

1A04

セラミドのラマンスペクトルにおける鎖長依存性と機能相関

(神戸大院自¹, 神戸大農²)

○橘真未¹, 田中陽子², 土橋慶輔¹, 田中文幸¹, 大野隆², 幡山文一²

【緒言】ヒトの皮膚の最も外側にある角質層には角質細胞が密集し、それらの間は脂質で満たされている。細胞間脂質は二分子膜を形成し、組織化することで角質層の構造安定性や保水性を担っている。細胞間脂質にはセラミド、コレステロール、遊離脂肪酸があり、セラミドが約50%を占めている。スフィンゴ脂質のひとつであるセラミドは、スフィンゴシン塩基と脂肪酸が酸アミド結合した構造をもつ分子であり、疎水性のアルキル鎖やエチレン基と親水性の水酸基やアミド基からなる。セラミドはヘッドグループ構造の置換基の違いによって分類され、ヒトの皮膚の角質層ではセラミド2が最も多く存在する(図1)。

本研究では、ラマン分光法を用いて様々な鎖長のセラミド2を測定することで、セラミドの構造と機能相関について考察する。

【実験方法】脂肪酸鎖の炭素数が2から18までのセラミド2を購入し、試料とした。脂肪酸鎖の炭素数がnのセラミド2をCnセラミドと略す。顕微ラマンスペクトルの測定にはKaiser Optical Systems社製のHolo Probe 532を用いた(分解能5 cm⁻¹)。前処理として微量の試料を十分な量のクロロホルムに溶解させ、溶媒を揮発させてから測定した。また、クロロホルム処理後に十分な量のメタノールで洗浄した試料についても、溶媒を揮発させてから測定した。

【結果と考察】C2セラミド、C8セラミド、C14セラミド、C18セラミドについてクロロホルム処理した後、顕微ラマンスペクトルを測定した(図2)。C2セラミドのC=O伸縮振動領域において、1653 cm⁻¹と1676 cm⁻¹にバンドが観測された。セラミド2はヘッドグループに水酸基を持つことから、C=Oは分子内あるいは分子間で水素結合を形成すると考えられる。理論計算により、1676 cm⁻¹のバンドは分子内水素結合を形成したC=Oに帰属された。

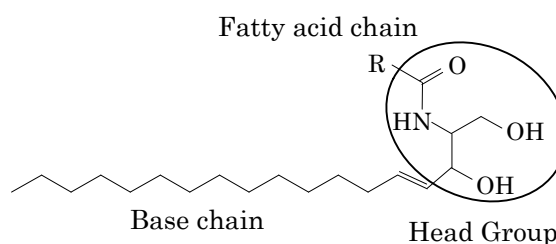


図1 セラミド2の化学構造

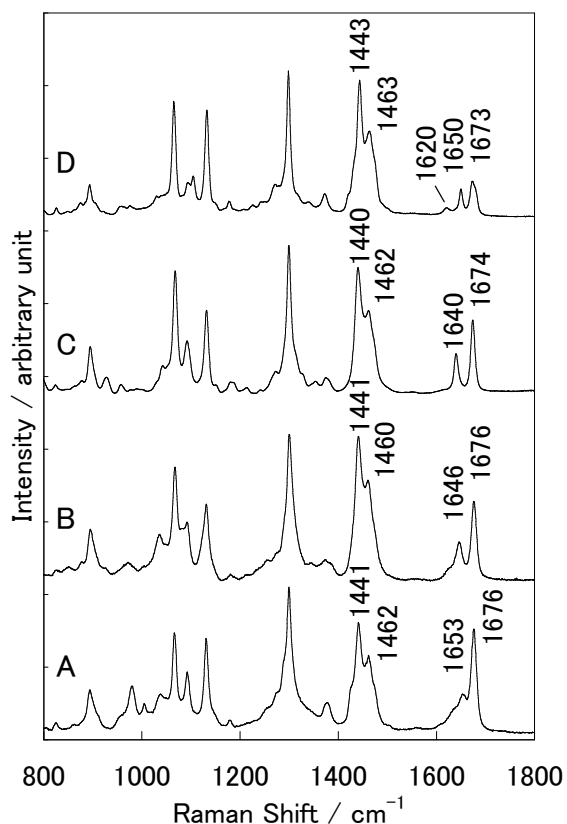


図2 クロロホルム処理したセラミド2のラマンスペクトル: (A) C2セラミド; (B) C8セラミド; (C) C14セラミド; (D) C18セラミド

これより低波数側に観測されたバンドは分子間水素結合を形成した C=O、または、水分子と水素結合した C=O に帰属された。1676 cm^{-1} のバンドは C8 セラミドおよび C14 セラミド、C18 セラミドにおいても観測された。また、1653 cm^{-1} のバンドは脂肪酸鎖の炭素数の増加に伴って低波数側へシフトした。しかし、C14 セラミドで 1640 cm^{-1} までシフトしたのに対し、C18 セラミドではそれよりも高波数側の 1650 cm^{-1} に現れ、1620 cm^{-1} にも弱いバンドが観測された。このことから、脂肪酸鎖の炭素数が 14 以下のセラミド 2 と C18 セラミドでは、分子間水素結合の様式が異なると考えられる。

次に、1400 から 1500 cm^{-1} の CH_2 はさみ振動領域に着目した。いずれの試料も 1440 cm^{-1} と 1460 cm^{-1} 付近にバンドが観測された。C2 セラミドでは 1423 cm^{-1} に弱いバンドが存在した。これはメタノール洗浄することで強度が増大した (図 3)。理論計算から、1440 cm^{-1} および 1460 cm^{-1} 付近のバンドはトランスの立体配座に、1423 cm^{-1} のバンドはゴーシュの立体配座に帰属された。脂肪酸鎖の短いセラミド 2 はメタノールの影響により、一部トランスからゴーシュに立体配座が変化すると考えられる。また、脂肪酸鎖の長いセラミド 2 はトランスの立体配座をとりやすいと考えられる。

アルキル鎖の立体配座に関して詳しい情報を得るために、メタノール洗浄した C2 セラミドについて温度変化測定を行った。32 $^{\circ}\text{C}$ から 36.5 $^{\circ}\text{C}$ までの 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 間隔で測定したときのスペクトルと 38 $^{\circ}\text{C}$ および 40 $^{\circ}\text{C}$ で測定したときのスペクトルを図 4 に示す。スペクトル解析の結果、1423 cm^{-1} および 1476 cm^{-1} のバンドの強度は減少し、1440 cm^{-1} および 1460 cm^{-1} のバンドの強度は増加した。その後、再び 30 $^{\circ}\text{C}$ で測定してもスペクトルに変化は見られず、この立体配座変化は不可逆であることがわかった。したがって、セラミド 2 はアルキル鎖がトランスの状態のほうが、部分的にゴーシュである状態よりもエネルギー的に安定であると思われる。

さらに、水分子を吸着させた試料の顕微ラマンスペクトルから、セラミド 2 の吸湿性についても検討する。

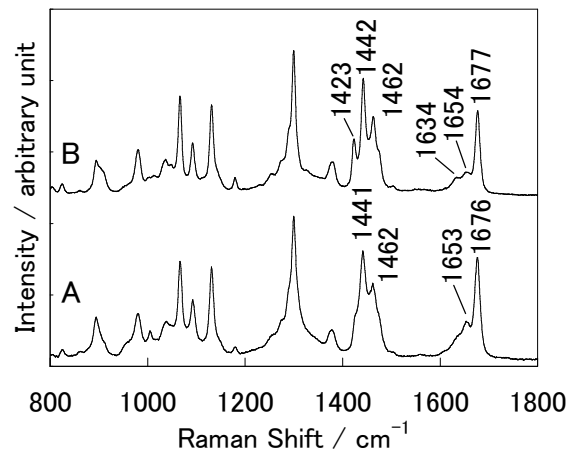


図 3 (A) クロロホルム処理; (B) メタノール洗浄した C2 セラミドのラマンスペクトル

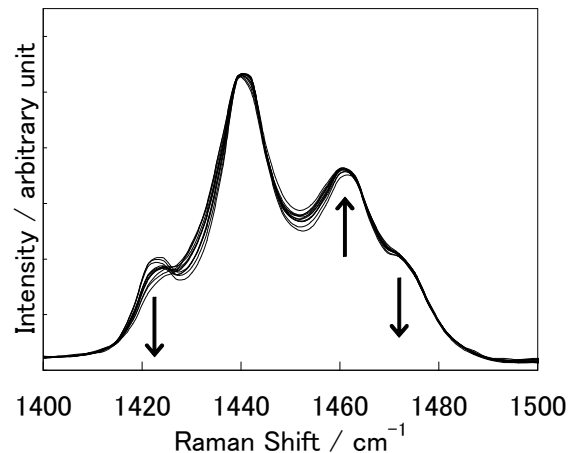


図 4 メタノール洗浄した C2 セラミドのラマンスペクトル: 32 $^{\circ}\text{C}$ から 36.5 $^{\circ}\text{C}$ までの 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 間隔と 38 $^{\circ}\text{C}$ および 40 $^{\circ}\text{C}$ で測定したときのスペクトルを 1440 cm^{-1} の強度で規格化した。矢印は温度上昇に伴うバンド強度の変化を表す。