

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410226

研究課題名(和文) カチオン性オリゴマーの調製と機能探索

研究課題名(英文) preparation and function of cationic oligomers

研究代表者

片野 肇 (KATANO, Hajime)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：50264685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖長のキトサンオリゴ糖，ポリリジン，ストレプトスリシン，長鎖長のキチンオリゴ糖の単離精製法を供した。アミノグリコシド系抗生物質，キチンの定量法を供した。前記単離精製法の利用により、従来見出されてこなかった単鎖長のポリリジンを見出した。有機溶媒可溶のポリリジンを得て、その物性および抗菌性能の評価を行った。同物質は湿潤堅牢性の高い抗菌コート剤となり得る。ポリリジンおよびストレプトスリシンの有機 | 水界面移動反応を観察した。同研究はカチオン性オリゴマーの親水性 / 疎水性を定量的に論じるものであり、この種の生理活性物質の膜透過性の理解に新たな視点を与えるものとなる。

研究成果の概要(英文)：The researcher developed the methods for the separation and purification of large-size chitosan oligosaccharides (J. Chitin Chitosan Sci., 2, 75 (2014)), -poly-L-lysine (Anal. Sci., 31, 1273 (2015)), streptothricin antibiotics (Anal. Sci., 32, 1101 (2015)), and large-size chitin oligosaccharides (Anal. Sci., in press), and the methods for determination of chitin (Anal. Sci., 32, 701 (2016)) and aminoglycoside antibiotics (Anal. Sci., 33, 499 (2017)). The researcher found smaller-size -poly-L-lysine (Appl. Environ. Microbiol. 80, 4993 (2014)). The researcher prepared a water-insoluble polylysine, and presented its application as antimicrobial agent (Biomacromolecules, in press). The researcher also presented the phase-transfer characteristics of -poly-L-lysine and streptothricin across an organic/water interface (J. Electroanal. Chem., 719, 138 (2014); *ibid.*, 754, 143 (2015)).

研究分野：分析化学

キーワード：カチオン性ポリマー オリゴマー ポリリジン キトサンオリゴ糖 ストレプトスリシン アミノグリコシド

### 1. 研究開始当初の背景

ポリカチオン種で重合度( $n$ )が  $n = 5 \sim 15$  程度のオリゴマーは容易に得られないためか、その研究事例はほとんど見られない。しかしながら、カチオン性ポリマーを対象とした酵素安定化効果、反応速度増加効果の研究結果はオリゴマー程度の分子量のものが有望との知見を与える。申請者は $\epsilon$ -ポリリジンを例にポリアミン・塩基性ペプチドの新規単離精製法を開発したところ(Anal. Sci., Vol. 28, 2012, 1153-1157)、同法を用いた蛋白質工学的研究の進展により、 $n = 10$  程度の $\epsilon$ -ポリリジンが得られるようになった(申請時は未発表)。また、予備検討によれば、同精製法の応用により  $n = 5 \sim 9$  のキトサンオリゴ糖も得られつつある。

### 2. 研究の目的

上記を鑑み、本研究ではカチオン性オリゴマー種の(1)分析法の構築および(2)単離精製法の展開を進める。関連して、これら分離法、分析法により、(3)従来得られなかったカチオン性オリゴマー試料を得る。また、従来のカチオン性オリゴマーについても対アニオン置換による物性変換を試みる。また、(4)物性研究法も取り上げ、これらカチオン性オリゴマーの応用の途を探ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1)分析法：新規カチオン性オリゴマー種の検出に繋がることを目指し、膨大な数の試料を対象とできるマイクロプレートアッセイを検討する。(2)と関連して、アニオン性色素との沈殿生成/再溶解による比色分析法を検討する。
- (2)単離精製法：従来のカラム精製に代わり、簡易迅速で工業化にも対応させることを鑑み、沈殿生成/再溶解に基づく単離精製法を検討する。
- (3)新規カチオン性ポリマーおよびオリゴマー：(1)および(2)と関連して、ここでは対アニオン置換による物性変換に注力する。得られた結果に応じ、応用の途を探る。
- (4)物性研究法：酵素反応速度増大効果および油水界面イオン移動ポルタンメトリーについて検討する。

### 4. 研究成果

#### (1)分析法

$\epsilon$ -ポリリジンのマイクロプレートアッセイとこれに続く単離精製：同分析法は黄色のアニオン性色素、ジピクリルアミンと $\epsilon$ -ポリリジンの  $H^+$ 付加体すなわちポリカチオン型との沈殿生成反応と、同沈殿のアセトニトリルへの再溶解、同溶液の比色分析により達成される。その後、塩化ビス(トリフェニルフォスフォラニデン)アンモニウムを加えることで、 $\epsilon$ -ポリリジンの塩酸塩が単離できる。(発表論文)

#### プレートアッセイ

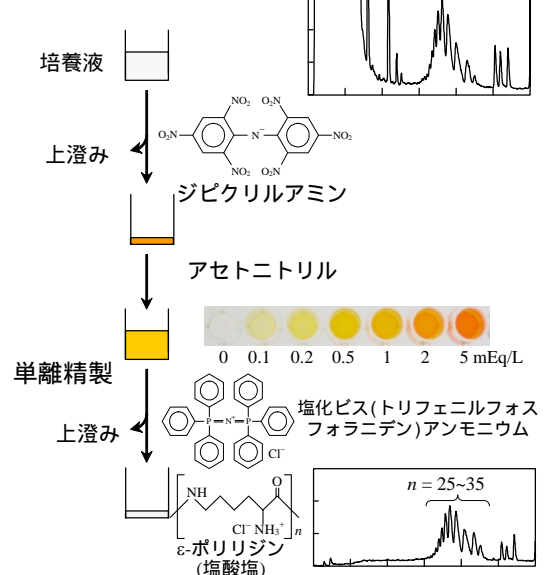


図1  $\epsilon$ -ポリリジンのマイクロプレートアッセイとこれに続く単離精製

ストレプトスリシンのマイクロプレートアッセイ法とこれに続く単離精製法：前記分析法の溶液条件を調節することにより、ストレプトスリシンについても同様の分析・単離が可能となることを示した(発表論文)

アミノグリコシド抗生物質のプレートアッセイ：アミノグリコシドの場合、ゲンタマイシン、トブラマイシン、ネオマイシンといった5, 6価のカチオンとなるものについて赤色のアニオン性色素、アマランスが選択的かつ定量的に沈殿を形成し、これが塩基性溶液に再溶解できることを見出した。この知見に基づくアミノグリコシドのプレートアッセイ法を構築した。(発表論文)

キチン定量法：カチオン種ではないが、キトサンとの関連から取り上げた。酸加水分解によりグルコサミンへと分解し、これに高感度な比色分析法を適用することで、蟹殻中のキチンの定量も可能となることを示した。(発表論文)

#### (2)単離法

$\epsilon$ -ポリリジン：(1)に含まれる。

ストレプトスリシン：(1)に含まれる。

長鎖長キトサンオリゴ糖：重合度4以上のキトサンないしはキチンオリゴ糖にはエリター活性が期待されている。従来のキトサンオリゴ糖試料にはその二量体、三量体およびキチンが含まれる。ビス(2-エチルヘキシル)リン酸との沈殿生成、EtOHへの再溶解(このとき四量体以上のもののみが溶ける)、塩酸添加によるキトサン塩酸の沈殿生成により、四量体以上のキトサンオリゴ糖が得られることを見出した。(発表論文)しかしながら、同試料には顕著なエリター活性が認

められず、次にはキチンオリゴ糖の単離精製を目指すこととなった。

長鎖長キチンオリゴ糖：従来のキチンオリゴ糖試料はむしろ単量体・二量体が主成分である。これらと四量体以上のキチンとでは酸を含む水・エタノール混合溶媒への溶解度が顕著に異なることを見出し、同混合溶媒と接触させるだけで簡便な長鎖長キチンオリゴ糖の単離精製法を構築した（発表論文）。

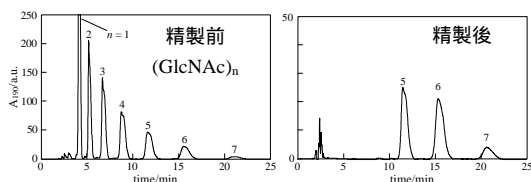


図2 長鎖長キチンオリゴ糖の単離精製

ここでの単離精製法は沈殿生成、再溶解に基づき、溶液操作のみによる。ゆえに従来のカラム精製と比べ、格段に簡易迅速であり、他の天然物に拡張することは興味深い。よって、粗精製サポニンからのソヤサポニン Bb の単離精製を取り上げ、所定の結果を得た。（発表論文）

### (3)新規カチオン性ポリマーおよびオリゴマー

短鎖長のポリリジン：申請時に成果を得つつあった、比較的短鎖長のε-ポリリジンの取得（合成酵素の探索）について、その研究結果を報告した。（発表論文）

イオン液体様ベンザルコニウム：下記の研究に先駆けて、第四アンモニウム塩型抗菌剤である塩化ベンザルコニウムについて、対アニオンをビス(2-エチルヘキシル)リン酸およびビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸に換えることにより有機溶媒に易溶な一方水に不溶とした。ただし、イオン液体様のため少量であれば水に分散するが、この状態でも抗菌性能を発揮することを示した。（発表論文）

有機溶媒可溶ポリリジン：ポリカチオン型ε-ポリリジンとビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸との塩は、それ自身が熱可塑性を持つことに加え、水に難溶である一方、イソプロパノールなどの有機溶媒に易溶であることを見出した。この塩を表面コート剤として用いたところ、優れた抗菌性能を発揮した。このことは、カチオン性ポリマーないしはオリゴマーについて、対アニオンを選ぶことで物性を顕著に変えることができ、その場合でも従来持つ機能を発揮することがある事例であり、今後、この種の薬剤の応用の途を広げる可能性を示す。（業績）

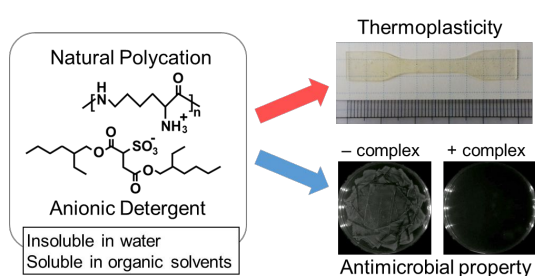


図3 有機溶媒可溶ε-ポリリジン

### (4)物性研究法

反応速度増大効果：負電荷を帯びた酵素(グルコースオキシダーゼ)が、ポリカチオン化ε-ポリリジンとポリイオン複合体を形成することで、負電荷を帯びた基質との静電的反発を低減し、その結果、酵素反応速度を増加させる事例を認めた（*Anal. Sci.*, Vol. 28, 2012, 657-660）。基質の電荷を変えることで、この反応速度増大効果を詳しく調べた。（発表論文）また、この効果に基づくε-ポリリジン分析法を示した。（発表論文）

ポリリジンの油水界面イオン移動反応：ε-ポリリジンのニトロベンゼン | 水界面のイオン移動反応がボルタンメトリー的に観察できることを示した。同法ではイオンの疎水性 / 親水性を定量的に論じることができる。（発表論文）

ストレプトスリシンの油水界面イオン移動反応：の測定法を異なる重合度のリジンオリゴマーを持つストレプトスリジンに適用したところ、オリゴマーサイズの増大と共に移動電位が負電位側にシフトする、簡単に言えば疎水性が増すと結果を得た。このことはカチオン性ポリマー、オリゴマー種の膜透過性の理解に新たな視点を与えるものである。（発表論文）

### (5)その他

今後、フルオラス溶媒を用いるイオン種の抽出を検討する。その為の基礎的知見を得るために、フルオラス溶媒 | 水界面のイオン移動ボルタンメトリーの実験系を構築し（発表論文）いくつかのイオン種について溶媒間移行ギブスエネルギーを決定した。（発表論文）

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 16 件)

K. Ushimaru, Y. Hamano, and H. Katano, "Antimicrobial activity of ε-poly-L-lysine after forming a water-insoluble complex with an anionic surfactant", *Biomacromolecules*, 査読有, in press.

H. Katano, K. Uematsu, Y. Kurada, and T. Osakai, "Ion Transfer at the Interface between Water and Fluorous Solvent 1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-Decafluoropentane", *J. Electroanal. Chem.*, 査読有, Vol. 796, 2017, 82-87. DOI: 10.1016/j.jelechem.2017.01.060

H. Katano, S. Noba, K. Sato, and H. Kimoto, "Solubility-Based Separation and Purification of Large Chitin Oligosaccharides with an Organic-Water Mixed Solvent", *Anal. Sci.*, 査読有, Vol. 33, No. 5, 2017, 639-642. DOI: 10.2116/analsci.33.639

H. Katano, Y. Kuroda, S. Taira, C. Maruyama, and Y. Hamano, "Colorimetric Microtiter Plate Assay of Polycationic Aminoglycoside Antibiotics in Culture Broth Using Amaranth", *Anal. Sci.*, 査読有, Vol. 33, No. 4, 2017, 499-504. DOI: 10.2116/analsci.33.499

H. Katano, Y. Kuroda, and K. Uematsu, "Applicability of Fluorous Solvent 1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-Decafluoropentane to a Non-Aqueous Medium in Liquid-Liquid Electrochemistry", *J. Electroanal. Chem.*, 査読有, Vol. 788, 2017, 232-234. DOI: 10.1016/j.jelechem.2017.01.060

H. Katano, Y. Kuroda, C. Maruyama, and Y. Hamano, "Separation of Streptothricin Antibiotics from Culture Broth with Colorimetric Determination using Dipicrylamine", *Anal. Sci.*, 査読有, Vol. 32, No. 10, 2016, 1101-1104. DOI: 10.2116/analsci.32.1101

K. Uematsu, T. Ueno, K. Ushimaru, C. Maruyama, Y. Hamano, and H. Katano, "Colorimetric method to detect  $\epsilon$ -poly-L-lysine using glucose oxidase", *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, Vol. 120, No. 4, 2016, 513-518. DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.03.005

H. Katano, M. Takakuwa, H. Hayakawa, and H. Kimoto, "Determination of Chitin Based on the Colorimetric Assay of Glucosamine in Acidic Hydrolysate", *Anal. Sci.*, 査読有, Vol. 32, No. 6, 2016, 701-703. DOI: 10.2116/analsci.32.701

K. Uematsu, C. Maruyama, Y. Hamano, and H. Katano, "Ion-transfer voltammetry of streptothricin antibiotics with differently sized lysine oligomers at a nitrobenzene | water interface", *J. Electroanal. Chem.*, 査読有, Vol. 754, 2015, 143-147. DOI: 10.1016/j.jelechem.2015.07.003

H. Katano, Y. Kasahara, K. Ushimaru, C. Maruyama, and Y. Hamano, "Separation and Purification of  $\epsilon$ -Poly-L-lysine with Its Colorimetric Determination using Dipicrylamine", *Anal. Sci.*, 査読有, Vol. 31, No. 12, 2015, 1273-1277. DOI: 10.2116/analsci.31.1273

H. Katano, H. Kimoto, S. Taira, and T. Tsukatani, "Physicochemical Properties and

Antimicrobial Performance of Benzyl-dimethylalkylammonium Bis(2-ethylhexyl) Phosphate", *Sens. Mater.*, 査読有, Vol. 27, No. 5, 2015, 359-364.

DOI: 10.18494/SAM.2015.1074

H. Katano, N. Okamoto, M. Takakuwa, S. Taira, T. Kambe, and M. Takahashi, "Simple and Rapid Separation of Soyasaponin Bb from a Soy Extract", *Anal. Sci.*, 査読有, Vol. 31, No. 2, 2015, 85-89.

DOI:10.2116/analsci.31.85

Y. Hamano, N. Kito, A. Kita, Y. Imokawa, K. Yamanaka, C. Maruyama, and H. Katano, " $\epsilon$ -Poly-L-lysine peptide-chain length regulated by the linkers connecting the transmembrane domains of  $\epsilon$ -poly-L-lysine synthetase", *Appl. Environ. Microbiol.* 査読有, Vol. 80, No. 16, 2014, 993-5000.

DOI:10.1128/AEM.01201-14

K. Uematsu, Y. Minami, C. Maruyama, Y. Hamano, and H. Katano, "Voltammetric study of the transfer of  $\epsilon$ -poly-L-lysine at nitrobenzene | water interface", *J. Electroanal. Chem.*, 査読有, Vol. 719, 2014, 138-142.

DOI:10.1016/j.jelechem.2014.02.015

H. Katano, A. Fujiwara, and H. Kimoto, "Separation and Purification of Oligochitosan Based on Precipitation with Bis(2-ethylhexyl) phosphate Anion, Re-dissolution, and Re-precipitation as the Hydrochloride Salt", *J. Chitin Chitosan Sci.*, 査読有, Vol. 2, No. 1, 2014, 75-78. DOI:10.1166/jcc.2014.1041

K. Uematsu, Y. Minami, S. Taira, and H. Katano, "Promotion and Suppression Effects of Cationic Polymer  $\epsilon$ -Poly-L-lysine on the Glucose Oxidase Reaction with Ferrocene Derivatives as Oxidants with Different Charges", *Anal. Sci.*, 査読有, Vol. 30, No. 2, 2014, 299 - 303.

DOI:10.2116/analsci.30.299

[学会発表](計 15 件)

野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇, 大豆粗精製サポニンおよび大豆粉末からのソヤサポニン Bb の単離精製, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 15 回高山フォーラム, 2016 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

寺澤晴香, 平 修, 植松宏平, 片野 肇, 酸加水分解物の単糖比色分析に基づくキチンおよびデンプンの定量法, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 15 回高山フォーラム, 2016 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

黒田康裕, 丸山千登勢, 濱野吉十, 片野 肇, ジピクリルアミンアニオンを用いるストレプトスリシンの比色分析と単離精製, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 15 回高山フォーラム, 2016 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

上野隆晃, 片野 肇, 植松宏平,  $\gamma$ -ポリリジンの有する酵素反応速度増大効果を利用したポリアニオンの定量, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 15 回高山フォーラム, 2016 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

上野隆晃, 片野 肇, 植松宏平, アミノグリコシド系抗生物質のグルコースオキシダーゼ酵素反応速度増大効果, 荻新太郎, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 15 回高山フォーラム, 2016 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

上野隆晃, 牛丸和乗, 丸山千登勢, 濱野吉十, 片野 肇, グルコースオキシダーゼを用いた  $\gamma$ -ポリリジンの比色分析, 植松宏平, 第 76 回分析化学討論会, 2016 年 5 月, 岐阜大学(岐阜県岐阜市).

野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇, 粗精製サポニンおよび大豆からのソヤサポニン Bb の単離精製, 第 76 回分析化学討論会, 2016 年 5 月, 岐阜大学(岐阜県岐阜市).

黒田康裕, 平 修, 丸山千登勢, 濱野吉十, 片野 肇, アマランスおよびテトラフェニルボレートを用いるアミドグリコシド系抗生物質の比色分析, 第 76 回分析化学討論会, 2016 年 5 月, 岐阜大学(岐阜県岐阜市).

野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇, 粗精製サポニンおよび大豆からのソヤサポニン Bb の単離精製, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 14 回高山フォーラム, 2015 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

黒田康裕, 丸山千登勢, 濱野吉十, 平 修, 片野 肇, アマランスおよびテトラフェニルボレートを用いるアミドグリコシド系抗生物質の比色分析, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 14 回高山フォーラム, 2015 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

笠原由博, 牛丸和乗, 丸山千登勢, 濱野吉十, 片野 肇, ジピクリルアミンを用いる  $\gamma$ -ポリリジンの比色分析および単離精製, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 14 回高山フォーラム, 2015 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

芝 鮎美, 植松宏平, 平 修, 片野 肇, ポリリジンの示す酵素反応速度増大効果の応用展開, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 13 回高山フォーラム, 2014 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市).

山本裕貴, 片野 肇, 岡本宣弘, 高橋正和, “大豆抽出物からのサポニン分子種の単離精製”, 「分析中部・ゆめ 21」若手交流会第 13 回高山フォーラム, 2014 年 11 月, 高山市図書館煥章館(岐阜県高山市). 植松宏平, 南 裕人, 平 修, 丸山千登勢, 濱野吉十, 片野 肇, 鎖長の異なる

リジンオリゴマーを持つストレプトスリシンのイオン移動ボルタンメトリー, 第 60 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 2014 年 11 月, 京都工芸繊維大学(京都府京都市).

植松宏平, 南 裕人, 平 修, 丸山千登勢, 濱野吉十, 片野 肇, “抗生物質ストレプトスリシンのニトロベンゼン/水界面におけるイオン移動ボルタンメトリー”, 日本分析化学会第 63 年会, 2014 年 9 月, 広島大学(広島県東広島市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片野 肇(KATANO, Hajime)  
福井県立大学・生物資源学部・教授  
研究者番号: 50264685

### (2) 研究分担者

なし( )

### (3) 連携研究者

なし( )

### (4) 研究協力者

なし( )