

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：35302

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20950

研究課題名(和文)3,500万年前の哺乳類化石を用いた化石分子系統解析手法の開発とその応用

研究課題名(英文)Development and Application of Molecular Phylogenetic Analysis Methods for Fossils of Mammals from the Eocene Epoch, Approximately 35 Million Years Ago

研究代表者

実吉 玄貴 (Saneyoshi, Mototaka)

岡山理科大学・生物地球学部・准教授

研究者番号：50522140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、有意に古い化石標本から、十分な量のタンパク質抽出と手法開発を目的とした。近年の渡航制限から、限定された化石標本及び岡山県第四系より産出した哺乳類化石を対象に、特殊染色を用いた組織学的解析、タンパク質抽出、分子系統解析等、手法と有用性を検証した。その結果、いずれの手法も第四紀の年代を示す哺乳類化石に対し有用性を確認できたが、古第三紀のモンゴル産哺乳類化石では、十分な量のタンパク質保存を確認できなかった。これは、タンパク質の分解と溶出、アミノ酸の化学修飾との要因を示唆する。一方で手法の一部をさらに応用し、化石標本よりタンパク質を抽出できており、さらに精度の良い手法開発を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、骨化石より抽出される有機物に対して、保存期間の問題や抽出方法、抽出物に対する各種化学的な論証など、その存在証明が難しいとされてきた。本研究は、それらの化学的論証に至る方法論に、画期的な成果を提供する可能性があり、今後研究対象を拡大することで、さらなる有機物抽出へつながる可能性がある。さらに多様な化石に対して分子系統解析手法を拡大することは、化石になった過去の生物を、生物学的に捉えることにつながり、生物多様性変遷など、この世界の成り立ちを理解する一助になるだろう。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to procure an ample quantity of protein from considerably older fossil specimens and establish a methodology for achieving this objective. Due to recent travel limitations, we evaluated the efficacy and applicability of various methods on a limited number of fossil specimens, including histological analysis utilizing specialized stains, protein extraction, and molecular phylogenetic analysis. Our findings affirmed the efficacy of all methods for mammalian fossils from the Quaternary period in Okayama while failing to confirm adequate protein preservation in Paleogene Mongolian mammalian fossils. This discrepancy suggests a relationship between protein degradation, elution, and chemical modification of amino acids. However, through further implementation of select methods, we succeeded in extracting proteins from fossil specimens and are actively pursuing the development of more precise techniques.

研究分野：層位古生物

キーワード：哺乳類化石 古第三紀 ゴビ砂漠 分子系統解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

生物の系統進化に対する理解は、長らく形態に基づいてきたが、分子系統学の発展により近年大きく見直されてきた。特に、化石から抽出されるタンパク質のアミノ酸配列に基づき、化石種に対する分子系統が検討されつつある。これらの検討の中で、以下の2点についての疑義が生じている。(1) 保存期間：タンパク質の保存限界は、400万年程度と言われ、大多数の化石標本ではこの手法を用いることができない。一方で前述の保存限界も、様々な条件でさらに伸びる可能性は考えられるものの、より古い試料からのタンパク質の確実な抽出には至っていない。(2) 抽出方法：原生動物由来の有機物混入の問題や、抽出量そのものが少量かつ断片的であり数千万年オーダーの化石試料に対して、分子系統学的解析可能な抽出量を確保できない。そのため、化石標本由来の有機物へ対する証明などが極めて難しいとされてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、数千万年オーダーの化石を用いた分子系統学的解析法の開発を目標に、これまでの形態解析では系統分類仮説の統一されていない、3500万年前の哺乳類化石を対象に、分子系統学的解析法に耐えうる有機物抽出法の開発を目的にした。

### 3. 研究の方法

(1) 化石標本の選定：モンゴル南東部に分布する3,500万年前の地層（古第三系 Ergilin Dzo 層）から産出した哺乳類化石群集を研究対象とした。これらの標本群は、本学研究グループが2019年度の発掘調査により、本層より多種の哺乳類化石を大量に採取し、モンゴル国内にて保管している。選定試料は、現生近縁種が存在し、かつ安定的に系統関係が推定される分類群（化石サイ類・化石イノシシ類・化石偶蹄類）を中心に50標本とした。さらに、現生近縁種が存在せず、先行研究で系統関係が統一見解を得られていない分類群に対して複数標本を選定した。これらの選定は、形態から科レベルの分類が可能であること、化石含有層がタンパク質の保存に適していること、化石の保存が良好であることの3点を基準とした。

(2) 化石の特殊染色を用いた組織学的解析：タンパク質の抽出において、化石サンプルによりタンパク質の回収量は大きく異なり、実験効率を低下させている。化石から効率よくタンパク質を回収するためにはタンパク質が保存されているサンプルを選定することが重要であるが、化石表面の観察のみではその保存性について知ることは不可能である。そこで効率的なタンパク質の抽出を目的に、現生ラットを用いて骨組織の主成分であるI型コラーゲンの特殊染色を行い、骨基質タンパク質を特異的に検出可能な染色法の選定を行った。ラット骨組織において特異的な染色性が認められたものを用いて、化石標本の特殊染色を行い有効性範囲の検討を行った。

(3) 化石からの骨タンパク質の抽出および質量分析による解析；前途した化石試料からタンパク質の抽出を行った後、SDSPAGEにより抽出タンパク質の確認を行った。タンパク質のバンドが認められたサンプルに関しては、バンドを切り出し、ゲル内でトリプシン消化および断片化されたペプチドの抽出を行い、岡山大学自然生命科学研究支援センターのMALDI-TOF型質量分析装置（Bruker Daltonics社製）を用いてペプチド断片の質量スペクトルデータを得た。質量分析計で測定されたペプチドの質量スペクトルに関しては、一致するアミノ酸配列をタンパク質・ゲノムの配列データベースから Mascot 解析を行った。また PEAKS を用いて de novo シークエンス解析を行った。

#### 4. 研究成果

研究開始頃から2022年まで続いたコロナ禍の影響で、2020年夏から2022年5月頃まで、モンゴルに保管される化石標本に対する試料採取を実施できなかった。そのため、すでに化石試料を採取し、モンゴルより貸し出されていた古第三系 Ergilin Dzo 層産の複数哺乳類化石、および上部白亜系産の複数恐竜化石を研究対象とした。また比較対象として、より新しい年代を示す、岡山県の第四系瀬戸内海産の哺乳類化石（ゾウ類の肋骨、尺骨、象牙（3個体））を用いた。

##### (1) 化石の特殊染色を用いた組織学的解析

化石の染色性について比較検討するための標準試料として現生ラットの大腿骨を用いて解析を行った。その結果、一般的にコラーゲンに特異的な染色性を示すとされている Sirius Red 染色で血管周囲の線維性結合組織へ染色性を認めた。しかし骨組織においては濃淡が認められるなど、不均一な染色性を示した。一方 Van Gieson's 染色では血管周囲の線維性結合組織および骨組織に特異的な染色性を示した。本染色を第四系瀬戸内海産のゾウ類化石に適応した結果、骨化石では強い染色性を示したが、象牙化石では殆ど染色性が認められなかった。この結果から部位による保存の違いや、タンパク質の分解、溶出の可能性が示唆された。

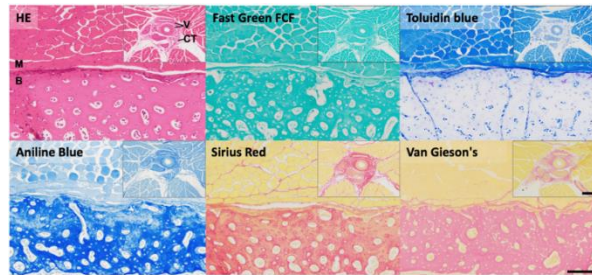


図1 特殊染色によるタンパク質の検出

一方 Van Gieson's 染色では血管周囲の線維性結合組織および骨組織に特異的な染色性を示した。本染色を第四系瀬戸内海産のゾウ類化石に適応した結果、骨化石では強い染色性を示したが、象牙化石では殆ど染色性が認められなかった。この結果から部位による保存の違いや、タンパク質の分解、溶出の可能性が示唆された。

##### (2) 化石からのタンパク質の抽出

モンゴル国産、古第三系 Ergilin Dzo 層産の複数哺乳類化石、および上部白亜系産の複数恐竜化石からタンパク質を抽出、SDSPAGE による解析を行ったところ、複数のサンプルから共通して分子量 100-150 kDa 間に I 型コラーゲンと考えられる複数のタンパク質のバンドが確認された（図2）。化石に付着していた堆積物、および実験に使用した試薬からはタンパク質バンドが検出されなかった。古第三系 Ergilin Dzo 層産の複数哺乳類化石および恐竜化石からは、化石由来と考えられるタンパク質は回収できたが、確認できたタンパク質は極少量であり銀染色でのみ検出可能であった。そのため今後のタンパク質解析が困難であると判断し、タンパク質の抽出回収過程について検討を行った。タンパク質の還元反応に考慮して  $\beta$  ME から DTT を含む試薬に変更や、タンパク質の沈殿法の変更などタンパク質の抽出回収法の改善を重ねた結果、Ergilin Dzo 層産の複数哺乳類化石および恐竜化石より、CBB 染色で検出可能なタンパク質量を抽出回収することに成功した（図3）。

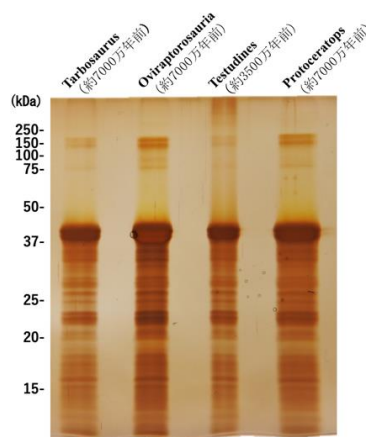


図2 SDSPAGEによるタンパク質の検出

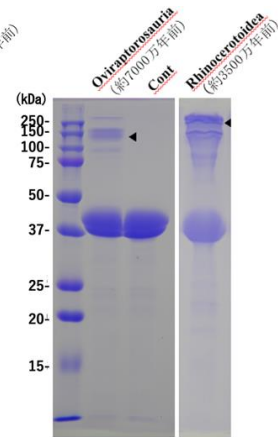


図3 抽出工程改善後の回収タンパク質

第四系瀬戸内海産のゾウ類化石の SDSPAGE による解析では、骨化石においてタンパク質バンドを極一部に認めたが、その殆どはスメア一状に観察された。象牙化石からは明瞭なタンパク質のバンドを認められなかった。これらの解析結果は、特殊染色による染色結果と相関性とあわせて、化石の特殊染色が効率的なタンパク質抽出に繋がる可能性を示した（図4）。今後は、特殊染色を用いて詳細な検討を行い、硬組織の構造とタンパク質の保存の関係、堆積環境の違いによる化石タンパク質残存に及ぼす影響などについて解析を行い、化石中のタンパク質の分解や溶出の過程を明らかにすることで、化石化過程へ対する理解へ貢献したい。

### (3) 質量分析による解析とアミノ酸配列に基づく分子系統解析

ポジティブコントロールとして、ラット骨から抽出された試料のSDSPAGEの結果より、分子量100-150 kDaの部位に確認されたタンパク質バンドを、質量分析計で解析を行い、データベースから質量スペクトルに一致するアミノ酸配列をMascot解析により検討した。その結果、ラットI型コラーゲン $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 鎖のアミノ酸配列と一致した。同様の方法を用いてErgilin Dzo層産のサイ化石および恐竜化石から回収したタンパク質の質量分析計を用いて解析を行ったところ、多数のペプチド断片のスペクトル情報は得られたがMascot解析により現生生物のアミノ酸配列と相同性を示すデータは得られなかった。そこで化石からのタンパク質抽出および解析手法の信憑性について確認するため、瀬戸内海産のゾウ類骨化石から得られた抽出された骨タンパク質の質量分析による解析、およびデータのMascot解析を行ったところ、絶滅種動物であるアメリカマストドンのI型コラーゲン $\alpha 1$ , 2鎖のアミノ酸配列と一部一致した。またPEAKSを用いたde novoシーケンス解析においても同様の結果が得られた。以上のことから、本研究手法に問題は無いと考えられ、現在投稿論文を準備中である。さらに、この結果から、Ergilin Dzo層産の哺乳類化石および恐竜化石といった、より古い年代を示す化石では、時間的経過によりタンパク質を構成するアミノ酸に化学的な修飾が加わるなど、ペプチドを構成するアミノ酸に化学的変化等が生じ、結果として配列に対する相同性を示さなかった可能性が示唆された。今後はより保存状態の良い化石を選定し、解析可能なタンパク質を得る方法等について検討したい。

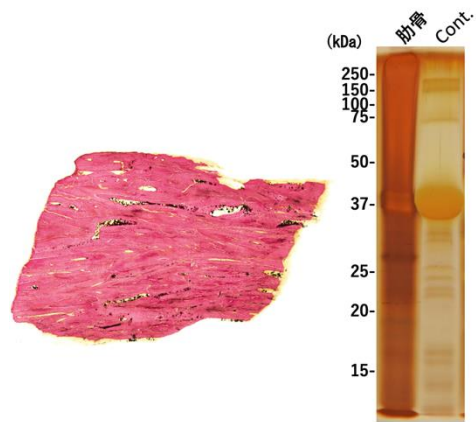


図4 ゾウ類化石の特殊染色とSDSPAGE

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 稲葉勇人, 千葉謙太郎, 實吉玄貴, 宮地孝明, 川上朝子, 武智泰史, 辻極秀次
2. 発表標題 化石組織間で異なるタンパク質の保存
3. 学会等名 第30回硬組織再生生物学会学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayato Inaba, Kentaro Chiba, Mototaka Saneyoshi, Takaaki Miyaji, Asako Kawakami, Yasushi Takechi, Kirstin Brink, Hidetsugu Tsujigiwa
2. 発表標題 Different protein recovery rate in fossil bone and dentine samples: implications for the Application of paleoproteomic methods in paleontological studies
3. 学会等名 82nd annual meeting of Society of Vertebrate Paleontology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻極秀次, 千葉謙太郎, 高橋亮雄, 實吉玄貴, 岡山大学自然生命科学研究支援センターゲノムプロテオーム解析部門
2. 発表標題 特殊染色を応用した脊椎動物化石の組織学的研究
3. 学会等名 OVSフォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上れな, 辻極秀次, 千葉謙太郎, 高崎竜司, 實吉玄貴
2. 発表標題 産卵期における現生カメ類の骨組織学的研究
3. 学会等名 第30回硬組織再生生物学会学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上れな, 辻極秀次, 千葉謙太郎, 高崎竜司, 実吉玄貴
2. 発表標題 ミシシippiaカミミガメ及びクサガメの産卵期における硬組織代謝に関する組織学的研究
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会第61回沖縄大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 実吉玄貴・林 昭次・千葉謙太郎・青木一勝
2. 発表標題 絶対年代決定から見るモンゴル国ゴビ砂漠から産出する後期白亜紀脊椎動物化石相の重要性
3. 学会等名 日本古生物学会2021年年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉勇人・辻極秀次・千葉謙太郎・宮地孝明・川上朝子・ヒシグジャフ ツォクトバートル ブンレイ・マインバヤル・実吉玄貴
2. 発表標題 モンゴル国産脊椎動物化石からのタンパク質の抽出
3. 学会等名 日本古生物学会2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本航汰・畠山唯達・北原 優・実吉玄貴・Khishigjav Tsogtbaatar
2. 発表標題 モンゴル国古第三系 Ergilin Dzo 層の地質年代学的研究
3. 学会等名 日本古生物学会2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉 勇人・千葉 謙太郎・辻極 秀次・宮地 孝明・川上 朝子・Khishigjav Tsogtbaatar・Buuvei Mainbayar・實吉 玄貴
2. 発表標題 脊椎動物化石の特殊染色による組織学的解析とタンパク質検出
3. 学会等名 第29回硬組織再生生物学会学術大会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本航汰・畠山唯弘・北原 優・實吉玄貴・Khishigjav Tsogtbaatar
2. 発表標題 モンゴル国南東部に分布する古第三系 Ergilin Dzo 層の古地磁気学的研究
3. 学会等名 日本堆積学会2021年オンライン大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉 勇人・小平 将大・辻極 秀次・千葉 謙太郎・実吉 玄貴
2. 発表標題 質量分析法と特殊染色によるモンゴル国産脊椎動物化石からのタンパク質抽出
3. 学会等名 OVSフォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Okoshi, S. Kodaira, K. Chiba, M. Saneyoshi, A. Takahashi, M. Natori, B. Mainbayar, K. Tsogtbaatar
2. 発表標題 A new mammalian fossil from the Upper Cretaceous Baynshire Formation, Gobi Desert, Mongolia
3. 学会等名 SVP annual meeting 2021 online (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 植田 和貴、ナショナル ジオグラフィック、小林 快次、小西 卓哉	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日経ナショナルジオグラフィック社	5. 総ページ数 160
3. 書名 NHKスペシャル 恐竜超世界 IN JAPAN	

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山理科大学生物地球学部生物地球学科古生態古環境学研究室ホームページ <a href="https://www.big.ous.ac.jp/~saneyoshi/">https://www.big.ous.ac.jp/~saneyoshi/</a> 岡山理科大学生物地球学部生物地球学科ホームページ <a href="https://www.big.ous.ac.jp/">https://www.big.ous.ac.jp/</a> 岡山理科大学古生物・年代学研究センター <a href="http://dinosaur.ous.ac.jp/ipg/index.html">http://dinosaur.ous.ac.jp/ipg/index.html</a>
--

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	辻極 秀次  (Tsuji giwa Hidetsugu)  (70335628)	岡山理科大学・理学部・教授    (35302)	
研究分担者	千葉 謙太郎  (Chiba Kentaro)  (80826438)	岡山理科大学・生物地球学部・講師    (35302)	

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
---------	---------



モンゴル	Monogila Academy of Science	Institute of Paleontology		
------	-----------------------------	---------------------------	--	--