

## 高い抗エイズウイルス作用を持つカードラン硫酸の合成

Synthesis of Curdlan Sulfates with Potent Anti-AIDS Virus Activity

吉 田 孝\*・瓜 生 敏 之\*

Takashi YOSHIDA and Toshiyuki URYU

## 1. は じ め に

エイズ<sup>1)</sup>に対して有効な薬剤は現在米国 FDA から AZT (2', 3'-ジデオキシ-3-アジドチミジン) が認可されており<sup>2)</sup>, AZT 耐性の場合には, DDI (ジデオキシイノシン)<sup>3)</sup>によって治療することが許されている. また, 最近, 第3のエイズ薬として AZT と併用して用いる条件で DDC も認可された<sup>4)</sup>. これらはすべて核酸系のエイズ薬であり, エイズウイルス自身が持つ, RNA から DNA を合成する逆転写酵素の働きを阻害する作用である. しかし, 強い副作用や耐性ウイルスの出現<sup>5)</sup>など新たな薬剤の開発が急がれている.

われわれはこれまでに硫酸化多糖が高い抗エイズウイルス作用を持つことを見出し<sup>6)</sup>, 特に天然多糖カードランをピペリジン硫酸で硫酸化したカードラン硫酸が高い抗エイズウイルス作用を持ち, しかも低毒性であることを報告した<sup>7), 8)</sup>. 作用機構は核酸系エイズ薬とは異なりエイズウイルスがヒトの T 細胞に感染することを防ぐ吸着阻害である. したがって, 耐性ウイルスの出現などの心配はない. そこで今回は, カードランをピペリジン硫酸, ピリジン-SO<sub>3</sub> 錯体, クロルスルホン酸などによって硫酸化を行い, 抗エイズウイルス作用や毒性, 活性におよぼすカードラン硫酸のらせん構造などの影響について検討した.

## 2. 実 験

## (1) ピペリジン硫酸による硫酸化

カードラン 0.5g (0.0031 モル) を乾燥 DMSO 50ml に溶解し, ピペリジン硫酸 1.16g (0.0070 モル) を加え, 85°C で 45 分攪拌した. 氷欲を用いて冷却し, 飽和重炭酸ナトリウム (重曹) 水溶液 30ml を加えた. その溶液にアセトン (約 400ml) を加えることによりカードラン硫酸を沈殿させ, 遠心分離, アセトン洗浄を 3 回繰り返したあと, 再びイオン交換水 50ml に溶解させ, イオン

交換水で 1 日透析した. 濃縮後, 凍結乾燥を行いカードラン硫酸 0.40g を得た.

(2) ピリジン-SO<sub>3</sub> 錯体による硫酸化

カードラン 0.50g (0.0031 モル) を乾燥ピリジン 50ml に分散させ, よく攪拌させながらピリジン-SO<sub>3</sub> 錯体 6.0g (0.0377 モル) を加え, 85°C で 1 時間攪拌を続けた. 氷欲を用いて冷却し, 10% NaOH 水溶液を反応液が完全にアルカリ性を示すまでゆっくり加えた. アセトンを加え上層を分離し, さらに下層をアセトンで 2 回洗浄し, ピリジンを取り除いた. その下層を透析膜に移し, イオン交換水で 1 日透析後, 中性となっていることを確認し, 濃縮, 凍結乾燥を行った. 収量 1.20g.

## (3) クロルスルホン酸による硫酸化

クロルスルホン酸 4.4g (0.0332 モル) の乾燥ピリジン液 (80ml) にカードラン 0.50g (0.0031 モル) を加え 100°C で 1 時間攪拌した. 反応終了後, 氷欲を用いて冷却し, 10% NaOH 水溶液を反応液が完全にアルカリ性を示すまでゆっくりと加えた. アセトンを加え, 上層を分離後, 下層をアセトンで洗浄し, イオン交換水で 1 日透析した. 濃縮し凍結乾燥を行った. 収量 1.22g.

## 3. 結 果

カードランは *Alcaligenes faecalis* ver *myxogenes* 10C3K 菌株が作る 1, 3-β 結合を持つ直鎖状天然多糖<sup>9)</sup>で食品添加物として使われている (図 1). 表 1 には硫酸化の結果を示す. ピペリジン硫酸による硫酸化は最も温和な条件で反応が進み, ピペリジン硫酸の添加量を変化させることにより, 元素分析値から計算した硫酸化度が 0.35~1.6 のカードラン硫酸が得られた (1~4). ピリジン-SO<sub>3</sub> 錯体では, カードランを構成するグルコース単位当たり 7.6~15.2 倍 (モル数) を用いたところ, 硫酸化度 2.2~2.6 のカードラン硫酸が得られた. カードランは溶媒のピリジンには溶けないので硫酸化には過剰の硫酸化剤が必要となる. また比旋光度は, -7.1~-19.9° となりピペリジン硫酸によって硫酸化したものに比べ,

\*東京大学生産技術研究所 第 4 部

## 研 究 速 報

Table 1 Sulfation of curdlan

Curdlan <sup>a</sup>	Sulfating reagent <sup>b</sup> g (mol per glucose)	Temp	Time	Yield	$\bar{M}_n$	$[\alpha]_D^{25c}$	Elemental analysis			DS
		°C	min	g	$\times 10^4$	deg	C	H	S	
1	1.16 (2.0)	65	30	0.54	-	-	31.88	5.07	5.6	0.4
2	1.16 (2.0)	85	30	0.53	12.1	-3.8	24.05	3.58	12.1	1.1
3	1.16 (2.0)	85	45	0.40	4.6	+0.1	21.02	3.17	14.4	1.6
4	2.32 (4.0)	85	60	0.66	2.0	-1.5	21.19	3.38	14.8	1.6
5	3.0 (7.6)	85	120	0.43	4.7	-7.1	16.19	2.68	15.6	2.2
6	3.0 (7.6)	85	240	0.79	12.4	-19.9	16.35	2.72	17.7	2.5
7	6.0 (15.2)	85	60	1.20	5.4	-14.9	16.22	2.59	16.5	2.4
8	6.0 (15.2)	85	120	1.30	6.3	-13.9	14.59	2.38	16.5	2.6
9	2.2 (6.3)	100	60	1.08	1.2	-16.0	15.84	2.40	18.0	2.6
10	2.2 (6.3)	100	120	0.96	1.2	-15.4	15.03	2.48	19.0	2.8
11	4.4 (12.6)	100	60	1.22	1.3	-22.0	14.80	2.31	19.4	2.9
12	17.5 (50.0)	100	60	0.90	3.5	-23.4	14.62	2.49	20.0	3.1

a) Curdlan: 0.5 g. b) 1~4: Piperidine N-sulfonic acid, 5~8: Pyridine-SO<sub>3</sub> complex, 9~12: Chlorosulfonic acid. c) Measured in H<sub>2</sub>O (c 1%).

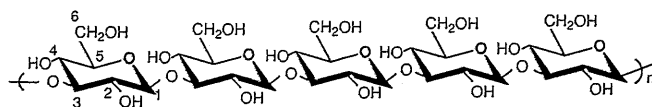


Figure 1. Curdlan

負の大きな値となった。クロルスルホン酸によって硫酸化したカードラン硫酸の比旋光度も負の $-16.0 \sim -23.4^\circ$ となり、硫酸化度は $2.6 \sim 3.1$ であった。図2の(A)はピペリジン硫酸、(B)はピリジン-SO<sub>3</sub>錯体、(C)はクロルスルホン酸で硫酸化した<sup>13</sup>C NMR スペクトルである。帰属は2次元 NMR によって行った。互いによく似たスペクトルであるが、Aでは硫酸基未置換のC6 (63ppm) 吸収が完全に消失して70ppmに移動した。BとCでは完全に消失していない。硫酸基は先ず初めに6位の水酸基に入りやすい。このNMRの結果と硫酸化度(表1)は合わない。BとCでは透析などで取りきれなかった無機の硫酸塩などがカードラン硫酸に取り込まれて残っている可能性がある。

## (2) 抗エイズウイルス活性

図3はエイズウイルスの存在下(斜線)とエイズウイルスを入れない系でのMT-4細胞を3日および6日間培養したときの生細胞数(縦軸)と抗原陽性(折れ線、右縦軸)におよぼすカードラン硫酸(横軸)の影響について調べた結果である(間接蛍光抗体法)。Aはピペリジン硫酸、Bはピリジン-SO<sub>3</sub>錯体で硫酸化したカードラン硫酸である。6日後、A、Bどちらも $3.3 \mu\text{g/ml}$ の濃度で抗原陽性率は0となり、完全にエイズウイルスの増殖を抑制したことが分かった。MT-4細胞はコント

ロール(濃度 $0 \mu\text{g/ml}$ )とほぼ同じくらい増殖しているので細胞毒性は低いと考えられる。しかし、Aでは $5000 \mu\text{g/ml}$ 加えても細胞毒性は示さないのに対し、Bでは $100 \mu\text{g/ml}$ から毒性が見られた。Bでは硫酸化度とNMRの測定結果が一致しないことなどから残留した無機の硫酸塩などの影響かもしれない。

クロルスルホン酸によって硫酸化したカードラン硫酸の抗エイズウイルス作用はMTT法によって調べた<sup>10)</sup>(表2)。EC<sub>50</sub>はエイズウイルスによるMT-4細胞の細胞障害を50%保護する濃度で抗エイズウイルス作用を示している。CC<sub>50</sub>はカードラン硫酸の50%細胞障害濃度で細胞毒性を表し、SIはSelectivity Indexでこの値が大きいほど全体的に抗エイズウイルス活性が高いことを示している。クロルスルホン酸で硫酸化したカードラン硫酸のEC<sub>50</sub>は、基準として用いているカードラン硫酸と同じ高い値を示し、分子量が低いにもかかわらず活性が高いことが分かった。また、 $1000 \mu\text{g/ml}$ 加えてもMT-4細胞は正常に増殖するので、細胞毒性は低いものと考えられる。

## 4. 考 察

今回合成したカードラン硫酸の分子量は1万~12万(数平均分子量)であった。高い抗エイズウイルス作用

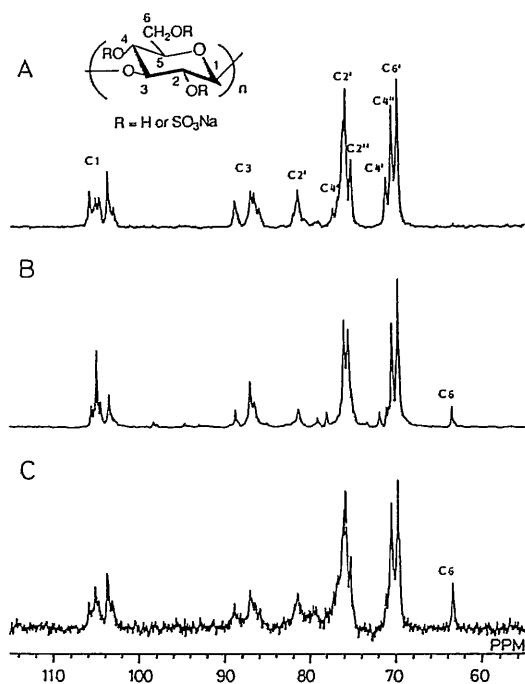
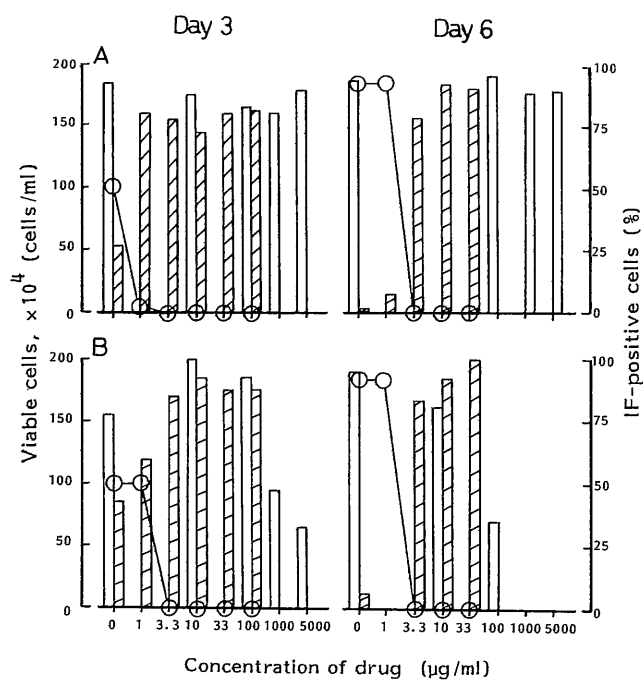


Table 2 Anti-AIDS Virus Activity of Curdylan sulfates prepared by chlorosulfonic acid

Run	S content %	DS <sup>a</sup>	$\bar{M}_n^b$ $\times 10^4$	EC <sub>50</sub> <sup>c</sup> $\mu\text{g/ml}$	CC <sub>50</sub> <sup>d</sup> $\mu\text{g/ml}$	SI <sup>e</sup>
9	18.0	2.6	1.3	0.3	>1000	3300
10	19.0	2.8	1.2	0.2	>1000	5000
11	19.4	2.9	1.3	0.5	>1000	2000
CS <sup>f</sup>	14.1		7.9	0.43	>1000	2330

a) The degree of sulfation per glucose unit.  
 b) Determined by GPC. c) 50% Effective concentration.  
 d) 50% Cytotoxic concentration. e) Selectivity index, CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.  
 f) Standard curdylan sulfate.

Figure 2. 67.8 MHz <sup>13</sup>C NMR spectra of curdylan sulfates (D<sub>2</sub>O as solvent at 37°C). (A) S=14.4%, prepared by piperidine-N-sulfonic acid, (B) S=16.5%, by pyridine-SO<sub>3</sub> complex, and (C) S=19.4%, by chlorosulfonic acid.Figure 3. The inhibitory effects of curdylan sulfates on cell growth and HIV-induced cytopathic effects (CPE). (A) Prepared by piperidine-N-sulfonic acid and (B) prepared by pyridine-SO<sub>3</sub> complex. Open bars: MT-4 cells. Slash bars: MT-4 cells and HIV-infected cells (0.2%). Open circles: The percentage of IF-positive cells.

## 研 究 速 報

を示すためには、高い硫酸化度が必要であり、ペリジン硫酸を用いて硫酸化した場合、硫酸化度を上げると分子量が低下する傾向があった<sup>8)</sup>。カードラン硫酸はエイズ治療薬として使う場合、静脈注射するので、他のタンパク質や酵素に影響をおよぼさないためにも分子量は低いほうが望ましい。クロルスルホン酸で硫酸化した場合は(表1, 2), 分子量は12000~13000でしかも高い抗エイズウイルス作用を示した。この結果は見かけの硫酸化度が高くなったためではなく、カードラン硫酸の立体構造が活性に関与しているのではないかと考えた。

固体状態でのカードランは、X線構造解析結果から三重らせん構造をとっている<sup>11)</sup>。カードランは水やピリジンなどの有機溶媒には溶けない。しかし、DMSOや希アルカリ水溶液には溶け、三重らせんから一重らせん構造となることが知られている<sup>12)</sup>。DMSOには溶けるので、ペリジン硫酸で硫酸化するとらせん構造はくずれて棒状の分子になっていると考えられる。そこで、らせん構造が抗エイズウイルス作用におよぼす影響について調べるために、カードランをピリジンに分散させた状態でピリジン-SO<sub>3</sub>錯体、クロルスルホン酸による硫酸化を試みた。カードランや合成したカードラン硫酸はピリジンには溶けないので、らせん構造を保っていると思われる。しかし、硫酸化度を上げるためには多量の硫酸化剤が必要であった。表1の元素分析の結果、硫酸化度が上がったにもかかわらず、NMR測定(図2)から6位の水酸基は完全に硫酸基に置換されなかった。このことは、らせん構造の内側にも6位の水酸基が向くために最も硫酸化されやすいと考えられる1級の6位水酸基の硫酸化が妨げられたのではないかと推定した。溶媒に溶けない状態で硫酸化したカードラン硫酸の比旋光度は-20°前後、DMSOに溶かして硫酸化したものでは0°前後になることから、らせん構造を示唆しているが、現在、色素による吸光度の測定やX線回折測定などの検討を行っている。また、元素分析値から計算した硫酸化度の上昇は(表2), らせんに取り込まれた無機硫酸塩などが透析を行った後でも取り残されたためではないかと考えている。

ペリジン硫酸で硫酸化した場合には、6位が完全に硫酸基に置き変わり、しかも2位にも導入されないと高い抗エイズウイルス作用は発現されないことに比べ<sup>6), 7)</sup>

ピリジン-SO<sub>3</sub>錯体、クロルスルホン酸で硫酸化したものでは、6位に水酸基が残っている状態(図2)でも高い抗エイズウイルス作用を示した(図3, 表2)。これらのことから、カードラン硫酸のらせん構造は抗エイズウイルス作用に大きく関係していると考えられる。

(1992年7月13日受理)

## 参 考 文 献

- 1) S. Broder, Ed., AIDS Modern Concepts and Therapeutic Challenges; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987.
- 2) H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. T. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7096 (1985).
- 3) H. Mitsuya, R. Yarchoan, and S. Broder, Science, 249, 1533 (1990).
- 4) Chem. Eng. News (Am. Chem. Soc.), April 27, 1992, p. 24.
- 5) B. A. Larder, G. Darby, and D. D. Richman, Science, 243, 1731 (1989).
- 6) a) H. Nakashima, O. Yoshida, T. Tochikura, T. Yoshida, T. Mimura, Y. Kido, Y. Motoki, Y. Kaneko, T. Uryu, and N. Yamamoto, Jpn. J. Cancer Res, 78, 1164 (1987). b) 吉田 孝, 瓜生敏之, 生産研究, 42, 626 (1990) c) 吉田 孝, 瓜生敏之, 生産研究, 43, 335 (1991).
- 7) Y. Kaneko, O. Yoshida, R. Nakagawa, T. Yoshida, M. Date, S. Ogiwara, S. Shioya, Y. Matsuzawa, N. Nagashima, Y. Irie, T. Mimura, H. Shinkai, N. Yasuda, K. Matsuzaki, T. Uryu, and N. Yamamoto, Biochem. Pharmacol., 39, 793 (1990).
- 8) T. Yoshida, K. Hatanaka, T. Uryu, Y. Kaneko, E. Suzuki, H. Miyano, T. Mimura, O. Yoshida, and N. Yamamoto, Macromolecules, 23, 3717 (1990).
- 9) T. Harada, M. Masada, K. Fujimori, I. Maeda, Agric. Biol. Chem., 30, 196 (1966).
- 10) R. Pauwels, J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, and E. De Clercq, J. Virol. Methods, 20, 309 (1988).
- 11) a) Y. Deslandes, R. H. Marchessault, and A. Sarko, Macromolecules, 13, 1466 (1980). b) R. H. Marchessault, Y. Deslandes, K. Ogawa, and P. R. Sundararajan, Can. J. Chem., 55, 300 (1977).
- 12) H. Sato and M. Yokoi, Bull. Chem. Soc. Jpn, 62, 392 (1989).