

液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いた
革および膠の由来動物種の同定に関する研究

Study on identification method for animal source of
leather and glue using LC-MS/MS

熊澤 雄基

目次

略語一覧	1
序論	2
第1章 革の動物種判定に使用する質量分析法の優位性	13
1.1 緒言	13
1.2 材料および方法	14
1.2.1 標準品試料	14
1.2.2 脱クロム処理法	14
1.2.3 試料抽出法	14
1) トリプシン消化法	14
2) 熱抽出法	15
3) ペプシン抽出法	15
1.2.4 LC-MS/MS の MRM 分析法	15
1.2.5 免疫組織染色法	15
1.2.6 SDS-PAGE と western blotting 法	16
1.2.7 DNA 抽出と PCR 法	16
1.3 結果および考察	17
1.3.1 質量分析法による動物種同定	17
1.3.2 免疫組織染色法による動物種同定	18
1.3.3 western blotting 法による動物種同定	19
1.3.4 PCR 法による動物種同定	19
1.4 まとめ	21
第2章 迅速で簡便な革の動物種判定法の開発	27

2.1	緒言	27
2.2	材料および方法	28
2.2.1	標準品試料	28
2.2.2	革試料の脱クロム処理法とトリプシン消化法	28
2.2.3	LC-MS/MS を使ったペプチドの同定法	29
2.2.4	MRM 分析法	29
2.3	結果および考察	30
2.3.1	脱クロムとトリプシン処理の最適化	30
2.3.2	革の由来動物種判定用コラーゲンマーカーペプチドの同定	31
2.3.3	ワニ革の由来動物種判定用コラーゲンマーカーペプチドの同定	32
2.3.4	コラーゲンマーカーペプチド (GFOGADGVAGPK) の同定	33
2.4	まとめ	33
第3章 革の動物種判定法の適用と応用		43
3.1	緒言	43
3.2	材料および方法	44
3.2.1	革試料と時計ベルト	44
3.2.2	革試料の脱クロム処理法およびトリプシン消化法	44
3.2.3	MRM 分析法	45
3.2.4	電子顕微鏡観察法	45
3.3	結果および考察	45
3.3.1	市場革の動物種同定	45
3.3.2	ヒツジ革とヤギ革の顕微鏡観察	46
3.3.3	革粉末化によるトリプシン消化効率の評価	47
3.3.4	時計ベルト革の準非破壊動物種同定	48

3.3	まとめ	48
第4章	複数種混合試料へ適用可能な膠の由来動物種判定法	56
4.1	緒言	56
4.2	材料および方法	57
4.2.1	標準品試料	57
4.2.2	膠試料	58
4.2.3	トリプシン消化法	58
4.2.4	カミーユ・ピサロ作《収穫》の分析法	58
4.2.5	LC-MS/MSを使ったペプチドの同定法	58
4.2.6	MRM分析法	59
4.3	結果および考察	59
4.3.1	コラーゲンマーカーパープチドの選択	59
4.3.2	市場膠製品の由来動物種の同定	61
4.3.3	カミーユ・ピサロ作《収穫》に使用された膠の由来動物種の同定	62
4.4	まとめ	63
総括		72
参考文献		76
学位論文要旨		84
謝辞		86

略語一覽

Arg : Arginine

CBB : Coomassie Brilliant Blue

DNA : Deoxyribonucleic acid

Gly : Glycine

HPLC : High performance liquid chromatography

Hyp : Hydroxyproline

IDA : Information Dependent Acquisition

LC : Liquid Chromatography

Lys : Lysine

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

MRM : Multiple Reaction Monitoring

MS : Mass Spectrometry

PBS : Phosphate Buffered Saline

PBS-T : Phosphate Buffered Saline-Tween

PCR : Polymerase chain reaction

PMF : Peptide mass fingerprinting

Pro : Proline

PCR : Polymerase chain reaction

SEM : Scanning Electron Microscope

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate- Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

SI : Stable isotopic

S/N : Signal/noise

TOF : Time of flight

序 論

革とは、様々な動物の皮から鞣し（なめし）処理によって作られたものである [1]。鞣し処理によって皮の主要なタンパク質であるコラーゲンが架橋され、革は腐敗しにくくなると同時に、耐熱性や耐水性が与えられる。

革利用の歴史は古く、人類が狩猟を行っていた時代まで遡る。当時から、皮に油脂を塗る（油鞣し）、煙に燻す（燻製鞣し）、木の皮や葉を浸した液に漬ける（植物タンニン鞣し）など経験的に様々な鞣し処理が行われ、敷物や履物などの生活用品として広く利用されてきた。また、古代エジプト人は経験的にミョウバンに腐敗防止効果があることを知っており、ミイラの保存や皮革製造に応用していたと言われている [2]。現在では、19 世紀後半に開発されたクロム鞣し革が工業的に生産されている。クロム革は保存性や耐熱性、染色性、経済性の良さ等の利便性が高いため、靴や鞆、手袋、衣類など様々な製品に使われ、革製品全体の 80%以上を占める。一方、植物タンニン革も工業的に生産されているが、製造に手間や時間が多くかかるため、必然的にクロム鞣し革よりも高価になる。植物タンニン革は、耐光性や耐熱性がクロム革よりも低いですが、堅ろう性や耐摩耗性が優れており、可塑性が大きく成型しやすいことから、馬具、鞆、靴底革、ベルトなどに使用される。さらに、タンニン鞣し革に表面の仕上げ処理を行わないヌメ革は、独特の経年変化を楽しむことができるなど、機能性だけではない利点も有する。革製品全体の輸出金額は世界全体で 1 年間当たり 1,000 億ドル以上に及び、さらに日本の出荷額は 3,000~4,000 億円 [3] を占める。このようなことから、様々な用途へ使用される革は世界的に重要な産業の 1 つである。革として利用される動物の種類は哺乳類、爬虫類が多く、鳥類、両生類、魚類は僅かである。哺乳類の中でも特に、家畜であるウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギの利用が多い [4]。この理由は、肉用などの目的で飼育された家畜から皮が副産物として産出されるからである。現在日本で生産される皮の量は世界と比較すると僅かであり、ウシ皮、ヒツジ皮、ヤギ皮のほとんどは輸入に頼り、自給できるのはブタ皮のみとなっている。様々な動物種の中で、

ウシ皮が飼育数の多さと幅広い年齢の原料皮が供給可能であることから、世界中で最も多く利用されている。

皮は、表皮と真皮の 2 層で構成され、肉面側には皮下組織が付着している。製革工程中のフレッシュ処理で皮下組織を物理的に、脱毛処理で表皮を化学的に除去することで、革には真皮だけが残る (Figure 1)。真皮には I 型コラーゲンを主体とする線維束が 3 次元的に互いに交錯している。さらに真皮は、毛根底部を境として外側を乳頭層、内側を網状層と 2 層に区別され、乳頭層では比較的細かいコラーゲン線維が、網状層では比較的太いコラーゲン線維が存在している [4]。乳頭層側の表面は銀面と呼ばれ、そのキメ細かさや状態の良さ、独特な風合いが革の価値の一部を決めると言われている。

これら皮の特徴は動物種によって異なるため、革としての利用方法も異なる。Figure 2 に代表的な動物の革の電子顕微鏡像を示した。

ウシ皮の特徴は乳頭層の凹凸が小さく比較的均質なコラーゲン線維構造を持ち、真皮の乳頭層と網状層の区別が付きやすいことである。さらに、ウシ皮は機械的強度が大きいため、靴甲革、靴底革、靴裏革、鞆、衣料、家具など様々な製品に用いられる。中でもカーフと呼ばれる生後 6 カ月以内の子ウシから作られた革は銀面が平滑でキメ細かいためより価値が高くなる。

ブタ皮の最大の特徴は 3 本ずつにまとまった毛が銀面から肉面を貫通していることであり、このことから毛穴由来の凹凸が多い銀面模様を示す。この貫通した毛穴によって、革の通気性の良さを向上させることから、靴の裏革や中敷きなどによく利用される。その他にウシ革と同様に鞆や衣料用などにも用いられる。

ヤギ皮の構造は、基本的にウシ皮と同じであるが、網状層の線維束の交差程度がウシ皮に比べて低い点が異なる。そのため、革の強度はウシ革より劣るが、乳頭層の弾性線維の発達が良いため、銀面の摩耗性に優れた強靱な革となる。このような特性から、ヤギ革は衣料、手袋、袋物などに使用される。

ヒツジ皮は、ヤギ皮と構造的に類似した点が多いが、網状層の厚さが薄く、線維束も銀

面に対して平行であり、その交差程度も少ない。そのため、ヤギ革より柔軟であるが、強度が劣る。ヒツジ革の用途はヤギ革と同様に手袋や袋物などである。

ウマ皮のコラーゲン線維は、ウシ皮に比べて粗大であるが、毛穴間の凹凸は小さく銀面が滑らかである。得に、非常に密な線維構造である腰部分の皮を植物タンニンで鞣したコードバンは高級な靴やランドセル、ベルトなどに利用される。

シカ皮は、細い絡み合いの粗い線維構造を持ち、柔軟な感触を与える革となる。しかしながら、飼養されているシカが少ないことから傷が多く、比較的銀面が硬いため、床皮部分を使用することが多い。シカ革は油鞣しによって製造されるセーム革や、漆で模様付けした伝統工芸品である印伝革などがある。

また、ワニやトカゲなどの爬虫類から作られる革は哺乳類革とは異なる独特な表面模様を有するため価値が高く、エキゾチックレザーとしてより高級な靴や鞄、時計ベルトなどへ使用される。爬虫類の中では、クロコダイル、アリゲーター、カイマンから作られるワニ革の流通が多く、その貿易の取引総数は2015年の1年間あたり約150万枚に達している[5]。クロコダイルはクロコダイル科に属し、クロコダイル革は主にイリエワニ、ニューギニアワニ、ナイルワニ、シャムワニの4種類に由来する。アリゲーターとカイマンはどちらもアリゲーター科に属し、アリゲーター革はミシシッピワニ、カイマン革はメガネカイマン、パナマカイマン、ヤカレカイマンにそれぞれ由来する。クロコダイル革とアリゲーター革はクラシックレザーと呼ばれ、独特な銀面模様を有し、かつ柔軟な材料であるため、最も価値の高いワニ革として利用される。一方、カイマン革は肚に存在する皮骨の影響で[6]、革が硬く、染料が均一に分散せず、見た目も劣ることから、クロコダイル革とアリゲーター革よりも価値が低いと言われている。さらには、ウシ革などの表面にワニ革模様に非常によく似た型を押した革（型押し革）も流通している。

このように様々な動物種が用いられる天然革に対して、革の銀面を他の動物種に似せた型押し革や、天然革に似せた合成品（合成皮革・人工皮革）がある。合成品は、ポリウレタンやポリ塩化ビニルなどの合成繊維から出来ており、天然革と比較して安価であるが、

革の風合いや耐久性、保存性、吸湿性などの性能は天然革より劣る。近年では、合成品が高性能化してきており、一般的な消費者が天然皮革と識別することが難しくなっている。家庭用品品質表示法では、革製品の品質に関する表示の適正化を図り、消費者利益を保護するため、鞆、衣料、手袋、家具に関して皮革の動物の種類を表示することが定められている [4]。例えば、鞆では、書類鞆、ボストンバッグ、スーツケース、トランク、ランドセル等で、外面積の 60%以上を占める場合、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギが表示対象である。衣料、手袋でもそれぞれ表示対象の動物種が記載されている。また、衣料用ベルトや袋物については各社が自主的な品質表示規格を定めている。爬虫類革は、家庭用品品質表示法での動物種表示対象からは除かれているが、ワニ革は全ての種類がワシントン条約による規制対象となっている。そのため、輸出国の許可を受けて商業取引を行うことが可能であるが、申請の際には由来種を明らかにしなければならない [7、8]。このように革製品には動物種表記の規制が存在するにも関わらず、現状では、故意的または偶発的な理由により哺乳類革やワニ革の動物種は誤って表記されることが発生し、商業的や国際的取引上の問題となっている。

革の動物種の判定は、一般的には電子顕微鏡 (SEM) を用いて、革断面の線維構造や表面の毛穴の形態などの動物種で異なる特徴を観察することによって行われている [9-11]。しかしながら、この分析法は主観的であり、正しく動物種を判定するためには分析者の熟練した経験が必要とされることや、多数の試料を処理することが困難であることが課題である。さらには、銀面を起毛するヌバック処理や、様々な凹凸模様を施す型押し処理、表面層を重ねるラミネート処理などの様々な仕上げ処理が行われた革や、銀面層を取り除いた床革では、革表面の毛穴の特徴が消えてしまうことがある。そのような革の場合、電子顕微鏡観察で革断面の線維構造が類似する動物種間であるヒツジとヤギ、ウシとウマを判別することは困難である。さらに、ワニ革と哺乳類革の判別は形態観察によって可能であるが、ワニ種間の判別は困難である。以上のことから、客観的かつ高精度な革の動物種判定技術の開発が求められている。

様々な動物の骨や皮から煮出すことで抽出される膠はコラーゲンが熱変性したゼラチンを主成分とする。膠利用の歴史も革同様に古く、その起源は 4,000 年以上前の古代エジプトにあると言われている [12]。当時、膠はピラミッドから出土する棺桶や調度品、美術工芸品用の接着剤として用いられており、さらには膠製造過程が描かれた壁画も存在する。中国の魏の時代には、膠液とススを練った膠墨が発明されたと言われている。この時、雌牛、水牛、ブタ、ロバ、ウマ、ラクダなど様々な動物種が膠に使用されたと言われている [12]。日本においては、日本書紀に初めて中国の墨について記された部分があり、奈良時代に国産の墨製造が始まったと大宝律令が伝えている [12]。日本における膠製造は、これまで特定の地域に限定されており、家内工業で行われてきた。しかし、採算性の問題から膠の生産は次々と終了となった [13]。日本製の膠は吸湿性や保水性に富み、濃度調製も容易にできることから手仕事に携わる職人や美術家などに人気が高かった。さらに、ウシ膠が最も一般的に製造される中で、入手が難しいシカ膠が高級品とされていた [14]。ヨーロッパでは、主に絵画や工芸品などの美術分野においてウシやウサギや魚を原料とした膠が使用されてきた [15]。当時の芸術家や工芸家はキャンバス画の下地や地塗り、ペイントの顔料、木製製品など様々な用途に膠を使用してきた。また、チョウザメの浮袋から作られた膠は少量ずつ入手できることから家庭用の常備品としても普及した。さらにこの膠は、適度な接着性と膠の色が淡く、絵具の色味に影響を与えないことから、主に写本や版画などの簡便な彩色用だけではなく、応急的な用途としても使用されたと言われている [12]。商業用膠の生産は 1700 年代にイギリスで開始され [16]、その後 1800 年代に入ると、フランスやアメリカ、ドイツでも工業化され、現在に至っている。膠はその時代や地域によって原料として用いられる動物種は異なり、また、物性の違いから用途に応じて様々な動物種が使い分けされていたと考えられている。そのため、様々な美術品や工芸品、文化財から膠の使用を明らかにし、さらにその由来動物種を同定することは、文化財製作当時の動物利用の実態や、使用した材料、芸術家の技法の把握など様々な情報を提供できる非常に重要な手がかりになる。

食品など様々な試料の由来動物種判定のために、DNA に基づいた PCR 法が良く用いられる [17, 18]。PCR 法とは、検体中に含まれる微量の DNA を、①熱変性による 2 本鎖 DNA の 1 本鎖への解離、②プライマーのアニーリング、③DNA ポリメラーゼによる DNA 伸長、によって大量に複製できる技術である。細胞中には 2 種類の DNA が存在し、1 つは核細胞の中にある 2 重螺旋状の DNA と、もう 1 つは核細胞外側に大量に存在するミトコンドリア DNA である。ミトコンドリア DNA にコードされるシトクロム b 遺伝子は動物種間で塩基配列の違いが大きいため種特異性が高い、DNA サイズが小さいため保存率が高い、1 細胞当たりのミトコンドリア量が多いため回収されやすいなどの PCR 法で動物種を決定することに対していくつかの利点を有する。そのため、各動物種固有のプライマーを利用することで高い分類学的特異性に基づき、ターゲットとなる動物種を高感度に検出することが可能である。Merheb *et al* [19] は、1800 年代に作曲家のベートーヴェンが使用したピアノのハンマーヘッドを覆う革にこの技術を適用した。彼らは革をプロテアーゼ K で処理することで DNA を効率的に抽出することに成功し、ウシの使用を明らかにした。また、Schlumbaum *et al* [20] はスイスアルプス山脈で発見された 4500 年以上前の動物皮で作られたズボンからヤギの DNA を検出すること成功した。しかしながら、現在市場に流通する革は、製造工程中に強酸や強アルカリに曝されたり、染料や顔料、加脂剤、仕上げ剤などの様々な薬品を含んだりするため、DNA の分解や損傷 [21]、PCR 増幅阻害 [22] などの問題点が常に懸念される。膠への PCR 法の適用については、Albertini *et al* [23] が Donatello 作品の彫刻 *Madonna of Citerna* (1415-1420) に使用された彩色層からウシ由来膠の同定に成功した。しかしながら、製造工程や経年劣化の影響で膠中の DNA は分解を受けているため、革と同様に PCR 法の適用は難しいとされている。さらに、これらの懸念点だけではなく、PCR 法は DNA 抽出、DNA 増幅、電気泳動による分離などで操作が煩雑になることが課題となっている。

コラーゲンは、皮膚や骨、腱などの全身の結合組織に存在する主要なタンパク質であり、細胞外マトリックスとして組織構造の維持や、細胞の増殖・分化の調節など様々な役割を

果たしている [24]。現在28種類の型が報告されているコラーゲンは、それぞれの型でポリペプチド鎖を構成する遺伝情報が異なり、さらに各組織中で異なるコラーゲン型組成で分布している。革や膠の主成分であるI型コラーゲンは、1分子あたり分子量が約30万、長さが約300 nm、太さが約1.5 nmで、1014アミノ酸残基の2本の α 1鎖と1本の α 2鎖が三重螺旋を形成している。そのアミノ酸配列はグリシン (Gly) -Xaa-Yaaの繰り返し構造から成っており、Xの位置にはプロリン (Pro)、Yの位置にはProが水酸化されたヒドロキシプロリン (Hyp) が頻出する。分解されやすいDNAに対して、コラーゲンの一次配列は安定的で保存されやすい。また、動物種でDNAの塩基配列は異なるため、翻訳後のアミノ酸配列も必然的に動物種で異なる。そのため、同じI型コラーゲンの α 1鎖であったとしても、動物種間でそのアミノ酸配列は部分的に異なる (Figure 3)。このことから、I型コラーゲンのアミノ酸配列の種間差を何らかの方法で検出できれば、革や膠の由来動物種を決定することが可能である。抗体を用いた方法として、高感度かつ高選択的に特定の抗原を検出できるELISA法が膠にも適用されている [25]。しかし、全てのコラーゲンがGly-Xaa-Yaa配列という共通した基本構造を持つため、動物種間で抗体の交差反応が常に懸念される。また、革に対しては、鞣された皮からコラーゲンを抽出することが困難であるため、適用は難しい。

最近、測定対象成分をイオン化して検出する質量分析装置 (MS) の性能が急速に発展し、高感度かつ高分解能分析が可能になったことで、コラーゲン研究を含めた様々な研究分野で威力を発揮している。質量分析装置はコラーゲンのアミノ酸配列の種間差を検出することも可能であり、骨 [26、27] や皮衣服 [28]、ゼラチン [29] や膠 [30] などの由来動物種同定にも用いられている。質量分析装置はイオン化や検出方法の違いでいくつかの種類に分類され、本研究で使用した高速液体クロマトグラフィー (LC) と三連四重極型の質量分析装置 (MS) を組み合わせたLC-MSは、高感度かつ大規模な分析が可能である。特定のターゲット成分だけを分析する場合は、多重反応モニタリング (MRM) モード [31] を用いた検出法が適している。これは、LCで分離した目的成分を第一段目のMSで特定のイオンを選択し、二段目のMSで不活性ガスを衝突させて断片化し、三段目のMSでさらに断片イ

オンを選択し、二重にフィルターをかけることにより、夾雑物の影響を極力排除した高感度分析が可能となる (Figure 4 A)。これまで当研究室では、このMRMモードによるLC-MS分析を様々なコラーゲン分析に適用してきた [32-37]。また、プロテオミクス分析では、予めトリプシンなどの酵素で消化し、生成したペプチドをLCで分離した後、第一段目のMSでイオンを選択し、二段目のMSで断片化し、三段目のMSでそれぞれの断片イオンを検出することで、アミノ酸配列を解読することができる (Figure 4 B、Figure 5)。質量分析装置で得られるデータ量は膨大であり、MS/MSスペクトルは複雑化しているため、手作業で解析を行うことはほとんど不可能であった。そこで、得られたデータから自動的にペプチドを同定できる方法として1993年に開発されたペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) がその威力を発揮してきた。この方法は配列データベースに登録されているタンパク質を、消化に使用した酵素の基質特異性に従い、理論的に生成される全てのペプチドの質量に対して、MS/MSスペクトル情報を照合させることで、統計的に最も可能性が高いペプチドを導くことができる [38、39]。さらに最近では、測定データを迅速・正確に処理できるプログラムの開発などが大きく進歩したことにより、データ解析が容易にできるようになった。このような手法をもとに、Brandt *et al* [28] はデンマークの湿原から、約2000年前に使用されたと推測される動物皮衣服からウシ、ヒツジ、ヤギを同定した。Dallongeville *et al* [30] はI型とIII型コラーゲン由来種特異的ペプチドを使い、膠の由来動物種 (ウシ、ウサギ、チョウザメ) を判定する方法を開発した。彼らは18世紀に建てられたフランスのSt Maximin 教会から採取した金箔片からウシ膠を同定し、さらにウサギ由来と供給されている膠のいくつかはウシに由来することを発見した。しかしながら、種特異的ペプチドによる同定法はターゲットとなる動物種を拡大した場合や、コラーゲン配列が未知な動物種に使用できないことが課題として挙げられる。

以上のことから、本研究では、様々な動物種にも対応できるよう予め選択した複数のコラーゲンマーカーペプチドをLC-MSのMRMモードで分析し、その検出パターンで判定を行うことで、革および膠の由来動物種の新規判定法を開発を行った。第1および2章では、迅

速かつ簡便に行える革の動物種判定方法を開発し、その優位性を様々な検出方法と比較した結果を報告する。第3章では、開発した方法を用いた市場革製品の調査と、革を粉末化することで達成した時計ベルト革の準非破壊分析について報告する。第4章では、複数種混合試料でも適用可能な膠の由来動物種判定法を開発し、市場膠や美術絵画作品を調査した結果を報告する。

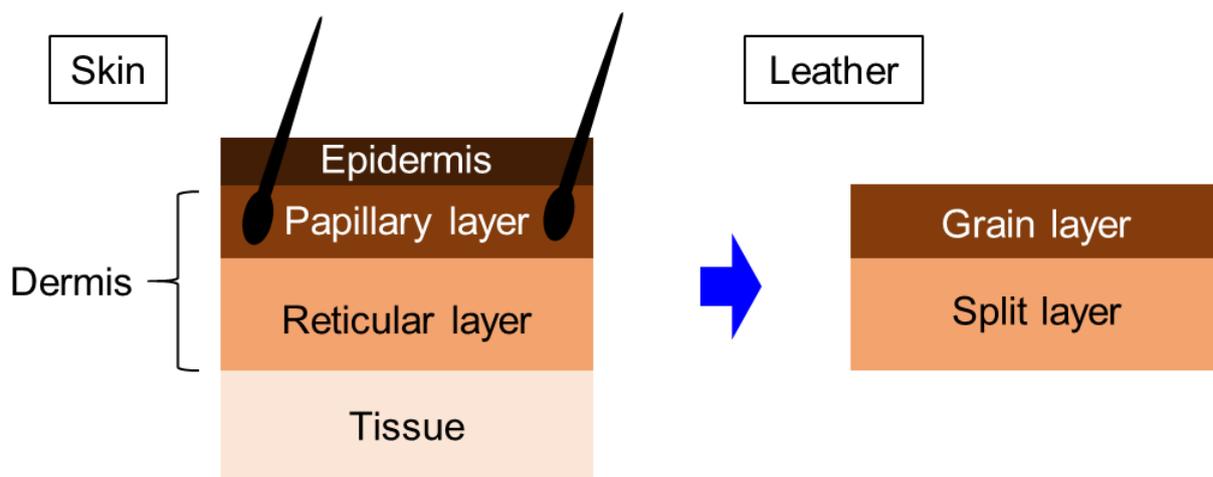


Figure 1. Structure of skin and leather.

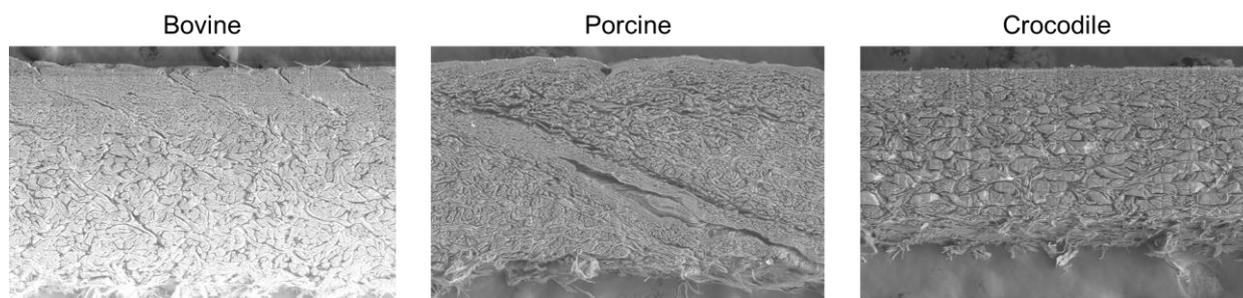
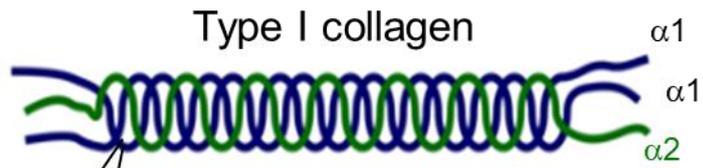


Figure 2. SEM images of cross-section of leather.



Type I collagen amino acid sequence (α1 chain, Position 1-200)

	10	20	30	40	50
Human	GPMG	PSGPRGL	PGPPGAPGP	QGFQ	PPGEPGEPGASG
Bovine	GPMG	PSGPRGL	SGPPGAPGP	QGFQ	PPGEPGEPGASG
Porcine	GPMG	PSGPRGL	PGPPGAPGP	QGFQ	PPGEPGEPGASG
Chicken	GPMG	PAGPRGL	PGPPGAPGP	QGFQ	PPGEPGEPGASG
Tilapia	GPMG	PMGPRGP	PPGPPGSS	SGPQGF	TGPPGEPGEPGASG
	60	70	80	90	100
Human	NGDD	GEAGK	PGRPG	ERGP	PPGQGARGL
Bovine	NGDD	GEAGK	PGRPG	ERGP	PPGQGARGL
Porcine	NGDD	GEAGK	PGRPG	ERGP	PPGQGARGL
Chicken	NGDD	GEAGK	PGRPG	QRGPP	PGQGARGL
Tilapia	NGED	GESGK	PGRPG	ERGP	PPGQGARGL
	110	120	130	140	150
Human	DAGE	PAGPK	GEPG	SPGENG	APGQM
Bovine	DAGE	PAGPK	GEPG	SPGENG	APGQM
Porcine	DAGE	PAGPK	GEPG	SPGENG	APGQM
Chicken	DAGE	PAGPK	GEPG	SPGENG	APGQM
Tilapia	DTGE	PAGPK	GEAG	TPGENG	TPGAM
	160	170	180	190	200
Human	GAAG	PPGPT	GPAG	PPGFP	GAVGAK
Bovine	GAAG	PPGPT	GPAG	PPGFP	GAVGAK
Porcine	GAAG	PPGPT	GPAG	PPGFP	GAVGAK
Chicken	GAAG	PPGPT	GPAG	PPGFP	GAVGAK
Tilapia	GAAG	PPGPT	GPAG	PPGFP	GAVGAK

Figure 3. Interspecies differences in amino acid sequence of type I collagen.

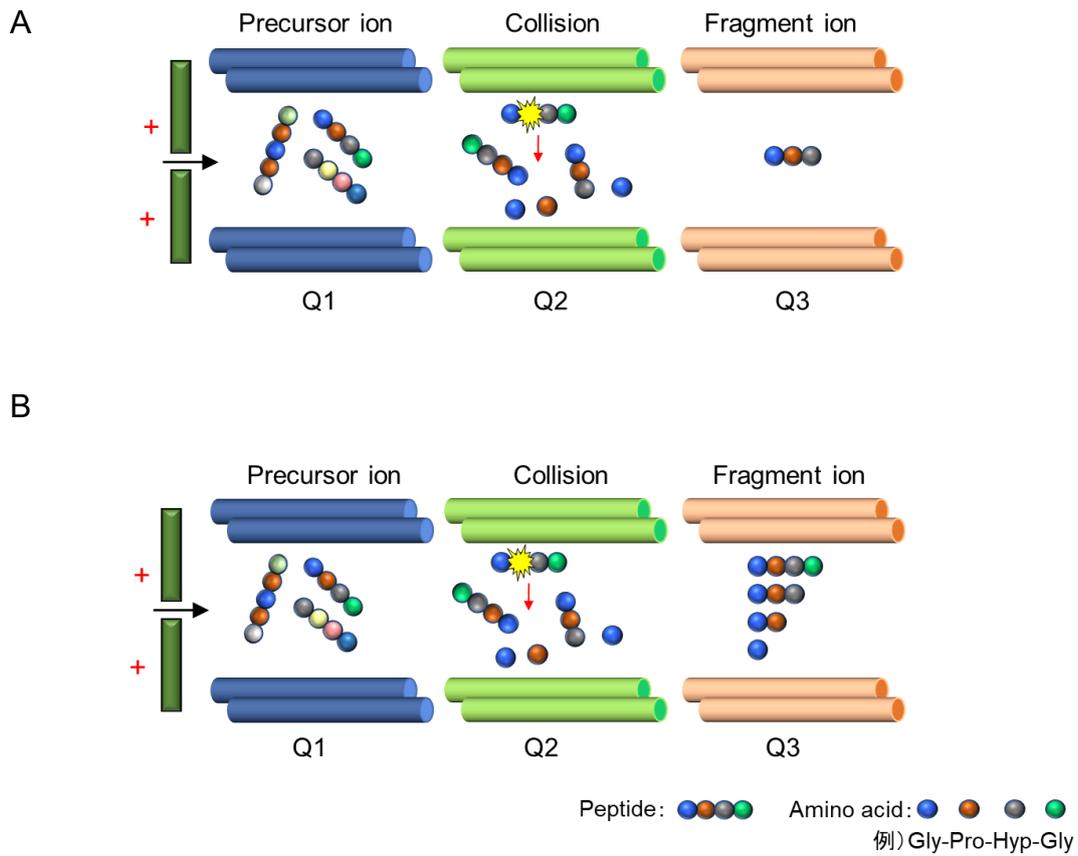


Figure 4. Triple quadrupole mass spectrometer.

A, MRM mode detection. B, MS/MS detection.

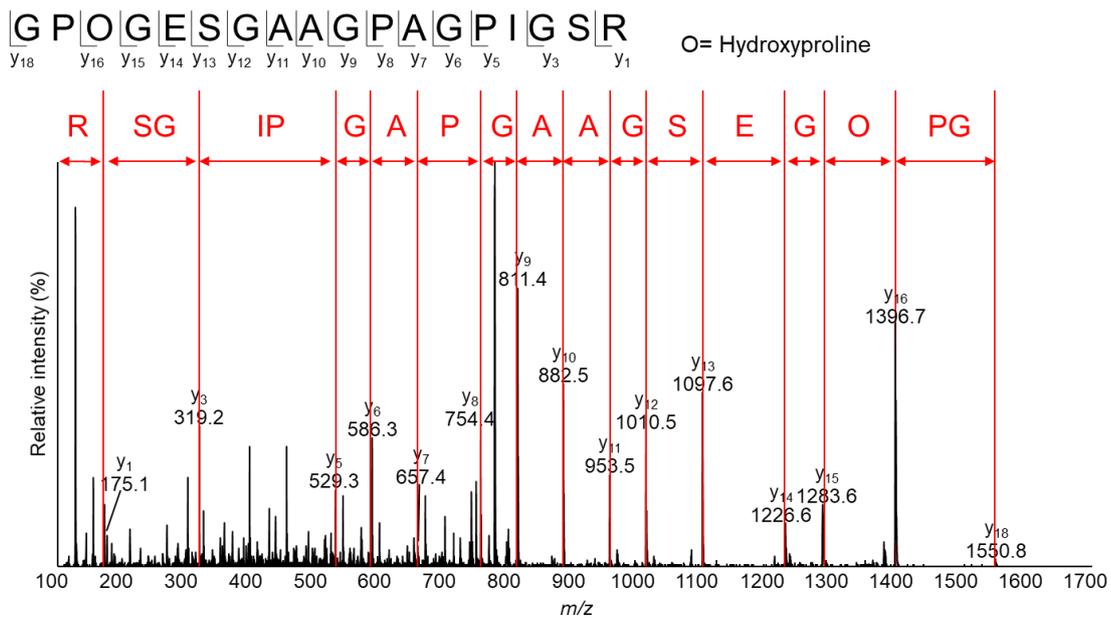


Figure 5. Peptide identification by MS/MS spectra.

第1章 革の動物種判定に使用する質量分析法の優位性

1.1 緒言

革は動物の皮からクロムや植物タンニンで鞣されて作られ、昔から現在に至るまで様々な用途に使用されている [1]。革に使用される動物種はウシやブタ、ヒツジ、ヤギなどの哺乳類や、ワニなどの爬虫類など様々である。日本の家庭用品品質表示法では、消費者利益を保護するため、鞆、衣料、手袋、家具に対して哺乳類革の動物種を表示することが定められ [4]、また爬虫類革は、ワシントン条約による規制対象となっており、申請の際にはその由来種を明らかにしなければならない [7, 8]。しかしながら、その表記は故意的または偶発的な理由により、しばしば間違えることが問題となっている。現在の革の動物種判定は、電子顕微鏡を用いて、革断面のコラーゲン線維構造や銀面の毛穴の形態など動物種で異なる特徴を観察することによって行われている [9-11]。しかしながら、この方法は主観的であり、正しく動物種同定を行うためには、分析者の熟練した経験が必要とされ、さらに、形態の特徴が似た種間（ヒツジとヤギ、ワニ種間）では判定が困難であった。

革の動物種判定法として、従来から行われている電子顕微鏡による形態観察法に対し、特異的な遺伝子やペプチドを解析する方法が提案されている。ミトコンドリア DNA に基づいた PCR 法は、高い分類学的特異性に基づき、ターゲットとなる動物種を高感度に検出できることから、食品など様々な試料の由来動物種判定のために良く用いられている [22, 23]。この方法は革へも適用され、ウシやブタ、ヒツジ、ヤギなどの同定に成功した報告がある [19, 20, 40, 41]。しかしながら、製造工程中に強酸や強アルカリに曝される影響による DNA の分解や損傷 [21]、染料や顔料、加脂剤、仕上げ剤などの様々な薬品などの影響による PCR 増幅阻害 [22] などの問題点が指摘されている。他の検出法としては、抗体を用いた方法が挙げられるが、この方法はコラーゲンの Gly-Xaa-Yaa 配列の共通構造から、動物種間で抗体の交差反応の影響で動物種判定が難しいと考えられている。さらに、鞣された皮に対して抗原抗体反応を行うことは難しいため、実際に革に適用された報告もない。

近年では、測定対象成分を高感度に検出できる質量分析装置の性能が急激に発展し、コ

ラーゲン研究を含めた様々な研究分野で用いられるようになった。ターゲットとなるコラーゲンをトリプシンなどの酵素で切断し、生成したペプチドを質量分析装置で検出することで、コラーゲンアミノ酸配列の種間差に基づいて骨 [26、27] や皮衣服 [28]、ゼラチン [29] や膠 [30] などの由来動物種同定も可能となった。そのため、革の動物種判定にも質量分析法の適用が最も良いと考えられる。

そこで本章では、革の動物種判定に使用する質量分析法の優位性を、DNA 検出による PCR 法、抗体検出による western blotting 法と免疫蛍光染色法で比較して示すことを目的とした。

1.2 材料および方法

1.2.1 標準品試料

当研究室で保存してあった、ウシ胎児皮膚、ブタ皮膚、ウシクロム鞣し革、ブタクロム鞣し革、ウシタンニン鞣し革、ブタタンニン鞣し革を標準品として使用した。ブタコラーゲンは以前の報告 [36] に準拠し、ペプシン消化、塩析、等電点沈殿によってブタ皮膚から精製し、SDS-PAGE および western blotting 法のポジティブコントロールとして使用した。

1.2.2 脱クロム処理法

脱クロム処理は以下の方法で行った。1 mm 角に切断した革試料 3-4 片を 10 mL の 0.25% 水酸化カルシウム溶液中にて 2 時間室温でゆっくり振とうさせ、蒸留水で数回洗浄した。

1.2.3 試料抽出法

分析用試料は、以下の方法で調製し、得られた上清を 0.45 μm のフィルター (ADVANTEC) でろ過したものを LC-MS/MS の MRM 分析に供した。

1) トリプシン消化法

脱クロムした試料を 80°C で 30 分間加熱してコラーゲンを変性させ、上清を除去した後、

50 μg のトリプシン (Sigma-Aldrich) を添加し、200 μL の 100 mM Tris-HCl/1 mM CaCl_2 (pH 7.6) 中にて 37°C で 4 時間消化反応を行った。反応溶液にギ酸 (最終濃度 1.0%) を加え、遠心分離 (16,000 \times g、4°C、10 分間) することで調製した。

2) 熱抽出法

熱抽出は、試料を 95°C で 2 時間加熱して行った。反応後、遠心分離 (16,000 \times g、4°C、10 分間) により得られた上清を熱抽出物とした。

3) ペプシン抽出法

ペプシン抽出は、0.5 M 酢酸溶液中で試料を 5.0 mg/mL ペプシン (Sigma-Aldrich) で、4°C で 16 時間消化反応を行った。反応溶液を遠心分離 (16,000 \times g、4°C、10 分間) し、得られた上清をペプシン抽出物とした。

1.2.4 LC-MS/MS の MRM 分析法

質量分析によるペプチド検出は、Agilent 1200 Series HPLC システムと三連四重極型質量分析装置 3200QTRAP 連結させた LC-MS の MRM モードを使用して実施し、コラーゲンマーカーペプチドの検出パターン (Table 2-3) に基づいて動物種判定を行った。トリプシン消化物を Ascentis Express C18 HPLC カラム (粒子径 5.0 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm : Supelco) を使い、流速 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件で分離した。0 分~2 分 : 98% 移動相 A (0.1%ギ酸)、2 分~6 分 : 2-60%移動相 B (100%アセトニトリル)、6 分~8 分 : 90%移動相 B、8 分~10 分 : 98%移動相 A。MRM チャンネルは 2 章の Table 2-4 に具体的に示す。

1.2.5 免疫組織染色法

試料を 95%エタノール 1%酢酸中にて 4°C で振とうさせた後、100%エタノール、キシレンの順に脱水処理を行った。次に、パラフィンへ包埋したブロックを作成した後、8 μm に薄切した切片をガラスプレート上へ固定した。パラフィン切片は、キシレンとエタノール

溶液を使用して脱パラフィン処理を行った後、抗原賦活化のため、pH 9.0 の 10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA バッファーにて 95°C で 10 分間加熱した。PBS および PBS-T で洗浄後、PBS で至適濃度に希釈した一次抗体：anti-bovine type I collagen (LSL) を添加し 4°C で 16 時間静置した。この時、一次抗体を添加しないサンプルをネガティブコントロールとした。その後、PBS および PBS-T で数回洗浄後、PBS で至適濃度に希釈した FITC 結合二次抗体 (Jackson Immuno Research) と細胞核染色用蛍光色素 TOPRO (Thermo Fisher Scientific) を添加し、室温で 1 時間静置した。PBS-T で数回洗浄後、5%DABCO (1,4-diazabicyclo-[2.2.2]octane) /80%グリセリンで封入後、レーザー走査型顕微鏡 FV1200 (OLYMPUS) を用いて観察した。TOPRO による核染色発光を赤で、FITC 発光 (=I 型コラーゲン) を緑で示す。

1.2.6 SDS-PAGE および western blotting 法

Laemmli 法に準拠し、試料を 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離した。泳動後のゲルを CBB 染色もしくは、ニトロセルロースメンブレンへの転写を行った。転写後のメンブレンは、2%スキムミルク/PBS にて室温で 1 時間ブロッキングした後、PBS-T で至適濃度に希釈した一次抗体：anti-bovine type I collagen を 4°C で 16 時間反応させた。メンブレンを PBS-T で数回洗浄後、PBS-T で至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ結合二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) を室温で 1 時間反応させた。PBS-T で数回洗浄後、SuperSignal Chemiluminescent (Thermo Fisher Scientific) で反応させ、LAS-3000 min (Fujifilm) で検出した。

1.2.7 DNA 抽出と PCR 法

DNA 検出は、愛知県産業技術研究所の食品工業センターが公開している「動物毛の DNA 検査プロトコル」[42] に準拠して行った。まず、DNA 抽出は QI Aamp DNA micro kit (QIAGEN) を使用して行った。約 10 mg の試料に Buffer ATL を 180 μ L 加えた後、Proteinase K を 20 μ L 添加し、56°C で一晩インキュベートした。Buffer AL を 200 μ L 加え 15 秒混和し

た後、エタノール 200 μ L 加え 15 秒混和し、5 分間静置した。反応液を QIAamp MinElute Column に添加し、6,000 \times g で 1 分間遠心分離した後、フロースルー溶液を除去した。Buffer AW1 を添加し、6,000 \times g で 1 分間遠心分離した後、フロースルー溶液を除去した。Buffer AW2 を添加し、6,000 \times g で 1 分間遠心分離した後、フロースルー溶液を除去し、20,000 \times g で 3 分間遠心分離し、メンブレンを完全に乾燥させた。メンブレン上に 50 μ L の超純水を添加し、5 分間静置した後、20,000 \times g で 1 分間遠心分離し、回収した溶液を DNA 試料溶液とした。DNA 試料溶液は、NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を使用し、260 nm の吸光度を測定することで DNA 濃度を求めた。

PCR は QI Aamp Fast Cycling PCR Kit (QIAGEN) を使用して行った。DNA 試料溶液に QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix、10 \times Coraload Dye、動物検出プライマー (ウシ DNA 検出プライマーとブタ DNA 検出プライマー (BEX)、Table 1-2) を添加し、以下の条件で PCR 反応を行った。95 $^{\circ}$ C、5 分間 \rightarrow [96 $^{\circ}$ C、5 秒間 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、5 秒間 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C、9 秒間] (30 サイクル) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、1 分間。反応後の溶液は 2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドを用いて染色した後、LAS-3000 min (Fujifilm) で検出した。

1.3 結果および考察

ウシとブタのそれぞれ皮膚、クロム革、タンニン革の合計 6 試料をそれぞれ質量分析によるペプチド検出法、DNA 検出による PCR 法、抗体検出による western blotting 法と免疫蛍光染色法で分析し、動物種判定の可否だけではなく、分析に費やす時間や、操作の煩雑性と安全性などを評価した。

1.3.1 質量分析法による動物種同定

クロム鞣し革は脱クロム処理後に、皮膚とタンニン鞣し革は直接トリプシン消化を行い、反応溶液を LC-MS の MRM モードに供し、哺乳類革判別用マーカーペプチド (M1~M6、第 2 章 Table 2-3) の検出パターンで動物種判定を行った。その結果、6 試料全てに対して

高感度にコラーゲンマーカーパープチドが検出された (Figure 1-1)。皮膚、タンニン鞣し革、クロム鞣し革に関わらず、全てのウシ試料が M1、M2、M4 の検出に基づきウシと同定され、ブタ試料も全てが M1、M5、M6 の検出に基づきブタと同定された。以上より、質量分析法は全ての試料の明白な動物種同定に成功した。また、この試験は、有害な試薬の使用もなく、脱クロム処理とトリプシン消化は溶液を添加するだけの簡便な操作であるため、ルーチン分析にも適していると考えられる。

1.3.2 免疫組織染色法による動物種同定

ウシの I 型コラーゲンを抗原とする抗体 (anti-bovine type I collagen) を使用した免疫組織染色法により、未変性コラーゲン検出による革の動物種判定の可否を評価した。一次抗体を添加していないネガティブコントロールと比較することで、発光の有無を判断した。その結果、ウシ皮膚で I 型コラーゲンの存在 (緑に発光) が確認されたが、ブタ皮膚でも同様の発光が観察された (Figure 1-2)。これは、I 型コラーゲン抗体の動物種間での交差反応が起きたことを意味する。タンニン鞣し革は、ウシとブタに関わらず、ネガティブコントロールでも緑と赤の発光が観察された。これは、特にタンニンを含む革由来成分による自家蛍光による影響であると考えられる。クロム鞣し革も同様に、ネガティブコントロールと比較した発光の差異は観察されなかった。このウシ革の銀面層に観察された緑の発光は、おそらく塗装膜に由来するものであると考えられる。また、クロム鞣し革は、均一に薄切し、固定化することは難しく、途中の工程でガラスプレートから部分的に剥がれてしまう問題が発生した。以上より、免疫組織染色による動物種判定は、コラーゲン抗体の種間交差反応と、革由来成分による発光の発生、革での操作の難しさなど様々な課題が挙げられた。また、この試験は、操作に 2 日以上費やすことや、キシレンや DABCO など人体に有害な試薬を使用することも課題の 1 つである。

1.3.3 western blotting 法による動物種同定

熱抽出後とペプシン抽出後の試料をそれぞれ western blotting 法により、変性コラーゲン検出による革の動物種判定の可否を評価した。この時、抽出前行った革試料の脱クロム処理の影響も評価した。SDS-PAGE 後のアクリルアミドゲルを CBB 染色することで、100 kDa 付近に検出するコラーゲンの $\alpha 1$ 鎖 (I) と $\alpha 2$ 鎖 (I) 由来のバンドと 200 kDa 付近に検出する $\beta 11$ 鎖由来バンドの存在の有無でコラーゲンの存在を確認した。その結果、ブタコラーゲン、ウシ皮膚、ブタ皮膚ではコラーゲン由来バンドが検出されたが、革試料では熱抽出後とペプシン抽出後のどちらの条件でもコラーゲン由来バンドは検出されなかった (Figure 1-3 A と 1-4 A)。これは、脱クロム処理の有無に関わらず、熱処理もしくはペプシン処理では革からコラーゲンを抽出できなかったことを示す。次に、泳動後のアクリルアミドゲルをメンブレンに転写した後、ウシの I 型コラーゲンを抗原とする抗体 (anti-bovine type I collagen) を使用した抗原抗体反応で変性コラーゲンを検出した。その結果、熱抽出もしくはペプシン抽出後の CBB 染色でコラーゲンバンドが確認されたブタコラーゲン、ウシ皮膚、ブタ皮膚の全てでバンドが検出された (Figure 1-3 B と 1-4 B)。これは、免疫組織染色の結果と同様に、使用した I 型コラーゲン抗体の動物種間での交差反応が起きたことを示す。また、CBB 染色の結果と同様に、革試料でのバンドは確認できなかった。以上より、western blotting による動物種判定は、コラーゲン抗体の種間交差反応と、革からコラーゲン抽出の難しさなどの課題点が挙げられた。また、抗体検出による方法は、使用する抗体が高価であることや、抗体の至適濃度を最適化する必要性があるなど、ルーチン分析には適していないことも問題点の 1 つであると考えられる。

1.3.4 PCR 法による動物種同定

愛知県産業技術研究所の食品工業センターが公開している「動物毛の DNA 検査プロトコル」[42] に準拠し、DNA 抽出操作を行った後、動物種特異的プライマーを使用した PCR 法で革の動物種判定の可否を評価した。プロテアーゼ K 処理後の試料は、皮膚は完全に溶

解し、タンニン鞣し革は全く溶解せず、クロム鞣し革は半分程度溶解した状態であった。260 nm の吸光度で DNA 濃度を定量した結果、皮膚では高濃度に DNA が検出されたが（ウシ皮膚 150.5 ng/μL、ブタ皮膚 145.2 ng/μL）、革試料では極僅かな DNA 濃度（3.7~13.9 ng/μL）に留まった（Table 1-2）。このように、革からは DNA 抽出することが難しいことが示唆され、これは以前の *Vuissoz et al* [21] の報告と一致する結果であった。この実験では、クロム鞣し革は半分程度が溶解されたため、DNA の一部が溶液中に抽出されることで、真の DNA 濃度は少なくともタンニン鞣し革以上（ウシタンニン革：13.9 ng/μL、ブタタンニン革 11.1 ng/μL、Table 1-2）であると推測していた。しかし、同時に染料由来成分での着色が確認されたため、この夾雑物の影響で DNA 濃度の誤定量が起きたと考えられた。次に、この仮説の確認を含めて、PCR 増幅の可否を調査した。ウシ DNA 検出プライマーを使用した場合には、ウシ皮膚のみで 137 bp 付近にバンドが検出された（Figure 1-5）。しかし、ブタ DNA 検出プライマーを使用した場合は、ブタ皮膚で 230 bp 付近に高強度にバンドが検出されたが、ウシ皮膚でも僅かにバンドが検出された。これはプライマーの動物種間での交差反応が若干起きたことを示す。また、革試料では、どちらのプライマーを使用した場合でも DNA 検出は確認されなかった。試料の半分程度が溶解し DNA 抽出の可能性が考えられたクロム鞣し革でも同様であった。クロム鞣し革から本当に DNA が抽出できていたかどうかをこれ以上確認することはできない。しかしながら、仮に DNA 定量結果が夾雑物の影響で誤値であり、真値は少なくともタンニン鞣し革以上の DNA 濃度であったとしても、最終的には革由来成分の影響で DNA 増幅阻害 [22] が発生し、DNA 検出ができなかったと考えられる。以上より、PCR 法による動物種判定は、動物種検出プライマーの種間交差反応と、革から DNA 抽出の難しさや PCR 増幅阻害などの問題点が複数挙げられた。また、人体に有害な試薬であるエチジウムブロマイドを使用することも課題の 1 つである。さらに、PCR 法は種特異的プライマーでピンポイントに動物種を検出する方法であるため、動物種が未知な試料に対する網羅的な動物種判定分析には適していない。

一方、質量分析法の弱点として、コラーゲンペプチドの種間差を検出できない動物種の

判定が不可能であることが挙げられる。しかしながら、PCR 法は種特異的プライマーを設計することで、原理的にはあらゆる動物種に適応が可能であることに大きな利点がある。そのため、革での最適な分析条件を見出すことができれば、PCR 法独自の優位性もあると考えられる。

1.4 まとめ

本章では、質量分析によるペプチド検出法が革の動物種同定のための有力なツールであることを抗体検出による免疫蛍光染色法および western blotting、DNA 検出による PCR 法を比較することで実証した。抗体検出法では、革からコラーゲン検出が認められず、使用した抗 I 型コラーゲンの種間交差反応も確認された。DNA 検出法では、革から DNA 検出が認められず、使用した DNA 検出プライマーの種間交差反応も確認された。これらのことから、対照に用いた方法では、革の動物種判定は不可能である結果となった。これらの方法に対し、革での最適な分析条件を見出されたとしても、操作の安全性や簡便性、迅速性に関する点においても質量分析による判定法には大きな優位性があると考えられる。

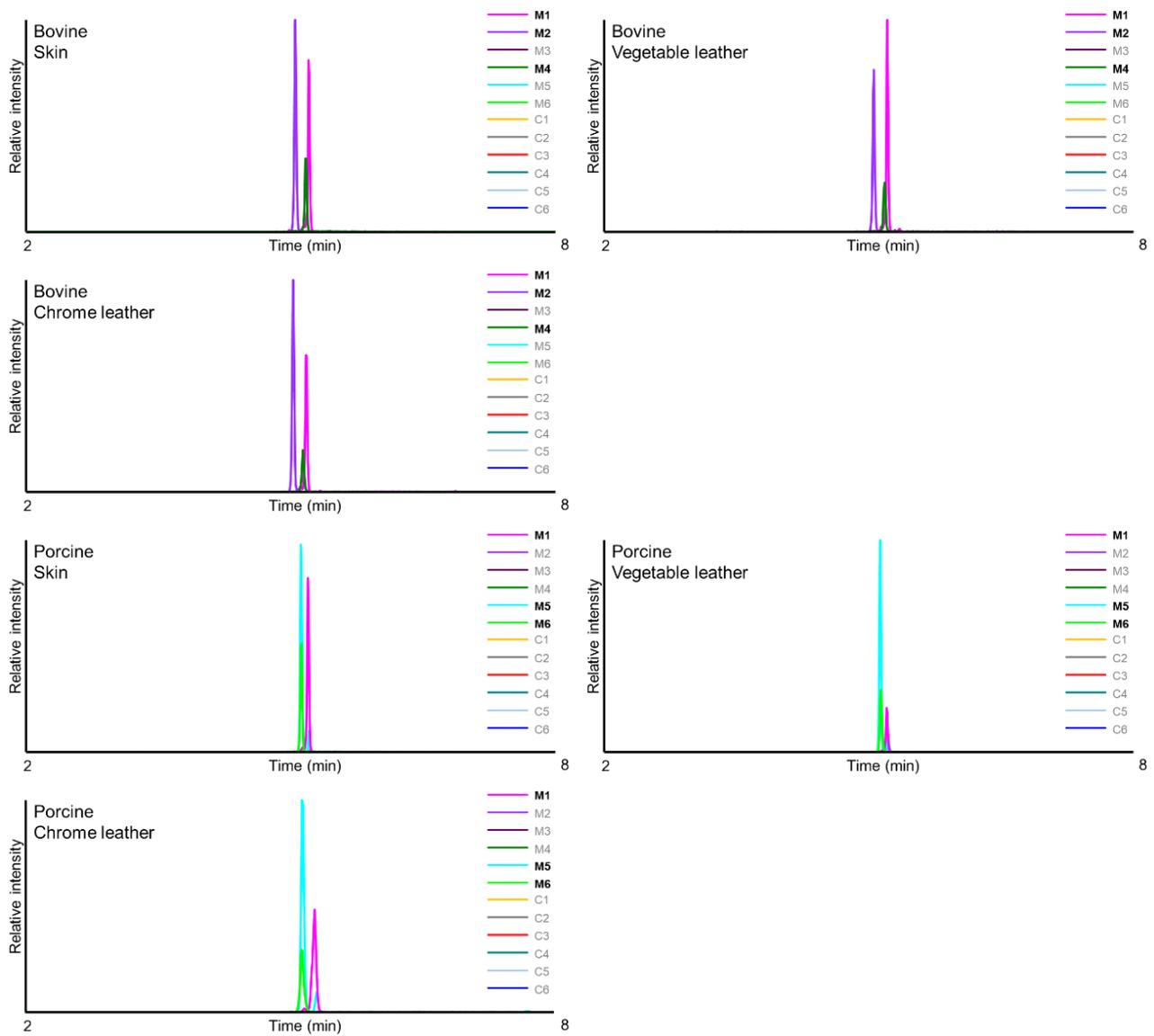
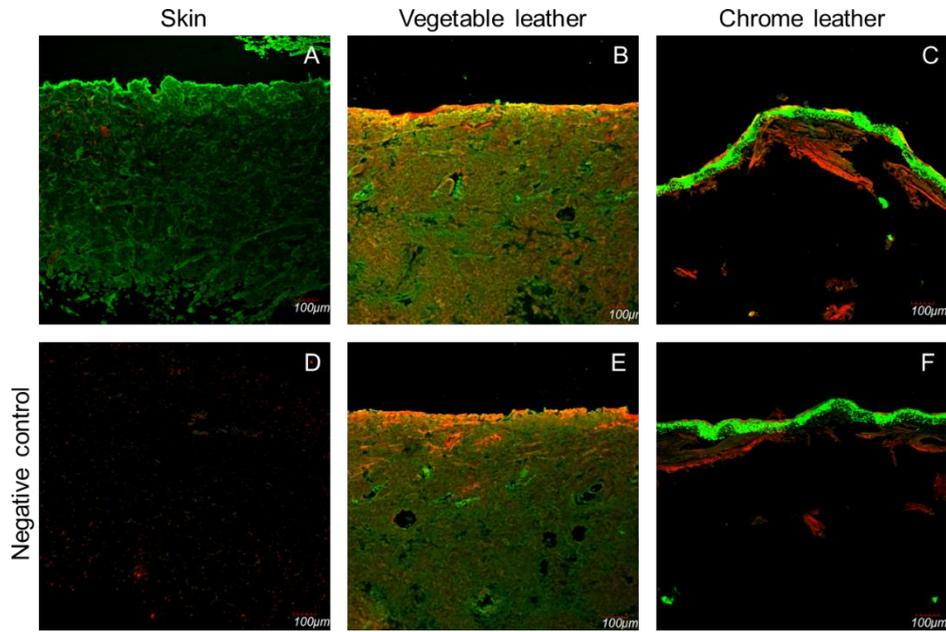


Figure 1-1. Detection of collagen marker peptides using MRM analysis.

The digests of skin, vegetable leather and chrome leather derived from bovine and porcine were analyzed by LC-MS in MRM mode. Detected marker peptides are indicated in boldface.

Bovine



Porcine

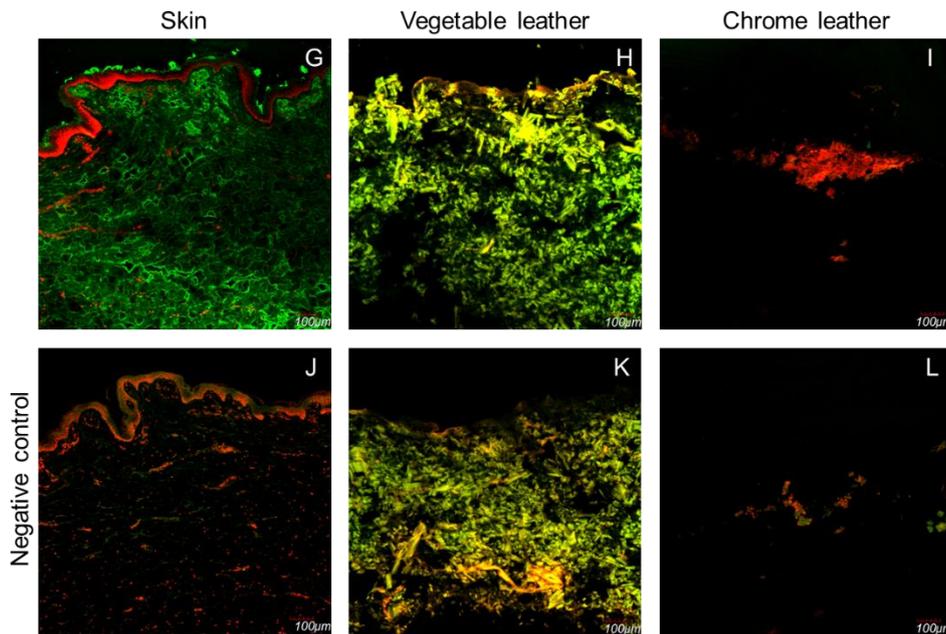
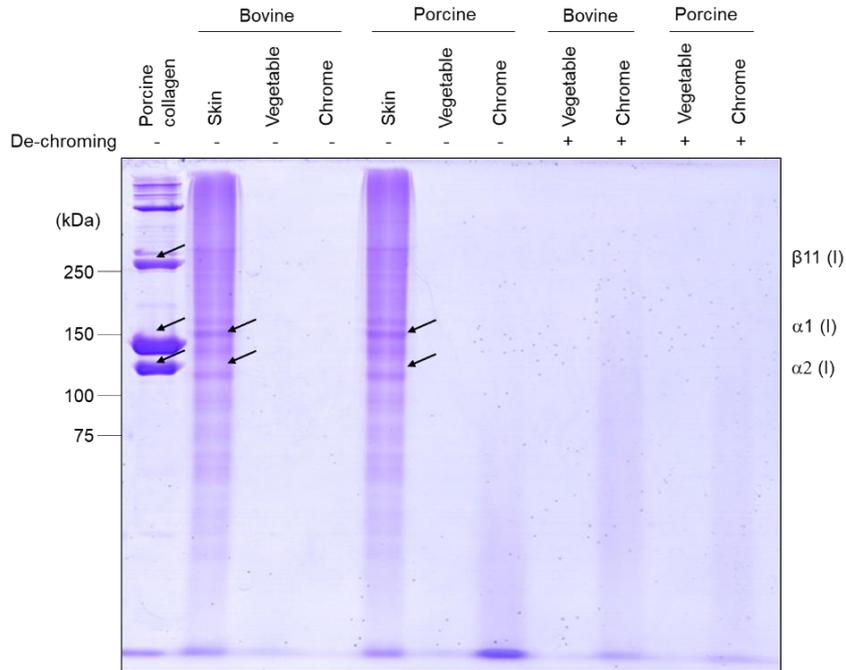


Figure 1-2. Immunohistochemical images of skin and leather derived from bovine and porcine. Bovine type I collagen was labeled with FITC (green) and cellular nuclei were labeled with TOPRO (red).

A



B

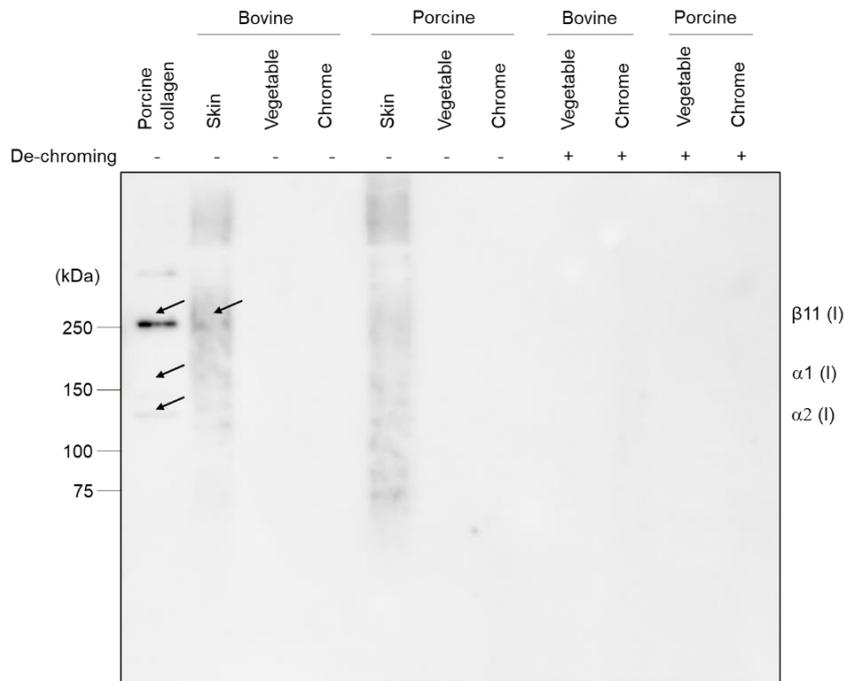


Figure 1-3. Detection of heat extracted samples by SDS-PAGE (A) and western blotting (B).

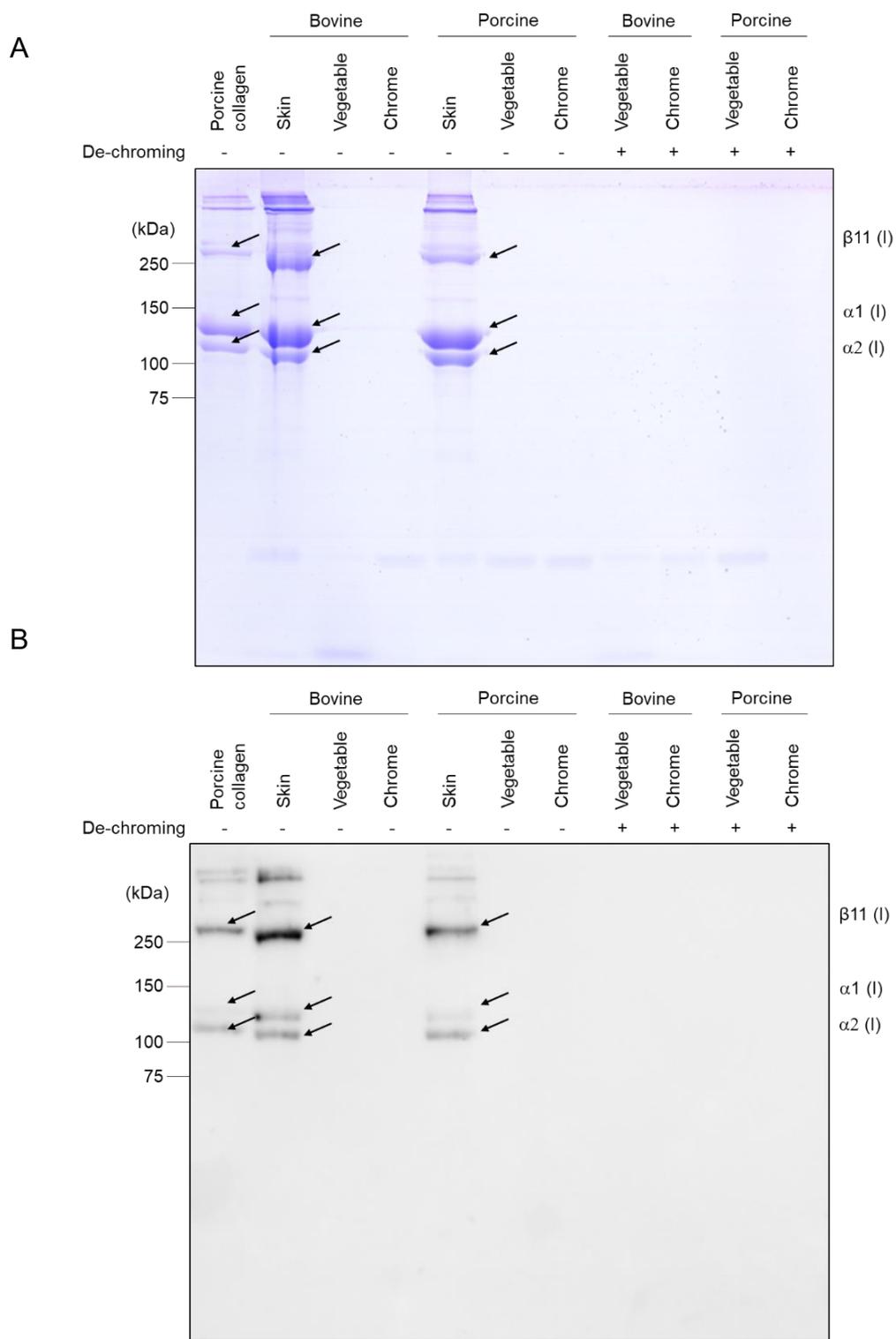


Figure 1-4. Detection of pepsin extracted samples by SDS-PAGE (A) and western blotting (B).

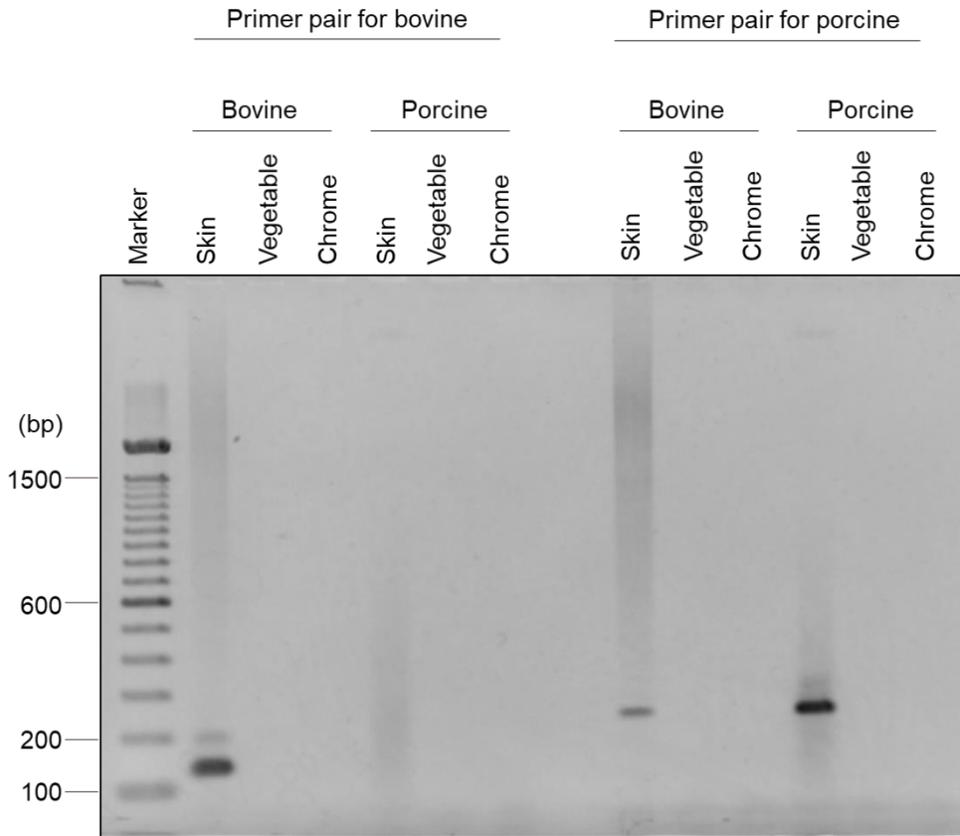


Figure 1-5. PCR detection of DNA extracted from skin and leather.

Table 1-1. Primer pairs list.

Name	Target length	Sequence
Primer pair for bovine	137 bp	Forward 5'-CCATACATCGGCACAAATT-3' Reverse 5'-AATAGTAGGTGGACTATGGCAATT-3'
Primer pair for porcine	230 bp	Forward 5'-CTCCATCCTAATCCTAATTTAATG-3' Reverse 5'-CGATGATGCTAGTGATTGGTATC-3'

Table 1-2. DNA concentration extracted from skin, and vegetable leather and chrome leather of bovine and porcine.

	Bovine			Porcine		
	Skin	Vegetable leather	Chrome leather	Skin	Vegetable leather	Chrome leather
DNA (ng/ μ L)	150.5	13.9	3.7	145.2	11.1	5.5

第2章 迅速で簡便な革の動物種判定法の開発

2.1 緒言

第1章では、質量分析によるペプチド検出法は革の動物種同定のための有力なツールであることを、抗体検出による western blotting 法と免疫蛍光染色法および DNA 検出による PCR 法と比較することで実証した。対照に用いた方法では、いずれも革の動物種判定は不可能である結果となった。さらに、操作の安全性や簡便性、迅速性においても質量分析法に大きな優位性があることが示された。

質量分析装置による動物種同定法は、使用する装置の種類や判定方法によって複数挙げられる。Buckley *et al* [26] は、MALDI-TOF-MS を使って、32種の哺乳類から92個のコラーゲンマーカーペプチドを同定し、フィンガープリント分析で骨の動物種を同定したことを報告した。彼らのその後の研究では、これまで形態学やDNA分析で試みられた様々な化石の明白な動物種識別を達成した [43、44]。しかしながら、この方法は試料濃縮のための分画操作や、複数ピークからマニュアル操作でのペプチド同定が必要とされるため、多大な時間と労力が費やされることが問題点であった。これに対し、Brandt *et al* [28] は、LC-MS分析で得られたMS/MSスペクトルをアミノ配列情報のデータベースに照合させることで、動物皮衣服からウシ、ヒツジ、ヤギの同定に成功した。しかしながら、この方法は、照合したデータが完全に一致しない場合は、最も可能性が高い動物種が挙げられるため、正しい結果が得られない点が課題である。特にコラーゲンアミノ酸配列の種間差がほとんどない動物種間（特にヒツジとヤギ）の判定は曖昧であり、厳密な種同定とはならない。実際に彼らの報告では、形態観察と質量分析検出による動物種判定結果が一致しない試料がいくつかあった。また、公的に入手可能なコラーゲン配列情報のデータベースは不完全であるため、シカ、ワニ種など適用できない動物種がある。ワニ種に関しては、これまで、生組織や血液分析のための研究にDNA分析が用いられているが [45-48]、革への適用については、チャイニーズアリゲーターの同定に成功したという報告が1つあるだけに留まっている [45]。さらに我々の現在の知見では、3つのワニ種間（クロコダイル、アリゲータ

一、カイマン) の明確な判定は、いかなる方法でも達成されていない。

本研究で我々が使用した LC-MS の MRM 分析では、予め目的成分についてのチャンネルを組んでおけば、試料濃縮の必要性がなく、簡便に高感度・高選択性を有する測定が可能となる [31-37]。例えば、コラーゲン型の定量化が行われた研究 [34] では、コラーゲン試料のトリプシン消化物を MRM 分析することで、データ取得のための時間は試料あたり僅か 10 分で完了した。本章では、コラーゲンマーカーペプチドを LC-MS の MRM モードで検出し、その検出パターンで判定を行うことで、コラーゲン配列未知種にも対応可能な新規革動物判定法の開発を目的とした。

2.2 材料および方法

2.2.1 標準品試料

ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、シカのクロム鞣し革は当研究室で保存してあった試料を使用した (Table 2-1)。クロコダイル、アリゲーター、カイマン、トカゲのクロム鞣し革は堀内貿易株式会社から提供して頂いた試料を使用した (Table 2-2)。

2.2.2 革試料の脱クロム処理法とトリプシン消化法

脱クロム処理は以前の報告に準拠して行った [49]。まず、革試料をそれぞれ 1 mm 角に切断し、3-4 片試料を 10 mL の 0.25%水酸化カルシウム溶液中で 0-24 時間室温でゆっくり振とうさせた。蒸留水で数回洗浄した後、革試料を 1.7%硫酸中で 0-4 時間室温でゆっくり振とうさせた。続いて、試料を蒸留水で数回洗浄し、80°Cで 30 分間加熱してコラーゲンを変性させた。上清を除去した後、0.5-200 μg のトリプシン (Sigma-Aldrich) を添加し、200 μL の 100 mM Tris-HCl/1 mM CaCl_2 (pH 7.6) 中で 1-16 時間 37°Cで消化反応を行った。反応溶液にギ酸 (最終濃度 1.0%) を加え、遠心分離後の上清を 0.45 μm フィルターを通した後、LC-MS/MS または MRM 分析に供した。

2.2.3 LC-MS/MS を使ったペプチドの同定法

コラーゲンペプチドの同定は LC-MS/MS (Agilent 1200 Series HPLC システム (Agilent Technologies) と三連四重極型質量分析装置 3200QTRAP (AB Sciex) もしくは Shimadzu Prominence UFLC-XR HPLC システム (島津製作所) と四重極飛行時間型質量分析装置 maXis II (Bruker)) を使い、ショットガンプロテオミクス解析により行った。

3200QTRAP を使用した LC-MS/MS 分析は、Ascentis Express C18 HPLC カラム (粒子径 2.7 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm : Supelco) を使い、流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件で分離した。0 分~5 分 : 98%移動相 A (0.1%ギ酸)、5 分~20 分 : 2-50%移動相 B (100%アセトニトリル)、20 分~25 分 : 90%移動相 B、25 分~30 分 : 98%移動相 A。分離後、イオン化したペプチドは、各タイムポイントの中で最も高強度なプレカーサーイオンから生成される 2 つのフラグメントイオンを選択する Information Dependent Acquisition (IDA) モード (Analyst ソフトウェア 1.6.2) で検出した。MS スキャンは 400~1300 の m/z 値の範囲で MS/MS スキャンは 100~1700 m/z 値の範囲で行った。衝突エネルギー値は Analyst ソフトウェアに組み込まれているローリング衝突エネルギー設定機能を用いてプレカーサーイオンの質量と電荷から自動的に決定した。maXis II を使用した LC-MS/MS 分析は、上記と同様の条件でサンプル分離した後、MS スキャンと MS/MS スキャンは 8 Hz の振動数の 50~2150 の m/z 値の範囲に設定して検出した。得られた MS/MS データを .mgf ファイルに変換した。

ペプチド同定は、Protein Pilot ソフトウェア (AB Sciex) を使って行った [50]。得られた MS/MS スペクトルを公共で入手可能なデータベース (UniProtKB) と Buckley *et al* [27] の報告をもとに作成した当研究室オリジナルの様々な動物種に対する I 型コラーゲン配列データベースに対して検索した。

2.2.4 MRM 分析法

I 型コラーゲン由来マーカーペプチドの分析は Agilent 1200 Series HPLC システムと三連四

重極型質量分析装置 3200QTRAP 連結させた LC-MS の MRM モードで行った。トリプシン消化物を Ascentis Express C18 HPLC カラム（粒子径 5.0 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm : Supelco）を使い、流速 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件で分離した。0 分～2 分：98% 移動相 A（0.1%ギ酸）、2 分～6 分：2-60%移動相 B（100%アセトニトリル）、6 分～8 分：90%移動相 B、8 分～10 分：98%移動相 A。マーカーペプチドに対する MRM チャンネルは Table 2-4 に示した。マーカーペプチド検出の閾値は S/N 比 10 に設定した。

2.3 結果および考察

2.3.1 脱クロムとトリプシン処理の最適化

熱変性後のトリプシン消化処理のみでは、クロム鞣し革からペプチドは全く生成されなかったため（データには示さず）、水酸化カルシウムと硫酸を使って構築された脱クロム処理法 [49] を革に適用することにした。脱クロム処理条件とトリプシン消化条件を最適化するために、標準品のウシのクロム鞣し革を 1 個使用し、次の実験で動物種同定のために選択した 3 個のマーカーペプチド（M1、M2、M4）の検出強度を調査した。まず、水酸化カルシウム処理なし（処理時間=0 時間）と硫酸処理 1 時間の脱クロム処理では、その後のトリプシン消化によってペプチドは検出されなかった（Figure 2-1 A）。しかし、水酸化カルシウム処理を行うことで、トリプシン消化によるペプチド生成は劇的に増加し、2 時間の処理で最大のペプチド生成に至った。対称的に、その後の硫酸処理はペプチド生成量に変化を与えなかった（Figure 2-1 B）。そのため、革からのペプチド生成のために、硫酸処理は必要としないことが明らかになった。従って、その後の実験では全ての革試料に硫酸処理は行わず、2 時間の水酸化カルシウム処理のみを使用することにした。また、植物タンニン鞣し革には、この脱クロム処理なしでペプチド生成することが確認された（データには示さず）。トリプシンの消化条件は、濃度が 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （Figure 2-2 A）、反応時間が 37°C、4 時間（Figure 2-2 B）でペプチド生成量が充分であることを見出した。マーカーペプチドの MRM 分析は、逆相クロマトグラフィーによる分離を用いて、サンプル当たりわずか 10

分である。従って、この方法による動物種同定は、約7時間で完了できるようになった。

2.3.2 哺乳類革の由来動物種判定用コラーゲンマーカーペプチドの同定

哺乳類革の動物種同定のための LC-MS 法を構築するため、まずは標準品のウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、シカのクロム鞣し革 (Table 2-1) を使って、マーカーペプチドを選択した。標準品試料を脱クロム処理した後、トリプシン消化によって生成したペプチドを、3200QTRAP を用いた LC-MS/MS 分析に供し、ショットガンプロテオミクス解析を行った。得られた MS/MS スペクトルを I 型コラーゲン配列データベースに照合することで、I 型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖由来の様々なペプチドが同定された。この同定されたペプチドリストの中から、コラーゲン Gly-Xaa-Yaa 配列の Y 位置の全ての Pro 残基が 4-Hyp にヒドロキシル化されていないペプチドと、Arg または Lys-Hyp 結合を除いて、トリプシンの切断ミスが観察されたペプチドを除外した。続いて、残りのマーカーペプチド候補について、MRM チャンネルを設定して、各標準品についてペプチド検出の有無を調査した (Table 2-1)。マーカーペプチドの選択は、動物種の誤同定を避けるために、2 個のルールを設定した。1: それぞれの動物に対して 2 個以上マーカーペプチドが検出されること、2: それぞれの動物種間でマーカーペプチドの検出パターンは少なくとも 2 ヶ所異なること。最終的に、これらの条件を満たす I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖から 3 個と $\alpha 2$ 鎖から 3 個の合計 6 個のマーカーペプチドを選択した (Figure 2-3 と Table 2-3)。続いて、MS/MS 分析で得られたプレカーサイオン (Q1) とフラグメントイオン (Q3) (Figure 2-3) からマーカーペプチドの MRM チャンネルを設定した (Table 2-4)。革の 6 種の動物種に対する 6 個のマーカーペプチドの検出の有無のパターンを Table 2-3 に示す。全てのマーカーペプチドの MRM クロマトグラム (Figure 2-4) は良好なピーク形状を示したため、ペプチド検出の有無を簡便に判断することができた。マーカーペプチドの検出パターンは 6 種の動物種でそれぞれ異なり、例えば、M1 と表記した $\alpha 1$ (I) 【316-327】GFOGADGVAGPK (O は Hyp を示す) はウシ、ウマ、ブタ、シカの革から検出され、 $\alpha 2$ (I) 【978-990】TGQOGAVGPAGIR (M6) はブタ、ヒツ

ジ、ヤギ、シカの革から検出された。Buckley *et al* は [51] 以前に、33 個のアミノ酸からなるトリプシン消化ペプチド $\alpha 2$ (I) 【757-789】を用いて、ヒツジとヤギの骨の識別を可能にした。このペプチドに加えて、ヒツジとヤギを識別するための共通の配列領域を含む $\alpha 1$ (I) [733-756] GETGPAGROGEVGPPOGPOGPAGEK (M2) と $\alpha 1$ (I) [741-756] AGEVGPPOGPOGPAGEK (M3) の 2 個のペプチドを新しく同定した。本来、Arg の後ろのペプチド結合はトリプシン消化によって切断されるが、P3 の 741 番目が Ala から Hyp へ置換されたことで、M2 の Arg-Hyp はトリプシン消化に対する抵抗性によって切断されず[52、53]、M2 ペプチドが生成された。この M2 はウシ、ヤギ、シカの革からは検出されたが、M3 はヒツジ革のみで検出された (Figure 2-4)。この新しいマーカーペプチドは、以前に同定された $\alpha 2$ (I) 【757-789】のペプチドと比較して、MRM 分析で高強度に検出された (データは示さず)。今回選択した 6 個のマーカーペプチドによって、革の由来動物種の効率的かつ簡便な同定を可能にし、さらにヒツジとヤギ間の識別さえも可能にした。

2.3.3 ワニ革の由来動物種判定用コラーゲンマーカーペプチドの同定

ワニ革の種判別は、標準品として使用したクロコダイル、アリゲーター、カイマン、トカゲのクロム鞣し革 (Table 2-2) を脱クロム処理した後、トリプシン消化し、maXis II を用いた LC-MS/MS 分析に供し、ショットガンプロテオミクス解析を行った。得られた MS/MS スペクトルから、2.3.2 と同様にマーカーペプチドを選択した。最終的に、I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖から 3 個と $\alpha 2$ 鎖から 3 個の合計 6 個のマーカーペプチド (C1~C6) を選択した (Table 2-3)。4 個のマーカーペプチド (C3、C4、C5、C6) がアリゲーターで検出され、さらに、I 型コラーゲン配列が未知な種であるクロコダイルは 2 個のペプチド (C3 と C5) が、カイマンは 4 個のペプチド (C2、C4、C5、C6) が検出された。また、トカゲでは C1 と C2 が検出され、ワニ類との明確な識別ができることが示された。MRM クロマトグラムは良好なピーク形状を示したため (Figure 2-4)、ペプチド検出の有無を簡便に判断することができた。この選択されたマーカーペプチドの検出パターンは、市場革に使用されるほとんど全

てのワニ種とトカゲ種 [5] で共通することが確認された (Table 2-2)。また、2.3.2 で選択した哺乳類革判別用マーカーペプチドは、ワニ革とトカゲ革からは検出されなかった (Figure 2-5)。従って、12 個マーカーペプチドの組み合わせで、6 種の哺乳類、3 種のワニ、トカゲ間の判定が可能になった。これまで、いかなる方法でもワニ種間の判定は未達成であったが、マーカーペプチドの検出パターンで判定を行う本法により達成できた。

2.3.4 コラーゲンマーカーペプチド (GFOGADGVAGPK) の同定

2.3.2 で同定されたマーカーペプチドの配列情報は、標準品革から生成したトリプシン消化物の MS/MS 分析で得られたプレカーサイオン (Q1) とフラグメントイオン (Q3) をデータベースに照合することで決定した。しかしながら、トリプシン消化物中に存在するコラーゲンペプチドを含む様々な革由来成分の影響で、本当に正しいマーカーペプチドの配列情報が同定されているかどうか疑問がある。そこで哺乳類判別用マーカーペプチド GFOGADGVAGPK (M1) の配列情報の確かさを標準品の合成ペプチドを用いて検証した。この合成ペプチドについて 3200QTRAP を用いた LC-MS/MS 分析に供し、得られた MS/MS スペクトルをマーカーペプチド M1 と比較した。その結果、プレカーサイオンとそのフラグメントイオンの検出パターンは M1 と同じであり、MRM チャンネルに設定した Q3 値と同様の m/z 値 (マーカーペプチド M1 : 643.3、合成ペプチド : 643.6) も確認された (Figure 2-3)。また、合成ペプチドを MRM 分析に供した結果、M1 のクロマトグラムの保持時間に一致することが確認された (Figure 2-4)。従って、マーカーペプチド M1 の配列は確実に GFOGADGVAGPK であり、MS/MS 分析のデータベースサーチによる配列決定は正確であることが示された。

2.4 まとめ

本章では、LC-MS の MRM モードを使用して、I 型コラーゲン由来のマーカーペプチドの検出パターンで革の哺乳類とワニ種の動物種判定法を開発した。本法のサンプル調製は、

脱クロム処理とトリプシン消化を含めて約 7 時間、LC-MS 分析はサンプルあたり 10 分で完了する。合計 12 個のマーカールペプチドの使用で、哺乳類間だけではなく、種間差が少ないワニ種の判定も可能になった。このマーカールペプチドの検出パターンによる動物種判定法は、シカ、クロコダイル、カイマンのように、コラーゲン配列が未知な種に対しても適用可能であることが示された。ターゲットとなる種に対して、マーカールペプチドを適宜選択することで、今後もさらに様々動物種に対して適用範囲を拡大することができる。このペプチド検出による動物種同定法は、これまで行われてきた形態観察や、DNA 分析では困難であったサンプルの分析において大きな威力を発揮する。特にワニ種は CITES で保護されているにも関わらず、貴重な皮の違法な取引に脅かされている [46]。本法は、これら絶滅危惧種から得られた皮革の国際貿易を監視するために使用されることも期待される。

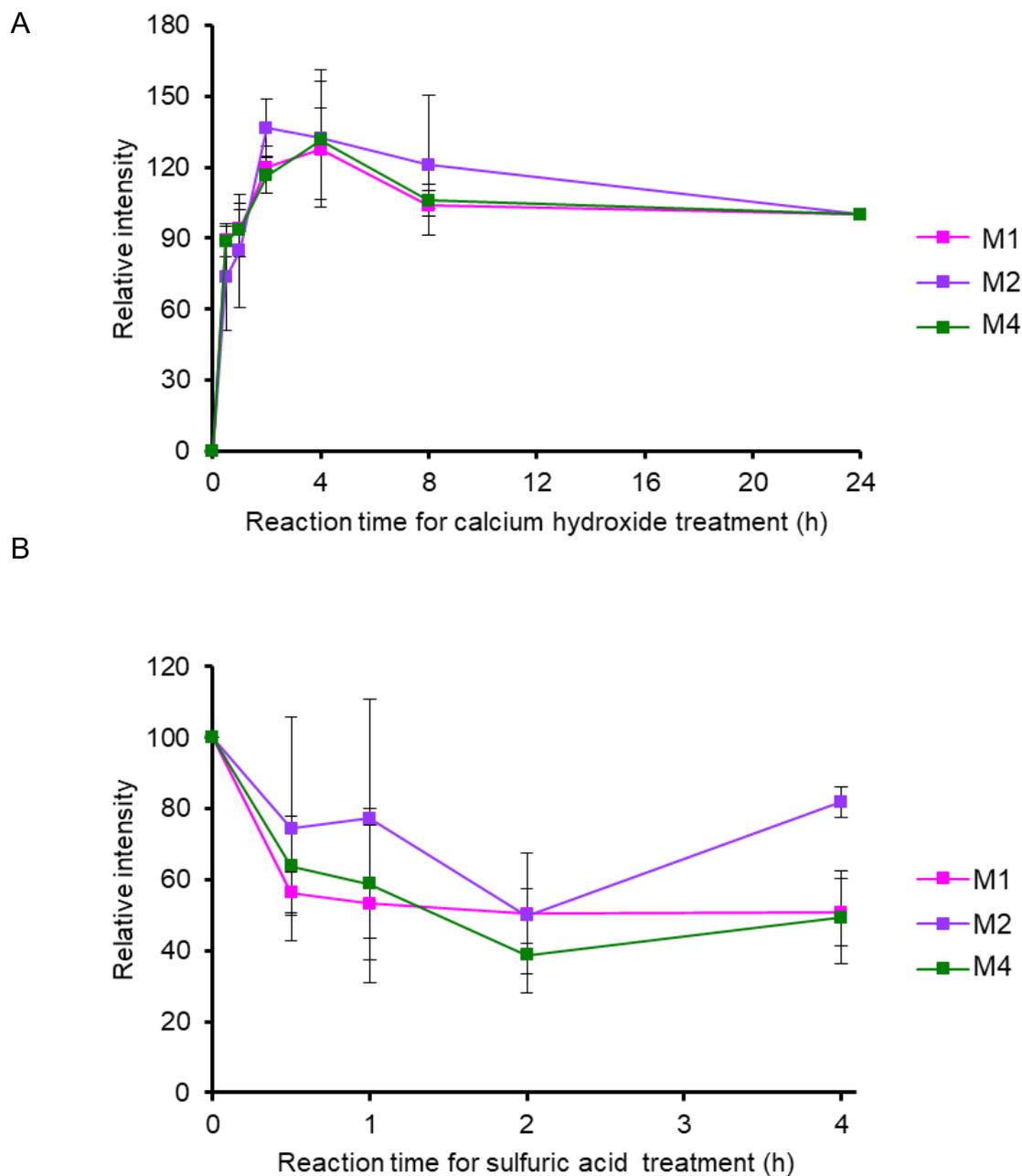


Figure 2-1. Optimization of dechroming treatments on peptide generation from chrome leather using trypsin. A sample of bovine chrome leather was treated with (A) 0.25% calcium hydroxide for either 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, or 24 h followed by treatment with 1.7% sulfuric acid for 1 h or (B) 1.7% sulfuric acid for either 0, 0.5, 1, 2, or 4 h following incubation with 0.25% calcium hydroxide for 2 h. The data are expressed as relative intensity with (A) 24 h or (B) 0 h being 100%, and represent the mean \pm SD of three replicates.

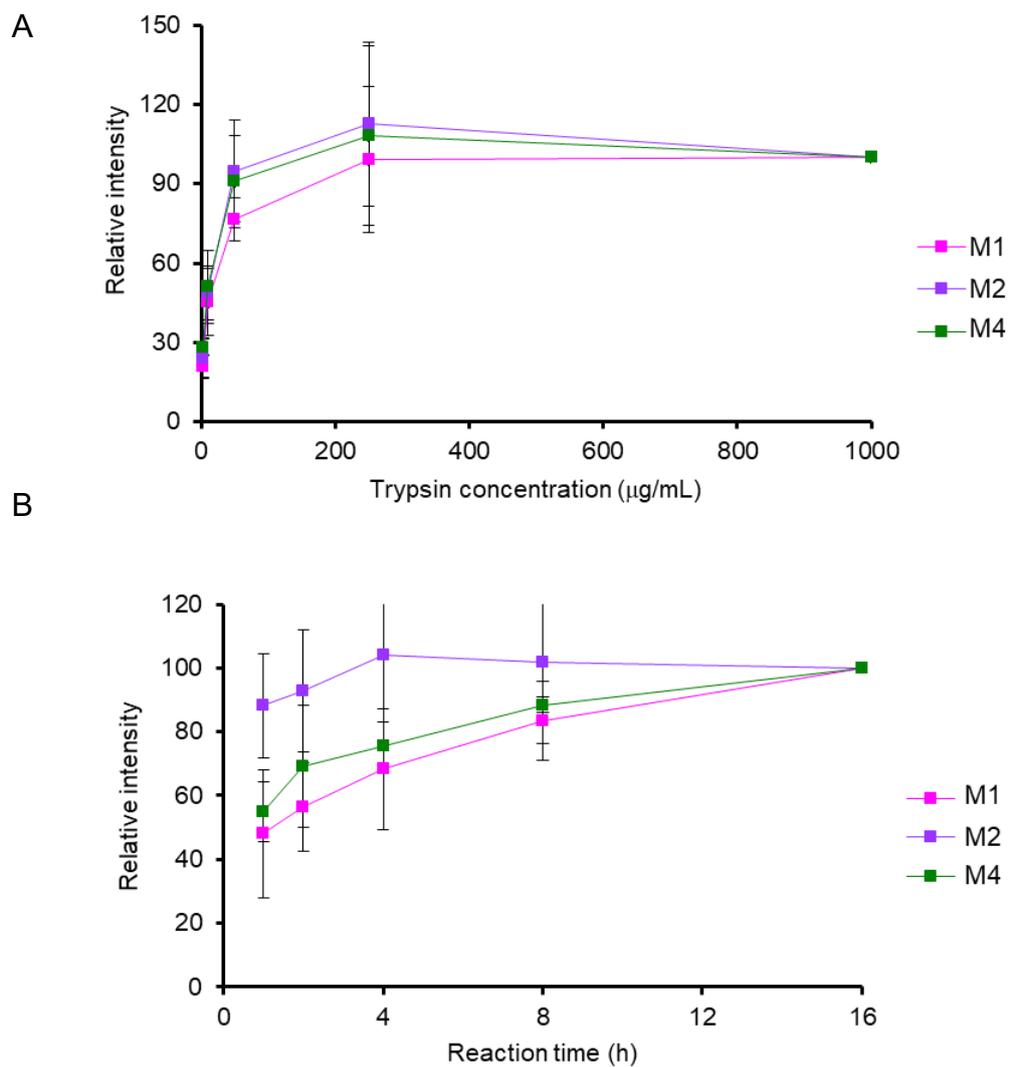


Figure 2-2. Optimization of trypsin digestion on peptide generation from chrome leather. A sample of bovine chrome leather was digested with (A) either 2.5,10,50, 250, or 1000 $\mu\text{g/mL}$ trypsin for 2 h or (B) 250 $\mu\text{g/mL}$ trypsin for either 1, 2, 4, 8, or 16 h following dechroming. The data are expressed as relative intensity with (A) 1000 $\mu\text{g/mL}$ or (B) 16h being 100%, and represent the mean \pm SD of three replicates.

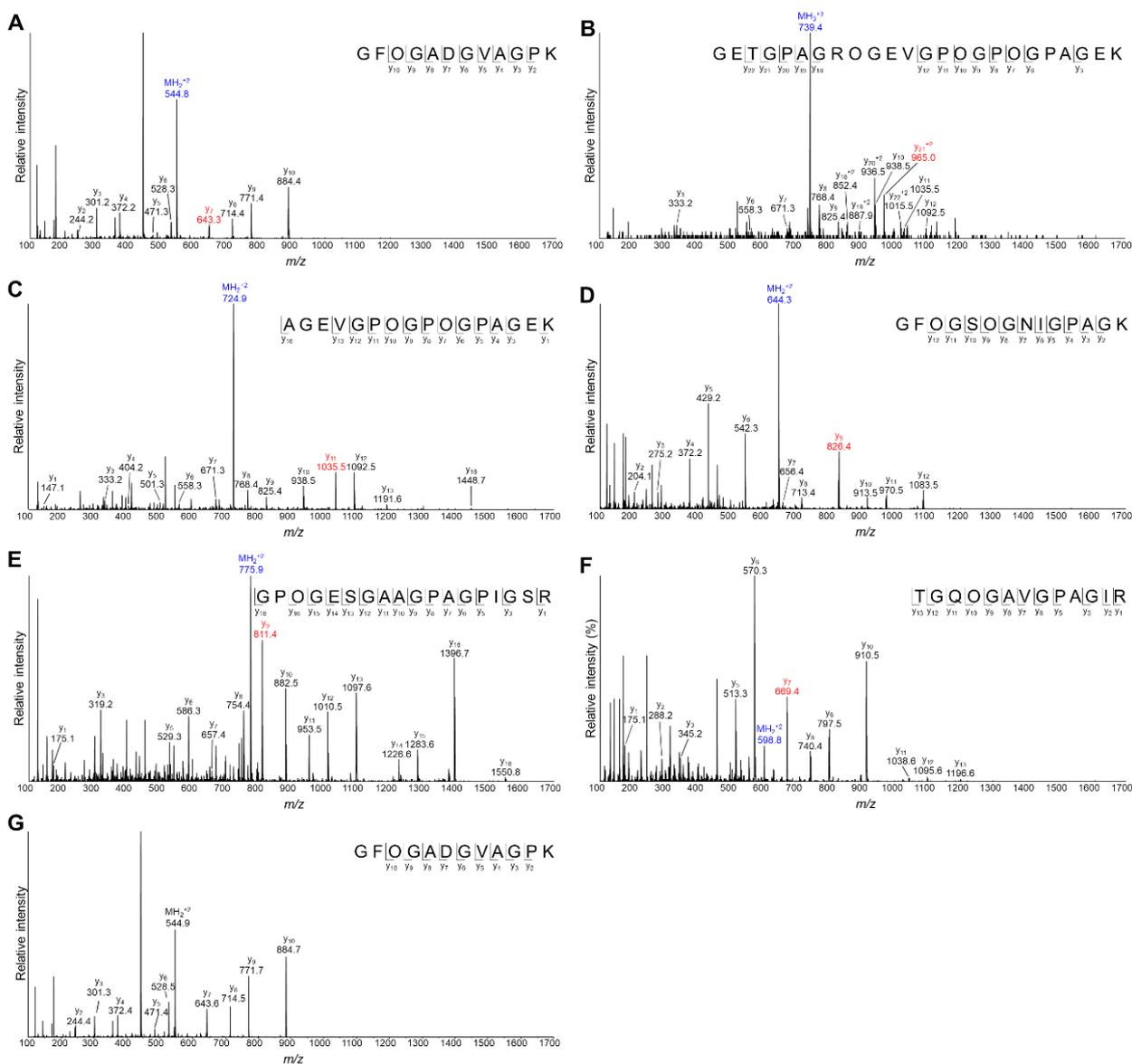


Figure 2-3. MS/MS spectra of marker peptides (M1-M6) and synthetic peptide GFOGADGVAGPK. MS/MS spectra of marker peptides (M1–M6) were obtained from bovine, goat, sheep, sheep, porcine, and porcine leathers. MS/MS spectra of synthetic peptide GFOGADGVAGPK agreed with detection pattern of marker peptide M1. The peaks in blue and red are used for Q1 and Q3 transitions, respectively, for MRM analysis of the marker peptides as summarized in Table 1-1.

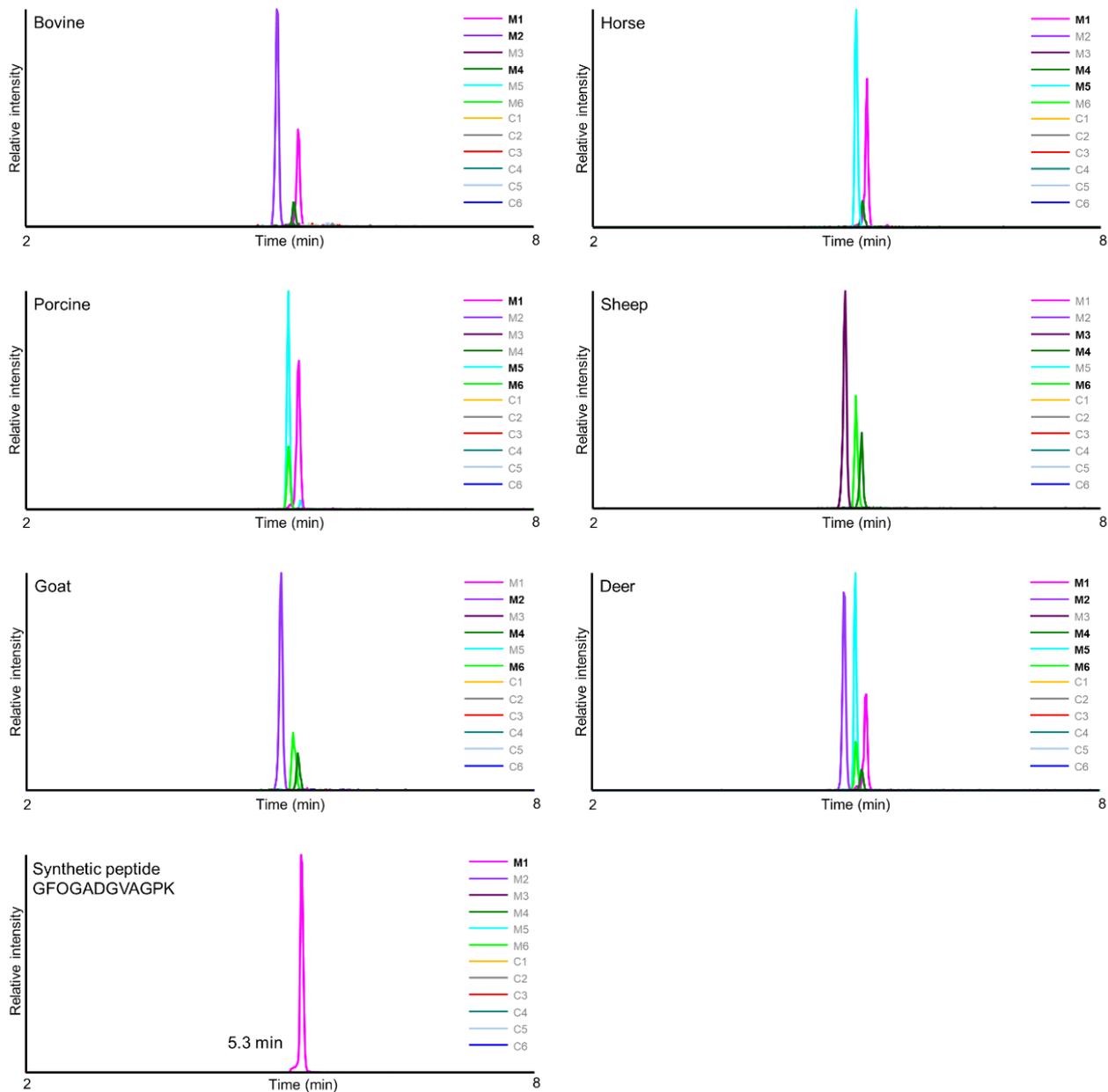


Figure 2-4. MRM chromatograms of marker peptides for leather from six animal species (bovine, horse, porcine, sheep, goat, and deer) and synthetic peptide GFOGADGVAGPK. Detected marker peptides are indicated in boldface.

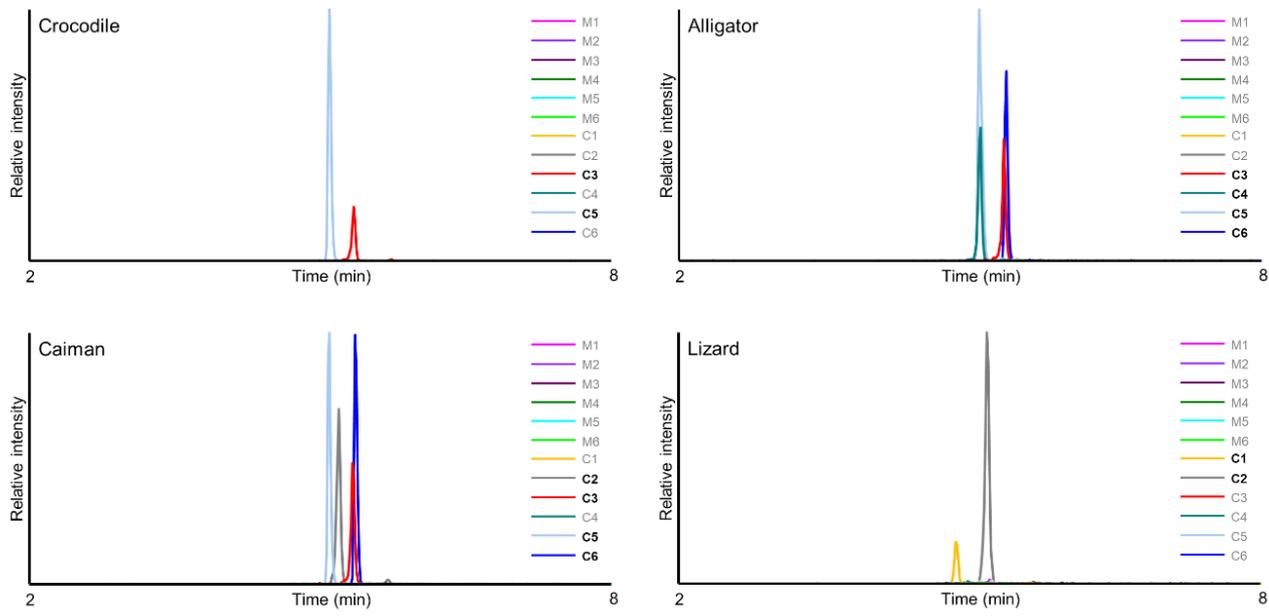


Figure 2-5. MRM chromatograms of marker peptides for crocodile, alligator, caiman, and lizard leather. Detected marker peptides are indicated in boldface.

Table 2-1. List of analyzed mammalian leathers.

Species	Numbers of samples	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Bovine	4	+	+	-	+	-	-
Horse	2	+	-	-	+	+	-
Porcine	3	+	-	-	-	+	+
Sheep	4	-	-	+	+	-	+
Goat	3	-	+	-	+	-	+
Deer	3	+	+	-	+	+	+

Table 2-2. List of analyzed crocodilian and lizard leathers

Common name	Scientific name	Numbers of samples	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Crocodile								
Nile crocodile	<i>Crocodylus niloticus</i>	2	-	-	+	-	+	-
New Guinea crocodile	<i>Crocodylus novaeguineae</i>	2	-	-	+	-	+	-
Saltwater crocodile	<i>Crocodylus porosus</i>	4	-	-	+	-	+	-
Siamese crocodile	<i>Crocodylus siamensis</i>	3	-	-	+	-	+	-
Alligator								
American alligator	<i>Alligator mississippiensis</i>	5	-	-	+	+	+	+
Caiman								
Spectacled caiman	<i>Caiman crocodilus</i>	1	-	+	+	-	+	+
Brown caiman	<i>Caiman crocodilus fuscus</i>	3	-	+	+	-	+	+
Yacaré	<i>Caiman yacare</i>	1	-	+	+	-	+	+
Lizard								
Common water monitor	<i>Varanus salvator</i>	5	+	+	-	-	-	-
Black Tegu	<i>Tupinambis teguixin</i>	2	+	+	-	-	-	-

Table 2-3. Marker peptides list for species identification.

Chain	Position ^a	Marker peptide	Sequence ^b	Crocodylia													
				Bovine ^c	Horse ^c	Porcine ^c	Sheep ^c	Goat ^c	Deer ^c	Crocodile ^c	Alligator ^c	Caiman ^c	Lizard ^c				
α1(I)	316-327	M1	F FOGADGVAGPK	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
	733-756	M2	GETGPAGROGEV GOGPOGPAGEK	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	741-756	M3	AGEV GOGPOGPAGEK	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	361-374	M4	G FOSSOGNIGPAGK	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	502-519	M5	G POGESGAA GPAG PIGSR	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	978-990	M6	T GQOGAVGPAGIR	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
α1(I)	109-126	C1	G EOSSOGENGA OGQ VGPR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	295-309	C2	G EOGPAGLOGPAGER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	316-327	C3	F FOGADGISGPK	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	238-252	C4	G IOGSPG PAGAA GTR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	253-264	C5	GLV GEOGPAGAK	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
	502-519	C6	G POGESGAVGP PIG SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

a: The numbering of residues begins with the triple-helical portion of the chains. b: O indicates 4-Hyp. c : The presence and absence of marker peptides are denoted by + and -, respectively.

Table 2-4. MRM channels of marker peptides.

Marker peptide	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	<i>z</i>	Collision energy	Time (min)
M1	544.76	643.34	2	30.0	5.3
M2	739.35	964.98	3	25.3	5.0
M3	724.85	1035.51	2	37.9	5.0
M4	644.31	826.44	2	34.3	5.2
M5	775.87	811.44	2	40.1	5.1
M6	598.82	669.40	2	32.3	5.1
C1	855.88	968.49	2	43.7	4.8
C2	697.33	940.48	2	36.7	5.2
C3	559.77	941.48	2	30.6	5.4
C4	641.32	941.50	2	34.2	5.1
C5	534.78	799.39	2	29.5	5.1
C6	803.91	938.54	2	41.4	5.4

第3章 革の動物種判定法の適用と応用

3.1 緒言

第2章では、LC-MSを用いた迅速かつ簡便に行える革の動物種判定法を開発した。本法は、予め選択した12個のコラーゲンマーカールペプチドの検出パターンで判定を行うことで、革に使用される哺乳類6種、ワニ3種、トカゲの合計10種間での判定を可能にした。また、脱クロム処理時間を2時間、トリプシン消化時間を4時間に最適化することで、1日で全体の分析が完了できるようになった。本法はコラーゲン配列が未知な動物種にも適用可能であり、さらに迅速かつ簡便な操作であるため、ルーチン分析にも有用であることが示された。

本法は動物種が明確になっている数枚の標準品革をもとに構築された。しかし、実際に革に使用される動物種は産地によって、その種類も多様であるため、判定可能な動物種全てに対して、本分析法が適用できるかどうかは定かではない。例えば、ヒツジは主にヨーロッパで羊毛工業の発達とともに品種改良が行われた毛用種であるウールシープと、アフリカやインドなどの熱帯地域を原産地とする肉用種または乳用種であるヘアシープに分けられる[4]が、そのどちらにも本法ではヒツジと判定できることを確認する必要がある。また、他の動物種に対しても実際にその種類を把握することは難しい。さらに、様々な革由来成分がDNA検出を阻害した事実があったように[23]、あらゆる革に対して、マーカールペプチドの検出ができるかどうかを確認する必要がある。

また序論でも記述したように、家庭用品品質表示法では対象製品に対して、使用した動物種を表示することが定められている。ワニ革は、表示対象からは除かれているが、クロコダイル、アリゲーター、カイマンとそれぞれの価値が異なるため、その種類を任意に表示することが適切であると考えられている[8]。ワニ革はいくつかの形態的特徴によって、動物種源の判別するための手がかりがいくつかある。例えば、腹側鱗の穿孔と呼ばれる感覚器官はクロコダイル特有であり[54、55]、網目模様を示す臍跡はアリゲーター特有のものである[54、56]。しかし、これらの特徴は革の製造工程に消失することが多く、時計ベ

ルトなどの小物製品の革の動物種源を識別することは特に難しくなる。さらに、電子顕微鏡観察でワニ革の判定は可能だが、試料の破壊が必須であり、実際に高価な革製品を検査するには、特に非破壊が望まれるため、適用が難しい場合がある。質量分析による検出は少量試料で可能であるとはいえ、2章で開発した方法は1 mm 角の革を3~4片使用することから、試料切除の必要があったため、破壊検査が望まれない製品への適用は困難であった。そこで本章では、①様々な産地由来の75個の市場革の由来動物種を分析することで本方法の正確さを実証すること、②本方法と鉄ヤスリによる粉末化処理を組み合わせることによる革製品の準非破壊分析法の開発を目的とした。

3.2 材料および方法

3.2.1 革試料と時計ベルト

様々な産地由来の75個の市場革は、複数のサプライヤーから入手した製品および当研究室で保管してあった製品を使用した。クロコダイル、アリゲーター、カイマン、クロコダイル型押しのカーフ、トカゲの革時計ベルトは、時計販売店から購入した。

3.2.2 革試料の脱クロム処理法およびトリプシン消化法

革試料は1 mm 角に細切もしくは鉄ヤスリで粉末化した。まず、試料約10 mgを脱クロム処理として0.25%水酸化カルシウム溶液に2時間振とうさせた。蒸留水で数回洗浄した後、80°Cで30分間加熱変性させた。50 µg トリプシン (Sigma-Ardrich) を加え、100 mM Tris-HCl/1 mM CaCl₂ (pH 7.6) 中にて37°Cで4時間消化反応を行った。ギ酸を加え(最終濃度1.0%)酸性化した後、遠心分離後の上清を0.45 µm フィルターでろ過した後、LC-MS/MS またはMRM 分析に供した。鉄ヤスリで削ることで時計バンドの裏側から採取された約100 µg の革粉末は脱クロム処理を行わずに、直接100 mM Tris-HCl/1 mM CaCl₂ (pH 7.6) 中でトリプシン消化を行い、MRM 分析に供した。

3.2.3 MRM 分析法

マーカーペプチドの分析は Agilent 1200 Series HPLC システムと三連四重極型質量分析装置 3200QTRAP 連結させた LC-MS の MRM モードで行った。トリプシン消化物を Ascentis Express C18 HPLC カラム（粒子径 5.0 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm : Supelco）を使い、流速 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件で分離した。0 分～2 分：98%移動相 A（0.1%ギ酸）、2 分～6 分：2-60%移動相 B（100%アセトニトリル）、6 分～8 分：90%移動相 B、8 分～10 分：98%移動相 A。マーカーペプチドに対する MRM チャンネルは第 2 章の Table 2-4 に示した。マーカーペプチド検出の閾値は S/N 比 10 に設定した。

3.2.4 電子顕微鏡観察法

革試料の形態観察は走査型電子顕微鏡（JCM-5700 JEOL）で行った。革をカミソリで薄層に細切した後の断面の線維構造と、革表面の塗装膜をジメチルホルムアミドで除去した後の毛穴の形態をそれぞれ観察した。

3.3 結果および考察

3.3.1 市場革の動物種同定

2.3.2 で開発した哺乳類革判別法を使用して、様々な生産地域からの 75 個の市場革を分析した。マーカーペプチドの検出パターンによる判定の結果、ウシ、ウマ、ブタと表記された全ての革試料は表記の動物種と一致したが、ヒツジ、ヤギ、シカと表記された革試料は、一部が表記の動物種と一致しなかった（Table 3-1）その中で、シカと表記された革試料のマーカーペプチドの検出パターンは生産地域によって異なるようであった。日本とニュージーランドを産地とするシカ試料については、M1、M2、M4、M5、M6 のマーカーペプチドの検出に基づき、同定結果は表記と一致した。これに対して、イタリアとアメリカを産地とするシカ試料については、M1、M2、M4、M6 の検出が確認されたが、一致する動物種はなかった（Figure 3-1 C）。この産地による検出パターンの違いは、シカが Cervinae と

Capreolinae の 2 つのサブファミリーに分類されるためと考えられる [57]。Buckley *et al* [58] の研究では、Cervinae サブファミリー（ダマジカ）と Capreolinae サブファミリー（ノロジカ）間で $\alpha 2$ (I) 【757-789】 のアミノ酸置換が起こると報告している。シカの生息地分布から、日本とニュージーランドのシカ革は Cervinae であり、イタリアとアメリカのシカ革は Capreolinae 由来であると推測される。そのため、シカのサブファミリーの違いが、イタリアとアメリカからのシカ試料で M5 マーカーが不検出になった理由であると説明できると考えられる。ただし、この仮説を確認するには、生産地が確実に認定されたシカ試料での分析が必要である。一方で、ヒツジとヤギと表記されたほとんどの革試料は、表記と同じとして同定されたが、Sheep_China-1 (M2、M4、M6 : Figure 3-1 A) と Goat_China-2 (M3、M4、M6 : Figure 3-1 B) の検出パターンは、表記の動物種に一致しなかった。その同定結果は、Sheep_China-1 がヤギ、Goat_China-2 がヒツジであった。

3.3.2 ヒツジ革とヤギ革の顕微鏡観察

3.3.1 で Sheep_China-1 と Goat_China-2 の 2 個の革試料の同定結果が表記の動物種と不一致であった結果に対して、その事実を確認するために、これらの試料を SEM で分析し、線維の構造、表面の形態、毛穴パターンを観察した (Figure 3-2)。この分析では、マーカーペプチドの検出結果 (Table 3-1) から、ヒツジと同定された Sheep_Indonesia-1 とヤギと同定された Goat_Indonesia -1 をそれぞれ標準試料として用いた。革断面を観察した結果、ヒツジとヤギの両方で、銀面に対して平行に走っているコラーゲン線維が確認された (Figure 3-2 A と B)。しかしながら、ヤギ革の表面は、滑らかなヒツジ革と比較して粗く、ヒツジ革では観察されなかった列状に揃った毛穴構造が観察された (Figure 3-2 E と F)。Goat_China-2 と Sheep_China-1 の試料の線維構造は、それぞれヒツジとヤギの標準試料と同様であった (Figure 3-2 C と D)。さらに、Goat_China-2 試料ではヒツジの標準試料と同様の滑らかな表面と均一な毛穴構造が観察された (Figure 3-2 G)。従って、Goat_China-2 はヒツジ由来であり、これはマーカーペプチドの検出パターンによる判定結果と一致することが確認され

た。対して、Sheep_China-1 革試料は、おそらく銀面層が取り除かれ起毛されたヌバック仕上げであったため、表面の形態を観察できなかった (Figure 3-2 H)。そのため、SEM 分析では、Sheep_China-1 革試料の動物種を同定することはできなかったが、マーカーペプチドの検出パターンを用いた方法では、この試料の由来は確実に明らかにすることができた。

1984 年に Fehilly *et al* [59] はヒツジとヤギの胚細胞の組み合わせからギーブと呼ばれる交雑種を作り出し、近年では自然交配による誕生も報告されている [60]。本法でヒツジとヤギを識別するためのマーカーペプチドは、同じ配列位置の $\alpha 1(I)$ [733-756] GETGPAGROGEVVGPOGPOGPAGEK (M2) と $\alpha 1(I)$ [741-756] AGEVVGPOGPOGPAGEK (M3) を使用している。この 2 個のマーカーペプチドは 1 種から同時に検出されることは起こり得ないため、ギーブではどちらのペプチドが検出されるかを確認することは今後の研究課題の 1 つであると考えられる。

3.3.3 革粉末化によるトリプシン消化効率の評価

2 章で開発した方法は、動物種同定のためのマーカーペプチドを確実に検出させるために、クロム革から 3-4 個の 1 mm 角 (~5 mg) を採取して分析した。しかしながら、高価なワニ革製品などを分析するためには、特に非破壊での検査が望まれるため、本法の適用が難しいことが課題として挙げられた。そこで、採取するサンプル量をできるだけ減らすために、鉄ヤスリを用いた粉末化処理を行うことにした。そのため、まずは、この処理のトリプシン消化効率に及ぼす影響を調べた。水酸化カルシウムで脱クロム処理した後、トリプシン消化をしたクロム鞣しクロコダイル革を使用し、粉末革と 1 mm 角の革のペプチド生成を比較した。マーカーペプチド C3 と C5 の検出強度を MRM 分析で評価した結果、ペプチド生成は粉末化処理によって約 2 倍に増加した (Figure 3-3)。さらに驚くべきことに、1 mm 角の革では不可欠であった脱クロム処理が、粉末化した革では必要とせず、マーカーペプチドが十分に検出されることが明らかになった。従って、この鉄ヤスリによるサンプリング方法は、最小限の試料破壊での動物種同定の可能性があることが見出された。そ

のため、次にこのサンプリング方法を採用して、ワニ革の時計ベルトを分析することにした。

3.3.4 時計ベルト革の準非破壊動物種同定

見た目だけでは動物種の明確な識別が難しいクロコダイル、アリゲーター、カイマン、クロコダイル型押しウシと表記された 4 個の革製時計ベルトを分析に使用した。試料は、鉄ヤスリで製品の裏側の目立たない部位から慎重に削って採取した (Figure 3-4)。このサンプリング法により、時計ベルトの損傷は裏側のほんの僅かだけで約 100 μg の革粉末が集められた (Figure 3-4)。採取した革粉末を加熱後、直接トリプシン消化し MRM 分析に供した結果、サンプリング量が僅かにも関わらず、それぞれの試料で高感度にマーカーペプチドの検出が確認された。その検出パターン (Figure 3-5) は全て表記のワニ種と一致した (クロコダイル : C3 と C5、アリゲーター : C3、C4、C5、C6、カイマン : C2、C3、C5、C6)。また、クロコダイルの型押し加工された時計ベルトでは哺乳類のマーカーペプチド (M1、M2、M4) が検出され、ウシ由来であることを示す結果となった。さらにトカゲ革時計ベルトの分析結果 (C1 と C2) も表記と同じ動物種と同定することに成功した (Figure 3-5 E)。これらの結果から、鉄ヤスリによる粉末化方法と組み合わせた LC-MS 法が、試料をほとんど破壊することなく革製品の動物種同定に使用できることが実証された。

3.4 まとめ

本章では初めに、2 章で開発した革の動物種判定法を 75 個の市場革の調査へ適用することで本方法の正確さを実証した。従来の形態観察による動物種判定法は、革表面や線維構造に損傷を受けた試料では判定が難しくなる場合があったが (Figure 3-2)、マーカーペプチドによる LC-MS 分析はシカ革を除く全ての革の革動物種同定に成功し、さらに動物種表記が異なる革も見出した。シカ革は産地によってマーカーペプチドの検出パターンが異なることが判明したが、それ以外の動物種は全て産地に関わらず同じ検出パターンを示すこと

が確認できた。続いて、鉄ヤスリによる粉末化処理（試料量約 100 μg ）を組み合わせること
とで革製品の準非破壊分析へと応用した。この方法を用いることで、衣服、ハンドバッグ、
財布などの他の皮革製品も目立たない部位からサンプリングすることで同様の準非破壊分
析が可能となる。さらに高感度な LC-MS を使用することで、サンプリング量をさらに削減
することもできることから、今後の活用が期待される。

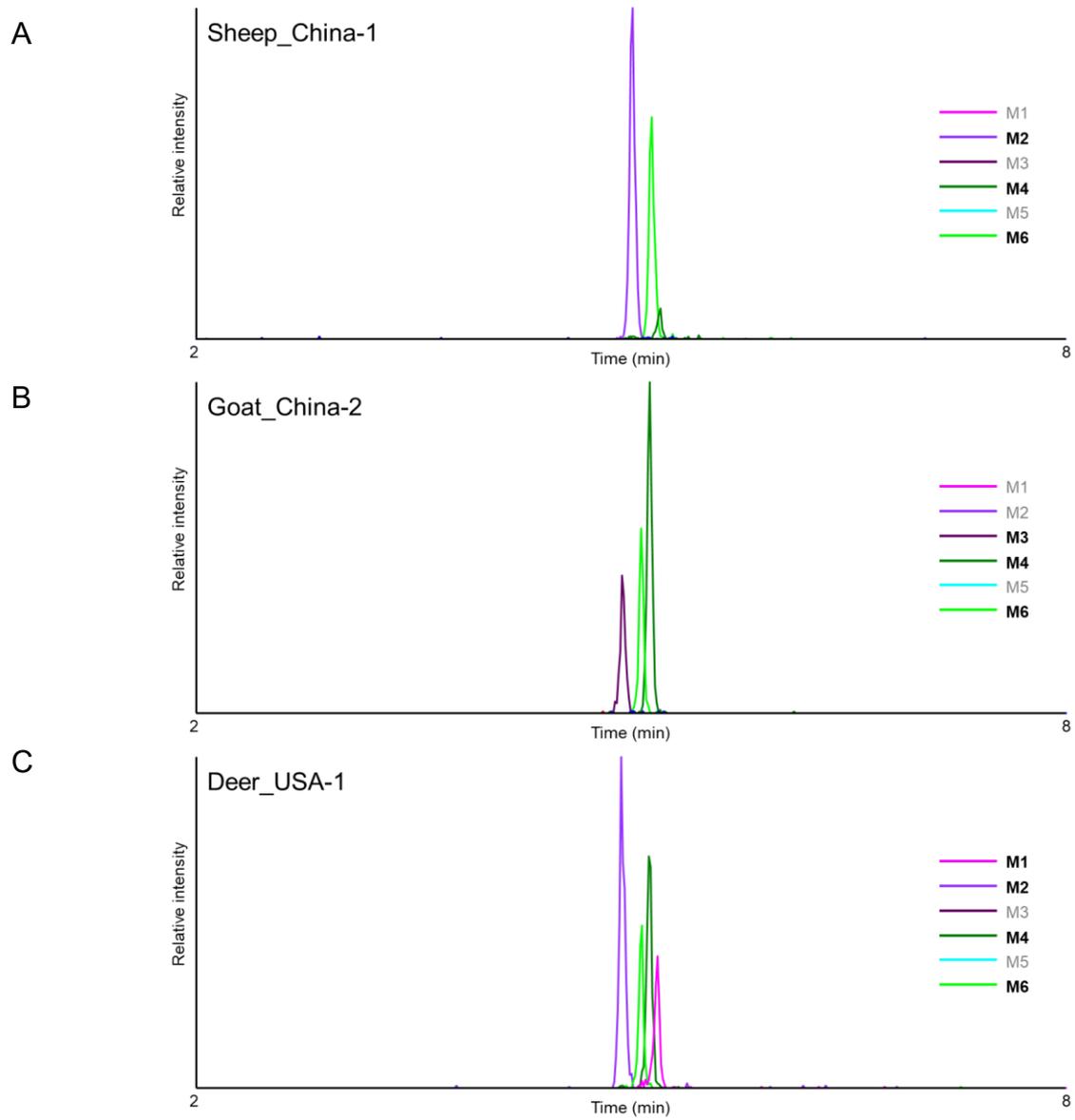


Figure 3-1. MRM chromatograms of marker peptides for unmatched leather samples. (A) sheep_China-1, (B) goat_China-2, and (C) deer_USA-1. Detected marker peptides are indicated in boldface.

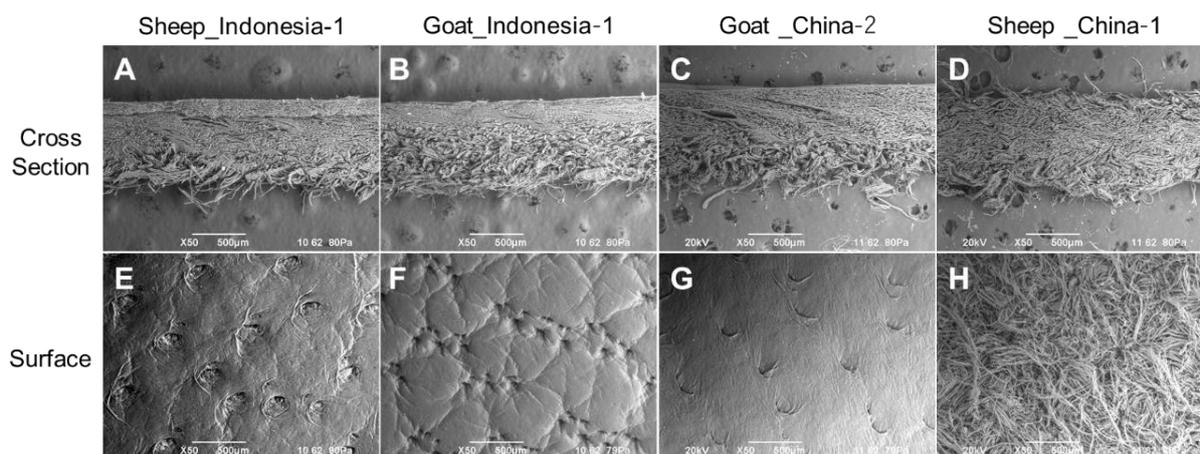


Figure 3-2. SEM images of cross-sections (A-D) and surfaces (E-H) for leather samples of goat and sheep.

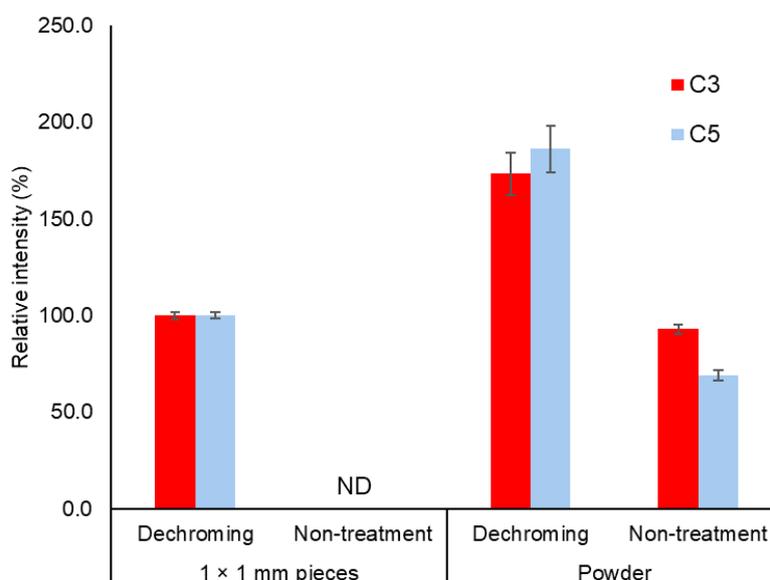


Figure 3-3. Effect of peptide generation from cut leather pieces and powdered leather with or without dechroming. The peak intensity of marker peptides C3 and C5 was compared by examining 1 × 1 mm piece samples and powdered samples taken from crocodile chrome leather. The samples were either treated with calcium hydroxide (dechroming) or not (non-treatment) before trypsin digestion. The data are expressed as relative intensity, with dechromed 1 × 1 mm pieces set as 100%, representing the mean ± SD of three separate experiments. ND, not detected.

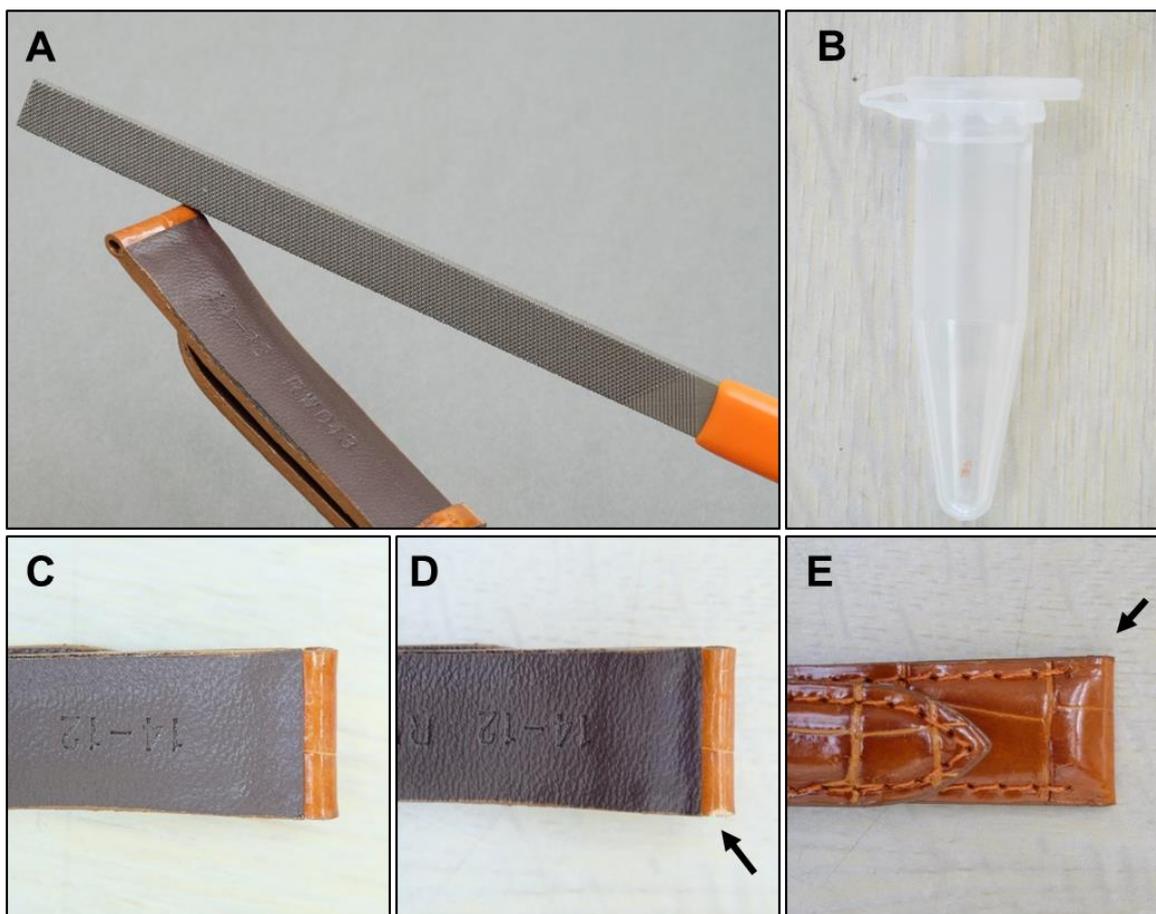


Figure 3-4. Collection of powdered leather sample from watch strap using a steel file. (A) edge of the underside of the leather was filed to collect powder, (B) powdered sample taken from the leather, (C) underside of the leather before filing, (D) underside of the leather after filing, and (E) topside of the leather after filing. The arrows indicate the sampling sites.

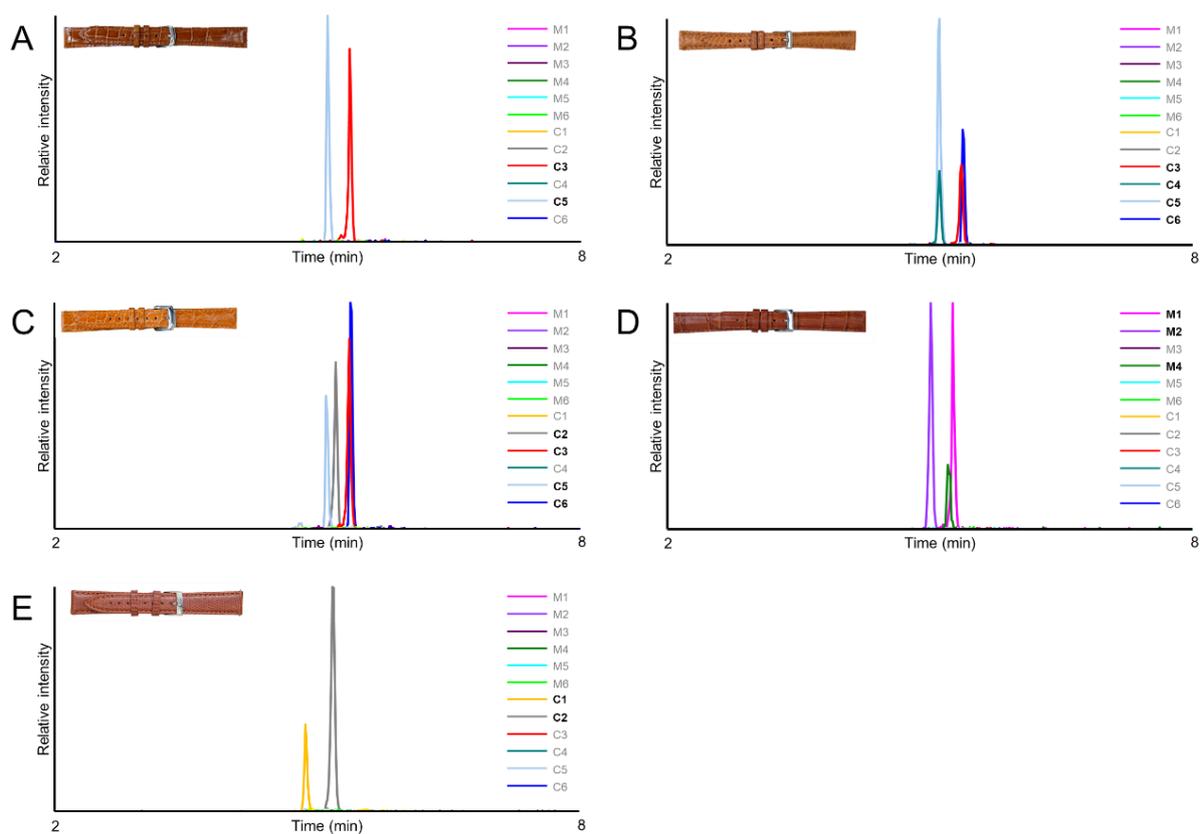


Figure 3-5. MRM chromatograms of marker peptides for commercial leather watch straps. (A) crocodile, (B) alligator, (C) caiman, and (D) crocodile-embossed calf leather watch straps. Detected marker peptides are indicated in boldface.

Table 3-1. Species identified for leathers from various areas.

Label	Sample	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Result
Bovine	Japan-1	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Japan-2	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Japan-3	+	+	—	+	—	—	Bovine
	China-1	+	+	—	+	—	—	Bovine
	China-2	+	+	—	+	—	—	Bovine
	China-3	+	+	—	+	—	—	Bovine
	India-1	+	+	—	+	—	—	Bovine
	India-2	+	+	—	+	—	—	Bovine
	India-3	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Pakistan-1	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Pakistan-2	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Pakistan-3	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Bangladesh-1	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Bangladesh-2	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Italy-1	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Italy-2	+	+	—	+	—	—	Bovine
	Italy-3	+	+	—	+	—	—	Bovine
	USA-1	+	+	—	+	—	—	Bovine
	USA-2	+	+	—	+	—	—	Bovine
	USA-3	+	+	—	+	—	—	Bovine
Horse	Japan-1	+	—	—	+	+	—	Horse
	Japan-2	+	—	—	+	+	—	Horse
	Mongol-1	+	—	—	+	+	—	Horse
	France-1	+	—	—	+	+	—	Horse
	Poland-1	+	—	—	+	+	—	Horse
	Poland-2	+	—	—	+	+	—	Horse
	Poland-3	+	—	—	+	+	—	Horse
Porcine	Japan-1	+	—	—	—	+	+	Porcine
	Japan-2	+	—	—	—	+	+	Porcine
	Japan-3	+	—	—	—	+	+	Porcine
	China-1	+	—	—	—	+	+	Porcine
	China-2	+	—	—	—	+	+	Porcine
	China-3	+	—	—	—	+	+	Porcine

Sheep	Japan-1	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Japan-2	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Japan-3	-	-	+	+	-	+	Sheep
	China-1	-	+	-	+	-	+	Goat
	China-2	-	-	+	+	-	+	Sheep
	China-3	-	-	+	+	-	+	Sheep
	India-1	-	-	+	+	-	+	Sheep
	India-2	-	-	+	+	-	+	Sheep
	India-3	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Pakistan-1	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Pakistan-2	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Pakistan-3	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Indonesia-1	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Indonesia-2	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Italy-1	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Italy-2	-	-	+	+	-	+	Sheep
	Italy-3	-	-	+	+	-	+	Sheep
Goat	China-1	-	+	+	+	-	+	Goat
	China-2	-	-	+	+	-	+	Sheep
	China-3	-	+	-	+	-	+	Goat
	India-1	-	+	-	+	-	+	Goat
	India-2	-	+	-	+	-	+	Goat
	India-3	-	+	-	+	-	+	Goat
	Pakistan-1	-	+	-	+	-	+	Goat
	Pakistan-2	-	+	-	+	-	+	Goat
	Pakistan-3	-	+	-	+	-	+	Goat
	Indonesia-1	-	+	-	+	-	+	Goat
	Indonesia-2	-	+	-	+	-	+	Goat
	Indonesia-3	-	+	-	+	-	+	Goat
	Italy-1	-	+	-	+	-	+	Goat
Deer	Japan-1	+	+	-	+	+	+	Deer
	Japan-2	+	+	-	+	+	+	Deer
	Japan-3	+	+	-	+	+	+	Deer
	Italy-1	+	+	-	+	-	+	Deer?
	Italy-2	+	+	-	+	-	+	Deer?
	Italy-3	+	+	-	+	-	+	Deer?
	USA-1	+	+	-	+	-	+	Deer?
	USA-2	+	+	-	+	-	+	Deer?
	USA-3	+	+	-	+	-	+	Deer?
	New Zealand-1	+	+	-	+	+	+	Deer
	New Zealand-2	+	+	-	+	+	+	Deer
	New Zealand-3	+	+	-	+	+	+	Deer

第4章 複数種混合試料へ適用可能な膠の由来動物種判定法

4.1 緒言

第3章までは、質量分析を用いた革の動物種判定法を開発し、様々な革試料へ適用することで、その有用性を実証した。本法はコラーゲンマーカールペプチドの検出パターンで動物種判定を行うことから、様々な動物種への対応と、革以外のコラーゲン材料への応用が考えられた。そこで本章では、革と同じコラーゲンを主成分とする膠へ本法を応用することにした。

様々な動物の皮や骨から煮出すことで抽出される膠は 4000 年以上前からエジプト人によって使用され、1700 年代からは工業的に生産されるようになった [16]。美術品や文化財作製のため、芸術家や工芸家は膠を壁画や絵画などの膠着剤、顔料の分散剤、カンヴァスの地塗りなど様々な目的に使用してきた。膠は由来動物種と調製方法によって様々な物理的、化学的な特性を示す [15]。そのため、作品の技法、材料の研究や保存修復、その時代背景の把握などのために、膠の検出に加え、その由来動物種を同定できることが必要とされる。作品中の膠の検出は、試料を加水分解した後 HPLC や GC-MS によってコラーゲン中に高含有する Gly や Hyp を評価することで可能であった [61、62]。しかしながら、これらの方法はアミノ酸配列の種特異性に欠けるため動物種の同定には不適である。また、ELISA 法で膠 (=コラーゲン) の検出は可能であるが [25]、動物種間でのコラーゲンのアミノ酸配列が似ているため、抗体の交差反応が常に問題であった。DNA に基づいた PCR 法も革や膠の由来動物種同定に検討されてきたが、製造工程などにおける DNA の分解や損傷が問題点として挙げられる [23]。序論や第1章でも既述したように、質量分析装置の機能の発達に伴い、最近ではコラーゲンのアミノ酸配列の種間差を検出することで、様々な種類のサンプルの由来動物種同定が可能になった。作品中の膠に対しては、Kuckova *et al* [63] はトリプシン消化物を MALDI-TOF-MS 検出し、マスフィンガープリンティングを行うことで、由来動物種の同定に成功した。この分析はシングル MS スペクトルで検出されたピークをもとに簡単に行うことができるが、特に他のタンパク質が混在した複雑な

サンプルでは明確な種決定は難しい。膠の由来動物種同定のために、LC-MS/MS スペクトルのデータベースサーチ検索によるプロテオミクスアプローチも報告されている [30、64-66] が、既存の方法ではコラーゲン配列情報が公共のデータベースから入手できない動物種の判定が難しい [30、67]。例えば、ウサギの I 型コラーゲンは $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖はともに部分配列のみの登録であり、シカの $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖は完全に未知である。Dallongeville *et al* [30] は I 型と III 型コラーゲン由来種特異的ペプチドを使い、ウシ、ウサギ、チョウザメを判定する方法を開発した。彼らは 18 世紀に建てられたフランスの St Maximin 教会から採取した金箔片からウシ膠を同定し、さらにウサギ由来と供給されている複数の膠試料がウシに由来することを発見した。しかしながら、ターゲットとなる動物種を拡大した場合、種特異的ペプチドによる同定は困難である。そして、上記の既存の方法は全て、複数の由来動物種を含む試料には適用できないことが課題として挙げられる。例えば、膠のサプライヤーには、膠の特性を変えるためにウサギにウシをブレンドして提供することが知られている [15]。さらに、製造工程中に他の膠が混入する可能性や、美術作品中に異なる由来動物種の膠がブレンドして使われる可能性もある。これらの理由から、複数種の膠を使用する場合でも、その由来動物種を明確に決定することは重要である。

そこで本章では、1 種だけではなく、2 種の動物種が混合した試料へも適用可能な膠の由来動物種判定法の開発と、さらにこの分析法により様々な市場膠製品と絵画資料（カミーユ・ピサロ作《収穫》（1882））に使用された膠の由来動物種を明らかにすることを目的とした。

4.2 材料および方法

4.2.1 標準品試料

ウシ、ウマ、ブタコラーゲンは以前の報告 [36] に準拠し、ペプシン消化と塩析によって、それぞれの動物の皮膚から精製した。ヒツジコラーゲンとウサギ皮膚由来コラーゲンは Sigma-Aldrich から購入した。シカ皮膚から調製されたシカ膠は天野山文化遺産研究所か

ら入手した。チョウザメ膠は株式会社フジキンに調製を委託し、入手した。ヤギのクロム鞣し革は、脱クロム処理（2章、2.2.2）の後、標準品として使用した。

4.2.2 膠試料

市場膠製品は複数の販売者から購入した。膠試料を蒸留水に入れ、60°Cで4時間溶解させた後、分析に使用するまで4°Cで保管した。

4.2.3 トリプシン消化法

コラーゲンと膠試料（タンパク量 50 μg ）を 60°Cで 30 分間加熱した後、2.5 μg のトリプシン（Sigma-Aldrich）を添加して 100 mM Tris-HCl/1 mM CaCl₂（pH 7.6）中で 16 時間消化反応を行った。脱クロム処理したクロム革は第 2,3 章と同じ方法でトリプシン消化した。トリプシン消化物にギ酸を加え酸性にし、0.45 μm フィルターでろ過した後、LC-MS/MS または MRM 分析に供した。

4.2.4 カミーユ・ピサロ作《収穫》の分析法

国立西洋美術館のコレクションの1つである絵画（カミーユ・ピサロ作《収穫》1882年、70.3×126 cm、テンペラ）のキャンバスの版画余白から2ヶ所（それぞれ約 1 mg）の試料を採取した。その試料には、キャンバスの地塗り層、目止め層、キャンバスの繊維が含まれていた。試料を 100 μL の 100 mM Tris-HCl/1 mM CaCl₂（pH 7.6）中にて 60°Cで 30 分間加熱した後、上記のように 2.5 μg のトリプシンで消化した。反応溶液をギ酸で酸性にし、遠心分離後の上清を MRM 分析に供した。

4.2.5 LC-MS/MS を使ったペプチドの同定法

コラーゲンマーカーペプチドの同定は Agilent 1200 Series HPLC システム（Agilent Technologies）と三連四重極型質量分析装置 3200QTRAP（AB Sciex）連結させた LC-MS/MS

を使い、ショットガンプロテオミクス解析により行った。Ascentis Express C18 HPLC カラム（粒子径 2.7 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm : Supelco）を使い、流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件で分離した。0 分～5 分 : 98%移動相 A（0.1%ギ酸）、5 分～20 分 : 2-50%移動相 B（100%アセトニトリル）、20 分～25 分 : 90%移動相 B、25 分～30 分 : 98%移動相 A。分離後、イオン化したペプチドは、各タイムポイントの中で最も高強度なプレカーサーイオンから生成する 2 つのフラグメントイオンを選択する IDA モード（Analyst ソフトウェア 1.6.2）で検出した。MS スキャンは 400~1300 の m/z 値の範囲で MS/MS スキャンは 100~1700 m/z 値の範囲で行った。衝突エネルギー値は Analyst ソフトウェアに組み込まれているローリング衝突エネルギー設定機能を用いてプレカーサーイオンの質量と電荷から自動的に決定した。ペプチド同定は、Protein Pilot ソフトウェア（AB Sciex）を使って行った [50]。得られた MS/MS スペクトルを公共で入手可能なデータベース（UniProtKB）と Buckley *et al* [27] の報告をもとに作成した当研究室オリジナルの様々な動物種に対する I 型コラーゲン配列データベースに対して検索した。

4.2.6 MRM分析法

I 型コラーゲン由来マーカーペプチドの分析は Agilent 1200 Series HPLC システムと三連四重極型質量分析装置 3200QTRAP 連結させた LC-MS の MRM モードで行った。トリプシン消化物を Ascentis Express C18 HPLC カラム（粒子径 5.0 μm 、長さ 150 mm、直径 2.1 mm : Supelco）を使い、流速 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、以下のグラジエント条件で分離した。0 分～2 分 : 98%移動相 A（0.1%ギ酸）、2 分～6 分 : 2-60%移動相 B（100%アセトニトリル）、6 分～8 分 : 90%移動相 B、8 分～10 分 : 98%移動相 A。マーカーペプチドに対する MRM チャンネルは Table 4-2 に示した。マーカーペプチド検出の閾値は強度 100、S/N 比 5 に設定した。

4.3 結果および考察

4.3.1 コラーゲンマーカーペプチドの選択

膠の由来動物種同定のための LC-MS 法を構築するため、まずは、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ウサギのコラーゲンと、シカとチョウザメの膠、ヤギ革の標準品を使ってマーカーペプチドを選択した。標準品試料をトリプシン消化し、生成したペプチドを LC-MS/MS 分析に供し、ショットガンプロテオミクス解析で同定した。様々な動物種由来の多くの I 型コラーゲンペプチドが、I 型コラーゲン配列データベースに対して MS/MS スペクトルを照合することで、それぞれの標準品試料から同定された（データには示さず）。例えば、シカの I 型コラーゲン配列は公共のデータベースでは入手できないが、シカ膠の分析では、ウシ由来の 55 個のペプチドとヒツジ由来の 37 個のペプチドを含む様々な動物種から I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖について合計 396 個のペプチドが同定された（データには示さず）。これは、哺乳類間コラーゲンの高い配列類似性によるものである。また、チョウザメ膠に対して同定されたペプチドのほとんどは魚種に由来するものであった（データには示さず）。

同定されたペプチドリストの中から、コラーゲン Gly-Xaa-Yaa 配列の Y 位置のすべての Pro 残基が 4-Hyp にヒドロキシル化されていないペプチドと、Arg または Lys-Hyp 結合を除いて、トリプシンの切断ミスが観察されたペプチドを除外した。次いで、残りのマーカーペプチド候補について、MRM チャンネルを設定し、各標準品試料についてペプチド検出の有無を調査した。これらの結果から、第 2 章と同じように、各動物種間でマーカーペプチドの検出の有無のパターンに少なくとも 2 つの違いがあるように、コラーゲンマーカーペプチドを設定した。さらに、2 つの異なる動物種由来の膠が混在する場合でも判定が可能となるように、マーカーペプチドの検出パターンに少なくとも 1 つの違いがあるように設定した。最終的に、これらの条件を満たす I 型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖から 7 個 (P1~P7) を $\alpha 2$ 鎖から 5 個 (P8~P12) のマーカーペプチドを選択した (Table 4-1)。ペプチドの存在を確実に判断するために、それぞれのマーカーペプチドについて 2 つの MRM チャンネルを設定した (Table 4-2)。MRM クロマトグラムの検出パターンから、Figure 4-1 に示すように、8 種類の動物種を明確に識別することが可能になった (各マーカーペプチドについては、強度が高い方のクロマトグラムを表す)。さらに 12 個のマーカーペプチドを使用することで、

1つのサンプルに2つの異なる種が混在する場合でも動物種の同定が可能になった (Table 4-3)。例えば、マーカーペプチド P1、P4、P11 はウシに検出され、P1、P4、P9 はウサギに検出される。そのため、P1、P4、P9、P11 が検出される場合は、ウシとウサギが混在する膠であることを意味する。

4.3.2 市場膠製品の由来動物種の同定

次に、構築した方法を用いて、市場膠製品の由来動物種を調査した (Table 4-4)。22 個の膠試料のうち、由来動物種が表記されていない膠を含む 18 個の試料の由来動物種を明確に決定することができた。さらに、3 個の試料 (C、K、S) で 2 つの異なる動物種が混在する膠であることが確認された。ヒツジとヤギが同定された試料 S においては、同一の配列位置 (I 型コラーゲン α 1 鎖の 733-756 と 741-756) を共有する 2 つのマーカーペプチド P4 と P5 が検出され、これは 1 つの製品中に異なる 2 種が混在することを示す。試料 B、F、L、P は、マーカーペプチドの検出パターンが 1 種か 2 種の動物種を含む膠に対して構築した方法のいずれにも一致しなかったため、動物種を決定できなかった。そのため、これらの膠試料は 3 種以上の動物種を含むか、対象外の動物種に由来すると考えられた。ウシ (A、D、E、G、H) またはチョウザメ (Q と R) と同定された 7 個の試料は、表記の動物種と一致した。しかしながら、いくつかの市販の膠は、表記の動物種とは異なるマーカーペプチドの検出パターンを示した。例えば、試料 I の表記の動物種はシカであったが、P1、P4、P11 の検出パターンに基づいて、ウシと同定された。驚くべきことに、ウサギと表記された膠製品はほとんど全てが、完全に異なる動物種に由来することが確認され (試料 J ではブタ、試料 M、N、O ではウシ)、さらに、試料 K ではウサギ以外の動物種としてウシも含まれることが示された。また、今回分析した市場膠製品の中には、純粋なウサギ膠は確認されなかった。この結果は、ウサギとして提供されている現在の皮膚由来膠のいくつかは実際にはウシ膠であるという以前の報告と一致する [30]。

次に、この分析結果から、ウシ由来とウサギ由来の両方が含有することが明らかになっ

た膠試料について、由来動物種の相対存在量を調べた（試料 C と K）（Table 4-5）。両方の動物種に対して検出されないマーカーペプチド（ウシに対して P11 とウサギに対して P9）の MRM クロマトグラムのピーク面積を使用し、それぞれの動物種量比の定量をした。まず、SI (stable isotope) -collagen と名付けられた以前に開発された内部標準 [34] を使用して、標準品のウシとウサギコラーゲンの I 型コラーゲン濃度を定量した後、ウシについては P11、ウサギについては P9 の特定のマーカーペプチドを用いて、外部検量線によって動物種の存在濃度を算出した後、ウシとウサギの量比を評価した。その結果、試料 C 中に表記されていない動物種の割合は低く、ウサギ 9.9%含有と算出された（Table 4-5）。このことから、膠製造過程などによって、ウシ膠にウサギ膠が偶発的に混入したことが示唆された。一方、ウサギと表記された試料 K（ウシ 55.0%、ウサギ 45.0%）は、異なる動物種の存在比が約半分であることから、ウシ膠が意図的にウサギ膠に混入されたことが示唆された。

4.3.3 カミーユ・ピサロ作《収穫》に使用された膠の由来動物種の同定

本法を用いて、1882 年にカミーユ・ピサロによって描かれた《収穫》の地塗り層と目止め層に使用された膠を調査した（Figure 4-2 A）。カンヴァスの版画余白の別々の場所（#1 と #2）（Figure 4-2 B）から約 1 mg の試料を採取し、直接トリプシン消化した後、MRM 分析に供した。その結果、Figure 4-3 に示すように、コラーゲンマーカーペプチドは#1 と#2 のどちらも明確に検出された。使用された膠は、マーカーペプチドの検出パターン（P1、P2、P4、P5、P11、P12）に基づいて、ウシとヒツジの 2 種に由来することが判明した。次に、ウシについては P11、ヒツジについては P5 の特定のマーカーペプチドを用いて、外部検量線によって動物種の存在濃度を算出した後、ウシとヒツジの量比を評価した。その結果、2 つの異なる場所から採取した試料はどちらも同様の結果であり、ウシ膠が約 65%でヒツジ膠が約 35%であった（Table 4-6）。この試料の地塗り層は以前の電子顕微鏡による分析で、2 層構造であることが判明していた [68]。そのため、今回の 2 種の動物種が検出されたことから、層ごとに異なる膠を使用したことや、カンヴァスの目止めと地塗り層の膠が異な

っていることが1つの可能性として考えられた。一方で、ウシ膠とヒツジ膠が予め混ざっている製品が使われていたという可能性も挙げられる。例えば、羊皮紙から製造された膠(=羊皮紙膠)は、古くから、綺麗でかつ最良であると言われており、原料としてヒツジやヤギ、ウシなどが使用される[69, 70]。この場合、意図的に混ぜなくても、ウシとヒツジが混ざる可能性がある。そのため、2種の動物種が使い分けされていたのではなく、カンヴァスの目止めや地塗り層の膠にはヒツジ皮紙膠だけを使用していることも別の可能性として考えられた。

コラーゲン分子のペプチド結合の切断は、動物組織から膠を熱抽出するプロセスの間にかかる可能性が考えられる[15]。さらに、作品中に存在する膠は、保存中に、ペプチド結合の切断やアスパラギンやグルタミン残基の脱アミド化など様々な化学反応を起こす可能性がある[71, 72]。これらの変化により部分的に修飾されたマーカーペプチドは、質量変化が起こるため、MRM分析によって検出することはできなくなる。しかしながら、100年以上前に描かれた《収穫》から採取した試料は少量(カンヴァスの繊維を含む約1mg)にも関わらず、コラーゲン由来マーカーペプチドの検出が確認され、膠の由来動物種同定に成功した。これは、経年変化に伴うタンパク質損傷が起きていたとしても、部分的に残った無傷なペプチドが膠の由来動物種同定のために十分量であったことを示す。膠の部分的な劣化が、由来動物種の相対存在量の正確な定量値に影響を与える可能性を排除することはできないが、今回の結果は、異なる2ヶ所からの定量値がほぼ同じであったため、信頼性は高いと考えられる(Table 4-6)。

4.4 まとめ

本章では、12個のI型コラーゲン由来マーカーペプチドの検出パターンで、膠の由来動物種を同定するための新規LC-MS法を構築した。このデータベースに依存しない方法は、I型コラーゲン配列が明らかになっているかどうかに関わらず、8種の動物の識別を可能にした。さらに、この方法は1種の動物種由来の試料だけではなく、2種の動物種が混在す

る試料へも適用可能である。また、市場の膠製品中から未申告の動物種および異なる動物種由来の混合物または混入品の検出により、膠の動物種認証への適用を実証した。さらに、《収穫》の地塗り層と目止め層には、ウシとヒツジの両方の動物種由来の膠が使用されていることを明らかにした。これまで、多くの研究で芸術作品に存在する膠を調査し、MS を使用してそれらの由来動物種を同定した [63-67]。しかしながら、ほとんど全ての調査が、各試料につき 1 種のみ動物種の同定であった。この新しい方法は、芸術作品に使用されている膠に関する隠された事実を明らかにすることができる。本分析では、4 個の膠製品の由来動物種を同定することができなかったが、これらは 3 種以上の動物または他の予想外の動物種に由来することが推測された。この種を特定することは、今後の将来的な研究課題であると考えられる。そのためには、目的の動物種に対応したマーカーペプチドを再選択することで、そのような複雑な膠試料の種同定に成功できるだろうと考えられる。

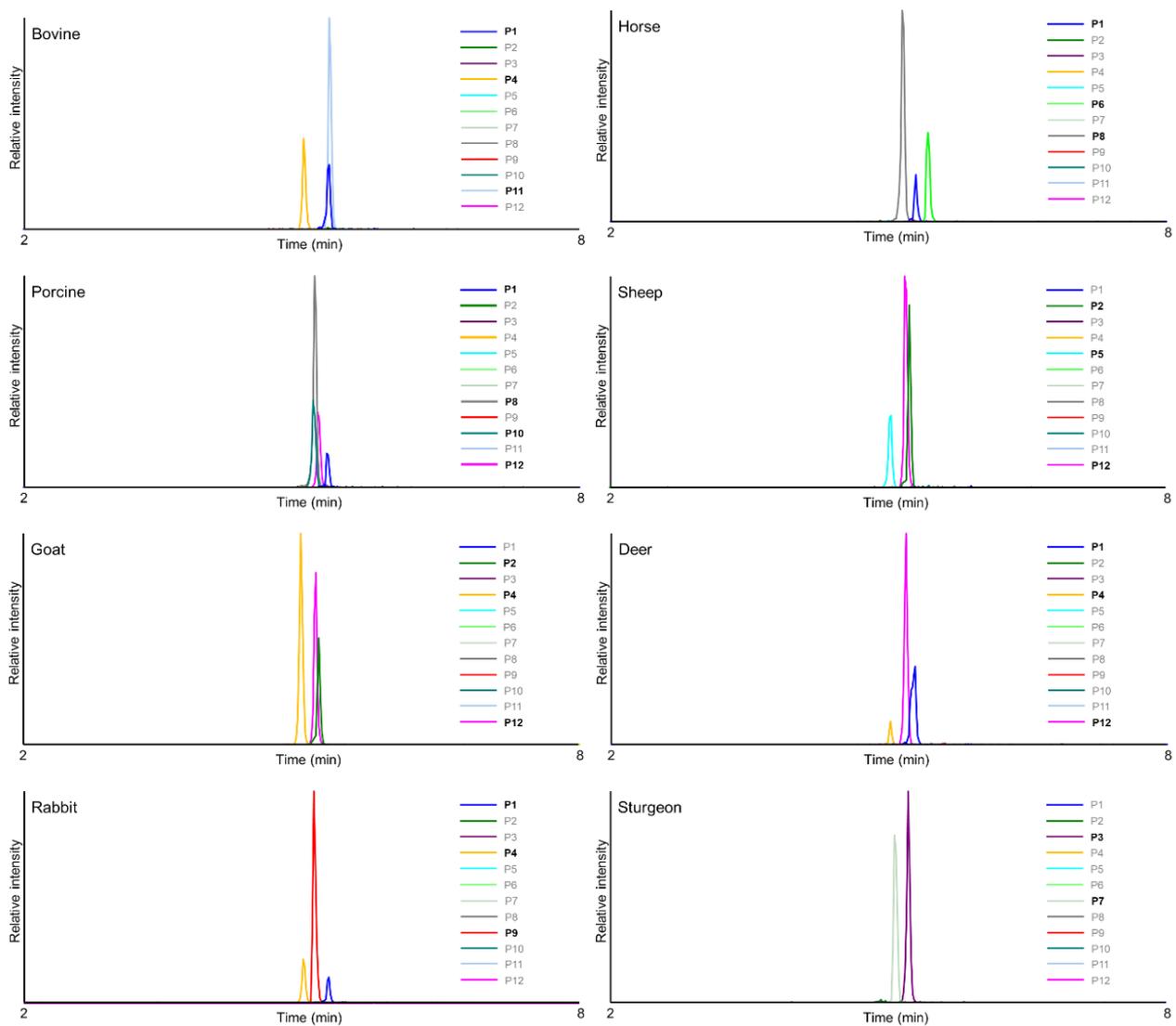


Figure 4-1. MRM chromatograms of marker peptides for eight animal species (bovine, horse, porcine, sheep, goat, deer, rabbit, and sturgeon). Detected marker peptides are indicated in boldface.

A



B



Figure 4-2. *The Harvest*. A: Small two samples from the tacking margin of the canvas (approximately 1 mg, respectively) were analyzed for species identification of glue. The sampling locations are indicated by dotted boxes (#1 and #2). B: The tacking margin of the canvas is enclosed by white dotted lines.

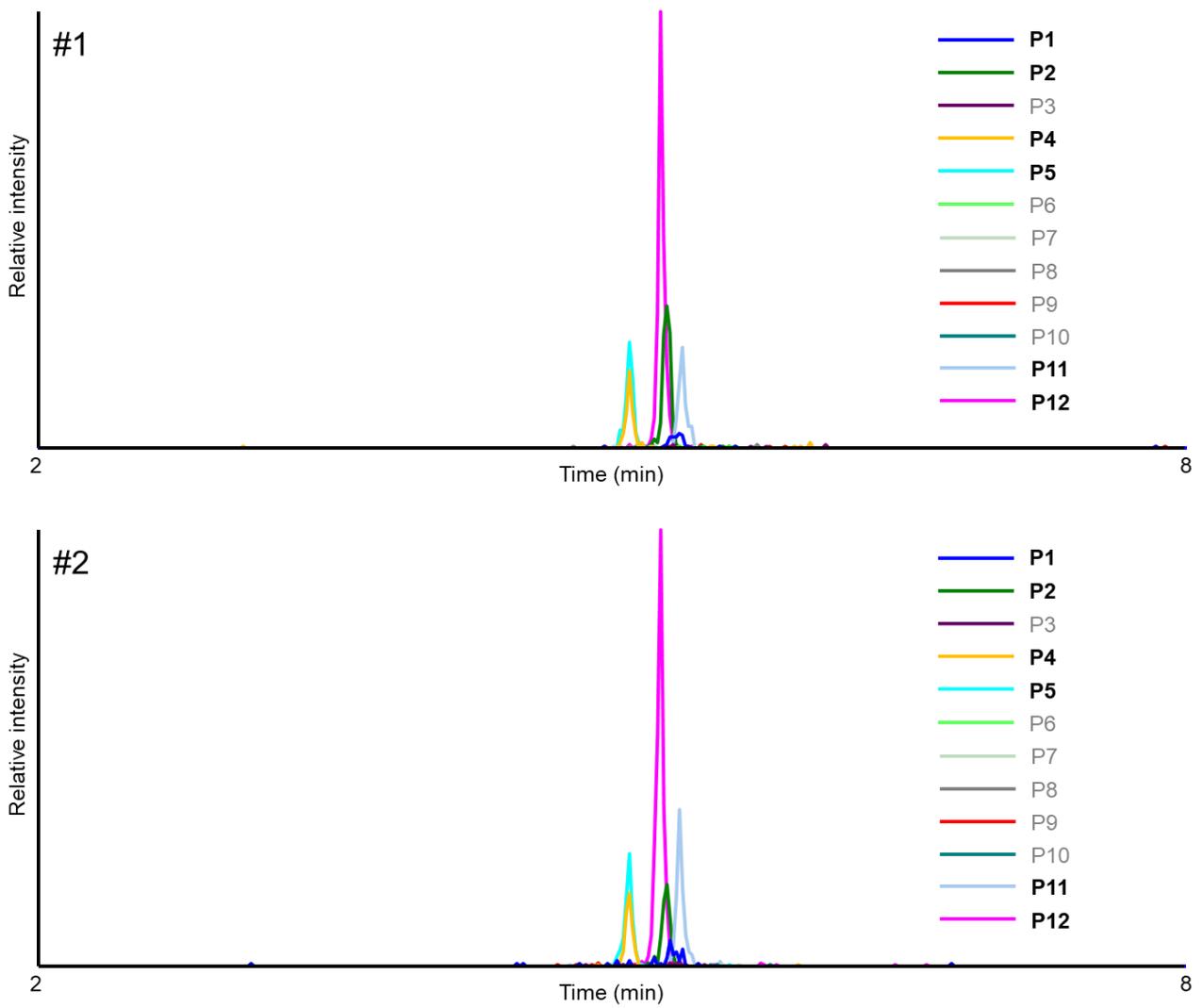


Figure 4-3. MRM chromatograms of marker peptides detected from *The Harvest*. Detected marker peptides are indicated in boldface.

Table 4-1. Marker peptides list for species identification of glue

Chain	Position ^a	Marker peptide	sequence ^b	Bovine ^c	Horse ^c	Porcine ^c	Sheep ^c	Goat ^c	Deer ^c	Rabbit ^c	Sturgeon ^c
α1 (I)	316-327	P1	GFOGADGVAGPK	+	+	+	-	-	+	+	-
	316-327	P2	GFOGSDGVAGPK	-	-	-	+	+	-	-	-
	688-704	P3	GAAGPOGATGFOGAAGR	-	-	-	-	-	-	-	+
	733-756	P4	GETPAGROGEVGPPOGPAGEK	+	-	-	-	+	+	+	-
	741-756	P5	AGEVGPPOGPOGPAGEK	-	-	-	+	-	-	-	-
	889-906	P6	GEAGPAGPAGPIGPVGAR	-	+	-	-	-	-	-	-
	889-906	P7	GETPAGPAGPAGPAGAR	-	-	-	-	-	-	-	+
	238-252	P8	GIOGPAGAAGATGAR	-	+	+	-	-	-	-	-
	253-264	P9	GLVGEOPAGTK	-	-	-	-	-	-	-	+
	361-374	P10	GFOGSOGNVGPAGK	-	-	+	-	-	-	-	-
	978-990	P11	IGQOGAVGPAGIR	+	-	-	-	-	-	-	-
	978-990	P12	TGQOGAVGPAGIR	-	-	+	+	+	+	+	-

a: The numbering of residues begins with the triple-helical portion of the chains. b: O indicates 4-Hyp. c : The presence and absence of marker peptides are denoted by + and - , respectively.

Table 4-2. MRM channels of marker peptide.

Marker peptide	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	z	Collision energy	Time (min)
P1	544.76	643.34 714.38	2	30.0	5.3
P2	552.76	900.45 787.40	2	30.3	5.2
P3	722.35	748.37 1090.53	2	37.8	5.2
P4	739.35	936.47 964.98	3	38.5	5.0
P5	724.85	1035.51 1092.50	2	37.9	5.0
P6	765.90	823.48 894.52	2	39.7	5.4
P7	745.86	753.40 921.49	2	38.8	5.1
P8	620.32	731.38 674.36	2	33.3	5.2
P9	549.79	643.34 829.41	2	30.2	5.1
P10	637.30	812.43 699.38	2	34.0	5.1
P11	604.83	669.40 797.46	2	32.6	5.3
P12	598.82	669.40 910.51	2	32.3	5.2

Table 4-3. Detection patterns of marker peptides for glue samples containing two different animal origins.

		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Bovine &	Horse	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
	Porcine	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
	Sheep	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	Goat	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	Deer	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	Rabbit	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
	Sturgeon	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Horse &	Porcine	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
	Sheep	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
	Goat	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
	Deer	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
	Rabbit	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	Sturgeon	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Porcine &	Sheep	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
	Goat	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
	Deer	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
	Rabbit	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
	Sturgeon	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
Sheep &	Goat	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	Deer	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	Rabbit	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
	Sturgeon	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Goat &	Deer	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	Rabbit	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
	Sturgeon	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Deer &	Rabbit	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
	Sturgeon	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Rabbit &	Sturgeon	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	

Table 4-4. Species identified for commercial glue products.

Sample	Label	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Result
A	Bovine	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
B	Bovine	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	ND
C	Bovine	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Bovine, rabbit
D	Bovine	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
E	Bovine	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
F	Bovine	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	ND
G	Bovine	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
H	Bovine	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
I	Deer	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
J	Rabbit	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	Porcine
K	Rabbit	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Bovine, rabbit
L	Rabbit	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
M	Rabbit	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
N	Rabbit	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
O	Rabbit	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
P	Rabbit	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	ND
Q	Sturgeon	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Sturgeon
R	Sturgeon	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Sturgeon
S	None	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	Sheep, goat
T	None	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	Porcine
U	None	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine
V	None	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	Bovine

ND : Not determined

Table 4-5. Relative abundance of the animal origin in commercial glues.

Sample	Label	Identified species	Content (%)
C	Bovine	Bovine	90.1 ± 1.4
		Rabbit	9.9 ± 1.4
K	Rabbit	Bovine	55.0 ± 2.5
		Rabbit	45.0 ± 2.5

Table 4-6. Identified species and relative abundance of the animal origin from *The Harvest*.

Location	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Identified species	Content (%)
#1	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	Bovine	65.3
													Sheep	34.7
#2	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	Bovine	62.4
													Sheep	37.6

総 括

本研究では、靴や鞆、手袋など様々な製品に使用される革と、絵画や壁画などの膠着剤、顔料の分散剤などに使用される膠の由来動物種を同定する新規分析法の開発を目的とした。革には様々な動物種が使用されているが、その表記は故意的または意図的な理由により、誤表記が起きてしまうことが問題点であった。革の動物種判定は主に電子顕微鏡による形態観察によって行われているが、正しく動物種を判定するためには分析者の熟練した経験が必要とされ、さらに形態特徴が類似した動物種間では判定が困難であった。また、熱変性コラーゲン (=ゼラチン) を主成分とする膠は、文化財製作当時の動物利用の実態や、使用した材料、芸術家の技法などの情報を得るためには、膠の存在を明らかにすることに加え、その由来動物種を同定することが望まれている。ELISA 法で膠の検出は可能であるが、動物種間での抗体の交差反応の影響で動物種判定には適用されていなかった。ミトコンドリア DNA に基づいた PCR 法も革や膠の由来動物種同定に検討され、動物種同定に成功した報告もあったが [19、20、40、41]、製造工程などにおける DNA の分解や損傷が起こるため、様々な分析条件を最適化する必要性があり、実用化には至っていない。最近ではターゲットとなるコラーゲンをトリプシンなどの酵素で切断し、生成したペプチドを質量分析装置で検出することで、コラーゲンアミノ酸配列の種間差に基づいて、骨や皮衣服、ゼラチンや膠などの由来動物種同定が可能となった。しかしながら、コラーゲン配列が未知な動物種や、複数種混合膠試料への適用の難しさが課題であった。そこで本研究では、複数のコラーゲンマーカーペプチドを LC-MS で分析し、その検出パターンで動物種判定を行うことで、様々な試料へ適用可能な新規分析法の開発を行った。

第 1 章では、質量分析によるペプチド検出法は革の動物種同定のための有力なツールであることを、DNA 検出による PCR 法、抗体検出による western blotting 法と免疫蛍光染色法で比較して示した。質量分析法は、LC-MS を用いたコラーゲンマーカーペプチド検出による方法を、PCR 法は愛知県産業技術研究所の食品工業技術センターが発表している「動

物毛の DNA 検査プロトコル」で、western blotting 法と免疫蛍光染色法は当研究室で一般的に用いるプロトコルで実施した。ウシとブタのそれぞれ皮膚、クロム革、タンニン革の合計 6 試料をそれぞれ上記の方法で分析し、動物種判定の可否だけではなく、分析に費やす時間や、操作の煩雑性と安全性などを評価した。その結果、質量分析法では、全ての試料の動物種同定に成功したが、対照とした方法は、革からコラーゲンや DNA の検出は認められず、また、使用した抗 I 型コラーゲン抗体や DNA 検出プライマーの種間交差反応も確認されたことから、動物種判定は不可能であるという結論に至った。さらに、革での最適な分析条件を見出されたとしても、操作の安全性や簡便性、迅速性に関する点においても質量分析によるペプチド検出法には大きな優位性があることが示された。

第 2 章では、迅速かつ簡便に行える革の動物種判定方法を報告した。これまでの質量分析装置による動物種同定は、データベース検索による方法が良く用いられていた。しかしながら、照合したデータが完全に一致しない場合は、最も可能性が高い動物種が挙げられるため、正しい結果が得られない可能性があり、特にコラーゲンのアミノ酸配列の種間差がほとんどない動物種間（特にヒツジとヤギ）の判定は曖昧で厳密な種同定とはならなかった。また、コラーゲン配列情報が不完全であるシカ、ワニ種など適用できない動物種があることも課題であった。特に 3 つのワニ種（クロコダイル、アリゲーター、カイマン）の明確な判定は質量分析を含むいかなる方法でも達成されていなかった。さらに、革試料に対して質量分析法が適用された報告もこれまでなかった。本章では、0.25%水酸化カルシウムによる脱クロム処理時間を 2 時間、250 ug/mL のトリプシンで 4 時間消化反応を行うことで、革から効率的にコラーゲンペプチドを生成する最適な条件を見出した。続いて、ショットガンプロテオミクス解析で同定したペプチドの中から、12 個の I 型コラーゲン由来マーカーペプチドを選択することで、その検出パターンで 10 種の動物種（ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、シカ、クロコダイル、アリゲーター、カイマン、トカゲ）を判定する方法を構築した。最後に、マーカーペプチドの配列情報の確かさを標準品の合成ペプチドを使い、MS/MS スペクトルと MRM モードのクロマトグラムを比較して示した。本法はコ

ラーゲン配列が未知な動物種にも適用可能であり、さらに簡便な操作でかつ 1 日で試験完了するため、ルーチン分析にも有用であることが示された。

第 3 章では、第 2 章で開発した方法を市場革や製品革へ適用した。第 2 章で開発した方法は、数枚の標準品革をもとに構築されたため、①革に使用される動物種は産地によってその種類も多様であるため、判定可能な動物種全てに対して、本分析法が適用できるかどうか、②革由来成分でマーカールペプチドの検出阻害がおきないかどうか、という 2 つの懸念点を確認する必要があった。そのため、様々な産地由来の 75 個の市場革を分析したところ、シカ革を除いた全ての革製品の動物種同定に成功した。シカ革は産地によってマーカールペプチドの検出パターンが異なることが判明した。また、それぞれ 1 個のヒツジ革とヤギ革が表記と異なることを見出した。このことから、本法は様々な革に対して動物種判定が可能な優れた技術であり、革製品の動物種認証に有用であることが実証された。

しかしながら、質量分析による検出は少量試料で可能であるとはいえ、本法は少なからずとも試料切除の必要があったため、破壊検査が望まれない実製品への適用が更なる課題として挙げられた。そこで、鉄ヤスリによる粉末化处理（試料量約 100 μg ）を組み合わせることで革製品の準非破壊分析へと応用した。この処理法で、脱クロム処理なしでも高感度にマーカールペプチドを検出できることを見出し、市販のワニ革時計ベルトの裏面の僅かな損傷だけで動物種を同定することに成功した。この方法を用いることで、衣服、ハンドバッグ、財布などの他の皮革製品も目立たない部位からサンプリングすることで同様の準非破壊分析が可能となることから、今後の活用が期待される。

第 4 章では、本アプローチをもとに複数種混合試料へ適用可能な膠の由来動物種判定法を開発し、市場膠と絵画試料に適用した。これまで、質量分析検出による膠の由来動物種同定はいくつか報告されてきたが、膠は複数の動物種がブレンドして使用されることや、製造工程中に他の膠が混入する可能性があるため、既存の方法では厳密に動物種を判定できないことが課題であった。そこで、対象とする動物種を膠に使用される 8 種（ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、シカ、ウサギ、チョウザメ）とし、さらにこれらの動物種が 2 種

混在する場合でも判定が可能となるように新たなマーカールペプチド 12 種を選択した。市場膠製品を分析すると、全ての膠の由来動物種を同定することができ、表記と異なる動物種や複数の動物種を原材料とする製品も見つかった。また、カミーユ・ピサロ作《収穫》(1882)の地塗りには、ウシとヒツジの 2 種に由来する膠が使用されていることを明らかにした。本法は、微量試料の測定も可能であり、今後、様々な美術作品や歴史的資料の測定へ応用されることが期待される。

以上、本研究では質量分析を用いた革と膠の由来動物種判定法を開発し、市場革や製品革、市場膠、絵画試料に適用することでその有用性を実証した。予め選択したコラーゲンマーカールペプチドの検出パターンで判定を行うことで、これまで不可能であったコラーゲン配列未知種の試料や、複数種が混合した試料の分析が可能になった。さらに、高感度な LC-MS 分析の使用が、膠の微量試料分析や、革の準非破壊分析を可能にした。本法が、これまで動物種同定が難しかった試料へ適用されることで、市場製品の認証検査の拡大や、考古学資料分析による知見獲得など様々な用途に繋がることを期待される。

参考文献

1. Covington A D. Tanning chemistry: the science of leather; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K, 2009.
2. 竹之内一昭, 原始時代と古代の皮革, 皮革科学, 2009, 55, 1-11.
3. 財務省統計データ (2014年～2017年データ集計)
4. 新版皮革科学 (Leather Science), 日本皮革技術協会, 1992.
5. Caldwell, J. World Trade in Crocodilian Skins 2013–2015, UNEP-WCMC: Cambridge, 2017.
6. Thorbjarnarson, J. Conserv. Biol. 1999, 13, 465–470.
7. CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Washington, DC, 1973.
8. エキゾチックスキンの基礎知識, 全日本爬虫類皮革産業協同組合, 日本皮革産業連合会, 2000.
9. Mirghani M E S, Salleh H M, Man Y B C, Jaswir, I. Rapid authentication of leather and leather products. Adv. Nat. Appl. Sci. 2012, 6, 651–659.
10. Dohshi, S. Quantitative estimation of hair follicle patterns for leather surface using k-function (L-function): Method (1): Influence of individual and location differences for goatskins. J. Soc. Leather Technol. Chem. 2013, 97, 145–148.
11. Dohshi, S. Quantitative estimation of hair follicle patterns for leather surface using k-function (L-function): Method (2): Influence of individual and location differences for sheepskins. J. Soc. Leather Technol. Chem. 2013, 97, 185–188.
12. 改訂版 にかわとゼラチン: 産業史と科学技術, 安孫子義弘編集代表, 日本にかわ・ゼラチン工業組合, 1997.
13. 膠の基礎知識: 膠とはなにか/膠の原料と製造方法/膠の現在とこれから, 膠文化研究会, 2015.

14. 森田恒之, 膠の文化, 部落解放研究, 2003, 154.
15. Schellmann NC. Animal glues: a review of their key properties relevant to conservation. *Stud Conserv.* 2007, 8, 55–66.
16. Ockerman HW, Hansen CL. *Animal by-product processing & utilization*. Lancaster: Technomic publishing. 2000.
17. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura, Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* 1999, 51, 143–148.
18. Tanabe S, Hase M, Yano T, Sato M, Fujimura T, Akiyama H. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007, 71, 3131–3135.
19. Merheb M, Vaiedelich S, Maniguet T, Hänni C. Mitochondrial DNA, restoring Beethovens music. *Mitochondrial DNA.* 2016, 27, 355–359.
20. Schlumbaum, A, Campos P F, Volken S, Volken M, Hafner A, Schibler J. Ancient DNA, a Neolithic legging from the Swiss Alps and the early history of goat. *J. Archaeol. Sci.* 2010, 37, 1247–1251.
21. Vuissoz A, Worobey M, Odegaard N, Bunce M, Machado C A, Lynnerup N, Peacock E E, Gilbert M T P. The survival of PCR-amplifiable DNA in cow leather. *J. Archaeol. Sci.* 2007, 34, 823–829.
22. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993, 362, 709–715.
23. Albertini E, Raggi L, Vagnini M, Sassolini A, Achilli A, Marconi G, Cartechini L, Veronesi F, Falcinelli M, Brunetti BG, Miliani C. Tracing the biological origin of animal glues used in paintings through mitochondrial DNA analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2011, 399, 2987–2995.
24. Gay S, Miller EJ. What is collagen, what is not. *Ultrastruct Pathol.* 1983, 4, 365–77.
25. Cartechini L, Vagnini M, Palmieri M, Pitzurra L, Mello T, Mazurek J, et al. Immunodetection of proteins in ancient paint media. *Acc Chem. Res.* 2010, 43, 867–876.

26. Buckley M, Collins M, Thomas-Oates J, Wilson JC. Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009, 23, 843–854.
27. Buckley M, Larkin N, Collins M. Mammoth and Mastodon collagen sequences; survival and utility. *Geochim Cosmochim Acta.* 2011, 75, 2007–2016.
28. Brandt L O, Schmidt A L, Mannering U, Sarret M, Kelstrup C D, Olsen J V, Cappellini, E. Species identification of archaeological skin objects from Danish bogs: comparison between mass spectrometry-based peptide sequencing and microscopy-based methods. *PLoS One* 2014, 9, e106875.
29. Zhang G, Liu T, Wang Q, Chen L, Lei J, Luo J, Ma G, Su Z. Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: A new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. *Food Hydrocolloids* 2009, 23, 2001–2007.
30. Dallongeville S, Koperska M, Garnier N, Reille-Taillefert G, Rolando C, Tokarski C. Identification of animal glue species in artworks using proteomics: application to a 18th century gilt sample. *Anal. Chem.* 2011, 83, 9431–9137.
31. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 2008, 4, 222.
32. Taga Y, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S. Development of a novel method for analyzing collagen O-glycosylations by hydrazide chemistry. *Mol. Cell. Proteomics* 2012, 11, M111.010397.
33. Taga Y, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S. Site-specific quantitative analysis of overglycosylation of collagen in osteogenesis imperfecta using hydrazide chemistry and SILAC. *J. Proteome Res.* 2013, 12, 2225–2232.
34. Taga Y, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S. Stable isotope-labeled collagen: a novel and versatile tool for quantitative collagen analyses using mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2014,

- 13, 3671–3678.
35. Taga Y, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S. Highly accurate quantification of hydroxyproline-containing peptides in blood using a protease digest of stable isotope-labeled collagen. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 12096–12102.
36. Taga Y, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S. Developmental stage-dependent regulation of prolyl 3-hydroxylation in tendon type I collagen. *J. Biol. Chem.* 2016, 291, 837–847.
37. Taga Y, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S. Efficient absorption of X-hydroxyproline (Hyp)-Gly after oral administration of a novel gelatin hydrolysate prepared using ginger protease. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 2962–2970.
38. 小田吉哉, 長野光司, 創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析—バイオマーカー・標的探索, 作用機序解析の研究戦略と実践マニュアル (実験医学別冊 26), 羊土社, 2010.
39. Clauser KR, Baker P, Burlingame AL. Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.* 2011, 71, 2871–2882.
40. Ojeda G N, Amavet P S, Rueda E C, Siroski P A. DNA extraction from skins of wild (*Hydrochoerus hydrochaeris* and *Pecari tajacu*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) species using a novel protocol. *GMR, Genet. Mol. Res.* 2012, 11, 672–678.
41. Campana M G, Robinson T, Campos P F, Tuross N. Independent confirmation of a diagnostic sheep/goat peptide sequence through DNA analysis and further exploration of its taxonomic utility within the Bovidae. *J. Archaeol. Sci.* 2013, 40, 1421–1424.
42. 動物毛のDNA検査プロトコル, 愛知県産業技術研究所 食品工業技術センター, 2008.
43. Welker F, Soressi M, Rendu W, Hublin J J, Collins M. Using ZooMS to identify fragmentary bone from the Late Middle/Early Upper Palaeolithic sequence of Les Cottés, France. *J. Archaeol. Sci.* 2015, 54, 279–286.

44. Welker F, Collins M J, Thomas J A, Wadsley M, Brace S, Cappellini E, Turvey S T, Reguero M, Gelfo J N, Kramarz A, Burger J, Thomas-Oates J, Ashford D A, Ashton P D, Rowsell K, Porter D M, Kessler B, Fischer R, Baessmann C, Kaspar S, Olsen J V, Kiley P, Elliott J A, Kelstrup C D, Mullin V, Hofreiter M, Willerslev E, Hublin J J, Orlando L, Barnes I, MacPhee R D. Ancient proteins resolve the evolutionary history of Darwin's South American ungulates. *Nature* 2015, 522, 81–84.
45. Yan P, Wu X B, Shi Y, Gu C M, Wang R P, Wang C L. Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene. *Biol Conserv Biol. Conserv.* 2005, 121, 45–51.
46. Meganathan PR, Dubey B, Haque I. 2009. Molecular identification of crocodile species using novel primers for forensic analysis. *Conservation Genet.* 10 767–770.
47. Srikulnath K, Thongpan A, Suputtitada S, Apisitwanich S. 2012. New haplotype of the complete mitochondrial genome of *Crocodylus siamensis* and its species-specific DNA markers: distinguishing *C. siamensis* from *C. porosus* in Thailand. *Mol Biol Rep.* 39 4709–4717.
48. Ahmad Nizar N N, Ali M E, Hossain M A M, Sultana S, Ahamad M N U. Double gene targeting PCR assay for the detection of *Crocodylus porosus* in commercial products *Food Addit. Contam., Part A* 2018, 35, 1038–1051.
49. Itoh K, Nakagawa S, Okayama T. Basic studies on the dechroming of shaving dust from chrome leather. *Sci. Rept. Fac. Agr. Kobe Univ.* 1983, 15, 387–391.
50. Shilov I V, Seymour S L, Patel A A, Loboda A, Tang W H, Keating S P, Hunter C L, Nuwaysir L M, Schaeffer D A. The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 1638–55.
51. Buckley M, Kansa S W, Howard S, Campbell S, Thomas-Oates J, Collins M. Distinguishing between archaeological sheep and goat bones using a single collagen peptide. *J. Archaeol. Sci.*

2010, 37, 13–20.

52. Yang C, Park A C, Davis N A, Russell J D, Kim B, Brand D D, Lawrence M J, Ge Y, Westphall M S, Coon J J, Greenspan D. S. Comprehensive mass spectrometric mapping of the hydroxylated amino acid residues of the alpha1(V) collagen chain. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 40598–610.
53. Geist, V. *Deer of the world: their evolution, behavior, and ecology*; Stackpole Books: Mechanicsburg, PA, 1998.
54. Charette R. *CITES Identification Guide: Crocodylians*; Environment Canada: Ottawa, Canada, 1995.
55. Huchzermeyer F W. *Crocodiles: Biology, Husbandry and Diseases*; CABI Publishing Cambridge, U.K, 2003.
56. Wiebe J J, Sepulveda M S, Buckland J E, Anderson S R, Gross T S. Umbilical scarring in hatchling American alligators. *Aquaculture* 2004, 239, 155–159.
57. Geist V. *Deer of the world: their evolution, behavior, and ecology*. Stackpole Books: Mechanicsburg, PA, 1998.
58. Buckley M, Kansa S W. Collagen fingerprinting of archaeological bone and teeth remains from Domuztepe, South Eastern Turkey. *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2011, 3, 271–280.
59. Fehilly C B, S M Willadsen, E M Tucker. Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature.* 1984, 307, 634-636.
60. Irish Farmers Journal. What do you get when you cross a goat and a sheep? <https://www.farmersjournal.ie/what-do-you-get-when-you-cross-a-goat-and-a-sheep-156405> (アクセス日 : 2019-07-04)
61. Kaml I, Vcelakova K, Kenndler E. Characterisation and identification of proteinaceous binding media (animal glues) from their amino acid profile by capillary zone electrophoresis. *J Sep Sci.* 2004, 27,161–166.
62. Prikryl P, Havlickova L, Pacakova V, Hradilova J, Stulik K, Hofta P. An evaluation of GC-MS

- and HPLC-FD methods for analysis of protein binders in paintings. *J Sep Sci.* 2006, 29, 2653–2663.
63. Kuckova S, Nemeč I, Hýnek R, Hradilová J, Grygar T. Analysis of organic colouring and binding components in colour layer of art works. *Anal Bioanal Chem.* 2005, 382, 275–82.
64. Fremout W, Dhaenens M, Saverwyns S, Sanyova J, Vandenabeele P, Deforce D, et al. Tryptic peptide analysis of protein binders in works of art by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2010, 658, 156–162.
65. Dallongeville S, Richter M, Schafer S, Kuhlenthal M, Garnier N, Rolando C, et al. Proteomics applied to the authentication of fish glue: application to a 17th century artwork sample. *Analyst.* 2013, 138, 357-364.
66. Mazurek J, Svoboda M, Maish J, Kawahara K, Fukakusa S, Nakazawa T, et al. Characterization of binding media in Egyptian Romano portraits using enzyme-linked immunosorbant assay and mass spectrometry. *e-Preserv Sci.* 2014, 11, 76–83.
67. Tripković T, Charvy C, Alves S, Lolić AD, Baosić RM, Nikolić-Mandić SD, et al. Identification of protein binders in artworks by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2013, 113, 49–61.
68. 高島美穂, カミーユ・ピサロ作《収穫》に見られる技法について, 国立西洋美術館研究紀要, 2012, 16, 35-45.
69. *Conservation of Leather and Related Materials*, M Kite, R Thomson, 2006.
70. *L'Art de faire différentes sortes de colles*, GRANDJEAN DE FOUCHY, 1771.
71. Manzano E, Romero-Pastor J, Navas N, Rodríguez-Simon LR, Cardell C. A study of the interaction between rabbit glue binder and blue copper pigment under UV radiation: a spectroscopic and PCA approach. *Vib Spectrosc.* 2010, 53, 260–268.
72. Leo G, Bonaduce I, Andreotti A, Marino G, Pucci P, Colombini MP, et al. Deamidation at asparagine and glutamine as a major modification upon deterioration/aging of proteinaceous

binders in mural paintings. *Anal Chem.* 2011, 83, 2056–2564.

学 位 論 文 要 旨

液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いた
革および膠の由来動物種の同定に関する研究
Study on identification method for animal source of leather and glue
using LC-MS/MS

熊澤 雄基
Yuki Kumazawa

革は動物の皮からクロムや植物タンニンで鞣されて作られ、昔から様々な用途に使用されている。使用される動物種はウシ、ヒツジ、ヤギ、ワニなど様々であるが、その表記は故意的または意図的な理由により、誤って記載されることがある。革の動物種判定は主に電子顕微鏡による形態観察によって行われているが、正しく動物種を判定するためには分析者の熟練した経験が必要とされ、さらに形態特徴が類似した動物種間では判定が困難であった。一方、熱変性コラーゲン（＝ゼラチン）を主成分とする膠は、様々な動物の骨や皮から抽出され、古くから壁画や絵画などの膠着剤、顔料の分散剤などとして使用されてきた。文化財製作当時の動物利用の実態や、使用した材料、芸術家の技法などの情報を得るためには、膠の存在を明らかにすることに加え、その由来動物種を同定することが望まれている。DNA に基づいた PCR 法が革や膠の由来動物種同定に検討されてきたが、製造工程などで DNA の分解や損傷が起こるため適用が難しく、実用化には至っていない。最近では質量分析装置を用いて、コラーゲンのアミノ酸配列の種間差を検出することで、骨や皮衣服、ゼラチンや膠などの由来動物種同定が可能となった。しかしながら、コラーゲン配列が未知な動物種や、複数種混合試料への適用の難しさが課題であった。そこで本研究では、これらの課題を解決するため、複数のコラーゲンマーカープепチドを LC-MS で分析し、その検出パターンで動物種判定を行う新規分析法の開発を行った。

第 1 章では、質量分析法は革の動物種同定のための有力なツールであることを、DNA 検出による PCR 法、抗体検出による western blotting 法と免疫蛍光染

色法で比較して示した。ウシとブタの皮膚、クロム革、タンニン革を分析した結果、ペプチド検出による本法では、全ての試料の動物種同定に成功した。一方、対照とした方法は、革からコラーゲンや DNA の検出は認められず、また、使用した抗 I 型コラーゲン抗体や DNA 検出プライマーの種間交差反応も確認されたことから、動物種判定は不可能であるという結論に至った。

第 2 章では、迅速かつ簡便に行える革の動物種判定方法を開発した。まず、0.25%水酸化カルシウムによる脱クロム処理時間を 2 時間、250 ug/mL のトリプシンで 4 時間消化反応を行うことで、革から効率的にコラーゲンペプチドを生成する最適な条件を見出した。続いて、ショットガンプロテオミクス解析で同定したペプチドの中から、12 個の I 型コラーゲン由来マーカープепチドを選択することで、その検出パターンで 10 種の動物種を判定する方法を構築した。本法はコラーゲン配列が未知な動物種にも適用可能であり、さらに簡便な操作でかつ 1 日で試験完了するため、ルーチン分析にも有用であることが示された。

第 3 章では、第 2 章で開発した方法を市場革や製品革へ適用した。まず、様々な産地由来の 75 個の市場革を分析したところ、シカ革を除いた全ての革製品の動物種同定に成功した。シカ革は産地によってマーカープепチドの検出パターンが異なることが判明した。さらに革をヤスリで削って粉末化することで、脱クロム処理なしで高感度にマーカープепチドを検出できることを見出し、市販のワニ革時計ベルトの裏面の僅かな損傷だけで動物種を同定することに成功した。これらのことから、本法は革製品の動物種認証に有用であり、さらに革の損傷を最小限に抑えた準非破壊分析が可能であることが示された。

第 4 章では、本アプローチをもとに複数種混合試料へ適用可能な膠の由来動物種判定法を開発し、市場膠と絵画試料に適用した。対象となる動物種を 8 種（ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、シカ、ウサギ、チョウザメ）とし、さらにこれらの動物種が 2 種混在する場合でも判定が可能となるように 12 個の I 型コラーゲン由来マーカープепチドを新たに選択した。市場膠製品を分析した結果、全ての膠の由来動物種を同定することができ、表記と異なる動物種や複数の動物種を原材料とする製品も見つかった。また、カミーユ・ピサロ作《収穫》（1882）の地塗りには、ウシとヒツジの 2 種に由来する膠が使用されていることを明らかにした。本法は、微量試料の測定も可能であり、今後、様々な美術作品や歴史的資料の測定へ応用されることが期待される。

以上、本研究では質量分析を用いた革と膠の由来動物種判定法を開発し、市場革や製品革、市場膠、絵画試料に適用することでその有用性を実証した。予め選択したコラーゲンマーカープепチドの検出パターンで判定を行うことで、これまで不可能であったコラーゲン配列未知種の試料や、複数種が混合した試料の分析が可能になった。さらに、高感度な LC-MS 分析の使用が、膠の微量試料分析や、革の準非破壊分析を可能にした。本法が、これまで動物種同定が難しかった試料へ適用されることで、市場製品の認証検査の拡大や、考古学資料分析による知見獲得など様々な用途に繋がることが期待される。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導頂きました東京農工大学農学部の野村義弘教授、本論文の審査を快くお引き受け頂き有益なご助言を頂きました東京農工大学農学部の西河淳教授、新井克彦教授、三浦豊教授、宇都宮大学農学部の東徳洋教授、茨城大学農学部の朝山宗彦教授に感謝致します。本研究を進める上でご指導、ご助言を頂きました株式会社ニッピ・バイオマトリックス研究所の多賀祐喜博士に感謝致します。様々な面でご協力頂きました株式会社ニッピと一般財団法人日本皮革研究所の皆様、学位論文を構成する共著者の皆様に心よりお礼申し上げます。なお、本研究の一部は、JSPS 科研費 JP16K01187 の助成を受けたものである。