ヘパリンの生物有機化学†

葛原 弘美, 市川 幸孝

(理化学研究所)

ヘパリンの発見は 1916 年ジョンズホプキンス大学の Howell 教授のもとで McLean が肝の抽出物が血液凝固阻止作用を持つことを見出し、次いで Howell と Halt によりその作用物質に対して肝にちなんだヘパリンという名が与えられたことにはじまる⁽¹⁾。その後この物質がアミノ糖やウロン酸から構成されている多糖で硫酸化を受けた水酸基、アミノ基を含有していること、また抗凝血活性のほかにも多彩な生理活性を示すことなどが明らかとなり多くの研究者の注目を集めることとなった⁽²⁾。しかし発見から現在に至る 70 年に及ぶ歴史のなかで、ヘパリンの抗凝血機能が明確な化学構造の裏付けをもって語られるようになったのは最近の 10 年余りのことにすぎない⁽³⁾。その最大の理由はヘパリンが他のグリコサミノグリカンのように単純な二糖性の反復単位を持たず機能性領域が分子中に片寄って存在していること、その含量や分布の仕方が動物や臓器の種類によってかなり異なることなどである。しかし血液凝固反応のメカニズムが確立し、アフィニティクロマトグラフなどの技術が進歩した結果、ヘパリンの分子生物機能の解明も大きく進展することになった。血液凝固是一群のセリンプロテアーゼの前駆体が連鎖的に位置特異的開裂を受けて活性化されることにより進行するが、アンチトロンビンⅢ（以下 ATⅢ と略す）に代表される数種のプロテアーゼ阻害タンパクが血漿中に存在してこのカスケード反応を制御している。ATⅢ の阻害作用は単独ではそれほど強くないが、ヘパリンが共存すると劇的に賦活される。すなわち、ヘパリンの抗凝血活性は ATⅢ を介して発現するものであり、まず ATⅢ へ特異的に接着してそのコンホメーションを変化させることにより、阻害反応の速度を数百倍加速するためと考えられている。

さて、市販のヘパリンは固定化された ATⅢ に対するアフィニティクロマトグラフによって、高抗血液凝固比活性を有する約 1/3 のフラクションとほとんど活性のない残りのフラクションに分離される⁽⁴⁾。Lindahl らは高比活性ヘパリンを化学的、酵素的に切断し ATⅢ に高い親和性を有するオリゴ糖断片を得⁽⁵⁾、さらに検討の結果 ATⅢ へ特異的に接着するヘパリンの最小構造として **1** (図 1) のような複雑な 5 糖 [A-B-C-D-E] を提出した⁽⁶⁾。また Choay らも別途同様な結論に達した⁽⁷⁾。非還元末端 [A] 中のアセチル基 (R=Ac) は ATⅢ との特異的接着に何ら寄与しておらず、除去してしまっても、または硫酸基で置き換えて **2** に変えても ATⅢ への親和性には全く影響を与えない⁽⁸⁾。**2** のような構造はウシの肺から単離されたヘパリン分子中に現実に存在していると言われている⁽⁵⁾。また後述するように、ヘパリンフラグメント **1**, **2** は単に ATⅢ へ接着するだけにとどまらず、ATⅢ コンプレックスとして凝血系カスケードに属する一部のプロテアーゼを効率よく阻害することができる⁽⁹⁾。とくに Xa 因子に対する阻害活性は、ATⅢ に対する結合定数とともにヘパリン関連化合物の活性の指標に用いられている。なお凝血系プロテアーゼのなかでもトロンビンなどの阻害には、この 5 糖を含むさらに大きな分子が必要である。

さて分析的手法に基づく生化学者たちの努力によって混沌としていたヘパリンの機能単位がここまで解明されてくると、その構造の正しさを最終的に立証し、さらに微細構造と機能の相関やタンパクとの接着に要求されるコンホメーションなどを調べるには有機合成が非常に効果的である。まず活性 5 糖 **2** の全合成が、フランス⁽⁹⁾、オランダ⁽¹⁰⁾、日本⁽¹¹⁾の 3 つのグループにより個々に達成された。全合成の後半の過程は 3 グループともよく似たスキームに従っており、図 1 に筆者ら日本グループの例を示す。**2** の合成上の問題点の一つは官能基の多彩さであり、とくに水酸基の硫酸化のパターンに全く規則性がな

† Bioorganic Chemistry on Heparin.
Hiroyoshi KUZUHARA and Yoshitaka ICHIKAWA
(RIKEN, The Institute of Physical and Chemical Research, Hirosawa, Wako 351-01)

図 1

いため 3 のようなキー前駆体を経由することにした。2 における硫酸化された水酸基、遊離の水酸基は 3 においてはおのおのアシル化 (Ac, Bz), アルキル化 (Bzl) されており, これら保護基の除去法の違いを利用して必要な位置のみを硫酸エステルに変換することができた。他の 2 グループの合成も基本的には 3 とほぼ同じような組合せの保護基が用いられており, さらに 3 のような完全に保護された 5 糖誘導体の構築法に関しても 3 つのグループに共通点がある。すなわち, 2 つの 2 糖性シントんと 1 つの単糖性シントンを縮合させるというブロック合成を用いている点である。筆者らがこのようなシントンの組合せを選んだ理由は, それまでにオリゴ糖の位置選択的保護に関する研究成果を蓄積しており, そのなかのセロビオース誘導体を活用して 2 糖性シントン 5 と 6 を合成する計画をたてたからであった。また, 4 は既知化合物でありただちに利用できる状態にあったので, 3 グループが共通して用いる結果となった。筆者らと異なり, フランスとオランダのグループは単糖性のグリコシル供与体および受容体を結合させて 5, 6 に相当する二糖性シントンを調製しているが, フランスグループが必要な化学修飾をすべて単糖レベルで完了しているのに対し

て, オランダグループは単糖と 2 糖 2 つのレベルで段階的に行っている。このようにして合成された 2 と AT III との間には $5 \sim 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の結合定数が測定 (蛍光変化分析法) され, これは高親和性ヘパリンに匹敵する数値であった。また 2 の合成標品は非常に強い Xa 因子阻害活性を示したが, これとは対称的に 2 の非還元末端や還元末端の単糖残基を欠く合成 4 糖は全く (またはほとんど) 活性を失っており, 2 や 1 のような 5 糖が AT III に対し強い親和性を有するヘパリンの最小構造であることが確実になった。この全合成研究において, 2 の還元末端, すなわち遊離ヘミアセタールの存在が副生成物を生み, 合成の最終段階で煩雑な分離精製操作が必要になることが判明したので, その後 2 の合成と同様なプロセスをへて 2 の α -メチルグリコシド (7, 図 2)⁽¹²⁾ およびその β -アノマー⁽¹³⁾ の合成が行われ, とともに 2 と同様な活性を持つことが確認された。

さてこのように複雑な構造を持つ 5 糖の合成法が確立すると, その方法論を展開してさらに AT III への作用に対する 5 糖分子中の個々の官能基の貢献度を調べることが可能となる。すでに生化学者たちによる構造解析の過程において, 1 の分子中の多数の硫酸基のなかで

図 2

[C], [E] 残基中の N-硫酸や [A] 残基中の 6-O-硫酸の必要性は明らかになっていた。合成化学的アプローチはさらにその他の O-硫酸のおおのについて, Xa 因子阻害活性に対する寄与の度合いを明確にした。図 2 の化合物 8, 9, 10 は 7 の分子中の特定の O-硫酸 1 つだけが遊離水酸基 (太字で書いてある) で置き換えられた化

合物と見なすことができるが, Petitou ら⁽¹⁴⁾, Beetz ら⁽¹⁵⁾ は 7 の合成と同様なプロセスでこれらの化合物を合成して AT III の共存下 Xa 因子阻害活性を調べた。その結果 8 は全く活性を喪失しているのに対して, 9, 10 は 7 の 20% 前後の活性を維持していた。それまでも構造解析の過程において天然物から得た活性ヘパリンフ

図 3

図 4

ラグメントに特徴的な構造として3位が硫酸化されたグルコサミン残基の存在が指摘されていたが、合成標品7と8の活性の比較によって疑問の余地がなくなった。有機合成はさらに天然物を凌駕する活性を創造することもできる。van Boeckel ら⁽¹⁶⁾は余計な3-O-硫酸を末端のグルコサミン残基中に有する11の合成を行ったが、この化合物の抗Xa因子活性は7の2倍以上の強さであった。

さて、ヘパリンの分子構造におけるもう1つの特徴はL-イデュロン酸残基(DoAと略す)の存在である。このウロン酸のコンホメーションが機能に重大な影響を及ぼしていることは後述するが、カルボキシレート基の存在が活性発現に必須であることも合成で確かめられた。7における2位が硫酸化されたDoA(DoA_{2s}と略す)の代りにカルボキシレートが欠落した2-O-スルホニル-D-キシロピラノース残基が入った合成5糖は全く活

性を示さなかったし、12のように10のDoA_{2s}をL-イドピラノース誘導体で置き換えた化合物の抗Xa因子活性は10の1/150に減少した。逆に11のアナログと見なされる13のように、DoAと同じ絶体配位のカルボキシレートがあれば、たとえそれが鎖状フラグメント中に存在していてもかなりの活性を残している⁽¹⁸⁾。

グリコサミノグリカンの分子中に存在するDoAのコンホメーションは以前から論議の対象になってきたが、ヘパリンに関連した合成研究のおかげでDoAやDoA_{2s}を含むオリゴ糖類の標品が入手できるようになりコンホメーションの精密解析に大いに役立つことになった。まずDoA_{2s}のみの単糖誘導体に関するforce field計算から¹C₄, ⁴C₁の2つの椅子型コンホメーションに加えて、skew-boatコンホメーションの1つ²S₀がエネルギー的にはほぼ等しいことが示され、DoA_{2s}誘導体は理論的にはこの3つのコンホメーションの平衡とし

て存在することになった (図 3)⁽¹⁹⁾. 次いで合成オリゴ糖類の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルが詳しく調べられ, 測定された J 値から最小二乗法を用いて3つのコンホメーションの比を計算した結果, Ido A_{28} が糖鎖の中に存在する場合は $^1\text{C}_1$ の寄与はなく $^1\text{C}_4/{}^2\text{S}_0$ の平衡状態にあることがわかった⁽²⁰⁾. しかも興味深いことには, Ido A_{28} の4位に結合しているグルコサミン残基 (Glc N と略す) がたとえば8のように3位が遊離水酸基の場合は Ido A_{28} のコンホマー比 $^1\text{C}_4/{}^2\text{S}_0$ は 6/4 であるが, 2のように Glc N の3位が硫酸化されると 4/6 と逆転する. このように Ido A_{28} は一種の“分子蝶番”として働いており, そのフレキシビリティがヘパリン機能に重要な役割を果たしていると考えられている.

これまで述べてきた事実や速度論的研究の結果などを総合して判断すると, ヘパリンの活性5糖部位と AT III の相互作用は2段階で進むらしい. まず5糖中で安定したコンホメーションを持つ3糖部分のアニオンクラスターが AT III binding site-1 に接着する. 第2段の接着に関してはまだ定説はないようであるが, van Boeckel ら⁽²¹⁾は図4に示すように Ido A_{28} のカルボキシレートが AT III binding site-2 に接着し, これにより AT III のコンホメーションの変化が誘起され则认为している. これに対し Petitou ら⁽¹⁴⁾はむしろ残りの部分 (図4の点線部分) を重視して, これを binding site-2 に含めているようである. 今後の解明が待たれるところである.

本稿執筆にあたり論文別刷を送って下さった C. A. A. van Boeckel 博士と M. Petitou 博士に感謝する.

- (1) 吉澤善作監修:「ヘパリン」, 講談社, 1979, p. 1.
- (2) L. B. Jaques: *Science*, **206**, 528 (1979).
- (3) B. Casu: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **43**, 51 (1985).
- (4) M. Höök, I. Björk, J. Hopwood and U. Lindahl: *FEBS Lett.*, **66**, 90 (1976).
- (5) U. Lindahl, G. Bäckström, M. Höök, L. Thunberg, L. Fransson and A. Linker: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 3198 (1979).

- (6) L. Thunberg, G. Bäckström and U. Lindahl: *Carbohydr. Res.*, **100**, 393 (1982).
- (7) J. Choay, J.-Claude Lormeau, M. Petitou, P. Sinaÿ and J. Fareed: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **370**, 644 (1981).
- (8) J. Choay, M. Petitou, J. C. Lormeau, P. Sinaÿ, B. Casu and G. Gatti: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 492 (1983).
- (9) P. Sinaÿ, J. Jacquinet, M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay and G. Torri: *Carbohydr. Res.*, **132**, C 5 (1984).
- (10) C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, J. N. Vos, A. J. M. de Jong, S. F. van Aelst, R. H. van den Bosch, J. M. R. Mertens and F. A. van der Vlugt: *J. Carbohydr. Chem.*, **4**, 293 (1985).
- (11) Y. Ichikawa, R. Monden and H. Kuzuhara: *Tetrahedron Lett.*, **27**, 611 (1986).
- (12) M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, J. Jacquinet, P. Sinaÿ and G. Torri: *Carbohydr. Res.*, **167**, 67 (1987).
- (13) Y. Ichikawa, R. Monden and H. Kuzuhara: *Carbohydr. Res.*, **172**, 37 (1988).
- (14) M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay and P. Sinaÿ: *Carbohydr. Res.*, **179**, 163 (1988); M. Petitou, J. Lormeau and J. Choay: *Eur. J. Biochem.*, **176**, 637 (1988).
- (15) T. Beetz and C. A. A. van Boeckel: *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5889 (1986).
- (16) C. A. A. van Boeckel, T. Beetz and S. F. van Aelst: *Tetrahedron Lett.*, **29**, 803 (1988).
- (17) S. F. van Aelst and C. A. A. van Boeckel: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **106**, 593 (1987).
- (18) C. A. A. van Boeckel, J. E. M. Basten, H. Lucas and S. F. van Aelst: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1177 (1988).
- (19) D. R. Ferro, A. Provasoli, M. Ragazzi, G. Torri, B. Casu, G. Gatti, J. Jacquinet, P. Sinaÿ, M. Petitou and J. Choay: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6773 (1986).
- (20) B. Casu, M. Petitou, M. Provasoli and P. Sinaÿ: *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 221 (1988).
- (21) C. A. A. van Boeckel, H. Lucas, S. F. van Aelst, M. W. P. van den Nieuwenhof, G. N. Wagenaars and J.-R. Mellema: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **106**, 581 (1987).