

墨に含まれる膠コラーゲンの質量分析による原料動物種の同定

宮路 淳子¹⁾・河原 一樹¹⁾・松尾 良樹¹⁾・
館野 和己¹⁾・鈴木 孝仁¹⁾・高田 将志²⁾・山崎 雄三³⁾

●キーワード：プロテオミクス (proteomics), 膠 (animal glue), 質量分析 (mass spectrometry), 墨 (Chinese ink stick)

1. はじめに

コラーゲンはあらゆる動物種の主要なタンパク質成分であり、骨や皮製品だけでなく、原材料の形態を全く残さない抽出物の膠またはその加工品として広く歴史資料に分布する。最近の研究から、八千万年前の恐竜の骨から抽出されたコラーゲンのアミノ酸配列解析により恐竜の進化上の位置まで特定できることが実証され (Schweitzer et al.: 2009), 考古学における有用な分析対象として注目されるようになった (Dobberstein et al.: 2009, Krause et al.: 2010)。

現在までに、ヒトやウシなどの哺乳類に関して、約 30 種類以上の機能の異なるコラーゲンが知られており、構造的には骨や表皮に多量に存在する I 型をはじめとする繊維状のコラーゲンと、血管内皮細胞が生産する非繊維性の VII 型コラーゲンなどに分類されている (Shoulders et al.: 2009)。コラーゲンは、基本構造として 3 分子がらせん状に絡み合った三重らせん構造を形成しており、繊維に必要な強度と弾性をもたらしている。例えば、繊維状の I 型コラーゲンの場合、2 分子の α -1 鎖と 1 分子の α -2 鎖からなる三重らせん構造を形成する (図 1)。それぞれの鎖は別々の遺伝子にコードされ、

アミノ酸配列が異なっており、同じ I 型コラーゲンの α -1 鎖であっても、動物種毎にアミノ酸配列が微妙に異なるので、適当な方法でコラーゲンのアミノ酸配列の違いが読み取れば、膠の原料となった動物種を特定することが可能である。

本研究では、古代から筆記用具として用いられてきた墨に注目し、その主要成分である煤の固着剤として約 40 % 含まれる膠のコラーゲンのアミノ酸配列を、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (MALDI) 質量分析法により解析し、原料動物種の同定を行った。日本

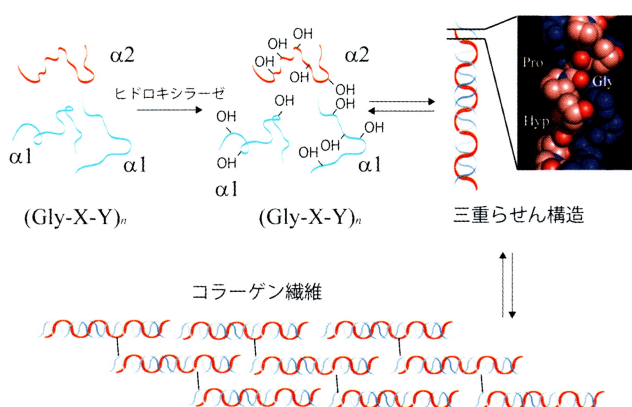


図 1 I 型コラーゲンの翻訳後修飾と構造転移の模式図

Fig. 1 Schematic representation of posttranslational modification and structural transition of type I collagen molecule.

¹⁾ 奈良女子大学 古代学学術研究センター 〒630-8506 奈良市北魚屋東町

²⁾ 奈良女子大学 共生科学研究センター 〒630-8506 奈良市北魚屋東町

³⁾ 島津製作所 応用技術部 〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1

において、墨は古代から現代に至るまで使用されている数少ない筆記用具の一つであることから、墨に含まれる膠の原料となった動物種を明らかにすれば、日本の文化史、そして技術史を解明するための新たな情報を提示できると考えられる。

2. 墨と膠

2.1 墨

墨は、煤と温水に溶かした膠を練り合わせ、成型、乾燥させるという方法で製造され、古代から現代にいたるまで基本的に変っていない。漢字が誕生した中国では文字媒体としての墨を早くから作り出していたが、現在のような膠を含む成形墨は、『中国文房四寶全集 1 墨』（北京出版社: 2007）によれば、後漢（1~3 世紀年頃）に始まる。中国においては 6 世紀に成立した『齊民要術』に、墨の具体的な製法が記されており、その後も『墨譜法式』『墨経』など墨の専門書が数多く残されている。

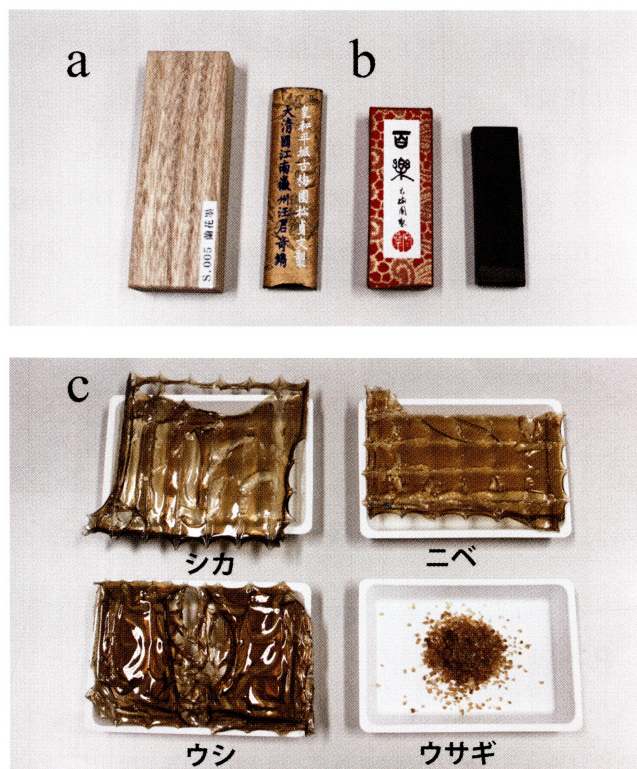


図 2 分析対象とした墨と膠試料. a: 江戸時代（1741 年）に古梅園で製造された墨, b: 2008 年に古梅園で製造された墨, c: 標準膠試料として用いた 4 種類（シカ, ウシ, ニベ, ウサギ）の膠試料.

Fig. 2 Chinese ink sticks and animal glues used in this study. Chinese ink sticks manufactured by Kobaien in 1741 (a) and in 2008 (b). Animal glues (deer, cow, fish, and rabbit) used as standard materials for MALDI-MS analysis (c).

『日本書紀』によれば、日本に墨を伝えたのは、推古天皇十八（610）年、高句麗からの渡来僧曇徴とされている。墨の製法が記されている日本の文献史料には 10 世紀に編纂された『延喜式』図書寮年料墨条・造墨条がある。室町時代末の 1577 年に奈良の地で製墨業を創業し、現在する日本最古の造墨の老舗である古梅園では、代々和墨の研究、改良が重ねられており、『古梅園墨譜』の処々に記されている記述から日本における墨の製造史の多くを知ることができる。中でも、六代松井元泰（1689-1743）が、元文 4 年（1739）に官許を得て長崎に赴き、長崎寄留の清国人 9 人と、中国における製墨法について質疑応答した記録は、『唐人墨製問答之記録』自筆本として保管されており貴重な資料である（松尾: 1993）。今回分析の対象とした江戸時代の墨は、古梅園が長崎への来船清人に依頼して作らせた墨型を用いて作られた（図 2）。西暦 1741 年（清・乾隆 6 年）に清国徽州の印工が作った墨型であることが『古梅園墨譜』に記されている。

2.2 膠

墨の重要な材料の一つである膠は、動物や魚類を煮炊きした残渣から発見され使われ始めたと言われるが、特定の目的のために作られた膠の起源は未だ明らかではない。先に挙げた『齊民要術』には、膠の製法について原料動物を含めた詳細な記述があり、当時の製造法を窺い知ることが出来る。一般的に、膠は、動物の皮・骨・爪・腱などに含まれるコラーゲンを温水中で加熱・抽出して、乾燥して製造される。原料としては、皮が最も多く使われるが、その場合石灰のような強アルカリ処理やバクテリアによる腐敗を利用して、表面の角質や脂肪分を分解・除去する。コラーゲンの抽出効率を高めるために煮沸を何度も繰り返すこともあるが、高温処理によって膠の接着力が弱くなることが知られている（安孫子: 1987）。

膠の原料となった動物種に関して、古代の文献史料に様々な記述がある。「膠」「阿膠」の原料として、古代中国では『周礼』考工記に鹿、馬、牛、鼠、魚、犀、『齊民要術』（北魏）には沙牛、水牛、猪（ブタ）、驢（ロバ）、馬、駝（ラクダ）、騾（ラバ）の記述があり、日本においては、『延喜式』（平安中期）に牛皮の記述がある。ま

た、墨の製造に使われた膠としては、『墨譜法式』『墨經』（宋）に牛、鹿角の記述があり、『墨法集要』（清）には魚鰾膠、牛膠と記されている。一方で、膠は墨ばかりでなく、美術分野において、顔料と混合して絵の具の製造に利用されており、伝統的手工業や工芸などの広い分野においては有用な接着・固着剤として使用されてきた。アジア諸国とは異なり、ヨーロッパでは、絵画などに用いられる顔料の固着剤として兎を原料とした膠が普及している。

膠の原料となるコラーゲンは、特定の温度範囲で、ゾル（液体）とゲル（固体）の間の可逆的な変化が起こる。例えば、ウシの I 型コラーゲンは、約 37 °C を境にゾルとゲルの相転移が起こることが報告されており、相転移の温度はコラーゲンの三重らせん構造の安定性と密接に関わると考えられている (Latinovic et al.: 2010)。コラーゲンと同様の特性を有する膠は、ゲル化に伴って水分の乾燥を待つまでもなく直ちに接着力を発揮し、必要があれば温和な加熱によって接着力のないゾル状態に変換できる。すなわち、古代から伝わる膠製造技術は、現代の最先端科学をもってようやく解明されようとしているコラーゲン分子の構造と機能を巧みに利用している。コラーゲンの分析による膠原料の同定は、膠に関連する古代の科学および技術史の新たな一側面を明らかにする考古学的意義がある。

以上の事実と文献上の知識を背景に、次項では墨に含まれている膠の分析を例に我々の方法論とその結果について紹介する。

3. 試料と手法

3.1 分析試料

試料の江戸時代の墨は、前述の通り古梅園が西暦 1741 年（清・乾隆 6 年）に清国徽州の印工が作った墨型を用いて成形しており、古梅園の土蔵に保存されていたものである（図 2 a）。本研究では、比較試料として、2008 年に古梅園でウシの皮を原料とした膠を用いて製造された市販の墨（製品名：百楽）についての分析を並行して行った（図 2 b）。これらの試料に加えて、標準の膠試料としてウシ、シカ、ニベ、ウサギの膠を用意した（図 2 c）。ウシとシカに関しては皮を原料とし、ニベ

に関しては浮き袋から抽出したコラーゲンを原料として製造された膠試料をそれぞれ（財）元興寺文化財研究所から提供を受けた。ウサギ由来の膠に関しては、皮から抽出したコラーゲンを原料とした製品をホルベイン工業株式会社より購入した。

3.2 試料調製

各墨試料は、まず約 1 mg の墨片を刃物で削り、乳鉢中で 100 mM 炭酸水素アンモニウム (NH_4HCO_3) 緩衝液 1 ml とともに粉碎し、墨汁液状にした。この液を溶液 A とし、2 ml 容量のエッペンドルフチューブに移した後、乳鉢に残った内容物を 1 ml の 100 mM NH_4HCO_3 緩衝液で洗浄し、得た液 B と溶液 A を合わせて保存液 C とした。

保存液 C (500 μl) を 100 mM NH_4HCO_3 緩衝液で洗ったシリンジフィルター (Whatmann/GDX-PTEE, 0.2 mm 径) で濾過し、濾液を 1 時間、60 °C で静置しコラーゲンの三重らせん構造を変性させた。この液を室温に冷却後、10 μl のトリプシン溶液 (10 mg/ml 100 mM NH_4HCO_3) を加えて、37 °C で 16~24 時間、酵素消化した。酵素消化によって生じるペプチド断片の混合物の溶液 10 μl に 40 μl の 0.5 % トリフルオロ酢酸水溶液を加えて酸性 (pH 4.0) にし、ZipTip-C18 で濃縮・脱塩して試料溶液 D とした。標準の I 型コラーゲンおよび各動物種の膠試料に関しては、各々約 1 mg を 100 mM 炭酸水素アンモニウム (NH_4HCO_3) 緩衝液 1 ml に溶解させ溶液 A を調製し、その後の実験操作は墨試料の場合と同様に実施した。

3.3 質量分析

MALDI サンプルプレート上で 1 μl の溶液 D と 1 μl 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) を混ぜた後、乾燥させ、MALDI タンデム飛行時間型 (MALDI-TOF/TOF) 質量分析測定を行った。質量分析計は、AXIMA-Performance (Shimadzu/Kratos) を使用し、MALDI-TOF スペクトル及びヘリウムガスによる衝突誘起解離 (CID) に基づく 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。また、最終的な動物種の同定は、質量分析データの解析結果から得られたアミノ酸配列をデータベースに登録されてある各種動物のコラーゲンのアミノ酸配列と照合することに加えて独自に用意した各動物種の膠試料の質量分析結果と直接比較することによって行った。

4. 結果および考察

本研究では、製造年代が異なる二種類の墨を分析の対象とした（図2）。MALDI 質量分析の結果から、図3に示すように、2008年に製造された墨と1741年（江戸

時代）に製造された墨から抽出された膠成分のトリプシン消化物、および標準試料として分析したウシI型コラーゲンのトリプシン消化物のMALDI-TOF スペクトルは、ほぼ一致したパターンを示した（図3）。

特に、プロテオミクス実験においてしばしば検出されるケラチンやトリプシンの自己消化物などの不純物に由来する数本の信号を除いて、検出された信号の数は完全に一致した。また、これらのスペクトル中で検出された同一の質量／電荷比（ m/z ）を示した主要な15本の信号については、MALDI-TOF/TOF 分析で得られる開裂パターンを解釈することにより、検出されたペプチド断片のアミノ酸配列を推定することができた（図4および表1）。

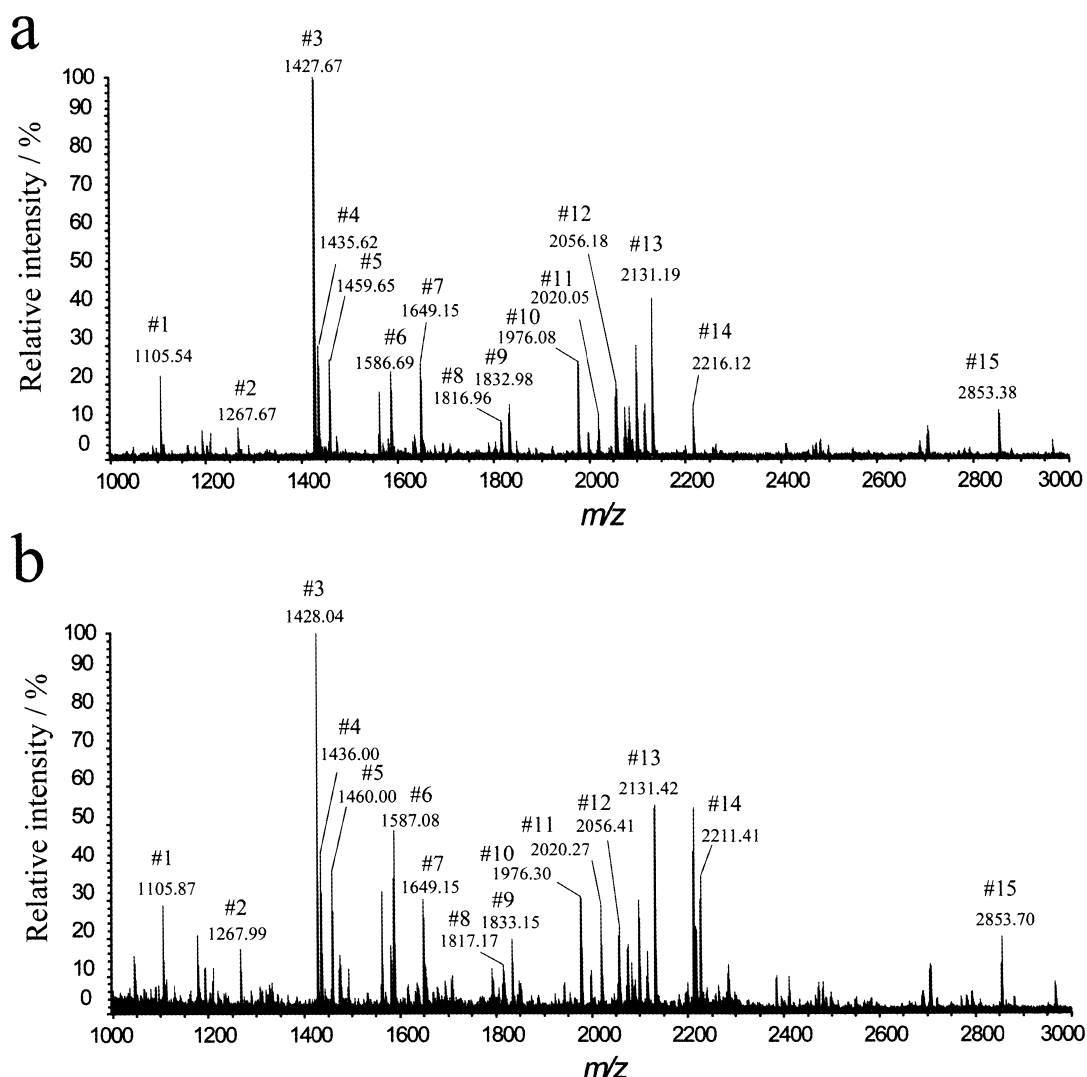


図3 2008年に製造された墨（a）と1741年に製造された墨（b）から抽出されたペプチドのトリプシン消化物のMALDI-TOF 質量スペクトル。MALDI-TOF/TOF 分析を行った信号を#1～#15で示してある。

Fig.3 MALDI-TOF mass spectra of tryptic digest of peptides extracted from ink sticks manufactured in 2008 (a) and in 1741 (b). The peaks subjected to MALDI-TOF/TOF analysis are labeled from #1 to #15.

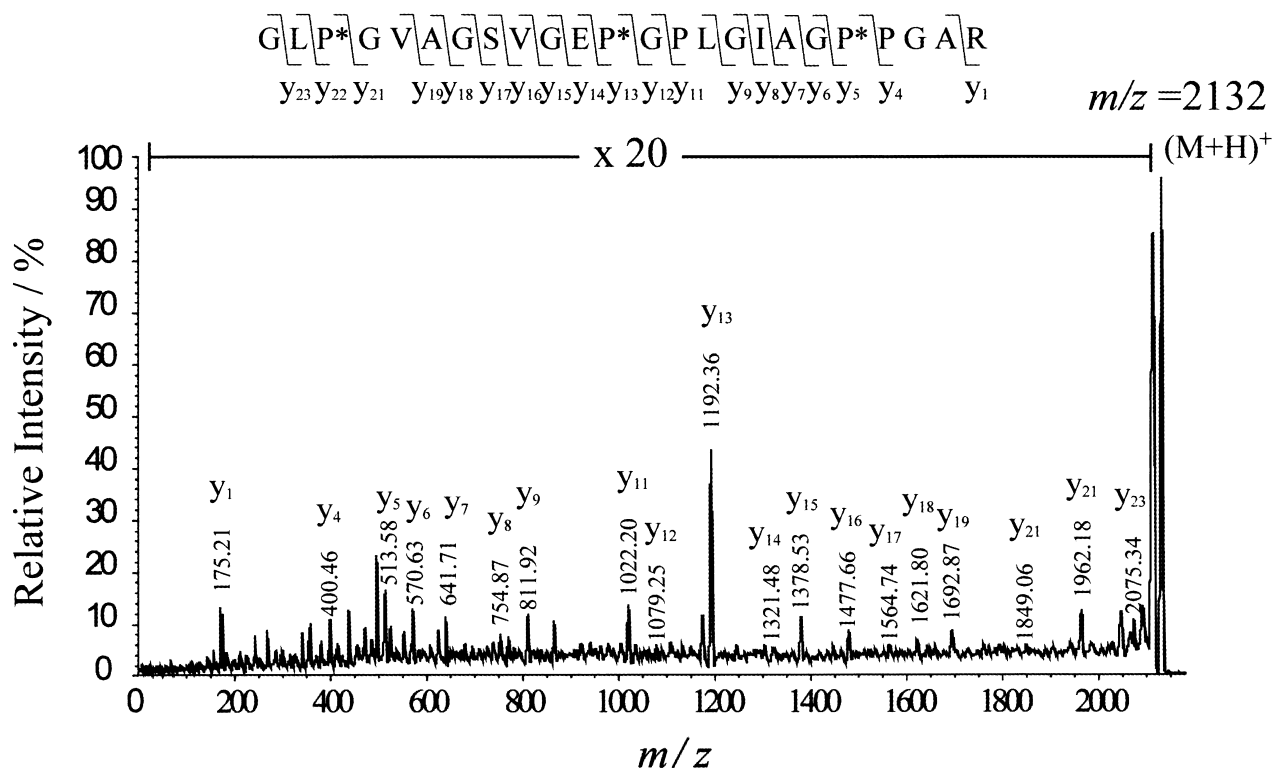


図4 2008年に製造された墨のMALDI-TOF質量スペクトル中に観測された m/z 2132 (#13)の信号のMALDI-TOF/TOF分析結果。一連の y 系列のフラグメントイオンのみ示してある。

Fig.4 MALDI-TOF/TOF mass spectrum and de novo sequencing of peak at m/z 2132 (#13) of Chinese ink stick manufactured in 2008. The y -type ions are indicated.

表1 墨から抽出したペプチドのMALDI-TOF/TOF分析によるアミノ酸配列解析結果
Table 1 Summary of the peptide sequences determined by the MALDI-TOF/TOF analysis.

m/z (#)	アミノ酸配列 ^a	鎖 (型)
1105.5(1)	G(685)VQGPPGP*AGPR(696)	α 1(I)
1267.8(2)	G(326)IP*GPVGAAGATGAR(340)	α 2(I)
1427.9(3)	G(572)IP*GEFGLP*GPAGAR(586)	α 2(I)
1435.8(4)	G(472)EP*GPAGLP*GPPGER(486)	α 1(I)
1460.1(5)	G(865)SAGPP*GATGFP*GAAGR(881)	α 1(I)
1585.8(6)	G(397)ANGAP*GIAGAP*GFP*GAR(414)	α 1(I)
1649.6(7)	G(380)STGEIGPAGPPGPPGLR(397)	α 2(I)
1818.0(8)	G(994)P*PGPMGPPGLAGPP*GESGR (1013)	α 1(I)
1834.0(9)	G(994)PP*GP*MGP*PGLAGPPGESGR(1013)	α 1(I)
1977.2(10)	S(1062)GDRGETGPAGPAGPIGPVGAR(1083)	α 1(I)
2021.2(11)	G(448)EP*GPTGIQGPP*GPAGEEGKR(468)	α 1(I)
2057.4(12)	E(463)GPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR(484)	α 2(I)
2132.4(13)	G(881)LP*GVAGSVGEP*GPLGIAGP*PGAR(904)	α 2(I)
2217.4(14)	G(910)ETGPAGRP*GEVGP*P*GPPGPAGEK(933)	α 1(I)
2855.1(15)	G(763)LTGPIGPPGP*AGAP*GDKGEAGPSGPAGPTGAR(795)	α 1(I)

^a 各ペプチドの先頭と末尾のアミノ酸配列番号は、データベース UniProt に登録されているウシI型コラーゲンのN末端からの順番に従って付した。

	#11 $m/z = 2021.2$	#4 $m/z = 1435.8$
墨	--GEPGPTGIQGPPGPAGEEGKR---	GEPGPAGLPGPPGER
ロバ(ID:B9VR88)	AKGEPGPTGIQGPPGPAGEEGKRGARGEPPGTGLPGPPGER	
ウシ(ID:P02453)	AKGEPGPTGIQGPPGPAGEEGKRGARGEPPGPAGLPGPPGER	
イヌ(ID:Q9XSJ7)	AKGEPGPTGIQGPPGPAGEEGKRGARGEPPGTGLPGPPGER	
ゾウ(ID:G3UE48)	AKGEPGPVGIQGPPGPAGEEGKRGARGEPPGTGLPGPPGER	
ゴリラ(ID:G3S8D4)	AKGEPGPVGVQGPPGPAGEEGKRGARGEPPGTGLPGPPGER	
マウス(ID:P11087)	AKGEPGATGVQGPPGPAGEEGKRGARGEPPSGLPGPPGER	
ラット(ID:P02454)	AKGEPGPAGVQGPPGPAGEEGKRGARGEPPSGLPGPPGER	
ニワトリ(ID:P02457)	AKGEPGPAGVQGPPGPAGEEGKRGARGEPPAGLPGPAGER	
カエル(ID:Q802B5)	AKGEPGPAGVQGPPGPSGEEGKRGSRGEPGPAGPPGPAGER	
ニジマス(ID:Q910C0)	AKGESGPAGVQGPAGPAGEEGKRGGRGEPGGAGARGAPGER	

図5 アミノ酸配列データベースに登録されている主な動物種のI型コラーゲンのアミノ酸配列とMALDI-TOF/TOF分析結果から推定された墨試料に含まれるペプチドのアミノ酸配列の比較。各動物種の右側の括弧内には、データベースUniProtの配列IDを示してある。各配列の中でウシのアミノ酸配列と異なるアミノ酸を水色で示してある。またトリプシンの切断部位のアミノ酸を赤で示す。

Fig. 5 Sequence alignment between the peptides (#4 and #11) derived from the glue in the Chinese ink stick and type I collagen in several taxa. The type I collagen sequences were extracted from the database UniProt and their accession numbers were provided in parentheses.

得られた結果を、NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) や UniProt (http://www.uniprot.org/) などのアミノ酸配列データベースに登録されている様々な動物に由来するコラーゲンのアミノ酸配列と比較したところ、15本の信号の全てがウシ (Bovine) のI型コラーゲンのアミノ酸配列と一致し、その内の10本は α -1鎖に該当し、残りの5本は α -2鎖に一致することが明らかになった (表1)。この結果は、I型コラーゲンの特徴的な3本鎖構造が2本の α -1鎖と1本の α -2鎖から形成されている事実とよく一致している。図5には、一例として、現在データベースに登録されている主な動物種のI型コラーゲン (α -1鎖) と墨から抽出したペプチドのアミノ酸配列の比較結果を部分的に抜粋して表示した。ここでは、図3の3種類の試料に共通して検出された#4 (m/z 1435.8) と#11 (m/z 2021.2) を参考として示したが、これらの部分的な配列情報だけでも墨試料と完全に合致する動物種はウシしか存在しないことがわかる。各動物の#4や#11のペプチド断片に相当する部分のアミノ酸配列は、3残基ごとにGlyが存在するなど極めて良く似ているが、各々数か所異なっており、そのことが動物種の判別を可能にしていることは興味深い。とはいえ、墨の原料となった膠に用いられた動物種を同定するためには、本来ならば、2.2の節にあげた膠原料として可能性のある動物種と比較することが望ましいが、現在 (2012年10月) でもデータベースに登録されてい

るI型コラーゲンの種類は極めて限られており、シカ、サカナ (ニベ)、サイ、スイギュウ、ラクダ、ラバは存在せず、ウマ、ブタ、ウサギに関して部分的な配列が登録されているのみである。したがって、最終的な動物種の同定は、当該動物種から製造した膠の質量分析結果と直接比較対照することが必要である。本研究では、ウシ由来の膠に加えて、上記の中から比較的入手の容易である、シカ、サカナ (ニベ)、ウサギの膠を収集し分析を実施した。

コラーゲンは、分子量13-14万でアミノ酸が約1400残基連なる長いポリペプチド鎖中に3残基毎にグリシン (G) が繰り返し現れ、その間に多くのプロリン (P) が挟まれる特徴的な配列を数多く含む。さらに、三重らせん構造を安定化するためにプロリンヒドロキシラーゼにより、プロリン残基が高い割合で酵素的に酸化されヒドロキシプロリン (ここではP*と表示する) に変換されている (図1)。この翻訳後修飾の割合は、同じI型コラーゲンであっても動物種ごとに異なっており (Burjanadze: 1982)、DNAの配列情報を基本とした既存のデータベースには、その様なDNAの翻訳後に修飾が起こるヒドロキシプロリンの情報が含まれていない場合が多い。そのため、今後データベースに蓄積される配列情報が一層充実したとしても、膠試料を直接分析する意義はあると思われる。

図6の膠試料の質量分析結果が示すように、二種類の

墨試料、ウシ、そしてシカに関しては m/z 1460 に特徴的な信号が検出された。MALDI-TOF/TOF 分析から、そのアミノ酸配列は GSAGPP*GATGFP*GAAGR と推定され、翻訳後修飾の位置も一致した。一方、ウサギとサカナ（ニベ）では、 m/z 1454 と m/z 1487 に相当する信号が検出されているが、各々に関して推定されるアミノ酸配列が GSPGPPGATGFPGAAGR と GPSGPP*GATGFP*GAAGR となり、幾つかのアミノ酸残基や翻訳後修飾の割合に差がみられた（図 6 a）。さらに、図 6 b に示すように、ウサギにおいて m/z 2129 に検出されるペプチド断片は、そのアミノ酸配列が GLP*GVAGALGEP*GPLGIAGP*PGAR と推定され、二種類の墨試料、ウシ、そしてシカに関して得られたスペクトル中の m/z 2131 に観測されるペプチドと 2 残基異なっていることも明らかになった。サカナ（ニベ）に関しては、今回の実験では、相当するペプチドは検出されなかった。

ここまでの結果から、今回対象とした墨試料の製造に用いられた膠がウサギおよびサカナ（ニベ）を原料としていないことは明白であるが、同じウシ亜目、真反芻下目に属するウシとシカのコラーゲンのアミノ酸配列は非常に類似している可能性があり、MALDI-TOF スペクトルも極めて似ていたため、判別が困難であった。しかしながら、我々は図 3 の a と b に共通して観測された 15 本のピークの中で、 m/z 2855 のピークのみがシカでは m/z 2885 となり、その原因が A（アラニン）から T（トレオニン）への変異によるものであることを見出した（図 6 c）（Kawahara et al.: 2011）。質量分析を基盤とした今回提案する方法では、あるピークについてのアミノ酸配列解析結果が一つのアミノ酸でも違えば、他のピークすべてについて配列が一致したとしても特定の動物に同定することは不可能である。

したがって、膠原料がシカである可能性は m/z 2855 のピークの検出によって排除できる。以上の結果から、今回の試料中のコラーゲンがウシ以外のシカ、ニベ、ウサギなどの膠原料として想定される主要な動物由来の可能性は否定できた。膠原料がウシであるとする今回の分析結果は、「牛皮を煮て之を作る」と記載した『和名類聚抄』が伝える膠の製法から考えても妥当といえる。

ところで、膠の製造時の加熱処理によりコラーゲン分子が非特異的に加水分解を受けて低分子化すると考えられている。ゼラチンに関する他の研究例において、加水分解後のペプチド断片が 3 重らせん構造を再形成することが報告されていることから（Fujitsu et al.: 1997）、製造時の加熱処理により、断片化が生じたとしてもある程度の量のペプチド断片は 3 重らせん構造を再形成することが充分考えられる。また、古い墨の劣化がコラーゲンの分解によるものであるとも考えられており、今回試料とした江戸時代の墨に含まれている膠は製造以来 270 年余りを経ていることから、こうした分解が著しく進んでいると予想された。即ち、製造時または経年劣化によりコラーゲンを構成しているペプチド結合がある特定のアミノ酸残基の位置で分解を受けていれば、先に述べた加水分解と同様に、トリプシン消化が正常に進行してリジン（K）あるいはアルギニン（R）の C 末端側で切断されて生じたペプチド以外についてもピークが観測されるはずである。ところが、今回の実験で明らかになったように、図 3 の各スペクトルは非常に似ており、経年劣化は観測されなかった。この事実は、今回の実験で墨に含まれる膠は、製造後 270 年の時を経ているにもかかわらず現代のものとほぼ同じ化学構造を保ち、動物種の特定が十分に可能であることを示唆している。おそらく、膠は固形の墨の内部で湿気や酸素、さらに微生物との接触を絶たれたために分析を困難にする大きな分解を免れたのであろう。しかしながら、今回解析によって明らかになったアミノ酸配列の総延長は 230 残基余りで、 α -1 鎖と α -2 鎖の三重鎖部分（各 1100 残基）を合わせた全長の約 1/10 に過ぎない。図 3 のスペクトルの類似性から、残りの 90% の部分に経年劣化箇所が多数存在するとは考え難いが、抽出条件の再検討や本研究では考慮していなかったコラーゲン特有の架橋構造の情報などを取り入れることで、アミノ酸配列の解析可能な領域がさらに拡大する必要があるだろう。

コラーゲンはタンパク質の一種であることから、これを成分として含む膠が「腐りやすい」あるいは「不安定」と考えられている。しかし江戸時代の墨に含まれているコラーゲンの分析結果が示す通り、少なくともこの墨と同様に温和な条件で保存されていれば数百年間はその分

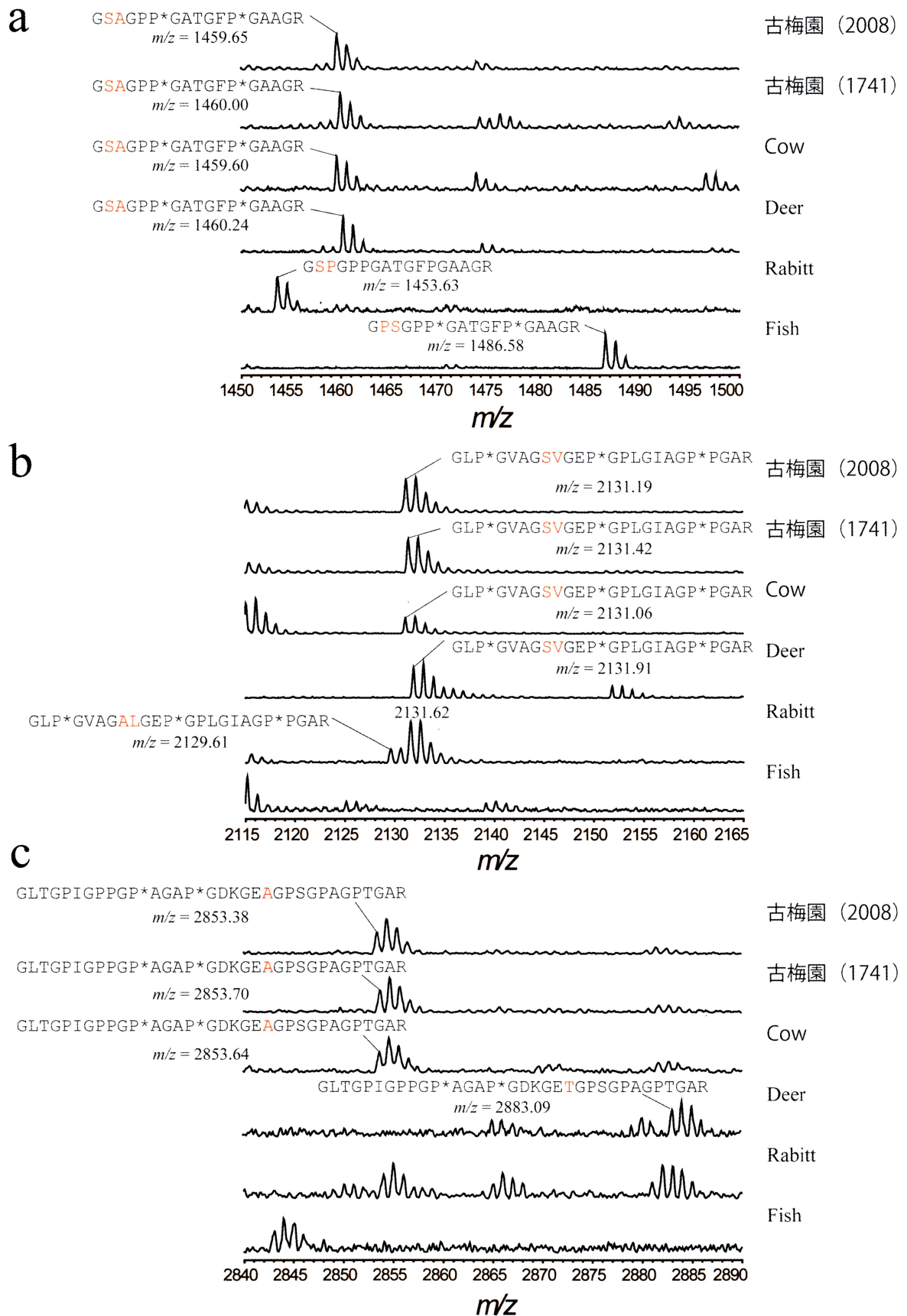


図6 2008年および1741年に製造された墨と各種動物由来膠試料から抽出されたペプチドのトリプシン消化物のMALDI-TOF質量スペクトルの比較。原料動物種の判別を利用した各信号を含む領域、 m/z 1450-1500 (a), m/z 2115-2165 (b), m/z 2840-2890 (c) をそれぞれ示した。

Fig. 6 Selected regions of MALDI-TOF mass spectra of tryptic digest of peptides derived from the glue in the Chinese ink stick manufactured in 2008 and in 1741. The MALDI-TOF mass spectra from animal glues (cow, deer, rabbit, and fish) are also shown.

子構造が例えば部分的であったとしても破壊されずに、質量分析可能な状態で残ると予想される。カビやバクテリアによるコラーゲン又は膠の分解については現在研究中であるが、一般的に腐敗には適度な湿度が必要であり、また、コラーゲンの特徴的な三重らせん構造はコラゲナーゼのような特殊な酵素でなければ分解することはできないため、江戸時代の墨の分析結果が示す分解に対する安定性の一部は、特徴的な三重らせん構造が一般的なタンパク質分解酵素による消化を受けるペプチド結合を立体的に保護していることで説明できるであろう。

熱変性により三重らせん構造が部分的に崩れたゼラチン状態では、当然接着力も低く、タンパク質分解酵素の作用を受けやすい。したがって腐りやすいはずである。膠の製造工程で、熱変性に伴ってペプチド結合が切断される可能性は否定できないが、その過程で起こる物理化学的現象は未だ理解されておらず、膠の安定性を解明する上で今後詳細に研究する必要がある。伝統産業や美術工芸では、これらの膠の特性が経験的知識に基づいて巧みに利用されている。例えば墨の製造工程では二重釜の湯煎で膠を温水に溶き、直火による過熱を避けている。古代から継承されてきた経験に基づく技術を現代科学によって理論的に裏付けることも、我々の研究の重要な目的の一つである。まだ文献上に記述のあるシカやニベの膠を使った墨は見つかっていないが、膠の種類と墨の品質の関係は、コラーゲンの物性と密接に関連しているはずである。魚のような変温動物のコラーゲンの変性温度は体温の高い恒温動物のものに比べて低く、従ってゾル（液体）とゲル（固体）の間の転移温度も低くなり、これはヒドロキシプロリンの低い含有量と関係があることが知られている（Burjanadze: 1982）。

5. 終わりに

本研究の結果から、比較的少量の試料（墨の場合、約1 mg 程度）で墨の固着剤である膠の原料が特定できることが実証された。今後、より古い時代の試料を入手し、また様々な地域にわたる墨試料を収集・分析することで、コラーゲンの経年劣化の過程の追跡と、墨の製法の変遷についての研究を進めていきたい。現時点でウシ、シカ、サカナ（ニベ）、ウサギなどの膠についての分析を行い、これらの動物種の区別と同定は可能となった。さらにデータベースに登録されていない動物種の膠を独自に調製し、動物種別の質量分析およびアミノ酸配列データの作成を予定している。また、牛膠の「三千本」や「鹿膠」が日本画の、また兎膠が西洋画の画材として利用されていることから、今回示した墨に含まれる膠の分析法の研究対象は、墨書から絵画に広げられる。さらに接着剤に膠を使った仏像や木工芸品など広範囲の文化財も今後研究対象としたい。

謝 辞

（財）元興寺文化財研究所の植田直見氏、天野山文化遺産研究所の山内章氏、株式会社呉竹の野田盛弘氏には、膠試料の提供および膠生産・使用に関してさまざまなご教示を賜りました。深く感謝を申し上げます。また、本研究は、独立行政法人日本学術振興会『異分野融合による方法的革新を目指した人文・社会科学研究推進事業』『公募型研究領域』受託研究「文化財に含まれる膠の自然科学的分析による古代文化史および技術史の解明」（平成 21～25 年度、研究代表者：宮路淳子）ならびに奈良女子大学古代史・環境史プロテオミクス研究創成事業（平成 21～23 年度）の研究成果の一部である。

文 献

- 安孫子義弘（編）1987『にかわとゼラチン－産業史と科学技術』日本にかわ・ゼラチン工業組合
北京出版社 2007『中国文房四寶全集 1 墨』図版 p.2
松尾良樹 1993『古梅園墨譜』松井元泰（編著）古梅園 pp.33-34
賈思勰（著）・繆啓愉（校釋）1982『齊民要術校釋』農業出版社
鄭玄注 1972『周礼鄭註』新興書局有限公司

- Burjanadze, T. V. 1982 "Evidence for the role of 4-hydroxyproline localized in the third position of the triplet (Gly-X-Y) in adaptational changes of thermostability of a collagen molecule and collagen fibrils" *Biopolymers* 21 pp.1489-1501.
- Dobberstein, R. C., Collins, M. J., Craig, O. E., Taylor, G., Penkman, K., Ritz-Timme, S. 2009 "Archaeological collagen: why worry about collagen diagenesis?" *J. Archaeol. Anthropol. Sci.* 1 pp.31-42.
- Fujitsu, M., Hattori, M., Tamura, T. 1997 "Effects of hydroxyl compounds on gel formation of gelatin" *Colloid Polym. Sci.* 275 pp.67-72.
- Kawahara, K., Yamazaki, Y., Ogami, A., Kuyama, H., Muguruma, M., Ueda, N., Yamauchi, A., Miyaji, A., Matsuo, Y., Nishimura, O., Nakazawa, T. 2011 "Identification of animal species by the MALDI-MS of collagen in animal glues of Chinese ink sticks" *Proceedings of the 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* pp.2871.
- Krause, J., Briggs, A. W., Kircher, M., Maricic, T., Zwyns, N., Derevianko, A., Pääbo, S. 2010 "A complete mtDNA genome of an early modern human from Kostenki, Russia" *Curr. Biol.* 29 pp.231-236.
- Latinovic, O., Lawrence, A., Hough, H., Ou-Yang, H. D. 2010 "Structural and micromechanical characterization of type I collagen gels" *J. Biomechanics* 43 pp.500-505.
- Schweitzer, M. H., Zheng, W., Organ, C. L., Avci, R., Suo, Z., Freemark, L. M., Lebleu, V. S., Duncan, M. B., Heiden, M. G. V., Neveu, L. M., Lane, W. S., Cottrell, J. S., Horner, J. R., Cantley, L. C., Kalluri, R., Asara, J. M. 2009 "Biomolecular characterization and protein sequences of the Campanian hadrosaur *B. Canadensis*." *Science* 324 pp.626-631.
- Shoulders, M. D., Raines, R. T. 2009 "Collagen structure and stability" *Ann. Rev. Biochem.* 78 pp.929-958

(2010年10月19日受付, 2012年10月6日受理)

Identification of Animal Sources of Collagen Used as Glue in Chinese Ink Sticks by MALDI Mass Spectrometry

**Atsuko Miyaji¹⁾, Kazuki Kawahara¹⁾, Yoshiki Matsuo¹⁾,
Kazumi Tateno¹⁾, Takahito Suzuki¹⁾, Masashi Takada²⁾ and Yuzo Yamazaki³⁾**

¹⁾ Center for Research of Ancient Culture, Nara Women's University, Kita-Uoya-Higashi Machi, Nara 630-8506, Japan

²⁾ Kyousei Science Center for Life and Nature, Nara Women's University, Kita-Uoya-Higashi Machi, Nara 630-8506, Japan

³⁾ Applications Development Center, Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan

Collagen is the most abundant protein in animals and has often been found as animal glue in a variety of archaeological materials. In East Asia, the Chinese ink stick, consisting of soot and animal glue, has been used almost exclusively as a means to write letters. According to ancient records, the glue used to bind soot can be prepared from a variety of animals such as cow, deer, fish, and donkey, but such preparation is difficult to prove scientifically. Therefore, the relationship between the physicochemical properties of collagen and the source animal of the glue remains to be clarified. We suggest here a method for unambiguously identifying the animal source of collagen by amino acid sequencing with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometry. Despite the limited number of amino acid substitutions in 15 major peptide peaks in the MALDI spectra of tryptic digest of collagen, we could distinguish different animals including cow, deer, fish, and rabbit from which collagen was derived. Employing these peaks as markers, we identified collagen $\alpha 1(I)$ and $\alpha 2(I)$ of cow as the glue of an ink stick manufactured about 270 years ago in Nara Prefecture, with no signs of chemical or biological degradation. These results demonstrate the possibility of obtaining historical information through the analysis of animal glue remains in archaeological materials.