

# モンゴル国産恐竜化石からの有機物検出

辻極 秀次・小平 将大\*・稲葉 勇人\*\*・千葉 謙太郎\*\*\* 實吉 玄貴\*\*\*

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

\*岡山理科大学大学院理学研究科博士課程材質理学専攻

\*\*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

## 1. 緒言

近年の化石に関する研究では、化石に含まれる有機物を対象として分子生物学的な解析が試みられており様々な研究報告がされている。しかし古い年代の化石では、組織中に含まれる有機物は分解、他の成分に置換していることが多く、また有機物が残存していたとしてもその含有量は僅かであり解析は非常に困難である。そこで本研究では、保存状態が世界的にも良好とされているモンゴル国から産出した約7000万年前の恐竜化石を用いてタンパク質抽出および糖類の検出を行い、恐竜化石における分子生物学的解析法の有効性について検討した。

恐竜化石からのタンパク質抽出に関する研究では、昨年度の研究において、化石試料から非脱灰抽出法により抽出したサンプルから、タンパク質のバンドを検出した。しかし検出されたバンドは、その後の解析によりヒト由来のケラチンタンパク質の混入であり、化石由来のタンパク質は含まれていないことが判明している。本年度研究では、化石試料を用いたタンパク質の抽出方法の再検討を行い、脱灰酵素処理法を用いてタンパク質の抽出を行った。

恐竜化石からの特殊染色法を用いた多糖類検出では、多糖類の簡便な検出方法の開発のため、現生鳥類の骨組織を用いて脱灰標本および非脱灰標本を作成、特殊染色による染色性の違いについて観察、恐竜化石から多糖類検出が可能であるか検討を行った。

## 2. 実験材料及び実験方法

### 2-1 化石試料からのタンパク質抽出

モンゴル国の Nemegt 層（約7000万年前）と Djadokhta 層（約7000万年前）から産出した恐竜類化石1標本、Baynshire 層（約1億-8500万年前）から産出したカメ類化石1標本を実験に用いた。またネガティブコントロールとして同化石周囲または同層準の堆積物、ポジティブコントロールとして現生生物であるラットの大腿骨を実験に用いた。化石

は試料の汚染を防ぐため、ダイヤモンドバーを用いて化石表面の汚染面を除去、超音波による洗浄を行った後、クライオプレスを用いて凍結破砕した。粉砕した試料は塩酸にて脱灰後、酵素処理によりタンパク質を溶出、抽出精製の後、SDS-PAGEにより展開、銀染色によりタンパク質のバンドを検出した。

### 2-2 特殊染色法を用いた多糖類検出

研究材料として、ニワトリの大腿骨（66週齢）と上腕骨（約8週）を用いた。すべての標本は、10%ホルマリン中性緩衝溶液で固定した。脱灰標本に関しては、大腿骨および上腕骨を10%ギ酸にて約1週間脱灰後、定法にてパラフィンブロックを作成、5 $\mu$ mの薄切切片を作製した。非脱灰標本の作製は、クロロホルムを用いて脱脂をした後、脱水、エポキシ樹脂にて包埋後、厚さ70-100 $\mu$ mまで研磨、切片を作製した。脱灰標本、非脱灰標本共に、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色および特殊染色としてPAS染色、アルシアンブルー染色、サフラニンO染色を行い、組織学的に観察、各特殊染色の染色性について比較検討を行った。

## 3. 結果

### 3-1 化石試料からのタンパク質抽出

電気泳動の結果、すべての化石試料に共通して分子量100-150 kDa間に複数のタンパク質のバンドが確認された。カメ類化石では分子量250 kDa以上にスミア状のバンドが複数確認できた。堆積物からは分子量100-150 kDa付近にバンドは確認されず、ケラチンタンパク質のバンドも確認されなかった。なお分子量50 kDa以下に観察される多数のバンドは、化石の処理に用いた酵素由来のタンパク質が分解した物であると考えられた（Fig.1.）。ポジティブコントロールとして用いたラット骨から抽出された試料からは、分子量100-150 kDa間に複数のタンパク質バンドが認められ、化石試料から検出されたバンドとほぼ同様の分子量を示すバンドも確認された。化石試料と同じ位置に認められたラット由来のバンドを質量分析により解析、データベース検索したとこ

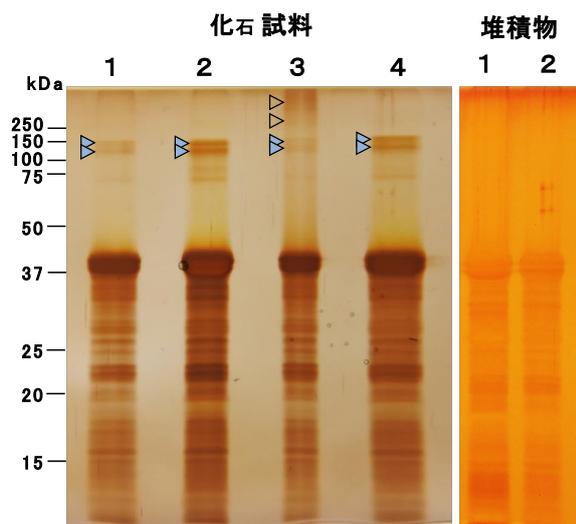


Fig. 1: 化石試料1. 恐竜の歯、2. カメ、3. 恐竜の骨4. 恐竜の歯、堆積物1、2

ろ、ラットI型コラーゲン $\alpha$ 鎖の質量情報と一致した。

### 3-2 特殊染色法を用いた多糖類検出

脱灰染色と非脱灰染色の染色性について比較したところ、HE染色では非脱灰標本において試料の包埋に用いたエポキシ樹脂が染色され、骨組織の観察が困難であった。特殊染色であるサフランin O、PAS、アルシアンブルー染色においては、脱灰標本、非脱灰標本共に、海綿骨に残存する軟骨基質に対して特異的な陽性所見が認められ、詳細な組織観察も可能であった。(Fig. 2.)。しかし上腕骨(約8週)非脱灰標本の特殊染色では、関節軟骨において明瞭な染色性が得られなかった。

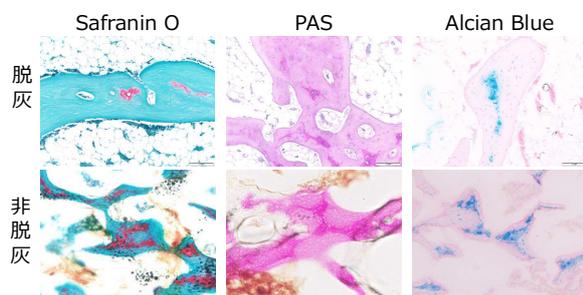


Fig. 2: 骨組織の特殊染色結果

## 4. 考察とまとめ

### 4-1 化石試料からのタンパク質抽出

恐竜化石からのタンパク質抽出で用いた脱灰酵素処理法では、全ての化石試料において分子量100-

150 kDa間に複数のバンドが確認できた。検出されたタンパク質は、その分子量からI型コラーゲンの可能性が考えられた。また堆積物と使用した酵素に、化石試料で認められたタンパク質のバンドは確認されなかった。以上のことから今回検出されたタンパク質は恐竜化石由来である可能性が高いと考えられた。今後、恐竜化石から得られたタンパク質バンドに関して、質量分析による解析を行う予定である。

### 4-2 特殊染色法を用いた多糖類検出

特殊染色法を用いた多糖類検出では、脱灰標本および非脱灰標本共に海綿骨に残存した軟骨基質に陽性所見が得られた。今回の結果から、非脱灰標本から多糖類を検出する目的においてはサフランin O、PAS、アルシアンブルーの特殊染色法が有効であることを示しており、化石標本に対しても同様の結果が得られる可能性が高いと考えられた。しかし上腕骨(約8週)非脱灰標本では期待された染色結果が得られなかったことから、試料に応じた標本の作製方法、成長段階や骨組織の部位による染色性の違いなど、さらなる検討を行う必要があると考えられた。

## 参考文献

- 1) M. H. Schweitzer, *et al.* Biomolecular Characterization and Protein Sequences of the Campanian Hadrosaur *B. canadensis*. 2009. *Science*. 324 : 626-631.
- 2) 服部 俊治, 動物由来線維分子コラーゲンの性質と応用. 2009. 繊維学会誌. 65 : 453-461.
- 3) C. Barreto, *et al.* Evidence of the Growth Plate and the Growth of Long Bones in Juvenile Dinosaurs. 1993. *Science*. 262 : 2020-2023.
- 4) A. Riquès, Cyclical growth in the long limb bones of a sauropod dinosaur. 1983. *Acta Palaeontologica Polonica*. 28 : 225-232.