

## 生理活性を有する多糖類の合成と構造解析

Synthesis and Structural Analysis of Bioactive Polysaccharide

畑 中 研 一\*・瓜 生 敏 之\*

Kenichi HATANAKA and Toshiyuki URYU

## 1. 諸 言

AIDS (acquired immune deficiency syndrome; 後天性免疫不全症候群) はレトロウイルスである HIV (human immunodeficiency virus) によって引き起こされることがわかっている<sup>1)</sup>。この疾患は、近年稀な致死率の高い感染症であり、その予防、治療は重要な急務となっている。HIV は、CD4陽性の T リンパ球にのみ感染し、リンパ細胞を破壊する。現在、唯一の薬として使用されているアジドチミジン (AZT) は患者の延命効果をもたらすが、長期投与に対する副作用の問題がある。

従来、抗凝血剤として用いられてきたヘパリンやデキストラン硫酸などの硫酸化多糖には、HIV の増殖を抑制する作用があることがわかってきた<sup>2)3)</sup>。これらの硫酸化多糖は、細胞内に侵入したウイルス RNA を DNA に変換する逆転写酵素を阻害することが解明された<sup>3)4)</sup>。しかしながら、分子量数万の硫酸化多糖が細胞内に侵入することは困難であると考えられるので、硫酸化多糖は、ウイルスの T 細胞への吸着を阻害しているのではないかと推察される。

筆者らはこれまでに、椎茸から抽出される分枝多糖で抗腫瘍活性を有するレンチナンを硫酸化することによって、毒性の低い抗エイズウイルス剤であるレンチナン硫酸を合成した<sup>5)6)</sup>。CD4陽性リンパ球である MT-4 細胞を用いた *in vitro* の試験で、レンチナン硫酸は  $3.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  という低濃度で HIV の増殖を完全に抑制した。

本研究では、NMR によってレンチナン硫酸の構造解析を行い、化学構造の異なるレンチナン硫酸の抗エイズウイルス活性、抗凝血活性について報告する。

## 2. 実 験

レンチナンの硫酸化は 2 通りの方法を用いて行った。

1) ピリジン中のクロルスルホン酸による硫酸化<sup>7)</sup>

レンチナン 500mg (グルコースに換算して  $3.1 \text{mmol}$ )

\*東京大学生産技術研究所 第 4 部

を酸化バリウムで乾燥したピリジン 40ml 中に懸濁させ、あらかじめ用意したクロルスルホン酸 10ml ( $152 \text{mmol}$ ) のピリジン (60ml) 溶液と混合した。反応混合物を  $100^\circ\text{C}$  に昇温し、攪拌しながら 1 時間反応した。室温になるまで水冷した後、200ml の水と 75ml の 2.5N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、イオン交換水にて 3 日間透析し、濃縮、凍結乾燥した。収量  $1.43\text{g}$

2) ジメチルスルホキシド (DMSO) 中のピペリジン硫酸による硫酸化<sup>8)</sup>

レンチナン 300mg (グルコースに換算して  $1.9 \text{mmol}$ ) を乾燥した DMSO 50ml に溶解し、 $3\text{g}$  のピペリジン硫酸 ( $18.2 \text{mmol}$ ) を加えて  $80^\circ\text{C}$  で 1 時間攪拌した。室温まで冷却後、50ml の重炭酸ナトリウム飽和水溶液を加え、重曹で 1 日、イオン交換水で 3 日間透析して濃縮、凍結乾燥を行ってレンチナン硫酸を得た。収量  $555\text{mg}$

NMR は、日本電子製 JNM GX-270 スペクトロメータを用い、重水を溶媒として DSS 基準で測定した。GPC は、東ソー製 TSK gel G-4000SW, G-3000SW, G-2000SW で、デキストランを基準として測定した。

抗エイズウイルス活性テストは、山口大学医学部・山本直樹教授に依頼測定した。HTLV-I 陽性細胞である MT-4 細胞を用い、0.2% の HTLV-IIIB (エイズウイルスの一種) に感染させ、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間の吸着後、細胞数が  $3 \times 10^6 \text{cells}/\text{ml}$  となるように調整して、種々の濃度の硫酸化多糖の存在下で培養した。空試験としてエイズウイルスを感染させていない細胞についても同様の操作を行った。培養開始後 3 日目、6 日目の生存細胞数と抗原陽性率を測定した。

抗凝血活性テストは、アメリカ薬局方ヘパリンの力価検定法に準じ、牛血しょうを用い、デキストラン硫酸を基準物質として行った。

## 3. 結 果 と 考 察

天然の分枝多糖であるレンチナンは、図 1 に示すよう

研究速報

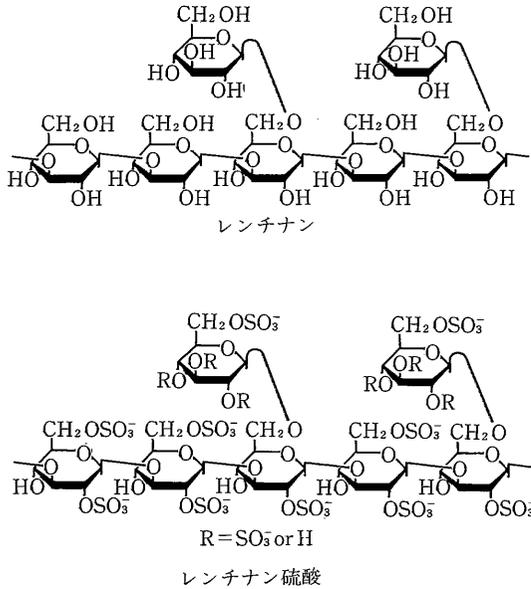


図1 レンチナンとレンチナン硫酸の化学構造式

表1 レンチナン硫酸の元素分析値

No.	S (%)	C (%)	H (%)	N (%)
LS-1	15.5	28.47	4.35	3.96
LS-2	16.4	14.55	1.55	0
LS-3	13.2	37.25	5.15	5.99
LS-4	6.8	30.76	5.16	0
LS-5	16.4	17.78	3.01	0
LS-6	14.1	23.40	4.26	0

に、(1→3)-β-D-グルカンの主鎖に(1→6)-β-D-グルコースの枝を持つ。レンチナンをピリジン中のクロルスルホン酸で硫酸化すると、水可溶性レンチナン硫酸(LS-1)が得られた。このポリマーは吸湿性であった。LS-1の270MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトル(図2A)には、芳香族プロトンに帰属できる吸収が観察された。LS-1の芳香族プロトンの吸収は、ピリジンのそれ(図2D)とは化学シフトが異なり、ピリジニウム塩のスペクトル(図2B, C)と一致した。したがって、LS-1の硫酸基の対カチオンとしてピリジニウムイオンが存在していることがわかった。元素分析の結果(表1)より、LS-1においては、硫酸基の対カチオンのうち59%がピリジニウムイオンであり、41%がナトリウムイオンであると計算された。

そこで、イオン交換樹脂を用いてLS-1中のカチオンを交換することを試みた。ダイヤイオンSK1B(Na<sup>+</sup>)を用いてイオン交換すると、得られたポリマー(LS-2)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(図3A)には芳香族に由来する吸収は

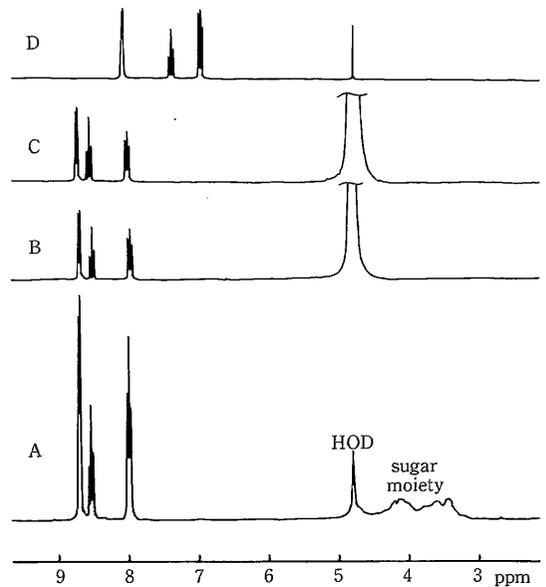


図2 <sup>1</sup>H-NMRスペクトル(A): LS-1, (B)ピリジン+硫酸(2:1), (C):ピリジン+硫酸+水酸化ナトリウム(1:1:1), (D):ピリジン

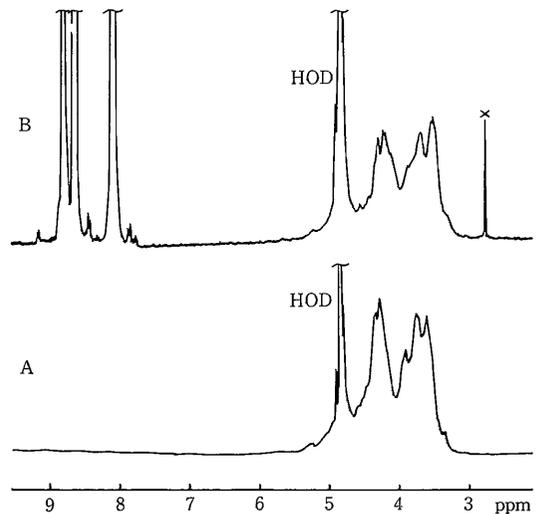


図3 <sup>1</sup>H-NMRスペクトル(A): LS-2, (B): LS-3

見られず、硫酸基の対イオンはすべてナトリウムイオンに置換されたと考えられる。LS-2の元素分析では窒素は検出されなかった。一方、ピリジニウム型のカチオン交換樹脂(SK1B)を用いてLS-1のカチオンを交換すると、得られたポリマー(LS-3)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(図3B)にはピリジニウムに帰属される吸収が観察された。

研 究 速 報

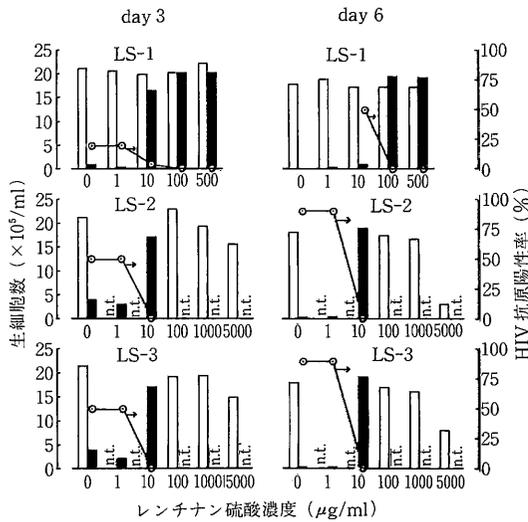


図 4 レンチナン硫酸による HIV の細胞内複製の抑制  
 ■ : HIV 感染細胞  
 □ : HIV 非感染細胞

LS-3の元素分析値(S=13.2%, N=5.99%)より, 対カチオンは, ほぼ100%ピリジニウムイオンに置換されていることがわかった。

LS-2の元素分析の結果から, グルコース残基あたりの硫酸基の数は2.5と計算された。レンチナン硫酸の吸湿性はLS-3>LS-1 >>LS-2であり, 硫酸基の対カチオン中のピリジニウムイオンの割合が増大するほど吸湿性が高くなっていることがわかった。

これら3種のレンチナン硫酸(LS-1, 2, 3)の抗HIV作用をMT-4細胞を用いて検討した(図4)。LS-2とLS-3は10μg/ml以上の濃度で, HIV感染後の細胞変性効果(cytopathic effect=CPE)による死滅を強く抑制した。これに対してLS-1は10μg/mlの濃度では抑制効果が低く, 100μg/ml以上の濃度でHIV感染によるCPEを完全に抑制した。3種のレンチナン硫酸の抗HIV活性は, ウイルス抗原陽性率の測定によっても確認された。すなわち, LS-2とLS-3は10μg/ml以上の濃度で, LS-1は100μg/ml以上の濃度でウイルス抗原の発現を完全に抑制した。これらのレンチナン硫酸の毒性を調べた結果, 細胞毒性は, 非常に低いことがわかった。抗HIV活性を示す濃度の100倍の濃度である1000μg/mlにおいても細胞毒性は認められず, 5000μg/mlにおいて毒性が認められた。これは, 分子量34000のデキストラン硫酸が1000μg/mlの濃度で20~30%の細胞増殖抑制を示す<sup>9)</sup>ことと比較して低毒性であると言える。

LS-1, 2, 3の抗凝血活性テストを行った。すべてピ

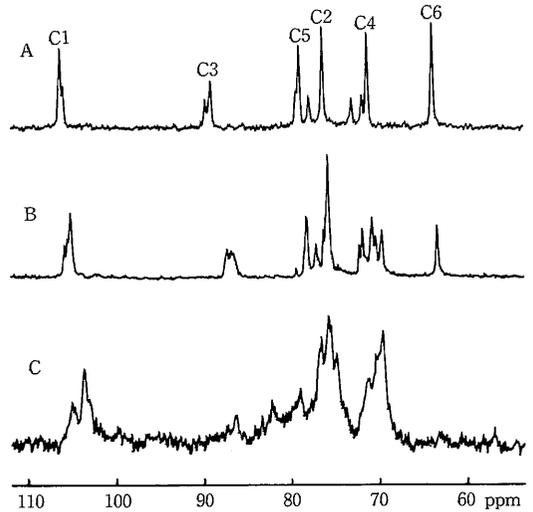


図 5 <sup>13</sup>C-NMR スペクトル(A): レンチナン (0.75N NaOD), (B): LS-4 (D<sub>2</sub>O), (C): LS-5 (D<sub>2</sub>O)

リジニウム塩からなるLS-3が13U/mgとやや低い値を示したが, LS-1とLS-2は市販のデキストラン硫酸と同程度の活性を示した。

次にレンチナンをDMSO中に溶解し, 硫酸化剤としてピペリジン硫酸を用いて均一系で硫酸化を行った。

イオウ含量の少ない (=置換度の低い) レンチナン硫酸(LS-4)の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル(図5B)には, 未反応の一級水酸基を有するC6炭素の吸収が見られた。LS-4には, 抗HIV活性, 抗凝血活性とも認められなかった。したがって, これらの生理活性の発現にはある程度以上の硫酸化度が必要なることがわかる。

イオウ含量16%および分子量1.9×10<sup>4</sup>のレンチナン硫酸(LS-5)は, 3.3μg/mlという低濃度でエイズウイルスの増殖を完全に抑制した。一方, LS-5の抗凝血活性は21U/mgであった。LS-5の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル(図5C)中には, 未反応水酸基を有するC6炭素の吸収は見られず,

表 2 レンチナン硫酸の生理活性

No.	S (%)	$\bar{M}_n$ ( $\times 10^4$ )	抗HIV活性 <sup>a)</sup> (μg/ml)	抗凝血活性 (U/mg)
LS-1	15.5	2.3	100	21
LS-2	16.4	1.9 <sup>b)</sup>	10	21
LS-3	13.2	2.5 <sup>b)</sup>	10	13
LS-4	6.8	>10	>100	0
LS-5	16.4	1.9	3.3	21
LS-6	14.1	0.9	100	6

a) HIVの増殖を抑制する最低濃度

b) 計算値

## 研究速報

C6位の一級水酸基は100%硫酸化されていることがわかる。さらに、C4炭素の吸収がほとんどシフトしないこと、C1炭素の吸収がやや高磁場シフトしていることなどから、C2位の水酸基が硫酸化されている可能性が高い。

イオウ含量14%および分子量 $0.9 \times 10^4$ のレンチナン硫酸(LS-6)は、抗HIV活性、抗凝血活性とも低い値を示した。このことから、双方の生理活性ともその高活性発現のためには、ある一定値以上の分子量が必要であると考えられる。

## 4. ま と め

1) レンチナンをピリジン中のクロルスルホン酸で硫酸化すると、硫酸基の対カチオンがナトリウムイオンとピリジニウムイオンの混在したレンチナン硫酸が得られた。このレンチナン硫酸は、イオン交換樹脂を用いて、100%ナトリウム型、100%ピリジニウム型に変換可能であり、高い抗エイズウイルス活性を示した。抗凝血活性については、100%ピリジニウム型になったものの活性が他に比較してやや劣った。

2) DMSO中のピペリジン硫酸で硫酸化を行った場合、C6位の一級水酸基がまず硫酸化され、次にC2位の水酸基が硫酸化されたと推定した。抗HIV活性、抗凝血活性発

現のためには、ある程度以上の硫酸化度および分子量が必要であると考えられる。タンパク質が硫酸化多糖のミクロな化学構造のみならず高分子全体としても認識していることがわかり興味深い。

終わりに、生理活性テストに多大な御協力をいただきました山口大学医学部・山本直樹教授、味の素株式会社、名糖産業株式会社に深く感謝致します。

(1988年11月29日受理)

## 参 考 文 献

- 1) F. Wong-Staal and R.C. Gallo, *Nature*, **317**, 395 (1985).
- 2) M. Ito et al., *Antiviral Res.*, **7**, 361 (1987).
- 3) H. Nakashima et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 1164 (1987).
- 4) H. Nakashima et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1524 (1987).
- 5) O. Yoshida et al., *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2887 (1988).
- 6) K. Hatanaka et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.
- 7) M.L. Wolfrom and T.M. Shen Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1764 (1959).
- 8) K. Nagasawa et al., *Carbohydr. Res.*, **21**, 420 (1972).