

カゼイン由来のペプチドを指標とした乳利用の起源の検証可能性

— MALDI/TOF 質量分析装置を用いた評価系 —

滝柳泰文¹・福田健二²・河原一樹³・三宅裕⁴・宮路淳子⁵・中澤隆⁵・常木晃⁴・平田昌弘⁶

(受付：2013年4月30日，受理：2013年7月10日)

A possibility of clarifying the origin of milk usage based on indexing the peptides derived from milk casein
- Toward the establishment of assay system using MALDI/TOF mass spectrometry-

Yasufumi TAKIYANAGI¹, Kenji FUKUDA², Kazuki KAWAHARA³, Yutaka MIYAKE⁴,
Atsuko MIYAJI⁵, Takashi NAKAZAWA⁵, Akira TSUNEKI⁴, Masahiro HIRATA⁶

摘 要

本稿では、乳利用の起源と歴史を解明するための乳ペプチドに着目した評価系を確立するために、乳成分付着土器片からタンパク質、ペプチドを効率的に抽出する手法、および、それらのMatrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI/TOF) 質量分析装置による同定の可能性について検証した。更に、本稿で提案する評価系を古代土器片に適用し、遺跡・遺構から出土した古代土器片中に含まれる乳ペプチド同定にむけた課題点を検討した。乳成分を付着させた土器片サンプルを準備し、乳由来のタンパク質・ペプチドを、重炭酸アンモニウム水溶液により抽出し、トリプシン処理後、得られたペプチド混合物を、MALDI/TOF 質量分析装置により分析した。質量スペクトルを精査した結果、ウシ由来カゼインのトリプシン消化後に得られるペプチド断片の幾つかと同数値の質量電荷比 (m/z) を示すペプチドのピークを得ることができた。その内、 m/z 1267.8 のピークを示すペプチドに関して、MS/MS スペクトルを測定し、得られるフラグメントパターンを解釈することにより、アミノ酸配列を YLGYLEQLLR と推定することができた。このペプチドは、アミノ酸配列データベース検索により、ウシ乳由来のタンパク質である α S1 カゼインの部分配列と一致した。従って、本稿で提案する MALDI/TOF 質量分析装置による評価系を用いることで、土器片

¹岩手大学大学院連合農学研究科生物環境科学専攻博士課程

²帯広畜産大学畜産衛生学研究部門

³奈良女子大学古代史・環境史プロテオミクス研究創成事業本部

⁴筑波大学大学院人文社会科学部

⁵奈良女子大学大学院人間文化研究科

⁶帯広畜産大学地域環境学研究部門

¹ PhD course, Division of Biotic Environment Science, The United Graduate School of Agricultural Science, Iwate University

² Department of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

³ Archaeological Proteomics Research Project Center for Research of Ancient Culture, Nara Women's University

⁴ Graduate School of Humanities and Social Sciences, University of Tsukuba

⁵ Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University

⁶ Department of Agro-Environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

から乳ペプチドを抽出・同定することが可能であることが示された。本稿で採用した評価系を用いて古代土器片の分析をおこなった結果、経年劣化や出土環境に依存した混雑物などに由来すると思われる多数の強度の強いピークが存在し、MS/MS 解析による乳由来のペプチドの同定は困難であった。そのため、今後は混雑物の適切な除去・分離を行い、MS/MS 解析によるペプチドの同定を行う必要がある。

キーワード : プロテオミクス、カゼイン、古代土器片、乳利用の起源、MALDI/TOF 質量分析装置

1. はじめに

搾乳の技術と乳利用の起源は西アジアであると考えられている。家畜として利用されているヒツジ、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。家畜を殺して肉に利用するという資源利用の在り方は、飼料を年間を通して確保する必要があり、多労を要する割には必ずしも効率的とはいえない。しかし、搾乳を開始したことによって、人類は家畜を生きたまま留めておき、言わばその利子である「乳」という食料を継続的に得ることが可能となった。乳利用は肉利用に対して飼料エネルギーの生産効率は3.7倍にも向上する(亀高ら 1979)。すなわち、搾乳を開始したことによって、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」という栄養性に優れた食料を獲得することになった。ここに「牧畜」という生業スタイルが確立することになる。これに伴って人類は、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(三宅 1999 ; 2008 ; 藤井 2001 ; 平田 2013)。

人類の生活において搾乳・乳利用の発見は、牧畜という新しい生業を誕生させるほど極めて重大なものであり、遺跡や遺構から出土する土器の自然科学的分析は、その付着物の起源に関して貴重な知見をもたらす可能性がある。近年、Gas chromatography-combustion-isotope ratio (GC/C/IR) 質量分析装置などガスクロマトグラフィーと質量分析を使用した古代遺物の成分分析による研究が活発化している(Dudd and Evershed, 1998 ; Evershed *et al.* 2008 ; Salque *et al.* 2013 ; Hong *et*

al. 2012)。特に、Dudd と Evershed は、脂肪酸の安定同位体分析の手法を用いることにより、土器片から乳成分を初めて特定することに成功した(Dudd and Evershed, 1998)。Dudd と Evershed による脂肪酸の安定同位体分析は、質量分析による古代遺物の成分分析による乳利用の起源や歴史の研究の先駆けとなった。Evershed らは、同様の手法を用いて、南ヨーロッパから西アジア西部にかけての広範囲な遺跡から出土した、2225 点もの土器片を分析することによって、少なくとも紀元前 7000 年紀には西アジアで乳利用が開始されていたと発表した(Evershed *et al.* 2008)。この乳利用の時代推定は、現在のところ最も古く、搾乳の起源が西アジアであることの根拠となっている。しかしながら、脂肪酸の安定同位体比分析は、測定に誤差を含みやすく、熟練した高度な技術が必要なこともあり、必ずしも汎用性の高い研究手法ではないことなどが問題である。

その点において、タンパク質やペプチド、多糖類を対象とした質量分析装置は、汎用性が高く、広く普及した分析手法である。タンパク質・ペプチドを対象とした質量分析機による乳利用の歴史解明の研究としては、その他の重要な研究例として、最近報告された Hong らの研究例がある(Hong *et al.* 2012)。Hong らは中国ウイグル自治区の Subeixi 遺跡から出土した古代食料遺物を液体クロマトグラフィー(LC)と Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI/TOF) 質量分析装置を使用して分析した結果、カゼインに由来する乳ペプチドを同定した。その結果、紀元前 500-300 年には中国内陸部において家畜から搾乳・乳利用がされていたことを明らかにしている。Hong らは、古代食料のみ

ならず、古代土器片に付着・浸透した食料成分についても質量分析による成分同定がおこなえる可能性があることについても言及している。

そこで我々は、比較的汎用性のある機械分析装置であり、使用する試料が少量で済む MALDI-TOF 質量分析装置に着目し、古代土器片に付着した乳残渣成分の抽出・同定による乳利用の起源解明へ向けた評価系の確立を試みることにした。

本稿の目的は、乳利用の起源と歴史を解明するための評価系を確立するために、乳成分付着土器片サンプルからのタンパク質・ペプチドの抽出、および MALDI/TOF 質量分析装置による乳ペプチドの同定の可能性について検証することにある。採用した評価系を、実際の応用として、シリアの Umm Qseir 遺跡から出土した紀元前 6000 年紀の土器片に適用し、古代土器片からの乳ペプチド同定に向けての課題点を検討した。

2. 材料と方法

2-1. 装置

MALDI/TOF 型質量分析装置は、autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics K.K. 製) を用いた。抽出したサンプルの凍結乾燥には FDU-2200 (EYELA 製) を用いた。

2-2. サンプルの調製

土器サンプルとして、素焼きの陶器を利用した。陶器の外周を削った後に牛乳中に浸し、牛乳を沸騰させて乳成分を付着させた。この作業を 10 反復おこなった。その後、粒子状に粉砕し、乳成分付着土器片サンプルとした。

古代土器片として、シリアの Umm Qseir 遺跡から出土した紀元前 6000 年紀の土器片を使用した (Miyake 1998)。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、割る際は硬いが削る際は脆かった。表面には多少の凹凸があった。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。この古代土器片の外周を削った後、粒子状に粉砕し古代土器片

サンプルとした。

2-3. タンパク質、ペプチドの抽出

溶媒として、0.1 mol/l の重炭酸アンモニウム (NH_4HCO_3) 水溶液を使用した。粉末状の乳成分付着土器片サンプルを 0.1 g 計測し、溶媒 1000 μl に加え、一晚攪拌した。その後、60°C の温水中で 3 時間の攪拌をおこない、タンパク質の変性をおこなった後、15600 \times g で 5 分間の遠心分離をおこない、溶媒層を 1000 μl 回収した。回収した溶媒を凍結乾燥機中で乾燥させ、液量を約 100 μl に減らした後、トリプシンを 5 μl 加え、37°C で 18 時間放置し、タンパク質を酵素消化した。消化後の溶液に、0.1% のトリフルオロ酢酸 (TFA) を加え、pH を 4 以下に調整した後、C18 樹脂充填ピペットチップの ZipTip (Millipore 株式会社) を使用して脱塩及びペプチドの回収をおこなった。

2-4. ペプチドの分析と同定

マトリックスとして α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) を使用した。ペプチド抽出サンプル 1 μl にマトリックス溶液 1 μl を混合した後、ターゲットプレート上に 1 μl スポットし、自然乾燥させた。その後、MALDI/TOF 質量分析装置により分析を実施した。内部標準として Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics K.K. 製) を使用した。MS/MS スペクトルのフラグメントパターンに基づくペプチドの同定には、ソフトウェア MASCOT (Matrix Science 株式会社) のデータベース検索エンジンを用いて行い、アミノ酸配列データベースに National Center for Biotechnology Information を利用した。

3. 結果と考察

3-1. 乳成分付着土器片サンプルの分析

牛乳に浸すことで乳成分を付着させた土器片サンプルから抽出したペプチドを MALDI/TOF 質量分析した際に得られた質量スペクトルを図 1 に示す。縦軸は相対強度、横軸は質量電荷比 (m/z) を表す。図中で検出強

度が相対的に高い 11 種類のピーク (m/z 797.5、971.5、1267.8、1383.9、1684.9、1780.0、1959.1、1999.1、2261.2、2723.4、2763.4) のうち、乳タンパク質の主要な構成成分であるカゼインをトリプシン消化した際に得られるペプチド由来のピークと一致するものは 6 種類 (m/z 1267.8、1383.9、1684.9、1780.0、1999.1、2261.2) であった。図 2 には、検出されたピークのうち、 m/z 1267.8 のピークについて、MS/MS 解析を行った際のスペクトルを示す。良質なフラグメントパターンが得られており、ソフトウェア MASCOT を用いたアミノ酸配列データベース検索の結果、このピークに由来するペプチドのアミノ酸配列は YLGYLEQLLR であると推定することができた。推定された配列 YLGYLEQLLR は成熟 α S1 カゼインのアミノ酸配列のうち N 末端から 106-115 の部分と一致

しており、このことから、乳タンパク質の主要な成分である α S1 カゼインの土器片への付着を確認することができた (図 2)。また、今回 MS/MS 解析を行った m/z 1267.8 のピークは、歴史的に建築材料として利用されているモルタルに関して実施された同様の分析において、検出頻度の高いカゼインペプチドとして同定された報告例もあり、古代資料に含まれる乳成分を同定する際のマーカーとなる可能性がある (Kuckova *et al.* 2009)。

これらの結果から、本稿で採用したペプチドの抽出法および MALDI/TOF 質量分析装置による解析、そして、ソフトウェア MASCOT を用いたデータベース検索に基づくペプチドの同定によって、乳成分が土器片に付着しているならば、乳ペプチドを抽出・同定することが可能であることが示唆された。

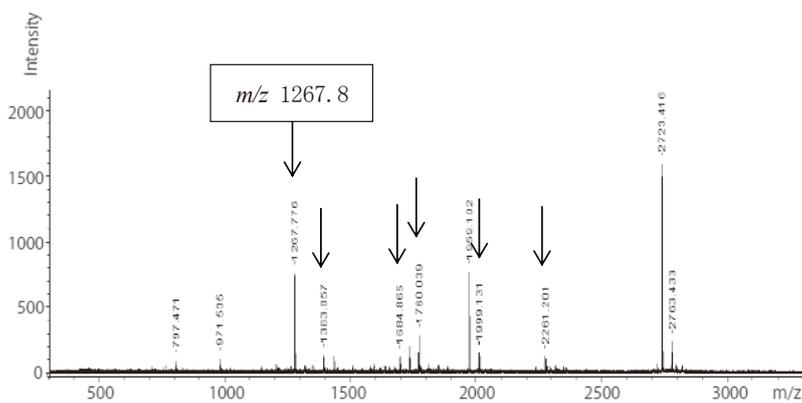


図 1. 乳成分付着土器片から抽出された乳ペプチドの MALDI/TOF 質量分析によるマッサスペクトル。カゼインの m/z と一致するピークを矢印 (↓) で示した。

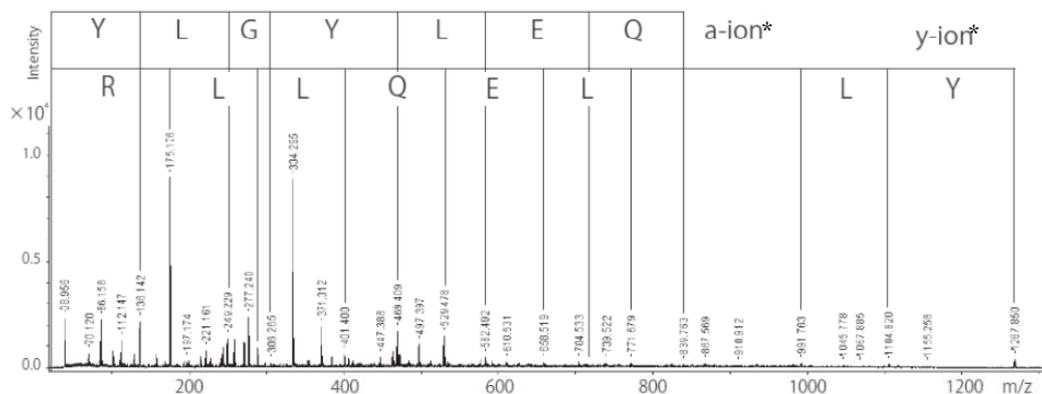


図 2. m/z 1267.8 のピークの MS/MS 検索結果。

* : a イオン、および、y イオンの開裂パターン。

3-2. 古代土器片サンプルの分析

前項までの実験から確立された評価系を適用して、シ

リアの Umm Qseir 遺跡から出土した紀元前 6000 年紀の土器片の分析をおこなった。この土器片は、乳の保存や

加工といった用途で使用されたものかは不明である。

MALDI/TOF 質量分析の結果、18種類 (m/z 412.3、453.2、485.3、585.2、736.4、768.4、842.4、1051.5、1332.6、1468.5、1713.5、1893.6、2239.1、2292.9、2378.1、2409.9、2594.9、2943.2) の有意な強度を持つピークが検出されたが(図3)、これらの検出されたピークには、トリプシン処理によって分解された場合に想定される α カゼインのペプチド断片と m/z 値が一致したピークは存在しなかった。また、 β カゼインや κ カゼインなどの牛乳に含まれる他の種類のカゼインや、アルブミンなどのタンパク質に関してもペプチド消化物に由来すると思われるピークは認められなかった。しかし、この結果から必ずしもカゼインを含まないとは言えず、翻訳後修飾により生じたリン酸化などのアミノ酸配列の変異や、長年の埋没中にトリプシン処理とは異なる過程でタンパク質がペプチドに分解されたなどの理由により検

出されるペプチドの m/z 値に差が生じた可能性、更に、それ以外の要因として、乳成分以外の食料成分が含まれている可能性も考えられる。そのため、これらの要因を考慮した抽出法、もしくはデータベース検索方法を考案し、MS/MS 解析と組み合わせることによって、実際に検出されたペプチドの同定をおこなうことが今後の課題となる。上述した要因に加え、測定に用いた土器が土壌に埋没したことによる土壌成分の混入や土壌細菌、発掘作業中に付着したケラチンなどのヒト由来成分が混入し、検出された可能性も考えられる。このような混雑成分が検出されることは、絵画などの古代遺物の成分分析の研究ではよく報告されている現象である (Gabriella *et al.* 2009 ; Marshall *et al.* 2009)。土壌成分や細菌、ヒト由来の成分を可能な限り除去する方法は、文化財一般に対する分析の課題と言える。

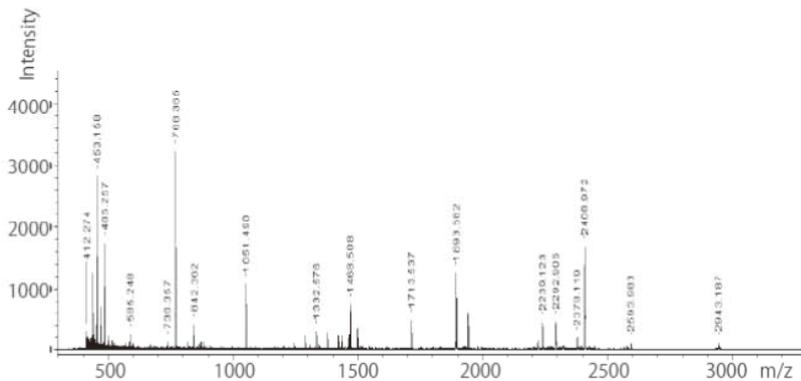


図3. 古代土器片から抽出されたペプチドをMALDI/TOF質量分析して得られたマスペクトル。

4. おわりに

本稿は、乳利用の起源と歴史を解明するための乳ペプチドに着目した評価系を確立するために、乳成分付着土器片サンプルからのタンパク質・ペプチドの抽出、およびMALDI/TOF質量分析装置による乳ペプチドの同定の可能性について検証することを目的とした。更に、本稿で採用した評価系を出土した古代土器片に適用し、経年劣化や混雑物を伴う古代土器片から乳ペプチドを抽出し、同定するための課題点を検討した。

古代遺物の成分分析に関する自然科学的研究は、古代

建築物や古代絵画、遺跡から出土する古代土器片など、様々な古代遺物に適用されており、必要なサンプル量が微量で、様々な成分のサンプルを分析することが可能である利点があるため質量分析装置の利用は、現在提案されている分析手法の中で重要な位置を占めている。タンパク質・ペプチドを対象としたMALDI/TOF質量分析装置による古代遺物の研究としては、FremoutらやHynekらのおこなった絵画の成分分析の報告があり (Fremout *et al.* 1999 ; Hynek *et al.* 2004)、古代の絵具や固着剤から卵の黄身や卵白などを抽出・同定している。これらの分析結果は、それぞれの絵画に適した保存方法や修復方法

を検討する際に有益な情報を提示する。また、Kuckovaらはモルタル中に乳成分が存在しているかどうかについて検討している (Kuckova *et al.* 2009)。モルタルは古代建築に固着剤として使用された素材である。古代の制作手法に基づき、乳を用いてモルタルを作成し、MALDI/TOF 質量分析装置によってモルタルの成分を分析した結果、モルタル内へのカゼインの付着とその同定が可能であることを報告している。また、自然状態で9ヶ月間放置した同モルタルからも、使用サンプル量は増加するものの、カゼインを同定できることを実証している。これらのことから、古代建築物に使用されたモルタルの質量分析から、乳利用の有無を明らかにすることが可能であることが示唆された。

このように、タンパク質・ペプチドを対象とした質量分析による古代遺物の成分分析は、近年盛んに行われるようになってきており、我々が本稿で提案するように、質量分析を基盤とした評価系を利用することによって、現在のところ脂肪酸分析が中心である、西アジアでの紀元前7000年紀前後の古代土器片についても、タンパク質・ペプチドの視点から搾乳・乳利用の起源解明が可能であると考えられる。

引用文献

- Dudd, S.N. and R.P. Evershed, 1998. Direct Demonstration of Milk as an Archeological Economies, *Science*, 282: 1478-1481.
- Evershed, R.P., S. Payne, A.G. Sherratt, M.S. Copley, J. Coolidge, D. Urem-Kotsu, K. Kotsakis, M. Özudoğan, A.E., Özudoğan, O. Nieywenhuyse, P.M.M.G. Akkermans, D. Bailey, R. Andeescu, S. Campbell, S. Farid, I. Hodder, N. Yalman, M. Özbaşaran, E. Bıçakçı, Y. Garfinkel, T. Levyan and M.M. Burton, 2008. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding, *Nature*, 455: 528-531.
- Fremout, W., S. Kuckovaa, M. Crhova, J. Sanyova, S. Saverwyns, R. Hynek, M. Kodicek, P. Vandenaabeele and 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 communications in mass spectrometry*, 25: 1631-1640.
- Gabriella, L., L. Cartechini, P. Pucci, A. Sgamellotti, G. Marino, and L. Birolo. 2009, Proteomic strategies for the identification of proteinaceous binders in paintings, *Anal Bioanal Chem*, 395:2269-2280.
- Hong, C., H. Jiang, E. Lü, Y. Wu, L. Guo, Y. Xie, C. Wang and Y. Yang, 2012, Identification of Milk Component in Ancient Food Residue by Proteomics, *Plos one*, 7: 1-7.
- Hynek, R., S. Kuckovaa, J. Hradilova and 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 communications in mass spectrometry*, 18: 1896-1900.
- Kuckova, S., M. Crhovac, L. Vankovac, A. Hnizdad, R. Hynek, M. Kodicek, 2009, Towards proteomic analysis of milk proteins in historical building materials, *International Journal of Mass Spectrom*, 284: 42-46.
- Marshall, B., B.S. Phinney, and D. Goldberg, 2009, Reanalysis of Tyrannosaurus rex Mass Spectra, *Journal of Proteome Research*, 8:4328-4332.
- Miyake, Y., 1998. Chapter III Phase 1: Halaf Period, 2. Pottery. In A. Tsuneki, and Y. Miyake (eds.), *Excavations at Tell Umm Qseir in Middle Khabur Valley, North Syria: Report of the 1996*

- Season*. Department of Archaeology, Institute of History and Anthropology, University of Tsukuba. pp. 41-85.
- Salque, M., P.I. Bogucki, J. Pyzel, I. Sobkowiak-Tabaka, R. Grygiel, M. Szmyt and R.P. Evershed, 2013, Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe, *Nature*, 493: 522-525.
- 亀高雅夫、堀口雅昭、石橋晃、古谷修、1979. 「エネルギー利用効率」 亀高雅夫・堀口雅昭・石橋晃・古谷修（編）『基礎家畜飼養学』養賢堂、133-139 頁.
- 平田昌弘、2013. 『ユーラシア乳文化論』岩波書店.
- 藤井純夫、2001. 『世界の考古学(名) ムギとヒツジの考古学』同成社.
- 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.

Summary

The purpose of our study is to establish a method for clarifying the origin of the use of milk. The method is based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI/TOF-MS) of peptides derived from milk casein, which could remain in a shard of ancient pots made of clay. Caseins probably highly degraded and contaminated with many other proteins were extracted from the ancient pot with an aqueous 0.1 M NH_4HCO_3 solution, digested by trypsin, and analyzed by MALDI/TOF-MS. From casein in the milk deliberately adsorbed in a shard of clay, we detected a peak at m/z 1267.8, followed by its MS/MS analysis to reveal that the amino acid sequence of the peptide was YLGYLEQLLR, which was identified as residues 105-116 of αS1 casein. The MALDI mass spectra showed

another six peptide peaks that had identical m/z with those expected from the amino acid sequences of milk casein. However, none of the peaks observed for the tryptic peptides of proteins extracted from the specimen found in Umm Qseir (Syria) could be identified as derived from milk casein, suggesting that the protein, if any, was heavily damaged due to a myriad of degradation processes lasting for more than 7000 years in the soil. Therefore, the success of the present method relies on the identification of modifications characterizing the long lasting degradation of proteins, so that the coverage of database search for milk casein could be greatly enhanced.

Key words: proteomic, casein, ancient shard, origin of milk use, MALDI/TOF mass spectrometry