

化学処理による骨コラーゲンの炭素・窒素同位体比の変化 —主にXAD-2樹脂処理について—

南 雅代

名古屋大学大学院理学研究科地球惑星理学専攻

E-mail : minami@eps.nagoya-u.ac.jp

【はじめに】

哺乳類動物の骨・歯・牙などの ^{14}C 年代測定に際し、XAD-2樹脂という吸着ポリマーを用いる方法は、保存状態の良好でない骨化石試料からフミン酸・フルボ酸などの外来有機物を効果的に除去し、信頼度の高い ^{14}C 年代を得るのに有効であることが、これまでの研究で明らかになった (Stafford *et al.*, 1988 ; 南・中村, 1997; 1998)。しかし、XAD-2樹脂を用いることにより同位体分別を起し、試料中の炭素・窒素同位体比に変化が生じている恐れがある。コラーゲンの炭素・窒素安定同位体比は動物が摂取した食資源の同位体比を反映するとされており、食性復元の手段として有用である (van der Merwe and Vogel, 1978; DeNiro and Epstein, 1980)。信頼度の高い ^{14}C 年代とともに、信頼度の高い炭素・窒素安定同位体比を得ることは、骨化石研究において重要なことである。

現生の象牙試料、ならびに現生の牛アキレス腱コラーゲン試薬に対し、XAD-2樹脂処理が同位体比におよぼす影響を調べた結果、XAD-2樹脂処理をすることによって $\delta^{13}\text{C}$ 値は約1.0%高くなり、 $\delta^{15}\text{N}$ 値はほとんど変化しないことがわかった (南・池田, 1998 ; 南, 1999)。この結果は、XAD-2樹脂処理による同位体分別がほとんどないとするStafford *et al.* (1988)の結果 ($\delta^{13}\text{C}$ 値 $\approx +0.3\%$, $\delta^{15}\text{N}$ 値 $\approx +0.1\%$)と相反するものとなった。また、個々のアミノ酸試薬のXAD-2樹脂処理による同位体比の変化はほとんど見られず、XAD-2樹脂処理によるコラーゲンの炭素同位体比の変化は、コラーゲンを構成している個々のアミノ酸が、XAD-2樹脂を通る際に分別を起しているために生じているのではないと示唆された。

本研究においては、実際の骨化石に対し、化学処理が同位体比におよぼす影響を調べるため、化学抽出段階の異なるいくつかの成分について $\delta^{13}\text{C}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}$ 値およびC/N比を測定した。また、XAD-2樹脂処理の過程でコラーゲン加水分解物中のアミノ酸組成が変化しているかどうかを調べるため、アミノ酸組成分析も行った。

【試料および方法】

実験に用いた骨化石試料は、粟津湖底遺跡に存する第3縄文貝塚の第VII層から採取されたイノシシ(*Sus scrofa*)、ニホンジカ(*Cervus nippon*)、スッポン(*Trionyx sinensis*)の骨片である。これらの骨化石の ^{14}C 年代は約4,500yr BPと考えられる (中村ほか, 1997)。コラーゲン試薬は、Sigma ChemicalとNacalai Tesque製の現生の牛アキレス腱コラーゲンを用いた。

獣類骨片は蒸留水中で繰り返し超音波洗浄し、さらに0.2M NaOH中で超音波洗浄した後、蒸留水で注いで凍結乾燥した。これをステンレス乳鉢を用いて粉碎し、0.8N HCl (4°C, 24hr)で脱灰処理した後、酸に不溶成分を遠心分離し、蒸留水で洗浄して凍結乾燥した。この凍結乾燥試料に6N HClを加え、アルミニウムブロックヒーター内で110°Cで24時間反応させて加水分解した。得られた加水分解物の一部はエバポレーターによって塩酸を飛ばした後、凍結乾燥した。残りの加水分解物はXAD-2樹脂を詰めたカラム(1×30 cm)に通し、6N HClでアミノ酸集合体を溶出させた。アミノ酸集合体成分についてもエバポレーターで塩酸を飛ばした後、凍結乾燥した。コラーゲン試薬についても同様に、脱灰・加水分解・XAD-2樹脂処理を行い、アミノ酸集合体成分を抽出した(南・中村, 1997)。

以上のようにして得られた成分は酸化銅、銀線とともにバイコール管に真空封管して850°Cに加熱し、生じた気体を真空ラインを用いてN₂とCO₂に精製した。N₂の精製は、液体窒素で冷却した線状モレキュラシーブス(13X, 1/16)にトラップさせる方法を用いた(南ほか, 1998)。炭素・窒素安定同位体比の測定は気体用質量分析計(MAT-252)により行った。また、一部の試料についてはCNコーダー(柳本製, MT-700)により炭素および窒素含有量を測定した。

加水分解成分およびXAD-2樹脂処理されたアミノ酸集合体成分については、名古屋大学大気水圏科学研究所にあるガスクロマトグラフ質量分析計(Thermo Quest SSQ7000)によりアミノ酸分析を実施した。試料を超純水で薄め、そこからアミノ酸約30ng分を分取した。乾固した後、イソプロパノール1.8ml+アセチルクロライド0.7mlの混合液を加えて溶かし、N₂下で溶液200μlを分取した。100°Cで一時間加熱後、氷水中で冷却し、N₂下で溶媒を飛ばした。そこにTFAA-DCM液(トリフルオロ無水酢酸0.5ml+ジクロロメタン0.5ml混合液)を加えて溶かした後、N₂下で溶液100μlを分取した。100°Cで10分間加熱後、氷水中で冷却し、N₂下で溶媒を飛ばした。さらにジクロロメタン100μl加えて溶かし、そのうち1μlをガスクロマトグラフ質量分析計に導入した。

【結果と考察】

化学処理による骨化石試料の炭素・窒素同位体比の変化

骨化石試料を脱灰、加水分解、XAD-2樹脂処理する過程で得られた各成分の炭素・窒素同位体比の測定結果を表1に示す。図1に、獣類骨片の化学抽出処理にともなうC/N比、 $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化を、コラーゲン試薬から得られた値(南, 1999)とともに示した。

C/N比は、いずれの試料も化学処理が進むにつれて減少している。骨化石試料のC/N比が骨粉を塩酸で脱灰する際に大きく減少しているのは、コラーゲンから外来有機物が除去されたためであり、コラーゲン試薬のわずかな減少は、外来有機物の除去というよりは塩酸による変化と考えられる。脱灰成分を加水分解する過程においては、骨化石試料、コラーゲン試薬ともに減少の大きさに違いがなく、加水分解成分をXAD-2樹脂処理する過程においては、コラーゲン試薬のほうが大きな減少傾向を示している。

コラーゲン試薬の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、化学処理が進むにつれて増大しているのに対し、骨化石試料では、加水分解過程においてはかなり増大するものの、XAD-2樹脂処理過程においてはわずかに減少している。 $\delta^{15}\text{N}$ 値に関しては、骨化石試料、コラーゲン試薬ともにあまり変化が見られなかった。

骨化石試料、コラーゲン試薬いずれも、化学処理が進むにつれコラーゲンが純化され、よりコラーゲン本来の値に近づいていると考えられるが、XAD-2樹脂処理の過程における両者のC/N比、 $\delta^{13}\text{C}$ 値の変化の違いは、外来有機物が除去されたためだけでなく、化石と現生の骨の違い、動物の種の違いにも起因していると考えられる。つまり、化石のほうが塩酸によってコラーゲンが分解されやすい状態にあり、コラーゲンを構成しているアミノ酸が変化を受けやすいということ、そして、動物の種によってアミノ酸組成が異なるので、塩酸によって分解を受けやすいアミノ酸構成量が異なるということが考えられる。

以上の結果から、XAD-2樹脂処理による同位体比の変化は、炭素同位体比に対しては無視できないことがわかった。しかし、C/N比、 $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値はXAD-2樹脂処理だけではなく、コラーゲンを0.8N HClで脱灰、6N HClで加水分解する際にも変化しており、塩酸による影響、動物の種の違いによる影響など、他にもいくつかの要因を含めて考えることが必要である。

表1 栗津湖底遺跡から採取されたイノシシ、ニホンジカ、スッポン骨片の化学処理にともなうC/N比、 $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化

	C content (%)	N content (%)	C/N ratio	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
<i>Sus scrofa</i>					
Bone	10.4	2.9	3.6	---	---
Decalcified Bone	47.4	14.8	3.2	-21.0	+5.6
Hydrolysate	34.8	11.7	3.0	-19.9	+4.6
XAD-treated Hydrolysate	30.0	10.4	2.9	-20.4	+4.9
<i>Cervus nippon</i>					
Bone	8.2	2.0	4.0	---	---
Decalcified Bone	43.7	14.4	3.0	-21.7	---
Hydrolysate	36.3	12.8	2.8	-20.1	+4.0
XAD-treated Hydrolysate	30.0	11.1	2.7	-20.5	+4.4
<i>Trionyx sinensis</i>					
Bone	6.8	1.6	4.2	---	---
Decalcified Bone	43.0	13.5	3.2	-20.6	+9.3
Hydrolysate	33.7	11.6	2.9	-18.6	---
XAD-treated Hydrolysate	31.8	10.9	2.9	-19.4	+8.6

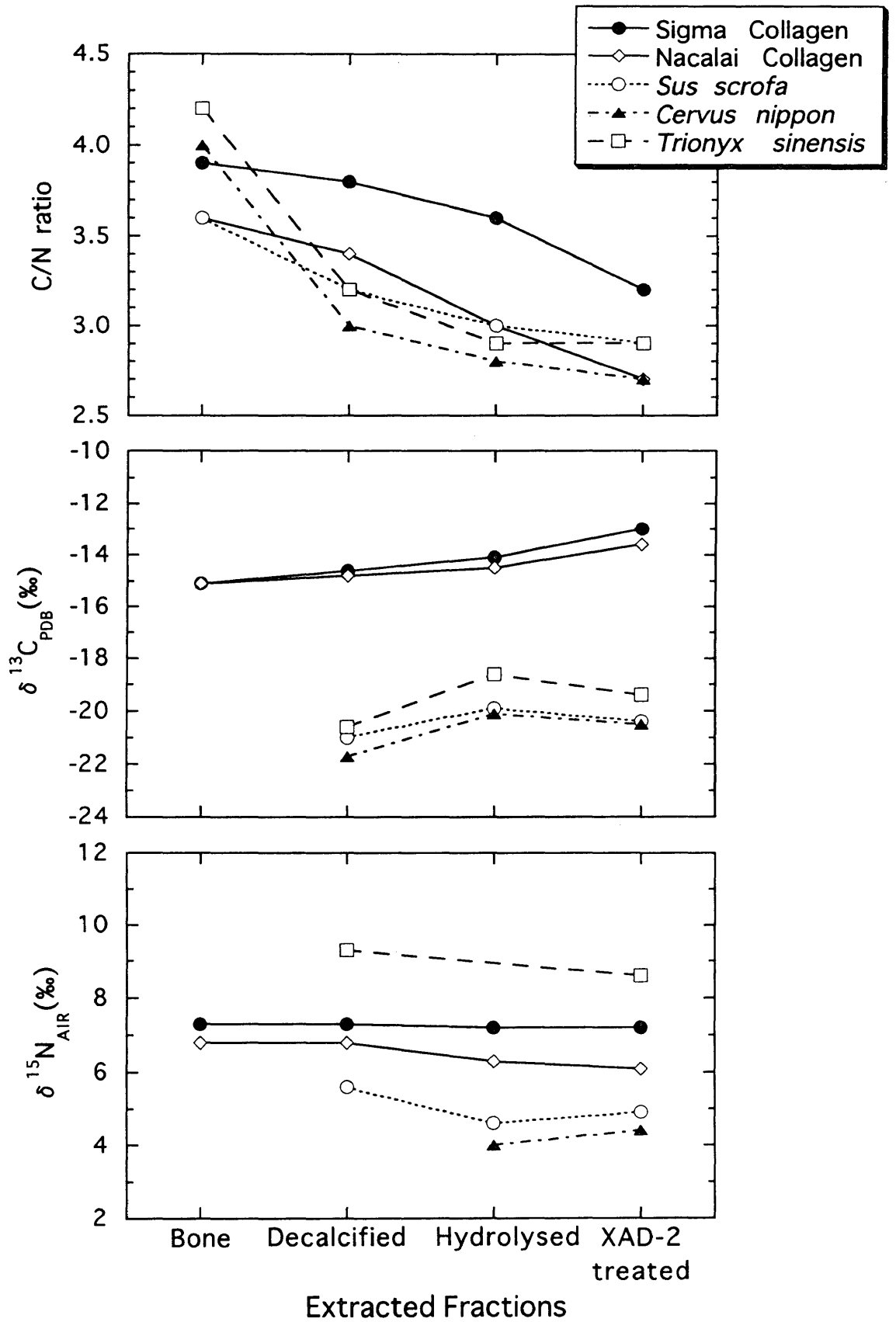


図1 化学処理にともなう獣類骨片およびコラーゲン試薬の C/N比, $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化

加水分解成分とXAD-2樹脂処理されたアミノ酸集合体成分のアミノ酸組成の違い

表2に、コラーゲン試薬および粟津湖底遺跡から採取されたイノシシ、ニホンジカ骨片のアミノ酸組成を示す。全体的に見て、アラニン、グリシン、アスパラギン酸の濃度が高い。XAD-2樹脂処理をすることによって増加しているアミノ酸と減少しているアミノ酸が存在し、トレオニン、イソロイシン、ロイシン、セリンについては減少することがわかった。アミノ酸はそれぞれ固有の炭素・窒素同位体比をもっているため、アミノ酸組成が変化することにより、アミノ酸集合体成分の炭素・窒素同位体比は変化する。動物の種が違えば、タンパク質を構成するアミノ酸組成も異なり、したがって、XAD-2樹脂処理によって変化する $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値の大きさも異なるはずである。骨化石試料の $\delta^{13}\text{C}$ 値が、加水分解過程において大きく変化するのには、骨化石のほうが現生の牛アキレス腱コラーゲンに比べて塩酸による分解反応を受けやすく、アミノ酸組成が大きく変化するためと考えられる。今後さらに分析例を増やし、化学抽出処理によって変化する骨コラーゲンの炭素・窒素同位体比について明らかにしていきたいと思っている。

表2 コラーゲン試薬および獣類骨片の加水分解成分、XAD-2樹脂処理したアミノ酸集合体成分のアミノ酸組成分析 (単位: $\mu\text{mol} / \text{mg}$)

	Nacalai Collagen		Sigma Collagen		<i>Cervus nippon</i>		<i>Sus scrofa</i>	
	H	XAD	H	XAD	H	XAD	H	XAD
Ala	0.70	1.29 (+0.59)*	0.55	0.35 (-0.20)	0.71	1.00 (+0.29)	1.09	1.03 (-0.06)
Gly	2.18	3.47 (+1.88)	1.57	1.36 (-0.21)	1.83	2.40 (+0.57)	2.51	2.20 (-0.31)
Val	0.09	0.11 (+0.02)	0.80	0.24 (-0.56)	0.85	0.90 (+0.05)	1.28	1.06 (-0.22)
Thr	0.11	n.d. (-)	0.46	0.26 (-0.20)	0.35	0.21 (-0.14)	0.44	0.12 (-0.32)
Ile	n.d.	n.d.	0.51	n.d. (-)	0.36	0.09 (-0.27)	0.45	0.12 (-0.33)
Leu	0.11	n.d. (-)	0.19	n.d.(-)	0.14	n.d. (-)	0.20	n.d. (-)
Ser	0.27	0.11 (-0.16)	0.53	0.28 (-0.27)	0.26	0.13 (-0.13)	0.33	0.13 (-0.20)
Pro	0.49	0.86 (+0.37)	0.23	0.33 (+0.10)	0.37	0.36 (-0.01)	0.41	0.25 (-0.26)
Asp	1.15	0.20 (0.95)	2.17	2.61 (+0.44)	2.64	2.29 (-0.35)	2.25	1.64 (-0.61)
Met	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glu	0.45	0.37 (-0.08)	0.38	0.45 (+0.07)	0.55	0.43 (-0.12)	0.44	0.39 (-0.05)
Phe	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tyr	n.d.	n.d.	0.24	n.d. (-)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lys	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.88	n.d.(-)	n.d.	n.d.
Total	5.55	6.41 (+0.86)	7.63	5.88 (-1.75)	8.94	7.81 (-1.13)	9.40	6.94 (-2.46)

H : Hydrolysate

XAD : XAD-treated hydrolysate

n.d. : not determined

* Deviation from values of Hydrolysate

【まとめ】

コラーゲン試薬のXAD-2樹脂処理による同位体比の変化は、 $\delta^{13}\text{C}$ 値については約+1.0%、 $\delta^{15}\text{N}$ 値については約-0.1%であったのに対し（南，1999），粟津湖底遺跡から採取されたイノシシ，ニホンジカ，スッポンの骨化石試料に対しては、 $\delta^{13}\text{C}$ 値が約-0.6%、 $\delta^{15}\text{N}$ 値が+0.3%となった。この結果は、XAD-2樹脂処理による同位体分別は $\delta^{13}\text{C}$ 値が+0.3%、 $\delta^{15}\text{N}$ 値が+0.1%とするStafford *et al.* (1988) の報告とは相異なる結果となった。

骨化石試料，コラーゲン試薬いずれも，化学処理が進むにつれC/N比， $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値の値が変化しているが，これはコラーゲンが純化され，よりコラーゲン本来の値に近づいているためと考えられる。これらの値の変化の仕方が骨化石試料とコラーゲン試薬で違うのは，外来有機物の除去のされ方が異なるためだけでなく，化石と現生の骨の違い，動物の種の違いにも起因していると考えられる。つまり，化石のほうが塩酸によってコラーゲンが分解されやすく，コラーゲンを構成しているアミノ酸が変化しやすく，また，動物の種によってアミノ酸組成が異なり，塩酸によって分解を受けやすいアミノ酸構成量が異なるためと考えられる。

コラーゲン試薬および実際の骨化石に対し，コラーゲン加水分解成分ならびにXAD-2樹脂処理されたアミノ酸集合体成分のアミノ酸組成分析を行った結果，XAD-2樹脂処理によってアミノ酸組成に変化が生じている可能性が示された。個々のアミノ酸試薬のXAD-2樹脂処理による同位体比の変化はほとんど見られないことから（南，1999），コラーゲンで生じるXAD-2樹脂処理による同位体分別は，コラーゲンを構成している個々のアミノ酸が，XAD-2樹脂を通る際に分別を起こしているために生じているのではなく，コラーゲンのアミノ酸組成が変化したためであると考えられる。

塩酸による化学処理がコラーゲンの炭素・窒素同位体比に及ぼす影響については，今後，検討していく予定である。

【謝辞】

この研究を進めるにあたり，中村俊夫教授（名古屋大学年代測定資料研究センター）のご指導，ご助言を得た。アミノ酸分析は，平成9年度名古屋大学大気水圏科学研究所共同研究に基づき，大田啓一助教授によって実施していただいた。粟津湖底遺跡から出土した試料は滋賀県教育委員会の伊庭功氏から提供して頂いた。この研究には，文部省科学研究費補助金（特別研究員奨励費，代表者：南雅代，課題番号：10003150）の一部を使用した。記して，感謝の意を示します。

引用文献

- DeNiro, M. J. and Epstein, S. (1980) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **45**, 341-351.
- 南 雅代 (1999) XAD-2吸着樹脂処理によるコラーゲンの炭素・窒素同位体分別について. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告, X, 247-253.
- 南 雅代・中村俊夫 (1997) 骨化石試料に対する信頼度の高い ^{14}C 年代, 炭素同位体比測定を試み. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告, VIII, 235-242.
- 南 雅代・中村俊夫 (1998) 化石骨のアミノ酸抽出とその ^{14}C 年代. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告, IX, 46-54.
- 南 雅代・青木浩・中村俊夫 (1998) 名古屋大学年代測定資料研究センター・MAT-252における窒素安定同位体比測定について. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告, IX, 316-322.
- 南 雅代・池田晃子 (1998) XAD-2樹脂処理による同位体分別について. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告, IX, 308-311.
- 中村俊夫・太田友子・伊庭 功・南 雅代・池田晃子 (1997) 滋賀県粟津湖底遺跡第3貝塚の同一層から出土した木片、哺乳類骨片、セタシジミ貝殻化石の放射性炭素年代の比較. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告, VIII, 237-246.
- Stafford, T. W. JR., Brendel, K. and Duhamel, R. C. (1988) Radiocarbon, ^{13}C and ^{15}N analysis of fossil bone: Removal of humates with XAD-2 resin. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, 2257-2267.
- van der Merwe, N. J. and Vogel, J. C. (1978) ^{13}C content of human collagen as a measure of prehistoric diet in Woodland North America. *Nature*, **276**, 815-816.

Carbon and nitrogen isotope fractionations of collagen by chemical treatments — mainly by XAD-2 treatment —

Masayo MINAMI

Department of Earth and Planetary Sciences, Graduate School of Science,
Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8602 JAPAN

E-mail : minami@eps.nagoya-u.ac.jp

XAD-2 resin is considered a good material to separate quantitatively polar amino acids from less polar fulvic and humic acids, which are predominant sources of error in ^{14}C and stable isotope analysis on collagen of fossil bone. To evaluate if XAD-2 treatment affects carbon and nitrogen isotope values, Minami (1999) measured $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ on several extracted fractions of collagens from modern bovine Achilles heel tendons made of Sigma Chemical and Nacalai Tesque. There were about +1.0‰ difference in $\delta^{13}\text{C}$ and about -0.1‰ in $\delta^{15}\text{N}$ between hydrolyzed collagen and XAD-treated collagen hydrolysates from modern collagen standards. On the other hand, the carbon and nitrogen isotope fractionations were about -0.6‰ and +0.3‰ in $\delta^{15}\text{N}$, respectively, on animal fossil bones collected from the Awazu submarine archeological site in this study. The C/N ratios, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of extracted fractions: decalcified, hydrolyzed and XAD-treated hydrolysate fractions, vary as chemical extraction proceeded. The change of the isotope values, which differ between fossils and modern collagens, might be caused by purification of collagen, decomposition of a part of collagen, and combined changes in amino acid composition in collagen.

The XAD-2 treatment affected amino acid compositions on both fossils and modern collagen standards. Since there was no difference in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values by XAD-2 treatment on amino acid standards (Minami, 1999), the isotope fractionation with XAD-2 resin on the collagens can not be due to the total isotope variation of individual amino acids, but be due to the change of amino acid compositions.

We need to further study the effect of chemical treatment with HCl on carbon and nitrogen isotope ratios of collagens with XAD-2 resin.