

エジプト壁画中に残存する膠のコラーゲンの 質量分析法による同定

河原 一樹* 中沢 隆* 川崎 英也**
アフメド・シュエイブ*** アーデル・アカリシュ**** 吹田 浩***** 荒川 隆一**

Identification by Mass Spectrometry of Animal-Glue Collagen Remaining in
a Layer of Ancient Egyptian Painting

Kazuki KAWAHARA*, Takashi NAKAZAWA*, Hideya KAWASAKI**,
Ahmed S. SHOEIB***, Adel AKARISH****, Hiroshi SUITA***** and Ryuichi ARAKAWA**

[Abstract]

We have detected type I collagen in mural paintings excavated from the underground burial chamber of Idout in the Saqqara region of Egypt. Proteins extracted from the debris of wall paintings were separated by gel-electrophoresis, digested by trypsin, and analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). The two MALDI peaks at m/z 1106 and 2855 strongly suggest that the protein derives from cow type I (α -1 and α -2) collagen. The amino acid sequence GLTGPIGPPGPAGAPGDKGEAGPSGPAGPTGAR deduced from the subsequent MALDI-TOF/TOF analysis of the peak at m/z 2855 corresponded precisely to cow type I collagen chain α -1 (residue 763-804), thus excluding the possibility that collagen derived from red deer or donkey. Due to the possible degradation including deamidation and nonspecific hydrolysis of peptide bonds, the other peaks could not be identified unambiguously as those arising from collagen, leaving the need to employ further analysis. Nevertheless, the results clearly indicate that animal glue was used as the binder for wall paintings.

-
- * 奈良女子大学学際的共同研究体制に基づくタンパク質考古学創成事業
(Archaeological Proteomics Research Project, Nara Women's University, Japan)
** 関西大学化学生命工学部
(Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Japan)
*** カイロ大学考古学部 (Faculty of Archaeology, Cairo University, Egypt)
**** ナショナルリサーチセンター (National Research Centre, Egypt)
***** 関西大学文学部 (Faculty of Letters, Kansai University, Japan)

[要旨]

我々は、エジプトのサッカラ遺跡の埋葬地であるイドウトの地下に掘られた墓の壁画片からI型コラーゲンを検出した。壁画片から抽出したタンパク質試料は、ゲル電気泳動で分離後、トリプシン消化し、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析法 (MALDI-MS) を用いて同定した。多数の MALDI ピークのうち、 m/z 1106 と 2855 の2本のピークから、検出されたコラーゲンはウシのI型 α -1 および α -2 鎖由来と考えられる。この2本のピークの MALDI-TOF/TOF 分析による解析の結果、それぞれに対応するペプチドのアミノ酸配列はウシのI型コラーゲンと一致し、 m/z 2855 のピークから、動物種としてシカやロバ、あるいはウサギの可能性は明確に排除できた。おそらく試料タンパク質の脱アミド化やペプチド結合の非特異的切断などの劣化、さらに挟雑タンパク質の混入により大多数のピークの帰属ができていないため、なお、コラーゲンの動物種を確定させるにはより精密な分析が必要である。しかし、現段階においても、壁画片に膠が含まれていることは、確実に示せた。

1 はじめに

エジプトの遺跡に見られる色彩豊かな壁画 (Fig. 1) は、乾燥した環境下において紀元前三千年紀以降に制作されたものが、現在も色材の剥離を免れており、その材質や製作技法の解明は文化財保護の観点から重視されている。これまでの調査報告から、色材の接着に際して用いられた接着剤原料として、アラビアゴム、膠、卵の白身 (卵白) など、タンパク質、あるいは部分的にタンパク質を含有するものが候補として挙げられている。しかし、材料の科学分析にあたって、文化財の重要性のため非破壊的な方法が望まれることや、様々な環境要因から生じる不純物の混入のため、学術的な検証例は少ない。本研究では、プロテオミクスで微量タンパク質の分離・同定に利用されている電気泳動法とマトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (MALDI) 質量分析法を併用することで、サッカラ遺跡のイドウトのマスタバで発見された壁画に使用された接着剤原料の特定を試みた。

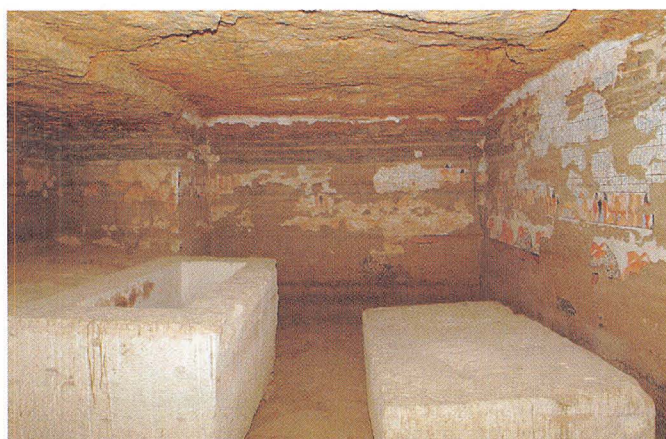


Fig. 1 Wall painting found in the burial chamber of mastaba of Idout

2 試料と分析方法

2.1 試料

イドウトのマスタバ石室内にある壁画の剥落片の一部を試料とした (Fig. 2)。試料表面には白色と黒色の二種類の顔料が塗布されているが、本実験では白色部に主眼をおき、そこに使用されている接着剤の原料の抽出と同定を行った。また、接着剤原料の同定に際し、比較のため、膠の標準試料としてウシ (*Bos taurus*) 由来I型コラーゲン (Sigma Aldrich)、卵白に含まれるアルブミンの標準試料としてウシ (*Bos taurus*) 血清アルブミン (Sigma Aldrich)、及びアラビアゴムの標準試料としてスーダン産のアラビアゴム (ホルベイン工業株式会社) をそれぞれ購入し、標準試料として用いた。

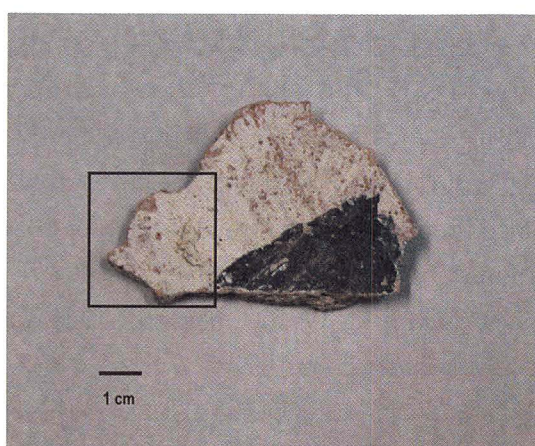


Fig. 2 A small fragment of wall painting [The rectangular box indicates a part of sample used in this study.]

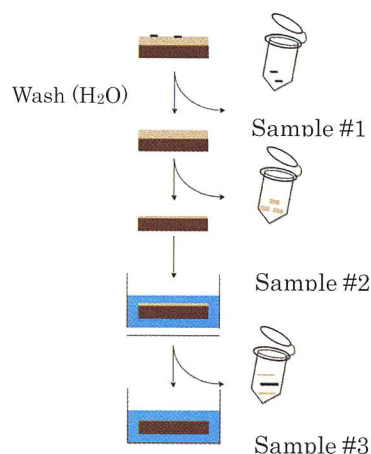


Fig. 3 A schematic representation of sample preparation procedure

2.2 試料調製

分析試料表面には、採取・保存環境から多くの不純物が付着していることが予想されるため、まず剥落片の表面を 1 mL の純水で洗った。得られる洗浄液をエッペンドルフチューブに移し、13,000 g で 5 分間、遠心分離し、上澄み液を試料溶液 1 (図中 Sample #1) とした。次に、洗浄後の壁画表面の白色顔料 (約 10 mg) をスパーテルで削り取り、エッペンドルフチューブ中で 1 mL の 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) と混合させ、15 分間超音波抽出した。その後、13,000 g で 5 分間、遠心分離し、上澄み液を試料溶液 2 とした (図中 Sample #2)。また、残った壁画片を乳鉢中で 2 mL の 0.1% TFA に浸し、表面に残存する顔料をスパーテルで削り取った。乳鉢から壁画片を取り除いた後、得られる残存液をエッペンドルフチューブに移し、13,000 g で 5 分間、遠心分離した後に得られる上澄み液を試料溶液 3 とした (図中 Sample #3)。以上の各行程の模式図を Fig. 3 に示した。

2.3 酵素消化

壁画表面の不純物による汚染の状況を調べるため、試料溶液 1 は不純物の分離等の前処理を行わず直接酵素消化に用いた。その際、試料溶液 1 を一度凍結乾燥し、100 μ L の 0.1M 重炭酸アンモニウ

ム (NH_4HCO_3) に溶解させた。得られる液を 1 時間 60°C で静置した後、室温に冷却させ、 $5\ \mu\text{L}$ のトリプシン溶液 ($0.2\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$) を加えて、 37°C で 24 時間、酵素消化した。酵素消化後の溶液 $10\ \mu\text{L}$ に $40\ \mu\text{L}$ の 0.5% トリフルオロ酢酸水溶液を加えて酸性 ($\text{pH}\ 4.0$) にし、ZipTip- C_{18} で濃縮・脱塩した。ZipTip- C_{18} での溶出は、 50% アセトニトリル / 0.05% TFA 溶液で行った。同様の作業を市販のウシ I 型コラーゲン、ウシ血清アルブミン、アラビアゴムの各々に対しても実施し、標準比較試料とした。

2.4 ゲル内酵素消化

壁画片に混入している不純物を考慮し、試料溶液 2 および 3 に関しては、酵素消化前にポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) をすることで有機物の分離を行い、その後、各成分をゲル内でトリプシン消化した。分離は、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用い Laemmli 法 (1) に基づいて実施した。

まず、試料溶液 2 および 3 を凍結乾燥し、各々を $12\ \mu\text{L}$ のサンプルバッファー [$100\ \text{mM}$ トリス塩酸 ($\text{pH}\ 6.8$)、 20% (v/v) グリセロール、 4% (w/v) SDS、 $100\ \text{mM}$ DTT、 0.1% (w/v) プロモフェノールブルー (BPB)] に溶解させ、 60°C で 20 分間加熱し可溶化させた。溶解後の液 $5\ \mu\text{L}$ を、 10% アクリルアミドゲルを用いて作成した分離ゲルの各ウェルに添加し、 $1\ \mu\text{L}$ の分子量マーカーとともに泳動を行った。分子量マーカーには、市販の Prestained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE (ナカライテスク株式会社) を用いた。電気泳動は $25\ \text{mA}$ の定電流下で行った。

分離後の各有機物成分の検出は、銀染色法 (Silver Stain II Kit Wako、和光純薬工業株式会社) を用いて行った。まず、SDS-PAGE が終了したゲルを、純水で洗浄しながらプラスチックケースに回収し、固定液 (33.3% (v/v) エタノール、 10% (v/v) 酢酸) に浸し、一晩振とうした。固定後のゲルは、 20% (v/v) エタノール中で 20 分間振とうした後、純水に 10 分間浸透させ、ゲルの洗浄を行った。その後、増感液 (0.02% (w/v) チオ硫酸ナトリウム) 中で 10 分間振とうした。増感の終了したゲルは純水で 20 秒間、3 回振とうし、洗浄した。洗浄後のゲルを、銀染色キット付の硝酸銀を含む染色液に 15 分間浸し、振とうさせながら純粋でゲルを洗浄した後、クエン酸およびホルムアルデヒドを含む現像液に浸した。

銀染色後のゲルから、目的のスポットを含む小片を各々切り出し、 $30\ \text{mM}$ フェリシアン化カリウムと $100\ \text{mM}$ チオ硫酸ナトリウムを $1:1$ で混合した溶液 $50\ \mu\text{L}$ に浸し、染色に用いた銀を除いた後、ゲルの周囲の溶液を捨て、 $50\ \mu\text{L}$ の $10\ \text{mM}$ DTT / $100\ \text{mM}$ NH_4HCO_3 を加え 50°C で一時間振とうさせることで蛋白質中のシステイン残基間で形成される S-S 結合を還元させた。その後、 $50\ \mu\text{L}$ の $50\ \text{mM}$ ヨードアセトアミド / $100\ \text{mM}$ NH_4HCO_3 を加え、室温で 40 分間、遮光条件下で振とうさせ蛋白質中のシステイン残基のアルキル化を行った。還元・アルキル化後の各ゲルに対して、 $30\ \mu\text{L}$ のトリプシン溶液 ($0.01\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$) を加え、 37°C で 24 時間放置し酵素消化した後、各試料溶液を 1% の TFA 溶液を加えて酸性 ($\text{pH}\ 4.0$) にし、ZipTip- C_{18} で濃縮・脱塩した。

2.5 MALDI 質量分析

酵素消化後の試料溶液 $1\ \mu\text{L}$ を MALDI サンプルプレート上で $0.5\ \mu\text{L}$ のマトリックス溶液 (α -シアノ-p-ヒドロキシ桂皮酸のアセトニトリル溶液) と混ぜた後、乾燥させ分析を行った。質量分析は、MALDI タンデム飛行時間型 (MALDI-TOF/TOF) 質量分析装置 (Axima Performance; Shimadzu/Kratos,

Manchester, UK) を使用し、MALDI-TOF スペクトル及び MALDI-TOF/TOF スペクトルを測定した。MALDI-TOF スペクトル中に検出された各ペプチドのアミノ酸配列は、MALDI-TOF/TOF スペクトルの測定によって得られた開裂パターンを手動で解釈することによって推定した。

3 結果と考察

3.1 壁画の最表層から調製した試料（試料溶液 1）の MALDI 質量分析

壁画の剥落片表面を 1 mL の純水で洗った際の洗浄液を、タンパク質分解酵素トリプシンで処理し、質量分析した結果得られた MALDI-TOF スペクトルを Fig. 4 に示した。ここで、壁画に含まれる接着剤の原料を想定して市販のウシの腱より抽出した I 型コラーゲン、ウシ血清由来アルブミン、アラビアゴムを同様にトリプシンで消化し得られるスペクトルを、比較試料として Fig. 4 にあわせて示した。

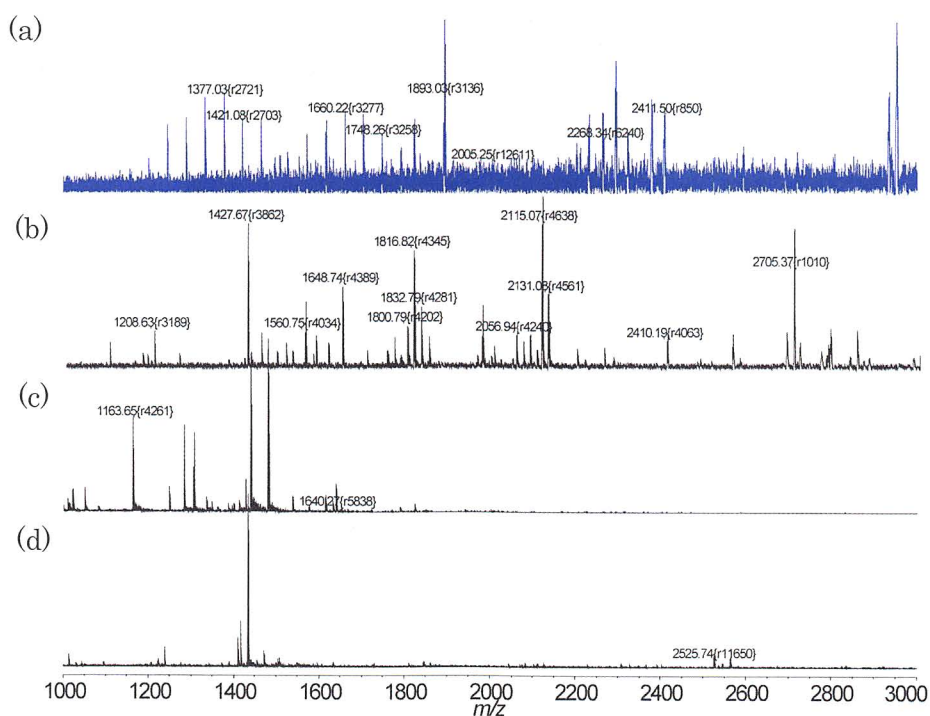


Fig. 4 MALDI-TOF MS spectra of tryptic digests of sample #1 (a), type I collagen (b), bovine serum albumin (c), and Arabic gum (d)

壁画片から得られた MALDI-TOF スペクトル中に観測されたピークの大部分は、各種ケラチンなどの不純物に由来するものであり、比較試料として用いた I 型コラーゲン、アルブミン、そしてアラビアゴムのスペクトル中に観測されたピークとは、分解酵素トリプシンの自己消化ペプチドを除いてほとんど一致しなかった。また、壁画片由来のスペクトルには、 m/z 44 の間隔を持つ一連の特徴的なピーク群が観測されており、合成ポリマーであるポリエチレングリコール（化学式： $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ ）の混入が認められた。この結果は、石室内の壁画表面が、見学の際の人為的要因による汚染や、採取時に多数の人の手に触れることから混入する毛髪や皮膚の主要成分であるケラチン、空気中の細菌で汚染さ

れており、さらに化粧品クリームなどの添加剤や保存に用いたビニルケースなどに含まれるポリエチレングリコールが混入していることを明確に示している。特に、ポリエチレングリコールのピークはMALDI-MSの感度が非常に高いためにしばしば観測されているので、さらに微量の文化財資料の分析には注意が必要である。

そのため、表面部に接着剤成分がたとえ分解されずに存在していたとしても検出することは非常に困難であると考えられる。次項では、不純物の分離に対する我々のアプローチを紹介する。

3.2 電気泳動法 (SDS-PAGE) による不純物の分離と質量分析

壁画の最表面から抽出した試料において顕著な不純物の汚染が認められたため、試料溶液2および試料溶液3に関しては、予め電気泳動法 (SDS-PAGE) により、有機物成分を分離した (Fig. 5)。

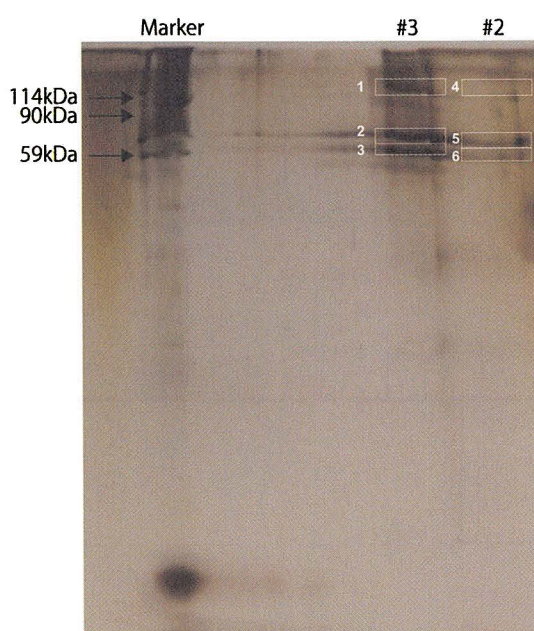


Fig. 5 Result of SDS-PAGE separation

得られたゲル中で、明確なバンドが見られる領域 (図中1~6) を切り取り、ゲル内で酵素消化したペプチド試料をMALDI-TOF MS分析した (Fig. 6)。市販のウシI型コラーゲンのスペクトルに比べて、ゲル内消化で得られた壁画由来のスペクトルは、非常にノイズが大きく、またピーク強度が小さい。これは、試料中のペプチド濃度が薄いことに対応している (比較的感度の高い銀染色法を用いて漸く存在が確認できる程度である)。

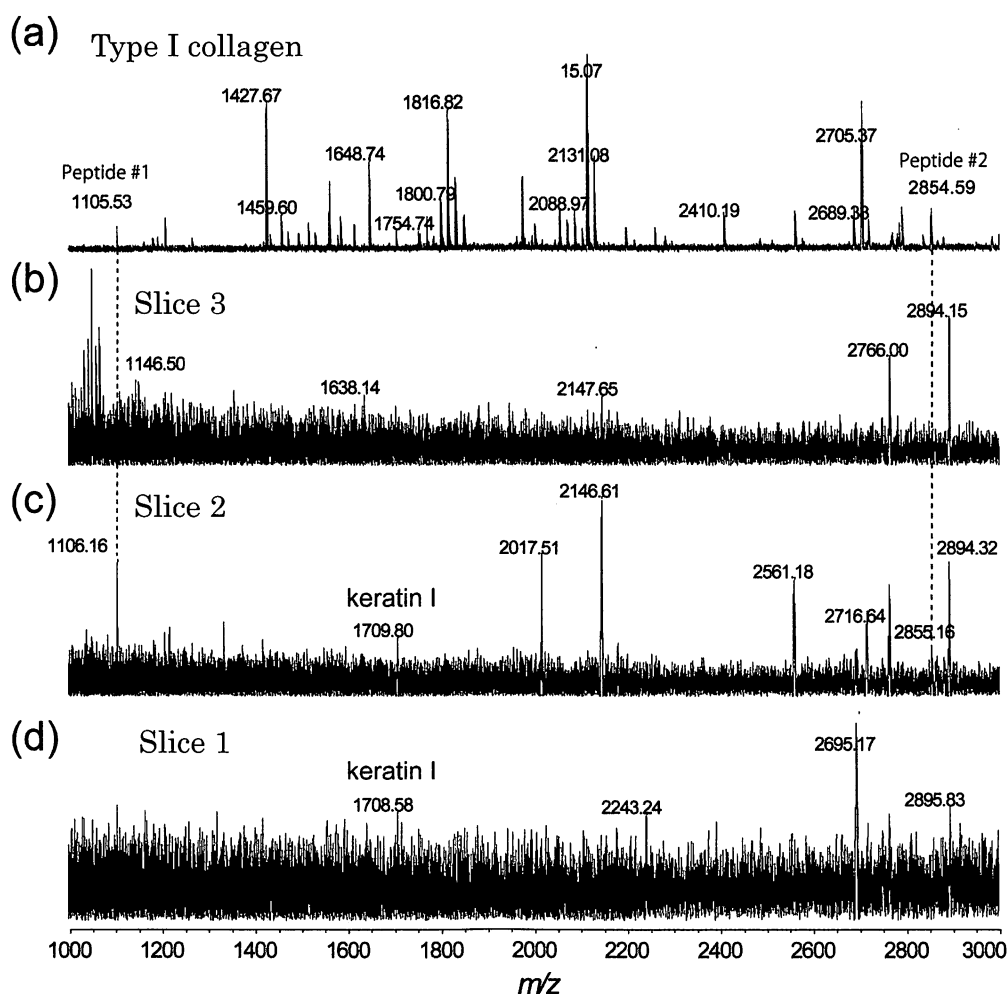


Fig. 6 MALDI-TOF MS spectra (m/z 1000-3000) of tryptic digest of peptides [Spectra of tryptic digest of type I collagen (a) and of peptides extracted from each slice of the SDS-PAGE gel (b-d) are shown.]

Fig. 6 中には、Fig. 5 の SDS-PAGE ゲルの内、1～3 の四角で囲った部分から抽出したペプチドの MALDI-TOF スペクトルを示している。興味深いことに、2 の四角で囲った部分からウシ I 型コラーゲンに由来するピークが確認された (m/z 1106 および 2855)。続く、MALDI-TOF/TOF スペクトルの手動による解釈によって、それらのアミノ酸配列を同定することができ、それぞれ GVQGP(O)PGPAGPR (m/z 1106) と GLTGPIGPPGP(O)AGAP(O)GDKGEAGPSGPAGPTGAR (m/z 2855) と判明した。1 と 3 の四角で囲った部分からはそのようなピークは検出されなかった。

今回、同定された二種類のペプチド配列を現在データベースに登録されている主な動物種のコラーゲンの配列と比較した図を Fig. 7 に示す。各動物種の内、当該ペプチド配列を含む動物は、ウシ (*Bos taurus*)、イヌ (*Canis familiaris*)、ゾウ (*Elephant*)、マウス (*Mouse*) が当てはまる。但し、種の特定には、今後、抽出法等を再検討し、より多くのペプチドを同定していく必要があるだろう。また、Fig. 6 (b)～(d) には、コラーゲンに由来するピーク以外にもいくつかのピークを含んでおり、今後同定していく必要がある。例えば、四角 2 には、ヒト Keratin 1 中の配列 (FSSCGGGGSFGAGGGFGSR) に相当するペプチドが m/z 1709.80 に観測されている。ヒト Keratin 1 は主に表皮に存在するタンパク質で、分子量がおよそ 66 kDa である。分子量マーカーと比較すると四角 2 の場所から検出されても不思議ではない。

| | m/z 1106 | | | m/z 2855 | | |
|--------------------------|------------|--------------------------------------|------------|------------|-------------------|---|
| Egyptian Painting | -----G | VQGPPGPAGP | R----- | -----GLT | GPIGPPGPAG | APGDKGEAGP SGPAGPTGAR |
| Donkey | GERGFPGERG | VQGPPGPAGP | RGSNGAPGND | DAGPKGADGS | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGE T GP SGPAGPTGAR |
| Bos taurus | GERGFPGERG | VQGPPGPAGP | RGANGAPGND | DAGPKGADGA | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR |
| Canisfamiliaris | GERGFPGERG | VQGPPGPAGP | RGANGAPGND | DAGPKGADGS | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR |
| Elephant | GERGFPGERG | VQGPPGPAGP | RGSNGAPGND | DAGPKGADGS | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR |
| Gorilla | GERGFPGERG | VQGPPGPAGP | RGANGAPGND | DAGPKGADGS | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGE S GP SGPAGPTGAR |
| Rabbit | GERGFPGERG | VQGPPGPAGP | RGSNGAPGND | DAGPKGADGS | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGE T GP SGPAGPTGAR |
| Mouse | GERGFPGERG | VQGPPGPAGP | RGNGAPGND | DAGPKGADGS | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR |
| Rat | GERGFPGERG | VQGPPGPAGP | RGNGAPGND | DAGPKGADGS | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGE T GP SGPAGPTGAR |
| Gallusgallus | GERGFPGERG | VQGPPGP Q GP | RGANGAPGND | DPGPKGADGA | PGKDGVRGLT | GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR |
| Frog | GERGFPGERG | A Q G PPGP Q GA | RGSNGAPGND | DQGVKGSDDT | PGKDGVRGLT | GPIGPPGP G APGDKGEAGP SGPAGPTGAR |
| Danioreerio | GDRGFPGERG | AP GPAG PV GA | RGSPGSAGND | DQGAAGADGA | AGKDGIR MT | GPIGPPGPAG APGDKGE S GP SGPAGPTGAR |
| Rainbowtrout | GDRGFPGERG | AP GPS G PAGA | RGSPGSAGND | DQGVKADGA | GGKDGVR MT | GPIGPPGPAG S PGDKGE T GA P GA VGP S GAR |

Fig. 7 Sequence alignment of type I collagen

今回検出された m/z 1106 のペプチドのアミノ酸配列は、8千年前の恐竜の骨から検出されたコラーゲンについての報告(2)のGVQGP(O)PGPQGP(1162 Da)と一残基(Q)の違い、 m/z 2855のペプチドともGLTGPIGPP(O)GPAGAP(O)GDKGEAGSPGPPGPTGAR(2878 Da)と一残基(P)の違いを、それぞれ示すに過ぎない。これらのペプチドが存在する部分は、コラーゲン分子の中でも安定な部位に存在するとする報告例もあり(3)、数千年の時が経過し分子の劣化が進行したにもかかわらず、試料中に残存したと考えられる。今後さらに分析を進めるとともに、古代エジプトにおける膠の利用について考える上での有力な視点を提供したい。

参考文献

- 1) Laemmli, U. K. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature* 227, 680 (1970).
- 2) Schweitzer, M. H., et al. "Biomolecular Characterization and Protein Sequences of the Campanian Hadrosaur *B. canadensis*," *Science* 324, 626 (2009).
- 3) San Antonio, J. D., "Dinosaur Peptides Suggest Mechanisms of Protein Survival," *PLoS One* 6, 20381 (2011).