Structure and Bioactivity of Sulfated Polysaccharides

酸性多糖類の構造と生理活性

Toida, Toshihiko¹ ; Chaiedgumjorn, Amornrut¹ ; and Linhardt, Robert J.²¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University 263-8522, JAPAN²Departments of Chemistry, Medicinal and Natural Products Chemistry, Chemical and Biochemical Engineering,
University of Iowa, Iowa City, Iowa, 52242, USA

FAX: +81-43-290-2895, +1-319-335-6634, E-mail: toida@p.chiba-u.ac.jp, robert-linhardt@uiowa.edu

Key Words: *sulfated polysaccharides, chemical O-sulfonation, anti-coagulant activity, anti-HAase activity, molecular weight***Abstract**

Sulfated polysaccharides including glycosaminoglycans show various chemical and biological functions. These functions strongly depend on the presence and spatial positioning of their sulfo groups. Therefore, chemical modifications such as partial, per-*O*-sulfonation or desulfonation are expected to alter the function of sulfated polysaccharides. There are many reports on the chemical modification of polysaccharides. This paper focuses on the investigation of both the chemical modification of polysaccharides and its effect biological function. A structure-activity relationship, SAR, is established on both intact and chemically modified polysaccharides.

要 約

グリコサミノグリカンを含む酸性多糖類は様々な化学的、生物学的な機能を示す。これらの機能の多くは硫酸基の存在に強く依存している。よってこれら多糖類の部分的硫酸化、完全硫酸化あるいは脱硫酸化などの化学的修飾は、硫酸化多糖の示す機能を制御できるものと期待されている。多糖類の化学的修飾に関する論文は数多く、私たちがこれまで多糖類の化学修飾のみならずその生物学的作用に関して検討してきた(構造-活性相関、SAR)。本論文では天然および化学修飾した多糖類の構造-活性相関について最近の結果を示す。

A. Introduction

Sulfated polysaccharides occur in many plant and animal species and tissue types (1). There are two major classes of endogenous polyanionic compounds found in animal tissues, the PGs/GAGs and the mucins. These polyanions are found in pericellular locations, on the external surface of cell membranes, in the extracellular matrix occupying the spaces between cells and at the mucous membrane (2). The primary functions of the endogenous polyanions are believed to be roles in cell-cell communication, acting as a barrier between tissues, cell adhesion, reservoirs for growth factors and barriers to protect against pathogens (2). Plant tissues also contain acidic polysaccharides. While most of these are polycarboxylated, *i.e.*, alginates and pectins, some algal species contain sulfated polysaccharides, *i.e.*, fucoidans and carrageenans (3). These polysaccharides serve a number of structural and protective roles in plants. The extensive range of their physiological functions has only recently begun to be appreciated and explored.

Heparin is a highly sulfated, linear polysaccharide that is derived from animal tissues and is widely used as a clinical anticoagulant. Heparin is an acidic and polydisperse bioactive polysaccharide. It is comprised of a major (75–95%) repeating

A. 緒 言

硫酸化多糖類は多くの植物、動物種、組織に見出される(1)。動物組織には主にプロテオグリカン・グリコサミノグリカン、ムチンの2つの内因性酸性多糖類が見出される。これらの酸性多糖類は細胞周囲あるいは細胞表面に存在し、また細胞外マトリックスとして細胞間を埋めている(2)。内因性酸性多糖類の主な機能は細胞間の情報交換、組織間障壁、細胞接着、増殖因子の貯蔵あるいは病原体に対する防御作用などが推定されている(2)。植物もまた主にアルギン酸やペクチンなどのポリウロン酸を含んでいるが、海草はフコイダンやカラゲナンなどの硫酸化多糖を含むことが知られている(3)。これらの多糖類は植物組織の構造維持や外部因子からの防御機構として働いているものと考えられる。さらに様々な生理的な機能が推定されているがその研究は最近緒についたばかりである。

一方ヘパリンは高い硫酸過度をもつ動物由来の直鎖の酸性多糖であり、血液抗凝固剤として広く用いられおり、さらに多様な生物活性を示す生理活性多糖である。その主な(75–95%)二糖繰り返し単位は GlcNS6Sα1→4IdoA2S であり、これに微量

disaccharide of 1→4 linked *N*-sulfo-6-*O*-sulfo-D-glucosamine and 2-*O*-sulfo-D-glucuronic acid with minor sequences containing variable levels of *O*- and *N*-sulfo groups and glucuronic acid. Heparan sulfate is structurally similar to heparin and is found in extracellular locations, thus, most of the endogenous biological functions ascribed to heparin probably result from heparan sulfate (4). Heparin has a variety of biological activities, and many of which are of interests because of their potential therapeutic utility. It is well established that the biological activities of heparin result from its binding to proteins, modulating their activities. These interactions are often very specific, *e.g.*, the anticoagulant activity primarily results from its specific binding to antithrombin III (a serine protease inhibitor of thrombin and other coagulation proteases) at a discrete pentasaccharide sequence (5, 6).

As a result of the multiplicity of biological activities associated with heparin and its importance as a major pharmaceutical, substantial research effort has been dedicated to the discovery of heparin analogues. Heparinoids, defined as heparin analogues, are usually obtained from animal, plant and synthetic sources. Heparinoids mimic biological functions of heparin by interacting with heparin-binding proteins. The large number of heparin-binding proteins can be classified into small number of groups. The interaction of heparin-binding proteins with heparinoids usually involves both ionic and hydrogen bonding interaction.

B. Sources of Sulfated Polysaccharides (7)

Naturally occurring sulfated polysaccharides:

From animal sources: A major group of sulfated polysaccharides found in animal tissues are the glycosaminoglycans (GAGs). Dermatan sulfate (8) is found in a wide variety of tissues in virtually all animals, and has been used clinically as an antithrombotic agent. Chondroitin sulfates are considered to have low biological activity due to the absence of the flexible L-iduronic acid, found in dermatan sulfate and heparin. Keratan sulfate (9), the only GAG not to possess an uronic acid residue, is an important component of cartilage and the cornea and involved in diseases associated with these tissues. Hyaluronan is a very high molecular weight unsulfated GAG. Chemical *O*-sulfonation of this polysaccharide affords a polysaccharide displaying several important biological activities such as anti-hyaluronidase activity (10).

From plant sources: Fucoidan, a homopolymer of sulfated L-fucose, has been isolated from plant tissue. Fucoidan is known to interfere the function of selectin (11), to inhibit LPS-induced leukocyte rolling (12) and adhesion on epithelial cell surface of aorta. Fucoidan also has been reported to have antithrombotic (13) and anti-infective activities. Carrageenans (14) are obtained by aqueous extraction of red seaweeds. They consist of sulfate esters of (1→3,4 linked) D-galactose and 3,6-

ではあるが様々な *N*-, *O*-硫酸化度の異なるグルコサミンやグルクロン酸が見出される。ヘパラン硫酸は構造的にヘパリンに類似してはいるが、ヘパリンと異なり多くの場合細胞外マトリックスに存在し、ヘパリンの示す生理活性の大部分はヘパラン硫酸が担っているものと考えられる(4)。ヘパリンが多くの生理活性を示すことはよく知られており、その多くは医薬品としての適応も含め、多くの関心を集めている。ヘパリンが活性を発現するに当たって標的となるタンパク質と結合し、調節していることはよく知られている。これらのヘパリン-タンパク質相互作用は特異的で、特に抗凝固活性におけるアンチトロンビンⅢ(トロンビンやその他の凝固系セリンプロテアーゼインヒビター)に対する特徴的五糖単位は特によく知られている(5,6)。

ヘパリンの示す様々な生物活性や医薬品としての重要性からこれまでヘパリン様物質の発見に多くの精力が費やされた。ヘパリン様物質、すなわちヘパリノイドとしては動物、植物由来あるいは合成によるものが知られているが、これらのヘパリノイドはヘパリン結合タンパク質に対して類似の挙動を示す。多くのヘパリン結合タンパク質はそれぞれ小さなグループに分類されているが、ヘパリノイドのヘパリン結合タンパク質に対する結合もヘパリンのそれと同じように静電氣的であったり、水素結合であったり様々である。

B. 硫酸化多糖の由来 (7)

天然由来硫酸化多糖

動物由来：主要な動物由来酸性多糖類はグリコサミノグリカン (GAGs) である。デルマタン硫酸 (8) は実際すべての動物の様々な組織に見出され、抗トロンビン薬として臨床で用いられている。コンドロイチン硫酸はデルマタン硫酸、ヘパリンの示す生理活性の本体と考えられている構造的自由度の高いL-イズロン酸を含まないため、生理活性物質としての認識は希薄である。GAGの中でも唯一ウロン酸を含まないケラタン硫酸 (9) は軟骨、角膜に見出され、これら組織の疾患に関与する機会が多い。ヒアルロン酸は非常に高い分子量を有し、硫酸基を含まない。化学的に硫酸化したヒアルロン酸が抗ヒアルロニダーゼ活性などのいくつか重要な生理活性を示すことが報告されている (10)。

植物由来：唯一硫酸化L-フコースからなる多糖フコイダンは植物から単離同定された。フコイダンはセレクトインの機能を阻害し(11)、LPS誘導白血球の血管壁ローリング、動脈内皮への接着を阻害する(12)。フコイダンはまた抗トロンビン作用(13)や抗感染作用を有するといわれている。カラゲナン類は紅藻類の抽出液から単離されている(14)。カラゲナンは部分的に硫酸化された(1→3, 4) D-ガラクトースと 3, 6アンヒドロ-D-ガラク

anhydro-D-galactose copolymers. Carrageenans are widely used in food, pharmaceutical and industrial application (15).

Sulfonation of neutral polysaccharides: Chitin, poly (2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose), is the major organic component of the exoskeleton found in insects, crabs, etc. (16). Chitin can be de-N-acetylated to prepare chitosan, which on chemical sulfonation has some structural similarity to heparin and inhibits thrombin activity through antithrombin (17, 18). Pentosan, a (1→4 linked) xylopyranose with a single branched 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid is extracted from the bark of the beech tree (19). On sulfonation, it has been shown to be an anticoagulant with one-tenth of heparin's activity. Dextran sulfate also is an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) binding to T-lymphocytes but because of its low oral bioavailability it has not been used therapeutically (20). Laminarin, isolated from the cell wall of seaweed and composed of (1→3 linked) glucose residues are chemically sulfonated which is effective in the prevention and treatment of ischemic cerebrovascular disease (21).

Fully synthetic sulfated polymers (22): Synthetic polymers such as poly(vinyl sulfate) and poly(anethole sulfonate) are highly charged heparin-like polyanions that exhibit anticoagulant activity (2). But the use of this agent *in vivo* has been precluded by their high toxicity. A small sulfonated molecule, suramin, was the first synthesized heparin analogue. It shows activity as an anthelmintic, an antiprotozoal, an antineoplastic and an antiviral agent (23,24). Despite its potent activities, suramin has a long half-life and exhibits a wide range of toxic side effects.

C. Biological Activities of Polysaccharides

The only currently approved therapeutic applications of heparinoids are as anticoagulant/antithrombotic agents and for biomaterials used in medical devices (*i.e.*, catheters, hollow fiber artificial kidneys, blood oxygenators). There are additional therapeutic areas that are under extensive investigation as described below.

Effect on smooth muscle proliferation: Heparin (25) and fucans (26) have demonstrated the ability to inhibit the proliferation of smooth muscle cells. The anticoagulant and antiproliferative effects of low molecular weight fucans on both coagulation and cell proliferation are dependent on their degree of sulfation (27).

Activation on immunosystem: The carbohydrate polymers β -1,3-D-glucans on sulfonation exert potent effects on the immune system by binding to receptors on macrophages and other white blood cells and activating them (28).

Anti-inflammatory activity: Natural sulfated fucans have a potential for use as anti-complementary and anti-inflammatory agents (29), owing to its potent inhibitory effect on human complement activation.

トースからなる多糖である。カラゲナンは広く食料や医薬品としてあるいは種々の工業原料として用いられている(15)。

中性糖の硫酸化: *N*-アセチルグルコサミンからなる多糖キチンは、昆虫、甲殻類の体表を覆う主要物質として知られている(16)。キチンは化学的に脱 *N*-アセチル化されキトウサンとなり、キトウサンはさらに化学的に硫酸化されヘパリン様作用を示し、アンチトロンビンを介して抗トロンビン作用を示すことが知られている(17,18)。ペントサンは1個の4-*O*-メチル D-グルクロン酸枝分かれをもつ直鎖の (1→4) キシロースポリマーであり、ブナ科の樹木より抽出されている(19)。化学的硫酸化されたペントサンはヘパリンの十分の一の抗凝固活性を示す。デキストラン硫酸もまた HIV の T-リンパ球への感染を阻害することが知られているが、経口的な吸収に難があり、治療法としては確立していない(20)。海草の細胞壁から単離されたラミナリンは (1→3) グルコースから単離され、化学的に硫酸化され虚血性脳血管症の予防・治療に効果を示す(21)。

合成硫酸化高分子(22): ポリビニル硫酸やポリアネトールスルホン酸などの合成高分子はヘパリン様の抗凝固活性を示す(2)ことが知られているが、その高い生体に対する毒性のために実際に使用されることはない。比較的小さな硫酸化された分子であるスラミンは最初に合成されたヘパリノイドであり、駆虫効果や抗ウイルス作用が報告されている(23,24)。スラミンの潜在的な薬理効果は期待できるが、体内寿命の長さや重篤な副作用も懸念されている。

C. 多糖類の生物活性

唯一実用的に治療に応用されているヘパリノイドは抗凝固・抗トロンビン試薬としてであり、カテーテル、人工腎臓、人工肺などの医療用器具の内側にコーティング剤として実用化されている。その他現在盛んに実用化が試みられている例を以下に示す。

平滑筋増殖に対する影響: ヘパリン (25) およびフカン (26) は平滑筋細胞の増殖阻害作用を示すことが報告された。低分子フカンの抗血液凝固、抗増殖活性はフカンの硫酸化度に依存することが明らかになった(27)。

免疫系の活性化: β 1-3 グルカンに硫酸化するとマクロファージや他の白血球受容体に結合することにより、あるいは直接これらの細胞に作用し、免疫系を活性化することが知られている(28)。

抗炎症活性: 天然の硫酸化フカンは、ヒト補体活性化阻害作用により抗補体および抗炎症試薬としての可能性を秘めている(29)。

Antiangiogenic activity: Not only heparins but also carrageenans and semi-synthetic sulfated polysaccharides like laminarin sulfate were shown to be potent angiogenesis inhibitors (30, 31).

Anticancer activity: Heparin and other proteoglycans have a role in neoplasia in regulating the growth of endothelial cells and controlling the proliferation of other cells through its interaction with growth factors. Basic fibroblast growth factor (FGF) might be closely related to the malignant growth of prostate cancer in addition to tumor angiogenesis. Epidermal growth factors (EGF) and their receptors (EGFR) are also important in human cancer. This growth factor includes heparin-binding EGF, making the study of heparin or heparin analogs important in the design of new anticancer agents. Sulfated α -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan (32), calcium spirulan (33), and other algae polysaccharides (34) exhibit inhibition of tumor invasion and metastasis properties.

Antiparasitic activity: Chondroitin sulfate A tetradecasaccharide (35) is the minimum length able to almost completely inhibit binding of malaria-infected erythrocytes to the microvascular endothelium of various organs. The adherence of infected erythrocytes (IEs) to the microvascular endothelium of various organs is a key feature of *Plasmodium falciparum* infection and contributes to the survival of parasites by aiding replication and evasion of splenic clearance.

Antiviral activity: Heparin and other sulfated polysaccharides particularly extracted from alga were found to be active against a wide variety of enveloped viruses such as HIV, herpes simplex virus type 1 and type 2, influenza A virus, respiratory syncytial virus, simian immunodeficiency virus and human cytomegalovirus (36). Heparin and sulfated polysaccharides represent a wide variety of different biological activities. However, unwanted side effects of these pharmacologically active compounds have often been observed due to their multiple bioactivities. Substantial research effort has focused on the structural modifications of preparing heparin analogues that might exhibit higher specificity and decreased side effects in different therapeutic applications. These heparinoids can be prepared from animal, plant and microbial sources and through chemical synthesis.

To elucidate the structure-activity relationship (SAR) of sulfated polysaccharides, homopolysaccharides from natural sources were modified by sulfonation to alter their physiological/pharmacological properties. In the present study, 1 $\rightarrow$ 3, or 1 $\rightarrow$ 4 linked linear polysaccharides including xylan, amylose, cellulose, curdlan, which are commercially available, and sulfated D-galactan isolated from clams were used. Their biological activities, including anticoagulant (37) and hyaluronidase inhibition activities were then compared.

D. Preparation of Per-O-Sulfo Polysaccharides

Sulfated polysaccharides have many biological functions,

抗血管新生作用：ヘパリンだけでなくカラゲナンやラミナリン硫酸などの半合成硫酸化多糖は血管新生阻害作用が知られている(30,31)。

抗がん作用：ヘパリンおよび他のプロテオグリカンとは各種増殖因子と結合することによって内皮細胞の増殖調節、他の細胞増殖の制御など組織新形成に深く関与している。塩基性増殖因子 (FGF) は前立腺がんの増殖に密接に関与しているのは間違いない。表皮増殖因子 (EGF) およびその受容体 (EGFR) もまたヒトがん細胞の増殖に重要である。EGFは新しい抗がん剤をデザインする上で、ヘパリンやヘパリノイドの抗がん作用を調べる格好の標的である。硫酸化 α 1 $\rightarrow$ 3-D-グルカン(32)、スピルランカルシウム(33)、および他の藻類由来多糖(34)もまたがん浸潤、転移の阻害活性を示す。

抗寄生虫作用：コンドロイチン硫酸 A 由来 14 糖 (コンドロイチン 4 硫酸) がマラリア感染赤血球の多様な臓器の血管内皮感染を完全に阻害する最小有効単位であることが報告された(35)。多様な臓器微小血管内皮細胞に対するマラリア感染赤血球 (IEs) の接着は、マラリア原虫の感染において鍵となる現象で、複製、脾クリアランスからの回避などとともに生き残りに貢献している。

抗ウイルス活性：ヘパリンや他の硫酸化多糖、特に藻類から単離された多糖は HIV、ヘルペスウイルス 1 および 2 型、インフルエンザ A ウイルス、呼吸性合胞性ウイルス、SIV、ヒト巨細胞ウイルスなどのエンベロープウイルスに対して有効であることが見出された(36)。ヘパリンや硫酸化多糖は幅広い多様な活性を有しているが、これらを薬剤として用いようとするとこれらが不要な副作用となることがしばしばある。そこでより特異的な活性をもち、副作用のない治療薬を開発するために、ヘパリン様物質を創製する化学的修飾に多くの努力が払われてきた。これらのヘパリノイド類は動物界、植物界、あるいは微生物などから広く探索され、更には化学合成を通じて創製しようと試みられている。

硫酸化多糖類の構造活性相関 (SAR) を明らかにするために、私たちは天然の単純多糖の本来有する生理的・薬理的活性を部分的に変える目的で化学的に硫酸化を施した。今回、1 $\rightarrow$ 3 結合あるいは 1 $\rightarrow$ 4 結合をもつ数種の直鎖の多糖、すなわち市販のキシラン、アミロース、セルロース、カードラン、および二枚貝から単離した硫酸化ガラクトランを例に行った。今回調製したこれらの化学修飾した多糖の、抗凝固活性(37)、および抗ヒアルロニダーゼ活性について比較検討した。

D. 完全 O-硫酸化多糖類の調製

硫酸化多糖は多くの生物活性を示すが、タンパク質に対す

which depend on binding of highly specific carbohydrate structures to proteins. Heparin is the most highly charged polyanionic polymer found in nature. In 1950, it has been established that heparin *in situ* was covalently linked to core proteins through serine residues. In the 1940s, it was assumed that the anticoagulant activity of heparin was in part due to its high negative charge density. This hypothesis was supported by the finding that chemical sulfonation of neutral polysaccharides resulted in anticoagulant activity. These compounds containing various carbohydrate backbones and carboxyl- and sulfo groups are categorized as 'heparinoids'. They were chemically synthesized and their anticoagulant activity examined. To understand the chemical structure within these heparinoids that influence their biological activities, chemical modification reactions such as depolymerization, phosphorylation, sulfonation, regioselective sulfonation, and/or desulfonation was undertaken.

Recently, we prepared and characterized the structures of chemically fully sulfated 1→3, or 1→4 linked linear polysaccharides including xylan, amylose, cellulose, curdlan, which are commercially available, and sulfated D-galactan isolated from clams (Figure 1), and their biological activities were compared. Additionally, the contribution of 6-O-sulfo group for biological activity of chemically fully sulfated polysaccharides by using a specific O-desulfonation reaction was also investigated (37).

E. Preparation and Characterization of Chemically Fully Sulfated Polysaccharides

Various methods for sulfonation of hydroxyl groups of polysaccharides involving chlorosulfonic acid-pyridine complex, sulfuric acid mediated by dicyclohexylcarbodiimide (38), sulfur trioxide-trimethylamine complex (39), and pyridine-sulfur trioxide complex in *N,N*-dimethylformamide (DMF) as sulfonating reagent have been reported. In this study, the pyridine-sulfur trioxide complex in DMF, in which causes less depolymer-

る特異的結合による場合が多い。1950年にヘパリンがセリン残基を介してタンパク質に共有結合することが明らかになったが、1940年代からヘパリンの示す抗凝固活性はヘパリンの有する高い陰電荷密度によるものと考えられていた。この仮説は中性多糖を硫酸化することによって抗凝固活性が出現することが見出され、裏付けられた。多様な糖鎖骨格、カルボキシル基、硫酸基をもつこれらの多糖を“ヘパリノイド”と称し、ヘパリンとは区別されている。ヘパリノイドは部分的に化学合成されたもので、凝固活性が調べられた。これらヘパリノイドの生物活性に影響する化学構造を理解するために、化学的低分子化、リン酸化、硫酸化、位置選択的硫酸化あるいは脱硫酸化などが行われている。

最近、私たちはキシラン、アミロース、セルロース、カードラン、および二枚貝から単離した硫酸化ガラクトン(図1)の化学修飾を行い、その生理活性を調べた(37)。特に6位硫酸基の意味を探るために完全硫酸化多糖から特異的な方法によって6位のみを選択的に脱硫酸化し、その影響を調べた。

E. 化学的完全硫酸化多糖の調製と同定

多糖の水酸基のスルホン化については数多くの方法が報告されている。例えばクロロスルホン酸-ピリジン錯体、ジシクロヘキシルカルボジイミドと硫酸(38)、三酸化イオウ-トリメチルアミン錯体(39)、あるいは *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 中で三酸化イオウ-ピリジン錯体を用いる方法などが報告されている。ここでは反応中の糖鎖の分解・副反応が少ない三酸化イ

Fig. 1. Structure of polysaccharides discussed.

ization and side reactions was used to prepare fully sulfated polysaccharides (37).

E-1. Preparation of Persulfonated Polysaccharides

The $\beta 1 \rightarrow 3$ linked curdlan and D-galactan, $\beta 1 \rightarrow 4$ linked xylan and cellulose, and $\alpha 1 \rightarrow 4$ amylose were subjected to full sulfonation to both increase their negative charge and decrease (or eliminate in the case of D-galactan isolated from clams) their sequence heterogeneity (Figure 1). In the previous reports (40, 41) chemical sulfonation was carried out under harsh conditions with adducts of sulfur trioxide in aprotic solvents to obtain fully sulfated polysaccharides. Each polysaccharide was allowed to swell well in dry DMF and was then stirred for 14 h at room temperature. An excess (15 mol/equivalent of available hydroxyl groups in polysaccharides) of sulfur trioxide-pyridine complex was required. The persulfonation reaction was carried out with stirring under N_2 gas for 6 h at 40° C. The resulting inorganic sulfuric acid was neutralized by an aqueous solution of NaOH. The sulfated polysaccharide was precipitated with cold ethanol, re-dissolved in water, dialyzed against water, and lyophilized.

In the case of cellulose, because of the very highly molecular weight of this polysaccharide, a sample was partially depolymerized under mild acid hydrolysis and sulfonation was repeated to afford fully sulfated cellulose. Different conditions were also investigated to obtain other fully sulfated polysaccharides and to prepare oversulfated polysaccharides with different levels of sulfation. Various types of sulfonation reactions, relying on different mechanisms, were considered for polysaccharides with different types of glycosidic linkages such as $\beta 1 \rightarrow 3$ and $\beta 1 \rightarrow 4$, and ones with different constituent sugar residues.

E-2. Preparation and Characterization of Chemically 6-O-Desulfonated Polysaccharides

Sulfated polysaccharides are found in most algal cell matrices, and those of animal origins are also well known as mucopolysaccharides. The biological activities of these sulfated polysaccharides have been investigated for development of new medicinal materials, and many papers have reported a variety of sulfonation and desulfonation (41, 42). One of the most convenient methods of desulfonation involves treatment with dilute methanolic hydrogen chloride and was originally applied to desulfonation of chondroitin sulfate (43). Unfortunately, this method also causes considerable depolymerization and reduction in yield because of concomitant cleavage of glycosidic linkages. An improved yield of desulfonated polysaccharides can be obtained without serious decomposition by the solvolysis of the pyridinium salts of polysaccharides in an aprotic solvent, such as dimethylsulfoxide, *N,N*-dimethylformamide, and pyridine, or dimethylsulfoxide, containing a small amount of water or methanol (44,45). The other advantage of solvolytic desulfonation is that selective *N*-desulfonation can be achieved by careful control of the reaction conditions (44). Additionally, a specific *O*-desulfonation method has been reported that in-

オウ-ピリジン錯体を DMF 中で用いる方法について紹介する (37)。

E-1. 完全硫酸化多糖の調製

$\beta 1 \rightarrow 3$ 結合を有するカードランとガラクトン、 $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合を有するキシラン、セルロースおよび $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合をもつアミロースについて、陰電荷の増加および糖鎖配列の複雑さの減少(あるいは二枚貝由来ガラクトンの場合ではランダムな位置での複雑な硫酸化パターンの除去)を目的に化学的硫酸化反応に供した(図 1)。以前発表された論文 (40,41) によれば、完全化学的硫酸化は強い条件下で、非プロトン性の溶媒中で行われていた。今回個々の多糖を DMF 中によく溶媒になじませるため、硫酸化反応前に 14 時間室温で攪拌した。次に硫酸化試薬である三酸化イオウ-ピリジン錯体を過剰に加え(多糖中の水酸基のモル数に対して 15 倍当量の硫酸化試薬)、窒素ガス置換後 40℃、6 時間反応にかけた。反応中に生成してくる硫酸基を水酸化ナトリウムで中和し、冷エタノールを加えて多糖を沈殿とし、水に再度溶かして透析後凍結乾燥した。

セルロースの場合、分子量が非常に高いことが予想されたのであらかじめ弱い酸で部分加水分解し完全硫酸化反応に供した。反応条件は種々検討し、硫酸化度の異なる部分硫酸化体も調製した。

E-2. 化学的脱 6-O-硫酸化多糖類の調製

硫酸化多糖はほとんどの藻類に見出され、また動物由来ではムコ多糖としてよく知られている。これら硫酸化多糖の生物活性については新しい医薬品の開発を目的に研究されており、硫酸化、脱硫酸化に関する論文は多数報告されている(41,42)。もっとも簡便な脱硫酸化法の一つにメタノール性塩酸で処理する方法があり、コンドロイチン硫酸からコンドロイチンへの脱硫酸化にはじめて用いられた(43)。しかしこの方法は脱硫酸化反応と同時にグリコシド結合の開裂が起こり、かなりの低分子化、回収率の低下を生じる。そこで改良法として硫酸化多糖のピリジン塩を、少量の水またはメタノールを含む非プロトン溶媒中、例えば DMSO 単独、DMF-ピリジンあるいは -DMSO 混合溶媒中でソルボリシスする方法が開発された(44,45)。ソルボリシスによる脱硫酸化反応の利点は、反応条件を注意深く制御することにより、選択的に *N*-硫酸基をはずすことができる点である(44)。加えて、位置選択的な脱 *O*-硫酸化反応が相次いで報

volves the treatment of pyridinium salts of methyl α -D-galactopyranoside 2,6-disulfate (46) and polysaccharide sulfates (47,48) with *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BTSA), *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), or *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTSTFA) in pyridine. This reaction supposedly does not involve a solvolytic process, as desulfonation does not occur when other silylating reagents, such as *N,O*-bis(trimethylsilyl)carbamate, *N*-trimethylsilylimidazole (TSIM), and iodotrimethylsilane, under similar conditions (46). BTSA in pyridine is useful for the selective desulfonation of fully sulfated neutral polysaccharides, affording 6-*O*-desulfonation without depolymerization of the polysaccharide chains. This method has been applied to elucidate the effect of 6-*O*-sulfo groups on the various biological activities of fully sulfated polysaccharides.

E-3. Preparation of 6-*O*-Desulfonated Persulfonated Polysaccharides

Fully sulfated amylose, cellulose, curdlan, and galactan were 6-*O*-desulfonated by using BTSA in pyridine. The procedure for the regioselective 6-*O*-desulfonation of fully sulfated polysaccharides is as follows. An aqueous solution of the sodium salt of each fully sulfated polysaccharide was passed through a Dowex 50W-X8 column to exchange sodium salt to pyridinium salt. Next, each polysaccharide was reacted in dry pyridine with *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BTSA) under N_2 gas to give a clear solution. Reaction conditions including time and temperature require optimization for the regioselective desulfonation of each polysaccharide. Finally, water was added to decompose excess reagent and silyl esters of sugar hydroxyl groups, the mixture is dialyzed against distilled water, the pH is adjusted to 7.0, and the resulting 6-*O*-desulfonated fully sulfated polysaccharide sodium salt is lyophilized.

F. Biological Activities of Chemically Sulfonated Polysaccharides

In recent years, a broad series of polysaccharides has emerged as an important class of bioactive natural products. Sulfated polysaccharides are widespread in nature, occurring in a great variety of organisms. In marine algae, the carrageenans and fucoidans are composed mainly of sulfated galactose and fucose, respectively (3, 13, 49). Vertebrate tissues express abundant sulfated glycosaminoglycans (50). Invertebrate species are also a rich source of sulfated polysaccharides with novel structures (51-55). We have isolated and characterized the structure of a new sulfated β -galactan from clams (52). In contrast with the algal polysaccharides, invertebrate galactan has simple structure, composed of a single repeating unit (52). The specific pattern of sulfation and the position of the glycosidic linkage vary among different species (53, 54, 56). It was surprising that these sulfated polysaccharides have been shown the different effects in treating a broad range of diseases, such as immune disorders

告されている。例えば2,6ジスルホ α ガラクトメトキシド(46)、あるいは硫酸化多糖(47,48)のピリジン塩をピリジン中でBTSA、BSTFAあるいはMTSTFAにより処理する方法が報告されている。この反応はソルボリシスではなく、また他のシリル化試薬、例えば*N,O*-(ビストリメチルシリル)カルバネート、TSIM、ヨードトリメチルシランなどでは同様な条件で脱硫酸化は起こらない。ピリジン中BTSAを用いた脱6硫酸化反応は低分子化も起こらず、完全硫酸化多糖の選択的脱硫酸化に便利である。今回、この方法を用いて先に完全硫酸化した多糖類の脱6硫酸化に用いた。

E-3. 脱6-*O*-硫酸化完全硫酸化多糖の調製

完全に硫酸化したアミロース、セルロース、カードランおよびガラクトタンはピリジン中BTSAを用いて脱6硫酸化した。方法の詳細は次の通りである。まず完全に硫酸化した多糖類のナトリウム塩を水に溶かし、ナトリウム塩をピリジン塩に変換するためにダウエックス50W-X8の陽イオン交換カラムにかけ、次に粉末にした各完全硫酸化多糖ピリジン塩をBTSAを含む乾燥ピリジン中に懸濁し、窒素ガス置換後透明になるまで反応を続ける。選択的な脱硫酸化体を得るための反応条件は、個々の硫酸化多糖により反応時間温度など慎重に最適化しなければならない。最終的に過剰の試薬および糖水酸基シリルエステルを分解するために水を加え、水に対して透析しpH7.0とした後、凍結乾燥することによって目的の多糖を得る。

F. 化学的硫酸化多糖の生物活性

近年、多様な多糖類が生理活性を有する重要な天然物の一つとして注目されている。天然には硫酸化多糖類は広く分布しており、様々な生物に見出されている。海洋藻類については硫酸化ガラクトース、フコースを主な成分とするカラゲナン、フコイダンが知られている(3,13,49)。脊椎動物の組織はグリコサミノグリカンに富んでいることはよく知られているが(50)、一方、無脊椎動物もまた新しい構造を持った硫酸化多糖の宝庫といつてよい(51-55)。私たちも二枚貝から新しい硫酸化 β -ガラクトタンを単離・同定している(52)。藻類の多糖類に比べて、無脊椎動物由来ガラクトタンは構造が単純で、その糖鎖配列も複雑でない(52)。普通硫酸化のパターン、グリコシド結合の位置などは異なった種では全く違うのが普通である(53,54,56)。これらの多糖を用いて様々な種類の病気、例えば免疫不全、腫瘍に対する作

Fig. 2. Schematic representation of the major pathways of the haemostatic cascade. The coagulation factors are designated with Roman numerals and the suffix a indicates a proteolytically activated factor. The intrinsic cascade is initiated when contact is made between blood and exposed endothelial cell surfaces. The extrinsic pathway is initiated upon vascular injury which leads to exposure of tissue factor (TF) (also identified as factor III), a subendothelial cell-surface glycoprotein that binds phospholipid. The two pathways converge at the activation of factor X to Xa. Factor Xa has a role in the further activation of factor VII to VIIa. Active factor Xa hydrolyzes and activates prothrombin to thrombin. Thrombin can then activate factor XI, VIII and V furthering the cascade. Ultimately the role of thrombin is to convert fibrinogen to fibrin and to activate Factor XIII to XIIIa. Factor XIII cross-links fibrin polymers solidifying the clot. After formation of the clot, the fibrinolysis, a normal haemostatic response, is achieved. The major enzyme for fibrinolytic pathway is plasmin, derived from plasminogen, which is activated to plasmin by the tissue type plasminogen activator (tPA) or urokinase-type plasminogen activator (uPA, UK). Finally, plasmin digests the fibrin clot to soluble fibrin degradation product (FDP). Other abbreviations: DS, dermatan sulfate; HP, heparin; SK, streptokinase; TFPI, tissue factor pathway inhibitor.

and tumors, and their activity as anti-inflammatory, anti-ulcer, cholesterol-lowering, blood-glucose-lowering, antiviral agents or antithrombotic agents. An essential prerequisite, when distinct physiological properties are to be attributed to a biological molecule, is knowledge of the structural parameters of such polymers. Initial efforts focused on sulfated homologous polysaccharides by studying their effects on anticoagulant activity, and hyaluronidase inhibition.

F-1. Anticoagulant Activity of Chemically Persulfonated Polysaccharides

The coagulation and fibrinolytic cascades (Figure 2) comprise a series of zymogens to enzyme conversions, which terminate in the proteolytic enzymes, thrombin and plasmin, respectively. These enzymes catalyze the deposition and removal of

用、あるいは抗炎症作用、抗潰瘍性、コレステロール低下作用、血糖値低下、抗ウイルスまたは抗凝固活性などを調べてみると、その異なった効果に驚かされる。またこれら明確な生理的性質、あるいは差異がこういった生物分子それ自身にあるとすると、多糖類の構造パラメーターに関する知識は必要不可欠である。最初は単純多糖の硫酸化体の抗凝固活性とヒアルロニダーゼ活性に焦点を当て調べた。

F-1. 化学的完全硫酸化体の抗凝固活性

凝固系および線溶系カスケード (図 2) は一連の酵素前駆体の酵素への変換過程であり、最終的にトロンビンとプラスミンに帰結する。これらの酵素は生体内でフィブリンの沈着、溶解

fibrin *in vivo*. A proper balance between the activities of the two cascades is required both to protect the organism from excessive blood loss upon injury and to maintain blood fluidity within the vascular system. Imbalances are characterized by either bleeding or thrombosis tendencies, the latter of which are manifested as heart attack and strokes.

Deep vein thrombosis (DVT) and closely associated pulmonary embolism (PE) (now accepted as being the expression of a single disease process, namely venous thrombosis) are significant causes of morbidity and mortality in the elderly (57, 58). The high incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism during post-operative and post-traumatic management of patients has prompted investigators to carefully examine the etiology and prevention of the process. Blood coagulation has long been considered pivotal in the development of venous thrombosis. It is known that a hypercoagulable state contributes significantly to the thrombogenic process (59, 60).

Most thromboembolic processes require anticoagulant therapy, and the sulfated polysaccharide heparin has been used to reduce thrombosis in post-operative or post-traumatic patients for more than 50 years (61–64). Its potent anticoagulant action is achieved mainly through potentiation of antithrombin and to a lesser degree through heparin cofactor II (HC II). Antithrombin is the major plasma protein inhibiting coagulation enzymes, in particular thrombin and factor Xa (Figure 3). Recently, low-molecular weight heparin preparations, obtained by fractionation of standard heparin, have become alternatives for prophylaxis of venous thromboembolism. Owing to their long half-life in plasma, high bioavailability and low variability in coagulation

反応を触媒する。二つのカスケードのバランスは、傷害時生体からの血液の損失を防ぐとともに血管内の血液の円滑な循環に必須である。これらのバランスが崩れたとき、出血傾向、および心臓発作あるいは梗塞を生じることとなる。

年をとるとともに DVT や PE (現在では静脈性血栓症と呼ばれる同一の疾病と表現されている) は深刻な罹病および死因の原因の一つとなっている(57,58)。手術後あるいは外傷を負った患者の予後に見られる DVT および PE の高い発症率は、研究者の高い関心を集め、その病因の解明、および予防法の開発につながった。血液凝固は長い間血栓症発現の要因とみなされていた。血液凝固が起こりやすい状態は血栓症の発現に重要な関わりを持つことはよく知られている(59,60)。

ほとんどの血栓塞栓症は抗凝固剤投与による治療が必要で、硫酸化多糖の一つであるヘパリンは、術後あるいは外傷を負った患者の血栓症を減少させる目的で 50 年以上も使用されている(61–64)。その強力な抗凝固作用は、一部 HC II を介すものの、主にアンチトロンビンの薬理効果を増強することによる。アンチトロンビンは凝固系酵素、特にトロンビンと Xa 因子の活性阻害作用をもつ主要な血漿タンパク質である(図3)。最近、天然ヘパリンの分子量分画によって調製した低分子量ヘパリンが血栓塞栓症の予防の選択肢の一つになった。長い血漿

Fig. 3. Inhibition of factor Xa and thrombin by antithrombin and heparin. Heparin is shown here as a repetition of squares (glucosamine units) and triangles (uronic acid units) the non-reducing end of the chain is on the left and the reducing end of the chain is on the right. (a) By binding to the antithrombin pentasaccharide-binding-site (A-domain, black squares and triangles), antithrombin undergoes a conformational change (hatched triangle) in a manner sufficient to inhibit factor Xa without any contribution from the rest of the saccharide chain. This is why the pentasaccharide representing the antithrombin-binding site can inhibit factor Xa (b). In contrast, thrombin inhibition requires attraction by the negative charges of thrombin-binding domain (T-domain). Thrombin slides along the heparin chain until it hooks itself on the exposed loop of activated antithrombin. Because the heparin-antithrombin complex has a well-defined structure, thrombin must approach from the non-reducing side (possibly c) to be irreversibly inhibited.

Fig. 4. The antithrombin-binding region in heparin (a) and the heparin cofactor II-binding region in dermatan sulfate (b).

response, low-molecular weight heparins can be administered subcutaneously at fixed dose without the need for laboratory monitoring (65, 66). The interaction with antithrombin requires only a short pentasaccharide segment (Figure 3a and 4a), which can be isolated from natural heparins or obtained by chemical synthesis (67). The pentasaccharide, Org31540/SR90107A, the first compound in a new class of synthetic antithrombotic agents, is a highly selective, antithrombin-dependent, indirect inhibitor of activated factor X (factor Xa). It has the potential to improve significantly the risk-benefit ratio for the prevention of venous thromboembolism, as compared with low-molecular-weight heparin (63). Binding of the pentasaccharide to antithrombin causes a conformational change in antithrombin that accelerates its interaction with thrombin and factor Xa by about 1,000 times. The pentasaccharide chain can inhibit the action of factor Xa simply by binding to antithrombin and causing a conformational change (Figure 3b). In contrast, to inactivate thrombin, heparin must bind to both antithrombin and thrombin (Figure 3c), thereby forming a ternary complex (68). This complex can be formed only by pentasaccharide-containing heparin chain composed of at least 18 saccharide units.

Heparin requires antithrombin as cofactor to inhibit thrombin. In congenital or acquired antithrombin deficiencies, the effects of heparin are reduced. Moreover, heparin infusion has been reported to result in a reduction in antithrombin activity, which may promote thrombosis. In such cases, supplementary administration of antithrombin becomes necessary. In addition, a few patients (2–7%) develop thrombocytopenia caused by heparin-reactive immunoglobulins, which induce platelet release and aggregation (69). The hemorrhagic side effect of heparin (including of its low-molecular-weight heparins and

滞在時間、高い利用効率、また低い凝固応答に対する高選択性によって低分子ヘパリンはモニターすることなく決まった投与量で皮下投与することができる(65,66)。アンチトロンビンとの相互作用には短い5糖配列(図3a, 4a)のみが必要であり、天然ヘパリンからも単離されているし、また化学合成されている(67)。初の新しいタイプの合成抗血栓薬5糖、Org31540/SR90107A、は高い選択性を持つアンチトロンビン依存性のXa因子の間接的阻害薬である。これは低分子ヘパリンに比べて血栓塞栓症の予防薬としては高い可能性を秘めている(63)。アンチトロンビンに対するこの5糖の結合はアンチトロンビンの立体構造変化を誘発し、これがトロンビンあるいはXa因子との結合を約1000倍程度加速する。この5糖鎖のアンチトロンビンと結合することによりXa因子の活性を阻害でき、立体構造変化を起こす(図3b)。これに対して、トロンビンの不活化に対してはヘパリンはアンチトロンビン、トロンビンの両方に結合し(図3c)、それによって三元複合体を形成している(68)。この複合体形成には5糖構造を含む最低18糖構造が必要である。

ヘパリンはトロンビンを阻害するためにアンチトロンビンが必要とする。先天性あるいは後天性のアンチトロンビン欠損症では、ヘパリンの効果は低下する。さらにヘパリンの連続投与はアンチトロンビン活性の低下を招き、さらには血栓症の促進をきたすことが予告されている。このような場合、アンチトロンビンの補給が必要である。更に、患者の中には(2~7%)ヘパリンに対して応答するイムノグロブリンを生じ、これが血小板の凝集を生み、結果として血小板減少症を発症する(69)。ヘパリン(低分子ヘパリンおよび先の5糖を含めて)の副作用として

pentasaccharide) is another limitation for the use of this compound in some clinical conditions. Moreover, a wide variety of medical conditions required antithrombotic agents with distinctive and unique anticoagulant properties.

Dermatan sulfate, a glycosaminoglycan that is structurally similar to heparin, is currently clinically used in a mixture with heparan sulfate and chondroitin sulfate as an alternative to heparin. It acts primarily on thrombin through HC II not through antithrombin (68). Because of this selectivity, dermatan sulfate has only a weak anticoagulant effect and negligible hemorrhagic complications. HCII inactivates thrombin by formation of a stable 1:1 complex, but does not react with factor Xa. The hexasaccharide shown in Figure 4b is the smallest HCII-binding high-affinity oligosaccharide found in dermatan sulfate. Because of its high molecular weight, dermatan sulfate is not well absorbed when administered subcutaneously.

Overall, these observations indicate that alternatives to heparin, perhaps new polysaccharides with fewer side effects and which would be more appropriate for each clinical condition are still required. The investigation for new natural sulfated polysaccharides with potent anticoagulant and antithrombotic action prepared from non-mammalian sources is an attractive alternative.

Sulfated polysaccharides are widespread in nature, occurring in a great variety of organisms. These intact and chemically modified sulfated polysaccharides have been investigated anticoagulant properties for clinical use. In contrast with heparin and dermatan sulfate, the structural features of these chemically sulfated polysaccharides required for anticoagulant activity have not been well characterized. The anticoagulant properties of a range of sulfated polysaccharides that differ in terms of monosaccharide composition and linkage, position of sulfo groups, and anomeric configuration were examined. Since the major inhibitors of serine proteases, such as thrombin (factor IIa) and factor Xa, involved in blood coagulation are antithrom-

知られる出血傾向は、症状によってはこれらヘパリンの使用を制限している。さらに、多種多様の抗凝固剤の出現が様々な医療のために必要とされている。

デルマタン硫酸もヘパリンに類似のグリコサミノグリカンであるが、最近ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸との混合製剤としてヘパリンの代わりに使用されている。デルマタン硫酸はアンチトロンビンではなく主に HC II を介してトロンビンに働く(68)。この特異性によってデルマタン硫酸は弱い抗凝固作用を示し、出血傾向などの厄介な副作用は無視できる。HC II はトロンビンを安定な 1:1 の複合体を形成することでトロンビンを不活化するが、Xa 因子には働かない。図 4b に示した 6 糖構造がデルマタン硫酸に見出される、最小で高い結合能をもつ配列である。デルマタン硫酸は分子量が大きいため皮下投与してもあまり吸収されない。

これらの研究成果は、ヘパリンの代用品として個々の臨床症状に添った、副作用のほとんどない新しいタイプの多糖が未だ要求されているといえる。潜在的に抗凝固活性、抗血栓活性をもつ新しい非動物性の天然多糖類に関する研究は、魅力的であるといえる。

硫酸化多糖類は自然界に広く分布し、数多くの生物に見られる。天然の、あるいは化学的に修飾した硫酸化多糖類は抗凝固薬として用いるために調査されてきた。ヘパリンやデルマタン硫酸と比べて、これら硫酸化多糖類の抗凝固活性発現における構造的な同定は済んでいない。そこで、調製した硫酸化糖の単糖組成、グリコシド結合、硫酸基の位置、およびアノメリック配座を調べた。トロンビン (IIa 因子) や Xa 因子のような主要なセリンプロテアーゼのインヒビターはアンチトロンビンと

Fig. 5. Amidolytic activity of fully sulfated polysaccharides. Heparin (Sigma, 172 U/mg) was used as a comparable standard.

bin and HCII, the effect of sulfated polysaccharides on the inactivation of thrombin (factor IIa) by human plasma (containing both HCII and antithrombin) and purified antithrombin were investigated to evaluate the anticoagulant activity in this study.

F-2. Effect of 1→3 and 1→4 Linkages of Chemically Sulfated Polysaccharides on Their Anticoagulant Activity

We prepared and characterized the chemically fully sulfated and specifically 6-*O*-desulfated 1→3, or 1→4 linked linear polysaccharides including xylan, amylose, cellulose, curdlan, which are commercially available, and sulfated D-galactan isolated from clams. Next, their anticoagulant activity was examined using an amidolytic assay. Heparin (172 units/mg) was used as a reference substance to estimate the relative anticoagulant action of these sulfated polymers. The effect, of fully sulfated polysaccharides and fully sulfated polysaccharides that had been 6-*O*-desulfated, on inactivation of chromogenic amidolytic activity of thrombin was examined using human plasma and is illustrated in Figure 5. Concentration-dependent inhibition of liberated chromogen was seen with both sulfated polysaccharides and with heparin. Because plasma contains both antithrombin and HCII it was necessary to examine activity in plasma-free systems containing purified antithrombin to understand the mechanism of action. These studies showed that all of the sulfated polysaccharides failed to inhibit thrombin activity both in the absence of plasma even in the presence of the purified antithrombin (data not shown). These results conclusively demonstrated that the sulfated polysaccharides show no direct or antithrombin mediated thrombin inhibition, but instead accelerated thrombin inhibition through HCII.

The antithrombin activity, of fully sulfated polysaccharides and fully sulfated polysaccharides that had been 6-*O*-desulfated, observed in human plasma is summarized in Figure 6 and compared to standard heparin (172 U/mg). It is ap-

HC II なので、これら硫酸化多糖類のトロンビンの不活化に対する影響は、アンチトロンビンと HC II を含むヒト血漿、および精製したアンチトロンビンを用いて調べた。

F-2. 1→3、1→4結合の違いによる抗凝固系への効果

直鎖のキシラン、アミロース、セルロース、カードラン、および二枚貝から単離した硫酸化ガラクトンの完全硫酸化体、およびこれらの脱6硫酸化体を用いて調べた。まずはじめに抗凝固活性としてアミド結合分解活性を調べた。ヘパリン (172 単位/mg) を対照に用い、各硫酸化多糖類の比活性を求めた。完全硫酸化体とその脱6硫酸化体の効果はトロンビンのアミド結合分解活性に対して、ヒト血漿を用いて測定した結果を図5に示す。測定系において分解されて遊離してくる色素の量には、ヘパリンおよび硫酸化多糖類の濃度依存的阻害効果が見られた。血漿はアンチトロンビンと HC II の両酵素を含んでいるので、血漿を含まない純粋なアンチトロンビンのみを用いた系での検討を行い、阻害メカニズムを調べたところ、すべての化学的に調製した硫酸化多糖類は、血漿が存在しないと、またアンチトロンビンが存在しても阻害活性を示さなかった(データは示していない)。これらの結果から、調製した硫酸化多糖類の凝固阻害活性は、直接、あるいはアンチトロンビンを介してではなく、HC II を介するものと結論付けられた。

完全硫酸化体、およびこれらの脱6硫酸化体のヒト血漿を用いた場合のアンチトロンビン活性は、標準品として用いたヘパリンの活性 (172 単位/mg) とともに図6に要約されている。

Fig. 6. Anti-IIa Activity of fully sulfated polysaccharides. The activity is expressed as the international U/mg.

parent that while each of the fully sulfated 1→4 or 1→3 linked polysaccharides exhibited plasma-mediated antithrombin activity, this activity is 4-fold lower than that of heparin. The fully sulfated galactan showed the lowest anti-IIa activity among the samples tested, presumably be attributed to its lower molecular weight. Unexpectedly, in the fully sulfated polysaccharide that have been 6-*O*-desulfonated, 1→3 linked polysaccharides such as curdlan and galactan lost 50% of their anti-factor IIa activity compared to those of their fully sulfated counterparts. In contrast, the activity of the 6-*O*-desulfonated 1→4 linked polysaccharides, such as amylose and cellulose, were unchanged compared to their fully sulfated counterparts. These data strongly suggest that the presence of two adjacent sulfo groups at C-2 and C-3 positions are required to inhibit factor IIa activity and the contribution of 6-*O*-sulfo group might be significant in 1→3 linked polysaccharides for the activity.

F-3. Effect of Chemically Sulfated Polysaccharides on Hyaluronidase Inhibition

Hyaluronidases (HAases, EC 3.2.1.35) are enzymes known to be involved in inflammatory reactions and metastasis of tumor cells. These enzymes usually exist in an inactive form that is activated by metal ions and other agents (70). Hyaluronidase is also a component of the venom of a wide variety of organisms, including bees, wasps, hornets, spiders, scorpions, snakes and lizards. In the human body, hyaluronidase is found both in organs (testes, spleen, skin, eye, liver, kidney, uterus and placenta) and body fluids (tear liquid, blood and sperma) (71). The hyaluronidases are a group of neglected enzymes that have recently shown to have greater significance, due to the increasing attention being given to their substrate, hyaluronan (hyaluronic acid, HA). These enzymes are a class of β 1-4 endoglucosaminidases. A key role of this enzyme has been recognized in a number of basic biological processes, such as embryogenesis (72), carcinogenesis (73, 74), wound healing (75), angiogenesis (76), and inflammation (77). The activity of hy-

この結果から明らかなように、1→3、あるいは1→4結合したそれぞれの完全硫酸化多糖は血漿タンパク質を介した抗凝固活性を示す一方、その活性はヘパリンの4分の1程度でしかない。完全硫酸化したガラクトランにいたっては調べた多糖類の中で最も抗IIa活性が低く、おそらくその分子量の低さが影響しているのだらうと推定された。予期しなかったことであるが、1→3結合したカードランとガラクトランの場合、脱6硫酸化体はもとの完全硫酸化体の約50%の抗IIa活性を失ってしまった。それに対して、1→4結合したアミロースやセルロースの脱6硫酸化体はほとんどもとの完全硫酸化体と同様の活性を示した。これらの結果はC-2, C-3に結合した隣接する硫酸基の存在と、1→3結合多糖においては6位の硫酸基の寄与が大きいことを強く示唆している。

F-3. 化学的に硫酸化した多糖類のヒアルロニダーゼ阻害活性

ヒアルロニダーゼ類(以下HAase, EC3.2.1.35)は炎症反応および腫瘍の転移に関与する酵素として知られている。これらの酵素は通常不活性型で存在し、金属イオンあるいは他の物質によって活性化される(70)。ヒアルロニダーゼはまた幅広く多様な生物、例えば蜜蜂、ジガバチ、スズメバチ、蜘蛛、さそり、蛇、トカゲなどの毒液に含まれる。ヒトの体内では、ヒアルロニダーゼは臓器(精巣、脾、皮膚、眼球、肝、腎、子宮、胎盤)と体液(涙、血液、精漿)の両方に見出される(71)。ヒアルロニダーゼ類はこれまで見過ごされてきた酵素の一群で、最近はその基質であるヒアルロン酸に対する関心が高まるにつれて注目されるようになった、 β 1→4エンドグルコサミニダーゼである。この酵素は、多くの生物学的な基本過程、例えば胚形成(72)、発ガン(73, 74)、創傷治癒(75)、血管新生(76)、炎症(77)などに関与する鍵となる酵素であると認識されるようになった。ヒアルロニダーゼの活性は様々な活性化物質(前立腺、脾、腎、

Fig. 7. Inhibition of hyaluronidase activity of fully sulfated polysaccharides.

Fig. 8. IC₅₀ of fully sulfated polysaccharides on hyaluronidase activity.

aluronidase is modulated by various activators (adrenalin, histamine and acid phosphatases formed in the prostate, spleen, kidney, erythrocytes and platelets) and inhibitors (antihistamine, salicylate, heparin, dicumarene, vitamin C and flavonoids) (78). Among the glycosaminoglycans, only heparin shows hyaluronidase inhibitor. Chemically *O*-sulfonated glycosaminoglycans showed IC₅₀ values of hyaluronidase inhibition that correlated with the degree of *O*-sulfonation. Heparin was found to inhibit hyaluronidase activity in a noncompetitive fashion, while sulfonated HA strongly inhibited hyaluronidase through both competitive and noncompetitive effects (79).

Until recently, the most commonly used HAase assays were based on the measurement of the generation of new reducing *N*-acetylglucosamido groups, or a decrease in viscosity, turbidity, and microtiter-based assays (80). Such assays are often either insensitive, lack specificity, and are complicated, requiring skillful assay techniques.

The HAase inhibitory activity of the persulfonated polysaccharides was determined using a flow injection assay (FIA) (79). All experiments were performed in duplicate. As shown in Figure 7, each of the fully sulfated polysaccharides inhibited HAase in a concentration-dependent fashion. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of fully sulfated polysaccharides on HAase (Figure 8) was 3.08 mg/mL (sulfated xylan), 3.44 mg/mL (sulfated amylose), 3.45 mg/mL (sulfated curdlan), 4.0 mg/mL (sulfated cellulose), and 8.4 mg/mL (sulfated galactan). All of fully sulfated polysaccharides showed less inhibition than sulfated hyaluronan (2.81 mg/mL). The sulfated amylose, cellulose, curdlan, and xylan exhibited the HAase activity inhibition at the same level, whereas the inhibitory effect of sulfated galactan was approximately 2-fold less than that of the others.

G. Structure, SAR and Conclusions

Sulfated polysaccharides have been found in a variety of

赤血球、血小板で産生されるアドレナリン、ヒスタミン、酸性ホスファターゼ)や阻害物質(抗ヒスタミン、サリチル酸、ヘパリン、ジクマレン、ビタミンC、フラボノイド)によって調節される(78)。グリコサミノグリカンの中では唯一ヘパリンが阻害活性を示す。化学的 *O*-硫酸化グリコサミノグリカンのヒアルロニダーゼに対する IC₅₀ は、硫酸化度に依存していた。ヘパリンのヒアルロニダーゼ阻害は非競合的であることが見出され、一方硫酸化したヒアルロン酸は競合的、非競合的の両者による阻害であることが明らかになっている(79)。

つい最近まで、最も汎用されていたヒアルロニダーゼ活性測定法は、生成する *N*-アセチル基の還元末端を測定するか、あるいはヒアルロン酸水溶液の示す粘度、濁度の測定あるいはマイクロタイターアッセイ (80) であった。これらの測定法はしばしば感度、特異性のどちらかに欠け、複雑で熟練を要する方法である。

今回ヒアルロニダーゼ活性の測定法は私たちが開発したFIAによった(79)。すべての測定は2回ずつ行い、図7に示すように個々の硫酸化した多糖は濃度依存的にヒアルロニダーゼを阻害した。個々の硫酸化多糖のヒアルロニダーゼに対する IC₅₀ はそれぞれ 3.08 µg/mL (硫酸化キシラン)、3.44 µg/mL (硫酸化アミロース)、3.45 µg/mL (硫酸化カードラン)、4.0 µg/mL (硫酸化セルロース)、8.4 µg/mL (硫酸化ガラクトン) であった (図8)。すべての調べた硫酸化多糖は硫酸化ヒアルロン酸に比べて (2.81 µg/mL) 低い阻害活性であった。硫酸化アミロース、セルロース、カードラン、キシランはほとんど同じレベルのヒアルロニダーゼ阻害活性を示したのに対し、硫酸化ガラクトンはこれらの約2分の1の阻害活性しか示さなかった。

G. 構造、SAR および結論

硫酸化多糖類のは多くの海洋動物、植物微生物に広く見出

marine animals, plants and microorganisms. Lentinan [$\beta(1\rightarrow3)$ -glucan] sulfate, curdlan [$\beta(1\rightarrow3)$ -glucan] sulfate and chemically sulfonated galactan [$\beta(1\rightarrow3)$ -galactan] from marine clam species *Meretrix petechialis* showing potent anti-HIV activity, but very low anticoagulant activity. The mechanism of action of sulfated polysaccharides on various biological activities are believed to be dependent on their polysaccharide backbones as well as the molecular weight, the degree and position of sulfo groups on sugar residues, and interestingly on the glycosidic linkages present in these polysaccharides. The correlation between biological activity and structure of polysaccharides having simple core structure and high homogeneity is leading to a better understanding of the relationship between structure and biological activity. Cellulose, amylose, curdlan, and galactan are useful for such studies as they are all naturally abundant and simple $\beta(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow4)$, $\beta(1\rightarrow3)$ -glucans and $\beta(1\rightarrow3)$ -galactan. After being chemically fully sulfonated using pyridine-sulfur trioxide in dimethylformamide their structure is determined. ^1H NMR spectroscopy, IR spectroscopy and chemical compositional analysis is used to show that chemical sulfonation is complete. Fine structural details including conformational flipping of core sugar residues caused by negative charges on sulfo groups, can often also be observed. NMR spectroscopy at 30°C demonstrates an altered conformation of monosaccharide residues from $^4\text{C}_1$ to $^1\text{C}_4$ in the persulfonated polysaccharide derivatives. The molecular weight of these fully sulfated polysaccharides can be estimated between 8,000 and 39,000 based on gel permeation chromatography with conductivity detection or by gradient PAGE. Fully sulfated $1\rightarrow4$ and $1\rightarrow3$ linked polysaccharides show expected enhanced anti-factor IIa activity in comparison with the activity displayed by heparin (172 units/mg) standard. A conformational change in the monosaccharide residues is responsible for this substantial increase in anti-factor IIa activity. It is also interesting that desulfonation at a specific position, C-6, causes a loss of the activity on only $1\rightarrow3$ linked fully sulfated polysaccharides, without affecting on the activity of $1\rightarrow4$ linked fully sulfated polysaccharides. Consequently, a pair of neighboring sulfo groups such as at C-2/C-3 or C-4/C-6 might be required for this anticoagulant activity. These $1\rightarrow4$ linked fully sulfated polysaccharides that had been 6-*O*-desulfonated might be useful in eliminating nonspecific binding to proteins preventing side-effects associated with clinical anticoagulants, such as thrombocytopenia. The molecular weight of these sulfated polysaccharides might also play a role in the anticoagulant activity of fully sulfated polysaccharides.

In conclusion, the sulfonation of polysaccharides can result in increased specific and non-specific binding to a wide range of biologically important proteins. Polysaccharide chain sequence and sulfo group substituents and conformational stereostructure all play a significant role in the observed bioactivity of sulfated polysaccharides.

されている。レンチナン (枝分かれ $\beta 1\rightarrow 3$ ガラクタン) 硫酸、カードラン ($\beta 1\rightarrow 3$ ガラクタン) 硫酸および化学的に硫酸化した二枚貝由来ガラクトンは抗 HIV 活性を示したが、非常に低い抗凝固活性をもつ。様々な生物活性における硫酸化多糖類の作用メカニズムは、多糖類の糖鎖骨格、分子量、硫酸基の位置だけでなく、興味深いのはグリコシド結合にも依存すると信じられている。単純なコア構造と高い均一性を持つ多糖類の構造と活性相関は、構造と活性との間の関係を理解する上で重要である。セルロース、アミロース、カードラン、そしてガラクトンはこれらが天然に豊富に存在すること、単純な $\beta 1\rightarrow 4$ 、 $\alpha 1\rightarrow 4$ グルカン、 $\beta 1\rightarrow 3$ ガラクタンであることから、今回のような研究に役に立つ。DMSO 中で三酸化イオウ-ピリジン錯体を用いた化学的硫酸化後、これらの構造は同定された。プロトン NMR、赤外、化学分析を用いて分析したところ調製した硫酸化多糖は完全に硫酸化されていた。硫酸基の陰電荷による反発が原因で起こる本来の糖残基のコンホメーションの反転が明瞭に確認された。30℃で測定した完全硫酸化多糖の NMR データは、それを構成する単糖のコンホメーションが $^4\text{C}_1$ から $^1\text{C}_4$ に変化していることを示していた。またこれらの完全硫酸化多糖類の分子量は、PAGE および電気伝導度検出器を装着したゲルろ過 HPLC で調べたところ 8000 から 34000 と推定できた。完全硫酸化した $1\rightarrow 4$ 結合および $1\rightarrow 3$ 結合した多糖は、ヘパリン標準品 (172 単位/mg) と一緒に調べたところ、期待通り抗 IIa 活性を増強した。単糖残基のコンホメーション変化がこの抗 IIa 活性の実質的な増加に寄与していた。また、完全硫酸化体から 6 位硫酸基を除くと $1\rightarrow 3$ 結合した多糖の場合のみ活性を失い、 $1\rightarrow 4$ 結合した多糖では影響がなかった。従って隣接する C-2/C-3 や C-4/C-6 などの硫酸基が凝固活性に必要なことに違いない。これら $1\rightarrow 4$ 結合した多糖の完全硫酸化脱 6 硫酸化体は血小板減少症などの副作用の原因となる非特異的なタンパク質との結合を避けられる意味で有用であるに違いない。これら硫酸化多糖類の分子量もまた完全硫酸化多糖類の示す抗凝固活性に役割を演じているはずである。

結論として、多糖類の硫酸化は特異的・非特異的な様々なタンパク質への結合を引き起こすことができ、糖鎖配列、硫酸基の数や位置、立体構造などの全てが硫酸化多糖に観察される生物活性に重要な役割を演じている。

References

- Hooper, L. V., Manzella S. M., and Baenziger J. U. (1996) *FASEB J.* **10**, 1137–1146
- Linhardt R. J., and Toida T. (1997) In *Carbohydrate in Drug Designing*, (J. W. Zbigniew, A. N. Karl, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 277–341
- Witvrouw M. and De Clercq E. (1997) *Gen. Pharmac.* **29**, 497–511
- Stringer S. E. and Gallagher J. T. (1997) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **29**, 709–714
- Lindhahl U., Backstrom G. Thunberg L. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9826–9830
- Villanueva G. B. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 2531–2536
- Gunay N. S., Linhardt, R. J. (1999) *Planta Med.* **65**, 301–306
- Linhardt, R. J., Hileman R. E. (1995) *Gen. Pharmac.* **26**, 443–451
- Greiling H., Scott J. (eds.) (1989) *Keratan sulfate chemistry, biology, chemical pathology*, T. J. Press Ltd., Great Britain
- Suzuki A., Toyoda H., Toida T., Imanari T. (2001) *Glycobiology* **11**, 57–64
- Swarte V. V., Joziassse D. H., Mebius R. D., van den Eijnden E., Kraal G. (1998) *Cell Adhes. Commun.* **6**, 311–322
- Linnemann G., Reinhart K., Parade U., Philipp A., Pfister W., Straube E., Karzai W. (2000) *Intensive Care Med.* **26**, 1540–1546
- Millet J., Jouault, S. C., Mauray S., Theveniaux J., Sternberg, C., Boisson V. C., Fischer A. M. (1999) *Thromb. Haemost.* **81**, 391–395
- Carlucci M. J., Pujol C. A., Ciancia, M., Nosedo, M.D., Matulewicz M. C., Damonte E. B., Cerezo A. S. (1997) *Int. J. Biol. Macromol.* **20**, 97–105
- Tobacman J. K., Wallace R. B., Zimmerman M. B. (2001) *Med. Hypotheses.* **56**, 589–598
- Hirano S. (1996) *Biotechnol. Annu. Rev.* **2**, 237–258
- van der Lubben I. M., Verhoef J. C., Borchard G., Junginger H. E. (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.* **14**, 201–207
- Muzzarelli R. A., Tanfani F., Emanuelli M., Pace D. P., Chiurazzi E., Piani M. (1984) *Carbohydr. Res.* **126**, 225–231
- Ghosh P. (1999) *Semin. Arthritis. Rheum.* **28**, 211–267
- Flexner C., Barditch-Crovo P. A., Kornhauser D. M., Farzadegan H., Nerhood L. J., Chaisson R. E., Bell K. M., Lorentsen M. J., Hendrix C. W., Petty B. G. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 2544–2550
- Miao H. Q., Ishai-Michaeli R., Peretz T., Vlodavsky I. (1995) *J. Cell Physiol.* **164**, 482–490
- Yoshida T. (2001) *Prog. Polym. Sci.* **26**, 379–441
- Edwards G., Breckenridge A. M. (1988) *Clin. Pharmacokinet.* **15**, 67–93
- Firsching-Hauck A., Nickel P., Yahya C., Wandt C., Kulik R., Simon N., Zink M., Nehls V., Allolio B. (2000) *Anticancer Drugs* **11**, 69–77
- Garg H. G., Joseph P. A., Thompson B. T., Hales C. A., Toida Imanari T., T., Capila I., Linhardt, R. J. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 228–233
- Logeart D., Prigent-Richard S., Jozefonvicz J., Letourneur D. (1997) *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 376–384
- Haroun-Bouhedja F., Ellouali M., Siquin C., Boisson-Vidal C. (2000) *Thromb. Res.* **100**, 453–459
- Brown G. D., Gordon S. (2001) *Nature* **413**, 36–37
- Blondin C., Fischer E., Boisson-Vidal C., Kazatchkine M. D., Jozefonvicz J. (1994) *Mol. Immunol.* **31**, 247–253
- Paper D. H., Vogl H., Franz G., Hoffman R. (1995) *Macromol. Symp.* **99**, 219–225
- Kasbauer C. W., Paper D. H., Franz G. (2001) *Carbohydr. Res.* **330**, 427–430
- Zhang L., Zhang M., Zhou Q., Chen J., Zeng F. (2000) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2172–2178
- Mishima T., Murata J., Toyoshima M., Fujii H., Nakajima M., Hayashi T., Kato T., Saiki I. (1998) *Clin. Exp. Metastasis* **16**, 541–550
- Fernandez L. E., Valiente O. G., Mainardi V., Bello J. L., Velez H., Rosado A. (1989) *Carbohydr. Res.* **190**, 77–83
- Beeson J. G., Chai W., Rogerson S. J., Lawson A. M., Brown G. V. (1998) *Infect. Immun.* **66**, 3397–3402
- Schaeffer D. J., Krylov V. S. (2000) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 208–227
- De Clercq E. (2000) *Med. Res. Rev.* **20**, 323–349
- Takano R., Yoshikawa S., Ueda T., Hayashi K., Hirase S., Hara S. (1996) *J. Carbohydr. Chem.* **15**, 449–457
- Maaroufi R.M., Tapon-Bretaudiere, J., Mardiguan J., Sternberg C., Dautzenberg M. D., Fischer A. M. (1990) *Thromb. Res.* **59**, 749–758
- Nagasawa K., Uchiyama H., Wajima N. (1986) *Carbohydr. Res.* **158**, 183–190
- Toida T., Maruyama T., Ogiata Y., Suzuki A., Toyoda H., Imanari T., Linhardt, R. J. (1999) *Int. J. Biol. Macromol.* **26**, 233–241
- Toida T., A. Suzuki, K. Nakajima, A. Chaidedgumjorn, and Imanari T. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 393–399
- Kantor T. G., Schubert M. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 152–153
- Inoue Y., Nagasawa K. (1976) *Carbohydr. Res.* **46**, 87–95
- Nagasawa K., Inoue Y., Kamata T. (1977) *Carbohydr. Res.* **58**, 47–55
- Takano R., Matsuo M., Kamei-Hayashi K., Hara S., Hirase S. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1577–1580
- Matsuo M., Takano R., Kaemi-Hayashi K., Hara S. (1993) *Carbohydr. Res.* **241**, 209–215
- Takano R., Ye Z. Z., Ta T. V., Hayashi K., Kariya Y., Hara S. (1998) *Carbohydr. Lett.* **3**, 71–77
- Nishino T., Aizu Y., Nagumo T. (1991) *Agric. Biol. Chem.* **55**, 791–796
- Mathews M. B. (1975) In “Connective tissue: macromolecular structure and evolution.” Berlin: Springer-Verlag, pp. 93–206
- Santos J. A., Mulloy B., Mourao P. A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 669–677
- Kim Y. S., Jo Y. Y., Chang I. M., Toida T., Park Y., Linhardt, R. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 11750–11755
- Amornrut C., Toida T., Imanari T., Woo E. R., Park H., Linhardt, R. J., Wu S. J., Kim Y. S. (1999) *Carbohydr. Res.* **321**, 121–127
- Alves A. P., Mulloys B., Diniz J. A., Mourao P. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 6965–6971
- Pereira M. S., Mulloys M., Mourao P. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7656–7667
- Farias W. R., Valente V., Pereira M. S., Mourao P. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 29299–29307
- Anderson F. A., Wheeler H. B. (1992) *J. Vasc. Surg.* **16**, 707–714
- Goldhaber S. Z., Morpurgo M. (1992) *JAMA.* **268**, 1727–1733
- Herbert J. M., Bernat A., Maffrand J. P. (1992) *Blood* **80**, 2281–2286
- Rosenberg R. D., Aird W. D. (1999) *N. Engl. J. Med.* **340**, 1555–1564
- Leyvraz P. F., Richard J., Bachmann F. (1983) *N. Engl. J. Med.* **309**, 954–958

62. Collins R., Scrimgeour A., Yusuf S., Peto R. (1988) *N. Engl. J. Med.* **318**, 1162–1173
63. Turpie A. G., Gallus A. S., Hoek J. A. (2001) *N. Engl. J. Med.* **344**, 619–625
64. Crafoord C., Jorpes E. (1941) *JAMA*. **116**, 2831
65. Hull R. D., Pineo G. F. (1993) *Haemostasis* **23** Suppl 1, 2–9
66. Weitz J. I. (1997) *N. Engl. J. Med.* **337**, 688–698
67. Lindahl U., Backstrom G., Thunberg L. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9826–9830
68. Bourin M. C., Lindahl U. (1993) *Biochem. J.* **289**, 313–330
69. Warkentin T. E., Levine M. N., Hirsh J. (1995) *N. Engl. J. Med.* **332**, 1330–1335
70. Sawabe Y., Nakagomi K., Iwakami S., Suzuki S., Nakazawa H. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*. **1137**, 274–278
71. Menzel E. J., Farr C. (1998) *Cancer Lett.* **131**, 3–11
72. Meyer M. F., Kreil G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 4543–4547
73. Knudson W. (1996) *Am. J. Physiol.* **148**, 1721–1726
74. Sherman L., Sleeman J., Herrlich P., Ponta H. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 726–733
75. Esters J. M., Adzick N. S., Harrison M. R., Longaker M. T., Stern R. (1993) *J. Pediatr. Surg.* **28**, 1227–1231
76. West D. C., Kumer S. (1989) *Ciba. Found. Symp.* **13**, 187–201
77. Edelstam G. A., Laurent U. B., Lundkvist O. E., Fraser J. R., Laurent T. C. (1992) *Inflammation* **16**, 459–469
78. Li M. W., Yudin A., Vande Voort C. A., Sabeur K., Primakoff P., Overstreet J. W. (1997) *Biol. Reprod.* **56**, 1383–1389
79. Toida T., Ogita Y., Suzuki A., Toyoda H., Imanari T. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **370**, 176–82
80. Frost G. I., Csoka T. B., Wong T., Stern R. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 10–15

Received on February 2, 2003, accepted on March 31, 2003

Profile of the Authors

Toshihiko Toida graduated in Analytical Chemistry in 1978 at Chiba University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and obtained his Ph.D. in Analytical Chemistry in 1983 at the same University. From 1983 to 1989, he was Research Associate/Lecturer in the Department of Biochemistry in Teikyo University, College of Medicine directed by Professor Ineo Ishizuka, and he was focusing on the structure and function of acidic glycosphingolipids. From 1989 to 2003, he was Associate Professor in Chiba University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, directed by Professor Toshio Imanari. He has spent a sabbatical year at Professor Robert Linhardt's laboratory in the University of Iowa, College of Pharmacy in 1996. Currently, he was promoted to Professor at Chiba University. His main research interests are focusing on the structures and physiological functions of sulfated polysaccharides from the natural products such using NMR, MS and SPR etc.

★★★★★★

Amornrut Chaidedgumjorn is currently a Lecture in College of Pharmacy at Silpakorn University in Thailand. She received her master degree (1999) and Ph.D. (2002) from Chiba University, Japan. She has returned to Silpakorn University and is a Lecture in Silpakorn University, College of Pharmacy. Her major research interests focus on the structure and biological functions of glycoconjugates from the natural products.

★★★★★★

Robert J. Linhardt received his B. S. degree in chemistry from Marquette University (1975) and his Ph.D. degree from Johns Hopkins University in organic chemistry (1979). His interest in heparin lyases began during his postdoctoral studies at Massachusetts Institute of Technology. It was there, while working with Professor Robert Langer on a bioreactor to remove heparin from the blood, that he first purified the heparin lyase enzymes. He continued this work on heparin, becoming a faculty member at the University of Iowa in 1982, with a focus on heparin structure and heparin's biological activities mediated through its interaction with proteins. Dr. Linhardt is currently the F. Wendell Miller Distinguished Professor of Chemistry, Medicinal

Chemistry and Chemical and Biochemical Engineering at the University of Iowa. Dr. Linhardt will be joining the faculty at Rensselaer Polytechnic Institute as the Constellation Chair of Biocatalysis and Metabolic Engineering this summer.

Dr Linhardt has published over 300 research papers and holds 35 patents. He is the regional editor of *Current Organic Synthesis* and *Mini Reviews in Organic Chemistry* and is on the editorial boards of *Analytical Biochemistry* and *Applied Biochemistry and Biotechnology* and the *Journal of Carbohydrate Chemistry*. He has been honored with the Horace S. Isbell award from the Carbohydrate Division of the American Chemical Society, the AACP Volwiler Research Achievement Award for Pharmaceutical Research sponsored by Abbott Pharmaceuticals and the Claude S. Hudson Award from the American Chemical Society.