

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550129

研究課題名(和文) 表面プラズモン共鳴による硫酸化糖鎖の抗ウイルス性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of antiviral activity of sulfated polysaccharides by SPR

研究代表者

吉田 孝 (Yoshida, Takashi)

北見工業大学・工学部・教授

研究者番号：40166955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：LMTBE と LMGABE モノマーの開環重合および共重合を行い、ベンジル化ガラクトマンナンに導いた。比旋光度や NMR 測定から(1-6)- β -D-マンノピラナン主鎖の4位にガラクトースが分枝した合成ガラクトマンナンを合成した。硫酸化して数平均分子量 4.0×10^3 から 7.5×10^3 、比旋光度 +45.6 から +88.7 の硫酸化ガラクトマンナンを合成することが出来た。硫酸化ガラクトマンナンは標準と同程度の高い抗 HIV 性を示すことを見出した。SPR、光散乱による粒径測定およびゼータ() 電位測定を行い、ガラクトース分枝の割合が少なくなると、抗 HIV 性は高くなり相互作用も高くなった。

研究成果の概要(英文)：For the elucidation of the structure-biological activity relationship, the synthesis of galactomannans by ring-opening copolymerization of 1, 6-anhydro-tri-O-benzyl- β -D-mannopyranose (LMTBE) and 1, 6-anhydro-2, 3-di-O-benzyl-4-O-(2', 3', 4', 6'-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)- β -D-mannopyranose (LMGABE) was carried out by PF5 as a catalyst under high vacuum at -60°C . The synthetic galactomannans were obtained in good yields. After debenzylation with Na in liquid NH_3 to recover hydroxyl groups, the resulting synthetic galactomannans were sulfated by piperidine N-sulfonic acid in DMSO to give sulfated galactomannans with high anti-HIV activity and low cytotoxicity. The anti-HIV mechanism of sulfated synthetic galactomannans was estimated by using SPR, DSL, and zeta potential measurements, suggesting that the electrostatic interaction between negatively charged sulfate groups and positively charged amino groups was an important role in the biological mechanism.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：硫酸化糖鎖 抗ウイルス性 構造解析 生理活性 開環重合 天然糖鎖

1. 研究開始当初の背景

硫酸化糖鎖の研究は半世紀以上前から行われ抗ウイルス性や抗血栓性など特異な生理活性について報告されてきた。硫酸化糖鎖の生理活性は 1958 年に Gerber らによって海藻に含まれる天然の硫酸化糖鎖の抗インフルエンザウイルス作用の報告が最初である[1]。以来多くの論文が発表されたが、1987 年に山本直樹教授と中島秀喜教授らによって海藻由来の硫酸化糖鎖の抗 HIV 作用が報告され、硫酸化糖鎖は高い抗 HIV 作用や抗凝血作用を示すことを明らかにしてきた[2]。特に天然多糖のカードランを硫酸化したカードラン硫酸は低毒性であるので、米国においてエイズ薬として大規模な治験を行った[3]。その作用メカニズムは硫酸基の(-)電荷とウイルス表皮タンパク由来の(+)電荷の集中部位、すなわち 506 ~ 518 番目のアミノ酸配列部分との静電的相互作用であることを予測し[4]、NMR によって定性的に証明した[5]。さらに遺伝子組換え技術で作製した HIV の表皮タンパク gp120 とカードラン硫酸を用いて相互作用を検討した研究もある[6]。

また、ヘパリンは牛の肺や豚の腸などから得られる動物由来の天然硫酸化糖鎖で抗血栓性薬剤として広く医療に用いられている。ヘパリンの抗血栓性メカニズムはアンチトロンピン III のリジンサイトとヘパリンが結合した複合体が血液凝固因子の 1 つであるトロンピンの活性を抑えることによるとの論文があるが[7]、定量的な研究はない。これまでに硫酸化糖鎖の医用高分子材料化について研究を行い、親水性の硫酸化糖鎖を疎水性の表面に固定化させるために長鎖アルキル鎖を導入することが極めて有用であることを見出し国際専門誌に公表した。そして問題点として構造明確な硫酸化糖鎖とウイルスとの相互作用を定量的に解明する必要があることが分かった。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの成果や解明すべき問題点を踏まえ、構造明確な硫酸化糖鎖とウイルスあるいはウイルスタンパク質との相互作用を SPR を用いて定量的、基礎的に解明し、種々のウイルスに対し効率的に捕捉・除去するフィルター開発への応用を検討するものである。本研究は種々のウイルスの表皮タンパクを別途合成し、硫酸化糖鎖との結合速度定数、解離速度定数、解離定数を測定して相互作用を定量化するものである。SPR を用いたタンパク質と抗体やヘパリンなどの相互作用を調べる研究などは多く報告されているが[8]、構造明確な硫酸化糖鎖を合成しタンパク質との相互作用を調べ、構造と生理活性との関係を明らかにした研究はない。本研究では SPR を用いる新しい方法論を提案し、これまで推定され

ている硫酸化糖鎖のタンパク質との相互作用を定量的に証明する研究である。硫酸化糖鎖は抗血栓性、抗ウイルス性などを示すことが知られている。我々は無水糖類の開環重合による立体規則性糖鎖の合成[9]や硫酸化した立体規則性糖鎖の構造と抗凝血作用との関係を研究してきたが、合成硫酸化糖鎖も高い抗 HIV 作用を持つことを見出した[2]。そして今述べたように無水糖誘導体の開環重合によって得られる立体規則性糖鎖の構造と生理活性との関係を調べ糖鎖の医用材料化について研究開発を行っている。本研究では 1, 6-無水マンノースの 4 位にガラクトースが分枝した新規無水二糖モノマーを合成し、開環重合、脱ベンジル化反応によりマンノースの主鎖にガラクトースが分枝したガラクトマンナンを合成した。さらに硫酸化を行い、抗ウイルス性も調べた。さらに表面プラズモン共鳴装置、光散乱測定装置等により、ポリリジンをモデルタンパク質として硫酸化糖鎖との相互作用を定量的に調べ硫酸化糖鎖の抗ウイルス性発現メカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

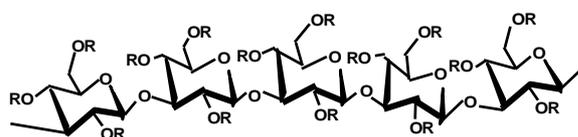
1, 6-無水マンノースの 2 位と 3 位をジベンジル化後、4 位にガラクトース導入しベンジル化した新規無水二糖モノマー(LMGABE)を合成した。この新規二糖モノマーにより開環重合および 2, 3, 4-トリベンジル化 1, 6- α -D-マンノースモノマー (LMTBE)との共重合を行った。液体アンモニア中、Na による脱ベンジル化を行い、4 位にガラクトースが分枝したガラクトマンナンを得た。600 MHz 高分解能 NMR、比旋光度、IR 測定などにより構造解析を行った。分子量はクロロホルム又は水系 GPC により測定した。モデルペプチドとの相互作用を SPR によって調べ、光散乱による粒径測定およびゼータ(ζ)電位測定を行った。

4. 研究成果

(1) カードラン硫酸の抗インフルエンザウイルス作用

図 1 にカードラン硫酸の構造を示す。カードランはある種の菌が生産する 1,3- β -グルカンで 3 重らせん構造を持ち、食品添加物として使われている安価な糖鎖である。一般には 1,3- β -グルカンは抗腫瘍性などを示すが、カードランはそのような作用はなく、水には溶けにくい、安定で毒性もないので食品添加物として使われている。カードランを硫酸化してカードラン硫酸を合成した。これまでに我々はカードラン硫酸は低毒性であり表 1 に示すように高い抗 HIV 作用を示すことを明らかにした。作用機構は、硫酸基に由来する(-)電荷が HIV のエンベロープタンパク質 gp120 の(+)電荷集中部位に静電的に相互作用し

てエイズウイルスが T 細胞などへ感染することを阻害すると考えた。



R = H カードラン

R = H or SO₃Na カードラン硫酸

図1. カードランの構造。

カードランは 1,3-β グルカンで3重らせん構造をとる。硫酸化したものがカードラン硫酸で高い抗 HIV 作用と低い毒性、抗凝血作用を持つ。

本研究でカードラン硫酸のインフルエンザウイルスに対する効果について検討した。

Table 1. Anti-HIV activity of curdlan sulfate

No	S content	DS	\overline{M}_n	$[\alpha]_D^{25}$	EC ₁₀₀ ^a
1	5.6	0.35			not effective
2	8.9	6.8			1000
3	12.1	1.1	8.1	-1.7	10
4	12.1	1.1	11.8	-3.8	3.3
5	12.5	1.3	15.7	-2.3	3.3
6	13.6	1.4	3.4	-0.8	3.3
7	14.1	1.6	2.1	-1.9	3.3
8	14.4	1.6	4.6	0.1	3.3
9	14.7	1.6	2.0	-1.5	3.3

a) Minimum effective concentration of curdlan sulfate on complete inhibition of HIV infection

インフルエンザウイルスもエンベロープタンパク質を持つので、カードラン硫酸の抗インフルエンザウイルス作用を調べるとともに、長鎖アルキル鎖をイオン結合で導入し疎水的にメンブランフィルター表面へ結合させた抗ウイルス材料を開発し、インフルエンザウイルスの吸着・除去効果について検討した。

カードラン硫酸に導入したアルキル鎖の割合が少ない(1本アルキル鎖/12~13糖鎖)ものの抗 HIV 作用は 0.87 μg/ml という高い活性を示すことを見出した。しかし、カードラン硫酸自身にはインフルエンザウイルスの感染を抑制する作用はなかった。

そこでアルキル鎖導入カードラン硫酸 1.5mg を 1μm の細孔があるメンブランフィルターに疎水的相互作用によって吸着させ、インフルエンザ A 型ウイルス、B 型ウイルスに

ついて吸着・除去作用を調べたところ、A 型ウイルスを選択的に吸着し、HA 価を 1/16 まで低下させ、高い吸着・除去性を持つことを明らかにした。B 型ウイルスについては吸着・除去性を示さなかった。図2に示すようにインフルエンザウイルスに対する作用は HIV と同じ静電的相互作用と考えている。選択性については、インフルエンザウイルスは

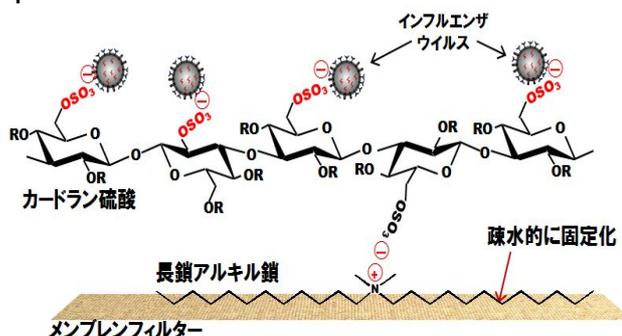


図2. カードラン硫酸のインフルエンザウイルス捕捉。

高病原性になるほど塩基性アミノ酸の割合が増えるとの報告もあるので、B 型よりも A 型ウイルスの方がタンパク質中の塩基性アミノ酸の割合が多いためと推定しているが、詳細な作用メカニズムは検討している。さらに我々が合成したカードラン硫酸はデングウイルスに対しても効果があることを見出した。

(2) 合成ガラクトマンナンの抗 HIV 性とポリリジンとの相互作用

LMTBE と 2 糖モノマーである LMGABE モノマーの開環重合および共重合を行い、ベンジル化ガラクトマンナンに導いた。比旋光度や NMR 測定から(1→6)-α-D-マンノピラナン主鎖の 4 位にガラクトースが分枝した合成ガラクトマンナンを合成した。

1,6-無水 D-マンノピラナンの 4 位にガラクトースが分枝した脱ベンジル化ガラクトマンナンの硫酸化し抗ウイルス活性を調べた。ピペリジン-N-スルホン酸を使って硫酸化を行った。数平均分子量 4.0 × 10³ から 7.5 × 10³、比旋光度 +45.6° から +88.7° の硫酸化ガラクトマンナンを合成することが出来た。硫酸化ガラクトマンナンは標準と同程度の高い抗 HIV 性を示すことを見出した。ウイルスモデルペプチドとしてポリリジンを用いて、SPR 光散乱による粒径測定およびゼータ(ζ)電位測定を行った。全般的にガラクトース分枝の割合が少なくなると、抗 HIV 性は高くなりポリリジンとの相互作用も高くなる傾向であった。また、SPR、DLS、ゼータ(ζ)電位測定の結果

から、ポリリジンとの相互作用を定量的に検討した。

SPR による相互作用を調べたところ、結合速度定数、解離速度定数ともに標準のデキストラン硫酸と同程度であることが分かった。ポリリジンと高い相互作用を示すことが明らかになり、硫酸基に由来する(-)電荷とアミノ基に依拠する(+)電荷との静電的相互作用によって抗 HIV 性が発現していると考えた。そこで、光散乱測定装置を用いて粒子径を測定し、ゼータ(ζ)電位測定装置によって粒子の周りの電位を測定した。粒子径はポリリジンを加える前後で測定したところ、ポリリジンを添加後では3倍以上大きくなり、ゼータ(ζ)電位はポリリジン添加前では-13~-24mVであったものが、添加後では-9~-12mVとなりポリリジンの添加によって電位が変位していることを明らかにした。これらの結果から、硫酸化合成ガラクトマンナンは、静電的にウイルスと相互作用をすることによりウイルスが細胞への感染を阻害しているのではと推定した。

以上をまとめると、糖鎖は、タンパク質や脂質とともに生体高分子の1つである。天然糖鎖は多種類の構成糖から成り複雑な構造を持ち多くの水酸基を有している。しかもそれら水酸基の反応性の違いは小さく天然糖鎖と同じものを合成し機能発現メカニズムを解明する研究を困難なものにしている。我々はこの問題に取り組むために、無水糖誘導体の開環重合法によって糖鎖の合成を行っている。この方法でも天然糖鎖と全く同じものを合成することは困難であるが、高分子量を持ち天然糖鎖の部分構造、例えば分枝構造などの合成は可能である。天然糖鎖の機能性とその発現メカニズムを解明するために合成と天然の両方向からの研究開発を推進して行く。

本研究は、聖マリアンナ医科大学・中島秀喜教授、金本大成講師と共同で実施した研究の成果である。また、東京大学生産技術研究所・瓜生敏之名誉教授には貴重な研究デスクッションをして頂いた。シンガポール国立大学医学部・山本直樹教授には硫酸化糖鎖の抗 Dengue 熱ウイルス性について調べて頂くと同時に研究デスクッションも賜った。

<引用文献>

- (1) Gerber, Dutcher, Adams, Sherman, *Proc Soc Exp Biol Med.*, **99**, 590-593 (1958).
- (2) Yoshida *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 379-441 (2001).
- (3) Gordon, Kaneko, *J. Med.*, **28**, 108-128

(1997).

- (4) Uryu, Yoshida, et al, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 2385-2392 (1992).
- (5) Jeon, Uryu, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12536-12541 (2000).
- (6) Jagodzinski, Kozbor, *Viology*, **226**, 217-227 (1996).
- (7) Lindahl, *J. Biol. Chem.*, **25**, 9826 - 9830 (1985).
- (8) Osmond, et al, *Anal. Biochem.*, **310**, 199-207 (2002)
- (9) Tegshi, Han, Kanamoto, Nakashima, Yoshida, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **49**, 3241 - 3247 (2011).

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- (1) Xuzhe Zhao, Xianxiang Liang, Shuqin Han, Toshiyuki Uryu, Takashi Yoshida, "Successive saccharification and fermentation of cellulosic agricultural residues using a combination of cellulase and recombinant yeast", *Sen'i Gakkasi-shi*, **70**, 191-196 (2014).
- (2) Bai Yuting, Takashi Yoshida, "Separation of lacquer polysaccharides and interaction with poly-L-lysine", *Carbohydr. Polym.*, **98**, 270-275 (2013).
- (3) M. Okimoto, H. Yamamori, Masayuki Hoshi, Takashi Yoshida, "Anodic cyclization of dimethyl 2-(5-aryl-5-oxopentyl)malonates into the corresponding dimethyl 2-arylcyclopentane-1, 1-dicarboxylates", *Tetrahedron Lett.*, **55**, 1299-1302 (2014).
- (4) M. Okimoto, H. Yamamori, Kosuke Ohasgi, Masayuki Hoshi, Takashi Yoshida, "Anodic cyclization of dimethyl 2-(3-oxo-3-arylpropyl)malonates into the corresponding dimethyl

2-arylcylopropane-1, 1-dicarboxylates", *Synlett.*, **24**, 1568-1572 (2013).

(5) Koji Ichiyama, Sindhoora Bhargavi Gopala Reddy, Li Feng Zhang, Wei Xin Chin, Tegshi Muschin, Lars Heinig, Youichi Suzuki, Haraprasad Nanjundappa, Yoshiyuki Yoshinaka, Akihideo Ryo, Nobuo Nomura, Eng Eong Ooi, Subhash G. Vasudevan, Takashi Yoshida, Naoki Yamamoto, "Sulfated polysaccharide, curdlan sulfate, efficiently prevents entry/fusion and restricts antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro: A possible candidate for clinical application", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **7**, e2188 (pp 1-17) (2013).

(6) Surina Bo, Tegshi Muschin, Taisei Kanamoto, Hideki Nakashima, Takashi Yoshida, "Sulfation and biological activities of konjac glucomannan", *Carbohydr. Polym.*, **94**, 899-903 (2013).

(7) Rong Lu, Takashi Yoshida, Tetsuo Miyakoshi, "Oriental lacquer: A natural polymer", *Polymer Reviews*, 53(2), 153-191 (2013).

(8) Xianxiang Liang, Takashi Yoshida, Toshiyuki Uryu, "Direct saccharification and ethanol fermentation of cello-oligosaccharides with recombinant yeast", *Carbohydr. Polym.*, 91, 157-161 (2013).

(9) Kazuyuki Hattori, Takashi Yoshida, "Synthesis of a new 2-amino-glycan, poly-(1→6)- α -D-mannosamine, by ring opening polymerization of 1, 6-anhydro mannosamine derivatives", *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **50**, 4524 - 4531 (2012).

(10) S. Nishikawa, M. Okimoto, T. Yoshida, M. Hoshi, K. Ohashi, "Unexpected formation of novel oxazolidine and tetrahydrooxazine derivatives by condensation of 2-(hydroxymethyl) or 2-(2-hydroxyethyl)piperidine, and ketones", *Bulgarian Chem. Commun.*, **44**, 314-317 (2012).

(11) M. Okimoto, H. Yamamori, K. Ohashi, S. Nishikawa, M. Hoshi, T. Yoshida, "Anodic cyclization of 1,7-diarylheptane-1, 7-diones to the corresponding 1,

2-diaroylcyclopentanes", *Synlett*, **23**, 2544-2548 (2012).

(12) S. Han, T. Kanamoto, H. Nakashima, T. Yoshida, "Synthesis of a new amphiphilic glycodendrimer with antiviral functionality", *Carbohydr. Polym.*, **90**, 1061-1068 (2012).

(13) M. Okimoto, K. Ohashi, H. Yamamori, S. Nishikawa, M. Hoshi, T. Yoshida, "Electrooxidative cyclization of hydroxylamine compounds possessing a benzyl group", *Synthesis*, **44**, 1315-1322 (2012).

〔学会発表〕(計 40 件)

(1) Xianxiang LIANG, Xuzhe ZHAO, Takashi YOSHIDA, Toshiyuki URYU, "Ethanol synthesis from alkaline pretreated cellulosic biomass", 第 63 回高分子討論会 (平成 26 年 9 月 24 日、長崎)

(2) Yuting BAI, Takashi YOSHIDA, "Interaction mechanism between lacquer polysaccharides and peptides", 第 62 回高分子討論会 (平成 25 年 9 月 11 日、金沢)

(3) Futoshi Sumisa and Takashi Yoshida, "Cloning and Characterization of Bacterial Expansin, Enhancing Saccharification of Cellulose", The 13th Pacific Polymer Conference (平成 25 (2013) 年 11 月 17 日、Taiwan)

(4) Tegshi Muschin, Taisei Kanamoto, Hideki Nakashima, Takashi Yoshida, "Synthesis and potent biological activities of sulfated galactomannans", 高分子国際会議 IPC2012 (平成 24 年 12 月 2 日、神戸) 他

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 孝 (YOSHIDA, Takashi)
北見工業大学・工学部・バイオ環境化学科・教授

研究者番号 : 4 0 1 6 6 9 5 5

(2) 研究分担者

中島 秀喜 (NAKASHIMA, Hideki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 2 0 1 9 2 6 6 9