

組織学的解析法と比色分析法による化石残存タンパク質の検出

稲葉勇人・村上凱星*・千葉謙太郎*・高橋亮雄*・實吉玄貴*・

辻極秀次**

岡山理科大学大学院総合情報研究科数理・環境システム専攻

*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. 緒言

近年、考古学分野や古生物学分野において分子生物学手法を応用した研究が行われており、絶滅生物のアミノ酸配列が解読されるなど目覚ましい発展をとげている(1)。しかし、化石に残存するタンパク質は極微量であるため、外部からの試料混入の可能性が常に問題視され、化石試料中のタンパク質を簡便に尚且つ確実に検出する方法の開発が求められている(2)(3)。そこで本研究では、化石に残存するタンパク質の検出と局在を明らかにするため、備讃瀬戸海底から産出した約3万年前のゾウ類の骨および象牙化石を使用し、組織学的解析法の可能性について検討を行った。また化石に残存するタンパク質を簡便に定量する手法確立のため、同化石を用いて比色分析法を試みた。

2. 材料と方法

試料には、化石と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た。化石試料は、倉敷市立自然史博物館所蔵のゾウ類の肋骨(F1468)、尺骨(F1456)、象牙(F1186, F1310, F1455)化石を使用した。これらゾウ類化石は、瀬戸内海の一部海域である備讃瀬戸から産出し、試料の年代は産出化石の比較によって中期から後期更新世と考えられている(4)。また、北川ほか(2009)による¹⁴C年代では、瀬戸内海産ナウマンゾウは約3万5千年前と推定されている(5)。

2-1 組織学的解析

化石試料からパラフィン薄切標本を作製するため、化石からカルシウム等を溶解する脱灰処理を行った。脱灰処理は、試料容積の数十倍のギ酸に試料を浸漬、脱灰液を毎日交換し10日間脱灰した。脱灰後の試料は、定法にてパラフィンで包埋後、ミクロトームを用いて約10 μ mに薄切、切片を作製し、その後HE染色を施した。

また脱灰薄切標本に加えて、非脱灰切片を作製した。非脱灰切片は、化石試料をエポキシ樹脂で包埋し、厚さ約50 μ mまで研磨し作製した。

脱灰および非脱灰切片ともに、標本作製後は光学顕微鏡で組織学的に観察し、写真撮影を行った。

2-2 比色分析

化石試料を1M塩酸で脱灰し化石中のカルシウム等を溶解した。脱灰操作後、脱灰液中に認められた不溶化画分を、6M塩酸を用いて加水分解、総タンパク質定量アッセイキット(QuickZyme Biosciences社)を用いて試料中のタンパク質量を定量した。さらに、試料中のコラーゲンをコラーゲン定量アッセイキット(QuickZyme Biosciences社)を用いて定量した。

3. 結果

3-1 脱灰標本の組織学的解析

象牙化石(F1186)は脱灰3日目から組織の崩壊が始まり、10日目にはほとんど完全に崩壊した(図1)。他の象牙化石(F1310, F1455)も同様に10日間の脱灰処理の結果、完全に崩壊し組織標本作製は困難であった。

一方、骨化石(F1456)は脱灰2日目から繊維状に組織分離が確認されたが、10日間経過後も完全には崩壊しなかった(図1)。そのため、骨化石のみパラフィン包埋標本が作製可能であった。骨化石から作製した組織標本をHE染色、観察した結果、骨化石には骨組織が高度に保存されており、ハバース管を中心とした骨単位や骨基質中に骨小孔が明瞭に観察され、現生生物とほぼ同様の骨組織構造を示した。(図1)。

3-3 比色分析法による定量解析

タンパク質の比色分析の結果、骨化石からは、試料1gあたり最大127.9mgの総タンパク質が検出された。これは、現生ラットの大腿骨から検出されたタンパク

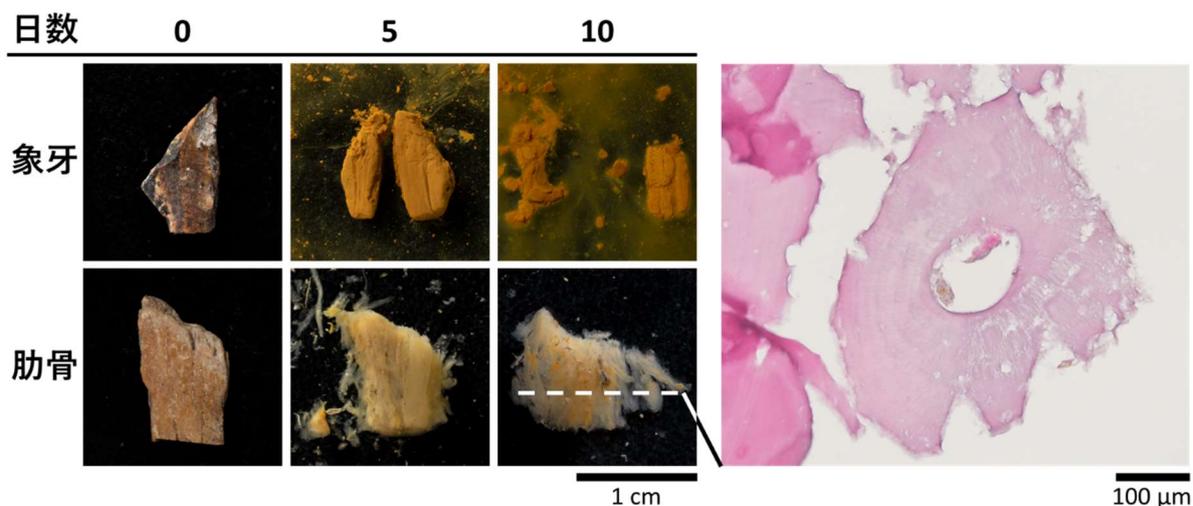


図 1. ギ酸を用いた脱灰処理による象牙化石 (F1186) と肋骨化石 (F1468) の 5 日おきの変化 (左図). 10 日間の脱灰処理後に作製した肋骨化石の脱灰切片の HE 染色像 (B).

質 (試料 1 g あたり 303.4 mg) の半分量にあたる。また、コラーゲンの比色分析の結果、骨化石からは試料 1 g あたり最大 14.1 mg のコラーゲンが検出された。一方、象牙化石中の総タンパク質とコラーゲン量は共に、ほとんど検出限界以下であった。

4. 考察

本研究では、骨化石の脱灰処理後に残存した不溶性試料の組織学的観察により明瞭な骨基質が観察された。また比色分析においてもタンパク質が検出されるなど、両解析法において骨基質タンパク質の存在を示唆する結果が得られた。本研究結果は以前に行われた SDS 電気泳動法による解析結果 (6) とも相関していることから、化石試料においても組織学的解析法および比色分析法の有効性が明らかになった。今後、骨の主成分であるコラーゲンを特異的に検出する特殊染色法など、より詳細な組織学的解析法について検討したい。

また骨組織と歯牙組織の比較から、硬組織の構造がタンパク質の保存に大きな影響をおよぼすことが考えられた。今後、骨組織、軟骨組織、歯牙 (エナメル質、象牙質) 等の硬組織がタンパク質保存とどのような相関があるのか、また堆積環境が化石タンパク質残存にどのような影響をおよぼすのかについて解析を行い、化石中のタンパク質の分解過程、化石化過程に対する理解を深めたいと考えている。

5. 謝辞

化石試料のサンプリングにご対応頂いた倉敷市立自然史博物館の武智泰史氏には、厚く感謝の意を申し上げる。

げる。

参考文献

- 1)Warinner, C. *et al.*: Paleoproteomics., *Chem. Rev.*, 122, 16, pp 13401-13446 (2022)
- 2)Schweitzer, M. H. *et al.*: Paleoproteomics of Mesozoic dinosaurs and other Mesozoic fossils., *Proteomics*, 19, 16, 1800251 (2019)
- 3)Buckley, M. *et al.*: A fossil protein chimera; difficulties in discriminating dinosaur peptide sequences from modern cross-contamination., *Proc. Royal Soc. B*, 284, 1855 (2017)
- 4) 樽野博幸: 備讃瀬戸海底の脊椎動物化石-その 1-. In 備讃瀬戸海底産出の脊椎動物化石-山本コレクション調査報告書 I-, pp 11-61, 倉敷市立自然史博物館 (1988)
- 5) 北川博道ほか: ナウマンゾウ化石の 14C 年代とその課題, 日本古生物学会年会講演予稿集, pp 25, 日本古生物学会 (2009)
- 6) 稲葉勇人ほか: 備讃瀬戸産ゾウ類化石中の残存タンパク質の検討, 岡山理科大学古生物学・年代学研究センター事業報告, 第 2 号, pp 74-75, 岡山理科大学古生物学・年代学研究センター (2022)