

学 位 論 文 題 名

Structure and Specific Biological Activities
of Chinese Lacquer Polysaccharides

(中国産漆多糖類の構造と生理活性)

学位論文内容の要旨

1. はじめに

漆は美しい塗膜を形成し優れた耐久性を示すので、アジアでは古くから漆器の材料として用いられている。漆は酵素重合、酸素酸化重合により塗膜を作る唯一の天然物なので次世代の塗料として注目されている。漆は主にウルシオール、ラッカーゼ酵素、糖タンパク、多糖類から構成される。ウルシオールの構造やラッカーゼ酵素によるウルシオールの重合機構などの研究は数多くあるが多糖類の研究例はあまりない。日本や中国では漆の葉、花、実などを漢方薬として使用している。

漆多糖類は、1963年に小田らによる酸分解法による構成単糖の同定、1984年に大島、熊野谿らによるメチル化分析法で部分化学構造が推定された。そこで本研究では、これまでにあまり研究例のない漆多糖類の簡便な漆構造解析手段を確立するためにNMRスペクトルを測定した。粘度を測定し、溶液中での構造について検討した。さらに、血液に対する生理活性、抗腫瘍性、抗HIV作用などを調べ、漆多糖構造と生理活性との関係を解明することを目的とした。

2. 中国産漆多糖類のNMRによる構造解析

漆多糖は中国産漆樹液からSephadex カラムで分離、精製した。GPC測定により8万6千と2万3千の分子量に25モル%と75モル%の割合で2つのピークが存在したが分離困難なためこのまま用いた。すでに大島らによって高度な分枝構造を持つ酸性多糖であることが明らかにされているがNMRスペクトルの測定による構造解析は行われていない。 ^{13}C 、 ^1H スペクトルでは数多くのシグナルが存在しこのままでは帰属困難であった。そこで、種々の二次元NMRを用いて構造解析を行った。一次元スペクトルでカーボンシグナルのC1領域が分離して現れたので、これまでの小田、大島らの構成糖やメチル化分析の結果を考慮して、単糖・オリゴ糖の文献値化学シフトを詳細に検討し主成分はD-ガラクトースであり、4-O-メチル-D-グルクロン酸、D-グルクロン酸、L-アラビノース、L-ラムノースからなると考えた。C1シグナルを帰属し、カーボンとプロトンシグナルの相関が現れるHMQCスペクトルから対応するH1シグナルを帰属した。プロトン-プロトン相関が現れるDQF-COSYスペクトルからH2シグナルを同定した。H2からH3の帰属はシグナルの重なりのため不可能であったので、NMRパルスのミキシング時間を変化させることでプロトンの遠隔カップリングが観測できるTOCSYスペクトルを測定した。各単糖成分のH1とH2、H3、H4、H5までのシグナルをそれぞれ検出することが出来た。この結果からHMQCスペクトルにより対応するカーボンシグナルを帰属した。さらに、結合2つまたは3つ隔てたカーボンまたはプロトンシグナルを観測することができるHMBCスペクトルから4-O-メチル-グルクロン酸のメチルプロトンシグナルより4位カーボンシグナルを帰属し、そこから3位と5位のプロトンシグナルを帰属した。これはHMQCスペクトルの結果と一致した。続いてDQF-COSYスペクトルの各H1とH2シグナルのカップリング定数を調べ、主鎖である1,3-D-ガラクトピラノースは $J_{1,2} = 7.2\text{ Hz}$ 、4-O-メチル-グルクロン酸は 9.0 Hz 、グルクロン酸は 8.1 Hz を持ち β 結合していることが明らかになった。また、側鎖末端に存在する

L-アラビノース、L-ラムノースは $J_{1,2} = 3.6 \text{ Hz}$ 以下になり α 結合であることが分かった。構成糖比をH 1プロトンシグナルの積分値から計算し、D-ガラクトース、4-O-メチル-D-グルクロン酸、D-グルクロン酸、L-アラビノース、L-ラムノースはそれぞれ62.0%、28.0%、3.2%、2.8%、4.0%であり、メチル化分析の結果とよく一致することが分かった。

以上の結果は、分枝の数や分枝に含まれる糖鎖の長さまでは知ることは不可能であったが、全体の構造を調べる時に、NMR測定が漆多糖類の構造解析にとって有効な手段であることを示し、構造と機能との関係を調べる上で用いることが出来ることを明らかにした。このNMR解析結果を基にして日本、台湾、ベトナム、ビルマ、カンボジアなどの漆多糖類の ^{13}C スペクトルを測定し、漆多糖の構造が大きく違うことを初めて明らかにした。

3. 粘度測定による漆多糖の水溶液中での構造

純水および食塩水中で粘度測定を行った。水溶液中では漆多糖の濃度を9.6 mg/mlから徐々に減じて測定した。濃度が薄くなると還元粘度は急上昇し高分子電解質の性質を示した。 $1.0 \times 10^{-4} \text{ N}$, $2.0 \times 10^{-4} \text{ N}$ の希食塩中では多糖濃度0.5 mg/mlまでは粘度が徐々に上昇しさらに薄い濃度になると急激に減少することが分かった。 $2.0 \times 10^{-3} \text{ N}$, 0.01 N, 0.5 N, 1 N食塩中では多糖濃度が薄くなるに従い還元粘度も直線的に減少した。還元粘度が最も小さくなった0.5 N食塩中での固有粘度は濃度0への補外から $[\eta] = 0.085 \text{ dl/g}$ と計算できた。純水中の固有粘度は粘度曲線からは計算出来なかったのでFuossの式に従って縦軸の値から $[\eta] = 0.65 \text{ dl/g}$ であることが分かった。

さらに2Nから5Nまでの食塩水中で粘度を測定すると、今度は粘度が徐々に上昇するという結果を得た。これはアルギン酸やヒアルロン酸などの直鎖状多糖や一般の高分子電解質にはない性質である。漆多糖は複雑な分枝構造を取っており分枝末端にグルクロン酸が結合している。この分枝の内部に対カチオンである Na^+ イオンが入り込むために分枝鎖が押し広げられ、結果として粘度に反映するものと推定した。

以上のように詳細な粘度測定結果から、漆多糖類は、分枝構造に由来する特異な粘度挙動を示すことを明らかにでき、分子量を考慮し広がった構造で存在していることが示唆された。

4. 漆多糖類の生理活性

漆は血行の改善や内蔵機能の強化、傷の治療などの漢方薬として中国や日本では昔から使われている。葉、花、実などが漢方薬として使われ、単糖、オリゴ糖、多糖などの糖類が含まれていることから、本研究では、漆多糖類に着目して生理活性を調べた。はじめに牛の全血（血しょう）を用いる血液凝固試験を行った。漆多糖は酸性多糖であるにもかかわらず抗凝血作用とは逆に血液の凝固を促進する作用であることを見出した。特異な分枝構造がいくつかの血液凝固因子を活性化していると考えた。次に、漆多糖の主鎖は1,3- β -D-ガラクトピラナンであり抗腫瘍性を示すレンチナンやシゾフィランなどと同じ主鎖結合様式を持っているのでラットを用いるサルコーマ180腫瘍退行試験を行った。各5ひきづつのラットにサルコーマ180腫瘍細胞による腫瘍を発生させ、漆多糖を種々の濃度で腹腔内注射および経口投与した。対照実験としてレンチナンおよび何も投与しない空試験も行った。この試験系はレンチナンの効果が最も高く現れる試験系である。腫瘍発生の7日目から1週間多糖を投与し、第7、9、11、14、16、18、21、28、35日目まで観測を続け、それぞれの日数のラットの腫瘍の重さを測った。何もしないラットのグループでは平均20gの腫瘍が発生したが、漆多糖を1 mg/kg腹腔内投与したラットの腫瘍は10gとなり有意な差があることが分かった。さらにレンチナンでは経口投与すると全く効かないのに対し漆多糖では経口投与でも腫瘍委縮効果が認められた。

漆多糖を硫酸化することによって抗HIV作用、抗凝血作用を調べた。抗HIV作用は、カードラン硫酸と比較した。すなわちHIVの増殖を50%抑制する濃度（ EC_{50} ）と細胞毒性（ CC_{50} ）で評価すると、分子量や硫酸化度により、 $\text{EC}_{50} = 0.5 \mu\text{g/ml}$, $\text{CC}_{50} = 457 \sim >1000 \mu\text{g/ml}$ となりカードラン硫酸（ $\text{EC}_{50} = 0.13 \mu\text{g/ml}$, $\text{CC}_{50} = >1000 \mu\text{g/ml}$ ）と同程度の低毒性で高い活性を持つことを明らかにした。

抗凝血作用は、アメリカ薬局方ヘパリン力価検定法に従って牛血しょうを用いて試験したところ9~15 unit/mgである。硫酸化度に比例し、硫酸化度が高くなると抗凝血作用も上昇したが、標準デキストラン

硫酸23 unit/mgと比較して低い値になった。硫酸化しない漆多糖は細胞毒性は低かったが（CC₅₀ => 1000 µg/ml）、抗HIV活性は認められなかった。漆多糖の分枝構造による血液凝固促進作用と硫酸基による抗凝血作用が拮抗して低い抗凝血作用を示すものと推定した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	西 村 紳一郎
副 査	教 授	中 田 允 夫
副 査	助教授	吉 田 孝
副 査	助教授	佐々木 直 樹

学 位 論 文 題 名

Structure and Specific Biological Activities of Chinese Lacquer Polysaccharides

(中国産漆多糖類の構造と生理活性)

近年、漆に関する研究が盛んに行われている。しかし、その多くはウルシオール構造やラッカーゼ酵素によるウルシオールの重合機構などの目的としており、漆多糖類の医薬としての研究例は未開拓の分野で、今後の発展が待たれている状況にある。

本論文は、このような現状にある漆多糖類について、一次元及び二次元NMRを用いて、漆多糖の構造を解明した。粘度を測定し、溶液中での構造について検討した。さらに、血液に対する生理活性、抗腫瘍性、抗HIV作用などを調べ、漆多糖の構造と生理活性との関係を解明することを目的としたものである。

1) 漆多糖類のNMRによる構造解析

漆多糖は中国産漆樹液から分離、精製したものをを用いた。種々の二次元NMRを用いて構造解析を行った。一次元スペクトルでC1領域が分離して現れたので、単糖・オリゴ糖の文献値化学シフトを詳細に検討し主成分はD-Galであり、4-O-Me-D-GlcA、D-GlcA、L-Ala、L-Rhaからなると考えた。C1を帰属し、HMQCでH1を帰属した。DQF-COSYからH2を同定した。H2からH3の帰属はシグナルの重なりのため不可能であったので、NMRパルスのミキシング時間を変化させることでプロトンの遠隔カップリングが観測できるTOCSYを測定した。各単糖成分のH1とH2、H3、H4、H5までのシグナルをそれぞれ検出することが出来た。この結果からHMQCにより対応するカーボンシグナルを帰属した。さらに、結合2つまたは3つ隔てたカーボンまたはプロトンシグナルを観測することができるHMBCから4-O-Me-D-GlcAのメチルプロトンシグナルよりC4を帰属し、そこからH3とH5を帰属した。これはHMQCの結果と一致した。続いてDQF-COSYスペクトルの各H1とH2シグナルのカップリング定数を調べ、主鎖である1,3-D-GalPは $J_{1,2} = 7.2$ Hz、4-O-Me-D-GlcAは9.0 Hz、D-GlcAは8.1 Hzを持ち β 結合していることが明らかになった。また、側鎖末端に存在するL-Ala、L-Rhaは $J_{1,2} = 3.6$ Hz以下になり α 結合であることが分かった。構成糖比をH1の積分値から計算し、D-Gal、4-O-Me-D-GlcA、D-GlcA、L-Ala、L-Rhaはそれぞれ62.0%、28.0%、3.2%、2.8%、4.0%であり、メチル化分析の結果とよく一致することが分

かった。

以上の結果は、分枝の数や分枝に含まれる糖鎖の長さまでは知ることは不可能であったが、全体の構造を調べる時、NMR測定が漆多糖類の構造解析にとって有効な手段であることを示し、構造と機能との関係を調べる上で用いることが出来ることを明らかにした。このNMR解析結果を基にして日本、台湾、ベトナム、ビルマ、カンボジアなどの漆多糖類の ^{13}C スペクトルを測定し、漆多糖の構造が大きく違うことを初めて明らかにした。

2) 粘度測定による漆多糖の水溶液中での構造

純水および食塩水中で粘度測定を行った。水溶液中では漆多糖の濃度を9.6 mg/mlから徐々に減じて測定した。濃度が薄くなると還元粘度は急上昇し高分子電解質の性質を示した。 $2.0 \times 10^{-3} \text{ N}$, 0.01 N , 0.5 N , 1 N 食塩中では多糖濃度が薄くなるに従い還元粘度も直線的に減少した。

さらに 2 N から 5 N までの食塩水中で粘度を測定すると、粘度が徐々に上昇するという結果を得た。漆多糖は複雑な分枝構造を取っており、この分枝の内部に対カチオンである Na イオンが入り込むために分枝鎖が押し広げられ、結果として粘度に反映するものと推定した。

以上のように詳細な粘度測定結果から、漆多糖類は、分枝構造に由来する特異な粘度挙動を示すことを明らかにでき、分子量を考慮し広がった構造で存在していることが示唆された。

3) 漆多糖類の生理活性

漆は血行の改善や内蔵機能の強化、傷の治療などの漢方薬として中国や日本では昔から使われている。本研究では、はじめに牛血漿を用いる血液凝固試験を行ったところ、血液凝固促進作用を見出した。特異な分枝構造がいずれかの血液凝固因子を活性化していると考えた。次に、ラットを用いる抗腫瘍実験を行ったところ、漆多糖は経口投与でも腹腔注射でも腫瘍委縮効果が認められた。

漆多糖を硫酸化することによって抗HIV作用、抗凝血作用を調べた。抗HIV作用は、カードラン硫酸と比較した。すなわちHIVの増殖を50%抑制する濃度と細胞毒性で評価すると、分子量や硫酸化度によりカードラン硫酸と同程度の低毒性で高い活性を持つことを明らかにした。

抗凝血作用は、アメリカ薬局方ヘパリン力価検定法に従って牛血漿を用いて試験した。硫酸化度に比例し、硫酸化度が高くなると抗凝血作用も上昇したが、標準デキストラン硫酸と比較して低い値になった。硫酸化しない漆多糖は細胞毒性は低かったが、抗HIV活性は認められなかった。漆多糖の分枝構造による血液凝固促進作用と硫酸基による抗凝血作用が拮抗して低い抗凝血作用を示すものと推定した。

著者は、漆多糖について、構造解析手段のためにNMR測定の有効性を示し、これまで知られていなかった生理活性を見出し、高分子化学に基礎を置く天然多糖類の研究に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。