

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05018

研究課題名（和文）アミノ酸の同位体比分析を用いた古栄養学の確立に資する基礎的研究

研究課題名（英文）Advance in amino acid isotope approaches for human paleo-nutritional studies

研究代表者

内藤 裕一（Naito, Yuichi）

名古屋大学・博物館・研究員

研究者番号：10754848

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,300,000円

研究成果の概要（和文）：非侵襲的な人体組織である頭髮や爪の主要構成タンパクであるケラチンをターゲットとし、その構成要素である特定アミノ酸の質量分析法や安定同位体比分析法を開発した。特に主要アミノ酸の1つであるシスチンをシステイン酸として定性・定量分析し、ヒトの栄養状態のマーカーとして利用する方法を提案した。安定同位体分析については共同研究機関に配備されている装置を使用し、カラムや溶媒、誘導体化等の検討を通して、これまで着目されてこなかった不可欠アミノ酸等の微量アミノ酸の測定法を考案した。これらの検討により特定アミノ酸の分析による新たな栄養学の展開を図る見通しがたった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の手法を用いれば、過去の資料の分析によって当時の人々の健康状態や飢餓に関する知見が得られるため、考古学・人類学等の分野に貢献する。たとえば飢餓の際の人々の栄養状態を直接分析できるため、文献情報以外のデータを提供できる。過去の気象災害の人類社会に対する影響を新たな視点から分析できる。

一方、本手法は栄養状態の新たなバイオマーカーとして用いられれば、健康科学にも貢献する可能性がある。国外では類似のアプローチがすでに応用されはじめているが、本邦ではまだほとんどない。今後ヒトを対象とした分析例を増やすことで、新たな健康科学のツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Several new protocols were developed for analyzing specific amino acids in keratin in human hair and fingernail with mass spectrometry and stable isotope analysis. It was suggested that cystine in these body tissues could be analyzed as cysteic acid and used as a new biomarker of human nutritional conditions. Besides, through the careful examination of GC columns, solvents, derivatization techniques, etc., stable isotope measurements of minor essential amino acids were succeeded. Applying these techniques may open a new window in nutritional studies.

研究分野：進化人類学

キーワード：栄養学 古病理 アミノ酸 同位体 ケラチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人間の体組織を構成する個別アミノ酸の同位体比は食事内容を反映することが分かっており、現代人や過去の人類集団の食習慣の解析・復元に応用されてきた。一方でこの体組織同位体比は食事だけでなく各種の栄養・生理・疾患にも影響を受けることが明らかとなってきた。しかし関与していると思われる各要因の影響の程度や影響のメカニズム、要因間の関係については不明な点が多く残されている。特に大型動物や哺乳類では基礎データが決定的に不足しており、室内の給餌実験やコントロールされた環境下での野外観察等の基礎的研究の蓄積が必要である。とりわけヒトの研究に関しては現代人を対象とした基礎研究が重要となるが、倫理的観点や方法論的な困難により実験的アプローチは非現実的であり、このことが研究の新展開を妨げる要因となっている。

2. 研究の目的

本研究では上述した学術的背景を踏まえ、栄養学・人類学等の関連分野の将来的な展開のために、古栄養学という新しい領域の開拓、および研究ツールの確立を大目標とした。そのために、すでに食事内容が綿密に調査されている現代人ボランティアの疫学調査データに着目し、体組織の同位体比と各種の栄養・健康状態の指標との相関を分析することで、新規のバイオマーカーを探索することを主眼に据えた。

3. 研究の方法

すでに申請者が所有する疫学調査データ(身体計測値・年齢や性別等の属性データ・既往歴等)と参加者の頭髪・爪試料のアミノ酸同位体比データの相関を統計解析により明らかにする。そのために、まず(i)特定アミノ酸の定性・定量分析法の開発を行い、(ii)続いてそれぞれのアミノ酸の安定同位体比測定法を確立した。具体的な手順は次の通りである。(i)まず頭髪や爪を構成する主要タンパク質であるケラチンの構成アミノ酸の1つであるシスチンをターゲットに定性・定量法の開発を試みた。シスチンは塩酸を用いたタンパク質の加水分解反応時に分解されるため、通常のプロトコールでは質量分析計に検出されない。そこで過ギ酸酸化反応によりシステイン酸に変換する性質を利用し、試料を予め酸化させた状態で加水分解を行うことでシステイン酸として質量分析を行う手法を考案した。分析はガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)を用いたため、各種の誘導体化法やカラムの種類、昇温プログラム等の条件を検討し、最適なものを選択した。(ii)個別アミノ酸の同位体比分析法については共同研究機関(チュービンゲン大学)に配備されている設備(ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計:Agilent, GC/Elementar, IRMS)を利用し、前出の条件に加えて酸化還元反応条件等の検討を実施した。

4. 研究成果

シスチンを過ギ酸酸化反応によりシステイン酸に変換することで、加水分解時の分解をうけずに遊離アミノ酸として質量分析の対象とすることが可能であった。誘導体化反応は様々なものがあるが、そのうち汎用的なTMS化やtBDMS化によりGC/MSを用いて再現良くnmolオーダーから定性・定量が可能であることが分かった(内藤, 2019)。これにより今後予定している個別アミノ酸の単離・精製にも目処がたった。

GC/IRMSを用いたマイナーアミノ酸の窒素同位体比測定法を確立し、標準アミノ酸を用いて分析条件を割り出した。その結果あまり着目されてこなかったトレオニンやリジン、その他のアミノ酸の同位体測定が可能となった。その成果の一部はすでに出版済みである(図1:Naito et al. 2020 Sci Rep; Meleg, Naito, Bocherens, 2020 Nat E&E)。現在さらに測定系の改良を進めており、上述したもの以外のアミノ酸の測定やアミノ酸の炭素同位体比測定も実現する予定である。

計画していた現代人頭髪のアミノ酸同位体比分析および健康指標との相関分析は現在進行中であるが、測定系の確立までは完了したため今後試料の分析を継続・増加する予定である。

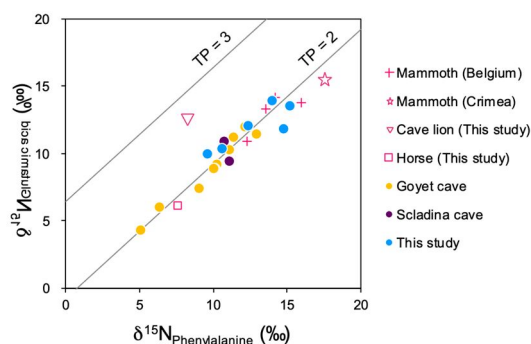


図 1. 欧州ホラアナグマの骨コラーゲン中アミノ酸の窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$)。

TP: 栄養段階 (Naito et al. 2020 を改変)。

< 引用文献 >

Naito, Y.I., Meleg, I.N., Robu, M. et al. Heavy reliance on plants for Romanian cave bears evidenced by

amino acid nitrogen isotope analysis. *Sci Rep* 10, 6612 (2020).

Meleg, I.N., Naito, Y.I., Bocherens, H. Herbivory in Carnivora: the case of emblematic cave bears. *Nature Ecology & Evolution, Behind the Study* (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuichi I Naito, Ioana N Meleg, Marius Robu, Marius Vlaicu, Dorothee G Drucker, Christoph Wissing, Michael Hofreiter, Axel Barlow, Herve Bocherens	4. 巻 10
2. 論文標題 Heavy reliance on plants for Romanian cave bears evidenced by amino acid nitrogen isotope analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-020-62990-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yuichi I Naito, Masako Yamane, Hiroyuki Kitagawa	4. 巻 34
2. 論文標題 A protocol for using attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy for pre-screening ancient bone collagen prior to radiocarbon dating	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM	6. 最初と最後の頁 e8720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcm.8720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 内藤裕一	4. 巻 3
2. 論文標題 歯エナメル質の酸素・炭素同位体比からみたTor Hamar遺跡における狩猟行動、およびその他の共同研究について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ホモ・サピエンスのアジア定着器における行動様式の解明 (「バレオアジア文化史学」計画研究A02班2018年度研究報告)	6. 最初と最後の頁 35-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wissing, C., Rougier, H., Crevecoeur, I., Drucker, D.G., Germonpre, M., Krause, J., Naito, Y.I., Posth, C., Schoenberg, R., Semal, P., Bocherens, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Stable isotopes reveal patterns of diet and mobility in last Neandertals and first modern humans in Europe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41033-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Horwood Paul F., Igai Katsura, Greenhill Andrew R., Tomitsuka Eriko, Umezaki Masahiro, Natsuhara Kazumi, Siba Peter M., Morita Ayako, Larkins Jo-Ann, Soli Kevin W., Baba Jun, McBryde Emma S., Tadokoro Kiyoshi, Pomat William, Naito Yuichi I., Maure Tobias, Odani Shingo	4. 巻 97
2. 論文標題 A High Burden of Asymptomatic Gastrointestinal Infections in Traditional Communities in Papua New Guinea	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene	6. 最初と最後の頁 1872 ~ 1875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Naito Yuichi I., Chikaraishi Yoshito, Drucker Dorothee G., Ohkouchi Naohiko, Semal Patrick, Wissing Christoph, Bocherens Herve	4. 巻 117
2. 論文標題 Reply to "Comment on "Ecological niche of Neanderthals from Spy Cave revealed by nitrogen isotopes of individual amino acids in collagen." [J. Hum. Evol. 93 (2016) 82?90]" [J. Hum. Evol. 117 (2018) 53?55]	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Evolution	6. 最初と最後の頁 56 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhevol.2017.09.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohkouchi Naohiko, Chikaraishi Yoshito, Close Hilary G., Fry Brian, Larsen Thomas, Madigan Daniel J., McCarthy Matthew D., McMahon Kelton W., Nagata Toshi, Naito Yuichi I., Ogawa Nanako O., Popp Brian N., Steffan Shawn, Takano Yoshinori, Tayasu Ichiro, Wyatt Alex S.J., Yamaguchi Yasuhiko T., Yokoyama Yusuke	4. 巻 113
2. 論文標題 Advances in the application of amino acid nitrogen isotopic analysis in ecological and biogeochemical studies	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organic Geochemistry	6. 最初と最後の頁 150 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2017.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Drucker Dorothee G., Naito Yuichi I., Pean Stephane, Prat Sandrine, Crepin Laurent, Chikaraishi Yoshito, Ohkouchi Naohiko, Puaud Simon, Laznickova-Galetova Martina, Patou-Mathis Marylene, Yanevich Aleksandr, Bocherens Herve	4. 巻 7
2. 論文標題 Isotopic analyses suggest mammoth and plant in the diet of the oldest anatomically modern humans from far southeast Europe	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07065-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 15件）

1. 発表者名 Naito, Y.I., M. Belmaker, H. Bocherens, T. Nakazawa, M. Osawa, C. Wissing, and S. Kadowaki
2. 発表標題 Gazelle hunting activities around Tor Hamar rock-shelter in Jordan viewed from carbon and oxygen isotopic compositions of tooth enamel and ZooMS.
3. 学会等名 International Symposium on Paleoanthropology in Commemoration of the 90th Anniversary of the Discovery of the First Skullcap of Peking Man (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Belmaker, M., H. Bocherens, Y. Naito, H. D. O'Brien, C. Wissing, T. Tamura, and S. Kadowaki
2. 発表標題 Paleoenvironmental studies Tor Hamar, southern Jordan: Early modern human behavioral adaptability during MIS 3.
3. 学会等名 The 88th Annual Meeting of the American Association of Physical Anthropologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suraprasit K., R. Shoocongdej, Y. I. Naito, J. -J. Jaeger, Y. Chaimanee, A. Wattanapituksakul, and H. Bocherens
2. 発表標題 Ecological flexibility of the Pleistocene Sumatran serow and the possible cause of local extinction of the Himalayan goral in Thailand.
3. 学会等名 20th Congress of the International Union for Quaternary Research (INQUA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naito, Y.I., I. N. Meleg, M. Vlaicu, D.G. Drucker, C. Wissing, M. Hofreiter, A. Barlow, and H. Bocherens
2. 発表標題 Amino acid nitrogen isotope analysis suggests herbivory for Romanian cave bears (<i>Ursus ingressus</i>)
3. 学会等名 20th Congress of the International Union for Quaternary Research (INQUA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wissing C., H. Rougier, I. Crevecoeur, C. Draily, M. Germonpre, A. Genez-Olivencia, Y. I. Naito, C. Posth, P. Semal, and H. Bocherens
2. 発表標題 When diet became diverse: Isotopic tracking of subsistence strategies among Gravettian hunters in Europe.
3. 学会等名 9th Annual ESHE Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤裕一・門脇誠二
2. 発表標題 ガゼルの歯の炭素・酸素同位体比からみたヨルダン・Tor Hamar遺跡における旧石器時代人の狩猟活動
3. 学会等名 日本旧石器学会第17回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤裕一・M. Belmaker・H. Bocherence・門脇誠二
2. 発表標題 ガゼルの歯の酸素同位体比からみたTor Hamarにおける狩猟活動 (第3報)
3. 学会等名 文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究2016-2020: パレオアジア文化史学第7回研究大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤裕一
2. 発表標題 ケラチン中アミノ酸のGCMS分析法の開発と応用研究の可能性について
3. 学会等名 第3回日本古病理学研究会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bocherens H., Drucker D., Naito Y., Wissing C.
2. 発表標題 Isotopic evidence for high mammoth consumption by late Neandertals and early modern humans in Europe and its possible ecological impact
3. 学会等名 8th International Symposium on Biomolecular Archaeology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wissing C., Rougier H., Crevecoeur I., Drucker D., Germonpre M., Naito Y.I., Posth C., Semal P., Bocherens H.
2. 発表標題 Isotopic insights into paleoecology (diet, mobility) of late Neandertals in North-West Europe
3. 学会等名 The Hugo Obermaier Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakazawa T., Osawa M., Matsuo K., Inuzuka M., Ito Y., Kawahara K., Naito Y.I., Kadowaki S., Nishiaki Y.
2. 発表標題 Identification of animal species by mass spectrometry of collagen extracted from Neolithic and Paleolithic bones and teeth
3. 学会等名 ASMS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naito Y. I., Belmaker M., Bocherens H., Wissing C., Kadowaki S.
2. 発表標題 Gazelle hunting activities around Tor Hamar rock-shelter in Jordan viewed from carbon and oxygen isotopic compositions of tooth enamel.
3. 学会等名 The International Workshop, Cultural History of PaleoAsia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naito Y. I., Bocherens H., Chikaraishi Y., Drucker D.G., Germonpre M., Hobson K.A., Ohkouchi N.
2. 発表標題 Paleodiets of late Quaternary humans and mammals inferred from nitrogen isotopic composition of individual amino acids in bone collagen
3. 学会等名 IsoecoI2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naito Y. I., Belmaker M., Bocherens H., Wissing C., Kadowaki S.
2. 発表標題 Gazelle hunting activities around Tor Hamar rock-shelter in Jordan viewed from carbon and oxygen isotopic compositions of tooth enamel
3. 学会等名 IsoecoI2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naito Y.I., Yamane M., Kitagawa H.
2. 発表標題 A prescreening protocol for radiocarbon dating of ancient bone collagen using ATR-FTIR
3. 学会等名 The 23rd International Radiocarbon Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamane M., Naito Y.I., Kitagawa H
2. 発表標題 A promised method of diatom frustule separation from sediments for radiocarbon dating
3. 学会等名 The 23rd International Radiocarbon Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Belmaker M., Bocherens H., Naito Y., O'Brien H.D., Wissing C., Tamura T., Kadowaki S.
2. 発表標題 Paleoenvironmental studies Tor Hamar, Southern Jordan: Human adaptability during MIS 3
3. 学会等名 AAPA 88th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichi I. Naito
2. 発表標題 Stable isotope analysis of pollen grains for terrestrial paleoclimate reconstruction revisited
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内藤裕一、H. ボチェレンス、門脇誠二
2. 発表標題 ガゼルの歯の酸素同位体比からみたTor Hamarにおける狩猟活動：定量化の試みと制約
3. 学会等名 文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究2016-2020：パレオアジア文化史学第4回研究大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考