

高い抗エイズウイルス活性を有する硫酸化 アルキルオリゴ糖の構造と活性

Structure and Activity of Sulfated Alkyl Oligosaccharide Having Potent Anti-HIV Activity

髪 谷 要*・瓜 生 敏 之*
Kaname KATSURAYA and Toshiyuki URYU

1. はじめに

すでに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、多方面から盛んに治療法の研究が行われているが完治に至る治療法は見出されていない。強い副作用を持ち長期服用で耐性の生じる核酸系のものがいくつか認可されているだけであり^{1),2)}、延命効果が期待できるのみの状況となっている。また、次期治療薬として注目され盛んに研究されているプロテアーゼインヒビター（酵素活性阻害剤）も、交差耐性ウイルス問題が明らかになるなど³⁾治療に関しては明るい局面へは向かっていない。ワクチンへの期待が高まっている。

我々は、以前より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、カードラン硫酸に代表される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 の臨床試験が実施されており、その有効性が確認されつつある⁶⁾。

これらの知見を基に、我々は高い抗エイズウイルス活性と低副作用を持ちながら硫酸化多糖に比べ分子量の低い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を調べた。その糖鎖及びアルキル鎖の絶対的および相対的長さ、抗エイズウイルス活性、細胞毒性、抗凝血活性などとの相関について報告してきた^{7),8)}。これまでの知見により、ラミナリオリゴ糖骨格では糖鎖長が5~9の間では抗エイズウイルス活性はほぼ一定で、抗凝血活性のみが糖鎖長と共に増加すること、アルキル鎖が炭素数で18以上と特に長い場合、低いながらも一定の細胞毒性を示すことが分かった⁹⁾。

今回は、さらに短い糖鎖長で高活性の硫酸化アルキルオリゴ糖を合成するためラミナリテトラオース（4糖）糖骨格での抗エイズウイルス活性を調べた。さらに5糖のラミ

ナリペンタオースにアルキル部分として光学活性基や環状構造を持つ化合物の合成を行いその抗エイズウイルス活性に与える影響について評価した。

2. 実験方法

2.1 ラミナリオリゴ糖の合成とアセチル化

糖鎖長4のラミナリテトラオースはカードランをジメチルスルホキシド中、希塩酸を用いて化学的に加水分解して得たラミナリオリゴ糖混合物から、活性炭を充てん剤とし、エタノール・水系溶媒を用いたカラムクロマトにより分離精製した。(Fig. 1)

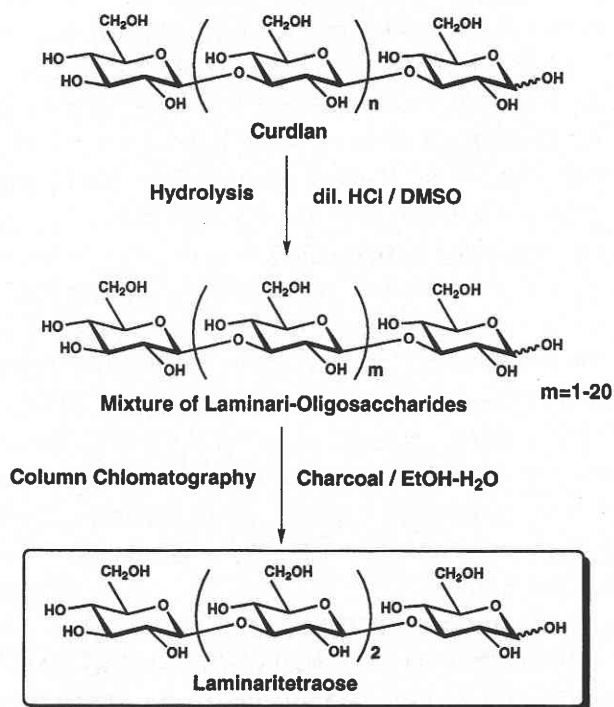


Fig. 1 ラミナリテトラオースの合成

*東京大学生産技術研究所 第4部

研 究 速 報

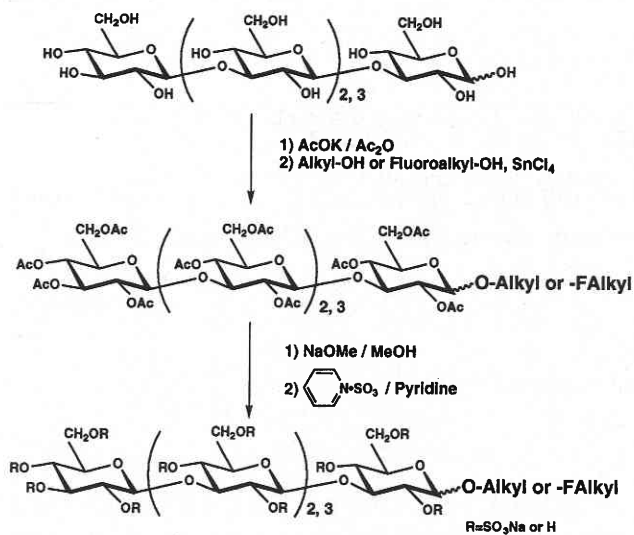


Fig. 2 硫酸化アルキルラミナリテトラオシドおよびペンタオシドの合成

糖鎖長5のラミナリペンタオースはカードランを酵素を用いて生化学的に選択的に分解して得た。これらの純粋なラミナリオリゴ糖は酢酸カリウム存在下、無水酢酸中で環流し、β-アセチル体が優先的に生成するようにアセチル化を行いラミナリオリゴ糖パーアセテートを得た。

2.2 アルキルオリゴ糖の合成

アルキルラミナリペンタオシドは、ルイス酸触媒として塩化スズ (IV) を用い塩化メチレン中でラミナリオリゴ糖パーアセテートを種々のアルキルアルコールと反応させることにより合成し、シリカゲルカラムで精製した。得られたアセチル化アルキルラミナリオリゴ糖を、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で処理した後に、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されたアルキルオリゴ糖を得た。

2.3 アルキルオリゴ糖の硫酸化

アルキルラミナリオリゴ糖を乾燥ピリジンに溶解させ、85℃まで加熱し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2.2当量添加し、温度を保持して90分間窒素下で攪拌し硫酸化を行った。反応終了後、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。一連の合成ルートを Fig. 2 に示した。

2.4 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 × 10⁴/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℃ 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¹⁰⁾。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 EC₅₀で表し、薬剤の持つ細胞毒性を薬剤単独での細胞傷害が50%に達する濃度 CC₅₀で表した。

3. 実験結果

ラミナリテトラオース、ラミナリペンタオースともにアセチル化はほぼ定量的に進行し、β/α 比が3.2~3.8のパーアセテートが得られた。これらアセチル化ラミナリオリゴ糖と今回検討した種々のアルコールとの反応の結果を Table 1 に示す。

また、同様の方法を適用し、Table 2 に示すように、光学活性アルコール、脂環式アルコール、芳香族環を持つアルコールともグリコシル化反応を行った。

通常のアシル鎖では45~70%の収率で配糖体を与えているが、フッ素を含む場合は、以前から認められた傾向の通り、20%台まで収率が低下した¹¹⁾。一方、シクロヘキ

Table 1 Synthesis of peracetylated alkyl laminaritetraoside by stannic chloride catalyst^a

sample	peracetylated laminaritetraose		alkyl alcohol		yield %
	mg	(mmol) ^b	mg	(eq.) ^c	
L4C4	200	(0.16)	24	(2.0)	45
L4C8	200	(0.16)	41	(2.0)	55
L4C12	200	(0.16)	60	(2.0)	54
L4C2F10	130	(0.10)	180	(3.0)	28

^aStannic chloride was used 2.0eq. to acetylated oligosaccharide. ^bEquivalent to acetylated oligosaccharide. ^cEquivalent to acetylated oligosaccharide.

Table 2 Synthesis of peracetylated alkyl laminaripentaosides by stannic chloride catalyst^a

sample	laminaripentaose peracetate mg	alkyl alcohol		yield %
		alkyl portion	mg (eq.) ^b	
L5C(+)-2Oc*	250		42(2.0)	50
L5C(-)-2Oc*	250		42(2.0)	54
L5C*HM	250		37(2.0)	47
L5C35DM*H	250		42(2.0)	55
L5PhC6	300		70(2.0)	70

^aStannic chloride was used 2.0eq. to acetylated oligosaccharide. ^bEquivalent to peracetylated oligosaccharide.






サノールのような脂肪族の2級アルコールとの反応においてもそれほど大きな収率の低下は認められず、目的とする配糖体を得ることができた。実際に反応に参加するのがβアセテートのみであることを考慮に入れば、比較的良好な収率と考えられる。

これらの配糖体アセチル化物を脱保護後、硫酸化した物について抗エイズウイルス活性を評価した。評価の結果をTable 3に示した。

糖鎖長を4糖に固定しアルキル鎖長を4から12の間で変化させたところ炭素数が8以下ではアルキル鎖長の減少と共に抗エイズウイルス活性も有意に減少する傾向が認められた。この傾向は以前に報告したラミナリペンタオースの場合と同じであるが、アルキル鎖として炭素数12のものを導入した場合においても抗エイズウイルス活性は、EC₅₀値で3.2 μg/mlとペンタオース骨格の場合に比べて有意に低いことが分かった。フルオロアルキル基を導入した場合でも3.3 μg/mlと同程度にとどまり、高い抗エイズウイルス活性を発現するためには、ラミナリオリゴ糖骨格で5糖以上が必須であることが示された。

そこで次に、この5糖に着目し光学活性アルキル基を導入した。互いに光学異性である(+)、(-)2-オクチル基と、

Table 3 The anti-HIV activity of sulfated alkyl laminarioligosaccharides and sulfated polysaccharides

sample	alkyl portion	anti-HIV activity ^a EC ₅₀ (μg/ml)	cytotoxic effect ^b CC ₅₀ (μg/ml)	SI ^c (CC ₅₀ /EC ₅₀)
laminaritetraoside				
L4C4S	-C ₄ H ₉	24	>1000	>42
L4C8S	-C ₈ H ₁₇	14	>1000	>71
L4C12S	-C ₁₂ H ₂₅	3.2	>1000	>310
L4C2F10	-C ₂ H ₄ C ₁₀ F ₂₁	3.3	>1000	>300
laminaripentaoside				
L5C(+)-2Oc*		0.75	>1000	>1300
L5C(-)-2Oc*		0.65	>1000	>1500
L5C ^c HM		0.73	>1000	>1400
L5C35DM ^c H		0.66	>1000	>1500
L5PhC6		0.40	>1000	>2500
Curdlan sulfate ^d	—	0.18	>1000	>2500
Dextran sulfate	—	0.65	>1000	>1500

^aConcentration of the drug inhibiting 50% virus infection. ^bDrug concentration for 50% cytotoxicity. ^cSelectivity index. ^dCurdlan sulfate with molecular weight of 79 x 10³ was used for measurement of anti-HIV activity as reference.

(-)2-オクチル基を用いた場合、従来の硫酸化アルキルラミナリペンタオシドと比べ、対応する炭素鎖量の化合物と同程度の活性を示したが、光学活性な基に起因すると考えられるような抗エイズウイルス活性における有意な差違は認められなかった。

さらに、アルキル基の違いについて調べるために、環状構造を有する置換シクロヘキシル基や、フェニルアルキル基についても検討した。その結果、シクロヘキシル基の場合でも直鎖アルキル基の場合と同程度の活性を示し、細胞毒性は低かった。フェニルアルキル基導入の場合も通常のアルキルの場合と同様の高い抗エイズウイルス活性を維持した。フェニルアルキル基は細胞毒性を示すことが懸念されたが、今回試みた範囲では細胞毒性は低く有効な抗エイズウイルス活性剤と成り得る可能性が示された。

4. 考 察

これまでの我々の研究によりラミナリ骨格では、5糖以上で活性が変わらないことから活性発現のためには、最低5糖が必要であることが実験的に分かっていたが、4糖骨格ではっきりと活性が低下したことを考え合わせると、5糖骨格は、活性を発現するための最も重要なメカニズムを担う単位と推定される。本化合物は、エイズウイルスのエンベロープ糖タンパク 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バインディングサイト (リジン、アルギニンの NH₃⁺ 基により、プラスチャージの連続する部位と考えられる部分) が、糖鎖骨格長で5つ程度で覆われるのではないかと考えられ、このことはオリゴ糖鎖長が5糖以上必要でかつそれ以上で活性が一定していることと矛盾しない。

さらに、光学活性アルキル基の場合でも光学不活性なアルキルの場合と同程度の活性しか示さず、試みた中では抗エイズウイルス活性発現に於いて光学活性基が認識されている可能性は認められなかった。また、比較的高い環状構造を持つアルキル基や芳香族環を有する化合物でも高い活性と低い毒性が確認できたことと、以前までの結果と併せて考察すると、アルキル基としては一定の大きさがあればいかなる形状でも良く、特異的な認識による特定の部位との相互作用を引き起こしている可能性は低いことが示唆された。本化合物は細胞外且つウイルス外で作用するので、他の多くの薬剤に対して耐性のできたウイルス株に対しても感染阻害作用を十分発現できると予想される。

研究速報

5. ま と め

ラミナリテトラオース(4糖)骨格を用いた硫酸化アルキルオリゴ糖の合成と評価により, 抗エイズウイルス活性発現においてペンタオース(5糖)以上の糖鎖部分の重要性が確認できた。ラミナリペンタオースを用いた実験では, 光学活性基や環状構造を持つアルキル基を導入した系においても高い活性と低い毒性が確認でき, 有効な抗エイズウイルス剤となり得ることが分かった。(1996年1月9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.

- Teppler, 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) M. Gordon, M. Guralnik, Y. Kaneko, T. Mimura, M. Baker, W. Lang, *J. Med.*, **25**, 163 (1994).
 - 7) T. Uryu, N. Ikushima, K. Katsuraya, T. Shoji, N. Takahashi, T. Yoshida, K. Kanno, T. Murakami, H. Nakashima, N. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 2385 (1992).
 - 8) K. Katsuraya, N. Ikushima, N. Takahashi, T. Shoji, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Yoshida, T. Uryu, *Carbohydr. Res.*, **260**, 51 (1994).
 - 9) K. Katsuraya, T. Shoji, K. Inazawa, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Uryu, *Macromolecules*, **27**, 6695 (1994).
 - 10) R. Pauwels, J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, E. De Clercq, *J. Virol. Methods*, **20**, 309 (1988).
 - 11) K. Katsuraya, T. Uryu, *SEISAN-KENKYU*, **47**, 185 (1995).