

特 集 7  
研 究 速 報

## 抗エイズウイルス剤としての硫酸化アルキルオリゴ糖

—アルキル鎖構造と活性の相関について—

Sulfated Alkyl Oligosaccharide as Anti-AIDS Virus Active Agent

—The Relationship Between Structure and Activity—

鬘 谷 要\*・瓜 生 敏 之\*

Kaname KATSURAYA and Toshiyuki URYU

## 1. は じ め に

エイズ（後天性免疫不全症候群）が HIV（ヒト免疫不全ウイルス）によって引き起こされることが明らかになり<sup>1)</sup>，その治療法の確立が世界的な課題となり精力的な研究活動が展開されてきている。しかしながら，現在のところ一部の副作用の強い核酸系薬剤<sup>2),3)</sup>が臨床的に用いられるのみで根本的な治療法は見出されていないのが現状である。我々は，多糖硫酸化物が高い抗エイズウイルス活性を持つことを見出し<sup>4),5)</sup>，カードラン硫酸を臨床試験へと導いた。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低く抑え，多糖硫酸化物が持つ抗凝血活性をできる限り抑え，さらに経口投与への可能性が期待できる新規の薬剤として硫酸化アルキルオリゴ糖を分子設計し，その効率的な合成法の確立と抗エイズウイルス活性をはじめとする生理活性について評価検討を行ってきた。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<sup>6),7)</sup>。血中での活性持続時間の点でマルトオリゴ糖より有効であると考えられるラミナリオリゴ糖に着目した研究において糖鎖骨格部分として5糖以上では抗エイズウイルス活性は一定となり，アルキル鎖長が18程度まで長くなると細胞毒性を発現することが分かってきた<sup>8)</sup>。これらの結果を基に，本稿ではアルキル鎖の活性発現への寄与をさらに詳細に調べるため，直鎖で極端に鎖長の短い場合や，枝分かれ構造を持つアルキル基，さらにフッ素含有アルキル基についてその導入の検討を行い，それらの抗エイズウイルス活性について評価したので報告する。

\*東京大学生産技術研究所 第4部

## 2. 実 験 方 法

## 2.1 アセチルオリゴ糖の合成

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。このラミナリペンタオースは酢酸カリウム存在下，無水酢酸中で環流し， $\beta$ -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<sup>7)</sup>ラミナリペンタオースパーアセテートとした。

## 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，または1, 2-ジクロロエタン中でラミナリペンタオース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。フッ素含有アルコールとして1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデカノール，1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロドデカノールを用いたグリコシル化については，溶媒としてメタ-キシレンヘキサフルオライドも検討した。得られたアセチル化アルキルペンタオシド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。

## 2.3 アルキルオリゴ糖の硫酸化

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2.2当量用いて85°C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。

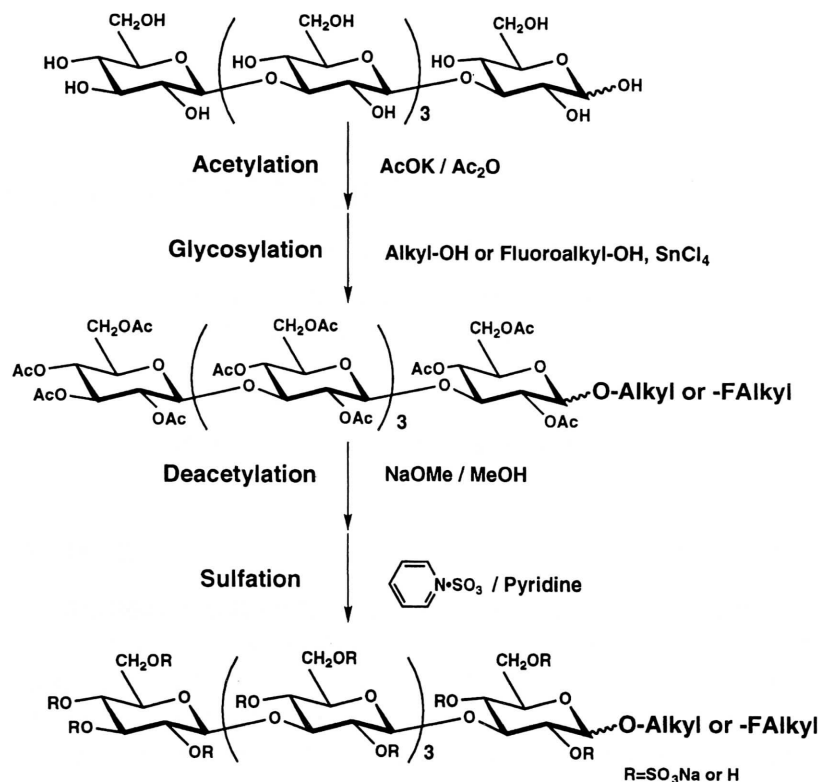


図 硫酸化アルキルラミナリペンタオシドの合成

## 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 ( $2.5 \times 10^4/\text{well}$ ,  $\text{MOI}=0.01$ ) 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  $37^\circ\text{C}$  で 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. 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  $\text{EC}_{50}$  と, 薬剤単独での細胞傷害が 50% に達する濃度  $\text{CC}_{50}$  で表した.

## 3. 実験結果

ラミナリペンタオースのアセチル化はほぼ定量的に進行し  $\beta/\alpha$  比が 3.8 のラミナリペンタオースパーアセテートを与えた. 今回検討した種々のアルコールとの反応の結果を表 1 に示す.

通常のスルホ基を含まないアルキル鎖では 40~70% の収率で配糖体を与えているが, 実際に反応に参加するのが  $\beta$ -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. スルホ基を含む場合は, おそらく糖鎖の切断に帰因すると推測される副生成物のために 20% 程度まで収率が低下した. フルオロアルキル系化合物の溶媒と

表 1 パーアセチルアルキルラミナリペンタオシドの合成

sample	peracetylated laminaripentaose mg (mmol) <sup>a</sup>	alkyl alcohol mg (eq.) <sup>b</sup>	$\text{SnCl}_4$ mol % <sup>c</sup>	yield %
<b>n-alkyl</b>				
L5C4 <sup>d</sup>	300 (0.19)	30 (2.0)	200	40
L5C8 <sup>d</sup>	300 (0.19)	50 (2.0)	200	70
L5C10 <sup>d</sup>	190 (0.12)	38 (2.0)	200	56
L5C12 <sup>d</sup>	500 (0.32)	111 (2.0)	100	53
L5C18 <sup>d</sup>	150 (0.10)	18 (2.0)	200	50
<b>branched alkyl</b>				
L52E6S <sup>d</sup>	310 (0.20)	52 (2.0)	200	46
L537DM8 <sup>d</sup>	260 (0.17)	60 (2.0)	200	63
<b>fluoro alkyl</b>				
L5C2F8 <sup>e</sup>	300 (0.19)	190 (2.0)	200	21
L5C2F10 <sup>e</sup>	200 (0.13)	250 (2.0)	200	22

<sup>a</sup>Equivalent to acetylated oligosaccharide. <sup>b</sup>Equivalent to acetylated oligosaccharide. <sup>c</sup>Equivalent to acetylated oligosaccharide. <sup>d</sup>A mixture of  $\alpha$  and  $\beta$  anomers. <sup>e</sup>Only  $\beta$  anomer.

表2 アルキルラミナリペンタオシドの硫酸化

sample	alkyl oligo- saccharide (mg)	yield (mg)	DS	sulfated alkyl oligosaccharide						
				elem anal. <sup>c</sup>						
				%C	%H	%N	%S	%Na		
<u>n-alkyl</u>										
L5C0S	220	426	2.1	calcd	14.1	1.4	0.0	21.3	15.3	
				found	19.0	4.3	0.0	15.7	11.1	
L5C4S	53	83	3.9	calcd	16.2	1.8	0.0	20.4	14.6	
				found	12.1	2.9	0.0	18.4	n.d.	
L5C8S	99	183	3.2	calcd	17.7	2.0	0.0	19.9	14.3	
				found	13.4	3.1	0.0	18.8	13.2	
L5C12S	100	190	3.0	calcd	19.2	2.3	0.0	19.5	14.0	
				found	17.8	3.0	0.0	17.0	12.2	
L5C18S	50	70	3.4	calcd	2.12	2.7	0.0	18.9	13.6	
				found	17.9	3.0	0.0	16.7	12.0	
<u>branched alkyl</u>										
L5C2E6S	60	174	3.4	calcd	17.7	2.0	0.0	19.9	14.3	
				found	13.9	3.1	0.0	18.8	15.7	
L5C37DM8S	99	244	3.2	calcd	19.2	2.3	0.0	19.5	14.0	
				found	15.5	3.5	0.0	18.6	14.1	
<u>n-fluoro alkyl</u>										
L5C2F8S	45	68	3.4	calcd	16.5	1.4	0.0	17.7	12.7	
				found	14.2	2.8	0.0	15.9	11.6	
L5C2F10S	35	39	3.6	calcd	16.8	1.3	0.0	17.1	12.2	
				found	13.7	2.6	0.0	15.5	10.8	

<sup>a</sup>2.2 eq. of sulfur trioxide pyridine complex to OH group was used. <sup>b</sup>Degree of sulfation (DS) designates the number of sulfate groups per a glucose residue. <sup>c</sup>Calculated as a persulfated sample.

して検討したメタ-キシレンヘキサフルオライドでも顕著な収率改善は認められなかった。これら各アルキルラミナリペンタオシドの硫酸化の結果を表2に示した。

糖1残基当たりの硫酸基の数を硫酸化度 (DS) として元素分析値より算出した。いずれの化合物においても硫酸化度が3前後の値を示し高い硫酸度の目的化合物が生成したことが分かった。

一連の化合物の抗エイズウイルス活性を表3に示した。

糖鎖長を5糖に固定しアルキル鎖長を0から18の間で変化させたところ鎖長が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。

さらに、アルキル基の効果について調べるために、分枝アルキル基や、パーフルオロアルキル基についても検討を行った結果、枝分かれの有るアルキ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、特に細胞毒性は現われなかった。パーフルオロ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。フルオロアルキル基は通常のアルキル基よりも疎水性が高く様々な生理活性を持つことから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、細胞毒性は認められな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. 作用機序からの考察

本化合物は、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と考えられる部位はリジン、アルギニンの  $\text{NH}_3^+$  基によりプラスチャージの連続する部位で、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。この部位はコンピュータを使った三次元的な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、このことはオリゴ糖鎖長が5糖以上で活性が一定していることと矛盾しない。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。また、アルキル部分の形状や、フッ素基の導入による考察から、ウイルス表層の脂質二分子膜と相互作用を生じると推察される一定の疎水場が提供されることが重要でありその形状は活性には影響が少ないことが示唆された。さらに、最近の Kozbor<sup>9)</sup>らの報告で、先に述べた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る。

#### 5. ま と め

これまでの研究において抗エイズウイルス剤としての硫酸化アルキルオリゴ糖に最も適当であると考えられるラミナリペンタオース骨格を用い、短い直鎖アルキル基、分枝アルキル基、フルオロアルキル基について対応する硫酸化アルキルラミナリペンタオシドを合成できた。抗エイズウイルス活性試験の結果より、アルキル鎖は一定の大きさ、つまり疎水性を有するものであれば、分枝していても、

表 3 硫酸化アルキルオリゴ糖の抗エイズウイルス活性

sample	alkyl portion	anti-HIV activity <sup>a</sup> EC <sub>50</sub> (μg/ml)	cytotoxic effect <sup>b</sup> CC <sub>50</sub> (μg/ml)	SI <sup>c</sup> (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )
<u>n-alkyl</u>				
L5C0S	—	6.7	>1000	>150
L5C4S	—C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	1.9	>1000	>530
L5C8S	—C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	0.62	>1000	>1600
L5C12S	—C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	0.61	>1000	>1600
L5C18S	—C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	0.63	220	350
<u>branched alkyl</u>				
L5C2E6S	—CH <sub>2</sub> CH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.74	>1000	>1400
L5C37DM8S	—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> CH(CH <sub>3</sub> )C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.54	>1000	>1900
<u>n-fluoro alkyl</u>				
L5C2F8	—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> C <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	0.57	>1000	>1800
L5C2F10	—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> C <sub>10</sub> F <sub>21</sub>	0.19	>1000	>5300
Curdan sulfate <sup>d</sup>	—	0.18	>1000	>5600
Dextran sulfate	—	0.65	>1000	>1500

<sup>a</sup>Concentration of the drug inhibiting 50% virus infection. <sup>b</sup>Drug concentration for 50% cytotoxicity. <sup>c</sup>Selectivity index. <sup>d</sup>Curdan sulfate with molecular weight of  $79 \times 10^3$  used for measurement of anti-HIV activity as reference.

フッ素を有していても直鎖の場合と同様に高い活性を示し、毒性も示さず、有効な抗エイズウイルス剤となり得ることが分かった。  
(1994年12月20日受理)

## 参 考 文 献

- 1) F. Barré-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Daugey, C. Axler-Blin, F. Véinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rosenbaum, and L. Montagnier, *Science*, **220**, 868 (1983)
- 2) 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)
- 3) B. A. Larder, G. Darby, D. D. Richman, *Science*, **243**, 1731 (1989)
- 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. Ogiwara, 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, 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, and T. Uryu, *Macromolecules*, **27**, 6695 (1994)
- 9) P. P. Jagodzinski, R. Wiaderekiewicz, G. Kurzawski, M. Kloczewiak, H. Nakashima, E. Hyjec, N. Yamamoto, T. Uryu, Y. Kaneko, M. R. Posner, D. Kozbor, *Virology*, **202**, 735 (1994)