

死貝の殻におけるアミノ酸の保存

秋山雅彦*・水島徳太郎**

I はじめに

硬組織は、化石化の過程で各種の変化を受けている。有機地球化学的な側面からその変化の内容を明らかにすることは、化学化石から元の有機物を復原する上で、きわめて重要であると考えられる。軟体動物の貝殻中に含まれている硬タンパク質が古い年代の化石ほど少ない事実は、これまで多くの種について明らかにされてきている(Abe-lson, 1959; Akiyama and Wyckoff, 1970; Matter III et al., 1969)。

硬タンパク質が化石の中で受ける主要な変化は加水分解であり、副次的にはアミノ酸の側鎖の変化による他のアミノ酸への変化やラセミ化である。加水分解を受けたタンパク質は可溶性となり、しだいに化石から溶出して失なわれるとともに、生じたアミノ酸が脱アミノ・脱炭酸によって最終的には炭化水素を生成するという(Thompson and Creath, 1966)。

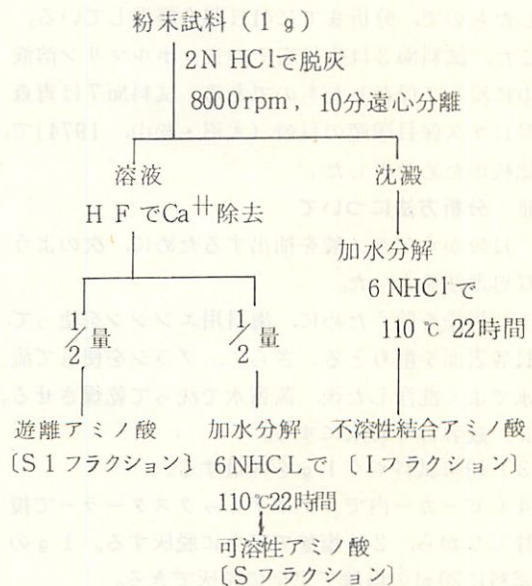
このような結論は、貝化石が生物としてかって生息していた当時に量・質ともに現生の同一種または近縁種と同一または近似の硬タンパク質を有していたという仮定にたって導かれたものである。現生貝類の同一属または同一科に属する種では、それらのもつ貝殻構造は同一であって、含有される硬タンパク質のアミノ酸組成は区別できない(Akiyama, 1966)。この事実から、上記の仮定は正しいものと考えられている。

続成作用における硬タンパク質の変化といった、この種の研究は、縄文貝塚の数1000年前の貝殻から中生代の貝化石にまでさかのぼって行なわれてきている。しかし、貝の死後数年といった期間にどんな変化が生じているかといった研究はない。

筆者の一人水島は、海水中に貝殻を放置し、昭和41年以来どのような変化が起っているかを観察してきた。この報告の目的は、このような貝殻中の硬タンパク質のアミノ酸が生貝のそれとどのように異なっているかを明らかにすることにある。また、採集後の貝殻の処理法についても、あわせて論じた。

II 分析試料について

この小論で扱う種は、Babylonia japonica (バイ)とGomphina melanaegis (コタマガイ)の2種で、保存に関する履歴は第1表に示されている。表中で海水中での放置期間とあるのは、生貝から軟体部を外した後、貝殻だけを上越市立水族博物館の水槽中に放置した期間を表わしている。この水槽は3月から11月まで海水の循環を行ない、11



第1図 貝殻のアミノ酸分画法

* 北海道大学理学部地質学鉱物学教室

** 上越市立水族博物館

第 1 表 分 析 試 料

試料番号		海水中での放置期間	備 考
1	<u>Babylonia japonica</u>	0	分析するまでの41日間室内に保存
2	<u>B. japonica</u>	6年10カ月	"
3	<u>B. japonica</u>	0	ホルマリン固定 1 年
4	<u>B. japonica</u>	5 年	"
5	<u>Gomphina melanaegis</u>	6年6カ月	分析するまでの41日間室内に保存
6	<u>G. melanaegis</u>	6年6カ月	"
7	<u>G. melanaegis</u>	0	青森県日ヶ久保貝塚*(5850±105B.P.)

* 大沼・松山 (1974)

月より翌年3月までの冬期には循環を止めている。分析した試料は昭和42年に水槽中に投入されたもので、水槽内の水温・pH・塩分濃度は毎日測定されている。試料投入の昭和42年8月上旬に水温27.8°Cで最高値を示し、翌年2月上旬が3.3°Cで最低値であった。4月から11月までの循環期間では、海水温と一致するが、冬期の循環停止期間では海水温よりも4°C低い。pHは7.8～8.1の間を変動し、年間の平均値は8.0で、天然海水の8.3%よりわずかに低い。塩分濃度は29.9～32.2%で、年平均31.0%を示し、天然海水の31.2%とは一致する。昭和48年の試料採取まで、ほぼ同一条件であったといえる。

試料No.1は生貝から貝殻だけを取り、風乾放置したもので、分析までに41日間を経過している。また、試料No.3は生貝をそのままホルマリン溶液中に浸して保存したものである。試料No.7は青森県日ヶ久保貝塚産の貝殻(大沼・松山, 1974)で、比較のため分析した。

Ⅲ 分析方法について

貝殻からアミノ酸を抽出するために、次のような処理法をとった。

- 1) 汚染を除くために、歯科用エンジンを使って、貝殻表面を削り取る。さらに、ブラシを使って流水でよく洗浄した後、蒸留水で洗って乾燥させる。
- 2) 鉄乳鉢で粉末にする。
- 3) 粉末試料やく1gを秤量する。
- 4) ビーカー内でマグネティックスターラーで攪拌しながら、2N塩酸で完全に脱灰する。1gの試料に20mlの塩酸で完全に脱灰できる。
- 5) 8000rpmの遠心分離器を使って、第1図のようにI, S, S1の3つのフラクションを得る。

SとS1溶液中のカルシウムは当量のフッ化水素水を加えて沈澱除去する。

6) IとSフラクションは6N塩酸とともに試験管内に入れ、封管して110°C, 22時間加水分解を行なう。この際、空気は窒素ガスで完全に置換して、アミノ酸の酸化分解を防ぐ。

7) I・S両フラクションの加水分解生成物とS1フラクションは、ロータリーエバポレーターで減圧乾燥後、1/100N塩酸を加えアミノ酸分析に供する。

このようにして得られたIフラクションは不溶性タンパク質であり、SフラクションはIフラクション以外のすべてのアミノ酸を含む。また、S1フラクションでは、遊離アミノ酸だけが分析される。

アミノ酸分析には、日本電子製アミノ酸分析機(JLC-6AH)を使用した。分析条件は下記の通りである。

ショートカラム; 8φ×150mm (塩基性アミノ酸用), JEOL レジンLCR-2充填; クエン酸緩衝液, pH=5.28, Na⁺濃度0.35N(90分); 温度, 52°C.
ロングカラム; 8φ×500mm (中・酸性アミノ酸用), レジン同上; クエン酸緩衝液, pH=3.23, Na⁺濃度0.2N(120分), pH=4.22, Na⁺濃度0.2N(75分), pH=5.23 Na⁺濃度0.35N(60分); 温度, 52°C.

サンプリングポンプ流量; 0.42 ml/min

ニヒドリンポンプ流量; 0.21 ml/min

検出器セル; 10 mm

この条件で、タンパク質構成の全アミノ酸とともに、α-アミノ酪酸、β-アラニンの分析も同時に可能である。JLC-6AHに付属している、

さん孔テープ光電読取方式のプログラマーを使うと、6検体を34時間30分で完全に分析できる。

定量のためのアミノ酸標準液として、国際試薬株式会社製のものを0.01μM/mlの濃度に調整して使用した。この場合、検出器の測定レンジを×10 (90~100% T fs.) として、±2%の誤差内で定量できる。

V 結果と考察

Babylonia japonicaの貝殻中に含有されるアミノ酸は第2表に、またGomphina melanaegisの分析結果は第3表に示されている。表中の各フラクションのうちS1フラクションでは、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニンなどのアミノ酸が検出されているが、一般に微量で各試料間の比較ができない。したがって、ここでは、単に上記6種のアミノ酸を合計し総量として示した。

生貝と水槽内の海水中に保存した貝殻（以下、死貝という）との比較をB. japonicaの分析値で行なうと、予想通り後者の貝殻中の各フラクションの値が小さくなっていることが分かる。残存百分率で表わすと、I・S・S1の各フラクションで、それぞれ53%、62%、21%となる。IフラクションとSフラクションとの合計値が貝殻中の全アミノ酸総量を表わすから、その値から残存百分率を算出すると53%となる。

ただし、生貝とはいっても、採集後41日間室内に放置されていたため、すでに分解を受けている可能性も考えられる。

アミノ酸組成に関しては、各フラクションとも相互に類似していて、大きな差異は認められない。ただし、Iフラクションについて見ると、死貝でリジンとグリシンの含有率が小さくなっている。リジンの側鎖で脱アミノが起っているとすれば、ノルロイシンを生じているはずであるが、クロマトグラム上でノルロイシンの確認はなされていない。貝殻の硬タンパク質が単一タンパク質ではないために、それらの分解の遅速の差によってアミノ酸組成に変化が生じたという可能性もあり、今後の問題として残されよう（秋山，1971）。

次に、ホルマリン固定を施した貝殻を未処理のものと比較してみよう。生貝と死貝のそれぞれのフラクションについて比較すると、Iフラクションではホルマリン処理貝でアミノ酸含有量が小さく、Sフラクションでは逆にその値が大きくなっ

ている。この事実は、ホルマリン処理によって硬タンパク質の一部が可溶化することを示している。また、アミノ酸組成上の比較では、次の2点が指摘できる。ホルマリン処理を施した貝殻では、Iフラクションにアロイソロイシンが検出されることと、チロシンの含有量が小さく逆にフェニルアラニンのそれが大きくなっていることである。

アミノ酸のラセミ化はアルカリ性条件下で容易に起きる。ホルマリンの中和の際に過剰のアルカリを使用したことによる影響とみられる。この分析法では、D-アロイソロイシン以外のD-アミノ酸をL-アミノ酸と分離して定量することは不可能である。したがって、他のアミノ酸のラセミ化も生じているものと推定される。

チロシンとフェニルアラニンについては、両アミノ酸の合計が、ホルマリン処理貝と未処理貝の両方できわめて近い値を示している。したがって、チロシンの水酸基がホルマリンによって切断され、チロシンからフェニルアラニンへの変化が生じたと推定できる。ホルマリンによる固定は硬組織中のタンパク質の分解を防ぐ、とされている（堀田，1968）。しかし、上述のような変化を無視する訳にはいかない。

Gomphina melanaegisについては、生貝の分析値がないので、海水中に6年6カ月間放置された死貝がどのような変化を受けているか、論じることとはできない。第3表に示された分析値のうち、No.5はきわめて新鮮にみえる貝殻であり、No.6は表面がチョーク状に変化した貝殻である。アミノ酸含有量は、Iフラクションについて比較すると、No.6はNo.5の62%しか存在しない。同一条件下で保存されていても、貝殻の個体差によって分解の遅速が生じているといえよう。しかし、アミノ酸組成上の差は存在しない。

青森県日ヶ久保貝塚産のGomphina melanaegisの貝殻では、上述の貝殻に比較して、Iフラクションのアミノ酸量は小さいが、Sフラクションでは逆に大きな値を示している。Iフラクションのアミノ酸組成上の差異も認められ、日ヶ久保貝塚の標本でアスパラギン酸の値が小さく、グリシンとアラニンは大きな値を示している。

第 2 表 Babylonia japonica の貝殻中のアミノ酸
(1000 残基中のアミノ酸残基数)

試料 No. アミノ酸 フラクション	1		2		3		4	
	I	S	I	S	I	S	I	S
Lys	53	+	35	+	47	136	43	103
His	9.5	+	11	+	7.0	18	5.1	12
Arg	24		27		28		27	
Asp	120	200	124	237	121	318	137	153
Thr	86	53	81	51	89	39	80	52
Ser	63	204	73	168	60	95	57	183
Glu	93	168	92	139	105	153	119	90
Pro	52		67	+	52		53	
Gly	132	213	109	225	132	121	109	203
Ala	66	88	76	81	65	64	75	107
Cys/2							2.1	
Val	56	25	61	35	61	22	67	34
Met	+		+		+		+	
Ile	80	27	86	37	48	12	44	18
Leu	81	22	77	26	99	24	104	47
Tyr	42		46		11		9.9	
Phe	43		37		76		68	
total $\mu\text{M/g}$	7.841	0.394	4.130	0.245	4.670	1.90	3.617	0.909
S1フラクション $\mu\text{M/g}$	0.135		0.029		0.547		0.091	

第 3 表 Gomphina melanaegis の貝殻中のアミノ酸
(1000 残基中のアミノ酸残基数)

試料 No. アミノ酸 フラクション	5		6		7	
	I	S	I	S	I	S
Lys	35		35		40	
His	5.5		6.3		6.3	
Arg	26		37		28	22
Asp	236	438	236	390	165	341
Thr	61	48	57	49	48	37
Ser	87	116	84	152	76	80
Glu	68	69	72	60	87	86
Pro	64	40	70	33	60	58
Gly	207	213	192	223	290	210
Ala	49	40	47	45	73	62
Cys/2	14					
Val	35	18	37	21	45	35
Met	+		+			
Ile	30		32	14	34	26
Leu	24	16	25	12	26	23
Tyr	39		44			3.6
Phe	22		25		21	16
total $\mu\text{M/g}$	8.434	1.164	4.566	1.364	0.926	4.780
S1フラクション $\mu\text{M/g}$	0.020		0.024		0.670	

Ⅵ あとがき

この報告は、続成作用のきわめて初期に、貝殻中のタンパク質がどのように変化し、どのように減少していくかという問いに答えようと意図したものである。ここで扱った2種の貝殻以外に、テングニシ *Pugilina termata*, イタヤガイ *Pecten albicans*, アカガイ *Anadara broughtonii*, ベンケイガイ *Glycymeris albolineata* など、海水中に7~8年間放置した標本の分析も行なっている。しかし、それらは生貝の分析値がないので、ここで論じることがをひかえた。

研究の中間段階でありながらあえて公表したのは、会員の皆様方のご批判をいたゞいて、今後の研究方向を定めたいからであった。忌憚のないご批判をいたゞきたい。同時にこの試料が組織学や鉱物学の立場から研究されることを望んでいることも、この小論を公表した理由である。

最後になったが、この研究を進めるにあたって、多大のご援助を賜った歌代勤、井尻正二、大森昌衛の諸会員に厚く御礼申上げる。また、試料の一部を提供して下さった大池昭二氏に感謝の意を表する。

(論文紹介)

Richard I. Gibson (1974)

Descriptive Human Pathological Mineralogy.

American Mineralogist, vol. 59, p. 1177 - 1182.

著者は、約15,000個のヒトの尿結石の鉱物組成につき、X線回折等を用いて検討し、次のような種類を識別している。

(1) calcium oxalate

whewellite $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

weddellite $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(2) calcium phosphate

hydroxylapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

carbonate apatite PO_4 を CO_3OH 基が置換

brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

monetite CaHPO_4

whitlockite $\text{Ca}_3\text{Mg}(\text{PO}_4)_6$

(3) magnesian phosphate

struvite $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

newberyite $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

hannayite $\text{Mg}_3(\text{NH}_4)_2\text{H}_4(\text{PO}_4)_8 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$

その他、carbonateとしてcalcite, aragonite, vaterite, sulphateとしてgypsum, hexahydrate $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, コレステロール結石等があるという。

これらのなかでもカーボネート・アパタイトが多く、いろいろな鉱物の共存関係、結晶の形や色、習癖、成因等についてもふれている。

(岩田圭示)

引用文献

Abelson, P. H. (1959): Geochemistry of organic substances. In Researches in Geochemistry (Abelson ed.), John Wiley & Sons.

Akiyama, M. (1966): Conchiolin-constituent amino acids and shell structures of bivalved shells. Proc. Japan Acad. Vol. 42, 800 - 805.

秋山雅彦 (1971): 古生化学の研究とその課題. 地質雑, 77巻, 9号, 563 - 573.

Akiyama, M. and Wyckoff, R.W.G. (1970): The total amino acid content of fossil pecten shells. Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., Vol. 67, 1097 - 1100.

堀田 進 (1968): 現生および化石ウニの殻体から検出されたアミノ酸について. 地質雑, 74巻, 3号, 159 - 164.

Matter III, P. et al. (1969): Composition of fossil oyster shell protein. Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., Vol. 64, 970 - 972.

大池昭二・松山 力 (1974): 青森県日ヶ久保貝塚の ^{14}C 年代. 地球科学, 28巻, 2号, 64 - 65.

Thompson, R.R. and Creath, W.B. (1966): Low molecular weight hydrocarbons in recent and fossil shells. Geochim. Cosmochim. Acta, Vol. 30, 1137 - 1152.