

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18521

研究課題名（和文）コラーゲン分析による日本の遺跡出土の「同定不能骨片」同定のための基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research for identifying "unidentifiable bone fragments" excavated from Japanese archaeological sites by collagen peptide fingerprinting

研究代表者

江田 真毅（Masaki, Eda）

北海道大学・総合博物館・准教授

研究者番号：60452546

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、日本の遺跡から出土した形態からは同定できない骨の破片をコラーゲンタンパクの質量分析から同定するための基準の作成を目的とした。研究期間中に現生日本産を中心に哺乳類68種、鳥類30種（前科学研究と合わせて180種）の骨標本を解析してデータを蓄積し、特定の科や属、種あるいは特定の複数の分類群の同定に役立つ基準が作成できた。また、実際に遺跡から出土した骨片を対象に質量分析を実施した結果、これらの基準が遺跡資料の同定に有用であることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺跡から出土する骨には断片化していて形態から同定できないものが多数含まれる。本研究の成果を生かしてこれらの骨を同定すれば、遺跡を形成した人々に利用された動物が明らかにできる。また資料のわずかな破壊で分類群を特定できることから、骨や角を加工して作成された骨角器の素材同定にも利用できると考えられる。さらに形態から同定できない骨の同定は考古学や文化財科学のほか、生物学や古生物学、法医学分野でも求められることがあると予想される。本研究の成果が広く公表されることで、日本におけるこれらの学問分野への波及的な効果も考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish identification criteria for Japanese archaeological bone fragments that were unidentifiable from the morphological characters, using collagen peptide fingerprinting. During the research period, bone specimens of 68 species of mammals and 30 species of birds (180 species in total including the previous research), mainly from modern Japan, were analyzed. Based on the data, identification criteria for specific family, genus, species or specific taxa were created. Collagen peptide fingerprinting was also performed on archaeological bone fragments, confirming that the data accumulated so far are useful for their identification.

研究分野：動物考古学

キーワード：コラーゲンタンパク 種同定 質量分析 遺跡出土動物骨

1. 研究開始当初の背景

火成岩由来の酸性土壌が多い日本の遺跡では、骨は残りにくい。かろうじて残った骨も断片的で「同定不能骨片」としてしか扱えないことがしばしばある。また、動物骨を加工して作成された道具である骨角器やその未製品も、哺乳類骨製あるいは鳥骨製以上の素材の同定ができないことが多い。しかし、これらの骨を同定できれば、遺跡を形成した人々に利用された動物を明らかにし、その動物を獲得した人々の狩猟技術や生業の季節性の推定につなげることができる。また、その動物が遺跡周辺に生息していたことを根拠に当時の環境の復元も可能となる。時には遺跡を形成したヒトの骨も発見できる可能性がある。

2010年以降、このような「同定不能骨片」の同定にも応用可能な新しい遺跡出土動物骨の同定法としてコラーゲタンパク(以下、コラーゲン)の質量分析が急速に発展してきた。この方法の長所として、1)骨中のコラーゲンが変性しにくいこと、分析成功率が高いこと、2)抽出試料を直接計測するため、コンタミネーションの危険性が少ないこと、3)分析に必要な骨粉の量(約1mg)が極めて少ないこと、資料の破壊を最小限にできること、4)分析に必要なコストがDNA解析に比べて格段に安いことが挙げられている[1]。ヤギの骨とヒツジの骨の識別から始まったこの方法は、その後急速に発展し、イギリスを中心にヨーロッパの哺乳類や魚類の同定に有効なことが示された[2, 3]。一方で、日本では墨に含まれる膠コラーゲンから原料となった動物種を特定した研究があったものの[4]、研究代表者らの鳥類を対象とした研究[5, 6]以外、コラーゲンの質量分析による動物骨や骨角器素材の同定を目指した研究は皆無であった。

イギリスを中心としたヨーロッパの哺乳類を対象に開発されたコラーゲンの質量分析による遺跡資料の同定法は、日本の遺跡から出土した資料に直ちに適用することはできない。その理由は、ヨーロッパと日本では生息する種が大きく異なるためである。また、この方法ではトリプシン(特定のアミノ酸配列を識別して切断する酵素)で処理したコラーゲン断片を質量分析し、比較対象とする種間を識別する鍵となるピークの有無に基づいて種を同定する。そのため、近縁種でもこの鍵となるピークを構成するアミノ酸配列に置換があった場合、まったく異なる種と同定されてしまう可能性もありうる。一方、研究代表者らの当時までの研究で、日本産の鳥類を科あるいはより低次の分類群で同定するための鍵となるピークが明らかになりつつあった[6]。

2. 研究の目的

本研究では、日本の遺跡から出土した「同定不能骨片」をコラーゲンの質量分析から同定するための基準の作成を目的とした。そのために、これまでに分析してきた鳥類に加え、鯨類や鰭脚類などの海棲を含む日本産の哺乳類を対象にコラーゲンのトリプシン切断断片のマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計(MALDI-TOFMS)分析によるピークリストを作成し、同定の鍵となるピークの検出を目指した。また、実際に遺跡から出土した「同定不能骨片」を分析し、この方法の有用性を検討した。

3. 研究の方法

1)比較標本の収集;哺乳類では、日本の遺跡から出土して「同定不能骨片」となる可能性がある海牛目(ジュゴン)、霊長目(ニホンザル)、食肉目(キツネ、ヒグマ、ニホンアシカなど)、鯨偶蹄目(シカ、イノシシ、ザトウクジラなど)、兎目(ニホンノウサギなど)を分析対象とした。また沖縄の更新世遺跡では頻繁に出土するリュウキュウジカ、リュウキュウムカシキョンも解析対象に加える。骨標本は研究代表者の所属する北海道大学総合博物館と研究分担者の所属する国立科学博物館で収集した。絶滅種で現生標本のないリュウキュウジカ、リュウキュウムカシキョンでは遺跡出土資料を用いた。鳥類では主に前科学研究(挑戦的萌芽研究・15K12439)で分析できなかった種を分析対象とした。標本が不足する場合には、遺体を入手して標本を作成し、分析対象とした。

- 2) 試料の採取；標本から骨粉約 1mg を採取。後世の研究の支障にならないよう、試料の採取は趾骨や肋骨からおこなった。
- 3) コラーゲンの抽出と制限酵素による切断；[1] の方法でおこなった。試料を塩酸で脱灰し、コラーゲンを抽出。重炭酸アンモニウムを加えて加熱し、酸不溶性の残渣をゼラチン化。サンプルにトリプシンを加えて加熱し、アミノ酸配列を切断した。
- 4) アミノ酸配列のピークリストの作成；C18Zip-Tip を用いて脱塩処理をした後、北海道大学・アイソトープ総合センターにある MALDI-TOFMS でアミノ酸配列のピークを検出し、ピークリストを作成した。
- 5) 分類群間で差のあるアミノ酸配列のピークの特異性と配列の決定；作成したピークリストに基づき、分類群間の判別の鍵となるアミノ酸配列のピークを特定した。またアイソトープ総合センターの MALDI-TOF/TOF (MS/MS) で分類群間の判別の鍵となるピークのアミノ酸配列決定を試みた。
- 6) 遺跡資料の同定；事例研究として、「同定不能骨片」を含む各地の遺跡から出土した資料を対象に 2) ~ 5) の方法で同定する。

4. 研究成果

現生標本の分析では、北海道大学総合博物館および国立科学博物館において日本産を中心とした骨標本の収集・作成を進めるとともに、収集されている標本からサンプリングし、コラーゲンのトリプシン切断断片の MALDI-TOFMS によるピークリストの作成をおこなった。その結果、日本産の種を中心に哺乳類では 68 種 123 点、鳥類では 30 種 31 点（前科研の成果と合わせて 180 種 195 点）についてピークリストが作成できた。分析の結果得られたピークには、特定の科や属、種あるいは特定の複数の分類群に特徴的に出現するものが含まれていた。これらのピークに基づき、遺跡資料についても同定できると考えられた。一方で、先行研究で提示された各分類群の同定のための指標となるピークとの齟齬も複数認められることが分かった。

遺跡資料の分析では、日向洞窟（山形県高島町）やカラカミ遺跡（長崎県壱岐市）、ルチェイキ遺跡（ロシア・沿海州）の資料ではコラーゲンの抽出とピークリストの作成に成功し、資料の同定が可能であった。このことから、蓄積したピークリストの情報が遺跡資料の同定に有用であることが確認できた。一方、石城山遺跡（沖縄県石垣市）、友利天井（同宮古島市）、ジープアブ洞（同南城市）、真栄平洞窟（同糸満市）、根堅遺跡（静岡県浜松市）などの出土資料では良好なピークリストが得られなかった。更新世にさかのぼるこれらの資料では、コラーゲンの劣化が進んでいたものと考えられる。サンプル量の増加や異なる脱塩方法の施行など実験方法の改良を試みたもののこれらの資料では良好なピークリストの検出には至らず、資料の同定は今後の課題となった。

「同定不能骨片」は骨が見つかるほとんどの遺跡から出土する。本研究の成果を生かしてこれらの骨を同定すれば、遺跡を形成した人々に利用された動物を明らかにできる。また資料のわずかな破壊で動物種を同定できることから、骨や角を加工して作成された骨角器の素材同定にも利用できると考えられる。さらに、小さな骨片からも人類活動を復元する手がかりが得られることが広く認知されることによって、これまで発掘時に土中から採集されなかった骨片や、水洗選別で採取されたものの同定されないままになっていた試料にも光が当てられ、日本の文化財科学や考古学研究の飛躍的な発展につながる可能性がある。波及的な効果として生物学や古生物学、法医学分野への貢献が考えられる。「同定不能骨片」から得られるデータは、その動物の過去の分布範囲の復元や、絶滅種の系統関係の推定にも利用できると考えられる。さらに、発見された骨がヒトのものかどうかを明らかにするのに必要な時間の短さ、分析成功率の高さ、分析に必要な経費の安さのいずれにおいても、コラーゲンの質量分析は DNA 分析を上回っている。考古学・文化財科学分野の興味・関心に端を発したこの研究の成果が、犯罪捜査の現場でも役立つ可能性がある。

1. Buckley, M., et al., 2010. Distinguishing between archaeological sheep and goat bones using a single collagen peptide. *Journal of Archaeological Science* 37: 13-20.

2. Buckley, M., et al., 2014. Species identification of archaeological marine mammals using collagen fingerprinting. *Journal of Archaeological Science* **41**: 631-641.
3. Richter, K.K., et al., 2011. Fish 'n chips: ZooMS peptide mass fingerprinting in a 96 well plate format to identify fish bone fragments. *Journal of Archaeological Science* **38**: 1502-1510.
4. 宮路淳子ほか 2013.「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 **64**: 47-57.
5. 江田真毅・泉洋江 2017.「質量分析による遺跡出土鳥類骨同定のための基礎的研究」日本文化財科学学会大会、山形.
6. 江田真毅ほか 2014.「コラーゲンタンパクによる遺跡出土動物骨の種同定 - キジ科鳥類を対象とした事例研究 - 」日本人類学会大会、横浜.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujita Masaki	4. 巻 125
2. 論文標題 Late Pleistocene human fossils in Japanese Archipelago	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 L'Anthropologie	6. 最初と最後の頁 102965 ~ 102965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anthro.2021.102965	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 Louys Julien, Braje Todd J., Chang Chun-Hsiang, Cosgrove Richard, Fitzpatrick Scott M., Fujita Masaki, et al.	4. 巻 118
2. 論文標題 No evidence for widespread island extinctions after Pleistocene hominin arrival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2023005118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2023005118	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 Eda Masaki, Morimoto Minoru, Mizuta Toshifumi, Inoue Takao	4. 巻 34
2. 論文標題 ZooMS for birds: Discrimination of Japanese archaeological chickens and indigenous pheasants using collagen peptide fingerprinting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Archaeological Science: Reports	6. 最初と最後の頁 102635 ~ 102635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jasrep.2020.102635	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 近藤恵、藤田祐樹、太田圭、久野正博	4. 巻 32
2. 論文標題 浜北人が発見された根堅遺跡の再発掘調査	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 浜松市博物館報	6. 最初と最後の頁 21-33
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 江田真毅、泉洋江、福田正宏	4. 巻 20
2. 論文標題 ルチェイキ遺跡出土の動物遺体について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 東京大学所実習施設研究報告	6. 最初と最後の頁 57-60
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤田祐樹
2. 発表標題 島嶼環境における旧石器人の文化と生活. Culture and lifestyle of Paleolithic people migrated to the island environment
3. 学会等名 東北大学東北アジア研究センター25周年国際シンポジウム, セッションA2「人類の進化と人類が進化させてきた文化の歴史」(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田祐樹
2. 発表標題 洞窟出土の動物遺骸から見えた旧石器時代の環境とヒトの暮らし
3. 学会等名 日本動物考古学会主催オンライン講演会「洞窟遺跡に残された動物骨とヒトの暮らし - 沖縄における動物考古学研究の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江田真毅・泉洋江・米田穰・藤田三郎
2. 発表標題 弥生時代におけるニワトリの継代飼育の可能性を探る：奈良県田原本町唐古・鍵遺跡資料の検討から
3. 学会等名 動物考古学会第8回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉 洋江・江田真毅・川上和人
2. 発表標題 質量分析を用いた鳥類骨の同定
3. 学会等名 日本鳥学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江田真毅・泉 洋江・菊地大樹・孫国平
2. 発表標題 長江下流域の新石器・稲作農耕社会でニワトリは利用されていたのか？ - コラーゲンタンパク分析からの検討
3. 学会等名 第7回動物考古学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江田真毅・泉 洋江・川上和人・沖田絵麻
2. 発表標題 「鵜を抱く女」が「抱く」鳥は何か？コラーゲン分析と形態解析からの検討
3. 学会等名 第36回日本文化財科学学会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	田島 木綿子 (Tajima Yuko) (00450635)	独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・研究主幹 (82617)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	藤田 祐樹 (Fujita Masaki) (50804126)	独立行政法人国立科学博物館・人類研究部・研究主幹 (82617)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関