

化石骨から抽出したアミノ酸の ^{14}C 年代とラセミ化反応

南 雅代¹⁾・村中泰史¹⁾・中村俊夫²⁾

1) 名古屋大学大学院環境学研究科

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

TEL: 052-789-3030 FAX: 052-789-3033

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

2) 名古屋大学年代測定総合研究センター

【はじめに】

アミノ酸 (α -アミノ酸) は、一般式 $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ であり、多くは縮合してペプチド結合を作り、ペプチドや蛋白質を形成する。このアミノ酸の R の部分に様々な置換基がくることによってアミノ酸の種類が決まる。アミノ酸は C 原子を中心とした立体構造、つまり H 原子、カルボキシル基、アミノ基、R 置換基がそれぞれ頂点となるような四面体構造であり、グリシン ($\text{R}=\text{H}$) 以外は不斉炭素原子を持つ。この不斉炭素原子の存在によって、アミノ酸には光学異性体が存在する。この光学異性体において、鏡像関係にあり、化学的な性質はほとんど変わらないが生理的作用や旋光性が異なるものをエナンチオマーという。また、それぞれの異性体を、旋光性の違いから右旋光のものを D 体、左旋光のものを L 体と言う。アミノ酸の四面体構造において、塩基によって H^+ が抜き取られ、この状態でアミノ酸全体としては平面構造となる。これを平面カルボアニオンという。この平面カルボアニオンに平面の両側から同じ確率で H^+ が再び付加する。このために、D 体と L 体は同じ確率で形成されて等量となる。これがラセミ化の反応機構である。



生物体内ではアミノ酸はほとんどが L 体である。生物が死後、埋没して様々な条件の変化などからラセミ化が起こる。つまりはじめは L 体がほとんどであるが、ラセミ化によって D 体が形成されはじめ、最終的には D 体と L 体の等量混合物であるラセミ体となり、全体として旋光性を失う。このラセミ化の速度がわかれば、その有機物を含む堆積物の年代がわかる。ラセミ化は可逆一次反応である。(1)式において、L-アミノ酸の消失速度は

$$-\text{dL}/\text{dt} = k_1\text{L} - k_2\text{D} \quad (\text{L, D は L-, D-アミノ酸のモル濃度})$$

と表わされる。埋没直後 ($t=0$) では $\text{D}_{t=0} \ll \text{L}_{t=0}$ なので

$$\text{L}_{t=0} = \text{L} + \text{D}$$

であり、よって

$$-\text{dL}/\text{dt} = (k_1 + k_2)\text{L} - k_2\text{L}_{t=0}$$

これを積分して

$$\ln((1+\text{D}/\text{L}) / K(1-\text{D}/\text{L})) = (1+K)k_2t + C \quad (2)$$

この(2)式において $K = k_2/k_1$ であり、C は積分定数 ($C = \ln((1+\text{D}/\text{L}) / K(1-\text{D}/\text{L}))_{t=0}$) である。

厳密な意味のラセミ化では $k_1 = k_2$ なので、(2)式は

$$\ln((1+D/L)/(1-D/L)) = 2kt + C \quad (k_1=k_2=k) \quad (3)$$

となる。(2), (3)式で速度定数が一定であるとすれば, 時間 t とアミノ酸の D/L 比の一次関数となり, アミノ酸の D/L 比を測定すれば時間が求まる。しかし実際のラセミ化はこの可逆一次反応に完全には従わない。一つの理由として考えられるのは, 速度定数が常に一定ではないということである。速度定数 k は

$$k = A \exp(-E/RT) \quad (4)$$

(A ; アレニウス定数, E ; 活性化エネルギー, R ; 気体定数, T ; 絶対温度)

である。この式から分かるように速度定数は温度の関数である。そのため, 温度変化によってラセミ化の反応速度にも影響がでる。また, ラセミ化はさらに複雑な影響(アミノ酸ポテンシャル配置, 加水分解, pH, イオン強度)を受け, 可逆一次反応から逸脱するようになる(Bada and Schroeder, 1972)。よって正確なラセミ化年代を測定する際は, 採集地, time range が近く, 温度履歴などが類似の予め年代の分かっている化石骨を用いてキャリブレーションを行わなくてはならない。他方, ラセミ化反応が温度の影響を受け易いのを利用して, その化石骨が経験してきた平均的な温度履歴を計算することができる。

本研究においては, 1960 年頃, 愛媛県西宇和郡三崎町名取梶谷鼻沖で採取され, 永く同地の資料館に保管されていたナウマン象臼歯化石を用いて, ラセミ化反応を利用した温度履歴の推定を行なった。ナウマン象は今から約 30~2 万年前まで日本や中国北部に生息していた。当時は氷河期であり, 現在よりも 10℃位気温が低くまた海水面が低かったため, 現在瀬戸内海であるところも陸地であった。岡山県牛窓沖の黄島貝塚と黒島貝塚では半淡水産の貝の層の上に海水産の貝の層が乗っており, その境界の貝殻の ^{14}C 年代が約 8,000 年であることから, 瀬戸内海に海水が流れ込んできたのは約 8,000 年前といわれている(牛窓町史, 1997)。ナウマン象臼歯化石は死後, 堆積物中に埋没し, さらに約 8,000 年前に瀬戸内海の海底に沈んだと考えられる。この臼歯化石から抽出したゼラチンコラーゲンを加水分解し, XAD-2 樹脂処理を行った“純化されたアミノ酸集合体成分”に対しては, 放射性炭素 (^{14}C) 年代が $43,870 \pm 450$ BP と報告されている(武藤, 2001)。“純化されたアミノ酸集合体成分”を誘導体化し, ガスクロマトグラフィーによってラセミ化の割合を測定することにより, ナウマン象臼歯化石が経験してきた平均温度履歴を計算することを目的とする。

【実験方法】

試料をアミノ酸にして 1mmol 程度になるようにリアクティブアルに取り, 減圧下で凍結乾燥(フリーズドライ)を行う。減圧を開始した直後, 急に試料が突沸する場合に備えて, リアクティブアルの口はポリシーラーを小さく切ったもので覆い, 針のようなもので数ヶ所穴を開けておいた。試料が乾固した後, イソプロパノールと塩化アセチルを 3.6 : 1.4 (v/v) で混合して作成したエステル化試薬を 1ml リアクティブアルに取り, リアクティブアルの蓋をきつく締め, ブロックヒーターで 100℃で 1 時間加熱する。リアクティブアルを冷ましてから, 試料を窒素ガスで柔らかく乾燥させる。その後トリフルオロ酢酸とジクロロメタンを 1 : 1 (v/v) で混合して作成したアセチル化試薬を 1ml 加え蓋をきつく締め, ブロックヒーターで 100℃で 30 分加熱する。エステル化試薬やアセチル化試薬は作成過程で発

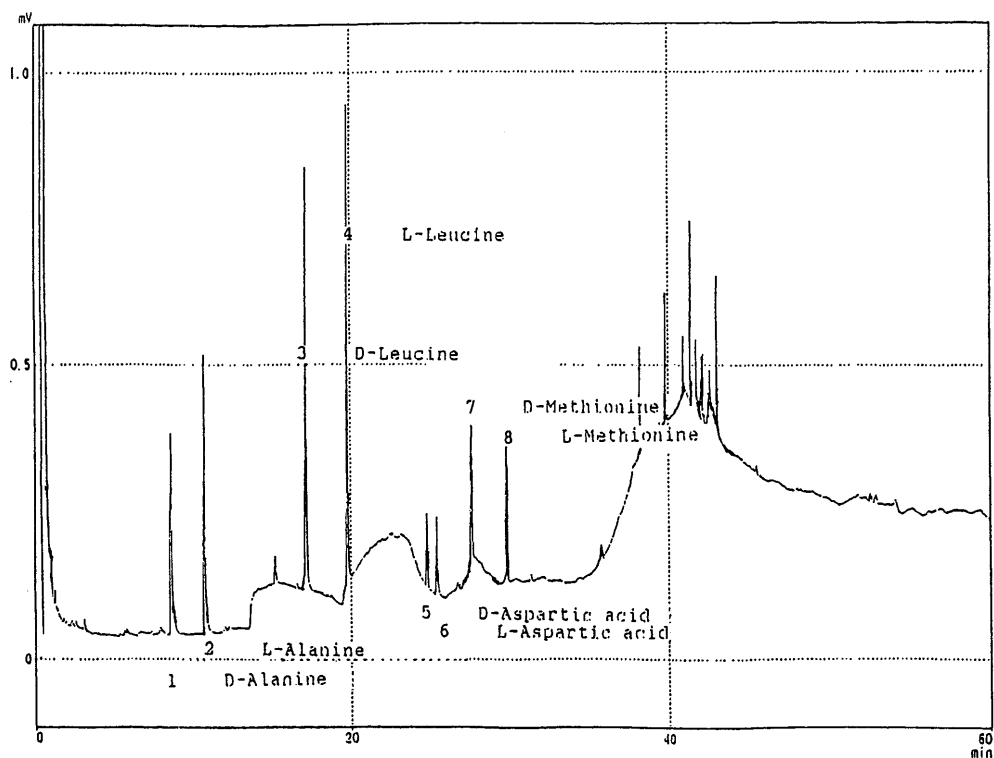


Figure 1 Chromatogram for the test mixture attached to Capillary Column.
This was measured by gaschromatography in this laboratory.

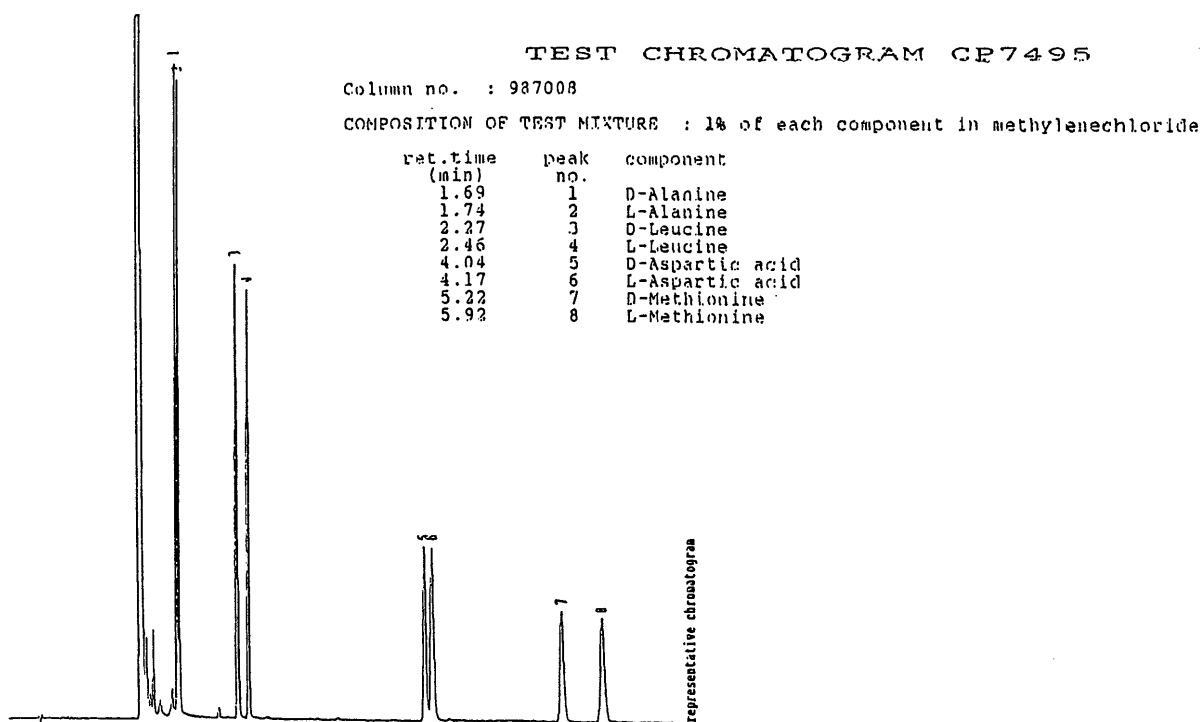


Figure 2 Appended test chromatogram to Capillary Column.

熱するため、イソプロパノールやジクロロメタンを先にビーカーに入れ、周囲を氷で冷やしながら塩化アセチルやトリフルオロ酢酸を少量づつ攪拌しながら加えていく。リアクティブアルが冷めた後、試料を窒素ガスで柔らかく乾燥させ、得られたアミノ酸誘導体を、ジクロロメタン 0.1ml に溶解し、ガスクロマトグラフ（島津製作所, GC-17A Ver. 2）に導入した。用いたカラムは、クロムパックキャピラリーカラム（CP-Chirasil-L-Val, 0.25mm×25M）である。

【結果と考察】

ガスクロマトグラフのアミノ酸の保持時間の決定

カラム付属のすでに誘導体化済みの DL-アラニン, DL-アスパラギン酸, DL-ロイシン, DL-メチオニンからなるテスト試料をメタノール 1ml に溶かし、ガスクロマトグラフィーで分析した。この結果 (Fig. 1) とカラム付属の図 (Fig. 2) を比較して各アミノ酸の保持時間を確認した。次にグリシン, DL-アラニン, DL-アスパラギン酸, DL-グルタミン酸, DL-スレオニン, DL-セリン試薬をそれぞれ誘導体化し、ガスクロマトグラフ分析したところ, DL-グルタミン酸, DL-スレオニンのピークは確認できたが, その他のアミノ酸はブロードなピークがでてしまった。これはリアクティブアルの蓋の密閉性が悪く, エステル化, アセチル化作業での加熱時にエステル化試薬, アセチル化試薬がかなり揮発してしまい, 誘導体化が不十分であった事が原因であった。密閉性の高い蓋を購入し, きつく口を締めて使用し, アセチル化試薬の量を増やしたところ, 十分誘導体化できるようになった。これにより DL-アラニン, DL-アスパラギン酸のピークが確認できた。

ナウマン象臼歯化石のアミノ酸集合体成分の D/L 比

宇和海の海底から採取されたナウマン象臼歯化石の“純化されたアミノ酸集合体成分”を誘導体化し、ガスクロマトグラフィーで分析するとアスパラギン酸の D/L 比は 0.128 であった (Fig. 3)。この D/L 比と, すでに“純化されたアミノ酸集合体成分”に対して得られている ^{14}C 年代 ($43,870 \pm 450 \text{ BP}$) を

$$\ln((1+D/L)/(1-D/L)) - 0.14 = 2k_{\text{asp}}t$$

(Masters and Bada, 1978 ; Bada et al., 1979) の式に代入し, アスパラギン酸エナンチオマーの速度定数を計算することができる。

$$\begin{aligned} k_{\text{asp}} &= (\ln((1+D/L)/(1-D/L)) - 0.14) / 2t \\ &= (1.336 \pm 0.014) \times 10^{-6} \end{aligned}$$

この k_{asp} を

$$\ln((8 \times 10^{-4}) / k_{\text{asp}}) = ((33.4 \times 10^3) / 1.987) (310 - T) / 310T$$

に代入すれば平均温度履歴を計算できる (Bada et al., 1979)。計算の結果, $T = 277.3 \pm 0.1 \text{ (K)}$ となり, ナウマン象臼歯化石は平均温度履歴 4.1°C の状況で 44,000 年の時を過ごしたということが分かった。瀬戸内海に海水が流れ込んできたのは約 8,000 年前といわれているため, この時を境に臼歯化石の環境は変化している。約 4 万年前に死亡したナウマン象の臼歯は約 1 万年前までの氷河期の中, 陸地の堆積物中に埋没していた。氷河期は現在よりも 10°C 位気温が低かったといわれており, 臼歯化石は 4.1°C 以上ではあるがそれほど高くない温度環

境にあったと予想できる。また、海底に沈んだ後は 0～5℃位の温度環境であったと考えられる。陸地と海底では pH など異なるため、アスパラギン酸のラセミ化の反応速度を温度だけの関数と仮定して議論を進めることは不適當かもしれないが、4℃というナウマン象臼歯化石の平均温度履歴は大体妥當な値であると考えられる。

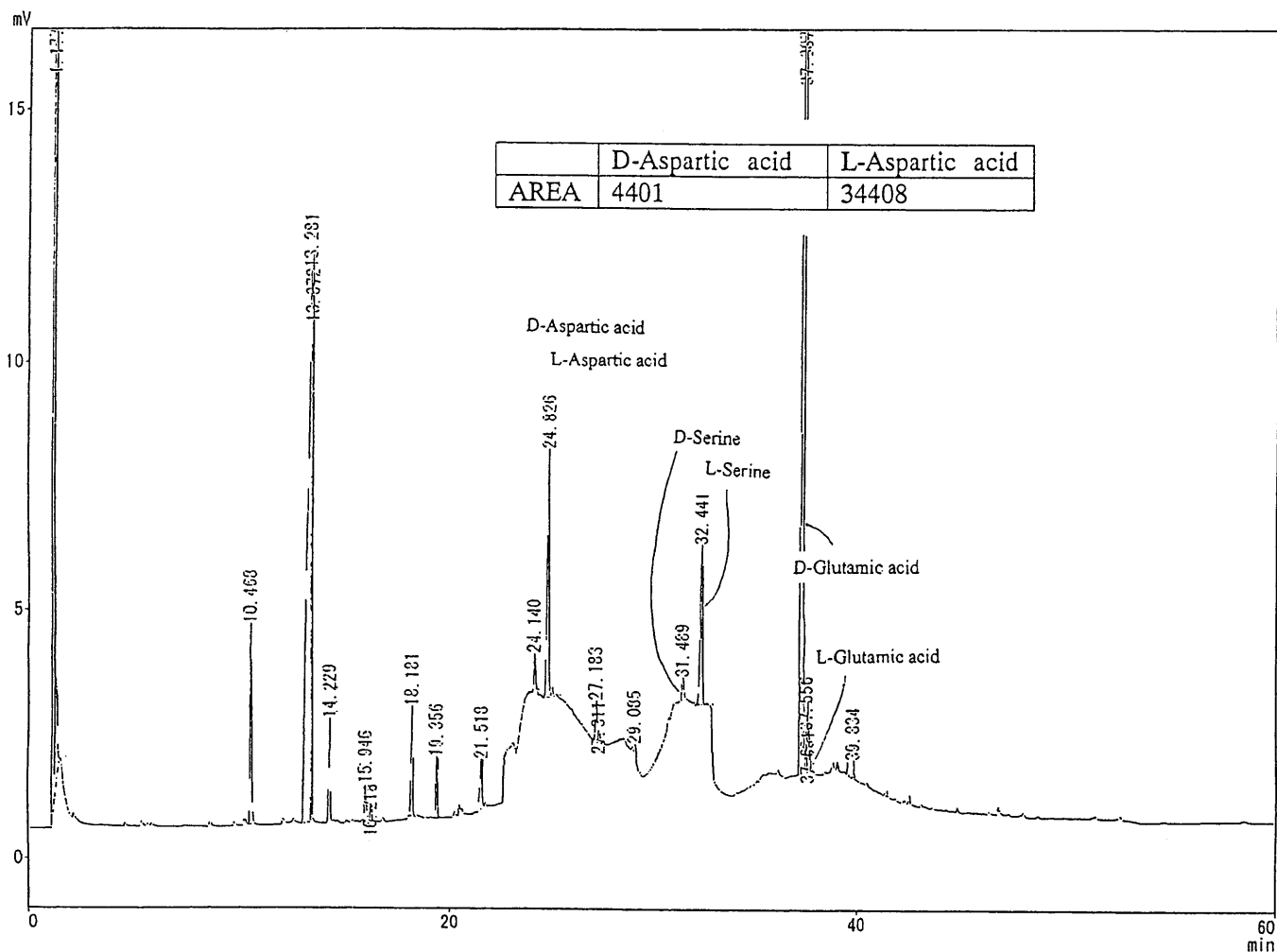


Figure 3 Chromatogram for a Naumann's elephant molar fossil.

【まとめ】

宇和海の海底から採取されたナウマン象臼歯化石のアミノ酸のラセミ化率を測定した。臼歯化石からゼラチンコラーゲンを抽出し、加水分解後 XAD-2 樹脂処理をして純化したアミノ酸集合体成分を誘導体化し、ガスクロマトグラフィーによりアスパラギン酸の D/L 比を測定したところ 0.128 という値が得られた。この D/L 比と武藤 (2001) によって得られている ^{14}C 年代 ($43,870 \pm 450$ BP) から、4.1℃という平均温度履歴が算出された。約 4 万年前は氷河期であったために、現在よりも海水面が低く、この試料の採取地である瀬戸内海は陸地であり、ナウマン象などが生育していた。化石骨が陸地の堆積物中に存在していた間は 4.1℃以上の温度環境にあったと予想できる。また海底の温度は 0～5℃位と考えられ、ナウマン象臼歯化石から得られた 4.1℃という平均温度履歴は、大體妥當であると考えられる。

【謝辞】

名古屋大学大学院環境学研究科の三村耕一博士には、アミノ酸の誘導体化手法ならびにガスクロマトグラフィーでの測定において多大なる御助言，御尽力を頂きました。愛媛県西宇和郡保内町教育委員会の宮本雅三氏には試料を提供していただきました。記して謝意を表します。なお。本研究の実施に際し，住友財団 2001 年度環境研究助成金“化石骨から抽出した無機および有機成分分析に基づく古環境復元（代表者：南 雅代）”を使用しました。

引用文献

- Bada, J.L. and Schroeder, R.A. (1972) Racemization of isoleucine in marine sediments: Kinetics and mechanics. *Earth. Planet. Sci. Lett.*, **15**, 1-11.
- Bada, J.L., Masters, P.M., Hoopes, E. and Darling, D. (1979) The dating of fossil bones using amino acid racemization. in: *Radiocarbon Dating*, Berger, R. and Suess, H.E. eds. (University of California Press, Berkeley and Los Angeles, Calif.), 740-756.
- Bada, J.L. (1981) Racemization of amino acids in fossil bones and teeth from the Olduvai Gorge region, Tanzania, East Africa *Earth and Planetary Science Letters*, **55**, 292-298.
- Masters, P.M. and Bada, J.L. (1978) Amino acid racemization dating of bone and shell. *ACS Adv. Chem. Ser.*, 171.
- 武藤宏男 (2001) 加速器質量分析計による化石骨の C-14 年代測定－試料前処理法の検討－.
名古屋大学人間情報学研究科修士論文
- 牛窓町史 (1997) 牛窓町史編纂委員会編集，資料編，考古・古代・近世.

Radiocarbon age and racemization reaction of amino acids extracted from a molar fossil

Masayo MINAMI¹⁾, Yasushi MURANAKA¹⁾ and Toshio NAKAMURA²⁾

1) Department of Earth and Environmental Sciences, Graduate School of Environmental Studies, Nagoya University, Furo-cho, chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

2) Center for Chronological Research, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

The XAD-2 treated collagen-hydrolysate of a Naumann's elephant molar fossil collected from the bottom of the Uwa Sea was analyzed with the gaschromatography. The ratio of D/L Aspartic acid is 0.128. Substituting the D/L Aspartic acid ratio and the radiocarbon age of 43,870±450 BP (Muto, 2001) for "D/L" and "t", respectively, into the following equation :

$$\ln((1+D/L)/(1-D/L)) - 0.14 = 2k_{asp}t$$

where k_{asp} is the rate constant of Aspartic acid enantiomer, and t is the time after the start of the racemization reaction, we have $(1.34 \pm 0.01) \times 10^{-6}$ for k_{asp} .

Futhermore, substituting the value of k_{asp} into the equation :

$$\ln((8 \times 10^{-4}) / k_{asp}) = ((33.4 \times 10^3) / 1.987) (310 - T) / (T \times 310) \quad (10)$$

where T is the average temperature (K) of the fossil since deposition, yields T of 277.3±0.1 K (4.1±0.1°C).

The age between 44,000 and 10,000 years ago was a glacial period. The Seto Inland Sea was a land before 10,000 years, and sea water has flowed into the Seto Inland Sea since 8,000 years ago. The surrounding temperature of the molar fossil on land could be over 4.1°C, and water temperature of the bottom of the sea is assumed to be 0~5°C. Therefore, the average temperature of 4.1°C for the molar fossil could be true.