

ラマン分光法による疾患関連分子の検出法の開発

田中裕之, 沼田靖

日大工・生命

【序論】

我々のグループでは疾病関連物質の定量分析をラマン分光法で行うことを目標としている。今年度はアミノ酸、脂質、および糖についての実験を行った。アミノ酸では生理機能を有するいわゆる機能性アミノ酸の定量法を確立した。脂肪酸ではトランスとシスの異性体混合溶液における定量を行い、糖ではグルコースの構造異性体のスペクトルの違いからそれぞれの異性体の定量を行った。また、可視領域と近赤外の励起光で得たスペクトルを比較した。

1. なぜラマン分光法による定量法なのか？

今年度の結果を説明する前に、まずラマン分光を定量分析に利用する理由について述べたい。ラマン分光法は赤外線吸収スペクトル(IR)と同様、分子の振動準位を測定することが可能であり、定量分析というよりも分子構造の知見を得ることに主に使われてきた。もし、この分光法が定量分析に適応できればさまざまな利点がある。

図1にラマンスペクトルのエネルギーダイアグラムを示す。図中の S_0 、および S_1 はそれぞれ、基底電子状態と励起電子状態を表している。また、 S_0 状態にはいくつかの振動準位があり、それを短い実線で表している。分子にレーザーのような強い光を照射すると分子は仮想的な状態(図中の破線まで)に励起され、散乱が起こる。この散乱には二つのタイプの散乱光がある。一つは入射レーザー光と同じエネルギーをもつレイリー散乱であり、その低エネルギー側に現れる強度の弱い散乱光をラマン散乱という。これはちょうど分子の振動準位に相当するところにピークが現れる。図2にラマンスペクトルの模式図を示す。レイリー散乱からラマン散乱までのエネルギー差(一般的に波数、 cm^{-1} の単

図1 Energy diagram of Raman scattering.

位で表すことが多い)が基底電子状態の振動準位となる。

N 個の原子からなる分子の振動の自由度は $3N-6$ (直線分子では $3N-5$)となるので、ほとんどの分子でピークが現れる。

IRスペクトルも振動状態間の遷移であるので、同じエネルギー準位の情報が得られるが、スペクトルの選択則のためIRスペクトルには水素のような二原子分子は測定できない。しかし、ラマンスペクトルはそれら分子も測定可能である。

次の利点としてはIRでは水のピークが非常に大きく現れるがラマンスペクトルにはそのピークがあまり大きく現れないので、水溶液中の分子の定量も可能な点である。

また、分解能が良いので多成分系の定量にも利用可能である。

しかしながら、このような利点があるにも関わらず、ラマン分光法はこれまで定量分析にはあまり使われてこなかった。なぜなら、ラマン分光法は散乱現象を利用しているため、その散乱強度がレーザーパワーに大きく依存するからである。近年、レーザーパワーの影響を排除するために標準物質とのラマン強度比を用いる方法が行われるようになってきた。以前、我々の研究においても溶媒を内部標準に用いてフィトケミカルであるケルセチンの定量を行ったり¹⁾、あらかじめ測定した物質を外部標準に用いて、発酵気体である水素、メタンおよび二酸化炭素の同時定量²⁾や水-アルコール混合溶液の定量分析を行ったりしてきた³⁾。

現在、これらの研究をもとに疾病関連物質の定量分析をラマン分光法で行っている。その研究の一環として、平成26年度は生体物質で重要なアミノ酸、脂質および糖について実験を行った。

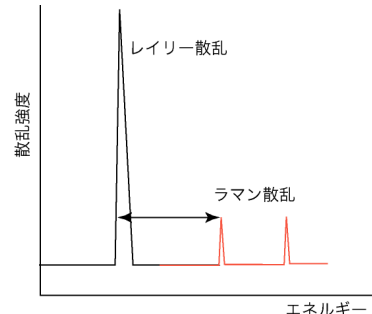


Fig. 2 Schematic Raman spectrum.

2. 本年度の結果

(1) アミノ酸

本年度は機能性アミノ酸の定量を行った。用いたアミノ酸は鎮静作用のあるキョートルフィン、動脈硬化防止に効果のあるシトルリンおよび疲労回復に効果のあるカルノシンをターゲットとした。図3にキョートルフィンおよびそれを構成するチロシンとアルギニンのラマンスペクトルを示す。

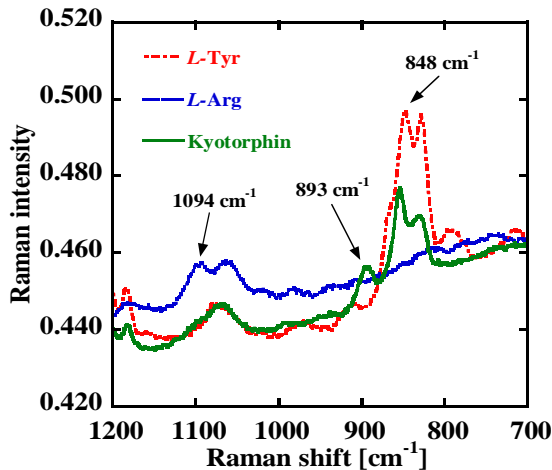


Fig. 3 Raman spectra of amino acids and peptides.

ジペプチドであるキョートルフィンは構成アミノ酸のピークが主に観測されるが、893 cm⁻¹にキョートルフィンにのみ現れるピークが観測された。これはペプチド結合に由来するピークと考えられる。このピークの強度比を濃度に対してプロットすることにより検量線を得た。Fig. 4にキョートルフィンの検量線と比較のためにチロシンとアルギニンの検量線も示す。いずれのアミノ酸についても良い直線性を示しており、ジペプチドとその構成アミノ酸がラマン分光法によって定量できることを明らかにした。シトルリンやカルノシンも同様な実験を行い、検量線は濃度に

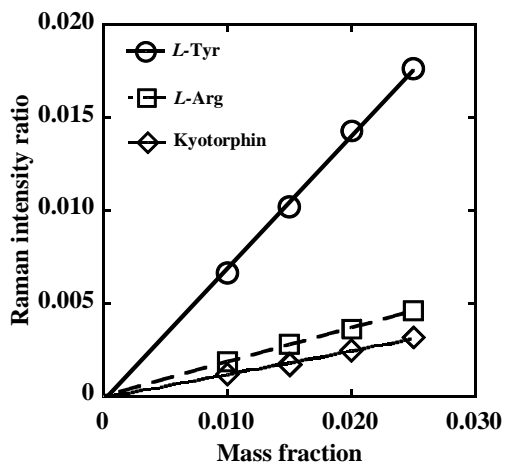


Fig. 4 Calibration curves of amino acids and peptides.

対して比例していることが分かった。

(2) 脂肪酸

トランス脂肪酸はLDLコレステロールを増加させるといわれている。トランス脂肪酸は天然油にはほとんど含まれていないが硬化油を製造する過程や油の酸化時に生成される。本研究ではシス体であるオレイン酸とそのトランス体(エライジン酸)の定量分析を行った。図5にシス体とトランス体のラマンスペクトルを示す。

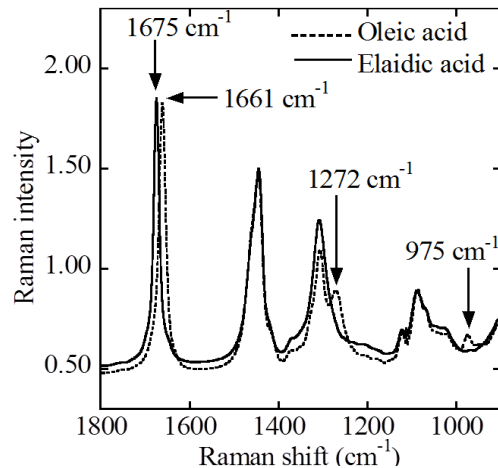


Fig. 5 Raman spectra of Oleic and Elaidic acids

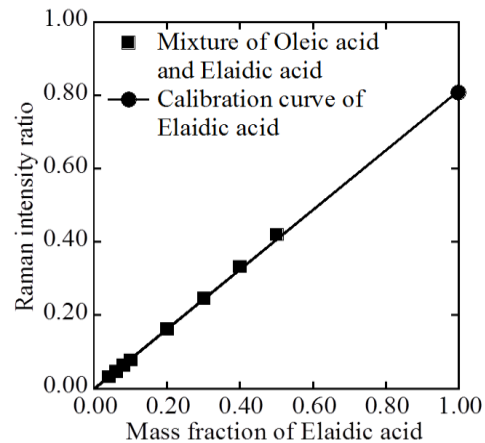


Fig. 6 Calibration curve of Elaidic acid.

1670 cm⁻¹ 付近のバンドが分離されて観測される。これは二重結合の構造異性によるものであり、1675、および 1661 cm⁻¹ のピークはそれぞれ、トランス体とシス体に帰属された。種々の濃度で測定し、図6にトランス体のラマン強度比を濃度に対してプロットした図を示す。濃度に対してラマン強度比は比例した。シス体も同様なグラフが得られた。この結果からラマン強度比から各脂肪酸の濃度が決定できることを明らかとした。

(3) 糖

糖の構造を知るためにラマンスペクトルを測定した。図7にグルコース、ガラクトースおよびマンノースのラマンスペクトルを示す。

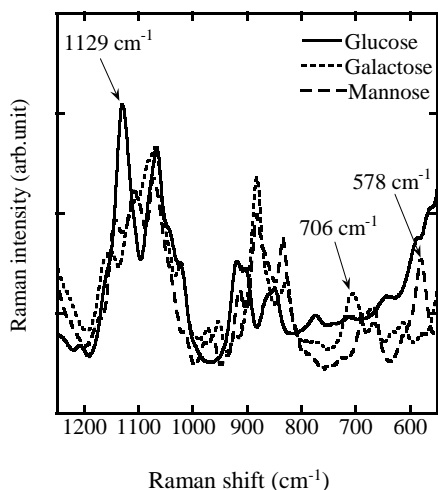


Fig. 7 Raman spectra of saccharides

ヒドロキシ基が異なるだけで大きなスペクトル変化が観測された。この理由については現在、分子軌道計算による振動数解析を行っているところである。各糖固有のピーク（グルコース、ガラクトースおよびマンノースはそれぞれ、1129, 578, 706 cm⁻¹）を用いて検量線を作成したところ濃度に対してラマン強度比は比例することが分かった。

(4) 532 nm と 785 nm 励起のラマンスペクトル

現在、当研究室のラマン分光装置は励起光に488 nm または 532 nm のレーザーを用いている。しかし、このような短波長を励起光に用いた場合、蛍光物質が含まれていると蛍光が強く現れて、ラマンピークが観測されなくなることがある。特に生体物質を用いる場合、注意が必要となる。蛍光を押さえ、ラマンスペクトルを測定するひとつの方法として長波長のレーザーを励起光として用いる場合がある。図8(a)に鶏胸肉からアミノ酸を抽出した試料の532 nm 励起によるラマンスペクトルを示す。このスペクトルは蛍光が強く現れピークが観測できなかった。そこで、785 nm 励起 (Renishaw inVia) でラマンスペクトルを測定したところ、蛍光が消失し、ピークが観測された(図8bの黒線)。しかしこのピークはカルノシンとは一致せず、他のアミノ酸も多く抽出されたと考えられる。

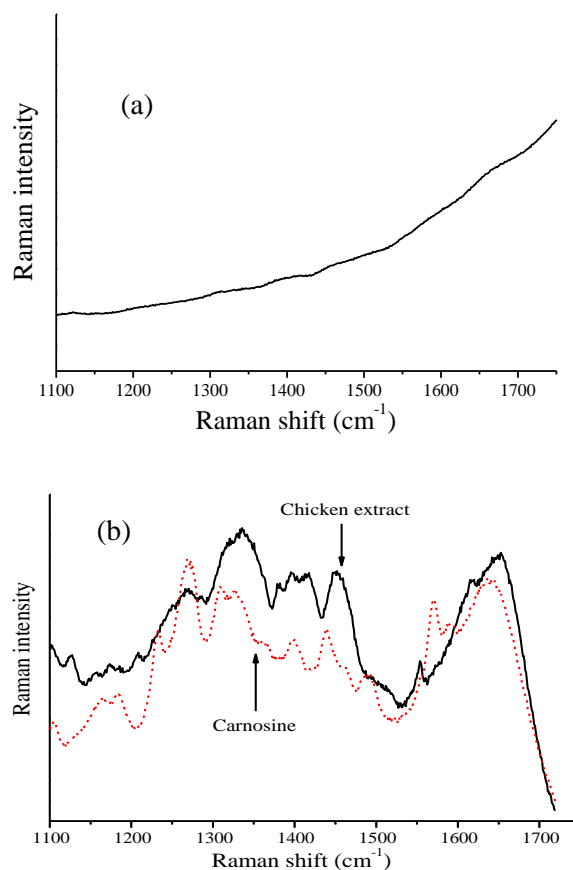


Fig. 8 Raman spectra with (a) 532 nm and (b) 785 nm excitation.

平成 27 年度

この結果をもとに、今年度ではより疾病診断に利用できる系での実験や疾病のメカニズムの解明に役立つ系での実験を行う予定である。

具体的には細胞の認識などで重要な役割を果たしているといわれているシアル酸である。種々のシアル酸とその誘導体のラマンスペクトルを測定することにより、それらの構造の知見や定量法の確立を目指す。また、今年度から分担者に糖質工学を専門としている小林先生に入っていたので、種々の糖鎖においてどんな糖がどのような順序で結合しているかという分析法の確立も行う予定である。

【参考文献】

1. Numata, Tanaka, *Food Chemistry*, **126**, 751-755, (2011).
2. Numata, Shinohara, Kitayama, Tanaka, *Process Biochemistry*, **48**, 569-574 (2013).
3. Numata, Iida, Tanaka, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, **112**, 1043-1049, (2011).