

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

髪谷 要, 小平志乃, 出山悦代, 後藤政幸

Introduction of Oligosaccharide onto Dietary Fiber Polygalactosamine and Estimation of Its Three-Dimensional Structure

Kaname KATSURAYA, Shino KODAIRA, Etsuyo IDEYAMA
and Masayuki GOTOH

キチンやキトサンと同じ2-アミノ糖を基本単位とする食物繊維糖鎖の一つである(1→4)- α -ポリガラクトサミンの化学修飾による新規機能分子化を検討した。(1→4)- α -ポリガラクトサミン2位のアミノ基を、穏和な水系緩衝溶液条件でボラン・ピリジン錯体を還元剤とする還元アミノ化反応により置換させた。置換基としては、マルトースやラクトースをはじめとするオリゴ糖を用い、種々の条件を検討した。還元アミノ化反応では、ポリガラクトサミン中のガラクトサミン残基に対するオリゴ糖のモル比に応じて、置換度が異なる生成物を得た。これらのオリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミンを、三酸化イオウ・ピリジン錯体を硫酸化剤として、乾燥ピリジン中で硫酸化した。硫酸化生成物は極めて高い水溶性を示した。さらに、オリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミンの分子構造を、コンピュータを用いた分子軌道計算、分子力場計算により推定した。計算結果から、オリゴ糖鎖が導入された場合、主鎖構造は僅かに湾曲した直鎖状となり、側鎖はほぼ完全に交互に位置する構造を取ることが予測された。らせん状の構造を取らなかったのは、主鎖構造の糖鎖間の結合様式によるものと考えられた。

キーワード：ポリガラクトサミン、糖鎖高分子、還元アミノ化、硫酸化糖、分子力場計算

緒 言

食物繊維である多糖は、生体親和性が高く主鎖構造を選ぶことで生体内で比較的安定で安全な薬剤の基質となり得る。近年薬剤そのものをはじめドラッグデリバティブシステムや、医療用人工材料への応用が進んでおり、最も注目されている生体高分子材料の一つとなっている。著者らはこれまでに、天然および合成の多糖を化学修飾することで、多糖が本来持た

なかった新しい生理活性機能を発現させ得ることを見出した。その一例として硫酸化多糖や硫酸化オリゴ糖誘導体が、高い抗エイズウイルス活性と低い毒性を併せ持つ事を明らかにし、その作用機構の推定と併せて報告してきた¹¹⁾⁻¹²⁾。

一方で、糖鎖やペプチド鎖などの中で、分子量が一定量以上の生体機能分子は、その生体機能性の一部が分子の二次以上の高次構造に由来することから、有機化学反応に対して必ずしも安定でないことが知られている。我々は、このような分子を穏和で高次構造をも損なうことがないような条件下で取り扱う手法として、糖の還元末端を利用した還元アミノ化反応に着目しその応用について報告してきた¹³⁾。還元アミノ化反応は還元性を示す糖の末端とアミノ基とを利用できるため、生体高分子への適応範囲が広い。

これまで、還元アミノ化反応によって糖鎖高分子に糖鎖以外の置換基を導入することや、糖鎖以外的高分子を糖鎖によって修飾することを報告してきたが、糖鎖高分子を異なる糖鎖によって修飾するという試みは報告がない。糖鎖高分子に直接異なった糖鎖分子を導入できれば、新規の分枝多糖を合成することが出来、新しい生体機能性発現の可能性が大きいと考えられる。

そこで、本研究ではキチンやキトサンと同じ主鎖に2-アミノ糖を有するポリガラクトサミンに着目し、側鎖としてのオリゴ糖鎖を、2位のアミノ基を介して還元アミノ化反応で化学結合させる事を目的とした。オリゴ糖鎖としては、まず高い水溶性が期待されるマルトースや、非還元末端に肝実質細胞親和性をはじめとする高い生体認識能を有するガラクトースを持つラクトースを用いた。今回は還元アミノ化反応を水系溶媒中で実施することで、それぞれの構造や機能を損なうことなく新しい分子を構築できるものと考えられ、各分子本来の機能を活かした上で、相乗効果による新規な生体機能を賦与できるものと期待された。2-アミノ糖は2位に存在するアミノ基により、強固な水素結合を形成し溶解性が低いことが知られているため、還元アミノ化反応に際して、予め水素結合を切断する前処理を行い均一な系で実施することも検討事項とした。

得られた新規オリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミンにつき、水溶性の向上など物性の改質と、異なる生理活性の付与という観点から骨格上の水酸基を化学的硫酸化の手法で修飾し、新たな機能性発現の可能性についても検討することを併せて目的とした。

さらに、導入されたオリゴ糖側鎖の主鎖構造を検討するため、分子軌道計算、分子力場計算を用いて主鎖骨格中のガラクトサミン残基間の結合二面角を最適化し立体構造を予測した。

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、三酸化イオウ・ピリジン錯体は東京化成、ボラン・ピリジン錯体はAldrich Chemical、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。

ポリガラクトサミンの前処理

1 N水酸化ナトリウム水溶液にポリガラクトサミンを40~45℃に加熱して溶解させ、35℃に保った透析浴中、分画分子量13,000の透析膜を用い、約50 Lの加熱イオン交換水で24時間透析した。透析膜内の水溶液を50℃に加熱し0.1mol/lの濃度になるよう四ホウ酸ナトリウムを6時間かけて徐々に溶解させた。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へのオリゴ糖の導入

アミノ基を外側に有するリジンデンドリマーや、主鎖に規則的にアミノ基を有するポリペプチドであるポリリジンへの糖鎖の導入法として著者らが用いてきた条件に倣い以下の条件を用いた。ポリガラクトサミン ($\overline{M}_w \geq 10$ 万) を0.1Mホウ酸緩衝溶液中、アミノ基当たり1~10当量のマルトース、マルトトリオースまたはラクトース等のオリゴ糖と、オリゴ糖と同じ当量のボラン・ピリジン錯体を還元剤として45~50℃で7~8日間反応させた。反応終了後直ちに分画分子量約13,000の透析膜を用いて透析を行い未反応の糖と還元剤を除いた。透析は透析浴にイオン交換水約100 Lを2日間にわたり通して行った。これらを水から凍結乾燥し白色固体として目的物を得た。

オリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミンの硫酸化

一連のオリゴ糖鎖導入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、硫酸化糖の存在はトルイジンブルー試験により行った。分画分子量13,000の透析膜を用い、約100 L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。

分子軌道計算と分子力場計算

分子力場計算及び分子軌道計算にはCache Scientific社製のCache 3.9 (Macintosh版)を用いた。分子軌道計算はMOPACを使用した。分子力場計算にはMM2を使用し、単一構造の最適化の場合は、収束条件を0.0001kcal/mol以下、収束しない場合の計算上限界数を3,000回とし、二面角探索の二次元マッピングの場合は、1点当たりの収束条件を0.001 kcal/mol以下、収束しない場合の計算上限界数を300回としConjugate Gradient法を用いて行った。

オリゴ糖部分の初期構造および最適化

グルコース及びガラクトース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、分子軌道計算により安定構造としたものから出発した。マルトースの場合は(1→4)- α -型にグルコースを二分子結合させ、ラクトースの場合は(1→4)- α -型にガラクトースとグルコースを結合させた。糖残基間のエーテル酸素の両側のC-O結合の二面角を二次元マッピング法で最適化し、エネルギーの最低のものから4 kcal/mol以内の構造を選びその中から最も妥当と考えられるものを求めた。これをそれぞれ側鎖オリゴ糖の初期構造とし分子軌道計算を行い安定化オリゴ糖ユニットとした。

ポリガラクトサミンの初期構造および最適化

まずガラクトサミンは前項同様シクロヘキサンの椅子型コンフォメーションを基とし、分子軌道計算により安定構造としたものを基本とした。次にこの2分子を(1→4)- α -型に結合させ、同様に二次元マッピング法で最適化し、エネルギーの最低のものから4 kcal/mol以内の構造を選びその中から最も妥当と考えられるものを初期構造とし、分子軌道計算を行い二量体の安定コンフォメーションとした。この2量体を2分子(1→4)- α -型に結合させ、同様に二次元マッピング法で最適化し、エネルギーの最低のものから4 kcal/mol以内の構造中最も妥当と考えられるものをさらに安定化させ4量体とした。この手法を繰り返すことで16量体まで求めた。一方で安定2量体の糖残基間の結合をもとにPolymerize methodで20量体とし、これを力場計算で安定化させ推定構造を求めた。

オリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミン分子の構築

まずポリガラクトサミン鎖に単分子のオリゴ糖鎖が還元アミノ化で導入された場合を仮定し、ポリガラクトサミンの安定4量体構造の中央の2糖残基にオリゴ糖鎖を結合させ、分子力場計算により中央のエーテル酸素の両側のC-O結合の二面角を二次元マッピング法で最適

化し、エネルギーの最低のものから 4 kcal/mol 以内の構造中最も妥当と考えられるものを初期構造としさらに最適化した。同様にポリガラクトサミンの安定 4 量体構造の全ての糖残基にオリゴ糖鎖を結合させ、分子力場計算により同様に最適化した。両者から求めた中央の結合二面角は誤差の範囲で一致したため、この結合二面角を用いてガラクトサミンの 12 量体骨格を構築し、分子力場計算により最適化した。

結果と考察

ポリガラクトサミンホウ酸緩衝溶液の調整

分子量の大きなポリガラクトサミンは、未処理のままでは水に対して極めて難溶であり、試みた約 70℃ までの加温も有効ではないと判断された。同様にホウ酸緩衝溶液にもポリガラクトサミンが不溶であったため、アミノ基に起因する水素結合を絶つ目的で、まず 1 N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解させた。水溶液を 45℃ 程度に加熱したところ 1 時間以内に完全に溶解し黄色透明となった。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。室温での透析を行ったところ時間の経過と共に溶液が徐々に懸濁し、12 時間以上経過させた場合透析チューブ内に黄白色の沈殿を認めたが、透析浴を 35℃ 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。ポリガラクトサミンの完全な溶解を維持したまま溶媒系を緩衝溶液とするため、50℃ に加温下で所定の濃度になるよう四ホウ酸ナトリウムを溶解させることで、ポリガラクトサミンホウ酸緩衝溶液を調整することが出来た。

還元アミノ化反応によるオリゴ糖鎖の導入

前述の緩衝溶液にオリゴ糖を加えボラン・ピリジン錯体と共に攪拌し還元アミノ化反応を行った結果、ラクトース、マルトースの何れとの反応の場合も、Table 1 に示したように仕込み比に応じて異なる置換度の生成物を得た。

両者の比較からラクトースに比べてマルトースの方が主鎖に導入されにくい傾向が認められたが、その原因は現在のところ不明である。また、生成物は水に易溶となったが、オリゴ糖鎖により置換されたアミノ基の割合が少ない化合物では、透析中に懸濁や沈殿が生じるなど水に対する顕著な溶解度の低下が認められた。このことから、水溶性を支配する主たる要因は側鎖糖鎖による 2 位への置換がアミノ基に起因する水素結合の影響を消失させたためと推察された。

Table 1. Introduction of Oligosaccharide onto (1→4)- α -Polygalactosamine by Reductive Amination

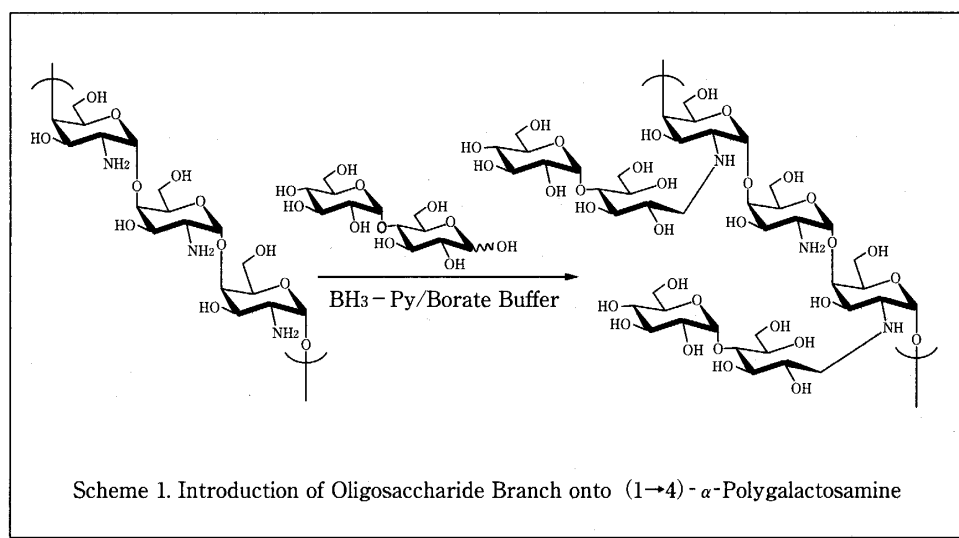
Run	Polygalactosamine		Oligosaccharide		BH ₃ -Py equiv ^{c)}	Time day	DS ^{d)}
	weight (mg)	mmol ^{a)}	kind	equiv ^{b)}			
1	250	1.55	Lactose	1.0	1.0	7	0.34
2	250	1.55	Lactose	5.0	5.0	7	0.52
3	250	1.55	Lactose	10.0	10.0	7	0.71
4	250	1.55	Maltose	1.0	1.0	7	0.20
5	250	1.55	Maltose	5.0	5.0	7	0.33
6	250	1.55	Maltose	10.0	10.0	7	0.48
7	200	1.24	Maltotriose	5.0	5.0	8	0.31

a) Based on monosaccharide residue.

b) Equiv to galactosamin residue.

c) Equiv to galactosamin residue.

d) Degree of substitution. Number of oligosaccharide molecules/galactosamin residue.



オリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミンの硫酸化

硫酸化反応はピリジン溶媒中で実施したが、主鎖であるポリガラクトサミンへのオリゴ糖鎖の導入率が低い場合、溶媒への溶解性が低く懸濁状態となった。

これまで種々の糖鎖の硫酸化の際に、原料糖の溶解が不完全で不均一系となる場合、硫酸化の進行が困難となり低い硫酸化度に留まることが分かっていたため、予め水に溶解させ連続的にピリジンへと置換することで、均一なピリジン溶液とした。最終的な溶媒系に水が残存する事は、著しい硫酸化度の低下をもたらすことが明らかであったため、十分ピリジンにより共沸を行い水を除いた。硫酸化剤として三酸化イオウ・ピリジン錯体を用いることによ

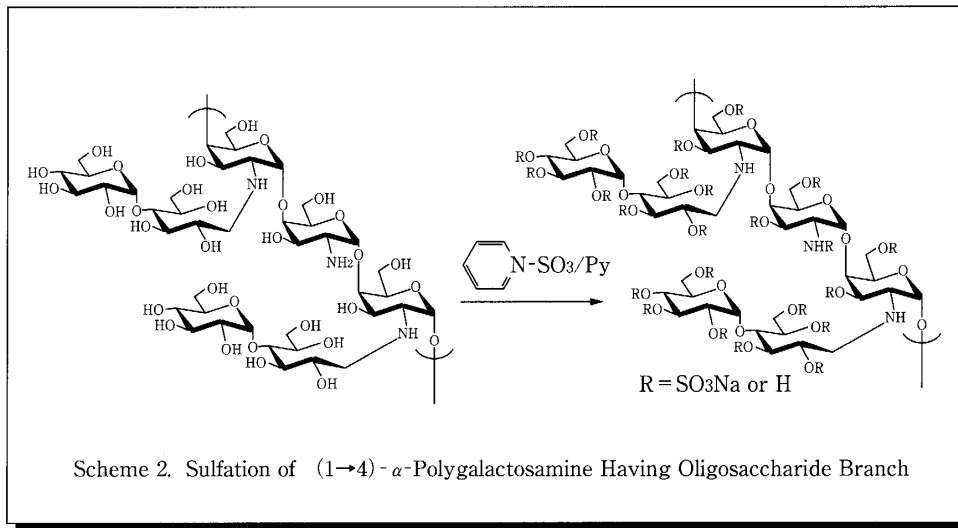


Table 2. Sulfation of (1→4)- α -Polygalactosamine Having Oligosaccharide Branch^{a)}

Run	Poly-GalNH-oligosac. ^{b)}		SO ₃ -Py ^{c)} mg	Time min.	Yield mg	Toluidineblue Test
	kind of oligosac.	weight (mg)				
1	Lactose	70	200	90	110	+
2	Maltose	70	200	90	105	+
3	Maltose	70	400	90	180	+

a) Sulfation was carried out at 85°C.

b) (1→4)- α -Polygalactosamine having oligosaccharide branch.

c) Sulfur trioxide-pyridine complex.

り水酸基の硫酸化を行い、結果をTable 2に示した。いずれの場合もトルイジンブルーで明瞭な呈色を認め、硫酸化が十分に進行したことが確かめられた。一連の側鎖オリゴ糖導入ポリガラクトサミンの硫酸化物は非常に高い水溶性を示し、水溶性の低かったオリゴ糖鎖の導入率が低い化合物の場合においても、その硫酸化体は高い水溶性を示す事が分かった。

分子軌道計算と力場計算による構造の推定

実験結果からポリリジンやリジンデンドリマーに比較して、アミノ基の周りの立体的込み合いの影響などが懸念されたが、ポリガラクトサミン骨格にも還元アミノ化反応により容易に高い割合で側鎖を導入できることが示された。そこで実際に今回合成したオリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミンを分子軌道計算と分子力場計算によって構造を推定した。構築過程は実験項に示した通りである。ガラクトサミン2分子間の結合二面角を求めた際のエネルギーマップをFigure 1aに示した。(1→4)- α -型にガラクトサミンを結合させた場合、二つのシクロヘキサン型の環がアキシャル-アキシャルにエーテル結合で結ばれるため、最も安定なコンフォメーションはFigure 1bに示される特徴的な角度を有するものとなった。

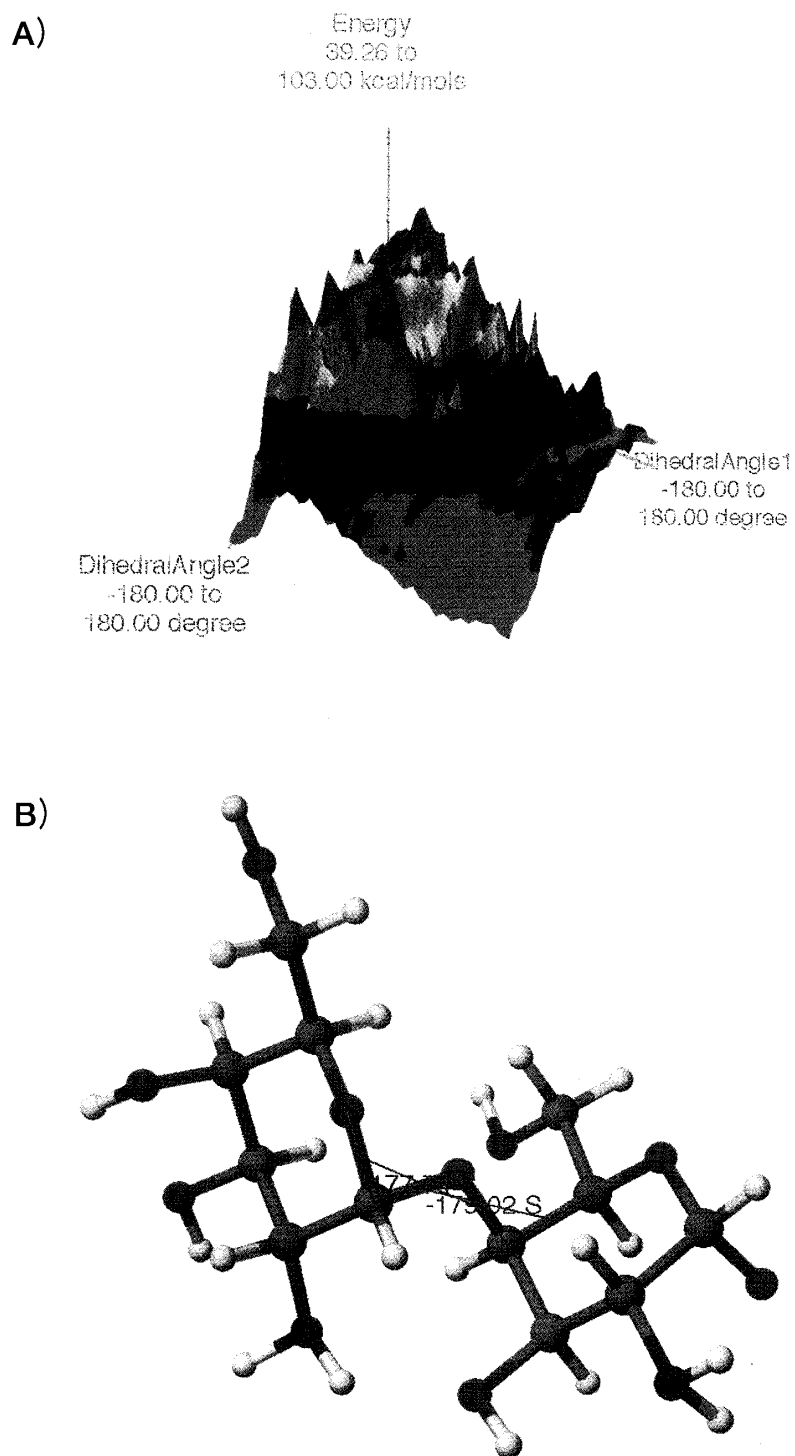


Figure 1. A) Energy level mapping of (1→4)- α -digalactosamine depends on rotation around ether bond dihedral angles. B) 3-D skeleton model of most stable conformation of (1→4)- α -digalactosamine.

この角度情報を用いてPolymerize methodにより (1→4)- α -ポリガラクトサミンを構築し、その計算結果をFigure 2に示した。また、側鎖のオリゴ糖を主鎖ガラクトサミンの2位アミノ基全てに導入した構造を構築し、その計算結果をFigure 3に示した。

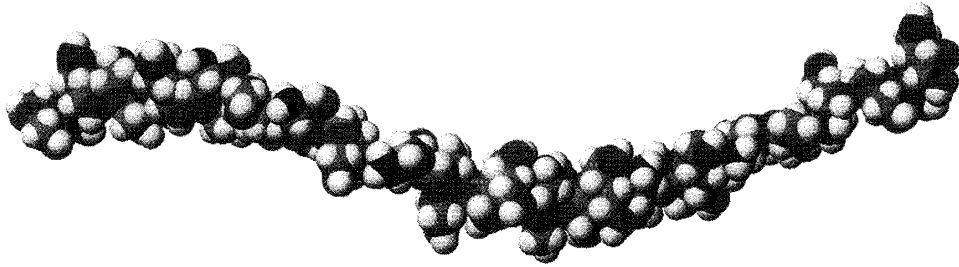


Figure 2. 3-D model of most stable conformation of (1→4)- α -polygalactosamine.

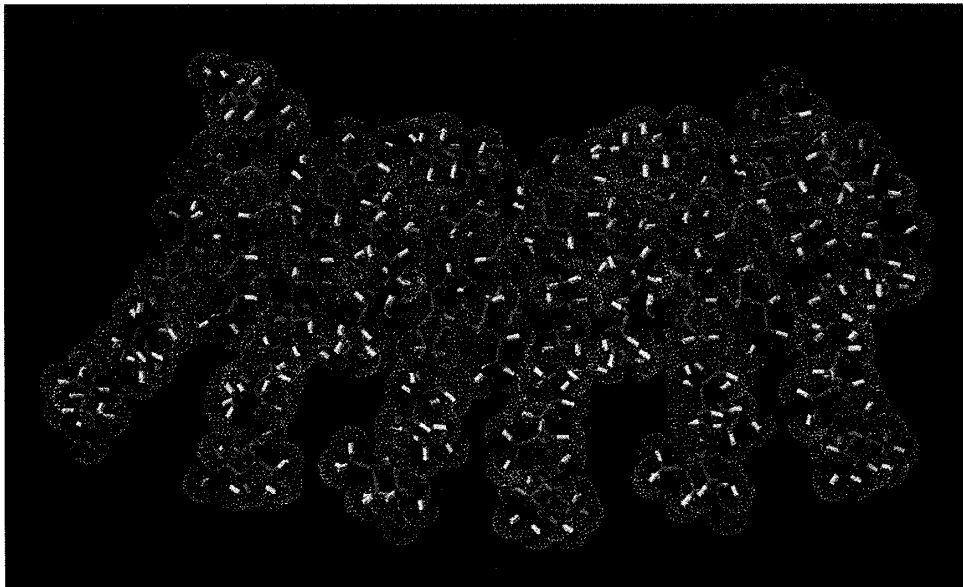


Figure 3. 3-D skeleton and van der Waals radius model of (1→4)- α -galactosamine (12 mer) having maltose branch.

Figure 2から、(1→4)- α -ポリガラクトサミンは比較的直線性の高い緩やかならせん構造を持つ可能性が示された。一方Figure 3から、オリゴ糖鎖を導入することにより、主鎖構造は僅かに湾曲した直鎖状となり、側鎖は一方向の楕形でもらせん階段状でもない、ほぼ完全に交互に位置する構造を取ることが示唆された。らせん階段状の構造を取らなかったのは、Figure 2にも示した主鎖構造の糖鎖間の結合様式によるものと考えられた。

要 約

食物繊維糖鎖の一つである(1→4)- α -ポリガラクトサミンの化学修飾による、新規機能分子化を実施した。ポリガラクトサミン2位のアミノ基を、ホウ酸緩衝溶液中、45℃の条件でボラン・ピリジン錯体を還元剤とする還元アミノ化反応によりオリゴ糖を導入する事が出来た。置換基としては、マルトースやラクトースをはじめとするオリゴ糖を用い、還元剤やオリゴ糖の仕込み比条件を検討した。その結果、ポリガラクトサミン中のガラクトサミン残基に対するオリゴ糖のモル比に応じて、置換度が異なる生成物が得られた。これらのオリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミンを、三酸化イオウ・ピリジン錯体を硫酸化剤として、硫酸化を行った。硫酸化物はトルイジンブルー試験に溶性となり極めて高い水溶性を示した。さらに、オリゴ糖鎖導入ポリガラクトサミンの分子構造を、コンピュータを用いた分子軌道計算、分子力場計算により推定した結果、オリゴ糖鎖が導入された場合、主鎖構造は僅かに湾曲した直線となり、側鎖はほぼ完全に交互に位置する構造を取ることが示唆された。

現在さらに高置換度の生成物を得るために、反応時間と仕込み比を検討しており、今後各種NMR測定による化学構造等の解析に引き続き硫酸化物を含むこれら一連の化合物について、細胞毒性や、細胞親和性、抗エイズウイルス活性などの生理活性について評価検討を計画中である。さらに、側鎖にビタミンやコレステロールなどの機能性分子の導入とその機能性評価を進めていく予定である。

謝 辞

本研究は平成十三年度繊維学会研究助成によってその一部が実施されたものである。また、(1→4)- α -ポリガラクトサミンを提供していただいたヒゲタ醤油株式会社様に深謝申し上げます。

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 Laminara-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-oligosaccharides 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. Jeon, K.-J., Katsuraya, K., Uryu, T., et al.: NMR Spectroscopic Detection of Interaction between a HIV Protein Sequence and a Highly Anti-HIV Active Curdlan Sulfate, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12536–12541 (2000)
13. Baigude, H., Katsuraya, K., Uryu, T.: Synthesis of Dicarboxylate-Oligosaccharide Multi-Layer Terminal Function Upon a Poly (lysine) Dendrimer Scaffolding, *J. Polym. Sci.*, **40**, 3622–3633 (2002)

鬘 谷 要 (短期大学部服飾生活学科助教授)
小 平 志 乃 (家政学部服飾造形学科助手補)
出 山 悦 代 (短期大学部服飾生活学科助手補)
後 藤 政 幸 (短期大学部食物栄養学科教授)