

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

南 雅代

日本学術振興会特別研究員（名古屋大学年代測定資料研究センター）

Tel: 052-789-2578, E-mail: minami@eps.nagoya-u.ac.jp

1. 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（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こし、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。

南・池田（1998）は、極めて保存状態のよい現生の象牙試料に対し、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+1.0‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値は+0.2‰の変化を示した。一方、Stafford et al.（1988）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+0.2‰と、ほとんど無視できる程度であると報告している。そこで本研究では、XAD-2樹脂処理が同位体比に与える影響の有無を明らかにするために、コラーゲンおよびアミノ酸の標準試薬に対し、化学処理法の異なるいくつかの成分について $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値を測定した。また、脱灰時の塩酸の濃度の違いによる $\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化の様子についても調べた。

2. 試料および実験方法

実験に用いた試料は、以下の(1)～(3)である。

- (1) Sigma Chemical Company のコラーゲン試薬（タイプ I ; 現生の牛アキレス腱コラーゲン）
- (2) ナカライテスクのコラーゲン試薬（現生の牛アキレス腱コラーゲン）
- (3) キンダ化学の特級アミノ酸試薬（グリシン, アラニン, セリン, バリン, チロシン, プロリン, アスパラギン, グルタミン酸, メチオニン, アルギニン）

(1), (2)のコラーゲン試薬は、約40mgを約100mlの0.8NHCl(4°C, 24hr)で脱灰処理し、酸に不溶成分を遠心分離した後、蒸留水で洗浄して凍結乾燥した。この凍結乾燥試料約100mgに約10mlの6NHCl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(1×30cm)に通し、6NHCl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。

(3)のアミノ酸試薬は、100~200mgを数mlの6NHClに溶かし、XAD-2樹脂カラム(1×30cm)に通し、6NHClで溶出させた。この塩酸溶液をエバポレーターにかけて塩酸を飛ばし、凍結乾燥した。

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。

3. 化学処理によるコラーゲン標準試薬の炭素・窒素同位体比の変化

コラーゲン標準試薬を脱灰、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。

表1 一連の化学処理にともなうコラーゲン標準試薬の炭素・窒素同位体比の変化

Table 1 Comparison of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for the sequential chemical treatments of collagen standards

Fraction analysed	C content (%)	N content (%)	C/N ratio	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
Sigma Chemical Company					
Collagen	50.6	13.0	3.9	-15.1	+7.3
Decalcified Collagen	49.1	12.8	3.8	-14.6	+7.3
Hydrolysed Collagen	24.3	6.8	3.6	-14.1	+7.2
XAD-2-treated Collagen	25.8	8.1	3.2	-13.0	+7.2
Nacalai Tesque Company					
Collagen	48.7	13.7	3.6	-15.1	+6.8
Decalcified Collagen	46.8	13.6	3.4	-14.8	+6.8
Hydrolysed Collagen	28.2	9.5	3.0	-14.5	+6.3
XAD-2-treated Collagen	27.3	10.1	2.7	-13.6	+6.1

コラーゲン加水分解成分およびXAD-2樹脂処理した加水分解成分の炭素・窒素含有率が小さいのは、これらの成分がシロップ状として得られ、水分を含んでいるためである。表1の結果から、コラーゲン試薬そのもの、コラーゲンを脱灰した成分、加水分解成分、XAD-2樹脂処理した加水分解成分と、化学処理が進むにつれ、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は増加していることがわかる(図2)。一方 $\delta^{15}\text{N}$ 値は、Sigma Chemical Companyのコラーゲンではいずれの成分もあまり変化がないが、ナカライテスクのコラーゲンでは、加水分解成分、XAD-2樹脂処理した加水分解成分の $\delta^{15}\text{N}$ 値が大きくなる傾向が見られた。XAD-2樹脂処理による同位体比の変化、すなわち加水分解成分とXAD-2樹脂処理した加水分解成分との違いは、 $\delta^{13}\text{C}$ 値については+1.0‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値については0.0~+0.2‰となり、南・池田(1998)の現生の象牙試料から得られた結果とほぼ一致した。今回の結果は、コラーゲン試薬においては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とするStafford et al. (1988)の報告($\delta^{13}\text{C}$ 値については+0.3‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値については+0.2‰と報告されている)とは相反する結果となった。しかし、 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 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、塩酸による処理が大きな原因となっていることがわかる。

C/N比に関しても化学処理が進むにつれて変化を示し、脱灰成分に比べてXAD樹脂処理した加水分解成分は明らかに小さい。コラーゲンのようにグリシンの多いタンパク質のC/N比は、 3.2 ± 0.5 といわれており(Hare and von Endt, 1990)、C/N比の減少は、一連の塩酸処理により、コラーゲンから汚染物が除去され、コラーゲンそのものの値に近づいたとも考えられる。

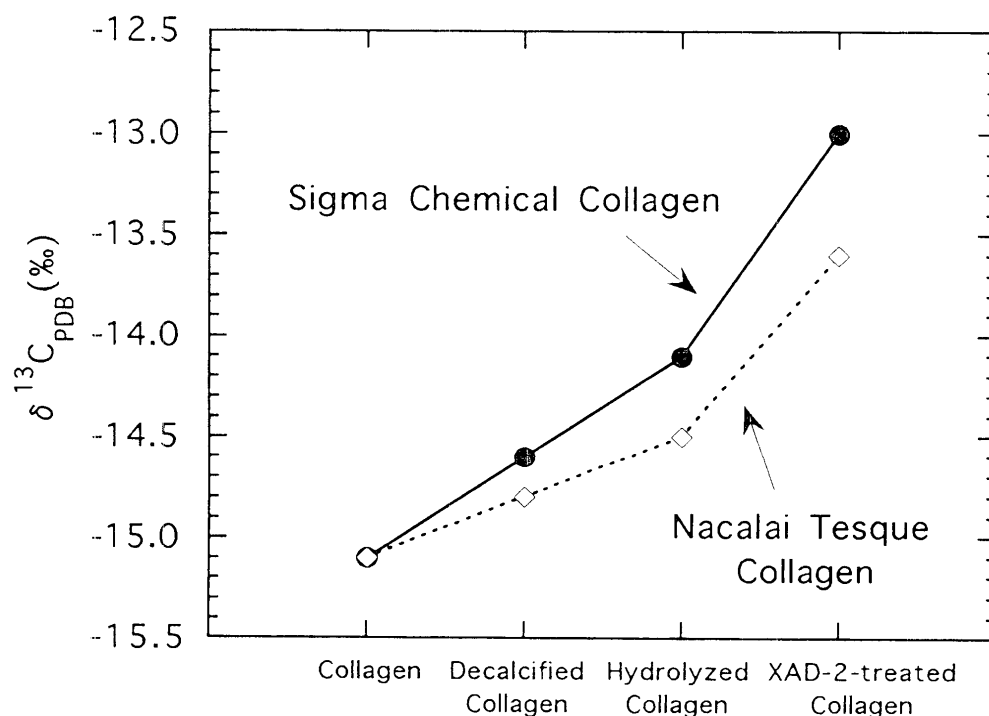


図1 化学処理にともなうコラーゲン試薬の炭素・窒素同位体比の変化

Figure 1 Comparison of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for the sequential chemical treatments of collagen standards

4. XAD-2樹脂処理によるアミノ酸標準試薬の炭素・窒素同位体比の変化

コラーゲン加水分解成分は多数のアミノ酸の集合体である。XAD-2樹脂処理によってコラーゲンに同位体分別が生じていることから、コラーゲンを構成する個々のアミノ酸がXAD-2樹脂処理によって同位体分別を生じている可能性が考えられる。そこでまず、アミノ酸標準試薬をXAD-2樹脂に通し、炭素・窒素同位体比に変化が見られるかどうかを調べた。結果を表2に示す。

アミノ酸試薬においては、アスパラギンとグルタミン酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値を除き、XAD-2樹脂処理にもとづく炭素・窒素同位体比の変化はほとんど見られなかった。しかし、いくつかのアミノ酸では、XAD-2樹脂を通すことによって $\delta^{13}\text{C}$ 値が若干大きくなる傾向があるので、炭素同位体に関しては、XAD-2樹脂処理による同位体分別がわずかに生じている可能性も考えられる。しかし、このわずかな炭素同位体比の変化が、コラーゲンにおける+1.0‰という大きな増加を全て説明しているとは考えにくい。3. で述べたように、コラーゲンのXAD-2樹脂処理による同位体分別は、6Nという塩酸処理によるものと考えられる。

アスパラギンとグルタミン酸という酸性アミノ酸の窒素同位体分別は、封管して試料を加熱する際、あるいはモレキュラーシーブスによって N_2 をトラップする際に生じている可能性が高い。今後の検討を必要とする。

表2 XAD-2樹脂処理によるアミノ酸標準試薬の炭素・窒素同位体比の変化

Table 2 Comparison of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for XAD-2 treatment of amino acid standards

	Amino acids		XAD-2-treated amino acids	
	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
Glycine	-33.8	+0.4	-33.8	+0.4
DL- α -Alanine	-25.3	-3.0	-25.2 (+0.1)*	-3.0
L-Serine	-37.1	+1.9	-37.1	+1.9
L-Valine	-20.2	-5.5	-20.2	-5.4 (+0.1)
L-Tyrosine	-17.0	+5.8	-17.0	----
L-Proline	-12.3	+10.7	-12.3	+10.8 (+0.1)
DL-Asparagine	-22.8	-4.8	-22.7 (+0.1)	-4.2 (+0.6)
L-Glutamic acid	-13.0	-12.3	-13.0	-11.8 (+0.5)
L-Methionine	-32.4	+1.4	-32.3 (+0.1)	+1.4
L-Arginine	-13.8	-7.6	-13.7	-7.6

* Deviation from original value

5. さまざまな濃度によるコラーゲンの脱灰

南・中村（1997, 1998）の方法では、骨化石試料の脱灰を0.8N HClで行っているが、ゼラチン化を行う従来のコラーゲン抽出法（有田ほか, 1990; 沢田ほか, 1992; 中村ほか, 1996）では1.2N HClで、またStafford, et al.（1988）は0.6N HClで行っている。上述の結果から、塩酸処理がコラーゲンの炭素同位体比に影響を及ぼしていることがわかった。そこで、塩酸の濃度を変えてコラーゲン試薬の脱灰を行い、同位体比に及ぼす塩酸の影響を調べた（表3）。用いたコラーゲン試薬はSigma Chemical Companyのものである。コラーゲン試薬そのものと、0.8N HClで脱灰したコラーゲンの値は、表1の結果を引用した。

塩酸処理後のコラーゲン回収率は、0.4N HClで約85%、1.2N HClで約65%となった。しかし、酸処理後の溶液を遠心分離してコラーゲンを回収した際、どうしても一部沈殿してくれず、浮遊している分を損失してしまったため、回収率に関しては、再実験する必要がある。

表3より、炭素・窒素含有率ともに、塩酸処理濃度が高くなるにつれ減少し、C/N比も小さくなる傾向を示している。また、塩酸の濃度が高くなるにつれ、 $\delta^{13}\text{C}$ 値はもとのコラーゲンの値より大きくなった。 $\delta^{15}\text{N}$ 値についても、大きくなる傾向が見られた。塩酸の濃度が高くなるにつれコラーゲンが分解しやすい条件になるので、その結果として、炭素・窒素含有率、炭素・窒素同位体比に変化が現れたと考えられる。

保存状態のよくない骨化石ではコラーゲン収率が悪いため、かなりの量の骨化石試料からでも十分な量のコラーゲンが得られず、 ^{14}C 年代測定できない場合が多い。今後、骨化石からコラーゲンを過度に損失することなく抽出し、また正確な ^{14}C 年代を得ることのできる脱灰条件（塩酸の濃度、脱灰時間等）を、実際の骨化石について調べていく予定である。

表3 塩酸の濃度を変えて脱灰した場合のコラーゲンの炭素・窒素同位体比

Table3 $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for decalcified collagens with various concentrations of HCl

	C content (%)	N content (%)	C/N ratio	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
Collagen	50.6	13.0	3.9	-15.1	+7.3
Decalcified with 0.4N HCl	50.1	12.9	3.9	-15.0	+7.3
Decalcified with 0.6N HCl	49.3	12.8	3.9	-14.8	----
Decalcified with 0.8N HCl	49.1	12.8	3.8	-14.6	+7.3
Decalcified with 1.0N HCl	48.7	12.6	3.8	-14.6	+7.0
Decalcified with 1.2N HCl	47.3	12.5	3.8	-14.2	+6.8

Sigma Chemical Collagen was used.

6. 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+1.0‰、 $\delta^{15}\text{N}$ 値については0.0～+0.2‰となった。この結果は、XAD-2樹脂処理による同位体比の変化はほとんどないとするStafford et al. (1988)の報告とは相異なる結果となった。他方、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、コラーゲンにおける同位体分別は、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結果として生じているのではないと示唆された。

コラーゲンの $\delta^{13}\text{C}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}$ 値そしてC/N比はXAD-2樹脂処理だけではなく、コラーゲンを0.8N NaClで脱灰、6N HClで加水分解する際にも変化しており、XAD-2樹脂処理による同位体比の変化は樹脂によるものというよりは、塩酸が大きな原因となっていると考えられる。塩酸処理によって外来の有機物が除去されて純度の高いコラーゲンが得られているのか、あるいはコラーゲンが分解してアミノ酸構成が変化しているのかを調べるため、現在、それぞれの成分のアミノ酸分析を行い、検討中である。

7. 謝辞

この研究を進めるにあたり、中村俊夫助教授（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。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）を使用した。記して感謝の意を示します。

引用文献

- 有田陽子・中井信之・中村俊夫・亀井節夫・秋山雅彦・沢田 健 (1990) 哺乳類化石のコラーゲン抽出法とそのAMS法による ^{14}C 年代測定. 名古屋大学古川総合研究資料館報告, 6, 45-54.
- DeNiro, M. J. and Epstein, S. (1980) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45, 341-351.
- Hare, P. E. and von Endt, D. (1990) Variable preservation of the organic matter in fossil bone. *Annual Report of Director of the Geophysical Laboratory, Carnegie Institute, Washington, 1989-1990, Geophysical Laboratory, Washington D.C.*, 115-118.
- 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, 炭素同位体比測定の試み. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告, VIII, 247-253.
- 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・大塚裕之・奥野 充・太田友子 (1996) 東シナ海の大陸棚および琉球弧の海底から採取された哺乳類化石の加速器質量分析法による ^{14}C 年代測定. *地学雑誌*, 105, 306-316.
- 沢田 健・有田陽子・中村俊夫・秋山雅彦・亀井節夫・中井信之 (1992) 加速器質量分析計を用いた ^{14}C 年代測定による野尻湖層の編年. *地球科学*, 46, 133-142.
- 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 treatment with XAD-2 adsorption resin

Masayo MINAMI

JSPS Research Fellow (Dating and Materials Research Center, Nagoya University)

Humic and fulvic acids are predominant source of error in ^{14}C and stable isotope analysis on collagen of fossil bone. XAD-2 resin is considered a good material to separate quantitatively polar amino acids from less polar fulvic and humic acids. To evaluate if XAD-2 treatment affects carbon and nitrogen isotope values, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were measured on collagens, decalcified collagens, hydrolyzed collagens and XAD-2-treated collagen hydrolysates from modern bovine achilles heel tendons made of Sigma Chemical Company and Nacalai tesque Company, and also measured on amino acids and XAD-2-treated amino acids.

There was 1.0‰ difference in $\delta^{13}\text{C}$ and 0.0~+0.2‰ variation in $\delta^{15}\text{N}$ between hydrolyzed collagen and XAD-treated collagen hydrolysates from achilles tendon collagen. The carbon isotope fractionation is larger than +0.3‰ by Stafford et al. (1988). The $\delta^{13}\text{C}$ values of four collagen fractions: collagen, decalcified collagen, hydrolyzed collagen and XAD-treated collagen hydrolysate, became progressively more positive as purification proceeded. The $\delta^{15}\text{N}$ values of the four fractions hardly varied with the sequential purification for Sigma collagen, but varied by 0.7‰ for Nacalai collagen.

There was no difference in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values by XAD-2 treatment on amino acid standards except for $\delta^{15}\text{N}$ on asparagic and glutamic acids. Therefore, the isotope fractionation on collagen can not be due to total isotope variation of individual amino acids.

When collagen is decalcified with various concentrations of 0.4N, 0.6N, 0.8N, 1.0N and 1.2N HCl, the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of decalcified collagen tend to be larger as higher concentration. We should evaluate if the variations in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ on the modern collagen standards are due to combined errors from pretreatment method or changes in amino acid composition.