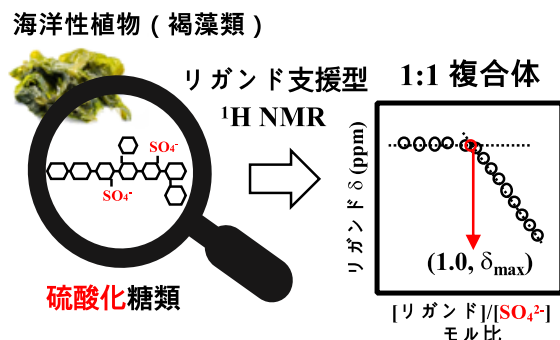


硫酸化糖における硫酸含量の非破壊的推定のためのリガンド支援型¹H核磁気共鳴法

～海藻由来多糖の硫酸基定量に向けたリガンド支援型核磁気共鳴法の開発～

朴俊夏*, 宮崎義之****, 中野勇人***, 松井利郎*

(*九州大学農学研究院, **NPOフコイダン研究所, ***株式会社ヴェントゥーノ)



リガンド支援型¹H-NMR法を用いた海藻由来多糖類の硫酸基定量

硫酸基とモル比1:1で相互作用するリガンドを用いた¹H-NMR法を開発し、海藻から抽出した硫酸化多糖の硫酸基含量を簡便かつ非破壊的に推定することに成功した。

はじめに

硫酸化多糖類は、海藻表面を覆う粘質成分中に存在し、糖鎖を構成する糖に硫酸基が結合した特殊な構造を有している。フコイダンやカラギーナンなどの海藻由来の硫酸化多糖は、抗血液凝固、抗血管新生、抗がんおよび免疫増強作用などの様々な生理機能を持つことが報告されている¹⁻⁶⁾。興味深いことに、それらの生理活性は糖の硫酸基含量と密接な関連がある^{1,2,5-7)}。Youらは、フコイダンが硫酸基含量依存的にがん細胞の増殖に対する抑制作用を発揮することを明らかにしている⁶⁾。Haroun-Bouhedjaらは、アスコフィラム由来の硫酸化多糖が、強い抗血液凝固作用および抗増殖活性を有することを¹⁾、Koyanagiらは、フコイダンが血管内皮細胞増殖因子の結合阻害により血管内皮細胞増殖を抑制することを報告している²⁾。

硫酸化糖の生理学的な有用性が示される一方で、硫酸基と生理機能との相関は十分に理解されていない。その要因のひとつに、一般的な硫酸基定量⁸⁾では、酸加水分解によって糖鎖構造が破壊されてしまうことが挙げられる。また、この方法では煩雑な抽出・精製などの手間のかかる工程が必要とされるうえ、抽出工程の再現性が低い^{2,6)}。そのため、生理活性多糖の硫酸基含量を測定するための簡便かつ信頼できる方法が求められている。

核磁気共鳴 (NMR) 装置を用いた分析法は、簡便で信頼性の高い非破壊的な定量分析が可能である。最近の研究において、フルーツジュース中のブドウ糖やショ糖などの成分定量が報告され⁹⁻¹¹⁾、食品の品質評価への応用が期待されている。一方、NMRを用いた硫酸化糖の定量分析を実現するためには、構成糖に由来するシグナルや硫酸基から生じるシグナルを確実に分別検出する必要がある¹²⁾。しかし、構成糖の一般的な指標シグナルとされるアノマー炭素プロトンの化学シフト (δ) 値 (4.5-5.8 ppm) は、多くの場合において溶液を構成する他の成分のシグナルによる干渉を受ける^{9,12)}。また、硫酸化糖の場合、硫酸基置換の効果によってシグナルの高磁場シフトが生じ¹²⁾、他の糖骨格プロトンのδ値と重複する⁸⁾。それらの問題を回避する新たな分析法として、本研究では、硫酸化糖と複合体を形成し得るリガ

ンドを用い、その δ 値をモニタリングするNMR滴定法^{13,14}応用した硫酸基定量を試みた。NMR滴定法は、イオン性相互作用によって生じる化学シフト値の変化 ($\Delta\delta$) をモニタリングすることで、対となる2分子による複合体形成を化学量論に基づき評価・デザインする方法である^{13,15-17}。硫酸陰イオンと対をなす陽イオン分子が相互作用した際に顕著な $\Delta\delta$ を生じ、それらが1:1複合体を形成することを示した研究報告がなされている^{15,16,18}。本研究では、硫酸基を有する市販の単糖~4糖を用い(図1)、滴定理論に基づいて硫酸化糖と1:1複合体を形成する至適リガンド分子を選抜し、リガンド支援型¹H NMR法の硫酸基含量測定への応用を検証した。また、市販の天然硫酸化多糖であるフコイダン中の硫酸基含量を同リガンド支援型¹H NMR法によって評価した。

実験方法 (詳細は、元文献参照のこと)

試薬

各種硫酸化糖：ガラクトース-6-*O*-硫酸 (G6S)、ネオカラビオース-4-*O*-硫酸 (NB4S)、ネオカラテトラオース-4,1,3-*di-O*-硫酸 (NTdS)、 β -ガラクトビオース (GalB) および 3α - 4β - 3α -ガラクトテトラオース (GalT) は、Dextra Laboratories Ltd. (Shinfield, UK) より購入した。ヒバマタ (*Fucus vesiculosus*) 由来フコイダンは、Sigma-Aldrich Co. ($\geq 95\%$ pure, Cat. No. F8190, St. Louis, MO) より購入した。

リガンド-硫酸化糖溶液の調製

硫酸化糖 (G6S, NB4S, NTdS) は重水に溶解し、前処理としてTOYO-PAK IC-SP M cartridge (東ソー株式会社, 東京) に通すことでナトリウムイオンを除去した。各リガンドを重水に溶解し、糖とのモル比が 0.2:1~3:1 (リガンド:硫酸化糖) となるよう混合した。硫酸基を持たないガラクトース (Gal)、GalBおよびGalTを硫酸化糖の比較対象として用い、硫酸基に対するリガンドの作用特性を検証した。陰イオン性官能基であるカルボキシル基を有する糖にリガンドが結合することを防止する処理法を評価するため、Jansen and Jangらの方法¹⁹)に従ってガラクトン酸のエステル化処理を行った後、¹H NMR測定に供した。

ヒバマタ由来フコイダンの硫酸基含量の定量

従来法によるフコイダンの硫酸基定量は、以下に略説する塩化バリウム-ロジゾン酸法により行った。フコイダン (10 mg) を2 mLの3 M 塩酸水溶液に溶解して100°Cで2時間加熱することで加水分解した²⁰。減圧蒸発をくり返すことで塩酸を除去した後、一部 (0.5 mL) を

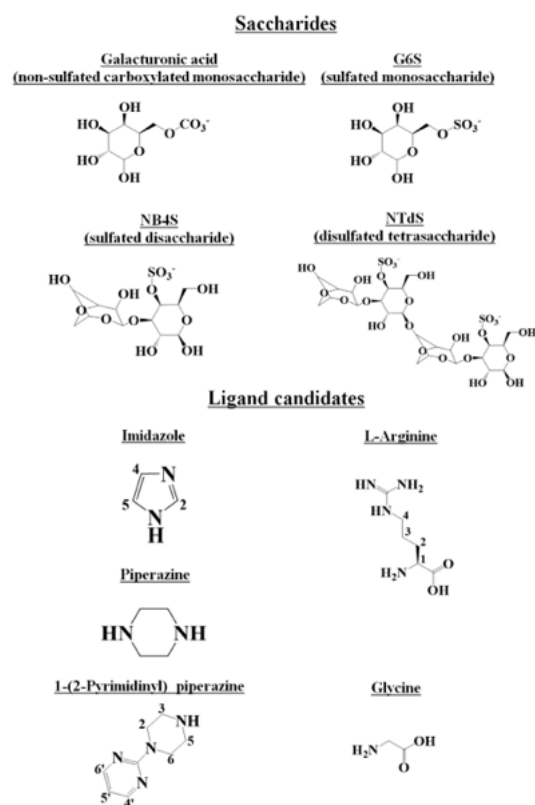


Fig. 1 本研究に使用した糖 (ガラクトン酸; G6S, ガラクトース-6-*O*-硫酸; NB4S, ネオカラビオース-4-*O*-硫酸; NTdS, ネオカラテトラオース-4,1,3-ジ-*O*-硫酸) およびリガンド候補分子の化学構造。

採って1.0 mLの10 mM塩化バリウム緩衝液, 1.5 mLの50 $\mu\text{g/mL}$ ロジゾン酸エステルおよび2.0 mLのエタノールと混合し、室温で10 min静置した。恒温の後、520 nm 吸光度を測定した。硫酸ナトリウムを標準物質として0–24 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で硫酸濃度の検量線を作製し、フコイダン中の硫酸基含量を算出した。

リガンド支援型 ^1H NMR法では、イミダゾール濃度領域が1.25-6.25 mmol-ligand/g-fucoidanとなるよう重水に溶解し、フコイダン (0.08 mg-fucoidan/mL) と混合した後に上述と同様に測定した。

結果と考察

^1H NMR装置を用いた硫酸含量測定に用いるリガンドの選定

本研究において定量分析の対象となる硫酸化糖中の硫酸基 (Fig. 1, $-\text{SO}_3^-$; 陰イオン性) との複合体形成に適した候補化合物は、対イオンとして陽イオン特性を有することが求められる。先の研究でアザ環状化合物^{13,14,17}やアミノ基/グアニジウム基^{15,16,18}の硫酸イオン選択的な結合が報告されており、本研究では、同様の典型構造を持ったイミダゾール、ピペラジン、1-(2-ピリミジニル)ピペラジン、グリシンおよびL-アルギニンをリガンド候補化合物として検討を進めた (Fig. 1)。Fig. 2 には、リガンド単独および硫酸化糖 (NB4S) 共存下 (リガンド: 硫酸化糖モル比=1:1) におけるNMR測定の結果を示す。5つの候補の内、イミダゾール、ピペラジンおよびグリシンにおいて δ 値の顕著な低磁場シフト ($\Delta\delta > 0.15$ ppm) が観察された。一方、L-アルギニンではNB4Sと混合した際にシグナル幅が広がり明瞭な結果が得られず、1-(2-ピリミジニル)ピペラジンについては $\Delta\delta$ 値が比較的小さかった。また、ピペラジンとグリシンの $\Delta\delta$ 値は、それぞれ0.28および0.15と高かったものの、それらの δ 値 (およそ3.5 ppm) は糖の δ 領域と重複していた¹²)。対照的に、イミダゾールでは、NB4Sが共存した際に芳香環プロトン δ 値の明確な低磁場への変化 ($\Delta\delta$) が示された (H4,5 : $\Delta\delta = 0.15$ ppm, 7.15 to 7.45 ppm; H2 : $\Delta\delta = 0.79$ ppm, 7.80 to 8.59 ppm)。以上の結果から、硫酸化糖に対する適切なリガンドとしてイミダゾールを選択した。

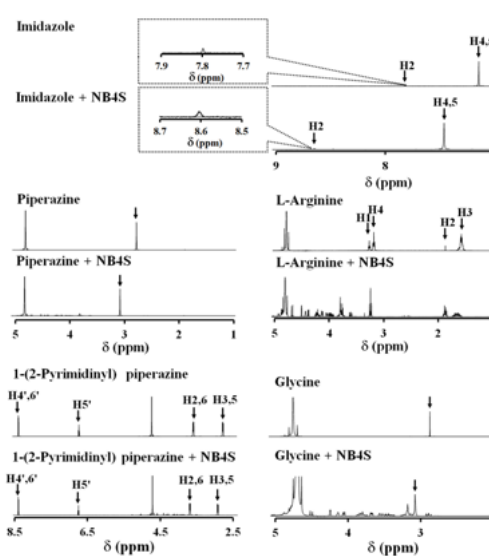


Fig. 2 モル比1:1でNB4S (8.3 mM) を添加した時のリガンド候補分子 (8.3 mM) における化学シフト値の変化。 ^1H NMR法の測定条件は、実験方法の項に記載。矢印は、NB4Sと複合体を形成した際のリガンド候補分子における標的プロトンシグナルを示す。

ネオカラビオース4-O-硫酸を用いた ^1H NMR法による硫酸基定量

硫酸化糖との複合体形成がイミダゾールプロトンの δ 値に与える影響をより詳細に検討するため、イミダゾールとNB4Sをモル比0.2 : 1~3:1で混合し、各モル比に対する δ 値の変化を検討した。Fig. 3A (省略) に示されるように、モル比1:1まで (硫酸化糖よりもイミダゾールが少ない時) はイミダゾールプロトンの δ 値に変化は認められず、モル比が1:1を越えた場合 (イミダゾールが硫酸化糖よりも多くなった時) に、 δ 値が高磁場側に大きくシフトした。これは、遊離あるいは飽和以上のイミダゾール分子が存在するようになったためと考えられた。飽和モル比 (1:1) に至るまで δ 値が変化しなかったことから、イミダゾールと硫酸基は

等量でイオンの相互に相互作用し1:1複合体を形成することが示された。Fig. 3B (省略) のように、NMRによる δ 測定値をモル比 (イミダゾール vs. NB4S) の関数としてプロットすると、等量モル比 (1:1) において変曲点が認められる。この事は、変曲点におけるイミダゾール濃度が糖の硫酸基含量に相当することを意味しており、既知濃度のイミダゾールから硫酸化糖の硫酸基含量を推定することが可能である。

¹H NMRによるイミダゾールと硫酸化糖との複合体形成の検証

リガンドと糖硫酸基との複合体形成は、硫酸基の数や硫酸化多糖の分子サイズおよび構造によって影響される^{6,22)}。そこで、本研究ではイミダゾール分子と糖硫酸基の化学量論的な複合体形成を立証するため、硫酸基を一つ有する単糖および二糖 (G6SおよびNB4S) ならびに硫酸基を二つ有する四糖 (NTdS) を用いてイミダゾールの $\Delta\delta$ 値を測定した。また、それらに対応する非硫酸化糖、すなわち、単糖、二糖および四糖 (それぞれ、Gal、GalBおよびGalT) を比較対象として用いた。Fig. 4 (省略) に示されるように、非硫酸化糖を添加した際にはイミダゾールプロトンの $\Delta\delta$ 値 (7.15 ppm) は変化しなかったが、硫酸化糖を添加した際の¹H NMRデータでは顕著な $\Delta\delta$ 値の変化が観察された。同強度の $\Delta\delta$ 値変化が各硫酸化糖および対応する非硫酸化糖の共存下で観察されたことから、夾雑する糖の存在に関わらず、イミダゾール分子は硫酸化糖 (単糖~四糖) の標的硫酸基を特異的に認識することが示された。既報^{13,15)}におけるDMSO-*d*₆中のイミダゾールと硫酸イオンの結合定数 (350 M⁻¹) から、本研究においてイミダゾールは、硫酸化糖に対して中程度の結合能を持つリガンドとして作用したことが示唆された。

硫酸基の有無の他に留意すべきことは、ガラクトン酸やアルギン酸の様な陰イオン性のカルボキシ基を有する天然海洋性の糖が存在することである^{3,23)}。Ihmらは、ビスイミダゾール塩が硫酸イオンと同様に炭酸イオンとも複合体を形成することを報告しており¹³⁾、カルボキシ基を有する糖がイミダゾールと硫酸基との複合体形成や本研究で検討してきた硫酸基含量推定に影響を及ぼす可能性がある。実際に、ガラクトン酸は、硫酸化糖で観察されたもの (Fig. 4 省略) と同等のイミダゾールプロトンにおける $\Delta\delta$ 値低磁場シフト (7.15 ppm to 7.47 ppm) をもたらした (Fig. 5 省略)。そこで、カルボキシ基のエステル化処理によるブロッキングが、硫酸基選択的な¹H NMR定量分析に効果的か否かを検討し、エステル化されたガラクトン酸 (ガラクトン酸メチルエステル) では δ 値変化が生じないこと、NB4Sによる δ 値変化に影響を及ぼさないことを確認した (Fig. 5 省略)。この結果から、¹H NMR測定に先立つ糖のエステル化が、糖中の硫酸基含量を測定するイミダゾール支援型¹H NMR測定の選択性を保証する有効な前処理法であることが示された。

フコイダンの硫酸基含量推定のためのリガンド支援型 ¹H NMR法の応用

天然硫酸化多糖への本リガンド支援型¹H NMR法の応用を検証するため、代表的な天然多糖であるフコイダンをを用い、従来法の一つである硫酸バリウム-ロジゾン酸法による硫酸基含量測定²⁰⁾と比較検討した。Fig. 6Aに示されるように、イミダゾール濃度が2.0 mmol-imidazole/g-fucoidanを越えるまではイミダゾールプロトンの $\Delta\delta$ は観察されなかったが、2.0 mmol-imidazole/g-fucoidanを越える高濃度範囲では高磁場シフトを生じ、2.0-6.25 mmol-imidazole/g-fucoidanの濃度範囲において直線的に変化した (Fig. 6B, R²=0.993)。変曲点を通る直線の回帰式から、変曲点におけるイミダゾール濃度は0.21 mmol-imidazole/g-fucoidanと算出され、これに相当するフコイダンの硫酸基含量は0.21 mmol/g-fucoidanすなわち20.2 wt%と推定された。また、本NMR法によって推定された硫酸基含量は、従来法の硫酸バリウム-ロジゾン酸法による測定値 (20.1 ± 3.2 wt%, n = 3) と一致しており、硫黄-元素分析による既

報値 (18.2 wt% and 19.0%)^{26,27})と同等であった。以上により、本研究で提案したイミダゾールを用いたリガンド支援型¹H NMR法は、酸加水分解のような煩雑な前処理²⁰)を必要としない非破壊的試料調製によって、単糖から多糖にいたる様々な硫酸化糖の硫酸基含量の推定に適用可能であることが示された。

まとめ

本研究では、¹H NMRをリガンドの $\Delta\delta$ 値を利用した糖の硫酸含量の非破壊的推定に初めて用いた。我々の発見は、イミダゾールが夾雑する糖の影響を受けずに硫酸化糖の分析を行うために最も適したリガンドであり、 δ 値の変化をイミダゾールモル濃度の関数としてプロットすることで硫酸基含量を推定できることを示した。提案したリガンド支援型¹H NMR法は、フコイダンのような天然多糖類を含む様々な硫酸化糖の硫酸基含量推定に、煩雑な前処理を必要とせず広く応用することが可能である。

謝辞

本研究は、日本学術振興会による科学研究費基盤研究 (C) 17K07819 (Y.M.) および学振特別研究員 (DC1) 19J20015 (B.J.) の助成を受けた。

参考文献

1. F. Haroun-Bouhedja, M. Ellouali, C. Sinquin, and C. Boisson-Vidal, *Thromb. Res.*, **2000**, *100*, 453.
2. S. Koyanagi, N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda, and H. Shimeno, *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *65*, 173.
3. M. B. Mansour, R. Balti, L. Yacoubi, V. Ollivier, F. Chaubet, and R. M. Maaroufi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**, *121*, 1145.
4. Y. Miyazaki, Y. Iwaihara, J. Bak, H. Nakano, S. Takeuchi, H. Takeuchi, T. Matsui, and D. Tachikawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2019**, *516*, 245.
5. T. Nishino, Y. Aizu, and T. Nagumo, *Thromb. Res.*, **1991**, *64*, 723.
6. S. You, C. Yang, H. Lee, and B. Y. Lee, *Food Chem.*, **2010**, *119*, 554.
7. S. Palanisamy, M. Vinosha, T. Marudhupandi, P. Rajasekar, and N. M. Prabhu, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, *102*, 405.
8. H. Korva, J. Kärkkäinen, K. Lappalainen, and M. Lajunen, *Starch-Stärke*, **2016**, *68*, 854.
9. R. Cao, F. Komura, A. Nonaka, T. Kato, J. Fukumashi, and T. Matsui, *Anal. Sci.*, **2014**, *30*, 383.
10. R. Cao, A. Nonaka, F. Komura, and T. Matsui, *Food Chem.*, **2015**, *171*, 8.
11. I. Berregi, G. del Campo, R. Caracena, and J. I. Miranda, *Talanta*, **2007**, *72*, 1049.
12. H. N. Cheng and T. G. Neiss, *Polym. Rev.*, **2012**, *52*, 81.
13. H. Ihm, S. Yun, H. G. Kim, J. K. Kim, and K. S. Kim, *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 2897.
14. K. Sato, T. Onitake, and S. Arai, *Heterocycles*, **2003**, *60*, 779.

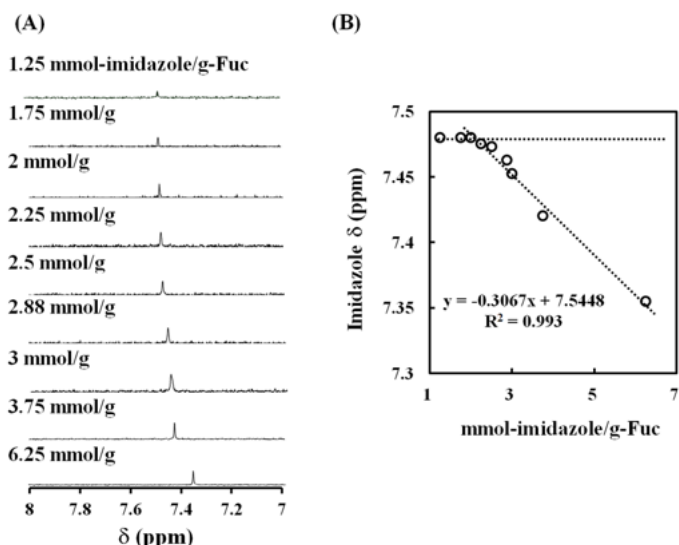


Fig. 6 (A) ヒバマタ由来フコイダン (Fuc, 0.08 mg/mL) 共存下でのイミダゾール化学シフト値の濃度依存的な変化 (1.25–6.25 mmol-imidazole/g-Fuc). (B) モル比 (イミダゾール vs. Fuc) に対するイミダゾール δ 値のプロット。

15. M. Emami Khansari, M. H. Hasan, C. R. Johnson, N. A. Williams, B. M. Wong, D. R. Powell, R. Tandon, and M. A. Hossain, *ACS Omega*, **2017**, *2*, 9057.
16. C. Jin, M. Zhang, L. Wu, Y. Guan, Y. Pan, J. Jiang, C. Lin, and L. Wang, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 2025.
17. J. Yoon, S. K. Kim, N. J. Singh, and K. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 355.
18. M. Berger and F. P. Schmidtchen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2694.
19. E. F. Jansen and R. Jang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, *68*, 1475.
20. L. J. Silvestri, R. E. Hurst, L. Simpson, and J. M. Settine, *Anal. Biochem.*, 1982, *123*, 303.
21. V. Domenici, *Soft Matter*, **2011**, *7*, 1589.
22. C. Oliveira, A. S. Ferreira, R. Novoa-Carballal, C. Nunes, I. Pashkuleva, N. M. Neves, M. A. Coimbra, R. L. Reis, A. Martins, and T. H. Silva, *Macromol. Biosci.*, **2017**, *17*, 1600340.
23. M. T. Ale, J. D. Mikkelsen, and A. S. Meyer, *Mar. Drugs*, **2011**, *9*, 2106.
24. H. Garna, T. H. Emaga, C. Robert, and M. Paquot, *Food Hydrocolloid*, **2011**, *25*, 1219.
25. M. Rayner, K. Östbring, and J. Purhagen, “*Application of Natural Polymers in Food*”, **2016**, Springer International Publishing, Switzerland, 115.
26. K. S. Bittaku, S. Neupane, and S. Alban, *Algal Res.*, **2020**, *45*, 101759.
27. L. E. Rioux, S. L. Turgeon, and M. Beaulieu, *J. Sci. Food and Agric.*, **2007**, *87*, 1630.

出典 : Analytical Sciences 2020; doi.org/10.2116/analsci.20P163