化石ホタテガイ属の殻にふくまれるアミノ酸の定量分析*

秋 山 雅 彦**

(1964 年 5 月 11日受理)

Quantitative analysis of the amino acids included in Japanese fossil scallop shells

Masahiko AKIYAMA

(Abstract)

Amino acids included in some 100 mg of the fossil molluscan shell can be analysed quantitatively by the paper chromatographic method shown in Table 1.

The writer found protein-constituent amino acids from the several shells of Japanese fossil scallops by means of this analytical method. The results are as follows.

1) Buried in the strata as fossils, the scallop shells show remarkable diminishing of amino acid content for some hundred thousand years and slow decreasing since then (Fig. 4).

2) Generally speaking, each protein-constituent amino acid is less in quantity in the geologically older scallop shells.

3) Glycine and aspartic acid, which are the stable amino acids according to P. H. ABELSON, show considerable diminishing in the fossil scallop shells, compared with the other amino acids (Fig. 3).

I ま え が き

II 定量分析法について

III 分析試料について

IV 分析結果と考察

1. 現生種のコンキオリン

2. 化石にふくまれるアミノ酸総量

3. 化石にふくまれるアミノ酸の種類

V 総括および問題点

VI あとがきおよび謝辞

I ま え が き

化石の硬組織のなかにタンパク質構成アミノ酸がのこされていることは、1954年にABELSONが指摘してから、いろいろな時代の、いろいろな化石でたしかめられてきている(秋山1964a)。

筆者は、さきに、中新世から洪積世にかけての化石ホタテガイの殻のなかに、現生のホタテガイの殻にふくまれるコンキオリン構成アミノ酸と同一種類のアミノ酸が保存されていることを報告した(秋山1964b)。このような研究から、化石の硬組織のなかに、どのような種類のアミノ酸がのこされているかといった知識をうることはできるが、硬組織が化石として保存されているあいだに、どのような変化をうけてきたか、といった問題の解決のためには、化石のなかのアミノ酸の定量分析がぜ

* 日本地質学会総会(1964)で講演

** 東京教育大学理学部地質学鉱物学教室
地質学雑誌第70巻第828号1964年9月

ひともなされなければならない。

近年、アミノ酸自動分析装置の開発がすすみ、優秀な国産の器械が完成しているが、筆者の研究条件では、この器械を利用することができない。さらに、化石の硬組織から抽出できるアミノ酸の量は少ないので、より鋭敏な分析法が必要になる。この2つの理由から、筆者はペーパークロマトグラフィーによる定量分析法を試みた。

藤原 (1963) はペーパークロマトグラフィーの一次元展開法による定量化に成功しているが、何回も展開溶媒をかえて、アミノ酸の分離をおこなう必要があり、きわめて繁雑であるという難点がある。したがって、二次元展開法によつて定量をおこなえば、この問題は解決されるわけであるが、従来の報告によると、この方法は再現性に とぼしく、定量には適さないといわれている。しかし、保田 (1958) はペーパークロマトグラフィーの二次元展開法による定量で生じる誤差の問題を詳細に論じ、“吸湿乾熱発色法”をおこない、よい結果をえている。

筆者も、保田の研究を十分に参照して、ペーパークロマトグラフィーの二次元展開法をおこない、定量化でほぼ満足できる結果をえた。この小論では、はじめに、この分析法についてのべ、ついで、その分析法をもちいておこなった実験結果にいつてのべる。

II 定量分析法について

化石の硬組織にふくまれるアミノ酸の分析法については、藤原・井尻 (1959) の研究が公表されているので、ここでは重複してのべることをさけて、定量分析法について新しく用いた方法だけをのべることにする。

藤原・井尻の方法によつて、化石から抽出したアミノ酸を、0.1 ml の再蒸留水にとかし、そのうちの 0.05 ml をマイクロピペットで、東洋汙紙 No 50 (40×40 cm) につける。そのごの実験法については、第1表を参照されたい。

アミノ酸とニンヒドリンとの反応による発色濃度は、アミノ酸の量と比例の関係にあることが知られている。したがって、あらかじめ、アミノ酸の量と発色濃度との関係をたしかめておけば、未知の試料について、その発色濃度から、アミノ酸の量をきめることができる。しかし、保田 (1958) によつて指摘されているように、ペーパークロマトグラフィーによる定量の際には、展開溶媒・展開時間・展開温度・溶媒の残りかた・汙紙の性質・汙紙の吸湿度など、いろいろな要因によつて誤差が生じる。したがって、一定条件をえるのが困難なために、ペーパークロマトグラフィーは、定量には適しないとされていた (FISCHER und DORFEL 1953)。

第1表 ペーパークロマトグラフィーによるアミノ酸定量法

一 次 展 開	フェノール水 (4:1) 系, 20°C 17 時間, 下降法で展開
↓	
乾 燥	70°C クロマトオーブンで 8 時間
↓	
二 次 展 開	ブタノール酢酸水 (4:1:2) 系, 20°C 15 時間, 下降法で展開
↓	
乾 燥	70°C クロマトオーブンで 5 時間
↓	
ニンヒドリン添加	2%のニンヒドリン・アセトン溶液に浸す
↓	
乾 燥	70°C クロマトオーブンで 10 分間
↓	
吸 湿	50°C 水飽和クロマトキャビネット中に 7 分間放置
↓	
発 色	75°C 水飽和恒温槽中で 20 分間加熱
↓	
抽 出	発色スポットを切りぬき, 水飽和ブタノール 2.5 ml 中で 100 分間
↓	
比 色 定 量	東洋科学デンスシトメーター (緑色フィルター使用)

第1図 アミノ酸の量 (γ) と吸光度 (E) との関係

アミノ酸の呈色反応は、基本的にはアミノ酸とニンヒドリンと水の三者で生じる反応であるから、一定の条件のもとで、ニンヒドリンと水蒸気とを濾紙に十分あたえてやればよいと考え、第1表に示した順序で実験をおこなった。

アミノ酸の量とニンヒドリン発色による吸光度 (E 値) との間の関係をきめるために、15 種のアミノ酸を等量ずつ秤量して、一定量の再蒸留水にとかし、それを標準試料とした。ついで、1 枚の濾紙に 1 種類のアミノ酸が 2.5γ になるように標準試料をつけ、第 1 表の方法にしたがつて展開し、発色・抽出して E 値を求めた。さらに、濾紙につける標準試料の量をかえて、同じ方法で E 値を求めた。そして、それぞれのアミノ酸について、0~40 γ の値とその吸光度との関係を求めて、グラフに示した (第 1 図)。

ところで、化石のなかから抽出したアミノ酸を、第 1 表に示した方法で展開・発色すれば、発色したスポットの位置によつて、アミノ酸の種類をきめることができる (第 2 図)。そして、さらに、それぞれの発色したアミノ酸のスポットを比色すれば、第 1 図 からそれらの量を求めることができる。

III 分析試料について

ホタテガイ属の現生種、*Patinopecten yessoensis* (JAY) (ホタテガイ) および、これと同一属に属する化石種のうちで、洪積世 (3 種)・鮮新世 (5 種)・中新世 (1 種) の 10 種の試料をあつかつた (第 2 表)。

ホタテガイの殻は 3 層からつくられており、各層のちがいによつて、コンキオリン構成アミノ酸にちがいがありうる (秋山 1954 b)。したがつて、試料をとる位置による分析値のちがいをなくすために、外層だけを取りだし、それを粉末にして、そのなかから 100 mg をとり 1 回の分析にもちいた。

IV 分析結果と考察

第2図 *Patinopecten yessoensis* (現生) の殻にふくまれているコンキオリンのペーパークロマトグラム

1. アスパラギン酸	2. グルタミン酸	3. セリン
4. グリシン	5. トレオニン	6. アラニン
7. チロシン	8. バリン	9. ロイシン
10. シスチン	11. リジン	12. ヒスチジン
13. アルギニン	14. プロリン	
A 一次展開 (フェノール・水系)		
B 二次展開 (ブタノール・酢酸・水系)		

前述した定量分析法をつかつて、現生および化石ホタテガイの殻にふくまれているアミノ酸を分析した結果が第2表に示されている。

1 現生種のコンキオリン

現生種 *P. yessoensis* の外層をダイヤモンドカッターで切りとり、100 mg を 1N HCl 中で脱灰した。そして、溶液のなかに溶けだした遊離アミノ酸を定量分析した結果、コンキオリン蛋白構成アミノ酸の大部分を検出したが、それらの総量は 10 γ にみたない。100 mg の殻のなかにふくまれているアミノ酸はやく 400 γ であるから、現生種のばあい、遊離アミノ酸は、ほとんど無視しうる量しか存在しないことになる。

P. yessoensis のコンキオリン蛋白は、第2表に示めたアミノ酸組成をもち、とくに、アスパラギン酸・グリシン・セリンが顕著にふくまれている。比較のために分析した *Chlamys nipponensis* (アズマニシキ) のコンキオリン蛋白のアミノ酸

組成も、*P. yessoensis* のそれときわめて類似している (第3図)。

2. 化石にふくまれるアミノ酸総量

洪積世・鮮新世・中新世のホタテガイ化石の殻にふくまれているアミノ酸総量は、それぞれ、60~35 γ 、46.5~22 γ 、21.5 γ となり、それらが生存していた当初には、現生種と同じ量のアミノ酸をふ

第2表 現生および化石タテガイ属の殻にふくまれるアミノ酸

No.	種 名	産 地	地質年代	アミノ酸総量	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Leu	Lys	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val*
1	<i>Patinopecten yessoensis</i>	北海道	現世	384	18	12	88	+	20	94	24	12	15		40	46	8	+	7
2	<i>P. tokoensis sematensis</i>	千葉県市原郡瀬又新田	洪積世 (瀬又層)	54	5		16		5	7		5		5		5	2		4
3	<i>P. tokoensis</i>	神奈川県三浦市上宮田	洪積世 (宮田層)	35	4		6	+	5	6		5				4	2		3
4	<i>P. yessoensis</i>	秋田県男鹿市安田	洪積世 (鮭川層)	64	5.5		29	+	5	7.5	+	6	+		+	4	3		4
5	<i>P. yessoensis</i>	新潟県佐渡郡沢根村員立沢	鮮新世 (沢根層)	46.5	5.5		21	+	3	5		4			+	4	1		3
6	<i>P. poculum kurosawensis</i>	秋田県南秋田郡大平村黒沢	鮮新世 (脇本層)	35	6		6		5	4		5				4	2		3
7	<i>P. poculum yokoyamae</i>	青森県下北郡田名部町近川	鮮新世 (浜田層)	29	4		4	+	5	4		4				4	2		2
8	<i>P. takahashii</i>	宮城県仙台市川内	鮮新世 (竜の口層)	26	6		2	+	4	3		5				3	+	+	3
9	<i>P. ninoensis</i>	岩手県二戸郡福岡町穴牛	鮮新世 (末の松山層)	22	5		2	+	3.5	1.5		3	+			2	2		3
10	<i>P. muryamamai</i>	秋田県由利郡東由利村小倉	中新世 (須郷田層)	21.5	4		4		3	3		2.5			+	2.5	+		2.5

* アミノ酸は BRAND の表示記号でしめしてある。また、この表中の数字は 100 mg の殻にふくまれているアミノ酸を γ 単位でしめしてある。

第3図 ホタテガイ属の殻にふくまれているアミノ酸。図中の番号は第2表の番号と同じ。ただし、11は*chlamys nipponensis* (アズマニシキー現生)

くんでいたとすると、それぞれの残存率は洪積世の化石で 16.8~9.1%, 鮮新世の化石で 12~5.7%, 中新世の化石で 5.6% となる。

これらの分析結果を、アミノ酸総量と絶対年数のグラフにプロットすると、第4図のようになる。このグラフから、化石のなかのアミノ酸の量は、洪積世でいちじるしく減少し、洪積世から中新世に

第4図 ホタテガイ属の殻にふくまれているアミノ酸総量と絶対年数との関係。図中の番号は第2表の標本番号と同じ。

かけて漸減していることがわかる。言いかえると、化石として地層に埋もれてから数10万年のあいだに、アミノ酸はいちじるしく減少し、それ以後の失なわれかたはきわめてゆるやかである、ということができる。

しかし、*P. tokyoensis* と *P. sematensis* はこのグラフの上にのらずに、異常に少ない。このことは、これらの化石種にもともとコンキオリン蛋白が少なかつたためか、または、他の種に比べて殻がうすいために保存されにくかつたのか、保存の条件がわるかつたためなのかは、にわかにきめがたい。

ABELSON (1955) は、現世・洪積世・中新世の *Mercenaria mercenaria* の殻にふくまれているアミノ酸を分析して、1 gr. の殻のなかに、それぞれ $35 \mu\text{M}$, $5.4 \mu\text{M}$, $0.75 \mu\text{M}$ のアミノ酸が存在することを報告している。この分析値をもとにして、洪積世の化石種と中新世の化石種について、その残存率をもとめると、それぞれ 15%, 2.1% になる。この結果は、筆者がホタテガイの化石種でおこなった結果と類似の傾向をしめしている。ABELSON は、この分析値をもとにして、化石のなかのアミノ酸総量の失なわれかたについて、筆者の結論とほぼ同じ考えをのべている。

3. 化石にふくまれるアミノ酸の種類

筆者の分析によれば、現生種の *P. yessoensis* のコンキオリン構成アミノ酸のうち、塩基性アミノ酸（アルギニン・ヒスチジン・リジン）とプロリンをのぞいて、他のすべてのアミノ酸は化石種の殻

のなかにも保存されている（第2表）。

これらの個々のアミノ酸について、いろいろな地質時代の化石種の殻に、どのくらいの量のアミノ酸が保存されているかを調べるため、グラフにあらわすと、第3図のようになる。この図では、横軸にアミノ酸の種類をとり、縦軸にアミノ酸の量を単位でとつて、示された値を折れ線グラフにしてあらわしてある。

ホタテガイ属の化石標本にふくまれるアミノ酸総量は、一般に時代が古くなるほど少なくなっていることがわかった。さらに、個々のアミノ酸について検討してみると、やはり同一の傾向がみとめられる。

現生種と洪積世の種とを比較すると、前者でいちじるしく多量にふくまれているアスパラギン酸・グリシン・セリンが、後者ではいちじるしく少なくなっている。それに反して、もともと含有量の少ない他のアミノ酸は、その失なわれかたが少ない。ところが、洪積世・鮮新世・中新世の種をそれぞれ比較すると、時代が古くなるにつれて、平行的に減少する傾向がつかめる。

FLORKIN et al. (1961) はノーチルスの現生種、*Nautilus macromphalus* と始新世の *N. sp.* の殻のなかにふくまれているアミノ酸を分析している。その結果を検討すると、現生種ではグリシン・アラニン・セリン・アスパラギン酸が多量にふくまれているが、化石種では、グリシン・アラニン・アスパラギン酸はいちじるしく減少して、もともと少量しかふくまれていなかったアミノ酸、例えばグルタミン酸との差が少なくなっている。このような結果は、筆者のホタテガイ属の化石標本の分析値ときわめて類似している。

V 総括および問題点

第1表にしめしたペーパークロマトグラフィーによる分析法をつかつて、100 mg 程度のわずかな化石標本から、アミノ酸を定量的に分析することが可能になった。

さらに、この分析法を用いて、現生および化石ホタテガイ属のいくつかの種について、その殻のなかにふくまれているアミノ酸を分析した結果、次のようなことがらが明らかになった。

1) ホタテガイ属の化石標本の殻にふくまれているアミノ酸総量は、地質時代が古いものほど、その含有量が少なく、とくに、現生のものと洪積世のものとの間に大きなちがいがみとめられる。したがって、化石として地層のなかに埋没されてから、数 10 万年の間に、殻のなかのアミノ酸はいちじるしく減少し、それ以後は失なわれかたがゆるやかである。

2) 殻のなかにふくまれている個々のアミノ酸についても、総量のばあいと同じく、古い地質時代のものほど、その含有量が少なくなっている。

3) しかも、その失なわれかたは、現世から洪積世にかけていちじるしく、とくに、現生種に多量にふくまれているアミノ酸の減少が顕著である。

最後にあげた結論については、いちじるしく減少のみられるグリシン・アスパラギン酸が、ABELSON のいう安定なアミノ酸であるだけに、なぜこのような失なわれかたをするのか、大きな問題としてのこされる。

この問題の解決のためには、化石のなかにのこされているアミノ酸が、遊離アミノ酸としてのこされていたのか、それともペプチッドやタンパク質としてのこされていたのか、区別して分析することが、まず重要になつてくる。

さらに、第4図にしめされている、地質時代におけるアミノ酸総量の減少曲線の上にのらないサンプルが、どのような意味をもっているのか、検討する必要もあろう。

とにかく、化石のなかのアミノ酸分析はまだ始まつたばかりであり、今後、この種の研究が量的に

つみかさねられることの必要性が痛感される。

VII あとがきおよび謝辞

これまでの古生物学は、地質時代の生物の外部形態だけに着目して、古生物の進化を論じようとしてきたが、それはあくまでも古生物の進化のみちすじを示すにとどまって、古生物の進化の要因については、論じられなかった。

しかし、生物学が歴史科学としての位置づけがなされるならば、当然、古生物に関する年表づくりを脱皮して、生物の進化の必然性について論求しなければならない。

このような目標をかかげて、新しい古生物学の研究の息吹きが、化石研究会のなかから生まれ、現在“化石の微細構造の研究”と題して、電子顕微鏡・X線・生化学・*in vitro*の実験などの武器をつかつて、化石の研究がすすめられている。

この研究は、生化学的方法をつかつて、化石にのこされている有機物の研究から、生物進化の問題にアプローチするための研究の一環としておこなわれているものの一部である。

これまでの形態分類学にとどまっていた古生物学をふみこえて、この種の新しい研究がさかんになり、古生物学からの生物進化への寄与がますます大きくなることを信じている。

おわりにあたって、化石にふくまれるアミノ酸分析の開拓者である藤原隆代氏には、終始かわらぬご指導を受けた。また、大森昌衛・井尻正二の両氏には、つねにご指導ごべん達をいただいた。化石研究会の諸兄弟には、たえずご討論いただいた。これらのかたがたに厚く御礼申しあげる。

引 用 文 献

- ABELSON, P. H. (1955): Paleobiochemistry—Organic constituents of fossils, *Carnegie Inst. Wash., Year Book*, 54, 107~109.
- 秋山 雅彦 (1964 a): 化石の中のアミノ酸, 蛋白質・核酸・酵素, 9, 6, 1~7.
- (1964 b): ホタテガイ化石にふくまれているアミノ酸, 地球科学, 70, 11~16.
- FISCHER, F. G., und DORFEL, H. (1953): Zur quantitative Answertung der Papierchromatogramme von Eiweiß-Hydrolysaten. *Biochemis. Z.*, 324, 554~566.
- FLORKIN, M., GRÉGOIRE, C., GRÉGOIRE S. B. et SCHOFFENIELS, E. (1961): Paléobiochimie—Conchiolines de nacres fossiles. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, 252, 440~442.
- 藤原 隆代 (1963): 化石に含まれているアミノ酸の定量分析法について (第1報) ペーパークロマトグラフィーによる定量法, 資源研彙報, 60, 52~58.
- 藤原隆代・井尻正二 (1959): 歯の化石にふくまれている蛋白質の分析法, 地球科学, 41, 20~31.
- 保田正人 (1958): PPC 法によるアミノ酸のニンヒドリン呈色に関する研究, 長崎大水産学部紀要, 6, 1~17.