

《ミニノート》

多糖の硫酸化における位置選択性と立体化学

(Regioselectivity and stereochemistry of the synthesized sulfated polysaccharides)

理学部 分子生物学科 前田 昌 徹
(Department of Molecular Biology,
Faculty of Science, Masaakira Maeda)

A novel sulfated β -1,3-xylan product was synthesized from algal cell wall microfibril homoxylan by the N, N-dimethylformamide (DMF)-SO₃ complex sulfation method. Antithrombin activity appeared in this product was 6.5 times higher than that of standard heparin. From the results of ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic analyses by DQF-COSY and HMQC, it was revealed that the ordered structure of β -1, 3-xylan as a triple helix decayed and the resulting conformational changes had been caused by the sulfation reaction. The sulfated positions on the C-4 hydroxyl groups of the xylose residues were determined from ¹³C-NMR chemical shifts, and it was found that regioselective sulfation had occurred predominantly with the C-4 secondary hydroxyl groups to produce mono-substituents. Another type of sulfation of β -1,4-xylan that showed no regioselectivity is considered to have been due to the different conformation of both xylan chains such as triple helix in β -1, 3-xylan and the double straight chain like cellulose in β -1,4-xylan. Therefore, the different type of regioselective sulfation of β -1, 3- and β -1,4-xylan was caused by the difference in steric hindrance due to these conformations. These different types of regioselective sulfation with different linkage positions are also discussed for the secondary hydroxyl groups in β -1,3- and β -1,4-glucan after chemoselective sulfation of the C-6 primary hydroxyl groups.

【はじめに】

自然界には、アルコール、またはフェノール性の水酸基と無機硫酸との間の脱水、縮合によって、硫酸エステル (sulfate ester) が形成された物質がひろく存在する。生体内でのこの反応は、3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸 (PAPS) から硫酸基が転移して生成するが、この転移の対象によって、それぞれアシル硫酸、ステロイド硫酸、ロリン硫酸、脂肪族硫酸エステルなどと呼ばれる種々の生体物質の生成することになる。糖鎖に対して転移が起こった結果では、硫酸化多糖 (sulfated polysaccharides) と呼ばれる修飾多糖のグループとなる。

硫酸化多糖は、動物界ではかつて粘性分泌物から得られた多糖を意味するムコ多糖と呼ばれた中で、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸などのように硫酸基を持つグループがあり、その広い分布の状況が良く知られている。しかし植物界での存在は、海藻類の細胞壁を構成する粘質多糖の成分として、塩濃度の高い水圏における選択的なイオン吸収の機能を担う多糖として知られるもののみであって、陸上植物には存在しない。

近年、硫酸化多糖は、HIV の場合をも含む抗ウイルス活性、血液凝固阻止などの種々の生物活性が認められてきていて、これらの調整には、まず化学分類的な立場から海藻類を広く検索することが行われた。^{1) 2)}

³⁾ 他方、これまで原材料として入手が容易であったセルロース、デンプンなどの中性多糖を化学的に硫酸化することによって、これ迄に認められていない新たな活性を求める考えから、多糖鎖に対して硫酸化反応を調節し、より活性の高い生成物を得る試みがなされている。

この中で、カードラン (β -1, 3-グルカン) 硫酸が、これまでに知られていたデキストラン硫酸などよりも、高い割合で HIV の増殖を阻むことから、¹⁾ この種の硫酸化多糖の構造と活性相関について広く考えられるようになった。糖鎖構造では、多糖を構成する糖残基の種類、コンフィグレーションをも含む糖鎖の結合

位置、さらに分子サイズなどの構造要因がどのような活性発現に関与するかを調べるることとなる。したがってキシランは、グルコースより炭素数の一個少ないキシロースを構成単糖とするため、カードランの場合とは単糖組成は異なりながらも、同様な β -1, 3-結合の糖鎖であることは、両者の共通する構造因子と考えられ、この要因がどのように活性に影響を及ぼすかの比較が期待できる。 β -1, 3-キシランは、 β -1, 4-マンナンの場合と共に、⁵⁾ 体が管状である特徴の一群の「非セルロース性植物」と呼ばれる緑藻の細胞壁マイクロフィブリルの構成する多糖である。大部分の植物のマイクロフィブリルがセルロースであるのに対して、これらの藻類では、セルロースが存在しない代わりに、キシラン、あるいはマンナンによってマイクロフィブリルが構成されている。また、キシランか、マンナンかの形質によって、この藻類を化学分類的に考察するとき、得られた結果には他の形質による分類的な考察をした場合とも一致している。⁶⁾

陸上植物の細胞壁から得られたキシランでは、例外なく β -1, 4-キシランであるのに対して、この藻類からのキシランは β -1, 3-結合をした直鎖構造のホモ多糖であって、植物界ではこの藻類以外からは発見されていない、珍しい多糖である。この β -1, 3-キシランの高次構造は、スパイラルに伸長する糖鎖に、同じように伸長する別な糖鎖が相互に支えあって安定化し、三重ラセンを形成する結果となることがX線回折の結果から認められている。⁷⁾ この事実、このキシランの水系および非水系でのゲルろ過クロマトグラフィーによって求められた見かけの分子量を比較すると、3:1の関係として示された結果からも明らかであった。⁸⁾

【主な実験方法】

糖質の水酸基やアミノ基への硫酸化反応は、最も簡便な場合は、0℃以下に冷却した濃硫酸中に試料を添加して攪拌を続ける方法がある。⁹⁾ 例えばD-グルコースにおいてはモノ-硫酸からポリ-硫酸の混合物が得られる。しかし、これらの生成物を相互に分離、精製することは至難であり、現在では酸が他の用途に供されるような工業的な場合を除いてほとんど利用されていない。

これに代わって汎用されている方法は、ピリジン溶液中でクロロスルホン酸を添加する場合¹⁰⁾、とか、求核試薬としてN,N-ジメチルフォルムアミド (DMF) などの第三アミンに対して、三酸化イオウを溶解して得られた複合体を試薬として用いるなどの方法¹¹⁾ などが、古くから有効な方法として知られている。最近では、DMFを溶媒としてジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を縮合剤とする糖硫酸エステルの合成は、温和な条件下で行われる簡便な方法として評価が高い。¹²⁾ この際反応前の試料が荷電体の場合は、イオン交換樹脂カラムを通じてH⁺型とした後に、ピリジンで中和したピリミジウム塩とすることによって、溶媒に容易に可溶となる。この反応は、温度と時間に依存するのでこれらを調節することによって、硫酸化の程度が種々に異なる生成物が得られるので、活性発現に際してはより活性の高い生成物を得ることを目的とすることができる。硫酸化は、赤外線吸収スペクトルで、新たに硫酸基の吸収の出現が認められたことで判定した。この吸収強度、あるいはS分析の結果によって、硫酸化の程度を判定し、これを糖残基に対する置換度 (D.S.; Degree of substitution) の算定にも利用される。

【結果と考察】

今回、ヘライズブタ (*Caulerpa brachypus*) より得られたキシランは、キシロースのみを構成単糖とするホモキシランであり、完全メチル化分析、および、この部分加水分解物のMALD-TOFによる質量分析では、少なくとも25残基が直鎖に結合している β -1, 3-キシランであった。¹³⁾ このキシランを、SO₃-DMF複合体を用いて、0℃、30分間の条件で硫酸化を行ったところ、D.S.=1の結果であって、全ての構成単糖に1モルの硫酸基が導入されていた。キシロースはペントースであって一級水酸基は存在せず、 β -1, 3-キシランでのエステル化は2、または4位に、 β -1, 4-キシランでは2、または3位における、いずれも二級水酸基において起こる。硫酸化前後の試料のメチル化分析結果の比較において、硫酸化以前の場合、得られた量的に最も多い主要なメチル化単糖は、2, 4-ジメチル-キシロースであるのに対して、硫酸化物では、2-モノメチル-

キシロースであり、硫酸基はキシロース残基の4位に対して導入が起こることが認められた。

完全メチル化分析の結果は、NMRスペクトル分析においての結果とも良く一致した。すなわち、DQF-COSY、HMQCなどによって全プロトンの化学シフトの帰属は第1表に示すように決定し、¹⁴⁾ この結果から、C-H COSYによる炭素シグナルの帰属の決定を行うことができた。

Table I. Chemical Shifts (δ ppm from DMSP) in the ¹H-NMR (A) and ¹³C-NMR (B) Spectra of Sulfated and Original β -1,3-Xylan

(A)	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5ax	H-5eq
Sulfated β -1,3-xylan*	5.16	4.61	4.28	4.61	3.80	4.41
Original β -1,3-xylan	4.63	3.44	3.55	3.62	3.28	3.93
Δ	0.5	1.2	0.7	1.0	0.5	0.5

* Spin-coupling constants could not be obtained because of signal broadening.

(B)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Sulfated β -1,3-xylan	101.2	76.7 or 77.5	76.7	76.7 or 77.5	63.3
Original β -1,3-xylan	107.1	76.5	88.9	70.7	68.3
Δ	-5.9	0.2 or 1.0	-12.2	6.0 or 6.8	-5.0

硫酸化が起こった位置の決定は、硫酸化前後の試料についてのスペクトルの比較によって行えた。¹⁵⁾ すなわち、¹³C- のスペクトルでは、2位の炭素シグナルの化学シフトにはほとんど変化がないのに対して、4位の炭素のシグナルのみが、特異的に低磁場側に大きくシフトしていたことから、硫酸化はこの位置の水酸基に選択的に導入されたことが知られる。¹H-NMRスペクトルでの、2位、3位のシグナルも4位の場合と同様に低磁場側にシフトしたことは、硫酸基のような巨大置換基が糖残基に導入されて生成した β -D-キシロピラノース-4-硫酸残基で認められる水酸基がエステル化をされて起こった置換基の導入の効果である。

β -1, 3-キシランのコンフォメーションが、ラセン型の三重鎖をとるときには、第1図に示すように、2位および4位の水酸基はそれぞれラセンの内側と外側に配向する構造となる。

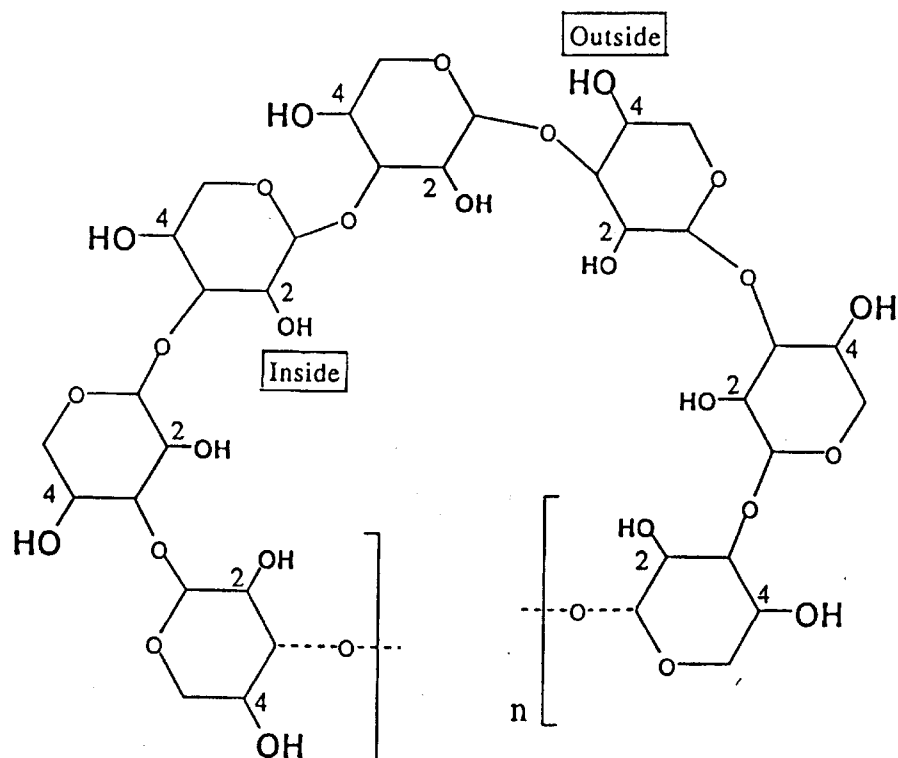
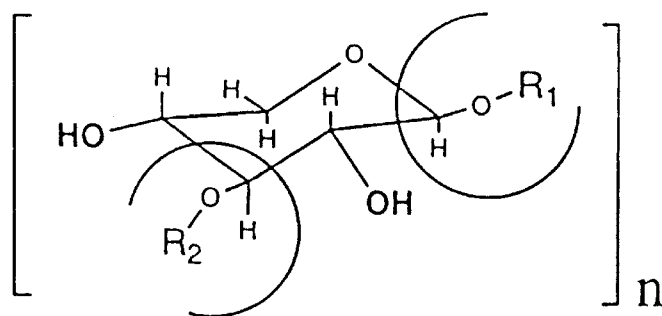


Fig. 1, Orientations of C-2 or C-4 hydroxyl groups in the helical structures of β -1, 3-xylan.

したがって内側に配向した 2 位の水酸基の間には、分子内のまたは分子間の水素結合の形成によって、ラセンの安定化への寄与があるのに対して、このような状態にないラセンの外側に配向する 4 位の水酸基は、外界に対して直接に向きあっていて、一般に試薬の攻撃が行われやすい環境にある。また、第 2 図 (A) に示すように、 β -1, 3-キシランでのキシロース残基では、2 位、および 3 位のそれぞれの二級水酸基に対する反応性は、隣接キシロース残基の立体障害の影響があつて、必ずしも同一な反応性を示すものではない。

(A)



(B)

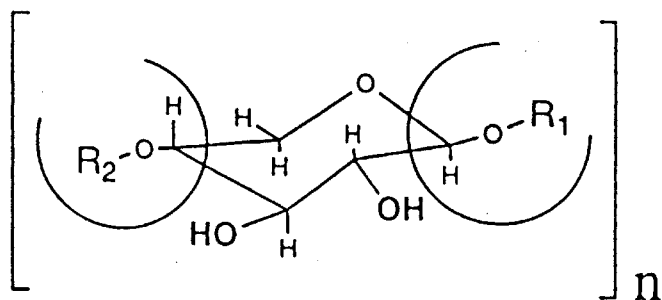


Fig. 2, Steric hindrance to the secondary hydroxyl groups of β -1,3-xylan (A) and β -1,4-xylan (B). (Circle indicate the steric hindrance effects of bulky substituents to the secondary hydroxyl groups)

2 位の水酸基は、あたかも両側を隣接するキシロース残基 (R_1 および R_3) に挟まれた形で、両者による立体障害が大きくなるため、硫酸化試薬の接近は阻止される。これに対して、4 位の水酸基は、3 位にはキシロース残基 (R_2) が隣接するのみで、隣接の糖残基による立体障害は 2 位の場合よりもより少なく、硫酸化試薬の接近も容易である。このようなことが、硫酸化が 4 位において優位に起こる理由と考えられる。

このような考え方は、 β -1, 4-キシランの硫酸化の結果とを比較して考えて見ると、より理解がされやすい。この多糖は、第 3 図に示すように、キシロース残基が交互に反転した直鎖の構造をとり、この糖鎖は、セルロースの場合のように平行に位置する他の糖鎖間で分子間の水素結合の形成によってマイクロフィブリルとなる。

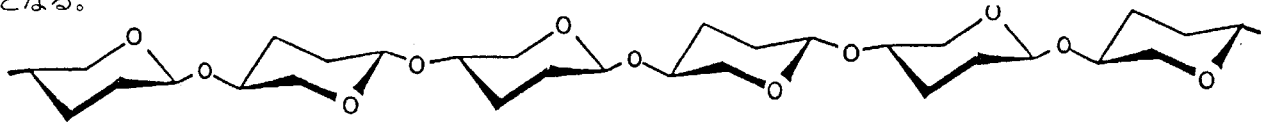


Fig. 3, Alternately linked linear structure of β -1,4-xylan.

β -1, 4-キシランを硫酸化するとき、2-モノ硫酸と3-モノ硫酸の等量混合物が生成するが、硫酸化がこの多糖鎖において起こるとき、2 位および 3 位の二級水酸基の隣接する糖残基による立体障害は、第 2 図 (B) で示されるようにいずれも等価の位置にあるためとなる。したがってこの二級水酸基に対する硫酸化試薬の接近は、同じ確率で起こり、その生成物でも両者の等量混合物が得られる。

二級水酸基における位置選択的な硫酸化の起こり方は、同じくグルコースを構成単糖としながら、その結合の異なる、 β -1, 3-および β -1, 4-グルカンに対する過硫酸化 (oversulfation) の場合についての比較においても同様な結果が認められた。いずれのグルカンにおいても、ヘキソースであるグルコースに対する硫酸エステル化は、官能基選択的に 6 位の一級水酸基において起こり、モノエステルが得られる。しかし、ジエステルを得るためにさらに反応を継続してゆくと、二級水酸基に対する位置選択が起こるが、この機構はさきの結合の異なるキシランの場合と同様であった。即ち、 β -1, 3-グルカン (カードラン) では、第 4 図に示すように、まず 6 位に導入された、巨大置換基としての硫酸基による立体障害が、2 位または 4 位の二級水酸基に対する反応性に影響を与える。

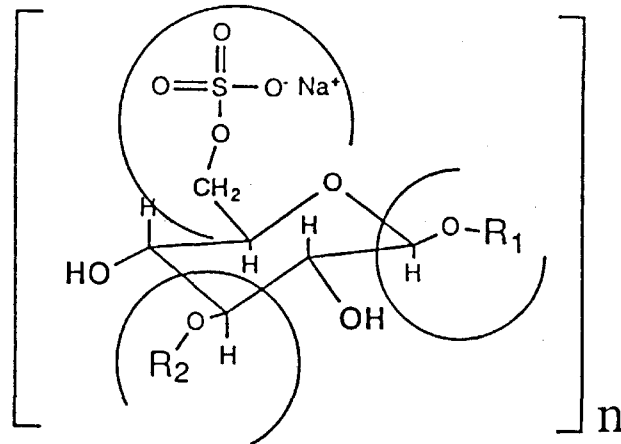


Fig. 4, Steric hindrance to the secondary hydroxyl groups of β -1,3-glucan after chemoselective sulfation.

ここで 2 位の水酸基に対しては、隣接する糖残基 (R_1 および R_2) による立体障害があり、同様に、4 位の水酸基においては、3 位における隣接糖残基と 6 位における硫酸基が共に立体障害となり、これらの二級水酸基が硫酸化される確率は等しい。事実、この生成物については、収量は数%程度と極めて低く、また、それらは、2, 6-および 4, 6-ジ硫酸の等量混合物であった。

これに対して、 β -1, 4-グルカン (セルロース) の場合がある。セルロースは、第 5 図に示すように、 β -1, 4-キシランと同じく、糖残基が交互に反転した直鎖構造をし、分子内において 6 位の一級水酸基は隣接する糖残基の 2 位の二級水酸基と、3 位の二級水酸基も隣接の糖残基の環内酸素原子との間で水素結合を形

成し、極めてリジットな構造体となっている。

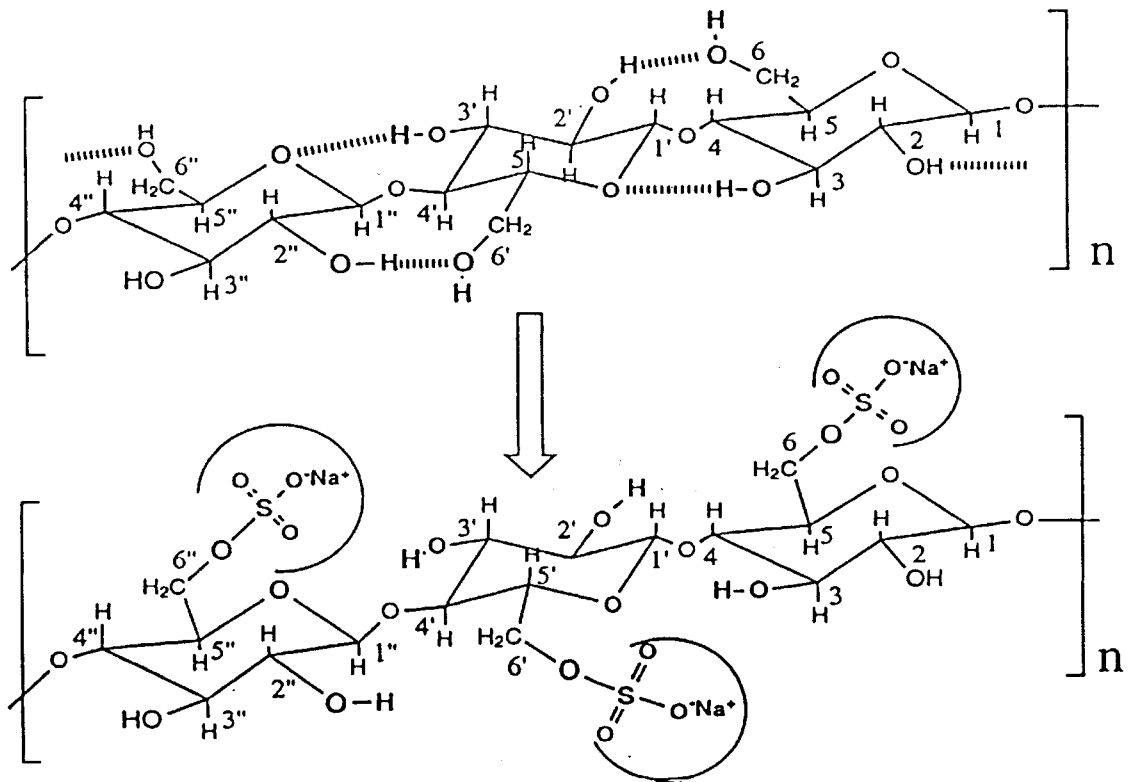


Fig. 5, Steric hindrance to the secondary hydroxyl groups of β -1,4-glucan after chemoselective sulfation. (| | | | ; indicates a hydrogen bond).

硫酸化は、カードランの場合と同様にまず一級水酸基に対して起こるが、ここに導入された硫酸基は隣接糖残基の3位の水酸基に接近し、これを覆うような配向をとる。このため、本来は等価であるべき2位、または3位の二級水酸基では、巨大置換基としての硫酸基による立体障害によって、3位の反応性は乏しくなる。この生成物については、収量はやはり少なく、2, 6-ジ硫酸の生成が主要であった。

このようにして得られた β -1, 3-キシラン硫酸においては、顕著な血液凝固阻止活性を示し、その抗トロンビン活性は標準ヘパリンの約7倍とする高い値を示した。これはまた、HIVの宿主細胞への接触を阻止するなどの抗ウイルス活性をもまた顕著に示した。¹⁶⁾ 硫酸化多糖のこのような構造と機能相関についての解説は、次の機会にゆずりたい。

この小論は、これまで当研究室において真摯に研鑽を積まれた多くの卒研究生、大学院生の成果のまとめであり、これらの人々に敬意と感謝の気持ちを表したい。

【文献】

- 1), M.Maeda, T.Uehara, N.Harada, M.Sekiguchi, A.Hiraoka, *Phytochemistry*, 30, 3611 (1991).
- 2), J.B.Lee, T.Yamagaki, M.Maeda, H.Nakanishi, *Phytochemistry*, 48, 921 (1998).
- 3), N.Harada, M.Maeda, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 62, 1647 (1998).
- 4), Z.Osawa, T.Morota, K.Hatanaka, T.Akaike, K.Matsuzaki, H.Nakashima, N.Yamamoto, E.Suzuki, H.Miyano, T.Mimura, Y.Kaneko, *Carbohydr.Polymers*, 21, 321 (1993).
- 5), S.Kaihou, T.Hayashi, O.Otsuru, M.Maeda, *Carbohydr.Res.*, 240, 207 (1993).
- 6), M.Maeda, K.Kuroda, Y. Iriki, M.Chihara, K.Nisizawa, T.Miwa, *Bot.Mag.Tokyo*, 79, 940 (1966).
- 7), E.D.T.Atkins, K.D.Parker, R.D.Preston, *Proc.R.Soc.London*, (B), 173, 209 (1969).

- 8), Y.Fukushi, O.Ohturu, M.Maeda, *Carbohydr.Res.*,182, 313(1988).
- 9), K.Nagasawa, Y.Tohira, Y. Inoue, N.Tanoura, *Carbohydr.Res.*, 18, 95(1971).
- 10),E.Percival, *J.Chem.Soc.*, 1945, 119.
- 11),M.L.Worform, T.M.Shen Han, *J.Am.Chem.Soc.*, 81, 1764 (1959).
- 12),C.P.Hoiberg, R.O.Mumma, *J.Am.Chem.Soc.*, 91, 4273, (1969).
- 13),T.Yamagaki, M.Maeda, K.Kanazawa, Y. [shizuka, H.Nakanishi, *Biosci,Biotech,Biochem.*, 60, 1222 (1996).
- 14),T.Yamagaki, M.Maeda, K.Kanazawa, Y. Ishizuka, H.Nakanishi, *Biosci,Biotech,Biochem.*, 61, 1077 (1997).
- 15),T.Yamagaki, Y.Tsuji, M.Maeda, H.Nakanishi, *Biosci,Biotech,Biochem.*, 61, 1281 (1997).
- 16),J.B.Lee, T.Hayashi, K.Hayashi, M.Maeda, *J.Nat.Prod.*, 61.1101(1998).