

コラーゲンとアパタイトの同位体比を用いたマクロ栄養素モデルの構築と 日本先史時代人による雑穀摂取の検出

先端生命科学専攻 同位体生態学分野 山口晴香 (47-176344)
2019年3月修了 指導教員：米田穰教授

キーワード：古人骨、コラーゲン、アパタイト、マクロ栄養素、炭素安定同位体
窒素安定同位体、弥生時代、縄文時代、食性分析、雑穀

背景・問題点

炭素・窒素安定同位体比を用いた食性分析の古人骨への応用として、人骨中のコラーゲンが広く用いられている。コラーゲンは食料中のタンパク質の同位体比を主に反映する。一方で、エナメル質の主成分であるアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) は、生物の生存期間中にリン酸塩 (PO_4^{3-}) の 2-5%が炭酸塩 (CO_3^{2-}) に置換され、食事に含まれる全栄養素の炭素同位体比を反映する (図 1)。

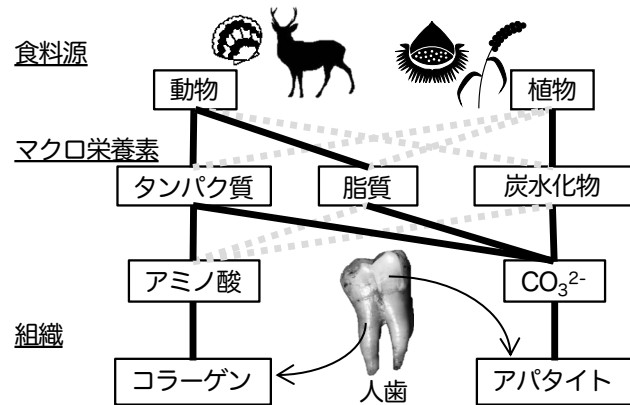


図 1. マクロ栄養素の各組織への回路

古人骨に含まれるアパタイトの炭素同位体比を用いた先行研究では、 ^{13}C の割合が高い C_4 植物の農作物が C_3 生態系に導入された現象を高感度に検出できることが示された。しかし、海産物は C_4 植物と類似した炭素同位体比を有しており、少量のみ摂取されていた場合、同位体比の特徴だけでは区別が難しい。海産物も利用した狩猟採集民が C_4 植物の農作物を利用した可能性を議論するためには、 C_3 生態系に C_4 植物あるいは海産物が導入された時の同位体比の特徴を区別する新たな手法が必要である。

解決方策・目的

本研究では、縄文・弥生時代人が利用していた可能性が考古学的証拠から示唆された、 C_4 植物に分類されるアワ・ヒエなどの雑穀 (C_4 雑穀) と海生貝類の区別を、異なる組織の同位体比を組み合わせることで試みる。この際、コラーゲンとアパタイトの主に反映する栄養素が異なることを踏まえ、食料源によってマクロ栄養素 (炭水化物・脂質・タンパク質) の組成に顕著な差異があることに着目した。 C_4 雑穀においては炭水化物の割合が非常に高い (アワで 82%) のに対し、海生貝類ではタンパク質が主要な栄養素である (ハマグリで 72%)。よって、全栄養素を反映するアパタイトには C_4 雑穀の方がより大きな影響を及ぼすと期待できる。各栄養素が食料源に含まれる割合と、栄養素ごとの同位体比の違いを反映させて食性を評価する「マクロ栄養素モデル」を構築し、 C_3 生態系の食料源と合わせて C_4 雑穀や海生貝類が少量摂取された場合、両者の区別が可能な指標を理論的に検討する。次に、狩猟採集から農耕という大きな生業の転換が起きた縄文～弥生時代の人歯資料のコラーゲンとアパタイトにおける炭素・窒素安定同位体比を測定し、

上記のマクロ栄養素モデルを用いて C4 雑穀の摂取の有無を評価する。

方法・材料

[マクロ栄養素モデルの構築] C3 植物とそれを食する動物、C4 雑穀および海生貝類といった食料源の摂取量とともにコラーゲンの炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$)、アパタイトの炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}}$)、両者の炭素同位体比の差 ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{collagen-apatite}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$)、コラーゲンの窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) がどのように変動するかを Fernandes et al. (2012) の関係式に従い計算した。扱った食料源の各栄養素の含有率は文部科学省の食品成分データベースを参照した。本モデルで評価する食性への各食料源の寄与率は食事全体で乾燥重量にて占める割合で表される。

[縄文・弥生時代人の C4 雑穀摂取の評価] 群馬県と長野県の縄文～弥生時代の人歯資料 35 点・人骨資料 7 点からコラーゲンを抽出し、炭素・窒素安定同位体比および放射性炭素年代を測定した。人歯資料については歯冠エナメル質の炭素安定同位体比を測定した。これらの実測値をマクロ栄養素モデルと比較した。

結果・考察

マクロ栄養素モデルの計算結果より、C4 雑穀あるいは海生貝類が C3 植物、C3 草食動物と合わせて少量摂取された場合において、同位体比の変化は異なる挙動を示すことが認められた。C3 生態系の食料源が食事の大部分を占めているときに $\delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}}$ が $\Delta^{13}\text{C}_{\text{apatite-collagen}}$ と正の相関を持つのは、今回想定した食料源の中では C3 草食動物と C4 雑穀の混合の場合のみであった (図 2)。同じ条件の海生貝類の混合では負の相関を示した。考古資料では、コラーゲンとアパタイト両方の $\delta^{13}\text{C}$ において、

縄文早期～後期の試料と比べ縄文晩期～弥生時代の試料で上昇が確認された。ピアソンの積率相関検定を行なったところ、縄文～弥生時代の試料にて $\delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}}$ と $\Delta^{13}\text{C}_{\text{apatite-collagen}}$ の間に有意な正の相関関係が検出された。これは、マクロ栄養素モデルにおいて C4 雑穀の寄与率を 20-80%とした場合の C3 草食動物と C4 雑穀の混合と整合的な結果であり、縄文晩期～弥生時代の試料では C4 雑穀の摂取が示唆された。次に、食料源として C3 草食動物、C4 雑穀、および C3 植物を想定し、縄文～弥生時代の試料の $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}}$ からそれぞれの食料源の寄与率をマクロ栄養素モデルで用いた方法にて算出した。縄文早期～後期の資料では C4 雑穀、C3 草食動物、C3 植物の寄与率が 9.8%、77.8%、12.4% だったのに対し、縄文晩期～弥生後期の試料では 37.7%、25.5%、36.9%であった (図 3)。

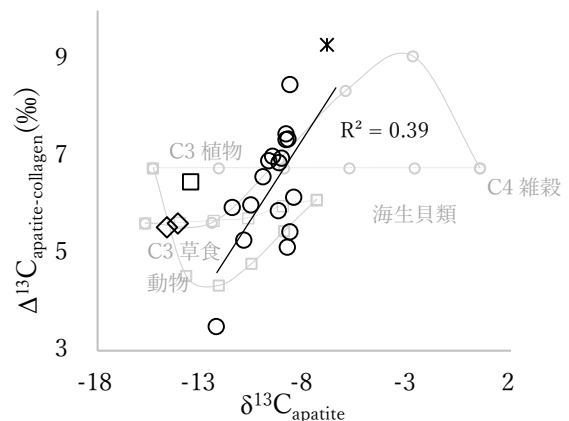
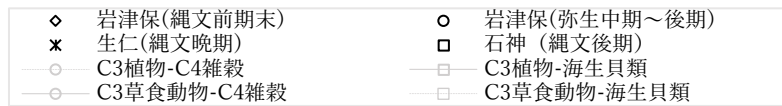


図 2. マクロ栄養素モデルと縄文・弥生人歯データ

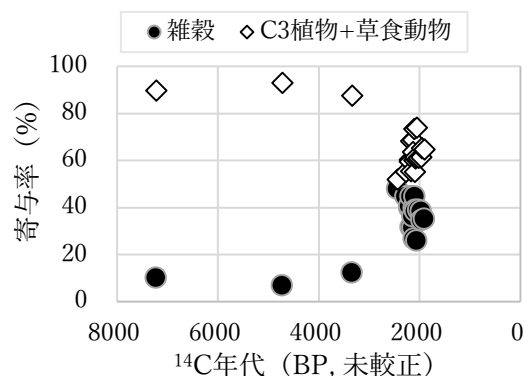


図 3. C4 雑穀寄与率の時代変化

総括

C4 雑穀と海生貝類といった炭素・窒素安定同位体比が類似している食料源でも、各栄養素の含有率が異なる場合はコラーゲンとアパタイトの同位体比を用いて少量の寄与を区別できるモデルを新たに考案した。縄文・弥生時代人の実測値にこのモデルを応用した結果、縄文晩期～弥生時代で C4 雑穀の摂取が強く示唆された。これは、考古学的に推論されていた仮説と整合的である。

A macronutrient-based model using isotope ratios in collagen and enamel reveals millet consumption by prehistoric Japanese populations

Haruka Yamaguchi (Department of Integrated Biosciences, Laboratory of Isotope Ecology, 47-176344)

March, 2019 Advisor: Prof. Minoru Yoneda

Background The application of carbon and

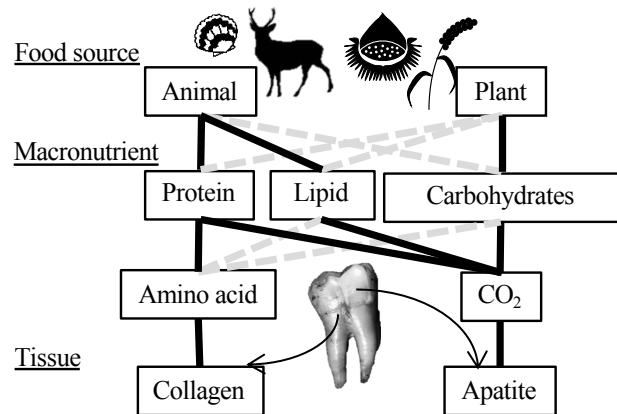
nitrogen stable isotope ratios to archaeological human bones has mostly utilised collagen, which primarily reflects protein consumption. However, apatite, which is the dominant component in bone/enamel mineral and is noted $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, has some PO_4^{3-} ions substituted with CO_3^{2-} during an organism's lifetime, and reflects all nutrients in the diet ([fig. 1]). Previous studies have used both

collagen and apatite in human bones to identify the consumption

of C4 plants such as maize, and have been successful in detecting it in the early stages of the agricultural transition from a C3 terrestrial diet. However, marine resources show similarly high $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios to C4 plants, and it is difficult to distinguish minor consumption of marine sources from that of C4 plants. In order to assess the usage of C4 agricultural plants by foragers with access to marine resources, it is necessary to find a new analysis to discriminate between these two foods.

Objective Archaeological evidence has suggested possible cultivation of millets such as foxtail millet and broomcorn millet, classified as C4 plants, in the Final Jomon-Yayoi period in Japan. This study attempts to distinguish minor consumptions of C4 millets from those of marine shellfish, a marine resource which shares a comparatively low $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ with C4 millets. We combined the analysis of two different tissues which reflect different nutrients, focusing on the significant difference in the distribution of macronutrients (carbohydrates, lipids and protein) in C4 millets and marine shellfish. Carbohydrates take up the majority (82% in foxtail millet) in C4 millets, whereas protein is the primary component (72% in hard clam) in marine shellfish. Therefore, C4 millet is expected to have a more substantial effect on apatite, which reflects the whole diet. This study built a macronutrient-based model which calculates the effect that the introduction of these foods brings upon carbon and isotope ratio indexes. The model was then applied to test whether C4 millet consumption could be detected in dentine collagen and enamel apatite of human teeth samples from the Jomon to Yayoi period in Japan, a period that saw the transition from foraging to agriculture.

Materials and Methods Construction of the macronutrient-based model: Carbon isotope ratios in collagen and apatite ($\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}}$), isotope enrichment between these two values ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{collagen-apatite}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$) and nitrogen isotope ratios in collagen ($\delta^{15}\text{N}$) were calculated for mixed diets consisting of C3 plants, C3 herbivores, C4 plants and marine shellfish, with different mixing ratios, based



[fig. 1] Macronutrient routing

on the algebraic models proposed by Fernandes et al. (2012). I referred to the MEXT Food Composition Database for macronutrient content data for each food source. The contribution rate of each food source is given by dry weight ratio in the whole diet.

Evaluation of C4 millet consumption in the Jomon and Yayoi people: 35 tooth and 7 bone samples were collected from human remains excavated from sites in Gunma and Nagano Prefecture. Extracted collagen was analyzed for carbon/nitrogen stable isotope ratios and radiocarbon dates. For human tooth samples, carbon stable isotope ratios in enamel apatite were analyzed. The observed values were compared with the macronutrient-based model.

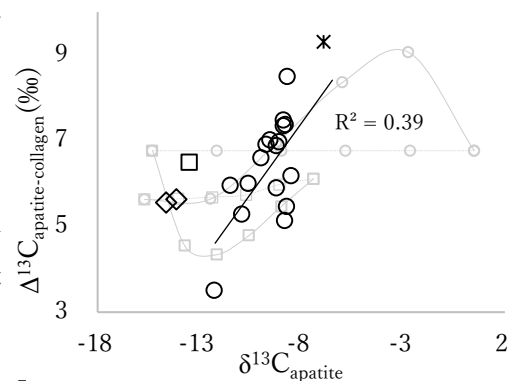
Results and Discussion

According to calculations of the macronutrient-based model, isotope ratios showed different trends between the introduction of trace amounts of C4 millet and marine shellfish into a C3-terrestrial diet. In all the diets that were considered for this study, a positive correlation between $\delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}}$ and $\Delta^{13}\text{C}_{\text{apatite-collagen}}$ was only observed in a diet consisting of C3 herbivores and C4 millet ([fig. 2]).

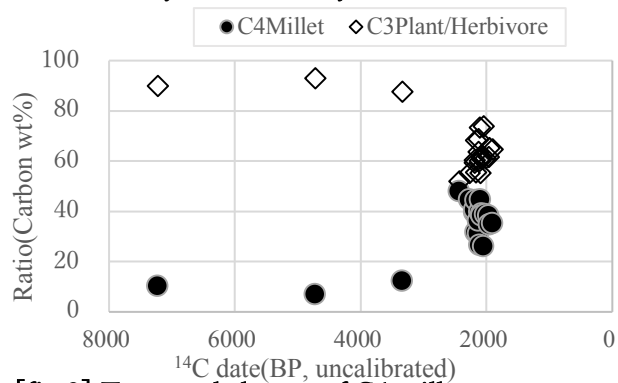
Marine shellfish gave a negative correlation under the same conditions. In both collagen and apatite, an increase in $\delta^{13}\text{C}$ was seen in samples from Final Jomon-Yayoi, compared to those from Early-Late Jomon. Pearson's correlation test revealed a significant positive correlation between $\delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}}$ and $\Delta^{13}\text{C}_{\text{apatite-collagen}}$ of Jomon and Yayoi samples. This is consistent with the macronutrient-based model for a mixed diet of C3 herbivores and C4 millet where the contribution of C4 millet is 20-80%, implying the consumption of C4 millet in Final Jomon-Yayoi samples.

Next, the contribution of each food source in the whole diet was calculated with the same method used in the macronutrient-based model. C3 herbivores, C4 millet and C3 plants were considered as food sources. C3 herbivores, C4 millet and C3 plants each took up 9.8%, 77.8% and 12.4% in Early-Late Jomon samples, where Final Jomon-Yayoi had contributions of 7.7%, 25.5% and 36.9%, respectively ([fig. 3]).

Conclusion A new macronutrient-based model testified that trace contributions of food sources bearing similar isotopic ratios but which differ in nutrient distribution, such as C4 millet and marine shellfish, could be distinguished using collagen and apatite. The application of the macronutrient-based model to Jomon and Yayoi human collagen and apatite samples strongly



[fig.2] Curve of the macronutrient-based model shown with Jomon and Yayoi human tooth data



[fig.3] Temporal change of C4 millet consumption

suggested the consumption of C4 millet from Final Jomon to Yayoi. This result is consistent with the hypothesis built on archaeological grounds.