

備讃瀬戸産ゾウ類化石中の残存タンパク質の検討

稲葉 勇人・千葉 謙太郎^{*}・實吉 玄貴^{*}・辻極 秀次^{**}

岡山理科大学大学院生物地球科学研究科修士課程生物地球科学専攻

^{*}岡山理科大学生物地球学部生物地球学科

^{**}岡山理科大学理学部臨床生命科学科

1. 諸言

分子生物学の発展により、それまでの形質情報に基づく系統樹が再構成され、新たな知見が得られてきた (e. g. 1). 近年、絶滅生物においても、化石中に残存するDNAの塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列による分子系統解析が試みられており、DNAよりも保存されやすいとされるタンパク質は、様々な堆積環境や幅広い年代の化石の分子系統解析に用いられている (2).

日本で産出した第四紀のゾウ類化石に関しても、分子レベルでの進化を明らかにすることを目指した生化学的な研究が行われてきた (e. g. 3; 4). 先行研究では、電子顕微鏡や特殊染色による観察、アミノ酸組成の分析から、コラーゲンの存在が示唆された (4) が、現在までアミノ酸配列の解読には至っていない。そこで本研究は、タンパク質をバンドとして検出する電気泳動によって、備讃瀬戸産ゾウ類化石中のタンパク質の残存を検討した上で、現在広く用いられる質量分析法によって、アミノ酸配列の解読を試みた。

2. 試料と方法

倉敷市立自然史博物館所蔵のゾウ類化石の肋骨、尺骨、象牙を実験に用いた。これら化石試料は瀬戸内海に位置する備讃瀬戸地域海底から産出したものであり、瀬戸内海他地域から産出したナウマンゾウ化石には約2万4000年前のものとしてされている化石が含まれる (5)。また、実験室由来の試料汚染などを確認するためのコントロールは、試料を含まずに化石試料と同様の処理を行った。

凍結破砕によって粉末化した試料を塩酸にて脱灰し、脱灰不溶性残渣からタンパク質を可溶化した。上清を、精製して2倍に濃縮した後、電気泳動によって展開し、銀染色でタンパク質のバンドを検出した。化石試料で特異的に検出されたバンドは、ゲルから切り出してゲル内消化を行い、質量分析を行った。質量分析によって得られたスペクトルデータは、Mascot serverを用いたデータベース (Swiss-Prot) 検索による生物種とタンパク質の種類の同定、PEAKSを用いたde novo解析に

よるアミノ酸配列の解読をそれぞれ行った。

3. 結果

3-1 電気泳動

尺骨化石の上清では、コントロールと異なる37 kDa以上の濃いスメア状のバンドと、約25kDaと20kDaの濃いバンドが確認された。37 kDa以下の複数の濃いバンドは、コントロールでも検出された。肋骨化石の上清は、2倍、5倍、10倍で濃縮して分析した。この結果、上記の尺骨化石と同様、37 kDa以上の濃いスメア状のバンドと、約25kDaと20kDaの濃いバンドが確認された。また、濃縮率が高い試料ほど、全体的に濃いバンドを示した。このため、10倍濃縮した試料で確認された約25kDaと20kDaの濃いバンドを切り出し、質量分析を行った。象牙化石の上清では、全てコントロールと同じバンドが検出された。

3-2 質量分析

10倍濃縮した肋骨化石の上清から得られた約25kDaと20kDaのバンドは質量分析が行われた。データベース検索の結果、それぞれのバンドの生物種は*Mammut americanum* に同定された。しかし、タンパク質については、約25kDaのバンドがI型コラーゲンのa1鎖に同定され、同定の確からしさを示すスコアは299であった。一方、約20kDaのバンドはI型コラーゲンのa2鎖に同定され、スコアは231であった。de novo解析の結果、それぞれのバンドはデータベース検索で同定されたアミノ酸配列の2%が解読された。さらに、de novo解析で解読されたが、データベースには該当しない多くの不明な断片的なアミノ酸配列も確認された。

4. 考察とまとめ

電気泳動によって化石試料に特異的なタンパク質のバンドが検出され、質量分析ではゾウ類のI型コラーゲンが同定された。このことから、備讃瀬戸地域から産出したゾウ類化石にはコラーゲンが残存しており、抽出が可能であることが示された。しかし、質量分析に用いられた2本のタンパク質バンドの分子量は、I型コ

ラーゲンに特徴的なバンドの分子量(6;7)と異なり、低分子量であった。これら2本のバンドは、試料を処理する過程でI型コラーゲンがより断片化されて低分子量に変化した可能性がある(e.g. 8)。しかし、断片化しているものの、バンドとしてタンパク質が検出されていることから、化石残存コラーゲンの構造や性質は高度に保たれていることが示唆された。象牙化石の電気泳動像では、骨化石の結果と異なり、化石試料に特異的なタンパク質バンドが検出されなかった。これは、象牙細管で構成される象牙質の微細構造(9)が、骨に比べて多孔質で表面積が大きいため、外的環境の影響を受けやすく、残存タンパク質が分解されやすいことが考えられた。

質量分析で同定された*M. americanum*の産出報告は北米やアラスカ、メキシコであり(10)、備讃瀬戸地域から報告されているゾウ類化石は*Stegodon orientalis*と*Palaeoloxodon naumanni*である(11)。したがって上記の同定結果は、Swiss-Protに登録されているゾウ類が*M. americanum*のみであることに起因していることが考えられた。このため、今回同定されたアミノ酸配列はゾウ類共通のアミノ酸配列の可能性があり、今後、de novo解析によって取得されたアミノ酸配列を用いて分子系統解析を行う予定である。

5. 謝辞

倉敷市立自然史博物館の武智泰史氏には、化石試料のサンプリングにご対応頂いた。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の宮地孝明博士、川上朝子氏、杉本育代氏には、ゲル内消化や質量分析の実施とご助言を頂いた。以上の方々に、厚く感謝の意を申し上げる。

参考文献

- 1) Stanhope, M. J. *et al.* (1998). *PNAS*, 95(17), 9967-9972.
- 2) Cappellini, E. *et al.* (2018). *Annu. Rev. Biochem.*, 87, 1029-1060.
- 3) Ijiri, S., & Fujiwara, T. (1958). *Proc. Jpn. Acad.*, 34(5), 280-283.
- 4) 象団研グループ. (1968). *化石研究会会誌*, 1, 35-69.
- 5) Kitagawa, H. *et al.* (2006). *Abstracts with Programs The 2006 Annual Meeting The Palaeontological Society of Japan*, pp. 17.
- 6) Weissman, A. M. (1969). *J. Periodontal Res.*, 40(10), 611-616.
- 7) Arrecubieta, C. *et al.* (2007). *J. Biol. Chem.*, 282(26), 18767-18776.
- 8) Matmaroh, K. *et al.* (2011). *Food Chem.*, 129(3), 1179-1186.
- 9) Virág, A. (2012). *J. Morphol.*, 273(12), 1406-1423.
- 10) Polaco, O. J. *et al.* (2001). *The World of Elephants - Proceedings of the 1st International Congress, Rome October 16-20, 2001*. pp. 237-242.
- 11) Taruno, H. (1988). In Kurashiki Museum of Natural History. *Vertebrate Fossils from the Sea Bottom of Bisan-seto, West Japan -Report of researchers on the Yamamoto Collection I-*, pp. 7-10.

Examination of the ancient proteins in the elephantid fossil from the Bisan Seto area, Japan

Hayato Inaba, Kentaro Chiba^{*}, Mototaka Saneyoshi^{*}, Hidetsugu Tsujigiwa^{**}

Department of Biosphere-Geosphere Science, Graduate School of Biosphere-Geosphere Science,

** Department of Biosphere-Geosphere Science, Faculty of Biosphere-Geosphere Science,*

*** Department of Life Science, Faculty of Science,*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

The elephantid fossils from the Bisan Seto area of the Seto Inland Sea, Japan, were examined in the presence of ancient proteins by extracting protein and analyzing using electrophoresis, which detects proteins as bands. This study also performed mass spectrometry to identify the species and types of proteins and predict the amino acid sequences of these fossils. In electrophoresis, the demineralized supernatants of the fossilized bone samples indicated different bands from the control, which was treated the same without the fossil samples. On the other hand, both supernatants of the fossilized incisor sample indicated no sample-specific bands, suggesting that protein degradation is more progressive than in fossilized bone samples due to the porous microstructure of dentin. In mass spectrometry, sample-specific bands from the fossilized bone were identified as type I collagen of elephantid. These results suggested that the elephantid fossilized bone samples from the Bisan Seto area contain endogenous proteins, especially collagen.

Keywords: Paleoproteomics; collagen; Mammalian fossil; Pleistocene.