

ペプチドを指標とした乳利用の起源の検証可能性
—質量分析計 MALDI/TOF-MS による評価系—

平成 25 年
(2013)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科
修士課程 資源環境農学専攻
滝柳 泰文

Verifiability of origin of milk use based on peptide index
- Assay establishment by mass spectrometer
MALDI/TOF-MS -

2013

TAKIYANAGI Yasufumi
Master's Program in
Agro-environmental Science
Graduate School of
Obihiro University of Agriculture
and Veterinary Medicine

目次

第 1 章 序論.....	1
1-1 研究の背景.....	1
1-2 研究の目的.....	2
1-3 論文の構成.....	3
第 2 章 乳利用の起源や歴史についての研究.....	4
2-1 はじめに.....	4
2-2 乳利用の起源や歴史を解明するための 4 種類の研究.....	5
2-2-1 図章学的資料の分析.....	5
2-2-2 動物考古学的手法.....	6
2-2-3 土器の形態的な分析.....	7
2-2-4 出土した食料遺物の成分分析.....	8
第 3 章 乳成分付着土器片からのペプチドの抽出法の確立.....	9
3-1 はじめに.....	10
3-2 MALDI/TOF-MS について.....	11
3-3 抽出溶媒の選定.....	14
3-4 酸乳付着土器片サンプルの分析.....	22
3-5 NH_4HCO_3 溶媒への変更.....	26
3-6 脱塩及び回収時のアセトニトリル・0.1%TFA 混合液の濃度の調整.....	28
3-7 トリプシンによるタンパク質消化に要する時間の調整.....	30
3-8 凍結乾燥によるサンプル濃縮.....	32
3-9 確立したペプチドの抽出法.....	34
第 4 章 MALDI/TOF-MS による抽出されたペプチドの分析 及び MS/MS 検索による同定.....	37
4-1 はじめに.....	37
4-2 確立された抽出法によって得られたペプチドの分析.....	38
第 5 章 確立した乳ペプチドの抽出法及び同定法による 実際の古代土器片の分析.....	42
5-1 はじめに.....	42
5-2 古代土器片の分析.....	43
第 6 章 総合考察.....	45
要約.....	47
引用文献.....	51
謝辞.....	54

第1章 序論

1-1 研究の背景

搾乳の技術と乳利用の起源は西アジアにある。一般に家畜として利用されるヒツジ、ヤギ、ウシといった草食反芻動物は、年に1~2頭という繁殖率の低い動物である。さらに通年における飼料の確保と供給の必要性などの問題もある。そのため、肉利用などの家畜を殺す必要のある資源を期待した家畜利用においては、草食反芻動物は効率的とはいえ、古代の人々は食料確保に狩猟や採集などに頼らざるを得なかった。しかし、搾乳を開始したことによって人類は肉や皮を得るために家畜を殺すことをせずに、家畜を生きたまま留めておき、その利子である「乳」という食料を得ることを可能にした。このことによって、人類は雄畜によって肉や皮を得ると共に、雌畜によって繁殖と並行して「乳」という栄養性、保存性共に優秀な食料を得る「牧畜」という生業スタイルを確立させた。そして牧畜を開始したことによって、人類は作物の栽培が不利で、食料資源が豊富ではない乾燥地帯や山岳地帯でも生活していくことが可能となった。

さらに、牧畜という生業スタイルをおこなうにあたり、人々は家畜の管理という問題に直面する。その問題において、搾乳は重要な技術となっている。すなわち、家畜から乳を得るために母仔を分離し、別々の群れにして放牧し、仔畜の哺乳を制限することで、人間が得られる乳量を増すことに加えて、管理の容易な仔畜の群れをいわば『人質』として管理することで、母畜の群れを管理することが可能となっている。加えて、雌畜を多く飼養し、妊娠や出産、泌乳を管理することで乳をより多く得るための、雄の選別・淘汰などのような、搾乳に関係する様々な技術も開発、発展していった。これらの特殊な技術は現代もおこなわれており、搾乳のメリットがいかに大きいかが理解できる（平田 2012）。

このように、人類の生活において乳利用、搾乳という行為の発見は極めて重大なものであった。しかし、そのように重大な乳利用の起源ではあるが、その始まりが何時なのかは未だ明確ではない。遺跡の発掘や動物骨の調査などの考古学的手法では歴史を知ることは出来ても起源にまではせまることは出来ない。そのため、現在は質量分析などの分析機器を使用した古代遺物の分析による起源の研究が活発化し始めている。

そのため、乳利用の起源を解明するために、古代遺物の分析に用いられている分析機の中でも、乳の主要成分でありその抽出方法がある程度確立しているタンパク質を指標として、比較的汎用性のある機械であり使用するサンプル量が少量で済む質量分析計である MALDI/TOF-MS を使用して、古代土器片に付着した乳残渣成分の抽出及び同定による乳利用の起源解明の評価系の確立を試みることにした。

1-2 研究の目的

研究の背景にて述べたように、牧畜という生活様式は、乾燥地帯や山岳地帯といった農耕に適していない土地でも人類が生きることが可能としている。そのような牧畜の成立において、乳利用や搾乳は重要な要素となっており、乳利用の起源や歴史を解明するための研究は数多く為されている。そのような研究のうち、近年注目されている手法として、古代食料遺物の成分分析が存在する。この研究は、発掘された古代の食料や食器や保存用具に付着、浸透した食料成分を成分分析しその起源を同定することで、当時の食生活や乳利用の起源や歴史を解き明かそうというものである。成分分析において、よく使用される分析器として質量分析器が存在する。この分析機は使用するサンプル量が少なく、さらにその分析目的に合わせて様々な種類の質量分析器が存在するために後半の試料の分析が可能であり、希少且つ未知な成分の分析をおこなう必要のある考古学的な研究には適している分析機である。

これらの質量分析器によって、古代中国における最古の乳成分の発見や、器壁に小孔が多数存在する土器の使用用途が乳加工時の濾過であることの証明といった様々な成果があげられた。それらの研究の結果、乳利用の歴史は BC7000 年紀にまで遡っている。

しかしながら、質量分析器はその操作や管理において高い技術と経験を有する。特に脂肪酸の測定によって乳脂肪、反芻動物由来の体脂肪、単胃動物由来の体脂肪を区別して、BC7000 年紀に乳利用が為されていたと発表した Evershed が使用した GC/C-IRMS など、極めて高い技術と経験を必要とする。そのため、この GC/C-IRMS による考古学的な研究の数は極めて少なくなっている。従って、より汎用性の高い質量分析機を使用した古代食料遺物の成分分析による乳利用の起源の研究が求められている。

本研究においては、タンパク質やペプチドを主なターゲットとしており、広範なサンプルを分析することが可能で、使用するサンプル量が少量で済むため、サンプルが希少なことが多い考古学の研究に適しているといった特徴を持った質量分析器である MALDI/TOF-MS を使用した成分分析による乳利用の起源の検証可能性を検討することにした。

従って本研究において、乳利用の起源と歴史を解明するための乳ペプチドの評価系を確立するために、1) 乳成分付着土器片サンプルからの乳ペプチドの抽出法の確立、2) MALDI/TOF-MS による解析及び MS/MS 検索による乳ペプチドの同定法の確立、そして、3) 確立した乳ペプチドの抽出法及び同定法による実際の古代土器片の分析、の 3 項目を目的として設定し、分析をおこなった。

1-3 論文の構成

本論文の構成は、第 1 章で背景と目的を述べた後、まず第 2 章でこれまでにこなわれていた乳利用や搾乳の起源や歴史についてどのような研究が為されていたかについて概説する。乳利用や搾乳の起源や歴史についての研究として、どのような手法の研究が為されていたか、またそれらの研究によって得られた結果やその研究の持つ利点、欠点などをまとめる。第 3 章からは、この論文の中心課題となるタンパク質を指標とした質量分析計である MALDI/TOF-MS を使用した、土器片に付着した乳残渣成分の抽出及び同定による乳利用の起源解明の評価系の確立について述べる。評価系の確立のためにおこなった様々な分析の調整やその結果などをまとめ、現時点において確立された乳成分付着土器片からの乳ペプチドの抽出法をまとめる。そして、第 4 章で確立されたペプチドの抽出法を用いて乳成分付着土器片サンプルから抽出したペプチドを MALDI/TOF-MS で分析しマススペクトルを解析し、MS/MS 検索によってデータベースで照合し、ペプチドの同定をおこなう。そして第 5 章において、確立された乳ペプチドの抽出法と同定法を用いて実際の古代土器片の分析をおこない、その結果をまとめる。そして、第 6 章において総合考察をおこなう。本研究によって確立された乳ペプチドの評価系によって得られた結果の考察や問題点、今後の展開や課題をまとめる。

第2章 乳利用の起源や歴史についての研究

2-1 はじめに

第1章で既述したように、搾乳や乳利用といった技術によってもたらされる牧畜という生活様式は、家畜という財産を減らすことなく生きたまま乳という食料を得ることを可能とし、さらにその乳との交換という形で他の食料を得ることも可能にした。加えて、乳は加工することでその保存性を高めることが可能であり、季節を問わずに食料を保存し食べることが可能である。このような牧畜という生活様式を成立させたことで、人類は作物の栽培が不利で食料資源が豊富ではない乾燥地帯や山岳地帯でも生活していくことが可能となった。そして、牧畜をおこなう人々は牧畜民、遊牧民、さらには騎馬遊牧民など様々な様式に発展していき、ついにはモンゴル帝国という大帝國を作り出し人類史に大きな影響を与えている。

このように、人類の発展において牧畜という生活様式は重要な要素であり、その牧畜において搾乳や乳利用は欠かせない要素となっている。そのため、乳利用の起源や歴史を解明するための研究は以前から様々な方法でおこなわれていた。

搾乳、乳利用の起源や歴史を解明するための主な考古学的な研究として、1) 遺跡のレリーフや印章などの図像学的資料の分析、2) 動物考古学的手法、3) 出土した土器の形態的な分析、そして4) 出土した食料遺物の成分分析の4種類の研究方法が存在する。

以下に、それらの研究がどのようになされていたのか、その研究によってどのような成果があったのか、またその研究の欠点はどのようなものが存在するのか、をまとめる。

2-2 乳利用の起源や歴史を解明するための4種類の研究

2-2-1 図章学的資料の分析

図章学的資料とは、印章やレリーフに描かれた図章から乳利用の存在とその在り方を明確していく研究である。

そのような図章学的資料において、乳利用の歴史について触れられる際によく言及される有名な資料として、南メソポタミアのエル・ウバイド遺跡から出土したBC3000年紀のフリーズが存在する（図1）。このフリーズにはウシの搾乳風景や乳を加工して乳製品を製造する場、そして小屋の中から顔を出す仔ウシなどが描かれており、BC3000年紀には家畜の乳が利用され、乳加工がおこなわれていたことが示されている。また、インド最古の宗教文献であるリグ・ヴェーダのような古文書などにも乳加工体系の記載が存在している。

しかし、この研究方法は乳利用の存在を明確に示してくれる反面、資料が非常に限られており古い時代までは遡ることが不可能であるために、乳利用の起源までには迫れないといった問題も存在する（三宅 1999）。



図1. 南メソポタミアのエル・ウバイド遺跡から出土した乳利用の存在を示す図章学的資料。(Gouin 1993; 三宅 1996)

2-2-2 動物考古学的手法

動物考古学的手法によって示される家畜化の指標として、動物遺骨の 1) サイズの小型化、2) 動物組成の急激な変化、3) 野生種の生活圏外からの出土、4) 年齢構成の変化、5) 家畜に特徴的な病変などの確認、の 5 点に要約できる。

1) サイズの小型化は、外部に対して閉じた群れを築いた家畜群は隔離状態の中での何世代にも渡る交配や、多数の個体が密度高く生息することによって生じる栄養状態の悪化などの影響により小型化が起これと考えられている。

2) 動物組成の急激な変化は、それまで利用されていた動物が激減し、少なかったかまたはまったく利用されていなかった動物が短期間に突然高い割合で出現する場合は、ある動物が家畜として新たに他地域から導入されたことによると考えることができる。

3) 野生種の生活圏外からの出土は、本来の生活圏から大きく離れた地域である種の動物が一定量出土する場合は、家畜として人為的にもたらされた場合が考えられる。

4) 年齢構成の変化は、ヒトが動物を家畜として飼養する際は、自らの目的に沿った形で家畜の消費をおこなうので、一般に雌畜は生産のために成獣まで育成し、雄畜は幼獣や若獣の段階で屠殺される場合が多い。従って、性別の判別が可能な状態で、雄畜の割合の幼獣や若獣が多い場合などは、家畜化されていた可能性が高い。

5) 家畜に特徴的な病変などの確認は、野生種では考えられない歯槽膿漏や脚の疾患といった家畜特有の病変が遺骨に見られる場合、家畜化がなされていたと考えられる。

これらの指標はどれかひとつをみたしていれば十分というものではなく、いくつも組み合わせて蓋然性を高めていく必要を有するものである（三宅 1999）。

これらの研究から、動物の家畜化は BC10000 年～BC13000 年紀にオオカミの家畜化から開始され、牧畜を目的としたヒツジやヤギの家畜化は BC7000 年紀に西アジアの肥沃な三日月地帯（Fertile Crescent）にてヤギの家畜化、同時期のアナトリア高原南麓からザクロス西麓の限定的な地域で羊の家畜化が開始されたとされている。そして BC6000 年紀にウシが、BC4000 年紀にウマやスイギュウ、BC2500 年紀にフタコブラクダの家畜化が為されたとされている（平田 2009）

このような手法で動物考古学的な動物の家畜化についての研究はされており、その中の『4)年齢構成の変化』によって乳利用の起源、歴史についての考察が為されている。前述のようにヒトが動物を家畜として飼養する際は、雌畜は生産のために成獣まで育成し、雄畜は幼獣や若獣の段階で屠殺される場合が多い。そのような管理をおこなう理由として、雌畜は子供を産み、さらに搾乳をおこなうために成獣以降も飼育することになるが、雄同士の争いといった問題が存在し、妊娠や出産の管理、優秀な個体の子孫を残す、などの理由によって、一部の個体を残して成獣の雄畜は屠殺し食肉などの用途に利用するためである。このような雄畜のみの屠殺がおこなわれているということは、搾乳や乳利用が為されている可能性が高く、その指標として扱われる。

しかし、この指標は骨に形態的变化が現れた段階を以て家畜化の成立とみなしており、野生動物から家畜への変化の段階を無視している、といった批判も散在する。

2-2-3 土器の形態的な分析

乳加工や乳の保存は、皮袋や木製の器などの長期間の保存がされにくく遺物として残りにくい有機質の道具を利用するが多い(三宅 1996)。そのため、乳利用において使用されたと予想される道具が現在まで保存されていることはあまり多くないと予想される。しかし、少数ながら乳加工に使用されたと考えられる形状の土器も存在している。その形態から機能と用途を予想し、考察することによって乳利用の歴史や起源の研究がおこなわれている。

BC5000年紀のパレスチナにおいては、チャーンという土器が存在していたことが知られている。この土器はバターを製造するための攪拌機であったと予想されている(三宅 1999)。

他にも、BC6000年紀後半の遺跡である南東アナトリアのチャヨニュ(Cayonu)遺跡や東アナトリアのチュリンテペ(Tulintepe)から出土した器壁に小孔が多数穿たれている土器(図2)は、おそらくチーズ作成時において凝固したタンパク質と残りの乳漿を分離させるための濾過機として使用されていたのではないかと予想されている(三宅 1996)。この予想を裏付けるように、イギリスの Evershed が北ヨーロッパで発掘された BC6000年紀の上記と同様に器壁に小孔が多数穿たれている構造の土器の内部残留成分を脂肪酸分析によって分析した結果、乳由来の脂肪酸を同定することができている(Evershed *et al.* 2012)。

しかし、この分析手法は、機能の特定が難しく、その土器が本当に乳製品製造に関係しているのかという疑問が常に存在するという問題がある。前述の Evershed の脂肪酸分析のように、他の分析手法を用いて予想されている機能の特定をおこなう必要が存在してしまう。また、前述したように乳加工はその工程において有機質の道具で事足りる場合が多く、現在まで遺物として残る場合が少なく、その資料が極めて貴重であるという問題も存在する。

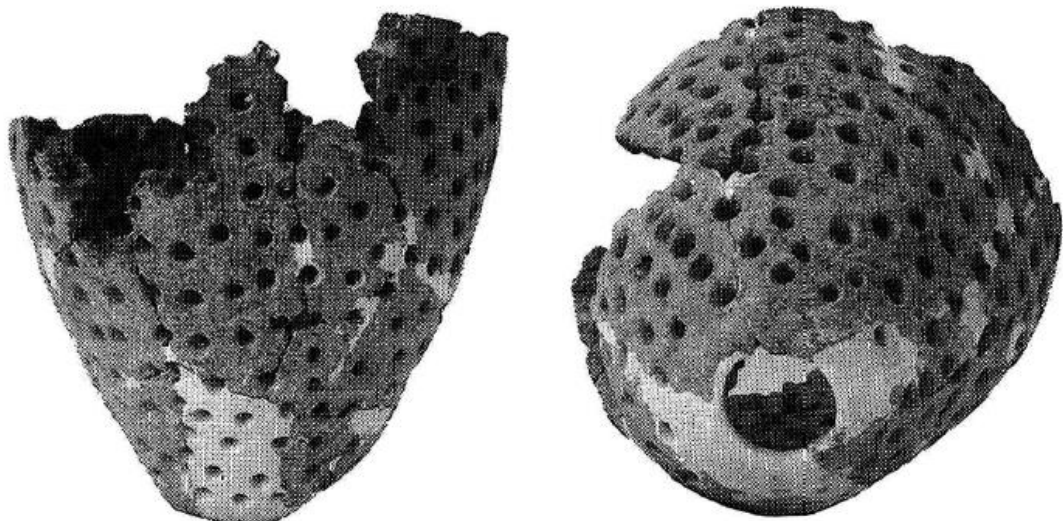


図 2.器壁に小孔が多数穿たれている乳加工に関連する容器。(三宅 1999)

2-2-4 出土した食料遺物の成分分析

先に述べたように、乳の加工や保存は主に革製品や木製の器などの有機質の道具が使用される場合が多い。そのため古代遺物の形態的な分析は、その道具の希少性が高く、さらに加工に使用されたと予想される土器も、本当に乳の加工や保存に関係しているのかという疑問が常に存在してしまう。そのような指摘を改善するため、食器として使用されていた土器片に付着、もしくは浸透した食料残渣や、発掘された食料遺物自体の成分分析をおこなうことで、その食料遺物から乳成分を同定し、乳利用の起源や歴史を研究する手法が開発されてきている。

そのような食料遺物の成分分析として、主に脂肪酸やタンパク質の質量分析が存在する。また、質量分析が考古学的な研究に使用される例として、絵画などの芸術品や歴史的建築物の建築材などの成分分析をおこなう研究が存在する。芸術品や建築材の成分分析をおこなうことで、それらの最適な修復方法や保存方法を研究している (Kuckovaa *et al.* 1999)。使用するサンプル量が少量で分析が可能な質量分析は、芸術品や古代土器片、古代食料残留物のような貴重な試料を使用した分析に極めて適しているといえる。

質量分析による乳利用の歴史や起源の解明の研究のうち、脂肪酸の分析として Dudd・Evershed らが、土器に付着している脂肪酸から GC/C-IRMS を用いて安定同位体比分別値 $\Delta^{13}\text{C}$ (安定同位体比 $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ ・ $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$) を求めれば、乳脂肪酸、反芻動物由来の体脂肪、単胃動物由来の体脂肪に区別できることを報告した (Evershed *et al.* 1998)。そして、Evershed らは、アナトリア、バルカン半島、レバントにかけての土器を対象に同様の手法を用いて $\Delta^{13}\text{C}$ 値を分析・計算した結果、BC7000 年紀には家畜の乳利用がなされていたと発表した (Evershed *et al.* 2008)。しかし、Evershed らのおこなった手法を再現することは簡単ではない。安定同位体分析に必要な GC/C-IRMS は分析状態が安定しにくいいため誤差を含みやすく、さらに正確に扱うために高度な技術と経験が必要となる。そのため、GC/C-IRMS 以外の乳利用の起源を解明するための新手法開発が求められている。

タンパク質を指標とした質量分析として、Hong らが、中国ウイグル自治区域に存在する Subeixi 遺跡から出土した古代食料残渣を LC-MALDI-TOF/TOFMS を使用して分析した結果、カゼインを構成するペプチドを同定した。その結果、BC500-300 年紀には中国大陸において家畜の乳利用がなされていたと発表した (Hong *et al.* 2012)。

このように、質量分析を用いた食料遺物の成分分析による乳利用の起源の研究は近年目に見えて発展しており、多くの実績を残している。しかし、前述の GC/C-IRMS のように、質量分析機はその操作技術や管路に高度な技術や経験が必要なことが多く、汎用性に欠ける点が存在する。

そのような中で、私は乳成分の主要な成分であるタンパク質を分析することが可能で、高い汎用性を持つ質量分析器である MALDI/TOF-MS に注目し、乳利用の起源を解明するための研究をおこなうことにした。

第3章 乳成分付着土器片からの乳ペプチドの抽出法の確立

3-1 はじめに

この研究は、2008年に Evershed らのおこなった古代土器片から脂肪酸を抽出し、その脂肪酸の由来を同定させた研究を参照にしている。第2章で述べたように、Evershed の研究は土器内の食料残渣成分を分析することで乳利用の歴史を BC7000 年紀まで遡り、また器壁に小孔が多数穿たれている構造の土器が乳加工に利用されていたことを解明する等、乳利用の歴史と起源の研究において多大な貢献をもたらしている。しかし、分析に使用された質量分析機の GC-C-IRMS は、その操作や管理において高度な技術を要する等その汎用性が乏しいという欠点が存在する。

そのため本研究では、より操作や管理が容易であり、分析可能なサンプルが多く、汎用性が高い質量分析計である MALDI/TOF-MS を使用した、土器片からの乳残渣物の抽出及び同定の手法を確立させ、その手法を用いて牧畜における家畜の乳利用の起源を解明することをおこなうことにした。

また、土器片から抽出し同定を試みる乳残渣成分として、MALDI/TOF-MS による分析が可能であり、乳成分の主要な成分の一種であるペプチドを指標とした。そのため、まずは乳成分付着土器片サンプルからの乳ペプチドの抽出法の確立を試みることにした。この章では、乳ペプチドの抽出法の確立のためにおこなった調整と、それらの調整の結果から確立された乳ペプチドの抽出法をまとめている。

3-2 MALDI/TOF-MS について

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization）と、飛行時間型質量分析法（Time of Flight Mass Spectrometry）を使用した機械のことである（Silverstein *et al.* 1997）（図 6）。

MALDIとは、多量のマトリックスとサンプルを一体化させた混合結晶に窒素レーザー（波長337nm）を照射し、マトリックスに吸収させることで熱エネルギーに変換させ、マトリックスと共にサンプルをイオン化させる手法である（図3）。他のイオン化法では不得手であるとされてきた、分子量が数十万にも及ぶタンパク質などの生体関連物質についても高精度に解析することが可能である（志田ら 2001）。

TOF-MSとは、様々な大きさの正イオンをサンプルスライド上に発生させ、電位差によって設置グラウンドに引き出し、その際の各イオンの質量電荷比（ m/z 値）の違いによる飛行時間の差（ m/z 値が小さいイオンほど高速で飛行する。）を利用して質量分析を行う手法のことである。検出された m/z 値を横軸に、検出強度を縦軸にしたスペクトルであるマススペクトル（MS）を作成する。測定時間が短く、測定可能な質量範囲に限界がない。また、TOFにはリニアモードとリフレクトロンモードの2種類の測定モードが存在する。

リニアモードは、イオン源から検出器までイオンを直線的に飛行させる測定モードである（図 4）。測定中に分解や中性化したイオンも分析することが可能であるため、高感度測定には向いている。反面、イオンの初期運動エネルギーの影響で同じ質量のイオンでも飛行時間に少量の差が生じてしまい、その差がピークの幅の広がりになるため、リニアモードは高分解測定には不向きである（上野ら 1997）。

リフレクトロンモードは、リフレクトロンと呼ばれる静電場ミラーを用いて、イオンの向きを反転させることでイオンの初期運動エネルギーの差から来る分解能の低下を防ぐ測定モードである（図 5）。大きな初期運動エネルギーをもつイオンほど奥まで進んでから反転するため、同じ m/z のイオンはほぼ同時に検出器に到達し、リニアモードと比べ高分解能が得られる。反面、飛行途中で分解や中性化が起こりやすい高質量数のイオンは、もとのイオンとは異なる軌道を描いて反転するか直進するため、いずれもリフレクトロン検出器に到達する事ができない。そのため、リニアモードと比較して検出感度は低くなる（上野ら 1997）。

検出されたマススペクトルの m/z 値をスタンダードと比較することによってより詳細に数値化した後に、個々のデータを選択し同様の手法でさらに詳細にアミノ酸配列のマススペクトルを作成し、web 上のアミノ酸配列のデータベースと比較し同定をおこなう MS/MS 検索をおこなうことが可能である。

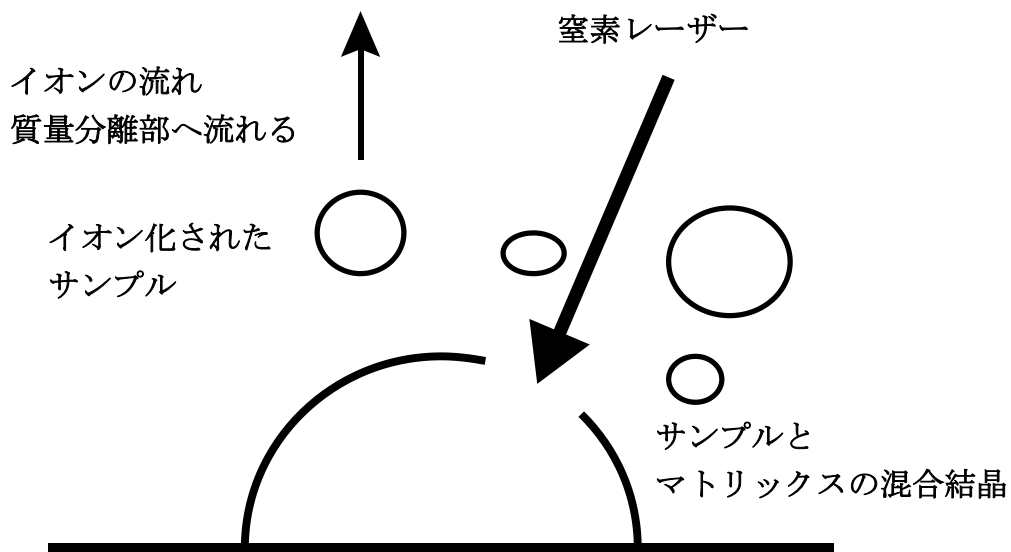


図 3. MALDI の仕組み。

サンプルとマトリックスの混合結晶に
レーザー光を照射する事でイオン化する。

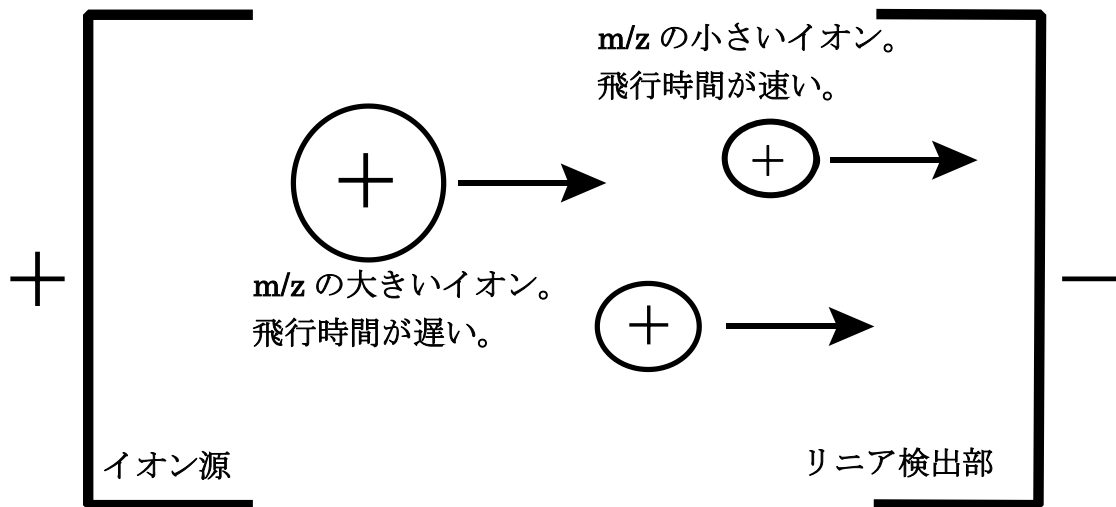


図 4. TOF のリニアモードの仕組み。

真空中でのイオンの飛行時間が質量電荷比 (m/z) によって
異なる事を利用する分離部。
リニアモードでは、イオンはイオン源から検出部まで直線状に飛ぶ。
リフレクトロンモードと比較して、分解能は低い、検出感度は高い。

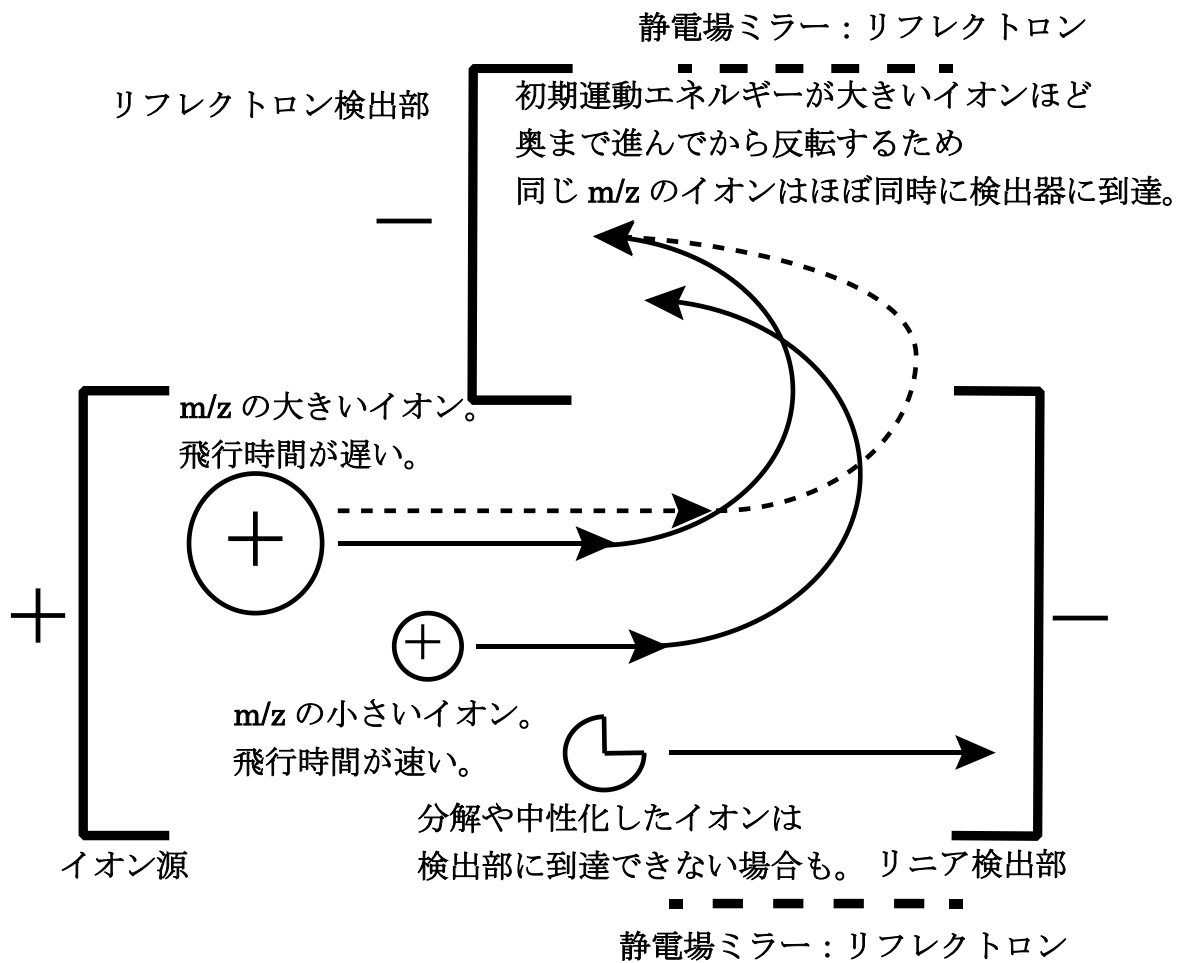


図 5. TOF のリフレクトロンモードの仕組み。

リフレクトロンモードでは、リフレクトロンの影響で、イオンの向きを反転させ、イオンの初期運動エネルギーの差から来る分解能の低下を防ぐ。

リニアモードと比較して、検出感度は低いですが、分解能は高い。

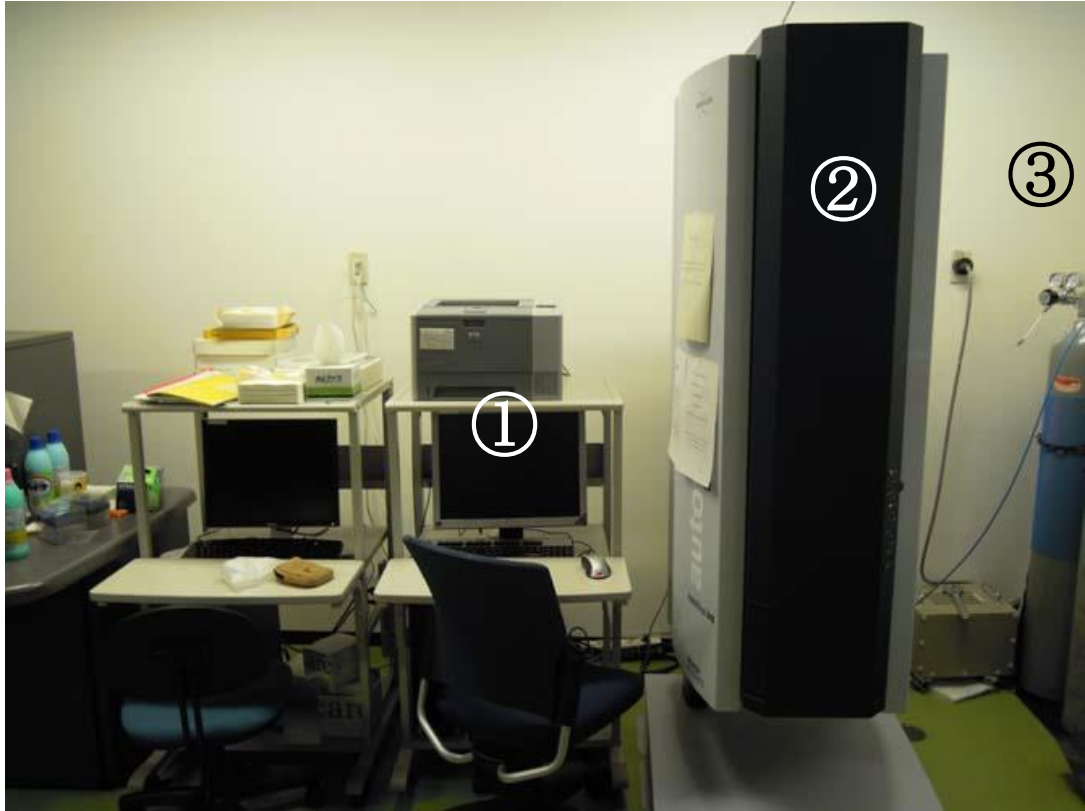


図 6. MALDI/TOF-MS の外観写真。

- ①パソコン : 操作やデータの観察をおこなう。
- ②本体 : サンプルをセットし、実際に観察をおこなう。
- ③N₂ガス : 窒素レーザー等に使用する。

3-3 抽出溶媒の選定

ペプチド抽出において、土器に付着したタンパク質やペプチドをより効率的に抽出できる溶媒を選定するために、有機溶媒(アセトニトリル)、H₂O 溶媒(milli-Q-water)、イオン溶媒(0.1mol/l NaCl)の3種類を比較検討した。有機溶媒は無極性の物質の抽出に効果が期待でき、水溶媒は極性のある物質の抽出に効果的な溶媒である。そして、イオン溶媒は乳成分が電荷によって土器に吸着している場合の抽出に効果的な溶媒である。また、この分析は抽出法の確立のためにおこなうため、市販の土器片に市販の牛乳を使用して乳成分を人工的に付着させた土器片サンプルを作成し、その土器片サンプルからペプチドの抽出をおこなった。

材料

市販の土器片と牛乳を使用して乳成分付着土器片を作成し使用した(図7, 8)。

方法

i) 土器サンプルの作成

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないように必ずゴム手袋を着用し、極力サンプルを触れないようにした。

土器を10cm程度の適当な大きさに分割した。鍋の中に牛乳を入れ、その中に土器片を数個入れ、牛乳が沸騰するまで加熱した(図9, 10)。その後、1時間程度乳中で放置し、牛乳から土器片を回収した。流水で軽く洗浄した後にニッパクホイル上に置き自然乾燥させた(図11)。その際、土器片の上にニッパクホイルを敷き、細菌やゴミの付着を極力減らした。この作業を10回繰り返した。

その後、鑪で土器片の表面を削り、土器片の内部を鑪や乳鉢で粒子状に粉砕し回収した(図12)。表面は乳成分の付着は多いが、乾燥時などにゴミの付着や細菌による浸食などが多いと考えられ、逆に内部は乳成分の付着は起こりにくい。ゴミの付着や細菌の浸食も少ないと予想したため、ゴミや細菌による汚染の影響が少ない内部のみを回収した。粉砕作業の際はマスクを付けニッパクホイルを机上に敷きその上で作業した。

作成したサンプルは容器に密閉し-20℃以下の冷凍庫で冷凍保存した(図13)。

ii) 抽出溶媒の選定

作業中はゴム手袋を常時着用した。有機溶媒(アセトニトリル)、H₂O 溶媒(milli-Q-water)、イオン溶媒(0.1mol/l NaCl)の3種類の溶媒を使用した。4区画の各サンプルを各3種類の溶媒分用意し、約0.1gを質量計で計りチューブに入れた。また、コントロールとして水、イオン、有機溶媒用の3個の空チューブを用意した。

各々のチューブに溶媒500mlを加えた。超音波振動で15分間攪拌し、さらにオーバーナイトでミキサーで攪拌した。その後、遠心分離機を使用し15600Gで5分間遠心分離させ、上層の溶媒層を別チューブに移し、水、イオン溶媒サンプルを-30℃以下の冷凍庫で冷凍した。有機溶媒は凍結しないので、スピードバックで約1時間、量が1/3以下になるまで遠心濃縮させた。凍結及び遠心濃縮させたサンプルのチューブ

の蓋を開け、パラフィルムで密閉し、注射針でパラフィルムに穴を開けた後に凍結乾燥機にかけ、サンプルを濃縮させた。その後、水溶媒：milli-Q-water 50 μ l、イオン溶媒：milli-Q-water 100 μ l、有機溶媒：0.1%TFA 50mlを加えた後にボルテックスし、完全に溶解させた。

また、イオン溶媒は脱塩が十分でないと MALDI/TOF-MS で分析する際にデータに乱れが生じるため、ZipTip を使用して脱塩及びペプチドの回収をおこなった。ZipTip をおこなう際は必ず手袋をはめ、70%エタノールで手袋と机を殺菌した。そして以下の4種類の溶液をそれぞれ1ml用意した。

**表 1. ZipTip による脱塩及びペプチド回収
に使用するための溶液の成分**

溶液	成分
Wetting	100%ACN
Equilibration	0.1%TFA
Wash	0.1%TFA
Elution	0.1%TFA : ACN=1 : 1

廃棄用チューブと別のサンプル回収用チューブを用意した。ZipTip をピペットにはめ、Wetting 溶液を 2 μ l 吸引し廃棄用チューブに廃棄した。吸引する時は泡が生じないようにゆっくりと吸引した。Equilibration 溶液を 2 μ l 吸引し廃棄用チューブに廃棄した。サンプルを 2 μ l 吸引し廃棄用チューブに廃棄した。吸引の際 20~30 回ピペッティングし ZipTip にタンパク質とペプチドを吸着させる。Wash 溶液を 2 μ l 吸引し廃棄用チューブに廃棄する。この洗浄作業を 5 回繰り返した。Elution 溶液を 2 μ l 吸引し、回収用チューブに回収した。回収の際 20~30 回ピペッティングし ZipTip に吸着しているタンパク質とペプチドを完全に解離させる。使用した ZipTip は空チューブに入れ保存しておく。サンプルは冷凍庫に保存した。

iii) MALDI/TOF-MS による分析

MS ターゲットプレートを、ヒトのタンパク質やゴミなど異物の付着などの汚染によって生じるデータの乱れが発生しないように完全に洗浄した。MS ターゲットプレート上にアセトニトリルを流し、専用の金属の容器に MS ターゲットプレートを入れ、50%メタノールで浸し超音波振動で 5 分間洗浄した。メタノールを捨て、再びメタノールを容器に加えた後に超音波振動で 5 分間洗浄した。メタノールを捨て、容器から MS ターゲットプレートを取り出し milli-Q-water で洗浄した。その後、窒素ガスを吹き付けて乾燥させた。

マトリックスである α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) を 10mg 計測し、アセトニトリル : 0.1%TFA=1:2 の混合溶液 1ml 中に加え、ボルテックスによって混合させた。そして、CHCA とサンプルを 1 μ l ずつで混合させ、1 μ l 回収し MS ターゲットプレート上に滴下し自然乾燥させた。ピペットの先端をプレート上に付着させないように注意し、更に気泡が生じないように注意する。

そして、MALDI/TOF-MS でサンプルの計測をおこなった。

結果

有機溶媒による抽出では、ペプチドのピークは検出されなかった。milli-Q-water を溶媒とした抽出ではペプチドのピークが検出されたが、そのピーク数は少数であった。そして、イオン溶媒による抽出では、ペプチドのピークを多数検出することができた (図 14)。

以上の結果から、土器片からペプチドを抽出する際の抽出溶媒は、イオン溶媒 (0.1mol/l NaCl) を使用すると決定した。

また、得られた抽出サンプルを 1 ヶ月間冷凍保存し分析した結果、多少強度は低下したもののペプチドのピークを検出することができた。

しかし、この分析で得られたペプチドのピークは強度が不十分であり、得られたペプチドのピークのアミノ酸配列を解読し、そのアミノ酸配列と同様のアミノ酸配列を持つペプチドをデータベースで検索することでそのペプチドの由来を同定する MS/MS 検索を使用したペプチドの同定はおこなう事はできなかった。そのため、より強度の強いピークを得られる抽出方法を探る必要が生じた。



図 7. サンプル作成に使用した市販の植木鉢。



図 8. サンプル作成に使用した市販の牛乳。



図 9. 鍋の中に牛乳と土器片を入れ、加熱沸騰させる。



図 10. 沸騰後、1 時間程度乳中で放置する。



図 11. 鍋から土器片をだし、自然乾燥させる。これらの作業を 10 回繰り返す。



図 12. 土器片を鑊などで粉末状に粉砕する。



図 13. 粉碎サンプルの保存状態。

容器に入れ、さらにジップロックで密閉して冷凍保存する。

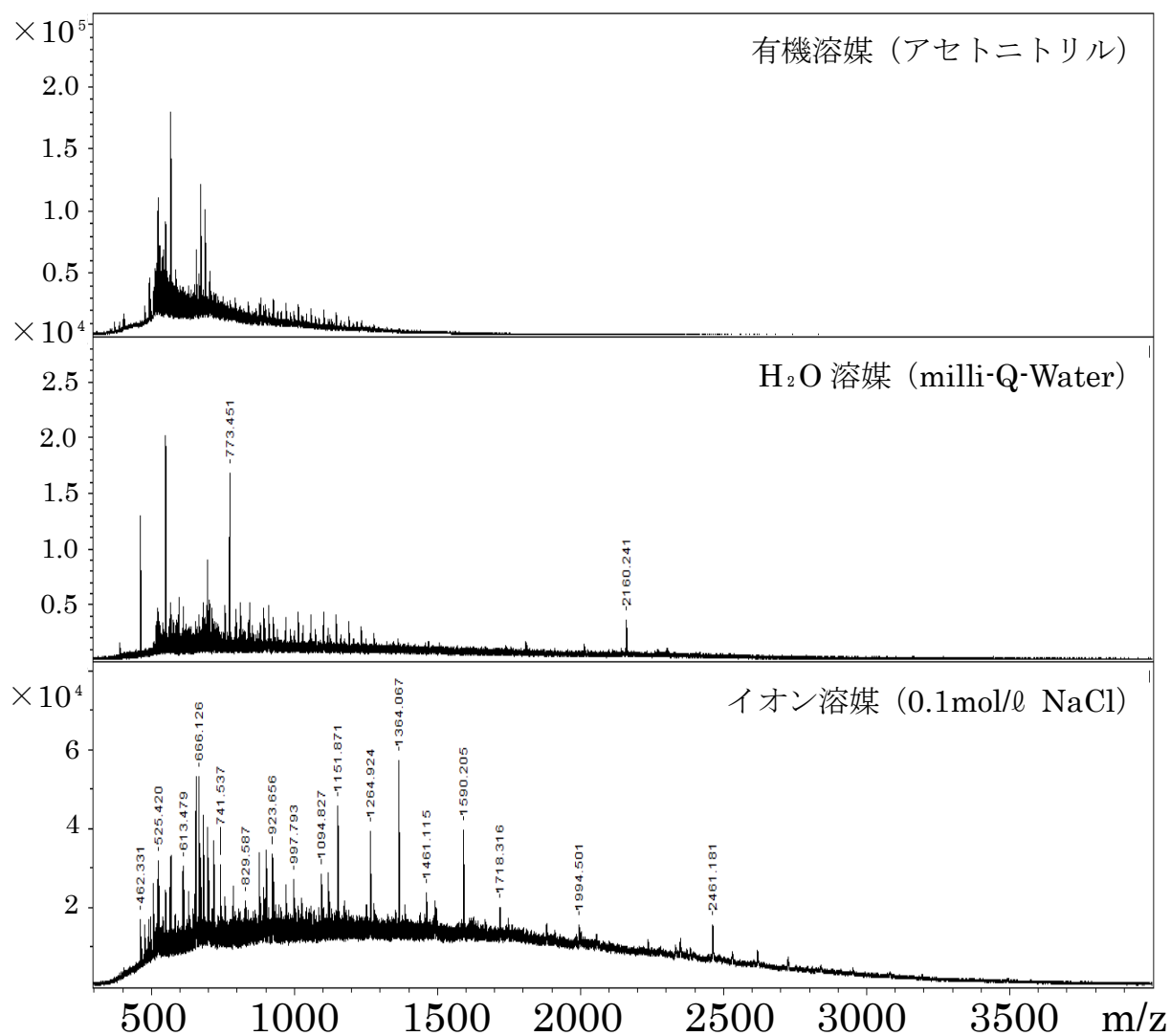


図 14. 有機溶媒 (アセトニトリル)、H₂O 溶媒 (milli-Q-water)、イオン溶媒 (0.1mol/l NaCl) によって抽出されたサンプルから MALDI/TOF-MS を使用してリニアモードで分析して得たマススペクトルの比較。

3-4 酸乳付着土器片サンプルの分析

イオン溶媒を使用した分析において、ペプチドの抽出は成功したが、その同定はおこなうことは出来なかった。そのため、生乳よりも乳タンパク質のペプチド化の進んでいる酸乳を使用して、乳成分の土器片への付着作業をおこない、抽出サンプル中のペプチドの濃度を増やして分析をおこなうことにした。

材料

市販の土器片に、市販の酸乳を使用して乳成分付着土器片を作成し使用した。

方法

i) 土器サンプルの作成

酸乳は市販の明治ブルガリアヨーグルトを使用した。

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないようにゴム手袋を着用し、サンプルを素手で触れないようにした。土器片は 5~10cm 程度の適当な大きさのものを使用した。

サンプルとして、酸乳の中に入れ 10 日間放置したのみのサンプルである『生』と、鍋の中で酸乳と共に加熱させた『加熱』の 2 区画を設定した。

『生』区画は、洗浄と煮沸殺菌をしたガラス製のコップの中に酸乳を入れ、酸乳中に土器片を埋没させた。コップにニツパクホイルで蓋をし、常温中で 10 日間放置した。その後、酸乳中から取出した土器片を水洗し、1 時間 30 分間自然乾燥させた。乾燥はニツパクホイル上に置き、その上にニツパクホイルを敷いて細菌やゴミの付着を極力減らした。

『加熱』区画は、鍋の中に酸乳と土器片を投入し加熱した。沸騰した酸乳は凝固してホエイと固形分に分解されるので、分解される前に加熱を停止した。蓋をして 1 時間 30 分間放置した。軽く水洗した後に 1 時間放置し自然乾燥させた。これらの作業を 10 回反復した。また、作業が終わる度に酸乳を別容器に移し、鍋を洗浄した。作業中に数回ヨーグルトを適量増量させた。

その後、土器片を鑿や彫刻刀、乳鉢等で粒子状に粉砕した。粉砕作業の際はマスクを付けニツパクホイルを机上に敷きその上で作業した。ゴミや細菌による汚染の影響が少ない内部のみを回収した。粉砕作業の際はマスクを付けニツパクホイルを机上に敷きその上で作業した。

ii) 抽出作業

抽出溶媒はイオン溶媒 (0.1mol/l NaCl) を使用した。作業中は常時ゴム手袋を着用した。

粉砕した土器片サンプルを約 0.1g 測りチューブに入れた。さらにコントロール分の空チューブを用意した。各々のチューブに抽出溶媒を 500 μ l ずつ加えた。超音波で 15 分間攪拌し、更に 1 晩以上ミキサーで攪拌した。遠心分離機を使用し 15600G で 5 分間遠心分離し、上層の抽出溶媒層を別チューブに移し -30 $^{\circ}$ C 以下の冷凍庫で凍結させた。凍結させたサンプルチューブの蓋を開け、パラフィルムで蓋をして注射針で穴

を開け凍結乾燥機にかけ抽出サンプルを濃縮させた。サンプルに milli-Q-water を 100 μ l 加えボルテックスし完全に融解させた。

ZipTip を 2 回使用して脱塩及びペプチドの回収をおこなった。サンプルは冷凍庫に保存した。

iii) MALDI/TOF-MS による分析

前述と同じ工程で MS ターゲットプレートの洗浄とサンプルの調整などの準備をおこない、MALDI/TOF-MS でサンプルの計測をおこなった。

結果

双方のサンプルでペプチドのピークが検出された (図 15)。これらのデータは MS/MS 検索に使用するには十分な濃度であり、『生』区画からもデータが検出されたことから、酸乳を数日間保存した容器内にはタンパク質が付着しており、MALDI/TOF-MS によって検出が可能であると判明した。

そして、すべてのサンプルで高い濃度で存在した m/z 値 1151 のデータを MS/MS 検索で同定した結果、 β -カゼインを構成しているペプチド Casoparan であることが判明した (図 16、17)。このことから、酸乳によって乳成分を付着させた土器片からペプチドを抽出し、MALDI/TOF-MS によってピークを検出させ、MS/MS 検索によって同定させることが可能であることが判明した。その結果、m/z 値 1151 のデータが検出された場合、その反応が乳タンパク質である β -カゼインの一部である可能性が高いことも判明した。

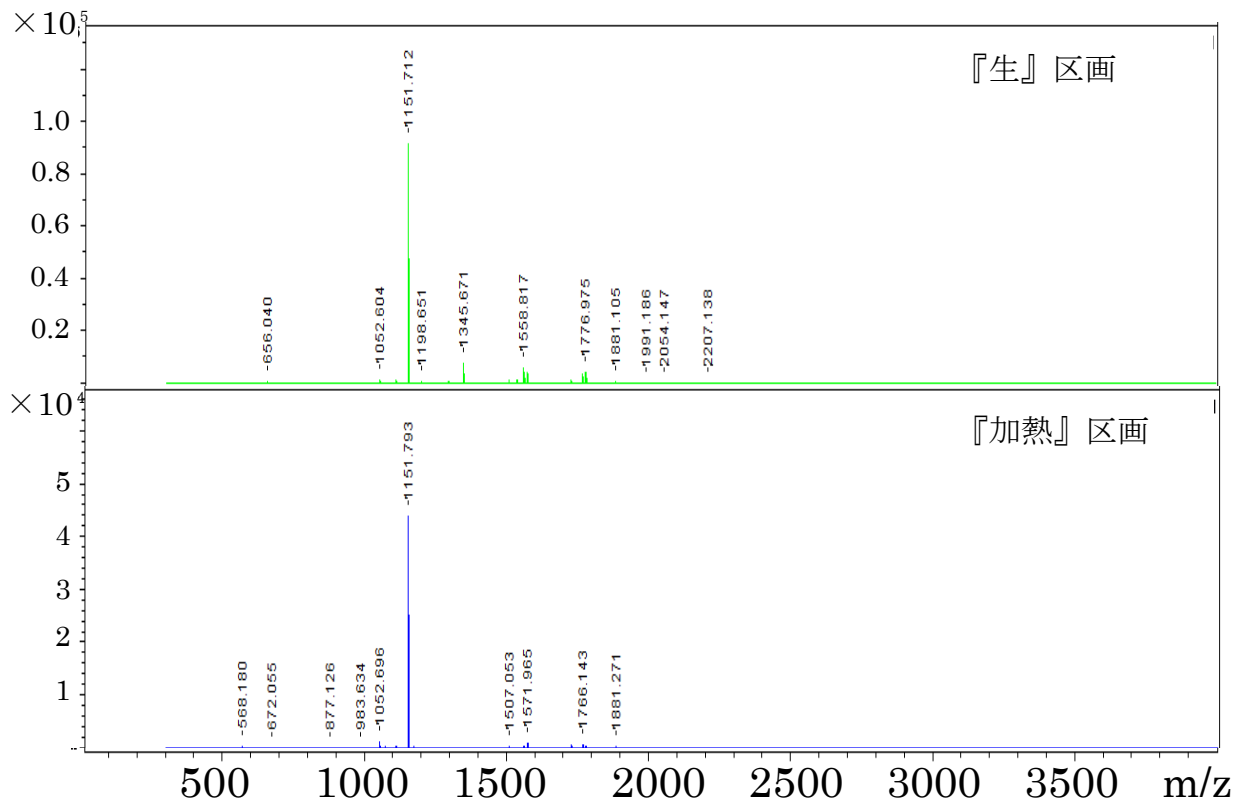


図 15. 酸乳を使用した乳成分付着作業において作成した『生』、『加熱』区画のサンプルから MALDI/TOF-MS を使用してリフレクトロンモードで分析して得たマススペクトルの比較。

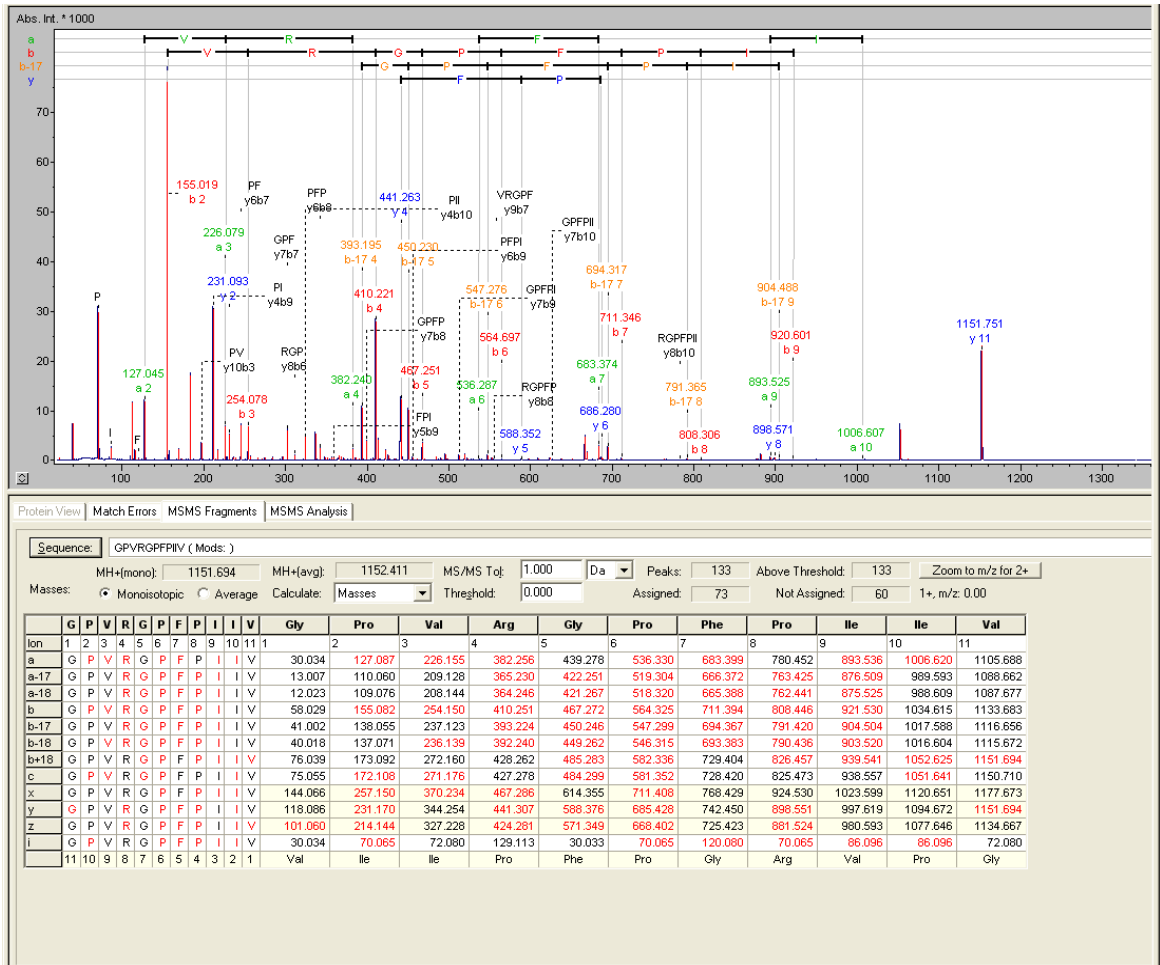


図 16. MS/MS 検索によって得られた m/z1151 のペプチドの amino 酸配列。

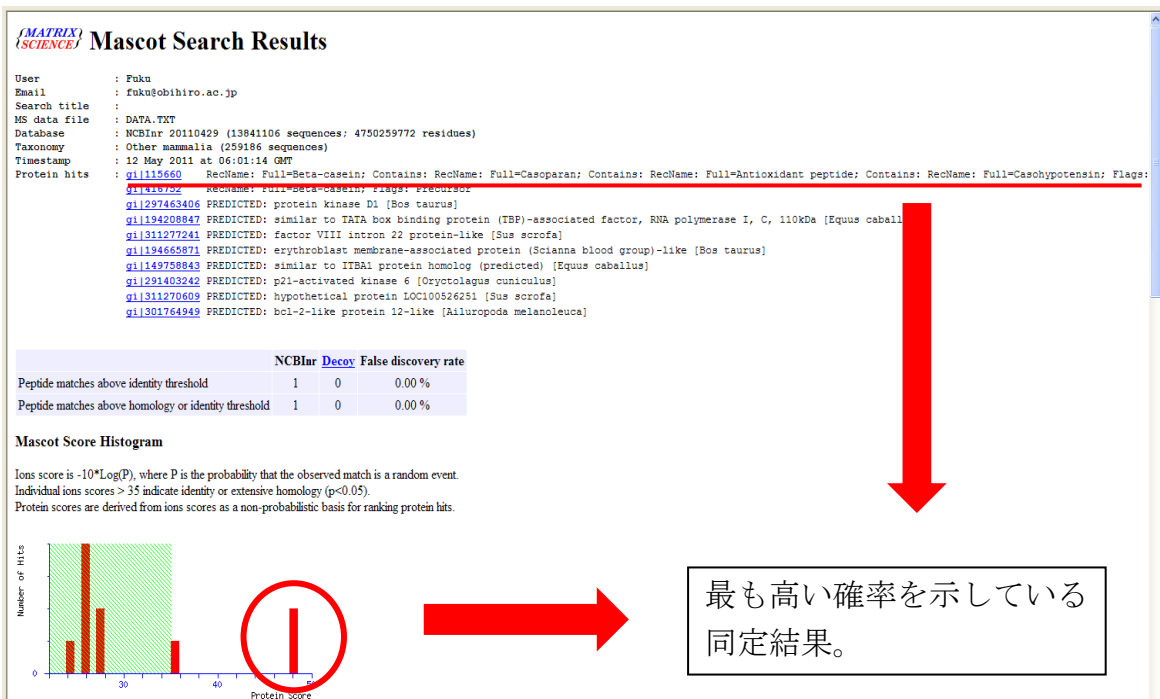


図 17. MS/MS 検索によるデータベース上での m/z1151 のペプチドの同定結果。

3-5 NH₄HCO₃溶媒への変更

前述のように、酸乳を付着させた土器片サンプルでは乳ペプチドの同定をおこなうことはできた。しかし、生乳を付着させた土器片サンプルでは乳ペプチドの同定をおこなうことはできず、さらに検出されたペプチドのピークも強度が低いものが多かった。

そのため、溶媒として使用していた NaCl とは別に、古代の絵画や書物の絵具や墨からペプチドを抽出する際に使用される溶媒である NH₄HCO₃を溶媒として使用して乳成分付着土器片からのタンパク質の抽出を試みた。

また、タンパク質分解酵素であるトリプシンを使用してタンパク質のペプチド化をおこない、抽出サンプル中のペプチド濃度を増加させ、さらにトリプシンを使用したことによる規則的なタンパク質分解から生じる MS/MS 検索のペプチドの同定における作業の効率化をおこなった。

材料

市販の土器片に、市販の牛乳を使用して乳成分付着土器片を作成し使用した。

方法

i) 土器サンプルの作成

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないように必ずゴム手袋を着用し、極力サンプルを触れないようにした。

乳成分付着作業は、溶媒選定時と同様の工程でおこなった。

ii) 抽出作業

1mol/l NH₄HCO₃ 100 μ l と milli-Q-water 1000 μ l を乳鉢に入れ、粉碎土器片サンプルを適量投入した。その後、乳棒で磨り潰し、1時間放置した。1時間後、再び乳棒で軽く磨り潰してから、ピペットを使用してチューブに土器片サンプルごと移した。チューブを 60°C の温水中に入れて、3時間攪拌し、タンパク質を変性させた。テルモシリンジを使用してサンプルをろ過し土器片を分離した。その後、サンプル 100 μ l にトリプシン 5 μ l を加え、18時間以上 37°C で放置した。

サンプルに 0.1%TFA を加え、pH 試験紙で測定しながら pH4 以下に調整した。その後、ZipTip による回収をおこなった

iii) MALDI/TOF-MS による分析

前述と同じ工程で MS ターゲットプレートの洗浄とサンプルの調整などの準備をおこない、MALDI/TOF-MS でサンプルの計測をおこなった。

結果

分析の結果、NH₄HCO₃溶媒を使用した分析において、酸乳ではなく牛乳を使用して作成した乳成分付着サンプルで、リフレクトロンモードの分析でペプチドのピークを得ることができた (図 18)。また、m/z1267 などのカゼインペプチドの m/z と同一

の m/z を示すピークの検出もおこなえた。

しかし、MS/MS 検索によってペプチドの同定をおこなうことは出来なかった。そのため、ピークの強度や数を増やすために、一連のペプチド抽出の工程において、様々な調整をおこなう事にした。

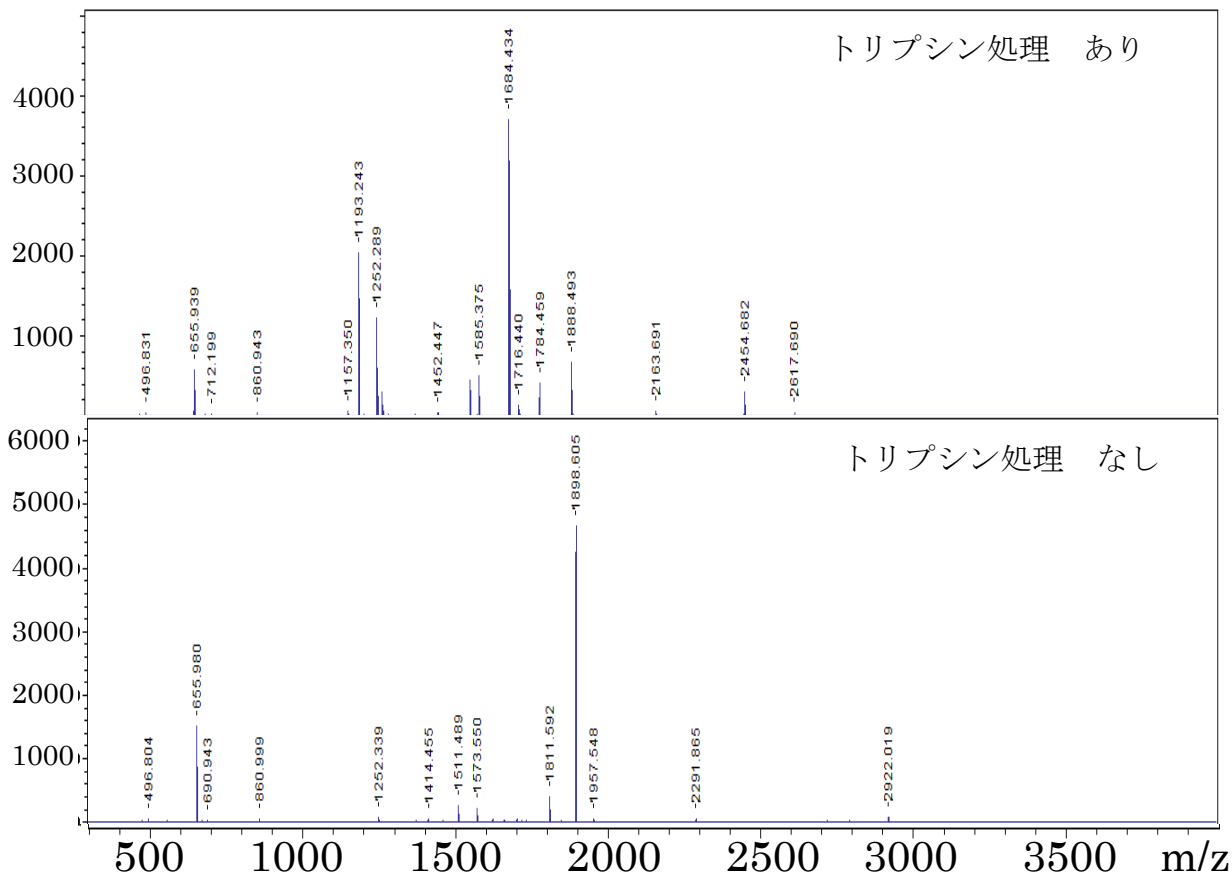


図 18. 0.1mol/l NH_4HCO_3 によって抽出し
トリプシン処理が『あり』と『なし』のサンプルから
MALDI/TOF-MS を使用してリフレクトロンモードで分析して得た
マススペクトルの比較。

3-6 脱塩及び回収時のアセトニトリル・0.1%TFA 混合液の濃度の調整

前述のように、 NH_4HCO_3 溶媒によるペプチドを抽出したサンプルの分析では、ペプチドのピークを得ることは出来ても MS/MS 検索による同定はおこなえなかった。そのため、分析によって得られるマススペクトル内のペプチドのピークの強度と数を増加させるために、一連のペプチド抽出の諸作業を調整させることにした。

この分析では、ZipTip によるサンプル内からの脱塩及びペプチドの回収時に使用する際の溶液内のアセトニトリルの濃度を調整し比較することで、よりペプチドの回収率が高いアセトニトリルの濃度を検討する。

材料

市販の土器片に、市販の牛乳を使用して乳成分付着土器片を作成し使用した。

方法

i) 土器サンプルの作成

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないように必ずゴム手袋を着用し、極力サンプルを触れないようにした。

乳成分付着作業は、溶媒選定時と同様の工程でおこなった。

ii) 抽出作業

抽出溶媒はイオン溶媒 ($0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$) を使用した。作業中は常時ゴム手袋を着用した。

粉砕した土器片サンプルを約 0.1g 測りチューブに入れた。さらにコントロール分の空チューブを用意した。各々のチューブに抽出溶媒を 100 μl と milli-Q-water 900 μl を加えた。超音波で 15 分間攪拌し、更に 1 晩以上ミキサーで攪拌した。チューブを 60 $^\circ\text{C}$ の湯中に入れて、3 時間攪拌し、タンパク質を変性させた。遠心分離機を使用し 15600G で 5 分間遠心分離し、上層の抽出溶媒層を回収した。その後、サンプル 100 μl にトリプシン 5 μl を加え、18 時間以上 37 $^\circ\text{C}$ で放置した。

サンプルに 0.1%TFA を加え、pH 試験紙で測定しながら pH4 以下に調整した。その後、ZipTip による回収をおこなった。ZipTip による回収の際に、Elution 溶液のアセトニトリルの比率を 5%、50%、70% の 3 種類作成し、回収をおこなった。

iii) MALDI/TOF-MS による分析

前述と同じ工程で MS ターゲットプレートの洗浄とサンプルの調整などの準備をおこない、MALDI/TOF-MS でサンプルの計測をおこなった。

結果

サンプルを分析した結果、アセトニトリル 5% サンプルではペプチドのピークは検出されなかった。アセトニトリル 50% 及び 70% サンプルにおいては、両サンプルにおいてペプチドのピークが多数検出された。その結果、両サンプルの検出されたペプチドピークの強度にはあまり変化は生じなかったものの、アセトニトリル 50% サン

プルにおいては検出されなかったピークが、アセトニトリル 70%サンプルにおいては数個検出された (図 19)。この結果から、以後は ZipTip による脱塩処理の際に回収時に使用するアセトニトリル・0.1%TFA 混合液におけるアセトニトリルの比率は 70%にすることにした。

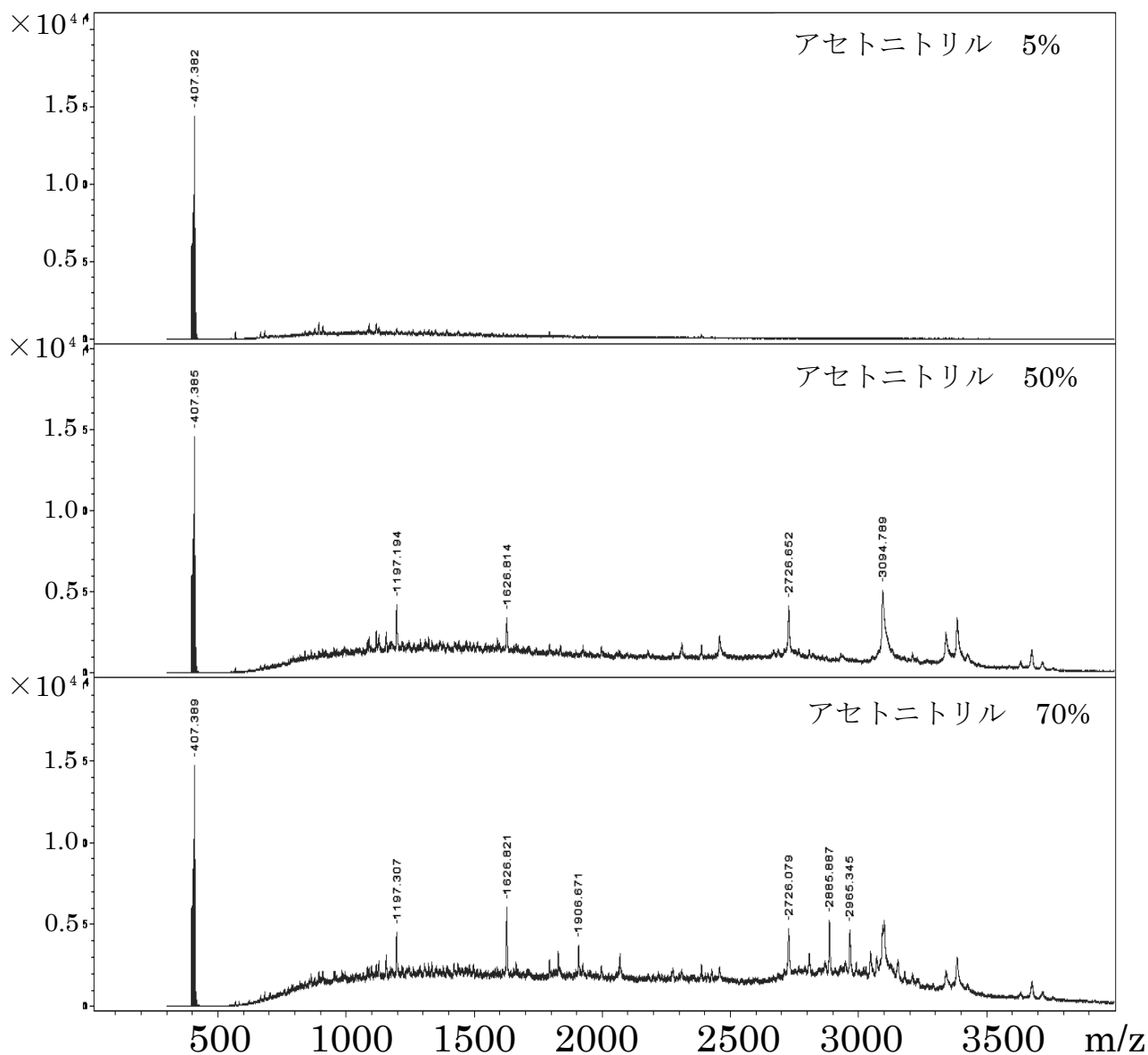


図 19. ZipTip による脱塩及びペプチドの回収時に使用するアセトニトリル・0.1%TFA 混合液のアセトニトリル濃度を 5%、50%、70%にして抽出したサンプルから MALDI/TOF-MS を使用してリニアモードで分析して得たマススペクトルの比較。

3-7 トリプシンによるタンパク質消化に要する時間の調整

前述のように、分析によって得られるマススペクトル内のペプチドのピークの強度と数を増加させるために、一連のペプチド抽出の諸作業を調整させることにした。

この分析では、タンパク質をペプチドに分解するために使用するタンパク質消化酵素であるトリプシンの処理時間を比較し、最適な処理時間を検討した。比較時間として、トリプシン消化の処理時間として一般的な 18 時間と S. Kuckovaa の記した古代モルタル粘土内の乳成分を分解するための最適な処理時間である 2 時間の 2 区画のサンプルを作成し比較検討した (Kuckovaa *et al.* 2009)。

材料

市販の土器片に、市販の牛乳を使用して乳成分付着土器片を作成し使用した。

方法

i) 土器サンプルの作成

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないように必ずゴム手袋を着用し、極力サンプルを触れないようにした。

乳成分付着作業は、溶媒選定時と同様の工程でおこなった。

ii) 抽出作業

抽出溶媒はイオン溶媒 ($0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$) を使用した。作業中は常時ゴム手袋を着用した。

粉碎した土器片サンプルを約 0.1g 測りチューブに入れた。さらにコントロール分の空チューブを用意した。各々のチューブに抽出溶媒を 100 μl と milli-Q-water 900 μl を加えた。超音波で 15 分間攪拌し、更に 1 晩以上ミキサーで攪拌した。チューブを 60 $^\circ\text{C}$ の湯中に入れて、3 時間攪拌し、タンパク質を変性させた。遠心分離機を使用し 15600G で 5 分間遠心分離し、上層の抽出溶媒層を回収した。

その後、サンプル 100 μl にトリプシン 5 μl を加え、18 時間と 2 時間の 2 区画を作成し、37 $^\circ\text{C}$ で放置した。

サンプルに 0.1%TFA を加え、pH 試験紙で測定しながら pH4 以下に調整した。その後、ZipTip による回収をおこなった。ZipTip による回収の際に、Elution 溶液のアセトニトリルの比率を 70% に調整し回収をおこなった。

iii) MALDI/TOF-MS による分析

前述と同じ工程で MS ターゲットプレートの洗浄とサンプルの調整などの準備をおこない、MALDI/TOF-MS でサンプルの計測をおこなった。

結果

分析の結果、18 時間、2 時間の 2 区画の双方でペプチドのピークを得ることができた (図 20)。その結果、2 時間区画で得られたピークは 18 時間区画のピークと比較して、ピーク数、強度共に減少した。よって、今後はトリプシンの処理時間は 18 時間

とすることにした。

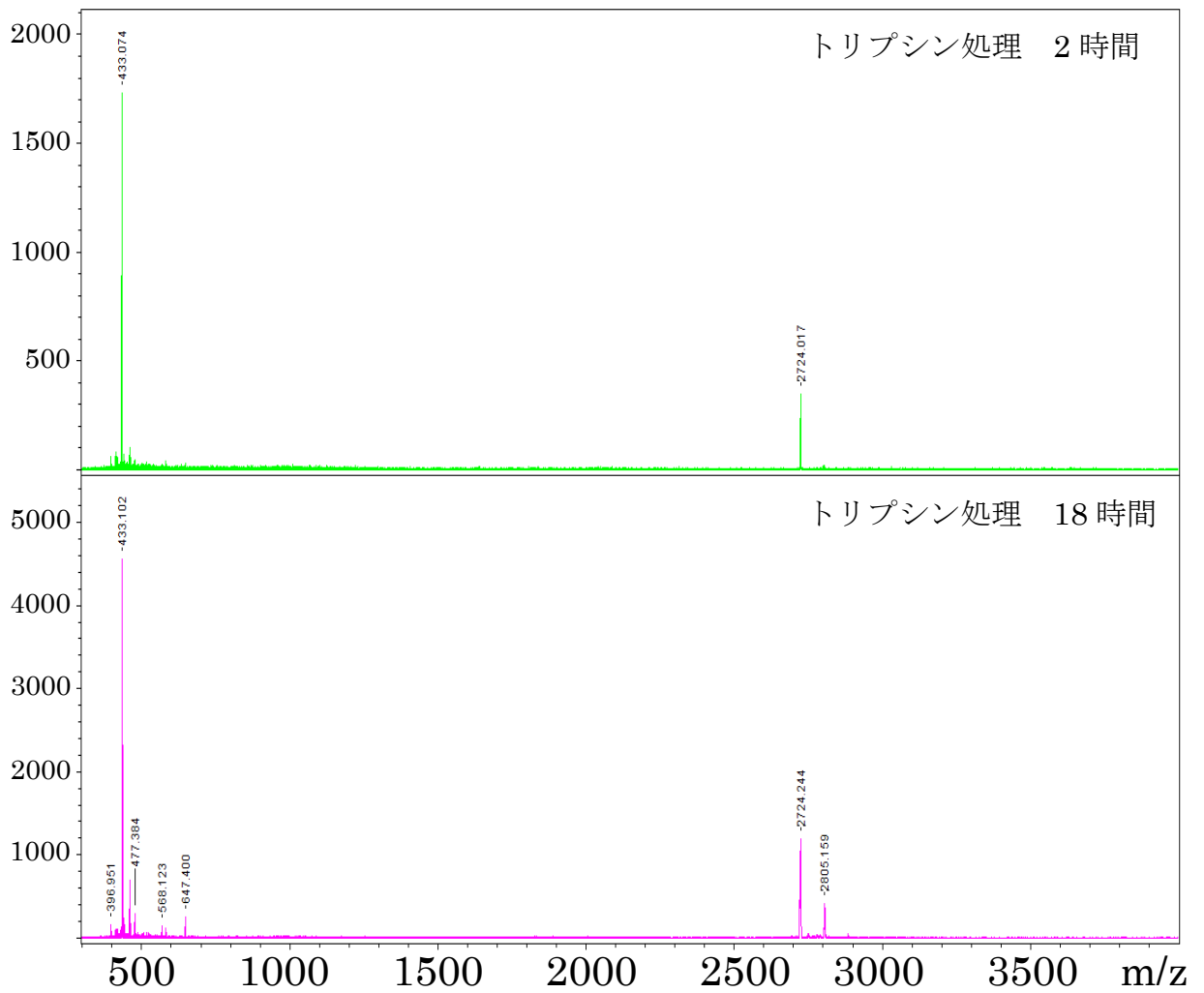


図 20. トリプシン消化処理の時間を 2 時間と 18 時間にした際のサンプルから MALDI/TOF-MS を使用してリフレクトロンモードで分析して得たマススペクトルの比較。

3-8 凍結乾燥によるサンプル濃縮

MS/MS 検索によるサンプルから検出されたペプチドの同定をおこなうにあたり、サンプル濃度が低いために十分な分析がおこなえない場合が存在した。そのため、凍結乾燥によるサンプル濃縮をおこない、サンプル内のペプチド濃度を上げて分析をおこなうことにした。

材料

市販の土器片に、市販の牛乳を使用して乳成分付着土器片を作成し使用した。

方法

i) 土器サンプルの作成

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないように必ずゴム手袋を着用し、極力サンプルを触れないようにした。

乳成分付着作業は、溶媒選定時と同様の工程でおこなった。

ii) 抽出作業

抽出溶媒はイオン溶媒 ($0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$) を使用した。作業中は常時ゴム手袋を着用した。

粉砕した土器片サンプルを約 0.1g 測りチューブに入れた。さらにコントロール分の空チューブを用意した。各々のチューブに抽出溶媒を $100\mu\text{l}$ と milli-Q-water $900\mu\text{l}$ を加えた。超音波で 15 分間攪拌し、更に 1 晩以上ミキサーで攪拌した。チューブを 60°C の湯中に入れて、3 時間攪拌し、タンパク質を変性させた。遠心分離機を使用し 15600G で 5 分間遠心分離し、上層の抽出溶媒層を回収した。

比較用に $100\mu\text{l}$ のサンプルを回収し、残りのサンプルを凍結乾燥にかけて濃縮した。凍結乾燥をおこなったサンプルに $0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$ を $100\mu\text{l}$ 加え溶解させた。その後、各サンプル $100\mu\text{l}$ にトリプシン $5\mu\text{l}$ を加え、18 時間以上 37°C で放置しタンパク質を分解した。

サンプルに 0.1% TFA を加え、pH 試験紙で測定しながら pH4 以下に調整した。その後、ZipTip による回収をおこなった。ZipTip による回収の際に、Elution 溶液のアセトニトリルの比率は 70% に調整し、回収をおこなった。

iii) MALDI/TOF-MS による分析

前述と同じ工程で MS ターゲットプレートの洗浄とサンプルの調整などの準備をおこない、MALDI/TOF-MS でサンプルの計測をおこなった。

結果

すべてのサンプルでピークを検出することができた。また、乳成分付着土器片サンプルと牛乳混入土器片サンプルにおいて、凍結乾燥処理サンプルと凍結乾燥未処理サンプルでは、凍結乾燥処理サンプルにおいて、すべてのピークの強度が増加していた (図 21)。そのため、凍結乾燥による濃縮は MALDI/TOF-MS による分析において効

果があるとわかった。

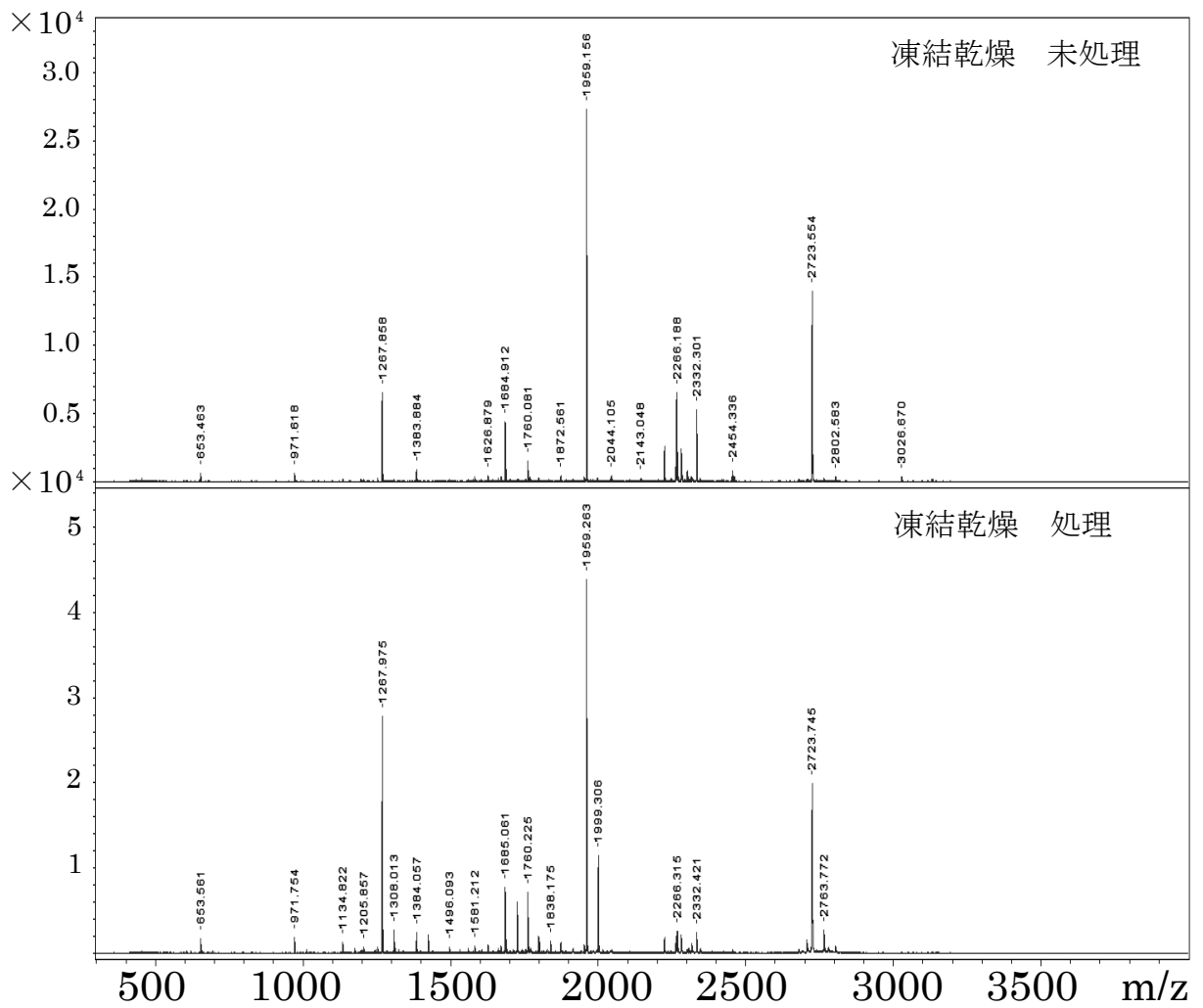


図 21. 凍結乾燥による濃縮処理をおこなったサンプルと凍結乾燥による濃縮処理をおこなっていないサンプルからMALDI/TOF-MSを使用してリフレクトロンモードで分析して得たマスペクトルの比較。

3-9 確立したペプチドの抽出法

以上の結果から、乳成分付着土器片からペプチドを抽出する方法として、以下の工程を確立した。

この抽出方法によって乳成分付着土器片サンプルからペプチドを抽出することで、土器片サンプルの乳成分が付着していれば、ペプチドを抽出して MALDI/TOF-MS で分析をおこなうことが可能である。

また、市販の牛乳と土器片を使用した乳成分付着土器片サンプルのこの節に作成方法もまとめる。

抽出溶媒

0.1mol/l NH_4HCO_3 (炭酸水素アンモニウム)

土器サンプルの作成

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないように必ずゴム手袋を着用し、極力サンプルを触れないようにする。

土器を 10cm 程度の適当な大きさに分割する。また、土器片の表面を事前に削り、釉を除去する。

鍋の中に牛乳を入れ、その中に土器片を数個入れ、牛乳が沸騰するまで加熱する。その後、1 時間程度放置し、牛乳から土器片を回収する。流水で軽く洗浄した後にニッパクホイル上に置き自然乾燥させる。その際、土器片の上にニッパクホイルを敷き、細菌やゴミの付着を極力減らす。この作業を 10 回繰り返す。

その後、鑪で土器片の表面を削り、土器片の内部を鑪や乳鉢で粒子状に粉砕し回収する。ゴミや細菌による汚染の影響が少ない内部のみを回収する。粉砕作業の際はマスクを付けニッパクホイルを机上に敷きその上で作業する。

作成したサンプルは容器に密閉し -20°C 以下の冷凍庫で冷凍保存する。

サンプル準備

土器片粉砕サンプルを約 0.1g チューブ (MCT-150-L-C) に入れる。さらにコントロールとして空チューブを用意する。

溶媒を加える。

各々に溶媒を 1000ml ずつ加える。

攪拌

超音波で 15 分間攪拌し、さらにミキサーを使用してオーバーナイトで攪拌する。

タンパク質変性

60°C の温水中で 3 時間攪拌する。

遠心分離

遠心分離機を使用し 15600G で 5 分間遠心分離させ、上層の溶媒層を別チューブに移す。

凍結乾燥による濃縮

凍結させたサンプルチューブの蓋を開け、パラフィルムで蓋をして注射針で穴を開け凍結乾燥機にかけ、サンプルを濃縮する。その後、0.1M NH_4HCO_3 溶液を 100 μl 加えて溶解させる。

トリプシン作成

1 バイアル中のトリプシンに milli-Q-water 40 μl を入れ溶解させる。トリプシン溶液は冷凍保存する。

トリプシン消化

サンプル 100 μl にトリプシン 5 μl を加え 18 時間以上 37°C で放置する。この際、チューブは (0.2ml Hi-tube Flat Cap) を使用する。

pH 調整

サンプルに 0.1%TFA を 100ml 程度加え、pH 試験紙で測定しながら pH4 以下に調整する。

ZipTip による脱塩およびペプチド回収

必ず手袋をはめ、70%エタノールで手袋と机を殺菌する。
溶液をそれぞれ 1ml 程度用意する。

表 2. ZipTip による脱塩及びペプチド回収
に使用するための溶液の成分

溶液	成分
Wetting	100%ACN
Equilibration	0.1%TFA
Wash	0.1%TFA
Elution	0.1%TFA : ACN=3 : 7

廃棄用チューブとサンプル回収用チューブを用意する。

ZipTip をピペットにはめ、Wetting 溶液を 2 μl 吸引し廃棄用チューブに廃棄する。吸引する時は泡が生じないようにゆっくりと吸引する。Equilibration 溶液を 2 μl 吸引し廃棄用チューブに廃棄する。サンプルを 2 μl 吸引し廃棄用チューブに廃棄する。吸引の際 20~30 回ピペッティングし ZipTip にタンパク質とペプチドを吸着させる。Wash 溶液を 2 μl 吸引し廃棄用チューブに廃棄する。5 回繰り返す。Elution 溶液を 2 μl 吸引し、回収用チューブに回収する。回収の際 20~30 回ピペッティングし ZipTip

に吸着しているタンパク質とペプチドを完全に解離させる。使用した ZipTip は空チューブに入れ保存しておく。サンプルは冷凍庫に保存する。

MS ターゲットプレートを洗浄する

手袋を付け、アセトンをプレート上に流す。専用の箱にプレートを入れ 50%メタノールで浸し超音波で 5 分間洗浄する。メタノールを捨て、再びメタノールを加えた後再び超音波で 5 分間洗浄する。メタノールを捨て、プレートを箱から出し milli-Q 水で洗浄する。窒素ガスを吹き付けて乾燥させる。

CHCA 作成

アセトニトリル : 0.1%TFA = 1 : 2 の混合溶液 1ml 中に CHCA の粉末を 10mg 混入する。その後、ボルテックスによってある程度溶解させる。CHCA は溶液に完全には溶解しきらない。

MALDI/TOF-MS の準備と分析

空チューブのキャップ上で CHCA とサンプルを 1 μ l ずつ混ぜ、1 μ l 回収しターゲットプレート上に滴下し、自然乾燥させる。ピペットは先端をプレートに付けないように注意し、さらに泡が出ないように駒込ピペットのサンプルの排出は 1 段階目までにする。プレート上のサンプルを滴下した個所はノートなどで記録しておく。

用意したサンプル以外にスタンダードサンプルもプレート上に滴下する。

その後、MALDI/TOF-MS でサンプルを計測する。

第4章 MALDI/TOF-MSによる抽出されたペプチドの分析及びMS/MS検索による同定

4-1 はじめに

第3章における様々な調節によって、乳成分が土器片に付着していた場合は付着した乳ペプチドを抽出しMALDI/TOF-MSによって分析をすることが可能となる抽出方法を確立することができた。

その確立された抽出方法によって乳成分付着土器片サンプルからペプチドを抽出し、MALDI/TOF-MSによって抽出されたペプチドの分析をおこないマススペクトルを得ることで、確立された抽出方法の確実性を確認することにした。

この章では、確立された乳ペプチドの抽出法による乳成分付着土器片サンプルからの乳ペプチドの抽出、そして抽出された乳ペプチドのMALDI/TOF-MSによる分析、さらに分析によって得られたマススペクトルのうち、カゼインと m/z が一致するペプチドのピークのMS/MS検索によるアミノ酸配列の解析と同定の結果をまとめる。

4-2 確立された抽出法によって得られたペプチドの分析

第 3 章において確立された乳成分付着土器片サンプルからの乳ペプチドの抽出方法を用いて、乳成分付着土器片サンプルから乳ペプチドを抽出し、MALDI/TOF-MS によって分析をおこなった。また、分析によって得られたマススペクトルから、乳タンパク質の主成分であるカゼインを分析した際に検出されたピークの m/z と一致するペプチドのピークを選択し、MS/MS 検索によってアミノ酸配列の解析とデータベース照合による同定をおこなった。

この分析の際は、乳ペプチドの判別を容易にするために、標準カゼインサンプルから同様のペプチド抽出方法を使用して抽出したペプチドも同時に分析をおこなった。

材料

乳成分付着土器片サンプルは、市販の土器片と市販の牛乳を使用した。

方法

i) 土器サンプルの作成

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないように必ずゴム手袋を着用し、極力サンプルを触れないようにした。

土器を 10cm 程度の適当な大きさに分割した。鍋の中に牛乳を入れ、その中に土器片を数個入れ、牛乳が沸騰するまで加熱した。その後、1 時間程度乳中で放置し、牛乳から土器片を回収した。流水で軽く洗浄した後にニッパクホイル上に置き自然乾燥させた。その際、土器片の上にニッパクホイルを敷き、細菌やゴミの付着を極力減らした。この作業を 10 回繰り返した。

その後、鑊で土器片の表面を削り、土器片の内部を鑊や乳鉢で粒子状に粉砕し回収した。表面は乳成分の付着は多いが、乾燥時などにゴミの付着や細菌による浸食などが多いと考えられ、逆に内部は乳成分の付着は起こりにくい。ゴミの付着や細菌の浸食も少ないと予想したため、ゴミや細菌による汚染の影響が少ない内部のみを回収した。粉砕作業の際はニッパクホイルを机上に敷きその上で作業した。

ii) 抽出作業

抽出溶媒はイオン溶媒 (0.1mol/l NH_4HCO_3) を使用した。作業中は常時ゴム手袋を着用した。

粉砕した土器片サンプルを約 0.1g 測りチューブに入れた。さらにコントロール分の空チューブを用意した。各々のチューブに抽出溶媒を $100\mu\text{l}$ と milli-Q-water $900\mu\text{l}$ を加えた。超音波で 15 分間攪拌し、更に 1 晩以上ミキサーで攪拌した。チューブを 60°C の湯中に入れて、3 時間攪拌し、タンパク質を変性させた。遠心分離機を使用し 15600G で 5 分間遠心分離し、上層の抽出溶媒層を回収した。

その後、サンプルを凍結乾燥にかけて濃縮した。凍結乾燥をおこなったサンプルに 0.1mol/l NH_4HCO_3 を $100\mu\text{l}$ 加え溶解させた。その後、各サンプル $100\mu\text{l}$ にトリプシン $5\mu\text{l}$ を加え、18 時間以上 37°C で放置しタンパク質を分解した。

サンプルに 0.1% TFA を加え、pH 試験紙で測定しながら pH4 以下に調整した。そ

の後、ZipTip による回収をおこなった。ZipTip による回収の際に、Elution 溶液のアセトニトリルの比率は 70%に調整し、回収をおこなった。

結果

乳成分付着土器片サンプルの分析によって、多数のピークが検出された。これらのピークにおいて、 $m/z1267$ のような標準カゼインで検出されたピークの m/z と一致する m/z を示すピークが多数検出された (図 23)。これら標準カゼインと一致する m/z のピークは、カゼインペプチドであると予想される。よって、土器片に乳成分が付着している場合、前述のペプチド抽出方法を使用して土器片からペプチドを抽出し、MALDI/TOF-MS によって分析をおこなうことで、土器片に付着していたペプチドを検出できることが判明した。

また、標準カゼインで検出されたピークの m/z と一致する m/z を示すピークにおいて、そのうちの 1 つである $m/z1267.776$ で検出されたピークにおいて、MS/MS 検索によってアミノ酸配列を解析し、データベースで照合をおこない、同定をおこなった。その結果、アミノ酸配列が YLGYLEQLLR であると決定され、 $m/z1267.776$ において観測されたピークのペプチドは、乳タンパク質の主要な成分である $\alpha S1$ カゼインであることが判明した。

従って、本研究で確立されたペプチドの抽出法及び MALDI/TOF-MS による解析、そして、MS/MS 検索による同定によって、乳成分付着土器片からペプチドを抽出し、乳ペプチドの同定をおこなえることが判明した。ここに、本研究により、土器片に乳成分が混在しているかを判別することのできる乳ペプチドの評価法が確立されたと言える。

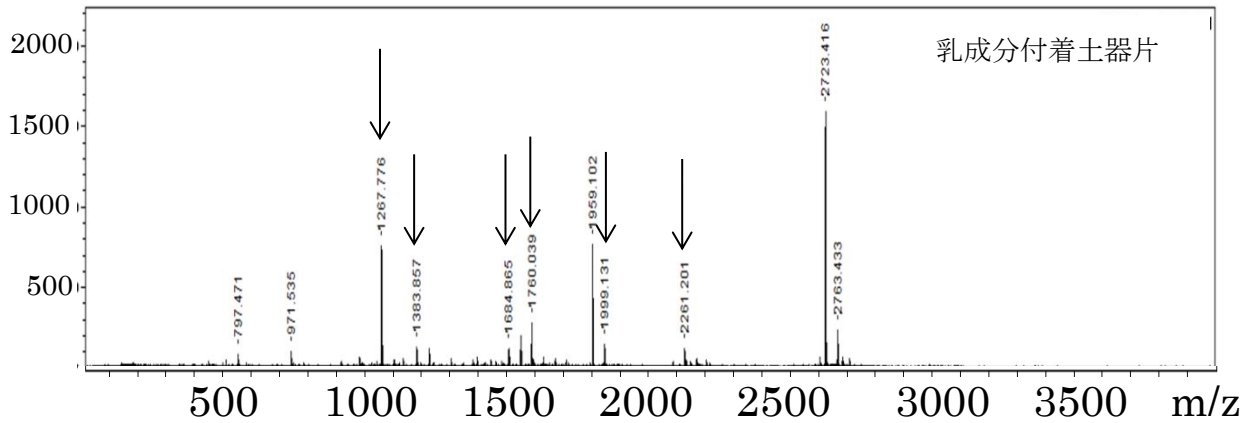


図 22. 確立したペプチド抽出方法を使用して乳成分付着土器片サンプル及び標準カゼインサンプルからペプチドを抽出し、MALDI/TOF-MS を使用してリフレクトロンモードで分析して得たマスペクトル。乳成分付着土器片サンプルにて得られたピークのうち m/z がカゼインと一致するピークを矢印 (\downarrow) で示した。

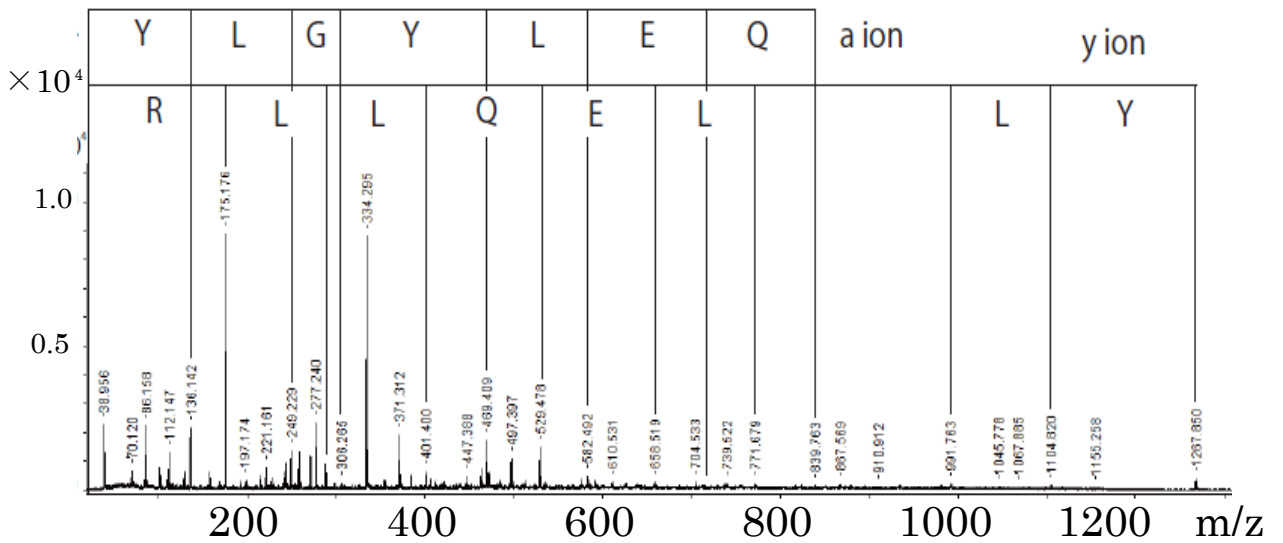


図 23. 乳成分付着土器片から抽出された乳ペプチドのうち、 $m/z1267$ に観測されたピークの MS/MS 検索結果。a イオン及び y イオンの開裂パターンを記している。

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

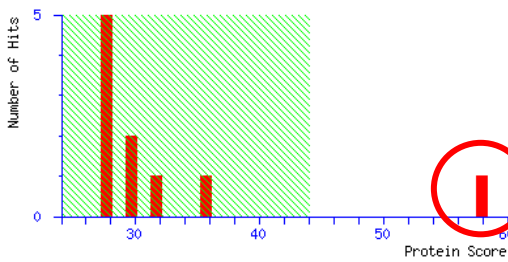
```

User       : Fuku
Email      : fuku@obihiro.ac.jp
Search title :
MS data file : DATA.TXT
Database   : NCBI nr 20130202 (22826945 sequences; 7847231743 residues)
Taxonomy   : Mammalia (mammals) (1304676 sequences)
Timestamp  : 4 Feb 2013 at 02:37:10 GMT
Protein hits : gi|954 as1-casein [Capra hircus]
              gi|1841552 LEAAT [Homo sapiens]
              gi|344252342 Protein SOLO [Cricetulus griseus]
              gi|351709672 Antigen KI-67 [Heterocephalus glaber]
              gi|403287843 PREDICTED: glutamate carboxypeptidase 2 isoform [Saimiri boliviensis boliviensis]
              gi|3116438 gag protein [Sus scrofa]
              gi|397471912 PREDICTED: zinc finger protein 592 [Pan paniscus]
              gi|7022691 unnamed protein product [Homo sapiens]
              gi|402878701 PREDICTED: triple QxxK/R motif-containing prote [Papio anubis]
              gi|119608942 hCG2041489 [Homo sapiens]
  
```

	NCBI nr	Decoy	False discovery rate
Peptide matches above identity threshold	1	0	0.00 %
Peptide matches above homology or identity threshold	1	0	0.00 %

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 44 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



最も高い確率を示している同定結果。

図 24. MS/MS 検索によるデータベース上での m/z11267 のペプチドの同定結果。

第 5 章 確立した乳ペプチドの抽出法及び同定法による実際の古代土器片の分析

5-1 はじめに

第 3 章において、イオン溶媒による乳成分付着土器片からの乳ペプチドの抽出方法を確立させることができた。また、第 4 章においては、その確立した抽出方法を用いて抽出したペプチドを MALDI/TOF-MS によって分析し、MS/MS 検索によって乳ペプチドとして同定することができ、乳ペプチドの同定方法を確立することができた。

これらの結果から、乳利用の起源と歴史を解明するための乳成分が付着、残留した土器片を使用した乳ペプチドの評価系を確立することができた。この確立された乳ペプチドの評価系を用いて、実際に古代土器片の分析をおこなった。

この章では、実際の古代土器片からのイオン溶媒によるペプチドの抽出、抽出したペプチドの MALDI/TOF-MS による分析の結果をまとめる。

5-2 古代土器片の分析

第 3 章において確立されたイオン溶媒による乳成分付着土器片からの乳ペプチドの抽出法を用いて、実際の古代土器片からペプチドを抽出した。また、第 4 章において確立された抽出したペプチドの MALDI/TOF-MS による分析と MS/MS 検索による同定法を用いて、古代土器片から抽出されたペプチドを MALDI/TOF-MS で分析し、得られたマススペクトルから乳タンパク質の主要な成分であるカゼインを分析した際に得られるピークの m/z と一致する m/z を示すピークを探し、乳ペプチドの同定を試みた。

材料

古代土器片サンプルは、筑波大学人文学類考古学・民俗学専攻先史学・民俗学コース三宅裕准教授より提供していただいた BC6000 年紀のシリアにて作成され、Umm Qseir 遺跡から出土した土器を粉末状に粉砕して使用した。この土器片は無文の粗製土器であり、色は全体的に赤色であり、割る際は硬いが削る際は脆い。表面には多少の凹凸がある。また、内部には視認できる大きさの隙間と層が存在し、小石は存在しなかった (図 24)。

方法

i) 土器サンプルの作成

作業中はサンプルに人体のタンパク質が付着しないように必ずゴム手袋を着用し、極力サンプルを触れないようにした。

古代土器片の表面を削り、内部を粉末状に粉砕した。

ii) 抽出作業

抽出溶媒はイオン溶媒 ($0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$) を使用した。作業中は常時ゴム手袋を着用した。

作業は前述のペプチド抽出作業を使用しておこなった。

iii) MALDI/TOF-MS による分析

前述と同じ作業で MS ターゲットプレートの洗浄とサンプルの調整などの準備をおこない、MALDI/TOF-MS でサンプルの計測をおこなった。

結果

古代土器片の分析において、多数のピークが検出された (図 25)。しかし、それらのピークのほとんどは標準カゼインを分析して得られたカゼインのピークとは m/z が一致せず、土器片が土壌に埋没している期間に付着した土壌細菌や土壌成分由来の汚染、発掘作業や保存作業中に付着したヒト由来汚染のピークであると予想される。このような汚染はマススペクトルの解読を困難とし、またアミノ酸配列の分析結果を乱して、MS/MS 検索によるペプチドの同定を困難にする要因となる。そのため、今

後はこの土壌細菌や土壌成分由来の汚染を可能な限り除去する方法を模索する必要が存在する。



図 25. BC6000 年紀のシリアの Umm Qseir 遺跡から出土した古代土器片の外観。

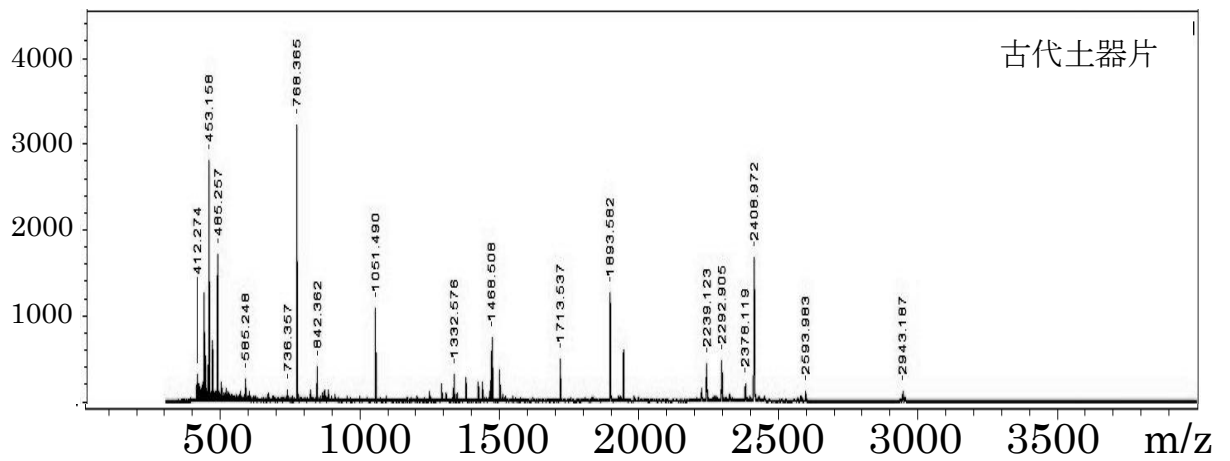


図 26. 確立した乳ペプチド抽出方法を使用して古代土器片サンプルからペプチドを抽出し MALDI/TOF-MS を使用してリフレクトロンモードで分析して得たマススペクトル。

第6章 総合考察

本研究において確立された乳残渣成分付着土器片からのペプチドの抽出方法を使用することで、乳成分が付着、残留している土器片からペプチドを抽出し、MALDI/TOF-MS によって分析をおこない、十分な濃度のペプチドが存在していれば MS/MS 検索によって検出されたペプチドが乳ペプチドであると同定することが可能であると判明した。このことから、乳成分が付着、もしくは浸透している古代土器片が存在すれば、MALDI/TOF-MS によって乳ペプチドを分析し同定することが可能であり、乳利用の起源と歴史の解明のための乳ペプチドの評価系が確立されたといえる。また、MALDI/TOF-MS は極めて多種の成分を分析できる高い汎用性を持った質量分析器である。そのため、この研究は高い汎用性を持っているといえる。この汎用性の高さは、貴重な古代遺物の分析をおこなう考古学的な研究において極めて重要な利点であり、使用するサンプル量が少量で済むという点も加えて、MALDI/TOF-MS は考古学的な研究に極めて適している分析機であるといえる。

また、抽出方法が確立される以前におこなった酸乳を使用して作成した乳成分付着土器片の分析において、乳ペプチドを同定することができた事実から、乳を加工するために使用された土器片が存在する場合、その土器片を分析することで、食器や保存用の土器片の分析と比較して、より効果的な分析をおこなえる可能性が考えられる。さらに、この手法による食料成分の分析は、乳以外でも主要なタンパク質やペプチドのアミノ酸配列が判明している食料ならば土器片に付着、浸透した食料成分を分析することが可能であり、MALDI/TOF-MS を使用した食料残渣成分の分析は、古代の食生活の解明といった研究にも適用することも可能であると考えられる。そのため、まずは乳成分の分析において、ウシ、ヤギ、ヒツジといった乳を利用されている主要な家畜種の分別同定をおこなうことができるかを実験することを考えている。

しかし、研究の課題もまた存在する。まず挙げられる大きな課題として、確立されたペプチドの抽出法を使用しておこなった分析でも、その分析から得られるペプチドのピークは検出強度が低い場合も存在し、安定して検出されたペプチドのピークを同定することは出来ていないという事である。実際に古代土器片を分析する際は、その内部に付着、残留している乳成分は極めて少量であることが予想されるため、この濃度の問題を改善して、検出されたペプチドの同定を安定化させることは早急におこなうべき課題である。そのため、MALDI/TOF-MS による分析の技術の更なる学習や、溶媒や使用する薬品の変更、遠心濃縮などの凍結乾燥以外の濃縮方法の比較といった、ペプチドの抽出方法の更なる調整をおこなう必要が存在する。

さらに、確立されたペプチドの抽出方法を用いて BC6000 年紀の古代土器片の分析をおこなったところ、そのマススペクトルには土壌細菌や土壌由来の汚染のピークが多数検出されてしまった。このような多数の汚染のピークは、マススペクトルの解読を困難にさせ、さらにアミノ酸配列を分析しペプチドの同定をおこなう際に、その結果の安定性を失わせるなどの問題を生じさせる。そのため、このような汚染を可能な限り除去する手法を模索する必要が存在する。

また、古代土器片の分析において、その年月の影響を考える必要も存在する。乳成分付着土器片の時間経過による成分の劣化状況や、土器片が土壌中に埋没された場合の分析結果への影響の確認をおこなうことも必要となる。そのため、乳成分付着土器片を作成し、その土器片を自然状態、及び、土壌埋没状態にして一定日数放置し、『作成直後』『作成6ヶ月後』『作成1年後』程度の区画を作成して比較分析をおこなうことにしている。

このように数々の課題点は存在しているものの、前述のように MALDI/TOF-MS はその高い汎用性と少ないサンプル量によって、考古学的な研究に適した分析機械であり、本研究が乳利用の起源の解明のために研究方法として効果的であるだろうといえる。しかし、MALDI/TOF-MS 以外でも、Chuan Hong らが、BC500-300 年紀の古代食料残渣を分析し、中国大陸最古の乳利用の痕跡を発見した研究において使用した LC-MALDI-TOF/TOFMS といったような、乳利用の起源の解明のために使用できる質量分析機は存在する。そのため、他の質量分析器の情報も収集し、より効果的な乳利用の起源を解明するための評価系の確立を目指すことにする。

要約

搾乳の技術と乳利用の起源は西アジアにある。搾乳を開始したことによって、人類は肉を得るために家畜を殺さずに生きたまま留めさせておき、その利子である「乳」という食料を得ることが可能となった。搾乳や乳利用の開始によって人類は作物の栽培が不利で、食料資源が豊富ではない乾燥地帯でも生活していくことが可能となった。人類史において極めて重大な発明である乳利用ではあるが、その始まりが何時なのかは未だ明確ではない。そこで本研究においては、乳利用の起源と歴史を解明するための乳ペプチドの評価系を確立するために、1) 乳成分付着土器片サンプルからの乳ペプチドの抽出法の確立、2) MALDI/TOF-MS による解析及び MS/MS 検索による乳ペプチドの同定法の確立、そして、3) 確立した乳ペプチドの抽出法及び同定法による古代土器片の分析、を目的として分析をおこなった。本研究において使用する MALDI/TOF-MS は、広範なサンプルを分析することが可能であり、使用するサンプル量が少量で済むため、サンプルが希少なことが多い考古学の研究に適している質量分析計である。

乳成分付着土器片からペプチドを抽出するための溶媒を選定するために、有機溶媒（アセトニトリル）、 H_2O 溶媒（milli-Q-water）、イオン溶媒（ 0.1mol/l NaCl ）の3種類の溶媒で比較検討をした。その結果、イオン溶媒（ 0.1mol/l NaCl ）による抽出がペプチドのピークの検出数がより多かった。さらに、イオン溶媒として $0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$ を使用した分析も試みた結果、 $0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$ を溶媒としたペプチド抽出は、 0.1mol/l NaCl を溶媒としたペプチド抽出よりピークの検出数が多かった。以上のことから、乳成分付着土器片からの乳ペプチドの抽出には、イオン溶媒である $0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$ がより多くのペプチドのピークを検出できる溶媒であると選出された。

ペプチド抽出工程における脱塩及びペプチド回収に使用するアセトニトリル・ $0.1\%TFA$ 混合溶液について、アセトニトリルの濃度を 5%、50%、70% の3区画を作成し、それぞれのペプチド回収効果を比較した。その結果、アセトニトリル濃度 70% の区画でペプチドのピーク検出数がより多かった。さらに、タンパク質をペプチドに消化分解するためのタンパク質消化酵素トリプシンの処理時間を、一般的に用いられる 18 時間とモルタル内の乳タンパク質を分解するための最適な処理時間とされる 2 時間の 2 区画を設定し、得られるマスペクトルのピーク数と強度を比較検討した。その結果、18 時間処理の区画でより多くのピークを検出できた。また、ペプチド抽出時に凍結乾燥による濃縮をおこない、その効果を調べた。その結果、凍結乾燥によって濃縮をおこなったサンプルのマスペクトルは凍結乾燥をおこなっていないサンプルと比較して、ペプチドのピークの検出強度、検出数ともに増加した。従って、凍結乾燥によるサンプルの濃縮は効果があることが判明した。

これらの結果から、 $0.1\text{mol/l NH}_4\text{HCO}_3$ を溶媒とし、脱塩及びペプチド回収にはアセトニトリル濃度 70% のアセトニトリル・ $0.1\%TFA$ 混合溶液を使用し、トリプシン処理は 18 時間でおこない、凍結乾燥によるサンプル濃縮をおこなう作業工程を乳

成分付着土器片からの乳ペプチド抽出法と定めた。

さらに、抽出した乳ペプチドを MALDI/TOF-MS によって分析しマススペクトルを解析した。その結果、多数のペプチドピークを検出することができ、カゼインと同数値の m/z を示すペプチドのピークが多数得られた。それらの検出された m/z とカゼインの m/z が一致したピークのうち、 $m/z1267$ のピークにおいて、アミノ酸配列を解析し、MS/MS 検索によってデータベース照合をおこなった。その結果、 $m/z1267$ のピークは、アミノ酸配列 YLGYLEQLLR であり、 $\alpha S1$ カゼインであると同定された。従って、本研究で確立されたペプチドの抽出法及び MALDI/TOF-MS による解析、そして、MS/MS 検索による同定によって、乳成分付着土器片からペプチドを抽出し、乳ペプチドの同定をおこなえることが判明した。ここに、本研究により、土器片に乳成分が混在しているかを判別することのできる乳ペプチドの評価法が確立されたと考えられる。

そして、本研究によって確立された乳ペプチドの評価法を用いて、実際にシリアの Umm Qseir 遺跡から出土した BC6000 年紀の古代土器片からペプチドを抽出し、MALDI/TOF-MS によって分析をおこなった。その結果、多数のピークは検出されたものの、古代土器片は長時間土壌中に埋没していたため、細菌や土壌成分由来の汚染によるピークが多数存在すると考えられた。今後の課題は、これら細菌や土壌成分由来の汚染の除去方法や、時間経過による成分劣化の影響などを検討することにある。

以上をまとめると、本研究によって乳成分が付着した土器片サンプルからペプチドを抽出する方法は確立された。そして、抽出したペプチドを MALDI/TOF-MS でマススペクトルを解析し、MS/MS 検索によってペプチドのアミノ酸配列を解析し、解析されたアミノ酸配列をデータベースによって照合しペプチドの同定をおこなう乳ペプチドの同定法を確立することができた。これらの結果から、本研究により乳利用の起源と歴史を解明するための乳ペプチドによる評価系を確立することができたといえる。

Summary

The milking and milk uses are originated in West Asia. The start of milking made food production such as 'milk' possible in keeping animals alive, without slaughtering animals to get meat. It became possible for human being by the start of milking and milk uses to spread their life even in the area where crop cultivation is difficult and food resources are poor. Although the milk uses is momentous invention in the history of human being, it is not clear yet when the milk uses started. Therefore the purpose of this study in the master's program is 1) to establish an extraction method of milk peptides from a milk-components adherent pottery shard, and 2) to establish an identification method of the extracted milk peptides by MALDI/TOF-MS and MS/MS, to establish an assay process for discussing the origin of milk uses and its history. In addition, using the sampling process and identification method of peptide which were established, it decided to also conduct analysis of an actual ancient shard. MALDI/TOF-MS can analyze an extensive sample, and since the amount of samples to be used can be managed with a small quantity, a sample is a mass spectrometer suitable for research of archaeology with many rare things.

In order to select the solvent for extracting peptide from a milk ingredient adhesion shard, comparison examination was carried out with three kinds of solvents, Organic solvent (acetonitrile) , H₂O solvent (milli-Q-water) , and Ion solvent (0.1mol/l NaCl). As a result, the number of detection of the peak of peptide had more extraction by an ion solvent (0.1mol/l NaCl). In addition, as a result of also trying the analysis which uses 0.1mol/l NH₄HCO₃, the peptide extraction which used 0.1mol/l NH₄HCO₃ as the solvent had more detection of a peak than the peptide extraction which used 0.1mol/l NaCl as the solvent. From the above thing, it was elected as extraction of milk peptide from a milk ingredient adhesion shard that it is a solvent in which 0.1mol/l NH₄HCO₃ which is an ion solvent can detect the peak of more peptide.

About the Acetonitrile and a 0.1%TFA mixed solution used for the desalination and peptide recovery in a peptide extraction process, 5%, 50%, and 70% of three divisions were created for the concentration of acetonitrile, and each peptide recovery effect was compared. As a result, there was more peak detection of peptide in the division of 70% of acetonitrile concentration. In addition, comparison examination of the number of peaks and intensity of a mass spectrum which are obtained by setting up two divisions of 18 hours and 2 hours in the processing time of protein digestive enzyme trypsin was carried out. As a result, more peaks have been detected in the division of processing for 18 hours. Moreover, concentration by freeze-drying was performed at the time of peptide extraction, and the effect was investigated. As a result, as compared with the

sample which is not condensing, the detection intensity of the peak of peptide and the number of detection increased the mass spectrum of the sample which condensed. Therefore, it became clear that concentration of the sample by freeze-drying was effective.

From these results, use 0.1mol/l NH_4HCO_3 as a Acetonitrile and a 0.1%TFA mixed solvent and it uses the solution of 70% of acetonitrile concentration for desalination and peptide recovery, The process of operation which performs trypsin treatment in 18 hours and performs sample concentration by freeze-drying was determined as the milk peptide sampling process from a milk ingredient adhesion shard.

MALDI/TOF-MS analyzed the extracted milk peptide and it analyzed the mass spectrum. As a result, many peptide peaks could be detected and many peaks of the peptide in which m/z of casein and a same number value is shown were obtained. Among the peaks in which those detected m/z and m/z of casein corresponded, in the peak of m/z1267, the amino acid sequence was analyzed and MS/MS search performed database collation. As a result, it was identified that the peak of m/z1267 is amino acid sequence YLGYLEQLLR, and is alphaS1 casein. Therefore, it became clear that peptide was extracted from a milk ingredient adhesion shard, and milk peptide could be identified by the analysis by the sampling process and MALDI/TOF-MS of peptide which were established by this research, and identification by MS/MS search. It is thought that the appraisal method of the milk peptide which can distinguish here whether the milk ingredient is intermingled in the shard by this research was established.

Peptide was extracted from the ancient shard of BC6000 actually excavated from the ruins of Umm Qseir in Syria using the appraisal method of the milk peptide established by this research, and MALDI/TOF-MS analyzed. As a result, although many peaks were detected, since the ancient shard was buried into soil for a long time, it was thought that many bacteria and peaks by contamination of soil constituent origin existed. There is a future subject in considering the influence of these bacteria, the removal method of contamination of soil constituent origin, and ingredient degradation by time progress.

When the above was summarized, the method of extracting peptide from the shard sample to which the milk ingredient adhered by this research was established. Therefore, the mass spectrum was analyzed for the extracted peptide by MALDI/TOF-MS, the amino acid sequence of peptide was able to be analyzed by MS/MS search, and the identification method of the milk peptide which compares the analyzed amino acid sequence with a database, and identifies peptide was able to be established. It can be said that the evaluation system by milk peptide for solving the origin and history of milk use by this research was able to be established from these results.

引用文献

- 三宅裕、1999. 「The Walking Account: 歩く預金口座—西アジアにおける家畜と乳製品の開発—」常木晃編『現代の考古学 3 食糧生産社会の考古学』朝倉書店、50-71 頁.
- 三宅裕、2008. 「古代メソポタミアにおける乳利用と乳製品」『古代オリエント博物館 紀要』 **28**: 39-51.
- 南川雅男、2001. 「炭素・窒素同位体分析により復元した先史日本人の食生活」『国立歴史民俗博物館研究報告』 **86**: 333-357.
- 平田昌弘、2009. 「生業としての牧畜」日本沙漠学会編『砂漠の事典』丸善株式会社、75 頁.
- 平田昌弘、2009. 「乳文化圏」日本沙漠学会編『砂漠の事典』丸善株式会社、76 頁.
- 平田昌弘、2009. 「乳利用と牧畜」日本沙漠学会編『砂漠の事典』丸善株式会社、77 頁.
- 平田昌弘、2009. 「牧畜の起源」日本沙漠学会編『砂漠の事典』丸善株式会社、78 頁.
- 平田昌弘、小坂康之、石本恭子、水野一晴、滝柳泰文、内田健治、安藤和雄、2012. 「インド北東部のチベット系牧畜民プロ玖波の乳加工体系—アルナチャル・プラデーシュ州ウエスト・カメン県ディラン・サークルにおける冷涼湿潤地域の事例—」 *Milk Science*、**61**: 11-24.
- 平田昌弘、2012. 「ユーラシア大陸における乳文化の一元二極化論」 *Milk Science*、**61**: 205-215.
- 藤井純夫、2001. 『世界の考古学⑩ ムギとヒツジの考古学』同成社.
- 宮澤陽夫、藤野泰朗、2000. 『生物化学実験法 9 脂質・酸化脂質分析法入門』学会出版センター.
- 荒木峻、山本修、益子洋一郎、鎌田利紘訳、1999. 『有機化合物のスペクトルによる同定法—MS,IR,NMR の併用—』東京化学同人 (R. M. Silverstein, F. X. Webster, 1997. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Wiley, New Jersey.) .
- 志田保夫、笠間健嗣、黒野定、高山光、高橋利枝、2001. 『これならわかるマススペクトロメトリー』化学同人.
- 上野民夫、平山和雄、原田健一、1997. 『バイオリジカルマススペクトロメトリー』東京化学同人.
- Dudd, S.N. & R.P. Evershed, 1998. Direct Demonstration of Milk as an Archeological Economies, *Science*, **20**: 1478-1481.
- Mottram, H.R., S.N. Dudd, G.J. Lawrence, A.W. Stott & R.P. Evershed, 1999. New chromatographic, mass spectrometric and stable isotope approaches to the classification of degraded animal fats preserved in archaeological pottery, *Journal of Chromatography A*, **833** : 209-221.

- Evershed, R.P., S. Payne, A.G. Sherrat, M.S. Copley, J. Coolidge, D. Urem-Kotsu, K. Kotsakis, M. Özudoğan, A.E., Özudoğan, O. Nieywenhuys, P.M.M.G. Akkermans, D. Bailey, R. Andeescu, S. Campbell, S. Farid, I. Hodder, N. Yalman, M. Özbaşaran, E. Bıçakcı, Y. Garfinkel, T. Levyand & M.M. Burton, 2008. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding, *Nature*, **455**: 528-531.
- Dudd, S.N. & R. P. Evershed, 1999, Evidence for Varying Patterns of Exploitation of Animal Products in Different Prehistoric Pottery Traditions Based on Lipids Preserved in Surface and Absorbed Residues, *Journal of Archaeological Science*, **26**: 1473-1482.
- Dunne, J., R.P. Evershed, M. Salque, L. Cramp, S. Bruni, K. Ryan, S. Biagetti & Savino di Lernia, 2012, First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium BC, *Nature*, **486**: 390-394.
- Salque, M., P.I. Bogucki, J. Pyzel, I. Sobkowiak-Tabaka, R. Grygiel, M. Szmyt & R.P. Evershed, 2013, Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe, *Nature*, **493**: 522-525.
- Balasse, M. & A. Tresset, 2002. Early Weaning of Neolithic Domestic Cattle (Bercy, France) Revealed by Intra-tooth Variation in Nitrogen Isotope Ratios, *Journal of Archaeological Science*, **29**: 853-859.
- Barnard, H., S.H. Ambrose, D.E. Beehr, M.D. Forster, R.E. Lanehart, M.E. Malainey, R.E. Parr, M. Rider, C. Solazzo & R.M. Yohe II, 2007. Mixed results of seven methods for organic residue analysis applied to one vessel with the residue of a known foodstuff, *Journal of Archaeological Science*, **34**: 28-37.
- Oliver E.C. & M.J. Collins, 2002. The Removal of Protein from Mineral Surfaces: Implications for Residue Analysis of Archaeological Materials, *Journal of Archaeological Science*, **29**: 1077-1082.
- Oliver E.C. & M.J. Collins, 2000. An improved method for the immunological detection of mineral bound protein using hydrofluoric acid and direct capture, *Journal of Immunological Method*, **236**: 89-97.
- Chuan Hong, Hongen Jiang, Enguo Lu^{*}, Yunfei Wu, Lihai Guo, Yongming Xie, Changsui Wang & Yimin Yang, 2012, Identification of Milk Component in Ancient Food Residue by Proteomics, *PLOS ONE*, **7**: 1-7.
- Fremout, W., S. Kuckovaa, M. Crhova, J. Sanyova, S. Saverwyns, R. Hynek, M. Kodicek, P. Vandenabeele & L. Moens, 1999, Classification of protein binders in artist's paints by matrix - assisted laser desorption/ionisation time - of - flight mass spectrometry: an evaluation of principal component analysis (PCA) and soft independent modelling of class analogy (SIMCA), *Rapid Commun. Mass Spectrom*, **25**: 1631-1640.
- Hynek, R., S. Kuckovaa, J. Hradilova & M. Kodicek, 2004, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a tool for fast

- identification of protein binders in color layers of paintings, *Rapid Commun. Mass Spectrom*, **18**: 1896-1900.
- Kuckovaa, S., M. Crhovac, L. Vankovac, A. Hnizdad, R. Hynec & M. Kodicek, 2009, Towards proteomic analysis of milk proteins in historical building materials, *International Journal of Mass Spectrometry*, **284**: 42-46.
- Craig, O.E., G. Taylor, J. Mulville, M.J. Collins & M.P. Pearson, 2004, The identification of prehistoric dairying activities in the Western Isles of Scotland: an integrated biomolecular approach, *Journal of Archaeological Science*, **32**: 91-103.
- Fremout, W., M. Dhaenens, S. Saverwyns, J. Sanyovaa, P. Vandenabeele, D. Deforcec & L. Moens, 2012, Development of a dedicated peptide tandem mass spectral library for conservation science, *Analytica Chimica Acta*, **728**: 39-48.

謝辞

修士研究をおこなうにあたり、様々な方々にご助力して頂き、心から感謝致します。本研究をおこなうにあたり、丁寧且つ熱心なご指導を頂いた指導教官の平田昌弘准教授には深謝致します。本研究において、様々なご助言を頂いた本江昭夫元教授に厚く御礼申し上げます。ペプチド抽出作業や MALDI/TOF-MS の操作方法など、この研究の根幹ともいえる技術をご教授して頂いた畜産食品科学ユニットの福田健二准教授に、厚く御礼申し上げます。また、本研究において使用した貴重な古代土器片を提供して下さった筑波大学人文社会科学研究科の三宅裕准教授に厚く御礼申し上げます。研究を進めるにあたり、分析方法において数々のご助言と丁寧なご指導を頂いた奈良女子大学タンパク質考古学創生事業・古代学学術研究センターの河原一樹特任助教に厚く御礼申し上げます。お忙しい中、たびたび時間を割いていただき、本当にありがとうございます。加えて、帯広畜産大学平田研究室 4 年生の九鬼千夏さん、3 年生の田口麻里子さん、宮崎杏花音さんにも、分析や論文執筆、ゼミなどの様々な活動において数々の補助や助言をくれたことに、心から感謝します。

色々と至らない点も多かった自分に叱咤激励とご助言をくださった皆さんに、心から謝辞を述べさせていただきます。