

生理活性が期待される食物繊維多糖の化学修飾と構造計算

鬘谷 要, 後藤政幸

Chemical Modification and Structure Analysis of Dietary Fiber Polysaccharide with Expectation of Bioactivity

Kaname Katsuraya and Masayuki Gotoh

Abstract

There are many kind of carbohydrate compound having strong bioactivity. Authors had been reported that natural polysaccharide and oligosaccharide would have novel biological activity by chemical modification. Structure analysis of chemically modified dietary fiber polygalactosamine having NH_2 group on 2nd position by use of molecular force field calculation was also reported.

In this paper, we described that synthesis and structure analysis of sulfated polysaccharides, such as polygalactosamin and chitosan. Molecular orbital and semi-empirical molecular orbital methods were used for 3-dimensional graphical mapping of electron density, electrostatic potential (the energy of interaction of a point positive charge with the nuclei of a molecule), and local ionization potential (a measure of the ease with which electrons are detached from a region of space).

キーワード：ポリガラクトサミン、キトサン、硫酸化、分子軌道法、計算化学

緒 言

糖鎖はタンパクとともに生体を構成し、信号伝達物質としての働きなどその詳細な生理活性が明らかになりつつある物質である。単糖としての構造もちろん重要であるが、そのつながり方や置換基の有無が生理活性に与える影響が大きいことが知られている。著者らはこれまでに天然の多糖や、それから誘導されるオリゴ糖を化学修飾することにより、抗エイズウイルス活性などの生理活性を発現させることを報告してきた¹⁻¹⁰⁾。この際に糖の水酸基を高い硫酸化度で硫酸化する方法や、位置選択的に硫酸化する方法を確立してきた¹¹⁾。また、還元アミノ化反応を用いた糖鎖の化学修飾法についても多くの知見を得ている¹²⁾。さらにコ

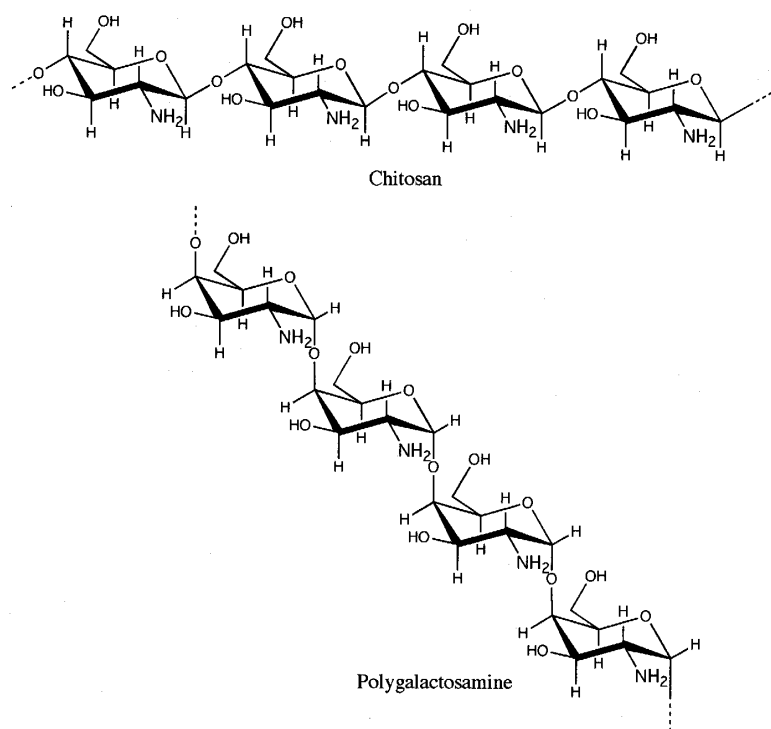


Fig. 1 Chemical structure of chitosan and polygalactosamine.

ンピュータを用いた分子力場計算や分子軌道計算が比較的容易に利用できるようになったことから、計算化学の手法を用いて糖鎖の立体高次構造の推定を行い報告している¹³⁾。

このような背景に鑑み、今回いくつかの生理活性が期待される糖鎖の合成と、その分子構造を半経験的分子軌道計算法を用いて、立体構造のみならず表面電荷や電子密度までを計算し、目的化合物の分子の性質の推定を行った。

実験及び計算方法

試 薬

(1→4)- α -ポリガラクトサミンはヒゲタ醤油、クロルスルホン酸、キトサンは和光純薬工業、三酸化イオウ・ピリジン錯体は東京化成、トルイジンブルーはChroma-Gesellschaft製をそれぞれそのまま使用した。ピリジンは和光純薬特級試薬を水酸化カリウムで乾燥させた物を用いた。

キトサンおよびポリガラクトサミンの前処理

1N水酸化ナトリウム水溶液にポリガラクトサミンを40~45℃に加温して溶解させ、35℃に保った透析浴中、分画分子量13000の透析膜を用い、約50Lの加温イオン交換水で24時間

透析した。調整した水溶液は温度を40℃以下にならないように保ち、次の反応に用いた。

ポリガラクトサミンの硫酸化

ポリガラクトサミンを水に溶かし均一な溶液とし、半量のピリジンと共にエバポレータで、溶媒量が約3分の1になるまで減圧濃縮した。この残渣溶液に元の量までピリジンを加えさらに3分の1まで濃縮することを10回繰り返した。この乾燥ピリジン溶液中に、三酸化イオウ・ピリジン錯体を糖の水酸基に対して2~3当量加え、85℃で90分攪拌して反応を行った。反応終了後40℃まで放冷することで硫酸化された糖が油状の沈殿となったため、上澄みをデカンテーションで除き、沈殿を少量の水に溶解させた。水溶液をpH7.0~7.5の範囲に0.1N水酸化ナトリウム水溶液で調整し、硫酸化糖の確認をトルイジンブルー試験により行った。分画分子量13000の透析膜を用い、約100Lのイオン交換水で2日間にわたり透析し、内容物をpH7.0~7.5の範囲に調整し水から凍結乾燥を行い、硫酸化物を白色の固体として得た。

キトサンの硫酸化

1gのキトサンを100mlの2%酢酸に溶解させ、ろ過後水酸化ナトリウムで中和した。この際の沈殿を水、エタノール、エーテルで洗い10mlのピリジンに懸濁させた。別途水冷下に12mlのピリジンに2mlのクロルスルホン酸を加えたものを調整し、ここに前述の懸濁液を加え、100℃で1時間反応させ、水酸化ナトリウムでナトリウム塩とし、エタノール再沈による洗浄と2日間の透析により目的物を得た。

半経験的分子軌道計算と分子力場計算

半経験的分子力場計算及び分子軌道計算にはWavefunction社製のSpartan Macintosh版'02 Ver1.0.6を用いた。分子力場計算にはSYBYL力場(Tripos, Inc.)およびMMFF94力場(Merck Pharmaceuticals)を使用した。分子軌道計算はHartree-Fock (3-21G)を、半経験的分子軌道法(Semi-Empirical)ではAM1、PM3モデルを用いた。

計算の実行にはApple Computer社製 Power Macintosh G5 (Dual 2GHz CPU, 1.5GB RAM)を用いた。

多糖部分の初期構造および最適化

グルサミン及びガラクトサミンはシクロヘキサンの椅子型コンフォメーションを基とし、分子力場計算により安定構造としたものから出発した。これを、ポリグルコサミン(キトサン)では(1→4)-β-型に、ポリガラクトサミンでは(1→4)-α-型に単純に結合させ、糖残基間のエーテル酸素の両側のC-O結合の二面角を前報に準じ細かく変化させ、2次元エネルギーマッピングを求めた。ここで得られた最も安定な二面角を用いて6糖骨格を構築し、グリコシド結合を固定し、さらに分子力場計算を行い最適化構造とした。

多糖部分の硫酸化構造および最適化

位置選択的な硫酸化を行わない場合グルサミン及びガラクトサミンでは、硫酸基は1級水酸基である6位とアミノ基に導入されやすいことから、2位と6位に硫酸基を導入された構造を構築した。前項で求めた安定構造の2位と6位の水酸基に硫酸基を導入し、さらに分子力場計算を行い安定構造とした。

電子密度等値面の構築

グルコサミン及びガラクトサミンとその硫酸化物の電子密度が $0.002\text{electrons/au}^3$ となる電子密度等値面を求めた。分子軌道計算は3-21G Hartree-Fock法とPM3半経験的 (Semi-empirical) 分子軌道計算を試みた。総電荷 (Total Charge) は0、スピン多重度 (Multiplicity) はSingletで行った。また数個以上の単糖構造を持つ場合、発散もしくは振動を起こしたため収束強化オプション "Converge" を使用した。この等値面にイオン化ポテンシャルのレベルをマッピングした。

静電ポテンシャル等値面の構築

グルサミン及びガラクトサミンとその硫酸化物の静電ポテンシャルが -20kcal/mol となる静電ポテンシャル等値面を求めた。ここでの静電ポテンシャルは分子の核や電子と点電荷の相互のエネルギーを意味するもので、PM3半経験的 (Semi-empirical) 分子軌道計算およびHartree-Fock (3-21G) 分子軌道計算を試みた。総電荷 (Total Charge) は0、スピン多重度 (Multiplicity) はSingletで行った。また収束強化オプション "Converge" を使用した。

結果と考察

ポリガラクトサミンおよびキトサンホウ酸緩衝溶液の調整

分子量の大きな2-アミノ多糖は、未処理のままでは水素結合が原因となり水に対して極めて難溶であり、このアミノ基に起因する水素結合を絶つ目的で、まず1N水酸化ナトリウム水溶液に溶解させた。水溶液を 50°C 程度に加熱したところポリガラクトサミンは30分以内に完全に溶解し黄色透明となった。一方でキトサンは120分後も若干浮遊物が懸濁した状態であった。還元アミノ化反応においてはpHを緩衝溶液により8.5~9.0に保つ必要があるため過剰の水酸化ナトリウムを透析により除いた。透析浴を 35°C に保つことにより水溶液のpHを7.0~7.5まで下げた際でもポリガラクトサミンの析出を完全に抑えることが可能であったが、キトサンは半透明の懸濁液となった。キトサンでは懸濁状態のまま実施した。

ピリジン溶媒への置換と硫酸化

前報の方法¹³⁾で溶媒をピリジンに置換したが、ポリガラクトサミンでは若干、キトサンで

Table 1 Sulfation of Chitosan and (1→4)- α -Polygalactosamine^{a)}

Run	Poly-saccharide.		Sulfating reagent		Time min.	Yield mg	Toluidineblue Test
	kind of poly-sac.	weight (mg)	kind	mg			
1	Chitosan	100	SO ₃ -Py ^{b)}	200	90	110	±
2	Chitosan	100	SO ₃ -Py ^{b)}	400	90	105	+
3	Chitosan	100	SO ₃ -Py ^{b)}	800	90	123	+
4	Chitosan	100	CS ^{c)}	200	90	125	+
5	Chitosan	100	CS ^{c)}	800	90	133	+
6	Polygalactosamin	75	SO ₃ -Py ^{b)}	150	90	120	+
7	Polygalactosamin	75	SO ₃ -Py ^{b)}	300	90	181	+
8	Polygalactosamin	75	SO ₃ -Py ^{b)}	600	90	208	+

a) Sulfation was carried out at 90°C.

b) Sulfur trioxide-pyridine complex.

c) Chlorosulfonic acid

は顕著な懸濁液となった。三酸化硫黄ピリジン錯体での硫酸化反応はピリジン溶媒中で実施したが、反応中は懸濁状態から、粘稠なシロップ状となった。硫酸化の結果はTable 1に示した。

ポリガラクトサミンおよびキトサンの構造計算

ポリガラクトサミン、キトサン共にピラノース環は交互に配列した構造が安定と判断された。ポリガラクトサミンは(1→4)- α -ガラクトタン型構造を持つため、アキシアル-アキシアル結合によって、一方キトサンは(1→4)- β -グルカン型構造を持つため、エカトリアル-エカトリアル結合によって主鎖構造を構築していることにより、明確なら旋構造を取らずに比較的直鎖に近い構造をとったものと考えられる。興味深いことにポリガラクトサミンとキトサンを比較した場合、同じ6糖では分子鎖長がポリガラクトサミンでは26.30 Å、キトサンでは31.49 Åと2割程度異なる鎖長を持つと推定された。

硫酸化ポリガラクトサミンおよび硫酸化キトサンの構造計算

硫酸基が導入された場合でもポリガラクトサミン、キトサン共にピラノース環は交互に配列した構造が安定と判断された。硫酸化前と同じいずれの構造でもアミノ基は主鎖に対してある平面を構成する方向に並んだ。硫酸化前では6糖の分子鎖長が硫酸化キトサンでは31.77 Åとキトサンの31.49 Åとほとんど変わらなかったのに対して、硫酸化ポリガラクトサミンでは28.50 Åとなりポリガラクトサミンの26.30 Åに比べて有意に増加した。これは、前者が硫酸基を収容するのにほぼ十分な空間的広がりを持っていたのに対して、後者はそのままでは収容できなかったものと考察された。

電子密度等値面の構築

グルコサミン及びガラクトサミンとその硫酸化物について、電子密度が $0.002\text{electrons}/\text{au}^3$ となる電子密度等値面に静電ポテンシャルの状態をマッピングしたものをFig. 2a、2bに示す。

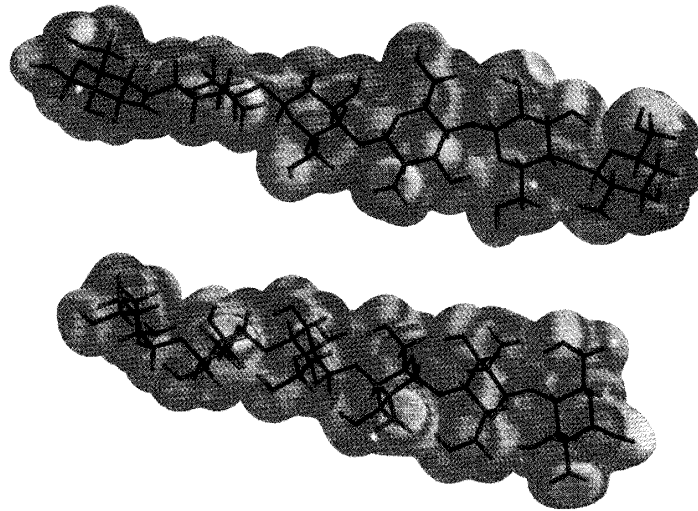


Fig. 2a Tube model and electron density surface ($0.002\text{ electrons}/\text{au}^3$) with local ionization potential of chitosan (upper) and $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-polygalactosamine}$.

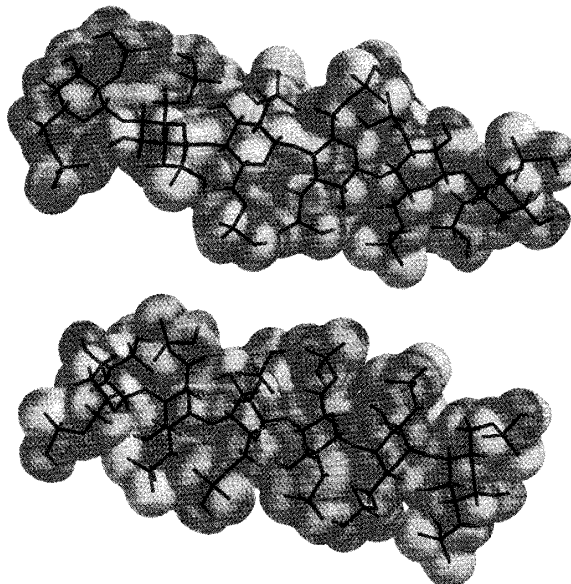


Fig. 2b Tube model and electron density surface ($0.002\text{ electrons}/\text{au}^3$) of sulfated chitosan (upper) and sulfated $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-polygalactosamine}$.

Fig. 2aからポリガラクトサミンの方が赤く示されるイオン化しやすい部位が規則的に配置されていることが分かる。キトサンも同じ数の荷電部位を持つがその部位は不規則に現れている。抗ウイルス活性などは電荷の分布が活性に大きく影響することが知られており、両者の違いは生理活性に影響を及ぼすと考えられる。Fig. 2bの硫酸化物の比較でも解離しや

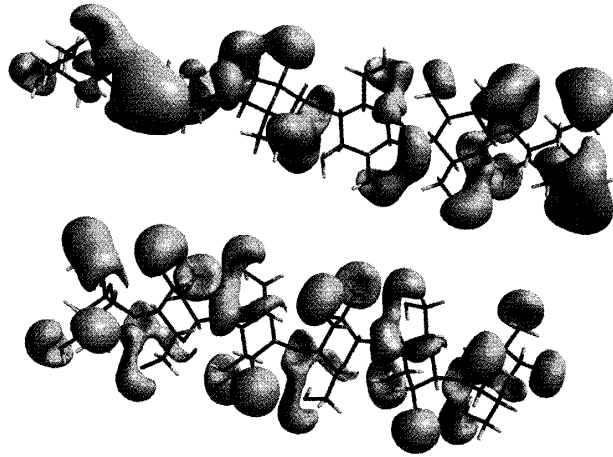


Fig. 3a Electrostatic potential surface (-20kcal/mol) of chitosan (upper) and $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-polygalactosamine}$.

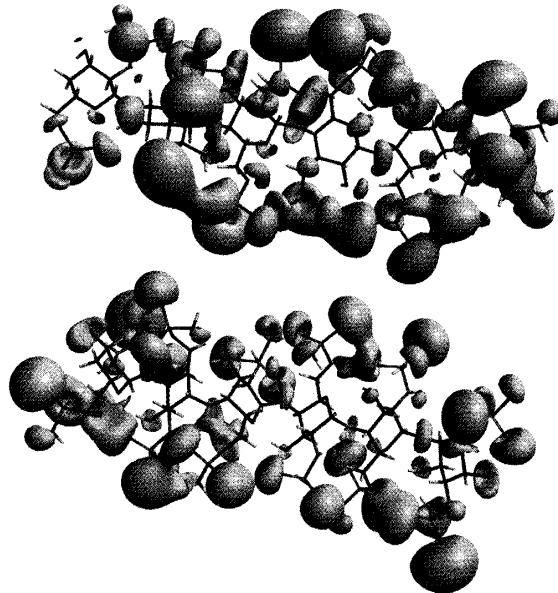


Fig. 3b Electrostatic potential surface (-20kcal/mol) of sulfated chitosan (upper) and sulfate $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-polygalactosamine}$.

すい部分が赤から黄に示されているが、キトサンの方がイオン化しやすい部位が面状に広い範囲に及んでいることが示された。著者らは抗エイズウイルス活性が硫酸化度、即ち単位糖あたりの硫酸基の数に大きく依存することを報告している¹⁰⁾が、今回示された結果から、キトサン骨格の方が同じ硫酸化度であっても高い活性を示す可能性が推察された。

静電ポテンシャル等値面の構築

ポリガラクトサミン、キトサンとその硫酸化物について、 -20kcal/mol となる静電ポテンシャル等値面をFig. 3a、3bに示す。

灰色で示されるモデルは主として窒素および酸素の非共有電子対を示しており、ポリガラクトサミンとキトサン、硫酸化ポリガラクトサミンと硫酸化キトサンのそれぞれの比較において顕著な差異は認められなかった。

結 言

ポリガラクトサミンおよびキトサンの硫酸化物を合成しその分子軌道法による解析を行った。化学修飾する前のキトサンがポリガラクトサミンに比較して高い生理活性を持つことを、計算化学的手法で推定できる可能性が示された。生理活性の推定には、電子密度等値面への静電ポテンシャルのマッピングが有効であると考えられた。

引用文献

- 1) Uryu, T., Katsuraya, K., Yamamoto, N., et al. : Sulfated Alkyl Oligosaccharides with Potent Inhibitory Effects on Human Immunodeficiency Virus Infection, *Biochem. Pharm.*, 43, 2385-2392 (1992).
- 2) Katsuraya, K., Nakashima, H., Uryu, T., et al. : Synthesis of Sulfated Alkyl Malto- and Laminari-oligosaccharides with Potent Inhibitory Effects on AIDS Virus Infection, *Carbohydr. Res.*, 260, 51-61 (1994).
- 3) Katsuraya, K., Nakashima, H., Uryu, T., et al. : Synthesis of Sulfated Alkyl Laminari-oligosaccharides Having Potent Anti-HIV Activity and Relationship between Structure and Biological Activities., *Macromolecules*, 27, 6695-6699 (1994).
- 4) Nakashima, H., Katsuraya, K., Schinazi, R.F., et al. : Sulfated Alkyl Oligosaccharides Inhibits Human Immunodeficiency Virus in Vitro and Provide Sustained Drug Levels in Mammals, *Antiviral Chem. Chemotherapy*, 6, 271-280 (1995).
- 5) Katsuraya, K., Nakashima, H., Uryu, T., et al. : Synthesis of Sulfated Alkyl Malto-oligo-

- saccharides with Potent Inhibitory Effects on AIDS Virus Infection, *Macromolecules*, 28, 6697–6700 (1995).
- 6) Jeon, K.-J., Katsuraya, K., Uryu, T., et al. : Studies on Interaction Mechanism of Sulfated Polysaccharides as an AIDS Drug by NMR, *Macromolecules*, 30, 1997–2001 (1997).
- 7) Gao, Y., Katsuraya, K., Uryu, T. : Synthesis of Regioselective Substituted Curdlan Sulfates with Medium Molecular Weights and Their Specific Anti-HIV-1 Activities, *Macromolecules*, 30, 3224–3228 (1997).
- 8) Uryu, T., Katsuraya, K., Nakashima, H. : Synthesis of Sulfated Alkyl Oligosaccharides with Potent Anti-HIV Activity, *Macromol Symp.* 120, 147–158 (1997).
- 9) Katsuraya, K., Nakashima, H., Uryu, T., et al. : Synthesis of Sulfated Oligosaccharide Glycosides Having High Anti-HIV Activity and Relationship Between Activity and Chemical Structure, *Carbohydr. Res.*, 315, 234–242 (1999).
- 10) Katsuraya, K., Jeon, K.-J., Nakashima, H., Uryu, T. : NMR Studies on Structure and Action Mechanism of Sulfated Dodecyl Laminaripentaoside with High Anti-HIV Activity, *Polym. J.* 31, 924–928 (1999).
- 11) Gao, Y., Katsuraya, K., Uryu, T., et al. : Synthesis, Enzymatic Hydrolysis and Anti-HIV Activity of AZT-Spacer-Curdlan Sulfate, *Macromolecules*, 32, 8319–8324 (1999).
- 12) Baigude, H., Katsuraya, K., Uryu, T., et al. : Synthesis of Sphere-Type Monodispersed Oligosaccharide-Polypeptide Dendrimers, *Macromolecules*, 36, 7100–7106 (2003).
- 13) 鬘谷要、後藤政幸他、食物繊維糖鎖ポリガラクトサミンへのオリゴ糖鎖導入とその立体構造の推定、和洋女子大学紀要家政系編、43、111 (2003)。

鬘 谷 要 (和洋女子大学家政学部服飾造形学科助教授)

後 藤 政 幸 (和洋女子大学家政学部健康栄養学科教授)