

味の素食の文化センター研究成果概要報告書

<2021 年度研究助成>

考古資料に含まれる残存有機質情報の抽出による古食性と生活の復元

—残存 DNA を通した当時の生活様式の可視化—

大阪大学大学院薬学研究科・押鐘 浩之

2023 年 6 月 30 日

<2021 年度研究助成>

考古資料に含まれる残存有機質情報の抽出による古食性と生活の復元

押鐘 浩之

大阪大学大学院薬学研究科

【緒言】

昨今、考古資料に含まれる有機質、特に遺伝物質である DNA を手掛かりとした古代における人間を取り巻く環境や古代に生きた人間自身の可視化が大いに進展を遂げている。ネアンデルタール人のミトコンドリアゲノムを解読したスバンテ＝ペーボ博士が 2022 年にノーベル生理学・医学賞を受賞したことは記憶に新しいであろう。この発展を支えているものとして、分子生物学領域での 2000 年代からの次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing (NGS)) に代表される DNA 分析技術の飛躍的発展が挙げられる。例えば、2000 年に完了したヒトゲノム計画 (ヒトの全遺伝子配列を解析するプロジェクト) では、費やした時間は約 10 年、費用も億単位であったのに対し、現在ではヒトゲノムは 1~2 週間程度で費用も数十万円程度で解読可能となっている¹⁾。この様に昨今の DNA 関連技術の台頭によって、20 年前には時間的・費用的に難しかった DNA を通した網羅的な可視化も実現可能となりつつある。

一方、生命情報を有する生体高分子としてタンパク質が挙げられ、タンパク質に対する分析化学的なアプローチも急速に発展してきた。2002 年ノーベル化学賞を受賞した田中耕一博士によるソフトイオン化法を基礎とした新規質量分析法である MALDI-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry: マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析) 法の確立により、これまで難しいとされてきたタンパク質の可視化が急速に進展してきた²⁾。昨今では MALDI-TOF/MS 法を基礎とした微生物同定プラットフォームの構築・医療応用³⁾や、顕微鏡と MALDI-TOF/MS とを組み合わせたイメージング MS⁴⁾も普及されつつあり、タンパク質に対する質量分析を通じた医療応用の研究が盛んになってきている。考古科学分野においても、ZooMS (Zooarchaeology by mass

spectrometry) と呼ばれるペプチドマスフィンガープリンティング (Peptide Mass Fingerprinting: PMF) 法を考古科学研究に応用した生物種同定が盛んに用いられており、タンパク質性試料を中心とした報告例が重ねられてきている⁵⁾。

この様に、分子生物学・分析化学領域における発展は、今後も次世代的な考古科学の発展に寄与することが考えられる。食文化史を考える上でも DNA やタンパク質といった情報分子は、生物種自体だけではなく地理的情報や年代といった、食文化史を理解する上で非常に貴重な情報も含まれていることから、食文化史の科学的解明は今後も発展を続けることが見込まれる。

古代における食文化を解明するにおいて、例えば食物の摂取・取り分けおよび貯蔵等に用いる土器に残存する有機質、特に DNA やタンパク質などの情報分子を対象とした分析は、当時の環境や文化を復元する上で非常に有力なツールとなり得る。しかしながら、一言で食物と云っても古代においてもバラエティーがあったことは想像に難くなく、土器に残存する生体由来の情報分子も多岐に渡ることが予想される。

以上の事情を鑑み、本研究では DNA からのアプローチによる網羅的な解析手法の実証を試みた。上記の様にタンパク質からのアプローチでも生物情報を明らかにすることは可能であるが、複数の生物種の「混ぜ物」の分析には余り適していない。若し「混ぜ物」の分析を可能にする技術があれば、古代における食文化をより克明かつ網羅的に復元する可能性があると考えられる。

【目的】

本研究は、古来より食材や接着用途に用いられてきたニカワを題材とした DNA バーコード技術による生物種同定の実施を通し、「混ぜ物」であっても評価し得る本アプローチの有効性を実証することを研究目的としている。上記の様にタンパク

質の質量分析によるアプローチは「混ぜ物」の分析は難しい。一方 DNA からのアプローチであれば、DNA バーコードと呼ばれる PCR (Polymerase Chain Reaction) を基礎とした技術を用いれば、複数の生物種の「混ぜ物」であっても定性的に評価が可能であると考えた。DNA バーコードとは生物種(群)に特有の DNA 配列を増幅・検出するシステムであり、各生物種(群)が共通して持つ DNA 配列の特異性を利用した検出法であり、その特異性を担保し得る PCR 条件・プライマーについては多くの報告がある⁶⁾。この様に DNA バーコードであれば、生物種の「混ぜ物」を効果的に検出できることが原理的には期待されるものの、特に考古資料由来の DNA においては：

- ①環境要因による DNA の断片化
- ②経年劣化による変質
- ③環境中の様々な物質の混入

といった問題が PCR による検出を難しくさせることが当初から予想された。

①については、環境中の微生物活動といった要因によって DNA が小さいサイズへと断片化を受けることが考えられる。PCR という反応自体、鋳型となる DNA 鎖を増幅させる反応であることから、DNA の断片化は鋳型となり得る DNA 量の減少を意味しており、環境に曝露した試料ほど PCR での検出が難しくなる。

②については、postmortem degradation と呼ばれる DNA の変質が知られており、DNA を構成するシトシン (dC) は生物体死後に環境中でメチル化を受け、最終的にウラシル (dU) へと変化することが知られている。昨今、この postmortem degradation の法医学的な応用研究が報告されており⁷⁾、死後時間を postmortem degradation による変質率から推定する方法論が確立されつつある。PCR を実施するにおいて、postmortem degradation による dU への変質は気を付けなければならない。PCR においてエラー率の低い High-fidelity DNA ポリメラーゼは古細菌由来であることが多いが、古細菌由来の DNA ポリメラーゼは dU が存在すると複製・増幅が出来ないことが知られており⁸⁾、これを逆手に取って、所謂実験室内のコンタミネーションであるキャリーオーバー問題の対処策とし、Uracil-DNA glycosylase (UNG) を用いた方法論も確立されている⁹⁾。

最後に③について、PCR は DNA ポリメラーゼ

による酵素反応と云えることから、DNA ポリメラーゼを阻害する物質が反応液中に混在する場合、PCR による検出が実質的に不可能となる。PCR を阻害する物質として土壤に含まれる腐食酸類 (フミン酸、フルボ酸など) といったポリフェノール類や、EDTA やクエン酸といったキレート剤が知られており、考古資料由来の DNA を鋳型として PCR 検出を実施するにおいて、これら阻害物質の混入は不可避であることから、腐食酸類に対する何等かの対処が重要となる。最近では、阻害物質をアルミニウム錯体の形成を通して除去する DNA 精製キット¹⁰⁾や、これら PCR 阻害物質が混入していても PCR による検出を可能にする DNA ポリメラーゼも上市されており、今後の PCR 関連技術の進展が期待される。

以上、本研究では”古い”DNA に特有な上記①～③の問題をクリアできれば、DNA バーコード技術を通じた可視化が出来ると考えられる。本研究では、先ず古来の方法と折衷的に作製されたニカワ (和膠) および工業的方法で作製されたニカワ (洋膠) を対象とし、由来となる生物種が判明しているニカワを対象とした DNA バーコードによる生物種同定が可能であるかを検証し、さらに”古い”DNA を含むニカワ試料として江戸時代後期～明治時代初期に制作された浮世絵を対象とし、当時ニカワの原料となった生物種の同定を行うことで、”古い”資料の分析における DNA バーコード技術の有用性の実証を試みた。

【材料・方法】

本稿では材料・方法については概略を記すのみにとどめ、詳細については Kuramata H., *et al.* (2022)¹¹⁾の記載を参考にして欲しい。市販の各ニカワ (和膠・洋膠：表 1) を 0.1 g 秤量し Milli Q で 1 mL (10 % w/v) 溶液とし、70°C で一晩ボルテックスしながら溶解させた。このニカワ溶液に存在する粗核酸量を Qubit4 (Thermo Fisher) にて定量を行った。DNA 抽出に関しては PME Gelatin DNA kit (Analytik Jena) を用い、抽出した DNA は DNA バーコーディングによる動物種同定における PCR テンプレートとした。

本研究のアプローチの実証のための浮世絵資料については、江戸時代後期から明治時代初期の 4 点を対象とした。浮世絵制作においてはドーサ引きといひニカワとミョウバンとの混合溶液を下地

として塗布することが知られているため、各作品の端の小部分を滅菌した鋏にて切断し、TE バッファー (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA) にて 70°C で一晚浸漬してニカワを溶解させた上で、上清をフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿にかけ DNA の粗精製を行った後、上記 PME Gelatin DNA kit にて DNA 精製を行い、PCR テンプレートとした。

表 1 : 本研究で使用された市販のニカワ

試料番号	説明 (部位など)	説明書に記載された動物種
1	骨	ウシ
2	獣皮	不明
3	獣皮	ウサギ
4	獣皮	ウサギ
5	テクニカルゼラチン	ウシ
6	製本用ゼラチン	ウシ
7	Parchment glue	ヒツジ
8	三千本膠 飛鳥	ウシ
9	特三千本膠	鯛
10	浮袋*	チョウザメ
11	浮袋*	チョウザメ
12	クックゼラチン	不明
13	クッキングゼリー	不明
14	ニッピゼラチン	ウシ
15	ニッピゼラチン	ブタ
16	ニッピゼラチン	魚類
17	吉祥 膠液	不明

*チョウザメ浮袋由来で異なるロットを意味する

PCR 酵素については、市販ニカワに対しては MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (タカラバイオ株式会社) を、浮世絵由来のニカワに対しては Quick Taq™ HS DyeMix (東洋紡株式会社) をそれぞれ用いた。なお、各動物種検出のためのプライマーは公知の配列を援用した¹¹⁾。PCR 条件は、市販のニカワは 94 °C 15 秒、48 ~56 °C 15 秒、72 °C 45 秒で 40 サイクルとグラジエント PCR を、浮世絵由来のニカワに対しては 94 °C 15 秒、50 °C 15 秒、72 °C 45 秒で 55 サイクルと Tm が定温での PCR をそれぞれ実施した。特異的増幅の確認はアガロース電気泳動にて行い、目的となるサイズにおける特異的増幅が認められた場合は、その動物種が検出されたと判別した。

【結果・考察】

先ず市販の和膠 11 種 (試料番号#1~#11)、洋膠

5 種 (試料番号#12~#16) および不明 1 種 (試料番号#17) について核酸の定量を実施したところ、図 1 に示す様に二本鎖 DNA (dsDNA : 図 1 (a))、一本鎖 DNA (ssDNA : 図 1 (b))、miRNA を含む短鎖 RNA (miRNA : 図 1 (b)) と、和膠は洋膠と比較して総じて核酸含量が多いことが分かった。洋膠はニカワを構成する主なタンパク質であるコラーゲンの純度が高い、裏返せば不純物である核酸類が除去されているため、和膠は洋膠に比べて総じて核酸含有量が高かったのではないかと考えた。

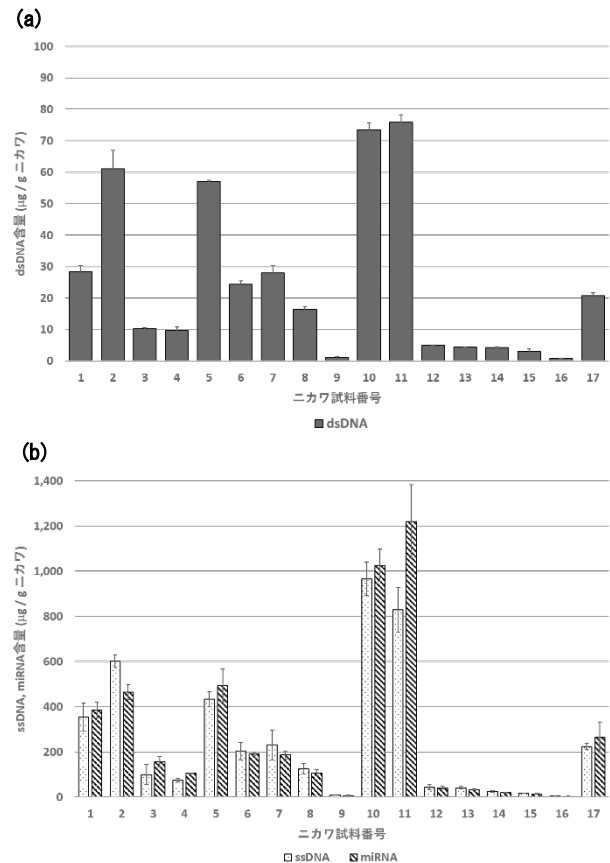


図 1 各ニカワ試料における核酸含有量 : (a) dsDNA、(b) ssDNA および短鎖 RNA の含有量を示し、試料番号#9 を除いて和膠 (試料番号#1~11) では洋膠 (試料番号#12~16) と比較して核酸量が総じて多いことが分かる (Kuramata H., et al. (2023)¹¹⁾ より改変)。

このことは、和膠および古典的膠といったニカワ由来の DNA をターゲットとする本研究にとってアドバンテージであると考えている。しかしながら、鯛の鱗由来のニカワ (試料番号#9) においては各核酸量が他の和膠と比べて顕著に低かった。これは、他の和膠の製造初期工程においてアルカリ処理を施すことが多いのに対し、魚類由来では酸処理を行うことが多く、その為に核酸が加水分解を受けたためと推察している。また、吉祥膠液

(試料番号#17) では核酸量が他の和膠に近い値を示したことから、含有核酸量の上では和膠に近い製法で作られたものと推察された。

次に上記和膠の幾つかについて DNA 抽出から DNA バーコーディングによる動物種同定を試みた。最初、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase を用いて動物種同定を試みたが、殆どが増幅に失敗した。そこで、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 を用いたところ、**図 2** の様に特異的増幅が確認でき、DNA バーコードを用いて動物種同定が可能であることが確かめられた。

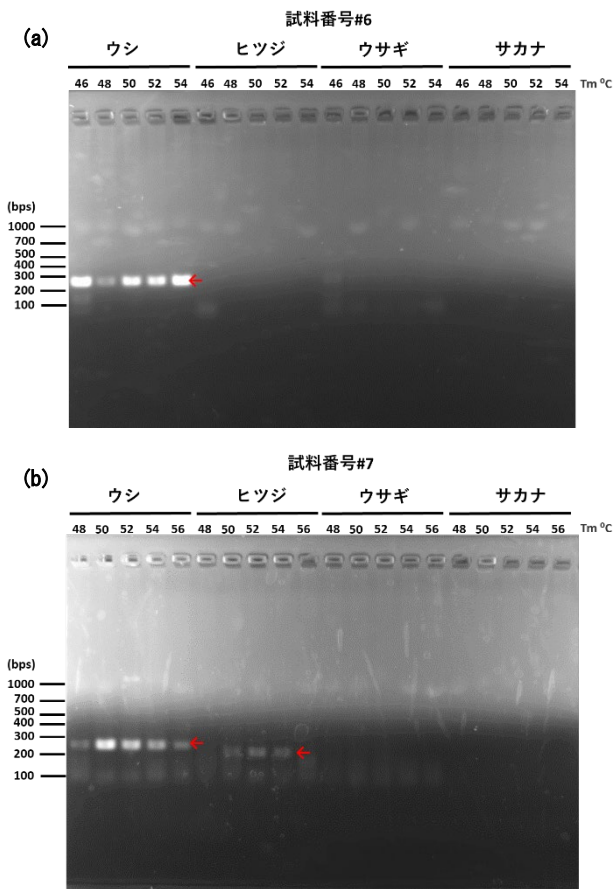


図 2 各ニカワ試料の DNA バーコーディングによる動物種同定例：(a) 試料番号#6 (ウシ)、(b) 試料番号#7 (ヒツジ) の同定の様子を示す。試料番号#6 (ウシ) については、DNA バーコーディングによってもウシのみ検出できた一方、試料番号#7 (ヒツジ) についてはヒツジだけではなくウシも検出された (Kuramata H., *et al.* (2023) ¹¹⁾ より改変)。

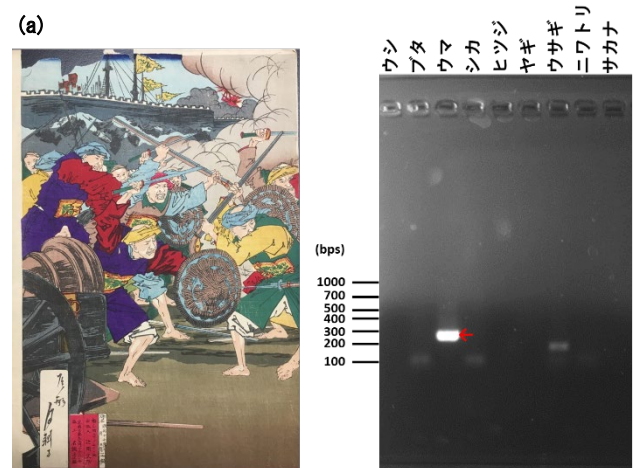
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase では特異的増幅が失敗し、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 では増幅が成功した理由として、各ニカワからの DNA 抽出は PME Gelatin DNA kit を用いたものの、それでもなお血液成分などの PCR 阻害物質が混入していた可能性があると考えられた。

次に**図 2** から目的となる動物種同定に成功していることが分かるが、**図 2 (b)** の様に目的動物種以

外の動物種を検出するケースもあった。これはニカワの製造において異なる動物種由来のニカワであっても同じ釜を用いることに起因すると考えている。釜は水洗いした後に異なる種のニカワ製作に用いられるが¹²⁾、PCR 法は非常にセンシティブな方法であり、pg オーダーの残留 DNA が存在しても増幅反応をしてしまうことから、恐らく水洗い後にも以前に煮炊きした際のウシ DNA が残留していたものと考えている。

この様に、動物種が判明している市販のニカワ試料を出発材料とし、DNA バーコーディングによって正確に動物種同定が可能であることを実証できた。さらに当初の目的の通り、ニカワ試料が動物種の「混ぜ物」であったとしても DNA バーコーディングであれば個々に同定可能であることも示された。

次に本アプローチの文化財資料を用いた実証として、江戸時代後期～明治時代初期に制作された浮世絵 4 点について、各作品に用いられたニカワから DNA バーコーディングを通じた動物種同定を試みた。当初 PCR 酵素として**図 2** の例と同様に MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 での増幅を試みたが、全てにおいて特異的増幅は見られなかった。そこで、これら古い DNA は postmortem degradation と呼ばれるシトシン (dC) からウラシル (dU) への、一種の DNA の質的劣化が惹起されている¹³⁾とすると、古細菌由来の PCR 酵素である MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 では dU を含む DNA を鋳型とした PCR は不可能であると考えられた。そこでバクテリア由来の PCR 酵素である Quick Taq™ HS DyeMix を用いたところ、**図 3** に示す同定結果を導くことができた。



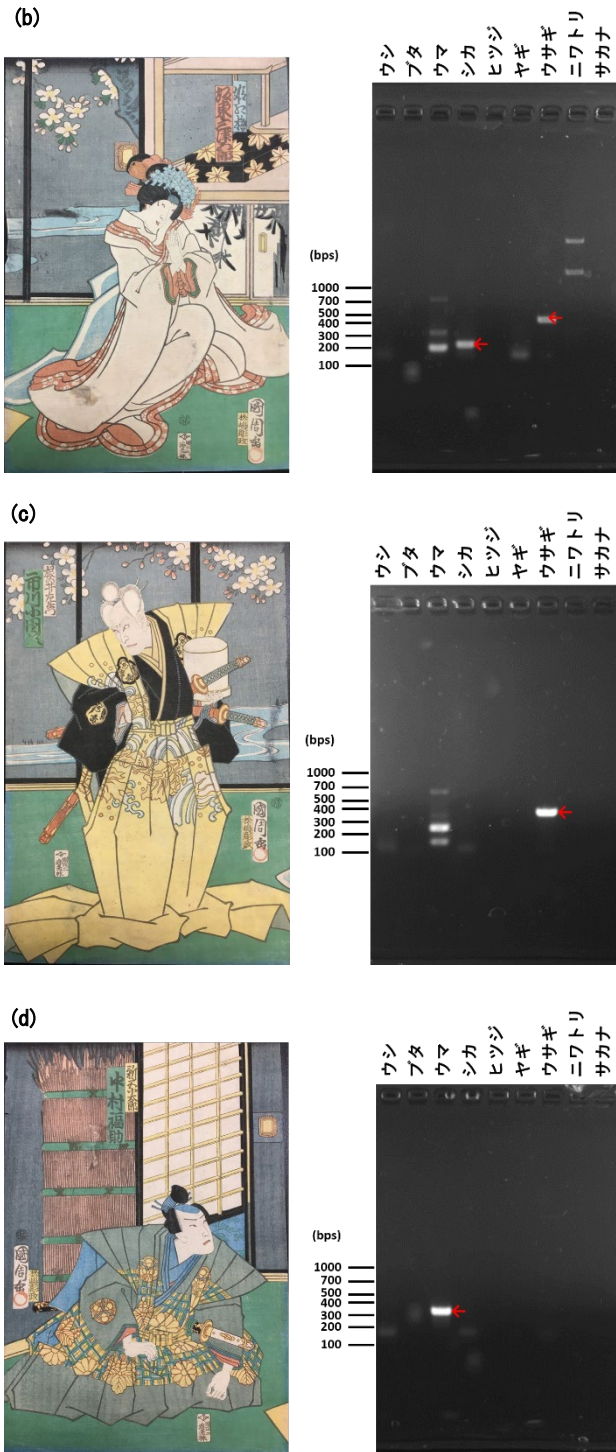


図3 浮世絵を題材とした動物種同定例：(a) 明治初期、(b)～(d) 江戸時代末期に制作された浮世絵を題材とし、DNA バーコーディングを通じた動物種同定を試みた。ウマ、シカ、ウサギなどで特異的な検出が認められる。本結果から、動物種同定に際し DNA バーコーディングの有効性を実証できたと考えている (Kuramata H., *et al.* (2023) ¹¹⁾ より改変)。

特に図2 (b)と同様に動物種の「混ぜ物」であっても各動物種の同定が DNA バーコーディングを通して可能であることが実証できた (図3 (b))。以上の結果から、当時の動物利用状況や当時の技

法の再現に貢献できると期待している。

【まとめ】

本研究を通し、文化財資料という古い DNA を含有するケースにおいて、DNA バーコーディング法の有効性が実証できたと考えている。さらに、考古資料や文化財に含まれる古い DNA 特有の問題として、前記①～③に挙げた項目を資料ごとに最適化しながら解決を図ることが、DNA を通した可視化の為に極めて重要であることが本研究を通して改めて認識できたと云える。本研究の成果が、古い DNA を通した当時の人々の文化の解明やその復元に対し貢献できることを心より願っている。

【謝辞】

本研究の実施にあたり、三吉商店様、妻屋膠研究所様、株式会社ニッピ様、株式会社三栄源様、高津善太様 (元森永乳業・森乳サンワールド) にはご指導・ご助言を頂き、感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Hayden, E.C. “The \$1,000 genome” (2014) *Nature* **507**(7492) 294-295.
- 2) Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T. “Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry.” *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1988) **2**(8) 151–153.
- 3) Kassim, A., Pflüger, V., Premji, A., Daubenberger, C., Revathi, G. “Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast.” *BMC Microbiology* (2017) **17**:128
- 4) Buchberger A.R., DeLaney, K., Johnson, J., Li “Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights” *Anal Chem.* (2018) **90**(1): 240–265.
- 5) Buckley, M., Kansa, S.W., Howard, S., Campbell, S., Thomas-Oates, J., Collins, M. “Distinguishing between archaeological sheep and goat bones using a single collagen peptide.” *Journal of Archaeological Science.* (2010) **37**(1) 13-20.
- 6) Antil, S., Abraham, J.S., Sripoorna, S., Maurya, S.,

Dagar, J., Makhija, S., Bhagat, P., Gupta, P., Sood, U., Lal, R., Toteja, R. “DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review” *Molecular Biology Reports* (2023) **50**: 761–775.

7) Tozzo, P., Scrivano, S., Sanavio, M., Caenazzo, L. “The role of DNA degradation in the estimation of post-mortem interval: A systematic review of the current literature.” (2020) *Int J Mol Sci.* **21**(10) 3540.

8) Fogg, M.J., Pearl, L.H., Connolly, B.A. “Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases.” (2002) *Nat Struct Biol.* **9**(12) 922–927.

9) 東洋紡株式会社 “Uracil-DNA Glycosylase (UNG)”

https://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=261 (2023年6月27日閲覧)

10) Qiagen “DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit” <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powerlyzer-powersoil-kit/> (2023年6月27日閲覧)

11) Kuramata, H., Hashiba, M., Kai, Y., Nishizawa, K., Inoue, T., Kikuchi-Ueda, T., Uetsuki, M., Yamauchi, K., Fujisawa, A., Oshikane, H. “Animal Species Identification Utilising DNAs Extracted from Traditionally Manufactured Gelatin (Wanikawa)” (2022) *Heritage Science* **10** 183.

12) 妻屋膠研究所との personal communication

13) Brotherton, P., Endicott, P., Sanchez, J.J., Beaumont, M., Barnett, R., Austin, J., Cooper, A. “Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions.” *Nucleic Acids Res.* (2007) **35**(17) 5717–5728.