラーゲン断片の推定を行う（ペプチドマスフィンガープリント法（PMF 法）と呼ぶ）。

さらに、各断片の質量を示すピークに対応するペプチドにヘリウム（He）ガスを衝突させて、細かく断片化することによって、MS/MS スペクトルを測定し、amino 酸配列情報を得る（MS/MS イオンサーチ法と呼ぶ）。コラーゲンは動物の種や採取部位によって、構成する千個程の amino 酸中で数%程度 of amino 酸の置換が見られる。そのため、酵素消化で生じる断片の質量分析結果から得られる amino 酸配列情報により、動物種を見分けることが可能である。また、古い文化財試料中では経年劣化により様々な修飾が発見できる可能性がある。図中では、経年劣化により生じるアスパラギンと呼ばれる amino 酸の脱アミド化の例を示している。

以上の分析行程の詳細については、学術雑誌に掲載済みである（河原一樹他、*纏向学研究*、2013 年；Maurek, J., et al. *e-Preserv. Sci.* 2014）。

#### 4. 研究成果

本研究では、高度に汚染された発掘品を含む文化財からの膠の抽出、分析を可能にするため、ナノ液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（ナノ LC/ESI-MS/MS）法を基盤としたプロテオミクス技術を採用し、実際の文化財分析への応用を図った。その結果、平城京跡出土墨（奈良文化財研究所）や江戸時代（1742 年）に製造された墨（古梅園）のそれぞれからウシ由来膠を検出することに成功した（宮路淳子他、*考古学と自然科学*、2013 年；深草俊輔他、*古代学*、2013 年）。特に、平城京跡出土墨については土壤中で千年以上経過しているにもかかわらず、タンパク質（コラーゲン）が分解・消失を免れて残存可能であることを示す例であり、今後幅広い文化財に本法を適用するうえで重要な知見である。また、近代（昭和 16 年～18 年）の墨型資料からはスイギュウの膠が検出された（六車美保他、*日本文化財科学会第 30 回大会*、2013 年）。

これらの日本国内の試料に加えて、筑波大学との共同研究成果として、J. Paul Getty 美術

館（アメリカ合衆国）所蔵のローマ期エジプトの三連祭壇画（180～200 A.D.）の微量片（約 100～500  $\mu\text{g}$ ）の分析を行い、ウシ皮が膠の原料であることを特定することができた（Maurek, J., et al. *e-Preserv. Sci.* 2014）。

また、関西大学と共同研究体制を組み実施した紀元前 2360 年頃にエジプトで建設された地下墓であるマスタバ・イドウトの壁画の剥落片の分析では、建設からおよそ 4,400 年が経過しているにもかかわらず、ナノ LC-ESI-MS/MS を用いて分析することで、多数のペプチドを検出することが可能であった（図 2）。

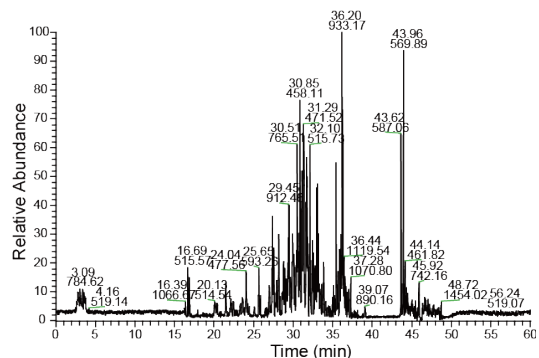


図 2 . ナノ LC-ESI-MS/MS の結果得られたベースピーククロマトグラム .

今回、検出された各ペプチドのそれぞれに質量分析装置内で He ガスを衝突させて得られる分解物の MS/MS スペクトルを合計 10,496 スペクトル収集し、既存のタンパク質の amino 酸配列データベースを基にしたデータベース検索によって、16 種類のウシ I 型もしくは III 型コラーゲン由来のペプチドを同定することが出来た。図 3 では、質量電荷比 ( $m/z$ ) が 1066.97 に観測されたピークについて得られた MS/MS スペクトルを示している。ペプチド分解物に相当する明瞭なフラグメントピークが観測されており、当該ピークに由来するペプチドの amino 酸配列はウシ I 型コラーゲンの 2 鎖に含まれる配列、GLP(O)GVAGSVGEP(O)GPLGIAGPP(O)GAR に相当すると推定された。I 型と共に検出された III 型コラーゲンは、皮に特徴的に含まれることから、今回分析した壁画に用いられた膠はウシ皮由来であることが示唆された。

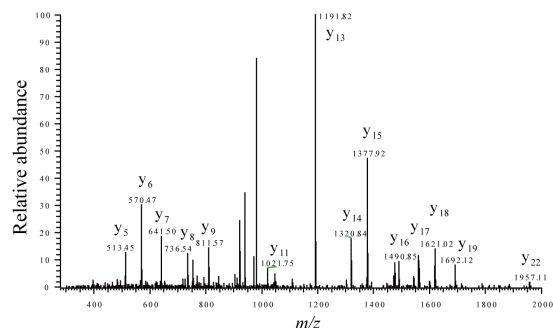
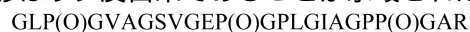


図 3 .  $m/z$  1066.97 のピークの MS/MS スペクトル

詳細な配列情報解析から、検出されたペプチドのうち半数の8種類のペプチドは配列中のアスパラギン(N)もしくはグルタミン(Q)が経年劣化により脱アミド化していることも明らかとなった (Fukakusa, S., et al. *Proceedings of the 62<sup>nd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2015)。このようなタンパク質の経年劣化による修飾については、現在アミノ酸のラセミ化と併せて年代推定への応用が検討されている。今回の分析では、不純物であるヒト由来セラチンや微生物に由来すると思われるペプチドも検出されているが、依然として約99%のMS/MSスペクトルが未同定であり、その中には、脱アミド化以外の化学修飾が施されたことによって、同定できなかったコラーゲン由来ペプチドも含まれると思われる。興味深いことに今回検出されたコラーゲン由来ペプチドをコラーゲン全長のアミノ酸配列上にマッピングすると、特定の部位に集中していることがわかり、尚且つ以前に他のグループによって報告された6,800万年前の恐竜から検出されたコラーゲン由来のペプチド配列とも同様の位置が残存して検出されていることが明らかになった (Antonio, J.D.D., et al. *PLoS ONE*, 2011; Fukakusa, S., et al. *Proceedings of the 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2015)。

今後より多くの分析結果を集める必要があるが、コラーゲンは生体内で螺旋状の三量体構造を形成する性質があることを考慮すると、これらの結果は、コラーゲン分子集合体特有の三量体構造が文化財中での膠の経年劣化の進行に大きな影響を及ぼす可能性を示唆するものである。特に、コラーゲンの三重らせん構造は、カビやバクテリアが分泌する一般的なタンパク質分解酵素による分解を免れることが示唆されているため、そのような分解耐性についても生化学、構造生物学的手法を用いて研究を進めている。ただし、膠に関しては、それを栄養源として繁殖する菌も最近確認されており、そのような菌が分泌する酵素に関する研究も進めている (木原山奈々他、*古代学*, 2013年)。これらの研究は、文化財保存の観点で、重要な知見を与える可能性がある。

以上のように、膠は動物の加工品であり、化石や骨などミネラルに取り囲まれている環境とは異なるため、極めて分解しやすいと思われる。しかしながら、土壌中に埋まっていた平城京出土墨や紀元前2,360年のエジプトの壁画からも検出が可能であったのは驚くべきであり、古代の試料も分析対象として考えることができる可能性を示唆することが出来た意義は大きいと思われる。今後は、本研究で提案する手法による分析例を増やし、日本国内だけでなく、世界的な規模での膠利用の実態解明へ向けた研究を実施する予定である。

また、本手法は膠だけでなく他のタンパク質を原料とする素材の特定にも応用することが可能である。そのような研究例として、相国寺旧境内出土の櫛の分析からカメの甲羅(コラーゲン、セラチン等が含まれる)が原料として使用されていることを特定した例(深草俊輔他、*同志社大学歴史資料館調査研究報告第13集*, 2015年)や、奈良県桜井市の纏向遺跡から出土した巾着型布製品の原料が天蚕の繭(タンパク質としてセリシンやフィブロインが含まれる)を原料としていることを明らかにした研究例が挙げられる(河原一樹他、*纏向学研究*, 2013年)。今後、更に適用例を増やし、本手法で分析可能な文化財もしくは古代のタンパク質について検討する予定である。

#### 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13件)

(1) Fukakusa, S., Kawahara, K., (ほか2名、2番目) Mass spectrometry of collagen preserved in archaeological specimens including human bones, *Proceedings of the 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* 2015, 1285-1285. 査読無.

(2) 深草俊輔、河原一樹、(ほか4名、2番目) 「相国寺旧境内出土櫛の質量分析による材質の特定」『同志社大学歴史資料館調査研究報告第13集』(2015) pp. 163-169. 査読無.

(3) 河原一樹「プロテオミクス技術による古代タンパク質分析」『西アジア文明研究センターNewsletter』(2015年) 6巻, pp. 1-2. 査読無.

(4) Mazurek, J., Svoboda, M., (ほか5名、4番目) Characterization of binding media in Egyptian Romano portraits using enzyme-linked immunosorbent assay and mass spectrometry, *e-Preserv. Sci.* 2014, **11**, 76-83. 査読有.

<http://www.morana-rtd.com/e-preservationsscience/>

(5) Hayashi, N., Kuyama, H., (ほか6名、4番目) Imidazole C-2 Hydrogen/Deuterium Exchange Reaction at Histidine for Proving Protein Structure and Function with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, *Biochemistry* 2014, **53**, 1818-1826. 査読有.

DOI: 10.1021/bi401260f

(6) Fukakusa, S., Kawahara, K., (ほか6名、2

番目) Characterization by nano-LC/ESI-MS/MS of highly degraded collagen detected in 4,400-year-old Egyptian wall paintings of the Idout Tomb, *Proceedings of the 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* 2014, 453-453. 査読無 .

(7) 深草俊輔、河原一樹、(ほか3名、2番目) 「質量分析による平城京跡から出土した墨に残存するウシ膠コラーゲンの同定」『古代学』(2013年)、6巻、pp.35-59. 査読有 .

(8) 木原山奈々、河原一樹、(ほか2名) 「膠を分解する真菌の分泌プロテアーゼ-真菌の生育による文化財微生物汚染の観点から-」『古代学』、(2013年)、6巻、pp. 40-48. 査読有 .

(9) 河原一樹、中澤隆「皮革・繊維製品の質量分析」『七観古墳の研究』、(2013年)、pp. 207-209. 査読無 .

(10) 滝柳泰文、福田健二、(ほか6名、3番目) 「カゼイン由来のペプチドを指標とした乳利用の起源の検証可能性—MALDI/TOF質量分析装置を用いた評価系」、『帯広畜産大学学術研究報告』、(2013年)、34巻、pp. 89-95. 査読無 .

(11) 宮路淳子、河原一樹、(ほか5名、2番目) 「墨に含まれる膠コラーゲンの質量分析による原料動物種の同定」、『考古学と自然科学』、(2013年)、64巻、pp.47-57. 査読有 .

(12) 河原一樹、六車美保、(ほか2名) 「纏向遺跡出土巾着型布製品の質量分析」『纏向学研究』、(2013年)、1巻、pp.80-84. 査読無 .

(13) Kawahara, K., Yamada, M., (ほか5名、1番目) Degradation Processes of Archaeological Silk Proteins to Remind in Mass Spectrometry, *Proceedings of the 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2013, 812-812. 査読無 .

〔学会発表〕(計15件)

(1) 深草俊輔、河原一樹、(ほか5名、2番目) 高分解能 MALDI 質量分析計を用いた膠の原料動物種の同定、文化財保存修復学会第37回大会、2015年6月27日~28日、京都工芸繊維大学、日本 .

(2) 深草俊輔、河原一樹、(ほか5名、2番目) 相国寺旧境内より出土した櫛の質量分析による材質の特定、日本文化財科学会第32回大会、2015年7月11日~12日、東京学芸大学、日本 .

(3) 河原一樹、文化財に潜むタンパク質の質量分析法開発とその考古学への応用、西アジア文明研究センター第13回定例研究会「タンパク質研究と文化遺産・考古学」、2015年11月6日、筑波大学、日本 .

(4) Fukakusa, S., Kawahara, K., (ほか2名、2番目) Mass spectrometry of collagen preserved in archaeological specimens including human bones, *63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2015年5月31日~6月4日、セントルイス、アメリカ合衆国 .

(5) 河原一樹、古タンパク質の構造安定性と分析可能性~質量分析による検討~、第267回生存圏シンポジウム、2014年10月20日、京都大学、日本 .

(6) 深草俊輔、河原一樹、(ほか5名、2番目) ローマ期エジプトの三連祭壇画に使われた膠着材原料の ELISA 法及び質量分析法による同定、文化財保存修復学会第36回大会、2014年6月7日~8日、明治大学、日本 .

(7) 深草俊輔、河原一樹、(ほか5名、2番目) マスタバ・イドウトの壁画中に存在する経年劣化した動物膠の分析、日本文化財科学会第31回大会、2014年7月5日~6日、奈良教育大学、日本 .

(8) Fukakusa, S., Kawahara, K., (ほか6名、2番目) Characterization by nano-LC/ESI-MS/MS of highly degraded collagen detected in 4,400-year-old Egyptian wall paintings of the Idout Tomb, *62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2014年6月15日~19日、ボルチモア、アメリカ合衆国 .

(9) Nakazawa, T., Taniguchi, Y., (ほか5名、3番目) The use of enzyme-linked immunosorbent assay and mass spectrometry for the characterization of binding media in Egyptian Romano portraits, 40th International Symposium on Archaeometry, 2014年5月19日~23日、ロサンゼルス、アメリカ合衆国 .

(10) 鈴木孝仁、木原山奈々、(ほか3名、3番目) 膠に生育する真菌 *Aspergillus parasiticus* が分泌する中性金属プロテアーゼ、日本植物形態学会第25回大会、2013年9月12日、北海道大学、日本 .

(11) 河原一樹、宮路淳子、(ほか3名、1番目) MALDI 質量分析法による膠の原料動物種の同定、文化財保存修復学会第35回大会、2013年7月20日~21日、東北大学、日本 .

(12) 河原一樹、六車美保、(ほか4名、1番目) 纏向遺跡出土の巾着形布製品の質量分析、日本文化財科学会第30回大会、2013年7月

6日～7日、弘前大学、日本。

(13) 木原山奈々、河原一樹、(ほか2名、2番目)文化財の劣化に関連する真菌が膠の分解に伴って分泌する酵素の同定 - 膠と *Aspergillus parasiticus* - 、日本文化財科学会第30回大会、2013年7月6日～7日、弘前大学、日本。

(14) 六車美保、河原一樹、(ほか2名、2番目)近代墨型資料より検出した膠の動物種の特定とその歴史的意義、日本文化財科学会第30回大会、2013年7月6日～7日、弘前大学、日本。

(15) Kawahara, K., Yamada, M., (ほか5名、1番目) Degradation Processes of Archaeological Silk Proteins to Remind in Mass Spectrometry, *61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 2013年6月9日～13日, ミネアポリス, アメリカ合衆国。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nara-wu.ac.jp/kodai/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

河原一樹 (KAWAHARA KAZUKI)  
大阪大学・薬学研究科(研究員)・助教  
研究者番号: 60585058