

抗エイズウイルス作用を示す多糖類の合成と NMRによる構造解析

Synthesis of Anti-AIDS Viral Polysaccharides and Their Structural Analysis by NMR Spectroscopy

吉田 孝*・瓜生 敏之*
Takashi YOSHIDA and Toshiyuki URYU

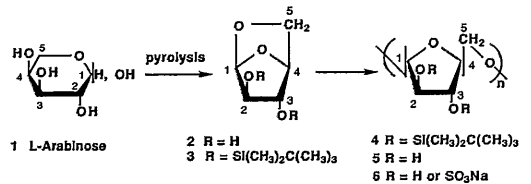
1. 諸 言

無水糖の開環重合によって立体規則性多糖が得られることは、すでに報告している。無水糖モノマー水酸基の保護基の種類、触媒、重合温度などにより(1→5)- α -フラナン型と(1→5)- β -ピラナン型のポリマーを与える。われわれは、これまでに無水糖モノマーとしてリボース¹⁾、キシロース²⁾、アラビノース³⁾、グルコース⁴⁾などを用いて選択的開環重合を検討し、最近、それらモノマーから合成した多糖類の硫酸化物が、抗エイズウイルス作用を持つことを見いだした⁵⁾。

エイズ(Acquired Immunodeficiency Syndrome, 後天性免疫不全症候群)は、HIV(Human Immunodeficiency Virus, ヒト免疫不全ウイルス)と呼ばれるレトロウイルスが免疫を担当しているT4リンパ球などに感染して免疫機能を低下させてしまう病気である。1981年に初めて発病が報告され⁶⁾、1983年にフランスのL. Montagnier⁷⁾とアメリカのR.C. Gallo⁸⁾らによりそれぞれ独立にエイズの原因ウイルスとしてHIVが発見された。しかし現在まで、エイズウイルスを殺傷する決定的なワクチンや薬の開発にはまだ至っていない。唯一治療に使われている薬にAZT(アジドチミジン)があるが、副作用が強すぎると言われている。

天然多糖のヘパリンやデキストラン硫酸は以前より抗凝血剤として使われていたが、ドイツのH. Dringerらはデキストラン硫酸が抗エイズウイルス作用を持つことを報告した⁹⁾。一方、Ueno¹⁰⁾やわれわれもDiringerと同時期にデキストラン硫酸がエイズウイルスの増殖抑制効果があることを見いだした⁵⁾。また(1→3)- β -グルカン類の天然分枝多糖レンチナンやシゾフィランなどは抗腫瘍剤として市販されているが、レンチナン¹¹⁾や直鎖天然多糖カードラン¹²⁾を硫酸化したところ、高い抗エイズウイルス作用があることを見だし、しかも低毒性であることが分かった。

*東京大学生産技術研究所 第4部



Scheme. Synthesis of arabinofuranan sulfate.

そこで本研究では、無水アラビノース誘導体の選択的開環重合によって得られる合成多糖アラビノフラナン硫酸について抗凝血作用、抗エイズウイルス作用を検討したので報告する。

2. 実 験

重合モノマーの合成

L-アラビノース(1)を真空熱分解して1,4-アンヒドロ- α -L-アラビノピラノース(2)とした。次にt-ブチルジメチルシリルクロリドによって水酸基を保護して重合モノマーである1,4-アンヒドロ-2,3-ジ-O-t-ブチルジメチルシリル- α -L-アラビノピラノース(3)(ADSA)を得た。

開環重合と脱保護

重合は3を0.5g、塩化メチレン1mlを溶媒として高真空下、PF₅触媒(2mol%)を用い、-60°Cで2時間行った。得られたポリマーは、少量のクロロホルムに溶解させ、メタノールで再沈させることによって精製した。再沈を3回繰り返した後、ベンゼンに溶解させて凍結乾燥させて2,3-ジ-O-t-ブチルジメチルシリル-(1→5)- α -L-アラビノフラナン(4)を得た。収率は83.6%であった。4をTHFに溶解し、テトラブチルアンモニウムフロリドによって脱保護を行い、純水で透析後、凍結乾燥して(1→5)- α -L-アラビノフラナン(5)を(収率は95%で)得た。

硫酸化

アラビノフラナン(5)74mg(0.56mmol)を、乾燥した

研究速報

DMSO 20mlに溶解し, 0.3g (1.6mmol) のピペリジン硫酸を加えて80°Cで1時間かくはんした。氷水浴を用いて室温まで冷却後, 飽和重炭酸ナトリウム水溶液で中和し, アセトンを用いてアラビノフラナン硫酸を沈殿させた。遠心分離によって沈殿を集め, アセトンで3回洗浄後, 30mlの純水に再び溶解し, 純水で1日透析させた。凍結乾燥を行ってアラビノフラナン硫酸(6)を得た。収量は106.8mgであった。元素分析値; S=15.7, C=18.24, H=2.94%。

3. 結果と考察

Schemeに示すようにL-アラビノース(1)を真空熱分解して1,4-アンヒドロ- α -L-アラビノピラノース(2)を全収率6.4%で得た。2の水酸基をt-ブチルジメチルシリル基(tBDMS)で保護して重合モノマー3を合成した。KopsとSchuerchはメチル基を保護基として開環重合を検討したが, 立体規則性ポリマーは得られず, ほぼ同じ割合でフラナン型とピラナン型のポリマーを得た¹⁴⁾。われわれはアラビノースの開環重合に関してこれまでに3種類の保護基, すなわち, ベンジル基^{3a)}, p-プロモベンジル基^{3b)}, およびtBDMS基^{3c)}を用いた。水酸基の保護基としてベンジル基またはp-プロモベンジル基を用いた場合, 開環重合によって得られたポリマーの(1 \rightarrow 5)

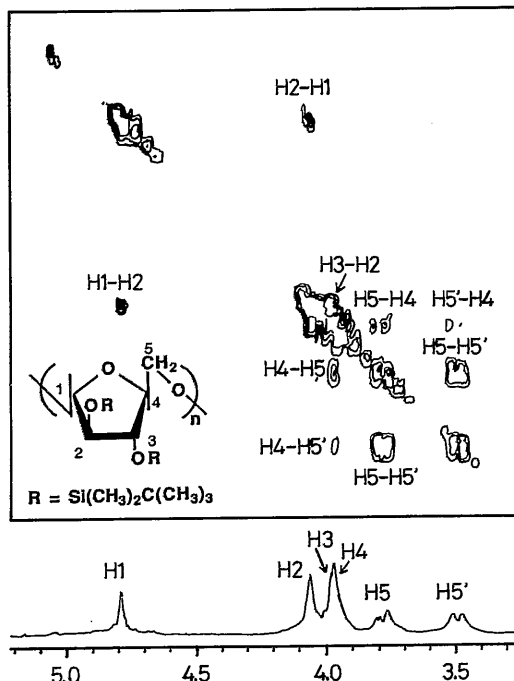


Fig. 1. 270MHz H-H COSY NMR spectrum of 2,3-di-O-t-butyl dimethylsilyl-(1-5)- α -L-arabinofuranan.

Table 1. Deprotection of 2,3-di-O-t-butyl dimethylsilyl-(1-5)- α -L-arabinofuranan

Polymer		Free polysaccharide			
$[\alpha]_D^{25}$	\bar{M}_n	Yield	$[\alpha]_D^{25}$	\bar{M}_n	Stereoregularity ^c
deg $\times 10^4$		%	deg	$\times 10^4$	%
-20.4	5.0	95	-18.4	3.0	(1 \rightarrow 5)- α -F >95

a) Measured in H₂O (c1). b) Determined by GPC.

c) Calculated from ¹³C NMR spectrum.

- α -フラナン型の立体規則性は最高値で93%であった。tBDMS基の場合では, PF₅触媒, -60°C, 2時間の重合条件下で立体規則性95~98%のフラナン型のポリマーとなり, (1 \rightarrow 4)- β -ピラナン型のポリマーも生成して来る。重合モノマーがリボースやキシロースなどの場合では, 完全に立体規則性のポリマーを与える。3の開環重合は立体規則性が最もよくなる条件で行い, 収率83.6%, 分子量(\bar{M}_n) 5.0 $\times 10^4$ のフラナン型に対応するポリマー4を得た。

図1には4のH-H COSYスペクトルを示す。H1吸収は最も低磁場(4.79ppm)に現れるので, 図1に示すようにH1から順に解析して¹H NMRスペクトルを帰属した。いままでに3-O-ベンゾイル-1,2-O-[(1-エンドシアノ)エチリデン]-5-O-トリチル- β -L-アラビノフラノースの重宿合によって(1 \rightarrow 5)- α -L-アラビノースの合成報告はあるが¹⁵⁾, 開環重合によって高分子量の立体規則性のよいポリマーを得たという報告はない。

表1にポリマー4の脱保護の結果を示す。分子量5.0 $\times 10^4$ のポリマーから分子量3.4 $\times 10^4$ のアラビナンが得られた。その¹³C NMRスペクトルを図2Bに示す。リボフラナンやキシロフラナン誘導体の脱保護ではフラナン構造に対応する5本だけのピークとなるが, アラビナンの場合には帰属された5本の吸収以外に小さな吸収がいくつか現れて来る。これらはアラビナンのC1-O-C4結合が切れた構造に対応すると推定した^{3b)}。しかし次の硫酸化反応にはこのまま用いた。次にピペリジン硫酸によって硫酸化を行いアラビノフラナン硫酸(6)が得られた。分子量は2.4 $\times 10^4$ 。SとCの元素分析値の割合より硫酸化度は1.6(最高で2.0)であった。

¹³C NMRを図2Aに示す。2Bと比較してピークはブロードとなり, 67.8, 74.5, 76ppmには新たなピークが現れた。これらのピークはフラノース環の2位または3位に硫酸基が導入されたために, C4, C3, C2の吸収がシフトしたものと考えられる。

続いてアラビノフラナン硫酸の抗凝血活性と抗エイズウイルス活性を調べた。抗凝血活性は今までと同じように牛血しょうを用いてアメリカ薬局方ヘパリン力価検定

研 究 速 報

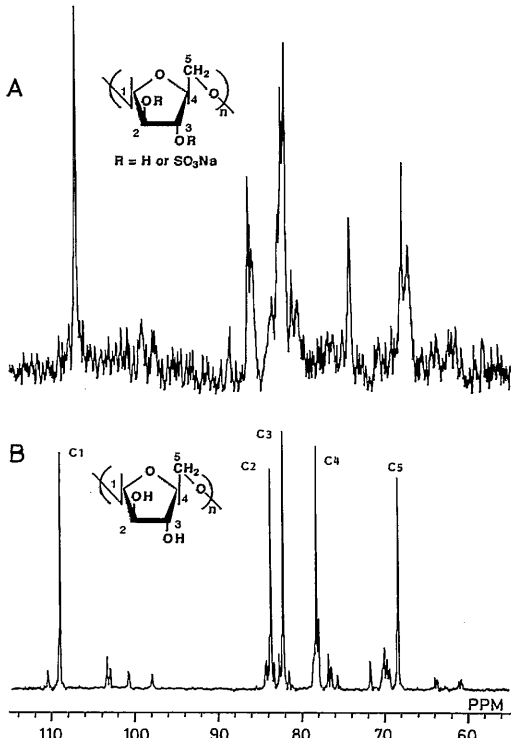


Fig. 2. 67.8MHz ¹³CNMR spectra of (A) arabinofuranan sulfate (S=15.7%) and (B) (1→5)-α-L-arabinofuranan in D₂O.

法を一部修正して行った¹⁰⁾。標準デキストラン硫酸 (NC-1032) の値20.6unit/mgを基準として測定すると、アラビノフラナン硫酸では36unit/mgとなり、標準デキストラン硫酸よりも高い値となった。抗エイズウイルス活性試験⁹⁾の結果を図3に示す。エイズウイルス不在下 (白棒) および存在下 (斜線) に30万個のMT-4細胞を3日間、6日間培養したとき、生存細胞数および免疫法感染率に及ぼすアラビノフラナン硫酸の影響について調べたものである。アラビノフラナン硫酸を3.3μg/ml加えてエイズウイルス存在下に6日間培養したところ、MT-4細胞は正常に増殖し、空試験 (濃度0 μg/ml) として行ったMT-4細胞だけの培養結果とまったく変わらなかった。また、同じ濃度での間接免疫蛍光法で生存MT-4細胞のエイズウイルス感染率を調べると、0となり、増殖した生存MT-4細胞はエイズウイルスに感染していないことが分かった。すなわち3.3μg/mlという低濃度でアラビノフラナン硫酸は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。一方、1000μg/mlアラビノフラナン硫酸を加えてもMT-4細胞は正常に増殖するので、細胞毒性は低いと考えられる。われわれのこれまでの研究から、

抗がん剤として使われている1,3-β-グルカン類のレンチナンや、食品添加剤として使用されているカードランを硫酸化したものも3.3μg/mlで完全にエイズウイルスの増殖を抑え非常に高い抗エイズウイルス作用を持ち、かつ低毒性であることを見いだしている。アラビノフラナン硫酸とこれまでに発表した硫酸多糖体の抗エイズウイルス活性の結果について表2にまとめた。表2に示すように硫酸多糖体はある程度の分子量や、硫酸化度を持っていれば糖の種類によらず3.3~10μg/mlの低濃度でエイズウイルスに対して効果があることが分かった。しかしエイズ薬として使用する場合には副作用や細胞毒性が低いほうが望ましく、表2に示す抗凝血作用も小さいほうがよい。その意味からアラビノフラナン硫酸は抗凝血作用は高すぎると考えられる。しかしカードラン硫酸の抗凝血作用はデキストラン硫酸の値と比較すると10unit/mg以下となりエイズ薬としては最適であると考えられる。

エイズウイルスはヒトのT4リンパ球に感染する場合、T4リンパ球の表皮タンパクDC4が、エイズウイルスの外衣糖タンパクgp120のレセプターとなっており、物理的に吸着することによってウイルスの感染が始まる。エイズウイルスは、レトロウイルスの一種でRNAしか持っていないので、T4リンパ球内でウイルス自身の持っている逆転写酵素を使ってRNAからウイルスDNAを合成しT4リンパ球の核内にあるDNAに組み込んでプロウイルスDNAとなり増殖する。エイズの唯一の治療薬として使われているAZTは、このRNAからDNAを合成する際の逆転写の段階を阻害する。硫酸多糖体では、gp120がCD4に吸着する段階を妨害する作用と考えられている。硫酸多糖体は硫酸基という陰イオンを多数持っているので、gp120の陽イオン集中部位に正負の電気的作用で選択的

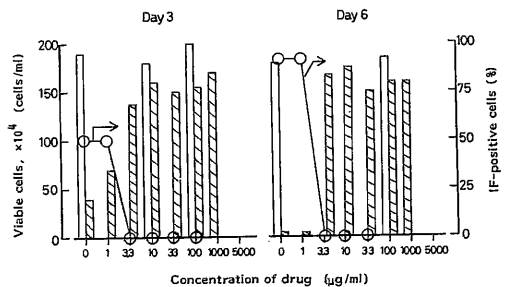


Fig. 3. Inhibitory effects of arabinofuranan sulfate (S=15.7%, Mn=3.0×10⁴) against HIV at various concentrations of the compound on days 3 and 6. Open bars: MT-4 cells. Slash bars: MT-4 cells and HIV-infected MT-4 cells (0.2%). Open circles: Percentage of IF positive cells.

