

令和元年6月22日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14503

研究課題名(和文) 酵素を用いた有機系多価イオンの簡易・高感度分析法の確立

研究課題名(英文) Development of a sensitive and easy method for analysis of organic multivalent ions using an enzyme

研究代表者

植松 宏平 (Uematsu, Kohei)

福井県立大学・生物資源学部・講師

研究者番号：30547584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：天然物・合成物ともに、有用な有機系の多価イオン物質は広く存在し、その簡易・高感度分析法が必要とされている。研究代表者は、これまで  $\gamma$ -poly-L-lysineがある種の酵素反応速度を劇的に増大させる知見を見出し、これが  $\gamma$ -poly-L-lysineの多価カチオン性に起因することを突き止めた。本研究ではこの知見に基づいて、酵素を用いた多価イオン物質の簡易・高感度分析法の構築を行った。実際に構築した分析法により、0.1ppmレベルの多価カチオン高感度定量分析ができること、また同原理に基づく1  $\mu$ eqMレベルのポリアニオン分析が可能であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素を用いて多価イオン物質を簡便かつ高感度に分析できる手法を開発した。同法は市販の試薬を混ぜるだけで可能であり、多価カチオンの場合では、吸光度計を用いれば0.1 ppmレベルでの定量分析が行える。目視でも同レベルの半定量分析が行え、他の多価イオン比色分析法と比較して十分高い感度を示す。本法はその操作の簡便さと高い感度特性から、多価イオンが関与する基礎・応用研究ならびに品質管理などの実際利用において、極めて有効な分析法の一つになりうると期待される。

研究成果の概要(英文)：Useful natural and synthetic multivalent ions widely exist, and an easy and high sensitive analytical method for the multivalent ions has been required. The representative researcher previously found a significant promotion effect of  $\gamma$ -poly-L-lysine on an enzymatic reaction, and reveal that the effect is due to the polycationic property of  $\gamma$ -poly-L-lysine. In this study, based on the information, a novel analytical method for multivalent ion using enzyme has been developed. The method allowed for the determination of a multivalent cation at 0.1 ppm level, and was also capable of determining polyanions at 1  $\mu$ eqM level.

研究分野：分析化学

キーワード：多価カチオン ポリアニオン 酵素 比色分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

天然物・合成物ともに、有機系の多価イオン物質は広く存在する。よって、簡易・迅速な高感度多価イオン検出・定量法は、様々な分野で重宝される。多価イオン物質の分析は、通常、イオン会合反応を利用する。その高感度分析には、沈殿・濾過・再溶解・抽出等の濃縮過程を必要とする場合が多い。仮に、これら実験操作を大幅にカットできる多価イオン高感度分析法が構築できれば、操作の簡易化はもちろん、スクリーニング法の構築といった、さらなる分析法の展開が見込める。また、多価イオン物質が関与する諸研究の加速度的発展に大きく貢献できる。

### 2. 研究の目的

我々グループでは、フェリシアン化物イオン( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ )を酸化剤とするグルコースオキシダーゼ( $\text{GO}_x$ )酵素反応の反応速度が、多価カチオン性の $\epsilon$ -ポリリジン( $\epsilon\text{PL}$ )を共存させることで1万倍も増大する知見を見出し、これを利用した $\epsilon\text{PL}$ 分析法、スクリーニング法を開発してきた。同速度増大効果は $\epsilon\text{PL}$ の多価カチオン性と高い水溶性に起因すると考えられる。故にこの $\epsilon\text{PL}$ 分析法は水溶性の高い多価カチオン物質分析法として拡張できると期待される。またこの速度増大効果は、多価カチオン物質の電荷数の影響を強く受けると予想される。故に、同分析法は電荷数をより多く持つ多価カチオン選択的な分析法になり得ると期待される。さらに、ポリカチオン物質はポリアニオン物質と定量的なポリイオン複合体を形成する。故に、同法はポリアニオン物質の高感度分析法にも応用できると予見される。これら期待される分析法の構築に関する検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 多価カチオン高感度定量法の確立

$\epsilon\text{PL}$ 以外の多価カチオン物質においても提案する高感度分析法が適用可能か、分析事例の比較的多い多価カチオン物質、ポリヘキサメチレンピグアナイド(PHMB, 図1)を対象とした検討を行った。PHMBはコンタクトレンズ洗浄液や入浴施設の除菌剤などに広く用いられており、1 ppmレベルでの簡易分析法が必要とされている。まずPHMBが同酵素反応の速度増大効果を示すことを確認し、速度増大効果のPHMB濃度依存性を検討した。最大の速度増大効果が得られるPHMB濃度で、酵素反応速度の $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 濃度依存性を検討し、ミカエリス・メンテンの速度式を用いて同効果を定量的に評価した。次に基質濃度大過剰の条件で、酵素反応量とPHMB濃度の関係を明らかにし、酵素反応量に基づくPHMB高感度定量法の検討を行った。従来の $\epsilon\text{PL}$ 定量法では、酵素反応の初速度を用いた手法を採用していたが、ここでは酵素反応量に基づく手法に改良することで、提案する分析法のさらなる高感度化を目指した。

#### (2) 速度増大効果における多価カチオンの正電荷数の影響に関する検討と、電荷数の多い多価カチオン選択的な分析法の構築

$\epsilon\text{PL}$ の速度増大効果は、正電荷を持つ $\epsilon\text{PL}$ と負電荷を持つ $\text{GO}_x$ との複合体形成により生じる。故に多価カチオン物質の正電荷数は、同速度増大効果に強く影響することが予想される。また $\epsilon\text{PL}$ は+25~+35個の正電荷を持つ物質である。故に、より正電荷数が少ない多価カチオン物質においても同効果が現れるかには興味もたれる。そこで、正電荷数の異なる一連のストレプトスリシン(ST)、構造の類似したアミノグリコシド抗生物質(AG)を用いて、速度増大効果における多価カチオンの正電荷数の効果を検討した。AGにはネオマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、カナマイシン、ストレプトマイシンを用いた。酵素反応速度の多価カチオン濃度依存性・ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 濃度依存性を調べ、 $\text{GO}_x$ と多価カチオンの相互作用・速度増大効果における電荷数の影響を検討した。またこれら多価カチオン物質を対象とする高感度分析法の構築に取り組み、同法の正電荷数に対する選択性の検討を行った。実分析への応用として、ST生産菌の培養液に適用し、本法が電荷数の多い多価カチオン選択的検出法として利用できるか検討した。

#### (3) ポリアニオン分析法の構築

ポリカチオン物質はポリアニオン物質と定量的なポリイオン複合体を形成する。故にポリアニオン物質は、多価カチオンの示す $\text{GO}_x$ 酵素反応速度増大効果を定量的に妨害することが予想され、提案する分析法はポリアニオン分析法としても利用できることが期待される。ポリアニオンとして、ポリビニル硫酸、ポリスチレンスルホン酸、アルギン酸、ポリアクリル酸、ヘパリンを用いた。 $\epsilon\text{PL}$ の速度増大効果に対するポリアニオンの妨害効果が現れるか調べ、妨害効果のポリアニオン濃度依存性を検討した。また所定のpHにおけるポリアニオンの電荷量をコロイド滴定により求めた。これらの結果よりポリアニオンの電荷量に基づく検量線を作製し、検討した全てのポリアニオンの検量線が実験誤差内で一致するかを調べ、提案する分析法の妥

当性を検証した。本法の実試料分析への応用として、本法による血漿中ヘパリンの分析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 多価カチオン高感度定量法の確立

多価カチオンとして PHMB を用いた結果、PHMB も同酵素反応速度を増大させることが分かった。酵素反応速度の PHMB 濃度依存性から、PHMB と GOx との複合体形成反応が定量的に起こること、酵素反応速度の  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  濃度依存性から、PHMB で活性化される GOx 酵素反応もミカエリスメンテンの速度式で解析できることがわかった。そのミカエリス定数と触媒定数は  $\epsilon\text{PL}$  で活性化された GOx 酵素反応の値と大きく変わらず、PHMB の速度増大効果が、 $\epsilon\text{PL}$  と同程度であることが確認できた。

酵素反応量に基づく PHMB 高感度分析法構築のため、基質（グルコースと  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ）濃度大過剰の条件下で酵素反応を進行させた。反応時間が 30 分の間では、反応速度が不変となる酵素反応条件を見出した。酵素反応量は PHMB 濃度に対し線形的に増大し、酵素反応量に基づく PHMB 定量法を構築できた。この手法による検出限界は 0.027 ppm であり、プレートリーダーを用いて 0.1 ppm レベルの定量分析、また同レベルの目視による半定量分析が可能であることがわかった（図 1）。この分析感度は PHMB の比色分析法としてはトップクラスである。反応初速度を利用した従来法と比較して、5 倍程度の高感度化が達成できた。

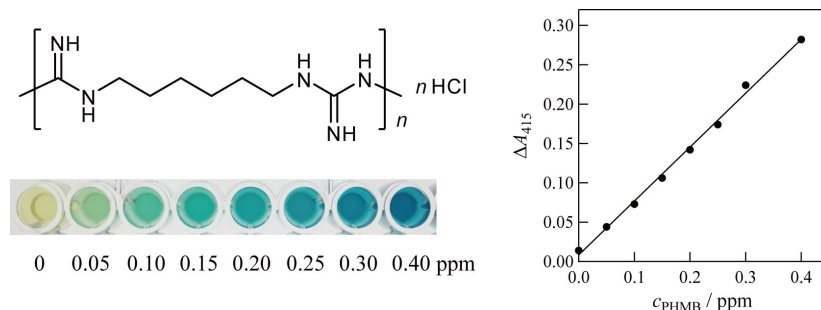


図 1 ポリヘキサメチレンビグアナイド(PHMB)の構造と提案する手法による PHMB の分析結果。

##### (2) 速度増大効果における多価カチオンの正電荷数の影響に関する検討と、電荷数の多い多価カチオン選択的分析法の構築

ST と AG とともに、同酵素反応の速度増大効果を示すことが確認でき、数価程度の多価カチオン物質でも同効果を示すことが確認できた。ST と AG の濃度依存性の検討から、多価カチオン物質の正電荷数が増大するほど、GOx との相互作用が増大すること、また得られる速度増大効果も増大することが確認できた（図 2）。これらの結果は、同効果を利用した分析法が、正電荷数を多く持つ多価カチオン選択的な分析法になり得ることを支持する。実際に ST と AG を同分析法により検討した結果、正電荷数が増えるほど検出感度が高くなった（図 2）。同法の実分析への応用として ST 生産菌の培養液に適用した結果、正電荷数の多い ST 生産菌のスクリーニング法に応用できることが確認できた。

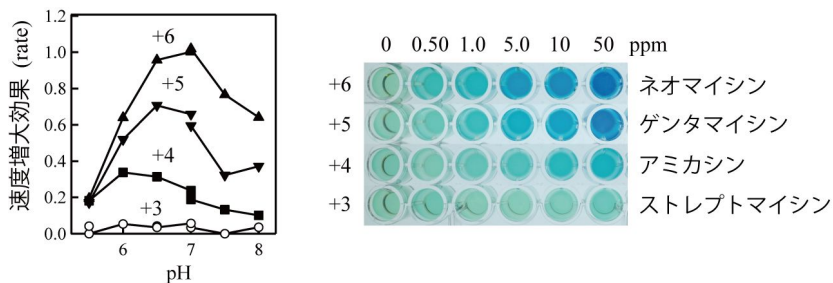


図 2 アミノグリコシド(AG)の速度増大効果における電荷数の効果と提案する手法による AG の分析結果。

### (3) ポリアニオン分析法の構築

検討したすべてのポリアニオンにおいて、 $\epsilon$ PL 速度増大効果の妨害効果が確認された。この妨害効果のポリアニオン濃度依存性を検討した結果、ポリアニオンの妨害効果が定量的に起こることが分かった。電荷量に基づく検量線を作製した結果、検討したすべてのポリアニオンにおいて、それら検量線が実験誤差内で一致し、同法によるポリアニオン定量分析が可能であることが分かった。その検出限界は電荷量換算で  $0.3 \mu\text{eqM}$  であり、吸光度計を用いた簡易分析法としては十分高い分析感度を示した。同法の実分析への応用として、血漿中のヘパリン分析に適用した結果、血漿中  $1 - 8 \text{ unit/mL}$  のヘパリン分析が可能であり、実分析にも耐えうる分析性能を有することが確認できた。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) K. Uematsu, A. Shinozaki, and H. Katano, "Determination of polyhexamethylene biguanide utilizing a glucose oxidase enzymatic reaction", *Anal. Sci.* in press. <https://doi.org/10.2116/analsci.19P095>
- (2) K. Uematsu, T. Ueno, and H. Katano, "Effect of  $\epsilon$ -poly-L-lysine on a glucose sensor based on glucose and ferricyanide ion", *Anal. Sci.* **34**, 947-951 (2018). <https://doi.org/10.2116/analsci.18P114>
- (3) K. Uematsu, T. Ueno, H. Kawasaki, C. Maruyama, Y. Hamano, and H. Katano, "Promotion effect of streptothricin on a glucose oxidase enzymatic reaction and its application to a colorimetric assay", *Anal. Sci.* **34**, 143-148 (2018). <https://doi.org/10.2116/analsci.34.143>

### 〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) グルコースオキシダーゼ酵素反応を利用したヘキサメチレンピグアナイドの分析, 植松宏平, 篠崎淳人, 片野 肇, 日本分析化学会第 66 年会, 2018 年 9 月, 仙台市 .
- (2) ポリリジンの酵素反応速度増大効果を利用したポリアニオン分析法の検討, 植松宏平, 上野隆晃, 片野 肇, 第 78 回分析化学討論会, 2018 年 5 月, 宇部市 .
- (3) 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増大効果とその比色分析への応用, 植松宏平, 荻真太郎, 上野隆晃, 片野 肇, 第 77 回分析化学討論会, 2017 年 5 月, 京都市 .
- (4)  $\epsilon$ -ポリリジン-グルコースオキシダーゼ複合体固定化電極の特性評価, 上野隆晃, 片野 肇, 植松宏平, 2017 年電気化学秋季大会, 2017 年 9 月, 長崎市

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。