

硫酸化アルキルキトオリゴ糖の合成と その抗エイズウイルス活性

Synthesis and Anti-HIV Activity of Sulfated Alkyl Chito-oligosaccharide

鬘谷 要*・石川 慎一**・市川 剛***・後藤 和博****・瓜生 敏之*

Kaname KATSURAYA, Shin-ichi ISHIKAWA, Tsuyoshi ICHIKAWA, Kazuhiro GOTO and Toshiyuki URYU

1. はじめに

現在世界的に蔓延している後天性免疫不全症候群(エイズ)には、多方面から盛んに研究が行なわれ様々な新しい事実が明らかになってきている。しかし治療法としては決定的なもの完成されていない現状であり、臨床的には、いくつかの副作用の強い核酸系薬剤が認められているだけである¹⁾²⁾。また、プロテアーゼインヒビター(酵素活性阻害剤)も臨床薬としてAZT等と併用で効果を挙げている、しかし、これも交差耐性ウイルスの問題があるとされている³⁾。

これまでに我々は、カードラン硫酸に代表される多糖硫酸化物に認められていた高い抗エイズウイルス活性に着目し硫酸化多糖系抗エイズウイルス剤を研究してきた⁴⁾⁵⁾。現在、カードラン硫酸は、米国においてPhase I/IIの臨床試験を実施している。これらの知見を基に、高い抗エイズウイルス活性を保持しつつ、分子量を十分小さくし、多糖硫酸化物が持つ抗凝血活性をできる限り抑えた薬剤として、硫酸化アルキルオリゴ糖を分子設計し、その効果的な合成法および、その高い抗エイズウイルス活性と十分低い抗凝血活性について報告してきた。これまでに糖鎖骨格としてラミナリオリゴ糖及びマルトオリゴ糖を用い、直鎖の長鎖アルキル基を導入することで非常に高い抗エイズウイルス活性を発現し得ることが明らかになった⁶⁾⁻¹¹⁾。一方、最近2-アミノ糖の多糖であるキチンやキトサンがその高い生体親和性や生理活性の面から注目されてきている¹²⁾¹³⁾。そこで、本研究では、オリゴ糖骨格としてキトオリゴ糖を用い、新規な構造を有する硫酸化アルキルキト

オリゴ糖の合成について検討を行ない、一定の割合でアルキル鎖の導入された硫酸化アルキルキトオリゴ糖を合成し、この化合物の抗エイズウイルス活性についても評価した。また、コンピュータを用いた三次元構造の予測より活性と構造について考察した。

2. 実験方法

2.1 フタルイミド化・アセチル化 平均重合度7、平均分子量1200のキトオリゴ糖を原料として用いた。ジメチルホルムアミド(DMF)中、130℃でアミノ基に対して1当量の無水フタル酸を加え7時間攪拌し、2-フタルイミド化体とし、これを単離せず、引き続き無水酢酸とピリジンを加え室温で36時間攪拌した。収率79%でフタルイミド・アセチル化体を得た。

2.2 チオフェニル化 フタルイミド・アセチル化体を、1,2-ジクロロエタン中、0.5当量のヨウ化亜鉛存在下フェニルチオトリメチルシラン(4.5当量)と攪拌することにより、57%の収率でチオフェニル化体を得た。

2.3 グリコシル化 1.5当量のN-ヨウ化こはく酸イミド(NIS)存在下、ジクロロメタン中0℃で、トリフルオロメタンスルホン酸(4当量)を滴下し、さらに3時間攪拌することにより、収率84%でグリコシル化体を得た。

2.4 脱保護 グリコシル化体をメタノール中室温でアセチル基の0.3当量のナトリウムメトキシドと反応させた後に、H⁺型イオン交換樹脂で中和しほぼ定量的に脱アセチル化物を得た。これを大過剰のヒドラジンを含むエタノール中80℃で攪拌しフタルイミド基を外した。

2.5 硫酸化 乾燥ピリジン中で三酸化硫黄ピリジン錯体を硫酸化剤として糖の水酸基に対して2~3当量用いて85℃で90分攪拌し硫酸化を行った。反応後、水酸化バリウムで過剰の三酸化硫黄ピリジン錯体を中和し、糖の硫酸エステル部分をイオン交換樹脂でナトリウム塩とし水-アセ

*東京大学生産技術研究所 第4部

**旭電化工業(株)

***元工学院大学工学部

****キャノン精機(株)

トン系の再沈殿にて精製し水から凍結乾燥して生理活性評価のためのサンプルとした。

2.6 抗エイズウイルス活性の評価

種々の濃度の試験物質と共に感染直後の HIV 感染 MT-4 細胞 (2.5×10^4 /well, MOI=0.01) と, 試験物質の MT-4 細胞に対する細胞毒性を知るために, ウイルス非感染細胞を同様に炭酸ガスインキュベーター中 37°C 5 日間培養し MTT 法によって生存細胞数を測定し抗エイズウイルス活性を評価した¹⁴⁾。抗エイズウイルス活性は, HIV 感染による細胞傷害を 50% 抑制する濃度 EC_{50} と, 薬剤単独での細胞傷害が 50% に達する濃度 CC_{50} で表した。

2.7 三次元分子構造計算

CAChe (CAChe Scientific 社製分子構造計算プログラム) を用いて, 硫酸化ドデシルキトペンタオシドと硫酸化ドデシルラミナリペンタオシドの構造を分子力場計算により求めた。糖鎖間の結合は, エーテル結合の酸素原子の両側の結合について 15° 刻みで回転させ, 最も安定な二面角を求めた。このようにして求めた構造を初期構造として, Conjugate Gradient 法を用い 0.0001 kcal/mol の精度で MM2 パラメータを用いて安定構造を算出した。

3. 実験結果

キトオリゴ糖の保護では, フタルイミド基とアセチル基が共に正確に導入されたことが NMR により確認された。また, チオフェニル化並びにグリコシル化においても, 事前にモデルとした単糖の場合に比較して遜色無い収率で, 目的物を与えた。各段階で精製を行った結果, この段階では, ほぼすべての分子にアルキル差が導入されたことが NMR により確認された。しかしながら, 脱保護ではフタルイミド基を除去する際に, 導入したアルキル基が部分的

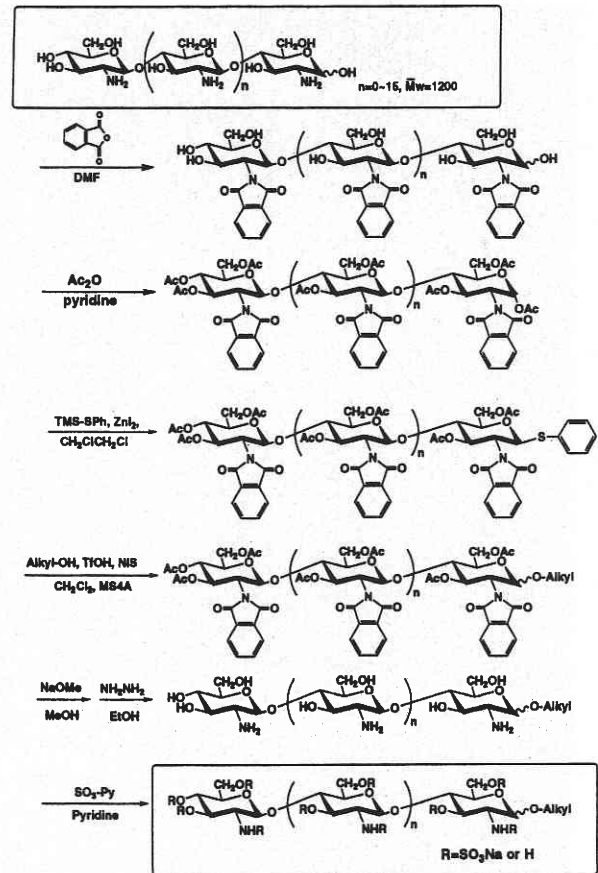


図1 硫酸化アルキルキトオリゴ糖の合成

にはずれてしまう事が分かり, この段階でのアルキル鎖導入率は 50~70% であった。この脱フタルイミド化に関しては, 反応時間, 温度等の条件を種々変えて試みたが, アルキル鎖の脱離を防ぐことは出来なかった。硫酸化に際して

表1 硫酸化アルキルキトオリゴ糖および硫酸化アルキルラミナリオリゴ糖の抗エイズウイルス活性

Sample	Number of glucose unit	Carbon number of alkyl chain	Anti-HIV activity ^a $\text{EC}_{50}(\mu\text{g/ml})$	Cytotoxic effect ^b $\text{CC}_{50}(\mu\text{g/ml})$	SI ^c ($\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$)
Sulfated octyl chito-oligosaccharide	7	8	8	>1000	>250
Sulfated dodecyl chito-oligosaccharide	7	12	6	740	250
Sulfated chito-oligosaccharide	7	0	138	>1000	>14
Sulfated octyl laminari pentaoside	5	8	0.6	>1000	>1700
Sulfated dodecyl laminari pentaoside	5	12	0.2	>1000	>5000
Curdian sulfate	--	0	0.2	>1000	>5000

^aDrug concentration effective for 50% inhibition of virus infection in 5 days HIV-infected MT-4 cell culture.

^bDrug concentration for 50% cytotoxicity in 5 days MT-4 cell culture.

^cSelectivity Index.

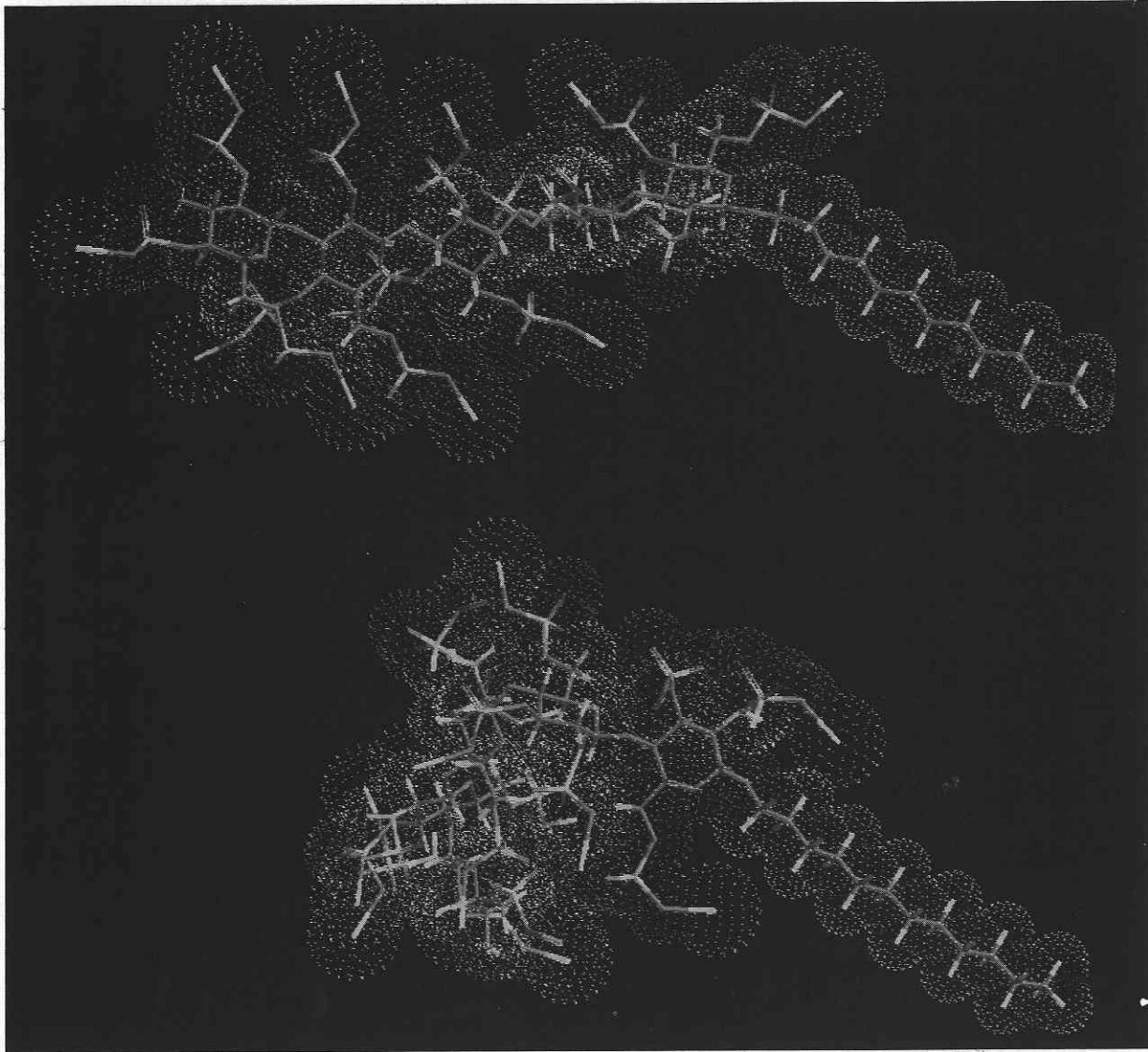


図2 硫酸化ドデシルラミナリペンタオシド (上) および硫酸化ドデシルキトペンタオシド (下) の分子力場計算による三次元構造

は、アルキル鎖の切断は認められずに、最終的にアルキル鎖導入率は50~70%程度を保持した。

本化合物の抗エイズウイルス活性の評価の結果を硫酸化アルキルラミナリオリゴ糖の結果と併せて表1に示した。表中の EC_{50} 値よりオクチル基を導入した場合 ($EC_{50}=8\mu\text{g/ml}$) も、ドデシル基を導入した場合 ($EC_{50}=6\mu\text{g/ml}$) も、アルキル鎖を導入する前 ($EC_{50}=138\mu\text{g/ml}$) に比べて、活性が向上していることが分かる。硫酸化時の溶媒については、ジメチルスルホキシド (DMSO) についても試みたが、抗エイズウイルス活性試験の結果よりピリジンの方が優れていることが分かった。

抗エイズウイルス活性という点では、キトオリゴ糖骨格

を用いても、活性を発現できることが分かったが、従来合成してきた硫酸化アルキルラミナリオリゴ糖や硫酸化アルキルマルトオリゴ糖と比較すると、やや低いものであった。

三次元分子構造計算の結果を、図2に示した。硫酸化ドデシルキトペンタオシドが、硫酸化ドデシルラミナリペンタオシドに比べて、糖鎖骨格の直線性が低く、分子全体の長さが短いことが示された。

4. 考 察

硫酸化アルキルキトオリゴ糖が、抗エイズウイルス活性を有することおよび、アルキル鎖の導入により活性が有意に向上することから、*in vitro*では硫酸化アルキルラミナ

リオリゴ糖等と同様のメカニズムで、抗エイズウイルス活性を発現しているものと考えられている。つまり、エイズウイルスのエンベロープ糖タンパクである gp120 と、ヒトリンパ球のレセプターである CD4 との接着を、gp120 へ硫酸化アルキルキトオリゴ糖が接触することで、物理的に、あるいは gp120 のコンフォメーションを変化させることで阻害することにより活性を発現しているものと考えられている。gp120 への硫酸化アルキルオリゴ糖の結合部位と考えられている部位はリジン、アルギニンの NH_3^+ 基によりプラスチャージの連続する部分で、gp120 のアミノ酸配列の506番目から518番目と予想されている。

一方、これまでの研究結果と合わせて、アルキル基導入の効果は抗エイズウイルス活性が親水疎水のバランスに支配されるものでないことから、典型的な界面活性型効果によるものではなく、アルキル部分とウイルス表層の脂質部分との親和性に依るのではないかと推察している。

さらに相互作用部位のコンピュータによる三次元モデリングによる分子サイズの考察などから、オリゴ糖鎖長が5糖程度のもので覆われるのではないかと考えられ、このことはラミナリやマルトオリゴ糖で糖鎖長が5糖以上で活性が一定していることにより支持されている。硫酸化ドデシルキトペンタオシドの分子力場法による構造計算結果により、硫酸化ドデシルラミナリペンタオシドと比較して分子全体の長さが短い可能性が示唆されたが、このことが gp120 との相互作用の大きさに影響を与え、活性を低下させている可能性も考えられる。

本化合物（アルキル鎖導入率約60%）が、抗エイズウイルス活性の点で、硫酸化アルキルラミナリオリゴ糖（アルキル鎖導入率100%）に劣る理由としては、アルキル鎖の脱離が最も寄与していると考えられている。表1に示した通り、キトオリゴ糖骨格においても、アルキル鎖を導入することで活性が向上することが確認されていることより、アルキル鎖の導入率を向上させることにより、現在よりは活性を向上させることが出来ると考えられている。

米国の Kozbor¹⁵⁾ らの報告によれば、多糖硫酸化物であるカードラン硫酸の抗エイズウイルス活性発現において、エイズウイルスがヒトリンパ球である T4 細胞に接着した後に T4 細胞の表層の膜分子を破壊する段階を阻害することが重要なメカニズムの一つであることが明らかになってきた。このことより硫酸化アルキルオリゴ糖においても類似のメカニズムで活性を発現している可能性が予想されている。

5. ま と め

硫酸化アルキルキトオリゴ糖が、抗エイズウイルス活性

を発現し、これまでに合成してきた硫酸化アルキルラミナリオリゴ糖等と同じく、アルキル鎖の導入が活性向上に寄与している事が明らかとなった。三次元分子構造解析の結果より、キトオリゴ糖骨格の直線性がラミナリオリゴ糖骨格に比べて低いことが示唆された。（1996年12月27日受理）

参 考 文 献

- 1) D.D. Richman, M.A. Fischl, M.H. Grieco, M.S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J.E. Groopman, D. Mildvan, M.S. Hirsch, G.G. Jackson, D.T. Durack, S. Nusinoff-Lehrman, AZT Collaborative Working Group, *N. Engl. J. Med.*, **317**, 192 (1987).
- 2) B.A. Larder, G. Darby, D.D. Richman, *Scienc*, **243**, 1731 (1989).
- 3) J.H. Condra, W.A. Schleif, O.M. Blahy, L.J. Gabryelski, D.J. Graham, J.C. Quintero, A. Rhodes, H.L. Robbins, E. Roth, M. Shivaprakash, D. Titus, T. Yang, H. Tepler, K.E. Squires, P.J. Deutsch, E.A. Emini, *Nature*, **374**, 569 (1995).
- 4) K. Hatanaka, T. Yoshida, S. Miyahara, T. Sato, F. Ono, T. Uryu, H. Kuzuhara, *J. Med. Chem.*, **30**, 810 (1987).
- 5) Y. Kaneko, O. Yoshida, R. Nakagawa, T. Yoshida, M. Date, S. Ogihara, T. Shiyoya, Y. Matsuzawa, H. Shinkai, N. Yasuda, K. Matsuzaki, T. Uryu, N. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 793 (1990).
- 6) T. Uryu, N. Ikushima, K. Katsuraya, T. Shoji, N. Takahashi, T. Yoshida, K. Kanno, T. Murakami, H. Nakashima, and N. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 2385 (1992).
- 7) K. Katsuraya, N. Ikushima, N. Takahashi, T. Shoji, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Yoshida, T. Uryu, *Carbohydr. Res.*, **260**, 51 (1994).
- 8) K. Katsuraya, T. shoji, K. Inazawa, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Uryu, *Macromolecules*, **27**, 6695 (1994).
- 9) K. Katsuraya, T. Shibuya, K. Inazawa, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Uryu, *Macromolecules*, **28**, 6697 (1995).
- 10) K. Katsuraya, T. Uryu, *SEISAN-KENKYU*, **47**, 185 (1995).
- 11) K. Katsuraya, T. Uryu, *SEISAN-KENKYU*, **48**, 165 (1996).
- 12) S. Nishimura, Y. Ikeuchi, S. Tokura, *Carbohydr. Res.*, **134**, 305 (1984).
- 13) S. Nishimura, N. Nishi, S. Tokura, K. Nishimura, I. Azuma, *Carbohydr. Res.*, **146**, 251 (1986).
- 14) R. Pauwels, J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, E. De Clercq, *J. Virol. Methods*, **20**, 309 (1988).
- 15) P. P. Jagodzinski, R. Wiaderkiewicz, G. Kurzawski, M. Kloczewiak, H. Nakashima, E. Hyjec, N. Yamamoto, T. Uryu, Y. Kaneko, M. R. Posner, D. Kozbor, *Virology*, **202**, 735 (1994).