

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05731

研究課題名(和文) マイクロ波を活用した日本脳炎ウイルス感染阻害剤の合成

研究課題名(英文) Microwave-assisted synthesis of infection inhibitor for Japanese encephalitis virus

研究代表者

中野 博文(Nakano, Hirofumi)

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号：50242897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在までに日本脳炎の有効な治療薬は臨床で存在せず、日本脳炎ウイルス(JEV)に罹患した患者に対しては対症療法が基本となっている。JEV感染地域の拡大とその高い致死率から、JEV感染の流行・拡散を防止し、罹患者の予後を改善するためにも、有効な抗JEV薬の開発が切望されている。本研究では、コンドロイチン硫酸E(CS-E)が、JEV感染阻害活性を示すことから、二重結合あるいは硫酸基もつウロン酸、および、CS-Eの繰返二糖単位であるグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンのハイブリッド型ウロン酸を設計し、それらの合成とライブラリーの作成を行い、有効なJEV感染阻害活性を持つ化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CS-Eが、強力なJEV感染阻害活性を示すことから、CS-Eを構成するグルクロン酸、N-アセチルガラクトサミン構造を基本に、硫酸基結合数およびその結合位置の異なる低分子糖誘導体やそれらのハイブリッド型をデザインし、密閉反応装置を積極的に利用して化学合成し、有効なJEV感染阻害活性を有する化合物を探索・同定を行った。JEVの吸着を阻害する化合物は、JEVの宿主認識メカニズムの解明に重要であり、抗JEV薬開発に繋がるリード化合物につながる化合物を本研究期間内に見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：To date, there is no effective treatment for Japanese encephalitis in clinical practice, and symptomatic therapy is the basic treatment for patients affected by Japanese encephalitis virus (JEV). The development of effective anti-JEV drugs is urgently needed to prevent the epidemic and spread of JEV infection in the future and to improve the prognosis of those affected by the disease. In this study, since chondroitin sulfate E (CS-E) shows JEV infection inhibitory activity, we designed uronic acids with double bonds or sulfate groups, and hybrid uronic acids of glucuronic acid and N-acetylgalactosamine, a repeating disaccharide unit of CS-E, and found compounds with effective JEV infection inhibitory activity through the synthesis and library preparation of them.

研究分野：糖質化学

キーワード：ウイルス感染阻害剤 日本脳炎 ウロン酸 化合物ライブラリー 糖質化学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Flavivirus 属の日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus; JEV) は、同属のウェストナイルウイルス、デングウイルス、ジカウイルスなどとともに、世界各地で公衆衛生上の重要な感染症の原因となっている。これらのウイルスは共通して、節足動物であるカによって媒介される。JEV 感染に対する効果的な予防策として培養細胞由来の不活化ワクチンの接種が行われている。しかし、この不活化ワクチンは一般に 2~3 回以上の接種が必要であること、比較的短期間で追加免疫を行う必要があること、高度精製を必要とするためコストが高いこと、稀にワクチン由来のアレルギー反応を起こす可能性があるなどの問題を抱えている。現在までに JEV に対する有効な治療薬は臨床で存在していないことから、JEV に罹患した患者に対しては主に対症療法が基本となっている。JEV 感染地域の拡大とその高い致死率から、JEV 感染の流行・拡散を防止し、罹患者の予後を改善するためにも、有効な抗 JEV 薬の開発が切望されている。

JEV は脂質二重層をもつ E タンパク質に覆われたプラス鎖 RNA ウイルスである。E タンパク質は宿主細胞への吸着のほか、膜融合活性や中和抗体誘導能を持ち、ウイルスによる感染が成立する上で重要な膜表面タンパク質である。JEV に対する宿主受容体として、硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) である heparin やコンドロイチン硫酸 E (CS-E) (図 1) が感染初期段階の宿主認識に関与していることが、報告されている。

GAG はウロン酸 (グルクロン酸 GlcA、イズロン酸 IdoA) およびアミノ糖 (*N*-アセチルガラクトサミン GalNAc、*N*-アセチルグルコサミン GlcNAc) の二糖により構成され、これらを繰り返し単位とする直鎖状の高分子多糖類である GAG は細胞外マトリックスや細胞表面に存在し、GAG 結合性タンパク質と相互作用することで細胞の接着、増殖および分化、成長因子の調節などを行うことが知られている。

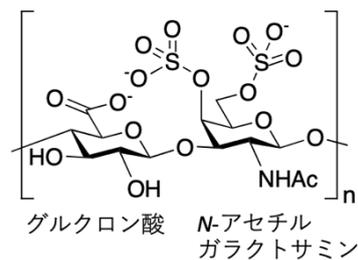


図 1 CS-E

2. 研究の目的

本研究では、CS-E が、強力な JEV 感染阻害活性を示すことから、CS-E を構成する GlcA、GalNAc 構造を基本に、硫酸基結合数およびその結合位置の異なる低分子糖誘導体をデザインを行い、マイクロ波等による加熱を積極的に利用して化学合成し、有効な JEV 感染阻害活性を有する化合物を探索・同定、さらに性状解析を行うことを研究期間内の目的とした。JEV の吸着を阻害する化合物は、JEV の宿主認識メカニズムの解明に重要であるとともに、抗 JEV 薬開発に繋がるリード化合物となることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) *N*-アセチルガラクトサミン誘導体やグルクロン酸誘導体の効率的な合成

既に当研究室で合成技術を持ち合わせている GalNAc 残基や GlcA 残基に着目し、JEV に対する感染阻害効果を持つ CS-E の最小単位および硫酸基の位置と数を特定した。また、鍵段階である硫酸化においてマイクロ波合成の特徴をシンプルに行える最下位の機種(密閉型反応装置)を用いることで、反応時間の短縮および反応条件の均一化を図ることができた。

(2) クリックケミストリーを用いたアグリコンのライブラリー作成

アジド基は Click Chemistry の一種である Cu(I) 触媒アジド-アルキン付加環化反応 (Cu(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition) を利用した変換を行った。研究代表者の元の専門が複素環化学であるので、図 2 に示したような方法でアグリコンを効率的に導入した。

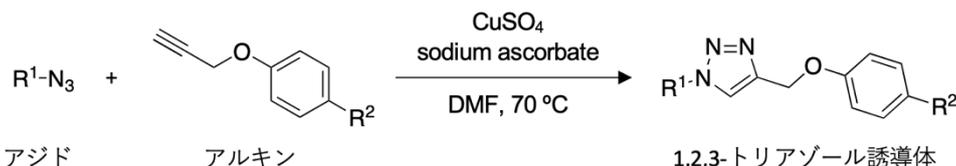


図 2 Cu(I) 触媒アジド-アルキン付加環化反応

(3) 化合物による細胞障害性の評価

合成した化合物存在下における、アフリカミドリザル腎臓由来培養細胞株である Vero 細胞の生存率を、ミトコンドリア代謝活性を測定するための MTT 試薬を用いて評価した。化合物を含まない培地における Vero 細胞の生存率を 100%とした時、指定された濃度の各化合物存在下における細胞の相対的な生存を求めた。

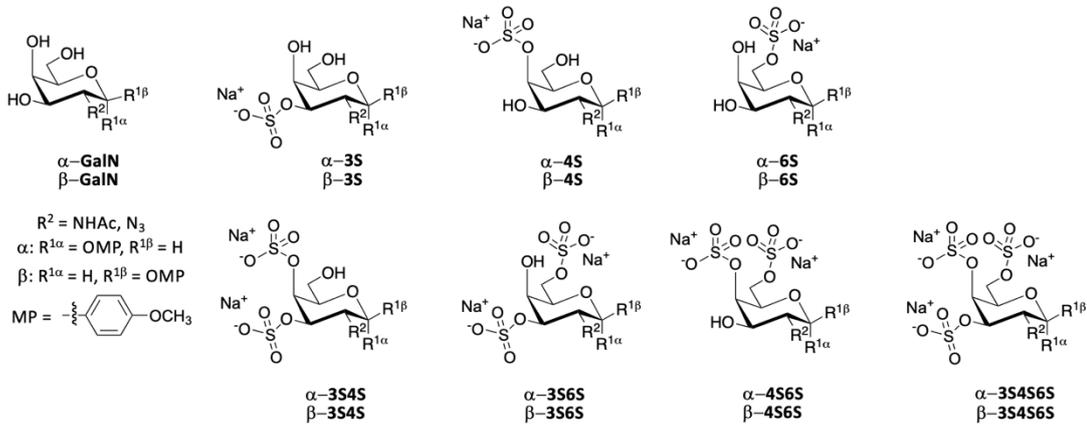
(4) ウイルス感染阻害活性試験

Vero 細胞にウイルス-化合物混合溶液を加え、ウイルス感染させ、細胞を培養する。日本脳炎ウイルス感染細胞内では、吸着・侵入したウイルス量に相関してウイルスゲノムの複製が行われる。感染細胞から総 RNA を抽出、逆転写酵素による相補的 DNA を合成した後、リアルタイム PCR 法により、感染細胞内におけるウイルスゲノムを定量することで、化合物存在下におけるウイルス感染価を評価した。

4. 研究成果

(1) *N*-アセチルガラクトサミン誘導体や 2-アジドガラクトース酸誘導体の効率的な合成

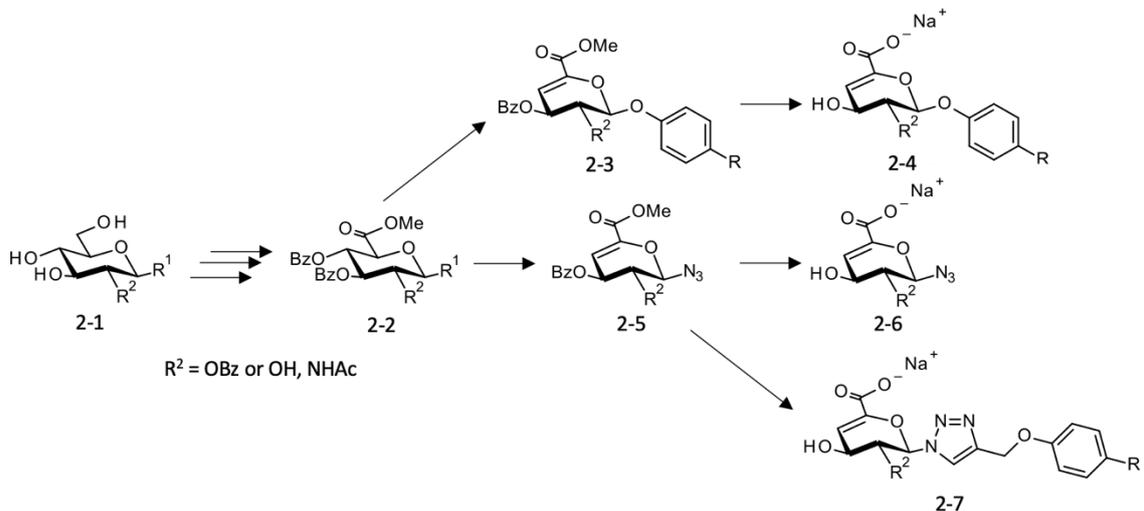
既に当研究室で合成技術を持ち合わせている GalNAc 残基や GlcA 残基に着目し、JEV に対する感染阻害効果を持つ CS-E の最小単位および硫酸基の位置と数を特定した。JEV 感染阻害剤をグルクロン酸誘導体とガラクトサミン誘導体部に分けて行なった。2 位にアジド基を有するガラクトース誘導体の *p*-メトキシフェニルグリコシドについて、3 位、4 位、6 位のモノ硫酸化誘導体 **3S**, **4S**, **6S**、3、4 位と 4、6 位のジ硫酸化誘導体 **3S4S**, **4S6S**、3、4、6 位のトリ硫酸化誘導体 **3S4S6S** を多段階で化学合成し、感染阻害実験に十分な純度になる様に精製を行なった。また、鍵段階である硫酸化においてマイクロ波合成の特徴をシンプルに行える最下位の機種(密閉型反応装置)を用いることで、反応時間の短縮および反応条件の均一化を図ることができた。また、感染阻害効果に重要であるメトキシ基を様々な位置に導入したフェニル基を 1 位に持ち、さらに硫酸基位置の変更した誘導体の合成を効率的に行い、化合物ライブラリーの構築を行うことができた。



(2) 不飽和ウロン酸誘導体の効率的な合成クリックケミストリーを用いたアグリコンのライブラリー作成

コンドロイチン硫酸 E が、JEV 感染阻害活性を示すことから、二重結合をもつウロン酸誘導体、および、コンドロイチン硫酸の繰り返し二糖単位であるグルクロン酸と *N*-アセチルガラクトサミンの両者の特徴を有するハイブリッド型のウロン酸誘導体を設計した。

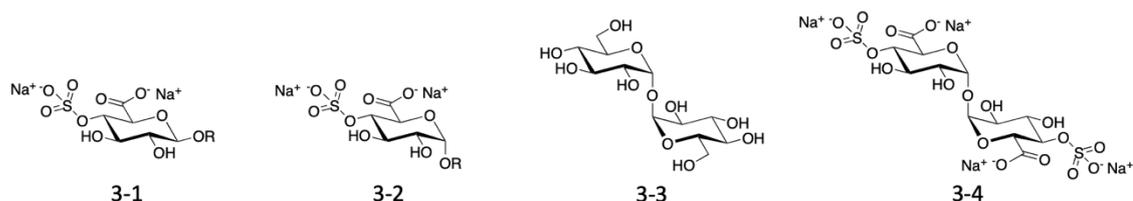
そこで、C-4, 5 位間に二重結合をもち、C-2 位にヒドロキシ基やアセトアミド基をもつウロン酸誘導体 **2-4** の合成法確立と、ライブラリーの作成を行った。このライブラリー構築のために様々な *p*-置換フェノキシ基やアジド基を C-1 位に導入し、さらにアジド基の場合 Cu(I) 触媒による様々な置換基を持ったアルキンとの反応により 1, 2, 3-トリアゾール誘導体 **2-7** に



変換した。このライブラリーの JEV に対する感染阻害効果を測定したところ、高活性な誘導体を見出すことができた。エビの頭より抽出された分子量 3 万のヘパラン硫酸は、JEV 感染阻害効果をもつことが報告されている。一方、そのヘパラン硫酸のヘパリナーゼ消化物は、C-4,5 位間に二重結合をもつグルクロン酸誘導体とグルコサミンの二糖となるが、これは全く阻害活性をもたないことが報告されている。我々のライブラリー構築は、適切なアグリコンの選択と、単糖部分の修飾により、低分子量の単糖誘導体でも強力な阻害活性をもたせることに成功し、非常に興味深い結果を得ることができた。

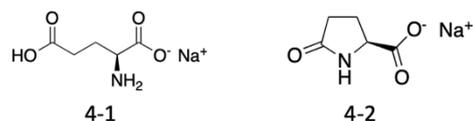
(3) 硫酸化グルクロン酸化合物誘導体の効率的な合成

コンドロイチン硫酸 E が、JEV 感染阻害活性を示すことから、グルクロン酸ユニットに注目し、グルクロン酸の 4 位が硫酸化した誘導体を設計した。また、これまで、*p*-メトキシフェニルグリコシドが日本脳炎ウイルスに対して高い感染阻害活性を持つことを報告しているため、それを踏襲した。最初に、グルクロン酸の 2, 3 位をアシル系の保護基、6 位をメチルエステルとした合成を進めたところ、硫酸化までは成功したが、最後のアシル系保護基の脱保護の段階で、ナトリウムメトキシドを用いたところ、グルクロン酸の 4, 5 位間に二重結合が導入されることが明らかになった。そこで、グルクロン酸の 2, 3 位をベンジル系の保護基、6 位をベンジルエステルとした合成を進めたところ、目的物 β -GalNAc4S **3-1** を得ることができた。この化合物の感染阻害実験をおこなったところ、十分な活性を持つことが明らかとなった。また、同様な経路で現在、 α -GlcA4S **3-2** の合成を行っており、合成の完了も近い。一方、トレハロース **3-3** は自然界に広く存在している二糖であり、現在では大量生産が可能になったことで安価に入手することができる。また、有用な食品添加物として利用されており、この汎用性を活かして化粧品や医薬品への応用も期待されており、大変良い出発物質ではないかと考えた。そこで、トレハロースを原料にベンジル保護した合成を進め、6 位の酸化、ベンジルエステル化に成功した。今後、硫酸化、脱保護を行い、硫酸化トレハロース誘導体 **3-4** の合成を完了する予定である。

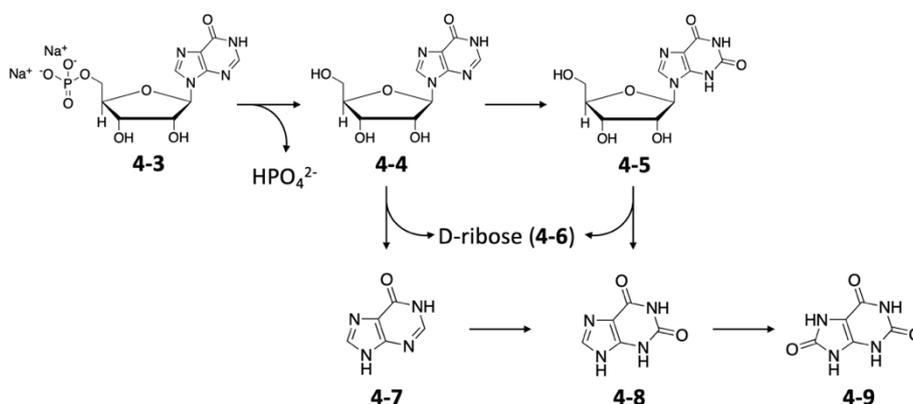


(4) グルタミン酸モノナトリウムの水中における密閉合成反応

グルタミン酸モノナトリウム (**4-1**) は、味の素の主成分となっている物質であり、安価に供給され、合成ビルディングブロックの原料として注目されている。**4-1** を水溶媒中で、高温で加熱することで自己環化反応が起きることが報告されている。我々は、グルタミン酸モノナトリウムとオリーブオイルとの反応による界面活性剤の合成を、密閉合成反応装置を用いて検討していたところ、反応混合物の NMR 測定により、5-オキソピリリジン-2-カルボン酸ナトリウム (**4-2**) が生成していることがわかった。そこで、**4-2** を実験室的かつ効率的に合成する条件や高濃度で反応を検討し、非常に効率的な条件を見出した。また、味の素を原料とした場合、色の変化に着目し、その原因を反応混合物の一次元、二次元 NMR 測定し、解析することで、イノシン酸ナトリウム (**4-3**) の密閉合成反応条件下での分解経路を明らかにした。



我々は、グルタミン酸モノナトリウムとオリーブオイルとの反応による界面活性剤の合成を、密閉合成反応装置を用いて検討していたところ、反応混合物の NMR 測定により、5-オキソピリリジン-2-カルボン酸ナトリウム (**4-2**) が生成していることがわかった。そこで、**4-2** を実験室的かつ効率的に合成する条件や高濃度で反応を検討し、非常に効率的な条件を見出した。また、味の素を原料とした場合、色の変化に着目し、その原因を反応混合物の一次元、二次元 NMR 測定し、解析することで、イノシン酸ナトリウム (**4-3**) の密閉合成反応条件下での分解経路を明らかにした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirofumi Nakano	4. 巻 71
2. 論文標題 Reaction of Monosodium Glutamate in Water using a Closed Vessel Reactor: Improvement of the Organic Chemistry Experiment in Cambodian High School by Using Cambodian Materials. Part 3.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of Aichi University of Education (Natural Science)	6. 最初と最後の頁 52-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 近藤嶺皇, 後藤優太, 清水風月, 左一八, 根元学, 山中隆史, 中野博文
2. 発表標題 日本脳炎ウイルス感染阻害活性の開発を目的とした不飽和ウロン酸誘導体の高効率合成
3. 学会等名 第50回 複素環化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤康太, 近藤嶺皇, 清水風月, 左一八, 根本学, 山中隆史, 中野博文
2. 発表標題 日本脳炎ウイルスに対する感染阻害活性をもつ不飽和あるいは硫酸化ウロン酸の合成
3. 学会等名 第17回 糖鎖科学中部拠点 若手のカフォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤康太, 近藤嶺皇, 清水風月, 左一八, 根本学, 山中隆史, 中野博文
2. 発表標題 日本脳炎ウイルスに対する感染阻害剤効果を持つ不飽和ウロン酸誘導体あるいは硫酸化グルクロン酸誘導体の合成
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 望, 中野 博文
2. 発表標題 グルタミン酸モノナトリウムの密閉合成反応
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤 優太, 近藤 嶺皇, 左 I. P. J. 一八, 根元 学, 山中 隆史, 中野 博文
2. 発表標題 日本脳炎ウイルス感染阻害効果のある不飽和ウロン酸誘導体の合成と活性
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 風月, 左 一八, 根本 学, 山中 隆史, 中野 博文
2. 発表標題 密閉容器型リアクターを用いた硫酸化 GaIn ₃ 誘導体の日本脳炎ウイルス感染阻害効果
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 優太, 近藤 嶺皇, 左 I. P. J. 一八, 根元 学, 山中 隆史, 中野 博文
2. 発表標題 不飽和結合を持つウロン酸誘導体の系統的合成と日本脳炎ウイルス感染阻害試験の結果
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 風月, 柳澤 圭哉, 高橋 沙耶, Hor Seanghai, 左 一八, 山中 隆史, 中野 博文
2. 発表標題 密閉容器型リアクターを用いたGaIN3誘導体の硫酸化条件検討
3. 学会等名 第 38 回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuzuki Shimizu, Keiya Yanagisawa, Saya Takahashi, Seanghai Hor, Kazuya I. P. J. Hidari, Takashi Yamanaka, and Hirofumi Nakano
2. 発表標題 Investigation of reaction conditions to synthesize sulfated GaIN3 derivatives with various phenyls having methoxy groups at 0-1 position using closed-vessel reactor
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reo Kondo, Kazuya I. P. J. Hidari, Manabu Nemoto, Takashi Yamanaka, and Hirofumi Nakano
2. 発表標題 Synthesis of Japanese encephalitis virus infection inhibitor with unsaturated bond introduced to glucuronic acid having hydroxy or acetamido group at C-2 position
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水風月, 柳澤圭哉, 高橋沙耶, Hor Seanghai, 左一八, 山中隆史, 中野博文
2. 発表標題 密閉容器型合成リアクターを用いた2 - アジドガラクトース誘導体の硫酸化条件検討
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤嶺皇, 左 I. P. J. 一八, 中野博文
2. 発表標題 不飽和結合を導入したウロン酸誘導体の合成と日本脳炎ウイルスに対する感染阻害効果
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北島 健、佐藤 ちひろ、門松 健治、加藤 晃一、中野 博文ほか29名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 306のうち2
3. 書名 「糖鎖生物学」の中の 「コラム2 糖鎖の有機合成」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>中野 博文 愛知教育大学研究者総覧 http://souran.aichi-edu.ac.jp/person/006f52e9102a8d3be2fe5614f42ba989ja.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	左 一八 (Hikari Kazuya) (20260226)	会津大学短期大学部・食物栄養学科・教授 (41601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------