

Active aging を支援する診断治療のための新規機能分子・測定法の開発 -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)

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。昨年度(平成26年度)はアミノ酸、脂質、および糖についてラマン分光法を用いて定量分析が可能であることを示した。

そこで、本年度では、1. 機能性アミノ酸である「シトルリン」を実試料(スイカの果皮)から抽出し、その濃度を決定した。2. 不飽和脂肪酸にはシス体トランス体の幾何異性体があるが、光異性化反応によるそれぞれの量をラマン分光法で決定した。3. 糖ではアグリコンと配糖体のような構造類似化合物がラマン分光法によって定量可能かどうかの実験を行った。

1. スイカの果皮から抽出されたシトルリンの定量

シトルリンは生体内で一酸化窒素の合成に関与し、血管拡張を起こすので、動脈硬化や高血圧改善などの効果があることが知られている。この分子はスイカの果皮部に豊富に含まれている。そこで、本研究ではスイカからシトルリンを抽出して、定量分析を試みた。昨年度、シトルリンはラマン分光法による定量が可能であることを示した。そこで、本年度では実際のサンプルから抽出されたシトルリンの定量分析を行った。

ところがラマン測定に532 nmを励起光として用いたところ、非常にブロードなスペクトルが得られ、シトルリンのバンドは観測できなかった。これは抽出された試料中に532 nmの光を吸収し、蛍光を発する分子が存在するためと考えられる。そこで、本実験では励起光にもっと低エネルギーである785 nmのレーザーを用いることにした。

Fig. 1に785 nm励起のシトルリンのラマンスペクトルを示す。これは532 nm励起によって得られたスペクトルと一致していた。種々の濃度におけるスペクトルを測定して、検量線を作成したところ、濃度に対して良好な直線が得られた。

Fig. 2にスイカから抽出した試料のラマンスペクトルを示す。532 nm励起のスペクトルとは異なり、シャープなピークが観測されている。比較

のためにシトルリン分子のスペクトルもFig. 2に示す。ふたつのスペクトルを比較するとスイカから抽出した試料に現れているピークとシトルリンのピークは、ずれていることがわかる。

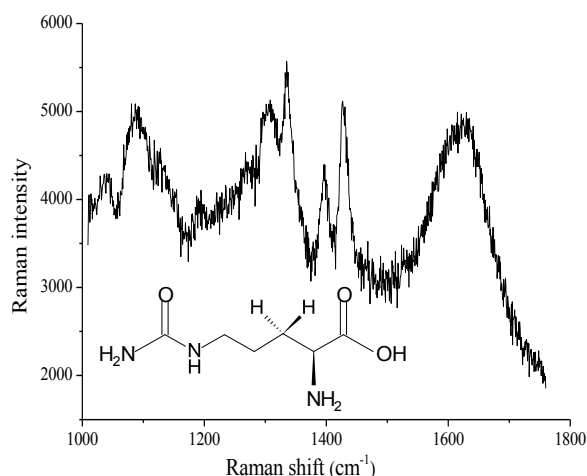


Fig. 1 Raman spectrum of citrulline obtained by excitation at 785 nm.

これは、抽出試料中にシトルリン以外の分子が含まれていることを示している。しかし、シトルリンのピーク位置にはピークやショルダーが観測されるので、この試料中にはシトルリンが入っていると考えられる。そこで、1437 cm⁻¹のピーク強度を用いて、定量を行ったところシトルリンの濃度が 2.85×10^{-2} mol/Lと求められた。

これが、正しいかどうかを確認するために先日納入されたアミノ酸分析装置を用いて定量を行った。その結果、 2.67×10^{-2} mol/Lと求められた。

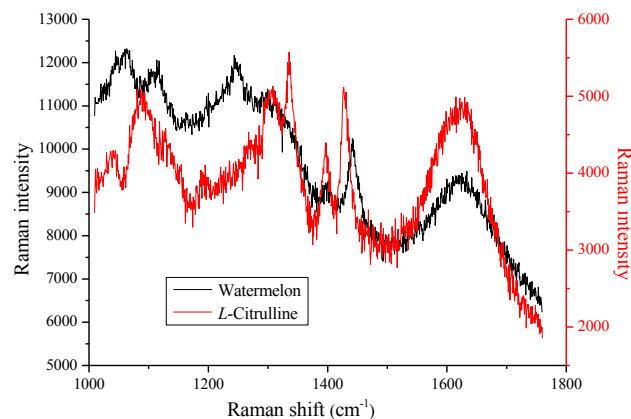


Fig. 2 Raman spectra of the extracted sample and citrulline.

2. 不飽和脂肪酸の光異性化反応

昨年の研究において、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）の定量分析を行い、ラマン強度比は濃度に比例することが分かった。そこで本研究では、オレイン酸に光照射してトランス体に変化する反応について追跡した。

Fig. 3 に光照射した時間（日にち）に対するオレイン酸とエライジン酸由来のラマン強度比を示す。オレイン酸由来の 1661 cm^{-1} のラマン強度比は減少するのに対して、エライジン由来の 1675 cm^{-1} のラマン強度比は増加していることが分かった。オレイン酸の減少量とエライジン酸の増加量の直線の傾きは絶対値でほぼ同じとなることから、光照射によりオレイン酸からエライジン酸が生成しているといえる。

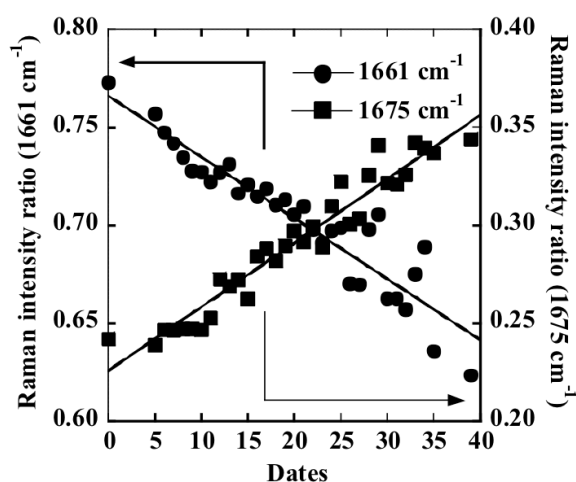


Fig. 3 Dependence of the Raman intensities at 1661 and 1675 cm^{-1} on the irradiation time.

また、エライジン酸の純成分の検量線（Fig. 4）から紫外線照射後のオレイン酸の強度比を求めたところ最大で約 15 %のエライジン酸が生成されていた。

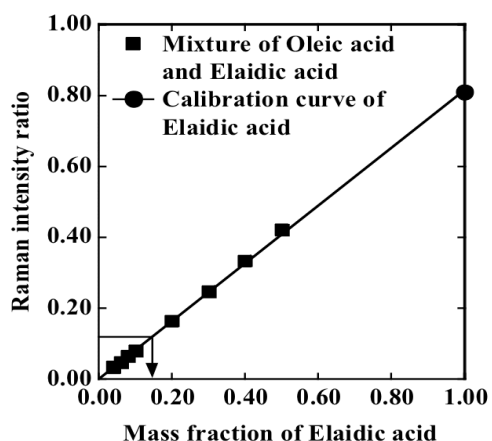


Fig. 4 Calibration curve of Elaidic acid.

3. アグリコンと配糖体の同時定量

生体系では配糖体として存在する分子も多く存在する。そこで、ラマン分光法を使って、配糖体と配糖体でないもの（アグリコン）の同時定量ができるかどうかを確認した。今回使った試料はポリフェノールであるケルセチンとその配糖体ルチンである。

ケルセチンとルチンのラマンスペクトルではピークの出現位置はほぼ同じであるが、 1500 cm^{-1} ~ 1700 cm^{-1} の間にあるピークの強度比が異なっている。Fig.5 にケルセチンとルチンの混合比を変えた混合溶液のラマンスペクトルを示す。混合比によって 1500 cm^{-1} ~ 1700 cm^{-1} のピーク強度比が変化していることが分かる。

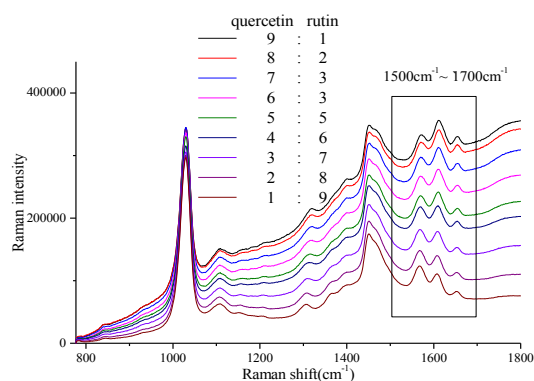


Fig. 5 Raman spectra of mixed solutions

このスペクトルを多変量解析（PLSR:部分最小二乗回帰）を用いて定量分析を行い、各成分の体積を求めた（Fig. 6）。その結果、仕込み体積と計算から求めた体積は非常によく一致していた。

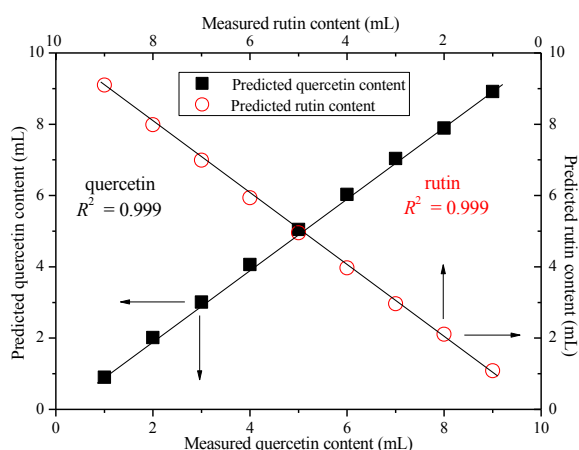


Fig. 6 Relation between the measured and the predicted values obtained by PLSR.

4. フェルラ酸と γ オリザノールの定量

最後に薬品に応用が期待されている分子の定量を行った。

本実験では、フェルラ酸とそれにステロールが縮合した γ オリザノールを選んだ。それらの分子は米ぬかに多く含まれることが知られており、更年期障害における心身症候の抑制および高脂血症の抑制、コレステロールの吸収・合成の阻害などの効能がある。

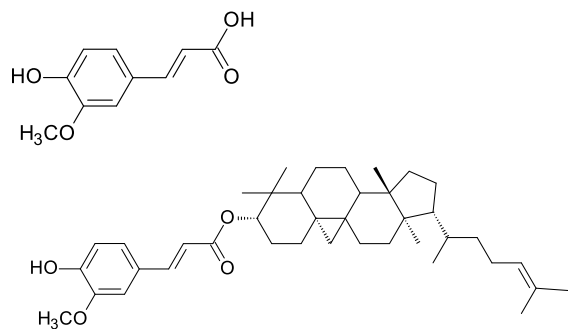


Fig. 7 にアセトンを経としたフェルラ酸および γ オリザノールのラマンスペクトルを示す。

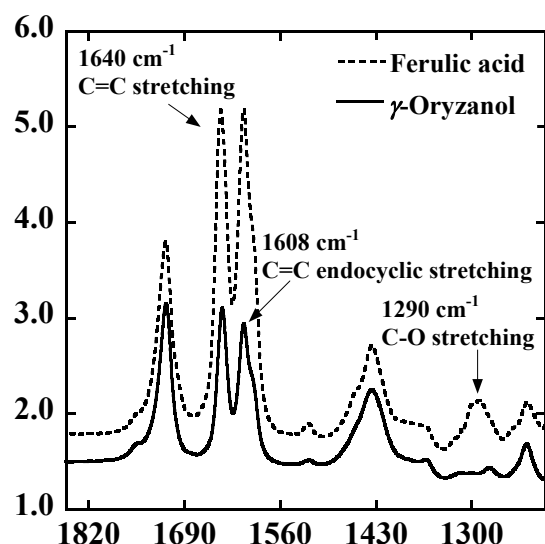


Fig. 7 Raman spectra of ferulic acid and oryzanol.

フェルラ酸における 1640 cm^{-1} のピークは C=C 伸縮振動、 1608 cm^{-1} のピークはベンゼン環の C=C 伸縮振動、 1290 cm^{-1} のピークはカルボキシ基上の C-O 伸縮振動と帰属される。その他の 1710 cm^{-1} 、 1440 cm^{-1} と 1230 cm^{-1} のピークは溶媒であるアセトンの振動と帰属される。 γ オリザノールのラマンスペクトルはフェルラ酸と非常に酷似している。しかし、 1290 cm^{-1} の C-O 伸縮振動ピークはフェルラ酸には現れているが、 γ オリザノールには現れていない。この振動はカルボキシ基の C-O 伸縮振動と帰属され、 γ オリザノールではステロールが縮合し、かなり重いものが振

動するようになるため、このピークは大きく低エネルギー側にシフトするため、 γ オリザノールのラマンスペクトルには現れなかったと考えられる。そこで、フェルラ酸ではこのピークが特有のピークとなるので、このピーク強度を用いて、検量線を作成した。また、 γ オリザノールでは強度が強く現れている二重結合による 1608 cm^{-1} のピークを用いて、検量線を作成した。

Fig. 8 にそれぞれの検量線を示す。どちらの分子の検量線共に良い直線関係が得られたおり、ラマン分光法による定量分析の可能性を伺わせる。

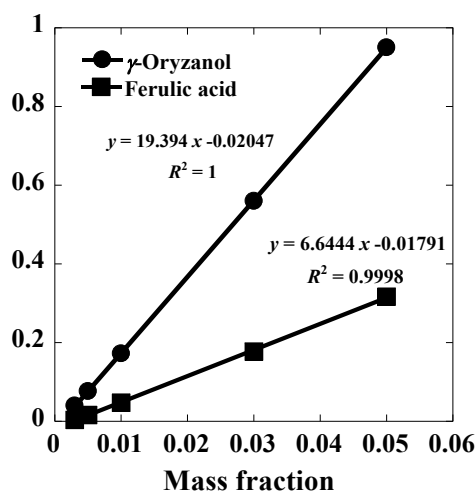


Fig. 8 Calibration curves

現在、この検量線をもちいてフェルラ酸とオリザノールの混合溶液中に含まれるそれぞれの成分の定量分析を行っているところである。

投稿中の論文

1. Yasushi Numata, Maria Otsuka, Kenji Yamagishi and Hiroyuki Tanaka, Quantitative Determination of Glycine, Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid Phenylalanine, and Tryptophan by Raman Spectroscopy, *Analytical Letters*.

2. Yasushi Numata, Yuta Shinohara and Hiroyuki Tanaka, Quantitative analysis of ethanol-methanol-water ternary solutions using Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*.

今後の予定

この研究で開発した定量法を使って、より生体内の反応に関する分子の定量ができることを確認していきたい。現在、細胞認識で重要であるノイラミン酸のモノマー、ダイマー、トリマーの定量分析を行っている。