

紫外-可視分光法, ラマン分光法を用いたリコピン凝集体の *in vitro, in vivo* での分析

¹関学理工, ²中国計量大, ³筑波大生命環境

○石垣美歌¹, Phiranuphon Meksiarun¹, 北濱康孝¹, Leilei Zhang^{1,2}, 橋本秀樹¹,
源川拓磨³, 尾崎幸洋¹

Investigation of lycopene aggregation *in vitro* and *in vivo* using UV-VIS and Raman spectroscopies

○Mika Ishigaki¹, Phiranuphon Meksiarun¹, Yautaka Kitahama¹, Leilei Zhang², Hideki Hashimoto¹, Takuma Genkawa³, Yukihiro Ozaki¹

¹ School of science and technology, Kwansei Gakuin University, Japan

² College of Life Sciences, China Jiliang University, China

³ Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan

【Abstract】 The present study investigated the structure of lycopene aggregates both *in vitro* and *in vivo* using ultraviolet-visible (UV-VIS) and Raman spectroscopies. The electronic absorption bands of the J- and H-aggregates *in vitro* shift to lower and higher energies, respectively, compared to that of the lycopene monomer. Along with these results, the frequencies of the ν_1 Raman bands were shifted to lower and higher frequencies, respectively. By plotting the frequencies of the ν_1 Raman band against the $S_0 \rightarrow S_2$ transition energy, a linear relationship between the data set with different aggregation conformations can be obtained. Applying this knowledge to an *in vivo* measurement of a tomato fruit sample, the relationship between the aggregation conformation of lycopene and the spectral patterns observed in the UV-VIS as well as Raman spectra in different parts of tomato fruits were discussed in detail. Raman imaging indicated that lycopene with different aggregate conformations was distributed inhomogeneously. In this manner, the presence of lycopene distributions with different aggregate conformations was unveiled *in vivo*.

【序】 本研究では、紫外・可視 (UV-VIS) 分光法とラマン分光法を用いて、リコピン会合体の $S_0 \rightarrow S_2$ 電子遷移及び基底状態における分子振動を *in vitro* 及び *in vivo* で詳細に分析した。トマト内におけるリコピンの構造や分布を、ラマンイメージングによって可視化することを目指す。

【方法 (実験・理論)】 リコピン凝集体の *in vitro* 測定では、リコピンを濃度の異なるアセトン水溶液に溶かし(100%, 80%, 50% and 20% acetone/water (v/v)), 氷で冷却しながら 7-10 分間超音波破碎機にかけた。100%アセトン溶液ではリコピンは単量体として存在し、アセトン水溶液では J 会合体, H 会合体が共存する。紫外・可視及びラマン測定においては、石英キュベットに 5 mL のリコピン溶液を注入して測定した。また石英ガラスに 1-2 mL リコピン溶液を滴下することにより、溶液の蒸発によって乾燥したリコピン凝集体 (マイクロ結晶) が得られた。トマトの *in vitro* 測定には、6 段階の成熟段階のトマトを使用し、外果皮, 中果皮, 内果皮, 胎座から各スペクトルを取得した。サンプルはタキイ種苗株式会社から提供を受けた。

可視・紫外分光法による測定は UV-3600 (SHIMADZU, Japan) を使用し、波長領域 300–800 nm の反射測定を行った。ラマン測定では 638 nm (DL 638-025-S, CrystaLaser, USA), 532 nm (RL532C150, Renishaw Inc., UK) の 2 波長レーザーを使用し、イメージ

ング測定では共焦点顕微ラマンシステム (*inVia Qontor*, Renishaw Inc., UK) を用いた。

【結果・考察】 リコピンアセトン水溶液の紫外・可視吸収スペクトルは Fig.1A のようになる。100%アセトン溶液では、448, 473, 505 nm に単量体による吸収バンドが観測された。また、アセトン水溶液のスペクトルでは 358 nm 及び 556 nm に H 会合体, J 会合体のバンドが検出された。一方、励起波長 532 nm のラマン測定では、1510 cm^{-1} 付近に C=C 伸縮振動 (ν_1) のバンドが観測され、2次微分スペクトルから H 会合体 (1521 cm^{-1}), J 会合体 (1508 cm^{-1}) 由来のバンドは単量体 (1511 cm^{-1}) のバンドからそれぞれ高波数, 低波数にシフトしていることが分かる (Fig.1B)。同様に、トマトの外皮及び胎座のスペクトルから、*in vivo* における H 会合体及び J 会合体のラマンバンドは 1516 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} に観測されることが分かった。これら、H 会合体, J 会合体, 単量体の $S_0 \rightarrow S_2$ 遷移吸収エネルギー及びラマンシフト ν_1 をプロットすると、Fig.1C のように線型性が確認できた。

$S_0 \rightarrow S_2$ の吸収エネルギーと共役 2 重結合鎖の長さの逆数の間に、線型性があることが多数報告されている [1, 2]。また、溶媒効果によって ν_1 と溶媒の分極率との間に線型性があることも報告されている [3]。これは、溶媒によるサイトシフト効果が電子基底状態に影響を与え、 ν_1 が変化したものと考えられる。そして、 $S_0 \rightarrow S_2$ と ν_1 との間の線型性は、溶媒の極性によるサイトシフト効果によって、有効共役 2 重結合鎖長が変化したことを表していると考えられている。本研究結果での同様に $S_0 \rightarrow S_2$ と ν_1 との間の線型性が確認されたが、この現象は H 会合体及び J 会合体形成におけるエキシトン効果を、会合体に囲まれたリコピン分子が一種のサイトシフト効果のように感じ、有効共役 2 重結合鎖長が変化したものと解釈できる。

最後に、トマト断面のラマンイメージングを行った。主成分分析 (PCA) の主成分 1 (PC1) 及び PC3 のローディングに、H 会合体, J 会合体に特徴的なラマンシグナルが検出された。それぞれの成分のスコアを 2 次元にプロットしたところ、H 会合体, J 会合体の *in vivo* での分布を可視化することに成功した。

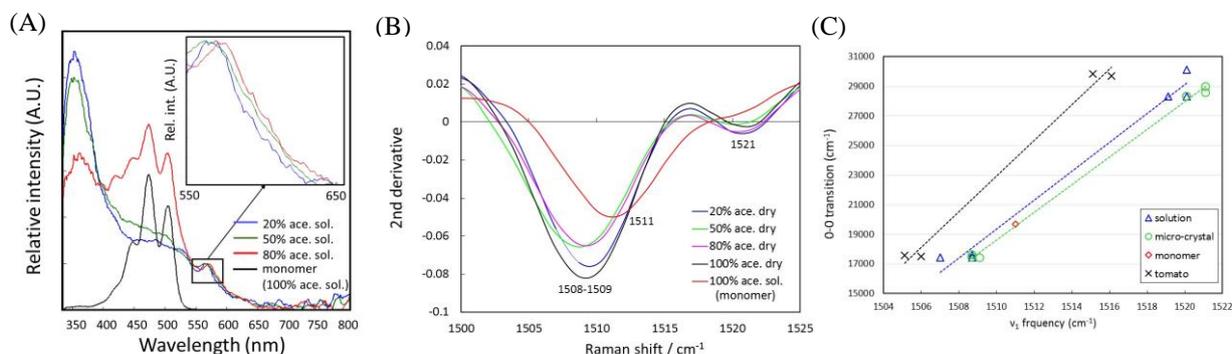


Fig.1 (A) UV-VIS spectra of lycopene acetone/water solutions. (B) The 2nd derivative Raman spectra of lycopene *in vitro* using 532 nm excitation. (C) The plot of the frequency of the ν_1 Raman band (cm^{-1}) at 532 nm excitation versus the $S_0 \rightarrow S_2$ transition energy (cm^{-1}) of lycopene *in vitro* and *in vivo*.

【参考文献】

- [1] R. Hemley *et al. Biophys. J.* **20**(3), 377-382 (1977).
- [2] M. Macernis *et al. J. Phys. Chem.* **118**(10), 1817-1825 (2014).
- [3] M. M. Mendes-Pinto *et al. J. Phys. Chem. B.* **117**(38), 11015-11021 (2013).

【謝辞】

本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」及び JSPS 科研費 JP16H04181, MEXT 科研費 JP24107002 の支援を受けて行った。