

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：82641

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21445

研究課題名（和文）歯牙エナメル質中アミノ酸同位体分析法の開発による食性研究の新展開

研究課題名（英文）A new analytical method of isotopic compositions of individual amino acids in tooth enamel

研究代表者

内藤 裕一（Naito, Yuichi）

一般財団法人電力中央研究所・サステナブルシステム研究本部・主任研究員

研究者番号：10754848

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）：液体クロマトグラフ（LC）/分取システム等の機器類を用いて歯牙エナメル質資料に含まれる個別アミノ酸の単離メソッドのルーチン化を行った。まず目的試料である生物体歯牙サンプル中のアミノ酸存在量の定量を試み、その結果、安定同位体分析に必要な試料量が、歯牙エナメル質の重量で数百mg以上であることがわかった。現生動物の歯牙サンプルを対象としたアミノ酸安定同位体比の測定を実施し、食性復元を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のねらいはこれまでに分析対象とされなかった歯牙エナメル質に着目し、その保存性の良好さから古い時代の生物資料の食性を復元する手法を開発することにある。検討の結果、安定同位体分析に必要な資料量が判明し、今後の古生物、考古学等の研究において分析化学的アプローチを適用するための端緒が開けた。

研究成果の概要（英文）：An isolation method of individual amino acids in tooth enamel using a liquid chromatography (LC)/fraction collector system has been developed. Quantities of those amino acids in each tooth enamel sample were measured to clarify minimum weights for stable isotope analysis. As a result, it was found that at least several hundred mg of enamel powder was needed. Besides, stable isotope measurements on amino acids from modern animal teeth were conducted.

研究分野：自然人類学

キーワード：歯牙 エナメル質 アミノ酸 同位体比 クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

結晶性の高い骨資料や化石資料の歯牙エナメル質は、それらが形成された当時の生体情報を保存している可能性がある。エナメル中に残存するタンパクやペプチドもその生体情報のうちの1つである。これまでに約2百万年前のギガントピテクス歯牙化石に含まれるペプチドの配列解析に成功した例はあるが、残存する量がわずかであるためにタンパクやその構成要素であるアミノ酸の安定同位体比を測定した例はほとんどない。アミノ酸の同位体分析法は現生物の研究で開発されてきたものであり、体組織を構成する特定のアミノ酸の同位体比から、その生物の栄養段階や食物中の窒素源を特定できることが分かっている。

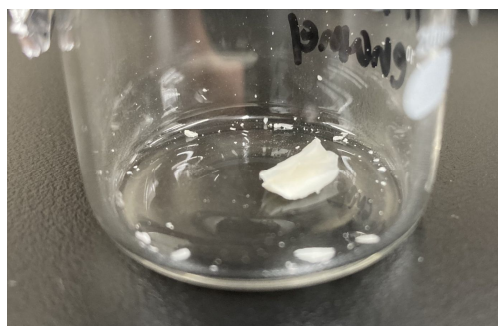
上述したように、例えば骨に残存するコラーゲンタンパクの安定同位体分析では、一般に保存状態の良い欧州の環境であっても通常数万年前までの時代の資料を対象とするにとどまる。より古い時代の資料の生体物質の安定同位体比が測定できれば、従来遺伝解析などの生物学的手法が大勢を占めていた生物進化の研究において、分析化学的アプローチを用いて進化研究を遂行できるようになるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究計画では大型哺乳類の歯牙エナメル質に残存する微量タンパクに着目し、その構成アミノ酸ごとの安定同位体比を測ることで、当時の生物の食性を復元する新手法を開発する。この分析法を確立・応用することで、分析化学に基づいた従来の生物の食性研究の時間軸を拡張し、数十万年前～数百万年前までの時代をも研究対象となることをデモンストレーションすることが本研究のねらいである。

3. 研究の方法

生物の歯牙エナメル質にはエナメル分泌タンパク等の様々なタンパクが存在する。これらのタンパクの一部が分解作用を受けつつも化石・骨資料に残るが、本計画ではこの残存したタンパクやペプチドの断片、およびその構成アミノ酸を安定同位体分析の対象とする。数十万年前よりも古い時代の資料は国内では入手が困難であるため、まず国内外の研究協力者の助力を得て資料の収集・整理を行う。



分析に供した歯牙エナメル質資料の例

次に分析法の検討を実施する。まず歯牙エナメル質の無機成分(ヒドロキシアパタイト)の除去のための脱灰条件を検討する。塩酸等の薬品を用いることになるが、Tris-HClを使用するかどうかを判断し、またそのpHや時間・温度等のパラメーターを最適化する。

分析対象のタンパク質成分以外の外部由来の有機物を除去する方法を検討する。エナメル質は結晶性が高いため一般的にエナメル質内部にまで浸透する汚染は少ない。しかし非常に古い時代の資料で同様のことがいえる確証はないため、この検討を実施する。抽出したタンパク・ペプチド断片を加水分解することで遊離アミノ酸とし、液体クロマトグラフ(LC)/蒸発光散乱検出器(ELSD)により定性・定量分析を行う。その後分取装置を用いて目的の個別アミノ酸を単離する。単離した個々のアミノ酸を化学洗浄により精製した後、元素分析計/同位体比質量分析計(EA/IRMS)によりアミノ酸ごとの炭素・窒素同位体比を測定する。

上記の検討を通して歯牙エナメル質中アミノ酸の安定同位体分析法を確立した後、収集した化石資料に適用する。

4. 研究成果

国内外のつてを通じて、ミャンマー等の地域から出土した更新世の化石資料を入手することができた。より若い時代の国内の資料も併せて資料整理をまず実施した。

歯牙エナメル質からのタンパク質・ペプチド断片の抽出には塩酸が有効であることが分かった。また、LCカラムの選別、保持時間、溶離液の種類などの一通りの検討を行った結果、LC/ELSD/分取システムを用いた個別アミノ酸の単離メソッドを確立した。LCクロマトグラム上に現れるピークエリア面積に基づき、個別アミノ酸の定量を逐次実施した。これらの方法を用いて様々な歯牙エナメル質資料に含まれるアミノ酸の存在量を分析した。

現生動物の歯牙サンプルを対象とした分析の結果、安定同位体分析に必要な試料量が、歯牙サンプルとしての重量で数百mg以上であることがわかった。これらの検討により、将来的に

過去の生物遺骸にも本手法を応用する端緒が開けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuichi I. Naito, Masato Hirose, Miriam Belmaker, Donald O. Henry, Momoko Osawa, Takashi Nakazawa, Sophie G. Habinger, Peter Tung, Herve Bocherens, Sate Massadeh, Seiji Kadowaki	4. 巻 282
2. 論文標題 Paleoenvironment and human hunting activity during MIS 2 in southern Jordan: Isotope records of prey remains and paleosols	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Quaternary Science Reviews	6. 最初と最後の頁 107432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/J.QUASCIREV.2022.107432	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, Miriam Belmaker, Francisco J. Jimenez-Espejo, Maria D. Simon-Vallejo, Jose Antonio Riquelme Cantal, Ruben Parrilla-Giraldez, Miguel Cortes-Sanchez	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Evidence for marine consumption during the Upper Palaeolithic at “El Pirulejo” inland rockshelter (southern Iberia Peninsula, Spain)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Open Quaternary	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5334/OQ.109	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 Leonie Rey, Yuichi I. Naito, Yoshito Chikaraishi, Stephane Rottier, Gwenaelle Goude, Naohiko Ohkouchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Specifying subsistence strategies of early farmers: New results from compound-specific isotopic analysis of amino acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Osteoarchaeology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/OA.3093	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, D. G., Naito, Y. I., Coromina, N., Rufi, I., Soler, N., Soler, J.	4. 巻 154
2. 論文標題 Stable isotope evidence of human diet in Mediterranean context during the Last Glacial Maximum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Evolution	6. 最初と最後の頁 102967
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jhevol.2021.102967	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 Hirose, M., Naito, Y. I., Kadowaki, S., Arai, S., Guliyev, F., Nishiaki, Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Investigating early husbandry strategies in the southern Caucasus: intra-tooth sequential carbon and oxygen isotope analysis of Neolithic goats, sheep, and cattle from Goeytepe and Haci Elamxanlı Tepe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Archaeological Science: Reports	6. 最初と最後の頁 102869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jasrep.2021.102869	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 内藤裕一	4. 巻 4
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(続報)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ホモ・サピエンスのアジア定着期における行動様式の解明(「パレオアジア文化史学」計画研究A02班2019年度研究報告)	6. 最初と最後の頁 36-39
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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 内藤裕一
2. 発表標題 動物遺存体と古土壌の同位体分析に基づく南ヨルダン・トルハマル遺跡の古環境と狩猟行動の復元
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10回研究大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤裕一・H. Bocherens・門脇誠二
2. 発表標題 ヨルダン・Tor Hamar遺跡における旧石器時代人の狩猟行動:最新の分析状況について
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9回研究大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tung, P., Bocherens, H., Drucker, D.G., Naito, Y.I.
2. 発表標題 Unravelling the diet of extinct cave bears in Romania using 15N isotopic analysis of amino acids
3. 学会等名 ASI 2021 -Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Stabile Isotope e.V.- (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本霊長類学会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 638
3. 書名 霊長類学の百科事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>氷河期終末の温暖化と乾燥化の下でホモ・サピエンスが行った狩猟活動を解明 https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/2022/04/post-239.html 牧畜の世界への普及、最初期から多彩だった 同位体分析で解明 https://scienceportal.jst.go.jp/gateway/clip/20210318_g01/</p>

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

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