



一般社団法人

# 文化財保存修復学会

第37回大会 於 京都

研究発表要旨集

日 時

2015年6月27日(土)

2015年6月28日(日)

会 場

京都工芸繊維大学

主 催：一般社団法人文化財保存修復学会

共 催：京都工芸繊維大学

# 高分解能 MALDI 質量分析計を用いた膠の 原料動物種の同定

◎深草俊輔<sup>1</sup>、河原 一樹<sup>2</sup>、高嶋美穂<sup>3</sup>、谷口陽子<sup>1</sup>、宮路 淳子<sup>1</sup>、松尾 良樹<sup>1</sup>、中沢 隆<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>奈良女子大学、<sup>2</sup>大阪大学、<sup>3</sup>国立西洋美術館、<sup>4</sup>筑波大学

## 1. はじめに

動物に多く含まれる繊維性タンパク質コラーゲンを主原料とする膠は、古くから仏像や木造建築物、そして絵画や壁画などの膠着剤として幅広い文化財に利用されてきた素材である。そのため、文化財に含まれる膠の検出と、その原料動物種及び製法を特定することができれば、動物利用の実態を知ることができるだけでなく、当該文化財の保存・修復における材料選定に貴重な情報を提示できる。文献調査から、膠の原料となった動物種は牛、水牛、犬、豚、猪、驢馬、馬、鹿、魚（ニベ）、そして兔など多岐に渡ることが示唆されており<sup>1),2)</sup>、原材料の入手のしやすさ、あるいは用途に応じて膠を作り分けていた可能性があるが、これらの文献の記述を検証する実証的な研究は行われていない。また、そのような手法も未だ確立されていない。最近我々は、生命科学分野でタンパク質同定法として利用されているマトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)質量分析による微量(数 mg)試料の分析から、先に挙げた膠の検出とその原料動物を特定する方法を提案した<sup>1),2)</sup>。現在、より多くの生物種由来膠に対して本手法の適用可能性を検討しているところであり、本研究では、「アイシングラス」と呼ばれる油彩画やテンペラ画の下地作りや保存修復に重用されているチョウザメの浮袋を原料として製造された膠をとりあげ、その質量分析による同定の可能性について報告する。

## 2. 試料と実験

### 2-1. 試料

本研究で分析に用いたチョウザメの浮袋を原料とした膠試料は東京藝術大学美術学部より提供を受けた<sup>3)</sup>。また、比較試料として用いたウシ、シカのそれぞれ皮を原料として製造された膠試料については(財)元興寺文化財研究所より提供を受けた。

### 2-2. 実験

約 10 mg の膠試料を 100 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液 2 mL に溶解させ、60 °C で 1 時間振盪し、シリンジフィルター (0.2 μm 径) で濾過した後、液量を約 100 μL に濃縮した。濃縮後の溶液を 60 °C で 30 分間振盪し、5 μL のタンパク質分解酵素トリプシン溶液 (0.2 μg/μl) を加えて、37 °C で 24 時間、酵素消化した。消化後に得られるペプチド混合物の溶液 10 μL に対して適量の 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加えて溶液を弱酸性にした後、チップ型 C18 樹脂充填カラムで脱塩・濃縮を行い質量分析用の試料溶液とした。

MALDI サンプルプレート上で試料溶液 0.5 μL を 0.5 μL のマトリックス溶液 ( $\alpha$ -シアノ-p-ヒドロキシ桂皮酸のアセトニトリル溶液) と混ぜてから乾燥させ、MALDI タンデム飛行時間型 (TOF/TOF) 質量分析装置 (JMS-S3000 SpiralTOF、日本電子株式会社) を用いて質量分析を行った。

### 3. 結果と考察

膠の原料となるコラーゲンは、哺乳類中に最も豊富に存在し、生命活動維持に必須である。その為、コラーゲンのアミノ酸配列は生物種を通じて高度に保存されている。例えば、図1はウシの皮や骨に多く含まれるI型コラーゲンのアミノ酸配列の一部をシカの相当する配列と比較したものであるが、互いに極めてよく似ており、このことはウシとシカ由来膠の分析結果が互いに酷似した質量スペクトルを示すことから明らかである(図1、2)。一方で、チョウザメ浮袋由来膠に関しては、そのスペクトルの様相がウシやシカとは異なっており、図1の部分配列比較からも明らかのように、ウシなどの哺乳類と比べてアミノ酸配列が大部分異なっていることが示された。

例えば、牛皮由来膠の酵素消化物はアミノ酸配列 GLTGPIGPPGPAGAPGDKGEAGPSGPAGPTGAR に由来する質量ピークを示すが、シカの場合は1箇所のAがTに置き換わっているため質量電荷比( $m/z$ )の値が30 Da だけずれた位置にピークを与える<sup>2)</sup>。この様なわずか1アミノ酸残基の違いもMALDI質量分析装置により精度よく検出することが可能である。チョウザメでは、コラーゲンに特有のX-Y-Gの繰り返し配列は有しているものの、当該配列中の8残基がウシと異なるため、その差73 Da ずれた位置にピークが検出される。この様に、ウシ GLTGPIGPPGPAGAPGDKGEAGPSGPAGPTGAR  
シカ GLTGPIGPPGPAGAPGDKGETGPSGPAGPTGAR  
チョウザメ GLTGPIGPPGPAGPNGEKGESGPSGPPGAAGTR  
チョウザメは、ウシ等の哺乳類と配列が非常に異なっており、コラーゲンおよび膠の物性に差が生じる可能性がある。また、配列が異なる特徴的なピークが多く存在すれば、それらを指標とすることで実際の文化財分析においても当該膠を検出することは容易になる。

我々が試みている膠中のコラーゲンペプチドの質量分析による同定法は、DNA解析が利用できない動物の加工品である膠に対しても、高精度かつ簡便に原料生物種を特定することができる現在唯一のアプローチであり、特に、文化財の材質の特定や保存修復への応用が期待できる方法である。

### 4. 参考文献

1) 中沢隆、山崎雄三(2010)「文化財に含まれるタンパク質を対象とする古代史プロテオミクス-質量分析による墨の膠原料の特定とその古代学的意義-」『古代学』、2、17-27。

2) 宮路淳子、河原一樹、松尾良樹、館野和己、鈴木孝仁、高田将志、山崎雄三(2013)「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」『考古学と自然科学』、64、p. 47-57。

\* 膠試料の提供にあたり、東京藝術大学美術学部 関出教授、同美術研究科文化財保存学 稲葉政満教授、(財)元興寺文化財研究所の植田直見氏のご協力をいただきました。また、本研究は、JSPS 科学研究費補助金(15H00709、25750104)により行われた研究成果の一部である。

ウシ GLTGPIGPPGPAGAPGDKGEAGPSGPAGPTGAR  
シカ GLTGPIGPPGPAGAPGDKGETGPSGPAGPTGAR  
チョウザメ GLTGPIGPPGPAGPNGEKGESGPSGPPGAAGTR

図1. ウシ、シカ、チョウザメ由来コラーゲンの部分配列比較結果。

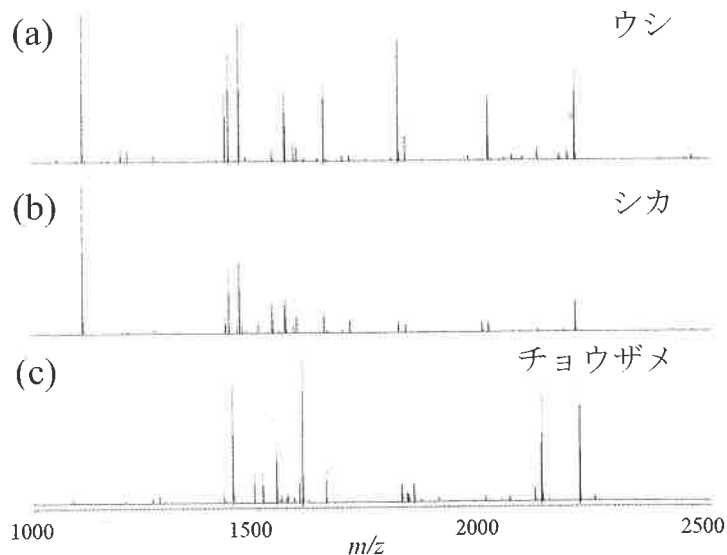


図2. ウシ、シカ、チョウザメ由来膠のトリプシン消化後に得られるMALDI質量スペクトル。 $m/z$ 値が1000~2500の範囲を示す。

