

東シベリアマンモス臼歯化石のアミノ酸のラセミ化と ^{14}C 年代南 雅代¹⁾・竹山雅美²⁾・中村俊夫³⁾

1) 名古屋大学大学院環境学研究科地球環境科学専攻

〒464-8602 名古屋市千種区不老町 TEL: 052-789-3030

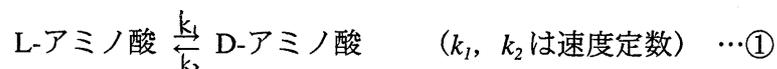
e-mail: minami@eps.nagoya-u.ac.jp

2) 名古屋大学理学部地球惑星科学科

3) 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, ペプチドやタンパク質を形成する。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 (R=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 (D 型, L 型) が存在する。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, 平面カルボアニオンが生成する。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 型と L 型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。



生物体中ではアミノ酸はほとんどが L-アミノ酸として存在する。しかし生物の死後, 長い時間をかけてゆっくりとラセミ化が進み, L-アミノ酸は D-アミノ酸へと変化していく。ラセミ化速度はアミノ酸の種類によって異なり, 例えば, アスパラギン酸のラセミ化の半減期は 25°C で 3,500 年 (Bada and Shou, 1980) であり, 他のアミノ酸に比べて短い半減期を示す。ラセミ化は可逆一次反応である。式①において, L アミノ酸の消失速度は

$$-\frac{dL}{dt} = k_1L - k_2D \quad (L, D \text{ はそれぞれのモル濃度}) \quad \dots \textcircled{2}$$

と表すことができ, 埋没直後 ($t=0$) では $D_{t=0} \ll L_{t=0}$ なので

$$L_{t=0} \cong L + D \quad \dots \textcircled{3}$$

したがって,

$$-\frac{dL}{dt} = (k_1 + k_2)L - k_2L_{t=0} \quad \dots \textcircled{4}$$

となつて, ④式を積分して

$$\ln \left[\frac{1 + \left(\frac{D}{L}\right)}{1 - K \left(\frac{D}{L}\right)} \right] = (1 + K) k_2 t + C \quad \dots \textcircled{5}$$

の関係式が得られる。

⑤式において、 $K = k_2/k_1$ であり、積分定数 $C = \ln \left[\frac{1 + (D/L)}{1 - K(D/L)} \right]_{t=0}$ と表せる。厳密な意味で

のラセミ化は $k_1 = k_2$ なので、⑤式は

$$\ln \left[\frac{1 + (D/L)}{1 - (D/L)} \right] = 2kt + C \quad \dots \textcircled{6}$$

となる。ここで、 $k_1 = k_2 = k$ である。式⑤、⑥で速度定数が一定であるとすれば、これは時間 t とアミノ酸の D/L 比の一次関数である。ここでアレニウスの式より速度定数 k は

$$k = A \exp \left(-E / RT \right) \quad \dots \textcircled{7}$$

と表される。 A はアレニウス定数、 E は活性化エネルギー、 R は気体定数、 T は絶対温度である。このように、速度定数は温度の関数であり、年代の求められている化石の D/L 比を測定することで、化石の経てきた平均的な温度履歴を求めることができる。たとえば、Schroeder and Bada (1979) は洞穴に保存されていた化石から、最終氷期の気温低下を 4°C と定めた。しかし、ラセミ化の反応速度は温度以外にも、タンパク質やペプチド中での結合位置、保存の pH 条件、水の存在、イオン強度などさまざまな条件の影響を受け、可逆一次反応から逸脱するようになる (Bada and Schroeder, 1972)。

南ほか (2003) は、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”のアスパラギン酸の D/L 比を測定し、この D/L 比と ^{14}C 年代値から、平均温度履歴 4.1°C を求めた。ナウマン象臼歯化石は約 44,000 年前に死後、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。つまり、この臼歯化石は約 8,000 年前を境に堆積環境が変化しており、ラセミ化速度も変化していると考えられる。そこで、本研究においては、堆積環境に大きな変化がないと考えられる化石について、 ^{14}C 法により年代を求めるとともに、アスパラギン酸の D/L 比を測定し、ラセミ化による温度履歴の推定がどの程度可能かについて考察を行う。

【試料】

試料は東シベリアのマンモスの臼歯化石および栗津湖底遺跡の獣類骨片を用いた。マンモス臼歯化石は、東シベリアのチクシから東北東約 25m に位置するブイコフスキー半島の北東岸 (北緯 $71^\circ 46'$ 東経 $129^\circ 30'$) で採取された (Fig. 1)。この地域では、円柱状の凍結凍土とその周辺を取り囲む巨大な地下氷からなるアイスコンプレックスが観察できる。試料は深さ 21.3m の地点の凍結した泥炭層中から発見された。この臼歯化石に対しては $34,250 \pm 820$ BP、臼歯化石周囲の泥炭については 80 ± 240 BP、深さ 24.7m の泥炭については $32,850 \pm 1,030$ BP の ^{14}C 年代が長岡ほか (1994) によって求められているが、この値はタンデトロン第 I 号機によって測定されたものであり、今回、改めて、タンデトロン第 II 号機での測定も行った。

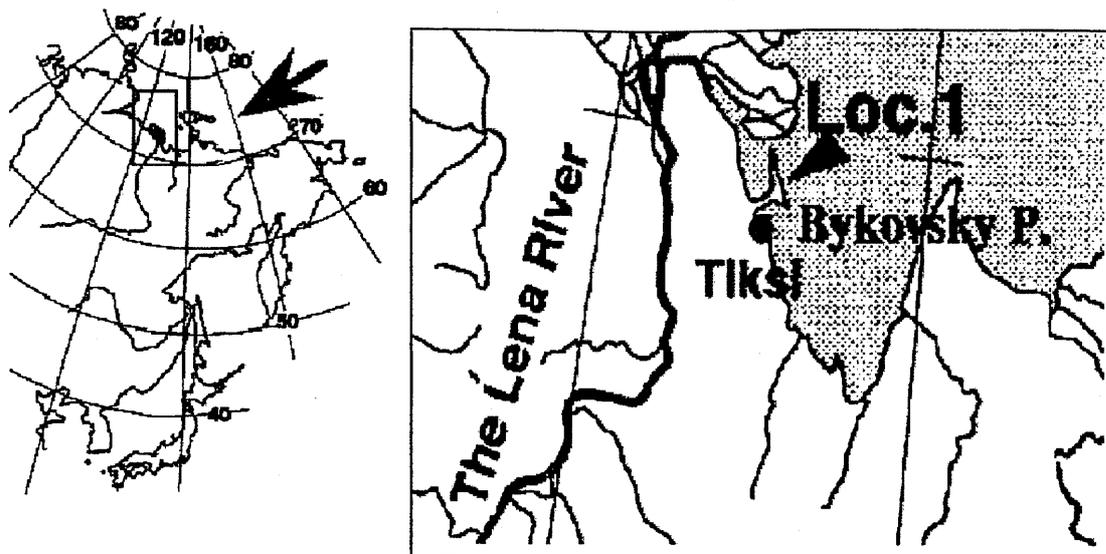


Fig. 1 Sampling point of a Mammoth molar fossil

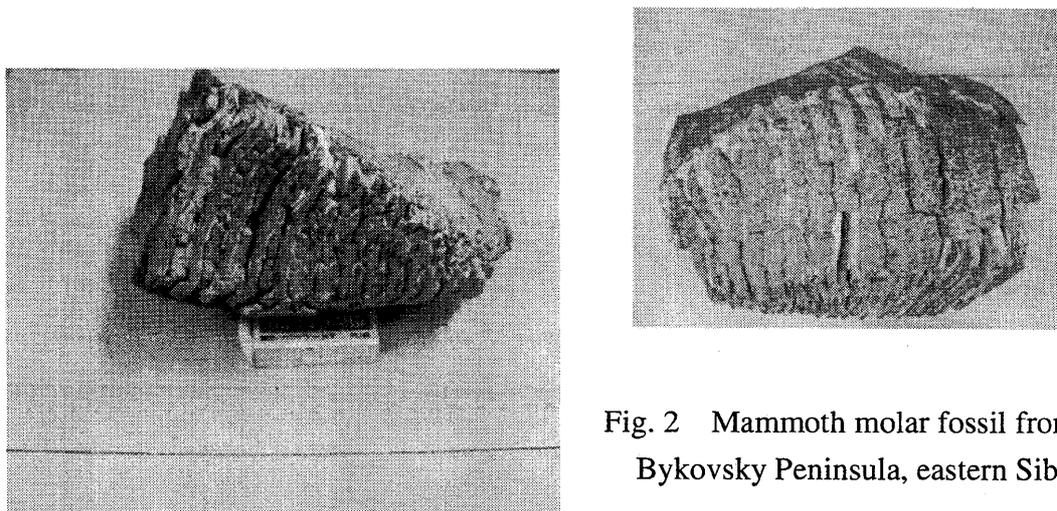


Fig. 2 Mammoth molar fossil from Bykovsky Peninsula, eastern Siberia

琵琶湖南湖の瀬田川河口に位置する栗津湖底遺跡は、水面 2~3mの湖底に沈んだ縄文貝塚である。第 3 貝塚は、最上層から最下層まで大きく 9 層に分けられている。発掘により出土した破片数は、イノシシ、スッポン、ニホンジカが大部分を占め、この 3 種の組成は層によらずほぼ一定と報告されている。AWA-8, 10, 11, 12 の骨試料は、それぞれ第 II, V, VI, VII 層から採取されたものでイノシシ、スッポン、ニホンジカなどの獣骨片のいずれか、またはその混合と考えられる。これらの獣類骨片の ^{14}C 年代は、4,500 BP と求められている (Minami and Nakamura, 2000)。

その他、加水分解によるラセミ化変化を見積もるために、現生の牛アキレス腱のコラーゲン試薬 (シグマおよびナカライテスク製)、L-アスパラギン試薬の D/L アスパラギン酸比も求めた。

【実験方法】

マンモス臼歯化石は、エナメル質・象牙質・セメント質の3つの硬組織と歯根部に分離し、それぞれの部分の ^{14}C 年代および D/L アスパラギン酸比を測定した。 ^{14}C 年代はゼラチンコラーゲンを抽出する方法と、吸着ポリマーである XAD 樹脂を用いる方法 (Stafford et al., 1988) の 2 方法を用いた。コラーゲン分子は骨の有機成分の 80~90% を占め、分子量約 10 万の 3 本のポリペプチド鎖 ($\alpha 1$ 鎖 2 本, $\alpha 2$ 鎖 1 本) がお互いに絡み合った複合 3 重螺旋構造をしており、弱酸性条件下で加熱するとゼラチンコラーゲンに変性する。ゼラチン抽出法は、フミン酸が 90℃ の弱酸性水溶液に不溶であることを利用して、骨本来のコラーゲンを抽出する方法である。また、XAD 樹脂法は、加水分解により化石骨から骨の本質成分であるアミノ酸を抽出し、XAD 樹脂という吸着ポリマーを用いてフミン物質を除去する方法である。

獣類骨片については、D/L アスパラギン酸比のみの測定を行った。

1. 洗浄および粉碎

ゼラチンコラーゲン法, XAD 処理法とも、試料は蒸留水中で超音波洗浄し、骨表面の不純物を除去した後、0.2M NaOH 中で超音波洗浄して骨表面の脂質、フミン酸を除去した。これを凍結乾燥した後、ステンレス乳鉢により粉碎した。

2. 脱灰

骨の無機成分であるハイドロキシアパタイトおよび炭酸塩を除去するため、粉末試料約 2g をセルロースチューブに入れて両端をクリップで留め、0.6M HCl 約 500ml 中に浸し、マグネチックスターラーで攪拌しながら、4℃ で 16 時間、脱灰を行った。この間、発泡の状況に合わせて 0.6M HCl 水溶液の交換を行った。蒸留水により中性化した後、遠心分離 (2,000rpm, 20 分) により、上澄みの可溶性コラーゲン (Solution Collagen: 以下 SC) と、コラーゲン分子の断片化である酸不溶成分 (Decalcified Bone: 以下 DB 成分) を分離し、それぞれ凍結乾燥した。

3. ゼラチンコラーゲン抽出法

得られた DB 成分約 200mg に、0.1M NaOH 水溶液約 25ml を加え、4℃ で 3 時間アルカリ処理を行い、汚染物質であるフミン酸およびフルボ酸を除去した。蒸留水と 0.6M HCl 水溶液で繰り返し中性化した後、遠心分離により残渣 (Alkali-treated Decalcified Bone fraction: 以下 A-DB) を凍結乾燥した。

A-DB 約 100mg を 0.01M HCl 水溶液 (pH 3) にて溶解したものを、アルミニウムブロックヒーターで 90℃, 16 時間加熱しゼラチン化を行う。この時、試料の酸化を防ぐため、試料を入れたスクリーキャップ付試験管内を窒素ガスで満たした。反応後吸引ろ過し、不純物である沈殿と上澄みを分け、上澄みを凍結乾燥してゼラチンコラーゲン (Gelatin Collagen: 以下 GC) 得た。

4. XAD-2 樹脂処理法 (加水分解および XAD-2 樹脂によるカラムクロマトグラフィー)

DB 成分約 200mg に 6M HCl 約 3ml を加え、アルミニウムブロックヒーターで 110℃, 16 時間反応させ加水分解を行った。吸引ろ過により不純物である沈殿を除き、アミノ酸を抽出した。カラムに加水分解物を通して 6M HCl 水溶液でアミノ酸集合体を溶出させ、ロータリーエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥により、XAD-2 樹脂処理加水分解物 (XAD-2 resin treated

Hydrolysate : 以下 XAD) を得た。

5. ^{14}C 年代および $\delta^{13}\text{C}$ 測定

前処理によって得られた試料約 15mg を, 約 800mg の線状酸化銅とともに直径 6mm, 長さ 5cm のバイコール管に入れ, 石英綿で軽く蓋をしてから線状銀線を加えた。これを直径 9mm, 長さ 30cm のバイコール管に約 500mg の還元銅とともに入れ, 真空密閉した。約 2 時間 850°C で加熱し, 生じた気体を真空ラインで精製し CO_2 を得た。精製した CO_2 を, 鉄触媒を入れたバイコール管に水素とともに封じ, 650°C で 6 時間加熱し, 鉄-水素還元法によりグラファイトを作成した。 ^{14}C 年代測定は名古屋大学年代測定総合研究センターに設置されているタンデロン加速器質量分析計第 2 号機を用いて行った。また, 精製された CO_2 の一部を用いて, 気体用質量分析計 (MAT-252) により $\delta^{13}\text{C}$ 値の測定を行った。

6. C/N 比の測定

凍結乾燥した各有機成分約 2mg をすずのカップに封入し, サルファミドアミドを標準体として, FISONS instruments 社製 EA1108 元素分析計により, C と N の含有量を測定し, C/N 比を求めた。

7. ラセミ化測定

アミノ酸 10 nmol 程度をリアクティブバイアルに取り凍結乾燥したものに, エステル化試薬 (イソプロパノールと塩化アセチルの 3.6 : 1.4 混合試薬) を約 1.5ml 加え, ブロックヒーターで 100°C, 1 時間加熱し窒素ガスで乾燥させた。続いて, アセチル化試薬 (トリフルオロ酢酸とジクロロメタンの 1 : 1 混合試薬) を 0.5ml 加え, ブロックヒーターで 10 分間加熱し, 窒素ガスで柔らかく乾燥させた。これをジクロロメタンに溶解し, ガスクロマトグラフィーによりアスパラギン酸の D/L 比を求めた。ラセミ化には, XAD 成分と, GC 成分を加水分解したものを使用した。

【結果】

1. 東シベリアマンモス臼歯化石

Table 1 に, 東シベリアマンモス象臼歯化石の象牙質, セメント質, 歯根部について, 各有機成分の収率, CO_2 収率, C/N 比, $\delta^{13}\text{C}$ 値および ^{14}C 年代値を示した。いずれの部分のコラーゲン収率も 10% 以上あり, 保存状態が非常に良好であったことがわかる。エナメル質は DB 成分の収率が 0.004% と非常に低く, 前処理前の骨粉, および SC 成分について C/N 比を求めたのみで, CO_2 収率, $\delta^{13}\text{C}$ 値および ^{14}C 年代値については試料量不足のため未測定である。 ^{14}C 年代測定において, ^{14}C 年代濃度の標準体には NBS シュウ酸を用いた。 ^{14}C 年代値は西暦 1950 年からさかのぼった年数 BP で示し, より正確な ^{14}C 年代値を得るため, $\delta^{13}\text{C}$ 値を用いて炭素同位体分別の補正を行った。

C/N 比

Fig. 3 に前処理の各段階において, C/N 比がどのように変化しているか示した。エナメル質を除く硬組織及び歯根部の各成分の C/N 比はコラーゲンの示す一般的な値 3.2 ± 0.5 (Hare and von Endt, 1990) とほぼ一致した。土壌有機物の C/N 比は一般に 8 以上の高い値を示すことが多く, 前処理が進むにつれ C/N 比が減少しているのは, 外来有機物が除去され, より

Table 1 Collagen yields, CO₂ yields, C/N ratios, $\delta^{13}\text{C}$ values and ¹⁴C ages of some fractions of a Mammoth molar fossil from Bykovsky Peninsula, eastern Siberia.

		Collagen yield (%)	CO ₂ yield (%)	C/N ratio	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	¹⁴ C age (BP)	NUTA2
Dentin	GC 1		35.2	---	-20.5	36,010 ± 430	6441
	2		---	---	-20.5	35,440 ± 420	6442
	3	10.0	42.9	2.7	-20.5	36,440 ± 440	6443
	XAD		29.2	2.7	-20.3	35,080 ± 390	6444
Cement	GC 1		40.6	---	-21.0	37,300 ± 490	6433
	2	18.2	42.2	2.8	-21.2	37,920 ± 470	6435
	XAD 1		29.6	---	-20.7	35,540 ± 410	6434
	2		30.0	2.6	-20.9	34,470 ± 380	6436
Root	GC		24.8	2.8	-21.5	37,290 ± 480	6445
	XAD	13.0	41.2	2.6	-21.1	38,750 ± 540	6446
IC4	Molar					34,280 ± 820	NUTA-2236
IC5	Peat					32,880 ± 1,030	NUTA-2237

Root : The root of a Mammoth tooth

GC: Gelatin Collagen ; XAD: XAD-treated hydrolysate

IC4 and IC5 are a Mammoth molar fossil and a peat from Bykovsky, eastern Siberia.

The data are after Nagaoka et al. (1994).

Error of ¹⁴C age is one sigma.

純粋なコラーゲンが得られているためと考えられる。また、表面の不純物を除去しただけの前処理前の骨粉でも C/N 比が 3.0~3.3 とコラーゲンと同じ値を示しており、C/N 比からも、この試料の保存状態が良かったことがわかる。DB 成分のアルカリ処理で、C/N 比がわずかに大きくなる傾向が見られる。

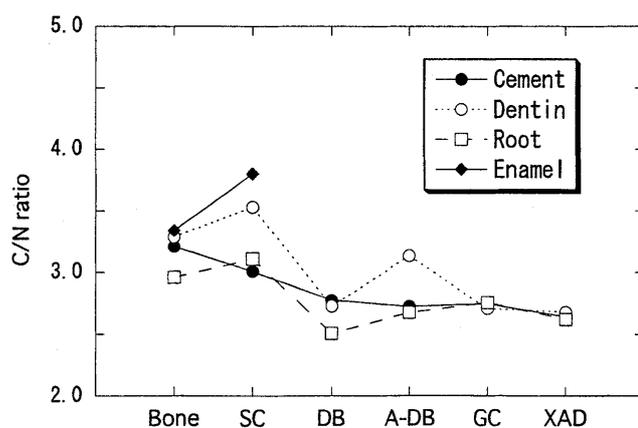


Fig. 3 C/N ratios of some fractions extracted from the molar fossil of the Siberian Mammoth.

SC: Solution Collagen (Acid-soluble fraction), DB: Decalcified Bone,

A-DB: Alkali-treated DB, GC: Gelatin Collagen, XAD: XAD-treated hydrolysate

$\delta^{13}\text{C}$ 値

動物の化石骨から抽出されるコラーゲンの炭素安定同位体比は、動物の摂取した食資源の同位体比を反映するとされる。本研究において、各有機成分の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、XAD 成分、GC 成分ともに、象牙質がやや高い値を示すものの、C3 植物を食する陸上草食動物の骨コラーゲンの示す $\delta^{13}\text{C}$ 値である -23~-21‰ (南川, 1993) とほぼ一致した (Fig. 4)。また、いずれの有機成分においても、XAD 成分が GC 成分よりやや高い値を示している。考えられる要因のひとつに、XAD-2 樹脂処理を行うためにコラーゲンを 6M HCl によって加水分解する際の同位体分別がある。塩酸処理を行うことによってコラーゲンのアミノ酸組成が変化し、 $\delta^{13}\text{C}$ の値に影響が出るとされる (南, 1999)。一般的にアルカリ処理操作によるコラーゲンのアミノ酸組成の変化はほとんどみられず、本研究においても XAD-2 樹脂処理の際に若干の同位体分別が起こったものと考えられる。一方、フミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値は -28~-24‰ とされ、アルカリ処理およびゼラチン化の各操作において、フミン物質が完全に除去されなかった可能性も考えられる。

臼歯においては、中心に象牙質があり、その周りにエナメル質が存在し、さらにセメント質が取り囲むような構造をしている。歯根部は、むき出しの状態では歯の根元に存在する。Fig. 4 より、歯根部、セメント質、象牙質と、歯の内部にいくにつれ、 $\delta^{13}\text{C}$ 値が高くなっていくのわかる。1) 歯の内部で炭素同位体分別が生じているのか、2) それぞれの部分でアミノ酸組成やアミノ酸結合状態が異なるために、化学処理による同位体分別の仕方が違ったのか、3) 歯の表面側のほうが外来炭素の影響を受けやすいため $\delta^{13}\text{C}$ 値が低くなっているのか、現段階では明らかなことは言えないが、もし 3) の場合、化学処理において化石から外来炭素が完全に除去されていないということになるため、1)か 2)の可能性が強い。

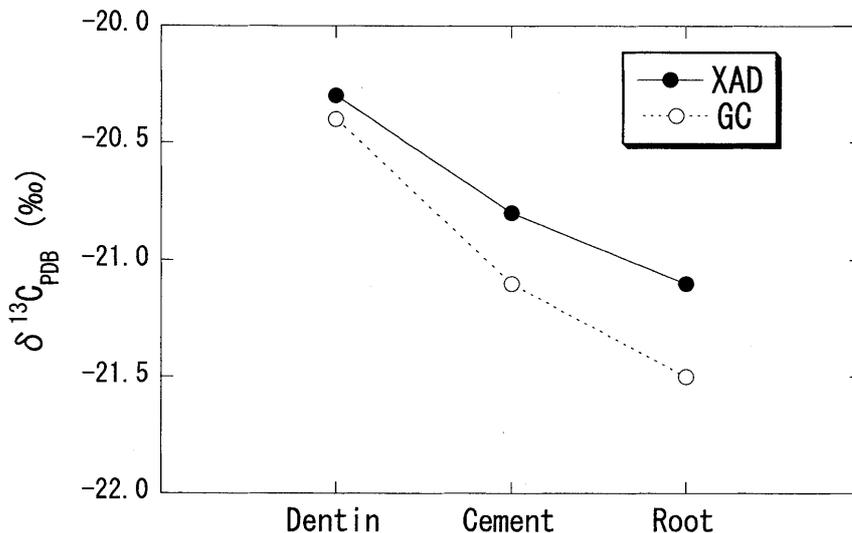


Fig. 4 $\delta^{13}\text{C}$ values of GC and XAD fractions for dentin, cement and root parts in the molar fossil of the Siberian Mammoth.

^{14}C 年代値

Fig. 5 にマンモス臼歯化石から抽出した各有機成分の ^{14}C 年代値を示す。長岡ほか (1994) によるマンモス臼歯化石の ^{14}C 年代値、および深度 24.7m 地点の泥炭の ^{14}C 年代値も同時に示した。長岡ほか (1994) の年代値はタンデトロン第 I 号機によって得られたもので、ブランク値に近いような古い試料の場合は、タンデトロン第 II 号機によって得られた値のほうが信頼性が高いと考えられる。第 I 号機で得られた年代は、第 II 号機で得られた年代より 1 割程度若い年代となっている。

マンモス象臼歯化石の GC 成分の ^{14}C 年代値は象牙質が 36,000 BP、セメント質と歯根部が 37,000 BP 前後となったのに対し、XAD 成分の ^{14}C 年代値は象牙質、セメント質が 35,000 BP 前後、歯根部が 38,750 BP となった。歯根部を除いて、XAD 成分は GC 成分より 1,000~2,000 年若い値を示している。歯根部の XAD 成分は、XAD 樹脂を通したアミノ酸集合体溶出液をエバポレーターによって濃縮している際、アスピレーターに使用している井戸水が逆流、混入した恐れがある。一般に、地下水の ^{14}C 年代は古く、数万年の年代を示すことが多い。もし 4 万年よりも古い ^{14}C 年代をもつ井戸水が混入したとすれば、そのために XAD 年代が古くなった可能性が考えられる。しかし、名古屋大学で使用されている井戸水の ^{14}C 年代は 3,000 年位の ^{14}C 年代である可能性もあり (中村, 私信), 歯根部の XAD 成分に関しては、試料の再調製および ^{14}C 年代値の再測定, 井戸水の ^{14}C 年代値測定が必要である。

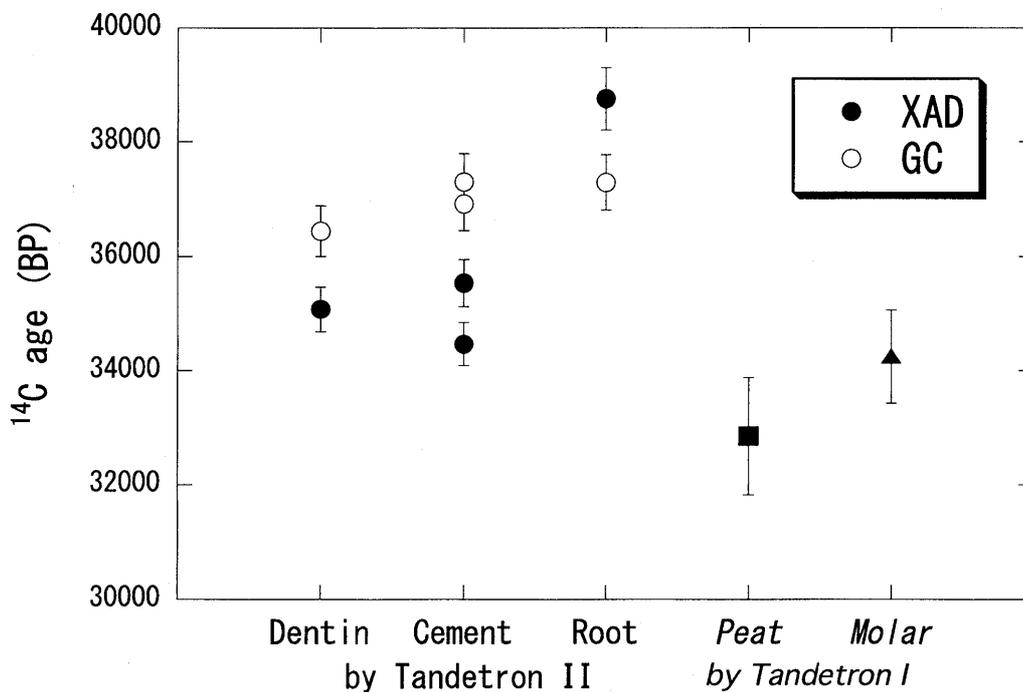


Fig. 5 ^{14}C ages of GC and XAD fractions for dentin, cement and root parts in the molar fossil of the Siberian Mammoth.

GC 成分と XAD 成分の ^{14}C 年代値に差が見られた原因として、永久凍土中の有機物など、外来有機物の ^{14}C 年代が骨本来のコラーゲンより古く、ゼラチン抽出処理においては外来有機物が十分に除去されずに残ったため、GC 成分の ^{14}C 年代値が実際より古くなった可能性が考えられる。しかし臼歯化石の周りの泥炭は 80 ± 240 BP、3.4m 以深の泥炭は $32,850 \pm 1,030$ BP と臼歯化石よりも若い年代を示している（長岡ほか, 1994）ので、古い ^{14}C 年代をもつ外来有機物には成り得ない。古い ^{14}C 年代をもつ外来有機物としては、凍土中の氷が考えられる。臼歯の一番内側に存在する象牙質の GC 成分がそのまわりのセメント質、歯根部の GC 成分より年代が若いということから、氷中の古い炭素が化石に浸透し、凍土に接している臼歯の外側に古い炭素の影響がでていとも考えられる。

GC 成分と XAD 成分の ^{14}C 年代値に差が見られたもう 1 つ考えられる原因として、臼歯化石から XAD 成分を抽出する化学処理の過程での現代炭素の汚染がある。XAD-2 樹脂処理法は一般にコラーゲン収率が 1% 以下の保存状態良好でない化石骨に対して有効であり、保存状態の良好な骨化石に対してはゼラチン抽出法との差はほとんどないと考えられる（南・中村, 2000）。したがって、今回得られた差は、若返った XAD 成分の年代によるものとも考えられる。GC 成分の示す ^{14}C 年代値が真の値と仮定して XAD 成分に混入している現代炭素の量を見積もると約 0.3% となる。

ラセミ化

Table 2 に、現生の牛アキレス腱コラーゲン L-アスパラギン試薬の D/L 比を示す。Bada and Protsch (1973) は、6M HCl で 24 時間加水分解した時のアスパラギン酸の D/L 比の変化を 0.07 と報告している。本研究においては、シグマケミカル製のコラーゲンは 0.070、ナカライテスク製のコラーゲンは 0.077 となり、ほぼ Table 2 D/L Aspartic acid ratio of L-Aspartic acid and collagen standards

Bada and Protsch (1973) の結果と一致した。L-アスパラギン酸の D/L 比は 0.011 とコラーゲンよりも小さくなった。ペプチドやタンパク質中のアミノ酸は結合した状態で存在し、一般にペプチド結合がつくられると、 α -水素イオンの引き抜きが容易になり、ラセミ化速度が大きくなるといわれている

		D/L ratio
L-aspartic acid	no-treated	0.000
	Hydrolysis	0.011
Collagen standard	Sigma	0.070
	Nakali	0.077

（秋山・下山, 1988）。L-アスパラギン酸試薬はペプチド結合をもたないために、コラーゲン試薬と同じ塩酸処理の条件でもラセミ化の進行速度が小さかったと考えられる。化石中においては、アミノ酸は結合した状態で存在するので、本研究においては、Bada and Protsch

(1973) と同様、加水分解した際のアスパラギン酸の D/L 比の変化を 0.07, すなわち $\left(\frac{D}{L}\right)_{t=0} = 0.07$ とする。したがって、式⑥は次のように表される。

$$\ln \left[\frac{1 + \left(\frac{D}{L}\right)}{1 - \left(\frac{D}{L}\right)} \right] - 0.14 = 2kt \quad \dots \textcircled{8}$$

Table 3 に東シベリアマンモス象臼歯化石の各有機成分の XAD および GC 成分のアスパラギン酸の D/L 比と、その D/L 比と Table 1 の ^{14}C 年代値を用いて計算した速度定数 k_{asp} 、平均履歴温度を示す。平均履歴温度は、速度定数よりアレニウスの式を使って求めた。人の歯は、年齢とともにエナメル質や象牙質のアスパラギン酸のラセミ化が進むことが知られている (Helfman and Bada, 1975)。哺乳類の体温である 37°C におけるアスパラギン酸の速度定数 k_{asp} の値は $8.1 \times 10^4 \text{yr}^{-1}$ と求められているため、式⑦は次のように表される。

$$\ln \left[\frac{k_{asp}(\text{tooth})}{k_{asp}(\text{fossil})} \right] = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_{calc}} - \frac{1}{T_{tooth}} \right) \quad \dots \textcircled{9}$$

ここで、 E_a : 33.4 kcal/mol (Bada, 1972), $k_{asp}(\text{tooth})$: $8.1 \times 10^4 \text{ yr}^{-1}$, $k_{asp}(\text{fossil})$: 試料のラセミ化速度定数, T_{tooth} : 310.15 K , T_{calc} : 試料が受けた平均履歴温度, R : $1.987 \text{ cal}/(\text{K} \cdot \text{mol})$ である。

マンモス象臼歯化石の各有機成分の XAD 成分の D/L 比は歯根部を除いて $0.07 \sim 0.08$ となり、 $\left(\frac{D}{L}\right)_{t=0}$ の値とほとんど変わらなかった。この臼歯化石は永久凍土の中で凍ったまま保存されていたことから、埋没中はラセミ化がほとんど進まなかったことがわかる。わずかに 0.07 よりも大きい傾向がみられるため、ラセミ化が進んでいると考え、平均履歴温度を計算した結果、マイナス数℃となった。一般に永久凍土の温度は $-35^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ であり、得られた平均温度は永久凍土の温度より高い。考えられる理由として、1) マンモス象は死後すぐに凍土に埋没したのではなく、死後何年か経ってから氷に覆われたため、氷に覆われるまでの間にラセミ化が進んだ、2) 凍土中から採集された後の温度環境の変化により、ラセミ化が進んだ、などの可能性が考えられる。

歯根部 XAD 成分の D/L 比は、 $\left(\frac{D}{L}\right)_{t=0} = 0.07$ よりも低い 0.057 という値となった。前述し

たように、アミノ酸の結合状態の違いによってラセミ化速度に違いがみられるため、歯根部は、象牙質、セメント質とは違うアミノ酸の結合組織をしており、加水分解の際の D/L 比変化の仕方が異なっていたということも考えられる。また、歯根部の XAD 成分は他の有機成分と比べて古い ^{14}C 年代値を示したが、もし、これが混入した井戸水の影響によるものならば、D/L 比にも影響が出ると考えられる。詳細な議論をするためには、アミノ酸の組成や結合状態、さらに井戸水の分析が必要である。

一方、GC 成分の D/L 比は、象牙質、セメント質、歯根部いずれにおいても、XAD 成分より約 0.01 高い値となった。ゼラチン抽出の際、 90°C の 0.01M HCl 水溶液中で 16 時間加熱を行っているため、この時にもラセミ化が進行したことにより、GC 成分は XAD 成分よりも高い D/L 比がでたものと考えられる。したがって、GC 成分における $\left(\frac{D}{L}\right)_{t=0}$ は、 0.07 よりも高いと考えられ、現生の牛アキレス腱コラーゲンを用いて、ゼラチン抽出、加水分解の過程における GC 成分の $\left(\frac{D}{L}\right)_{t=0}$ 値を求める必要がある。

Table 3 D/L Aspartic acid ratio, rate constant of Aspartic acid enantiomer for some fractions extracted from a Mammoth molar fossil from eastern Siberia and average temperature to which the sample has exposed

		D/L ratio	k_{asp}	Average temperature (°C)
Dentin	XAD	0.077	$(2.04 \pm 0.02) \times 10^{-7}$	-4.1 ± 0.1
	GC-H	0.088	---	---
Cementum	XAD	0.073	$(9.09 \pm 0.10) \times 10^{-8}$	-7.6 ± 0.1
	GC-H	0.082	---	---
Root	XAD	0.057	---	---
	GC-H	0.069	---	---

GC-H: Hydrolysate of Gelatin Collagen

2. 粟津湖底遺跡の獣類骨片

Table 4 に粟津湖底遺跡から採取された獣類骨片のアスパラギン酸の D/L 比と、その D/L 比と Minami and Nakamura (2000)の ^{14}C 年代値を用いて計算した速度定数 k_{asp} , 平均履歴温度を示す。いずれも XAD 成分について分析を行った。アスパラギン酸の D/L 比は、 $(D/L)_{t=0} = 0.07$

より高く、死後、埋没中にラセミ化が進んでいることがわかる。ラセミ化速度から平均履歴温度を求めると $12 \sim 14^\circ\text{C}$ となり、平均は 13.2°C となった。粟津湖底遺跡は縄文貝塚であり、縄文以後の土器、化石は見られないことから、短期間で湖底に沈んだといわれている。したがって、獣類骨片は死後ほどなくして湖底に沈んだと考えられ、示す平均履歴温度は湖底で埋没中に受けた平均温度と考えられる。粟津湖底遺跡は水面下 $2 \sim 3\text{m}$ の湖底に沈んでおり、琵琶湖の水深 3m における年平均水温は 2000 年で 17.1°C , 2001 年 16.7°C である (滋賀県教育委員会, 1997)。土壌中では、季節による温度の変化も少なく、土壌中の平均温度は、これらの年平均水温よりも低いと予想される。したがって、今回得られた温度は、大体妥当であると考えられる。

Table 4 D/L Aspartic acid ratio, the rate constant of Aspartic acid enantiomer for some animal bone fragments from Awazu archeological site, Siga and average temperature to which the samples have exposed

	D/L ratio	K_{asp}	average temperature (°C)
AWA-8	0.112	$(9.53 \pm 0.17) \times 10^{-6}$	13.5 ± 0.1
AWA-10	0.119	$(1.13 \pm 0.02) \times 10^{-5}$	14.4 ± 0.1
AWA-11	0.098	$(6.24 \pm 0.14) \times 10^{-6}$	11.5 ± 0.1
AWA-12	0.114	$(9.73 \pm 0.17) \times 10^{-6}$	13.6 ± 0.1

【まとめ】

東シベリアマンモス臼歯化石の ^{14}C 年代値は象牙質，セメント質，歯根部と部位の違いによって，また XAD 成分と GC 成分で 1000～2000 年の違いがみられたが，約 37,000 BP の年代を示すものと考えられる。マンモス臼歯化石の D/L アスパラギン酸比は歯根部を除いて現生のコラーゲン試薬の D/L 比とほとんど変わらず，ラセミ化が進んでいなかった。したがって，臼歯化石は約 37,000 年前に埋没してからラセミ化の進まない環境下にあったと考えることができる。これは臼歯化石が永久凍土中で発見された事実と矛盾しない結果である。臼歯化石の歯根部は ^{14}C 年代も D/L 比も象牙質，セメント質とはふるまいが異なっていた。

粟津湖底遺跡から採集した獣類骨片についてはラセミ化がみられ， 13.2°C という平均温度が求められた。これは貝塚遺跡が沈んでいた湖底の温度とほぼ一致した。獣類骨片が埋没し琵琶湖に沈んでから約 4,500 年の間に琵琶湖に大きな環境変動があったとは考えにくいいため，獣類骨片が堆積してから琵琶湖湖底に大きな温度変化はなかったと考えられる。

本研究ではラセミ化は温度のみに依存するものとして考えた。pH や無機物の存在により，またアミノ酸の結合状態，水の存在によりラセミ化速度は変わる。温度以外のラセミ化要因についても，研究が必要とされる。

【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。北海道大学低温科学研究所の福田正己教授には試料を提供していただき，試料に関する情報を提供していただきました。記して謝意を表します。

【引用文献】

- 秋山雅彦・下山 晃 (1988) アミノ酸のラセミ化による年代測定. *地質学論集*, 29, 129-142.
- Bada, J.L. (1972) Kinetics of racemization of amino acids as a function of pH. *J. Am Chem. Soc.*, 95, 1371-1373.
- Bada, J.L. and Schroeder, R.A. (1972) Racemization of isoleucine in calcareous marine sediments: Kinetics and mechanism, *Earth.Planet.Sci.Lett.*, 15, 1-11.
- Bada, J.L. and Protsch, R. (1973) Racemization reaction of aspartic acid and its use in dating fossil bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 1331-1334.
- 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 Inst. Wash, 1989-1990, Geophysical Laboratory, Washington D. C., 115-118.
- Helfman, P.M. and Bada, J.L. (1975) Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 2891-2894.
- Minami M. and Nakamura, T. (2000) AMS radiocarbon age for fossil bone by XAD-2 chromatography method. *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research*, B172, 462-468.
- 南 雅代・村中泰志・中村俊夫 (2003) 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. *名古屋大学加速器質量分析計業績報告書*, XIV, 201-207.
- 南 雅代・中村俊夫 (2000) XAD-2 樹脂処理法による化石骨の AMS ^{14}C 年代-ゼラチン抽出法との比較-. *第四紀研究*, 39, 547-557.
- 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書*, X, 235-242.
- 南川雅男 (1993) アイソトープ食性解析法. 日本第四紀学会編「第四紀試料分析法 2 研究対象別分析法」: 404-414.
- 長岡大輔・曾根敏雄・中村俊夫・福田正己・仲山智子・V. クニツキー (1994) 東シベリア, ブイコフスキー半島周辺の永久凍土の形成年代. *名古屋大学加速器質量分析計業績報告書*, V, 197-206.
- Schroeder, R.A. and Bada, J.L. (1976) A review of the geochemical applications of the amino acid racemization reaction. *Earth Science Rev.*, 12, 347-391.
- 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.

Amino acid racemization and radiocarbon age of a Mammoth molar fossil from eastern Siberia

Masayo MINAMI¹⁾, Masami TAKEYAMA¹⁾ and Toshio NAKAMURA³⁾

- 1) Department of Earth and Environmental Sciences, Graduate School of Environmental Studies, Nagoya University, Nagoya 464-8602, Japan
- 2) Department of Earth and Planetary Science, School of Science, Nagoya 464-8602, Japan
- 3) Center for Chronological Research, Nagoya University, Nagoya 464-8602, Japan

We measured D/L aspartic acid ratios and radiocarbon ages of a Mammoth molar fossil collected from Bykovsky Peninsula, eastern Siberia and animal bone fossils collected from the shell mound excavated at Awazu submarine archeological site, Shiga, Japan. Four parts of dentin, enamel, cement and root in the molar fossil were measured. The ¹⁴C ages of gelatin collagens are dated ~36,000 BP for the dentin and ~37,000 BP for the cement and root, while those of XAD-treated hydrolysates are dated ~35,000 BP for the dentin and cement and 38,750 BP for the root. The gelatins have 1000~2000 year older ages than the XAD-treated hydrolysates, except for the root part. It might be due to that the gelatins contain foreign organic carbon with older ¹⁴C age than the fossil, or that the XAD-treated hydrolysates are contaminated by modern carbon. The latter is possible, and the age of the Mammoth molar could be ~37,000 BP.

The D/L aspartic acid ratio of the molar fossil is low, and it suggests that amino acids in the Mammoth molar have not racemized since it was dead and buried. This result is well consistent with the fact that it was preserved in the permafrost. In animal bone fossils from Awazu submarine archeological site, amino acids racemization is observed and the average of D/L aspartic acid ratio is about 0.11. The average temperature, to which samples had exposed, is estimated to $13.2 \pm 1.1^\circ\text{C}$, using the D/L ratios and ¹⁴C age of 4,500 BP (Minami and Nakamura, 2000). Because it is hard to think that there was large environmental change at Lake Biwa during last 4,500 years after the samples were sank, the animal bone fossils had not experienced large environmental change about temperature since it was buried.

In this study, we suppose that the rate of amino acid racemization in a fossil depends on only temperature. However, it is also dependent on other environmental factors such as pH, existence of water and amino acid composition in a fossil. More study is needed to obtain reliable the average temperature.