

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18486

研究課題名（和文）Cupinファミリータンパク質を活用した植物パレオプロテオミクスの創成

研究課題名（英文）Establishment of Plant Paleoproteomics

研究代表者

西内 巧（Nishiuchi, Takumi）

金沢大学・疾患モデル総合研究センター・准教授

研究者番号：20334790

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：植物遺体(炭化種子)や土器付着炭化物に残存する植物の種子タンパク質であるCupinファミリータンパク質を検出・同定することで、植物の属や種を明らかにする植物パレオプロテオミクスの基盤整備を試みた。炭化米は、試料の保存状況が良ければ、ジャポニカ種とインディカ種を判別可能であることが分かった。土器付着炭化物については、イネ、ダイズ属、クルミ属由来のCupinタンパク質を効率よく検出し、属や種を同定することができた。一方で、タンパク質の情報がほとんどない6種の堅果類の現生果実を用いてRNA-Seq解析を実施して、新たにタンパク質のデータベースを作成し、多様な植物種を同定できるように基盤整備を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、植物遺体を同定することで、炭化米の場合には、試料の保存状況が良ければ、ジャポニカ種とインディカ種を判別可能であることを明らかにした。また、土器付着炭化物については、Cupinファミリータンパク質を効率よく検出する研究基盤を確立できたことで、考古試料について植物の属や種のレベルで同定することが可能となった。さらに、タンパク質の情報がほとんどなかった堅果類等については、現生果実を用いてRNA-Seq解析を実施し、タンパク質のデータベースを作成することで、より多様な植物種の同定が可能となり、植物パレオプロテオミクスの今後の拡張性についても示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We attempted to develop a foundation for plant paleoproteomics, which reveals plant genera and species by detecting and identifying Cupin superfamily proteins, which are plant seed proteins that remain in carbonized seeds and carbonized food crusts attached to archaeological potteries. For carbonized rice, it was found that Japonica and Indica species could be discriminated if the samples were well preserved. For the charred food crusts adhering to archaeological potteries, Cupin family proteins from rice, soybean, and walnut were efficiently detected, and genus and species could be identified. On the other hand, RNA-Seq analysis was performed on six current acorn species for which little protein information was available, and a new protein database was created to improve the foundation for detecting more diverse plant species.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：パレオプロテオミクス 植物種子 土器付着物 植物遺体 タンパク質データベース RNA-Seq

1. 研究開始当初の背景

遺跡から出土する植物遺体や土器付着炭化物について、タンパク質調整に一般的に用いられるアセトン沈殿法を用いて、アセトンに可溶性低分子化合物等の夾雑物を除去し、アセトンに不溶性タンパク質を精製することで、古代タンパク質を検出・同定することに成功していた。試料数は少ないものの、複数遺跡の炭化米や土器付着炭化物の残存タンパク質分析から、マメのグロブリン、イネの germin 等の Cupin ファミリーに属するタンパク質が検出された。これらの実験結果を受けて、Cupin ファミリータンパク質が考古試料における植物種同定のマーカータンパク質として利用できる可能性について検討するという本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多様な植物遺体や土器付着物に残存するタンパク質を分析し、Cupin ファミリータンパク質の残存性を検証し、植物パレオプロテオミクスにおける種同定のマーカータンパク質としての可能性を明らかにすることにある。Cupin ファミリータンパク質は、Cupin モチーフ (パレルと ヘリックスからなるループ構造を形成)を有しているタンパク質群のことであり、植物グロブリン、Germin やグリシニン等が含まれ、熱耐性、乾燥耐性、プロテアーゼ耐性等の特徴を持つものが知られている。本研究では、出土年代や地域が異なる多数の植物遺体(炭化種子)や土器付着炭化物を用いて、残存タンパク質を検出・同定し、Cupin ファミリータンパク質の検出頻度を明らかにし、出土試料における植物種同定のマーカータンパク質となりえるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

本研究におけるタンパク質の分析手法については、アセトン沈殿法を用いた方法で一定の成果が得られていたが、試料によってはタンパク質の検出できない状況が続いた。そこで、より効率的に植物タンパク質を検出・同定する実験手法を再検討した結果、3kDa の限外濾過膜でタンパク質をトラップして、3kDa 以下の代謝物等の低分子化合物を除去し、限外濾過膜上でタンパク質を還元・アルキル化してトリプシン消化を行うことで、低分子化したペプチドを遠心して回収する FASP 法を一部改良した方法を用いることにより、アセトン沈殿法に比べて、検出効率が向上することを見出した。そこで、本研究では FASP 法により、試料からタンパク質、さらにトリプシン消化ペプチドを調整して、脱塩精製し、nanoLC(液体クロマトグラフィー)と Orbitrap 型質量分析計を組み合わせた LC-MS/MS によるショットガンプロテオミクスを用いてペプチドの検出を行った(図 1)。PEAKS という解析ソフトを用いたペプチドのアミノ酸配列の同定により、試料中の植物由来のタンパク質の検出を行った。さらに、相同性検索プログラム(BlastP)を用いて、登録されている全生物種のタンパク質のデータベースに対して、同定したペプチドのアミノ酸配列の植物種に特異的かどうかについて検証を行った。

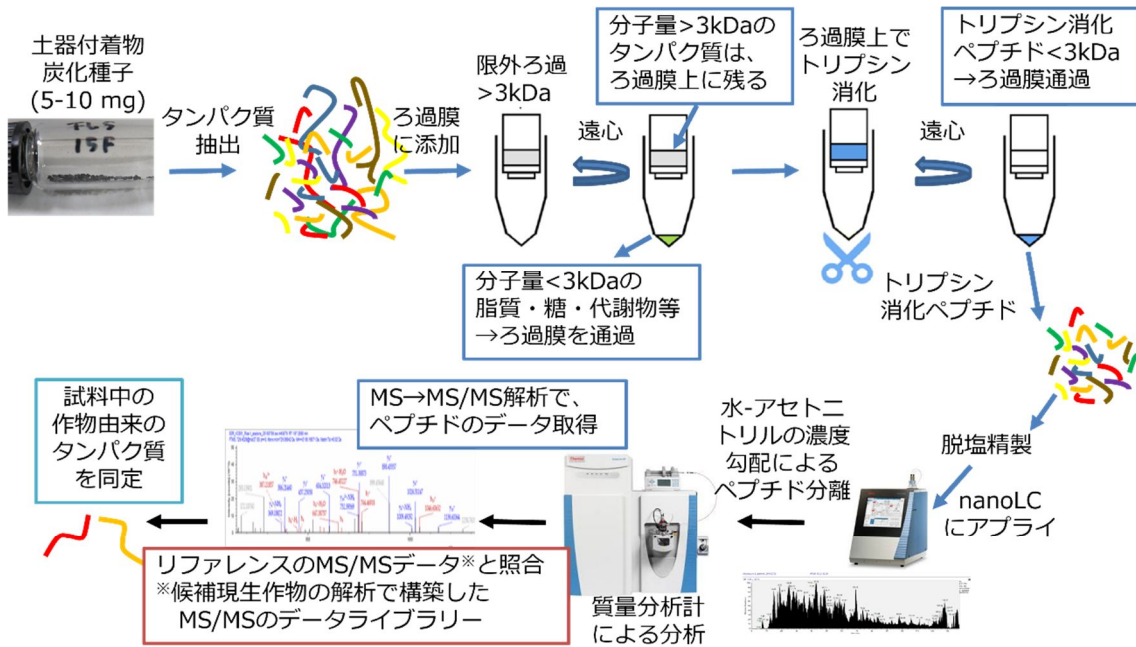


図1. FASP法によるプロテオミクス実験系の構築
(西内、2024を一部改変)

4. 研究成果

炭化米等の植物遺体中のタンパク質の残存状況は、試料によって大きく差異があることから、2022年度は、炭化米について、弥生時代を中心に地域の異なる8遺跡で出土した試料を用いて、残存タンパク質の分析を行った。その結果、全ての遺跡からイネに特異的なタンパク質を検出することができたが、Cupinファミリーに属するタンパク質が検出されなかった試料も複数見られた。また、ジャポニカ種に特異的なアミノ酸配列が検出された試料も見られたことから、タンパク質の残存状況によっては、ジャポニカ種とインディカ種を判別可能であることが分かった。一方、約1400年前の炭化コムギ種子についても10点以上について分析を行ったが、いずれの試料においてもコムギに特異的なタンパク質を検出することはできなかった。

出土土器の炭化付着物の残存タンパク質の分析についても、植物由来のタンパク質に着目して分析を行った。他の試料で既に検出されていたイネやダイズ属由来のCupinファミリータンパク質と同様のタンパク質が検出される試料が多く、土器付着炭化物においては、Cupinファミリータンパク質が植物種の同定に有効であることが示唆された。特に、ダイズのグリシニンG1タンパク質は、複数の遺跡の土器付着炭化物でC末側に近い領域が共通して検出されており、タンパク質の構造と安定性の関連性が示唆された。一方で、縄文時代の遺跡の土器付着物から、クルミ属のCupinファミリーに属するグロブリンタンパク質を検出することができた。今後、堅果類等のデータベースの整備は課題となるが、これまでの穀物と豆類のCupinファミリータンパク質に加えて、堅果類のCupinタンパク質を検出できたことは大きな成果であり、今後も同様に解析を進めることで、Cupinファミリータンパク質に着目した植物パレオプロテオミクスの研究基盤の確立を進めたい。一方で、同じ炭化物でありながら、土器付着炭化物に比べて、炭化種子はタンパク質の検出効率が低い傾向にあった。炭化種子の多くは、火災等により貯蔵していた種子が炭化したと考えられるため、高温条件により長時間さらされていたことがタンパク質の残存率に影響しているのかもしれない。

縄文人等に食されていたと考えられる堅果類由来のタンパク質の検出が少なく、ブナ科等の堅果類のタンパク質のデータベースが整備されていないことが主な要因と考えられたことから、2023年度は、候補となるコナラ、ミズナラ、アベマキ、スダジイ、トチノキ、オニグルミの6つの植物種を選定し、RNA-Seq解析を実施し、それらがコードするタンパク質のアミノ酸配列を同定することでデータベースの作成を行った。スダジイとトチノキについては、現生の果実試料を用いてタンパク質を抽出してプロテオーム解析を実施することで、それぞれ6135及び5636種のタンパク質を同定することができた。今後、これらのデータベースを用いて、土器付着炭化物を中心にプロテオーム解析を進める予定である。また、前年度に検出された土器付着炭化物のクルミ属のCupinファミリータンパク質の11Sグロブリンタンパク質が、オニグルミ由来と推察されたため、新たに作成したオニグルミのデータベースを用いて再解析したが、オニグルミに特異的なペプチドの検出には至らなかった。土器付着炭化物についても、異なる遺跡の試料を用いて、継続して解析を行っており、ダイズ属等のCupinファミリータンパク質が比較的高頻度に検出されることを確認している。一方、現生のイネ果実を土器で煮て得られた炭化付着物について、タンパク質の分析を行ったところ、前年度に炭化米の試料で同定されたタンパク質と同じタンパク質が複数検出された。この結果から、炭化過程において残存したタンパク質は、経年変化の影響をあまり受けない可能性も考えられた。今後、多様な植物の現生果実試料を用いた土器付着物の形成実験とプロテオーム解析を実施することで、現生果実の調理過程及び炭化過程において残存するタンパク質を明らかにし、データをライブラリー化することで、考古試料における土器付着炭化物等の分析に役立てていきたい。

植物遺体については、炭化米と炭化コムギの多数の試料を分析したが、Cupinファミリータンパク質が検出されない試料も多かったことから、マーカータンパク質としての活用は難しいことも示唆された。他の植物種の炭化種子の入手が難しく、残存タンパク質の解析が実施できておらず、検証が十分に進んでいない状況である。今後、できるだけ多くの植物種の炭化種子等を入手して分析することで、Cupinファミリータンパク質の残存性及び種同定における有効性について検証を進めたい。土器付着炭化物については、Cupinファミリータンパク質を効率的に検出することができることが明らかになったが、穀物やマメ類由来のタンパク質が多く、堅果類としては、クルミ属のグロブリンタンパク質のみであった。本研究において、現生試料を用いて、6種の堅果類のタンパク質のデータベースを整備することができたが、今後、これらのデータベースを活用して、土器付着炭化物等の残存タンパク質の検出を進めると共に、できるだけ多くの植物種についてデータベースの整備を行い、多様な植物種が検出・同定可能な植物パレオプロテオミクスの研究基盤を固めたい。

<引用文献>

西内巧「パレオプロテオミクスの進展と展望」東アジア考古科学の新展開 雄山閣出版 (2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sidiq Y, Tamaoki D, Nishiuchi T	4. 巻 23
2. 論文標題 Proteomic Profiling of Plant and Pathogen interaction in Leaf Epidermis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232012171.	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 Sidiq Y, Tamaoki D, Nishiuchi T	4. 巻 5
2. 論文標題 Data for proteomic analysis of epidermis of Arabidopsis leaves inoculated with plant pathogenic fungi, Fusarium graminearum.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Data and Methods.	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14889/jpdm.2023.0009	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 Uchida-Fukuhara Yoko, Shimamura Shigeru, Sawafuji Rikai, Nishiuchi Takumi, Yoneda Minoru, Ishida Hajime, Matsumura Hirofumi, Tsutaya Takumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Palaeoproteomic investigation of an ancient human skeleton with abnormal deposition of dental calculus	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-55779-y	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 -
1. 著者名 Kausar Rehana, Nishiuchi Takumi, Komatsu Setsuko	4. 巻 294
2. 論文標題 Proteomic and molecular analyses to understand the promotive effect of safranal on soybean growth under salt stress	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 105072 ~ 105072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jprot.2024.105072	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西内巧
2. 発表標題 土器付着物プロテオミクスで古代人の食生活を探る
3. 学会等名 植物分析学会中部談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西内巧、庄田慎矢
2. 発表標題 土器付着物を用いたプロテオミクスによる古代人の食生活の復元
3. 学会等名 2022年度日本プロテオーム学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西内巧、庄田慎矢
2. 発表標題 プロテオミクスを用いた土器付着物に含まれる作物種の同定
3. 学会等名 第37回日本植生史学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西内巧、斎藤秀樹、村上夏希、中野正貴、中山誠二、庄田慎矢
2. 発表標題 藍染の伝統技術の 解明に向けた藍甕付着物のメタプロテオーム解析
3. 学会等名 2023年度日本プロテオーム学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takumi Nishiuchi, Hideki Saito, Natsuki Murakami, Seiji Nakayama and Shinya Shoda
2. 発表標題 Proteomics Approach to the Biomolecule Degradation of Indigo Dyeing Vessel Deposits
3. 学会等名 42nd conference on Dyes in History and Archaeology. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西内巧, 中野正貴, 庄田慎矢、上條信彦
2. 発表標題 6遺跡から出土した炭化米における残存タンパク質及び代謝物の包括的な解析
3. 学会等名 第38回日本植生史学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 村上夏希、西内巧、庄田慎矢	4. 発行年 2023年
2. 出版社 吉川弘文館	5. 総ページ数 222
3. 書名 古代寺院の食を再現する	

1. 著者名 西内巧、中野正貴、庄田慎矢	4. 発行年 2023年
2. 出版社 六一書房	5. 総ページ数 305
3. 書名 中国新石器時代文明の探求 vol.2	

1. 著者名 西内巧	4. 発行年 2024年
2. 出版社 雄山閣	5. 総ページ数 192
3. 書名 東アジア考古科学の新展開	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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