Sulfated Polysaccharides as Specific Biologically Active Materials

特異な生理活性を持つ硫酸化糖鎖マテリアル

Muschin, Tegshi¹; Han, Shuqin^{1,2}; Ishimura, Hisataka¹; and Yoshida, Takashi¹¹Department of Bio and Environmental Chemistry, Faculty of Engineering,

Kitami Institute of Technology, Koen-cho 165, Kitami 090-8507, Hokkaido, Japan

²College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Hohhot, 010021, P. R. China

FAX: 81-157-26-9388, E-mail: yoshida@chem.kitami-it.ac.jp

(Received on November 21, 2011, accepted on December 5, 2011)

Key Words: *sulfated polysaccharide, anti-viral activity, polysaccharide-protein interactions, NMR, SPR***Abstract**

Sulfated polysaccharides are related to recognition and many biological activities in an organism. The action mechanism has become apparent by means of nuclear magnetic resonance (NMR) and surface plasmon resonance (SPR) apparatus. In this minireview, we describe the recent synthesis, biological activity, and relationship between structure and biological activity of polysaccharides.

要 約

硫酸化糖鎖は生体内での認識や多くの生理活性に関わっている。その作用メカニズムは核磁気共鳴装置 (NMR) や表面プラズモン共鳴装置 (SPR) などによって明らかになりつつある。このミニレビューでは糖鎖に関する最近の合成、生理活性、構造と生理活性との関係などについて述べる。

A. Introduction

Sulfated polysaccharides are known to have unique biological activities including antiviral and blood anticoagulant activities. In particular, curdlan sulfate, which is prepared by sulfation of a natural polysaccharide, curdlan, had potent anti-HIV activity at a concentration as low as 3.3 µg/ml (1), and heparin is the strongest known blood anticoagulant natural polysaccharide (2). The elucidation of carbohydrate-protein interactions is important not only to understand the antiviral mechanism of sulfated polysaccharides, but also to develop new and effective medicines or biomaterials. For this purpose, synthesis of polysaccharides with defined structures is necessary. Ring-opening polymerization of anhydro sugar derivatives is an excellent method to synthesize of stereoregular polysaccharides with defined structures and high molecular weights. Since the first paper on the synthesis of stereoregular polysaccharide by the ring-opening polymerization of anhydro sugar derivatives (3), many anhydro sugar monomers have been synthesized and their ring-opening polymerizations were examined by Schuerch (4, 5), Okada (6), Uryu (7, 8). To date, we have investigated the synthesis of stereoregular polysaccharides by the ring-opening polymerization of anhydro sugar derivatives and subsequent deprotection. We have also synthesized sulfated polysaccharides by sulfation of naturally occurring polysaccharides (9). Studies using both synthetic and naturally occurring polysaccharides are important ways

A. はじめに

硫酸化糖鎖は抗ウイルス性や抗凝血作用など特異な生理活性を持つことが知られている。特に天然の糖鎖カードランを硫酸化して合成したカードランは、3.3 µg/ml という低濃度で高い抗 HIV 作用を持つことが分かり (1)、ヘパリンは最も高い抗凝血作用を持つ天然の硫酸化糖鎖として知られている (2)。糖鎖とタンパク質間の相互作用の解明は硫酸化糖鎖の抗ウイルス性メカニズムの理解だけでなく新しく効果的な薬やバイオマテリアルの開発にとっても重要である。この目的のために明確な構造を持つ糖鎖の合成は必要である。無水糖モノマーの開環重合法による立体規則性糖鎖の合成は高分子量で構造明確な糖鎖をえることができるたいへんよい方法である。開環重合法による立体規則性糖鎖の初めての報告 (3) 以来、多くの無水糖モノマーが合成され、それらの開環重合はシャーシ (4, 5)、岡田 (6)、瓜生 (7, 8) らによって成し遂げられてきた。我々も無水二糖モノマーや無水三糖モノマーを含む多くの無水糖モノマーを合成し糖鎖構造と生理活性との関係について研究してきた (9)。構造明確な合成糖鎖と天然糖鎖の両方を用いる研究は糖鎖の構造と生理活性との関係を知るために重要な方

to investigate the structure-biological activity relationships of polysaccharides. Nuclear magnetic resonance (NMR) and surface plasmon resonance (SPR) are good tools for studying interactions between polysaccharides and proteins. In this minireview, we focus the results since around the year 2000 of studies on the ring-opening polymerization of anhydro sugar monomers into stereoregular polysaccharides and on the antiviral activities of sulfated synthetic and natural polysaccharides.

B. Synthesis of Stereoregular Polysaccharides

B-1. Ring-Opening Polymerization of Anhydro Sugar Derivatives

The ring-opening polymerization of anhydro sugar derivatives into stereoregular polysaccharides was first reported by Schuerch in 1966, who prepared benzylated 1, 6-anhydro- β -D-glucopyranose (LGTBE) **1** and polymerized it using phosphorus pentafluoride (PF₅) as a cationic catalyst under high vacuum to give (1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranan **3** after reductive deprotection of benzyl groups to recover hydroxyl groups by sodium in liquid ammonia, as shown in Scheme 1 (3). The yield and molecular weight of polymers produced by

Scheme 1. Ring-opening polymerization of benzylated 1,6-anhydroglucose 1 into stereoregular (1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranan (dextran).

the ring-opening polymerization were high. The benzyl group is a good protection group for a hydroxyl group because it is easily deprotected to recover the hydroxyl group in high yield.

Most monosaccharides have eight aldohexoses with six carbons and four aldopentoses with five carbons. In those monosaccharides, five and four anhydro hexose and pentose monomers have been synthesized and polymerized to give the corresponding 1, 6- α -D-hexopyranan and 1, 5- α -D-pentofuranans after deprotection to recover hydroxyl groups. For example, 1, 4-anhydro-2,3-di-*O*-benzyl- α -D-ribofuranose **4** in CH₂Cl₂ at -40°C with BF₃OEt₂ as the catalyst gave a new polysaccharide, 1,5- α -D-ribofuranan **5**, after deprotection (10). On the other hand, the highly stereoregular 2,3-*O*-benzylidene-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-ribofuranan was synthesized by selective ring-opening polymerization of a pentose monomer, 1,4-anhydro-2,3-*O*-benzylidene- α -D-ribofuranose **6** at -40 °C with SbCl₅ as the catalyst in CH₂Cl₂ and then deprotected to give (1 $\rightarrow$

法論となる。核磁気共鳴 (NMR) や表面プラズモン共鳴 (SPR) はそれを成し遂げるためのたいへん有効なツールとなる。このミニレビューでは主に 2000 年以降の研究に焦点を絞り無水糖モノマーの開環重合法により合成した立体規則性硫酸化糖鎖と天然の硫酸化糖鎖の抗ウイルス性などの生理活性について述べる。

B. 立体規則性糖鎖の合成

B-1 無水糖モノマーの開環重合

無水糖モノマーの開環重合法による立体規則性糖鎖の合成は 1966 年にシャーシによって初めて報告された。シャーシはベンジル化 1,6-無水グルコース (LGTBE) **1** を合成し、PF₅ 触媒、高真空下による開環重合を行い、液体アンモニア中金属ナトリウムを用いるバーチ還元によってベンジル基の脱保護を行い Scheme 1 に示すように (1 $\rightarrow$ 6)- α -D-グルコピラン **3** を得た (3)(スキーム 1)。得られた合成糖鎖の収率や分子量は高いものであった。ベンジル基は水酸基のたいへんよい

保護基であり簡単な脱保護を行うことができ、水酸基を再生することができる。

ほとんどの単糖類は 8 種類の 6 個の炭素から成るアルドヘキソースと 4 種類の 5 個の炭素から成るアルドペントースに分類される。これらの単糖類のうち、5 つの無水ヘキソースモノマーと 4 つの無水ペントースモノマーが合成され、開環重合によって 6 員環構造の立体規則性糖鎖である 1, 6- α -D-ヘキシピラン、5 員環構造を持つ立体規則性糖鎖の 1, 5- α -D-ペントフラナンが得られた。たとえば、無水リボースのモノマーである 1, 4-アンヒドロ-2,3-ジ-*O*-ベンジル- α -D-リボピラノース **4** は塩化メチレン溶媒、-40°C で BF₃ エーテレート触媒により重合し新しい立体規則性糖鎖である 1,5- α -D-リボフラナン **5** が得られた (10)。一方、高い立体規則性を持つ 2,3-*O*-ベンジリデン-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-リボピラナンは 1,4-アンヒドロ-2,3-*O*-ベンジリデン- α -D-リボピラノース **6** モノマーの -40 °C、五塩化アンチモン (SbCl₅) 触媒による開環重合し脱保護によって 6

4)- β -D-ribofuranose **7** consisting of a six-membered ring with high molecular weights ($[\eta] = 0.131 \sim 0.347$) (11).

員環を持つ (1 $\rightarrow$ 4)- β -D- リボピラナン **7** が得られた (11)。このときの粘度は ($[\eta] = 0.131 \sim 0.347$) であり高い分子量を持つことが分かった。

Scheme 2. Selective ring-opening polymerization of 1,4-anhydribose monomers.

Recently, we prepared a new monomer, 1,6-anhydro-2,3,4-tri-*O*-benzyl- β -D- talopyranose **8** (benzylated 1, 6-anhydro- β -D-talopyranose), which is the sixth anhydro hexose monomer synthesized to date, from D-galactose as a starting monosaccharide by 11 steps and then polymerized it with PF_5 as catalyst at low temperature at -60°C under high vacuum to give the corresponding (1 $\rightarrow$ 6)- α -D-talopyranan **9** with around 20% yields (Scheme 3) (12). The copolymerizability with LGTBE **1** was also low.

最近我々は 8 種類のヘキソースからのモノマーのうち第 6 番目に当たる、最も新しい無水糖モノマーの 1,6- アンヒドロ-2,3,4- トリ -*O*- ベンジル - β -D- タロピラノース **8** (ベンジル化 1, 6- アンヒドロ - β -D- タロピラノース) を D- ガラクトースを出発単糖類として 11 段階で合成した。そして五フッ化リン (PF_5) 触媒、高真空下、 -60°C で重合させたところ、対応する立体規則性の 2,3,4- トリ -*O*- ベンジル -(1 $\rightarrow$ 6)- α -D- タロピラナン **9** が 20% の収率で得られることを見出した (スキーム 3) (12)。

Scheme 3. Ring-opening polymerization of benzylated 1,6-anhydro- β -D-talopyranose.

The polymerizability of the benzylated 1, 6-anhydro- β -D-talopyranose **8** was reported in the order mannose > glucose > galactose > allose > talose > altrose. The order of the polymerizability was determined by the results of copolymerization with the 1,6-anhydro glucose monomer **1**.

In general, ring-opening polymerization is performed with cationic catalysts under high vacuum conditions at low temperatures because catalysts are unstable at high temperatures and it is necessary to avoid contamination by oxygen and humidity. However, we found that the methylated monomer 1,6-anhydro-2,3,4-tri-*O*-methyl- β -D-glucopyranose (LGTME) **10** has high ring-opening polymerizability and

ベンジル化無水グルコースモノマーの LGTBE **1** との共重合性も低く、**1** との共重合比から無水タロースモノマー **8** の重合性はマンノース > グルコース > ガラクトース > アロース > タロース > アルトロースの順になることが分かった。

一般に、無水糖モノマーの開環重合はカチオン触媒を用い高真空下低温で行われる。それは触媒が高温になると不安定になることと酸素や水分の影響を防ぐためである。ところが、我々はメチル化した無水グルコースモノマーである 1,6- アンヒドロ-2,3,4- トリ -*O*- メチル - β -D- グルコピラノース (LGTME) **10** は高い開環重合性を持ち、温和な重合条件で容易に重合することを見出した (13)。すなわち、三フッ化ホウ素エーテル

polymerizes under mild conditions (13). With BF_3OEt_2 as a catalyst under a normal pressure and N_2 atmosphere at 0°C , the methylated monomer **10** gave a high molecular weight polymer having two molecular weight fractions, $\bar{M}_n = 161 \times 10^3 \sim 364 \times 10^3$ and $\bar{M}_n = 394 \times 10^3 \sim 2,820 \times 10^3$ in the proportion of 4.5:1, with complete 1,6- α stereoregularity in a high yield (Scheme 4), even though benzylated 1,6-anhydro glucose monomer **1** gave no polymers in the same

(BF_3OEt_2) 触媒を用いてチッ素気流下、常圧、 0°C の条件下で重合させたところ、4.5 : 1 の割合で2つの高分子量成分、 $\bar{M}_n = 161 \times 10^3 \sim 364 \times 10^3$ と $\bar{M}_n = 394 \times 10^3 \sim 2,820 \times 10^3$ を持ち、完全にポリマーが好収率で1,6- α -立体規則性のポリマーを与えることを見出した(スキーム 4)。ベンジル化無水グルコースモノマー **1** は同条件下での重合ではポリマーを得ること

Scheme 4. Two-step ring-opening polymerization of methylated 1,6-anhydroglucopyranose monomer **10, which monomer had high ring-opening polymerizability and stable propagating end.**

polymerization conditions. In addition, we found that this methylated monomer had “living” polymerizability. After the first stage of polymerization under normal pressure for 6 h at 0°C , the second methylated monomer was added to the polymerization mixture and then the polymerization was continued for a further 12h. We found that the lower molecular weight of the resulting polymer was increased to $\bar{M}_n = 394 \times 10^3$ and the yield was 78%. These results suggest that after the first-stage polymerization the polymer has a stable propagating end that has a potential ability to re-starting for the ring-opening polymerization.

In our previous reports, three pentose monomers (Fig.1), 1,4-anhydro-2,3-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- α -D-

が出来ないことに比べ **10** は高い開環重合性を持っていることが分かった。さらにこのメチル化モノマー **10** はリビング重合性を示すことも見出した。常圧、 0°C 、6時間の第1段階目の重合後にメチル化無水グルコースモノマー **10** を再度加えそのまま重合を12時間続けた。すると78%の収率でポリマーが得られ、分子量は $\bar{M}_n = 394 \times 10^3$ まで大きくなることが明らかとなった。この結果は第1段階目の重合において重合終了後においてもポリマー末端は重合性を保っており再重合性を持っていることが示唆される結果である。

我々の以前の研究で、3つの無水ペントースモノマー(図1)、1,4-アンヒドロ-2,3-ジ-*O*-*tert*-ブチルジメチルシリ

Fig. 1. 1,4-anhydropentose monomers gave stable propagating end.

ribose (ADSR) **11**, 1,4-anhydro-2,3-*O*-benzylidene- α -D-ribose (ABRP) **6**, and 1,4-anhydro-2,3-di-*O*-benzyl- α -D-xylopyranose (ADBx) **12**, were found to have a stable propagating end (14). That is, these monomers gave the block copolymers consisting of poly(ADSR-ADBR), poly(ABRP-ADBR), and poly(ADBx-ADBR) having narrow molecular weight dispersion, respectively. In particular, the block copolysaccharide consisting of pyranose and furanose units, (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-ribofuranan and (1 $\rightarrow$ 5)- α -D-ribofuranan, was obtained by the first-stage polymerization of ABRP monomer and then by addition of the second ADBR monomer.

B-2. Ring-Opening Mechanism

For 1,5-anhydro pentose monomers, there are two possible ring-opening mechanisms, oxonium and carbenium ion mechanisms to give 1,5- α linked or mixed structure of 1,5- α and 1,5- β linked pentofuranans (Scheme 5). For ABRP monomer, the bulky SbCl_5 catalyst was complexed to the C1-O⁺-C4 oxygen with less steric hindrance, and then ion pairing of SbCl_6^- was formed. The next ABRP monomer was attacked from the back side of the complex to give exclusively a 1,4-linked pentopyranan structure. For 1,6-anhydro hexose monomers, ring-opening at a 1,6-linked bond occurred by the complexation of a catalyst at the C1-O⁺-C6 oxygen to give 1,6- α -linked hexopyranans exclusively (10, 11, 15).

ル- α -D-リボピラノース (ADSR) **11**, 1,4-アンヒドロ-2,3-*O*-ベンジリデン- α -D-リボピラノース (ABRP) **6**, および 1,4-アンヒドロ-2,3-ジ-*O*-ベンジル- α -D-キシロピラノース (ADBx) **12** は安定な成長末端を持っていることを示した (14)。すなわち、これらのモノマーは狭い分子量分布を持つブロック共重合体、poly(ADSR-ADBR)、poly(ABRP-ADBR)、および poly(ADBx-ADBR) をそれぞれ与えた。特にブロック共重合体のうち、(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-リボピラナンおよび (1 $\rightarrow$ 5)- α -D-リボフラナンのピラノースユニットとフラノースユニットからなる共重合体、すなわち はベンジリデン化無水リボースモノマー ABRP **6** を始めに重合させた後にベンジル化無水リボースモノマー ADBR を加えることにより得られることが分かった。

B-2. 開環重合のメカニズム

1,5-無水ペントースモノマーの場合、Scheme 5 に示すように 2 つの開環重合メカニズム、すなわちオキソニウムおよびカルベニウムメカニズムによって 1,5- α 結合の立体規則性ポリマーか 1,5- α と 1,5- β 構造の混合構造を持つペントフラナンを与える (スキーム 5)。ABRP モノマー **6** では大きな五塩化アンチモン (SbCl_5) 触媒がより立体障害の少ない C1-O⁺-C4 酸素に配位して SbCl_6^- とのイオンペアを形成する。そして次の ABRP モノマーが形成した錯体に対し背面攻撃を行い、1,4- β 結合を持つ 6 員環構造のペントピラナンポリマーのみを与える。また、6 個の炭素を持つ 1,6-無水ヘキソースモノマーでは触媒が C1-O⁺-C6 酸素に配位して 1,6-結合が開くことによって開環重合が起こり、1,6- α 結合を持つ 6 員環構造のヘキソピラナンポリマーのみを与える (10, 11, 15)。

Scheme 5. Ring-opening modes of 1,4-anhydro- α -D-ribose monomer.

B-3. Ring-Opening Polymerization of Di and Trisaccharide Monomers into Branched Polysaccharides

Synthetic polysaccharides have a linear structure. In nature, on the other hand, branched polysaccharides are common structures and are involved in several biological activities such as recognition between cell and cell, viruses, bacteria, and toxins. It is difficult to determine the relationship between the structures of polysaccharides and their biological activities because natural polysaccharides have complex and branched structures. Therefore, branched polysaccharides

B-3. 無水二糖モノマー、無水三糖モノマーの開環重合による分枝多糖の合成

合成で得られた糖鎖はふつう直鎖状構造である。しかし天然では分枝構造を持つ糖鎖がふつうであり、その分枝構造が多く of 生理活性に関与していると推定される。すなわち、細胞と細胞、ウイルス、細菌や毒性物質などとの認識に関わっていると思われる。しかし、天然の糖鎖が複雑な分枝構造をもっているため、糖鎖の構造と生理活性との関係を調べることは通常は極めて困難な課題である。それゆえ、合成によ

with defined structures obtained by synthesis are expected to be model polysaccharides for biological studies of naturally occurring polysaccharides. In 1970, Schuerch reported two anhydro disaccharide monomers, benzylated 1, 6-anhydro cellobiose and maltose, that were polymerized to give β - and α -glucose a branched (1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranans with a comb-shaped structure, respectively (16, 17). The proportion of branched glucoses was changed by the copolymerization with benzylated 1,6-anhydro glucopyranose (LGTBE) **1**. In 1993, Kobayashi synthesized 1,6-anhydro mannobiose monomer, 1,6-anhydro-2,3-di-*O*-benzyl-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyl)- β -D-mannopyranose, and obtained the corresponding mannose branched polysaccharide, 4-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-mannopyranan after ring-opening polymerization using PF_5 as the catalyst and subsequent debenzoylation (18).

We have also reported the synthesis of branched polysaccharides by ring-opening polymerization of a new anhydro disaccharide monomer (19). Lactose is one of the three natural disaccharides, lactose, sucrose, and trehalose. We used lactose to synthesized a 1,6- anhydro disaccharide monomer, 1,6-anhydro-2,3-di-*O*-benzyl-4-*O*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranose (benzylated 1,6-anhydro lactose (LSHBE)) **13**, and then revealed the ring-opening polymerizability. The ring-opening polymerization of LSHBE **13** was carried out using PF_5 as a catalyst under high vacuum to give a stereoregular benzylated (1 $\rightarrow$ 6)- α -D-lactopyranan **14**. The polymerization temperatures affected both molecular weights and yields of the polymers. At -60 °C, homopoly(LSHBE) had the highest yield, 68.5%, and at -78 °C, homopoly(LSHBE) had the highest molecular weight, $\bar{M}_n = 7.3 \times 10^3$ (Scheme 6). The copolymerizability of LSHBE **13** with LGTBE **1** was high, and the corresponding

て得られた構造明確な分枝多糖類は、モデル化合物として天然糖鎖の生理活性を調べる研究に期待できる。1970年にシャーシは2つの無水二糖モノマー、すなわち、ベンジル化無水セロビオースモノマーとマルトースモノマーを合成し開環重合させることにより、それぞれ β -と α -グルコース分枝を持つ櫛型糖鎖の合成に成功した(16, 17)。枝の割合は、1,6-無水グルコースモノマー**1**との共重合によって任意に変化させることが出来た。1993年に小林らは無水マンノース二糖モノマー、1,6-アンヒドロ-2,3-ジ-*O*-ベンジル-4-*O*-(2,3,4,6-テトラ-*O*-ベンジル- α -D-マンノピラノシル)- β -D-マンノピラノースを合成し、 PF_5 触媒を用いる開環重合によって対応するマンノースが1つ分枝したマンノース主鎖の分枝糖鎖、4-*O*- α -D-マンノピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-マンノピラナンを得ることが出来た(18)。

我々も新しい無水二糖モノマーを合成し開環重合による分枝多糖類の合成について報告した(19)。すなわち、天然の二糖類は3種類あり、ラクトース、スクロース、トレハロース、我々はそのうちラクトースから1,6-無水二糖モノマーである、1,6-アンヒドロ-2,3-ジ-*O*-ベンジル-4-*O*-(2',3',4',6'-テトラ-*O*-ベンジル- β -D-ガラクトピラノシル)- β -D-グルコピラノース(ベンジル化1,6-無水ラクトース(LSHBE))**13**を合成した。このモノマーは高真空中 PF_5 触媒で開環重合し1,6-グルコピラナンの主鎖に1つの糖残基当たりガラクトースが1つ分枝したベンジル化(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-ラクトピラナン**14**を与えた。このモノマーの重合ではポリマーの分子量や収率に及ぼす重合温度の影響が大きいことが明らかになった。-60℃で68.5%の最も高い収率で対応するポリマーを与え、-78℃では最も高い分子量、 $\bar{M}_n = 7.3 \times 10^3$ のポリマーを与えた(スキーム6)。LGTBE**1**との共重合性は高く、種々の割合で対応するグルコースとラ

Scheme 6. Ring-opening polymerization of anhydro disaccharide, LSHBE.

copolysaccharides with different proportions of lactose and glucose units were obtained in good yields. In addition, the structure-biological activity relationship was also elucidated. We found that sulfated homopoly(lactose)s **16** had moderate anti-HIV ($\text{EC}_{50} = 5.9$ and $1.3 \mu\text{g/ml}$) and blood anticoagulant

クトースユニットを持つ分枝糖鎖を好収率で合成することができた。さらに構造と生理活性との関係を明らかにした。硫酸化したラクトースのみから成る糖鎖、すなわちすべてのグルコース主鎖ユニットにガラクトースの分枝がある構造、では中間的な抗 HIV 作用、($\text{EC}_{50} = 5.9$ and $1.3 \mu\text{g/ml}$) および抗

activities (AA = 18 and 13 unit/mg) compared to those of standard dextran ($EC_{50} = 0.84 \mu\text{g/ml}$ and AA = 22.9 unit/mg) and curdlan sulfates ($EC_{50} = 0.13 \mu\text{g/ml}$ and AA = 19 unit/mg) in potency of activities. For sulfated poly(lactose-co-glucose) **17**, the biological activities increased with a decrease in the proportion of lactose units. Sulfated poly(lactose-co-glucose) having 15 mol% lactose units had high anti-HIV and blood anticoagulant activities of 0.3 $\mu\text{g/ml}$ and 54 unit/mg, respectively. The cytotoxicity (CC_{50}) was below 276 $\mu\text{g/ml}$. These biological results suggest that the distance between branched units on the main chain plays an important role in the anti-HIV and blood anticoagulant activities.

Among the anhydro sugar monomers we synthesized, 1,4-anhydro ribose was one of the monomers with high ring-opening polymerizability (10, 11). Therefore, we selected this monomer for synthesis of the main chain, and galactose and lactose for branched moieties to give new di- and trisaccharide monomers, 1, 4-anhydro-2-*O*-benzyl-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)- α -D-ribofuranose (A2B3GalR) and 1,4-anhydro-2-*O*-benzyl-3-*O*-(2',3',6',2'',3'',4'',6''-hepta-*O*-benzyl- β -D-lactosyl)- α -D-ribofuranose (A2B3LR).

The disaccharide monomer A2B3GalR gave stereoregular 1,5- α polymers with a high molecular weight, $\bar{M}_n = 43.0 \times 10^3$, in good yields. After deprotection, a stereoregular 1,5- α -D-ribofuranan main chain having a β -D-galactopyranose branch in every repeating unit was obtained. The trisaccharide monomer A2B3LR was found to have high polymerizability with BF_3OEt_2 as a catalyst to give the corresponding lactose-branched ribofuranans after deprotection to recover hydroxyl groups. These branched polysaccharides with defined structures should be useful model branched polysaccharides to study the relationship between structure and biological activity (20, 21).

C. Sulfated Polysaccharides with Antiviral Activity

It is well known that sulfated polysaccharides in nature

凝血作用 (AA = 18 and 13 unit/mg) を示した。これらの値は標準の硫酸化糖鎖として用いているデキストラン硫酸 ($EC_{50} = 0.84 \mu\text{g/ml}$ and AA = 22.9 unit/mg) とカードラン硫酸 ($EC_{50} = 0.13 \mu\text{g/ml}$ and AA = 19 unit/mg) の値と比較して求めたものである。ラクトースとグルコースとの共重合体 **17** では主鎖のラクトースユニットの割合が低くなるに従ってそれらの生理活性は高くなることが分かった。15% の割合でラクトースユニットを持つ硫酸化した共重合体では、それぞれ、抗 HIV 作用が 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 、抗凝血作用が 54 unit/mg と高い生理活性を示した。細胞毒性 (CC_{50}) は 276 $\mu\text{g/ml}$ となり (276 $\mu\text{g/ml}$ 以上加えても 50% の細胞は正常に増殖) 低いことが分かった。この生理活性の結果は枝と枝との間の距離が硫酸化糖鎖の抗 HIV 作用や抗凝血作用にとって重要な役割を担っていることを示している。

多くの無水糖モノマーのうち、我々は高い開環重合性を持つ 1,4-無水リボースモノマーに着目した (10, 11)。リボースユニットが主鎖になり各リボースユニットからガラクトースおよびラクトースの枝が生えた二糖モノマー、三糖モノマーの 1, 4-アンヒドロ-2-*O*-ベンジル-3-*O*-(2,3,4,6-テトラ-*O*-ベンジル- β -D-ガラクトピラノシル)- α -D-リボピラノース (A2B3GalR)、1, 4-アンヒドロ-2-*O*-ベンジル-3-*O*-(2',3',6',2'',3'',4'',6''-ヘプタ-*O*-ベンジル- β -D-ラクトシル)- α -D-リボピラノース (A2B3LR) を成

Fig.2. Galactose and lactose branched di- and trisacchacide ribose monomers

した。無水二糖モノマー A2B3GalR は高い開環重合性を示し、分子量 $\bar{M}_n = 43.0 \times 10^3$ を持つ 1,5- α 構造のポリマーを与えた。脱ベンジル化後、1,5- α -D-リボフラナンの主鎖に 1 つ 1 つのリボースユニットに対し 1 つの β -D-ガラクトースの枝を持つ糖鎖が得られた。また、無水三糖モノマーの A2B3LR も三フッ化ホウ素エーテル (BF_3OEt_2) 触媒で高い開環重合性を示し、脱ベンジル化後、対応する二糖のラクトースが分枝したリボフラナンを与えることが分かった。これらの分枝構造を持つ糖鎖は構造明確であり糖鎖構造と生理活性との関係を調べるために有効なモデル糖鎖になる (20, 21)。

C. 抗ウイルス性を持つ硫酸化糖鎖

上に述べてきたように、天然では硫酸化糖鎖は抗ウイルス

have specific biological activities such as blood anticoagulant and antiviral activities. In 1958, Gerber found for the first time that sulfated polysaccharides extracted from sea alga had anti-influenza virus activity (22). In 1987, Professors Yamamoto and Nakashima found the anti-HIV activity of sulfated polysaccharides also extracted from sea alga (23). However, to our knowledge, there are no reports on the antiviral activities of synthetic sulfated polysaccharides and also no reports on the relationship between the structure of polysaccharides and biological activities.

We reported in 1987 that three synthetic sulfated polysaccharides, dextran sulfate, ribofuranan sulfate, and xylofuranan sulfate had potent anti-HIV activity at concentrations as low as 3.3 $\mu\text{g/ml}$ (24). In 1990, we carried out the sulfation of curdlan which is a natural polysaccharide with a linear (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranosidic structure produced by a fungus. Curdlan sulfate was found to have potent anti-HIV activity below 3.3 $\mu\text{g/ml}$ and the lowest cytotoxicity at more than 1000 $\mu\text{g/ml}$ (1).

Recently, it was reported that two sulfated polysaccharides from the red seaweeds selectively inhibited dengue virus (DENV) in different host cell types (25). The sulfated polysaccharides inhibited the multiplication of DENV-2 in Vero cells with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) at around 1 $\mu\text{g/ml}$. However, the sulfated polysaccharides had lower IC_{50} values for DENV-3 and DENV-4, in the range 13.9 ~ 14.2 $\mu\text{g/ml}$ and 29.3 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and they were inactive against DENV-1. On the host cells, the sulfated polysaccharides had similar effective anti-DENV-2 and -3 activities in human hepatoma HepG2 and foreskin PH cells as in Vero cells, but they were inactive in mosquito C6/36 HT cells. These variations may be ascribed to differences in the virus-cell interaction leading to virus entry. Recently, a Chinese group at Shantou University reported *in vitro* anti-influenza virus activity of sulfated polysaccharides extracted from sea alga, suggesting that the sulfated polysaccharides had higher antiviral activity in the range $\text{IC}_{50} = 2.96 \sim 15.99 \mu\text{g/ml}$ without significant cytotoxicity (26). A Japanese group of Toyama University also reported the antiviral activities of an edible blue-green alga on the replication of herpes simplex virus-2 and influenza A virus at the concentrations of $\text{IC}_{50} = 0.32 \sim 190 \mu\text{g/ml}$ and 0.79 ~ 65 $\mu\text{g/ml}$, respectively (27). The activity was dependent on the timing of addition of the extracts, and the addition of sulfated polysaccharides to the medium at the same time as viral infection was more effective than addition immediately after infection. These results suggest that sulfated polysaccharides had the inhibition on the stage of virus absorption and subsequent infection to cells. The same Japanese group also reported the antiviral polysaccharides, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium (28). Nostoflan exhibited a potent

性や抗凝血作用など特異な生理活性を持つことが知られている。1958年にGerberらは海藻からの硫酸化多糖類が抗インフルエンザウイルス作用を持つことを見出した(22)。1987年には山本直樹教授と中島秀喜教授は同じく海藻からの硫酸化糖鎖に抗HIV作用があることを明らかにした(23)。しかし、合成で得られた構造明確な硫酸化糖鎖の抗ウイルス性や構造と生理活性との関係を明らかにした研究は、これまでにあまり報告されていないようである。

1987年に我々は合成で得られた硫酸化糖鎖、デキストラン硫酸、リボフラナン硫酸、キシロフラナン硫酸は高い抗HIV作用を持ち、3.3 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度でHIVの感染を完全に抑制することを見出した(24)。また、1990年には(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルコピラノース構造を持つ天然の直鎖状多糖類、カードランを硫酸化して得たカードラン硫酸が最も高い抗HIV作用(3.3 $\mu\text{g/ml}$)を示し、最も低い細胞毒性(1000 $\mu\text{g/ml}$ 以上)であることを見出した(1)。

最近、海藻から抽出された2つの硫酸化多糖類がデング熱ウイルス(DENV)に対し異なった宿主細胞において効果が高いことが報告された(25)。それらの硫酸化糖鎖はベロ細胞中でDENV-2ウイルスの増殖を約1 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50})の濃度で抑制した。しかしながらこれらの硫酸化糖鎖はDENV-3とDENV-4ウイルスに対しては IC_{50} の値が13.9 ~ 14.2 $\mu\text{g/ml}$ and 29.3 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ となりそれほど高い効果を示さなかった。さらにDENV-1ウイルスに対しては効果を示さなかった。また、ヒトのヘパトーマ(hepatoma) HepG2細胞とフォースキン(foreskin) PH細胞ではベロ細胞中と同様なDENV-2ウイルスとDENV-3ウイルスに対して効果が認められたが、C6/36 HT細胞中では効果がなかった。これらの相違はウイルスが感染する際のウイルスと細胞との相互作用の違いに由来していると推定している。また、中国の研究者は海藻からの硫酸化糖鎖に抗インフルエンザウイルス作用が認められたと報告した(26)。これらの硫酸化糖鎖は特段の細胞毒性を示すことなく高い活性、 $\text{IC}_{50} = 2.96 \sim 15.99 \mu\text{g/ml}$ を持っていた。日本の研究者は海藻から得られた硫酸化糖鎖はヘルペスウイルスとインフルエンザウイルスに対してそれぞれ高い効果($\text{IC}_{50} = 0.32 \sim 190 \mu\text{g/ml}$ および 0.79 ~ 65 $\mu\text{g/ml}$)を持つことを報告した(27)。そして活性は抽出した硫酸化糖鎖の加えるタイミングによることも報告し、硫酸化糖鎖の加えるタイミングはウイルスを細胞に感染させた直後に加えるよりも先に細胞溶液に加えておいた方が効果的であることも示した。このことはウイルスが細胞に吸着・感染する段階を硫酸化糖鎖が阻害していることを示している。同じ日本の研究者は抗ウイルス性多糖類をバクテリアから抽出しナストフランと命名した(28)。ナストフランはヘルペスウイルスHSV-1に対して高い効果があ

anti-HSV-1 (herpes simplex virus type-1) activity with an IC_{50} of 0.37 $\mu\text{g/ml}$, and also potent antiviral activities against HSV-2 (29 $\mu\text{g/ml}$), human cytomegalovirus (0.47 $\mu\text{g/ml}$), and influenza A virus (78 $\mu\text{g/ml}$). However, no effect was observed on adenovirus or coxsackie virus. Therefore, nostoflan has antiviral activity against enveloped viruses whose cellular receptors are carbohydrates. Nostoflan is composed of two types of sugar sequences and showed no antithrombin activity, unlike sulfated polysaccharides, because it has no sulfate groups in the polysaccharide molecule.

Several papers on the development of carbohydrate clusters using dendrimers have been published (29). Dendritic compounds with polylysine or carbosilane core scaffolds with sialic acid on their surface were potent inhibitors of influenza viruses, depending on cluster effects (30). Influenza virus is infected into the cells by a target of sialic acid on the surface of cells. An acyclic oligopeptide from HIV connects to cellobiose on the surface of a polylysine dendrimer (31). This type of dendrimer may become an AIDS vaccine. Negatively-charged sulfated oligosaccharides on the surface of the dendrimer were expected to have high biological activities due to both ionic interaction and the cluster effect on the positively charged surface proteins of viruses. We recently described the synthesis of a polylysine dendrimer with sulfated cellobiose and evaluated its anti-HIV and blood anticoagulant activities (32, 33). A relationship between the structure and biological activities was reported. Polylysine-dendritic sulfated cellobiose was synthesized by sulfation of polylysine-dendritic cellobiose, which had been prepared from cellobiose and polylysine dendrimer generation 3. The degree of sulfation was 1.85 per glucose unit (maximum 3). The molecular weights measured by GPC were $\overline{M}_w = 12.4 \times 10^3$ and $\overline{M}_n = 10.4 \times 10^3$, suggesting that the sulfated cellobiose dendrimer had a very compact structure. The anti-HIV activity was assayed in vitro by the MTT method, which indicated that the $EC_{50} = 3.2 \mu\text{g/ml}$ for the 50% inhibitory concentration of virus replication, a concentration that is as high as that of the currently clinical used AIDS drug, ddC ($EC_{50} = 3.51 \mu\text{g/ml}$), and has low cytotoxicity ($CC_{50} = 1000 \mu\text{g/ml}$). The blood anticoagulant activity determined by the method of the United States Pharmacopoeia was $AA = 19.4 \text{ unit/mg}$, the same as that of the sulfated polysaccharides, dextran sulfate ($AA = 22.9 \text{ unit/mg}$) and curdlan sulfate ($AA = 19 \text{ unit/mg}$). These results suggest that the biological activities were improved by a cluster effect of the sulfated cellobiose that originated from the dendritic structure because sulfated oligosaccharides have little anti-HIV activity.

Recently, we prepared a membrane filter coated with curdlan sulfate to remove influenza virus. A long alkyl chain from didodecyltrimethylammonium bromide was introduced

ることを示し ($IC_{50} = 0.37 \mu\text{g/ml}$)、同様に HSV-2 ($IC_{50} = 29 \mu\text{g/ml}$) やヒトサイトメガロウイルス ($IC_{50} = 0.47 \mu\text{g/ml}$) に対しても効果が高かったが、インフルエンザウイルスに対しては $IC_{50} = 78 \mu\text{g/ml}$ であった。しかし、アデノウイルスやコクサッキーウイルスに効果は示さなかった。このことは、ナストフランは細胞のレセプターに糖鎖を持つ表皮ウイルスに対して効果的であることを示している。そしてナストフランは2つの形の糖鎖からできており、硫酸化糖鎖のような抗血栓性は示さなかったため、その糖鎖中には硫酸基が存在していないと考えた。

糖鎖を用いたデンドリマーの開発に関する報告がされた(29)。ポリリジンやカーボシラン骨格表面にシアル酸を持つデンドリマーはクラスター効果によって高い抗インフルエンザウイルス作用を持つことが示された(30)。インフルエンザウイルスは細胞表面にあるシアル酸をターゲットとして細胞に感染する。また、HIVの表皮タンパクをもとにして合成したオリゴペプチドを環状にしてデンドリマー表面に結合させた構造を構築した報告もある(31)。これはエイズワクチンになると期待できる。(－)電荷の硫酸化オリゴ糖鎖を表面を持つデンドリマーは、表皮タンパクに由来する(+)電荷を持つウイルスに対してイオニックな相互作用とクラスター効果の両方によって高い生理活性が期待できる。我々は最近、硫酸化セロビオースユニットを表面を持つポリリジンデンドリマーを合成し、高い抗HIV作用と抗凝血作用を示し(32, 33)、構造と生理活性との関係を明らかにした。このセロビオースデンドリマーはポリリジンデンドリマー第3世代とセロビオースから合成し、硫酸化度はグルコース1コあたり1.85(最高は3)である。GPCで測定した分子量は $\overline{M}_w = 12.4 \times 10^3$ および $\overline{M}_n = 10.4 \times 10^3$ となりコンパクトな構造を持つことが明らかになった。抗HIV作用はこれまでと同様にMTT法によって行った。それによると、硫酸化したデンドリマーの50%感染を抑制する濃度は、 $EC_{50} = 3.2 \mu\text{g/ml}$ となり、現在エイズ薬として使われているddCの値、 $EC_{50} = 3.51 \mu\text{g/ml}$ とほぼ同じ高い抗HIV作用を示すことが分かった。さらに細胞毒性は低かった($CC_{50} = 1000 \mu\text{g/ml}$)。また、抗凝血作用は $AA = 19.4 \text{ unit/mg}$ となりデキストラン硫酸(22.9 unit/mg)やカードラン硫酸(19 unit/mg)の値とほぼ同じ低いことが分かった。硫酸化セロビオース自身には高い抗HIV性などの生理活性はないので、この結果は硫酸化セロビオースのクラスター効果によって高まったことを示している。

最近、我々はカードラン硫酸を固定化させて作製したメンブランフィルター(1 μm の細孔)が効率的にインフルエンザAウイルスを吸着し除去できることを見出した(34)。メンブランフィルターの疎水性表面に親水性のカードラン硫酸を固定化させるために長鎖アルキル鎖をカードラン硫酸にイオン結

into curdian sulfate by the ionic interaction between the negative sulfate group and positive ammonium salt with a didodecyldimethyl group to give alkyl curdian sulfates with various degree of alkylation (34). The alkyl curdian sulfate with the degree of alkylation of 0.03 (1 alkyl group in 12 sugar units) had potent anti-HIV activity at concentrations as low as $EC_{50} = 0.87 \mu\text{g/ml}$, a 50% effective concentration. Coating the alkyl curdian sulfate on a membrane filter (pore size: $1 \mu\text{m}$) gave a curdian sulfate-coated membrane filter due to the hydrophobic interaction between the long alkyl groups and the surface of the filter. The membrane filter has pores with a diameter around $10 \mu\text{m}$ on the surface as observed by SEM. It was found that the three sheets of the membrane filter coated with 1.6 mg of alkyl curdian sulfate selectively removed influenza A viruses at dilutions below 1/32. However, the membrane filter did not effectively remove on influenza B viruses. The removal mechanism was assumed to be due to the adsorption of influenza A viruses on the curdian sulfate-coated membrane filter by the electrostatic interaction between negatively charged sulfate groups and a positively charged envelope protein, hemagglutinin, of the A viruses (Scheme 7).

Scheme 7. Illustrated image of the interaction between curdian sulfate and influenza A virus.

D. Relationship between Structure and Biological Activities of sulfated polysaccharides

Determining the interaction mechanism between sulfated polysaccharides and proteins is important for the development of biomaterials. Surface plasmon resonance (SPR) is one means to quantitatively investigate the relationships. Scheme 8 illustrated the mechanism of SPR apparatus. The change of weight after interaction between analyte and ligand is continuously monitored by the SPR signal and the interaction is calculated quantitatively.

Many investigations of the relationship between

合で導入した。長鎖アルキル鎖とメンブランフィルター表面との疎水的相互作用によってカードラン硫酸を固定化させた。長鎖アルキル鎖の割合が0.03 (12糖残基あたり1本の長鎖アルキル鎖を導入) のものは50%感染を抑制する濃度で高い抗HIV作用、 $EC_{50} = 0.87 \mu\text{g/ml}$ を示すことが分かった。SEM写真によってカードラン硫酸を固定化したメンブランフィルターは表面の $10 \mu\text{m}$ の細孔を持つことが分かった。ウイルスの直径は最大でも $0.4 \mu\text{m}$ 程度なのでカードラン硫酸を固定化させたメンブランフィルターはろ過ではなく静電的な相互作用による吸着によってウイルスを除去しているものと推定した。カードラン硫酸1.6 mgを固定化したメンブランフィルターを3枚用いると少なくともインフルエンザウイルス濃度を1/32以下に低下させることが分かった。インフルエンザAウイルスの除去のメカニズムは上に述べた通りカードラン硫酸の(-)電荷とインフルエンザAウイルス表皮タンパクヘマグルニチンに由来する(+)電荷間の静電的相互作用によってウイルスが吸着され取り除かれるものと推定した (Scheme 7)。しかし、インフルエンザBウイルスに対しては効果を示さなかったため、AウイルスとBウイルスの表皮タンパクの構造に違いがあるのではと推定し、現在検討を進めている。

D. 硫酸化糖鎖の構造と生理活性との関係

硫酸化糖鎖とタンパク質間の相互作用メカニズムの決定は生医学材料化を開発するためにたいへん重要である。表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置はその関係を定量的に調べることができる装置である。Scheme 8 は SPR 装置の模式図であるが、アナライトとリガンドとの相互作用によって生ずる質量変化を SPR シグナルとして連続的に記録し、相互作用を定量的に計算できる装置である。

SPR を用いるタンパク質とタンパク質、核酸とタンパク

Scheme 8. Illustrated scheme of SPR. The analyte is flowed in a flow cell and across the immobilized ligand on the sensorchip. The change of weight on the sensorchip after interaction is detected by SPR signal.

protein-protein, nucleic acid- protein, carbohydrate-protein, and carbohydrate-carbohydrate interactions using SPR have been reported. Among them, there are many papers on heparin-protein interactions. Heparin is a natural sulfated polysaccharide with complex branched structures that has a potent blood anticoagulant activity. Ronald and Coombe of Curtin University of Technology in Australia reported the heparin-protein interactions by means of SPR (35). Biotin was connected to the reducing terminal of heparin (EP-heparin) and then heparin was immobilized through biotin on the SA sensor chip with a thin layer of dextran bearing carboxylic acids. The analytes, lactoferrin, antithrombin III, avidin, and thrombin, at various concentrations in buffer solutions were flowed over the heparin-immobilized sensor chip, respectively, and the interactions were measured by SPR. Two other biotinylated heparin derivatives, NH_2 -heparin and COOH -heparin, which were obtained by the connection of biotin to the NH_2 and COOH groups in heparin, respectively, were synthesized and the interactions measured by SPR. The EP-heparin was found to have the highest binding capacity of each of the proteins. The NH_2 -heparin had an intermediate binding capacity, and the COOH -heparin had the lowest. These results suggest that the biological activity of heparin requires a specific and defined heparin sulfation pattern for binding. Furthermore, French researchers identified the heparin binding domains of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 by SPR (36). The interaction was attributed mainly to the V3 loop in gp120. However, the researchers found three additional binding domains in the gp120 on heparin, in which four binding domains were identified in the V2 and V3 loops, in the C-terminal domain, and within the CD4-induced bridging sheet. Shen and coworkers of University Clinic in Australia described the evaluation of binding affinity of several natural sulfated polysaccharides including heparin against human neutrophil elastase (HNE), hyaluronidase (HAase), and lysozyme (37). The results showed the ranking of binding affinities of several acidic polysaccharides to HNE,

質、糖鎖とタンパク質との相互作用など多くの研究が報告されている。それらの研究の中で抗凝血作用を持つ天然の硫酸化糖鎖ヘパリンとタンパク質との相互作用に関する研究が数多く発表されている。ロナルドとコンビはヘパリンとタンパク質との相互作用を SPR を用いて研究した (35)。ビオチンをヘパリンの末端に導入し SA センサーチップ表面に固定化したもの (EP-ヘパリン) を作製した。相互作用を観測したいタンパク質 (アナライト) としてラクトフェリン、抗凝血因子であるアンチトロンビン III、アビディン、凝固因子のトロンビンを用いてセンサーチップ上に固定化させたヘパリンとの相互作用を SPR 装置を用いて観測した。さらにビオチンをヘパリンのアミノ基に結合させた NH_2 -ヘパリン、カルボキシル基に結合させた COOH -ヘパリンも合成し相互作用の相違を検討した。その結果、EP-ヘパリンが各タンパク質に関して最も高い相互作用を示すことが分かった。 NH_2 -ヘパリンは中間の値、 COOH -ヘパリンは低い相互作用であった。これらの結果はヘパリンの生理活性が特異的である硫酸化のパターンがタンパク質との結合に必要であることを示している。さらにフランスの研究者は SPR によってヘパリンが HIV-1 ウイルスの表皮タンパク gp120 のどのドメインに結合するのかを調べた (36)。その結果、相互作用は gp120 中の V3 ループに主に存在すると推定した。彼らはヘパリンの結合ドメインに関してさらに 3 つのドメインの存在を明らかにした。すなわち、それらは gp120 表皮タンパク中の V2 ループ、C-末端、および CD4 を誘起する架橋シート中に見出した。オーストラリアの研究グループはヘパリンを含むいくつかの天然硫酸化糖鎖といくつかの酵素との相互作用を調べ、硫酸化糖鎖の相互作用しやすさを報告した (37)。そのうち、ケラタン硫酸のみが他の硫酸化

HAase, and lysozyme, respectively. Although keratin sulfate (KS) had strong binding affinity to lysozyme, KS showed low affinity to HNE and HAase.

The anti-HIV activity of sulfated polysaccharides originates from the electrostatic interaction between negatively charged sulfate groups of sulfated polysaccharides and the positively charged envelope glycoprotein gp120 on the HIV surface (38). This mechanism was estimated *in vivo* by using recombinant gp120 (39) and *in vitro* by using NMR spectroscopy (40, 41). Taking into account the interaction mechanisms, ionic interactions play an important role in the enhancement of biological activities. Recently, we reported quantitatively the interaction between synthetic sulfated polysaccharides with defined structures and poly-L-lysine as a model compound of proteins to investigate the quantitative relationship between the two biomacromolecules (42, 43). The interaction was observed using a Biacore X100 SPR biosensor at 25°C. Poly-L-lysine was immobilized on a CM5 sensor chip using the amine coupling kit as described by the manufactures instructions. Dextran sulfates at various concentrations were injected into the flow cell at a flow rate of 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ and then the interaction was measured after 2 min as the binding response (RU) as shown in Fig. 3. The binding affinity was found to increase with increasing degree of sulfation of

糖鎖のタンパク質との相互作用の傾向が異なっていた。ケラタン硫酸はヒト HNE と HAase に対して相互作用は低かった。

硫酸化糖鎖の抗 HIV 作用は硫酸基に由来する (−) 電荷と HIV の表皮タンパク gp120 中の塩基性アミノ酸集中部位に由来する (+) 電荷との静電的相互作用による (38)。このメカニズムは遺伝子組換え gp120 を用いる *in vivo* の実験 (39) および NMR を用いる *in vitro* の実験 (40, 41) から推定された。この相互作用メカニズムから考え、イオンの相互作用は硫酸化糖鎖の生理活性にとって重要と認識される。最近、我々は構造明確な合成硫酸化糖鎖とタンパク質のモデル化合物としてポリ-L-リジンとの間の相互作用を定量的に解析し2つの分子間の定量的関係を検討した (42, 43)。その相互作用はピアコア X100SPR 装置を用いて 25°C で観測したものである。メーカー指定の方法によりアミンカップリングキットを用いてポリ-L-リジンを CM5 センサーチップ上に固定化して実験を行った。図 3 に示すように種々の濃度でデキストラン硫酸をフローセル中に導入し緩衝溶液を 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で流し2分後から結合レスポンス (RU) として相互作用を測定した。結合の親

Fig.3. Binding of dextran sulfates with various degree of sulfation to immobilized poly-L-lysine. Dextran sulfate (1.25 mg/ml) was injected over the sensorchip immobilized poly-L-lysine.

dextran sulfate, and the interacting dextran sulfate was not removed from the sensor chip, suggesting that dextran sulfate interacted strongly with poly-L-lysine. The binding affinity also increased with the increasing molecular weight of dextran sulfate. The association-rate (k_a), dissociation-rate (k_d), and dissociation (K_D) constants between dextran sulfates and poly-L-lysine were $k_a = 6.92 \times 10^4 \sim 2.08 \times 10^6$ (1/Ms), $k_d = 1.37 \times 10^{-4} \sim 5.58 \times 10^{-5}$ (1/s), and $K_D = 8.77 \times 10^{-11} \sim 1.63 \times 10^{-9}$ (M), respectively. These results indicate that the two compounds interacted strongly by the electrostatic interaction between negatively charged sulfate groups in dextran sulfates and positively charged amino groups in poly-L-lysine.

和性はデキストラン硫酸の硫酸化度が大きくなるにつれて増加し、ポリ-L-リジンと相互作用したデキストラン硫酸はセンサーチップ上から外れることはなかった。また結合の親和性はデキストラン硫酸の分子量が大きくなれにつれても増加した。このときのデキストラン硫酸とポリ-L-リジンとの間の結合速度定数は $k_a = 6.92 \times 10^4 \sim 2.08 \times 10^6$ (1/Ms)、解離速度定数は $k_d = 1.37 \times 10^{-4} \sim 5.58 \times 10^{-5}$ (1/s)、解離定数は $K_D = 8.77 \times 10^{-11} \sim 1.63 \times 10^{-9}$ (M) となった。この結果はデキストラン硫酸の硫酸基に基づく (−) 電荷とポリ-L-リジンの (+) 電荷との間の静電的相互作用によって2つの化合物はたいへん強く相互作用していることが定量的に明らかとなった。

E. Perspective

We described recent developments in studies of sulfated polysaccharides in focusing on the synthesis, activities, and elucidation of their interactions. Sulfated polysaccharides not only have specific biological activities, such as antiviral and blood anticoagulant activities, but also are expected to become new biomaterials. For their use as biomaterials, it is important to elucidate the action mechanisms. Polysaccharide-protein interactions are widely involved in serious diseases such as cancer and infectious diseases. The SPR and NMR methods are powerful tools to investigate the mechanisms *in vitro*. We continue to develop new sulfated polysaccharides and elucidate quantitatively their interaction with proteins and peptides.

Acknowledgment

We are particularly indebted to Professor Toshiyuki Uryu for his valuable discussions and continuing encouragement.

E. 今後について

このミニレビューでは最近の硫酸化糖鎖の研究について合成、生理活性、相互作用などを中心に述べた。硫酸化糖鎖は抗ウイルス性や抗凝血作用など特異な生理活性を持つことだけではなく新しい生医学材料としても期待されているものである。生医学材料として用いる場合にはその作用メカニズムを解明することが重要となる。糖鎖とタンパク質間の相互作用はガンや感染症などたいへん広い範囲で関係していると考えられている。SPR や NMR を用いることは *in vitro* でそれらのメカニズムを解明するためにたいへん有効な手段である。我々は引き続き新しい糖鎖の合成とタンパク質やペプチドとの定量的な相互作用の解析について研究を進めている。

謝 辞

本研究を推進するにあたり貴重な研究討論と励ましを頂いている瓜生敏之教授（東京大学名誉教授）に感謝申し上げます。

References

1. Yoshida, T., Hatanaka, K., Uryu, T., Kaneko, Y., Yasuda, N., Mimura, T., Yoshida, O., and Yamamoto, N. (1990) *Macromolecules* **23**, 3717–3722.
2. Lane, D. A., and Lindahl, U. (1989) Heparin, Chemical Properties Clinical Applications. Edward Arnold, London.
3. Ruckel, E. R., and Schuerch, C. (1966) *J. Org. Chem.* **31**, 2233–2238.
4. Schuerch, C. (1972) *Adv. Polym. Sci.* **10**, 173–194.
5. Schuerch, C. (1981) *Adv. Polym. Sci.* **39**, 157–212.
6. Okada, M. (1992) *Adv. Polym. Sci.* **102**, 1–46.
7. Uryu, T. (1990) in Models of biopolymers by ring-opening polymerization (Penczek, S., Ed.), pp. 133–233, CRC Press, Boca Raton.
8. Uryu, T. (1993) *Prog. Polym. Sci.* **18**, 717–761.
9. Yoshida T. (2001) *Prog. Polym. Sci.* **26**, 379–441.
10. Uryu, T., Kitano, K., Ito, K., Yamanouchi, J., and Matsuzaki, K. (1981) *Macromolecules* **14**, 1–9.
11. Uryu, T., Yamanouchi, J., Kato, T., Higuchi, S., and Matsuzaki, K. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 6865–6871.
12. Hattori, K. and Yoshida, T. (2009) *Macromolecules* **42**, 6044–6049.
13. Yoshida, D., and Yoshida, T. (2009) *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **47**, 1013–1022.
14. Choi, Y., Yoshida, T., and Uryu, T. (1997) *Macromol. Chem. Phys.* **198**, 2875–2888.
15. Uryu, T., Yamanouchi, J., Hayashi, S., Tamaki, H., and Matsuzaki, K. (1983) *Macromolecules* **16**, 320–326.
16. Veruovic, B., and Schuerch, C. (1970) *Carbohydr. Res.* **14**, 199–206.
17. Masura, V., and Schuerch, C. (1972) *Carbohydr. Res.* **15**, 65–72.
18. Kobayashi, K., Nomura, K. and Okada, M. (1993) *Carbohydr. Res.* **242**, 161–166.
19. Han, S., Kanematsu, Y., Hattori, K., Nakashima, H. and Yoshida, T. (2009) *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **47**, 913–924.
20. Yoshida, T. and Endo, K. (2001) *Macromol. Biosci.* **1**, 298–304.
21. Yoshida, D., Han, S., Narita, K., Hattori, K., and Yoshida, T. (2009) *Macromol. Biosci.* **9**, 687–693.
22. Gerber, P., Dutcher, J. D., Adams, E. V., and Sherman, J. H. (1958) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **99**, 590–593.
23. Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., and Yamamoto, N. (1987) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **113**, 413–416.
24. Nakashima, H., Yoshida, O., Tochikura, T., Yoshida, T., Mimura, Y., Kido, Y., Motoki, Y., Kaneko, T., Uryu, T., and Yamamoto, N. (1987) *Jpn. J. Cancer Res. (Gan)* **78**, 1164–1168.
25. Talarico, L. B., Pujol, C. A., Zibetti, R. G. M., Faria, P. C. S., Nosedá, M. D., Duarte, M. E. R., and Damonte, E. B. (2005) *Antiviral Res.* **66**, 103–110.
26. Chen, M., Xie, H., Yang, L., Liao, Z., and Yu, J. (2010) *Virologica Sinica* **25**, 341–351.
27. Ogura, F., Hayashi, K., Lee, J., Kanekiyo, K., and Hayashi, T. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1687–1690.
28. Kanekiyo, K., Lee, J., Hayashi, K., Takenaka, H., Hayakawa, Y., Endo, S., and Hayashi, T. (2005) *J. Nat. Prod.* **68**, 1037–1041.
29. Newkome, G.R., Moorefield, C.N., and Vögtle, F. (2003) Dendrimers and Dendrons, Wiley-VCH, Weinheim.
30. Roy, R., Pon, R.A., Tropper, F. D., and Andersson, F. O. (1993) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **3**, 264–265.
31. Baigude, H., Katsuraya, K., Okuyama, K., and Uryu, T. (2004) *Macromol. Chem. Phys.* **205**, 684–691.
32. Han, S. Baigude, H. Hattori, K. Yoshida, T. and Uryu, T. (2007) *Carbohydr. Polym.* **68**, 26–34.
33. Han, S. Yoshida, T. and Uryu, T. (2007) *Carbohydr. Polym.* **69**, 436–444.

34. Tegshi, M., Han, S., Kanamoto, T., Nakashima, H., and Yoshida, T. (2011) *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **49**, 3241–3247.
35. Osmond, R. I. W., Kett, W. C., Skett, S. E., Coombe, D. R. (2002) *Anal. Biochem.* **310**, 199–207.
36. Crublet, E., Andrieu, J. P., Vives, R. R., and Lortat-Jacob, H. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 15193–15200.
37. Shen, B., Shimmer, S., Smith, M. M., and Ghosh, P. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**, 83–93.
38. Uryu, T., Ikushima, N., Katsuraya, K., Shoji, T., Takahashi, N., Yoshida, T., Kanno, K., Murakami, T., Nakashima, H., and Yamamoto, N. (1992) *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2385–2392.
39. Jagodzinski, P. P., Wustner, J., Kmiecik, D., Wasik, T. J., Fertala, A., Sieron, A. L., Takahashi, M., Tsiji, T., Mimura, T., Fung, M. S., Gorny, M. K., Kloczewiak, M., Kaneko Y., and Koznor, D. (1996) *Virology* **226**, 217–227.
40. Jeon, K., Katsuraya, K., Kaneko, Y., Mimura, T., and Uryu, T. (1997) *Macromolecules* **30**, 1997–2001.
41. Jeon, K. J., Katsuraya, K., Inazawa, K., Kaneko, Y., Mimura, T., and Uryu, T. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12536–12541.
42. Ishimura, T. and Yoshida, T. (2011) *Polym. Prep. Jpn.* **60**, 4851–4852.
43. Bai, Y., Ishimura, T., and Yoshida, T. (2011) *Polym. Prep. Jpn.* **60**, 4971.

Profile of the Authors

Tegshi Muschin is a research fellow (supervised by Professor Takashi Yoshida) at Kitami Institute of Technology, Japan. He obtained his MS degree in School of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University (China) in 2007. He was a research assistant in the Institute of Macromolecular Chemistry and Mongolian Medicine, Inner Mongolia University (2007–2008). After that he came to Hokkaido, Japan and received his Ph.D. in 2011 at Kitami Institute of Technology. His research is focused on the synthesis and structural analysis of bio macromolecules.

Shuqin Han is an associate professor of Inner Mongolia University and also a research fellow at Kitami Institute of Technology. She received her Ph.D. in 2007 under the supervision of Professor Yoshida at Kitami Institute of Technology, Japan. She carried out the synthesis of hyper-branched peptides with carbohydrates and glycodendrimers with anti-influenza virus and anti-HIV activities. From 2007 to 2009 she performed postdoctoral research at the Kitami Institute of Technology. Then, she got a position at the Inner Mongolia University (China) in 2009. Currently, she is a member of the research group of Professor Borjihan at Inner Magnolia Key Laboratory of Macromolecular Chemistry and Mongolian Medicine.

Takahisa Ishimura is a research fellow (supervised by Prof. Takashi Yoshida, Department of Bio and Environmental Chemistry) at Kitami Institute of Technology. He received his Ph.D. in Engineering at Meiji University in 2008 and then he was working at Meiji University (supervised by Prof. Tetsuo Miyakoshi, Department of Applied Chemistry). In 2010, he moved to Kitami Institute of Technology (2010–present).

Takashi Yoshida received his Ph. D. in 1983 at the Department of Industrial Chemistry, Graduate School of Engineering, Meiji University (Professor Shojiro Saito). Then, he worked at Nippon Dental University as a research associate (1983–1985) and then moved to University of Tokyo as a research associate during 1985–1993 (Professor Toshiyuki Uryu). In 1988–1989, he moved to York University (Canada) as a visiting scientist. He became an associate professor at the Department of Polymer Science, Faculty of Science, Hokkaido University (1993–2001). Since 2001 he is a professor at the Department of Bio and Environmental Chemistry, Faculty of Engineering, Kitami Institute of Technology. His research interests are focus on the study of bio macromolecules and environmental science.