

エイズ薬カードラン硫酸とタンパク質の相互作用のNMRによる解析

瓜生敏之* 鬘谷要* 全寛俊*** 奥山光作*** Huricha Baigude* 松井崇博* 小俣拓

(平成 18 年 12 月 5 日受理)

NMR Analysis of The Interaction between An AIDS Drug Curdlan Sulfate and Proteins

Toshiyuki URYU* Kaname KATSURAYA** Kwan-Jun JEON*** Kohsaku OKUYAMA***
Huricha Baigude* Takahiro MATSUI* Hiraku OMATA*

A positively charged polylysine dendrimer generation 3 (LDG3) produced gels by interacting with a negatively charged curdlan sulfate which is a sulfated polysaccharide with high anti-AIDS virus activity. ^1H NMR spectra showed a new peak caused by gel formation, which became highest at the ion ratio of 0.75. In addition, when a linear polyornithine (PO) were mixed with curdlan sulfate, gel formation also occurred. In the molar ratio of 0.7, the mixture afforded 100% gel. This result suggests that the action mechanism of curdlan sulfate is attributed to an ionic interaction.

Key word: Polylysine dendrimer, Curdlan sulfate, Gel formation, ^1H NMR, Polyornithine, Anti-AIDS virus activity, Ion complex, Anti-HIV

序論

我々は、高い抗エイズウイルス活性を持つ硫酸化多糖のカードラン硫酸を合成した。カードラン硫酸は他の硫酸化多糖と違って、高い抗エイズウイルス活性を持つにも拘らず低い抗凝血活性を有するので、エイズ薬として優れている¹⁾。ポリ-1,3- α -グルコースであるカードランは、2, 4, 6位に水酸基を持つので、3つの水酸基の内、特定の水酸基を硫酸エステルに変えたのがカードラン硫酸である²⁾。In vitro 試験で非常に高い抗エイズウイルス活性と低い抗凝血活性を持ち、また動物実験で低い毒性を示すカードラン硫酸を工業的規模で作る工程の開発も行われた。

カードラン硫酸は、アメリカにおいて Phase I/II テ

ストがエイズ感染者に対して行われた³⁾。その結果、カードラン硫酸は1人当り1回点滴投与で100, 200, および300 mg までの投与が可能であり、それぞれの対象者に血中のCD4細胞の顕著な増加がみられた。しかし、血中のエイズウイルス数の減少は引き起こさなかった。カードラン硫酸の2日間連続投与も調べられ、CD4細胞数の顕著な増加は認められた。また、エイズウイルス感染者が同時に感染していることが多いサイトメガウイルス感染が消滅した⁴⁾。

天然硫酸化多糖のヘパリンは古くから外科手術において、そして近年は人工透析器内での血液の凝固を防ぐ薬剤として、広く大量に使用されている。作用機構は血中の抗凝血タンパク質のアンチトロンビンIII (AT-III) に結合することによって、AT-IIIを活性化させて、これが凝血タンパク質トロンビン

* 帝京科学大学

** 和洋女子大学

*** 東京大学

を捕捉する。トロンビンがなくなると凝血しない。この作用に関与するのは、ヘパリンの主に数個の硫酸アミド基と硫酸エステル基の持つアニオン（負電荷）とリジンの側鎖アミノ基の数個のカチオン（正電荷）によるイオン相互作用である。Lindahl はヘパリンの活性5糖を決定した⁵⁾。

ヘパリンの作用機構から推定して、カードランに含まれる硫酸エステルの負電荷と、エイズウイルスの外衣糖タンパク質に含まれる正電荷がイオン相互作用することによって抗エイズウイルス活性が発現されると考えられる。エイズウイルスタンパク質のモデル化合物として、ポリリジンを選んだ。カードラン硫酸とポリリジンの相互作用を NMR で定量的に測定する方法を発見した⁶⁾。溶液法の高分解能 ¹³C NMR はゲル状物質についても測定可能であることを利用して、イオン相互作用によってゲルが生成する条件を探索した。その結果、カードラン硫酸とポリリジンの混合物は D₂O 中で相互作用して、ゲルを形成することが目視で観察された。

ポリイオンコンプレックスであるゲルの ¹³C NMR および ¹H NMR を測定したところ、ポリリジンの側鎖の末端にあるアミノ基の隣のε-メチレン炭素およびε-メチレンのプロトンピークが、フリーのポリリジンとは異なる、高磁場側に新たなピークとして現れた。ピークの定量により、フリーとゲル状で存在するポリリジン鎖の各々が定量出来た。

次に、カードラン硫酸をヘパリンに変えて、ヘパリンとポリリジンとの相互作用を NMR で定量的に調べた⁷⁾。ヘパリンの負電荷とポリリジンの正電荷が相互作用して、ゲルを形成した。ε-メチレンのプロトンピークはゲル形成によって、高磁場側に新たなピークを示した。[ヘパリン]/[ポリリジン]=0.6 の時、93% がゲルで、残りの7%がフリーのポリリジンとして存在した。これは抗凝血硫酸化多糖ヘパリンの作用機構を、NMR 分光学的に見た初めての例である。

種々の生理作用を持つグリコサミノグリカンのコンドロイチン-6-硫酸とポリリジンの相互作用も NMR で調べることが出来た⁸⁾。硫酸エステル基とカルボキシル基の2種のアニオンを持つコンドロイチン-6-硫酸もまた、ポリリジンとイオン相互作用してゲルを形成したので、硫酸基のみならずカルボキシル基もアニオンとして有効に働くことが分った。

高分子カードラン硫酸の代りに、高い抗エイズウイルス活性を持つ、中分子量の硫酸化ドデシルラミナリペンタオースを選択しても、同様にポリリジン

と相互作用して、ポリイオンコンプレックスを形成した⁸⁾。

このゲル NMR 測定法を使ってカードラン硫酸の抗エイズウイルス活性を調べた。カードラン硫酸はエイズウイルスの外衣糖タンパク質 gp120 と相互作用することが分っているので、結合部位と思われる gp120 の部分タンパク質を設計し、注文生産で入手した。カードラン硫酸とこの部分タンパク質はゲルを形成したので、NMR で測定した⁹⁾。その結果、部分タンパク質に含まれ水溶液中で正電荷を持つリジンとアルギニンは、カードラン硫酸と相互作用することを明らかにした。また、部分タンパク質の領域がウイルスの感染を引き起こすことが分った。

本研究では、中分子量を持ち半球状形態を取る、ポリリジン dendrimer 第1, 第2, および第3世代をカードラン硫酸と混合させ、ゲルの形成を試みた。Dendrimer 第3世代は直鎖状ポリリジンと同様にゲルを形成することを見出した。ゲルの NMR を測定することによって、相互作用を調べた。さらに、ポリリジンの代りに、直鎖状のポリオルニチンおよびポリオルニチンとポリリジンの混合物を使っても、カードラン硫酸との間に相互作用が起り、NMR で検出可能であることを見出したので、報告する。

実験

1. ポリリジン dendrimer 第1, 第2, 第3世代の合成¹⁰⁾

β-アラニンメチルエステル (2.20 g, 15.4 mmol) をコアに用い、これに Di-Boc-lysine (8.20 g, 15.6 mmol) を dimethylformamide (DMF, 80 ml) 中で BOP 試薬 (6.90 g, 15.6 mmol) と diisopropylethylamine (DIEA, 4.66 g, 27.0 mmol) と反応させて、リジン dendrimer 第1世代 (LDG1) (5.71 g) を得た。収率は 84.4%。

LDG1 (1.50 g) の Boc 基を CF₃COOH:CH₂Cl₂ = 1:1 の混合溶液 (80 ml) に溶解後、室温で 30 min 攪拌することによって外した (LDG1deBoc)。LDG1deBoc を DMF (32 ml) 中で BOP (2.90 g) と DIEA (3.12 g) を触媒に Di-Boc-lysine (3.52 g) と反応させ、ポリリジン第2世代 (2.16 g, 収率 71.4%) を得た。同様に、脱 Boc ポリリジン第2世代と Di-Boc-lysine を反応させて、ポリリジン第3世代を合成した。Boc 基を外した脱 Boc ポリリジン第3世代 (以後 LDG3 と略称) を得た。

2. ポリオルニチン

ポリオルニチンは分子量 11900 と 38800 の 2 つの試料を Sigma 社より購入し、そのまま使用した、

3. NMR 測定用サンプル調製と測定

a) カードラン溶液の調製

硫酸化度 1.5 のカードラン硫酸 (CS) 257.2 mg を D_2O 1360 μl に溶解させた溶液を母液として、所定量を計り取って使用した。例えば、CS 溶液を 17 μl 使用した場合、 D_2O を 233 μl 加えて希釈し 250 μl の CS 溶液として、NMR サンプル管へ入れた。

b) リジン dendroliマー第 3 世代 (LDG3) 溶液の調製

LDG3 (100 mg) を D_2O 4000 μl に溶解した。NMR サンプル中の LDG3 量は一定 (6.25 mg) にしたので、LDG3 溶液をすべての測定で 250 μl 使用した。

c) ゲルの調製

所定量のカードラン硫酸を含む 250 μl の CS 溶液と 250 μl の LDG3 溶液を NMR サンプル管中で混合し、合わせて 500 μl の溶液を作った。サンプル管を 35 $^{\circ}C$ の恒温器中で一晩静置した。

ポリオルニチン (PO) の場合、ポリオルニチン 100 mg を 2564 μl の D_2O に溶かして溶液を作り、測定時に 250 μl を NMR サンプル管中へ入れた。カードラン硫酸 246 mg を D_2O 1300 μl に溶かした母液を作り、これを希釈して使用した。2 つの溶液は NMR 管中で混合して、ゲルを作った。

d) NMR 測定

帝京科学大学所有の JEOL 製 500 MHz NMR スペクトロメーターで 1H NMR を測定した。

結果

ポリリジン dendroliマー第 3 世代とカードラン硫酸の相互作用の NMR による検出

ポリリジン dendroliマー第 1 及び第 2 世代はカードラン硫酸と混合してもゲル形成は見られなかった。ゲル形成にはアニオン種とカチオン種の両方が、ある程度の大きさの分子量を持つ必要がある。カードラン硫酸は約 7 万の重量平均分子量を持っている。ポリリジン dendroliマー第 1 世代も第 2 世代も 500 以下の分子量であるので、ゲルを形成するには分子量が低すぎるからかも知れない。

一方、約 1000 の分子量を持つ第 3 世代 LDG3 は、NMR サンプル管の中で、カードラン硫酸とコンプレ

ックス化してゲルを形成することが見いだされた。Figure 1 に示すように、カードラン硫酸は 1 残基当たり 1.5 個の硫酸基アニオンを、そしてポリリジン dendroliマー第 3 世代はユニット当たり 8 個のアンモニウムカチオンを持つ。

ゲルが形成されたということは、高分子であるカードラン硫酸が架橋したことを意味する。Figure 1C は LDG3 が架橋剤になって、カードラン硫酸分子同士を結びつけている想像図である。架橋に関与するユニットは数 10 分の 1 であるので、ゲル内に閉じこめられた分子は、局所運動は可能なので、NMR で検出できる筈である⁶⁻⁹⁾。

カードラン硫酸 (CS) 中の硫酸アニオンとリジン dendroliマー (LDG3) 中のアンモニウムカチオンのイオン比 $[CS^-]/[LDG3^+]$ を、0/1 から 4.50/0 まで約 0.15 刻みに変えた測定試料を 12 個作り、ゲル状態の試料の 1H NMR を測定した。

Figure 2-1, 2-2 に、イオン比を変えて測定した CS と LDG3 混合物の 1H NMR を示す。

Figure 2-1 (a) に示されるように、イオン比 $[CS^-]/[LDG3^+]=0$ の時、すなわち LDG3 のみの NMR 吸収は 1~5 ppm に現れている。2.8~3.8 ppm にリジン側鎖であるアミノブチレン基 ($NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$) の吸収が見られる。この中で、 NH_2 の隣の $\epsilon-CH_2$ (アミノ基は HBr 塩なので、 ϵ_{HBr} と表記) の吸収は、2.9 ppm に見られるシャープなピークである。

$[CS^-]/[LDG3^+]=0.30$ の Figure 2-1 (b) において、 $\epsilon-CH_2$ の吸収は 2.9 ppm の他に、高磁場側の 2.85 ppm にシヨルダーが見られる。この吸収は、イオン比が大きくなるに従い明瞭になった。そして、 $[CS^-]/[LDG3^+]=0.75$ (Figure 2-1 (c) では、2.85 ppm に大きなピークとして分離した。この時、2.9 ppm にあったピークは、3.08 ppm へ低磁場シフトした。すなわち、イオン比 0.75 では、 $\epsilon-CH_2$ の吸収は、2.85 と 3.08 ppm の 2 本のピークとして現れることが分った。

カードラン硫酸と直鎖状ポリリジン HBr 塩から出来たゲルの NMR において、ポリリジンの側鎖 $\cdot-CH_2$ の吸収は、2.84 ppm にゲルに基づく吸収 ϵ_g と 3.03 ppm に元のフリー (実際は HBr 塩) の ϵ_{HBr} として現れた⁶⁾。0.8 のイオン比において、ゲルの割合は 100% であった。

これを考慮すると、カードラン硫酸とリジン dendroliマーとのコンプレックス化によって出来たゲルは、 $\epsilon_g-CH_2=2.85$ ppm のピークを与えた。また、dendroliマーでは、カードラン硫酸の過剰存在下においては、アミノ基は硫酸塩になっており、 $\epsilon_{\text{oscs}^-}-CH_2=3.08$

ppm に現れたと考えられる。

$[CS^-]/[LDG3^+]=0.75$ の時に見られる $\epsilon\text{-CH}_2$ の 2 本の吸収のピーク強度は、それぞれの化学種の存在割合に対応しているため、この場合 64% のゲルと 36% のフリーの化学種として存在することが分った。

$[CS^-]/[LDG3^+]=1.20$ (Figure 2-2 (f)) の時、2.85 ppm の ϵ_g ピークは減少し、 ϵ_{free} ピークが増加した。1.20 より大きなイオン比では、 ϵ_{free} ピークのみとなった。

この結果、 dendrogram-LDG3 においては、イオン比が 0.75 の時にゲルの割合が最大の 60% となった。ゲル形成に寄与しないカチオンが存在する理由としては、 dendrogram は 1 分子当り近接した 8 個のカチオンを有するので、この内の数個がゲル形成に関与するためだと考えられる。

ポリオルニチンとカードラン硫酸の相互作用の NMR による検出

ポリオルニチン・HBr とカードラン硫酸を混合して 35°C に一晩保った時、透明なゲルが形成した。Figure 1 に示すように、ポリオルニチン (PO) HBr 塩は側鎖がアミノプロピレン基 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) であるため、カードラン硫酸とコンプレックス化すれば、 $\delta\text{-CH}_2$ に変化が現れる筈である。

分子量 11900 のポリオルニチンを使って測定した Figure 3 (a) に示されるように、モル比 $[CS^-]/[PO]=0$ 、すなわち PO だけの時、 δ_{free} ピークは 3.05 ppm に現れた。 $[CS^-]/[PO]=0.2$ のサンプルを測定した Figure 3 (b) には、3.05 ppm の他に 2.84 ppm にゲルに基づく吸収 δ_g が現れた。モル比の増加と共に δ_g ピークの割合は増加し、 $[CS^-]/[PO]=0.7$ では 100% になった。モル比が 1.0 以上になると、3.07 ppm に新たなピークが現れた。これはカードラン硫酸の量が増加したために、フリーの $\delta\text{-CH}_2$ による吸収 δ_f が出現したのであろう。

モル比 3.0 で δ_f のみ現れたことは、カードラン硫酸が多すぎるとコンプレックス形成を妨害することを意味している。

分子量 38800 のポリオルニチンもカードラン硫酸とコンプレックス化してゲルを形成した。Figure 4 にモル比を変えて測定した NMR スペクトルを示す。この場合も分子量 11900 の時と同様の傾向を示し、モル比が 0.7 でゲル割合が 100% になった。ピークのシャープさは高い分子量のために低下した。モル比が 0.8 以上では、フリーの側鎖 $\delta\text{-メチレン}$ 基による吸収が現れた。

ポリオルニチンとポリリジンの混合物についても、同様にカードラン硫酸とコンプレックス化することを見出した。生成したゲルの NMR を測定したところ、単独のポリペプチドの場合とほとんど同じ結果が得られた。

この結果、ポリリジン dendrogram 第 3 世代およびポリオルニチンは共に、カードラン硫酸とコンプレックス化してゲルを形成することが分った。カードラン硫酸の抗エイズウイルス活性の発現機構が、エイズウイルスのタンパク質に含まれる塩基性アミノ酸の集中部位とのイオン相互作用によるとの我々の仮説は、正しいことが結論された。

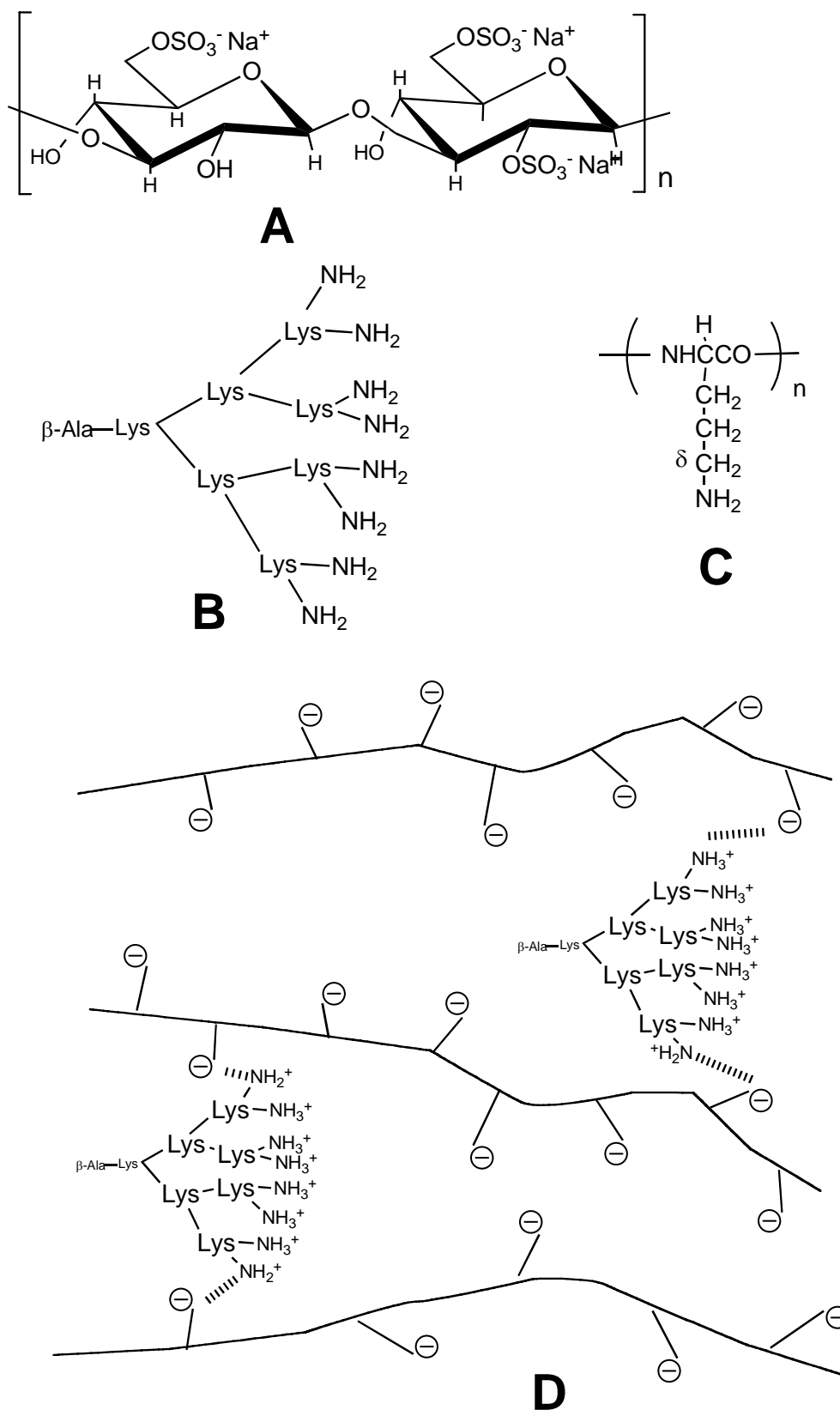


Figure 1

Figure 1. Structure of (A) curdlan sulfate, (B) polylysine dendrimer generation 3, (C) polyornithine, and (D) gel formed by complexation between curdlan sulfate and polylysine dendrimer generation 3.

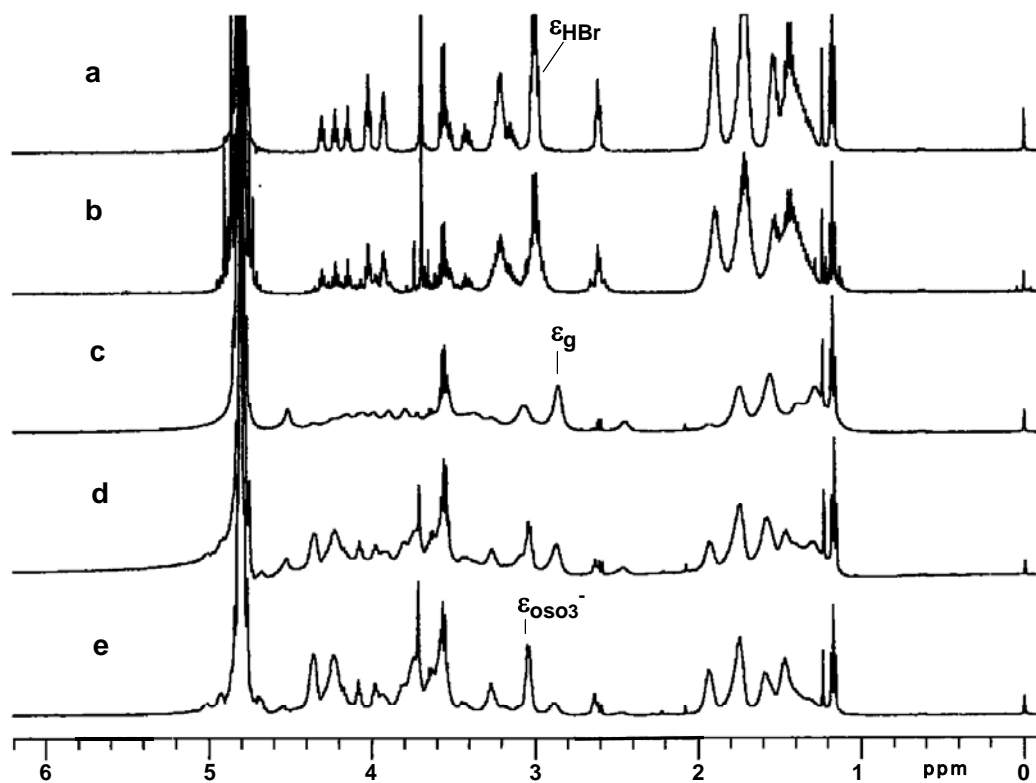


Figure 2-1

Figure 2-1. ^1H NMR Spectra of the gel formed between curdlan sulfate (CS) and polylysine dendrimer generation 3 (LDG3) in the ion ratio $[\text{CS}]/[\text{LDG3}^+]$ of (a) 0, (b) 0.30, (c) 0.75, (d) 0.90, (e) 1.05.

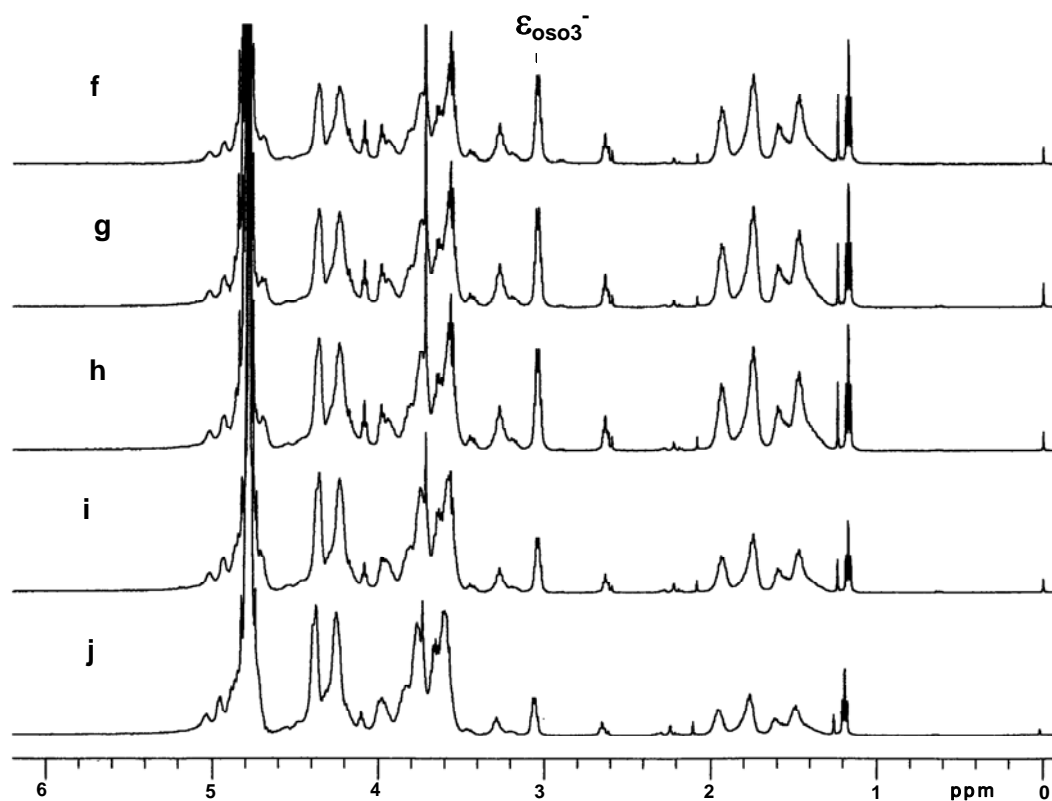


Figure 2-2

Figure 2-2. ^1H NMR Spectra of the gel formed between curdlan sulfate and polylysine dendrimer generation 3 in the ion ratio $[\text{CS}]/[\text{LDG3}^+]$ of (f) 1.20, (g) 1.35, (h) 1.50, (i) 3.0, (j) 4.50.

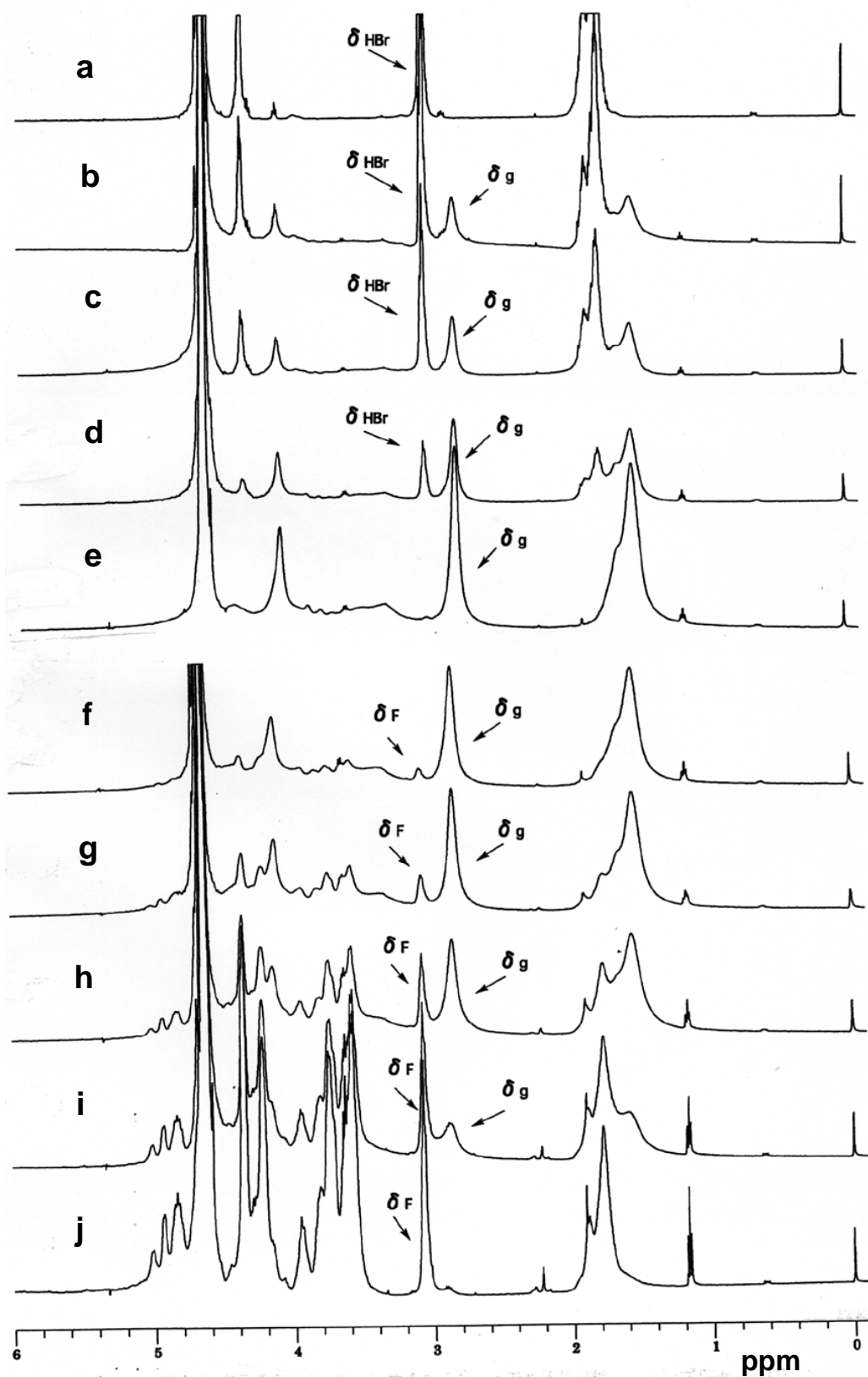


Figure 3. ^1H NMR Spectra of the gel formed between curdlan sulfate (CS) of molecular weight of 11900 and polyornithine (PO) in the molar ratio $[\text{CS}]/[\text{PO}]$ of (a) 0, (b) 0.2, (c) 0.3, (d) 0.5, (e) 0.7, (f) 0.8, (g) 1.0, (h) 1.3, (i) 2.0, and (j) 3.0.

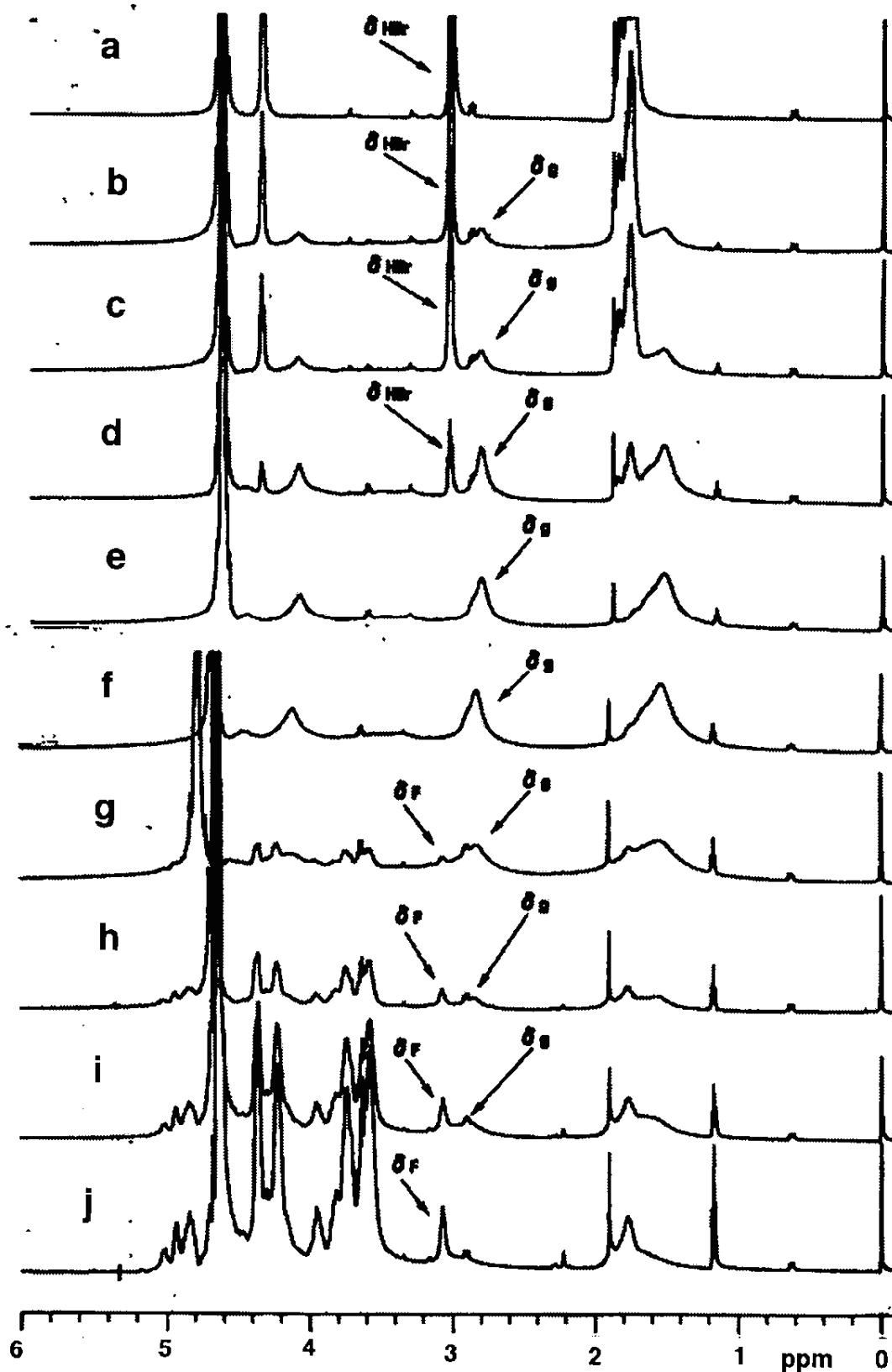


Figure 4

Figure 4. ^1H NMR Spectra of the gel formed between curdlan sulfate (CS) of molecular weight of 38800 and polyornithine (PO) in the molar ratio [CS]/[PO] of (a) 0, (b) 0.2, (c) 0.3, (d) 0.5, (e) 0.7, (f) 0.8, (g) 1.0, (h) 1.3, (i) 2.0, and (j) 3.0.

Reference

- 1) Y. Kaneko; O. Yoshida; R. Nakagawa; M. Date; S. Ogiwara; T. Shioya; Y. Matsuzawa; H. Shinkai; N. Yasuda; K. Matsuzaki; T. Uryu; N. Yamamoto, Complete Inhibition of HIV-1 Infectivity with Curdlan Sulfate *in Vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, *39*, 793-797.
- 2) T. Yoshida; K. Hatanaka; T. Uryu; Y. Kaneko; E. Suzuki; H. Miyano; T. Mimura; O. Yoshida; N. Yamamoto, Synthesis and Structural Analysis of Curdlan Sulfate with a Potent Inhibitory Effect of AIDS Virus Infection, *Macromolecules*, **1990**, *23*, 3717-3722.
- 3) M. Gordon; M. Guralnik; Y. Kaneko; T. Mimura; M. Baker; W. Lang, A Phase I Study of Curdlan Sulfate - An HIV Inhibitor. Tolerance, Pharmacokinetics and Effects on Coagulation and on CD4 Lymphocytes, *J. Medicine*, **1994**, *25*, 163-180.
- 4) M. Gordon; S. Deeks; C. De Marzo; J. Goodgame; M. Guralnik; J. Goodgame; T. Mimura; D. Pearce; Y. Kaneko, Curdlan Sulfate In a 21-Day Intravenous Tolerance Study in Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Cytomegalovirus (CMV) Infected Patients: Indication of Anti- CMV Activity with Low Toxicity, *J. Medicine*, **1997**, *28*, 108-128.
- 5) U. Lindahl; G. Backstrom; L. Thunberg, The Antithrombin-binding Sequence in Heparin, *J. Biol. Chem.*, **1983**, *258*, 9826-9830.
- 6) K.-J. Jeon; K. Katsuraya; Y. Kaneko; T. Mimura; T. Uryu, Studies on Interaction Mechanism of Sulfated Polysaccharides as an AIDS Drug by NMR, *Macromolecules*, **1997**, *30*, 1997-2001.
- 7) K.-J. Jeon; K. Katsuraya; Y. Kaneko; T. Mimura; T. Uryu, NMR Studies on Interactions between a Sulfated Polysaccharide Heparin and a Protein Model Compound, *Sen-i Gakkaishi*, **1997**, *53*, 533-539.
- 8) K. Katsuraya; K.-J. Jeon; H. Nakashima; T. Uryu, NMR Studies on Structure and Action Mechanism of Sulfated Laminaripentaose with High Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity, *Polym. J.*, **1999**, *31*, 924-928.
- 9) K.-J. Jeon; K. Katsuraya; Toshiyuki Inazu; Y. Kaneko; T. Mimura; T. Uryu, NMR Spectroscopic Detection of Interactions between a HIV Protein Sequence and a Highly Anti-HIV Active Curdlan Sulfate, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 12536-12541.
- 10) H. Baigude; K. Katsuraya; K. Okuyama; Y. Yachi; S. Sato; T. Uryu, Synthesis of Dicarboxylate Oligosaccharide Multilayer Terminal Functionality upon Poly(lysine) Dendrimer Scaffolding, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.*, **2002**, *40*, 3622-3633.