

学 位 論 文 題 名

Synthesis of New Sulfated Amino-Polysaccharides Having
Anti-HIV and Blood Anticoagulant Activities

(抗H I V活性および抗凝血性を有する硫酸アミノ多糖の合成)

学位論文内容の要旨

多糖は核酸、タンパク質と並ぶ三大生体高分子の一つである。糖質は主に生体の構築材やエネルギー源と考えられ、立体化学に起因する構造の多様性や選択的反応性の乏しさから、それほど注目されていなかった。しかし近年、糖鎖が生命現象の本質的な生理機構に深く関わっていることが次々と報告され、また各種分析機器の飛躍的な進歩と共に、構造と機能の関係が数多く明らかにされつつある。これらを解明し、同時に生化学的な用途へと拡大するには天然多糖の構造を正確に解析すると同時に、構造及び結合様式の明確な多糖を化学合成する必要がある。古くは単糖の重縮合に始まる多糖合成であるが、非選択的で規則性多糖は得られない。糖の持つ多官能性とアノマー炭素の立体制御が困難であるため、天然に匹敵するような高立体規則性かつ高重合度の多糖を得るのは容易ではない。一方、キチン、ヘパリンに代表されるよう、天然にはアミノ基含有多糖が数多く存在し、その特異な生理活性は興味深い。本論文の第一章では、その代表的な生理活性と硫酸化多糖が示す抗H I V活性について述べた。さらに、立体規則性多糖の合成法について記述し、中でも最も有用性の高い無水糖の開環重合法について詳しく説明した。

第二、三章では困難とされてきたアミノ多糖の開環重合法による合成の可能性を検討した。しかし、開環重合法によるアミノ多糖の合成は、アミノ基がカチオン触媒と反応し重合を妨害するため、アミノ前駆体を有する無水糖モノマーが必要とされる。1,6-無水グルコースの2位、3位または4位にアジド基を導入し、水酸基をベンジル保護したモノマーでは、3-アジド体が高い重合性を示したのに対し、2-あるいは4-アジド体は低重合性であった。この低重合性を詳細に解明するため、グルコースのエピマーであるアロース型の3-アジド化1,6-無水糖モノマーに注目し、合成、重合を試みた。セルロースなどの真空熱分解で得られる1,6-無水グルコースを出発原料に、目的モノマーを効率良く新規合成した。塩化メチレン中、五フッ化リン、五塩化アンチモンなどを開始剤として重合を行い、数平均分子量 $5.0 \times 10^3 \sim 24.0 \times 10^3$ のグリコシド結合が1,6- α 型に完全制御されたポリマーを高収率で得た。さらに、先に行われた3-アジド化1,6-グルコース、1,6-アロースとの比較により、アジド基の立体配置の相異は重合性を著しく左右するが、3位に限り、アジド基が重合性に与える影響は小さいことを見出した。

アミノ基が生理活性に及ぼす影響を詳細に調べるには、アミノ基含有率とその配列が制御された多糖を用いるのが効果的である。そこでアジド基を持たない1,6-無水糖と共重合を行い、得られたポリマーの構造を解析した。3-アジド化1,6-無水アロースと1,6-無水グルコース誘導体を種々の割合で共

重合し、Kelen-Tudos法で両モノマーの反応性比を計算した結果、 $r_{\text{azido}} = 0.66$ 、 $r_{\text{glucose}} = 1.67$ で、ほぼランダムに両モノマーが取り込まれ、共重合体中のモノマー組成は仕込比に一致することがわかった。さらに1,6-無水アロースとの共重合も試みたところ、同系列のアロースどうしてもさらにランダム性が強まり、 $r_{\text{azido}} = 0.92$ 、 $r_{\text{allose}} = 1.11$ と計算された。これは予想された各モノマーの単独重合性、すなわち、グルコース>アロース $\approx$ 3-アジドアロースの順と矛盾しなかった。合成ポリマーは水素化リチウムアルミニウムでアジド基をアミノ基に還元後、ベンジル基を除去してフリーのアミノ多糖へと導き、アミノ基含有率及びその分布が確立した立体規則性アミノ多糖を合成可能とした。

天然アミノ多糖の構成単位はグルコサミンが最も多く、グルコサミンのポリマーを合成することは生物学的に意義も大きい。そこで、保護したアミノ基を2位に有する1,6-無水グルコース誘導体を新規に合成し、その重合性を調べた。アミノ保護基としてはカチオン触媒が干渉しないと考えられるアルキル、シリル、ベンジル基などを用いた。その中で二官能性シリル基で環状保護したものは数平均分子量 4.1×10^3 のポリマーを与え、アミノ基フリーのポリマーを合成出来た。1,6-ジブプロモヘキサンで環状三級アミンに変換したモノマーも立体規則性ポリマーが得られた。しかし、ベンジル保護したものは重合せず、石油ベンジン不溶のオリゴマーのみをわずかに与えた。以上から1,6-無水糖の開環重合性は、2位の電子吸引性が大きいほど活性末端(1位)の電子密度が低下するためカチオン重合に有利であるが、2位置換基の立体障害に著しく影響を受けることを示した。

第四章では合成したアミノ多糖を硫酸化多糖へと導き、多糖の構造と抗HIV活性、抗凝血性との関係について考察した。硫酸化多糖は負の電荷を多く有し、エイズウイルス表層の糖タンパク質や凝血因子と静電的に相互作用する。第3章で合成した3-アミノアランを硫酸化後、 ^{13}C -NMRで構造解析し、2位と3位がほぼ完全に硫酸化されたアミノ多糖を得た。MTT法で抗HIV活性を測定した結果、数平均分子量 8.8×10^3 の硫酸化3-アミノアランの EC_{50} (正常細胞がHIVに感染するのを50%阻害する濃度)は $0.14 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、現在、米国で臨床中の標準カードラン硫酸($0.13 \mu\text{g}/\text{ml}$)に匹敵する高い活性を示した。これは同程度の分子量及び硫酸化度を有し、アミノ基を持たない硫酸化多糖に比べて非常に高い活性であった。一方、抗凝血性は標準のデキストラン硫酸($22.7 \text{ unit}/\text{mg}$)の2倍近い値($30 \sim 50 \text{ unit}/\text{mg}$)を示し、アミノ基を持たない硫酸化多糖に比べて増大することがわかった。さらに共重合でアミノ基数を制御した硫酸化多糖の結果から、アミノ糖残基が増加するに連れて抗HIV活性、抗凝血性ともに増大するということが示された。以上により、3位の硫酸アミド基は両活性に大きく寄与していることが明らかとなった。

第五章では以上の内容を総括し、第二章から第四章で得られた重要な事実と結果の考察を簡潔にまとめた。開環重合で得られた多糖は立体規則性になることが多く、従って構造も明確であり、分子量もある程度制御可能である。これは天然多糖の生物活性発現に必要な化学構造を調べる上で最も重要なことである。本研究で述べたアミノ多糖の合成法は、生命現象を担う多くの多糖合成の手助けとなり、合成した新規アミノ多糖は天然多糖の特異な生理機能を調べる上で重要なモデルになると同時に、高分子医薬としての応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 長 田 義 仁

副 査 助教授 吉 田 孝

副 査 助教授 坂 入 信 夫 (大学院地球環境科学研究科)

学 位 論 文 題 名

Synthesis of New Sulfated Amino-Polysaccharides Having Anti-HIV and Blood Anticoagulant Activities

(抗H I V活性および抗凝血性を有する硫酸アミノ多糖の合成)

近年、糖鎖が生命現象の本質的な生理機構に深く関わっていることが次々と報告され、また各種分析機器の飛躍的な進歩と共に、構造と機能の関係が数多く明らかにされつつある。これらを解明し、同時に生化学的な用途へと拡大するには天然多糖の構造を正確に解析すると同時に、構造及び結合様式の明確な多糖を化学合成する必要がある。一方、キチン、ヘパリンに代表されるよう、天然にはアミノ基含有多糖が数多く存在し、その特異な生理活性は興味深い。

このような背景のもとに、本論文の第一章ではアミノ多糖の代表的な生理活性と硫酸化多糖が示す抗H I V活性について述べている。さらに、立体規則性多糖の合成法、特に本研究で用いられている無水糖の開環重合法について説明している。

第二、三章では困難とされてきたアミノ多糖の開環重合法による合成の可能性を検討している。開環重合法によるアミノ多糖の合成は、アミノ基がカチオン触媒と反応し重合を妨害するため、アミノ前駆体を有する無水糖モノマーが必要とされる。通常、オリゴ糖合成においてはアジド基が汎用されるが、3-アジド化無水グルコースのみ重合可能で、他のアジド化無水糖は低重合性である。この低重合性を詳細に解明するため、グルコースのエピマーであるアロース型の3-アジド化1,6-無水糖モノマーに注目し、合成・重合を試みている。セルロースなどの真空熱分解で得られる1,6-無水グルコースを出発原料に、目的モノマーを効率良く新規合成し、塩化メチレン中、五フッ化リン、五塩化アンチモンなどを開始剤として重合を行い、数平均分子量 $5.0 \times 10^3 \sim 24.0 \times 10^3$ のグリコシド結合が1,6- α 型に完全制御されたポリマーを高収率で得ている。さらに、先に行われた3-アジド化1,6-グルコース、1,6-アロースとの比較により、アジド基の立体配置の相異は重合性を著しく左右するが、3位に限り、アジド基が重合性に与える影響は小さいことを見い出している。

アミノ基が生理活性に及ぼす影響を詳細に調べるには、アミノ基含有率とその配列の明確な多糖を用いるのが効果的である。本論文ではアジド基を持たない1,6-無水糖と共重合を行い、その目的を達成している。3-アジド化1,6-無水アロースと1,6-無水グルコース誘導体を種々の割合で共重合し、

Kelen-Tudos法で計算した両モノマーの反応性比 $r_{\text{azido}} = 0.66$ 、 $r_{\text{glucose}} = 1.67$ を用いて、共重合体中にランダムに両モノマーが取り込まれ、そのモノマー組成は仕込比に一致することを明らかにした。さらに1,6-無水アロースとの共重合も試み、同系列のアロースどうしてはさらにランダム性が強まり、 $r_{\text{azido}} = 0.92$ 、 $r_{\text{allose}} = 1.11$ となる知見を得ている。これは予想された各モノマーの単独重合性、すなわち、グルコース>アロース $\approx$ 3-アジドアロースの順と矛盾していない。合成ポリマーは水素化リチウムアルミニウムでアジド基をアミノ基に還元後、ベンジル基を除去してフリーのアミノ多糖へと導き、アミノ基含有率及びその分布が確立した立体規則性アミノ多糖を合成可能とした。

天然アミノ多糖の構成単位はグルコサミンが最も多く、グルコサミンのポリマーを合成することは生物学的に意義も大きい。本研究では、保護したアミノ基を2位に有する1,6-無水グルコース誘導体を新規に合成し、保護基と重合能の関係について調べている。アミノ保護基としてはカチオン触媒が干渉しないと考えられるアルキル、シリル、ベンジル基などを用い、その中で二官能性シリル基で環状保護したものは数平均分子量 4.1×10^3 のポリマーを与え、アミノ基フリーのポリマーを合成可能とした。しかし、ベンジル保護したものは重合せず、1,6-無水糖の開環重合性は、2位の電子吸引性が大きいほど活性末端（1位）の電子密度が低下するためカチオン重合に有利であるが、2位置換基の立体障害に著しく影響を受けることを示した。

第四章では合成したアミノ多糖を硫酸化多糖へと導き、多糖の構造と抗HIV活性、抗凝血性との関係について考察している。第3章で合成した3-アミノ-アランを硫酸化後、 ^{13}C -NMRで構造解析し、2位と3位がほぼ完全に硫酸化されたアミノ多糖を合成可能とした。MTT法による抗HIV活性において、数平均分子量 8.8×10^3 の硫酸化3-アミノアランの EC_{50} は $0.14 \mu\text{g/ml}$ で、現在、米国で臨床中の標準カードラン硫酸 ($0.13 \mu\text{g/ml}$) に匹敵する高い活性を示した。これは同程度の分子量及び硫酸化度を有し、アミノ基を持たない硫酸化多糖に比べて非常に高い活性である。一方、抗凝血性は標準のデキストラン硫酸 (22.7 unit/mg) の2倍近い値 ($30 \sim 50 \text{ unit/mg}$) を示し、アミノ基を持たない硫酸化多糖に比べて増大することを示した。さらに共重合でアミノ基数を制御した硫酸化多糖の結果より、アミノ糖残基が増加するに連れて抗HIV活性、抗凝血性ともに増大するということを示し、3位の硫酸アミド基は両活性に大きく寄与していることを明らかとした。

第五章では以上の内容を総括し、第二章から第四章で得られた重要な事実と結果の考察が簡潔にまとめられている。開環重合で得られた多糖は立体規則性になることが多く、従って構造も明確であり、分子量もある程度制御可能である。これは天然多糖の生物活性発現に必要な化学構造を調べる上で最も重要なことである。本研究で述べられたアミノ多糖の合成法は、生命現象を担う多くの多糖合成の手助けとなり、合成した新規アミノ多糖は天然多糖の特異な生理機能を調べる上で重要なモデルになると同時に、高分子医薬としての応用が期待される。

以上のように申請者は新規の無水糖モノマーの開環重合により、立体規則性アミノ多糖の合成法を開拓し、アミノ基が抗エイズウイルス作用及び抗凝血性に及ぼす影響を詳細にわたって系統的に調べた。よって、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認定した。